

丙型肝炎病毒复制子细胞培养体系的发展及应用

Development and application of HCV replicon cell culture system

雷 创(LEI Chuang) 综述 蒋孝华(JIANG Xiao-hua) 审核

(南华大学附属第一医院,湖南 衡阳 421001)

(The First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[关键词] 肝炎病毒,丙型;复制子;细胞培养;抗病毒药物

[中图分类号] R512.6⁺3 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2010)06-0458-04

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)是丙型肝炎的病原体。目前全世界约有 1.2 亿~1.8 亿慢性 HCV 感染者,是世界范围内导致慢性肝炎、肝硬化、肝细胞癌的主要病因之一^[1]。传统的感染细胞模型 HCV 复制效率非常低,缺乏合适的体外细胞培养模型及小动物感染模型,使得 HCV 各方面的研究进展缓慢。HCV 复制子细胞培养体系的出现,解决了长期以来缺乏适合 HCV 体外复制的细胞培养体系的问题,被认为是 HCV 研究具有里程碑意义的突破。HCV 复制子细胞培养体系极大地方便了 HCV 完整生命周期、HCV 与宿主细胞的相互作用、抗病毒药物筛选及 HCV 对抗病毒药物耐药机制等方面的研究。而 HCV 复制子细胞培养体系本身也不断被改进、完善,在 HCV 研究中发挥越来越大的作用。本文综述了 HCV 复制子细胞培养体系的发展及其在 HCV 研究领域的应用。

1 HCV 复制子细胞培养体系的建立

Lohmann 等^[2]于 1999 年首次报道了亚基因组 HCV 复制子细胞培养体系。该复制子将编码结构蛋白的基因删除,加入选择性标志物新霉素磷酸转移酶基因和心肌脑炎病毒(encephalomyocarditis virus, EMCV)的内部核糖体进入位点(internal ribozyme entry site, IRES)2 个异源性成分,由此获得了所谓的选择性双顺反子 HCV 亚基因组复制子。上游顺反子在天然 HCV IRES 控制下表达选择性抗生素标志物,以获得含有大量 HCV RNA 和

病毒蛋白的稳定新霉素抗性细胞克隆;下游顺反子在 EMCV IRES 控制下编码非结构蛋白(non-structural protein, NS)3-5B。选择性 HCV RNA 复制子能在 Huh7 细胞中稳定高效地自主复制,并表达病毒蛋白,同时无明显的细胞毒性作用。细胞在新霉素 G418 选择下连续传代时,复制子可在细胞中稳定维持多年。复制子细胞培养体系的这些特性为研究 HCV 的生命周期、致病机制以及抗 HCV 药物筛选奠定了基础。

2 复制子细胞培养体系的发展

随着复制子细胞培养体系在 HCV 研究中的广泛应用,其自身也在不断地被改进。适用于各种基因型以及满足各种研究需要的新复制子不断出现, HCV 复制子的宿主细胞范围也不断被拓展。

2.1 复制子类型、结构的发展 HCV 基因组有显著的异质性。根据基因序列的差异可以分为 6 种基因型,每种基因型又可分为很多亚型。准种也极大丰富了 HCV 基因型的异质性。世界各地 HCV 各种基因型、亚型的分布差异很大,而基因型的不同甚至是准种的复杂性都可能表现出其生物学特性以及对干扰素治疗敏感性的差异^[3]。因此,需要建立各种基因型及亚型的复制子。1999 年, Lohmann 等^[2]首次构建亚基因复制子 Con1(1b)以来,许多亚基因复制子相继诞生: H77(1a)、HCV-N(1b)、HCV2N(2a)、50-1(1b-1)、1B-2R1(1b-2)、21-5HCV、J6CF(2a)。

[收稿日期] 2010-06-03

[作者简介] 雷创(1985-),男(汉族),湖南省长沙县人,硕士研究生,主要从事病毒性肝炎临床研究。

[通讯作者] 蒋孝华 E-mail: snakewin65@yahoo.com.cn

亚基因复制子不含结构基因,无法研究结构蛋白对 HCV 复制翻译的影响以及对宿主细胞的影响,也无法研究病毒的感染、组装、分泌等生命周期,因此需建立全长基因组复制子。2002 年后,许多研究小组先后报道构建了 HCV 全基因组复制子。全基因组复制子与亚基因组复制子的差别在于它用 HCV 的全长基因组替换了亚基因组复制子的 NS3-5B。并将细胞适应性突变引入全基因组复制子以增加复制子的复制能力。也有人尝试在复制子基因结构上做改变。有学者构建了 HCV2a 全长基因复制子,全长 HCV RNA 基因转录表达由 5'端 1 个细胞 Pol II 多聚酶启动子和 3'端 1 个丁型肝炎病毒核酶所调控^[4]。姚相杰等^[5]利用含 S2197P、E1202G、T1280I 3 个细胞适应性突变的全长基因 HCV1b 复制子与重组痘病毒同时感染 HeLa 细胞,以促进 HCV RNA 复制,HCV RNA 达 10^7 拷贝/mL,并且在电镜下观察到了直径约 47 nm 的病毒样颗粒。后来又出现了各种基因型或亚型间基因重组形成的嵌合体复制子,它们能在细胞培养中高水平复制及表达病毒蛋白,甚至产生病毒样颗粒,但这些病毒样颗粒不能感染黑猩猩^[6]。瞬时复制子系统,即用报告基因取代传统复制子结构中的新霉素磷酸转移酶基因,通过检测报告基因的表达活性来分析病毒复制,大大方便了变异研究及药物筛选。还有人建立了缺乏新霉素磷酸转移酶基因及 EMCV IRES 的 HCV RNA 复制子,并证明这种复制子复制效率更高^[7]。2005 年,JFH1(2a)株全基因复制子的出现则将复制子细胞培养体系提到了一个新的高度,因为它不需要引入细胞适应性突变就可在 Huh7 细胞中稳定高效地复制,并且转染 Huh7.5 细胞后形成的病毒颗粒可感染黑猩猩^[8]。近年来不少人通过构建 JFH1 株与其他型及亚型 HCV 基因的嵌合体复制子,把 JFH1 株的上述特性应用于其他型及亚型 HCV 的研究。

2.2 宿主细胞的拓展 目前在 HCV 复制子细胞培养体系中应用最广泛的还是 Huh7 细胞以及它的一些衍生系细胞(如 Huh7.5 细胞)。Zhu 等^[9]证明了 HCV 亚基因组复制子可以在肝上皮细胞及鼠肝癌细胞中复制。这些实验结果证明 HCV 的复制及翻译不依赖肝细胞的或灵长类特异的细胞因子。此外,HeLa、HuH6、兔肾细胞系 RK-13 及非洲猴肾细胞系 VeroE6、Vero、FCA1、CBRH7919、HBK21、Li23 等细胞也被证明可以支持 HCV 复制子复制。近来有学者用三维化的方式培养 Huh7 细胞(即利

用一种旋转管壁的生物反应器来促进 Huh7 细胞的分化),使其对 HCV 复制子的容受性变得更好^[10]。用原代肝细胞建立 HCV 复制子细胞培养体系的研究也在开展^[11]。对于一些细胞是否支持 HCV 复制的研究,不同实验的结果不一致,甚至相矛盾。因此,有学者认为动物细胞中可能普遍存在支持 HCV 复制的遗传背景,而不同生存环境则造成其表型的显著差异,但这种观点尚未被大多数人认可。

3 复制子细胞培养系统在 HCV 研究中的应用

HCV 复制子细胞培养系统以其能在细胞中稳定高效复制的优势自创建以来就广泛应用于 HCV 生命周期、基因结构、蛋白功能、致病机制以及抗 HCV 药物筛选等实验。

3.1 HCV 复制翻译及相关基因、蛋白结构与功能的研究 一些学者通过将非翻译区域的相关基因片段删减后观察亚基因复制子的复制效率变化,确定了 5'NTR(5' non-translation region)及 3'NTR 影响 HCV 复制的一些关键区域。通过构建不同型、亚型之间的嵌合体复制子,观察到复制子复制效率有的增加,有的降低,甚至完全阻断,证明 HCV 不同基因区域之间有相互作用。Binder 等^[12]将 Con1 株的 NS3-5A 与 JFH1 株的 NS5B 组合,观察到带有 2a 基因型 X 尾的复制子复制效率有提高,这表明 NS5B 识别这一区域的基因型特异信号。相反,NS3 解螺旋酶、NS5A 及 NS5B 则是识别 HCV RNA 5'端基因型特异性所必需。这些结果首次提供了 HCV RNA 合成起始需要 NS3 解螺旋酶、NS5A 和 NS5B 之间相互作用的证据^[11]。

3.2 HCV 与宿主细胞间相互作用的研究 HCV 复制子细胞培养体系是研究该病毒与宿主细胞相互作用的很好模型。Fredericksen 等^[13]研究发现,HCV 亚基因复制子复制可激活宿主细胞中的核因子 κ B、干扰素调节因子-1、干扰素调节因子-3,这些因子与干扰素 β 启动子的正性调节序列结合,促进干扰素 β 转录表达,干扰素 β 通过诱导效应基因表达,使细胞处于抗病毒状态而有利于清除病毒。Koo 等^[14]研究发现在急性 HCV 复制中,白细胞介素(IL)-8 可能对低复制能力的病毒产生抑制效应。近来 Manna 等^[15]发现内吞的 Rab 蛋白参与 HCV 复制复合体的形成,而 Gretton 等^[16]则发现 Ras-Erk 信号系统调节 HCV RNA 的复制。另一方面,也有人对 HCV 逃避宿主免疫清除作用及 HCV 复

制对宿主细胞的影响进行了研究。Pflugheber 等^[17]研究发现一些亚基因 HCV 复制子编码的 NS5A 可阻断 dsRNA-PKR-IRF-1 途径的激活,抑制宿主细胞的抗病毒反应。Foy 等^[18]发现 HCV NS3/NS4A 编码的丝氨酸蛋白激酶可抑制宿主细胞中的关键性抗病毒信号分子 IRF-3 的磷酸化激活,从而使 HCV 亚基因复制子能在宿主细胞内活跃复制。Abe 等^[19]用微点阵分析证实 HCV 亚基因复制子可以改变宿主细胞的基因表达水平。Koutsoudakis 等^[20]建立了带有 HCV Con1(1b)株和 J6CF(2a)株结构蛋白的 2 种嵌合体 JFH1 株荧光素酶报告病毒;运用这些嵌合体及 JFH1 报告病毒探究了 HCV 生命周期的早期阶段,发现 CD81 分子是 pH 值依赖的病毒侵入的关键受体。另外,运用 HCV 复制子系统对 HCV 感染后肝细胞癌的发生机制的研究正在开展。

3.3 抗 HCV 药物及耐药机制的研究 HCV 复制子在 Huh7 细胞系中稳定高效复制,引入报告基因后,可行非选择性短暂复制实验,通过检测报告基因活性来评估药物对 HCV 复制的抑制作用,极大地方便了药物筛选试验。可用这些复制子细胞培养体系来筛选新合成的药物,几种可能有效的药物已进入临床试验阶段。其中, VX950 及 SCH503034 已经接近临床应用了,2011 年第 1 代蛋白酶抑制剂抗 HCV 药物就可能被批准上市。目前,一些细胞培养系统中已经可以有病毒颗粒产生,这使得我们可以研究 HCV 的黏附、入侵等环节,进而研发阻断这些环节的抗病毒药物。不少人也通过复制子细胞培养体系来研究 RNA 干扰方式抗 HCV 并取得了一定的进展^[21-22]。另一方面,一些人利用复制子细胞培养体系研究了 HCV 对抗病毒药物抵抗的机制。Lin 等^[23]研究发现 HCV 蛋白通过减少 STAT1 磷酸化来抑制 1 型干扰素信号。Hazari 等^[24]发现 Jak-Stat 通路损害的 Huh7 细胞中 HCV2a 复制子对干扰素敏感性下降。Mo 等^[25]通过对体外培养 HCV 产生的单独对 RNA 依赖的 RNA 聚合酶抑制剂耐药或同时对丝氨酸蛋白酶抑制剂耐药的变异进行了研究,发现 NS5B 基因的单个替代(H95Q/N411S/M414L/M414T/T448H)导致 HCV 对 A782759 敏感性下降;同样,有 NS5B 多聚酶变异(M414L/M414T)及 NS3 点突变(A156V/D168V)导致同时对 A782759 及 BILN2061 耐药。但是, A782759 耐药株对核苷类及非核苷类 NS5B 多聚酶抑制剂及干扰素仍然敏感。

4 展望

自 HCV 复制子细胞培养体系诞生以来, HCV 的研究取得了长足的进步。在一些实验中已发现了 HCV 病毒颗粒的产生,为研究 HCV 完整生命周期及致病机制带来了希望。但目前的 HCV 复制子细胞培养体系并非尽善尽美。有些基因型、亚型 HCV 复制子尚未构建成功,而感染这些基因型 HCV 的人并不少。介于不同基因型 HCV 一些生物学特性的不同以及对抗病毒治疗敏感性的差异,有必要建立这些基因型的复制子。在不断完善复制子本身的同时,将复制子模型和细胞感染模型,甚至小动物感染模型结合起来,将进一步推动 HCV 生命周期、致病机制的研究以及抗病毒药物筛选,甚至疫苗的研发。

[参考文献]

- [1] Lavanchy D. The global burden of hepatitis C [J]. *Liver Int*, 2009, 29(suppl 1):74-78.
- [2] Lohmann V, Korner F, Koch J, *et al*. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line [J]. *Science*, 1999, 285(5424):110-113.
- [3] 李颖, 张琳, 石理兰, 等. HCV 准种复杂性与干扰素疗效关系的初步探讨 [J]. *中国感染控制杂志*, 2004, 3(2):103-105.
- [4] Cai Z, Zhang C, Chang KS. Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells [J]. *J Virol*, 2005, 79(22):13963-13973.
- [5] 姚相杰, 郭佳, 郑从义, 等. 丙肝病毒全基因组 cDNA 克隆侵染细胞培养体系的建立 [J]. *科学通报*, 2004, 49(10):965-970.
- [6] Oniangue-Ndza C, Aus dem Siepen M, Lohmann V, *et al*. In vitro replicative properties of replicons constructed using sequence variants of the hepatitis C virus strain AD78 that caused a single-source outbreak of hepatitis C [J]. *Virus Res*, 2009, 142(1-2):1-9.
- [7] Blight K J, McKeating J A, Marcotrigiano J, *et al*. Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture [J]. *J Virol*, 2003, 77(5):3181-3190.
- [8] Wakita T, Pietschmann T, Kato T, *et al*. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome [J]. *Nat Med*, 2005, 11(7):791-796.
- [9] Zhu Q, Guo J T, Seeger C. Replication of hepatitis C virus subgenomes in nonhepatic epithelial and mouse hepatoma cells [J]. *J Virol*, 2003, 77(17):9204-9210.
- [10] Bruno Sainz Jr, Veronica TenCate, Uprichard S L. Three-dimensional Huh7 cell culture system for the study of hepatitis C

- virus infection [J]. *J Virol*, 2009, 15(6):103.
- [11] Zhu H, Elyar J, Floss R, *et al.* Primary human hepatocyte culture for HCV study [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 510:373 - 382.
- [12] Binder M, Quinkert D, Bochkarova O, *et al.* Identification of determinants involved in initiation of hepatitis C virus RNA synthesis by using intergenotypic replicase chimeras [J]. *J Virol*, 2007, 81(10):5270 - 5283.
- [13] Fredericksen B, Akkaraju G R, Foy E, *et al.* Activation of the interferon-beta promoter during hepatitis C virus RNA replication [J]. *Viral Immunol*, 2002, 15(1):29 - 40.
- [14] Koo B C, McPoland P, Wagoner J P, *et al.* Relationships between hepatitis C virus replication and CXCL-8 production in vitro [J]. *J Virol*, 2006, 80(16):7885 - 7893.
- [15] Manna D, Aligo J, Xu C, *et al.* Endocytic Rab proteins are required for hepatitis C virus replication complex formation [J]. *Virology*, 2010, 398(1):21 - 37.
- [16] Gretton S, Hughes M, Harris M. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by Ras-Erk signaling [J]. *J Gen Virol*, 2010, 91(Pt 3):671 - 680.
- [17] Pflugheber J, Fredericksen B, Sumpter R, *et al.* Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(7): 4650 - 4655.
- [18] Foy E, Li K, Wang C, *et al.* Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease [J]. *Science*, 2003, 300(5622):1145 - 1148.
- [19] Abe K, Ikeda M, Dansako H, *et al.* cDNA microarray analysis to compare HCV subgenomic replicon cells with their cured cells [J]. *Virus Res*, 2005, 107(1):73 - 81.
- [20] Koutsoudakis G, Kaul A, Steinmann E, *et al.* Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses [J]. *J Virol*, 2006, 80(11):5308 - 5320.
- [21] Korf M, Meyer A, Jarczak D, *et al.* Inhibition of HCV subgenomic replicons by siRNAs derived from plasmids with opposing U6 and H1 promoters [J]. *J Viral Hepat*, 2007, 14(2): 122 - 132.
- [22] Ray R B, Kanda T. Inhibition of HCV replication by small interfering RNA [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 510:251 - 262.
- [23] Lin W, Kim S S, Yeung E, *et al.* Hepatitis C virus core protein blocks interferon signaling by interaction with the STAT1 SH2 domain [J]. *J Virol*, 2006, 80(18):9226 - 9235.
- [24] Hazari S, Chandra P K, Poat B, *et al.* Impaired antiviral activity of interferon alpha against hepatitis C virus 2a in Huh-7 cells with a defective Jak-Stat pathway [J]. *J Virol*, 2010, 7: 36.
- [25] Mo H, Lu L, Pilot-Matias T, *et al.* Mutations conferring resistance to a hepatitis C Virus (HCV) RNA-dependent RNA polymerase inhibitor alone or in combination with an HCV serine protease inhibitor in vitro [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(10):4014.

(上接第 455 页)

途径主要是通过污染的手(尤其是医务人员手)导致人与人之间的传播。因此,临床应及时发现 MRSA 感染者及携带者,并将其隔离,给予有效治疗,及时清除携带状况,防止细菌在医院环境中传播,导致医院感染的暴发流行。同时,各科室一定要加强抗感染药物的使用管理,合理使用抗感染药物,以减少耐药菌株的产生。

抗菌药物使用中,内科系统治疗用药率为 79.83%,外科系统为 26.82%,两者比较,差异有显著性($P < 0.05$)。说明该三级综合医院抗菌药物的使用,在内科系统多以治疗为目的,外科系统多以预防为目的。病原微生物送检率较低,在治疗性用药中仅占 37.72%,低于《江苏省抗菌药物临床应用管理规范》中要求治疗用药病原送检率应达到 60% 的规定。抗菌药物的管理是一项系统工程,要在实践中加以研究和总结^[4]。加强医护人员医院感染知识

与抗菌药物合理使用知识的培训,将抗菌药物使用率及治疗性用药的微生物送检率纳入科室的质量控制,加大合理使用抗菌药物的管理力度;提高病原学送检率;严格掌握围术期用药的适应证及方法,方能使用抗菌药物的应用更合理、更规范。

[参 考 文 献]

- [1] 吴安华,任南,文细毛,等. 193 所医院医院感染现患率调查分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2002, 12(8):561 - 563.
- [2] 李春红,沈黎,姜亦虹,等. 1990~2002 年神经外科医院感染监测情况分析[J]. *中国感染控制杂志*, 2005, 4(1):41 - 43.
- [3] 徐秀华. *临床医院感染学*[M]. 长沙:湖南科学技术出版社, 2005:68 - 463.
- [4] 林小聪,詹永忠,谢杨,等. 医院感染现患率调查与监控研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2004, 14(3):265.