

IRES 特异性 IRNA 在丙型肝炎抗病毒治疗中作用

梁雪松, 连建奇, 周永兴

梁雪松, 连建奇, 周永兴, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 710038
国家自然科学基金资助课题, No. 3000147
项目负责人: 连建奇, 710038, 陕西省西安市霸桥区新寺路 1 号, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. lianjq@yahoo.com
电话: 029-3377595
收稿日期: 2002-10-25 接受日期: 2002-11-20

摘要

丙型肝炎基因治疗是目前研究的热点, HCV IRES 是丙肝病毒核酸复制和蛋白翻译的关键结构. 目前针对 IRES 结构的治疗策略主要包括反义核酸、核酶、抑制性 RNA 等. 现就抑制性 RNA 在 HCV 感染基因治疗中作用研究进展作简要综述.

梁雪松, 连建奇, 周永兴. IRES 特异性 IRNA 在丙型肝炎抗病毒治疗中作用. 世界华人消化杂志 2003; 11(2): 242-245
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/130.htm>

0 引言

到目前为止, 抗 HCV 感染的治疗效果远不尽人意, 其重要原因之一是不能快速、有效地抑制 HCV 基因在宿主体内的表达, 并清除病毒^[1-18]. 近年来一些学者提出了基因治疗的思路, 主要包括反义核酸策略、核酶策略、细胞内干扰性多肽或蛋白策略、抑制性 RNA 策略等, 后者具有高效、特异和安全等优点, 现就其研究进展综述如下.

1 HCV 因结构及翻译机制

1.1 HCV 基因结构 HCV 是黄病毒属成员, 单股正链 RNA 病毒, 全长约 9 400 核苷酸(nt)组成, 含有一大的开放读码框(ORF), ORF 几乎跨越 HCV 全基因组. HCV 基因组 5' 末端为非编码区(NCR), 位于 ORF 上游. 3' 末端也为 NCR 区, 位于 ORF 的下游, 可含 poly (A) 或 poly (U) 尾. 5' NCR 和 3' NCR 在病毒的复制和稳定病毒的生物学性状等方面起重要作用^[19-29]. 采用基因克隆方法可以检出 HCV 5' NCR 区的完整序列. 首先报道的从原型株获得的 5' NCR 长为 341 nt, 以后报道的该区长短略有不同, 为 319nt 或 324 nt, 这些短的 5' NCR 可能是 HCV 基因组在体内被切割或基因变异的结果. 5' NCR 在 HCV 基因组中最为保守. 在 5' NCR 中存在三个高度保守的结构区域, 分别位于 3-65、178-199 和 246-263 位, 后二个区域与病毒的进化有关, 前一个区域毗邻病毒蛋白前体翻译的真实启动子 AUG, 故认为这一结构对 HCV 基因组的翻译至关重要, 这一假设在以后的

体内外实验研究中得到了证实. 通过热力学模拟试验和使用特异性 RNA 酶裂解试验分析 HCV 5' NCR 二级结构证实: 5' NCR 二级结构可分为 4 个结构域, 结构域 I 呈发夹状, 可能有阻止病毒翻译启动的作用; 结构域 II 是一个大的茎-环结构, 可能存在一辅助结合位点, 当核糖体或其他未知因子与其结合后会对 HCV 5' NCR 空间结构起稳定作用, 从而消除结构域 I 的负性作用, 保证病毒蛋白前体的有效翻译; 结构域 III 和结构域 IV 对 HCV RNA 有效启动和 5' NCR 翻译调控至关重要^[30-35].

1.2 HCV 蛋白翻译机制 迄今为止, 真核细胞中 mRNA 翻译机制有二种不同的形式. 第一种为核糖体扫描机制, 该机制涉及核糖体 40S 亚单位和 5' 帽状结构结合, 然后核糖体从 5' 端向 3' 端扫描, 直至碰到合适的起始密码子 AUG; 第二种机制为内部启动, 特定病毒和细胞 mRNA 在 5' NCR 含有一定的序列, 可以介导非帽状结构形成依赖性蛋白翻译机制, 这一序列已被定为 IRES, 位于 5' 端下游约 100 nt 左右处, 主要介导核糖体与 mRNA 结合. 这种机制最早在小核糖核酸病毒属中发现. 进一步研究发现, 宿主细胞性蛋白多肽和具有一定二级结构的病毒 5' NCR 结合是这种机制的关键. 现已确定的蛋白多肽包括 La 自身抗体、聚嘧啶束蛋白 (PTB) 及核仁素等, 这些蛋白多肽与 IRES 结合可便于核糖体与 mRNA 结合. HCV 5' NCR 结构与瘟病毒和微小 RNA 病毒相似, 在 HCV 5' NCR 存在同微小 RNA 病毒相似的富嘧啶区即 IRES 结构. Wang et al 以 CAT 作为报道基因, 应用 PCR 技术构建了一系列 HCV 5' NCR 控制突变型表达载体, 体外翻译和细胞转染实验证明, HCV 基因组的翻译机制为非帽状结构形成依赖性的, 且证明 IRES 结构的存在和完整性是 HCV 蛋白翻译正常进行的结构基础^[36-52]. 以这种机制进行蛋白翻译的病毒还有脊髓灰质炎病毒(PV)、口蹄疫病毒、鸭乙型肝炎病毒等.

2 IRNA 的结构

1992 年 Coward 和 Dasgupta 在研究 PV 时, 发现酵母细胞的一段 60 nt 的片段对 PV 病毒的复制和表达具有较强的抑制作用, 被称为抑制性 RNA (IRNA). IRNA 为一种核酸物质, 其一级结构和空间结构对其活性均有重要意义. Das et al 采用缺失突变方法获得不同 IRNA 突变体 (mutant IRNA, mIRNA), 并以 mIRNA 对含 PV IRES 的 p2CAT 体内外表达的抑制作用进行了检测. 结果缺失

31-45 nt 的 miRNA 完全失去了抑制活性,含 30-40 nt 的 miRNA 保留了大部分的抑制活性,而另一含 30-45 nt 的 miRNA 表现出较高的体内抑制活性,这说明序列 30-40 nt 是维持 IRNA 活性的必须序列。此后,Venkatesan et al [53] 依据能量级最低原则,应用计算机软件 MFOLD 预测了 IRNA 及其互补体(complete IRNA,cIRNA)的二级结构,发现二者具有大体相似的结构,即二个环、一个茎和一个大的膨出。为了证实此结果和确立其结构,作者应用酶学方法和化学修饰法对 IRNA 及 cIRNA 二级结构进行了探索。具体的方法是:第 1 步以 RNases T₁、核酸酶 S₁ 和 RNases ONE 消化体外转录的 IRNA,确立单链部分, RNases V₁ 消化 IRNA,确立双链部分;第 2 步在先行与寡核苷酸杂交后用 RNases H 切割;第 3 步应用 DMS 化学法改变腺苷和胞苷。结果发现 IRNA 结构为:20-27 nt 与 62-69 nt 配对形成一茎,二个环位于 6-15 nt、36-43 nt,膨出位于 46-61 nt 之间。cIRNA 结构为二个位于 20-28 nt 和 49-57 nt 的环,位于 42-48 nt 的茎和位于 61-64 nt 间的 2 nt 大小的膨出。他们还证实 IRNA 和 cIRNA 结合相同的蛋白多肽,具有相似的抑制活性,上述结果提示二级结构对 IRNA 的抑制活性具有重要的意义。他们进一步依据能量级最低化原则建立了 m1IRNA 和 m2IRNA,前者将 44-46 nt 5' GCA 3' 变为 5' UUC 3',结果是位于 36 nt 和 43 nt 间的发夹样环状结构消失了,使 m1IRNA 与 IRNA 结构相比发生了改变。m2IRNA 是通过将 24-26 nt 的碱基与 63-65 nt 的碱基互换而成,结构与 IRNA 大相径庭。对上述二种突变体活性检测的结果表明,其完全失去了抑制活性,这反过来进一步证明维持 IRNA 的二级结构对其活性是十分重要的。总之,IRNA 为一 60 nt 的小分子 RNA,可特异性抑制 IRES 介导蛋白翻译,其二级结构是维持其抑制活性的关键。

3 IRNA 的功能

3.1 IRNA 抑制 IRES 介导蛋白翻译机制 据目前的研究结果分析,IRNA 可特异性抑制 IRES 介导蛋白翻译。从理论上推测 IRNA 作用机制有二种可能:(1)作为反义核酸与 5' NCR 特定序列结合;(2)与 IRES 介导蛋白翻译过程中宿主因子结合而阻断核糖体与 IRES 结合^[54-61]。目前的研究结果均不支持前一种情况,其原因是:早在分离提纯 IRNA 的过程中就见纯化的 IRNA 序列与病毒 5' NCR 序列无互补性,且也不与其相杂交。另外,过量的 Hela 细胞裂解液可逆转 IRNA 抑制活性,而过量的病毒 RNA 或 5' NCR 却无此作用,这进一步说明 IRNA 并非通过与病毒直接作用而发挥抑制活性。研究者们为了探讨 IRNA 作用机制,而在纯化、克隆 IRNA 的基础上使用竞争性实验、UV-交叉连接实验等方法进行研究发现, Hela 细胞裂解液中蛋白多肽 P52 与 PV 5' NCR 特异性环状结构相结合, IRNA 可竞争性阻断这种结合,经对 IRNA 二级结构与病毒 5' NCR 二级结构相比发现二者具有相似的环状结构,这一发现证实

IRNA 是通过与病毒基因的 5' NCR 竞争结合相同的宿主蛋白多肽而发挥抑制活性的。研究还发现,真核细胞中 La 自身抗原可以明显逆转 IRNA 的抑制活性,抗 La 抗体可以将 P52 与 IRNA 或 5' NCR 探针复合体免疫共沉淀,从而证实 Hela 细胞裂解液成份 P52 与 La 抗原相同。从目前的结果可见,IRNA 抑制机制为通过与 IRES 竞争结合宿主蛋白多肽而阻止核糖体与病毒 IRES 结合,抑制病毒蛋白翻译,对真核细胞帽状结构形成依赖性蛋白合成无抑制作用,这为其在真核细胞中抑制病毒的复制奠定了理论基础。

3.2 IRNA 对 HCV 蛋白翻译抑制作用 如前所述 HCV 病毒 5' NCR 结构与微小 RNA 病毒 5' NCR 结构相似,且已证实 HCV 蛋白翻译启动机制为 IRES 介导的内部启动机制。在 HCV 蛋白翻译过程中 IRES 与一些细胞性蛋白多肽,如 La 抗原、PTB、P25、P84、P120 等相结合而便于核糖体与 IRES 结合并激发 HCV 翻译过程。由于 HCV 与 PV 蛋白翻译中均结合相同的蛋白多肽,而推测 IRNA 可能对 HCV 蛋白翻译具相似的抑制活性。为了证实这种推断, Das 等使用三种表达质粒:表达 HCV IRES 与荧光素酶(Luciferase,luc)融合体的 pCDHCV-luc、pSV40/ β -gal 和表达 IRNA 的 pCDIR.Rib T7 共转染人肝癌细胞系(Huh-7)。结果发现,同对照组相比,最低浓度的 IRNA 可抑制 pCDHCV-luc 表达物 50% 的荧光素酶活性,最高浓度的抑制活性 90%,这提示 IRNA 能特异性抑制 HCV IRES 介导的蛋白翻译。他们进一步构建了含有 HCV IRES 的双顺反子体外转录载体,进行体外转录,结果是 1 μ g IRNA 对由 HCV IRES 介导的荧光素酶合成的抑制率为 20%,2 μ g 时抑制率为 76%,而对以帽状结构形成依赖性机制进行的 CAT 基因蛋白合成抑制性很低,这证实 IRNA 对 HCV IRES 介导蛋白体外翻译同样具抑制性。研究上发现 PV-HCV IRES 嵌合体在 IRNA 表达细胞株中不能复制。

4 存在的问题和展望

IRNA 作为一种 HCV 感染的基因治疗方法还存在许多问题。例如 IRNA 进行抗 HCV 治疗有二种方法:一种为体外合成 IRNA 片段,把这种 IRNA 作为一种药物来使用,这就存在 IRNA 体内稳定性等问题;另一种方法是将 IRNA 的重组体导入细胞内进行基因治疗,这种方法可能有广泛的应用前景,但同时也存在导入方法等问题。现阶段需要的是大量有关载体和靶细胞生物学的基础研究,以及价廉易得的 HCV 感染动物模型的建立。

丙型肝炎作为一种危害较大的病毒性疾病,基因治疗能在不同水平影响病毒的复制,因此是一种很有潜力的治疗方法。IRNA 通过阻断病毒蛋白翻译而抑制病毒感染过程,同时对宿主细胞繁殖代谢物影响,这为 HCV 感染基因治疗提供了新思路和新前景,也许在不久的将来,IRNA 治疗能真正成为治疗 HCV 感染的突破口。

5 参考文献

- 1 Yu YC, Mao Q, Gu CH, Li QF, Wang YM. Activity of HDV ribozymes to trans-cleave HCV RNA. *World J Gastroenterol* 2002;8:694-698
- 2 Rabe C, Pilz T, Klostermann C, Berna M, Schild HH, Sauerbruch T, Caselmann WH. Clinical characteristics and outcome of a cohort of 101 patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;7:208-215
- 3 Wu HB, Li ZW, Li Y. Clinical significance of detection of positive and negative strands of HCV RNA in peripheral blood mononuclear cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:220-221
- 4 Jia ZS, Zhou YX, Lian JQ, Feng ZH, Li GY, Zhang WB. Computerized design of hepatitis C virus RNA-directed hammerhead ribozymes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:300-302
- 5 Zhao XP, Shen HX, Tian DY, Zhang DS, Peng ZH, Yang DL, Hao LJ. Expression and significance of HCV RNA and HCV NS5 antigen in liver tissues of patients with hepatitis C. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:516-518
- 6 Fan XG, Tang FQ, Ou ZM, Zhang JX, Liu GC, Hu GL. Lymphoproliferative response to hepatitis C virus (HCV) antigens in patients with chronic HCV infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:1038-1040
- 7 Nie QH, Li MD, Hu DR, Chen GZ. Study on the cause of human protective immunodeficiency after HCV infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:28-30
- 8 Song ZQ, Hao F, Wang YG, Min F, Wang YM. Blocking effect of hyperimmune rabbit serum against MAP containing HVR1 sequences on HCV infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:171-174
- 9 Assy N, Minuk GY. A comparison between previous and present histologic assessments of chronic hepatitis C viral infections in humans. *World J Gastroenterol* 1999;5:107-110
- 10 Zhang SZ, Liang JJ, Qi ZT, Hu YP. Cloning of the non-structural gene 3 of hepatitis C virus and its inducible expression in cultured cells. *World J Gastroenterol* 1999;5:125-127
- 11 Huang F, Zhao GZ, Li Y. HCV genotypes in hepatitis C patients and their clinical significances. *World J Gastroenterol* 1999;5:547-549
- 12 Dai YM, Shou ZP, Ni CR, Wang NJ, Zhang SP. Localization of HCV RNA and capsid protein in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2000;6:136-137
- 13 Jiang RL, Lu QS, Luo KX. Cloning and expression of core gene cDNA of Chinese hepatitis C virus in cosmid pTM3. *World J Gastroenterol* 2000;6:220-222
- 14 Michielsen P, Brenard R, Reynaert H. Treatment of hepatitis C: impact on the virus, quality of life and the natural history. *Acta Gastroenterol Belg* 2002;65:90-94
- 15 Nishiguchi S, Enomoto M, Tanaka M, Fukuda K, Tamori A, Habu D, Takeda T, Shiomi S, Tanaka T, Yano Y, Otani S. Accurate prediction of response to interferon therapy by repeated measurement of hepatitis C virus core protein in patients with chronic hepatitis C. *Intervirology* 2002;45:105-110
- 16 Kato J, Kato N, Moriyama M, Goto T, Taniguchi H, Shiratori Y, Omata M. Interferons specifically suppress the translation from the internal ribosome entry site of hepatitis C virus through a double-stranded RNA-activated protein kinase-independent pathway. *J Infect Dis* 2002;186:155-163
- 17 Castet V, Fournier C, Soulier A, Brillet R, Coste J, Larrey D, Dhumeaux D, Maurel P, Pawlotsky JM. Alpha interferon inhibits hepatitis C virus replication in primary human hepatocytes infected in vitro. *J Virol* 2002;76:8189-8199
- 18 Chayama K. Management of chronic hepatitis C and prevention of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2002;37 (Suppl 13):69-73
- 19 Friebe P, Bartenschlager R. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* 2002;76:5326-5338
- 20 Friebe P, Lohmann V, Krieger N, Bartenschlager R. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* 2001;75:12047-12057
- 21 Odreman-Macchioli F, Baralle FE, Buratti E. Mutational analysis of the different bulge regions of hepatitis C virus domain II and their influence on internal ribosome entry site translational ability. *J Biol Chem* 2001;276:41648-41655
- 22 Wiklund L, Spangberg K, Goobar-Larsson L, Schwartz S. Cap and polyA tail enhance translation initiation at the hepatitis C virus internal ribosome entry site by a discontinuous scanning, or shunting, mechanism. *J Hum Virol* 2001;4:74-84
- 23 Spangberg K, Wiklund L, Schwartz S. Binding of the La autoantigen to the hepatitis C virus 3' untranslated region protects the RNA from rapid degradation in vitro. *J Gen Virol* 2001;82:113-120
- 24 Hellen CU, Pestova TV. Translation of hepatitis C virus RNA. *J Viral Hepat* 1999;6:79-87
- 25 Sergi C, Arnold JC, Rau W, Otto HF, Hofmann WJ. Single nucleotide insertion in the 5'-untranslated region of hepatitis C virus with clearance of the viral RNA in a liver transplant recipient during acute hepatitis B virus superinfection. *Liver* 2002;22:79-82
- 26 Zhang J, Yamada O, Ito T, Akiyama M, Hashimoto Y, Yoshida H, Makino R, Masago A, Uemura H, Araki H. A single nucleotide insertion in the 5'-untranslated region of hepatitis C virus leads to enhanced cap-independent translation. *Virology* 1999;261:263-270
- 27 Honda M, Rijnbrand R, Abell G, Kim D, Lemon SM. Natural variation in translational activities of the 5' nontranslated RNAs of hepatitis C virus genotypes 1a and 1b: evidence for a long-range RNA-RNA interaction outside of the internal ribosomal entry site. *J Virol* 1999;73:4941-4951
- 28 Tang S, Collier AJ, Elliott RM. Alterations to both the primary and predicted secondary structure of stem-loop IIIc of the hepatitis C virus 1b 5' untranslated region (5'UTR) lead to mutants severely defective in translation which cannot be complemented in trans by the wild-type 5'UTR sequence. *J Virol* 1999;73:2359-2364
- 29 Honda M, Beard MR, Ping LH, Lemon SM. A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *J Virol* 1999;73:1165-1174
- 30 Kim YK, Kim CS, Lee SH, Jang SK. Domains I and II in the 5' nontranslated region of the HCV genome are required for RNA replication. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:105-112
- 31 Kruger M, Beger C, Welch PJ, Barber JR, Manns MP, Wong-Staal F. Involvement of proteasome alpha-subunit PSMA7 in hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. *Mol Cell Biol* 2001;21:8357-8364
- 32 Jubin R, Murray MG, Howe AY, Butkiewicz N, Hong Z, Lau JY. Amantadine and rimantadine have no direct inhibitory effects against hepatitis C viral protease, helicase, ATPase, polymerase, and internal ribosomal entry site-mediated translation. *Infect Dis* 2000;181:331-334
- 33 Collier AJ, Gallego J, Klinck R, Cole PT, Harris SJ, Harrison GP, Aboul-Ela F, Varani G, Walker S. A conserved RNA structure within the HCV IRES eIF3-binding site. *Nat Struct Biol* 2002;9:375-380
- 34 Friebe P, Lohmann V, Krieger N, Bartenschlager R. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* 2001;75:12047-12057
- 35 Michielsen P, Brenard R, Reynaert H. Treatment of hepatitis C: impact on the virus, quality of life and the natural history. *Acta Gastroenterol Belg* 2002;65:90-94
- 36 Kim I, Lukavsky PJ, Puglisi JD. NMR Study of 100 kDa HCV IRES RNA Using Segmental Isotope Labeling. *J Am Chem Soc* 2002;124:9338-9339
- 37 Otto GA, Lukavsky PJ, Lancaster AM, Sarnow P, Puglisi JD. Ribosomal proteins mediate the hepatitis C virus IRES-HeLa 40 S interaction. *RNA* 2002;8:913-923
- 38 Kato J, Kato N, Moriyama M, Goto T, Taniguchi H, Shiratori Y, Omata M. Interferons specifically suppress the translation from the internal ribosome entry site of hepatitis C virus through a double-stranded RNA-activated protein kinase-independent pathway. *J Infect Dis* 2002;186:155-163
- 39 Soler M, Pellerin M, Malnou CE, Dhumeaux D, Kean KM, Pawlotsky JM. Quasispecies heterogeneity and constraints on the evolution of the 5' noncoding region of hepatitis C virus (HCV): relationship with HCV resistance to interferon-alpha therapy. *Virology* 2002;298:160-173
- 40 Koev G, Duncan RF, Lai MM. Hepatitis C virus IRES-dependent translation is insensitive to an eIF2alpha-independent mechanism of inhibition by interferon in hepatocyte cell lines. *Virology* 2002;297:195-202

- 41 Kashiwagi T, Hara K, Kohara M, Iwahashi J, Hamada N, Honda-Yoshino H, Toyoda T. Promoter/origin structure of the complementary strand of hepatitis C virus genome. *J Biol Chem* 2002;277:28700-28705
- 42 Gallego J, Varani G. The hepatitis C virus internal ribosome-entry site: a new target for antiviral research. *G. Biochem Soc Trans* 2002;30:140-146
- 43 Lafuente E, Ramos R, Martinez-Salas E. Long-range RNA-RNA interactions between distant regions of the hepatitis C virus internal ribosome entry site element. *J Gen Virol* 2002;83:1113-1121
- 44 Zhang J, Yamada O, Yoshida H, Iwai T, Araki H. Autogenous translational inhibition of core protein: implication for switch from translation to RNA replication in hepatitis C virus. *Virology* 2002;293:141-150
- 45 Kalliampakou KI, Psaridi-Linardaki L, Mavromara P. Mutational analysis of the apical region of domain II of the HCV IRES. *FEBS Lett* 2002;511:79-84
- 46 Shimazaki T, Honda M, Kaneko S, Kobayashi K. Inhibition of internal ribosomal entry site-directed translation of HCV by recombinant IFN- α correlates with a reduced La protein. *Hepatology* 2002;35:199-208
- 47 Kato J, Kato N, Yoshida H, Ono-Nita SK, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus NS4A and NS4B proteins suppress translation in vivo. *J Med Virol* 2002;66:187-199
- 48 Ali N, Pruijn GJ, Kenan DJ, Keene JD, Siddiqui A. Human La antigen is required for the hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. *J Biol Chem* 2000;275:27531-27540
- 49 Isoyama T, Kamoshita N, Yasui K, Iwai A, Shiroki K, Toyoda H, Yamada A, Takasaki Y, Nomoto A. Lower concentration of La protein required for internal ribosome entry on hepatitis C virus RNA than on poliovirus RNA. *J Gen Virol* 1999;80:2319-2327
- 50 Izumi RE, Valdez B, Banerjee R, Srivastava M, Dasgupta A. Nucleolin stimulates viral internal ribosome entry site-mediated translation. *Virus Res* 2001;76:17-29
- 51 Anwar A, Ali N, Tanveer R, Siddiqui A. Demonstration of functional requirement of polyuridine tract-binding protein by SELEX RNA during hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. *J Biol Chem* 2000;275:34231-34235
- 52 Jubin R, Vantuno NE, Kieft JS, Murray MG, Doudna JA, Lau JY, Baroudy BM. Hepatitis C virus internal ribosome entry site (IRES) stem loop IIIId contains a phylogenetically conserved GGG triplet essential for translation and IRES folding. *J Virol* 2000;74:10430-10437
- 53 Venkatesan A, Das S, Dasgupta A. Structure and function of a small RNA that selectively inhibits internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;27:563-572
- 54 Kolupaeva VG, Pestova TV, Hellen CU. Ribosomal binding to the internal ribosomal entry site of classical swine fever virus. *RNA* 2000;6:1791-1807
- 55 Saleh L, Rust RC, Fullkrug R, Beck E, Bassili G, Ochs K, Niepmann M. Functional interaction of translation initiation factor eIF4G with the foot-and-mouth disease virus internal ribosome entry site. *J Gen Virol* 2001;82:757-763
- 56 Fernandez J, Yaman I, Mishra R, Merrick WC, Snider MD, Lamers WH, Hatzoglou M. Internal ribosome entry site-mediated translation of a mammalian mRNA is regulated by amino acid availability. *J Biol Chem* 2001;276:12285-12291
- 57 Lukavsky PJ, Otto GA, Lancaster AM, Sarnow P, Puglisi JD. Structures of two RNA domains essential for hepatitis C virus internal ribosome entry site function. *Nat Struct Biol* 2000;7:1105-1110
- 58 Owens GC, Chappell SA, Mauro VP, Edelman GM. Identification of two short internal ribosome entry sites selected from libraries of random oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:1471-1476
- 59 Klinck R, Westhof E, Walker S, Afshar M, Collier A, Aboul-Ela F. A potential RNA drug target in the hepatitis C virus internal ribosomal entry site. *RNA* 2000;6:1423-1431
- 60 Rijnbrand R, Bredenbeek PJ, Haasnoot PC, Kieft JS, Spaan WJ, Lemon SM. The influence of downstream protein-coding sequence on internal ribosome entry on hepatitis C virus and other flavivirus RNAs. *RNA* 2001;7:585-597
- 61 Kim YK, Jang SK. La protein is required for efficient translation driven by encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry site. *J Gen Virol* 1999;80:3159-3166

世界华人消化杂志和 WJG 获得商标注册

本刊讯 世界华人消化杂志和 World Journal of Gastroenterology 经中华人民共和国国家工商行政管理总局商标局核定使用商品 (第 16 类), 获得商标注册。

世界华人消化杂志® 注册有效期限自公元 2002-11-14 至 2012-11-13 止. 商标注册证第 2001071 号.

World Journal of Gastroenterology® 注册有效期限自 2002-11-14 至 2012-11-13 止. 商标注册证第 2001158 号.