

土拨鼠肝炎病毒感染模型在乙型肝炎研究中的应用

艾灵¹, 朱彬¹, 王俊忠¹, 陆蒙古², 杨东亮¹, 王宝菊^{1*}

(1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院感染性疾病科, 武汉 430022; 2. 德国 Duisburg-Essen 大学医院病毒研究所, 德国埃森 D-45122)

【摘要】 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是嗜肝 DNA 病毒的原型, HBV 感染所致的乙型肝炎是严重危害我国人民身体健康的公共卫生问题。现有的抗乙肝药物包括核苷类似物和干扰素均难以达到临床治愈, 研究新的抗乙肝药物、评价新的联合治疗策略均离不开合适的动物模型。土拨鼠肝炎病毒(woodchuck hepatitis virus, WHV)于 1978 年美国费城动物园患肝癌的土拨鼠中首次被发现, 因其基因组结构、复制周期与 HBV 高度近似, 被归类为嗜肝 DNA 病毒。WHV 感染土拨鼠后的自然史与 HBV 感染人高度近似, 因此土拨鼠模型很早就被用于乙肝 DNA 疫苗、抗 HBV 药物的评价。近年来土拨鼠多种细胞因子及其受体、免疫细胞表面标志先后被克隆和鉴定, T 细胞应答的检测方法包括淋巴细胞增殖实验、CD107a 脱颗粒实验逐步被建立, 大大促进了土拨鼠模型在 HBV 发病机制及免疫调节治疗中的应用。本文主要综述了 WHV 感染土拨鼠模型的免疫学特征, 以及该模型在抗乙肝病毒药物评价和免疫调节治疗中的应用。

【关键词】 土拨鼠; 旱獭; 土拨鼠肝炎病毒; 乙型肝炎病毒; 动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 05-0649-07

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2018.05.018

Applications of the woodchuck model of hepatitis virus infection in studies on hepatitis B

AI Ling¹, ZHU Bin¹, WANG Junzhong¹, LU Mengji², YANG Dongliang¹, WANG Baoju^{1*}

(1. Department of Infectious Diseases, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China; 2. Institute of Virology, University of Duisburg-Essen, Essen D-45122, Germany)

Corresponding author: WANG Baoju. E-mail: bjwang73@163.com

【Abstract】 Hepatitis B virus (HBV) is a prototype of hepadnavirus, and hepatitis B caused by HBV infection is a serious public health problem. Using the currently available anti-HBV drugs, including nucleotide analogs and interferon- α , it is difficult to achieve a “clinical cure” endpoint. Thus, new anti-HBV drugs and combination therapy strategies are urgently needed, as are appropriate animal models for preclinical evaluations. Woodchuck hepatitis virus (WHV) was first discovered in woodchucks at the Philadelphia Zoo in the United States in 1978, and has been classified as hepadnavirus due to its comparable genomic structure and replication cycle with HBV. Furthermore, the natural history of WHV infection in woodchucks is highly similar to that of HBV infection in humans; therefore the woodchuck model has been used to evaluate HBV DNA vaccines and anti-HBV drugs for decades. In recent years, many cytokines, their receptors, and other immune

【基金项目】 国家传染病科技重大专项(2008ZX10002011, 2012ZX10004503, 2017ZX10304402-002-005); 国家自然科学基金(81101248, 81371828, 81461130019); 国家国际科技合作计划(2011DFA31030); 国家科技支撑计划课题(2015BAI09B06)。

Funded by the National Science and Technology Major Project for Infectious Diseases of China (2008ZX10002011, 2012ZX10004503, 2017ZX10304402-002-005), the National Natural Science Foundation of China (81101248, 81371828, 81461130019), the International Science & Technology Cooperation Program of China (2011DFA31030), and the Chinese National Key Technology R&D Program (2015BAI09B06).

【作者简介】 艾灵(1992—), 男, 硕士, 研究方向: 乙肝动物模型及乙肝发病机制。Email: m201675438@hust.edu.cn

【通信作者】 王宝菊(1973—), 女, 副教授、副主任医师, 研究方向: 乙肝动物模型及乙肝发病机制。Email: bjwang73@163.com

cell surface markers have been cloned and identified. Additionally, detection method for T cell responses, including lymphocyte proliferation assays and CD107a degranulation assays, have been established and have greatly promoted the woodchuck model for studies of the immune-pathogenesis and immunomodulatory therapy of HBV infection. This review summarizes the immunological features of the WHV-infected woodchuck model and its application for evaluating anti-HBV drugs and immunomodulation therapies.

[Keywords] Marmot; woodchuck; woodchuck hepatitis virus; hepatitis B virus; animal model

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染所致的乙型病毒性肝炎是严重影响人民身体健康的传染性疾病。全世界约有 20 亿人曾感染 HBV, 其中至少 2.4 亿患者为慢性 HBV 感染者, 每年约有 65 万人死于 HBV 感染所致的肝衰竭、肝硬化和原发性肝细胞癌。我国是 HBV 感染的高发区, 虽然乙肝疫苗计划接种成功地将五岁以下幼儿的 HBsAg 携带率降至 1% 以下, 但 HBsAg 的整体携带率仍高达 7.18%, 据此推算我国现有的慢性 HBV 感染者约 9300 万人, 其中慢性乙型肝炎患者约 2000 万例。虽然慢性乙型肝炎及其引发的肝衰竭、肝硬化、肝癌问题仍十分严重, 但因其发病机制不明且现有的抗病毒药物如干扰素和核苷类似物的治疗效果不佳, 乙型肝炎的防控形势仍非常严峻。HBV 相关科研机构及药物研发企业仍在不断探索以期找到更好的 HBV 防控药物或生物制剂, 而这些药物、生物制剂以及一些联合治疗策略的临床前评价均离不开合适的细胞和动物模型。HBV 具有严格的种属特异性, 仅能感染人、黑猩猩和树鼩, 因此与 HBV 同属嗜肝 DNA 病毒家族的土拨鼠肝炎病毒 (woodchuck hepatitis virus, WHV) 以及鸭乙肝病毒 (duck hepatitis B virus, DHBV) 感染的土拨鼠和鸭乙肝模型在乙型肝炎相关研究中应用广泛^[1]。本文主要综述了 WHV 感染土拨鼠模型的免疫学特征, 以及该模型在抗乙肝病毒药物评价和免疫调节治疗中的应用。

1 土拨鼠/旱獭 WHV 感染模型

WHV 的发现可追溯到 19 世纪 80 年代, 它在美国费城动物园患肝癌的东方土拨鼠 (以下均简称土拨鼠) 中首次被发现^[2]。WHV 与 HBV 同属嗜肝 DNA 病毒科正嗜肝 DNA 病毒属, 两者基因结构非常相似, 并在核酸序列和氨基酸水平上具有高度同源性, 其生物学特性和复制过程实际上是基本相同的^[3]。此外土拨鼠 WHV 感染后的血清学和病理学特征类似于人类 HBV 感染, 例如其血清中除检测到

完整病毒颗粒外, 也可检测到由 WHV 表面蛋白组成的杆状和小球形颗粒^[4]。不仅如此, WHV 感染土拨鼠后的自然经过也与人感染 HBV 高度类似。人 HBV 感染后的结局与感染时的年龄明显相关, 成人感染后仅 5%~10% 发生慢性化, 而 90% 的围产期感染后发展为慢性感染。成年土拨鼠 WHV 感染后慢性化率低于 5%, 而幼年土拨鼠 WHV 感染的慢性化率可达 60%~75%^[5]。此外, 土拨鼠急性 WHV 感染被清除后, 其肝脏内仍能检出痕量的 WHV DNA 及残存的炎症反应, 这可能是急性乙肝感染恢复后仍不能完全避免 HCC 发生的原因^[6]。

东方土拨鼠 (Eastern woodchuck) 亦称美洲土拨鼠 (American woodchuck), 是 *Marmota monax* 的俗称, 为松鼠科 (Sciuridae) 旱獭属 (*Marmota*) 动物, 亦可译为美洲旱獭, 分布在美洲大陆, 引入国内非常困难, 特别是 WHV 感染的土拨鼠, 且价格高昂, 在我国广泛应用存在一定局限性。我国西北地区也有旱獭分布, 主要有喜马拉雅旱獭 (*Marmota himalayana*)、灰旱獭 (*Marmota baibacina*) 和长尾旱獭 (*Marmota caudata*) 等。我们研究发现喜马拉雅旱獭 (以下简称旱獭) 对 WHV 高度易感, WHV 感染后第 2~4 周血清中检出 WHsAg、WHV DNA, 第 4~6 周检出 WHcAb, 在第 10 周处死动物采集肝组织样本, 在肝内检出 HBV 复制中间体、WHsAg 和 WHcAg, 其感染经过和成年土拨鼠 WHV 感染过程非常相似^[7]。应用 RNA-seq 技术, 我们比较了土拨鼠和旱獭转录序列同源性, 结果发现 74% 的序列同源性高达 90%~100%, 9.9% 的序列同源性高达 80%~90%, 7.67% 的序列同源性高达 60%~70%, 提示二者转录组序列高度同源^[8]。因此在下文中我们将东方土拨鼠模型和喜马拉雅旱獭模型统称为土拨鼠模型。

2 土拨鼠 WHV 感染后的免疫学特征

越来越多的研究表明抗病毒药物联合免疫调节治疗是实现慢性乙肝临床治愈最有可能的方案。

要将土拨鼠 WHV 感染模型用于免疫调节治疗研究需首先建立土拨鼠免疫学研究手段,以便对该模型 WHV 感染后的免疫学特征进行研究。近年来,多种土拨鼠天然免疫、获得性免疫分子被克隆,病毒特异性 T 细胞应答检测方法的建立,大大促进了土拨鼠模型在乙肝免疫发病机制研究中的应用。

2.1 模式识别受体

模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRR) 是病毒感染启动天然免疫并介导获得性免疫的重要分子。目前多种土拨鼠 PRR 已被成功克隆和进行功能分析,包括 Toll 样受体 (toll-like receptor, TLR) 2、TLR3、TLR4、TLR7、TLR8、TLR9、干扰素 γ 诱导蛋白 16 (gamma-interferon-inducible protein 16, IFI16)、AIM-2 (absent in melanoma 2) 和维甲酸诱导基因 1 (retinoic acid-inducible gene 1, RIG-I)。我们的研究发现 TLR2 的配体可激活 NF- κ B、PI3K/Akt 和部分 MAPK 信号通路,诱导肝细胞产生促炎细胞因子。TLR2 配体刺激诱导的天然免疫应答可降低 HepG2. 2. 15 细胞中 HBV 与土拨鼠原代肝细胞中 WHV 的病毒复制和基因表达水平。土拨鼠 WHV 慢性感染时,外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 和肝组织中 TLR2 的表达水平相对较低,而急性感染或恩替卡韦经治的慢性感染土拨鼠,其 PBMC 中 TLR2 表达水平与 WHV DNA 滴度呈负相关^[9]。上述研究提示肝细胞在嗜肝 DNA 病毒感染 TLR2 介导的抗病毒应答中发挥重要作用,TLR2 信号在急慢性 WHV 感染时的差异或许对慢性乙肝的免疫治疗有参考价值。我们的研究也发现土拨鼠 IFI16 和 AIM2 在 DNA 介导的 IFN- β 和 IL-1 β 的诱导中可能分别起关键作用;IFI16 和 AIM2 转录物在急性 WHV 感染后肝脏和脾脏中上调,而 IFI16 在慢性感染后肝脏中下调,IFI16 的配体 VACV ds 70 mer 体内转染导致 IFI16 和 IFN- β 的上调,提示 IFI16 有可能作为 HBV 治疗的新靶标^[10]。

2.2 细胞因子及其受体

α 干扰素 (interferon α , IFN- α) 被广泛用于慢性乙肝的抗病毒治疗,然而其应答率不高。近年来,关于土拨鼠 IFN- α 的认识越来越深入。有两种亚型的土拨鼠 IFN- α 最早被发现,通过腺病毒载体将 IFN- α 基因导入来自 WHV 慢性感染土拨鼠的原代肝细胞内,可使肝细胞内 WHsAg 呈剂量依赖性降低^[11]。随后 10 个亚型的土拨鼠 IFN- α 和 8 个亚型

的早獭 IFN- α 被发现,二者具有非常高的同源性^[12-13]。在 Poly(I:C) 刺激下,未感染 WHV 的土拨鼠 PBMC 可产生 1、4、5 型 IFN- α ,提示土拨鼠 IFN- α 亚型在 PBMC 呈选择性表达;而慢性 WHV 感染土拨鼠 PBMC 的 IFN- α 产量减少,提示慢性 HBV 感染者的 IFN 应答受损。土拨鼠和早獭 1 型干扰素受体 (IFNAR1/2) 序列已成功鉴定^[14]。在 IFN α / γ 的刺激下,土拨鼠原代肝细胞 IFNAR2 的表达水平显著升高,而慢性感染时 IFNAR1 和 IFNAR2 的表达水平则降低^[15]。用重组的土拨鼠 IFN- α 治疗慢性 WHV 感染土拨鼠 15 周后,通过 RNA-seq 检测肝内转录组学的改变,结果 IFN- α 诱导的抗病毒效应与肝内 IFN 刺激基因的表达没有明显相关性,而与肝内 NK/T 细胞的转录标志相关,提示 IFN- α 诱导的抗病毒效应更多地与 NK/T 细胞介导的细胞杀伤效应和非细胞杀伤效应相关^[16]。

白介素 10 (interleukin 10, IL-10) 是一种重要负向免疫调节分子,通过与其受体 (IL-10R) 结合发挥免疫抑制功效。土拨鼠的 IL-10R 已被克隆,并制备了其特异性多抗,该抗体能在体外使来自慢性 WHV 感染土拨鼠的病毒特异性 T 细胞的增殖和脱颗粒功能明显增强^[17]。

白介素 12 (interleukin 12, IL-12) 在诱导抗病毒细胞免疫应答中发挥重要作用。研究表明肝内注射携带 IL-12 基因的腺病毒载体,仅能在低病毒载量的慢性 WHV 感染土拨鼠中发挥很好的抗病毒效应^[18]。在高病毒载量动物体内不能很好地发挥抗病毒效应可能与 TGF- β 和 Treg 有关,在体外阻断 TGF- β 和敲除 Treg 能恢复 T 细胞对 IL-12 的应答,然而在体内联合 TGF- β 抑制性多肽和敲除 Treg 仍不能发挥很好的抗病毒效应^[19]。

白介素 15 (interleukin 15, IL-15) 在天然和获得性免疫自稳中发挥重要功能。我们克隆了土拨鼠和早獭 IL-15 分子,并发现重组的 IL-15 蛋白能增强活化的小鼠脾细胞及土拨鼠 PBMC 增殖功能,慢性 WHV 感染土拨鼠肝脏内 IL-15 的表达轻度上调^[20]。

2.3 T 细胞应答

已有研究表明,病毒特异性的 T 细胞应答在 HBV 清除中发挥重要作用。T 细胞表面标志是区分 T 细胞亚群的先决条件,且在 T 细胞功能分析中不可或缺。土拨鼠 CD4、CD28、CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、Tim-3、Galectin-9 等 T 细胞表面标志均已克隆鉴定^[21-26]。我们制备的抗土拨鼠 CD4 单克隆

抗体(G2)在体外能有效抑制 ConA 诱导的淋巴细胞增殖,在健康土拨鼠体内能清除 60% CD4⁺ T 细胞,余下的 CD4⁺ T 细胞仍能保持对 ConA 刺激的反应性^[23]。土拨鼠慢性 WHV 感染时 CD8⁺ T 细胞上 PD-1 的表达水平明显升高,且与 WHV 病毒载量呈正相关;恩替卡韦治疗时,随着病毒载量的下降,CD8⁺ T 细胞上 PD-1 表达水平随之下降^[25]。急性慢性 WHV 感染时 PBMC 上 PD-L1 的表达均明显上调,体外阻断 PD-L1 和 PD-L2 能部分上调 WHV 感染土拨鼠 PBMC 的增殖和脱颗粒功能^[26]。

检测病毒特异性 T 细胞功能是将土拨鼠模型用于免疫发病机制和免疫调节治疗的先决条件。最早建立的土拨鼠 T 细胞功能检测方法是基于同位素氚 [³H] 标记的腺嘌呤的淋巴细胞增殖实验,使用 WHV 抗原刺激土拨鼠 PBMC 后用液体闪烁计数器检测被细胞摄取的氚 [³H] 标记的腺嘌呤数量。应用上述方法, Menne 等^[27] 发现 WHV 感染 3 周即可检出强烈的针对 WHsAg、WHcAg 以及 WHcAg 97-110aa 多肽的 T 细胞应答,并在病毒清除期达到高峰。病毒清除 1 年后,病毒特异性 T 细胞应答仅能在 WHV 再次接种后检出。新生土拨鼠接种 WHV 后,清除 WHV 的个体在急性期即可检出强烈且多特异性的病毒特异性细胞免疫应答,而 WHV 持续感染的个体则缺如或应答不足^[28]。随着流式细胞术的发展,基于羧基荧光素二乙酸酯琥珀酰亚胺酯 (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE) 的土拨鼠淋巴细胞增殖流式分析方法随后也被建立^[29]。CD107a 可以作为细胞毒性 T 细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 脱颗粒的标志,可被用于检测抗原特异性的 CTL 应答^[30]。应用建立的 CD107a 脱颗粒流式细胞技术, Frank 等^[31] 发现:急性 WHV 感染的土拨鼠 PBMC,用 WHcAg 96-110aa 多肽刺激后,从病毒复制的高峰期至感染后 15 周均能检出强烈的 CTL 应答;而慢性 WHV 感染土拨鼠则不能检出病毒特异性 CTL 应答。上述研究结果均与在人 HBV 感染及黑猩猩 HBV 感染中的 T 细胞应答高度近似。

3 土拨鼠 WHV 感染模型在抗病毒药物评价中的应用

目前临床上使用的核苷类似物包括拉米夫定 (lamivudine, LAM)、阿德福韦酯 (adefovir, ADV)、恩替卡韦和替诺福韦 (tenofovir, TDF) 均在土拨鼠模型进行了评价。以替诺福韦为例,土拨鼠分别按

每日 0.5、1.5 或 5.0 mg/kg 的剂量用替诺福韦处理 4 周,血清 WHV DNA 水平均显著降低,但血清 WHcAb 和 WHsAb、肝内 WHV RNA 无显著变化^[32]。其中部分动物血清中 WHsAg、肝内 WHV 复制中间体和肝内 WHV 抗原表达也出现一过性降低^[32]。联合抗病毒治疗是 HIV 感染的标准治疗方案,联合抗病毒治疗能否在 HBV 治疗中取得更好的治疗效果及其安全性在 TDF 上市之初就在土拨鼠模型中进行了评价。该研究发现 ADV 和 LAM 联用、TDF 和恩曲他滨 (emtricitabine, FTC) 联用 24 周,能显著降低土拨鼠 WHV 病毒血症水平,上述四种药物单独和联用 48 周均未见明显的生理、生化及血液学异常^[33]。为验证新药在土拨鼠模型抗 WHV 疗效能否预测该药在慢性乙肝患者中抗 HBV 的疗效,研究者在 LAM 上市之初就进行了下面的研究。四种当时已在临床上使用的抗病毒药物阿糖腺苷、病毒唑、LAM 和泛昔洛韦在土拨鼠模型中抗 WHV 的疗效与慢性乙肝患者抗 HBV 临床研究中的疗效类似,均可降低 WHV 病毒血症和肝内 WHV DNA 复制水平^[34]。和慢性乙肝患者的临床研究结果类似,齐多夫定对 WHV 的复制无影响。这进一步说明 WHV 慢性感染的土拨鼠模型可以作为慢乙肝抗病毒治疗药物的精准研究模型。

除核苷类似物外,土拨鼠模型最近也被用于 TLR7 刺激剂 GS-9620 的临床前研究^[35]。研究发现 GS-9620 可快速、显著且持续降低土拨鼠血清 WHV DNA、肝内 WHV DNA 复制中间体、肝内 WHV cccDNA 和 WHV RNA 水平,使血清 WHsAg 水平低于检测下限。GS-9620 还可诱导部分土拨鼠对 WHsAg 产生持续的抗体应答,在持续低病毒载量的土拨鼠中显著降低肝癌的发生率^[35]。上述研究提示 TLR7 激动剂 GS-9620 的短期使用可诱导 WHV 慢性感染的土拨鼠产生持续的抗病毒应答,有可能在慢性乙肝患者中实现功能性治愈。

虽然土拨鼠模型在核苷类似物及 TLR7 激动剂中的研究结果能够很好地预测这些药物在慢性乙肝患者中的抗 HBV 疗效,然而最近的研究也有不同发现。核酸聚合物 (nucleic acid polymers, NAP) 被发现可阻断 HBV 感染肝细胞中 HBsAg 的释放。NAP 可清除 DHBV 感染时的血清 DHBsAg,并显著降低甚至清除人 HBV 慢性感染或 HBV/HDV 重叠感染时的 HBsAg。虽然在土拨鼠和小鼠肝内均能检出两种 NAP REP 2139 和 REP 2055 的聚集,然而上

述两种 NAP 在 WHV 感染土拨鼠、HBV 感染 SCID-Hu 小鼠及 HBV 转基因小鼠中均未能检出很好的抗 WHV 或抗 HBV 效应。推测可能是啮齿类动物肝细胞中表面抗原颗粒的装配及分泌不同于人 HBV 和鸭 DHBV^[36]。

4 土拨鼠 WHV 感染模型在免疫调节治疗中的应用

病毒特异性的 T 细胞应答在 HBV 清除中发挥重要作用,其功能缺失是 HBV 感染持续的根本原因。核苷类似物治疗只能暂时恢复 HBV 特异性的 CTL 功能^[37]。与此类似,土拨鼠 WHV 慢性感染时,恩替卡韦治疗也只能诱导短期的 CTL 应答^[25]。因此抗病毒治疗联合免疫调节治疗可能是实现慢性乙肝临床治愈最有可能的方案。

表达 WHV 核心抗原的 DNA 疫苗初次免疫和腺病毒疫苗增强免疫在小鼠和土拨鼠中均能诱导强烈的 CD8⁺ T 细胞应答。将其与恩替卡韦联合使用后,可使 WHV 慢性感染的土拨鼠产生 WHsAg 和 WHcAg 特异性 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞应答,且持久抑制 WHV 复制,维持低水平 WHsAg。其中 4 只土拨鼠中有两只在恩替卡韦停药后仍维持 WHsAg 的血清学转换^[38]。上述研究结果提示抗病毒治疗联合 DNA 疫苗初次免疫-腺病毒疫苗增强免疫的新方案有可能成为慢性乙肝治疗的新方案。

乙肝疫苗需冷链保存,在偏远农村地区的普及难度较大,且乙肝疫苗仍存在血源性病原感染的风险。最近我们也在土拨鼠模型中评价了抗病毒药物联合疫苗免疫在 HBV 暴露后预防中的价值。我们发现恩替卡韦单药或联用 DNA 疫苗,可使土拨鼠在大剂量 WHV 接种后不出现病毒血症,部分或全部动物产生了保护性免疫可以抵抗 WHV 的再次感染^[39]。基于上述研究,我们提出核苷类似物单独使用或联合乙肝疫苗可能是 HBV 暴露后预防的替代方案,特别是对发展中国家的偏远农村地区居民、乙肝疫苗无应答者的职业或非职业 HBV 暴露后预防将大有裨益。

AIC649 可直接作用于宿主免疫防御系统的抗原提呈细胞,调节细胞因子的释放和活化 T 细胞的应答。AIC649 对 HBV 转基因小鼠可产生等同于替诺福韦的抗病毒效应。有趣的是 AIC649 治疗在 WHV 慢性感染的土拨鼠产生双向治疗应答,WHV DNA 和 WHsAg 在治疗初期升高,随后则显著降低直至治疗结束后,这可能与 AIC649 重建 WHV 特异

性免疫应答相关^[40]。

慢性病毒感染中 PD-1/PD-L1 的相互作用对 T 细胞功能耗竭至关重要,阻断 PD-1/PD-L1 的相互作用可部分恢复 T 细胞功能。慢性乙肝患者和慢性 WHV 感染土拨鼠中病毒特异性 T 细胞上的 PD-1 表达上调,体外阻断 PD-1/PD-L1 的相互作用可部分恢复 T 细胞功能。无论在慢性乙肝患者还是 WHV 慢性感染的土拨鼠,恩替卡韦治疗均能降低 PD-1 的表达。因此抗病毒药物联合 PD-1/PD-L1 阻断有可能较单用抗病毒药物获得更好的疗效。最近的一项研究发现:在自然感染所致的 WHV 慢性感染土拨鼠中,PD-L1 抗体和恩替卡韦联用比恩替卡韦单药治疗能更好地实现病毒血症和 WHsAg 的控制,然而仅在少数土拨鼠中实现上述疗效^[41]。我们最近还测试了抗病毒药物、DNA 疫苗联合 PD-1/PD-L1 阻断的联合免疫治疗策略。我们发现 PD-1 抗体、DNA 疫苗联合恩替卡韦,可协同增强病毒特异性 T 细胞的功能,诱导部分土拨鼠实现病毒清除和 WHsAg 血清学转换^[25]。这些研究结果为慢性乙肝的免疫调节治疗策略设计提供了新的可能。

总之,由于 WHV 和 HBV 在基因组结构、生物学特性、复制周期、感染后的自然经过及免疫学特征均与 HBV 高度近似,因而土拨鼠 WHV 感染模型在抗病毒药物评价方面有较高的应用价值,且已被广泛应用。随着该模型免疫学特征的阐明及免疫学检测方法的完善,其在免疫调节治疗策略及联合治疗策略评估中的应用价值也大大提高。得益于深度测序技术的进展,随着土拨鼠模型转录组学数据的逐步丰富,该模型在生物医药中的应用也将进一步拓宽。然而,仍需注意到啮齿动物和人、WHV 和 HBV 尚存在一定的差异,因此在评价来自土拨鼠模型的研究结果时仍需谨慎。

参 考 文 献 (References)

- [1] Guo WN, Zhu B, Ai L, et al. Animal models for the study of hepatitis B virus infection [J]. Zool Res, 2018, 39(1): 25-31.
- [2] Summers J, Smolec JM, Snyder R. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978, 75(9): 4533-4537.
- [3] Tennant BC, Gerin JL. The woodchuck model of hepatitis B virus infection [J]. ILAR J, 2001, 42(2): 89-102.
- [4] Ganem D, Varmus HE. The molecular biology of the hepatitis B viruses [J]. Annu Rev Biochem, 1987, 56: 651-693.
- [5] 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.
- [6] Michalak TI, Pardoe IU, Coffin CS, et al. Occult lifelong persistence of infectious hepadnavirus and residual liver inflammation in woodchucks convalescent from acute viral hepatitis [J]. *Hepatology*, 1999, 29(3): 928–938.
 - [7] Wang BJ, Tian YJ, Meng ZJ, et al. Establishing a new animal model for hepadnaviral infection; susceptibility of Chinese *Marmota-species* to woodchuck hepatitis virus infection [J]. *J Gen Virol*, 2011, 92(Pt 3): 681–691.
 - [8] Liu Y, Wang B, Wang L, et al. Transcriptome analysis and comparison of *Marmota monax* and *Marmota himalayana* [J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0165875.
 - [9] Zhang X, Ma Z, Liu H, et al. Role of Toll-like receptor 2 in the immune response against hepadnaviral infection [J]. *J Hepatol*, 2012, 57(3): 522–528.
 - [10] Yan Q, Li M, Liu Q, et al. Molecular characterization of woodchuck IFI16 and AIM2 and their expression in woodchucks infected with woodchuck hepatitis virus (WHV) [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 28776.
 - [11] Salucci V, Lu M, Aurisicchio L, et al. Expression of a new woodchuck IFN- α gene by a helper-dependent adenoviral vector in woodchuck hepatitis virus-infected primary hepatocytes [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2002, 22(10): 1027–1034.
 - [12] Lu Y, Xu Y, Yang D, et al. Molecular characterization of woodchuck type I interferons and their expression by woodchuck peripheral blood lymphocytes [J]. *Cytokine*, 2008, 41(2): 127–135.
 - [13] Lu Y, Wang B, Huang H, et al. The interferon- α gene family of *Marmota himalayana*, a Chinese marmot species with susceptibility to woodchuck hepatitis virus infection [J]. *Dev Comp Immunol*, 2008, 32(4): 445–457.
 - [14] Fan H, Zhu Z, Wang Y, et al. Molecular characterization of the type I IFN receptor in two woodchuck species and detection of its expression in liver samples from woodchucks infected with woodchuck hepatitis virus (WHV) [J]. *Cytokine*, 2012, 60(1): 179–185.
 - [15] Kosinska AD, Liu J, Lu M, et al. Therapeutic vaccination and immunomodulation in the treatment of chronic hepatitis B; preclinical studies in the woodchuck [J]. *Med Microbiol Immunol*, 2015, 204(1): 103–114.
 - [16] Fletcher SP, Chin DJ, Gruenbaum L, et al. Intrahepatic transcriptional signature associated with response to interferon- α treatment in the woodchuck model of chronic hepatitis B [J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11(9): e1005103.
 - [17] Jiang M, Liu J, Zhang E, et al. Molecular characterization of woodchuck interleukin – 10 receptor and enhanced function of specific T cells from chronically infected woodchucks following its blockade [J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2012, 35(6): 563–573.
 - [18] Crettaz J, Otano I, Ochoa-Callejero L, et al. Treatment of chronic viral hepatitis in woodchucks by prolonged intrahepatic expression of interleukin – 12 [J]. *J Virol*, 2009, 83(6): 2663–2674.
 - [19] Otano I, Suarez L, Dotor J, et al. Modulation of regulatory T-cell activity in combination with interleukin – 12 increases hepatic tolerogenicity in woodchucks with chronic hepatitis B [J]. *Hepatology*, 2012, 56(2): 474–483.
 - [20] Wang B, Lohrengel B, Lu Y, et al. Molecular characterization of woodchuck interleukin 15 (wIL – 15) and detection of its expression in liver samples of woodchucks infected with woodchuck hepatitis virus (WHV) [J]. *Cytokine*, 2005, 32(6): 296–303.
 - [21] Yang D, Roggendorf M, Lu M. Molecular characterization of CD28 and cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA – 4) of woodchuck (*Marmota monax*) [J]. *Tissue Antigens*, 2003, 62(3): 225–232.
 - [22] Liu Y, Wang J, Wang L, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of Tim – 3 and Galectin – 9 in the woodchuck model [J]. *Mol Immunol*, 2017, 83: 127–136.
 - [23] Yang Y, Zhang X, Zhang C, et al. Molecular characterization of woodchuck CD4 (wCD4) and production of a depletion monoclonal antibody against wCD4 [J]. *Mol Immunol*, 2013, 56(1–2): 64–71.
 - [24] Yang Y, Wang B, Yang D, et al. Prokaryotic expression of woodchuck cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (wCTLA – 4) and preparation of polyclonal antibody to wCTLA – 4 [J]. *Protein Expr Purif*, 2012, 81(2): 181–185.
 - [25] Liu J, Zhang E, Ma Z, et al. Enhancing virus-specific immunity in vivo by combining therapeutic vaccination and PD-L1 blockade in chronic hepadnaviral infection [J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(1): e1003856.
 - [26] Zhang E, Zhang X, Liu J, et al. The expression of PD – 1 ligands and their involvement in regulation of T cell functions in acute and chronic woodchuck hepatitis virus infection [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26196.
 - [27] Menne S, Maschke J, Lu M, et al. T-Cell response to woodchuck hepatitis virus (WHV) antigens during acute self-limited WHV infection and convalescence and after viral challenge [J]. *J Virol*, 1998, 72(7): 6083–6091.
 - [28] Menne S, Roneker CA, Roggendorf M, et al. Deficiencies in the acute-phase cell-mediated immune response to viral antigens are associated with development of chronic woodchuck hepatitis virus infection following neonatal inoculation [J]. *J Virol*, 2002, 76(4): 1769–1780.
 - [29] Gujar SA, Michalak TI. Flow cytometric quantification of T cell proliferation and division kinetics in woodchuck model of hepatitis B [J]. *Immunol Invest*, 2005, 34(2): 215–236.
 - [30] Betts MR, Brenchley JM, Price DA, et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation [J]. *J Immunol Methods*, 2003, 281(1–2): 65–78.
 - [31] Frank I, Budde C, Fiedler M, et al. Acute resolving woodchuck

- hepatitis virus (WHV) infection is associated with a strong cytotoxic T-lymphocyte response to a single WHV core peptide [J]. J Virol, 2007, 81(13): 7156–7163.
- [32] Menne S, Cote PJ, Korba BE, et al. Antiviral effect of oral administration of tenofovir disoproxil fumarate in woodchucks with chronic woodchuck hepatitis virus infection [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(7): 2720–2728.
- [33] Menne S, Butler SD, George AL, et al. Antiviral effects of lamivudine, emtricitabine, adefovir dipivoxil, and tenofovir disoproxil fumarate administered orally alone and in combination to woodchucks with chronic woodchuck hepatitis virus infection [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(10): 3617–3632.
- [34] Korba BE, Cote P, Hornbuckle W, et al. Treatment of chronic woodchuck hepatitis virus infection in the Eastern woodchuck (*Marmota monax*) with nucleoside analogues is predictive of therapy for chronic hepatitis B virus infection in humans [J]. Hepatology, 2000, 31(5): 1165–1175.
- [35] Menne S, Tumas DB, Liu KH, et al. Sustained efficacy and seroconversion with the Toll-like receptor 7 agonist GS-9620 in the Woodchuck model of chronic hepatitis B [J]. J Hepatol, 2015, 62(6): 1237–1245.
- [36] Schoneweis K, Motter N, Roppert PL, et al. Activity of nucleic acid polymers in rodent models of HBV infection [J]. Antiviral Res, 2018, 149: 26–33.
- [37] Boni C, Penna A, Bertolotti A, et al. Transient restoration of anti-viral T cell responses induced by lamivudine therapy in chronic hepatitis B [J]. J Hepatol, 2003, 39(4): 595–605.
- [38] Kosinska AD, Zhang E, Jorhden L, et al. Combination of DNA prime-adenovirus boost immunization with entecavir elicits sustained control of chronic hepatitis B in the woodchuck model [J]. PLoS Pathog, 2013, 9(6): e1003391.
- [39] Wang B, Zhu Z, Zhu B, et al. Nucleoside analogues alone or combined with vaccination prevent hepatitis B virus viremia and induce protective immunity: alternative strategy for hepatitis B virus post-exposure prophylaxis [J]. Antiviral Res, 2014, 105: 118–125.
- [40] Paulsen D, Weber O, Ruebsamen-Schaeff H, et al. AIC649 induces a bi-phasic treatment response in the woodchuck model of chronic hepatitis B [J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0144383.
- [41] Balsitis S, Gali V, Mason PJ, et al. Safety and efficacy of anti-PD-L1 therapy in the woodchuck model of HBV infection [J]. PLoS One, 2018, 13(2): e0190058.

[收稿日期] 2018-06-25

会议

AMEM 首届编委会成立大会隆重召开

金秋十月,丹桂飘香。2018 年 10 月 10 日 9:00, *Animal Models and Experimental Medicine*(AMEM) 创刊会暨首届编委会成立大会在青岛隆重召开。

AMEM 由中国科学技术协会主管,由中国实验动物学会和中国医学科学院医学实验动物研究所主办,以国际著名学术出版商 Wiley 为出版平台,于今年 3 月正式创刊,目前已正式出版 2 期,第 3 期已在线出版 7 篇论文。AMEM 成长的每一步足迹都离不开主编和各位编委的倾力支持,此次创刊会的成功举办,对 AMEM 的发展壮大具有里程碑式的意义。

此次创刊会,由来自中国农业大学动物科技学院的王军军教授和来自 University of Illinois College of Medicine 的王克维教授主持,由中国实验动物学会副理事长赵德明教授致开幕词。会议首先由 AMEM 主编、中国实验动物学会理事长秦川教授对编委会组成情况和期刊发展目标进行介绍,明确了 2019 年的工作重点,对 AMEM 未来的发展寄予厚望。随后,编辑部李继平主任对期刊的创办过程和发展现状进行了展示,在看到 AMEM 取得喜人成绩的同时,希望各位编委能够严格把控稿件质量,缩短审稿时滞,推动 AMEM 战胜更多挑战,取得更长远的发展。此外,来自 Wiley 出版商的 Tina 女士对 Wiley 出版平台及如何提高期刊的国际影响力进行了介绍。

此次创刊会上,各位编委就期刊运转过程中存在的问题展开了热烈的讨论,从多个角度和不同专业背景出谋划策,为 AMEM 的发展及其国际影响力的提升提供了诸多宝贵的意见和建议。AMEM 是一本高质量的国际化开放获取期刊,也是中国唯一一本体现实验动物科学及相关领域多学科交叉的英文期刊,它的创办,将实现多学科的交叉融合,有利于相关领域的科研人员及时掌握研究热点、学科信息与相关行业脉动。目前,AMEM 已被国际著名开放存取期刊目录数据库 DOAJ 以及中国专业的学术数据库万方数据库收录,在此基础上,AMEM 进一步扩大国际影响力将指日可待。

两刊编辑部 供稿