

DOI:10.13350/j.cjpb.220801

• 论著 •

丙型肝炎病毒感染促进 53BP1 蛋白通过泛素-蛋白酶体途径降解的研究*

周亚莉,何玉林,乔冠华,金科,覃培芳,黄海涛,闫建国**

(桂林医学院基础医学院,广西桂林 541004)

【摘要】 目的 探讨丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)对 53BP1 表达的影响及机制。方法 建立 HCV 体外感染 Huh7 细胞模型,采用 Western blot 检测 HCV 感染对 53BP1 总蛋白、胞浆和胞核蛋白表达的影响,qPCR 检测 53BP1 的 mRNA 表达,采用免疫荧光(Immunofluorescence, IF)方法检测 HCV 感染对 53BP1 亚细胞定位的影响;采用免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)法定量检测 HCV 相关肝癌中 53BP1 蛋白的表达,并与癌旁组织及正常肝脏相比较;采用免疫共沉淀(Co-Immunoprecipitation, CO-IP)方法检测 HCV 对 53BP1 蛋白泛素化水平的影响。结果 HCV 感染导致 Huh7 细胞 53BP1 蛋白的相对表达水平为(0.41±0.03),明显低于对照组(1.00±0.08),差异有统计学意义($P<0.01$);在 HCV 感染后,胞核 53BP1 蛋白相对表达水平为(0.35±0.03),明显低于对照组(1.00±0.09),差异有统计学意义($P<0.01$);而胞浆 53BP1 相对表达水平为(1.20±0.18),对照组相对表达水平为(1.00±0.17),两者表达无显著改变($P>0.05$);HCV 感染可导致 53BP1 蛋白,尤其是胞核 53BP1 蛋白的表达下降。免疫荧光结果显示 HCV 感染导致 53BP1 从胞核到胞浆的亚细胞定位改变;免疫组化结果显示,与正常肝脏相比,53BP1 在 HCV 相关 HCC 的癌组织($P<0.01$)和癌旁组织($P<0.05$)中显著降低。机制分析表明 HCV 感染促进 53BP1 的泛素-蛋白酶体途径降解。

结论 HCV 感染可致 Huh7 细胞 53BP1 发生由细胞核到细胞质的定位改变,并促进其通过泛素-蛋白酶体途径降解。

【关键词】 肝细胞癌;丙型肝炎病毒;53BP1;泛素-蛋白酶体降解

【中图分类号】 R373.21

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)08-0869-04

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Aug.;17(8):869-872,879.]

Hepatitis C virus infection promotes the ubiquitination and degradation of 53BP1

ZHOU Ya-li, HE Yu-lin, QIAO Guan-hua, JIN Ke, QIN Pei-fang, HUANG Hai-tao, YAN Jian-guo
(Faculty of Basic Medical Sciences, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi, 541004, China)***

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of hepatitis C virus (HCV) infection on the expression of 53BP1 and its mechanism. **Methods** Total, cytoplasmic, and nuclear 53BP1 protein after HCV infection were detected by western blotting. The expression of 53BP1 in normal liver and HCV-related HCC tissues was quantified by immunohistochemistry. The subcellular localization of 53BP1 cells were detected by immunofluorescence staining and the ubiquitination level of 53BP1 was determined by Co-Immunoprecipitation. **Results** The relative expression level of 53BP1 protein in Huh7 cells caused by HCV infection was (0.41±0.03), significantly lower than that in the control group (1.00±0.08), the difference was statistically significant ($P<0.01$); After HCV infection, the relative expression level of nuclear 53BP1 protein was (0.35±0.03), significantly lower than that in the control group (1.00±0.09), the difference was statistically significant ($P<0.01$). The relative expression level of cytoplasmic 53BP1 was (1.20±0.18) and that of control group was (1.00±0.17); There was no significant change in the expression of both groups ($P>0.05$). HCV infection can decrease the expression of 53BP1 protein, especially in the nucleus. Immunofluorescence showed that HCV infection could lead to a striking re-localization of 53BP1 from nucleus to cytoplasm. Compared with the normal liver tissues, significantly lower levels of 53BP1 were found in the HCC tumor ($P<0.01$) and adjacent tissues ($P<0.05$). Mechanism analysis showed that HCV infection promoted the ubiquitination and degradation of 53BP1. **Conclusion** HCV infection shifts the localization of 53BP1 from nucleus to cytoplasm and promote its ubiquitination and degradation.

【Key words】 HCC; HCV; 53BP1; ubiquitin and degradation

* **【基金项目】** 广西科技基地和人才专项(桂科 AD18281010);国家自然科学基金地区基金项目(No. 82160517);广西高等学校千名中青年骨干教师培育计划项目(桂教师范[2019]81号)。

** **【通讯作者】** 闫建国, E-mail: yanjianguo@glmc.edu.cn

【作者简介】 周亚莉(1982-),女,河南许昌人,博士研究生,副教授,主要研究方向:病毒肿瘤学。E-mail:zhouyali@glmc.edu.cn

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种高度恶性的肿瘤,致死率高且易发生早期转移,丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)感染作为肝细胞癌的重要病因,一直以来都是研究的重点^[1]。世界卫生组织公布的数据表明,目前全球约有2亿人感染HCV,每年有30余万例可能死于HCV导致的肝细胞癌^[2]。因此,加强HCV与肝癌的研究具有重大的社会意义和经济意义。

肝癌的发生机制尚未完全阐明,越来越多的研究表明,其发生与DNA的损伤积累密切相关^[3]。p53结合蛋白1(p53-binding protein 1, 53BP1)是DNA损伤应答通路中的重要成员,是将DNA损伤信号传导至p53及其他肿瘤抑制蛋白途径中的一个重要传感器,在保持基因组稳定性和预防癌症方面发挥重要作用^[4]。53BP1可致DNA发生损伤的细胞阻滞在G2/M期并增强其凋亡,从而避免基因组遗传信息的不稳定而阻断肿瘤的发生,这些均提示53BP1可作为一个潜在的肿瘤抑制基因^[5]。在乳腺癌、卵巢癌、肺癌和肝癌等恶性肿瘤组织中发现了53BP1不同程度的表达缺失,同时肿瘤组织53BP1的低表达与不良预后和对放疗的不敏感有关^[6-7],但HCV感染能否通过抑制53BP1的表达而促进肝癌的发生发展尚不清楚。本研究拟采用HCV体外感染Huh7细胞建立HCV感染模型,探讨HCV促进53BP1泛素化途径降解的具体机制,为HCV感染致HCC的发病机制的论证提供新的理论依据,为HCV感染所致HCC提供更精准的预防和治疗靶点。

材料与方法

1 材料

1.1 细胞系和病毒 人肝癌细胞系Huh7为本实验室保存。HCV JFH-1 (Japanese fulminant hepatitis 1)为从日本爆发性HCV感染者血清中分离的HCV 2a基因型病毒株, JFH-1病毒颗粒由华中科技大学同济医学院杨红枚教授提供。

1.2 主要试剂和仪器 DMEM培养基(HIGH Glucose, HyClone); 胎牛血清(Gibco); Anti-HCV core (Thermo); Anti-53BP1, Anti-lamin A/C, Anti-tubulin, Goat anti-Rabbit IgG-HRP, Goat anti-mouse IgG-HRP, anti-ubiquitin (Abcam); Alexa Fluor 488-, Alexa Fluor 594-conjugated secondary antibody (Molecular Probes); cycloheximide (CHX), MG132 Sigma, chloroquine (Sigma); Protein A/G PLUS-Agarose (Santa cruz); 细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒(P0028, 碧云天)。全自动凝胶成像系统, 电泳槽, 电泳仪 (Bio-Rad); LightCycler® 480 II PCR 仪器

(Roche); 免疫组化试剂盒(北京中杉金桥)。

2 方法

2.1 细胞培养及病毒感染 用含10%的胎牛血清(FBS)和0.01%的青-链霉素的DMEM培养基,于37℃含5% CO₂的培养箱中进行培养。将HCV感染高效容许HCV复制的Huh7.5.1细胞中,长满后取细胞正常传代,观察细胞培养情况。待培养基变黄,细胞长满同时出现凋亡时收集培养基上清液,1 000 g离心15 min, 0.22 μm 抽滤器抽滤并分装至无菌无RNase离心管中, -80℃冰箱保存备用。

2.2 组织标本的采集与免疫组化检查 HCC癌和癌旁组织以及正常肝组织芯片购自上海芯超生物科技有限公司。免疫组化检查采用北京中杉金桥免疫组化试剂盒,按照说明书操作。结果判定由两个病理科医生独立对53BP1的染色进行评分,根据染色强度评分为0~3(0 = no, 1 = weak, 2 = moderate, 3 = strong staining),染色强度分值与染色阳性细胞数的乘积为最终染色评分。

2.3 细胞总蛋白、胞浆核蛋白的提取以及Western blot分析 取对数生长期细胞,用冷PBS洗2次;刮下细胞,使用碧云天细胞总蛋白质抽提试剂盒(P0013B)提取细胞核蛋白与细胞浆蛋白,BCA标准曲线法测定蛋白浓度。制备上样蛋白样品,经SDS-PAGE电泳后转移到PVDF膜上并用5%脱脂乳中封闭,以免抗53BP1多克隆抗体为一抗,HRP标记的羊抗兔IgG为二抗进行Western blot,用ECL试剂(Pierce)显色并进行分析,使用ImageJ软件定量蛋白质表达。

2.4 RNA的提取及qPCR扩增 使用Trizol (Invitrogen)从细胞中提取总RNA,并使用Revert Aid First Strand cDNA合成试剂盒(Thermo)逆转录为mRNA。在LightCycle 480II (Roche)上使用2×SYBR Green Mix (Thermo)进行qPCR。以GAPDH为参照,用公式 $2^{-\Delta C_t}$ 计算HCV RNA和53BP1相对于宿主GAPDH的表达量。引物序列如表1,由金维智科技有限公司(苏州)合成。

表1 qPCR引物
Table 1 Primers of qPCR

基因 Gene	正向引物 Forward Primers(5'-3')	反向引物 Reverse Primers(5'-3')
HCVmRNA	TCTGCGGAACCGGTGAGTA	TCAGGCAGTACCACAAGGC
53BP1mRNA	CTCCTCCACATGGCCATGTCTTAC	CCTGAGGAGCCCCAGTCTGT
GAPDH	GGTGAAGGTCGGAGTCAACGG	GAGGTCAATGAAGGGTCATTG

2.5 免疫荧光试验 在盖玻片上生长的细胞用冷PBS洗涤两次,4%多聚甲醛中固定,再用0.3% Triton X-100破膜10 min,3% BSA封闭;加入相应一

抗染色过夜,洗涤;加入荧光标记二抗染色,细胞核用 DAPI 染色,荧光显微镜(Nikon)观察拍照。

2.6 免疫共沉淀试验 用冷 PBS 洗涤细胞两次, Triton 裂解缓冲液中裂解。裂解物在 4 °C 下 12 000 g 离心 10 min,上清液在 4 °C 下用 20 μ L Protein A/G Agarose (Santa Cruz)孵育 1 h,以去除非特异性结合物,然后在 4 °C 下与相应的抗体孵育过夜,接着用预洗的 Protein A/G Agarose 沉淀。通过洗涤和离心 3 次收集免疫沉淀物,在 2 \times SDS 样品缓冲液中煮沸,并进行 Western blotting 分析。

2.7 数据处理与分析 实验数据采用 mean \pm SEM 表示。用 GraphPad Primer 绘图统计软件将 qRT-PCR 数据进行统计作图。数据的统计学分析采用 Student's *t*-test or one-way ANOVA, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 HCV 感染下调 53BP1 的表达

将 HCV JFH-1 以 0.1 的感染复数感染 Huh7 细胞,72 h 后收集细胞提取 RNA 或者蛋白质进行 Western blot 和 RT-qPCR 检测。结果表明,HCV 在 Huh7 细胞内高效复制,翻译并表达 HCV Core 蛋白(图 1A 和 B)。另外,HCV 感染后 53BP1 蛋白的相对表达水平为(0.41 \pm 0.03),明显低于对照组(1.00 \pm 0.08),差异有统计学意义($P < 0.01$)(图 1C)。进一步将细胞总蛋白分为胞核和胞浆表达蛋白,如图 1D 和 1E 所示,在 HCV 感染 72 h 后,胞核 53BP1 相对表达水平为(0.35 \pm 0.03),明显低于对照组(1.00 \pm 0.09),差异有统计学意义($P < 0.01$);而胞浆 53BP1 相对表达水平为(1.20 \pm 0.18),对照组相对表达水平为(1.00 \pm 0.17),两者表达无显著改变($P > 0.05$)。表明 HCV 感染可导致 53BP1 蛋白,尤其是胞核 53BP1 蛋白的表达下降。

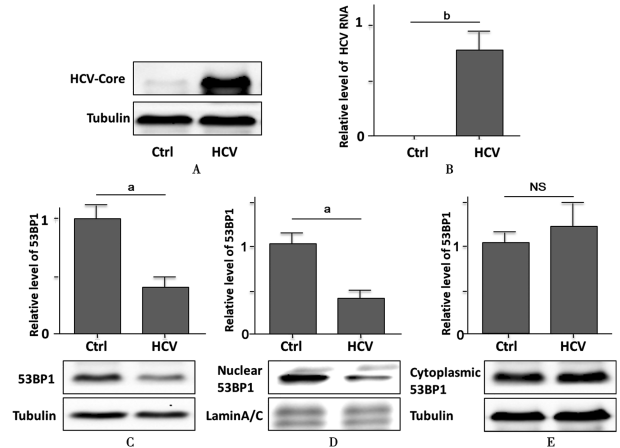
2 HCV 感染改变 53BP1 的细胞定位

采用免疫荧光法检测 HCV 感染对 53BP1 细胞定位的影响,结果如图 2。在未感染细胞,53BP1 主要定位于细胞核;在 HCV 感染 72 h 的细胞,53BP1 主要分布于细胞浆,且总荧光强度降低。表明 HCV 感染可导致 53BP1 由细胞核转位于细胞浆,且导致 53BP1 总量的降低,与 Western blot 结果一致。

3 53BP1 在 HCV 相关 HCC 癌组织中低表达

为了进一步证实体内 HCV 感染对于 53BP1 的影响,通过免疫组化法检查了正常肝组织、HCV 相关 HCC 癌组织及癌旁组织中 53BP1 的表达情况,结果如图 3。与正常肝组织相比较,53BP1 在 HCV 相关 HCC 癌组织和癌旁组织中降低,与正常肝组织相比,

53BP1 在 HCV 相关 HCC 癌组织表达显著降低($P < 0.01$);与正常肝组织相比较,53BP1 在 HCV 相关 HCC 癌旁组织中表达显著降低($P < 0.05$)。在 HCV 感染的肝脏,癌组织 53BP1 的表达较癌旁组织显著降低($P < 0.05$)。

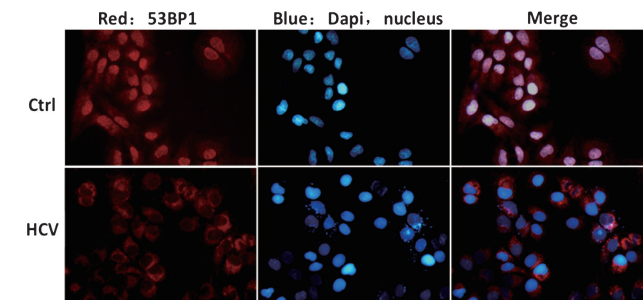


A,B 分别为 HCV JFH-1 感染 Huh7 细胞 72 h HCV 结构蛋白 Core 的 Western blot 分析和 HCV mRNA qRT-PCR 检测 C-E 分别为 HCV 感染 72 h Huh7 细胞 53BP1 总蛋白、胞核蛋白和胞浆蛋白的表达情况。与对照组比较, $a P < 0.01$; $b P < 0.001$ 。

图 1 HCV 感染下调 Huh7 细胞 53BP1 的表达

A,B Levels of HCV infection in Huh7 cells were determined by immunoblotting for HCV core protein (A) and RT-qPCR for HCV RNA (B) C-E Total (C), nuclear (D), and cytoplasmic (E) 53BP1 protein levels were measured after HCV infection. Compared with control group, $a P < 0.01$; $b P < 0.001$.

Fig. 1 53BP1 abundance is negatively regulated in HCV-infected cells



Ctrl 未感染 HCV Huh7 细胞对照 HVC Huh7 细胞感染 HCV 72 h 免疫荧光检测 53BP1 的表达和定位。

图 2 HCV 感染改变 53BP1 的细胞定位

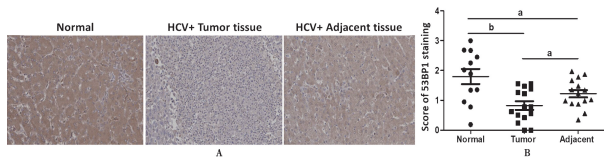
Ctrl Cells were infected not with JFH-1 HCV Cells were infected with JFH-1 for 72 h, the subcellular localization of 53BP1 was monitored by immunolabeling of 53BP1.

Fig. 2 The subcellular localization of 53BP1 in HCV infected cells

4 HCV 感染促进 53BP1 的泛素-蛋白酶体途径降解

为进一步分析 HCV 感染降低 53BP1 表达的具体机制,首先检测了 HCV 感染对 53BP1 mRNA 的影响,如图 4A 所示。HCV 感染对 53BP1 mRNA 的表达无显著性影响($P > 0.05$)。然后检测了 HCV 感染对 53BP1 的蛋白稳定性的影响,结果如图 4B。Huh7 细胞在感染 HCV 72 h 后,加入蛋白质合成抑制剂放

线菌酮(CHX)0~3 h,在蛋白质合成被抑制的情况下,HCV感染能够随时间推移显著降低53BP1的蛋白含量,表明HCV感染影响53BP1的蛋白质的稳定性,促进53BP1的降解。

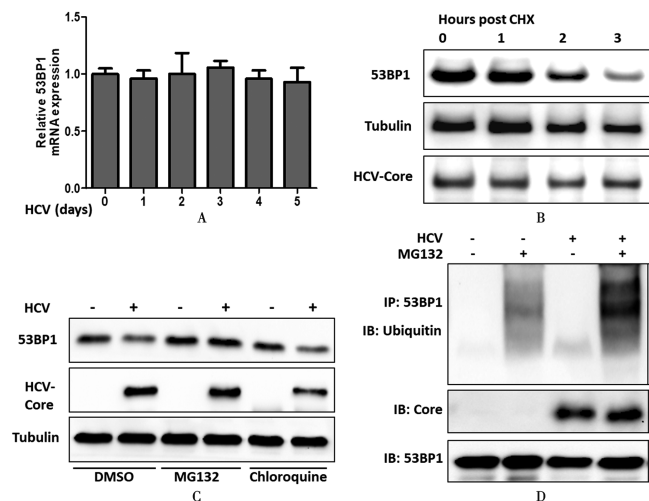


A 免疫组化染色 B 免疫组化定量, a $P < 0.05$; b $P < 0.01$ 。

图3 53BP1在HCV相关HCC癌组织中低表达

A Shown the representative images of 53BP1 expression B Shown the representative images of 53BP1 expression quantitative data, a $P < 0.05$; b $P < 0.01$ 。

Fig. 3 Significantly lower levels of 53BP1 were found in HCV-associated HCC tumor and adjacent tissues



A HCV感染对53BP1的mRNA的影响 B 放线菌酮抑制53BP1合成后HCV感染对53BP1蛋白质稳定性的影响 C HCV感染的背景下MG132和氯喹对53BP1表达的影响 D HCV感染对53BP1泛素化水平的影响。

图4 HCV感染促进53BP1的泛素-蛋白酶体途径降解

A Huh7 cells were infected with JFH1 for 0-5 days, the 53BP1 mRNA level was determined by qRT-PCR B Effect of HCV infection on 53BP1 protein stability after cycloheximide inhibits 53BP1 synthesis C Effects of MG132 and chloroquine on 53BP1 expression in the context of HCV infection D Huh7 cells were infected with JFH1 for 72 h, and treated with MG132 (20 μ mol/L) for 12 h, the cells were lysed and subjected to immunoprecipitation with antibody against 53BP1 and analyzed by Western blot with antibodies against the indicated proteins.

Fig. 4 HCV infection promotes the ubiquitination and degradation of 53BP1

泛素-蛋白酶体途径(UPP)和自噬-溶酶体途径(ALP)是真核生物最常见的两种降解蛋白质的方法^[8]。为了明确HCV影响53BP1蛋白水平的作用方式,在HCV感染72 h的Huh7细胞分别加入UPP的抑制剂MG132和ALP的抑制剂氯喹,对两条降解途径进行阻断,结果如图4C。MG132阻断UPP降解后,53BP1蛋白的表达几乎恢复到对照组的水平,表明HCV可能是促进53BP1的UPP途径降解。采用免

疫共沉淀方法检测HCV感染对53BP1泛素化水平的影响,结果如图4D。HCV感染显著提高了53BP1的泛素化水平。

讨论

本研究表明,HCV感染可促进53BP1的泛素-蛋白酶体途径降解,且导致53BP1发生从细胞核穿梭到细胞浆的亚细胞定位的改变。免疫组化染色显示,HCV阳性癌组织中53BP1的表达也显著降低。53BP1作为DNA损伤应答通路中的重要成员,在DNA双链断裂修复中迅速聚集在DNA损伤处形成,作为支架蛋白招募后续蛋白质以执行有效修复^[4]。因此推测,除了表达量的关系,53BP1从细胞核转位至细胞质也是导致其修复DNA能力下降的重要原因。

HCV是一种单链RNA病毒,其所有的生命活动都局限于细胞质中,HCV表达的蛋白也分布于细胞质中,且HCV表达的蛋白能够与多种宿主细胞的蛋白发挥相互作用^[9]。据此推测,53BP1从细胞核转位于细胞质可能是由于53BP1与HCV表达蛋白的相互作用,从而被滞留于细胞浆中进而被降解。泛素-蛋白酶体途径介导的蛋白质降解是机体调节细胞内蛋白水平与功能的一个重要机制^[10],文献^[11-13]也报道HCV的蛋白参与宿主细胞蛋白的泛素-蛋白酶体途径,表明泛素-蛋白酶体途径可能成为HCV促进肝癌发生发展的一个新的机制。

综上,本研究初步证明HCV感染会导致53BP1的表达量的降低和细胞定位的改变,这可能是HCV感染促进肝癌发生发展的机制之一。

【参考文献】

- [1] Bandiera S, Billie Bian C, Hoshida Y, et al. Chronic hepatitis C virus infection and pathogenesis of hepatocellular carcinoma[J]. Curr Opin Virol, 2016(20): 99-105.
- [2] Ansaldo F, Orsi A, Sticchi L, et al. Hepatitis C virus in the new era: perspectives in epidemiology, prevention, diagnostics and predictors of response to therapy[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(29): 9633-9652.
- [3] Ui A, Chiba N, Yasui A. Relationship among DNA double-strand break (DSB), DSB repair, and transcription prevents genome instability and cancer[J]. Cancer Sci, 2020, 111(5): 1443-1451.
- [4] Panier S, Boulton SJ. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(1): 7-18.
- [5] Shibata A, Jeggo PA. Roles for 53BP1 in the repair of radiation-induced DNA double strand breaks[J]. DNA repair, 2020(93): 102915.
- [6] Mirza-Aghazadeh-Attari M, Mohammadzadeh A, Yousefi B, et al. 53BP1: A key player of DNA damage response with critical functions in cancer[J]. DNA Repair, 2019(73): 110-119.

- swine, China, 2017 [J]. Emerg Infect Dis, 2017, 23(9):1607.
- [5] Li K, Li H, Bi Z, et al. Complete genome sequence of a novel swine acute diarrhea syndrome coronavirus, ch/fjw/2018, isolated in Fujian, China, in 2018 [J]. Microbiol Resour Announc, 2018, 7(22):e01259-18.
- [6] 张誉瀚, 袁为锋, 张帆帆, 等. 2018年江西及福建省新现猪急性腹泻冠状病毒的分子流行病学调查[J]. 养猪, 2019(4):113-117.
- [7] Yang YL, Yu JQ, Huang YW. Swine enteric alphacoronavirus (swine acute diarrhea syndrome coronavirus): An update three years after its discovery [J]. Virus Res, 2020(285):198024.
- [8] Masters PS. The molecular biology of coronaviruses [J]. Adv Virus Res, 2006(66):193-292.
- [9] Zhou P, Fan H, Lan T, et al. Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin [J]. Nature, 2018, 556(7700):255-258.
- [10] Yin L, Chen J, Li L, et al. 猪德尔塔冠状病毒不同肠段嗜性与猪氨基肽酶 N 表达量有关而与干扰素应答无关[J]. 中国预防兽医学报, 2020, 42(6):638.
- [11] 史晗. 猪肠道 α 冠状病毒辅助蛋白 NS7a 调控 I 型 IFN 信号通路的机制研究[D]. 中国农业科学院, 2021.
- [12] Weiss S R, Navas-Martin S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2005, 69(4):635-664.
- [13] 宋红芹, 姜翠翠, 张鑫宇, 等. 非洲猪瘟病毒 NP419L 基因 shRNA 表达质粒的构建与筛选[J]. 中国兽医科学, 2013, 43(1):9-14.
- [14] 梁瑾, 王靖飞. B 细胞表位预测方法研究进展[J]. 生命科学, 2009(2):320-323.
- [15] 毕靖舒. 基于深度学习的 T 细胞表位预测方法研究[D]. 山东师范大学, 2021.
- [16] 丁寿鹏, 李祥芳, 高婧华, 等. 鸟结核分枝杆菌 MAV-5183 蛋白的生物信息学分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(10):1153-1157.
- [17] 张春霆. 生物信息学的现状与展望[J]. 世界科技研究与发展, 2000, 22(6):17-20.
- [18] 韩郁茹. 猪急性腹泻综合征冠状病毒 N 蛋白单克隆抗体的制备及其抗原表位的鉴定[D]. 中国农业科学院, 2021.
- [19] 张记宇. 猪急性腹泻综合征冠状病毒诱导宿主细胞凋亡的分子机制[D]. 中国农业科学院, 2021.
- [20] 周芝海, 谭耀荣, 郑瑶瑶, 等. 猪急性腹泻综合征冠状病毒核衣壳蛋白的原核表达及其多克隆抗体的制备[J]. 中国兽医科学, 2019, 49(9):1179-1186.
- [21] Calvo E, Escors D, Lopez J, et al. Phosphorylation and subcellular localization of transmissible gastroenteritis virus nucleocapsid protein in infected cells [J]. J Gen Virol, 2005, 86(8):2255-2267.
- [22] Ying L, Xu S, Yang RF, et al. Identification of an epitope of SARS-coronavirus nucleocapsid protein [J]. Cell Res, 2003, 13(3):141-145.
- [23] 赵冠宇, 黄海鑫, 张世亨, 等. 猪肠道 α 冠状病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41(1):35-39.
- [24] Parra GS, Agarwal P, Abril JF, et al. Comparative gene prediction in human and mouse [J]. Genome Research, 2003, 13(1):108-117.
- [25] 王鹏, 廉士珍, 刘晓颖, 等. 犬 I 型腺病毒 IX 蛋白的生物信息学分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021.
- [26] 孙啸, 陆祖宏, 谢建明. 生物信息学概论[M]. 清华大学出版社有限公司, 2004.
- [27] 陈禹, 杜谦, 霍瑞超, 等. 猪圆环病毒 2 型 ORF1、ORF2 和 ORF3 原核表达和多克隆抗体的制备 [J]. 中国兽医学报, 2015, 35(5):686-691.
- [28] Reddy SM, Lupiani B, Gimeno IM, et al. Rescue of a pathogenic Marek's disease virus with overlapping cosmid DNAs: use of a pp38 mutant to validate the technology for the study of gene function [J]. Pro Nat Aca Sci, 2002, 99(10):7054-7059.

【收稿日期】 2022-04-14 【修回日期】 2022-06-09

(上接 872 页)

- [7] Bouwman P, Aly A, Escandell JM, et al. 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers[J]. Nature Structural Mol Biol, 2010, 17(6):688-695.
- [8] Yerlikaya A, Kanbur E, Stanley BA, et al. The ubiquitin-proteasome pathway and epigenetic modifications in cancer[J]. Anti-Cancer Agent Med Chem, 2021, 21(1):20-32.
- [9] Niepmann M, Shalamova LA, Gerresheim GK, et al. Signals involved in regulation of hepatitis C virus RNA genome translation and replication[J]. Front Microbiol, 2018(9):395.
- [10] Manasanch EE, Orlowski RZ. Proteasome inhibitors in cancer therapy[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2017, 14(7):417-433.
- [11] Zhou Y, Zhao Y, Gao Y, et al. Hepatitis C virus NS3 protein enhances hepatocellular carcinoma cell invasion by promoting PPM1A ubiquitination and degradation[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2017, 36(1):42.
- [12] Chen Y, He L, Peng Y, et al. The hepatitis C virus protein NS3 suppresses TNF- α -stimulated activation of NF- κ B by targeting LUBAC[J]. Sci Signaling, 2015, 8(403):ra118.
- [13] Kang X, Chen X, He Y, et al. DDB1 is a cellular substrate of NS3/4A protease and required for hepatitis C virus replication [J]. Virology, 2013, 435(2):385-394.

【收稿日期】 2022-04-05 【修回日期】 2022-06-27