

[文章编号] 1671-587X(2011)06-1005-05

3种新型核苷类似物抗鸭乙型肝炎病毒活性及其 对肝脏组织形态学的影响

吴 荻^{1,2}, 牛俊奇¹, 鲍万国¹, 仲伯华³, 吴新宇¹, 丁艳华¹, 冯相伟¹

(1. 吉林大学第一医院感染症科, 吉林 长春 130021; 2. 吉林省肿瘤医院肿瘤内科, 吉林 长春 130012;
3. 军事医学研究院毒物药物研究所, 北京 100850; 4. 吉林大学公共卫生学院卫生化学教研室, 吉林 长春 130021)

[摘要] 目的: 研究3种具有新型结构的核苷类似物在体内的抗鸭乙型肝炎病毒的活性及其对鸭肝脏组织形态学的影响, 探寻新型高效核苷类抗乙型肝炎病毒药物。方法: 实验组鸭分为2、10和50 mg·kg⁻¹ 3个剂量组, 分别给予核苷类似物030703、030605和030705, 对照组鸭给予阿德福韦10 mg·kg⁻¹, 每日1次, 经口服连续给药30 d。分别在给药前、给药第15天、第30天和停药后第2周时静脉采血, 采用荧光定量PCR方法进行血清鸭乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸(DHBV DNA)检测, 同时设DHBV DNA阳性和阴性对照组。实验结束后处死鸭, 取肝脏, 进行光镜下的病理组织形态学检查。结果: 受试药物030703的高、中、低剂量组在给药后分别有3只(60%)、2只(40%)、1只(20%)鸭的DHBV DNA含量下降至原含量1/3, 与阿德福韦对照组比较, 高剂量组DHBV DNA含量差异有统计学意义($P < 0.01$), 而中、低剂量组差异无统计学意义($P > 0.05$)。受试药物030605的高、中、低剂量组在给药后分别有4只(80%)、3只(60%)、1只(20%)鸭的DHBV DNA含量下降至原含量1/3, 与阿德福韦对照组比较, 高、中剂量组DHBV DNA含量差异均有统计学意义($P < 0.01$), 而低剂量组差异无统计学意义($P > 0.05$)。受试化合物030705药物的高、中、低剂量组在给药后分别有3只(60%)、2只(40%)、0只(0%)鸭的DHBV DNA含量下降至原含量1/3, 与阿德福韦对照组比较, 高剂量组DHBV DNA含量差异有统计学意义($P < 0.01$), 而中、低剂量组差异则无统计学意义($P > 0.05$)。所有测试药物高、中、低剂量各组干预后的鸭肝脏组织形态分别与病毒阳性对照组比较, 炎症均有不同程度的减轻, 与阿德福韦对照组的表现相似。结论: 3种新型核苷类似物030703、030605及030705具有体内抗鸭乙型肝炎病毒的活性, 并且能够不同程度地缓解鸭肝脏组织炎症, 是一类高效的新型核苷类抗乙型肝炎病毒药物。

[关键词] 核苷类似物; 肝炎, 乙型/药物疗法

[中图分类号] R512.6; R453.9 **[文献标志码]** A

Activities of anti-duck hepatitis B virus of three novel nucleoside analogues and their effects on histomorphology of duck liver

WU Di^{1,2}, NIU Jun-qi¹, BAO Wan-guo¹, ZHONG bo-hua³, WU Xin-yu⁴, DING Yan-hua¹, FENG Xiang-wei¹

(1. Department of Infectious Disease, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China;

2. Department of Tumor Internal Medicine, Tumor Hospital of Jilin Province, Changchun 120012, China;

3. Institute of Poison and Drugs, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;

4. Department of Sanitary Chemistry, School of Public Health, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract: Objective To study the activities of anti-duck hepatitis B virus (anti-DHBV) of three novel nucleoside

[收稿日期] 2011-08-15

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题(30400566); 吉林省科技厅科研基金资助课题(20040542)

[作者简介] 吴 荻(1971-), 男, 吉林省长春市人, 副主任医师, 医学博士, 主要从事肝脏疾病的分子生物学研究。

[通信作者] 牛俊奇(Tel: 0431-85612708, E-mail: junqiniu@yahoo.com.cn)

analogues and their effects on histomorphology of duck liver, and to explore novel potential anti-HBV agents.

Methods The anti-DHBV activities were analyzed by fluorescent quantitative PCR in experimental groups with various doses of 030703, 030605, 030705 (2, 10 and 50 mg · kg⁻¹) and adefovir dipioxil control group (10 mg · kg⁻¹). Compounds were taken by oral administration per day and last 30 d. The serum specimens were obtained at the time of before administration, 15 d and 30 d after administration and 2 weeks after withdraw. The serum DHBV DNA was detected with fluorescence quantitative PCR. At the same time, DHBV DNA positive and negative groups were set up. The duck liver specimens were obtained after experiment. The histomorphological changes of duck liver caused by three tested compounds were observed under optic microscope.

Results After administration with compound 030703, there were 3 ducks (60%) in high dose group, 2 ducks (40%) in middle dose group, 1 duck (20%) in low dose group, in which the DHBV DNA contents were decreased to 1/3 of primary contents; compared with adefovir dipioxil control group, the inhibitory effects in high dose group had significant difference ($P < 0.01$), whereas the inhibitory effects in middle and low dose groups had no significant difference ($P > 0.05$). After administration with compound 030605, there were 4 ducks (80%) in high dose group, 3 ducks (60%) in middle dose group, 1 duck (20%) in low dose group, in which the DHBV DNA contents were decreased to 1/3 of primary contents; compared with adefovir dipioxil control groups, the inhibitory effects in high dose group and middle group had significant difference ($P < 0.01$), whereas the inhibitory effect in low dose group had no significant difference ($P > 0.05$). After administration with compound 030705, there were 3 ducks (60%) in high dose group, 2 ducks (40%) in middle dose group, 0 duck (0%) in low dose group, in which the DHBV DNA contents were decreased to 1/3 of primary contents; compared with adefovir dipioxil control groups, the inhibitory effects in high dose group had significant difference ($P < 0.01$), whereas the inhibitory effects in middle and low groups had no significant difference ($P > 0.05$). Compared with adefovir dipioxil control group, the effects of all three test compounds (high, middle and low dose groups) on duck liver inflammation were similar to that in adefovir dipioxil control group.

Conclusion Three novel test compounds 030703, 030605 and 030705 have obvious anti-DHBV activities and might improve duck liver inflammation to some extent. It has been suggested that all of these novel compounds be potential anti-HBV agents.

Key words: nucleoside analogues; hepatitis B, chronic/ drug therapy

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染是急慢性肝炎的主要原因, 其与肝纤维化和肝细胞癌的发生密切相关, 在治疗上缺乏理想的抗病毒药物^[1-2]。随着拉米夫定、阿德福韦、恩替卡韦等核苷类似物的应用, 乙型肝炎的抗病毒治疗迈进了一个新阶段。目前, 新型核苷类似物的研发成为抗 HBV 未来发展的方向, MCC-478 (LY582563)、2-氨基-6-(4-甲氧基苯基硫基)-9- {2- [双 (2, 2, 2-三氟乙氧基)-磷酸基-甲氧基]-乙基}-嘌呤就代表了一类新结构类型的核苷酸药物^[3]。然而, MCC-478 的衍生物在鸭模型实验动物水平上进行抗 HBV 治疗的研究国内外未见报道。本研究以 MCC-478 为先导化合物, 通过合理药物设计, 对其碱基母核的 6 位进行结构改造 (避开已注册的专利), 合成新型目标化合物, 并对其在动物体内抗乙肝病毒活性及其对肝脏组织形态学的影响进行研究, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 受试化合物

核苷类似物 030703、030605 及 030705 均由军事医学科学院毒物药物研究所仲伯华教授合成并提供。阳性对照药物阿德福韦酯片, 由天津药物研究院药业有限责任公司生产 (国药准字 H20050803, 批号 050501), 每片含阿德福韦酯 10 mg。

1.2 实验动物

本实验的实验动物为江浙地区特有的鸭禽种系麻鸭, 经筛选确认为垂直传播感染, 鸭乙型肝炎病毒核酸 (DHBV DNA) 检测呈阳性。选用 12 月龄雌性麻鸭, 体质量 900~1 100 g。

1.3 实验分组及给药方法

实验组鸭分为低、中、高 3 个剂量组, 分别给予剂量为 2、10 和 50 mg · kg⁻¹ 的核苷类似物 030703、030605 及 030705, 均为口服途径给药, 每天 1 次, 共 30 d。对照组鸭给予阿德福韦, 剂量为 10 mg · kg⁻¹, 亦为口服途径给药, 连续给药

30 d。同时设 DHBV DNA 阳性对照组和阴性对照组。每个剂量组 5 只麻鸭。实验组和对照组的麻鸭分别在给药前、给药 15 及 30 d 和停药后第 2 周时静脉采血, 分离血清后保存于 -20°C 待检, 进行血清 DHBV DNA 定量 PCR 检测。DHBV DNA 定量方法采用外标准 TaqMan 实时荧光 PCR 法检测, 由实验室标定的相对外标准作为参比, 定量线性范围为 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^8 \text{ copies} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

测定各实验组鸭的 DHBV DNA 定量结果。根据阳性对照组的定量均值和标准差, 比较实验组用药前、用药后和停药后 DHBV DNA 定量结果的前后变化, 以此界定变化差别和了解药物的治疗效果。实验结束后处死实验鸭, 取肝脏, 进行光镜的病理组织形态学检查。

1.4 TaqMan 探针实时荧光 PCR 法定量检测鸭乙型肝炎动物模型血清中 DHBV DNA 载量

1.4.1 引物和探针 根据基因库中已登录的 DHBV 全基因序列, 在最保守的区域中设计多套引物和探针, 合成后进行实验筛选, 确定上游引物位于 DHBV 基因序列 1321-1339 位, 下游引物位于 1563-1583 位。每组样品包含鸭血清提取物 $2.5 \mu\text{L}$, 去离子水 $7.5 \mu\text{L}$, 反应混合液 $10 \mu\text{L}$ 。反应混合液包含 LSYBR Green 1 荧光染料 $2 \mu\text{L}$, $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$ $2.4 \mu\text{L}$, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的引物 $0.5 \mu\text{L}$, 水 $5.1 \mu\text{L}$ 。引物序列为: $5'$ -AGCTGGCCTAATCGGATTAC- $3'$ 和 $5'$ -TGTCCTGTCAGATACAGCAAG- $3'$ 。探针位于 1387-1411 位, 探针两端分别标记 FAM 荧光基团和 TAMRA 淬灭基团。

1.4.2 扩增模板的制备 15% Chelex 100 (Bio-Red 产品) $20 \mu\text{L}$ 中加入待检鸭血清 $20 \mu\text{L}$, 混匀后放 $98 \sim 100^{\circ}\text{C}$ 加热变性 10 min , $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min , 上清作为扩增的模板。

1.4.3 核酸扩增和荧光检测 PCR 反应液 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Tris-HCl}$, $\text{pH}8.3$, $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$, $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ dNTP}$, 上游和下游引物各 $600 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 探针 $200 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Taq E 1.5 U) $48 \mu\text{L}$ 中加 $2 \mu\text{L}$ 待扩增模板或参比标准, 置荧光 PCR 仪 (iCycler Bio-Rad 公司产品) 中进行核酸扩增和实时荧光检测。PCR 参数为: 95°C 、 3 min , 94°C 、 5 s , 60°C 、 30 s , 共 42 个循环, 在 60°C 时采集荧光信号。扩增结束后, 以 4~13 个循环数计算阈值, 仪器根据参比标准的 Ct 值自动计算出被检样品的 DHBV DNA 的拷贝数。

1.4.4 疗效判定标准 根据统计结果, 如果采用 2SD, 则用药后的 DHBV DNA 量要低于用药前含量的 $1/2$ 可以判为有效, 但考虑到 PCR 技术的特殊性, 本实验采用低于用药前 DHBV DNA 含量 $1/3$ 作为判断疗效的阈值 (即治疗过程中 DHBV DNA 含量下降至原含量的 $1/3$ 判断为有效)。

1.5 鸭肝组织标本病理组织学检测

取各个剂量组鸭肝脏标本, 10% 中性甲醛固定, 石蜡包埋, 制作切片, HE 染色, 光学显微镜下观察肝脏组织病理学变化。

参照 Scheuer 慢性肝炎分期分级标准, 将慢性肝炎的炎症活动度分为 0~4 共 5 级, 纤维化程度分为 0~4 共 5 期, 对应定性程度为 0、±、+、++ 及 +++。评分标准如下: 0~± 为 0.25 分, ± 为 0.5 分, ±~+ 0.75 分为分, + 为 1.0 分, +~++ 1.5 分, ++ 为 2.0 分, ++~+++ 为 2.5 分。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 10.0 版统计软件进行统计学处理, 实验前后有效率比较采用 χ^2 检验; DHBV DNA 载量以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 受试化合物对鸭血清 DHBV DNA 的抑制作用

2.1.1 阳性及阴性对照组 经过对阳性组 5 只麻鸭, 每只鸭 4 份血标本的 DHBV DNA 检测, 该组整体 DHBV DNA 平均含量在 1×10^8 左右, 而且前后比较稳定。而阴性对照组的血清 DHBV DNA 在实验过程中均保持为阴性。

2.1.2 阿德福韦对照组 该组 5 只鸭子中的 4 只 (80%) 在治疗过程中 DHBV DNA 含量有较明显的下降, 该组有效率与阳性对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.1.3 受试药物 030703 实验组 受试药物 030703 高、中、低剂量组在药物治疗过程中分别有 3、2 及 1 只实验鸭的 DHBV DNA 含量下降至原含量的 $1/3$ 以上, 所占比例分别为 60%、40% 和 20%。与阿德福韦对照组比较, 高剂量组差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 而中、低剂量组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。但是结果显示在停药后, 用 030703 治疗的 3 组 DHBV DNA 含量变化较小, 与停药前相比变动不大; 而阿德福韦对照组则变化较大。

2.1.4 受试药物 030605 实验组 受试药物

030605 高、中及低剂量组在药物治疗过程中分别有 4、3 及 1 只实验鸭的 DHBV DNA 含量下降至原含量的 1/3 以上, 所占比例分别为 80%、60% 和 20%。与阿德福韦对照组比较, 高、中剂量组差异有统计学意义 (均 $P < 0.01$), 而低剂量组则差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.1.5 受试药物 030705 实验组 受试药物

030705 高、中及低剂量组在药物治疗过程中分别有 3、2 及 0 只实验鸭的 DHBV DNA 含量下降至原含量的 1/3 以上, 所占比例分别为 60%、40% 和 0%。与阿德福韦对照组比较, 高剂量组差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 而中、低剂量组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组麻鸭血清中 DHBV DNA 载量随时间的变化

Tab. 1 The changes of serum DHBV DNA load with the time in ducks in various groups ($n=5, \bar{x} \pm s, \text{copies} \cdot \text{mL}^{-1}$)

Group	Serum DHBV DNA			
	Baseline	15 d	30 d	2 weeks after withdraw
030703				
H	$1.29 \times 10^8 \pm 4.16 \times 10^7$	$8.76 \times 10^7 \pm 1.77 \times 10^7^*$	$4.90 \times 10^7 \pm 1.63 \times 10^7^*$	$5.88 \times 10^7 \pm 1.82 \times 10^7^*$
M	$1.47 \times 10^8 \pm 2.87 \times 10^7$	$1.32 \times 10^7 \pm 2.79 \times 10^7$	$6.87 \times 10^7 \pm 3.54 \times 10^7$	$9.14 \times 10^7 \pm 3.63 \times 10^7$
L	$1.42 \times 10^8 \pm 4.31 \times 10^7$	$1.25 \times 10^7 \pm 3.45 \times 10^7$	$8.91 \times 10^7 \pm 1.84 \times 10^7$	$1.03 \times 10^8 \pm 2.46 \times 10^7$
030605				
H	$2.12 \times 10^8 \pm 5.89 \times 10^7$	$1.54 \times 10^8 \pm 4.50 \times 10^7^*$	$7.44 \times 10^7 \pm 1.04 \times 10^7^*$	$1.24 \times 10^8 \pm 2.64 \times 10^7^*$
M	$1.84 \times 10^8 \pm 2.12 \times 10^7$	$1.42 \times 10^8 \pm 2.68 \times 10^7^*$	$6.70 \times 10^7 \pm 3.57 \times 10^7^*$	$9.85 \times 10^7 \pm 5.42 \times 10^7^*$
L	$1.21 \times 10^8 \pm 3.43 \times 10^7$	$1.14 \times 10^8 \pm 2.33 \times 10^7$	$8.01 \times 10^7 \pm 8.85 \times 10^6$	$8.72 \times 10^7 \pm 1.56 \times 10^7$
030705				
H	$1.46 \times 10^8 \pm 4.93 \times 10^7$	$1.22 \times 10^8 \pm 2.39 \times 10^7^*$	$5.26 \times 10^7 \pm 1.67 \times 10^7^*$	$7.75 \times 10^7 \pm 1.52 \times 10^7^*$
M	$1.45 \times 10^8 \pm 4.90 \times 10^7$	$1.23 \times 10^8 \pm 3.85 \times 10^7$	$6.93 \times 10^7 \pm 2.44 \times 10^7$	$1.04 \times 10^8 \pm 1.71 \times 10^7$
L	$2.19 \times 10^8 \pm 6.54 \times 10^7$	$2.13 \times 10^8 \pm 7.86 \times 10^7$	$1.24 \times 10^8 \pm 2.25 \times 10^7$	$1.39 \times 10^8 \pm 3.21 \times 10^7$
Adefovir	$2.06 \times 10^8 \pm 5.25 \times 10^7$	$1.32 \times 10^8 \pm 9.09 \times 10^7$	$2.35 \times 10^7 \pm 2.32 \times 10^7$	$1.15 \times 10^8 \pm 6.08 \times 10^7$
DHBV DNA(+)	$1.45 \times 10^8 \pm 7.94 \times 10^7$	$1.18 \times 10^8 \pm 4.86 \times 10^7$	$1.34 \times 10^8 \pm 3.61 \times 10^7$	$1.59 \times 10^8 \pm 3.65 \times 10^7$

* $P < 0.01$ compared with baseline.

2.2 各组鸭肝组织形态学变化

观察中发现各组均有一定数量的鸭肝细胞脂肪变性。DHBV DNA 阳性对照组鸭肝细胞明显萎缩, 小胆管扩张、增生, 出现肉芽肿小结节, 有坏死伴多核巨细胞吞噬反应。阿德福韦对照组与 DHBV DNA 阳性对照组比较, 炎症有一定的减轻。所有测试药物高、中、低剂量各组分别与 DHBV DNA 阳性对照组比较, 炎症都有不同程度的减轻, 与阿德福韦对照组的作用相似。

DHBV DNA 阳性对照组分级数值为 1.25, 阿德福韦对照组分级数值为 0.8。肝细胞脂肪变性均为中度。

受试药物 030703 高、中、低剂量组的分级数值分别为 0.95、0.75 和 0.90, 不同剂量组平均分级数值为 0.87, 分级数值略高于阿德福韦对照组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。受试药物不同剂量组比较均未见明显差异。光镜下病理学检查未发现鸭肝病理毒性作用, 受试药物 030703 各剂量组均未见肝细胞有中毒性坏死病灶。

受试药物 030605 高、中、低剂量组的分级数值分别为 0.55、0.75 和 0.80, 不同剂量组的平均分级数值为 0.7, 分级数值低于阿德福韦对照组, 其中高剂量组的分级数较低, 显著小于阿德福韦对照组, 其炎症程度降低较多。光镜下病理学检查未发现鸭肝病理毒性作用, 3 个剂量组均未见肝细胞有中毒性坏死病灶。

受试药物 030705 高、中、低剂量组的分级数值分别为 0.85、0.80 和 0.80, 不同剂量组的平均分级数值为 0.82, 分级数值与阿德福韦对照组相似, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。不同剂量组比较均未见明显差异。光镜下病理学检查未发现鸭肝病理毒性作用, 3 个剂量组均未见肝细胞有中毒性坏死病灶 (图 1, 见插页一)。

3 讨论

DHBV 和人乙型肝炎病毒 (HBV) 同属嗜肝病毒科, 因二者在基因结构和复制方式等方面有其相似性, 常以 DHBV 感染易感细胞系或动物的模

型, 研究抗 HBV 药物的疗效、病毒复制的动力学、消毒剂效果的观察等^[4-8], 故 DHBV 动物模型是一种用于评估临床前期抗病毒药物如核苷(酸)类似物、反义寡聚核苷酸等治疗效果的良好模型。

本实验中选用的实验动物为江浙地区特有的鸭禽种系麻鸭(上海麻鸭), 其 DHBV 自然感染率在 70%~80%, 经筛选确认为垂直传播感染, DHBV DNA 检测呈阳性。DHBV 的定性检测对研究结果的分析有很大的局限性, 需要对病毒复制水平作量化分析, 以取得更为可靠、有价值的研究结果。

由于转染细胞与自然感染状态的肝细胞仍有一定的差异, 而且体内的特殊环境是在体外所无法复制的, 故体外研究结果有其局限性。因此, 本研究进一步对 MCC-478 的衍生物 030605、030703、030705 进行了体内抗病毒活性研究。DHBV 模型经过几十年的研究和应用, 已经成为研究乙肝病毒, 尤其是抗乙肝病毒药效学研究比较公认的动物模型。本文作者采用 PCR 法对江浙地区特有的上海麻鸭(成体)进行筛选, 建立了垂直感染鸭乙肝模型, 较国内常用的后天感染模型具有无法比拟优势^[9-12]。

本研究结果表明: 3 种核苷类似物(030703、030605 及 030705)在鸭体内均有一定抑制 DHBV 复制的作用, 但抗 DHBV 活性均不及阳性对照药物阿德福韦, 其中化合物 030605 的效果较好, 但是在停药后其高剂量组的 DHBV DNA 有反跳现象。

本研究病理组织学检测结果表明: 3 种受试药物均有缓解鸭肝脏炎症作用, 其中受试药物 030605 对炎症的缓解作用较好, 略优于阿德福韦; 其余药物效果和阿德福韦类似。提示受试化合物通过抑制病毒的复制, 从而间接改善了肝脏病理情况。

本组受试化合物抑制 DHBV 复制的作用不及阳性对照药物阿德福韦, 然而 3 种药物对炎症的缓解作用与阿德福韦相近, 甚至化合物 030605 还略优于阿德福韦。这可能是由于受试化合物与其先导化合物 MCC-478 相似, 对肝脏细胞具有高度选择性, 从而导致局部的高药物浓度, 有利于肝脏炎症的缓解。

[参考文献]

[1] Perrillo RE, Schiff E, Yoshida A, et al. Adefovir dipivoxil

for the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B mutants [J]. *Hepatology*, 2000, 32 (1): 129-134.

- [2] Colonna R, Rose RE, Levine SM, et al. Entecavir (ECV) two year resistance update: no resistance observed in nucleoside naive patients and low frequency resistance emergence in lamivudine refractory patients. Abstract (ID: 67445) of 56 th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) [C]. San Francisco, California, USA, 2005.
- [3] Kamiya N, Kubota A, Iwase Y, et al. Antiviral activities of MCC-478, a novel and specific inhibitor of hepatitis B virus [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46 (9): 2872-2877.
- [4] 于德敏, 张欣欣, 陆志檬. HBV 细胞模型及其在抗病毒药物研究中的应用 [J]. *国外医学: 流行病学传染病学分册*, 2003, 30 (4): 212-215.
- [5] Addison WR, Walters KA, Wong WW, et al. Half-life of the duck hepatitis B virus covalently closed circular DNA pool in vivo following inhibition of viral replication [J]. *J Virol*, 2002, 76 (12): 6356-6363.
- [6] Boregowda RK, Lin L, Zhu Q, et al. Cryptic protein priming sites in two different domains of duck hepatitis B virus reverse transcriptase for initiating DNA synthesis in vitro [J]. *J Virol*, 2011, 85 (15): 7754-7765.
- [7] Fu XH, Liang WF, Wu XD, et al. Construction of a duck hepatitis B virus YMDD mutant and identification of its resistance phenotype [J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2011, 31 (4): 633-636.
- [8] Ying C, Tan S, Cheng YC, et al. Helioxanthin analogue 8-1 inhibits duck hepatitis B virus replication in cell culture [J]. *Antivir Chem Chemother*, 2010, 21 (2): 97-103.
- [9] Zhao KK, Wang Q, Miao XH, et al. Dynamic detection of duck hepatitis B virus cccDNA in serum of ducks with liver injury [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2010, 90 (35): 2509-2513.
- [10] Feng F, Teoh CQ, Qiao Q, et al. The development of persistent duck hepatitis B virus infection can be prevented using antiviral therapy combined with DNA or recombinant fowlpoxvirus vaccines [J]. *Vaccine*, 2010, 28 (46): 7436-7443.
- [11] Liu W, Zhai J, Liu J, et al. Identification of natural recombination in duck hepatitis B virus [J]. *Virus Res*, 2010, 149 (2): 245-251.
- [12] Reaiche GY, Le-Mire MF, Mason WS, et al. The persistence in the liver of residual duck hepatitis B virus covalently closed circular DNA is not dependent upon new viral DNA synthesis [J]. *Virology*, 2010, 406 (2): 286-292.