临床研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003582

慢性乙型肝炎环状RNA表达谱的鉴定与分析

周明纱[1]，范　捷[1]，刘　兴[2]，谌丽娟[1]，罗　佳[1]，李　山[1]，周　莉[1]
（1.重庆医科大学公共卫生学院流行病学教研室，重庆　400016；
2.重庆市九龙坡区疾病预防控制中心免疫规划管理科，重庆　400039）

【摘　要】目的：分析慢性乙型肝炎（chronic hepatitis B，CHB）患者与健康对照人群的外周血单核细胞（peripheral blood mononuclear cells，PBMCs）中环状RNA（circular RNA，circRNA）表达谱，筛选验证差异表达的circRNA，并研究差异表达circRNA的特征、通路及下游基因。**方法：**利用高通量芯片技术鉴定CHB患者和健康对照组中异常表达circRNA。随后对差异circRNA来源基因进行基因本体论和京都基因百科全书富集分析。基于竞争性内源RNA理论，利用多个数据库预测差异circRNA结合的微小RNA（microRNA，miRNA）和miRNA靶mRNA，并构建circRNA-miRNA-mRNA调控网络。最后利用实时荧光定量PCR（quantitative real-time PCR，qRT-PCR）对芯片结果进行验证。**结果：**与健康对照组相比，CHB患者PBMCs中存在321个表达上调和549个表达下调的circRNAs。大多数差异表达circRNAs来源于外显子剪切，主要分布于1号和2号染色体。生物信息学分析表明差异circRNAs的来源基因主要参与免疫、炎症反应及疾病相关通路。circRNA-miRNA-mRNA调控网络包括11个circRNAs、17个miRNAs和212个mRNAs。qRT-PCR结果显示circRNA表达趋势与芯片结果一致。与健康对照组比较，hsa_circ_0018744表达在CHB患者组中明显上调（F=4.382，P<0.01），hsa_circ_0085744表达明显下调（F=4.906，P<0.01）。**结论：**与健康对照组相比，CHB患者PBMCs中存在差异表达的circRNAs。进一步功能分析表明，这些差异表达circRNAs可以通过某些通路参与CHB发生发展。

【关键词】慢性乙型肝炎；环状RNA；高通量芯片；实时荧光定量PCR
【中图分类号】R183.9　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2024-01-12

Identification and analysis of circular RNA expression profiles in chronic hepatitis B

Zhou Mingsha[1], Fan Jie[1], Liu Xing[2], Chen Lijuan[1], Luo Jia[1], Li Shan[1], Zhou Li[1]
(1.Department of Epidemiology, School of Public Health, Chongqing Medical University; 2.Department of Immunization Planning Management, Jiulongpo District Center for Disease Control and Prevention of Chongqing)

【Abstract】*Objective*: To analyze the expression profiles of circular RNAs (circRNAs) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in patients with chronic hepatitis B (CHB) and healthy controls, select and validate differentially expressed circRNAs, and study the characteristics, pathways, and downstream genes of differentially expressed circRNAs. ***Methods*:** We identified differentially expressed circRNAs between patients with CHB and controls using high-throughput microarray technology; performed Gene Ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes enrichment analyses on the origin genes of the differentially expressed circRNAs; based on the competing endogenous RNA hypothesis, predicted the target micro RNAs (miRNAs) of the differentially expressed circRNAs and the target messenger RNAs (mRNAs) of the miRNAs using multiple databases to construct a circRNA-miRNA-mRNA regulatory network; and finally, validated the microarray results using quantitative real-time PCR (qRT-PCR). ***Results*:** A total of 321 upregulated circRNAs and 549 downregulated circRNAs were found in PBMCs of patients with CHB compared with healthy controls. Most of the differentially expressed circRNAs were derived from exon splicing, and were mainly distributed on chromosomes 1 and 2. The enrichment analyses demonstrated that the origin genes of the differentially expressed circRNAs were mainly involved in immune, inflammatory response, and disease-related pathways. The established circRNA-miRNA-mRNA regulatory network consisted of 11 circRNAs, 17 miRNAs, and 212 mRNAs. The qRT-PCR results demonstrated that circRNA expression trends were consistent with the microarray results. Notably, in the CHB group, hsa_circ_0018744 was significantly upregulated (F=4.382, P<0.01), and hsa_circ_0085744 was significantly downregulated (F=4.906, P<0.01), as compared with healthy controls. ***Conclusion*:** The identi-

作者介绍：周明纱，Email：2021110619@stu.cqmu.edu.cn，研究方向：慢性乙型肝炎分子流行病学。
通信作者：周　莉，Email：zhouli@cqmu.edu.cn。
基金项目：重庆市渝中区自然科学基金资助项目（编号：20210139）；重庆医科大学未来医学青年创新计划资助项目（编号：W0177）；重庆市自然科学基金资助项目（编号：CSTB2024NSCQ-MSX0169）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240926.0938.008（2024-09-26）

fied differentially expressed circRNAs in PBMCs between patients with CHB and healthy controls may play a role in the development and progression of CHB through certain pathways.

【Key words】chronic hepatitis B; circular RNA; high-throughput microarray; quantitative real-time PCR

慢性乙型肝炎（chronic hepatitis B，CHB）仍然是全球范围的主要健康负担，尤其是在中国[1-2]。世界卫生组织报告称，2019年全球约有300万新发乙型肝炎病毒（hepatitis B virus，HBV）感染者和2.96亿慢性HBV感染者[3]。HBV感染是诱发主要CHB患者形成发展的直接因素，也是诱发肝纤维化、肝硬化和肝细胞癌（hepatocellular carcinoma，HCC）等严重肝脏疾病的关键原因[4]。虽然近年乙型肝炎疫苗接种率有一定提高，HBV感染率有所下降，但CHB患者人数仍然居高不下。迄今为止，CHB的分子机制尚不完全清楚[5]。此外，CHB进展的不可预测性也阻碍了CHB的治疗[6]。临床上，CHB的治疗具有时间长、治疗效果差、预后差等特点，对人体健康产生巨大的负面影响[7]。因此，优化或探索更完善的治疗方法极为重要。环状RNA（circular RNA，circRNA）是一类内源性非编码RNA，在前mRNA阶段由外显子、内含子或2者组合进行反向剪接形成闭合环状结构。circRNA具有RNAse R耐受和抗核酸酶活性，比线性RNA稳定[8]。伴随高通量芯片技术和生物信息学分析的快速发展，在真核转录组中已经鉴定出许多circRNA[9]。circRNA在CHB患者肝脏组织中具有差异表达[10]。大量研究证实，circRNA通过竞争性结合微小RNA（microRNA，miRNA）并充当海绵或诱饵，抑制miRNA活性，从而调节基因表达和细胞功能[11-14]。由此猜想，CHB患者血清外周血单核细胞（peripheral blood mononuclear cells，PBMCs）中可能也存在一些异常表达的circRNAs，通过吸附miRNA影响CHB的发生发展。因此，本研究应用高通量芯片和生物信息学技术分析circRNA表达谱，寻找有效的分子靶点，为更深入的机制研究提供数据支持和研究思路。

1 资料与方法

1.1 研究对象

图1展示本研究技术路线图。本研究招募的24例CHB患者来源于2021年4月至6月在重庆市九龙坡区人民医院感染科就诊人员，24例年龄和性别匹配的健康对照为2021年4至5月在重庆市九龙坡区人民医院体检人员。本研究获得重庆医科大学伦理审查委员会支持，并遵循知情同意原则。CHB患者纳入标准：①年龄为18～60岁；②HBsAg血清阳性且持续时间超过6个月，诊断标准参照《慢性乙型肝炎防治指南（2019版）》；③同意并签署知情同意书。排除标准：①合并其他病毒性感染，如甲型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、戊型肝炎病毒或人类免疫缺陷病毒；②合并有冠心病、慢性阻塞性肺气肿、终末期肾脏病、非小细胞肺癌等严重慢性疾病；③病历资料不全。健康对照组没有任何HBV感染史，HBV标志物检测阴性且生化肝功能正常。健康对照组不一定接受过HBV检测，本研究主要纳入肝功能检测指标进行分析，结果如表1所示。

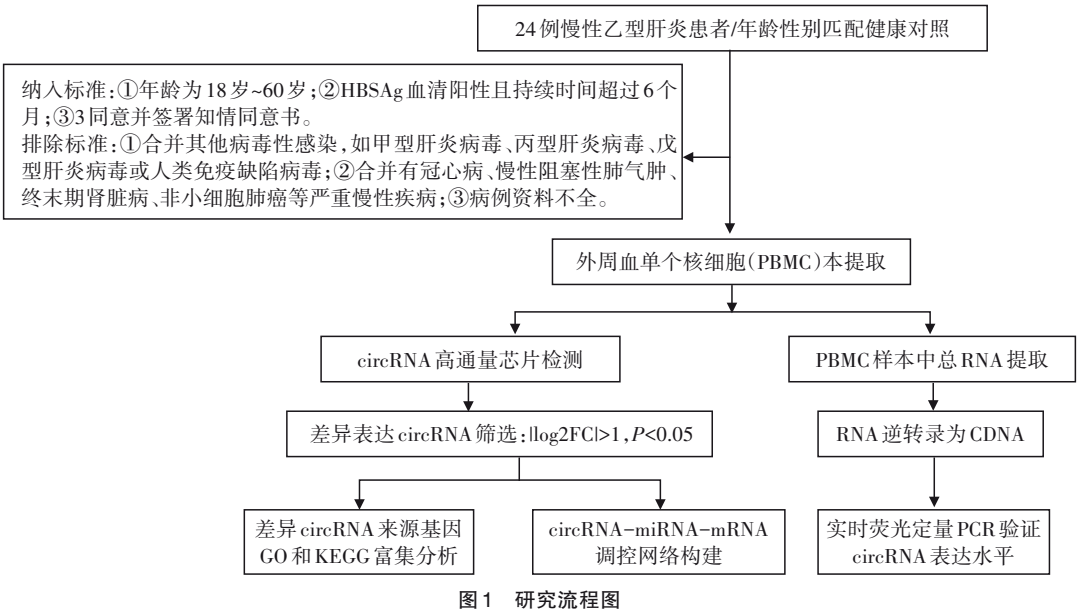


图1 研究流程图

表1 研究对象临床基线资料对比分析（n,%）

临床特征	慢性乙型肝炎组（n=24）	健康对照组（n=24）	χ^2/t值	P值
性别[a]			0.333[b]	0.564
女	11（27.080）	13（22.920）		
男	13（22.920）	11（27.080）		
年龄	34.420 ± 10.086	38.250 ± 11.437	2.294	0.224
丙氨酸氨基转移酶（U/L）	41.583 ± 49.357	23.157 ± 4.577	4.686	0.075
天冬氨酸氨基转移酶（U/L）	29.375 ± 23.443	24.438 ± 2.480	7.668	0.310
碱性磷酸酶（U/L）	0.859 ± 0.305	0.958 ± 0.217	0.200	0.455
总蛋白（g/L）	84.958 ± 23.226	89.758 ± 20.896	1.211	0.040[c]
白蛋白（g/L）	72.121 ± 5.069	69.329 ± 4.035	0.281	0.001[c]
球蛋白（g/L）	45.425 ± 3.913	41.517 ± 4.032	6.115	0.015[c]
白球比	27.029 ± 4.211	24.537 ± 2.369	14.769	0.497
总胆红素（μmol/L）	1.755 ± 0.364	1.699 ± 0.157	9.564	0.063
直接胆红素 μmol/L）	11.546 ± 4.929	9.396 ± 2.519	2.993	0.026[c]
间接胆红素（μmol/L）	4.000 ± 1.997	2.904 ± 1.219	0.178	0.113
胆碱酯酶（U/L）	7.546 ± 3.606	9.342 ± 4.081	3.454	0.031[c]
前白蛋白（mg/L）	8 732.542 ± 2 361.884	7 463.167 ± 1 483.868	0.921	0.214

注：a，使用χ^2检验；其他连续变量用$\bar{x} \pm s$表示，使用独立样本t检验进行统计分析；b，χ^2值；c，P<0.05

1.2 血样采集及外周血单核细胞提取

使用肝素抗凝管和EDTA抗凝管分别采集2 mL和5 mL受试者外周静脉血，24 h内完成处理。其中肝素抗凝血用于检测临床生化指标；EDTA抗凝血离心后，吸取中间淋巴细胞层，使用人全血单个核细胞分离液（灏洋生物，中国）提取PBMCs。

1.3 高通量芯片检测

本研究选取5例CHB患者和5例健康对照PBMCs样本进行芯片分析。按照制造商说明，使用RNeasy总RNA分离试剂盒（qiagen，gmBH，Germany）和Trizol试剂（Life technologies，Carlsbad，CA，US）分离总RNA，并使用RNeasy Mini试剂盒（qiagen，gmBH，Germany）进行RNA纯化。通过Agilent Bioanalyzer 2100（agilent technologies，Santa Clara，CA，US）检查样本中总RNA完整性。利用各组RNA样品生成生物素化cRNA靶标，随后将cRNA靶标与载玻片杂交。扫描过程在Agilent芯片扫描仪（agilent technologies，Santa Clara，CA，US）上完成。使用特征提取软件10.7（agilent technologies，Santa Clara，CA，US）进行数据提取。用R软件“limma”包中的quantile算法对原始数据进行归一化处理。

1.4 circRNA的鉴定和特征分析

首先计算2组间circRNA的差异倍数（fold change，FC），进而得到log2FC。通过R软件中“ggplot2”包绘制circRNA的散点图和火山图，“pheatmap”包进行聚类热图分析。当|log2FC|≥1，P<0.05认为2组间circRNA差异具有统计学意义。

1.5 GO和KEGG功能富集分析

基因本体论（gene ontology，GO）通过定义基因产物的功能，被广泛应用于基因、基因产物和序列注释。京都基因和基因组百科全书（kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）用于分析基因的潜在生物学功能。本研究对circRNA对应的来源基因进行富集分析，以阐明受circRNA影响的特定生物学过程，深入了解其作用机制。当P<0.05，错误发现率小于0.1时被认为具有统计学意义，得到基因集富集结果。

1.6 circRNA-miRNA-mRNA调控网络构建

利用circBase数据库获取差异circRNA基本信息。通过circinteractome数据库预测前10个上调circRNA和前10个下调circRNA吸附miRNA。使用miRDB、miRTarBase和TargetScan数据库同时预测miRNA结合靶mRNA，筛选出3个数据库同时预测到的miRNA结合mRNA。可视化分析使用Cytoscape 3.9.0完成。

1.7 实时荧光定量PCR验证circRNA表达

鉴于circRNA的表达量变化差异及重要性，本研究选择8个差异表达circRNAs，根据circRNA引物设计原则设计特异性引物。通过实时荧光定量PCR（quantitative real-time PCR，qRT-PCR）检测与微阵列分析相同的样本中circRNA相对表达量，进一步检测所有样本具有最高意义的2个circRNAs。用Trizol试剂提取PBMCs样本中总RNA，按照逆转录试剂盒（RT Master Mix for qPCR，MCE，USA）的说明合成cDNA，采用荧光染料法进行扩增。使用的SYBR Green qPCR Master Mix购自MCE公司，特异性引物由上海生工合成，见表2。

1.8 统计学方法

采用R 4.2.2、IBM SPSS 25.0和GraphPad Prism 9.0软件进行绘图和统计分析。使用来自至少3个独立实验的数据评估统计学意义。计量数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，2组间比较采用两独立样本t检验。计数资料用频数（%）表示，采用卡方检验。检验水准α=0.05。

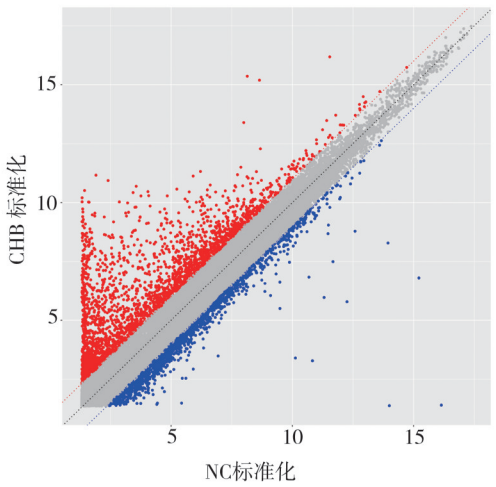
2　结　果

2.1　差异表达 circRNA 筛选

芯片扫描得到的原始数据进行归一化后绘制散点图和火山图。如图 2A 散点图所示，2 组数据总体分布集中趋势较好，表明归一化结果可靠。如图 2B 火山图所示，与健康对照组相比，CHB 患者 PBMCs 中共有 870 个 circRNAs 的表达具有统计学差异，包括 321 个表达上调 circRNAs 和 549 个表达下调 circRNAs。分层聚类分析表明，circRNA 在 2 组样本中的表达模式具有差异（图 2C）。表 3 展示前 10 个上调和下调 circRNAs。

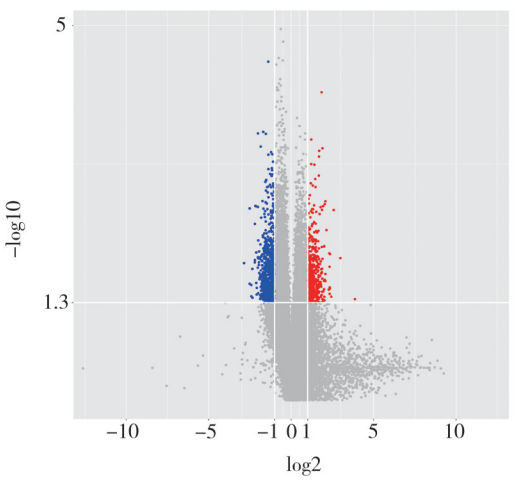
表 2　用于 PCR 的引物序列

基因	正向引物	反向引物
hsa_circ_0000081	TCAAATTTGGGCCTCCTCCG	TCATCGGCTCATCAAGGGTT
hsa_circ_0018455	CCTCCCAGCGCCAAATCTTA	CCGTGGAGTGAATGACCGTA
hsa_circ_0055625	GCAGGGGTTGGAAACTTAGC	CACAGGGCCACCTTGTTTTT
hsa_circ_0018744	TGTTAAAACAGTTCGCTCAGCC	CATCCAGGTAAGCCGTGTCT
hsa_circ_0015269	TTTTGGACTTCTGCTGGCCT	GGGACTTGTACTGCTGGTAAT
hsa_circ_0028075	GAACCGGAATGGCAGTCTGA	GGCATTATCACAGCAGCAACA
hsa_circ_0085744	CCCACCAGAGGAGTGGAAATA	GTGATTCAAGTTGGGGTCAAGG
hsa_circ_0080913	TGTGTCCCTAAATTGTAGCCCT	TGTCGTGCAGTAAGAACCCAA
GAPDH	CAGGAGGCATTGCTGATGAT	GAAGGCTGGGGCTCATTT



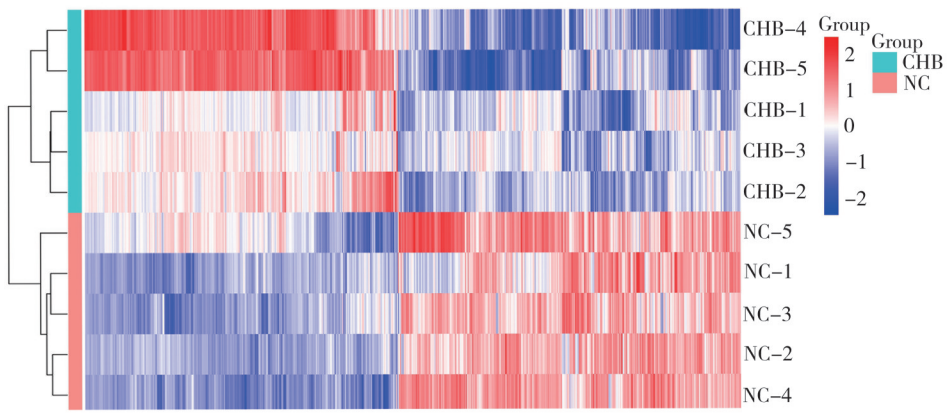
注：点代表探针信号，横轴和纵轴数值分别对应探针信号在2组样本中的强弱；红点表示上调，蓝点表示下调

A. 差异表达circRNA散点图



注：右侧竖线表示上调2倍，左侧竖线表示下调2倍，横线表示P=0.05；红点表示上调，蓝点表示下调

B. 差异表达circRNA火山图



注：红色代表高表达，蓝色代表低表达；横轴代表circRNA聚类，纵轴代表样本聚类情况

C. 差异表达circRNA聚类热图

图 2　差异表达 circRNA 筛选

表3　CHB中10个上调和下调的差异表达circRNAs

差异circRNA	circRNA_ID	来源基因	log2FC	*P*
上调circRNA	*hsa_circ_0083427*	*MTMR7*	2.981	0.013
	hsa_circ_0012574	*ZYG11A*	2.361	0.011
	hsa_circ_0091710	*GABRE*	2.335	0.038
	hsa_circ_0081174	*PPP1R9A*	2.317	0.011
	hsa_circ_0076892	*PRIM2*	2.283	0.034
	hsa_circ_0000081	*ROR1*	2.146	0.005
	hsa_circ_0018744	*DDIT4*	2.078	0.002
	hsa_circ_0033905	*ADAM6*	2.077	0.026
	hsa_circ_0070163	*FRAS1*	2.017	0.042
	hsa_circ_0086402	*SNAPC3*	2.005	0.009
下调circRNA	*hsa_circ_0060867*	*ATP9A*	−2.089	0.039
	hsa_circ_0088177	*ORM2*	−2.115	0.011
	hsa_circ_0053345	*WDR43*	−2.116	0.027
	hsa_circ_0008132	*PRELID2*	−2.200	0.004
	hsa_circ_0066918	*HGD*	−2.204	0.014
	hsa_circ_0071409	*PALLD*	−2.349	0.043
	hsa_circ_0075271	*RUFY1*	−2.354	0.018
	hsa_circ_0075270	*RUFY1*	−2.409	0.041
	hsa_circ_0069972	*CXCL5*	−2.516	0.028
	hsa_circ_0070186	*ANXA3*	−2.854	0.015

注：FC，Fold Change，即差异倍数

2.2　差异circRNA特征分析

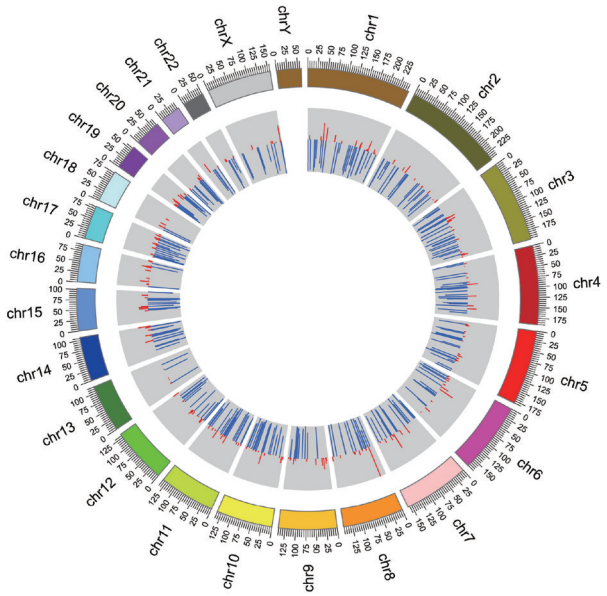
为了进一步了解差异circRNA，对CHB患者和健康对照组PBMCs中上调和下调circRNA进行了特征分析。结果如图3A所示，这些差异表达circRNA广泛分布在除性染色体Y以外的所有染色体中，其中1号和2号染色体承载数量最多的circRNA。本研究统计了870个差异circRNA的产生方式，其中88.85%的circRNA来源于exon的剪接，7.47%的差异circRNA来源于intergenic，极少数来源于intron（图3B）。大多数失调的circRNA的长度小于2000个核苷酸，中位长度为733.5个核苷酸（图3C）。

2.3　circRNA来源基因功能通路分析

GO富集通路结果显示上调circRNA来源基因显著富集在细胞发育、细胞分化和中枢神经系统发育等生物学术语（图4A），而下调circRNA主要在囊泡、细胞膜和细胞骨架富集较多（图4B）。KEGG富集分析表明，CHB中上调circRNA来源基因涉及几种常见的通路，mTOR信号通路、PI3K-Akt信号通路、白细胞跨内皮迁移和Rap1信号通路（图4C）。下调circRNA来源基因除了富集于常见的白细胞跨内皮迁移、ErbB信号通路和Rap1信号通路外，还参与多种细菌感染（耶尔森氏菌感染、致病性大肠杆菌感染）通路（图4D）。

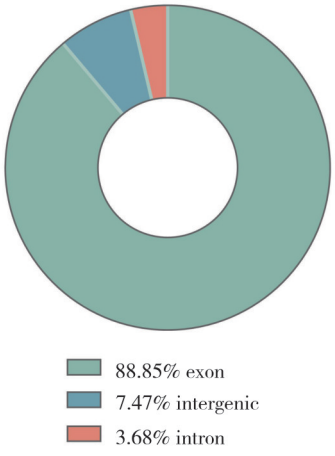
2.4　circRNA-miRNA-mRNA调控网络分析

为进一步探索差异circRNA在CHB中的潜在作用，本研究拟构建circRNA、miRNA及mRNA组成的调控网络探寻其相互作用关系。首先，通过生物信息学预测得到前10个上调和下调circRNA的吸附miRNA。接下来，通过miRDB、miRTarBase和TargetScan在线数据库共同预测上述得到的miRNA对应的mRNA，得到639个miRNA-mRNA对，其中存在427个重复基因。最后将数据导入Cytoscape 3.9.0显示该调控网络包括11个circRNA节点，17个miRNA节点以及212个mRNA节点，如图5所示。

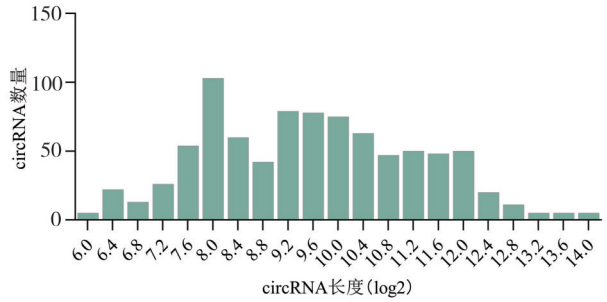


注：外圈数字为染色体号，不同颜色代表不同染色体；内圈反映染色体坐标区间circRNA密度；红色和蓝色分别为上调和下调circRNA

A. 差异circRNA染色体分布

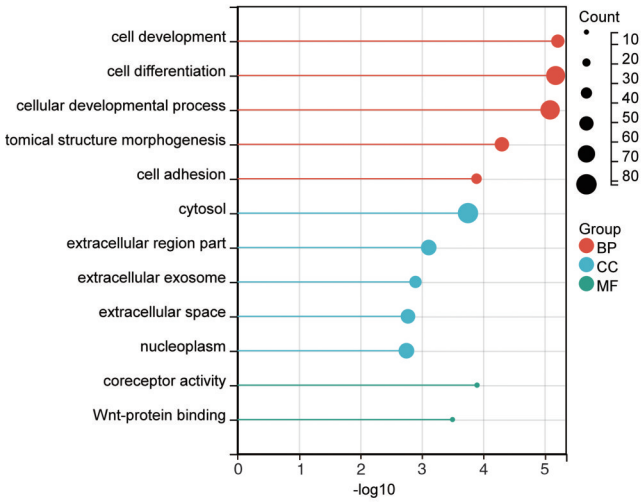


B. 差异circRNA基因组来源

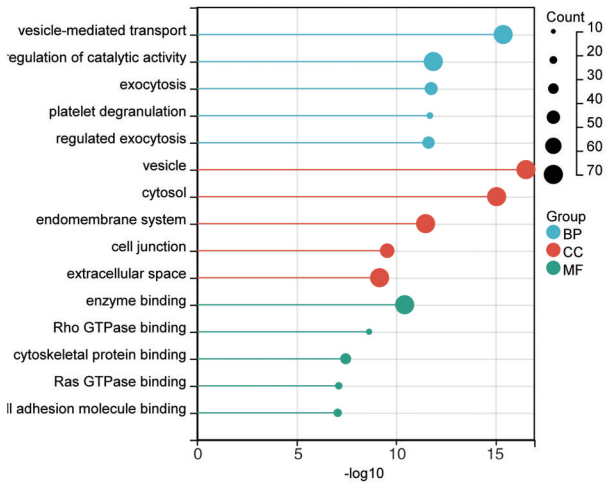


C. 差异表达circRNA长度分布

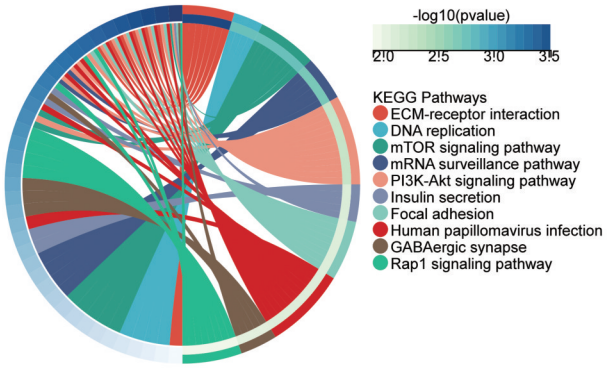
图3　差异表达circRNA特征分析



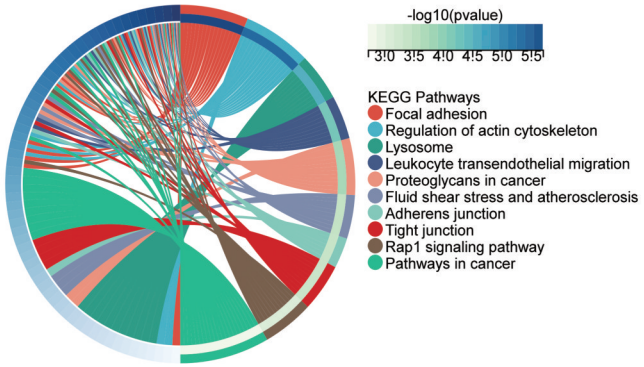
A.上调circRNA来源基因GO分析



B. 下调circRNA来源基因GO分析



C. 上调circRNA来源基因KEGG分析



D. 下调circRNA来源基因KEGG分析

图 4　差异 circRNA 来源基因富集分析

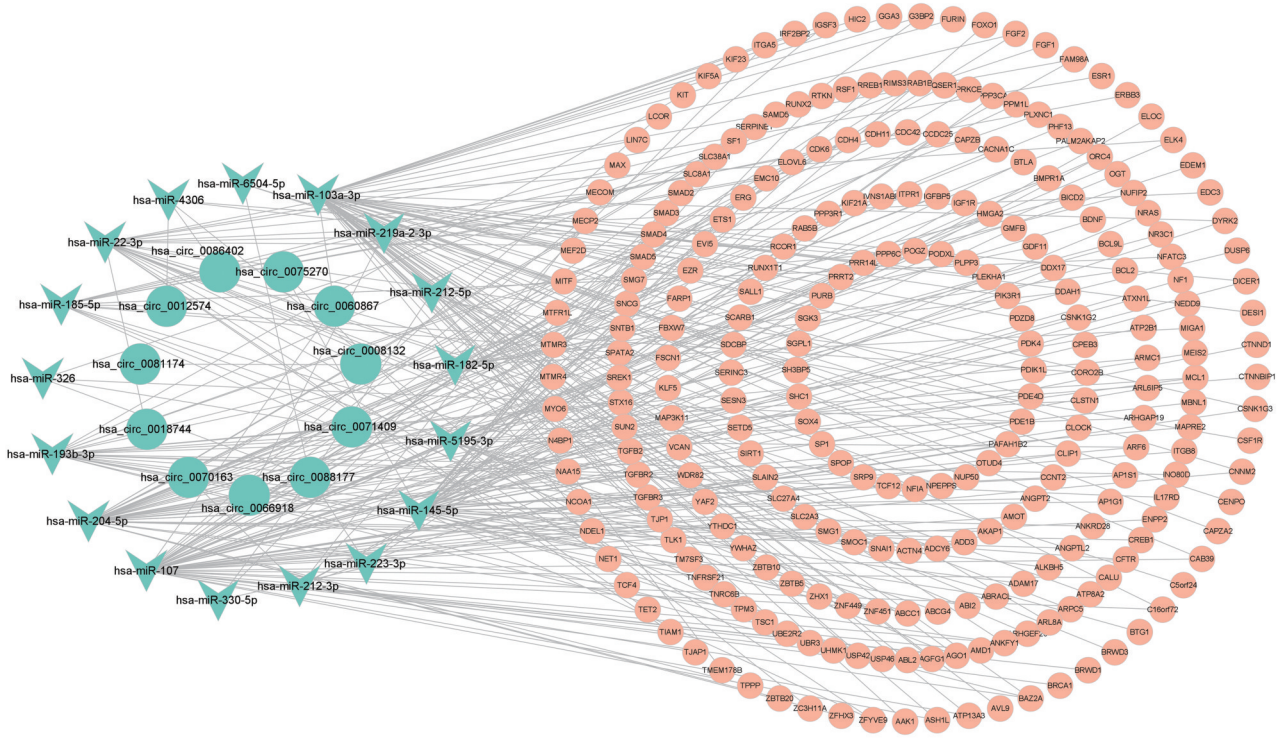
2.5　差异 circRNA 表达验证

首先使用 qRT-PCR 检测与芯片分析相同的 CHB 患者和健康对照组 PBMC 中 circRNA 表达。与对照组相比，hsa_circ_0018744、hsa_circ_0018455、hsa_circ_0055625 及 hsa_circ_0000081 表达在 CHB 组中显著上调（F=2.832，P<0.01；F=0.205，P<0.05；F=1.225，P<0.05；F=2.439，P<0.01），同时，与对照组比较，hsa_circ_0015269、hsa_circ_0085744 和 hsa_circ_0080913 的表达在 CHB 组中显著下调（F=38.335，P<0.01；F=2.414，P<0.01；F=15.367，P<0.01），但 hsa_circ_0028075 表达差异无统计学意义（F=3.541，P=0.053；图 6A）。进一步发现与 24 例健康对照组比较，hsa_circ_0018744 表达在 24 例 CHB 患者中明显上调（F=4.382，P<0.01），hsa_circ_0085744 表达显著下调（F=4.906，P<0.05；图 6B）。以上结果与芯片检测一致，表明芯片结果具有可靠性。

3　讨　论

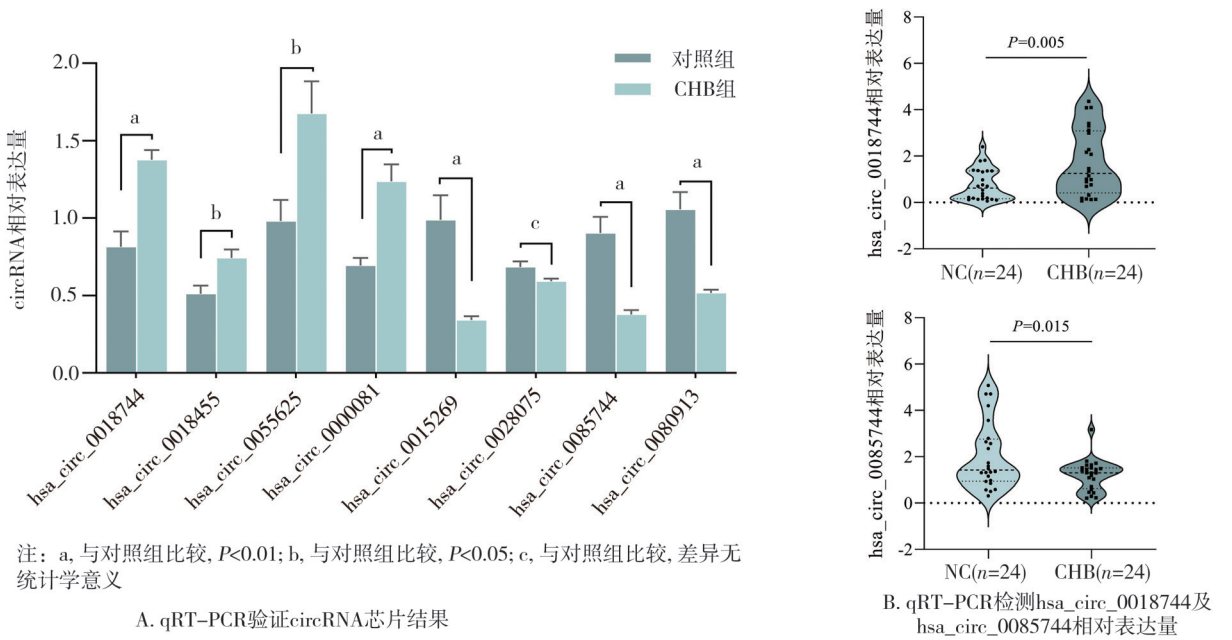
本研究采用高通量芯片技术，展示 CHB 患者 PBMCs 中 circRNA 表达谱，探究了 CHB 患者发生发展的潜在调控机制。芯片表达谱分析结果表明，与健康对照组相比，大量 circRNAs 在 CHB 中具有差异表达，且差异倍数在 2 倍以上，表明这些差异 circRNAs 可能与 CHB 的发生发展有关。CHB 相关差异 circRNA 来源基因 GO 分析结果表明细胞发育生长、细胞分化和活性调节是明显富集的生物学过程。KEGG 富集分析显示，来源基因主要在白细胞跨内皮迁移、mTOR 信号通路、PI3K-Akt 信号通路和 Rap1 信号通路中富集。以上结果提示感染通路、免疫和炎症反应在 CHB 中明显失调，表明差异表达 circRNA 可能在 HBV 感染和免疫反应中发挥重要作用[15-18]。

本研究通过生物信息学分析分别预测 circRNA 和 mRNA 的多个 miRNA 吸附位点。在预测的 circRNA 吸附 miRNA 中，miR-212-3p 在 HBeAg 处理的细胞中上调，并通过靶向 MAPK1 抑制炎性细胞因子产生[19]。其他吸附 miRNA 与 CHB 的发病机制是



注：绿色圆圈，差异表达 circRNA；绿色箭头，miRNA；橙色圆圈，mRNA

图 5　circRNA–miRNA–mRNA 调控网络构建



注：a, 与对照组比较, $P<0.01$; b, 与对照组比较, $P<0.05$; c, 与对照组比较, 差异无统计学意义

A. qRT–PCR验证circRNA芯片结果

B. qRT–PCR检测hsa_circ_0018744及hsa_circ_0085744相对表达量

图 6　qRT–PCR 验证 circRNA 表达水平

否相关尚需进一步研究。此外，TGFBR2[20]、IGF1R[21]和 DDX17[22]等靶 mRNA 与 HBV 感染和 CHB 相关疾病之间存在密切联系。通过 qRT–PCR 证实，7 个 circRNAs 相对表达量与芯片表达的趋势基本一致，且具有统计学差异性。特别地，本研究选择差异表达最明显的 circRNAs 在所有患者中进行 qRT–PCR 检测。结果显示，与健康对照组相比，hsa_circ_0018744 和 hsa_circ_0085744 在 CHB 患者中明显失调。尽管目前还未见这些差异 circRNAs 与 HBV 感染相关的报道，有研究证实这些 circRNAs 与某些疾病的相关性[23-24]。另有报道发现 hsa_circ_0018744 和 hsa_circ_0085744 来源基因 DDIT4 和 PTK2 可能

是HBV相关HCC的潜在诊断和预后生物标志物[25-26]。以上结果均表明hsa_circ_0018744和hsa_circ_0085744可能作为CHB的潜在有价值的新型标志物。

综上所述，鉴于circRNA在疾病或病毒中的重要作用，本研究基于高通量芯片技术筛选并验证CHB中差异表达的circRNA。进一步分析发现差异表达circRNAs可能参与CHB的发病机制，作为CHB患者潜在的治疗靶点。本研究的局限性在于circRNA-miRNA-mRNA调控网络的潜在机制尚不清楚，未通过具体实验验证准确性。接下来的研究应进一步验证这些候选标志物在体内和体外对CHB的影响。

参 考 文 献

[1] Ren H. The experience of management of chronic hepatitis B in China[J]. J Viral Hepat, 2017, 24(s1): 4-5.

[2] Soriano V, Young B, Reau N. Report from the international conference on viral hepatitis - 2017[J]. AIDS Rev, 2018, 20(1): 58-70.

[3] Liu J, Liang WN, Jing WZ, et al. Countdown to 2030: eliminating hepatitis B disease, China[J]. Bull World Health Organ, 2019, 97(3): 230-238.

[4] Su S, Wong WC, Zou ZR, et al. Cost-effectiveness of universal screening for chronic hepatitis B virus infection in China: an economic evaluation[J]. Lancet Glob Health, 2022, 10(2): e278-e287.

[5] Akbar SMF, Yoshida O, Hiasa Y. Immune therapies against chronic hepatitis B[J]. J Gastroenterol, 2022, 57(8): 517-528.

[6] Yang ZJ, Sun BZ, Xiang JC, et al. Role of epigenetic modification in interferon treatment of hepatitis B virus infection[J]. Front Immunol, 2022, 13: 1018053.

[7] Lau G, Yu ML, Wong G, et al. APASL clinical practice guideline on hepatitis B reactivation related to the use of immunosuppressive therapy[J]. Hepatol Int, 2021, 15(5): 1031-1048.

[8] Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency[J]. Nature, 2013, 495(7441): 333-338.

[9] Hsiao KY, Sun HS, Tsai SJ. Circular RNA - New member of noncoding RNA with novel functions[J]. Exp Biol Med, 2017, 242(11): 1136-1141.

[10] Zhou TC, Li X, Chen LJ, et al. Differential expression profile of hepatic circular RNAs in chronic hepatitis B[J]. J Viral Hepat, 2018, 25(11): 1341-1351.

[11] Chen L, Sun ZG, Xu H, et al. Emerging roles of circular RNAs in thyroid cancer[J]. Exp Cell Res, 2021, 404(2): 112626.

[12] He W, Zhu XY, Tang XY, et al. Circ_0027089 regulates NACC1 by targeting miR-136-5p to aggravate the development of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. Anticancer Drugs, 2022, 33(1): e336-e348.

[13] Huang XY, Huang ZL, Xu YH, et al. Comprehensive circular RNA profiling reveals the regulatory role of the circRNA-100338/miR-141-3p pathway in hepatitis B-related hepatocellular carcinoma[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 5428.

[14] Panda AC. Circular RNAs act as miRNA sponges[J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1087: 67-79.

[15] Si T, Ning XJ, Chen HH, et al. ANTXR1 as a potential prognostic biomarker for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma identified by a weighted gene correlation network analysis[J]. J Gastrointest Oncol, 2021, 12(6): 3079-3092.

[16] Marotel M, Villard M, Drouillard A, et al. Peripheral natural killer cells in chronic hepatitis B patients display multiple molecular features of T cell exhaustion[J]. Elife, 2021, 10: e60095.

[17] Zheng YY, Li J, Johnson DL, et al. Regulation of hepatitis B virus replication by the ras-mitogen-activated protein kinase signaling pathway[J]. J Virol, 2003, 77(14): 7707-7712.

[18] Xie XY, Lv HR, Liu CX, et al. HBeAg mediates inflammatory functions of macrophages by TLR2 contributing to hepatic fibrosis[J]. BMC Med, 2021, 19(1): 247.

[19] Chen WJ, Bian HJ, Xie XY, et al. Negative feedback loop of ERK/CREB/miR-212-3p inhibits HBeAg-induced macrophage activation[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(18): 10935-10945.

[20] Yu FJ, Chen BC, Fan XF, et al. Epigenetically-regulated microRNA-9-5p suppresses the activation of hepatic stellate cells via TGFBR1 and TGFBR2[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 43(6): 2242-2252.

[21] Guo YH, Kang W, Lei XY, et al. Hepatitis B viral core protein disrupts human host gene expression by binding to promoter regions[J]. BMC Genomics, 2012, 13: 563.

[22] Mao RC, Dong MH, Shen ZL, et al. RNA helicase DDX17 inhibits hepatitis B virus replication by blocking viral pregenomic RNA encapsidation[J]. J Virol, 2021, 95(19): e0044421.

[23] 李德瑶，陆丹娟，曲晨箫，等. 乙型肝炎病毒RNA的转录后调控机制及抗病毒策略[J]. 中华肝脏病杂志，2024，32(5)：474-480.
Li DY, Lu DJ, Qu CX, et al. Post-transcriptional regulation mechanism and antiviral strategy of hepatitis B virus RNA[J]. Chin J Hepatol, 2024, 32(5): 474-480.

[24] Kong Z, Lu YL, Yang Y, et al. m6A-mediated biogenesis of circDDIT4 inhibits prostate cancer progression by sequestrating ELAVL1/HuR[J]. Mol Cancer Res, 2023, 21(12): 1342-1355.

[25] Kunadirek P, Ariyachet C, Sriphoosanaphan S, et al. Identification of BHLHE40 expression in peripheral blood mononuclear cells as a novel biomarker for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 11201.

[26] El-Kafrawy SA, El-Daly MM, Bajrai LH, et al. Genomic profiling and network-level understanding uncover the potential genes and the pathways in hepatocellular carcinoma[J]. Front Genet, 2022, 13: 880440.

（责任编辑：周一青）