DOI:10.16016/j.1000-5404.201508080

论著

HIV-1 Rev 蛋白和人 DDX3 解旋酶对 HCV RNA 复制影响

罗亚东,洪国枯,贾 鸣,郭 艳,刘 明,毛 青 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军感染病研究所,感染病研究重庆市重点实验室)

[**摘要**] **目的** 研究人类免疫缺陷病毒Ⅰ型(HIV-1)病毒颗粒蛋白表达调节因子(regulator of virion protein expression, Rev)和DEAD-box蛋白家族ATP依赖的RNA解旋酶3(DDX3)对HCV RNA复制的影响。**方法** 利用HCV表达质粒pCDNA3.1-JFH1转染Huh7细胞以构建稳定的HCV细胞复制模型,另构建pCDNA3.1-Rev-Flag-mCherry和pCDNA3.1-DDX3-YFP-Flag的过表达载体,通过PCR、Western blot和核苷酸测序等方法鉴定载体构建成功后,将实验分为2组对照实验,对照组均只将HCV复制质粒转染Huh7细胞:1组实验组为DDX3和HCV RNA复制质粒共转染入Huh7细胞;2组的实验组为Rev、DDX3和HCV RNA复制质粒共转染入Huh7细胞。最后通过qPCR定量测定各组HCV RNA复制水平并进行比较。**结果** 转染后48 h测各组HCV RNA的复制水平,DDX3+HCV RNA复制质粒组中HCV RNA的水平($1.09\times10^7\pm0.18\times10^7$)明显高于单独转染HCV RNA复制质粒组($4.79\times10^6\pm1.24\times10^6$)($P=0.03$);而Rev+DDX3+HCV RNA复制质粒组中HCV RNA的水平($1.74\times10^7\pm0.40\times10^7$)明显低于单独转染HCV RNA复制质粒组($4.17\times10^7\pm0.46\times10^7$)($P<0.001$)。**结论** 成功构建Rev蛋白和DDX3的过表达载体,并初步证明人DDX3解旋酶可促进HCV RNA的复制,而Rev蛋白和DDX3共同作用可抑制HCV RNA的复制。

[**关键词**] 人类免疫缺陷病毒Ⅰ型;病毒颗粒蛋白表达调节因子;DEAD-box蛋白家族的ATP依赖的RNA解旋酶3;丙型肝炎病毒

[**中图法分类号**] R345; R373.9; R394.3 [**文献标志码**] A

Effect of HIV-1 Rev protein and DDX3 helicase on HCV RNA replication

Luo Yadong, Hong Guoku, Jia Ming, Guo Yan, Liu Ming, Mao Qing (Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of the regulator of HIV-1 virion protein expression (Rev) and a DEAD box RNA helicase (DDX3) on HCV RNA replication. **Methods** pCDNA3.1-Re-Flag-mCherry and pCDNA3.1-DDX3-YFP-Flag were constructed and identified by PCR, Western blotting and DNA sequencing. Then the Huh7 cells were divided into 2 groups, the control group (only HCV RNA replication plasmid was transfected into Huh7 cells) and the experimental group (DDX3 and HCV RNA replication plasmids were co-transfected into Huh7 cells). qPCR was used to detect the level of HCV RNA for the effects of DDX3 and HCV RNA replication plasmids. **Results** In 48 h after transfection, the expression level of HCV RNA was significantly higher in DDX3+HCV RNA replication plasmid group than HCV RNA plasmid group [$(1.09\pm0.18)\times10^7$ *vs* $(4.79\pm1.24)\times10^6$, $P=0.03$]. But the expression level of HCV RNA was significantly lower in Rev+DDX3+HCV RNA replication plasmid group than that of HCV RNA replication

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81271814);十二五国家科技重大专项(2012ZX10001003-003-003)

[**通信作者**] 毛 青,电话:(023)68754141, E-mail: qingmao@tmmu.edu.cn

[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151118.1451.021.html(2015-11-18)

HCV RNA plasmid group [$(1.74 \pm 0.40) \times 10^7$ *vs* $(4.17 \pm 0.46) \times 10^6$, $P < 0.001$]. **Conclusion** The over-expression vector of DDX3 and Rev is successfully constructed, and DDX3 can accelerate the replication of HCV RNA, but Rev combined with DDX3 can inhibit the replication of HCV *in vitro*.

[**Key words**] human immunodeficiency virus type I; regulator of virion protein expression; DEAD box RNA helicase 3; hepatitis C virus

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation (81271814) and the State Key Project Specialized for Infectious Diseases of the "Twelfth Five-year Plan" for Science and Technology of China(2012ZX10001003-003-003). Corresponding author: Mao Qing, Tel: 86-23-68754141, E-mail: qingmao@tmmu.edu.cn

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus,HCV)和人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus,HIV)的传播途径十分相似,约30%的HIV阳性患者合并HCV感染。在中国的静脉药瘾的HIV感染者中,HCV阳性率可高达90%[1]。HCV患者合并感染HIV将加速丙型肝炎病程进展,同时降低抗HCV疗效。近年较多研究表明,对合并感染患者针对HIV进行严格的高效抗逆转录病毒治疗(highly active antiretroviral therapy,HAART)不能有效地改善这些情况,同时HCV病程加速也与$CD4^+$T淋巴细胞数量下降无明显关联。我们前期的研究也证实,HIV合并感染可能导致患者体内HCV准种分布特征改变,但HCV载量及准种复杂度与$CD4^+$T淋巴细胞数量无关[2-3]。以上证据提示HIV对HCV的影响可能存在其他途径。有研究证实HCV、HIV可以共感染同一肝细胞,进而可能导致两种病毒在同一细胞内发生相互作用[4]。HCV、HIV均为RNA病毒,而DDX3在人体细胞内与RNA的复制过程关系密切,已有研究证实DDX3可与HCV Core蛋白结合促进HCV的复制[5-6]。同时发现HIV-1 Rev蛋白可与DDX3结合在核膜上形成复合体从而导致细胞质内DDX3的水平下降[7],也有研究表明,Rev蛋白可以与HCV 5′-UTR作用直接促进HCV的复制。但是尚未有研究证实Rev蛋白可以通过间接作用影响HCV的复制,或通过影响其他细胞代谢途径影响HCV的复制,也没有研究证实Rev蛋白和DDX3可以共同作用并对HCV的复制产生影响。

本实验通过分别构建HCV RNA复制细胞模型及表达DDX3、Rev+DDX3的HCV RNA复制细胞模型,研究Rev蛋白和DDX3对HCV RNA复制的影响。旨在为进一步深入研究Rev蛋白和DDX3是否通过共同作用,从而影响HCV RNA复制。

1 材料与方法

1.1 材料

Huh7肝癌细胞系和HCV复制模型pCDNA3.1-JFH1均为本实验室保存,Huh7细胞系生长于含10%灭活小牛血清、2 mmol/L谷氨酰胺、氨苄青霉素(100 U/mL)、链霉素(100 U/mL)和DMEM培养基中,37 ℃、5% CO_2条件下培养。实验中主要材料包括:真核过表达质粒pCDNA3.1(鼎国生物技术有限公司,北京),各种工具酶、核酸标准分子量Marker以及蛋白质预染Marker(天根生化有限公司,北京),去内毒素质粒大量提取试剂盒(Qiagen公司,德国),质粒转染转染试剂Lipofectamine2000(Invitrogen公司,美国),鼠抗Flag单克隆抗体(Sigma公司,美国)、兔抗人GAPDH单克隆抗体、小鼠抗人DDX3单克隆抗体、小鼠抗HIV Rev单克隆抗体(Abcam公司,美国),HRP标记的羊抗兔IgG二抗,HRP标记的羊抗小鼠IgG二抗(福州迈新公司中国),qPCR引物由Invitrogen公司合成。

1.2 方法

1.2.1 含Rev、DDX3基因重组真核表达载体的构建

查询NCBI获得Rev蛋白和DDX3的基因表达序列,并分别在其基因的5′端引入限制性酶切位点*Eco*RⅠ和增强表达的Kozak序列,3′端引入限制酶切位点*Xba*Ⅰ和便于Rev、DDX3表达检测的Flag标签蛋白(DYKDDDDK)编码序列,以及便于观察转染效率的mCherry和YFP序列。以上相关基因序列由深圳华大生物科技有限公司协助合成。进一步分别将各自基因序列插入真核过表达载体pCDNA3.1中命名为pCDNA3.1-Rev-Flag-mCherry、pcDNA3.1-DDX3-YFP-Flag。从GenBank中查询目的基因以及上下游的序列,用VectorNTI软件进行PCR引物设计。载体pCDNA3.1-Rev-Flag-mCherry正向引物(5′-AGTCCAGTGTGGTGGAATTCGCCACCATGGAGCCAGTAGATCCTAG-3′)(含同源重组序列、*Eco*RⅠ酶切位点、Kozak序列,并含有目的基因5′端配对序列),(5′-TAGTCCATGGTGGCGAATTCTTCTTTAGTTCCTGACTCCAATAC-3′)(含同源重组序列、*Eco*RⅠ酶切位点,并含有目的基因3′端配对序列)。载体pcDNA3.1-DDX3-YFP-Flag正向

引物 5′-ACGATGACGATAAGCTCGAGGCCACCATGAG-TCATGTGGCAGTGG-3′(含同源重组序列、*Xho* Ⅰ酶切位点、Kozak 序列,并含有目的基因 5′端配对序列),反向引物 5′-GTTTAAACGGGCCCTCTAGATCAGTTAC-CCCACCAGTCAAC-3′(含同源重组序列、*Xba* Ⅰ酶切位点,并含有目的基因 3′端配对序列)。

1.2.2 重组 pCDNA3.1-Rev-Flag-mCherry、pcDNA3.1-DDX3-YFP-Flag 质粒的鉴定 用构建好的重组 pCDNA3.1-Rev-Flag-mCherry、pcDNA3.1-DDX3-YFP-Flag 质粒分别转化入大肠杆菌 DH5α 中,均匀涂布接种于含有氨苄青霉素的琼脂糖平板上,次日挑取阳性单克隆菌落摇菌扩增后,抽提质粒进行 PCR 扩增并进行琼脂糖凝胶电泳(图 1),对扩增产物进行回收,并进行核酸测序。

1.2.3 重组 pCDNA3.1-Rev-Flag-mCherry、pCDNA3.1-DDX3-YFP-Flag 及 pCDNA3.1-JFH1 质粒的转染 采用 Lipofectamine2000 转染试剂,实验步骤按照使用说明书进行操作。将重组 pCDNA3.1-Rev-Flag-mCherry、pCDNA3.1-DDX3-YFP-Flag 质粒分别瞬时转染入 Huh7 细胞中,通过荧光显微镜观察转染效率(图 2)。pCDNA3.1-JFH1 瞬时转染入 Huh7 细胞中,qPCR 检测 HCV 的复制情况。

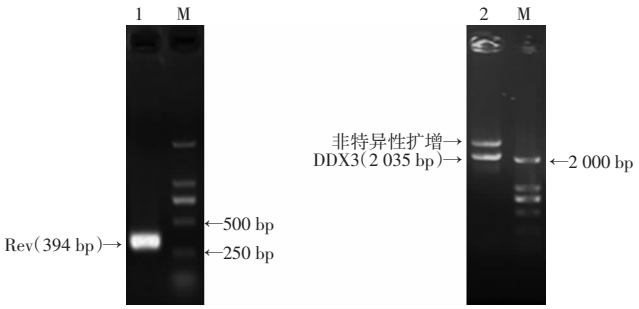
1.2.4 Western blot 鉴定 Rev、DDX3 基因在 Huh7 细胞中的表达 分别转染 48 h 后,提取细胞总蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳。在 4 ℃下、300 mA 恒流条件下电转 120 min,用封闭液(含 5% 脱脂牛奶的 TBST)室温封闭 PVDF 膜 1 h,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,一抗加入 1∶5 000 比例稀释的 anti-Rev 单克隆抗体 4 ℃孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,二抗加入 1∶5 000 比例稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体室温孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。化学发光试剂检测,以 GAPDH 为内参。

1.2.5 qPCR 检测细胞内 Rev、DDX3 对 HCV 复制的影响 用 Lipofectamine2000 转染试剂,实验按照使用说明书进行操作。将 pCDNA3.1-DDX3-YFP-Flag 和 pCDNA3.1-JFH1 瞬时共转染入 Huh7 细胞中,qPCR 检测 HCV 复制情况。将 pCDNA3.1-Rev-Flag-mCherry、pCDNA3.1-DDX3-YFP-Flag 及 pCDNA3.1-JFH1 瞬时共转染入 Huh7 细胞中,qPCR 检测 HCV 复制情况。查询 NCBI 中 HCV 基因组序列,以 5′非翻译区为模板设计引物,引物序列为 HCV-F:5′-CCCTGTGAGGAACTACT-GTCTT-3′; HCV-R:5′-TGAGCGGGTTTATCCAAG-3′。引物序列由美国 Invitrogen 公司合成。扩增条件为 95 ℃ 预变性 1 min,95 ℃变性 10 s,58 ℃退火扩增 30 s,循环 40 次,最后添加 65 ~ 95 ℃溶解曲线。标准曲线:取 1 μg PCDNA3.1-JFH1 按 10 倍梯度稀释 5 个梯度后按上述体系进行 Real-time PCR 检测,最终将每个梯度的 Ct 值带入对应终浓度计算函数,最终以该函数计算每个样品中对应的 HCV 复制水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 进行统计,实验组与对照组采用两独立样本 *t* 检验检测均值是否有显著性差异。

2 结果

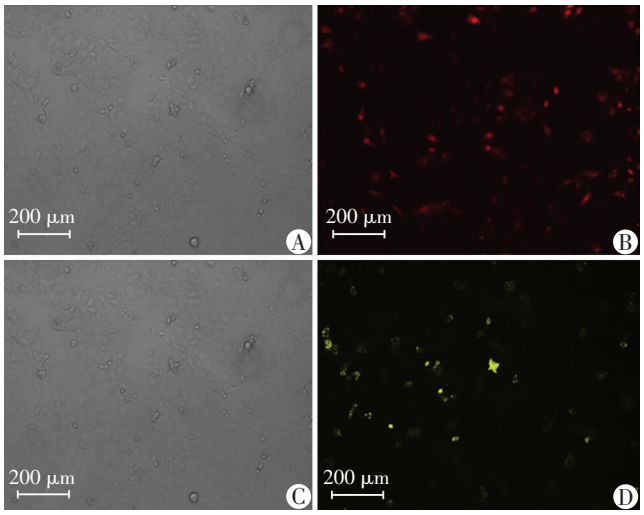
2.1 重组 pCDNA3.1-Rev-Flag-mCherry、pCDNA3.1-DDX3-YFP-Flag 真核表达载体的鉴定 含 pCDNA3.1-Rev-Flag-mCherryg 质粒的菌液经扩增培养后提取纯化质粒,进行 PCR 鉴定,产物经 5% 琼脂糖凝胶电泳,分别出现 1 条特异性条带,均位于 400 bp 附近。核酸序列测定结果显示,克隆的外源基因全长 394 bp(图 1)。含 pCDNA3.1-DDX3-YFP-Flag 质粒的菌液经扩增培养后提取纯化质粒,进行 PCR 鉴定,产物经 5% 琼脂糖凝胶电泳,分别出现 2 条特异性条带,分别位于 2 000 bp 附近,选择与预期产物大小接近的条带进行胶回收并测序。核酸序列测定结果显示,克隆的外源基因全长 2 035 bp(图 1)。通过对克隆的外源基因序列测序并和 GenBank 中 Rev 和 DDX3 序列对比,证实其基因序列 100% 同源,提示 Rev 和 DDX3 真核表达载体构建成功。



1:重组 pCDNA3.1-Rev-Flag-mCherry 质粒;2:重组 pCDNA3.1-DDX3-YFP-Flag 质粒;M:标准

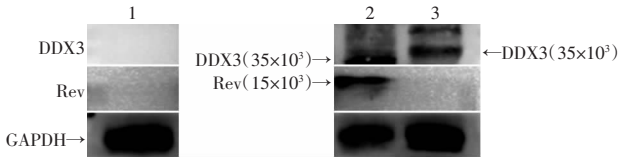
图 1 重组 PCR 产物的鉴定

2.2 Rev、DDX3 基因分别在 Huh7 细胞中的表达 重组 pCDNA3.1-Rev-Flag-mCherry、pCDNA3.1-DDX3-YFP-Flag 质粒分别转染 Huh7 细胞,转染 24 h 后用荧光显微镜观察荧光(图 2),可见 Rev 在荧光显微镜下发红光(图 2),DDX3 在荧光显微镜下发黄光(图 2);转染 48 h 后提取细胞总蛋白,通过 Western blot 检测 Rev 蛋白和 DDX3 的表达,凝胶成像仪成像结果(图 3)证明重组 pCDNA3.1-Rev-Flag-mCherry、pCDNA3.1-DDX3-YFP-Flag 质粒能在 Huh7 细胞中表达相应的蛋白。



A:重组 pCDNA3.1-Rev-Flag-mCherry 质粒转染细胞后,普通显微镜下观察转染后的细胞;B:在A的同视野下在荧光显微镜下观察细胞 Rev 的表达;C:重组 pCDNA3.1-DDX3-YFP-Flag 转染细胞后,普通显微镜下转染后的细胞;D:在C的同视野下在荧光显微镜下观察细胞 DDX3 的表达

图2 荧光显微镜下观察重组 pCDNA3.1-Rev-Flag-mCherry、pCDNA3.1-DDX3-YFP-Flag 质粒转染 Huh7 细胞后的转染结果及表达



1:在只转染 pCDNA3.1-JFH1 的细胞模型中,没有 Rev 蛋白和 DDX3 的表达;2:重组 pCDNA3.1-Rev-Flag-mCherry、pCDNA3.1-DDX3-YFP-Flag 和 pCDNA3.1-JFH1 质粒共转染 Huh7 细胞,可以在细胞中检测到 Rev 蛋白和 DDX3 的表达;3:为重组 pCDNA3.1-DDX3-YFP-3Flag 和 pCDNA3.1-JFH1 质粒共转染 Huh7 细胞,可以在细胞中检测到 DDX3 的表达

图3 Western blot 检测 Rev 蛋白和 DDX3 在 Huh7 细胞中的表达

2.3 DDX3 对细胞 HCV 复制的影响

重组 pCDNA3.1-DDX3-YFP-Flag 和 pCDNA3.1-JFH1 质粒共转染 Huh-7 细胞,48 h 后用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,qPCR 检测 HCV 的复制水平,进行对照组与实验组的两独立样本 t 检验。结果表明,瞬时转染 DDX3 和 HCV 复制质粒后,HCV 的复制水平($1.09\times10^7\pm0.18\times10^7$)明显高于 HCV 复制质粒单独转染后的 HCV 复制水平($4.79\times10^6\pm1.24\times10^6$)($P=0.03$)。提示,DDX3 可以增强 HCV 在细胞中的复制(表1)。

表1 qPCR 检测 HCV RNA 在各组 Huh7 细胞中表达的差异($n=3,\bar{x}\pm s$)

组别	细胞模型	HCV RNA (IU/mL)	P	t 值
第1组	Huh7-JFH1	$4.79\times10^6\pm1.24\times10^6$	0.03	−5.335
	Huh7-JFH1-DDX3	$1.09\times10^7\pm0.18\times10^7$		
第2组	Huh7-JFH1	$4.17\times10^7\pm0.46\times10^7$	<0.001	8.778
	Huh7-JFH1-Rev-DDX3	$1.74\times10^7\pm0.40\times10^7$		

2.4 Rev 和 DDX3 共同作用对细胞 HCV 复制的影响

重组 pCDNA3.1-Rev-Flag-mCherry、pCDNA3.1-DDX3-YFP-Flag 和 pCDNA3.1-JFH1 质粒共转染入 Huh-7 细胞中,转染 48 h 后,提取细胞总 RNA,进行 qPCR 检测 HCV 的复制水平,进行对照组与实验组的两独立样本 t 检验。结果表明,Rev、DDX3 和 HCV 复制质粒共转染 Huh-7 细胞后,HCV 的复制水平($1.74\times10^7\pm0.40\times10^7$)明显低于 HCV 单独转染后的 HCV 复制水平($4.17\times10^7\pm0.46\times10^7$)($P<0.001$)。Rev 蛋白和 DDX3 共同作用可以抑制 HCV 的复制(表1)。

3 讨论

有研究证实循环血液中的 HIV gp120 蛋白在与肝细胞表面 CCR5 和 CXCR4 接触后可激活肝细胞内 TGFβ-1 表达从而促进肝细胞内 HCV 的复制[8]。有研究发现可以从 $CD4^-CXCR4^+$ 的原代肝细胞中成功分离出 HIV;并且 Fromentin[9] 证实 $CD4^-CXCR4^-$ 的某些肝癌细胞株也可以感染 HIV。证明 HIV 和 HCV 可共感染同一肝细胞,表明二者有产生直接作用的可能。在 HIV、HCV 共感染的患者中,HIV 可以促进 HCV 的复制,而且加速肝纤维化的进程[10]。HIV 合并 HCV 感染患者与 HIV 单独感染患者比较,肝脏相关疾病是非 AIDS 引起死亡的主要原因[11]。最新的研究表明,HIV 和 HCV 合并感染加速疾病的进程,特别是 HIV 感染增加 HCV 的复制、肝细胞凋亡、肠道微生物的移位[12]、损伤 HCV 的特异性免疫应答。对 HIV 合并 HCV 的患者分别进行 HIV 的抗病毒治疗和 HCV 的抗病毒治疗,结果表明抗病毒治疗有效的延缓了肝纤维化的进程并减少了 HIV 合并 HCV 感染的患者终末期肝病的并发症[13-14]。然而 HIV 合并 HCV 感染的患者接受常规的 PEG-IFN 联合利巴韦林治疗所产生的持续性病毒学应答要比单独 HCV 患者有明显的降低[15]。

有研究表明,在 HIV-1 致病过程中,Rev 蛋白发挥着重要作用,其可以促进 HIV-1 病毒颗粒的产生,并可以抑制病毒所有调节蛋白的产生[16]。因 HIV 和 HCV 在细胞复制中无法自身合成 RNA 解旋酶,其在细胞中的复制需要细胞内的 RNA 解旋酶参与。DDX3 属于 DEAD 解旋酶家族,DDX3 参与多种细胞进程,包括 mRNA 的剪接和转录[17]、翻译的起始[18]和 RNA 的转

运[19]。有研究显示,DDX3 可以与 HIV-1 中的 Tat 蛋白作用,刺激病毒 mRNA 的翻译[20],也可以和 Rev 蛋白作用参与 REV-RRE 介导的输出作用[21]。有研究表明 DDX3 与 HCV Core 蛋白结合促进 HCV 的复制。同时也有学者发现 HIV-1 Rev 蛋白可与 DDX3 结合在核膜上形成复合体从而影响细胞质内 DDX3 的水平。也有研究发现 Rev 蛋白可以与 HCV 5'-UTR 作用直接促进 HCV 的复制。但是尚未有研究证实 Rev 可以通过间接作用影响 HCV 的复制,也没有研究证实 Rev 蛋白和 DDX3 共同作用对 HCV 的影响。

本研究证实 pCDNA3.1-Rev-Flag-mCherry、pCDNA3.1-DDX3-YFP-Flag 可以在真核细胞中表达;转染后 48 h qPCR 检测发现,DDX3 单独与 HCV 作用时,可以促进 HCV RNA 的复制;当 Rev 和 DDX3 共同作用于 HCV 时,可以有效抑制 HCV RNA 的复制。可能原因:①Rev 和 DDX3 在细胞中结合形成复合物,降低了细胞内 DDX3 的水平,降低了 DDX3 对 HCV RNA 的复制作用,从而竞争性抑制了 DDX3 对 HCV 复制的影响;②也有可能通过抑制某些信号通路从而影响 HCV RNA 的复制,因为 Rev 和 DDX3 不仅在 HCV 的表达中起作用,而且参与细胞中的多种信号通路,Rev 和 DDX3 形成复合物后也抑制了相应的信号通路,导致 HCV RNA 的表达量下降;③或者改变了 Rev 和 DDX3 在细胞中的分布,导致它们无法在指定的作用位点与 HCV 进行相互作用,从而导致 HCV RNA 表达量的下降。

参考文献:

[1] Garten R J, Lai S, Zhang J, *et al*. Rapid transmission of hepatitis C virus among young injecting heroin users in Southern China[J]. Int J Epidemiol, 2004, 33(1): 182-188.

[2] Mao Q, Ray S C, Laeyendecker O, *et al*. Human immunodeficiency virus seroconversion and evolution of the hepatitis C virus quasispecies[J]. J Virol, 2001, 75(7): 3259-3267.

[3] Netski D M, Mao Q, Ray S C, *et al*. Genetic divergence of hepatitis C virus: the role of HIV-related immunosuppression[J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 2008, 49(2): 136-141.

[4] Fromentin R, Tardif M R, Tremblay M J. Inefficient fusion due to a lack of attachment receptor/co-receptor restricts productive human immunodeficiency virus type 1 infection in human hepatoma Huh7.5 cells[J]. J Gen Virol, 2011, 92(Pt 3): 587-597.

[5] Upadya M H, Aweya J J, Tan Y J. Understanding the interaction of hepatitis C virus with host DEAD-box RNA helicases [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(11): 2913-2926.

[6] Ariumi Y. Multiple functions of DDX3 RNA helicase in gene regulation, tumorigenesis, and viral infection [J]. Front Genet, 2014, 5: 423.

[7] Yedavalli V S, Neuveut C, Chi Y H, *et al*. Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function [J]. Cell, 2004, 119(3): 381-392.

[8] Lin W, Weinberg E M, Tai A W, *et al*. HIV increases HCV replication in a TGF-beta1-dependent manner[J]. Gastroenterology, 2008, 134(3): 803-811.

[9] Xiao P, Usami O, Suzuki Y, *et al*. Characterization of a CD4-independent clinical HIV-1 that can efficiently infect human hepatocytes through chemokine (C-X-C motif) receptor 4[J]. AIDS, 2008, 22(14): 1749-1757.

[10] Pineda J A, Romero-Gomez M, Diaz-Garcia F, *et al*. HIV coinfection shortens the survival of patients with hepatitis C virus-related decompensated cirrhosis [J]. Hepatology, 2005, 41(4): 779-789.

[11] Koziel M J, Peters M G. Viral hepatitis in HIV infection [J]. N Engl J Med, 2007, 356(14): 1445-1454.

[12] Kim A Y, Schulze-zur-Wiesch J, Kuntzen T, *et al*. Impaired hepatitis C virus-specific T cell responses and recurrent hepatitis C virus in HIV coinfection[J]. PLoS Med, 2006, 3(12): e492.

[13] Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV drugs (D: A: D) Study Group, Smith C, Sabin C A, *et al*. Factors associated with specific causes of death amongst HIV-positive individuals in The D: A: D Study[J]. AIDS, 2010, 24(10): 1537-1548.

[14] Qurishi N, Kreuzberg C, Luchters G, *et al*. Effect of antiretroviral therapy on liver-related mortality in patients with HIV and hepatitis C virus coinfection[J]. Lancet, 2003, 362(9397): 1708-1713.

[15] Barcaui H S, Tavares G C, May S B, *et al*. Low rates of sustained virologic response with peginterferon plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection in HIV infected patients in Rio de Janeiro, Brazil[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e67734.

[16] Pollard V W, Malim M H. The HIV-1 Rev protein[J]. Annu Rev Microiol, 1998, 52: 491-532.

[17] Chao C H, Chen C M, Cheng P L, *et al*. DDX3, a DEAD box RNA helicase with tumor growth-suppressive property and transcriptional regulation activity of the p21waf1/cip1 promoter, is a candidate tumor suppressor[J]. Cancer Res, 2006, 66(13): 6579-6588.

[18] Shih J W, Tsai T Y, Chao C H, *et al*. Candidate tumor suppressor DDX3 RNA helicase specifically represses cap-dependent translation by acting as an eIF4E inhibitory protein [J]. Oncogene, 2008, 27(5): 700-714.

[19] Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule [J]. Neuron, 2004, 43(4): 513-525.

[20] Lai M C, Wang S W, Cheng L, *et al*. Human DDX3 interacts with the HIV-1 Tat protein to facilitate viral mRNA translation[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e68665.

[21] Yedavalli V S, Neuveut C, Chi Y H, *et al*. Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function [J]. Cell, 2004, 119(3): 381-392.

(**收稿**:2015-08-18;**修回**:2015-10-12)

(编辑 王 红)