

丙型肝炎病毒基因1b型F蛋白对人肝细胞癌细胞株HepG₂凋亡的影响

杨静静 张云 邓小昭 许可 王忠灿 王洁 冯乐 丁伟良

【摘要】 目的 研究丙型肝炎病毒(HCV)基因1b型F蛋白对人肝细胞癌细胞株HepG₂凋亡的影响。方法 构建真核表达重组质粒pcDNA3.0-F-EGFP,并利用Lipofectamine 2000转染人肝细胞癌细胞系HepG₂,同时设pcDNA3.0-C-EGFP-HepG₂阳性对照、pcDNA3.0-HepG₂为阴性对照及未转染HepG₂为空白对照,以Act-D、TNF α 诱导四组细胞系发生凋亡,Annexin V-FITC/PI双染检测肿瘤细胞死亡率,并使用细胞凋亡DNA Ladder检测,进一步验证HCV 1b型F蛋白在肝细胞凋亡的生物学功能效应。结果 pcDNA3.0-F-EGFP-HepG₂细胞系在发生凋亡的时间上比pcDNA3.0-C-EGFP-HepG₂快,但相对空白质粒转染组及未转染HepG₂细胞系有明显延迟,凋亡的发生率也明显低于阴性对照及空白对照细胞系($P<0.001$)。结论 外源性基因HCV 1b型F的引入及表达,对HepG₂细胞的凋亡有抑制作用。

【关键词】 丙型肝炎病毒; F蛋白; 凋亡; 肿瘤坏死因子 α

Influence of F protein of hepatitis C virus subtype 1b inhibits on human hepatocellular carcinoma HepG₂ cell apoptosis YANG Jing-jing*, ZHANG Yun, DENG Xiao-zhao, XU Ke, WANG Zhong-can, WANG Jie, FENG Le, DING Wei-liang. *School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China Corresponding author: ZHANG Yun, Email: zhangyun111@sohu.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of F protein of hepatitis C virus subtype 1b on the apoptosis of human hepatocellular carcinoma HepG₂ cells. Methods HepG₂ cells were transfected with recombinant plasmid pcDNA3.0-F-EGFP and pcDNA3.0-F-EGFP-HepG₂ strain was exposed to Act-D and tumor necrosis factor α (TNF α) treatment in order to induce cell apoptosis with positive control pcDNA3.0-C-EGFP-HepG₂, negative control pcDNA3.0-C-EGFP-HepG₂ and blank control HepG₂. Annexin V-FITC/PI of flow cytometry was performed to determine the number of apoptotic cells. DNA Ladder was used to observe the isolation of apoptotic DNA fragments in the apoptotic cells. Results pcDNA3.0-F-EGFP-HepG₂ cell strain showed a much delayed apoptosis as well as obviously lowering the apoptotic rate when compared with the pcDNA3.0-HepG₂ strain and HepG₂ strain ($P<0.001$). Conclusion The introduction and expression of extraneous gene (the F gene of hepatitis C virus subtype 1b) could significantly inhibit the apoptosis of HepG₂ cells.

【Key words】 Hepatitis C virus; F protein; Apoptosis; Tumor necrosis factor α

丙型肝炎病毒(HCV)是世界范围内慢性肝炎的主要病原之一,约有1.8亿人被感染,常导致严重肝病,包括肝硬化和肝细胞癌(HCC)^[1]。在非洲和南美一些国家/地区的HCV感染率高达10%以上,我国HCV感染率近3%并呈上升趋势^[2]。有研究表明,HCV C、NS3和NS5A蛋白与肝癌的发生发展有关^[3-5]。其中,作为HCV惟一能够编码两种蛋白的C基因,其编码的F蛋白的功能,尚未十分明确。在HCV所致HCC患者体内,F蛋白的数量、抗体阳性

率以及基因序列的突变率均显著升高,提示F蛋白可能与HCC有关^[6]。HCV基因型分为6型,其中又可分很多亚型。我国大部分地区主要流行的HCV型别为基因1b型^[2]。基因1b型在慢性肝炎、肝硬化和肝癌中占绝大多数,而国内外关于HCV 1b型F蛋白对肝癌细胞凋亡影响的研究甚少。本研究利用真核表达载体pcDNA3.0将HCV 1b型的C基因、F基因转染至HepG₂细胞,对照HCV C蛋白研究F蛋白的存在对肝癌细胞的凋亡是否有抑制作用。

材料与方法

一、材料

1. 标本来源:含有1b型HCV全长基因重组质粒PUC119-HCV、HepG₂细胞、大肠埃希菌*E.coli*

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.04.020

基金项目:江苏省高校自然科学基金(03KJD330144)

作者单位:210029 南京医科大学公共卫生学院(杨静静、张云、王洁);南京军区军事医学研究所(邓小昭、王忠灿);江苏省疾病预防控制中心(许可);江苏省宜兴市人民医院(冯乐、丁伟良)

通信作者:张云,Email: zhangyun111@sohu.com

TG1 及 pcDNA3.0 均为本实验室提供。

2. 试剂: DNA Marker、DNA 限制性内切酶 BamH I、Xba I、EcoR I、pMD18-T Vector、T4 DNA 连接酶和蛋白质 Marker 为 TaKaRa 公司产品。细胞转染试剂盒 Lipofectamine2000 为 Invitrogen 公司产品。Taq 酶为 Promega 公司产品。胶回收试剂盒购自上海申能博彩公司。鼠抗 HCV-F mAb 购自北京博菲康公司,兔抗人 HCV C 单克隆抗体、鼠抗 EGFP 单克隆抗体、重组人肿瘤坏死因子 TNF α 购自北京博奥森公司。羊抗鼠 HRP-IgG、羊抗兔 HRP-IgG 为博士德公司产品。培养基 DMEM、胎牛血清、G-418 购自 GIBCO 公司,去内毒素提质粒试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物公司,细胞凋亡 DNA Ladder 检测试剂盒购自上海美季生物公司。

二、方法

1. PCR 引物设计、扩增产物及载体构建: 根据 Pubmed 上标准序列设计引物,并人为加上酶切位点和保护碱基及柔性 linker,根据 GenBank 上 HCV 1b 型 F 蛋白 42 位密码子 -2/+1 框移位及 144 位密码子终止以 HCV 1b 型 C 基因序列设引物。所需 PCR 引物见表 1,以 HCV 全基因质粒 PUC119-full 为模板应用 PCR 方法扩出 C 基因序列,扩增参数: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,扩增 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,1% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。将 PCR 取得的基因片段 C 装入 T 载体 (TaKaRa),转化大肠埃希菌 *E.coli* TG1,挑选阳性克隆菌落,提取质粒经 PCR、双酶切及测序鉴定 T-C。测序鉴定正确后分别以 T-C 为模板,重叠延伸 PCR 技术 (gene splicing by overlap extension PCR, SOE PCR) 扩增 F 上下游片段,退火温度为 60 $^{\circ}$ C,其余扩增参数同上;再以 F1、F4 引物,F 上下游片段 (分别插入 T 载体测序验证正确) 等浓度混合作为模板 PCR 扩增 F 融合片段,退火温度为 58 $^{\circ}$ C,其余扩增参数同上 (图 1)。将 PCR 取得的基因片段 F 融及质粒 T-C 双酶切分别装入 pcDNA3.0,提取质粒经 PCR、双酶切及测序鉴定。从 pEGFP-N1 质粒上用 EGFP 引物 G1、G2 PCR 扩增 EGFP 产物,退火温度为 54 $^{\circ}$ C,其余反应条件同上,PCR 产物双酶切连接入真核载体 pcDNA3.0-F 和 pcDNA3.0-C,转化大肠埃希菌 *E.coli* TG1,挑选阳性克隆菌落,用去内毒素提质粒试剂盒纯化质粒 pcDNA3.0-F-EGFP 和 pcDNA3.0-C-EGFP 并测序验证。

2. 细胞转染及 Western blot 检测: 将 HepG₂ 细胞

表 1 目的基因 PCR 引物

引物	序列 (5' → 3')	限制性片段
F1	GCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGG	
F2	CGCGCGCACACCCAACTGGGCCCTGCGGGCGC	
F3	GGGGCCCAAGTTGGGTGTGCGCGCGACTAG	
F4	ACGGAATTC TCCTAGGGGGCGCCGACGAGCEcoR I	
C1	ACGGCATTC ATGAGCACGAATCCTAAACC	BamH I
C2	ATAGAAATTC GGAAGCTGGGATGGTCAAAC	EcoR I
G1	GCGCGAATTC GGTGGTGGTGTAGC	EcoR I linker
	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT	
G2	TGG CTGATTATGATCTAGA GTCGCG	Xba I

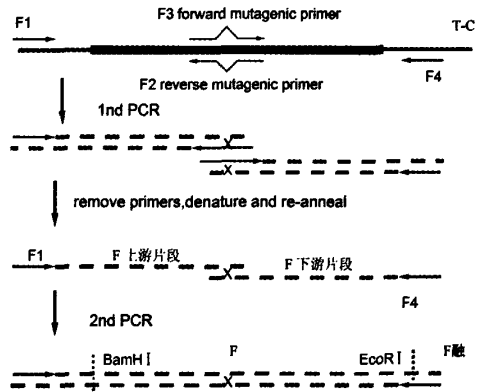


图 1 SOE PCR 扩增 F 蛋白

接种于 12 孔板,2 $\times 10^5$ /孔,70% ~ 80% 细胞融合后,分别用 pcDNA3.0-F-EGFP、pcDNA3.0-C-EGFP (阳性对照)、pcDNA3.0 质粒 (阴性对照) 2 μ g 和 Lipofectamine 8 μ l 进行转染,转染 48 h 的 pcDNA3.0-F-EGFP-HepG₂、pcDNA3.0-C-EGFP-HepG₂ 及 pcDNA3.0-HepG₂ 分别在倒置荧光显微镜观察,计数 EGFP 阳性细胞并拍照。利用 G418 (400 μ g/ml) 对转染 48 h 的三组细胞进行稳定表达的筛选,收集细胞,分别加入 0.5 ml 蛋白裂解液,按蛋白提取试剂盒说明书提取总蛋白,-20 $^{\circ}$ C 保存。检测前测样品蛋白浓度,按比例与 5 \times 上样缓冲液混合,置 100 $^{\circ}$ C 沸水中煮 5 min,待测。取等量蛋白样品及蛋白 Marker 上样进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,电泳后进行电转移,将凝胶转移至硝酸纤维素膜上,置于含 1% 脱脂奶粉的 TBST 中封闭过夜。将硝酸纤维素膜与 1:200 稀释的鼠抗 HCV-F mAb 一抗溶液及 1:5000 稀释的抗兔 IgG 二抗溶液作用,HRP-DAB 底物显色试剂盒内的各溶液混合,滴于膜上,室温染色 10 min,显色后拍照。同上步骤再进行 HCV-C、EGFP Western blot 检测,结果拍照。

3. 细胞凋亡检测:

(1) Act-D 及 TNF α 诱导细胞凋亡: 将转染的 pcDNA3.0-F-EGFP-HepG₂ (F 组)、pcDNA3.0-C-EGFP-HepG₂ (C 组)、空白质粒组及未转染 HepG₂ 组四组细胞

胞系以每孔 1×10^6 接种在 6 孔板中,待细胞生长贴壁良好时,吸弃培养上清,PBS 冲洗孔内细胞 2 次,冲洗去贴壁生长不良和悬浮细胞,参照文献[7]各加入终浓度 333 nmol/L Act-D 的 DMEM 培养基 2 ml,诱导刺激 30 min,再加入 20 μ l TNF α (10 mg/L),开始计时诱导凋亡刺激时间。

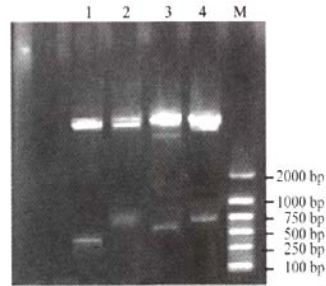
(2)流式细胞仪检测:按上述(1)方法以 Act-D、TNF α 诱导细胞发生凋亡,每组细胞各 3 复孔分别处理 0、8、16、24、32、40、48 h。每孔用 0.25 ml 胰酶消化液消化收集细胞。每孔收集细胞用 3 ml PBS 洗涤 1 次。RCF 为 $95 \times g$ 离心去 PBS 后按 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒说明处理,上流式细胞仪检测。

(3)DNA Ladder 凋亡检测:按上述(1)方法以 Act-D、TNF α 诱导细胞发生凋亡,每组细胞各 3 复孔分别处理 8、16、24、32、40、48 h 用细胞刮收集,细胞 DNA 的收集处理步骤参照上海美季生物公司的细胞凋亡 DNA Ladder 检测试剂盒说明书进行。取上述各组细胞不同处理时间的 DNA 样品 15 μ l 加入 3 μ l Loading buffer, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳(凝胶和电泳缓冲液 TBE 均加入 0.5 μ g/ml 的溴化乙锭); 5 V/cm 电泳 1 h,紫外灯下观察并拍照。

结 果

1. 扩增目的片段及重组克隆质粒的酶切鉴定:分别用 PCR 及 SOE PCR 扩增 HCV 1b 型 C 基因、F 基因片段及绿色荧光蛋白 EGFP 基因片段,并分别插入真核载体 pcDNA3.0,载体重组后的 pcDNA3.0-F-EGFP、pcDNA3.0-C-EGFP 阳性克隆质粒分别进行双酶切后电泳,结果见图 2: pcDNA3.0-F-EGFP、pcDNA3.0-C-EGFP 分别用 BamH I / EcoR I 和 EcoR I / Xba I 双酶切可见 432 bp 的 F 片段、573 bp 的 C 片段及 720 bp 的 EGFP 片段;其酶切带与预期结果一致,证明了所有插入的基因片段正确。

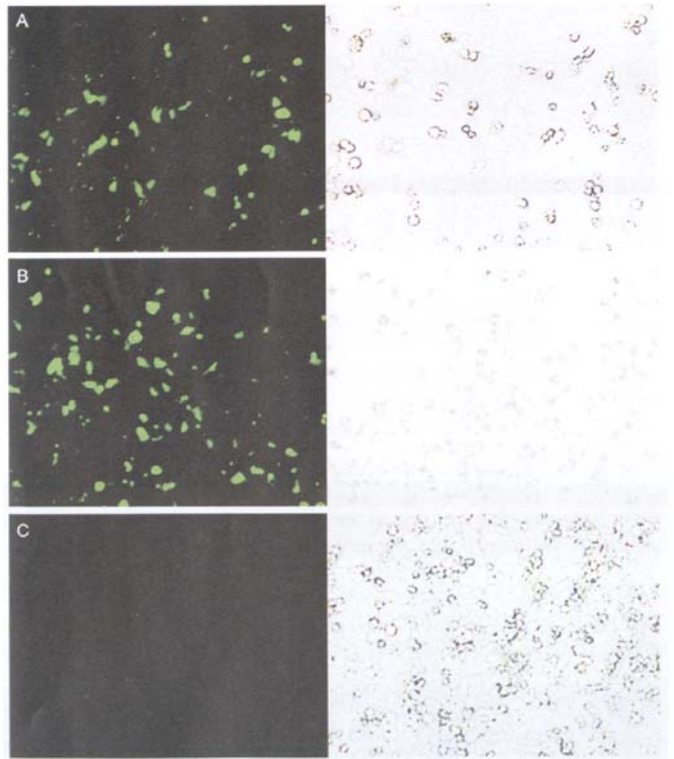
2. 转染细胞蛋白的表达:转染 48 h 后的 F、C 组及空白质粒分别在倒置荧光显微镜下观察,计数绿色荧光细胞数目,并计算得出 F、C 组转染率分别为 39.7% 和 50.8%。拍照结果:F 组及 C 组两组细胞有绿色荧光表达,而 pcDNA3.0 空白质粒在细胞内阴性表达(图 2)。Western blot 检测结果表明,抗 HCV-F Western



注:M: DNA Marker DL2000; pcDNA3.0-F-EGFP 重组质粒酶切鉴定结果:1: BamH I、EcoR I 双酶切 HCV F 基因片段,432 bp; 2: EcoR I、Xba I 双酶切 EGFP 基因片段,720 bp。pcDNA3.0-C-EGFP 重组质粒酶切鉴定结果: 3: BamH I、EcoR I 双酶切 HCV C 基因片段,573 bp; 4: EcoR I、Xba I 双酶切 EGFP 基因片段,720 bp

图 2 pcDNA3.0-F-EGFP、pcDNA3.0-C-EGFP 酶切鉴定

blot, F 组细胞表达出相对分子质量(M_r)为 16×10^3 蛋白,其他两组未有表达。抗 HCV-C Western blot, C 组细胞表达出 M_r 为 22×10^3 蛋白,其他未有表达。而抗 EGFP Western blot, F 组及 C 组都表达出一条 M_r 为 27×10^3 的蛋白条带,而空白质粒转染组阴性表达(图 3、4)。



注: A: F 组: pcDNA3.0-F-EGFP 质粒转染 HepG₂ 48 h 后 EGFP 表达($\times 100$); B: C 组: pcDNA3.0-C-EGFP 质粒转染 HepG₂ 48 h 后 EGFP 表达($\times 100$); C: pcDNA3.0 空白质粒转染 HepG₂ 48 h 后无 EGFP 表达($\times 100$); 各转染组左侧为荧光显微镜拍照结果,右侧为该转染组电子显微镜拍照结果

图 3 荧光显微镜观察 EGFP 在 HepG₂ 内的表达

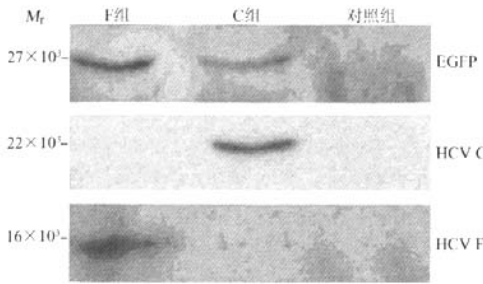
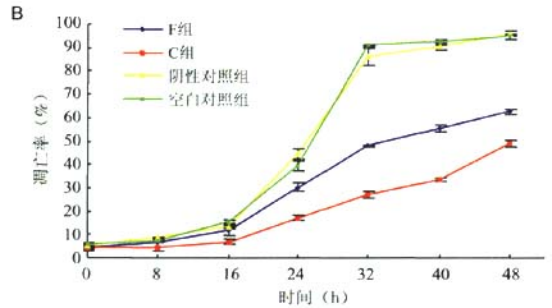
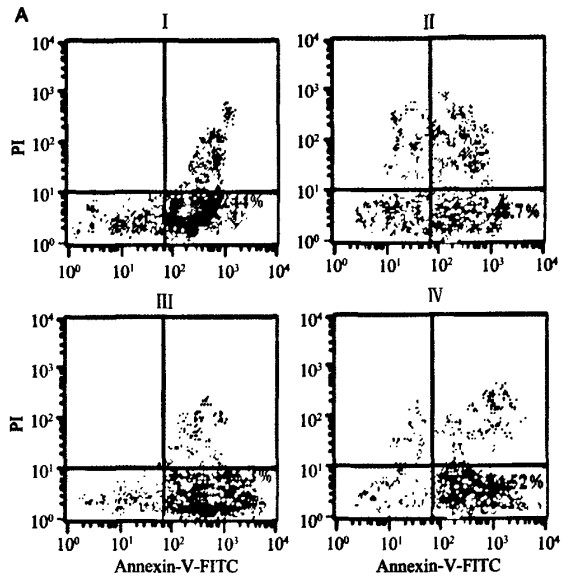


图4 Western blot 检测 F、C、EGFP 在 HepG₂ 细胞内表达

3. 细胞凋亡检测: 流式细胞术检测以 Act-D、TNF α 诱导的 F 组、C 组及空白质粒组、未转染 HepG₂ 细胞组发生凋亡的情况, 图 5A 为上述四组细胞 Act-D、TNF α 作用 48 h 检测结果。F 组和空白质粒转染组及未转染组相比, 细胞凋亡率趋势较低, 但相对 C 组凋亡率却较高。而空质粒转染组和未转染组细胞之间无明显差异 (图 5B)。经处理主效应方差分析结果显示在 0 和 8 h 时间点四组细胞系凋亡率比较及各组间 SNK 法两两比较, $P > 0.05$, 均差异无统计学意义; 在 16、24、32、40、48 h 各时间点, 四组细胞系凋亡率方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 且 SNK 法两两比较中, F 组与其他三组细胞系凋亡率的差异有统计学意义, 而空质粒转染组和未转染组细胞之间无明显差异。同时用 DNA Ladder 凋亡检测验证上述结果, 结果见图 6, F 组 DNA 碎片含量相对同一时间点的空质粒转染组和未转染组细胞少, 却比同一时间点 C 组 DNA 碎片含量多, 提示 HCV 1b 型的 F 蛋白对 HepG₂ 细胞的凋亡可能有抑制凋亡的作用。

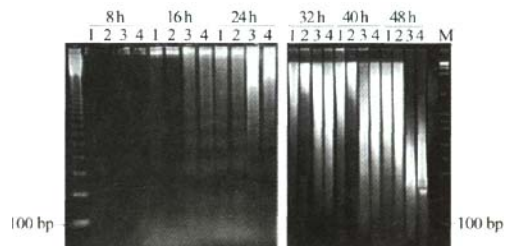
讨 论

HCV F 蛋白是近年发现的由 C 基因编码的, 在病毒自然感染过程中产生的新型结构蛋白。不同基因型 HCV 均能产生 F 蛋白, 但其长度不同, 1a 型的 F 蛋白为 161aa, 1b 型的 F 蛋白则为 134aa^[8-11]。国内外研究表明 F 抗体在 HCV 慢性患者和 HCV 所致 HCC 患者体内的检出, 以及在 HCV 所致肝癌患者肿瘤组织内 F 蛋白准种的检出, 提示 F 蛋白和 HCV 慢性化和肝癌形成有关^[6, 12]。Boulant 等^[10]研究发现 1b 型 F 蛋白的产生是由 C 蛋白的第 42 位密码子的 +1 位移移框和第 144 位的 -1 位移移框的两次移框产生的。因此它包含与 C 蛋白相同的 N 端 42 个氨基酸、C 末端以及完全不同的中间 101 个氨基酸。HCV F 蛋白的编码区与 C 基因区的重叠是否提示 F 蛋白的功能是否



注: A: 流式细胞术检测以 Act-D、TNF α 诱导 48 h 的 F 组、C 组、pcDNA3.0 空白质粒组和未转染 HepG₂ 细胞组发生凋亡的情况。(I) F 组 HepG₂ 细胞凋亡率为 62.44%; (II) C 组 HepG₂ 细胞凋亡率为 48.7%; (III) pcDNA3.0 空白质粒组 HepG₂ 细胞凋亡率为 95.3%; (IV) 未转染 HepG₂ 细胞组凋亡率为 94.52%。B: 四组细胞在 Act-D、TNF α 诱导 0、16、24、32、40、48 h 时的凋亡率 (平均值及标准差图中已标注) 变化趋势

图5 流式细胞术检测细胞凋亡率时间变化



注: M: 100 bp DNA Ladder Marker; 1: F 组; 2: C 组; 3: pcDNA3.0 空白质粒组; 4: 未转染组

图6 DNA Ladder 凋亡检测验证

与 C 蛋白功能相似, 能引起肝癌细胞凋亡异常, 本研究为探究上述问题, 将表达的 HCV 1b 型 F 蛋白的质粒转染 HepG₂ 细胞, 再用 G418 筛选稳定表达 F 蛋白的细胞克隆, 然后用 Act-D、TNF α 处理以期观察细胞

凋亡情况。用 Annexin V-FITC/PI 双标记流式细胞术检测结果表明, Act-D、TNF α 作用 24 h 和 32 h 后, F 组细胞凋亡率分别为(30.23 \pm 1.71)%和(48.03 \pm 0.41)%, 空白质粒转染细胞凋亡率分别为(44.43 \pm 2.03)%和(86.20 \pm 3.37)%, 前者显著低于后者。以上结果提示稳定转染 F 基因的 HepG₂ 细胞的凋亡率明显低于空白质粒组及未转染 HepG₂ 组。HepG₂ 细胞在 32 h 时凋亡率达到 86.20%, 而 C 组和 F 组细胞在 48 h 时分别约 48.70% 和 62.44% 的细胞被检测到凋亡, 不仅是细胞凋亡的发生被延迟, 且凋亡发生率亦明显降低。DNA Ladder 凋亡检测结果也表明, F 组细胞在诱导刺激 24 h 时, DNA 小分子量碎片明显低于空白质粒及未转染 HepG₂ 细胞系, 但高于 C 组。与流式细胞术的检测结果基本相符, 从而提示, 外源性基因 1b 型 F 的引入及表达对细胞的凋亡有抑制作用, 但与 1b 型 C 蛋白相比其抑制作用并不显著。该过程具体的调控机理、相关的分子机制以及是否涉及其他信号分子还需做深入的研究。HCV C 蛋白的研究表明, C 蛋白能够抑制抑癌基因 p16、p27 和 p53 的转录与 DNA 合成, 扰乱细胞周期, 进而参与致癌过程^[13,14]。C 蛋白致癌过程中可能也有 F 蛋白的表达, 我们是否可以通过基因定点突变的方法, 使得仅仅有 C 蛋白表达而没有 F 蛋白表达, 同时将 F 蛋白和野生型 C 蛋白对照研究, 分析 F 蛋白对癌基因和抑癌基因的作用, 进而了解 F 蛋白在肝癌发生发展中的作用, 明确 F 蛋白缺失后对 HCV 病毒复制、感染性病毒颗粒产生以及干扰素敏感性的影响, 并检测这种影响是否存在基因型间差异, 更进一步解析 F 蛋白在病毒复制周期中以及肝癌的发生发展中的作用。

丙型肝炎及其发展而来的 HCC 至今没有令人满意的治疗方法。研究 HCV 基因 1b 型 F 蛋白与 HepG₂ 发生的关系对阐明 HCC 发生的机理及其防治有着重要的意义, F 蛋白能否作为 HCC 筛查的参考指标, 能否为 HCC 治疗开辟新的途径, 已成为近年来国内外研究的热点。本研究结果表明 HCV 基因 1b 型 F 蛋白对 HepG₂ 细胞的凋亡有抑制作用, 对此深入研究有助于阐明 HCV 的致病机理, 并为丙型肝炎疫苗的发展与新的 HCC 治疗药物研究提供帮助。

参 考 文 献

[1] Leone N, Rizzetto M. Natural history of hepatitis C virus infection: from chronic hepatitis to cirrhosis, to hepatocellular carcinoma. *J Minerva Gastroenterol Dietol*, 2005, 51(1):31-46.

[2] 中华医学会肝病学会, 中华医学会传染病与寄生虫病学会. 丙型肝炎防治指南. *中华肝病杂志*, 2004, 12(2):194-198.

[3] Chang J, Yang SH, Cho YG, et al. hepatitis C virus core from two different genotypes has an oncogenic potential but is not sufficient for transforming primary rat embryo fibroblasts in cooperation with the H-ras oncogene. *J Virol*, 1998, 72 (4) : 3060-3065.

[4] Kwun HJ, Jung EY, Ahn JY, et al. p53-dependent transcriptional repression of p21 (waf1) by hepatitis C virus NS3. *J Gen Virol*, 2001, 82(Pt 9):2235-2241.

[5] 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(17):9599-9604.

[6] Ogata S, Nagano-Fujii M, Ku Y, et al. Comparative sequence analysis of the core protein and its frameshift product, the F protein, of hepatitis C virus subtype 1b strains obtained from patient with and without hepatocellular carcinoma. *J Clin Microbiol*, 2002, 40 (10):3625-3630.

[7] Jones BE, Lo CR, Liu H, et al. Hepatocytes sensitized to tumor necrosis factor: a cytotoxicity undergo apoptosis through caspasedependent and caspase-independent pathways. *J Biol Chem*, 2000, 275(1):705-712.

[8] Xu Z, Choi J, Yen TS, et al. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J*, 2001, 20(14): 3840-3848.

[9] Walewski JL, Keller TR, Stump DD, et al. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA*, 2001, 7:710-721.

[10] Boulant S, Becchi M, Penin F, et al. Unusual multiple recoding events leading to alternative forms of hepatitis C virus core protein from genotype 1b. *J Biol Chem*, 2003, 278(46):45785-45792.

[11] Bain C, Parroche P, Lavergne JP, et al. Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection. *J Virol*, 2004, 78(19):10460-10469.

[12] 邵圣文, 武文斌, 于建国, 等. 丙型肝炎病毒 F 蛋白抗原性及患者血清 F 抗体流行率的研究. *中华肝病杂志*, 2006, 14(12): 890-893.

[13] Otsuka M, Kato N, Lan K, et al. Hepatitis C virus core protein enhances p53 function through augmentation of DNA binding affinity and transcriptional ability. *J Biol Chem*, 2000, 275(44) : 34122-34130.

[14] Tai DI, Tsai SL, Chen YM, et al. Activation of nuclear factor kappa B in hepatitis C virus infection: implications for pathogenesis and hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, 2000, 31(3):656-664.

(收稿日期:2008-09-22)

(本文编辑:张林东)