

· 基础研究 ·

## 乙型丙型肝炎病毒合并感染细胞模型的建立

胡平平,朱传龙,徐瑞瑞,田安然,李 军\*

南京医科大学第一附属医院感染病科,江苏 南京 210029

**[摘要]** 目的:利用慢病毒载体在可感染丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)的Huh7.5.1细胞中过表达人肝细胞乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)受体钠离子牛磺胆酸共转运蛋白(sodium taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP)编码基因,建立Huh7.5.1-hNTCP细胞模型,使其可以被HBV、HCV共同感染。方法:使用携带人NTCP编码基因、绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因、嘌呤霉素抗性基因的GV358重组慢病毒载体,以感染复数(MOI)50感染Huh7.5.1细胞。经过嘌呤霉素筛选获得稳定表达人NTCP基因的Huh7.5.1-hNTCP细胞株,并通过Western blot验证NTCP蛋白的表达。使用HepAD38细胞来源的HBV感染Huh7.5.1-hNTCP细胞,通过ELISA及qPCR等方法检测HBV感染后不同时间点乙肝病毒表面抗原(HBsAg)、e抗原(HBeAg)的表达以及HBV DNA的复制。HBV感染后24 h予以HCV-JFH1感染,检测合并感染状态下HBV DNA以及HCV RNA的复制。结果:Western blot结果表明Huh7.5.1-hNTCP细胞株可稳定表达HBV受体NTCP。HBV感染Huh7.5.1-hNTCP细胞后ELISA、qPCR结果显示,HBsAg、HBeAg、HBV DNA合成逐渐增加,并在第9天达峰。HBV/HCV合并感染Huh7.5.1-hNTCP细胞后,qPCR检测结果显示不同时间点HBV DNA、HCV RNA复制逐渐增加。结论:建立了Huh7.5.1-hNTCP细胞模型,该模型可被HBV/HCV合并感染。

**[关键词]** 乙型肝炎病毒;丙型肝炎病毒;钠离子牛磺胆酸共转运蛋白;Huh7.5.1细胞

**[中图分类号]** R575.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2019)01-037-06

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20190107

## Establishment of a HBV and HCV co-infection cell model

Hu Pingping, Zhu Chuanlong, Xu Ruirui, Tian Anran, Li Jun\*

Department of Infectious Disease, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029, China

**[Abstract]** **Objective:** To establish a sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)-complemented Huh7.5.1 cell line (Huh7.5.1-hNTCP) that supports hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) co-infection. **Methods:** Huh7.5.1 cells were infected with GV358 recombinant lentiviral vector carrying human NTCP encoding gene, green fluorescent protein (GFP) gene and puromycin resistance gene with the multiplicity of infection (MOI) of 50. NTCP positive cells were obtained through the puromycin screening and NTCP expression was identified by Western blotting. Huh7.5.1-hNTCP cells were infected with HBV derived from HepAD38 cells. The expression of HBsAg, HBeAg and HBV DNA at different time points were detected by ELISA and qPCR. HCV-JFH1 was added 24 hours after HBV infection, and then HBV DNA and HCV RNA were detected in co-infected cells. **Results:** Western blotting results indicated that Huh7.5.1-hNTCP cell line stably expressed the HBV receptor NTCP. ELISA and qPCR results showed that HBsAg, HBeAg and HBV DNA secretion increased gradually and peaked on the 9<sup>th</sup> day in HBV infected Huh7.5.1-hNTCP cells. The results of qPCR suggested that the replication of HBV DNA and HCV RNA increased gradually at different time points in HBV and HCV co-infected cells. **Conclusion:** Huh7.5.1-hNTCP cell line was established, and it can be co-infected by HBV and HCV.

**[Key words]** HBV; HCV; NTCP; Huh7.5.1 cells

[Acta Univ Med Nanjing, 2019, 39(01):037-042]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81770591, 81871242);江苏省医学创新团队(CXTDA2017023)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: dr-lijun@vip.sina.com

病毒性肝炎是全世界发病率较高的疾病,其中最常见为乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)和丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染,由于HBV

与HCV具有相同传播途径,HBV、HCV合并感染在全世界范围内广泛存在。临床上HBV、HCV合并感染比单一感染更容易引起肝硬化和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)<sup>[1-2]</sup>,这种合并感染病毒间的相互作用可影响相关疾病发生、发展和预后过程。因此研究HBV、HCV合并感染具有较高的临床价值。

传统HBV、HCV合并感染的研究多使用以下两种模型,一是原代肝细胞模型<sup>[3]</sup>,二是携带HBV、HCV病毒基因的质粒共同转染肝癌细胞获得的HBV、HCV复制表达模型<sup>[4]</sup>。原代肝细胞获取困难,体外培养条件下存活时间短,HBV、HCV复制表达模型缺乏病毒自然感染过程,均不是理想的模型。近年来,国内外学者不断致力于病毒感染模型的探索和优化。在丙型肝炎领域,2005年日本Wakita<sup>[5]</sup>课题组从1例暴发型肝炎患者体内分离出HCV 2a型全基因序列JFH-1株基因,并将构建的JFH-1复制子电转入Huh7细胞系,可产生具有感染性的HCV颗粒,建立了高效的HCV感染、复制、分泌模型。以此为基础,Zhong等<sup>[6]</sup>用Huh7.5.1细胞系替换了Huh7细胞系,对该模型做了进一步优化,可获得更高滴度的具有感染性的病毒颗粒,成为HCV研究的经典模型。在乙型肝炎领域,钠离子-牛磺胆酸共转运蛋白(sodium taurocholate transporting peptide, NTCP)的发现使HBV感染模型的建立取得了新的突破。NTCP是HBV感染人肝细胞的功能性受体分子。2012年Yan等<sup>[7]</sup>发现NTCP能够与HBV包膜蛋白L蛋白上受体结合区域pre-S1特异性紧密结合,介导HBV进入肝细胞。并在难以感染HBV的肝癌源性细胞中外源性表达NTCP,使其获得了HBV易感性,建立了HepG2-hNTCP、Huh7-hNTCP等HBV感染细胞模型<sup>[8-11]</sup>。已应用于HBV感染机制的研究及抗病毒药物的筛选。

本课题组在原有JFH1-Huh7.5.1丙肝感染模型以及NTCP过表达的乙肝感染模型基础上,利用慢病毒载体,在Huh7.5.1细胞中过表达HBV受体NTCP,建立了同时具有HBV、HCV易感性的Huh7.5.1-hNTCP细胞模型。为更深入研究病毒之间相互作用机制,探索更有效的治疗方案奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

胎牛血清、DMEM高糖培养基(Gibco公司,美国);Huh7.5.1细胞、HepAD38细胞(哈佛大学We-

nyu Li教授提供);PEG病毒浓缩试剂盒(Abcam公司,德国);GV358载体(上海吉凯基因化学技术有限公司);胰酶、双抗、BCA蛋白定量试剂盒(上海碧云天);嘌呤霉素(上海吉凯);全蛋白提取试剂盒(KGP250,南京凯基);兔抗人NTCP抗体(anti-SLC10A1, Sigma公司,美国)、鼠抗人GAPDH抗体(南京巴傲德)、山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗(北京康为世纪);乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)诊断试剂盒、乙型肝炎病毒e抗原(HBeAg)检测试剂盒(酶联免疫法,上海科华公司);HBV DNA定量检测试剂盒(广州中山大学达安基因股份有限公司);丙型肝炎病毒定量检测试剂盒(深圳普瑞康)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

Huh7.5.1细胞、HepAD38细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中(含青霉素100 U/mL,链霉素0.1 mg/mL)。培养环境为37℃,5%CO<sub>2</sub>。细胞汇合度达80%时用0.25%的胰酶消化传代。

#### 1.2.2 病毒培养

HBV培养及浓缩:本实验中HBV来源于HepAD38细胞<sup>[12]</sup>。使用无四环素培养基培养HepAD38细胞,以诱导HBV复制和病毒粒子产生,每3 d换1次液并收集培养基上清。使用PEG病毒浓缩试剂盒浓缩HBV:将收集的培养基上清在4℃条件下以3 200 g离心力离心15 min后,弃去沉淀保留上清;上清与50%的PEG8000溶液按4:1混合,使PEG8000的终浓度为10%,置于4℃冰箱过夜;第2天4℃条件下,3 200 g离心力离心30 min,去除上清,底部白色沉淀即为HBV颗粒。将白色沉淀重新溶解于病毒重悬液(重悬液体积为原体积的1%),混匀所有重悬后的病毒液,取200 μL用PCR法进行病毒核酸定量检测,其余分装后于-80℃冰箱内保存备用。

HCV培养:Huh7.5.1细胞对数生长期加入HCV-JFH1<sup>[5-6]</sup>,感染复数(MOI)值为0.2。3 d换液1次,并收集感染后细胞培养基上清,混匀,0.45 μm滤器过滤后进行上清中病毒定量,于-80℃冰箱内保存备用。

#### 1.2.3 确定Huh7.5.1细胞嘌呤霉素筛选浓度

取对数生长期的Huh7.5.1细胞,接种于6孔板,待各孔细胞长满后,梯度加入含嘌呤霉素的完全培养基2 mL,各孔嘌呤霉素浓度分别为0、1、2、3、4、5 μg/mL。每天对各孔细胞生长情况进行观察。4 d可以杀死相应孔中全部细胞的嘌呤霉素最低浓度即为最终药物筛选浓度<sup>[13]</sup>。经实验观察Huh7.5.1

细胞嘌呤霉素筛选浓度为5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

#### 1.2.4 建立过表达NTCP的Huh7.5.1细胞模型

NTCP编码基因(SLC10A1)与GV358慢病毒(元件顺序为Ubi-MCS-3FLAG-SV40-EGFP-IRES-puro-mycin)连接,构建携带NTCP基因的重组慢病毒载体(课题组前期实验中完成<sup>[14]</sup>)。

Huh7.5.1消化离心后,用完全培养基制备密度为 $5 \times 10^4$ 个/mL的细胞悬液,以500  $\mu\text{L}/$ 孔,接种于24孔板。培养24 h,细胞密度达30%~50%时进行慢病毒感染。用含5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 感染增强试剂(polybrene)的完全培养基制备MOI分别为100、50、10、1的病毒液各500  $\mu\text{L}$ ,阴性对照组只加入转染试剂,不加慢病毒。吸除各孔细胞上清液,更换为不同MOI的病毒液,继续培养。12 h后换液为常规培养液。72 h后流式检测表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的细胞所占百分比以验证慢病毒感染效率。

选取感染效率大于80%,且细胞生长状态良好的最佳MOI值,在6 cm培养皿中按上述过程再次进行感染。72 h后荧光显微镜观察细胞是否表达GFP。加入嘌呤霉素进行为期1周的药物筛选,筛选后用荧光显微镜观察阳性细胞比例,此后在培养该细胞株时都加入最佳筛选浓度1/4的嘌呤霉素。

#### 1.2.5 Western blot检测NTCP受体的表达

慢病毒感染1周后Western blot检测Huh7.5.1-hNTCP细胞中NTCP蛋白的表达情况。按照全蛋白提取试剂盒方法提取Huh7.5.1-hNTCP细胞、Huh7.5.1细胞总蛋白。用BCA法进行蛋白定量后加入SDS上样缓冲液,100  $^{\circ}\text{C}$ 煮沸5 min。制备10%的电泳凝胶,进行SDS-PAGE;将电泳产物转移至PVDF膜;牛奶封闭2 h,加入NTCP抗体(1:1 000稀释)4  $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜;次日洗膜3次,山羊抗兔二抗(1:5 000稀释)室温孵育2 h,弃二抗洗膜3次,用ECL发光液进行曝光,BIO-RAD凝胶成像仪进行成像分析。

#### 1.2.6 HBV、HCV-JFH1感染

HBV感染:Huh7.5.1-hNTCP细胞消化离心后,制备浓度为 $2 \times 10^5$ 个/mL的细胞悬液,接种至12孔板,每孔接种体积1 mL,24 h后进行感染。制备接种培养液:完全培养液稀释病毒至 $2 \times 10^8$ 拷贝/mL[病毒接种量为1 000基因组当量(GEq)/细胞]<sup>[15-16]</sup>,取病毒液540  $\mu\text{L}$ ,加入60  $\mu\text{L}$  40%的PEG8000<sup>[17]</sup>,充分混匀。去除细胞上清,加入600  $\mu\text{L}$ 接种培养液。将培养板置于离心机1 000  $g$ 离心力离心5 min<sup>[18]</sup>,使病毒细胞充分接触,放入培养箱。病毒细胞共孵育24 h

后,去除接种培养液,PBS冲洗3遍。制备复制培养液:完全培养液中加入2.5%的DMSO<sup>[17]</sup>。每孔加入1 mL的复制培养液。每3 d换1次液,收集培养基上清进行病毒复制指标检测。

HCV-JFH1感染:HCV-JFH1以0.2的MOI值<sup>[19]</sup>加入Huh7.5.1、Huh7.5.1-hNTCP培养基中进行感染。

#### 1.2.7 ELISA检测HBsAg、HBeAg表达水平

按照上海科华公司的HBsAg诊断试剂盒和HBeAg诊断试剂盒(ELISA法)步骤,检测培养基上清中HBsAg、HBeAg。检测结果以S/COV来表示,S为待测样本的OD值,COV为Cut-off值, $S/\text{COV} \geq 1$ 检测样本结果为阳性, $S/\text{COV} < 1$ 检测样本结果为阴性。

#### 1.2.8 qPCR检测病毒核酸表达水平

按照乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒步骤检测HBV DNA,按照丙型肝炎病毒定量检测试剂盒步骤检测HCV RNA。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS17.0及GrahPad Prism5分析处理数据。计算3次实验的均值和标准差,采用 $t$ 检验进行数据比较, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

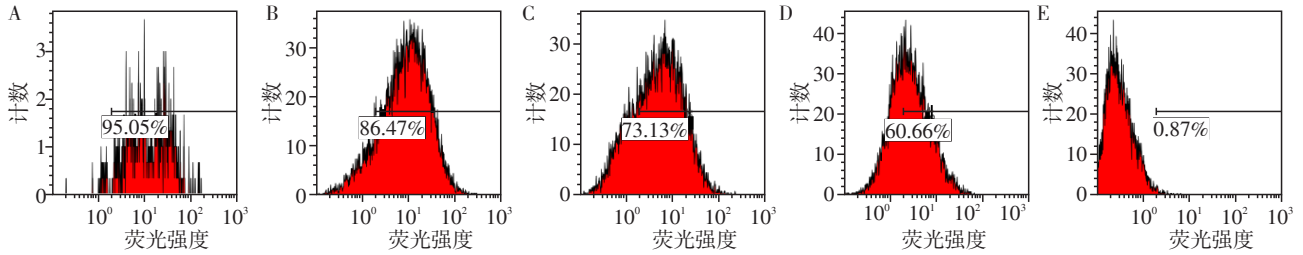
## 2 结果

### 2.1 建立Huh7.5.1-hNTCP细胞模型

确定感染最佳MOI值,MOI值为100时,荧光细胞百分比为95.05%,但细胞生长缓慢状态不佳;MOI值为50时,荧光细胞百分比为86.47%,且细胞生长状态良好;故后续实验中选取MOI值50进行感染(图1)。将含有NTCP基因的GV358慢病毒载体,以最佳MOI值50感染Huh7.5.1细胞,72 h后荧光显微镜观察到荧光细胞比例大于80%,加入5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素筛选1周后荧光显微镜观察荧光细胞比例大于95%(图2)。Western blot检测NTCP表达,Huh7.5.1-hNTCP细胞NTCP表达明显高于Huh7.5.1细胞(图3)。可以稳定表达NTCP的Huh7.5.1-hNTCP细胞株构建完成。

### 2.2 Huh7.5.1-hNTCP可被HBV感染

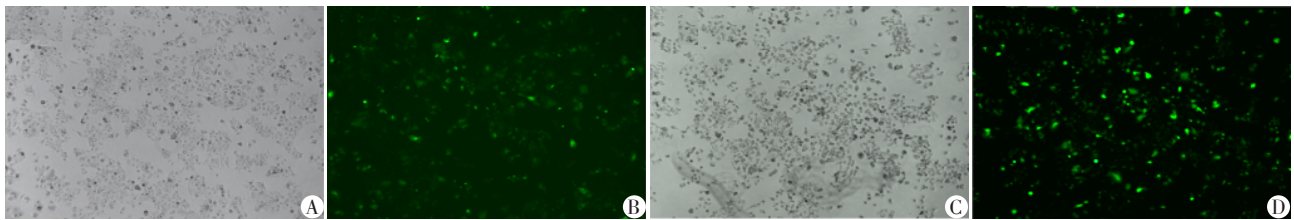
将含有HBV病毒的培养基加入Huh7.5.1-hNTCP细胞中共孵育24 h,更换为含有2.5%DMSO的复制培养液继续培养,并在第3、6、9、12天收集细胞上清,ELISA检测HBsAg、HBeAg表达(图4A、B),Huh7.5.1细胞为对照组,进行同步处理。Huh7.5.1-hNTCP组HBsAg和HBeAg逐渐增高,第9天达峰;对照组Huh7.5.1细胞HBsAg和HBeAg逐渐降低至检测不到。qPCR检测第3、6、9、12天上清中HBV DNA(图



NTCP过表达慢病毒分别以MOI值100(A)、50(B)、10(C)、1(D)感染Huh7.5.1细胞后72 h流式检测GFP荧光细胞所占百分比分别为95.05%、86.47%、73.13%、60.66%;E:阴性对照组。

图1 流式细胞仪检测不同MOI值感染效率

Figure 1 Infection efficiency of different MOI values detected by flow cytometry



嘌呤霉素筛选前荧光细胞比例约80%(A、B),筛选1周后荧光细胞比例>95%(C、D)。

图2 荧光显微镜下比较白视野和荧光视野中荧光细胞所占百分比(×40)

Figure 2 The percentage of fluorescent cells was detected by comparing the white field and fluorescence field (×40)

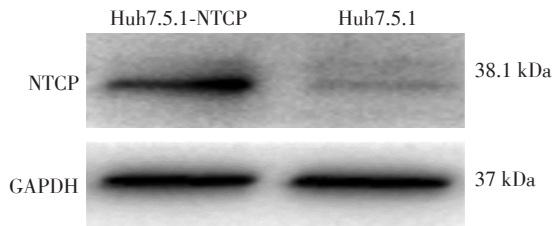


图3 Western blot检测Huh7.5.1-hNTCP、Huh7.5.1细胞NTCP蛋白表达

Figure 3 The expression of NTCP protein in Huh7.5.1-hNTCP and Huh7.5.1 cells was detected by Western blot

4C), Huh7.5.1-hNTCP组HBV DNA含量均高于Huh7.5.1组,且在第9天HBV DNA表达量达到峰值。对照组Huh7.5.1细胞HBV逐渐降低至检测不到。

以上结果表明Huh7.5.1-hNTCP细胞能够被HBV感染,并且支持病毒的复制,病毒抗原HBsAg、

HBeAg的表达以及子代病毒的产生。Huh7.5.1因缺乏NTCP受体无法被HBV感染,第3天时仅检测到感染培养基中少量HBsAg、HBeAg以及病毒DNA残留,之后逐渐降低至检测不到。

2.3 Huh7.5.1-hNTCP可被HBV、HCV合并感染

HBV与Huh7.5.1-hNTCP细胞共孵育24 h后,换液去除HBV,培养基中加入HCV-JFH1(MOI=0.2),建立Huh7.5.1-hNTCP HBV、HCV合并感染模型。以Huh7.5.1 HBV、HCV合并感染组及Huh7.5.1-hNTCP HBV单独感染组为对照同步进行处理,收集各组第3、6、9天培养基上清。qPCR检测HBV DNA含量,结果显示:Huh7.5.1细胞在第3、6、9天HBV DNA逐渐降低至检测不到;Huh7.5.1-hNTCP细胞在不同时间点HBV DNA逐渐增加;同一时间点HBV单独感染组HBV DNA明显高于HBV、HCV合并感染组,差异具有统计学意义(图5A)。

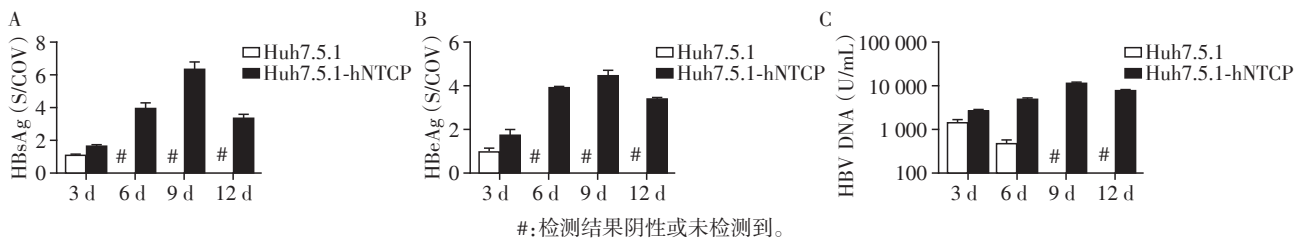


图4 HBV感染Huh7.5.1、Huh7.5.1-hNTCP细胞后病毒血清学标志物及复制水平检测

Figure 4 Detection of HBV serologic marker and replication level after HBV infection of Huh7.5.1 and Huh7.5.1-hNTCP cells

qPCR检测HCV RNA, Huh7.5.1细胞、Huh7.5.1-hNTCP细胞不同时间点HCV RNA均逐渐增高,同一时间点Huh7.5.1细胞和Huh7.5.1-hNTCP HCV RNA复制水平无显著差异(图5B)。

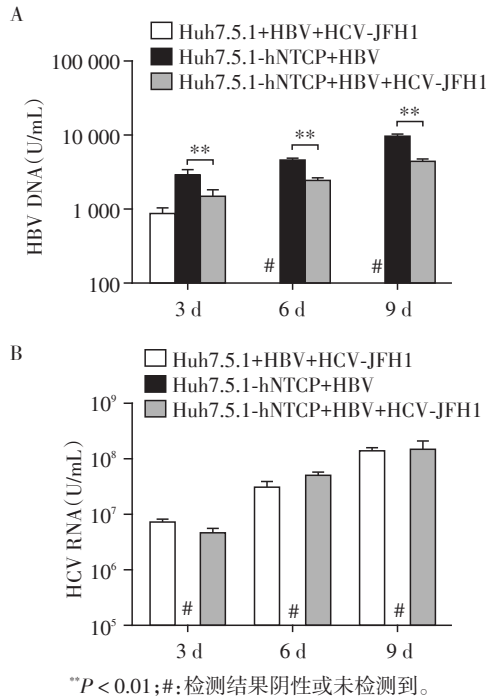


图5 HBV、HCV共同感染后病毒复制指标检测

Figure 5 Detection of viral replication after HBV and HCV co-infection

以上结果表明:Huh7.5.1细胞不能被HBV感染。Huh7.5.1-hNTCP细胞可以被HBV、HCV合并感染,且HCV的感染会干扰HBV的复制。过表达NTCP受体后Huh7.5.1细胞中HCV的感染复制不受影响。

### 3 讨论

据估计,全世界有700万~2000万HBV、HCV合并感染患者<sup>[20]</sup>,已成为严重的公共卫生和社会问题<sup>[21]</sup>。相对于单独感染,HBV、HCV合并感染进展为肝硬化、肝癌的发病风险增加。虽然存在有效的药物和方案来控制两种病毒的单独感染,但是临床上并没有成熟、高效的方案来治疗HBV、HCV合并感染。因此需要建立HBV、HCV合并感染模型,以便于研究两种病毒之间以及病毒和宿主之间的相互作用,建立有针对性的治疗方案。

HBV、HCV感染具有种特异性和组织特异性,自然状态下仅能感染人和少数灵长类动物肝细胞。原代肝细胞在体外条件下存活周期短,无法进行增

殖;体外培养的肝脏肿瘤细胞表面关键性受体缺失,无法直接被HBV、HCV感染,因此合并感染模型的建立面临重重障碍。本研究在前人研究基础上,利用慢病毒载体将NTCP受体基因过表达在Huh7.5.1细胞中,建立了可被HBV、HCV共感染的Huh7.5.1-hNTCP细胞模型,形成了HBV/HCV-JFH1-Huh7.5.1-hNTCP感染系统。同时利用该模型初步观察到HBV、HCV共感染组上清中HBV DNA水平显著低于HBV单独感染组,与临床研究中HBV/HCV共感染患者易出现HBV复制抑制现象相一致<sup>[22-23]</sup>。HCV对HBV的抑制机制目前尚在研究之中,有文献报道HCV核心蛋白的C端疏水区可对HBV增强子1、增强子2产生抑制作用,从而抑制HBV复制,导致HBsAg和HBeAg的表达降低,子代病毒生成减少<sup>[24]</sup>。该模型可以为更深入研究两种病毒之间相互作用机制,探索更有效的治疗方案提供有效工具。

该模型提供了HBV、HCV合并感染的建模思路,但是也存在一些不足之处。过表达NTCP受体后,HCV感染不受影响,仍以较小的感染MOI值获得较高的产毒量,然而HBV感染效率较低,并且难以获得持续感染,是该模型研究中的难点。我们从HepG2-hNTCP、Huh7-hNTCP等HBV单独感染模型寻找经验,通过增加HBV感染滴度,平均每个细胞加入1000 GEq的病毒,增强感染;通过病毒接种后进行离心、感染培养基中加入4% PEG8000,增大病毒和细胞的接触,便于病毒进入细胞内;通过复制培养基中加入2.5%的DMSO,增加病毒复制。感染效率取得了一定提高,但只能达到30%左右。实验中我们观察到HBV感染后病毒复制逐渐增加,第9天达峰,后逐渐减少,随着细胞的增殖传代,2~3周后上清中HBV病毒逐渐减少至检测不到。其可能原因在于:①NTCP受体是HBV感染的一条通路,但不是影响感染的唯一因素,可能存在着其他HBV进入细胞的通路,限制了感染效率的提高;②感染要求的病毒接种量较高,而感染后的细胞的产毒量远低于初次外源接种的病毒量,随着细胞增殖,未感染的细胞逐渐占优势。多次传代后感染细胞逐渐减少。这些问题的解决依赖于更多HBV感染机制的发现,相信将来在肝病研究者的共同努力下HBV感染模型和HBV/HCV合并感染模型会越来越完善。

综上所述,本研究建立了HBV/HCV合并感染模型,为短期感染的研究提供了有效工具。

#### [参考文献]

[1] Dimitris K, Melanie D. The spectrum of HBV/HCV coin-

- fection: epidemiology, clinical characteristics, viral interactions and management[J]. *Ann Gastroenterol*, 2015, 28(2):221-228
- [2] Caccamo G, Saffioti F, Raimondo G. Hepatitis B virus and hepatitis C virus dual infection[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(40):14559-14567
- [3] Ramboer E, Craene BD, Kock JD, et al. Strategies for immortalization of primary hepatocytes[J]. *J Hepatol*, 2014, 61(4):925-943
- [4] Wu Q, Li Z, Liu Q. An important role of SREBP-1 in HBV and HCV co-replication inhibition by PTEN[J]. *Virology*, 2018, 520:94-102
- [5] 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
- [6] Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, et al. Robust hepatitis C virus infection *in vitro* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(26):9294-9299
- [7] Yan H, Zhong G, Xu G, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus[J]. *eLife*, 2012, 1(1):e00049
- [8] Hayes CN, Chayama K. HBV culture and infectious systems[J]. *Hepatol Int*, 2016, 10(4):559-566
- [9] Masashi I, Koichi W, Senko T, et al. Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 443(3):808-813
- [10] Sun Y, Qi Y, Peng B, et al. NTCP-reconstituted *in vitro* HBV infection system[M]// Guo HT, Cuconati A. Hepatitis B virus, methods and protocols. New York: Humana Press, 2017, 1540:1-14
- [11] Ren JH, Hu JL, Cheng ST, et al. SIRT3 restricts HBV transcription and replication via epigenetic regulation of cccDNA involving SUV39H1 and SETD1A histone methyltransferases[J]. *Hepatology*, 2018, 68(4):1260-1276
- [12] Ladner SK, Otto MJ, Barker CS, et al. Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) in stably transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors of HBV replication [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 41(8):1715-1720
- [13] 王 坤, 朱甜甜, 李毓雯, 等. c-met慢病毒载体的构建及稳定转染骨髓间充质干细胞[J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(4):597-601
- [14] 朱甜甜, 李毓雯, 胡平平, 等. 功能性受体钠离子牛磺胆酸共转运蛋白-Huh7细胞株的构建及其HBV易感性[J]. *医学研究生学报*, 2018, 31(11):1142-1147
- [15] Okuyamadobashi K, Kasai H, Tanaka T, et al. Hepatitis B virus efficiently infects non-adherent hepatoma cells via human sodium taurocholate cotransporting polypeptide [J]. *Sci Rep*, 2015, 5:17047
- [16] Yao WL, Ikeda S, Tsukamoto Y, et al. Establishment of a human hepatocellular cell line capable of maintaining long-term replication of hepatitis B virus [J]. *Int Immunol*, 2017, 29(3):109-120
- [17] Ni Y, Lempp FA, Mehrle S, et al. Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes [J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(4):1070-1083
- [18] Yan R, Zhang Y, Cai D, et al. Spinoculation enhances HBV infection in NTCP-reconstituted hepatocytes [J]. *PLoS One*, 2015, 10:e0129889
- [19] Zhu C, Xiao F, Hong J, et al. EFTUD2 is a novel innate immune regulator restricting hepatitis C virus infection through the RIG-I/MDA5 pathway [J]. *J Virol*, 2015, 89(13):6608-6618
- [20] Potthoff A, Manns MP, Wedemeyer H. Treatment of HBV/HCV co-infection [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2010, 11(6):919-928
- [21] 张若洋, 范恩勇, 王明元, 等. 基于PCR-化学发光的HBV/HCV/HIV并行核酸检测试剂盒的评价[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(3):335-339
- [22] Sagnelli E, Coppola N, Marrocco C, et al. Hepatitis C virus superinfection in hepatitis B virus chronic carriers: a reciprocal viral interaction and a variable clinical course [J]. *J Clin Virol*, 2006, 35(3):317-320
- [23] Liaw YF. Hepatitis C virus superinfection in patients with chronic hepatitis B virus infection [J]. *J Gastroenterol*, 2002, 37(Suppl 13):65-68
- [24] Schuttler G, Fiedler N, Schmidt K, et al. Suppression of hepatitis B virus enhancer 1 and 2 by hepatitis C virus core protein [J]. *J Hepatol*, 2002, 37(6):855-862

[收稿日期] 2018-09-16