

郑海香,丁明珠,张雨琪,等. 乙肝病毒相关肝细胞癌小鼠模型的构建和前沿应用现状[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 837-844.

Zheng HX, Ding MZ, Zhang YQ, et al. Research progress of the mouse model of HBV-related hepatocellular carcinoma [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 837-844.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.015

乙肝病毒相关肝细胞癌小鼠模型的构建和前沿应用现状

郑海香,丁明珠,张雨琪,施佳健,张璐,景月娥,王星*

(福建医科大学基础医学院消化道恶性肿瘤教育部重点实验室,福州 350108)

【摘要】 病毒感染可引起世界范围内 12% 左右癌症的发生,每年约有 130 万例患者死亡。目前一个重要的瓶颈问题就是所有类型的肿瘤病毒均缺乏可广泛使用的体内研究模型。肝癌是全球第四大癌症相关死亡原因,其中肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)占 80%,是最常见的类型。乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)相关的 HCC 在我国尤为严重,占据所有病例的 60% 以上。慢性 HBV 感染是发生肝癌最重要的危险因素,但目前对此类患者仍缺乏有效治愈手段。因此,明确 HBV 与宿主的互作方式及其致癌机制是制定临床治疗策略的前提。近几十年来,HBV 病毒相关肝癌小鼠模型的建立和应用得以不断发展,伴随精准医学的进步出现了更多复杂的新模型和大量研究成果。本综述回顾分析现有基因工程小鼠和人源化小鼠在此类模型的构建方法等方面的特点,并进一步总结需应用于研究病毒致癌机制时应特别注意的适用范围或优缺点。

【关键词】 乙型肝炎病毒;肝细胞癌;小鼠模型;肿瘤病毒;致癌

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 06-0837-08

Research progress of the mouse model of HBV-related hepatocellular carcinoma

ZHENG Haixiang, DING Mingzhu, ZHANG Yuqi, SHI Jiajian, ZHANG Lu, JING Yuee, WANG Xing*

(Key Laboratory of Gastrointestinal Malignant Tumor of Ministry of Education,
Basic Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China)

Corresponding author: WANG Xing. E-mail: xwang@ips.ac.cn

【Abstract】 Viral infections cause approximately 12% of cancers worldwide and approximately 1.3 million cancer-related deaths each year. However, representative *in vivo* models for all types of tumor viruses are lacking. Liver cancer is the fourth leading cause of cancer-related death in the world, and hepatocellular carcinoma (HCC) accounts for 80% of all liver cancer cases. Hepatitis B virus (HBV)-associated HCC is particularly a public health issue in China, which consists of more than 60% of domestic patients. Chronic HBV infection is the critical etiological factor for liver cancer. However, curable treatments for these patients are still lacking. The prerequisite for developing effective cancer drugs for HBV-associated HCC is to disrupt the mechanism of HBV interaction with the host. The mouse model of HBV-induced liver cancer has been remarkably advanced in recent decades, and multiple novel models have been developed by precision medicine. This review comprehensively summarizes the viral and oncogenic properties of *in vivo* models of HBV-induced

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81873966),病毒学国家重点实验室开放课题(2020KF007),福建医科大学高层次人才启动项目(XRCZX2019016)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(81873966), State Key Laboratory of Virology(2020KF007), Fujian Medical University(XRCZX2019016).

【作者简介】 郑海香(1998—),女,本科生,研究方向:病原生物学。Email: 1050833519@qq.com

【通信作者】 王星(1976—),女,博士,研究员,研究方向:肿瘤病毒学及其致病机制研究。Email: xwang@ips.ac.cn

HCC, with a focus on genetically engineered mouse and humanized mouse models. In addition, we discuss the benefits and caveats of each model and present a selection of the most important findings obtained from the respective systems.

[Keywords] hepatitis B virus; hepatocellular carcinoma; mouse model; tumor virus; oncogenesis

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

全球每年约有 200 万新发癌症病例与感染相关,占全年新发癌症病例的 15.4%。感染相关肿瘤在中国占比约为 26.1%,居亚洲之首,积极预防病原体的感染对减轻未来全球癌症负担将产生重大的积极意义^[1]。致癌病原体中涵盖了目前公认的 7 种人类肿瘤病毒:HBV、丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)、EB 病毒(epstein-barr virus, EBV)、人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)、人类 T 淋巴细胞白血病毒 I 型(human T lymphocytic leukemia virus type I, HTLV-1)、卡波西肉瘤相关疱疹病毒(kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV)和最新的 Merkel 细胞多瘤病毒(Merkel cell polyomavirus, MCPyV),HBV 是其中临床危害最严重的 DNA 肿瘤病毒^[2]。在我国,HBV 或 HCV 介导的肝炎、肝纤维化和肝硬化是导致肝癌发生的根本原因之一,其中 HBV 相关的 HCC 占据所有病例的 60% 以上^[3]。尽管人们对病毒相关肝癌的临床表现和干预手段已经有了相当深入的认识,但 HBV 致癌的具体机制仍不是十分清楚,一个重要的限速步骤就是缺乏感染背景下的致癌动物模型。目前最为广泛使用的 HBV 相关肝癌动物模型主要集中于模式化小鼠。主要是在联合致癌剂、细胞癌基因或单独使用组织特异性启动子情况下,观察转基因小鼠中病毒癌基因对相应表型的诱导能力,或使用 HBV 阳性的肿瘤细胞系或者肝癌组织移植到免疫缺陷小鼠身上复制出相关表型。HBV 肝癌小鼠不同模型间的功能侧重和适用范围差异巨大,本综述拟详尽梳理并比较它们之间的病毒感染复制特点及致癌特性,以期研究者选择正确的模型开展靶向药物或疫苗研究提供参考。

1 基于基因工程的肝癌小鼠模型

1.1 基于 HBx 转基因小鼠的肝癌模型(HBx transgenic mice, HBx-Tg)

在 HBV 编码的分子中,x 蛋白在 HCC 的发生发展中起着关键的作用,被认为是主要的病毒癌蛋白。HBx 蛋白作为病毒基因转录的反式激活因子,被证实可广泛与细胞增殖和存活的关键信号通路互作,导致肝细胞癌的发生^[4]。早在 1991 年,研究

人员就在病毒自身元件调控作用下将 HBx 基因插入小鼠的基因组中建立了单个病毒基因的转基因小鼠模型。然后观察到该小鼠肝中出现多灶性区域病变,继以良性腺瘤后发展为恶性肿瘤^[5]。同时,84% 的 HBx 高表达小鼠被发现于 13~24 个月内发生 HCC。HBx-Tg 被认为是研究 x 蛋白在病毒基因表达调控从而致瘤的分子机制以及临床前药物筛查的良好模型。

但许多报道指出最初建立的 HBx 转基因小鼠具有如下缺陷:(1)小鼠模型技术要求高、制备周期长。一般在 13~24 个月产生肝恶性肿瘤,饲养时间长,成本高。(2)肝癌发病率不稳定且受到小鼠性别差异的影响。为弥补此类缺陷,研究人员常将病毒 HBx 基因与细胞癌基因如 c-Myc、c-Met 等联合转基因,或与传统的化学诱导方法相结合,以快速制备 HBV-HCC 小鼠模型并评价病毒-宿主互作在肿瘤发生中的功能机制^[6]。

此外,近年来新出现的一种简单的肝特异性转基因方法明显缩短了小鼠模型建立的时间,简化了相应的技术。该方法通过采用 Sleeping Beauty(SB)转座酶系统和基于流体动力学的转染(hydrodynamic transfection, HT)方法来创建 HBx-转基因模型。SB 转座子是一种高效稳定的基因转移工具,它能通过“剪切-粘贴”的方式将外源目的基因整合入宿主细胞基因组中^[7](图 1)。以 SB 转座子作为递送系统,通过流体动力尾静脉注射将 HBx 基因整合入 Fah^{-/-}/Rag2^{-/-}/Il2r γ ^{-/-}(FRG)小鼠的肝细胞中。流体动力传递的过程诱导了肝炎症,随后携带 HBx 转基因的肝细胞进行选择性的再繁殖,由此证实了单个 HBx 突变可以诱导肝细胞增殖^[8]。HT 模型造模时间短是其优势之一,但两个明显的缺点在于:编码癌基因的转座子随机整合到染色体中,会影响整合位点或附近的细胞基因表达。其次,转座子中的癌基因通常被置于强启动子的控制之下,因此导致基因以极高的水平表达,不符合人体正常生理机制^[9]。

针对 HBx 转基因小鼠模型的研究发展迅速,其应用也较为广泛。虽然 HBx-Tg 的建模成功率高且表型显著,但其局限性在于小鼠发生肿瘤之后进展

过快,这与人类肝癌的缓慢演变大不相同。第二,小鼠肿瘤往往过于同质,无法正确反映人类肝癌的复杂性。特别是 HBx-Tg 仅能体现过表达 x 基因后对肝癌的促进作用,无法反映出完整病毒在自然感染状态下的致癌效应。

1.2 基于 HBs 转基因小鼠的肝癌模型 (HBs transgenic mice, HBs-Tg)

HBV S 基因所编码的表面抗原蛋白 (HBsAg) 也被认为起到促瘤发生的作用。上个世纪末期,已有报道提示年龄为 14~16 个月的近半数 HBs 转基因小鼠中可检测到自发形成的 HCC^[10]。最近,研究者通过纳入 CRISPR/Cas9 技术靶向 HBV 的 preS1/preS2 和 S 编码序列,特异性敲除肝癌细胞系中的 HBsAg,功能上进一步证实 HBsAg 所介导的细胞体外增殖和体内成瘤能力被显著抑制。机制上则阐明 HBsAg 缺失可导致炎症通路关键分子白介素 IL-6 表达量降低,并抑制下游 STAT3 的信号转导与活化,提示 HBsAg 参与促发炎症是其可能的致癌机制之一^[11]。

HBs-Tg 在自然状态下持续表达 HBsAg 并表现出系统对该抗原的免疫耐受,因此,常应用于研究病毒相关肿瘤的适应性免疫反应。据此,Zong 等^[12]通过阻断 HBs-Tg 小鼠的免疫检查点受体分子 TIGIT (T cell immunoglobulin and ITIM domain),同时持续接种乙肝疫苗,观察到这种联合处理所引起的过度免疫反应可诱导肝癌发生。肝癌在 9 个月龄转基因小鼠中的发生率可达 63.64%,由此建立了新的 HBV 抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 介导的病毒相关肝癌动物模型。值得注意的是,上述结果提示在 HBV 携带者中开展免疫检查点治疗,可能增加慢性肝炎和癌症的发生风险。此外,还有研究人员在免疫系统完全的 Fah^{-/-}小鼠肝中通过脾注射转移 HBs-Tg 小鼠的肝细胞,同样证实了病毒特异性 T 细胞的活化是诱导小鼠发生肝癌的关键因素。该模型在 6 个月时的肿瘤发生率为 100%,较强的免疫能力使其成为研究抗 HBV 适应性免疫和免疫病理学的有效工具^[13]。而最近一项研究提示,除了细胞杀伤性 T 细胞外,自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK cell) 被激活亦利于 HBs-Tg 小鼠发生肝癌。在该模型小鼠中连续 8 周使用自然杀伤细胞激活剂后,下游激活的 IFN- γ 效应分子可通过上调 EpCAM-EMT 信号轴使得全部小鼠在 6 个月后均发生肝癌^[14]。

现有研究成果表明 HBs-Tg 转基因小鼠是研究病毒相关 HCC 的免疫机制和免疫相关疗法的较佳模型。但 HBs-Tg 与 HBx-Tg 小鼠具有同样缺点,即均为单个病毒基因的转基因模型,并且往往需要联合其他化学或物理方法进行协同干预,才能快速获得符合研究需要的肝癌表型。

1.3 基于 HBV 基因组转染小鼠的肝癌模型 (HBV transgenic mice, HBV-Tg)

小鼠肝细胞被证实是可以支持 HBV 的复制与增殖,但不支持病毒自然感染和形成 HBV cccDNA^[15]。2011 年,Huang 等^[16]应用腺病毒相关病毒 (adenovirus-associated virus, AAV) 作为病毒载体,研究 HBV 在免疫完全小鼠中持续表达是否可导致 HCC。通过静脉注射 AAV 荷载的 HBV 基因组至 C57BL/6 小鼠中,发现所有转染小鼠在持续 12~16 个月后均出现肝肿瘤结节,后续组织病理学分析提示 HCC 发生率为 83%。邻近的癌旁组织也呈现炎症浸润、脂肪变性和局灶性坏死等组织学异常。目前该模型已被广泛用于揭示 HBV 病毒复制和病毒抗原持续表达对肝癌发生发展的影响 (图 1)。

CRISPR/Cas9 基因组编辑工具的出现克服了腺病毒作为载体的 HBV-Tg 小鼠中造模周期长的缺点。CRISPR/Cas9 系统是一种可以对特定基因组位点进行切割置换的系统^[17]。研究者们利用此系统靶向敲除肝癌中关键的细胞抑癌基因,作为辅助手段加速建模过程并研究 HBV 与宿主分子互作的致癌机理。但是近年更多是作为新型干预治疗手段尝试性地用于清除 HBV 病毒蛋白或基因组,研究对于 HBV 持续感染关键分子 cccDNA 的表达、慢性炎症乃至肝癌的抑制作用。文献报道,通过 CRISPR/Cas9 系统向成年 C57-HBV-Tg 小鼠肝中同时引入 p53 和 Pten 突变,可加速发生肝癌,最早可提前至注射后 4 个月。荷瘤小鼠的血清甲胎蛋白、谷丙转氨酶和 HBsAg 水平显著高于对照质粒组和野生型组^[18]。HBV 慢性感染的一个治疗难点即为患者肝细胞中 HBV cccDNA 高度稳定并难以清除,使得肝和血清中持续表达病毒相关分子,它是 HBV 体内复制和再复发的根本原因,因此是预防继发恶性肝病的关键靶点^[19]。Greggi 等^[20]、Ramanan 等^[21]在高压尾静脉注射 HBV 1.3 拷贝的质粒所建立的基因组转染小鼠模型中,同时转导可靶向于 HBV 各基因型间保守序列的 24 个向导 sgRNA,结果显示病毒表达与复制及 cccDNA 水平全部被明显抑制,提示

CRISPR/Cas9 可用于体内模型研究病毒复制。但现有数据未提示其在病毒相关肝炎、肝硬化乃至肝癌的三部曲演进过程中的作用,值得长期关注。尽管目前的 CRISPR/Cas9 系统已具有强大的靶向性能,但原始的切割式基因编辑方式可能同时诱导细胞基因组双链断裂从而引发重排和损伤。与传统技术不同,最新发展出的 CRISPR/Cas9 通过联合使用部分失活的 Cas9 内切酶以及 APOBEC 脱氨酶,可精准引发 C-T/G-A 的碱基转换,但同时避免 HBV 整合位点的宿主基因断裂。在充分抑制 HBV 基因组的同时保护细胞中不出现脱靶突变。CRISPR/Cas9 系统可精准靶向病毒基因组的特性,使其成为将来可能彻底治愈慢性 HBV 感染和其他肝病的有效办法^[22]。作为病毒学领域的热点技术,CRISPR/Cas9 干预病毒的功能效应研究目前主要在体外系统中展开,因此需要纳入更多类型体内模型予以精准评价^[23]。

与单个基因过表达的 HBV 转基因小鼠相比, AAV/HBV-Tg 小鼠具有易于操作、结果稳定、重现性好的优点。它是在完全免疫小鼠中模拟病毒和宿主互作过程,因此是进一步研究 HBV 介导慢性肝病和肝癌发生的分子机制的有效工具。

2 基于异种移植或嵌合的 HBV 肝癌小鼠模型

2.1 应用标准化人肝癌细胞系的小鼠模型 (cell line-derived Xenograft, CDX 模型)

目前用于制备人鼠肝嵌合模型的 HBV 阳性的标准化肝癌细胞系有: HCC LM3 细胞、Hep3B 细胞、MHCC97H 细胞、HepG2. 2. 15 细胞、HepAD38 等。为成功制备 CDX 模型,必须满足两个条件: (1)受体小鼠对异种移植物具备可容纳性,不会产生免疫排斥或其他严重不良反应; (2)该细胞系在

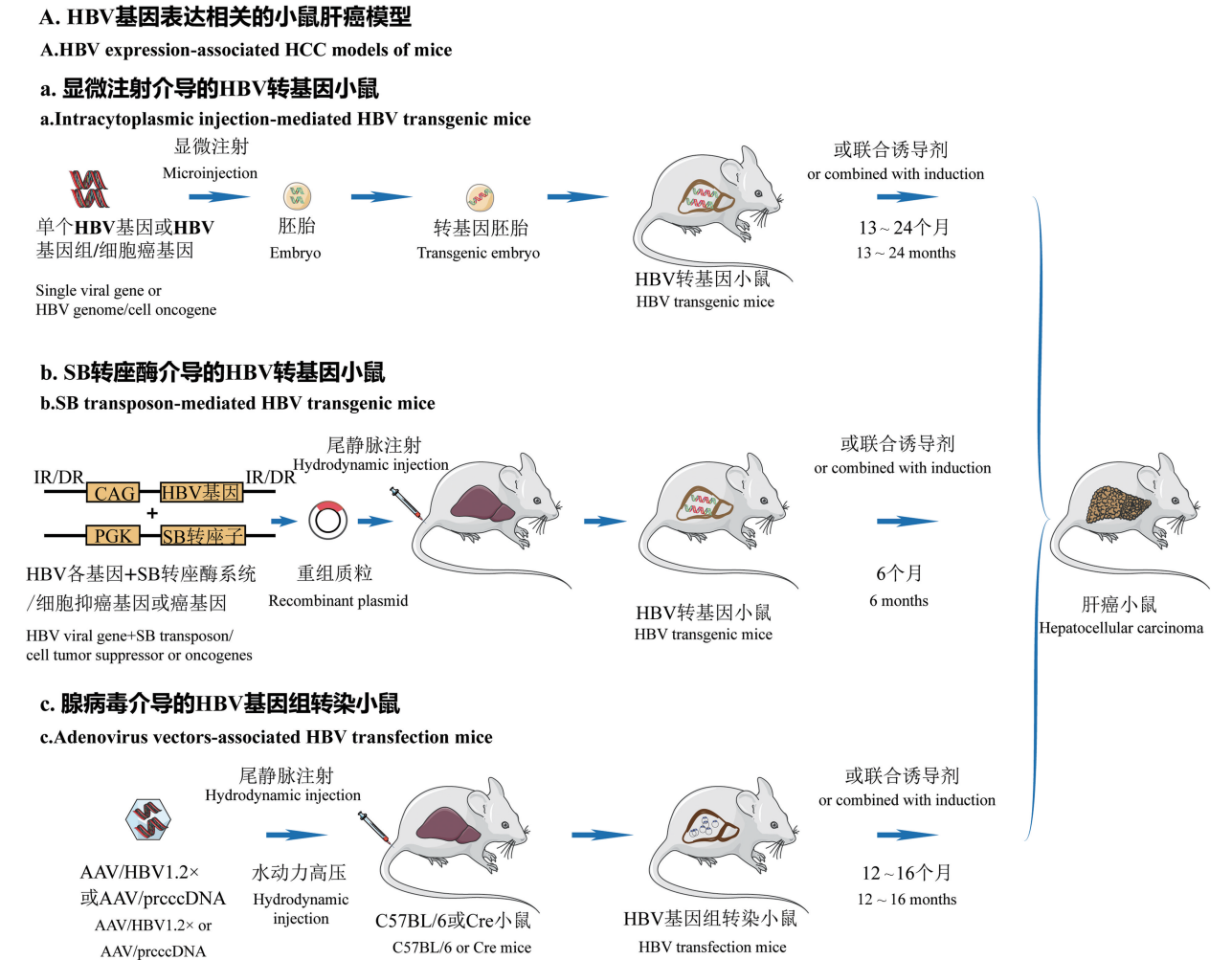


图1 HBV 病毒基因过表达相关的肝细胞癌小鼠模型

Figure 1 Various HBV-related hepatocellular carcinoma mice model by ectopic viral genes or HBV genome

小鼠中具备可成瘤性。

目前 CDX 模型主要包括皮下移植、腹腔移植和肝内原位移植(图 2)。皮下和腹腔移植模型通常是分别将 HBV 阳性肝癌细胞混悬液注射于小鼠的腹背侧面皮下,或直接至腹腔中。CDX 的肝内原位模型则通常是先构建小鼠皮下肿瘤移植物,然后移植包埋或夹心于小鼠原位肝内^[24]。最常见和最简单的模型是皮下移植模型,它可以快速获得肿瘤组织,这对于研究肿瘤细胞的药物反应或细胞-病毒互作分子机制较为便利^[25],因此,该模型应用最广泛。但是,它不能提供肝癌发生所需要的各种肝细胞、各种成分相互作用的微环境,所以原位模型在阐明疾病发生发展机制中更具有优势。2019 年, Xu 等^[26]先将 HCCLM3 细胞悬液皮下注射于五只无胸腺裸小鼠中获得肿瘤包块,未发现转移。但是再次将组织块原位接种于小鼠肝左内侧叶的囊下区域时,却观察到 45% 的小鼠出现肝癌骨转移。

在病毒性肝癌的治疗策略研究中,抗病毒药物有效抑制 HBV 阳性肝癌细胞的增殖提示了抗病毒治疗的重要性^[27]。研究显示替比夫定、恩替卡韦和干扰素- α 2b 等处理可下调肝癌细胞中 HBx 表达并抑制细胞增殖,但在恢复 HBx 蛋白表达后,三种抗病毒药物均失去了抗增殖作用,以上提示 HBx 可能是抗 HBV 药物抑制病毒阳性肝癌细胞增殖的主要靶点。

CDX 模型均具有技术简单、操作时间短、成瘤率高的特点。肝内原位移植模型更容易观察到肿瘤的侵袭和转移,皮下模型操作最为便利,腹腔模型因其引发腹腔器官广泛成瘤现象,现已较少使用。此外,由于培养条件单一,标准化细胞系在长期传代过程中往往会获得一些新的永生化表征,且体外培养条件与肝原发环境的显著差异也使得 CDX 移植物部分丢失原代肝癌细胞的特征。这导致 CDX 异种移植物缺乏临床前患者肝癌组织中典型的细胞多样性和异质性,同时因为小鼠基质细胞的大量浸润,CDX 模型在病理表现上与人类肝癌相似性较低,使得该模型不常用于药物筛选和疗效评估。

2.2 患者来源的异种移植物模型(patient-derived xenograft, PDX 模型)

与 CDX 模型相比,病毒性肝癌 PDX 小鼠(HBV-HCC PDX)模型的移植物来自 HBV 阳性的肝细胞癌患者的新鲜肿瘤组织或所分离的原代肝

癌细胞(图 2)。该模型克服了永生化肝癌细胞系在多次传代培养中逐渐丢失肿瘤细胞异质性的缺点,表现出更接近患者组织的临床病毒学和肿瘤细胞学特征。

在该模型中,由于免疫缺陷小鼠的异种移植物在荷瘤传代过程中,其中的人源基质细胞逐渐被小鼠来源所替代,因此仅部分保留了患者原始肿瘤的基因表达模式。但其独特之处是,研究显示胞外基质、细胞黏附分子和免疫通路调节分子等基因的表达在移植物中被下调,而与细胞周期和 DNA 复制相关的基因表达则显著富集。此外,研究者通过此类皮下模型研究建模过程中 HBV 抗原表达和定位等病理变化,分析该模型是否可用于肿瘤病毒学研究^[28]。结果显示,HBV-HCC PDX 模型从宿主和病毒学两方面模拟了患者来源肝癌组织的特点,尤其是 HBsAg 和 HBcAg 的表达和细胞定位较好重现了其在患者组织中的特点。HBcAg 保留了在原始组织中高水平表达且呈胞质、胞核和全细胞分布的复杂模式,HBsAg 也再现了患者癌组织中无法检出的现象。

但是,另有研究者基于 7 例新加坡 HCC 病例建立的皮下 PDX 模型显示,随着异种移植物在小鼠体内持续传代,HBV 复制逐渐丢失^[29]。比起皮下模型,肝原位模型更贴合原发肝癌的肿瘤微环境。研究者将来自 HBV-HCC 患者的新鲜肿瘤组织切取为直径 2 mm 大小的组织块并嵌合于无胸腺小鼠的原位肝中,成功制备了原位 PDX 模型并观察到广泛的肿瘤自发转移。免疫组化检测结果同样证实 HBx 蛋白和人甲胎蛋白保持高表达,说明了原位模型对应肿瘤起源的器官保留了必需的微环境,更能观察到肿瘤的远距离广泛转移^[30]。

PDX 模型基本保留了原始肿瘤的结构和组织学特征,因此对于研究肿瘤基因表达模式、突变状态、转移潜力和药物反应性等个体化精准医学,它更具有临床病理学优势。研发并完善 PDX 模型将加速精准医学的发展,由于具备和人类原始肿瘤组织高度的相似性,使得该模型可以用于预测患者个体化抗癌和抗病毒治疗的效果^[31]。目前 HCC PDX 模型也已被用于多种药物的临床前药理学测试^[32]。

该模型存在的缺点为:(1)建模需要大量的患者肿瘤资源和大量资金,且技术要求高、肝原位移植模型死亡率较高;(2)该模型建立在免疫缺陷的小鼠中,仍无法完全模拟肿瘤在人体中的发生发展

过程,对于肝癌免疫疗法和免疫治疗药物研发具有局限性^[33]。因此,有研究人员通过将人类造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)注入入严重免疫缺陷(NOD-scid Il2rg^{-/-}, NSG)小鼠中以重建人源免疫系统的模型,并进一步原位移植入 I 型人白细胞抗原匹配的人肝癌组织,由此建立了免疫完全小鼠的人源肝癌 PDX 模型^[34]。人源免疫小鼠可用以研究肿瘤和免疫应答的变化以及免疫检查点抑制剂的作用,其效应可基本还原临床结果。该模型更适用于探索病毒介导的人类癌症与免疫系统之间的相互作用^[35]。

3 总结

虽然 HBV 病毒相关肝癌的动物模型类别多种多样,在肿瘤病毒学研究领域居于前列,但是目前仍然没有一种动物模型能够成为广泛使用的代表性模型。该领域小鼠模型作为目前最简便和实惠的选择,在实验室中得以普遍使用,但仍存在着一些缺点。转基因小鼠模型仅选择性在小鼠基因组中插入一个或几个病毒基因,不能完全拟合 HBV 正常感染和致病过程中完整病毒各分子间复杂的时空协同作用。此外,全基因转染小鼠中则因为小鼠

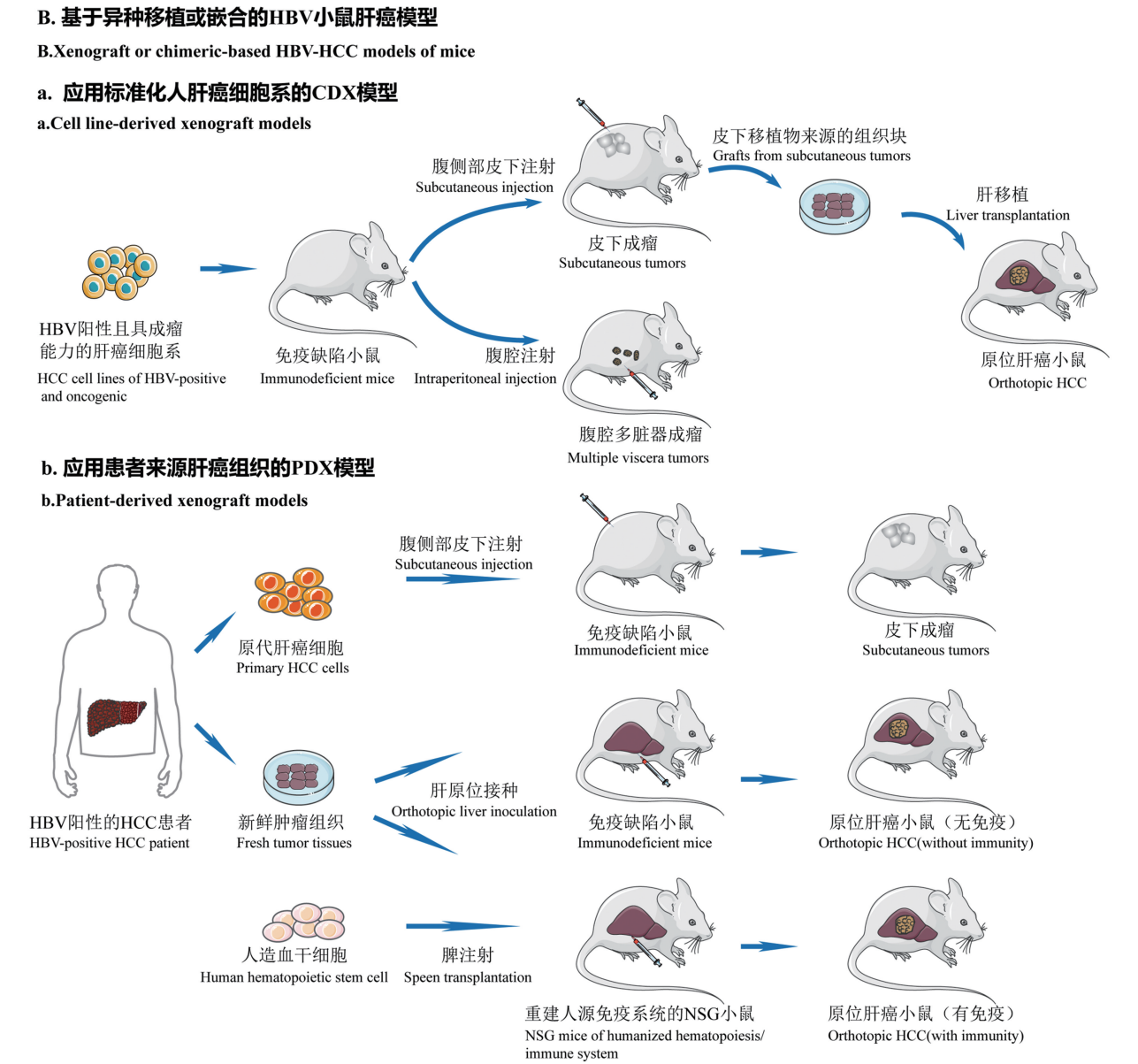


图 2 基于异种移植或嵌合的 HBV 肝细胞癌小鼠模型

Figure 2 Xenograft or chimera-based HBV-related hepatocellular carcinoma mice model

肝细胞不表达 HBV 感染的功能性受体钠离子牛磺胆酸共转运蛋白(sodium taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP), 因此缺乏野生型 HBV 的自然感染过程。这两种模型有其优势和特色之处, 但在病毒相关肝癌中的研究还需审慎解释相关数据。传统的人源化小鼠因其缺少免疫系统, 在研究抗病毒和抗肿瘤免疫治疗方面受到极大限制, 限制了目前最前沿的免疫治疗研究。综上, 现有的病毒相关肝癌模式动物模型存在其各自优缺点和适用范围, 需要我们在实际应用中根据具体目的针对性的选择使用。同时, 为了进一步剖析病毒和肿瘤在免疫学方面的互作机制, 需要我们继续研发能够完全还原人类免疫系统的病毒相关肝癌的体内模型。建立可真实反映病毒感染和致病特征的体内模型, 将为研究肿瘤病毒的致病机制提供平台, 具备突出的临床意义和科学价值。

参 考 文 献(References)

- [1] de Martel C, Georges D, Bray F, et al. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis [J]. *Lancet Glob Health*, 2020, 8(2): e180-e190.
- [2] Vescovo T, Pagni B, Piacentini M, et al. Regulation of autophagy in cells infected with oncogenic human viruses and its impact on cancer development[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 47.
- [3] Zhao H, Zhu P, Han T, et al. Clinical characteristics analysis of 1180 patients with hepatocellular carcinoma secondary to hepatitis B, hepatitis C and alcoholic liver disease[J]. *J Clin Lab Anal*, 2020, 34(2): e23075.
- [4] Zhang W, Lu Z, Kong G, et al. Hepatitis B virus X protein accelerates hepatocarcinogenesis with partner survivin through modulating miR-520b and HBXIP [J]. *Mol Cancer*, 2014, 13: 128.
- [5] Kim CM, Koike K, Saito I, et al. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice[J]. *Nature*, 1991, 351(6324): 317-320.
- [6] Ahodant J, Lekbaby B, Bou Nader M, et al. Hepatitis B virus X protein enhances the development of liver fibrosis and the expression of genes associated with epithelial-mesenchymal transitions and tumor progenitor cells[J]. *Carcinogenesis*, 2020, 41(3): 358-367.
- [7] Singh H, Huls H, Kebraie P, et al. A new approach to gene therapy using Sleeping Beauty to genetically modify clinical-grade T cells to target CD19[J]. *Immunol Rev*, 2014, 257(1): 181-190.
- [8] Keng VW, Tschida BR, Bell JB, et al. Largeaspada DA. Modeling hepatitis B virus X-induced hepatocellular carcinoma in mice with the Sleeping Beauty transposon system [J]. *Hepatology*, 2011, 53(3): 781-790.
- [9] Kebraie P, Izsvák Z, Narayanavari SA, et al. Gene therapy with the sleeping beauty transposon system[J]. *Trends Genet*, 2017, 33(11): 852-870.
- [10] Zhang R, Real CI, Liu C, et al. Hepatic expression of oncogenes Bmi1 and Dkk1 is up-regulated in hepatitis B virus surface antigen-transgenic mice and can be induced by treatment with HBV particles or lipopolysaccharides in vitro[J]. *Int J Cancer*, 2017, 141(2): 354-363.
- [11] Song J, Zhang X, Ge Q, et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of HBsAg inhibits proliferation and tumorigenicity of HBV-positive hepatocellular carcinoma cells [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(10): 8419-8431.
- [12] Zong L, Peng H, Sun C, et al. Breakdown of adaptive immunotolerance induces hepatocellular carcinoma in HBsAg-tg mice[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 221.
- [13] Hao X, Chen Y, Bai L, et al. HBsAg-specific CD8⁺ T cells as an indispensable trigger to induce murine hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Mol Immunol*, 2019, 10. 1038/s41423-019-0330-1, Epub ahead of print.
- [14] Chen Y, Hao X, Sun R, et al. Natural killer cell-derived interferon-gamma promotes hepatocellular carcinoma through the epithelial cell adhesion molecule-epithelial-to-mesenchymal transition axis in hepatitis B virus transgenic mice [J]. *Hepatology*, 2019, 69(4): 1735-1750.
- [15] Allweiss L, Volz T, Giersch K, et al. Proliferation of primary human hepatocytes and prevention of hepatitis B virus reinfection efficiently deplete nuclear cccDNA *in vivo* [J]. *Gut*, 2018, 67(3): 542-552.
- [16] Huang YH, Fang CC, Tsuneyama K, et al. A murine model of hepatitis B-associated hepatocellular carcinoma generated by adeno-associated virus-mediated gene delivery[J]. *Int J Oncol*, 2011, 39(6): 1511-1519.
- [17] 吴曦, 霍桂桃, 刘甦苏, 等. 利用 CRISPR/ Cas9 基因编辑技术建立 FcγR 基因大片段敲除小鼠模型[J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(5): 583-591.
Wu X, Huo GT, Liu SS, et al. Establishment of a large fragment FcγR gene knockout mouse model using CRISPR/Cas9 genome editing technique[J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2019, 27(5): 583-591.
- [18] Liu Y, Qi X, Zeng Z, et al. CRISPR/Cas9-mediated p53 and Pten dual mutation accelerates hepatocarcinogenesis in adult hepatitis B virus transgenic mice [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2796.
- [19] Lin G, Zhang K, Li J. Application of CRISPR/Cas9 technology to HBV[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(11): 26077-26086
- [20] Gregg S, Franchi M, Aletti G, et al. Management of endometrial cancer in Italy: a national survey endorsed by the Italian Society of Gynecologic Oncology[J]. *Int J Surg*, 2014, 12(10): 1038-1044.
- [21] Ramanan V, Shlomai A, Cox DB, et al. CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 10833.

- [22] 朱佩琪, 蒋伟东, 周诺. CRISPR/ Cas9 基因编辑系统的发展及其在医学研究领域的应用[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(2): 116-123.
Zhu PQ, Jiang WD, Zhou N. CRISPR/ Cas9 system and its application in medical research [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(2): 116-123.
- [23] Yang YC, Chen YH, Kao JH, et al. Permanent inactivation of HBV genomes by CRISPR/Cas9-Mediated non-cleavage base editing[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020, 20: 480-490.
- [24] Zhao GJ, Xu LX, Chu ES, et al. Establishment of an orthotopic transplantation tumor model of hepatocellular carcinoma in mice [J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(47): 7087-7092.
- [25] Ruggeri BA, Camp F, Miknyoczki S. Animal models of disease: pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery[J]. Biochem Pharmacol, 2014, 87(1): 150-161.
- [26] Xu ZT, Ding H, Fu TT, et al. A nude mouse model of orthotopic liver transplantation of human hepatocellular carcinoma HCCLM3 cell xenografts and the use of imaging to evaluate tumor progression[J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 8694-8703.
- [27] Zhang S, Gao S, Zhao M, et al. Anti-HBV drugs suppress the growth of HBV-related hepatoma cells via down-regulation of hepatitis B virus X protein [J]. Cancer Lett, 2017, 392: 94-104.
- [28] Liu J, Chen S, Zou Z, et al. Pathological pattern of intrahepatic HBV in HCC is phenocopied by PDX-derived mice: a novel model for antiviral treatment[J]. Transl Oncol, 2019, 12(9): 1138-1146.
- [29] Huynh H, Soo KC, Chow PK, et al. Xenografts of human hepatocellular carcinoma: a useful model for testing drugs [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(14): 4306-4314.
- [30] Cheung PF, Yip CW, Ng LW, et al. Comprehensive characterization of the patient-derived xenograft and the paralleled primary hepatocellular carcinoma cell line [J]. Cancer Cell Int, 2016, 16: 41.
- [31] Ice RJ, Chen M, Sidorov M, et al. Drug responses are conserved across patient-derived xenograft models of melanoma leading to identification of novel drug combination therapies [J]. Br J Cancer, 2020, 122(5): 648-657.
- [32] Gao H, Korn JM, Ferretti S, et al. High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response [J]. Nat Med, 2015, 21(11): 1318-1325.
- [33] Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, et al. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2012, 9(6): 338-350.
- [34] Zhao Y, Shuen TWH, Toh TB, et al. Development of a new patient-derived xenograft humanised mouse model to study human-specific tumour microenvironment and immunotherapy [J]. Gut, 2018, 67(10): 1845-1854.
- [35] 郭文文, 乔天运, 张彩勤, 等. 免疫系统人源化小鼠模型的构建及其在肿瘤治疗研究中的应用[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 98-104.
Guo WW, Qiao TY, Zhang CQ, et al. Establishment of mouse models with a humanized immune system and applications for tumor immunotherapy [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 98-104.

[收稿日期] 2020-05-27