

## 用重组 8 型腺相关病毒载体介导的乙型肝炎病毒持续感染小鼠模型评价核苷类似物的抗病毒效果

王国婧<sup>1,2\*</sup>, 王刚<sup>2\*</sup>, 董小岩<sup>3</sup>, 田文洪<sup>2,4</sup>, 尉迟捷<sup>2</sup>, 魏国超<sup>2</sup>, 孟红<sup>1</sup>, 吴小兵<sup>5</sup>

1 山东省医学科学院基础医学研究所 济南大学 山东省医学科学院医学与生命科学学院, 山东 济南 250000

2 中国疾病预防控制中心 病毒病预防控制所, 北京 100052

3 北京五加和分子医学研究所, 北京 100176

4 吉林大学生命科学学院, 吉林 长春 130012

5 北京亦庄国际生物医药投资管理有限公司, 北京 100111

王国婧, 王刚, 董小岩, 等. 用重组 8 型腺相关病毒载体介导的乙型肝炎病毒持续感染小鼠模型评价核苷类似物的抗病毒效果. 生物工程学报, 2013, 29(1): 95-106.

Wang GJ, Wang G, Dong XY, et al. Assessment of anti-HBV effects of nucleotide analogues on mouse model of chronic HBV infection mediated by recombinant adeno-associated virus 8. Chin J Biotech, 2013, 29(1): 95-106.

**摘要:** 探索用重组 8 型腺相关病毒载体携带 1.3 拷贝乙型肝炎病毒 (rAAV8-1.3HBV) 介导的 HBV 持续感染小鼠模型评价核苷酸类似物抗病毒药物的抗病毒效果。首先, 通过将 rAAV8-1.3HBV 经尾静脉注射到 30 只 C57BL/6 小鼠体内, 建立 HBV 持续感染模型并对模型成功率进行检测, 将建模成功的 27 只小鼠随机分成 6 组。然后采取灌胃的方式给予不同剂量的抗病毒药物恩替卡韦 (ETV) 及拉米夫定 (LAM), 每日 1 次, 连续 10 d, 后停药 15 d, 同时设置生理盐水及空白对照组。其中 ETV 分为高剂量 (1.0 mg/(kg·d)) 和低剂量 (0.1 mg/(kg·d)) 两组; LAM 分为高剂量 (500 mg/(kg·d)) 和低剂量 (100 mg/(kg·d)) 两组。检测给药前后和停药前后小鼠模型血清中 HBV DNA、HBeAg 和 HBsAg 表达水平并比较变化情况。结果发现连续给药 10 d 后, 各给药组与生理盐水组相比, 血清中 HBV DNA 水平均显著下降, 具有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。停药 15 d 后, 低剂量的 ETV 与 LAM 两组血清 HBV DNA 水平出现反弹, 差异存在统计学意义 ( $P < 0.05$ )。在整个实验过程中, 各组小鼠血清中 HBeAg 和 HBsAg 表达水平均未出现明显变化。上述结果表明, ETV 和 LAM 能有效抑制模型小鼠中 HBV 病毒的复制, 而对 HBeAg 和 HBsAg 表达水平无明显影响; 提示 AAV8-1.3HBV 介导的 HBV 持续感染小鼠模型制备简单, 成模率高, 可有效体现出 ETV 和 LAM 抗 HBV 的作用效果, 从而用于核苷酸类似物抗 HBV 药物的筛选。

**关键词:** rAAV8-1.3HBV, 乙型肝炎病毒, 小鼠模型, 核苷酸类似物, 药物筛选, 药物评价

**Received:** July 23, 2012; **Accepted:** October 27, 2012

**Supported by:** Special Key Program on Infectious Diseases of China (No. 2008ZX10002-023), Major Program of New Drugs Creation and Technology (No. 2009ZX09102-237).

\*These authors contributed equally to this study.

**Corresponding author:** Xiaobing Wu. Tel: +86-10-63523187; Fax: +86-10-63536871; E-mail: wuxb0168@vip.sina.com

Hong Meng. Tel/Fax: +86-531-82919701; E-mail: menghlc@163.com

传染病重大专项 (No. 2008ZX10002-023), 新药创制科技重大专项 (No. 2009ZX09102-237) 资助。

## Anti-HBV effect of nucleotide analogues on mouse model of chronic HBV infection mediated by recombinant adeno-associated virus 8

Guojing Wang<sup>1,2</sup>, Gang Wang<sup>2</sup>, Xiaoyan Dong<sup>3</sup>, Wenhong Tian<sup>2,4</sup>, Jie Yuchi<sup>2</sup>, Guochao Wei<sup>2</sup>, Hong Meng<sup>1</sup>, and Xiaobing Wu<sup>5</sup>

1 Institute of Basic Medical Science, Shandong Academy of Medical Science, College of Life Science, University of Jinan, Jinan 250000, Shandong, China

2 Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China

3 Beijing Five Plus Molecular Medicine Institute, Beijing 100176, China

4 School of Life Science, Jilin University, Changchun 130012, Jilin, China

5 Beijing Yizhuang International Biomedical Investment & Management Co. Ltd., Beijing 101111, China

**Abstract:** We evaluated the anti-HBV effects of nucleotide analogues, Entecavir (ETV) and Lamivudine (LAM) targeting mouse model of HBV persistent infection with recombinant adeno-associated virus 8 carrying 1.3 copies of HBV genome (rAAV8-1.3HBV). Ninety percent (27 of 30 mice) of rAAV8-treated mice were chosen as mouse model. Four groups were orally administrated with different doses of ETV (1 mg/(kg·d) or 0.1 mg/(kg·d)) and LAM (500 mg/(kg·d) or 100 mg/(kg·d)) once a day for 10 days. The other two groups were set as normal saline treated and untreated control. We detected the levels of HBV DNA, HBeAg and HBsAg in sera at different time. Results indicate that HBV DNA level decreased significantly ( $P<0.05$ ) in drug-treated groups compared with normal saline group after drug administration. Fifteen days after the drug withdrawal, HBV DNA level rebounded back obviously ( $P<0.05$ ) in groups with low doses of ETV and LAM. However, there was no apparent change of HBeAg and HBsAg in the whole process among all groups. These results showed that our model could reflect the anti-viral effect of nucleotide analogues. This model can be a useful and convenient tool for anti-HBV drug discovery.

**Keywords:** rAAV8-1.3HBV, Hepatitis B virus, mouse model, nucleotide analogues, drug screening, drug evaluation

乙型肝炎病毒 (Hepatitis B virus, HBV) 属嗜肝 DNA 病毒科, 是引起病毒性乙型肝炎的病原体<sup>[1]</sup>。全球约 1/3 的人曾感染过 HBV, 慢性 HBV 感染者约 3~4 亿, 其中 25%~40% 人死于 HBV 感染相关性疾病<sup>[2]</sup>。我国属于 HBV 感染的高流行区, 一般人群的 HBsAg 阳性率接近 10%<sup>[3]</sup>。对现有病毒性乙型肝炎患者及 HBsAg 携带者的防治工作, 在今后几十年里仍是一项艰巨的任务。

目前, 治疗乙型肝炎的药物主要包括核苷酸类似物和干扰素等<sup>[4]</sup>, 其中以核苷酸类似物临床应用最广泛<sup>[5]</sup>。由于 HBV 耐药突变株不断出现<sup>[6]</sup>, 使得现有抗 HBV 药物难以达到理想的治疗效果, 因此需要研发新的药物。而新型乙肝药物的筛选鉴定需要合适的 HBV 动物模型。因小鼠容易获得、研究背景清楚、经济实用等优点, HBV 相关小鼠模型是理想的新型乙肝治疗药物的筛选动物模型。

2010 年本课题组利用高嗜肝性 8 型重组腺相关病毒携带 1.3 个拷贝的 HBV 基因组 (ayw 亚型) (Recombinant adeno-associated virus type 8 carrying 1.3 copies of HBV genome (ayw), rAAV8-1.3HBV), 体内转导 C57BL/6 小鼠, 成功制备乙型肝炎病毒持续感染小鼠模型<sup>[7]</sup>。该模型与 HBV 转基因小鼠类似, 小鼠体内可持续检测到 HBeAg 和 HBsAg 的表达以及 HBV DNA 的复制。HBV 转基因小鼠模型已广泛应用于治疗病毒性乙型肝炎核苷酸类似药物的筛选和评价。为探讨该模型是否也可用于新型核苷酸类抗 HBV 药物筛选和评价, 本研究选用目前临床治疗病毒性乙型肝炎最常用的两种核苷酸类似物 (拉米夫定和恩替卡韦) 作用于该模型, 对比给药前后及停药前后小鼠血清学 HBV DNA、HBeAg、HBsAg 检测指标的变化情况, 判断此模型能否反映核苷类药物的抗 HBV 效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

4~6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司; 乙型肝炎病毒 (HBV) 核酸定量检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) (国药准字 S20020033) 购自深圳匹基生物有限公司; HBeAg、HBsAg 定性诊断试剂盒购自北京万泰生物药业股份有限公司; HBeAg、HBsAg 定量检测试剂盒购自美国 Abbott 公司; 恩替卡韦片 (国药准字 H20052237) 购自中美上海施贵宝制药有限公司; 拉米夫定片 (国药准字 H20030581) 购自葛兰素史克公司。

### 1.2 重组病毒 rAAV8-1.3HBV 的制备

重组腺相关病毒 rAAV8-1.3HBV 由北京五

加和分子医学研究所制备和提供。主要步骤为: 用 pAAV2neo-1.3HBV 质粒转染 BHK21 细胞后, 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 培养基选择培养 15 d, 得到 BHK21/AAV-1.3HBV 细胞; 用携带 *rep2cap8* 基因的重组单纯疱疹病毒 (MOI=1~5) 感染 BHK21/AAV-1.3HBV 细胞, 72 h 收获病变细胞以及培养上清液, 按照吴小兵等报道的 AAV 载体纯化方法<sup>[8]</sup>进行粗纯化, 之后使用离子交换柱层析方法进一步纯化, 点杂交方法测定病毒滴度。

### 1.3 动物模型

将 rAAV8-1.3HBV 病毒经尾静脉注射至 30 只 C57BL/6 小鼠体内。注射剂量为  $1 \times 10^{11}$  vg/200  $\mu\text{L}$ /只。注射病毒 14、28 和 42 d 后, 分别小鼠尾静脉采血, 分离血清, 测定血清中 HBeAg 和 HBsAg 表达水平以及 HBV DNA 拷贝数, 判断模型构建成功与否。

### 1.4 荧光定量 PCR 检测血清 HBV DNA

病毒注射后第 42 天、实验过程中第 5 天、第 10 天、第 25 天 4 个时间点尾静脉取血, 分离血清, 按照乙型肝炎病毒 (HBV) 核酸扩增 (PCR) 荧光定量检测试剂盒的说明书检测小鼠血清 HBV DNA 表达水平。

### 1.5 ELISA 检测小鼠血清 HBeAg、HBsAg

病毒注射第 14 天和第 28 天后分别尾静脉取血, 分离血清, 去离子水稀释 20 倍后, 用万泰公司 HBeAg、HBsAg 诊断试剂盒检测小鼠血清 HBeAg 和 HBsAg 表达水平, 检测过程参见试剂盒说明书。两项指标阳性判断标准均为样品  $OD_{450} \geq$  阴性对照孔平均值  $\times 2.1$ 。

病毒注射第 42 天以及实验第 10 天和第 25

天后分别尾静脉取血, 分离血清, 生理盐水稀释 40 倍后, 用 Abbott 公司的 HBeAg、HBsAg 定量检测试剂盒检测小鼠血清 HBeAg 和 HBsAg 表达水平, 检测过程参见试剂盒说明书。阳性参考值分别为: HBeAg (S/CO) > 1, HBsAg (mIU/mL) > 0.05。

## 1.6 实验设计

整个实验流程如图 1 所示, 分为建立、筛选慢性 HBV 感染小鼠模型并对该模型的成模率进行评价, 以及评价核苷酸类似物药物作用效果两个阶段。具体如下所述。

### 1.6.1 实验分组

根据病毒注射第 14 天和第 28 天后每只小鼠的 HBeAg、HBsAg 表达定性检测结果, 以及第 42 天 (药物处理 0 d) 后 HBeAg、HBsAg 和 HBV DNA 的定量检测结果, 从 30 只注射 rAAV8-1.3HBV 小鼠中挑选 27 只小鼠用于后续实验。挑选出的 27 只小鼠各自 HBV DNA 表达水平都大于  $1 \times 10^5$  IU/mL, HBeAg 和 HBsAg 在第 14 天和第 28 天时的定性检测均为阳性, 且第 42 天时 HBeAg、HBsAg 和 HBV DNA 的定性检测结果都较高。用随机数表法, 对挑选出的 27 只模型小

鼠进行分组, 其中空白对照组 (Untreated) 5 只、生理盐水组 (NS) 4 只、ETV 高剂量组 (1.0 mg/(kg·d)) 5 只、ETV 低剂量组 (0.1 mg/(kg·d)) 4 只、LAM 高剂量组 (500 mg/(kg·d)) 5 只、LAM 低剂量组 (100 mg/(kg·d)) 4 只。

### 1.6.2 药品

恩替卡韦、拉米夫定研成粉末, 损失量以每片 20% 计算, 生理盐水配置药品溶液, 4 °C 保存备用。

### 1.6.3 处理

根据 1.6.1 中小鼠模型分组时设定的每组给药种类和剂量给药。每组小鼠以灌胃方式连续给药 10 d (第 1~10 天), 每日 1 次, 之后停药 15 d (第 11~25 天)。实验过程中, 第 0 天、第 5 天、第 10 天和第 25 天, 分别尾静脉采血, 分离血清, -20 °C 保存备用。第 25 天采血后, 处死全部小鼠。

### 1.6.4 统计学分析

采用成组 *t* 检验分析相对应时间点 (0 d、10 d 和 25 d) 给药组与 NS 组的血清学 HBV DNA 表达水平统计学差异; 采用配对 *t* 检验分析给药

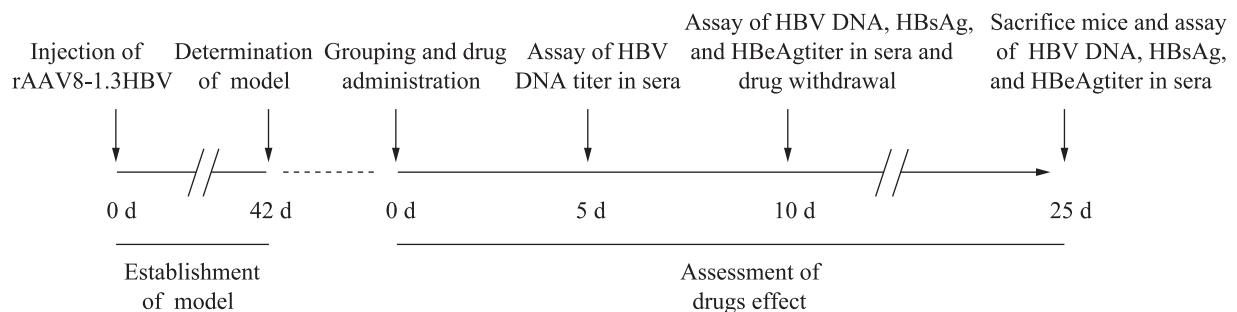


图 1 实验流程示意图

Fig. 1 The schematic map of procedure for experiment. In the whole of experiment process, mouse model of HBV chronic infection was firstly established by injection of rAAV8-1.3HBV and determination of model. Then suitable models were chosen, different kinds of drugs were given and effects of drugs on model were assessed.

组给药前后和停药前后的 HBV DNA 表达水平的统计学差异。HBeAg、HBsAg 定量检测两项指标分别采用成组 *t* 检验分析相对应时间点 (0 d、10 d 和 25 d) 给药组与 NS 组的统计学差异; 采用配对 *t* 检验分析给药组给药前后和停药前后的统计学差异。以上分析过程均采用 SPSS16.0 软件分析完成。

## 2 结果

### 2.1 小鼠成模情况

将 rAAV8-1.3HBV 病毒经尾静脉注射至 30 只 C57BL/6 小鼠体内, 第 14 天和第 28 天后分别对 30 只小鼠采血并定性检测 HBeAg 和 HBsAg 表达水平。结果显示, 第 14 天除 11 号、25 号小鼠 HBeAg 检测结果为阴性外, 其余小鼠均为阳性; 30 只小鼠 HBsAg 检测结果均为阳性。第 28 天除 25 号小鼠 HBeAg 检测结果为阴性外, 其余小鼠均为阳性; 同时各小鼠 HBsAg 检测结果均为阳性。第 42 天定量检测小鼠血清学 HBV DNA、HBeAg、HBsAg 的表达水平, 结果如图 2 所示。30 只小鼠血清学 HBV DNA 表达情况 (lg (IU/mL)), 除 11 号小鼠为 4.13, 25 号小鼠为 3.85, 28 号小鼠为 4.46 以外, 其余 27 只小鼠均大于 5.00, 平均值为  $5.38 \pm 0.34$ 。进一步定量检测小鼠血清 HBeAg 及 HBsAg 的表达情况。以上 3 只血清 HBV DNA 表达水平较低的小鼠情况如下: 11 号小鼠 HBeAg 表达为 2.00 S/CO, HBsAg 表达为 23.07 mIU/mL; 25 号小鼠 HBeAg 表达为 1.13 S/CO, HBsAg 表达为 8.10 mIU/mL; 28 号小鼠 HBeAg 表达为 8.27 S/CO, HBsAg 表达为 81.54 mIU/mL。其他 27 只小鼠血清 HBeAg 平均值  $13.22 \pm 1.78$  S/CO, 最低值为 9.50 S/CO;

HBsAg 平均值  $93.24 \pm 7.24$  mIU/mL, 最低值为 81.69 mIU/mL。结合血清 HBV DNA 表达水平及 HBeAg、HBsAg 情况, 在 30 只小鼠中剔除 11 号、25 号、28 号小鼠, 挑选其他 27 只小鼠用于后续实验。

### 2.2 药物处理对小鼠模型血清 HBV DNA 的影响

rAAV8-1.3HBV 介导的 HBV 持续感染小鼠模型成功建立后, 按照 ETV 高、低剂量分别给药 10 d 后停药 15 d, 尾静脉取血检测血清学 HBV DNA 的变化情况, 结果见表 1。相同时间点 ETV 低剂量组与生理盐水组对比分析, 发现给药 10 d

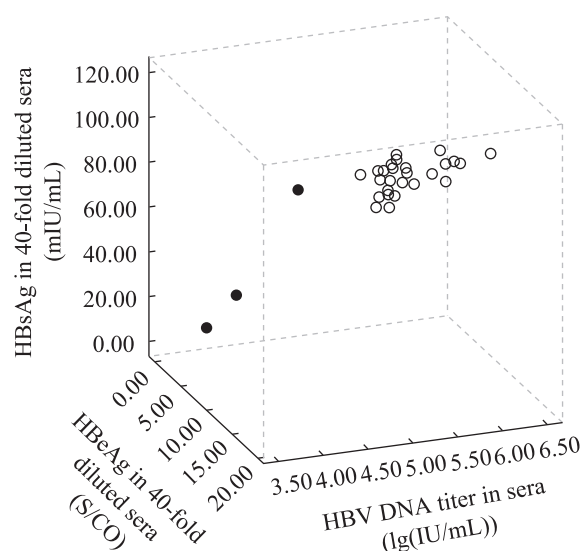


图 2 HBV 慢性感染小鼠模型的确定

Fig. 2 Determination of mouse model of HBV chronic infection. Thirty mice were injected with rAAV8-1.3HBV. Forty-two days post-injection, HBsAg, HBeAg, and HBV DNA titer in sera were assayed. Mouse whose HBV DNA, HBsAg (40-fold diluted), and HBeAg (40-fold diluted) titer in sera was separately more than 5.00 (lg(IU/mL)), 81.00 mIU/mL, and 9.50 S/CO was determined as model. Twenty-seven mice were chose as models. The hollow circles indicated the mouse model of HBV chronic infection; the solid circles indicated the mice which were not determined as models.

后相比于生理盐水组,ETV低剂量组血清学HBV DNA表达水平下降显著,差异存在统计学意义 ( $P<0.05$ )。不同时间点ETV低剂量组组内对比(图3),给药5 d与0 d相比,血清学HBV DNA表达水平 ( $\lg(\text{IU/mL})$ ) 由  $5.31\pm 0.42$  下降到  $4.54\pm 0.46$ ,差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 给药10 d与0 d相比,下降到  $4.26\pm 0.05$ ,差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 停药15 d与给药10 d对比,HBV DNA表达水平有所反弹,上升到  $4.57\pm 0.14$ ,差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。

相同时间点血清HBV DNA表达水平ETV高剂量组与生理盐水组对比分析(表1),相比于生理盐水组,ETV高剂量组给药5 d即出现显著下降,差异存在统计学意义 ( $P<0.01$ ); 给药10 d继续下降,差异存在统计学意义 ( $P<0.01$ ); 停药15 d差异仍具有统计学意义 ( $P<0.01$ )。不同时间点ETV高剂量组组内对比分析(图3),给药5 d与0 d相比,血清学HBV DNA表达水平 ( $\lg(\text{IU/mL})$ ) 由  $5.36\pm 0.36$  下降到  $4.29\pm 0.18$ ,差异具有统计学意义 ( $P<0.01$ ); 给药10 d与0 d

表1 ETV和LAM分别作用于rAAV8-1.3HBV介导的HBV持续感染小鼠模型后不同时间点血清HBV DNA情况

Table 1 HBV DNA titer in sera of HBV chronic infection mouse model mediated by rAAV8-1.3HBV at different time points treated with ETV or LAM

Treatment	Dose (mg/(kg·d))	HBV DNA titer in sera ( $\lg(\text{IU/mL})$ )			
		0 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	25 <sup>a</sup>
Untreated	—	$5.33\pm 0.32$	$5.29\pm 0.25$	$5.25\pm 0.39$	$5.27\pm 0.28$
NS	—	$5.39\pm 0.31$	$5.12\pm 0.30$	$4.89\pm 0.23$	$4.92\pm 0.14$
ETV	0.1	$5.31\pm 0.42$	$4.54\pm 0.46^{\dagger}$	$4.26\pm 0.05^{*,\dagger}$	$4.57\pm 0.14^{\Delta}$
	1.0	$5.36\pm 0.36$	$4.29\pm 0.18^{**,\dagger\dagger}$	$3.75\pm 0.21^{**,\dagger\dagger}$	$3.69\pm 0.27^{**}$
LAM	100	$5.22\pm 0.17$	$4.91\pm 0.22^{\dagger}$	$4.42\pm 0.22^{*,\dagger\dagger}$	$5.10\pm 0.49^{\Delta}$
	500	$5.61\pm 0.42$	$4.63\pm 0.40^{\dagger\dagger}$	$4.32\pm 0.32^{*,\dagger\dagger}$	$4.17\pm 0.28^{**}$

Twenty-seven mice models were divided into 6 groups. The two groups were set as untreated and normal saline (NS) control, respectively. The other four groups were separately treated with different doses of ETV or LAM. Different time points post-treatment (0, 5, and 10 d), HBV DNA titers in sera of mice were detected. HBV DNA titer was shown means $\pm$ S.D ( $\lg(\text{IU/mL})$ ). Data were analyzed using the independent-sample T test for comparison of different groups at the same time point or paired-sample T test for comparison of the same group at different time points. ETV, Entecavir; LAM, Lamivudine; NS, normal saline.

<sup>a</sup> indicated the time treated by drug whose unit was d.

\*  $P<0.05$ , compared with NS controls at the same time point, from day 0 to day 25.

\*\*  $P<0.01$ , compared with NS controls at the same time point, from day 0 to day 25.

$\dagger$   $P<0.05$ , compared with day 0 value in the same group, from day 0 to day 10.

$\dagger\dagger$   $P<0.01$ , compared with day 0 value in the same group, from day 0 to day 10.

$\Delta$   $P<0.05$ , compared with day 10 value in the same group, at the day 25.

$\Delta\Delta$   $P<0.01$ , compared with day 10 value in the same group, at the day 25.

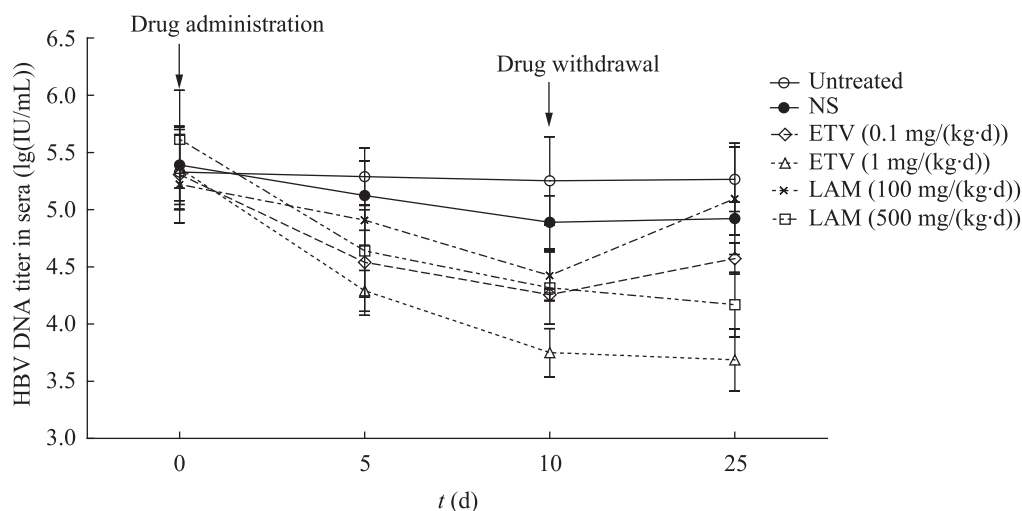


图3 rAAV8-1.3HBV介导的HBV持续感染小鼠模型血清中HBV DNA表达随时间的变化情况

Fig. 3 HBV DNA titer in sera of the HBV chronic infectious mice models mediated by rAAV8-1.3HBV at different time points. Mice models of HBV chronic infection were continuously treated by drugs day by day for 10 days. Then drugs were withdrew and lasted for fifteen days. At different time points in the process, HBV DNA titer in sera was tested.

相比, 下降至  $3.75 \pm 0.21$ , 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 停药第 15 天与给药第 10 天相比变化甚微, 为  $3.69 \pm 0.27$ 。

rAAV8-1.3HBV 介导的 HBV 持续感染小鼠模型成功建立后, 按照 LAM 高、低剂量分别给药 10 d 后停药 15 d, 尾静脉取血检测血清学 HBV DNA 变化情况, 结果如表 1 所示。相同时间点 LAM 低剂量组与生理盐水组对比分析, 发现给药 10 d 后相比于生理盐水组, LAM 低剂量组血清学 HBV DNA 表达水平也显著下降, 差异存在统计学意义 ( $P < 0.05$ )。而不同时间点 LAM 低剂量组组内对比分析, 给药 5 d 与 0 d 相比, 血清学 HBV DNA 表达水平 (lg (IU/mL)) 由  $5.22 \pm 0.17$  下降到  $4.91 \pm 0.22$ , 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 给药 10 d 与 0 d 相比, 下降到  $4.42 \pm 0.22$ , 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 停

药 15 d 后与给药第 10 天对比, HBV DNA 表达水平反弹, 上升到  $5.10 \pm 0.49$ , 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

同理, 相同时间点血清 HBV DNA 表达水平 LAM 高剂量组与生理盐水组对比分析 (表 1), 相比于生理盐水组, LAM 高剂量组给药 10 d 出现显著下降, 差异存在统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 停药 15 d 差异仍具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。不同时间点 LAM 高剂量组组内对比分析 (图 3), 给药 5 d 与 0 d 相比, 血清学 HBV DNA 表达水平 (lg (IU/mL)) 由  $5.61 \pm 0.42$  下降到  $4.63 \pm 0.40$ , 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 给药 10 d 与 0 d 相比, 下降至  $4.32 \pm 0.32$ , 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 停药第 15 天与给药第 10 天相比变化甚微, 为  $4.17 \pm 0.28$ 。此外, 实验全程中生理盐水组略有下降, 但各时间点均无统计学意义, 未



处理组血清学 HBV DNA 表达水平平稳, 无明显变化, 且相同时间点生理盐水组和未处理空白组间 HBV DNA 表达水平无统计学差异。

### 2.3 药物处理对小鼠血清中 HBeAg、HBsAg 水平的影响

检测 ETV 给药前后和停药前后血清中 HBeAg 表达水平, 即第 0 天、第 10 天、第 25 天时的 HBeAg 表达水平, 结果如图 4A 所示, 所有结果均为血清 40 倍稀释后的测定值。ETV 低剂量组

第 0 天时 HBeAg 表达水平为  $13.49 \pm 1.72$  S/CO, 给药 10 d 后为  $13.28 \pm 1.87$  S/CO, 停药 15 d 后为  $13.26 \pm 1.60$  S/CO, 实验全程中 HBeAg 表达无明显变化, 未见统计学差异。ETV 高剂量组第 0 天表达为  $12.44 \pm 1.93$  S/CO, 给药 10 d 为  $13.05 \pm 1.74$  S/CO, 停药 15 d 为  $12.55 \pm 1.64$  S/CO, 全程 HBeAg 表达无明显变化, 差异无统计学意义。同时, 空白对照组、生理盐水组全程血清 HBeAg 表达水平无明显变化, 差异无统计学意义。

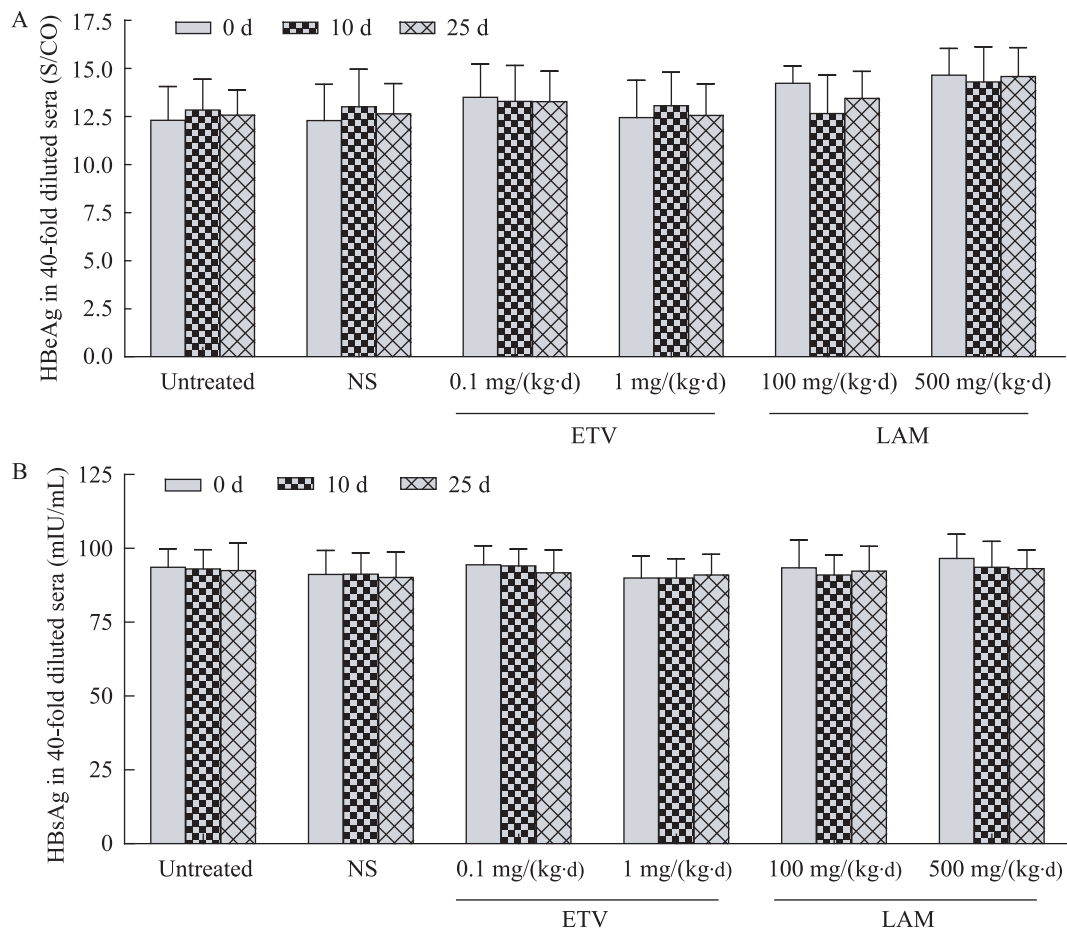


图 4 rAAV8-1.3HBV 介导的 HBV 持续感染小鼠模型血清中 HBeAg、HBsAg 表达随时间的变化情况

Fig. 4 HBeAg and HBsAg titer in the HBV chronic infectious mice models mediated by rAAV8-1.3HBV at different time points. (A) The HBeAg titer. (B) The HBsAg titer.



检测 ETV 给药前后血清中 HBsAg 表达水平, 即第 0 天、第 10 天、第 25 天时的 HBeAg 表达水平, 结果如图 4B 所示, 所有结果均为血清 40 倍稀释后的测定值。ETV 低剂量组第 0 天时 HBsAg 表达水平为  $94.43 \pm 6.48$  mIU/mL, 给药 10 d 为  $94.10 \pm 5.67$  mIU/mL, 停药 15 d 为  $91.76 \pm 7.71$  mIU/mL, 实验全程中 HBsAg 表达无明显变化, 差异无统计学意义。ETV 高剂量组第 0 天时 HBsAg 表达水平为  $90.02 \pm 7.42$  mIU/mL, 给药 10 d 为  $90.01 \pm 6.47$  mIU/mL, 停药 15 d 为  $91.01 \pm 6.94$  mIU/mL, 实验全程中 HBsAg 表达也无明显变化, 差异无统计学意义。空白对照组、生理盐水组全程血清 HBsAg 表达水平无明显变化, 差异无统计学意义。

检测 LAM 给药前后血清中 HBeAg 表达水平, 即第 0 天、第 10 天、第 25 天时的 HBeAg 表达水平, 结果如图 4A 所示, 所有结果均为血清 40 倍稀释后的测定值。LAM 低剂量组第 0 天时 HBeAg 表达为  $14.22 \pm 0.91$  S/CO, 给药 10 d 为  $12.65 \pm 2.00$  S/CO, 停药 15 d 为  $13.43 \pm 1.41$  S/CO, 实验全程 HBeAg 表达无明显变化, 差异无统计学意义。LAM 高剂量组在第 0 天时 HBeAg 表达为  $14.65 \pm 1.38$  S/CO, 给药 10 d 为  $14.29 \pm 1.82$  S/CO, 停药 15 d 为  $14.57 \pm 1.50$  S/CO, 实验全程 HBeAg 表达无明显变化, 差异无统计学意义。

检测 LAM 给药前后血清中 HBsAg 表达水平, 即第 0 天、第 10 天、第 25 天时的 HBeAg 表达水平, 结果如图 4B 所示, 所有结果均为血清 40 倍稀释后的测定值。LAM 低剂量组第 0 天时 HBsAg 表达为  $93.42 \pm 9.41$  mIU/mL, 给药 10 d 为  $90.99 \pm 6.77$  mIU/mL, 停药 15 d 为

$92.33 \pm 8.35$  mIU/mL, 实验全程 HBsAg 表达无明显变化, 差异无统计学意义。LAM 高剂量组第 0 天时 HBsAg 表达为  $96.61 \pm 8.23$  mIU/mL, 给药 10 d 为  $93.62 \pm 8.73$  mIU/mL, 停药 15 d 为  $93.16 \pm 6.30$  mIU/mL, 实验全程 HBsAg 表达也无明显变化, 差异无统计学意义。

### 3 讨论

小鼠由于缺乏 HBV 病毒进入及脱壳所需的特异性受体和某些因子, 无法直接应用感染性乙型肝炎病毒接种的方法制备模型<sup>[9]</sup>。现有小鼠模型是借助其他手段将 HBV 基因组导入到肝脏或者直接利用转基因方法制备的。近来本课题组用携带 1.3 拷贝 HBV 基因组的重组 8 型腺相关病毒 (rAAV8-1.3HBV) 成功在具有正常免疫力的 C57BL/6 小鼠体内建立了 HBV 持续感染模型, 该模型在小鼠肝细胞中自发回复形成染色体外环状闭合 HBV 基因组 DNA, 在血清中持续检测到 HBeAg 及 HBsAg 表达, 在肝脏及血清均持续检测到 HBV DNA。

本实验应用的 rAAV8-1.3HBV 介导的 HBV 持续感染小鼠模型与现有小鼠模型相比, 主要存在以下几个优点。与转基因小鼠相比, 该模型应用免疫功能正常的成体小鼠, 没有转基因小鼠在胚胎发育过程中对 HBV DNA 形成的免疫耐受过程<sup>[10-11]</sup>; 模型制备操作过程简单可控; 模型血清中 HBV DNA 水平一致性好, 各组组长标准差小; 初始建模病毒量高低、建模时间可控。更为重要的是以本研究所用的小鼠模型为基础, 可以很方便地获得 HBV 耐药突变株的动物模型。这有利于研究目前临床应用核苷类似物后出现的耐

药突变问题<sup>[12]</sup>, 为耐药株筛选抗 HBV 敏感的新药物。此外, 本模型与应用水动力方法建立的 HBV 小鼠模型<sup>[13-14]</sup>相比, 具有 HBV DNA 表达稳定, 水平集中, 时间长久, 成功率高等优点。

基于上述一系列优点, 对 rAAV8-1.3HBV 介导的 HBV 持续感染小鼠模型应用已上市最常用的两种核苷酸类似物 (ETV 和 LAM), 观察两药在该模型中的抗 HBV 作用效果。ETV 是鸟嘌呤核苷类似物, LAM 是胞嘧啶核苷类似物, 两种药物均通过形成三磷酸盐形式而表现活性<sup>[15-16]</sup>, 主要作用于病毒逆转录酶位点<sup>[17-18]</sup>。HBV 复制需要利用逆转录酶以病毒 pg RNA (Pregenomic RNA) 为模板逆转录生成负链 DNA (Minus-strand DNA), 然后合成 RC DNA (Relaxed circular DNA) 和 DSL DNA (Double-stranded linear DNA)<sup>[19]</sup>。这一步是核苷酸类似物药物阻断 HBV 复制、产生抗 HBV 效果的关键环节。本实验观察了用药前后模型小鼠血清 HBV DNA、HBeAg、HBsAg 的变化情况。

首先初步评估了 rAAV8-1.3HBV 介导的小鼠成模情况。在第 14 天、第 28 天进行血清学 HBeAg 及 HBsAg 定性检测。在 30 只小鼠中初步选择前后两次检测两项指标均为阳性的小鼠用于后续实验。同时, 由第 42 天小鼠血清 HBV DNA 表达水平 (lg (IU/mL)) 观察可见, 30 只小鼠中 27 只大于 5.0。本实验中, 我们将小鼠血清 HBV DNA 表达水平 (lg (IU/mL)) 大于 5.0 定为阳性模型筛选标准。在 30 只小鼠中进一步筛选出 27 只作为构建成功的小鼠模型。结合小鼠血清 HBeAg、HBsAg 两项指标表达情况分析, 被剔除的 3 只小鼠血清 HBeAg、HBsAg 的表达水

平, 明显低于其余 27 只小鼠血清 HBeAg 表达水平的平均值 (13.22±1.78 S/CO) 和 HBsAg 表达水平的平均值 (93.24±7.24 mIU/mL)。因此, 在 30 只小鼠中最终挑选出 27 只用于后续实验。本次实验, rAAV8-1.3HBV 介导的 HBV 持续感染小鼠模型通过尾静脉注射的方法构建成功, 成模率达 90%, 反映了该模型制备简单、成模率高的特点。

对已建立的 rAAV8-1.3HBV 介导的 HBV 持续感染小鼠模型应用核苷酸类似物后发现, ETV 及 LAM 两药高、低剂量组均对小鼠血清 HBV DNA 产生明显抑制效果。其中, 两种药物高剂量组对小鼠血清 HBV DNA 的抑制作用明显强于低剂量组。给药过程中随着给药时间延长, 所有给药组小鼠模型血清 HBV DNA 表达水平逐渐下降。给药停止前, 即给药 10 d 后, 所有给药组小鼠血清 HBV DNA 水平下降至给药全程最低值。整个实验过程中, 未处理组血清 HBV DNA 水平未观察到改变。而生理盐水组血清 HBV DNA 水平有所下降, 但差异无统计学意义, 这可能由反复灌胃刺激引起。此外, 无论给药 5 d 或 10 d 后 ETV 高、低剂量组对小鼠血清 HBV DNA 抑制效果均强于 LAM 高、低剂量组, 这一现象与两种药物在临床实际应用中的情况相符<sup>[20-21]</sup>。停药 15 d 与给药 10 d 相比, 两种药物低剂量组小鼠血清 HBV DNA 水平出现明显上升, 提示低剂量组出现停药反弹现象, 这也与临床情况吻合<sup>[22]</sup>。

与小鼠血清 HBV DNA 表达水平出现明显变化形成鲜明对比的是血清 ELISA 结果。无论高、低剂量给药组或生理盐水组、空白对照组, 小鼠血清 HBeAg、HBsAg 给药前后、停药前后表达

稳定, 未出现明显改变。这可能是因为核苷酸类似物药物作用于逆转录酶位点, 能够有效地抑制以 pg RNA 为模板的逆转录过程中 DNA 的合成, 降低新合成的 HBV DNA 产量。但核苷酸类似物不能够清除细胞中原有的 HBV DNA 量, 即转录时需要的模板, 也不能够抑制转录过程, 因此细胞中 HBeAg 和 HBsAg 表达过程可能不受核苷酸类似物影响, 用药前后表达水平未见明显变化。该模型中的这一现象, 也与转基因小鼠模型应用核苷酸类似物后, 血清学 HBV DNA 明显下降, HBeAg、HBsAg 无明显变化的现象相类似<sup>[23-26]</sup>。

对 rAAV8-1.3HBV 介导的 HBV 持续感染的小鼠模型应用核苷酸类似物后, 小鼠血清 HBV DNA 表达水平下降, 而血清 HBeAg、HBsAg 表达水平未见明显改变。该模型能够客观真实地反映现有核苷酸类似物的抗 HBV 效果, 同时具有制备简单、成模率高的特点, 可以作为新的抗 HBV 核苷酸类似物筛选评价模型进行进一步推广应用。

## REFERENCES

- [1] Jin Q. Medical Molecular Virology. Beijing: Science Press, 2001: 325-347 (in Chinese).  
金奇. 医学分子病毒学. 北京: 科学出版社, 2001: 325-347.
- [2] Zhuang H. Progress in epidemiology of hepatitis B virus. Chin J Front Med Sci, 2009, 1(2): 18-24 (in Chinese).  
庄辉. 乙型肝炎流行病学研究进展. 中国医学前沿杂志, 2009, 1(2): 18-24.
- [3] Zhao H, Si CW. Current study on epidemiology of viral hepatitis B in China. Chin J Front Med Sci, 2008, 1(2): 1-3 (in Chinese).  
赵鸿, 斯崇文. 中国乙型肝炎病毒感染的流行现状. 中国医学前沿杂志, 2008, 1(2): 1-3.
- [4] Ayoub WS, Keeffe EB. Review article: current antiviral therapy of chronic hepatitis B. Aliment Pharmacol Ther, 2011, 34(10): 1145-1158.
- [5] Fung J, Lai CL, Seto WK, et al. Nucleoside/nucleotide analogues in the treatment of chronic hepatitis B. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(12): 2715-2725.
- [6] Zoulim F. Hepatitis B virus resistance to antiviral drugs: where are we going? Liver Int, 2011, 31(Suppl 1): 111-116.
- [7] Dong XY, Yuchi J, Wang G, et al. Establishment of hepatitis B virus (HBV) chronic infection mouse model by *in vivo* transduction with a recombinant adeno-associated virus 8 carrying 1.3 copies of HBV genome(rAAV8-1.3HBV). Chin J Virol, 2010, 26(6): 425-431 (in Chinese).  
董小岩, 尉迟捷, 王刚, 等. 高嗜肝性 8 型重组腺相关病毒体内转导法制备乙型肝炎病毒持续感染小鼠模型. 病毒学报, 2010, 26(6): 425-431.
- [8] Wu XB, Dong XY, Wu ZJ, et al. A novel method for purification of recombinant adeno-associated virus vectors on a large scale. Chin Sci Bull, 2001, 46(6): 485-489.
- [9] Li P, Yu YZ. The mouse model of HBV infection. Inter J Epidemiol Infect Dis, 2006, 33(6): 392-395 (in Chinese).  
李平, 于益芝. 乙型肝炎病毒感染的小鼠模型. 国际流行病学传染病学杂志, 2006, 33(6): 392-395.
- [10] Takashima H, Araki K, Miyazaki J, et al. Characterization of T-cell tolerance to hepatitis B virus (HBV) antigen in transgenic mice. Immunology, 1992, 75(3): 398-405.
- [11] Akbar SK, Onji M. Hepatitis B virus (HBV)-transgenic mice as an investigative tool to study immunopathology during HBV infection. Int J Exp Pathol, 1998, 79(5): 279-291.
- [12] Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, et al. Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. Hepatology, 2007, 46(1): 254-265.
- [13] Yang PL, Althage A, Chung J, et al. Hydrodynamic

- injection of viral DNA: a mouse model of acute hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(21): 13825–13830.
- [14] Huang LR, Wu HL, Chen PJ, et al. An immunocompetent mouse model for the tolerance of human chronic hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(47): 17862–17867.
- [15] Yamanaka G, Wilson T, Innaimo S, et al. Metabolic studies on BMS-200475, a new antiviral compound active against hepatitis B virus. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(1): 190–193.
- [16] Lai CL, Yuen MF. Profound suppression of hepatitis B virus replication with lamivudine. *J Med Virol*, 2000, 61(3): 367–373.
- [17] Seifer M, Hamatake RK, Colonno RJ, et al. *In vitro* inhibition of hepadnavirus polymerases by the triphosphates of BMS-200475 and lobucavir. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42(12): 3200–3208.
- [18] Doong SL, Tsai CH, Schinazi RF, et al. Inhibition of the replication of hepatitis B virus *in vitro* by 2', 3'-dideoxy-3'-thiacytidine and related analogues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(19): 8495–8499.
- [19] Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al. *Fields virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publisher, 1996: 2703–2737.
- [20] Lai CL, Rosmawati M, Lao J, et al. Entecavir is superior to lamivudine in reducing hepatitis B virus DNA in patients with chronic hepatitis B infection. *Gastroenterology*, 2002, 123(6): 1831–1838.
- [21] Shepherd J, Gospodarevskaya E, Frampton G, et al. Entecavir for the treatment of chronic hepatitis B infection. *Health Technol Assess*, 2009, 13(Suppl. 3): 31–36.
- [22] Hong JH, Choi Y, Chun BK, et al. Current status of anti-HBV chemotherapy. *Arch Pharm Res*, 1998, 21(2): 89–105.
- [23] Nagahata T, Araki K, Yamamura K, et al. Inhibition of intrahepatic hepatitis B virus replication by antiviral drugs in a novel transgenic mouse model. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992, 36(9): 2042–2045.
- [24] Morrey JD, Bailey KW, Korba BE, et al. Utilization of transgenic mice replicating high levels of hepatitis B virus for antiviral evaluation of lamivudine. *Antiviral Res*, 1999, 42(2): 97–108.
- [25] Julander JG, Sidwell RW, Morrey JD. Characterizing antiviral activity of adefovir dipivoxil in transgenic mice expressing hepatitis B virus. *Antiviral Res*, 2002, 55(1): 27–40.
- [26] Julander JG, Colonno RJ, Sidwell RW, et al. Characterization of antiviral activity of entecavir in transgenic mice expressing hepatitis B virus. *Antiviral Res*, 2003, 59(3): 155–161.

(本文责编 陈宏宇)