

免疫功能正常的HBV cccDNA小鼠模型用于苦参碱和青蒿素抑制HBV的药效评价

伍悦¹, 吕小琴², 刘阳^{2,3}, 向霞², 赵中华⁴, 徐如青², 潘朔寒², 何明忠², 张华堂⁴, 赖国旗²

(1. 重庆医科大学附属第二医院, 重庆 400010; 2. 重庆医科大学实验动物中心, 重庆 400016; 3. 泸县第二中学, 泸州 646106; 4. 重庆市科学技术研究院, 重庆 401123)

[摘要] 目的 应用免疫功能正常的乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 小鼠模型评价中药苦参碱和青蒿素的作用效果, 同时为模型应用奠定基础。方法 体外合成 HBV 共价闭合环状 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA), 通过尾静脉高压注入 8~10 周龄的雄性 CBA/CaJ 小鼠体内, 然后分别在急性感染期和慢性感染期腹腔注射苦参碱或青蒿素。定量 PCR 法检测小鼠血清及肝组织中 HBV DNA 和 cccDNA 含量, 酶联免疫吸附法检测血清中 HBV 表面抗原 (HBV surface antigen, HBsAg) 的含量, 免疫组织化学法检测肝组织中 HBsAg 和 HBV 核心抗原 (HBV core antigen, HBcAg) 的表达。结果 在 HBV 急性感染期, 注射苦参碱和青蒿素第 4 周即能够明显抑制小鼠血清中 HBsAg 的分泌 (均 $P < 0.05$), 降低血清中 HBV DNA 的表达 (均 $P < 0.01$)。在 HBV 慢性感染期, 苦参碱和青蒿素对小鼠血清和组织中 HBsAg 的抑制作用不明显 (均 $P > 0.05$), 但是血清中 HBsAg 相对降低水平 (ΔHBsAg) 明显大于生理盐水对照组 (均 $P < 0.05$); 而且苦参碱能降低小鼠血清或组织中 HBV DNA ($P < 0.05$, $P < 0.01$) 和组织中 HBV cccDNA 的拷贝数 ($P < 0.05$); 青蒿素仅能明显抑制小鼠血清中 HBV DNA 拷贝数 ($P < 0.01$), 而对组织中 HBV DNA 和 HBV cccDNA 的作用不明显 (均 $P > 0.05$); 另外, 苦参碱对肝组织中 HBcAg 的作用不明显 ($P > 0.05$), 而青蒿素对 HBcAg 有明显的抑制作用 ($P < 0.05$)。结论 免疫功能正常的 HBV cccDNA 小鼠模型能够用于治疗急性期和慢性期乙型肝炎的药物疗效评价。

[关键词] 乙型肝炎病毒; 慢性感染; 药效评价; 苦参碱; 青蒿素; CBA/CaJ 小鼠

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)02-0108-08

Application of Immunocompetent HBV cccDNA Mouse Model in the Efficacy Evaluation of Matrine and Artemisinin on Inhibiting HBV

WU Yue¹, LÜ Xiaoqin², LIU Yang^{2,3}, XIANG Xia², ZHAO Zhonghua⁴, XU Ruqing², PAN Shuohan², HE Mingzhong², ZHANG Huatang⁴, LAI Guoqi²

(1. Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 2. Laboratory Animal Center of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 3. Luxian No.2 High School, Luzhou 646106, China; 4. Chongqing Academy of Science and Technology, Chongqing 401123, China)

Correspondence to: LAI Guoqi, E-mail: laiguoqi@163.com

[Abstract] **Objective** To evaluate the effects of matrine and artemisinin on immunocompetent hepatitis B virus (HBV) infected mouse model, and to lay a foundation for the application of the model. **Methods** HBV covalently closed circular DNA (HBV cccDNA) was synthesized in vitro. Male CBA/CaJ mice aged 8 to 10 weeks were injected with HBV cccDNA at high pressure through tail vein, and then intraperitoneally injected

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81570541); 重庆市科委社会民生项目(cstc2017shmsA130097); 重庆医科大学大学生研究与创新实验项目(SRIEP202049)

[作者简介] 伍悦(1992—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 肝胆外科。E-mail: truth1105@qq.com

[通信作者] 赖国旗(1964—), 女, 博士, 教授, 研究方向: 实验动物模型建立及其应用研究。E-mail: laiguoqi@163.com

with matrine or artemisinin in acute or chronic infection periods, respectively. Quantitative PCR was used to detect HBV DNA and cccDNA in serum or liver tissues of mice. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the content of HBV surface antigen (HBsAg) in serum. Immunohistochemistry was used to determine HBsAg and HBV core antigen (HBcAg) in liver tissues. **Results** In HBV acute infection period, matrine and artemisinin injection at week 4 significantly inhibited the secretion of HBsAg in serum of mice (both $P<0.05$), and reduced the expressions of HBV DNA (both $P<0.01$). In HBV chronic infection period, matrine and artemisinin had no significant inhibitory effects on HBsAg in serum and liver tissues (all $P>0.05$), but the decrease of HBsAg in serum in the group administered with matrine or artemisinin was significantly higher than that in the normal saline control group (both $P<0.05$). Moreover, matrine decreased the copy number of HBV DNA in serum and liver tissues ($P<0.05$ and $P<0.01$, respectively) and the copy number of HBV cccDNA in liver tissues ($P<0.05$). Artemisinin only inhibited the copy number of HBV DNA in serum of mice ($P<0.01$), but had no significant effect on HBV DNA and HBV cccDNA in liver tissues (both $P>0.05$). In addition, matrine had no significant effect on HBcAg in liver tissues ($P>0.05$), but artemisinin did the opposite ($P<0.05$). **Conclusion** The immunocompetent HBV cccDNA mouse model can be used to evaluate the efficacy of drugs for the treatment of acute and chronic hepatitis B.

[Key words] Hepatitis B virus; Chronic infection; Efficacy evaluation; Matrine; Artemisinin; CBA/CaJ mice

近年来, 90% 以上的丙肝患者能够实现临床治愈, 但乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染仍是一个困扰全球的健康问题。虽然自 1982 年预防性 HBV 疫苗应用以来, 儿童的 HBV 感染率显著下降, 但是世界卫生组织数据显示全球仍有约 2.5 亿人为慢性乙型肝炎 (简称乙肝) 患者。中国是全球慢性乙肝中高度流行地区, 据统计中国慢性乙肝发病人数约 930 万, 其中约 10%~20% 会发展成为肝硬化, 1%~5% 可演变成成为肝癌^[1-2]。消灭 HBV 或已成为全球实现“2030 全面消灭病毒性肝炎目标”的头等大事^[3-4], 也是中国医疗卫生事业面临的一个重大挑战^[5]。目前, 乙肝防控仍存在不少难点, 其中, 缺乏合适的实验动物模型一直是 HBV 研究领域病毒学、免疫学和新药评价研究的瓶颈。

CBA/CaJ 小鼠的 B 细胞、T 细胞、自然杀伤细胞和粒细胞均正常^[6]。与 BALB/cJ、C57BL/6J 和 C3H/HeN 等 6 个品系小鼠相比, HBV 感染 CBA/CaJ 小鼠的效率不受鼠龄的影响, 同时, 病毒携带时限可以超过半年以上^[7]。本课题组前期利用分子生物学技术体外合成 HBV 共价闭合环状 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA), 并通过尾静脉高压水动力注射至 CBA/CaJ 小鼠体内, 自主研发建立了免疫功能正常的 HBV cccDNA 小鼠模型^[8-10]。尽管已经证明这一模型具有建模方便、免疫健全、携带病毒时限超过半年, 且肝

细胞中含有 HBV cccDNA 等优点^[11-14], 但是该模型是否能很好地用于药物评价尚不清楚。

中药是我国医学瑰宝。已有文献报道, 中药苦参碱 (matrine) 及青蒿素 (artemisinin) 在体外及体内均具有一定的抑制 HBV 的作用^[14], 但因无理想的动物模型, 其药效评价指标有限。本研究应用 HBV cccDNA CBA/CaJ 小鼠模型, 观察苦参碱和青蒿素对模型小鼠体内 HBV 的治疗作用, 并以此评价该小鼠模型的应用价值, 为应用该模型进行药效学评价研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级的 8~10 周龄雄性 CBA/CaJ 小鼠 37 只, 体质量为 22~25 g, 购自重庆医科大学实验动物中心 [SCXK (渝) 2018-003]。动物实验操作在重庆医科大学实验动物中心屏障设施内完成, 实验动物使用许可证号为 SYXK (渝) 2018-003。本实验方案得到重庆医科大学伦理委员会的批准 (No. 2015019)。

1.2 药品与主要试剂

苦参碱 (批号: CAS#519-02-8) 购自上海源叶生物科技有限公司; 青蒿素 (批号: CAS#63968-64-9) 购自北京索莱宝科技有限公司; 病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒 (批号: Cat.#DP315) 购自天根生化科技 (北京) 有限

公司; HBV 表面抗原 (HBV surface antigen, HBsAg) 诊断试剂盒 (国药准字 S10910113) 购自上海科华生物工程股份有限公司; HBsAg 质控标准品[批号: GBW(E)090072]购自北京康彻思坦生物技术有限公司; 马抗 HBsAg 多克隆抗体 (ab9193) (批号: Lot. GR207325-21) 和山羊抗兔 IgG H&L (ab6717) (批号: A20180314314) 购自英国 Abcam 公司; 兔抗 HBV 核心抗原 (HBV core antigen, HBcAg) 抗体 (GTX40523) (批号: Lot No.82180026) 购自美国 GeneTex 公司; 辣根过氧化物酶标记的兔抗马多克隆抗体 (批号: SAA544Eq09) 购自美国 Cloud-Clone Crop 公司; T₅ 核酸外切酶试剂盒 (批号: M0363S) 购自新英格兰生物 (北京) 有限公司; Blaze iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix 试剂盒 (批号: Cat.#1725124) 购自美国 Bio-Rad 公司。定量 PCR 检测引物均由重庆茂百科技有限公司合成。

1.3 实验仪器

酶标检测仪 (1510-00783) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 核酸浓度检测仪 (NanoDrop 2000) 购自香港基因有限公司; CFX Connect™ Real-Time System 定量 PCR 检测仪 (788BR05039) 购自美国 Bio-Rad 公司。

1.4 药物配制

苦参碱和青蒿素分别用二甲基亚砷溶解为无色透明的储存液 (250 μg/μL), 于 -80 °C 保存。使用时按如下体积比配制药物使用质量浓度 (5 μg/μL): 2% 药物储存液, 40% 聚乙二醇 300, 2% 吐温 80, 最后用 ddH₂O 补足至 2 mL; 依次加入溶剂, 每加入一种溶剂后, 先充分振荡混匀, 再加入下一种溶剂。

1.5 动物模型的建立与鉴定

按照本课题组之前建立的方法^[8-10]制备 HBV cccDNA, 然后从尾静脉一次性高压注射质量浓度为 1 μg/mL 的 HBV cccDNA 于每只 CBA/CaJ 小鼠中, 注射量为小鼠体质量的 8% (约 2 mL), 注射时间控制在 6~8 s。高压注射后第 1 周和第 8 周分别采集小鼠血清, 按照 HBV 表面抗原诊断试剂盒说明检测血清中 HBsAg 含量, 并判断 HBsAg 阳性结果。第 1 周血清 HBsAg 阳性者 (样本光密度值与阴性对照孔平均光密度值 +0.100 的比值 ≥ 1.0), 初步判断为 HBV 小鼠感染成功;

第 8 周检测血清 HBsAg 阳性, 同时 HBV DNA 载量大于 10⁵ 拷贝/mL 者, 判断为 HBV cccDNA 模型阳性, 并用于后续的药物评价研究。

1.6 药物实验

成功转染 HBV cccDNA 后第 8 周 (处于急性期) 和第 26 周 (处于慢性期) 的小鼠分别随机分为苦参碱组、青蒿素组和生理盐水对照组。每组小鼠 6 只, 按小鼠体质量分别腹腔注射 50 μg/g 苦参碱、50 μg/g 青蒿素或同体积的 0.9% 氯化钠溶液 (此时记为给药第 0 周), 每 3 d 给药 1 次, 连续给药 9 次, 共 27 d (约 4 周)。给药过程中定期进行尾静脉采血, 急性期小鼠的具体采血时间点为给药前和开始给药后第 1、2、3、4 周, 慢性期小鼠的采血时间点为给药前和开始给药后第 2、4 周。在最后一次收集血清后, 急性期和慢性期所有小鼠经麻醉后以脱颈椎法无痛处死, 收集肝组织。

1.7 实时定量 PCR 法检测 HBV DNA 和 HBV cccDNA

用病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒提取小鼠血清或肝组织中 HBV 总 DNA。使用 CFX Connect™ Real-Time System 定量 PCR 检测仪和 Blaze iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix 试剂盒进行 HBV DNA 和 HBV cccDNA 的定量 PCR 检测。HBV DNA 的上游引物 (1493) 序列为 5'-TTCTCCGCTGTCTGTCGTACC-3', 下游引物 (1638) 序列为 5'-GGTTTCTGTGGGCGTTCC-3'; HBV cccDNA 的上游引物 (1559) 序列为 5'-CTTCTCATCTGCGGACC-3', 下游引物 (1864) 序列为 5'-CACAGCTTGGAGGCTTGA-3'。

在进行 HBV cccDNA 荧光定量 PCR 检测之前, 用核酸外切酶 T₅ 处理样品, 去除线性和有缺口的 DNA, 仅保留 cccDNA, 以避免细胞基因组、HBV rcDNA 对 cccDNA 的影响, 使定量检测结果更加准确。按照 T₅ 核酸外切酶试剂盒说明书, 37 °C 处理 1 h 后, 再 72 °C 20 min, 酶切结束后的产物置于 -20 °C 保存备用。定量检测 HBV DNA 和 cccDNA 的 PCR 扩增条件如下: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 10 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环; 72 °C 延伸 5 min, 并读取熔解曲线。定量 PCR 检测时使用合成的已知拷贝数的标准品 (5 × 10⁸ 拷贝) 以

绘制标准曲线, 检测得到样本的 HBV DNA 或 cccDNA 拷贝数, 然后统计学分析两个药物组与生理盐水对照组的差异。

1.8 酶联免疫吸附法检测血清中 HBsAg 水平

按照HBV表面抗原诊断试剂盒操作说明书步骤, 采用酶联免疫吸附法检测用药后各组小鼠血清中 HBsAg 的水平。检测有效值的判断标准: 阴性对照孔平均光密度值 $NCx \leq 0.01$, 阳性对照孔平均光密度值 ≥ 1 , 判断为检测操作有效无误; 样本光密度值与 COV 值 ($COV = NCx + 0.100$) 的比值 ≥ 1.0 , 判断为样本 HBsAg 阳性。样本 HBsAg 表达量的计算: 用 HBsAg 标准质控品建立的标准曲线, 按照样本光密度值和 HBsAg 标准曲线得到的公式计算 HBsAg 含量; HBsAg 标准质控品的含量为 4 U/mL, 样本 HBsAg 检测时对样本进行 100 倍稀释, 因此计算得到的样本 HBsAg 含量不超过有效范围, 单位计为 10^2 U/mL。

1.9 免疫组织化学法检测肝组织中 HBsAg 和 HBcAg 水平

将小鼠肝脏组织固定在 4% 多聚甲醛溶液中, 随后进行石蜡包埋和切片。切片经过脱蜡和水化、抗原修复、抗体孵育等操作后, 用 DAB 染色并封固, 置于光学显微镜下评估。免疫组织化学法检测肝组织中 HBsAg 和 HBcAg 所使用的抗体 (工作液稀释比例) 分别为: 马抗 HBsAg (1:100) 和兔抗 HBcAg (1:200) 一抗, 兔抗马 IgG (1:200) 和山羊抗兔 IgG H&L (1:50) 二抗。免疫组织化学检测结果可示 HBsAg 表达在细胞质, HBcAg 表达在细胞核; 相应定位若在显微镜下观察到棕褐色, 则为抗原阳性信号。

1.10 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行实验结果数据分析。所有实验至少独立重复 3 次, 结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组比较采用方差分析, 组内两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 动物模型建立成功

一共注射 37 只 CBA/CaJ 小鼠, 尾静脉高压注射 HBV cccDNA 后第 8 周检测小鼠血清中 HBsAg

和 HBV DNA 含量。将 HBsAg 阳性且 HBV DNA 载量大于 10^5 拷贝者, 判定为 HBV cccDNA 模型阳性。结果显示, HBV cccDNA 模型阳性小鼠有 36 只, 建模阳性率为 97.30% (36/37)。

2.2 HBV 感染急性期苦参碱和青蒿素的抑制作用

2.2.1 急性期给药过程中小鼠血清 HBsAg 的表达

HBV 感染急性期 (即转染 HBV cccDNA 后第 8 周) 小鼠在苦参碱和青蒿素给药前 (第 0 周) 及给药后第 1、2、3、4 周, 酶联免疫吸附法检测小鼠血清中 HBsAg 的表达水平 (图 1A)。结果显示, 苦参碱和青蒿素对 HBV cccDNA 模型小鼠急性期 HBsAg 具有明显的抑制效果, 但前 3 周与生理盐水对照组相比差异没有统计学意义, 仅在第 4 周 HBsAg 水平才明显降低 ($P < 0.05$)。

2.2.2 急性期给药过程中小鼠血清 HBV DNA 的拷贝情况

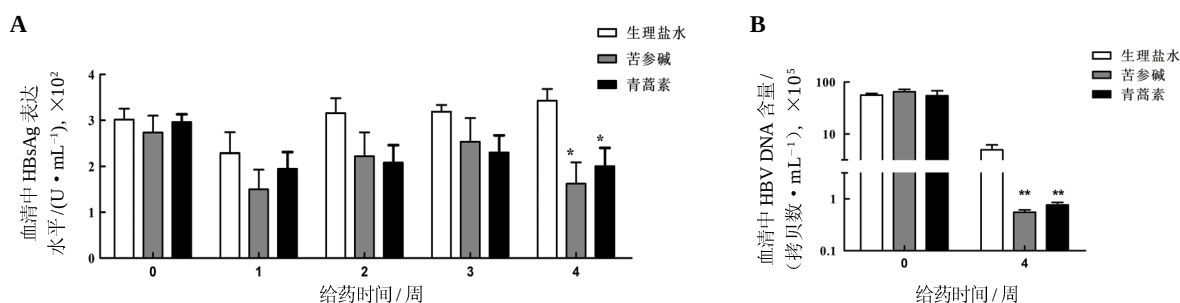
对 HBV 感染急性期小鼠, 采用实时定量 PCR 法检测苦参碱和青蒿素给药前及给药后第 4 周的小鼠血清中 HBV DNA 含量 (图 1B)。结果显示, 用药后第 4 周, HBV cccDNA 模型小鼠血清中 HBV DNA 拷贝数比生理盐水对照组明显减少 ($P < 0.01$)。

2.3 HBV 感染慢性期苦参碱和青蒿素的抑制作用

2.3.1 慢性期给药过程中小鼠血清 HBsAg 的表达

小鼠转染 HBV cccDNA 后第 26 周即携带 HBV 至 26 周, 进入 HBV 感染慢性期, 这时用同样的浓度和方法给予小鼠苦参碱和青蒿素治疗, 并在给药前及给药后第 2 周和第 4 周各进行一次尾静脉采血, 然后采用酶联免疫吸附法检测小鼠血清中 HBsAg 水平 (图 2A)。结果显示, 无论是第 2 周或第 4 周, 与相应的生理盐水对照组相比, HBsAg 变化均不明显 (均 $P > 0.05$)。

同时, 分析用药前 HBsAg 绝对值与用药后第 4 周 HBsAg 绝对值之差, 计算出相对降低水平 (即 $\Delta HBsAg$), 其结果如图 2B 所示。结果表明, 用药后第 2 周, 两个药物组和生理盐水对照组的 $\Delta HBsAg$ 无明显差异 (均 $P > 0.05$); 但是, 用药后第 4 周, 与生理盐水对照组的 $\Delta HBsAg$ 相比, 苦参碱组和青蒿素组的 $\Delta HBsAg$ 均存在明



注: HBV cccDNA 转染后第 8 周即急性期, HBsAg 是乙型肝炎病毒表面抗原, HBV 是乙型肝炎病毒。与生理盐水对照组相比, 各用药组 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 每组 6 只小鼠。

图 1 急性期 CBA/CaJ 小鼠经苦参碱或青蒿素治疗后血清 HBsAg (A) 和 HBV DNA 水平 (B) 的变化

Figure 1 Serum HBsAg (A) and HBV DNA (B) levels in CBA/CaJ mice during acute phase after matrine or artemisinin treatment

显差异 (均 $P < 0.05$)。

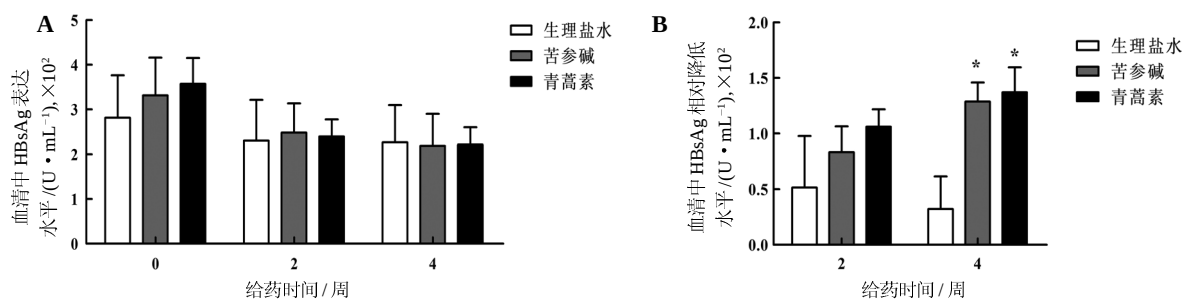
2.3.2 慢性期给药过程中小鼠血清及肝脏 HBV DNA 和 HBV cccDNA 拷贝数变化

在 HBV 感染慢性期, 给药后第 4 周收集小鼠血清及肝脏等样本, 分别提取病毒基因组 DNA, 采用实时定量 PCR 法检测各组小鼠血清中 HBV DNA (图 3A) 以及肝组织中 HBV DNA 和 HBV cccDNA (预先进行 T_5 酶切处理) 的拷贝情况 (图 3B)。结果表明, 苦参碱能明显降低小鼠血清或肝组织中 HBV DNA 的拷贝数 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 也能明显降低小鼠肝组织中 HBV cccDNA 的拷贝数 ($P < 0.05$); 但是, 青蒿素仅对血清中 HBV DNA 有明显抑制作用 ($P < 0.05$), 而对肝组织中 HBV DNA 和 HBV cccDNA 作用均无明显影响 (均 $P > 0.05$)。

2.3.3 慢性期给药过程中小鼠肝组织 HBsAg 和 HBcAg 的表达

免疫组织化学法检测给药后 HBV 感染慢性期小鼠肝组织中 HBsAg 和 HBcAg 的表达情况, 结果显示, 生理盐水对照组和苦参碱、青蒿素给药组中均能观察到 HBsAg 和 HBcAg 阳性表达 (图 4A)。对观察到的阳性信号数量进行统计分析, 结果 (图 4B) 显示, 苦参碱对 HBsAg 和 HBcAg, 以及青蒿素对 HBsAg 作用均不明显 (均 $P > 0.05$); 但是, 青蒿素对 HBcAg 表达有明显的抑制作用 ($P < 0.05$)。

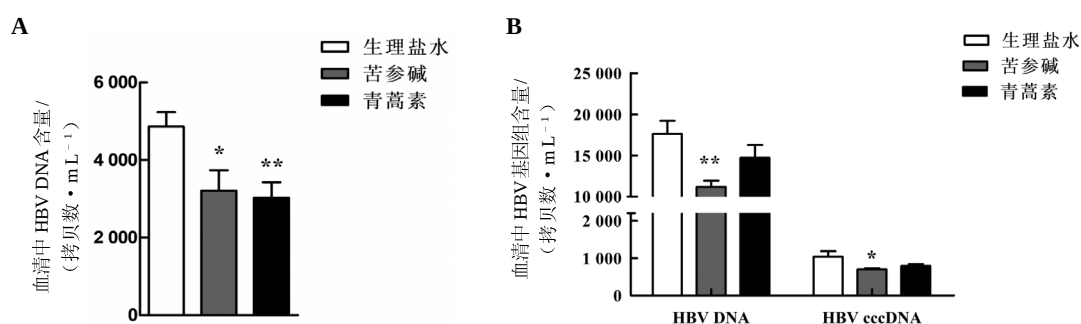
综上, HBV cccDNA 转染后 HBV 感染急性期和慢性期小鼠模型经苦参碱和青蒿素治疗后, 各药物对 HBV 主要标志物有不同程度的抑制效果 (表 1)。



注: HBV cccDNA 转染后第 26 周即慢性期。HBsAg 是乙型肝炎病毒表面抗原, HBV 是乙型肝炎病毒。与生理盐水对照组相比, 各用药组 * $P < 0.05$; 每组 6 只小鼠。

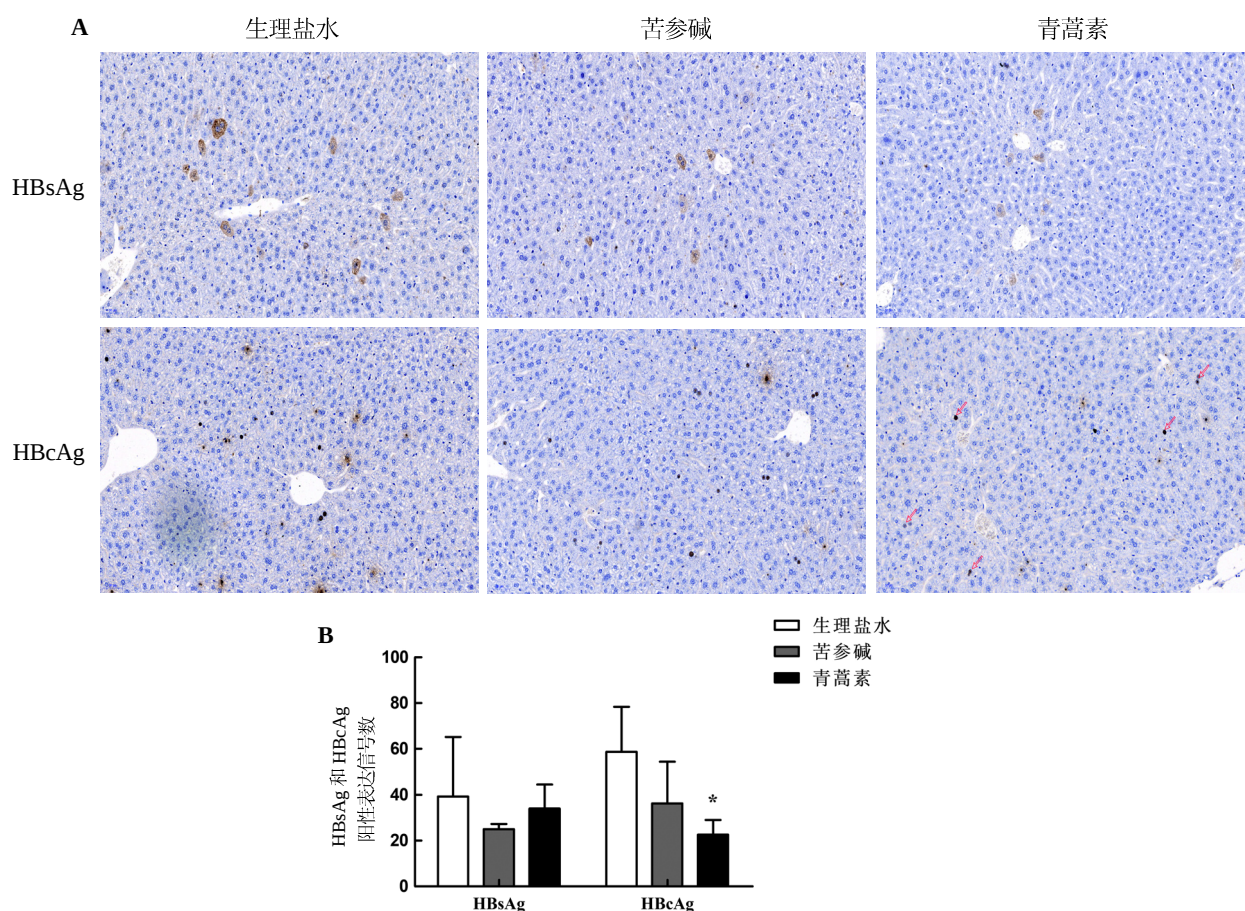
图 2 慢性期 CBA/CaJ 小鼠经苦参碱或青蒿素治疗后血清中 HBsAg 水平变化 (A) 及相对降低水平 (B)

Figure 2 Serum HBsAg level (A) and decrease (B) in CBA/CaJ mice during chronic phase after matrine or artemisinin treatment



注: HBV cccDNA 转染后第 26 周即慢性期。HBV 是乙型肝炎病毒, cccDNA 指共价闭合环状 DNA。与生理盐水对照组相比, 用药组 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 每组 6 只小鼠。

图 3 慢性期 CBA/CaJ 小鼠经苦参碱或青蒿素治疗后血清 (A) 及肝脏 (B) 中 HBV DNA 或 HBV cccDNA 拷贝数
Figure 3 The copy number of HBV DNA or cccDNA in serum (A) and liver tissues (B) of CBA/CaJ mice during chronic phase after matrine or artemisinin treatment



注: HBV cccDNA 转染后第 26 周即慢性期。HBsAg 为乙型肝炎病毒 (HBV) 表面抗原, HBcAg 为 HBV 核心抗原。与生理盐水对照组相比, 用药组 * $P < 0.05$; 每组 6 只小鼠。

图 4 免疫组织化学法检测慢性期 CBA/CaJ 小鼠经苦参碱或青蒿素治疗后肝组织中 HBsAg 和 HBcAg 的表达水平 (DAB 染色, ×200) (A) 及其阳性信号数量统计结果 (B)

Figure 4 Immunohistochemical detection of the expression levels (DAB staining, ×200) (A) and the number of positive signals (B) of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and hepatitis B virus core antigen (HBcAg) in liver tissues of CBA/CaJ mice during chronic phase after matrine or artemisinin treatment

表 1 HBV cccDNA 转染小鼠模型给药 4 周后苦参碱和青蒿素对 HBV 的抑制效果评价

Table 1 Inhibitory effects of matrine and artemisinin on HBV in HBV cccDNA mouse model after 4 weeks of administration

药物	急性期		慢性期						
	血 清		血 清			组 织			
	HBsAg	HBV DNA	HBsAg	ΔHBsAg	HBV DNA	HBsAg	HBcAg	HBV DNA	HBV cccDNA
苦参碱	*	**	—	*	*	—	—	**	*
青蒿素	*	**	—	*	**	—	*	—	—

注: * 表示 $P<0.05$; ** 表示 $P<0.01$; — 表示 $P>0.05$; HBsAg 为乙型肝炎病毒 (HBV) 表面抗原, HBcAg 为 HBV 核心抗原, ΔHBsAg 表示 HBV 相对表面抗原表达水平。

3 讨论

苦参碱是从豆科槐属植物苦参中分离出来的一种单体化合物,有效成分为生物碱,具有抗炎、抗病毒及抗肿瘤等药理作用^[12-13]。迄今,在抑制 HBV 作用方面,临床试验结果显示,苦参碱单独或联合其他药物能抑制肝细胞表达和分泌 HBsAg,并抑制 HBV DNA 复制^[6, 15-17]。尽管苦参碱已被应用于慢性乙肝治疗,但其更多的功能并不清楚。而来源于黄花蒿的青蒿素,在抑制 HBV 的作用方面目前报道较少。Romero 等^[11]利用 HepG2 2.2.15 细胞模型,初步证明青蒿素与拉米夫定联合使用具有协同抗 HBV 的作用。因此,青蒿素作为抗 HBV 感染的抗病毒药物值得进一步评价。

HBV 的 HBsAg 和 (或) HBV DNA 在动物体内存在时间超过 6 个月时,即由急性 HBV 感染转为慢性 HBV 感染^[18]。另外,HBV 感染免疫系统发育完善的成年人后,90% 的成年人只是一过性感染,即表现为急性感染。而母婴传播导致新生儿 HBV 感染时,由于新生儿免疫功能尚未发育完善,不能清除母亲传染给的 HBV,90% 的新生儿会在感染超过 6 个月时发展成为慢性乙肝^[19]。因此,探索不同时期的药物作用效果,对指导临床用药具有十分重要的意义。

近年来,HBsAg 定量检测已在临床中被广泛应用,其水平可以反映疾病分期与疾病进展风险。HBV DNA 定量主要用于评估 HBV 感染者体内的病毒复制水平,是抗病毒治疗适应症选择及疗效判断的重要指标。另外,HBcAg 在区分疾病分期、预测肝细胞癌发生风险方面是一个重要

的相关性指标^[18]。同时,cccDNA 是 HBV 进入细胞、建立感染后进行复制和增殖的直接模板^[20],是现有的抗病毒药物治疗亦难以清除的主要遗传物质^[21],也是乙肝药物研究的“终极”靶点^[22]。因此,检测上述指标可有效评估药物的作用效果。

本研究首先应用课题组前期建立的技术体系,高压注射体外合成的 HBV cccDNA 于 37 只免疫功能正常的 CBA/CaJ 小鼠尾静脉后,发现 HBsAg 阳性且 HBV DNA 大于 1×10^5 拷贝/mL 的小鼠有 36 只,模型成功率达 97.30%。随后的实验结果证实,该模型的 HBV 标志物,尤其是 HBV cccDNA 均能表达,病毒携带时限可长达半年以上,与前期实验结果^[8-10]一致。该模型的成功建立,为后续药效评价奠定了基础。

随后,本课题组将 36 只 HBV cccDNA 阳性小鼠模型分成 HBV 感染急性期和 HBV 感染慢性期,系统观察苦参碱和青蒿素对 HBV 主要标志物的抑制效果。在感染急性期,苦参碱和青蒿素既能够明显抑制血清中 HBsAg 的分泌,又能降低血清 HBV DNA 的复制;结果提示,苦参碱和青蒿素对 HBV 感染急性期的患者作用明显。在感染慢性期,苦参碱和青蒿素能明显降低血清中 ΔHBsAg 及 HBV DNA 水平;前者结果未见报道,而后者与以往文献报道的体外实验结果及临床结果^[6, 11, 22-24]基本一致。同时本研究还发现,在感染慢性期,苦参碱和青蒿素对血清和肝组织中 HBsAg 的抑制作用不明显;这与已报道的临床结果^[6, 22-24]有一定差异,可能是本研究中生理盐水对照组与两个药物组的起始 HBsAg 水平不一致所致。进一步观察苦参碱和青蒿素对肝组织中 HBV 标志物的作

用, 结果发现, 苦参碱和青蒿素对 HBsAg 均无明显作用。更有趣的是, 本研究还发现苦参碱和青蒿素对 HBV 的作用效果是不同的: 苦参碱能有效抑制 HBV DNA 和 HBV cccDNA, 而对 HBcAg 无明显抑制作用; 相反, 青蒿素能有效抑制 HBcAg, 而对 HBV DNA 和 HBV cccDNA 无明显抑制作用。以上研究结果提示: 苦参碱和青蒿素在小鼠体内对肝组织中的 HBV 有一定程度的抑制作用, 同时两种药物的抗 HBV 作用机制可能存在一定差异。

综上所述, 本研究首次应用免疫正常的 HBV cccDNA 转染小鼠模型在急性感染期和慢性感染期进行了苦参碱和青蒿素抗 HBV 有效性评价的示范研究, 结果发现苦参碱和青蒿素对 HBV 均有不同程度的抑制作用, 这一结果与以往文献报道^[23-24]基本一致。除此之外, 本研究结果还丰富了苦参碱和青蒿素对 HBV 感染慢性期肝组织中标志物 cccDNA、HBcAg 等的的作用功效评价数据, 为使用苦参碱和青蒿素进行抗 HBV 治疗提供了新的理论依据。后续本课题组还将充分利用该小鼠模型的优势进一步开展药物作用机制, 尤其是免疫机制的研究, 以期对 HBV 急性感染期和慢性感染期药物评价提供更多数据支持。

参考文献:

- [1] JIA L Y, GAO Y N, HE Y W, et al. HBV induced hepatocellular carcinoma and related potential immunotherapy[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 159:104992. DOI:10.1016/j.phrs.2020.104992.
- [2] European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection[J]. *J Hepatol*, 2017, 67(2): 370-398. DOI:10.1016/j.jhep.2017.03.021.
- [3] LIU J, LIANG W N, JING W Z, et al. Countdown to 2030: eliminating hepatitis B disease, China[J]. *Bull World Health Organ*, 2019, 97(3):230-238. DOI:10.2471/BLT.18.219469.
- [4] SMITH S, HARMANCI H, HUTIN Y, et al. Global progress on the elimination of viral hepatitis as a major public health threat: an analysis of WHO Member State responses 2017[J]. *JHEP Rep*, 2019, 1(2):81-89. DOI:10.1016/j.jhepr.2019.04.002.
- [5] CHEN Z C, ENGLE R E, SHEN C H, et al. Distinct disease features in chimpanzees infected with a precore HBV mutant associated with acute liver failure in humans[J]. *PLoS Pathog*, 2020, 16(8):e1008793. DOI:10.1371/journal.ppat.1008793.
- [6] 王冠蕾, 富大智. 苦参碱与恩替卡韦联合介入治疗乙型肝炎的临床疗效分析[J]. *贵州医药*, 2018, 42(4):420-422. DOI:10.3969/j.issn.1000-744X.2018.04.013.
- [7] CHOU H H, CHIEN W H, WU L L, et al. Age-related immune clearance of hepatitis B virus infection requires the establishment of gut microbiota[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(7):2175-2180. DOI:10.1073/pnas.1424775112.
- [8] CAO M, ZHAO Z H, TANG Y W, et al. A new hepatitis B virus e antigen-negative strain gene used as a reference sequence in an animal model[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 496(2):502-507. DOI:10.1016/j.bbrc.2018.01.081.
- [9] LIU Y, ZHAO Z H, LV X Q, et al. Precise analysis of the effect of basal core promoter/precore mutations on the main phenotype of chronic hepatitis B in mouse models[J/OL]. *J Med Virol* (2020-05-19) [2021-01-02]. <https://doi.org/10.1002/jmv.26025>.
- [10] WANG L, CAO M, WEI Q L, et al. A new model mimicking persistent HBV e antigen-negative infection using covalently closed circular DNA in immunocompetent mice [J]. *PLoS One*, 2017, 12(4):e0175992. DOI:10.1371/journal.pone.0175992.
- [11] ROMERO M R, EFFERTH T, SERRANO M A, et al. Effect of artemisinin/artesunate as inhibitors of hepatitis B virus production in an "in vitro" replicative system[J]. *Antiviral Res*, 2005, 68(2):75-83. DOI:10.1016/j.antiviral.2005.07.005.
- [12] SHI J F, HAN X, WANG J F, et al. Matrine prevents the early development of hepatocellular carcinoma like lesions in rat liver[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(4):2583-2591. DOI:10.3892/etm.2019.7875.
- [13] GONG X B, GAO Y, GUO G Q, et al. Effect of matrine on primary human hepatocytes *in vitro*[J]. *Cytotechnology*, 2015, 67(2):255-265. DOI:10.1007/s10616-013-9680-1.
- [14] BLAZQUEZ A G, FERNANDEZ-DOLON M, SANCHEZ-VICENTE L, et al. Novel artemisinin derivatives with potential usefulness against liver/colon cancer and viral hepatitis[J]. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21(14):4432-4441. DOI:10.1016/j.bmc.2013.04.059.
- [15] 唐超, 马军伟, 刘辉, 等. 恩替卡韦联合苦参碱对慢性乙型肝炎的疗效及对炎症因子水平的影响[J]. *西北药学杂志*, 2019, 34(5):673-676.
- [16] 孔李远, 孔维环, 赵莉. 苦参碱联合恩替卡韦对慢性乙型肝炎肝纤维化的影响[J]. *中国实用医刊*, 2020, 47(8):108-110. DOI:10.3760/cma.j.cn115689-20191218-09088.

(下转第 130 页)