

肝 癌

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001695

肝癌细胞中 CDK2 调控宿主限制性因子 SAMHD1 的磷酸化机制研究

唐 丹¹, 胡 杰², 乔 森², 陈彦猛², 周 星², 皮思碟², 胡 源²

(1. 成都市第一人民医院内分泌代谢科, 成都 610094;

2. 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:主要研究乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)感染肝细胞后, 细胞周期激酶 2(cyclin-dependent kinase 2, CDK2)调控宿主限制性因子 SAMHD1(sterile alpha motif and histidine/aspartic acid domain-containing protein 1)磷酸化的分子机制。**方法:**利用 siRNA 干扰技术, 特异性处理肝癌细胞 Huh7.0 的对照组、干扰 CDK1 组和干扰 CDK2 组, 分别用 Southern blot 检测这 3 组中乙肝病毒复制的变化, Western blot 检测这 3 组中 SAMHD1 磷酸化水平的变化, 流式细胞仪检测这 3 组中细胞周期的变化; 进一步通过免疫共沉淀技术鉴定肝癌细胞中 CDK2 激酶和 SAMHD1 的相互作用。**结果:**在肝癌细胞 Huh7.0 中, 与对照组相比, 干扰 CDK1 组和干扰 CDK2 组的细胞周期明显有差异, 分别停滞在 G₂ 期($P=0.001$)或 G₁ 期($P=0.001$)。Western blot 结果表明, 干扰 CDK2 后, 宿主限制性因子 SAMHD1 磷酸化水平下降 48%, Southern blot 结果表明病毒复制水平降低 57% ($P=0.003$), 而干扰 CDK1 后病毒复制水平没有明显变化($P=0.325$)。进一步通过免疫共沉淀发现在肝癌细胞 Huh7.0 中, CDK2 激酶可与 SAMHD1 发生相互作用, 并且相互作用发生在细胞核内。**结论:**HBV 感染肝细胞后, 募集 CDK2 调控宿主限制性因子 SAMHD1 的磷酸化, 拮抗其抗病毒作用。

【关键词】乙肝病毒; SAMHD1; 细胞周期激酶 2; 磷酸化**【中图分类号】**R373.2¹; Q789**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-10-31

CDK2 regulates HBV replication by controlling SAMHD1 phosphorylation in hepatoma cells

Tang Dan¹, Hu Jie², Qiao Miao², Chen Yanmeng², Zhou Xing², Pi Sidie², Hu Yuan²

(1. Department of Endocrinology, Chengdu 1st People's Hospital; 2. Key Laboratory of Molecular Biology for Infectious Diseases, Ministry of Education, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the molecular mechanism of phosphorylation of sterile alpha motif and histidine/aspartic acid domain-containing protein 1 (SAMHD1) in hepatoma carcinoma cell. **Methods:** By knocking down CDK1 or CDK2 expression in hepatoma carcinoma cell, how CDK1 or CDK2 regulated cell cycle, HBV replication and phosphorylation of SAMHD1 was investigated. Furthermore, the interaction of SAMHD1 and CDK2 was analyzed by coimmunoprecipitation assays (Co-IP) and immunofluorescence. **Results:** Flow cytometry assay confirmed most Huh7.0 cells were arrested at S/G₂ phase ($P=0.001$) or G₁ phase ($P=0.001$), respectively when knockdown CDK1 or CDK2. Meanwhile, HBV replication and SAMHD1 phosphorylation levels were significantly influenced by knocking down CDK2 expression ($P=0.003$), not by CDK1 expression ($P=0.325$). In hepatoma cells, SAMHD1 can bind to CDK2, and this interaction located in nucleus. **Conclusion:** Our results provide evidences that HBV employs CDK2, not CDK1 to regulate SAMHD1 phosphorylation during cell cycle, thus contribute to viral replication.

【Key words】hepatitis B virus; sterile alpha motif and histidine/aspartic acid domain-containing protein 1; cyclin-dependent kinase 2; phosphorylation

作者介绍: 唐 丹, Email: 308380151@qq.com,

研究方向: 肝癌发生机制

通信作者: 胡 源, Email: tottyhy@163.com.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81471945); 重庆市科委自然科学基金资助项目 (编号: cstc2014jcyjA10075); 重庆市教委科学技术研究资助项目 (编号: KJ1600205)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180511.1728.007.html> (2018-05-14)

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 是一种嗜肝 DNA 病毒, 感染呈世界范围广泛流行^[1]。HBV 的复制周期主要包括以下 3 个环节: 病毒颗粒的感染; 病毒基因组的转录和复制, 其复制主要以逆转录方式进行; 病毒颗粒的释放。乙肝病毒建立感染复制必然涉及与肝细胞及相关因子的相互作用^[2], 而在长期进化中, 宿主形成一系列具有抗病毒作用

的限制性因子,如 APOBEC3s、SAMHD1、TRIM5 α 、Tetherin、MOV10 等,可直接专一地捕获复制周期中的病毒,从而影响病毒的感染复制过程^[3],同时病毒也通过多种方式逃逸这些限制性因子的作用,因此深入研究 HBV 和宿主限制性因子的相互作用无疑有助于抗病毒靶点的确定和药物的筛选。

SAMHD1 (sterile alpha motif and histidine/aspartic acid domain-containing protein 1) 是最近报道的具有抗病毒作用的重要限制性因子,主要通过降解细胞内病毒复制需要的 dNTP 原料来有效抑制病毒的复制^[4-5],同时 SAMHD1 蛋白 C 端 T592 位点的磷酸化负调控其抗病毒作用^[6]。在 HIV 感染的单核 THP-1 细胞中,细胞周期激酶 1 (cyclin-dependent kinase 1, CDK1) 和 CDK2 激酶参与 SAMHD1 磷酸化^[7-8]。本课题组前期发现 SAMHD1 的磷酸化拮抗其抑制 HBV 的复制^[9],但是 HBV 感染肝细胞后,CDK 激酶如何调控 SAMHD1 磷酸化尚无报道。

为了深入研究 HBV 感染肝细胞后,CDK 激酶调控宿主限制性因子 SAMHD1 磷酸化的机制,本研究利用 siRNA 干扰特异性沉默 CDK1 或 CDK2 激酶的表达,探索干扰后对肝癌细胞周期、HBV 复制、SAMHD1 磷酸化的影响,并通过免疫共沉淀和激光共聚焦证实在 HBV 感染的肝细胞中,病毒主要募集 CDK2 激酶参与调控 SAMHD1 的磷酸化,有助于深入理解 HBV 感染与宿主的相互作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和细胞 pCH9/3091 是含有 HBV 基因组(基因型 D)全长 1.1 倍体序列的 HBV 复制质粒;SAMHD1 表达质粒由北京义翘神州生物基因公司构建,羧基端带有 3 $\times$ HA 标签;CDK1 和 CDK2 表达质粒由广州复能基因公司构建,氨基端含有 3 $\times$ Flag 标签;所有构建的质粒通过基因测序和 Western blot 鉴定;HepAD38 细胞是 HBV 稳定复制的肝癌细胞系,Huh7.0 细胞由重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室保存。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清购自天津 TBD 公司, MEM 培养基、青-链霉素购自美国 Hyclone 公司, HA 鼠单克隆抗体(AH158)购自碧云天生物技术公司, Flag 鼠多克隆抗体(MA1-91878)购自 Thermo 公司, HBc 兔多克隆抗体(B0586)购自丹麦 Dako 公司, HRP 标记山羊抗鼠二抗、HRP 标记山羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术公司, DIG 探针标记检测试剂盒来自 Roche 公司, DNA 和 siRNA 转染试剂 Lipofectamine 3000 购自美国 Invitrogen 公司, siRNA 合成和设计由上海吉玛公司提供, 特异性干扰序列列表 1。

表 1 siRNA 干扰序列
Tab.1 Sequences of siRNA

siRNA 靶基因	序列(5'→3')
siRNA-CDK1	FP:CCUGGUCAGUACAUGGAU RP:AAUCCAUGUACUGACCAGG
siRNA-CDK2	FP:CCAGCUCUUCGGAUCUUU RP:AAAGAUCGCGAAGAGCUGG

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和质粒转染 Huh7.0 和 HepAD38 细胞采用含 10%胎牛血清、1%青-链霉素和 1%丙酮酸钠的 MEM 培养基,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养。转染质粒和 siRNA 过程按照转染试剂 Lipofectamine 3000 说明书进行。实验分成干扰对照组(siRNA NC 组)、干扰 CDK1 组(siRNA CDK1 组)和干扰 CDK2 组(siRNA CDK2 组),每组实验都进行 3 次重复实验。

1.2.2 免疫共沉淀和 Western blot 肝癌细胞 Huh7 转染质粒后,使用含蛋白酶抑制剂 Cocktail(罗氏)和 1 mmol/L PMSF 的 RIPA 裂解液冰上裂解细胞 30 min。细胞裂解液与不同的一抗在 4 $^{\circ}$ C 反应过夜,形成的免疫复合物与琼脂糖珠 G(Merck, 德国)在 4 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。最后,用 12%的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离样本,转膜至 PVDF 膜,用对应的一抗、二抗进行孵育, ECL 发光显影,采用软件 Image J 对蛋白质水平进行定量分析。实验所用的一抗为:HBc 抗体(Dako, 丹麦)、HA 抗体(碧云天)、Flag 抗体(Thermo, 美国)、CDK1 抗体(Santa Cruz, 美国)、CDK2 抗体(Santa Cruz, 美国)、SAMHD1 抗体和 T-592 位点的磷酸化抗体(CST 公司)。

1.2.3 病毒核心颗粒 DNA 的提取 参考文献[10]方法提取胞内病毒核心颗粒 DNA。细胞转染 72 h 后裂解,35% PEG 8000 沉淀病毒核心颗粒后,通过蛋白酶 K 消化过夜,然后用酚/氯仿抽提,乙醇沉淀得到病毒核心颗粒 DNA。

1.2.4 Southern blot 按照文献[11]方法通过 Southern blot 检测病毒颗粒中的 DNA。提取的病毒核心颗粒 DNA 经 1.2%琼脂糖凝胶电泳,碱变性 1 h 后转移到尼龙膜上,紫外交联固定 DNA 后加入地高辛(DIG)标记的 DNA 探针于 42 $^{\circ}$ C 水浴箱中杂交过夜,然后孵育抗 DIG 抗体(1:10 000),化学发光显色。

1.2.5 激光共聚焦 HepAD38 细胞种板于含有盖玻片的 6 孔板中,12 h 后转染质粒,转染 48 h 后做免疫荧光实验。4%多聚甲醛室温处理 25 min,对应的一抗孵育后,分别加入鼠抗荧光二抗 Alexa Fluor[®] 488 和兔抗荧光二抗 Alexa Fluor[®] 639(Thermo, 美国), DAPI 染核处理后,在莱卡共聚焦显微镜下观察。

1.2.6 流式细胞分析 细胞通过 1% FBS 饥饿处理 72 h 同步化,转染相应的 siRNA 后,再用 10% FBS 培养,收集细胞后用 70%乙醇于 -20 $^{\circ}$ C 固定 1 d 后,50 mg/mL 溴乙锭处理 30 min 后,流式细胞技术分析。

1.3 统计分析

每组实验都进行 3 次独立重复实验,数据由 GraphPad Prism 软件处理,3 组变量采用单因素方差分析,组间两两比

较采用 Dunnett-*t* 法, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 干扰 CDK1 和 CDK2 对 Huh7.0 细胞周期的影响

由于 CDK1 和 CDK2 激酶主要参与细胞周期调控, 因此首先研究干扰 CDK1 或 CDK2 对肝癌细胞 Huh7.0 细胞周期的影响: siRNA 分别干扰 CDK1 和 CDK2 后, 收集细胞蛋白质检测表明, siRNA 干扰 CDK1 或 CDK2 有效率至少 >70% (图 1A)。进一步通过血清饥饿处理使细胞同步化, 然后转染 CDK1 或 CDK2 激酶的特异性 siRNA。通过流式细胞仪分析显示, 在 G_1 期, 与对照组 (64.43 ± 0.32)% 相比, 干扰 CDK1 组相对细胞含量为 (56.14 ± 1.43)%, 干扰 CDK2 组相对细胞含量为 (73.63 ± 0.81)%。3 组间差异有统计学意义 ($F=81.590$, $P=0.000$), 其中干扰 CDK1 组与干扰对照组相比有统计学差异 ($P=0.001$), 干扰 CDK2 组与干扰对照组相比有统计学差异 ($P=0.001$); 在 S 期, 与对照组 (24.71 ± 0.87)% 相比, 干扰 CDK1 组相对细胞含量为 (25.03 ± 1.19)%, 干扰 CDK2 组相对细胞含量为 (16.88 ± 0.71)%。3 组间差异有统计学意义 ($F=23.840$, $P=0.001$), 其中干扰 CDK1 组与干扰对照组相比无统计学差异 ($P=0.817$), 干扰 CDK2 组与干扰对照组相比有统计学差异 ($P=0.001$); 在 G_2 期, 与对照组 (10.87 ± 1.15)% 相比, 干扰 CDK1 组相对细胞含量为 (18.83 ± 1.09)%, 干扰 CDK2 组相对细胞含量为 (9.49 ± 0.20)%。3 组间差异有统计学意义 ($F=29.700$, $P=0.001$), 其中干扰 CDK1 组与干扰对照组相比有统计学差异 ($P=0.001$), 干扰 CDK2 组与干扰对照组相比无统计学差异 ($P=0.334$)。因此干扰 CDK1 激酶组细胞明显停滞

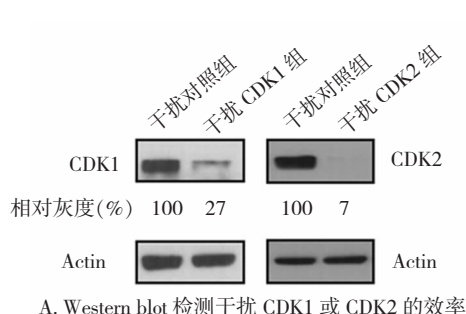
在 G_2 期 ($P=0.001$), 而干扰 CDK2 激酶组细胞停滞在 G_1 期 ($P=0.001$) (图 1)。

2.2 干扰 CDK1 和 CDK2 对 HBV 复制的影响

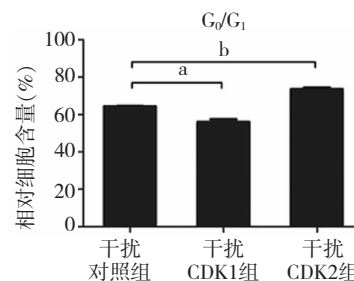
在 Huh7.0 细胞中特异性干扰 CDK1 或 CDK2 表达后, 转染外源性的 HBV 复制质粒, 3 d 后提取病毒颗粒。通过 Southern blot 检测发现, 与干扰对照组 (100.00 ± 8.18)% 相比, 干扰 CDK1 组病毒复制水平为 (87.28 ± 10.23)%, 而干扰 CDK2 组病毒复制水平仅为 (41.94 ± 6.26)% (图 2A), 3 组间差异有统计学意义 ($F=13.250$, $P=0.006$), 其中干扰 CDK1 组与干扰对照组相比无统计学差异 ($P=0.325$), 干扰 CDK2 组与干扰对照组相比有统计学差异 ($P=0.003$)。同时提取细胞上清, 检测 HBV 表面抗原的变化。结果表明, 与干扰对照组 (99.52 ± 9.33)% 相比, 干扰 CDK1 组 (99.27 ± 12.59)% 或干扰 CDK2 组 (95.17 ± 12.19)% 上清中 HBV 表面抗原表达水平没有统计学差异 ($F=0.101$, $P=0.905$, 图 2B)。

2.3 干扰 CDK1 和 CDK2 对 SAMHD1 磷酸化的调控

前期报道表明, Roscovitine 作为 CDK 激酶广谱抑制剂, 可通过抑制宿主限制性因子 SAMHD1 的磷酸化而抑制 HBV 复制。因此, 将进一步研究 HBV 感染后, CDK1 或 CDK2 对 SAMHD1 磷酸化的调控作用。同样, 在肝癌细胞 Huh7.0 特异性干扰 CDK1 或 CDK2 激酶的表达, 转染外源性的 HBV 复制质粒, 72 h 提取磷酸化蛋白, 检测内源性的 SAMHD1 磷酸化水平。结果表明, 作为对照, 干扰 CDK1 或 CDK2 激酶后, HBV 核心蛋白的表达没有发生明显变化; 干扰 CDK1 组 SAMHD1 磷酸化水平仅仅下降 18%, 而干扰 CDK2 组 SAMHD1 磷酸化水平下降 52% (图 3), 表明在 HBV 感染中, CDK2 激酶参与了 SAMHD1 磷酸化。

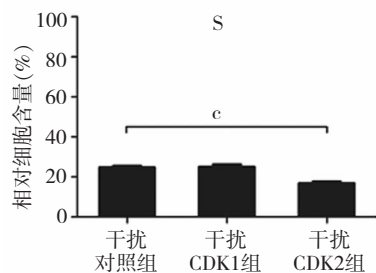


A. Western blot 检测干扰 CDK1 或 CDK2 的效率



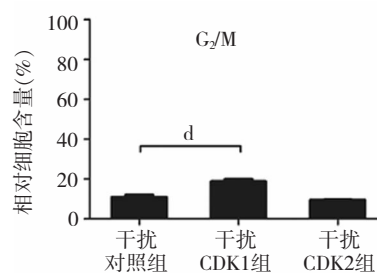
a: 与干扰对照组比较, $P < 0.01$; b: 与干扰对照组比较, $P < 0.01$

B. 干扰 CDK1 或 CDK2 对肝癌细胞 Huh7.0 周期 (G_0/G_1) 的影响



c: 与干扰对照组比较, $P < 0.01$

C. 干扰 CDK1 或 CDK2 对肝癌细胞 Huh7.0 周期 (S) 的影响



d: 与干扰对照组比较, $P < 0.01$

D. 干扰 CDK1 或 CDK2 对肝癌细胞 Huh7.0 周期 (G_2/M) 的影响

图 1 干扰 CDK1 和 CDK2 对 Huh7.0 细胞周期的影响

Fig.1 Effect of cell cycle of Huh7.0 cell by knocking down CDK1 or CDK2

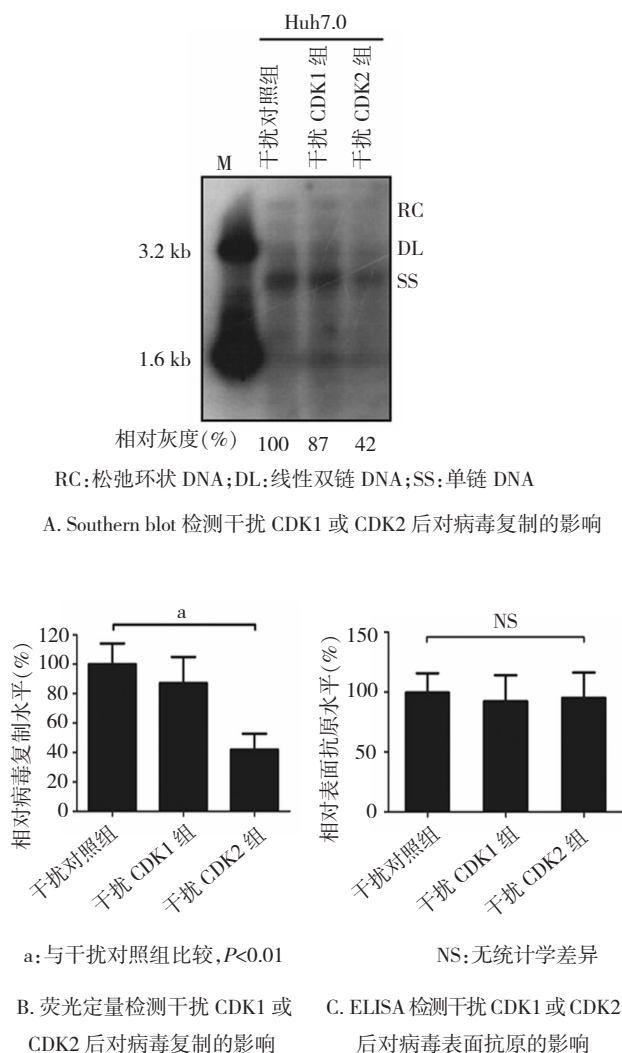
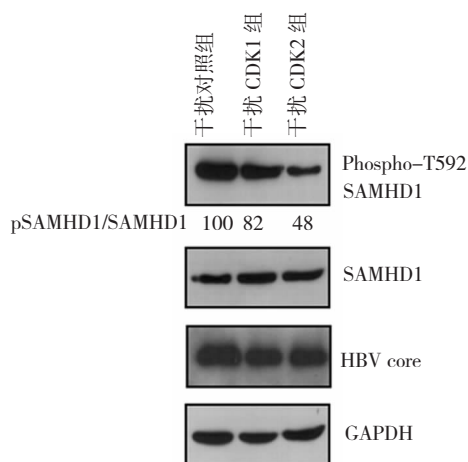


图 2 干扰 CDK1 或 CDK2 对 HBV 复制的影响

Fig.2 Effect of HBV DNA replication by siRNA targeting CDK1 or CDK2

图 3 干扰 CDK1 或 CDK2 对宿主 SAMHD1 的磷酸化影响
Fig.3 Effect of SAMHD1 phosphorylation by knocking down CDK1 or CDK2

2.4 CDK2 激酶与 SAMHD1 的相互作用

进一步研究在 Huh7.0 细胞中, SAMHD1 与 CDK1 或 CDK2 的相互作用。带有 HA 标签的 SAMHD1 和 Flag 标签的 CDK1 或 CDK2 共转染后, 通过免疫相互作用检测表明: 外源性过表达的 SAMHD1 可以与 CDK2 蛋白发生相互作用, 而不与 CDK1 发生相互作用(图 4), 表明在肝癌细胞中 CDK2 激酶可与 SAMHD1 发生相互作用。

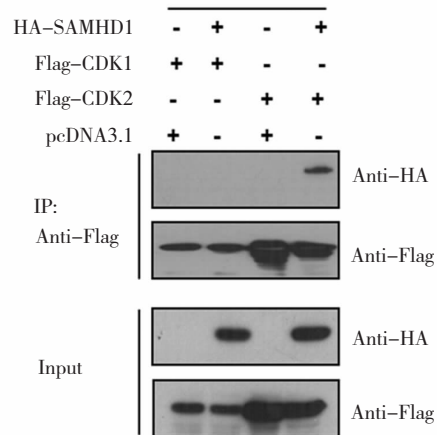


图 4 肝癌细胞中 SAMHD1 与 CDK2 的相互作用

Fig.4 SAMHD1 interacts with CDK2 in Huh7.0 cells

进一步通过激光共聚焦技术证实 SAMHD1 与 CDK2 激酶的相互作用。在 HBV 稳定复制的 HepAD38 细胞中, 转染外源性 HA-SAMHD1 和 Flag-CDK1 或 Flag-CDK2, 通过荧光二抗染色后结果表明 CDK2 激酶和 SAMHD1 在 HBV 稳定复制的肝癌细胞中可发生相互作用, 并且相互作用发生在细胞核内(图 5)。

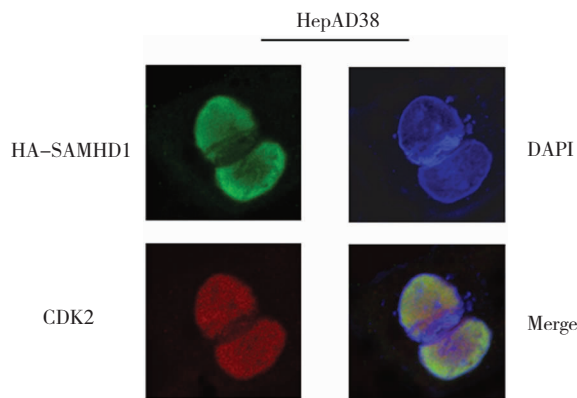


图 5 激光共聚焦分析 SAMHD1 和 CDK2 的相互作用

Fig.5 Co-localization of SAMHD1 with CDK2 in HepAD38 cells

3 讨论

SAMHD1 蛋白是一种广谱抗逆转录病毒和 DNA 病毒天然免疫因子, 在宿主的防御过程中起着重要的作用。人源 SAMHD1 基因包括 SAM(sterile

alpha motif) 和 HD (histidine-aspartic) 两个结构域, 其中 HD 结构域具有核酸酶和磷酸水解酶活性, 将细胞中脱氧核苷三磷酸 (dNTPs) 水解成脱氧核苷 (dNs) 和三磷酸 (3Pi), 是真核生物中迄今为止发现的唯一参与核酸代谢降解 dNTPs 的蛋白^[12]。更为重要的是, 这种抗病毒作用受到其磷酸化的负调控^[7], 但是这种磷酸化状态是否是通过影响磷酸水解酶活性来限制病毒复制却存在较大争议。Welbourn 等^[13]认为 SAMHD1 蛋白 T592 位点的磷酸化修饰会导致抗病毒能力丧失, 但是其 dNTP 酶活性却没有发生改变, 然而 Tang 等^[14]对 SAMHD1 蛋白磷酸化突变体 T592E 的结构解析发现 T592 位点磷酸化改变了 SAMHD1 四聚体的结构, 从而影响其磷酸水解酶 dNTPase 的结构和活性。这些矛盾的结果进一步暗示 SAMHD1 磷酸化调控其抗病毒作用的机制非常复杂, 需要深入研究。本课题组前期结果表明在 HBV 感染中, SAMHD1 的磷酸化拮抗了其限制 HBV 复制的作用, 并且和磷酸水解酶活性相连, 这种磷酸化主要影响病毒 DNA 的复制, 而不影响其对表面抗原和病毒蛋白的合成^[9], 但是在肝细胞中, HBV 如何利用细胞周期激酶调控 SAMHD1 的磷酸化尚不清楚。

真核生物细胞周期主要分成 Gap 1 (G1) 期、合成 (S) 期、Gap 2 (G2) 期和有丝分裂 (M) 期, 其中细胞周期蛋白依赖性激酶 CDK1、CDK2 和 CDK6 在调节细胞周期中进程中发挥重要的作用。研究报道认为 HBV 感染可影响细胞周期进程, 诱导肝细胞从静息期进入 G1 期, 导致细胞增殖紊乱^[15], 从而影响病毒的复制。本研究首先在肝癌细胞中, 通过 siRNA 沉默 CDK1 或 CDK2, 发现干扰 CDK2 后病毒的复制水平明显下降, 而上清中表面抗原没有发生明显下降, 同时限制性因子 SAMHD1 发生去磷酸化作用, 暗示在调控 SAMHD1 的磷酸化及病毒的复制中, CDK2 激酶发挥更为重要的作用。同时结合免疫共沉淀技术证实了在肝癌细胞中, CDK2 激酶在细胞核内能与 SAMHD1 发生相互作用, 暗示 HBV 在感染后, 不仅诱导肝细胞从静息期进入 G1 期, 同时募集细胞周期激酶 CDK2 对宿主限制性因子 SAMHD1 磷酸化, 使其丧失抗病毒作用, 帮助病毒持续复制。

本研究主要通过 siRNA 和免疫共沉淀技术发现在肝癌细胞中, CDK2 激酶参与了宿主限制性因子 SAMHD1 的磷酸化作用, 从而调控其病毒作用, 其结果有助于进一步理解 HBV 感染与宿主的相互作用。

参 考 文 献

- [1] Revill P, Testoni B, Locarnini S, et al. Global strategies are required to cure and eliminate HBV infection[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2016, 13(4): 239–248.
- [2] Nguyen DH, Ludgate L, Hu J. Hepatitis B virus–cell interactions and pathogenesis[J]. J Cell Physiol, 2008, 216(2): 289–294.
- [3] Zheng YH, Jeang KT, Tokunaga K. Host restriction factors in retroviral infection: promises in virus–host interaction[J]. Retrovirology, 2012, 9: 112.
- [4] Lahouassa H, Daddacha W, Hofmann H, et al. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates[J]. Nat Immunol, 2012, 13(3): 223–228.
- [5] Kim ET, White TE, Brandariz–Núñez A, et al. SAMHD1 restricts herpes simplex virus 1 in macrophages by limiting DNA replication[J]. J Virol, 2013, 87(23): 12949–12956.
- [6] Welbourn S, Dutta SM, Semmes OJ, et al. Restriction of virus infection but not catalytic dNTPase activity is regulated by phosphorylation of SAMHD1[J]. J Virol, 2013, 87(21): 11516–11524.
- [7] Cribier A, Descours B, Valadão AL, et al. Phosphorylation of SAMHD1 by cyclin A2/CDK1 regulates its restriction activity toward HIV–1[J]. Cell Rep, 2013, 3(4): 1036–1043.
- [8] St Gelais C, de Silva S, Hach JC, et al. Identification of cellular proteins interacting with the retroviral restriction factor SAMHD1[J]. J Virol, 2014, 88(10): 5834–5844.
- [9] 胡杰, 陈彦猛, 乔森, 等. Roscovitine 抑制 HBV 复制的机制研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2017, 37(4): 487–491.
- [10] Hu Y, Cheng X, Cao F, et al. β -Thujaplicinol inhibits hepatitis B virus replication by blocking the viral ribonuclease H activity[J]. Antiviral Res, 2013, 99(3): 221–229.
- [11] Luo X, Huang Y, Chen Y, et al. Association of hepatitis B virus covalently closed circular DNA and human APOBEC3B in hepatitis B virus–related hepatocellular carcinoma[J]. PLoS One, 2016, 11(6): e0157708.
- [12] Franzolin E, Pontarin G, Rampazzo C, et al. The deoxynucleotide triphosphohydrolase SAMHD1 is a major regulator of DNA precursor pools in mammalian cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(35): 14272–14277.
- [13] Welbourn S, Dutta SM, Semmes OJ, et al. Restriction of virus infection but not catalytic dNTPase activity is regulated by phosphorylation of SAMHD1[J]. J Virol, 2013, 87(21): 11516–11524.
- [14] Tang C, Ji X, Wu L, et al. Impaired dNTPase activity of SAMHD1 by phosphomimetic mutation of Thr–592[J]. J Biol Chem, 2015, 290(44): 26352–26359.
- [15] Gearhart TL, Bouchard MJ. The hepatitis B virus X protein modulates hepatocyte proliferation pathways to stimulate viral replication[J]. J Virol, 2010, 84(6): 2675–2686.

(责任编辑: 张辉洁)