

· 综述 ·

乙型肝炎病毒感染模型研究进展

冯广义 张养生

乙型肝炎病毒(HBV)是严重危害人类健康的致病因素之一。全世界约有20亿人曾感染HBV,其中3.5亿为慢性携带者,每年约有100万人死于HBV感染所致的肝衰竭、肝硬化和原发性肝细胞癌。HBV宿主范围狭窄,且有明显的嗜肝性,因而建立合适的HBV感染细胞和动物模型非常困难。目前缺乏合适的感染模型是限制HBV药物发展的主要障碍之一。随着现代科学技术的发展,尤其是分子生物学和基因工程的出现,有关HBV的细胞和动物模型相继建立。病毒性肝炎抗病毒药物的开发和评价中的重要环节之一就是建立一种方便有效的且与人类近似的感染模型。本文从细胞和动物两方面就乙型肝炎感染模型的研究进展作一简要综述。

一、细胞模型

HBV属嗜肝DNA病毒科,基因组长约3.2 kb,为部分不完全闭合双链环状DNA。HBV在其复制过程中存在着转录与逆转录过程。这一特点决定了HBV感染有高度的种属和组织特异性,它只感染人和类人猿。其原因是病毒黏附以及病毒DNA转录及复制对细胞有严格的要求。体外培养的人和类人猿原代肝细胞可以支持HBV的复制,但细胞生存时间不长。为了建立合适的模型,前人做了大量的工作,研究复制了各种各样的细胞模型。

1. 成人肝细胞模型:成人肝细胞分离后接种于胶原凝胶上,24小时内形成柱结构,可维持培养4~6周,用含HBV感染颗粒的患者血清(1:20或1:200稀释)接种刚分离铺板的成人肝细胞,通过放射免疫法(RIA)检测发现,感染6天后培养上清内出现高水平HBsAg,低水平HBeAg,12天达高峰,14天开始下降。采用Southern印迹和内源性聚合酶检测发现感染细胞胞浆内存在单链HBV DNA,表明有病毒复制。采用免疫沉淀法在感染12天时可在培养血清内检出含HBV DNA及病毒聚合酶的颗粒。另一方面,前-S1抗原特异性抗血清能够阻断感染。结果表明HBV可感染原代培养的成人肝细胞^[1]。HBV感染成人肝细胞的细胞模型特点是具有与HBV自然感染相似的过程,但是成人肝细胞不能传代培养,时间有限。另一方面,肝细胞铺板后,成熟肝细胞的功能如白蛋白的产生迅速下降并丧失其典型的多角形态,肝细胞也逐渐失去对病毒的敏感性,是其应用的主要障碍。

2. HepG2细胞模型:用慢性HBV携带者血清中获得的HBV颗粒作为接种物感染HepG2细胞,结果发现感染细胞能够从头合成HBV包膜及核心蛋白,并分

作者单位:712046 咸阳市,陕西中医学院

通信作者:冯广义,Email: fengguangyi2007@163.com

泌至培养上清,细胞内发现 ccc DNA 及主要的 HBV 转录物,感染细胞能够释放完整地含 DNA 及 DNA 聚合酶的病毒颗粒,该细胞称为 HepG2-HBV 细胞株,能够传代培养维持达一年。这个细胞模型特点在于:与 HBV 转染 HepG2 细胞模型比较,它可研究病毒的透过和脱衣壳过程;与 HBV 感染原代肝细胞模型比较,它能够较长时间的产生细胞外完整病毒颗粒^[2]。研究还表明影响 HBV 体外感染 HepG2 细胞的因素包括高表达前-S1 决定簇相关的 HBV 病毒体形态完整,有利于病毒吸附与透过;培养介质中加入激素调节因子维持人肝细胞代谢状态与病毒活性之间的平衡;HepG2 细胞克隆之间对 HBV 感染的敏感性存在变异^[2]。也有报道指出肝癌细胞系对 HBV 感染不敏感,不能用于检测病毒生活周期的各个阶段^[1]。有关 HBV 感染 HepG2 细胞的细胞模型存在争议。

3. 肝源性肿瘤细胞株 2.2.15 细胞模型:肝源性肿瘤细胞株 2.2.15 是应用最广泛的乙型肝炎病毒复制细胞模型。将含有 HBV 基因组(2 个 HBV 头对尾二聚体,以尾对尾方向串联)的重组载体质粒转染 HepG2 细胞,经新霉素类似物(G418)筛选,得到的克隆能稳定分泌 HBsAg、HBeAg 及 Dane 颗粒,可检测到细胞内 DNA 和 RNA,但无 ccc DNA。2.2.15 细胞模型存在的问题是:HBV 是整合在宿主细胞染色体上,复制方式与自然感染不同,且不能被清除;病毒复制的水平不能人为改变;病毒复制水平低。为克服 HBV 的细胞膜屏障,人们借用其他病毒的感染能力,把 HBV 导入到靶细胞。Delaney 等^[3]报道了一种抗 HBV 药物体外筛选系统,即 HBV-杆状病毒-HepG2 系统。利用杆状病毒 Autographa California 将具有复制能力的 HBV 基因组导入到 HepG2 细胞,检测到高水平的 HBV 表达,包括细胞内和细胞外 HBV DNA 和 RNA,以及 ccc DNA 和各种 HBV 抗原。病毒表达的水平 and 病毒的感染量(MOI)有量效关系。该系统可以控制感染的时间,在病毒复制期间或之前对细胞进行处理。用该系统对拉米夫定的药效进行评价,发现拉米夫定可以减少细胞内复制中间体和细胞外 HBV DNA,而且可以抑制 ccc DNA 的表达,这在以前的系统中是不能观察到的。拉米夫定的作用有剂量和时间依赖性。他们还用此模型检测了药物对 HBV 变异株的作用。但是,杆状病毒系统也有缺陷:(1)杆状病毒进入哺乳动物细胞是通过非特异的内涵体摄取而不是受体介导方式;(2)杆状病毒感染的每个细胞内有多个 HBV 拷贝;(3)杆状病毒介导的基因转移限制在一定的种属,更重要的是不能作为动物体内实验的方法。Sprinz 等^[4]利用 AdHBV1.3,将 293 细胞包装好的病毒感染数种原代肝细胞和 HepG2 细胞,获得成功。分别用 Ad-HBV1.3 感染人原代肝细胞,小鼠肝细胞,大鼠肝细胞,树鼯肝细胞,以及鸭肝细胞和 HepG2 细胞,应用 Southern 杂交检测出细胞内 HBV DNA,HBV ccc DNA,用 Northern 杂交检测到 3.5 kb、2.4 kb 和 2.1 kb 的 HBV RNA。用 Western blot 检测到 HBV 各种抗原。应用斑点杂交方法检测到培养基或血清中的 HBV 颗粒。该系统使 HBV 可以感染跨种的多种细胞,包括小鼠,大鼠,树鼯肝细胞,甚至包括禽类的鸭肝细胞。以 DHBV 代替 HBV 也能得到相似的结果。和 2.2.15 系统相比,它具有高效转移、表达 HBV,可对 HBV 突变和

表达进行人为控制等优点;和杆状病毒系统相比,它不存在种属障碍,可以用作体内实验,而且表达水平更高。

4. 其他细胞模型:PLC/PRF/5 细胞株是由血清 HBsAg 阳性的原发性肝细胞癌组织体外培养数月后建立的含整合的 HBV 基因组及 HBsAg 特异性转录物,产生 HBsAg,不产生 HBcAg、HBeAg 及游离病毒。有报道 PLC/PRF/5 变异克隆中 HBsAg 表达明显升高,还可检出 HBcAg^[5],提示细胞表达病毒基因的能力与分化程度有关。PLC/PRF/5 细胞已用于反义核酸药物抗 HBV 的研究。

二、动物模型

类人猿和黑猩猩作为 HBV 感染模型已得到公认,但价格昂贵,难以推广。因此有必要寻找合适的乙型肝炎小动物模型。

1. 土拨鼠乙型肝炎病毒模型:土拨鼠肝炎病毒(WHV)慢性感染的土拨鼠可以发展为严重的肝炎和肝肿瘤,和人感染 HBV 后的发病过程非常相似。给新生的土拨鼠接种 WHV,可获得慢性 WHV 感染土拨鼠模型。慢性 WHV 携带的土拨鼠平均寿命为 29 个月,最后几乎全部发展为肝肿瘤。土拨鼠还可作为抗病毒药物临床前评价的工具,研究药物的药效、药物动力学以及毒理,也可用作评价免疫治疗的疗效。用土拨鼠的局限是:它们感染的肝炎病毒为 WHV,和 HBV 有一定差异,使对乙型肝炎的发病机理和机体应答的研究受到限制。

2. 树鼩乙型肝炎病毒模型:研究发现树鼩可以感染 HBV,严瑞琪等^[6]发现 HBV 感染树鼩 HBsAg 血症者 47%,平均持续 7 周,HBV DNA 阳性率 51%,持续 41 周以上;肝细胞 HBV DNA 阳性率 67%,并存在复制型 HBV DNA。用感染 HBV 树鼩的血清可连续传代感染。但国外报道有所不同,将新生树鼩和成年树鼩腹腔接种 HBV 阳性患者的血清,都在血清中检测到 HBsAg,2~4 周后血清中检测到抗-HBs,抗-HBc,抗-HBe,而 HBsAg 消失,类似急性肝炎的病程。说明在树鼩感染 HBV 是一过性的,HBV 的复制和表达水平不高。

3. 鸭乙型肝炎病毒模型:鸭乙型肝炎病毒与人乙型肝炎病毒同属嗜肝病毒,两者的病毒大分子结构和复制过程有很多相似之处;鸭乙型肝炎病毒天然感染的鸭子已经作为乙型肝炎动物模型,目前被广泛应用。以感染有鸭乙型肝炎病毒阳性血清 0.2 ml 经腿胫静脉感染雏鸭,在感染后 7 天取血,分离血清,或经腹腔接种 0.1 ml DHBV DNA 阳性的血清。接种一周后,分别颈外静脉抽血,用地高辛标记的 DHBV DNA 探针经斑点杂交检测或用其他检测方法筛选出感染阳性鸭作为实验动物。以肝脏病理变化,肝功情况,血清病毒滴度等作为观察指标^[7]。国内外学者目前普遍采用 DHBV 感染 1~3 日龄雏鸭建立乙型肝炎动物模型,其病毒血症持续时间较长且较稳定,无明显的自然转阴现象,是研究人类乙型肝炎发病机制,病毒复制过程及筛选有效治疗药物的较理想动物模型。由于 DHBV 只感染鸭,而不能感染人,反之亦然。所以此模型仍不能很好的再现人的乙型肝炎感染过程,而且鸭肝炎病毒并不能诱发肝细胞性肝癌,故此模型存在一定缺陷,但由于此模型造价相对较低,故常用作抗乙型肝炎病毒的药物筛选。

4. 乙型肝炎病毒转基因小鼠:将乙型肝炎病毒基因转移到小鼠基因组中,造成人为感染并能代代相传,这类转基因小鼠解决了乙型肝炎研究缺乏动物模型的难题,是乙型肝炎新药开发,药物筛选及乙型肝炎治疗研究的理想动物模型。在1999年8月出版的《自然医学》期刊上,美国研究人员 Feitelson 及其同事发表文章报告,他们建立了第一个乙型肝炎转基因小鼠动物模型,他们将乙型肝炎的DNA引入成为严重综合性免疫缺陷的小鼠,并用正常的免疫系统移植到小鼠体内,使其终生自我产生HBV,但又可将HBV看作外来抗原,从而可以控制该小鼠产生各种慢性或急性肝炎。该动物模型具有很大的灵活性,它对研究乙型肝炎的发病机理及治疗药物的设计有广泛的应用价值。近年来HBV转基因小鼠受到重视。将HBV目的基因显微注射到小鼠的受精卵,产生稳定整合HBV的小鼠^[8]。在目的基因的选取上,可以是HBV全长或超过其基因组的1.3倍HBV,也可以是HBV片段,如前-S、S、C和X基因,用于研究各基因及其表达产物在HBV生活史中的作用。HBV转基因小鼠不仅可以研究HBV感染过程和感染后的免疫病理改变,还有助于发展新的抗病毒治疗方法。HBV转基因小鼠实验发现在慢性HBV携带者由于一种抗原提呈细胞(树突状细胞)的功能缺陷和缺乏一些必要的细胞因子,不能有效提呈HBsAg,不能清除病毒,导致持续感染。但是在所有的HBV转基因小鼠都不能检测到细胞内cccDNA,而cccDNA是前基因组及各种长度RNA的转录模板,在HBV的复制过程中起着非常重要的作用,而目前抗病毒治疗主要是在反转录和复制水平抑制病毒DNA,而且HBV是整合在宿主染色体上的,没有经过和靶细胞受体结合穿透的过程,与自然感染不同,应用也受到限制。

为克服转基因鼠的缺陷,人们寻求一种模拟HBV自然感染的动物模型。有人将UPA转基因小鼠和RAG-2基因剔除小鼠杂交,得到的后代被移植入人肝细胞。由于UPA是一种纤维蛋白酶原激活剂,它选择性地在肝细胞表达,使肝细胞中的蛋白质水解,造成UPA小鼠体内肝细胞持续损伤,产生肝再生刺激信号,有利于外源肝细胞的存活。而RAG-2基因剔除小鼠由于缺失重组活化基因RAG-2,T细胞和B细胞不能成熟,不具备完整的体液和细胞免疫功能,对外源肝细胞不排斥。二者杂交的后代兼有以上两种特征,可以支持HBV感染和表达。实验中采用脾内注射人肝细胞悬液,在小鼠血清和肝脏中均检测到HBV各种抗原和复制中间体。该模型可以用于HBV感染过程和治疗的研究,以及肝癌的发生机理,但因采用的是免疫缺陷鼠,不能作为机体和病毒相互作用特别是免疫清除机理的研究。另外,人肝细胞移植的效率很低,只占小鼠肝脏的15%,而采用同样的方法移植土拨鼠肝细胞,则可占小鼠肝脏的90%以上,可能和移植肝细胞的活力高低有关。

三、存在的问题与展望

前人多年的研究已经建立了一些HBV感染或转基因细胞和动物模型,并在发病机理及药物筛选评价中发挥了重要的作用。但仍存在许多问题,表现在:

(1) HBV 感染细胞和动物尚不太成功,主要是感染滴度低,持续时间短及稳定性差。(2)转基因细胞模型 2.2.15 细胞株表达不稳定,随着传代次数的增加主要抗原表达量逐渐降低。加之该细胞培养也较困难。转基因动物模型也存在上述问题。基于上述问题,未来研究应集中在两个方面:(1)提高 HBV 感染或转基因细胞和动物模型的感染和表达滴度;(2)提高稳定性。另外,我们应该懂得没有一种动物模型能完全复制人类疾病真实情况,动物毕竟不是人体的缩影,模型实验只是一种间接性研究,只可能在一个局部或几个方面与人类相似。因此,模型实验结论的正确性只是相对的,最终必须在人体身上得到验证。

参 考 文 献

- 1 Galle PR, Hagelstein J, Kommerell B, et al. In vitro experimental infection of primary human hepatocytes with hepatitis B virus. *Gastroenterology*, 1994, 106:664-673.
- 2 Behini R, Capel F, Dauguet C, et al. In vitro infection of human hepatoma (HepG2) cells with hepatitis B virus. *J Virol*, 1990, 64:3025-3032.
- 3 Delaney WE 4th, Isom HC. Hepatitis B virus replication in human hepG2 cells mediated by hepatitis B virus recombination baculovirus. *Hepatology*, 1998, 28:1134-1146.
- 4 Sprinzl MF, Oberwinkler H, Schaller H, et al. Transfer of hepatitis B virus genome by adenovirus vectors into cultured cells and mice. Crossing the species barrier *J Virol*, 2001, 75:5108-5118.
- 5 Tugizov SM, Savchenkova IP, Grabovskaya IL, et al. Changes in expression of surface and coreant igenshepat it is B virus in different mutantclones of hepatoma PLC2PRF25 cells. *Virus Res*, 1993, 30:189-203.
- 6 严瑞琪, 苏建家, 黄定瑞, 等. 人乙型肝炎病毒在树鼯的实验感染及其与肝癌发生的关系. *中山医科大学学报*, 1995, 16: 1-5.
- 7 胡平香, 廖奕华, 吴斌, 等. 鸭乙型肝炎病毒对鸭心肌细胞超微结构的影响. *中西医结合肝病杂志*, 2000, 10:28-30.
- 8 刘光泽, 张宜俊. HBV 转基因小鼠在乙型肝炎研究中的应用. *上海实验动物科学*, 1999, 19:124-125.

(收稿日期:2007-06-05)

(本文编辑:王丹静)

冯广义,张养生. 乙型肝炎病毒感染模型研究进展[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*, 2009, 3(3):329-333.