

## · 论著 ·

无锡地区 HBsAg-/HBV DNA+ 献血人群  
HBcrAg 检出特点分析王嫣 金建怀 许友山 郝庆钦 夏卫  
(无锡市中心血站, 江苏 无锡 214000)

**摘要:**目的 分析新型血清标志物乙型肝炎核心相关抗原(HBcrAg)在无锡地区 HBsAg-/HBV DNA+ 献血人群中的检出特点。方法 通过电话追踪随访了 37 名既往 HBsAg-/HBV DNA+ 献血者并获得其血清, 采用电化学发光法和实时荧光定量 PCR 核酸筛检出 22 例 HBsAg-/HBV DNA+ 献血者血清作为 OBI 组进行 HBcrAg 酶联免疫吸附法检测。挑选出 20 名经 2 遍酶免和 1 遍核酸筛检的健康献血者的血清作为健康对照组, 20 例经无锡第五人民医院临床诊断为慢性乙型肝炎患者血清作为实验的 CHB 组, 分别进行 HBcrAg 酶联免疫吸附法检测; 并对 OBI 组进行 HBcrAg 与 HBeAb、HBcAb、ALT、HBV DNA 的相关性分析。结果 37 份献血者标本经化学发光法检测 HBsAg 和核酸筛查, 检出 22 份 HBsAg-/HBV DNA+ 标本即 OBI 组, 检出率 59.46%。OBI 组与健康对照组、CHB 组血清的 HBcrAg 表达含量分别是  $(0.92 \pm 0.13)$  ng/mL、 $(0.47 \pm 0.09)$  ng/mL、 $(1.14 \pm 0.23)$  ng/mL ( $P < 0.05$ ), OBI 组与 CHB 组的 HBcrAg 表达均高于健康对照组 ( $P < 0.05$ )。OBI 组的 HBcrAg 与 HBeAb、HBcAb、ALT、HBV DNA 指标均无相关性 ( $P > 0.05$ )。结论 OBI 组与 CHB 组的 HBcrAg 表达均高于健康对照组, 其血清 HBcrAg 在一定程度上与 HBeAb、HBcAb、ALT、HBV DNA 无相关性, HBcrAg 在筛查 HBsAg-/HBV DNA+ 献血者中具有较好的应用前景。

**关键词:**乙型肝炎核心相关抗原; HBsAg-/HBV DNA+; 献血者; 共价闭合环状 DNA

中国分类号: R457.1 R446 R373.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-549X(2024)1-0032-05

DOI: 10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2024.01.006

**Characteristics of HBcrAg in HBsAg-/HBV DNA+ blood donors in Wuxi area**

WANG Yan, JIN Jianhuai, XU Youshan, HAO Qingqin, XIA Wei. Wuxi Central Blood Station, Wuxi 214000, China.

Corresponding author: XIA Wei, Email: 2928867762@qq.com

**Abstract: Objective** To analyze the detection characteristics of a novel serum marker, hepatitis B core-associated antigen (HBcrAg), in the HBsAg-/HBV DNA+ blood donors in Wuxi. **Methods** A total of 37 previous HBsAg-/HBV DNA+ blood donors were followed up by telephone and their serum was obtained, and the serum of 22 HBsAg-/HBV DNA+ blood donors was detected by electrochemiluminescence and real-time PCR nucleic acid screening as the OBI group for HBcrAg enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The serum of 20 healthy blood donors who underwent dual ELISA and one nucleic acid testing (NAT) was selected as the healthy control group, and the serum of 20 patients with chronic hepatitis B who were clinically diagnosed by Wuxi Fifth People's Hospital was selected as the experimental CHB group, and HBcrAg ELISA was detected respectively. The correlation analysis between HBcrAg and HBeAb, HBcAb, ALT and HBV DNA in the OBI group was performed. **Results** Thirty-seven blood samples were detected by chemiluminescence for HBsAg and NAT, and 22 HBsAg-/HBV DNA+ samples were detected in the OBI group, with a detection rate of 59.46%. The serum HBcrAg expression content (ng/mL) between the OBI group, the healthy control group and the CHB group were  $(0.92 \pm 0.13)$ ,  $(0.47 \pm 0.09)$  and  $(1.14 \pm 0.23)$ , respectively, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ), the expression of HBcrAg in the OBI group and CHB group was higher than that in the healthy control group ( $P < 0.05$ ). There was no correlation between HBcrAg and HBeAb, HBcAb, ALT and HBV DNA indexes in the OBI group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The expression of HBcrAg in the OBI group and CHB group was higher than that in the healthy control group, and the serum HBcrAg was not correlated with HBeAb, HBcAb, ALT and HBV DNA to a certain extent. HBcrAg has a good application prospect in screening HBsAg-/HBV DNA+ blood donors.

**Key words:** hepatitis B core-related antigen (HBcrAg); HBsAg-/HBV DNA+; blood donors; covalently closed circular DNA (cccDNA)

基金项目: 江苏省无锡市卫生健康委科研青年项目 (Q201928)

第一作者简介: 王嫣 (1985-), 女, 主管技师, Email: 18068280810@163.com; 通信作者: 夏卫, Email: 2928867762@qq.com

新型血清标志物乙型肝炎核心相关抗原(hepatitis B core-related antigen, HBcrAg)由前 C 基因和 C 基因编码的 HBsAg、HBeAg、p22cr 3 种蛋白组成,它们共同拥有 1 段 149 个氨基酸的序列,可被同 1 抗体检测。松弛环状 DNA(rcDNA)感染肝细胞后,首先要被修复成共价闭合环状 DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA)<sup>[1]</sup>。HBV cccDNA 是复制的原始模板,它的形成和持续存在是引起 HBV 慢性感染和导致慢乙肝患者难以治愈及肝癌发生的关键因素,也是激活隐匿性 HBV 感染(occult HBV infection, OBI)的主要原因<sup>[2]</sup>。临床上肝活组织检查可以准确反映肝组织内 HBV cccDNA 的水平,但肝活检是 1 种有创检查,且需要进行多次有创检查,多数患者很难接受,故通过肝活组织检查来监测患者 HBV cccDNA 水平还存在着较大的困难,目前迫切需要寻找 1 种操作方便且能反映肝组织内 cccDNA 水平的血清学替代指标。

HBcrAg 能够反映肝组织 cccDNA 的含量和转录活性,是近年来的研究热点<sup>[3]</sup>。研究表明,在未治疗及经 NAs 治疗后的慢乙肝患者中,无论 HBeAg 阳性或阴性患者,HBcrAg 与 cccDNA 具有显著相关性<sup>[4]</sup>。我国是乙型病毒性肝炎感染大国,慢性感染人数至少 2.57 亿人<sup>[5]</sup>,献血者中潜在的 HBsAg-/HBV DNA+感染者排除窗口期感染即为 OBI。OBI 作为 HBV 持续性感染的特殊形式,成为威胁血液制品安全和受血者健康的隐患,随着核酸技术与酶联免疫吸附技术在血液筛查中互补开展应用逐渐被最大限度检出。目前有关新型血清标志物 HBcrAg 的研究多为慢性乙肝感染、肝硬化、肝癌患者等。本研究从血液安全角度出发,旨在分析血清中 HBcrAg 在献血人群筛检 HBsAg-/HBV DNA+感染者的表达情况,为探讨其在 OBI 感染发病机制中的作用提供新的思路,从而改进血液 HBV 筛查方法,降低漏检率,提高临床输血安全。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

对无锡市中心血站 2019—2020 年 104 917 名无偿献血者进行 2 遍酶联免疫吸附法及 1 遍实时荧光定量 PCR 核酸初筛,选取了 47 名 HBsAg-/HBV DNA+献血者进行电话追踪,成功追踪到 37 名至本站采集血液标本。37 份 HBsAg-/HBV DNA+献血者血液标本进行 1 遍电化学发光法和 PCR 核酸检

测筛查出 22 名 HBsAg-/HBV DNA+献血者标本作为 OBI 组。选取 20 名经过 2 遍酶联免疫吸附法及 1 遍 PCR 核酸检测都合格的献血者作为健康对照组,选取 20 名经无锡市第五人民医院临床诊断为慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者作为 CHB 组,其中男 15 名,女 5 名;年龄 25~51 岁,所有病例 6 个月内未使用抗病毒制剂;诊断标准参照《乙型病毒性肝炎诊断标准》(WS299-2008)以及《慢性乙型肝炎防治指南》(2015 更新版)<sup>[6]</sup>。

### 1.2 试剂与仪器

HBsAg ELISA 检测试剂(英科新创公司,批号:B20201139;上海科华公司,批号:202009231), Cobas TaqScreen MPX test HBV 核酸检测试剂(罗氏诊断公司,批号:G11355)。乙肝两对半:乙型肝炎病毒抗原抗体检测系统(HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、抗-HBc)检测试剂盒(化学发光法)(上海博阳生物科技有限公司,批号:A2001);HBcrAg 检测试剂(厦门仑昌硕公司,批号:202102210033)。LI-CA500 自动化学发光检测仪(上海博阳公司), Hamilton STAR 全自动加样仪、Microlab FAME 全自动酶联免疫分析系统(Hamilton 公司), Cobas S201 全自动核酸检测系统(罗氏诊断公司), RT-6100 酶标分析仪(Rayto 公司); AU480 全自动生化分析仪(贝克曼公司)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 标本采集

无菌操作采集 37 份既往 HBsAg-/HBV DNA+献血者的新鲜血清,分成酶免(分离胶)检测和核酸(带分离胶, EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝)检测各 1 管(5 mL/管)。采血后 4 h 内 1 800×g, 离心 20 min, 2~8℃ 保存,并在 48 h 内完成检测。剩余血清-80℃ 保存。

#### 1.3.2 血清学检测

对 37 份既往 HBsAg-/HBV DNA+献血者血清用化学发光法检测 HBsAg, 若为阴性, 则进行下一步核酸检测。

#### 1.3.3 核酸检测

采用 Cobas Taqsceen MPX 试剂进行单标本检测, 单标本检测有反应性判定为 NAT 阳性, 即为 HBsAg-/HBV DNA+ OBI 组; 单标本检测无反应性判定为 NAT 阴性, 不纳入本研究范围。

#### 1.3.4 乙肝两对半检测

对纳入研究的 OBI 组标本进行化学发光法检测乙肝抗原抗体系统。

#### 1.3.5 丙氨酸氨基转移酶(ALT)检测

对 OBI 组标本进行 ALT 检测,检测范围是 5~50 U/L。

1.3.6 HBcrAg 含量的检测

对本研究的 3 组标本都采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验(ELISA)检测,实验严格按照试剂盒说明书进行。实验重复 3 次。检测范围是(0.25~8)ng/mL。

1.3.7 HBV DNA 定量

采用实验室内部自建系统定量(标准曲线法)<sup>[7]</sup>。

1.4 统计学分析

数据采用 SPSS20.0 软件进行统计分析。正态分布的计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较用单因素方差分析。HBcrAg 与乙肝血清学相关指标采用 Pearson 相关性分析,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象一般资料

CHB 组、OBI 组与健康对照组在年龄、性别构成比、ALT 方面均无差异( $P>0.05$ ),各组间具有可比性,见表 1。

表 1 3 组研究对象基本信息

Table 1 Basic information of 3 groups of research subjects

|       | 男性     | 女性    | 年龄         | ALT          |
|-------|--------|-------|------------|--------------|
|       | n(%)   |       | (岁,95% CI) | (U/L,95% CI) |
| 健康对照组 | 13(65) | 7(35) | 32(23~41)  | 23(6~40)     |
| OBI 组 | 17(77) | 5(23) | 35(21~49)  | 26(9~43)     |
| HBV 组 | 15(75) | 5(25) | 38(25~51)  | 25(12~39)    |

2.2 OBI 组乙肝两对半的检出特征

37 份献血者标本经化学发光法检测 HBsAg 和核酸筛查,检出 22 份 HBsAg-/HBV DNA+标本,检出率 59.46%(22/37),对这 22 例 OBI 进行乙肝两对半的检测,HBsAg 检测都为阴性,HBcAb 检出率 86.36%(19/22),HBeAb 检出率 22.73%(5/22)。

2.3 CHB 组、OBI 组与健康对照组的血清中 HBcrAg 表达水平比较

HBcrAg 表达水平在 3 组间两两比较(单因素方差分析),均有差异( $P<0.05$ ),见表 2。

2.4 OBI 组 HBcrAg 与 HBeAb、HBcAb、ALT、HBV DNA 的相关性

HBcrAg 与 HBeAb、HBcAb、ALT、HBV DNA 无相关性( $P>0.05$ ),见表 3。

表 2 3 组研究对象 HBcrAg 表达比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 Comparison of the expression of HBcrAg among three groups( $\bar{x}\pm s$ )

|               | 健康对照组     | OBI 组     | CHB 组     |
|---------------|-----------|-----------|-----------|
| HBcrAg(ng/mL) | 0.47±0.09 | 0.92±0.13 | 1.14±0.23 |

注: $F=49.87, P<0.05$

表 3 OBI 组 HBcrAg 与 HBeAb、HBcAb、ALT、HBV DNA 的相关性

Table 3 Correlation between HBcrAg and HBeAb, HBcAb, ALT, and HBV DNA in the OBI group

|                | <i>n</i> | 平均值    | 标准差    | <i>r</i> | <i>P</i> |
|----------------|----------|--------|--------|----------|----------|
| HBeAb(S/CO)    | 22       | 1.467  | 1.283  | 0.159    | 0.481    |
| HBcAb(S/CO)    | 22       | 0.922  | 0.127  | 0.226    | 0.311    |
| ALT(U/L)       | 22       | 25.820 | 9.043  | 0.227    | 0.309    |
| HBV DNA(IU/mL) | 22       | 8.103  | 10.717 | 0.182    | 0.418    |
| HBcrAg(ng/mL)  | 22       | 0.922  | 0.127  | 1        |          |

3 讨论

血清 HBV DNA 水平易受抗病毒药物,特别是核苷(酸)类似物抗 HBV 药物的影响,不能很好地反映肝内 HBV 的复制情况<sup>[8]</sup>,新型血清标志物 HBcrAg 不但可避免反复肝脏穿刺取材检测 cccDNA 的风险与繁琐及被检者的痛苦,而且能反映整合 HBV DNA 的转录活性,是反映肝内 HBV cccDNA 水平的较好替代指标,其准确性优于血清 HBV DNA 和 HBsAg 水平<sup>[9]</sup>。唐红等<sup>[10]</sup>曾对 139 例接受肝活组织检查的慢乙肝患者血清中 HBcrAg、HBsAg、HBV DNA 和肝内 cccDNA 的水平进行检测,发现血清 HBcrAg 水平与肝内 HBV cccDNA 水平呈显著相关( $r=0.929, P<0.05$ ),且这一相关性明显优于 HBsAg( $r=0.742, P<0.05$ )和 HBV DNA( $r=0.854, P<0.05$ )。由于 cccDNA 主要存在于肝细胞核中,当肝细胞受到严重损害时,才释放到血液中,血清中微乎其微,几乎检测不到,因此临床上采取检测肝活组织的 cccDNA 的含量才能准确评估患者 HBV 的复制程度和制定相应的诊疗方案。本研究中的 22 例 OBI 虽然检测 HBV DNA 有反应性,但病毒载量不高,不足以严重损害肝细胞,其释放于血清的 cccDNA 极低,目前检测技术尚未能检测到其含量,故未做血清 HBcrAg 与肝活组织 HBV cccDNA 之间的相关性研究。

本研究中的 3 组研究对象 HBcrAg 水平依次为:CHB 组>OBI 组>健康对照组。推测其原因,是由于 HBV cccDNA 即使量很少,在慢性乙型肝炎中通常只占肝内 HBV DNA 总量的 1%以下<sup>[11]</sup>,却可以

十分稳定地存在,目前临床广泛使用的核苷(酸)类似物抗 HBV 药物对其没有直接抑制作用。采供血机构筛查出的 HBsAg-/HBV DNA+感染者都是未使用过核苷(酸)类似物的自然人,其潜在的 cccDNA 完整的保留在肝细胞中,但并不是所有的受血者都会发生 HBV 感染,宿主的免疫功能、输血量和患者的病毒载量会影响其发生率<sup>[12]</sup>。临床上 78% 的接受抗病毒治疗的患者经常无法检测到血清 HBV DNA,却可检测到血清 HBcrAg<sup>[13]</sup>,其原因是 cccDNA 的稳定存在,也是导致隐匿性肝炎再激活的主要原因之一。

西方等发达国家 HBV 的流行率低,大多采用联合 HBsAg 与抗-HBc 或 HBV 核酸检测的方法来筛查献血者,输血后肝炎发生率非常低<sup>[14]</sup>。本研究中 OBI 组 HBcAb 检出率为 86.36%,提示我们可以将 HBcAb 和 HBsAg 同时做为筛查献血者的血清指标。另外,HBcAb 是感染者血液中 HBV 复制受到抑制而表现出乙肝病毒减少,可以出现在慢性乙肝患者和无症状 HBsAg 携带者。我们对 22 名 HBsAg-/HBV DNA+感染者的 HBcrAg 与其 HBcAb、HBsAg、ALT、HBV DNA 等血清学检测指标进行相关性分析的结果表明 HBcrAg 与上述指标之间无相关性。其原因是本研究仅为本中心小样本的追踪性实验,追踪的数量和时间有限,需要在今后研究中扩大样本量并且联合多中心进行针对不同年龄、不同病程的 OBI 感染者对其拉长持续追踪的时间和增加次数,动态了解 HBsAg-/HBV DNA+人群的 HBcrAg 表达水平,才能更充分体现出血清 HBcrAg 水平在筛查 HBsAg-/HBV DNA+人群的优越性,最大限度降低输血 HBV 残余风险。

虽然试验用的是传统的酶联免疫吸附法检测血清 HBcrAg 水平,但这与目前我国血站检测 HBsAg 的方法一致,且目前很少有文献报道此方法检测血清 HBcrAg 水平与 HBsAg-/HBV DNA+献血者的相关性,这是本研究的创新点之一。综上所述,新型血清标志物血清 HBcrAg 在本研究中对筛查出 HBsAg-/HBV DNA+感染者有一定的影响和应用前景,在一定程度上可反映肝细胞中的 cccDNA 的存在水平。

#### 利益冲突说明/Conflict of Interests

所有作者均声明不存在利益冲突。

#### 伦理批准及知情同意/Ethics Approval and Donor Consent

本研究已获无锡市中心血站伦理委员会审批通过,伦理号:

Q201928;本研究纳入的所有献血者和患者,其本人或家属均已签署知情同意书。

#### 作者贡献/Authors' Contribution

夏卫:文章整体设计与指导;王嫣:进行实验,数据统计、分析与文章撰写;金建怀:从研究出发对实际工作进行考察与调查;郝庆钦:收集资料和数据;许友山:文献查找等。

#### [参考文献]

- [1] HONG X P, HU J M. Serum HBV RNA composition dynamics as a marker for intrahepatic HBV cccDNA turnover[J]. Med Virol, 2020, 92(8): 935-937.
- [2] YANG H C, KAO J H. Quantification of HBV core antibodies may help revisit infectious occult hepatitis B virus[J]. Gut, 2018, 29(11): 317-385.
- [3] WONG D K, SETO W K, CHEUNG K S, et al. Hepatitis B virus core-related antigen as a surrogate marker for covalently closed circular DNA[J]. Liver Int, 2017, 37(7): 995-1001.
- [4] TESTONI B, LEBOSSE F, SCHOLTES C, et al. Serum hepatitis B core-related antigen (HBcrAg) correlates with covalently closed circular DNA transcriptional activity in chronic hepatitis B patients[J]. Hepatol, 2019, 70(4): 615-625.
- [5] MAK L Y, SETO W K, FUNG J, et al. New biomarkers of chronic hepatitis B[J]. Gut Liver, 2019, 13(6): 589-599.
- [6] 王贵强, 王福生, 成军, 等. 慢性乙型肝炎防治指南(2015 更新版)[J]. 中华肝脏病杂志, 2015, 23(12): 888-905.  
WANG G Q, WANG F S, CHENG J, et al. The guideline of prevention and treatment for chronic hepatitis B: a2015 update[J]. Chin J Hepatol, 2015, 23(12): 888-905.
- [7] 陈彦猛. 调控 APOBEC3B 抑制 HBV 复制的宿主因子鉴定及相关机制研究[J]. 重庆医科大学学报, 2020, 36(6): 513-537.  
CHEN Y M. Identification of host factors that regulate APOBEC3B inhibit HBV replication and related mechanisms[J]. Journal of Chongqing Medical University, 2020, 36(6): 513-537.
- [8] CHEN E Q, WANG M L, TAO Y C, et al. Serum HBcrAg is better than HBV RNA and HBsAg in reflecting intrahepatic covalently closed circular DNA[J]. Viral Hepatol, 2019, 26(5): 586-595.
- [9] 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]. Gastroenterol, 2021, 56(5): 479-488.

- [10] 陈恩强,唐红. 一种有前途的新型 HBV 血清标志物——HBcrAg[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(10): 2159-2162.  
CHEN E Q, TANG H. Hepatitis B virus core - related antigen: A promising new serum marker for hepatitis B virus[J]. J Clin Hepatol, 2019, 35(10): 2159-2162.
- [11] INOUE T, TANAKA Y. Novel biomarkers for the management of chronic hepatitis B[J]. Clin Mol Hepatol, 2020, 26(3): 261-279.
- [12] 鲁凤民,王杰,陈香梅,等. 新型血清指标在乙型肝炎创新药物研发中的应用[J]. 中华肝脏病杂志, 2020, 28(8): 649-653.  
LU F, WANG J, CHEN X, et al. Application of the new serum markers in the research and development of innovative hepatitis B drugs[J]. Chin J Hepatol, 2020, 28(8): 649-653.
- [13] 李乐,廖昊,刘妍,等. 新型血清学标志物在不同类型乙型肝炎病毒感染中的检出特征分析[J]. 解放军医学杂志, 2022, 16(3): 260-269.  
LI L, LIAO H, LIU Y, et al. Detection characteristics of novel serum biomarkers in HBV-infected patients with different category of clinical illness[J]. PLA Medical Journal, 2022, 16(3): 260-269.
- [14] 王林,刘学恩,庄辉. 乙型肝炎病毒核心相关抗原定量检测的临床意义[J]. 中国病毒病杂志, 2019, 9(1): 24-32.  
WANG L, LIU X E, ZHUANG H. Clinical Significance of quantification of serum hepatitis B core-related antigen [J]. Chin J Viral Dis, 2019, 9(1): 24-32.  
(2023-07-05 收稿, 12-31 修回)  
本文编辑: 闻欣