

黄恺,孙鑫,赵志敏,等.两种乙型肝炎纤维化小鼠复合模型比较[J].中国实验动物学报,2019,27(5):598-603.

Huang K,Sun X,Zhao ZM, et al. Comparison of two composite mouse models of hepatitis B fibrosis[J]. Acta Lab Anim Sci Sin,2019, 27(5):598-603.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.05.008

两种乙型肝炎纤维化小鼠复合模型比较

黄恺¹,孙鑫²,赵志敏¹,彭渊²,陶艳艳²,刘成海^{1,2*}

(1.上海市中医临床重点实验室,上海 201203; 2.上海中医药大学附属曙光医院肝病研究所,上海 201203)

【摘要】 目的 采用 C57BL/6 N-Tg (1.28HBV)/Vst 型乙肝病毒转基因小鼠与 rAAV8-1.3HBV 腺相关病毒转染小鼠联合 CCl₄ 腹腔注射诱导乙型肝炎纤维化小鼠模型,比较两种小鼠模型的病毒学及生化病理特点。**方法** 实验分野生型对照组 (WT)、rAAV8-1.3HBV 转染组 (rAAV)、CCl₄ 组 (CCl₄)、rAAV8-1.3HBV 复合 CCl₄ 模型组 (rAAV+CCl₄)、C57BL/6 N-Tg(1.28HBV)/Vst 乙肝病毒转基因组 (Tg)、转基因复合 CCl₄ 组 (Tg+CCl₄),共计造模 12 周。ELISA 试剂盒测定血清 HBsAg、HBeAg 水平,荧光定量 PCR 法检测血清 HBV-DNA 载量,肝组织石蜡切片免疫组化染色观察肝内 HBsAg 及 HBeAg 的表达,生化试剂盒测定血清 ALT、AST、AKP,盐酸水解法检测肝组织羟脯氨酸 (Hyp) 含量。HE 染色及天狼星红染色观察炎症与胶原等病理变化。**结果** 除 WT 组、CCl₄ 组,其余各组 ELISA 检测血清 HBsAg、HBeAg 均呈阳性,同时荧光定量 PCR 检测 HBV-DNA 载量均高于 1.0×10⁴ IU/mL。其中 Tg+CCl₄ 组 HBsAg、HBeAg 含量高于 rAAV+CCl₄ 组。rAAV、rAAV+CCl₄ 组 HBV-DNA 水平高于 Tg、Tg+CCl₄ 组。免疫组化表明:除 WT 组、CCl₄ 组,其余各组肝组织中 HBsAg 与 HBeAg 均呈阳性。rAAV 组对比 Tg 组,HBsAg 表达减少;rAAV 组相比 Tg 组,HBeAg 表达明显增多。Tg+CCl₄ 与 rAAV+CCl₄ 相比,HBsAg 结果无明显差异,rAAV+CCl₄ 组 HBeAg 阳性表达明显增高。生化结果显示:CCl₄ 组、Tg+CCl₄ 组、rAAV+CCl₄ 组血清 ALT、AST 及肝组织 Hyp 含量均显著升高;其中 Tg+CCl₄ 组 Hyp 含量高于 rAAV+CCl₄ 组。AKP 结果对比 WT 组无明显差异。病理结果表明:对比 WT 组,rAAV 与 Tg 组炎症与胶原沉积不明显;CCl₄ 组、Tg+CCl₄ 组、rAAV+CCl₄ 组炎症反应及胶原沉积明显增高,其中 Tg+CCl₄ 组胶原沉积高于 rAAV+CCl₄ 组。**结论** 两种复合模型符合乙型肝炎纤维化模型需求,其差异主要集中于病毒学指标以及病理改变。rAAV+CCl₄ 组在 HBV-DNA 载量上具有优势,Tg+CCl₄ 组在纤维化进展更为明显。

【关键词】 动物模型;乙型肝炎病毒;炎症;肝纤维化;病理学

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 05-0598-06

Comparison of two composite mouse models of hepatitis B fibrosis

HUANG Kai¹, SUN Xin², ZHAO Zhimin¹, PENG Yuan², TAO Yanyan², LIU Chenghai^{1,2*}

(1. Shanghai Key Laboratory of Traditional Clinical Chinese Medicine, Shanghai 201203, China.

2. Institute of Liver Diseases, Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203)

Corresponding author: LIU Chenghai. E-mail: chenghailiu@hotmail.com

【Abstract】 Objective We examined the virological, biochemical and pathological features of two composite mouse models of hepatitis B fibrosis. **Methods** Mice were transfected with rAAV8-1.3HBV adeno-associated virus and C57BL/6 N-Tg(1.28HBV)/Vst type hepatitis B virus transgenic mice, combined with CCl₄ to induce hepatitis B liver fibrosis in mice. The mice were divided into the following groups: wild-type control group (WT), rAAV8-1.3HBV transfection control group (rAAV), CCl₄ control group (CCl₄), rAAV8-1.3HBV transfection with CCl₄ model group (rAAV+CCl₄), C57BL/6 N-Tg (1.28HBV)/Vst hepatitis B virus transgenic control group (Tg), and HBV transgenic

【基金项目】国家自然科学基金重点项目(81730109);上海中医药大学研究生创新培育项目(Y201826)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(81730109), and the Graduate Innovative Training Program of Shanghai University of TCM(Y201826).

【作者简介】黄恺(1987—),男,初级技师,学士,研究方向:实验技术。Email:kanghui12@163.com

【通信作者】刘成海(1965—),男,教授、博士生导师,研究方向:中西医结合防治慢性肝病的基础与临床。Email:chenghailiu@hotmail.com

complex CCl_4 model group (Tg+ CCl_4). After 12 weeks, the levels of HBsAg and HBeAg were measured by ELISA. The HBV-DNA load was detected by PCR. The expression of HBsAg and HBeAg in the liver tissue was observed by immunohistochemical staining. Serum ALT, AST and AKP were determined by a biochemical kit, and hydroxyproline (Hyp) content was detected by hydrochloric acid hydrolysis method. HE staining and Sirius red staining were used to observe the pathological changes. **Results** ELISA result showed positive serum HBsAg and HBeAg, meanwhile the PCR examined the HBV-DNA load was higher than 1.0×10^4 IU/mL in all the groups except for the WT and CCl_4 group. The HBsAg and HBeAg content in the Tg+ CCl_4 group was higher than in the rAAV+ CCl_4 group. The levels of HBV-DNA in the rAAV and rAAV+ CCl_4 groups were higher than those in the Tg and Tg+ CCl_4 groups. Immunohistochemistry showed positive HBsAg and HBeAg in the liver tissues in all groups except the WT group and CCl_4 group. The expression of HBsAg was decreased but HBeAg was significantly increased in the rAAV+group compared with the Tg group. No significant difference was detected in HBsAg between the Tg+ CCl_4 group and rAAV+ CCl_4 group, but the HBeAg positive expression was obviously increased in the latter group. The levels of ALT, AST and liver Hyp were significantly increased in the CCl_4 group, Tg+ CCl_4 group and rAAV+ CCl_4 group. The Hyp content in the Tg+ CCl_4 group was higher than in the rAAV+ CCl_4 group. The biopsy showed that there were significantly increased inflammation reaction and collagen deposition in the CCl_4 group, Tg+ CCl_4 group and rAAV+ CCl_4 group. The Tg+ CCl_4 group collagen deposition was higher than in the rAAV+ CCl_4 group. **Conclusions** The two composite mouse models conform to the hepatitis B liver fibrosis model and the differences are concentrated in virological indicators and pathological changes. The rAAV + CCl_4 group has an advantage in HBV-DNA load, and the Tg + CCl_4 group was more obvious in fibrosis progress.

[Keywords] mouse model; hepatitis B virus; inflammation; hepatic fibrosis; histopathology

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 是一种嗜肝性 DNA 病毒, 可导致慢性肝炎、肝硬化与肝癌^[1-2]。建立稳定的 HBV 诱导的慢性肝炎肝纤维化动物模型对于乙肝肝纤维化病理机制及其药物评价具有重要意义。本研究采用 C57BL/6 N-Tg (1.28HBV)/Vst 乙肝病毒转基因 (HBV-Tg) 与 rAAV8-1.3HBV 腺相关病毒转染 (rAAV) 小鼠, 联合 CCl_4 腹腔注射, 诱导慢性乙肝肝纤维化发生。观察比较两种模型的病毒学及纤维化病理特点, 为研究时选择相关动物模型提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6 野生型小鼠 20 只, C57BL/6 N-Tg (1.28 HBV)/Vst 乙肝病毒转基因小鼠 10 只, 购自并饲养于北京维通达生物技术有限公司【SCXK (京) 2014 - 0001】【SYXK (京) 2014 - 0015】, 体重 (20 ± 5) g, 自由饮食饮水。

1.1.2 实验试剂与仪器

rAAV8-1.3HBV 重组腺相关病毒, 购自北京五加和分子医学研究所有限公司。四氯化碳 (Carbon tetrachloride, CCl_4), 化学纯; 橄榄油, 化学纯, 均购自上海国药集团化学试剂有限公司; 血清 HBsAg、HBeAg 检测试剂盒 (酶联免疫法, ELISA), HBV-DNA

定量检测试剂盒 (PCR-荧光探针法), 购自上海科华生物工程股份有限公司; 谷丙转氨酶 (ALT/GPT) 测试盒 (货号: C009-1)、谷草转氨酶 (AST/GOT) 测试盒 (货号: C010-1)、碱性磷酸酶 (AKP) 测试盒 (货号: A059-1)、苏木精-伊红染液 (货号: D006), 均购自南京建成生物工程研究所; 兔抗 HBeAg 多克隆抗体 (货号: ab140243)、小鼠抗 HBsAg 单克隆抗体 (货号: ab859)、兔鼠通用 HRP/DAB 二抗显色试剂盒 (货号: ab64264), 均购自 Abcam 公司; 羟脯氨酸 (Hyp) 标准品购自 Sigma 公司。Bio-Tek Power Wave XS 微孔板分光光度计, 购自美国 Bio-Tek 公司; 石蜡脱水机、病理切片机购自德国徕卡公司; 高倍显微镜购自日本奥林巴斯有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物造模与分组

将 C57BL/6N 野生型小鼠随机分为野生型对照组 (WT)、rAAV8-1.3HBV 转染组 (rAAV)、 CCl_4 组 (CCl_4)、rAAV8-1.3HBV 转染复合 CCl_4 组 (rAAV+ CCl_4), 将同周龄 C57BL/6 N-Tg (1.28HBV)/Vst 乙肝病毒转基因小鼠随机分为 HBV 转基因组 (Tg)、HBV 转基因复合 CCl_4 组 (Tg+ CCl_4)。每组小鼠各设 5 只。rAAV8-1.3HBV 转染采用尾静脉注射方式, 实验首日注射 1 次, 每只小鼠尾静脉注射病毒载量为 $1\text{E}+10\text{v.g.}$; CCl_4 以橄榄油稀释至 10% 浓度, 按照 2 mL/kg 小鼠体重腹腔注射造模, 隔天 1 次。造

模 12 周后麻醉处死小鼠,留取血清与肝组织。

1.2.2 血清 HBV 病毒学指标测定

血清 HBsAg、HBeAg 采用 ELISA 试剂盒检测,按照试剂盒说明书要求操作;血清 HBV-DNA 采用荧光探针 PCR 试剂盒检测,UNG 酶反应 50℃ 2 min,预变性 94℃ 2 min,变性 94℃ 10 s 循环 60 次,退火、延伸及检测荧光 60℃ 30 s 检测通道:530 nm (FAM)。

1.2.3 血清肝功能测定

血清谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST),采用赖氏比色法试剂盒检测;血清碱性磷酸酶 (AKP),采用金氏法试剂盒检测,均按照试剂盒说明书要求操作。

1.2.4 肝组织 Hyp 含量测定

参照 Jamall's 盐酸水解法^[3],称取 100 mg 肝组织放入 50%盐酸中 105℃ 水解过夜。后取三层滤纸过滤水解液并吸取 100 μL 烘干处理。取 Hyp 标准品 0.2 ~ 1.6 μg 设为标准曲线,经氯胺 T 溶液 0.2 mL,含 25%对二甲基氨基苯甲醛和 27.3%高氯酸的异丙醇溶液反应,50℃ 水浴 1 h, 558 nm 测定吸收值。

1.2.5 肝组织病理

小鼠肝组织 4%甲醛浸泡固定、脱水后石蜡包埋切片;进行 HE 染色后封片,显微镜 (×200 倍) 观察。天狼猩红采用饱和苦味酸配制,显微镜 (×100

倍) 观察,利用 Image-Pro Plus 6.0 软件对胶原面积作半定量分析。

1.2.6 肝组织免疫组织化学染色

肝组织脱蜡逐级复水,柠檬酸盐缓冲液高压热修复,3%双氧水去酶处理内源性酶。5% BSA 室温 30 min,滴加一抗 4℃ 过夜。洗去一抗滴加二抗 37℃ 1 h,洗去后滴加 SABC 链霉素 10 min。DAB 显色后苏木素染核封片。阳性区域总面积半定量分析采用 Image-Pro Plus 6.0 软件。

1.3 统计学分析

计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,所有数据均使用 SPSS 21.0 分析,对于符合正态性和方差齐性的计量资料,用单因素方差分析检验 (LSD 进行两两比较),两组间差异比较采用两独立样本的 *t* 检验。以 *P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两种复合模型小鼠血清病毒学指标比较

结果显示:除 WT 组、CCl₄ 组外,其余组血清 HBsAg、HBeAg 均为阳性,两种复合模型组相比,Tg+CCl₄ 组血清 HBsAg 和 HBeAg 水平高于 rAAV+CCl₄ 组 (*P* < 0.01、*P* < 0.05) (图 1A、1B)。PCR 结果显示,除 WT 组、CCl₄ 组外,其余组别血清 HBV-DNA 载量均高于 1.0×10⁴ IU/mL, rAAV 组与 rAAV+CCl₄ 组 HBV-DNA 载量高于 Tg 组与 Tg+CCl₄ 组 (*P* < 0.01、*P* < 0.05) (图 1C)。

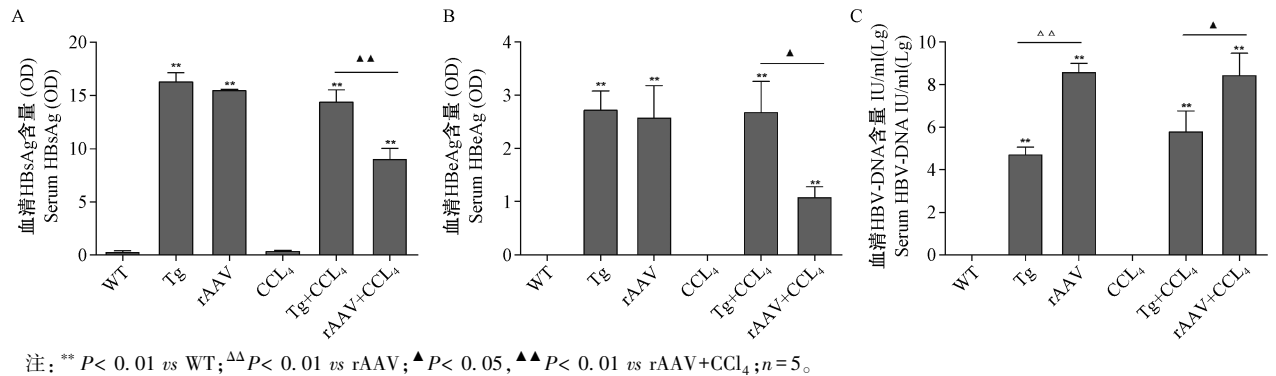


图 1 小鼠血清乙肝病毒学检测结果

Note. ** *P* < 0.01 vs WT. ^{ΔΔ} *P* < 0.01 vs rAAV. [▲] *P* < 0.05, ^{▲▲} *P* < 0.01 vs rAAV+CCl₄. *n* = 5.

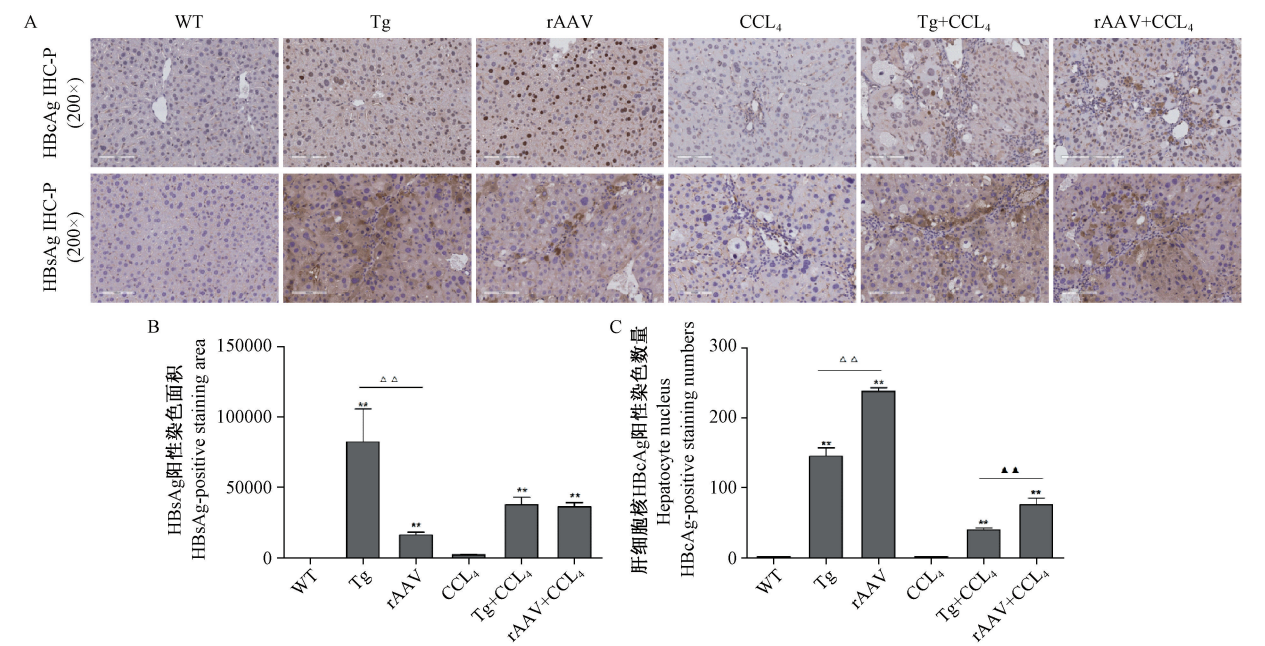
Figure 1 Virological detection of HBV in the mouse serum

2.2 两种复合模型小鼠肝组织免疫组化染色指标比较

肝组织石蜡切片免疫组化结果显示,WT 组、CCl₄ 组均未见 HBsAg、HBeAg 阳性表达,其余组别小鼠肝组织中 HBsAg 和 HBeAg 均可见不同程度阳

性表达 (图 2A); 通过图片半定量分析后发现, rAAV 组较 Tg 组 HBsAg 阳性表达面积明显减少 (*P* < 0.01), 而 rAAV 组较 Tg 组肝细胞核 HBeAg 阳性数量明显增多 (*P* < 0.01); 两种复合模型组相比, HBsAg 在肝组织中的表达未见明显差异 (*P* >

0.05), 但 rAAV+CCl₄ 组肝细胞核 HBcAg 阳性数量显著高于 Tg+CCl₄ 组 ($P < 0.01$) (图 2B、2C)。



注: ** $P < 0.01$ vs WT, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs rAAV, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ vs rAAV+CCl₄, $n = 5$ 。
图 2 小鼠肝组织 HBsAg、HBeAg 免疫组化染色与半定量分析
Note. ** $P < 0.01$ vs WT, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs rAAV, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ vs rAAV+CCl₄, $n = 5$ 。

Figure 2 Immunohistochemical staining(A) and semi-quantitative analysis of HBsAg(B) and HBeAg(C) in the mouse liver tissues

2.3 两种复合模型小鼠肝组织炎症与纤维化生化指标的比较

血清生化检测结果显示(表 1), 与 WT 组比较, CCl₄ 复合造模 12 周后, CCl₄ 组、Tg+CCl₄ 组与 rAAV+CCl₄ 组血清 ALT 与 AST 水平均明显上升 ($P < 0.01$), Tg 组与 rAAV 组对比 WT 组没有明显变化 ($P > 0.05$)。Tg 组与 rAAV 组 ALT 水平具有差异 ($P < 0.01$)。两种复合模型组相比; Tg+CCl₄ 组与

rAAV+CCl₄ 组 ALT、AST 水平均未见显著差异 ($P > 0.05$); 各组 AKP 水平均未见明显差异 ($P > 0.05$)。肝组织 Hyp 含量检测结果显示, 与 WT 组比较, CCl₄ 复合造模 12 周后, CCl₄ 组、Tg+CCl₄ 组与 rAAV+CCl₄ 组肝组织中 Hyp 含量均显著升高 ($P < 0.01$), 两种复合模型组相比, Tg+CCl₄ 组对比 rAAV+CCl₄ 组肝内 Hyp 含量具有明显差异 ($P < 0.01$)。

表 1 小鼠血清肝功能及肝组织羟脯氨酸含量的测定

Table 1 Serum ALT, AST, AKP levels and Hyp levels in the mouse liver tissues				
组别 Groups	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	AKP (King U/100 mL)	Hyp (μg/g wet liver)
WT 组	6.33 ± 0.23	6.57 ± 1.22	20.80 ± 1.61	171.39 ± 22.21
Tg 组	9.66 ± 0.49 $\Delta\Delta$	11.69 ± 1.14	23.54 ± 1.75	215.35 ± 5.88
rAAV 组	7.40 ± 1.03	9.60 ± 1.39	18.96 ± 2.87	250.36 ± 84.08
CCl ₄ 组	87.68 ± 3.13**	24.20 ± 17.27**	25.03 ± 7.73	624.36 ± 100.43**
Tg+CCl ₄ 组	119.15 ± 29.34**	35.83 ± 17.89*	26.23 ± 6.09	798.34 ± 311.56** $\blacktriangle\blacktriangle$
rAAV+CCl ₄	119.60 ± 38.49**	40.23 ± 27.33**	21.15 ± 2.62	604.33 ± 166.27**

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs WT, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs rAAV, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ vs rAAV+CCl₄, $n = 5$ 。
Note. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs WT, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs rAAV, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ vs rAAV+CCl₄, $n = 5$ 。

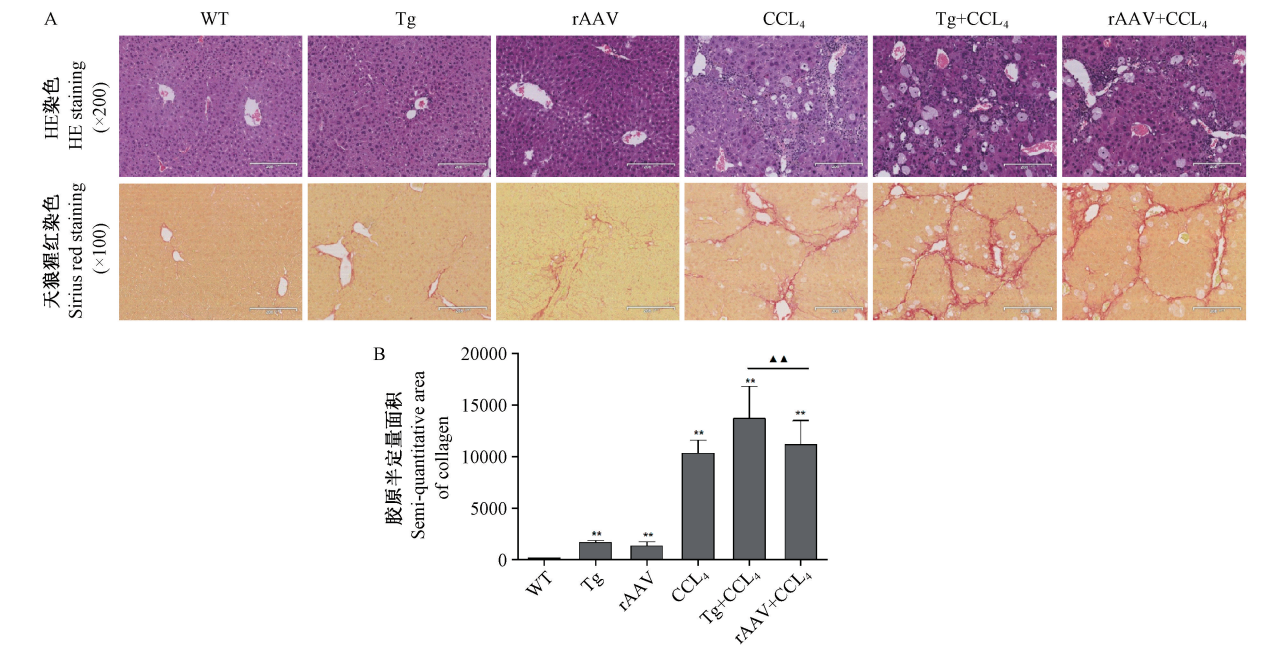
2.4 两种复合模型小鼠肝组织炎症与纤维化病理特点的比较

HE 染色结果显示, WT 组小鼠肝小叶结构完整、清晰, 肝细胞呈条索状排列整齐, 在中央静脉周围呈放射状分布, Tg 组与 rAAV 组肝小叶排列整齐,

仅可观察到肝细胞核增大, 其中 rAAV 组存在少量炎细胞浸润, CCl₄ 组、rAAV+CCl₄ 组、Tg+CCl₄ 组均出现大量肝实质细胞坏死, 正常肝小叶结构消失, 出现明显气球样变和脂肪变, 汇管区大量炎性细胞浸润。天狼猩红染色结果显示, WT 组肝组织未见

明显胶原沉积,Tg 组和 rAAV 组汇管区及小叶间出现少量胶原沉积,呈细线状,未见明显的桥接和假小叶,CCl₄ 组、rAAV+CCl₄ 组、Tg+CCl₄ 组肝组织出现明显胶原纤维沉积,由汇管区向周围延伸,形成

纤维间隔,其中 Tg+CCl₄ 组可见到明显的假小叶形成(图 3A)。通过胶原半定量分析后发现;Tg+CCl₄ 组胶原含量高于 rAAV+CCl₄ 组($P < 0.01$)(图 3B)。



注: ** $P < 0.01$ vs WT, ▲▲ $P < 0.01$ vs rAAV+CCl₄, $n = 5$ 。
图 3 肝组织病理 HE、天狼猩红染色与胶原半定量分析
Note. ** $P < 0.01$ vs WT, ▲▲ $P < 0.01$ vs rAAV+CCl₄, $n = 5$ 。

Figure 3 Pathological changes (A) and semi-quantitative analysis of collagen content (B) in the mouse liver tissues

3 讨论

目前乙肝动物模型主要为:麻鸭乙型肝炎模型、转基因小鼠模型、树鼯模型等^[4-5]。其中以小鼠乙肝模型为主流^[6-7]。小鼠乙肝模型又可分为转基因型、高压水动力注射型与腺病毒转染^[8]三种。其中利用肝衰竭小鼠移植人骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells)的人源化模型可有效模拟人体乙肝肝硬化发病过程^[9],但是此类方法实验难度较高且成本较为昂贵。近年来,有研究者使用 HBV 转基因小鼠复合 CCl₄ 模型观察慢性乙肝肝纤维化过程中自然杀伤 T 细胞(natural killer T cells, NKT cells)的变化^[10]。构建慢性乙肝肝纤维化动物模型需具备两个基本要素:首先是 HBV 基因的高水平表达,其次具有长期性的 HBV 感染及相应的纤维化的病理特征。rAAV 采用携带 1.3 拷贝 HBV 基因组的重组 8 型腺相关病毒,依其对于肝亲嗜性特点,将 HBV 基因组高效导入肝细胞中^[11]。HBV-Tg 转基因小鼠则是 1.28 拷贝 HBV 病毒基因片段或全基因组导入小鼠单细胞受精卵的雄原核,

再植入母体使其发育^[12]。本实验室前期研究表明^[13],单纯 HBV-Tg 小鼠在 36 周以上才会出现较为明显的自发性病理炎症和转氨酶升高。通过 CCl₄ 复合造模可以进一步缩短成模时间。CCl₄ 模型在与肝纤维化发展相关的组织学、生化学、细胞和分子变化方面具有明显特点,通过诱导肝内 III 区坏死和肝细胞凋亡,使肝星状细胞活化导致纤维化产生^[14-15]。

合理地选用小鼠慢性乙肝模型可以有效解决 HBV 在病毒感染、复制、免疫应答和药物评价方面的难题。本研究发现:Tg 组与 rAAV 组在联合 CCl₄ 染毒 12 周后能够稳定成模。两者血清生化学差异并不明显,其差异主要体现在病毒学标志物方面。HBV-DNA 结果可以看到:由于 rAAV 本身具有剧烈嗜肝性,注射机体后破坏肝细胞使大量 HBV-DNA 释放入血,并且肝组织中 HBcAg 大面积表达是其典型特征。而 HBV-Tg 病毒主要依靠小鼠不断表达 HBV 蛋白并且在肝中产生病毒颗粒^[16],HBV-DNA 的复制则相对缓慢。rAAV8 注射后,机体自身免疫应答升高,血清中出现 Anti-HBs,血清学转换发生,

部分 HBsAg 被清除^[17-18], 导致血清与肝组织中 HBsAg 和 HBeAg 水平较 HBV-Tg 组偏低。纤维化进展方面, Tg+CCl₄ 组则更为明显, 其原因和自然杀伤 T 细胞加速并释放细胞因子 IL-4 和 IL-13 导致肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 活化有关^[19]。

综上所述, rAAV 与 HBV-Tg 在建立慢性乙肝模型上具有一定优势, 但是同时也存在一些局限性。首先两者无法有效在体内合成共价闭合环状 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA)。并且由于 CCl₄ 造成的脂质过氧化损伤后部分肝实质细胞产生坏死, 导致 HBV 的复制存在一定抑制^[20], 但 rAAV+CCl₄ 组与 Tg+CCl₄ 组病毒学指标仍要高于 WT 组。本次实验 rAAV 注射剂量为每只 1E+10v.g., 增加病毒载量至 5E+12v.g. 时成模效率可能更高, 并且 rAAV 由于其存在嗜肝性, 需要一定的尾静脉注射技巧, 处理不当可导致实验人员发生感染风险。而 HBV-Tg 相对风险性较小并且价格相对低廉。综上所述, 本研究两种模型可以给慢性乙肝纤维化的药物评价提供一定思路和借鉴。如需探讨乙肝纤维化免疫机制等其他问题, 则有待进一步研究挖掘。

参 考 文 献 (References)

- [1] Zhang HW, Yin JH, Li YT, et al. Risk factors for acute hepatitis B and its progression to chronic hepatitis in Shanghai, China[J]. Gut, 2008, 57(12): 1713-1720.
- [2] Beasley RP, Hwang LY. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus[J]. Semin Liver Dis, 2006, 26(2): 153-161.
- [3] Jamall I, Finelli V, Que Hee S. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues [J]. Anal Biochem, 1981, 112(1): 70-75.
- [4] 桂桂利, 高新, 刘铮铸, 等. 乙肝病毒体内外感染模型研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(9): 93-98.
Xu JL, Gao X, Liu ZT, et al. Recent progress for HBV infection model in vitro and in vivo [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(9): 93-98.
- [5] Huang LR, Wu HL, Chen PJ, et al. An immunocompetent mouse model for the tolerance of human chronic hepatitis B virus infection [J]. J Clin Virol, 2006, 103(47): 17862-17867.
- [6] Bourguine M, Crabe S, Lobaina Y, et al. Nasal route favors the induction of CD4⁺ T cell responses in the liver of HBV-carrier mice immunized with a recombinant hepatitis B surface- and core-based therapeutic vaccine[J]. Antiviral Res, 2018, 153: 23-32.
- [7] Yang D, Liu L, Zhu D, et al. A mouse model for HBV immunotolerance and immunotherapy [J]. Cell Mol Immunol, 2014, 11(1): 71-78.
- [8] Ilan E, Burakova T, Dagan S, et al. The hepatitis B virus-trimera mouse: A model for human HBV infection and evaluation of anti-HBV therapeutic agents [J]. Hepatology, 1999, 29(2): 553-562.
- [9] Yuan L, Jiang J, Liu X, et al. HBV infection-induced liver cirrhosis development in dual-humanised mice with human bone

- mesenchymal stem cell transplantation [J]. Gut, 2019. pii: gutjnl-2018-316091
- [10] Jin Z, Sun R, Wei H, et al. Accelerated liver fibrosis in hepatitis B virus transgenic mice: Involvement of natural killer T cells [J]. Hepatology, 2011, 53(1): 219-229.
- [11] 董小岩, 尉迟捷, 吴小兵. 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 [J]. 病毒学报, 2010, 26(6): 425-431.
Dong XY, Yu CJ, 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) [J]. Chin J Virol, 2010, 26(6): 425-431.
- [12] Chisari FV, Pinkert CA, Milich DR, et al. A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state [J]. Science, 1985, 230(4730): 1157-1160.
- [13] 孙鑫, 黄恺, 赵志敏, 等. C57BL/6N-Tg(1.28HBV)/Vst 乙肝病毒转基因小鼠肝脏炎症与纤维化的病理特点 [J]. 肝脏, 2018, 23(1): 26-30.
Sun X, Huang K, Zhao ZM, et al. Pathological features of liver inflammation and fibrosis in hepatitis B virus transgenic mice C57BL/6N-Tg (1.28HBV) /Vst [J]. Chin Hepatol, 2018, 23(1): 26-30.
- [14] Constandinou C, Henderson N, Iredale JP. Modeling liver fibrosis in rodents [J]. Methods Mol Med, 2005, 117: 237-250.
- [15] 周滔, 闫秀川, 杨珂, 等. CCl₄ 和脂多糖诱导的急性肝损伤中肝细胞凋亡病理特点比较 [J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(5): 347-350+315.
Zhou T, Yan XC, Yang K, et al. Comparison of hepatocyte apoptosis induced by CCl₄ and LPS in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2007, 15(5): 347-350+315.
- [16] Wang Y, Chen K, Wu Z, et al. Immunizations with hepatitis B viral antigens and a TLR7/8 agonist adjuvant induce antigen-specific immune responses in HBV-transgenic mice [J]. Int J Infect Dis, 2014, 29: 31-36.
- [17] 王刚, 董小岩, 田文洪, 等. 用 rAAV8-1.3HBV 制备两种品系小鼠乙型肝炎病毒感染模型比较研究 [J]. 病毒学报, 2012, 28(05): 541-547.
Wang G, Dong XY, Tian WH, et al. Study on the differences of two mouse models of hepatitis B virus infection by transduction with rAAV8-1.3HBV [J]. Chin J Virol, 2012, 28(5): 541-547.
- [18] Zheng B, Ng M, He L, et al. Therapeutic efficacy of hepatitis B surface antigen-antibodies-recombinant DNA composite in HBsAg transgenic mice [J]. Vaccine, 2001, 19(30): 4219-4225.
- [19] 李凤磊, 郝晓磊, 田志刚. HBV 小鼠模型与肝脏免疫学研究进展 [J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(2): 145-153.
Li FL, Hao XL, Tian ZG. Research advances of HBV mouse model and liver immunology [J]. Chin J Immunol, 2016, 32(2): 145-153.
- [20] Hu D, Wang H, Wang H, et al. Non-alcoholic hepatic steatosis attenuates hepatitis B virus replication in an HBV-immunocompetent mouse model [J]. Hepatol Int, 2018, 12(5): 438-446.