



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107988260 B

(45) 授权公告日 2021.02.09

(21) 申请号 201711220061.9

WO 2014072526 A1,2014.05.15

(22) 申请日 2017.11.29

Alexander König等.Kinetics of the bile acid transporter and hepatitis B virus receptor Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) in hepatocytes.《Journal of Hepatology》.2014,第61卷

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107988260 A

(43) 申请公布日 2018.05.04

Ming Zhou等.hNTCP-expressing primary pig hepatocytes are a valuable tool for investigating hepatitis B virus infection and antiviral drugs.《Mol Med Rep》.2019,第20卷(第4期),

(73) 专利权人 立沃生物科技(深圳)有限公司  
地址 518129 广东省深圳市龙岗区坂田街道华为荔枝苑B5栋1112室

王文等.应用慢病毒载体携带HBV基因组DNA制备乙型肝炎病毒感染小鼠模型的影响因素分析.《病毒学报》.2017,第33卷(第5期),

(72) 发明人 周明

(74) 专利代理机构 北京轻创知识产权代理有限公司 11212

代理人 杨立 付倩

勾英等.慢病毒介导过表达NTCP的NTCP-SK-Hep1细胞系构建.《遵义医学院学报》.2017,第40卷(第2期),

(51) Int.Cl.

C12N 15/867(2006.01)

C12N 5/071(2010.01)

审查员 白鸽

(56) 对比文件

CN 103740637 A,2014.04.23

CN 103509751 A,2014.01.15

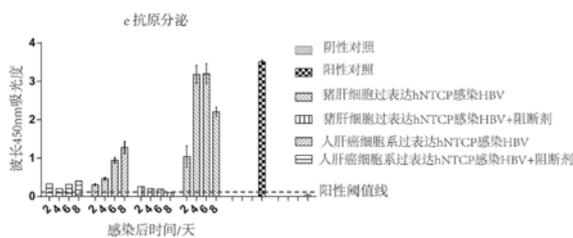
权利要求书2页 说明书11页 附图11页

(54) 发明名称

一种利用猪原代肝细胞和hNTCP重组慢病毒建立乙型肝炎病毒感染细胞模型的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种利用猪原代肝细胞和hNTCP重组慢病毒建立乙型肝炎病毒感染细胞模型的方法,属于细胞改造技术领域。其包括如下步骤:步骤1:制备hNTCP重组慢病毒浓缩液;步骤2:制备消化完全的肝组织;步骤3:制备猪原代肝细胞;步骤4:制备猪原代肝细胞单细胞悬液;步骤5:制备铺板用细胞悬液;步骤6:细胞铺板与培养;步骤7:对猪原代肝细胞进行hNTCP重组慢病毒感染;步骤8:建立乙型肝炎病毒感染细胞模型。本发明在体外构建含hNTCP基因的重组慢病毒,通过高感染效率的慢病毒将hNTCP基因整合到猪原代肝细胞基因组中,实现hNTCP稳定过表达,使猪原代肝细胞支持乙肝感染。



CN 107988260 B

1. 一种利用猪原代肝细胞和hNTCP重组慢病毒建立乙肝病毒感染细胞模型的方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤1:制备hNTCP重组慢病毒浓缩液

利用磷酸钙转染法,将慢病毒包装质粒pCMV dr8.91、慢病毒包装质粒pMD.2G和hNTCP过表达质粒pWPI-hNTCP-Puro按质量比2:1:3,同时转染到293T细胞中,转染后48h收集含慢病毒的培养上清,浓缩后,得到hNTCP重组慢病毒浓缩液;

其中,所述磷酸钙转染法具体为:无菌条件下,向第一个离心管中分别加入450 $\mu$ L去离子水、50 $\mu$ L 2mol/L氯化钙溶液、10 $\mu$ g慢病毒包装质粒pCMV dr8.91、5 $\mu$ g慢病毒包装质粒pMD.2G和15 $\mu$ g hNTCP过表达质粒pWPI-hNTCP-Puro,混匀形成转染溶液I;在另一个离心管中加入500 $\mu$ L 2 $\times$ HBS溶液,边震荡,边滴入转染溶液I,形成转染溶液II,常温静置20min;将转染溶液II加入到直径为10cm、细胞融合度70-80%、含有10mL DMEM转染培养液的293T细胞培养皿中,在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养12h后,将DMEM转染培养液换成新鲜DMEM培养液,即转染结束;

所述浓缩的方法为:先将慢病毒上清置于4 $^{\circ}$ C水平离心机中,3800 $\times$ g/min,离心10min,用0.45 $\mu$ m滤膜过滤后,取15mL过滤液加入到100KD超滤管中,然后再将上述100KD超滤管转移至4 $^{\circ}$ C水平离心机中,4000 $\times$ g/min,离心30min后,即得到hNTCP重组慢病毒浓缩液;

步骤2:制备消化完全的肝组织

通过两步胶原酶灌注法,消化分离猪原代肝细胞,得到消化完全的肝组织;其中,所述两步胶原酶灌注法,是将新鲜的猪肝组织先通过4 $^{\circ}$ C预冷的灌注溶液I灌注20min,直至肝组织中的血液被冲洗干净,再用37 $^{\circ}$ C预热的灌注溶液II灌注30min,直至肝组织失去弹性;

步骤3:制备猪原代肝细胞

将步骤2得到的消化完全的肝组织,转移至含有细胞洗液的培养皿中,得到猪原代肝细胞细胞悬液;

步骤4:制备猪原代肝细胞单细胞悬液

将步骤3得到的猪原代肝细胞细胞悬液,过细胞筛,得到猪原代肝细胞单细胞悬液;

步骤5:制备铺板用细胞悬液

将步骤4得到的单细胞悬液离心,用细胞洗液重悬后,再重复离心3次,用铺板培养液重悬细胞,得到铺板用细胞悬液;

步骤6:细胞铺板与培养

将步骤5得到的铺板用细胞悬液以(1.5-2.5) $\times 10^5$ 活细胞/cm<sup>2</sup>的接种密度,接种到胶原包被的培养板或培养皿中,加入铺板培养液,摇匀,在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养4-6h后,将铺板培养液换成肝细胞维持培养基PMM,得到培养好的猪原代肝细胞;

步骤7:对猪原代肝细胞进行hNTCP重组慢病毒感染

将步骤1得到的hNTCP重组慢病毒浓缩液,以感染复数为1感染步骤6得到的培养好的猪原代肝细胞,感染孵育24h,换成新鲜的肝细胞维持培养基PMM,每2天换1次,感染后第4天检测hNTCP蛋白表达,得到hNTCP蛋白过表达的猪原代肝细胞;

步骤8:建立乙肝病毒感染细胞模型

向步骤7得到的hNTCP蛋白过表达的猪原代肝细胞中,先加入乙肝病毒感染阻断剂,孵育30min后,再以感染复数为1000感染乙肝病毒,感染16-24h后换成新鲜的肝细胞维持培养

基PMM,每2天更换1次,感染后第8天检测乙肝病毒感染指标,即得到所述利用猪原代肝细胞和hNTCP重组慢病毒建立乙肝病毒感染细胞模型。

2. 根据权利要求1所述的一种利用猪原代肝细胞和hNTCP重组慢病毒建立乙肝病毒感染细胞模型的方法,其特征在于,所述DMEM转染培养液,为DMEM培养基中加入10%v/v胎牛血清;所述新鲜DMEM培养液,为DMEM培养基中加入100units/mL青霉素、100mg/mL链霉素和10%v/v胎牛血清。

3. 根据权利要求1所述的一种利用猪原代肝细胞和hNTCP重组慢病毒建立乙肝病毒感染细胞模型的方法,其特征在于,所述灌注溶液I为D-Hank' s溶液中含有2mmol/l乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸的混合液,pH值为7.4,0.22 $\mu$ m滤膜过滤,4 $^{\circ}$ C保存;所述灌注溶液II为D-Hank' s溶液中含有5mmol/l氯化钙、0.1g/l六水氯化镁、0.3g/l IV型胶原酶、1.0g/l II型分离酶、50mg/l核酸酶的混合液,pH值为7.4,0.22 $\mu$ m滤膜过滤,4 $^{\circ}$ C保存。

4. 根据权利要求1所述的一种利用猪原代肝细胞和hNTCP重组慢病毒建立乙肝病毒感染细胞模型的方法,其特征在于,步骤5中,所述离心的条件均为50 $\times$ g,4 $^{\circ}$ C,离心的时间为5min;所述铺板培养液,是在William' s E培养基里加入1%v/v的ITS+premix、2mmol/l谷氨酰胺、10 $\mu$ g/l表皮生长因子、18mg/l氢化可的松、40 $\mu$ g/l地塞米松、100units/mL青霉素、100mg/mL链霉素、5%v/v胎牛血清。

5. 根据权利要求1所述的一种利用猪原代肝细胞和hNTCP重组慢病毒建立乙肝病毒感染细胞模型的方法,其特征在于,步骤6中,所述胶原包被的培养板或培养皿的制备方法为:将172 $\mu$ L冰醋酸加入到100mL去离子水中,再加入终浓度为50 $\mu$ g/mL的IV型鼠尾胶原,无菌条件下,用0.22 $\mu$ m滤膜过滤除菌后,得到胶原工作液,4 $^{\circ}$ C保持待用;将该胶原工作液以5 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>的包被量加入到需要包被的培养板或培养皿中,常温孵育1h后,将胶原工作液吸出,自然晾干后封口,4 $^{\circ}$ C保藏;所述肝细胞维持培养基PMM,是在William' s E培养基里加入1%v/v的ITS+premix、2mmol/l谷氨酰胺、10 $\mu$ g/l表皮生长因子、18mg/l氢化可的松、40 $\mu$ g/l地塞米松、100units/mL青霉素、100mg/mL链霉素和2%v/v DMSO。

6. 根据权利要求1所述的一种利用猪原代肝细胞和hNTCP重组慢病毒建立乙肝病毒感染细胞模型的方法,其特征在于,步骤8中,所述乙肝病毒感染阻断剂的浓度分别为500nmol/L、50nmol/L、5nmol/L、0.5nmol/L、0.05nmol/L、0nmol/L,所述乙肝病毒感染阻断剂为Myr-PreS1<sup>2-47</sup>;所述乙肝病毒感染指标为乙肝病毒表面抗原、乙肝病毒e抗原和细胞内乙肝病毒核心抗原。

## 一种利用猪原代肝细胞和hNTCP重组慢病毒建立乙肝病毒感染细胞模型的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种利用猪原代肝细胞和hNTCP重组慢病毒建立乙肝病毒感染细胞模型的方法,属于细胞改造技术领域。

### 背景技术

[0002] 乙肝病毒(英文缩写为HBV)感染是中国的“国病”,中国约有9000万乙肝携带者,每年死于乙肝感染相关疾病的人数约一百万。由于缺乏合适的HBV感染细胞模型,抗HBV药物的研发相对滞后。尽管乙肝疫苗可以保护健康人免受乙肝侵扰,但对于基数庞大的乙肝携带者,目前尚无治愈性药物。HBV感染细胞模型及动物模型对于抗HBV药物研发至关重要。

[0003] 长期以来,抗HBV药物筛选与评价的细胞模型局限于肝癌细胞系如HepG2、HepG2.2.15、Huh7等等。由于这些细胞系去分化严重,与体内肝细胞相比在分化状态上相差甚远,所以在筛选与评价抗HBV药物时不能反映药物真实的抗病毒效果与细胞毒作用。 $\text{Na}^+$ /牛磺胆盐共转运多肽(human  $\text{Na}^+$ /taurocholate cotransporting polypeptide, hNTCP)被证明是乙肝受体后,基于肝癌细胞系HepG2、Huh7构建了HBV感染细胞模型,在HBV基础研究及抗HBV药物研发中发挥着重要作用。但这类细胞系的分化状态相对较低,且感染效果不理想。

[0004] 人原代肝细胞由于保持了肝内环境的原始状态,在抗HBV药物研发中被公认为“金标准”。人原代肝细胞是HBV研究及抗病毒药物研发的最佳模型,但人原代肝细胞存在来源有限、批次差异大、医学伦理问题等缺点,这种细胞并不能在HBV基础研究及抗HBV药物研发中被广泛使用。实验证实,来自于小鼠和大鼠的肝癌细胞系在过表达hNTCP后仍然不支持HBV感染,说明HBV对人肝细胞的高度嗜性与种属特异性,其它动物的肝细胞很有可能不支持HBV感染,这形成了一种偏见。

[0005] 基于猪与人遗传距离相近、肝脏转录组相似性及猪血清流行病学调查,在猪原代肝细胞中过表达hNTCP后极有可能支持HBV感染,从而制备出HBV易感的原代细胞模型及动物感染模型。再者,由于普通转染试剂如Lipo2000和电转染,极难实现对原代肝细胞的高效基因操作。而慢病毒可实现对原代肝细胞的高效感染与基因整合表达。但目前,尚未有利用猪原代肝细胞和hNTCP重组慢病毒建立乙肝病毒感染细胞模型的方法。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的是解决现有技术的不足,提供一种利用猪原代肝细胞和hNTCP重组慢病毒建立乙肝病毒感染细胞模型的方法。本发明在体外构建含hNTCP基因的重组慢病毒,通过高感染效率的慢病毒将hNTCP基因整合到猪原代肝细胞基因组中,实现hNTCP稳定过表达,使猪原代肝细胞支持乙肝感染。

[0007] 本发明解决上述技术问题的技术方案如下:一种利用猪原代肝细胞和hNTCP重组慢病毒建立乙肝病毒感染细胞模型的方法,包括如下步骤:

- [0008] 步骤1:制备hNTCP重组慢病毒浓缩液
- [0009] 利用磷酸钙转染法,将慢病毒包装质粒pCMV dr8.91、慢病毒包装质粒pMD.2G和hNTCP过表达质粒pWPI-hNTCP-Puro按质量比2:1:3,同时转染到293T细胞中,转染后48h收集含慢病毒的培养上清,浓缩后,得到hNTCP重组慢病毒浓缩液;
- [0010] 步骤2:制备消化完全的肝组织
- [0011] 通过两步胶原酶灌注法,消化分离猪原代肝细胞,得到消化完全的肝组织;
- [0012] 步骤3:制备猪原代肝细胞
- [0013] 将步骤2得到的消化完全的肝组织,转移至含有细胞洗液的培养皿中,得到猪原代肝细胞细胞悬液;
- [0014] 步骤4:制备猪原代肝细胞单细胞悬液
- [0015] 将步骤3得到的猪原代肝细胞细胞悬液,过细胞筛,得到猪原代肝细胞单细胞悬液;
- [0016] 步骤5:制备铺板用细胞悬液
- [0017] 将步骤4得到的单细胞悬液离心,用细胞洗液重悬后,再重复离心3次,用铺板培养液重悬细胞,得到铺板用细胞悬液;
- [0018] 步骤6:细胞铺板与培养
- [0019] 将步骤5得到的铺板用细胞悬液以 $(1.5-2.5) \times 10^5$ 活细胞/cm<sup>2</sup>的接种密度,接种到胶原包被的培养板或培养皿中,加入铺板培养液,摇匀,在37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养4-6h后,将铺板培养液换成肝细胞维持培养基PMM,得到培养好的猪原代肝细胞;
- [0020] 步骤7:对猪原代肝细胞进行hNTCP重组慢病毒感染
- [0021] 将步骤1得到的hNTCP重组慢病毒浓缩液,以感染复数为1感染步骤6得到的培养好的猪原代肝细胞,感染孵育24h,换成新鲜的肝细胞维持培养基PMM,每2天换1次,感染后第4天检测hNTCP蛋白表达,得到hNTCP蛋白过表达的猪原代肝细胞;
- [0022] 步骤8:建立乙肝病毒感染细胞模型
- [0023] 向步骤7得到的hNTCP蛋白过表达的猪原代肝细胞中,先加入乙肝病毒感染阻断剂,孵育30min后,再以感染复数为1000感染乙肝病毒,感染16-24h后换成新鲜的肝细胞维持培养基PMM,每2天更换1次,感染后第8天检测乙肝病毒感染指标,即得到所述利用猪原代肝细胞和hNTCP重组慢病毒建立乙肝病毒感染细胞模型。
- [0024] 本发明通过慢病毒介导的hNTCP过表达,经乙肝病毒感染证实猪原代肝细胞支持乙肝病毒感染,其对乙肝病毒的易感性相较于hNTCP稳转肝癌细胞系更高,且可用于抗乙肝病毒药物测试。此外,猪原代肝细胞相对于人原代肝细胞,来源不受限制、细胞批次间差异小、不存在医学伦理问题,是理想细胞模型。
- [0025] 在上述技术方案的基础上,本发明还可以做如下改进。
- [0026] 进一步,步骤1中,所述慢病毒包装质粒pCMV dr8.91、慢病毒包装质粒pMD.2G和hNTCP过表达质粒pWPI-Puro均来自于全球质粒共享Addgene网站。hNTCP过表达质粒pWPI-hNTCP-Puro是将hNTCP通过分子克隆方法克隆到pWPI-Puro载体中。293T细胞,由人肾上皮细胞系293细胞通过基因技术派生出的细胞系,能表达SV40大T抗原,是生产慢病毒常用的细胞系,购买于中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection,简称CCTCC)。

[0027] 进一步,步骤1中,所述磷酸钙转染法具体为:无菌条件下,向第一个离心管中分别加入450 $\mu$ L去离子水、50 $\mu$ L 2mol/L氯化钙溶液、10 $\mu$ g慢病毒包装质粒pCMV dr8.91、5 $\mu$ g慢病毒包装质粒pMD.2G和15 $\mu$ g hNTCP过表达质粒pWPI-hNTCP-Puro,混匀形成转染溶液I;在另一个离心管中加入500 $\mu$ L 2 $\times$ HBS溶液,边震荡,边滴入转染溶液I,形成转染溶液II,常温静置20min;将转染溶液II加入到直径为10cm、细胞融合度70-80%、含有10mL DMEM转染培养液的293T细胞培养皿中,在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养12h后,将DMEM转染培养液换成新鲜DMEM培养液,即转染结束。

[0028] 更进一步,所述2 $\times$ HBS溶液,是在400mL去离子水中加入8.00g氯化钠、0.38g氯化钾、0.10g磷酸氢二钠、5.00g羟乙基哌嗪乙磺酸、1.00g葡萄糖,调节pH值为7.05,定容至500mL,用0.22 $\mu$ m滤膜过滤除菌,保存于-20 $^{\circ}$ C所得。

[0029] 更进一步,所述DMEM转染培养液,为DMEM培养基中加入10%v/v胎牛血清。其中,DMEM培养基、胎牛血清,均购至美国GIBCO公司。

[0030] 采用上述更进一步的有益效果是:DMEM转染培养液无抗生素。

[0031] 更进一步,所述新鲜DMEM培养液,为DMEM培养基中加入100units/mL青霉素、100mg/mL链霉素和10%v/v胎牛血清。

[0032] 其中,DMEM培养基、胎牛血清、青霉素、链霉素,均购至美国GIBCO公司。

[0033] 进一步,步骤1中,所述浓缩的方法为:先将慢病毒上清置于4 $^{\circ}$ C水平离心机中,3800 $\times$ g/min,离心10min,用0.45 $\mu$ m滤膜过滤后,取15mL过滤液加入到100KD超滤管中,然后再将上述100KD超滤管转移至4 $^{\circ}$ C水平离心机中,4000 $\times$ g/min,离心30min后,即得到hNTCP重组慢病毒浓缩液。

[0034] 采用上述进一步的有益效果是:浓缩分为两次离心,第一次离心,是为了初步去除死细胞或大的细胞碎片。0.45 $\mu$ m滤膜过滤,是为了去除小的细胞碎片。第二次离心,是为了截留分子量大于100道尔顿的分子,包括hNTCP重组慢病毒,以达到浓缩的目的。

[0035] 上述100KD超滤管,购自美国Millipore公司。

[0036] 进一步,步骤2中,所述两步胶原酶灌注法,是将新鲜的猪肝组织先通过4 $^{\circ}$ C预冷的灌注溶液I灌注20min,直至肝组织中的血液被冲洗干净,再用37 $^{\circ}$ C预热的灌注溶液II灌注30min,直至肝组织失去弹性。

[0037] 更进一步,所述灌注溶液I为D-Hank's溶液中含有2mmol/l乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸的混合液,pH值为7.4,0.22 $\mu$ m滤膜过滤,4 $^{\circ}$ C保存。

[0038] 更进一步,所述灌注溶液II为D-Hank's溶液中含有5mmol/l氯化钙、0.1g/l六水氯化镁、0.3g/lIV型胶原酶、1.0g/l II型分离酶、50mg/l核酸酶的混合液,pH值为7.4,0.22 $\mu$ m滤膜过滤,4 $^{\circ}$ C保存。

[0039] 其中,IV型胶原酶,购自美国Sigma公司。II型分离酶,即Dispase II,购自瑞士Roche公司。核酸酶,即DNase I,购自中国Solarbio公司。

[0040] 更进一步,所述D-Hank's溶液中含有8.00g/l氯化钠、0.40g/l氯化钾、0.06g/l二水磷酸氢二钠、0.06g/l磷酸二氢钾和0.35g/l碳酸氢钠。

[0041] 进一步,步骤3中,所述细胞洗液,为DMEM培养基中加入100units/mL青霉素、100mg/mL链霉素和10%v/v胎牛血清。

[0042] 进一步,步骤4中,所述细胞筛的孔径为70 $\mu$ m。

- [0043] 进一步,步骤5中,所述离心的条件均为 $50\times g$ , $4^{\circ}\text{C}$ ,离心的时间为5min。
- [0044] 进一步,步骤5中,所述铺板培养液,是在William's E培养基里加入1%v/v的ITS+premix、2mmol/l谷氨酰胺、 $10\mu\text{g}/\text{l}$ 表皮生长因子、18mg/l氢化可的松、 $40\mu\text{g}/\text{l}$ 地塞米松、100units/mL青霉素、100mg/mL链霉素、5%v/v胎牛血清。
- [0045] 其中,William's E培养基,简称WE,购自美国GIBCO公司。ITS+premix,购自美国GIBCO公司。表皮生长因子,购自美国R&D公司。胎牛血清,购自美国GIBCO公司。
- [0046] 更进一步,所述ITS+premix为100倍母液,含有 $6.25\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰岛素、 $6.25\mu\text{g}/\text{mL}$ 转铁蛋白、 $6.25\text{ng}/\text{mL}$ 亚硒酸、 $1.25\text{mg}/\text{mL}$ 牛血清白蛋白和 $5.35\mu\text{g}/\text{mL}$ 亚油酸。
- [0047] 进一步,步骤6中,所述胶原包被的培养板或培养皿的制备方法为:将 $172\mu\text{L}$ 冰醋酸加入到100mL去离子水中,再加入终浓度为 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 的IV型鼠尾胶原,无菌条件下,用 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌后,得到胶原工作液, $4^{\circ}\text{C}$ 保持待用;将该胶原工作液以 $5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的包被量加入到需要包被的培养板或培养皿中,常温孵育1h后,将胶原工作液吸出,自然晾干后封口, $4^{\circ}\text{C}$ 保藏。
- [0048] 其中,上述胶原包被的培养板或培养皿使用前,需用PBS清洗一次,以去除残留的冰醋酸。
- [0049] 进一步,步骤6中,所述肝细胞维持培养基PMM,是在William's E培养基里加入1%v/v的ITS+premix、2mmol/l谷氨酰胺、 $10\mu\text{g}/\text{l}$ 表皮生长因子、18mg/l氢化可的松、 $40\mu\text{g}/\text{l}$ 地塞米松、100units/mL青霉素、100mg/mL链霉素和2%v/v DMSO。
- [0050] 其中,William's E培养基,简称WE,购自美国GIBCO公司。ITS+premix,购自美国GIBCO公司。表皮生长因子,购自美国R&D公司。胎牛血清,购自美国GIBCO公司。
- [0051] 更进一步,所述ITS+premix为100倍母液,含有 $6.25\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰岛素、 $6.25\mu\text{g}/\text{mL}$ 转铁蛋白、 $6.25\text{ng}/\text{mL}$ 亚硒酸、 $1.25\text{mg}/\text{mL}$ 牛血清白蛋白和 $5.35\mu\text{g}/\text{mL}$ 亚油酸。
- [0052] 进一步,步骤8中,所述乙肝病毒感染阻断剂的浓度分别为 $500\text{nmol}/\text{L}$ 、 $50\text{nmol}/\text{L}$ 、 $5\text{nmol}/\text{L}$ 、 $0.5\text{nmol}/\text{L}$ 、 $0.05\text{nmol}/\text{L}$ 、 $0\text{nmol}/\text{L}$ ,所述乙肝病毒感染阻断剂为Myr-PreS1<sup>2-47</sup>。
- [0053] 上述乙肝病毒感染阻断剂Myr-PreS1<sup>2-47</sup>购自于吉尔生化(上海)有限公司,氨基酸序列为Myristoyl-GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNPDWDFNPNKDHWPENKVG,其中氨基端为肉豆蔻酰化(Myristoyl)修饰。
- [0054] 进一步,步骤8中,所述乙肝病毒感染指标为上清中乙肝病毒表面抗原、乙肝病毒e抗原和细胞内乙肝病毒核心抗原。
- [0055] 本发明的有益效果:
- [0056] (1) 本发明构建的慢病毒可对猪原代肝细胞进行高效的感染,并且将hNTCP整合到基因组中,实现hNTCP的高效稳定表达,模拟人原代肝细胞的原始状态。
- [0057] (2) 本发明分离到高活力猪原代肝细胞,以高密度方式铺板,在肝细胞维持培养基PMM中形成100%融合度的单层细胞培养,可维持肝细胞分化特性约1个月,为慢病毒感染、hNTCP表达、乙肝病毒感染及后续病毒复制与释放提供了充足的时间保障。
- [0058] (3) 本发明建立hNTCP稳定表达的猪肝原代细胞,支持乙肝病毒高效的感染,其易感性相对于hNTCP稳定表达的肝癌细胞系效率更高,分化状态更高,有望替代人原代肝细胞而在乙肝病毒基础研究和抗乙肝病毒药物评价中发挥主要作用。
- [0059] (4) 相对于人原代肝细胞,本发明得到的hNTCP稳定表达的猪肝原代细胞具有来源

不受限制、细胞批次差异小、不存在医学伦理等优点；初步建立了新颖的抗乙肝病毒侵染药物筛选与评价的体外细胞模型，为开发具有完整免疫系统的动物感染模型提供了可能，对抗病毒药物研究具有重要价值。

### 附图说明

- [0060] 图1为本发明包含hNTCP基因的重组慢病毒质粒图谱图。
- [0061] 图2为本发明培养的猪原代肝细胞铺板第2天的细胞形态图。
- [0062] 图3为本发明培养的猪原代肝细胞铺板第30天的细胞形态图。
- [0063] 图4为本发明hNTCP表达与定位的人肝癌细胞系Huh7D的对照的免疫荧光检测图。
- [0064] 图5为本发明hNTCP表达与定位的人肝癌细胞系Huh7D的hNTCP的免疫荧光检测图。
- [0065] 图6为本发明hNTCP表达与定位的猪原代肝细胞的对照的免疫荧光检测图。
- [0066] 图7为本发明hNTCP表达与定位的猪原代肝细胞的hNTCP的免疫荧光检测图。
- [0067] 图8为本发明乙肝病毒e抗原分泌检测图。
- [0068] 图9为本发明乙肝病毒s抗原分泌检测图。
- [0069] 图10为本发明乙肝病毒感染人肝癌细胞系Huh7D的细胞核染色检测图。
- [0070] 图11为本发明乙肝病毒感染人肝癌细胞系Huh7D的乙肝病的核心抗原免疫荧光染色图。
- [0071] 图12为本发明乙肝病毒感染人肝癌细胞系Huh7D的细胞核染色和乙肝病的核心抗原免疫荧光染色重叠图。
- [0072] 图13为本发明乙肝病毒感染猪原代肝细胞的细胞核染色检测图。
- [0073] 图14为本发明乙肝病毒感染猪原代肝细胞的乙肝病的核心抗原免疫荧光染色图。
- [0074] 图15为本发明乙肝病毒感染猪原代肝细胞的细胞核染色和乙肝病的核心抗原免疫荧光染色重叠图。
- [0075] 图16为本发明抗乙肝病毒入侵抑制剂的测试与评价图。

### 具体实施方式

[0076] 以下结合附图对本发明的原理和特征进行描述，所举实例只用于解释本发明，并非用于限定本发明的范围。

[0077] 实施例

[0078] 本实施例的利用猪原代肝细胞和hNTCP重组慢病毒建立乙肝病毒感染细胞模型的方法，包括如下步骤：

[0079] 步骤1：制备hNTCP重组慢病毒浓缩液

[0080] 利用磷酸钙转染法，将慢病毒包装质粒pCMV dr8.91、慢病毒包装质粒pMD.2G和hNTCP过表达质粒pWPI-hNTCP-Puro按质量比2:1:3，同时转染到293T细胞中，转染后48h收集含慢病毒的培养上清，浓缩后，得到hNTCP重组慢病毒浓缩液。

[0081] (1) hNTCP表达质粒构建

[0082] 慢病毒包装质粒pCMV dr8.91、慢病毒包装质粒pMD.2G和hNTCP过表达质粒pWPI-Puro均来自于全球质粒共享Addgene网站 (<http://www.addgene.org/>)。从人肝组织中获得人Na<sup>+</sup>/牛磺胆盐共转运多肽 (hNTCP) 的基因编码序列，通过酶切与链接的分子克隆方法将

hNTCP克隆到pWPI-Puro空载体中,得到hNTCP慢病毒表达质粒pWPI-hNTCP-Puro(图1)。293T细胞,由人肾上皮细胞系293细胞通过基因技术派生出的细胞系,能表达SV40大T抗原,是生产慢病毒常用的细胞系,购买于中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection,简称CCTCC)。

### [0083] (2) 慢病毒生产

[0084] 复苏293T细胞,利用新鲜DMEM培养液培养于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中,培养24h。利用胰酶消化细胞成单细胞,以1:3传代铺板至直径为10cm的细胞培养皿中,在DMEM转染培养液中继续培养12h,293T细胞融合度约70-80%,通过磷酸钙转染法将质粒转染进细胞。

[0085] 新鲜DMEM培养液,是DMEM培养基(购自美国GIBCO公司)加入10%v/v胎牛血清(购自美国GIBCO公司)、100units/mL青霉素和100mg/mL链霉素。DMEM转染培养液,为DMEM培养基(购自美国GIBCO公司)中加入10%v/v胎牛血清(购自美国GIBCO公司)。

[0086] 磷酸钙转染法具体为:无菌条件下,向第一个离心管中分别加入450μL去离子水、50μL2mol/L氯化钙溶液、10μg慢病毒包装质粒pCMV dr8.91、5μg慢病毒包装质粒pMD.2G和15μg hNTCP过表达质粒pWPI-hNTCP-Puro,混匀形成转染溶液I;在另一个离心管中加入500μL2×HBS溶液,边震荡,边滴入转染溶液I,形成转染溶液II,常温静置20min;将转染溶液II加入到直径为10cm、细胞融合度70-80%、含有10mL DMEM转染培养液的293T细胞培养皿中,在37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养12h后,将DMEM转染培养液换成新鲜DMEM培养液,即转染结束。

[0087] 2×HBS溶液,是在400mL去离子水中加入8.00g氯化钠、0.38g氯化钾、0.10g磷酸氢二钠、5.00g羟乙基哌嗪乙磺酸、1.00g葡萄糖,调节pH值为7.05,定容至500mL,用0.22μm滤膜过滤除菌,保存于-20℃所得。

[0088] DMEM转染培养液,为DMEM培养基(购自美国GIBCO公司)中加入10%v/v胎牛血清(购自美国GIBCO公司)。

[0089] 新鲜DMEM培养液,为DMEM培养基(购自美国GIBCO公司)中加入100units/mL青霉素(购自美国GIBCO公司)、100mg/mL链霉素(购自美国GIBCO公司)和10%v/v胎牛血清(购自美国GIBCO公司)。

[0090] 浓缩的方法为:先将慢病毒上清置于4℃水平离心机中,3800×g/min,离心10min,用0.45μm滤膜过滤后,取15mL过滤液加入到100KD超滤管(购自美国Millipore公司)中,然后再将上述100KD超滤管转移至4℃水平离心机中,4000×g/min,离心30min后,将100KD超滤管中截留的病毒浓缩液(约250μL)取出,保存于-80℃,即得到hNTCP重组慢病毒浓缩液。

### [0091] (3) 慢病毒滴度测定

[0092] 测定前1天将肝癌细胞系Huh7细胞以5×10<sup>4</sup>/孔的密度接种于96孔板中;利用含6μg/ml溴化己二甲铵的DMEM培养液对hNTCP重组慢病毒浓缩液进行10倍梯度稀释,分别得到稀释倍数为10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup>、10<sup>-9</sup>的稀释液;从96孔板中吸出原有的DMEM培养液,将上述稀释的病毒感染液分别加入各孔中,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养过夜后,换成100μL新鲜的DMEM培养液,继续培养48h后,96孔板中感染的每个细胞孔利用胰酶消化以1:2传代至2个新的培养孔中,其中1孔加入含5μg/mL嘌呤霉素,另1孔空白对照;再培养48h,通过细胞计数分别计算每个稀释比中嘌呤霉素处理孔与空白对照孔中细胞数目,并计算出病毒感染效率和病毒滴度。

[0093] 其中,病毒感染效率=(嘌呤霉素处理孔细胞数/空白对照孔中细胞数)×100%,

计算得到病毒感染效率,通过约10%感染效率的对应细胞孔计算病毒滴度,病毒滴度(titer/mL)=病毒感染效率×无嘌呤霉素处理孔细胞数×稀释倍数。

[0094] 步骤2:制备消化完全的肝组织

[0095] 通过两步胶原酶灌注法,消化分离猪原代肝细胞,得到消化完全的肝组织。

[0096] 其中,两步胶原酶灌注法第一步:新鲜的猪肝组织经暴露的血管用4℃预冷灌注溶液I灌注20min,直至肝组织中血液被冲洗干净。其中,灌注溶液I为D-Hank' s溶液中含有2mmol/l乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸的混合液,pH值为7.4,0.22μm滤膜过滤,4℃保存。D-Hank' s溶液中含有8.00g/l氯化钠、0.40g/l氯化钾、0.06g/l二水磷酸氢二钠、0.06g/l磷酸二氢钾和0.35g/l碳酸氢钠

[0097] 两步胶原酶灌注法第二步:用37℃预热的灌注溶液II灌注30min,直至猪肝组织失去弹性。其中,灌注溶液II为D-Hank' s溶液中含有5mmol/l氯化钙、0.1g/l六水氯化镁、0.3g/lIV型胶原酶(购自美国Sigma公司)、1.0g/l II型分离酶(Dispase II,购自瑞士Roche公司)、50mg/l核酸酶(DNase I,购自中国Solarbio公司)的混合液,pH值为7.4,0.22μm滤膜过滤,4℃保存。

[0098] 步骤3:制备猪原代肝细胞

[0099] 将步骤2得到的消化完全的肝组织,转移至含有细胞洗液的培养皿中,小心抖落消化好的细胞,得到猪原代肝细胞细胞悬液。

[0100] 其中,细胞洗液,为DMEM培养基(购自美国GIBCO公司)中加入100units/mL青霉素、100mg/mL链霉素和10%v/v胎牛血清(购自美国GIBCO公司)。

[0101] 步骤4:制备猪原代肝细胞单细胞悬液

[0102] 将步骤3得到的猪原代肝细胞细胞悬液,过孔径为70μm的细胞筛,得到猪原代肝细胞单细胞悬液。

[0103] 步骤5:制备铺板用细胞悬液

[0104] 将步骤4得到的单细胞悬液离心,离心条件为:50×g,4℃,5min。用细胞洗液重悬后,再重复离心3次,用铺板培养液重悬细胞,得到铺板用细胞悬液。

[0105] 其中,铺板培养液,是在William' s E培养基(简称WE,购自美国GIBCO公司)里加入1%v/v的ITS+premix(购自美国GIBCO公司)、2mmol/l谷氨酰胺、10μg/l表皮生长因子(购自美国R&D公司)、18mg/l氢化可的松、40μg/l地塞米松、100units/mL青霉素、100mg/mL链霉素、5%v/v胎牛血清(购自美国GIBCO公司)。

[0106] ITS+premix为100倍母液,含有6.25μg/mL胰岛素、6.25μg/mL转铁蛋白、6.25ng/mL亚硒酸、1.25mg/mL牛血清白蛋白和5.35μg/mL亚油酸。

[0107] 计算铺板用细胞悬液的细胞密度与细胞活力,即将铺板用细胞悬液铺板与0.4% m/v台酚蓝染色液以体积比1:1混匀后,得到混合液,迅速取20μL混合液加入到计数板(购自美国Counterstar公司)中,通过计数仪读出细胞密度与细胞活力的数值。

[0108] 其中,0.4% m/v台酚蓝染色液的配制方法为:将0.4g台酚蓝固体完全溶解到100mL的磷酸缓冲液溶液中,pH值为7.2-7.4,高压蒸汽灭菌,4℃保持。磷酸缓冲液溶液,英文缩写为PBS,含有8.0g/l氯化钠、0.2g/l氯化钾、3.58g/l十二水磷酸氢二钠和0.24g/l磷酸二氢钾。

[0109] 步骤6:细胞铺板与培养

[0110] 将步骤5得到的铺板用细胞悬液以  $(1.5-2.5) \times 10^5$  活细胞/cm<sup>2</sup> 的接种密度, 接种到胶原包被的培养板或培养皿中, 加入铺板培养液, 摇匀, 在37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养4-6h, 以充分让其贴壁后, 将铺板培养液换成肝细胞维持培养基PMM, 培养周期为30天, 分别在铺板后第2天、30天通过相差显微镜记录细胞形态, 得到培养好的猪原代肝细胞。

[0111] 其中, 胶原包被的培养板或培养皿的制备方法为: 将172μL冰醋酸加入到100mL去离子水中, 再加入终浓度为50μg/mL的IV型鼠尾胶原, 无菌条件下, 用0.22μm滤膜过滤除菌后, 得到胶原工作液, 4℃保持待用; 将该胶原工作液以5μg/cm<sup>2</sup>的包被量加入到需要包被的培养板或培养皿中, 常温孵育1h后, 将胶原工作液吸出, 自然晾干后封口, 4℃保藏。上述胶原包被的培养板或培养皿使用前, 需用PBS清洗一次, 以去除残留的冰醋酸。

[0112] 肝细胞维持培养基PMM, 是在William's E培养基里加入1%v/v的ITS+premix、2mmol/l谷氨酰胺、10μg/l表皮生长因子、18mg/l氢化可的松、40μg/l地塞米松、100units/mL青霉素、100mg/mL链霉素和2%v/v DMSO。

[0113] 步骤7: 对猪原代肝细胞进行hNTCP重组慢病毒感染

[0114] 将步骤1得到的hNTCP重组慢病毒浓缩液, 以感染复数为1感染步骤6培养第2天的猪原代肝细胞, 感染孵育24h, 换成新鲜的肝细胞维持培养基PMM, 每2天换1次, 感染后第4天, 一部分细胞固定后用免疫荧光的方法检测hNTCP蛋白表达与定位, 其它细胞进行乙肝病毒感染测试, 得到hNTCP蛋白过表达的猪原代肝细胞。

[0115] 步骤8: 建立乙肝病毒感染细胞模型

[0116] 向步骤7得到的hNTCP蛋白过表达的猪原代肝细胞中, 先加入浓度分别为500nmol/L、50nmol/L、5nmol/L、0.5nmol/L、0.05nmol/L、0nmol/L的乙肝病毒感染阻断剂Myr-PreS1<sup>2-47</sup> (购自于吉尔生化(上海)有限公司), 孵育30min后, 在含4%w/v聚乙二醇8000的肝细胞维持培养基PMM中以感染复数为1000感染乙肝病毒, 感染16-24h后换成新鲜的肝细胞维持培养基PMM, 每2天更换1次, 感染后第8天检测乙肝病毒感染指标乙肝病毒表面抗原(英文缩写为HBsAg)、乙肝病毒e抗原(英文缩写为HBeAg)和细胞内乙肝病毒核心抗原, 即得到所述利用猪原代肝细胞和hNTCP重组慢病毒建立乙肝病毒感染细胞模型。

[0117] 检测与分析

[0118] 1、对分离的猪原代肝细胞形态与hNTCP表达检测

[0119] 一方面, 用相差显微镜形态学观察在不同培养时间点的猪原代肝细胞形态; 另一方面, 利用免疫荧光的方法鉴定hNTCP的表达和定位。

[0120] hNTCP免疫荧光的具体方法是: 以12孔板的1孔为例, 细胞培养至2个月时, 吸去旧培养液, 用常温PBS洗1次, 立即用冰冷的4%多聚甲醛1mL (具体配方为: 称取4g多聚甲醛, 置于三角烧瓶中, 加入80mL去离子水, 放入37℃恒温水浴箱, 每隔1-2h摇晃混匀, 16-24h后多聚甲醛会完全溶解, 补充去离子水至100mL, 调节pH值至7.2), 常温固定10-15min; 用PBS在水平摇床上洗3次, 每次5min; 为增强抗体与细胞内蛋白的结合, 使用0.5mL含0.25%v/v Triton100的PBS溶液常温处理45min; 用PBS在水平摇床上洗3次, 每次5min; 封闭, 加入适量封闭液(含有5%v/v山羊正常血清, 2%w/v BSA的PBS溶液), 常温水平摇床孵育至少1h; 利用含3%v/v山羊正常血清的PBS溶液稀释抗体, 抗hNTCP兔多抗(购自美国Sigma公司)稀释比例为1:500, 4℃摇床孵育过夜; 再用含3%山羊正常血清的PBS溶液在水平摇床上洗3次, 每次10min, 以去除非特异结合的抗体; 二抗为山羊抗兔IgG偶联DyLight-488 (购自美国

Thermo Fisher Scientific Inc公司),以1:1000稀释到含3%山羊正常血清的PBS溶液,于暗处避光常温孵育1h,此后操作一律避光;再用含3%山羊正常血清的PBS溶液在水平摇床上洗2次,每次10min,第三次清洗时加入1:1000的DAPI(购自瑞士Roche公司)用于细胞核染色,常温孵育10min;再清洗一次以清洗掉残留的DAPI,10-20min;加入适量含3%山羊正常血清的PBS溶液防止在观察时细胞因干燥变形。最后,利用Leica DFC425C荧光显微镜(购自德国Leica公司)观察荧光信号。

#### [0121] 结果分析

##### [0122] (1) 猪原代肝细胞在不同培养时间点的形态学观察分析

[0123] 利用上述两步胶原酶灌注法分离得到的猪原代肝细胞在本发明所述培养条件下表现明显的分化肝细胞形态。在铺板后第2天(图2),猪原代肝细胞呈多边形,细胞核圆而高亮,细胞器丰富;在铺板后第30天(图3),肝细胞状态尚好,猪细胞出现轻微老化,细胞碎片相对于第2天明显增多。由于30天的培养时间已经可满足慢病毒感染、乙肝病毒感染及药物测试等所需要的时间周期,本申请发明人把该时间点确定为培养的终点。图片标尺为150 $\mu$ m。

##### [0124] (2) hNTCP表达和定位的免疫荧光检测

[0125] 以人肝癌细胞系Huh7D为对照,通过免疫荧光确认受体hNTCP蛋白在猪细胞中的表达和定位。如图4-图7所示,在人肝癌细胞系Huh7D中,只有感染慢病毒的细胞才表达hNTCP蛋白,且hNTCP蛋白主要定位在细胞膜上。同样,只有感染慢病毒的猪原代肝细胞才表达hNTCP蛋白,且hNTCP蛋白主要定位在细胞膜上。说明hNTCP蛋白可在猪原代肝细胞中表达,且定位正确,为hNTCP蛋白发挥生物学功能奠定了基础。图片标尺为150 $\mu$ m。

##### [0126] 2、HBV感染表达hNTCP的猪原代肝细胞与抗HBV入侵药物测试

##### [0127] ELISA与免疫荧光检测病毒感染后的关键指标检测方法

[0128] HBeAg检测参照上海科华公司提供的乙型肝炎病毒e抗原诊断试剂盒说明书。首先,将试剂盒中提供的25倍浓缩的洗涤液稀释成1倍的工作浓度,具体方法为:量取480mL纯化水,加入20mL浓缩洗涤液,充分混匀后,成500mL工作浓度洗涤液,待用。每孔加入待测样品50 $\mu$ L,每个样品设三个重复,设阴、阳性对照各2孔,每孔加入阴性对照或阳性对照各50 $\mu$ L,并设空白对照1孔;接着每孔加入酶结合物50 $\mu$ L,充分混匀,封板,置于37 $^{\circ}$ C孵育30min;然后,手工洗板,即弃去孔内液体,用试剂盒提供的洗涤液注满各孔,静置5s,甩干,重复五次后拍干;完成洗板后每孔加入试剂盒提供的显色剂A液、显色剂B液各50 $\mu$ L(或1滴),充分混匀,封板,置37 $^{\circ}$ C孵育15min,之后每孔加入终止液50 $\mu$ L(或1滴),混匀;最后用酶标仪读数,取波长450nm,先用空白孔校零,然后读取各孔OD值。

[0129] HBsAg检测参照上海科华公司提供的乙型肝炎病毒表面抗原诊断试剂盒说明书。首先将试剂盒中提供的25倍浓缩的洗涤液稀释成1倍的工作浓度,具体方法为:量取480mL纯化水,加入20mL浓缩洗涤液,充分混匀后,成500mL工作浓度洗涤液,待用;然后加入75 $\mu$ L待测样品(每个样品三个重复)和阴、阳性对照于反应孔中(共预留阴性对照3孔、阳性对照1孔、建议预留空白对照1孔),用封片纸覆盖反应板后,将反应板置于37 $^{\circ}$ C孵育60min;取出反应板,撕去封片,在已加入待测样品和阴性、阳性对照的孔中加入50 $\mu$ L酶结合物,手工轻轻震荡10s,之后用封片纸覆盖反应板后,将反应板置于37 $^{\circ}$ C孵育30min;取出反应板,撕去封片纸,洗涤反应板5次(手工洗板:弃去孔内液体,用配制的工作浓度洗涤液注满各孔,静置

30-60s,甩干,重复5次后,在干净的吸水纸上拍干);洗涤结束后立即在所有孔内加入试剂盒提供的显色剂A、显色剂B各50 $\mu$ L,混匀,手工轻轻震荡10s。然后用封片覆盖反应板后,将反应板置37 $^{\circ}$ C孵育30min,之后每孔加入50 $\mu$ L终止液,震荡反应5s,使之充分混匀。最后用酶标仪读数,取波长450nm,则先用空白孔校零,然后读取各孔OD值。

[0130] 分析HBV的核心抗原HBcAg免疫荧光的具体方法是:以12孔板的1孔为例,细胞感染至少8天后,吸去旧培养液,用常温PBS洗1次,立即用冰冷的4%多聚甲醛0.5mL,常温固定10-15min;用PBS在水平摇床上洗3次,每次5min;为增强抗体与细胞内蛋白的结合,使用0.5mL含0.25%v/v Triton100的PBS溶液常温处理45min;用PBS在水平摇床上洗3次,每次5min;封闭,加入适量封闭液(含有5%v/v山羊正常血清,2%w/v BSA的PBS溶液),常温水平摇床孵育至少1h;利用含3%山羊正常血清的PBS溶液稀释抗体,HBcAg兔多抗(购自丹麦Dako公司)稀释比例为1:400,4 $^{\circ}$ C摇床孵育过夜;再用含3%山羊正常血清的PBS溶液在水平摇床上洗3次,每次10min,以去除非特异结合的抗体;二抗山羊抗兔IgG偶联DyLight-488(购至美国Thermo Fisher Scientific Inc公司)以1:400稀释到含3%山羊正常血清的PBS溶液,于暗处避光常温孵育1h,此后操作一律避光;再用含3%山羊正常血清的PBS溶液在水平摇床上洗2次,每次10min,第三次清洗时加入1:1000的DAPI(购自瑞士Roche公司)用于细胞核染色,常温孵育10min;再清洗一次以清洗掉残留的DAPI,10-20min;加入适量含3%山羊正常血清的PBS溶液防止在观察时细胞因干燥变形。最后,利用Leica DFC425C荧光显微镜(购自德国Leica公司)观察荧光信号。

#### [0131] 结果分析

##### [0132] (1) 乙肝病毒感染猪原代肝细胞分析

[0133] 如图8、图9所示,分别表示稳定表达hNTCP的猪原代肝细胞或人肝癌细胞系Huh7D感染乙肝病毒后第2、4、6、8天乙肝病毒表面抗原(英文缩写为HBsAg)、乙肝病毒e抗原(英文缩写为HBeAg)的分泌水平。一方面,HBsAg和HBeAg在稳定表达猪原代肝细胞中随培养时间推移呈依次上升趋势,其水平与阳性对照相近。而稳定表达hNTCP的人肝癌细胞系Huh7D,其病毒抗原水平呈弱阳性,明显低于稳定表达hNTCP的猪原代肝细胞。同时,两种细胞在感染时加入抗乙肝病毒入侵小肽Myr-preS1<sup>2-47</sup>后,HBsAg和HBeAg水平呈下降趋势或阴性,说明乙肝病毒感染是受体hNTCP介导的。细胞内病毒核心抗原(HBcAg)阳性免疫荧光信号(图10-图15)更充分说明了稳定表达hNTCP的猪原代肝细胞对HBV具有易感性。总之,以上数据说明稳定表达hNTCP的猪原代肝细胞相较于稳定表达hNTCP的人肝癌细胞系Huh7D,是更优异的乙肝病毒感染模型。

##### [0134] (2) 基于猪原代肝细胞的抗乙肝病毒入侵药物测试

[0135] 对于抗HBV入侵抑制剂测试,抗乙肝病毒入侵小肽Myr-preS1<sup>2-47</sup>可与hNTCP发生特异性结合,从而阻断乙肝病毒与受体hNTCP的结合。感染前30min,Myr-preS1<sup>2-47</sup>以不同浓度(0nmol/l、0.5nmol/l、5nmol/l、50nmol/l、500nmol/l)提前加入到培养液中,感染时Myr-preS1<sup>2-47</sup>同样以不同浓度(0nmol/l、0.5nmol/l、5nmol/l、50nmol/l、500nmol/l)加入到感染液中,与细胞孵育16-24h,去掉感染液,用磷酸缓冲液(PBS)清洗3次,加入新鲜维持培养液PMM,2天换1次新鲜的培养液;收集旧培养液用作酶联免疫吸附试验,分析乙肝病毒表面抗原(英文缩写为HBsAg)、乙肝病毒e抗原(英文缩写为HBeAg)的分泌水平。

[0136] 结果如图16所示,Myr-preS1<sup>2-47</sup>以剂量依赖的方式抑制乙肝病毒表面抗原(英文

缩写为HBsAg)、乙肝病毒e抗原(英文缩写为HBeAg)的分泌水平。其中50nmol/l的小肽可100%抑制病毒感染,0.5nmol/l的小肽可抑制50%的病毒抗原分泌,这与文献报道一致,说明基于猪原代肝细胞的乙肝病毒感染模型可用于抗乙肝病毒药物药效测试。

[0137] 由此可见,本发明实现了hNTCP在猪原代肝细胞中高效稳定表达,模拟人原代肝细胞的原始的分化状态,支持HBV高效的感染及抗HBV感染药物的测试,具有来源不收限制、细胞批次差异小、不存在医学伦理等优点,有望替代人原代肝细胞而在HBV基础研究和抗HBV药物评价中发挥主要作用。

[0138] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

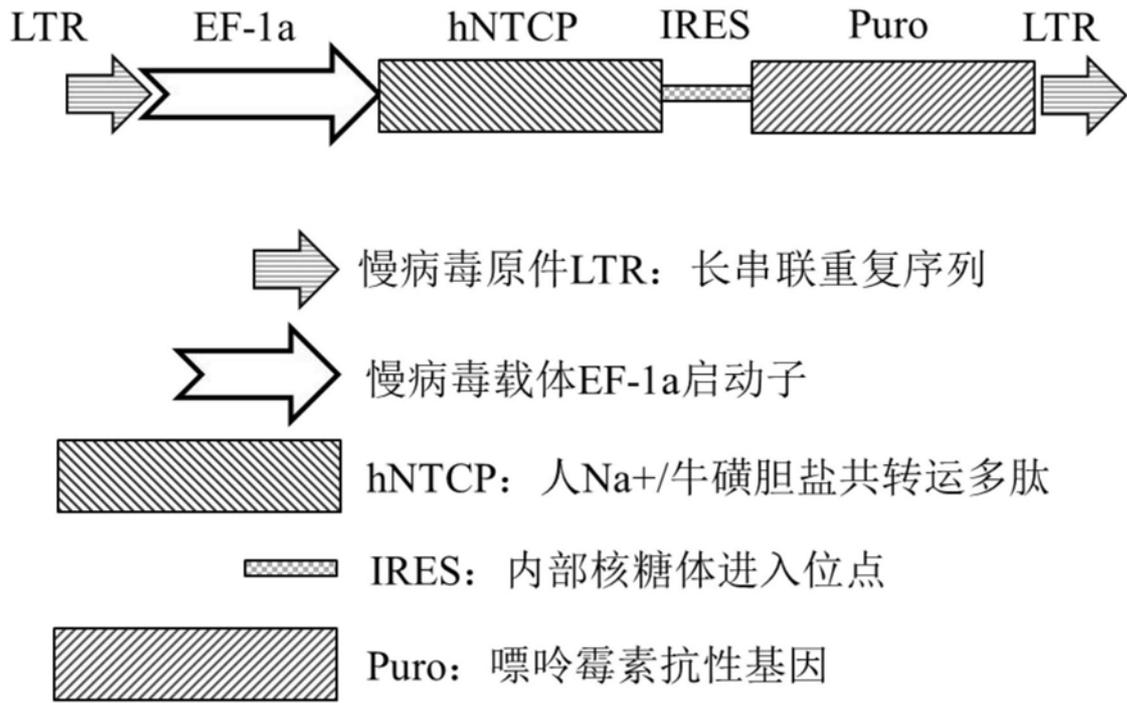


图1

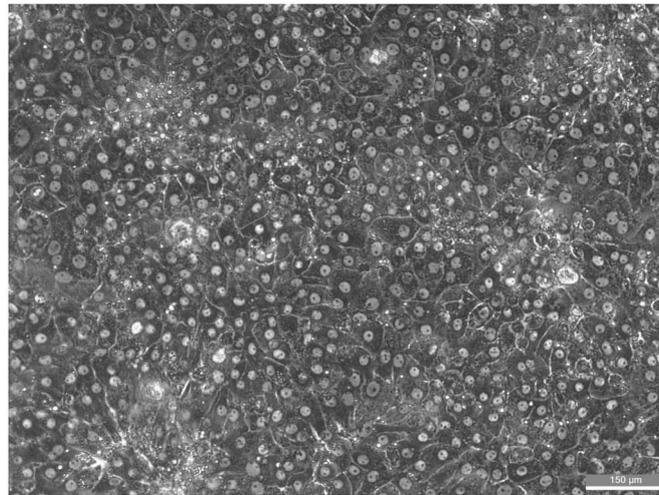


图2

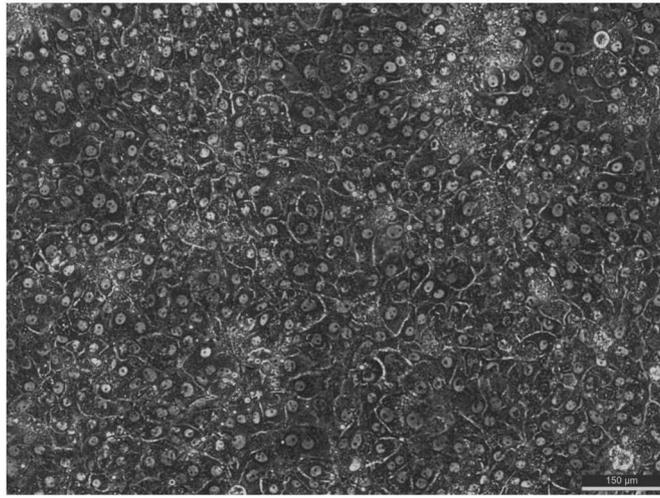


图3

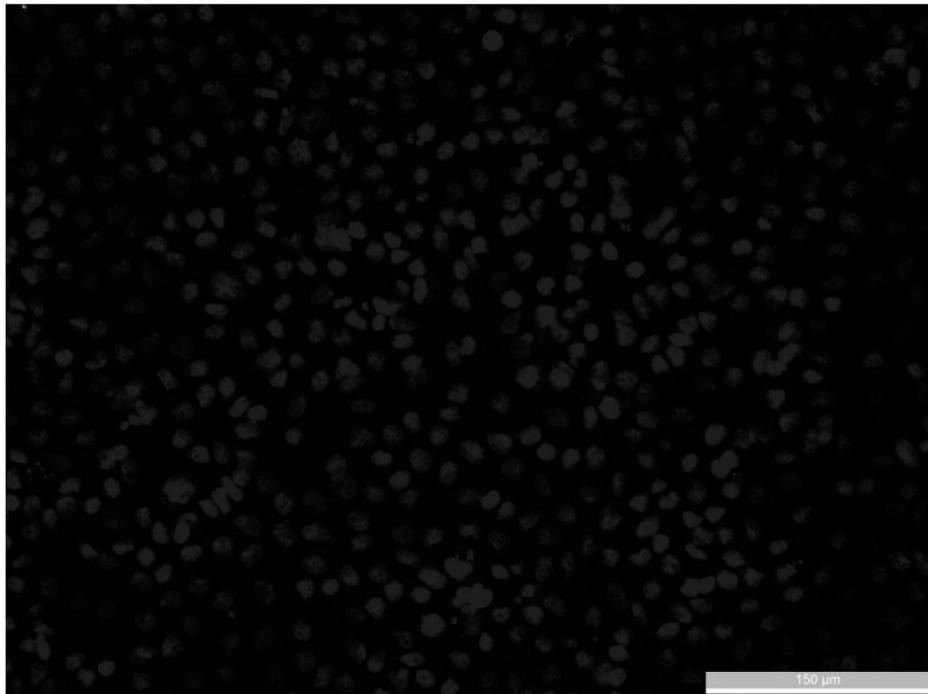


图4

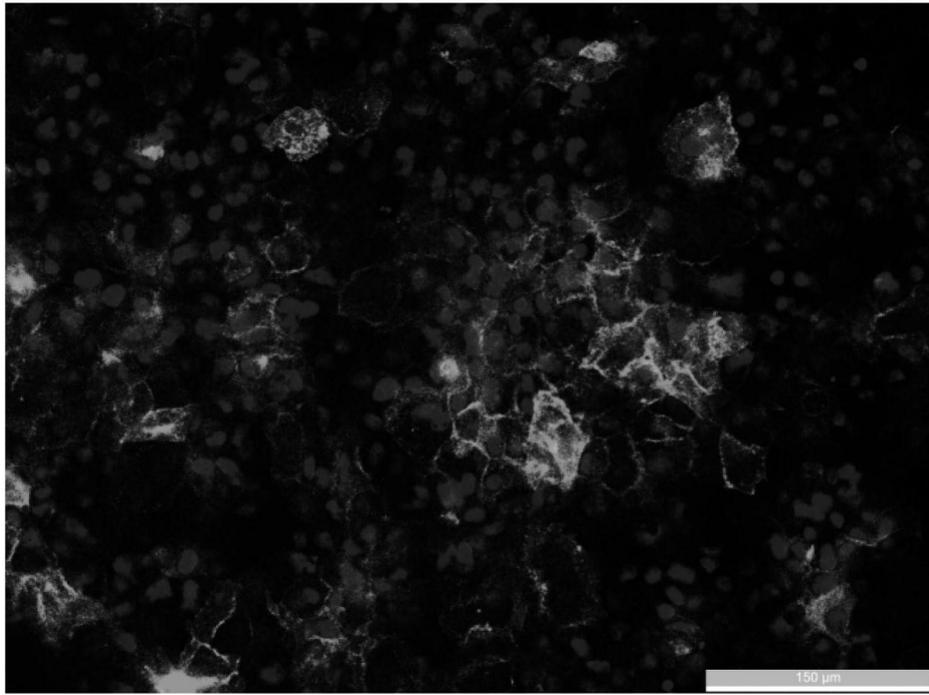


图5

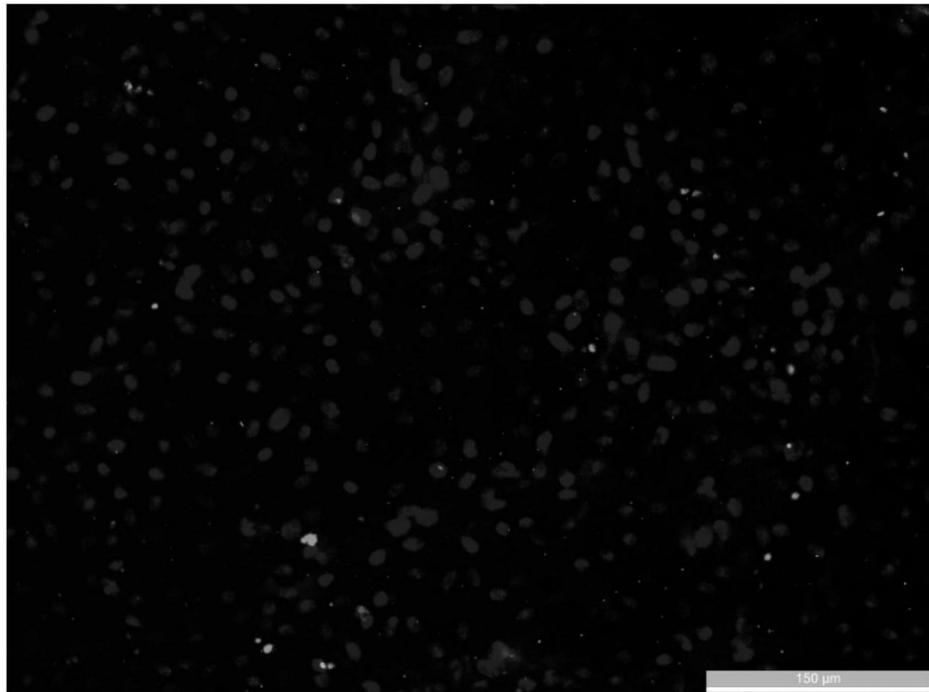


图6

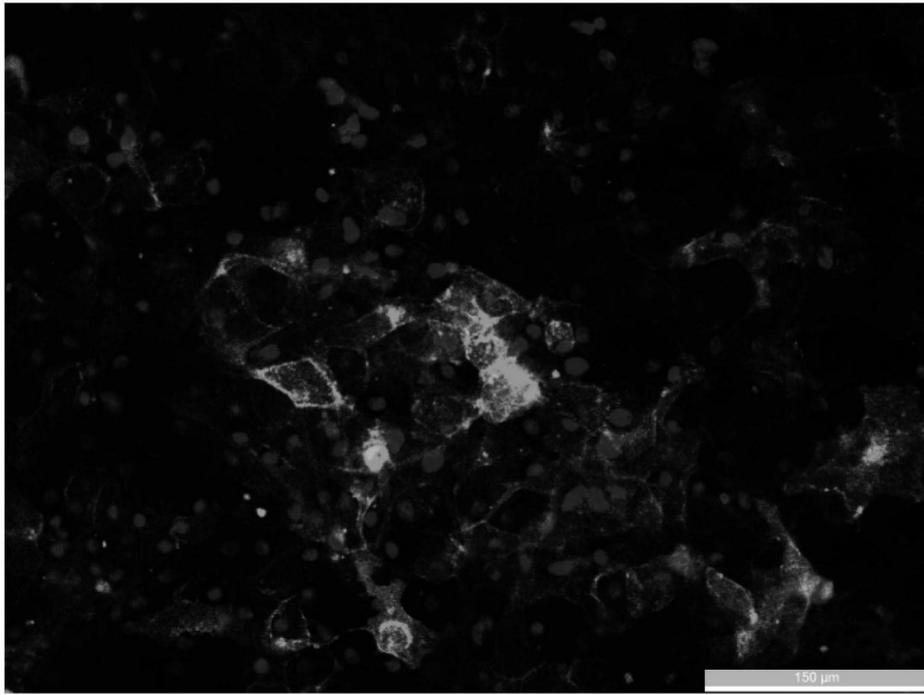


图7

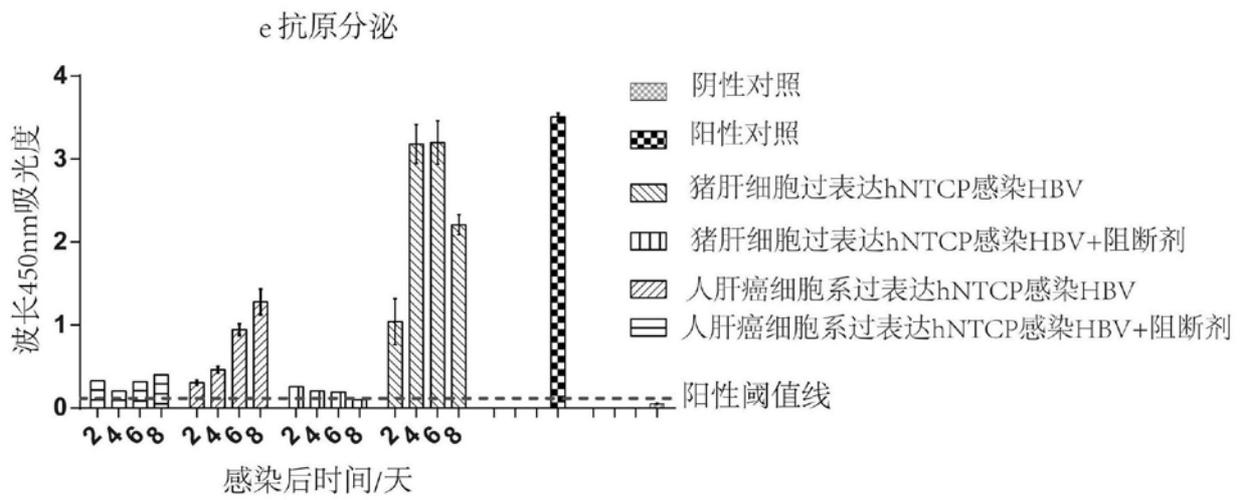


图8

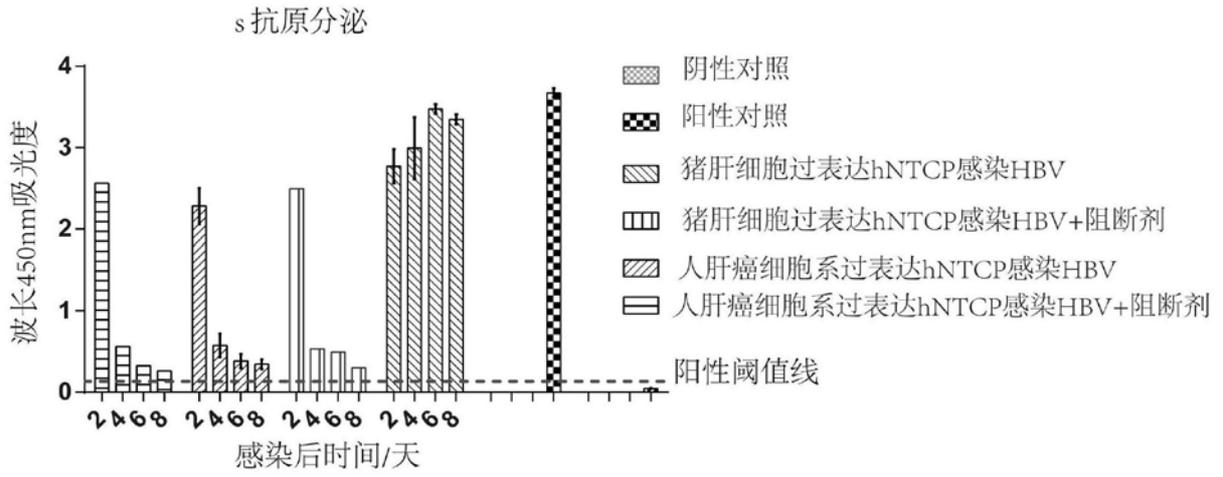


图9

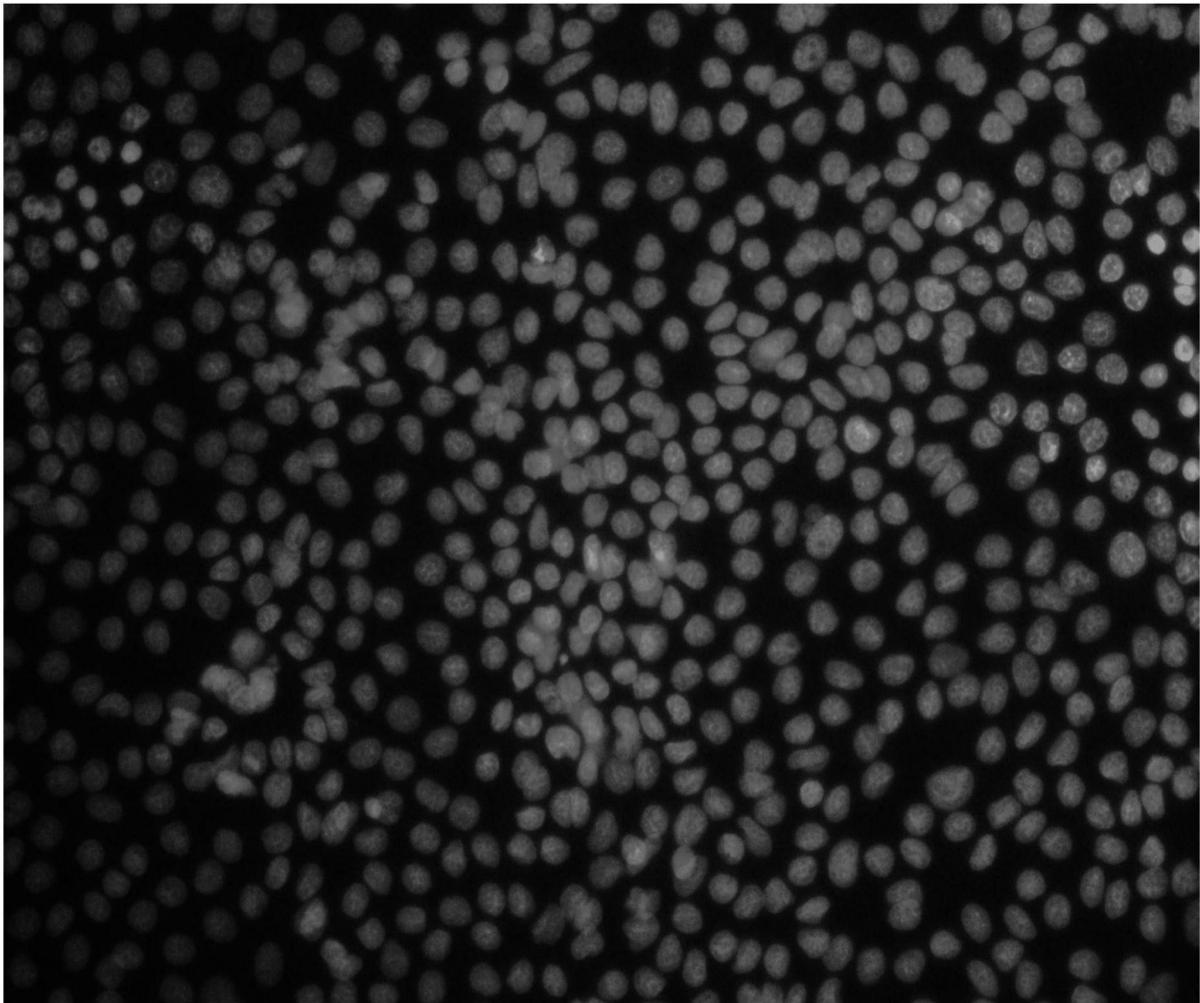


图10

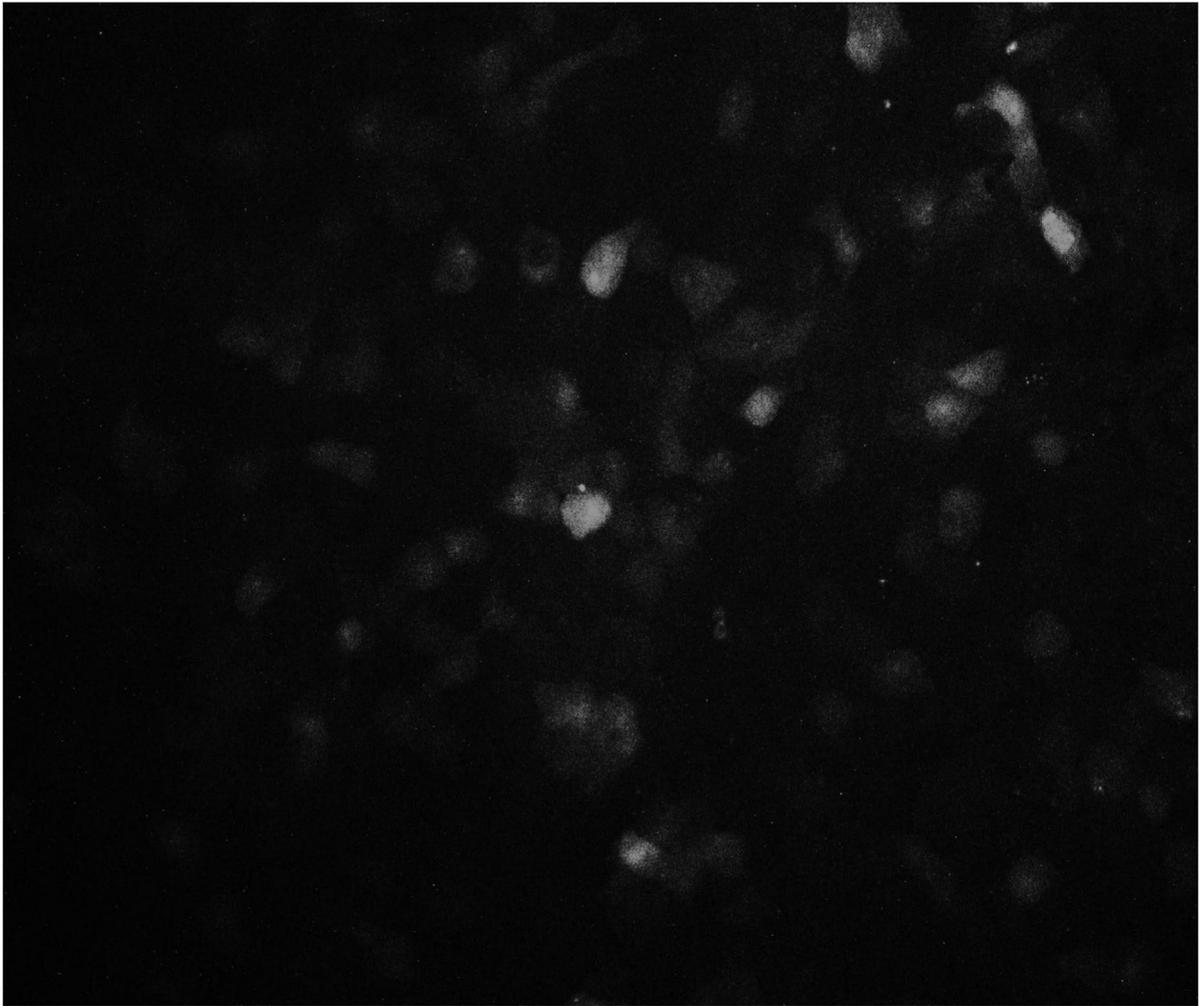


图11

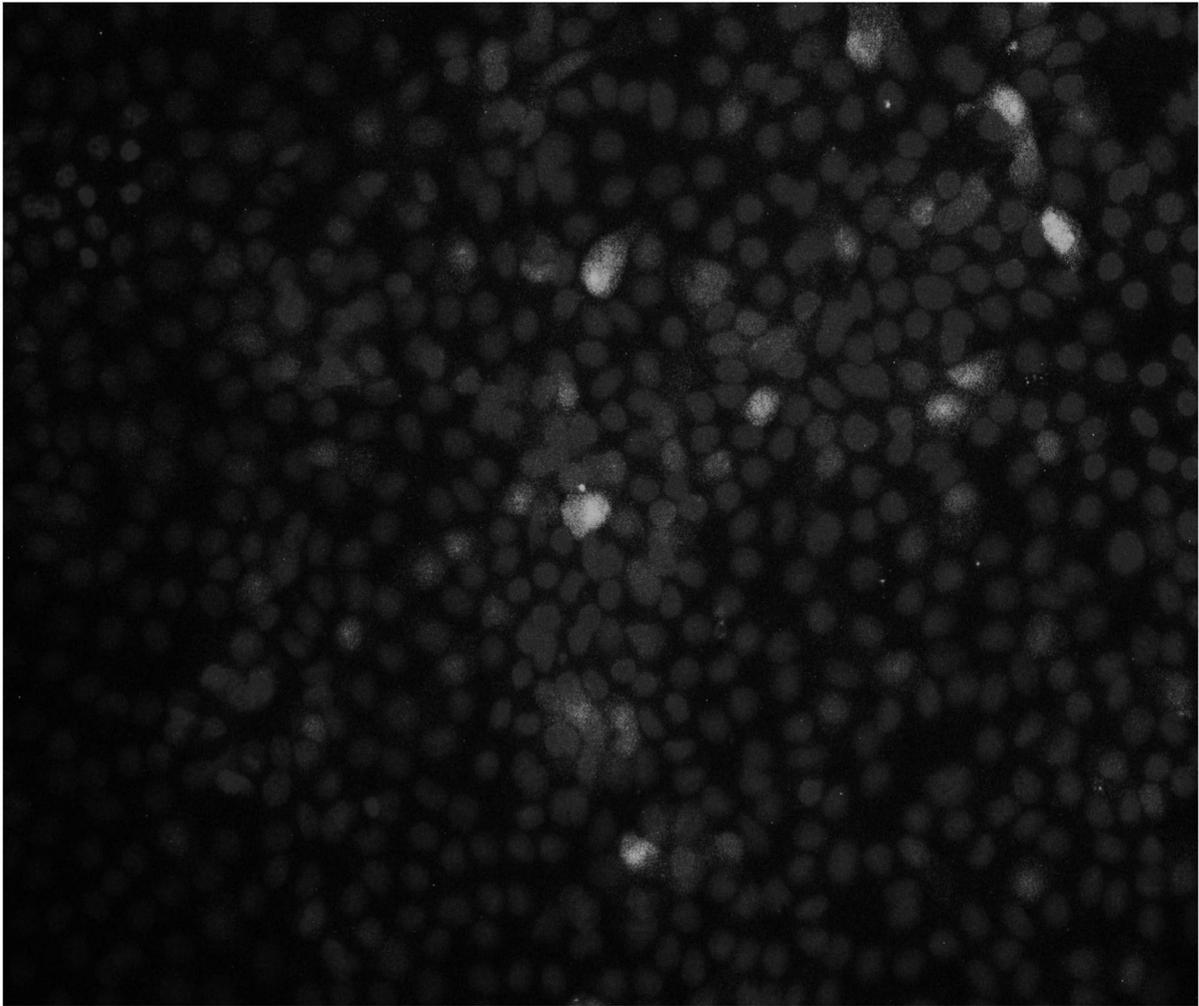


图12

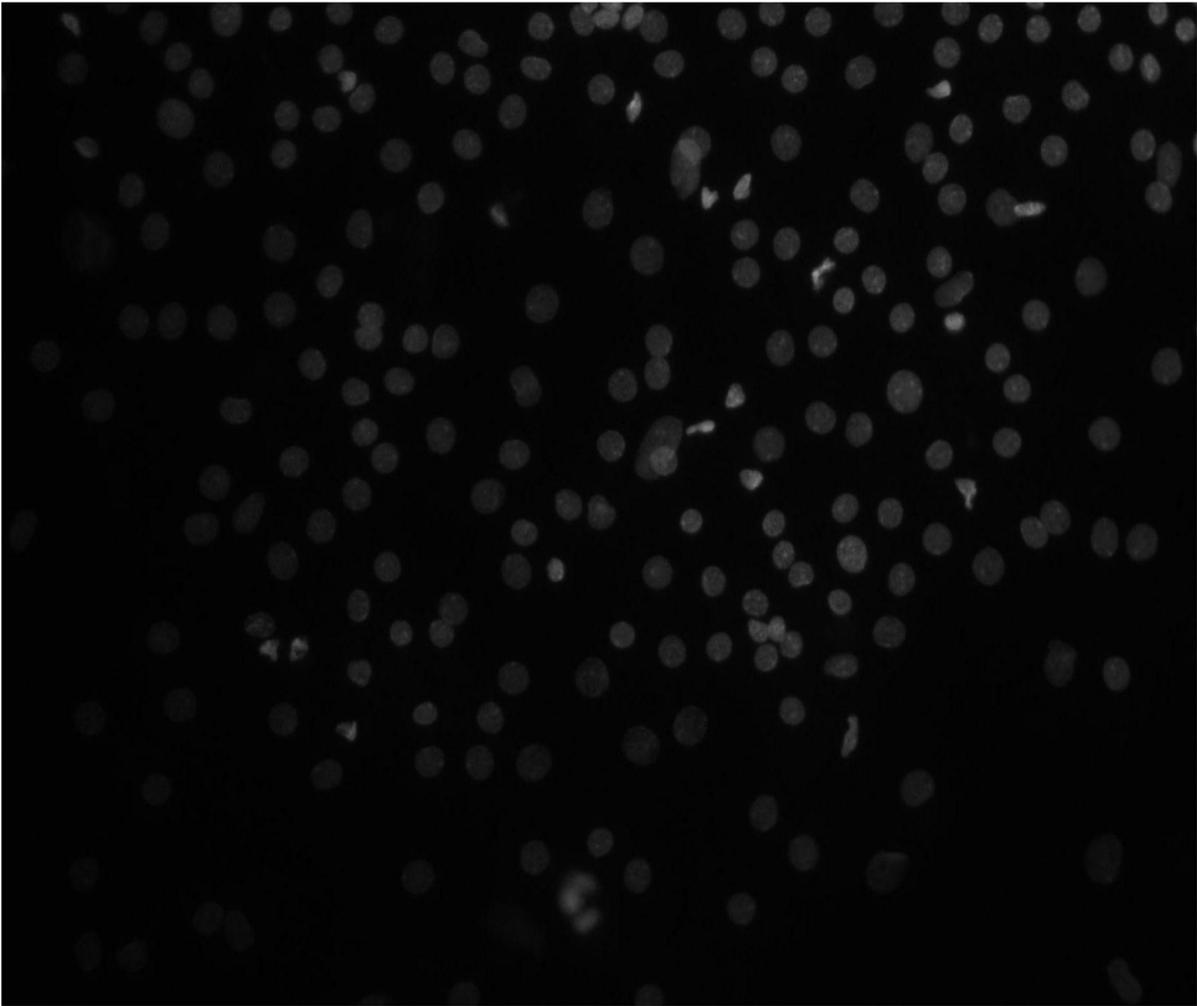


图13

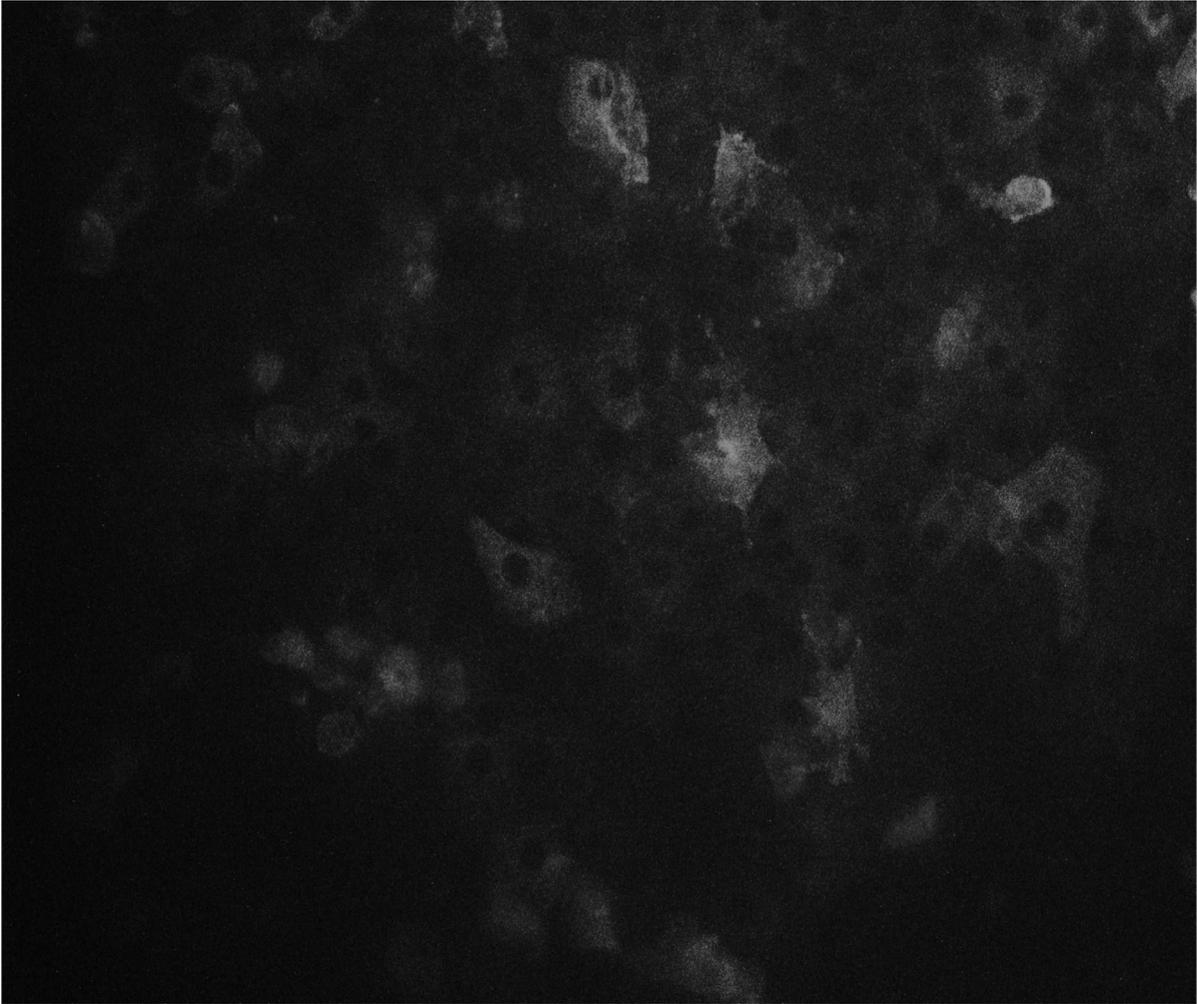


图14

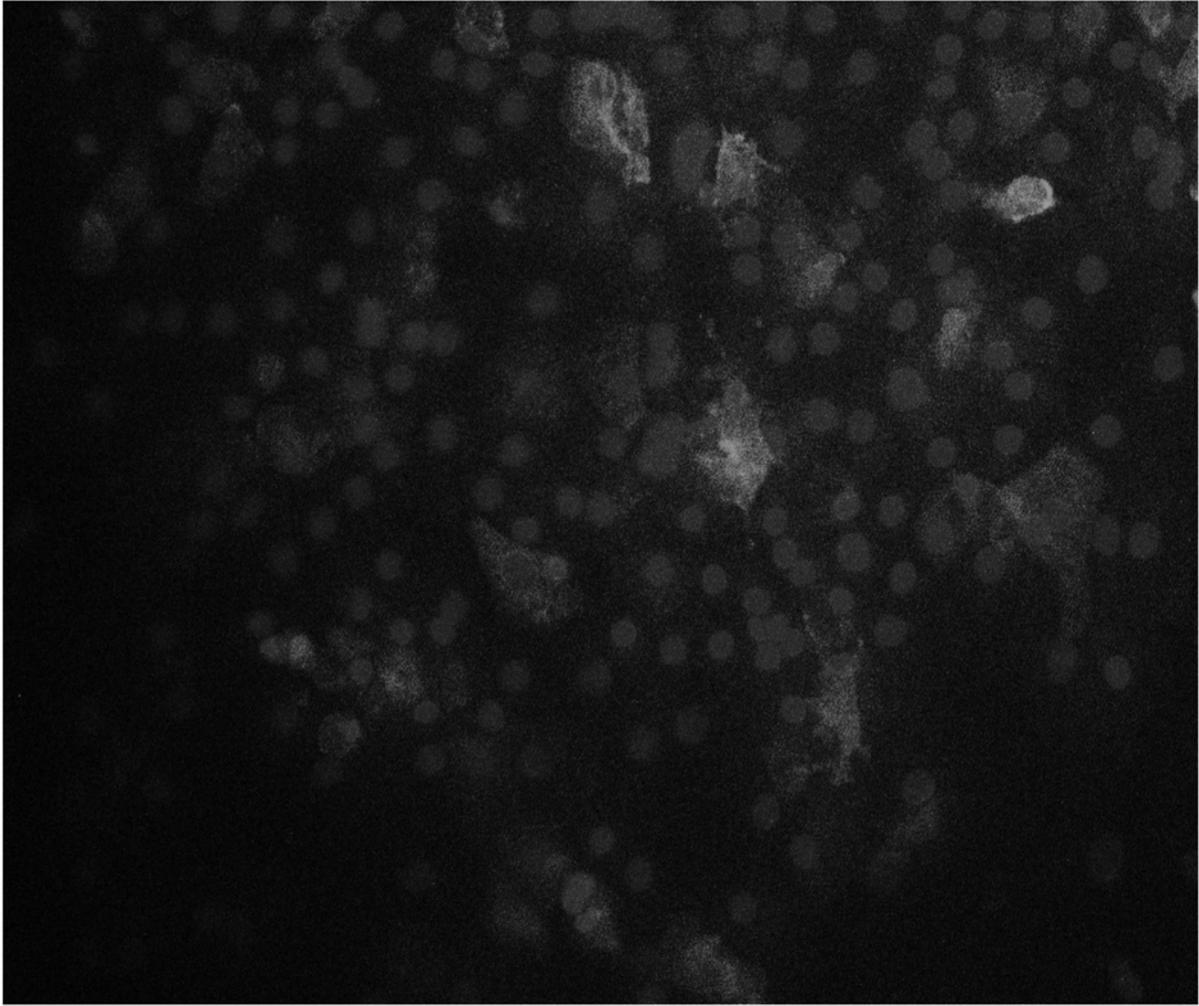


图15

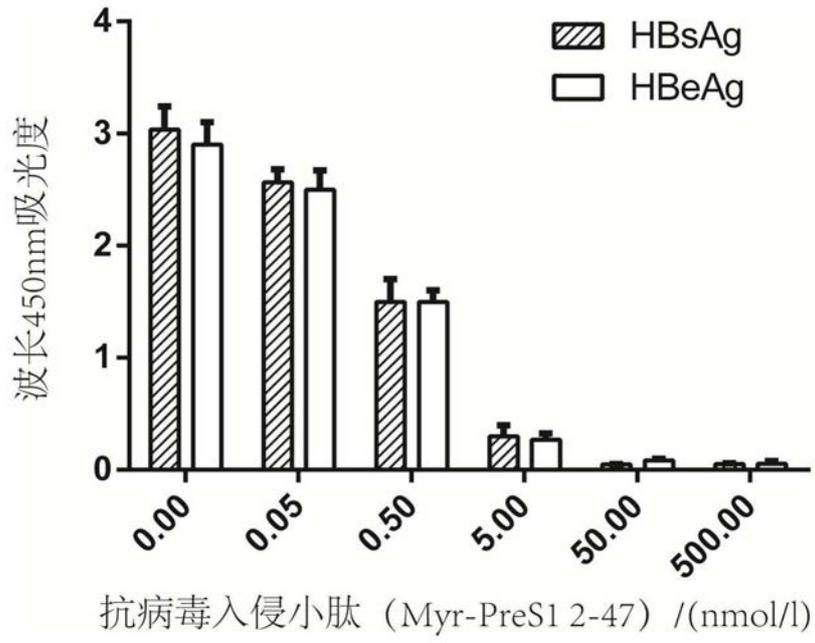


图16