

丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白上调 NS3TP6 基因启动子表达活性的研究

洪源, 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军

洪源, 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 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 北京市 100039
洪源, 男, 1974-12, 福建省莆田市人, 汉族. 1998 年毕业于第四军医大学军医系, 获医学学士学位, 2003 年毕业于解放军军医进修学院, 获得内科传染病学硕士学位, 主要课题方向是肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制. 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. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

Up-regulating effect of hepatitis C virus NS5A protein on NS3TP6 gene promoter

Yuan Hong, Qian Yang, Jun Cheng, Yan Liu, Jian-Jun Wang

Yuan Hong, Qian Yang, Jun Cheng, Yan Liu, Jian-Jun Wang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, the 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
Supported by Grants from the National Natural Scientific Foundation, No. C03011402, No. C30070689; and the 9.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 98D063; and the Launching Foundation for Student Studying Abroad of PLA, No. 98H038; and the 10.5 Youth Research and Technique Foundation of PLA, No. 01Q138; and the 10.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 01MB135.
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To investigate the regulatory effects of non-structural protein 5A of hepatitis C virus (HCV NS) protein on NS3TP6 gene promoter.

METHODS: The sequence of NS3TP6 gene promoter was identified in GenBank by bioinformatics and amplified from HepG2 genome by polymerase chain reaction (PCR), which was cloned into pCAT3 reporter vector. The HepG2 cell line was transfected by pCAT3-NS3TP6-p, and co-transfected by pCAT3-NS3TP6-p and pcDNA3.1(-)-NS5A, respectively. The chloramphenicol acetyltransferase (CAT) activity was detected by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit.

RESULTS: The recombinant vector of reporter gene expressive vector pCAT3-NS3TP6-p was approved correctly by restriction enzyme digestion and sequencing analysis. In the transfection experiment of HepG2, pCAT3-NS3TP6-p had higher activity of CAT expression than that of pCAT3-basic demonstrated by an ELISA kit. The expression level

of CAT in co-transfection of pCAT3-NS3TP6-p and pcDNA3.1(-)-NS5A was 1.87 times as higher as that of pCAT3-NS3TP6-p plasmid alone.

CONCLUSION: Cell transfection and ELISA technology are successfully used to prove the results from microarray of HCV NS5A, which brings some new clues for studying the trans-regulated and immune regulation mechanism of NS5A.

Hong Y, Yang Q, Cheng J, Liu Y, Wang JJ. Up-regulating effect of hepatitis C virus NS5A protein on NS3TP6 gene promoter. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(4):813-816

摘要

目的: 探讨丙型肝炎病毒(HCV)非结构蛋白 5A(NS5A)对 NS3TP6 启动子转录的激活作用.

方法: 以我实验室前期研究中得到的 HCV NS5A/NS3 的基因表达谱芯片结果为基础, 利用生物信息学技术确定 NS3TP6 的启动子区域(NS3TP6-p), 聚合酶链反应(PCR)扩增 NS3TP6-p, 克隆至真核报告载体 pCAT3 中, 构建 pCAT3-NS3TP6-p 报告载体; 以该质粒转染肝癌细胞系 HepG2 细胞系, 用酶联免疫吸附法(ELISA)检测氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达活性; 并与 pcDNA3.1(-)-NS5A 共转染 HepG2 细胞系, 用 ELISA 法检测 CAT 的表达活性.

结果: 限制性内切酶消化和序列分析结果表明, 构建的 NS3TP6-p 指导的报告基因表达载体 pCAT3-NS3TP6-p 正确无误. pCAT3-NS3TP6-p 在 HepG2 细胞中能够启动 CAT 的表达; 共转染实验中 pCAT3-NS3TP6-p+pcDNA3.1(-)-NS5A 组 CAT 的表达活性是 pCAT3-NS3TP6-p 单独转染试验的 1.87 倍.

结论: 我室克隆的 NS3TP6 启动子有指导下游基因转录表达的活性; HCV 的 NS5A 蛋白具有对 NS3TP6 基因启动子的转录具有反式激活作用. 本实验进一步验证了我室利用基因表达谱技术研究 HCV NS5A 蛋白反式激活作用的结果, 为进一步阐明丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 的反式激活作用及免疫调节机制提供了新的依据.

洪源, 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军. 丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白上调 NS3TP6 基因启动子表达活性的研究. *世界华人消化杂志* 2004;12(4):813-816
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/813.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)属于黄病毒属, 是含外膜蛋白的

单股正链RNA病毒.在大多数感染人群中HCV表现为持续性感染,并可导致慢性肝炎、肝硬化,或肝细胞癌(HCC),而且与肝脏脂肪变、糖代谢紊乱有关^[1-10].HCV基因组含有单一的开放读码框架,编码3 010-3 033个氨基酸残基(aa)的多肽前体,两侧是5'-非翻译区及3'-非翻译区.因为HCV的基因复制形式没有经过DNA阶段,不存在HCV基因组与肝细胞基因组DNA的整合,所以,HCV主要是通过基因组编码蛋白和肝细胞蛋白之间的相互作用及肝细胞蛋白与HCV调节基因的相互作用造成对肝细胞的损伤.其中非结构蛋白NS5A具有多种生物学功能,在HCV多蛋白的成熟和RNA的复制过程中具有十分重要的作用^[11-14].研究表明,NS5A上存在干扰素 α 敏感决定区(ISDR),与干扰素 α 治疗的敏感性相关^[15-16];此外,NS5A还是一种作用很强转录激活因子^[17-21],调控着细胞基因的转录,还包括对细胞周期及细胞生长的调节,并与感染HCV的细胞发生恶性转化过程有关.对于NS5A蛋白的反式调节功能,我实验室已证明他可以反式激活SV40早期启动子/增强子^[21],并应用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)和基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)^[24-26]等不同的技术对NS5A/NS3的反式调节基因进行了研究^[22-23].为了对NS5A反式调节基因的筛选结果进行验证,我们选取了基因表达谱芯片得到的NS5A反式调节基因-NS3TP6为研究对象,利用生物信息学手段对NS3TP6上游调控序列进行分析、克隆,并与报告基因氯霉素乙酰转移酶(CAT)构建表达质粒,与NS5A表达载体共转染,研究NS5A对NS3TP6启动子(promoter)是否具有激活作用,使下游CAT基因的表达增强,这一结果也为研究NS5A的信号传导途径提供新的理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌 DH5 α , 肝母细胞瘤细胞系 HepG2、pcDNA3.1(-)-NS5A, 为本室保存. pGEM-T、pCAT3 载体购自 Promega 公司, 脂质体 FuGENE6 购自 Roche 公司, Taq DNA 聚合酶购自鼎国生物公司, 限制性内切酶购自 Takara 公司. 质粒 DNA 提取试剂盒(Promega 公司), 玻璃奶 DNA 回收试剂盒(博大公司), CAT ELISA 试剂盒(Roche 公司). 引物合成、核苷酸序列测序由上海博亚公司完成.

1.2 方法

1.2.1 启动子结构分析 根据 GenBank 中 NS3TP6 基因组序列, 确定 NS3TP6 的转录起始点, 选取其上游 1 000 bp, 通过在线分析(<http://www.fruitfly.org>)预测其启动子活性区域. 设计并合成引物, 在上下游引物的 5'-端分别加上 Kpn I 和 Xho I 酶切位点序列. 上游引物: 5'-GGT ACC TTC TTG ACT TTT GGT GTC TTG-3'; 下游引物: 5'-CTC GAG CAG CAT TCA GTC TAC AAC CAG-3'. 1.2.2 质粒构建 PCR 扩增 NS3TP6 启动子序列, 玻璃奶纯化回收 DNA 片段, 在 T4 DNA 连接酶的作用下,

与 pGEM-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取在选择平皿(Amp, X-gal/IPTG)生长的白色阳性菌落提取质粒, 经酶切(Kpn I/Xho I)及测序鉴定. Kpn I/Xho I 双酶切重组质粒 pGEM-T-NS3TP6-p, 玻璃奶纯化回收酶切产物, 定向克隆至 pCAT3 载体, 构建成重组质粒 pCAT3-NS3TP6-p. 经双酶切及菌落 PCR 鉴定连接产物, 试剂盒法提取质粒以备转染.

1.2.3 细胞培养及 pCAT3-NS3TP6-p 转染肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞系在含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中生长. 细胞生长至 50-80% 融合度时采用脂质体转染法, 具体转染方法参照 FuGENE6 说明书进行, 质粒 pCAT3-NS3TP6-p 转染 48 h 后收获细胞.

1.2.4 共转染实验 细胞生长至 50-80% 融合度时, 质粒 pCAT3-NS3TP6-p 与 pcDNA3.1(-)-NS5A 共转染 HepG2 细胞系. 具体转染方法参照 FuGENE6 说明书进行, 转染 48 h 后收获细胞.

1.2.5 CAT 表达量的检测 将收获的细胞进行裂解, 提取上清液, 取 200 μ L 用于检测 CAT 的表达量. 具体方法严格按照 CAT ELISA 试剂盒说明书进行, 在 415 nm 光波下测吸光度 A 值.

2 结果

2.1 NS3TP6 启动子结构 根据 GenBank 中基因组序列, 确定 NS3TP6 的转录起始点, 选取其上游 1 080 bp, 其核苷酸序列见图1. 对此序列进行分析发现有多多个TATA盒及TATA样盒存在.

```

1   TCTTGAC TTT TGGTGCTCTG AAATAGAAGA TTATTTTGT ATGTATGTAT
51  CTACCTCACA GAAGTTATTG ATTTGGTGGA AGAGCACTAG GAGTAGAGTC
101 AGAAAAGCTG GGAAAAATCC TGCAGCTTCC TTATATTTTT AACCTTTTGC
151 TATAGAATTAA TAACTAAATG AGTTCATTGA TTTGTGTGTG TAAAGTGCT
201 TAGTACAATG CCTAGACTTA TCATTTATCA AATAAATATCA TTCTTAAAAAC
251 TGACCATAAAA AATATTAGAA AAGTAGAATA TCTAGACAAT ATTTTAGAAA
301 AAGGGAGCTT AAAGAATTTG GAAAATGTCA TTCATCTGTC CAAATGTCTG
351 CCAAGCTAAG GCTCTCACTA CAGGGAGAGG TATAGTTTAG ATGTTAGAGT
401 GTAAACCCAA TTTTAAATG TGGTCATAGT TATTAATCTT TTATGCCTTG
451 CAATTTGTTG TAATTCAGTA AAAGCCTTTT TTCATCCTGA AATTTAAAAA
501 AATTATCTAG TGGTTCTTT TTTGCTTCA TGGATTCAC TGTCTTCAAAT
551 AAACCTTTGA ACTTTGGGGA ATTTATGCCA TATGAGGTTT GAGGTTTTGA
601 CTCAACTTTT TTCCATTGA GATATACAGT TATGGCAACC TCTCATTGTA
651 TAAATGTACG GGTATTATT TAATTCAGA AACATCACA ATATGTTATC
701 CTATTGGATA CTAGTTACAA GTTTTCTTTG TTTTATTTAG ATTTCTGAAA
751 CTGATGAAAA AGAAGACCTG CTGCATGAAA ACTGCTTGAT GCAAGATGAA
801 ATTGCTGGCT CAGGCTGGA AAAAGACACA AATAAGAAACC AAAACCTGGA
851 AAATAAATAC TTAAGAAAT TTGAAATTGT GAAAGAAAG CGTGAAGACC
901 TTCAAAAGGCT CTAACACGGA ATGGGGAA CATTAGCAAA AACGATAGCC
951 TGTTACAGTG GACAGCTGCT TGCTCTGACA GATGAAACA CAACGCTGCA
1001 TTCCAACTGG GAGAAGCAA AGAGAGAGT AGGCAAGACT GGAAACAGAAA
1051 TGCAATCATG TGGTTGTAGA CTGAATGCTG

```

图1 NS3TP6 基因转录起始点上游序列.

2.2 在线分析 (<http://www.fruitfly.org>)预测其启动子活性区域.

Start	End	Score	Promoter Sequence
639	689	0.90	cctctcattgtataaatgtacgggtattatttaatttcagaacaatca

2.3 重组质粒的构建 以 HepG2 基因组为模板, PCR 扩增 NS3TP6 启动子序列, 1 000 bp 处出现所需条带. 将扩增产物与 pGEM-T 载体连接, 双酶切鉴定, 并送测序鉴定正确. 双酶切产物与 pCAT3 载体连接, 双酶切鉴定如图 2 所示(4 000 bp 的 pCAT3-basic 载体片段和 1 081 bp 的 NS3TP6 启动子片段), 连接转化生长的菌落进行 PCR 鉴定所示, 于 1 081 bp 处可见理想条带.

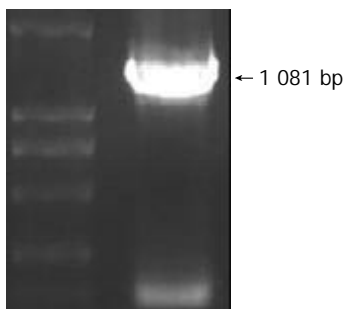


图 2 以 HepG2 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 NS3TP6 启动子序列.

2.4 重组质粒转染实验及报告基因 CAT 的检测 将重组质粒 pCAT3-NS3TP6-p 转染 HepG2 细胞, 可见 pCAT3-NS3TP6-p 具有启动子活性, pcDNA3.1(-)-NS5A 和 pCAT3-NS3TP6-p 共转染后, CAT 的表达较对照质粒明显升高, 说明 NS5A 对 NS3TP6 启动子具有激活作用(表 1), 重复试验得到同样的结果(表 2).

表 1 pCAT3-NS3TP6-p+pcDNA3.1(-)-NS5A 共转染后 CAT 的表达

组别	质粒	吸光度(A 值)
阴性对照	pCAT3-basic	0.033
阳性对照(control)	pCAT3-control	2.215
实验组	pCAT3-NS3TP6-p	0.165
共转染组	pCAT3-NS3TP6-p+ pcDNA3.1(-)-NS5A	0.329

表 2 pCAT3-NS3TP6-p+pcDNA3.1(-)-NS5A 共转染重复实验

组别	质粒	吸光度(A 值)
阴性对照	pCAT3-basic	0.045
阳性对照(control)	pCAT3-control	0.879
实验组	pCAT3-NS3TP6-p	0.182
共转染组	pCAT3-NS3TP6-p+ pcDNA3.1(-)-NS5A	0.317

3 讨论

HCV 非结构蛋白 NS5A 为丝氨酸磷酸化蛋白, 因磷酸化程度的不同而存在 p56 和 p58 两种胞质磷酸化蛋白形式. NS5A 定位于肝细胞内质网核周区网状膜, 形成核糖核蛋白复合物, 在病毒基因组的翻译中起重要的作

用. 同时 NS5A 因为能直接与双链 RNA 依赖的蛋白激酶结合, 并使其失活, 从而抵抗 IFN α 的抗病毒而受到广泛的重视^[27-30]. 目前研究认为 NS5A 除上述的作用外, 还具有转录反式激活因子的功能, 但其确切的机制及途径并不十分清楚. 研究发现 NS5A 可以引起胞内 Ca²⁺ 分布异常, 启动 Ca²⁺ 相关的信号传导途径, 导致转录因子蛋白 NF- κ B 和 STAT-3 转位于核内, 发挥其反式激活作用^[31-36].

尽管 NS5A 蛋白是存在于胞质中, 但研究发现其具有功能性核定位信号(nucleic localization signal, NLS)序列, 即 PPRKRVV(354-362 aa), 因此有核信号转导功能^[37]. Satoh et al^[38]为了说明 NS5A 蛋白的细胞定位, 他们采用多种 NS5A 蛋白 N-端或 C-端缺失突变体, 通过在细胞株中短暂表达的亚细胞定位分析发现, N-端缺失的 NS5A 蛋白位于细胞核, 并且只要 NS5A 蛋白 N-端 27 个氨基酸残基序列缺失, 就可使其定位于细胞核中, 因此他们认为 NS5A 蛋白的细胞定位主要决定于其 N-端的分子结构. 同时, 他们也研究了 NS5A 蛋白的分解过程, 认为 NS5A 蛋白裂解仅发生在其 N-端和 C-端的少数几个位点, 此裂解作用可以被凋亡刺激剂加强, 被半胱氨酸蛋白酶抑制剂 Z-VAD-FMK 所抑制, 说明 NS5A 蛋白的裂解来源于一种或几种半胱氨酸蛋白酶样的蛋白酶. 基于对 NS5A 蛋白突变体的分析, 他们推测裂解产物包括一种去除 N-端和 C-端的 NS5A 蛋白(155-389 aa), 与此种裂解产物相同氨基酸序列的多肽存在于细胞核中. 我们利用基因芯片技术对于 HCV 的 NS5A 反式调节的靶基因成功地进行了筛选, 其中上调 NS3TP6 基因表达的能力最强 -Cy5/Cy3 值达 3.4. NS3TP6 基因为邵清 et al^[39]于 2003 年从人肝组织 cDNA 文库中测序得来, 目前对于他的功能研究并不多. 通过美国国立图书馆(NCBI)在线软件分析, 确定 NS3TP6 基因的启动子序列, 构建 CAT 表达的载体, 与 NS5A 表达载体共转染, 结果表明 NS5A 可以激活 NS3TP6 基因的启动子, 与对照组相比 A 值升高约 2 倍, 重复试验亦得到同样的结果. 结合基因芯片结果, 我们认为 NS5A 上调 NS3TP6 基因的表达, 可能与 NS5A 对基因启动子的激活有关, 这一结论还需要 NS5A 胞质信号传导通路阻断试验进一步证实. 总之, 本研究验证了前期 NS5A 反式激活基因的筛选结果, 为丙肝病毒的反式调节机制提供了新的线索.

4 参考文献

- 1 Zandman-Goddard G, Levy Y, Weiss P, Shoenfeld Y, Langevitz P. Transverse myelitis associated with chronic hepatitis C. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:111-113
- 2 Moriguchi H, Kobayashi M, Chung RT, Sato C. Optimal IFN therapy for 40-year-old patients with severe HCV-1b infection. *Gastroenterology* 2003;124:1166-1167
- 3 Chowdhury A, Santra A, Chaudhuri S, Dhali GK, Chaudhuri S, Maity SG, Naik TN, Bhattacharya SK, Mazumder DN. Hepatitis C virus infection in the general population: A community-based study in West Bengal, India. *Hepatology* 2003; 37:802-809

- 4 Ioannou GN, Dominitz JA, Weiss NS, Heagerty PJ, Kowdley KV. Racial differences in the relationship between hepatitis C infection and iron stores. *Hepatology* 2003;37:795-801
- 5 Ryu KJ, Kim JH, Lee SW. Ribozyme-mediated selective induction of new gene activity in hepatitis C virus internal ribosome entry site-expressing cells by targeted trans-splicing. *Mol Ther* 2003;7:386-395
- 6 Kasuno K, Ono T, Matsumori A, Nogaki F, Kusano H, Watanabe H, Yodoi J, Muso E. Hepatitis C virus-associated tubulointerstitial injury. *Am J Kidney Dis* 2003;41:767-775
- 7 Chen S, Wang Y. Genetic variation characteristics of the envelope region of hepatitis C virus in the patients with chronic hepatitis. *Zhonghua Shiyan He Linchuang Bingduxue Zazhi* 2002;16:219-222
- 8 Hui CK, Belaye T, Montegrande K, Wright TL. A comparison in the progression of liver fibrosis in chronic hepatitis C between persistently normal and elevated transaminase. *J Hepatol* 2003;38:511-517
- 9 Fang CT, Tobler LH, Haesche C, Busch MP, Phelps B, Lepar G. Fluctuation of HCV viral load before seroconversion in a healthy volunteer blood donor. *Transfusion* 2003;43:541-544
- 10 Sunagawa H, Takayama H, Yamashiro T, Sasaki H, Sashida Y, Matsuura K, Kayou M. Hepatocellular carcinoma in a patient with primary biliary cirrhosis and seronegativity for markers of hepatitis B virus and hepatitis C virus: report of a case. *Surg Today* 2003;33:219-223
- 11 Sarrazin C, Berg T, Lee JH, Teuber G, Dietrich CF, Roth WK, Zeuzem S. Improved correlation between multiple mutations within the NS5A region and virological response in European patients chronically infected with hepatitis C virus type 1b undergoing combination therapy. *J Hepatol* 1999;30:1004-1013
- 12 Zech B, Kurtenbach A, Krieger N, Strand D, Blencke S, Morbitzer M, Salassidis K, Cotten M, Wissing J, Obert S, Bartenschlager R, Herget T, Daub H. Identification and characterization of amphiphysin II as a novel cellular interaction partner of the hepatitis C virus NS5A protein. *J Gen Virol* 2003;84:555-560
- 13 Georgopoulou U, Caravokiri K, Mavromara P. Suppression of the ERK1/2 signaling pathway from HCV NS5A protein expressed by herpes simplex recombinant viruses. *Arch Virol* 2003;148:237-251
- 14 Qadri I, Iwahashi M, Simon F. Hepatitis C virus NS5A protein binds TBP and p53, inhibiting their DNA binding and p53 interactions with TBP and ERCC3. *Biochim Biophys Acta* 2002;1592:193-204
- 15 Sarrazin C, Herrmann E, Bruch K, Zeuzem S. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein and interferon resistance: a new model for testing the reliability of mutational analyses. *J Virol* 2002;76:11079-11090
- 16 Sato C. Effects of hepatitis C virus proteins on the interferon-stimulated signal transduction. *Nippon Rinsho* 2001;59:1271-1276
- 17 Ghosh AK, Majumder M, Steele R, Yaciuk P, Chrivia J, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates transcription through a novel cellular transcription factor SRCAP. *J Biol Chem* 2000;275:7184-7188
- 18 成军. 慢性丙型肝炎肝脂肪变的机制及其意义. *世界华人消化杂志* 2002;10:999-1003
- 19 Kato N, Lan KH, Ono-Nita SK. Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator. *J Virol* 1997; 71:8856-8859
- 20 Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412
- 21 刘妍, 段惠娟, 成军, 王建军, 陆荫英, 牟劲松, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活 SV40 病毒启动子的研究. *军医进修学院学报* 2003;24:81-83
- 22 刘妍, 陆荫英, 成军, 王建军, 李莉, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因的克隆化研究. *解放军医学杂志* 2003;28:40-43
- 23 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式调节基因的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:939-942
- 24 Ruano JM, Glidle A, Cleary A, Walmsley A, Aitchison JS, Cooper JM. Design and fabrication of a silica on silicon integrated optical biochip as a fluorescence microarrayplatform. *Biosens Bioelectron* 2003;18:175-184
- 25 Barsky V, Perov A, Tokalov S, Chudinov A, Kreindlin E, Sharonov A, Kotova E, Mirzabekov A. Fluorescence data analysis on gel-based biochips. *J Biomol Screen* 2002;7:247-257
- 26 Chan K, Baker S, Kim CC. Genomic Comparison of salmonella enterica serovars and salmonella bongori by use of an S. enterica serovar typhimurium DNA microarray. *J Bacteriol* 2003;185:553-563
- 27 Francois C, Duverlie G, Rebouillat D, Khorsi H, Castelain S, Blum HE, Gagnon A, Wychowski C, Moradpour D, Meurs EF. Expression of hepatitis C virus proteins interferes with the antiviral action of interferon independently of PKR-mediated control of protein synthesis. *J Virol* 2000;74:5587-5596
- 28 Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999;285:107-110
- 29 Taylor DR, Tian B, Romano PR, Hinnebusch AG, Lai MM, Mathews MB. Hepatitis C virus envelope protein E2 does not inhibit PKR by simple competition with autophosphorylation sites in the RNA-binding domain. *J Virol* 2001;75:1265-1273
- 30 Pflugheber J, Fredericksen B, Sumpter R Jr, Wang CF, Ware F, Sodora DL, Gale M Jr. Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:4650-4655
- 31 成军, 李克, 陆荫英, 董菁, 李莉, 王琳, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒调节基因区结合蛋白的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:223-225
- 32 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:125-128
- 33 Qadri I, Iwahashi M, Simon F. Hepatitis C virus NS5A protein binds TBP and p53, inhibiting their DNA binding and p53 interactions with TBP and ERCC3. *Biochim Biophys Acta* 2002;1592:193-204
- 34 Park KJ, Choi SH, Choi DH, Park JM, Yie SW, Lee SY, Hwang SB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates c-Jun N-terminal kinase through interaction with TNF receptor-associated factor 2. *J Biol Chem* 2003[Epub ahead of print]
- 35 Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9599-9604
- 36 Goh PY, Tan YJ, Lim SP, Lim SG, Tan YH, Hong WJ. The hepatitis C virus core protein interacts with NS5A and activates its caspase-mediated proteolytic cleavage. *Virology* 2001;290:224-236
- 37 Ide Y, Zhang L, Chen M, Inchauspe G, Bahl C, Sasaguri Y, Padmanabhan R. Characterization of the nuclear localization signal and subcellular distribution of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *Gene* 1996;182:203-211
- 38 Satoh S, Hirota M, Noguchi T, Hijikata M, Handa H, Shimotohno K. Cleavage of hepatitis C virus nonstructural protein 5A by a caspase-like protease(s) in mammalian cells. *Virology* 2000;270:476-487
- 39 邵清, 成军, 白雪帆, 王琳, 张健, 梁耀东, 刘敏, 李强. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 反式激活基因 6 的克隆化研究. *胃肠病学和肝病杂志* 2003;12:245-247