



# 丙型肝炎病毒感染实验动物模型的研究进展

姜晨晨, 彭宗根

(中国医学科学院 北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

**【摘要】** 丙型肝炎病毒(HCV)感染是导致人类慢性病毒性肝炎、肝硬化和肝癌的最主要病因之一。由于缺乏合适的HCV感染实验动物模型,使得针对HCV感染更为有效的疗法及疫苗的研发滞后。黑猩猩是HCV感染研究的最佳实验动物,但由于其来源有限、价格昂贵及临床症状等诸多问题,其应用受限,因此发展新的实验动物模型用于HCV感染相关的基础和应用研究迫在眉睫。近年来,以啮齿类等动物为替代模型取得了不少进展,应用转基因等实验技术使替代动物感染了HCV,并成功应用于多个学科领域的研究。本文分析了HCV自然感染的实验动物、自然感染和非自然感染的替代实验动物在致病机制研究、药物评价和疫苗研发应用中的优缺点及未来研究趋势。

**【关键词】** 丙型肝炎病毒;自然感染的动物模型;替代实验动物模型;啮齿类动物

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 05-0087-08

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.05.020

## Advances in research on experimental animal models of HCV infection

JIANG Chen-chen, PENG Zong-gen

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**【Abstract】** Hepatitis C virus (HCV) is a leading cause of chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma in humans. Due to the lack of suitable experimental animal models for HCV infection, the development of more effective treatment of HCV infection and vaccines has been delayed. Chimpanzee is the best experimental animal model for the research of hepatitis C virus (HCV) infection. However, because of its limited in resource, expensive in breeding, and difference in clinical symptoms, thus developing new experimental animal models for HCV-related basic and applied research is imminent. In recent years, as a surrogate animal model, the development of rodent model and other models has been achieved a lot of progress. Using such as genetically modified experimental techniques, those surrogate animals were infected with HCV *in vivo* and were successfully applied to research in several areas. In this review, we will focus on the achieved progress in naturally infected animal model and transgenic surrogate experimental models, and their advantage and limitation in usage in study on the pathogenetic mechanism of infection, drug evaluation and development of vaccines, and will also discuss the future direction of development of experimental animal models for research of infection with HCV.

**【Key words】** Hepatitis C virus; Naturally infected animal models; Surrogate animal models; Rodents

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)属于黄病毒科,肝炎病毒属,为有包膜的单股正链RNA病毒,全长约9.6 kb<sup>[1]</sup>。它是引发肝脏疾病的主要病

因之一,极易发展为慢性肝炎、肝纤维化、肝硬化、甚至肝癌<sup>[2,3]</sup>。全世界约有1.7亿慢性感染人群,每年死亡人数超过35万<sup>[4]</sup>。到目前为止尚无预防

**【基金项目】** 国家自然科学基金委优秀青年科学基金(81322050);教育部新世纪优秀人才项目(NCET-12-0072);北京市科技新星项目(2010B072)

**【作者简介】** 姜晨晨,女,硕士研究生,研究方向:抗病毒药物药理学研究。E-mail: happy123450604@126.com。

**【通讯作者】** 彭宗根,男,研究员,博士研究生导师,研究方向:抗病毒药物分子药理学研究。联系电话:(010)63010984, E-mail: pumcpzg@126.com。

HCV 感染的疫苗,而现有的干扰素与利巴韦林联合的标准治疗方案治疗效果有限<sup>[5]</sup>。近来研制的直接抗病毒药物(DAAs)显著提高了抗病毒疗效,但也不同程度地会诱导耐药的产生。因此,HCV 的感染仍然严重威胁着人们的健康,发现新型治疗方案和研发新型药物迫在眉睫<sup>[6-8]</sup>。然而,HCV 研究和相关药物研发严重滞后,其主要原因为缺乏理想的研究模型,特别是动物模型<sup>[9]</sup>。目前,黑猩猩是用于 HCV 自然感染研究的重要模型动物<sup>[10-11]</sup>,然而由于其有诸多限制,发展新型实验动物模型迫在眉睫。近年来,以啮齿类等动物为替代模型取得了不少进展,应用转基因等实验技术使替代动物感染了 HCV,并成功应用于多个学科领域的研究。本文分析了 HCV 自然感染的实验动物、自然感染和非自然感染的替代实验动物在致病机制研究、药物评价和疫苗研发应用中的优缺点及未来研究趋势。

## 1 HCV 自然感染的动物模型

众所周知,在体内系统中,HCV 复制相关的研究比较困难,这就严重阻碍了更为有效的新型治疗方法的进展<sup>[12]</sup>。到目前为止,HCV 仅能感染除人类之外的极少数物种,如黑猩猩以及非啮齿类的小型哺乳动物树鼩等<sup>[10,13]</sup>。

### 1.1 黑猩猩

黑猩猩与 HCV 的发现史密切相关<sup>[14]</sup>,是研究病毒与宿主抗病毒免疫反应的关系、免疫发病机制及预防性疫苗评价的最佳模型动物<sup>[15]</sup>。但人和黑猩猩感染 HCV 后的临床症状有所不同<sup>[16]</sup>,如 HCV 慢性感染在人身上的发病率高达 80%,而在黑猩猩上却只有 30%~40%<sup>[17]</sup>;并且 HCV 慢性感染后的黑猩猩并不会发展为肝纤维化及肝硬化,而是一些相对较温和的症状<sup>[18]</sup>。尽管如此,相关研究也极大地提高了我们对 HCV 感染过程中机体免疫应答的认识<sup>[19]</sup>。在黑猩猩体内记忆 T 细胞、NK 细胞以及 I 型/II 型干扰素可阻止 HCV 的再次感染<sup>[20]</sup>;此外,中和抗体虽能预防动物感染 HCV,但在人体内的预防效果却不理想<sup>[21]</sup>。虽然有此不足之处,黑猩猩仍然是用于 HCV 研究的重要模型动物,是其他动物模型的一个金标准。然而黑猩猩作为濒临灭绝的物种且价格昂贵,并受到伦理上的争议,使得其在生物医学方面的应用受到了极大的限制<sup>[22]</sup>。因此,发展合适的替代动物模型用于 HCV 相关的研究迫在眉睫。

### 1.2 树鼩

树鼩是一种非啮齿类小型哺乳动物,能自然感染 HCV,可用于 HCV 感染研究<sup>[23]</sup>。人或小鼠细胞表达来源于树鼩的 HCV 进入因子 CD81、SR-B1、CLDN1 和 OCLN 能够促进 HCV 假病毒颗粒或者 HCVcc 进入,树鼩的原代肝细胞可感染 HCVcc 并能产生具有感染性的子代病毒<sup>[24]</sup>。但树鼩对 HCV 的感染率较低,且病毒血症很弱并极少能够保持下去<sup>[23]</sup>,即使能够在 HCV 感染的动物中检测到肝损伤及 HCV core 蛋白的表达,但在血清中却检测不到 HCV RNA 以及抗 HCV 的抗体。尽管树鼩在获取方面比黑猩猩要简单得多,然而也受到了饲养的费用高以及所用试剂的特殊性的限制<sup>[11]</sup>。

### 1.3 自然感染的替代动物模型

#### 1.3.1 狨猴和小娟猴

狨猴和小娟猴是一种小型灵长类动物,易感 GB 病毒 B 型(GBV-B),这是一种与 HCV 同源性最近的且能诱发其病毒性肝炎的黄病毒科病毒,这使得狨猴与小娟猴有可能成为 HCV 自然感染的替代模型<sup>[25]</sup>。但 GBV-B 与 HCV 间存在一定的差异<sup>[26]</sup>,GBV-B 与 HCV 的多聚蛋白同源性很低(25%~30%),而在 5' 及 3' 非编码区的同源性则更少,使得 GBV-B 用于抗 HCV 药物研发上存在局限性。为克服这些不足之处,将 HCV 结构蛋白基因(CE1E2p7)或是完整的包膜蛋白基因(E1E2p7)替代 GBV-B 上对应的基因,构建了两种 HCV/GBV-B 嵌合体,其可在肝细胞内复制及表达并能释放到外周血中。研究结果显示,在所有 HCV 嵌合体感染的狨猴体内可被刺激产生特异性的免疫反应<sup>[27]</sup>,提供了检验抗 HCV 疗法的新模型。但此模型存在一定的使用限制,因为这些病毒并不能够完全模仿 HCV 的复制周期,以及嵌入到 GBV-B 序列中的 HCV 部分不能精确的反应其在 HCV 基因组中所起的作用。虽然如此,也为我们提供了一个新型的用于研究病毒宿主相互作用、研发疫苗及抗 HCV 药物的替代黑猩猩的小型动物模型。

#### 1.3.2 犬科/非灵长类丙型肝炎病毒

犬科丙型肝炎病毒(CHV)是从狗的呼吸道中分离出来的,是演化中与 HCV 最为相近的病毒<sup>[13]</sup>,其自然感染的宿主范围更广,实验验证 CHV 可引发病毒性肝炎。与之非常相近的非灵长类丙肝病毒(NPHV)也已在马体内得到了鉴定<sup>[28]</sup>。这些新型肝炎病毒的遗传学及生物学特征将会增进人们对人

类感染 HCV 起源的认识,也因此可能发展为新型替代动物模型。

## 2 非自然感染的啮齿类替代动物模型

小鼠和大鼠能够自然抵抗 HCV 的感染,其肝细胞不支持 HCV 的进入和复制<sup>[29]</sup>。在鼠科动物细胞内,HCV 不能完成其复制循环,其感染程度也因物种而异<sup>[30]</sup>。值得注意的是,相比于 HCV 复制的早期阶段,在小鼠肝细胞中 HCV 的组装与释放并不受到限制<sup>[31, 32]</sup>。随着转基因技术的出现,逐渐出现了用于 HCV 感染的多种小鼠模型。携带 HCV 不同基因片段的转基因小鼠成为第一个可用来研究 HCV 与宿主相互关系的模型<sup>[11, 33]</sup>。这些小鼠可呈现出模仿人类疾病的肝脏病理学,主要为脂肪肝及早期肝癌。因此,研究工作将进一步集中于通过异种移植人类细胞或转基因等手段人源化小鼠或者大鼠,发展能够支持 HCV 感染的啮齿类动物模型。

### 2.1 uPA-SCID 小鼠模型

uPA-SCID 小鼠由于其肝脏内过量表达尿激酶型纤溶酶原激活剂(uPA)而能够有效地移植人源肝细胞继而易感染 HCV。这种人肝脏嵌合小鼠对 HCV 易感,感染后病毒滴度高达  $10^7$  IU/mL,且可持续 10 个月之久<sup>[34, 35]</sup>。因此这种小鼠模型可用于评价 HCV 感染的预防或治疗。

首先是用于评价预防 HCV 的感染<sup>[36]</sup>。HCV 的进入是病毒感染中极为重要的一步,其可被结合到病毒颗粒上的中和抗体或者以宿主进入因子为靶标的单克隆抗体阻止。在 uPA-SCID 小鼠模型中这些抗体结合到包膜糖蛋白 E2 并能阻止多种 HCV 基因型的感染。针对 HCV 进入因子如 CD81 及 SRBI 的单克隆抗体已成功在嵌合的 uPA-SCID 小鼠中得到了检验,它能够有效抑制不同基因型的 HCV 的感染。此外,HCV 感染 3 d 的肝脏嵌合小鼠,若每天注射  $400\mu\text{g}$  的抗 SR-BI 的单克隆抗体,连续 5 d 便可治愈<sup>[37]</sup>。uPA-SCID 小鼠模型也已成功用于评价小分子及其他以宿主进入因子为靶点的药物<sup>[38, 39]</sup>,此即 uPA-SCID 小鼠模型与其他小鼠模型相比的优势所在。

uPA-SCID 小鼠模型也成功用于评价以病毒复制酶为靶标的直接抗病毒药物。蛋白酶抑制剂 BILN2061 就是通过这个模型筛选而来的,用药 4 d 后病毒载量明显降低,但导致心肌细胞恶化,同样在恒河猴中也得到了验证,后来因其心脏毒性而停止

临床研究<sup>[40]</sup>。近来,临床上认可的 NS3-4A 蛋白酶抑制剂特拉匹韦(Telaprevir)单独使用或与 NS5B 抑制剂 MK-0608 联用同样通过这个模型进行药效学评价<sup>[41]</sup>。此外,Shi 等<sup>[42]</sup>利用这个小鼠模型,将 NS3 蛋白酶抑制剂 BMS-605339、NS5A 抑制剂 BMS-788329 和 NS5B 非核苷类似物抑制剂 BMS-821095 联用以评价其抗病毒活性,结果显示药物联用能有效抑制 HCV 基因 1b 型却不能抑制 2a 和 2b 型。

尽管 uPA-SCID 小鼠已被证明其有效性,对临床前药物评价也具有重要意义,但是其应用仍具有限制性。首先是 uPA-SCID 小鼠的死亡率很高,且移植需要在其生下来的两周内进行,因其生来就是肝细胞致死性的表型<sup>[34]</sup>。其次,部分小鼠 uPA 转基因也容易丢失,出现一定程度的免疫功能恢复,此为 SCID 小鼠渗漏现象,但不遗传,只与小鼠年龄、品系、饲养环境有关。再次,这个动物模型缺乏功能性的适应性免疫,不能产生功能性的 T 细胞和 B 细胞,因此不能将其用于适应性免疫反应的研究。

### 2.2 MUP-uPA/SCID/Bg 转基因小鼠

MUP-uPA 基因结构包含 MUP 增强子/启动子及全部的小鼠 uPA 基因编码序列,而 SCID/Bg 转基因小鼠能表达分泌型人 uPA,将 MUP-uPA 小鼠与 SCID/Bg 背景的 BALB/c 小鼠杂交<sup>[43]</sup>,不仅新生鼠的死亡率低,人类肝细胞移植过程中其死亡率也很低,且该转基因小鼠对 HCV 感染的敏感程度与黑猩猩相近<sup>[44]</sup>,因此可以取代黑猩猩进行一系列的研究工作。在 HCV 基因 1a 型感染的小鼠体内可检测到病毒滴度为  $10^3 \sim 4$  /mL,且 2 个月内都可检测到,感染 HCV 其他基因型的小鼠体内同样也可检测到病毒。

MUP-uPA/SCID/Bg 小鼠模型弥补了 Alb-uPA 小鼠的一些缺陷<sup>[11]</sup>,这些转基因小鼠即使不移植人肝细胞也能健康的存活至少一年,这就使得人类肝细胞的移植、HCV 病毒的感染等操作可在其 4 ~ 12 月时进行,由于移植时已为成年鼠,使得手术程序变得简单及实验死亡率也大大降低。这种小鼠模型将会在 HCV 感染引起的免疫反应、免疫发病机制及疫苗研发中发挥极大的作用。

### 2.3 Fah<sup>-/-</sup> Rag2<sup>-/-</sup> $\gamma$ -c<sup>-/-</sup> (FRG) 小鼠模型

FRG 小鼠免疫缺陷现象更为严重,由于它们缺少 Rag2 重组酶、白细胞介素的  $\gamma$  链以及酪氨酸分解代谢酶(Fah),若停用肝脏保护药物 NTBC,则导致小鼠在停药 4 ~ 8 周后死亡,这可能是由于 DNA 修

复缺陷造成的。基于这种机制,FRG 小鼠可有效地移植人肝细胞获得肝脏的再生<sup>[45]</sup>。FRG 小鼠模型在多个方面优于 uPA 小鼠模型,首先,肝脏坏死的程度及选择压力可通过控制 NTBC 是否使用来实现。其次,Fah-缺陷突变是一种去除型突变,因此不能因转基因的失活而回复突变成野生型。因此,人类肝细胞在这类小鼠体内的移植时间相对于 uPA-SCID 小鼠来说更加方便,可在其成年鼠的任一阶段进行以及连续移植也是可行的。Bissig 等应用这种模型成功地感染了 HCV 基因 2a 型 JFH-1 株和 HCV 基因 1a 型临床分离株及基因 1a/2a 和 1b/2a 嵌合株。但这种小鼠模型存在一个明显的缺陷,由于 Rag2 及  $\gamma$ -c 的缺失,小鼠没有 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞,不能用于 HCV 感染的适应性免疫研究,因此不适于 HCV 的免疫致病机理的研究以及疫苗的研发与评价。

#### 2.4 AFC8-huHSC/Hep 小鼠

为克服 uPA-SCID 及 FRG 小鼠模型内在免疫缺失的不足,AFC8-huHSC/Hep 小鼠模型应运而生。这种小鼠模型基于免疫缺陷的 Balb/c Rag2<sup>-/-</sup>  $\gamma$ -c<sup>-/-</sup> (BRG) 小鼠,能在肝脏中过表达 FKPB 和 AFC8 融合蛋白<sup>[46]</sup>。注射 AP20187 可诱导 caspase-8 活性域的二聚化以激发这个酶的自噬活性及小鼠肝细胞的死亡<sup>[47]</sup>,这种诱导性的肝脏缺陷有利于人肝细胞的移植。因此,这些转基因小鼠适于在 5 d 鼠龄时移植源于婴儿肝脏的且与其组织相容性抗原 (HLA) 匹配的人肝细胞及 CD34<sup>+</sup> 造血干细胞。约有 50% AFC8-huHSC/Hep 小鼠可感染从丙肝病人血清中分离的基因 1a 型 HCV,但 HCV RNA 只能在这些动物的肝脏中检测到,而在血液中却检测不到。尽管其缺乏病毒血症,但是 HCV 阳性小鼠肝脏中存在人免疫细胞渗透及 HCV 特异的 CD4、CD8 T 细胞反应。且半数 HCV 阳性小鼠会发展为肝纤维化,这是 HCV 首次在小型动物模型感染上呈现了 HCV 特异性的适应性免疫以及首次诱导了免疫致病机制。

尽管这种小鼠在研究 HCV 感染的具有完全免疫活性小鼠模型上具有重大突破,但不足的是无血清 HCV 和缺失功能性 B 细胞,然而这却是评价潜在抗病毒药物及疫苗的重要因素之一。此外,虽然对来源于人 HSC 的免疫系统已在鼠科主要组织相容性复合物上进行了研究,但是人免疫细胞在小鼠上是否能够识别 HCV 感染的 HLA 表达的人肝细胞仍不清楚<sup>[48]</sup>。

#### 2.5 Rosa26-Fluc HCV 进入因子人源化小鼠

暨 AFC8-huHSC/Hep 小鼠模型之后,另一种对 HCV 易感且具有免疫活性的小鼠模型随之产生,与之前的模型相比较,此模型具有完整的免疫系统及肝脏。为了克服病毒进入的种属特异性及实现小鼠肝脏对于 HCV 的易感性,Dorner 等在小鼠体内肝细胞中转染腺病毒载体来表达产生 HCV 的进入因子 CD81、SR-BI、CLDN1 和 OCLN<sup>[29]</sup>,约有 5% 的小鼠肝细胞能完全表达这四种进入因子,且能检测到病毒入侵。鉴于 HCV 在小鼠体内并不能高效复制,Dorner 等重新设计病毒使之进入小鼠肝脏后能够表达 HCV-Core 蛋白,表达后将会导致 loxP-flanked 荧光素酶报告基因在 Rosa26-Fluc 小鼠中表达,其表达强度反应了病毒入侵肝细胞的复制能力<sup>[49]</sup>。这个动物模型首次用于研究不同基因型的 HCV 嵌合体在生物体内入侵肝细胞,并成功地评估了抗 CD81、E2 抗体的抗 HCV 复制作用。这是第一例报道的用于研究 HCV 感染的具有完全免疫活性的小动物模型,且到目前为止,这个模型也是唯一有效的与免疫相关的小鼠模型,同时它也是免疫系统与感染的肝细胞间的主要组织相容性复合体有较好的匹配度的小鼠模型,使我们能更好的认识由病毒诱导的全部免疫反应。

但是该小鼠模型也存在其局限性<sup>[50]</sup>。首先,由于这些细胞内病毒复制效率较低,导致感染小鼠肝细胞中检测不到病毒产物,这使得这种模型并不适于直接抗病毒药物 (DAAs) 或以病毒周期中组装及释放为靶点的抗病毒药物的筛选。其次,通过腺病毒载体引入人源的进入因子会引起小鼠对这些载体的免疫排异反应。因此,此模型不适于研究 HCV 诱导的免疫学发病机制。尽管如此,利用人进入因子的转基因小鼠的后续研究,具有深入探索 HCV 的发病机制的潜在价值。

#### 2.6 免疫活性大鼠模型

不排异人肝细胞且易感 HCV 的大鼠可作为具有免疫活性的小动物模型<sup>[51]</sup>。胎鼠在妊娠 15 ~ 17 天时腹腔注射人 Huh7 细胞以诱导对这些细胞的免疫耐受,因而在新生鼠 24 h 内可通过腹腔注射移植 Huh7 细胞。这些大鼠在移植一周后接种从血清中分离的基因 1 型 HCV,能够出现一过性的病毒血症,且在 12 周的时候 HCV 病毒载量可达  $2 \times 10^4$  / mL<sup>[52]</sup>。

不幸的是,这个模型由于腹膜注射存在危险性

而使其建立具有一定的困难。此外,由于移植的细胞是肝癌细胞系而非人原始的肝细胞,使得这个模型受到了使用限制。而且,与 HCV 感染的患者或是人肝脏细胞嵌合的小鼠相比,此模型中移植外源细胞的数量低且病毒血症很弱,约在  $2 \times 10^4$ /mL 左右。尽管这个模型具有免疫活性且可被 HCV 感染,但是人 HLA 与大鼠 MHC 不匹配阻止了其在感染的肝癌细胞中开展适应性免疫的研究。

### 3 HCV 感染动物模型的未来发展方向

过去几年内,在发展新型动物模型以研究 HCV-宿主相互作用方面取得了不少进展。但是,这些小型动物模型仍存在如下诸多缺陷:①适应性免疫缺乏或是功能不全;②病毒复制水平较低及缺乏病毒血症;③不出现或极少出现肝纤维化以及没有肝硬化现象的发生。因此,发展更为合适的 HCV 感染模型同时用于多领域的研究仍拭目以待。目前有如下几条研究途径:①改造病毒使之能够适应小鼠,使其可在肝细胞内完成整个生命周期;②进一步人源化小鼠使之对 HCV 更易感;③上两种方案的组合。

#### 3.1 HCV 适应的具有免疫活性的小鼠模型

由于小鼠的肝细胞对 HCV 感染具有抵抗力,通过基因工程的手段改造病毒以克服病毒感染中物种特异性的限制,使病毒在普通的小鼠肝细胞内可以完成它的整个生命周期,包括进入、转录、复制和释放等环节。Bitzegeio 等<sup>[53]</sup>将源于 HCV 基因 2a 亚型的病毒株 HCV Jc1 改造,以适应鼠科的进入因子 CD81。与野生型的 Jc1 相比,变种可进入表达鼠源 CD81 的肝细胞。尽管如此,它并不能在小鼠肝细胞内进行复制,说明宿主因子限制了病毒进入细胞后下游的持续感染<sup>[53]</sup>。证据表明这可能是固有免疫干扰了 HCV 的复制,因而在小鼠细胞内感染效率很低<sup>[11, 32, 54]</sup>。为更精确的模仿人体的免疫反应,人们尝试应用 HLA 表达小鼠<sup>[55]</sup>,然而这个方案的主要缺陷是难于模仿人体内 HLA 组合的可变性。因此,今后应进一步明确 HLA 转基因的组合。然而,我们仍不能确定小鼠对病毒的免疫反应与人体内的是否具有可比性。因此,下一步的计划应致力于发展具有人免疫系统及人源化肝脏的且具有完全免疫活性的小鼠模型,以用于研究 HCV 感染。

#### 3.2 人免疫系统-人肝细胞嵌合小鼠模型

评价免疫系统在 HCV 侵染时所起的作用,及探

索在与人体内环境相似的情况下病毒诱导的免疫发病机制的最佳动物模型,将会落在与人免疫细胞及肝细胞不发生排异反应的转基因小鼠上。然而,人免疫细胞是在鼠科 MHC 上而非在 HLA 分子上进行选择,这将会阻止有效的 T 细胞及 B 细胞反应的产生。

但不幸的是,来源于小鼠体内的 hHSC 并不能非常有效的发挥作用,原因是一些小鼠的细胞因子不能有效的刺激人的细胞<sup>[56]</sup>。为改善来自于 hHSC 的免疫重建,尝试了通过注射外源重组的细胞因子,或是构造转基因或基因敲除小鼠等途径<sup>[57]</sup>。具有不同遗传背景的多种小鼠都会排斥移植的人类细胞,这是因为人 CD47 与表达于巨噬细胞上的小鼠信号调节蛋白  $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ) 相互作用的效率低下,而这将会导致巨噬细胞的吞噬作用的激活。实验证明,表达小鼠 CD47 的人源细胞可有效移植到 BRG 小鼠体内,使淋巴器官中 T 细胞及 NK 细胞处于稳态<sup>[58]</sup>。同样的,它能更有效的允许 hHSC 的移植,以用来构建人 SIRP $\alpha$  转基因小鼠<sup>[59]</sup>。另外,移植细胞基因上的操作与选择过程,会导致移植时数量上的限制。为了克服这种限制,通过对比其他基因背景的小鼠在接受其他外源移植上的效率问题,发现 NOD 小鼠最适于 hHSC 移植,由于其编码 SIRP $\alpha$  基因的多态性,使结合到人 CD47 上的效率更高<sup>[60]</sup>。因此,NOD 小鼠可能是最适于引入无需基因修饰的外源细胞,并使之嵌合程度更高的小鼠模型。

人免疫系统-人肝细胞嵌合小鼠模型有以下几点优势<sup>[61]</sup>:①可评估抗 HCV 免疫反应;②慢性感染中深入破译免疫发病机制的发展;③探究急性感染中 HCV-宿主相互作用关系;④解决病毒杀死的机制;⑤研发疫苗及其他抗病毒疗法。

#### 3.3 基因人源化小鼠模型

为研发具有免疫活性的小鼠模型,另一途径有赖于将病毒生命周期所需的人源特异性因子引入基因改造的小鼠体内。Dorner 等<sup>[29]</sup>的研究表明,腺病毒在小鼠肝脏中表达人的病毒进入因子使病毒能够进入鼠肝细胞,鉴于此,HCV RNA 的复制成为接下来及最终在小鼠细胞中需要解决的关键步骤。然而,病毒 RNA 可在小鼠细胞内翻译却不能有效复制<sup>[29]</sup>。一些研究表明 HCV 复制子可在鼠细胞系内复制<sup>[62]</sup>,提示目前仍没有针对 HCV 在小鼠细胞中复制低的抑制因子,以及解决鼠直系同源的宿主因子的限制性等问题。小鼠固有免疫反应的激活与其

细胞内有限的 HCV 的复制相关<sup>[54]</sup>。事实上,固有免疫中涉及的几种抗病毒分子的失活可促进小鼠细胞内 HCV 的复制<sup>[32, 63]</sup>。基因人缘化小鼠可表达人肝细胞的免疫反应,为未来构建更适于 HCV 免疫发病机制研究的新型动物模型打下了基础。

#### 4 其他替代动物模型

斑马鱼基因与人类基因的同源性达到 87%,这意味着在其身上做药物实验所得到的结果在多数情况下也有可能适用于人体,因此它受到生物学家的重视。因为斑马鱼的胚胎是透明的,所以生物学家很容易观察到药物对其体内器官的影响。此外,雌性斑马鱼可产卵 200 枚,胚胎在 24 h 内就可发育成形,这使得生物学家可以在同一代鱼身上进行不同的实验,进而研究病理演化过程并找到病因。

有研究<sup>[64]</sup>表明 HCV 的亚复制子被设计为带有两个载体,其中之一为 HCV NS5b 及红色荧光蛋白基因,另外一个包括 HCV 5'-UTR、Core 蛋白、3'-UTR 和绿色荧光蛋白。含有亚复制子的载体被注入到斑马鱼的受精卵中,高表达 HCV RNA 及核心蛋白,但并不引起斑马鱼生长发育过程中的不良反应,且能够引发同人类肝细胞相近的基因表达。两个已知的抗 HCV 的药物:利巴韦林和氧化苦参碱,能够通过降低 HCV RNA 及核心蛋白的量来抑制亚复制子的表达。由于这个模型在技术方面具有较好的再现性且易于操作,因此,斑马鱼有可能成为 HCV 感染宿主的新的模式生物,并且斑马鱼/HCV (亚复制子)系统有可能成为抗 HCV 药物筛选与评价的替代动物模型之一。

#### 5 结论与展望

自第一个 HCV 感染替代小动物模型 (uPA-SCID 小鼠模型) 出现后,产生了多种更为复杂的 HCV 感染替代动物模型。尽管这些模型可用于病毒致病机制研究和不同种类抗病毒药物和疫苗的临床前评价,但却没有任何一个模型可以在病毒感染过程中(如:病毒生命周期、免疫反应、免疫学发病机制、疫苗的研发等)具有完全的优势。鉴于 HCV 感染的自然史,需要多年甚至几十年才有可能发展为肝癌,因此像这种平均寿命只有两年的啮齿类动物,怎样使其受 HCV 感染并诱导产生肝纤维化、肝硬化及肝癌是一个极大的挑战。尽管如此,这些模型仍极大地增进了我们对 HCV 感染和 HCV-宿主相

互作用关系的认识,为日后将这些模型不同的特点及优势结合以构建新型动物模型打下了基础,结合多种现代实验技术,最终会促进更适于 HCV 免疫发病机制研究及药物和疫苗评价的新型动物模型的发展。

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] Momin B, Richardson L. An analysis of content in comprehensive cancer control plans that address chronic hepatitis B and C virus infections as major risk factors for liver cancer [J]. *J Community Health*, 2012, 37(4): 912-916.
- [ 2 ] Yamashita T, Honda M, Kaneko S. Molecular mechanisms of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C virus infection [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26(6): 960-964.
- [ 3 ] McGivern DR, Lemon SM. Virus-specific mechanisms of carcinogenesis in hepatitis C virus associated liver cancer [J]. *Oncogene*, 2011, 30(17): 1969-1983.
- [ 4 ] Armstrong GL, Wasley A, Simard EP, et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002 [J]. *Ann Intern Med*, 2006, 144(10): 705-714.
- [ 5 ] Houghton M. Prospects for prophylactic and therapeutic vaccines against the hepatitis C viruses [J]. *Immunol Rev*, 2011, 239(1): 99-108.
- [ 6 ] Lok AS, Gardiner DF, Lawitz E, et al. Preliminary study of two antiviral agents for hepatitis C genotype 1 [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(3): 216-224.
- [ 7 ] Gane EJ, Roberts SK, Stedman CA, et al. Oral combination therapy with a nucleoside polymerase inhibitor (RG7128) and danoprevir for chronic hepatitis C genotype 1 infection (INFORM-1): a randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial [J]. *Lancet*, 2010, 376(9751): 1467-1475.
- [ 8 ] Chayama K, Takahashi S, Toyota J, et al. Dual therapy with the nonstructural protein 5A inhibitor, daclatasvir, and the nonstructural protein 3 protease inhibitor, asunaprevir, in hepatitis C virus genotype 1b-infected null responders [J]. *Hepatology*, 2012, 55(3): 742-748.
- [ 9 ] von Schaeuwen M, Ploss A. Murine models of hepatitis C: What can we look forward to? [J]. *Antiviral Res*, 2014, 104: 15-22.
- [ 10 ] Bukh J. Animal models for the study of hepatitis C virus infection and related liver disease [J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(6): 1279-1287 e1273.
- [ 11 ] Billerbeck E, de Jong Y, Dörner M, et al. Animal models for hepatitis C [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2013, 369: 49-86.
- [ 12 ] Dustin LB, Rice CM. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C [J]. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25: 71-99.
- [ 13 ] Simmonds P. The origin of hepatitis C virus [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2013, 369: 1-15.
- [ 14 ] Houghton M. The long and winding road leading to the identification of the hepatitis C virus [J]. *J Hepatol*, 2009, 51(5): 939-948.

- [15] Akari H, Iwasaki Y, Yoshida T, Non-human primate surrogate model of hepatitis C virus infection [J]. *Microbiol Immunol*, 2009, 53(1):53–57.
- [16] Bukh J. A critical role for the chimpanzee model in the study of hepatitis C [J]. *Hepatology*, 2004, 39(6):1469–1475.
- [17] Lanford RE, Bigger C, Bassett S, et al. The chimpanzee model of hepatitis C virus infections [J]. *ILAR J*, 2001, 42(2):117–126.
- [18] Bukh J, Forns X, Emerson SU, et al. Studies of hepatitis C virus in chimpanzees and their importance for vaccine development [J]. *Intervirology*, 2001, 44(2–3):132–142.
- [19] Rehermann B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(7):1745–1754.
- [20] Barth H, Rybczynska J, Patient R, et al. Both innate and adaptive immunity mediate protective immunity against hepatitis C virus infection in chimpanzees [J]. *Hepatology*, 2011, 54(4):1135–1148.
- [21] Bailey J. An assessment of the use of chimpanzees in hepatitis C research past, present and future: 1. Validity of the chimpanzee model [J]. *Altern Lab Anim*, 2010, 38(5):387–418.
- [22] Harrington M. State of the (research) chimp [J]. *Lab Anim (NY)*, 2012, 41(2):31.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] Li T, Zhu S, Shuai L, et al. Infection of common marmosets with hepatitis C virus/GB virus-B chimeras [J]. *Hepatology*, 2014, 59(3):789–802.
- [26] Schulze Zur Wiesch J, Ciuffreda D, Lewis-Ximenez L, et al. Broadly directed virus-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses are primed during acute hepatitis C infection, but rapidly disappear from human blood with viral persistence [J]. *J Exp Med*, 2012, 209(1):61–75.
- [27] Takikawa S, Engle RE, Faulk KN, et al. Molecular evolution of GB virus B hepatitis virus during acute resolving and persistent infections in experimentally infected tamarins [J]. *J Gen Virol*, 2010, 91(Pt 3):727–733.
- [28] Burbelo PD, Dubovi EJ, Simmonds P, et al. Serology-enabled discovery of genetically diverse hepaciviruses in a new host [J]. *J Virol*, 2012, 86(11):6171–6178.
- [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] Sandmann L, Ploss A. Barriers of hepatitis C virus interspecies transmission [J]. *Virology*, 2013, 435(1):70–80.
- [31] Long G, Hiet MS, Windisch MP, et al. Mouse hepatic cells support assembly of infectious hepatitis C virus particles [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(3):1057–1066.
- [32] Vogt A, Scull MA, Friling T, et al. Recapitulation of the hepatitis C virus life-cycle in engineered murine cell lines [J]. *Virology*, 2013, 444(1–2):1–11.
- [33] Lerat H, Higgs M, Pawlotsky JM. Animal models in the study of hepatitis C virus-associated liver pathologies [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011, 5(3):341–352.
- [34] Vanwolleghem T, Libbrecht L, Hansen BE, et al. Factors determining successful engraftment of hepatocytes and susceptibility to hepatitis B and C virus infection in uPA-SCID mice [J]. *J Hepatol*, 2010, 53(3):468–476.
- [35] Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, et al. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers [J]. *Nat Med*, 2001, 7(8):927–933.
- [36] Lacey K, Vercauteren K, Grzyb K, et al. Novel human SR-BI antibodies prevent infection and dissemination of HCV in vitro and in humanized mice [J]. *J Hepatol*, 2012, 57(1):17–23.
- [37] Meuleman P, Catanese MT, Verhoye L, et al. A human monoclonal antibody targeting scavenger receptor class B type I precludes hepatitis C virus infection and viral spread in vitro and in vivo [J]. *Hepatology*, 2012, 55(2):364–372.
- [38] Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, et al. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy [J]. *Nat Med*, 2011, 17(5):589–595.
- [39] Sainz B, Jr., Barretto N, Martin DN, et al. Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor [J]. *Nat Med*, 2012, 18(2):281–285.
- [40] Reiser M, Hinrichsen H, Benhamou Y, et al. Antiviral efficacy of NS3-serine protease inhibitor BILN-2061 in patients with chronic genotype 2 and 3 hepatitis C [J]. *Hepatology*, 2005, 41(4):832–835.
- [41] Ohara E, Hiraga N, Imamura M, et al. Elimination of hepatitis C virus by short term NS3-4A and NS5B inhibitor combination therapy in human hepatocyte chimeric mice [J]. *J Hepatol*, 2011, 54(5):872–878.
- [42] Shi N, Hiraga N, Imamura M, et al. Combination therapies with NS5A, NS3 and NS5B inhibitors on different genotypes of hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice [J]. *Gut*, 2013, 62(7):1055–1061.
- [43] Heo J, Factor VM, Uren T, et al. Hepatic precursors derived from murine embryonic stem cells contribute to regeneration of injured liver [J]. *Hepatology*, 2006, 44(6):1478–1486.
- [44] 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.
- [45] Azuma H, Paulk N, Ranade A, et al. Robust expansion of human hepatocytes in *Fah<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>/Il2rg<sup>-/-</sup>* mice [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(8):903–910.
- [46] Washburn ML, Bility MT, Zhang L, et al. A humanized mouse model to study hepatitis C virus infection, immune response, and liver disease [J]. *Gastroenterology*, 2011, 140(4):1334–1344.

- [47] Pajvani UB, Trujillo ME, Combs TP, et al. Fat apoptosis through targeted activation of caspase 8: a new mouse model of inducible and reversible lipodystrophy [J]. *Nat Med*, 2005, 11(7): 797–803.
- [48] Arichi T, Saito T, Major ME, et al. Prophylactic DNA vaccine for hepatitis C virus (HCV) infection: HCV-specific cytotoxic T lymphocyte induction and protection from HCV-recombinant vaccinia infection in an HLA-A2.1 transgenic mouse model [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(1):297–302.
- [49] Safran M, Kim WY, Kung AL, et al. Mouse reporter strain for noninvasive bioluminescent imaging of cells that have undergone Cre-mediated recombination [J]. *Mol Imaging*, 2003, 2(4): 297–302.
- [50] Hikosaka K, Noritake H, Kimura W, et al. Expression of human factors CD81, claudin-1, scavenger receptor, and occludin in mouse hepatocytes does not confer susceptibility to HCV entry [J]. *Biomed Res*, 2011, 32(2):143–150.
- [51] Ouyang EC, Wu CH, Walton C, et al. Transplantation of human hepatocytes into tolerized genetically immunocompetent rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2001, 7(3):324–330.
- [52] Wu GY, Konishi M, Walton CM, et al. A novel immunocompetent rat model of HCV infection and hepatitis [J]. *Gastroenterology*, 2005, 128(5):1416–1423.
- [53] 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 Pathol*, 2010, 6:e1000978.
- [54] Schoggins JW, Rice CM. Innate immune responses to hepatitis C virus [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2013, 369:219–242.
- [55] Dion S, Bourguin 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.
- [56] Legrand N, Ploss A, Balling R, et al. Humanized mice for modeling human infectious disease: challenges, progress, and outlook [J]. *Cell Host Microbe*, 2009, 6(1):5–9.
- [57] Willinger T, Rongvaux A, Strowig T, et al. Improving human hemato-lymphoid-system mice by cytokine knock-in gene replacement [J]. *Trends Immunol*, 2011, 32(7):321–327.
- [58] Legrand N, Huntington ND, Nagasawa M, et al. Functional CD47/signal regulatory protein alpha (SIRP(alpha)) interaction is required for optimal human T- and natural killer- (NK) cell homeostasis in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(32):13224–13229.
- [59] Strowig T, Rongvaux A, Rathinam C, et al. Transgenic expression of human signal regulatory protein alpha in *Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup>* mice improves engraftment of human hematopoietic cells in humanized mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(32): 13218–13223.
- [60] Yamauchi T, Takenaka K, Urata S, et al. Polymorphic Sirpa is the genetic determinant for NOD-based mouse lines to achieve efficient human cell engraftment [J]. *Blood*, 2013, 121(8):1316–1325.
- [61] Tsuge M, Fujimoto Y, Hiraga N, et al. Hepatitis C virus infection suppresses the interferon response in the liver of the human hepatocyte chimeric mouse [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(8): e23856.
- [62] Frentzen A, Hugging K, Bitzegeio J, et al. Completion of hepatitis C virus replication cycle in heterokaryons excludes dominant restrictions in human non-liver and mouse liver cell lines [J]. *PLOS Pathog*, 2011, 7(4): e1002029.
- [63] Aly HH, Oshiumi H, Shime H, et al. Development of mouse hepatocyte lines permissive for hepatitis C virus (HCV) [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(6):e21284.
- [64] Zhao Y, Qin W, Zhang JP, et al. HCV IRES-mediated core expression in zebrafish [J]. *PLOS ONE*, 2013, 8(3):e56985.

[收稿日期] 2014-06-03