

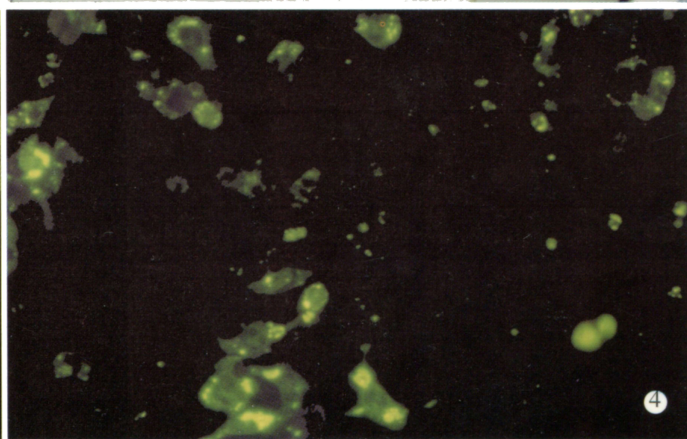
世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003 年 4 月 15 日 第 11 卷 第 4 期

(Volume 11 Number 4)



4/2003

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. 2001 年 JCR® 报告 WJG 影响因子 1.445. 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 4 月 15 日 第 11 卷 第 4 期 (总第 108 期)

述评

373 新基因结构与功能研究的策略 成军

病毒性肝炎

- 378 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因和蛋白的生物信息学分析 成军,李克,陆荫英,王琳,刘妍
- 385 酵母双杂交技术筛选 Hcbp6 结合的肝细胞蛋白编码基因 王琳,李克,成军,陆荫英,张健,陈天艳,洪源,刘妍,王刚,钟彦伟
- 389 噬菌体表面展示技术筛选 HCBP6 人源单链可变区抗体 钟彦伟,成军,张忠东,孙敏,李强,李克,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅
- 394 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析 刘妍,成军,李克,杨倩,陆荫英,王琳,王建军
- 399 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 反式激活的相关基因 牟劲松,刘妍,王刚,成军,段惠娟,李克,陆荫英,王琳,王惠芬

肝 癌

- 404 单克隆抗体 3A5- 复方中药安迪偶联物的肝癌导向治疗 梁军,孙纪元,谢艳华,栗燕,闫露,王四旺
- 408 树突状细胞内外对肝癌细胞的抑制作用 郭建巍,秦力维,蔡美英,吕同德
- 411 肝癌组织中 survivin 蛋白表达的意义 陈涛,贾玉容,田伏洲,蔡忠红,李广阔
- 415 热休克蛋白 70 与 IL-2 对小鼠肝癌移植模型的治疗比较 傅庆国,沈晓东,孟凡东,郭仁宣
- 419 肝癌 DC 疫苗活化的 CTL 对人肝癌裸鼠皮下移植瘤的抑制作用 郭建巍,秦力维,蔡美英

基 础 研 究

- 422 HBeAg 肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆 陆荫英,王琳,李克,刘妍,成军,张玲霞
- 426 酵母双杂交技术筛选 HBeAg 肝细胞结合蛋白基因 陆荫英,王琳,成军,李克,刘妍,张玲霞
- 430 大鼠肝卵圆细胞的生物学特征 陈耀凯,王宇明,李俊刚,郎松
- 434 肝硬变大鼠肝部分切除术后残肝 TGF- α 、HGF、PCNA 和 IGFBP-1s mRNA 的变化 陈平,李昆,董家鸿,韩本立
- 438 细菌内同源重组法构建 HBV S 区和 C 区基因非复制型腺病毒载体及其体外表达 黄呈辉,欧阳玲,马会慧,汤正好,李刚,姚集鲁
- 442 大鼠肠巨噬细胞 TNF α 表达及复方大承气汤的影响 陈海龙,王辉,李文利,范琦
- 446 家兔回肠淋巴管铸型的扫描电镜研究 滕诚毅,王晓平,魏双艳,王广友,汤凤彩

焦 点 论 坛

- 450 酵母单杂交技术的原理及应用 马守东,洪源,成军
- 451 酵母双杂交系统的原理及应用 陈天艳,成军,张树林
- 456 抑制性消减杂交技术原理及应用 杨倩,成军,刘妍,王建军,张树林
- 459 噬菌体展示技术的原理及应用 张忠东,成军,张树林
- 461 基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用 刘妍,成军,王建军,杨倩,陆荫英
- 464 丙型肝炎病毒与 JAK-STAT 信号转导系统 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳
- 466 丙型肝炎病毒与 MAPK 信号转导系统 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳
- 469 肿瘤抑制因子 p21/waf1 与肝炎病毒复制与表达的调节研究 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳
- 472 乙型肝炎病毒对细胞信号转导的影响 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳
- 474 生物信息学技术与新基因的研究 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳

研 究 快 报

- 478 中药复方肠安泰对肠癌肺转移模型小鼠肠黏膜固有层 B 细胞及 IL-12 的影响 王文萍,王垂杰,姜良铎,饭乡正明
- 481 细胞外信号调节激酶在胃癌组织中的表达及其与幽门螺杆菌感染的关系 褚传莲,李延青,张燕,李文婕,赵宪邨

研究快报	483 实验性肝纤维化形成过程中几种基质金属蛋白酶表达的研究 李保森,游绍莉,赵志海,辛绍杰,赵景民,王松山 486 鼠肝移植对胃黏膜损伤的实验研究 褚延魁,马庆久,鲁建国,刘维,何显力,杜锡林,乔庆,王胜智
临床经验	488 重叠丙型肝炎病毒感染在慢性乙型肝炎患者肝脏病变中的作用 商庆华,于建国,徐传镇,肖德明,尹燕明,陈崇兴,张光曙 491 正常人胃左静脉的声象图及血流动力学特征 夏建国,董胜翔,李凤华 494 手术与非手术治疗重症急性胰腺炎 120 例 金世龙,侯庆福,顾红光,王仁云,廖维健
消息	388 欢迎订阅 2003 年度世界华人消化杂志 393 欢迎订阅 2003 年度 World Journal of Gastroenterology® 398 中国科技期刊走向世界的步伐正在加快 403 世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版目次 407 提供您使用世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版 414 世界华人消化杂志和 WJG 获得商标注册 418 美国国立医学图书馆 2002 年度收录中国医学期刊名单 425 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 433 WJG 搭建我国消化化学基础和临床研究惟一国际交流的平台 437 世界胃肠病学杂志英文版获得第二届国家期刊奖百种重点期刊 477 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊
征文通知	429 第五届上海国际肝癌肝炎会议征文启事 480 全国第八届中西医结合普通外科学术研讨会征文通知
电子版	2003 世界华人消化杂志电子版 http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2003.htm 2002 世界华人消化杂志电子版 http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2002.htm 2001 世界华人消化杂志电子版 http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2001.htm 2003 World J Gastroenterol 电子版 http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2003.htm 2002 World J Gastroenterol 电子版 http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2002.htm 2001 World J Gastroenterol 电子版 http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2001.htm
读者来信	493
封面故事	377 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所、基因治疗研究中心

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 2003-04-15
原刊名 新消化病学杂志

总顾问 陈可冀 张金哲
黄象谦 张学庸
黄志强 赵东海
黎介寿 周殿元
刘耕陶 社长总编辑 马连生
裘法祖 中文编辑 潘伯荣
汤钊猷 王瑾晖
王宝恩 英文编辑 任师颜
危北海 排版 李少华
吴孟超 校对 李天华
吴咸中

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()》
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

COMMENTARY

Strategy in study the structure and function of novel gene

Cheng J 373

VIRAL HEPATITIS

Bioinformatics analysis of human hepatitis C virus core protein-binding protein 6 gene and protein

Cheng J, Li K, Lu YY, Wang L, Liu Y 378

Screening of gene encoding of hepatic proteins interacting with Hcbp6 via yeast two hybridization

Wang L, Li K, Cheng J, Lu YY, Zhang J, Chen TY, Hong Y, Liu Y, Wang G, Zhong YW 385

Screen for human single chain variable region in antibody against human hepatitis C virus core protein binding protein 6

Zhong YW, Cheng J, Zhang ZD, Sun M, Li Q, Li K, Wang L, Li L, Zhang LX, Chen JM 389

Gene expression profile of HepG2 cell transfected with hepatitis C virus core protein-binding protein 6 gene

Liu Y, Cheng J, Li K, Yang Q, Lu YY, Wang L, Wang JJ 394

Cloning of genes transactivated by NS3 protein of HCV with suppressive and subtractive hybridization

Mu JS, Liu Y, Wang G, Cheng J, Duan HJ, Li K, Lu YY, Wang L, Wang HF 399

LIVER CANCER

Effect of monoclonal antibody 3A5 coupled with Chinese medicine compound Andi in targeted treatment of hepatocellular carcinoma

Liang J, Sun JY, Xie YH, Li Y, Yan L, Wang SW 404

Inhibition of dendritic cells against hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*

Guo JW, Qin LW, Cai MY, Lu TD 408

Expression of survivin protein in hepatocellular carcinoma tissues and its relationship with clinical pathological features and prognosis.

Chen T, Jia YR, Tian FZ, Cai ZH, Li GK 411

Comparison of therapeutic efficacy between tumor-derived heat shock protein 70 and interleukine-2

Fu QG, Shen XD, Meng FD, Guo RX 415

Cytotoxic lymphocytes primed by DC based hepatocellular carcinoma vaccine against growth of carcinoma xenograft on nude mice

Guo JW, Qin LW, Cai MY 419

BASIC RESEARCH

Screening and cloning of gene encoding HBcAg interacting protein in hepatocytes

Lu YY, Wang L, Li K, Cheng J, Liu Y, Zhang LX 422

Screening of HBcAg interacting proteins in hepatocytes with yeast-two hybrid technique

Lu YY, Wang L, Li K, Liu Y, Cheng J, Zhang LX 426

Biological characteristics of rat hepatic oval cells

Chen YK, Wang YM, Li JG, Lang S 430

Changes of TGF- α , HGF, PCNA and IGFBP-1s mRNA after partial hepatectomy in rat liver

Chen P, Li K, Dong JH, Han BL 434

Construction of replication-deficient recombinant adenoviral vector carrying HBV S and C region gene by homologous recombination in bacteria and its expression *in vitro*

Huang CH, Ou-Yang L, Ma HH, Tang ZH, Li G, Yao JL 438

TNF α expression and effects of Dachengqi Decoction compound in gut macrophages

Chen HL, Wang H, Li WL, Fan Q 442

Lymphatic corrosion casts in rabbit ileum: scanning electronmicroscopic studies

Teng CY, Wang XP, Wei SY, Wang GY, Tang FC 446

FOCUSED FORUM

Principle and applications of yeast single hybridization

Ma SD, Hong Y, Cheng J 450

Principle of yeast two hybridization and its applications

Chen TY, Cheng J, Zhang SL 451

Principle and applications of suppressive and subtractive hybridization technique

Yang Q, Cheng J, Liu Y, Wang JJ, Wang SL 456

Principle of phage display technique and its application

Zhang ZD, Cheng J, Zhong YW, Zhang SL 459

Gene chip technique in the pathogenesis of viral hepatitis

Liu Y, Cheng J, Wang JJ, Yang Q, Lu YY 461

Hepatitis C virus and signal transduction system of JAK-STAT

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 464

Hepatitis C virus and signal transduction system of MAPK

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 466

Tumor inhibitive factor p21/waf1 and regulation of replication and expression of hepatitis virus

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 469

Effect of Hepatitis B virus on cellular signal transduction

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 472

Study on Bioinformatics and new gene

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 474

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi \$

World Chinese Journal of Digestology
Monthly \$ \$

Founded on 15th January, 1993

Renamed on 25th January, 1998

Publication date 15th April, 2003

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

ISSN 1009-3079 **CN** 14-1260/R

Edited by Editorial Board of World Chinese Journal of Digestology
P.O.Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

77, Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Overseas Distributor China International Book Trading Corporation
P.O.Box 399, Beijing 100044, China **Code No.** M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

P.O.Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381892

Fax: +86-10-85381893

Email: wcjd @ wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

Copyright © 2003 by The WJG Press

Indexed/

Abstracted by

Chemical Abstracts

EMBASE/

Excerpta Medica

Abstract Journal

丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析

刘妍,成军,李克,杨倩,陆荫英,王琳,王建军

刘妍,成军,李克,杨倩,陆荫英,王琳,王建军,中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心,全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

刘妍,女,1973-01-15生,辽宁海城市人,满族. 1995年北京医科大学本科毕业,军事医学科学院免疫学专业2002级硕士研究生,助理研究员,主要从事病毒性肝炎基础研究.

国家自然科学基金资助项目, No.C39970674, No.C03011402, 归国留学人员科研启动基金资助项目, No.98H038

项目负责人:成军,100039,北京市丰台路26号,中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心,全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn

电话:010-66933391 传真:010-63801283

收稿日期:2002-10-29 接受日期:2002-11-28

Gene expression profile of HepG2 cell transfected with hepatitis C virus core protein-binding protein 6 gene

Yan Liu, Jun Cheng, Ke Li, Qian Yang, Yin-Ying Lu, Lin Wang, Jian-Jun Wang

Yan Liu, Jun Cheng, Ke Li, Qian Yang, Yin-Ying Lu, Lin Wang, Jian-Jun Wang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Supported by grants from National Natural Science Foundation of China, No. C39970674, No. C03011402, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA, No. 98H038

Correspondence to: Jun Cheng, MD, PhD, Chief, Professor, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 26 Fengtai Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2002-10-29 Accepted: 2002-11-28

Abstract

AIM: To screen and clone genes of hepatic protein interacting with hepatitis C virus (HCV) core protein and analyze the gene expression profiles of HepG2 cell transfected with HCV core protein-binding protein 6 (HCBP6) gene.

METHODS: Using yeast two-hybrid system 3, bait plasmid of HCV core protein was constructed and genes encoding HCV core protein-binding protein were screened and identified. One gene named HCBP6 was identified. Human full-length encoding gene of HCBP6 and its amino acid sequences were identified by bioinformatics method, and the recombinant expression plasmid pcDNA3.1(-)-HCBP6 was constructed. mRNA from HepG2 cells transfected with pcDNA3.1(-)-HCBP6 and the empty vector were detected with cDNA microarray, respectively.

RESULTS: Human HCBP6 cDNA sequence was identified. The coding sequence for human HCBP6 consists of 456 nt and its protein consists of 152 aa. Twenty of 1152 genes obtained from gene expression profile analysis differed from those in GenBank, in which 13 genes were up-regulated and 7 genes

were down-regulated in HepG2 cells transfected with HCBP6 plasmid. These genes differentially regulated by HCBP6 protein included human genes encoding proteins involved in signal transduction, cell proliferation, differentiation, and growth regulation.

CONCLUSION: The bioinformatics combined yeast two hybrid technique is a powerful method for screening and analysis of genes of hepatic protein interacting with HCV core protein. The findings obtained by cDNA microarray technique provided significant data for preliminary understanding of the biological function of new gene, and also provided some clues for further clarifying the molecular biological processes of hepatocytes in interaction between HCV core protein and HCBP6.

Liu Y, Cheng J, Li K, Yang Q, Lu YY, Wang L, Wang JJ. Gene expression profile of HepG2 cell transfected with hepatitis C virus core protein-binding protein 6 gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(4):394-398

摘要

目的: 筛选并克隆丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白的肝细胞结合蛋白基因,并对新基因转染肝癌细胞的基因表达谱进行分析,探索该基因表达对肝细胞基因表达的调节机制.

方法: 应用酵母双杂交技术,以HCV的核心蛋白作为“诱饵(bait)”,筛选鉴定与其结合的肝细胞中蛋白的编码基因.应用生物信息学(bioinformatics)技术,分析其中筛选得到的人HCV核心蛋白结合蛋白6(HCBP6)基因的全长编码序列,并构建HCBP6基因的真核表达载体pcDNA3.1(-)-HCBP6.应用基因表达谱芯片技术对重组表达质粒pcDNA3.1(-)-HCBP6转染的HepG2细胞和空载体处理的相同细胞差异表达的mRNA进行检测.

结果: 通过酵母双杂交技术的筛选和鉴定,结合生物信息学分析,确定人的HCBP6基因由456 nt组成,编码152 aa的蛋白.基因表达谱芯片所检测的1152条目的基因均为GenBank中登录的基因,HCBP6表达质粒转染的细胞有20条差异表达基因,其中13条基因表达增强,7条基因表达降低.这些差异表达的基因与细胞信号转导、增生、分化及生长调节密切相关.

结论: 酵母双杂交技术结合生物信息学技术,是克隆蛋白结合蛋白的有效方法,基因表达谱芯片技术对于初步全面探索新基因的功能提供重要的资料.本实验结果为进一步阐明HCV核心蛋白与Hcbp6相互作用后的肝细胞生物

大分子变化提供了理论依据.

刘妍, 成军, 李克, 杨倩, 陆荫英, 王琳, 王建军. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析. 世界华人消化杂志 2003;11(4): 394-398
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/394.htm>

0 引言

肝炎病毒蛋白与宿主蛋白相互作用, 可能是病毒感染导致肝细胞损伤、肝纤维化和肝细胞癌发生、发展的重要原因. 丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白是一种多功能蛋白质, 除了作为核壳蛋白具有病毒颗粒组装功能外, 还具有多种调控细胞及病毒基因表达、细胞凋亡、细胞增生与分化以及免疫调节等功能. 临床和实验研究显示 HCV 核心蛋白在病毒致病过程中起到重要的作用^[1-7].

为更好地了解 HCV 核心蛋白与肝细胞蛋白之间的相互作用, 我们采用酵母双杂交系统 3, 以 HCV 核心蛋白作为“诱饵”, 对于肝细胞 cDNA 文库进行酵母双杂交筛选, 获得了一些与 HCV 核心蛋白结合的肝细胞蛋白的编码基因, 其中包括功能未知基因 6 号, 我们命名为 HCV 核心蛋白结合蛋白 6(HCBP6). 为进一步探索该基因的功能, 我们应用基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)筛选 HCBP6 表达质粒转染 HepG2 细胞后的差异表达基因, 并应用生物信息学(bioinformatics)对差异表达的基因进行分析. 本研究为全面了解 HCBP6 基因在肝细胞中的生物过程提供理论基础.

1 材料和方法

1.1 HCV 核心蛋白结合蛋白的酵母双杂交筛选 应用酵母双杂交技术筛选 HCV 核心蛋白结合的肝细胞蛋白的研究原理、方法、操作步骤以及 HCBP6 基因真核表达载体的构建等参考基因治疗研究中心相关的研究论文^[8-11].

1.2 总 RNA 提取及 mRNA 纯化 在 35 mm 培养皿中常规培养肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞(由本室保存), 细胞生长至对数期时, 分别以脂质体转染试剂 Lipofectamine PLUS(购自 Invitrogen 公司)将 2 μ g pcDNA3.1(-)-HCBP6 和空载体 pcDNA3.1(-)转染 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞, 每 5 \times 10⁶ 个细胞加入 1 mL 总 RNA 提取试剂 Trizol(购自 Invitrogen 公司). 立即于液氮中保存. 使用 Trizol 试剂一步法提取 HCBP6 表达质粒 pcDNA3.1(-)-HCBP6 和空载体 pcDNA3.1(-)转染的 HepG2 细胞总 RNA (分别标记为实验组和对照组), 样品经分光光度计检测吸光度 A 值, 并行热稳定实验, 于 -20 和 70 保温 1 h 后, 经琼脂糖凝胶电泳检测 28 S、18 S 条带变化. 以 Qiagen 公司 Oligotex mRNA Midi Kit 纯化得 mRNA. 操作按说明书进行, 并行电泳检测.

1.3 探针标记及芯片制备 参照 Yang et al^[14]方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化. Cy3-dUTP 标记对照组细胞 mRNA(5 μ g), Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA(5 μ g). 乙醇沉淀后溶解在 20 μ L 5 \times SSC+2 g/L SDS 杂交液中.

芯片包含的 1 152 个 cDNA 由上海联合基因有限公司提供, 包括原癌基因和抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等. 以通用引物进行 PCR 扩增, PCR 产物长度为 1-3 kb. 靶基因以 0.5 μ g / μ L 溶解于 3 \times SSC 溶液中, 用 Cartesian 公司的 Cartesian 7 500 点样仪及 TeleChem 公司的硅烷化玻片进行点样. 玻片经水合(2 h)、室温干燥(0.5 h), UV 交联, 再分别用 2 g/L SDS、水及 2 g/L 的硼氢化钠溶液处理 10 min, 晾干备用.

1.4 杂交及洗涤 将基因芯片和杂交探针 95 水浴变性 5 min, 将混合探针加在基因芯片上, 置于 60 杂交 15-17 h. 依次以 2 \times SSC+2 g/L SDS、1 g/L \times SSC+2 g/L SDS、1 g/L \times SSC 洗涤 10 min, 室温晾干.

1.5 检测与分析 用 General Scanning 公司的 ScanArray 3 000 扫描芯片. 用预先选定的内参照基因(24 条管家基因, 每个基因点 2 个点, 共 48 个点)对 Cy3 和 Cy5 的原始提取信号进行均衡和修正. 用 ImaGene3.0 软件分析 Cy3、Cy5 两种荧光信号的强度, 计算 Cy5/Cy3 比值. 阳性结果判断: Cy5/Cy3 > 1.8, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3 < 0.7, 为绿色荧光, 显示表达减低.

2 结果

2.1 以 HCV 核心蛋白为“诱饵”对于肝细胞文库酵母双杂交筛选结果 经过以 HCV 核心蛋白为“诱饵”的肝细胞 cDNA 文库的酵母双杂交, 筛选出与 HCV 核心蛋白结合的一系列阳性克隆. 根据克隆的随机编号, 将这一基因编码产物命名为 HCV 核心蛋白结合蛋白 6(HCBP6), 该基因由 456 nt 组成, 编码 152 aa 组成的蛋白^[8-11].

2.2 总 RNA 及 mRNA 的定性、定量分析 提取 HCBP6 表达质粒 pcDNA3.1(-)-HCBP6 和空载体 pcDNA3.1(-)转染的 HepG2 细胞总 RNA, 测得吸光度 A₂₆₀/A₂₈₀ > 1.90, 热稳定实验 70 保温 1 h 与 -20 1 h 电泳条带比较, 显示 28 S 条带无明显降解, 电泳结果证实已抽提高纯度的总 RNA. mRNA 主要集中于 0.9-4.0 kb 的连续条带.

2.3 芯片杂交体系验证及结果分析 在芯片上共有 1 152 个 cDNA. 为了监控芯片杂交技术体系的整个过程, 在芯片上设置了阴性对照(8 条水稻基因, 共 8 个点), 这些点的杂交信号均很低, 证实了数据的可靠性. 由于实验组探针标记 Cy5 荧光素(呈红色), 对照组探针标记 Cy3 荧光素(呈绿色), 红绿颜色的差异就显示该基因在实验组和对照组中基因表达水平上的差异, 黄色代表表达水平无差异. 按阳性标准, 从 1 152 个基因中筛选出差异常表达基因共 20 条, 其中 13 条基因表达增强, 7 条基因表达降低.

2.4 差异表达基因分析 表达增强的基因主要有四类: (1) 细胞生长调节相关基因, 如胰腺肿瘤相关蛋白, 神经纤维瘤病 2 肿瘤抑制蛋白斯库瓦诺明的相互作用蛋白 1 以及 20 号染色体开放读框 1 等; (2) 细胞信号转

导相关基因,如表皮生长因子受体,神经生长因子 β 多肽,跨膜受体蛋白,蛋白磷酸酶2调节亚基等;(3)DNA复制及翻译相关基因,如RNA结合基序蛋白,微小染色体维持缺陷3蛋白,新生多肽相关复合体等;(4)免疫调节因

子,如白介素10受体.表达增强的基因见表1.表达降低的基因主要有:(1)过氧化酶相关基因,如细胞质的环氧化物水解酶,过氧化物歧化酶等;(2)线粒体相关的基因,如细胞色素P450等.表达降低的基因见表2.

表1 表达增强的基因

GenBank 登录号	编码蛋白	Cy5/Cy3
NM_005228	表皮生长因子受体 epidermal growth factor receptor (EGFR)	1.803
NM_025263	来源于 MHC-I 分子的富含脯氨酸的蛋白 CAT56 protein (CAT56)	1.833
NM_003564	平滑肌分化特异性蛋白 transgelin 2 (TAGLN2)	1.835
NM_005777	RNA 结合基序蛋白 RNA binding motif protein 6 (RBM6)	1.856
NM_002506	神经生长因子 多肽 nerve growth factor ,beta polypeptide (NGFB)	1.896
AF311912	胰腺肿瘤相关蛋白 pancreas tumor - related protein (FKSG12)	1.941
NM_001558	白介素10受体 interleukin 10 receptor , alpha (IL10RA)	1.959
Z17227	跨膜受体蛋白 transmembrane receptor protein	1.983
NM_014225	蛋白磷酸酶2调节亚基 protein phosphatase 2 , regulatory subunit A (PR 65)	2.083
NM_002388	微小染色体维持缺陷3蛋白 minichromosome maintenance deficient 3 (MCM3)	2.262
NM_014575	神经纤维瘤病2肿瘤抑制蛋白 schwannomin 的相互作用蛋白 1 schwannomin interacting protein 1 (SCHIP1)	2.362
NM_012112	20 号染色体开放读框 1 chromosome 20 open reading frame 1 (C20orf1)	2.486
NM_005594	a polypeptide (NACA)	4.750

表2 表达降低的基因

GenBank 登录号	编码蛋白	Cy5/Cy3
NM_005161	血管紧张素受体样蛋白 1 angiotensin receptor - like 1 (AGTRL1)	0.485
NM_000732	T 细胞抗原受体相关的复合物 链 CD3D antigen , delta polypeptide (TiT3 complex) (CD3D)	0.512
NM_001423	上皮膜蛋白 1 epithelial membrane protein 1 (EMP1)	0.545
NM_001979	细胞质的环氧化物水解酶 epoxide hydrolase 2 , cytoplasmic (EPHX2)	0.611
NM_000104	细胞色素氧化酶 P450 cytochrome P450	0.665
NM_000699	胰腺淀粉酶 2A amylase , alpha 2A; pancreatic (AMY2A)	0.678
NM_000454	过氧化物歧化酶 superoxide dismutase 1 , soluble (SOD1)	0.689

3 讨论

HCV 基因组含有单一的开放读码框架,编码3010-3033个氨基酸残基的多肽前体,两侧是5'-非翻译区及3'-非翻译区.多肽前体至少被加工为10种结构蛋白和非结构蛋白,HCV各结构和非结构蛋白在肝细胞内并不是孤立存在的,与宿主肝细胞蛋白之间相互作用可能是HCV致病的分子生物学基础^[12-17].HCV核心蛋白是一种多功能蛋白质,除了作为核壳蛋白具有病毒颗粒组装功能外,还调控多种细胞及病毒基因启动子的活性,具有广泛的反式调节作用.研究显示,核心蛋白可以和宿主的多种蛋白质如淋巴毒素 β 受体、核糖核蛋白K、RNA螺旋酶、DBX等相互作用,影响细胞的正常生理过程^[18-21].表达HCV核心蛋白的转基因鼠不仅引起肝脂肪变性而且引起肝细胞癌^[22,23].可见HCV核心蛋白在HCV发病机制中起重要作用.为进一步研究HCV核心蛋白与宿主肝细胞蛋白的相互作用,我们用肝细胞cDNA文库与HCV核心蛋白诱饵进行酵母双杂

交,结合生物信息学分析,筛选并克隆了与HCV核心蛋白相互作用的新的蛋白质基因HCBP6^[9,11,24].我们构建了HCBP6基因的真核表达载体,初步研究发现该基因的表达在一定程度上抑制了HCV核心蛋白对SV40早期启动子的反式激活作用.本研究采用基因表达谱芯片方法筛选HCBP6基因转染细胞差异表达基因,以期综合分析HCBP6基因的生物功能.

基因表达谱芯片是将大量的基因特异探针或其cDNA片段固定在一块基因芯片上,对来源不同的个体、不同组织、不同细胞周期、不同发育阶段、不同分化阶段、不同病变、不同刺激(包括不同诱导、不同治疗手段)下的细胞内的mRNA或逆转录产物cDNA进行检测,从而大规模对这些基因表达的个体特异性、组织特异性、发育阶段特异性、分化阶段特异性、病变特异性、刺激特异性进行综合分析和判断^[25-28].本研究应用基因表达谱芯片对HCBP6表达质粒pcDNA3.1(-)-HCBP6转染的HepG2细胞和空载体处理的相同细胞差异表达的

mRNA 进行检测, 通过分析二者之间基因表达的差异信息, 寻找 HCBP6 上调或下调的基因. 在 1 152 个基因中筛选出 20 个差异表达基因, 这些差异调节基因大多与细胞信号传导、细胞增生分化、免疫调节、肿瘤发生等生物过程密切相关.

在表 1 的上调基因中, 有多条基因与细胞生长调节密切相关, 如神经纤维瘤病 2 肿瘤抑制蛋白斯库瓦诺明的相互作用蛋白 1 基因分布在人染色体 3q25, 斯库瓦诺明是负性生长调节因子, 可以与肝细胞生长因子调节的酪氨酸激酶作用底物(HRS)相互作用, 发挥其生物功能^[29]. 20 号染色体开放读框 1, 为细胞周期 S、G₂、M 期增生相关的核蛋白 P100, 该蛋白的检出预示肿瘤的预后差^[30]. HCBP6 蛋白通过调控上述基因的表达, 影响肝细胞基因的增生与分化, 可能是其协同 HCV 核心蛋白致病的主要机制之一. 一些细胞信号转导相关基因, 如表皮生长因子受体, 神经生长因子 β 多肽, 跨膜受体蛋白, 蛋白磷酸酶 2 调节亚基等基因的表达上调^[31], 表明 HCBP6 蛋白参与了细胞信号转导及细胞增生与分化的调控, 影响肝细胞基因组的表达. 微小染色体维持缺陷 3 蛋白是 DNA 复制中起重要作用的核蛋白^[32], 新生多肽相关复合体能够与核糖体携带的新生肽结合, 从而阻止新生肽与胞质中其他蛋白的异常相互作用, 此外, 该复合体是 12 号染色体的转录反式激活因子^[33]. 可见 HCBP6 蛋白在调节 DNA 复制及蛋白翻译成熟修饰过程中起重要作用. 免疫调节因子, 白介素 10 受体表达增强, 提示 HCBP6 蛋白可能具有一定的免疫调节作用.

分析部分表达降低的基因主要有: 过氧化酶相关基因, 如过氧化物歧化酶, 在清除自由基介导的细胞内大分子损伤过程中起重要作用; 又如细胞质的环氧化物水解酶, 生理条件下, 能够水解经细胞色素 P450 催化产生的环氧化物为二醇, 自胆汁、尿中排泄. 当水解功能缺陷时, 环氧化物可在肝内蓄积, 与细胞内大分子物质共价结合, 导致一系列的病理改变. HCBP6 基因通过下调上述基因的表达水平, 在一定程度上妨碍了肝细胞的损伤后修复, 扰乱肝细胞生长调节, 甚至诱发自身免疫性肝损害及肝癌. 此外, 线粒体能量代谢相关的基因, 如细胞色素氧化酶 P450, 能够直接激活分子氧, 参与药物和毒物的转化. 该基因表达降低, 暗示机体对许多药物及毒物的摄取、转化发生障碍, 易积蓄中毒, 可见 HCBP6 基因通过下调细胞色素氧化酶 P450 的表达, 参与了肝脏的生物转化作用. HCBP6 还下调 T 细胞抗原受体相关复合物的表达, 参与 T 细胞免疫调节. 结合表 1 的结果, 我们发现 HCBP6 蛋白双相调节细胞的生长, HCBP6 独自存在是否足以引起细胞病变, 还需要深入研究, 而与 HCV 核心蛋白相互作用可能是 HCV 的致病机制之一.

总之, 利用基因表达谱芯片对 HCBP6 蛋白差异调节基因的表达研究表明, 细胞内 HCBP6 蛋白的过表达引起的生物过程涉及许多不同基因表达的变化, 这些基因与细胞信号转导、细胞增生与分化、免疫调节、

肿瘤发生、能量代谢及生物转化等生物过程密切相关. 本研究结果为进一步了解 HCBP6 基因的生物学功能及其与 HCV 核心蛋白相互作用过程中致病(癌)的分子生物学机制提供重要的线索.

4 参考文献

- Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-virus core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000; 32:405-412
- Ray RB, Lagging LM, Meyer K, Steele R, Ray R. Transcriptional regulation of cellular and viral promoters by the hepatitis C virus core protein. *Virus Res* 1995; 37: 209-220
- 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- Cheng J. Molecular pathogenesis of viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:A185
- 刘妍, 成军. 丙肝病毒致肝细胞癌的生物分子生物学机制. 国外医学流行病学传染病学分册 2000; 27:10-13
- 刘妍, 成军, 邵得志, 王琳, 钟彦伟, 夏小兵. 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活 SV40 病毒早期启动子 / 增强子的研究. 军医进修学院学报 2001;22:186-188
- 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 董菁, 洪源, 张跃新, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因. 解放军医学杂志 2001;26:880-883
- 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 陆荫英, 夏小兵, 李莉, 杨继珍. 丙型肝炎病毒核心蛋白基因表达载体的构建及在酵母中的表达. 军医进修学院学报 2002;23:1-3
- 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆 HCV 核心蛋白结合蛋白基因 1. 世界华人消化杂志 2001;9:1379-1383
- 李克, 王琳, 成军, 张玲霞. HCBP6 基因转染促进哺乳动物细胞增生作用的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:000-000
- 成军, 李克, 陆荫英, 王琳, 刘妍. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因和蛋白的生物信息学分析. 世界华人消化杂志 2002;11:378-384
- Caselmann WH, Serwe M, Lehmann T, Ludwig J, Sproat BS, Engels JW. Design, delivery and efficacy testing of therapeutic nucleic acids used to inhibit hepatitis C virus gene expression in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol* 2000;6:626-629
- Song ZQ, Hao F, Min F, Ma QY, Liu GD. Hepatitis C virus infection of human hepatoma cell line 7721 in vitro. *World J Gastroenterol* 2001; 7:685-689
- Yang JM, Wang RQ, Bu BG, Zhou ZC, Fang DC, Luo YH. Effect of HCV infection on expression of several cancer associated gene products in HCC. *World J Gastroenterol* 1999;5:25-27
- Zhou HC, Xu DZ, Wang XP, Zhang JX, Huang Y, Yan YP, Zhu Y, Jin BQ. Identification of the epitopes on HCV core protein recognized by HLA A2 restricted cytotoxic T lymphocytes. *World J Gastroenterol* 2001;7:583-586
- 周永兴, 冯志华, 贾战生, 连建奇, 李谨华, 李文波. 丙型肝炎病毒核心基因免疫研究. 世界华人消化杂志 1998; 6:966-968
- 杜竞辉, 查文章. 丙型肝炎与原发肝癌关系研究现状. 世界华人消化杂志 1999; 7:176-179
- 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 丙型肝炎病毒蛋白结合蛋白. 世界华人消化杂志 2002;10:215-217
- Mamiya N, Worman HJ. Hepatitis C virus core protein binds to a DEAD box RNA helicase. *J Biol Chem* 1999;274:15751-15756
- You LR, Chen CM, Yeh TS, Tsai TY, Mai RT, Lin CH, Lee YH. Hepatitis C virus core protein interacts with cellular putative RNA helicase. *J Virol* 1999;73: 2841-2853
- Chen CM, You LR, Hwang LH, Lee YH. Direct interaction of hepatitis C virus core protein with the cellular lymphotoxin-beta receptor modulates the signal pathway of the lymphotoxin-beta receptor. *J Virol* 1997; 71:9417-9426
- Ray RB, Lagging LM, Meyer K, Ray R. Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. *J Virol* 1996; 70: 4438-4443
- Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Ishibashi K, Matsuura Y, Kimura S, Miyamura T, Koike K. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma

- in transgenic mice. *Nat Med* 1998;4:1065-1067
- 24 李克,王琳,成军,陆荫英,张玲霞,牟劲松,洪源,刘妍,段惠娟,王刚,李莉,陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白与染色体转位蛋白的相互作用. *中华医学杂志* 2002; 82:673-677
- 25 Schena M, Shalon D, Dais RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270:467-470
- 26 李瑶,陈菊祥,裘敏燕,应康,陈沁,符薇,王品,沈娴,谢毅,毛裕民. 基因芯片的制备研究. *第二军医大学学报* 2000; 21: 812-814
- 27 Zhang MQ. Large-scale gene expression data analysis: a new challenge to computational biologists. *Genome Res* 1999;9:681-688
- 28 Bigger CB, Brasky KM, Lanford RE. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol* 2001;75:7059-7066
- 29 Goutebroze L, Brault E, Muchardt C, Camonis J, Thomas G. Cloning and Characterization of SCHIP-1, a Novel Protein Interacting Specifically with Spliced Isoforms and Naturally Occurring Mutant NF2 Proteins. *Mol Cell Biol* 2000; 20:1699-1712
- 30 Heidebrecht HJ, Buck F, Steinmann J, Sprenger R, Wacker HH, Parwaresch R. p100: a novel proliferation associated nuclear protein specifically restricted to cell cycle phases S, G2, and M. *Blood* 1997;90:226-233
- 31 Sundaresan P, Farndale R. p38 mitogen-activated protein kinase dephosphorylation is regulated by protein phosphatase 2A in human platelets activated by collagen. *FEBS Lett* 2002; 528:139-148
- 32 Kubota Y, Mimura S, Nishimoto S, Takisawa H, Nojima H. Identification of the yeast MCM3-related protein as a component of *Xenopus* DNA replication licensing factor. *Cell* 1995; 81: 601-609
- 33 Wiedmann B, Sakai H, Davis TA, Wiedmann M. A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature* 1994;370:434-440

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国科技期刊走向世界的步伐正在加快

截止到2002年7月,中国被著名检索系统SCI收录的科技期刊数从63种增加到了67种.从制作SCI的美国ISI(美国科学情报所)发布的JCR(期刊引证报告)上的数据看,有指标数据的59种我国科技期刊中,80%以上的期刊影响因子呈上升趋势;约90%的总被引频次都提高了.

在2001年的JCR中,总被引频次超过1000次的中国科技期刊有4个,他们是《高等学校化学学报》(中文版)(1959次),《科学通报》(1628次),《物理学报》(中文版)(1227次),《中国物理快报》(1215次)

首次有两个中国科技期刊的影响因子超过1,他们是《细胞研究》(2.102)和《世界胃肠病学杂志》(1.445),这两种期刊均为中国英文版科技期刊.

从期刊影响因子在本学科的排位看,进入SCIE的我国科技期刊,有8个期刊排在本学科的中上水平,他们是《力学学报》,《高等学校化学学报》(中文版),《中国物理》,《中国物理快报》,《科学通报》,《中国科学B》,《中国科学E》,《中国有色金属学报》.

在本学科国际期刊中,我国有10个期刊被引频次位于中上水平的.他们是:《科学通报》,《高等学校化学学报》(中文版),《中国科学A》,《物理学报》(中文版),《中华医学杂志》,《化学学报》(中文版),《中国物理快报》,《中国有色金属学报》(英文版),《中国科学B》,《中国药理学报》.

在SCI网络版收录的中国科技期刊中,有25个期刊是由中国科学出版社出版的,其中在JCR中有指标的期刊有18个.

另外,除SCI系统外,中国科技期刊被其他几个重要国际检索系统收录的数量也呈上升趋势.例如,在反映工程技术论文的历史超百年的检索系统《EI》(工程索引)中,中国被收录的科技期刊从最少时的40种,增加到了2000年的104种.这也直接反映了我国科技期刊被国际认可的程度.

国家科技部中国科技信息研究所,每年对我国科技期刊在国内的情况做出统计分析,定期出版《中国科技期刊引证报告》.以2000年数据看,我国科技期刊的平均影响因子由上一年的0.208上升到0.240,其中影响因子超过1的有20个;总被引频次的平均值达到了192.2次,总被引频次超过1000次的期刊有25个,其中《科学通报》的总被引频次达到了2979次.

目前,我国科技期刊数量已达到4600余种,已经形成了一定的规模,而且门类相对齐全,为我国基础研究的发展和科研成果转化为生产力做出了重要的贡献,但我们承认中国的科技期刊发展水平与世界发达国家之间存在较大的差距.随着中国加入WTO,对于中国的科技期刊,既是机遇又是挑战.我们相信,通过我国学术界和编辑部门的共同努力,一定会在不远的将来产生一批具有国际水准的科技期刊.

(2002-11-08)



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

