

乙型病毒性肝炎动物模型的比较分析

张 倩,刘江宁,秦 川

(北京协和医学院比较医学中心 中国医学科学院医学实验动物研究所,
卫生部人类疾病比较医学重点实验室,北京 100021)

【摘要】 全世界有近 2.4 亿慢性乙型病毒性肝炎 (HBV) 患者,尽管已有 HBV 疫苗和抗病毒治疗药物的产生,但乙肝仍是严重威胁人类健康的传染病。由于缺乏理想的动物模型,使得对于乙型病毒性肝炎的研究受到局限。本综述按照现有 HBV 动物模型进行对比分析,探讨各种模型病原学和病理与病理生理学应用的区别,以期为科研人员在今后的 HBV 研究中更好的利用相关资源,提供参考。

【关键词】 乙型病毒性肝炎;动物模型;病原学;病理与病理生理学

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 06-0072-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.06.015

Comparative analysis of animal models of hepatitis B viral hepatitis

ZHANG Qian, LIU Jiang-ning, QIN Chuan

(Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC); Institute of Laboratory Animal Science,
Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine,
Ministry of Health, Beijing 100021, China)

【Abstract】 There are approximately 240 million patients with chronic hepatitis B virus (HBV) in the world. Despite the production of HBV vaccines and antiviral drugs, HBV still remains a serious threat as an infectious disease to human health. Due to the lack of an ideal animal model, the study of HBV is limited. This review was to analyze in accordance with existing HBV animal model, to explore the differences in applications of various models regarding their etiology, pathology and pathophysiology. thus, to provide a reference for researchers in future HBV research to better use the resources.

【Key words】 Hepatitis B virus; Animal model; Etiology; Pathology; Pathophysiology

全世界约有 2.4 亿慢性乙型病毒性肝炎患者,其中 15%~40% 很有可能发展成严重的肝脏疾病,如肝硬化、肝细胞肝癌。每年有超过 78 万人因此失去生命。尽管已有 HBV 疫苗和抗病毒治疗药物的产生,但乙肝仍是严重威胁人类健康的传染病。HBV 感染和复制并不能直接损伤肝脏细胞,临床症状由宿主免疫反应和病毒复杂的相互作用起引

起^[1-3],从而导致肝硬化和肝癌的发生^[4]。由于 HBV 宿主的局限性,目前仍没有理想的 HBV 动物模型用于研究 HBV 与宿主之间如何相互作用从而导致慢性感染^[5]。同时关于慢性感染如何导致肝脏损伤,肝硬化和肝细胞肝癌的机制,目前并不十分清楚。本综述对现有的 HBV 动物模型,根据其感染的病原种类,导致的病生理变化,发展成为肝癌

【基金项目】 艾滋病、病毒性肝炎、结核病及其他新发突发传染病实验动物的研究专项,编号:(2012ZX10004501)。

【作者简介】 张倩,女,博士研究生,研究方向:病理学与病理生理学,传染性疾病与动物模型的研究。E-mail: zhangqianbisheng@163.com。

【通讯作者】 秦川,女,研究院,教授,博士生导师,研究方向:病理学与病理生理学。Email: qinchuan@pumc.edu.cn。

的情况分别进行介绍,探讨各种模型的应用比较,以使科研人员在今后的 HBV 研究中更好的利用相关资源,提供参考。

1 病毒病原学特征比较

我们把现有的 HBV 动物模型分为 3 类,(1) 直接感染 HBV 动物模型,如:黑猩猩、树鼩,同时对小鼠进行了改造,把人的肝细胞移植到小鼠肝脏上,使得可以直接感染 HBV 的人源化肝脏嵌合体小鼠模型等;(2) HBV 类似病毒的动物模型,如:土拨鼠肝炎病毒模型、鸭肝炎病毒模型等;(3) HBV DNA 转染小鼠模型,如:水流动力学转染 HBV 基因组小

鼠模型等(表 1)。

2 病理与病理生理学特征比较:

HBV 的感染和复制并不能直接造成肝脏细胞的损伤,肝脏病变是由于病毒与机体的免疫相互作用导致。对表现出急、慢性肝炎的一些病理与病理生理上变化的 HBV 动物模型进行归类比较(表 2)。

3 各类模型的应用比较

根据动物模型的应用范围,比较其优缺点,对各种模型的应用进行分析讨论,从而为科学研究提供一定的参考(表 3)。

表 1 病原学特征比较					
动物模型	感染病原体	感染途径	感染时间	感染效率	持续时间
黑猩猩	人血清 HBV	血液感染	成年幼年均可	完全易感	可造成慢性感染
树鼩	人血清 HBV	3 日龄树鼩皮下注射	3 日龄树鼩	10% 左右	6 年以上
人源化肝脏嵌合体小鼠	人血清 HBV	Alb-uPA-SCIDRAG2 ^{-/-} -/- 小鼠出生 2 周内进行人肝细胞移植,机体稳定后进行 HBV 尾静脉感染	人肝细胞移植到小鼠肝脏中稳定后	80% 以上	1-5 月
免疫系统存在的人源化肝脏嵌合体小鼠模型	人血清 HBV	Rag2 ^{-/-} γc ^{-/-} 或 NOD-SCID/γc ^{-/-} 小鼠出生 1-2 日内进行人肝细胞和免疫细胞的移植,12~16 月移植稳定后,尾静脉感染 HBV	人免疫细胞和人肝脏细胞稳定后	75%	4 个月
土拨鼠 WHV 模型	WHV,它与 HBV 同源性很高,高达 70% 以上。	颈后皮下注射	1 月龄内	大部分易感	持续存在
鸭 DHBV 模型	DHBV,与 HBV 的基因组结构及复制方式相似	静脉、腹腔、肌肉注射	1~3 日龄雏鸭	80% 以上	持续 3 个月以上感染
鼠肝炎病毒模型	MHV,为冠状病毒科 RNA 病毒	腹腔注射	6~8 周龄 NIH 小鼠	30%	14 d
恒河猴	HBV DNA 质粒	肝脏注射	成年恒河猴	较低	几周
水流动力学转染 HBV 基因组的小鼠模型	pAAV/HBV1.2 质粒	尾静脉注射,快速推注	6~8 周龄 C57BL/6	80%	10 周以上
腺相关病毒 HBV 小鼠模型	AVV2/8/HBV1.2	尾静脉注射	6~8 周龄 C57BL/6	100%	1 年以上
HBV 转基因小鼠	1.3 倍长 HBV 基因组	受精卵显微注射	受精卵时期	100%	持续存在

表 2 病理与病理生理学特征比较

动物模型	血清学变化	肝脏病理检测	最终发展为肝癌
黑猩猩	血清 ALT 与 AST 升高, HBsAg 阳性持续 6 个月	小叶肝炎表现,轻微的肝脏纤维化	无
树鼩	血清 ALT 升高;HBsAg 可检测到	类似轻型肝炎样变:气球样变、脂肪样变等	6 年以上可最终发展成肝癌
人源化肝脏嵌合体小鼠	血清中 ALT 升高,HBsAg 可检测到	无	无
免疫系统存在的人源化肝脏嵌合体小鼠模型	血清中 ALT 升高,HBsAg 可检测到	肝脏慢性炎症和纤维化,人巨噬细胞浸润	无
土拨鼠 WHV 模型	血清中 ATL、AST 和 GCT 升高, WHsAg, WHcAg 可检测到	与人肝炎相似的慢性炎性反应,但不发展为肝硬化	3~5 年可发展成肝癌
鸭 DHBV 模型	DHBV DNA 检测	可发生与人肝硬化类似的病理表现	无
HBV 转基因小鼠	血清中 HBsAg 可终生检测到	无	HBx 蛋白在细胞中沉积,抑癌因子发生改变,发生癌症
水流动力学转染 HBV 基因组的小鼠模型	血清中 ALT 轻度增高, HBsAg 可检测到	肝脏轻微炎性反应	无
腺相关病毒 HBV 小鼠模型	感染两个月后,血清中 AST 轻度升高,HBsAg 可检测到	肝脏炎性细胞浸润,脂肪样变,肝脏纤维化	12~16 月龄内发展成肝癌

表 3 各类模型的应用比较

动物模型 参考文献	优点	缺点	应用研究领域
黑猩猩 ^{[6][7][8][9]}	和人类的亲缘性最近,可信度最高;对 HBV 完全易感;通过血液感染,可发展成急、慢性肝炎。	不能发展成肝硬化和肝癌,无法进行此方面研究;2013 年美国 NIH (National Institute of Health) 作出限制使用黑猩猩作为实验动物,所以在伦理和经济上受到严格的限制。	可用于 HBV 感染细胞、体内持续性感染、预防性疫苗、慢性感染的治疗性疫苗、HBV 导致的自限性疾病机制等的研究。
恒河猴 ^{[10][11]}	可感染 HBV,在肝脏内进行 HBV 复制和 DNA 重组;分离的原代肝细胞可以感染 HBV。	只能引起轻微的肝脏疾病和自限性肝炎。	对于它的研究还不太普遍,未来可能成为一种新的研究免疫学和抗病毒研究的模型。
树鼩 ^{[12][13]}	小型动物模型,可直接感染 HBV;体外分离培养的原代肝脏细胞可以感染 HBV。幼年树鼩感染 HBV,可发展为肝硬化、肝癌。	非纯系动物,个体差异大;缺乏研究需要的抗体和试剂,不利于深入的机制研究;成年树鼩感染 HBV 后,只能导致轻微一过性感染;病毒复制水平太低。	可用于 HBV 感染肝脏细胞、HBV 特异性受体的研究和病毒表面蛋白侵入肝脏细胞中作用的研究。
人源化嵌合体小鼠模型 ^[14]	可直接感染 HBV;可用于研究不同突变和不同基因型的 HBV 株。	由于这种模型是建立在免疫缺失的小鼠基础上,所以不能用于人类免疫细胞和 HBV 相互作用的免疫反应及导致肝脏疾病的研究。	可用于 HBV 感染细胞的机制研究;研究 cccDNA 的生物学特性;抗病毒药物的研究。
免疫系统存在的人源化嵌合体小鼠模型 ^{[14][15]}	可直接感染 HBV;因为拥有人的免疫系统,可研究免疫反应抗病毒的机制。	此模型成本太高,并且建立的条件和技术要求很高	此模型成立较晚,其应用有待进一步的开发。可用于抗体的评价,抗 HBV 感染的相关药物研究等。

土拨鼠 WHV 模型	WHV 与 HBV 同源性高;土拨鼠感染 WHV 后,可成慢性感染并发展成肝癌。	WHV 与 HBV 在分类、结构和生物学功能等方面不完全相同,使其在感染机制及复制过程中存在差异。	可用于 HBV 慢性感染抗病毒药物的筛选和疫苗的评价。
鸭 DHBV 模型 ^[16]	鸭 DHBV 的基因组结构及复制方式与 HBV 相似;鸭 DHBV 可造成鸭肝纤维化和坏死。	DHBV 与 HBV 在结构上有较大差别,如 DHBV 基因组结构缺乏 X 基因,其极少诱发肝癌	用于代替 HBV 感染研究中的致病机制和抗病毒药物的筛选
鼠肝炎病毒模型 ^[17]	有作为小鼠疾病模型的优点;小鼠肝脏出现炎症改变;血清学改变与人感染 HBV 的肝炎相似。	MHV 属冠状病毒科 RNA 病毒,种属差异性大,虽然导致疾病的症状和病理反应相似,但其研究价值有待考量。	可用于动态研究慢性病毒性肝炎的遗传控制因素和发病机制,为防治 HBV 提供新的理论依据。
HBV 转基因小鼠模型 ^[18]	可在小鼠肝细胞内,形成完整的病毒颗粒;HBV 复制水平与慢性乙肝患者相似。	HBV 抗原在小鼠胚胎期便持续性存在,产生免疫耐受,不能用于 HBV 免疫病理变化的研究。	用于 HBV 持续性感染的深入研究;乙型肝炎治疗和抗病毒药物筛选的研究。
水流动力学转染 HBV 基因组的小鼠模型 ^{[19][20]}	造模成本低廉;可形成急性 HBV 感染小鼠的状态。	由于感染时间短,不能模拟慢性 HBV 感染的病程。	可用于急性 HBV 感染的研究,在免疫清除 HBV 的研究中,起到一定的作用。
腺相关病毒 HBV 小鼠模型 ^{[21][23][23][24][25]}	HBsAg 持续表达时间长达 1 年,可用于 HBV 慢性感染的研究,可发展成肝癌。	不是自然感染,而且新生成的 HBV 病毒颗粒不能复感染小鼠的肝脏细胞。	可用于 HBV 持续性感染机制的研究;用于抗病毒药物的评价和筛选

4 总结

在疾病的研究中,理想的 HBV 感染动物模型,至少应具备两个基本条件:(1)HBV 在肝脏细胞内保持高水平的复制;(2)能模拟 HBV 感染人的病理过程,也就是伴有持续性 HBV 感染及相应的病理变化特征^[26]。由于 HBV 严格种属特异性的特点,导致一直缺乏合适的 HBV 体内感染的实验模型,使得 HBV 的相关基础和临床研究不能得到很好发展。虽然小鼠不是 HBV 天然宿主,但经改造,可达到让小鼠感染 HBV 的目的。此综述从 3 个不同角度对 HBV 感染模型进行比较阐述,在模型的使用中既要考虑到适用性,也要考虑到课题组的实用性。我国是乙肝大国,对于建立 HBV 更理想的动物模型一直在不懈的研究和探索,NTCP 受体的发现,给转基因小鼠打开了另一扇窗,在不久的将来,一定会出现合适的模型,让我们去攻克 HBV。

参考文献:

[1] Chen J, Yuan Z. Interplay between hepatitis B virus and the innate immune responses; implications for new therapeutic strategies [J]. Virolog Sin, 2014, 29(1): 17 – 24.

[2] Wang F-S, Zhang Z. Host immunity influences disease progression and antiviral efficacy in humans infected with hepatitis B virus [J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2009, 3(5): 499 – 512.

[3] Yang PL, Althage A, Chung J, et al. Immune effectors required for hepatitis B virus clearance [J]. Proc Nat Acad Sci U S A, 2010, 107(2): 798 – 802.

[4] Scaglione SJ, LOK ASF. Effectiveness of hepatitis B treatment in clinical practice [J]. Gastroenterology, 2012, 142(6): 1360 – 1368.

[5] Bility MT, LI F, Cheng L, et al. Liver immune-pathogenesis and therapy of human liver tropic virus infection in humanized mouse models [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2013, 28(Suppl 1): 120 – 124.

[6] Maynard JE, Berquist KR, Krushak DH, et al. Experimental infection of chimpanzees with the virus of hepatitis B [J]. Nature, 1972, 237(5357): 514 – 515.

[7] Wieland SF. The chimpanzee model for hepatitis B virus infection [J]. Cold Spring Harbor Persp Med, 2015, 5(6): pii: a021469.

[8] Wieland S, Thimme R, Purcell RH, et al. Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection [J]. Proc Nat Acad Sci U S A. 2004, 101(17): 6669 – 6674.

[9] Lanford RE, Guerra B, Chavez D, et al. GS – 9620, an oral agonist of Toll-like receptor-7, induces prolonged suppression of hepatitis B virus in chronically infected chimpanzees [J]. Gastroenterology, 2013, 144(7): 1508 – 1517. e1 – 10.

- [10] Gheit T, Sekkat S, Cova L, et al. Experimental transfection of *Macaca sylvanus* with cloned human hepatitis B virus [J]. J Gen Virol, 2002, 83(7): 1645–1649.
- [11] Lucifora J, Vincent I E, Berthillon P, et al. Hepatitis B virus replication in primary macaque hepatocytes: crossing the species barrier toward a new small primate model [J]. Hepatology (Baltimore, Md.), 2010, 51(6): 1954–1960.
- [12] Walter E, Keist R, Niederöst B, et al. Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo [J]. Hepatology, 1996, 24(1): 1–5.
- [13] Yang C, Ruan P, Ou C, et al. Chronic hepatitis B virus infection and occurrence of hepatocellular carcinoma in tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*) [J]. Virol J, 2015, 12: 26.
- [14] Dandri M, Lütgehetmann M. Mouse models of hepatitis B and delta virus infection [J]. J Immunol Methods, 2014, 410: 39–49.
- [15] Bility MT, Cheng L, Zhang Z, et al. Hepatitis B virus infection and immunopathogenesis in a humanized mouse model: induction of human-specific liver fibrosis and M2-like macrophages [J]. PLoS Pathogens, 2014, 10(3): e1004032.
- [16] 谈博, 张奉学, 操红缨, 等. 鸭乙型肝炎病毒感染模型及其方法学研究进展 [J]. 热带医学杂志, 2005 (01): 111–113, 117.
- [17] 覃小敏. 慢性病毒性肝炎小鼠动物模型的建立及其特征分析 [D]. 华中科技大学, 2006.
- [18] Guidotti LG, Matzke B, Schaller H, et al. High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice [J]. J Virol, 1995, 69(10): 6158–6169.
- [19] Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA [J]. Gene Ther, 1999, 6(7): 1258–1266.
- [20] Yang PL, Althage A, Chung J, et al. Hydrodynamic injection of viral DNA: a mouse model of acute hepatitis B virus infection [J]. Proc Nat Acad Sci U S A. 2002, 99(21): 13825–13830.
- [21] Bramson JL, Graham FL, Gauldie J. The use of adenoviral vectors for gene therapy and gene transfer in vivo [J]. Curr Opinion Biotechnol, 1995, 6(5): 590–595.
- [22] von Freyend MJ, Untergasser A, Arzberger S, et al. Sequential control of hepatitis B virus in a mouse model of acute, self-resolving hepatitis B [J]. J Viral Hepatitis, 2011, 18(3): 216–226.
- [23] Mingozzi F, Liu Y-L, Dobrzynski E, et al. Induction of immune tolerance to coagulation factor IX antigen by in vivo hepatic gene transfer [J]. J Clin Investig, 2003, 111(9): 1347–1356.
- [24] Yang D, Liu L, Zhu D, et al. A mouse model for HBV immunotolerance and immunotherapy [J]. Cell Mol Immunol, 2014, 11(1): 71–78.
- [25] Dlion S, Bourguine M, Godon O, et al. Adeno-associated virus-mediated gene transfer leads to persistent hepatitis B virus replication in mice expressing HLA-A2 and HLA-DR1 molecules [J]. J Virol, 2013, 87(10): 5554–5563.
- [26] Dembek C, Protzer U. Mouse models for therapeutic vaccination against hepatitis B virus [J]. Med Microbiol Immunol, 2015, 204(1): 95–102.

[修回日期]2016–09–30