文章编号:1000-5404(2012)19-1925-04

论著

结构特异性核酸酶FEN1对HBV复制的影响

潘万龙[1],方 岩[2],许 舸[1],单雪峰[1],徐 蕾[1],陈 可[1],黄爱龙[1],胡接力[1] (400016 重庆,重庆医科大学感染性疾病分子生物学国家教育部重点实验室[1];730000 兰州,甘肃省第二人民医院ICU[2])

[摘要] **目的** 探索宿主因子FEN1对HBV复制过程的影响。**方法** 构建FEN1过表达慢病毒质粒,酶切鉴定并测序,转染293FT细胞,Western blot检测FEN1蛋白表达。将该质粒转染HBV复制稳定细胞系,设立慢病毒包装改造质粒pLenti6/V5-D-TOPO和不转染质粒的细胞作为对照。ELISA检测细胞上清,Southern blot及Real-time PCR检测HBV DNA。**结果** 初筛阳性克隆提取质粒酶切鉴定,于FEN1及线性载体质粒大小处出现明亮单一条带,测序结果表明序列插入正确,Western blot检测FEN1蛋白表达量为对照的2~3倍。FEN1过表达质粒转染HBV复制稳定细胞株,细胞上清ELISA检测HBsAg抗原呈阳性,D(450)值为(1.982±0.032);细胞内提取病毒DNA行Real-time PCR,绝对定量拷贝数为1.18×10^9,Southern blot检测亦表明HBV复制水平明显上调。**结论** 结构特异性核酸酶FEN1能够明显促进HBV DNA复制,是体内一种重要的病毒复制调控因子。

[关键词] DNA瓣核酸内切酶类;慢病毒载体;乙型肝炎病毒;病毒复制
[中图法分类号] R373.21; R394-33; R394.3 [文献标志码] A

Effect of structure-specific nucleic acid enzyme FEN1 on HBV replication

Pan Wanlong[1], Fang Yan[2], Xu Ge[1], Shan Xuefeng[1], Xu Lei[1], Chen Ke[1], Huang Ailong[1], Hu Jieli[1] ([1]Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Intensive Care Unit, Second People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou, Gansu Province, 730000, China)

[**Abstract**] **Objective** To lay the foundation for working out new clinical treatment strategies by studying the effect of host factor FEN1 on HBV replication. **Methods** FEN1 overexpression lentiviral plasmid was constructed with its sequence identified by restriction enzyme digestion and transfected into 293FT cells. FEN1 protein expression was detected by Western blotting. The plasmid was transfected into stable cell lines with HBV replication. The plasmid pLenti6/V5-D-TOPO was modified by lentivirus packaging and non-transfected plasmid cells served as controls. HBsAg in medium supernatant was detected by ELISA. HBV DNA was detected by RT-PCR and Southern blotting, respectively. **Results** The plasmid extracted from positive clones was digested by restriction endonuclease, and a bright band was observed in FEN1 and linear plasmid, respectively. The lentiviral plasmid sequencing showed that the sequence was inserted correctly. Western blot analysis displayed that the FEN1 protein expression level was 2 – 3 fold higher in transfected plasmid cells than in non-transfected plasmid cells. FEN1-overexpressed plasmid could transfect stable cell lines with HBV replication. ELISA demonstrated positive HBsAg in medium supernatant with a D_{450} value of 1.982 ± 0.032. RT-PCR revealed intracellular viral DNA with an absolutely-quantified copy number of 1.18×10^9. Southern blot analysis indicated that the HBV replication level was significantly up-regulated. **Conclusion** Structure-specific nuclease FEN1 can significantly promote HBV DNA replication and is thus one of the important regulatory factors for virus replication.

[**Key words**] DNA flap endonuclease; lentiviral vector; hepatitis B virus; virus replication

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81000732). Corresponding author: Hu Jieli, Tel: 86-23-68486780, E-mail: hujieli1977@gmail.com

HBV感染是世界范围的公共卫生问题,我国尤为严重。目前,虽有特异性疫苗预防,但乙型肝炎患者及慢性携带者的治疗仍是一个严峻而具挑战的课题,其难点在于对HBV DNA复制的机制及其调控因素认识不足。在HBV DNA复制过程中,病毒颗粒进入肝细胞,脱去核衣壳释放病毒基因组,在细胞核内完成HBV rcDNA到HBV cccDNA的修复转化,以cccDNA为逆转录模板合成新的子代病毒,从而不断循环。其中关键性的步骤是HBV rcDNA到HBV cccDNA过程中

[基金项目] 国家自然科学基金(81000732)
[通信作者] 胡接力,电话:(023)68486780,E-mail:hujieli1977@gmail.com

的结构修复,对比结构可知,HBV rcDNA 负链为不闭合且5′及3′端含有冗余序列的DNA结构,这一发夹结构必须被修复才能顺利完成复制。Sohn 等[1]在相关研究中提出假设,推测体内某种具有核酸酶活性的物质促进该过程的发生。

大量研究表明,FEN1 是一种保守的结构特异性核酸酶,存在于细胞核及线粒体中[2-3],具有 DNA 代谢中的多种功能,包括 DNA 复制与修复,作用机制可能与其参与多种蛋白质间相互作用有关[4]。最近研究表明,FEN1 是人体细胞核中最重要的5′核酸内切酶[5-6],其具有3种不同表现形式:①5′-3′flap 核酸内切酶活性(FEN):在随从链复制中 RNA 引物的去除和碱基切除修复中发挥作用[7];②5′-3′核酸外切酶活性[8];③间隔依赖核酸内切酶(GEN)活性:解决复制中三核苷酸重复衍生的2级结构、发夹环及复制叉停滞[9-11],作为多功能酶,FEN1 缺失可致基因组不稳定。最近有研究报道,在肿瘤组织标本中 FEN1 系列突变体使2/3的核酸酶失活从而导致肿瘤的发生和进展[12]。FEN1 在包括前列腺癌[13]、胃癌[14]、神经母细胞瘤[15]、胰腺癌[16]、肺癌[17]和乳腺癌[18]在内的多种肿瘤细胞中皆存在较高表达。以上结果似乎与 FEN1 作为 DNA 修复基因的功能不相符。但是,考虑到 FEN1 在 DNA 复制中的重要作用,其表达上调可能正是反映了肿瘤细胞与正常细胞相比增殖率增加的事实。

鉴于 FEN1 的功能特点,其有可能成为 HBV DNA 复制的一种重要的体内调控因子,故我们利用 HBV1.1 倍体质粒 pch9 构建的可稳定表达 HBV 细胞系 HepG2-H7 对 FEN1 在 HBV DNA 复制中的作用进行研究,观察其对 HBV 复制的影响,为寻找新型 HBV 治疗策略奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂及耗材 pLenti6/V5-D-TOPO 改造质粒(本室构建),EZNA Plasmid Mini Kit Ⅰ试剂盒(Omega 公司),QIAquick Gel Extraction Kit 试剂盒(Qiagen 公司),Go *Taq* Green Mix(Promega 公司),DNA Marker Ⅲ(Tiangen 公司),PrimeStar HS DNA Polymerase、λEcoT14 Ⅰ digest DNA Marker、T_4 DNA Ligase、*Xho* Ⅰ均购自 TaKaRa 公司,High Pure PCR Product Purification Kit 试剂盒、FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)及 X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent 均购自 Roche 公司,DMEM(Hyclone 公司),胎牛血清(Gibico 公司),鼠抗人 FEN1 单克隆抗体(Abcam 公司),抗 GAPDH 小鼠单克隆抗体、兔抗鼠 IgG 抗体均购自北京中杉公司,ELISA 检测 HBsAg 试剂盒(上海科兴公司),细胞培养皿(Corning 公司),SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate(Thermo 公司)等。

1.1.2 引物 反向引物 R,5′端引入 *Xho* Ⅰ酶切位点。F2/R2 为 FEN1 表达基因两端的正反向引物,用于初筛及测序。引物由 Invitrogen 英骏(上海)生物公司代为合成,序列如下:上游 F_{CMV}:5′-CCAAAGGCCAGTCATCCCTC-3′,下游 R:5′-TATCTC-GAGTTATTTTCCCCTTTTAAACTTCCCTG-3′;上游 F_2:5′-TAT-TCTAGAATGGGAATTCAAGGCCTGGCCA-3′,下游 R_2:5′-TAT-TCTAGATTATTTTCCCCTTTTAAACTTCCCTG-3′。

1.1.3 细胞株 Stbl3 感受态菌株购自 Intivtrogen 公司,293FT 为本室保存,稳定表达 HBV 细胞系 HepG2-H7 为本室构建[19]。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增 FEN1 基因片段、酶切定量 以本室构建 FEN1-pcDNA3.1 质粒为模板,上游 CMV 启动子序列为正向引物,下游引物为含 *Xho* Ⅰ酶切位点的 FEN1 基因序列,PCR 扩增。反应体系:H_2O 32.8 μl,5×Buffer 10 μl,dNTP 4 μl,F_{CMV}/R 各1 μl,Template 1 μl,PrimeStar 0.2 μl,总体积 50 μl。反应条件:95 ℃ 5 min,95 ℃ 30 s→53 ℃ 30 s→72 ℃ 1 min 10 s×35 循环,72 ℃ 10 min,4 ℃保存。产物行琼脂糖凝胶电泳,1% agarose gel,120 V,20 min,定量。酶切 FEN1 基因片段体系:H_2O 13 μl,10×Buffer H 5 μl,FEN1 30 μl,*Xho* Ⅰ 2 μl,总体积 50 μl。质粒 pLenti-virus vector 酶切体系:H_2O 33 μl,10×Buffer H 5 μl,pLenti-virus vector 10 μl,*Xho* Ⅰ 2 μl,总体积 50 μl。37 ℃ 温育 1 h 左右,电泳检测,切割完全继续 2 h。胶回收纯化试剂盒 QIAquick Gel Extraction Kit 纯化 FEN1 及 pLenti-virus vector,1% 琼脂糖凝胶电泳,定量。

1.2.2 酶切产物纯化后连接,电转感受态并初筛 T_4 DNA Ligase 连接 FEN1 和 pLenti-virus vector 酶切后纯化定量产物,体系:FEN1 8 μl,pLenti-virus vector 5.2 μl,10×Ligation buffer 2 μl,T_4 DNA Ligase 2.6 μl,H_2O 2.2 μl,总体积 20 μl。16 ℃ 温育,过夜。用 Roche 纯化试剂盒 High Pure PCR Product Purification Kit 纯化,双蒸水 20 μl 洗脱,全部用于电转。电转感受态 Stbl3 50 μl 置冰上 10 min,将 20 μl 纯化连接产物加入其中,轻轻混匀,转移至无水乙醇及超纯水清洗的电转杯,2.5 kV 电击,加入 250 μl 无氨苄抗性的 LB 液体混匀后吸出至一灭菌 EP 管中,37 ℃孵育 10 min,铺板。培养 16 h 左右,挑取单克隆菌落于含氨苄抗性液体 LB 的96孔板中,继续培养3 h,各取 1 μl 为模板,引物选择 FEN1 表达基因两端的正反向序列 F_2/R_2,反应体系:H_2O 3.8 μl,2×Green Mix 5 μl,F_2 0.1 μl,R_2 0.1 μl,Template 1 μl,总体积 10 μl。条件:95 ℃ 5 min,95 ℃ 15 s→55 ℃ 15 s→72 ℃ 50 s×35 循环,72 ℃ 10 min,4 ℃保存。1% 琼脂糖凝胶电泳,阳性样品扩大培养.

1.2.3 酶切鉴定抽提质粒并测序,转染细胞及 Western blot 检测 FEN1 蛋白表达 Omega 去内毒素质粒抽提试剂盒 EZNA Plasmid Mini Kit Ⅰ提取质粒,操作方法按说明,定量,以 *Xho* Ⅰ酶切鉴定,同时质粒送 Invitrogen 公司测序,测序结果采用 DNAsist 软件比对分析。6孔细胞培养板,接种 3×10^5 个 293FT 细胞,24 h 后换液,采用 Roche 公司 X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent 转染试剂转染 FEN1 慢病毒质粒,2 μg 质粒稀释于无血清 Opti-MEM 中,使成 2 μg/100 μl 终浓度,加入 6 μl HP,室温孵育 15 min,加入换液后的 293FT 细胞于培养液中,24 h 后换液,转染 72 h 后 RPIA 法裂解细胞提取蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,Western blot 检测 FEN1 表达量。蛋白上样量每孔 50 μg,10% SDS-PAGE 分离胶,恒流 20 mA,1.5 h,250 mA

恒流湿法转膜 1 h,4 ℃封闭抗体过夜,洗涤后室温孵二抗 1.5 ~ 2 h,ECL 底物显色,曝光。

1.2.4 FEN1 慢病毒质粒瞬时转染 HBV 复制稳定细胞株,上清 HBsAg 及细胞内 DNA 检测 6 孔细胞培养板,每孔接种 $(3 \sim 5) \times 10^5$ 个 HepG2-H7 细胞,24 h 后换液,转染 FEN1 慢病毒质粒,操作同 1.2.3。72 h 后取培养细胞上清 ELISA 检测 HBsAg,提取细胞内 HBV DNA 行 Real-time PCR 及 Southern blot 检测。细胞内 HBV DNA 提取方法:胰酶消化细胞,PBS 洗涤细胞,13 000 × *g*,15 s/次,2 次,收集于 EP 管中,加入 500 μl HBV 病毒核心颗粒 DNA 提取液(Tris Buffer,pH = 8.0,10 mmol/L,EDTA 1 mmol/L,NP-40 1%,蔗糖 3%)吹打混匀,37 ℃孵箱,20 min;再加入 30% PEG8000 250 μl 震荡混匀,置于冰上,慢速震荡,40 min;4 ℃,12 000 × *g*,15 min 离心,弃去上清;白色沉淀中加入 ddH_2O 42 μl、10 × Buffer 5 μl、DNase Ⅰ 3 μl,37 ℃酶切 3 ~ 4 h;加入 400 μl Proteinase K 消化液,20 μl Proteinase K,45 ℃ 消化过夜;酚氯仿抽提异丙醇沉淀,干燥后 ddH_2O 6 μl 溶解 DNA;Real-time PCR 及 Southern blot 检测。

2 结果

2.1 PCR 扩增 FEN1 基因片段,纯化后酶切连接

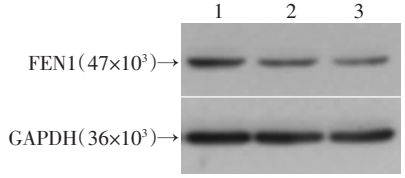
PCR 扩增 FEN1,产物纯化后电泳结果如图 1A,泳道 1 为 FEN1 纯化产物,条带单一,大小约 1 300 bp,Quantity One 软件灰度分析,定量约 150 ng/μl。*Xho* Ⅰ酶切 FEN1 及 pLenti6/V5-D-TOPO 改造质粒 1 h 后电泳结果如图 1B,泳道 2 为线性化 pLenti6/V5-D-TOPO 改造质粒条带,大小约 7 000 bp,单一明亮,泳道 3 未酶切环形质粒电泳迁移速率较线性相同大小 DNA 快,故认为 FEN1 及 pLenti6/V5-D-TOPO 改造质粒切割完全。3 h 后胶回收纯化定量酶切产物,定量 FEN1 约 50 ng/μl,pLenti6/V5-D-TOPO 改造质粒约 40 ng/μl。

2.2 初筛阳性克隆酶切鉴定及测序分析

挑取电转铺板后生长菌落 48 个,菌液 PCR,引物 F_2/R_2 初筛获得阳性克隆 6 个,遂扩大培养后提取质粒,以 *Xho* Ⅰ酶切鉴定如图 1C。初筛阳性的 6 个克隆菌株提取质粒,于 1 200 bp 左右及 7 000 bp 左右处各有 1 条带,与 FEN1 及线性化 pLenti6/V5-D-TOPO 改造质粒大小一致。说明连接产物正确。测序结果经 Chromas 及 DNAsist 软件分析,峰图间隔均匀一致,各主峰突出,无干扰;与 GenBank 获得 FEN1 表达基因序列比对完全相同。

2.3 Western blot 检测 FEN1 蛋白表达

FEN1 质粒转染 293FT 细胞后 72 h 提取蛋白,Western blot 检测结果如图 2,设置慢病毒包装改造质粒 pLenti6/V5-D-TOPO 和不转染质粒的细胞作为对照。FEN1 均存在不同程度表达,Quantity One 软件灰度分析,计算校正灰度值,FEN1 灰度值/GAPDH 灰度值分别约为 0.7、0.3、0.25。表明转染 FEN1 慢病毒载体质粒后,细胞 FEN1 表达量明显提高,为对照的 2 ~ 3 倍。

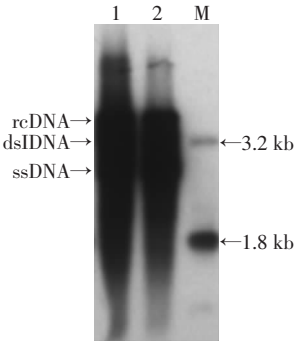


1:FEN1 慢病毒包装质粒转染 293FT 细胞;2:未转染质粒的 293FT 细胞;3:pLenti6/V5-D-TOPO 质粒转染 293FT 细胞

图 2 Western blot 检测细胞内 FEN1 蛋白表达

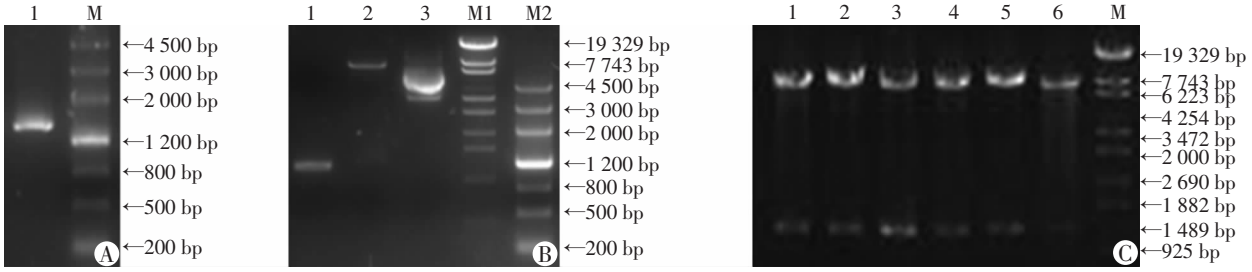
2.4 Real-time PCR、Southern blot 检测 FEN1 慢病毒质粒转染 HepG2-H7 细胞内病毒,上清 ELISA 检测 HBsAg

FEN1 慢病毒质粒转染 HepG2-H7 细胞 72 h 后,上清 ELISA 检测 HBsAg,与转染空质粒的 HepG2-H7 细胞对比,*D*(450) 分别为(1.982 ± 0.032)、(1.106 ± 0.019),二者均为阳性。Real-time PCR 检测 HBV DNA 绝对定量拷贝数,前者为 1.18×10^9,后者为 5.50×10^6,前者约为后者 2 个数量级。Southern blot 检测 HBV DNA 如图 3 示,可见与对照组比较,FEN1 慢病毒过表达质粒转染细胞 HBV DNA 复制明显增强。



1:pLenti-FEN1 转染 HepG2-H7 细胞;2:pLenti6/V5-D- TOPO 质粒转染 HepG2-H7 细胞;M:HBV 标准

图 3 Southern blot 检测细胞内提取的 HBV DNA



A:PCR 扩增 FEN1 产物纯化后电泳图 1:FEN1 纯化产物;M:DNA 标准Ⅲ;B:pLenti6/V5-D-TOPO 改造质粒 1 h 后电泳图 1:*Xho* Ⅰ酶切 FEN1 产物;2:*Xho* Ⅰ酶切慢病毒质粒 pLenti6/V5-D-TOPO 产物;3:pLenti6/V5-D-TOPO 质粒;M1:λEcoT14 Ⅰ digest DNA 标准;M2:DNA 标准Ⅲ;C:*Xho* Ⅰ酶切鉴定结果 1 ~ 6:初筛阳性克隆提取质粒;M:λEcoT14 Ⅰ digest DNA 标准

图 1 FEN1 过表达慢病毒质粒构建及酶切鉴定

3 讨论

目前,对HBV复制基本过程的研究较为清楚,而对病毒复制的调控因素则认识不足。作为宿主依赖的病原体HBV,其调控不仅与病毒自身因素有关,宿主体内亦可能存在重要的病毒复制调控因子。Sohn等[1]从原理上推测体内某种核酸内切酶参与促进HBV复制过程,以此为基础,我们从功能特点上定位并选取FEN1作为研究对象,希望通过研究证实其促HBV复制作用,从而发现新的宿主调控HBV复制因子。

本研究中,我们成功构建了FEN1慢病毒过表达质粒,酶切、测序及转染后Western blot检测蛋白表达,均表明其插入序列能在真核细胞中表达,且表达量较正常水平升高2~3倍。作为研究工具可将其用于相关功能研究。将该FEN1过表达质粒转染HBV稳定复制细胞株HepG2-H7中,与空质粒转染对照进行比较分析。ELISA结果表明:FEN1过表达质粒转染细胞培养上清中分泌的HBsAg显著高于空质粒转染对照;Real-time PCR检测显示,在FEN1促进作用下病毒拷贝数约为正常对照的2个数量级;Southern blot结果亦印证HBV DNA复制明显增强这一结果。以上实验证据均表明,FEN1确能上调HBV DNA表达,在HBV复制中,作为宿主促病毒复制因素存在。

FEN1促进HBV DNA复制的最佳解释可能为其作用于HBV rcDNA到HBV cccDNA结构修复及转化阶段,由于HBV rcDNA负链3′和5′端带有冗余序列的特殊结构,在形成cccDNA过程中,FEN1发挥间隔依赖核酸内切酶活性,将HBV rcDNA结构中两端各约9 nt的冗余序列形成的发夹结构(即假"Y"结构)剪切修复,并在聚合酶和连接酶作用下形成完整的闭合环状结构,从而促进了病毒DNA的复制。另外,对于HBV rcDNA正链5′端的RNA引物,FEN1亦可借助其5′-3′flap核酸内切酶活性将RNA引物切除,进而延伸闭合,形成完整的共价闭合环状DNA分子。相信通过今后深入细致的研究可彻底阐明HBV复制的分子机制,并为清除细胞内cccDNA库,完全阻断HBV复制这一治疗目标[20]创造条件。本研究在为解析HBV复制调控分子机制奠定理论基础的同时,也为HBV新型治疗策略及药物的研究开辟了新的途径。

参考文献:

[1] Sohn J, Litwin S, Seeger C. Mechanism for CCC DNA synthesis in hepadnaviruses[J]. PLoS One, 2009, 4(11): e8093.

[2] Liu P, Qian L, Sung J S, *et al*. Removal of oxidative DNA damage *via* FEN1-dependent long-patch base excision repair in human cell mitochondria[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(16): 4975-4987.

[3] Szczesny B, Tann A W, Longley M J, *et al*. Long patch base excision repair in mammalian mitochondrial genomes[J]. J Biol Chem, 2008, 283(39): 26349-26356.

[4] Zheng L, Jia J, Finger D, *et al*. Functional regulation of FEN1 nuclease and its link to cancer[J]. Nucleic Acids Res, 2011; 39(3): 781-794.

[5] Zheng L, Zhou M, Guo Z, *et al*. Human DNA2 is a mitochondrial nuclease/helicase for efficient processing of DNA replication and repair intermediates[J]. Mol Cell, 2008, 32(3):325-336.

[6] Duxin J P, Dao B, Martinsson P, *et al*. Human Dna2 is a nuclear and mitochondrial DNA maintenance protein[J]. Mol Cell Biol, 2009, 29(15): 4274-4282.

[7] Kikuchi K, Taniguchi Y, Hatanaka A, *et al*. Fen-1 facilitates homologous recombination by removing divergent sequences at DNA break ends[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(16): 6948-6955.

[8] Wu X, Li J, Li X, *et al*. Processing of branched DNA intermediates by a complex of human FEN-1 and PCNA[J]. Nucleic Acids Res, 1996, 24(11): 2036-2043.

[9] Singh P, Zheng L, Chavez V, *et al*. Concerted action of exonuclease and Gap-dependent endonuclease activities of FEN-1 contributes to the resolution of triplet repeat sequences (CTG)n- and (GAA)n-derived secondary structures formed during maturation of Okazaki fragments [J]. J Biol Chem, 2007, 282(6): 3465-3477.

[10] Zheng L, Zhou M, Chai Q, *et al*. Novel function of the flap endonuclease 1 complex in processing stalled DNA replication forks[J]. EMBO Rep, 2005, 6(1): 83-89.

[11] Saharia A, Teasley D C, Duxin J P, *et al*. FEN1 ensures telomere stability by facilitating replication fork re-initiation[J]. J Biol Chem, 2010, 285(35): 27057-27066.

[12] Zheng L, Dai H, Zhou M, *et al*. Fen1 mutations result in autoimmunity, chronic inflammation and cancers[J]. Nat Med, 2007, 13(7): 812-819.

[13] LaTulippe E, Satagopan J, Smith A, *et al*. Comprehensive gene expression analysis of prostate cancer reveals distinct transcriptional programs associated with metastatic disease[J]. Cancer Res, 2002, 62(15): 4499-4506.

[14] Kim J M, Sohn H Y, Yoon S Y, *et al*. Identification of gastric cancer-related genes using a cDNA microarray containing novel expressed sequence tags expressed in gastric cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(2 Pt 1): 473-482.

[15] Krause A, Combaret V, Iacono I, *et al*. Genome-wide analysis of gene expression in neuroblastomas detected by mass screening[J]. Cancer Lett, 2005, 225(1): 111-120.

[16] Iacobuzio-Donahue C A, Maitra A, Olsen M, *et al*. Exploration of global gene expression patterns in pancreatic adenocarcinoma using cDNA microarrays[J]. Am J Pathol, 2003, 162(4): 1151-1162.

[17] Yang M, Guo H, Wu C, *et al*. Functional FEN1 polymorphisms are associated with DNA damage levels and lung cancer risk[J]. Hum Mutat, 2009, 30(9): 1320-1328.

[18] Singh P, Yang M, Dai H, *et al*. Overexpression and hypomethylation of Flap endonuclease 1 gene in breast and other cancers[J]. Mol Cancer Res, 2008, 6(11): 1710-1717.

[19] 罗强, 苏怀斌, 梁盼盼, 等. 1.1倍全长HBV基因组克隆转染细胞系的建立[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(16): 1672-1675.

[20] Levrero M, Pollicino T, Petersen J, *et al*. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection[J]. J Hepatol, 2009, 51(3): 581-592.

(收稿:2012-04-07;修回:2012-05-07)

(编辑 王 红)