研究进展

乙肝病毒体内外感染模型研究进展

徐桂利[1,2],高新[1],刘铮铸[2*],巩元芳[2],宋海峰[1*]

(1.军事医学科学院放射与辐射研究所,北京 100850;
2.河北科技师范学院 动物科技学院,河北 秦皇岛 066004)

【摘要】 乙肝病毒是威胁人类健康的重要病原体之一。目前,利用针对乙肝病毒和宿主分别建立的细胞模型和动物模型,广泛应用于乙肝病毒的基础研究、新药研发和新疗法的探索。但是,这些模型仍然存在某些方面的缺陷,如感染率低、感染期短,与人存在较大的种属差异等,最重要的是,这些模型无法完全模拟乙肝病毒自然感染人的过程及产生病理变化。本文对近十五年来主要乙肝病毒体内外感染模型及其最新的研究进展进行简要综述,为今后建立新型乙肝病毒感染模型提供参考。

【关键词】 乙肝病毒;细胞模型;动物模型
【中图分类号】R-332 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856(2016)09-0093-06
doi:10.3969.j.issn.1671-7856.2016.09.017

Recent progress for HBV infection model *in vitro* and *in vivo*

XU Gui-li[1,2], GAO Xin[1], LIU Zheng-zhu[2*], GONG Yuan-fang[2], SONG Hai-feng[1*]
(1. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medicine Sciences, Beijing 100850, China;
2. College of Animal Science and Technology, Hebei Normal University of Science & Technology, Qinhuangdao 066004, China)

【Abstract】 Hepatitis B virus (HBV) is an important pathogen threatening to human health. Up to date, various of cell infection models and animal models for HBV and the host are widely used in the exploring research of infection mechanism, new drug development and effective therapeutic method for HBV. However, these models have some defects, such as low infection rate, rather short infective stage, and comparatively large species differences with human, and so on. Among them, the biggest problem is that these models cannot completely simulate HBV infection process and pathological changes naturally occurred in human. Herein, the major HBV infection models developed in the past fifteen years, as well as the latest research progress, are presented as a brief review, to provide a reference for constructing novel HBV infection models in the future.

【Key words】 Hepatitis B virus; Cell model; Animal model

1 前言

乙肝病毒(Hepatitis B virus,HBV)会引起肝炎、肝硬化和肝癌等肝脏疾病,最终致人死亡,是严重威胁人类健康的病原体之一[1-4]。HBV 流行区分布全球,尤其以亚洲和非洲为主。据世界卫生组织(world health organization, WHO)调查统计,全球超过 20 亿人曾经感染过 HBV,其中大约 3.6 亿人是慢性 HBV 感染者。临床治疗中,虽然对急性 HBV 感染患者的治疗效果较佳,但是对慢性 HBV 感染患者仍缺乏安全而有效的治疗手段,全球每年大约 100 万人死于 HBV 感染性肝病[5,6]。

[作者简介]徐桂利(1986-),男,硕士研究生,研究方向:动物分子遗传。E-mail:296881485@163.com。
[通讯作者]刘铮铸(1968-),男,教授,研究方向:动物分子遗传育种研究。E-mail:liuzhengzhu@163.com。
宋海峰(1972-),男,教授,研究方向:生物技术药物药理学和药动学研究。E-mail:bapklab@yahoo.com。

目前,在乙肝研究领域,研究者们根据各自的研究目的建立了相应的乙肝体内外模型。虽然这些模型存在各种缺陷,但是它们的应用使人们对 HBV 有了更多的了解,并在研发、评价防治 HBV 新型药物中起到了重要作用。本文就当前 HBV 感染研究中出现的相关体内外模型及乙肝模型研究进展作简要的概述,为今后更深入研究 HBV 相关内容奠定基础。

2 体内外乙肝模型研究现状

2.1 细胞模型

HBV 属于嗜肝 DNA 病毒,在自然状态容易直接感染肝细胞,于是研究者

们建立了 HBV 感染的原代人肝细胞(PHH)模型[7];但是来源较少的 PHH 阻碍了该模型在 HBV 相关研究中的广泛应用。随后,研究发现,HBV 可自然感染原代树鼩肝细胞(PTH);这为研究 HBV 提供了新的模型平台[8,9]。然而树鼩与人之间存在的种属差异将会制约该模型的应用,继续探索与人肝细胞相似表现的细胞模型成为必然。2010 年,Lucifora J 等[10]用重组杆状病毒(Bac-HBV)作为病毒载体,体外成功转染了猕猴肝细胞。原代肝细胞受到 HBV 感染后能很好地重现病毒感染细胞、复制、组装和释放等自然感染过程,但是存在培养难度较大,存活时间较短,不能无限增殖等缺陷,以及在培养过程中还会逐渐丧失一些生理功能,如代谢、胆汁分泌、免疫防御等。Tagawa Y 等[11,12]在体外分别建立了鼠胚胎干细胞和人肝癌细胞系(HepG2、Huh7)体外肝组织培养系统(又称体外肝模型,*In Vitro* Liver Systerm,IVL)。体外肝组织培养系统可以保留体内肝细胞所具有的某些生理功能(如鸟氨酸循环等)和代谢功能,同时延长了细胞体外存活时间。当把 HBV 基因导入该系统细胞时,HBV 基因会在肝类细胞内复制、表达、组装和释放等,因此该系统未来可用于研究 HBV 的生活周期。

与上述 HBV 感染细胞模型相比,细胞系模型则更为理想。迄今为止,HepaRG 细胞是唯一能被 HBV 直接感染的细胞系,但是受感染率低;在应用时常加入二甲基亚砜(DMSO)来增加 HBV 对该细胞系的感染率[13-14]。在 HBV 相关研究中还常用到 HepG2.2.15 细胞系和 HepAD38 细胞系。这两株细胞系均含有稳定复制和表达的 HBV 基因,在培养过程中可产生高病毒滴度、较强感染力的 HBV 颗粒[15,16]。在用于研究 HBV 时两者各有其独特性,HepG2.2.15 细胞系核内可检测到少量 HBV cccDNA,与其相比,HepAD38 细胞系则可产生更高病毒滴度的病毒颗粒及具有更快的细胞分化速度;两者存在的缺陷分别是乙肝表面抗原差异性表达、需要四环素诱导启动 HBV 基因表达。除上述细胞系外,2014 年,Yang D 等[17]从一名男性丙肝病毒(Hepatitis C Virus,HCV)感染患者的肝肿瘤内分离出了肝癌细胞,然后把该癌细胞进行 NOD/SCID 小鼠荷瘤转化后获得了一株新的肝癌细胞系—HLCZ01;随后用 HBV 对其进行直接感染实验,结果显示该细胞系被 HBV 感染。该细胞系今后有望成为新的细胞模型。

2012 年,李文辉实验室[18]发现钠离子/牛磺胆酸共转运蛋白(Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide,NTCP)是 HBV 感染肝细胞的功能受体。随后,在多次验证这一发现过程中研究者们把人的 *NTCP* 基因稳转到 HepG2、Huh7 等细胞内,再用 HBV 病毒颗粒直接感染细胞,于是建立了 HBV 易感的 HepG2-hNTCP 细胞系、Huh7-hNTCP 细胞系等[18-21]。这些模型可用于研究 HBV 的生活周期、筛选抗 HBV 药物及探究影响 HBV 复制的宿主细胞因子等。

综上,现阶段应用的 HBV 感染细胞模型(见表 1.1)极大的促进了对 HBV 生活周期的研究、抗 HBV 相关药物的筛选和评价及影响 HBV 复制的宿主细胞因子的探究等,但是仍缺乏与受感染 PHH 病理变化相似的细胞模型。而 NTCP 未来可能弥补现有乙肝模型缺陷,成为研究 HBV 感染机制、抗 HBV 药物等的重要靶点。

2.2 动物模型

2.2.1 非人灵长类模型

黑猩猩是最早且唯一公认易被 HBV 感染的动物。后相继报道,长臂猿[22]、熊猴[23]、狒狒[24]和绒毛猴[25,26]等非人灵长类也易被 HBV 感染。这些易感动物可用于研究 HBV 的感染性、自然感染过程和发病机制及机体对病毒的免疫清除过程等,但是存在病毒感染程度轻微、动物伦理及物种濒危性等限制性因素[16]。

为了能够建立与 HBV 自然感染人相似的动物模型,研究者们从未停止过对猕猴属的探索性研究。20 世纪初,Gheit T 等[27]建立了 HBV DNA 重组质粒在体转染叟猴模型;用重组质粒点注射肝脏 2 天后开始在叟猴血清中检测到乙肝表面抗原(HBsAg)、HBV DNA,且阳性结果持续 3 周以上。上述结果表明 HBV DNA 能在猴体内正常复制,且存在较长时间。2013 年,Dupinay T 等[28]在毛里求

斯发现了少量自然状态下可感染 HBV 的猕猴群;该种群的发现为未来建立 HBV 感染猕猴模型提供了直接证据。不久后,冷静等[29]用人 HBV 血清分别直接感染幼年和成年食蟹猴,结果部分幼年食蟹猴被感染,并表现出了类似人急性肝炎的肝组织学反应。综上,这些探索性动物模型在研究 HBV 感染机制及在感染过程中宿主的免疫反应等中发挥了重要作用,但是规模极为有限,并缺乏更多的 HBV 感染验证性实验。

2.2.2 树鼩模型

树鼩属于属攀鼩目(Scandentia)树鼩科(Tupaiidae),是继上述灵长类后又发现的一种能够易被 HBV 感染的动物[30];其被 HBV 感染后会出现暂时性的病毒血症、病毒清除过程、HBsAg 血清转化现象[7],感染过程与人类相似,感染周期较短(40d 左右)[30-34],在整个感染过程中表现为一过性感染。近年研究表明,采用 HBV 感染幼年树鼩的方法可成功建立慢性 HBV 感染模型。李瑗实验室[35-37]用幼年树鼩被动感染人 HBV 血清后建立了感染时间较长(可达一年以上)的树鼩模型。在该类模型中树鼩多为野外捕获,感染情况与动物年龄、品种、HBV 基因型等有关,而且目前缺乏针对它的特异性检测乙肝抗体,因此该模型的可靠性、可控性、重复性以及检测结果仍然存在较大争议[38]。

2.2.3 小鼠模型

目前应用最多的乙肝模型动物是小鼠,但是 HBV 却不能直接感染小鼠。成熟的 HBV 感染小鼠模型[39],通常可分为两类:一类是嵌合型小鼠模型,最常用的模型是接种 PHH 或 PTH 的基因(如:编码尿激酶型纤溶酶原激活物(*uPA*)基因、编码延胡索酰乙酰乙酸水解酶(*Fah*)基因、重组活化基因 2(*Rag* 2)、编码白细胞介素 2 g 链基因(*Il2rg*))缺陷小鼠[40-45]。这类动物模型易被 HBV 感染,主要用于研究由 HBV 感染所引起的机体免疫应答、病毒复制、病毒致病机理等,以及筛选、评价抗 HBV 药物,但是存在着繁殖率低、死亡率高,感染 HBV 过程缓慢及对病毒存在一定免疫耐受性等缺陷。Bility MT 等[46]在 A2/NSG 小鼠(*HLA-A2* 转基因 NOD. Cg-Prkdcscid Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ 小鼠)肝内注射人 CD34$^+$造血干细胞(HSC)和人肝祖细胞后建立了 A2/NSG-hu HSC/Hep 转基因小鼠;随后对其用 HBV 进行了感染实验,结果表明大约 75% 的小鼠被感染,由此使其成为一种新的乙肝模型。2015 年,Strick-Marchand H 等[47]在 BALB/c Rag2$^{-/-}$ IL-2Rγc$^{-/-}$ NOD. sirpa uPA$^{tg/tg}$(BRGS-uPA)小鼠体内建立了人免疫系统与肝细胞嵌合(HIS-HUHEP)的小鼠模型,该模型可维持 5 个月左右。上述两个模型可用于研究人机体对 HBV 的免疫应答机理及筛选抗该类病原体的药物、疫苗,同时也解决了机体免疫耐受问题,更贴近病毒自然感染发生过程。另一类是转基因小鼠模型,包括转 HBV 基因和转钠离子/牛黄胆酸共转运多肽(Na$^+$/taurocholate Cotransporting Polypeptide, NTCP)基因两类,其中前者应用最多。转 HBV 基因模型大致分为 HBV 部分序列(主要是 HBV 复制基因部分)、全长序列、超长序列三种类型。该类模型在研究 HBV 复制、评价抗 HBV 药物和疫苗方面发挥了重要的作用,但存在着 HBV 非自然感染和病毒 RNA 来自于整合的 HBV 基因组的缺陷,因此不能用于研究病毒早期感染、病毒感染机制,及不适于研究影响 cccDNA 调节、转录活性机制和评价针对 cccDNA 生成的药物药效作用[48-50]。

除此之外,还有一类高压水动力法小鼠模型,即通过给小鼠静脉注射 HBV DNA、HBV cccDNA 或者含 HBV 基因的无包膜病毒载体建立起 HBV 感染模型[51-56]。HBV DNA 通过静脉注射到小鼠体内后会在肝细胞内存在较长时间,这更有利于 HBV 病毒基因在体内的复制和表达[51]。利用该技术可建立 HBV 急性感染模型,用于研究机体被感染后的免疫应答及评价相关抗病毒药物、疫苗等[52,53]。据报道,以 HBV cccDNA 静脉注射裸鼠后可成功建立 HBV 慢性感染模型,其可用于研究人 CHB 的致病机制及筛选相关抗 CHB 药物[55]。此外,通过高压水动力法静脉注射含 HBV 复制必需 DNA 序列的慢病毒质粒也可以建立 HBV 持续感染的小鼠模型[56]。另一种方法是利用高压水动力静脉注射法给 BALB/c 乳鼠接种人 HBV 血清建立 HBV 感染模型[57]。该模型主要依靠乳鼠免疫力低这一特点,在 HBV 血清注入后机体不能有效清除 HBV 颗粒,从而造成 HBV 的感染;其可用于研究 HBV 对机体免疫状态的作用。

2.2.4 其他嗜肝 DNA 病毒感染模型

HBV 属于嗜肝 DNA 病毒科,分为正肝病毒属和禽肝病毒属。除易感人与非人灵长类的人 HBV 外,在正肝病毒属中具有代表性且应用最多的是土拨鼠乙型肝炎病毒(WHV)。利用 WHV 建立的 WHV 成年动物模型主要用于研究病毒急性感染时机体清除受感染细胞的过程、慢性感染和癌变机理及评价抗 HBV 药物、疫苗[58,59]。另有研究发现,新生的土拨鼠感染 WHV 后能够较长时间的表现病态,最终成为慢性感染者[60,61];该模型可用于研究 HBV 自然感染过程等。然而土拨鼠模型所表现出

的急/慢性感染症状与 WHV 的基因型和动物年龄有关,这相对限制了其普遍应用[62]。在禽肝病毒属中应用较多的则是鸭乙型肝炎病毒(DHBV)。目前,主要是用 DHBV 感染 1 ~ 3 日龄雏麻鸭进行建模研究,该模型可用于抗 HBV 新药评价及研究细胞表面病毒受体及病毒清除机制等[63 - 66]。与其他类型的模型相比,该模型的不足在于鸭与人之间存在种属差异,HBV 与 DHBV 之间结构差别较大,影响建模稳定的因素较多,如鸭种类、日龄、病毒来源、批次、感染途径等。

此外,猪乙型肝炎病毒(SHBV)的发现为将来建立猪乙肝模型提供了可能。Li W 等[29 ~ 30]在验证猪嗜肝病毒的存在时猪血清乙肝标记物的检测结果显示 HBsAg 的阳性率大于 24. 8%,之后透射电子显微结果显示在血清、肝脏细胞中存在类似 HBV 的病毒颗粒;这些结果证实了 SHBV 的存在。

总之,各类动物模型(见表 1,2)的应用为 HBV 体内研究提供了重要支撑。但是这些模型中只有较少的能够表现出 HBV 的自然感染过程及在整个感染过程中机体的病理变化。

表 1 HBV 感染细胞模型

Tab. 1 Cell models of HBV infection

细胞模型	优点	缺点	应用
原代人肝细胞乙肝模型	HBV 易感,与人的感染一致	原代人肝细胞来源困难	绝大部分的 HBV 相关研究
原代树鼩肝细胞乙肝模型	早期感染过程与人相似	感染率低,感染时间短	病毒感染细胞过程,筛选、评价药物
体外肝模型	模拟体内环境,与人的感染一致	未知	HBV 的生活周期
HepaRG 细胞乙肝模型	保留肝细胞的特异性功能特性,产生 HBV cccDNA	感染率低	HBV 分子机制及筛选、评价抗 HBV 药物等
HepG2. 2. 15 细胞系	研究乙肝病毒的生活周期,产生少量 HBV cccDNA	抗原表达不稳定	HBV 的生活周期及筛选、评价抗 HBV 药物等
HepAD38 细胞系	产生高滴度的病毒颗粒,具有更快的细胞分化速度	需要四环素诱导启动 HBV 基因表达	HBV 的生活周期及筛选、评价抗 HBV 药物等
HLCZ01	HBV 易感,无限增殖	未知	HBV 的生活周期,筛选、评价抗 HBV 药物等

表 2 HBV 感染动物模型

Tab. 2 Animal models of HBV infection

动物模型	优点	缺点	应用
黑猩猩	HBV 易感,感染期长,与人感染相近	感染程度轻,存在伦理问题,物种濒危性	HBV 的感染性、自然感染过程和发病机制及机体对病毒的免疫清除过程等
猕猴	与人基因同源性高,感染症状与人相似	不易被 HBV 感染;即使感染,也是一过性感染	HBV 感染机制及在感染过程中宿主的免疫反应等
树鼩	HBV 易感,感染过程与人类相似,体型小	感染个体差异较大,感染期不同,缺乏特异性检测抗体	HBV 感染机制,筛选、评价抗 HBV 药物等
嵌合型小鼠	HBV 易感,慢性感染模型	感染过程缓慢,对病毒存在一定免疫耐受性,鼠繁殖率低、死亡率高	机体免疫应答、病毒复制、病毒致病机理等及筛选、评价抗 HBV 药物
转基因小鼠	稳定表达 HBV 基因	非自然感染,无 HBV cccDNA 产生,不适于研究转录活性机制	HBV 复制,筛选、评价抗 HBV 药物
土拨鼠	体型小,WHV 易感,易建立急性、慢性模型	较多为野外捕捉,WHV 与 HBV 存在差异	病毒急性感染时机体清除受感染细胞的过程、慢性感染和癌变机理及筛选、评价抗 HBV 药物
鸭	来源多,DHBV 易感	DHBV 与 HBV 结构差别较大,鸭种类和日龄、病毒来源和批次、感染途径等影响建模	筛选、评价抗 HBV 新药及研究细胞表面病毒受体及病毒清除机制等

3 问题与展望

综上所述,虽然不同类型 HBV 感染体内外模型的应用极大推动了 HBV 生物学特性、感染过程、致病机理等的研究以及抗 HBV 相关药物和疫苗的研发、评价,但是 HBV 对组织和种属感染的特异性使得现有 HBV 感染模型都不能较好的呈现出与人类相似的 HBV 感染病理变化及 HBV 生活周期变化。不过,在不同 HBV 感染的幼年动物模型中幼年动物表现出不同程度的 HBV 感染,甚至慢性乙肝症状,而且受感染时间较长。这些模型的出现为今后优化、新建立乙肝模型提供了重要参考。同时,NTCP 新功能的发现未来可能促进 HBV 感染模型的发展,加快 HBV 相关研究的进程。

参考文献:

[1] Lavanchy D. Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention[J]. J Clin Virol, 2005, 34 (Suppl 1): S1 - S3.

[2] Chan HL, Sung JJ. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus[J]. Semin. Liver Dis, 2006, 26(2):153 - 161.
[3] Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(3):215 - 229.
[4] Wright TL. Introduction to chronic hepatitis B infection[J]. Am J Gastroenterol, 2006, 101(Suppl 1): S1 - S6.
[5] Ott JJ, Stevens GA, Groeger J, *et al.* Global epidemiology of hepatitis B virus infection: New estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity[J]. Vaccine, 2012, 30(12): 2212 - 2219.
[6] Kwon H, Lok AS. Hepatitis B therapy[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011, 8(5): 275 - 284.
[7] Gripon P, Diot C, Thézé N, *et al.* Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide[J]. J Virol, 1988, 62(11): 4136 - 4143.
[8] Walter E, Keist R, Niederöst B, *et al.* Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes *in vitro* and *in vivo*[J]. Hepatology, 1996, 24(1): 1 - 5.
[9] Yan RQ, Su JJ, Huang DR, *et al.* Human hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. I. Experimental infection of tree shrews with hepatitis B virus[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 1996, 122(5): 283 - 288.
[10] Lucifora J, Vincent IE, Berthillon P, *et al.* Hepatitis B virus replication in primary macaque hepatocytes: Crossing the species barrier toward a new small primate model[J]. Hepatology, 2010, 51(6):1954 - 1960.
[11] Tamai M, Aoki M, Nishimura A, *et al.* In vitro recapitulation of the urea cycle using murine embryonic stem cell-derived in vitro liver model[J]. Amino Acids, 2013, 45(6):1343 - 1351.
[12] Ahn S, Tamai M, Nakashima K, *et al.* An in vitro liver model consisting of endothelial vascular networks surrounded by human hepatoma cell lines allows for improved hepatitis B virus replication[J]. J Biosci Bioeng, 2014, 118(1):107 - 111.
[13] Ni Y, Lempp FA, Urban S, *et al.* Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes[J]. Gastroenterology, 2014, 146(4): 1070 - 1083.
[14] Gripon P, Diot C, Guguen-Guillouzo C. Reproducible high level infection of cultured adult human hepatocytes by hepatitis B virus: effect of polyethylene glycol on adsorption and penetration[J]. Virology, 1993, 192(2): 534 - 540.
[15] Chang CM, Jeng KS, Hu CP, *et al.* Production of hepatitis B virus in vitro by transient expression of cloned HBV DNA in a hepatoma cell line[J]. EMBO J, 1987, 6(3): 675 - 680.
[16] Zhou T, Guo H, Guo JT, *et al.* Hepatitis B virus e antigen production is dependent upon covalently closed circular (ccc) DNA in HepAD38 cell cultures and may serve as a cccDNA surrogate in antiviral screening assays[J]. Antiviral Res, 2006, 72(2): 116 - 124.
[17] Yang D, Zuo C, Wang X, *et al.* Complete replication of hepatitis B virus and hepatitis C virus in a newly developed hepatoma cell line[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(13): E1264 - 1273.
[18] Yan H, Zhong G, Xu G, *et al.* Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus[J]. Elife, 2012, 1: e00049.
[19] Yan H, Peng B, He W, *et al.* Molecular Determinants of Hepatitis B and D Virus Entry Restriction in Mouse Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide[J]. J Virol, 2013, 87(14): 7977 - 7991.
[20] Li H, Zhuang Q, Wang Y, *et al.* HBV life cycle is restricted in mouse hepatocytes expressing human NTCP[J]. Cell Mol Immunol, 2014, 11(2):175 - 183.
[21] Ni Y, Lempp FA, Mehrle S, *et al.* Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes[J]. Gastroenterology, 2014,146(4): 1070 - 1083.
[22] Bancroft WH, Snitbhan R, Scott RM, *et al.* Transmission of hepatitis B virus to gibbons by exposure to human saliva containing hepatitis B surface antigen[J]. J Infect Dis, 1977, 135(1): 79 - 85.
[23] 葛宪民, 陈杰, 黄国勇, 等. 熊猴实验感染人乙型肝炎病毒的研究[J]. 上海实验动物科学, 1989, 9(2):65 - 72.
[24] Kedda MA, Kramvis A, Kew MC, *et al.* Susceptibility of chacma baboons (Papio ursinus orientalis) to infection by hepatitis B virus[J]. Transplantation, 2000, 69(7): 1429 - 1434.
[25] Lanford RE, Chavez D, Brasky KM, *et al.* Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95(10): 5757 - 5761.
[26] Lanford RE, Chavez D, Barrera A, *et al.* An Infectious Clone of Woolly Monkey Hepatitis B Virus[J]. J Virol, 2003, 77(14): 7814 - 7819.
[27] Gheit T, Sekkat S, Cova L, *et al.* Experimental transfection of Macaca sylvanus with cloned human hepatitis B virus[J]. J Gen Virol, 2002, 83(7):1645 - 1649.
[28] Dupinay T, Gheit T, Roques P, *et al.* Discovery of naturally occurring transmissible chronic hepatitis B virus infection among Macaca fascicularis from Mauritius Island[J]. Hepatology, 2013, 58(5): 1610 - 1620.
[29] 王振常, 梁增文, 冷静, 等. 食蟹猴实验感染 HBV 的血清学反应[J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(6):814 - 816.
[30] 卢渝, 张君. 乙型肝炎病毒感染模型的研究进展[J]. 中外医疗, 2009, 27(9):172 - 174.
[31] Guidotti LG, Rochford R, Chung J, *et al.* Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection[J]. Science, 1999, 284(5415): 825 - 829.
[32] Li W, She R, Liu L, *et al.* Prevalence of a virus similar to human hepatitis B virus in swine[J]. Virol J, 2010, 7: 60.
[33] 张博雅, 沈中阳, 宋红丽. 感染乙型肝炎病毒动物模型的建立与应用[J]. 实用器官移植电子杂志, 2014, 2(2):124 - 128.
[34] 曾兴光. 乙肝病毒体内外感染模型的建立及其在乙肝新药药效学评价中的应用[D]. 重庆:第三军医大学, 2010.
[35] 梁亮, 李瑗, 杨春, 等. 用人工繁育的围生期和幼年树鼩感

染人乙型肝炎病毒的初步研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(8):792 - 795.

[36] 杨芳. 新生期树鼩接种人乙型肝炎病毒的长期实验观察[D]. 广西 南宁:广西医科大学, 2009.

[37] 王琦. 新生期树鼩感染人乙型肝炎病毒模型的优化[D]. 广西 南宁:广西医科大学, 2010.

[38] 庞义全,冯悦,夏雪山,等. 病毒性肝炎树鼩动物模型研究与建模策略[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(2):95 - 102.

[39] Wang Q, Schwarzenberger P, Yang F, *et al.* Experimental chronic hepatitis B infection of neonatal tree shrews (Tupaia belangeri chinensis): a model to study molecular causes for susceptibility and disease progression to chronic hepatitis in humans[J]. Virol J, 2012, 9: 170.

[40] Dandri M, Lutgehetmann M, Volz T, *et al.* Small animal model systems for studying hepatitis B virus replication and pathogenesis [J]. Semin Liver Dis, 2006, 26(2): 181 - 191.

[41] Meuleman P, Leroux-Roels G. The human liver-uPASCID mouse: a model for the evaluation of antiviral compounds against HBV and HCV[J]. Antiviral Res, 2008, 80(3): 231 - 238.

[42] Bissig KD, Wieland SF, Tran P, *et al.* Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment[J]. J Clin Invest, 2010, 120(3): 924 - 930.

[43] Lütgehetmann M, Volz T, Köpke A, *et al.* In vivo proliferation of hepadnavirus-infected hepatocytes induces loss of covalently closed circular DNA in mice[J]. Hepatology, 2010, 52(1): 16 - 24.

[44] Dandri M, Petersen J. Chimeric mouse model of hepatitis B virus infection[J]. J Hepatol, 2012, 56(2): 493 - 495.

[45] Lütgehetmann M, Bornscheuer T, Volz T, *et al.* Hepatitis B virus limits response of human hepatocytes to interferon-alpha in chimeric mice [J]. Gastroenterology, 2011, 140(7): 2074 - 2083.

[46] Bility MT, Cheng L, Zhang Z, *et al.* Hepatitis B virus infection and immunopathogenesis in a humanized mouse model: induction of human-specific liver fibrosis and M2-like macrophages [J]. PLoS Pathog, 2014, 10(3):e1004032.

[47] Strick-Marchand H, Dusséaux M, Darche S, *et al.* A novel mouse model for stable engraftment of a human immune system and human hepatocytes [J]. PLoS One, 2015, 10(3):e0119820.

[48] Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference[J]. Hepatology, 2003, 37(4): 764 - 770.

[49] Shlomai A, Shaul Y. RNA interference—small RNAs effectively fight viral hepatitis[J]. Liver Int, 2004, 24(6): 526 - 531.

[50] Zheng Y, Chen WL, Louie SG, *et al.* Hepatitis B virus promotes hepatocarcinogenesis in transgenic mice[J]. Hepatology, 2007, 45(1): 16 - 21.

[51] Yang PL, Althage A, Chung J, *et al.* Hydrodynamic injection of viral DNA: a mouse model of acute hepatitis B virus infection [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(21): 13825 - 13830.

[52] Ketzinel-Gilad M, Zauberman A, Nussbaum O, *et al.* The use of the hydrodynamic HBV animal model to study HBV biology and anti-viral therapy[J]. Hepatol Res, 2006, 34(4): 228 - 237.

[53] Huang LR, Gäbel YA, Graf S, *et al.* Transfer of HBV genomes using low doses of adenovirus vectors leads to persistent infection in immune competent mice[J]. Gastroenterology, 2012, 142(7): 1447 - 1450.

[54] 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]. J Virol, 2001, 75(11): 5108 - 5118.

[55] Zhao T, Li X, Yin W, *et al.* Establishment of an HBV chronic hepatitis B infection mouse model by vivo transduction of HBV cccDNA[J]. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2014, 22(4): 260 - 265.

[56] Chuai X, Wang W, Chen H, *et al.* Lentiviral backbone-based hepatitis B virus replicon-mediated transfer favours the establishment of persistent hepatitis B virus infection in mice after hydrodynamic injection[J]. Antiviral Res, 2014, 101:68 - 74.

[57] 蔡启茵, 任广立, 张卫云, 等. 乙型肝炎病毒感染 Babl/c 乳鼠动物模型的研究[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(5): 815 - 818, 848.

[58] 李军, 刘宏利, 韩 超, 等. 乙型肝炎病毒感染动物模型研究进展[J]. 免疫学杂志, 2014, 30(9):829 - 832.

[59] Menne S, Cote PJ. The woodchuck as an animal model for pathogenesis and therapy of chronic hepatitis B virus infection [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(1): 104 - 124.

[60] Cote PJ, Korba BE, Miller RH, *et al.* Effects of age and viral determinants on chronicity as an outcome of experimental woodchuck hepatitis virus infection[J]. Hepatology, 2000, 31(1): 190 - 200.

[61] 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]. J Med Virol, 2004, 72(3): 406 - 415.

[62] Menne S, Cote PJ. The woodchuck as an animal model for pathogenesis and therapy of chronic hepatitis B virus infection [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(1): 104 - 124.

[63] Le Guerhier F, Thermet A, Guerret S, *et al.* Antiviral effect of adefovir in combination with a DNA vaccine in the duck hepatitis B virus infection model[J]. J Hepatol, 2003, 38(3): 328 - 334.

[64] Zhang YY, Theele DP, Summers J. Age-related differences in amplification of covalently closed circular DNA at early times after duck hepatitis B vieus infection of ducks[J]. J Virol, 2005, 79(15): 9896 - 9903.

[65] 南大航, 潘宁, 张建琼. 乙型肝炎动物模型研究进展[J]. 东南大学学报(医学版), 2012, 31(4):504 - 507.

[66] 郝友华, 李安意, 丁宏晖,等. 不同种雏鸭建立鸭乙肝病毒感染模型及抗病毒效果的实验[J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(11):23 - 26.

〔修回日期〕2016-04-01