

## · 综述 ·

## 丙型肝炎病毒细胞研究模型的建立及进展

王琦 谢雯

**【摘要】**丙型肝炎病毒(HCV)可引发严重的肝脏疾病。过去10余年间, HCV体外研究获得了一系列突破性进展。其中, 细胞研究模型为HCV致病机制研究、抗病毒药物筛选以及疫苗研发等提供了便利的研究平台。本文着眼于细胞研究模型的发展历程, 对研究中主要阶段以及关键应用领域进行综述, 并重点展示目前应用最为广泛的JFH1细胞培养系统。旨在为读者系统了解HCV细胞研究模型提供帮助。

**【关键词】**肝炎病毒, 丙型; 细胞培养模型

**Establishment and progress of cell culture study model of hepatitis C virus** Wang Qi, Xie Wen. The First Department in Center of Liver Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, 100015 Beijing, China

Corresponding author: Xie Wen, Email: xiewen6218@163.com

**【Abstract】** Hepatitis C virus could lead to serious liver diseases. During the last decade, many progress of HCV in vitro studies had been achieved. Among which, HCV cell culture study model was an important system for pathogenic mechanism researches, antiviral drug screening and also vaccine researches. This paper reviewed the development course, especially the main phases, key application fields, and also supply more understanding on this field.

**【Key words】** Hepatitis C virus; Cell culture model

1974年Golafeld首先报告了输血后非甲型非乙型肝炎。1989年Choc等应用分子克隆技术获得病毒基因克隆, 并命名本病及其致病病毒为丙型肝炎(hepatitis C)和丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)。由于各国流行病学调查水平存在显著差异, 全球慢性丙型肝炎总体发病率尚不明确。据世界卫生组织统计数据显示, 全球约有1.3亿~1.7亿人感染该病毒<sup>[1]</sup>, 每年35万余人死于HCV感染, 其中绝大多数为HCV感染所致的肝纤维化和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)。2006年全国血清流行病学调查显示, 我国1~59岁人群抗-HCV流行率为0.43%, HCV感染人数约为510万, 较1992年全国病毒性肝炎血清流行病学调查的3.2%下降了86.6%, 提示我国属于HCV感染低流行区<sup>[2]</sup>。

丙型肝炎病毒属于有包膜的单股正链RNA病毒, 其基因组全长约9.6 kb, 由5'-和3'-端非编码区(non-translated

region, NTR) 和一个编码所有的病毒蛋白的长开放读码框架(open reading frame, ORF) 组成。HCV RNA基因组的翻译由位于5'-UTR区域的内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES) 介导。

过去十余年间, HCV体外研究获得了一系列突破性进展, 为HCV复制机理、致病机制和抗病毒药物筛选提供了重要的技术平台。本文着眼于HCV细胞研究模型的发展历程, 对其研究中的主要阶段、关键和重要领域进行综述。

#### 一、第一阶段: 复制子系统的建立

正链RNA病毒基因组和mRNA具有相似的特性, 即能够直接转染细胞进行病毒蛋白的表达, 甚至包括RNA复制组件的表达, 即正链RNA病毒基因组具有感染性。此概念为反向遗传学(reverse genetics)用于病毒功能研究的理论基础。许多正链RNA病毒的复制子系统在该理论的指导下建立。

在呼肠病毒和猪瘟病毒等正链RNA病毒亚基因组复制子系统的启发下, Bartenschlager等<sup>[3]</sup>于1999年建立了HCV的复制子系统。复制子的最初原型为HCV基因1b型分离株Con1。该系统将结构基因(core、E1和E2)、p7和NS2替换为新霉素(neomycin phosphotransferase, neo)筛选标志, 然后与脑心肌炎病毒(encephalomyocarditis virus,

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2016.06.002

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(No. 81500439); 首都医科大学基础-临床科研合作基金(No. 15JL80); 北京市医院管理局扬帆计划项目(肝病专业)(No. ZYLX201402); 登峰计划项目(肝病专业)(No. DFL20151701)

作者单位: 100015 北京, 首都医科大学附属北京地坛医院肝病中心肝病一科

通讯作者: 谢雯, Email: xiewen6218@163.com

EMCV) IRES控制下的NS3-NS5B等HCV结构基因编码序列形成双顺反子。将该复制子转染人肝癌细胞系Huh7后利用G418筛选,每个细胞可以获得约1 000~5 000拷贝的正链RNA分子,同时还可检测到HCV编码的多种蛋白。在G418筛选压力下,复制子细胞克隆能够稳定传代约1年并持续保持HCV RNA阳性。

之后,复制子系统被广泛用于HCV病毒结构生物学、抗病毒药物筛选和致病机理研究等领域<sup>[4-8]</sup>。研究者还将环孢素A(cyclosporine A)、萤虫素酶和荧光蛋白<sup>[9]</sup>等筛选标记或报告基因序列引入到了复制子系统中,提高了系统的可操作性和适用范围。除此之外,研究者还陆续构建出了1a型、2a型、4a型和其他1b型的复制子<sup>[10]</sup>。

尽管HCV基因组核苷酸序列的鉴定已经HCV病毒复制子构建奠定了基础,但由于HCV RNA的低拷贝数、众多的基因型、基因亚型和复制高突变率等原因,如何获得一个细胞层次具备感染能力的HCV cDNA克隆一直是复制子建立的主要障碍。为此,研究者提出了HCV一致性基因组(consensus genome)的概念。一致性基因组可以代表一个特定感染者体内大多数HCV的基因组序列。研究者最初利用序列比对成功地确定了名为H77的一致性HCV 1a亚型基因组序列。该基因组接种到黑猩猩肝内可以造成其肝功能损伤。Masayuki等<sup>[11]</sup>在构建HCV 1a亚型亚基因组复制子的过程中也是通过与H77的比对避免了变异氨基酸序列对复制子复制能力的影响。

综上,亚基因组复制子的基本结构主要包括:①带有HCV 5'-UTR和部分核心蛋白编码区域;②抗菌药物筛选标记——新霉素磷酸转移酶基因(neo<sup>R</sup>);③指导HCV非结构蛋白翻译的序列,来自于EMCV的IRES;④HCV RNA非结构蛋白编码区——NS2/NS3-NS5B;⑤3'-NTR等。

宿主细胞的容许能力是复制子系统建立的重要条件。Huh7细胞种群中可能存在一些能够支持HCV复制的高容许性细胞克隆,G418的筛选过程进一步强化了此类克隆的富集程度<sup>[12]</sup>。目前在HCV研究领域广泛应用的Huh 7.5、Huh 7.5.1及Huh 7-Lunet<sup>[13]</sup>等细胞系均是从Huh7细胞系中通过进一步筛选获得的。除Huh7细胞外,HCV病毒复制子无法在其他细胞系内复制,推测可能与病毒片段在细胞内诱发天然免疫导致的病毒抑制相关。

复制子系统与复制增强突变(replication enhancing mutations, REMs)关系紧密。HCV NS5B是一种RNA依赖的RNA聚合酶(RdRp),在HCV基因组RNA复制过程中发挥关键作用。由于NS5B缺乏校对功能,因此,HCV复制突变率非常高,这是HCV的主要特点之一,也是REMs出现的重要前提。虽然复制子转染后的细胞在G418压力下只有极少量可以存活,但HCV RNA却能在存活细胞内以较高水平进行复制,序列测定证实,高水平复制病毒的非结构蛋白

编码区域出现了一系列保守变异,而这些变异对复制的增强作用也能在体外突变研究得以重现。此外,最初来源于Con1的REMs也可以在包括HCV-O、HCV-BK、J4和AH1等其他1b亚型复制子中产生复制增强效果。大部分REMs出现于NS3的N-末端、NS4B以及NS5A的中间部位。目前鉴定的NS5A内部具有潜在功能的REMs往往可以改变NS5A的磷酸化状态,提示NS5A的磷酸化水平与HCV RNA复制相关<sup>[14]</sup>。除2a亚型分离株JFH1和4a亚型外,其余非1型复制子的REMs情况尚未见报道。REMs还与选择性药物耐药基因<sup>[15]</sup>、单顺反子复制子<sup>[16]</sup>和瞬时复制分析等相关,后者一般是将外源报告基因引入到了HCV基因组中并作为定量或定性分析指标<sup>[17-18]</sup>。虽然,目前只有极少数REMs同时出现于体内研究中<sup>[19]</sup>,但大量REMs被证实与HCV生活周期、感染性病毒产量等关系密切。因此,REMs的研究仍是今后HCV研究领域的重要方向之一。

## 二、第二阶段:病毒入侵机制研究细胞模型

由于复制子模型在完整病毒生活周期研究中存在缺陷,研究者又构建出了一种替代模型用于病毒感染过程中糖蛋白作用及其机理的研究,其中最为成功的是以未修饰HCV糖蛋白为依托的逆转录病毒假膜病毒模型——HCVpp<sup>[20]</sup>。

HCVpp系统是通过HCV E1、E2表达载体、鼠白血病病毒(murine leukemia virus, MLV)或HIV的Gag-pol蛋白、以及编码报告基因的逆转录病毒基因组共转染293T细胞来构建的。病毒感染细胞后可通过逆转录和整合机制将逆转录病毒核衣壳成分表达于靶细胞胞浆中。而该病毒的黏附与受体的相互作用必须依赖于HCV E1-E2蛋白复合物,因此,HCVpp可以被患者血清中的抗-E1、抗-E2所中和<sup>[21-22]</sup>。葡糖氨基聚糖类(glycosaminoglycans)、低密度脂蛋白受体(low-density lipoprotein receptor, LDL-R)、树突状细胞特异性细胞间黏附分子-3-结合非整合素分子(dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin, DC-SIGN)、claudin-1、claudin-6、claudin-9、occludin和表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、酪氨酸蛋白激酶受体A2( EphA2)和尼曼-皮克C1样蛋白质1(Niemann-Pick C1-like cholesterol adsorption receptor, NPC1L1)等HCV黏附或入侵相关分子均通过此系统鉴定和识别<sup>[23]</sup>。

但由于病毒产生于不合成脂蛋白的非肝细胞系293T,其包装过程是在高尔基体后细胞器和(或)浆膜完成的,因此,该系统无法重复HCV病毒粒子与脂蛋白相互关系的研究,并因此影响了中和抗体分析和LDL-R、SR-BI以及NPC1L1等脂蛋白受体分子<sup>[23]</sup>的研究。即便如此,由于利用HCVpp研究病毒入侵机制可以抛开HCV生活周期的其他环节,因此,该系统在病毒入侵机制研究中仍然发挥着重要

作用。

### 三、第三阶段：HCV感染性细胞培养系统

感染性HCV细胞培养系统(infectious HCV cell culture system)与亚基因组复制子系统最大的区别在于其能够产生有感染能力的病毒颗粒。

2001年, Wakita教授研究组从一名日本暴发性肝炎(fulminant hepatitis)患者血清中分离获得2a亚型的全长HCV病毒株, 命名为JFH1<sup>[24]</sup>。该病毒基因组RNA全长9 678 bp。2005年, 该项目组又初步建立了基于JFH1的感染性细胞培养系统<sup>[25]</sup>。该研究首先将JFH1转录本RNA体外转染Huh7细胞, 24 h后Northern blot检测HCV RNA阳性并持续至72 h之后; 转染后72 h, 70%~80%细胞的核心蛋白和NS3蛋白免疫荧光阳性; 转染5 d后HCV RNA和蛋白表达水平达到高峰, 并持续约7 d; 以E2特异性抗体进行的免疫电镜检测可以获得阳性结果。更为重要的是, 以转染JFH1 RNA的Huh-7细胞培养上清孵育新鲜Huh7细胞, 48 h后可观察到核心蛋白和NS5A蛋白呈双阳性; 用上清感染黑猩猩后其血清中亦能检测到HCV RNA, 说明该上清包含了具有感染能力的HCV病毒颗粒。但是, 感染性病毒的滴度很低, 且无法形成持续性感染。

Huh7.5细胞是HCV复制高容许性的细胞系。Huh7.5.1是由Huh7.5细胞系I/5A-GFP-6衍生而来<sup>[26]</sup>。这两种细胞系均为干扰素信号通路缺陷性肝细胞系。每微克JFH1 RNA转染Huh7.5.1细胞2 d后即可获得 $1.3 \times 10^7$ 拷贝/ml的HCV RNA, 之后经历一个逐渐降低到增高再趋于稳定的变化过程, 其感染性病毒滴度在转染后21 d达到最大值( $4.6 \times 10^4$  ffu/ml)。将转染细胞的上清孵育为转染的Huh7.5.1细胞, 可以通过RNA检测和蛋白分析观察到HCV复制和表达, 再次收集上清进行的重复感染仍然可以观察到上述现象, 提示第二代病毒仍具有良好的感染能力。目前Huh7.5和Huh7.5.1细胞系均被用于感染性HCV细胞培养体系的研究当中。

前文已经提到, REMs在复制子构建中发挥了关键作用。研究发现, 带有适应性突变的HCV全基因组能在Huh7细胞中高效复制; 随后研究证实, 不带适应性突变的HCV全基因组虽不能高效复制, 但能释放HCV RNA和核心蛋白; JFH1被成功鉴定后发现, JFH1可以不依赖适应性突变在Huh7细胞、其他肝癌细胞系(如HepG2 and IMY-N9)<sup>[27]</sup>和非肝细胞系(如HeLa和HEK293)<sup>[28]</sup>中复制并产生感染性病毒颗粒; 但近年来的诸多研究提示, 野生型JFH1结构或非结构蛋白的特定区域出现的突变可以明显提高感染性病毒的产量, 而部分突变还可以提高JFH1 RNA的复制水平或增强HCV生活周期的其他环节<sup>[29-30]</sup>。而且适应性突变还可能通过协同作用产生更强的提升作用<sup>[31-33]</sup>。E2(I414T)可通过抑制入胞过程对HCV受体水平的依赖程度提高病毒滴

度, 但不影响病毒基因组复制及病毒入胞<sup>[34]</sup>。E2(G451R)与体外持续感染相关<sup>[35]</sup>。p7(N765D)能有效增加JFH1系统感染性病毒的滴度, 其机制可能是影响了病毒颗粒产生的早期环节<sup>[36]</sup>。p7(Y781H)可提升培养上清中HCV core的浓度, 并增强病毒粒子的装配和释放能力从而提高感染性病毒产量<sup>[37]</sup>。NS4B(K1846T)能提高病毒基因组复制水平, 并与V1897A或V1897L产生协同作用<sup>[38]</sup>。某些适应性突变还可以通过减少p58提高HCV RNA复制水平<sup>[39]</sup>。本项目组前期也成功鉴定了一个显著提高感染性病毒滴度的适应性突变株AM120, 该病毒可以显著降低p58/p56<sup>[40]</sup>。NS5A(T2438I)和NS3(M2052K)可增加JFH1-NS5A-EGFP嵌合病毒产量<sup>[32]</sup>。NS5A的V2440L突变可通过减慢NS5A-NS5B的剪切速度增加病毒滴度<sup>[41]</sup>; V2440L和相同位置的另一突变V2440A还可降低病毒复制对亲环素A的依赖度<sup>[42]</sup>。目前, 对适应性突变的筛选仍然是研究的热门领域, 其目的主要有以下两点: ①为继续优化感染性HCV细胞培养系统寻找更好的突变位点; ②通过适应性突变机制研究HCV生活周期和致病机理。

最初的JFH1系统在HCV RNA定量、蛋白示踪和病毒结构解析技术方面无法满足高通量、大样本和快速检测的需求。因此, 研究人员一直试图将报告基因检测策略运用到感染性HCV细胞培养系统当中。目前, 包括增强型绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)<sup>[9]</sup>、增强型黄色荧光蛋白(enhanced yellow fluorescent protein, EYFP)<sup>[43]</sup>和海肾荧光素酶(renilla luciferase, Rluc)等均已获得成功<sup>[17-18, 43]</sup>。NS5A<sup>[9, 44]</sup>、core和p7/NS2结合部均可作为可选的插入区域。凝集素(haemagglutinin, HA)<sup>[45]</sup>和Flag序列<sup>[46]</sup>等标签蛋白也被用作标签蛋白。本项目组曾利用Rluc全长编码序列替换了V3区域, 构建的JFH1-ΔV3-Rluc获得了大于 $10^6$ 病毒滴度, 并成功用于抗病毒药物的筛选研究<sup>[17]</sup>及后续的多项HCV致病机制研究<sup>[9, 47-48]</sup>。Wu等<sup>[18]</sup>构建了同时包含EGFP和Rluc的嵌合病毒株, 该病毒在HCV RNA基因组复制和感染性病毒滴度与单报告基因病毒株相当, 且具备了双报告基因的独特优势。本课题组利用包含了EGFP的JFH1-EGFP嵌合病毒, 在3-D培养体系中连续培养后观察绿色荧光表达及定量, 结果提示, 培养40 d后嵌合病毒仍然可以高复制水平产生、保留EGFP并可作为评估病毒产生能力的标志物<sup>[49]</sup>; 目前利用该病毒进行的HCV复制影响因素方面的研究尚在继续深入, 初步研究报道, 细胞自噬相关的外泌体途径<sup>[44]</sup>和干扰素诱导蛋白6发挥一定作用<sup>[50]</sup>。此外, 本项目组还构建了包含Lac-Z报告基因的嵌合病毒, 结果证实, 对于长度约为HCV RNA基因组1/3的报告基因, 嵌合病毒在复制过程中会产生“lose”作用, 体现了其对外源片段插入的容受能力(数据尚未正式发表)。

近年来, 随着HCV治疗方案的逐步调整以及治疗、预



后方面研究数据的不断积累, HCV细胞研究模型越来越多的被用于直接抗病毒药物(direct-acting antiviral angets, DAA)开发、疗效评价、耐药机制分析等过程中。近期发表的一项研究报道了以JFH1为基础建立的一种高效、3a基因型HCV全长重组病毒(DBN3a)培养体系, 并对其应用于包括Sofosbuvir等在内的多种NS5B蛋白酶抑制剂耐药及药效方面的研究进行了尝试<sup>[51]</sup>。Liu等<sup>[52]</sup>还利用1a基因型重组嵌合病毒pH77S.3<sup>23</sup>/GLuc2A<sup>23</sup>观察了miR-122 antagonism联合DAA的病毒抑制能力, 结果证实, miR-122 antagonism对DAA的抗病毒作用具有相加或协同效应, 并能有效抑制HCV复制及DAA耐药变异株的产生。

#### 四、结语

综上, 细胞感染模型是HCV研究的必要手段, 也是今后一段时间HCV疫苗研发和抗病毒药物筛选的关键技术平台。虽然随着DAA抗HCV疗效的不断改善, 科研人员在HCV研究上的热度出现了“滑坡”现象, 但DAA耐药的发生却愈加引起临床医生和药物研发人员的关注。笔者认为, 作为一项有生命力的研究体系, HCV细胞模型可能会在以下几个方面有所作为: ①HCV表型耐药机制分析。基因检测可以指导临床治疗方案, 但是对于耐药机制的探索还需要大量实验室数据, 细胞模型可以从HCV生命周期的表型层面予以阐释。②新型药物的开发。药物开发过程中需要开发高效的细胞水平筛选结果, 细胞模型是合适的筛选平台。③HCV生命周期的进一步阐明。目前对HCV受体、变异机制、自然史以及致病机制等环节仍有许多尚未明确的内容, 细胞模型易于操作、检测及分析指标多样, 仍然是研究人员的重要平台。

#### 参 考 文 献

- Global burden of disease (GBD) for hepatitis C[J]. *J Clin Pharmacol*,2004,44(1):20-29.
- 陈园生, 李黎, 崔富强, 等. 中国丙型肝炎血清流行病学研究[J]. *中华流行病学杂志*,2011,32(9):888-891.
- 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.
- 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]. *J Virol*,2002,76(6):2997-3006.
- Gates AT, Sarisky RT, Gu B. Sequence requirements for the development of a chimeric HCV replicon system[J]. *Virus Res*,2004,100(2):213-222.
- Qi X, Bae A, Liu S, et al. Development of a replicon-based phenotypic assay for assessing the drug susceptibilities of HCV NS3 protease genes from clinical isolates[J]. *Antiviral Res*,2009,81(2):166-173.
- Gieseler RK, Marquitan G, Schlattjan M, et al. Hepatocyte apoptotic bodies encasing nonstructural HCV proteins amplify hepatic stellate cell activation: implications for chronic hepatitis C[J]. *J Viral Hepat*,2011,18(11):760-767.
- Yon C, Viswanathan P, Rossignol JF, et al. Mutations in HCV non-structural genes do not contribute to resistance to nitazoxanide in replicon-containing cells[J]. *Antiviral Res*,2011,91(3):233-240.
- Panigrahi R, Chandra PK, Ferraris P, et al. Persistent hepatitis C virus infection impairs ribavirin antiviral activity through clathrin-mediated trafficking of equilibrative nucleoside transporter 1[J]. *J Virol*,2015,89(1):626-642.
- Bartenschlager R. Hepatitis C virus molecular clones: from cDNA to infectious virus particles in cell culture[J]. *Curr Opin Microbiol*,2006,9(4):416-422.
- Yanagi M, Purcell RH, Emerson SU, et al. Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1997,94(16):8738-8743.
- Blight KJ, McKeating JA, Rice CM. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication[J]. *J Virol*,2002,76(24):13001-13014.
- Peng B, Yu M, Xu S, et al. Development of robust hepatitis C virus genotype 4 subgenomic replicons[J]. *Gastroenterology*,2013,144(1):59-61.e6.
- Steinmann E, Pietschmann T. Cell culture systems for hepatitis C virus[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*,2013,369:17-48.
- Appel N, Herian U, Bartenschlager R. Efficient rescue of hepatitis C virus RNA replication by trans-complementation with nonstructural protein 5A[J]. *J Virol*,2005,79(2):896-909.
- Blight KJ, McKeating JA, Marcotrigiano J, et al. Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture[J]. *J Virol*,2003,77(5):3181-3190.
- Liu S, Nelson CA, Xiao L, et al. Measuring antiviral activity of benzimidazole molecules that alter IRES RNA structure with an infectious hepatitis C virus chimera expressing Renilla luciferase[J]. *Antiviral Res*,2011,89(1):54-63.
- Wu Y, Liao Q, Yang R, et al. A novel luciferase and GFP dual reporter virus for rapid and convenient evaluation of hepatitis C virus replication[J]. *Virus Res*,2011,155(2):406-414.
- 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[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2012,109(18):E1101-E1110.
- Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes[J]. *J Exp Med*,2003,197(5):633-642.
- Hsu M, Zhang J, Flint M, et al. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2003,100(12):7271-7276.
- Cai Z, Zhang C, Chang KS, et al. Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells[J]. *J Virol*,2005,79(22):13963-13973.
- Zeisel MB, Felmler DJ, Baumert TF. Hepatitis C virus entry[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*,2013,369:87-112.
- Kato T, Furusaka A, Miyamoto M, et al. Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient[J]. *J Med Virol*,2001,64(3):334-339.
- 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.
- 26 Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, et al. Robust hepatitis C virus infection in vitro[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2005,102(26):9294-9299.
  - 27 Date T, Kato T, Miyamoto M, et al. Genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon can replicate in HepG2 and IMY-N9 cells[J]. *J Biol Chem*,2004,279(21):22371-22376.
  - 28 Kato T, Date T, Miyamoto M, et al. Nonhepatic cell lines HeLa and 293 support efficient replication of the hepatitis C virus genotype 2a subgenomic replicon[J]. *J Virol*,2005,79(1):592-596.
  - 29 Gorzin AA, Ramsland PA, Tachedjian G, et al. Identification of residues involved in NS2 homodimerization and elucidation of their impact on the HCV life cycle[J]. *J Viral Hepat*,2012,19(3):189-198.
  - 30 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[J]. *Antiviral Res*,2013,98(1):85-92.
  - 31 Jiang J, Luo G. Cell culture-adaptive mutations promote viral protein-protein interactions and morphogenesis of infectious hepatitis C virus[J]. *J Virol*,2012,86(17):8987-8997.
  - 32 Han Q, Xu C, Wu C, et al. Compensatory mutations in NS3 and NS5A proteins enhance the virus production capability of hepatitis C reporter virus[J]. *Virus Res*,2009,145(1):63-73.
  - 33 Liu S, Xiao L, Nelson C, et al. A cell culture adapted HCV JFH1 variant that increases viral titers and permits the production of high titer infectious chimeric reporter viruses[J]. *PLoS One*,2012,7(9):e44965.
  - 34 Tao W, Xu C, Ding Q, et al. A single point mutation in E2 enhances hepatitis C virus infectivity and alters lipoprotein association of viral particles[J]. *Virology*,2009,395(1):67-76.
  - 35 Grove J, Nielsen S, Zhong J, et al. Identification of a residue in hepatitis C virus E2 glycoprotein that determines scavenger receptor BI and CD81 receptor dependency and sensitivity to neutralizing antibodies[J]. *J Virol*,2008,82(24):12020-12029.
  - 36 Kim CS, Keum SJ, Jang SK. Generation of a cell culture-adapted hepatitis C virus with longer half life at physiological temperature[J]. *PLoS One*,2011,6(8):e22808.
  - 37 Brohm C, Steinmann E, Friesland M, et al. Characterization of determinants important for hepatitis C virus p7 function in morphogenesis by using trans-complementation[J]. *J Virol*,2009,83(22):11682-11693.
  - 38 Lohmann V, Hoffmann S, Herian U, et al. Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture[J]. *J Virol*,2003,77(5):3007-3019.
  - 39 Huang Y, Staschke K, De Francesco R, et al. Phosphorylation of hepatitis C virus NS5A nonstructural protein: a new paradigm for phosphorylation-dependent viral RNA replication[J]. *Virology*,2007,364(1):1-9.
  - 40 Lim YS, Hwang SB. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with phosphatidylinositol 4-kinase type IIIalpha and regulates viral propagation[J]. *J Biol Chem*,2011,286(13):11290-11298.
  - 41 Kaul A, Woerz I, Meuleman P, et al. Cell culture adaptation of hepatitis C virus and in vivo viability of an adapted variant[J]. *J Virol*,2007,81(23):13168-13179.
  - 42 Kaul A, Stauffer S, Berger C, et al. Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics[J]. *PLoS Pathog*,2009,5(8):e1000546.
  - 43 Yamamoto M, Sakamoto N, Nakamura T, et al. Studies on virus kinetics using infectious fluorescence-tagged hepatitis C virus cell culture[J]. *Hepatol Res*,2011,41(3):258-269.
  - 44 Shrivastava S, Devhare P, Sujjantarant N, et al. Knockdown of Autophagy Inhibits Infectious Hepatitis C Virus Release by the Exosomal Pathway[J]. *J Virol*,2015,90(3):1387-1396.
  - 45 Haqshenas G, Mackenzie JM, Dong X, et al. Hepatitis C virus p7 protein is localized in the endoplasmic reticulum when it is encoded by a replication-competent genome[J]. *J Gen Virol*,2007,88(Pt 1):134-142.
  - 46 Clarke D, Griffin S, Beales L, et al. Evidence for the formation of a heptameric ion channel complex by the hepatitis C virus p7 protein in vitro[J]. *J Biol Chem*,2006,281(48):37057-37068.
  - 47 Chandra PK, Gunduz F, Hazari S, et al. Impaired expression of type I and type II interferon receptors in HCV-associated chronic liver disease and liver cirrhosis[J]. *PLoS One*,2014,9(9):e108616.
  - 48 Chandra PK, Bao L, Song K, et al. HCV infection selectively impairs type I but not type III IFN signaling[J]. *Am J Pathol*,2014,184(1):214-229.
  - 49 Liu S, Chen R, Hagedorn CH. Direct visualization of hepatitis C virus-infected Huh7.5 cells with a high titre of infectious chimeric JFH1-EGFP reporter virus in three-dimensional Matrigel cell cultures[J]. *J Gen Virol*,2014,95(Pt 2):423-433.
  - 50 Meyer K, Kwon YC, Liu S, et al. Interferon- $\alpha$  inducible protein 6 impairs EGFR activation by CD81 and inhibits hepatitis C virus infection[J]. *Sci Rep*,2015,5:9012.
  - 51 Ramirez S, Mikkelsen LS, Gottwein JM, et al. Robust HCV genotype 3a infectious cell culture system permits identification of escape variants with resistance to sofosbuvir[J]. *Gastroenterology*,2016,151(5):973-985.
  - 52 Liu F, Shimakami T, Murai K, et al. Efficient Suppression of hepatitis C virus replication by combination treatment with miR-122 antagonism and direct-acting antivirals in cell culture systems[J]. *Sci Rep*,2016,6:30939.

(收稿日期: 2016-04-27)

(本文编辑: 孙荣华)

王琦, 谢雯. 丙型肝炎病毒细胞研究模型的建立及进展[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2016,10(6):654-658.