维普资讯 http://www.cqvip.com

第19卷 第2期 重庆医科大学学报 Vol.19 No.2
1994 ACTA UNIVERSITATS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1994

乙型肝炎，抗病毒药，药物筛选

165~168

抗乙型肝炎病毒药物筛选模型的研究及评价

病毒性肝炎研究所 陈压西 综述 郭树华 审校

R512.62 — R978.7

中图分类号 R512·6

目前常用的抗乙肝病毒药物筛选的体内和体外实验模型，前者主要有鸭乙型肝炎动物模型、转基因小鼠等；后者主要为细胞培养系统，常用的有原代鸭肝细胞培养、HBV DNA转染人肝肿瘤细胞株、PLC/PRF/5细胞株培养等。下面就几种常用模型的研究及评价加以综述。

体内实验模型

1 鸭乙型肝炎病毒(DHBV)及鸭乙肝动物模型：

(1) DHBV它与人乙肝病毒(HBV)、土拔鼠肝炎病毒(WHV)、地松鼠肝炎病毒(GSHV)同属于嗜肝DNA病毒科(Hepadnavirus)。HBV基因组全长为3.2kb,WHV和GSHV为3.3kb,而DHBV为3.021kb,HBV与WHV、GSHV、DHBV的核苷序列同源性分别为70%、55%、40%，因而DHBV与HBV的DNA可以发生杂交，且DHBsAg与HBsAg有部份交叉反应[1]。DHBV的X基因羧基端90%可以缺失，在相当于X基因区段是与其它主要序列相融合的，成为一个长"8"区或C区，与其它病毒的X区无同源。四种病毒不同编码区长短略有不同。垂直传播是DHBV主要的传播途径，其自然感染率存在地理分布、鸭种的差异，且随鸭龄增加有自然转阴现象[2]。

(2) 鸭乙肝动物模型WHBV的持续感染可引起严重的慢性肝炎和肝癌，而GSHV及DHBV引起的肝内病变轻微，土拔鼠为野生繁殖率低的动物，不易获得，鸭子是DHBV的自然感染宿主，在病因或肝脏病理方面类似人类乙型肝炎，是较理想的动物模型。

DHBV实验感染因接种病毒量、接种途径、鸭龄及鸭种不同，各家报道的感染率也不同，尤其DHBV实验感染的病毒血症持续时间与接种病毒时的鸭龄有关，1—3日龄鸭感染后可呈持续性病毒血症3—6月以上，而2周—3月龄鸭感染后仅有短暂病毒血症[3-8]。研究认为：对病毒的易感性可能与免疫系统发育成熟与否有关，幼鸭3—5日龄后免疫机制才开始建立，1—3日龄鸭由于免疫系统发育不完善，对DHBV最为易感，可产生高水平的慢性携带病毒状态。要建立稳定可靠的动物模型，用含一定量病毒(约10^{8-9}个毒粒/ml)的DHBV阳性病毒血清10—100μl感染3日龄内的病毒指标阴性的雏鸭，无论腹腔，肌肉、静脉途径，感染成功率为40—100%，且于接种病毒后1—3周病毒血症达高峰。1—3日龄鸭感染后，肝组织炎症改变多不明显，仅表现为

维普资讯 http://www.cqvip.com

单纯病毒血症，与人类感染HBV后的慢性带病毒状态相似，电镜下肝组织中可见DHBV颗粒。但也有1日龄鸭感染后第6周开始出现门静脉周围炎性浸润和肝细胞点状坏死的报道。此外，接种病毒后2周可在外周血单核细胞、脾红髓、白髓中测得DNA，而法氏囊与胸腺中一直测不到DNA[9]。

2 转基因小鼠

将HBV DNA的特定基因片段，含表面抗原，前S及X抗原的基因及病毒质粒PAC2或含金属硫因的启动子导入小鼠生殖细胞核，第二代小鼠组织的基因与HBV DNA呈整合状态，HBV DNA区段编码的抗原可以表达，并可在血清中检测出来，其中10-30%小鼠组织中有HB_sAg表达[10]。有人用一个比HBV DNA全基因还长的片段注入小鼠卵内，可以转录所有基因产物，也可以测定不同药物对各个病毒基因产物的特异性抑制作用，这些药物还可以用于抗病毒治疗[11]。可见转基因小鼠也是一个筛选药物的模型。

体外细胞培养系统

1. 原代鸭肝细胞培养系统1986年，Tuttleman[12]用DHBV阳性血清感染培养了1—4日的原代鸭肝细胞，于感染后第2天，培养系统出现病毒复制，先出现单链DNA(SS)与闭环DNA(CCC)，后出现松弛型DNA(RC)。6—12天后，培养上清中可测得含DNA的病毒颗粒，持续约3周。研究发现原代培养的鸭肝细胞对DHBV的易感性7天后消失，可能与复制中间体合成之前的增殖过程受阻，即肝细胞的DHBV受体受损有关[13]。用荧光染色发现仅10%的培养细胞中有DHBsAg和DHBeAg存在，这表明体外培养的肝细胞虽可合成相应抗原、释放完整病毒，但毕竟不同于整体，因为先天性自然感染的鸭肝细胞中几乎全部细胞均被感染[8]。

以后，Bishop[14]利用先天性感染DHBV的幼鸭肝细胞进行原代培养，并在培养体系中加入了人胚肺成纤维细胞作为饲养细胞，肝细胞至少可以生存3周，且可分泌产生DNA中间体和病毒的结构蛋白。Fourel[15]用先天性感染DHBV的2月龄鸭肝细胞与鼠肝上皮细胞共同培养，发现它与普通的先天性感染DHBV的鸭肝细胞培养一样可产生RC、线性DNA(L)、CCC、SS四种病毒复制形式，但普通肝细胞培养的细胞形态仅能保持10天左右，细胞生存3周，而共同培养的细胞形态可维持7—8周，47天后仍能保持复制病毒，因而这个系统较单纯的原代鸭肝细胞培养系统对抗病毒药物筛选更有益。

2. HBV DNA转染细胞培养系统近年，Sureau等[16]报道用克隆的HBV DNA转染人肝肿瘤细胞$HePG_2T14$克隆细胞株建立的培养系统，可以进行病毒复制，释放含DNA的DNA多聚酶活性的类病毒颗粒入培养上清，产生HBc/eAg、HBsAg6—9个月以上。该系统HBV DHA基因整合入宿主细胞染色体上至少有2个或以上的位点，细胞内外可产生3.9kb(RC)、3.0kb、1.6kb(SS)的DNA形式，未测得有CCC DNA。1987年，Toshiki等[17]用克隆的HBV DNA转染另一种肝肿瘤细胞株Huh6—CIS，同样能在体外复制游离的HBV DNA，产生Dane颗粒达6个月以上，也未发现复制过程中的CCC形式，而HBV DNA转染的HepG2另一克隆株细胞(2.2.15细胞)却发现在复制过程中可产生高浓度的CCC，充当转录前基因组RNA的模板[18-20]。进一步研究发现，尽管2.2.15细胞的培养上清静脉接种黑猩猩可引起急性肝炎，但它自己产生的病毒不能直接感染HePG2细胞[21]，这可能是因为HePG2细胞缺乏病毒吸附和穿入的受体，且游离的HBV DNA和病毒体的产生仅由染色体整合了HBV DNA的细胞不断补充维持就可达9个月以上。免疫组化染色及电镜发现2.2.15细胞产生的HBc/eAg胞浆内多于核内，未发现20nm的球形或杆状颗粒，与人肝活检标本一样，2.2.15细胞中很难发现Dane颗粒[20]，而在细胞培养上清中可发现由细胞分泌的

维普资讯 http://www.cqvip.com

42nm的Dane颗粒[18]、[20]。用间接免疫荧光抗体可测得2.2.15细胞表面有HBsAg和HBc/cAg，这同样在感染的人肝组织悬液中有活性的肝细胞上得到证实。

总之，HBV DNA转染的人肝肿瘤细胞，特别是2.2.15细胞与感染的人肝细胞在活跃的复制期产生的HBV形态学十分相似，用它作为研究HBV复制和抗病毒药物筛选的体外模型比较适宜。

3. PLC/PRF/5细胞株它是1976年Alexander等用HBsAg阳性者肝癌组织建立起来的一株肝癌传代细胞株，其细胞中有4个完整和2个不完整的HBV DNA整合，但只有S基因得到表达，可在培养液中查见较高浓度的HBsAg，而在该细胞内和培养液中均未查到HBc/cAg。观察不同药物对该细胞系产生HBsAg的影响，可筛选HBV感染治疗的药物。有人利用该细胞系统进行了人重组干扰素和苦味叶下株提取物疗效的观察，证实有一定的治疗作用。但由于该系统不能表达最直接反映乙肝病毒复制的指标DNA，因此在药物筛选研究中存在很大的缺陷。

模型的比较与评价

首先，动物模型与人体之间有差异性。法氏囊是禽类特有的免疫器官，是B.L.C成熟分化的场所，行法氏囊切除后的2周龄鸭，接种病毒后感染率与1日龄鸭接种病毒相似，血清与肝脏的DNA检出率明显高于未切除者，且肝脏病理改变不明显，不与DHBV在肝中的复制程度相关[22]，这表明鸭的非特异性体液免疫反应在阻止DHBV接近靶细胞或限制DHBV在肝细胞间的扩散中起一定的作用，免疫反应比病毒在肝细胞中复制对肝脏病理影响更直接。人和哺乳动物B.L.C分化成熟在骨髓进行，起着类法氏囊的功能，尽管它们有相似之处，但动物模型不能代替人体这个更为复杂的机体系统。转基因小鼠在免疫功能方面对HBV抗原是耐受的，对HBV无特异性细胞和体液免疫反应，更适合作为嗜肝DNA病毒基因表达及肝炎发病机理的研究，有可能将病毒抗原表达导致的病理反应与免疫介导的应答加以区别，有报告证明，转基因小鼠系似乎仅表达病毒外膜蛋白[23]，而过度的前S_1蛋白的产生会抑制所有外膜蛋白分泌，导致在内质网内堆积，引起细胞毒性作用，造成肝细胞损害[24]。另外，尽管DHBV与HBV有相似的病毒复制过程，但由于基因编码区的差异：HBV的S区编码PreS1、PreS2、S蛋白，而DHBV仅有一种PreS蛋白[25]，Pontisso等[26]证明人肝细胞浆膜上有2种受体：一种HcPG2受体与$PreS_1$序列结合，另一种聚合人血清白蛋白受体通过聚合人白蛋白与PreS2序列结合。可见，由于人与鸭的种属差异，它们肝细胞膜上受体也不同，因而抗病毒药物，特别是阻止病毒吸附、穿入靶细胞的药物作用机理也不同。

其次，体内模型与体外模型之间有差异性。在体内感染的鸭肝细胞，复制过程中CCC DNA较mRNA和SS DNA先出现，而2.2.15细胞浆中SS和RC DNA先出现，有解释为：2.2.15细胞的HBV DNA整合基因可直接作为病毒复制的前驱，这就减少了CCC的需求，而产生大量的SS和RC DNA[19]，这同样可以对缺乏CCC的转染细胞作为解释。在体内自然发生感染的肝细胞，胞外HBV DNA主要是RC，肝细胞内缺乏成熟形式的病毒(包括SS、部份双链DNA病毒)，而体外感染的鸭肝细胞和转染细胞，胞外主要为含SS和部份双链DVA病毒，胞内为CCC，这种体内外模型病毒成熟的调节及释放的差异的机理尚不清楚[21]。此外，动物模型DHBV感染率和持续时间受鸭龄的限制，而原代鸭肝细胞培养细胞的感染率不受鸭龄的影响，这主要是免疫系统作用于机体的缘故[11]；动物模型可进行疾病及抗病毒治疗过程中DNA、肝脏病理改变的动态观察，且存在对药物的吸收、分布、代谢的过程，与人体更具可比性；细胞培养通过检测培养上清中HBsAg和HBeAg的分泌情况，对大量药物进行初筛，简单可行，但该

维普资讯 http://www.cqvip.com

系统对pH值要求严格，这就限制了部份药物的研究。目前，国内外利用上述体内、体外模型进行传统抗病毒药物[27]及中药的研究陆续有报道，而正因为体内外模型的差异，往往体外实验有效的抗病毒药物，作用于体内并不一定有效。如:Suramin在体外可抑制DNBV的DNA多聚酶，在鸭乙肝动物模型中仅有短暂性抑制DNA多聚酶的作用，而用于临床治疗未见类似作用，且可使凝血酶原时间延长和血清胆红素上升，似无临床使用价值[10]。

最后，细胞模型之间有差异。原代鸭肝细胞与转染细胞系统除了因种属来源不同造成的培养条件、细胞受体等的差异，更主要的是它们病毒复制方式及维持病毒复制的时间长短不同，2.2.15细胞可维持病毒复制达9个月以上，从这个意义讲，转染细胞更适于抗病毒药物筛选的研究。

结　语

目前，无论是动物模型还是细胞系统，尚无一种单独的模型可以准确复制出HBV感染的全部特征，但各模型之间的差异也是可以彼此弥补的。随着病毒分子生物学及分子免疫学的进展，人们正在从多个领域寻找抗病毒治疗的方法，将不断为寻找有效的抗病毒药物开拓新途径。

参考文献

1 朱万孚，等.北京医科大学学报.1987;19(4):223
2 童普庆，等.上海第二医科大学学报.1990;10(3):194
3 Mason W.S,et al.Virol.1983;131:375
4 Mason W.S,et al.In viral hepatitis and liver disease.1984;P443
5 Omata M,et al.Hepatology.1984;4:603
6 Fukuda R,et al.J.Med.Virol.1987;21:311
7 Mar ion P.L,et al.Hepatology.1987;7(4):724
8 Uchiad T,et al.Hepatology.1987;7(1):29
9 Freiman J. S, et al. Vira; Hepatitis and Live Disease.1988;P501
10 张定凤.乙型肝炎发病机理及临床 1992年(第一版)
11 Turkaspa,et al.J.Hepatology.3(suppl), S25(1986)
12 Tuttleman J,et al.J.Virol.1986;58(1):17
13 Uchiad T,et al.Hepatology.1988;8(3):760
14 Bishop N,et al.J.Med.Virol.1990;31:82
15 Fourel I,et al.Viral Hepatitis and Liver Disease.1988;P506
16 Sureal C,et al.Cell.1986;47:37
17 Tsurimoto T,et al.Proc.Natl.Acad.Sci. USA.1987;84:444
18 Sells M.A,et al.Proc.Natl.Acad.Sci. USA.1987;84:1005
19 Sells M.A,et al.J.Virol.1988;P2836
20 Gerber M.A,et al.Lab.Inv.1988;59(2):173
21 Acs G,et al.Proc.Natl.Acad.Sci. USA.1987;84:4641
22 Qu DI,et al.Viral Hepatitis and Liver Disease.1988;P503
23 Purk R.D,et al.J Virol.1988;62:649
24 Chisari F.V,et al.Proc.Natl.Acad.Sci. USA.1987;83:6909
25 Pugh J.et al.J.Virol.1987;61:1384
26 Pontisso P.et al.J.Virol.1989;63:1981
27 Civitico G,et al.J.Med.Virol.1990;31:90

(收稿日期　1993-09-28)

(上接164页)

1 Doolittle RT, et al. Science, 1983;221：275
2 Sap J, et al. Nature, 1986;324：635
3 Bishop JM, et al. cell, 1991;64：235
4 Knudon AG. Mutat Res, 1991;247(2)：185
5 Morgam GJ. Rec Prog Med. 1989;80：505
6 Seebung PN, et al. Nature,1984;312：71
7 Dias P. et al. J Ciln Pathol, 1990;43：888
8 Hunter J. Cell, 1991;64：249
9 Siamon DJ. et al. Science, 1989;244：707
10 Dykins R, et al. J Pathhol, 1991;163：105
11 Yasui W, et al. Cancer. Res, 1988; 48(1)：137
12 杨冬华，等.第三军医大学学报，1991;(6)：517
13 Jame T Wu, et al. Journal of Cilnical Laboratoty Analysis. 1993;7：31
14 Avril Nugent et al. Clin Chemistry. 1992;38：1421
15 蔡志明，等.中华小儿外科，1992;(5)：296

(收稿日期　1994-01-20)