

## 应用抑制性消减杂交技术筛选 HCV p7TP2 反式调节基因

袁菊 成军 洪源 陶明亮 靳亚平 李越 李康 杨延平

**【摘要】** **目的** 应用抑制性消减杂交技术筛选 HCV p7TP2 反式调节基因。**方法** 采用实时定量 PCR 验证 HCV p7 下调 p7TP2 基因的表达,并应用抑制性消减杂交技术筛选并构建 p7TP2 下调表达基因的消减文库。用活细胞发光法检测 p7TP2 基因抑制 Huh-7 细胞系的增殖。**结果** 经同源性分析 p7TP2 下调表达的基因主要位于线粒体,并与细胞凋亡有关。p7TP2 基因转染的 Huh-7 细胞的活性被显著抑制。**结论** p7TP2 基因功能的研究为 HCV 致病机制的研究奠定了基础。

**【关键词】** 实时定量 PCR; 下调表达; 细胞凋亡; 丙型肝炎病毒

**Screening of the target genes transactivated by HCV p7TP2 with suppression subtractive hybridization technique** YUAN Ju, CHENG Jun, HONG Yuan, TAO Ming-liang, JIN Ya-ping, LI Yue, LI Kang, YANG Yan-ping. Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Corresponding author: CHENG Jun, Email: cj@genetherapy.com.cn

**【Abstract】** **Objective** To screen the target genes transactivated by HCV p7TP2 with suppression subtractive hybridization technique. **Methods** Realtime PCR was used to check whether HCV p7 down-regulated expression of p7TP2 and suppression subtractive hybridization technique was used to screen and set up the subtractive library down-regulated by HCV p7TP2. Cell viability was detected by celltiter-Glo luminescent to check whether p7TP2 gene could inhibit generation of huh-7 cells. **Results** Homological analysis showed p7TP2 down-regulated genes mainly located in the mitochondrion and involved in cell apoptosis. The growth of huh-7 cells transfected with p7TP2 gene was dramatically inhibited compared with the parent huh-7 cells. **Conclusions** This finding brought some new clues for further study on biological functions of p7TP2 and established a foundation for studying the pathogenesis of HCV.

**【Key words】** Realtime PCR; Down-regulation; Cell apoptosis; HCV

基金项目: 国家自然科学基金项目(C03011402、C30070689); 军队九五科技攻关项目(98D063); 军队回国留学人员启动基金项目(98H038); 军队十五科技攻关青年基金项目(01Q138); 军队十五科技攻关项目(01MB135)

作者单位: 100011 北京市, 北京地坛医院传染病研究所(袁菊、成军、洪源、陶明亮、李越、李康); 西北农林科技大学动物科技学院(袁菊、陶明亮、靳亚平、杨延平)

通讯作者: 成军 Email: cj@genetherapy.com.cn

丙型肝炎病毒(HCV)是世界范围内引起慢性肝炎的主要病原之一,常导致严重肝病,包括肝硬化和肝细胞癌(HCC)<sup>[1]</sup>。HCV基因组含有一个长的开放阅读框架(ORF),编码一个由约3010个氨基酸残基组成的多肽,p7是由HCV基因组2580~2768核苷酸(nt)间的基因编码的由63个氨基酸残基组成的一个小蛋白,其编码基因位于结构蛋白和非结构蛋白编码基因之间<sup>[2]</sup>。p7对病毒复制并非关键性的,但对感染性病毒的产生是必不可少的,p7可以定位在线粒体或内质网衍生的微粒体的膜结构,据其在细胞内分布的复杂性推测p7在HCV生命周期中在细胞内或者作为病毒粒子组件起着多重作用<sup>[3]</sup>。

p7TP2基因是本课题组应用基因表达谱芯片技术研究p7蛋白对于宿主细胞基因的反式调节作用时,发现并鉴定的p7蛋白下调表达的未知功能靶基因,命名为p7TP2,该序列被美国核苷酸序列数据库GenBank收录,收录号码为AY819648,开放读码框长495bp,编码164个氨基酸残基<sup>[4]</sup>。基因表达谱芯片技术是近年新发展起来的一项研究差异基因表达的分子生物学前沿技术,为了证实基因芯片实验结果的可靠性,实验应用实时荧光定量RT-PCR检测HCV p7蛋白对p7TP2基因的反式调节作用,并利用抑制性消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)筛选p7TP2新基因上调基因的类型,对p7TP2表达载体转染Huh-7细胞进行研究并结合生物信息学技术分析p7TP2蛋白反式激活作用的靶基因,同时研究了p7TP2基因对Huh-7细胞生长速度的影响,为p7TP2基因功能的进一步研究及HCV的致病机制研究提供了新的思路。

## 材料和方法

### 一、细胞和质粒及主要试剂

酵母细胞瘤细胞系Huh-7、大肠埃希菌DH5 $\alpha$ 、质粒pcDNA 3.1/myc-His A由本室保存;重组质粒pcDNA 3.1/myc-His A-p7TP2由本室构建<sup>[4]</sup>;FuGENE6转染试剂购自Roche公司;mRNA Purification试剂盒购自Amersham Pharmacia Biotech公司;PCR-Select cDNA Subtraction试剂盒、50  $\times$  PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning试剂盒购自Clontech公司;High Pure PCR Product Purification试剂盒购自Boehringer Mannheim公司;T7、SP6通用引物及pGEM-Teasy载体购自Promega公司;脂质体转染试剂盒Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司;DMEM培养基、OPTI-MEM I Reduced Serum Medium购自Gibco公司;SYBR ExScript RT-PCR Kit购自TaKaRa公司;celltiter-Glo luminescent cell viability assay购自Promega,引物合成由上海生物工程技术服务公司完成,测序由北京三博远志有限公司完成。

### 二、方法

1. 细胞培养:酵母细胞瘤细胞系HepG2及Huh-7在5% CO<sub>2</sub>和37 $^{\circ}$ C的条件下,在含10%胎牛血清(FBS购自Hyclone)的DMEM培养基(Invitrogen公司)中贴壁生长(含100 U/ml青霉素,100 mg/L链霉素),细胞用含0.25%胰蛋白酶和0.02% EDTA的消化液消化进行传代。

2. 实时荧光定量RT-PCR验证HCV p7下调p7TP2基因的表达:(1)根据

p7TP2 基因的开放读码框设计两条引物,上游引物:5'-AGCCCACTGCACTCT-CAGAT-3',下游引物:5'-TCCAGGTAGGTGAGCTGCTT-3',PCR 扩增片段长 140 bp,同时扩增 GAPDH 作为实时荧光定量 RT-PCR 的内参照,其上游引物:5'-CCT-GTTCGACAGTCAGCCG-3',下游引物:5'-CGACCAAATCCGTTGACTCC-3',PCR 扩增片段长 100 bp;(2)细胞转染及总 RNA 提取:在六孔板常规培养肝母细胞瘤细胞 Huh-7,当细胞密度长至 85%~90% 时应用 Lipofectamine 2000 转染 pcDNA<sup>TM</sup> 3.1(-)空及 pcDNA<sup>TM</sup> 3.1(-)-HCV p7 质粒,24 h 后应用 Trizol(Invitrogen)一步法提取细胞总 RNA,经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性定量分析;(3)实时荧光定量 RT-PCR 反应将定量的总 RNA 用 SYBR ExScript RT-PCR Kit 反转录总 RNA,反转录条件:42℃ 15 min,95℃ 2 min,使用 Light Cycler PCR 仪(Roche),SYBR ExScript RT-PCR Kit(TaKaRa)进行实时荧光定量 RT-PCR 扩增,扩增条件:变性 95℃,10 s;PCR 扩增 95℃ 5 s,65℃ 20 s,45 个循环;熔解曲线生成 60℃ 15 s。实时荧光定量 RT-PCR 体系见表 1、表 2。电泳检测 PCR 扩增情况,每组做 2 个复孔,共重复 3 次。

表 1 总 RNA 反转录体系

试剂	5×ExScript 缓冲液	d NTP 混合物(各 10 mmol/L)	随机引物(100 μmol/L)	ExScript (200 U/μl)	RNase 抑制剂 (40 U/μl)	总 RNA	去 RNA 酶 ddH <sub>2</sub> O
使用量	2.0 μl	0.5 μl	0.5 μl	0.25 μl	0.25 μl	500 ng	加至总体积为 10 μl

表 2 实时荧光定量 PCR 体系(μl)

试剂	SYBR 预混 EXtaq(2×)	PCR 前向引物(10 μmmol/L)	PCR 反向引物(10 μmmol/L)	模板(cDNA 溶液)	灭菌蒸馏水
使用量	10.0	0.4	0.4	2.0	7.2

3. 抑制性消减杂交技术筛选 HCV p7TP2 下调表达基因:(1)细胞转染及 mRNA 提取:HepG2 细胞以  $1 \times 10^6$  接种 35 mm 平皿,常规培养,当细胞密度长至 85%~90% 时,用 Lipofectamine 2000 转染试剂分别将 pcDNA<sup>TM</sup> 3.1/myc-HisA-p7TP2 质粒及 pcDNA<sup>TM</sup> 3.1/myc-His A 空载体转染 HepG2 细胞,48 h 后收获细胞,使用 mRNA Purification 试剂盒,提取 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;(2)消减杂交文库的建立:采用 Clontech 公司的 PCR-Select cDNA Subtraction Kit,常规 SSH 方法按说明书进行:以转染了重组表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA 为模板逆转录合成双链 cDNA(dscDNA),并分别标记为 Tester(转染重组表达质粒)和 Driver(转染空载体),进行正向抑制消减杂交。dscDNA 经 *Rsa* I(一种识别 4 碱基序列的内切酶)消化,产生相对较短的平端片段,纯化酶切产物。将 Tester 的 dscDNA 分为两份,分别连接试剂盒提供的特殊设计的寡核苷酸接头 Adapter 1 和 Adapter 2,然后与过量的 Driver dscDNA 进行杂交;合并两种杂交产物后再与 Driver dscDNA 作第 2 次杂交;然后将杂交产物做选择性 PCR 扩增,使 Tester dscDNA 中特异性表达或高表

达的片段得到特异性扩增;(3)消减文库扩增及克隆鉴定分析:扩增产物与 pGEM-Teasy 载体连接,转化 DH5 $\alpha$  感受态细菌,在含氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上,37 $^{\circ}$ C 培养 18 h。共得到 76 个白色菌落,pGEM -Teasy 载体多克隆位点两端 T7/SP6 引物进行菌落 PCR 扩增,证明含有插入片段后(200 ~ 1000 bp)测序,并且应用生物信息学将测得序列 GenBank 数据库进行同源性分析。

4. 应用活细胞发光法检测 HCV p7TP2 基因对细胞生长的影响:常规培养肝母细胞瘤细胞 Huh-7,以  $5 \times 10^4$  个细胞接种 96 孔板,24 h 后当细胞密度长至 70% ~ 85%,用 Plus Reagent (Invitrogen) 脂质体转染 pcDNA<sup>TM</sup>3.1/myc-HisA-p7TP2 及 pcDNA<sup>TM</sup>3.1/myc-His A 空质粒,以转染第一天开始应用活细胞发光法检测转染活细胞数量相对值,同时连续 7 d 每隔 24 h 检测一次,每组做 6 个复孔共做三次重复实验。

5. 统计学分析:所有数据分析均采用 SPSS 10.0 软件分析,当  $P < 0.05$  时被认为具有统计学意义。

## 结 果

### 一、实时荧光定量 RT-PCR 细胞转染及总 RNA 提取

常规培养肝母细胞瘤细胞系 Huh-7 并转染 pcDNA<sup>TM</sup>3.1(-)空及 pcDNA<sup>TM</sup>3.1(-)-HCV p7 质粒,24 h 后应用 Trizol (Invitrogen) 一步法提取细胞的总 RNA,经琼脂糖凝胶电泳分析,结果如图 1,分光光度计进行定性定量分析显示  $A_{260}/A_{280}$  在 1.8 ~ 2.0 之间, $A_{260}/A_{230}$  大于 2.3,电泳检测总 RNA 为 28 S 及 18 S 的亮带,表明 RNA 质量高,可用于进一步分析。

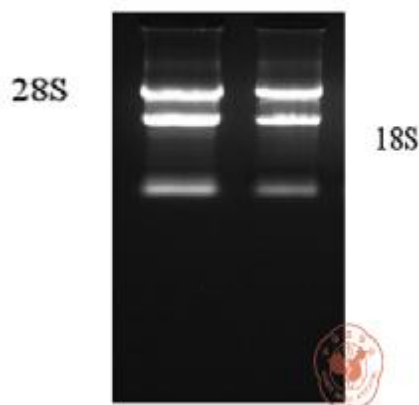


图 1 提取 Huh-7 细胞的总 RNA  
左为转染 pcDNA<sup>TM</sup>3.1(-)空,右  
转染 pcDNA<sup>TM</sup>3.1(-)-HCVp7

### 二、实时荧光定量 RT-PCR 反应

1. 熔解曲线分析:熔解曲线分析对照通用引物扩增的 GAPDH PCR 产物熔解曲线峰值为 85.8 $^{\circ}$ C(图 2),重组特异性引物扩增 p7TP2 PCR 产物熔解曲线峰值为 87.0 $^{\circ}$ C(图 2),峰型锐利,熔解温度较为均一。PCR 产物进行凝胶电泳鉴定

可见单一清晰条带,条带位置与预期 PCR 扩增产物大小吻合(图3),说明本实验设计的 2 对引物扩增的 PCR 产物均有较强的特异性。

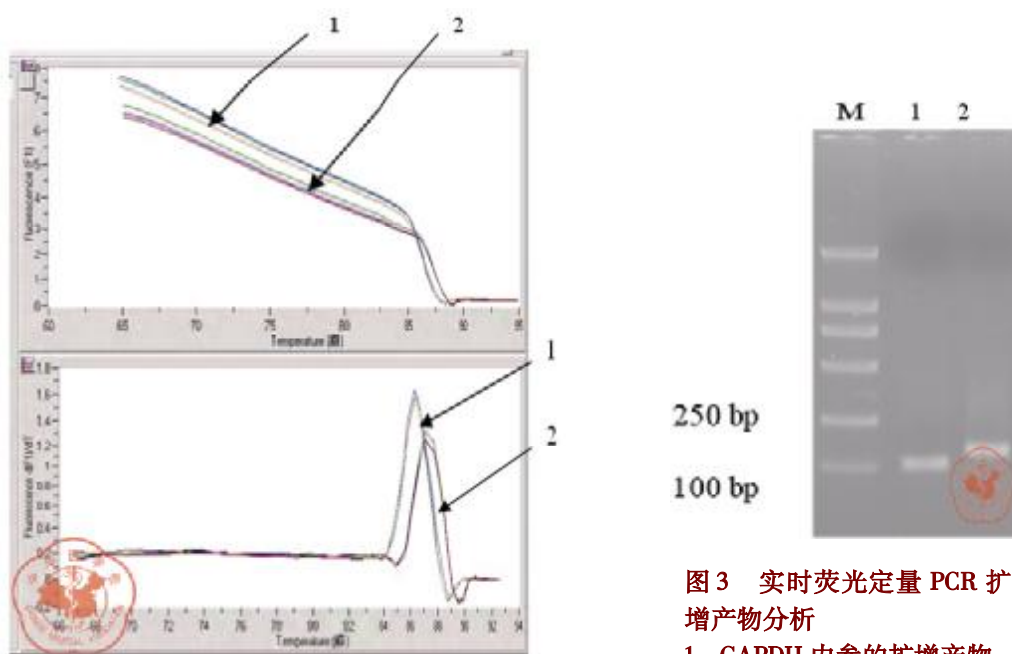


图2 实时荧光定量 PCR 扩增 p7TP2 基因和 GAPDH 内参的熔解曲线  
1. p7TP2 熔解曲线  
2. GAPDH 熔解曲线

图3 实时荧光定量 PCR 扩增产物分析  
1. GAPDH 内参的扩增产物  
2. p7TP2 基因的扩增产物

2. 实时荧光定量 RT-PCR 结果:实验结果自动以 CT 值给出,相对表达量计算按照 Livak 等<sup>[5]</sup>的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行计算。结果显示转染了 HCV p7 的细胞组 p7TP2 基因的表达量下降至对照组的 0.3 倍。

### 三、提取细胞 mRNA 的定性及定量分析

使用高质量的 mRNA 是保证 cDNA 高产量的前提。紫外分光检测显示,转染了 pcDNA<sup>TM</sup>3.1/myc-His A-p7TP2 质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA 分别为 4.84  $\mu\text{g}$  和 5.25  $\mu\text{g}$ ,  $A_{260}/A_{280} = 2.02$ 。2.0% 琼脂糖凝胶电泳见 mRNA 为大于 0.5 kb 清晰慧尾片状条带(图4)。

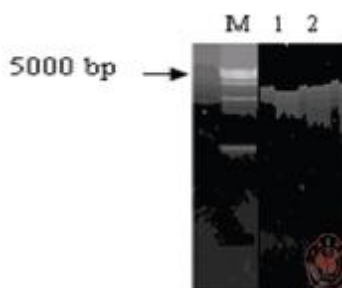


图4 提取转染质粒的细胞 mRNA  
1. 转染空质粒的细胞 mRNA; 2. 转染 p7TP2 质粒的细胞 mRNA

#### 四、dscDNA 两端连接效率检测

dscDNA 与接头连接效率的高低是决定抑制性消减杂交成败的最关键步骤。将连接有 adaptor 1 和 adaptor 2 的两组 dscDNA 分别用不同的特异性引物(看家基因甘油三磷酸脱氢酶 G3PDH 引物及 PCR 引物 1)进行 28 个循环扩增,产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。结果显示两组 dscDNA 扩增产物浓度差距小于 25% (图 5),说明 dscDNA 已与接头高效率连接。

#### 五、cDNA 消减文库消减效率的鉴定

分别取 1  $\mu$ l 抑制性及非抑制性 PCR 产物为模板,用看家基因 G3PDH 引物进行 PCR 扩增,分别在 18、23、28、33 次循环结束时从体系中吸取 5  $\mu$ l 进行电泳鉴定。结果显示:与非抑制性 PCR 产物相比,抑制性 PCR 产物中 G3PDH 基因产物大大减少,说明所构建的消减文库具有很高的消减效率(图 6)。

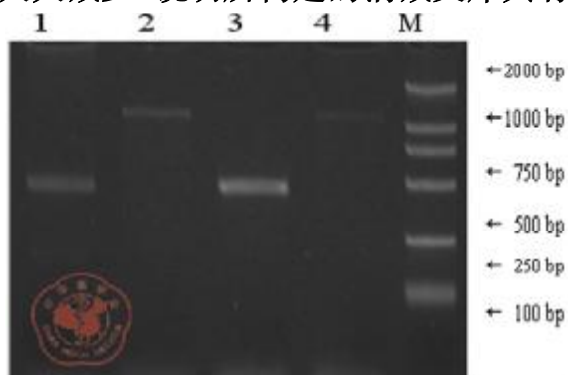


图 5 dscDNA 两端连接效率检测  
1. G3PDH 产物;2. PCR 产物;3. G3PDH 产物;  
4. PCR 产物

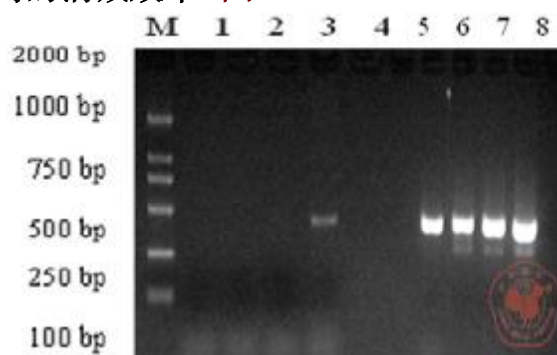


图 6 cDNA 消减文库消减效率的鉴定  
1~4 道分别为消减组 18、23、28、33 循环扩增产物;5~8 为未消减组 18、23、28、33 循环扩增产物

#### 六、差异表达 cDNA 片段的扩增及克隆

将第二次 PCR 扩增产物与 pGEM-Teasy 载体连接,转化大肠埃希菌,进行蓝白斑筛选,对阳性克隆用 pGEM-Teasy 载体上的 SP6、T7 通用引物进行菌落 PCR,结果显示插入片段在 200 ~ 1000 bp 不等。这些条带可能代表差异表达的基因片段(图 7)。

#### 七、cDNA 测序与同源性的初步分析

挑选 30 个克隆测序,与 GenBank 数据库进行比较。有 24 个已知基因的部分序列高度同源(97% ~ 100%),详见表 3。对于每一条基因片段的序列提交 GenBank 进行同源基因序列的搜索,确认所得基因片段的独特性。

#### 八、生长曲线的绘制

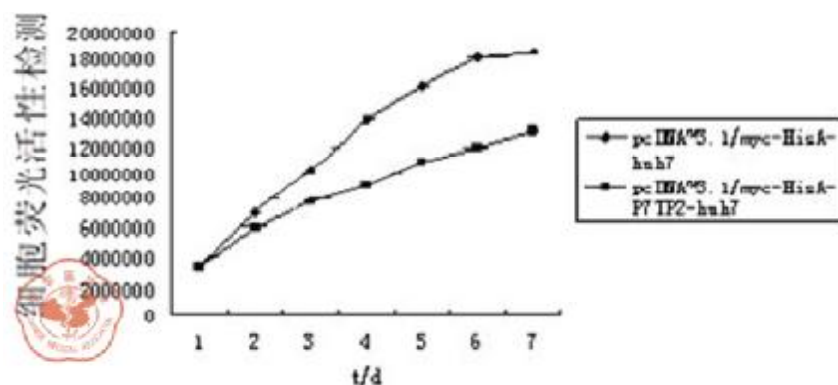
以相同细胞数量接种后,自转染第一天开始连续 7 d 每隔 24 h,以活细胞发光检测为纵坐标,间隔时间为横坐标绘制生长曲线,其生长曲线及统计学分析结果表明:与转染了空载体的细胞相比,转染 p7TP2 基因的 Huh-7 细胞其生长速度明显减慢( $P < 0.05$ )(图 8)。

**表 3** cDNA 测序与同源性的初步分析

同源蛋白名称	同源克隆数	同源性(%)
线粒体核糖体蛋白 L43	2	100
核糖体蛋白 L12	2	99
核糖体蛋白 L23	3	99
钙蛋白酶小亚基(Capns1)	1	99
核糖体蛋白 p2(Rpp2)	2	99
信号转导与激活因子 5A(Stat5a)	3	100
核糖体蛋白 L19(Rpl19)	3	99
细胞色素氧化酶 亚单位 I	1	99
电压依赖性阴离子通道 2(Vdac2)	4	99
蛋白磷酸酶 4(PP4)	3	100



**图 7** 消减 cDNA 文库部分克隆菌落 PCR



**图 8** 转染 p7TP2 质粒及空质粒的 Huh-7 细胞系的生长曲线

### 讨 论

SYBR Green I 是一种只与双链 DNA 结合的染料。当与 DNA 双链结合时,可发出荧光;从 DNA 双链上释放出来时,荧光信号急剧减弱。因此,在一个体系内,其信号强度代表了双链 DNA 分子的数量。荧光定量 PCR 反应过程中,随着 PCR 产物的增加,产物与 SYBR Green I 结合的量也增大,两者结合后形成的荧光信号可被仪器检测到,每经过一个循环,收集一个荧光强度信号,这样就可以通过荧光强度变化检测产物量的变化,从而得到一条荧光扩增曲线图,熔点曲线分析则可

对 PCR 产物的特异性进行鉴定<sup>[6]</sup>。实时荧光定量 PCR 作为一种高效的核酸定量分析方法,是一个全自动的过程,无 PCR 后操作,使交叉污染的几率降到最低,结果更具有可信性,已逐渐被广泛接受用于基因表达的定量分析,并与微阵列等分子生物学技术一起,在后基因组时代的生命科学研究中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。p7TP2 基因是应用基因表达谱芯片技术筛选的 HCV p7 下调表达的靶基因,为了证明该实验结果的可靠性,进行了实时定量 RT-PCR 检测,结果显示 HCV p7 蛋白确实下调 p7TP2 基因的表达,与基因芯片结果一致。

SSH 是由 Diatchenko 等<sup>[8]</sup>建立的用于筛选差异表达基因的新技术,我们利用此方法获得了 10 个 p7TP2 诱导表达下调基因,主要是线粒体基因或与线粒体有关的基因,提示可能与 p7TP2 基因定位于细胞浆线粒体有关<sup>[4]</sup>。下调表达的基因主要包括一些与细胞生长调节蛋白(核糖体蛋白 L12、L43、L19、L23)、线粒体呼吸链酶(细胞色素氧化酶)和细胞凋亡相关的蛋白(信号转导与激活因子 5A,电压依赖性阴离子通道 2,蛋白磷酸酶 4)等有密切关系的蛋白。

信号转导与激活因子(STAT)含有 SH2 和 SH3 结构域,可与特定的含磷酸化酪氨酸的肽段结合。当 STAT 被磷酸化后,聚合成为活化的转录激活因子形式,进入胞核内与靶基因结合,促进其转录。现在已成功克隆 4 种 JAK(JAK1~3 和 Tyk2)与 6 种 STAT(STAT1~6)。信号转导和转录激活因子 5(STAT5)是一类能与磷酸化的酪氨酸结合的 Src 同源区 2(SH2)的蛋白质分子,最早被认为乳腺特异因子,后来又称为转录因子类癌基因,广泛参与细胞增殖和分化,调节细胞凋亡,参与许多细胞因子、激素和生长因子的信号转导,在调控造血细胞和淋巴细胞系的增殖、分化和凋亡中起重要作用<sup>[9-13]</sup>。

电压依赖性阴离子通道(VDAC)是位于所有真核生物线粒体外膜上的一种生孔蛋白,具有多种细胞质酶的结合位点主要包括己糖激酶和甘油激酶的亚型,其在能量代谢及细胞凋亡过程中的作用已引起广泛重视。电压依赖性阴离子通道蛋白 2(VDAC2)可以与线粒体凋亡分子 Bak 或 Bax 组成一个复合物,VDAC2 抑制表达可以促进 Bak 聚合物的形成而诱发细胞凋亡,VDAC2 过表达却有选择性的抑制 Bak 聚合物激活并抑制线粒体细胞凋亡通路<sup>[14,15]</sup>。

蛋白磷酸酶 4(PP4)是 PP2A 亚家族的重要成员之一,PP4 是一种非常重要的磷酸酶,对微管最初在中心体上的生长及微管与中心体连接和维持上都起到重要的作用。在哺乳动物,PP4 参与了中心体相关功能的调节,其表达下降导致间期微管疏松与紊乱,出现异常核分布甚至核丢失,有丝分裂及胞质分裂异常,并抑制细胞的增殖<sup>[16-19]</sup>。

p7TP2 基因可以下调多种基因表达,推测该基因可以促进细胞凋亡。应用细胞活性发光法连续 7 天对转染 pcDNA<sup>TM</sup>3.1/myc-HisA-p7TP2 重组质粒的 Huh-7 细胞进行活细胞数检测,并绘制生长曲线,发现 p7TP2 基因确实具有抑制细胞增殖的作用。本实验结果为 p7TP2 基因功能的深入研究提供了新的研究结果和思路,也为 HCV 致病机制的研究奠定了基础。

## 参 考 文 献

- 1 成军, 李克, 陆荫英, 等. 丙型肝炎病毒调节基因区结合的研究进展. 世界华人消化杂志, 2002, 10: 223-225.
- 2 Lo SY, Selby M, Tong M, et al. Comparative studies of the core gene products of two different hepatitis C virus isolates: two alternative forms determined by single amino acid substitution. *Virology*, 1994, 199: 124-131.
- 3 Griffin S, Clarke D, McCormick C, et al. Signal peptide cleavage and internal targeting signals direct the hepatitis C Virus p7 protein to distinct intracellular membranes. *J Virol*, 2005, 79: 15525-15536.
- 4 袁菊, 郭江, 成军, 等. HCV p7 蛋白反式调节基因 p7TP2 的克隆化及生物信息学分析. 世界华人消化杂志, 2006, 14: 581-587.
- 5 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- 6 张蓓, 沈立松. 实时荧光定量 PCR 的研究进展及其应用. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2003, 24: 327-329.
- 7 Overbergh L, Giulietti A, Valecx D. The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J Biomol Tech*, 2003, 14: 33-43.
- 8 Diatchenko L, Lukyanov S, Lau YF, et al. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol*, 1999, 303: 349-380.
- 9 Nosaka T, Kawashima T, Misawa K, et al. STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *EMBO J*, 1999, 18: 4754-4765.
- 10 Tommi JA, Jian WX, Matthew JL, et al. Inhibition of transcription factor stat5 induces cell death of human prostate cancer cells. *Biol Chem*, 2003, 278: 27287-27292.
- 11 Calo V, Nligiavacca M, Bazan V, et al. Stat proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *Cell Physiol*, 2003, 197: 157-168.
- 12 Marja TN, Jianwu X, Lukas BD, et al. Basal activation of transcription factor signal transducer and activator of transcription 5 (stat5) in Nonpregnant mouse and human breast epithelium. *Mol Endoc*, 2002, 16: 1108-1124.
- 13 Hiroko Y, Hirotake I, Tatasuya T, et al. Naturally occurring dominant-negative Stat5 suppresses transcriptional activity of estrogen receptors and induces apoptosis in T47D breast cancer cells. *Oncogene*, 2003, 22: 1638-1652.
- 14 Cesar Mde C, Wilson JE. All three isoforms of the voltage-dependent anion channel (VDAC1, VDAC2, and VDAC3) are present in mitochondria from bovine, rabbit, and rat brain. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 422: 191-196.
- 15 Emily HY, Cheng, Tatiana V, et al. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science*, 2003, 25: 513-517.
- 16 Huang X, Cheng A, Honkanen RE. Genomic organization of the human PP4 gene encoding a serine/threonine protein phosphatase (PP4) suggests a common ancestry with PP2A. *Genomics*, 1997, 44: 336-343.
- 17 Helps NR, Brewis ND, Lineruth K, et al. Protein phosphatase 4 is an essential enzyme required for organization of microtubules at centrosomes in *Drosophila* embryos. *J Cell Sci*, 1998, 111: 1331-1340.
- 18 Sumiyoshi E, Sugimoto A, Yamamoto M. Protein phosphatase 4 is required for centrosome maturation in mitosis and sperm meiosis in *C elegans*. *J Cell Sci*, 2002, 115: 1403-1410.
- 19 黄秀清, 龙治洵, 宁丽峰, 等. 蛋白磷酸酶 4 在人肺癌细胞 A549 增殖中的功能分析. 生物化学与生物物理进展, 2006, 33: 730-737.

(收稿日期: 2007-06-21)

(本文编辑: 王丹静)

袁菊, 成军, 洪源, 等. 应用抑制性消减杂交技术筛选 HCV p7TP2 反式调节基因[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2008, 2(3): 153-161.