

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01184

丙型肝炎患者血清中丙型肝炎病毒交叉中和抗体的检测

吉 瑾^{1,2}, 罗 源², 陆 伟³, 朱勇喆², 戚中田², 王 敦^{1*}, 赵 平^{2*}

- 1. 西北农林科技大学植物资源与利用教育部重点实验室, 杨凌 712100
- 2. 第二军医大学基础部微生物学教研室, 上海市医学生物防护重点实验室, 上海 200433
- 3. 第二军医大学基础部流行病学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 分析 HCV 感染者血清中是否存在交叉反应性中和抗体。**方法** 以分泌表达 HCV 包膜 E2 蛋白真核表达质粒转染的 293T 细胞培养上清液中的 HCV E2 蛋白作为检测抗原, 建立检测 HCV E2 抗体的 ELISA 方法, 检测 32 份 HCV 抗体阳性的慢性丙肝患者血清, 然后用免疫荧光分析血清与 HCV 全长包膜蛋白表达质粒转染的 293T 细胞的结合反应, 再用 5 株 HCV 假病毒(HCVpp)及两株细胞培养产生的 HCV(HCVcc)为模型分析血清的病毒中和活性。**结果** 32 份 HCV 抗体阳性血清中, 26 份血清可检测出 E2 抗体, 阳性率 81.3%。其中 HCV RNA 阳性的 12 份血清均为 E2 抗体阳性, E2 抗体水平与 HCV RNA 水平负相关。HCV E2 抗体阳性血清对 5 株 HCVpp 以及两株 HCVcc 的感染性均有不同程度的中和作用, 中和活性与 E2 抗体水平相平行。**结论** HCV 感染可诱导保护性体液免疫应答, 丙肝患者血清中存在交叉中和抗体, 提示开发能诱导广泛交叉中和抗体的丙肝疫苗具有可行性。

[关键词] 丙型肝炎病毒; 丙型肝炎; 中和抗体
[中图分类号] R 512.63 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)11-1184-05

Detection of hepatitis C virus cross-neutralization antibodies in sera of hepatitis C patients

Ji Jin^{1,2}, Luo Yuan², Lu Wei³, Zhu Yong-zhe², Qi Zhong-tian², Wang Dun^{1*}, Zhao Ping^{2*}

- 1. Key Laboratory of Plant Protection Resources & Pest Management of Ministry Education, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China
- 2. Department of Microbiology, Shanghai Key Laboratory of Medical Biodefense, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
- 3. Department of Epidemiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the presence of neutralization antibodies in the sera of hepatitis C patients. **Methods** A eukaryotic expression plasmid encoding carboxyl terminal-truncated HCV envelope protein 2 (E2) was transfected into human 293T cells. ELISA method was established to examine the anti-E2 antibodies in the sera of 32 hepatitis C patients. The full-length envelope protein expression plasmid was transfected into 293T cells and the reactivity of transfectant with anti-E2 IgG positive sera was analyzed by immunofluorescence. Five strains of HCV pseudotype particle (HCVpp), including H77 (1a genotype), Con-1 (1b genotype), J4 (1b genotype), J6 (2a genotype), and UNK3a (3a genotype), and two strains of cell cultured HCV (HCVcc) were used to assay the neutralization activity of 12 anti-E2 positive serum samples. **Results** ELISA results showed that 26 of 32 serum samples were anti-E2 IgG positive, with the positive rate being 81.3%. The 12 serum samples positive for HCV RNA were all anti-E2 IgG, and the virus load was negatively correlated with the anti-E2 antibody level. The anti-E2 positive sera could neutralize the infections of five strains of HCVpp and two strains of HCVcc to various extents, and the neutralization activity was consistent with the anti-E2 antibody level. **Conclusion** It is suggested that HCV infection can induce protective humoral immune response, and cross-neutralization antibodies against HCV are present in sera of hepatitis C patients, which indicates a feasibility for developing vaccines that can induce broadly-reactive neutralizing antibodies.

[Key words] hepatitis C virus; hepatitis C; neutralization antibodies

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(11):1184-1188]

[收稿日期] 2010-04-12 [接受日期] 2010-09-27
[基金项目] 国家自然科学基金(30901348), 上海市基础研究重点项目(08JC1405000)和上海市重点学科建设项目(B901). Supported by National Natural Science Foundation of China(30771929), Shanghai Key Basic Research Project(08JC1405000), and Shanghai Leading Academic Discipline Project(B901).
[作者简介] 吉 瑾, 硕士生. E-mail: leatesjj@yahoo.com.cn
* 通讯作者(Corresponding authors). Tel: 029-87091511, E-mail: wanghandecn@yahoo.com.cn; Tel: 021-81870990, E-mail: pnzhao@163.com

丙型肝炎病毒(HCV)为黄病毒科成员,是引起慢性肝病的主要病原体,其慢性感染率达 70%以上,目前还没有有效的疫苗可预防 HCV 感染。细胞免疫应答在控制和清除 HCV 感染过程中的作用已被大量研究所证实和被相关领域的学者所公认,在 HCV 感染早期产生强、多特异性和持久的抗 HCV 细胞免疫应答对于急性丙型肝炎的自然恢复极为重要^[1-4]。然而,体液免疫应答对 HCV 清除的影响尚存在争议,抗体是否具有保护作用及其作用程度尚不明确。

近年来建立的装配有功能性的 HCV 包膜蛋白,核心为小鼠反转录或 HIV 衣壳蛋白及含报告基因的基因组 RNA 的 HCV 假病毒(pseudotype particle, HCVpp)以及由细胞培养产生的 HCV (HCVcc)为分析包膜蛋白抗体的中和活性提供了良好的模型,尤其是 HCVpp,可用于对各基因型/亚型 HCV 中和抗体的分析^[5-8]。本研究用 4 个基因型/亚型的 5 株 HCVpp 以及属于 2a 亚型的 2 株 HCVcc 分析 HCV 患者血清的中和活性,结果表明,HCV 患者血清中存在交叉中和抗体,中和活性与 E2 抗体水平正相关,与 HCV RNA 水平负相关。

1 材料和方法

1.1 主要材料 分泌表达 J4 株 HCV 包膜 E2 蛋白的真核表达质粒 pcDNA3.1-1b661 以及表达 H77 株(1a 亚型)、Con-1 株(1b 亚型)、J6(2a 亚型)、J4 株(1b 亚型)、以及 UNK3a 株(3a 亚型)全长包膜蛋白的真核表达质粒由本实验室构建,均以 pcDNA3.1 为载体。丙肝患者血清由第二军医大学长海医院感染科和实验诊断科提供,均为 HCV 抗体阳性。HCVpp 构建用质粒由法国里昂 ENS 大学 Cosset FL 教授惠赠。2a 型嵌合 HCV 全长 cDNA 转录质粒 pFL-J6/JFH-1 以及人肝癌细胞株 Huh7.5 由美国洛克菲勒大学 Charles Rice 教授惠赠。JFH-1 株 HCVcc 上清由中国科学院上海巴斯德研究所钟劲教授惠赠。凝集素 GNA 购自 Sigma 公司。E2 多抗为 BioDesign 产品。酶标二抗以及 FITC 标记二抗为 Jackson 产品。T7 体外转录试剂盒为 Promega 产品。ECL 化学发光试剂购自浦飞生物科技有限公司。

1.2 丙肝患者血清 HCV E2 抗体的 ELISA 检测 用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 将质粒 pcDNA3.1-1b661 转染 293T 细胞,48 h 后用 E2 多抗为一抗,用蛋白质印迹法检测细胞裂解液和细胞培养上清中的 HCV E2 蛋白。以 GNA 包被酶标板,4℃过夜(1 μg/孔),次日 37℃封闭 2 h,洗板 1

次,每孔加质粒 pcDNA3.1-1b661 转染的 HEK 293T 细胞裂解液 100 μl,室温 2 h,洗板 2 次,每孔加 1:10 稀释的丙肝患者血清 100 μl,37℃ 40 min,洗板 5 次,加 HRP-抗人 IgG(1:2 000 稀释),37℃ 40 min,洗板 5 次,TMB 显色,测 D_{450}/D_{630} 。HCV 抗体阴性的 6 份健康成人血清作为阴性对照,丙肝患者血清的 D_{450}/D_{630} 大于阴性对照平均值的 2.1 倍定为 E2 抗体阳性。

1.3 丙肝患者血清中 HCV E2 抗体的免疫荧光检测 用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 将编码 J4 株 HCV 全长包膜蛋白表达质粒 pcDNA3.1-E1E2 转染 293T 细胞,48 h 后细胞裂解液进行 SDS-PAGE 和蛋白质印迹法分析,一抗为 E2 多抗。同时将质粒转染接种于 96 孔板内的 293T 细胞,48 h 后吸除孔内的培养液,每孔加甲醇 100 μl,至于-20℃冰箱固定 20 min,然后吸除甲醇,每孔用 PBS 洗一次,再加 0.1% TritonX-100 100 μl,室温放置 20 min,然后吸除之,用 PBS 洗一次,加 2% BSA 100 μl,室温封闭 1 h,然后吸除封闭液,每孔加稀释的丙肝患者或健康人血清 100 μl(1:50 稀释),室温摇动 1 h,洗孔 2 次,加 FITC-抗人 IgG 100 μl(1:100 稀释),室温摇动 1 h,洗孔 2 次,于荧光显微镜下观察细胞是否有绿色荧光染色。

1.4 HCVpp 制备^[5] 将 HEK 293T 细胞传代接种于 24 孔板内,次日以 Lipofectamine 2000 2 μl 以及质粒 HCV 全长包膜蛋白表达质粒 pcDNA3.1-E1E2 0.1 μg、pCMV-gag-pol 0.2 μg、pCMV-luciferase 0.2 μg 共转染。以 pCMV-gag-pol 0.25 μg、pCMV-luciferase 0.25 μg 共转染作为 HCVpp 对照上清。12 h 后吸除细胞培养上清,加入 500 μl 含 3%胎牛血清及双抗的 DMEM 培养液,置于孵箱内培养 24~48 h,然后收集细胞培养上清,高速离心去除残余细胞。

1.5 HCVpp 中和试验 取含 HCVpp 的培养上清 45 μl 置于微量离心管内,加入 HCV 患者或健康人血清 5 μl,混匀,于 37℃孵箱放置 1 h,随后将混合液加入预先接种有 Huh7.5 细胞的 96 孔板,设 2 个平行孔。5 h 后换液,72 h 后检测每孔的荧光素酶活性(RLU),计算中和率:(加正常人血清孔 RLU-丙肝患者血清孔 RLU-HCVpp 对照上清孔 RLU)/(加正常人血清孔 RLU-HCVpp 对照上清孔 RLU)×100%。

1.6 HCVcc 制备^[8] Xba I 酶切线性化质粒 pFL-J6/JFH-1,等体积苯酚/氯仿/异戊醇(体积比 25:24:1)抽提线性化质粒,室温乙醇沉淀 20 min,

8 000×*g*离心 20 min,弃上清,沉淀干燥后以适量 DEPC 处理水溶解,再以之为模板,用 T7 体外转录试剂盒进行体外转录, RNA 转录产物以电穿孔转染 Huh7.5 细胞,7~14 d 后,取细胞培养上清用梯度稀释法感染接种于 96 孔板中的 Huh7.5 细胞,免疫荧光检测感染性 HCVcc。

1.7 HCVcc 中和试验 取 J6/JFH-1 株或 JFH-1 株 HCVcc 上清 5 μl(10⁵ CFU/ml)置于微量离心管内,加入丙肝患者或健康人血清 10 μl,混匀,于 37℃ 孵箱放置 1 h,随后将混合液加入预先接种有 Huh7.5 细胞的 96 孔板,设 2 个平行孔。5 h 后换液,72 h 后用逆转录-实时荧光定量 PCR 检测细胞内的 HCV RNA 相对水平^[8],计算中和率:(加正常人血清孔 HCV RNA 相对水平-丙肝患者血清孔 HCV RNA 相对水平)/加正常人血清孔 HCV RNA 相对水平×100%。

1.8 统计学处理 采用 *t* 检验,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 HCV 包膜 E2 蛋白的表达和分泌 将编码有截短的 1b 型 J4 株 HCV 包膜质粒 pcDNA3.1-1b661 转染 293T 细胞,用 E2 多抗对细胞裂解液和培养上清液进行蛋白质印迹法分析可检测到 E2 蛋白的表达和分泌,培养上清中的 E2 相对分子质量略大于胞内 E2,可能与分泌 E2 的糖基化程度较高有关(图 1)。

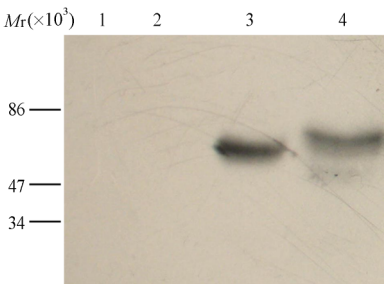


图 1 HCV 包膜蛋白的表达与分泌

Fig 1 Analysis of expression and secretion of HCV envelope protein by Western blotting

1: Lysate of 293T cells transfected with mock vector; 2: Supernatant of 293T cells transfected with mock vector; 3: Lysate of 293T cells transfected with encoding full length of HCV envelope protein; 4: Supernatant of 293T cells transfected with encoding full length of HCV envelope protein

2.2 丙肝患者血清中存在 HCV 包膜 E2 蛋白抗体 HCV 包膜蛋白为高度糖基化蛋白,凝集素 GNA

能结合包膜蛋白的 N-聚糖,因此可将 GNA 包被于酶标板,以之吸附包膜 E2 蛋白,从而建立 E2 抗体的 ELISA 检测方法。

6 名健康成人血清的 *D*₄₅₀/*D*₆₃₀ 界于 0.032 和 0.119 之间,平均值为 0.078,以之 2.1 倍 0.164 为 cut off 值,则 32 名丙肝患者血清中,E2 抗体阳性血清 26 例,阳性率 81.3%。

2.3 HCV 包膜 E2 蛋白抗体与血清中 HCV RNA 水平负相关 ELISA 检测的 32 份丙肝患者血清中,有 12 份血清经反转录-实时荧光定量 PCR 检测为 HCV RNA 阳性,其余 20 份血清未经逆转录-实时荧光定量 PCR 检测。HCV RNA 阳性的 12 份血清均为 E2 抗体阳性,E2 抗体水平与 HCV RNA 水平负相关(相关系数 *R*²=0.891,*P*<0.01),见图 2。

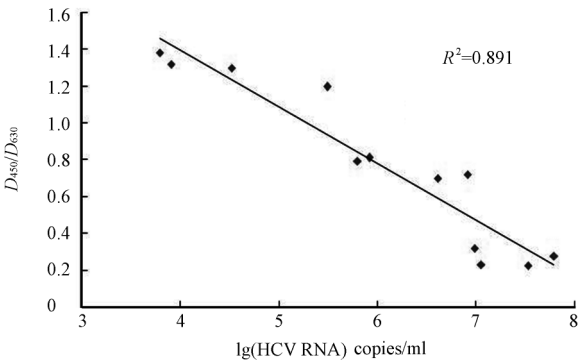


图 2 HCV RNA 阳性血清中 E2 抗体水平与 HCV RNA 水平负相关

Fig 2 Level of anti-HCV E2 IgG was negatively correlated with HCV RNA load in HCV RNA positive sera

2.4 免疫荧光分析丙肝患者血清中的包膜蛋白抗体 为了进一步分析 ELISA 检测结果的准确性,我们挑选了 4 例健康成人血清和 12 例 E2 抗体阳性的丙肝患者血清,根据 *D*₄₅₀/*D*₆₃₀ 将这 12 例血清的 E2 抗体分为低(L1:0.231,L2:0.227,L3:0.278,L4:0.321)、中(M1:0.699,M2:0.721,M3:0.793,M4:0.812)、高(H1:1.198,H2:1.299,H3:1.321,H4:1.383)3 种不同水平。

将 J4 株全长 E1E2 表达质粒转染 293T 细胞,细胞裂解液进行蛋白质印迹法分析表明质粒转染的 293T 细胞能表达质粒编码的全长 E2 蛋白(图 3)。随后分析 16 例血清与 293T 细胞的结合反应,结果表明,健康人血清不与 E1E2 质粒转染的 293T 细胞结合,而 E2 抗体阳性丙肝患者血清能与 293T 细胞发生特异性结合,E2 抗体水平越高的血清与细胞结合的荧光强度越强(免疫荧光结果未示)。

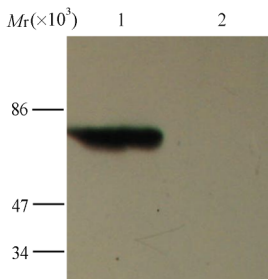


图 3 蛋白质印迹法检测全长 HCV 包膜 E2 蛋白在 293T 细胞内表达

Fig 3 Analysis of full envelope 2 protein in 293T cells by Western blotting analysis

1: Lysate of 293T cells transfected with plasmid encoding full length of HCV envelope protein; 2: Lysate of 293T cells transfected with mock vector

2.5 丙肝患者血清能交叉中和 HCVpp 的感染性 用 5 株 HCVpp 为模型评价抗体的中和活性,将健康成人血清与 HCVpp 混合以后感染 Huh7.5 细胞的 RLU 值与单纯将 HCVpp 感染 Huh7.5 细胞的 RLU 值的差异低于 5%,表明健康成人血清对 HCVpp 的感染性无明显影响,因此,可以将健康成人血清作为阴性对照,计算 HCV 患者血清对 HCVpp 的中和率。图 4 为 L、M、H(分别代表低、中和高水平 E2 抗体血清)组血清对不同株 HCVpp 的平均中和率,各组 E2 抗体阳性血清均对不同株 HCVpp 有不等的中和作用,随着 E2 抗体水平的增高,血清对 HCVpp 的中和作用也相应增强。H 组血清对各株 HCVpp 的中和作用均高于 L 组($P<0.01$)。除 UNK3a 株外, H 组血清对其他 4 株 HCVpp 的中和率高于 M 组($P<0.05$)。除 J4 株外, M 组血清对其他 4 株 HCVpp 的中和率高于 L 组($P<0.05$)。

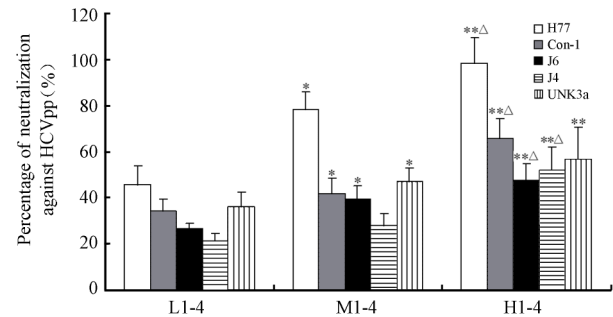


图 4 HCV 包膜 E2 抗体阳性血清对 HCVpp 的中和作用
Fig 4 Neutralization against HCVpp by sera positive for anti-HCV E2 antibodies

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs L1-4 group; $\triangle P<0.05$ vs M1-4 group. $n=12$, $\bar{x}\pm s$. L: Low; M: Middle; H: High

2.6 丙肝患者血清能交叉中和 HCVcc 的感染性 分别将健康人以及 E2 抗体阳性的丙肝患者血清与 JFH-1 和 J6/JFH-1 嵌合 HCVcc 上清混合孵育,然后感染 Huh7.5 细胞,3 d 后检测细胞内 HCV RNA 相对水平,评价血清对 HCV 的中和作用,结果表明,E2 抗体水平较高的血清可有效中和该 2 株 HCVcc 的感染性,但 E2 抗体水平较低血清的病毒中和作用不明显,结果也表明,E2 抗体水平越高的血清对 HCV 的中和作用越强, H 组血清的中和作用强于 L 组($P<0.001$)和 M 组($P<0.01$), M 组血清的中和作用也强于 L 组($P<0.01$),见图 5。

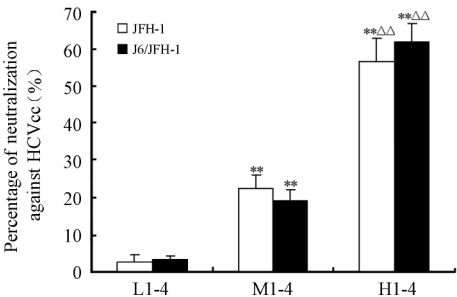


图 5 HCV 包膜 E2 抗体阳性血清对 HCVcc 的中和作用
Fig 5 Neutralization against HCVcc by sera positive for anti-HCV E2 antibodies

** $P<0.01$ vs L1-4 group; $\triangle\triangle P<0.01$ vs M1-4 group. $n=12$, $\bar{x}\pm s$. L: Low; M: Middle; H: High

3 讨论

明确界定抗体在 HCV 免疫清除中的作用,对于认识 HCV 慢性感染的发生机制以及开发 HCV 疫苗有重要意义^[9-13]。HCV 为有包膜的病毒,包膜蛋白与靶细胞表面受体的相互作用是介导 HCV 侵入胞内的关键步骤,HCV 包膜蛋白由 E1 和 E2 通过非共价键形成异二聚体组成,其中 E2 蛋白介导 HCV 与肝细胞膜受体的结合^[14-15],E2 蛋白理论上应该是重要的中和抗体靶抗原。

本研究用属于 1b 亚型的 J4 株 E2 蛋白为抗原检测丙肝患者血清中的 E2 抗体,主要是因为我国的主要流行株为 1b 亚型,用 J4 株为检测抗原有利于提高检测的敏感性。结果 32 例丙肝患者血清的 E2 抗体阳性率为 81.3%。由于大部分 HCV 感染者在急性感染阶段肝损伤的症状不明显,以急性丙肝首次就诊的病例少见,在中国这种现象尤为明显,因此从 HCV 急性感染阶段开始进行系统性抗体以及 HCV RNA 检测的报道不多见。有限的一些对急性 HCV 感染者血清进行的连续观察提示,HCV 感染

后包膜蛋白抗体产生滞后,然而在慢性感染阶段,血清中可持久存在包膜蛋白抗体^[16]。虽然缺乏这些受检者的临床资料,但根据这些信息,我们认为这些患者主要为慢性感染者。为了验证 ELISA 检测的特异性,我们进一步用免疫荧光分析血清与表达全长包膜蛋白的 293T 细胞的反应,结果 ELISA 检测的抗体水平与细胞荧光强度一致。

本实验中 12 份 HCV RNA 阳性血清(其他 20 份未测 HCV RNA)均为 E2 抗体阳性,HCV RNA 载量与 E2 抗体水平负相关,HCV RNA 水平高的血清 E2 抗体水平较低,而 E2 抗体水平较高的血清则 HCV RNA 水平较低,这提示 E2 抗体可能对 HCV 病毒血症具有抑制作用。

用 HCVpp 为模型,评价低、中、高 3 种不同水平 E2 抗体的血清对 5 株 HCVpp 的中和活性,结果大部分血清能不同程度的交叉中和 1a、1b、2a、2b、3a 亚型 HCVpp 的感染性,中和活性与 E2 抗体水平正相关。我国流行的 HCV 以 1b 型为主,但各组血清均对 H77 株的中和率最高。值得注意的是,共转染制备的 5 株 HCVpp 中也以 H77 株的产量或者感染性最高。进一步用 2 株同属 2a 亚型的 HCVcc 为模型评价 E2 抗体阳性血清的中和作用,结果提示 E2 抗体阳性血清对于 HCVcc 具有中和作用,但低水平 E2 抗体血清的中和作用明显不及较高水平 E2 抗体阳性血清。HCVpp 和 HCVcc 中和实验的结果还表明,E2 抗体阳性的丙肝患者血清具有广泛的交叉中和活性,同一份血清可中和不同基因型/亚型 HCVpp 和 HCVcc 的感染性,提示 HCV 包膜蛋白中存在保守的中和抗体表位。这与最近基于一系列来源于丙肝患者的单克隆抗体的交叉反应性分析结果相一致^[17]。

总之,本研究在大多数丙肝患者血清中检测出 E2 抗体,并且发现:HCV RNA 水平与 E2 抗体水平负相关,E2 抗体阳性的丙肝患者血清能交叉中和多个基因型/亚型 HCVpp 及 HCVcc 的感染性,血清的中和活性与 E2 抗体水平正相关。这些结果提示 HCV 感染可诱导保护性体液免疫应答,开发基于 HCV 包膜蛋白的丙肝疫苗具有可行性。

[参 考 文 献]

[1] Rohrbach J,Robinson N,Harcourt G,Hammond E,Gaudieri S,Gorgievski M,et al. Cellular immune responses to HCV core increase and HCV RNA levels decrease during successful antiretroviral therapy[J]. Gut,2010,59:1252-1258.

[2] Rodrigue-Gervais I G,Rigsby H,Jouan L,Sauvé D,Sékaly R,Willems B,et al. Dendritic cell inhibition is connected to exhaustion of CD8⁺ T cell polyfunctionality during chronic hepatitis C

virus infection[J]. J Immunol,2010,184:3134-3144.

[3] Ulsenheimer A,Gerlach J T,Gruener N H,Jung M C,Schirren C A,Schraut W,et al. Detection of functionally altered hepatitis C virus-specific CD4 T cells in acute and chronic hepatitis C[J]. Hepatology,2003,37:1189-1198.

[4] Ulsenheimer A,Lucas M,Seth N P,Tilman Gerlach J,Gruener N H,Loughry A,et al. Transient immunological control during acute hepatitis C virus infection: *ex vivo* analysis of helper T-cell responses[J]. J Viral Hepat,2006,13:708-714.

[5] Bartosch B,Dubuisson J,Cosset F L. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes[J]. J Exp Med,2003,197:633-642.

[6] Hsu M,Zhang J,Flint M,Logvinoff C,Cheng-Mayer C,Rice C M,et al. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2003,100:7271-7276.

[7] Wakita T,Pietschmann T,Kato T,Date T,Miyamoto M,Zhao Z,et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome[J]. Nat Med,2005,11:791-796.

[8] Lindenbach B D,Evans M J,Syder A J,Wölk B,Tellinghuisen T L,Liu C C,et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture[J]. Science,2005,309:623-626.

[9] Kamal S M,Amin A,Madwar M,Graham C S,He Q,Al Tawil A,et al. Cellular immune responses in seronegative sexual contacts of acute hepatitis C patients[J]. J Virol,2004,78:12252-12258.

[10] Post J J,Pan Y,Freeman A J,Harvey C E,White P A,Palladineti P,et al. Clearance of hepatitis C viremia associated with cellular immunity in the absence of seroconversion in the hepatitis C incidence and transmission in prisons study cohort[J]. J Infect Dis,2004,189:1846-1855.

[11] Ishii K,Rosa D,Watanabe Y,Katayama T,Harada H,Wyatt C,et al. High titers of antibodies inhibiting the binding of envelope to human cells correlate with natural resolution of chronic hepatitis C[J]. Hepatology,1998,28:1117-1120.

[12] Yu M Y,Bartosch B,Zhang P,Guo Z P,Renzi P M,Shen L M,et al. Neutralizing antibodies to hepatitis C virus (HCV) in immune globulins derived from anti-HCV-positive plasma[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2004,101:7705-7710.

[13] Logvinoff C,Major M E,Oldach D,Heyward S,Talal A,Balfe P,et al. Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2004,101:10149-10154.

[14] Burlone M E,Budkowska A. Hepatitis C virus cell entry:role of lipoproteins and cellular receptors[J]. J Gen Virol,2009,90:1055-1070.

[15] Helle F,Dubuisson J. Hepatitis C virus entry into host cells[J]. Cell Mol Life Sci,2008,65:100-112.

[16] Zeisel M B,Cosset F L,Baumert T F. Host neutralizing responses and pathogenesis of hepatitis C virus infection[J]. Hepatology,2008,48:299-307.

[17] Law M,Maruyama T,Lewis J,Giang E,Tarr A W,Stamataki Z,et al. Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge[J]. Nat Med,2008,14:25-27.