

何苗,向霞,徐如青,等. HBV 相关肝纤维化小鼠模型的建立及关键表型深度分析研究 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31 (2): 187-193.

He M, Xiang X, Xu RQ, et al. A mouse model of liver fibrosis with HBV and key phenotypic analysis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(2): 187-193.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.02.006

HBV 相关肝纤维化小鼠模型的建立及关键表型深度分析研究

何苗¹, 向霞¹, 徐如青¹, 伍悦², 吕小琴¹, 刘阳¹, 何明忠¹, 赖国旗^{1*}

(1. 重庆医科大学实验动物中心, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学第一附属医院, 重庆 400042)

【摘要】 目的 探索 HBV 感染所致肝纤维化小鼠模型形成条件及表型分析。**方法** 以 18 只 CBA/CaJ 小鼠为研究对象, 随机分为对照组 ($n = 4$) 和实验组 ($n = 14$), 实验组按照每只 2 μg 的剂量、通过高压水动力方法进行尾静脉注射 cccDNA, 对照组注射等体积 PBS, 转染 68 周后采样。通过 qPCR 方法检测肝中 HBV DNA 及 HBV cccDNA, ELISA 方法检测血清 HBsAg、HBeAg, 免疫组化检测肝组织中 HBsAg、HBcAg, 用一代测序法检测 HBeAg⁺/HBsAg⁻ 及 HBeAg⁻/HBsAg⁺ 组织 DNA 基因测序, 生化分析 ALT 和 AST, HE 染色、天狼星染色及 Masson 染色分析肝组织病理。**结果** 实验组中, 100% 的小鼠 HBV-DNA 拷贝数高于 1000 copies/mL; 小鼠肝组织 cccDNA 拷贝数显著高于空白组 ($P < 0.05$); 42.9% 的小鼠血清 HBsAg 和 HBeAg 呈阳性; 60% 的小鼠肝 HBsAg 呈阳性和 26.7% 的小鼠肝 HBcAg 呈阳性; HBeAg⁻/HBsAg⁺ 样本中出现 A1762T/G1764A 和 G1896A/G1899A 位点突变, HBeAg⁺/HBsAg⁻ 样本出现前 S2 区及 S 区多位点突变; 小鼠 ALT 值异常率为 57.1%, AST 值异常率为 7.1%; HE 染色观察到所以实验组小鼠肝组织损伤及肝炎症浸润, 天狼星染色、Masson 染色观察到 92.9% 的肝组织发生纤维化。**结论** 通过尾静脉高压水动力注射 CBA/CaJ 小鼠 HBV cccDNA 68 周后, HBV 主要 DNA、HBV cccDNA、血清及肝组织 HBsAg、HBeAg 仍然阳性, HBV 感染可引起小鼠肝纤维化, 甚至可模拟临床 HBV BCP/PC 基因突变表型。

【关键词】 HBV; CBA/CaJ; 肝纤维化; 小鼠模型; 表型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 02-0187-07

A mouse model of liver fibrosis with HBV and key phenotypic analysis

HE Miao¹, XIANG Xia¹, XU Ruqing¹, WU Yue², LYU Xiaoqin¹, LIU Yang¹, HE Mingzhong¹, LAI Guoqi^{1*}

(1. Laboratory Animal Center of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China. 2. First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400042)

Corresponding author: LAI Guoqi. E-mail: laiguoqi@163.com

【Abstract】 Objective To explore the formation conditions and phenotype of a mouse model of liver fibrosis induced by HBV (hepatitis B virus, HBV) infection. **Methods** Eighteen CBA/CaJ mice were randomly divided into control group ($n = 4$) and experimental group ($n = 14$), and the experimental group was injected with cccDNA by tail vein at a dose of 2 μg per mouse by high-pressure hydrodynamic method, and the control group was injected with an equal volume of PBS. Samples were obtained 68 weeks after transfection. HBV DNA and HBV cccDNA in mouse livers were detected by quantitative PCR. Serum HBsAg (hepatitis B surface antigen, HBsAg) and HBeAg (hepatitis Be antigen, HBeAg) levels were tested using ELISA. HBsAg and HBcAg liver tissue levels were tested by immunohistochemistry. HBV DNA in mouse liver tissue, with the phenotype HBeAg⁺/HBsAg⁻ or HBeAg⁻/HBsAg⁺, were first-generation sequenced. ALT and AST

【基金项目】 国家自然科学基金 (81570541), 重庆市科委社会民生项目 (cstc2017shmsA130097)。
Funded by National Natural Science Foundation of China (81570541), Chongqing Science and Technology Commission Social Livelihood Project (cstc2017shmsA130097).

【作者简介】 何苗 (1999—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: HBV 慢性感染小鼠模型建立及应用。Email: hemiao9906@163.com

【通信作者】 赖国旗 (1964—), 女, 教授, 研究方向: HBV 慢性感染小鼠模型建立及应用。Email: laiguoqi@163.com

levels were evaluated by biochemical analysis, and histopathology was analyzed by HE, Sirius, and Masson staining.

Results In the experimental group, 100% of mouse HBV DNA was higher than 1000 copies/mL. The cccDNA copy number of mouse liver tissue was significantly higher than that of the blank group ($P < 0.05$); 42.9% of mice were positive for HBsAg and HBeAg, 60% were positive for HBsAg, and 26.7% were positive for HBeAg. Mutations at A1762T/G1764A and G1896A/G1899A were found in HBeAg⁻/HBsAg⁺ samples, and there were multiple mutations in the S2 and S regions of HBeAg⁺/HBsAg⁻ samples. ALT and AST values were abnormal in 57.1% and 7.1% of mice, respectively. Liver damage and infiltration were observed in all experimental mice, and liver tissue fibrosis was found in 92.9% of mice. **Conclusions** HBV DNA, HBV cccDNA, HBsAg, HBeAg of Serum and liver tissue remained positive 68 weeks after hydrodynamically injecting HBV cccDNA into CBA/CaJ mice. HBV infection caused liver fibrosis in mice and even mimicked a clinical HBV BCP/PC gene mutation phenotype.

[Keywords] HBV; CBA/CaJ; liver fibrosis; mouse model; phenotypic

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

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 是一种存在于患者血液中, 在肝组织中以共价闭合环状 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA) 为模板进行复制的一种全球广泛传播的病毒, 可以引起慢性肝炎、肝纤维化、肝硬化, 甚至肝癌^[1-2]。据统计, 全球每年患有慢性乙肝达 3 亿人, 死于 HBV 相关的肝炎患者有 100 万^[3-4]。HBV 感染所致肝纤维化动物模型对 HBV 的发病及治疗研究具有十分重要的意义。

HBV 小鼠模型主要包括人源化肝小鼠、转基因小鼠、重组病毒载体转导的小鼠模型以及 3 种手段相结合的小鼠模型, 目前这些模型已被广泛应用于乙肝病毒疾病及机制研究^[5]。但是, 上述模型的共同不足是难以形成肝纤维化, 这成为 HBV 相关肝纤维化发病机制及其药物评价的瓶颈。

本课题前期通过高压水动力尾静脉注射人工合成的 cccDNA 到小鼠体内, 仅对小鼠观察了 26 周, 虽然 HBV 主要标志物均为阳性, 但是却未发现小鼠肝纤维化^[6]。由于 HBV 所致肝病是一个慢性感染过程, 本实验以同样方法建立 HBV 感染小鼠模型, 持续观察到 68 周, 除发现小鼠 HBV 标志物部分阳性外, 最终出现了小鼠肝纤维化表型, 甚至部分小鼠出现 HBV 基因突变所致的 HBsAg 阴性 (HBsAg⁻) 或 HBeAg 阴性 (HBeAg⁻)。此研究结果为肝纤维化药物评价及 HBsAg 或 HBeAg 转阴机制研究的模型建立提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

18 只 8 ~ 10 周龄 SPF 级雄性 CBA/CaJ 小鼠, 体重 22 ~ 25 g, 购自重庆医科大学动物实验中心

【SCXK(渝)2018-0003】。饲养环境: 昼夜各半循环交替照明, 湿度恒定, 温度控制在 22 ~ 25℃。高压的纯净水, 无菌营养颗粒饲料自由采食, 饲养于重庆医科大学动物实验中心进行动物实验【SYXK(渝)2018-0003】。所有操作均符合重庆医科大学伦理委员会伦理要求(2015019)。

1.1.2 主要试剂与仪器

血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒 (TIANGEN, DP304); ELISA 检测试剂盒 (HBeAg) (KHB, 202107112); ELISA 检测试剂盒 (HBsAg) (KHB, 202107222); HBV qPCR 引物及 HBV cccDNA qPCR 引物 (上海生工生物工程技术服务有限公司合成); 4% 多聚甲醛固定液 (Biosharp, 21313432); 盐酸塞拉嗪注射液 (又名速眠新 II, 圣鑫, 20210401); 谷丙转氨酶 (ALT) 检测试剂条 (北京益仁恒业科技有限公司, 011851); 谷草转氨酶 (AST) 检测试剂条 (北京益仁恒业科技有限公司, 011808); T5 核酸外切酶 (NEB, M0363L); 马抗 HbsAg 多克隆抗体 (Abcam, ab9193) 和山羊抗兔 IgG H&L (Abcam, ab6717); 兔抗 HBcAg (GeneTex, GTX40523); 兔抗马 IgG (Cloud-Clone Corp, SAA544Eq09)。

PCR 仪 (Bio-Rad, S1000TM Thermal Cycler, 美国), 核酸电泳仪 (北京六一仪器厂, DYY-6C, 中国), 凝胶成像分析仪 (Bio-Rad, GelDoc XR Biorad, 美国), 恒温水浴锅 (上海一恒科技有限公司, XMTD-6000, 中国), 台式高速冷冻离心机 (Thermo Scientific, FRESCO21, 美国), 核酸浓度仪 (Thermo Scientific, NaNo DROP 2000, 美国), Real-time System PCR 定量 PCR 分析仪器 (Bio-Rad, CFX ConnectTM, 美国), 酶标检测仪 (Thermo Scientific, 1510-00783,

美国)全自动生化分析仪(IDEXX, IDEXX Catalyst, 美国)及配套试纸条(DXTM), 微量移液枪(Eppendorf, 德国)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立

将 18 只小鼠随机分为 2 组: 对照组 4 只, 实验组 14 只。实验前首先观察确认小鼠健康状况正常, 然后, 通过尾静脉在 5 ~ 8 s 内对照组和实验组分别注射 2 mL 生理盐水或含有 2 ng cccDNA^[7-8] 的生理盐水。建立模型 3 d 后尾静脉采血, 通过 ELISA 检测 HBsAg、HBeAg, 以确定模型建立成功。成功建模后, 小鼠饲养环境保持不变, 并且对小鼠的机体状态及生活状态进行观察, 68 周对小鼠进行采血并分离血清, -20℃ 保存备用。小鼠按照 0.6 ~ 1.0 mg/kg 剂量肌肉注射浓度为 50% 的盐酸塞拉嗪注射液, 麻醉后以脱颈椎法处死, 解剖收集肝组织, 部分固定于 4% 的多聚甲醛中用于病理切片, 部分冻存于 -80℃ 冰箱中用于乙型肝炎标志物检测。

1.2.2 肝中 HBV DNA 提取及拷贝数检测

根据“血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒”说明书, 提取小鼠肝组织 DNA。用 qPCR 检测 HBV DNA 拷贝数, 方法如下: 合成引物序列, 上游引物序列为 (F): 5'-CCTCTTCATCCTGCTGCT-3'、下游引物序列为 (R): 5'-AACTGAAAGCCAAACAGTG-3'; 构建质粒作为标准品, 其 HBV DNA 拷贝数为 5×10^3 、 5×10^4 、 5×10^5 、 5×10^6 、 5×10^7 和 5×10^8 /mL 拷贝; qPCR 反应条件: 95℃, 5 min; 94℃, 30 s, 60℃, 30 s, 40 个循环; 72℃, 30 s; 72℃, 3 min; 72℃, 5 min。qPCR 体系: MIX 5 μ L, F/R 0.4 μ L, DNA 2 μ L, 加入 ddH₂O, 定容至 10 μ L。

1.2.3 肝中 HBV cccDNA 提取及拷贝数检测

使用 T5 外切酶 37℃ 处理 60 min, 消化松弛环状的双链 DNA (relaxed circular DNA, rcDNA), 70℃ 处理 20 min 终止消化, 保留环状的 cccDNA。将溶液收集到离心管中 -20℃ 保存备用。qPCR 检测 HBV cccDNA 拷贝数。其引物序列为 (F): 5'-CCTCTTCATCCTGCTGCT-3'、(R): 5'-AACTGAAA GCCAAACAGTG-3'。标准品、反应条件及反应体系同上。

1.2.4 血清中 HBsAg 及 HBeAg 表达检测

将小鼠血清从 -20℃ 冰箱取出, 根据“ELISA 检测试剂盒 (HBsAg)”和“ELISA 检测试剂盒 (HBeAg)”说明书, 检测 HBsAg 及 HBeAg。

1.2.5 肝组织 HBsAg 及 HBeAg 免疫组化检测

将小鼠肝组织固定在 4% 的多聚甲醛液中, 随后进行石蜡包埋和切片。切片经脱蜡、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。使用的抗体分别为: 马抗 HBsAg (1:100) 和兔抗 HBeAg (1:200) 一抗, 兔抗马 IgG (1:200) 和山羊抗兔 IgG H&L (1:50) 二抗^[9]。

1.2.6 样本测序

HBsAg 呈现阴性 (HBsAg⁻) 且 HBeAg 呈现阳性 (HBeAg⁺) 样本和 HBsAg 呈现阳性 (HBsAg⁺) 且 HBeAg 呈现阴性 (HBeAg⁻) 的肝组织样本送至上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.2.7 谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST) 浓度检测

将小鼠血清从 -20℃ 冰箱取出, 置于冰上融化后, 取 70 μ L 血清置于生化分析 IDEXX Catalyst 容器内, 放入 ALT、AST 检测试剂条, 进行 ALT、AST 测定^[7-8]。

1.2.8 苏木精-伊红染色法 (Hematoxylin-Eosin staining, HE) 染色

组织切片依次用二甲苯脱蜡并以升序乙醇系列脱水。切片用苏木精染色 5 min, 然后用自来水冲洗。然后, 用盐酸乙醇进行 30 s 的鉴别, 用自来水冲洗, 用 0.6% 氨水变蓝, 用自来水冲洗。切片用曙红染色 2 min。置于光学显微镜下评估。

1.2.9 天狼星红染色

中性甲醛固定组织, 石蜡切片, 常规脱蜡至水。人大青石蓝液染色 5 ~ 10 min。蒸馏水洗 3 次。天狼星红饱和苦味酸浓染色 15 ~ 30 min; 无水乙醇直接分化与脱水, 封片。置于光学显微镜下评估。

1.2.10 Masson 染色

切片常规脱蜡、水合、苏木精染色 5 min, 然后在酸性乙醇分化溶液中分离。加入 Masson 反蓝溶液后, 用地衣红-品红染料溶液进行染色。用冰醋酸溶液浸取后, 用磷钼酸盐溶液冲洗切片 3 min, 然后用苯胺蓝染色液染色 5 min。切片用 95% 乙醇和无水乙醇脱水, 二甲苯渗透, 用中性胶密封。置于光学显微镜下评估。

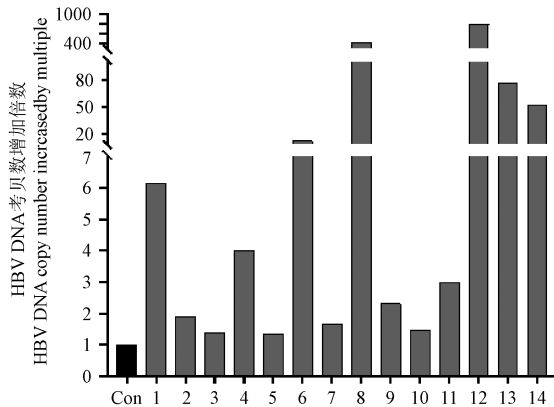
1.3 统计学分析

所有数据均用 GraphPad Prism 8 软件处理, 多组间比较使用单因素方差分析, 采用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 两组间比较采用独立样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 肝中 HBV DNA 拷贝数

通过高压水动力方法建立动物模型,注射生理盐水和 cccDNA 后饲养 68 周,解剖小鼠采样肝组织,对肝组织 HBV DNA 拷贝数进行检测,发现实验组小鼠 HBV DNA 拷贝数显著高于对照组小鼠 HBV DNA 拷贝数(1000 copies/mL) ($P < 0.05$),最高可达到对照组的 900 倍以上(图 1)。



注:Con 为空白组,其余为实验组。(下图同)

图 1 空白组(Con)与实验组(1 ~ 14)小鼠肝中 HBV DNA 拷贝数增加倍数

Note. Con was blank group, others were experimental group.
(The same in the following figures)

Figure 1 Multiple increase of HBV DNA copy number in liver of blank group (Con) and experimental group(1 ~ 14)

2.2 肝中 HBV cccDNA 拷贝数

感染 cccDNA 68 周后小鼠肝组织 cccDNA 拷贝数明显高于空白组小鼠肝组织 cccDNA 拷贝数($P < 0.05$)(图 2)。

2.3 血清中 HBsAg 和 HBeAg

注射后 68 周采用 IHC 方法检测小鼠肝中的 HBsAg 和 HBeAg 表达,结果在实验组中($n = 14$),42.9%(6/14)小鼠 HBsAg 和 HBeAg 表达均为阳性(HBsAg⁺/HBeAg⁺);7.1%(1/14)小鼠出现 HBsAg 阴性,而 HBeAg 阳性(HBsAg⁻/HBeAg⁺);7.1%(1/14)小鼠出现 HBsAg 阳性、而 HBeAg 阴性(HBsAg⁺/HBeAg⁻);42.9%(6/14)小鼠 HBsAg 和 HBeAg 表达均为阴性(HBsAg⁻/HBeAg⁻)。

2.4 肝中 HBsAg 及 HBcAg 表达

在注射后第 68 周采用 IHC 方法检测小鼠肝中的 HBsAg 表达。观察到与正常小鼠肝组织(图 3)相比,HBV 感染小鼠肝组织中 HBsAg 被染成红棕色,主要围绕动脉窦表达细胞质,在肝小叶中呈现

阳性信号(图 3)。在注射后第 68 周采用 IHC 方法检测小鼠肝中的 HBcAg 表达。观察到与正常小鼠肝组织(图 3)相比,HBV 感染小鼠肝组织中 HBcAg 被染成红棕色,主要表达细胞核,在动脉窦附近呈现阳性信号(图 3)。

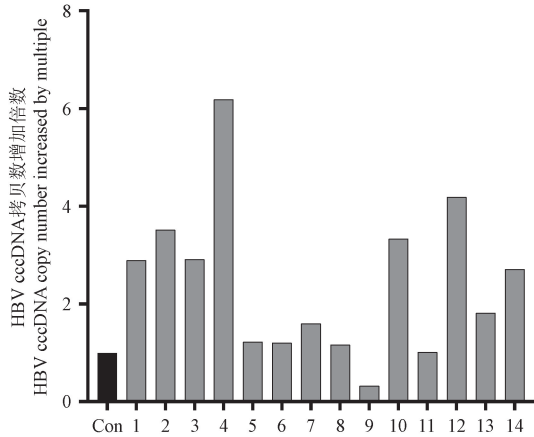


图 2 空白组(Con)与实验组(1 ~ 14)小鼠肝中 HBV cccDNA 拷贝数增加倍数

Figure 2 Multiple increase of Copy number of HBV cccDNA in liver of blank group (Con) and experimental group(1 ~ 14)

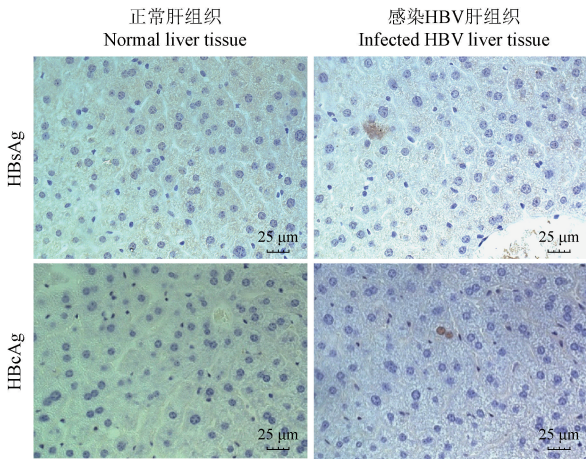


图 3 小鼠肝组织中 HBsAg 和 HBcAg 表达(40×)

Figure 3 HBsAg and HBcAg expression in mouse liver tissue (40×)

2.5 HBsAg⁻/HBeAg⁺及 HBsAg⁺/HBeAg⁻小鼠肝组织基因测序分析

提取 HBsAg⁻/HBeAg⁺和 HBsAg⁺/HBeAg⁻样本肝组织 DNA 后,前者进行 HBV Basal Core Promoter (BCP)区及 Pre-Core (PC)区基因组测序,后者进行 HBV PreS2 区和 S 区基因组测序。HBsAg⁻/HBeAg⁺样本的克隆子表现出 A1762T/G1764A、G1896A/G1899A 位点突变。除此之外还出现 C1809T、C1816G、G1752A、C1913A 突变(表 1)。

HBsAg⁺/HBeAg⁻样本突变位点分别是 T/C、95 位插入 C、37 位插入 G、272 位插入 A 和 T/C、95 位插入 C、37 位插入 G、272 位插入 A、290 位插入 C (见表 2)。

表 1 HBsAg⁻/HBeAg⁺样本测序分析

Table 1 Sequencing analysis of HBsAg⁻/HBeAg⁺ samples

突变编号 Mutation number	克隆子 1 Clone 1	克隆子 2 Clone 2	克隆子 3 Clone 3
突变 1 Mutation 1	A1762T/G1764A	A1762T/G1764A	A1762T/G1764A
突变 2 Mutation 2	G1896A/G1899A	G1896A/G1899A	G1899A
突变 3 Mutation 3	-	-	C1809T
突变 4 Mutation 4	-	-	C1816G
突变 5 Mutation 5	-	-	G1752A
突变 6 Mutation 6	-	-	C1913A
突变 7 Mutation 7	-	-	G1915C

注:HBV PreS2 区测序结果,HBsAg⁻/HBeAg⁺样本的克隆子表现出 A1762T/G1764A、G1896A/G1899A 位点突变。
Note. HBsAg⁻/HBeAg⁺ clones showed mutations at A1762T/G1764A and G1896A/G1899A in HBV PreS2 genome sequencing results.

表 2 HBsAg⁺/HBeAg⁻样本测序分析

Table 2 Sequencing analysis of HBsAg⁺/HBeAg⁻ samples

突变编号 Mutation number	克隆子 1 Clone 1	克隆子 2 Clone 2
突变 1 Mutation1	1T/1C	1T/1C
突变 2 Mutation 2	95 位插入 C (Insert C at bit 95)	95 位插入 C (Insert C at bit 95)
突变 3 Mutation 3	137 位插入 G (Insert G at bit 137)	37 位插入 G (Insert G at bit 37)
突变 4 Mutation 4	272 位插入 A (Insert A at bit 272)	272 位插入 A (Insert A at bit 272)
突变 5 Mutation 5	-	290 位插入 C (Insert C at bit 290)

注:S 区基因组测序结果,HBsAg⁺/HBeAg⁻样本部分为点发生突变。
Note. Sequencing results of S-region genome showed that HBsAg⁺/HBeAg⁻ samples had point mutations.

2.6 血清中 ALT 和 AST 值

注射后 68 周采用生化分析仪检测血清中 ALT 和 AST 浓度,检测结果表明:在空白组中,小鼠 ALT 异常数占样本总数的 25.0% (1/4,均高于正常值),AST 值正常;在实验组中,ALT 异常占样本总数的 57.1% (8/14),AST 异常占样本总数 7.1% (1/14,均高于正常值)。

2.7 炎症及纤维化损伤

解剖后,对照组 25%小鼠形成肿瘤 (1/4),实验组 57.1% (8/14) 小鼠形成肿瘤。

2.8 病理染色

2.8.1 HE 染色

肝组织 HE 染色时,细胞核被染成蓝色,细胞浆及红血球被染成红色。与肝肿瘤旁组织相比,肝肿瘤组织细胞癌细胞排列紊乱、细胞核增大、核浆比较大、细胞间距小;能够明显观察到细胞稀疏、细胞坏死、细胞水肿、点状坏死;细胞核集中,有细胞形态但无细胞核,核固缩后溶解消失等现象 (图 4)。

2.8.2 天狼星红染色

肝组织天狼星染色时,组织胶原纤维被染成红色。HBV 感染组小鼠肝组织纤维化较癌旁严重;与肝肿瘤旁组织相比,肝肿瘤组织肝纤维化明显,主要存在于静脉窦附近 (图 5)。

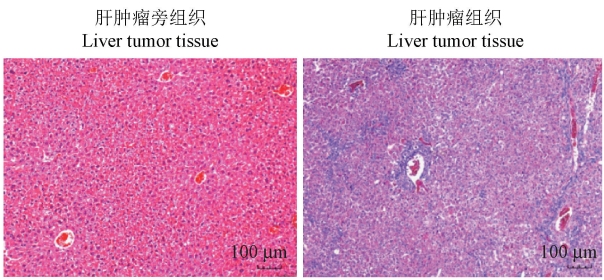


图 4 小鼠肝组织 HE 染色 (10×)
Figure 4 HE staining of mouse liver tissue (10×)

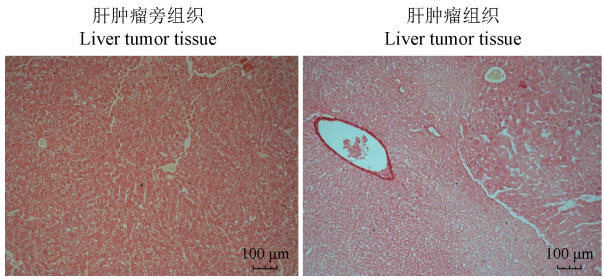


图 5 肝组织天狼星红染色 (10×)
Figure 5 Sirius red staining of liver tissue (10×)

2.8.3 Masson 染色

肝组织 Masson 染色时,胶原纤维、黏液、软骨呈蓝色,胞浆、肌肉、纤维素、神经胶质呈红色,胞核被染成黑蓝色。与肝肿瘤旁组织相比,肝肿瘤组织呈

蓝紫色区域明显,主要集中在静脉窦附近,部分出现于细胞间质中,胶原纤维丰富(图6)。

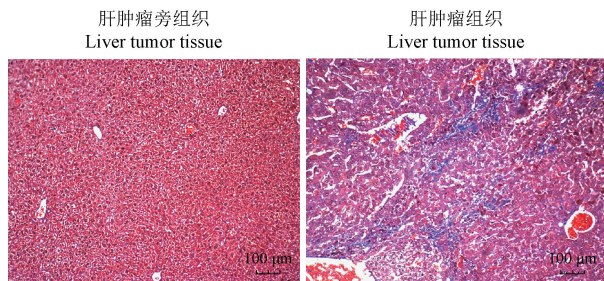


图6 小鼠肝组织 Msaon 染色(10×)

Figure 6 Msaon staining of mouse liver tissue(10×)

3 讨论

HBV 是通过逆转录复制的嗜肝 DNA 病毒。HBV 病毒进入机体后,吸附在肝细胞表面,通过钠离子-牛磺胆酸共转运蛋白(sodium taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP)受体进入细胞^[10],病毒基因组以 rcDNA 形式进入细胞核,在细胞核中形成 cccDNA^[11-12],然后,以 cccDNA 为模板,先后在细胞核及细胞质中进行逆转录、翻译,形成各种蛋白,部分 rcDNA 与蛋白包装成病毒颗粒释放到胞外进入血液继续感染其他肝细胞,部分 rcDNA 重新由细胞质进入细胞核进行复制产生 cccDNA^[13-14]。cccDNA 一旦形成,就作为微染色体长期存在于感染细胞的细胞核中,是形成 HBV 慢性感染、肝纤维化、肝硬化及肝癌的原动力。肝纤维化是指由各种致病因子所致肝内结缔组织异常增生,任何肝损伤在肝修复愈合的过程中都有肝纤维化的过程。肝纤维化是 HBV 疾病恶化的关键环节,HBV 感染所致的肝纤维化小鼠模型是 HBV 相关肝纤维化药物评价研究的瓶颈^[15-16]。

目前,人源化肝小鼠模型是现有的相对接近自然状态下感染的小鼠模型,但同时免疫缺陷限制了它在实验应用的范围^[17-18];转基因小鼠能够根据特定的实验目的利用基因工程技术对小鼠基因进行靶向敲除或改变设计,更加精确且具有稳定的遗传性,但转基因小鼠免疫耐受,且不产生 cccDNA;重组病毒载体转导小鼠模型是近年来的研究热点方法,通过这种方法建模具有免疫原性、靶向性良好,整合到宿主基因组中的目的基因能持久稳定地表达,但病毒载体是机体免疫的外来入侵体,具有机体毒性且不易降低,且通常被认为不易稳定持续形成 cccDNA。随着研究的推进更多新模型不断产生,如

更复杂的免疫系统重建模型,但其技术挑战性以及耗时间问题成为人们选择的限制因素。在 Wu 等^[19]的研究报道中表明,通过结合 Cre/LoxP 技术建立了重组 cccDNA (rcccDNA) 小鼠模型。在该模型中能够观察到炎症和纤维化,然而,该 rcccDNA 含有外源基因 LoxP,同时, rcccDNA 水平通常太低,不能被 Southern Blot,限制了它们用于研究 cccDNA 的体内维持和开发新的 cccDNA 靶向药物。

本课题组前期采用高压水动力模型通过尾静脉注射方法向小鼠注射 cccDNA,发现 HBV 主要标志物在 26 周时,均为阳性,超过半年时间,达到慢性感染标准。但是,此时小鼠模型的肝未观察到肝纤维化表型。

研究人员设想,是否可以延长 HBV 感染时间,建立起肝纤维化的小鼠模型? 本研究在小鼠感染 HBV 68 周后,首先观察了 HBV 标志物。我们发现,在实验组中,小鼠肝中检测到 HBV DNA 和 HBV cccDNA; HBsAg 阳性率和 HBeAg 阳性率分别为 60.0% 和 26.7%;小鼠血清中 42.9% 为 HBsAg⁺/HBeAg⁺, 42.9% 为 HBsAg⁻/HBeAg⁻, 7.1% 为 HBeAg⁺/HBsAg⁻, 7.1% 为 HBeAg⁻/HBsAg⁺。结果表明:在部分鼠体内 HBV 主要标志物仍能够持续存在,HBV 可以在 CBA/CaJ 小鼠持续感染达 1.5 年(68 周),显著高于现有模型 HBV 携带时限。

由于有 7.1% 的小鼠出现 HBeAg⁺/HBsAg⁻ 或者 HBeAg⁻/HBsAg⁺,我们猜测导致这种表型的原因是否与基因突变有关? 为了验证这个设想,我们针对 HBeAg⁺/HBsAg⁻ 和 HBeAg⁻/HBsAg⁺ 血清样本进行克隆测序,结果显示 HBeAg⁺/HBsAg⁻ 基因部分位点产生突变, HBeAg⁻/HBsAg⁺ 基因在 C1896 T/A1899 T 位点的突变,后者与人感染 HBV 后, HBeAg⁻/HBsAg⁺ 具有相似性^[20],即在小鼠出现 HBeAg⁻ 与 C1896 T/A1899 T 位点的突变密切相关。

ALT、AST 主要分布在肝中,血清中 ALT 活力在肝组织发生病变时浓度升高,是检测肝组织炎症的重要标志物,血清中 AST 在细胞受损时浓度升高,是检测肝组织损伤的重要标志物。在本研究中,发现实验组 57.1% ALT 和 7.1% AST 异常,提示小鼠具有明显的肝损伤及组织炎症病变情况。

通过解剖发现,57.1% 的在肝部位观察到明显的肿瘤,显著高于对照组 ($P < 0.05$) (25.0%, $n = 4$)。病理 HE 染色可通过红蓝色鲜明对比观察组织细胞结构形态及分布情况,本实验 HE 染色表明,在

HBV 感染肝组织中出现肝细胞癌细胞间距小、细胞排列紊乱,细胞核增大、集中、有细胞形态但无细胞核,核浆比较大;能够明显观察到细胞稀疏、细胞坏死、细胞水肿、点状坏死、炎症浸润。

天狼星染色是通过不同折射呈现不同颜色深浅,Masson 染色通常用来评估组织中纤维以及炎症因子,胶原纤维呈蓝色,肌纤维呈红色,天狼星染色和 Masson 染色均可反映纤维化部位及严重程度。本实验对小鼠肝进行相应染色检测,天狼星染色结果表明:大部分在静脉窦附近出现胶原纤维化,少部分胶原纤维弥散至细胞间质中。Masson 染色结果表明,肿瘤组织纤维化程度较为严重,胶原纤维弥散在静脉窦及细胞间质中,而旁组织中有纤维化但程度较轻,多分布在静脉窦附近。表明,CBA/CaJ 小鼠感染 HBV 68 周,92.9% (13/14) 可形成肝纤维化。

总之,HBV cccDNA 转染 CBA/CaJ 小鼠所建立的感染模型,可携带 HBV 标志物达到 68 周,小鼠体内 HBV 可发生 BCP/PC 位点基因突变,小鼠具有肝纤维化表型。研究结果为 HBV 肝炎疾病治疗研究及治疗肝纤维化药物评价模型的建立提供理论参考。

参 考 文 献(References)

- [1] Lupberger J, Hildt E. Hepatitis B virus-induced oncogenesis [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(1): 74–81.
- [2] Ward JW, Hinman AR. What is needed to eliminate hepatitis B virus and hepatitis C virus as global health threats [J]. Gastroenterology, 2019, 156(2): 297–310.
- [3] WHO. Hepatitis B fact sheets [EB/OL]. (2018-07-18) [2019-04-13]. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>.
- [4] Collaborators PO. Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modelling study [J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2018, 3(6): 383–403.
- [5] 苏瑜, 朱园飞, 田青右, 等. HBV cccDNA 的体外细胞模型和实验小鼠模型 [J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(6): 1205–1211.
Su Y, Zhu YF, Tian QY, et al. *In vitro* cell model and mouse model of HBV cccDNA [J]. J Clin Hepatol, 2019, 35(6): 1205–1211.
- [6] 刘阳. BCP/PC 突变对慢性乙型肝炎小鼠模型表型影响的研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学; 2020.
Liu Y. Study on the effect of BCP/PC mutation on the phenotype of hepatitis B mouse model [D]. Chongqing: Chongqing Medical University; 2020.
- [7] Cao M, Zhao Z, Tang Y, 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.
- [8] Wang L, Cao M, Wei QL, 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.
- [9] 伍悦, 吕小琴, 刘阳, 等. 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 [J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(2): 108–115, 130.
Wu Y, Lü XQ, Liu Y, et al. Application of immunocompetent HBV cccDNA mouse model in the efficacy evaluation of matrine and artemisinin on inhibiting HBV [J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 41(2): 108–115, 130.
- [10] Yan H, Zhong G, Xu G, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus [J]. eLife, 2012, 1: e00049.
- [11] Arzumanyan A, Reis HMGPV, Feitelson MA. Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma [J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(2): 123–135.
- [12] Ni Y, Lempp FA, Mehrle S, et al. Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes [J]. Gastroenterology, 2014, 146(4): 1070–1083.
- [13] Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection [J]. Virology, 2015, 479: 672–686.
- [14] Yang W, Mason WS, Summers J. Covalently closed circular viral DNA formed from two types of linear DNA in woodchuck hepatitis virus-infected liver [J]. J Virol, 1996, 70(7): 4567–4575.
- [15] Revill PA, Chisari FV, Block JM, et al. A global scientific strategy to cure hepatitis B [J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2019, 4(7): 545–558.
- [16] Allweiss L, Dandri M. The role of cccDNA in HBV maintenance [J]. Viruses, 2017, 9(6): 156.
- [17] Rhim JA, Sandgren EP, Palmiter RD, et al. Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(11): 4942–4946.
- [18] Bissig KD, Wieland SF, Tran P, et al. Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment [J]. J Clin Invest, 2010, 120(3): 924–930.
- [19] Wu M, Li J, Yue L, et al. Establishment of Cre-mediated HBV recombinant cccDNA (rcccDNA) cell line for cccDNA biology and antiviral screening assays [J]. Antiviral Res, 2018, 152: 45–52.
- [20] Zhang D, Ma S, Zhang X, et al. Prevalent HBV point mutations and mutation combinations at BCP/preC region and their association with liver disease progression [J]. BMC Infect Dis, 2010, 10: 271.