



# 病毒性肝炎树鼩动物模型研究与建模策略

庞义全<sup>1</sup>, 冯悦<sup>1</sup>, 孙晓梅<sup>2</sup>, 刘丽<sup>1</sup>, 代解杰<sup>2</sup>, 夏雪山<sup>1</sup>

(1. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650500; 2. 中国医学科学院医学生物学研究所, 昆明 650118)

**【摘要】** 病毒性肝炎是由肝炎病毒引起的肝脏疾病。在我国, 病毒性肝炎高度流行, 其中又以乙型肝炎病毒 (Hepatitis B virus, HBV) 和丙型肝炎病毒 (Hepatitis C virus, HCV) 危害较大。动物模型是研究疾病感染与发病机制, 进行药物与疫苗研究的必要工具。目前病毒性肝炎实验动物模型的研究已取得长足的发展, 主要集中于病毒在动物体内的感染特性及发病规律方面。本文仅就病毒性肝炎动物模型, 尤其乙型、丙型肝炎树鼩动物模型的研究及建模策略进行综述。

**【关键词】** 病毒性肝炎; 乙型肝炎; 丙型肝炎; 树鼩; 动物模型

**【中图分类号】** R-33; R373.2+1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 02-0095-08

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2014.02.0020

## Research progress of tree shrew models of viral hepatitis and modeling strategy

PANG Yi-quan<sup>1</sup>, FENG Yue<sup>1</sup>, SUN Xiao-mei<sup>2</sup>, LIU Li<sup>1</sup>, DAI Jie-jie<sup>2</sup>, XIA Xue-shan<sup>1</sup>

(1. Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming Yunnan 650500, China;  
2. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Kunming 650118)

**【Abstract】** Viral hepatitis is a major liver disease caused by virus infection. Viral hepatitis is popular in China, mainly caused by hepatitis B and hepatitis C viruses. Experimental animal model is a necessary platform for the research on mechanism of viral infection and pathogenicity, for treatment and vaccine development. Up to date, a great progress in the development of viral hepatitis animal models has been achieved in spite of the most of findings are limited to hepatitis B and C. Here, we summarize the recent findings of viral hepatitis animal models, focusing on the tree shrew animal model and its modeling strategy.

**【Key words】** Viral hepatitis; Hepatitis B virus; Hepatitis C virus; Tree shrews; Animal model

病毒性肝炎严重危害人类的健康, 据世界卫生组织最新数据显示, 全球约有 20 亿人感染肝炎病毒 (包括病毒携带者和患者), 每年约有 80 ~ 100 万人死于病毒性肝炎感染相关疾病。我国属于肝炎的中度流行区, 每年有超过 130 万人感染病毒性肝炎, 占传染病总数的 1/3。由于合适的动物模型的缺乏, 诸如丙型肝炎等感染性高的病毒性肝炎类型, 至今尚无有效的疫苗和可治愈策略<sup>[1]</sup>。人和黑猩猩是多种肝炎病毒的自然宿主, 但黑猩猩数量稀少、价格昂贵以及伦理道德

等原因, 很难用于模型研究。研究者多用小鼠来研究肝炎病毒, 并通过转基因及肝细胞移植等手段提高小鼠对病毒的感染性, 但由于小鼠与人类亲缘关系差距较大, 病毒感染后的病理变化机制也存在较大差异, 即使病毒可有效感染, 并未产生典型的肝炎症状<sup>[2]</sup>。最近研究显示, 树鼩可以感染乙型、丙型等肝炎病毒, 因而也就为其发展成为病毒性肝炎动物模型提供了可能<sup>[3]</sup>。本文就病毒性肝炎树鼩模型研究情况及可能的建模策略作一综述。

[基金项目] 国家自然科学基金(81260248, 81360247); 国家科技支撑计划项目(2011BAI15B01-21, 2012BAI39B01, 2014BAI01B01)。

[作者简介] 庞义全(1988-), 男, 硕士在读。E-mail: pyq837787062@126.com。

[通讯作者] 夏雪山。E-mail: oliverxia2000@aliyun.com 代解杰。E-mail: dj@imbcams.com.cn。

## 1 病毒性肝炎

病毒性肝炎是由肝炎病毒引起的肝脏疾病,肝炎病毒都以肝细胞作为宿主细胞,主要通过病毒感染和免疫病理变化侵害肝组织,临床表现为急慢性肝炎、肝硬化、乃至肝癌。肝炎病毒主要有甲型、乙型、丙型、丁型、戊型等五种病毒,分别属于不同病毒科,具有不同的生物学特性(表 1)。

染和免疫病理变化侵害肝组织,临床表现为急慢性肝炎、肝硬化、乃至肝癌。肝炎病毒主要有甲型、乙型、丙型、丁型、戊型等五种病毒,分别属于不同病毒科,具有不同的生物学特性(表 1)。

表 1 各型肝炎病毒及特点

Tab. 1 Different hepatitis viruses and their characteristics

项目 Items	HAV	HBV	HCV	HDV	HEV
生物特性 Biological characteristics	单股正链 RNA	DNA 病毒	单股正链 RNA	单股负链 RNA	单股正链 RNA
潜伏期 Incubation period	2-6 周	4-22 周	2-6 周	4-7 周	2-8 周
感染率/% Infection rate	不详	7.18	3.6	1.2	不详
传播途径 Route of transmission	粪-口途径	血液,母婴及 体液接触	血液,母婴及 体液接触	血液,母婴及 体液接触	粪-口途径
检测方法 Detection method	检测 HAV 抗 原和抗体	两对半检测	HCV 抗体、 RT-PCR 检测	抗 HDV IgM 检测	抗 HEV IgM 检测、 PCR 法
并发症 Complications	无	肝癌、肝硬化	肝癌、肝硬化	无	无
敏感人群 Susceptible population	年轻人	各年龄	各年龄	HBV 感染者	各年龄
疫苗预防 Vaccine prevention	有	有	无	无	无
动物模型 Animal models	鹰猴、黑猩猩 狨猴等	黑猩猩、树鼩、转基 因小鼠、人鼠嵌合	黑猩猩、树鼩、转基 因小鼠、人鼠嵌合	不详	黑猩猩、狨猴、 鼠猴等

甲型肝炎病毒和戊型肝炎病毒属于粪-口传播的爆发型流行病毒,主要表现为急性感染,极少数会转为慢性化。随着医疗卫生条件改善,甲型和戊型肝炎感染与发病率显著下降。丁型肝炎病毒是一种缺陷病毒,只能在嗜肝性 DNA 病毒辅助下才能复制。乙型肝炎病毒属于嗜肝性 DNA 病毒,主要通过血液、母婴以及其他体液传播,感染后容易产生慢性化。我国是乙型肝炎患病人数最多的国家,约有 1.2 亿人携带 HbsAg<sup>[4]</sup>。丙型肝炎病毒属于黄病毒科单股正链 RNA 病毒,我国目前大约有 4300 万人感染丙型肝炎病毒,其传播途径与乙型肝炎病毒类似。至今,对乙型肝炎和丙型肝炎都尚无有效的治疗方式,主要原因在于缺乏合适的动物模型来进行病毒致病机理研究和疫苗、药物研发。

## 2 病毒性肝炎模型研究近况

除人之外,只有黑猩猩是多种肝炎病毒的自然宿主,感染后表现出与人类相似的疾病症状,是最为合适的肝炎病毒动物模型,但由于其属于濒危动物、价格昂贵及伦理道德原因,难以广泛使用。甲型肝炎动物模型主要有鹰猴模型<sup>[5]</sup>、豚鼠模型<sup>[6]</sup>、白须狨猴模型<sup>[7]</sup>、普通狨猴模型<sup>[8]</sup>和食蟹猴动物模型<sup>[9]</sup>等。豚鼠模型已被用于甲肝发病机制研究和疫苗的评价;白须

狨猴模型也被用于甲型肝炎疫苗开发;甲型肝炎病毒口服接种狨猴,在粪便中可检测到 HAV RNA,可用于疫苗保护性和抗病毒药物试验。丁型肝炎动物模型主要有土拨鼠模型<sup>[10]</sup>、人源化 uPA/SCID 小鼠模型<sup>[11]</sup>和移植肝细胞小鼠模型<sup>[12]</sup>。土拨鼠动物模型可用于 HDV 感染后发病机制研究及疫苗开发;人源化 uPA/SCID 小鼠模型已被用于抗病毒药物的临床前药物评价;移植肝细胞小鼠模型更多用于感染发病机制研究。戊型肝炎动物模型主要为食蟹猴<sup>[13]</sup>、非洲绿猴<sup>[14]</sup>等非人灵长类动物,已用于发病机制研究和疫苗试验;另外,SD 大鼠<sup>[15]</sup>、猪<sup>[16]</sup>、兔<sup>[17]</sup>、沙鼠<sup>[18]</sup>等也可用于戊型肝炎病毒感染方面的研究。

乙型肝炎动物模型主要有鸭模型、土拨鼠模型和小鼠模型。由于鸭乙型肝炎病毒(DHBV)可感染鸭子,产生类肝炎症状,鸭模型可用于评价抗病毒药物治疗效果<sup>[19]</sup>。但由于鸭 HBV 和人 HBV 在结构上差别较大,不能很好的再现人 HBV 感染过程。土拨鼠肝炎病毒(WHV)基因结构及致病特性等方面与 HBV 类似,被该病毒感染的土拨鼠也被用于 HBV 感染机制研究及疫苗开发<sup>[20]</sup>。HBV 小鼠模型主要为转基因小鼠模型(包括全基因组转染模型<sup>[21]</sup>、亚基因组转染模型<sup>[22]</sup>)、人鼠嵌合肝模型(NOD/SCID 小鼠模型<sup>[12]</sup>、uPA/SCID 小鼠模

型<sup>[23]</sup>、MUP-uPA/SCID/Bg 小鼠模型<sup>[24]</sup>)以及水动力法转染小鼠模型<sup>[25]</sup>。转基因小鼠模型可以用于抗原耐受机制及致病机理研究,但很难用于病毒侵入、传播及抗病毒药物的研究。人鼠嵌合肝模型可以用于 HBV 感染及肝癌发生机制的研究,但由于小鼠免疫特性与人相差较大,很难用于病毒后的免疫致病机制研究。水动力法转染模型则是通过水动力法将 HBV DNA 快速注入到小鼠肝脏,使肝细胞感染 HBV,并发现感染后症状,其一定程度上可用于 HBV 复制周期研究及抗病毒药物筛选。

丙型肝炎动物模型主要有猴模型和小鼠模型。夏宁邵等<sup>[26]</sup>在猕猴体内植入人肝细胞,使猕猴可被 HCV 感染,但很难用于 HCV 致病机制的研究。最近, Sourisseau 等<sup>[27]</sup>将豚尾猴干细胞分化成的肝细胞,发现此细胞可支持 HCV 感染和复制,为动物模型建立开创了新的途径。小鼠模型主要有转基因小鼠模型和肝移植小鼠模型。转基因小鼠是将 HCV 结构基因或者 HCV 受体基因转至小鼠体内,使小鼠具有对 HCV 的易感性,可用于致病机理等方面的研究<sup>[28,29]</sup>,但由于免疫特性的种间差异,很难用于致病过程的研究。肝细胞移植小鼠模型则是将人肝细胞移植到免疫缺陷的小鼠体内(如 Trimer 小鼠模型<sup>[30]</sup>、uPA/SCID 小鼠模型<sup>[31]</sup>、MUP-uPA/SCID/Bg 小鼠模型<sup>[24]</sup>),可使 HCV 病毒感染并支持其增殖,已用于 HCV 感染与增殖特性研究及抗病毒药物筛选。

尽管灵长类及啮齿类在病毒性肝炎疾病动物模型的研究与应用方面已取得较大进展,但灵长类繁育难度大、操作繁琐、价格昂贵,而啮齿类动物与人之间较大的种间遗传差异,导致病毒的感染与致病特性也因此不同,急需寻找一种与人遗传与生理差距小,且易于获得的小动物模型。树鼩(*Tupaia*)被分类为哺乳纲、攀鼩类的小型哺乳动物,广泛分布于热带和亚热带地区,在我国主要分布在云南、广西、海南等地。树鼩个体小,繁殖快,易于获得,且生理机能和新陈代谢较啮齿类更接近于人类,已用于多种人类疾病模型研究,尤其因其能被 HBV 和 HCV 等肝炎病毒感染而备受关注。

### 3 树鼩作为病毒性肝炎模型研究近况

#### 3.1 甲型、丁型、戊型肝炎病毒树鼩动物模型

Zhan 等<sup>[32]</sup>首次用树鼩进行甲型肝炎动物模型研究,用甲型肝炎患者粪便过滤物通过饲喂感染树鼩,在树鼩体内及排泄物中可检测到甲型肝炎病毒。丁型肝炎病毒属于缺陷型病毒,其复制需依赖于乙型肝炎病毒的辅助。Li 等<sup>[33]</sup>建立了丁型肝炎/乙

型肝炎树鼩感染模型,并发现树鼩病理变化过程与黑猩猩感染类似,证实树鼩可以作为丁型肝炎动物模型。蒋雷等<sup>[34]</sup>用戊型肝炎病毒(HEV)静脉注射感染树鼩,7 天后可检测到血液中 HEV RNA,并发现肝脏出现相关的病理变化,证实树鼩有可能成为戊型肝炎动物模型。

#### 3.2 乙型肝炎病毒树鼩动物模型

早在 1984 年,严瑞琪等<sup>[35]</sup>用人 HBV 阳性血清分别经静脉和腹腔注射感染树鼩,感染后检测显示,7/10 只树鼩血清出现 HBsAg 阳性,首次表明树鼩可被 HBV 感染。随后, Walter 等<sup>[36]</sup>用 HBV DNA 阳性血清感染树鼩原代肝细胞及新生、成年树鼩,原代肝细胞在感染后 5 ~ 6 d 能检测到 HBsAg 和 HBeAg;新生树鼩在感染后 2 ~ 4 周能检测到 HBsAg 以及多种特异性抗体,并出现类似人的急性肝炎症状,但 10 只成年树鼩感染后仅表现为一过性感染。Wang 等<sup>[37]</sup>用 HBV 阳性血清感染新生树鼩,46 只新生树鼩中有 6 只建立了慢性感染,且出现类似乙型肝炎症状及相应的组织病理变化,说明树鼩模型可用于进行乙型肝炎病程和致病机制研究。Ren 等<sup>[38]</sup>用重组的 Ad-HBV1.3 和 AdGFP-HBV1.3 病毒感染树鼩原代肝细胞,能检测到 HBsAg、HBeAg、HBV DNA 和 HBV 包膜蛋白的表达。曾扬等<sup>[39]</sup>利用重组腺相关病毒为载体使 HBV 全基因在树鼩肝脏中表达,建立了 HBV 急性感染树鼩动物模型。最近, Ping 等<sup>[40]</sup>用 HBV 阳性血清感染新生树鼩发现,树鼩可以被 HBV 感染,肝组织出现与乙型肝炎患者类似的病理变化。以上结果显示,树鼩可以被 HBV 感染,并且出现典型的感染症状与病理变化,有望成为理想的乙型肝炎动物模型。

#### 3.3 丙型肝炎树鼩动物模型

1998 年,刘志等<sup>[41]</sup>就用 HCV RNA 阳性血清静脉注射感染成年树鼩,可以在被感染动物血清中间歇性检测到 HCV RNA,首次发现树鼩可能对 HCV 易感。同时, Xie 等<sup>[42]</sup>用 HCV 1b 型阳性血清感染 23 只树鼩,发现 8 只树鼩出现间歇性感染,而用 1a、1b、3 型 HCV 混合血清感染树鼩,发现经辐照树鼩出现持续病毒血症,进一步证实树鼩可以被 HCV 感染。Zhao 等<sup>[43]</sup>用丙型肝炎患者血清感染树鼩原代肝细胞,收取上清进行传代培养,两次传代均能在培养上清中检测到 HCV RNA,并在其中发现 HCV 病毒的准种变化,证实体外培养的树鼩原代肝细胞也可以被 HCV 感染并支持其复制。Xu 等<sup>[44]</sup>用 1b、2c、3b 和 6 型四种基因型混合的 HCV 血清感染树鼩,18 只树鼩有 16 只被感染,其中 12 只建立了慢

性感染。Amako 等<sup>[45]</sup>用培养 HCV 病毒和临床病毒株感染树鼩,经长达三年的连续观察,发现树鼩可以建立慢性感染,感染树鼩会出现间歇性病毒血症、脂肪肝变性、肝脏纤维化及肝细胞癌等组织病理学变化。尽管由于树鼩来源不同及种系差别大、遗传不稳定等因素,导致树鼩对 HCV 感染率不稳定,不同研究发现的感染与致病现象也不尽相同,但已有报道均可确定树鼩可以被 HCV 感染,并且出现慢性肝炎相关症状,有望成为合适的丙型肝炎动物模型<sup>[46]</sup>。

## 4 肝炎病毒对树鼩感染与致病的宿主影响因素

病毒对宿主的感染及致病除受到病毒基因所决定的感染力与致病性等病毒因素外,还受到细胞内小 RNA、病毒感染细胞表面受体及其他宿主影响因素影响(见图 1)。

### 4.1 细胞内小 RNA

细胞内小 RNA (miRNA) 是一类长约 21 到 23 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,参与转录后基因表达调控。miRNA 通过与信使 RNA 特异结合,从而抑制转录后基因表达,并且 miRNA 在病毒感染中起到一定作用。在诸多的 miRNA 中,与 HCV 感染有关的主要有 miR-122、miR-199a\*、miR-29 和 miR-27a 等。miR-122 在 HCV 感染中起到至关重要的作用,能够促进 HCV RNA 的复制<sup>[47]</sup>;上调 miR-199a\*、miR-29 或 miR-27a 则可抑制 HCV 在细胞中的复制<sup>[48-50]</sup>。而与 HBV 有关的 miRNA 主要有 miR-122、miRs-372/373、miR-501、miR-141 和 miR-155 等。miR-122 在 HBV 感染树鼩肝细胞后发现表达量提高<sup>[51]</sup>;miRs-372/373 通过靶向核因子 I/B 促进 HBV 的表达<sup>[52]</sup>;miR-501 能够促进 HBV 的复制<sup>[53]</sup>,相反 miR-141 则能抑制 HBV 的复制<sup>[54]</sup>;miR-155 能够提高机体的免疫,从而抑制 HBV 的感染<sup>[55]</sup>。不同种类的 miRNA 在肝炎病毒感染及复制过程中具有不同的作用。

### 4.2 肝炎病毒受体分子

肝炎病毒必须通过与宿主细胞表面受体分子结合,才能完成病毒对宿主细胞的感染。目前,乙型、丙型肝炎病毒受体研究已有了较大进展。

HBV 受体研究从 70 年代就已开始,早期认为多聚人血清白蛋白(PHSA)<sup>[56]</sup>、细胞因子修饰的血清蛋白(MSA)<sup>[57]</sup>、HBV 结合因子(HBV BF)<sup>[58]</sup>、p80 蛋白<sup>[59]</sup>、白介素-6(IL-6)<sup>[60]</sup>、多聚 IgA 受体<sup>[61]</sup>以及人肝细胞附加素<sup>[62]</sup>都可能是 HBV 受体。也发

现多种细胞表面游离分子可与 HBV 相结合,可能参与介导 HBV 对肝细胞的感染,但这些分子对介导感染特性与分子机制仍不清楚。李文辉等<sup>[63]</sup>在 HBV 感染树鼩原代肝细胞中发现,牛黄胆酸钠共转移多肽(NTCP)可与 HBV 前 S1 蛋白域结合。把人或树鼩 NTCP 转染 HepG2 细胞,使其具有对 HBV 易感,沉默肝细胞中的 NTCP 则降低 HBV 对肝细胞的感染,证实 NTCP 是 HBV 感染细胞的受体。牛黄胆酸钠共转移多肽(NTCP)是一种具有胆酸转运功能的多肽类物质,主要负责肝脏内的胆酸转运,其作为乙型肝炎病毒细胞受体新功能确定,对动物模型的建立研究、靶向药物的研发起到重要的推动作用。

HCV 通过宿主细胞的多种表面蛋白分子介导感染肝细胞,已确定的受体主要包括四次跨膜素成员 CD81<sup>[64]</sup>、B 族 I 型清道夫受体 SR-BI<sup>[65]</sup>、细胞紧密连接蛋白 claudin-1 (CLDN1)<sup>[66]</sup> 和 occludin (OCLN)<sup>[67]</sup>、氨基葡聚糖(GAGs)、低密度脂蛋白受体(LDLr)、凝集素分子(DC-SIGN 和 L-SIGN)等其他分子也有一定的感染辅助作用。CD81 是四次跨膜蛋白家族成员,其大胞外环是介导 HCV 感染的关键区域。我们克隆了树鼩 CD81 分子基因,经序列测定与分析发现,树鼩 CD81 分子与人氨基酸序列同源性高达 96%,与 E2 结合的关键氨基酸位点树鼩和人完全一致<sup>[43]</sup>。SR-BI 是另一种介导 HCV 进入细胞的受体分子,树鼩 SR-BI 与人的氨基酸序列同源性为 88%,Barth 等<sup>[68]</sup>将树鼩 SR-BI 基因转入 CHO 细胞中,证实树鼩 SR-BI 可与 E2 蛋白结合,并介导病毒入胞。Claudin-1 作为介导 HCV 入胞的受体分子,树鼩 claudin-1 和人的该分子氨基酸序列同源性达 93%,Tong 等<sup>[69]</sup>发现树鼩 claudin-1 可提高细胞对 HCVpp 的易感性。树鼩 occludin 分子和人的氨基酸序列同源性为 88%,与 HCV 结合关键区域的 45 个氨基酸位点仅有 4 个与人不同,将树鼩 occludin 分子与人 CD81、SR-BI、claudin-1 分子共转染 NIH3T3 可高度介导 HCVpp 对细胞的感染<sup>[69]</sup>。以上结果,从 HCV 受体序列同源性和介导功能的角度,佐证了树鼩对 HCV 易感,可以成为 HCV 动物模型。

### 4.3 其他宿主影响因素

肿瘤坏死因子- $\alpha$  是一种系统性炎症细胞因子,具有调节免疫细胞的功能。Xu 等<sup>[70]</sup>发现肿瘤坏死因子- $\alpha$  的表达可抑制 HBV 在肝细胞中的复制,不利于 HBV 的感染。p53 基因可修复 DNA 损伤,抑制细胞周期或诱导凋亡。Lee 等<sup>[71]</sup>发现 p53 可抑制 HBV 的复制,李强等<sup>[72]</sup>也发现 HCV 的核心蛋白可与 p53 相互作用。超氧化物歧化酶是一种能够催

化超氧化物转化为过氧化氢,具有抗氧化作用,而谷胱甘肽 S-转移酶是谷胱甘肽结合反应的关键酶。Li 等<sup>[73]</sup>发现铜锌超氧化物歧化酶(SOD1)及谷胱甘肽 S-转移酶 A1 基因(GSTA1)在肝炎患者中表达水

平显著下调。NF- $\kappa$ B 为一个转录因子蛋白家族,参与免疫反应的早期和炎症反应分子的调控,Guitart 等<sup>[74]</sup>发现 HCV 感染原代肝细胞后可下调 NF- $\kappa$ B 基因的表达。



图 1 调控病毒感染树鼩

Fig. 1 Regulation of the viral infection in tree shrew

## 5 病毒性肝炎树鼩建立策略

已有研究表明,树鼩可以感染 HBV 和 HCV,但树鼩对 HBV 和 HCV 病毒感染率低,不能达到稳定感染。通过借鉴现有病毒感染率提高及基因操作、异种动物建模技术,我们可以在树鼩和病毒两方面进行改造和优化,来提高病毒对树鼩的感染性,以实现最终建立病毒性肝炎树鼩动物模型。

### 5.1 树鼩个体的改造与优化

肝炎病毒能自然感染人和黑猩猩,主要原因可能在于肝炎病毒对人和黑猩猩肝脏环境的适应性。我们可以通过异种移植的方式,将人肝细胞移植到动物体内,为病毒提高合适的感染与复制环境,以提高病毒的感染性。比如, Tesfaye 等<sup>[24]</sup>将人肝细胞移植到 MUP-uPA/SCID/Bg 转基因小鼠上,发现人肝细胞可在小鼠肝脏内生长。这种肝细胞移植小鼠可以提高 HBV 和 HCV 的感染。Kosaka 等<sup>[75]</sup>发现 TK-NOG 小鼠(基于胸腺激酶的小鼠)在注射鸟嘌呤后可支持人肝细胞的移植,并能对 HBV 和 HCV 易感,并可建立稳定的感染,且能出现病毒血症。而 Ilan 等<sup>[30]</sup>则用无免疫系统的正常小鼠与 SCID 小鼠骨髓细胞进行重构,再将感染了 HCV 的人肝细胞移植到鼠肝内建立 HCV 三聚体小鼠,发现 HCV 感染率高达 80%,并且在肝细胞中可检测到 HCV 负链的存在。这些鼠类肝细胞移植模型可提高病毒的感染与复制,而我们可借鉴这些建模策略,比如可以构建成 MUP-uPA/SCID/Bg 转基因树鼩和 TK-NOG 树鼩,再将人肝细胞移植到经过改造的树鼩体内,有望提高病毒对树鼩的感染性。或者直接将有肝炎病毒的人肝细胞移植到免疫缺陷型的树鼩体内,构建

成类似的三聚体树鼩,提高病毒感染性。通过此方式将有希望建成 HBV 和 HCV 高感染的树鼩动物模型。

牛黄胆酸钠共转移多肽(NTCP)已被证实是 HBV 的受体,CD81、SR-BI、CLDN1 和 OCLN 则是 HCV 进入细胞的受体,受体基因的高表达有助于相应病毒对宿主细胞的感染。比如 Dorner 等<sup>[76]</sup>用基因工程技术在小鼠体内表达人 CD81 和 OCLN,发现该小鼠对 HCV 易感。我们也可以借助基因工程技术在树鼩肝组织中高表达人 HBV 和 HCV 的相应受体分子,借助受体分子的表达来提高肝炎病毒对树鼩的感染与致病性。

细胞内存在着病毒复制的正调节因子及负调节因子,正调节因子的存在可提高病毒在细胞内的复制及释放,比如 miR-122 可提高 HCV 的翻译和复制<sup>[47]</sup>。而负调节因子则可能在动物体内参与提高体内的抗病毒反应,使病毒蛋白失活导致对细胞感染性下降,比如 HCV 在 PKR 缺失的鼠胚胎成纤维病毒细胞的复制远远大于在正常成纤维细胞中<sup>[77]</sup>。因此,我们可以借助基因工程手段,提高细胞中与病毒感染及复制有关的正调节因子的表达、降低或沉默负调节因子的表达,来提高病毒对树鼩的感染与致病性。

### 5.2 病毒的改造与优化

筛选获得对异种动物的适应性病毒株,有助于提高病毒的感染、致病性和疾病模型的建立。已有研究已利用细胞传代筛选、病毒基因改造等技术筛选出适应性 HCV 病毒株,提高了病毒对小鼠与狨猴的感染性。比如 Bitzegeio 等<sup>[78]</sup>用高表达鼠 CD81 的 Lunet N 细胞连续传代 HCV 病毒,筛选到可利用

鼠 CD81 感染细胞的 HCV 病毒适应株,并证实由于囊膜蛋白与 P7 蛋白的部分氨基酸发生了变异,使病毒获得对异种细胞感染能力。我们可借鉴此方法,用树鼩 CD81 在 Lunet N 细胞中表达,筛选出适应树鼩 CD81 的 HCV 病毒株,并用适应性病毒株在树鼩原代肝细胞经连续传代培养,进一步优化病毒,有望提高肝炎病毒对树鼩的感染性和致病性。

Li 等<sup>[79]</sup>采用基因工程技术将 HCV 的核心和包膜蛋白或者是完整的膜蛋白替换为 GBV-B 对应基因片段,构建了 HCV/GBV-B 嵌合病毒,使嵌合病毒具备了对 GBV-B 自然宿主狨猴的感染性。因此,我们也可以利用与肝炎病毒同类并且可以自然感染树鼩的病毒,构建嵌合病毒,提高肝炎病毒对树鼩的感染性。

病毒在树鼩体内不能稳定感染的主要原因可能还在于病毒不能适应树鼩肝细胞的环境,导致病毒在细胞中复制较低,不能产生稳定的感染性病毒。我们可以开发出体内选择系统,来提高病毒的复制能力。有研究报道,在病毒基因组中嵌入 FAH 选择标记基因,与 FAH 缺失小鼠可产生互补的选择性,通过选择压力,促使病毒基因组在 FAH 缺失小鼠肝细胞内复制,提高病毒的感染性<sup>[80]</sup>。我们也可将树鼩肝细胞中 FAH 基因敲出,利用病毒与细胞的互补选择性提高病毒在树鼩肝细胞中的复制,来提高病毒对树鼩肝细胞的感染性。

## 6 展望

疾病动物模型对于研究病原体感染与致病机制,以及药物与疫苗的研发均具有重要意义。理想的动物模型应能使病毒易于建立感染,产生与人类感染相应肝炎病毒相同、至少相似的疾病过程与症状。从分子水平来看,树鼩的 HBV 和 HCV 受体与人同源性高,尤其是关键结合位点高度一致,并可介导病毒的感染,为树鼩发展成为合适的动物模型提供了良好的佐证。目前为止,虽然树鼩对于 HBV、HCV 感染率仍较低,难以建立慢性感染,但随着分子生物学、免疫学、病毒学、基因工程技术及细胞培养技术的发展,树鼩有望发展成为合适病毒性肝炎动物模型,为这些疾病感染与致病机制研究、药物与疫苗研发提供技术支撑。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] 陈欣如,侯岩岩,燕顺生. 肝炎病毒动物模型的研究进展 [J]. 地方病通报, 2005, 20(1):70-73.
- [ 2 ] Chayama K, Hayes CN, Hiraga N, et al. Animal model for study of human hepatitis viruses [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2011, 26(1):13-18.
- [ 3 ] 陈瑾,代解杰,孙晓梅. 树鼩肝炎动物模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(2):59-62.
- [ 4 ] Cui Y, Jia J. Update on epidemiology of hepatitis B and C in China [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2013, 28(S1):7-10.
- [ 5 ] Asher LV, Binn LN, Mensing TL, et al. Pathogenesis of hepatitis A in orally inoculated owl monkeys (*Aotus trivirgatus*) [J]. J Med Virol, 1995, 47(3):260-268.
- [ 6 ] Hornei B, Kämmerer R, Moubayed P, et al. Experimental hepatitis A virus infection in guinea pigs [J]. J Med Virol, 2001, 64(4):402-409.
- [ 7 ] Purcell RH, Wong DC, Shapiro M. Relative infectivity of hepatitis A virus by the oral and intravenous routes in 2 species of non-human primates [J]. J Infect Dis, 2002, 185(11):1668-1671.
- [ 8 ] Pinto MA, Marchevsky RS, Baptista ML, et al. Experimental hepatitis A virus (HAV) infection in *Callithrix jacchus*: Early detection of HAV antigen and viral fate [J]. Exp Toxicol Pathol, 2002, 53(6):413-420.
- [ 9 ] Amado LA, Marchevsky RS, De Paula VS, et al. Experimental hepatitis A virus (HAV) infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*): evidence of active extrahepatic site of HAV replication [J]. Int J Exp Pathol, 2010, 91(1):87-97.
- [ 10 ] Freitas N, Salisse J, Cunha C, et al. Hepatitis delta virus infects the cells of hepadnavirus-induced hepatocellular carcinoma in woodchucks [J]. Hepatology, 2012, 56(1):76-85.
- [ 11 ] Lütgehetmann M, Mancke LV, Volz T, et al. Humanized chimeric uPA mouse model for the study of hepatitis B and D virus interactions and preclinical drug evaluation [J]. Hepatology, 2012, 55(3):685-694.
- [ 12 ] Ohashi K, Marion PL, Nakai H, et al. Sustained survival of human hepatocytes in mice: a model for in vivo infection with human hepatitis B and hepatitis delta viruses [J]. Nature Med, 2000, 6(3):327-331.
- [ 13 ] de Carvalho LG, Marchevsky RS, dos Santos DR, et al. Infection by Brazilian and Dutch swine hepatitis E virus strains induces haematological changes in *Macaca fascicularis* [J]. BMC Infect Dis, 2013, 13(1):495-511.
- [ 14 ] Bossart KN, Geisbert TW, Feldmann H, et al. A neutralizing human monoclonal antibody protects African green monkeys from hendra virus challenge [J]. Sci Transl Med, 2011, 3(105):105-103.
- [ 15 ] Zhu Y, Yu X, Zhang Y, et al. Infectivity of a genotype 4 hepatitis E virus cDNA clone by intrahepatic inoculation of laboratory rats [J]. Vet Microbiol, 2013, 166(3):405-411.
- [ 16 ] Williams TP, Kasorndorkbua C, Halbur PG, et al. Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model [J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(9):3040-3046.
- [ 17 ] Cheng X, Wang S, Dai X, et al. Rabbit as a novel animal model for hepatitis E virus infection and vaccine evaluation [J]. PLoS one, 2012, 7(12):e51616.
- [ 18 ] Li W, Sun Q, She R, et al. Experimental infection of Mongolian gerbils by a genotype 4 strain of swine hepatitis E virus [J]. J

- Med Virol, 2009, 81(9):1591-1596.
- [19] 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.
- [20] Cote PJ, Korba BE, Miller RH, et al. Effects of age and viral determinants on chronicity as an outcome of experimental woodchuck hepatitis virus infection [J]. Hepatology, 2000, 31(1):190-200.
- [21] 孔祥平, 吴庆洲, 罗显荣, 等. 复制型 HBV 转基因小鼠遗传稳定性研究 [J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(5):17-21.
- [22] 屠亚军, 琦祖和. 人乙型肝炎病毒 x 基因转基因小鼠模型的建立 [J]. 中国医学科学院学报, 2000, 22(3):263-265.
- [23] Dandri M, Petersen J. Chimeric mouse model of hepatitis B virus infection [J]. J Hepatol, 2012, 56(2):493-495.
- [24] Tesfaye A, Stift J, Maric D, et al. Chimeric mouse model for the infection of hepatitis B and C viruses [J]. PloS one, 2013, 8(10):e77298.
- [25] Huang LR, Wu HL, Chen PJ, et al. An immunocompetent mouse model for the tolerance of human chronic hepatitis B virus infection [J]. Proc Natl Acad Sci, 2006, 103(47):17862-17867.
- [26] 夏宁邵, 毕胜利. 中国株丙型肝炎病毒实验感染 3 种猕猴的初步结果 [J]. 中国科学: B 辑, 1995, 25(7):732-739.
- [27] Sourisseau M, Goldman O, He W, et al. Hepatic cells derived from induced pluripotent stem cells of pigtail macaques support hepatitis c virus infection [J]. Gastroenterology, 2013, 145(5):966-969.
- [28] 任进余, 成国祥, 孔晓飞, 等. 丙型肝炎病毒结构基因转基因小鼠模型的建立 [J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 7(13):501-504.
- [29] Dorner M, Horwitz JA, Robbins JB, et al. A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection [J]. Nature, 2011, 474(7350):208-211.
- [30] Ilan E, Arazi J, Nussbaum O, et al. The hepatitis C virus (HCV)-Trimera mouse: a model for evaluation of agents against HCV [J]. J Infect Dis, 2002, 185(2):153-161.
- [31] Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, et al. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers [J]. Nature Med, 2001, 7(8):927-933.
- [32] 詹美云, 刘崇柏, 李成明, 等. 甲型肝炎病毒感染树助的初步研究 [J]. 中国医学科学院学报, 1981, 3(3):148-152.
- [33] 李奇芬, 丁明权, 王洪, 等. 丁型肝炎对成年树鼩的感染 [J]. 中华医学杂志, 1995, 75(10):611-617.
- [34] 蒋雷, 尹革芬, 舒相华, 等. 戊型肝炎病毒树鼩感染模型的初步研究 [J]. 云南农业大学学报, 2013, 20(2):186-190.
- [35] 严瑞琪, 苏建家, 陈志英, 等. 人乙型肝炎病毒实验感染成年树鼩的初步研究 [J]. 广西医科大学学报, 1984, 1:002.
- [36] 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.
- [37] Wang Q, Schwarzenberger P, Yang F, et al. Experimental chronic hepatitis B infection of neonatal tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*): A model to study molecular causes for susceptibility and disease progression to chronic hepatitis in humans [J]. J Virol, 2012, 9(1):170-179.
- [38] Ren S, Nassal M. Hepatitis B virus (HBV) virion and covalently closed circular DNA formation in primary tupaia hepatocytes and human hepatoma cell lines upon HBV genome transduction with replication-defective adenovirus vectors [J]. J Virol, 2001, 75(3):1104-1116.
- [39] 曾扬, 吴小红, 胡靛雅, 等. 重组 8 型腺相关病毒介导 HBV 急性感染树鼩模型建立 [J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(3):36-41.
- [40] Ruan P, Yang C, Su J, et al. Histopathological changes in the liver of tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) persistently infected with hepatitis B virus [J]. Virol J, 2013, 10(1):333-340.
- [41] 刘志, 毛青. 丙型肝炎病毒感染成年树鼩的实验研究 [J]. 第三军医大学学报, 1998, 20(6):472-475.
- [42] Xie ZC, Riezu-Boj JI, Lasarte JJ, et al. Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews [J]. Virology, 1998, 244(2):513-520.
- [43] Zhao X, Tang Z Y, Klumpp B, et al. Primary hepatocytes of *Tupaia belangeri* as a potential model for hepatitis C virus infection [J]. J Clin Invest, 2002, 109(2):221-232.
- [44] Xu X, Chen H, Cao X, et al. Efficient infection of tree shrew (*Tupaia belangeri*) with hepatitis C virus grown in cell culture or from patient plasma [J]. J Gen Virol, 2007, 88(9):2504-2512.
- [45] Amako Y, Tsukiyama-Kohara K, Katsume A, et al. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri* [J]. J Virol, 2010, 84(1):303-311.
- [46] 李尧, 代解杰, 孙晓梅, 等. 树鼩作为丙型肝炎动物模型的 HCV 受体研究进展 [J]. 动物学研究, 2011, 32(1):97-103.
- [47] Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, et al. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA [J]. Science, 2005, 309(5740):1577-1581.
- [48] Murakami Y, Aly HH, Tajima A, et al. Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a [J]. J Hepatol, 2009, 50(3):453-460.
- [49] Bandyopadhyay S, Friedman RC, Marquez RT, et al. Hepatitis C virus infection and hepatic stellate cell activation down regulate miR-29; miR-29 over expression reduces hepatitis C viral abundance in culture [J]. J Infect Dis, 2011, 203(12):1753-1762.
- [50] Shirasaki T, Honda M, Shimakami T, et al. MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells [J]. J Virol, 2013, 87(9):5270-5286.
- [51] Xu G, Gao Z, He W, et al. MicroRNA expression in hepatitis B virus infected primary tree shrew hepatocytes and the independence of intracellular miR-122 level for de novo HBV infection in culture [J]. Virology, 2014, 448:247-254.
- [52] Guo H, Liu H, Mitchelson K, et al. MicroRNAs-372/373 pro-

- mote the expression of hepatitis B virus through the targeting of nuclear factor I/B [J]. *Hepatology*, 2011, 54(3):808–819.
- [53] Jin J, Tang S, Xia L, et al. MicroRNA-501 promotes HBV replication by targeting HBXIP [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 430(4):1228–1233.
- [54] Hu W, Wang X, Ding X, et al. MicroRNA-141 represses HBV replication by targeting PPARA [J]. *PLoS one*, 2012, 7(3):e34165.
- [55] Su C, Hou Z, Zhang C, et al. Ectopic expression of microRNA-155 enhances innate antiviral immunity against HBV infection in human hepatoma cells [J]. *Virology*, 2011, 8(1):354–365.
- [56] Imai M, Yanase Y, Nojiri T, et al. A receptor for polymerized human and chimpanzee albumins on hepatitis B virus particles co-occurring with HBsAg [J]. *Gastroenterology*, 1979, 76(2):242–247.
- [57] Pontisso P, Petit MA, Bankowski MJ, et al. Human liver plasma membranes contain receptors for the hepatitis B virus pre-S1 region and, via polymerized human serum albumin, for the pre-S2 region [J]. *J Virol*, 1989, 63(5):1981–1988.
- [58] Budkowska A, Quan C, Groh F, et al. Hepatitis B virus (HBV) binding factor in human serum: candidate for a soluble form of hepatocyte HBV receptor [J]. *J Virol*, 1993, 67(7):4316–4322.
- [59] Ryu CJ, Cho DY, Gripon P, et al. An 80-kilodalton protein that binds to the pre-S1 domain of hepatitis B virus [J]. *J Virol*, 2000, 74(1):110–116.
- [60] Neurath AR, Strick N, Sproul P. Search for hepatitis B virus cell receptors reveals binding sites for interleukin 6 on the virus envelope protein [J]. *J Exp Med*, 1992, 175(2):461–469.
- [61] Pontisso P, Ruvoletto MG, Tiribelli C, et al. The preS1 domain of hepatitis B virus and IgA cross-react in their binding to the hepatocyte surface [J]. *J Gen Virol*, 1992, 73(Pt 8):2041–2045.
- [62] Breiner KM, Schaller H. Cellular receptor traffic is essential for productive duck hepatitis B virus infection [J]. *J Virol*, 2000, 74(5):2203–2209.
- [63] 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.
- [64] Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81 [J]. *Science*, 1998, 282(5390):938–941.
- [65] Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus [J]. *EMBO J*, 2002, 21(19):5017–5025.
- [66] Evans MJ, von Hahn T, Tschernig DM, et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry [J]. *Nature*, 2007, 446(7137):801–805.
- [67] Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, et al. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells [J]. *Nature*, 2009, 457(7231):882–886.
- [68] Barth H, Cerino R, Arcuri M, et al. Scavenger receptor class B type I and hepatitis C virus infection of primary tupaia hepatocytes [J]. *J Virol*, 2005, 79(9):5774–5785.
- [69] Tong Y, Zhu Y, Xia X, et al. Tupaia CD81, SR-BI, claudin-1, and occludin support hepatitis C virus infection [J]. *J Virol*, 2011, 85(6):2793–2802.
- [70] Xu Y, Köck J, Lu Y, et al. Suppression of hepatitis B virus replication in Tupaia hepatocytes by tumor necrosis factor alpha of *Tupaia belangeri* [J]. *Comp Immunol, Microbiol Infect Dis*, 2011, 34(4):361–368.
- [71] Lee H, Kim HT, Yun Y. Liver-specific enhancer II is the target for the p53-mediated inhibition of hepatitis B viral gene expression [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(31):19786–19791.
- [72] 李强, 成军, 程明亮, 等. 肿瘤抑制基因 p53 与肝炎病毒调节的研究 [J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2003, 3:012.
- [73] Li Y, Wan D, Wei W, et al. Candidate genes responsible for human hepatocellular carcinoma identified from differentially expressed genes in hepatocarcinogenesis of the tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) [J]. *Hepatol Res*, 2008, 38(1):85–95.
- [74] Guitart A, Riezu-Boj JI, Elizalde E, et al. Hepatitis C virus infection of primary tupaia hepatocytes leads to selection of quasispecies variants, induction of interferon-stimulated genes and NF- $\kappa$ B nuclear translocation [J]. *J Gen Virol*, 2005, 86(11):3065–3074.
- [75] Kosaka K, Hiraga N, Imamura M, et al. A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 441(1):230–235.
- [76] Dorner M, Horwitz JA, Donovan BM, et al. Completion of the entire hepatitis C virus life cycle in genetically humanized mice [J]. *Nature*, 2013, 501(7466):237–241.
- [77] Chang JH, Kato N, Muroyama R, et al. Double-stranded RNA-activated protein kinase inhibits hepatitis C virus replication but may be not essential in interferon treatment [J]. *Liver Int*, 2010, 30(2):311–318.
- [78] Bitzegeio J, Bankwitz D, Hueging K, et al. Adaptation of hepatitis C virus to mouse CD81 permits infection of mouse cells in the absence of human entry factors [J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6(7):e1000978.
- [79] Li T, Zhu S, Shuai L, et al. Infection of common marmosets with hepatitis C virus/GB virus-B chimeras [J]. *Hepatology*, 2013. 10.1002/hep.26750.
- [80] Grompe M, Al-Dhalimy M, Finegold M, et al. Loss of fumarylacetoacetate hydrolase is responsible for the neonatal hepatic dysfunction phenotype of lethal albino mice [J]. *Genes Development*, 1993, 7(12a):2298–2307.