

NIRF对HBV复制的影响及其对组蛋白H3乙酰化水平的修饰

周丹琳¹ 胡 斌¹ 宣艳艳¹ 段昌柱^{1,2*}

(¹重庆医科大学细胞生物学遗传学教研室, 重庆 400016;

²重庆医科大学临床检验诊断中心教育部重点实验室, 重庆 400016)

摘要 为研究NIRF(Np95/ICBP-90 like RING finger protein)对乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的复制以及乙型肝炎病毒共价环状闭合DNA(HBV cccDNA)结合的组蛋白H3乙酰化的影响, 采用脂质体转染将pGEM-HBV1.3+pFLAG、pGEM-HBV1.3+pFLAG-NIRF、pGEM-HBV1.3质粒分别转入HepG2细胞, Western blot检测NIRF蛋白的表达, 用ELISA结合RT-PCR检测HBsAg、HBeAg以及HBV cccDNA的量并同时说明HBV在细胞内是完成完整复制表达的, 采用染色质免疫共沉淀(ChIP)的方法检测与HBV cccDNA结合的组蛋白H3以及H3乙酰化水平的动态变化。结果显示, NIRF蛋白下调HBV标志物HBeAg、HBsAg的分泌以及HBV cccDNA的表达, 表明其对HBV复制具有抑制作用; 组蛋白H3及乙酰化的组蛋白H3都与HBV cccDNA的动态变化水平呈现相似的平行性, 而NIRF蛋白也明显抑制组蛋白H3的表达水平和乙酰化水平。结论证实NIRF不仅能抑制HBV在肝癌细胞中的复制, 而且能下调与HBV cccDNA结合的组蛋白H3和乙酰化组蛋白H3的表达。期待NIRF能为后续的HBV致病机理、HBV复制表观遗传学水平研究及有效抗病毒药物的研究与开发提供理论上的支持与帮助。

关键词 乙型肝炎病毒; NIRF; 组蛋白H3; 乙酰化

The Effect of NIRF on the Acetylation Status of HBV cccDNA Bound-H3 in HepG2 Cells

Zhou Danlin¹, Hu Bin¹, Xuan Yanyan¹, Duan Changzhu^{1,2*}

(¹Department of Cell Biology and Medical Genetics, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; ²Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract To determine the effect of NIRF protein (Np95/ICBP-90 like RING finger protein) on the replication of HBV and the acetylation of cccDNA-bound H3 histone at various times after transient transfection of linear HBV DNA into human hepatoma HepG2 cells. HepG2 cells were infected with GEM-HBV1.3+pFLAG、pGEM-HBV1.3+pFLAG-NIRF、pGEM-HBV1.3 plasmids. The secretion of HBsAg and HBeAg in the cultural supernatants of the transfected cells was detected by ELISA. The expression of HBV mRNA and NIRF protein was examined by RT-PCR and Western blot, respectively. Finally the levels of the HBV cccDNA-bound H3 histone and

收稿日期: 2012-10-29 接受日期: 2012-12-24

国家自然科学基金(批准号: 30872248)、重庆市科技委员会基金(批准号: 2008BB5400)和重庆市教育委员会基金(批准号: KJ080326)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485804, E-mail: duanchzhu@cqmu.edu.cn

Received: October 29, 2012 Accepted: December 24, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30872248), Chongqing Science and Technology Commission Foundation (Grant No.2008BB5400) and Chongqing Education Commission Foundation (Grant No.KJ080326)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485804, E-mail: duanchzhu@cqmu.edu.cn

网络出版时间: 2013-2-26 16:54

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130226.1654.002.html>

the acetylated H3 histone were identified by ChIP (Chromatin Immunoprecipitation). Our results demonstrated that the acetylation of cccDNA-bound H3 histone was associated with the level of HBV replication. NIRF can inhibit the levels of cccDNA-bound H3 and acetylated H3 in HepG2 cells, which may play roles in a better understanding of the mechanisms of HBV and confirm new therapeutic strategies against hepatitis B virus.

Key words hepatitis B virus; NIRF; H3 histone; acetylation

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界第五大恶性肿瘤,我国肝癌患者占全世界肝癌患者的比例达到55%^[1-2]。研究表明,乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是肝脏疾病和肝脏肿瘤的主要病因之一,HBV感染对人类健康造成如此巨大的危害,是全世界尤其是我国急需解决的重大科学和社会问题^[3]。

NIRF(Np95/ICBP-90 like RING finger protein)的分子结构类似于人ICBP90和鼠NP95蛋白,是2002年新发现的一种定位于人类染色体3p23-24.1的蛋白^[4],全长由802个氨基酸残基组成,包含NIRF_N、Tudor、PHD、SRA/YDG和RING-finger五个结构域和一个Rb结合位点^[5-6]。HBV是嗜肝DNA病毒家族的溶原性病毒,基因组呈松弛环状双链结构,具有特别的复制属性^[7]。目前的研究表明,HBV中存在类似真核细胞染色质样的结构,HBV在复制过程中产生共价环状闭合DNA(cccDNA),细胞核中cccDNA和组蛋白以及非组蛋白共同组成了病毒微染色体,即HBV复制中间体^[8-9]。而基于DNA序列改变的染色质重塑是一种非常重要的细胞调控机制,其参与了基因的转录调控,其中蛋白质修饰是极其重要的一种表现形式。已有研究表明,NIRF蛋白能与去乙酰化酶结合参与病毒组蛋白修饰^[10]。并且在本实验室之前的研究中已经证实,NIRF能与乙肝病毒核心蛋白(hepatitis B virus core protein, HBc)相互结合并导致HBc的泛素化降解^[11]。NIRF的这一特性是否会影响HBV病毒在宿主体内的包装、成熟,通过参与HBV cccDNA组蛋白H3的修饰作用调节HBV复制即是本研究所要探讨的主要内容。在此基础上,我们希望能对病毒微染色体参与HBV复制调控有更进一步的了解,期待为后续的HBV致病机理以及治疗药物的研究与开发提供理论帮助。

1 材料与方法

1.1 质粒

pCMV-3xFlag-NIRF质粒、带有完整HBV基因

组的pGEM-HBV1.3质粒为本实验室构建并保存,人肝癌细胞HepG2细胞株为本实验室冻存。

1.2 细胞培养、转染和收获

HepG2细胞用含10%胎牛血清(Hyclone)的DMEM培养基(Gibco公司)进行常规培养。细胞转染时,将HepG2细胞按80%的融合度分别接种于6孔板中,待细胞贴壁后,按照Lipofectamine 2000(Invitrogen公司)说明书分别加入2 μ L pGEM-HBV1.3、2 μ L pGEM-HBV1.3+pFLAG、2 μ L pGEM-HBV1.3+pFLAG-NIRF对HepG2细胞进行转染或共转染,转染48 h后收获细胞。收获细胞时,用预冷的PBS缓冲液清洗3次,再用细胞铲轻轻刮下贴壁的细胞离心洗涤后加入含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液,于4 $^{\circ}$ C裂解30 min, 14 000 r/min离心15 min,收集上清,待用。

1.3 Western blot

取样品行SDS-PAGE后,用电转移装置将蛋白质转移至PVDF膜上,用含5%脱脂牛奶的TBST溶液室温孵育1 h,滴加相应的 β -actin抗体(碧云天生物技术有限公司)、FLAG抗体(碧云天生物技术有限公司),于4 $^{\circ}$ C封闭过夜。TBST洗8 min $\times$ 3次,加入HRP标记的山羊抗小鼠IgG抗体(1:1 000,北京鼎国昌盛生物技术有限公司),室温下孵育1 h, TBST洗8 min $\times$ 5次, ECL法显影。

1.4 ELISA检测

分别在转染后12, 24, 48, 72 h收集6孔板的细胞培养上清液,用ELISA检测细胞上清中HBsAg和HBeAg的水平。依照试剂盒(上海科华生物技术有限公司)操作说明:于反应孔分别加入50 μ L待测样品、阴性对照样品和阳性对照样品,加入50 μ L酶标二抗混匀,37 $^{\circ}$ C孵育30 min,洗板5次,依次加入显色液A液、B液各50 μ L,混匀后37 $^{\circ}$ C孵育15 min,加入终止液50 μ L,酶联仪450 nm波长条件下测量D值。

1.5 荧光定量PCR

用Plasmid-safe DNase(Epicentre公司)处理HepG2细胞以消除开环HBV DNA以及单链DNA,提高HBV

cccDNA荧光定量的灵敏性。基因引物合成由上海生工生物工程有限公司完成, HBV上游引物: 5'-CTC CCC GTC TGT GCC TTC T-3', 下游引物: 5'-GCC CCA AAG CCA CCC AAG-3'; 探针: 5'-GTT CAC GGT GGT CTC CAT GCA ACG T-FAM-3'和5'-ROX-AGG TGA AGC GAA GTG CAC ACG GAC C-PO4-3'。以上述引物和探针进行PCR扩增, 条件为: 95 °C预变性30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 31 s, 共40个循环。

1.6 染色质免疫共沉淀

1.6.1 细胞核质分离以及超声波破碎 用pGEM-HBV1.3作为对照组、pGEM-HBV1.3+pFLAG-NIRF作为实验组转染细胞, 分别于转染后12, 24, 48, 72 h取出细胞培养板, 加入甲醛至最终浓度为1%, 37 °C孵育8 min, 加入甘氨酸至最终浓度为0.125 mol/L, 室温放置5 min终止交联。室温下放置5 min后弃去培养基, 用预冷的PBS溶液(含有蛋白酶抑制剂)清洗2次并将细胞刮下移入离心管中, 4 °C离心机3 000 r/min离心5 min收集细胞, 加入SDS Lysis Buffer冰上裂解15 min后进行超声破碎(条件: VCX750, 30%功率, 4.5 s冲击, 9 s间隙, 共8次), 获得200-400 bp的目的片段。

1.6.2 非特异性抗体的清除以及免疫共沉淀 取超声剪切的染色质200 µg, 加入70 mL Protein A, 4 °C颠转过夜, 将上述样品摇床1 h后, 2 500 r/min、4 °C离心5 min。取上清, 各留取20 µL样品做为input。分别加入乙酰化H3组蛋白特异性抗体、H3组蛋白特异性抗体(Millipore公司)以及相应的阴性IgG作为对照, 4 °C颠转过夜后加入Protein A(Millipore公司), 4 °C颠转2 h后, 4 °C、2 500 r/min离心5 min, 除去上清。加入预冷的ChIP缓冲液, 颠转3 min, 按上述方法收集凝胶磁珠3次。依次用高盐洗涤液、氯化锂洗涤液、TE洗涤液清洗, 除去上清。清洗完毕后开始洗脱, 每管加入250 µL洗脱buffer, 室温下颠转15 min, 静置离心后, 收集上清。重复洗涤1次。最终的洗脱液为每管500 µL。每管中加入NaCl至最终浓度为0.2 mol/L解交联。

1.6.3 PCR检测 解交联结束后, 分离纯化DNA, 每管加入1 µL RNase A(MBI), 37 °C孵育1 h后加入10 µL 0.5 mol/L EDTA、20 µL 1 mol/L Tris-HCl(pH6.5), 2 µL 10 mg/mL蛋白酶K。于45 °C处理2 h。设计HBV cccDNA特异性引物P23、P24(上海生工生物工程有限公司)以及Taqman探针, 收集产物进行PCR扩增,

条件为: 94 °C 30 s; 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共35个循环。

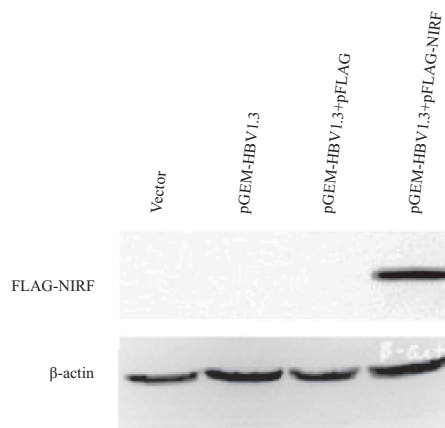
1.7 统计学分析

所有数据采用均值±标准差(SD)的表示方法, 采用SPSS12.0统计分析软件进行统计学分析, 显著性分析采用独立样本 t 检验, $P<0.05$ 表示统计结果有显著性差异。

2 结果

2.1 建立NIRF表达的HepG2细胞模型

为了探究在HepG2细胞中NIRF对HBV的影响, 首先将pGEM-HBV1.3、pGEM-HBV1.3+pFLAG、pGEM-HBV1.3+pFLAG-NIRF三组质粒分别通过脂质体转染HepG2细胞, 转染3 d后收获细胞, 提取蛋白。用Western blot检测NIRF蛋白的表达情况。结果如图1所示, 转染了pGEM-HBV1.3+pFLAG-NIRF的HepG2细胞中NIRF蛋白的表达有明显上升。



HepG2中转染和共转染入相应质粒, 于转染3天后收获细胞, 用FLAG特异性抗体和 β -actin抗体进行Western blot, 检测对照组和实验组的相关蛋白的表达。

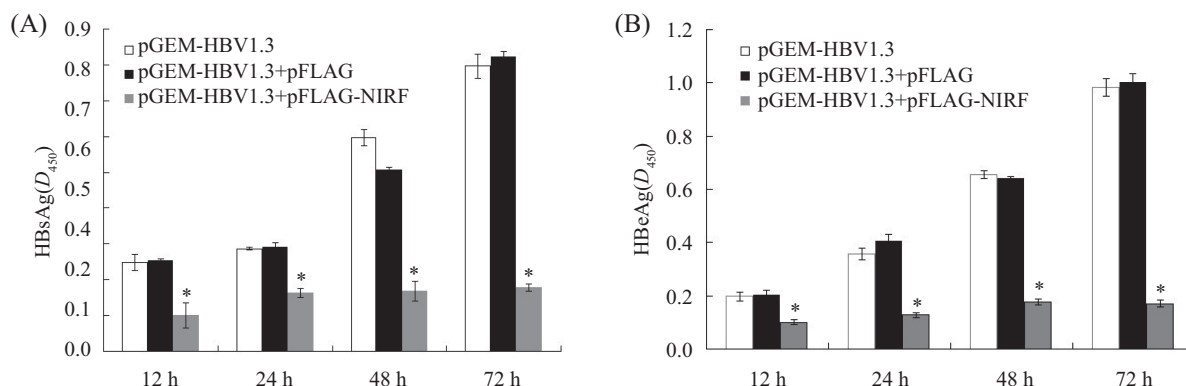
HepG2 cells were transfected or co-transfected with the specific plasmid as the graph showed. The cells were harvested for three days. Western blot was performed with FLAG antibody while β -actin was used as the loading control.

图1 Western blot检测各组细胞中NIRF蛋白的表达

Fig.1 The expression of NIRF protein in different groups detected by Western blot

2.2 NIRF蛋白影响HBV病毒蛋白标志物HBeAg和HBsAg的分泌

按照上述方法转染质粒后, 分别于转染后12, 24, 48, 72 h收集细胞上清液, 用ELISA检测HBeAg、HBsAg的表达情况, 结果显示(图2), 虽然对照组和



HepG2 cells were co-transfected with pGEM-HBV1.3, pGEM-HBV1.3+pFLAG, pGEM-HBV1.3+pFLAG-NIRF. A: the HBsAg levels in HepG2 cells transfected with plasmid at 12, 24, 48, 72 h were detected by ELISA; B: the HBeAg levels in HepG2 cells transfected with plasmid at 12, 24, 48, 72 h were detected by ELISA. $n=3$. $*P<0.05$.

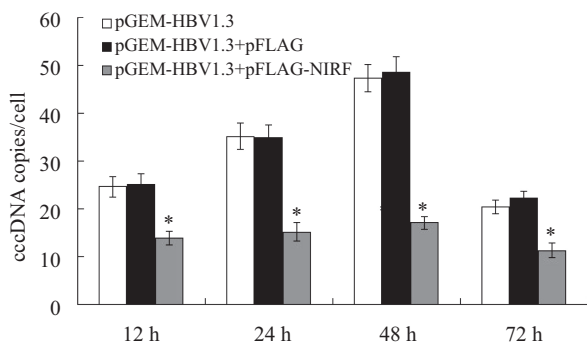
图2 转染后各个时间点HBsAg、HBeAg水平的ELISA检测

Fig.2 Detection of HBsAg and HBeAg by ELISA at different time points after transfection

实验组都是在第72 h出现最大D值, 但转染pGEM-HBV1.3+pFLAG-NIRF的细胞 D_{450} 值较其他各组有明显降低($P<0.05$)。

2.3 NIRF蛋白抑制HBV cccDNA的复制水平

转染质粒后, 分别于12, 24, 48, 72 h取细胞上清液后进行荧光定量PCR检测HBV cccDNA的表达水平。结果显示(图3), 转染pGEM-HBV1.3组的cccDNA表达水平明显高于转染pGEM-HBV1.3+pFLAG-NIRF质粒的实验处理组($P<0.05$), 并且两组细胞中



Real-time PCR检测HBV转染后12, 24, 48, 72 h HepG2细胞核中HBV cccDNA拷贝数的变化情况。* $P<0.05$ 。

Real-time PCR quantification of HBV cccDNA levels in HepG2 cells transfected with HBV at 12, 24, 48, 72 h post-transfection. $*P<0.05$.

图3 各个时间段NIRF对细胞核HBV cccDNA动态水平的影响

Fig.3 Quantification of HBV cccDNA expression affected by NIRF by Real-time PCR

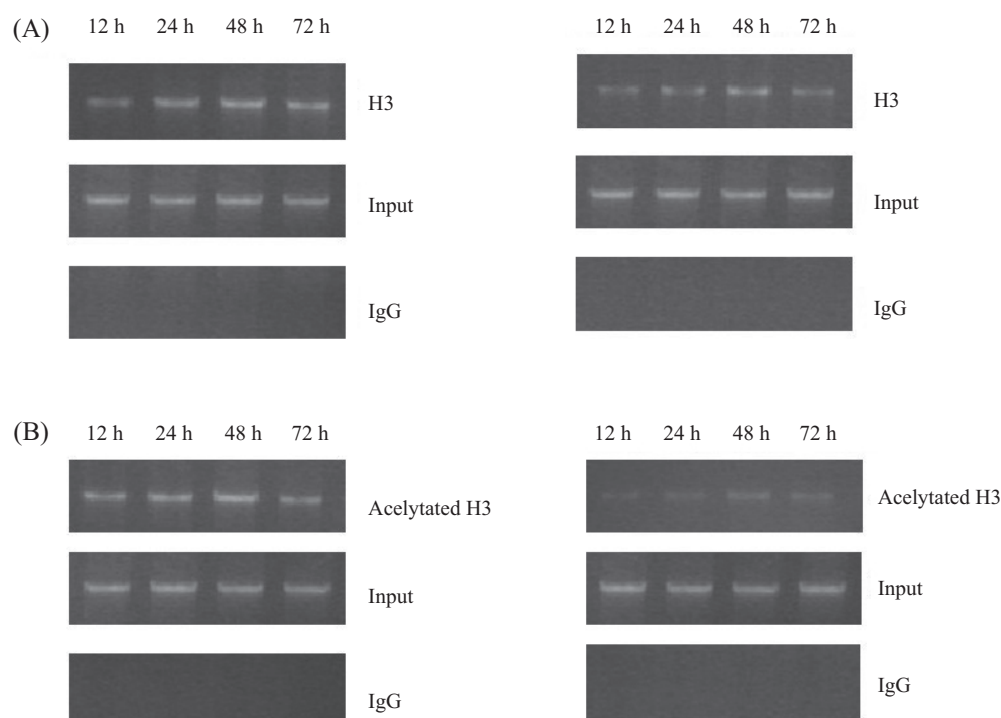
HBV cccDNA的表达水平都是在第48 h达到高峰, 随着时间的延长, 在72 h有所下降。

2.4 NIRF蛋白影响HBV cccDNA组蛋白H3的乙酰化水平

转染质粒后, 分别于12, 24, 48, 72 h收集细胞进行染色质免疫共沉淀。结果显示, 共转染pGEM-HBV1.3+pFLAG-NIRF质粒的实验处理组的乙酰化水平低于转染pGEM-HBV1.3的对照组, 与HBV cccDNA结合的组蛋白H3的表达水平和被修饰后的组蛋白H3乙酰化水平在各个转染时间点都有所不同, 并且两组都是在48 h达到高峰, 72 h开始有所下降(图4)。这一现象说明, NIRF蛋白抑制了组蛋白H3的乙酰化水平, 同时, HBV cccDNA的复制水平的变化与组蛋白H3的乙酰化水平的动态变化存在一定的平行关系。

3 讨论

已有文献表明, NIRF蛋白具有自身泛素化功能, 是HBc的一个E3连接酶(E3 ligase), 通过宿主细胞的泛素化系统对HBc蛋白进行修饰从而影响HBV DNA的复制^[12]。本文采用脂质体转染法, 将包含HBV线性全长DNA的质粒和NIRF质粒共同瞬时转入HepG2细胞内, 线性HBV DNA可以自我环化后作为cccDNA的模板启动细胞中的病毒复制过程并且有效地分泌抗原。文章通过ELISA、特异性探



HepG2细胞中分别转染pGEM-HBV1.3和pGEM-HBV1.3+pFLAG-NIRF。A: 用抗组蛋白H3抗体以及阴性对照抗体对只转染pGEM-HBV1.3的对照组(左)和共转染pGEM-HBV1.3+pFLAG-NIRF的实验组(右)的HepG2细胞进行12, 24, 48, 72 h四个时间点的ChIP分析; B: 用抗乙酰化组蛋白H3抗体以及阴性对照抗体对只转染pGEM-HBV1.3的对照组(左)和共转染pGEM-HBV1.3+pFLAG-NIRF的实验组(右)的HepG2细胞进行12, 24, 48, 72 h四个时间点的ChIP分析。

HepG2 cells were transfected with pGEM-HBV1.3 and pGEM-HBV1.3+pFLAG-NIRF, respectively. A: ChIP assay was performed on pGEM-HBV1.3 transfected cells by using negative antibody (left panel) and pGEM-HBV1.3+pFLAG-NIRF transfected cells by using antibody specific to H3 (right panel) at 12, 24, 48, 72 h post-transfection; B: ChIP assay was performed on pGEM-HBV1.3 transfected cells by using negative antibody (left panel) and pGEM-HBV1.3+pFLAG-NIRF transfected cells by using antibody specific to H3 (right panel) at 12, 24, 48, 72 h post-transfection.

图4 各组不同时间段HBV cccDNA结合的H3及乙酰化H3的表达水平

Fig.4 The expression of HBV cccDNA-bound H3 and the acetylation status of cccDNA-bound H3 at different time points

针Real-time PCR技术检测在不同时间点HBV特殊标志物HBeAg、HBsAg的分泌量及细胞核内HBV cccDNA的动态水平,证实了NIRF抑制HBV复制的作用,更发现其随时间变化的作用趋势。继而结合染色质免疫共沉淀技术着重研究了NIRF蛋白对参与组蛋白修饰的H3乙酰化水平的抑制,以及HBV cccDNA的动态变化与组蛋白H3及乙酰化的组蛋白H3的表达变化之间平行的变化趋势。

HBV cccDNA是HBV复制的中间体,是HBV mRNA和前基因组RNA的合成模板,也是HBV持续感染的关键因素,最终决定了HBV的复制效率^[13]。而在与HBV复制相关的微型染色体修饰中,组蛋白H3的乙酰化又是起重要作用的。组蛋白乙酰化主要发生在H3、H4的N-端比较保守的赖氨酸位置上,是由组蛋白乙酰化酶(histone acetyltransferase, HAT)和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDAC)协

调进行的^[14]。cccDNA的活性在体内和体外均受到如组蛋白H3乙酰化状态改变的调控,进而影响其转录和HBV的复制^[15]。我们的结果显示,HBV cccDNA的复制水平与组蛋白H3、组蛋白H3的乙酰化水平动态变化有相同的变化趋势,都是在48 h达到最大值,在72 h有所下降。在表观遗传学水平上探讨NIRF蛋白抑制HBV复制的机理,发现NIRF蛋白极有可能通过下调与HBV cccDNA结合的组蛋白H3、乙酰化的组蛋白H3的表达水平,通过调节组蛋白对HBV的修饰作用来抑制HBV复制。现有文献证实,组蛋白的乙酰化和去乙酰化是基因表达调控的一种非常重要和普遍的方式^[16-17]。我们的实验结果也证实,HBV cccDNA的活性在细胞内受到表观遗传学如组蛋白H3乙酰化状态改变的调控,进而影响其转录和HBV复制。我们发现, NIRF对组蛋白乙酰化水平的影响为NIRF在染色质水平上调节HBV复制机

理研究提供了新的思路, 极有可能是NIRF蛋白影响HBV病毒复制的另一途径。在后续实验进程中, 我们将更进一步研究NIRF对其他组蛋白如组蛋白H4乙酰化水平的影响。组蛋白的修饰并不是单一作用的, 甲基化、磷酸化、乙酰化之间存在着一定的抑制或协同作用。探讨NIRF是否通过影响其他几种组蛋白修饰方式调节HBV复制, 为研究NIRF在HBV复制过程中调节H3、H4组蛋白的修饰作用提供了基础。

总之, 我们的研究结果在表观遗传学水平上为NIRF以cccDNA为靶点的抗病毒治疗以及探讨乙肝病毒复制调控规律提供了理论和实验依据。

参考文献 (References)

- 1 Tsouchatzis EA, Meyer T, O'Beirne J, Burroughs AK. Transarterial therapies for hepatocellular carcinoma (HCC): A long way towards standardization. *J Hepatol* 2013; 58(1): 194.
- 2 Ahmad J, Eng FJ, Branch AD. HCV and HCC: Clinical update and a review of HCC-associated viral mutations in the core gene. *Semin Liver Dis* 2011; 31(4): 347-55.
- 3 Hanto DW, Curry MP, Sun M, Nasser I. Hepatocellular carcinoma (HCC) in a patient with hepatitis B virus (HBV) infection. *Am J Transplant* 2012; 12(3): 786-7; quiz 88.
- 4 钱冠华, 金方敏, 段昌柱. 人NIRF蛋白与HBV核心蛋白相互作用的初步研究. *生命科学研究*(Qian Guanhua, Jin Fangmin, Duan Changzhu. Preliminary study on the interaction between human NIRF protein and HBV core protein. *Life Science Research*) 2012; 15(1): 1-4.
- 5 Mori T, Ikeda DD, Yamaguchi Y, Unoki M. NIRF/UHRF2 occupies a central position in the cell cycle network and allows coupling with the epigenetic landscape. *FEBS Lett* 2012; 586(11): 1570-83.
- 6 Bronner C, Achour M, Arima Y, Chataigneau T, Saya H, Schini-Kerth VB. The UHRF family: Oncogenes that are drugable targets for cancer therapy in the near future. *Pharmacol Ther* 2007; 115(3): 419-34.
- 7 Lucifora J, Durantel D, Belloni L, Barraud L, Villet S, Vincent IE, *et al.* Initiation of hepatitis B virus genome replication and production of infectious virus following delivery in HepG2 cells by novel recombinant baculovirus vector. *J Gen Virol* 2008; 89(Pt 8): 1819-28.
- 8 Belloni L, Pollicino T, de Nicola F, Guerrieri F, Raffa G, Fanciulli M, *et al.* Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(47): 19975-9.
- 9 Liang WF, Liu ZH, Yang J, Luo KX. Dynamic analysis of HBV cccDNA in HepG2 cells infected with Ad-1.2 HBV. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2007; 2(9): 1374-5.
- 10 Mori T, Ikeda DD, Fukushima T, Takenoshita S, Kochi H. NIRF constitutes a nodal point in the cell cycle network and is a candidate tumor suppressor. *Cell Cycle* 2011; 10(19): 3284-99.
- 11 Qian G, Jin F, Chang L, Yang Y, Peng H, Duan C. NIRF, a novel ubiquitin ligase, interacts with hepatitis B virus core protein and promotes its degradation. *Biotechnol Lett* 2012; 34(1): 29-36.
- 12 Mori T, Li Y, Hata H, Kochi H. NIRF is a ubiquitin ligase that is capable of ubiquitinating PCNP, a PEST-containing nuclear protein. *FEBS Lett* 2004; 557(1/2/3): 209-14.
- 13 Yu MM, Gu XJ, Xia Y, Wang GJ, Kan NY, Jiang HX, *et al.* Relationship between HBV cccDNA expression in the human ovary and vertical transmission of HBV. *Epidemiol Infect* 2012; 140(8): 1454-60.
- 14 Mathew OP, Ranganna K, Yatsu FM. Butyrate, an HDAC inhibitor, stimulates interplay between different posttranslational modifications of histone H3 and differently alters G₁-specific cell cycle proteins in vascular smooth muscle cells. *Biomed Pharmacother* 2010; 64(10): 733-40.
- 15 Zhang L, Wu F, Shi LL, Dou XG. Quantitative analysis of HBV cccDNA from liver biopsy specimens in HBV carriers: Correlation with serological makers and sera HBV DNA. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 2011; 25(2): 112-3.
- 16 Peserico A, Simone C. Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 371832.
- 17 Levrero M, Pollicino T, Petersen J, Belloni L, Raimondo G, Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2009; 51(3): 581-92.