

抗乙型肝炎病毒药物筛选模型及其应用

秦向菁综述 吕秋军审校

(军事医学科学院放射医学研究所,北京 100850)

摘要:乙型肝炎是一种严重危害人类的传染性疾病,全世界约有 3.5 亿乙型肝炎病毒(HBV)携带者,中国就有 1.2 亿人之多。HBV 感染是慢性肝炎、肝硬化和原发性肝癌的主要诱因。研制抗 HBV 的药物是药学工作者的重要任务。研究 HBV 的实验模型近年来有了很大进展,从猩猩、树鼩、鸭、转基因小鼠等动物模型到原代细胞、转染细胞等细胞模型。鸭、土拨鼠、转基因小鼠等动物模型已用于药物评价。

关键词:肝炎病毒,乙型;药物筛选;动物模型;细胞模型

中图分类号:R978.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0971(2004)06-0366-04

乙型肝炎病毒(HBV)只有很窄的宿主范围和较高的组织特异性,很难在普通实验动物中建立疾病模型。在病毒分类学上,HBV 属于嗜肝 DNA 病毒科(hepadnaviridae)。嗜肝 DNA 病毒科包括 2 个属:哺乳动物病毒属和禽病毒属,前者感染人类、非人灵长类、土拨鼠、地松鼠等;后者分别感染鸭和灰苍鹭等。鸭乙型肝炎病毒(DHBV)、土拨鼠肝炎病毒(WHV)在嗜肝性、毒粒形态、结构和基因复制等方面都与 HBV 很相似,使人们对 HBV 有了更多的了解途径。现就目前应用的抗 HBV 药物筛选模型做一综述。

1 动物模型

1.1 鸭

DHBV 的自然感染主要是先天性的,适合于慢性肝炎的药理、药效学研究,由于没有免疫应答,不适于免疫机制方面的研究。以 DHBV 实验感染接种鸭可有三种结果:持续病毒感染、有或无病毒血症的短暂感染和不感染,与接种时雏鸭的日龄和接种时的病毒剂量有关。Le Guerhier 等^[1]选用急性感染 DHBV 的北京鸭,考察阿德福韦(adefovir)与 DNA 疫苗联合使用的效果。3 d 龄小鸭接种带病毒血清,每只接种 6.5×10^8 基因拷贝。检测血清及肝脏内 DHBV DNA 含量。证明核苷类似物与 DNA 疫苗联合使用可诱导持续的抗病毒作用,核苷类似物联合 HBV 特异免疫反应是有效的治疗方法。

共价闭合环状 DNA(cccDNA)是病毒复制的起点,在病毒复制周期中起着重要作用。因此,对

cccDNA 含量的评价是 DNA 病毒感染模型建立的关键。Addison 等^[2]选用先天性感染 DHBV-16 Alberta 种系病毒的北京鸭,建立准确的聚合酶链反应(PCR)方法,可敏感精确地检测鸭中 cccDNA 的含量。在动物模型中考察抗病毒疗效时,通过监控 cccDNA 的含量变化,决定何时停药而不引起病毒反弹。

目前,鸭模型能达到很高的 DHBV 感染率,易喂养,可进行较大数量研究,已广泛用于抗 HBV 药物的筛选工作。

1.2 土拨鼠

WHV 在形态学、基因组结构、基因产物、流行病学感染进程、疾病和癌症发生、发展方面与 HBV 非常近似。Genovesi 等^[3]采用土拨鼠慢性乙肝感染模型评价核苷类似物洛布卡韦(lobucavir)的抗病毒活性。所用土拨鼠在一周龄时接种从携带 WHV 的土拨鼠血清中分离出的病毒,即土拨鼠病毒 WH7。6 月龄时检测血清中的 WHV 抗原、抗体。结果血清中 WHV 表面抗原阳性和核心抗体阳性的土拨鼠均为慢性 WHV 携带土拨鼠。实验说明,WHV 携带土拨鼠每日口服洛布卡韦显效的最小剂量约为 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

Korba 等^[4]研究拉米夫定(lamivudine, 3TC)与泛昔洛韦(famciclovir)合用对慢性 WHV 携带的土拨鼠体内 WHV 复制的作用。所用土拨鼠为 WHV 阴性的母土拨鼠所产幼鼠,3 d 龄时接种 500 万单位标准 WHV 接种体,产生 65% ~ 70% WHV 表面抗原(WHsAg)携带动物。将 14 ~ 20 月龄的慢性 WHV 携带土拨鼠分成 9 组,拉米夫定、泛昔洛韦单独给药或两者合用给药。每日给药,共 12 周,停药后观察 12

周。定期采集血清,麻醉状态下取动物肝组织,检测 WHV 抗原、抗体。实验证实,合用治疗对 WHV 的复制较单用某一种药物有显著的抑制作用。

人类在慢性 HBV 感染 20~50 年后,肝癌发生率为 5%。而土拨鼠 3 年后几乎 100% 发生肝癌。土拨鼠癌变发生率高、周期短,可用于研究癌变高危因素。目前,土拨鼠已广泛用作抗 HBV 药物评价模型,用于疫苗、治疗性疫苗及抗病毒药物的研发,还可用于病毒生命周期分子机制、癌变机制及细胞感染机制的研究。

1.3 小鼠

一般采用尾静脉注射的方法将改造过的 HBV 基因组注射入小鼠体内进行研究。Suzuki 等^[5]将 1.5 倍长度 adw2 亚型 HBV 基因组通过尾静脉注射入 5 周龄 Balb/cA 雌性小鼠,肝脏可以检测出病毒转录产物,约 3% 的肝细胞有核心抗原表达。HBV 分泌入血,HBV DNA 在血液内持续一周,乙型肝炎表面抗原(HBsAg)持续 2 周,之后可检测到表面抗体。Giladi 等^[6]用同样方法评价小分子干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 抑制 HBV 的复制情况。选用 6~7 周 Balb/c 小鼠,每只尾静脉注射 15 μg HBV 质粒和 1 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ siRNA 混合物,2 d 后检测血清中 HBsAg, HBeAg 和 HBV DNA 含量,对 HBsAg 最大抑制率达到 92%。

Galun 等^[7]建立 TrimerA 小鼠模型,用于研究 HBV 感染及抗 HBV 病毒药物的评价。正常小鼠给予 SCID 种小鼠骨髓细胞进行辐射保护处理并经致死剂量辐射照射后,可以移植经 HBV 感染的人肝组织块,称之为 HBV TrimerA 小鼠模型。在 TrimerA 小鼠体内移植已感染 HBV 肝脏组织或 HepG2 细胞,研究人白细胞介素-6(IL-6)在 TrimerA 小鼠体内对 HBV 感染的影响。实验证明 IL-6 能促进 HBV 感染,IL-6 存在时,感染小鼠增多。

1.4 转基因动物

转基因动物的建立,为乙型肝炎的基础研究和抗 HBV 药物开发带来希望。将 HBV 目的基因显微注射到小鼠的受精卵,产生稳定整合 HBV 基因组的小鼠。选取的目的基因,可以是全长或超过其基因组长度的基因(如 1.3 和 2 倍基因),也可以是 HBV 片段,如前 s、s、c 和 x 基因,用于研究各基因及其表达产物在 HBV 生活史中的作用。1986 年以来,多株表达 HBsAg 和 x 抗原的转基因小鼠已建立成功,但早期转基因小鼠一般为 HBV 全基因组单拷贝或二

拷贝,血清中病毒含量很低,影响了其广泛使用。1.3 倍 HBV 是完整的病毒复制体,除含完整 HBV 基因组外,在 5' 端还多余一段 HBV 序列,即增强子 I (ENH I)、增强子 II (ENH II)、X 开放读码框 (X ORF) 和 Poly A。该重组体能高效启动 HBV 复制,产生几乎所有 HBV 特异转录子,体外转染和转基因小鼠有高度肝细胞特异性,可成为进一步研究 HBV DNA 的结构、功能及抗病毒药物筛选的良好模型。Julander 等^[8,9]利用转基因小鼠评价阿德福韦及恩替卡韦(entecavir)的抗病毒活性。所用小鼠为 Guidotti 建立的 1.3.32 品系,由 C57BL/6 小鼠转基因而来。实验前每只小鼠采集血清建立病毒基线对照,测量所有转基因小鼠 HBeAg 浓度,使每组包含 HBeAg 浓度从高到低的小鼠,实验证实了阿德福韦及恩替卡韦抗 HBV 的作用。Wang 等^[10]将 HBsAg 和 X 基因(HBx)定位引入小鼠基因组 p21 位点,通过显微注射和胚胎移植,获得稳定表达表面抗原基因和 X 基因的转基因小鼠,发现 X 基因转基因小鼠 18 月龄开始发生肝癌,而表面抗原基因转基因小鼠 15 月龄就开始发生肝癌。15~24 月龄的表面抗原基因转基因小鼠只有雄性发生肝癌,这种性别间的差异与人类男性 HBV 感染者更易发生肝癌相似,可能与雌激素受体在肝中表达相关。目前,表达 HBV 病毒的转基因小鼠已逐渐用于评价有抗病毒活性的化合物。转基因小鼠优点是便于基因改造,研究病毒基因表达的调节规律,但不能研究免疫发病机制及病毒复制周期。

2 细胞模型

2.1 原代肝细胞

原代肝细胞感染模型的优点在于保留肝细胞的细胞功能,支持 HBV 的自然穿入和复制。但在经过数日培养后逐渐失去肝特异细胞因子表达,难以持续感染。人肝细胞 HBV 传染最能模拟自然的体内过程。Schulze-Bergkamen 等^[11]采用常规两步灌注法,以胶原酶灌注人肝组织,分离得到人原代肝细胞(PHH)。灌注时间、培养密度及是否添加血清对细胞最优化生长影响很大。以野生型 HBV 感染和腺病毒载体携带 HBV 基因组转染,使 PHH 有效感染 HBV。胎肝细胞是 HBV 宫内感染靶细胞,研究表明,妊娠晚期(22~24 周)胎肝细胞在体外可被 HBV 感染。由于人肝细胞来源少,收获率不稳定,功能状态也有个体差异,亦有人采用电穿孔仪 HBV 线形裸

DNA 进入原代大鼠肝细胞或原代鸭细胞。收集培养上清或裂解液,通过 Southern 杂交,检测 HBV 复制中间体,可见松弛环状 DNA 等,有 HBsAg 表达,HBcAg 和 HBeAg 较少,有待进一步研究。也有人以胶原酶经门静脉灌流鸭或土拨鼠肝脏制备原代肝细胞,用 WHV 或 DHBV 感染细胞,免疫荧光技术检测 HBsAg 和 HBcAg, Southern 印迹检测细胞内或培养上清液中的 HBV DNA。加入 DHBV 后,约 10% 原代鸭肝细胞可被感染,用含二甲基亚砜(DMSO)培养液无血清培养,可极大提高感染率。

2.2 肝癌细胞系

HepG2, Huh6 和 Huh7 等肝癌细胞系,能表达正常肝细胞的许多蛋白,可作为有肝特异基因表达的体外培养系统。目前,常用的 HepG2.2.15 细胞株,是将克隆的 HBV DNA 双聚体转染 HepG2 细胞系获得的细胞株。2.2.15 细胞分泌外膜蛋白(HBsAg)、核壳蛋白(HBeAg)、完整毒粒及全长 cccDNA,已成为国内外公认的 HBV 全基因稳定表达细胞系。已知另一种可稳定分泌 HBV 颗粒的细胞系是 HB611 细胞系,将 3 倍 HBV 质粒转染 Huh6 细胞构建,也广泛用于抗 HBV 药物的体外筛选工作。但这两种细胞不能研究 DNA 复制的调控,用抗生素维持阳性表达,分泌 HBV 毒粒,与体内 HBV 稳定平衡的复制不同。

已知的人肝细胞系中,尚没有一种细胞系对人 HBV 易感。Gripon 等^[12]构建了 HepaRG 细胞系,这种细胞系具有肝细胞的形态和肝细胞的功能,并与原代人肝细胞一样对 HBV 易感。细胞系需在肾上腺皮质激素和 DMSO 存在下维持对人 HBV 的易感性。该细胞能中和 HBeAg。HepaRG 细胞系可作为研究 HBV 穿入的工具,该细胞系与人肝细胞有许多类似之处,可用于药物机制研究、抗病毒药物筛选等。

拉米夫定长期用药后(6 个月以上)病毒发生变异,出现拉米夫定耐药 HBV,随疗程的延长变异增加。Walters 等^[13]建立了能分泌拉米夫定耐药 HBV 的稳定细胞系。这一细胞系转染有稳定 HBV 序列,细胞培养上清液及细胞内均可检测到分泌的完整病毒颗粒。病毒颗粒对拉米夫定的敏感性大幅度降低。药物实验证实,这种耐拉米夫定 HBV 对喷昔洛韦(penciclovir)敏感性降低,但仍可被核苷类似物碳环脱氧鸟嘌呤核苷(CDG)和阿巴卡韦(abacavir)抑制,为寻找对耐拉米夫定 HBV 有活性的抗病毒化合

物提供了一条途径。HBV X 基因编码的 X 蛋白具有多种功能,如转录激活、诱导细胞增殖、抑制 p53 活性等,并与乙型肝炎相关肝癌的发生密切相关。一些研究显示,X 蛋白通过影响细胞通路扰乱细胞生长。Wang 等^[14]将含 X 基因启动子的质粒转入 Chang 细胞系,建立了表达 HBV X 基因的 Chang-HBx 细胞,能稳定表达 X 蛋白,表达可受控制,用于观察 X 蛋白在乙型肝炎进程中的作用。实验发现,X 蛋白可以诱导细胞生长,可在病毒感染早期使细胞停留在 G₁ 期。还尝试将该细胞移植入 Balb/c 裸鼠中,观察肿瘤生长情况,在裸鼠中可以观察到由于 X 基因表达引起 Chang-HBx 细胞生长抑制。

3 结语

寻找合适的 HBV 感染模型,对理解乙型肝炎的发病机制、病毒复制周期及建立特异的药物筛选模型具有重要的意义。目前,研究 HBV 的动物模型和细胞模型有了很大的进展,北京鸭、美洲土拨鼠、转基因鼠为目前常用的动物模型,已用于药物评价,但与 HBV 有基因差异。广泛使用的 HepG2.2.15 和 HB611 细胞系,存在用抗生素维持阳性表达,与体内 HBV 稳定平衡的复制不同的缺点,新的细胞模型不断出现。1.3 倍 HBV 重组体可高效复制 HBV,应用于体外转染,是一种良好的研究工具。一般化合物筛选多选用细胞模型,方便建立高通量筛选方式,用于大量化合物的活性集中筛选。对治疗指数较高的化合物可选用鸭、土拨鼠或转基因小鼠作进一步活性评价。

参 考 文 献

- [1] Le Guerhier F, Thermet A, Guerret S, et al. Antiviral effect of adefovir in combination with a DNA vaccine in the duck hepatitis B virus infection model[J]. *J Hepatol*, 2003, 38(3): 328-334.
- [2] Addison WR, Wong WW, Fisher KP, et al. A quantitative competitive PCR assay for the covalently closed circular form of the duck hepatitis B virus[J]. *Antiviral Res*, 2000, 48(1): 27-37.
- [3] Genovesi EV, Lamb L, Medina I, et al. Antiviral efficacy of lobucavir (BMS-180194), a cyclobutyl-guanosine nucleoside analogue, in the woodchuck (*Marmota monax*) model of chronic hepatitis B virus (HBV) infection[J]. *Antiviral Res*, 2000, 48(3): 197-203.
- [4] Korba BE, Cote P, Hornbuckle W, et al. Enhanced anti-

- ral benefit of combination therapy with lamivudine and famciclovir against WHV replication in chronic WHV carrier woodchuck[J]. *Antiviral Res* ,2000 ,45(1):19 - 32.
- [5] Suzuki T , Takehara T , Ohkawa K , *et al.* Intravenous injection of naked plasmid DNA encoding hepatitis B virus (HBV) produces HBV and induces humoral immune response in mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun* , 2003 , 300(3):784 - 788.
- [6] 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.
- [7] Galun E , Nahor O , Eid A , *et al.* Human interleukin-6 facilitates hepatitis B virus infection *in vitro* and *in vivo*[J]. *Virology* , 2000 , 270(2):299 - 309.
- [8] Julander JG , Sidwell RW , Morrey JD. Characterizing antiviral activity of adefovir dipivoxil in transgenic mice expressing hepatitis B virus[J]. *Antiviral Res* , 2002 , 55(1):27 - 40.
- [9] Julander JG , Colonno RJ , Sidwell RW , *et al.* Characterization of antiviral activity of entecavir in transgenic mice expressing hepatitis B virus[J]. *Antiviral Res* , 2003 , 59(3):155 - 161.
- [10] Wang Y , Cui F , Lv Y , *et al.* HBsAg and HBx knocked into the p21 locus causes hepatocellular carcinoma in mice[J]. *Hepatology* , 2004 , 39(2):2318 - 2324.
- [11] Schulze-Bergkamen H , Untergasser A , Dax A , *et al.* Primary human hepatocytes - a valuable tool for investigation of apoptosis and hepatitis B virus infection[J]. *J Hepatol* , 2003 , 38(6):736 - 744.
- [12] Gripon P , Rumin S , Urban S , *et al.* Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2002 , 99(24):15655 - 15660.
- [13] Walters KA , Tipples GA , Allen MI , *et al.* Generation of stable cell lines expressing lamivudine-resistant hepatitis B virus for antiviral-compound screening [J]. *Antimicrob Agents Chemother* , 2003 , 47(6):1936 - 1942.
- [14] Wang JC , Hsu SL , Hwang GY. Inhibition of tumorigenicity of the hepatitis B virus X gene in Chang liver cell line[J]. *Virus Res* , 2004 , 102(2):133 - 139.

新型磷酸核苷类抗病毒药物

温晓雪, 彭 涛编译 王 林审校

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要:自从发现(S)-羟基磷酰甲氧基丙基腺嘌呤对 DNA 病毒表现出广谱抗病毒作用以来,人们对磷酸核苷的抗病毒作用进行了广泛的研究。磷酸核苷抑制病毒的复制不同于其他核苷类药物的作用方式,它通过细胞内代谢产生活化态。虽然磷酸核苷表现出广谱的抗病毒活性,但由于磷酸基团带有负电荷使其细胞通透性和口服生物利用度较低,因而必须利用前药方法掩饰其负电荷。目前,已有 3 种该类药物上市,还有 2 种药物处于临床试验阶段。

关键词:磷酸核苷;二磷酸盐;抗病毒药

中图分类号:R978.7 文献标识码:A 文章编号:1001-0971(2004)06-0369-04

1 磷酸核苷类药物的结构特点和作用机制

磷酸核苷是应用广泛的广谱抗病毒药物,部分药物还具有抗肿瘤活性。磷酸核苷可以视为带有磷酸的核苷,核苷类抗病毒药物必须在细胞内被病毒和细胞激酶三磷酸化后才具有抗病毒活性。因此,细胞内的一、二和三磷酸盐的浓度可能与其抑制病毒复制的效果有关。例如,随着酯酶将核苷一磷酸盐水解成核苷速率的增加,其抗病毒作用降低。磷

酸核苷的磷原子和碳原子之间有很强的共价键,因而可以抵抗酯酶的水解作用。此外,磷酸核苷绕过了一磷酸化过程,而这是核苷药物被病毒或宿主细胞激酶转变成其活性代谢产物三磷酸盐的关键的过程。(S)-9-(2',3'-二羟丙基)腺嘌呤[(S)-DHPA]是一个脂肪族无环核苷类似物,对多种 DNA 和 RNA 病毒表现出广谱的抗病毒活性。然而(S)-DHPA 一磷酸酯在体内没有显著的生物活性。(S)-9-(3-羟基-2-磷酰甲氧基)腺嘌呤[(S)-HPMPA]是第一个为防止细胞内酯酶的去磷酸化作用而设计合成的磷