

丙型肝炎病毒 NS2 蛋白在 Huh-7 细胞中抑制 NF- κ B 活性*

阳帆, 叶林柏**, 刘静, 杨小骏, 廖庆娇, 余应龙, 叶力

(武汉大学生命科学院病毒研究所, 湖北武汉, 430072)

Hepatitis C Virus NS2 Protein Suppresses the Activities of NF- κ B
in Huh-7 Cell Line*YANG Fan, YE Lin-bai**, LIU Jing, YANG Xiao-jun, LIAO Qing-jiao, SHE Ying-long, YE Li,
(Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: Recombinant plasmid pCNS2 was constructed by inserting Hepatitis C Virus full-length NS2 gene between *Xho* I and *Hind* III sites of an eukaryotic expression vector pCDNA3.1(-). The recombinant plasmid pCNS2 was transfected to Huh-7 cells with LipoVecTM and HCV NS2 mRNA and protein produced in transient expression system was detected at the transcriptional and translational levels, respectively. This indicated that pCNS2 could be expressed successfully in Huh-7 cells. Cotransfected pCNS2 of different doses to Huh-7 cells with reporter plasmid pNF- κ B-Luc, the activity of luciferase controlled by NF- κ B promoter/enhancer elements was detected by luciferase assay kit 48h after transfection. The results showed that the expression of luciferase in Huh-7 cells transfected by the pCNS2 decreased about two to four folds compared to control plasmid. It is suggested that the HCV NS2 protein distinctly suppressed the activities of NF- κ B in a dose-dependent manner in Huh-7 cells and this will enable to investigate on the role of NS2 in the pathogenesis of chronic HCV infection.

Key words: Hepatitis C virus(HCV); NS2 protein; NF- κ B; Suppress the activity

摘要: 将丙型肝炎病毒(HCV)非结构蛋白 NS2 基因的全长序列插入到真核表达载体 pCDNA3.1(-) CMV 启动子下游, 构建成重组质粒 pCNS2。用脂质体 LipoVecTM 转染 Huh-7 细胞, 转染细胞内可检出 NS2 的 mRNA 和蛋白质, 表明构建的 pCNS2 可在 Huh-7 细胞内成功表达; 把不同剂量的 pCNS2 质粒 DNA 与报告质粒 pNF- κ B-Luc 共转染 Huh-7 细胞, 48h 后检测荧光素酶活性, 结果显示与 pCNS2 共转染的细胞中 pNF- κ B-Luc 表达出的荧光素酶的活性比对照细胞降低了约 2~4 倍, 并呈明显的剂量相关性。表明 HCV NS2 对 NF- κ B 激活转录活性有明显的抑制作用。这可能与 HCV 慢性持续性感染的致病性有一定的相关性。

关键词: 丙型肝炎病毒; NS2 蛋白; NF- κ B; 抑制活性

中图分类号: R512.6

文章标识码: A

文章编号: 1003-5125(2004)04-0335-05

丙型肝炎病毒(*Hepatitis C virus*, HCV)属黄病毒科, 基因组为长约 9.5kb 的正链单链 RNA, 含有一个大的开放阅读框, 翻译产生长为 3000 多个氨基酸的聚蛋白。在宿主编码的蛋白酶及病毒自身蛋白酶的作用下, 聚蛋白被切割为 core、E1、E2、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B 10 种

病毒蛋白^[1]。其中 HCV NS2 蛋白是第一个由 HCV 基因组编码的非结构蛋白, 处于上连结构区下接非结构区的特殊位置, 变异率仅次于 E1 和 E2 区, 由 216 个氨基酸组成^[2]。成熟的 NS2 蛋白是一个强疏水性跨膜蛋白, 它的 C 末端转运至 ER 腔中, 而 N 末端位于细胞腔^[3]。直到目前, 对 NS2 的研究资料

收稿日期: 2004-02-19, 修回日期: 2004-03-31。

* 基金项目: 国家自然科学基金(30070175)。

作者简介: 阳帆(1979-), 女, 湖南省籍, 硕士研究生, 从事医学病毒学研究。

** 通讯作者。Corresponding author. Tel:027-87682372, E-mail: linbaiye@hotmail.com

十分缺乏,因此,人们对 NS2 蛋白的主要生物学功能仍然不清楚。

近年来对聚蛋白在该区域的酶解加工的研究,发现 NS2 的 C 端部分参加 NS2-NS3 之间的切割过程^[4],这个病毒内源性的 NS2-3 蛋白酶包括 NS2 和 NS3 元件,该酶是除 NS3 Ser 蛋白酶之外的非结构蛋白酶,它的作用是在 NS2 与 NS3 之间切割,暴露出 NS3 的 N 端,使其成为有活性的蛋白酶,而参与后面所有非结构蛋白的切割加工。可以说 NS2-3 酶的作用是 HCV 蛋白加工的关键步骤,对 HCV 病毒的复制非常重要。图谱分析指出该酶活性结构域的氨基酸序列在 827~1027,这一区域覆盖了 NS2 的大部分和 NS3 的 N 端 1/3 区域,与 NS3 的丝氨酸蛋白酶的活性结构域重叠。目前只发现这个 NS2-NS3 蛋白酶的自我切割功能。而 NS2 作为一个跨膜蛋白,与 HCV 结构蛋白 E1、E2 和非结构蛋白如 NS5A、5B 都存在复杂的蛋白质之间的相互作用^[2]。因此可以推测 NS2 在 HCV 的复制循环中起非常重要的作用,针对 NS2 的结构和功能的研究有重要的实际意义。

NF- κ B(nuclear factor κ B)属于 Rel 蛋白家族成员,是一种重要的反式转录激活因子。它分布广泛,参与多种基因的转录调控,与炎症反应、免疫应答、以及细胞的增生、转化和凋亡等重要的生理病理过程关系密切^[5]。目前,NF- κ B 正作为治疗多种疾病的分子靶而倍受科学界的关注。

本实验构建了真核表达载体 pCNS2,应用报告基因 Luc 共转染瞬时表达系统,研究 HCV NS2 在 Huh-7 细胞中的瞬时表达;在共转染实验中,通过检测 Luc 基因的表达水平来反映 NS2 蛋白对 NF- κ B 活性的抑制效应。NS2 蛋白的这种功能可能在 HCV 慢性持续性感染过程中起着一定的作用。

1 材料和方法

1.1 质粒和菌株

含有全部 HCV-1b 型全长开放阅读框 cDNA 重组质粒 pBRTM/HCV 1-3011 由华盛顿大学 Rice 教授惠赠。PMD18-T Vector 购自 TaKaRa 公司。真核表达载体 pCDNA3.1(-)购自 Invitrogen 公司。质粒 pNF- κ B-Luc 购自 Stratagene 公司,该质粒包含一个基本的启动子元件,含 TATA box 和 5 个重复的 NF- κ B 识别与结合的序列(TGGGGACTTTCCGC),启动子下游为 *phtinum pyralis*(firefly)荧光素酶报告基因。*E. coli* DH5 α 、JM109 菌株均由本室保存。

1.2 试剂及工具酶

玻璃奶 DNA Extraction Kit 为晶美生物工程公司产品;质粒纯化试剂盒 3S Spin plasmid Miniprep Kit V3.1 为上海申能博彩生物科技有限公司产品;Luciferase assay Kit 为 Promega 公司产品;LipoVecTM 为 InvivoGen 公司产品;TRIZOL 试剂为 MRC (Molecular Research Center, Inc.)公司产品;Reverse Transcriptase XL(AMV)、rTaq DNA Polymerase Kit、T4 DNA Ligase 为 TaKaRa 公司产品;DNA 限制性内切酶为晶美生物工程公司产品。

1.3 引物设计和合成

根据 HCV NS2 核苷酸序列设计特异性引物,在正反引物的 5'端分别引入 *Xho* I 和 *Hind* III 酶切位点及起始密码子(ATG)和终止密码子(UAG),并遵循 Kozak 原则。由上海博亚生物技术有限公司合成。

正向引物: 5'-GATAC/TCGAGATGGCGTTGCCTCAGCGG-3';

反向引物: 5'-CCGCA/AGCTTCTACGCCAGCAACTTCCAC-3'

1.4 HCV NS2 重组真核表达质粒的构建

1.4.1 PCR 扩增 NS2 基因片断及回收:以质粒 pBRTM/HCV 1-3011 为模板进行 PCR 反应,扩增 HCV NS2 基因片断(编码 802~1027 位氨基酸)。在 0.5 mL 的 PCR 管中依次加入 10 \times buffer 5 μ L、dNTP 4 μ L(2.5mmol/L)、正向引物和反向引物各 1 μ L(约 50pmol/L)、模板 pBRTM/HCV 1-3011 0.5 μ L(0.1 μ g)、ddH₂O 38 μ L 混匀,加 Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L(5U/ μ L),石蜡油 50 μ L。反应如下:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min;然后 94 $^{\circ}$ C 变性 5min,56 $^{\circ}$ C 退火 1min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1min,进行 35 个循环;最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。4 $^{\circ}$ C 暂时保存。扩增产物经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测。将扩增的产物 670bp DNA 片断用 DNA Extraction Kit 回收。

1.4.2 PCR 产物与 pMD18-T 载体进行连接:依据 pMD18-T 载体说明书,进行连接反应,以常规 CaCl₂ 法转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,在含氨苄青霉素的 LB 平板上 37 $^{\circ}$ C 培养过夜,随机挑取抗性克隆,碱裂解法提取重组质粒。通过 PCR 和酶切鉴定,获得阳性重组克隆 pTNS2。

1.4.3 构建重组 HCV NS2 真核表达质粒 pCNS2:用限制性内切酶 *Xho* I-*Hind* III 消化重组质粒 pTNS2,获得 NS2 基因,将 NS2 基因与经过限制性内切酶 *Xho* I-*Hind* III 双酶切消化的载体质粒 pCDNA3.1(-) 进行连接,以常规 CaCl₂ 法转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,在含氨苄青霉素的 LB 平板上

37°C 培养过夜, 筛选阳性菌落, 酶切及 PCR 鉴定得到在 CMV 早期启动子控制下的重组 HCV NS2 真核表达质粒 pCNS2。

1.5 细胞培养和转染

Huh-7 (human hepatoma) 细胞系由武汉大学生命科学学院郭德银教授惠赠, 在含 10% 胎牛血清 (FBS, Hyclone, USA) 的 DMEM (GIBCO BRL) 培养基, 5% CO₂, 37°C 培养。

按 3S Spin plasmid Miniprep Kit V3.1 提纯质粒 pCNS2, pCDNA3.1(-) 以及 pNF- κ B-Luc, 用无菌双蒸水溶解, 测定 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值确定核酸样品的纯度, A₂₆₀ 值确定样品的浓度。

用脂质体 LipoVecTM (InvivoGen) 进行 DNA 转染, 实验操作按照试剂说明书进行, pCDNA3.1(-) 载体转染的细胞作阴性对照。

1.6 转染细胞中 NS2 mRNA 的检测

转染 48h 后的 Huh-7 细胞 (24 孔培养板培养) 吸出细胞上清, 用 PBS (PH 7.4) 洗两遍后, 每孔细胞加入 200 μ L TRIZOL 试剂。按照 TRIZOL 法提取总 RNA, 详细操作见 TRIZOL 说明书。以此 RNA 为模板进行逆转录, 具体方法如下: 将提取的总 RNA 溶于含 RNasin (40U/ μ L) 的 DEPC 双蒸水中, 70°C 水浴 10min。立即取出置冰上, 再加入 4 μ L 5 \times AMV buffer、4 μ L 2.5mmol/L dNTP、0.5 μ L 5 U/ μ L AMV、0.5 μ L 50pmol/L 的反向引物, 反应总体积 20 μ L。42°C 水浴 90min 进行逆转录反应。取 1 μ L 逆转录反应产物 cDNA 为模板, 用 TaKaRa 公司的 Taq DNA Polymerase 进行 PCR 扩增。以转染了 pCDNA3.1(-) 空载体的 Huh-7 细胞总 RNA 为 RT-PCR 阴性对照。0.7% Agarose 鉴定 RT-PCR 产物。

1.7 转染细胞内 NS2 蛋白的 Western blot 鉴定

转染 48h 后收集细胞, 用 PBS (pH 7.4) 洗两遍后, 加入 SDS-PAGE 上样 buffer (50mmol/L Tris-HCl <PH6.8>, 2% SDS, 100mmol/L DTT, 0.1% 溴酚蓝, 10% 甘油) 裂解细胞后, 沸水煮 5~10min, 放入 4°C 冰箱待用。样品蛋白经 15% SDS-PAGE 分离后, 4°C 14~18V 转膜 16hr, 用 5% 脱脂牛奶封闭, 一抗为人 HCV 抗体阳性血清, 以羊抗人 IgG-HRP 为第二抗体, DAB-过氧化氢系统显色。

1.8 荧光素酶试验

用 0.05 μ g~0.6 μ g 不同剂量的 pCNS2 DNA 和 0.3 μ g 的报告质粒 pNF- κ B-Luc DNA 共转染 Huh-7 细胞, 48h 后制备成裂解液, 定量检测 Luc 的表达, Luc 的检出按 Luciferase assay Kit 操作说明书进行; 共转染 48h 后收集细胞, 用 PBS (pH7.4) 洗两遍, 加

入 100 μ L 1 \times 裂解缓冲液, 室温下裂解 20min。用细胞刮子将细胞刮下, 吸至离心管内, 4°C 12000r/min 离心 30min, 取 20 μ L 上清液, 加入 100 μ L 反应底物, 10s 后用 TD-20/20 luminometer (Turner BioSystems, Sunnyvale, CA) 测其 Luc 活性, 每一个样本读两个数值, 取均值。每次试验设 3 个平行孔, 实验重复三次。对照的细胞用 pCDNA3.1(-) 和 pNF- κ B-Luc 共转染, 与实验组平行测定。

2 结果

2.1 重组 HCV NS2 真核表达载体的构建

PCR 产物电泳检查, 显示一条 DNA 带大小约为 670bp 左右, 与预期大小完全相符。经 T4 连接酶把 PCR 获得的 NS2 DNA 与 pMD18-T 载体 (2.7kb) 连接后用 *Hind* III 单酶切, 电泳鉴定插入基因片断的方向性。由于 pMD18-T 上有一 *Hind* III 切点, 如果为反向插入用 *Hind* III 单酶切会得到一条约 670bp 的小带。同时用 *Xho* I 单切只会得到一条约 3.4kb (2.7+0.7kb) 左右的带。所以从 pTNS2 载体上回收 NS2 DNA 片断时, 应先用 *Xho* I 单酶切线性化后再用 *Hind* III 酶切便会得到所需的带。用 DNA Extraction Kit 回收 NS2 DNA 带, 连接到用 *Xho* I 和 *Hind* III 切开的 pCDNA3.1(-) 表达载体 (5.4kb) 中。单酶切, 双酶切鉴定结果表明 NS2 DNA 已被克隆到 pCDNA3.1(-) 中的 CMV IE 启动子下游, 获得的重组克隆命名为 pCNS2 (图 1)。

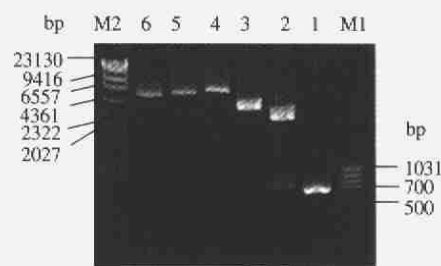


图 1 重组质粒的酶切鉴定

Fig.1 Analysis of recombinant plasmid pCNS2

M1, 100bp DNA ladder Marker; M2, λ DNA/*Hind* III Marker; 1, PCR product; 2, pTNS2/*Hind* III; 3, pTNS2/*Xho* I; 4, pCNS2/*Hind* III; 5, pCNS2/*Hind* III & *Xho* I; 6, pCDNA3.1(-)/*Hind* III

2.2 HCV NS2 蛋白基因在 Huh-7 细胞中瞬时表达

2.2.1 RT-PCR 检测 NS2 的 mRNA

转染 Huh-7 细胞 48h 后按照 TRIZOL 法提取总 RNA, 分别以实验组及对照组细胞的总 RNA 为模板进行逆转录, 然后加入逆转录反应产物 cDNA 以及 NS2 引物进行 PCR 扩增, 同时还以实验组 mRNA

为模板作为空白对照。反应结束后用 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 实验组出现 670bp 的特异性的带, 而对照组以及空白对照组未见特异性的带出现 (图 2), 结果证实提取的 RNA 中无 DNA 污染, 表明瞬时转染的 Huh-7 细胞中 NS2 基因已被转录产生 mRNA。

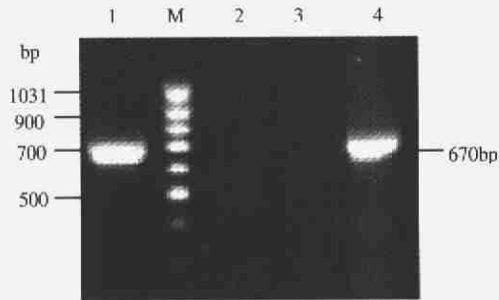


图 2 RT-PCR 检测转染 Huh-7 细胞中的 NS2 mRNA

Fig.2 Identification of NS2 mRNA in transfected Huh-7 cells by RT-PCR

M, 100bp DNA ladder Marker; templet is respectively 1, plasmid pBRTM-/HCV 1-3011; 2, mRNA of cell transfected with pCNS2; 3, cDNA of cell transfected with pCDNA3.1(-); 4, cDNA of cell transfected with pCNS2

2.2.2 Western blot 检测 NS2 蛋白

将 pCNS2 DNA 用脂质体法转染导入 Huh-7 细胞, 设 pCDNA3.1(-) 转染的细胞作对照。转染 48h 后收集细胞, SDS-PAGE 电泳, 利用 HCV 阳性血清作为一抗进行 Western blot 反应, Western Blot 实验结果表明, 转染 pCNS2 DNA 组的细胞裂解液中含有一条分子量 23 KDa 的带能和 HCV 阳性血清反应, 而对照组细胞裂解液中不含有能与 HCV 抗体反应的蛋白 (图 3)。从而证实 HCV NS2 蛋白基因已经在 Huh-7 细胞中成功表达。



图 3 Western blot 检测 NS2 蛋白

Fig.3 Detection of NS2 protein by Western blot analysis

1, Cell lysis of cell transfected with pCDNA3.1(-); 2, Cell lysis of cell transfected with pCNS2

2.3 HCV NS2 蛋白对 NF- κ B 活性的抑制作用

共转染实验报告质粒 pNF- κ B-Luc 用量选择

0.3 μ g。当加入等量的 pCNS2 质粒和报告基因质粒 (即均为 0.3 μ g) 时, 共转染 pCNS2/pNF- κ B-Luc 组的 Huh-7 细胞荧光素酶表达量只有对照质粒组 pCDNA3.1(-)/pNF- κ B-Luc 的 1/3。为了证明 NS2 蛋白在 Huh-7 细胞中对 NF- κ B 活性的这种抑制作用是否有剂量相关性, 分别用不同剂量 (0.05, 0.15, 0.3, 0.6 μ g) 的 pCNS2 DNA 和 0.3 μ g 的报告质粒 pNF- κ B-Luc DNA (质粒的量总共为 0.9 μ g, 不足的用空载体质粒补齐) 共转染 Huh-7 细胞, 图 4 显示随着 NS2 DNA 剂量增加, 抑制作用逐步增强。这些结果说明 NS2 蛋白对 NF- κ B 有反式抑制作用, 抑制其下游 Luc 基因的表达, 并呈明显的剂量相关性。

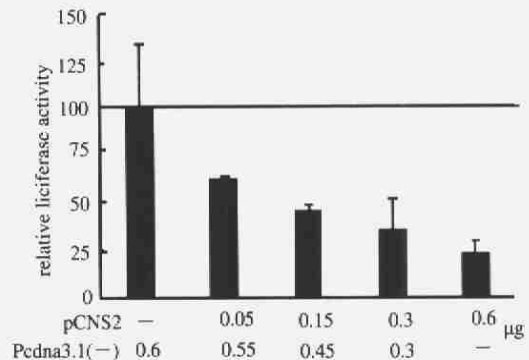


图 4 HCV NS2 蛋白在 Huh-7 细胞中抑制 NF- κ B 的活性
Fig.4 HCV NS2 Protein Suppresses the Activities of NF- κ B in Huh-7 Cells

3 讨论

丙型肝炎病毒属于黄病毒科, 是主要经血传播的肝炎病原体, 严重地危害着人类的健康。HCV 感染机体后, 病毒难以完全清除, 容易转变成慢性持续性感染, 而且 HCV 持续感染与肝硬化和肝细胞癌变的发展密切相关^[6]。对 HCV 病毒各个蛋白功能的研究, 有利于阐明病毒复制及致病变的机理, 但由于目前尚未找到敏感的细胞培养系统和合适的动物模型, 因此, 迄今为止对于 HCV 蛋白的功能研究多依赖于体外实验。目前国际上对 HCV NS2 研究很少, 因此对 NS2 的结构及功能尚不了解。

一种转录调节因子可以在不同类型的细胞中表现出多种各异的生物学效应。在具有多向性调节作用的蛋白质因子中, 转录激活因子 NF- κ B (nuclear factor- κ B) 是近年来研究较为深入的一种。许多病毒能利用 NF- κ B 来调节自身的表达。例如, 人类免疫缺陷病毒 I (HIV) 分子的长末端重复序列 (LTR) 上含有多个 κ B 位点^[7]。HIV 编码的蛋白 Tat 可以诱导 NF- κ B 激活, 从而加速了病毒的转录

与复制。在艾滋病患者体内, NF- κ B 很可能是一把双刃剑: 一方面, NF- κ B 可介导许多促炎症细胞因子的表达, 引起机体免疫系统功能加强; 另一方面, NF- κ B 的激活也同时诱导了病毒粒子的成熟及释放, 导致免疫功能的减弱。表明在细胞中 NF- κ B 的效应具有复杂性和潜在的不稳定性。这既体现在该因子与那些众多的已被发现的 NF- κ B 结合蛋白的相互作用上, 又更体现在有些结合蛋白所表现出的分子环境依赖效应中。它们在某些情况下表现为协同作用, 其它情况下则为拮抗。这些相互作用, 可能是因为细胞对不同胞外信号传导的反应不同, 细胞最终表现出的效应是各种反应的综合。

在本研究中, 我们将构建的重组真核表达载体 pCNS2 瞬时转染 Huh-7 细胞, 从基因的转录和蛋白质的翻译水平均证明了 pCNS2 在 Huh-7 细胞中表达相应的 NS2 蛋白。与报告质粒 pNF- κ B-Luc 共转染 Huh-7 细胞, 在同等剂量的情况下, pCNS2 组荧光素酶的表达较空质粒对照组降低了约 3 倍, 并进一步证明 NS2 蛋白在 Huh-7 细胞中对 NF- κ B 活性的抑制呈明显的剂量相关性。

近年来, 许多的研究表明 HCV 病毒蛋白能干扰宿主细胞的基因表达。例如在 HepG2 细胞中, HCV core 蛋白激活人类 c-myc 基因、RSV LTR 和 SV40 早期启动子^[8]; HCV NS4B 蛋白能激活一系列的包含顺式增强子元件的报告基因的活性^[9]。有报道指出 HCV NS2 蛋白通过使其凋亡诱导因子 CIDE-B 介导释放的细胞色素 C 的失活, 从而抑制 CIDE-B 诱导的细胞凋亡途径, 参与 HCV 对宿主细胞的防御^[10]。推测在 Huh-7 细胞中, HCV NS2 蛋白通过抑制 NF- κ B 的活性从而可间接抑制受 NF- κ B 控制的那些基因的表达。宿主细胞基因表达的变化可能有利于病毒建立慢性持续性感染状态, 从

而推测 NS2 可能与 HCV 的慢性感染和致病性有着密切的关系。

参考文献

- [1] Clarke B. Molecular Virology of Hepatitis C Virus[J]. J Gen Virol, 1997, 78: 2397-2410.
- [2] Santolini E, Pcini L, Migliaccio G, *et al.* The NS2 Protein of Hepatitis C Virus is a Transmembrane Polypeptide[J]. J Virol, 1995, 69: 7461-7471.
- [3] Yamaga A K, Ou J h. Membrane Topology of the Hepatitis C Virus NS2 Protein[J]. J Biol Chem, 2002, 277(36): 33228-33234.
- [4] Hijikata M, Mizushima H, Akagi T, *et al.* Two Distinct Proteinase Activities Required for the Processing of a Putative Nonstructural Precursor Protein of Hepatitis C Virus[J]. J Gen Virol, 1993, 67: 4665-4675.
- [5] Fei C, Vince C, Xianglin S, *et al.* New Insight into the Role of Nuclear Factor- κ B, a Ubiquitous Transcription Factor in the Initiation of Diseases[J]. Clin Chem, 1999, 45: 7-17.
- [6] Saito J, Miyamura T, Ohbayashi A, *et al.* Hepatitis C Virus Infection is Associated With the Development of Hepatocellular Carcinoma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 6547-6549.
- [7] Deluca C, Kwon H, Lin R, *et al.* NF- κ B activation and HIV-1 induced apoptosis[J]. Cyto Growth Fact Rev, 1999, 10: 235-253.
- [8] Chang J, Yang S H, Cho Y G, *et al.* Hepatitis C virus core from different genotypes has an oncogenic potential but is not sufficient for transforming primary rat embryo fibroblasts in cooperation with the H-ras oncogene[J]. J Virol, 1998, 72(4): 3060-3065.
- [9] Kato N, Yoshida H, Ono-Nita K, *et al.* Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signaling inducer[J]. Hepatology, 2000, 32: 405-412.
- [10] Erdtmann L, Franck N, Lerat H, *et al.* The Hepatitis C Virus NS2 Protein Is an Inhibitor of CIDE-B-induced Apoptosis[J]. J Biol Chem, 2003, 278 (20): 18256-18264.