

B和C基因型HBV核心蛋白促细胞凋亡的比较

温志立, 谭德明, 成军, 杨永峰, 刘国珍, 刘洪波

■背景资料

近几年, HBV的基因型逐渐成为国内外研究热点. 研究内容主要为四个方面: 分型方法的建立、基因型的地理分布、基因型与临床的关系、发病机制的研究.

温志立, 南昌市第一医院消化科 江西省南昌市 330008
谭德明, 刘国珍, 刘洪波, 中南大学湘雅医院传染科 湖南省长沙市 410008
成军, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011
杨永峰, 东南大学南京市第二医院肝病科 江苏省南京市 210003
通讯作者: 温志立, 330008, 江西省南昌市象山北路128号, 南昌市第一医院消化科. wenzhili@126.com
收稿日期: 2006-08-27 接受日期: 2006-09-20

Comparison of effect on hepatocellular apoptosis between core proteins of hepatitis B virus genotype B and C

Zhi-Li Wen, De-Ming Tan, Jun Cheng,
Yong-Feng Yang, Guo-Zhen Liu, Hong-Bo Liu

Zhi-Li Wen, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Nanchang City, Nanchang 330008, Jiangxi Province, China
De-Ming Tan, Guo-Zhen Liu, Hong-Bo Liu, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China
Jun Cheng, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China
Yong-Feng Yang, Department of Liver Disease, the Second Hospital of Dongnan University, Nanjing 210003, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Zhi-Li Wen, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Nanchang City, 128 Xiangshan North Road, Nanchang 330008, Jiangxi Province, China. wenzhili@126.com
Received: 2006-08-27 Accepted: 2006-09-20

Abstract

AIM: To compare the proapoptosis effect of hepatitis B virus (HBV) genotype B and C core proteins on liver cells, and explore the pathogenesis of HBV infection with different genotypes.

METHODS: Four serum samples infected by HBV (2 for type B and C, respectively) were used to amplify HBV core fragment using polymerase chain reaction (PCR). After recombination, cloning, and subcloning, four eucaryotic plasmids with different genotypes and clinical phenotypes were obtained. Then the plasmids were transfected into hepatocellular carcinoma

cell line HepG2, and MTT assay and flow cytometry were used to detect the proliferation and apoptosis of HepG2 cells.

RESULTS: All the four recombinant eucaryotic plasmids were constructed successfully, and HBV core protein expression was confirmed by internal reference for transfection. The proliferation of HepG2 cells was not significantly different between the four plasmids, but the apoptosis rate in C-type (C₂) group was markedly higher than that in B-type (B₁) group ($8.8\% \pm 2.0\%$ vs $6.4\% \pm 0.8\%$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: C-type HBV can induce more severe cell apoptosis than B-genotype HBV.

Key Words: Hepatitis B virus; Genotype; Core protein; Apoptosis

Wen ZL, Tan DM, Cheng J, Yang YF, Liu GZ, Liu HB. Comparison of effect on hepatocellular apoptosis between core proteins of hepatitis B virus genotype B and C. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(33):3228-3232

摘要

目的: 比较B, C两种基因型HBV核心蛋白在促进肝细胞凋亡方面的差异, 以期初步阐述HBV基因型与临床关系的发病机制.

方法: 用PCR扩增4份(B和C基因型各2份)HBV-C区DNA片段, 通过基因重组、分子克隆和亚克隆等方法, 合成4份不同基因型和临床表型的重组真核表达质粒. 鉴定后, 将他们分别转染至肝癌细胞系HepG2中, 采用MTT法和流式细胞仪测定转染细胞的细胞增殖率和细胞凋亡率等指标.

结果: 4份重组真核表达质粒均构建成功, 转染至HepG2后通过内参照EGFP可鉴定出均有HBV-C蛋白表达. 流式细胞仪提示C型/重型HBV转染组的细胞凋亡率显著高于B型/携带HBV转染组($8.8\% \pm 2.0\%$ vs $6.4\% \pm 0.8\%$, $P < 0.05$).

结论: C型HBV核心蛋白较B型HBV更能促进

肝细胞凋亡, HBV基因型与临床相关性可能与此有关。

关键词: 乙型肝炎病毒; 基因型; 核心蛋白; 细胞凋亡

温志立, 谭德明, 成军, 杨永峰, 刘国珍, 刘洪波. B和C基因型HBV核心蛋白促细胞凋亡的比较. 世界华人消化杂志 2006;14(33):3228-3232
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3228.asp>

0 引言

目前研究发现, HBV的基因型与肝炎的临床表现有一定关系. 大量研究表明C型HBV所致肝炎较B型HBV为重^[1-8]. 但其原因不是很清楚, 两者基因序列的差异导致了何种致病机制的改变不得而知, 至今尚未见有关报道. 众所周知, HBV致病的主要机制除诱发宿主自身免疫损伤外, 还可通过促进肝细胞的凋亡来加重乙肝病情变化^[9-13]. 本研究首先从细胞凋亡途径入手, 检测两种基因型HBV的核心蛋白和表面蛋白对细胞凋亡诱导的差异, 然后检测两者在促进体外淋巴细胞免疫反应的差异, 从多个致病因素方面比较两种基因型HBV的差异, 以期找出HBV基因型与临床关系的发病机制.

1 材料和方法

1.1 材料 从GenBank中找出HBV全基因序列 (AY206391), 根据其核心区序列(nt1816-2454)设计引物, 能扩增出全长HBV-C序列. 在两条引物前面分别设计EcoR I和Kpn I酶切位点, 并在上游引物PC1的EcoR I酶切位点与引物中编码序列之间加入一个A碱基, 以便HBV-C在载体pEGFP-C1表达绿色荧光融合蛋白时不出现移位. 引物经计算机分析软件Primer Premier 5.0检测自身不形成“发夹”结构或引物间不形成引物二聚体. 引物由大连宝生物公司合成, 预计扩增片段长度为639 bp. 上游引物(PC1): 5'-GAATTCATGCAACTTTT TCACCTCTG-3', 下游引物(PC2): 5'-GGTACCCTAACATTGAGGCTCCCG-3'. DNA提纯试剂盒(上海申友生物公司); Taq DNA聚合酶、dNTP(日本TaKaRa公司); PCR产物的凝胶纯化回收试剂盒和小量质粒提纯试剂盒均为日本TaKaRa公司产品; 大肠杆菌JM109; Amp(+) LB培养基和Amp(+)培养平板中氨苄青霉素(华北制药厂)浓度均为100 mg/L, Kan(+) LB培养基Kan(+)培养平板中卡那霉素(Sigma)浓度均为50 mg/L; 限制性内切酶EcoR

I和Kpn I(日本TaKaRa公司); T4 DNA连接酶(MBI); T-载体pMD18-T Vector为日本TaKaRa公司产品, 长2692 bp, 含有1个多克隆位点, 还包括抗氨苄青霉素和LacZ基因; 真核表达质粒pEGFP-C1(Gibco)全长4731 bp, 含有CMV, SV40启动子、1个多克隆位点(包括EcoR I和Kpn I)及抗卡那霉素(Kan)基因, 并含有EGFP基因(798 bp), EGFP基因能表达融合绿色荧光蛋白, 故pEGFP-C1可作为转染内参照. EPS-300型稳压稳流电泳仪和GIS凝胶电脑全自动图像处理仪为上海天能科技有限公司产品; DNA全自动测序仪ABI377型(美国PE公司); 紫外分光光度仪(美国Beckman公司产品); IX70倒置显微镜、IX70荧光显微镜为日本Olympus公司产品; 一次性细胞培养板(北京鼎国公司); 试剂瓶、培养瓶、吸管、试管、盖玻片等玻璃制品均在浓硫酸中浸泡过夜, 充分洗涤后高压灭菌; DG-3022A型酶标仪(华东电子管厂); 流式细胞仪(FACS420).

1.2 方法

1.2.1 扩增目的片段 将血清样品按患者病情轻重程度分成慢性乙肝无症状携带、慢性乙型肝炎轻度、慢性乙型肝炎中度、慢性乙型肝炎重度和慢性乙肝慢性乙肝重型五组, 各取若干份采用多对型特异性引物巢式PCR法^[14]鉴定HBV基因型. 选取慢性乙肝无症状携带(B基因型)、慢性乙肝重型(B基因型)、慢性乙肝轻度(C基因型)、慢性乙肝重型(C基因型)的患者血清各1例, 分别编号为B1, B2, C1和C2. 用DNA提取试剂盒提取HBV DNA, 以其为模板进行PCR扩增, 加样如下: PC1(50 pmol) 1 μL, PC2(50 pmol) 1 μL, 5 MU/L Taq酶0.25 μL, 10×PCR Buffer(含Mg²⁺) 5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 4 μL, 灭菌DDW 37 μL, DNA模板2 μL, 总量50 μL. 反应条件如下: 95℃预变性5 min, 然后按94℃ 1 min, 58℃ 1 min, 72℃ 1 min扩增35个循环, 再72℃延伸7 min. PCR产物的回收与纯化按琼脂糖凝胶DNA纯化试剂盒说明进行操作.

1.2.2 重组T载体的构建 包括制备感受态细菌、目的片段与T载体连接、转化细菌、阳性克隆的筛选、提取质粒和酶切鉴定阳性克隆等步骤, 按文献[15]进行.

1.2.3 重组真核表达质粒的构建、鉴定及转染 包括真核表达质粒的提取及鉴定、制备含有相同酶切位点黏性末端的目的片段和开环状真核表达质粒、连接目的片段和开环真核表达质粒

■研究前沿

随着全基因分析或S基因测序法、聚合酶链反应(PCR)法、聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)法、微板核酸杂交ELISA法等方法相继建立和完善, 各种基因型地理分布情况的基本弄清, 如A型主要在北欧和非洲, B型和C型主要在东亚, D型在中东、北非和南欧, E型在非洲, F型仅在南美, 研究重点已转移到基因型与临床关系方面. 例如西方学者发现D型对HBV-DNA、HBsAg、HBeAg的清除率均比A型低, 死亡率较A型高. 而在流行B、C型的东亚地区, 日本、台湾、香港以及中国大陆的研究者们经过大量研究发现, C型可引起比B型更严重的临床表现, 如ALT的升高、HBeAg阳性率的增加、重症中所占比例的增大.

■创新盘点

虽然在HBV基因型与临床的关系方面已有大量研究,而且基本上对所有HBV基因型导致病情的程度也基本达成共识,但是大都只停留在流行病学调查后进行统计学分析的水平上,并没有从本质上即HBV感染和发病机制上去阐述其中的缘由。例如为什么C型HBV引起的临床表现要比B型重,他是通过什么途径达到这一效果的?为此,本文就先从细胞凋亡入手研究HBV基因型与临床关系的机制。

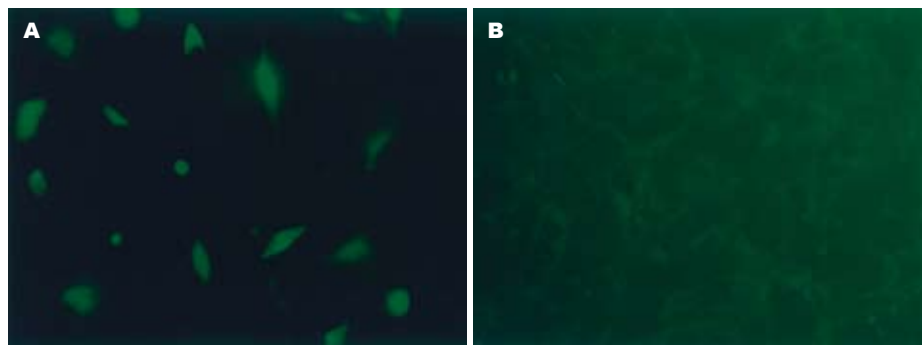


图1 荧光显微镜检测HepG2转染效率。A: 转染重组真核表达质粒的HepG2; B: 未转染pEGFP-C1的HepG2。

pEGFP-C1、细菌转化和克隆筛选、重组真核表达质粒的鉴定等步骤。鉴定完毕后,将重组真核表达质粒转染肝癌细胞HepG2中,按参考文献[16]进行。

1.2.4 荧光显微镜观察绿色荧光蛋白以鉴定转染效率 用2.5 g/L胰蛋白酶消化已转染并培养48 h的细胞,将 2×10^5 个细胞置于放有盖玻片的6孔培养板中继续培养48 h后,取出盖玻片直接在488 nm激发光荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白并摄像。

1.2.5 MTT法检测HBV-C蛋白对HepG2增殖率的影响 分别消化、计数转染4份重组真核质粒和空白质粒的HepG2、以及未转染HepG2共6种细胞,调整细胞浓度为 1×10^8 /L,96孔板中每孔加入200 μ L细胞悬液,置于含50 mL/L CO₂、37℃培养箱中培养;培养48 h后弃去原培养基,按每180 μ L培养基加20 μ L MTT(5 g/L)配置培养基,然后加入96孔板继续培养4 h;4 h后弃去培养基,用0.1 mol/L PBS洗涤细胞5 min \times 1次;每孔加200 μ L DMSO,5 min后于酶标仪上测定490 nm波长各孔光密度值。

1.2.6 流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡情况 分别将4份HBV-C转染HepG2、空白质粒转染HepG2和未转染HepG2细胞传代 2×10^5 个至6孔培养板培养48 h;经2.5 g/L胰蛋白酶消化细胞,室温下1500 r/min离心10 min,0.1 mol/L PBS洗涤细胞1次,用700 mL/L冷乙醇固定细胞于4℃保存。细胞经流式细胞仪检测细胞凋亡率、细胞周期性变化。

统计学处理 利用SPSS 11.0进行统计学分析,计量资料数据用mean \pm SD表示。如分组只有2组,采用独立样本 t 检验分析;如分组多于2组,则用单因素方差分析,首先多组之间进行比较,当 $P < 0.05$ 时采用LSD法进行两两比较;率的比较采用卡方检验进行统计学分析,并以 $P < 0.05$ 确定差异是否具有显著性。

2 结果

2.1 重组T-载体的构建 重组T-载体经EcoR I和Kpn I双酶切3 h后于15 g/L琼脂糖中进行凝胶电泳观察,可见4份样品的环状质粒样条带均被酶切成2条清晰的条带,大小分别为2600 bp和640 bp左右,与预期结果相符,初步认定所需阳性克隆构建成功。

2.2 重组真核表达质粒的鉴定 取8 μ L PCR扩增产物于15 g/L琼脂糖中进行凝胶电泳,85 V稳压泳动20 min后于紫外透视仪观察,在640 bp左右可见清晰浓亮的单一条带,与预期目的片段大小相符,而阴性对照DDW无条带。重组真核表达质粒经EcoR I和Kpn I双酶切3 h后于15 g/L琼脂糖中进行凝胶电泳,可见4份样品的环状质粒样条带均被酶切后得到两条清晰的大小分别约为4700 bp和640 bp的条带。4份样品的基因序列均用通用引物EGFP-C-F和EGFP-C-R进行双向测定。通过与GenBank上pEGFP-C1的序列比较发现,4份样品的测序结果中目的片段以外的基因序列均与pEGFP-C1序列完全吻合,说明重组真核表达质粒构建成功。采用Blastn程序进行基因序列同源性比较,发现4份重组真核质粒目的片段与GenBank中B或C基因型HBV核心区序列的同源性均为97%-98%,与多对型特异性引物巢式PCR的分型结果完全一致。

2.3 荧光显微镜观察绿色荧光蛋白以鉴定转染效率 用镊子将盖玻片从培养板中取出放在载玻片上,然后在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白。结果发现,转染了B1, B2, C1, C2 4份重组真核表达质粒和pEGFP-C1质粒的HepG2均能看到细胞内发出强烈的绿色荧光,而未转染的HepG2没有看到细胞发出荧光(图1)。结果表明,绿色荧光蛋白质粒pEGFP-C1能很好地起到一个转染内参的作用,可鉴定转染成功与否和转染效率。同时证明了此次转染获得成功。

2.4 MTT法检测不同基因型HBV-C蛋白对HepG2

表 1 6份样品的细胞周期和细胞凋亡率的比较(mean \pm SD, $n = 4$, %)

细胞分组	G ₀ /I期	S期	G ₂ /M期	细胞凋亡率
HBV-C转染组				
B1	72.3 \pm 3.0	21.2 \pm 3.8 ^{ac}	6.5 \pm 1.3	6.4 \pm 0.8 ^{ac}
B2	72.6 \pm 2.1	19.8 \pm 1.7 ^a	7.6 \pm 1.6	7.3 \pm 1.6 ^a
C1	75.8 \pm 0.9	17.7 \pm 1.5 ^a	6.5 \pm 1.8	6.8 \pm 1.2 ^a
C2	77.4 \pm 2.2	16.2 \pm 1.6 ^a	6.4 \pm 1.7	8.8 \pm 2.0 ^a
空白质粒转染组	74.9 \pm 2.5	15.2 \pm 1.1	9.9 \pm 1.0	4.3 \pm 1.4
未转染细胞组	80.5 \pm 3.6	14.2 \pm 3.6	5.3 \pm 0.9	3.8 \pm 1.4

^a $P < 0.05$ vs 空白质粒转染组、未转染组; ^c $P < 0.05$ vs C2.

细胞增殖率的影响 用MTT法检测了HBV-C转染组、空白质粒(pEGFP-C1)转染组和未转染细胞组共6组细胞的增殖率, 结果显示HBV-C转染组HepG2细胞生长增殖率均低于空白质粒转染组细胞生长增殖率(0.250 ± 0.032)和未转染组HepG2细胞生长增殖率(0.267 ± 0.017), 4份样品与后二者两两比较其差异均有显著性($P < 0.05$), 后两者之间的差异无显著性($P > 0.05$). 而HBV-C转染组中4份样品的细胞增殖率亦不尽相同, 按从高到低排序依次为B1(B型携带, 0.202 ± 0.038)、B2(B型重型, 0.195 ± 0.038)、C1(C型轻度, 0.183 ± 0.024)、C2(C型重型, 0.172 ± 0.023), 但4者之间无显著性差异($P > 0.05$).

2.5 流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡 用流式细胞仪检测了B1, B2, C1和C2 4个重组质粒转染组、空白质粒转染组和未转染细胞组共6组细胞的细胞周期和细胞凋亡情况, 结果显示, B1, B2, C1, C2转染组的细胞凋亡率明显高于空白质粒转染组和未转染细胞组($P < 0.05$), 表明HBV-C蛋白能够促进HepG2细胞的凋亡. 经两两 t 检验比较, 发现C2(C型重型)转染组的细胞凋亡率显著高于B1(B型携带)转染组的细胞凋亡率($P < 0.05$)(表1).

3 讨论

HBV基因型与乙型病毒性肝炎的病情存在一定关系, 我国的HBV主要为B型和C型, 研究证实C型HBV所致病情较B型HBV为重, 但原因不明, 目前未见关于其机制的报道. 我们通过对不同基因型的HBV分别进行核心区序列的扩增, 之后与真核表达载体pEGFP-C1(绿色荧光蛋白表达质粒)进行基因重组和分子克隆, 再将这些重组真核表达质粒分别转染至肝癌细胞系HepG2中, 用MTT法和流式细胞仪分别检测其细胞增

殖率和凋亡率. 结果显示HBV-C转染组HepG2与空白质粒转染组和未转染组HepG2细胞相比, 细胞生长增殖率显著降低, 凋亡率显著升高, 进一步表明HBV有促进肝细胞凋亡的作用. HBV-C转染组中4份样品的平均细胞增殖率从高到低排序依次为B1(B型携带)、B2(B型重型)、C1(C型轻度)、C2(C型重型), 似乎提示C基因型HBV促进肝细胞凋亡的能力要略强于B基因型HBV, 但4者经两两比较后发现并无显著性差异($P > 0.05$), 可能与样本数较少有关, 或因为HBV基因型只是促进肝细胞凋亡的多个因素之一而已. 不过, 流式细胞仪则提示C2转染组的细胞凋亡率显著高于B1转染组的细胞凋亡率, 并具有统计学意义($P < 0.05$), 表明C型HBV核心蛋白在促进细胞凋亡方面确实要强于B型HBV, 至于在其他致病因素方面是否也存在着差异, 从而更好地诠释HBV基因型与临床关系的发病机制, 还有待于下一步的研究.

4 参考文献

- 1 Sugauchi F, Chutaputti A, Orito E, Kato H, Suzuki S, Ueda R, Mizokami M. Hepatitis B virus genotypes and clinical manifestation among hepatitis B carriers in Thailand. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 671-676
- 2 黄晶, 高志良. 乙型肝炎病毒基因型及其临床意义的研究. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 1362-1364
- 3 Sumi H, Yokosuka O, Seki N, Arai M, Imazeki F, Kurihara T, Kanda T, Fukai K, Kato M, Saisho H. Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. *Hepatology* 2003; 37: 19-26
- 4 Chan HL, Wong ML, Hui AY, Hung LC, Chan FK, Sung JJ. Hepatitis B virus genotype C takes a more aggressive disease course than hepatitis B virus genotype B in hepatitis B e antigen-positive patients. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1277-1279
- 5 Lee CM, Chen CH, Lu SN, Tung HD, Chou WJ, Wang JH, Chen TM, Hung CH, Huang CC, Chen WJ. Prevalence and clinical implications of hepatitis

同行评价

本文实验设计合理, 论证严密, 科学性较强, 采用的实验技术手段较为领先, 所得到的结论可信, 是一篇学术水平较高的研究论文.

- B virus genotypes in southern Taiwan. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 95-101
- 6 许军, 王齐欣, 蒋栋, 陈红松, 魏来, 王宇, 杨柳明, 赵延龙. 乙型肝炎病毒基因型与病情轻重的关系. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 11-13
- 7 温志立, 谭德明, 侯周华, 杨永峰. 型特异性巢式PCR研究HBV基因型与临床关系. *中南大学学报(医学版)* 2004; 29: 50-53
- 8 李卓, 李洪权, 李俊红, 刘英, 刘芳, 勾春燕, 高冀容, 单晶, 郭新会, 殷继明, 刘道洁, 谢贤春, 李辉. 北京地区乙型肝炎病毒基因型与其感染临床表型的相关性. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2823-2827
- 9 Kim KH, Seong BL. Pro-apoptotic function of HBV X protein is mediated by interaction with c-FLIP and enhancement of death-inducing signal. *EMBO J* 2003; 22: 2104-2116
- 10 Birrer RB, Birrer D, Klavins JV. Hepatocellular carcinoma and hepatitis virus. *Ann Clin Lab Sci* 2003; 33: 39-54
- 11 Nakamoto Y, Kaneko S. Mechanisms of viral hepatitis induced liver injury. *Curr Mol Med* 2003; 3: 537-544
- 12 Janssen HL, Higuchi H, Abdulkarim A, Gores GJ. Hepatitis B virus enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) cytotoxicity by increasing TRAIL-R1/death receptor 4 expression. *J Hepatol* 2003; 39: 414-420
- 13 Foo NC, Ahn BY, Ma X, Hyun W, Yen TS. Cellular vacuolization and apoptosis induced by hepatitis B virus large surface protein. *Hepatology* 2002; 36: 1400-1407
- 14 温志立, 谭德明. 多对型特异性引物巢式PCR检测湖南省乙肝病毒基因型. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 332-335
- 15 颜子颖, 王海林. 精编分子生物学实验指南. 第1版. 北京: 科学出版社, 1998: 17
- 16 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术. 第1版. 北京: 北京出版社, 1995: 78-238

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志关于作者署名的声明

本刊讯 世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 第一方面是直接参与, 包括: (1) 酝酿和设计实验; (2) 采集数据; (3) 分析/解释数据. 第二方面是文章撰写, 包括: (1) 起草文章; (2) 对文章的知识性内容作批评性审阅. 第三方面是工作支持, 包括: (1) 统计分析; (2) 获取研究经费; (3) 行政、技术或材料支持; (4) 指导; (5) 支持性贡献. 每个人必须在第一至第三方面至少具备一条, 才能成为文章的署名作者. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者. (世界胃肠病学杂志社2006-11-28)

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

国际会议

9th World Congress on Gastrointestinal Cancer
20-23 June 2007
Barcelona
Imedex
meetings@imedex.com

New York Society for Gastrointestinal Endoscopy
13-16 December 2006
New York
www.nysge.org