消化系统疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000987

丙型肝炎病毒核心蛋白抑制 E-cadherin 基因启动子活性

聂丽珠，聂　丹，段玉洁，李　治，陈　震，田　玲，唐　霓
（重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室，重庆　400016）

【摘　要】**目的**：探讨丙型肝炎病毒核心蛋白（hepatitis C virus core protein，HCV core）对 E-cadherin 启动子活性的调控作用。**方法**：以 Huh7 细胞基因组为模板，构建野生型 E-cadherin（CDH1）基因启动子荧光素酶报告质粒（pGL3-CDH1），然后设计突变引物序列将人 E-cadherin 启动子区负性调控关键区域，即位于-80~-75 nt（E-box1），-30~-25 nt（E-box3），和+22~+27 nt（E-box4）的 3 个 E-box 的共识别序列 5'-CANNTG-3'突变为 5'-AANNTA-3'，分别构建 E-box1（pGL3-mut1）、E-box3（pGL3-mut2）、E-box4（pGL3-mut3）、E-box1+3（pGL3-mut1+2）、E-box1+4（pGL3-mut1+3）、E-box3+4（pGL3-mut2+3）、E-box1+3+4（pGL3-mut1+2+3）的荧光素酶报告质粒。将上述质粒与内参质粒 pRL-TK 分别共转染于过表达核心蛋白的肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞，采用双荧光素酶报告系统检测 HCV core 对 E-cadherin 启动子的调控，分析 E-cadherin 启动子区不同位点的 E-box 区域在 HCV core 调控 E-cadherin 启动子活性中发挥的作用。**结果**：荧光素酶活性检测结果显示，与 GFP 对照组相比，HCV core 可以明显抑制野生型 E-cadherin 启动子活性；在 E-box 单一突变的 E-cadherin 报告质粒转染细胞中，HCV core 对 CDH1 启动子的抑制作用有不同程度减弱，特别是-80~-75 nt 和-30~-25 nt 位点的 E-box 区域作用最为明显；E-box 联合突变型质粒转染细胞中，HCV core 对 CDH1 启动子的抑制作用明显减弱。**结论**：HCV core 能明显抑制 E-cadherin 的转录活性，E-box 突变可以部分拮抗 HCV core 对 E-cadherin 的转录抑制作用，提示位于-80~-75 nt 和-30~-25 nt 位点的 E-box 保守负性调控区域在 HCV core 对 E-cadherin的转录调控中发挥关键作用。

【关键词】肝细胞肝癌；丙型肝炎病毒核心蛋白；E-cadherin；E-box；启动子活性
【中图分类号】R575.1　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2015-06-23

Hepatitis C virus core protein inhibits the E-cadherin promoter activity

Nie Lizhu, Nie Dan, Duan Yujie, Li Zhi, Chen Zhen, Tian Ling, Tang Ni
(*Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases Founded by the Ministry of Education, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To investigate the regulation of hepatitis C virus core protein (HCV core) on E-cadherin promoter activity. ***Methods***: The CDH1 promoter fragment, amplified from the Huh7 cells, was cloned into pGL3-Basic to construct the luciferase report plasmid (pGL3-CDH1). The three E-boxes consensus sequences, which located at -80~-75 nt (E-box1), -30~-25 nt (E-box3), and +22~+27 nt (E-box4) in human E-cadherin promoter region, play important role in E-cadherin transcriptional regulation. Thus, mutagenic primers were designed to induce point mutations in three putative E-box sites in the CDH1 promoter sequence. These mutations changed the sequence of the E-boxes from 5'-CANNTG-3' to 5'-AANNTA-3', which resulted in the insertion of a Snail-unrecognized site. These reporter constructs were named E-box1 (pGL3-mut1), E-box3 (pGL3-mut2), E-box4 (pGL3-mut3) single mutation types and E-box1+3 (pGL3-mut1+2), E-box1+4 (pGL3-mut1+3), E-box3+4 (pGL3-mut2+3), E-box1+3+4 (pGL3-mut1+2+3) mutant constructs respectively. The E-cadherin promoter constructs containing wild-type or mutant E-boxes were co-transfected with pRL-TK (an internal control) into SMMC-7721 cells over expressing HCV core protein respectively, then the luciferase activities were detected. ***Results***: Compared with that of GFP control group, HCV core protein could significantly inhibit wild-type CDH1 promoter activity. In E-box single mutant CDH1 transfection cells, the inhibition of HCV core protein on CDH1 promoter decreased in different degrees. It is most obvious in -80~-75 nt and -30~-25 nt. In compound mu-

作者介绍：聂丽珠，Email：Lizhunie0419@163.com，
研究方向：病毒感染与原发性肝癌致病机制。
通信作者：唐　霓，Email：nitang@cqmu.edu.cn。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81572683、81371827、31171307）；“十二·五”传染病国家科技重大专项资助项目（编号：2012ZX10002005-003-002、2013ZX10002002-005-003）；重庆医科大学科研培育基金资助项目（编号：201401）；重庆医科大学附属第二医院“优秀青年人才”资助项目；重庆市研究生科研创新资助项目（编号：CYS14124）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160513.1658.120.html（2016-05-13）

tation of CDH1-transfected cells, the HCV core-induced CDH1 inhibition was significantly diminished. ***Conclusion***: HCV Core protein strongly inhibits E-cadherin transcriptional activity. The −80~−75 nt, −30~−25 nt E-boxes consensus sequences within E-cadherin promoter region may play a dominant role in HCV core-induced E-cadherin repression.

【Key words】hepatocellular carcinoma; hepatitis C virus core protein; E-cadherin; E-box; promoter activity

原发性肝癌（hepatocellular carcinoma，HCC）是威胁人类健康最严重的恶性肿瘤之一，其致死率居世界第三位[1]，丙型肝炎病毒（hepatitis C virus，HCV）感染是 HCC 发生的重要诱因之一。据世界卫生组织统计，目前全球约有 1.7 亿 HCV 慢性感染者，每年因 HCV 感染而发展为肝癌的患者数以 1%~7% 的速度增加[2]。因此开展 HCV 感染引起的 HCC 相关机制的研究具有重要意义。HCV 属于黄病毒科嗜肝病毒，基因组为 9.6 kb 的单股正链 RNA，在宿主细胞信号肽酶和病毒蛋白酶的共同作用下至少可加工成 10 种病毒蛋白[3]，包括 3 种结构蛋白（Core、E1、E2）和 7 种非结构蛋白（p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B）。其中 HCV 核心蛋白（HCV core）诱导的细胞信号转导和转录因子调控异常参与了 HCV 相关肝癌的发生和恶性转移过程[4]。

黏着蛋白 E-cadherin（CDH1）是广泛分布于胚胎组织和成熟组织上皮细胞膜上的一种重要的糖蛋白[2]，除参与调节胚胎组织的发育、形成以及细胞与细胞间信息传递交流外，还与多种恶性肿瘤细胞的上皮细胞向间质样细胞转化（epithelial to mesenchymal transformation，EMT）进程密切相关[5]。既往研究表明，当缺失 E-cadherin 时，细胞的侵袭、转移能力都显著增加，而回复肿瘤细胞中 E-cadherin 表达，细胞表现为上皮表型，同时细胞的迁移能力降低。除此之外，异位表达的 E-cadherin，可以使间质细胞特异表达基因的转录受阻[6]。Kaur 等[7]研究证实 E-cadherin 在正常口腔黏膜上皮、癌组织、转移淋巴结中的表达依次降低，且与口腔鳞状上皮细胞癌分化不良和远处转移密切相关。既往研究表明，在过表达 HCV core 细胞或者 JFH-1 转染的 Huh7.5.1 细胞模型中，HCV core 通过上调 DNMT1 和 DNMT1 3b[8]、SIRT1[9]等，促进 E-cadherin 基因启动子区甲基化，抑制 E-cadherin 表达；本课题组前期研究也表明，HCV core 能够促进肝癌细胞的 EMT 进程，并下调 E-cadherin 的表达[10]。E-cadherin 作为上皮细胞标志物，其启动子区 E-box 序列是细胞保持上皮特性的关键区域[11]，但 E-cadherin 基因启动子区负性调控关键区域 E-box 突变后，是否能影响 HCV core 对 E-cadherin 的转录抑制作用，未见研究报道。本实验拟采用腺病毒过表达系统以及荧光素酶报告质粒技术，研究 E-box 保守序列在 HCV core 调控 E-cadherin 转录活性中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和病毒 荧光素酶报告质粒 pGL3-Basic以及内参质粒 pRL-TK 为本实验室提供，腺病毒 AdCore、AdGFP 和 DH10B 菌种为本实验室保存。人肝癌细胞系 SMMC-7721（本实验室保存），细胞培养于含 10%胎牛血清、100 U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养基中，于 37 ℃、5% CO_2 条件下常规培养。

1.1.2 主要试剂盒及试剂 DMEM 培养基（C119955 00BT）、胎牛血清（10270-106）购于 Gibco 公司；青链霉素双抗（SV30010）购于 Hyclone 公司，Polybrene（H9268）购于 Sigma 公司；限制性内切酶 *Kpn* Ⅰ（R0142S）和 *Hind* Ⅲ（R0104S）及酶切缓冲液购于 New England Biolabs 公司；*Dpn* Ⅰ 酶（R623A）、T4 DNA 连接酶（M1801）、质粒小量提取试剂盒（A1330）和双荧光素酶活性检测试剂盒（E1910）购于 Promega 公司；DNA marke（3401）、PCR 扩增所需酶 Prime STAR（R044A）及其缓冲液购于 TaKaRa 公司；脂质体 Lipofectamine 2000（11768-019）购于 Invitrogen 公司；琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒（28704）购于 QIAGEN 公司；PCR 纯化试剂盒（11732668001）购于 Roche 公司。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建 以 Huh7 细胞基因组为模板，PCR 扩增 CDH1 启动子序列（引物序列见表 1）。PCR 反应体系：模板 Huh7 细胞基因组 2 μl，5 × PS Buffer 10 μl，dNTP 1.5 μl，DMSO 2.5 μl，Prime STAR 1 μl，上下游引物各 1.5 μl，加水至 50 μl。PCR 反应条件：94 ℃ 4 min；96 ℃ 20 s，60 ℃ 15 s，72 ℃ 15 s，循环 32 次；72 ℃ 5 min。产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后，用琼脂糖凝胶 DNA 回收及 PCR 纯化试剂盒纯化回收产物。将扩增的目的片段以及 pGL3-Basic 载体先后采用 *Kpn* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ限制性内切酶进行酶切，T4 DNA 连接酶在 16 ℃条件下过夜（16 h）连接目的片段与载体，乙醇沉

淀法纯化后，产物经感受态细胞 DH10B 电转，行氨苄青霉素（ampicillin，Amp）抗性筛选。

1.2.2 突变质粒的构建 参照黄媛等的分子克隆方法[12]，以构建的 pGL3-CDH1 质粒为模版，PCR 扩增（突变引物序列见表 1）对 E-cadherin 启动子区的不同 E-box 序列进行单一突变或者联合突变。PCR 反应体系：模板野生型重组质粒 3 μl，5×Buffer 10 μl，dNTP 4 μl，Prime STAR 1 μl，上下游引物各 1 μl，加水至 50 μl。PCR 反应条件：96 ℃ 2 min；92 ℃ 30 s，65 ℃ 30 s，72 ℃ 40 s，循环 30 次；72 ℃ 5 min。产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后，用琼脂糖凝胶 DNA 回收及 PCR 纯化试剂盒纯化产物。然后将第 1 轮 PCR 扩增产物作为第 2 轮扩增引物，PCR 反应体系：模板野生型重组质粒<50 ng，5×PS Buffer 10 μl，dNTP 4 μl，Prime STAR 1 μl，引物 500~1 000 ng，加水至 50 μl。PCR 反应条件：95 ℃ 2 min；95 ℃ 15 s，53 ℃ 15 s，72 ℃ 5 min，循环 18 次；72 ℃ 5 min。PCR 产物经乙醇沉淀法纯化后取 2 μl 经 *Dpn* Ⅰ酶切 2 h，产物经感受态细胞 DH10B 电转，行氨苄青霉素抗性筛选。

1.2.3 双酶切鉴定荧光素酶重组质粒 分别取上述构建好的荧光素酶报告质粒 1 μl、100×BSA 0.1 μl、10×NEB buffer4 1 μl、限制性内切酶 *Hind* Ⅲ和 *Kpn* Ⅰ各 1 μl 与 5.9 μl ddH_2O 混匀后，37 ℃水浴酶切 2 h。酶切产物经 1%琼脂糖凝胶电泳 20 min。

1.2.4 重组质粒的测序鉴定 采用质粒小量提取试剂盒提取双酶切鉴定阳性的重组质粒，送测序验证，测序成功后分别命名为 pGL3-CDH1、pGL3-mut1、pGL3-mut2、pGL3-mut3、pGL3-*mut1*+2、pGL3-*mut1*+3、pGL3-*mut2*+3 和 pGL3-*mut1*+2+3。

1.2.5 细胞转染及病毒感染 SMMC-7721 细胞以 4×10^5 个/ml 密度铺于 60 mm 培养皿中，12 h 后 2 μg pGL3-Basic、pGL3 -CDH1、pGL3 -*mut1*、pGL3 -*mut2*、pGL3 -*mut3*、pGL3 -mut1+2、pGL3-mut1+3、pGL3-mut2+3 和 pGL3-mut1+2+3 质粒，分别与 0.2 μg pRL-TK 内参质粒、7.5 μl 脂质体 2000、250 μl 空 DMEM 培养基（不含血清及抗生素）混匀，室温下放置 15 min，细胞更换空 DMEM 培养基 2.5 ml，然后加入已准备好的混合物，4 h 后更换含血清及抗生素的 DMEM 培养基。8 h 后将细胞以 1×10^5 个/ml 密度铺于 24 孔板中，12 h 后分别将适量 AdCore、AdGFP 腺病毒与 8 μl Poly 混匀后加入细胞培养基。细胞于 37 ℃，5% CO_2 条件下培养。

1.2.6 双荧光素酶活性检测 病毒感染 30 h 后弃去细胞培养液，并用干净的 PBS 轻柔地冲洗细胞两遍。室温下 100 μl 细胞裂解液裂解细胞 30 min，取 30 μl 细胞裂解上清于 1.5 ml 离心管中，加入 30 μl LAR Ⅱ，充分混匀，放入多功能酶标仪中检测，测得数值为虫荧光素酶活性。再加入 30 μl Stop Regent 于该管中，充分混匀，放入多功能酶标仪中检测，测得数值为海肾荧光素酶活性。以虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性的比值表示待测质粒的荧光素酶活性，以对照组和实验组荧光素酶活性差值的绝对值与对照组荧光素酶活性比值表示启动子活性抑制率。每组细胞进行 3 次独立重复实验。

1.3 统计学处理

实验结果采用 Graphpad Prism5 软件作图，SPSS 统计软件进行统计学分析。数据均采用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。两组数据间差异性比较采用独立样本 t 检验，多组数据间差异性比较采用单因素方差分析，总体差异有统计学意义情况下再采用 Dunnett-t 检验进行组间两两比较，检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 野生型及突变型荧光素酶报告质粒的鉴定

荧光素酶报告质粒经 *Hind* Ⅲ和 *Kpn* Ⅰ双酶切鉴定。结果显示：野生型及突变型 CDH1 荧光素酶报告质粒酶切后均可见 224 bp 的 CDH1 启动子区片段（图 1），与理论预期一致。

2.2 CDH1 启动子 E-box 野生型荧光素酶活性检测

野生型荧光素酶报告质粒和 pRL-TK 内参质粒共转染于过表达 HCV core 的 SMMC-7721 细胞，并设置 pGL3-Basic 质粒转染为阴性对照组，50 h 后检测荧光素酶活性。结果显示：在 E-box 野生型（pGL3-CDH1）质粒转染细胞中，较 GFP 组荧光素酶活性（53.549±1.842）相比，Core 组荧光素酶活性（19.311±1.842）明显下降（图 2，t=24.744，P=0.000）。提示 HCV core 对启动子活性具有明显抑制作用。

表 1 CDH1 启动子区扩增引物序列

Tab.1 Primer sequences for CDH1 promoter

质粒	引物
pGL3-CDH1	FWD GTGCCAGAACATTTCTCTATCGATAGGTACCAGACCCTAGCAACTCCAGGCTAGAG
	REV CTCTAGCCTGGAGTTGCTAGGGTCTGGTACCTATCGATAGAGAAATGTTCTGGCAC
pGL3-*mut1*	FWD GTCCGCGCTGCTGATTGGCTGTGGCCGGAAGGTAAACCCTCAGCCAATCAGCGGTACG
	REV GGAA ACGAACACCA CGGTAGGCTG CGAAATGC
pGL3-mut2	FWD CGGTACGGGGGGCGGTGCCTCCGGGGCTAACCTAGCTGCAGCCACGCACCCCCTCTCAG
	REV GGAA ACGAACACCA CGGTAGGCTG CGAAATGC
pGL3-mut3	FWD CACCCCCTCTCAGTGGCGTCGGAACCTAGCAGAACCTATAGCTTAAGCTTGGCATTCCGG
	REV GGAA ACGAACACCA CGGTAGGCTG CGAAATGC

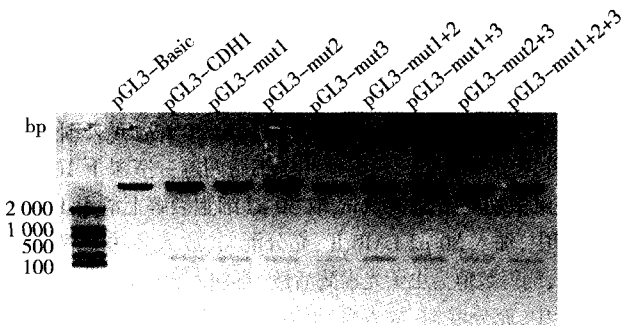


图 1　限制性内切酶 *Hind* Ⅲ、*Kpn* Ⅰ 酶切荧光素酶报告质粒

Fig.1　Identification of Luciferase report plasmid by *Hind* Ⅲ and *Kpn* Ⅰ digestion

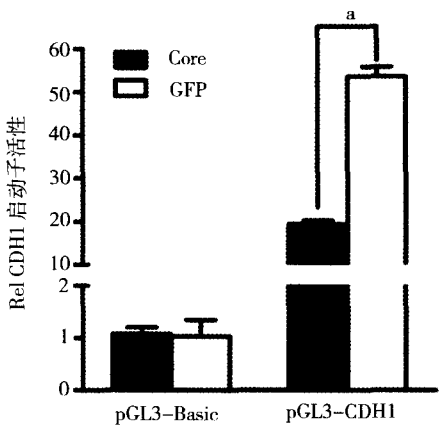


图 2　7721 细胞中 E-box 野生型 CDH1 启动子活性（$\bar{x} \pm s$，n=3）

Fig.2　Activity of pGL3-CDH1 in SMMC-7721 cells（$\bar{x} \pm s$，n=3）

2.3　CDH1 启动子 E-box 突变型荧光素酶活性检测

将 E-box 单一突变型荧光素酶报告质粒和 pRL-TK 内参质粒共转染于过表达 HCV core 的 SMMC-7721 细胞，并设置 pGL3-Basic 质粒转染为阴性对照组，50 h 后检测荧光素酶活性。结果显示：在含单一 E-box 突变位点的 CDH1 启动子报告质粒转染细胞中，HCV core 对 CDH1 启动子活性的抑制作用均有明显减弱。单因素方差分析提示 4 个组之间抑制率存在统计学差异（F=20.642，P=0.000）（表 2）。进一步的 Dunnett-t 两两比较表明，与野生型的 pGL3-CDH1 相比较，抑制率分别下降了 19.05%（P=0.000，mut1），11.69%（P=0.004，mut2）和 5.10%（P=0.191，mut3）。上述实验结果提示质粒转染细胞，HCV core 对 CDH1 启动子活性的抑制有不同程度减弱，说明 E-box 是调控 E-cadherin 转录活性的关键位点，并且 E-box1 和 E-box3 作用更为明显。

在此基础上，将 E-box 联合突变型荧光素酶报告质粒和 pRL-TK 内参质粒共转染于过表达 HCV core 的 SMMC-7721 细胞，并设置 pGL3-Basic 质粒转染为阴性对照组，50 h 后检测荧光素酶活性。单因素方差分析提示 5 个组之间抑制率存在统计学差异（F=60.490，P=0.000）（表 3）。进一步的 Dunnett-t 两两比较表明，与野生型 pGL3-CDH1 相比较，E-box 联合突变质粒转染细胞中，HCV core 对 CDH1 的抑制作用有大幅下降（mut1+2：P=0.000；mut1+3：P=0.000；mut2+3：P=0.000；mut1+2+3：P=0.000，表 3），提示 E-box1、3、4 对于 HCV Core 抑制 CDH1 启动子活性具有重要的调控作用，启动子区不同位点的 E-box 之间也具有协调作用。

表 2　E-box 野生型与突变型 CDH1 启动子活性抑制率比较

Tab.2　Comparsion of activity of differently CDH1 mutants' inhibition ratio

组别	启动子活性抑制率
pGL3-CDH1	0.638 5 ± 0.024 8
pGL3-mut1	0.448 0 ± 0.021 3
pGL3-mut2	0.515 6 ± 0.020 7
pGL3-mut3	0.587 5 ± 0.034 5
F 值	20.642
P 值	0.000

表 3　E-box 野生型与联合突变型 CDH1 启动子活性抑制率比较

Tab.3　Comparision of activity of differently CDH1 mutants' inhibition ratio

组别	启动子活性抑制率
pGL3-CDH1	0.638 5 ± 0.024 8
pGL3-mut1+2	0.050 7 ± 0.047 4
pGL3-mut1+3	0.064 3 ± 0.041 6
pGL3-mut2+3	0.059 6 ± 0.042 3
pGL3-mut1+2+3	0.054 4 ± 0.069 2
F 值	60.490
P 值	0.000

3　讨　论

HCV 感染是导致原发性肝癌发生的重要危险因素。HCV 通过病毒-宿主细胞相互作用影响细胞重要的信号通路，促使肝细胞发生恶性转化。在HCV 体外复制的细胞模型（HCV JFH1 转染的 Huh7.5.1 细胞）、HCV 转基因小鼠以及人-鼠嵌合 HCV 感染模型（Alb-uPA 等小鼠）中，相继证实了 HCV 编码蛋白特别是 HCV core、NS5A、NS3 等具有直接的致癌效应[13]。其中 HCV core 还可以通过激活 PI3K、NFκB、Wnt/β-catenin、TGF-β 信号通路，反式调控 AP-1、TGF-α、P53 等转录因子，促进细胞增殖，诱导细胞异常分化，参与肝细胞恶性转变进程[14]。因此核心蛋白是一种重要的宿主细胞调节因子，通过影响细胞重要的信号传导通路、干扰细胞正常的代谢和增殖，参与 HCV 相关疾病的发生和发展。最近，Akkari[15]和 Benzoubir[16]等发现 HCV core 和 NS5A 通过激活或者协同 TGF-β 信号通路，降低 E-cadherin 表达，诱导 EMT 进程。E-cadherin 表达下调或缺失

被视为 EMT 发生的重要标志，可能是导致肝癌转移的重要机制。但 HCV core 能否直接调控 E-cadherin 表达，参与 HCV 相关肝癌的发生和转移？上述分子机制仍然未完全阐明。

课题组前期研究发现，过表达 HCV 核心蛋白能够明显促进肝癌细胞和肝前体细胞的 EMT 进程，同时 E-cadherin 的表达明显下调；外源表达 E-cadherin 可以部分逆转 core 诱导的 EMT。在前期研究基础上，本研究以 E-cadherin 基因为研究对象，通过荧光素酶活性检测证实 HCV core 能明显抑制 E-cadherin 基因转录活性，与前期研究发现 HCV core 能下调 E-cadherin 的表达并促进细胞 EMT 进程的结论相互印证[10]。此外，本研究发现 E-cadherin 基因启动子区 E-box 共识别序列 5'-CANNTG-3'点突变后，HCV core 对该基因的抑制作用发生了不同程度的减弱，提示 HCV core 对 E-cadherin 表达抑制作用与 E-box 区密切相关。

虽然本实验证实 HCV core 能抑制 E-cadherin 转录，突变 E-box 序列后，其抑制作用明显减弱，但具体机制不明。E-cadherin 基因启动子区的 E-box 序列包含 4 个高度保守的同源序列 E-box1、E-box2、E-box3 和 E-box4，在黑猩猩及人的基因组中只包含 E-box1、E-box3 和 E-box4[11]。研究表明，肝癌组织中 E-cadherin 的表达与 Snail 负相关，转录因子 Snail 通过募集 mSin3A/HDAC 至 CDH1 启动子区与 E-box 结合，负性调控 E-cadherin 的表达[17]，进而促进正常上皮细胞发生 EMT，而拮抗肿瘤细胞 Snail 的表达可逆转 EMT 表型、降低肿瘤转移潜能[18]。那么，HCV core 对 E-cadherin 的转录抑制作用是否与 Snail 有关还有待进一步研究。

综上所述，本实验成功构建了 CDH1 启动子区荧光素酶报告质粒，初步观察了单一或联合 E-box 突变对 HCV core 抑制 CDH1 启动子活性的调控作用，发现 E-box1 和 E-box3 对 E-cadherin 的转录调控起关键作用，并且 E-box1、E-box3、E-box4 之间具有协同作用。本实验为深入研究 HCV 感染，特别是 HCV core 下调 E-cadherin 的表达、促进 EMT 发生和参与 HCV 相关肝癌的发生等，提供了新的实验证据。

参 考 文 献

[1] Lombaerts M, van Wezel T, Philippo K, et al. E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines [J]. Br J Cancer, 2006, 94(5): 661-671.

[2] Flores A, Marrero JA. Emerging trends in hepatocellular carcinoma: focus on diagnosis and therapeutics[J]. Clin Med Insights Oncol, 2014 (8): 71-76.

[3] Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V, et al. Assembly of infectious hepatitis C virus particles[J]. Trends Microbiol, 2011, 19(2): 95-103.

[4] Ahmad J, Eng FJ, Branch AD. HCV and HCC: clinical update and a review of HCC-associated viral mutations in the core gene[J]. Semin Liver Dis, 2011, 31(4): 347-355.

[5] Gall TM and Frampton AE. Gene of the month: E-cadherin (CDH1)[J]. J Clin Pathol, 2013, 66(11): 928-932.

[6] Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer[J]. Cancer Metastasis Rev, 2009, 28(1-2): 151-166.

[7] Kaur G, Carnelio S, Rao N, et al. Expression of E-cadherin in primary oral squamous cell carcinoma and metastatic lymph nodes: an immunohistochemical study[J]. Indian J Dent Res, 2009, 20(1): 71-76.

[8] Park J and Jang KL. Hepatitis C virus represses E-cadherin expression via DNA methylation to induce epithelial to mesenchymal transition in human hepatocytrs[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 446(2): 561-567.

[9] Ripoli M, Barbano R, Balsamo T, et al. Hypermethylated levels of E-cadherin promoter in Huh-7 cells expressing the HCV core protein [J]. Virus Res, 2011, 160(1-2): 74-81.

[10] Quan H, Zhou F, Nie D, et al. Hepatitis C virus core protein epigenetically silences SFRP1 and enhances HCC aggressiveness by inducing epithelial-mesenchymal transition[J]. Oncogene, 2014, 33(22): 2826-2835.

[11] Giroldi LA, Bringuier PP, de Weijert M, et al. Role of E Boxes in the Repression of E-Cadherin Expression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 241(2): 453-458.

[12] 黄 媛，陶 颖，张文露，等. 一种新的 DNA 分子克隆方法[J]. 中国科学：生命科学，2011，16(9)：722-729.

[13] Shlomai A, de Jong YP, Rice CM. Virus associated malignancies: the role of viral hepatitis in hepatocellular carcinoma[J]. Semin Cancer Biol, 2014(26): 78-88.

[14] Tellinghuisen TL, Rice CM. Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors[J]. Curr Opin Microbiol, 2002, 5(4): 419-427.

[15] Akkari L, Grégoire D, Floc'h N, et al. Hepatitis C viral protein NS5A induces EMT and participates in oncogenic transformation of primary hepatocyte precursors[J]. J Hepatol, 2012, 57(5): 1021-1028.

[16] Benzoubir N, Lejamtel C, Battaglia S, et al. HCV core-mediated activation of latent TGF-β via thrombospondin drives the crosstalk between hepatocytes and stromal environment[J]. J Hepatol, 2013, 59(6): 1160-1168.

[17] Ropero S and Esteller M. The role of histone deacetylases(HDACs) in human cancer[J]. Mol Oncol, 2007, 1(1): 19-25.

[18] 张阿丽，王全胜，钟亚华，等. 转录因子 Snail 调控上皮-间质转型及对肿瘤转移的逆转作用[J]. 癌症，2005，24(11)：1301-1305.

（责任编辑：冉明会）