

## 乙型肝炎病毒感染小鼠模型的建立<sup>\*</sup>

孟忠吉<sup>1,2</sup>, 李磊<sup>1</sup>, 李新宇<sup>1,2</sup>, 张正茂<sup>1</sup>, 张振华<sup>1</sup>, 田拥军<sup>1</sup>,  
王宝菊<sup>1</sup>, 张珺<sup>1</sup>, 雷延昌<sup>1</sup>, 杨东亮<sup>1\*\*</sup>

(1 华中科技大学同济医学院附属同济医院临床免疫研究室 感染病学教研室, 湖北武汉, 430030; 2 鄂阳医学院附属太和医院  
感染科, 湖北十堰, 442000)

### Development of a Mouse Model for Acute Hepatitis B Virus Infection

MENG Zhong-ji<sup>1,2</sup>, LI Lei<sup>1</sup>, LI Xin-yu<sup>1,2</sup>, ZHANG Zheng-mao<sup>1</sup>, ZHANG Zhen-hua<sup>1</sup>, TIAN Yong-jun<sup>1</sup>,  
WANG Bao-ju<sup>1</sup>, ZHANG Jun<sup>1</sup>, LEI Yan-chang<sup>1</sup>, YANG Dong-liang<sup>1\*\*</sup>

(1. Division of Clinical Immunology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030 China; 2. Taihe Hospital of Yunyang Medical Collage, Shiyuan 442000, China)

**Abstract:** Using hydrodynamic injection, pUC18-HBV1.3 containing a replication-competent, HBV1.3 supergenomic DNA, was injected into BALB/cJ mice through tail vein. HBV viremia was measured by real-time PCR. Serum concentrations of HBsAg were detected by sandwich ELISA. HBeAg was detected and quantified by RIA using HBeAg standards to generate. Antibodies specific for HBsAg, and HBeAg were assayed by endpoint titration ELISA. HBV core protein expressed in the liver was visualized by immunohistochemical staining. Viral RNA and replicative DNA intermediates in liver were detected by Northern and Southern blot analyses, respectively. Hydrodynamic injection of pUC18-HBV1.3 lead to viral gene expression and replication *in vivo*. The immune response to HBV, which was comparable with the characteristic response during acute HBV infection in man, was elicited in mice. A mouse model of acute hepatitis B virus infection can be developed by transfection of hepatocytes *in vivo*.

**Key words:** Hepatitis B virus, (HBV); Animal model; Hydrodynamic injection

**摘要:**采用高压水注射方法,通过尾静脉将具有复制能力的HBV质粒导入BALB/cJ小鼠体内,应用real-time PCR、ELISA、RIA、Southern Blot、Northern Blot,以及免疫组化等方法,检测小鼠病毒血症、血清和肝组织中HBV抗原表达动态变化、肝组织中HBV转录和复制情况,以及小鼠免疫应答状况。结果HBV基因可以在小鼠体内表达和复制,并诱导小鼠产生特异性免疫应答,其应答模式及HBV清除过程与人类的HBV急性感染类似。实验显示高压注射具有复制能力的HBV质粒可以在小鼠体内建立HBV急性感染模型,这种模型可以用于HBV病毒学、免疫学以及抗病毒药物筛选等方面的研究。

**关键词:**乙型肝炎病毒;动物模型;高压水注射

中图分类号:R373.2

文献标识码:A

文章编号:1003-5125(2005)06-0565-05

乙型肝炎仍然是人类一大健康问题,目前全球有将近4亿人为乙型肝炎病毒(HBV)持续感染,每年因肝功能衰竭和HBV相关肝癌死亡的病例超过100万<sup>[1]</sup>,严重威胁人类的健康,迄今仍缺乏特效的

治疗措施,缺乏合适的动物模型是其主要原因之一。有关HBV生活周期的资料目前主要来源于鸭乙肝模型<sup>[2]</sup>、土拨鼠乙肝模型<sup>[3]</sup>,以及HBV感染黑猩猩<sup>[4]</sup>和HBV转基因小鼠<sup>[5]</sup>。但是鸭乙肝病毒(DHBV)

\* 收稿日期:2005-04-25,修回日期:2005-05-18

\* 基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(973计划)(No.2001CB510008)

作者简介:孟忠吉(1970-),男,副主任医师,博士,现在鄂阳医学院附属太和医院感染科工作 研究方向为病毒感染与免疫。

\*\* 通讯作者:杨东亮(1955-),男,教授,博士,研究方向为病毒感染与免疫。

Corresponding author. Tel:027-83662891, E-mail: dlyang@tjh.tjmu.edu.cn

<sup>6</sup> 和土拨鼠乙肝病毒(WHV)<sup>7</sup>基因组有别于人类HBV,而且由于鸭和土拨鼠尚未建立纯系动物,使得感染免疫学研究难以进行;黑猩猩由于稀少而昂贵,限制了其作为HBV感染模型的广泛应用;而HBV转基因鼠对病毒耐受,极大的限制了它的应用潜能。最近研究表明,通过尾静脉短时间内高容量注射(高压水注射)的方法,可以使基因在小鼠肝脏有效表达<sup>8</sup>。注射具有复制能力的HBV质粒可以建立HBV急性感染模型<sup>9</sup>。本研究通过注射pUC18-HBV1.3质粒,在小鼠成功建立了HBV急性感染。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

pUC18-HBV1.3质粒是在pUC18的BamH I和Hind III位点中插入1.3拷贝加长HBV(A基因型)DNA重组质粒,由本室构建。SYBR Green I购自上海开放科技发展有限公司。TRIzol试剂为GIBCO公司产品;DEPC、PIPES、Bis-Tris为AMERESCO公司产品;蛋白酶K、DMSO(HPLC级)为德国MERCK公司产品;去离子乙二醛为Sigma公司产品;复方氯化钠溶液为双鹤药业公司产品;32P-dCTP购自北京福瑞公司。质粒提取试剂盒、DNase I为TAKARA公司产品;ELISA试剂盒为上海科华公司产品;HBeAg RIA试剂盒购自北京北方生物技术研究所;GeneScreen Plus尼龙膜为NEN公司产品;探针标记试剂盒Prime- $\alpha$ -Gene Labeling System为美国Promega公司产品;X-ray胶片为柯达公司产品。抗体:一抗:兔抗HBc多克隆抗体由Roggendorf教授馈赠,二抗:猪抗兔及兔PAP为DAKO公司产品。BALB/cJ小鼠购自湖北省卫生防疫站。

### 1.2 动物实验

6-8周龄雌性BALB/cJ小鼠,体重14-18g。按时间点分组,每组至少3只,采用高压水注射方法,每只动物给予15 $\mu$ g pHBV1.3质粒,加入总体积为0.1mL/g(体重)的复方氯化钠溶液,57s内通过尾静脉注入小鼠体内。注射后第1、2、3、4、7、10、15、20d眼眶采血,分离血清以备血清学检测。注射后第1、4、7、10、15、20d处死取肝脏,部分肝组织福尔马林固定以备免疫组化检测,其余肝组织液氮冻存。

小鼠血清内氨酸氨基转移酶(sALT)活性分析采用自动生化分析仪检测。

### 1.3 血清HBV DNA定量检测

80 $\mu$ L血清加10 $\mu$ L10×DNase I缓冲液和

10 $\mu$ L DNase I(5U/ $\mu$ L),混匀后于37℃消化16h,然后等体积酚/氯仿:乙醇抽提病毒颗粒相关HBV DNA,溶于40 $\mu$ L TE。定量PCR采用引物:CP2:5'-CCTCCAAAGCTGTGCCTTGG-3';few3a:5'-TCTCGACGCCGGCATTTGAGA-3';循环参数:(1)1 cycle: 95℃ 60s;(2)40 cycles: 95℃ 10s, 55℃ 10s, 72℃ 15s;(3)1 cycle: 72℃ 10min。

### 1.4 血清学检测

血清HBsAg的检测采用科华公司的ELISA试剂盒,操作按说明书进行。血清HBeAg的检测采用RIA法,操作按说明书进行。血清HBsAb、HBcAb的检测采用科华公司的ELISA包被板,小鼠血清分别以1:25、1:100、1:400、1:1600、1:6400、1:25600、1:102400稀释后加入ELISA包被板,37℃45min,5min×5次洗板,加AP标记的兔抗小鼠Ig(1:200)37℃孵育1h,5min×5次洗板,加显色剂A和B各50 $\mu$ L,37℃10min,终止显色。读取A<sub>450</sub>值。以样本A<sub>450</sub>/阴性对照A<sub>450</sub>(S/N)>2.1为cut off值。

### 1.5 小鼠肝脏组织学检查

小鼠肝组织中性福尔马林固定,常规石蜡包埋,4 $\mu$ m切片,常规HE染色,光镜下观察组织病理改变。

### 1.6 免疫组织化学检测

小鼠肝组织中性福尔马林固定,常规石蜡包埋,4 $\mu$ m切片。切片脱蜡至水,微波处理修复抗原,3%过氧化氢消除内源性过氧化物酶活性,正常二抗同源血清封闭后,依次加入一抗、二抗及辣根过氧化物酶-抗辣根过氧化物酶(PAP)孵育,二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,常规脱水、透明封片,光镜下观察HBeAg的表达。对照标本:HBV阳性HCC肝组织、注射复方氯化钠溶液小鼠和正常小鼠肝组织标本分别作为阳性/阴性对照。

### 1.7 Northern Blot分析

肝组织总RNA的提取采用TRIzol试剂,操作按说明书进行。30 $\mu$ g的总RNA以1.2%的乙二醛变性琼脂糖凝胶分离,然后于转移缓冲液中(0.01mol/L NaOH-3mol/L NaCl)转印到GeneScreen Plus尼龙膜上,与<sup>32</sup>P标记的HBV全长探针杂交,X-ray胶片-70℃自显影。

### 1.8 Southern Blot分析

肝组织总DNA的提取参照分子克隆操作指南<sup>10</sup>。20 $\mu$ g的总DNA以1.0%的琼脂糖凝胶分离,然后于转移缓冲液(0.5mol/L NaOH/1.5mol/L NaCl)中转印到GeneScreenPlus尼龙膜上,与<sup>32</sup>P标记的HBV全长探针杂交,X-ray胶片-70℃自显影。

## 2 结果

### 2.1 实验小鼠体内 HBV 基因复制和表达

注射后第 1、4、7d, 分别在一只小鼠肝脏提取物中检测到 HBV 复制中间体 (Core 相关 HBVDNA), 同时可检测到质粒 DNA, 其中一只动物肝组织提取物中检测到 HBV RNA 转录物 (图 1)。

### 2.2 血清丙氨酸氨基转移酶(sALT)水平

注射后第 1d, 小鼠血清 ALT 显著升高, 达到  $688 \pm 141$  U/L (正常值  $< 35$  U/L), 至第 4d 迅速下降至  $81 \pm 40$  U/L, 注射后第 7d 恢复至正常水平, 但是在第 10d 至第 15d 又出现低水平波动 ( $48 \pm 8$  U/L), 20d 以后恢复正常。

### 2.3 小鼠肝组织病理变化

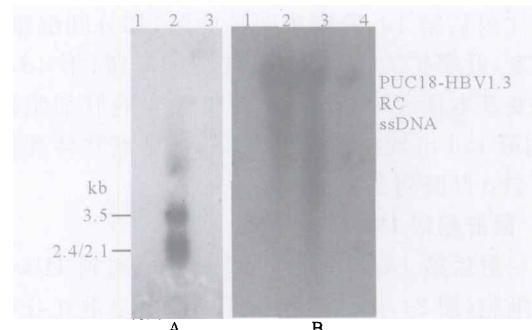


图 1 小鼠肝脏 HBV 基因的表达和复制

Fig. 1 HBV gene expression and replication in liver of mice injected with HBV plasmid

A: HBV transcripts detected by Northern blot analysis; 1, No RNA loaded blank; 2, Mouse No. 78 of day 1; 3, Mouse No. 24 of day 4. B: HBV replicative intermediates detected by Southern blot analysis. 1, No DNA loaded blank; 2, Mouse No. 78 of day 1; 3, mouse No. 24 of day 4; 4, mouse No. 47 of day 7.

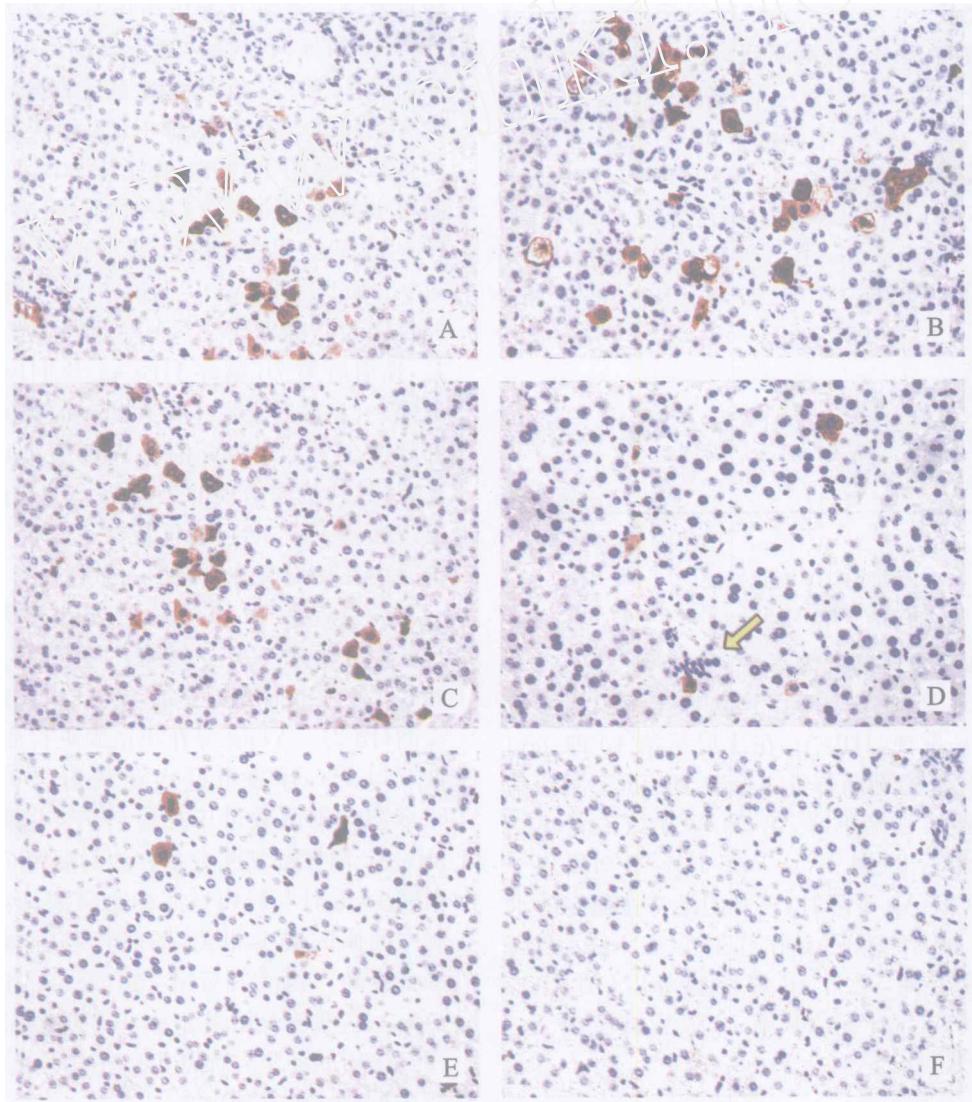


图 2 注射 HBV 质粒小鼠肝组织 HBcAg 表达

Fig. 2 HBcAg expression in the liver of mice injected with HBV plasmid  
A, day 1; B, day 4; C, day 7; D, day 10; E, day 15; F, day 20.

注射后第 1d, 肝细胞明显肿胀, 部分肝细胞嗜酸性变, 肝窦扩大, 窦内大量红细胞滞留; 第 4d, 前述病变基本恢复, 仅见少量嗜酸性变的肝细胞; 第 7d 到第 15d 出现淋巴细胞浸润, 可见点状坏死灶; 至第 20d 肝脏病变完全恢复。

#### 2.4 鼠肝组织 HBcAg 表达

注射后第 1d, 小鼠肝组织便可检测到 HBcAg 阳性细胞(图 2), 阳性细胞在肝组织内呈散在分布, 但有在小叶中央静脉周围聚集的趋势, 阳性物质呈均质细颗粒状胞浆型和/或核型分布。肝组织 HBcAg 表达水平在注射后第 1d 达到峰值(约 5%), 并维持在较高水平持续到注射后第 7d, 此后 HBcAg 阳性细胞略有减少, 而与此同时出现炎症细胞浸润; 随着浸润炎症细胞数量的增加, HBcAg 阳性细胞逐渐减少, 到注射后第 20d 消失。

#### 2.5 病毒血症

病毒血症在第 1d 检测不到, 第 4d 达到  $4.86 \times 10^6 \pm 6.13 \times 10^5$  copies/mL, 而在第 7d 达到峰值( $4.97 \times 10^7 \pm 2.08 \times 10^7$  copies/mL), 随后病毒滴度呈指数下降至注射后第 10d 的  $1.82 \times 10^5 \pm 1.9 \times 10^5$  copies/mL。第 15d 病毒滴度降至  $4.24 \times 10^4 \pm 2.62 \times 10^4$  copies/mL, 在注射后 20d 小鼠血清病毒滴度仍维持在  $2.65 \times 10^4 \pm 1.58 \times 10^4$  copies/mL(图 3)。

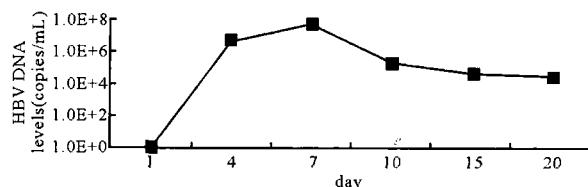


图 3 HBV 病毒血症

Fig. 3 HBV viremia.

#### 2.6 抗原血症和血清抗体水平

注射 pUC18-HBV1.3 质粒动物连续监测血清病毒抗原水平发现, HBsAg 在注射后第 1d 即达到  $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ , 第 2d 达到高峰  $6 \mu\text{g}/\text{mL}$ , 第 3d 又回到第 1d 的水平, 然后逐渐下降, 第 7d 仅为  $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ , 至第 10d 检测不出(图 4A)。anti-HBs 最初出现于第 5d, 正值 HBsAg 下降时, 一月内维持在稳定的水平(图 4A)。血清 HBeAg 在注射后第 1d 达到高峰, 然后迅速下降, 至第 7d 即检测不出(图 4B)。anti-HBc 最初出现于第 3d, 第 7d 以后维持在  $10^{-3}$  到  $10^{-4}$  水平(图 4B)。

### 3 讨论

HBV 转基因小鼠研究显示, 小鼠在 1.3 倍加长

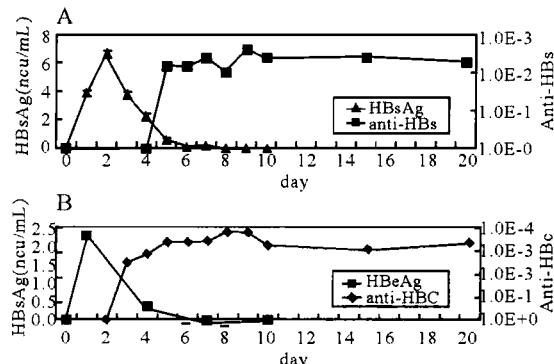


图 4 小鼠血清 HBV 抗原抗体水平动态变化

Fig. 4 Disappearance of HBV serum antigens coincides with the induction of an HBV-specific antibody response.

HBV 转基因模板存在下, 体内可以出现高水平病毒复制。本研究采用高压水注射方法, 将  $1.3 \times 10^6$  HBV 质粒导入免疫功能正常的 BALB/cJ 小鼠, 在注射后 24 小时内, 质粒到达肝细胞, 并在这些细胞内大量转录(图 1), 病毒 RNA 很快翻译成蛋白质, 产生高水平的 HBsAg 血症及 HBeAg 血症(图 4), 同时出现病毒血症。注射后 24 小时, 肝组织内 HBcAg 表达阳性细胞达到 5%(图 2)。在第 2d 到第 4d, 循环 HBsAg 及 HBeAg 水平下降(图 4), 可能是因为肝脏 HBVRNA 降低的反应。值得注意的是, 注射后第 7d 循环 HBsAg 及 HBeAg 水平急剧下降, 恰在此时血清中出现相应的抗体, 表明宿主已开始产生针对 HBV 的特异性免疫应答。有趣的是, 特异性抗体出现的顺序与人类自然感染后抗体出现顺序完全一致, 可能反映了人和小鼠针对这些抗原内在免疫应答机制的一致性。

注射后第 4d 小鼠脾脏开始增大, 第 7d 到第 10d 最明显, 然后开始回缩, 注射后第 20d 恢复到原始大小。在抗体出现的同时, 肝组织出现淋巴细胞浸润(图 2)。Yang 等在小鼠脾脏检测到 HBV 特异性 CTLs<sup>[9]</sup>, 标志着肝内免疫应答的开始。CD3/CD8 阳性细胞数量于注射后第 4d 即开始增加, 而 HBcAg 阳性肝细胞数量在注射后第 7d 到第 10d 急剧减少, 并且与肝内炎症细胞浸润、病毒 RNA 和复制中间体的减少相关, 同时伴随轻微的血清 ALT 水平升高。到注射后第 20d, 肝脏的病毒标志全部消失。这些实验结果显示, HBV 感染后宿主和病毒相互作用的各个方面都可以在这种免疫背景清楚的纯系小动物中复制出来。

这一模型为 HBV 的研究提供了一种新的途径, 特别是 HBV 病毒学和免疫学的详细研究, 只要

构建各种已知的 HBV 变异基因组,就可以在免疫幼稚的或正常的小鼠体内,也可以在现有的多种转基因小鼠体内研究其生物学特性。既可以在不同遗传背景的小鼠体内研究抗 HBV 感染应答中 CTL 应答的重要性以及各种先天免疫应答的功能意义;也可以注射突变病毒基因研究 HBV 基因调控和复制;而且这种模型可以用于研究定向进化实验,应用随机突变建立 HBV 突变库,然后在体内进行选择以确定调节元件和结构元件,抑或鉴定哪些突变株出现功能改变。这种方法也可能有助于建立新的模型系统,HBV S 基因突变的病毒可能会产生一种适于小鼠体内寄生的新的病毒基因。此外,这种模型对于抗病毒药物筛选研究也非常有益,具有周期短、经济、方便等优点。已有报道 siRNA 在这种模型中可以有效的抑制 HBV 基因表达及复制<sup>[11~14]</sup>。同时,高压水注射小鼠模型不仅适用于 HBV 研究,也适用于研究其他肝脏特异性病原<sup>[15]</sup>。这种模型还可以用于研究病毒的组织嗜性,这对具有肝内复制潜能的新发现病毒的研究特别有益。

当然这种模型还不是十分成熟,目前能够完善建立该模型的研究机构还很少。本实验未能在一些动物肝脏检测到病毒复制中间体和 HBVRNA,可能因为:(1)这种模型中 HBV 的复制和表达水平不高,以致我们只能在个别高表达的动物肝脏检测到;(2)Southern 和 Northern blot 检测灵敏度有限。我们正在改进实验方法,力求使高压注射小鼠 HBV 急性感染模型能成为 HBV 研究有力的工具。

## 参考文献

- [1] Seeger C, Mason W S. Hepatitis B virus biology[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, 64(1):51-68.
- [2] Mason W S, Seal G &, Summers J. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus [J]. J Virol, 1980, 36(3): 829- 836.
- [3] Summers J, Smolec J M, Snyder R A. virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1978, 75(9):4533-4537.
- [4] Barker I F, Chisari F V, McGrath P P, et al. Transmission of type B viral hepatitis to chimpanzees[J]. J Infect Dis, 1973, 127(6):648-662.
- [5] Chisari F V. Hepatitis B virus transgenic mice: models of viral immunobiology and pathogenesis[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 1996, 206:149-173.
- [6] Mandart E, Kay A, Galibert F. Nucleotide sequence of a cloned duck hepatitis B virus genome: comparison with woodchuck and human hepatitis B virus sequences[J]. J Virol, 1984, 49(3):782-792.
- [7] Di Q, Summers J, Burch J B, et al. Major differences between WHV and HBV in the regulation of transcription[J]. Virology, 1997, 229(1):25-35.
- [8] Zhang G, Budker V, Wolff J A. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA[J]. Hum Gene Ther, 1999, 10(10):1735-1737.
- [9] Yang P L, Althage A, Chung J, et al. Hydrodynamic injection of viral DNA: a mouse model of acute hepatitis B virus infection[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(21):13825-13830.
- [10] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M], 第二版. 北京: 科学出版社, 1996, 16-66.
- [11] McCaffrey A P, Nakai H, Pandey K, et al. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference[J]. Nat Biotechnol, 2003, 21(6):639-644.
- [12] Giladi H, Ketzinel-Gilad M, Rivkin L, et al. Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice[J]. Mol Ther, 2003, 8(5):769-776.
- [13] Klein C, Bock C T, Wedemeyer H, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication in vivo by nucleoside analogues and siRNA[J]. Gastroenterology, 2003, 125(1):9-18.
- [14] Wu H L, Huang L R, Huang C C, et al. RNA interference-mediated control of hepatitis B virus and emergence of resistant mutant[J]. Gastroenterology, 2005, 128(3):708-716.
- [15] Chang J, Sigal L J, Lerro A, et al. Replication of the human hepatitis delta virus genome is initiated in mouse hepatocytes following intravenous injection of naked DNA or RNA sequences[J]. J Virol, 2001, 75(7):3469-3473.