

HCV NS5A反式激活基因NS5ATP13对肝癌细胞生长的影响

袁菊^{1,2}, 成军¹, 洪源¹, 陶明亮^{1,2}, 李康¹, 石磊¹ (1.首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所, 北京 100015; 2.西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌市 712100)

摘要: 目的 验证HCV NS5A对NS5ATP13基因反式激活作用, 并检测NS5ATP13基因表达产物对Huh-7细胞系生长的影响。方法 应用实时定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法验证HCV NS5A对NS5ATP13基因的反式激活作用, 构建NS5ATP13与绿色荧光蛋白(GFP)的融合蛋白表达载体, 用荧光显微镜观察NS5ATP13-GFP融合蛋白在细胞的分布。结果 HCV NS5A可反式激活NS5ATP13基因的表达, NS5ATP13-GFP融合蛋白荧光主要集中在细胞核质, 转染细胞出现大量双核及多核现象, 活细胞发光法检测NS5ATP13具有促进细胞增殖的作用。结论 NS5ATP13基因生物学功能的研究, 为HCV致肝纤维化和肝癌的病理机制研究提供新的思路。

关键词: 聚合酶链反应, 荧光; 反式激活; 细胞定位; 细胞增殖

Growth-promoting effects of NS5ATP13 transactivated by HCV NS5A on hepatoma cells

YUAN Ju^{1,2}, CHENG Jun¹, HONG Yuan¹, TAO Ming-liang^{1,2}, LI Kang¹, SHI Lei¹ (1. Institute of Infections Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 2. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: Objective To testify the transactivated role of HCV NS5A to NS5ATP13 gene and the effect of NS5ATP13 gene expression on Huh-7 cells. **Methods** RT-PCR was carried out to testify the transactivated role of HCV NS5A to NS5ATP13 gene and NS5ATP13-GFP fusion gene expression vector was constructed. The subcellular localization of NS5ATP13-GFP fusion protein was observed by fluorescence microscope. **Results** HCV NS5A can transactivate the NS5ATP13 gene expression, NS5ATP13-GFP fusion protein mainly located in the nucleus and most of the cell occurred two or more nucleus. Celltiter-Glo luminescent cell viability assay showed that the growth of Huh-7 cells transfected with NS5ATP13 gene was dramatically promoted compared with the parent Huh-7 cells. **Conclusions** The biological functional study of NS5ATP13 brought some new clues for studying the pathogenesis of HCV induced hepatic fibrosis and hepatoma.

Key words: Polymerase chain reaction, fluorescence; Transactivated; Cellular localization; Cell proliferation

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染与慢性病毒性肝炎、肝纤维化和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)发生发展密切相关, 而病毒基因组编码蛋白与宿主肝细胞蛋白之间的相互作用和调节可能是HCV致病(癌)的重要分子机制^[1,2]。HCV非结构蛋白5A(HCV NS5A)基因位于HCV

基因组的6258~7601核苷酸, 编码约56 kD的NS5A蛋白(448 aa), 主要分布于胞浆内。NS5A蛋白具有多种生物学功能, 除了参与HCV多蛋白成熟和RNA复制过程外, 还是一种作用很强的转录激活因子, 能够影响细胞信号转导途径, 激活多种病毒及细胞基因启动子, 调控细胞、病毒基因表达, 调节细胞生长、凋亡以及免疫调节等功能, 与HCV感染细胞发生恶性转化的过程密切相关^[3-7]。

本研究利用抑制性消减杂交(SSH)技术筛

基金项目: 北京市科委重大项目(D08050700650803)

通讯作者: 成军 Email: jun.cheng.ditan@gmail.com

选了NS5A蛋白反式激活靶基因并结合生物信息技术(bioinformatics)克隆了NS5A蛋白反式激活的靶基因,即HCV NS5A 蛋白反式激活基因13(NS5ATP13)^[8,9],已在GenBank中登录(登录号为D21262),并对其进行了克隆化研究。该新基因的开放读码框架(ORF)长度为2103个核苷酸(nt),编码产物由700个氨基酸残基(aa)组成,并应用表达谱芯片技术研究NS5ATP13的反式调节基因^[10]及应用SSH技术筛选NS5ATP13蛋白的上调基因^[11],发现NS5ATP13与细胞增生、分化、信号转导、代谢、凋亡及肝纤维化发生发展密切相关。

本实验主要应用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术验证在肝母瘤细胞系Huh-7中过表达的HCV NS5A对NS5ATP13基因的反式激活作用,并应用细胞发光法检测NS5ATP13基因产物对Huh-7细胞系生长曲线的影响,以期对NS5ATP13基因功能有进一步了解,为研究HCV的致病机制提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 细胞和质粒及主要试剂 肝母瘤细胞系Huh-7和质粒pEGFP-C1由本室保存,脂质体转染试剂盒Lipofectamine 2000和DMEM培养基购自Invitrogen公司,DMEM培养基、OPTI-MEM I Reduced Serum Medium购自Gibco公司,核酸内切酶EcoR I/Bam H I和SYBR ExScript RT-PCR Kit购自TaKaRa公司,Taq DNA聚合酶购自鼎国生物技术公司,玻璃奶DNA回收试剂盒购自博大生物公司,Celltiter-Glo luminescent cell viability assay、dNTP Mix (10 mmol/L)、Mg²⁺ Free Buffer、MgCl₂ (25 mmol/L)、Taq DNA polymerase (5 U/μl)均购自Promega公司,Plus Reagent及Trizol均购自Invitrogen公司,10%胎牛血清(FBS)购自Hyclone公司。Taqman探针由TaKaRa公司合成,引物合成及核苷酸序列测序由上海生物工程技术有限公司完成。

1.2 细胞培养 肝母瘤细胞系Huh-7在5% CO₂和37℃含10% FBS的DMEM培养基中贴壁生长(含100 U/ml青霉素、100 mg/L链霉素),细胞以含0.25%胰蛋白酶和

0.02% EDTA消化液进行消化并传代。

1.3 方法

1.3.1 实时荧光定量RT-PCR验证HCV NS5A基因转染可反式激活NS5ATP13基因的表达

(1) 设计实时荧光定量RT-PCR引物:根据NS5ATP13基因的开放读码框设计两条引物。上游引物:5'-CTCCAGTGACGAGGAAGAGG-3';下游引物5'-CTTCTCCACAGCCTTCTTGG-3'。Taqman探针 FAM-TAAACCAGGTCCCTACAGTTCAGTCCC-TAMRA,PCR片段长136 bp,同时应用GAPDH作为实时荧光定量RT-PCR的内参照,PCR片段长100 bp。上游引物:5'-CCTGTTTCGACAGTCAGCCG-3';下游引物:5'-CGACCAAATCCGTTGACTCC-3'。

(2) 细胞转染及总RNA提取:在6孔板常规培养肝母瘤细胞Huh-7,当细胞密度长至85%~90%时应用Lipofectamine 2000转染pcDNA3.1(-)-空及pcDNA3.1(-)-HCV-NS5A质粒,24小时后应用Trizol(Invitrogen)一步法提取细胞总RNA,经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性定量分析。

(3) 实时荧光定量RT-PCR反应:将定量的总RNA用SYBR ExScript RT-PCR Kit反转录总RNA,反转录条件:42℃ 15分钟,95℃ 2分钟,反转录体系见表1。使用Light Cycler PCR仪(Roche)进行RT-PCR反应,扩增NS5ATP13基因的实验组应用Taqman探针反应体系,MgCl₂ 4 μl,H₂O 5.1 μl,5×ExScript,buffer 2 μl,dNTP 0.4 μl,引物1(0.5 μmol/L) 2 μl,引物2(0.5 μmol/L) 2 μl,cDNA 2 μl,Taq酶(2.5 U)0.5 μl,探针(0.2 μmol/L) 2 μl,共20.0 μl体系,扩增条件见表2。内参照GAPDH扩增对照组应用SYBR Green反应体系:SYBR Premix EXTaq (2×) 10.0 μl,PCR Forward Primer (10 μmol/L) 0.4 μl,PCR Reverse Primer (10 μmol/L)

表 1 实时荧光定量RT-PCR反转录体系

试剂	使用量
5×ExScript Buffer	2.00 μl
dNTP Mixture (各10 mmol/L)	0.50 μl
Random 6 mers (100 μmol/L)	0.50 μl
ExScript RTase (200 U/μl)	0.25 ml
RNase抑制剂 (40 U/μl)	0.25 ml
总RNA	500.00 ng
去RNase ddH ₂ O	加至10.00 μl

0.4 μ l, 模板 (cDNA溶液) 2.0 μ l, 灭菌蒸馏水 7.2 μ l, 共 20.0 μ l 体系, 扩增条件见表 3。琼脂糖凝胶电泳检测 RT-PCR 扩增情况, 每组做 2 个复孔, 共重复 3 次。

1.3.2 NS5ATP13 基因亚细胞定位。

(1) NS5ATP13 基因的 RT-PCR 扩增: 根据基因 NS5ATP13 的完整开放阅读框和 pEGFP-C1 表达载体序列设计引物, 由上海生物工程技术有限公司合成。引物序列如下: 上游引物 5' - AGATCTATGGCGGACGCC-3' (*Bgl* II 位点), 下游引物 5' -GTCGACTCACTCGCTGTCAAAC-3' (*Sal* I 位点)。提取 Huh-7 细胞总 RNA, 按照 Promega 公司反转录试剂盒说明书合成 cDNA 模板, 并以此为模板进行 PCR 反应。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 分钟, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 分钟, 60 $^{\circ}$ C 退火 1 分钟, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 分钟, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟。

(2) pEGFP-C1-NS5ATP13 重组表达载体的构建: 根据玻璃奶回收试剂盒说明书回收 NS5ATP13 基因的 PCR 产物; 在 T4 DNA 连接酶作用下, 与 pGEM-T 载体连接, 转化大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取在平皿 (Amp, X-gal/IPTG) 上生长的白色菌落提取质粒, 经酶切 (*Bgl* II/*Sal* I) 鉴定并测序。*Bgl* II/*Sal* I 双酶切重组质粒 pGEM-T-NS5ATP13, 玻璃奶纯化回收酶切产物, 定向

克隆至 pEGFP-C1, 构建成重组质粒 pEGFP-C1-NS5ATP13, 经双酶切鉴定正确。磁珠法提取质粒以备转染。

(3) 瞬时转染细胞系 Huh-7 及 GFP 荧光显微镜观察: 常规培养 Huh-7 细胞, 1×10^5 个/孔接种于 24 孔细胞培养板中, 培养 24 小时后细胞密度生长至 85%~90%, 将待转染的 0.8 μ g pEGFP-C1-NS5ATP13 质粒用 Lipofectamine 2000 按脂质体转染策略转入。阴性对照转染 pEGFP-C1 空质粒, 同时做 3 个复孔。

1.3.3 应用活细胞发光法检测 HCV NS5ATP13 对 Huh-7 细胞生长的影响 常规培养肝母瘤细胞系 Huh-7 以每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔板, 1 天后当细胞密度长至 70%~85%, 用 Plus Reagent 脂质体转染 pEGFP-C1-NS5ATP13 及 pEGFP-C1 空质粒, 应用活细胞发光法检测转染细胞的活细胞数量相对值, 每组做 6 个复孔, 同时连续检测 7 天, 做 3 次重复实验。

1.4 统计学分析 数据分析均采用 SPSS 10.0 软件, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实时荧光定量 RT-PCR 细胞转染及总 RNA 提取 常规培养肝母瘤细胞系 Huh-7 并转染 pcDNA3.1 (一)-空及 pcDNA3.1 (一)-NS5A 质粒, 24 小时后应用 Trizol 一步法提取细胞总 RNA, 经琼脂糖凝胶电泳分析, 总 RNA 为 28 S 及 18 S 的亮带, 结果如

表 2 NS5ATP13 基因扩增的 Taqman 探针反应条件

	程序序号	目标温度 ($^{\circ}$ C)	持续时间 (s)	温度下降 ($^{\circ}$ C/s)	应用模式	循环数
变性	1	95	300	20	无	1
PCR	1	95	5	20	无	40~50
	2	60	20	20	单一	
融合曲线	1	95	0	20	无	1
	2	60	30	20	无	
	3	85	0	20	持续性	
冷却	1	40	30	20	无	1

表 3 内参照 GAPDH 扩增 SYBR Green 反应条件

	程序序号	目标温度 ($^{\circ}$ C)	持续时间 (s)	温度下降 ($^{\circ}$ C/s)	应用模式	循环数
变性	1	95	10	20	无	1
PCR	1	95	5	20	无	40~50
	2	65	20	20	单一	
融合曲线	1	95	0	20	无	1
	2	60	15	20	无	
	3	95	0	0.1	持续性	
冷却	1	40	10	20	无	1

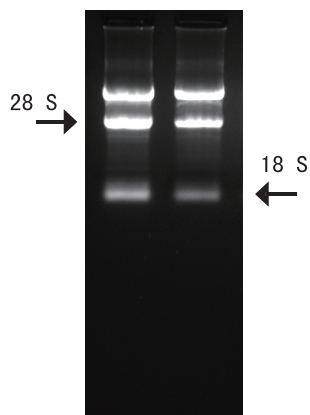


图1 提取Huh-7细胞的总RNA

注: 左为转染3.1 (—) -空, 右转染3.1 (—) -NS5A

图1, 分光光度计进行定性定量分析显示 A_{260}/A_{280} 为1.8~2.0, $A_{260}/A_{230} > 2.3$, 表明RNA质量较高, 可用于进一步分析。

2.2 实时荧光定量RT-PCR实验结果 实时荧光定量RT-PCR实验结果自动以CT值给出, 相对表达量计算按照 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行计算。实验组扩增NS5ATP13基因的Taqman探针反应PCR产物进行凝胶电泳鉴定可见单一清晰条带, 条带位置与预期PCR扩增产物大小吻合, 见图2。对照组内参照GAPDH扩增SYBR Green反应体系溶解曲线分析可见, GAPDH扩增的PCR产物溶解曲线峰值为85.8℃, 见图3, 峰型锐利, 溶解温度较为均一。PCR产物进行凝胶电泳鉴定可见单一清晰条带, 条带位置与预期PCR扩增产物大小吻合, 见图2, 说明本实验扩增的两种PCR产物均有较强的特异性。结果显示在转染pcDNA3.1 (—) -NS5A的细

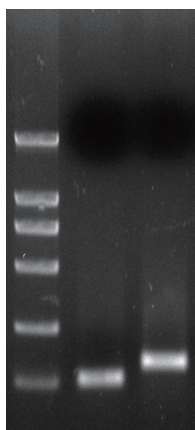


图2 实时荧光定量PCR产物分析

注: 1为GAPDH扩增产物; 2为NS5ATP13扩增产物

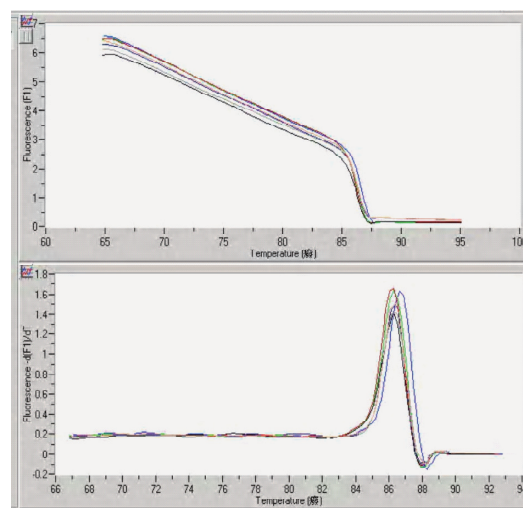


图3 实时荧光定量PCR扩增GAPDH的溶解曲线

胞组, NS5ATP13基因的表达量较对照组增高, 增高至对照组的1.96倍, 即NS5A蛋白可以上调NS5ATP13基因的表达。

2.3 NS5ATP13基因的RT-PCR扩增与pEGFP-C1-NS5ATP13载体的构建 以Huh-7细胞cDNA为模板扩增, 2103 bp左右的RT-PCR产物与理论片段大小符合, 见图4。重组表达载体pEGFP-C1-NS5ATP13经Bgl II/Sal I双酶切后, 显示正确的酶切图谱, 见图5。重组载体pEGFP-C1-NS5ATP13双酶切图谱见图6。

2.4 荧光显微镜观察NS5ATP13基因产物在Huh-7细胞系的定位 常规培养Huh-7细胞, 接种于24孔细胞培养板中, 将待转染的pEGFP-C1-NS5ATP13质粒用Lipofectamine 2000按脂质体转染策略转入, 阴性对照转染pEGFP-C1空质粒, 24小时后显微镜观察显示对照组转染pEGFP-C1空质粒的细胞均体发光, 无明显的定位, 而实验组转染pEGFP-C1-NS5ATP13质粒的绿色荧光主要集中在细胞核质中, 并出现大量双核及多核现象, 见图7。

2.5 转染NS5ATP13基因的Huh-7细胞生长曲线的绘制 用Plus Reagent脂质体转染pEGFP-C1-NS5ATP13及pEGFP-C1空质粒至Huh-7细胞系, 应用活细胞发光法连续7天检测活细胞数量相对值。结果表明与转染了空载体的细胞相比, 转染NS5ATP13基因的Huh-7细胞生长速度明显加快, 即NS5ATP13具有促

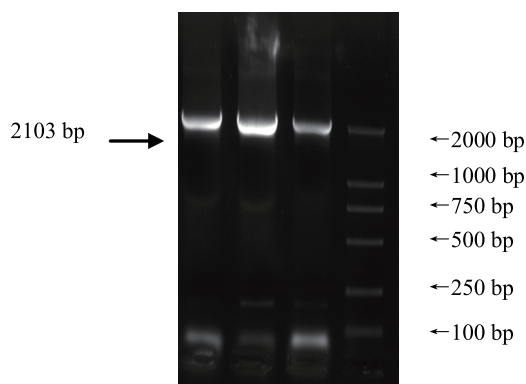


图4 以Huh-7细胞cDNA为模板扩增NS5ATP13基因

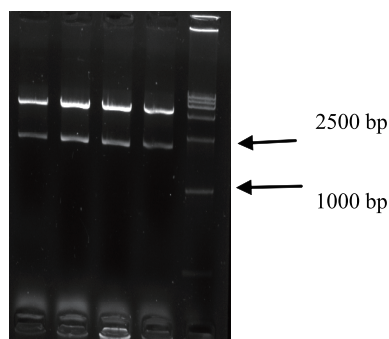
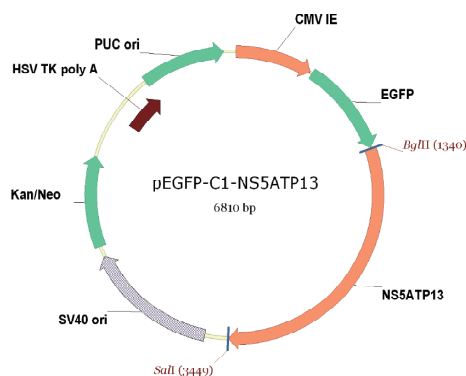
图5 重组表达载体pEGFP-C1-NS5ATP13经*Bgl* II/*Sa* I Ⅰ双酶切鉴定图谱

图6 重组表达载体pEGFP-C1-NS5ATP13构建图

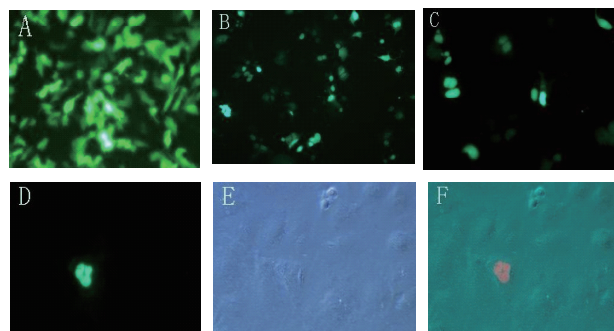


图7 NS5ATP13基因表达产物在Huh-7细胞系的定位

注：A为转染pEGFP-C1空质粒；B、C、D为转染pEGFP-C1-NS5ATP13质粒的不同视野；E为D视野的明场观察；F为D和E的重叠图片

进细胞增殖的作用，见图8。

3 讨论

NS5ATP13基因的开放读码框架（ORF）长度为2103个核苷酸（nt），编码产物由700个氨基酸残基（aa）组成，并与核蛋白p130（p130）、核磷酸蛋白p140（Nopp140）、核螺旋小体磷化蛋白1（NOLC1）的基因序列有高度同源性，与p130和NOPP140的同源性为98%，与NOLC1的同源性为100%。鼠核磷酸蛋白p140（Nopp140）是第一个被认为具有可结合蛋白的核定位信号^[12]，并对细胞分裂期核仁凝聚有辅助功能^[13]，人核磷酸蛋白p140（hNopp140）在细胞分裂期定位在核仁的密集纤维区，据报道hNopp140的表达水平主要在高度分化细胞的分裂间期和有丝分裂期之间变化^[14]。而另有研究显示其在有丝分裂期细胞hNopp140的表达减少，在分裂前期和后期的细胞却未表达^[15]，研究发现hNopp140与各种核仁蛋白或者与核仁发生相关蛋白有密切的关系比如RNA聚合酶I^[16]、转录因子C/EBP β ^[17]、酪蛋白激酶II^[18]、p80 coilin^[19]和小核仁核蛋白微粒（snoRNPs）^[20]。过表达hNopp140至高水平可改变核仁结构^[21]，而转染显性负性突变体hNopp140可导致snoRNPs的表达缺失^[20]。所有研究显示hNopp140在rRNA合成和核仁发生起了很重要的作用。

hNopp140基因序列相当独特，因为其表达产物包含大量带电荷的氨基酸、长链丝氨酸残基结构和10个重复在正电荷区和负电荷区的折叠^[13,15]。其有82个

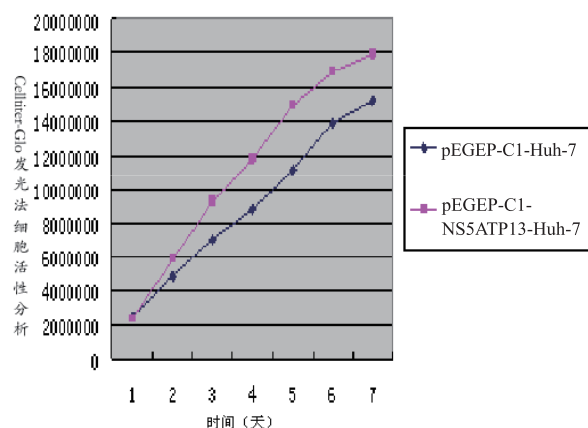


图8 转染pEGFP-C1-NS5ATP13及pEGFP-C1空质粒的Huh-7细胞系的生长曲线

潜在的磷酸化位点,并被酪蛋白激酶II磷酸化^[13]。hNopp140去磷酸化可使其蛋白大小由140 kD降到95 kD,且hNopp140的磷酸化程度在细胞循环周期是可变的。在细胞有丝分裂期,hNopp140磷酸化程度很高但表达水平降低^[15]。此外,应用噬菌体文库展示技术生物素淘洗人cDNAs时发现阿霉素(一种抗癌药物)可以和hNopp140羧基端结合^[22]。hNopp140在核仁发生过程中的磷酸化程度及与抗癌药物的结合推测hNopp140可能在细胞循环周期中起了很重要的作用。

本研究曾应用表达谱芯片技术研究NS5ATP13的反式调节基因^[10]及应用抑制性消减杂交技术筛选NS5ATP13蛋白的上调基因^[11],结果表明了NS5ATP13可上调 $\alpha 2$ 巨球蛋白及纤维连接蛋白(Fn)的表达。 $\alpha 2$ 巨球蛋白可抑制胶原酶的活性,与肝纤维化形成机制有关。纤维连接蛋白可促使肝细胞分泌胶原,促进成纤维细胞的趋化性,促进成纤维细胞及肝细胞等与胶原基质的黏附作用。胰岛素样生长因子结合蛋白1(IGFBP21)在肝脏和子宫内膜大量表达,调节胰岛素样生长因子(IGF)的生物利用度,还可能通过对MAPK/ERK和C/EBP β 信号系统的影响来支持肝细胞的再生^[23]。NS5ATP13还可上调Ran结合蛋白2(RanBP2)、凋亡蛋白1抑制因子(IAP-1、MIHC、cIAP2)、细胞分裂周期蛋白23(CDC23)等。RanBP2作为核孔复合物的组成成分,在细胞核内外物质转运中发挥着重要的作用,NS5ATP13可能通过上调这些凋亡相关因子抑制细胞凋亡,从而引起肿瘤的发生。NS5ATP13通过上调PKA和钾离子电压门控通道KQT样亚家族成员3,也可能是抑制凋亡发生的机制之一。NS5ATP13下调多种诱导细胞凋亡的信号分子如有丝分裂原活化蛋白激酶激酶激酶3(MAP4K3)和有丝分裂原活化蛋白激酶激酶激酶2(MAP3K2),可能在肝细胞癌的发生机制中起到一定的作用。

本实验应用实时荧光定量RT-PCR方法证实了应用SSH技术筛选NS5A蛋白反式激活靶基因NS5ATP13的实验结果,即HCV NS5A蛋白上调

NS5ATP13基因的表达水平,实时荧光定量PCR具有引物和探针的双重特异性。TaqMan技术的实时荧光定量PCR无需内标,其Ct值的重现性好,且Ct值与起始模板的对数存在线性关系。实时荧光定量PCR是一个全自动的过程,无PCR后操作,使交叉污染的几率降到最低,结果更具有可信性。实时荧光定量PCR作为一种高效的核酸定量分析方法,已逐渐被广泛接受用于基因表达的定量分析,并与微阵列等分子生物学技术一起,在后基因组时代的生命科学研究中发挥重要作用。

GFP是一种新型的生物标签^[24],含有一种修饰过的氨基酸组成的载色中心,用普通荧光显微镜以标准的波长紫外线就很容易观察到该基因的产物,将GFP基因与另一种基因连接在一起构成融合基因,另一种基因表达的蛋白质可由GFP产生的荧光来反映^[24],实验结果显示转染pEGFP-C1-NS5ATP13质粒的Huh-7细胞绿色荧光主要集中在细胞核质中,并显著且大量出现双核及多核现象,与国外研究报道相一致,并应用细胞活性发光法连续7天对转染pEGFP-C1-NS5ATP13重组质粒的Huh-7细胞进行活细胞数检测,并绘制生长曲线,发现NS5ATP13具有促进细胞增殖的作用,也与以上的研究成果相符合。NS5ATP13基因功能的研究及与HCV NS5A蛋白的关系研究,为阐明HCV感染及慢性肝炎、肝纤维化和肝癌的病理机制提出了新的思路。

参考文献

- [1] 成军,杨守纯.现代肝炎病毒分子生物学[M].北京:人民军医出版社,1997.137.
- [2] Sato C. Effects of hepatitis C virus proteins on the interferon-stimulated signal transduction[J]. Nippon Rinsho,2001,59:1271-1276.
- [3] Kato N, Lan KH, Nita SK, et al. Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator[J]. J Virol,1997,71:8856-8859.
- [4] Kato N, Yoshida H, Nita SK, et al. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C2 viral core is the most potent signal inducer[J]. Hepatology,2000,32:405-412.
- [5] Chung KM, Song OK, Jang SK. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A contains potential transcriptional activator domains[J]. Mol Cells,1997,7:661-667.
- [6] Gong G, Waris G, Tanveer R, et al. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B[J].

- Proc Natl Acad Sci USA,2001,98:9599-9604.
- [7] Ghosh AK, Steele R, Meyer K, et al. Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth[J]. J Gen Virol,1999,80:1179-1183.
- [8] 刘妍, 陆荫英, 成军, 等. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS5A反式激活基因的克隆化研究[J]. 解放军医学杂志,2003,28:40-43.
- [9] 党晓燕, 成军, 刘妍, 等. 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式激活基因NS5ATP13的克隆化研究[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2003,12:260-262.
- [10] 张黎颖, 邓红, 成军, 等. 应用表达谱芯片技术研究NS5ATP13的反式调节基因[J]. 世界华人消化杂志,2004,12:2757-2761.
- [11] 党晓燕, 成军, 邓红, 等. 抑制性消减杂交技术筛选NS5ATP13蛋白的上调基因[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2004,13:39-42.
- [12] Meier UT, Blobel G. A nuclear localization signal binding protein in the nucleolus[J]. J Cell Biol,1990,111:2235-2245.
- [13] Meier UT, Blobel G. Nopp140 shuttles on tracks between nucleolus and cytoplasm[J]. Cell,1992,70:127-138.
- [14] Vandelaer M, Thiry M. The phosphoprotein pp135 is an essential constituent of the fibrillar components of nucleoli and of coiled bodies[J]. Histochem Cell Biol,1998,110:169-177.
- [15] Pai CY, Chen HK, Sheu HL. Cell-cycle-dependent alterations of a highly phosphorylated nucleolar protein p130 are associated with nucleologenesis[J]. J Cell Sci,1995,108:1911-1920.
- [16] Chen HK, Pai CY, Huang JY. Human Nopp140, which interacts with RNA polymerase I: implications for rRNA gene transcription and nucleolar structural organization[J]. Mol Cell Biol, 1999,19:8536-8546.
- [17] Miao LH, Chang CJ, Tsai WH. Identification and characterization of a nucleolar phosphoprotein, Nopp140, as a transcription factor[J]. Mol Cell Biol,1997,17:230-239.
- [18] Li D, Meier UT, Dobrowolska G, et al. Specific interaction between casein kinase 2 and the nucleolar protein Nopp140[J]. J Biol Chem,1997,272:3773-3779.
- [19] Isaac C, Yang Y, Meier UT. Nopp140 functions as a molecular link between the nucleolus and the coiled bodies[J]. J Cell Biol,1998,142:319-329.
- [20] Yang Y, Isaac C, Wang C, et al. Conserved composition of mammalian box H/ACA and box C/Dsmall nucleolar ribonucleoprotein particles and their interaction with the common factor Nopp140[J]. Mol Biol Cell,2000,11:567-577.
- [21] Isaac C, Pollard JW, Meier UT. Intranuclear endoplasmic reticulum induced by Nopp140 mimics the nucleolar channel system of human endometrium[J]. J Cell Sci,2001,114:4253-4264.
- [22] Jin Y, Yu J, Yu YG. Identification of hNopp140 as a binding partner for doxorubicin with a phage display cloning method[J]. Chem Biol,2002,9:157-162.
- [23] Leu JI, Crissey MA, Craig LE, et al. Impaired hepatocyte DNA synthetic response posthepatectomy in insulin-like growth factor binding protein 1-deficient mice with defects in C/EBP beta and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase regulation[J]. Mol Cell Biol,2003,23:1251-1259.
- [24] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. Science,1994,263:802-805.

收稿日期: 2010-05-14

• 消息 •

《中国肝脏病杂志(电子版)》征稿启事

《中国肝脏病杂志(电子版)》为卫生部主管、人民卫生出版社主办、首都医科大学附属北京地坛医院承办的肝脏病学专业学术电子期刊,是一本在载体形式上与纸媒体相互补充的多媒体光盘期刊(CD-ROM)。本刊以电子期刊特有的表现形式,运用影视语言和多媒体技术登载有关肝脏病的专业论著、专家讲坛、临床病理讨论及学术会议等,图文声像并茂,是广大肝脏病工作者了解当前学科前沿、掌握最新技术的有效工具。本刊内容主要包括各种肝脏病的病原学、流行病学、免疫学、临床诊断及预防的实践经验和研究成果,以及本领域新技术、新方法的重要进展。本刊常设的主要栏目有述评、专家讲座、论著、指南、继续医学教育、经验交流、短篇报道、综述、临床病理讨论、设备技术介绍、国内外学术动态等。

本刊特色栏目:(1)继续医学教育(视频);

(2)临床病理讨论(病例分析、典型图像分析、专家点评)。

本刊的办刊宗旨是:

贯彻党和国家的卫生工作方针政策,贯彻理论与实践、普及与提高相结合的办刊方针,紧跟国际医学发展趋势,及时反映我国肝脏病临床和科研工作的重大进展,促进国内外肝脏病学学术交流。

本杂志为季刊,16开,64页,逢季末月20日出版。每期定价20元,全年定价80元。本刊已纳入“中国核心期刊(遴选)数据库”、“中文生物医学期刊文献数据库—CMCC”和“美国化学文摘数据库(Cheical Abstracts Service)”中进行论文统计和引证查询。

通讯地址:北京市朝阳区京顺东街8号《中国肝脏病杂志(电子版)》编辑部

邮编:100015 电话:010-84322058 传真:010-84322059 网址: <http://www.j-ditan.com>