

免疫与感染

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000096

组蛋白去乙酰化酶抑制剂对乙型肝炎病毒复制的影响

陈 可,任吉华,宋春丽,冉龙宽,李宛蔚,陈 娟

(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:研究 SIRT1 抑制剂 sirtinol、曲古抑菌素 A(trichostatin A, TSA)对乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)复制的影响,并探讨组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)在 HBV 复制过程中的作用。**方法:**运用 MTS 分析 HepG2.2.15 细胞对 sirtinol、TSA 的耐受程度;real-time PCR 和 Southern blot 验证 sirtinol 和 TSA 对 HepG2.2.15 细胞中 HBV 复制中间体表达的影响;Western blot 和 ELISA 分析 sirtinol 对 HBV 核心蛋白(HBc)和 HBsAg、HBeAg 表达的影响。**结果:**sirtinol 能抑制 HBV 复制中间体、HBc 的表达和 HBsAg、HBeAg 的分泌,TSA 可以促进 HBV 的复制。**结论:**SIRT1 抑制剂 sirtinol 具有抗病毒作用。

【关键词】SIRT1; sirtinol; 乙肝病毒复制; 曲古抑菌素 A

【中图分类号】R512.6²; R373.2¹

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-09-05

Effect of histone deacetylase inhibitor on HBV replication

Chen Ke, Ren Jihua, Song Chunli, Ran Longkuan, Li Wanyu, Chen Juan

(Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of SIRT1 inhibitor sirtinol, trichostatin A (TSA) on hepatitis B virus (HBV) replication and to discuss the role of histone deacetylase in the process of HBV replication. **Methods:** The tolerance degree of HepG2.2.15 cell to sirtinol and TSA was determined by MTS assay. The effects of sirtinol and TSA on the expression of HBV replicative intermediates were measured by real-time PCR and Southern blot. The effects of sirtinol and TSA on the expression of HBc, HBsAg and HBeAg were analyzed by Western blot and ELISA. **Results:** Sirtinol inhibited the expression of HBV replicative intermediates and HBc as well as the secretion of HBsAg and HBeAg. TSA promoted the HBV replication. **Conclusion:** SIRT1 inhibitor sirtinol may have anti-HBV potentiality.

【Key words】SIRT1; sirtinol; hepatitis B virus replication; trichostatin A

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是导致人类疾病的重要病原体,是慢性HBV感染患者发展为肝硬化和肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的重要病因^[1-2]。全球约 20 亿人曾感染过HBV,其中 3.5 亿人为慢性 HBV 感染者。控制 HBV 感染和治疗 HBV 患者已越来越引起了人们的重视。尽管 HBV 疫苗在许多国家得到了广泛的应用,但也存在接种疫苗失败或者无应答的问题。目前治疗 HBV 患者的两大类药均存在严重的不足,长期服用核苷酸类似物会导致药物抵抗^[3],干扰素价格昂贵并可产生严重的副作用。因此,寻找新的治疗靶点,

发展新的治疗方法显得尤为重要。

组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)是一类蛋白酶,对染色体的结构修饰和基因表达调控发挥着重要的作用,根据 HDACs 与酵母同系物的序列类似性,HDACs 被分Ⅳ类。Ⅰ类 HDACs 与酵母 Rpd3 具有同源性,包括 HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC8;Ⅱ类 HDACs 与酵母 Hda1 具有同源性,包括 HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC9 和 HDAC 10;Ⅲ类 HDACs 即沉默信息调节因子 2(silent information regulator 2, Sir2)相关酶类;Ⅳ类 HDACs 主要是 HDAC11。Sirtuin 家族是一组依赖烟碱腺嘌呤二核苷酸的Ⅲ类 HDAC^[4]。它包括 7 个家族成员(SIRT1~7),SIRT1、SIRT2、SIRT3 和 SIRT5 被证实具有去乙酰化酶活性^[5-8],其中 SIRT1 研究得最为广泛而深入。SIRT1 参与了体内许多生理功能的调节,

作者介绍:陈 可,Email:378793028@qq.com,

研究方向:乙肝发病机制。

通信作者:陈 娟,Email:yixin_xinyuan@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81201282)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000096.html

包括众多基因转录、能量代谢以及细胞衰老过程的调节等^[9]。SIRT1 属于Ⅲ类 HDAC,与Ⅰ、Ⅱ类 HDACs 有不同的生物学特征。Ⅰ、Ⅱ类 HDACs 抑制剂菌曲古抑菌素(trichostatin A,TSA)不能抑制 SIRT1 的活性^[10],同样,SIRT1 特异性抑制剂 sirtinol 也不能抑制Ⅰ、Ⅱ类 HDACs 的活性^[11]。有文献报道,与 cccDNA 结合的组蛋白 H3/H4 的乙酰化状态能调控 HBV 的表达^[12]。本课题也重点研究了组蛋白乙酰化状态对 HBV 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

HepG2.2.15 细胞购于美国模式培养物集存库,TSA (T1952)、sirtinol(S7942)购于 Sigma 公司,MTS 试剂盒(G3582)购于 Promega,SYBR Green(04913914001)购于 Roche 公司,抗 HBc(B0586)购于 Dako,抗 β -actin(sc-1616-R)购于 Santa Cruz Biotechnolog,ELISA 试剂盒购于 KHB。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HepG2.2.15 细胞系培养于含有 10%胎牛血清,400 μ g/ml G418 的 MEM 培养基中,在含 5%CO₂,37 $^{\circ}$ C 孵箱中常规培养。

1.2.2 MTS 实验 2×10^4 个 HepG2.2.15 细胞接种于 96 孔板,第 2 天在 100 μ l 培养基中加入不同浓度的 sirtinol、TSA(溶剂为 DMSO),以 DMSO 为对照,作用 3 d 后,在培养基中加入 20 μ l 试剂盒中的 Solution Reagent,5%CO₂,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后,490 nm/L 下读取吸光度值。

1.2.3 细胞内 HBV DNA 提取和 Southern blot 分析 PBS 清洗 6 孔板中细胞 2 次后,加入 0.5 ml 细胞裂解液(10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0、1 mmol/L EDTA、1% NP-40 和 2%蔗糖),混匀后,37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min,收集细胞裂解液,15 000 g 离心 5 min。在上清中加入 40 U/ml DNase I 和 10 mmol/L MgCl₂,37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后加入 200 μ l 35% PEG 8000(含 1.5 mmol/L NaCl),冰浴 1 h 后,11 000 g、4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,弃上清,加入 0.5 ml 蛋白酶 K 消化液(0.5% SDS,150 mmol/L NaCl,25 mmol/L Tris-HCl pH8.0 和 10 mmol/L EDTA)和 12.5 μ l 20 mg/ml 蛋白酶 K(Takara),45 $^{\circ}$ C 水浴过夜。等体积酚氯仿抽提、70%乙醇沉淀,TE 缓冲液溶解 HBV DNA。提取的 HBV DNA 经 0.9% 琼脂糖凝胶电泳,毛细管虹吸法转膜,120 $^{\circ}$ C 固定。预杂交 1 h,加入地高辛标记 DNA 探针杂交过夜。然后洗膜、化学发光、采集图片、标记结果。

1.2.4 Real-time PCR 提取 HBV 复制中间体,按照 SYBR Green(Roche,Germany)说明书配制反应体系和设置反应条件,HBV DNA 引物,上游引物:5'-CCTAGTAGTCAGTTATGT-CAAC-3',下游引物:5'-TCTATAAGCTGAGGAGTCCGA-3'。

1.2.5 Western blot 检测 收集细胞,用 PBS 小心洗涤 2 次后,加入相应体积 RIPA 裂解缓冲液(含 Protease inhibitor,PI),15 min 后收集裂解液离心,去除细胞碎片,用 BCA 法测定蛋白浓度。取等量(30 μ g)细胞总蛋白上样,于 12%的 SDS-PAGE 中分离蛋白后,在 Bio-Rad 湿式转移电泳槽中,以 90 V 电转膜 3 h。将转移好的 NC 膜用 5%脱脂奶粉封闭 1 h。将经过封闭处理的 NC 膜孵育于一抗(以封闭液 1:1 000 稀释一抗),4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜。然后以 TBS-T 洗涤 3 次,每次 10 min。二抗(即辣根过氧化物酶标记的兔抗人 IgG 抗体,以封闭液按 1:2 000 稀释),室温下摇床孵育 2 h,洗涤 3 次后,ECL 显影。以 β -actin 为内参。

1.2.6 HBsAg 和 HBeAg 的检测 按照酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒检测细胞培养基中的 HBsAg 和 HBeAg 的水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计,并采取单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 HepG2.2.15 细胞对 sirtinol、TSA 的耐受程度分析

为了验证 sirtinol、TSA 对 HBV 复制的影响并避免 sirtinol、TSA 的细胞毒性对结果的干扰,作者对 HepG2.2.15 细胞做了 MTS 分析。结果显示 sirtinol 的半抑制浓度(IC₅₀)为 100 μ mol/L(表 1,图 1A),TSA 的 IC₅₀ 为 300 nmol/L(图 1B、表 2)。

表 1 MTS 分析 sirtinol 的细胞毒性 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 Cytotoxicity of sirtinol analyzed by MTS assay ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	细胞存活率 (%)
0 μ mol/L	99.67 $\pm$ 3.51
25 μ mol/L	97.00 $\pm$ 1.00
50 μ mol/L	84.67 $\pm$ 2.52
75 μ mol/L	67.0 $\pm$ 2.65
100 μ mol/L	50.67 $\pm$ 2.52
125 μ mol/L	33.67 $\pm$ 3.21
150 μ mol/L	18.33 $\pm$ 2.52

表 2 MTS 分析 TSA 的细胞毒性 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab.2 Cytotoxicity of TSA analyzed by MTS assay ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	细胞存活率 (%)
0 μ mol/L	103.33 $\pm$ 4.04
100 nmol/L	95.00 $\pm$ 1.00
200 nmol/L	86.67 $\pm$ 2.52
300 nmol/L	49.67 $\pm$ 1.53
400 nmol/L	39.67 $\pm$ 1.53
500 nmol/L	31.33 $\pm$ 4.04
600 nmol/L	11.33 $\pm$ 1.53

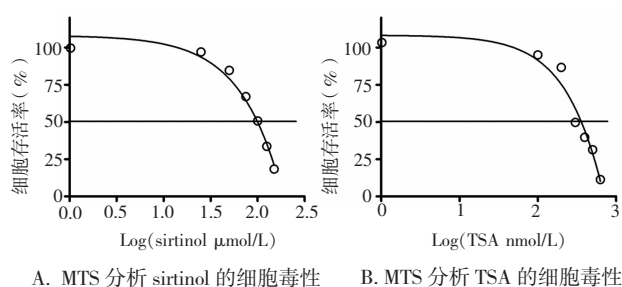


图 1 MTS 分析 sirtinol、TSA 的细胞毒性

Fig.1 Cytotoxicity of sirtinol and TSA analyzed by MTS assay

2.2 Sirtinol 对 HBV 复制的影响

25 $\mu\text{mol/L}$ sirtinol 和 50 $\mu\text{mol/L}$ sirtinol 分别作用于 HepG 2.2.15 细胞 2 d, 弃去培养基中的 sirtinol, 继续培养 5 d, 用 real-time PCR 发现, 不同浓度 sirtinol 处理后, 每个 HepG2.2.15 细胞中平均 HBV 拷贝数分别为 111、56、40 个(图 2、表 3), 说明 sirtinol 能显著地抑制 HBV 的表达(0 $\mu\text{mol/L}$ vs. 25 $\mu\text{mol/L}$, $P=0.000$; 0 $\mu\text{mol/L}$ vs. 50 $\mu\text{mol/L}$, $P=0.000$), Southern blot 进一步证实 sirtinol 能明显地抑制 HBV 复制中间体的表达(图 3)。

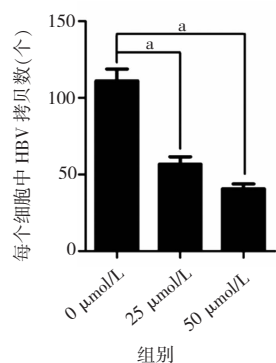
a. 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, 差异具有统计学意义

图 2 Real-time PCR 检测 sirtinol 对 HBV 复制中间体表达的影响

Fig.2 Effect of sirtinol on the expression of HBV replicative intermediates determined by real-time PCR

表 3 Real-time PCR 检测 sirtinol 对 HBV 复制中间体表达的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

分组	每个细胞 HBV 拷贝数 (个)
0 $\mu\text{mol/L}$	111.00 $\pm$ 13.53
25 $\mu\text{mol/L}$	56.67 $\pm$ 8.50 ^a
50 $\mu\text{mol/L}$	40.67 $\pm$ 5.51 ^a

注: a, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, 差异具有统计学意义

2.3 sirtinol 对 HBV 相关蛋白表达的影响

HepG2.2.15 细胞经过以上相同的处理后(处理方法如 2.2), 收集培养基上清和提取细胞蛋白质, Western blot 显示, sirtinol 能明显抑制 HBV 核心蛋白(HBc)的表达(图 4), ELISA

检测培养基上清中的 HBsAg 和 HBeAg, 结果显示 sirtinol 能明显抑制 HBsAg(0 $\mu\text{mol/L}$ vs. 25 $\mu\text{mol/L}$, $P=0.009$; 0 $\mu\text{mol/L}$ vs. 50 $\mu\text{mol/L}$, $P=0.001$)和 HBeAg 的分泌(0 $\mu\text{mol/L}$ vs. 25 $\mu\text{mol/L}$, $P=0.001$; 0 $\mu\text{mol/L}$ vs. 50 $\mu\text{mol/L}$, $P=0.000$), 见图 5、表 4。

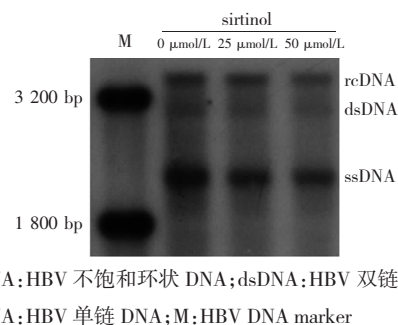


图 3 Southern blot 检测 sirtinol 对 HBV 复制中间体表达的影响

Fig.3 Effect of sirtinol on the expression of HBV replicative intermediates determined by Southern blot

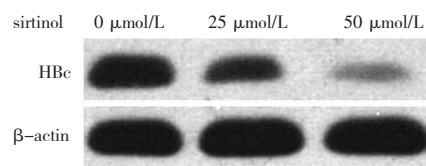


图 4 Western blot 检测 sirtinol 对 HBc 表达的影响

Fig.4 Effect of sirtinol on the expression of HBc measured by Western blot

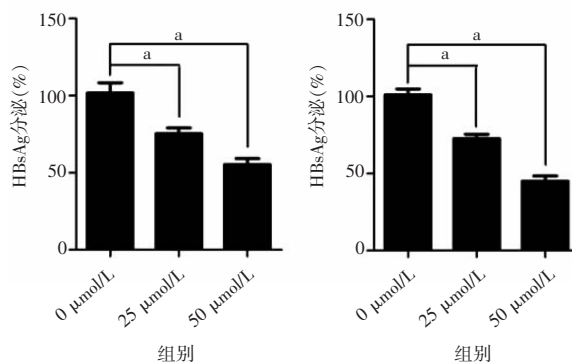
a. 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, 差异具有统计学意义

图 5 ELISA 检测 sirtinol 对 HBsAg、HBeAg 分泌的影响

Fig.5 Effect of sirtinol on the secretion of HBsAg and HBeAg measured by ELISA

表 4 ELISA 检测 sirtinol 对 HBsAg、HBeAg 分泌的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

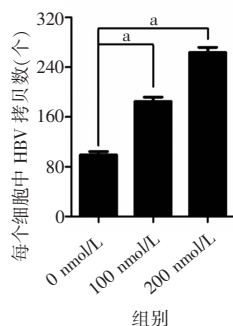
分组	0 $\mu\text{mol/L}$	25 $\mu\text{mol/L}$	50 $\mu\text{mol/L}$
HBsAg 分泌 (%)	101.67 $\pm$ 6.69	75.33 $\pm$ 6.51 ^a	55.33 $\pm$ 6.66 ^a
HBeAg 分泌 (%)	101.00 $\pm$ 6.51	72.67 $\pm$ 4.73 ^a	45.00 $\pm$ 6.00 ^a

注: a, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, 差异具有统计学意义

2.4 TSA 对 HBV 复制的影响

100 nmol/L TSA 和 200 nmol/L TSA 分别作用于 HepG2.2.15

细胞 3 d, 弃去培养基中的 TSA, 继续培养 2 d, 用 real-time PCR 发现, 不同浓度 TSA 处理后, 每个 HepG2.2.15 细胞中平均 HBV 拷贝数分别为 99、185、263 个 (图 6、表 5), 说明 TSA 能明显地促进 HBV 的表达 (0 nmol/L vs. 100 nmol/L, $P=0.000$; 0 nmol/L vs. 200 nmol/L, $P=0.000$), Southern blot 进一步证实 TSA 能明显地促进 HBV 复制中间体的表达 (图 7)。



a. 与 0 nmol/L 组相比, 差异具有统计学意义

图 6 Real-time PCR 检测 TSA 对 HBV 复制中间体表达的影响

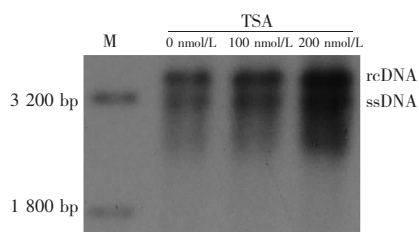
Fig.6 Effect of TSA on the expression of HBV replicative intermediates determined by real-time PCR

表 5 Real-time PCR 检测 TSA 对 HBV 复制中间体表达的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab.5 Effect of TSA on the expression of HBV replicative intermediates determined by real-time PCR ($n=3, \bar{x} \pm s$)

分组	每个细胞 HBV 拷贝数 (个)
0 nmol/L	99.00 ± 9.17
100 nmol/L	185.00 ± 12.00 ^a
200 nmol/L	263.67 ± 14.05 ^a

注: a, 与 0 nmol/L 组相比, 差异具有统计学意义



rcDNA: HBV 不饱和和环状 DNA; ssDNA: HBV 双链 DNA;
M: HBV DNA marker

图 7 Southern blot 检测 TSA 对 HBV 复制中间体表达的影响

Fig.7 Effect of TSA on the expression of HBV replicative intermediates determined by Southern blot

2.5 TSA 对 HBV 相关蛋白表达的影响

HepG2.2.15 细胞经过以上相同的处理后 (处理方法如 2.4), 收集培养基上清和提取细胞蛋白质, Western blot 显示, TSA 能明显促进 HBV 核心蛋白 (HBc) 的表达 (图 8), ELISA 检测培养基上清中的 HBsAg 和 HBeAg, 结果显示 TSA 能明显促进 HBsAg (0 nmol/L vs. 100 nmol/L, $P=0.02$; 0 nmol/L vs. 200 nmol/L, $P=0.000$) 和 HBeAg (0 nmol/L vs. 100 nmol/L, $P=0.05$; 0 nmol/L vs. 200 nmol/L, $P=0.001$) 的分泌 (图 9、表 6)。

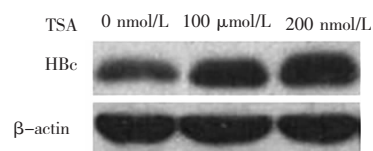
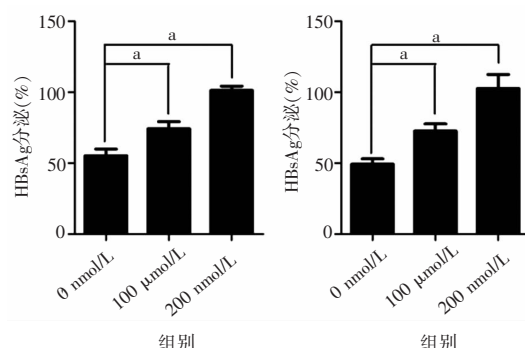


图 8 Western blot 检测 TSA 对 HBc 表达的影响

Fig.8 Effect of TSA on the expression of HBc measured by Western blot



a. 与 0 nmol/L 组相比, 差异具有统计学意义

图 9 ELISA 检测 TSA 对 HBsAg、HBeAg 分泌的影响

Fig.9 Effect of TSA on the secretion of HBsAg and HBeAg measured by ELISA

表 6 ELISA 检测不同浓度 TSA 对 HBsAg、HBeAg 分泌的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab.6 Effect of different concentrations of TSA on the secretion of HBsAg and HBeAg measured by ELISA ($n=3, \bar{x} \pm s$)

分组	0 nmol/L	100 nmol/L	200 nmol/L
HBsAg 分泌 (%)	55.33 ± 8.02	74.33 ± 8.62 ^a	101.33 ± 5.13 ^a
HBeAg 分泌 (%)	49.33 ± 6.51	72.67 ± 8.62 ^a	102.67 ± 17.16 ^a

注: a, 与 0 nmol/L 组相比, 差异具有统计学意义

3 讨论

HBV 基因组长约 3.2 kb, 为部分环状双链 DNA, 其复制过程中最基本的事件是 rcDNA 转化成 cc-cDNA。cccDNA 是 HBV 所有 mRNA 转录的模板, 与多种组蛋白和非组蛋白共同组成病毒微染色体^[12-13], 其形成标志着病毒初始感染。目前, 多项研究证实 cccDNA 的表观遗传修饰可以过程调控 HBV 的复制过程。Pollicino 等^[14]发现与 cccDNA 结合的 H3/H4 组蛋白的乙酰化状态可以调节 HBV 的复制, H1 HDAC 抑制剂可以促进 HBV 的复制。Belloni 等^[12]近来也发现 cccDNA 表观遗传变异常能调节 HBV 微染色体的转录, 细胞 HDAC (CBP、p300、PCAF/GCN5) 和 HDAC (HDAC1、SIRT1) 被募集到了 cccDNA, 他们进一步证实 HDAC1 和 SIRT1 募集到 cccDNA 的

多少与 HBV 的复制水平有关。因此,本研究分别研究了 I、II 类 HDACs 抑制剂,SIRT1 抑制剂对 HBV 复制的影响。本课题组发现 I 类、II 类 HDACs 抑制剂 TSA 对 HBV 复制的影响,与 Belloni 等^[12]发现一致,real-time PCR 和 Southern blot 等实验方法都证实了 TSA 增强了 HBV 的复制能力。更为重要的是本研究发现 SIRT1 的抑制剂 sirtinol 对 HBV 的复制则起到了抑制作用。这一发现与 Belloni 等^[12]的报道不相一致。但遗憾的是,Belloni 等^[12]课题组只在 Huh-7 或 HepG2 细胞中瞬时表达了野生型 HBV 或 HBx 突变型 HBV,检测到 HBx 突变后募集到 cccDNA 微染色体的 SIRT1 水平增加和 HBV 的表达水平降低,并未直接研究 SIRT1 在稳定表达 HBV 的细胞系中对 HBV 复制调控作用。通过本课题组的研究发现组蛋白 I、II 类 HDACs 可能通过调控组蛋白的乙酰化状态从而在 cccDNA 微染色体的转录活性上发挥着主要的功能,而 SIRT1 则可能是通过其它机制从而促进 HBV 的复制。

目前,一些 SIRT1 抑制剂相继被发现,包括 sirtinol^[15]、nicotinamide^[16]、splitomicin^[17]、cambinol^[18]、tenovins^[19]等,其中 sirtinol 是 SIRT1 的特异性抑制剂,并不抑制其它类 HDAC 酶活性。本课题组研究发现 SIRT1 抑制剂 sirtinol 作用于 HepG2.2.15 细胞后,sirtinol 展现了抗 HBV 活性,减少了多种 HBV 大分子的表达,如 HBV DNA、HBc、HBsAg、HBeAg 等,指示着 HBV 的复制受到显著地抑制。这些结果说明是 I 类、II 类 HDACs 而不是 SIRT1 在调控 cccDNA 微染色体表观遗传学方面发挥着主要的作用。尽管这些发现只是初步的,sirtinol 的生物毒性也需要在动物模型上得到证实,但这类药物仍然为治疗 HBV 感染和其相关疾病提供了一种新的选择方案。

参 考 文 献

- [1] Blumberg BS. Hepatitis B virus, the vaccine, and the control of primary cancer of the liver[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(14): 7121-7125.
- [2] Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection—natural history and clinical consequences[J]. N Engl J Med, 2004, 350(11): 1118-1129.
- [3] Liaw YF, Chu CM. Hepatitis B virus infection[J]. Lancet, 2008, 373(9633): 582-592.
- [4] Imai S, Armstrong CM, Kaerberlein M, et al. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase[J]. Nature, 2000, 403(6771): 795-800.
- [5] Inoue T, Hiratsuka M, Osaki M, et al. The molecular biology of mammalian SIRT proteins: SIRT2 in cell cycle regulation[J]. Cell Cycle, 2007, 6(9): 1011-1018.
- [6] Saunders LR, Verdin E. Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging[J]. Oncogene, 2007, 26(37): 5489-5504.
- [7] Cen Y, Youn DY, Sauve AA. Advances in characterization of human sirtuin isoforms: chemistries, targets and therapeutic applications[J]. Curr Med Chem, 2011, 18(13): 1919-1935.
- [8] Du J, Zhou Y, Su X, et al. Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase[J]. Science, 2011, 334(6057): 806-809.
- [9] Marcia CH, Leonard PG. Mammalian sirtuins 2 emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction[J]. Gen Dev, 2008, 20(21): 2913-2921.
- [10] Imai S, Armstrong CM, Kaerberlein M, et al. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase[J]. Nature, 2000, 403(6771): 795-800.
- [11] Bedalov A, Gatabont T, Irvine WP, et al. Identification of a small molecule inhibitor of Sir2p[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(26): 15113-15118.
- [12] Belloni L, Pollicino T, De Nicola F, et al. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(47): 19975-19979.
- [13] 梁蔚芳, 刘志华, 杨洁, 等. Ad-1.2 乙型肝炎病毒感染 HepG2 细胞后 cccDNA 的动态分析[J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(9): 1374-1375.
- [14] Pollicino T, Belloni L, Raffa G, et al. Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones[J]. Gastroenterology, 2006, 130(3): 823-837.
- [15] Grozinger CM, Chao ED, Blackwell HE, et al. Identification of a class of small molecule inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening[J]. J Biol Chem, 2001, 276(42): 38837-38843.
- [16] Bitterman KJ, Anderson RM, Cohen HY, et al. Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1[J]. J Biol Chem, 2002, 277(47): 45099-45107.
- [17] Freitag M, Schemies J, Larsen T, et al. Synthesis and biological activity of splitomicin analogs targeted at human NAD(+)-dependent histone deacetylases (sirtuins)[J]. Bioorg Med Chem, 2001, 19(12): 3669-3677.
- [18] Heltweg B, Gatabont T, Schuler AD, et al. Antitumor activity of a small-molecule inhibitor of human silent information regulator 2 enzymes[J]. Cancer Res, 2006, 66(8): 4368-4377.
- [19] Lain S, Hollick JJ, Campbell J, et al. Discovery, in vivo activity, and mechanism of action of a small-molecule p53 activator[J]. Cancer Cell, 2008, 13(5): 454-463.

(责任编辑: 关蕴良)