

· 综述 ·

HBV 转基因小鼠在乙型肝炎防治方面的研究

党双锁 宋平

慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染是一个严重的全球性公共卫生问题。HBV 的感染具有严格的种属特异性,在自然状态下只感染人和高等灵长类动物,有关的动物实验一直是 HBV 研究的瓶颈。乙型肝炎病毒(HBV)转基因动物模型已广泛地应用于乙型肝炎的研究。利用 HBV 转基因鼠在抗乙型肝炎病毒、免疫调节及发病机制等方面进行研究,取得了可喜的成绩。本文就近年来 HBV 转基因小鼠的研究进展作一综述。

一、HBV 转基因动物研究概况

转基因技术是20世纪80年代初发展起来的一项新型的生物技术,通过近30年的不断发展与完善,至今已研制出百余种人类疾病转基因动物模型,并广泛用于生物学各领域,尤其在传染病、遗传病和肿瘤等方面。

长期以来对病毒性乙型肝炎的研究由于没有近似于感染人体的动物模型而受到限制,1985年Chisari等^[1]采用显微注射法最早建立了能表达HBsAg的转基因小鼠模型,随后又相继发展出有病毒复制的HBV转基因动物模型,随后,国内外学者依据病毒学、分子生物学及免疫学等相关学科的成就进行HBV模型的探索,取得了一些成绩。Cooper等^[2]发现鸭只能感染相应的鸭乙型肝炎病毒(duck hepatitis B virus, DHBV),但DHBV属禽类嗜肝病毒,与人HBV在结构上有较大差别(如DHBV无X基因),并且鸭在生物进化上与人类相差较远,因此DHBV在鸭体内的感染、复制过程与HBV在人体内感染、复制可能有较多不同。已知慢性DHBV感染的鸭肝脏病变较轻微,极少能诱发出肝细胞癌,此与人HBV慢性感染所致的结果亦有不同。Wang等^[3]发现土拨鼠肝炎病毒(woodchuck hepatitis virus, WHV)和人HBV在分类、结构和生物学功能等方面不完全相同(如:有认为啮齿类嗜肝病毒WHV的致肝癌性大于原嗜肝病毒HBV),且WHV的宿主土拨鼠属啮齿目动物,故在研究HBV感染机制及复制过程中受到一定限制。树鼯是一种形似松鼠的小型哺乳物,在种系发生上与灵长类接近,较啮齿类动物更接近于人类。树鼯可经野外捕获后喂养或人工繁育生长,因其价廉易获、个体小易操作等优势,在医学研究中的应用日趋广泛。已证实树鼯可被多种与人类疾病有关的病毒感染,包括单纯疱疹病毒、轮状病毒、甲型、丙型、丁型肝炎病毒等。成年树鼯感染HBV多为急性自限性感染,HBV在多数感染动物体内的持续时间较短,并且多数感染动物出现的肝脏病理变化较轻微^[3],难以形成慢性肝炎或慢性

基金项目:国家自然科学基金(30472266)

作者单位:710004 西安市,西安交通大学医学院第二附属医院感染科

通讯作者:党双锁 Email:dang212@126.com

HBV 携带状态,接种 HBV 后的感染率亦不够稳定,因此树鼯感染 HBV 的模型有待进一步完善。虽然黑猩猩是最早发现能够感染人 HBV 的动物品系,其感染 HBV 后的血清学和肝脏病理组织学改变与人较接近,但它属珍贵动物,数量有限,来源困难,受伦理及费用等方面的限制而难以广泛应用。

现在国内已有几家实验室相继成功建立了 HBV 转基因小鼠模型,这些小鼠可将 HBV 基因组传给下一代,并在下一代肝、肾组织中检出 HBV 的 3.5 kb、2.1 kb、0.8 kb 的 mRNA,并有 HBsAg、HBeAg 表达,电镜观察肝组织可见到 Dane 样颗粒,外周血可检出 HBV DNA。目前已建立若干组 HBV 转基因动物模型,所转移基因可以是 HBV 全基因或其部分片段,也可以是 HBV 与其它基因启动子如鼠金属硫蛋白、SV 40 拼成融合基因,以使其获得更强烈的表达。迄今为止,HBV 转基因小鼠可根据其所选用目的基因的不同,大体可以分 3 种类型:(1)HBV 部分片段的转基因小鼠模型:将所选用的 HBV 各基因片段连接在 HBV 调节序列或外源性启动子(如小鼠金属硫蛋白、白蛋白、MUP 和人 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶($\alpha 1$,AT)等下游,显微注射后所建立的转基因小鼠,其可表达一种或几种相关抗原成分如 HBsAg、大包膜蛋白、X 蛋白、HBcAg,但这种小鼠体内无 HBV DNA 复制;(2)HBV 全长序列转基因小鼠模型:1988 年 Farza 等^[5]应用 HBV 全长序列,首次成功建立了复制型 HBV 转基因小鼠,但病毒复制水平低,应用受到限制;(3)HBV 超长序列的转基因小鼠模型:1995 年 Guidotti 等^[6]在 HBV 全长序列 5'-末端重复一个 C 和 X 基因及其增强子,形成长 4096 bp 的 HBV 超长序列(113 基因组当量),通过受精卵显微注射法获得了 3 个品系的高水平基因表达和复制的转基因小鼠,并对其两个品系进行了深入研究。

HBV 转基因小鼠模型同黑猩猩、鸭等乙型肝炎动物模型相比至少有以下优势:(1)能在个体水平,从时间和空间角度同时观察 HBV 单个核多个基因区的整合与表达功能及致病作用;(2)小鼠饲养容易,成本低,繁殖周期短;(3)遗传背景清楚;(4)高水平复制型 HBV 转基因小鼠与人 HBV 慢性感染相似,为筛选抗 HBV 药物展示了广阔空间。

二、HBV 转基因小鼠用于 HBV 治疗药物的研究

慢性乙型肝炎的治疗抗病毒是关键,寻求安全有效的抗 HBV 药物一直是所有医疗工作者的难题,Kajino 等^[7]早在 1997 年就开始利用 HBV 转基因小鼠研究药物抗乙型肝炎病毒的效果,在 1999 年,John 等^[8]通过观察拉米夫定组在用药 21 d 后对转基因小鼠 HBV 复制的影响,发现拉米夫定具有快速强力抑制 HBV 的效果,但停药 7 d 后就出现反跳,说明该药不能清除 HBV,与临床用药结果相似。Wen 等^[9]应用 HBV 转基因小鼠作为实验模型验证了 RNAi 能在动物水平抑制 HBV 的蛋白质表达和病毒复制,HBV 转基因小鼠能够持续表达病毒蛋白和复制病毒 DNA,与 HBsAg 慢性携带者的情形相似,pU6-sHi BV5 质粒注射后血清 HBsAg 和肝细胞内 HBcAg 表达减少,小鼠血清 HBsAg 降低 50% 左右,与对照组相比有显著差异,蛋白抑制至少持续 14 d。Davis 等^[10]研究表明,单剂量 DNA 疫苗免

疫导致 HBV 转基因小鼠 HBsAg 的清除及 HBV mRNA 的控制,且在肝脏未检测到细胞病变。Li 等^[11]用 HBV DNA 疫苗及 HBsAg 重组蛋白疫苗免疫小鼠及其同源 HBV 转基因小鼠,结果正常小鼠体内诱导出较强的细胞及体液免疫反应,但在 HBV 转基因小鼠未诱导出免疫反应,未见抗原滴度下降,未出现抗-HBsAg 抗体,无 CTL 反应及肝脏损坏的迹象。

国内学者刘光泽等^[12]近期研究发现用拉米夫定 3 周后转基因小鼠 HBV 复制显著抑制,停药 1 周出现反跳,也与 John 等^[8]等结果相似,研究还发现 IFN α -1b 可抑制 HBV 转基因小鼠乙型肝炎病毒复制,重组人干扰素 IFN α -1b 能抑制 HBV 转基因小鼠体内 HBV DNA 的复制,有效降低其血清 HBV DNA 水平,但由于其可作为异源抗原可刺激小鼠机体产生相应抗体,所以影响其长期应用疗效。这也反证了本实验 HBV 转基因小鼠模型对抗乙型肝炎病毒药物评价的可靠性。

然而,抗病毒药物仅能杀伤血液、体液内的乙型肝炎病毒,对在肝细胞内发生 HBV DNA 整合的病毒无能为力,从而造成抗病毒药作用有限,这也是慢性乙型肝炎迁延难愈的原因之一;另一个原因就是 HBV 感染所形成的免疫功能不全,体内高滴度病毒含量及对感染细胞的免疫耐受状态。因此,打破 HBV 感染后的免疫耐受状态将是治疗乙型肝炎的关键所在,HBV 转基因鼠为此研究也同样提供较好的实验模型^[13]。

三、HBV 转基因小鼠用于免疫学的研究

乙型肝炎发病机制十分复杂,影响因素很多,目前存在多种学说。但从免疫学角度分析,在由 HBV 感染引发的重型肝炎中,乙型肝炎病毒的直接致病作用是有限的,肝细胞感染后 HBV 抗原表达所致免疫应答才是肝脏疾病的主要病因。

1. 免疫耐受机制:通常认为胸腺在胎儿期及新生儿期清除自身抗原反应性 T 细胞即胸腺的阴性选择是导致免疫耐受的主要原因,但目前的研究表明周围耐受在转基因小鼠免疫耐受的建立及维持中起着重要的作用。免疫发病机制中的主角首推特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL),在用 HBV 全基因组建立的转基因小鼠的血清中虽可查到 HBV 基因产物但并无明显细胞病变存在,然而在这类小鼠被动注入 CD8⁺、MHC I 限制性 HBsAg 抗原特异性的 CTL 后,可发生类似急性病毒性肝炎。发病严重程度与 CTL 的输注途径、CTL 识别抗原后 α 干扰素(IFN- α)的产生、HBsAg(+)肝细胞数量、每个肝细胞内 HBsAg 的量等有关,并且大部分肝损伤是由 CTL 激发的炎症细胞以及它们释放的细胞因子所引起,而不是 CTL 本身。Okx 等^[15]的研究表明,DNA 疫苗能诱导 HBV 转基因鼠产生抗体,但 5 种种系的转基因小鼠中 3 个种系不能诱导抗原特异性 CTL 反应,而活化树突状细胞(dendritic cells, DC)在这 3 种种系的 HBV 转基因鼠中诱导出正常数量的 HBsAg 特异性 CTL 前体,表明这些小鼠的 HBsAg 特异性 CTL 前体逃过了胸腺的阴性选择,只是出现无反应性,同时还表明经细胞因子体外活化的 HBV 转基因小鼠来源及非转基因鼠来源的 DC 所表达的表面标志的水平相当,说明 HBV 转基因鼠的 DC 具有正常处理及提呈 HBsAg 的能力,只是在 HBV 转

基因鼠中表现为功能性静息状态。由于持续与非专职抗原提呈细胞提呈的 HBsAg 接触,使 HBsAg 特异性 T 细胞受体(TCR)表达量及活性下调,也是难以激活转基因鼠 CTL 的原因之一。另外,肝细胞提呈抗原时,由于缺乏协同刺激信号,不能活化 CTL 反应,肝细胞表达低水平 MHC I 分子,逃避 CTL 攻击及 HBV 诱导 FasL 表达并下调 Fas 表达,从而致 CTL 的清除或免遭 CTL 介导的细胞破坏等也被认为与 HBV 转基因小鼠的免疫耐受有关。

2. 免疫治疗:DC 的活化在打破转基因鼠免疫耐受中起着重要作用,DC 专职抗原提呈细胞,分布于全身,在抗原提呈过程中起重要作用。Furukawa 等^[15]的研究表明 DC 的活性与免疫治疗的预后有关。研究者在对 43 只转基因小鼠的试验研究表明,虽然治疗前 43 只小鼠的 HBsAg、HBeAg 滴度相近,其中 23 只小鼠由于在疫苗开始治疗时具有强大的 DC 功能,治疗后 HBsAg、HBeAg 均转阴 HBV DNA 均下降,有的小鼠由于在疫苗开始治疗时 DC 功能较差,而成为完全不应答者,并非是治疗前 HBsAg、HBeAg 及 HBV DNA 的滴度或免疫前淋巴细胞的功能影响了疫苗的治疗效果,而是 DC 的活性程度影响了疫苗治疗的预后,并认为免疫治疗前上调 DC 功能将对治疗有意义。研究表明对疫苗无应答者的 HBsAg 特异性淋巴细胞增殖水平及 DC 诱导的 T 细胞增殖能力及抗体水平均较应答者低,而疫苗注射后导致应答者的 DC 细胞表面 MHC II 及 CD86 水平上调及 IL-2 及 TNF- α 产生增多,表明疫苗注射后 DC 活性是 HBV 慢性携带者治疗的关键。由于持续与非专职抗原提呈细胞提呈的 HBsAg 接触,使 HBsAg 特异性 TCR 表达量及活性下调,因此,活化转基因鼠的 CTL 需具有比活化正常鼠 CTL 更有效的协同刺激,DC 协同刺激分子的上调可能是关键。T 细胞的协同刺激信号能降低 T 细胞的活化阈值,减少 T 细胞的活化时间,表明 DC 表达高水平的协同刺激分子并分泌炎症因子,能活化不应答的 T 细胞,表明抗原递呈细胞(antigen-presenting cell, APC)特别是 DC 在增强免疫反应中及打破转基因鼠免疫耐受中起着关键作用^[16]。

Sugiyama 等^[17]的研究表明 HBV 转基因小鼠注入重组 HBsAg 蛋白后,除非该蛋白是含有异源表位的融合蛋白否则不能打破免疫耐受状态。以 4-氯-3,5-二甲苯酚免疫 HBV 转基因小鼠,2 周后能测出抗体,于 8~12 周其抗体水平达普通小鼠体内能达到的高度,所诱导的抗体类型与普通小鼠相同,免疫应答以 Th1 为主,伴有微弱的 Th2 反应。可以认为其原因可能是 HBV 肽段由非专职 APCs 如肝细胞提呈,缺乏共刺激分子,诱导无应答。而质粒表达的抗原肽不同于包封蛋白,存在于注射位点的骨髓来源的专职 APCs 可能更有效的提呈被转染细胞所表达的抗原,从而打破免疫耐受。Akabar 等^[18]证实注射 HBsAg 及 CFA 可以上调 APC 的功能,引起 HBsAg 特异性淋巴细胞的产生,同时抑制 HBV 基因表达。纯化的 HBsAg 及 CFA 免疫转基因小鼠后,会导致 T 细胞依赖性的抗-HBs 产生,且可以清除血中的 HBsAg,从而打破 B 细胞的免疫耐受。

由上述结果可以发现不管何种途径如可以上调转基因小鼠体内免疫系统功能即可有良好的抗病毒治疗效果,CFA、重组 HBsAg、DNA 疫苗等均可以激活小

鼠体内的免疫系统,打破免疫耐受达到增强抗病毒治疗效果的作用。

四、问题与展望

尽管 HBV 转基因小鼠模型在 HBV 感染动物模型方面前进了一大步,且具有模型制作方便、易于繁殖使用等优点而被广泛应用。但仍存在如下问题:(1)转基因小鼠处于免疫耐受状态,通常不易发生肝炎;(2)HBV 复制水平较低,且可出现外源基因遗传和表达的不稳定性;(3)转基因效率低且费用相对较大,推广应用较困难;(4)尽管 HBV 转基因小鼠肝内可有 HBV 复制,病毒蛋白的表达并可分泌入血,但 HBV 的生活周期是不完整的,如今也未检测到 cccDNA,释放入血的病毒体不能再感染鼠肝细胞,也不涉及 HBV 与肝细胞的结合和入胞过程。随着 HBV 感染种属特异性研究的深入,制备能够模拟人 HBV 自然感染过程的乙型肝炎易感小鼠将成为乙型肝炎动物模型的又一研究方向。随着转基因技术的不断完善,HBV 相关研究用转基因小鼠品系的不断增多,将来很有希望制备出能完全模拟人类 HBV 感染的转基因小鼠模型。由此,我们有理由对利用 HBV 转基因鼠来彻底阐明 HBV 发病机制和治疗寄予厚望。

参 考 文 献

- 1 Chisari FV, Pinkert CA, Milich DR, et al. A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state. *Science*, 1985, 230:1157-1160.
- 2 Cooper A, Paran N, Shaul Y. The earliest steps in hepatitis B virus infection. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1614:89-96.
- 3 Wang Y, Menne S, Baldwin BH, et al. Kinetics of viremia and acute liver injury in relation to outcome of neonatal woodchuck hepatitis virus infection. *J Med Virol*, 2004, 72:406-415.
- 4 李璦, 严瑞琪. 乙肝黄曲霉毒素 B1 诱发树鼯肝癌的病理变化. *临床与实验病理学杂志*, 2000, 16:224-227.
- 5 Farza H, Hachouel M, Scotto J, et al. Replication and gene expression of hepatitis B virus in a transgenic mouse that contains the complete viral genome. *J Virol*, 1988, 62:4144-4152.
- 6 Guidotti LG, Matzke B, Schaller H. High level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol*, 1995, 69:6158-6691.
- 7 Kajino K, Kamiya N, Yuasa S, et al. Evaluation of anti-hepatitis B virus (HBV) drugs using the HBV transgenic mouse: application of the semiquantitative polymerase chain reaction (PCR) for serum HBV DNA to monitor the drug efficacy. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 241:43-48.
- 8 Morrey JD, Bailey KW, Korba BE, et al. Utilization of transgenic mice replicating high levels of hepatitis B virus for antiviral evaluation of lamivudine. *Antiviral Res*, 1999, 42:97-108.
- 9 Wen WH, Liu JY, Qin WJ, et al. Targeted inhibition of HBV gene expression by single-chain antibody mediated small interfering RNA delivery. *Hepatology*, 2007, 46:84-94.
- 10 Davis HL, McCluskie MJ, Gerin JL, et al. DNA vaccine for hepatitis B: evidence for immunogenicity in chimpanzees and comparison with other vaccines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93:7213-7218.
- 11 Li X, Yang X, Jiang Y, et al. A novel HBV DNA vaccine based on T cell epitopes and its potential therapeutic effect in HBV transgenic mice. *Int Immunol*, 2005, 17:1293-1302.
- 12 刘光泽, 孔祥平, 任向荣, 等. 高复制 HBV 转基因小鼠模型对抗乙型肝炎病毒药物的效应研究. *中国病理生理杂志*, 2007, 23:99-102.
- 13 Ando K, Moriyama T, Gudo G, et al. Mechanisms of class restricted immunopathology: a transgenic mouse model of fulminant hepatitis. *J Exp Med*, 1993, 178:1541-1553.
- 14 Okx Y, Akbar SM, Horiiko N, et al. Mechanism and therapeutic potential of DNA-based immunization against the envelope proteins of hepatitis B virus in normal and transgenic mice. *Immunology*, 2001, 103:90-97.
- 15 Furukawa S, Akbar SM, Hasebe A, et al. Production of hepatitis B surface antigen-pulsed dendritic cells from immunosuppressed murine hepatitis B virus carrier: evaluation of immunogenicity of antigen-pulsed dendritic cells in vivo. *Immunobiology*, 2004,

209:551-557.

- 16 Li X, Yang X, Jiang Y, et al. A novel HBV DNA vaccine based on T cell epitopes and its potential therapeutic effect in HBV transgenic mice. *Int Immunol*, 2005, 17: 1293-1302.
- 17 Sugiyama M, Tanaka Y, Kato T, et al. Influence of hepatitis B virus genotypes on the intra- and extracellular expression of viral DNA and antigens. *Hepatology*, 2006, 44: 915-924.
- 18 Akabar SM, Kajino K, Tanimoto K, et al. Production of antibody to hepatitis B surface antigen (anti-HBs) by murine hepatitis B virus carriers: neonatal tolerance versus antigen presentation by dendritic cells. *Immunology*, 1997, 92: 494-500.

(收稿日期:2007-12-17)

(本文编辑:王丹静)

党双锁,宋平. HBV 转基因小鼠在乙型肝炎防治方面的研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2008, 2(1): 99-104.