

HBV的小鼠模型研究进展

刘大斌, 童贻刚

刘大斌, 童贻刚, 中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病研究所病原微生物国家重点实验室 北京市 100071

通讯作者: 童贻刚, 100071, 北京市, 中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病研究所病原微生物国家重点实验室.

tong.yigang@gmail.com

电话: 010-66948407

收稿日期: 2008-09-19 修回日期: 2008-10-22

接受日期: 2008-10-27 在线出版日期: 2008-12-08

Advance in the mouse model of hepatitis B virus infection

Da-Bin Liu, Yi-Gang Tong

Da-Bin Liu, Yi-Gang Tong, State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Department of Pathogenic Molecular Biology, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100071, China

Correspondence to: Yi-Gang Tong, State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Department of Pathogenic Molecular Biology, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100071, China. tong.yigang@gmail.com

Received: 2008-09-19 Revised: 2008-10-22

Accepted: 2008-10-27 Published online: 2008-12-08

Abstract

Hepatitis B virus (HBV) infection is a major worldwide healthy problem and now the virus and the virus-caused diseases have been known deeply. However, due to lack of a practical and convenient animal model, the study of HBV biology and the therapeutic development of HBV infection are still at a low level. As a common species used in laboratory, mice are studied most and the genetic and immune system are clearly understood. In this paper, we briefly describes the mouse models currently available in HBV.

Key Words: Hepatitis B virus; Animal model; Mouse model

Liu DB, Tong YG. Advance in the mouse model of hepatitis B virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(34): 3859-3864

摘要

乙型肝炎病毒感染是全球范围内影响人类健

康的重要问题, 目前人们对HBV及其所致疾病有了相当深入的认识. 但由于缺乏合适的动物模型, 乙型肝炎病毒的生物学研究和治疗进展缓慢. 小鼠作为一种实验室常用的动物, 遗传免疫背景清楚明确, 已经成为人们研究乙肝的重要工具. 本文简要综述了小鼠模型在乙型肝炎研究中的进展.

关键词: 乙型肝炎病毒; 动物模型; 小鼠模型

刘大斌, 童贻刚. HBV的小鼠模型研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(34): 3859-3864

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3859.asp>

0 引言

人类乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)属于嗜肝DNA病毒科, 含有约3.2 kb的部分双链DNA基因组, 其复制需要经过转录和逆转录过程同时具有高度的宿主种属和组织特异性. 人们对HBV及其所致疾病有了相当深入的认识, 但是仍然有大量疑难问题有待解决, 如HBV感染肝细胞的受体, HBV进入细胞的机制及相关的蛋白因子, HBV非结构蛋白x和e抗原在病毒复制和致病机制中所扮演的角色^[1-2], HBV分泌大量不含基因组的空心颗粒的原因^[3]等. 上述这些问题没能获得很好解决的一个重要原因就是由于合适的HBV动物模型太少. 迄今为止, HBV的体外模型(细胞模型)已经取得了较大的进展, 已有多种支持HBV基因表达和病毒复制的稳定的肝癌细胞系被成功建立^[4], HBV的体外感染模型也可用原代培养人肝细胞或者树鼯肝细胞以及肝癌细胞系HepaRG^[5], 然而感染效率很低. 由于体外系统既没有肝脏组织结构, 也没有体内环境如免疫分子、细胞因子等的影响, 因此在体外实验中获得的结果还需要有体内实验进行验证. 体内模型, 黑猩猩是迄今为止唯一能够感染HBV并发生急性肝炎的动物, 他可以产生与人类极其相似的细胞免疫^[6]. 然而由于他属于较高级的灵长类动物, 各国的使用限制很多, 不适用于作为常规的实验动物. 另一种可以感

■背景资料

动物模型是研究乙肝的一种重要工具, 小鼠是一种实验室常用的动物, 目前已经被广泛应用于模型研究. 各种小鼠模型在乙肝治疗、分子生物学等研究中发挥了很大作用, 但每种模型都存在着一些缺陷, 需要努力去研究一种更理想的小鼠模型.

■同行评议者

曹洁, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学微生物学教研室

■研发前沿

乙型肝炎严重威胁我国人民的身体健康, 据统计我国平均每年大约有30万人死于乙肝, 因此乙型肝炎相关研究非常紧迫。

染HBV的动物是同属灵长类的小河树鼩(*tupaia belangeri*), 但其感染仅仅是一过性的, 产生的病毒滴度也很低, 感染效率也不高^[7]. HBV相关病毒如土拨鼠HBV(WHV)和鸭HBV(DHBV)也可以用来做HBV的相关研究^[8-9], 但是上述这些动物都不是理想的HBV动物模型. 由于人HBV的替代动物模型具有各种缺点, 因而十分有必要研制遗传和免疫背景清楚、易于饲养的常规小动物模型, 经过基因修饰的小鼠模型因此成为近年研究人HBV的重要工具. 本文就有关支持HBV复制和感染的小鼠模型进行综述.

1 HBV转基因动物模型

1.1 HBV全基因组转基因小鼠 小鼠没有人HBV入侵的受体或者其他相关的因子, 因而无法感染人HBV, 但是可以通过转基因的方法将人HBV基因组转入小鼠胚胎干细胞, 使HBV基因组进入小鼠体内. 用这种模型研究发现, 小鼠虽然不能感染人HBV, 但是小鼠的肝脏和肾脏却可以有效的复制人HBV, 能分泌HBV病毒, 该病毒颗粒在形态学上与人血清HBV颗粒没有区别, 并且可以像人HBV一样感染黑猩猩. 然而尽管转基因小鼠可以产生高滴度的病毒, 却没有表现出任何细胞病理迹象, 这是由于转基因小鼠在胚胎发育阶段就耐受了HBV的各种组分. 这些现象说明, HBV感染具有严格的种属特异性, 但是复制并无种属特异性, 而具有组织特异性, 同时证明HBV的致病机制为宿主的免疫致病. 因转基因小鼠对HBV抗原处于免疫耐受状态, 还可用于研究感染慢性化的形成机制, 熊一力 *et al*^[10]在研究树突状细胞的抗原提呈功能时, 发现转基因小鼠对HBV的抗原提呈能力低下, 同时观察到小鼠的T淋巴细胞免疫活化受到抑制, 鼠肝细胞应答能力下降, 由此推测树突状细胞的抗原提呈能力下降, 是宿主对HBV产生免疫耐受的关键. Zheng *et al*^[11]研究HBV全基因组转基因小鼠模型时发现HBV虽然是肝细胞癌产生的一个重要原因, 但病毒本身并不是有效的致癌物, 其致癌作用可以被致癌物二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)所激发.

HBV基因组转基因小鼠模型为抗HBV药物的评价做出了重要的贡献, 不仅用于核苷类似物以及细胞因子的抗HBV效果评价, 而且被用来评价siRNA对HBV的治疗效果. 研究发现, siRNA作为一种新的潜在的治疗HBV感染的手段, 具有良好的抗HBV的效果, 在转基因小鼠中可以将

HBV的复制水平抑制到不能检测的水平^[12-13]. 虽然HBV基因组转基因小鼠将HBV组分当作自身组分, 不会发生肝炎, 但是, 如果在这种小鼠体内注入针对HBsAg的CTL细胞, 则可以建立急性肝炎小鼠模型^[14], 利用这种模型获得了大量的HBV相关的免疫学信息, 证明HBV特异性CTL细胞通过分泌细胞因子强烈抑制病毒复制, 从而大大降低血液中HBV浓度, 但是这些CTL并不直接杀伤受HBV感染的细胞^[15], 而是引起非HBV特异性的炎症细胞进入肝脏, 这可能是宿主细胞免疫导致肝脏损伤的原因所在^[16], 而且如果在HBV CTL诱导的肝炎模型中去除Gr-1(+)细胞, 则可以避免对肝组织的损伤, 并且不影响CTL的抗病毒活性. 将HBV基因组转入严重免疫缺陷小鼠(SCID小鼠), 该转基因小鼠也可以终身分泌HBV, 但不表现出任何肝炎症状, 但是给该小鼠注入脾细胞则可以消除血液中的病毒并产生慢性肝炎, 如果注入更多的脾细胞, 则可以导致急性肝炎^[17].

1.2 HBV亚基因组转基因小鼠 除了上述HBV全基因组转基因小鼠之外, 也有人用HBV的某一个或多个基因建立转基因小鼠. 这种HBV亚基因组转基因小鼠主要用于研究单个HBV基因对宿主的影响, 尤其是对HBV相关肝硬化及肝癌发生机制的影响, 以及对宿主免疫系统的影响. 屠亚军 *et al*^[18]建立一种可用于研究慢性乙型肝炎患者诱发肝癌的机制及HBX反式激活机制的人的HBV X基因转基因小鼠模型. 相关研究进一步证实HBV X基因是有一定的致癌作用, 但并不单独直接致癌, 而是与其他致癌基因和环境致癌物共同致癌^[19-20], 其致癌机制与抑癌基因p53相关^[21]. 应用转X基因小鼠的其他研究也陆续证明, X蛋白可以调节细胞转录因子的活性、激活Ras2Raf、NF2kB通路、影响p53基因修复DNA等而引起细胞癌变^[22-25]. 此外, 有学者用该模型对其在HBV复制周期中的作用进行研究, 发现X蛋白不是HBV复制所必需的, 但能增强病毒的复制^[26]. Yamazaki *et al*^[27]通过在转X基因小鼠上的研究发现β-干扰素(IFN-beta)在小鼠体内可以抑制DNA的合成继而有效的预防HCC的发生. 同样利用转X基因小鼠, 台湾学者证实了水飞蓟素(silymarin)可以有效的预防或者延迟肝癌的发生^[28]. 转大S基因小鼠研究发现, 大S基因的表达导致大量S蛋白堆积于肝细胞内, 导致肝细胞毒性及代偿性增生, 直至引发肝癌. 另有实验证实全长的preS/S基因产物不具有反式激活作用, 而pres1、pres2区突变的preS/S基因的表

达产物诱导DNA的氧化损伤,可能与HBV相关性HCC的发生有关^[29]. 转HBc/HBeAg基因小鼠研究发现,分泌型抗原e比抗胞内蛋白c更能诱导机体产生T细胞免疫耐受. 刘红 *et al*^[30]用受CMV启动子调控的HBV C基因建立了能够稳定传代的转基因小鼠,并用作评价HBV核酸疫苗的效果和观察针对HBcAg的免疫反应在肝脏损伤中的作用.

总之,转基因小鼠在研究HBV的复制及其与宿主的相互作用方面发挥了重要的作用,然而相关研究具有多种缺陷:首先,转基因小鼠并非被HBV感染,因此无法用来研究病毒进入和在体内的散布;第二,转基因小鼠中的病毒RNA均来自于整合的HBV基因组,在转基因小鼠肝细胞中未发现HBV正常复制所需要的cccDNA(原因不明),因此这些模型不太适合于用来研究抗病毒药物对cccDNA生成的抑制作用.

2 HBV转染小鼠模型

2.1 以病毒载体转导小鼠 用HBV基因组转染体外培养原代细胞或肝癌细胞系,可以建立基因cccDNA的HBV复制细胞模型. 利用杆状病毒载体或者腺病毒载体包装HBV基因组,也可有效的转染小鼠体内肝脏细胞. Rauschhuber *et al*^[31]用一种缺失了全部病毒编码序列的腺病毒载体GD-Adv(gene-deleted adenoviral vector)建立一种转基因小鼠模型. 这样建立的动物模型由于HBV非天生就有,因此可以引起宿主的免疫反应,产生针对HBV的细胞免疫和体液免疫^[32],然而由于载体以及HBV自身的抗体性,以及HBV不能感染小鼠肝细胞,因此HBV只能短暂分泌.

2.2 HBV裸DNA直接注射小鼠 直接将HBV裸DNA注射到裸鼠肝脏内,可以打破种间屏障,使裸鼠产生类似HBV携带者的状况,但这种方法只能是小鼠肝脏中一小部分细胞携带HBV. Yang *et al*^[33]创造了尾静脉大体积(1.6 mL)注射质粒DNA的方法,可以使小鼠产生高滴度(10^7 copy/mL血液)的病毒,但是1 wk以后随着血中抗体和CTL细胞的出现,病毒很快被清除. 而用同样的方法再NOD/SCID小鼠中,病毒可以持续81 d以上. 利用这种小鼠模型研究发现,注射DNA siRNA可以阻断HBV复制^[34];大大降低血中HBV含量. 有中国学者,采用水动力尾静脉注射法,将含有1.3倍HBV基因组的pHBV4.1注入BALB/C小鼠,建立了一种快速简便并且病毒可高水平复制的HBV动物模型,可以用来研究

多聚肌苷酸对HBV复制的抑制作用^[35]. 2006年, Ketzinzel-Gilad *et al*^[36]将HBV adw亚型通过酶切位点连接到载体上,用水动力转染法尾静脉分别注射到BALB/c和SCID小鼠体内. 在BALB/c小鼠体内HBeAg和HBsAg在第3天打到高峰,10 d后随着抗体的出现而开始下降;在SCID小鼠血清中30 d后仍可以检测到HBeAg和HBsAg,利用Real-time PCR检测到HBV-DNA的复制水平可以达到 10^6 - 10^7 . 同年Takehara *et al*^[37]利用水动力转染技术注射1.5倍HBV基因到Balb/c裸鼠体内,HBV相关抗原表达超过1年,而且检测到了cccDNA,说明该模型更接近于自然感染.

尽管在NOD/SCID小鼠中HBV存在时间较长,但是仍然是一过性的HBV复制模型,病毒会以为不能感染和复制而自引清除. 此外该系统不仅需要使用特殊的小鼠NOD/SCID,而且由于注射剂量太大(相当于小鼠全身体液的总量),对小鼠肝脏和其他器官造成的损伤也不能忽视.

3 人-鼠嵌合肝模型

近年来人们用人的肝细胞移植到免疫缺陷小鼠体内,得了一些嵌合肝动物模型,在这些动物模型中,人的肝细胞可以存在并感染HBV.

3.1 Trimer小鼠模型 该模型是用正常Balb/c小鼠经致死剂量的辐射处理后,静脉注射严重联合免疫缺陷(severe combined immunodeficient, SCID)小鼠的骨髓细胞. 这种小鼠用HBV感染过的人肝活检细胞植入其体内,大约80%的移植小鼠可产生病毒血症,组织化学分析和人血清白蛋白mRNA检测结果显示,人肝细胞移植可以在小鼠体内存活. 这种小鼠模型中HBV病毒滴度不高,仅为 10^5 HBV copy/mL血液,而且病毒血症持续时间也只有20 d,仅适合于短时间的药物抗病毒活性分析^[38].

3.2 NOD/SCID小鼠模型 该模型使用NOD/SCID小鼠作为人肝细胞的受体动物,给小鼠注射肝细胞生长因子c-Met的受体酪氨酸激酶拮抗剂(抗体)可以大大促进人肝细胞的存活时间,这种动物模型可以支持HBV的感染和复制,HBV抗原和DNA可在血中存在5 mo,但是HBV DNA的浓度也不太高,只能达到 2×10^5 copy/mL血清. 该模型还可以进行HDV的超感染^[39]. 一旦停止注射抗c-Met抗体,小鼠体内人肝细胞就会缓慢的减少. 有人将HBV基因组转染永生化的肝细胞后植入RAG-2缺陷小鼠(该小鼠与SCID小鼠类似,因为recombination activation gene-2

■应用要点

虽然普通小鼠无法感染HBV,但是通过多种多样的分子生物学的手段,却可以建立适合于各种研究目的HBV小鼠模型,这为HBV的研究提供了非常有用的工具

■同行评价

本文就HBV的小鼠模型研究情况进行综述,为进一步开展实验研究提供了较为系统的理论与实践经验。

的失活而不能形成成熟的T、B细胞),结果获得了5 mo以上的高滴度病毒(达 1×10^8 copy/mL血清)^[40]。

3.3 uPA/SCID小鼠模型 该模型使用的是uPA/SCID小鼠,这种小鼠因为被转入具有肝脏毒性的uPA基因(urokinase plasminogen activator),自身的肝细胞生长受到抑制,而植入的肝细胞具有生长优势,加之该小鼠无免疫排斥能力,适合于移植肝细胞的生长^[41]。移植肝细胞可以生长到小鼠出生之后8 wk,这个年龄正是小鼠肝脏长势正常的时期。在这种小鼠中,移植人肝细胞可以有机的整合到整个鼠肝脏中,在有些模型中,人的肝细胞可以占到整个肝脏的绝大部分,该肝脏近乎完全人源化^[42-43]。给这种小鼠注射乙肝患者血清,小鼠可产生 10^{10} copy/mL血清,并且可以持续5 mo^[43],用体外HepG2细胞产生的病毒上清也可以感染这样的动物模型。Petersen *et al*^[44]用这种模型研究发现从HBV大外膜蛋白分离的酰化肽可以抑制HBV的感染。这种模型还被用来研究HBV突变株(HBeAg阴性)的生物学特性,该模型将非常适合于抗病毒药物的评价,无论这些药物是抑制病毒复制,还是影响病毒进入细胞和体内传播。

尽管该模型可以说是目前最好的HBV感染复制模型,但是由于该小鼠没有免疫机能,对于研究HBV的致病机制以及HBV与宿主免疫系统的相互关系仍然是一个难以克服的问题,一种间接的解决方法就是使用人抗HBV免疫细胞对小鼠进行处理,实施过继免疫(adoptive immune)由于uPA/SCID小鼠在生长过程中,转基因uPA可能会丢失,失去uPA基因的小鼠肝脏重新获得生长优势,结果会导致小鼠肝细胞比例增加,实验发现人肝细胞所占总肝细胞的比例直接影响了血清HBV的含量。uPA/SCID小鼠的饲养和繁殖也是一个问题,由于没有细胞免疫和体液免疫,加上肝脏不能正常发育,因此出生死亡率很高。

与其类似的另一种嵌合肝模型使用uPA转基因小鼠和RAG2小鼠(该小鼠因为recombination activation gene-2的失活而不能形成成熟的T、B细胞)杂交获得杂合子小鼠,其特征与uPA/SCID纯合子小鼠类似,但是由于是杂合子,移植肝细胞占肝脏总细胞数比例较低(可达15%)。这种模型与uPA/SCID模型一样,也可以进行HBV的感染和复制研究。所有嵌合肝模型的主要特点就是允许人肝细胞生长,但是这类模型的构建必须每次都使用新鲜的人肝细胞,而这种人

鲜活肝细胞来源很有限,不易获得。折衷的解决方案是使用树鼯肝细胞,但是从某种角度讲,如果用树鼯肝细胞移植到小鼠体内,还不如直接以树鼯作为模型更好。

4 结论

小鼠作为实验室最常使用的动物,其易于饲养,遗传背景清楚,基因组全序已完全确定,其免疫系统研究深入透彻,这些特点决定了小鼠是最理想的动物模型。虽然普通小鼠无法感染HBV,但是通过多种多样的分子生物学的手段,却可以建立适合于各种研究目的HBV小鼠模型,这为HBV的研究提供了非常有用的工具,如Zhang *et al*^[45]利用小鼠模型研究发现LIGHT基因(TNF家族成员)可以增强细胞和体液免疫反应。目前国内研究的HBV小鼠模型各有特点和不足,转基因小鼠和基因转染小鼠最大的缺点是HBV病毒不能进入细胞发生正常感染和在体内传播,转基因小鼠的优点是可以稳定的分泌必须HBV病毒及抗原,无需每次进行转染或移植,但是机体不能产生对HBV的免疫反应,可以通过过继免疫的方法进行部分补救。而基因转染小鼠的优点是可以产生对HBV的免疫反应,并且可以方便的研究HBV不同突变对HBV本身以及对免疫系统的影响,可以进行免疫致病机制研究。嵌合肝小鼠模型的最大特点是允许HBV复制,但是由于免疫缺陷,他们与转基因小鼠一样不能产生对HBV的免疫,同时动物饲养比较困难,而且必须提供来源稀少的新鲜活跃的人肝细胞。因此,有必要进一步研究更为理想的动物模型。

5 参考文献

- 1 Bréchet C. Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms. *Gastroenterology* 2004; 127: S56-S61
- 2 Chen M, Sällberg M, Hughes J, Jones J, Guidotti LG, Chisari FV, Billaud JN, Milich DR. Immune tolerance split between hepatitis B virus precore and core proteins. *J Virol* 2005; 79: 3016-3027
- 3 Bruns M, Miska S, Chassot S, Will H. Enhancement of hepatitis B virus infection by noninfectious subviral particles. *J Virol* 1998; 72: 1462-1468
- 4 Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 1005-1009
- 5 Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaize D, Canine I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C, Guguen-Guillouzo C. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 15655-15660
- 6 Bertoni R, Sette A, Sidney J, Guidotti LG, Shapiro M, Purcell R, Chisari FV. Human class I supertypes

- and CTL repertoires extend to chimpanzees. *J Immunol* 1998; 161: 4447-4455
- 7 von Weizsäcker F, Köck J, MacNelly S, Ren S, Blum HE, Nassal M. The tupaia model for the study of hepatitis B virus: direct infection and HBV genome transduction of primary tupaia hepatocytes. *Methods Mol Med* 2004; 96: 153-161
 - 8 Lin E, Luscombe C, Colledge D, Wang YY, Locarnini S. Long-term therapy with the guanine nucleoside analog penciclovir controls chronic duck hepatitis B virus infection in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2132-2137
 - 9 Korba BE, Cote PJ, Menne S, Toshkov I, Baldwin BH, Wells FV, Tennant BC, Gerin JL. Clevudine therapy with vaccine inhibits progression of chronic hepatitis and delays onset of hepatocellular carcinoma in chronic woodchuck hepatitis virus infection. *Antivir Ther* 2004; 9: 937-952
 - 10 能一力, 刘光泽, 贾彦征. HBV转基因小鼠免疫耐受机制的实验研究. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 642-645
 - 11 Zheng Y, Chen WL, Louie SG, Yen TS, Ou JH. Hepatitis B virus promotes hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Hepatology* 2007; 45: 16-21
 - 12 Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology* 2003; 37: 764-770
 - 13 Shlomai A, Shaul Y. RNA interference--small RNAs effectively fight viral hepatitis. *Liver Int* 2004; 24: 526-531
 - 14 Moriyama T, Guilhot S, Klopchin K, Moss B, Pinkert CA, Palmiter RD, Brinster RL, Kanagawa O, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of hepatocellular injury in hepatitis B virus transgenic mice. *Science* 1990; 248: 361-364
 - 15 Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, Matzke B, Schreiber R, Chisari FV. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1996; 4: 25-36
 - 16 Sitia G, Isogawa M, Iannaccone M, Campbell IL, Chisari FV, Guidotti LG. MMPs are required for recruitment of antigen-nonspecific mononuclear cells into the liver by CTLs. *J Clin Invest* 2004; 113: 1158-1167
 - 17 Larkin J, Clayton M, Sun B, Perchonock CE, Morgan JL, Siracusa LD, Michaels FH, Feitelson MA. Hepatitis B virus transgenic mouse model of chronic liver disease. *Nat Med* 1999; 5: 907-912
 - 18 屠亚军, 琦祖和, 杨鹏, 潘燕, 于玉树, 杜森, 李光三. 人乙型肝炎病毒X基因转基因小鼠模型的建立. *中国医学科学院学报* 2000; 22: 263-265
 - 19 Madden CR, Finegold MJ, Slagle BL. Altered DNA mutation spectrum in aflatoxin b1-treated transgenic mice that express the hepatitis B virus x protein. *J Virol* 2002; 76: 11770-11774
 - 20 Zhu H, Wang Y, Chen J, Cheng G, Xue J. Transgenic mice expressing hepatitis B virus X protein are more susceptible to carcinogen induced hepatocarcinogenesis. *Exp Mol Pathol* 2004; 76: 44-50
 - 21 Ueda H, Ullrich SJ, Gangemi JD, Kappel CA, Ngo L, Feitelson MA, Jay G. Functional inactivation but not structural mutation of p53 causes liver cancer. *Nat Genet* 1995; 9: 41-47
 - 22 Lin Y, Nomura T, Cheong J, Dorjsuren D, Iida K, Murakami S. Hepatitis B virus X protein is a transcriptional modulator that communicates with transcription factor IIB and the RNA polymerase II subunit 5. *J Biol Chem* 1997; 272: 7132-7139
 - 23 Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 10350-10354
 - 24 Lucito R, Schneider RJ. Hepatitis B virus X protein activates transcription factor NF-kappa B without a requirement for protein kinase C. *J Virol* 1992; 66: 983-991
 - 25 Becker SA, Lee TH, Butel JS, Slagle BL. Hepatitis B virus X protein interferes with cellular DNA repair. *J Virol* 1998; 72: 266-272
 - 26 Xu Z, Yen TS, Wu L, Madden CR, Tan W, Slagle BL, Ou JH. Enhancement of hepatitis B virus replication by its X protein in transgenic mice. *J Virol* 2002; 76: 2579-2584
 - 27 Yamazaki K, Suzuki K, Ohkoshi S, Yano M, Kurita S, Aoki YH, Toba K, Takamura MA, Yamagiwa S, Matsuda Y, Aoyagi Y. Temporal treatment with interferon-beta prevents hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus X gene transgenic mice. *J Hepatol* 2008; 48: 255-265
 - 28 Wu YF, Fu SL, Kao CH, Yang CW, Lin CH, Hsu MT, Tsai TF. Chemopreventive effect of silymarin on liver pathology in HBV X protein transgenic mice. *Cancer Res* 2008; 68: 2033-2042
 - 29 Hsieh YH, Su IJ, Wang HC, Chang WW, Lei HY, Lai MD, Chang WT, Huang W. Pre-S mutant surface antigens in chronic hepatitis B virus infection induce oxidative stress and DNA damage. *Carcinogenesis* 2004; 25: 2023-2032
 - 30 刘红, 姚玉成, 何金, 李文林, 李建秀, 苏小平, 张钦宪, 胡以平. 乙型肝炎病毒核心抗原转基因小鼠的建立. *第二军医大学学报* 2003; 24: 172-1741
 - 31 Rauschhuber C, Xu H, Salazar FH, Marion PL, Ehrhardt A. Exploring gene-deleted adenoviral vectors for delivery of short hairpin RNAs and reduction of hepatitis B virus infection in mice. *J Gene Med* 2008; 10: 878-889
 - 32 Isogawa M, Kakimi K, Kamamoto H, Protzer U, Chisari FV. Differential dynamics of the peripheral and intrahepatic cytotoxic T lymphocyte response to hepatitis B surface antigen. *Virology* 2005; 333: 293-300
 - 33 Yang PL, Althage A, Chung J, Chisari FV. Hydrodynamic injection of viral DNA: a mouse model of acute hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 13825-13830
 - 34 Morrissey DV, Lockridge JA, Shaw L, Blanchard K, Jensen K, Breen W, Hartsough K, Machemer L, Radka S, Jadhav V, Vaish N, Zinnen S, Vargeese C, Bowman K, Shaffer CS, Jeffs LB, Judge A, MacLachlan I, Polisky B. Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 1002-1007
 - 35 Liu FJ, Liu L, He F, Wang S, Zhou TY, Liu C, Deng LY, Tang H. Establishment and primary application of a mouse model with hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5324-5330
 - 36 Ketzinil-Gilad M, Zauberman A, Nussbaum O, Shoshany Y, Ben-Moshe O, Pappo O, Felig Y, Ilan E, Wald H, Dagan S, Galun E. The use of the hydrodynamic HBV animal model to study HBV biology and anti-viral therapy. *Hepatol Res* 2006; 34: 228-237
 - 37 Takehara T, Suzuki T, Ohkawa K, Hosui A, Jinushi M, Miyagi T, Tatsumi T, Kanazawa Y, Hayashi N. Viral covalently closed circular DNA in a non-transgenic mouse model for chronic hepatitis B

- virus replication. *J Hepatol* 2006; 44: 267-274
- 38 Ilan E, Burakova T, Dagan S, Nussbaum O, Lubin I, Eren R, Ben-Moshe O, Arazi J, Berr S, Neville L, Yuen L, Mansour TS, Gillard J, Eid A, Jurim O, Shouval D, Reisner Y, Galun E. The hepatitis B virus-trimera mouse: a model for human HBV infection and evaluation of anti-HBV therapeutic agents. *Hepatology* 1999; 29: 553-562
- 39 Ohashi K, Marion PL, Nakai H, Meuse L, Cullen JM, Bordier BB, Schwall R, Greenberg HB, Glenn JS, Kay MA. Sustained survival of human hepatocytes in mice: A model for in vivo infection with human hepatitis B and hepatitis delta viruses. *Nat Med* 2000; 6: 327-331
- 40 Brown JJ, Parashar B, Moshage H, Tanaka KE, Engelhardt D, Rabbani E, Roy-Chowdhury N, Roy-Chowdhury J. A long-term hepatitis B viremia model generated by transplanting nontumorigenic immortalized human hepatocytes in Rag-2-deficient mice. *Hepatology* 2000; 31: 173-181
- 41 Sandgren EP, Palmiter RD, Heckel JL, Daugherty CC, Brinster RL, Degen JL. Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. *Cell* 1991; 66: 245-256
- 42 Tatenno C, Yoshizane Y, Saito N, Kataoka M, Utoh R, Yamasaki C, Tachibana A, Soeno Y, Asahina K, Hino H, Asahara T, Yokoi T, Furukawa T, Yoshizato K. Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol* 2004; 165: 901-912
- 43 Tsuge M, Hiraga N, Takaishi H, Noguchi C, Oga H, Imamura M, Takahashi S, Iwao E, Fujimoto Y, Ochi H, Chayama K, Tatenno C, Yoshizato K. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis B virus. *Hepatology* 2005; 42: 1046-1054
- 44 Petersen J, Dandri M, Mier W, Lütgehetmann M, Volz T, von Weizsäcker F, Haberkorn U, Fischer L, Pollok JM, Erbes B, Seitz S, Urban S. Prevention of hepatitis B virus infection in vivo by entry inhibitors derived from the large envelope protein. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 335-341
- 45 Zhang Y, Jiang W, Fan Y, Wen J, Hao W, Qian M. Engineering enhancement of the immune response to HBV DNA vaccine in mice by the use of LIGHT gene adjuvant. *J Virol Methods* 2008; 153: 142-148

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写, 后空 1 格写标题; 2 级标题后空 1 格接正文。以下逐条陈述: (1) 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。(2) 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。(3) 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。(4) 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图 1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则 ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 第 3 套为 ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P < 0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、- 应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴。(5) 致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。(常务副总编辑: 张海宁 2008-12-08)