

DOI: 10.13376/j.cblls/2014123

文章编号: 1004-0374(2014)08-0858-08

HCV复制子与细胞培养体系研究进展

刘 宁, 冯 悦, 张阿梅, 岳 蕾, 夏雪山*

(昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650500)

摘 要: 丙型肝炎是由丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 感染所导致的传染性肝病, 呈现世界性流行态势, 严重危害人类健康。由于病毒自身高度突变, 以及广泛高效的细胞培养体系和合适的小动物模型缺乏, 目前尚无可有效预防的疫苗。自 1989 年丙型肝炎病毒基因组首次被确定以来, Con1(1b) 亚基因组复制子和 JFH1(2a) 毒株细胞培养体系相继建立。以此为工具, HCV 生活周期多个关键环节得以阐明。近年来, 研究者在 Con1 亚基因组复制子、JFH1 和 J6/JFH1 细胞培养体系的基础上, 构建出多个基因型和亚型的复制子和细胞培养体系。不同的体系在 HCV 复制与致病机制研究、抗病毒药物筛选方面, 具有不同的用途及优缺点。针对 HCV 复制子与细胞培养体系的研究进展进行综述, 可为 HCV 的相关研究提供参考。

关键词: 丙型肝炎病毒; 复制子; 基因型; 嵌合体

中图分类号: Q939.4; R512.63 **文献标志码:** A

The development of HCV replicon and cell culture system

LIU Ning, FENG Yue, ZHANG A-Mei, YUE Lei, XIA Xue-Shan*

(Faculty of Life Sciences and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: Hepatitis C is an infectious hepatopathy caused by hepatitis C virus (HCV). It is globally prevalent and seriously harmful to the health of human beings. So far, there are no preventive vaccines due to the lack of efficient cell culture systems derived from various genotypes and suit small animal models, and also the frequent mutation of HCV genome. Since the genome of HCV firstly was determined in 1989 using molecular cloning technique, the replicons of Con1 subgenome and JFH1 (2a) cell culture system were constructed subsequently. Further studies made great progress in our understanding on the multiple phases of the life cycle of this virus. Recently, based on the constructing strategies of the Con1 replicon, JFH1 and J6/JFH1 cell culture systems, HCV replicons and cell culture systems of other genotypes have been generated. Various systems have been selectively used in the research of HCV replication, pathogenic mechanism and anti-virus drug screening. Here, we review the progress in the construction of HCV replicons and cell culture systems to provide a helpful reference for the research of HCV.

Key words: hepatitis C virus; replicon; genotype; chimera

丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 为单股正链 RNA 病毒, 属黄病毒科, 丙型肝炎病毒属^[1]。据统计, 全世界约有 1.85 亿人感染 HCV, 55%~85% 的感染者会发展为慢性肝炎, 近 30% 的慢性感染者最终会发展为肝硬化, 甚至肝癌^[2]。HCV 的基因组长约 9.6 kb, 由一个开放阅读框 (open reading frames, ORF) 和两侧的非编码区组成 (图 1)。非编码区对病毒 RNA 的复制和翻译至关重要^[3], HCV 的开放阅读框编码一个约 3 000 个氨基酸的多

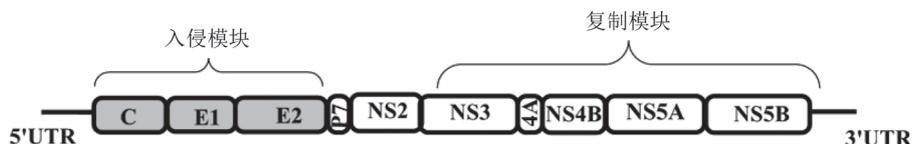
聚蛋白前体。在宿主细胞的内质网中, 该前体由宿主和病毒蛋白酶加工成 10 个成熟的功能性蛋白^[4], 分为结构蛋白和非结构蛋白两大类。

HCV 基因高度变异, 根据核酸序列同源性,

收稿日期: 2014-01-13; 修回日期: 2014-03-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(81260248, 813602-47); 国家科技支撑计划项目(2011BAI15B0121, 2012BAI39B01, 2014BAI01B01)

*通信作者: E-mail: oliverxia2000@aliyun.com



灰色: HCV的结构蛋白; 白色: 非结构蛋白。其中core-E2蛋白与HCV的入侵相关, 非结构蛋白NS3~NS5B与HCV复制相关^[5]。

图1 HCV基因组模式图

HCV可分为7种基因型和67个亚型^[6]。不同基因型HCV具有明显的地区分布差异, 如在欧洲以1型为主要流行, 3型在印度和泰国非常普遍, 4型主要分布于埃及和中东地区, 5型主要分布在南非, 6型主要集中在东南亚地区^[7]。丙型肝炎的临床常用治疗药物为干扰素/利巴韦林联合疗法^[8], 其治疗有效率及病程进展速度很大程度上取决于感染病毒的基因型^[9]。其中, 干扰素对1型和4型HCV感染的治疗效果差, 而基因3型HCV感染与脂肪病变和纤维化高度相关。尽管最近以依赖RNA的RNA聚合酶(RdRp)为靶点的抗病毒药物sofosbuvir(也称PSI-7977)的使用较大程度地提高了患者持续性病毒学应答率, 但由于病毒在此区段自然发生的基因变异可能产生耐药性突变, 该药物使用仍伴有一定的副作用^[10-12], 亟待开发新型抗病毒药物。由于不同基因型存在地区差异化, 且在药物治疗应答方面有明显的差异^[13], 因此迫切需要建立针对不同基因型HCV的研究工具, 为丙型肝炎的预防和治疗策略的研究提供技术支撑。

1 亚基因组复制子体系

自1989年HCV全基因组首次被克隆后, HCV体外细胞培养体系的缺乏严重制约了HCV病原学研究及抗HCV药物的研发。直到1999年, 属HCV 1b型的Con1病毒株亚基因组复制子体系的成功建立, 使得HCV体外细胞培养体系的建立有了突破性进展^[14]。Con1亚基因组复制子是在HCV全基因组中去除核心蛋白至p7和非结构蛋白2(NS2)两段基因, 相应替换为非病毒成分新霉素磷酸转移酶(neo)基因(用于G418抗性筛选)和小核糖核酸病毒的内部核糖体进入位点(IRES)。由此获得的HCV复制子具有双顺反子, 可分别编码neo基因和HCV复制酶(NS3~NS5B)基因。将该复制子的转录产物转染人肝癌细胞系Huh7, 经G418抗性筛选, 可获得具有HCV RNA高水平复制细胞克隆(单个细胞含1 000~5 000个正链RNA分子)^[15]。

HCV亚基因组复制子体系部分模拟HCV的真实复制周期但不产生感染性病毒颗粒, 通过测定HCV正链和负链RNA及非结构蛋白水平, 可评价HCV复制的水平^[16]。

Con1亚基因组复制子的构建策略已被用来构建HCV其他病毒株的亚基因组复制子。李雪黎等^[17]用Quick change点突变法删除pJ6/JFH1BlaRL质粒上的core-NS2片段, 替换为海肾荧光素酶(Rluc)报告基因, 构建了HCV-IRES启动的单顺反子复制子, 通过测定报告基因的表达来检测HCV的复制。Date等^[18]按照Kato等^[19]的pSGR-JFH1亚基因组复制子体系的构建策略, 构建了HCV 2a型JFH2毒株的亚基因组复制子, 通过插入荧光素酶报告基因获得含报告子的复制子。Saeed等^[20]用含NPTII基因和EMCV IRES的片段替代HCV 3a型S52毒株的20~1 032个氨基酸获得新霉素抗性的亚基因组复制子S52/SG-neo, 并用编码萤火虫荧光蛋白(Luc)与NPTII的融合基因取代NPTII基因, 获得表达萤火虫荧光蛋白的亚基因组复制子S52/SG-Feo。为提高基因复制效率, 引入位于NS5A蛋白的S2210I核酸点突变, 使RNA拷贝达每 μg RNA $1.9 \times 10^7 \sim 5.5 \times 10^7$ 。进而, Saeed等^[21]又从一个例肝移植后复发的丙型肝炎患者得到3a型HCV毒株S310, 用相同的策略建立了S310毒株在Huh7细胞中稳定复制的亚基因组复制子体系。在此基础上, Yu等^[22]相继构建了3a型S52毒株的用于neo抗性筛选、便于检测的neo-Rluc融合报告子的亚基因组复制子体系, 以及脊髓灰质炎病毒的IRES与Rluc融合报告子的用于瞬时转染的亚基因组复制子体系, 引入位于NS5A的S232I突变, 极大地增强了HCV的复制效率和neo-Rluc抗性克隆的形成率。在4a型HCV亚基因组复制子构建方面, Peng等^[23]构建了含NS4A蛋白Q34R和NS5A蛋白S232I适应突变的亚基因组复制子ED43-RluNeo, neo和荧光素酶基因的插入使其具有良好的筛选和检测标记。Saeed等^[20]用NPTII和EMCV IRES的基因片

段替代 HCV 4a 型 ED43 毒株的 20~1026 个氨基酸, 获得新霉素抗性筛选的亚基因组复制子 ED43/SG-neo, 并用萤火虫荧光蛋白基因与 NPTII 融合基因取代 NPTII 基因获得表达萤火虫荧光蛋白的亚基因组复制子 ED43/SG-Feo。引入位于 NS5A 蛋白的 S2204I 和 E2163G 双重突变后, 进一步提高了 HCV RNA 的复制效率。

近年, HCV 嵌合型亚基因组复制子的研究也取得了一些进展。Wang 等^[24]用 3a 型 HCV 3 个毒株的 NS5A 基因, 替换 JFH1 亚基因组复制子的相应区段, 得到以 2a 型为骨架嵌合 3a 型 NS5A 基因的亚基因组复制子。Kylefjord 等^[25]则用 3a 型病毒的 NS5A-5B 替代 pFK/I389Luc 3-3ET 中的相应区段, 得到以 1b 型为骨架嵌合 3a 型病毒 NS5A-5B 区段的亚基因组复制子。鉴于 NS5B 对 HCV 复制的重要作用, Wong 等^[26]将 2b、3a、4a、5a 和 6a 型 HCV 的 NS5B 序列嵌合到 1b-Con1 亚基因组复制子, 获得以 1b 型为骨架, 分别含有多个基因型 NS5B 区段的嵌合型亚基因组复制子。不同基因型、亚型及不同形式嵌合型亚基因组复制子体系的构建, 为研究 HCV 非结构蛋白的功能, 筛选靶向抗病毒药物提供了必要的技术支持。部分举例见表 1。

2 HCV 细胞培养体系

亚基因组复制子不含结构蛋白基因, 没有完整的病毒生活周期, 无法进行病毒感染机制及结构蛋白对宿主细胞影响的研究^[27]。用 HCV Con1 毒株的

全长基因组替换其亚基因组复制子中的非结构蛋白, 获得含 HCV 全基因组的质粒, 体外转染宿主细胞, 获得能够在宿主细胞中高效复制和表达蛋白的 HCV 全基因组复制子体系^[28], 使得对 HCV 结构蛋白的研究成为可能。由于缺乏支持 HCV 组装和释放的宿主因子, 该体系无法释放出感染性病毒颗粒, 无法进行 HCV 组装和释放的研究^[28-29]。2005 年, Wakita 等^[30]成功构建了 2a 型 HCV 毒株 JFH1 感染性克隆的细胞培养体系。在不引入适应性突变的情况下, HCV 基因组可在 Huh7 细胞和其衍生的肝癌细胞系, 如 Huh7.5 细胞中稳定高效复制, 产生的病毒颗粒可感染黑猩猩^[31]。HCV 病毒培养体系的成功构建极大地推动了 HCV 的研究进展。部分举例见表 1。

Li 等^[32]对 J6 全长克隆 (J6CF) 的 3'UTR 可变区 (VR) 的核苷酸进行突变并缩短多聚 poly (U/UC) 序列, 引入 F1468L、A1676S、D3001G、F776S、P1100L 和 N1931S/T 多氨基酸位点突变, 使 J6 全基因组 J6.LSGΔ33U 能在 Huh7.5 细胞中高效复制, 病毒滴度达 $10^{4.2}$ FFU/mL。在 2b 型的 HCV J8 毒株基因组中引入与 J6 同样的突变位点 (F1468L、A1676S 和 D3001G), 有效启动了 J8 毒株在转染细胞中的复制; 引入 F772C/W864R/A1208T 和 I1968V/E2263V/H2922R 两种形式的联合突变, 可有效提高其感染和病毒颗粒的产生。感染后 6~10 d, 超过 80% 的细胞被感染, 上清病毒滴度最高达 $10^{2.7} \sim 10^{2.9}$ FFU/mL, 连续传代后病毒滴度达 $10^{3.2} \sim 10^{3.4}$ FFU/mL。之后, Li 等^[33]

表1 部分毒株HCV复制子和细胞培养体系的复制、感染能力及适应性突变引入

HCV培养体系	基因型	适应突变	细胞系	感染滴度Log(FFU/mL)
亚基因组复制子				
S52/SG-neo ^[20]	3a	S2210I	Huh7.5	-
S52-neo ^[22]	3a	P89L/K583E	1C	-
S52-Pi-Rluc ^[22]	3a	P89L/K583E	1C	-
ED43/SG-neo ^[20]	4a	S2204I/E2163G	Huh7.5	-
ED43-neo ^[23]	4a	Q34R/S232I	1C	-
ED43-RluNeo ^[23]	4a	Q34R/S232I	1C	-
细胞培养体系				
TNcc ^[33]	1a	F1464L/A1672S/D2979GY2981F/ A1226G/Q1773H/N1927T/F2994S	Huh7.5	4.9
J6cc ^[32]	2a	F1468L/A1676S/D3001G/F776S/P1100L/N1931S/T	Huh7.5	4.2
J8cc ^[32]				
PR63cc ^[34]	2b	F1468L/A1676S/D3001G/F772C/W864R/A1208T/ I1968V/E2263V/H2922R	Huh7.5	3.4
	2a	n.r	Huh7.5.1	5

注: -, 该复制子只能在细胞中复制, 不具备感染细胞的能力; n.r, 未查到参考文献中的相关报道; 感染滴度, 指该体系在转染和传代中能达到的最高感染性滴度。

通过引入 HCV 2a(J6) 和 2b(J8) 型全长细胞培养体系构建必要的 F1464L/A1672S/D2979G (LSG) 突变 (位于非结构蛋白区) 获得 HCV 1a 型 TN 全长毒株的细胞培养体系。病毒感染滴度达 $10^{4.6} \sim 10^{4.9}$ FFU/mL, 与阳性对照病毒 J6 5'UTR-NS2/JFH1 ($10^{4.7} \sim 10^{4.9}$ FFU/mL) 感染力相当。Date 等^[18]用 JFH2 的 5'UTR-NS2 区段替代 pJ6/JFH2 T7 启动子下游 J6 的相应序列获得 HCV 2a 型的 JFH2 毒株的细胞培养体系, 该复制子能在 Huh7.5.1 细胞中复制, 释放出的病毒颗粒能够感染培养的细胞。Lu 等^[34]以 JFH1 为骨架, 用一例 2a 型 HCV 临床分离株 (PR63) 样本的序列依次取代 JFH1 的相应序列, 通过功能性克隆筛选、拼接及引入细胞适应性突变, 构建了它的全长感染性 cDNA 克隆 (PR63cc), 进而建立了基于 PR63cc 的 HCV 细胞感染模型。PR63cc 在 Huh7.5.1 细胞中能高效产生病毒, 最高感染滴度达 1.6×10^5 FFU/mL。该病毒对现有抗丙肝药物的敏感性与 JFH1 病毒不同, 其中 PR63cc 病毒对 NS5A 的抑制剂高度不敏感。PR63cc 是第一例来源于中国丙肝患者样本的全长感染性克隆, 也是世界上首例不通过共有序列, 而直接从临床样本来源构建的能感染肝细胞系的感染性克隆。这种新开发的方法可以应用于其他临床分离株, 对丙型肝炎患者的个性化治疗以及药物测试开发等领域均有重要意义。

3 嵌合体 HCV 细胞培养体系

由于未知原因, 对于细胞培养体系中 HCV 的感染与感染性病毒颗粒的产生, JFH1 非结构蛋白似乎必不可少, 现有的细胞培养体系多以 JFH1 毒株为骨架进行构建。另外, 非结构蛋白氨基酸突变可使 HCV RNA 在 Huh7 细胞复制更为高效, 产生感染性病毒粒子的能力更强。鉴于此, 研究者通过构建 JFH1 毒株与其他基因型或亚型的嵌合体 HCV 细胞培养体系, 以弥补其他基因型、亚型 HCV 细胞培养体系难以建立的不足。

为了进行 1b 型 HCV 结构蛋白的研究, Chan 等^[35]用 1b 型 Con1 毒株的 core-NS2 蛋白前 33 个氨基酸的编码基因片段替换 JFH1 的相应部分, 并将人源化的海肾荧光素酶基因插入到 1b 型 HCV 的 5'UTR 和 core 之间, 获得带有报告基因的 1b/2a 嵌合体 HCV (1b/2a hRluc)。在此嵌合体中引入 6 个适应性氨基酸突变, 分别为位于 core 的 A150V, NS2 的 L839S, NS3 的 V1065G 和 I1312V, NS5A 的 M2388I 和 NS5B 的 V2937A, 极大增强了病毒对

Lunet 细胞的感染效率和感染性病毒颗粒的产生能力。用不同的 HCV 抑制剂处理插入和未插入海肾荧光素酶的病毒, 证明海肾荧光素酶的插入没有改变病毒对药物的敏感性。Lu 等^[36]用临床样本来源的 1b 型 (GT1b) HCV core-NS2 的第一个跨膜域 (TMD)(aa 1~842) 的序列替代 JFH1 对应的序列, 构建了嵌合体 HCV GT1b core-1st TMD/JFH1。1b 型是中国、日本和欧洲等地流行的主要 HCV 基因型, 临床来源的 1b 型毒株与 2a 型嵌合体 HCV 细胞培养体系的构建对 1b 和 2a 型混合感染患者的抗病毒治疗具有重要意义。该临床毒株嵌合体的构建策略为其他临床分离株的细胞培养体系的构建提供了参考。

适应性突变可显著提高病毒的感染与复制效率, Galli 等^[37]用基因型 1a、1b、3a、4a、5a、6a 和 7a 的 core-NS2 和 NS5A 取代 JFH1 的相应序列, 通过反向遗传学分析, 引入适应性突变 Y1644H 和 E2267G, 最终得到可用于检测 core 与 NS5A 共定位的基因型 1~7 的 core-NS2/NS5A 的嵌合体病毒 H77C/JFH1(1a) 和 TN/JFH1(1a), 以及 J4/JFH1(1b)、S52/JFH1(3a)、ED43/JFH1(4a)、SA13/JFH1(5a)、HK6a/JFH1(6a) 和 QC69/JFH1(7a)。在 Huh7.5 细胞传代后, HCV 的 RNA 载量最高约 10^7 IU/mL。S52(3a)、SA13(5a) 和 QC69(7a) 感染滴度最高达 10^4 FFU/mL, H77C(1a) 和 HK6a(6a) 的达 $10^{3.5}$ FFU/mL, 而 TN(1a)、J4(1b) 和 ED43(4a) 的低于 10^3 FFU/mL。Li 等^[38]在 HCV 1a、1b、2a、2b、3a、4a、5a 和 6a 的 5'UTR-NS2 与 JFH1 的嵌合体细胞培养体系中, 进行 HCV 5'UTR 区的删除或定点突变, 经功能验证发现 5'UTR 的茎环结构 I (1~43 个核苷酸) 是基因型 1~6 病毒感染所必需的。

HCV 的非结构蛋白尤其是 NS5A、NS5B 对病毒的复制、增殖具有重要作用。通过用不同基因型的重要功能蛋白的基因区段替换 J6/JFH1 的相应序列, 构建的嵌合体病毒的细胞培养体系将是研究这些蛋白相关功能的重要工具^[39-42]。

Gottwein 等^[43]分别将基因型 1a(H77 和 TN)、1b(J4)、2a(J6)、3a(S52)、4a(ED43)、5a(SA13)、6a(HK6a) 和 7a(QC69) 的 NS3 N 末端 1/3 的蛋白酶域 (NS3P) 与 NS4A 替代 J6/JFH1 的相关序列, 得到表达特定基因型 NS3P/4A 的嵌合体 HCV, 并建立了这些体外重组病毒的细胞培养体系。在这些培养体系中引入位于 E1、p7、NS2、NS3P、NS4A、NS4B 和 NS5A 的相关适应性突变, 培养体系上清

中的病毒感染滴度达 $10^{3.5} \sim 10^{4.0}$ FFU/mL。此外, Gottwein 等^[44]用相应基因型 1a (H77 和 TN)、1b(J4)、2a (J6)、3a (S52)、4a (ED43)、5a (SA13)、6a (HK6a) 和 7a (QC69) 的 NS4A 取代 pJ6/JFH1 的 NS4A 序列, 建立能表达多种基因型 NS4A 蛋白的病毒培养体系。引入位于 P7 和 NS4A 的适应性突变 F772S(P7) 和 V1663A(NS4A), 显著提高了嵌合型病毒的感染与增殖效率, 感染滴度不低于 $10^{3.5}$ FFU/mL。Scheel 等^[45]用 HCV 7 个基因型 H77C(1a)、TN(1a)、J4(1b)、J6(2a)、S52(3a)、ED43(4a)、SA13(5a)、HK6a(6a) 和 QC69(7a) 病毒株的 NS5A 替换 J6/JFH1 完整的 NS5A 序列, 得到表达特定基因型 NS5A 蛋白的嵌合型病毒的细胞培养体系。引入适应性突变使得重组病毒产生效率及感染滴度明显增高。

含报告基因的嵌合体 HCV 细胞培养体系的构建提高了 HCV 相关研究的易操作性。Gottwein 等^[46]在 2a 型的 J6/JFH1 基因组的 NS5A 区段插入 EGFP 报告基因, 经在 Huh7.5 细胞适应性培养, NS5A 蛋白产生一个 40 或 25 个氨基酸的结构缺失 ($\Delta 40$ 或 $\Delta 25$), 来修复 EGFP 报告基因的插入导致的病毒粒子装配功能损伤。用该报告基因插入表达的方法, 进一步构建了 1~7 基因型的 core-NS2 与 JFH1 嵌合并可具有 EGFP 或 RLuc 等报告基因的多种形式的嵌合体全基因组细胞培养体系。这些带报告基因的嵌合型细胞培养体系, 使得进行高通量抗病毒药物筛选和 HCV 中和抗体评价成为可能。目前抗病毒药物研究中最常用的药物筛选体系是 J6/JFH1 嵌合体病毒的细胞培养体系。Kamada 等^[27]为了便于检测药物对 HCV 复制的抑制作用, 对 J6/JFH1 进行改造。用 pFL J6/JFH1 中的 J6/JFH1 全基因组替换 pFGR JFH1/Luc 中的 JFH1 全长, 得到含单顺反子荧光素酶报告基因的 pFGR J6/JFH1/Luc 病毒。该报告子病毒可以作为 HCV 的替代模型, 用于研究 HCV 的各个生活阶段, 包括入侵、复制和子代病毒的产生等。由于该病毒便于检测, 已应用于抗 HCV 化合物库的筛选。

多种基因型 HCV 中重要功能蛋白的嵌合型病毒细胞培养体系的建立(复制子的结构、感染能力和引入的适应性突变见表 2), 为针对相应基因型 HCV 生活周期中的特定靶点及其相关功能研究提供了技术保障。

4 复制子和细胞培养体系的应用和优缺点

HCV 亚基因组复制子体系含有的主要药物靶

点是 NS3/4A 丝氨酸蛋白酶和 NS5B RNA 依赖的 RNA 聚合酶。目前, HCV 亚基因组复制子涵盖了范围更广的基因型和分离株(表 1)。因为亚基因组复制子的基因比全长病毒基因组更易于改造, 通过用特定基因型或毒株的相应基因替代复制子中的蛋白酶或聚合酶基因, 获得针对特定基因型相关靶点的嵌合体亚基因组复制子, 更有利于开展针对特定靶点的相关功能或药物研究。而含报告基因的亚基因组复制子, 如荧光素酶、分泌型碱性磷酸酶和氯霉素转移酶等, 进一步促进了 HCV 感染的研究, 可以在不影响 HCV 复制的情况下, 追踪观察活细胞中的 HCV 复制复合物^[47-48]。此外, 复制子系统不会导致生物危害, 这使得该系统可以在低级别的生物安全水平进行以筛选为目的的实验。因此, HCV 复制子系统的存在对于开发新的抗 HCV 药物具有重要意义。HCV 亚基因组复制子对抗病毒药物耐药株的筛选也很重要。在大多数情况下, 筛选使用的是可选择的复制子系统, 该系统利用选择标记(如 G418 对含有新霉素基因的复制子)来保护抗病毒药物选择压力作用下的复制子, 进而筛选出含有 RNA 变异的细胞克隆。当使用 HCV 细胞培养体系时, 具有高基因屏障的强效抗病毒药物可迅速消除培养基中的病毒, 无法达到筛选耐药株的目的。

然而, 该体系也有自身的缺点。因为 HCV RNA 的复制与宿主细胞的增殖相偶联, 抑制宿主细胞生长的药物也会降低病毒 RNA 的复制水平, 无法真实地反映该药物对 HCV 复制的影响。细胞培养的适应性突变也可能改变病毒蛋白的生化性质, 从而对抗病毒药物的敏感性发生变化。此外, 使用亚基因组复制子模型进行抗病毒药物的筛选, 实际上忽略了结构蛋白对化合物抗病毒活性的影响。由于目前大部分复制子系统是双顺反子, 对 EMCV IRES 有抑制作用的药物也能抑制病毒 RNA 的复制。然而, 随着不含外源 IRES 的单顺反子复制子的成功构建, 这种假阳性的复合物将逐渐被排除。

HCV 细胞培养体系能够在实验室中产生重组的感染性 HCV 病毒颗粒, 可以用于研究 HCV 完整的生活周期, 尤其是对生活周期的晚期阶段即组装与释放的研究。此外, HCV 细胞培养体系是研究该病毒与宿主细胞相互作用的模型, 可以通过构建不同基因型、亚型之间的嵌合体 HCV 细胞培养体系, 观察不同嵌合体病毒的复制效率和感染率, 来研究 HCV 不同基因区域之间的相互作用。

表2 部分转染Huh7.5细胞的嵌合体病毒细胞培养体系的特性

嵌合毒株	基因型	嵌合片段	适应突变	感染滴度Log ₁₀ (FFU/mL)
JFH1骨架				
H77 ^[46]	1a	Core-NS2	T2701C/A4081T	3.7
TN ^[46]	1a	Core-NS2	T2701C/A4081T	4.3
J4 ^[46]	1b	Core-NS2	T2701C/A4081T	3.7
J6 ^[46]	2a	Core-NS2	None	4.7
J8 ^[46]	2b	Core-NS2	None	4.0
S52 ^[46]	3a	Core-NS2	T2701G/ A4533C	4.4
ED43 ^[46]	4a	Core-NS2	A2820G/A3270T	3.8
SA13 ^[46]	5a	Core-NS2	C3403G/ A3694G	5.3
HK6a ^[46]	6a	Core-NS2	T1387C/ A1591C	4.4
QC69 ^[46]	7a	Core-NS2	T2975C/ C8356T	4.1
H77 ^[37]	1a	Core-NS2/NS5A	V787A/C1185S/ Q1247L	3.5
TN ^[37]	1a	Core-NS2/NS5A	I1312V/ R1408W	2.7
J4 ^[37]	1b	Core-NS2/NS5A	F886L/C1185S/Q1496L	2.5
J6 ^[37]	2a	Core-NS2/NS5A	None	5.0
S52 ^[37]	3a	Core-NS2/NS5A	I787S/ K1398Q/C2419R	3.8
ED43 ^[37]	4a	Core-NS2/NS5A	T827A/T977S/ Y1644H/E2267G	2.6
SA13 ^[37]	5a	Core-NS2/NS5A	A1021G/K1118R/ R1978G/C2419R	4.5
HK6a ^[37]	6a	Core-NS2/NS5A	F349S/ N417T/I2268N	3.3
QC69 ^[37]	7a	Core-NS2/NS5A	L878P	4.1
J6/JFH1骨架				
S52 ^[43]	3a	NS3P/4A	G868S/L1663A/E2267G/T270A/F772S/F842V	4.0
SA13 ^[43]	5a	NS3P/4A	F880S/I1682L/I1859M/N2077D/M2275V	3.4
HK6a ^[43]	6a	NS3P/4A	F772S/V1040L/V1663A	3.9
H77 ^[44]	1a	NS4A	F772S/ V1663A	3.8
TN ^[44]	1a	NS4A	F772S/ V1663A	3.8
J4 ^[44]	1b	NS4A	F772S/ V1663A	4.3
ED43 ^[44]	4a	NS4A	I879T/V1663A	4.3
SA13 ^[44]	5a	NS4A	F772S/ 1663A/V1683F	3.7
HK6a ^[44]	6a	NS4A	F772S/ E1105A/V1663A/V1677A	3.6
QC69 ^[44]	7a	NS4A	F772S/ I1061V/V1663A/S1679C	3.8
H77 ^[45]	1a	NS5A	None	4.2
TN ^[45]	1a	NS5A	None	4.1
J4 ^[45]	1b	NS5A	R867H/C1185S	4.3
JFH1 ^[45]	2a	NS5A	None	5.0
J6 ^[45]	2a	NS5A	F772S	4.5
S52 ^[45]	3a	NS5A	D1975G	4.4
ED43 ^[45]	4a	NS5A	F772S/Y1644H/E2267G	4.4
SA13 ^[45]	5a	NS5A	R1978G/S2416G	3.8
HK6a ^[45]	6a	NS5A	I2268N	4.2
QC69 ^[45]	7a	NS5A	None	4.2

注: 感染滴度, 指该体系在转染和传代中能达到的最高感染性滴度。

HCV 细胞培养体系或嵌合体细胞培养体系的构建大多需要引入相应的适应性突变以增加 HCV 的复制能力和感染力。然而, 在 HCV 细胞培养体系中引入的相关适应性突变也可能改变病毒蛋白的生化性质, 使抗病毒药物的敏感性发生变化, 从而

无法真实地反映药物的抗病毒效果^[49]。另外大部分 HCV 细胞培养体系是以 2a 型的 JFH1 为基础进行构建的。该基因克隆源自于一位罕见的暴发型的肝炎患者, 不属于全球流行的主要基因型。此外, HCV 细胞培养体系的高通量筛选还需要大规模感

染性病毒颗粒的生产,会产生生物危害,不能在低生物安全水平的实验室中进行操作,在一定程度上限制了该系统的使用。

5 总结与展望

目前 HCV 亚基因组复制子体系从 1b、2a 型扩展到 3a、4a 等其他基因型, HCV 细胞培养体系也由最初单一的 2a 型 JFH1 毒株, 逐渐构建出 1a 型 TN 毒株、2a 型 J6 毒株和 2b 型 J8 毒株的细胞培养体系(表 1)。由 JFH1 非结构蛋白编码区段与 HCV 基因型 1~7 的结构蛋白基因嵌合而成的 HCV 嵌合体病毒(表 2), 进一步拓宽了 HCV 细胞培养体系的范围, 尤其在抗病毒药物筛选和中和抗体评价方面具有重要意义^[25, 30]。含报告子的 HCV 亚基因组复制子和感染性病毒克隆使得对于 HCV 的相关研究更加容易操作, 功能性克隆筛选和拼接技术可用于临床毒株细胞培养体系的构建; 在 HCV 细胞培养体系中引入适应性突变(如 F1468L/A1676S/D3001G), 则增加了 HCV 在宿主细胞中的复制和感染性病毒粒子产生的效率, 提高了 HCV 的感染滴度。鉴于不同基因型 HCV 生物学特性以及对抗病毒治疗反应性的差异, 有必要建立真正的各基因型或亚型 HCV 的亚基因组复制子和细胞培养体系, 为 HCV 病原学研究及药物、疫苗开发提供技术保障。

[参 考 文 献]

- [1] Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 1989, 244(4902): 359-62
- [2] Thomas DL. Global control of hepatitis C: where challenge meets opportunity. *Nat Med*, 2013, 19(7): 850-8
- [3] Penin F, Dubuisson J, Rey FA, et al. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology*, 2004, 39(1): 5-19
- [4] Dubuisson J, World J. Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(17): 2406-15
- [5] Lindenbach BD, Rice CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature*, 2005, 436(7053): 933-8
- [6] Smith DB, Bukh J, Kuiken C, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*, 2014, 59(1): 318-27
- [7] Simmonds P, Bukh J, Combet C, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, 2005, 42(4): 962-73
- [8] Poynard T, Yuen MF, Ratzin V, et al. Viral hepatitis C. *Lancet*, 2003, 362(9401): 2095-100
- [9] Bisceglie AM Di, Hoofnagle JH. Optimal therapy of hepatitis C. *Hepatology*, 2002, 36(5 Suppl 1): S121-7
- [10] Gentile I, Borgia F, Buonomo AR, et al. A novel promising therapeutic option against hepatitis C virus: an oral nucleotide NS5B polymerase inhibitor sofosbuvir. *Curr Med Chem*, 2013, 20(30): 3733-42
- [11] Herbst DA Jr, Reddy KR. Sofosbuvir, a nucleotide polymerase inhibitor, for the treatment of chronic hepatitis C virus infection. *Expert Opin Investig Drugs*, 2013, 22(4): 527-36
- [12] Lam AM, Espiritu C, Bansal S, et al. Genotype and subtype profiling of PSI-7977 as a nucleotide inhibitor of hepatitis C virus. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 56: 3359-68
- [13] Doerrbecker J, Meuleman P, Kang J, et al. Thermostability of seven hepatitis C virus genotypes *in vitro* and *in vivo*. *J Viral Hepat*, 2013, 20(7): 478-85
- [14] del Canho R, Grosheide PM, Mazel JA, et al. Ten-year neonatal hepatitis B vaccination program, The Netherlands, 1982-1992: protective efficacy and long-term immunogenicity. *Vaccine*, 1997, 15(15): 1624-30
- [15] Woerz I, Lohmann V, Bartenschlager R. Hepatitis C virus replicons: dinosaurs still in business? *J Viral Hepat*, 2009, 16(1): 1-9
- [16] Lohmann V, Körner F, Koch J, et al. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*, 1999, 285(5424): 110-3
- [17] 李雪黎, 雷宇, 钟珊. 基于 2a 基因型丙型肝炎病毒自身启动子的单顺反子复制子的构建和功能测定. *中华肝脏病杂志*, 2012, 20(2): 103-7
- [18] Date T, Kato T, Kato J, et al. Novel cell culture-adapted genotype 2a hepatitis C virus infectious clone. *J Virol*, 2012, 86(19): 10805-20
- [19] Kato T, Date T, Miyamoto M, et al. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology*, 2003, 125(6): 1808-17
- [20] Saeed M, Scheel TK, Gottwein JM, et al. Efficient replication of genotype 3a and 4a hepatitis C virus replicons in human hepatoma cells. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(10): 5365-73
- [21] Saeed M, Gondeau C, Hmwe S, et al. Replication of hepatitis C virus genotype 3a in cultured cells. *Gastroenterology*, 2013, 144(1): 56-58.e7
- [22] Yu M, Corsa AC, Xu S, et al. *In vitro* efficacy of approved and experimental antivirals against novel genotype 3 hepatitis C virus subgenomic replicons. *Antiviral Res*, 2013, 100(2): 439-45
- [23] Peng B, Yu M, Xu S, et al. Development of robust hepatitis C virus genotype 4 subgenomic replicons. *Gastroenterology*, 2013, 144(1): 59-61.e6
- [24] Wang C, Valera L, Jia L, et al. *In vitro* activity of daclatasvir on hepatitis C virus genotype 3 NS5A. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(1): 611-3
- [25] Kylefjord H, Danielsson A, Sedig S, et al. Transient replication of a hepatitis C virus genotype 1b replicon chimera encoding NS5A-5B from genotype 3a. *J Virol Methods*, 2014, 195: 156-63
- [26] Wong KA, Xu S, Martin R, et al. Tegobuvir (GS-9190)

- potency against HCV chimeric replicons derived from consensus NS5B sequences from genotypes 2b, 3a, 4a, 5a, and 6a. *Virology*, 2012, 429(1): 57-62
- [27] Kamada K, Shoji I, Deng L, et al. Generation of a recombinant reporter hepatitis C virus useful for the analyses of virus entry, intra-cellular replication and virion production. *Microbes Infect*, 2012, 14(1): 69-78
- [28] Pietschmann T, Lohmann V, Kaul A, et al. Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol*, 2002, 76(8): 4008-21
- [29] Ikeda M, Yi M, Li K, et al. Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh7 cells. *J Virol*, 2002, 76(6): 2997-3006
- [30] Wakita T, Pietschmann T, Kato T, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*, 2005, 11(7): 791-6
- [31] Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*, 2005, 309(5734): 623-6
- [32] Li YP, Ramirez S, Gottwein JM, et al. Robust full-length hepatitis C virus genotype 2a and 2b infectious cultures using mutations identified by a systematic approach applicable to patient strains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(18): E1101-10
- [33] Li YP, Ramirez S, Jensen SB, et al. Highly efficient full-length hepatitis C virus genotype 1 (strain TN) infectious culture system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(48): 19757-626
- [34] Lu J, Xiang Y, Tao W, et al. A novel strategy to develop a robust infectious hepatitis C virus cell culture system directly from a clinical isolate. *J Virol*, 2014, 88(3): 1484-91
- [35] Chan K, Robinson M, Yang H, et al. Development of a robust luciferase reporter 1b/2a hepatitis C virus (HCV) for characterization of early stage HCV life cycle inhibitors. *Antiviral Res*, 2013, 98(1): 85-92
- [36] Lu J, Tao W, Li R, et al. Construction and characterization of infectious hepatitis C virus chimera containing structural proteins directly from genotype 1b clinical isolates. *Virology*, 2013, 443(1): 80-8
- [37] Galli A, Scheel TK, Prentoe JC, et al. Analysis of hepatitis C virus core/NS5A protein co-localization using novel cell culture systems expressing core-NS2 and NS5A of genotypes 1-7. *J Gen Virol*, 2013, 94(Pt 10): 2221-35
- [38] Li YP, Gottwein JM, Scheel TK, et al. MicroRNA-122 antagonism against hepatitis C virus genotypes 1-6 and reduced efficacy by host RNA insertion or mutations in the HCV 5' UTR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(12): 4991-6
- [39] Kaul A, Woerz I, Meuleman P, et al. Cell culture adaptation of hepatitis C virus and *in vivo* viability of an adapted variant. *J Virol*, 2007, 81(23): 13168-79
- [40] Appel N, Zayas M, Miller S, et al. Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog*, 2008, 4(3): e1000035
- [41] Masaki T, Suzuki R, Murakami K, et al. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J Virol*, 2008, 82(16): 7964-76
- [42] Tellinghuisen TL, Foss KL, Treadaway J. Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog*, 2008, 4(3): e1000032
- [43] Gottwein JM, Scheel TK, Jensen TB, et al. Differential efficacy of protease inhibitors against HCV genotypes 2a, 3a, 5a and 6a NS3/4A protease recombinant viruses. *Gastroenterology*, 2011, 141(3): 1067-79
- [44] Gottwein JM, Jensen SB, Serre SB, et al. Adapted J6/JFH1-based hepatitis C virus recombinants with genotype-specific NS4A show similar efficacies against lead protease inhibitors, α interferon, and a putative NS4A inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(12): 6034-49
- [45] Scheel TK, Gottwein JM, Mikkelsen LS, et al. Recombinant HCV variants with NS5A from genotypes 1-7 have different sensitivities to an NS5A inhibitor but not interferon- α . *Gastroenterology*, 2011, 140(3): 1032-42
- [46] Gottwein JM, Jensen TB, Mathiesen CK, et al. Development and application of hepatitis C reporter viruses with genotype 1 to 7 core-nonstructural protein 2 (NS2) expressing fluorescent proteins or luciferase in modified JFH1 NS5A. *J Virol*, 2011, 85(17): 8913-28
- [47] Yi M, Lemon SM. Replication of subgenomic hepatitis A virus RNAs expressing firefly luciferase is enhanced by mutations associated with adaptation of virus to growth in cultured cells. *J Virol*, 2002, 76(3): 1171-80
- [48] Murray EM, Grobler JA, Markel EJ, et al. Persistent replication of hepatitis C virus replicons expressing the β -lactamase reporter in subpopulations of highly permissive Huh7 cells. *J Virol*, 2003, 77(5): 2928-35
- [49] Tariq H, Manzoor S, Parvaiz F, et al. An overview: *in vitro* models of HCV replication in different cell cultures. *Infect Genet Evol*, 2012, 12(1): 13-20