DOI:10.16016/j.1000-5404.201606072

热休克蛋白 B1 抑制 HBV 复制的研究

程胜桃,任吉华,刘 波,陈 娟 (400016 重庆,重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室)

[摘要] **目的** 探讨热休克蛋白 B1(heat shock protein B1,HSPB1)对乙型肝炎病毒(HBV)复制的影响。**方法** 采用 Western blot 检测正常肝细胞系(HepRG)和 HBV 稳定复制细胞系(HepAD38 和 HepG2.2.15)中 HSPB1 的蛋白水平。在 HBV 稳定复制细胞系(HepAD38 和 HepG2.2.15)中转染 pCMV6-HSPB1 质粒及对照质粒,采用 Western blot 验证 HSPB1 过表达水平,实时荧光定量 PCR 和 Southern blot 检测 HSPB1 过表达对 HBV 复制中间体表达的影响;qRT-PCR 检测 HSPB1 过表达对 HBV 3.5 kb mRNA 表达的影响;ELISA 检测 HSPB1 过表达对 HBV s 抗原(HBsAg)和 e 抗原(HBeAg)分泌的影响。在肝癌细胞系 Huh-7 中共转染 pCH9/3091 和 pCMV6-HSPB1 质粒,采用 Western blot 验证 HSPB1 过表达水平,实时荧光定量 PCR 和 Southern blot 检测 HSPB1 过表达对瞬时转染的 HBV 复制中间体表达的影响。**结果** HSBP1 在 HepAD38 和 HepG2.2.15 中的表达明显低于 HepRG。HSPB1 在 HepAD38 和 HepG2.2.15 细胞中成功过表达,在过表达 HSPB1 的 HepAD38 和 HepG2.2.15 细胞中 HBV 复制中间体水平以及 3.5 kb mRNA 水平均降低,细胞培养上清中 HBsAg 和 HBeAg 的分泌水平也降低。HSPB1 在转染 pCH9/3091 的 Huh-7 细胞中成功过表达,HSPB1 过表达抑制了瞬时表达的 HBV 的复制水平。**结论** HSPB1 可以抑制 HBV 复制。

[关键词] 乙型肝炎病毒;热休克蛋白 B1;病毒复制
[中图法分类号] R341;R373.21;R394.3 [文献标志码] A

Heat shock protein B1-mediated inhibition of hepatitis B virus replication *in vitro*

Cheng Shengtao, Ren Jihua, Liu Bo, Chen Juan (Key Laboratory of Molecular Biology for Infectious Diseases of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of heat shock protein B1 (HSPB1) on the replication of hepatitis B virus (HBV). **Methods** The expression level of HSPB1 in the normal liver cell line (HepRG) and HBV stable replication cell lines (HepAD38 and HepG2.2.15) was determined by Western blotting. Both HepAD38 cells and HepG2.2.15 cells were transfected with pCMV6-HSPB1 or control vector, and the over-expression efficiency of HSPB1 was confirmed by Western blotting. The effect of HSPB1 on HBV replicative intermediates was measured by real-time PCR and Southern blotting. The effect of HSPB1 on the HBV 3.5kb mRNA was determined by qRT-PCR. And the secretion levels of HBsAg and HBeAg in the cell culture medium were detected by ELISA. Finally, pCH9/3091 and pCMV6-HSPB1 were co-transfected in Huh-7 cells, and its efficiency was confirmed by Western blotting. The effect of HSPB1 on HBV replicative intermediates was measured by real-time PCR and Southern blotting. **Results** The expression level of HSPB1 was obviously decreased in HepAD38 cells and HepG2.2.15 cells when compared with HepRG cells. HBV replicative intermediates, 3.5kb mRNA level and the secretion levels of HBsAg and HBeAg were decreased in HepAD38 cells and HepG2.2.15 cells with HSPB1 over-expression. HSPB1 was over-expressed in the pCH9/

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81472271)
[通信作者] 陈 娟,E-mail:yixin_xinyuan@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160831.1411.013.html

3091-transfected Huh-7 cells, which inhibited the replication of HBV. **Conclusion** HSPB1 can inhibit HBV replication.

[**Key words**] hepatitis B virus; heat shock protein B1; virus replication

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81472271). Corresponding author: Chen Juan, E-mail: yixin_xinyuan@163.com

乙型肝炎病毒(HBV)是最常见的肝炎病毒,其所引起的乙型肝炎呈世界性分布,据估计全世界有3.5亿人为慢性HBV感染者[1],每年约有100万人死于因HBV感染所导致的相关疾病。我国是HBV的高流行地区,慢性肝炎及其相关疾病也是我国面临的重大卫生问题。因此,阐明HBV复制调控机制,控制HBV感染显得尤为重要。据文献报道,HBV在体内的复制受到宿主因素的严格调控[2],研究发现Sirt1[3]、Cyclin D2[4]、Ku80[5]、SAMHD1[6]等宿主因素均可以调控HBV的复制。但是宿主因素对HBV复制的影响尚未完全明了。因此,对HBV相关的宿主因素的研究具有重要的意义。

热休克蛋白(heat shock proteins,HSPs)是一类广泛存在于生物体内的应激蛋白质。当机体处于应激状态时,此种蛋白合成增多以保护机体,并且,许多热休克蛋白具有分子伴侣活性。按照蛋白相对分子质量的大小,热休克蛋白共分为5类,分别为HSP110、HSP90、HSP70、HSP60以及小分子热休克蛋白[7]。热休克蛋白B1(heat shock protein B1,HSPB1)属于小分子热休克蛋白,也称为HSP25(小鼠)和HSP27(人类),是分布最广和研究最多的小分子热休克蛋白。其主要定位于细胞质,在内质网、细胞核等亚细胞器中也有分布。

作为小分子热休克蛋白,HSPB1与多种物理和化学应激相关,可以识别并辅助降解错误折叠的蛋白[8];HSPB1还能与多种参与细胞程序性死亡的组分相互作用[9]。研究发现HSPB1与多种肿瘤相关,其表达量与肿瘤的治疗反应[10]、预后[11]以及肿瘤进展[12]相关。许多文献也报道了HSPB1与病毒的关系。目前研究发现:HSPB1与Ⅰ型单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV-1)[13]、人腺病毒E37(HDTV-D37)[14]、丙型肝炎病毒(HCV)[15]和Ⅱ型猪圆环病毒(porcine circovirus type2,PCV2)[16]等感染过程相关。已知大多数肝癌与HBV相关[17],Harimoto等[18]研究发现,高表达HSPB1的HBV相关性肝癌患者预后较差。并且,蛋白质组学分析发现HSPB1可能是潜在的肝癌标志物且与病理分期和患者预后密切相关[19]。临床研究也发现HSPB1在肝癌患者的血清以及组织标本中表达上调[20-21]。以上发现阐明了在临床样品中HSPB1与HBV相关性肝癌存在明确关系,但并未解释其具体原因;另外,HBV在肝细胞内的持续复制是HBV持续感染以及向肝硬化、肝癌进展的重要原因[22],而以上研究大多是基于HBV背景下HSPB1表达水平的研究,并未深入讨论HSPB1与HBV的关系以及HSPB1是否参与HBV复制调控。本文拟在细胞水平对HSPB1是否参与HBV复制调控进行研究,从而有利于深入了解HSPB1对HBV的作用及影响,并为HBV的防治提供新的思路和靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

HepAD38细胞基因组整合了HBV基因组,HBV表达受Tet-off系统调控,一方面整合的HBV基因组通过表达pgRNA逆转录合成cccDNA(单个细胞中约有10个cccDNA分子),进而转录生成3.5、2.4、2.1 kb mRNA和0.7 kb mRNA,另一方面整合的HBV基因组可直接转录形成HBV RNA,继而完成HBV生活周期,该细胞由华西医学院感染性疾病中心唐红教授转赠;HepG2.2.15细胞同样整合有HBV基因组,能够稳定表达HBV,完成完整的HBV生活周期,该细胞中形成低水平cccDNA,目前的技术方法不能检测,该细胞由本实验室保存;人肝癌细胞系Huh-7购自日本健康科学研究资源库(Health Science Research Resources Bank, HSRRB);HepRG细胞由厦门大学公共卫生学院夏宁邵教授转赠。pCMV6-HSPB1(RC201800)质粒购自美国Origene公司;pCH9/3091质粒包含由CMV启动子启动的1.1倍HBV基因组,通过转染,在细胞内能够表达HBV RNA,完成HBV生活周期,该质粒由第三军医大学西南医院全军感染病研究所兰林副研究员惠赠。HSPB1抗体购自美国Santa Cruz Biotechnology公司;辣根过氧化物酶标记羊抗鼠IgG和GAPDH抗体均购自中杉金桥公司(中国);辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG购自美国GE Healthcare公司。质粒转染试剂购自德国Roche公司。iScript™ cDNA合成试剂盒购于美国Bio-Rad公司。

1.2 细胞培养

HepG2.2.15和HepAD38细胞均培养于含有

10%胎牛血清(美国 Gibco 公司)、400 μg/mL G418(美国 Merck 公司)和 1%丙酮酸钠(美国 HyClone 公司)的 MEM 培养基(美国 Corning 公司)中;Huh-7 和 HepRG 细胞培养于含有 10%胎牛血清(美国 Gibco 公司)、1%青/链霉素(美国 HyClone 公司)的 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司)中,在含 5% CO_2、37 ℃孵育箱中培养。质粒转染严格按照说明书操作。

1.3 Western blot 检测

收集细胞,根据细胞多少加入适当体积的细胞裂解液 RIPA(含蛋白酶抑制剂),4 ℃摇床裂解 15 min;离心弃细胞碎片;BCA 法进行蛋白质定量。取等量总蛋白(30 μg)加蛋白变性液后 95 ℃变性 10 min,利用 SDS-PAGE 电泳进行蛋白质分离,采用电湿转法将分离后蛋白质转移至 NC 膜(RPN303D,美国 GE 公司)上。将含有目的蛋白质的 NC 膜放在 5%脱脂奶粉中,室温摇床封闭 1 h,一抗 4 ℃摇床过夜孵育(HSPB1 抗体 1∶6 000 稀释)。次日 TBS-T 洗膜 3 次,每次 5 min。二抗在摇床上室温孵育 2 h(抗体 1∶3 000 稀释),洗膜同上。ECL 显影。以 GAPDH 为内参。

1.4 qRT-PCR 相对定量法

采用 TRIzol(美国 Invitrogen 公司)法裂解细胞提取总 RNA,取 1 μg RNA 利用 iScript™ cDNA Synthesis Kit(美国 Bio-Rad 公司)试剂盒将其逆转录为 cDNA,然后进行 qRT-PCR(Fast Start Universal SYBR Green Master, 德国 Roche 公司)检测目的基因的 mRNA 水平, HBV 3.5 kb mRNA 水平(上游引物:5′-GCCTTAGAGTCTCCTGAGCA-3′,下游引物:5′-GAGGGAGTTCTTCTTCTAGG-3′,产物大小:345 bp)。以 β-actin 为内参(上游引物:5′-CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT-3′,下游引物:5′-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3′,产物大小:182 bp)。每个样本均设 3 个复孔,每组实验重复 3 次。

1.5 HBV 复制中间体的提取

用胰蛋白酶消化并收集转染质粒 5 d 的细胞,采用牛鲍氏计数板计数后,取相同数目的细胞,PBS 洗涤,加入 500 μL 细胞裂解液(10 mmol/L Tris-HCl、pH = 8.0,1 mmol /L EDTA,1% NP-40 和 2% Sucrose),37 ℃ 孵育 15 min,15 000 × g 离心 5 min,取上清。在上清中加入 4 μL DNase Ⅰ(5 U/mL)和 5 μL $MgCl_2$(1 mol/L),37 ℃ 孵育 4 h。加入 200 μL 含 1.5 mol/L NaCl 的 35% PEG 8000,冰浴 1 h,11 000 × g、4 ℃离心 5 min,去上清,加入 12.5 μL 蛋白酶 K(20 mg/mL,日本 TaKaRa 公司)和 500 μL 蛋白酶 K 消化液(0.5% SDS,150 mmol/L NaCl,25 mmol/L Tris-HCl、pH = 8.0 和 10 mmol/L EDTA)。酚氯仿抽提,异丙醇沉淀,70%乙醇洗涤,ddH_2O 溶解。

1.6 Southern blot 检测

利用 0.9%琼脂糖凝胶电泳分离 HBV 复制中间体;将凝胶放入碱变性液中,室温水平摇床 30 min,重复 1 次;毛细管虹吸法转膜 4 h,紫外交联固定。42 ℃预杂交 1 h 后加入地高辛标记 DNA 探针 42 ℃杂交过夜。次日,依次在 30 mL 2 × SSC/0.1% SDS、1 × SSC/0.1% SDS、0.1 × SSC/0.1% SDS 洗膜各 15 min。将膜在阻断液中 37 ℃阻断 30 min,采用抗地高辛二抗 37 ℃ 孵育 30 min 后化学发光、采集信号。

1.7 实时荧光定量 PCR

检测 HBV 复制中间体。严格按照 SYBR Green(11797100 德国 Roche 公司)说明书配制反应体系和设置反应条件(上游引物:5′-CCTAGTAGTCAGTTATGTCAAC-3′,下游引物:5′-TCTATAAGCTGGAGGAGTGCGA-3′,产物大小:150 bp)。每个样本均设 3 个复孔,每组实验重复 3 次。

1.8 酶联免疫吸附实验(ELISA)

ELISA 试剂盒购自中国 KHB 公司。严格按照试剂盒说明书进行操作,分别检测 HBsAg 和 HBeAg 的分泌水平。

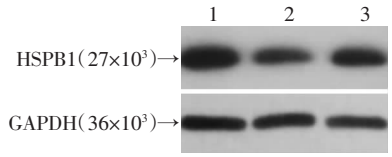
1.9 统计学分析

实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,采用 SPSS 20.0 统计软件,两组间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HSPB1 在 HBV 复制细胞系的表达

Western blot 检测 HSPB1 在正常肝细胞系(HepRG)和 HBV 稳定复制细胞系(HepAD38 和 HepG2.2.15)中的蛋白水平,结果显示 HSPB1 在 HepAD38 和 HepG2.2.15 这两种细胞中表达明显低于 HepRG(图 1)。

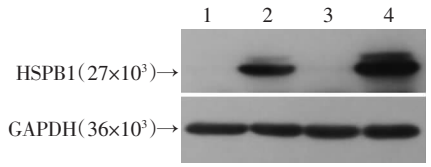


1:HepRG 细胞;2:HepAD3 细胞;3:HepG2.2.15 细胞

图 1 Western blot 检测 HSPB1 在 HBV 复制细胞系的表达

2.2 HSPB1 过表达验证

在 HBV 稳定复制细胞系 HepAD38 细胞和 HepG2.2.15 细胞中转染了 HSPB1 表达质粒及对照质粒,Western blot 检测结果显示 HSPB1 在这两种细胞中均成功过表达(图 2)。

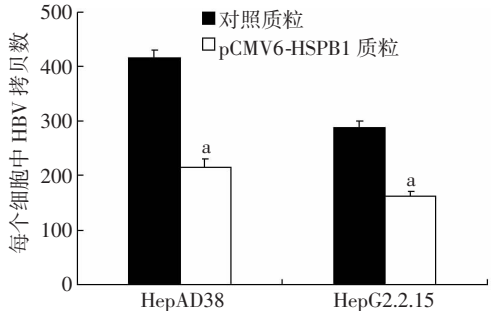


1、2:分别为转染对照质粒和 pCMV6-HSPB1 质粒的 HepAD38 细胞;3、4:分别为转染对照质粒和 pCMV6-HSPB1 质粒的 HepG2.2.15 细胞

图 2 Western blot 验证 HSPB1 过表达

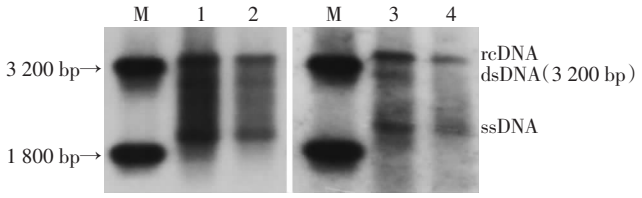
2.3 HSPB1 过表达对 HBV 复制中间体水平的影响

实时荧光定量 PCR 检测发现:过表达 HSPB1 时,HepAD38 细胞和 HepG2.2.15 细胞中 HBV 复制中间体的表达明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 3)。Southern blot 检测进一步证实 HSPB1 过表达抑制了 HBV 复制中间体的表达(图 4)。这些结果表明 HSPB1 过表达可显著抑制 HBV 复制中间体的表达。



a:$P<0.05$,与转染对照质粒细胞比较

图 3 实时荧光定量 PCR 检测 HSPB1 过表达对 HBV 复制中间体水平的影响



M:标准;1、2:分别为转染对照质粒和 pCMV6-HSPB1 质粒的 HepAD38 细胞;3、4:分别为转染对照质粒和 pCMV6-HSPB1 质粒的 HepG2.2.15 细胞

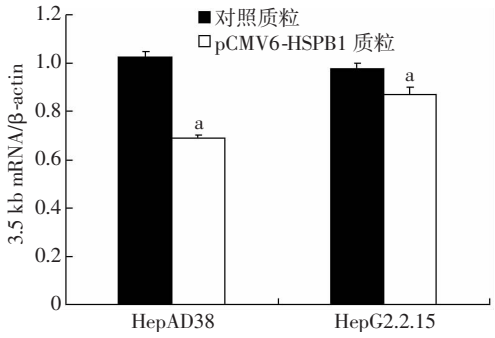
图 4 Southern blot 检测 HSPB1 过表达对 HBV 复制中间体水平的影响

2.4 HSPB1 过表达对 HBV 3.5 kb mRNA 水平的影响

由于 HBV 3.5 kb mRNA 含有 HBV 基因组全部的遗传信息,并且是 HBV 复制的模板,因此,本研究检测 HSPB1 对其表达的影响。qRT-PCR 分析结果显示:HSPB1 过表达时,HepAD38 细胞和 HepG2.2.15 细胞中 HBV 3.5 kb mRNA 表达显著降低,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 5)。说明 HSPB1 也可明显抑制 HBV 3.5 kb mRNA 的表达。

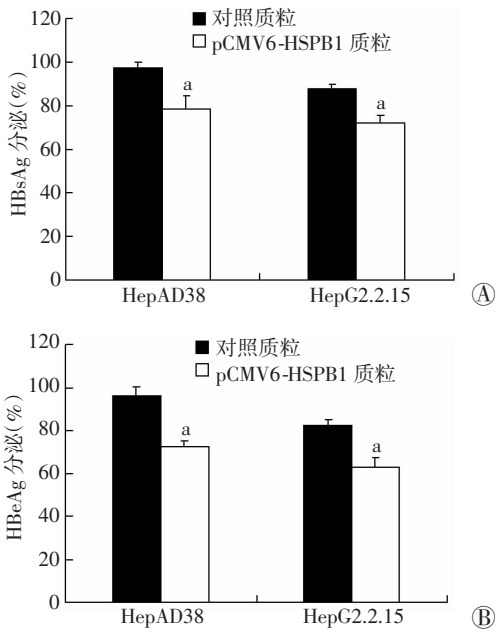
2.5 HSPB1 过表达对 HBsAg 和 HBeAg 的分泌水平的影响

ELISA 检测发现:HSPB1 过表达时,细胞培养上清中 HBsAg 和 HBeAg 的分泌明显减少,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 6)。表明 HSPB1 过表达抑制了 HBV 抗原的分泌。



a:$P<0.05$,与转染对照质粒细胞比较

图 5 qRT-PCR 检测 HSPB1 过表达对 HBV 3.5 kb mRNA 水平的影响



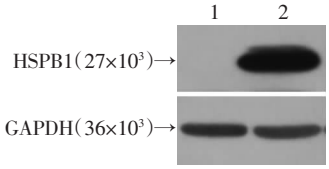
a:$P<0.05$,与转染对照质粒细胞比较

A:过表达 HSPB1 对 HBsAg 分泌的影响;B:过表达 HSPB1 对 HBeAg 分泌的影响

图 6 ELISA 检测 HSPB1 过表达对 HBsAg 和 HBeAg 分泌水平的影响

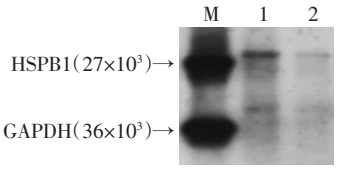
2.6 HSPB1 过表达对瞬时 HBV 感染复制的影响

为验证 HSPB1 对 HBV 复制的影响,在肝癌细胞系 Huh-7 中共转染了 HBV 表达质粒 pCH9/3091 和 HSPB1, Western blot 检测显示:HSPB1 在 Huh-7 细胞中过表达成功(图 7),实时荧光定量 PCR 分析结果显示 HSPB1 过表达时,瞬时表达 HBV 的 Huh-7 细胞中 HBV 复制中间体的表达明显降低,差异具有统计学意义(111.67 ± 10.21 *vs* 75.33 ± 6.02, $P < 0.05$)。Southern blot 检测结果也显示:过表达 HSPB1 后,HBV 复制中间体的表达水平明显降低(图 8)。进一步表明 HSPB1 过表达抑制了 HBV 复制。



1:共转染对照质粒与 pCH9/3091 质粒的 Huh-7 细胞;2:共转染 pCMV6-HSPB1 与 pCH9/3091 质粒的 Huh-7 细胞

图 7 Western blot 验证 HSPB1 过表达



M:标准;1:共转染对照质粒与 pCH9/3091 质粒的 Huh-7 细胞;2:共转染 pCMV6-HSPB1 与 pCH9/3091 质粒的 Huh-7 细胞

图 8 Southern blot 检测 HSPB1 过表达对 HBV 瞬时感染复制中间体水平的影响

3 讨论

在各种生理与病理应激状态下,HSPB1 作为应激蛋白,均有不同程度的激活,而病毒作为常见的病原体,能够引起机体的一系列应激改变。研究发现用 p38 MAPK 抑制剂(SB203580)处理登革热病毒(dengue virus ,DENV)感染的小鼠时,其下游信号分子 HSPB1 的磷酸化水平明显下降,从而减轻了登革热病毒诱导的肝损伤[23]。同时,卡波氏肉瘤相关疱疹病毒(Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV)可以促进 MK2-HSPB1 信号通路介导的转录后修饰[24]。人类巨细胞病毒(human cytomegalovirus ,HCMV)通过上调 HSPB1 来抑制活性 Caspase 3 的形成以及细胞凋亡的起始[25]。这些发现显示了病毒通过 HSPB1 调节了细胞的生物学进程,然而,目前关于 HSPB1 调控病毒生活周期少见报道。本研究在 HBV 复制细胞系上过表达 HSPB1,发现 HSPB1 通过下调 HBV 3.5 kb mRNA 和复制中间体水平来改变 HBV 的复制水平,表明 HSPB1 可以通过改变 HBV 复制水平而影响 HBV 的生活周期,进而可能改变肝炎向肝硬化、肝癌的进展。而这一发现与 Harimoto 等[18]研究报道 HSPB1 与 HBV 相关性肝癌患者预后呈负相关这一结论矛盾,其主要原因可能是由于 Harimoto 等研究纳入的患者中同时有 HBV 和 HCV 感染,不能排除 HCV 对预后的影响;而本研究同时在 HBV 稳定复制细胞系和外源性表达 HBV 的细胞中进行研究,得到的实验结果更加充分说明了 HSPB1 与 HBV 复制的关系;并且 Harimoto 等纳入样本数仅为 60 例,需要扩大样本量进一步深入研究。

HBV 虽然是 DNA 病毒,但其可以通过共价闭合环状 DNA(cccDNA)转录生成的前基因组 RNA(pgRNA)逆转录生成松弛环状 DNA(rcDNA)[26]。本研究在过表达 HSPB1 后发现 HBV 3.5 kb mRNA 水平降低,提示 HSPB1 可能通过下调 pgRNA 的生成,进一步减少 HBV 复制中间体的产生,从而抑制 HBV 的复制。

作为重要的应激蛋白,HSPB1 参与调节细胞氧化应激状态[27]。Poussard 等[28]发现天然抗氧化剂 Oligopin® 可以通过调节 HSPB1 而减少骨骼肌细胞的氧化损伤,并且有研究发现利用干扰 RNA 靶向沉默 HSPB1 后会引起体内 ROS 堆积[29]。病毒侵入机体,在体内定植、复制,打破体内氧化与抗氧化平衡。也有研究发现在体内外,抗氧化剂谷胱甘肽具有抗流感病毒的活性[30];并且另一种抗氧化剂 MnTBAP 可以通过修饰病毒蛋白而抑制 HIV-1 的复制[31]。以上研究结果显示:HSPB1 参与氧化应激,且氧化应激状态可以影响病毒在体内的复制与感染。而对于 HBV,Ren 等[32]研究发现,氧化剂 H_2O_2 明显促进 HBV 的复制,而抗氧化剂 N-乙酰基-L-半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC)会抑制 HBV 的复制。Kim 等[33]证实 ROS 可以促进 HBV 衣壳的组装,进而促进 HBV 的复制。说明氧化应激可以促进 HBV 的复制。以上研究结果提示 HSPB1 可能通过氧化应激途径参与 HBV 复制。为我们下一步研究 HSPB1 调控 HBV 复制分子机制提供了理论依据。

综上所述,本研究发现 HSPB1 能够抑制 HBV 复制。本课题组下一步将通过研究 HSPB1、氧化应激状态、HBV 复制 3 者之间的相互作用关系,进一步阐明 HSPB1 下调 HBV 复制的分子机制,从而为控制 HBV 感染提供新的靶点。

参考文献:

[1] Mohammadi Z, Keshtkar A, Eghtesad S, *et al*. Epidemiological Profile of Hepatitis B Virus Infection in Iran in the Past 25 years; A Systematic Review and Meta-analysis of General Population Studies[J]. Middle East J Dig Dis, 2016, 8(1): 5-18. DOI: 10.15171/mejdd.2016.01

[2] Morikawa K, Suda G, Sakamoto N. Viral life cycle of hepatitis B virus: host factors and druggable targets[J]. Hepatol Res, 2016, 46(9): 871-877. DOI: 10.1111/hepr.12650

[3] Ren J H, Tao Y, Zhang Z Z, *et al*. Sirtuin 1 regulates hepatitis B virus transcription and replication by targeting transcription factor AP-1[J]. J Virol, 2014, 88(5): 2442-2451. DOI: 10.1128/JVI.02861-13

[4] 任吉华, 冉龙宽, 李宛蔚, 等. 细胞周期蛋白 D2 对 HBV 复制的影响[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(15): 1550-1554. DOI: 10.16016/j1000-5404.201411228

[5] Guo H, Xu C, Zhou T, *et al*. Characterization of the host factors required for hepadnavirus covalently closed circular (ccc) DNA formation[J]. Plos one, 2012, 7(8): e43270. DOI: 10.1371/journal.pone.0043270

[6] Jeong G U, Park I H, Ahn K, *et al*. Inhibition of hepatitis B virus replication by a dNTPase-dependent function of the host restriction factor SAMHD1[J]. Virology, 2016, 495: 71-78. DOI: 10.1016/j.virol.2016.05.001

[7] Mizrahi T, Heller J, Goldenberg S, *et al*. Heat shock proteins and resistance to desiccation in congeneric land snails[J]. Cell Stress Chaperones, 2010, 15(4): 351-363. DOI: 10.1007/s12192-009-0150-9

[8] Garrido C, Brunet M, Didelot C, *et al*. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties[J]. Cell Cycle, 2006, 5(22): 2592-2601. DOI: 10.4161/cc.5.22.3448

[9] Melle C, Ernst G, Escher N, *et al*. Protein profiling of microdissected pancreas carcinoma and identification of HSP27 as a potential serum marker[J]. ClinChem, 2007, 53(4): 629-635. DOI: 10.1373/clinchem.2006.079194

[10] Ciocca D R, Calderwood S K. Heat shock proteins in cancer: Diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications[J]. Cell Stress Chaperones, 2005, 10(2): 86-103.

[11] Zoubeidi A, Gleave M. Small heat shock proteins in cancer therapy and prognosis[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44(10): 1646-1656. DOI: 10.1016/j.biocel.2012.04.010

[12] Sherman M, Multhoff G. Heat shock proteins in cancer[J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1113: 192-201. DOI: 10.1196/annals.1391.030

[13] Choi Y W, Tan Y J, Lim S G, *et al*. Proteomic approach identifies HSP27 as an interacting partner of the hepatitis C virus NS5A protein[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 318(2): 514-519. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.04.052

[14] Mathew S S, Della Selva M P, Burch A D. Modification and reorganization of the cytoprotective cellular chaperone Hsp27 during herpes simplex virus type 1 infection[J]. J Virol, 2009, 83(18): 9304-9312. DOI: 10.1128/JVI.01826-08

[15] Rajaiya J, Yousuf M A, Singh G, *et al*. Heat shock protein 27 mediated signaling in viral infection[J]. Biochemistry, 2012, 51(28): 5695-5702. DOI: 10.1021/bi3007127

[16] Liu J, Zhang L, Zhu X, *et al*. Heat shock protein 27 is involved in PCV2 infection in PK-15 cells[J]. Virus Res, 2014, 189: 235-242. DOI: 10.1016/j.virusres.2014.05.024

[17] Tornesello M L, Buonaguro L, Izzo F, *et al*. Molecular alterations in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B and hepatitis C infections[J]. Oncotarget, 2016, 7(18): 25087-25102. DOI: 10.18632/Oncotarget.7837

[18] Harimoto N, Shimada M, Aishima S, *et al*. The role of heat shock protein 27 expression in hepatocellular carcinoma in Japan: Special reference to the difference between hepatitis B and C[J]. Liver Int, 2004, 24(4): 316-321. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2004.0927.x

[19] King K L, Li A F, Chau G Y, *et al*. Prognostic significance of heat shock protein-27 expression in hepatocellular carcinoma and its relation to histologic grading and survival[J]. Cancer, 2000, 88(11): 2464-2470.

[20] Feng J T, Liu Y K, Song H Y, *et al*. Heat-shock protein 27: A potential biomarker for hepatocellular carcinoma identified by serum proteome analysis[J]. Proteomics, 2005, 5(17): 4581-4588. DOI: 10.1002/pmic.200401309

[21] Yang Z, Zhuang L, Szatmary P, *et al*. Upregulation of heat

shock proteins (HSPA12A, HSP90B1, HSPA4, HSPA5 and HSPA6) in tumour tissues is associated with poor outcomes from HBV-related early-stage hepatocellular carcinoma[J]. Int J Med Sci, 2015, 12(3): 256-263. DOI: 10.7150/ijms.10735

[22] Levrero M, Zucman-Rossi J. Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2016, 64(1 Suppl): S84-S101. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.02.021

[23] Sreekanth G P, Chuncharunee A, Sirimontaporn A, *et al*. SB203580 Modulates p38 MAPK signaling and dengue virus-induced liver injury by reducing MAPKAPK2, HSP27, and ATF2 phosphorylation[J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0149486. DOI: 10.1371/journal.pone.0149486

[24] Corcoran J A, Johnston B P, McCormick C. Viral activation of MK2-hsp27-p115 RhoGEF-RhoA signaling axis causes cytoskeletal rearrangements, P-body disruption and ARE-mRNA stabilization[J]. PLoS Pathogens, 2015, 11(1): e1004597. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004597

[25] Peppenelli M A, Arend K C, Cojohari O, *et al*. Human cytomegalovirus stimulates the synthesis of select Akt-dependent antiapoptotic proteins during viral entry to promote survival of infected monocytes[J]. J Virol, 2016, 90(6): 3138-3147. DOI: 10.1128/JVI.02879-15

[26] Blondot M L, Bruss V, Kann M. Intracellular transport and egress of hepatitis B virus[J]. J Hepatol, 2016, 64(1 Suppl): S49-S59. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.02.008

[27] Tadros S F, D'Souza M, Zhu X, *et al*. Gene expression changes for antioxidants pathways in the mouse cochlea: relations to age-related hearing deficits[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e90279. DOI: 10.1371/journal.pone.0090279. eCollection 2014

[28] Poussard S, Pires-Alves A, Diallo R, *et al*. A natural antioxidant pine bark extract, Oligopin®, regulates the stress chaperone HSPB1 in human skeletal muscle cells: a proteomics approach[J]. Phytother Res, 2013, 27(10): 1529-1535. DOI: 10.1002/ptr.4895

[29] Song T F, Zhang Z F, Liu L, *et al*. Small interfering RNA-mediated silencing of heat shock protein 27 (HSP27) Increases chemosensitivity to paclitaxel by increasing production of reactive oxygen species in human ovarian cancer cells (HO8910)[J]. J Int Med Res, 2009, 37(5): 1375-1388.

[30] Cai J, Chen Y, Seth S, *et al*. Inhibition of influenza infection by glutathione[J]. Free Radic Biol Med, 2003, 34(7): 928-936.

[31] Aquaro S, Muscoli C, Ranazzi A, *et al*. The contribution of peroxynitrite generation in HIV replication in human primary macrophages[J]. Retrovirology, 2007, 4: 76. DOI: 10.1186/1742-4690-4-76

[32] Ren J H, Chen X, Zhou L, *et al*. Protective role of sirtuin3 (SIRT3) in oxidative stress mediated by hepatitis B virus X protein expression[J]. PLoS ONE, 2016, 11(3): e0150961. DOI: 10.1371/journal.pone.0150961

[33] Kim Y S, Seo H W, Jung G. Reactive oxygen species promote heat shock protein 90-mediated HBV capsid assembly[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 457(3): 328-333. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.12.110

(收稿:2016-06-14;修回:2016-07-18)

(编辑 王 红)