论著

文章编号:1000-5404(2012)12-1162-05

丙型肝炎病毒核心蛋白抑制 shRNA 介导的 RNA 干扰作用

易 敏[1,2],黄文娟[1],宋彩虹[1],陆水英[1],李升锦[2],陈维贤[1] (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院:检验科[1],呼吸内科[2])

[摘要] **目的** 研究丙型肝炎病毒编码的蛋白对 RNA 干扰的抑制作用,筛选出有作用的 RNA 干扰抑制因子。**方法** 构建丙型肝炎病毒不同蛋白质的真核表达质粒,加入萤火虫荧光素酶基因的 RNA 干扰体系,共转染 HeLa 细胞,检测萤火虫荧光素酶活性以观察 RNA 干扰效果的变化,筛选出有作用的 RNA 干扰抑制因子。在针对内源性 GFP 的 RNA 干扰体系中进一步确证该种抑制作用。利用共转染方法观察该蛋白抑制 RNA 干扰的剂量效应关系、在不同细胞系中的作用以及对 siRNA 介导的 RNA 干扰是否有相同的拮抗作用。**结果** 加入核心蛋白后,萤火虫荧光素酶活性恢复到 80%,与空白对照比较有显著性差异($P<0.05$)。在绿色荧光蛋白 RNA 干扰体系中,核心蛋白使绿色荧光蛋白的表达强度明显增加。该种对抗 RNA 干扰的作用在 HepG2、HEK293 和 HeLa 细胞中均存在,且呈剂量依赖关系。在 siRNA 介导的 RNA 干扰体系中,加入核心蛋白后萤火虫荧光素酶活性无显著性变化($P>0.05$)。**结论** 核心蛋白能够对抗 shRNA 介导的 RNA 干扰作用,但不能对抗 siRNA 介导的 RNA 干扰作用,这种作用具有普遍性。核心蛋白对抗 RNA 干扰的作用可能有利于提高丙型肝炎病毒在宿主细胞内的生存能力并导致持续感染,亦可能在丙型肝炎病毒致病机制中发挥重要作用。

[关键词] 丙型肝炎病毒;核心蛋白;RNA 干扰;抑制因子

[中图法分类号] R373.21;R394-33;R394.3 [文献标志码] A

Hepatitis C virus core protein inhibits RNA interference mediated by shRNA

Yi Min[1,2], Huang Wenjuan[1], Song Caihong[1], Lu Shuiying[1], Li Shengjin[2], Chen Weixian[1] ([1]Department of Clinical Laboratory, [2]Department of Respiratory Diseases, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To identify the potent RNA interference suppressor encoded by hepatitis C virus (HCV). **Methods** The eukaryotic recombinant plasmids expressing various proteins encoded by HCV genes were constructed by inserting the corresponding DNA sequences into pcDNA3.1-3Flag, and the expression of the proteins in HepG2 cells were confirmed by immunofluorescence staining. The recombinant plasmids and the RNA interference system targeting firefly luciferase were co-transferred into HepG2 cells. The luciferase activity was assayed by dual luciferase assay system to identify the potent RNA interference suppressor, which was further confirmed using a RNA interference system targeting intrinsic GFP. The suppressing effect was observed in other two non-liver cell lines and the dose-dependent effect was studied. The effect of the potent suppressor on siRNA-mediated RNA interference was studied using a RNA interference system targeting firefly luciferase. **Results** The eukaryotic recombinant plasmids expressing various proteins encoded by HCV genes were constructed successfully. The core protein of HCV rescued both extrinsic luciferase activity and intrinsic GFP that were silenced by shRNA in HepG2 cells ($P<0.05$), in a dose-dependent manner. Similar results were observed in HEK293 and HeLa cells. However, HCV core protein did not rescue the luciferase activity silenced by siRNA ($P>0.05$). **Conclusion** HCV core protein can act as a potent suppressor of shRNA-mediated RNA interference, but can not suppress siRNA-mediated RNA interference. This ability may contribute to the persistent infection and pathogenesis of HCV.

[基金项目] 国家自然科学基金(30972582,30500428);重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5276)

[通信作者] 李升锦,电话:(023)63703244,E-mail:cqlsj1025@yahoo.com.cn

陈维贤,电话:(023)63703244,E-mail:ache11@163.com

[**Key words**] hepatitis C virus; core protein; RNA interference; suppressor

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30972582, 30500428) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BB5276).
Corresponding author: Li Shengjin, Tel: 86-23-63703244, E-mail: cqlsj1025@yahoo.com.cn; Chen Weixian, Tel: 86-23-63703244, E-mail: ache11@163.com

RNA沉默是一种古老的基因水平的免疫机制,用以限制有害的RNA,如RNA病毒、外源基因及转座子,同时在维持细胞的正常发育、代谢和凋亡中有重要作用。在哺乳动物细胞中存在指向病毒的内源性微小RNA(microRNA,miRNA)的存在,亦在病毒感染过程中检测到了源于病毒的小干扰RNA(small interfering RNA,siRNA),这些报道充分显示了RNA干扰(RNA interference,RNAi)在哺乳动物细胞内亦可能是防御病毒的重要机制。而病毒蛋白对RNAi作用有抵抗作用,以提高其生存能力[1]。

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus,HCV)是一种单股正链RNA病毒,可以导致慢性肝炎,肝硬化及肝癌[2-3]。估计全球有3%人口曾感染过HCV,其中超过80%的感染者发展为慢性肝炎。较高的持续感染率提示HCV可能存在某些机制来逃避细胞的免疫攻击,一些HCV编码产生的蛋白质能够拮抗干扰素的作用。由于RNAi亦是哺乳动物细胞的一种抗病毒机制,HCV也极可能能够对抗这一机制。为了验证这一猜想,我们利用已经建立的RNAi体系,对HCV编码的蛋白质在RNAi中的作用进行了筛选,旨在为进一步研究HCV病毒核心蛋白的RNAi机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与细胞株 质粒pcDNA3.1-3Flag、pLuc-FR(自建的双荧光素酶表达质粒)、pshRNA-GFP、pshRNA-Luc和细胞株HepG2、HEK293细胞及HeLa细胞由本室保存。稳定表达绿色荧光蛋白(GFP)的细胞株(HepG2.GFP)由本室自行建立并提供。质粒pSG5mP19(p19为番茄丛矮病毒的编码蛋白,能够抑制RNAi,用作阳性对照)由英国Charle教授赠送。含HCV 1a型全基因组的质粒HFL由美国洛克菲勒大学的Rice教授惠赠。

1.1.2 主要试剂 PCR反应、内切酶、质粒提取等试剂盒购自大连宝生物公司。脂质体Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司。双荧光素酶检测试剂为Promega公司产品。RNA提取试剂盒,DNAse Ⅰ(RNA free)及RT-PCR试剂盒(一步法)购自Qiagen公司。兔抗Flag抗体购自Santa Cruz;羊抗actin、羊抗兔IgG购自北京中山生物技术公司。细胞培养用胎牛血清购自HyClone公司。化学发光显色试剂SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit购自Pierce公司。其余常用试剂均为本室自行配制。

1.1.3 PCR引物及siRNA序列 所有引物添加*Nhe* Ⅰ和*Hind*Ⅲ酶切位点。Core上游引物:5′-GTAGCTAGCATGAGCACGAATCCTAAA-3′,下游引物:5′-GCTAAGCTTGGCTGAAGCGGGCACAGT-3′;E1上游引物:5′-GCCGCTAGCATGTACCAAGTGCGCAATTC-3′,下游引物:5′-ATGAAGCTTCGCGTCGACGCCGGCAAA-3′;E2NS1上游引物:5′-GTCGCTAGCATGGAAACCCACGTCACCG-3′,下游引物:5′-AGTAAGCTTTGCGTATGCCCGCTGAGG-3′;NS3b/4a上游引物:5′-ATAGCTAGCATGGCGCCCATCACGGCGTA-3′,下游引物:5′-AGTAAGCTTGCACTCTTCCATCTCATCG-3′;NS5a上游引物:5′-AGAGCTAGCATGTCCGGTTCCTGGCTA-3′,下游引物:5′-AGTAAGCTTGCAGCACACGACATCTTC-3′。针对萤火虫荧光素酶基因的siRNA序列为:5′-CACUUACGCUGAGUACUUCGA-3′,由大连宝生物公司合成。

1.2 方法

1.2.1 HCV不同蛋白质表达克隆的构建 选择带3倍Flag标签的真核表达质粒pcDNA3.1-3Flag为载体,从HFL质粒上利用PCR方法获得HCV的不同蛋白编码的DNA片段,利用不同的内切酶插入载体,得到相应的蛋白表达克隆。克隆经过酶切分析及DNA序列分析,证明插入片段正确性。

1.2.2 免疫荧光检测丙型肝炎病毒蛋白的表达 将HepG2细胞按1×10^5/孔接种于预置玻片的24孔细胞培养板培养,待细胞生长占玻片约80%时,按分组转染细胞,转染细胞48 h后,吸尽每孔标本的液体,PBS洗涤5 min×3次,用4%多聚甲醛4 ℃固定60 min,PBS洗涤5 min×3次,3% H_2O_2封闭内源性过氧化物酶,10 min,PBS洗涤5 min×3次,吸尽周围水分,用0.25% Triton X-100 4 ℃作用20 min,PBS洗涤5 min×3次,加入正常山羊血清封闭液,室温1 h,加入一抗反应液(兔抗Flag单克隆抗体,用PBS按1∶100稀释),37 ℃ 1 h,PBS洗涤5 min×3次,加入二抗反应液(FITC标记的羊抗兔IgG,1∶100稀释),37 ℃ 1 h,PBS洗涤5 min×3次,二甲苯透明,中性树胶封片,荧光显微镜下(波长568~574 nm)观察并照相。

1.2.3 不同蛋白质对虫荧光素酶RNAi体系的影响细胞 HepG2接种24孔板,细胞生长至90%融合时进行转染,按试剂说明书进行。每孔脂质体用量2 μl,质粒总量2 μg。其中pLuc-FR 0.2 μg,pshRNA-LUC 0.8 μg,蛋白表达质粒1 μg,用空载体pcDNA3.1-3Flag及pTZU6+1作为对照。转染6 h后换液。验证核心蛋白对SV40启动子启动的萤火虫荧光素酶基因表达活性是否有影响时,核心蛋白表达质粒pCORE-3FLAG(0、0.2、0.4、0.6、0.8 μg)与pLuc-FR(0.2 μg)共转染,并以空载体pcDNA3.1-3Flag为对照,观察萤火虫荧光素酶及海肾荧光素酶活性及其比值是否有显著性变化。每次转染3孔,实验重复3次。

1.2.4 核心蛋白对内源性 GFP RNAi 体系的影响 为验证核心蛋白拮抗 RNAi 作用的普遍性,将之加入针对内源性 GFP 的 RNAi 系统中验证。HepG2. GFP 接种 6 孔板,待细胞 90% 融合后转染。每孔脂质体 10 μl,质粒总量 4 μg,其中 pshRNA-GFP 2 μg,pCORE-3Flag 2 μg,分别以空载体 pCDNA3. 1-3Flag 及 pTZU6 +1 作为对照。转染后每日观察荧光强度并照相。

1.2.5 不同细胞系中的作用 分别接种肝癌细胞株 HepG2、HEK293 细胞、HeLa 细胞于 24 孔板,按 1.2.3 中方法转染细胞,收集细胞裂解液检测荧光素酶活性,比较核心蛋白在不同细胞株中的作用。重复 3 次实验。

1.2.6 剂量效应关系 接种细胞株 HepG2 于 6 孔板, 90% 融合时进行转染。每孔脂质体用量 10 μl, 质粒总量 4 μg。其中 pLuc-FR 400 ng,pshRNA-Luc 1.6 μg,pCORE-3Flag 梯度用量分别为 0.0、0.5、1.0、2.0 μg,用空载体 pcDNA3. 1-3Flag 平衡质粒总量至 4 μg。用 pLuc-FR 0.4 μg + pTZU6 1.6 μg + pcDNA 3. 1-3Flag作为标准组,用于数据的标准化比较。重复 3 次实验。

1.2.7 对 siRNA 干扰体系的作用 检测核心蛋白对 siRNA 引起的 RNAi 作用时,以 12 孔板进行。转染体系为 siRNA 0.1 pmol, pLuc-FR 0.3 μg,蛋白表达质粒或空载体 1.5 μg,脂质体 4 μl。转染后 48 h 收集细胞裂解液测定荧光素酶活性。重复 3 次实验。

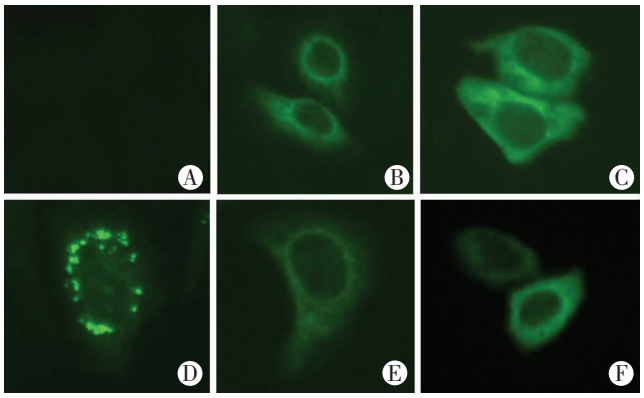
1.3 统计学分析

数据分析时以海肾荧光素酶活性为内参照,计算萤火虫荧光素酶与海肾荧光素酶活性的比值,并将对照组活性比值设为 1,计算各组标准化比值后进行比较,数据以 SPSS 13.0 统计软件中的 t 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 核心蛋白抑制针对虫荧光素酶 RNAi 作用

利用萤火虫荧光素酶、海肾荧光素酶 RNAi 体系,发现核心蛋白能能够明显恢复被 shRNA 抑制的萤火虫荧光素酶基因的表达($P<0.05$)。其中,阴性对照组为(0.41 ±0.03),核心蛋白为(0.75 ±0.06)较番茄丛矮病毒 p19 蛋白(0.86 ±0.08)弱,实验中 HCV 的其他蛋白质无类似作用(图 1)。



A:阴性对照;B:NS3b/4a;C:NS5a;D:Core;E:E1;F:E2NS1

图 1 免疫荧光检测不同 HCV 蛋白质对 RNAi 的作用

2.2 核心蛋白对 SV40 启动子启动的萤火虫荧光素酶表达的影响

将核心蛋白表达质粒与萤火虫荧光素酶、海肾荧光素酶表达质粒共转染,与对照比较,未发现萤火虫荧光素酶活性有明显变化(图 2),证明核心蛋白对 SV40 启动子启动的表达本身无明显作用。因此,核心蛋白恢复被 RNAi 下调的萤火虫荧光素酶基因表达的作用,不是通过非特异性激活 SV40 驱动的目的基因的表达,而是对抗了 RNAi 的下调作用。

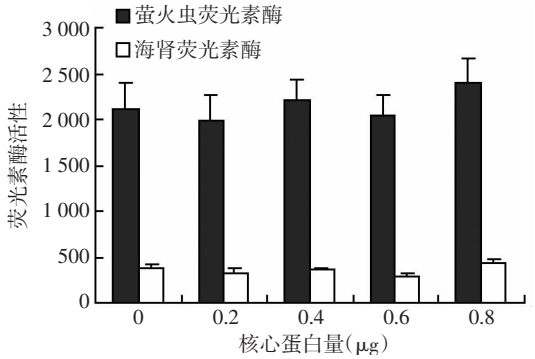


图 2 HCV 核心蛋白对 SV40 启动子介导的萤火虫荧光素酶表达活性的影响

2.3 不同细胞系中的对抗作用

在不同的细胞系进行实验时发现,核心蛋白在肝癌细胞株 HepG2、HEK293、HeLa 细胞中均能够对抗 RNAi 的作用(图 3)。证明该种作用与细胞株特性无关,而具有普遍性。因此其发挥作用的机制应当是影响了 RNAi 途径中的某些共同成分,而非结合肝源细胞系中的某一因子。

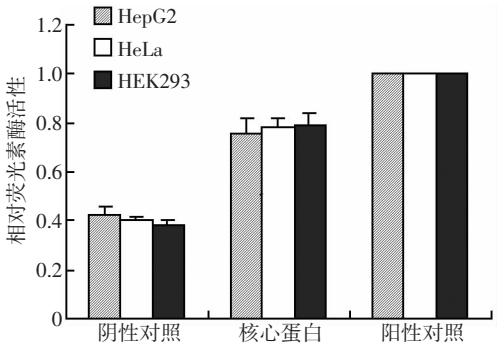
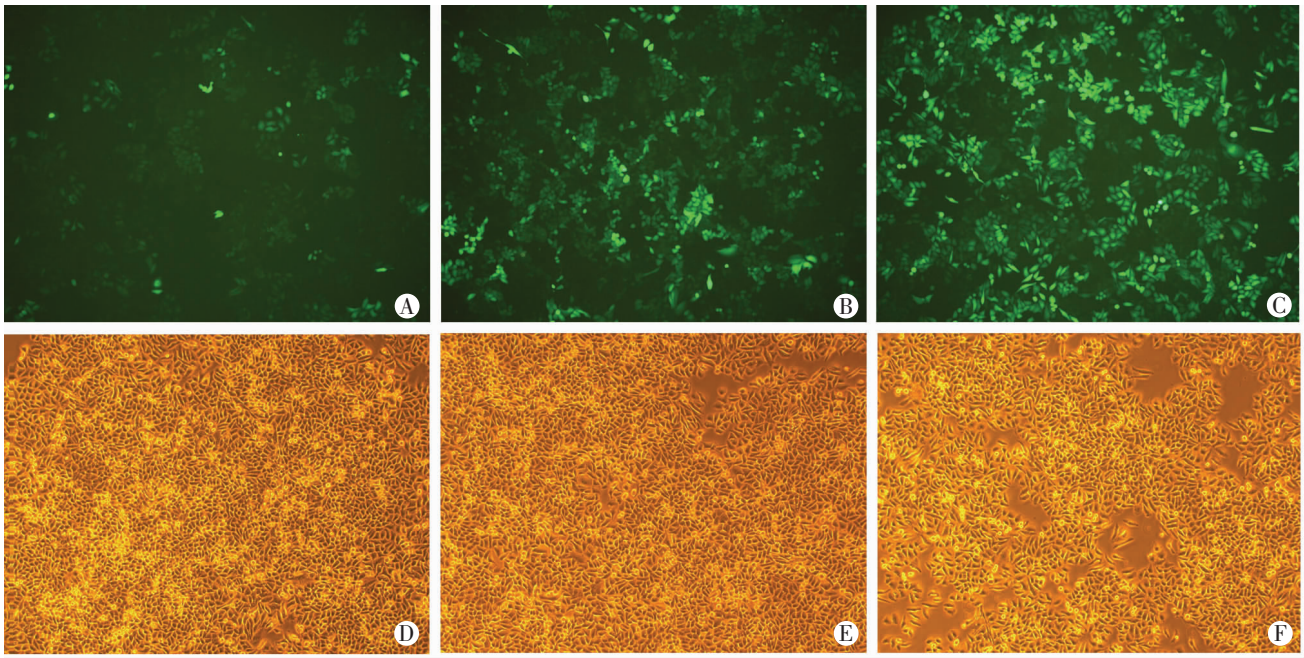


图 3 核心蛋白在不同细胞系中抑制 RNAi 的作用

2.4 剂量效应关系

进一步研究了该抑制作用与核心蛋白转染量的关系,发现其随着核心蛋白表达质粒加入量的增加而增强,抑制 RNAi 的效果呈现剂量效应关系。未转染核心蛋白质粒时,萤火虫荧光素酶相对活性为 0.33;当核心蛋白质粒转染量为 0.5 μg 时,萤火虫荧光素酶相对活性为 0.58,对 RNAi 已有明显的抑制作用;当转染量达到 1.0 μg 和 2.0 μg 时,萤火虫荧光素酶相对活性已经分布恢复至 0.73 和 0.89。核心蛋白的表达量与 RNAi 抵抗呈现明显的剂量效应关系。



A:阴性对照绿色荧光(荧光显微镜);B:核心蛋白绿色荧光(荧光显微镜);C:阳性对照绿色荧光(荧光显微镜);D:阴性对照白光(LM);E:核心蛋白白光(LM);F:阳性对照白光(LM)

图 4 核心蛋白抑制针对内源性 GFP 的 RNAi 作用 (×20)

2.5 核心蛋白抑制针对内源性 GFP 的 RNAi 作用

将核心蛋白加入针对内源性 GFP 的 RNA 干扰体系中,发现核心蛋白能够恢复 GFP 的表达,使细胞的荧光强度较对照明显增强,表达绿色荧光的细胞更多(图 4)。抑制针对内源性基因 RNAi 的实验结果进一步验证了核心蛋白拮抗 RNAi 的作用,并且证明该作用具有普遍性。

2.6 核心蛋白不能抑制 siRNA 引起的干扰作用

为了解核心蛋白抑制 RNAi 发生的机制,将核心蛋白加入 siRNA 介导的 RNAi 体系中,发现核心蛋白对 siRNA 引发的 RNAi 无拮抗作用。加入化学合成的 siRNA,萤火虫荧光素酶相对活性降至 0.35;当加入 p19 时,萤火虫荧光素酶相对活性恢复至 0.81,二者比较有统计学差异($P=0.02$);当加入核心蛋白时,萤火虫荧光素酶相对活性为 0.46,与空白比较无统计学差异($P=0.13$)。此结果表明核心蛋白对 siRNA 的功能无影响,其抑制 RNAi 的作用发生于 siRNA 形成的上游,可能是通过影响 siRNA 的形成产生的。

3 讨论

RNAi 是生物体内广泛存在的一种古老的基因水平的免疫监控机制,用以对抗病毒感染[1]。许多病毒也在进化中获得了对抗该机制的能力,通过产生 RNAi 抑制因子(RNAi suppressor),来抑制 RNAi 的作用,从而增加自身的生存能力[4]。这些 RNAi 抑制因子同时可能通过影响细胞正常的 RNAi 作用,引起宿主细胞某些重要蛋白质表达的异常,并导致细胞发育的异常或疾病的产生[5-6]。

第 1 个被研究确认的 RNA 干扰抑制因子是烟草蚀刻病毒(tobacco etch potyvirus, TEV)编码的 HC-pro[7]。Kasschau 等[7]在研究植物中两种不同病毒协同致病现象时,发现 TEV HC-pro 能够对抗 RNA 干扰机制。随之许多其他病毒编码的 RNA 干扰抑制因子相继被发现。这些抑制因子包括黄瓜花叶病毒的 2b 蛋白、番茄丛矮病毒的 p19 蛋白等[8]。后来又发现一些动物病毒也可编码类似的抑制因子,如猫疱疹病毒的 B2 蛋白、呼肠孤病毒的 δ3 因子、痘苗病毒的 E3L、流感病毒的 NS1 蛋白、HIV-1 的 TAT 蛋白[9]和一种类似于 HIV 的逆转录病毒(primate foamy virus type 1, PFV-1)的 TAS 蛋白[3-6,9]等。

HCV 是一种单股正链 RNA 病毒,在细胞内膜结构上通过负链来产生正链 RNA,在这复制过程中可能产生 dsRNA 中间体[10-11]。同时,正链或者负链都具有复杂的二级结构并可以在某些区域形成茎环结构。由于 dsRNA 和茎环状 RNA 均可以被 Dicer 处理产生 siRNA,推测在 HCV 感染过程中有针对 HCV 的 siRNA 的形成并对 HCV RNA 发挥抑制作用。虽然在 HCV 感染中尚未检测到特异性 siRNA,但在 HCV 复制子模型中检测到了针对 HCV 5′非翻译区和 NS5b 序列的

siRNA,表明人类细胞亦极有可能利用RNAi机制来对抗HCV的感染。

HCV在感染过程中会激活干扰素反应并使其数量限制在一个稳定的水平,而HCV编码的E1、NS5a和核心蛋白均能够拮抗干扰素的效果[12-14]。本研究表明,核心蛋白亦能够对抗RNAi机制。我们在不同的RNAi体系中对核心蛋白拮抗RNAi的作用进行了验证,发现核心蛋白既能抑制针对外源基因的RNAi,也能对抗针对内源基因的RNAi,在不同的细胞系里均存在此作用,并且随着核心蛋白量的增加,其抑制效果也更明显,呈现明显的剂量效应关系。我们通过缺失突变体的构建,发现核心蛋白N端结构域是RNAi抑制作用所必需的,抑制作用的发挥与其结构的完整性和细胞内定位也有关系。但是,核心蛋白并不能抑制siRNA引发的RNA干扰,表明核心蛋白对siRNA的功能未发生影响,而是作用于siRNA形成的上游,可能通过影响Dicer的功能而实现抑制作用。Wang等[13]报道了他们在这一领域的进展,证明核心蛋白能够抑制RNAi作用,我们的结果与之相符。

随着RNAi研究的深入,发现另一相似的miRNA在细胞发育及疾病发生中具有重要作用[8]。迄今,在人类细胞中已经发现200多种miRNA,多数为组织特异性和发育时相性表达。miRNA为单链小RNA,长度与siRNA相似,源于细胞内dicer切割内源性发夹状RNA,亦是通过进入RNA诱导沉默复合体(RISC)中发挥作用[13]。由于miRNA在细胞发育及代谢过程中的重要作用,当其表达水平发生变化时,细胞的正常生理功能就会受到极大的影响。可以推测,如果一种蛋白能够影响RNAi,它必然影响miRNA的功能。Kasschau等[7]证实了几种RNAi抑制因子可以影响miRNA的水平。当利用转基因技术在植物中持续表达这些抑制因子时,植物出现了畸形等发育异常。人类细胞中的miRNA被发现能够调节细胞的发育与凋亡,以及糖类和脂质的代谢[5],肝脏miRNA的异常可能引起糖尿病、脂肪肝及肝癌。慢性持续性丙型肝炎常导致肝癌的发生[3],HCV的NS5a、NS3和核心蛋白被认为是肝癌发生的可能原因[15]。我们推测核心蛋白亦能够通过影响miRNA的水平进而引起肿瘤及其他代谢疾病疾病的发生。

参考文献:

[1] Sanghvi V R, Steel L F. A re-examination of global suppression of RNA interference by HIV-1[J]. PLoS One, 2011, 6(2): e17246.

[2] Aravalli R N, Steer C J, Cressman E N. Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2008, 48(6): 2047-2063.

[3] Levrero M. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C [J]. Oncogene, 2006, 25(27): 3834-3847.

[4] Marathe R, Anandalakshmi R, Smith T H, *et al*. RNA viruses as inducers, suppressors and targets of post-transcriptional gene silencing [J]. Plant Mol Biol, 2000, 43(2/3): 295-306.

[5] Poy M N, Spranger M, Stoffel M. MicroRNAs and the regulation of glucose and lipid metabolism[J]. Diabetes Obes Metab, 2007, 9 (Suppl 2): 67-73.

[6] Arbuthnot P, Thompson L J. Harnessing the RNA interference pathway to advance treatment and prevention of hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(11): 1670-1681.

[7] Kasschau K D, Xie Z, Allen E, *et al*. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA unction[J]. Dev Cell, 2003, 4(2): 205-217.

[8] Takaoka A, Wang Z, Choi M K, *et al*. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response[J]. Nature, 2007, 448(7152): 501-505.

[9] Ni J Q, Zhou R, Czech B, *et al*. A genome-scale shRNA resource for transgenic RNAi in Drosophila[J]. Nat Methods, 2011, 8(5): 405-407.

[10] Ouellet D L, Perron M P, Gobeil L A, *et al*. MicroRNAs in Gene Regulation: When the Smallest Governs It All[J]. J Biomed Biotechnol, 2006, 2006(4): 69616.

[11] Chisari FV. Unscrambling hepatitis C virus-host interactions[J]. Nature, 2005, 436(7053): 930-932.

[12] Melen K, Fagerlund R, Nyqvist M, *et al*. Expression of hepatitis C virus core protein inhibits interferon-induced nuclear import of STATs [J]. J Med Virol 2004, 73(4): 536-547.

[13] Wang Y, Kato N, Jazag A, *et al*. Hepatitis C virus core protein is a potent inhibitor of RNA silencing-based antiviral response[J]. Gastroenterology, 2006, 130(3): 883-892.

[14] Xiang Zhufang, Feng Aijuan. Inhibition of hepatitis C virus core and NS3 protein expression by siRNA[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2011, 3(3): 181-187.

[15] Ivanov A V, Smirnova O A, Ivanova O N, *et al*. Hepatitis C virus proteins activate NRF2/ARE pathway by distinct ROS-dependent and independent mechanisms in HUH7 cells[J]. PLoS One, 2011, 6 (9): e24957.

(**收稿**:2011-11-18;**修回**:2012-02-18)

(编辑 邓强庭)