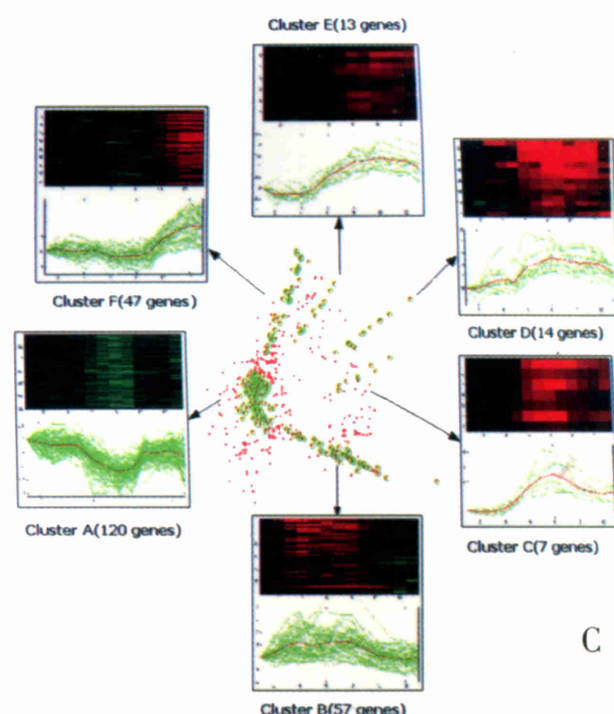


世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003 年 10 月 15 日 第 11 卷 第 10 期 (Volume 11 Number 10)



10/2003

ISSN 1009-3079



名誉总编辑
潘伯荣
总编辑
马连生

World Journal of Gastroenterology® 被 SCI®-E, Research Alert®, Current Contents®/Clinical Medicine, Journal Citation Reports® Index Medicus, MEDLINE, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2002 年 JCR® 报告 WJG 影响因子 2.532. 世界华人消化杂志® 被 Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001 年中国科技期刊引证报告: 世界华人消化杂志® 影响因子 3.733, WJG 影响因子 2.920.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2003 年 10 月 15 日 第 11 卷 第 10 期 (总第 114 期)

述 评	1465 复杂性疾病生物信息学研究的策略与方法 李梢, 张学工, 季梁, 李衍达
幽门螺杆菌	1470 幽门螺杆菌黏附素基因 babA ₂ 的克隆、序列测定及其生物信息学分析 白杨, 黄文, 王继德, 张兆山, 周殿元, 张亚历 1475 幽门螺杆菌 HspA 与大肠杆菌 LTB 基因融合及表达 郭红, 邹全明, 赵晓晏, 吴超 1480 人幽门螺杆菌热休克蛋白 A 编码基因的克隆、表达及抗原性研究 姜政, 蒲丹, 黄爱龙, 陶小红, 王丕龙 1485 幽门螺杆菌对克拉霉素耐药的分子基础 郝庆, 李岩, 高红, 张显忠
基础研究	1488 氧化苦参碱对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化 I, III, IV 型胶原表达的影响 陆伦根, 曾民德, 茅益民, 李继强, 邱德凯, 杨文卓, 贾一韬, 曹爱平 1492 粉防己碱、大黄与潘生丁抗肝纤维化作用比较 王如涛, 陈颖伟, 卫新革, 徐芹芳, 李定国 1497 珍珠梅水提物对大鼠肝损伤的保护作用 张学武, 朴龙, 刘超, 孙权, 金海玲, 尹宗柱 1500 乙型肝炎病毒 S 基因系列单突变克隆人工构建 余祖江, 杨东亮, 张俊, 郝友华, 王宝菊, 郝连杰 1505 急性胰腺炎大鼠肝脏 NF- κ B 对 ICAM-1 表达的调控及其意义 石力, 田伏洲, 黄大熔, 李旭, 赵碧, 顾大勇, 唐旭东, 王雨 1508 丁酸钠对结肠癌细胞株 HT-29 组织蛋白酶 D 表达水平的影响 李曦, 罗和生, 李凡 1511 国人青年结直肠癌解剖部位分布及临床病理特点 谢正勇, 卿三华 1515 慢性乙型肝炎病毒清除自杀基因平衡制约载体系统的构建 阙全程, 余祖江, 雷延昌, 杨东亮, 郝连杰 1520 人工构建含丙型肝炎病毒核糖体插入位点的双顺反子表达载体 阙全程, 余祖江, 雷延昌, 杨东亮, 郝连杰 1524 溃疡性结肠炎患者肠黏膜 Th1/Th2 类细胞因子 m-RNA 的表达 崔海宏, 陈村龙, 杨玉捷, 张祚建, 张耀东, 崔耀升
临床研究	1528 自膨胀金属支架治疗晚期食管癌吞咽困难 26 例 张朋彬, 赵晓晏, 李宜辉, 达四平 1531 胃癌组织 CD ₄₄ v9 和 MMP-2 基因的表达 张翠萍, 田宇彬, 赵清喜, 武军, 梁永信 1535 奥沙利铂综合治疗胃癌的疗效及机制 林万隆, 李定国, 陈强, 陆汉民, 马小明, 孙培龙 1540 聚合酶链反应检测 SEN 病毒 D 型和 H 型方法的建立及初步应用 唐蔚, 彭晓谋, 张瑛, 王辉, 蒋晓玲, 周伯平 1544 肝病患者血清 IGF-I 和 IGF-II 的变化 邵静鸣, 俞丽芬, 张曙, 吴云林 1547 ERCP 对儿童胰腺炎的诊断与治疗价值 李兆申, 许国铭, 施新岗, 邹晓平, 金震东, 孙振兴 1550 急性胆源性胰腺炎内镜诊治疗效及安全性 王东, 李兆申, 张文俊, 潘雪, 孙振兴, 邹晓平 1554 胰腺癌组织 ChAT, GAD65 和 PKC 酶活性的表达 杨竹林, 王群伟, 邓星辉, 李代强, 吕芳, 李永国 1558 国人胆囊结石的形态结构特征 吴杰, 杨海珉, 李静仪, 宋一德, 刘刚 1563 结核性腹膜炎与恶性腹水端粒酶活性 赵金满, 李福才, 于继红, 崔巍, 傅宝玉, 沙文阁
科研方法	1566 山莨菪碱联用地塞米松治疗腹部外科疾病并发 MODS 临床研究的操作方案 岳茂兴
文献综述	1569 门脉高压性肠病 尹朝晖, 刘浔阳 1572 肝纤维化治疗研究进展 叶方鹏, 肖冰, 张万岱 1576 现代肝脏局部解剖在活体部分肝移植应用的研究进展 方驰华, 朱新勇 1581 生长抑素类似物治疗肝细胞肝癌的抗肿瘤作用及其机制 冒海蕾, 黄介飞 1588 胰头部解剖在扩大胰十二指肠切除术中的应用 方驰华, 马俊勋, 钟世镇 1593 p53 基因在肿瘤基因治疗中的研究进展 张艳, 何凤田 1597 血管抑素的研究进展 陈建发, 黄宗海 1601 TGF β -Smad 信号转导通路与肝纤维化 吴晓玲, 曾维政, 王丕龙 1606 消化管发育中上皮细胞凋亡研究进展 李均, 汪维伟 1609 生物芯片技术及其在消化系统疾病研究中的应用 蒋业贵, 李兆申

文献综述	1614 Wilson病的诊断和治疗 林连捷, 郑长青 1618 E- 钙粘蛋白与食管癌侵袭转移的关系 吴静, 薛群基, 刘维民, 王爱勤, 寇伟 1621 胰腺癌的光动力学治疗 丁新民, 顾瑛, 刘凡光 1624 Ets 转录因子家族在发育和肿瘤发生中作用的研究进展 张健, 高福禄, 刘芝华 1628 核因子-κB 与细胞凋亡关系的研究进展 於亮亮, 于皆平, 罗和生, 于红刚
研究快报	1632 paxillin 在胃腺癌中的表达及临床意义 田素芳, 熊永炎, 余少平, 汪必成 1634 丹参对 TGF-β1 刺激的 NIH/3T3 细胞 <i>c-fos</i> mRNA 表达和 AP1 蛋白结合活性的影响 胡旭东, 王晓玲, 童普德, 吴小江, 刘平 1636 左旋精氨酸对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用 郝悦, 周新民 1638 端粒酶在大肠癌细胞中的活性表达及临床意义 鲁明良, 林富林, 郑国宝, 姜朝晖 1640 多种因子在门脉高压大鼠结肠黏膜中的表达 尹朝晖, 刘浚阳, 黄飞舟, 黄穰浪, 任树平 1642 黄连素对 HT-29 人结肠癌细胞系 Ca ²⁺ 的抑制作用 台卫平, 罗和生 1645 DPC4 蛋白在不同病理分期的结肠肿瘤中的表达 唐朝晖, 邹声泉, 杨想平, 陈启奇 1646 Genistein 和 PD98059 对 aFGF 及 bFGF 诱导的 CCL229 细胞增生的抑制作用 尚海, 张颐, 单吉贤 1649 CO ₂ 气腹对肠道菌群生物学特性影响的实验研究 周丁华, 卫冰, 李宁, 黎介寿 1652 CO ₂ 气腹对大鼠胃肠肌电作用的实验研究 周丁华, 卫冰, 李宁, 黎介寿 1654 CO ₂ 气腹对胃黏膜血管活性肠肽及 P 物质含量的影响 周丁华, 卫冰, 李宁, 黎介寿
临床经验	1656 腹腔严重感染致多器官功能障碍的临床救治新对策 岳茂兴 1657 解毒固本冲剂治疗腹腔感染合并全身炎性反应综合征的临床研究 姜玉峰, 岳茂兴 1659 TIPSS 和 EVS 治疗食管静脉曲张破裂出血的临床分析 诸葛宇征, 王英德, 刘丽娜, 宫爱霞, 赵钢
消 息	1504 中国科技期刊走向世界的步伐正在加快 1568 欢迎订阅 2004 年度世界华人消化杂志 1571 欢迎订阅 2004 年度 World Journal of Gastroenterology® 1580 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊 1613 WJG 搭建我国消化学基础和临床研究惟一国际交流的平台 1655 世界胃肠病学杂志英文版获得 2003-2004 年国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助
封面故事	1553 清华大学生物信息学研究所、生物信息学教育部重点实验室

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名
(月刊)

创刊 1993-01-15
改刊 1998-01-25
出版 2003-10-15
原刊名 新消化病学杂志

总顾问 陈可冀
黄象谦
黄志强
黎介寿
刘耕陶
裘法祖
汤钊猷
王宝恩
危北海
吴孟超
吴咸中

社长总编辑 马连生
中文编辑 潘伯荣
王瑾晖
英文编辑 朱丽虹
排版 李少华
校对 李天华

张金哲
张学庸
赵东海
周殿元

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
030001, 山西省太原市双塔西街 77 号
E-mail: wcjd@wjgnet.com

出版 世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市 2345 信箱
E-mail: wcjd @ wjgnet.com
http://www.wjgnet.com
电话: 010-85381892
传真: 010-85381893

印刷 北京科信印刷厂

发行 国内: 北京报刊发行局
国外: 中国国际图书贸易总公司
(100044, 北京 399 信箱)

订购 全国各地邮电局

邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023, 北京市 2345 信箱)
电话: 010-85381892
传真: 010-85381893
2003 年版权归世界胃肠病学杂志社所有

本刊已被国内外检索系统收录

美国《化学文摘(CA)》
荷兰《医学文摘库/医学文摘(EM)》
俄罗斯《文摘杂志(PЖ)》
中国科技论文统计与分析
中国学术期刊文摘
中国中医药信息服务网
中国生物医学文献光盘数据库
《中文科技资料目录(医药卫生)》
中国生物医学期刊目次数据库
中国医学文摘外科学分册(英文版)
中国医学文摘内科学分册(英文版)

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.

ISSN 1009-3079	邮发代号	国外代号	国内定价	广告经营许可证
CN 14-1260/R	82-262	M 4481	每期 24.00 元 全年 288.00 元	1401004000050

www.wjgnet.com

慢性乙型肝炎病毒清除自杀基因平衡制约载体系统的构建

阚全程, 余祖江, 雷延昌, 杨东亮, 郝连杰

阚全程, 雷延昌, 杨东亮, 郝连杰, 华中科技大学同济医学院附属同济医院临床免疫研究室 湖北省武汉市 430030
余祖江, 郑州大学第一附属医院感染科 河南省郑州市 450052
阚全程, 男, 1963-09-24 生, 河南信阳市人, 汉族, 1992 年河南医科大学(现郑州大学医学院)药理学硕士, 现为华中科技大学同济医学院分子免疫学博士生。
国家“十五”科技攻关项目, No.2001BA705B05
国家重大基础研究项目, No.973-20014CB51008
项目负责人: 杨东亮, 430030, 湖北省武汉市解放大道 1095 号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院临床免疫研究室。 dlyang@tjh.tjmu.edu.cn
电话: 027-83662894
收稿日期: 2003-08-08 接受日期: 2003-09-01

Construction of the vector that harbors self-restricted system for hepatitis B virus clearance in gene therapy

Quan-Cheng Kan, Zu-Jiang Yu, Yan-Chang Lei, Dong-Liang Yang, Lian-Jie Hao

Quan-Cheng Kan, Yan-Chang Lei, Dong-Liang Yang, Lian-Jie Hao, Department of Clinical Immunology, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Zu-Jiang Yu, Department of Infectious Disease, the First Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Correspondence to: Dong-Liang Yang, Department of Clinical Immunology, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. dlyang@tjh.tjmu.edu.cn
Received: 2003-08-08 Accepted: 2003-09-01

Abstract

AIM: To construct the vector that harbors self-restricted system for clearing hepatitis B virus, eliminating infected hepatic cells and inhibiting hepatitis B recurrence in gene therapy.

METHODS: After amplifying hepatitis C virus (HCV) internal ribosome entry sites (IRES) by reverse-transcription PCR (RT-PCR), the products were cloned into pcDNA3. A bicistronic vector was obtained. A part of sequence in HBV anti-surface gene and part of sequence in HCV core gene were cloned into the vector before IRES site in turn and thymidine kinase (TK) was also cloned into it following the IRES site. After determination by PCR and sequencing, we acquired the vector containing HBV anti-S, HCV-C gene, HCV IRES and thymidine kinase gene, which was named the vector pcDNA3-SCITK. The vectors were separately transfected into HepG2 cells and 2.2.15 cells and all the media contained ganciclovir.

RESULTS: The novel vector was transfected into 2.2.15 and hepG2 cells, the expressed protein could destroy the former, but had no effect on HepG2 cells if all the media contained ganciclovir. Apoptosis cells in the former accounted for 15 per cent of all cells by fluorescence (FACS) detection. There was obvious difference between the two types of cells (the later was only 6 per cent).

CONCLUSION: The function of genes that pcDNA3-SCITK

carried with self-restricted system could be ego-controlled, and it might be used as gene therapy vector for HBV clearance if taking HBV S gene as target gene and TK gene as objective gene.

Kan QC, Yu ZJ, Lei YC, Yang DL, Hao LJ. Construction of the vector that harbors self-restricted system for hepatitis B virus clearance in gene therapy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(10):1515-1519

摘要

目的: 建立清除乙型肝炎病毒(HBV)自杀基因平衡制约载体系统, 靶向清除 HBV 感染的肝细胞, 抑制慢性乙型肝炎和肝硬化患者免疫再活动。

方法: 逆转录PCR(RT-PCR)扩增丙型肝炎病毒(HCV)基因组中核糖体插入位点(IRES), 以 pcDNA3 载体为基础, 构建双顺反子表达载体。同时在 IRES 位点的上游克隆 HBV 表面基因的部分反义序列和 HCV 全长核心基因, 在 IRES 位点下游克隆胸腺苷激酶基因, PCR、酶切和测序鉴定。构建的清除乙型肝炎病毒(HBV)自杀基因平衡制约载体系统分别转染培养基含有更昔洛韦的 HepG2 细胞和 2.2.15 细胞。

结果: 构建的清除乙型肝炎病毒(HBV)自杀基因平衡制约载体系统可以选择性促使 2.2.15 细胞凋亡(实验组细胞凋亡率为 15%, 而对照组仅为 6%); 抑制 2.2.15 细胞在培养基中分泌乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg), 统计学分析表明, HBsAg 在培养基中检测滴度, 在两组之间有显著性差异($P < 0.05$)。

结论: 构建以 HBV 表面基因为靶基因, 自杀基因为效应基因的自杀基因制约平衡系统, 可能为下一步慢性乙型肝炎的基因治疗提供理想的基因治疗载体。

阚全程, 余祖江, 雷延昌, 杨东亮, 郝连杰. 慢性乙型肝炎病毒清除自杀基因平衡制约载体系统的构建. *世界华人消化杂志* 2003;11(10):1515-1519
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1515.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是威胁人类健康的严峻问题, 全球大约有 5% 的人受到感染, 我国一般人群的 HBV 表面抗原携带率高达 10%^[1-4]。其中 75-90% 原发性肝癌与此有关, 因此研究控制 HBV 感染的有效方法, 一直是 HBV 研究的难点和重点^[5, 6]。当前人们主要根据上述慢性 HBV 感染 3 个自然过程及其相应的机体免疫应答特点^[7-9], 进行乙型肝炎病毒清除的治疗研究。迄今为止, 还没有一种有效的策略可以控

制和消除免疫清除后的逃逸病毒和耐受期高水平复制的HBV^[10,11]。采用现代基因治疗方法,有可能对这两个时期的低病毒复制和高水平复制HBV-DNA的细胞进行靶向性基因治疗,影响着慢性乙型肝炎预后。我们根据HCV复制特殊性,结合乙型肝炎免疫应答的基本特点,利用真核细胞表达载体,构建基因功能平衡制约系统,有可能为上述困境提供一种新的治疗方法。

1 材料和方法

1.1 材料 pcDNA₃, PCR产物提纯试剂盒,德国QIAGEN; Expand PCR Kit, 美国Stratgene; Taq, Pfu酶, 加拿大Bio-Star; EcoR I, BamH I, Hind III, 洛阳华美生物工程公司。HBV pcDNA₃-TK和pcDNA₃-S基因质粒系本室保存。引物合成由大连宝生物公司合成。HCV IRES L: 5' - GCGC GGATCCGGGCGA CACTCCACCATAG -3' (nt17-36, 划线为BamH-I切点), HCV IRES R: 5' - GCGAATTCGTTTTTCTTT GAGGTTTAGGATTC -3' (nt347-371, 划线为EcoR I切点), HBVL: 5' - GCGCGT GCAAGCTTAT AAAACGCCGCAGACACATC -3' (划线为Hind III切点), HBVR: 5' - ATTCGTGCTCATCAGGA TTCCT AGGACCCCTTC -3' (划线为HCV核心基因), HCVL: 5' - TAGGAATCCTGATGAGCACGAA TCCTAAACC TC-3' (划线为HBV部分反义序列), HCVR: 5' - GCG CGGATCCTTAAGCGGAAG CTGGG ATG -3' (划线为BamH I切点), TK R: 5' - ACTTCCGTGGCTTCTTGCT G-3' (nt150-nt170)。

1.2 方法 载体构建策略,如图1, HCV IRES位点和核心基因的获得。临床上已被鉴定的1例国人慢性HCV感染患者的阳性血清50 μL, Trizol裂解(深圳晶美公司提供),混匀后常规酚:氯仿:异戊醇抽提,取上清2倍乙醇沉淀,750 mL/L的乙醇洗涤,沉淀烘干后加的DEPC水溶解20 μL,获得HCV RNA。取含有HCV RNA的溶液,按照RT-PCR试剂盒(试剂提供为深圳晶美公司)要求,分别加入随机引物, HCV IRES上下游引物,含有逆转录酶的PCR扩增混合物。PCR仪为美国罗氏公司Real-time PCR仪。反应程序为:42 °C, 45 min; 94 °C, 5 min后进入主循环92 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 45个循环后收集PCR产物为目的HCV IRES目的基因产物。同样的方法获得HCV核心基因。分别提纯后备用。HBV部分S基因和胸腺苷激酶基因获得。根据HBV S基因序列,寻找合适的反义序列,在HBV S基因反义序列5'端处有一200 nt左右序列,之中不含有起始密码子ATG,设计引物(见上述)。按下列程序:主循环92 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s PCR扩增,产物为反义HBV S基因目的序列;小量提取TK质粒, EcoR I酶切获得TK基因。分别提纯后备用。反义HBV S和HCV核心基因连接:按照Horton et al^[12] (Gene 1989; 77: 61-68)方法进行SOEing PCR,保守扩增。在1.4.1.1中目的基因获得后,反义HBV S和HCV核心

基因引物之间(HCV L和HBV R)存在互补序列(下划线所示): HCVL5'-TAGGAATCCTGATGAGCACGAATCCTAAACCTC-3'(斜体为HCV核心基因序列)3'-CCCCAGGATCCTTAGGACTACTCGTGCTTA-5': HBVR(斜体为反义HBV S基因部分)。所以,将反义HBV S基因和HCV核心基因扩增产物按一定的比例混合后,以HBV L和HCV R为引物进行第二次PCR扩增,反应按下列程序进行:主循环92 °C 30 s, 50 °C 45 s, 72 °C 60 s PCR扩增30个循环后,72 °C再延伸10 min,获得目的基因产物,提纯后备用。反义HBV S-HCV核心基因和HCV IRES位点三片段连接。BamH I分别常规酶切反义HBV S-HCV核心基因和HCV IRES位点,分别提纯后按一定的比例混合,常规T4连接酶连接,连接产物常规酚:氯仿:异戊醇抽提后获得上清。取上清,以HBV L和HCV IRES R为引物,进行PCR扩增,反应按下列程序进行:主循环92 °C 30 s, 53 °C 45 s, 72 °C 60 s PCR扩增30个循环后,72 °C再延伸10 min,获得目的基因产物,提纯后备用。反义HBV S-HCV核心基因-HCV IRES三片段克隆。Hind III和EcoR I双向酶切反义HBV S-HCV核心基因-HCV IRES序列和pcDNA₃载体,提纯,T4连接酶连接。连接产物按常规方法进行转化感受态细胞后,涂板,37 °C培养,挑取单菌落,常规培养转化后的菌株,以HBV L和HCV IRES R为引物进行PCR和Hind III和EcoR I双酶切鉴定,获得的载体称为pcDNA3-SCI。

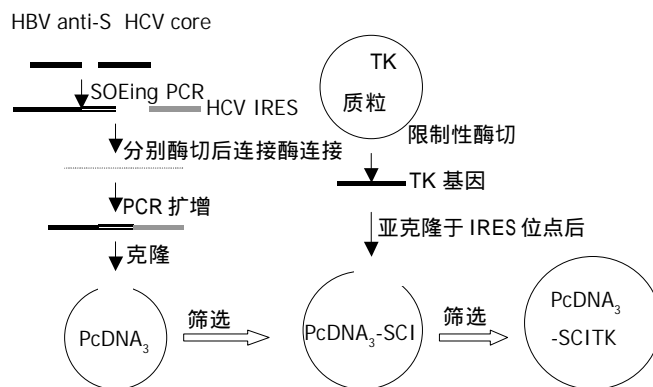


图1 自杀平衡载体构建策略图。

1.2.1 胸腺苷激酶基因亚克隆 EcoR I分别酶切pcDNA3-SCI和前面所得的TK基因,提纯后T4连接酶连接,连接产物按常规方法进行转化感受态细胞后,涂板,37 °C培养,挑取单菌落,常规培养转化后的菌株,以HBV L和TK R为引物进行PCR扩增,有目的产物出现即为TK基因正向插入pcDNA3-SCI载体后的目的质粒,即清除乙型肝炎病毒自杀基因平衡制约载体系统(pcDNA₃-SCITK)。获得的质粒送大连宝生物公司测序鉴定。

1.2.2 获得的载体细胞转染 常规培养细胞,转染前1 d将HepG2和2.2.15细胞接种到8孔槽中,加入100 mL/L

胎牛血清(FCS)的DMEM培养基,在37℃和50 mL/L的CO₂中培养至细胞的融合率为50-80%。用QIAGENE小量提取质粒(pcDNA3-SCI和pcDNA₃-SCITK),按lipofectamine试剂盒(boehringer mannheim biochemicals Co. USA)说明书要求,转染HepG2和2.2.15细胞,0,3,6 d分别取细胞培养基上清,6 d后,细胞常规碘化丙啶染色,流式细胞仪检测。

2 结果

2.1 PCR 扩增和酶切鉴定结果 见图 2-4.

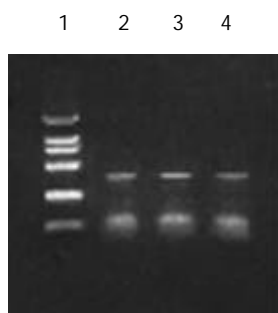


图2 HCV IRES PCR 扩增.

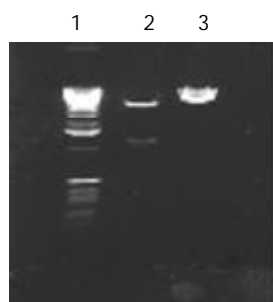


图3 SCI 平衡制约系统鉴定.

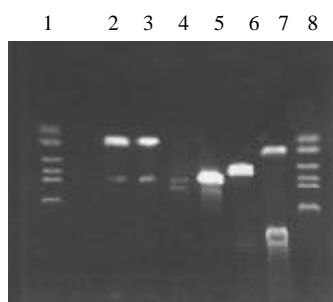


图4 SCITK 平衡制约系统克隆和鉴定过程.

图2为HCV IRES RT-PCR结果,左侧为2 kb Mark,右侧为PCR产物,大小300 bp左右;图3为反义HBV S-HCV核心基因-HCV IRES克隆后,HinD III和EcoR I双酶切鉴定结果,左侧为1 kb的Mark,右侧为2泳道为双酶切结果,前面为1 kb左右的SCI基因片段,后面为线状pcDNA₃载体,3泳道为pcDNA3-SCI载体;图4为SCITK平衡制约系统克隆和鉴定过程,1和8泳道为2 kb的Mark,2,3泳道为SCITK载体系统经过HBV L和TK R为引物进行PCR扩增鉴定结果,4泳

道为反义HBV S-HCV核心基因和HCV IRES位点连接后PCR扩增后提纯的电泳结果,5泳道反义HBV S和HCV核心基因SOEing PCR连接的结果,6泳道为HCV core RT-PCR结果,7泳道为HBV部分S基因PCR结果. 2.2 质粒转染和检测 ELISA 分析 2.2.15细胞培养上清,表达的HBsAg检测结果呈波浪性.对照组(pcDNA3-SCI)1,3,6 d的A值分别为0.32±0.13,0.61±0.23,0.61±0.25,而实验组(pcDNA3-SCITK)分别为0.31±0.11,0.51±0.22,0.41±0.16.在检测结果6 d,二者之间呈显著性差异(P<0.05).

2.3 细胞凋亡流式细胞仪检测和显微镜下观察 pcDNA3-SCITK载体分别转染2.2.15细胞和HepG2细胞,转染载体6 d后,收集细胞,进行流式细胞仪检测,发现对照组凋亡率约为6%,而实验组凋亡率约为15%,显微镜下检测原有梭形形态已丢失,细胞多皱缩呈圆形,多向凋亡趋势发展,图5和图6.

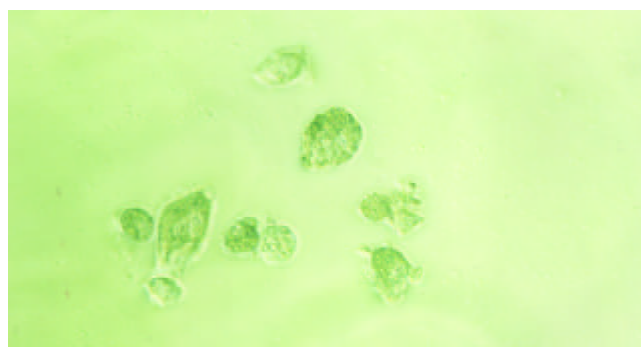


图5 2.2.15细胞被转染后6 d细胞形态.

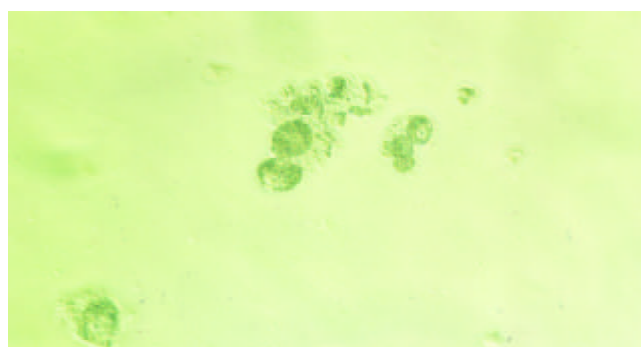


图6 2.2.15细胞被转染后6 d细胞形态.

3 讨论

慢性乙型肝炎高水平的病毒复制、低水平的免疫应答和不完全免疫清除后逃逸的较少病毒复制是慢性乙型肝炎间断性发作的决定性因素.目前常用的免疫调节剂如干扰素,IL-2等治疗效果不尽人意.以疗效较为肯定干扰素-α为例,其对e抗原的阴转率不到50%,对HBsAg的阴转率几无影响,而且远期疗效尚差,副作用大,价格昂贵^[13-15].另外抗病毒药物拉咪呋定,虽然有较强抑制病毒复制作用,但停药后,病毒又重新复制而复发^[16-18].现有的抗HBV药物都不能清除HBV

cccDNA, 停药后可以再度复制, 难以达到使其表达 HBsAg 消失, 因此远期治疗效果有限. 迄今为止, 还没有一种有效的策略可以控制和消除这些免疫清除后的逃逸病毒和耐受期高水平复制的HBV. 随着分子生物学研究进展, 通过基因治疗的方法来治疗慢性乙型肝炎已经成为目前研究的热点. 基因治疗的关键在于载体选择, 必须具有靶向性, 目的基因可调控性及有效表达等^[19, 20]. 因此对载体的合理修饰和改建是目前研究的热点和难点. 我们根据 HCV 复制特殊性, 蛋白质翻译的基本特点, 利用成熟的胸腺苷激酶基因(thymidine kinase, TK)为目的基因^[21-25], 构建基因功能平衡制约系统, 使目的基因的可调控性和靶向性融为一体, 有可能为目前慢性乙型肝炎的基因治疗提供一个有效的载体.

在慢性病毒性肝炎的病原中, 除 HBV 外, 丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)也是重要的病原之一. 研究表明 HCV 表达的核心蛋白可以与 HCV 的核糖体插入位点(IRES)相互结合, 下调 HCV 病毒蛋白表达, 自我调控 HCV 复制, 降低 HCV 水平, 导致 HCV 在血液中间断性出现, 逃避机体免疫监视, 造成患者体内持续病毒感染^[26-29]. 另外研究表明, HCV 基因组上存在的 IRES 序列, 具有很强的翻译功能, 为双顺反子载体中效率较高的启动蛋白质翻译序列, 已经用于载体构建之中^[30-33].

我们根据上述 HCV 复制特点, 在真核细胞表达载体 pcDNA₃ 的 CMV 启动子下依次驱动部分 HBV S 反义基因、HCV 核心蛋白基因、HCV IRES 部分有效序列和 TK 基因, 即 HBV-anti S/HCV/core-IRES-TK 载体系统, 构成一个以 HBV 特有的 S 基因为靶向的基因功能相互平衡制约系统, 简称为 SCITK 系统, 当细胞内 HBV 病毒表达 HBsAg, 这时 S 基因的 mRNA 即与载体系统中的 S 基因反义序列转录 mRNA 的相结合, 也就在 HCV 核心蛋白基因起始密码子 AUG 前形成 mRNA 的二聚体, 抑制的 HCV 核心蛋白 mRNA 翻译, HCV 核心蛋白表达水平下降. HCV IRES 结合蛋白减少, IRES 启动下游基因 TK 表达相对增强, 受感染的肝细胞因表达 HBsAg 而自我同时表达 TK, 肝细胞局部存在相对高浓度的 TK, 而发挥 TK 溶解细胞效应, 细胞出现坏死和凋亡(图 7A). ii, 在正常细胞内, 没有 HBV S 基因存在时, 表达的 HCV 核心蛋白与 HCV IRES 结合, 抑制 IRES 对下游 TK 的启动表达, 从而对机体细胞无害. 如果感染细胞 HBV 清除后, SCITK 载体系统表达的 TK 逐渐降低和消失, 具有良好的调控性, 图 7B.

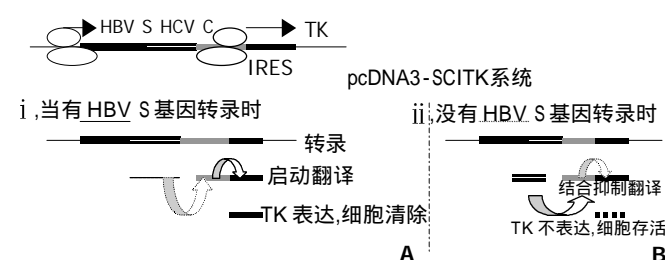


图7 pcDNA3-SCITK系统清除感染HBV细胞模式图.

为了验证上述理论, 我们构建了 pcDNA3-SCI 和 pcDNA3-SCITK 载体. PCR 和测序(图2-4)鉴定表明, 我们已经成功构建了一个以 HBV S 基因为靶向基因相互平衡制约系统. 将上述两种载体分别转染 2.2.15 在转染后的 0, 3, 6 d, 分别检测细胞培养基中 HBsAg 的表达量, 发现实验组中细胞分泌 HBsAg 呈波浪性, 而对照组细胞没有; 如果将 pcDNA3-SCITK 载体分别转染 2.2.15 细胞和 HepG2 细胞, 细胞凋亡明显增多, 细胞形态向凋亡方向发展(图5和图6). 该系统构建成功, 将为我们下一步的动物模型^[34-36]研究奠定了坚实的基础.

4 参考文献

- 1 Chu CM, Liaw YF. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: an immunopathological study. *J Gastroenterol* 1997;13:218
- 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 Fang JN, Jin CJ, Cui LH, Quan ZY, Choi BY, Ki M, Park HB. A comparative study on serologic profiles of virus hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2001;7:107-110
- 4 Roussos A, Goritsas C, Pappas T, Spanaki M, Papadaki P, Ferti A. Prevalence of hepatitis B and C markers among refugees in Athens. *World J Gastroenterol* 2003;9:993-995
- 5 Gao Y, Ma Y, Li M, Cheng T, Li SW, Zhang J, Xia NS. Oral immunization of animals with transgenic cherry tomato expressing HBsAg. *World J Gastroenterol* 2003;9:996-1002
- 6 Wu CH, Ou-Yang EC, Walton C, Promrat K, Forouhar F, Wu GY. Hepatitis B virus infection of transplanted human hepatocytes causes a biochemical and histological hepatitis in immunocompetent rats. *World J Gastroenterol* 2003;9:978-983
- 7 Fattovich G. Natural history and prognosis of hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2003;23:47-58
- 8 Iino S. Natural history of hepatitis B and C virus infections. *Oncology* 2002;62:18-23
- 9 Lau GK, Lai CL, Wu PC. The natural history of chronic hepatitis B infection. *Hong Kong Med J* 1997;3:283-288
- 10 Liaw YF. Therapy of chronic hepatitis B: current challenges and opportunities. *J Viral Hepat* 2002;9:393-399
- 11 Chin R, Locarnini S. Treatment of chronic hepatitis B: current challenges and future directions. *Rev Med Virol* 2003;13:255-272
- 12 Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK, Pease LR. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 1989;77:61-68
- 13 Manns MP. Current state of interferon therapy in the treatment of chronic hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2002;22:7-13
- 14 Leung N. Treatment of chronic hepatitis B: case selection and duration of therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:409-414
- 15 Di Bisceglie AM. Long-term outcome of interferon- α therapy for chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1995;22:s65-66
- 16 Sokal E. Lamivudine for the treatment of chronic hepatitis B. *Expert Opin Pharmacother* 2002;3:329-339
- 17 Schiff ER. Lamivudine for hepatitis B in clinical practice. *J Med Virol* 2000;61:386-391
- 18 Chayama K, Suzuki Y, Kobayashi M, Kobayashi M, Tsubota A, Hashimoto M, Miyano Y, Koike H, Kobayashi M, Koida I, Arase Y, Saitoh S, Murashima N, Ikeda K, Kumada H. Emergence and takeover of YMDD motif mutant hepatitis B virus during long-term lamivudine therapy and re-takeover by wild type after cessation of therapy. *Hepatology* 1998;27:1711-1716
- 19 Romano G, Pacilio C, Giordano A. Genetransfer Technology in therapy: current applications and future goals. *Stem Cell* 1999; 17:191-202

- 20 Ferry N, Heard JM. Liver-directed gene transfer vectors. *Hum Gene Ther* 1998;9:1795-1981
- 21 Dancer A, Julien S, Bouillot S, Pointu H, Vernet M, Huber P. Expression of thymidinekinase driven by an endothelial-specific promoter inhibits tumor growth of Lewis lung carcinoma cells in transgenic mice. *Gene Ther* 2003;10:1170-1178
- 22 Freund CT, Tong XW, Rowley D, Engehausen D, Frolov A, Kieback DG, Lerner SP. Combination of adenovirus-mediated thymidine kinase gene therapy with cytotoxic chemotherapy in bladder cancer in vitro. *Urol Oncol* 2003;21:197-205
- 23 Kwon GY, Jeong J, Woo JK, Choi HY, Lee MJ, Ko JK, Shim YH, Kim CW. Co-expression of bfl-1 enhances host response in the herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir gene therapy system. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;303:756-763
- 24 Litvinova E, Maury S, Boyer O, Bruel S, Benard L, Boissier G, Klatzmann D, Cohen JL. Graft-versus-leukemia effect after suicide-gene-mediated control of graft-versus-host disease. *Blood* 2002;100:2020-2025
- 25 Chen SH, Chen XHL, Wang YB, Kosai K, Finegold MJ, Rich SS, Woo SL. Combination gene therapy for liver metastasis of colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92:2577-2581
- 26 Yao ZQ, Ray S, Eisen-Vandervelde A, Waggoner S, Hahn YS. Hepatitis C virus: immunosuppression by complement regulatory pathway. *Viral Immunol* 2001;14:277-295
- 27 Shimoike T, Mimori S, Tani H, Matsuura Y, Miyamura T. Interaction of hepatitis c virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. *J Virol* 1999;73:9718-9725
- 28 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
- 29 Li D, Takyar ST, Lott WB, Gowans EJ. Amino acids 1-20 of the hepatitis C virus (HCV) core protein specifically inhibit HCV IRES-dependent translation in HepG2 cells, and inhibit both HCV IRES- and cap-dependent translation in HuH7 and CV-1 cells. *J Gen Virol* 2003;84(Pt 4):815-825
- 30 Urab M, Hasumi Y, Ogasawara Y, Matsushita T, Kamoshita N, Nomoto A, Colosi P, Kurtzman GJ, Tobita K, Ozawa K. A novel discistronic AAV vector using a short IRES segment derived from hepatitis c virus genome. *Gene* 1997;200:157-162
- 31 Kruger M, Begger C, Li QX, Welch PJ, Tritz R, Leavitt M, Barber JR, Wong-Staal F. Identification of eIF2Bgamma and eIF2gamma as cofactors of hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation using a functional genomics approach. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:8566-8571
- 32 Zhang H, Hanecak R, Brown-Driver V, Azad R, Conklin B, Fox MC, Anderson KP. Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus (HCV) gene expression in livers of mice infected with an HCV-vaccinia virus recombinant. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:347-353
- 33 Liang XS, Lian JQ, Zhou YX, Nie QH, Hao CQ. A small yeast RNA inhibits HCV IRES mediated translation and inhibits replication of poliovirus in vivo. *World J Gastroenterol* 2003;9:1008-1013
- 34 Zoulim F, Berthillon P, Guerhier FL, Seignerres B, Germon S, Pichoud C, Cheng YC, Trepo C. Animal models for the study of HBV infection and the evaluation of new anti-HBV strategies. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:460-463
- 35 Wang CY, Giambrone JJ, Smith BF. Detection of duck hepatitis B virus DNA on filter paper by PCR and SYBR green dye-based quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40:2584-2590
- 36 Le Guerhier F, Pichoud C, Jamard C, Guerret S, Chevallier M, Peyrol S, Hantz O, King I, Trepo C, Cheng YC, Zoulim F. Antiviral activity of beta-L-2', 3'-dideoxy-2', 3'-dideoxy-5-fluorocytidine in woodchucks chronically infected with woodchuck hepatitis virus. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1065-1077



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

