

李晓斌,刘博文,李峰,等. 基于数据挖掘的乙型肝炎病毒感染动物模型研究 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(8): 1035-1041.
Li XB, Liu BW, Li F, et al. Analysis of animal models for the study of hepatitis B virus infection based on data mining [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(8): 1035-1041.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.08.009

基于数据挖掘的乙型肝炎病毒感染动物模型研究

李晓斌^{1,2}, 刘博文^{1,2}, 李峰^{1,2}, 苏晓鹏^{1,2}, 胡世平^{2*}

(1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 北京中医药大学深圳医院, 广东 深圳 518172)

【摘要】 目的 研究乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染动物模型的造模特点, 为本模型的建立和评价提供参考。**方法** 通过计算机检索中国知网、万方数据库、维普中文期刊服务平台及 PubMed 数据库近十年的相关文献, 总结实验动物种类、造模方式、模型给药时间及阳性对照药、检测指标等, 建立数据库进行统计分析。**结果** 纳入符合标准的 59 篇文献中 HBV 感染动物模型以 C57BL/6 小鼠和 BALB/c 小鼠为主; 最常用的造模方式为水力高压注射法, 其次为静脉注射、重组腺相关病毒载体介导的 HBV 感染、腹腔注射、转基因、皮下注射及先天感染; 阳性对照药均为抗病毒药物, 以拉米夫定最常用, 给药时间多为 14 d; 检测指标以血清病毒学指标为主, 包括 HBsAg、HBV-DNA 和 HBeAg, 部分研究结合了肝组织病理检查及转氨酶水平来评估 HBV 感染后肝疾病进展。**结论** 本研究通过数据挖掘的方法筛选出应用最广泛的 HBV 感染动物模型的造模方法和评价指标, 描述了造模的原理及具体方法, 对不同的动物模型进行评估, 为 HBV 感染动物模型的应用提供参考。

【关键词】 数据挖掘; 动物模型; 乙型肝炎病毒

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 08-1035-07

Analysis of animal models for the study of hepatitis B virus infection based on data mining

LI Xiaobin^{1,2}, LIU Bowen^{1,2}, LI Feng^{1,2}, SU Xiaopeng^{1,2}, HU Shiping^{2*}

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China. 2. Shenzhen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Shenzhen 518172)
Corresponding author: HU Shiping. E-mail: 742205394@qq.com

【Abstract】 Objective To study the modeling characteristics of hepatitis B virus (HBV) infection in animal models and to provide references for standardizing animal models of HBV infection. **Methods** We retrieved relevant literature published in the previous decade from the China National Knowledge Infrastructure, VIP, WanFang, and PubMed databases. The type of experimental animal, modeling method, timing of administration, positive controls, and high-frequency detection indicators were recorded and analyzed. **Results** In total, 59 articles that met the criteria were included. The main animals used for HBV infection models were C57BL/6 and BALB/c mice. The most frequently used modeling method was hydrodynamic injection, and other method included intravenous, adeno-associated virus (AAV)-HBV infection, intraperitoneal injection, transgenic method, hypodermic injection, and natural infection. All positive controls were treated with antiviral drugs, with lamivudine being the most frequently used drug. Most drugs were administered for 14

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81973733), 深圳市科技创新项目(JCYJ20220530172812028), 深圳市龙岗区科技发展专项资金(LGKCYLWS2021000015)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81973733), Shenzhen Science and Technology Innovation Research Project (JCYJ20220530172812028), Shenzhen Longgang Science and Technology Development Special Fund (LGKCYLWS2021000015)。

【作者简介】 李晓斌(1996—), 女, 在读博士研究生, 研究方向: 中医药防治慢性肝病。Email: xiaobinxiaobin1@163.com

【通信作者】 胡世平(1965—), 男, 主任医师, 博士, 研究方向: 中医药防治慢性肝病。Email: 742205394@qq.com

days. The main detection indicators were serum virologic indices, including HBsAg, HBV DNA, and HBeAg. Some studies combined pathological examination of liver puncture tissue and aminotransferase levels to evaluate disease progression following HBV infection. **Conclusions** This study screened the most widely used animal models of HBV infection and the evaluation indicators, summarized the principle and specific method of modeling, and evaluated different HBV infection models by data mining to provide a reference for model application.

【Keywords】 data mining; animal model; hepatitis B virus

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

慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是一种非细胞病变的 DNA 病毒,基因组长约 3.2 kb,为部分双链环状 DNA。HBV 通过肝细胞膜上的钠离子-牛磺胆酸协同转运蛋白进入肝细胞,在受感染肝细胞的细胞核中产生共价闭合环状 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA)^[1],接着转录成前基因组 RNA(逆转录为 HBV DNA 的模板)和 mRNA 以翻译成 HBV 蛋白。cccDNA 是 HBV 难以根除和实现免疫抑制后 HBV 重新激活的主要原因^[2]。HBV DNA 可以整合到宿主基因组中,并且可以是 HBsAg 的来源,也是肝癌发生的促成因素^[3]。目前全球有超过 2.5 亿人为慢性 HBV 感染者(定义为 HBsAg 阳性)^[4],其中未经治疗的患者约 40%发展为肝硬化,且存在进展至失代偿性肝硬化和肝细胞癌的风险^[5-7]。目前慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)的治疗以干扰素和核苷类似物为主,但无法清除肝内的 cccDNA 以达到功能性治愈,故深入开展 CHB 发病机制及各种干预过程的有效性研究,对根除肝内的 cccDNA 具有重要意义。

有效动物模型的建立对于机制研究及新药研发至关重要,本研究检索近 10 年来 HBV 感染相关的文献,筛选出国内外期刊公开发表的涉及 HBV 感染动物模型的论文,对 HBV 感染动物模型的动物种类、造模方法、检测指标进行阐述,为今后 HBV 感染建模研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 数据来源

计算机检索中国知网、万方数据库、维普中文期刊服务平台及 PubMed 数据库,收集从 2012 年 1 月 1 日至 2022 年 12 月 31 日发表的研究,检索方法均为高级检索,中文数据库以“HBV”、“乙型肝炎病毒”、“动物模型”为主题词检索,英文数据库以“HBV”、“hepatitis B virus”、“animal model”为主题词检索。

1.2 文献筛选标准

1.2.1 纳入标准

(1) 涉及 HBV 感染动物模型且全部造模成功的实验类文献;(2) 模型资料完备(动物种类、造模方式、成模标准、检测指标等明确);(3) 可获得全文,语种不限。

1.2.2 排除标准

(1) 无法获取造模方式、造模药物、检测方法、检测指标等详细的资料;(2) 重复文献仅选取发表时间最早的一篇;(3) 会议、学位论文、报纸、综述、理论研究。

1.3 数据处理

将收集的文献中涉及的动物种类、造模方法、检测指标等以统一格式录入 Microsoft Excel 2013,采取双人录入的方法以确保信息的质量控制,整理并建立 HBV 感染动物模型的数据库。

1.4 统计学分析

应用 Microsoft Excel 2013 对 HBV 感染动物模型数据库中的信息进行统计分析,归纳造模要素^[8]。

2 结果

2.1 文献检索结果

共检索出 1216 篇文献,包括中国知网 311 篇、万方 524 篇、维普 56 篇、PubMed 325 篇,剔除重复文献 677 篇,阅读题目与摘要后剔除综述、理论研究、会议类、学位论文及无关文献共 257 篇,阅读全文剔除不符合 1.2.2 排除标准的文献,最终纳入文献 59 篇。其中英文文献 17 篇,中文文献 42 篇。

2.2 实验动物种类

将 59 篇纳入文献中应用的实验动物种类进行统计发现,主要包括 6 类实验动物,即小鼠、大鼠、鸭、土拨鼠、猴、树鼩。如表 1 所示,将实验动物种类按照频数进行排序,其中使用频数最高为 C57BL/6 小鼠(23 次,32.38%)和 BALB/c 小鼠(13 次,18.30%),其次较为常用的有鸭、土拨鼠等。造模动物的性别以雄性为主,分布见表 2。

表 1 实验动物种类频数分布

Table 1 Frequency distribution of experimental animal species

动物种类 Animal species	频数(次) Frequency (times)	频数/总数(%) Frequency/ total (%)
C57BL/6 小鼠 C57BL/6 mice	23	32.38
BALB/c 小鼠 BALB/c mice	13	18.30
广西麻鸭 Guangxi duck	9	12.68
土拨鼠 Marmots	4	5.63
北京麻鸭 Pekin ducks	4	5.63
人源化小鼠 Humanized murine	2	2.82
BABL/c 小鼠 BABL/c mice	2	2.82
裸鼠 Nude mice	2	2.82
食蟹猴 Cynomolgus	2	2.82
FVB/N 小鼠 FVB/N mice	2	2.82
C57BL/6N-Tg(1.28HBV)/ Vst 转基因小鼠	1	1.41
C57BL/6N-Tg(1.28HBV)/ Vst transgenic mice	1	1.41
OVA-HBsAg 转基因小鼠 OVA-HBsAg transgenic mice	1	1.41
树鼩 Tree shrew	1	1.41
HBV-X 转基因小鼠 HBV-X transgenic mice	1	1.41
河南樱桃谷鸭 Cherry valley duck Henan	1	1.41
SD 大鼠 SD rats	1	1.41
CBA/CaJ 小鼠 CBA/CaJ mice	1	1.41
未知小鼠 Unknown mice	1	1.41

表 2 实验动物性别及频次

Table 2 Sex and frequency of functional dyspepsia model animals

性别 Sex	频数(次) Frequency (times)	频数/总数(%) Frequency/total (%)
雄性 Male	24	40.68
雌性 Female	5	8.47
雌雄各半 Half male and half female	1	1.70
雌雄兼用 Both male and female	15	25.42
未提及 Not mentioned	14	23.73

2.3 造模方式

将文献中的造模方法进行统计分类,归纳为 6 种。最常用的为水动力高压注射法(28 次,47.46%),其次为静脉注射(注射部位涉及颈静脉、桡静脉及颈外静脉等)、腹腔注射重组腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)载体介导的 HBV 感染、转基因、皮下注射及先天感染。每一种造模方式的分布及原理见表 3。

2.4 模型给药时间及阳性对照药

共 20 项研究涉及药物干预,其中 13 项研究设置阳性对照药物。经统计,给药时间多为 14 d(7 次,35.00%),其次为 28 d(3 次,15.00%)。阳性对照药均为抗病毒药物,包括拉米夫定(9 次,69.23%)、阿昔洛韦(3 次,23.08%)及恩替卡韦(1 次,7.69%)。

2.5 检测指标

对本研究中涉及的全部检测指标进行分类统计,若同一组织被用于检测不同的指标,如肝组织既做病理检测又做免疫组化,则分别进行统计。结果表明检测指标主要包括 HBV 相关血清学指标、转氨酶、肝组织病理、肝组织免疫组化等。其中,检测前 3 位的指标包括血清 HBsAg(46 次,18.18%)、血清 HBV-DNA(43 次,17.00%)、血清 HBeAg(35 次,13.83%)。检测指标的频数分布见表 4。

3 讨论

目前 CHB 的治疗尚未实现功能性治愈,达到这一目标需要满足多个步骤:完全抑制 HBV DNA 复制及 HBsAg 产生,恢复先天性和 HBV 特异性免疫应答^[9],因此靶向 HBV 复制生命周期不同阶段的药物及免疫调节剂仍是目前的研究热点。基础研究中选择合适的动物模型至关重要。

3.1 常用实验动物

理想的临床前动物模型既需要模型中有较高的 HBV 病毒含量,也需要相应的免疫环境^[10]。目前用于制备 HBV 感染模型的动物主要有鼠、鸭、土拨鼠、树鼩、食蟹猴等,其中以小鼠最常用。HBV 感染具有极强的种属特异性,仅黑猩猩和食蟹猴存在 HBV 的自然感染,感染后的宿主反应与人类相似,是研究分子机制、评估疫苗功效和抗病毒药物等的首选^[11]。但受动物伦理的限制和高昂成本的影响,美国国立卫生研究院逐渐限制非人灵长类动物在生物医学上的研究应用。Fan 等^[12]研究发现树鼩

表 3 造模方式分布

Table 3 Distribution of modeling methods

造模方式 Method	造模药物或注射部位 Drug or injection site	原理 Principle	频数(次) Frequency (times)	频数/总数(%) Frequency/ total(%)
水动力高压注射法 Hydrodynamic injection	pAAV-HBV1.2 质粒	从小鼠尾静脉快速注射大量液体,造成肝血管内压力升高,利用瞬态水动力机械地(高压)将 HBV DNA 挤入肝细胞 Rapid injection of large amounts of fluid from the tail vein of mice results in an increase in intrahepatic vascular pressure, which uses transient hydrodynamic forces to mechanically (high-pressure) squeeze HBV DNA into hepatocytes	28	47.46
	pAAV-HBV1.2 plasmid			
	pAAV-HBV1.3 质粒			
	pAAV-HBV1.3 plasmid			
	pGEM4Z-HBV1.3 质粒			
	pGEM4Z-HBV1.3 plasmid			
	pUC18-HBV1.3 质粒			
	pUC18-HBV1.3 plasmid			
	pCS-HBV1.3 质粒			
	pCS-HBV1.3 plasmid			
	pCDNA3.1-HBV1.3 质粒			
	pCDNA3.1-HBV1.3 plasmid			
	Payw1.3 质粒			
	Payw1.3 plasmid			
	pHBV4.1 质粒			
	pHBV4.1 plasmid			
重组 AAV 载体介导的 HBV 感染 AAV/HBV-infected mice	pcDNA3.1 质粒	通过尾静脉注射 AAV-HBV(非上文所讲的高压注射),在肝细胞得到高转染效率的 HBV 表达细胞 High transfection efficiency of HBV-expressing cells were obtained in hepatocytes by tail vein injection of AAV-HBV (not high pressure injection as mentioned above)	5	8.47
	pcDNA3.1 plasmid			
	HBV 共价闭环环状 DNA			
	HBV cccDNA			
	HBV DNA 阳性血清			
	HBV DNA positive serum			
静脉注射 Intravenous injection	HBV 溶液	静脉注射 HBV 强阳性血清 Intravenous injection of HBV strong positive serum	12	20.34
	HBV solution			
	无名静脉			
	Unknown vein			
	颈静脉			
	Jugular vein			
腹腔注射 Intraperitoneal injection	胫静脉	腹腔注射 HBV 强阳性血清 Intraperitoneal injection of HBV strong positive serum	6	10.17
	Tibial vein			
	颈外静脉			
	External jugular vein			
	—			
	—			
转基因 Transgenic mice	—	将改建后的目的基因(或基因组片段)用显微注射法注入供体小鼠的受精卵(或着床前胚胎细胞),然后将此受精卵(或着床前胚胎细胞)再植入受体动物的输卵管(或子宫)中,使其发育成携带有外源基因的转基因动物 Modified target gene (or genomic fragment) is injected into the fertilized egg (or preimplantation embryonic cell) of the donor mouse by microinjection, and the fertilized egg (or preimplantation embryonic cell) is then implanted into the oviduct (or uterus) of the recipient animal to develop into a transgenic animal carrying the exogenous gene	4	6.78
	—	—		
皮下注射 Subcutaneous injection	—	皮下注射接种 WHV Subcutaneous injection with WHV	3	5.08
先天感染 Congenital infection	—	先天感染 DHBV Congenital infection with DHBV	1	1.70

表 4 检测指标频数分布

Table 4 Frequency distribution of detection indicators

检测指标 Detection indicator	具体指标 Specific indicators	频数(次) Frequency (times)	频数/总数(%) Frequency/total (%)
血清病毒学指标 Serum virological indicators	血清 HBsAg Serum HBsAg	46	18. 18
	血清 HBV DNA Serum HBV DNA	43	17. 00
	血清 HBeAg Serum HBeAg	35	13. 83
	血清 HBsAb Serum HBsAb	10	3. 95
	血清 HBcAb Serum HBcAb	7	2. 77
	血清 HBeAb Serum HBeAb	4	1. 58
	血清 HBcAg Serum HBcAg	1	0. 39
	血清 ALT Serum ALT	21	8. 30
血清转氨酶 Serum transaminases	血清 AST Serum AST	15	5. 93
肝内相关蛋白表达 Expression of related proteins in the liver	肝组织 HBeAg 的表达 Intrahepatic HBeAg	20	7. 91
	肝组织 HBsAg 的表达 Intrahepatic HBsAg	15	5. 93
	肝组织 HBV DNA 的表达 Intrahepatic HBV DNA	8	3. 16
肝组织病理 Pathological changes in liver tissue	苏木精-伊红染色法 Hematoxylin-eosin staining	28	11. 07

是灵长动物的近缘旁系群,并创建了树鼩基因组数据库。树鼩在基因组和免疫学特性等诸多方面与人类相似,在新生儿感染时表现出慢性感染倾向,肝组织病理学变化接近人类感染 HBV 后的改变,可通过感染人 HBV 建立慢性感染模型,成为除灵长类动物外可天然感染人 HBV 的动物,但遗传稳定性不足、个体差异大、实验结果的重复性较差^[13],在应用上受到极大限制。而土拨鼠肝炎病毒(woodchuck hepatitis virus, WHV)和鸭肝炎病毒(duck hepatitis virus, DHBV)与人 HBV 具有相似的复制周期和感染相应宿主的特性,可作为研究人 HBV 的替代病毒,故土拨鼠肝炎模型和鸭乙型肝炎模型在研究中较为常用。但 WHV 与 DHBV 均与人 HBV 的同源性差,也不能充分体现人 HBV 感染的全过程。

而小鼠与人类具有相似的遗传背景,且体型小、易获得、易饲养管理,已被广泛应用于实验研究。小鼠无法自然感染 HBV,多通过高压水力注射法、重组 AAV 载体介导法、转基因法等制备 HBV 感染模型。

3.2 常用造模方法

本研究结果发现,在小鼠中最常用的造模方法为水力高压注射法和重组 AAV 载体介导的 HBV 感染。水力高压注射法(hydrodynamic injection, HDI)是指将含有 HBV DNA 质粒的溶液通过小鼠尾静脉快速注射进小鼠体内。由于高压下血循环的冲击,使输入的 DNA 片段可以进入肝细胞内,通过转录前基因组 RNA 和其他 HBV mRNA 启动 HBV 复制,形成 HBV 复制中间体并表达 HBV 蛋白^[14]。HDI 的标准程序需要在 8 ~ 10 s 内快速注入相当于

12 ~ 13%小鼠重量(g)的液体^[15]。HDI HBV 小鼠模型可用于建立瞬时或持续性 HBV 复制,外周血中 HBsAg 阳性的持续时间从 1 周 ~ 6 个月。该模型中 HBV 的持久性由不同因素决定,包括小鼠品系的遗传背景、年龄、性别、质粒骨架和质粒剂量^[16-23]。HDI 模型广泛应用于 HBV 相关免疫应答机制及抗病毒药物的研究,还可通过构建不同 HBV 基因型和变异或突变体的质粒来测试药物对突变 HBV 的抗病毒作用^[23],并探索不同 HBV 基因组株对 HBV 感染持久性的影响及其潜在机制^[17,24]。但该模型仍存在很大的局限性:首先,HDI 的高压注射会造成严重的肝损伤;其次,质粒骨架引起的非 HBV 免疫应答可能会干扰实验结果;最后,小鼠肝细胞在从 rcDNA 形成 cccDNA 方面效率极低,导致 cccDNA 普遍缺失且肝内转染效率远低于 HBV 感染患者。

重组 AAV 载体介导的 HBV 感染小鼠模型是将携带 HBV 基因组的重组腺相关病毒(AAV-HBV)注射入小鼠体内(一般采取尾静脉注射),建立持续感染的 HBV 小鼠模型。AAV 属嗜肝病毒,具有低致病性和低免疫原性^[25],不同的 HBV 基因型或突变体插入 AAV 载体中可感染不同遗传背景的小鼠品系,故重组 AAV 载体介导的 HBV 感染小鼠模型在研究中应用广泛。与 HDI 相比,AAV-HBV 转导的小鼠模型能够实现更持续的 HBV 感染,注射后 12 周约 60%的肝细胞表达 HBcAg^[26],且 AAV-HBV 小鼠的血清 HBsAg 即使在 3 或 4 个月内也保持在相对较高的水平^[26-27],因此该模型被优选用于评估慢性感染的治疗性疫苗和 Toll 样受体激动剂的抗病毒作用^[28]。然而,AAV-HBV 是否通过 rcDNA 在小鼠

肝细胞中产生 cccDNA 仍不确定。

除此以外,HBV 转基因小鼠模型在 CHB 的发病机制及抗病毒药物筛选方面应用较多。HBV 转基因小鼠可选择性表达 HBV 蛋白(包括 HBsAg、HBeAg、HBcAg 或 HBx)及全 HBV 基因组,前者可用于研究不同 HBV 蛋白的病毒学和致癌潜力,后者支持 HBV 在体内复制的完整生命周期,已被广泛用于评估抗病毒药物的疗效^[29]。但迄今为止产生的所有 HBV 转基因小鼠谱系对病毒抗原具有免疫耐受性,不会发展为急性或慢性肝炎,并且这些全基因组转基因小鼠中缺乏 cccDNA,这些可能限制此类模型的应用^[30]。

3.3 高频检测指标分析

本研究发现实验中最常用的检测指标为 HBsAg,其次为 HBV-DNA 和 HBeAg。血清 HBsAg 来源于 cccDNA 转录的 mRNA 或整合人宿主基因组的 HBV DNA 序列,HBsAg 阳性表示 HBV 感染。目前,HBsAg 的定量检测已在临床中被广泛应用,其水平可反映疾病分期与疾病的进展风险^[31]。HBeAg 是具有免疫调节作用的可溶性蛋白,目前已被证实与 HBV 感染后宿主免疫功能的紊乱密切相关^[32]。HBeAg 阳性一般表示宿主具有较强的传染性。对于接受 NAs 治疗的 HBeAg 阳性 CHB 患者,HBeAg 血清学转换与宿主产生部分免疫控制相关,故临床将其作为评价抗病毒疗效的重要指标^[33]。血清 HBV DNA 的水平可直接反映病毒复制情况,是 HBV 感染后相对特异且灵敏的观测指标,也是在临床上被用作判断是否启动抗病毒治疗、预测疗效及预后的重要指标之一^[34]。以上指标均可反应宿主 HBV DNA 的复制情况,在判断造模成功及药物疗效评价等方面均具有重要的意义,是实验中的常用检测指标。

3.4 结语

目前 CHB 的治疗仍无法达到功能性治愈,CHB 的生物学机制探讨和新药研发都离不开动物模型的支持。构建理想的动物模型有利于产生更加严谨、科学的研究结果。目前关于 HBV 感染动物模型的选择尚无统一的评价标准,且国内外文献多以综述的形式列举动物模型的种类及各自的优缺点,尚无科学、客观的数据支持。本研究应用数据挖掘的方法,通过构建数据库,将数据进行了深入的整合与分析,客观地展示了实际研究中 HBV 感染动物模型的应用情况,供研究者参考。

本研究通过数据分析发现目前 HBV 感染的动物模型多选择 C57BL/6 小鼠和 BALB/c 小鼠,其次为鸭和土拨鼠,造模方法以小鼠高压水动力注射和 AAV-HBV 介导的转染为主,鸭和土拨鼠 HBV 感染的模型构建方法多选择静脉或腹腔注射 HBV 强阳性血清。检测指标以 HBV 相关血清病毒学指标为主,主要为 HBsAg、HBV-DNA 和 HBeAg,部分研究结合了肝组织病理检查及转氨酶水平来评估 HBV 感染后肝的疾病进展。

HBV 感染的动物模型造模方法多种多样,单一动物模型无法代表疾病的各个阶段,因此研究者应充分了解不同模型的优劣及适用场景,根据研究目的选择合适的动物模型,确保研究结果的科学性。由于 HBV 的特殊性,目前常用的动物模型无法完全重现人体感染 HBV 后的真实过程,因此建立与临床病理过程高度一致的动物模型是后续研究的关键。

参 考 文 献(References)

- [1] Martinez MG, Boyd A, Combe E, et al. Covalently closed circular DNA: the ultimate therapeutic target for curing HBV infections [J]. *J Hepatol*, 2021, 75(3): 706–717.
- [2] Raimondo G, Locarnini S, Pollicino T, et al. Update of the statements on biology and clinical impact of occult hepatitis B virus infection [J]. *J Hepatol*, 2019, 71(2): 397–408.
- [3] Bousali M, Papatheodoridis G, Paraskevis D, et al. Hepatitis B virus DNA integration, chronic infections and hepatocellular carcinoma [J]. *Microorganisms*, 2021, 9(8): 1787.
- [4] World Health Organization; Geneva; 2017. Global hepatitis report [EB/OL]. [2017-04-19]. <https://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/>.
- [5] Sarin SK, Kumar M, Lau GK, et al. Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update [J]. *Hepatol Int*, 2016, 10(1): 1–98.
- [6] Poh Z, Goh BB, Chang PE, et al. Rates of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B and the role of surveillance: a 10-year follow-up of 673 patients [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2015, 27(6): 638–643.
- [7] Yang JD, Kim WR, Coelho R, et al. Cirrhosis is present in most patients with hepatitis B and hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2011, 9(1): 64–70.
- [8] 朱正望, 朱平生, 苗明三. 基于数据挖掘的反流性食管炎动物模型应用分析 [J]. *中药药理与临床*, 2022, 38(5): 174–178.
- [9] Zhu ZW, Zhu PS, Miao MS. Application analysis of animal model with reflux esophagitis based on data mining [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2022, 38(5): 174–178.
- [10] Jeng WJ, Papatheodoridis GV, Lok ASF. Hepatitis B [J]. *Lancet*, 2023, 401(10381): 1039–1052.
- [10] 杨炜峰, 苗振川, 宋希军, 等. HBV 感染的动物模型研究进

- 展 [J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(5): 999–1005.
- Yang WF, Miao ZC, Song XJ, et al. Research advances in animal models of hepatitis B virus infection [J]. J Clin Hepatol, 2021, 37(5): 999–1005.
- [11] Engle RE, De Battista D, Danoff EJ, et al. Distinct cytokine profiles correlate with disease severity and outcome in longitudinal studies of acute hepatitis B virus and hepatitis D virus infection in chimpanzees [J]. mBio, 2020, 11(6): e02580–e02520.
- [12] Fan Y, Yu D, Yao YG. Tree shrew database (TreeshrewDB): a genomic knowledge base for the Chinese tree shrew [J]. Sci Rep, 2014, 4: 7145.
- [13] Kayesh MEH, Sanada T, Kohara M, et al. Tree shrew as an emerging small animal model for human viral infection: a recent overview [J]. Viruses, 2021, 13(8): 1641.
- [14] Suda T, Liu D. Hydrodynamic gene delivery: its principles and applications [J]. Mol Ther, 2007, 15(12): 2063–2069.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] Li X, Liu G, Chen M, et al. A novel hydrodynamic injection mouse model of HBV genotype C for the study of HBV biology and the anti-viral activity of lamivudine [J]. Hepat Mon, 2016, 16(2): e34420.
- [18] Kosinska AD, Pishraft-Sabet L, Wu W, et al. Low hepatitis B virus-specific T-cell response in males correlates with high regulatory T-cell numbers in murine models [J]. Hepatology, 2017, 66(1): 69–83.
- [19] Li L, Li S, Zhou Y, et al. The dose of HBV genome contained plasmid has a great impact on HBV persistence in hydrodynamic injection mouse model [J]. Virol J, 2017, 14(1): 205.
- [20] Wang X, Zhu J, Zhang Y, et al. The doses of plasmid backbone plays a major role in determining the HBV clearance in hydrodynamic injection mouse model [J]. Virol J, 2018, 15(1): 89.
- [21] Chou HH, Chien WH, Wu LL, et al. Age-related immune clearance of hepatitis B virus infection requires the establishment of gut microbiota [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(7): 2175–2180.
- [22] Peng XH, Ren XN, Chen LX, et al. High persistence rate of hepatitis B virus in a hydrodynamic injection-based transfection model in C3H/HeN mice [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(12): 3527–3536.
- [23] Yuan L, Wang T, Zhang Y, et al. An HBV-tolerant immunocompetent model that effectively simulates chronic hepatitis B virus infection in mice [J]. Exp Anim, 2016, 65(4): 373–382.
- [24] Qin B, Budeus B, Cao L, et al. The amino acid substitutions rtP177G and rtF249A in the reverse transcriptase domain of hepatitis B virus polymerase reduce the susceptibility to tenofovir [J]. Antiviral Res, 2013, 97(2): 93–100.
- [25] Mingozi F, Liu YL, Dobrzynski E, et al. Induction of immune tolerance to coagulation factor IX antigen by *in vivo* hepatic gene transfer [J]. J Clin Invest, 2003, 111(9): 1347–1356.
- [26] Dion S, Bourguin M, Godon O, et al. Adeno-associated virus-mediated gene transfer leads to persistent hepatitis B virus replication in mice expressing HLA-A2 and HLA-DR1 molecules [J]. J Virol, 2013, 87(10): 5554–5563.
- [27] Yang D, Liu L, Zhu D, et al. A mouse model for HBV immunotolerance and immunotherapy [J]. Cell Mol Immunol, 2014, 11(1): 71–78.
- [28] Moshkani S, Chiale C, Lang SM, et al. A highly attenuated vesicular stomatitis virus-based vaccine platform controls hepatitis B virus replication in mouse models of hepatitis B [J]. J Virol, 2019, 93(5): e01586–e01518.
- [29] Du Y, Broering R, Li X, et al. *In vivo* mouse models for hepatitis B virus infection and their application [J]. Front Immunol, 2021, 12: 766534.
- [30] Chisari FV. Hepatitis B virus transgenic mice: insights into the virus and the disease [J]. Hepatology, 1995, 22(4): 1316–1325.
- [31] 王贵强, 王福生, 庄辉, 等. 慢性乙型肝炎防治指南(2019 年版) [J]. 中国病毒病杂志, 2020, 10(1): 1–25.
- Wang GQ, Wang FS, Zhuang H, et al. Guidelines for the prevention and treatment of chronic hepatitis B (2019 version) [J]. Chin J Viral Dis, 2020, 10(1): 1–25.
- [32] Milich DR. Is the function of the HBeAg really unknown? [J]. Hum Vaccin Immunother, 2019, 15(9): 2187–2191.
- [33] European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection [J]. J Hepatol, 2017, 67(2): 370–398.
- [34] van Drimmelen H, Lelie N. Early dynamics of hepatitis B virus (HBV)-DNA and surface antigen (HBsAg) in ramp-up phase of viremia: implications for performance evaluation of blood screening assays [J]. Viruses, 2022, 14(9): 1942.

[收稿日期] 2023-02-17