

维拉帕米通过下调硫氧还蛋白互作蛋白的表达抑制丙型肝炎病毒感染

王世杰^{1△}, 张卫^{2△}, 张龙严¹, 罗正汉¹, 尹昊瓚³, 唐紫薇¹, 戚中田¹, 赵平^{1*}

1. 第二军医大学热带医学与公共卫生学系微生物学教研室, 上海市医学生物防护重点实验室, 上海 200433

2. 第二军医大学海军医学系学员5队, 上海 200433

3. 第二军医大学学员旅10队, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨抗高血压药维拉帕米是否可通过下调宿主硫氧还蛋白互作蛋白(TXNIP)的表达而抑制丙型肝炎病毒(HCV)的感染。**方法** 用不同浓度梯度的维拉帕米处理人肝癌细胞系 Huh7. 5. 1, 用 qPCR 和蛋白质印迹法检测 TXNIP 的表达。用维拉帕米处理 Huh7. 5. 1 细胞, 同时加入细胞培养产生的 HCV (HCVcc), 48 h 后检测 HCVcc 感染情况。用 TXNIP siRNA 转染 Huh7. 5. 1 细胞, 检测下调 TXNIP 表达后, 维拉帕米对 HCVcc 感染的影响; 用 TXNIP 启动子调控的增强型绿色荧光蛋白(EGFP)报告基因表达质粒(pTXNIP-EGFP)转染 Huh7. 5. 1 细胞, 分析维拉帕米对 TXNIP 启动子转录活性的影响。**结果** 与对照孔相比, 维拉帕米(100、200、400 $\mu\text{mol/L}$)可下调 Huh7. 5. 1 细胞中 TXNIP 的表达, 并呈现浓度依赖性($P < 0.05$); 并可抑制 HCVcc 对 Huh7. 5. 1 细胞的感染, 且浓度越高抑制作用越明显($P < 0.05$)。进一步研究结果显示, 与对照组相比, 维拉帕米能够抑制 pTXNIP-EGFP 转染细胞中 EGFP 的表达水平($P < 0.05$)。**结论** 维拉帕米可下调 TXNIP 的表达从而抑制 HCV 感染, 这可能是通过抑制 TXNIP 启动子的转录活性来实现的。

[关键词] 维拉帕米; 丙型肝炎病毒; 硫氧还蛋白互作蛋白; 转录启动子

[中图分类号] R 373. 21 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)05-0548-06

Verapamil inhibits hepatitis C virus infection via down-regulating thioredoxin-interacting protein expression

WANG Shi-Jie^{1△}, ZHANG Wei^{2△}, ZHANG Long-yan¹, LUO Zheng-han¹, YIN Hao-zan³, TANG Zi-wei¹, QI Zhong-tian¹, ZHAO Ping^{1*}

1. Department of Microbiology, Shanghai Key Laboratory of Medical Biodefense, Faculty of Tropical Medicine and Public Health, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. The 5th Team of Student Brigade, Faculty of Navy Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

3. The 10th Team of Student Brigade, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate whether antihypertensive agent verapamil can inhibit hepatitis C virus (HCV) infection via reducing the expression of thioredoxin-interacting protein (TXNIP) in hepatocytes of the host. **Methods** Human hepatocellular carcinoma Huh7. 5. 1 cells were treated with different concentrations of verapamil, and then the mRNA and protein expressions of TXNIP were detected by qPCR and Western blotting, respectively. The HCV infection level of Huh7. 5. 1 cells was determined 48 h after treatment with verapamil and cell culture-derived HCV (HCVcc). We observed the effect of verapamil on the Huh7. 5. 1 cells with TXNIP silenced by siRNA after infected by HCVcc. Huh7. 5. 1 cells were transfected with expression plasmid of enhanced green fluorescent protein (EGFP) controlled by TXNIP promoter (pTXNIP-EGFP), and then the effect of verapamil on transcriptional activity TXNIP promoter was analyzed. **Results** Compared with the control group, verapamil (100, 200, 400 $\mu\text{mol/L}$) significantly inhibited TXNIP expression and HCV infection in Huh7. 5. 1 cells in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Furthermore, verapamil reduced EGFP expression in Huh7. 5. 1 cells transfected with pTXNIP-EGFP in comparison with the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Verapamil can inhibit HCV infection via reducing TXNIP expression,

[收稿日期] 2017-02-09 **[接受日期]** 2017-05-04

[基金项目] 国家自然科学基金(31570170), 上海市公共卫生三年行动计划重点学科建设项目(15GWZK0103). Supported by National Natural Science Foundation of China (31570170) and Key Discipline Construction Program of Shanghai Public Health 3-Year Action Plan (15GWZK0103).

[作者简介] 王世杰, 硕士生. E-mail: 15026921726@163.com; 张卫, 第二军医大学海军医学专业 2014 级学员. E-mail: 1195717690@qq.com

△ 共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81870998, E-mail: pnzha@163.com

which may be associated with the inhibition of *TXNIP* promoter transcriptional activity.

[Key words] verapamil; hepatitis C virus; thioredoxin-interacting protein; transcription initiation site

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(5): 548-553]

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)是引起人类肝病的重要病原体,超过70%的急性HCV感染者不能自然清除病毒而发展为慢性感染状态。慢性HCV感染是导致脂肪肝、肝硬化、肝癌的重要原因,并和糖尿病、淋巴瘤等疾病的发生密切相关^[1]。目前尚没有可预防HCV感染的疫苗上市。干扰素联合利巴韦林曾是治疗丙型肝炎的标准方案,其疗效与所感染的HCV基因型有关,病毒清除率约为50%~70%^[2-3]。近年来,一些新的针对HCV NS5A(如 ledipasvir)、NS5B(如 sofosbuvir)的直接抗病毒药物(direct-acting antiviral agent, DAA)陆续上市,对各个基因型HCV感染均有显著疗效^[4-5]。这些药物价格极其昂贵,仅在欧美发达国家和少数发展中国家有售,其耐药性和远期不良反应尚待观察^[5]。最近报道,共感染乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的丙型肝炎患者应用DAA治疗可能会激活HBV的复制^[6]。因此,筛选、研发新的抗HCV药物仍十分必要。

我们前期研究发现HCV感染高度依赖于宿主分子硫氧还蛋白互作蛋白(thioredoxin-interacting protein, TXNIP),肝细胞内TXNIP的表达水平与HCV复制水平呈正相关^[7]。已有研究发现,被临床广泛用于治疗高血压的钙通道阻断剂维拉帕米(verapamil)能抑制胰腺 β 细胞内TXNIP的表达^[8-9]。本研究拟观察维拉帕米能否通过下调肝细胞内TXNIP的表达而抑制HCV感染,探讨其作为丙型肝炎治疗药物的可能性。

1 材料和方法

1.1 细胞、质粒与试剂 人肝癌细胞系 Huh7.5.1 由中国科学院上海巴斯德研究所钟劲研究员馈赠;用于制备细胞培养产生的 HCV (cell culture derived HCV, HCVcc)的 J6/JFH-1 嵌合全长基因组转录质粒由美国洛克菲勒大学 Charles Rice 教授馈赠;人胚肾 HEK 293T 细胞由本实验室保存;TXNIP 真核表达质粒 pLenti-TXNIP 和 TXNIP 启动子报告基因表达质粒 pTXNIP-EGFP 由本实验

室构建, pLenti-TXNIP 由人巨细胞病毒(CMV)启动子调控 TXNIP 基因表达, pTXNIP-EGFP 由人 TXNIP 启动子调控增强型绿色荧光蛋白(EGFP)表达; TXNIP siRNA 序列为: 5'-GUC UCU AGG GUU AAG CCA A(dTdT)-3', 非靶向宿主分子的对照 siRNA (NC siRNA) 序列为 5'-UUG GCU UAA CCC UAG AGA C (dTdT)-3', 由韩国 Bioneer 公司合成。

维拉帕米干粉购自美国 Selleck 公司;转染试剂 Lipofectamine 3000、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔或羊抗小鼠 IgG、Alexa Fluor[®] 488 标记的羊抗人 IgG 购自美国 Invitrogen 公司;GAPDH 兔单克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;TXNIP 小鼠单抗、HCV 核心蛋白单抗购自英国 Abcam 公司;RNA 抽提试剂 RNAiso Plus、PrimeScript[™] RT Master Mix (Perfect Real Time) 试剂盒、SYBR Premix Ex Taq 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;CCK-8 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;HCV 感染者血清由第二军医大学长海医院检验科提供。

1.2 Huh7.5.1 细胞的 siRNA 转染和 HCVcc 感染 Huh7.5.1 细胞用含有 1% 青霉素-链霉素、10% 胎牛血清、2 mmol/L 非必需氨基酸的 DMEM 完全培养液于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。将 Huh7.5.1 细胞接种于 24 孔板,每孔接种 2×10^4 个细胞,用 Lipofectamine 3000 转染 TXNIP siRNA 以及 NC siRNA,每孔 40 pmol siRNA,8 h 后更换新的 DMEM 完全培养液,48 h 后提取细胞总蛋白及总 RNA 检测 TXNIP 的表达。

J6/JFH-1 嵌合 HCVcc 的制备方法参见文献 [10], 将感染滴度调整为 10^5 FFU/mL 感染 Huh7.5.1 细胞。Huh7.5.1 细胞转染 siRNA 48 h 后用 HCVcc 感染,感染复数(MOI)为 1。HCVcc 感染 8 h 后弃去培养液, PBS 洗 3 次,加 DMEM 完全培养液继续培养 48 h 后进行相关检测。

1.3 Huh7.5.1 细胞过表达 TXNIP 用 HEK 293T

细胞包装含 *TXNIP* 基因的慢病毒,收集慢病毒上清感染接种于 24 孔板中的 Huh7.5.1 细胞(感染时细胞汇合度为 40%)。感染慢病毒上清 3 d 后,进行相关实验。

1.4 维拉帕米处理 维拉帕米干粉直接溶解于适量 DMEM 培养液至浓度为 20 mmol/L。将 Huh7.5.1 细胞接种于 24 孔板,6 h 后加入维拉帕米溶液至不同浓度梯度,用 DMEM 培养液补充各孔至等体积。对照孔(Mock 组)加等体积 DMEM

培养液。各浓度维拉帕米处理细胞 48 h 后用 CCK-8 试剂盒检测 Huh7.5.1 细胞增殖情况。

1.5 qPCR 分析 用 RNAiso Plus 试剂抽提细胞总 RNA,RNA 沉淀溶解于 DEPC 处理水,取适量行琼脂糖凝胶电泳检查 RNA 的完整性,用多功能酶标仪测定 RNA 浓度和纯度。然后用 PrimeScript™ RT Master Mix 试剂反转录获得 cDNA,随后用 SYBR Premix Ex Taq 试剂对 cDNA 行 qPCR。qPCR 引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物序列
Tab 1 Primer sequences of qPCR

| Target gene | Forward | Reverse |
|--------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| <i>TXNIP</i> | 5'-TCA TGC CAC CAC CGA CTT-3' | 5'-CCC ATC CAA CAA ACA CCC-3' |
| <i>GAPDH</i> | 5'-TCT CTG CTC CTC CTG TTC GAC-3' | 5'-CGG ATT TGG TCG TAT TGG G-3' |
| <i>HCV</i> | 5'-TCT GCG GAA CCG GTG AGT A-3' | 5'-TCA GGC AGT ACC ACA AGG C-3' |

TXNIP: Thioredoxin-interacting protein; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HCV: Hepatitis C virus

1.6 蛋白质印迹法分析与免疫荧光检测 用 RIPA 裂解液裂解细胞,抽提细胞总蛋白,用蛋白质印迹法检测细胞中 *TXNIP*、*GAPDH* 和 *HCV* 核心蛋白的表达,一抗为目标蛋白特异性单抗,二抗为 HRP 标记的抗鼠或抗兔 IgG,用化学发光法采集蛋白印迹结果。

用单因素方差分析(one-way ANOVA)。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

Huh7.5.1 细胞接种于 96 孔板,*HCVcc* 感染细胞 48 h 后,用免疫荧光检测细胞中的 *HCV* 蛋白,一抗为 *HCV* 抗体阳性的丙肝患者血清,二抗为 Alexa Fluor® 488 标记的羊抗人 IgG,用 DAPI 复染细胞核。用 Bioteck 细胞成像系统计数荧光阳性细胞。

2.1 下调 *TXNIP* 表达抑制 *HCV* 对 Huh7.5.1 细胞的感染 用 *TXNIP* siRNA 转染 Huh7.5.1 细胞,然后用 *HCVcc* 感染。蛋白质印迹法和 qPCR 结果显示,转染 *TXNIP* siRNA 48 h 后,*TXNIP* 蛋白和 mRNA 表达较转染 NC siRNA 的细胞相比均下调($P < 0.05$,图 1A~1C)。用免疫荧光检测 *HCV* 感染的阳性细胞(图 1D),*TXNIP* siRNA 转染的 Huh7.5.1 细胞 *HCV* 阳性克隆数为 NC siRNA 转染的 7.3%($P < 0.05$),与 *TXNIP* mRNA 的降低幅度相似。

1.7 统计学处理 应用 GraphPad Prism 5.0 软件进行数据处理和统计学分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 Student's *t* 检验,多组比较采

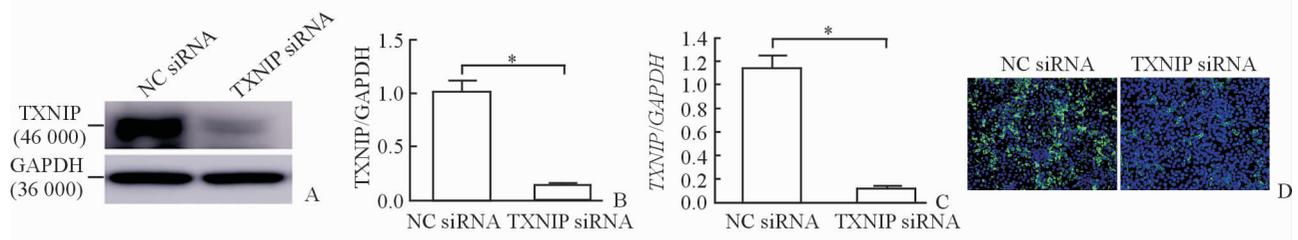


图 1 下调 *TXNIP* 表达对 *HCV* 感染的影响

Fig 1 Effect of down-regulating *TXNIP* expression on *HCV* infection

A, B; Western blotting analysis of *TXNIP* protein expression; C; qPCR analysis of *TXNIP* mRNA expression; D; Immunofluorescence staining of *HCV* infection. *TXNIP*: Thioredoxin-interacting protein; *HCV*: Hepatitis C virus; *GAPDH*: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. * $P < 0.05$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. Original magnification: $\times 400$ (D)

2.2 维拉帕米可下调 Huh7.5.1 细胞中 *TXNIP* 的表达 为了探讨维拉帕米能否通过下调肝细胞内

TXNIP 的表达从而抑制 *HCV* 感染,我们首先检测维拉帕米的细胞毒性,用 25、50、100、200、400、

800 $\mu\text{mol/L}$ 维拉帕米处理 Huh7. 5. 1 细胞 48 h, 随后用 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖情况。结果显示, 与 Mock 组相比, 维拉帕米浓度 $\leq 400 \mu\text{mol/L}$ 时, 对 Huh7. 5. 1 细胞无明显毒性(图 2A)。因此, 用 100、200、400 $\mu\text{mol/L}$ 的维拉帕米处理 Huh7. 5. 1 细胞

48 h, 检测 TXNIP 的表达。qPCR 结果显示, 维拉帕米可明显下调细胞内 TXNIP mRNA 水平, 且呈现浓度依赖性($P < 0.05$, 图 2B)。蛋白质印迹分析结果进一步证明维拉帕米能下调 TXNIP 的表达($P < 0.05$, 图 2C、2D)。

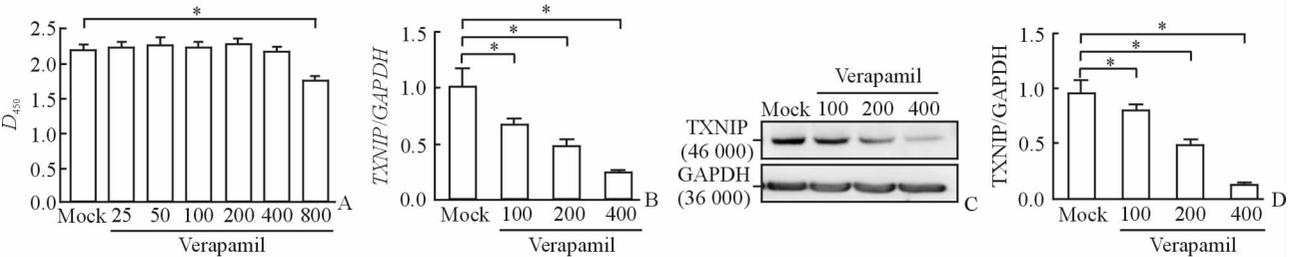


图2 维拉帕米($\mu\text{mol/L}$)下调 Huh7. 5. 1 细胞中 TXNIP 的表达

Fig 2 Verapamil ($\mu\text{mol/L}$) down-regulated TXNIP expression in Huh7. 5. 1 cells

A: Proliferation ability of Huh7. 5. 1 cells treated with verapamil using CCK-8 assay; B: qPCR analysis of TXNIP mRNA expression; C, D: Western blotting analysis of TXNIP protein expression. TXNIP: Thioredoxin-interacting protein; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. * $P < 0.05$, $n = 3$, $\bar{x} \pm s_x$

2.3 维拉帕米能抑制 HCV 感染 分别给予 Huh7. 5. 1 细胞 100、200、400 $\mu\text{mol/L}$ 维拉帕米处理 48 h 后, 用免疫荧光检测 HCV 感染的阳性细胞。结果显示, 经各浓度维拉帕米处理后, HCV 感染的阳性细胞数较 Mock 组均明显减少, 特别是当浓度达到 400 $\mu\text{mol/L}$ 时, HCV 感染的细胞数降低至 Mock 组

的 0.85% ($P < 0.05$, 图 3A、3B)。qPCR 结果显示, 细胞内的 JFH-1 RNA 水平随着维拉帕米浓度的增加而降低($P < 0.05$, 图 3C)。蛋白质印迹分析结果显示维拉帕米能抑制 HCV 核心蛋白的表达(图 3D)。qPCR 检测细胞培养上清中的 JFH-1 RNA, 结果显示维拉帕米处理可明显降低 HCVcc 的产生($P < 0.05$, 图 3E)。

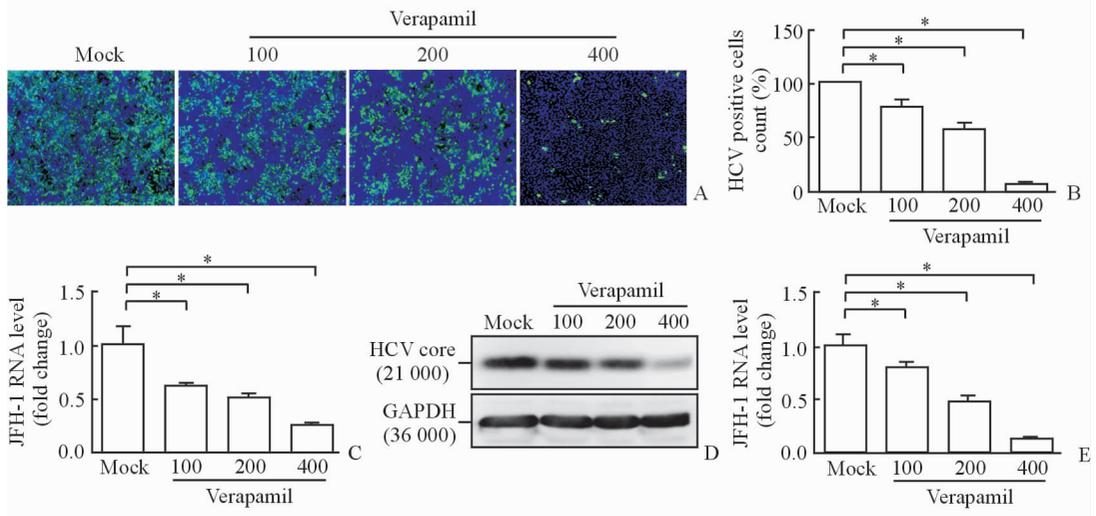


图3 维拉帕米($\mu\text{mol/L}$)抑制 HCV 感染 Huh7. 5. 1 细胞

Fig 3 Verapamil ($\mu\text{mol/L}$) inhibited HCV infection in Huh7. 5. 1 cells

A: Immunofluorescence staining of HCV infection in Huh7. 5. 1 cells treated with different concentrations of verapamil; B: HCV positive cells count relative to Mock group; C: JFH-1 RNA levels relative to Mock group in Huh7. 5. 1 cells; D: Western blotting analysis of HCV core protein expression; E: JFH-1 RNA levels relative to Mock group in cell culture supernatants. HCV: Hepatitis C virus; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Original magnification: $\times 400$ (A). * $P < 0.05$, $n = 3$, $\bar{x} \pm s_x$

2.4 维拉帕米通过下调 TXNIP 表达抑制 HCV 感染 用 TXNIP 慢病毒感染 Huh7. 5. 1 细胞过表达 TXNIP, 随后用 400 $\mu\text{mol/L}$ 维拉帕米处理、HCVcc (MOI = 2) 感染, 48 h 后, 行 qPCR 分析 TXNIP

mRNA 和 JFH-1 RNA。结果显示, 维拉帕米处理对过表达 TXNIP 的 Huh7. 5. 1 细胞 (Huh7. 5. 1-TXNIP) 中 TXNIP 的 mRNA 表达无明显影响(图 4A), 对 HCV 的感染也无明显影响(图 4B)。

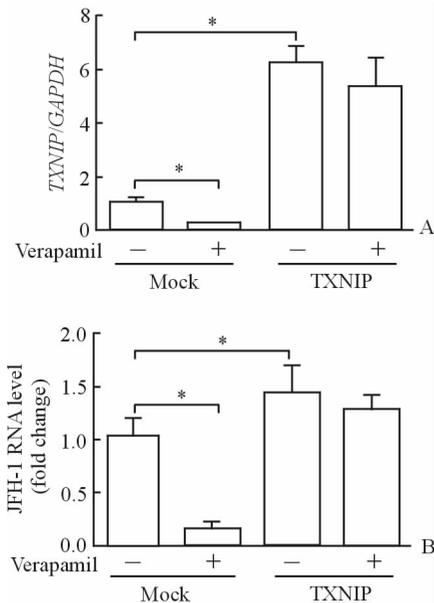


图4 过表达 TXNIP 对维拉帕米 (400 $\mu\text{mol/L}$) 抑制 HCV 感染的影响

Fig 4 Effect of TXNIP over-expression on verapamil (400 $\mu\text{mol/L}$) inhibiting HCV infection

A: The expression of TXNIP mRNA; B: JFH-1 RNA level. TXNIP: Thioredoxin-interacting protein; HCV: Hepatitis C virus; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. * $P < 0.05$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s_x$

2.5 维拉帕米能抑制 TXNIP 启动子的转录活性 为了进一步明确维拉帕米是否抑制 TXNIP 启动子的转录活性,我们用含 TXNIP 启动子的 EGFP 报告基因表达质粒 pTXNIP-EGFP 和含人 CMV 启动子的 EGFP 报告基因表达质粒 pCMV-EGFP 分别转染 Huh7.5.1 细胞,转染 8 h 后加入维拉帕米,使其终浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$,继续培养细胞 48 h,用多功能酶标仪检测细胞荧光强度。结果显示,维拉帕米能抑制 TXNIP 启动子调控的 EGFP 表达 ($P < 0.05$),但对 CMV 启动子调控的 EGFP 表达无影响(图 5)。

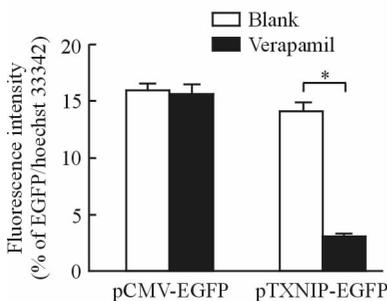


图5 维拉帕米 (400 $\mu\text{mol/L}$) 抑制 TXNIP 启动子的转录活性

Fig 5 Verapamil (400 $\mu\text{mol/L}$) inhibited transcriptional activity of TXNIP promoter

TXNIP: Thioredoxin-interacting protein; CMV: Cytomegalovirus; EGFP: Enhanced green fluorescent protein. * $P < 0.05$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s_x$

3 讨论

HCV 感染是全球范围的严重公共卫生问题,尽管近年来新一代 DAA 的上市使丙型肝炎的治疗取得巨大进展,但众多医药企业和科研机构仍致力于研发易于普及、疗效确切、不良反应小的抗 HCV 药物^[1-4]。在抗病毒药物研发方面,老药新用近年来备受瞩目,如最近陆续有报道在寨卡病毒药物筛选方面取得成功^[11-12]。从已上市的药物中筛选出的抗病毒药物,其安全性、不良反应、药代动力学等因素明确,且已规模化大批量生产,因此,老药新用能尽快得到有效、廉价的抗病毒药物,潜力巨大,与筛选研发新的抗病毒药物相比优势明显。

我们前期通过基因芯片和深度测序技术鉴定出 HCV 感染诱导肝细胞上调 TXNIP 的表达^[7],该分子除在细胞中与硫氧还蛋白相互作用调节细胞氧化还原反应外^[13-15],还对细胞自噬、凋亡、炎症小体激活、糖和脂类代谢等发挥重要调控作用^[16-21],其促进 HCV 感染的作用机制有待进一步探讨。本研究中,用 siRNA 下调 Huh7.5.1 细胞中 TXNIP 的表达,然后用 HCVcc 感染,结果可见 HCV 感染水平随 TXNIP 表达水平的降低而明显下降,二者之间呈现相似的下调比例,提示 HCV 感染对 TXNIP 分子的高度依赖。

有研究发现 TXNIP 的表达上调可导致胰腺 β 细胞凋亡,与糖尿病发生密切相关,而钙通道阻滞剂维拉帕米能抑制 TXNIP 的表达从而促进 β 细胞存活,在小鼠模型中能防止链脲佐菌素诱导的糖尿病发生^[8]。为探讨维拉帕米这种临床广泛用于治疗高血压的药物能否用于治疗丙型肝炎,我们以 Huh7.5.1 细胞为模型观察了维拉帕米的抗 HCV 活性。结果显示,在未产生细胞毒性的浓度范围内,维拉帕米可浓度依赖性下调 TXNIP 的表达和抑制 HCV 感染。用 TXNIP 慢病毒感染 Huh7.5.1 细胞,使其过表达 TXNIP,维拉帕米对 TXNIP 表达和 HCV 感染的抑制作用不再呈现,因慢病毒载体中 TXNIP 启动子是人 CMV 启动子,维拉帕米对该启动子的转录无抑制作用。用启动子-EGFP 报告基因质粒进行检测进一步证实维拉帕米是通过抑制 TXNIP 启动子的转录活性而下调该基因的表达。

大量报道显示, TXNIP 的高表达与 2 型糖尿病、脂肪肝的发生高度相关^[8,17-18],而 HCV 感染常引发这两种疾病^[1],因此,维拉帕米作为一种潜在的抗 HCV 药物,不仅能通过下调 TXNIP 的表达抑制 HCV 感染,还可能有助于延缓 HCV 感染引发的代谢性疾病。当然,对于血压正常的丙型肝炎患者,用

维拉帕米治疗是否会引起低血压,需引起重视。

本研究结果显示维拉帕米可作为一种潜在的抗HCV药物。参考目前丙型肝炎治疗的联合用药方案,我们下一步拟观察维拉帕米与利巴韦林这两种低价的临床常用药物联合应用是否具有协同作用,进一步探讨维拉帕米应用于丙型肝炎临床治疗的价值。

[参考文献]

- [1] ROSEN H R. Clinical practice. Chronic hepatitis C infection[J]. *New Engl J Med*, 2011, 364: 2429-2438.
- [2] LAU J Y, TAM R C, LIANG T J, HONG Z. Mechanism of action of ribavirin in the combination treatment of chronic HCV infection[J]. *Hepatology*, 2002, 35: 1002-1009.
- [3] DAVIS G L, ESTEBAN-MUR R, RUSTGI V, HOEFS J, GORDON S C, TREPO C, et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group [J]. *N Engl J Med*, 1998, 339: 1493-1499.
- [4] CHARLTON M, EVERSON G T, FLAMM S L, KUMAR P, LANDIS C, BROWN R S Jr, et al. Ledipasvir and sofosbuvir plus ribavirin for treatment of HCV infection in patients with advanced liver disease[J]. *Gastroenterology*, 2015, 149: 649-659.
- [5] NKUIZE M, SERSTÉ T, BUSET M, MULKAY J P. Combination ledipasvir-sofosbuvir for the treatment of chronic hepatitis C virus infection; a review and clinical perspective[J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2016, 12: 861-872.
- [6] KAWAGISHI N, SUDA G, ONOZAWA M, KIMURA M, MAEHARA O, ITO J, et al. Hepatitis B virus reactivation during hepatitis C direct-acting antiviral therapy in patients with previous HBV infection[J/OL]. *J Hepatol*, 2017. doi: 10.1016/j.jhep.2017.04.008. [Epub ahead of print]
- [7] 唐紫薇,王世杰,王文博,赵平,戚中田. 宿主细胞硫氧还蛋白互作蛋白与丙型肝炎病毒感染的相互作用研究[J]. *中华传染病杂志*, 2016, 34: 597-602.
- [8] XU G, CHEN J, JING G, SHALEV A. Preventing β -cell loss and diabetes with calcium channel blockers [J]. *Diabetes*, 2012, 61: 848-856.
- [9] LEDWITCH K V, BARNES R W, ROBERTS A G. Unravelling the complex drug-drug interactions of the cardiovascular drugs, verapamil and digoxin, with P-glycoprotein[J/OL]. *Biosci Rep*, 2016, 36(2). pii: e00309. doi: 10.1042/BSR20150317.
- [10] GUAN M, WANG W, LIU X, TONG Y, LIU Y, REN H, et al. Three different functional microdomains in the hepatitis C virus hypervariable region 1 (HVR1) mediate entry and immune evasion[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287: 35631-35645.
- [11] SACRAMENTO C Q, DE MELO G R, DE FREITAS C S, ROCHA N, HOELZ L V, MIRANDA M, et al. The clinically approved antiviral drug sofosbuvir inhibits Zika virus replication[J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40920. doi: 10.1038/srep40920.
- [12] ZHOU H, WANG F, WANG H, CHEN C, ZHANG T, HAN X, et al. The conformational changes of Zika virus methyltransferase upon converting SAM to SAH [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 14830-14834.
- [13] HWANG J, SUH H W, JEON Y H, HWANG E, NGUYEN L T, YEOM J, et al. The structural basis for the negative regulation of thioredoxin by thioredoxin-interacting protein[J/OL]. *Nat Commun*, 2014, 5: 2958. doi: 10.1038/ncomms3958.
- [14] HANSCHMANN E M, GODOY J R, BERNDT C, HUDEMANN C, LILLIG C H. Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins-molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 19: 1539-1605.
- [15] LEE S, KIM S M, LEE R T. Thioredoxin and thioredoxin target proteins; from molecular mechanisms to functional significance[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18: 1165-1207.
- [16] BOMPADA P, ATAC D, LUAN C, ANDERSSON R, OMELLA J D, LAAKSO E O, et al. Histone acetylation of glucose-induced thioredoxin-interacting protein gene expression in pancreatic islets[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 81(Pt A): 82-91.
- [17] MANDALA A, DAS N, BHATTACHARJEE S, MUKHERJEE B, MUKHOPADHYAY S, ROY S S. Thioredoxin interacting protein mediates lipid-induced impairment of glucose uptake in skeletal muscle[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 479: 933-939.
- [18] SINGH L P. Thioredoxin interacting protein (TXNIP) and pathogenesis of diabetic retinopathy[J/OL]. *J Clin Exp Ophthalmol*, 2013, 4. doi: 10.4172/2155-9570.1000287.
- [19] FORRED B J, NEUHARTH S, KIM D I, AMOLINS M W, MOTAMEDCHABOKI K, ROUX K J, et al. Identification of redox and glucose-dependent Txnip protein interactions[J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 5829063. doi: 10.1155/2016/5829063.
- [20] DOTIMAS J R, LEE A W, SCHMIDER A B, CARROLL S H, SHAH A, BILEN J, et al. Diabetes regulates fructose absorption through thioredoxin-interacting protein [J/OL]. *Elife*, 2016, 5. pii: e18313. doi: 10.7554/eLife.18313.
- [21] MAHMOOD D F, ABDERRAZAK A, EL HADRI K, SIMMET T, ROUIS M. The thioredoxin system as a therapeutic target in human health and disease [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 19: 1266-1303.