

# 乙型肝炎病毒e抗原肝细胞结合蛋白新基因E-36基因表达谱芯片分析

陆荫英, 刘 妍, 成 军, 梁耀东, 陈天艳, 邵 清, 王 琳, 张玲霞

陆荫英, 刘妍, 成军, 梁耀东, 陈天艳, 邵清, 王琳, 张玲霞, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

陆荫英, 女, 1973-08-27生, 贵州贵阳人, 汉族, 博士, 2003年军医进修学院毕业, 主治医师。主要从事肝病的基础研究及临床工作。

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室。cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-06-25 接受日期: 2003-07-16

## Screening and identification of genes trans-regulated by a novel HBeAg binding protein E-36 with cDNA microarray assay

Yin-Ying Lu, Yan Liu, Jun Cheng, Yao-Dong Ling, Tian-Yan Chen, Qing Shao, Lin Wang, Ling-Xia Zhang

Yin-Ying Lu, Yan Liu, Jun Cheng, Yao-Dong Ling, Tian-Yan Chen, Qing Shao, Lin Wang, Ling-Xia Zhang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China  
Supported by Grants from National Natural Science Foundation of China, No. C030114020, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA, No. 98H038

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2003-06-25 Accepted: 2003-07-16

## Abstract

**AIM:** To investigate the biological functions of a novel hepatitis B virus e antigen (HBeAg) binding protein E-36, and to screen genes regulated by E-36.

**METHODS:** The E-36 coding DNA fragment was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique from HepG2 cell. The expressive vector of pcDNA 3.1-E-36 was constructed by routine molecular biological methods. The HepG2 cells were transfected by pcDNA3.1(-) and pcDNA3.1-E-36, respectively by using lipofectamine. The total RNA was isolated and reverse transcribed. The cDNAs were subjected to microarray screening with 1 152 cDNA probes.

**RESULTS:** The expressive vector was constructed and confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing analysis. High quality mRNA and cDNA of transfected HepG2 cells were prepared and successful microarray screening conducted. From the scanning results, 20 genes were found to be up-regulated, including PTH-responsive

osteosarcoma B1 protein, slit homolog 2, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1, interleukin 3 receptor, caspase 2, angiotensin I converting enzyme, Low density lipoprotein 1, interleukin 6, T-cell receptor rearranged beta chain gene V-region, activator of NFκB, tumor suppressing subtransferable candidate 1, cyclin-dependent kinase-like 2, sialyltransferase 8, glutamate receptor, metabotropic 7, and 5 novel genes. Expression of the gene of eukaryotic translation elongation factor 2 could be down-regulated by E-36 protein.

**CONCLUSION:** The expression of E-36 protein affects the expression spectrum of HepG2 cell. The microarray is an important technique for the study of transactivating effects for viral proteins.

Lu YY, Liu Y, Cheng J, Ling YD, Chen TY, Shao Q, Wang L, Zhang LX. Screening and identification of genes trans-regulated by a novel HBeAg binding protein E-36 with cDNA microarray assay. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(1):66-69

## 摘要

**目的:** 为了研究未知功能的HBeAg结合蛋白E-36的生物学功能, 我们应用基因芯片技术对于pcDNA3.1(-)和pcDNA3.1(-)-E-36分别转染的HepG2细胞的基因表达谱进行分析, 筛选能被E-36反式调节的靶基因。

**方法:** 应用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术从HepG2细胞中扩增E-36蛋白编码基因片段, 以常规的分子生物学技术构建表达载体pcDNA3.1(-)-E-36。以脂质体技术转染肝母细胞瘤细胞系HepG2, 提取总mRNA, 逆转录为cDNA, 与转染空白表达载体pcDNA3.1(-)的HepG2细胞进行DNA芯片分析并比较。

**结果:** 构建的表达载体经过限制性内切酶分析和DNA序列测定鉴定正确。提取转染细胞的总mRNA并进行逆转录成为cDNA, 进行DNA芯片技术分析。在1 159个基因表达谱的筛选中, 发现有20个基因表达水平显著上调, 包括甲状腺激素应答的骨肉瘤B1蛋白、SLIT2、核因子κB、白介素受体3、白介素6、血管紧张素I转换酶、急性髓细胞性白血病1b、caspase 2、低密度脂蛋白1、T细胞受体重组β链、肿瘤坏死因子受体、肿瘤抑制亚转化因子、细胞周期相关激酶-2、亲代谢性谷氨酸盐受体-7、唾液酸转移酶-8及5个未知蛋白; 真核细胞翻译延伸因子2基因的表达水平显著下调。

**结论:** E-36基因的表达对于肝细胞基因表达谱有显著影响。

DNA芯片技术是分析反式激活靶基因的有效技术途径。

陆荫英, 刘妍, 成军, 梁耀东, 陈天艳, 邵清, 王琳, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 e 抗原肝细胞结合蛋白新基因 E-36 基因表达谱芯片分析. 世界华人消化杂志 2004;12(1):66-69

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/66.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)是由 HBV DNA 前 C 区编码的一种非颗粒性的分泌蛋白, 临床上将其作为判断 HBV 活动性复制的指标之一<sup>[1, 2]</sup>, 现普遍认为他是一种免疫耐受因子, 调节乙型肝炎的免疫发病机制<sup>[3, 4]</sup>. 但 HBeAg 与肝细胞之间是通过那些环节发生作用、如何作用以及作用后产生何种效应, 在此方面的研究较少且没有明确的结果, 因此寻找 HBeAg 与肝细胞间的相互作用蛋白, 并进一步明确其间的作用机制、作用效应, 可望能发现有价值的 HBV 感染防治途径. 前一阶段我们用酵母双杂交技术筛选出了一个未知功能的 HBeAg 结合蛋白基因 E-36, 并进一步用体外免疫共沉淀技术进行再次验证<sup>[5-13]</sup>, 为研究其具体生物学功能, 用基因表达谱芯片技术筛选能被 E-36 反式调节的蛋白基因, 为全面深入了解 E-36 的功能及其在 HBV 致肝细胞损伤中的作用研究铺垫了道路.

## 1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态大肠杆菌 JM109(本室保存), pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen); Lipofectamine PLUS 转染试剂(Gibco), mRNA Purification 试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech), PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50×PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒(Clontech), High Pure PCR Product Purification 试剂盒(Boehringer Mannheim), T7、SP6 通用引物及 pGEM-Teasy 载体(Promega), Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、EcoR I、BamH I 和 Pst I 等限制性内切酶购于 Takara 生物公司, 新基因 E-36 扩增引物(P3 5' - GAATTCATGTCCTATCCAGCCCTTCACCAG - 3', P4 5' - GGATCCTCAGCAGCAGGCGGAAA CGCT CGTC - 3')由合成及 DNA 测序由上海博亚公司承担.

### 1.2 方法

1.2.1 真核表达载体及细胞转染 E-36 蛋白真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-E-36 由本室构建. 用 Lipofectamine PLUS 转染试剂将 2 μg pcDNA3.1(-)-E-36 及 pcDNA3.1(-)空载体分别转染 35 mm 平皿 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞.

1.2.2 细胞 mRNA 提取 使用 mRNA Purification 试剂盒, 直接提取转染了 E-36 表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA, 经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性定量分析.

1.2.3 探针标记 逆转录标记 cDNA 探针并纯化. Cy3-dUTP 标记对照组细胞 mRNA (5 μg), Cy5-dUTP 标记实

验组细胞 mRNA(5 μg). 乙醇沉淀后溶解在 20 μL 5×SSC+2g/L SDS 杂交液中.

1.2.4 芯片制备 包含的 1 152 个 cDNA 由上海联合基因有限公司提供, 包括原癌基因和抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等. 以通用引物进行 PCR 扩增, PCR 产物长度为 1 000-3 000 bp. 靶基因以 0.5 μg/μL 溶解于 3 × SSC 溶液中, 用 Cartesian 公司的 Cartesian 7 500 点样仪及 TeleChem 公司的硅烷化玻片进行点样. 玻片经水合(2 h)、室温干燥(30 min), 紫外线(uv)交联, 再分别用 2 g/L SDS、水及 2 g/L 的硼氢化钠溶液处理 10 min, 晾干备用.

1.2.5 杂交及洗涤 将基因芯片和杂交探针在 95 °C 水浴变性 5 min, 将混合探针加在基因芯片上, 置于 60 °C 杂交 15-17 h. 依次以 2 × SSC+ 2g/L SDS、0.1 × SSC+2 g/L SDS、0.1 × SSC 洗涤 10 min, 室温晾干.

1.2.6 检测与分析 用 General Scanning 公司的 ScanArray 3 000 扫描芯片. 用预先选定的内参照基因(24 条管家基因, 每个基因点 2 个点, 共 48 个点)对 Cy3 和 Cy5 的原始提取信号进行均衡和修正. 用 ImaGene 3.0 软件分析 Cy3、Cy5 两种荧光信号的强度, 计算 Cy5/Cy3 比值. 阳性结果判断: Cy5/Cy3>2.0, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3<0.5, 为绿色荧光, 显示表达减弱.

## 2 结果

2.1 E-36 蛋白的表达载体构建 E-36 蛋白真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-E-36 构建成功, 经相应的限制性内切酶消化鉴定正确.

表 1 E-36 蛋白影响表达上调的基因

差异表达基因	GenBank Number
甲状旁腺激素应答的骨肉瘤 B1 蛋白	014451
SLIT2	004787
核因子 κB	003998
白介素受体 3	000600
白介素 6	032982
血管紧张素 I 转换酶	021804
急性髓细胞性白血病 1b	D43968
caspase 2	002183
低密度脂蛋白 1	004525
T 细胞受体重组 β 链	M11952
肿瘤坏死因子受体	003839
肿瘤抑制亚转化因子	003310
细胞周期相关激酶 -2	003948
亲代谢性谷氨酸盐受体 -7	000844
唾液酸转移酶 -8	003034
未知蛋白	BG171632
未知蛋白	007211
未知蛋白	AK025638
未知蛋白	AB020676
未知蛋白	014887

2.2 总 RNA 及 mRNA 的定性、定量分析 总 RNA 的吸光度  $A_{260}/A_{280} > 1.89$ , 热稳定实验  $70^{\circ}\text{C}$  保温 1 h 与  $-20^{\circ}\text{C}$  1 h 电泳条带比较, 显示 28 S 条带无明显降解, 电泳结果证实已抽提高纯度的总 RNA. mRNA 主要集中于 0.9-4.0 kb 的连续条带.

2.3 E-36 蛋白调节的基因表达 在基因芯片的扫描分析中, 如果荧光染料的 Cy5/Cy3 比值在 2.000 以上, 就判断为 E-36 蛋白的上调基因. 在本研究中发现有 20 种基因的表达水平上调(表 1), 1 种真核细胞翻译延伸因子 2 基因表达下调.

### 3 讨论

普遍认为 HBeAg 一种免疫调节因子, 可调节宿主的免疫应答, 与 HBV 感染形成的免疫耐受有关. 当 HBeAg 发生突变时, 失去血清中 HBeAg 的调节, 可导致病情加重; 血中抗-HBe 长期阳性的患者, 发生肝硬化、肝癌的几率较高, 原因不清, 是研究有效防治乙型肝炎病毒(HBV)感染的难点之一<sup>[14-18]</sup>. 前一阶段通过酵母双杂交技术和体外免疫共沉淀技术, 我们发现并验证了肝细胞中与 HBeAg 有相互作用未知蛋白 E-36, 为深入研究 HBeAg 的生物学功能迈出了可喜的一步. 但是, 对于一个新蛋白来说, 由于人们以往对其没有认识, 需要对他的表达调控、翻译后修饰、生物学功能以及相互作用等方面进行研究, 这是一项艰巨而有挑战性的工作, 有望对 HBV 感染的诊断、预后及疗效判断等提出新的参考<sup>[19-21]</sup>.

我们用基因表达谱芯片对新蛋白 E-36 作了初步的研究, 构建 pcDNA3.1(-)-E-36 真核表达载体, 将空载体作为对照共同转染 HepG2 细胞, 发现 E-36 的表达可使 HepG2 细胞中 20 种基因的表达水平上调, 1 种真核细胞翻译延伸因子 2 基因表达下调. 在上调中有肿瘤相关基因如急性髓细胞性白血病 1b、肿瘤抑制亚转化因子、甲状旁腺激素应答的骨肉瘤 B1 蛋白等; 有细胞信号转导、细胞凋亡相关的基因如细胞周期相关激酶-2、caspase 2、核因子  $\kappa\text{B}$  及一些酶.

其中 SLIT2 是一种分泌型的富含亮氨酸重复区的蛋白质, 有明确的肿瘤抑制作用, SLIT2 转染 COS-7 细胞的培养液能延缓细胞的生长和诱导 SW48 结肠癌细胞凋亡, SLIT2 的过表达可以抑制 70% 的体外培养乳腺癌细胞的集落化生长, 在发生肺癌及乳腺癌时, 由于其启动子的甲基化或等位基因的丢失而导致其失活<sup>[22-25]</sup>. 转录因子 NF- $\kappa\text{B}$  在缺乏引导信号时主要存在于细胞质中, 受一些炎性因子如肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素 1(IL-1)等的刺激细胞后发生降解、抑制, 使 NF- $\kappa\text{B}$  能够在胞核内沉积, 从而调节一些特殊基因的表达<sup>[26, 27]</sup>. 唾液酸转移酶-8 是糖基转移酶家族中的成员, 存在于高尔基体中, 具有催化细胞黏附分子-神经节苷酯聚唾液酸化的功能, 神经节苷酯是一类膜结合的含唾液酸的鞘糖脂, 是细胞黏附和体外培养恶性细胞生长的

重要因子. 白介素 3 受体  $\alpha$  链有促进髓样分化的作用, 在急性髓样白血病患者中的高表达可导致白血病细胞的爆发增生, 缩短完全缓解期及存活期, 使病情恶化<sup>[28, 29]</sup>. E-36 能上调这些基因的表达, 说明 E-36 可能在介导 HBeAg 参与肿瘤的发生过程中起作用.

半胱氨酸蛋白酶(caspases-2)是细胞死亡基因(CED-3)/白介素 1 $\beta$  转化酶蛋白酶(interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE) protease)家族中的一员, 定位于细胞核中, 是细胞凋亡早期过程中一个非常重要的蛋白酶, 被细胞因子激活后产生分解细胞的作用, 导致细胞凋亡. caspases-2 还是线粒体渗透必需的酶, 各种细胞因子通过不同途径活化 caspases, 或通过聚合形成受体复合物直接激活 caspases, 引起线粒体渗透扩大而不是起始 caspases 的活化来加速细胞分解<sup>[30, 31]</sup>. 亲代谢性谷氨酸盐受体-7(metabotropic glutamate receptor), 是 G 蛋白耦合受体家族 III, 与环磷腺苷(cAMP)级联途径的抑制有关, 谷氨酸盐在中枢神经系统中是一类主要的兴奋性神经递质, 他可激活亲离子性和亲代谢性谷氨酸盐受体. E-36 能上调这些基因的表达, 提示其可能参与细胞信号转导途径.

随着后基因组时代的到来, 越来越多的未知功能蛋白质被发现, 对新蛋白的生物学功能、与其他蛋白质间的相互作用以及他们在疾病发生、发展、转化过程中的变化规律的研究成为今天生命科学最重要的热点之一, 同时由于新技术的不断创新, 使一系列的研究成为可能. 我们应用基因表达谱芯片技术对 E-36 新基因的功能进行了初步的研究, 并获得一些有价值的结果, 为下一步的深入研究奠定了基础<sup>[32, 33]</sup>.

### 4 参考文献

- 1 Milich DR, Chen MK, Hughes JL, Jones JE. The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence. *J Immunol* 1998;160:2013-2021
- 2 Chu CM, Liaw YF. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: an immunopathological study. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:218-222
- 3 Ou JH. Molecular biology of hepatitis B virus e antigen. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:178-187
- 4 Barth H, Klein R, Berg PA, Wiedenmann B, Hopf U, Berg T. Induction of T helper cell type 1 response and elimination of HBeAg during treatment with IL-12 in a patient with therapy-refractory chronic hepatitis B. *Hepatogastroenterology* 2001;48:553-555
- 5 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆 HCV 核心蛋白结合蛋白基因 1. *世界华人消化杂志* 2001;9:1379-1383
- 6 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 基因酵母表达载体的构建及表达. *世界华人消化杂志* 2002;10:15-18
- 7 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 李莉, 刘妍, 段惠娟. 丙型肝炎病毒 NS2 基因酵母双杂交“饵”载体构建及表达. *世界华人消化杂志* 2002;10:129-132
- 8 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 钟彦伟, 段惠娟, 洪源. 筛选与克隆肝再生增强因子结合蛋白的基因. *世界华人消化杂志* 2002;10:161-164

- 9 陆荫英, 李克, 刘妍, 王琳, 成军, 张玲霞. 乙型及丙型肝炎病毒受体的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:211-213
- 10 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 陈天艳, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟. 酵母双杂交技术筛选 Hcbp6 结合的肝细胞蛋白编码基因. *世界华人消化杂志* 2003;11:385-388
- 11 马守东, 洪源, 成军. 酵母单杂交技术的原理及应用. *世界华人消化杂志* 2003;11:450-451
- 12 陆荫英, 王琳, 成军, 李克, 刘妍, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选 HBcAg 肝细胞结合蛋白基因. *世界华人消化杂志* 2003;11:426-429
- 13 陆荫英, 王琳, 李克, 刘妍, 成军, 张玲霞. HBcAg 肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆. *世界华人消化杂志* 2003;11:422-425
- 14 Lau GK, Nanji A, Hou J, Fong DY, Au WS, Yuen ST, Lin M, Kung HF, Lam SK. Thymosin- $\alpha$ 1 and famciclovir combination therapy activates T-cell response in patients with chronic hepatitis B virus infection in immune-tolerant phase. *J Viral Hepat* 2002;9:280-287
- 15 Merkle H, Deutschle T, Gastrock-Balitsch I, Nusser P, Knehr S, Reifenberg K. H-2(d) mice born to and reared by HBcAg-transgenic mothers do not develop T cell tolerance toward the hepatitis B virus core gene products. *Virology* 2000;273:149-159
- 16 Milich DR. Do T cells "see" the hepatitis B core and e antigens differently? *Gastroenterology* 1999;116:765-768
- 17 Diepolder HM, Ries G, Jung MC, Schlicht HJ, Gerlach JT, Grner N, Caselmann WH, Pape GR. Differential antigen-processing pathways of the hepatitis B virus e and core proteins. *Gastroenterology* 1999;116:650-657
- 18 Papatheodoridis GV, Hadziyannis SJ. Diagnosis and management of pre-core mutant chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2001;8:311-321
- 19 成军, 李克, 陆荫英, 王琳, 刘妍. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因和蛋白的生物信息学分析. *世界华人消化杂志* 2003;11:378-384
- 20 Zhen Z. Progress in proteomics. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2001;17:491-493
- 21 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 生物信息学技术与新基因的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:474-477
- 22 Dallol A, Morton D, Maher ER, Latif F. SLIT2 axon guidance molecule is frequently inactivated in colorectal cancer and suppresses growth of colorectal carcinoma cells. *Cancer Res* 2003;63:1054-1058
- 23 Dallol A, Da Silva NF, Viacava P, Minna JD, Bieche I, Maher ER, Latif F. SLIT2, a human homologue of the *Drosophila* Slit2 gene, has tumor suppressor activity and is frequently inactivated in lung and breast cancers. *Cancer Res* 2002;62:5874-5880
- 24 Wu W, Wong K, Chen J, Jiang Z, Dupuis S, Wu JY, Rao Y. Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature* 1999;400:331-336
- 25 Wang KH, Brose K, Arnott D, Kidd T, Goodman CS, Henzel W, Tessier-Lavigne M. Biochemical purification of a mammalian slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching. *Cell* 1999;96:771-784
- 26 Cogswell PC, Kashatus DF, Keifer JA, Guttridge DC, Reuther JY, Bristow C, Roy S, Nicholson DW, Baldwin AS Jr. NF- $\kappa$ B and I  $\kappa$ B  $\alpha$  are found in the mitochondria. Evidence for regulation of mitochondrial gene expression by NF- $\kappa$ B. *J Biol Chem* 2003;278:2963-2968
- 27 Figueroa YG, Chan AK, Ibrahim R, Tang Y, Burow ME, Alam J, Scandurro AB, Beckman BS. NF- $\kappa$ B plays a key role in hypoxia-inducible factor-1-regulated erythropoietin gene expression. *Exp Hematol* 2002;30:1419-1427
- 28 Testa U, Riccioni R, Militi S, Coccia E, Stellacci E, Samoggia P, Latagliata R, Mariani G, Rossini A, Battistini A, Lo-Coco F, Peschle C. Elevated expression of IL-3R  $\alpha$  in acute myelogenous leukemia is associated with enhanced blast proliferation, increased cellularity, and poor prognosis. *Blood* 2002;100:2980-2988
- 29 Evans CA, Ariffin S, Pierce A, Whetton AD. Identification of primary structural features that define the differential actions of IL-3 and GM-CSF receptors. *Blood* 2002;100:3164-3174
- 30 Lassus P, Opitz-Araya X, Lazebnik Y. Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science* 2002;297:1352-1354
- 31 Robertson JD, Enoksson M, Suomela M, Zhivotovsky B, Orrenius S. Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277:29803-29809
- 32 刘妍, 成军, 李克, 杨倩, 陆荫英, 王琳, 王建军. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析. *世界华人消化杂志* 2003;11:394-398
- 33 刘妍, 成军, 王建军, 杨倩, 陆荫英. 基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用. *世界华人消化杂志* 2003;11:461-463