

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001907

DHX15 在 HBV 复制中的意义及其机制初步研究

杨柳青, 魏霞飞, 甘春杨, 袁 怡, 沈 静, 黄爱龙, 胡接力

(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:筛选 DEX D/H-box 家族中可能影响 HBV 增强子或核心启动子转录活性的基因, 初步研究 DHX15 对 HBV 复制的调控作用。**方法:**克隆 DEX D/H-box 家族基因到表达质粒 PCH9, 并构建由 HBV 增强子和核心启动子驱动的海肾荧光素酶报告质粒 pcore-Rluc; 分别将各种 DDX 表达质粒与 pcore-Rluc 共转染 HepG2 细胞, 筛选影响 Rluc 荧光素酶活性的 DDX 家族成员。在 HepG2 细胞中共转染 HBV1.3 倍体质粒和 DHX15 表达质粒, 通过 Western blot 检测 DHX15 在细胞中的表达, 用 Southern blot、Northern blot 检测过表达 DHX15 对细胞中 HBV 复制水平和转录水平的影响。构建 HBV 增强子与核心启动子截短突变体, 确定 DHX15 在 HBV 增强子或核心启动子上的作用区域。**结果:**成功构建 30 种 DEX D/H-box 家族基因克隆; 筛选出对 HBV 增强子/核心启动子有明显影响的基因 DHX15 ($P=0.042$); 与对照组相比, 过表达 DHX15 能促进 HBV DNA 的复制水平; 并且能上调 HBV RNA 转录水平; 成功构建 HBV 核心启动子截短突变体, 发现 DHX15 促进 HBV 的复制是通过增强子实现的 ($t=8.292, P=0.001; t=5.215, P=0.006$)。**结论:**过表达 DHX15 可通过影响 HBV 增强子的活性从而促进 HBV 复制。

【关键词】乙型肝炎病毒; DDX 家族; DHX15; 启动子; 增强子

【中图分类号】Q786

【文献标志码】A

【收稿日期】2017-12-11

Effect of DHX15 on the replication of HBV and its mechanism

Yang Liuqing, Wei Xiafei, Gan Chunyang, Yuan Yi, Shen Jing, Huang Ailong, Hu Jieli

(Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education,

Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To screen DDX family for genes that affect the transcription activity of HBV core promoter, and to research the relationship between DHX15 and HBV replication *in vitro*. **Methods:** The DDX family genes were cloned into the expression plasmid PCH9 respectively. The HBV core promoter was cloned into a luciferase reporter vector to generate pcore-Rluc. HepG2 cells were transiently co-transfected with each of the DEX D/H-box expressing plasmids and pCH9-pcore-Rluc. The luciferase activity was measured with luciferase assay system. HepG2 cells were transiently co-transfected with DHX15 and HBV1.3 cells were lysed and subjected to Western blot analysis. The effects of DHX15 overexpression on the HBV DNA replication and the HBV RNA transcription were tested by using Southern blot and Northern blot respectively. HBV core promoter truncated mutants were constructed to dissect the sequence might interacting with DHX15. **Results:** Thirty DEX D/h-box family genes were successfully cloned. DHX15 significantly influenced the activity of HBV core promoter ($P=0.042$). Compared with the control, overexpression of DHX15 promoted the replication of HBV DNA and increased the transcription level of HBV RNA in HepG2 cells. Both of the 2 HBV enhancers seem to be partially responsible for the upregulation effect of DHX15 on the activity of HBV core promoter ($t=8.292, P=0.001; t=5.215, P=0.006$). **Conclusion:** Overexpression of DHX15 promotes HBV replication in HepG2 cells by affecting the activity of HBV enhancer.

【Key words】hepatitis B virus; DEX D/H-box; DHX15; HBV core promoter; enhancer

慢性乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染是一个全球性的公共卫生问题^[1]。据估计全世界有 3.5 亿人为慢性 HBV 感染者, 每年约有 100 万人死于 HBV 感染所导致的相关疾病^[2]。HBV 属于正嗜肝

DNA 病毒, 其基因组为双链松弛环状结构, 基因长度 3.2 kb。HBV 的生活周期涉及松弛环状的 DNA (relaxed circular DNA, rc DNA) 侵入、闭合环状 DNA (covalently closed circular DNA, ccc DNA) 的形成、RNA 转录、DNA 复制、包装、成熟和排泌等过程^[3-5]。HBV 的转录过程受到自身基因序列及宿主因子的精细调控, 是 HBV 与宿主相互作用最活跃的阶段^[6]。HBV 基因组中的调控基因序列包含 2 个增强子 (En I、En II)、4 个启动子 (Sp I、Sp II、Cp、Xp)、poly A 附加

作者介绍: 杨柳青, Email: 452903037@qq.com,

研究方向: HBV 复制相关基因的研究。

通信作者: 胡接力, Email: hujieli1977@163.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20181105.0859.010.html>

(2018-11-06)

信号和糖皮质激素应答元件等。有研究显示增强子 I (En I) 上具有多种细胞转录因子结合位点,在调控细胞周期、调节细胞凋亡等多种细胞进程中发挥作用^[7]。

HBV 感染复制过程中,与宿主因子之间存在大量相互作用。一些宿主因子起到限制 HBV 感染复制的作用,例如 APOBEC3G(A3G)^[8]、IL-6 和 IL-1 β ^[9];另一些宿主因子则对 HBV 的复制起到正向调控作用,例如 cyclinD2^[10]、Sirt1^[11]。鉴于细胞内宿主因子成分的复杂性,其与 HBV 复制间相互关系的研究一直存在较大空间,大量未知的参与调控 HBV 复制的宿主因子尚待鉴定和研究。

DEx D/H-box 家族蛋白是一类在进化中高度保守的 ATP 依赖的 RNA 解旋酶,广泛存在于从细菌到哺乳动物等许多物种中^[12],根据解旋酶模体 II 中的保守氨基酸序列的不同,DEx D/H-box RNA 解旋酶又可进一步分为 DEAD、DEAH、DEx H、DEx D 等亚家族^[12-15]。DEx D/H-box 家族蛋白不仅参与需要 RNA 结构调节的所有细胞过程,而且其中一些蛋白成员在转录调节中也发挥重要作用^[10,17]。有报道显示 DDX5、DDX17 和 DDX21 都是 HIV Rev 结合蛋白^[14,18],参与抵抗病毒感染;而该家族中 DDX3 在 HBV 复制调控过程中发挥重要作用^[16-18],然而,DEx D/H-box 家族其他蛋白在 HBV 复制调控中作用报道非常有限。因此,本研究首先筛选了可能影响 HBV 复制的 DEx D/H-box 家族成员,并对其中的 DHX15 在 HBV 复制中的作用及分子机制进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

HepG2 为肝癌细胞系,HepG2 细胞为本实验室保存;DMEM 培养基、胰酶、opti-MEM 均购自美国 Gibco 公司,胎牛血清购自 BI 公司,转染试剂 lipo3000 购自 Invitrogen 公司,胶原购自 BD 公司,Taq 酶、T7 连接酶、DTT、ATP 购自 NEB 公司,胶回收以及小抽试剂购自 QIAGEN 公司,海肾荧光素酶检测试剂盒(Renilla Luciferase Assay System)购自美国 Promega 公司,抗 Flag 鼠抗购自 Sigma 公司,抗 GAPDH 鼠抗购自上海碧云天生物技术公司。HBV1.3 倍体为本实验室构建并保存,pCH9/3091 质粒由德国弗莱堡大学 Nassal 实验室构建^[19]、中国人民解放军第三军医大学西南医院兰林博士惠赠。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建 针对不同 RNA 解旋酶核酸序列,分别设计目的基因扩增引物,扩增方法多为巢式 PCR,其中 F1 和 R1 为巢式 PCR 第 1 轮引物,F2 和 R2 为巢式 PCR 第 2 轮引物,

扩增引物序列见表 1(本文只列出几个代表性引物序列)。以 HepG2 细胞来源的 cDNA 为模板,扩增 DEx D/H-box 家族基因,胶回收纯化后用 Golden gate 克隆方法与载体片段连接,所得克隆经测序验证正确后提取质粒。

构建 HBV 增强子/核心启动子驱动表达的荧光素酶报告基因 pCH9-pcore-Rluc。以 pCH9/3091 质粒为模板,引物为 F 1070+R 1901,扩增 1070~1901 增强子/核心启动子片段;以 pCH9/3091 质粒为模板扩增载体,引物为 F SV40+ R CMV;以 pRL-TK 为模板,用引物 F Rluc+R Rluc,扩增报告基因,引物序列见表 1。扩增后经核酸电泳定量鉴定片段大小正确后做胶回收,胶回收方法严格按照说明书进行,然后用 Golden gate 方法将胶回收片段、Rluc 连接至 pCH9 载体,即得到 pCH9-pcore-Rluc。

1.2.2 海肾荧光素酶检测实验 将 HepG2 细胞接种 24 孔板,将成功构建的各个目的基因表达质粒或载体(即对照空载体)分别与 pCH9-pcore-Rluc 共转染,转染按照质量比为 1:1 进行,转染 48 h 后收集细胞进行荧光素酶实验。方法如下:PBS 清洗细胞后加入新配的细胞裂解液,室温反应 20 min,将孔板中液体转移至 EP 管,加入发光反应液,枪头迅速吹打后立刻放进仪器检测,并记录数值。

1.2.3 HBV 复制中间体的提取 用 HepG2 细胞铺 12 孔板,细胞转染后第 5 天收集细胞,PBS 清洗后吸干,加 250 μ L 细胞裂解液,37 $^{\circ}$ C 反应 10 min,将各孔内液体转移至 EP 管,4 $^{\circ}$ C 离心后吸上清转移至新的 EP 管;然后依次加入 10 μ L 100 mmol/L CaCl₂,2 μ L Micrococcal nuclease,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,再依次加入 4 μ L 0.5 mol/L EDTA、10 μ L 10 mg/mL Pronase、10 μ L 10% SDS,震荡器震荡混匀,继续孵育 1 h;接着用酚进行 DNA 萃取;离心转移上清至新的 EP 管后加 8 μ L 5 mol/L NaCl,2 倍体积无水乙醇,置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱沉淀过夜;过夜后离心弃去上清,70%乙醇离心洗涤沉淀,弃上清,沉淀风干后加入 ddH₂O 重溶。

1.2.4 Southern blot 检测 配制 1%的琼脂糖胶,样品电泳后,经过变性中和后转膜,虹吸法转膜过夜;第 2 天取出膜,紫外交联后预杂交 1 h,再杂交过夜;第 3 天用 Roche DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 试剂盒检测,SageCreation 化学发光成像系统曝光,具体操作按说明书进行。

1.2.5 提取 HepG2 细胞总 RNA 12 孔板的 HepG2 细胞,每孔加入 500 μ L Trizol 试剂,室温裂解 5 min,加入氯仿,手工震荡 15 s,室温孵育 2~3 min;然后 4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min 离心 15 min,转移上层水相至新的 1.5 mL EP 管中加入异丙醇,室温孵育 10 min;离心 10 min 后弃上清,75%乙醇洗涤沉淀;再次离心后弃上清,风干后,ddH₂O 重溶沉淀并用 Nanodrop 2000 分光光度计检测 RNA 浓度。

1.2.6 Northern blot 检测 细胞转染后第 5 天裂解细胞提取总 RNA(方法上述),使用 DIG Northern Starter Kit 检测 HBV RNA 转录情况。具体步骤如下:从细胞中提取细胞总 RNA,方法同前,loading buffer 与样品混匀后 65 $^{\circ}$ C 变性 10 min,冰上 1 min;上样后电泳,电泳参数:54 V/cm,2 h,点泳后将多余胶切除,20 $\times$ SSC 洗 15 min 共 2 次;转膜过夜,之后操作同 Southern blot。

1.2.7 Western blot 检测 细胞转染 48 h 后收集细胞,裂解离心加蛋白 Loading Buffer,煮沸离心后上样,SDS-PAGE 电泳 90 min,200 mA 恒流转膜 3 h,奶粉封闭 1 h,孵一抗 4 ℃过夜;第 2 天 TBST 洗 4 次,每次 10 min,接着孵二抗 1 h,TBST 漂洗后用双色红外激光成像系统曝光,具体操作严格按照说明书进行。

1.2.8 构建 HBV 增强子与核心启动子截短突变体 以 p CH9-pcore-Rluc 质粒为模板分别扩增 1636~1901、1636~1744 缺失段和 1744~1901,扩增引物分别为 F 1636+ R CMV、F 1744+R 1635、F 1744+R CMV,其序列见表 1。核酸电泳鉴定片段大小正确后做胶回收、Golden Gate 等完成克隆过程,构建成功的突变体分别命名为 p CH9-1636-Rluc、p CH9-1635/1744-Rluc、p CH9-1744-Rluc。用 DHX15 质粒以及空载体分别与上述 3 种 HBV 增强子/核心启动子截短突变体以质量比为 1:1 共转染 24 孔板 HepG2 细胞,转染 48 h 后收集细胞进行海肾荧光素酶活性检测,具体实验方法同上,转染过程严格按照说明书进行。

表 1 引物及其序列

引物名称	引物序列(5'→3')
DDX18 F1	CGTCTCTTTCTAGGCACTGTGTTGGCA
DDX18 F2	CGTCTCTATGTCACACCTGCCGATGAA
DDX18 R2	CGTCTCTCAGTGAGAGAACTGCCTGC
DDX18 R1	CGTCTCTAGATGAAAGGAAGGCATGTG
DDX19A F1	CGTCTCTGGTGCAGCGCATATTTTCAC
DDX19A F2	CGTCTCTATGGCCACCGACTCGTGGG
DDX19A R2	CGTCTCTCAGTTGGCTATTTTCTCAATC
DDX19A R1	CGTCTCTATGCACTGTCTCTGTGCA
DDX55 F1	CGTCTCTACGCGCGGAAGGAGCGCG
DDX55 F2	CGTCTCTATGGAGCATGTGACAGAGGG
DDX55 R2	CGTCTCTCAGCAGTCATCTTCCAAATC
DDX55 R1	CGTCTCTTGGAGCCATCCACCAAGTTA
DHX15 F1	CGTCTCTTAATGCCCGTTGCAAGAGT
DHX15 F2	CGTCTCTATGTCCAAGCGGACCGGT
DHX15 R2	CGTCTCTTCTAGTACTGTGAATATTCCTT
DHX15 R1	CGTCTCTAAGCTGAAGAGCACAACTCG
DHX58 F1	CGTCTCTCAGACCTACCTACTAGAGCA
DHX58 F2	CGTCTCTATGGAGCTTCGGTCTACCA
DHX58 R2	CGTCTCTTCACTCCAGGGAGAGTCC
DHX58 R1	CGTCTCTCAGCTGATGATTGAGGAAGG
F 1070	GCTGACCGTCTCCCGTTGATGCCCTTTGTATGCATGT
R 1901	GCTGACCGTCTCTAGACGACATGCCCCAAAGCCACCAAGGCT
F SV40	ACTCACCGTCTCTTAATCGCCGCGACTCTAGATCAT
R CMV	GCTGACCGTCTCTAACGGCTATGAACCTAATGACCCCGTA
F Rluc	GCTGACCGTCTCTGCTACTTCGAAAGTTTATGATCCAGA
R Rluc	GCTGACCGTCTCAGTATTTGTTTCAATTTTGAGAACTCGCT
F 1636	GCTGACCGTCTCCCGTTATGCCCCAAGGTCTTACATAAG
F 1744	GCTGACCGTCTCCCGTTGGGAGGAGATTAGTTAAAGGT
R 1635	GCTGACCGTCTCTAAGCTTTGCTGGGCGTTACCGGTCTGT
R CMV	GCTGACCGTCTCTAAGCGCTATGAACCTAATGACCCCGTA

1.3 统计学分析

数据采用 Graphpad Prism5.0 软件分析,所有数据均以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组计量资料差异比较采用两独立样本 t 检验,多重比较采用 Bonferroni 方法来校正 P 值。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 DEx D/H-box RNA 解旋酶家族基因克隆

目前已经发现的人源性 DEx D/H-box RNA 解旋酶有 58 个,包括 16 个 DHX(DEAH/DEx H 家族)基因和 42 个 DDX(DEAD/DEx D 家族)基因。通过巢式 PCR 扩增,从源于 HepG2 细胞的 cDNA 中成功扩增出 30 种基因,其余 28 种未能成功扩增,可能这部分基因并未在 HepG2 细胞中表达,或者表达丰度过低。接下来成功构建了这 30 种 DEx D/H-boxRNA 解旋酶基因的真核细胞表达质粒,包括:5 个 DHX 解旋酶,分别为 DHX8、DHX15、DHX32、DHX35、DHX40;25 个 DDX 解旋酶,DDX1、DDX3Y、DDX4、DDX6、DDX11、DDX18、DDX19A、DDX19B、DDX24、DDX27、DDX28、DDX39A、DDX39B、DDX43、DDX47、DDX48、DDX49、DDX52、DDX53、DDX54、DDX55、DDX56、DDX58、DDX59、DDXBP1。

2.2 影响 HBV 增强子/核心启动子活性的 DEx D/H-box RNA 解旋酶初步筛选

因为 HBV 核心启动子活性相对较弱,而海肾荧光素酶 (renilla luciferase, Rluc) 具有灵敏度高的优点,所以选用海肾荧光素酶为报告基因。利用构建成功的 HBV 增强子/核心启动子报告质粒,进行了荧光素酶筛选实验,以寻找对 HBV 增强子/核心启动子活性有明显影响的 DEx D/H-box 家族基因。从筛选结果(图 1)可以看出,DDX18、DDX19B、DDX39A、DDX39B、DDX55、DHX15 均对 HBV 有较显著的正向调控作用,使海肾荧光素酶活性升高 2 倍以上,其中以 DHX15 的作用最为显著,与对照相比,使 Rluc 活性升高 3 倍以上。用 Bonferroni 方法校正 P 值后得到 $P=0.042$,差异具有统计学意义,因此首先对 DHX15 做了进一步研究。

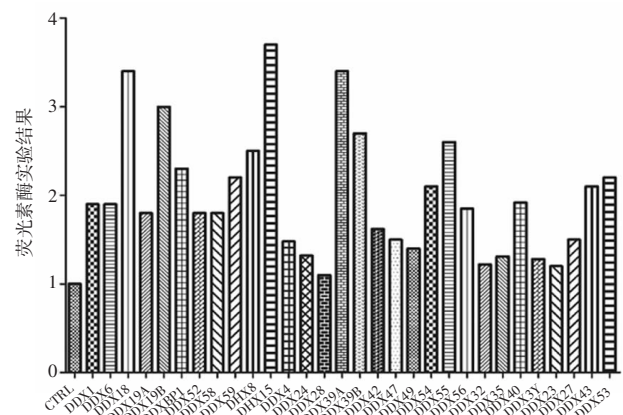


图 1 DEx D/H-box 解旋酶家族基因过表达对 HBV 增强子/核心启动子活性影响

2.3 DHX15 在 HepG2 细胞中过表达上调 HBV DNA 复制水平

为了观察 DHX15 过表达对 HBV DNA 复制的影响,将 DHX15 表达质粒与 HBV1.3(实验组)或者空载体与 HBV1.3(对照组)共转染 HepG2 细胞,转染 5 d 后收集细胞,提取复制中间体进行 Southern blot 检测。结果显示如图 2 所示,与对照组相比,实验组可成功检测到 3Flag-DHX15 表达,同时其 HBV 复制中间体水平明显升高,提示在 HepG2 细胞中过表达 DHX15 可以促进 HBV DNA 的复制水平。

2.4 DHX15 在 HepG2 细胞中过表达增强 HBV RNA 转录

上述结果证实了 DHX15 对 HBV DNA 复制具有正向调控作用,为了弄清这种上调作用是否是通过增强 HBV RNA 转录水平所引起的,将 DHX15 表达质粒与 HBV1.3(实验组),或者空载体与 HBV1.3(对照组)共转染 HepG2 细胞,转染 5 d 后收集细胞,提取细胞总 RNA 并进行 Northern blot 检测。结果(图 3)显示,在 HepG2 细胞中过表达 DHX15,导致 HBV mRNA 水平升高,提示 DHX15 可以上调 HBV 的转录水平。

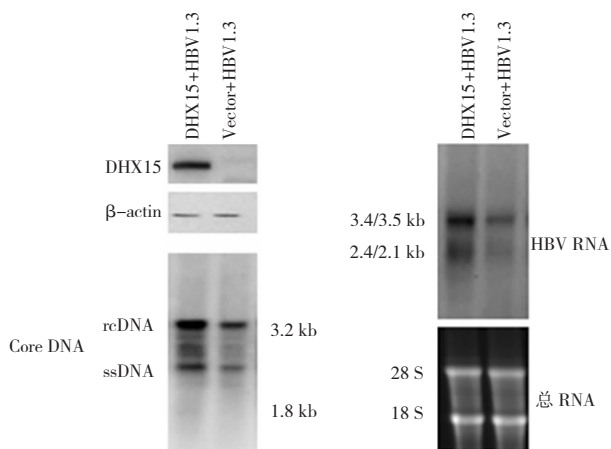


图 2 DHX15 过表达在 HepG2 细胞中可促进 HBV 复制

2.5 DHX15 过表达促进 HBV 增强子 I 与增强子 II 的活性

前述实验表明,DHX15 可通过促进 HBV 增强子/核心启动子活性,增强 HBV RNA 转录从而上调 HBV DNA 复制。为了进一步确定 DHX15 在 HBV 增强子或核心启动子作用的序列区域,课题组构建了 3 种 pcore 截短突变体,它们分别包含基本核心启动子(BCP)或者不同的增强子序列,具体包括 BCP+Enh II (PCH9-1636-Rluc)、BCP+Enh I (PCH9-1635/1747-Rluc)和 BCP(PCH9-1744-Rluc)(图 4)。用 DHX15 表达质粒或者空载体分别与上述 3 种 HBV 截短突变体以质量比为 1:1 共转染 HepG2 细胞,转染 48 h 后收集细胞进行海肾荧光素酶活性检测,DHX15 与 pCH9-1636-Rluc 共转染时荧光素酶结果如下:对照组 $250\ 943.300 \pm 18\ 427.080$,实验组 $374\ 214.700 \pm 17\ 985.640$;DHX15 与 pCH9-1635/1744-Rluc 共转染时荧光素酶结果如下:对照组 $142\ 811.00 \pm 8\ 973.131$,实验组 $209\ 434.700 \pm 20\ 224.750$;结果显示(图 5),与对照组相比,DHX15 分别与 pCH9-1636-Rluc、pCH9-1635/1744-Rluc 共转染时,HBV 启动子活性升高,其对应 t 值和 P 值分别是: $t=8.292, P=0.001$; $t=5.215, P=0.006$ 。而当 DHX15 与 pCH9-

1744-Rluc 共转染时,荧光素酶结果如下:对照组 $3\ 646.333 \pm 278.671$,实验组 $3\ 195.333 \pm 141.938$;其对应 t 和 P 值为 $t=2.498, P=0.067$,差异无统计学意义。即与对照组相比无明显差异。这提示 DHX15 可以正向调控增强子(En I、En II)的活性。

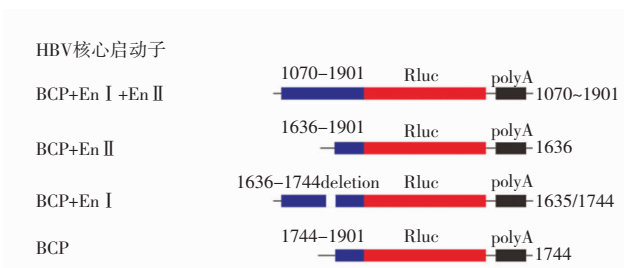


图 4 HBV 核心启动子及其截短突变体示意图

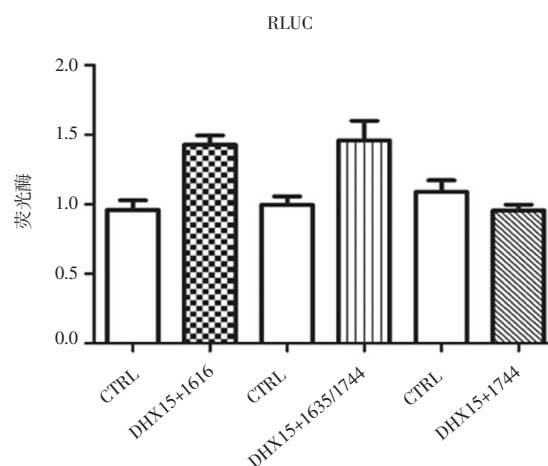


图 5 DHX15 对 HBV 核心启动子截短突变体的影响

3 讨论

海肾荧光素酶报告基因具有应用范围广、灵敏度高、检测速度快、背景低的特点,而且无放射性、半衰期短,对细胞无害。

目前克隆成功的 DEx D/H-box 家族基因有 30 个,其余没有扩增成功的可能原因如下:首先,第一轮 PCR 扩增是以 HepG2 细胞来源的 RNA 逆转录 cDNA,可能其在这种细胞中不表达或者很少表达;其次,采用的 PCR 条件不合适。

RNA 解旋酶是一类能解开 RNA 双链的酶,属于分子伴侣,对保证 RNA 分子的正确折叠以及保持和修饰其特定的二三级结构是必不可少的^[11,14]。RNA 解旋酶家族在进化上高度保守,家族的成员参与 mRNA 前体加工 RNA 翻转 RNA 转运核糖体的合成和翻译 RNA 降解等过程。另外,它们在复合物中 RNA 结构的调节大 RNA 蛋白复合物的解离等 RNA 代谢的各个方面也发挥重要作用^[9],如通过局

部 RNA 的解旋或者 RNA 蛋白质的结合或者解离促进 RNA 结构的形成^[13,25]。然而,越来越多的研究证明这个家族的一些成员作为转录调节因子具有功能。

人源 DHX15 基因位于 4 号染色体,具体位置是 4p15.2;DHX15 是 DEAD/H-box 家族的重要一员,795 个氨基酸,分子量 90 kD,有 12 个保守基序,即基序 Q、I、Ia、Ib、Ic、II、III、IV、IVa、V、Va、VI,主要有 2 种结合功能,即 ATP 结合水解功能和 RNA 结合水解功能^[12,26]。有研究显示 DHX15 蛋白是 RIG-I 连接蛋白^[21-23],是病毒感染后抗病毒自身免疫中必不可少的部分,是 RLR-MAVS 信号复合体的重要组成部分^[10,21]。研究报道显示,一些 DExD/H-box RNA 解旋酶家族蛋白在抗病毒免疫中也有重要作用,主要是通过识别病毒核酸或者通过促进下游信号通路来发挥作用^[9,17]。

本次实验发现 DHX15 促进 HBV 的表达是通过 HBV 核心启动子中的增强子来实现的,但具体的作用机制尚未清楚。因此,下一步将深入研究 DHX15 促进 HBV 表达的分子机制。此外,本次实验选择的是 HepG2 细胞,下一步将在其他细胞系中来验证这一结论。

参 考 文 献

- [1] Caccamo G, Saffioti F, Raimondo G. Hepatitis B virus and hepatitis C virus dual infection[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(40): 14559-14567.
- [2] Roman S, Jose-Abrego A, Fierro NA, et al. Hepatitis B virus infection in Latin America: a genomic medicine approach[J]. W J Gastroenterol, 2014, 20(23): 7181-7196.
- [3] Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection[J]. Virology, 2015, 480: 672-686.
- [4] Manzoor S, Saalim M, Imran M, et al. Hepatitis B virus therapy: what's the future holding for us?[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(44): 12558-12575.
- [5] Cui X, Guo JT, Hu J. Hepatitis B virus covalently closed circular DNA formation in immortalized mouse hepatocytes associated with nucleocapsid destabilization[J]. J Virol, 2015, 89(17): 9021-9028.
- [6] Lamontagne RJ, Bagga S, Bouchard MJ. Hepatitis B virus molecular biology and pathogenesis[J]. Hepatoma Res, 2016, 2(7): 163-186.
- [7] Bock CT, Malek NP, Tillmann HL, et al. The enhancer i core region contributes to the replication level of hepatitis B virus in vivo and in vitro[J]. J Virol, 2000, 74(5): 2193-2202.
- [8] Medzhitov R, Janeway CJr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways[J]. Immunol Rev, 2000, 173(1): 89-97.
- [9] Byrd AK, Raney KD. Superfamily 2 helicases[J]. Front Biosci, 2012, 17(6): 2070-2088.
- [10] Kehn K, Deng L, de la Fuente C, et al. The role of cyclin D2 and p21/waf1 in human T-cell leukemia virus type 1 infected cells [J]. Retrovirology, 2004, 1: 6.
- [11] Ren JH, Tao Y, Zhang ZZ, 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.
- [12] Banroques J, Tanner NK. Bioinformatics and biochemical methods to study the structural and functional elements of DEAD-box RNA helicases[J]. Methods Mol Biol, 2015, 1259(1259): 165-181.
- [13] Fuller-Pace FV. DEAD box RNA helicase functions in cancer[J]. RNA Biol, 2013, 10(1): 121-132.
- [14] Naji S, Ambrus G, Cimernančič P, et al. Host cell interactome of HIV-1 rev includes RNA helicases involved in multiple facets of virus production[J]. Mol Cell Proteomics, 2012, 11(4): M111.015313.
- [15] Upadya MH, Aweya JJ, Tan YJ. Understanding the interaction of hepatitis C virus with host DEAD-box RNA helicases[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(11): 2913-2926.
- [16] Fuller-Pace FV. DExD/H box RNA helicases: multifunctional proteins with important roles in transcriptional regulation[J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(15): 4206-4215.
- [17] Jing-Wen S, Yan-Hwa WL. Human DExD/H RNA helicases: emerging roles in stress survival regulation[J]. Clinica Chimica Acta, 2014, 436(10): 45-58.
- [18] Lai MC, Wang SW, 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.
- [19] Nassal M. The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly[J]. J Virol, 1992, 66(7): 4107-4116.
- [20] Ko C, Lee S, Windisch MP, et al. DDX3 DEAD-box RNA helicase is a host factor that restricts hepatitis B virus replication at the transcriptional level[J]. J Virol, 2014, 88(23): 13689-13698.
- [21] Robertpaganin J, Réty S, Leulliot N. Regulation of DEAH/RHA helicases by G-patch proteins[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 931857.
- [22] Kell AM, Jr GM. RIG-I in RNA virus recognition[J]. Virology, 2015, 480: 110-121.
- [23] Anchisi S, Guerra J, Garcin D. RIG-I ATPase activity and discrimination of self-RNA versus non-self-RNA[J]. MBio, 2015, 6(2): e02349.
- [24] Mosallanejad K, Sekine Y, Ishikura-Kinoshita S, et al. The DEAH-box RNA helicase DHX15 activates NF- κ B and MAPK signaling downstream of MAVS during antiviral responses[J]. Sci Signal, 2014, 7(323): ra40.
- [25] Putnam AA, Jankowsky E. DEAD-box helicases as integrators of RNA, nucleotide and protein binding[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1829(8): 884-893.
- [26] Linder P, Jankowsky E. From unwinding to clamping—the DEAD box RNA helicase family[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011, 12(8): 505-516.

(责任编辑:冉明会)