

文章编号: 1004-0374(2010)04-0338-07

## 从动物模型看乙型病毒性肝炎致病机制的研究进展

程 亮, 王盛典\*

(中国科学院生物物理研究所感染与免疫中心, 北京 100101)

**摘要:** 乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)是通过血液和体液传播的嗜肝DNA病毒, 尽管有有效的预防疫苗, 乙型病毒性肝炎仍是我国乃至全球人类健康的重大威胁。HBV的易感宿主只局限于人以及黑猩猩等灵长类动物, HBV感染性疾病的研究遇到很大困难。多种小动物研究模型的建立, 使我们对HBV感染致病机制的认识有了很大进步, 包括: 分子病毒学特征、在感染细胞中生命周期、机体的抗病毒免疫反应、肝脏病变的免疫病理机制等。但是, 由于已有动物模型的种种限制, 我们对HBV感染及乙型肝炎发生和发展的认识还远远不够, 目前除了抗病毒治疗外, 还没有有效地治疗慢性乙肝的方法。建立能够真实反映临床HBV感染、乙肝发生和进展过程的纯系小鼠模型, 对于我们全面深入地理解HBV感染的侵入机制、宿主和病毒之间相互作用, 以及发展预防和治疗HBV感染的新方法都具有非常重要的意义。

**关键词:** 乙型肝炎病毒; 动物模型; 免疫反应; 肝炎

**中图分类号:** R374.21; R-332 **文献标识码:** A

## Pathogenesis of hepatitis B: clues from the animal models

CHENG Liang, WANG Sheng-dian\*

(Center for Infection and Immunity, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** Hepatitis B virus (HBV) is hepatotropic DNA virus of hepadnavirus family that is spread by contact with blood and body fluids, and causes acute and chronic necroinflammatory liver disease. Despite the existence of a preventive vaccine, HBV infection represents a substantial threat to public health. HBV naturally infects only human and chimpanzees. Although various kinds of animal models have been established, which greatly improves our understanding of HBV infection including molecular virology, viral life circle, immune response against HBV infection and immunopathogenesis of hepatitis B, etc, many issues pertaining to the biology, immunobiology and pathogenesis of HBV infection remain unresolved due to the various limitations of the established models. Thus, developing animal models which can emulate natural HBV infection and resemble human HBV hepatitis is obviously of critical importance for addressing these issues, leading to the discovery of new approaches for prevention and treatment of HBV infection.

**Key words:** hepatitis B virus; liver cirrhosis; immune response; hepatitis

乙型病毒性肝炎是严重危害人类身心健康的全球传染性疾病, 是由乙型肝炎病毒(HBV)感染导致的慢性进行性肝脏炎症病变, 常常发展为肝硬化、肝癌。据WHO估计, 全世界约有20亿人曾经感染过HBV, 目前约有3.5亿慢性乙肝患者, 每年全世界因HBV感染引起的疾病死亡的人数为100万~200万<sup>[1]</sup>。我国是HBV感染高发区, 流行病学调查结果显

示, 我国人群乙肝表面抗原携带率为7.18%, 约有接近1亿的乙型肝炎病毒携带者, 其中约有2000

收稿日期: 2009-09-10; 修回日期: 2009-10-14

基金项目: 国家重大科学研究计划(2006CB504305); 国家高技术研究发展计划("863"计划)(2006AA02A410)

\*通讯作者: Tel: 010-64888493; E-mail: sdwang@moon.ibp.ac.cn

多万慢性乙肝患者。HBV感染给我国带来了非常严重的经济和社会负担。

乙肝表面抗原(HBsAg)疫苗接种对HBV感染有很好的预防作用,但有部分接种者无反应;临床上抗病毒药物能有效控制病毒复制,但需要长期服药,面临着患者产生耐药性、治疗无应答、不良反应严重等问题<sup>[2]</sup>,此外,对肝脏病变本身还没有有效的治疗方法。造成这一局面的主要原因是由于没有能进行HBV自然感染,能反映临床乙肝发生、发展过程的理想动物模型,导致目前对HBV感染的致病机制和肝脏病变的发展及转归机制认识还不全面和深入。本文将以HBV感染动物模型为线索,介绍乙型病毒性肝炎致病机制的研究进展和存在的问题。

## 1 HBV的生物学特性及其致病性

HBV是一种有被膜的嗜肝DNA病毒,有较强的种属特异性,自然条件下只感染人和非人灵长类(如黑猩猩等),主要通过血液及体液传播。HBV的感染和复制对靶细胞没有直接的毒性作用,病毒感染诱导的机体免疫反应被认为是引起肝脏疾病的重要原因<sup>[3]</sup>。机体对HBV感染的免疫反应是把双刃剑,一方面,特异性抗病毒CD8细胞毒性T细胞(CTL)反应,通过破坏感染的肝细胞而清除病毒,同时,还可以通过分泌IFN- $\gamma$ 以非细胞裂解机制抑制病毒复制而清除病毒<sup>[4-6]</sup>;另一方面,过强的抗病毒CTL反应会引起肝脏损伤,转氨酶升高,如急性乙型肝炎<sup>[3, 7]</sup>。在慢性乙肝患者体内,特异性CTL反应严重缺陷,表现为CTL数量显著降低,大多患者体内很难检测到CTL,而且功能下降<sup>[8, 9]</sup>,但同时伴随着肝脏大量非特异性淋巴细胞浸润和炎症因子及细胞毒性介质(包括TNF- $\alpha$ 、穿孔素、过氧化氢、超氧离子和一氧化氮)的产生,造成肝组织广泛的持续炎症损伤<sup>[8, 10]</sup>。持续的慢性肝损伤导致肝脏的修复反应持续激活,肝脏纤维发生和纤维降解过程发生紊乱,导致细胞外基质蛋白在肝脏内大量聚集,其后果逐步形成肝纤维化,进而发生肝硬化、肝癌<sup>[11]</sup>。

目前慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染的基本治疗措施是抗病毒治疗,治疗药物包括 $\alpha$ -干扰素(IFN- $\alpha$ )和核苷(酸)类似物等。IFN- $\alpha$ 作用广泛,除直接抗病毒,也有免疫调节及抗纤维化的作用,但只对25%~30%的患者有效,并且有明显的副作用<sup>[12, 13]</sup>。核苷(酸)类似物,如拉米夫定等能有效抑制病毒复

制,降低患者体内病毒载量,但不能彻底清除病毒,需要长期甚至终生服用,而且长期治疗可产生耐药性<sup>[2]</sup>。

由于目前的抗病毒疗法有种种局限性,临床上期待新的治疗方法问世,以达到控制或逆转乙型肝炎疾病的进展,甚至彻底治愈乙肝的目的,因此,对乙型肝炎致病机制的研究就显得尤其重要和迫切。

## 2 乙型肝炎研究的动物模型

由于HBV自然状态下只能感染人及黑猩猩等一些灵长类动物,要深入研究乙型肝炎的致病机制,发展合适的HBV感染实验动物模型的重要性就不言而喻。表1总结了目前已应用的及正在建立的动物模型。

### 2.1 黑猩猩模型

很早就发现了自然感染HBV的野生黑猩猩,在实验条件下也可利用HBV感染黑猩猩<sup>[14, 15]</sup>。黑猩猩是目前可被用来研究HBV感染、宿主抗病毒反应、疫苗和乙肝治疗效果评估的最佳模型。黑猩猩被用来评价酵母表达的HBsAg重组疫苗及其他预防及治疗性疫苗的效果研究<sup>[16, 17]</sup>,以及研究HBV感染过程中宿主的免疫反应<sup>[5, 6, 18]</sup>。在黑猩猩感染HBV后病毒的急性清除过程中,除了CD8<sup>+</sup>T细胞杀伤受感染的肝细胞外,细胞因子IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 等也可通过非溶细胞性的作用来阻止HBVDNA的复制,从而达到清除病毒的作用,由此证明了乙肝病毒的清除可通过非溶细胞性机制实现<sup>[5, 6]</sup>。黑猩猩也可以发生HBV的慢性感染,且伴随持续的慢性肝脏炎症,但其疾病程度比人要轻得多<sup>[19]</sup>,无法作为肝硬化及肝癌的研究模型。同时,由于伦理及经济上的制约,利用黑猩猩来进行HBV感染的生物学及免疫学研究受到很大的限制。

### 2.2 树鼩模型

除了黑猩猩等高等灵长类外,树鼩是其他的唯一能实验感染HBV的动物<sup>[20, 21]</sup>。树鼩感染HBV后,血清中很快出现抗HBe及抗HBs抗体,HBsAg快速消失,这一点和人的急性自限性肝炎很相似<sup>[21]</sup>。HBV可以体外感染分离的树鼩原代肝细胞,细胞内有HBVcccDNA及mRNA的合成,培养上清中能检测到HBsAg和HBeAg抗原,是体外研究HBV细胞感染机制的良好模型<sup>[22, 23]</sup>。最近利用树鼩-小鼠肝脏嵌合体小鼠实验表明,从HBV表面抗原大片段得到的乙酰基化的多肽可在体内阻断病毒的感染<sup>[24]</sup>。另外,利用从爆发性乙肝患者体内分离得

表 1 HBV 感染动物模型总结表

| 动物模型  | 建立方法  | 主要贡献   | 优点及局限性  | 参考文献                  |
|-------|---|--|---|-----------------------|
| 黑猩猩   | HBV 实验感染黑猩猩   | 评价多种疫苗效果及药物治疗效果；免疫系统可通过杀伤受感染的肝细胞及非裂解细胞方式清除病毒。    | 优点：黑猩猩和人的亲缘关系近；可体内直接感染 HBV；可研究免疫系统在控制病毒及致肝脏疾病中的作用。<br>局限性：使用受伦理和经济上的限制无法研究肝硬化及肝癌。   | [5, 6, 15-17, 19, 52] |
| 树鼩    | HBV 实验感染树鼩  | 病毒 Pre-S1 抗原在其感染侵入肝细胞中的作用；用于研究介导 HBV 感染的肝细胞上的受体。 | 优点：小动物模型，可直接感染 HBV；体外分离培养的树鼩原代肝细胞可感染 HBV。<br>局限性：非纯系动物，个体差异大；缺乏研究的试剂及抗体，不能检测它们的基因表达及免疫反应。   | [21-24]               |
| 鸭     | DHBV 实验感染鸭  | 肝 DNA 病毒的基因复制及病毒生活周期的研究；抗病毒药物的评价。                | 优点：DHBV 可感染鸭原代肝细胞，利于研究病毒的复制及生活周期。<br>局限性：无法研究病毒致病机制。  | [27-31, 53-56]        |
| 旱獭    | WHV 实验感染旱獭  | 肝 DNA 病毒的慢性感染可致肝癌；抗病毒药物的评价。                      | 优点：新生的旱獭易发生 WHV 慢性感染，可用于慢性乙肝药物的临床前评价。<br>局限性：由于缺乏相应试剂，难以研究免疫系统对病毒的作用  | [32-34]               |
| 转基因小鼠 | 在小鼠体内转基因表达完整的病毒基因组或单个的病毒基因片段  | HBV 病毒本身并不造成肝细胞的病变；免疫系统介导病毒清除，同时导致急性/慢性肝脏疾病      | 优点：可研究 HBV 不同蛋白在致肝脏疾病中的作用；可进行免疫致病机制研究。<br>局限性：HBV 的 DNA 被稳定地整合进小鼠的基因组中，小鼠肝细胞中不会产生 cccDNA，病毒在小鼠内没有完整的复制周期，也没有病毒感染肝脏细胞的过程，小鼠对 HBV 耐受。 | [35-43, 57-62]        |
| 嵌合体小鼠 | 移植从正常人或树鼩肝组织分离出的肝细胞至 Al <sup>b</sup> -uPA-SCID 或 RAG2 <sup>-/-</sup> 小鼠体内，然后用 HBV 体内感染小鼠                                  | 可评估抗病毒药物的效果                                      | 优点：可直接感染 HBV。<br>局限性：不能进行免疫介导的病毒清除和肝炎免疫致病机制的研究。   | [46, 47]              |
| 人源化小鼠 | 在免疫缺陷鼠 Rag2 <sup>-/-</sup> $\gamma$ c <sup>-/-</sup> 或 NOD-SCID/ $\gamma$ c <sup>-/-</sup> 体内重建人的免疫系统及人的肝脏，然后用 HBV 体内感染小鼠 | (尚在模型建立阶段)                                       | 优点：既能实现 HBV 体内自然感染，又能研究人免疫系统的抗病毒反应及肝脏疾病的免疫病理机制。<br>局限性：模型建立条件和技术要求高。  |                       |

到的 HBV 核心抗原启动子突变的 HBV 病毒感染树鼩原代肝脏细胞，显示此突变病毒感染对细胞有直接的细胞毒性作用<sup>[25]</sup>。但是，树鼩不是纯系动物，目前还处于散养条件下，HBV 感染后慢性肝炎的发生率不是很高，且个体差异很大；此外，目前缺乏

可进行树鼩研究的试剂及抗体，不能检测它们的基因表达及免疫应答，所以无法进行免疫反应及乙肝致病机制的研究。

### 2.3 鸭、旱獭模型

鸭是鸭乙型肝炎病毒(duck hepatitis B virus,

DHBV)的自然宿主。DHBV核酸组成与HBV有40%~70%的同源性,自然感染方式主要为垂直传播,先天性或幼年感染的雏鸭可发展为持续性DHBV感染<sup>[26]</sup>。由于机体的免疫系统对DHBV感染耐受,所以DHBV感染鸭子不会产生肝病。但对DHBV的研究为我们认识HBV的复制提供了很多参考,HBV DNA复制过程中的很多步骤,比如反转录过程、病毒正链及负链DNA的合成过程等等,都是首先从DHBV感染的鸭子研究中获知的<sup>[27, 28]</sup>。利用DHBV感染鸭子肝脏原代细胞,人们对HBV的生命周期有了更深入的认识,比如感染早期病毒cccDNA拷贝数增加,cccDNA是通过反转录而不是DNA的半保留复制合成等<sup>[29, 30]</sup>。DHBV模型也被用来评估临床前期抗病毒药物,如核苷类似物治疗效果<sup>[31]</sup>。

早獭肝炎病毒(woodchuck hepatitis virus, WHV)与HBV基因组DNA序列同源性约为70%,且基因组结构也相似。65%~75%的新生早獭易发生慢性WHV感染,它们在2~4年后几乎100%会发生肝癌<sup>[32]</sup>。慢性WHV感染和肝癌间的相关性研究为人群中HBV感染导致肝癌这一观点提供了有力的证据。早獭也是临床前期评估抗病毒药物效果的重要模型。研究显示,给携带WHV的早獭使用核苷类似物clevudine或entecavir能推迟肝癌的发生时间<sup>[33, 34]</sup>,这与在HBV患者中使用lamivudine能延缓肝癌发生的结果一致。

以上两种模型为我们理解HBV的复制周期、HBV的慢性感染及HBV的致肝癌作用做出了很大的贡献。然而,由于自交系的缺乏,以及没有相应的研究用试剂,使得人们很难用此模型进行病毒的致病机理研究。此外,这两种动物感染病毒后都不会发生肝硬化,不能用来作为肝硬化研究模型。

## 2.4 转基因小鼠模型

小鼠是理想的免疫学研究模式生物,但是HBV不感染小鼠。通过转基因技术将完整的病毒基因或单个的病毒基因片段在小鼠肝脏特异性表达,产生HBV转基因小鼠,这一模型的应用使人们对HBV感染的致病机制,特别是免疫系统在控制病毒复制及免疫致病中的作用有了更深入的认识。单独表达HBsAg的转基因小鼠可分泌HBsAg到血清中,但免疫系统对其耐受,不会发生肝脏疾病,类似于乙肝病毒健康携带者<sup>[35]</sup>。而同时表达HBsAg和Pre-S蛋白的小鼠,由于HBV表面抗原大片段在小鼠肝脏细胞内质网中大量聚集,对肝脏细胞有一定的毒性,

随着时间推移,会造成肝细胞循环性损伤和再生及轻度慢性炎症,18~21月龄后大部分小鼠会发生肝癌<sup>[36]</sup>。高表达HBx蛋白的转基因小鼠没有肝脏炎症,但也会发生肝癌,揭示了HBx可能具有致癌性<sup>[37]</sup>。HBV全基因组的转基因小鼠可复制产生HBV病毒颗粒,但也没有自发的肝脏疾病,说明HBV病毒本身并不造成肝细胞的病变<sup>[38, 39]</sup>。

所有HBV转基因小鼠对病毒抗原处于耐受状态,不产生乙型肝炎病变。为了研究免疫系统在病毒清除和导致肝脏疾病中的作用,将HBsAg特异性CTL过继转移给HBV转基因小鼠,结果引起肝细胞的严重坏死,血清转氨酶急剧升高,导致小鼠急性肝炎发生,同时伴随血清HBsAg的清除<sup>[7]</sup>。过继转移的CTL分泌的IFN- $\gamma$ 可以刺激趋化因子(如CXCL9和CXCL10)的产生,招募大量抗原非特异淋巴细胞浸润肝脏,进而扩大CTL介导的肝脏损伤<sup>[7]</sup>。另一方面,CTL产生的IFN- $\gamma$ 又可以通过非细胞裂解机制,控制或者清除病毒基因的表达和复制<sup>[4, 5, 40]</sup>。可见,机体免疫系统的多功能机制,一方面具有抗乙肝病毒感染,抑制病毒复制,清除病毒的作用;同时,又介导肝脏的免疫病理损伤。

HBV感染的主要危害是慢性感染导致的慢性肝病,上述的CTL转移模型也只能模拟临床爆发性或急性乙型肝炎的疾病过程。为了建立慢性乙肝小鼠模型,研究者通过多种方法来打破HBV转基因小鼠的免疫耐受。将HBV转基因鼠胸腺切除并进行照射,再用删除T细胞的野生型同系小鼠的骨髓重建没有T细胞的免疫系统,然后过继转移用HBsAg免疫过的同系野生型小鼠的脾细胞<sup>[41]</sup>;随后发展了更为简单的方法,在SCID小鼠背景上生产出带HBV转基因的SCID小鼠,或将HBV转基因鼠与免疫缺陷鼠(如RAG-1或者TCR  $\alpha$ 链基因敲除小鼠)交配,产生免疫缺陷的HBV转基因鼠,然后过继转移正常野生型同系小鼠的脾细胞<sup>[42, 43]</sup>。过继转移的淋巴细胞识别HBV抗原,产生免疫反应,抑制肝脏内病毒的基因复制及病毒抗原表达,并伴有抗HBV抗体的产生,小鼠血清中的病毒颗粒被清除,同时导致慢性肝脏炎症<sup>[42, 43]</sup>。这些实验很好地模拟了人感染HBV的疾病进程,特别是慢性肝脏炎症过程,同时也提示了NKT细胞在机体对HBV感染的免疫应答过程中所起的作用<sup>[42, 43]</sup>。

Zhu等<sup>[44]</sup>利用抗共刺激分子CD137抗体能非特异激活记忆表型T细胞(CD44<sup>+</sup>T细胞),给HBV转基因小鼠连续注射抗CD137抗体,激活的CD8<sup>+</sup>T

细胞浸润肝脏分泌 IFN- $\gamma$ ，招募大量炎症细胞浸润，分泌炎症因子，导致肝脏纤维化、肝硬化，最后发展成肝癌。这一模型较好反映了临床慢性乙肝的疾病进展过程，不失为研究慢性乙肝纤维化、肝硬化和原发性肝癌的良好动物模型。此外，将 HBV 转基因小鼠与不同基因敲除小鼠交配，可以研究不同基因在慢性肝炎肝纤维化、肝癌发生发展中的作用。我们发现 CD24 基因敲除的 HBV 转基因小鼠的肝癌发生率和进展明显小于没有敲除 CD24 基因的 HBV 转基因小鼠，从而证实了我们临床研究发现 CD24 分子基因多态性与乙肝进程的相关性<sup>[45]</sup>。

### 2.5 人-鼠肝脏嵌合体小鼠模型

在 HBV 转基因小鼠中，HBV 的 DNA 被稳定地整合进小鼠的基因组中，小鼠肝细胞中不会产生 cccDNA，病毒在小鼠内没有完整的复制周期，也没有病毒感染肝脏细胞的过程，并且不自然发病。为了实现在小鼠体内直接感染 HBV，研究者发展出了人-鼠肝脏嵌合体小鼠模型。此模型利用转基因技术，在免疫缺陷小鼠肝脏特异表达一种细胞毒性蛋白，使小鼠肝细胞坏死，如 Alb-uPA-SCID 或 Alb-uPA-RAG2<sup>-/-</sup> 小鼠，再将人的肝脏细胞移植到这些小鼠体内，人的肝细胞最高可以达到肝细胞的 50%<sup>[46, 47]</sup>。这种嵌合小鼠可以进行 HBV 体内感染，但是免疫系统缺陷，不能进行免疫介导的病毒清除和肝炎免疫病理机制的研究，可用来评估抗病毒药物的效果。

### 2.6 人源化小鼠模型

随着新一代免疫缺陷鼠 Rag2<sup>-/-</sup> $\gamma$ c<sup>-/-</sup> 和 NOD-SCID/ $\gamma$ c<sup>-/-</sup> 的出现，目前已能建立极具人免疫系统的人源化小鼠，并已应用于 HIV、EBV 病毒感染性疾病的研究<sup>[48-51]</sup>。我们与国外实验室合作，已经建立了诱导表达的 Alb-Caspase8- Rag2<sup>-/-</sup> $\gamma$ c<sup>-/-</sup> 转基因小鼠，该鼠比 Alb-uPA 转基因鼠有更大优越性，没有诱导基因表达前，对肝细胞几乎没有毒性。给新生转基因鼠输注人胎肝细胞和纯化的 CD34<sup>+</sup> 造血干细胞，就会在小鼠体内建立较为完善的人免疫系统，再给小鼠食用藤霉素诱导小鼠肝细胞特异性表达 Caspase8 而发生凋亡，植入的人胎肝细胞就会代偿性增生，这样就成为具有人免疫系统和肝细胞的人源化小鼠。该小鼠将是研究病毒性肝炎最理想的小鼠模型，既能实现 HBV 体内自然感染，又能研究人免疫系统的抗病毒反应及导致肝脏疾病的免疫病理机制。我们有理由相信，这一人源化小鼠模型的建立，对病毒性肝炎的基础和临床研究将会有巨大的推动作用。

## 3 总结

我们在乙型病毒性肝炎的研究上取得了很大进步，但已有的研究结果基本都是某些特定条件下的认识，不能完全反映乙肝患者体内的病理变化。我们对 HBV 感染的整体认识还很不全面和深入，还有一系列重要的科学问题需要回答，如 HBV 感染肝细胞的过程和机制；HBV 体外感染的细胞组织培养系统的建立；支持 HBV 体内感染并能导致类似于临床乙肝病变的小动物模型的建立；机体免疫系统在抗病毒感染和免疫致病过程中作用机制；慢性肝炎引发肝脏纤维化、肝硬化及肝癌的机制等等问题我们还知之甚少。这些问题的解决依赖于研究技术和手段的发展，尤其是能反映临床 HBV 感染疾病发生发展过程的模型的建立。只有这些有关 HBV 感染的重要问题认识清楚了，我们才能找到有效地预防和治疗 HBV 感染及 HBV 感染性肝脏疾病的方法。

### [参 考 文 献]

- [1] Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis*, 2002, 2: 43-50
- [2] Mailliard ME, Gollan JL. Emerging therapeutics for chronic hepatitis B. *Annu Rev Med*, 2006, 57: 155-66
- [3] Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol*, 2006, 1: 23-61
- [4] Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol*, 2001, 19: 65-91
- [5] Guidotti LG, Rochford R, Chung J, et al. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science*, 1999, 284: 825-9
- [6] Thimme R, Wieland S, Steiger C, et al. CD8<sup>+</sup> T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol*, 2003, 77: 68-76
- [7] Ando K, Moriyama T, Guidotti LG, et al. Mechanisms of class I restricted immunopathology. A transgenic mouse model of fulminant hepatitis. *J Exp Med*, 1993, 178: 1541-54
- [8] Maini MK, Boni C, Lee CK, et al. The role of virus-specific CD8<sup>+</sup> cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med*, 2000, 191: 1269-80
- [9] Boni C, Fiscaro P, Valdatta C, et al. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J Virol*, 2007, 81: 4215-25
- [10] Das A, Hoare M, Davies N, et al. Functional skewing of the global CD8<sup>+</sup> T cell population in chronic hepatitis B virus infection. *J Exp Med*, 2008, 205: 2111-24
- [11] Ramadori G, Saile B. Inflammation, damage repair, immune cells, and liver fibrosis: specific or nonspecific, this is the question. *Gastroenterology*, 2004, 127: 997-1000
- [12] Niederau C, Heintges T, Lange S, et al. Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon  $\alpha$  for chronic hepatitis B. *N Engl J Med*, 1996, 334: 1422-7

- [13] Lau GK, Piratvisuth T, Luo KX, et al. Peginterferon  $\text{Alf}\alpha\text{-}2\alpha$ , lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med*, 2005, 352: 2682-95
- [14] Maynard JE, Hartwell WV, Berquist KR. Hepatitis-associated antigen in chimpanzees. *J Infect Dis*, 1971, 123: 660-4
- [15] Barker LF, Chisari FV, McGrath PP, et al. Transmission of type B viral hepatitis to chimpanzees. *J Infect Dis*, 1973, 127: 648-62
- [16] Itoh Y, Takai E, Ohnuma H, et al. A synthetic peptide vaccine involving the product of the pre-S(2) region of hepatitis B virus DNA: protective efficacy in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 9174-8
- [17] Iwarson S, Tabor E, Thomas HC, et al. Protection against hepatitis B virus infection by immunization with hepatitis B core antigen. *Gastroenterology*, 1985, 88: 763-7
- [18] Asabe S, Wieland SF, Chattopadhyay PK, et al. The size of the viral inoculum contributes to the outcome of hepatitis B virus infection. *J Virol*, 2009, 83: 9652-62
- [19] Shouval D, Chakraborty PR, Ruiz-Opazo N, et al. Chronic hepatitis in chimpanzee carriers of hepatitis B virus: morphologic, immunologic, and viral DNA studies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77: 6147-51
- [20] 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 Cancer Res Clin Oncol*, 1996, 122: 283-8
- [21] Walter E, Keist R, Niederost B, et al. Hepatitis B virus infection of Tupaia hepatocytes *in vitro* and *in vivo*. *Hepatology*, 1996, 24: 1-5
- [22] Glebe D, Aliakbari M, Krass P, et al. Pre-S1 antigen-dependent infection of Tupaia hepatocyte cultures with human hepatitis B virus. *J Virol*, 2003, 77: 9511-21
- [23] Glebe D, Urban S, Knoop EV, et al. Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting pre-S1 lipopeptides and tupaia hepatocytes. *Gastroenterology*, 2005, 129: 234-45
- [24] Petersen J, Dandri M, Mier W, et al. Prevention of hepatitis B virus infection *in vivo* by entry inhibitors derived from the large envelope protein. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 335-41
- [25] Baumert TF, Yang C, Schurmann P, et al. Hepatitis B virus mutations associated with fulminant hepatitis induce apoptosis in primary Tupaia hepatocytes. *Hepatology*, 2005, 41: 247-56
- [26] O'Connell AP, Urban MK, London WT. Naturally occurring infection of Pekin duck embryos by duck hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, 80: 1703-6
- [27] Lien JM, Petcu DJ, Aldrich CE, et al. Initiation and termination of duck hepatitis B virus DNA synthesis during virus maturation. *J Virol*, 1987, 61: 3832-40
- [28] Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell*, 1982, 29: 403-15
- [29] Tuttleman JS, Pugh JC, Summers JW. *In vitro* experimental infection of primary duck hepatocyte cultures with duck hepatitis B virus. *J Virol*, 1986, 58: 17-25
- [30] Summers J, Smith PM, Horwich AL. Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification. *J Virol*, 1990, 64: 2819-24
- [31] Hirota K, Sherker AH, Omata M, et al. Effects of adenine arabinoside on serum and intrahepatic replicative forms of duck hepatitis B virus in chronic infection. *Hepatology*, 1987, 7: 24-8
- [32] Popper H, Roth L, Purcell RH, et al. Hepatocarcinogenicity of the woodchuck hepatitis virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 866-70
- [33] Korba BE, Cote PJ, Menne S, et al. 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: 937-52
- [34] Colonna RJ, Genovesi EV, Medina I, et al. Long-term entecavir treatment results in sustained antiviral efficacy and prolonged life span in the woodchuck model of chronic hepatitis infection. *J Infect Dis*, 2001, 184: 1236-45
- [35] Babinet C, Farza H, Morello D, et al. Specific expression of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in transgenic mice. *Science*, 1985, 230: 1160-3
- [36] Chisari FV, Klopchin K, Moriyama T, et al. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell*, 1989, 59: 1145-56
- [37] Kim CM, Koike K, Saito I, et al. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature*, 1991, 351: 317-20
- [38] Farza H, Hadchouel M, Scotto J, et al. Replication and gene expression of hepatitis B virus in a transgenic mouse that contains the complete viral genome. *J Virol*, 1988, 62: 4144-52
- [39] Guidotti LG, Matzke B, Schaller H, et al. High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol*, 1995, 69: 6158-69
- [40] Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MW, et al. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*, 1996, 4: 25-36
- [41] Nakamoto Y, Guidotti LG, Kuhlen CV, et al. Immune pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *J Exp Med*, 1998, 188: 341-50
- [42] Larkin J, Clayton M, Sun B, et al. Hepatitis B virus transgenic mouse model of chronic liver disease. *Nat Med*, 1999, 5: 907-12
- [43] Baron JL, Gardiner L, Nishimura S, et al. Activation of a nonclassical NKT cell subset in a transgenic mouse model of hepatitis B virus infection. *Immunity*, 2002, 16: 583-94
- [44] Zhu Y, Zhu G, Luo L, et al. CD137 stimulation delivers an antigen-independent growth signal for T lymphocytes with memory phenotype. *Blood*, 2007, 109: 4882-9
- [45] Li D, Zheng L, Jin L, et al. CD24 polymorphisms affect risk and progression of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*, 2009, 50: 735-42
- [46] Dandri M, Burda MR, Torok E, et al. Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and *in vivo* infection with hepatitis B virus. *Hepatology*, 2001, 33: 981-8
- [47] Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, et al. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med*, 2001, 7: 927-33
- [48] Traggiai E, Chicha L, Mazzucchelli L, et al. Development of

- a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science*, 2004, 304: 104-7
- [49] Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B, et al. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor  $\gamma$  chain (null) mice. *Blood*, 2005, 106: 1565-73
- [50] Zhang L, Kovalev GI, Su L. HIV-1 infection and pathogenesis in a novel humanized mouse model. *Blood*, 2007, 109: 2978-81
- [51] Strowig T, Gurer C, Ploss A, et al. Priming of protective T cell responses against virus-induced tumors in mice with human immune system components. *J Exp Med*, 2009, 206: 1423-34
- [52] Bitter GA, Egan KM, Burnette WN, et al. Hepatitis B vaccine produced in yeast. *J Med Virol*, 1988, 25: 123-40
- [53] Mason WS, Seal G, Summers J. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol*, 1980, 36: 829-36
- [54] Molnar-Kimber KL, Summers J, Taylor JM, et al. Protein covalently bound to minus-strand DNA intermediates of duck hepatitis B virus. *J Virol*, 1983, 45: 165-72
- [55] Lien JM, Aldrich CE, Mason WS. Evidence that a capped oligoribonucleotide is the primer for duck hepatitis B virus plus-strand DNA synthesis. *J Virol*, 1986, 57: 229-36
- [56] Addison WR, Walters KA, Wong WW, et al. Half-life of the duck hepatitis B virus covalently closed circular DNA pool *in vivo* following inhibition of viral replication. *J Virol*, 2002, 76: 6356-63
- [57] Milich DR, Jones JE, Hughes JL, et al. Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 6599-603
- [58] Guidotti LG, Ando K, Hobbs MV, et al. Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 3764-8
- [59] Guidotti LG, Martinez V, Loh YT, et al. Hepatitis B virus nucleocapsid particles do not cross the hepatocyte nuclear membrane in transgenic mice. *J Virol*, 1994, 68: 5469-75
- [60] Koike K, Moriya K, Iino S, et al. High-level expression of hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Hepatology*, 1994, 19: 810-9
- [61] Milich DR, Jones JE, Hughes JL, et al. Extrathymic expression of the intracellular hepatitis B core antigen results in T cell tolerance in transgenic mice. *J Immunol*, 1994, 152: 455-66
- [62] Tsui LV, Guidotti LG, Ishikawa T, et al. Posttranscriptional clearance of hepatitis B virus RNA by cytotoxic T lymphocyte-activated hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 12398-402