

• 论 著 •

聚乙二醇干扰素 α -2b 对慢性乙型肝炎患者血清标志物 HBsAg、HBV-pgRNA、HBV-RNA 的影响^{*}

刘秋红,张丽叶[△],张 敏,林 洁,欧阳雁
安宁市第一人民医院感染性疾病科,云南安宁 650302

摘要:**目的** 观察聚乙二醇干扰素 α -2b(Peg-IFN α -2b)对慢性乙型肝炎(CHB)患者血清乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)表达水平的影响,并探究其与新型血清标志物乙型肝炎病毒前基因组(HBV-pgRNA)、HBV-RNA 的关系。**方法** 收集该院 2018 年 2 月至 2021 年 12 月初次确诊的 36 例接受 Peg-IFN α -2b 治疗 6 个月的 CHB 患者血清;使用化学发光法 HBsAg 测定试剂盒检测血清 HBsAg 水平;聚合酶链式反应(PCR)荧光探针法检测血清 HBV-DNA、HBV-pgRNA、HBV-RNA 水平;使用 Pearson 相关性分析 HBV-pgRNA、HBV-RNA 与 HBsAg 之间的相关性。**结果** 与治疗前相比,治疗后 CHB 患者血清 HBsAg、HBV-DNA 发生明显降低,HBV-pgRNA、HBV-RNA 也明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);治疗前血清 HBV-pgRNA、HBV-RNA 均与 HBsAg 呈显著的正相关($r=0.751,0.702$,均 $P<0.05$);治疗后血清 HBV-pgRNA、HBV-RNA 与 HBsAg 也呈正相关($r=0.420,0.625$,均 $P<0.05$)。与治疗前相比,治疗后 HBV-pgRNA、HBV-RNA 与 HBsAg 的相关系数均明显的降低。**结论** Peg-IFN α -2b 可抑制 CHB 患者血清 HBV-HBsAg,且 HBV-pgRNA、HBV-RNA 与 HBV-HBsAg 表达水平呈正相关。

关键词:聚乙二醇干扰素 α -2b; 慢性乙型肝炎; 血清标志物; 乙型肝炎病毒前基因组; HBV-RNA
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.02.012 **中图法分类号:**R512.62
文章编号:1673-4130(2023)02-0192-04 **文献标志码:**A

Effects of peginterferon α -2b on serum markers HBsAg,HBV-pgRNA and HBV-RNA in patients with chronic hepatitis B^{*}

LIU QiuHong,ZHANG Liye[△],ZHANG Min,LIN Jie,OUYANG Yan

Infectious Diseases Department,Anning First People's Hospital,Anning,Yunnan 650302,China

Abstract: Objective To observe the effect of pegylated interferon α -2b (Peg-IFN α -2b) on the expression of serum HBsAg in patients with chronic hepatitis B (CHB),and explore its relationship with new serum markers hepatitis B virus (HBV-pgRNA),HBV-RNA. **Methods** Thirty six patients initially diagnosed in Anning first people's hospital from February 2018 to December 2021 received Peg-IFN α -2b serum of CHB patients treated for 6 months. The content of serum HBsAg was detected by chemiluminescence hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) assay kit. The contents of HBV-DNA,HBV-pgRNA and HBV-RNA in serum were detected by PCR fluorescence probe. Pearson correlation was used to analyze the correlation between HBV-pgRNA,HBV-RNA and HBsAg. **Results** Compared with before treatment,the serum HBsAg,HBV-DNA,HBV-pgRNA,HBV-RNA were all significantly decreased in CHB patients after treatment,the difference was statistically significant ($P<0.05$). Before treatment,serum HBV-pgRNA,HBV-RNA were all significantly positively correlated with HBsAg ($r=0.751,0.702,P<0.05$). After treatment,serum HBV-pgRNA,HBV-RNA were also positively correlated with HBsAg ($r=0.420,0.625,P<0.05$). Compared with before treatment,the correlation coefficients of HBV-pgRNA,HBV-RNA and HBsAg significantly decreased after treatment. **Conclusion** Peg-IFN α -2b could inhibit serum HBV-HBsAg in patients with CHB,and the expression of HBV-pgRNA,HBV-RNA were positively correlated with HBV-HBsAg.

Key words:pegylated interferon α -2a; chronic hepatitis B; serum markers; HBV-pgRNA; HBV-RNA

^{*} 基金项目:云南省教育厅科学研究基金项目(2021J0357)。
作者简介:刘秋红,女,主任医师,主要从事病毒性肝炎(慢性乙型肝炎)、结核病等感染性疾病方面的研究。 [△] 通信作者,E-mail: 13114242267@163.com。

慢性乙型肝炎病毒 (HBV) 感染影响着人类的健康, 该病毒可导致肝硬化、肝衰竭和肝细胞癌的发生发展。全球约有 2.5 亿人患有 HBV 感染, 每年可造成近 100 万人死亡^[1]。在 HBV 自然感染过程中, 一些被感染者的特点是血清 HBV 表面抗原 (HBsAg) 表达水平持续较低, 该人群中的大多数成员是慢性乙型肝炎 (CHB) 患者。过去这部分患者不主张治疗, 但在随访中发现有 14%~24% 可能进展为 HBV e 抗原 (HBeAg) 阴性 CHB, 有 20% 可能进展为 HBeAg 阳性 CHB, 有高达 25% 的患者发生肝脏相关疾病死亡, 故在筛查中发现的这些慢性 HBV 携带者采取聚乙二醇干扰素治疗, 疗程采取个体化方案, 可以达到临床治愈 (HBsAg 阴性) 效果。

干扰素是一种增加免疫系统活性的重要细胞因子, 由活跃的 Th1 细胞和 NK 细胞分泌^[2]。干扰素通过增强免疫细胞功能和促进细胞因子的表达, 诱导干扰素刺激基因的产生并经干扰素信号通路编码多种抗病毒蛋白等环节作用于 HBV 复制、转录等重要生物学过程, 从而发挥免疫调节和抗病毒的双重作用。此外, 干扰素可通过增强 HBV 前基因组 RNA (pgRNA) 和核心颗粒的降解, 表观遗传修饰共价闭环状 DNA (cccDNA), 抑制 HBV 转录并减少 HBsAg 的表达水平^[3-5]。因干扰素半衰期短, 需每天使用, 加上聚乙二醇分子后, 可延长干扰素的半衰期, 血药浓度可维持 1 周^[6]。目前市面上普遍推荐使用聚乙二醇干扰素。

HBV-pgRNA、HBV-RNA 作为近段时间新发现的乙型肝炎患者血清标志物, 其与聚乙二醇干扰素之间的关系尚未完全清楚。本研究旨在探究聚乙二醇干扰素 α -2b (Peg-IFN α -2b) 对 CHB 患者血清标志物 pgRNA、HBV-RNA 之间的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择本院 2018 年 2 月至 2021 年 12 月初次确诊的 36 例 CHB 患者。其中男 21 例, 女 15 例, 平均年龄 (38.53 $\pm$ 13.21) 岁。研究者 HBV 检测均为 B 型, HBsAg 均为阳性, 总胆红素 (TBIL) (26.78 $\pm$ 3.42) μ mol/L、碱性磷酸酶 (ALP) (159.78 $\pm$ 20.14) IU/L、丙氨酸氨基转移酶 (ALT) (48.95 $\pm$ 6.02) U/L、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) (41.84 $\pm$ 4.89) U/L 均在正常范围。所有患者均接受 Peg-IFN α -2b 皮下注射 [(剂量 <50 kg (135 μ g), $\geq$ 50 kg (180 μ g))] 每周 1 次, 连续治疗 6 个月。治疗前后, 均进行空腹外周静脉采血 5 mL, 3 000 r/min 离心 5 min, 取血清, -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

纳入标准: (1) 符合《慢性乙型肝炎防治指南 (2010 年版)》^[7] 诊断标准; (2) 有完整的基线筛查, 包括血常规、尿常规、甲状腺功能等。排除标准: (1) 不

符合 Peg-IFN α -2b 治疗指征者; (2) 妊娠期或短期内有妊娠计划、精神病、未能控制的癫痫、严重抑郁症、自身免疫性疾病、严重感染、心力衰竭、慢性阻塞性肺疾病等; (3) 甲状腺疾病、既往有抑郁症、未控制的糖尿病、高血压、心脏病、人类免疫缺陷病毒感染或严重活动性疾病 (如心脏病、大脑、肾脏疾病) 者; (4) 肝脏占位、肝硬化、肝癌及其他合并肿瘤疾病者。

本研究均获得所有患者及其家属知情同意并签署知情同意书, 经本院伦理委员会研究通过。

1.2 仪器与试剂 Peg-IFN α -2b (国药准字: S20174006) 购自厦门特宝生物公司; HBV-DNA 购自西安天隆科技有限公司; HBV-DNA 核酸定量检测试剂盒购自罗氏诊断公司; 病毒 RNA 提取纯化试剂盒、反转录试剂盒购自上海碧云天公司; TRIzol 液购自美国 Invitrogen 公司; ABI 7300 型实时荧光定量 PCR 检测仪购自美国 Thermo Fisher 公司; 实验所有引物的合成均委托上海吉玛公司完成。

1.3 指标检测方法

1.3.1 HBsAg 检测 取出一 80 $^{\circ}$ C 冰箱保存的血清, 恢复至室温, 待用。按照 HBsAg 测定试剂盒说明书要求进行操作, 检测血清中 HBsAg 水平。检测范围: 0.05~250 IU/mL; 若超过检测上限, 使用 HBsAg 稀释液稀释 500 或 1 000 倍再进行检测。

1.3.2 HBV-DNA 检测 取出一 80 $^{\circ}$ C 冰箱保存的血清, 恢复至室温, 待用。使用 HBV-DNA 定量检测试剂盒检测 HBV-DNA 水平。

1.3.3 HBV-pgRNA 检测 取出一 80 $^{\circ}$ C 冰箱保存的血清, 恢复至室温, 待用。通过病毒 RNA 提取纯化试剂盒提取血清 RNA, 并用 DNase I 消化。使用特异性引物、Taqman 探针的 qPCR 实验检测 HBV-pgRNA 水平。HBV-pgRNA 上游引物, 5'-AYA GAC CAT CAA ATG CCC-3', 下游引物 5'-ATT CTC AGA CCG TAG CAC ACG ACA C-3'; 探针 5'-FAM-CTT ATC AAC ACT TCC GGA RAC TAC TGT TGT TAG AC-BHQ1-3'。使用 30 μ L 的 qPCR 反应体系, 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 下变性 5 min, 然后在 95 $^{\circ}$ C 持续 20 s, 60 $^{\circ}$ C 持续 40 s, 进行 40 个循环。所用试剂严格按照质量控制、防污染体系操作, 保障数据的准确性。

1.3.4 HBV-RNA 检测 取出一 80 $^{\circ}$ C 冰箱保存的血清, 恢复至室温, 待用。使用 HBV-RNA 定量检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) 检测血清中 HBV-RNA 水平。

1.4 统计学处理 本实验中的数据分析使用 SPSS21.0 统计学软件处理。正态分布的数据使用 $\bar{x} \pm s$ 表示。利用 lg10 对数统计法将数据取指数, 两组数据比较用 t 检验。使用 pearson 相关性检验分析血

清标志物 HBV-pgRNA、HBV-RNA 与 HBsAg 的相关系数 r , $|r| \geq 0.70$ 表示强相关, 关系非常紧密; $0.4 \sim <0.7$ 表示弱相关, 关系紧密; $0.2 \sim <0.4$ 表示无相关性, 关系一般。以 $P < 0.05$ 为差异有统计意义。

2 结 果

2.1 Peg-IFN α -2b 治疗前后患者 HBsAg、HBV-DNA 的表达水平 患者使用 Peg-IFN α -2b 治疗 6 个月后的血清 HBsAg、HBV-DNA 的表达水平与治疗前比较, 结果见表 1。与治疗前相比, 治疗后 HBsAg、HBV-DNA 的表达水平均降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 患者血清 HBsAg、HBV-DNA 的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)		
分组	HBsAg (Lg10 IU/mL)	HBV-DNA (Lg10 IU/mL)
治疗前	3.76 $\pm$ 0.44	6.78 $\pm$ 0.71
治疗后	1.44 $\pm$ 0.27	2.56 $\pm$ 0.37
t	13.482	15.813
P	<0.001	<0.001

注: 与治疗前比较, * $P < 0.05$ 。

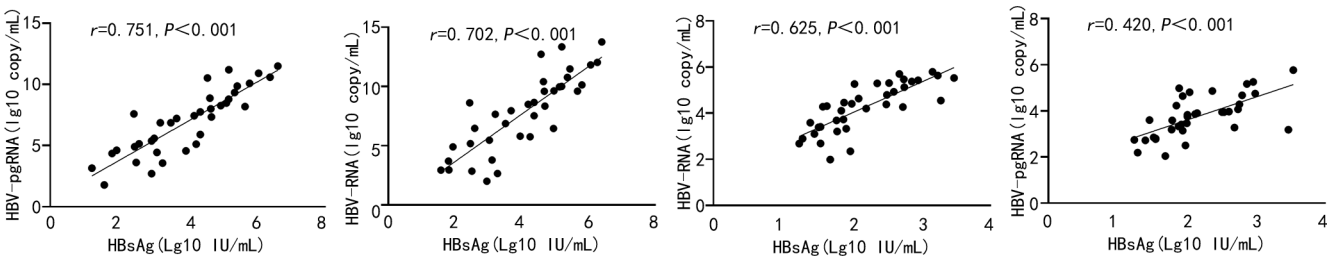
2.2 Peg-IFN α -2b 调控患者血清标志物 HBV-pgRNA、HBV-RNA 的表达水平 结果如表 2 所示, 与治疗前相比, 治疗后患者血清 HBV-pgRNA、HBV-

RNA 的表达水平均降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 2 患者血清 HBV-pgRNA、HBV-RNA、miR-548ah 的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)		
分组	HBV-pgRNA (Lg10 copy/mL)	HBV-RNA (Lg10 copy/mL)
治疗前	6.61 $\pm$ 0.71	7.75 $\pm$ 0.81
治疗后	3.74 $\pm$ 0.39	3.81 $\pm$ 0.43
t	10.629	12.889
P	<0.001	<0.001

注: 与治疗前比较, * $P < 0.05$ 。

2.3 患者血清 HBV-pgRNA、HBV-RNA 与 HBsAg 之间的关系 为了探究 HBV-pgRNA、HBV-RNA 与 HBsAg、Peg-IFN α -2b 之间的关系, 通过 pearson 相关性检验检测 Peg-IFN α -2b 治疗前后各个血清标志物之间的相关系数。结果如图 1 所示, 治疗前患者血清 HBV-pgRNA、HBV-RNA 水平与 HBsAg 水平均呈正相关 ($r = 0.751, 0.702, P$ 均 < 0.05), 见图 1A、B; 治疗后患者血清 HBV-pgRNA、HBV-RNA 水平与 HBsAg 水平也呈正相关 ($r = 0.420, 0.625, P$ 均 < 0.05)。Peg-IFN α -2b 治疗后, HBV-pgRNA、HBV-RNA 与 HBsAg 的相关系数均明显的降低。



注: A 为 Peg-IFN α -2b 治疗前 HBV-pgRNA 与 HBsAg 的相关性; B 为 Peg-IFN α -2b 治疗前 HBV-RNA 与 HBsAg 的相关性; C 为 Peg-IFN α -2b 治疗后 HBV-pgRNA 与 HBsAg 的相关性; D 为 Peg-IFN α -2b 治疗后 HBV-RNA 与 HBsAg 的相关性。

图 1 Peg-IFN α -2b 治疗前后 HBV-pgRNA、HBV-RNA 与 HBsAg 的相关性分析

3 讨 论

HBV 病毒复制周期复杂, 其在人类肝细胞中维持病毒的持久感染。目前, 已经找到了大量可靠的监测患者 HBV 感染的标志物, 包括血清的 pgRNA、HBV-RNA。HBV 感染期间, 病毒颗粒通过牛磺胆酸钠共转运多肽 (NTCP) 或硫酸乙酰肝素蛋白多糖 (HSPG) 受体侵入细胞; 然后, 脱去表面抗原后, HBV 基因组进入细胞核, 形成 cccDNA, 作为模板指导病毒 RNA 转录^[8-9]。在 RNA 转录物中, pgRNA 通过聚合酶的逆转录酶活性进一步反转录到新的松弛环状 DNA (rcDNA) 基因组, 然后核心颗粒与细胞膜中的 HBsAg 相互作用, 至此病毒颗粒成熟, 从肝细胞中释放^[10-11]。pgRNA 是一种新出现的 HBV 感染的血清学标志物, 其作为病毒蛋白质和病毒 DNA 合成的模

板, 参与病毒生命周期的调节功能, 并可能在 CHB 的发病机制中发挥作用^[12]。据报道, pgRNA 是一种新出现的 HBV 感染的血清学标志物, 可作为 CHB 患者不同感染时期的诊断、预后标志物^[13-15]。WANG 等^[16]报道, 血清 HBV-RNA 水平与肝脏的坏死性炎症和纤维化的组织病理学评分相关。由于血清 HBV-RNA 水平反映了肝内 HBV-RNA 的数量, 它们有可能被用作病毒入侵的诊断标志物, 血清 HBV-RNA 水平可用于准确的区分轻度和重度肝组织病理学损伤。LIU 等^[17]报道, 在慢性 HBV 感染的自然过程中, 血清 HBV-RNA 水平会发生变化, 血清 HBV-RNA 可作为预测慢性乙型肝炎患者疾病进程的生物标志物。pgRNA、HBV-RNA 还可能存在于肝癌细胞中, 引起肿瘤组织中的病毒复制^[18]。本研究发现, pgRNA、

HBV-RNA 在 Peg-IFN α -2b 治疗后的 CHB 患者血清中水平平均降低,说明 Peg-IFN α -2b 可抑制 CHB 血清 pgRNA、HBV-RNA 表达。

HBV 病毒的基因型与疾病进展和 IFN α 治疗应答有关。HBeAg 阳性患者对 IFN α 治疗的应答率,B 基因型高于 C 基因型,A 基因型高于 D 基因型。干扰素通过增强免疫细胞功能和促进细胞因子的表达、诱导干扰素刺激基因(ISGs)的产生并经干扰素信号通路编码多种抗病毒蛋白等环节作用于 HBV 复制、转录等重要生物学过程,从而发挥免疫调节和抗病毒的双重作用。此外,干扰素可通过增强 HBV-pgRNA 和核心颗粒的降解,或通过 cccDNA 的表观遗传修饰来抑制 HBV 转录并减少病毒蛋白如 HBsAg 的表达^[19-20]。干扰素疗程有限,血清学应答较高且应答更持久。核苷治疗后,HBsAg 较低或是下降快速者,加用干扰素治疗,HBsAg 下降将更快;而对于高病毒载量 CHB 患者单用干扰素治疗,如果 HBsAg 下降缓慢者,可同时联用恩替卡韦或替诺福韦酯,强强联合、优势互补,抗病毒与免疫调控双管齐下,治疗效果更佳。目前 70% 以上适合干扰素治疗者并未开始治疗,可能与还未真正了解到干扰素治疗的获益有关。现实中干扰素治疗者不到 20%,有大量的临床治愈优势患者未曾抓住临床治愈的时机。

综上所述,Peg-IFN α -2b 具有清除 CHB 患者血清 HBsAg 的巨大潜力,这与其抑制 HBV-pgRNA、HBV-RNA 的表达水平紧密相关,为 Peg-IFN α -2b 用于 CHB 的治疗提供理论支持。

参考文献

- [1] NGUYEN M H, WONG G, GANE E, et al. Hepatitis B virus: advances in prevention, diagnosis, and therapy[J]. Clin Microbiol Rev, 2020, 33(2): 46-119.
- [2] JORGOVANOVIC D, SONG M, WANG L, et al. Roles of IFN-gamma in tumor progression and regression: a review[J]. Biomark Res, 2020, 8(9): 49.
- [3] XU B, TANG B, WEI J. Role of STAT1 in the resistance of HBV-to IFN-alpha[J]. Exp Ther Med, 2021, 21(6): 550.
- [4] ZHAO X, SUN L, MU T, et al. An HBV-encoded miRNA activates innate immunity to restrict HBV-replication[J]. J Mol Cell Biol, 2020, 12(4): 263-276.
- [5] WANG H, LUO H, WAN X, et al. TNF-alpha/IFN-gamma profile of HBV-specific CD4 T cells is associated with liver damage and viral clearance in chronic HBV-infection[J]. J Hepatol, 2020, 72(1): 45-56.
- [6] DOGAN U B, GOLGE N, AKIN M S. The comparison of the efficacy of pegylated interferon alpha-2a and alpha-2b in chronic hepatitis B patients[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2013, 25(11): 1312-1326.
- [7] 华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J]. 实用肝脏病杂志, 2011, 14(2): 81-89.
- [8] GU Y R, CHEN L B, LIAN Y F, et al. Serum HBV-pre-genomic RNA is correlated with Th1/Th2 immunity in treatment-naïve chronic hepatitis B patients[J]. J Med Virol, 2020, 92(3): 317-328.
- [9] LI F, WANG Z, HU F Y, et al. Cell culture models and animal models for HBV-study[J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1179(11): 109-135.
- [10] MEGAHED F, ZHOU X, SUN P. The interactions between HBV-and the innate immunity of hepatocytes[J]. Viruses, 2020, 12(3): 285.
- [11] ZHOU L, HE R, FANG P, et al. Hepatitis B virus rigs the cellular metabolome to avoid innate immune recognition[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 98.
- [12] SHEN S, XIE Z, CAI D, et al. Biogenesis and molecular characteristics of serum hepatitis B virus RNA[J]. PLoS Pathog, 2020, 16(10): e1008945.
- [13] WU Y B, WEN J, XIAO W W, et al. Pregenomic RNA: How to assist the management of chronic hepatitis B[J]. Rev Med Virol, 2019, 29(4): e2051.
- [14] CAREY I, GERSCH J, WANG B, et al. Pregenomic HBV-RNA and hepatitis B core-related antigen predict outcomes in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B patients suppressed on nucleos(t)ide analogue therapy[J]. Hepatology, 2020, 72(1): 42-57.
- [15] 李解军, 冯煦, 常瑞霞. HBsAg、cccDNA 和 pgRNA 水平检测在慢性乙型肝炎诊治中的价值[J]. 保健医学研究与实践, 2021, 18(4): 95-98.
- [16] WANG J, YU Y, LI G, et al. Relationship between serum HBV-RNA levels and intrahepatic viral as well as histologic activity markers in entecavir-treated patients[J]. J Hepatol, 2017, 68(1): 16-24.
- [17] LIU Y, JIANG M, XUE J, et al. Serum HBV-RNA quantification; useful for monitoring natural history of chronic hepatitis B infection[J]. BMC Gastroenterol, 2019, 19(1): 53.
- [18] MAK L Y, HUANG Q, WONG D K, et al. Residual HBV-DNA and pgRNA viraemia is associated with hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B patients on antiviral therapy[J]. J Gastroenterol, 2021, 56(5): 479-488.
- [19] YE J, CHEN J. Interferon and hepatitis B: current and future perspectives[J]. Front Immunol, 2021, 12(9): 733364.
- [20] WU W, WU D, YAN W, et al. Interferon-induced macrophage-derived exosomes mediate antiviral activity against hepatitis B virus through miR-574-5p[J]. J Infect Dis, 2021, 223(4): 686-698.