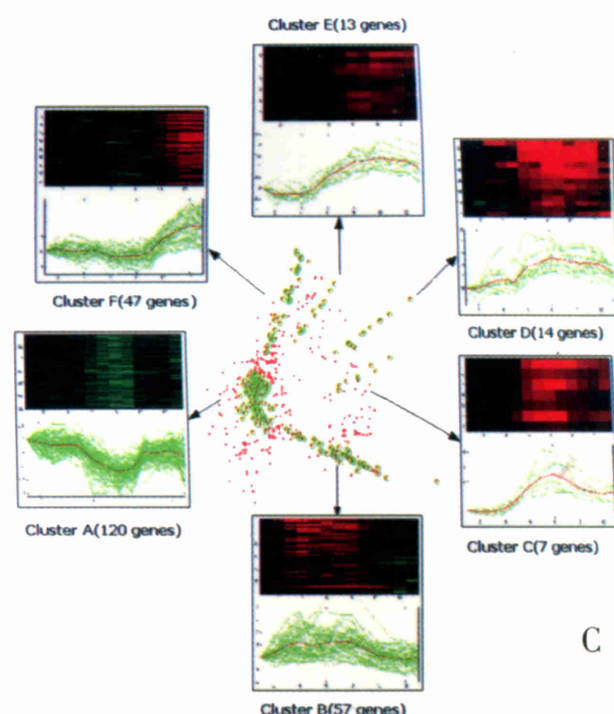
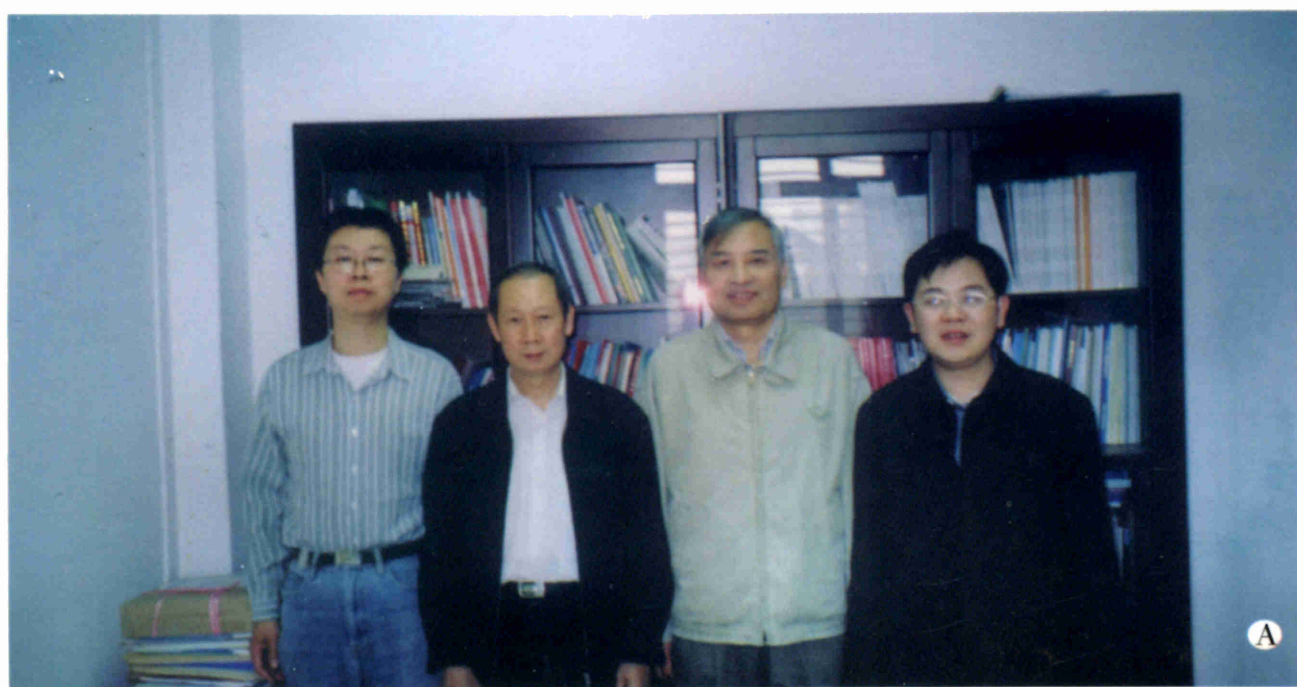


世界华人消化杂志®

**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(P Ж)》
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

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

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, 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: 2003-08-07 接受日期: 2003-09-01

Artificially constructed bicistronic vector containing hepatitis C virus internal ribosome entry site

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, 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: 2003-08-07 Accepted: 2003-09-01

Abstract

AIM: To study the function of hepatitis C virus(HCV) internal ribosome entry site (IRES), and to construct bicistronic vector.

METHODS: After amplifying HCV IRES by reverse-transcription PCR (RT-PCR), the products were cloned into pcDNA3-S upstream hepatitis B virus (HBV) surface gene. HBV core gene was cloned following HCV IRES. After determination by PCR and sequencing, we acquired plasmids containing HBV S, C gene and HCV IRES, which were named as plasmids pcDNA3-SIC. PcDNA3-SIC were transfected into HepG2 cells and detected by immunofluorescence assay and Western blot.

RESULTS: HBV surface gene and core gene were both expressed in hepG2 cells, which were detected by immunofluorescence assay and confirmed by Western blot.

CONCLUSION: The 17 nt of 5' nontranslated RNA in HCV IRES had no effect on driving downstream gene expression itself and could be used in the bicistronic vector that drove two genes expression.

Kan QC, Yu ZJ, Lei YC, Yang DL, Hao LJ. Artificially constructed bicistronic vector containing hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(10):1520-1523

摘要

目的: 研究丙型肝炎病毒核糖体插入位点启动翻译蛋白质功能, 构建双顺反子真核表达载体。

方法: 逆转录PCR(RT-PCR)扩增丙型肝炎基因组中核糖体插入位点序列(IRES), 定向克隆到pcDNA3-S质粒多克隆酶切位点中。在IRES下游克隆乙型肝炎病毒核心基因, 测序鉴定后获得的质粒经脂质体转染hepG2细胞, 间接免疫荧光染色和Western-blot检测。

结果: 在间接免疫荧光染色后, 荧光显微镜下可见乙型肝炎病毒S基因和核心基因表达。转染细胞破碎后免疫沉淀检测和图像分析表明, 两种基因有相似的表达量。

结论: 人为截断HCV 5' NTR区17个碱基, 并不影响IRES对下游基因蛋白质翻译, 为成功构建了含丙型肝炎病毒IRES的双顺反子表达载体打下基础。

阚全程, 余祖江, 雷延昌, 杨东亮, 郝连杰. 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. *世界华人消化杂志* 2003;11(10):1520-1523
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1520.asp>

0 引言

在引起慢性病毒性肝炎的病原中, 丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)是重要的病原之一^[1-7]。丙型肝炎的慢性化机制虽然和乙型肝炎有许多相似之处, 如免疫耐受的形成, 细胞凋亡等^[8-10]。但也有许多不同之处, 如HCV基因组具有高变性, 在血液中间断性出现等原因, 不易被免疫系统识别而造成患者慢性化^[11-14]。最近有研究表明, HCV核心蛋白可以和其IRES位点相结合, 下调HCV抗原表达, 降低病毒复制, 有利于逃避宿主免疫系统的监视^[15-17]。国内对于上一机制鲜有报道, 为了进一步阐述上述机制和研究HCV IRES位点功能, 我们构建了含HCV IRES的双顺反子载体。

1 材料和方法

1.1 材料 pcDNA₃, 德国Qiagen公司; Expand PCR Kit, 美国Stratgene公司; Taq酶, 加拿大Bio-Star公司; EcoRI、BamHI, 洛阳华美生物工程公司。HBV pcDNA₃-C和pcDNA₃-S基因质粒系本室保存。引物序列: 以下引物均在大连宝生物公司合成 HCV IRES L: 5' - GCGCGG ATCCGG GCGACACTCCACCATAG -3'(nt17-36, 黑

体划线为 BamH-I 切点)HCV IRES R: 5' -GC GAATTC GTTTTCTTTGAGTTTAGGATTC -3' (nt347-371, 黑体划线为 EcoR I 切点).

1.2 方法 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 μ L, 加 2 倍的裂解液 Trazol(深圳晶美公司提供), 加样枪混匀后, 常规酚: 氯仿: 异戊醇提取, 4 $^{\circ}$ C 离心 13 000 r/min, 14 min 后取上清, 加 2 倍乙醇沉淀, 在离心后加 750 mL/L 乙醇洗涤, 沉淀烘干后加 20 μ L 的 DEPC 水溶解后备用. 取含有 HCV RNA 的溶液, RT-PCR 一步法试剂盒由深圳晶美公司提供, 按照试剂盒要求, 依次加入随机引物, HCV IRES 上下游引物及含有逆转录酶的 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 $^{\circ}$ C, 45 min; 94 $^{\circ}$ C, 5 min 后进入主循环 92 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 45 个循环后收集 PCR 产物. PCR 产物常规酚: 氯仿: 异戊醇提取后, 离心后上清直接 EcoR I 和 BamH I 双酶切, 酶切后电泳, QIAGEN(德国产)试剂盒回收 PCR 产物, 定向克隆入 pcDNA₃-S 中, 所得的质粒为 pcDNA3-SI. PCR 和酶切鉴定后, 送入大连宝生物公司测序鉴定.

1.2.1 HBV (hepatitis B virus) 核心基因亚克隆 EcoR I 酶切含有 HBV 核心基因的质粒, 核心基因片段再回收. 小量提取 pcDNA₃-SI 质粒后, EcoRI 酶切后与 HBV 核心基因连接, 连接后产物常规转化感受态细胞, 小量培养筛选的单菌落后提取质粒, 所得质粒称为 pcDNA₃-SIC. 以 HCV IRES L 和 HCV 核心基因扩增下游引物(本室保存)作为所得质粒 PCR 方向鉴定引物, HBV 核心基因克隆鉴定方向后, 送大连宝生物公司测序.

1.2.2 pcDNA₃-SIC 在真核细胞 HepG2 表达 常规培养细胞, 转染前 1 d 将 HepG2 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 $^{\circ}$ C 和 50 mL/L 的 CO₂ 中培养至细胞的融合率为 50-80 %. II, 细胞转染 用 QIAGEN 小量提取质粒试剂盒提取 pcDNA₃-SIC 质粒, 按 lipofectamine 试剂盒(boehringer mannheim biochemicals Co. USA)说明书要求, 转染 HepG2 细胞, PBS 洗涤细胞 2 次后用 4 $^{\circ}$ C 的 500 g/L 甲醇和丙酮混合液, 低温固定 15min, 间接免疫荧光检测.

1.2.3 免疫沉淀检测 超声波破碎转染细胞, 7 000 r/min, 离心 10 min, 取上清. 取等量上清分别加入单克隆 HBsAb 和 HBcAb, 37 $^{\circ}$ C 温浴 45 min 后, 加入 PEG6000, 终浓度为 25 g/L, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 离心 10 000 r/min, 30 min, 收集沉淀, 30 g/L 的 PEG6000 洗涤 3 次, 3 mol/L KSCN 室温解离 3 h, 所得样品做 SDS-PAGE(分离胶为 120 g/L, 浓缩胶为 30 g/L, 稳流 25mA, 电泳 70min, 电泳仪为 Bio-Rad3000Xi 型), 凝胶用考马斯亮兰 R-250 染色.

2 结果

2.1 RT-PCR 在丙型肝炎患者血清中提取 RNA, 对 HCV IRES 片段进行 PCR 扩增, 扩增片段大小为 300 bp

左右, 图 1.

2.2 克隆目的基因鉴定 将外源性目的基因 HBV S 和 core 基因依次克隆入 PCDNA3-SIC 中, PCR 扩增鉴定插入 PCDNA3-SIC 载体中片段大小, 分别约为 670 bp 和 550 bp, 图 2.

2.3 质粒转染鉴定 将测序和 PCR 鉴定完成后 pcDNA3-SIC 质粒, 在 HepG2 中转染, 间接免疫荧光染色和免疫沉淀鉴定, 图 3-5.

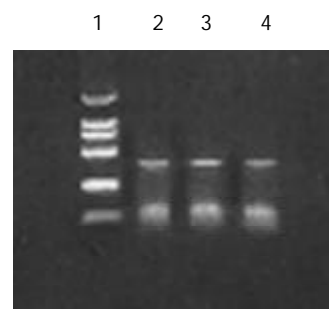


图1 血清中 HCV IRES RT-PCR.

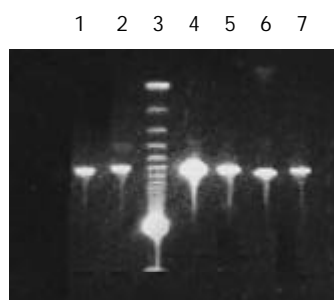


图2 克隆目的基因 PCR 鉴定.

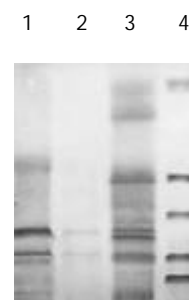


图3 质粒转染免疫沉淀鉴定.

图 1 为 HCV IRES 位点 RT-PCR 扩增的结果, 左侧 1 泳道为 2 kb 的 Mark, 右侧 2、3、4 泳道为 PCR 扩增结果, 分子大小为 335 bp. 图 2 为 PCDNA3-SIC 中 HBV S 和 core 基因扩增鉴定结果, 中间 3 泳道为 123 bp 的 Mark, 左侧第一泳道为 HBV core 基因 678 bp, 而第二泳道为 HBV S 基因 550 bp, 4、5 泳道为 S, 6、7 为 C; 图 3 为 pcDNA3-SIC 在 HepG2 中转染后, 免疫沉淀鉴定结果, 最右侧 4 泳道为中分子质量蛋白质 mark, 左侧第 1 泳道为 HBV S 基因表达后免疫沉淀的结果, 第 2 泳道为无关血清对照, 第 3 泳道为 HBV core 基因表达后免疫沉淀, 可见 HBV 核心蛋白表达, 为 2 000 左右.

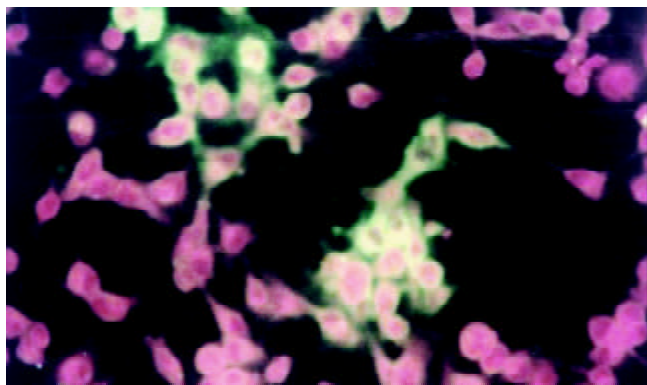


图4 单克隆 HBsAb 检测转染细胞图.

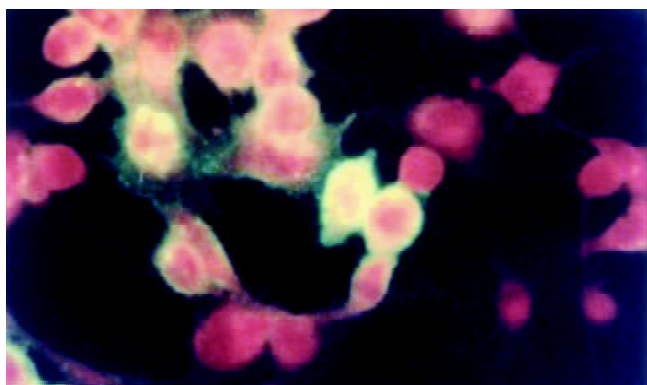


图5 被 HBcAb 结合后荧光检测图.

图4和图5分别为培养转染细胞被单克隆HBsAb和HBcAb结合后,间接免疫荧光显示(放大倍数: 10×20).

3 讨论

最初描述核糖体插入位点(internal ribosome entry site, IRES)的启动帽非依赖性的翻译功能首先在细小病毒RNA的5'端非编码区^[18],随后在有多种病毒基因组中发现.评价这些IRES元件,特别是来源于脑心肌炎病毒(EMCV)的大约600 nt IRES序列,可以被用做表达多种蛋白质^[19-21].最近,HCV的基因组被证明也有一个IRES序列,大约为200 nt左右^[22-26].现研究表明在HCV基因组中的5'端存在一个非基因编码区(nontranslated RNA),即5' NTR区,长度大约300 bp,共有4个茎环,即I, II, III和IV.其中第2个茎环含有IIa和IIb等2个环状结构,第3个茎环含有5个环状结构,即IIIa, IIIb, IIIc, IIId和IIIE,翻译的起始位点可能位于IV环中的AUG,而这4个茎环空间结构的正确形成对下游基因蛋白质翻译有着重要影响(见左图)^[27-32]. Rijnbrand et al^[33]等研究HCV IRES功能区位于40 nt和370 nt之间,包括一部分HCV核心蛋白序列,即位于茎环II和III上,内含丰富的RNA假结,有利于核糖体进入结合.HCV IRES能够在绝大多数细胞系中可以启动下游基因表达,甚至包括那些非灵长类细胞,具有帽非依赖性的强大翻译功能^[34].也有研究表明,茎环中第4环能够和病毒的病毒产物相结合,对下游翻译

有负调节作用,有利于病毒的持续感染^[35].但多数学者认为5' NTR正确的空间构像对下游基因蛋白质的翻译有重要作用.

我们通过RT-PCR扩增HCV 5' NTR部分片段(图1),构建了pcDNA₃-SIC载体,PCR鉴定(图2)和测序鉴定后,转染真核细胞.发现去断后的5' NTR区可完全启动下游蛋白质的表达(图4和图5),表达后的蛋白质经免疫沉淀后,SDS-PAGE发现,在HBcAb结合蛋白质质量远大于HBsAb结合蛋白质质量,IRES启动下游基因翻译不亚于CMV启动子的帽依赖结构对下游基因翻译(图3).表明人为去断HCV 5' NTR区20个碱基,破坏5' NTR区的第一茎环并不影响下游蛋白质表达.

在HCV基因组上的3'端同样也存在一个非编码区,即3' NTR,大约为40-60 nt.在HCV RNA结构稳定性方面有重要作用^[36-38].我们发现HCV 5' NTR区的第一个茎环在HCV蛋白质翻译并不起着重要作用,他是否起着3' NTR相似的稳定HCV RNA作用还不得而知,因此还有待于进一步研究.但本研究揭示了HCV IRES位点的对下游基因翻译功能,而且不受茎环I序列的限制,为下一步构建含HCV IRES的双顺反子载体奠定了基础.

4 参考文献

- Chang KM. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2003;7:89-105
- Chen YD, Liu MY, Yu WL, Li JQ, Dai Q, Zhou ZQ, Tisminetzky SG. Mix-infections with different genotypes of HCV and with HCV plus other hepatitis viruses in patients with hepatitis C in China. *World J Gastroenterol* 2003;9:984-992
- 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
- Jin J, Yang JY, Liu J, Kong YY, Wang Y, Li GD. DNA immunization with fusion genes encoding different regions of hepatitis C virus E2 fused to the gene for hepatitis B surface antigen elicits immune responses to both HCV and HBV. *World J Gastroenterol* 2002;8:505-510
- Tang ZY. Hepatocellular carcinoma-cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:445-454
- 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
- Assy N, Paizi M, Gaitini D, Baruch Y, Spira G. Clinical implication of VEGF serum levels in cirrhotic patients with or without portal hypertension. *World J Gastroenterol* 1999;5:296-300
- Agrati C, Nisii C, Oliva A, D'Offizi G, Montesano C, Pucillo LP, Poccia F. Lymphocyte distribution and intrahepatic compartmentalization during HCV infection: a main role for MHC-unrestricted T cells. *Arch Immunol Ther Exp* 2002;50:307-316
- Lin DB, Tsai TP, Chen WK. Seroprevalence of hepatitis C virus infection and its association with natural infection of hepatitis B virus among preschool children in Taiwan. *Eur J Epidemiol* 2003;18:245-249
- Waris G. Regulatory mechanisms of viral hepatitis B and C. *J Biosci* 2003;28:311-321
- Urbani S, Boni C, Missale G, Elia G, Cavallo C, Massari M, Raimondo G, Ferrari C. Virus-specific CD8+ lymphocytes share the same effector-memory phenotype but exhibit functional differences in acute hepatitis B and C. *J Virol* 2002;76:12423-12434
- Freeman AJ, Law MG, Kaldor JM, Dore GJ. Predicting progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *J*

- Viral Hepat* 2003;10:285-293
- 13 Watanabe H, Saito T, Shinzawa H, Okumoto K, Hattori E, Adachi T, Takeda T, Sugahara K, Ito JI, Saito K, Togashi H, Suzuki R, Hayashi M, Miyamura T, Matsuura Y, Kawata S. Spontaneous elimination of serum hepatitis C virus (HCV) RNA in chronic HCV carriers: A population-based cohort study. *J Med Virol* 2003;71:56-61
- 14 Kato T, Miyamoto M, Furusaka A, Date T, Yasui K, Kato J, Matsushima S, Komatsu T, Wakita T. Processing of hepatitis C virus core protein is regulated by its C-terminal sequence. *J Med Virol* 2003;69:357-366
- 15 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;78:9718-9725
- 16 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;293:841-150
- 17 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
- 18 Pelletier J, Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 1988;334:320-325
- 19 Morgan RA, Couture L, Elroy-Stein O, Ragheb J, Moss B, Anderson WF. Retroviral vectors containing patent internal ribosome entry site: development of a polycistronic gene transfer system and applications to human gene therapy. *Nucl Acids Res* 1992; 20:1293-1299
- 20 Gurtu V, Yan G, Zhang G. IRES bicistronic expression vectors for efficient creation of stable mammalian cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;229:295-298
- 21 Pu H, Cashion LM, Kretschmer PJ, Liu Z. Rapid establishment of high-producing cell lines using dicistronic vectors with glutamine synthetase as the selection marker. *Mol Biotechnol* 1998;10:17-25
- 22 Reynolds JE, Kaminski A, Kettinen HJ, Grace K, Clarke BE, Carroll AR, Rowlands DJ, Jackson RJ. Unique features of internal ribosome entry site of hepatitis C virus RNA translation. *EMBO J* 1995;14:6010-6020
- 23 Lu HH, Wimmer E. Poliovirus chimera replicating under the translational control of genetic elements of hepatitis C virus reveal unusual properties of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:1412-1417
- 24 Beales LP, Holzenburg A, Rowlands DJ. Viral internal ribosome entry site structures segregate into two distinct morphologies. *J Virol* 2003;77:6574-6579
- 25 Kim YK, Lee SH, Kim CS, Seol SK, Jang SK. Long-range RNA-RNA interaction between the 5' nontranslated region and the core-coding sequences of hepatitis C virus modulates the IRES-dependent translation. *RNA* 2003;9:599-606
- 26 Pudi R, Abhiman S, Srinivasan N, Das S. Hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation is stimulated by specific interaction of independent regions of human La autoantigen. *J Biol Chem* 2003;278:12231-12240
- 27 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
- 28 Branch AD. Hepatitis C virus RNA codes for proteins and replicates: does it also trigger the interferon response? *Semin Liver Dis* 2000;20:57-68
- 29 Hwang LH, Hsieh CL, Yen A, Chung YL, Chen DS. Involvement of the 5' proximal coding sequences of hepatitis C virus with internal initiation of viral translation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;252:455-460
- 30 Frolov I, McBride MS, Rice CM. Cis-acting RNA elements required for replication of bovine viral diarrhea virus-hepatitis C virus 5' nontranslated region chimeras. *RNA* 1998; 4:1418-1435
- 31 Rijnbrand RC, Abbink TE, Haasnoot PC, Spaan WJ, Bredenbeek PJ. The influence of AUG codons in the hepatitis C virus 5' nontranslated region on translation and mapping of the translation initiation window. *Virology* 1996;226:47-56
- 32 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 ribosomal entry site. *J Virol* 1999;73:4941-4951
- 33 Rijnbrand R, van der Straaten T, van Rijn PA, Spaan WJ, Bredenbeek PJ. Internal entry of ribosomes is directed by 5' noncoding region of classical swine fever virus and is dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initial codon. *J Virol* 1999;71:451-457
- 34 Borman AM, Le Mercier P, Girard M, Kean KM. Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins. *Nucl Acids Res* 1997; 25:925-932
- 35 Ali N, Siddiqui A. The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry sited-mediated translation. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:2249-2254
- 36 Yi M, Lemon SM. Structure-function analysis of the 3' stem-loop of hepatitis C virus genomic RNA and its role in viral RNA replication. *RNA* 2003;9:331-345
- 37 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
- 38 Gontarek RR, Gutshall LL, Herold KM, Tsai J, Sathe GM, Mao J, Prescott C, Del Vecchio AM. hnRNP C and polypyrimidine tract-binding protein specifically interact with the pyrimidine-rich region within the 3' NTR of the HCV RNA genome. *Nucleic Acids Res* 1999;27:1457-1463



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

