



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107208060 B

(45) 授权公告日 2021.06.18

(21) 申请号 201580072851.X
 (22) 申请日 2015.01.07
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 107208060 A
 (43) 申请公布日 2017.09.26
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2017.07.07
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/CN2015/070243 2015.01.07
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02016/109947 EN 2016.07.14
 (73) 专利权人 威世药业(如皋)有限公司
 地址 江苏省如皋市普庆路139号
 (72) 发明人 林成龙
 (74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
 72001
 代理人 黄登高 罗文锋

(51) Int.Cl.
 C12N 5/0775 (2006.01)
 C12N 7/00 (2006.01)
 (56) 对比文件
 WO 2013/068557 A1, 2013.05.16
 Jung Eun Choi et al., .MicroRNA-27a
 Modulates HCV Infection in Differentiated
 Hepatocyte-Like Cells from Adipose
 Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells.
 《PLOS ONE》.2014,第9卷(第5期),e91958.
 Delany James P et al., .Proteomic
 analysis of primary cultures of human
 adipose-derived stem cells- Modulation by
 adipogenesis.《Proteomics》.2005,第4卷(第6
 期),731-740.

审查员 刘俊

权利要求书2页 说明书26页 附图22页

(54) 发明名称
 应用人脂肪衍生的干细胞增殖血清来源的
 丙肝病毒及其用途

(57) 摘要

已经提出在肝外部位的丙肝病毒复制;然而,完全病毒复制仅在肝细胞中得到证实。在此我们显示,新鲜分离自HCV-感染个体的人脂肪形成的DLK-1⁺干细胞(hADSC)在体内包含病毒转录物、复制中间体和病毒抗原,在长期离体培养时病毒转录物在上清液中增加。此外,分离自HCV(-)个体的幼稚hADSC支持临床分离株在体外的完全复制,并且感染对细胞是供体非特异性的和对病毒是跨越基因型的。病毒感染/复制通过CD81、LDL-R、SR-B1、EGFR、载脂蛋白E、闭合蛋白、紧蛋白-1、NPC1L1和二酰基甘油乙酰转移酶-1介导,并且可被抗病毒药物抑制。此外,与JFH1/HCVcc相比,hADSC增殖的病毒颗粒的物理性质更类似于临床分离株,通过体外感染的hADSC增殖

的病毒对原代人肝细胞具有感染性。因此,hADSC是体内HCV贮库,代表临床病毒-宿主相互作用的新位点。hADSC还可被开发作为生理学相关的原代细胞培养系统以增殖临床分离株。

CN 107208060 B

1. 用于增殖丙肝病毒HCV的基于人脂肪衍生的干细胞hADSC的系统,其包括hADSC、适于培养hADSC的培养基和HCV,其中hADSC是传代细胞,和其中在培养中hADSC生成HCV,并且所述系统支持HCV的完全复制,包括产生有感染性的HCV病毒,其中hADSC是第1-6代细胞。

2. 权利要求1的系统,其中HCV源自被HCV感染的个体的血液、血清、血浆或体液,或是临床HCV分离株。

3. 权利要求1-2中任一项的系统,其中HCV具有基因型1a、1b、2a、2b、2c、2d、3a、3b、3c、3d、3e、3f、4a、4b、4c、4d、4e、4f、4g、4h、4i、4j、5a和6a,或其任何组合。

4. 权利要求3的系统,其中HCV具有基因型1a、1b、2a、2b或混合的2a+2b。

5. 用于增殖丙肝病毒HCV的方法,包括在适于培养hADSC的培养基中在适于HCV复制的条件下使用hADSC增殖HCV,其中hADSC是传代细胞,并且所述方法支持HCV的完全复制,包括产生有感染性的HCV病毒,其中hADSC是第1-6代细胞。

6. 权利要求5的方法,其中HCV源自被HCV感染的个体的血液、血清、血浆或体液,或是临床HCV分离株。

7. 权利要求5-6中任一项的方法,其中HCV具有基因型1a、1b、2a、2b、2c、2d、3a、3b、3c、3d、3e、3f、4a、4b、4c、4d、4e、4f、4g、4h、4i、4j、5a和6a,或其任何组合。

8. 权利要求7的方法,其中HCV具有基因型1a、1b、2a、2b或混合的2a+2b。

9. hADSC在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于诊断HCV感染,或增殖HCV,或进行HCV生命周期分析,或筛选抗病毒化合物,或表征被HCV感染的受试者的所述HCV,其中hADSC是传代细胞且为第1-6代细胞,并且在培养中hADSC生成HCV,HCV被完全复制,包括产生有感染性的HCV病毒。

10. 筛选抗HCV化合物的方法,包括以下步骤:

a) 使hADSC在第一容器的培养基中与HCV在不存在候选化合物的情况下接触,其中hADSC是传代细胞且为第1-6代细胞,并且在培养中hADSC生成HCV,HCV被完全复制,包括产生有感染性的HCV病毒;

b) 确定在不存在候选化合物的情况下在第一容器的培养基中HCV的水平;

c) 使hADSC在第二容器的培养基中与HCV在存在候选化合物的情况下接触;

d) 确定在存在候选化合物的情况下在第二容器的培养基中HCV的水平;

e) 比较在存在候选化合物的情况下的HCV水平与在不存在候选化合物的情况下的HCV水平;和

f) 当在存在候选化合物的情况下的HCV水平低于在不存在候选化合物的情况下的HCV水平时将该候选化合物鉴定为抗HCV化合物。

11. 权利要求10的方法,其中所述候选化合物为选自以下的至少一种:蛋白、肽、肽模拟物、核酸和小分子化合物。

12. 权利要求10的方法,其中所述候选化合物为选自以下的至少一种:抗体、反义核酸、shRNA和核酶。

13. 权利要求10的方法,其中HCV为选自以下的HCV基因型的至少一种:基因型1a、1b、2a、2b、2c、2d、3a、3b、3c、3d、3e、3f、4a、4b、4c、4d、4e、4f、4g、4h、4i、4j、5a和6a,或其任何组合。

14. 权利要求13的方法,其中HCV为选自以下的HCV基因型的至少一种:基因型1a、1b、

2a、2b和混合的2a+2b。

应用人脂肪衍生的干细胞增殖血清来源的丙肝病毒及其用途

发明领域

[0001] 本发明涉及用于增殖丙肝病毒 (HCV) 的系统和方法以及其用途。

[0002] 发明背景

[0003] HCV为黄病毒科 (Flaviviridae) 的包膜正链RNA病毒。它含有9.6kb基因组,其始于非翻译区 (5' -UTR),接着是编码结构蛋白 (核心、E1和E2) 和包括p7、NS2、NS3、NS4和NS5在内的非结构 (NS) 蛋白的序列 (关于综述,参见参考文献^{1,2})。与乙肝病毒 (HBV) 的感染不一样,HCV感染为具有肝内表现和肝外表现两者的多层面疾病³,并且HCV可驻留在非肝细胞⁴⁻⁶,其可在病毒持续性和再活化中起一定作用。然而,研究HCV的肝外复制的体外系统严重有限。就原代细胞而言,仅在人和黑猩猩肝细胞中证明血清携带的HCV (HCVser) 的直接感染,人和黑猩猩肝细胞难以在培养物中维持,并且还具有在细胞特性上显著的供体间的变化。此外,大多数体外细胞培养方法利用分子克隆,而不是天然病毒 (关于综述,参见参考文献⁷)。这些模型还在非原代细胞中生长病毒,包括最近经报道支持临床HCV分离株的感染的HLZ01肝癌细胞系⁸。因此,这些数据可外推至实际临床病毒-宿主相互作用的程度仍是一个担忧。

[0004] 因此,仍需要增殖血清携带的丙肝病毒 (HCV) 的备选系统和方法。

[0005] 发明概述

[0006] 提供本概述以呈现本发明的概述,从而简要地指出本发明的性质和实质。在理解其不用于解释或限制权利要求的范围或含义的情况下提出该概述。

[0007] 在一方面,本公开内容提供用于增殖丙肝病毒 (HCV) 的基于人脂肪衍生的干细胞 (hADSC) 的系统,其包括hADSC、适于培养hADSC的培养基和HCV。在一些实施方案中,hADSC为原代细胞或传代细胞,优选第1-15代细胞,更优选第1-6代细胞。在一些实施方案中,hADSC对特异性标记物DLK-1 (即Pref-1) 呈阳性。在一些实施方案中,HCV来源于感染HCV的个体的血液、血清、血浆或体液,或为临床HCV分离株。在一些实施方案中,HCV具有选自以下的基因型:1a、1b、2a、2b、2c、2d、3a、3b、3c、3d、3e、3f、4a、4b、4c、4d、4e、4f、4g、4h、4i、4j、5a和6a以及其任何组合,优选基因型1a、1b、2a、2b或混合的2a+2b。在一些实施方案中,所述系统支持HCV的完全复制,包括感染病毒的产生。

[0008] 在另一方面,本公开内容提供用于增殖丙肝病毒 (HCV) 的方法,其包括在适于培养hADSC的培养基中在适于HCV复制的条件下使用hADSC增殖HCV。在一些实施方案中,hADSC为原代细胞或传代细胞,优选第1-15代细胞,更优选第1-6代细胞。在一些实施方案中,hADSC对特异性标记物DLK-1 (即Pref-1) 呈阳性。在一些实施方案中,HCV来源于感染HCV的个体的血液、血清、血浆或体液,或为临床HCV分离株。在一些实施方案中,HCV具有选自以下的基因型:1a、1b、2a、2b、2c、2d、3a、3b、3c、3d、3e、3f、4a、4b、4c、4d、4e、4f、4g、4h、4i、4j、5a和6a以及其任何组合,优选基因型1a、1b、2a、2b或混合的2a+2b。在一些实施方案中,所述方法支持HCV的完全复制。

[0009] 在另一方面,本公开内容提供hADSC用于增殖HCV或进行HCV生命周期分析或诊断HCV感染或筛选抗病毒化合物或表征感染HCV的受试者的这种HCV的用途。

[0010] 在另一方面,本公开内容提供hADSC在制备用于诊断HCV感染或增殖HCV或进行HCV

生命周期分析或筛选抗病毒化合物或表征感染HCV的受试者的这种HCV的试剂盒中的用途。

[0011] 在另一方面,本公开内容提供用于诊断受试者中的HCV感染的方法,其包括以下步骤:

[0012] a) 提供hADSC,

[0013] b) 在适于培养hADSC的培养基中使hADSC与获自受试者的生物样品一起孵育,

[0014] c) 培养所述hADSC达足以允许HCV复制的时间,和

[0015] d) 检测HCV复制的水平,

[0016] 其中检测到HCV复制表明所述受试者感染HCV。

[0017] 在一些实施方案中,所述生物样品来源于血液、血清、血浆或体液。

[0018] 在另一方面,本公开内容提供用于筛选抗HCV化合物的方法,其包括以下步骤:

[0019] a) 使hADSC在第一容器的培养基中与HCV在不存在候选化合物的情况下接触;

[0020] b) 确定在不存在候选化合物的情况下在第一容器的培养基中HCV的水平;

[0021] c) 使hADSC在第二容器的培养基中与HCV在存在候选化合物的情况下接触;

[0022] d) 确定在存在候选化合物的情况下在第二容器的培养基中HCV的水平;

[0023] e) 比较在存在候选化合物的情况下的HCV水平与在不存在候选化合物的情况下的HCV水平;和

[0024] f) 当在存在候选化合物的情况下的HCV水平低于在不存在候选化合物的情况下的HCV水平时将该候选化合物鉴定为抗HCV化合物。

[0025] 在一些实施方案中,HCV水平通过测量HCV滴度、HCV核酸水平或HCV多肽水平而确定。

[0026] 在一些实施方案中,候选化合物为选自以下的至少一种:化合物、蛋白、肽、肽模拟物、抗体、核酸、反义核酸、shRNA、核酶和小分子化合物。

[0027] 在一些实施方案中,HCV为选自以下的HCV基因型中的至少一种:1a、1b、2a、2b、2c、2d、3a、3b、3c、3d、3e、3f、4a、4b、4c、4d、4e、4f、4g、4h、4i、4j、5a和6a以及其任何组合,优选基因型1a、1b、2a、2b和混合的2a+2b。

[0028] 其它方面描述于下文。

[0029] 附图简述

[0030] 当结合通过举例而非限制的方式所包含的附图阅读时能更好地理解前述概述和下列详述。

[0031] 图1:HCV在体内靶定人脂肪衍生的DLK-1⁺干细胞。(A) 3名HCV(+)个体的脂肪组织(表1)收获自手术伤口并且将RNA提取出用于HCV特异性5'-UTR(223bp)的RT-PCR。也对收获自3名HCV(-)个体的脂肪组织进行平行研究用于比较,HCV(+)血清用作阳性对照。(B) 将HCV(+)个体的脂肪组织切碎、匀浆并离心成漂浮物、缓冲液和细胞沉淀的层。将细胞沉淀的红细胞进一步裂解以收获SVF。将RNA从各细胞群中提取出并进行5'-UTR的RT-PCR。在SVF细胞中而未在漂浮物中检测到病毒转录物(左图)。SVF细胞进一步免疫分离成DLK-1⁻和DLK-1⁺细胞,并将RNA单独提取出用于RT-PCR。病毒转录物存在于DLK-1⁺细胞中,而不存在于DLK-1⁻细胞(右图)。数据代表利用来自3名HCV(+)供体的细胞的3个实验。(C) 将分离自3名HCV感染个体的DLK-1⁻和DLK-1⁺细胞的RNA提取出用于HCV负链RNA的RT-PCR。分离自HCV(+)个体的原代人干细胞(PHH)用作阳性对照。(D) 将分离自HCV(-)和HCV(+)个体的DLK-1⁻(图b和e)和DLK-

1⁺细胞(图c和f)离心到细胞离心涂片器载玻片(cytospin slide)上用于病毒NS5的免疫细胞化学(c中的棕色标记)和苏木精染色(核中的蓝色标记)。用小鼠IgG1对照抗体染色未分级分离的SVF细胞(图a和d)用作阴性对照。数据代表来自3名HCV(+)和3名HCV(-)供体的样品。(E)将来自HCV(+)或HCV(-)个体的脂肪组织在同一切片上针对DLK-1(红色标记,在图b、c和h中的箭头)和针对病毒NS5(棕色标记,在图e和f中的箭头)和苏木精(蓝色标记,图d-f和i-j)进行序贯染色。在HCV(+)脂肪组织中DLK-1⁺细胞(红色标记,箭头,图b和c)共表达NS5Ag(棕色标记,箭头,图e和f)。在HCV(-)脂肪组织中DLK-1⁺细胞(图h,箭头)并不表达NS5(图j,箭头;h对比j)。用兔IgG(图a和g)或小鼠IgG1(图d和i)进行的染色用作阴性对照。图b,e和c,f来自不同的供体。数据代表3名HCV(+)和3名HCV(-)供体。(F)分离自4名HCV(+)个体脂肪组织的DLK-1⁺细胞离体培养49天,并每7天将上清液收集用于5'-UTR的qRT-PCR。数据表示为各时间点的一式三份的平均值±SD。

[0032] 图2:幼稚DLK-1⁺ hADSC在体外允许血清携带的HCV感染。(A)原代人肝细胞(PHH)分离自HCV(-)供体,并置于皿中达3天,然后用HCVser(泳道“+”,左图)或HCV(-)对照血清(泳道“-“,左边)脉冲。在3h脉冲后,将PHH培养额外5天,并将RNA提取出用于5'-UTR的RT-PCR(左图)。平行地将分离自HCV(-)供体的p-3或p-4DLK-1⁺ hADSC通过HCVser以0.2moi悬浮脉冲,每7天更换培养基。在所示时间点,将上清液和细胞分开收获并将RNA提取出用于5'-UTR的RT-PCR。数据代表10个实验。也将HCV(+)血清的RNA提取出用于RT-PCR作为对照。(B)收集d14和d28HCVser-1b感染的hADSC的上清液和细胞,并提取RNA用于HCV-特异性负链RNA的RT-PCR。数据代表4个实验。*:第0天培养上清液在用HCVser感染后的洗涤后1h收获。(C)将HCVser-1b或HCV(-)对照血清脉冲的d14 hADSC离心到细胞离心涂片器载玻片上用于在同一切片上的兔抗人DLK-1抗体(红色标记,图b和f),接着小鼠抗NS5抗体(图d和h;在d中的棕色标记)和苏木精(蓝色标记,c,d,g和h)的三重染色。HCVser感染的DLK-1⁺ hADSC包含NS5A(图b对比d),而HCV(-)对照血清脉冲的细胞表达DLK-1而无NS5(图f对比h)。兔IgG和小鼠IgG1的染色用作阴性对照(分别为图a和e以及c和g)。结果代表4个实验。(D)d14(图b和c)和d21(图e和f)HCVser-1b感染的hADSC的透射电子显微照片。暴露于HCV(-)对照血清的D14和D21细胞显示于图a和d。图b-f中的插图为黄色正方形或黄色箭头的放大图。图b、c、e和f的插图中的白色箭头指示病毒颗粒,图d的插图中的白色箭头指示未感染hADSC的洋葱形膜结构。数据代表来自HCVser-1b感染的2个实验和来自HCVser-2a感染的1个实验。(E)每7天收集的HCVser-1b感染的hADSC的细胞裂解物(左图)和上清液(右图)中的病毒5'-UTR的qRT-PCR。数据表示为3个实验的平均值±SD。(F)在连续培养1-4周的HCVser-1b感染hADSC的上清液中定量病毒5'-UTR拷贝数(通过qRT-PCR)。数据表示为4个实验的平均值±SD。

[0033] 图3:HCVser感染对细胞为非供体特异性的且对于病毒为跨越基因型的,并且通过除miR-122外的各种宿主因子介导。(A)将“供体1”的P-2hADSC用HCVser-1b感染,并将21天的上清液(标记为“HCVadsc(1)”)过滤通过0.22-μm孔滤器和用于感染“供体2”的p-3hADSC,其21天的上清液(标记为“HCVadsc(2)”)用于感染“供体3”的p-6hADSC。21天的上清液的病毒拷贝数通过qRT-PCR定量。数据表示为各批次的感染hADSC的一式三份的平均值±SD。(B)p2、p6、p9和p15的hADSC由HCVser-1b感染,并将21天的上清液(左)和细胞裂解物(右)中的病毒转录物通过qRT-PCR确定。数据表示为3个独立实验的平均值±SD。(C)p0、p2、p6、p9和p15hADSC的DLK-1表达的RT-PCR。所有批次的细胞来自同一供体。N:作为阴性对照的无反转

录酶。数据代表利用来自3个不同供体的细胞的实验。(D) p5的hADSC用混合的基因型2a+2b的HCVser感染并连续培养。在d21和d56天,将细胞收集用于RT-PCR以检测编码基因型特异性核心抗原的mRNA(对于基因型2a为174bp,左,和对于基因型2b为123bp,右)。N:HCV(-)对照血清脉冲的d21细胞,作为阴性对照。P:HCV(+)血清本身作为阳性对照(混合的基因型2a+2b)。M:标记物。数据代表利用来自两个HCVser基因型2a+2b感染供体的血清的实验。(E) p0、p2和p6hADSC的CD81、LDL-R、SR-B1和EGFR的表面表达的流式细胞术。黑线:同种型对照Ab。红线:抗CD81、-LDL-R、-SR-B1或-EGFR Ab。数据代表各代细胞的3个实验。(F) p0、p2和p6hADSC的闭合蛋白(OCLN)、紧蛋白-1(CLDN1)、NPC1L1和miR-122的表达的RT-PCR(左图)。数据代表来自3个供体的hADSC。N:作为阴性对照的无反转录酶。P:分离自HCV(-)个体的原代人肝细胞,作为阳性对照。与Huh7.5或HCV(-)原代人肝细胞(PHH,右图)相比较,也通过qRT-PCR在p0、p2、p6 hADSC中确定miR-122表达。数据表示为分别使用来自3个不同供体的hADSC和PHH的以平均值 \pm SD计的相对于p0 hADSC的表达水平。(G) 将p2 hADSC用所示浓度的封闭单克隆抗CD81(克隆JS-81)、抗LDL-R(克隆C7)、抗EGFR Ab(克隆LA1)或多克隆抗SR-B1 Ab预处理1h,然后用HCVser-1b脉冲。对于封闭Apo-E,将指示浓度的抗ApoE抗体(克隆E6D10)添加至HCVser,随后将其用于和hADSC进行3-小时孵育。定量确定21天的上清液的病毒5'-UTR转录物。同种型:用同种型对照抗体(100 μ g/ml)处理。数据表示为3个实验的抑制分数平均值 \pm SD(与用同种型Ab的处理相对比)。还通过锥虫蓝评估每次处理后的细胞成活力。(H) p2 hADSC用对OCLN、CLDN1、NPC1L1或DGAT-1有特异性的siRNA转染。将用乱序RNA转染用作对照。转染后48小时,洗涤细胞和通过HCVser-1b感染,并定量确定21天的上清液中的病毒5'-UTR拷贝。在同一个实验中进行OCLN和CLDN1的敲减,而在分开的实验中进行NPC1L1或DGAT-1的敲减。每次转染后通过锥虫蓝排除测定法测定细胞成活力,与通过乱序siRNA的转染相比,其未明显改变。数据表示为3个独立实验的平均值 \pm SD。(I) 通过HCVser-1b感染附着的p4-p5 hADSC,和连续21天在培养中添加分级剂量的利巴韦林、特拉匹韦和环孢菌素A。还将hADSC与分级浓度的IFN α 一起孵育16h,然后暴露于HCVser-1b。每次处理后通过锥虫蓝评估细胞成活力。数据表示为3个独立实验的平均值 \pm SD。

[0034] 图4:HCVadsc在物理性质上不同于JFH1/HCVcc和对原代人肝细胞具有感染性。(A) HCVadsc(基因型2a)自21天的HCVser-2a感染的hADSC上清液收获,和通过在10-40%碘克沙醇中平衡离心进行密度梯度测定法。还平行进行HCVser(基因型2a)和JFH1/HCVcc的密度梯度测定法用于对比。数据代表5个实验。(B) 当以重量(ng)/病毒拷贝表示时,HCVcc级分13具有最低量的HDL和LDL/VLDL。数据代表3个供体的HCVser和它们的相应HCVadsc。(C) ApoE和B的测量证明,HCVser的主要级分具有最高的ApoE含量,接着是HCVadsc,而HCVcc级分13几乎没有可检测的ApoE(左图)。相比之下,ApoB仅在HCVser级分2中被检出(右图)。数据是使用HCVser(基因型2a)和其相应HCVadsc的一个实验(即,HCVadsc通过HCVser-感染的hADSC产生),和代表3个HCVser供体。(D) 将在6-cm培养皿中的P2 hADSC暴露于HCVser(基因型2a)或HCVcc。将感染的hADSC连续培养14或21天(无培养基更换),和在培养结束时通过qRT-PCR定量确定在上清液(左图)和细胞裂解物(右图)中的5'-UTR拷贝数。结果显示,在hADSC中HCVcc未有效地感染/复制。数据表示为3个实验的平均值 \pm SD。(E) 在HCVcc-感染的或未感染的Huh7.5培养物的上清液中以及在HCVcc-或HCVser-感染的hADSC的21天的上清液中病毒5'-UTR的RT-PCR。数据代表3个实验。(F) 将自HCV(-)患者分离的PHH放置3天以允许附着,

然后暴露于自被HCVser-1b或HCVser-2b感染的hADSC收集的21天的上清液中3h,或被对照血清脉冲。感染后5天,提取细胞RNA用于5'-UTR的RT-PCR。HCVser-1b本身用作阳性对照。数据代表3个实验。(G)将自3个HCV(-)供体(供体1、2和3)分离的 1×10^4 /孔的PHH置于6-孔板中3天以允许细胞附着,在第4天通过HCVser-1b的3个不同批次(自3个单独的供体收集)之一分别感染PHH。使用HCVser-1b以产生相应的HCVadsc,其也用于平行感染PHH。HCVser和其相应HCVadsc成对感染同一批次的PHH。感染后5天,收集PHH上清液和定量确定5'-UTR拷贝。将PHH暴露于HCV(-)对照血清(亦来自3个不同的供体)用作阴性对照。数据表示为每次感染的一式三份的平均值 \pm SD。

[0035] 图5:通过离心分离人脂肪组织的匀浆物成不同层。按所述⁹,HCV(+)个体的脂肪组织经离心并分成以下的层:漂浮物、缓冲液和细胞沉淀(左图)。漂浮群体含有成熟的脂肪细胞。收集细胞沉淀,和用RBC裂解缓冲液处理以裂解红细胞,收获基质血管级分(SVF)细胞,和将SVF细胞进行DLK-1⁺人脂肪形成的干细胞(hADSC)的免疫选择,所述干细胞可被认为是原代(第0代)hADSC。

[0036] 图6:所选级分的纯度和针对DLK-1的RT-PCR。(A)通过使用MoFlo XDP流式细胞仪(Becton Coulter,CA,USA)测定在DLK-1⁺(左)和DLK-1⁻(右)级分中DLK-1⁺细胞的百分比,和用Submit软件进行分析。使用DLK-1⁺和DLK-1⁻级分的99.5%自体荧光的消除设置门控,以测定在各级分中阳性染色的细胞。使用与同种型对照抗体(兔IgG)一起孵育的未分级分离的SVF细胞,获得类似的结果。数据代表6个实验。(B)自未分级分离的SVF细胞提取RNA,选择DLK-1⁻和DLK-1⁺细胞¹⁰和进行针对DLK-1的RT-PCR(引物按所述¹¹)。相比于在DLK-1⁺细胞中的丰富表达,DLK-1⁻细胞几乎不表达DLK-1 mRNA。数据代表4个实验。

[0037] 图7:HCV-感染的原代人肝细胞(PHH)表达NS5抗原。自HCV(-)或HCV(+)供体(分别为图a和b以及c和d)收获PHH并接种到胶原-I包被的孔中用于培养。作为对照实验,我们检测了NS5染色对新鲜分离自HCV(+)或HCV(-)供体和和无精氨酸Williams E培养基(Invitrogen,CA,USA)中培养的原代人肝细胞(PHH;接种数 1×10^4 细胞/孔)的特异性。在第9天,洗涤细胞和使用与所述用于在细胞离心涂片器载玻片上染色细胞的类似方法(参见“方法”),在孔中进行免疫细胞化学。数据代表使用来自3个HCV(+)和3个HCV(-)供体的PHH的3个实验。

[0038] 注意:在过去在感染的肝组织中难以检出HCV抗原。然而,染色分离的细胞未显示与对肝组织染色一样那么非特异性,只要适当控制显色时间(参见“方法”)。

[0039] 图8:在HCV-感染的个体的脂肪组织中DLK-1⁺细胞共表达HCV NS5抗原。自HCV-感染的个体收获脂肪组织(表1),和按方法中所述,用抗DLK-1Ab(红色标记,白色箭头,图a和b),接着用抗NS5 Ab(棕色标记,白色箭头,图c和d)和苏木精(在图c和d中蓝色标记)对同一切片进行免疫染色。在检查的HCV(+)脂肪组织的所有切片中,在高倍视场(400X)中能检出约0-4个DLK-1⁺NS5⁺细胞。图a和c来自供体2和图b和d来自供体3。用同种型对照抗体染色的图片类似于在图1E中显示的那些。

[0040] 图9:感染悬浮hADSC的方案。自HCV(-)个体制备hADSC,和按所述^{12,13}进行传代培养。以0.2moi将第2-6代hADSC暴露于HCVser(表2)(1×10^5 HCV 5'-UTR拷贝数对比 5×10^5 hADSC细胞),通过用新鲜培养基稀释HCV(+)血清进行调整。在3h后,用PBS洗涤细胞5次,之后在6-ml新鲜培养基中培养。在第7、14、21和28天收获上清液和细胞裂解物,提取RNA用于

5' -UTR的RT-PCR。

[0041] 图10:用HCVser感染附着在塑料上的hADSC。将hADSC置于6-cm培养皿中1天以允许细胞附着。之后以2ml培养基的终体积添加HCVser以0.5moi孵育细胞3h (1×10^5 5' -UTR拷贝对比 2×10^5 hADSC细胞)。在温和洗涤后,在有或没有每7天更换培养基的情况下(分别为途径a或b),将HCVser-感染的hADSC在5ml新鲜培养基中进行培养。

[0042] 图11:p2和p6hADSC的病毒复制效率优于p9和p15细胞的病毒复制效率。将不同代的hADSC悬浮暴露于HCVser-1a或-2a。感染后,21天的上清液和细胞裂解物(连续培养)的病毒5' -UTR转录物通过qRT-PCR测定。结果显示,与p2和p6细胞相对比,在细胞裂解物和上清液中p9和p15的细胞具有明显更少的病毒拷贝。数据表示为3个实验的平均值 \pm SD。

[0043] 图12:CD81、LDLR、SR-B1和EGFR的阻断以及ApoE的中和减少在21天的HCVser-感染的hADSC培养物的细胞裂解物中的病毒拷贝。P-2hADSC用分级剂量的针对CD81(克隆JS-81)、LDL-R(克隆C7)、EGFR(克隆LA1)的单克隆Ab或针对SR-B1的多克隆Ab预处理1h,然后在用HCVser-1b脉冲之前洗涤。对于ApoE阻断,按所述¹⁴在室温下将各种浓度的抗ApoE抗体(克隆E6D10)添加至HCV(+)血清1h,然后用于与hADSC一起孵育3h。与上清液中的测量(图3G)一致,在HCV(+)血清中hADSC的CD81、LDL-R、SR-B1、EGFR的阻断和ApoE的中和以剂量依赖方式显著降低在细胞裂解物中的病毒转录物的量。同时,抗体本身的处理未显著影响hADSC成活力。数据表示为每次处理的一式三份的平均值 \pm SD。

[0044] 图13:siRNA转染后的RT-PCR和在敲减闭合蛋白(OCLN)、紧蛋白-1(CLDN1)、NPC1L1或DGAT-1后在21天的细胞裂解物中的病毒拷贝数。(A)按所述^{15,16}进行闭合蛋白、紧蛋白-1或NPC1L1的敲减,和按所述^{16,17}进行RT-PCR。在同一实验中进行OCLN和CLDN1的敲减,而在分开的实验中进行NPC1L1的敲减。数据代表3个实验。(B)DGAT1的siRNA探针是来自Ambion的预设计的siRNA(目录号11782和11784)。按所述¹⁸进行乱序RNA和对DGAT1有特异性的siRNA的转染、qRT-PCR和蛋白质印迹分析。数据表示为4个实验的平均值 \pm SD,并表示为标准化至18S rRNA的相对比率。(C)在敲减之后,将hADSC暴露于HCVser-1b,和通过qRT-PCR测定21天的细胞裂解物的5' -UTR拷贝数。与用乱序siRNA的转染相比,siRNA转染本身未明显影响细胞成活力,其在转染后48h通过锥虫蓝排除试验测定。显然,在上清液中DGAT1敲减具有比在细胞中更突出的抑制作用(图C对比图3H)。这与以下发现一致:DGAT1敲减损害细胞内复制和释放两者,但病毒释放似乎更显著受到影响¹⁹。数据表示为4个实验的平均值 \pm SD,表示为与乱序对照感染的相对比率。

[0045] 图14:hADSC中亲环蛋白A表达的RT-PCR。按所述²⁰在p0-p6 hADSC中进行亲环蛋白A(Cyp A)的RT-PCR。幼稚Huh7.5细胞用作阳性对照。数据代表4个实验。

[0046] 图15:HCVser、JFH1/HCVcc和HCVadsc的主要级分(通过密度梯度)的总脂质含量。通过HDL和LDL/VLDL胆固醇测定试剂盒(Abcam)检测HDL和LDL/VLDL的水平。按照制造商的说明书,通过Quantikine® ELISA人ApoB免疫测定试剂盒和Quantikine® ELISA人ApoE免疫测定试剂盒(R&D)测量ApoB和ApoE的量。还将不同级分的HDL和LDL/VLDL、ApoB和ApoE的量标准化至重量/拷贝。(A)HCVser(特别是级分2)具有比HCVcc或HCVadsc更高的HDL和LDL/VLDL“总”量。(B)和(C)另外2个批次的HCVser和HCVadsc的分析表明相同模式的脂质和ApoE/B含量。

[0047] 图16:JFH1/HCVcc有效感染Huh7.5。将 4×10^5 Huh7.5细胞/孔置于6-孔板中过夜。1

天后,将细胞洗涤并与HCVcc病毒接种物(0.5moi)一起孵育3h。洗涤后,将细胞在补充有10%胎牛血清(FBS)和1%非必需氨基酸的DMEM中培养。在感染后第3天,收获上清液和提取RNA用于5'-UTR转录物的qRT-PCR。将未暴露于病毒接种物的幼稚Huh7.5细胞用作阴性对照。数据表示为3个实验的平均值±SD。本实验验证用于感染hADSC的HCVcc接种物的感染性(图4D)。

[0048] 本发明实施方案的详细描述

[0049] 参照用于说明的示例性应用,下文描述了本发明的几个方面。应理解,陈述了许多具体的细节、关系和方法以提供对本发明的充分理解。然而,相关领域的普通技术人员将容易地认识到,本发明可在没有或多个特定细节的情况下或与其它方法一起实施。本发明不受行为或事件的顺序限制,因为一些行为可以不同的顺序发生和/或其它行为或事件同时发生。此外,并非需要所有列举的行为或事件以实现本发明的方法。

[0050] 定义

[0051] 除非另有定义,否则本文所用的科学和技术术语以及命名法具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。一般而言,细胞培养、感染、分子生物学方法等的程序是本领域使用的常见方法。这样的标准技术可见于参考手册例如Sambrook等(1989, *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories)和Ausubel等(1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, New York)。

[0052] 如本文所用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”意欲也包括复数形式,除非上下文清楚另外指明。此外,在术语“包括”、“包含”、“具有”、“有”、“含有”或其变体用于详细描述和/或权利要求的情况下,这样的术语意欲以类似于术语“包含(comprising)”的方式包括在内。

[0053] 如本文所用的术语“约”当涉及可测量的值例如量、短暂持续时间等时,意指包括与指定值的±20%或±10%的变化,更优选±5%,甚至更优选±1%和还更优选±0.1%的变化,因为这样的变化适合进行所公开的方法。

[0054] 如本文所用的术语“脂肪组织”定义具有初级代谢重要性的弥散器官,其由白色脂肪、黄色脂肪或褐色脂肪构成。脂肪组织具有脂肪细胞和基质。脂肪组织存在于整个动物身体。例如,在哺乳动物中,脂肪组织存在于网膜、骨髓、皮下空间和包围大部分器官。

[0055] 如本文所用的术语“干细胞”定义成体未分化细胞,其可产生自身和进一步分化的后代细胞。

[0056] 术语“人脂肪衍生的干细胞”、“hADSC”、“人脂肪衍生的DLK-1⁺干细胞”和“人脂肪形成的DLK-1⁺细胞”可互换使用,如本文所用,是人成体干细胞,其是或具有获自含脂肪组织的组织来源的亲本细胞。这些细胞表达特定的标记物DLK-1(即Pref-1)——表皮生长因子样家族的一个成员²¹,对于脂肪形成是关键的,并且所述表达在成熟脂肪细胞中被完全废除²²⁻²⁴。

[0057] 如本文所用的术语“原代细胞”是指直接源自个体的细胞或组织的细胞。如本文所用的“传代细胞”是指从原代细胞再次培养的细胞。如本文所用的“传代数”是指细胞从原代细胞再次培养的次数。例如第1代细胞(P1细胞)是指通过直接再次培养原代细胞获得的细胞,和第2代细胞(P2细胞)是指通过直接再次培养第1代细胞获得的细胞,等等。

[0058] 如本文所用的术语“培养”、“培育”、“生长”、“增殖”和“繁殖”可互换使用,是指细

胞在配制的培养基中体外生长。如本文所用的术语“培养系统”、“培育系统”、“增殖系统”和“繁殖系统”可互换使用,是指包括生成病毒颗粒的细胞的细胞培养物。具体而言,本发明的培养系统包括培养中生成HCV的hADSC。所述系统支持HCV的完全复制(例如附着、进入细胞、复制、成熟等),包括产生有感染性的病毒,特别是病毒进入、包括(-)和(+)链合成的复制、病毒蛋白合成、病毒装配、病毒运输或病毒释放。

[0059] 如本文所用的术语“样品”或“生物样品”意指自受试者分离的或自体外培养物分离的生物材料。生物样品可包含适于检测受试者或体外细胞培养物中的核酸、多肽或生物、生理或病理过程的其它标记物的任何生物材料,可包括获自受试者或体外细胞培养物的培养基、体液、组织和细胞和/或非细胞材料。

[0060] 如本文所用的术语“诊断”是指确定疾病或病症的存在。在本发明的一些实施方案中,提供用于作出诊断的方法,其允许确定特定的疾病或病症的存在。

[0061] 如本文所用的术语“患者”、“受试者”、“个体”等可互换使用,是指可适于本文所述方法的任何动物。在某些非限制性实施方案中,所述患者、受试者或个体是人。

[0062] 描述

[0063] 本发明涉及hADSC容许被HCV感染这一发现。

[0064] hADSC

[0065] 人脂肪衍生的干细胞是中胚层来源的多能成体干细胞和可容易大量获得⁹。这些细胞表达特定的标志物DLK-1(即Pref-1)——表皮生长因子样家族的一个成员²¹,对于脂肪形成是关键的,并且所述表达在成熟脂肪细胞中被完全废除²²⁻²⁴。越来越多的证据表明,人脂肪形成的DLK-1⁺细胞(hADSC)可分化成多种细胞谱系(关于综述,参见参考文献^{25,26}),这使hADSC成为用于设计再生疗法的有前景的工具。还已报道,各种解剖腔室中的间充质干细胞对病毒感染敏感²⁷⁻³²。然而,尚未探究hADSC在病毒疾病中的作用。

[0066] 一般而言,hADSC可获自任何可得的来源。在一个实施方案中,hADSC自合适的组织来源分离。hADSC的合适的组织来源包括但不限于任何包含脂肪的组织,例如褐色或白色脂肪组织,例如皮下白色脂肪组织。通常,人脂肪组织使用手术切除或吸脂术从活的供体获得。在一些实施方案中,脂肪组织从受试者的预选择区域获得,即腹部、臀部、腹股沟和腹膜,或其任何组合。

[0067] 在一个实施方案中,hADSC自腹部或臀部皮下脂肪组织分离。在一个实施方案中,hADSC是原代细胞,即直接源自个体的脂肪组织的细胞。在另一个实施方案中,hADSC是经传代的细胞,例如第1-15代细胞,优选第1-6代细胞。

[0068] 分离、隔离和扩繁ADSC例如hADSC的方法是本领域已知的,和描述于例如美国专利号6,391,297B1;6,777,231B1;美国专利号5,786,207;美国专利申请公开号2005/0076396A1;Burris等(1999)Mol Endocrinol 13:410-7;Erickson等(2002)Biochem Biophys Res Commun. Jan.18,2002 290(2):763-9;Gronthos等(2001)Journal of Cellular Physiology,189:54-63;Halvorsen等(2001)Metabolism 50:407-413;Halvorsen等(2001)Tissue Eng.7(6):729-41;Harp等(2001)Biochem Biophys Res Commun 281:907-912;Saladin等(1999)Cell Growth&Diff 10:43-48;Sen等(2001)Journal of Cellular Biochemistry81:312-319;Zhou等(1999)Biotechnol. Techniques 13:513-517;Erickson等(2002)Biochem Biophys Res Commun.1月18日,2002;290(2):

763-9; Gronthos等(2001) *Journal of Cellular Physiology*, 189:54-63; Halvorsen等(2001) *Metabolism* 50:407-413; Halvorsen等(2001) *Tissue Eng.* 12月7日, 2001 (6):729-41; Harp等(2001) *Biochem Biophys Res Commun* 281:907-912; Saladin等(1999) *Cell Growth&Diff* 10:43-48; Sen等(2001) *Journal of Cellular Biochemistry* 81:312-319; Zhou等(1999) *Biotechnol. Techniques* 13:513-517; ZuIc等(2001) *Tissue Eng.* 7:211-228; Hauner等(1987) *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 64:832-835; Katz等(1999) *Clin. Plast. Surg.* 26:587-603。

[0069] 仅用于说明的目的, 几种基于形态学的、生物化学的或分子的方法可用于分离所述细胞。在一方面, 基于细胞大小和粒度分离hADSC, 因为hADSC小并且为颗粒。或者, 因为干细胞趋于具有比分化的细胞更长的端粒, 因此hADSC可通过测定端粒的长度或通过测定端粒末端转移酶活性分离。

[0070] 或者, hADSC可在免疫组织化学上通过选择hADSC-特异性细胞标记物与其它细胞分离。hADSC表达间充质干细胞标记物CD10、CD13、CD29、CD34、CD44、CD54、CD71、CD90、CD105、CD106、CD117和STRO-1。对于造血谱系标记物CD45、CD14、CD16、CD56、CD61、CD62E、CD104和CD106以及对于内皮细胞(EC)标记物CD31、CD144和von Willebrand因子而言, 它们是阴性的(Zuk等, *Mol Biol Cell* 13(12):4279-4295, 2002; Musina等, *Bull Exp Biol Med* 139(4):504-509, 2005; Romanov等, *Bull Exp Biol Med* 140(1):138-143, 2005)。在形态学上, 它们是成纤维细胞样的, 并且在体外扩繁后保持它们的形状(Zuk等, *Mol Biol Cell* 13(12):4279-4295, 2002; Arrigoni等, *Cell Tissue Res* 338(3):401-411, 2009; Zannettino等, *J Cell Physiol* 214(2):413-421, 2008)。在多个方面, hADSC通过DLK-1⁺的免疫选择分离。

[0071] 在另一个实施方案中, hADSC自市售可得的来源或已建立的hADSC系获得。这样的hADSC的非限制性实例例如PoieticsTM人脂肪衍生的干细胞(目录号PT-5006, Lonza Group Ltd.)和ATCC[®] PCS-500-011TM。

[0072] 细胞培养

[0073] 一般而言, hADSC可在本领域可得和众所周知的培养基中维持和扩繁。这样的培养基包括但不限于角质形成细胞-SFM(K-培养基)、Dulbecco's Modified Eagle's Medium[®] (DMEM)、DMEM F12 medium[®]、Eagle's Minimum Essential Medium[®]、F-12K medium[®]、Iscove's Modified Dulbecco's Medium[®]、RPMI-1640 medium[®]、间充质干细胞基础培养基(ATCC[®] PCS-500-030TM)和间充质干细胞生长试剂盒-低血清(ATCC[®] PCS-500-040TM)。

[0074] 本发明还考虑用哺乳动物血清补充细胞培养基, 优选胎牛血清。在本发明的一些实施方案中, 这样的哺乳动物血清浓度范围为0vol%-20vol%, 优选5vol%-15vol%, 更优选10vol%。血清的实例包括胎牛血清(FBS)、牛血清(BS)、小牛血清(CS)、胎牛血清(FCS)、新生牛血清(NCS)、山羊血清(GS)、马血清(HS)、人血清、小鸡血清、猪血清、绵羊血清、兔血清、血清代替品和牛胚胎液。

[0075] 其它补充物例如生长因子、激素、氨基酸、脂质、矿物质等也可有利地使用以供给

细胞最佳生长和扩繁所必需的痕量元素。这样的补充物是市售可得的。确定这些补充物的合适浓度完全在本领域技术人员的技能范围内。

[0076] HCV

[0077] 本发明的HCV可以是可感染hADSC的任何HCV或可自HCV感染的个体分离的任何HCV。在一个实施方案中,HCV是选自以下的HCV基因型的至少一种:基因型1a、1b、2a、2b、2c、2d、3a、3b、3c、3d、3e、3f、4a、4b、4c、4d、4e、4f、4g、4h、4i、4j、5a和6a,或其任何组合。在另一个实施方案中,HCV是选自以下的HCV基因型的至少一种:基因型1a、1b、2a、2b和混合的2a+2b。

[0078] 在一方面,本发明包括用于增殖HCV的基于hADSC的系统,其包括hADSC。在另一方面,本发明包括以下方法:将hADSC或本发明的HCV培养系统用于增殖HCV、或进行HCV生命周期分析、或诊断HCV感染、或筛选抗病毒化合物、或表征被HCV感染的受试者的HCV。

[0079] HCV的水平可通过本领域任何已知的技术来确定。这样的技术可包括抗HCV ELISA测定法(酶联免疫吸附测定法),其检测HCV蛋白。可使用通过扩增所测定的RNA来检测HCV复制(例如聚合酶链反应或PCR,分支DNA测定法)。HCV的RNA的合成实际上可通过在单一步骤中使用经设计用于实时PCR的装置的RT-PCR或通过滤器上使用HCV-特异性放射性探针的RNA杂交来分析。例如,可将分离的RNA进行使用能够扩增HCV基因组的特异性寡核苷酸引物的偶联的逆转录和扩增,例如逆转录和通过聚合酶链反应(RT-PCR)的扩增。然后,可进行直接测序以确定已经感染所述受试者的HCV的基因型。

[0080] 在各种实施方案中,HCV的水平通过测量HCV滴度、HCV核酸的水平或HCV多肽的水平来确定。

[0081] 在各种实施方案中,在候选化合物存在时观察到的HCV水平相对于在候选化合物不存在时观察到的HCV水平降低,表示候选化合物的抑制活性。

[0082] 根据本发明,候选化合物包括而限于化合物、蛋白、肽、肽模拟物、抗体、核酸、反义核酸、shRNA、核酶和小分子化合物。

[0083] 如本文所公开,使用筛选方法鉴定的抗HCV化合物可进一步在敏感性动物模型中进行测试。

[0084] 试剂盒

[0085] 在一个相关方面,本发明还提供用于增殖HCV,或进行HCV生命周期分析,或诊断HCV感染,或筛选抗病毒化合物,或表征被HCV感染的受试者的HCV的试剂盒,其包括本文所述的hADSC和适于培养hADSC的培养基。

[0086] 本发明进一步通过以下实施例进行说明。这些实施例仅意欲说明本发明,而不是限制本发明的范围。对于以下实施例中的实验方法,它们在常规条件例如由Sambrook等在Molecule Clone:A Laboratory Manual,New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989中描述的那些下或按制造商所指示那样进行,除非另有说明。

实施例

[0087] 材料和方法

[0088] 临床样品

[0089] 所有临床脂肪组织和肝样品在机构研究委员会的批准下获自Kaohsiung Medical

University Hospital (KMUH-IRB-960477、KMUH-IRB-960343和KMUH-IRB-20120404)。在该程序之前,书面的知情同意书获自所有供体。

[0090] 新鲜脂肪组织的分级分离和DLK-1⁺细胞的培养

[0091] HCV(+)脂肪组织获自用于切除肝细胞癌的外科创伤(剖腹术)。对于HCV(-)脂肪组织,如之前所述¹³,样品获自已在乳腺癌的乳房切除之后立即接受乳房再造术的女性的横向腹直肌肌皮瓣。HCV(-)脂肪组织还获自正接受吸脂术的肥胖人(表1)。无一患者已经接受辅助化学疗法或放射疗法以在手术前治疗乳腺癌。

[0092] 样品收获后,组织用无菌生理盐水洗涤和将样本置于无菌袋中并立即送出用于制备。如所述^{12,13,33},将新鲜脂肪组织固定用于免疫组织化学或通过离心(800g,10min)用于分级分离成在顶部的漂浮层(漂浮物)(其含有成熟的脂肪细胞和结缔组织)、在中间的缓冲液层和在底部的沉降的细胞沉淀。简言之,用剪刀将脂肪组织充分切碎成小块,和用不含钙和镁的PBS洗涤,随后通过在37°C在PBS中持续搅拌30min用0.075%胶原酶(37.5mg/mL;Sigma-Aldrich)消化。

[0093] 如所述^{12,34}收集在底层的细胞沉淀(即SVF细胞)和用RBC裂解溶液处理(以裂解红细胞),和随后通过100- μ m Steriflip(Millipore)滤器过滤。在用锥虫蓝染色后,SVF细胞的数量和成活力使用Countess Cell计数器(Invitrogen)确定。然后如所述¹⁰通过免疫磁珠,将SVF细胞进行针对DLK-1⁺细胞的阳性选择,提取细胞RNA用于RT-PCR或qRT-PCR。还将DLK-1⁺细胞进行免疫细胞化学(针对病毒NS5抗原)。

[0094] 对于所有样品,从脂肪取样至细胞分离的间隔时间是3h或更少。对于培养DLK-1⁺细胞,按所述¹³将 1×10^5 个细胞置于6-cm培养皿中49天,每7天收获上清液(与培养基更换同步)用于RNA提取。

[0095] DLK-1⁺细胞的免疫选择

[0096] 将自HCV-感染的或未感染的个体制备的RBC-裂解的未分级分离SVF细胞与多克隆兔抗DLK1抗体(Abcam,USA)在4°C一起孵育30分钟。按所述¹⁰,将细胞在含有0.8mmol/L MgCl₂、20mmol/L HEPES、100U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的HBSS中洗涤两次,和与磁性微珠结合的山羊抗兔IgG(Miltenyi Biotec Inc,Auburn,CA)在4°C一起孵育30分钟。将细胞悬浮液洗涤,并通过在MidiMACS Separator(Miltenyi Biotec)中的柱,结果DLK-1⁺细胞保留在柱中,而DLK-1⁻细胞通过柱。将两种细胞级分在HBSS中洗涤两次。DLK-1⁺和DLK-1⁻级分的细胞成活力分别为>96%和>97%。提取RNA用于RT-PCR或qRT-PCR。在单独实验中,将细胞固定至细胞离心涂片器载玻片上用于免疫细胞化学($5-7 \times 10^3$ 个细胞/载片)。在体外感染的实验中,在暴露于HCV(+)血清(HCVser)之后,培养并传代(再次培养,按所述¹³)DLK-1⁺细胞指定的时间周期。然后提取RNA用于病毒5'-UTR转录物的RT-PCR或qRT-PCR。

[0097] 用HCVser的hADSC感染

[0098] 在本研究中采用两种方案:

[0099] (1)方案1,悬浮感染-我们使用第2代(p-2)至第6代的幼稚hADSC用于HCVser感染。以0.2的感染复数(MOI),在Eppendorf管中,添加总计200 μ l的HCV血清(含 1×10^5 5'-UTR拷贝)至悬浮在800 μ l新鲜培养基中的 5×10^5 个hADSC,随后在37°C孵育3小时。用PBS洗涤细胞3次和进一步培养7、14、21和28天,收获上清液和细胞裂解物中的RNA用于5'-UTR的RT-PCR。还收集细胞用于免疫细胞化学和透射电子显微术(TEM)研究。

[0100] (2) 方案2,附着形式的感染-将P-2至p-6幼稚hADSC接板于6-cm培养皿中1天以允许细胞附着,在0.5moi (1×10^5 5' -UTR拷贝对比 2×10^5 hADSC细胞),以终体积2-ml培养基添加HCVset达3h。在温和洗涤后,在有或没有每7天更换培养基的情况下,将细胞在5ml新鲜培养基中培养。

[0101] 5' -UTR的RT-PCR和定量RT-PCR

[0102] 用QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Basle, Switzerland), 从140µl HCV (+) 血清或HCVser-感染的hADSC培养物的上清液提取RNA。按照制造商的说明书,使用PureLink® RNA Mini Kit (Ambion, Carlsbad, CA, USA) 分离来自细胞裂解物的RNA。然后用高容量cDNA逆转录试剂盒将RNA转换成单链cDNA,接着用GoTaq Master Mix (Promega, WI, USA) 进行PCR。对于定量病毒拷贝,使用Applied Biosystems® ViiA™ 7 Real-Time PCR System,用丙肝病毒高级试剂盒 (PrimerDesign Ltd., UK) 进行PCR。HCV-特异性逆转录和扩增引物按照ABI primer3.0 Express Soft Word进行设计。引物5' -ACTCGCAAGCACCTATCAG-3'用于逆转录,用于PCR和实时PCR的引物与不同HCV基因型的高度保守的5' -非翻译区(UTR)匹配,如所述³⁵。

[0103] 人脂肪组织的免疫组织化学(IHC)

[0104] 从外科创伤收获新鲜脂肪组织,在福尔马林中固定和在石蜡中包埋。将组织切成5µm切片和脱石蜡,然后浸入柠檬酸盐缓冲液(10mM柠檬酸pH 6.0)中和通过微波加热用于抗原恢复。在用5%BSA在室温下封闭30min后,在4°C施用多克隆兔抗DLK1抗体(1:150;目录号ab21682, Abcam, USA) 或兔IgG Ab(1:150;目录号AB-105-C, R&D) 过夜,接着在室温下施用碱性磷酸酶缀合的抗兔IgG第二抗体(1:500; Jason ImmunoResearch) 达1h和随后用固红底物系统(Sigma-Aldrich) 显色。对于连续NS5染色,将样品浸入PBS中10min以除去盖玻片,和在室温下将载玻片在0.3% H_2O_2 中孵育30min以减少内源过氧化物酶的非特异性背景。在用5%BSA在室温下封闭30min后,在4°C添加小鼠抗NS5抗体(1:200, 克隆BGN/1246/5G7, 目录号0200-0423, AbD Serotec) 或小鼠IgG1同种型Ab(1:100, 目录号14-4714, eBioscience) 过夜。在我们的经验中,对于脂肪组织的NS5染色而言,细胞浸透程序不是必需的,因为之前样品已被包埋在石蜡中。然后在室温下将切片与辣根过氧化物酶聚合物Quanto试剂(抗小鼠,即用型; Thermo Scientific) 一起孵育7min和用UltraVision Quanto Detection System (含DAB显色底物; Thermo Scientific) 显色。之后,切片用苏木精染色和放回盖玻片,其导致细胞轮廓的轻微改变(如图1E所示)。DLK1和NS5A染色的电子图片通过高质量显微镜(Zeiss)、快速计算机硬件和高分辨率显示屏以及TissueFAXS扫描软件(TissueGnostics) 捕获。随后选择图片中的相同视场和将其可视化用于共定位的对比和分析。

[0105] 在脂肪组织(图1E)中,显色所需的最佳时间在不同供体的组织间显著不同(即供体和供体之间变化),不管HCV感染状态如何。我们已改进所述方法多次,发现显色时间是关键。我们遵循的原理是,首先确定显色的最大时间,对于同种型Ab染色(兔IgG或小鼠IgG1) 这得到最少的颜色信号;然后采用该时间用于抗DLK-1 Ab或抗NS5 Ab染色的显色。这将确保几乎没有底物过度显色引起的假阳性,和获得同种型Ab染色的低背景。

[0106] 在我们对HCV (+) 供体1(表1)的脂肪组织的研究中,在显著颜色信号出现之前,兔IgG染色的显色的最大时间是40-50秒,因此设置DLK-1染色的显色为40-50秒。类似地,没有

明显颜色信号的小鼠IgG1染色的显色的最大时间短至15秒,这被设置为抗NS5 Ab染色的显色时间。相比之下,在供体2和供体3的脂肪组织上,兔IgG染色的最佳显色时间是30秒和小鼠IgG1染色的最佳显色时间为仅10秒,因此这些时间分别设置用于抗DLK-1和抗NS5 Ab染色的显色。当染色HCV(-)样品时遵循类似的原理。

[0107] 免疫细胞化学 (ICC)

[0108] 对于未分级分离的SVF细胞或DLK-1⁺ hADSC或DLK-1⁻细胞的免疫细胞化学,遵循与IHC类似的原理,和如上所述在每个对照实验中预确定最佳显色时间。在指定的时间点收集细胞和通过细胞离心涂片器附着至聚赖氨酸包被的玻璃载玻片上,随后用4%福尔马林固定20分钟。对于DLK-1染色,在37°C通过0.05%胰蛋白酶溶液处理30min对细胞进行抗原恢复,然后通过DDW漂洗3次。在用Ultra V Block缓冲液(在UltraVision Quanto Detection System中的试剂,Thermo,USA)封闭5min后,在4°C将细胞与兔抗DLK1抗体或兔IgG一起孵育过夜,接着在室温下与碱性磷酸酶缀合的抗兔IgG第二抗体一起孵育1h和用固红底物系统(Sigma-Aldrich)显色5-6min(在大多数情况下)。对于HCV-特异性NS5(其在相同载玻片上进行染色,如图2C所示)的单次或连续染色,将载玻片置于PBS中10min以除去盖玻片和洗出封固介质,将细胞用含0.3% Triton-X-100和1% BSA的PBS渗透和封闭30min,然后应用Ultra Vision Quanto Detection System(Thermo Scientific,Fremont,CA,USA)。然后将细胞在Hydrogen Peroxide Block (Abcam,MA,USA)中孵育10分钟以降低由于内源过氧化物酶引起的非特异性背景染色。在洗涤后,将细胞用Ultra V Block(Thermo Scientific,MA,USA)孵育5分钟以封闭非特异性背景染色,在4°C与含小鼠单克隆抗NS5抗体的稀释缓冲液孵育过夜。将用小鼠IgG1进行的染色用作阴性对照。第二天,将细胞与第一抗体Amplifier Quanto溶液一起孵育10分钟,和与HRP Polymer Quanto一起孵育另外10分钟,在每次试剂施用之间通过PBS洗涤。最终,将30μl DAB Quanto色原添加至1ml DAB Quanto底物,通过涡旋混合,并施用至细胞2-3分钟(在大多数情况下)用于显色。在洗涤后,用永久封固介质固定载玻片,通过盖玻片覆盖,和使用TissueFAXS显微术(ZEISS)可视化 and 照相。

[0109] 血清HCV-感染的hADSC的透射电子显微术

[0110] 对于TEM研究,按所述³⁶收集和制备hADSC,和通过透射电子显微镜(JEM2000EXII; JEOL,Tokyo,Japan)检查。

[0111] 编码HCV2a和2b的核心抗原的mRNA的RT-PCR

[0112] 按制造商的说明书,使用PureLink® RNA Mini Kit(Ambion,Carlsbad,CA,USA)分离hADSC的RNA。用高容量cDNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems)将RNA转换成单链cDNA。用于逆转录的特异性引物是5'-ATGTACCCCATGAGGTCGGC-3'。用于PCR的引物与不同HCV基因型的核心蛋白区相匹配。含(正向)5'-CGCGCGACTAGGAAGACTTC-3'和(反向)5'-CGCGCGACGCGTAAACTTC-3'的引物混合物用于第一次PCR,热概况如下设置:94°C 2分钟,接着94°C 45秒、55°C 45秒和72°C 90秒的35个循环,然后72°C 7分钟用于最终延伸。在第二次PCR中用于基因型鉴定的类型特异性反义引物是5'-CCAAGAGGGACGGAACCTC-3'(类型2a)和5'-ACCCTCGTTTCCGTACAGAG-3'(类型2b),热概况如下设置:95°C 2分钟,接着95°C 30秒、60°C 30秒和72°C 30秒的30个循环,然后72°C 7分钟用于最终延伸^{37,38}。

[0113] 流式细胞术和封闭实验

[0114] 不同代的悬浮的0.5-1x10⁵ hADSC用小鼠抗人CD81单克隆Ab(克隆JS-81,BD

Biosciences)、抗LDL-R Ab(克隆C7, Millipore)、抗EGFR Ab(克隆LA1, Millipore)或兔多克隆抗SRB1 Ab(Novus Biologicals)在4°C染色1h。各自的对照是小鼠IgG1或多克隆兔IgG。洗涤后,将细胞进一步与异硫氰酸荧光素(FITC)缀合的第二Ab(Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, USA)一起孵育和通过Cell Quanta™ SC高分辨率流式细胞仪(Beckman Coulter Fullerton, CA, USA)分析。为封闭细胞表面分子,在37°C用1ml含指定剂量(1-100µg/ml)的抗体的无血清K-培养基预处理 2×10^5 hADSC(附着在孔中)。将用各自同种型抗体的处理用作对照。在1h后,将未稀释的HCV(+)血清添加至Eppendorf管中,使MOI为0.2,以在抗体存在下孵育3h。之后,洗涤细胞和接板于6-cm培养皿中用于连续培养。对于ApoE封闭,按所述¹⁴在室温下添加各种浓度的抗ApoE抗体(克隆E6D10)至HCV(+)血清达1h,然后与hADSC一起孵育3h。在21天的持续培养后收集上清液和细胞,提取RNA以定量病毒5'-UTR转录物。在单独的实验中,孔中的hADSC用指定剂量的IFN α (Sigma-Aldrich, MO, USA)在K培养基中一式三份预处理16h,然后暴露于基因型1a、1b、2a和2b的HCV(+)血清。21天后,在细胞裂解物中的5'-UTR转录物通过qRT-PCR定量测定,结果计算为与用溶媒(PBS)对照处理的细胞相比的抑制分数。

[0115] 用于miR-122的RT-PCR的RNA提取

[0116] 按所述³⁹制备用于miR-122的RT-PCR的引物,并进行RT-PCR。细胞的总RNA用RNA提取试剂REzol™ C&T(Protech, Taipei, Taiwan)分离。为确定miR-122水平,我们使用TaqMan MicroRNA Reverse Transcriptionas试剂盒(Applied Biosystems)逆转录所提取的RNA,并将cDNA用作miR-122的TaqMan MicroRNA测定法的实时PCR分析的模板。

[0117] 合成的siRNA和基因沉默

[0118] 按所述^{15,40,41},对闭合蛋白和紧蛋白-1具有特异性的siRNA通过Dharmacon合成。它们各自的靶序列为UAACAUUAGGACCUAGAA(紧蛋白-1)和GUGAAGAGUACAUGGCUGC(闭合蛋白)。按所述¹⁶制备NPC1L1,和按所述¹⁹制备DGAT-1的siRNA。在6-孔细胞板的孔中使用Xfect转染试剂(Clontech)将特异性siRNA转染至hADSC。HCV感染通过与HCVser一起在37°C孵育siRNA-转染的细胞3h进行,然后用PBS洗出HCVser。按所述^{15,19,40,41},在转染后48小时,裂解细胞用于RT-PCR以确定基因沉默的程度。在21天的培养后收获HCVser-感染的hADSC的细胞裂解物和上清液用于5'-UTR的qRT-PCR。

[0119] JFH1/HC Vcc和Huh7.5细胞

[0120] 将Huh7.5细胞在含10%热灭活的胎牛血清(Invitrogen)和0.1mM非必需氨基酸(Invitrogen)的DMEM(Invitrogen)中培养。按之前所述⁴²,体外转录基因组JFH-1 RNA和通过电穿孔递送至细胞。然后将转染的细胞转移至完全DMEM中和每3-4天传代。在通常的实践中,来自全长JFH1 cDNA转染的细胞的培养通过离心(3,000xg)10分钟澄清,和在使用前无菌过滤(0.2µm乙酸纤维素, Millipore)。对于较长期的贮存,将HCVcc等分和贮存在-80°C。通过添加1/4体积的在PBS中的无菌过滤的40%(w/v)聚乙二醇-8000在4°C过夜孵育来浓缩病毒。按所述⁴³,通过离心(8,000x g, 15min)收集病毒沉淀物和重悬浮于PBS中。

[0121] 药物抑制测定法

[0122] 抗病毒药物利巴韦林、环孢菌素A和IFN α 全都来自Sigma-Aldrich。特拉匹韦来自 Selleck Chemicals, MA, USA。在培养皿中在第0天,将分级剂量的利巴韦林、特拉匹韦或环孢菌素A添加至HCVser-感染的hADSC的培养基中和培养21天。对于IFN α 处理, hADSC用指定

剂量的IFN α 预处理16h,然后与HCVser一起孵育。然后定量测定细胞裂解物的病毒5' -UTR转录物和计算为与用溶媒对照处理的细胞相比的抑制分数。对于利巴韦林和IFN α ,溶媒对照为PBS,对于环孢菌素A和特拉匹韦,溶媒对照为0.1%DMSO。

[0123] HC Vser、HCVadsc和HCVcc的浮力密度

[0124] 按之前所述,HCVcc和HCVadsc的培养基通过PEG-8000浓缩。将所有样品重悬浮于500 μ l的无血清培养基中和在连续的碘克沙醇(OptiPrep,Axis-Shield,Norway)密度梯度上分层,所述梯度为从10%至40%碘克沙醇(各0.5ml),其用含10mM Hepes(pH 7.55)、150mM NaCl和0.02%BSA的溶液制备,如之前所述⁴⁴。在4°C在SW-41转子(Beckman Coulter)中,将梯度在40,000rpm超速离心6小时。超速离心后,从梯度的顶部收集17个级分(各级分含有500u1)。最终,使用QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit(QIAGEN,Basle,Switzerland)从各级分中分离总RNA。将RNA用于通过定量RT-PCR的HCV RNA检测。

[0125] ApoB、ApoE和胆固醇的测定

[0126] 根据制造商的说明书,将Quantikine[®] ELISA人载脂蛋白B/ApoB免疫测定试剂盒和Quantikine[®] ELISA人载脂蛋白E/ApoE免疫测定试剂盒(R&D Systems)用于检测ApoB和ApoE表达。HDL和LDL/VLDL的胆固醇通过HDL和LDL/VLDL胆固醇测定试剂盒(Abcam)检测。在浮力密度的不同级分中ApoB、ApoE和HDL和LDL/VLDL的胆固醇的表达水平针对拷贝进行标准化。

[0127] 用HCVser或HCVadsc感染人原代肝细胞(PHH)

[0128] 新鲜的非肿瘤性肝组织自针对HCV-相关或非相关的肝细胞癌手术切除的肝样本获取,和按所述⁴⁵分离和培养PHH。将PHH接板于胶原I包被的6-孔板中3天以允许细胞附着至该板上。在第4天,温和洗涤细胞,和在终体积0.5ml的与HCVser或其相应的d21 hADSC-增殖的HCV(+)上清液(其含有 1×10^4 HCV 5' -UTR拷贝)混合的无精氨酸Williams E培养基(Invitrogen,CA,USA)中培养3小时。感染后,洗涤细胞和进一步在1ml的培养基中培养,直到感染后第5天,其中每天更换新鲜培养基。然后将细胞裂解用于RNA提取,用于5' -UTR的RT-PCR。

[0129] 实施例1:HCV体内靶向hADSC。

[0130] 在临床上,HCV感染的有意义的特征是HCV(+)患者在慢性感染的肝中可具有过度的脂肪积聚,即肝脂肪变性^{46,47},肝脂肪变性的严重性似乎与肝纤维化的比率相关⁴⁸。新近的研究还说明,HCV RNA复制可通过增加饱和脂肪酸的可用性刺激,通过多不饱和脂肪酸或脂肪酸合成的抑制剂抑制^{49,50}。这些发现表明,在HCV的生命周期中脂肪代谢起重要作用。因此我们猜测,脂肪组织的细胞组分可牵涉到体内HCV感染。

[0131] 为测试我们的猜测,我们从HCV-感染或未感染的个体(表1)收获皮下脂肪组织和提取RNA用于HCV-特异性5' -UTR转录物的RT-PCT,其使用HCVser基因型1b(HCVser-1b)作为阳性对照。

[0132] 表1

[0133] A. 皮下脂肪组织和肝组织的HCV(+) 供体。所有患者接受针对肝细胞癌的外科切除的剖腹术。从外科创伤(剖腹术)收获脂肪组织[$\sim (2-2.5\text{cm})^3$],和从切除的肝脏的非肿瘤性部分(远离损伤)收获肝组织。患者编号与图1F中指出的相同。

	患者编号	年龄(y/o)/性别	HCV 基因型	血清 HCV 载量 (拷贝/ml)
[0134]	1	48/M	1b	1.6×10^7
	2	71/M	1b	3.1×10^6
	3	56/F	2a	2.9×10^5
	4	51/M	1a	5.7×10^6

[0135] 注意:患者1-3的样品用于图1A-E,和患者1-4的样品用于图1F。患者4的样品大小比要求的小[$\sim (0.6-1.3\text{cm})^3$],因此该样品的分离的附着SVF细胞仅用于延长培养实验(在图1F中)。

[0136] B.HCV(-)肝组织的供体。患者是HBV-相关的或非-B非-C的肝细胞癌的受害者并接受了肝切除。

	患者编号	年龄(y/o)/性别	肝炎概况
[0137]	1	59/M	HBV(+), HCV(-)
	2	66/M	HBV(+), HCV(-)
	3	42/M	HBV(-), HCV(-)

[0138] 注意:在表1A和1B中肝炎病毒感染的诊断在诊断肝细胞癌时作出,在组织收获后给予抗病毒治疗。

[0139] 引人关注的是,HCV(+)个体(基因型1b或2a的患者编号1-3,表1)的脂肪组织含有病毒5'-UTR(223bp,图1A),与HCV(-)个体的那些相反。为排除可能的来自血液的污染和确定表达病毒转录物的细胞来源,我们按所述^{12,13,33}通过离心分级分离脂肪组织成在顶部的含有成熟脂肪细胞的漂浮层(漂浮物)、在中间的缓冲液层和在底部的沉降的细胞沉淀(图5)。收集细胞沉淀,和进一步用RBC裂解缓冲液处理,以裂解红细胞,收获基质血管级分(SVF)细胞。然后从漂浮物层和RBC-裂解的SVF细胞分别提取RNA,但几乎没有RNA能从缓冲液层中提取(数据未显示)。RT-PCR证实,尽管在漂浮物层中无病毒5'-UTR检出,但病毒转录物在SVF细胞中检出(左图,图1B)。

[0140] 接下来,我们按所述¹⁰通过免疫磁珠从SVF细胞阳性选择DLK-1⁺细胞,流式细胞术分析证实>99.7%的阳性选择的细胞表达DLK-1(图6)。随后分别从DLK-1⁺和DLK-1⁻细胞提取RNA用于RT-PCR,这证实病毒转录物存在于DLK-1⁺细胞中,但不存在于DLK-1⁻细胞中(右图,图1B)。我们还对HCV-特异性负链RNA进行RT-PCR⁵¹,使用自HCV(+)原代人肝细胞(PHH)提取的RNA作为阳性对照。数据证实,HCV复制中间体存在于所有的3个HCV(+)供体的DLK-1⁺细胞中,但不存在于DLK-1⁻细胞中(375bp;图1C)。DLK-1⁺和DLK-1⁻细胞还被分别离心到细胞离心涂片器载玻片上,用于用小鼠抗HCV NS5抗体(克隆BGN/1246/5G7)和苏木精(描绘细胞核)的免疫细胞化学。还染色自HCV(-)个体分离的细胞用于比较。与5'-UTR的mRNA表达一致,自HCV(+)供体分离的DLK-1⁺细胞表达NS5抗原(棕色标记,图c,图1E),而DLK-1⁻细胞的NS5表达接近背景,无论HCV感染状态如何(图b和e)。将用同种型抗体(小鼠IgG1)染色的未

分级分离的HCV (+) 或HCV (-) SVF细胞用作对照 (图a和d, 图1E)。苏木精染色 (蓝色标记) 证实, NS5⁺细胞是真正的有核细胞 (图c, 图1E), 而不是细胞碎片。抗NS5抗体的特异性在HCV (+) PHH的染色中得到证实 (图7)。

[0141] 对于体内验证, 我们对自HCV-感染和未感染的个体收获的皮下脂肪组织进行免疫组织化学。首先用抗DLK-1 Ab染色组织切片。在用PBS浸渍和洗涤后, 用抗NS5Ab和苏木精染色相同的切片。结果显示, DLK-1在自HCV-感染和未感染的个体两者收获的脂肪组织中在类似于小鼠脂肪组织中描述的位置⁵²中检出 (红色标记, 白色箭头, 分别为图b和c, 和h, 图1E)。此外, NS5⁺细胞在HCV (+) 脂肪组织中可见 (棕色标记, 白色箭头, 图e和f, 图1E), 但在HCV (-) 样品中不可见 (图j)。值得注意的是, 在HCV (+) 样品中病毒NS5与DLK-1表达共定位 (图b对比e和c对比f, 图1E; b和e以及c和g来自单独的供体; 亦见图8)。在检查的所有切片中, 在HCV (+) 脂肪组织的每个高倍放大视场 (400X) 中, 发现约0-4个DLK-1⁺NS5⁺细胞。

[0142] 为了确定HCV (+) 个体的hADSC是否产生病毒, 我们培养自HCV (+) 患者分离的DLK-1⁺细胞和每7天定量上清液中的病毒拷贝数。引人关注的是, 尽管在前4周很少病毒转录物被检出, 但d28-d35之后它们变得在上清液中可检出和拷贝数呈时间依赖性增加 (至d49; 图1F)。此外, 在延长培养时病毒转录物的量似乎与细胞从中分离的各个患者的血清病毒滴度相关 (图1F和表1)。

[0143] 总之, 我们的数据提供HCV体内靶向hADSC的证据。

[0144] 实施例2: 幼稚HCV (-) hADSC在体外对HCVser感染和复制敏感

[0145] 为检查幼稚HCV (-) hADSC在体外是否对HCVser感染和复制敏感, 我们从HCV (-) 个体制备hADSC和对其传代培养。悬浮的第3代 (p-3) 或p-4细胞 (在Eppendorf管中) 与HCVser (表2) 在0.2moi以终体积1ml一起孵育 (即 1×10^5 5'-UTR拷贝数对比 5×10^5 hADSC细胞)。

[0146] 表2. 用于本研究的HCV (+) 血清的HCV基因型和5'-UTR拷贝数。所有患者没有感染HIV或乙肝病毒的证据。他们也没有急性感染性疾病的征兆。从2011年9月至2014年2月收集血清并立即使用或贮存在-80°C直到使用。患者编号1-5的血清用于图2A-D, 和剩余的血清用于图2E-F、图3和图4。

患者编号	基因型	5'-UTR 拷贝数/ml
1	1b	176,554
2	1b	489,226
3	1b	125,117
4	2b	22,338
5	2b	269,274
6	1b	2,204,192
7	2a	10,235,072
8	1b	3,416,616
9	2b	2,113,496
10	2b	155,064
11	1b	408,572
12	1a	695,868
13	1b	3,652,720
14	1a	582,610
15	1b	10,169,980
16	1b	2,603,320
17	1b	576,728
18	2a+2b	7,357,744
19	2b	53,428,656
20	2a	9,266,436
21	1b	744,228
22	1b	60,154,272
23	1b	335,460
24	2a	74,090
25	1a	9,179,112
26	2a+2b	67,012
27	2b	1,455,144
28	2a	632,901
29	2a	46,793,192

[0149] 3h后,洗涤细胞和转移至6-cm培养皿中用于培养,每7天更换培养基,和在第7、14、21和28天收获上清液和细胞裂解物用于RNA提取(图9中的方案)。作为HCVser感染性的对照,将自非肿瘤肝组织(按所述⁴⁵和表1)分离的HCV(-) PHH接板于孔中3天,以允许细胞附着,然后在第4天与HCVser或HCV(-)对照血清(血型AB)一起孵育3h;洗涤后,将PHH进一步培养5天,然后进行细胞RNA提取。结果显示,暴露于HCVser的PHH的确表达病毒5' UTR(标记为“+”,左,图2A),而暴露于HCV(-)对照血清的细胞不表达(标记为“-”)。

[0150] 在感染后的培养中,病毒转录物不能在d7-上清液或d7-细胞裂解物中检出,但是

在所有实验的d14-细胞裂解物中变得可检出,还在18个实验的10个的上清液中可检出(右,图2A;总计18个实验,使用来自8个供体的hADSC,表3)。同时,5' -UTR在所有实验的d21和d28上清液两者中以及在细胞裂解物中始终被检出(右,图2A)。

[0151] 我们还检查了HCV-特异性负链RNA,结果证实d14和d28HCVser-1b感染的hADSC表达复制中间体,按所预期的,其不存在于上清液中(图2B)。自HCV-感染的患者分离的PHH用作阳性对照。

[0152] 为进一步证实,将感染的hADSC离心到玻璃载玻片上用于连续的免疫细胞化学研究。细胞首先用抗DLK-1抗体染色,接着在相同切片上用抗NS5抗体和苏木精染色。结果显示,d14HCVser-1b感染的hADSC的确表达DLK-1(红色标记,图b,图2C),和与RT-PCR发现相一致,它们还表达NS5(棕色标记,图d,图2C),这与对照血清脉冲的表达DLK-1(图f)但不表达NS5(图h)的hADSC相反。用同种型抗体兔IgG和小鼠IgG1(分别为抗DLK-1和抗NS5抗体的对照)染色证实了背景颜色(分别为图a和c以及e和g)。因为几乎所有HCVser-感染的DLK-1⁺细胞表达NS5(图b对比d),因此hADSC对临床分离株的感染的许可似乎是一个普遍化的性质,而不是限制于仅一个或多个细胞子集。

[0153] 还通过透射电子显微术研究了D14和d21 HCVser-hADSC。与暴露于HCV(-)对照血清的hADSC(图a和d,图2D)相比,~50-60nm直径的病毒颗粒能够在hADSC的外部(插图中的白色箭头,图b和e,图2D)和内部(插图中的白色箭头,图c和f,图2D)可见。在细胞外部鉴定的病毒颗粒被包裹在由双膜(黄色箭头和在插图中放大,图b)或电子致密膜状结构(黄色箭头和在插图中放大,图e)构成的膜状囊泡中。相比之下,细胞内部发现的病毒颗粒呈无膜状包裹的游离形式(黄色正方形和在插图中放大,图c;病毒颗粒通过白色箭头指出)或被多个环状同心膜包围(“洋葱形的”,黄色正方形和在插图中放大,图f;病毒颗粒通过白色箭头指出)。

[0154] 除了感染悬浮的hADSC之外(图2,A-D),我们还感染附着的hADSC,即通过将它们接板于6-cm培养皿中1天,然后用HCVser以0.5moi (1x10⁵ 5' -UTR拷贝对比2x10⁵ hADSC细胞)在终体积2ml中脉冲细胞3h。在温和洗涤后,将细胞在5ml的新鲜培养基中培养,每7天更换培养基(图10)。在第7、14、21和28天提取上清液和细胞裂解物中的RNA并进行qRT-PCR。结果显示,在第7天病毒转录物始终在细胞裂解物中可检出,尽管它们不存在于上清液中(左图对比右图,图2E)。此外,在细胞裂解物中的病毒拷贝在第2周最显著增加(左图,图2E),而在上清液中的增加以一周的滞后即第3周最明显(右图,图2E)。

[0155] 为测量通过该系统生产的总病毒拷贝,我们持续培养HCVser-感染的hADSC而无培养基更换(图10)和在指定的培养期结束时收集上清液。qRT-PCR证实,最多的病毒释放(至上清液中)发生在第3周,在28天的培养后总拷贝数为~3x10⁵/ml(图2F)。

[0156] 表3. 幼稚hADSC的供体的特征

供体	1	2	3	4	5	6	7	8
年龄(yr)/性别	40/F	41/F	52/F	55/F	49/F	60/F	36/M	27/M
疾病	乳腺癌, 用于乳房切除和乳房再造术						肥胖	
hADSC 来源	从 TRAM 瓣*脂肪切除的脂肪组织						从腹部壁或臀部/大腿的吸脂材料	

[0157]

[0158] *TRAM瓣:横向腹直肌肌皮瓣

[0159] 实施例3:hADSC产生的病毒体是显示临床分离株的生物学性质的真正的“病毒体”

[0160] 为了检查hADSC产生的病毒体(标记为“HCVadsC”)的感染性,我们用HCVser-1b感染了“供体1”的p2 hADSC和在第21天收集上清液(标记为“HCVadsc (1)”)。通过0.22- μ m孔滤器过滤后,使用HCVadsc (1)感染“供体2”的hADSC以制备HCVadsc (2),其随后用于感染“供体3”的hADSC。结果证实,HCVadsc对不同供体的幼稚hADSC具有感染性,具有如HCVser初始感染中见到的相对一致的复制效率(图3A)。还对源自初始被HCVser-1a、-2a和-2b感染的hADSC的上清液的HCVadsc获得了类似的观察结果(数据未显示)。

[0161] 接下来我们通过用HCVser-1b感染p2、p6、p9和p15hADSC研究了不同传代数的hADSC的许可性和在21天的持续培养后测量了病毒拷贝。结果显示,与p2和p6细胞相对比,在上清液和细胞裂解物两者中p9和p15 hADSC具有极低水平的病毒转录物(分别为左图和右图,图3B)。对用HCVser-1a和-2a的感染获得了类似的观察结果(图11)。在确定幼稚[HCV(-)]hADSC的DLK-1表达的实验中,我们发现,DLK-1表达可从p0至p6检出,但在p9时降低和在p15时不可检出(图3C),遵循如对于HCV感染的许可性所注意到的类似的趋势。

[0162] 此外,hADSC似乎对基因型1或2的感染没有偏爱(图3B和图11)。为对其做进一步检查,我们用混合的基因型2a+2b的HCVser感染了p5hADSC和收集细胞用于RT-PCR以检测编码基因型特异性核心抗原的mRNA。事实上,混合的2a+2b HCVser本身(作为阳性对照)表达编码基因型2a和2b两者的核心抗原的mRNA(174和123bp,泳道“P”,分别为左图和右图;图3D),其也在基因型2a+2b感染的hADSC的d21和d56细胞裂解物中被检出。在该实验中,通过HCV(-)对照血清脉冲的细胞用作阴性对照(标记为“N”)。因此,hADSC对于被临床分离株感染的许可性是跨越基因型的,至少对于基因型1a、1b、2a和2b是如此。

[0163] 宿主因子,包括四跨膜蛋白(tetraspanin) CD81、LDL-R、SR-B1、表皮生长因子受体(EGFR)、载脂蛋白(Apo)E、闭合蛋白、紧蛋白-1、Niemann-Pick C1-样1(NPC1L1)胆固醇吸收受体和二酰基甘油乙酰转移酶-1(DGAT-1),已显示在病毒附着或附着后步骤中介导在人肝细胞或肝癌细胞系中的HCV感染/复制^{15,16,19,53-58}。我们通过流式细胞术或RT-PCR检查了这些分子在hADSC中的表达。

[0164] 流式细胞术显示,p0(即附着的SVF细胞)、p2和p6hADSC明显表达CD81、LDL-R、SR-B1和EGFR(图3E)。RT-PCR也证实编码闭合蛋白(OCLN)、紧蛋白-1(CLDN1)和NPC1L1而非miR-122的mRNA的表达(左,图3F)。相比之下,miR-122在Huh7.5肝癌细胞中大量表达(为hADSC的~60倍高)和在PHH中甚至更高丰度(~2000倍高;右,图3F)。

[0165] 为了确定这些分子的作用,我们用分级剂量的针对CD81(克隆JS-81)、LDL-R(克隆C7)、EGFR(克隆LA-1)的单克隆Ab或针对SR-B1的多克隆Ab预处理p2hADSC达1h,然后通过HCVser-1b脉冲。对于ApoE阻断,按所述¹⁴在室温下将各种浓度的抗ApoE抗体(克隆E6D10)添加至HCV(+)血清达1h,然后用于感染。在21天的上清液中的病毒转录物的定量显示,在HCV(+)血清中的CD81、LDL-R、SR-B1、EGFR的阻断和还有ApoE的中和以剂量依赖方式显著降低病毒拷贝的量;同时,处理本身未显著影响细胞成活力(图3G)。还注意到在细胞裂解物的病毒拷贝中的类似的剂量-响应降低(图12)。

[0166] 在通过HCVser-1b感染之前,我们还按所述^{15,16}用对闭合蛋白或紧蛋白-1具有特异性的siRNA或在单独实验中用对NPC1L1具有特异性的siRNA转染p2hADSC。我们还检查了

DGAT-1的作用,DGAT-1是运输HCV核衣壳核心至脂质小滴所需要的分子,对于在肝癌细胞系中HCV的产生是重要的¹⁹。RT-PCR证实mRNA敲减的影响(图13),其随后降低在21天的培养后的上清液(图3H)和细胞裂解物(图13)中的病毒拷贝。

[0167] 最后,我们检查了抗病毒药物的抑制作用。将p4-5的细胞接板于孔中,暴露于HCVser-1b,和将分级浓度的包括利巴韦林、特拉匹韦或环孢菌素A(亲环蛋白A抑制剂)在内的抗病毒药物添加至培养基中。对于IFN α 处理,hADSC用指定剂量的IFN α 预处理16h,然后与HCVser一起孵育。然后测定21天的细胞裂解物中的病毒转录物,并计算为与用溶媒对照处理的细胞相比的抑制分数。结果证实,HCV复制以剂量-响应方式受到利巴韦林、特拉匹韦、环孢菌素A和IFN α 抑制(图3I)。在我们的预备实验中已经证实了在p0、p2和p6hADSC中亲环蛋白A的表达(图14)。因此,HCVadsc是显示临床分离株的生物学性质的真正的“病毒体”。

[0168] 实施例4:hADSC是允许完全的HCV复制的体内HCV贮库

[0169] 为了表征HCVadsc的物理性质,我们按所述⁴³通过平衡离心比较了HCVser、HCVcc和HCVadsc的浮力密度特征。研究的所有病毒源自基因型2a。与之前报道^{43,59,60}相一致,HCVser在较低密度1.039(级分2)和1.080(级分7)的级分中具有大量的RNA,而HCVcc的RNA在1.132(级分13;图4A)达到峰值。HCVadsc的最大量的RNA在密度1.080(级分7)中见到,接着是在较高密度1.124和1.156(级分12和15)中的两个峰。引人关注的是,在HCVadsc的1.080处的峰与HCVser相同(图4A)。因此,HCVadsc的物理性质比HCVcc更类似于临床分离株。

[0170] 我们还确定了各主要级分的脂质和载脂蛋白(Apo)特征,包括HDL、VLDL/LDL和ApoE和ApoB。与HCVcc和HCVadsc相比,HCVser似乎具有最高的总脂质量(图15),这不是意外的,因为病毒增殖的微环境不同(血清对比培养基)。此外,当表示为重量(ng)/病毒拷贝时,HCVcc级分13具有最低的HDL和LDL/VLDL含量(图4B)。HCVser的主要级分还具有最高的ApoE含量(按照pg/拷贝计),接着是HCVadsc,HCVcc级分13几乎没有可检出的ApoE水平(图4C)。因此,在病毒颗粒相关的脂质含量中,HCVadsc还显示与HCVser比与HCVcc更多的相似性。引人关注的是,在HCVadsc的任何级分中未检出ApoB,暗示ApoB可能对于hADSC中的感染不是必需的,这与ApoE相反(图3G)。

[0171] 我们还通过用JFH1/HCVcc的病毒接种物以及HCVser感染p2 hADSC比较了各种病毒对hADSC的感染性。平行进行作为对照的在Huh7.5细胞中的HCVcc复制。我们发现,与在Huh7.5细胞中的HCVcc的有效复制(图16)相反,HCVcc-感染的hADSC在14天或21天的培养后在上清液或细胞裂解物中产生很少的5' -UTR转录物(图4D),hADSC的HCVser感染显示与之前类似的复制动力学(图4D对比3A)。还收集幼稚Huh7.5和HCVcc-感染的Huh7.5细胞的21天的上清液以及HCVcc或HCVser感染的hADSC的那些上清液用于RNA提取和进行RT-PCR。结果证实,在HCVcc-感染的hADSC上清液中无病毒转录物被检出(泳道3,图4E),这与Huh7.5的HCVcc感染和hADSC的HCVser感染相反(分别为泳道2和4,图4E)。

[0172] 接下来我们检查了HCVadsc对幼稚PHH的感染性。PHH按所述⁴⁵自HCV(-)个体分离,培养3天(1×10^4 细胞/皿)以允许细胞附着,随后暴露于自HCVser-1b感染的hADSC培养物的21天的上清液制备的HCVadsc。感染后5天提取细胞RNA用于RT-PCR。结果显示,与通过对照血清脉冲的hADSC的上清液的感染(作为阴性对照,泳道“1”,图4F)相反,HCVadsc-感染的PHH的确表达病毒5' -UTR(标记为“2”和“3”,图4F)。

[0173] 最后,按之前所述制备来自3个不同供体的PHH,并接种到孔中。在第4天,通过HCV

(-)对照血清(来自3个不同个体)、HCVser-1b(来自3个单独的供体)和其相应的HCVadsc感染细胞。HCVser和相应的HCVadsc配对感染同一批次的PHH。感染后5天收集上清液和定量5'-UTR拷贝。PHH暴露于HCV(-)对照血清用作阴性对照。结果显示,HCVser的感染产生高度变化的复制动力学,如之前在用临床分离株对PHH的感染中所报道⁶¹。被HCVadsc的感染还导致病毒滴度增加,在HCVser感染的情况下病毒滴度高度变化(图4G)。这些发现证实了HCVadsc对肝细胞的感染性。

[0174] 总之,hADSC是体内HCV贮库,其允许完全的HCV复制和代表了之前未被认识的临床HCV-宿主相互作用位点。此外,hADSC是第一类非肝原代细胞,其允许临床HCV分离株的体外增殖,其可成为用于解释HCV生命周期和促进抗病毒策略的发展的新工具。

[0175] 本说明书中提及的所有出版物和专利通过引用结合到本文中。在不偏离本发明的范围和精神的条件下,本发明的所述方法和系统的各种改变和变化对本领域技术人员而言将是显而易见的。尽管已结合特定的优选实施方案描述了本发明,但应理解,所要求保护的本发明不应过度限制于这样的特定实施方案。事实上,对细胞培养、分子生物学、生物化学或相关领域的技术人员而言显而易见的用于实施本发明的所述方式的各种变化,意欲包括在所附权利要求书的范围内。

[0176] 参考文献

[0177] 1.Lindenbach,B.D.&Rice,C.M.Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function.Nature 436,933-938(2005).

[0178] 2.Scheel,T.K.&Rice,C.M.Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies.Nature medicine 19,837-849(2013).

[0179] 3.Blackard,J.T.,Kemmer,N.&Sherman,K.E.Extrahepatic replication of HCV:insights into clinical manifestations and biological consequences.Hepatology 44,15-22(2006).

[0180] 4.Laporte,J.,等人Differential distribution and internal translation efficiency of hepatitis C virus quasispecies present in dendritic and liver cells.Blood 101,52-57(2003).

[0181] 5.Wilkinson,J.,Radkowski,M.&Laskus,T.Hepatitis C virus neuroinvasion: identification of infected cells.Journal of virology 83,1312-1319(2009).

[0182] 6.Letendre,S.,等人Pathogenesis of hepatitis C virus coinfection in the brains of patients infected with HIV.J Infect Dis 196,361-370(2007).

[0183] 7.Lohmann,V.&Bartenschlager,R.On the history of hepatitis C virus cell culture systems.Journal of medicinal chemistry 57,1627-1642(2014).

[0184] 8.Yang,D.,等人Complete replication of hepatitis B virus and hepatitis C virus in a newly developed hepatoma cell line.Proc Natl Acad Sci U S A 111, E1264-1273(2014).

[0185] 9.Bunnell,B.A.,Flaat,M.,Gagliardi,C.,Patel,B.&Ripoll,C.Adipose-derived stem cells:isolation,expansion and differentiation.Methods 45,115-120(2008).

- [0186] 10.Oertel,M.,等人Purification of fetal liver stem/progenitor cells containing all the repopulation potential for normal adult rat liver.Gastroenterology 134,823-832(2008).
- [0187] 11.Abdallah,B.M.,等人Regulation of human skeletal stem cells differentiation by Dlk1/Pref-1.Journal of bone and mineral research:the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research 19, 841-852(2004).
- [0188] 12.Yoshimura,K.,等人Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates.J Cell Physiol 208,64-76(2006).
- [0189] 13.Lin,S.D.,Wang,K.H.&Kao,A.P.Engineered adipose tissue of predefined shape and dimensions from human adipose-derived mesenchymal stem cells.Tissue Eng Part A 14,571-581(2008).
- [0190] 14.Jammart,B.,等人Very-low-density lipoprotein(VLDL)-producing and hepatitis C virus-replicating HepG2 cells secrete no more lipoviroparticles than VLDL-deficient Huh 7.5 cells.Journal of virology 87,5065-5080(2013).
- [0191] 15.Owen,D.M.,Huang,H.,Ye,J.&Gale,M.,Jr.Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor.Virology 394,99-108(2009).
- [0192] 16.Sainz,B.,Jr.,等人Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor.Nature medicine 18,281-285(2012).
- [0193] 17.Dorner,M.,等人A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection.Nature 474,208-211(2011).
- [0194] 18.Krapivner,S.,等人DGAT1 participates in the effect of HNF4A on hepatic secretion of triglyceride-rich lipoproteins.Arterioscler Thromb Vasc Biol 30,962-967(2010).
- [0195] 19.Herker,E.,等人Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1.Nature medicine 16,1295-1298(2010).
- [0196] 20.Kaul,A.,等人Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics.PLoS Pathog 5,e1000546(2009).
- [0197] 21.Smas,C.M.&Sul,H.S.Pref-1,a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation.Cell 73,725-734(1993).
- [0198] 22.Lee,K.,等人Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor-1(Pref-1).The Journal of clinical investigation 111,453-461(2003).
- [0199] 23.Gesta,S.,Tseng,Y.H.&Kahn,C.R.Developmental origin of fat:tracking obesity to its source.Cell 131,242-256(2007).

- [0200] 24.Wang,Y.&Sul,H.S.Pref-1 regulates mesenchymal cell commitment and differentiation through Sox9.Cell Metab9,287-302(2009) .
- [0201] 25.Gimble,J.M.,Katz,A.J.&Bunnell,B.A.Adipose-derived stem cells for regenerative medicine.Circulation research 100,1249-1260(2007) .
- [0202] 26.Mizuno,H.,Tobita,M.&Uysal,A.C.Concise review:Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine.Stem Cells 30,804-810(2012) .
- [0203] 27.Parsons,C.H.,Szomju,B.&Kedes,D.H.Susceptibility of human fetal mesenchymal stem cells to Kaposi sarcoma-associated herpesvirus.Blood 104, 2736-2738(2004) .
- [0204] 28.Avanzi,S.,等人Susceptibility of human placenta derived mesenchymal stromal/stem cells to human herpesviruses infection.PloS one 8,e71412(2013) .
- [0205] 29.Soland,M.A.,等人Perivascular stromal cells as a potential reservoir of human cytomegalovirus.American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 14,820-830(2014) .
- [0206] 30.Khatri,M.&Saif,Y.M.Influenza virus infects bone marrow mesenchymal stromal cells in vitro:implications for bone marrow transplantation.Cell transplantation 22,461-468(2013) .
- [0207] 31.Gibellini,D.,等人HIV-1 and recombinant gp 120 affect the survival and differentiation of human vessel wall-derived mesenchymal stem cells.Retrovirology 8,40(2011) .
- [0208] 32.Ma,R.,等人Hepatitis B virus infection and replication in human bone marrow mesenchymal stem cells.Virology journal 8,486(2011) .
- [0209] 33.Rodbell.M.Metabolism of isolated fat cells.II.The similar effects of phospholipase C(Clostridium perfringens alpha toxin)and of insulin on glucose and amino acid metabolism.J Biol Chem 241,130-139(1966) .
- [0210] 34.Eto,H.,等人Characterization of structure and cellular components of aspirated and excised adipose tissue.Plast Reconstr Surg 124,1087-1097(2009) .
- [0211] 35.Bukh,J.,Purcell,R.H.&Miller,R.H.Importance of primer selection for the detection of hepatitis C virus RNA with the polymerase chain reaction assay.Proc Natl Acad Sci U S A 89,187-191(1992) .
- [0212] 36.Shimizu,Y.K.,Feinstone,S.M.,Kohara,M.,Purcell,R.H.&Yoshikura,H.Hepatitis C virus:detection of intracellular virus particles by electron microscopy.Hepatology 23,205-209(1996) .
- [0213] 37.Okamoto,H.,等人Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers:application to clinical surveys and tracing infectious sources.J Gen Virol 73(Pt 3),673-679(1992) .

- [0214] 38. Toniutto, P., 等人 Discordant results from hepatitis C virus genotyping by procedures based on amplification of different genomic regions. *J Clin Microbiol* 34, 2382-2385 (1996).
- [0215] 39. Jopling, C.L., Yi, M., Lancaster, A.M., Lemon, S.M. & Sarnow, P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 309, 1577-1581 (2005).
- [0216] 40. Al-Sadi, R., 等人 Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300, G1054-1064 (2011).
- [0217] 41. Jiang, J., 等人 Hepatitis C virus attachment mediated by apolipoprotein E binding to cell surface heparan sulfate. *Journal of virology* 86, 7256-7267 (2012).
- [0218] 42. Kato, T., 等人 Cell culture and infection system for hepatitis C virus. *Nature protocols* 1, 2334-2339 (2006).
- [0219] 43. Lindenbach, B.D. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309, 623-626 (2005).
- [0220] 44. Lindenbach, B.D., 等人 Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3805-3809 (2006).
- [0221] 45. Bhogal, R.H., 等人 Isolation of primary human hepatocytes from normal and diseased liver tissue: a one hundred liver experience. *PloS one* 6, e18222 (2011).
- [0222] 46. Clark, J.M., Brancati, F.L. & Diehl, A.M. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 122, 1649-1657 (2002).
- [0223] 47. Negro, F. Mechanisms and significance of liver steatosis in hepatitis C virus infection. *World journal of gastroenterology :WJG* 12, 6756-6765 (2006).
- [0224] 48. Adinolfi, L.E., 等人 Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. *Hepatology* 33, 1358-1364 (2001).
- [0225] 49. Kadadia, S.B. & Chisari, F.V. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2561-2566 (2005).
- [0226] 50. Mankouri, J., 等人 Enhanced hepatitis C virus genome replication and lipid accumulation mediated by inhibition of AMP-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 11549-11554 (2010).
- [0227] 51. Royer, C., 等人 A study of susceptibility of primary human Kupffer cells to hepatitis C virus. *Journal of hepatology* 38, 250-256 (2003).
- [0228] 52. Olson, L.E. & Soriano, P. PDGFRbeta signaling regulates mural cell

plasticity and inhibits fat development. *Dev Cell* 20,815-826 (2011).

[0229] 53. Pileri, P., 等人 Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282, 938-941 (1998).

[0230] 54. Molina, S., 等人 Serum-derived hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes is tetraspanin CD81 dependent. *Journal of virology* 82,569-574 (2008).

[0231] 55. Ploss, A., 等人 Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 457,882-886 (2009).

[0232] 56. Evans, M. J., 等人 Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446,801-805 (2007).

[0233] 57. Liu, S., 等人 Human apolipoprotein E peptides inhibit hepatitis C virus entry by blocking virus binding. *Hepatology* 56,484-491 (2012).

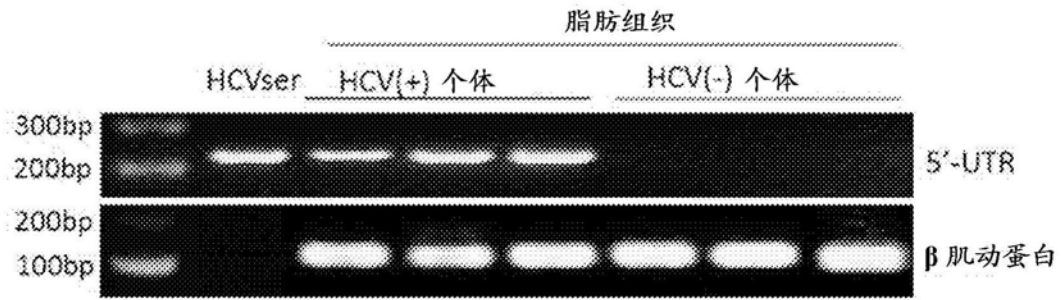
[0234] 58. Lupberger, J., 等人 EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nature medicine* 17, 589-595 (2011).

[0235] 59. Kanto, T., 等人 Buoyant density of hepatitis C virus recovered from infected hosts: two different features in sucrose equilibrium density-gradient centrifugation related to degree of liver inflammation. *Hepatology* 19,296-302 (1994).

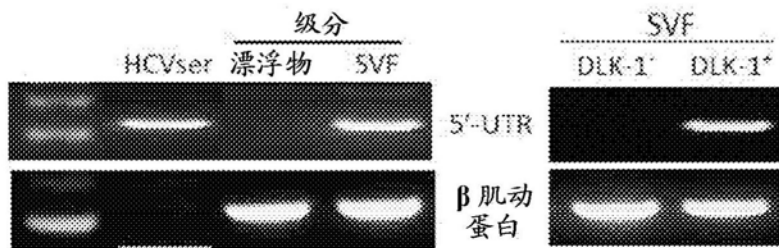
[0236] 60. Bartenschlager, R., Frese, M. & Pietschmann, T. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv. Virus Res.* 63,71-180 (2004).

[0237] 61. Gondeau, C., 等人 In vitro infection of primary human hepatocytes by HCV-positive sera: insights on a highly relevant model. *Gut* (2013).

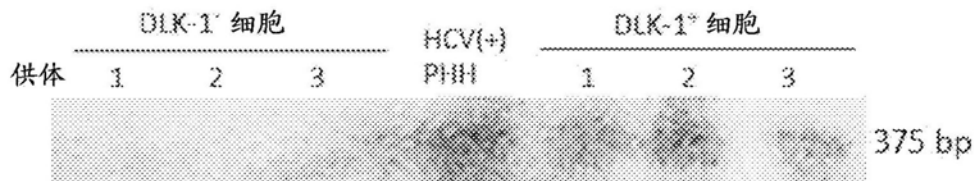
A.



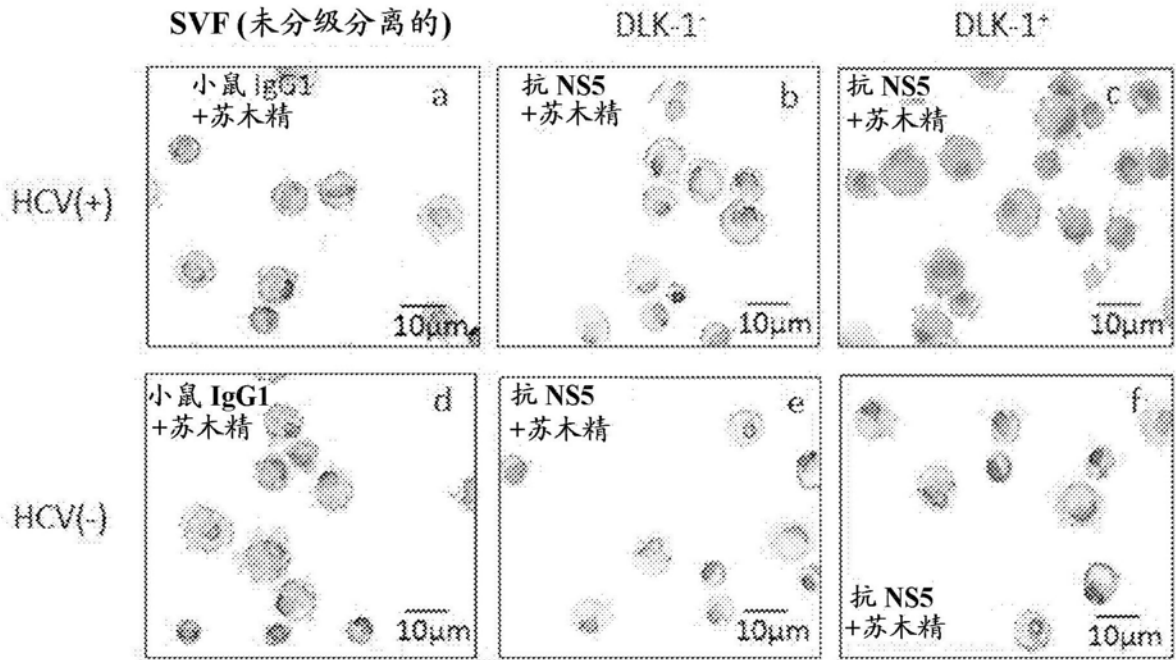
B.



C.

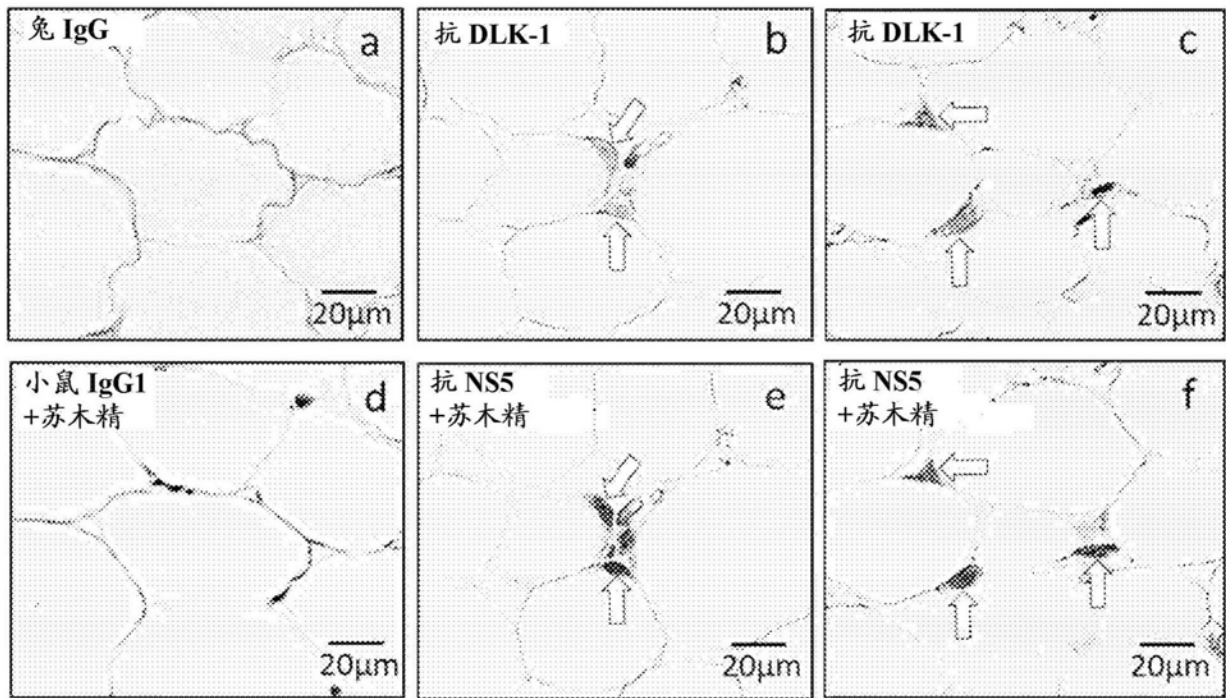


D.

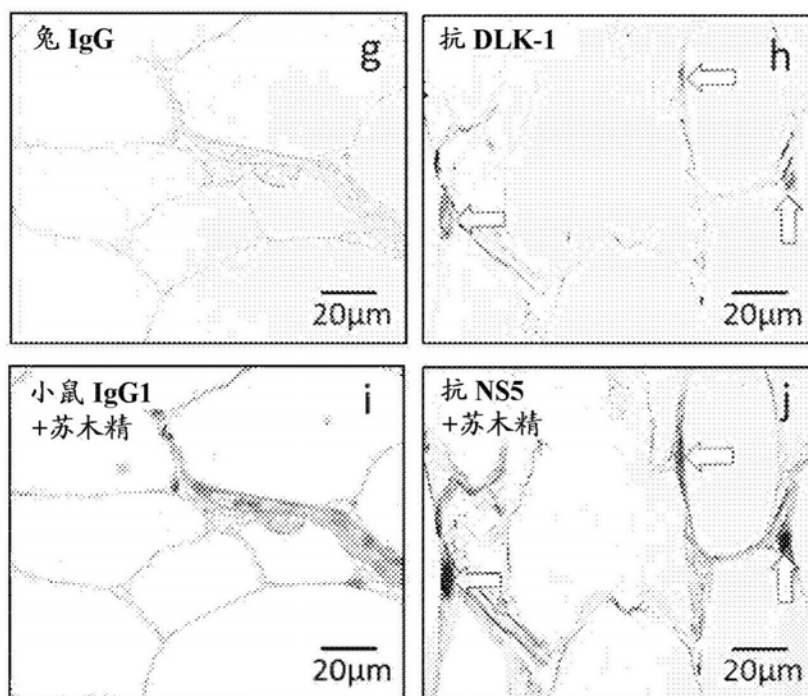


E.

HCV(+) 脂肪组织



HCV(-) 脂肪组织



F.

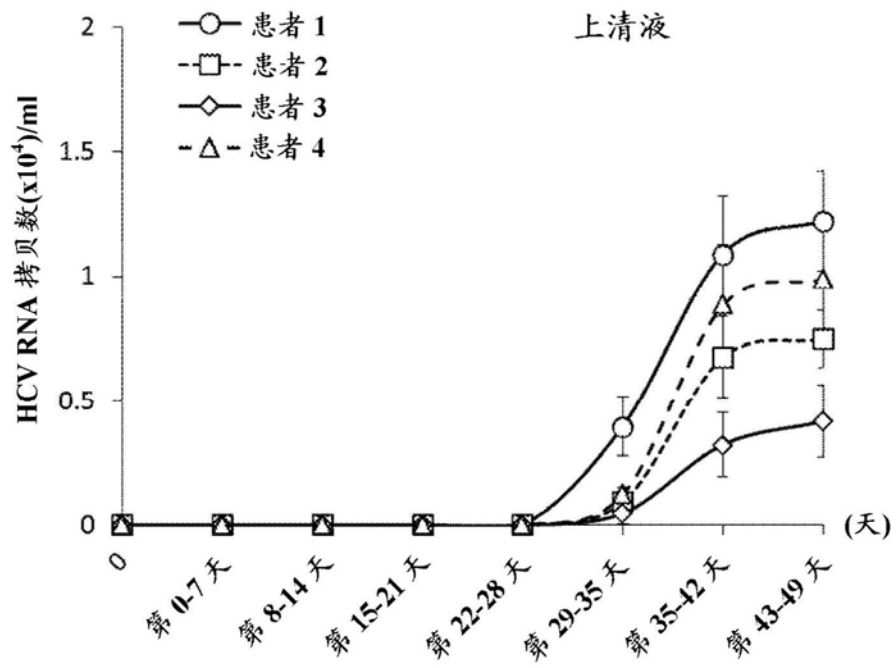
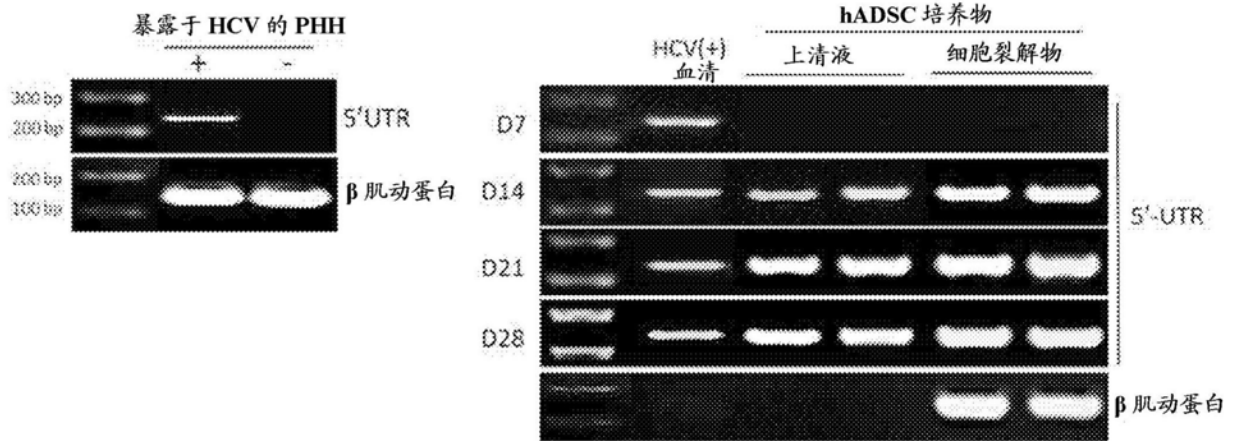


图1

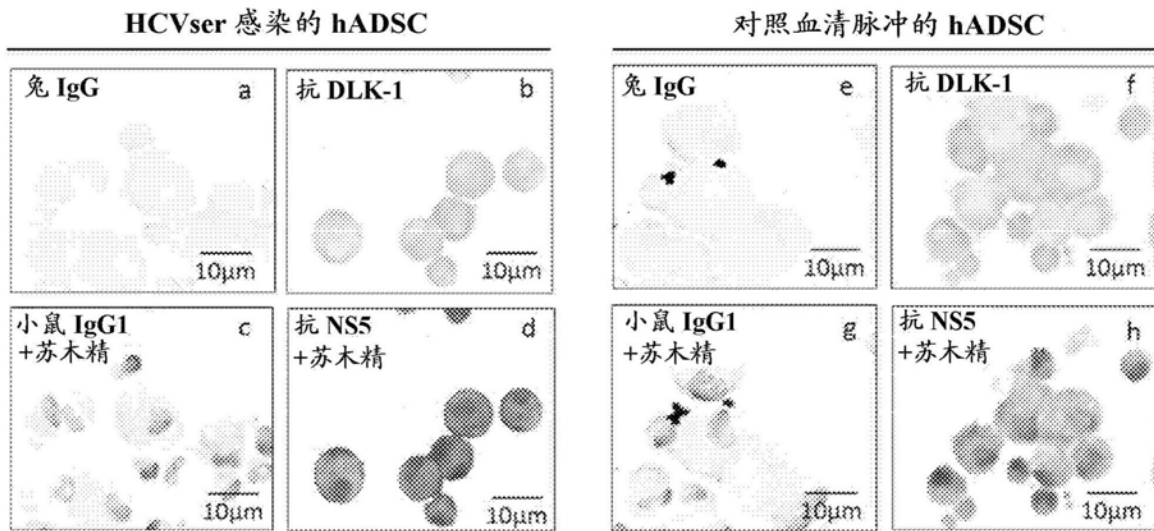
A.



B.

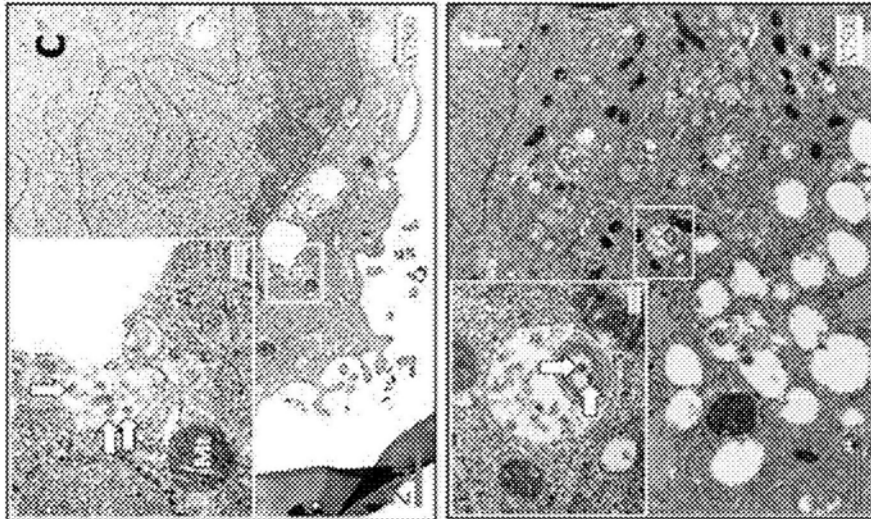


C.

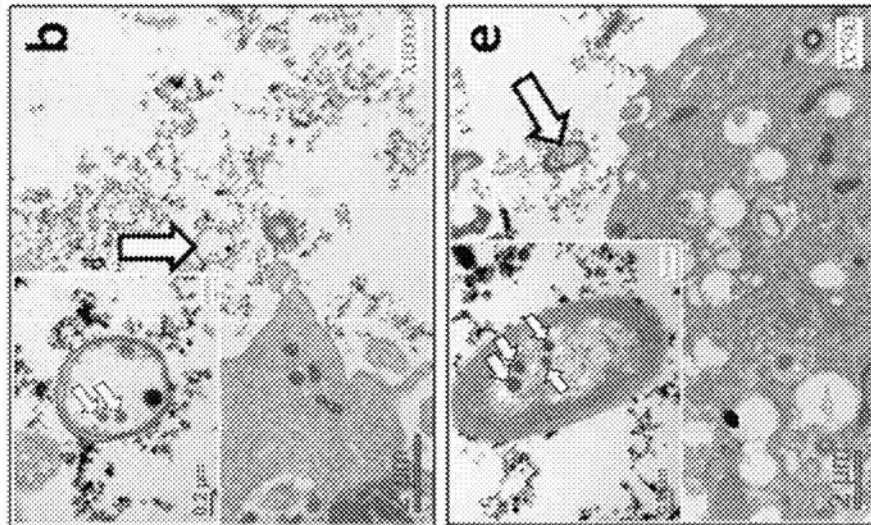


D.

暴露于 HCV(+)血清



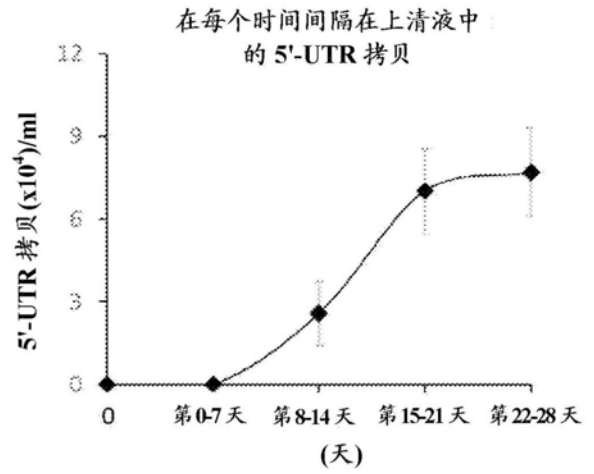
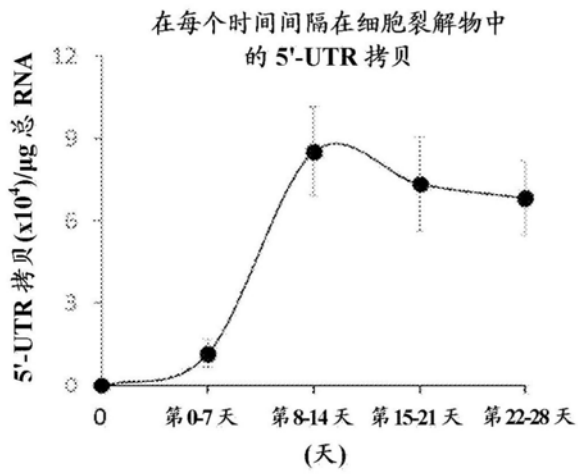
暴露于 HCV(-)血清



D14

D21

E.



E.

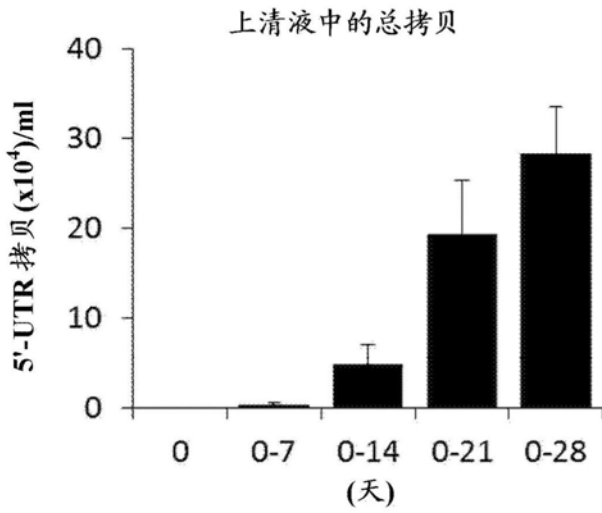
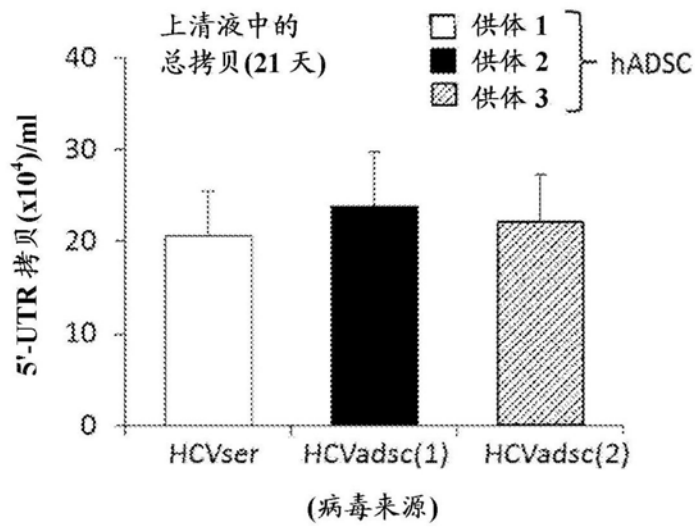
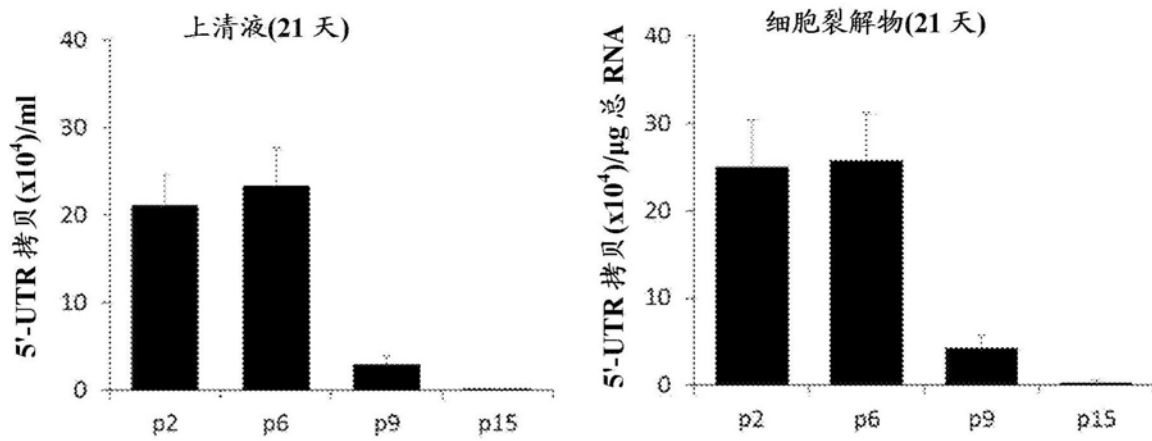


图2

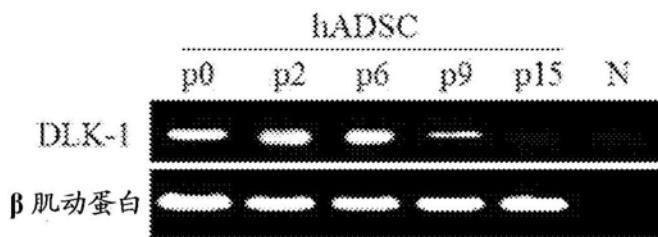
A.



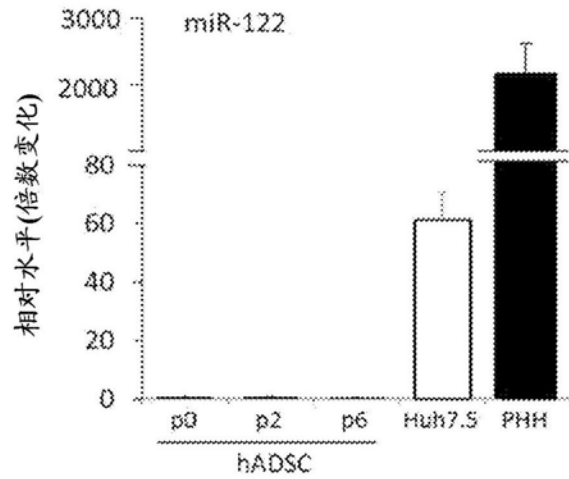
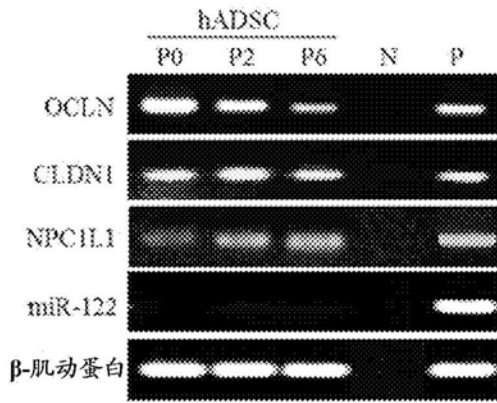
B.



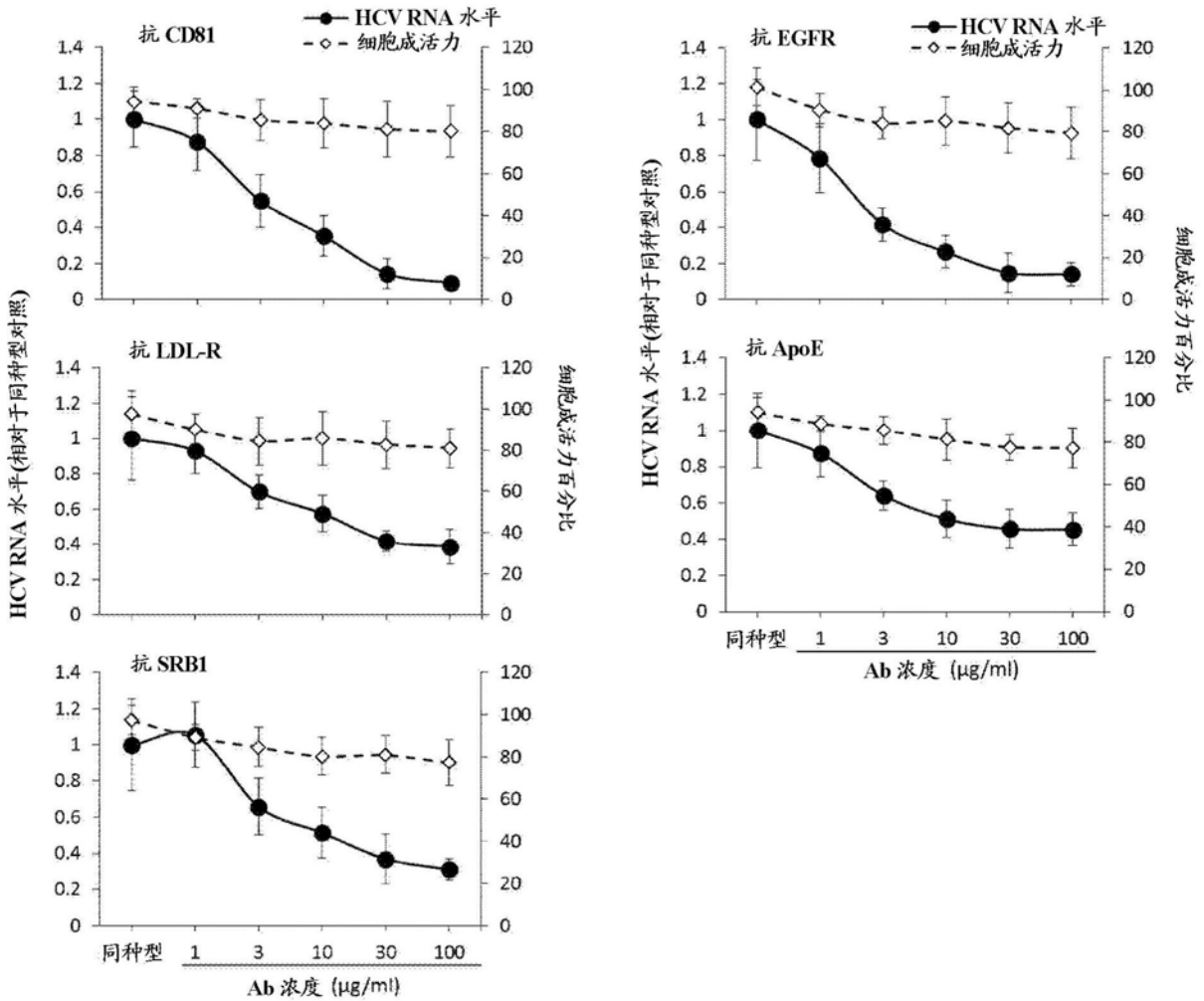
C.



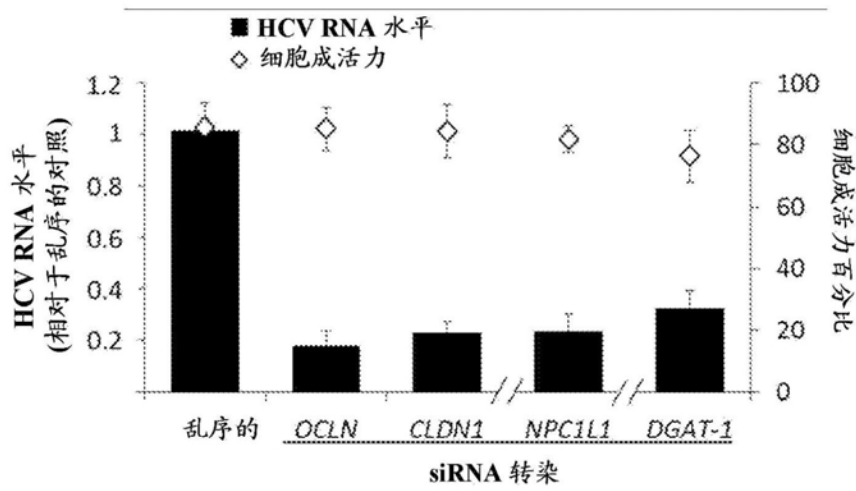
F.



G.



H.



I.

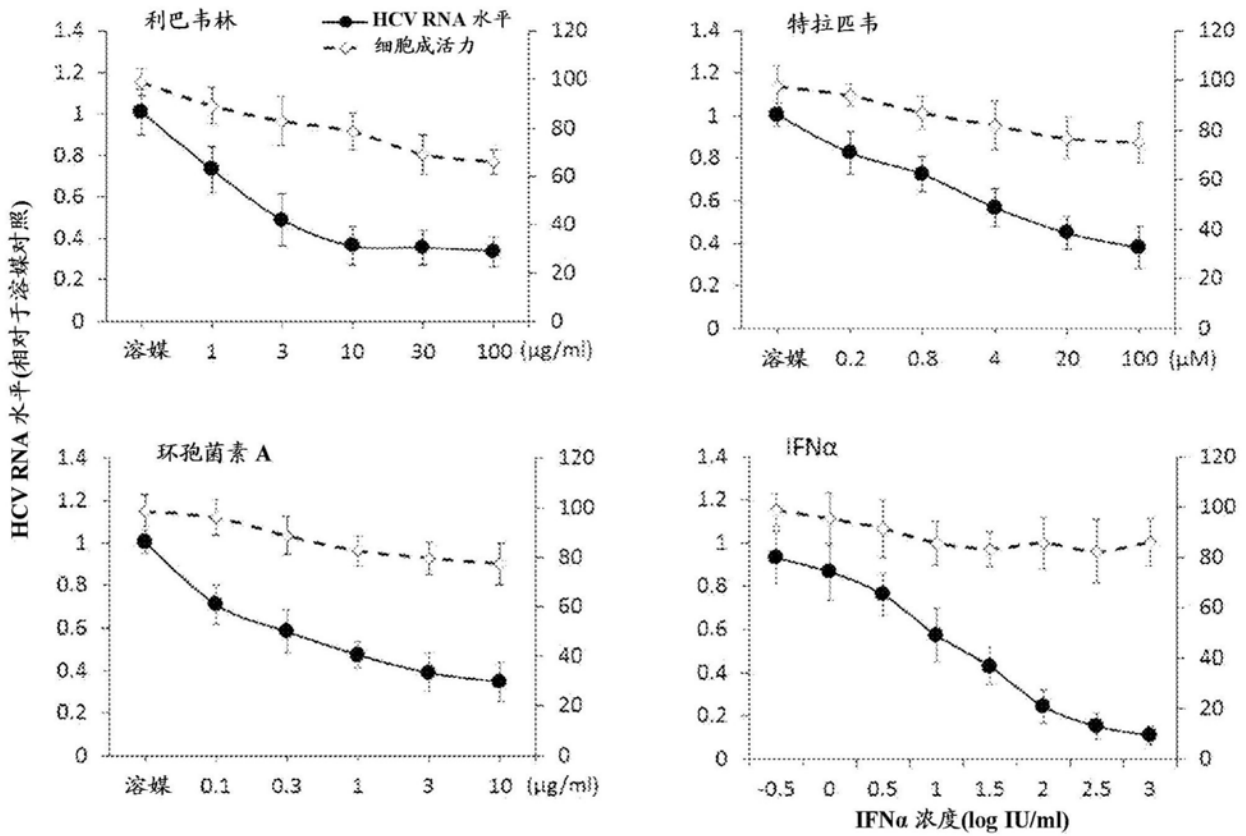
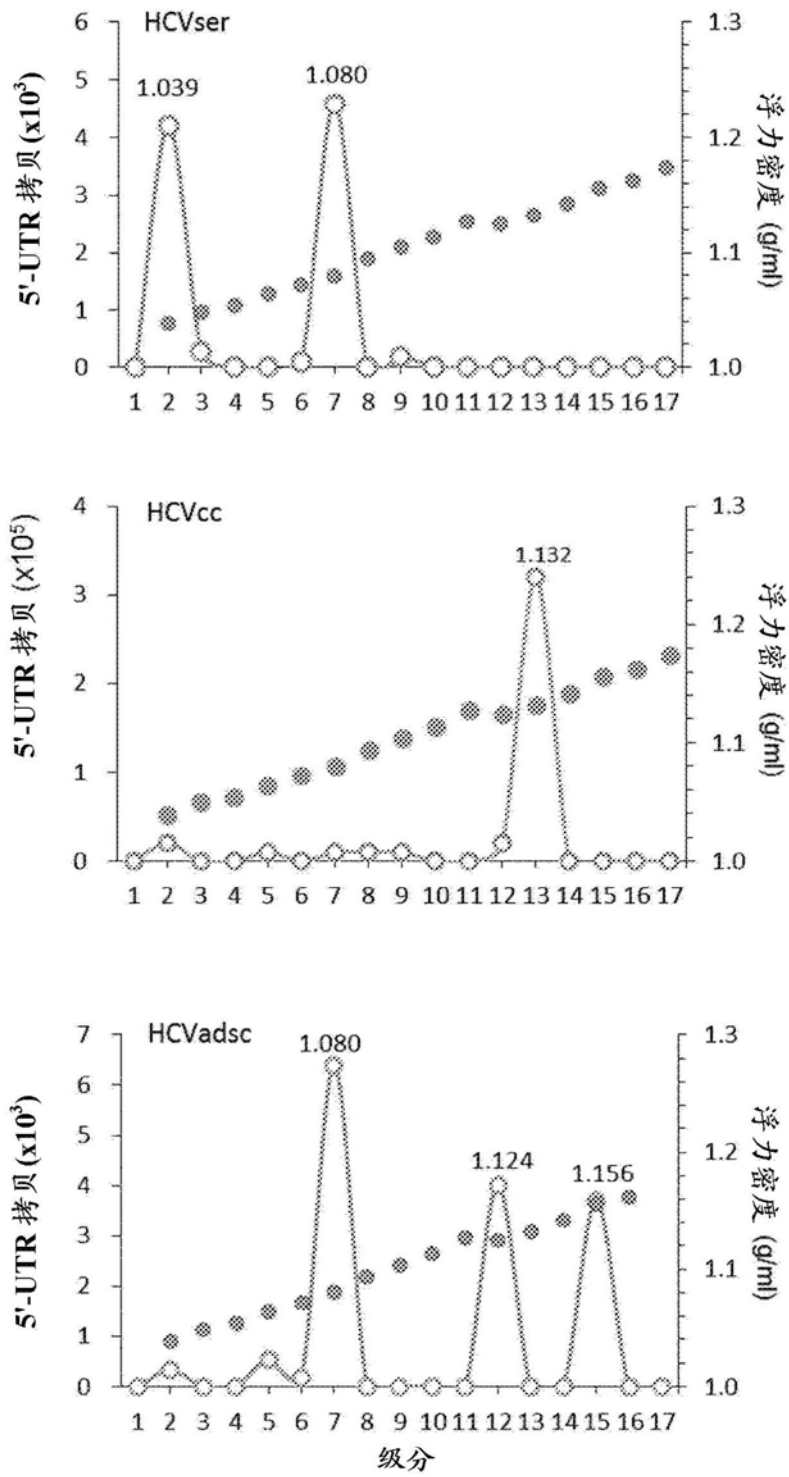
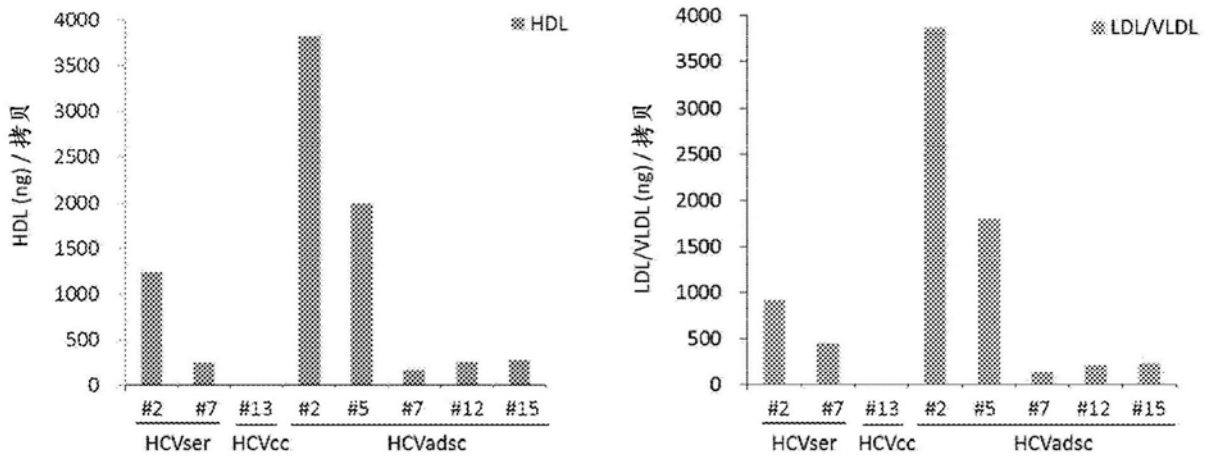


图3

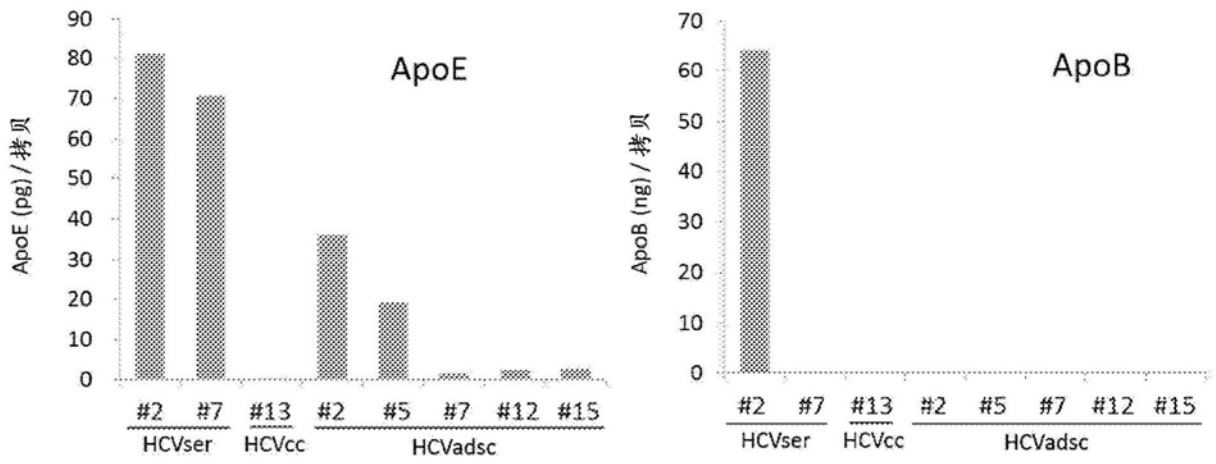
A.



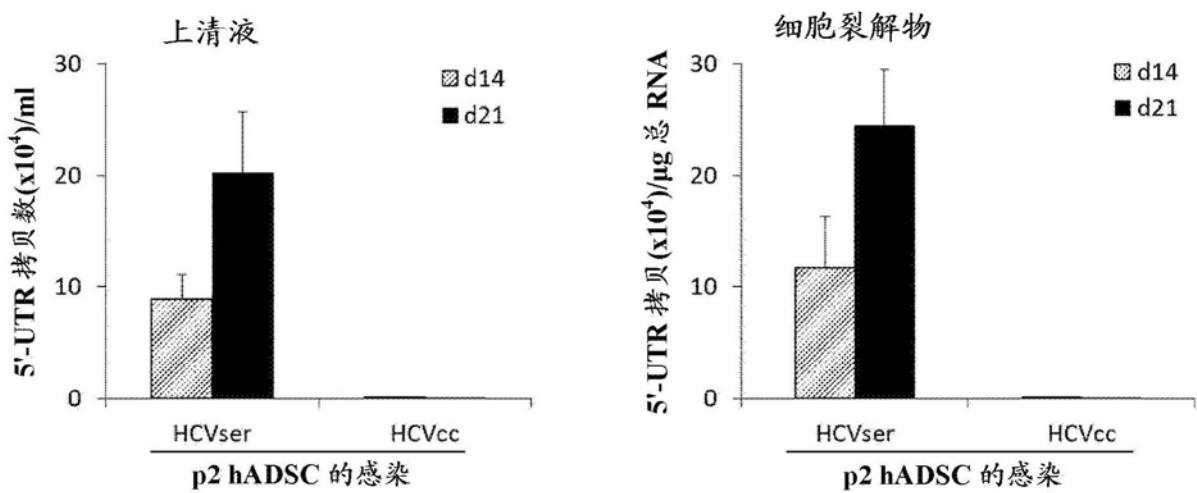
B.



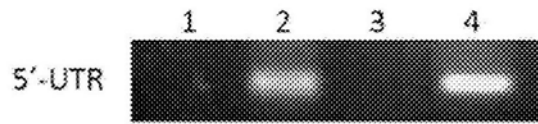
C.



D.

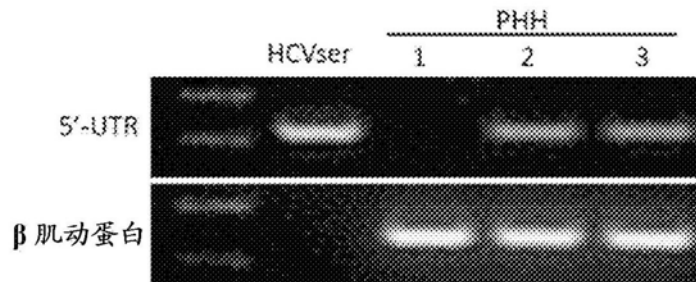


E.



1. 幼稚 Huh7.5 培养上清液
2. HCVcc 感染的 Huh7.5 培养上清液
3. HCVcc 感染的 hADSC 的 21 天的上清液
4. HCVser 感染的 hADSC 的 21 天的上清液

F.



- 1: 被暴露于 HCV(-)对照血清的 hADSC 的 21 天的上清液感染
- 2: 被暴露于 HCVser-1b 的 hADSC 的 21 天的上清液感染
- 3: 被暴露于 HCVser-2b 的 hADSC 的 21 天的上清液感染

G.

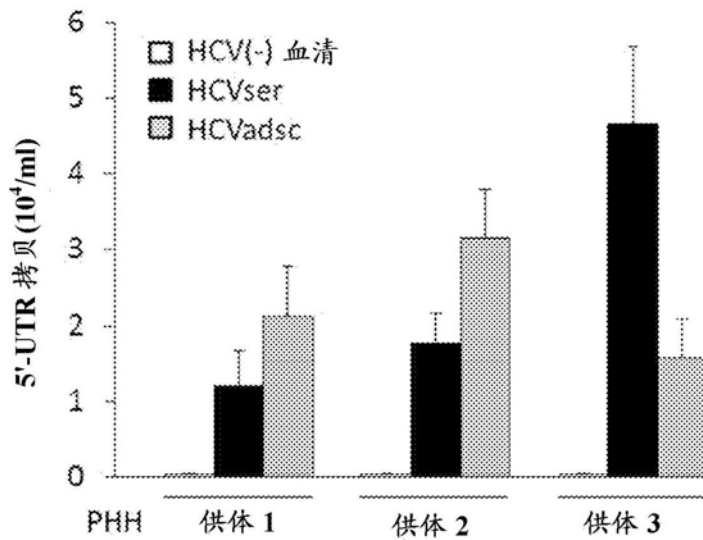


图4

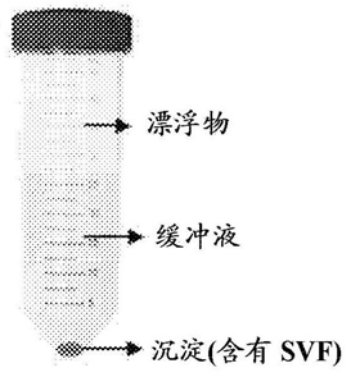
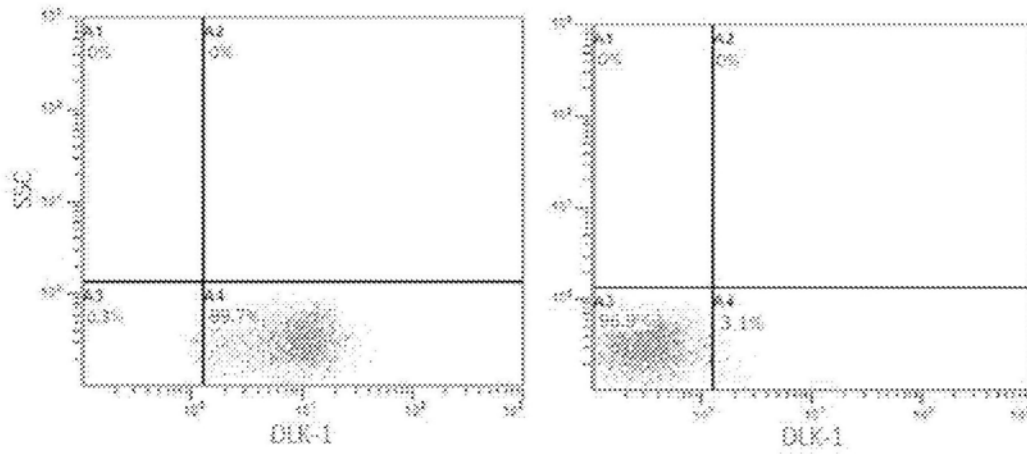


图5

A.



B.

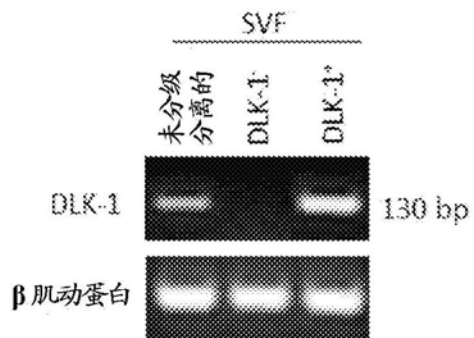


图6

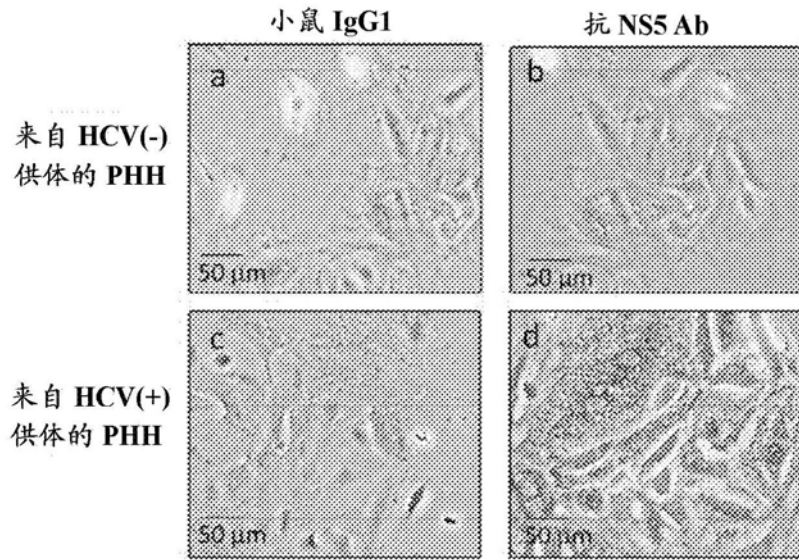


图7

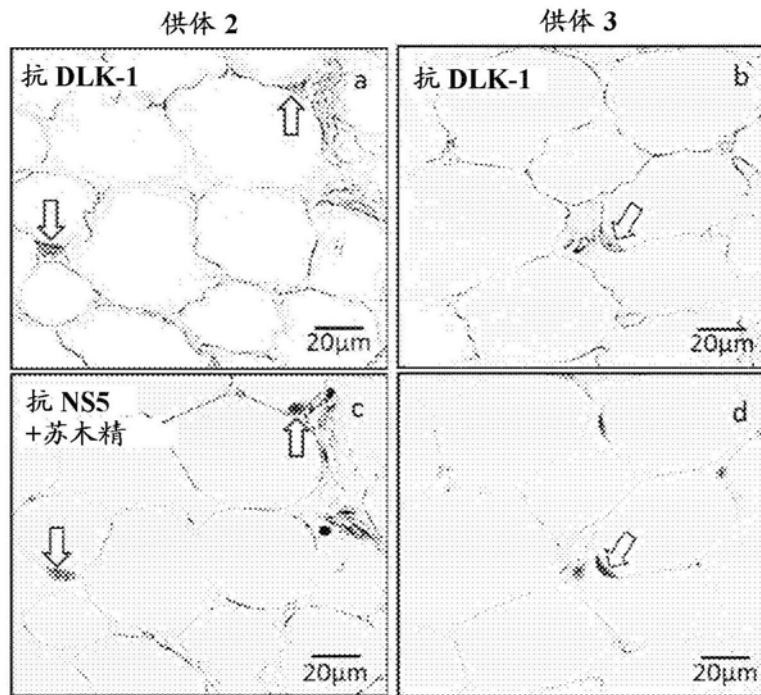


图8

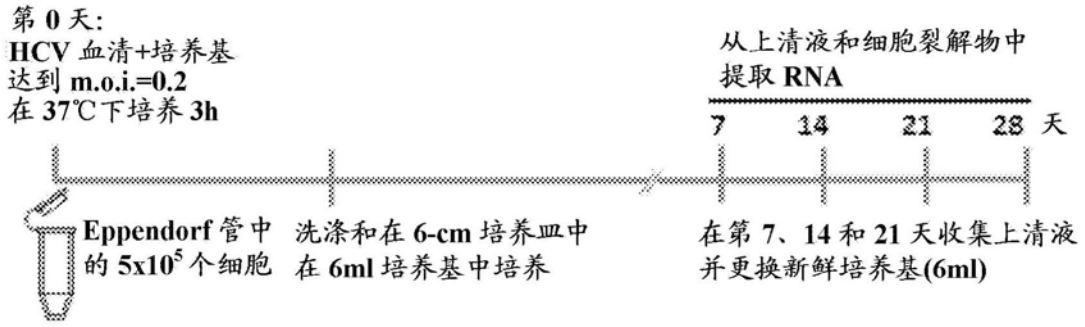


图9

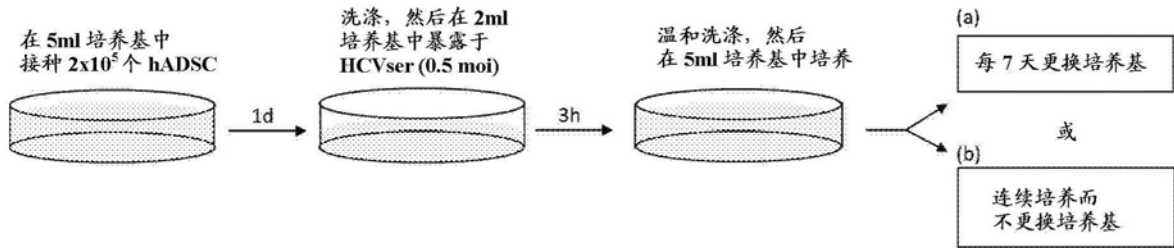


图10

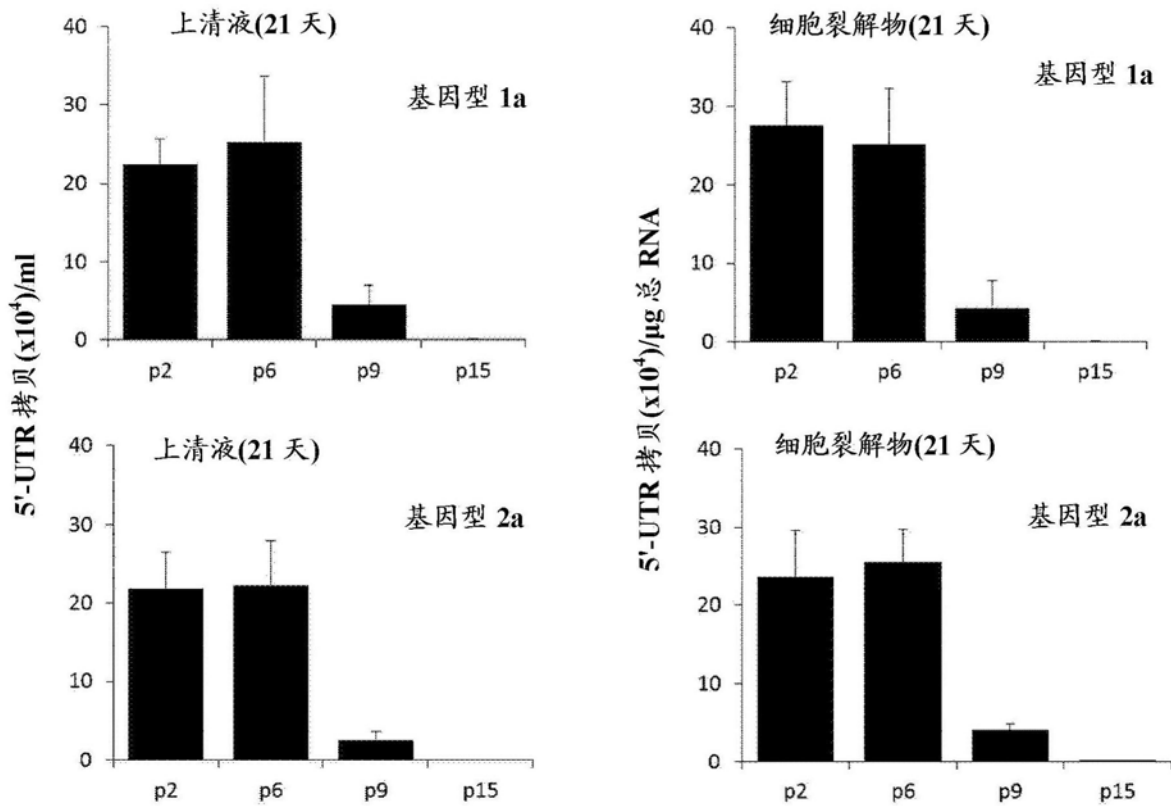


图11

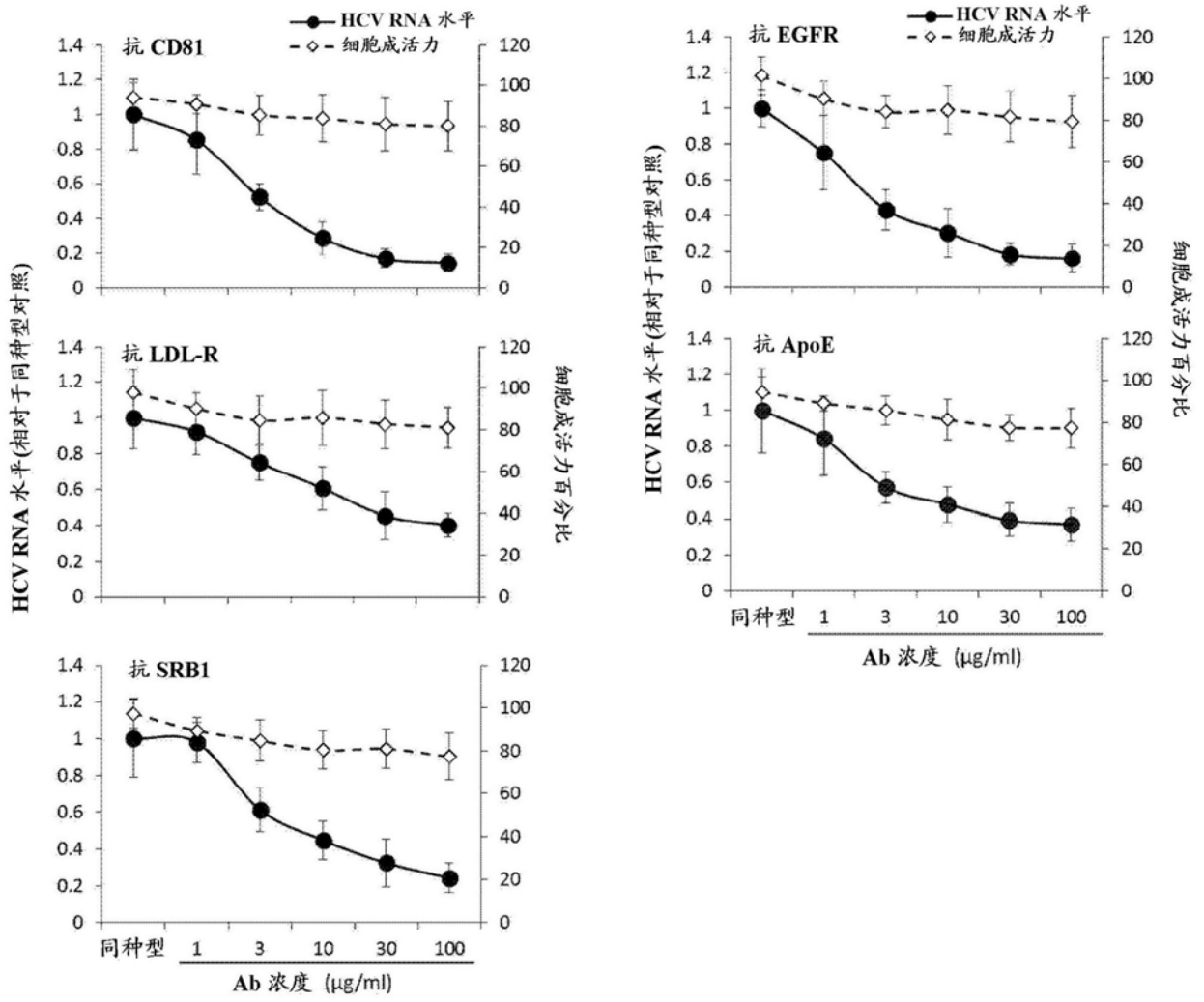


图12

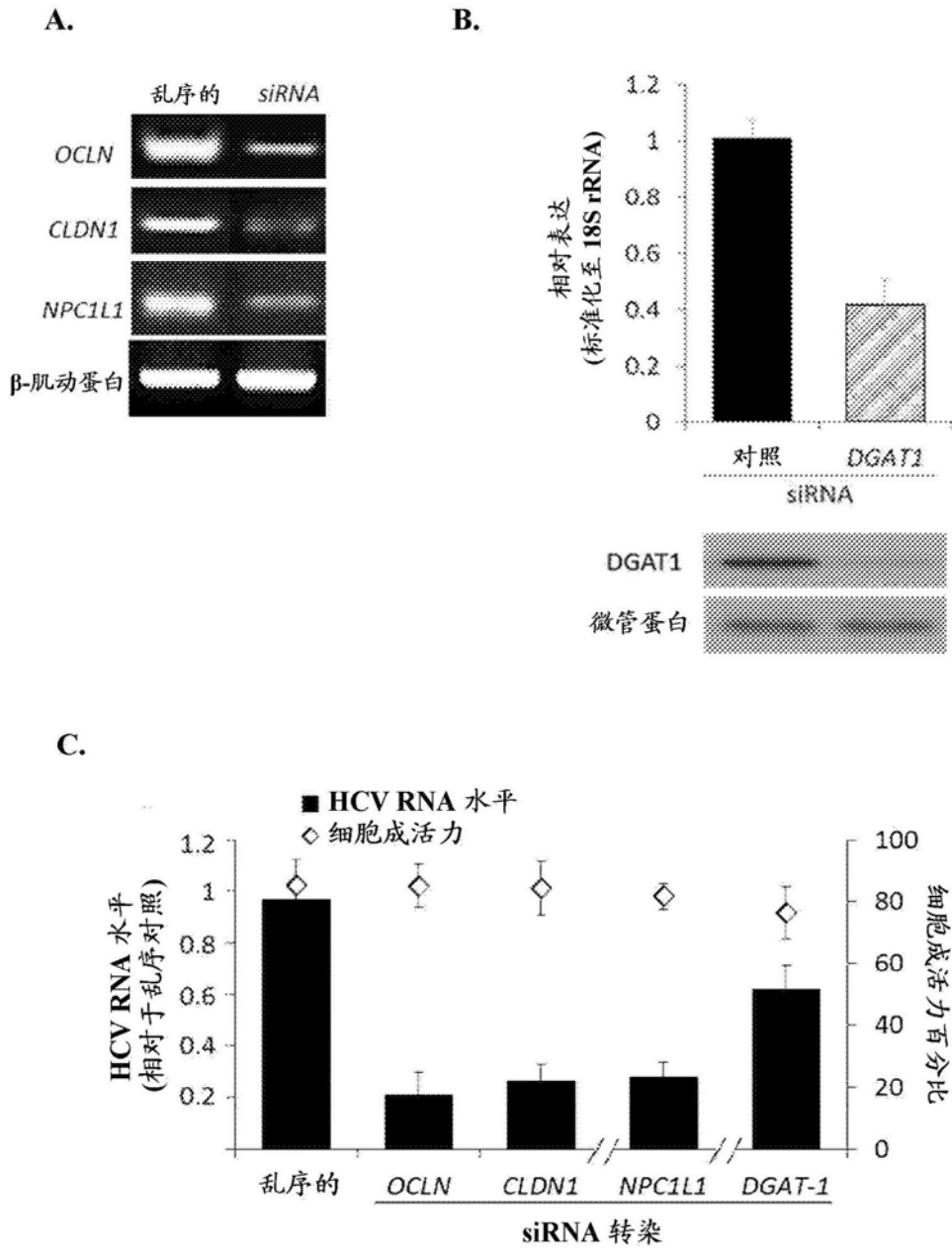


图13

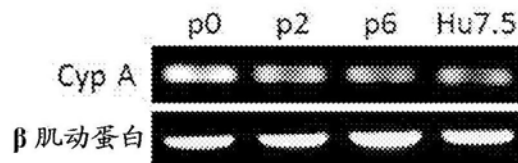
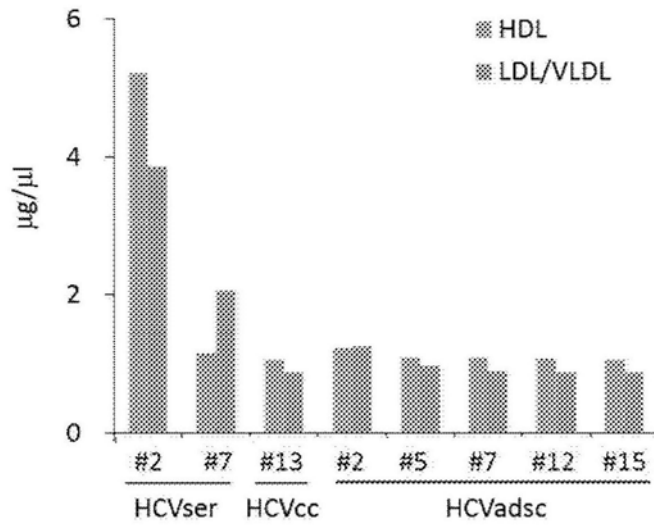
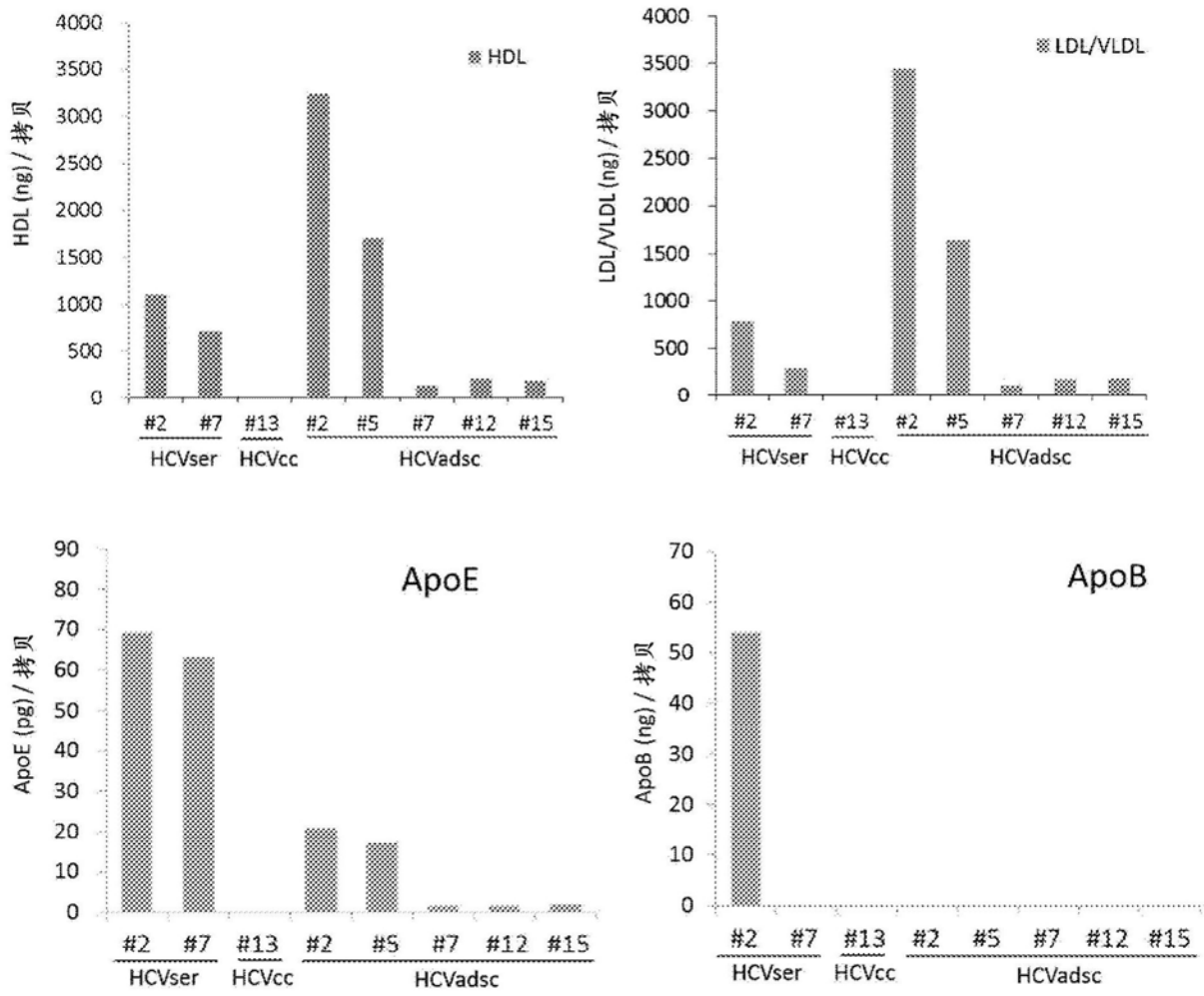


图14

A.



B



C

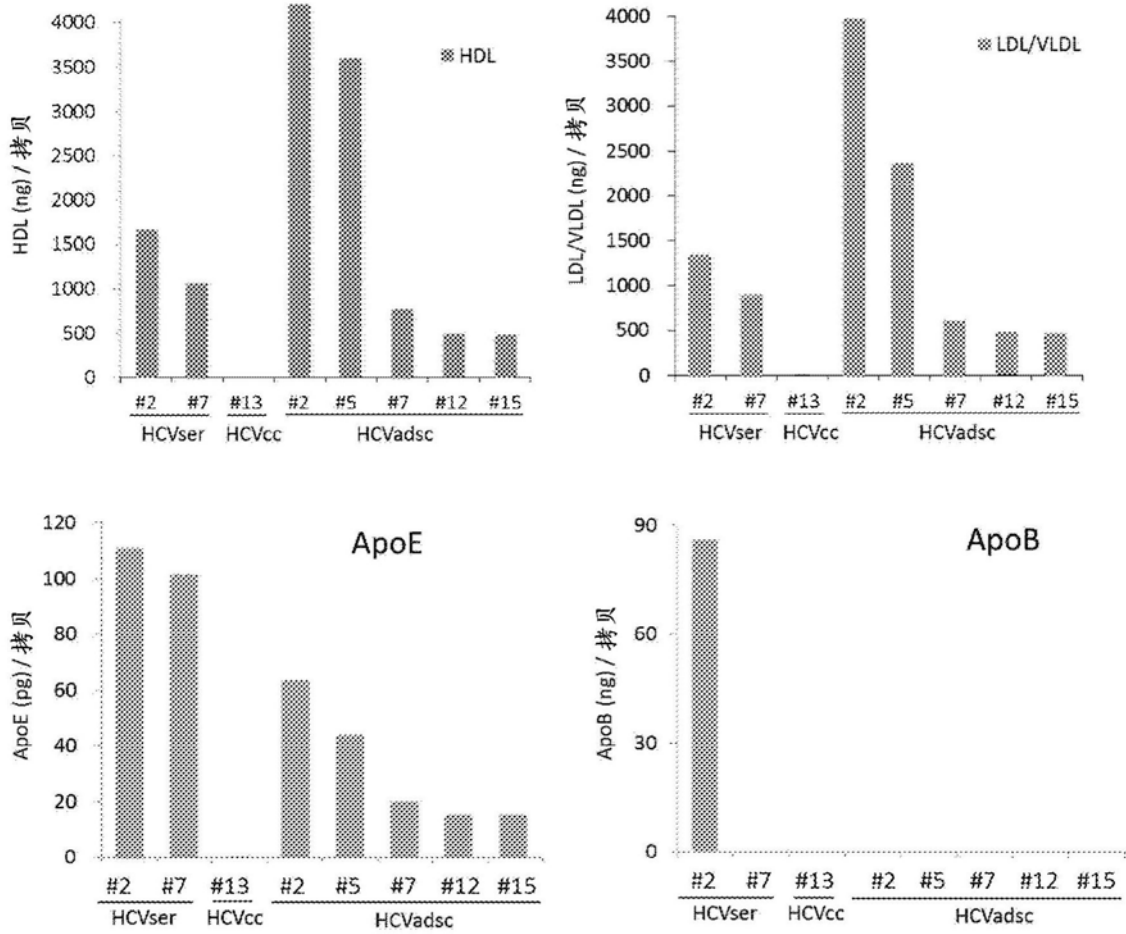


图15

A.

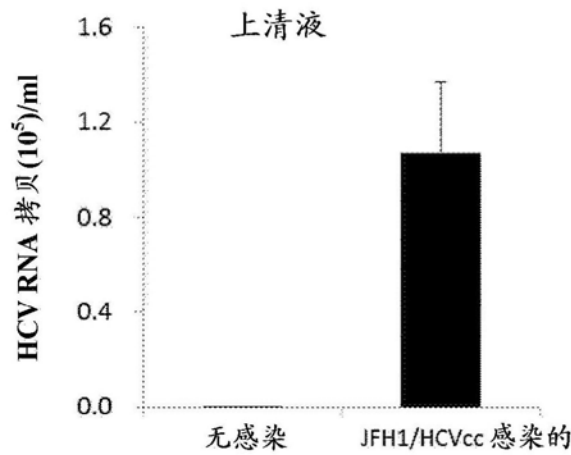


图16