

# 丙型肝炎病毒超微结构研究进展

程勇前,聂青和,周永兴

程勇前,聂青和,周永兴,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038  
国家自然科学基金资助课题, No.39970767  
项目负责人:聂青和,710038,陕西省西安市,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. nieqinghe@hotmail.com  
电话:029-3377595  
收稿日期:2002-10-25 接受日期:2003-11-20

## 摘要

丙型肝炎病毒(HCV)基因组克隆成功后,人们对其基因组的研究已十分深入,但由于HCV病毒颗粒在感染者血中、肝脏中含量很低,血中HCV又往往与免疫复合物和脂蛋白包裹存在,以及缺乏有效的HCV体外培养体系和小动物模型,形态结构研究难度极大而相对滞后,有关HCV超微结构和病毒装配过程还知之甚少,多数研究认为HCV病毒颗粒由外膜及核心组成,外膜表面有钉状突起.HCV感染后的细胞多数可见扩大的胞质囊腔,病毒颗粒多存在胞质囊腔内,这些胞质囊腔认为来自扩大的细胞内质网.细胞核内、胞质、血清、体外培养细胞中HCV颗粒的大小、形式有差异,目前尚无统一认识,其在感染细胞内的形态结构和定位尚不清楚.本文就近年来有关HCV超微结构研究的相关文献进行回顾.

程勇前,聂青和,周永兴.丙型肝炎病毒超微结构研究进展.世界华人消化杂志 2003;11(2):233-237

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/233.htm>

## 0 引言

自1989年丙型肝炎病毒(HCV)基因组克隆成功后,人们对其基因组的研究已十分深入<sup>[1-19]</sup>,然而,尽管许多学者曾对HCV患者和实验感染HCV的黑猩猩肝组织和血清、体外感染HCV的细胞等进行电镜研究,试图揭示HCV超微结构特征,但由于HCV病毒颗粒在感染者血中、肝脏中含量很低,血中HCV又往往与免疫复合物和脂蛋白包裹存在,以及缺乏有效的HCV体外培养体系和小动物模型,形态结构研究难度极大而相对滞后,有关HCV超微结构和病毒装配过程还知之甚少<sup>[20-30]</sup>,其在感染细胞内的形态结构和定位尚不清楚.本文就近年来有关HCV超微结构研究的相关文献进行回顾.

## 1 HCV动物模型肝脏组织标本中HCV颗粒及超微结构改变

Shimizu et al<sup>[31]</sup>给黑猩猩输入非甲非乙(NANB)肝炎患者血浆或血清制造急性肝炎模型,取其肝组织进行电镜观察.在其中1例供体引起的肝炎中发现了肝细胞核内

病毒样颗粒,直径20-27 nm.这些病毒样颗粒外观上类似于病毒,但与通常所见病毒颗粒不同.作者认为虽然不能排除这种结果可能是肝细胞对损伤的一种非特异反应,但与NANB肝炎有关,可作为与病毒感染有关的有意义的标志.随后Bradley et al<sup>[32]</sup>与Tsiquaye et al<sup>[33]</sup>在实验性黑猩猩急性输血后NANB肝炎中相继证实了这种颗粒的存在.

Burk et al<sup>[34]</sup>对感染人NANB肝炎的黑猩猩肝细胞中的病毒样颗粒进行了进一步研究,详细描述了核内病毒样颗粒的特点.发现颗粒直径约22 nm,在核中形成单一同源性颗粒簇.这些颗粒并非正常核内成分,与浓缩的核染色质不同,也不是周边染色质颗粒.因其平均直径在几何上更为一致,且周边无“晕”;而周边染色质颗粒的直径为30-50 nm,周边常有“晕”.至于核小体平均直径只有8-10 nm,比病毒样颗粒小;HBV的核型颗粒平均直径27 nm,较大,且有特殊的颗粒形态.可见这些病毒样颗粒的出现与NANB肝炎的感染有关,该颗粒可能就是NANB肝炎的一种特异性标志,尽管当时还不能完全排除这是肝细胞损伤的一种非特异性反应.

1981年Burk et al<sup>[34]</sup>在观察到核内病毒样颗粒的同时意外发现在其中1例黑猩猩肝细胞胞质内有病毒样颗粒簇.这种胞质内病毒样颗粒平均直径为 $37 \pm 2$  nm,呈高度规则晶体状排列,形态一致,由核心和外壳两部分组成,外观很像病毒.这种颗粒的大小和对称性很像与HBV有关的Dane颗粒,但比后者小.这样小的病毒也否定了其他常见的过客病毒,如呼吸道肠道病毒的可能性.尽管这种颗粒形态类似病毒,但其晶体排列方式相似于微管.

## 2 HCV患者肝脏、血清、外周血单个核细胞中HCV颗粒及超微结构改变

2.1 HCV患者肝脏中病毒样颗粒 Grimaud et al<sup>[35]</sup>在NANB肝炎患者的肝穿刺标本电镜观察中也发现肝细胞核内类似颗粒,50-100个圆形棒状病毒样颗粒成簇存在.这些小簇由50-100个圆形棒状颗粒构成,颗粒的直径为22-27 nm.Hantz et al<sup>[36]</sup>也有同样发现,并与Shimizu及Bradley et al在黑猩猩肝脏组织中所见病毒样颗粒一致.

De Vos et al<sup>[37]</sup>报告电镜观察90例肝炎患者和10例黑猩猩肝组织标本结果,患者包括NANB肝炎,非肝炎病毒性肝炎及乙型、甲型肝炎患者,黑猩猩中部分HBsAg阴性,部分HBsAg阳性.在上述标本中均

发现了病毒样颗粒簇.并根据核内病毒样颗粒的聚集密度分为3种类型: 型(密集型),多位于核中央,由直径20-29 nm的圆形或棒状颗粒密集组成,颗粒之间的间隙小且规则,颗粒簇电子密度小于核染色质中间染色质颗粒及周边染色质颗粒; 型(中间密度型),由与型相同的圆形或棒状颗粒组成,但颗粒间有规则且较宽的间隙; 型(疏松型),由均一的短棒状核内颗粒构成,颗粒间有宽窄不一的间隙,与、型者不同,这种类型的颗粒簇主要位于核周边.上述3种类型间无明显分界.型最常见,出现于94%的标本;型为4%;型为31%.他们认为不同型颗粒及其分布方式可能只代表了颗粒簇形成的不同阶段,对诊断NANB肝炎缺乏特异性.Busachi et al<sup>[38]</sup>指出, Shimizu et al在感染的NANB肝炎黑猩猩血中及随后其他作者在患者肝组织中见到的病毒样颗粒主要是直径20-27 nm的颗粒,类似于De Vos描述的型颗粒.因而认为准确区分颗粒簇的不同类型有一定意义,不同意De Vos提出的型、型仅代表同一种颗粒在聚集过程中的不同阶段的假说. Shimizu发现高度选择NANB肝炎黑猩猩(即无A、B型肝炎感染中)型颗粒的检出率达74%,而在HBsAg阳性肝组织中该颗粒阳性率为15%,对照组则为0.应该指出,HBsAg阳性组中也存在NANB肝炎交叉感染的可能性.这些结果支持上述核内颗粒为NANB肝炎超微结构标记的假说.

1989年确认HCV是一种RNA病毒,是NANB输血后肝炎和散发性肝炎的主要病原体.Balercia et al<sup>[39]</sup>于1993年报道电镜观察6例由HCV引起的慢性活动性肝炎肝组织标本,其中2例有核内病毒样颗粒,呈不规则圆形,或无定形结构,直径为18-22 nm.显然他与HBV的规则圆形结构和大小相异.这些与HCV感染有关的核内颗粒与HCV肝炎被认定为独立疾病之前称为NANB肝炎的肝组织核内颗粒相似.这种颗粒的特性尚未被阐明,仅代表一个与HCV感染有关的形态.

Prince et al<sup>[40]</sup>, Iwarsones et al<sup>[44]</sup>相继在NANB肝炎患者或黑猩猩肝细胞胞质中发现了“胞质病毒”,其直径在85-90 nm,核心40-45 nm. Feinstone et al<sup>[42]</sup>、Bradley et al<sup>[43]</sup>分别报道,NANB肝炎的致病因子呈管状结构,因此把NANB肝炎的致病因子称为管状形成因子(tubule forming agent, TFA). TFA直径<80 nm,对氯仿敏感,提示该结构中存在必需的脂质结构.但有人认为,肝细胞质中所见的特有管状结构,只是NANB肝炎致病因子造成的特殊病理改变,而不是致病因子本身的特性及结构.1987、1989年Fagan et al<sup>[44,45]</sup>先后报道了几例散发性亚急性重症NANB肝炎病例,其肝组织塌陷区内再生肝细胞胞质中有病毒样颗粒,后者具有双层外壳,直径60-80 nm.但这些颗粒是否就是NANB肝炎病毒胞质颗粒,还有待于高度敏感、特异的免疫细胞化学等方法探明.

1998年, Bosman et al<sup>[46]</sup>通过透射电镜(transmission electron microscopy, TEM)在血清HCV RNA阳性的2例

成年人及4例患儿的肝组织中检测到颗粒大小为45 nm的病毒样颗粒(virus-like particle, VLP),分布于内质网囊腔及感染的肝细胞质中.但到目前为止,在丙型肝炎患者肝组织中直接检测HCV阳性颗粒还很困难,其主要原因可能是肝组织中HCV颗粒含量极少.

2.2 HCV患者血清中病毒样颗粒 Takahashi et al<sup>[47]</sup>曾用电镜和固相免疫电镜观察了患者血中HCV.他们采集4名抗-HCV核心抗体强阳性志愿者血浆720 ml,以溴化钾密度梯度法纯化病毒,取密度 $1.150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组分做DEM法观察,见直径55 nm球形病毒样颗粒,但背景存在较多脂蛋白等杂质,影响观察和对病毒的正确辨认.因而用0.05% Tween80处理阳性组分,并以抗-HCV核心蛋白抗体包被电镜载网膜,以黏附经Tween80处理的病毒标本,结果显示,经较长时间(1 h)处理的标本可见缺乏病毒外膜,直径33 nm的核心颗粒,而仅经15 min处理的标本则可见直径55 nm、部分外膜破裂并含核样结构的病毒颗粒.这些结果表明,Tween80处理可裂解病毒脂蛋白外膜,从而暴露HCV核心颗粒的抗原性,因而被特异抗体黏附.

Kaito et al<sup>[48]</sup>首次用特异性的抗假定HCV包膜蛋白的多克隆抗体及单克隆抗体,对含高效价HCV RNA,而HBsAg、抗-HTLV<sub>1</sub>和HIV均阴性的血浆标本经反复超速离心并经连续蔗糖密度梯度分离,结果,在密度 $1.140-1.160 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组分中电镜见到55-65 nm球形病毒样颗粒,有棘状突起,形态特性与其他黄病毒相似.进行间接免疫电镜鉴定,发现病毒外膜为胶体金颗粒特异标记,证明所见确为HCV颗粒.关于病毒颗粒的大小,论文作者描述为直径55-65 nm,但陈良标 et al<sup>[49]</sup>根据论文照片提供的标尺测量,病毒的实际大小是:含包膜的完整病毒直径110-130 nm,内含直径55-65 nm圆球形核心或核壳体.核壳体表面6 nm长的细钉状突起,可能是病毒核壳体的子粒结构.病毒包膜与核心之间间距25-35 nm,类似疱疹病毒形态.病毒包膜不稳定,纯化过程中易破裂丢失,故不少报告HCV直径55-65 nm,实际可能是指病毒的核心结构.

Choo et al<sup>[50]</sup>发现在密度梯度离心后,血清中出现二种不同的颗粒,分别为 $1.186-1.213 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 及 $1.099-1.127 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,但当血清中的Ig被黏附后,再离心则很少能见到高密度颗粒,而低密度颗粒则无明显变化,提示高密度颗粒是HCV黏附Ig等成分形成的,低密度颗粒才是真正的HCV颗粒.病毒颗粒与免疫球蛋白黏附,可使HCV的致病性减弱,并可能有中和HCV的作用.另外,他们还发现这二种不同颗粒中的HCV高变区核苷酸有差异,以低密度颗粒中高变区的变异更大,可能是免疫压力选择的结果.

Watson et al<sup>[51]</sup>研究发现,约75%的急性感染者血中出现低密度颗粒,而高密度颗粒可见于急性感染后的慢性期及几乎所有的HCV RNA阳性的慢性感染患者.免疫缺陷患者HCV颗粒浓度明显升高,但其滴度与病

情无显著相关性.在抗-HCV及HCV RNA阳性的供血者中, ALT正常者的HCV密度为1.08-1.11 g/ml,而异常者则有1 090-1 100 g·L<sup>-1</sup>及1 220-1 250 g·L<sup>-1</sup>二种密度,提示HCV的颗粒状态与肝炎活动状态相关.1998年, Trestard et al<sup>[52]</sup>通过电镜观察,在密度为1 130 g·L<sup>-1</sup>的梯度中发现了直径为45 nm的核心样颗粒,在1 060-1 070 g·L<sup>-1</sup>梯度中发现了直径60 nm的颗粒,与黄病毒属颗粒相似,支持低密度颗粒层中的病毒样颗粒为HCV颗粒的观点.

HCV核心蛋白除了构成病毒核衣壳外,还在宿主细胞转录、调亡、细胞转化、脂质代谢中有多种调节功能,并且在抑制宿主免疫反应中起作用.HCV核心蛋白被认为以感染性核衣壳包被的病毒体出现在HCV感染宿主的血流中, Maillard et al<sup>[53]</sup>发现在HCV感染者血浆中存在具有病毒颗粒理化、形态、抗原特性的HCV无包膜核衣壳,这些颗粒的CsCl漂浮密度为1 320-1 340 g·L<sup>-1</sup>,大小相异,电镜下直径以38-43 nm和54-62 nm二种为主.用这些病毒颗粒制备的单克隆抗体在血HCV抗原阳性的实验感染HCV的急性期黑猩猩肝细胞胞质中染色阳性.提示无包膜核衣壳的过量产生和释放入血是HCV的形态发生学特性,血液中循环核心颗粒的存在和其在感染早期肝细胞中聚集可能是HCV持续存在和许多免疫病理改变的原因.

2.3 HCV患者外周血单个核细胞中病毒样颗粒 陈良标 et al<sup>[54-56]</sup>在对慢性丙型肝炎患者PBMCs的PCR和免疫组化检测基础上,对强阳性病例标本重点进行了常规和免疫电镜研究.结果,在10例HCV Ag强阳性PBMCs标本中发现了形态结构均一致的病毒颗粒.病毒颗粒呈圆球形,有双层外膜,定位于胞质空泡或内质网池内,大小形态均一,具有病毒结构特征,且不难观察到显示病毒复制形态特征的病毒芽生现象.据所见病毒形态结构分析,直径65 nm的型颗粒可能为型完整病毒的核心颗粒,相当于乙型肝炎病毒Dane颗粒的核心抗原颗粒;而直径100-120 nm,内含65 nm核心的型颗粒可能为完整病毒.

### 3 HCV体外感染细胞中病毒样颗粒及超微结构改变

Serafino et al<sup>[57]</sup>在研究HCV感染后的人TOFE淋巴细胞的超微结构改变时观察到,胞质小囊泡中的病毒样颗粒主要定位于感染细胞的核周区,在此区域可见增生的高尔基体和内质网,富集的小囊和溶酶体结构.而且只在此区域观察到了细胞病毒性效应(cytopathic effect, CPE)样改变,扩大的胞质空泡中充满了退化的无定形物质和病毒样颗粒.最后胞质中充满了这些退化的空泡,这可能是这些受染细胞的终末状态.

1996年, Shimizu et al<sup>[58]</sup>用HCV感染Daudi细胞, 4-24 d后,用RT-PCR检测HCV复制中间体,加入抗C及抗E McAb,通过免疫荧光法及酶标记免疫电镜法观察,于第12天时可检测到胞质中的C蛋白及E蛋白,至第15天阳性率为20%阳性染色呈颗粒状,主要分布

于核周.第10天起可见胞质内有成簇的小管状结构,至第15天时数量增多,并出现网状小管结构.第8天培养液中可检测到有抗病毒活性的IFN,提示小管结构可能由IFN所诱生.在第15天,胞质小泡内可见有直径约50 nm的病毒颗粒,用抗C及抗E进行免疫酶染色,抗体可与颗粒特异结合,从而证实这些颗粒含有HCV抗原.在10只HCV感染黑猩猩中,1只E蛋白阳性,经电镜检测发现了与培养细胞中相似的病毒样颗粒,但8例AHC患者中则未观察到相同的结果.

Steffan et al<sup>[59]</sup>用HCV阳性血清感染Daudi细胞,在不同时间点电镜下观察,感染后2 d可以观察到类似黄热病毒在肝细胞瘤细胞系中的改变:(1)可见一些病毒颗粒,直径大约42 nm,球形,直径30 nm电子致密的核衣壳,被膜包绕,与黄热病毒在已经显示典型的调亡早期阶段细胞中大小、结构一致;(2)大量富膜细胞器,尤其是内质网和囊泡结构;(3)膜增生;(4)胞质内电子致密包涵体与其他黄病毒的核衣壳相似.一些细胞在充满了无定型物质的内质网中可见直径30 nm圆形电子致密结构,突出的细胞病变特点为空泡状改变,尤其是扩大的囊泡和调亡改变常在含有富集病毒样颗粒细胞中发现,免疫杂交证实这些扩大的细胞中含有HCV RNA. HCV感染的Daudi细胞似乎很快激发细胞调亡,但并无病毒颗粒的有效释放.

Iacovacci et al<sup>[60]</sup>用HCV阳性血清感染体外培养的人胎肝细胞在感染后30 d的细胞质中观察到直径41-45 nm富集的病毒样颗粒.

Serafino et al<sup>[61]</sup>在HCV感染的TOFE细胞胞质中观察到平均直径45 nm的病毒样颗粒,多位于扩张的内质网中,由电子致密的核心和带突起的外膜组成,并见到类似于HCV感染的人和黑猩猩肝脏中所观察到的管状结构.有些病毒样颗粒外膜与内质网膜相连,提示病毒样颗粒可能从内质网出芽到胞质,在这些感染HCV的细胞扩大的胞质囊泡中充满无定形物质,类似黄病毒科病毒感染后改变.

### 4 HCV基因转染细胞中病毒样颗粒及超微结构改变

由于在感染HCV的人体、动物模型、细胞中直接观察HCV病毒样颗粒十分困难,许多学者开始采用HCV重组基因组转染细胞的方法进行研究.

Mizuno et al<sup>[62]</sup>曾把HCV-1b全基因组重组到带T7多聚酶的痘苗表达载体中,并转染HeLa G细胞,用免疫组化法证实这些细胞中可表达HCV C、E、NS<sub>3</sub>及NS<sub>5</sub>等病毒抗原.免疫电镜发现抗原主要定位于内质网膜上,而30 nm的核心颗粒存在于胞质中,用抗C McAb确证为C蛋白,提示C蛋白在胞质中装配后形成包被颗粒.而普通电镜在内质网池中也发现一直径为45 nm的带有包膜的病毒颗粒.该结果在COS细胞中可以重复.

Baumert et al<sup>[63,64]</sup>用包含HCV结构蛋白cDNA的重组HCV杆状病毒转染昆虫细胞,在扩大的胞质囊腔中

可见由重组基因表达的结构蛋白装配而成的病毒样颗粒,直径约40-60 nm,这些胞质囊腔可能来自内质网,CsCl及蔗糖密度梯度离心提示这些病毒样颗粒的与从HCV患者血中分离的病毒样颗粒生物物理特性相似,并且可以在小鼠体内介导体液和细胞免疫反应<sup>[66]</sup>。这个重组病毒表达系统中不含HCV P7多肽,说明不含P7多肽的HCV核心及包膜蛋白足以形成病毒颗粒<sup>[64]</sup>。

Blanchard et al<sup>[66]</sup>用表达编码HCV结构蛋白基因的重组Semliki森林病毒复制子,在哺乳动物细胞中装配成HCV病毒样颗粒。Liu et al<sup>[67]</sup>用分子克隆技术构建HCV核心蛋白基因重组质粒,并用脂质体转染法转染入QBC939细胞,重组质粒能够在此细胞中有效表达HCV-C蛋白,电镜下在胞质中发现了球型,有外膜,直径50-80 nm的HCV病毒样颗粒。Falcon et al<sup>[68]</sup>在表达HCV C及E1多肽的毕氏酵母菌中也用透射电镜观察到了病毒样颗粒,直径20-30 nm,沿内质网膜出现,但多定位于小囊泡中或自噬小体内,串珠状、链状、高密度网状结构或结晶状。结晶状病毒样颗粒由有序排列的直径20 nm的颗粒组成。这些病毒样颗粒在绵羊体内可诱导较强的体液免疫反应<sup>[69]</sup>。

总之,现研究认为,HCV在体内的存在形式包括(1)完整的独立HCV颗粒;(2)不完整的HCV颗粒(如核心颗粒);(3)与免疫球蛋白或脂蛋白结合的颗粒;(4)由感染细胞释放的含HCV成分的小泡。报道HCV颗粒直径在40-60 nm的较多,也有较小(20-30 nm)和较大(80-120 nm)的报道。多数研究认为HCV病毒颗粒由外膜及核心组成,外膜表面有钉状突起。HCV感染后的细胞多数可见扩大的胞质囊腔,病毒颗粒多存在胞质囊腔内,这些胞质囊腔认为来自扩大的细胞内质网。细胞核内、胞质、血清、体外培养细胞中HCV颗粒的大小、形式有差异,目前尚无统一认识。

## 5 参考文献

- Liu XF, Zou SQ, Qiu FZ. Construction of HCV-core gene vector and its expression in cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:135-138
- Clayton RF, Owsianka A, Aitken J, Graham S, Bhella D, Patel AH. Analysis of antigenicity and topology of E2 glycoprotein present on recombinant hepatitis C virus-like particles. *J Virol* 2002;76:7672-7682
- Beales LP, Rowlands DJ, Holzenburg A. The internal ribosome entry site (IRES) of hepatitis C virus visualized by electron microscopy. *RNA* 2001;7:661-670
- Kalkeri G, Khalap N, Garry RF, Fermin CD, Dash S. Hepatitis C virus protein expression induces apoptosis in HepG2 cells. *Virology* 2001;282:26-37
- Spahn CM, Kieft JS, Grassucci RA, Penczek PA, Zhou K, Doudna JA, Frank J. Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science* 2001;291:1959-1962
- Chen S, Wang YM. Genetic evolution of structural region of hepatitis C virus in primary infection. *World J Gastroenterol* 2002;8:686-693
- Zhu LX, Liu J, Li YC, Kong YY, Staib C, Sutter G, Wang Y, Li GD. Full-length core sequence dependent complex-type glycosylation of hepatitis C virus E2 glycoprotein. *World J Gastroenterol* 2002;8:499-504
- Jiang RL, Lu QS, Luo KX. Cloning and expression of core gene cDNA of Chinese hepatitis C virus in cosmid pTM3. *World J Gastroenterol* 2000;6:220-222
- Zhang SZ, Liang JJ, Qi ZT, Hu YP. Cloning of the non-structural gene 3 of hepatitis C virus and its inducible expression in cultured cells. *World J Gastroenterol* 1999;5:125-127
- Feng DY, Chen RX, Peng Y, Zheng H, Yan YH. Effect of HCV NS (3) protein on p53 protein expression in hep atocarcinogenesis. *World J Gastroenterol* 1999;5:45-46
- Zhu FL, Lu HY, Li Z, Qi ZT. Cloning and expression of NS3 cDNA fragment of HCV genome of Hebei isolate in E.coli. *World J Gastroenterol* 1998;4:165-168
- Rosenberg S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. *J Mol Biol* 2001;313:451-464
- Inoue K, Yoshida M. Overview of hepatitis C virus from its discovery to now. *Rinsho Byori* 2001;49:733-740
- Steinkuhler C, Koch U, Narjes F, Matassa VG. Hepatitis C virus protease inhibitors: current progress and future challenges. *Curr Med Chem* 2001;8:919-932
- Forns X, Bukh J. The molecular biology of hepatitis C virus. Genotypes and quasispecies. *Clin Liver Dis* 1999;3:693-716
- Kato N. Genome of human hepatitis C virus (HCV): gene organization, sequence diversity, and variation. *Microb Comp Genomics* 2000;5:129-151
- Drazan KE. Molecular biology of hepatitis C infection. *Liver Transpl* 2000;6:396-406
- De Francesco R, Neddermann P, Tomei L, Steinkuhler C, Gallinari P, Folgori A. Biochemical and immunologic properties of the nonstructural proteins of the hepatitis C virus: implications for development of antiviral agents and vaccines. *Semin Liver Dis* 2000;20:69-83
- Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of the hepatitis C virus. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2000;14:241-254
- Blanchard E, Brand D, Trassard S, Goudeau A, Roingeard P. Hepatitis C virus-like particle morphogenesis. *J Virol* 2002;76:4073-4079
- Clayton RF, Owsianka A, Aitken J, Graham S, Bhella D, Patel AH. Analysis of antigenicity and topology of E2 glycoprotein present on recombinant hepatitis C virus-like particles. *J Virol* 2002;76:7672-7682
- Wellnitz S, Klumpp B, Barth H, Ito S, Depla E, Dubuisson J, Blum HE, Baumert TF. Binding of hepatitis C virus-like particles derived from infectious clone H77C to defined human cell lines. *J Virol* 2002;76:1181-1193
- Flint M, Quinn ER, Levy S. In search of hepatitis C virus receptor (s). *Clin Liver Dis* 2001;5:873-893
- Rosenberg S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. *J Mol Biol* 2001;313:451-464
- Bartenschlager R, Lohmann V. Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. *Antiviral Res* 2001;52:1-17
- Kato N. Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama* 2001;55:133-159
- Feitelson MA, Larkin JD. New animal models of hepatitis B and C. *ILAR J* 2001;42:127-138
- Germi R, Crance JM, Garin D, Zarski JP, Drouet E. Hepatitis C virus culture systems. *Pathol Biol (Paris)* 2001;49:255-261
- Lechmann M, Liang TJ. Vaccine development for hepatitis C. *Semin Liver Dis* 2000;20:211-226
- Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of the hepatitis C virus. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2000;14:241-254
- Shimizu YK, Feinstone SM, Purcell RH, Alter HJ, London WT. Non-A, non-B hepatitis: ultrastructural evidence for two agents in experimentally infected chimpanzees. *Science* 1979;205:197-200
- Bradley DW, Cook EH, Maynard JE, McCaustland KA, Ebert JW, Dolana GH, Petzel RA, Kantor RJ, Heilbrunn A, Fields HA, Murphy BL. Experimental infection of chimpanzees with antihemophilic (factor VIII) materials: recovery of virus-like particles associated with non-A, non-B hepatitis. *J Med Virol* 1979;3:253-269
- Tsiquaye KN, Bird RG, Tovey G, Wyke RJ, Williams R, Zuckerman AJ. Further evidence of cellular changes associated with non-A, non-B hepatitis. *J Med Virol* 1980;5:63-71
- Burk KH, Cabral GA, Dreesman GR, Peters RL, Alter HJ. Ultrastructural changes and virus-like particles localized in liver hepatocytes of chimpanzees infected with non-A, non-B hepatitis. *J Med Virol* 1981;7:1-19
- Grimaud JA, Peyrol S, Vitvitski L, Chevallier-Queyron P, Trepo C. Hepatic intranuclear particles in patients with non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1980;303:818-819

- 36 Hantz O, Vitvitski L, Trepo C. Non-a, non-b hepatitis: identification of hepatitis-B-like virus particles in serum and liver. *J Med Virol* 1980;5:73-86
- 37 De Vos R, Vanstapel MJ, Desmyter J, De Wolf-Peeters C, De Groote G, Colaert J, Mortelmans J, De Groote J, Fevery J, Desmet V. Are nuclear particles specific for non-A, non-B hepatitis? *Hepatology* 1983;3:532-544
- 38 Busachi CA, Badiali de Giorgi L, Alberti A, Tremolada F, Laschi R, Realdi G, Pisi E. Intranuclear particles in non-A, non-B hepatitis. *Hepatology* 1984;4:571-573
- 39 Balercia G, Accordini C, Di Piramo D, Martella F, Tomezzoli A. An ultrastructural study of six cases of chronic active C hepatitis. A comparison with chronic active B hepatitis. *Ultrastruct Pathol* 1993;17:477-482
- 40 Prince AM, Huima T, Williams BA, Bardina L, Brotman B. Isolation of a virus from chimpanzee liver cell cultures inoculated with sera containing the agent of non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1984;2:1071-1075
- 41 Iwarson S, Schaff Z, Seto B, Norkrans G, Gerety RJ. Retrovirus-like particles in hepatocytes of patients with transfusion-acquired non-A, non-B hepatitis. *J Med Virol* 1985;16:37-45
- 42 Feinstone SM, Mihalik KB, Kamimura T, Alter HJ, London WT, Purcell RH. Inactivation of hepatitis B virus and non-A, non-B hepatitis by chloroform. *Infect Immun* 1983;41:816-821
- 43 Bradley DW, McCaustland KA, Cook EH, Schable CA, Ebert JW, Maynard JE. Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees. Physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus. *Gastroenterology* 1985;88:773-779
- 44 Fagan EA, Ellis DS, Portmann B, Tovey GM, Williams R, Zuckerman AJ. Microbial structures in a patient with sporadic non-A, non-B fulminant hepatitis treated by liver transplantation. *J Med Virol* 1987;22:189-198
- 45 Fagan EA, Ellis DS, Tovey GM, Portmann B, Williams R, Zuckerman AJ. Viruslike particles in liver in sporadic non-A, non-B fulminant hepatitis. *J Med Virol* 1989;27:76-80
- 46 Bosman C, Valli MB, Bertolini L, Serafino A, Boldrini R, Marcellini M, Carloni G. Detection of virus-like particles in liver biopsies from HCV-infected patients. *Res Virol* 1998;149:311-314
- 47 Takahashi K, Okamoto H, Kishimoto S, Munekata E, Tachibana K, Akahane Y, Yoshizawa H, Mishiro S. Demonstration of a hepatitis C virus-specific antigen predicted from the putative core gene in the circulation of infected hosts. *J Gen Virol* 1992;73:667-672
- 48 Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M, Yokoi M, Ishida S, Suzuki S, Kohara M. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol* 1994;75:1755-1760
- 49 陈良标. 电镜技术在病毒性肝炎诊断和研究上的应用. 电子显微学报 1997;16:574-587
- 50 Choo SH, So HS, Cho JM, Ryu WS. Association of hepatitis C virus particles with immunoglobulin: a mechanism for persistent infection. *J Gen Virol* 1995;76:2337-2341
- 51 Watson JP, Bevirt DJ, Spickett GP, Toms GL, Bassendine MF. Hepatitis C virus density heterogeneity and viral titre in acute and chronic infection: a comparison of immunodeficient and immunocompetent patients. *J Hepatol* 1996;25:599-607
- 52 Trestard A, Bacq Y, Buzelay L, Dubois F, Barin F, Goudeau A, Roingeard P. Ultrastructural and physicochemical characterization of the hepatitis C virus recovered from the serum of an agammaglobulinemic patient. *Arch Virol* 1998;143:2241-2245
- 53 Maillard P, Krawczynski K, Nitkiewicz J, Bronnert C, Sidorkiewicz M, Gounon P, Dubuisson J, Faure G, Crainic R, Budkowska A. Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients. *J Virol* 2001;75:8240-8250
- 54 安萍, 陈良标, 田惠英. 慢性丙型肝炎患者外周血单个核细胞丙型肝炎病毒检测及其意义. 中华内科杂志 1999;38:737-739
- 55 陈良标, 陈佩兰, 刘超英. 慢性丙型肝炎患者外周血单个核细胞(PBMC)HCV感染的电镜研究. 中国医学影像学杂志 1999;7: 110-111
- 56 Yao P, Chan LB, Hu X, Chen PL, Hu D. Hepatitis C virus infection and morphologic study in B lymphocytes of patient with hepatitis C. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2001;9:31-33
- 57 Serafino A, Valli MB, Andreola F, Carloni G, Bertolini L. Morphological modifications induced by HCV infection in the TOFE human lymphoblastoid cell line. *Res Virol* 1998;149:299-305
- 58 Shimizu YK, Feinstone SM, Kohara M, Purcell RH, Yoshikura H. Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology* 1996;23:205-209
- 59 Steffan A, Marianneau P, Caussin-Schwemling C, Royer C, Schmitt C, Jaek D, Wolf P, Gendralut J, Stoll-Keller F. Ultrastructural observations in hepatitis C virus-infected lymphoid cells. *Microbes Infect* 2001;3:193-202
- 60 Iacovacci S, Manzin A, Barca S, Sargiacomo M, Serafino A, Valli MB, Macioce G, Hassan HJ, Ponzetto A, Clementi M, Peschle C, Carloni G. Molecular characterization and dynamics of hepatitis C virus replication in human fetal hepatocytes infected in vitro. *Hepatology* 1997;26:1328-1337
- 61 Serafino A, Valli MB, Alessandrini A, Ponzetto A, Carloni G, Bertolini L. Ultrastructural observations of viral particles within hepatitis C virus-infected human B lymphoblastoid cell line. *Res Virol* 1997;148:153-159
- 62 Mizuno M, Yamada G, Tanaka T, Shimotohno K, Takatani M, Tsuji T. Virion-like structures in HeLa G cells transfected with the full-length sequence of the hepatitis C virus genome. *Gastroenterology* 1995;109:1933-1940
- 63 Baumert TF, Ito S, Wong DT, Liang TJ. Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *J Virol* 1998;72:3827-3836
- 64 Baumert TF, Vergalla J, Satoi J, Thomson M, Lechmann M, Herion D, Greenberg HB, Ito S, Liang TJ. Hepatitis C virus-like particles synthesized in insect cells as a potential vaccine candidate. *Gastroenterology* 1999;117:1397-1407
- 65 Lechmann M, Murata K, Satoi J, Vergalla J, Baumert TF, Liang TJ. Hepatitis C virus-like particles induce virus-specific humoral and cellular immune responses in mice. *Hepatology* 2001;34:417-423
- 66 Blanchard E, Brand D, Trassard S, Goudeau A, Roingeard P. Hepatitis C virus-like particle morphogenesis. *J Virol* 2002;76:4073-4079
- 67 Liu XF, Zou SQ, Qiu FZ. Construction of HCV-core gene vector and its expression in cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:135-138
- 68 Falcon V, Garcia C, de la Rosa MC, Menendez I, Seoane J, Grillo JM. Ultrastructural and immunocytochemical evidences of core-particle formation in the methylotrophic *Pichia pastoris* yeast when expressing HCV structural proteins (core-E1). *Tissue Cell* 1999;31:117-125
- 69 Acosta-Rivero N, Alvarez-Obregon JC, Musacchio A, Falcon V, Duenas-Carrera S, Marante J, Menendez I, Morales J. In vitro self-assembled HCV core virus-like particles induce a strong antibody immune response in sheep. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:300-304