

Cell Culture System for the Study of the Hepatitis E Virus

Shilin Gong^{1*}, Mickael Houfack Kenfack^{1*}, Wenhai Yu², Fen Huang^{1#}

¹School of Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming Yunnan

²Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Kunming Yunnan

Email: shilingongkm@163.com, houfack@gmail.com, #huangfen6789@163.com

Received: Jun. 26th, 2020; accepted: Jul. 10th, 2020; published: Jul. 17th, 2020

Abstract

Hepatitis E virus (HEV) is the causative agent of human hepatitis E and the main cause of viral hepatitis transmitted in the intestines worldwide. Virology research requires a powerful cell culture system. Unfortunately, like other hepatitis viruses, HEV is difficult to reproduce in conventional cells. Many different cell culture systems have been tested using various HEV strains, but virus replication generally progresses very slowly, and infections with low virion counts render HEV replication ineffective. However, recent advances in the passage of primary patient isolates in different cell lines have improved *in vitro* HEV transmission. This review describes the cell culture of several typical strains.

Keywords

Hepatitis E Virus, Replication *in Vitro*, Cell Culture System

用于研究戊型肝炎病毒的细胞培养系统

龚石林^{1*}, Mickael Houfack Kenfack^{1*}, 禹文海², 黄芬^{1#}

¹昆明理工大学, 医学院, 云南 昆明

²中国医学科学院医学生物学研究所, 云南 昆明

Email: shilingongkm@163.com, houfack@gmail.com, #huangfen6789@163.com

收稿日期: 2020年6月26日; 录用日期: 2020年7月10日; 发布日期: 2020年7月17日

摘要

戊型肝炎病毒(HEV)是人类戊型肝炎的致病因子,也是全世界肠道传播的病毒性肝炎的主要原因。病毒

*共同第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 龚石林, Mickael Houfack Kenfack, 禹文海, 黄芬. 用于研究戊型肝炎病毒的细胞培养系统[J]. 生物医学, 2020, 10(3): 62-67. DOI: 10.12677/hjbm.2020.103009

学研究需要强大的细胞培养系统。不幸的是,与其他肝炎病毒一样,HEV难以在常规细胞中繁殖。虽然已经使用各种HEV毒株测试了许多不同的细胞培养系统,但是病毒复制通常进展非常缓慢,并且具有低病毒粒子计数的感染导致HEV复制无效。然而,最近发现在不同细胞系中传代原发患者分离株的进展改善了体外HEV传播。本综述描述了几个典型毒株的细胞培养情况。

关键词

戊型肝炎病毒, 体外复制, 细胞培养系统

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

戊型肝炎病毒(Hepatitis E virus, HEV)是戊型肝炎(Hepatitis E, HE)的病原体,是世界范围内肠道传播的病毒性肝炎的主要原因,但也可能表现出肝外表现,如神经系统综合征,肾损伤和血液病等[1] [2]。HE 占我国急性病毒性肝炎 20%左右,病死率为 1.4%~5.3%,而孕妇中的病死率可达 25%,病毒的垂直传播还会导致不良后果,特别是在妊娠晚期,如早产,流产,死产,宫内感染和新生儿死亡[3] [4]。这使得 HE 成为一个重要的公共卫生问题。

HEV 属于戊型肝炎病毒科,其中包括正戊肝病毒属和鱼戊肝病毒属[5]。后一种属仅包括割喉鳟鱼病毒(Cutthroat trout virus, CTV),而正戊肝病毒属由四种组成:正戊肝病毒属包含了 A、B、C 和 D 4 种[5]。其中 A 主要感染人和猪、骆驼、兔、雪貂、鼠、鹿、猫鼬等哺乳动物;B 主要感染禽类;C 主要感染鼠和雪貂;D 主要感染蝙蝠[6] [7] [8]。A 包括 8 个基因型,人是基因 1 型和 2 型病毒的宿主,主要在发展中国家发现,通过粪口途径传播;动物是基因 3 型和 4 型病毒感染的宿主,包括猪,鹿和猫鼬,野猪,贝类,啮齿动物,野牛,牛和狗,主要存在于发达国家;基因 5 型和基因 6 型在日本野猪中分离;2014 年,基因 7 型在中东地区的单峰骆驼中被发现,并广泛分布在巴基斯坦、阿拉伯联合酋长国和四个非洲国家;基因 8 型在日本的骆驼中被发现[9] [10] [11] [12]。HEV 基因 3、4、7 型可以跨越物种屏障传播[13] [14] [15]。

HEV 是直径 27~34 nm 的二十面体病毒,病毒体含有一个大约 7.2 kb 的单链 RNA 基因组,其正向可编码三个开放阅读框(Open reading frame, ORF),具有 5'-7-甲基鸟苷酸帽和 3'聚(A)尾[16]。ORF1 是最大的病毒基因产物,由甲基转移酶、假定蛋白酶、RNA 解旋酶、RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RdRp)和病毒复制必需的高变区组成;ORF2 编码 660 个氨基酸的病毒衣壳,在病毒基因型中相对保守,并且是中和抗体的主要靶标;ORF3 蛋白分别是 113 或 114 个氨基酸的 13 kDa 蛋白质,在准包膜病毒粒子中发现,参与病毒体形态发生和病毒排出[2] [17] [18]。最近,已经报道了 ORF3 蛋白的离子通道活性,这对于感染性颗粒的释放是至关重要的[2]。

该综述总结了部分用于研究 HEV 的体外培养系统,希望对研究 HEV 的课题组有所帮助。

2. 毒株

1) 87A

HEV 基因 1 型株的 87A 最初来自 1986~1987 年新疆流行期间的一名戊型肝炎患者的粪便中分离到的

人胚肺二倍体细胞株(2BS),该株在 2BS 细胞中分离后,尝试在其他组织培养细胞中进行病毒的增殖[19]。由于很难获得足够的 2BS 细胞培养戊型肝炎病毒,因此急需寻找到适合于戊型肝炎病毒易于培养或对其增殖敏感的细胞系。

为寻找适合 HEV 增殖的敏感细胞株,将 87A 株病毒接种于 A549、Ic-mk、Vero、BHK-21 细胞株单层细胞上。结果表明,在上述 4 个细胞系中,只有 A549 细胞系对 HEV 敏感,并观察到细胞病变效应(CPE)[20]。在进行 6 次传代后,A549 细胞系上清液中依旧能检测到大小为 239 bp 的 HEV 谱带。使用电镜观察接种了 87A 株的 A549 细胞系,可见约为 30 nm 大小的病毒颗粒。这些结果表明 87A 株病毒可在 A549 细胞系中复制[19]。

2) G93

G93 病毒株是从中国广州的 HEV 分离株 G-9 相同个体的粪便样品中分离得到的,属于基因 1 型,与 G-9 有高度同源性(93%) [21]。通过 A549 细胞系培养 G93 株,并通过免疫学和分子生物学技术鉴定。结果显示 G93 株可以在 A549 细胞系中繁殖,并在感染 24 小时后引起 CPE,并逐渐发展到第 8 天[21]。通过使用免疫电子显微镜观察到,病毒颗粒直径约为 29~32 nm,形态与其他来源的 HEV 相似[22]。病毒抗原经 IFA 鉴定,免疫荧光定位于细胞质和细胞膜表面,但不存在于感染细胞的细胞核内。采用间接荧光抗体检测方法,可以通过细胞质和细胞膜上的免疫荧光检测感染细胞中的 HEV 抗原。有中国的学者利用戊型肝炎患者血清与分离到的病毒,通过 Western blotting 发现只有 G93 病毒蛋白的两个片段与血清反应,其中一个片段是被 IgM 类抗体识别的 58 kDa 片段,另一个是被 IgG 抗体识别的 82 kDa 片段。鉴定了 HEV 的 58-kDa 和 82-kDa 天然结构蛋白[21]。

3) Sar-55

Sar-55 株是从一名巴基斯坦患者分离到的基因 1 型 HEV 株,具有广泛的特征,与缅甸株有高同源性[23]。将 Sar-55 株分别接种到 HepG2/C3A 细胞系,LLC-PK1 细胞系、鹿细胞系中,发现,Sar-55 株能在 HepG2/C3A 细胞系和 LLC-PK1 细胞系中复制,并连续传代 6 次,尽管在 LLC-PK1 细胞系中复制效率较低[18]。

将含有 10% 人类粪便悬液的 Sar-55 株静脉注射到食蟹猴体内,生化和血清学检测证实,所有接种的动物都被感染了,并表现出丙氨酸氨基转移酶、异柠檬酸脱氢酶、 γ -谷氨酰胺转移酶、指示性肝炎的增加[23]。并且,所有食蟹猴都产生了重组型 HEV 抗原的抗体。在对上述食蟹猴的粪便、血清和胆汁样本进行了敏感的巢式 RT-PCR 检测后,发现,戊型肝炎病毒的基因组在第 6~35 天被检测到。这些结果表明,Sar-55 株能够诱导戊型肝炎并引起持续感染[23]。

4) F23

F23 株是从一名摩洛哥 28 岁的戊型肝炎男性患者的粪便中分离到的基因 1 型 HEV 株。将粪便样本悬浮在 10% 磷酸盐缓冲液中,经离心后,用 0.22 μ m 孔径的微孔过滤器过滤上清液,使用 PLC/PRF/5 细胞系培养,发现仅导致低滴度的复制,并且没有可见的 CPE。虽然有证据证明 F23 株能在 2BS 细胞系中复制并连续传代,但获得足够多的 2BS 细胞系仍较为困难,因此需要开发更多的 F23 株体外培养系统[18]。

5) Kernow-C1/P6

Kernow-C1 株是从一名慢性感染患者分离到的基因 3 型 HEV 株,被用于鉴定可受感染的人、猪和鹿细胞株,该病毒重组包含一个人核糖体蛋白基因的 174 个核糖核苷酸(58 个氨基酸)的插入[24]。

虽然已知某些基因型 3 和 4 毒株可感染猪和鹿以及人类,但没有适合探索宿主范围参数的病毒细胞培养系统。为了开发这样的系统,基因 3 型 HEV 株的 Kernow-C1 从感染 HEV 的 HIV-1 患者的粪便中半纯化。将病毒接种于 5 株人细胞系和 1 株恒河猴细胞系上,7 天后用 ORF2 衣壳蛋白和 ORF3 蛋白抗体对细胞进行免疫荧光显微镜染色。由于这些病毒蛋白是从亚基因组信使 RNA 翻译而来的,它们的存在表明

病毒 RNA 合成已经发生。免疫荧光显示肝细胞瘤细胞系 HepG2/C3A 对 HEV 接种后 7 天的耐受能力最强, 而 Caco-2、Huh-7.5、PLC/PRF/5 和 A549 细胞的耐受能力较弱[24]。

半纯化病毒在 HepG2/C3A 细胞中连续传代 6 次, 共传代 7 个月。粪便中病毒在 HepG2/C3A 细胞上形成的病灶分别是在 A549 和 PLC/PRF/5 细胞上形成的 80 倍和 90 倍, 并且在第 4 代病毒中, 病毒在 HepG2/C3A 细胞中产生的病灶数量比其中的 400 倍和 500 倍高。通过粪便和第 6 代病毒比较感染性病毒和病毒粒子 RNA 产生的 HepG2/C3A 细胞的生长曲线证实, 粪便病毒的连续传代产生了能够在 HepG2/C3A 细胞中更有效生长的病毒。在第 14 天, 粪便病毒释放了 89 FFU 和 1.3×10^6 基因组当量的 RNA/100 μ L 培养基, 以产生 1 FFU/15,083 基因组当量的特异感染性; 在第 14 天, 第 6 代病毒释放 3203 FFU 和 46.1×10^6 基因组当量 RNA/100 μ L, 以产生 1 FFU/14,399 基因组当量的特异感染性[25]。使粪便病毒适应在 A549 细胞或 PLC/PRF/5 细胞上生长的类似尝试是不成功的[20]。

6) KM01

猪基因 4 型戊型肝炎病毒株 KM01 是从中国云南省昆明市农村的一个村庄分离得到的, 那里的猪与人类生活在一起。序列和系统发育分析表明, 猪戊型肝炎病毒与新疆分离株(CHN-XJ-SW13)关系密切, 表明该株是人畜共患病的, 能够跨物种感染人类。KM01 菌株的基因组将为进一步研究我国 HEV 分子流行病学和遗传多样性奠定基础[26]。

将 KM01 株接种到 Huh 7.5.1、HepG2/C3A、A549、Vero、HEK293T 等细胞中, 发现均能成功复制, 并连续传代 4 次以上, 表明 KM01 株适合用于体外研究[27] [28] [29] [30]。

3. 展望

HEV 以前被认为是一种“旅行者病”, 在发展中国家引起了零星暴发。然而, 这种病毒现在被认为是工业化国家急性病毒性肝炎的主要病因, 在免疫缺陷患者中尤其成问题。由于这提高了对 HEV 公共卫生负担的认识, 一些研究小组已经建立了细胞模型系统来研究其生命周期和发病机制。然而, 关于 HEV 复制周期问题的许多病毒学问题仍未解决。未来的研究应该继续关注能够产生高病毒滴度的 HEV 颗粒的强大细胞培养模型。这应该是所有基因型 HEV 分离株的理想情况, 包括动物源菌株。此外, 应开发能够有效感染原发性 HEV 分离株的体外系统。这类系统不仅有助于确定 HEV 宿主靶标, 如特定的细胞受体, 而且还将通过简化药物筛选试验和启用候选药物的功能测试, 显著支持开发和评估新的抗 HEV 治疗方案。

4. 新颖性分析

本综述系统的概括了 HEV 目前研究较多的基因型和典型毒株的体外培养系统, 为未来开发更为强大的培养系统, 以及疫苗、抗 HEV 药物的研发奠定了基础。

致 谢

感谢昆明理工大学病毒与免疫课题组提供实验环境。

基金项目

国家自然科学基金项目(81660338, 81960370); 云南省科技厅项目(2017FA036, 2018FB132); 协和青年科研基金项目(3332019008)。

利益冲突

无。

参考文献

- [1] Wedemeyer, H., Pischke, S. and Manns, M.P. (2012) Pathogenesis and Treatment of Hepatitis E Virus Infection. *Gastroenterology*, **142**, 1388-1397e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.02.014>
- [2] Ding, Q., et al. (2017) Hepatitis E Virus ORF3 Is a Functional Ion Channel Required for Release of Infectious Particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **114**, 1147-1152. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614955114>
- [3] Khuroo, M.S. and Kamili, S. (2003) Aetiology, Clinical Course and Outcome of Sporadic Acute Viral Hepatitis in Pregnancy. *Journal of Viral Hepatitis*, **10**, 61-69. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2893.2003.00398.x>
- [4] Kumar, A., et al. (2004) Hepatitis E in Pregnancy. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, **85**, 240-244. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2003.11.018>
- [5] Smith, D.B., et al. (2016) Proposed Reference Sequences for Hepatitis E Virus Subtypes. *Journal of General Virology*, **97**, 537-542. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000393>
- [6] Chen, X., et al. (2012) Recombination and Natural Selection in Hepatitis E Virus Genotypes. *Journal of Medical Virology*, **84**, 1396-407. <https://doi.org/10.1002/jmv.23237>
- [7] Huang, F.F., et al. (2004) Determination and Analysis of the Complete Genomic Sequence of Avian Hepatitis E Virus (Avian HEV) and Attempts to Infect Rhesus Monkeys with Avian HEV. *Journal of General Virology*, **85**, 1609-1618. <https://doi.org/10.1099/vir.0.79841-0>
- [8] Huang, F., et al. (2009) Experimental Infection of Balb/c Nude Mice with Hepatitis E Virus. *BMC Infectious Diseases*, **9**, 93. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-93>
- [9] Smith, D.B., et al. (2014) Consensus Proposals for Classification of the Family Hepeviridae. *Journal of General Virology*, **95**, 2223-2232. <https://doi.org/10.1099/vir.0.068429-0>
- [10] Khuroo, M.S., Khuroo, M.S. and Khuroo, N.S. (2016) Hepatitis E: Discovery, Global Impact, Control and Cure. *World Journal of Gastroenterology*, **22**, 7030-7045. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i31.7030>
- [11] Goens, S.D. and Perdue, M.L. (2004) Hepatitis E Viruses in Humans and Animals. *Animal Health Research Reviews*, **5**, 145-156. <https://doi.org/10.1079/AHR200495>
- [12] Tomiyama, D., et al. (2009) Serological Evidence of Infection with Hepatitis E Virus among Wild Yezo-Deer, *Cervus nippon yesoensis*, in Hokkaido, Japan. *Journal of Viral Hepatitis*, **16**, 524-528. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2009.01107.x>
- [13] Lee, G.H., et al. (2016) Chronic Infection with Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology*, **150**, 355-357.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.10.048>
- [14] Tei, S., et al. (2003) Zoonotic Transmission of Hepatitis E Virus from Deer to Human Beings. *The Lancet*, **362**, 371-373. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14025-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14025-1)
- [15] Colson, P., et al. (2010) Pig Liver Sausage as a Source of Hepatitis E Virus Transmission to Humans. *The Journal of Infectious Diseases*, **202**, 825-834. <https://doi.org/10.1086/655898>
- [16] Takahashi, M., et al. (2011) Analysis of the Full-Length Genome of a Hepatitis E Virus Isolate Obtained from a Wild Boar in Japan That Is Classifiable into a Novel Genotype. *Journal of General Virology*, **92**, 902-908. <https://doi.org/10.1099/vir.0.029470-0>
- [17] Johne, R., et al. (2014) An ORF1-Rearranged Hepatitis E Virus Derived from a Chronically Infected Patient Efficiently Replicates in Cell Culture. *Journal of Viral Hepatitis*, **21**, 447-456. <https://doi.org/10.1111/jvh.12157>
- [18] Meng, J., Dubreuil, P. and Pillot, J. (1997) A New PCR-Based Seroneutralization Assay in Cell Culture for Diagnosis of Hepatitis E. *Journal of Clinical Microbiology*, **35**, 1373-1377. <https://doi.org/10.1128/JCM.35.6.1373-1377.1997>
- [19] Huang, R., et al. (1995) Hepatitis E Virus (87A Strain) Propagated in A549 Cells. *Journal of Medical Virology*, **47**, 299-302. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890470402>
- [20] Takahashi, H., et al. (2012) A549 and PLC/PRF/5 Cells Can Support the Efficient Propagation of Swine and Wild Boar Hepatitis E Virus (HEV) Strains: Demonstration of HEV Infectivity of Porcine Liver Sold as Food. *Archives of Virology*, **157**, 235-246. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1153-2>
- [21] Wei, S., et al. (2000) 93G, a Novel Sporadic Strain of Hepatitis E Virus in South China Isolated by Cell Culture. *Journal of Medical Virology*, **61**, 311-318. [https://doi.org/10.1002/1096-9071\(200007\)61:3<311::AID-JMV5>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1096-9071(200007)61:3<311::AID-JMV5>3.0.CO;2-H)
- [22] Huang, R., et al. (1999) Cell Culture of Sporadic Hepatitis E Virus in China. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **6**, 729-733. <https://doi.org/10.1128/CDLI.6.5.729-733.1999>
- [23] Tsarev, S.A., et al. (1992) Characterization of a Prototype Strain of Hepatitis E Virus. *Proceedings of the National*

-
- Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 559-563. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.2.559>
- [24] Shukla, P., *et al.* (2011) Cross-Species Infections of Cultured Cells by Hepatitis E Virus and Discovery of an Infectious Virus-Host Recombinant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 2438-2443. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018878108>
- [25] Shukla, P., *et al.* (2012) Adaptation of a Genotype 3 Hepatitis E Virus to Efficient Growth in Cell Culture Depends on an Inserted Human Gene Segment Acquired by Recombination. *Journal of Virology*, **86**, 5697-5707. <https://doi.org/10.1128/JVI.00146-12>
- [26] Yu, W., *et al.* (2014) Complete Genome Sequence of Swine Hepatitis E Virus Prevalent in Southwest China. *Genome Announcements*, **2**, e00090-14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00090-14>
- [27] Li, Y., *et al.* (2016) Construction of Recombinant Full-Length Hepatitis E Virus Fused with EGFP and Assessment of Infectivity. *Chinese Journal of Virology*, **32**, 529-537.
- [28] Huang, F., *et al.* (2016) Hepatitis E Virus Infection Activates Signal Regulator Protein α to Down-Regulate Type I Interferon. *Immunologic Research*, **64**, 115-122. <https://doi.org/10.1007/s12026-015-8729-y>
- [29] Bi, Y., *et al.* (2015) Pregnancy Serum Facilitates Hepatitis E Virus Replication *in Vitro*. *Journal of General Virology*, **96**, 1055-1061. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000054>
- [30] 曹文涛, 郝先辉, 赵勇琴, 司徒健文, 何秋霞, 纪汉斌, 杨伟敏, 黄芬. 天然免疫抗病毒因子 RIG-I 过表达对 HEV 复制的抑制作用[J]. 昆明理工大学学报(自然科学版), 2019, 44(3): 86-92.