

- HC Jr. Occult metastases in the sentinel lymph nodes of patients with early stage breast carcinoma: A preliminary study. *Cancer* 1999;86:990-996
- 18 Pfeifer JD. Sentinel lymph node biopsy. *Am J Clin Pathol* 1999; 112:599-602
- 19 Hiratsuka M, Miyashiro I, Ishikawa O, Furukawa H,

- Motomura K, Ohigashi H, Kameyama M, Sasaki Y, Kabuto T, Ishiguro S, Imaoka S, Koyama H. Application of sentinel node biopsy to gastric cancer surgery. *Surgery* 2001;129:335-340
- 20 Wong JH, Steinman S, Calderia C, Bowles J, Namiki T. Ex vivo sentinel node mapping in carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 2001;233:515-521

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

应用表达谱芯片技术筛选 HBcAg 反式调节基因

徐志强, 成军, 张鸿飞, 王建军, 刘妍, 纪冬

徐志强, 成军, 张鸿飞, 王建军, 刘妍, 纪冬, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室感染三科 北京市 100039
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室感染三科. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

摘要

目的: 筛选与克隆HBcAg激活基因, 了解其在体内的调节功能线索及机制。

方法: 以分子生物学技术构建HBcAg的真核表达载体pcDNA3.1(-)-HBcAg, 以表达质粒pcDNA3.1(-)-HBcAg转染HepG2细胞, 以空载体pcDNA3.1(-)为平行对照, 制备转染后的细胞裂解液, 提取mRNA. 应用基因表达谱芯片技术对差异表达mRNA进行检测和分析。

结果: HBcAg表达质粒pcDNA3.1(-)-HBcAg经酶切鉴定和DNA测序鉴定正确. 经基因表达谱芯片分析, 29种基因的表达水平上调, 17种基因的表达水平下调。

结论: 筛选到一些与细胞内信号传导、免疫调节、细胞凋亡、蛋白质翻译合成、肿瘤发生相关的HBcAg反式调节的靶基因。

徐志强, 成军, 张鸿飞, 王建军, 刘妍, 纪冬. 应用表达谱芯片技术筛选HBcAg反式调节基因. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2886-2890
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2886.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)属于嗜肝DNA病毒, 是一种严重

危害人类健康的致病因子. 不仅引起急、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化(LF)、肝细胞癌(HCC)的发生发展密切相关^[1]. HBcAg是由HBV DNA C基因区编码的一种结构性蛋白, 有保守的三维结构, 可因血清型不同而有183-185个氨基酸残基(aa), 在乙型肝炎病毒(HBV)的生活周期中, 病毒核心抗原(HBcAg)、病毒mRNA和DNA聚合酶共同构成核心颗粒, 在核心颗粒中完成病毒DNA的合成^[2-3]. 基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)是由大量目的基因片段有序、密集地固定于玻片或尼龙膜上制成芯片, 将两组组织或细胞的mRNA逆转录成cDNA, 掺入荧光标记, 同时与芯片杂交, 通过扫描分析每一位置的荧光信息可以快速有效地检测到二者间差异表达的基因^[4-7]. 为从不同角度对HBcAg的反式调节基因进行验证及了解HBcAg对于肝细胞基因表达谱的影响, 我们应用基因表达谱芯片技术检测肝癌细胞系在HBcAg基因转染后差异表达的基因谱的变化。

1 材料和方法

1.1 试剂 HepG2细胞及感受态*E.coli* JM109(本室保存), pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen); FuGENE6转染试剂, 总RNA提取试剂Trizol购自Gibco公司, mRNA Purification试剂盒购自Amersham Pharmacia Biotech, 表达谱芯片由上海联合基因有限公司提供. pcDNA3.1(-)-HBcAg表达载体由本室构建。

1.2 目的基因的扩增与纯化 以质粒pCP10中所含的HBV ayw亚型的DNA序列为模板, 用PCR方法扩增HBcAg基因片段. 上游引物为: 5'-GCT AGC CAT GGA CAT CGA CCC TTA TA-3', 下游引物为: 5'-GGT ACC CTA ACA TTG AGG TTC CCG AG-3'. PCR产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳, 切胶, 以GeneClean II kit (Bio 101公司)回收纯化550 bp DNA条带。

1.3 细胞培养和取材 在35 mm培养皿中常规培养HepG2细胞,细胞生长至对数期时,以脂质体转染试剂FuGENE分别将2 μ g pcDNA3.1(-)-HBcAg和空载体pcDNA3.1(-)转染 HepG2 细胞,48 h后收获细胞,每 5×10^6 个细胞加入 1 mL Trizol 试剂,立即于液氮中保存。

1.4 总 RNA 提纯及 mRNA 纯化 使用 Trizol 试剂一步法提取 PFA 及 0.9% NaCl 处理的 Jurkat 细胞总 RNA(分别标记为实验组和对照组),样品经分光光度计检测吸光度 A 值,并行热稳定实验,于 -20°C 和 70°C 保温 1 h 后,经琼脂糖凝胶电泳检测 28 s、18 s 条带变化。以 Qiagen 公司 Oligotex mRNA Midi Kit 纯化得 mRNA。操作按说明书进行,并行电泳检测。

1.5 探针标记 参照 Schena *et al*^[1] 方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化。Cy3-dUTP 标记对照组细胞 mRNA(5 μ g), Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA(5 μ g)。乙醇沉淀后溶解在 20 μ L $5 \times \text{SSC}+2\text{g/L}$ SDS 杂交液中。

1.6 芯片制备 芯片包含的 1 152 个 cDNA 由上海联合基因有限公司提供,包括原癌基因和抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等。以通用引物进行 PCR 扩增,PCR 产物长度为 1 000–3 000 bp。靶基因以 0.5 g/L 溶解于 $3 \times \text{SSC}$ 溶液中,用 Cartesian 公司的 Cartesian 7 500 点样仪及 TeleChem 公司的硅烷化玻片进行点样。玻片经水合(2 h)、室温干燥(30 min),UV 交联,再分别用 2 g/L SDS、水及 2 g/L 的硼氢化钠溶液处理 10 min,晾干备用。

1.7 杂交及洗涤 将基因芯片和杂交探针在 95°C 水浴变性 5 min,将混合探针加在基因芯片上,置于 60°C 杂交 15–17 h。依次以 $2 \times \text{SSC}+2\text{g/L}$ SDS、 $1 \times \text{SSC}+2\text{g/L}$ SDS、 $1 \times \text{SSC}$ 洗涤 10 min,室温晾干。

1.8 检测与分析 用 General Scanning 公司的 ScanArray 3000 扫描芯片。用预先选定的内参照基因(24 条管家基因,每个基因点 2 个点,共 48 个点)对 Cy3 和 Cy5 的原始提取信号进行均衡和修正。用 ImaGene 3.0 软件分析 Cy3、Cy5 两种荧光信号的强度,计算 Cy5/Cy3 比值。阳性结果判断: $\text{Cy5/Cy3} > 2.0$, 红色荧光,显示表达增强; $\text{Cy5/Cy3} < 0.5$, 为绿色荧光,显示表达减弱。

2 结果

2.1 重组质粒的酶切鉴定 pcDNA3.1(-)-HBcAg 载体经 *Kpn*I/*Nhe*I 双酶切鉴定可见 550 bp 的 HBcAg 基因 DNA 条带,证明载体构建正确(图 1)。

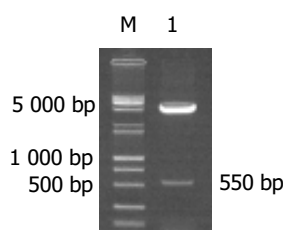


图 1 pcDNA3.1(-)-HBcAg 载体经 *Kpn*I/*Nhe*I 双酶切电泳图。

2.2 总 RNA 的定性、定量分析 总 RNA 的吸光度 $A_{260}/A_{280} = 1.82$, 热稳定实验 70°C 保温 1 h 与 -20°C 1 h 的电泳条带比较,显示 28 S 条带无明显降解,电泳结果证实已抽提高纯度的总 RNA。

2.3 芯片杂交体系验证及结果分析 在芯片上共有 1 152 个 cDNA。为了监控芯片杂交体系,在芯片上设置了阴性对照(8 条水稻基因,共 8 个点),这些点的杂交信号均很低,证实了数据的可靠性。由于实验组探针标记 Cy5 荧光素(呈红色),对照组探针标记 Cy3 荧光素(呈绿色),红绿颜色的差异就显示该基因在实验组和对照组中基因表达水平上的差异,黄色代表表达水平无差异。按阳性标准,从 1 000 个基因中筛选出差异常表达基因共 46 条,其中 29 条基因表达显著增强($\text{Cy5/Cy3} > 2.0$), 17 条基因表达显著降低($\text{Cy5/Cy3} < 0.5$)。

2.4 差异表达基因分析 表达显著增强的基因有 29 条(表 1)。表达显著降低的基因有 17 条(表 2)。

3 讨论

HBcAg 存在于 Dane 颗粒的核心,是 HBV 的结构蛋白即病毒核壳蛋白,他反映血清中 Dane 颗粒的存在及肝内 HBV 的复制。HBcAg 由 HBV 基因组的 C 开放读码区(ORF)编码,从第二个 ATG(1 901 nt)起始翻译(终止密码子在 2 458 nt)。HBcAg 有保守的三维结构,可因血清型不同而有 183–185 个氨基酸残基(aa), M_r 21 000, 180 个 HBcAg 形成 27 nm 的正 20 面体以构成核心颗粒。HBcAg 已被证明含有 HBV 特异性 DNA 聚合酶,是有能力合成 DNA 的病毒特异性酶,是 HBV 复制的标志。存在于乙型肝炎患者血液和肝组织内的 HBcAg 具有重要的生物学特性和临床病理意义。HBcAg 具有高度免疫原性,在 T 细胞和 B 细胞水平上,HBcAg 的抗原性较 HBsAg 强 100 倍,几乎所有 HBV 感染者都产生抗-HBc, HBcAg 既可作为 T 细胞依赖性抗原,也可作为非 T 细胞依赖性抗原,诱导强烈细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)应答^[8]。对 HBcAg 的免疫应答在病毒清除中可能有重要作用^[9–10]。HBcAg 有鱼精蛋白样亲胞核性的羧基末端,可介导细胞核内转运信号,使大量 HBcAg 进入细胞核内,而其他嗜肝 DNA 病毒的核壳蛋白都不向核内转运。在病毒成熟过程中,核壳和外膜相互作用,形成病毒颗粒分泌的信号^[11–12]。HBcAg 具有保护病毒 mRNA,防止其被 RNA 酶降解的作用,对于乙肝病毒前基因组 RNA 的装配、基因组 DNA 的合成具有重要的作用。HBcAg 有高免疫原性,HBcAg 与 HBsAg 一同为细胞毒性 T 细胞(Tc)细胞识别的主要靶抗原。HBcAg 在 HBV 的装配和致病机制中是必不可少的,HBcAg 是否还通过其他途径影响免疫应答,损害肝细胞的功能,是否参与肝细胞癌的发生,如何作用,是研究 HBcAg 复杂功能中需要解决的关键点。寻找肝细胞中 HBcAg 的相互作用的基因,并进一步探明其机制,对解答上述问题有着重要意义。

表1 表达显著增加的基因

序号	GenBank 登录号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	NM_005917	苹果酸脱氢酶 1(MDH1)	2.010
2	NM_013943	细胞内氯化物通道蛋白 4(CLIC4)	2.018
3	NM_000176	核受体亚家族 3, C 组, 1 号(NR3C1)	2.020
4	AF012086	Ran 结合蛋白 2(RanBP2alpha)	2.034
5	AF072928	肌管蛋白相关蛋白 6	2.038
6	AK055660	克隆 IMR321000219	2.045
7	NM_001892	酪蛋白激酶 1, $\alpha 1$ (CSNK1A1)	2.065
8	NM_004661	细胞分裂周期蛋白 23(CDC23)	2.068
9	NM_005335	造血细胞特异性 Lyn 底物 1(HCLS1)	2.071
10	AF070674	凋亡蛋白 1 抑制剂(MIHC)	2.085
11	AB014731	平滑肌细胞相关蛋白 3(SMAP-3)	2.113
12	NM_003591	cullin2(CUL2)	2.122
13	NM_005836	翻译抑制蛋白 p14.5(UK114)	2.133
14	NM_053274	FK506 结合蛋白相关蛋白(FAP48)	2.145
15	AJ243706	视网膜母细胞瘤结合蛋白(rbbp2h1a gene)	2.162
16	NM_000817	谷氨酸脱羧酶 1(GAD1)	2.170
17	NM_007268	免疫球蛋白超家族蛋白(Z39IG)	2.178
18	NM_006407	维生素 A 反应性细胞骨架相关蛋白(JWA)	2.289
19	NM_003129	鲨烯环氧酶(SQLE)	2.291
20	D50683	转化生长因子 β II 受体 α	2.326
21	NM_006995	Butyrophilin 亚家族 2 成员 A2 (BTN2A2)	2.353
22	NM_006918	固醇 C5 去饱和酶(SC5DL)	2.366
23	NM_006183	神经降压素(NTS)	2.398
24	NM_002736	cAMP 依赖的蛋白激酶调节亚单位 2 β (PRKAR2B)	2.429
25	NM_001316	染色体分离蛋白 1(CSE1L)	2.556
26	AF134802	cofilin 亚型 1	2.614
27	BC017169	未知基因 MGC:9535	2.619
28	NM_007034	DnaJ 样热休克蛋白 40(HLJ1)	2.630
29	NM_014887	假设蛋白(CG005)	2.813

表2 表达显著降低的基因

序号	GenBank 登录号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	NM_015385	Src 同源区 3 蛋白 5 (SH3D5)	0.352
2	AB032951	KIAA1125 蛋白	0.358
3	NM_021138	TNF 受体相关因子 2 (TRAF2)	0.365
4	AF110908	TNF 受体相关因子 3(TRAF-3)	0.481
5	NM_000269	表达在 NME1 的非转移性细胞蛋白 1	0.373
6	NM_006609	丝裂原激活蛋白激酶激酶 2(MAP3K2)	0.415
7	NM_001910	组织蛋白酶 E(CTSE)	0.447
8	NM_002388	微小染色体维持缺陷蛋白 3(MCM3)	0.450
9	NM_006913	环指蛋白 5(RNF5)	0.452
10	NM_005345	M,70 000 热休克蛋白 1A(HSPA1A)	0.461
11	AF090094	克隆 IMAGE 172979	0.464
12	NM_002421	基质金属蛋白酶 1(MMP1)	0.468
13	NM_004728	DEAD/H 盒多肽 21 (DDX21)	0.367
14	NM_013330	表达在二磷酸核苷激酶的非转移性细胞蛋白 7(NME7)	0.485
15	NM_006077	钙结合的过敏相关的自身抗体 1(CBARA1)	0.492
16	NM_001343	果蝇同源的丝裂原反应蛋白 2(DAB2)	0.496
17	NM_033138	调钙蛋白的结合蛋白 1(CALD1)	0.497

我们用分子生物学技术构建了 HBcAg 的真核表达载体 pcDNA3.1(-)-HBcAg, 并用空载体作为阴性对照, 利用脂质体转染 HepG2 细胞, 之后从中提取总 RNA, 逆转录为 cDNA, 进行基因芯片技术分析. 结果表明, 29 种基因的表达水平上调, 17 种基因的表达水平下调.

在差异表达的基因中包括各种参与氧化还原反应的酶类(苹果酸脱氢酶、谷氨酸脱羧酶 1、鲨烯环氧酶、固醇 C5 去饱和酶)、细胞信号转导和细胞周期相关蛋白基因(HCLS1、翻译抑制蛋白、转化生长因子 β II 受体 α 、酪蛋白激酶 1、cAMP 依赖蛋白激酶、SH3D5)、细胞凋亡(CLIC4、MIHC、TRAF2、TRAF3)、免疫反应调节蛋白基因(FKBP 相关蛋白、cullin2)及肿瘤发生相关基因(视网膜母细胞瘤结合蛋白)等及未知基因.

上调的基因中, CLIC4 是氯化物细胞内通道蛋白家族中的成员^[13], 存在于角化细胞的线粒体和细胞质内, 参与细胞凋亡过程^[14-15], 在多重压力作用下, CLIC4 从胞质向胞核内迁移, 免疫金电镜和共聚焦分析显示核内 CLIC4 表达先于细胞凋亡. Ran 是真核细胞核运输过程中必需的小 GTP 酶, 在细胞 mRNA 加工, 细胞周期调节等方面发挥作用, Ran 结合蛋白 2 即 RanBP2 是核孔蛋白, 在细胞核浆物质转运过程中起重要作用^[16-17]. 细胞分裂周期蛋白 CDC23 与酿酒酵母的 CDC23 高度同源, 是促进细胞分裂后期复合物(anaphase-promoting complex, APC)的成员, 对于细胞周期由 G2 期向 M 期过渡是必不可少的. APC 能够催化细胞周期蛋白 B 与泛素(cyclin B-ubiquitin)形成共轭复合物, 在泛素介导的细胞周期蛋白 B 的蛋白水解过程中起重要作用, HBcAg 通过上调 CDC23 的表达对细胞周期有调控作用^[18]. HCLS1 基因表达于人造血细胞内^[19], 编码蛋白-酪氨酸激酶的底物, 这种细胞内蛋白与 B 和 T 淋巴细胞抗原受体的信号传导有关. 凋亡蛋白 1 抑制剂能够抑制细胞凋亡, 促进肿瘤细胞的生长^[20]. Cullin2 基因为肿瘤抑制基因^[21]. FKBP 相关蛋白(FAP48)是细胞内与免疫调节有密切关系的蛋白, 可以与肽基脯氨酰异构酶 FK506 结合蛋白 59(FK506-binding protein 59, FKBP59)和 FKBP12 蛋白结合, 由于其相对分子质量为 M_r 48 000, 故命名为 FKBP 相关蛋白(FAP48), 此三种蛋白均具有大环内酯类分子的结合位点, 可能是这些免疫抑制剂药物受体的天然的共同配体分子. FAP48 与 FKBP 分子之间的结合可被大环内酯类物 FK506 所阻断, 说明免疫亲和素分子中的结合位点与 FK506 的结合位点相重叠. FAP48 的过表达可以抑制细胞的增生, 促进 IL2 的合成, 在免疫调节及临床疾病的发生、发展过程中具有十分重要的作用^[22-23]. 鲨烯环氧酶(SQLE)与脂类代谢相关, SQLE 参与胆固醇的生物合成, 是胆固醇生物合成过程中重要的限速酶, 其升高可以促进血中胆固醇水平升高, 许多药物通过抑制其活性可起到降低血中胆固醇的作用^[24-26]. cAMP 依赖的蛋白激酶调节亚单位 II β PRKAR2B 是参与细胞信号转导途径主要因子^[27].

在下调的基因中, SH3D5^[28]、丝裂素活化的蛋白激酶激酶激酶 2 参与细胞内信号传导途径. TRAF2、TRAF-3 具有重要的介导肿瘤坏死因子信号的作用, 能够活化核因子 kappaB、JNK 和细胞凋亡^[29-30].

微小染色体维持缺陷 3 蛋白是 DNA 复制中起重要作用的核蛋白^[31]. DEAD/H 盒多肽(DDX21)是推定的重要的 RNA 解旋酶, 参与众多细胞的 RNA 二级结构加工过程, 如翻译起始、核糖体 RNA 合成及加工过程. DDX21 在肿瘤组织中低表达, 而在正常组织中有显著的高水平表达. HBcAg 对 DDX21 的表达有下调作用, 提示, HBcAg 蛋白在一定程度上可能下调细胞核糖体 RNA 加工与合成^[32]. 钙调素结合蛋白 1(CALD1)与体内金属代谢有关. 基质金属蛋白酶 1(MMP1)^[33]具有细胞毒性作用, 其可能的机制是通过分解赖以维持细胞生存的基质蛋白而提高细胞毒性, 也可分解底物产生促使细胞死亡的分子, 另外还可作用于细胞表面受体而影响细胞生存.

总之, 我们利用基因表达谱芯片分析了 HBcAg 对肝细胞基因表达谱的影响, HBcAg 能够上调或下调 HepG2 细胞中许多不同基因表达的变化, 这些基因变化是复杂的, 有的甚至是矛盾的, 这些基因与细胞信号转导、细胞增生与分化、免疫应答、物质运输、细胞凋亡、肿瘤发生等生物过程密切相关. 我们的实验结果为了解 HBcAg 在肝细胞中的生物学效应提供了某些线索, 当然, 还需要进一步的实验加以深入研究.

4 参考文献

- 1 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第 1 版. 北京: 人民军医出版社, 1997:83-88
- 2 Pumpens P, Grens E. Hepatitis B core particles as a universal display model: a structure-function basis for development. *FEBS Lett* 1999;442:1-6
- 3 Le Pogam S, Shih C. Influence of a putative intermolecular interaction between core and the pre-S1 domain of the large envelope protein on hepatitis B virus. *J Virol* 2002;76:6510-6517
- 4 Yang GP, Ross DT, Kuang WW, Brown PO, Weigel RJ. Combining SSH and cDNA microarray for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* 1999; 27:1517-1523
- 5 Zhang MQ. Large-scale gene expression data analysis: a new challenge to computational biologists. *Genome Res* 1999;9:681-688
- 6 Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286:531-537
- 7 刘妍, 成军, 王建军, 杨倩, 陆荫英. 基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用. *世界华人消化杂志* 2003;11:461-463
- 8 Livingston BD, Crimi C, Fikes J, Chesnut RW, Sidney J, Sette A. Immunization with the HBV core 18-27 epitope elicits CTL responses in humans expressing different HLA-A2 supertype molecules. *Hum Immunol* 1999;60:1013-1017
- 9 Marinos G, Torre F, Chokshi S. Induction of T-helper cell response to hepatitis B core antigen in chronic hepatitis B: a major factor in activation of the host immune response to the hepatitis B virus. *Hepatology* 1995;22:1040-1049
- 10 Shimada N, Yamamoto K, Kuroda MJ. HBcAg-specific CD8 T cells play an important role in virus suppression, and acute flare-up is associated with the expansion of activated memory T cells. *J Clin Immunol* 2003;23:223-232
- 11 Watts NR, Conway JF, Cheng N, Stahl SJ, Belnap DM, Steven AC, Wingfield PT. The morphogenic linker peptide of HBV

- capsid protein forms a mobile array on the interior surface. *EMBO J* 2002;21:876-884
- 12 Karpenko LI, Ivanisenko VA, Pika IA, Chikaev NA, Eroshkin AM, Veremeiko TA, Ilyichev AA. Insertion of foreign epitopes in HBcAg: how to make the chimeric particle assemble. *Amino Acids* 2000;18:329-337
 - 13 Berryman MA, Goldenring JR. CLIC4 is enriched at cell-cell junctions and colocalizes with AKAP350 at the centrosome and midbody of cultured mammalian cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 2003;56:159-172
 - 14 Suh KS, Mutoh M, Nagashima K, Fernandez-Salas E, Edwards LE, Hayes DD, Crutchley JM, Marin KG, Dumont RA, Levy JM, Cheng C, Garfield S, Yuspa SH. The organellar chloride channel protein CLIC4/mtCLIC translocates to the nucleus in response to cellular stress and accelerates apoptosis. *J Biol Chem* 2004;279:4632-4641
 - 15 Fernandez-Salas E, Suh KS, Speransky VV, Bowers WL, Levy JM, Adams T, Pathak KR, Edwards LE, Hayes DD, Cheng C, Steven AC, Weinberg WC, Yuspa SH. mtCLIC/CLIC4, an organellar chloride channel protein, is increased by DNA damage and participates in the apoptotic response to p53. *Mol Cell Biol* 2002;22:3610-3620
 - 16 Miyauchi Y, Yogosawa S, Honda R, Nishida T, Yasuda H. Sumoylation of Mdm2 by protein inhibitor of activated STAT (PIAS) and RanBP2 enzymes. *J Biol Chem* 2002;277:50131-50136
 - 17 Nothwang HG, Rensing C, Kubler M, Denich D, Brandl B, Stubanus M, Haaf T, Kurnit D, Hildebrandt F. Identification of a novel Ran binding protein 2 related gene (RANBP2L1) and detection of a gene cluster on human chromosome 2q11-q12. *Genomics* 1998;47:383-392
 - 18 Zhao N, Lai F, Fernald AA, Eisenbart JD, Espinosa R, Wang PW, Le Beau MM. Human CDC23: cDNA cloning, mapping to 5q31, genomic structure, and evaluation as a candidate tumor suppressor gene in myeloid leukemias. *Genomics* 1998; 53:184-190
 - 19 Egashira M, Kitamura D, Watanabe T, Niikawa N. The human HCLS1 gene maps to chromosome 3q13 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1996;72:175-176
 - 20 Gordon GJ, Appasani K, Parcells JP, Mukhopadhyay NK, Jaklitsch MT, Richards WG, Sugarbaker DJ, Bueno R. Inhibitor of apoptosis protein-1 promotes tumor cell survival in mesothelioma. *Carcinogenesis* 2002;23:1017-1024
 - 21 Duerr EM, Gimm O, Neuberg DS, Kum JB, Clifford SC, Toledo SP, Maher ER, Dahia PL, Eng C. Differences in allelic distribution of two polymorphisms in the VHL-associated gene CUL2 in pheochromocytoma patients without somatic CUL2 mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3207-3211
 - 22 成军, 刘妍, 杨倩, 王建军, 洪源, 王琳. 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对 FAP48 信号转导的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11:962-1965
 - 23 Krummrei U, Baulieu EE, Chambraud B. Proliferate the FKBP-associated protein FAP48 is an antiproliferative molecule and a player in T cell activation that increases IL2 synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2444-2449
 - 24 Hiyoshi H, Yanagimachi M, Ito M, Yasuda N, Okada T, Ikuta H, Shinmyo D, Tanaka K, Kurusu N, Yoshida I, Abe S, Saeki T, Tanaka H. J Lipid Res. Squalene synthase inhibitors suppress triglyceride biosynthesis through the farnesol pathway in rat. *Hepatocytes* 2003;44:128-135
 - 25 Mukherjee PK, Leidich SD, Isham N, Leitner I, Ryder NS, Ghannoum MA. Clinical trichophyton rubrum strain exhibiting primary resistance to terbinafine. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:82-86
 - 26 Sawada M, Matsuo M, Seki J. Inhibition of cholesterol synthesis causes both hypercholesterolemia and hypocholesterolemia in hamsters. *Biol Pharm Bull* 2002;25:1577-1582
 - 27 Solberg R, Sistonen P, Traskelin AL, Berube D, Simard J, Krajci P, Jahnsen T, de la Chapelle A. Mapping of the regulatory subunits RI beta and RII beta of cAMP-dependent protein kinase genes on human chromosome 7. *Genomics* 1992;14:63-69
 - 28 Chamnongpol S, Li X. SH3 domain protein-binding arrays. *Methods Mol Biol* 2004;278:183-190
 - 29 Gotoh Y, Oishi K, Shibata H, Yamagiwa A, Isagawa T, Nishimura T, Goyama E, Takahashi M, Mukai H, Ono Y. Protein kinase PKN1 associates with TRAF2 and is involved in TRAF2-NF-kappaB signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:688-694
 - 30 Ramalingam P, Chu WS, Tubbs R, Rybicki L, Pettay J, Hsi ED. Latent membrane protein 1, tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 1, TRAF-2, TRAF-3, and nuclear factor kappa B expression in posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:1335-1339
 - 31 Kubota Y, Mimura S, Nishimoto S, Takisawa H, Nojima H. Identification of the yeast MCM3-related protein as a component of Xenopus DNA replication licensing factor. *Cell* 1995; 81:601-609
 - 32 Valdez BC, Yang H, Hong E, Sequitin AM. Genomic structure of newly identified paralogue of RNA helicase II/Gu: detection of pseudogenes and multiple alternatively spliced mRNAs. *Gene* 2002;284:53-61
 - 33 Conant K, St Hillaire C, Nagase H, Visse R, Gary D, Haughey N, Anderson C, Turchan J, Nath A. Matrix metalloproteinase 1 interacts with neuronal integrins and stimulates dephosphorylation of Akt. *J Biol Chem* 2004;279:8056-8062