


[重要通知](#)
[更多 »](#)

论文推荐

当前位置: [论文推荐](#)

嗜肝DNA病毒感染的动物模型研究进展

被浏览了 次, 发表时间: 2009-06-22 02:18:17, 来自: 中华医学会感染病学分会

杨东亮

华中科技大学同济医学院同济医院

临床免疫研究室, 传染病学教研室

武汉, 430030

动物模型是人们了解病毒复制、病毒感染自然史、病毒持续感染和致病的分子机制, 研制有效抗病毒药物和疫苗的不可或缺的工具。嗜肝DNA病毒不仅包括HBV, 也包括其它哺乳动物的嗜肝病毒, 如土拨鼠肝炎病毒(WHV)、地松鼠肝炎病毒(GSHV)和长毛猴肝炎病毒(WMHV), 以及禽嗜肝病毒, 如鸭乙型肝炎病毒(DHBV)、灰苍鹭乙型肝炎病毒(HHBV)和雪鹅肝炎病毒(SGHV)。所有嗜肝DNA病毒家族成员的生物学特性有许多相似之处, 如病毒形态、复制过程和致病性等。但是, 由于(1)嗜肝DNA病毒的易感宿主范围较狭窄; 如HBV感染黑猩猩, 长臂猿和树驹, WHV感染土拨鼠, DHBV可感染鸭子, (2)不同动物的免疫遗传学特性存在差异; (3)动物的来源和价格差异较大等, 因此, 不同动物模型的应用范围也有所区别。尽管如此, 这些动物模型提供了进行组织培养和体内研究的实验体系, 使人们得以认识嗜肝DNA病毒的复制周期以及病毒持续存在和病毒清除的机制; 有利于进一步研究病毒生命周期中各种病毒基因的作用; 还可详尽地研究疾病自然史相关的各种问题, 包括病毒基因多态性, 病毒感染的免疫病理, 病毒肝外储存部位以及肝细胞肝癌(HCC)的发生机制等。近年来, 应用鸭和土拨鼠模型评价了抑制病毒反转录酶的核苷类似物在清除慢性感染中的作用, 研究发现长期用药虽然可有助于清除病毒, 但是耐药突变株的产生也随之增加。在自然感染模型和转基因小鼠模型中均证明, 抗病毒细胞免疫应答可能是清除慢性病毒感染的前提。因此, 这些动物模型可使我们获得更多HBV分子生物学相关的信息, 以及对慢性HBV感染的治疗新策略进行实验性评估。

学术活动

[法规指南](#)
[更多 »](#)

- 慢性乙型肝炎防治指南2010年更...
- 孕产期妇女甲型H1N1流感防治指...
- 关于孕产妇接种甲型H1N1流感疫...
- 甲流诊疗方案(第三版)
- 甲流监测方案(第二版)
- 2009AASLD指南
- 2009 EASL 指南
- 卫生部发布《手足口病预防控制指南...

[联系我们](#)
[更多 »](#)

· Email: infectcma@126.com

一、HBV感染研究的动物模型

各种嗜肝病毒在病毒基因组结构、基因组复制周期、病毒蛋白的序列、病毒颗粒的结构和在自然宿主体内自然感染的过程等方面都很相似。研究人类、啮齿类和禽类嗜肝病毒感染的主要动物模型分别是黑猩猩、土拨鼠和鸭子。

1. 灵长动物HBV感染

黑猩猩感染HBV感染的自然史与人相似，可导致无症状感染和伴有转氨酶水平升高的慢性肝炎。该模型可用于评价病毒传染的预防策略和研究疫苗逃避现象。应用HBV感染的黑猩猩模型，也证实了细胞毒性T细胞可能在病毒清除中发挥重要作用。该动物模型还可用于评估DNA疫苗的预防和治疗作用。

2. 树獭 (tupaia) HBV感染

近来体内和体外研究都证实树獭肝细胞对HBV易感。体外实验时树獭肝细胞对HBV易感，但在体内仅产生一过性感染。人们正努力建立慢性HBV感染的树獭模型，以便研究HBV感染的临床和分子生物学特征，包括病毒进入细胞和进行复制所必需的细胞因素以及评估新的抗病毒策略。

3. 转基因小鼠模型

HBV转基因小鼠在单个病毒基因功能、基因组的复制和病毒感染的免疫发病机理研究中都是一个非常有用的模型。近年来，人们在严重联合免疫缺陷 (SCID) 的动物身上建立了HBV转基因小鼠模型，该小鼠可支持病毒持续复制。在输入同系小鼠未经刺激的脾细胞后，肝脏和血清中的病毒可被清除，并出现慢性肝脏损伤。这个模型对揭示与HBV感染导致的慢性肝炎的发病机理相关的宿主和病毒因素也具有重要意义。而该模型也可用于评估治疗慢性HBV感染的新的免疫调节策略。能支持HBV基因组复制的转基因小鼠模型已被用于评估新的化合物的抗病毒活性。这种小型动物模型非常有吸引力，因为它可用于研究新的抗病毒药物对HBV复制的影响以及治疗的反应性。但该模型也有一定的局限性，包括转基因小鼠的肝细胞并不是真的感染HBV，并且其肝细胞内无cccDNA。

嵌合小鼠模型，将感染HBV的人肝组织移植到已接受致死剂量放射线照射的小鼠或大鼠体内，并输入SCID小鼠的骨髓细胞。在这个模型中，PCR可检测到病毒血症的存在并可持续2-3周。拉米夫定对病毒血症也起抑制作用。向裸鼠体内输注来自于肝癌细胞系的细胞而建立的小鼠模型已用于在体内评价新化合物的抗病毒活性。

总的来说，HBV感染的灵长目动物模型为研究病毒清除机制和新的免疫治疗策略的抗病毒效应提供了非常重要的工具，而转基因小鼠则在阐明抑制病毒复制中抗病毒细胞因子所发挥的作用起到了重要作用。然而，这个模型虽能研究人类HBV的复制，却不能用于研究肝内HBV的感染状况和病毒cccDNA的形成过程。

二、禽类嗜肝病毒的动物模型

1. DHBV感染模型

DHBV感染的鸭模型给我们提供了一个研究体内抗HBV药物的活性和毒性的合适的体系。鸭和土拨鼠原代肝细胞培养研究提示，病毒cccDNA的持续存在是维持病毒感染慢性化的原因，cccDNA它可抵抗长期的抗病毒治疗。在DHBV感染的雏鸭体内，短期使用有效的病毒DNA抑制剂可诱导病毒血症的一过性降低，但不能清除肝内的cccDNA，因而在治疗停止后病毒复制会有明显的反弹。然而，这个模型在评估核苷类似物在体内抗的病毒效果中被证明是有用的，因为它不需要大量的药物。应用禽类动物模型的研究显示，前C基因终止密码子突变的病毒株仍保持复制能力并具感染性。反义寡核苷酸已成功地应用于鸭模型，研究表明，无论在体外原代鸭肝细胞培养还是在慢性感染的动物体内都可显著地抑制病毒复制。鸭模型实验研究表明，病毒基因DNA疫苗能诱导针对嗜肝感染的保护性免疫应答。总之，HBV感染鸭模型是研究HBV基因突变、细胞表面病毒受体、病毒清除机制以及筛选新的抗病毒药物的合适的动物模型。

2. 苍鹭HHBV感染模型

HHBV的宿主范围很窄，它可以感染灰苍鹭，而不能感染鸭。但重组的携带DHBV前S区的HHBV可以感染鸭，提示前S区是决定宿主范围的关键因素。所有HHBV分离株在其C基因的上游，哺乳动物嗜肝病毒X基因的相应位置，都存在一个高度保守的ORF。有趣的是，与DHBV不同，仅在于小外膜蛋白S上发现了肉豆蔻化位点，而大外膜蛋白L上则没有发现。HHBV基因组的复制及其生物学特点都与禽嗜肝病毒的原形DHBV存在很大差异。

3. 雪鹅嗜肝病毒感染模型

一种DHBV类似病毒SGHBV可感染雪鹅 (*Anser caerulescens*)。序列分析和比较发现，SGHBV基因组存在一些不同于DHBV的特征，如在对应于哺乳动物嗜肝病毒X基因的位置上存在ORF。而鸭肝来源的肝细胞对SGHBV易感，提示SGHBV与DHBV的宿主范围近似。雪鹅可能成为研究嗜肝病毒的生命周期的新动物模型。

三、哺乳动物嗜肝病毒模型

1. 土拨鼠肝炎病毒 (WHV) 感染模型

土拨鼠感染WHV后易转为慢性感染，并且通常表现为慢性活动性肝炎，在感染后2年，约有50%的动物进展为HCC，而感染后4年则几乎100%进展为HCC。已被广泛应用于HCC发生分子机制的研究。与鸭模型相比，土拨鼠模型的药物代谢与人类更接近，WHV的基因组更接近于人类的HBV基因组，使得它成为研究HBV的更有吸引力的模型。

此外，土拨鼠模型也是研究病毒基因在其生命周期中具有何种生物学功能的很有用的体内模型。对土拨鼠WHV感染模型研究发现，病毒感染肝细胞的自发清除可能是肝脏细胞再生与原位表达的抗病毒因子发挥旁观者效应联合作用的效果。此外，在WHV感染的土拨鼠肝细胞培养系统中，长期使用各种核苷类似物如拉米夫定进行治疗的研究发现，病毒cccDNA的半衰期很长，细胞内cccDNA的下降在治疗36天后才开始出现，这种下降更可能是肝细胞死亡的结果，而并不意味着cccDNA的清除。这些结果在使用拉米夫定治疗的WHV感染的土拨鼠的体内实验中也得到证实。土拨鼠模型中获得的实验结果使我们对病毒清除的动态过程以及逆转录酶抑制剂治疗时耐药株的出现有了更进一步的认识。土拨鼠模型在证实WHV肝外复制位点、阐明肝癌的发病机制等方面也发挥了重要作用。

2. 地松鼠GSHV感染模型

地松鼠嗜肝病毒感染模型与土拨鼠模型相似。GSHV可在土拨鼠体内复制，而在被感染动物体内，GSHV的致癌性比WHV弱。这种较弱的致癌性可能是由于GSHV整合至c-myc基因家族的几率较低所致。

上述这些动物模型在嗜肝病毒感染的分子生物学、病毒宿主相互作用和慢性肝炎的免疫发病机制等方面提供了十分有用的信息，同时也使人们对嗜肝病毒感染的致癌机制有了进一步的认识。这些模型现已被广泛用于新的抗病毒制剂的临床前评价。然而，仍然需要寻找新的HBV感染动物模型，特别是适合我国实际应用的动物模型尤为重要。

四、我们在土拨鼠模型和中国旱獭模型方面的工作

早在20世纪80年代初期，我国学者曾对生活在我国西北及北方地区的与土拨鼠同种的旱獭进行了嗜肝病毒感染状况的血清学调查。由于当时缺乏WHV特异性检测方法，主要应用HBsAg筛查试剂进行调查。结果表明在部分地区的旱獭血清和肝脏内可检测到WHsAg或WHV DNA。提示我国旱獭中可能存在嗜肝DNA病毒的自然感染。鉴于我国是病毒性肝炎大国，急需建立实用、价廉的动物模型进行嗜肝DNA病毒感染发病机制和抗病毒药物筛选的研究，因此我们近年来对我国旱獭感染嗜肝病毒的状况、WHV人工实验感染旱獭模型以及与建立该模型相关的基础研究进行初步探索。

1. 中国旱獭嗜肝DNA病毒自然感染状况的研究

用斑点杂交 (Dot-Blot) 技术对旱獭血清进行初筛, 然后用免疫组织化学技术 (SP法) 对初筛阳性的部分旱獭肝组织进行复检, 最后用PCR方法从复检阳性的肝组织中扩增特异性的病毒基因组片段, 经克隆测序后进行同源分析。108份旱獭血清初筛阳性34份, 18份旱獭肝组织复检阳性12例, PCR扩增2例免疫组化阳性的旱獭肝组织, 2例均阳性, PCR产物已经克隆、鉴定并测序。101例旱獭肝组织中嗜肝病毒表面抗原检出率为82.2% (83/101)。阳性抗原颗粒定位于肝细胞胞浆和/或胞膜, 阳性细胞分布呈散在、簇状和片状。101份肝组织标本中14例出现肝炎的病理改变, 且与抗原检出之间存在明显的相关性。应用WHV特异性检测技术证实我国旱獭存在着类似土拨鼠肝炎病毒的嗜肝DNA病毒感染。

2. 中国旱獭WHV人工实验感染模型的建立

采用静脉注射的方法, 将含 $5 \times 10^6 \text{E}_q$ 的WHV接种中国旱獭, 隔周采血一次, 监测WHV血清学指标, 在病毒血症的高峰期取动物肝组织, 检测WHV DNA复制中间体和转录子, 并检测病毒抗原的表达。结果表明, 自人工感染旱獭后第4周开始, 在被感染动物血清中可以检测到WHsAg和WHV DNA, 第8-10周达到高峰, 第12周开始下降。WHcAb在第8周开始检出。病毒接种后第10周旱獭肝组织中可检测出WHV DNA复制中间体和转录子, 肝组织内可见WHsAg和WHcAg的表达。WHV可以在中国旱獭中传代感染, 病毒血症在部分动物中至少可以持续20周, 提示中国旱獭对WHV易感, 人工实验感染中国旱獭WHV后, WHV可以在旱獭体内大量复制, 病毒抗原在肝内大量表达, 部分中国旱獭可以形成慢性感染。

3. WHV与HBV核心抗原间保守性B细胞抗原表位的阐明

土拨鼠病毒核心抗原 (WHcAg) 是一种免疫原性较强的抗原并且参与形成病毒核衣壳和病毒样颗粒。阐明WHcAg的抗原表位对研究WHV慢性感染的免疫发病机制和探索有效的免疫调控治疗具有重要意义。然而, 迄今仍缺乏大量表达WHcAg的体外系统和研究WHcAg的抗体。为此, 我们构建了多种表达WHcAg的质粒, 并比较了删除C末端部分氨基酸序列对表达效率和形成病毒样颗粒的影响。发现保留WHcAg第1-144或者149位氨基酸的表达质粒既能够高效表达WHcAg又不影响病毒核心颗粒的装配。两种删除部分C末端的WHcAg在大肠杆菌中均形成大量的直径约34nm形态均一的颗粒并具有和全长基因WHcAg相同的抗原性。将此种WHcAg变性处理后, 仍保留与抗WHc的反应

性，提示在WHcAg上存在着线性抗原表位。我们应用杂交瘤技术研制了针对WHcAg的单克隆抗体并用于WHcAg抗原表位分析，结果表明5株单克隆抗体可以识别WHcAg N端1-8位氨基酸，而且这些序列在HBV和WHV间完全相同，ELISA和免疫组化实验也证实上述单克隆抗体也识别HBcAg，从而证明了HBcAg和WHcAg的N末端存在着保守的线性B细胞抗原表位。

4. 中国旱獭 α 干扰素基因家族的克隆与分析

根据已发表土拨鼠IFN- α 基因序列及其它物种IFN- α 基因序列保守区设计引物，从中国旱獭肝组织中提取基因组DNA作模板，直接扩增中国旱獭IFN- α 基因编码区全序列，获得约630bp的扩增产物，全部进行双向序列分析和比较。共获得112个阳性克隆，这些克隆来自于6次独立的PCR扩增产物，对所有序列进行比较分析得到12个相异的基因序列，并且每一序列都至少来自于4次相互独立的PCR扩增产物。根据这12个基因推导出的氨基酸序列，结合系统发生树分析命名12个不同的中国旱獭IFN- α 基因亚型，包括4个假基因型。即cwIFNA1a、cwIFNA1b、cwIFNA2、cwIFNA3、cwIFNA4、cwIFNA5、cwIFNA6、cwIFNA7及cwIFNP1、cwIFNP2、cwIFNP3、cwIFNP4。同源性分析表明，在核苷酸水平中国旱獭IFN- α 基因与土拨鼠IFN- α 基因同源性极高，平均大约90%，而与其它种属动物平均同源性在70%以下。中国旱獭IFN- α 基因家族的克隆和分析进一步阐明了旱獭的免疫遗传学特性，为在该动物模型中开展抗病毒治疗研究提供了新的可能性。

5. 土拨鼠白介素15的克隆、表达和生物活性鉴定

用IL-15的保守引物进行土拨鼠白介素15 (wIL-15) 克隆、测序并进行分析，构建wIL-15的原核表达质粒，在大肠杆菌中表达，分离纯化后用淋巴细胞增殖试验检测其生物学活性。结果发现，wIL-15的完整编码序列由489核苷酸组成，与其它哺乳动物IL-15编码序列的同源性高达78-87%，所编码的162氨基酸长度的前体蛋白与其它哺乳动物IL-15蛋白的同源性高达70-80%，其信号肽为N端的48氨基酸，成熟蛋白由114氨基酸组成。土拨鼠IL-15与灵长动物IL-15的同源性高于啮齿动物。带有His-tag的成熟蛋白，可以在大肠杆菌中表达，分离纯化后，可以刺激ConA活化的小鼠脾细胞和土拨鼠PBMC增殖（其SI值可高达10以上），并存在明显的剂量依赖性。该工作为进一步研究IL-15在嗜肝病毒感染中的作用以及评价IL-15治疗慢性HBV感染的效果奠定了基础。

6. 土拨鼠MHC-I基因的克隆与分析

分离和鉴定土拨鼠MHC-I类基因的研究表明， 1. 土拨鼠 MHC-I基因编码区长1080bp， 编码359个氨基酸， 分为引导区， $\alpha 1$ ， $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 及跨膜/胞浆区， $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 区为多态性区域， 其余区域则高度保守。 2. 土拨鼠MHC-I类基因与松鼠关系最为密切， 其次为人类。 3. 土拨鼠MHC-I类分子中， $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 区和抗原性多肽结合的氨基酸残基与其它种系哺乳动物和人类相比高度保守， 而CD8识别氨基酸残基则与人类HLA-A2有区别。 4. 对来自13只土拨鼠的110个MHC-I基因 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 区克隆的分析可将上述克隆归类为土拨鼠MHC-I类基因A座位的14种等位基因， 其中A1和A9的表型分布频率分别为46%和30%。 每只动物具有A座位的两种等位基因。 5. 土拨鼠肝脏内MHC-I抗原的表达与组织损伤程度有关， WHV感染组织MHC-I抗原表达增强， 但与WHV表面抗原的表达无直接组织学关系。 肝癌组织内MHC-I抗原缺如。 上述研究为筛选合适的土拨鼠进行特异性CTL功能分析提供了条件。

7. 应用RNA干扰技术抑制WHV基因表达的研究

利用分子克隆技术， 以WHV全长质粒为模板PCR扩增WHV X基因， 克隆到pXF3H载体构建WHV X蛋白真核表达质粒（pXF3H-WHx）； 合成siRNA和反义RNA的模板序列， 分别克隆到siRNA表达质粒pSUPER-retro构建siRNA和反义RNA表达质粒（iWx1、iWx2和AWx）； 质粒pXF3H-WHx与iWx1、iWx2或AWx共转染HeLa细胞， Western blot检测WHV X蛋白的表达。 结果表明， HeLa细胞中WHV X蛋白的表达受siRNA的抑制， iWx1表达的siRNA抑制90%以上的X蛋白表达， 并呈剂量依赖性。 提示RNA干扰技术可以特异性抑制WHV X蛋白的表达。

[首页](#) | [联系我们](#) | [关于学会](#) | [友情建议](#) | [\[登录管理\]](#)

© 2011 中华医学会感染病学分会 Email: infectma@126.com

本网站由 [江苏正大天晴药业有限公司](#) 提供赞助 上海市英符信息科技有限公司 技术维护

沪ICP备06003978号