

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.05.005

乙型肝炎病毒感染 Babl/c 乳鼠动物模型的研究 *

蔡启茵^{1,2} 任广立^{1△} 张卫云¹ 马恒灏¹ 黄定鹏¹

(1 广州军区广州总医院儿科 广东 广州 510010; 2 广州中医药大学 广东 广州 510405)

摘要 目的:目前 HBV 感染动物模型各有局限,无法全面研究 HBV。拟建立人 HBV 血清感染 Babl/c 乳鼠的动物模型,以便于研究 HBV 感染与乳鼠免疫力低下下的相关性。**方法:**将 20 只 Babl/c 乳鼠随机分为实验组、对照组、PBS 组及空白组,通过高压水动力尾静脉注射法将人 HBV 血清、正常人血清、PBS 注入各组乳鼠体内,记录接种后乳鼠体温及体质量。于接种后第 7、15、30 d 采集血清标本,应用 ELISA 检测 HBsAg、HBeAg 的表达情况,实时荧光定量 PCR 检测 HBV DNA 浓度。**结果:**接种后各组小鼠体温及体质量均无明显变化。实验组中共 4 只乳鼠可检测到 HBsAg 为阳性且维持时间长达 30 d,但 HBeAg 均为阴性,HBV DNA 浓度均未达 500 IU/ml;余下各组检测 HBsAg、HBeAg 均为阴性。**结论:**通过高压水动力尾静脉注射法接种人 HBV 血清,可成功使 Babl/c 乳鼠感染 HBV。本实验证实乳鼠免疫力低下,HBV 血清进入体内未能有效清除,对 HBV 存在易感性,为建立 HBV 感染动物模型提供实验依据,可用于研究 HBV 对免疫状态的影响。

关键词:乙型肝炎;乙型肝炎病毒;Babl/c 乳鼠

中图分类号:Q95-3;R512.6+2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)05-815-03

Establishment of Babl/c Mouse Model by Infecting Hepatitis B Virus Serum*

CAI Qi-yin^{1,2}, REN Guang-li^{1△}, ZHANG Wei-yun¹, MA Heng-hao¹, HUANG Ding-peng¹

(1 Department of Pediatric, the General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou, Guangdong, 510010, China;

2 Guangzhou university of Chinese medicine, Guangzhou, Guangdong, 510405, China)

ABSTRACT Objective: Nowadays the hepatitis B virus (HBV) animal models have their own limitations, therefore, HBV infection cannot be studied comprehensively. To establish the HBV bloodborne transmission mouse model will be helpful to the study of the correlation between HBV infection and the immunodeficiency of suckling mice. **Methods:** Twenty Babl/c suckling mice were divided into four groups. Each group was injected with the HBV patient serum, health human serum, PBS and nothing, respectively. The temperature and weight of the mice were recorded and mice serum was collected at 7 d, 15 d and 30 d after injection. The enzyme linked immune sorbent assay (ELISA) was carried out to analyze the levels of HBsAg and HBeAg. Meanwhile, the real time, fluorescence, and quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) were used to detect the HBV DNA copy in mice serum. **Results:** The injected mice had the similar body temperature before. There were no differences with each group's body weight. Four mice of HBV injected group were found with positive HBsAg, and lasted for 30 days. However, all of them were found with negative HBeAg. The HBV DNA was considered as negative because the DNA titer is lower than 500 IU/mL. **Conclusions:** The suckling mice of Babl/c can infect HBV by hydrodynamic injection of HBV patients' serum. This study suggests that the Babl/c suckling mouse is susceptibility to HBV due to the immunodeficiency and disability of eliminating the virus effectively. Our study not only provides the experimental basis for establishing animal model of HBV infection, but also can be used in the studies of the effect of HBV on immune status.

Key words: Hepatitis B; Hepatitis B virus; Babl/c suckling mice

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R512.6+2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)05-815-03

前言

乙型肝炎是危及全人类健康的疾病,可通过血液传播、医源性传播、母婴传播及性传播,续发为肝纤维化、肝硬化、肝衰竭,甚至肝细胞癌。全球估计约 20 亿人曾感染 HBV,其中约 4 亿人为慢性乙型肝炎感染者^[1,2]。干扰素 α 、核苷类似物是目前主

要的抗病毒药物,在一定程度上抑制病毒复制,减轻肝细胞炎症、坏死程度,然而不能彻底清除体内共价闭环 DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA),从而无法根治慢性乙型肝炎^[3-7]。因此对如何彻底清除体内 HBV 的研究仍是当今的热点。目前,黑猩猩模型、鸭乙型肝炎模型、转基因小鼠模型、免疫缺陷小鼠模型、树鼯模型是研究 HBV 现有的动物模型,由于各自的

* 基金项目:广州市科技计划项目基金项目(2013J4100116)

作者简介:蔡启茵(1988-),女,硕士研究生,研究方向:儿科病毒感染性疾病研究,电话:020-88653521, E-mail: jou19@163.com

△通讯作者:任广立(1973-),硕士生导师,副主任医师, E-mail: guanglire@hotmai.com

(收稿日期:2014-06-23 接受日期:2014-07-18)

局限性,尚未能全面地研究 HBV^[9]。Wang et al.研究发现将人 HBV 血清经高压水动力尾静脉注入大鼠体内,成功建立 HBV 感染动物模型^[9]。故本文研究通过将人 HBV 血清接种于乳鼠体内,观察其对 HBV 的感染力及体内复制能力,以求建立稳定、方便、新型的 HBV 感染动物模型。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

乙型肝炎病毒表面抗原诊断试剂盒、乙型肝炎病毒 e 抗原诊断试剂盒购自深圳华康生物医学有限公司,乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒购自上海科华生物工程股份有限公司,荧光定量 PCR 仪购自中国测试技术研究所广州分院。

1.2 实验动物

实验用 Balb/c 乳鼠 20 只,13 日龄,体质量 10-15 g,SPF 级购自广东省动物实验中心,购回后饲养于广州军区广州总医动物实验中心,恒温、恒湿条件下自由摄取食水,饲养 3 d 后开始实验。

1.3 实验血清

实验组所用 HBV 感染者血清来自医院临床患者,均符合 HBsAg、HBeAg 阳性,HBV DNA 浓度大于 10^5 copies/mL。血清采集均为患者静脉血经无菌管收集,室温放置 2 h,离心分离得到血清,荧光定量 PCR 测定血清 HBV DNA 浓度,保存于 -80℃ 冰箱。

1.4 HBV 接种及血清样品采集

凡涉及动物的实验均严格遵循动物保护法进行。接种前 3 d,经眼内眦静脉采血应用 ELISA 检测 HBsAg、HBeAg,以排除自发感染。20 只乳鼠随机分为 4 组,接种 HBV 血清组为实验组,共 8 只;接种正常人血清组为对照组,共 4 只;接种 PBS 组为 PBS 组,共 4 只;无处理组为空白组,共 4 只。取 HBV 感染者血清 5 支复融混匀,实时荧光定量 PCR 测得 HBV DNA 浓

度为 3.05×10^6 copies/mL。采用高压水动力尾静脉注射法将血清按小鼠体质量(g)的 0.8 % 注入,以 PBS 稀释(约 0.5 mL),采用最小注射针头,10-15 s 注射完成^[10,11]。分别于注射后 7、15、30 d,经眼内眦静脉采血,每次采血约为 0.5 mL,3000 rpm 离心 5 min,收集上层血清,所得血清用于检测 HBsAg、HBeAg 及 HBV DNA 浓度。

1.5 小鼠体温及体重变化

每隔 3 d 称体质量一次,注射前及注射后 1 min 测小鼠体温。

1.6 ELISA 检测 HBsAg、HBeAg

按试剂说明书操作。

1.7 实时荧光定量 PCR 检测 HBV DNA 浓度

按试剂说明书操作。

2 结果

2.1 所有实验动物均无自发感染

接种前 3 d,采集 20 只乳鼠血清行 ELISA 检测 HBsAg、HBeAg 均为阴性,说明实验动物无自发 HBV 感染。

2.2 接种后各组小鼠体温及体质量均无明显变化

各组小鼠注射前体温为 36.3℃-37.0℃,经高压水动力尾静脉注射后 1 min,测体温均为 36.5℃-37.3℃,故注射前后体温无明显变化。注射后实验组与其余各组体质量称量均无明显差异。

2.3 Balb/c 乳鼠可感染 HBV

注射后于不同时间点采集小鼠血清行 ELISA 检测 HBsAg、HBeAg,实时荧光定量 PCR 检测 HBV DNA 浓度。实验组在 7、15、30 d 检测到 HBsAg 阳性共 4 只(见表 1),HBeAg 均为阴性,HBV DNA 均低于 500 copies/mL。对照组、PBS 组及空白组在各个时间点检测 HBsAg、HBeAg 均为阴性。

表 1 ELISA 检测各样本 HBsAg 的 OD 值

Table 1 Expression of HBsAg in each group by ELISA test

Group	Number	7 days after injection	15 days after injection	30 days after injection
Test group	1	0.521	0.411	0.330
	2	0.412	0.321	0.220
	3	0.026	0.023	0.031
	4	0.051	0.051	0.045
	5	0.602	0.633	0.599
	6	0.042	0.032	0.039
	7	0.908	0.879	0.343
	8	0.053	0.032	0.034
Control group	9	0.023	0.034	0.065
PBS group	10	0.034	0.034	0.033
Blank group	11	0.042	0.042	0.042

*注:当 OD 值 >0.5 时,HBsAg 为阳性。

*Note: when the OD value >0.5, HBsAg is positive.

3 讨论

目前,HBV 的动物模型主要为转基因小鼠模型、鸭乙型肝炎模型、树鼩动物模型及黑猩猩模型。HBV 转基因小鼠广泛用于药物研究及基因治疗对 HBV 的复制干扰^[12,13],甚至可用于研究 cccDNA 的清除^[14],然而其费用高,可重复性一般,且对于 HBV 生命周期研究尚未清楚^[15];鸭乙型肝炎模型主要针对的是禽类嗜肝病毒,与人 HBV 在结构上有较大差别,不能很好再现人 HBV 感染过程^[16];树鼩是近年来发现可以感染 HBV 的小型哺乳动物,现研究已成功通过接种感染者血清感染,使其体内复制 HBV,但所用于研究的树鼩多为野生型,存在遗传背景不清楚、培养困难、表达 HBV 时间短及不稳定等缺点^[17,18];黑猩猩是除人类外可感染 HBV 的灵长类动物,由于其价格昂贵、存在伦理问题,难以推广^[19,20]。与上述动物模型相比,Balb/c 乳鼠遗传背景清楚,容易获得,不存在伦理问题,是较佳的动物模型。同时人 HBV 血清含有丰富的 HBsAg、HBeAg,不必构建载体进行体内转染,减少转染过程中对动物所造成的不良反应。乳鼠通过水动力注射法接种人 HBV 血清,步骤简单,操作方便,有利于研究 HBV 对乳鼠的感染力以及对免疫系统的影响。这也许是一种新型、经济、方便的 HBV 感染动物模型。

龙隽等研究者已证实母鼠通过高压水动力尾静脉注射 HBV 基因组感染上 HBV。该母鼠所产下的胎鼠体内可检测到 HBsAg、HBeAg 及 HBV DNA 的表达,考虑胎鼠通过垂直传播途径感染上 HBV,同时自身免疫能力低下,无法自发清除病毒^[21]。本次实验根据 Balb/c 小鼠对 HBV 的易感性高于其他品种小鼠,利用乳鼠的免疫系统尚未成熟,对外源性抗原抵抗能力较低,故采用高压水动力尾静脉注射法将人 HBV 血清在短时间大量快速注入 Balb/c 乳鼠体内,以求建立 HBV 感染动物模型。经实验观察发现:乳鼠在接种 HBV 血清后体温无明显波动,体质量与正常乳鼠无明显差异,这提示乳鼠接种 HBV 后未引起发热、体质量下降等应激反应。于接种约为乳鼠体质量的 0.8% HBV 患者血清后,第 7 d 开始检测到 HBsAg 表达,且维持时间长达 30 d,然而 HBeAg 及 HBV DNA 为阴性。考虑乳鼠所接种的病毒血清量较少,HBsAg 为分泌性蛋白,不能长时间存在体内^[22],一定程度上排除对实验检测结果所带来的干扰后,推测 Balb/c 乳鼠可感染 HBV。而 HBV DNA 检测不到的原因可能是进入体内的病毒未能产生成熟病毒体或未分泌到外周血液循环体内^[9],HBV 拷贝数低于 500 copies/mL;或者小鼠并非 HBV 的天然宿主,体内缺乏 HBV 复制所必须的特异性受体和其他细胞因子的缘故^[9],体内无法复制 HBV。本次研究的优点是:(1)Balb/c 乳鼠遗传背景清楚,价廉易获;(2)接种方法操作简单方便;(3)Balb/c 乳鼠免疫能力较低,对外源性抗原清除能力差,容易感染上 HBV 且可维持时间较长。不足之处是:(1)实验所用的人 HBV 血清未做不同浓度接种,无法比较分析乳鼠未能体内复制 HBV 是否由于接种浓度低所带来的影响;(2)Balb/c 乳鼠体内无法复制 HBV,尚未能用于药物治疗研究;(3)乳鼠感染率及感染持续时间存在不可控因素,该动物模型稳定性有待研究。

本实验对 Balb/c 乳鼠行高压水动力尾静脉注射人 HBV 血清,经观察发现接种后乳鼠不会引起体温升高、体质量改变

等应激反应;Balb/c 乳鼠可感染 HBV,HBV DNA 低于 500 copies/ml,体内未能复制 HBV。这证实接种人 HBV 血清可使 Balb/c 乳鼠成功感染上 HBV;Balb/c 乳鼠免疫系统未成熟,免疫力低下,易于感染 HBV,未能自发清除 HBV,是人 HBV 血清感染动物模型的较佳选择。此动物模型可用于研究 HBV 对乳鼠免疫状态的影响。为下一步实验研究 miRNAs 对 HBV 免疫状态的影响提供了动物模型基础。

参考文献(References)

- [1] Hadziyannis SJ, Vassilopoulos D, Hadziyannis E. The natural course of chronic hepatitis B virus infection and its management [J]. *Advances in pharmacology*, 2013, 67: 247-291
- [2] Mastroianni CM, Lichtner M, Citton R, et al. Current trends in management of hepatitis B virus reactivation in the biologic therapy era [J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(34): 3881-3887
- [3] Lampertico P, Liaw YF. New perspectives in the therapy of chronic hepatitis B [J]. *Gut*, 2012, 61(Suppl 1): i18-i24
- [4] Tujios SR, Lee WM. Update in the management of chronic hepatitis B [J]. *Current opinion in gastroenterology*, 2013, 29(3): 250-256
- [5] Scaglione SJ, Lok AS. Effectiveness of hepatitis B treatment in clinical practice [J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(6): 1360-1368
- [6] Guo X, Sun T, Yang M, et al. Prognostic value of combined aquaporin 3 and aquaporin 5 overexpression in hepatocellular carcinoma [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 206525
- [7] Kwon H, Lok AS. Hepatitis B therapy [J]. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 2011, 8(5): 275-284
- [8] Chayama K, Hayes CN, Hiraga N, et al. Imamura M. Animal model for study of human hepatitis viruses [J]. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 2011, 26(1): 13-18
- [9] Wang Y, Chen H, Wang F, et al. Rat as an animal model carrying human hepatitis B virus in hepatocytes [J]. *Chinese medical journal*, 1996, 109(9): 674-679
- [10] Yang PL, Althage A, Chung J, et al. Hydrodynamic injection of viral DNA: a mouse model of acute hepatitis B virus infection [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(21): 13825-13830
- [11] 刘霜,谢清,段钟平.水动力注射法构建乙型肝炎病毒感染小鼠模型 [J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2009, 18(9): 840-842
- [11] Liu Shuang, Xie Qing, Duan Zhong-ping. A mouse model of acute hepatitis B virus infection constructed by hydrodynamic injection [J]. *Chin J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 18(9): 840-842
- [12] Yu W, Goddard C, Clearfield E, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of triazolo-pyrimidine derivatives as novel inhibitors of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) secretion [J]. *Journal of medicinal chemistry*, 2011, 54(16): 5660-5670
- [13] Fan Y, Jiang WZ, Wen JJ, et al. B7-DC-silenced dendritic cells induce stronger anti-HBV immunity in transgenic mice [J]. *Archives of virology*, 2009, 154(11): 1813-1821
- [14] Li G, Jiang G, Lu J, et al. Inhibition of Hepatitis B Virus cccDNA by siRNA in Transgenic Mice [J]. *Cell biochemistry and biophysics*, 2014, 69(3): 649-654
- [15] Takehara T, Suzuki T, Ohkawa K, et al. Viral covalently closed circular DNA in a non-transgenic mouse model for chronic hepatitis B virus replication [J]. *Journal of hepatology*, 2006, 44(2): 267-274

(下转第 848 页)

- cancer PC3 cells through Akt signaling pathway [J]. Journal of Third Military Medical University, 2013, 35(2): 105-108
- [14] 王鹏龙,徐昕,李国梁,等.新型川芎嗪衍生物的合成及其抗癌活性研究[J].西北药学杂志,2014,29(1):58-64
Wang Peng-long, Xu Xin, Li Guo-liang, et al. Synthesis and anti-tumor activity evaluation of new ligustrazine derivatives [J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2014, 29(1):58-64
- [15] Yin J,Yu C,Yang Z,et al.Tetramethylpyrazine inhibits migration of SKOV3 human ovarian carcinoma cells and decreases the expression of interleukin-8 via the ERK1/2, p38 and AP-1 signaling pathways[J]. Oncol Rep, 2011, 26(3):671-679
- [16] 侯常,潘雪珂,陈朝,等.川芎嗪对人宫颈癌 HeLa 细胞增殖的影响及其分子机制[J].新医学,2013,44(1):61-64
Hou Chang, Pan Xue-ke, Chen Chao, et al. Effects of tetramethylpyrazine on human cervical carcinoma cell line HeLa and its mechanisms [J]. New Medicine, 2013,44(1):61-64
- [17] 刘明华,任美萍,李蓉,等.川芎嗪对人卵巢癌顺铂耐药细胞株 COC1/DDP 的逆转作用研究[J].重庆医学,2011,40(20):1982-1984
Liu Ming-hua, Ren Mei-ping, Li Rong, et al. Reversal effect of tetramethylpyrazine on cisplatin-resistant ovarian cancer cell line COC1/DDP[J]. ChongQing Medicine, 2011,40(20):1982-1984
- [18] 陆永高,孙倩茹,张明,等.川芎嗪对耐阿霉素肝癌细胞的增效作用[J].中国中西医结合消化杂志,2013,21(6):290-293
Lu Yong-gao, Sun Qian-ru, Zhang Ming, et al. Intensifying action of tetramethylpyrazine on ADR-resisitent hepatocellular carcinoma cells [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Digestion, 2013,21(6):290-293
- [19] Wang XB, Wang SS, Zhang QF, et al. Nhhibition of tetramethylpyrazine on P-gp, MRP2, MRP3 and MRP5 in multidrug resistant human hepatocellular carcinoma cells[J]. Oncol Rep, 2010,23(1):211-215
- [20] 王听,陈信义,牛福玲,等.川芎嗪干预白血病及脐带血细胞 P-糖蛋白表达初步研究[J].中国医药学报,2002,17(12):729-730
Wang Ting, Chen Xin-yi, Niu Fu-lin, et al. Preliminary study of ligustrazine intervention leukemia and umbilical cord blood cells P-glycoprotein expression [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2002,17(12):729-730

(上接第 817 页)

- [16] Dandri M, Lutgehetmann M, Volz T, et al. Small animal model systems for studying hepatitis B virus replication and pathogenesis[J]. Seminars in liver disease, 2006, 26(2): 181-191
- [17] Walter E, Keist R, Niederost B, et al. Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo [J]. Hepatology, 1996, 24(1): 1-5
- [18] 李军,刘宏利,韩超,等.病毒接种剂量对 HBV 感染成年树鼩的影响[J].免疫学杂志,2012,28(12): 1056-1060
Li Jun, Liu Hong-li, Han Chao, et al. Impact of viral inoculum dose on the outcome of HBV infection in adult Tupaia [J]. Immunological Journal, 2012, 28(12): 1056-1060
- [19] Njoum R, Mba SA, Nerrienet E, et al. Detection and characterization of hepatitis B virus strains from wild-caught gorillas and chimpanzees in Cameroon, Central Africa [J]. Infect Genet Evo, 2010, 10(6): 790-796
- [20] Lyons S, Sharp C, LeBreton M, et al. Species association of hepatitis B virus (HBV) in non-human apes; evidence for recombination between gorilla and chimpanzee variants [J]. PloS one, 2012, 7(3): e33430
- [21] 龙隽,刘杰波,张绍芳,等. siRNA 对乙型肝炎孕鼠及胎鼠体内的抗乙型肝炎病毒的保护作用探讨 [J]. 临床合理用药杂志, 2012, 5(19): 44-46
Long Juan, Liu Jie-bo, Zhang Shao-fang, et al. Discussion of protective effect of anti-hepatitis B virus of siRNA on pregnancy mouse and fetal mouse with infected Hepatitis B virus [J]. ChinJof Clinical Rational DrugUse, 2012, 5(19): 44-46
- [22] Kapoor NR, Kumar V. Hepatitis B Virus: A Molecular Perspective [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 2012, 82(1): 31-41