

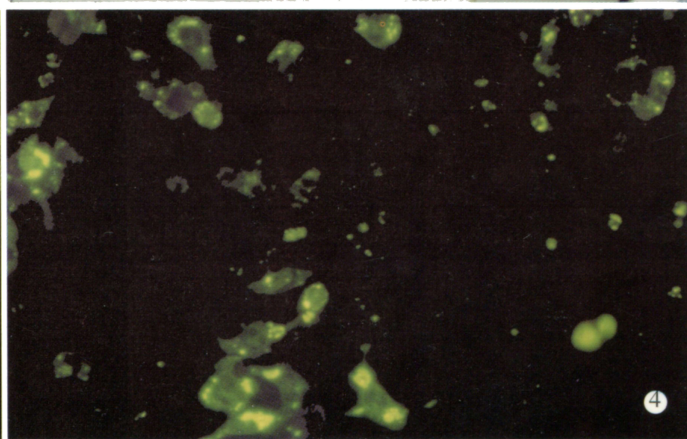
# 世界华人消化杂志®

**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- $\alpha$ 、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 $\alpha$  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 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2003.htm">http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2003.htm</a> 2002 世界华人消化杂志电子版 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2002.htm">http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2002.htm</a> 2001 世界华人消化杂志电子版 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2001.htm">http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2001.htm</a> 2003 World J Gastroenterol 电子版 <a href="http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2003.htm">http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2003.htm</a> 2002 World J Gastroenterol 电子版 <a href="http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2002.htm">http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2002.htm</a> 2001 World J Gastroenterol 电子版 <a href="http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2001.htm">http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2001.htm</a>
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- $\alpha$ , 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 $\alpha$  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

# 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

陆荫英,王琳,李克,刘妍,成军,张玲霞,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  
陆荫英,女,1973-08-27生,贵州省贵阳市人,汉族,1995年贵阳医学院临床医学系毕业,博士生,主治医师,主要从事肝病的基础及临床研究。  
军队回国留学人员启动基金资助课题, No.98H038  
项目负责人:成军,100039,北京市,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:010-66933392 传真:010-63801283  
收稿日期:2002-10-29 接受日期:2002-11-28

## Screening and cloning of gene encoding HBeAg interacting protein in hepatocytes

Yin-Ying Lu, Lin Wang, Ke Li, Yan Liu, Jun Cheng, Ling-Xia Zhang

Yin-Ying Lu, Lin Wang, Ke Li, Yan Liu, Jun Cheng, Lin-Xia Zhang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China  
Correspondence to: Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn  
Received: 2002-10-29 Accepted: 2002-11-28

### Abstract

**AIM:** To screen hepatic proteins interacting with hepatitis B virus e antigen (HBeAg) with yeast-two hybrid technique for investigating the function of HBeAg protein.

**METHODS:** HBeAg bait plasmid was constructed by ligating the HBeAg gene with plasmid pGBKT7, then transformed into yeast  $\alpha$ -AH109. The transformed yeast cells were amplified and mated with yeast cells  $\alpha$ -Y187 containing liver cDNA library plasmid pCAT2 in 2  $\times$  YPDA medium. Diploid yeast cells were plated on synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) and synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) containing x- $\alpha$ -gal for selecting twice and screening. After extracting plasmid from blue colonies, plasmid was transformed into competence E.coli and analyzed by DNA sequencing. Twenty genes were obtained from 39 positive colonies, which included five new genes.

**RESULTS:** Twenty genes in thirty nine positive colonies were obtained including three metallothionein 2 A, eight complement component 8 alpha polypeptide, one complement component 1q, one complement factor H, one retinoic acid receptor responder (tazarotene induced), two cytochrome b, three D-amino-acid oxidase, three ferritin light polypeptide, two NAD(P)H dehydrogenase  $\beta$ , four aldolase B, one CD81, one syndecan 1, one 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2, one dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A transcript variant 1, one 3-hydroxysteroid epimerase, one ATP synthase 6 and five new genes.

**CONCLUSION:** Genes encoding HBeAg interacting proteins in hepatocytes were successfully cloned and the results provided some new clues for studying the biological functions of

HBeAg and its associated proteins.

Lu YY, Wang L, Li K, Liu Y, Cheng J, Zhang LX. Screening and cloning of gene encoding HBeAg interacting protein in hepatocytes. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(4):422-425

### 摘要

**目的:** HBeAg 被认为与 HBV 引起免疫耐受、免疫系统功能障碍有关。筛选并克隆人肝细胞 cDNA 文库中与乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)相互作用蛋白的基因,明确其具体作用机制。

**方法:** 应用酵母双杂交系统 3, 将多聚酶链反应(PCR)法扩增的 HBeAg 基因连接入酵母表达载体 pGBKT7 中构建诱饵质粒, 转化酵母细胞 AH109 并在其内表达, 然后与转化了人肝 cDNA 文库质粒 pACT2 的酵母细胞 Y187 进行配合, 在营养缺陷型培养基和 X- - 半乳糖(X- - gal)上进行双重筛选阳性菌落, 提取阳性酵母菌落的质粒转化大肠杆菌, 接种在氨苄青霉素-LB 平板上选择并测序, 结果在 GenBank 中进行生物信息学分析。

**结果:** 成功克隆出 HBeAg 基因并在酵母细胞中表达, 与肝 cDNA 文库配合后选出既能在四缺(SD/-Trp-Leu-Ade-His)培养基又能在铺有 X- - gal 的四缺培养基上生长, 并变成蓝色的真阳性菌落 39 个, 其中有 5 个未知基因, 3 个含金属硫蛋白 2A 基因的菌落, 8 个补体 8 基因, 1 个补体因子 H, 1 个补体 1q, 1 个维甲酸受体应答元件 2 基因、2 个细胞色素 b 基因、3 个铁蛋白轻链, 2 个 NAD(P)H 脱氢酶亚基, 1 个 3- 羟基类固醇表位酶, 1 个 3- 羟基, 3- 甲基戊二酰辅酶 A 合成酶, 1 个双- 特异性酪氨酸-Y- 磷酸化调节激酶 1A 转录子突变体, 1 个 Syndecans-1, 3 个 2 胺氧化酶, 4 个醛缩酶 B, 1 个 CD81, 1 个 ATP 合成酶 6 基因。

**结论:** 成功克隆出乙型肝炎病毒 e 抗原的结合蛋白, 为进一步研究 HBeAg 在病毒装配、分泌、影响宿主免疫系统功能等方面的具体作用提供了新线索。

陆荫英,王琳,李克,刘妍,成军,张玲霞. HBeAg 肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆. 世界华人消化杂志 2003;11(4):422-425  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/422.htm>

### 0 引言

乙型肝炎病毒 e 抗原是核壳蛋白的分泌型, 现普遍认



为他是一种免疫耐受因子, 调节免疫发病机制<sup>[1]</sup>. 研究表明 HBeAg 可阻断细胞毒性 T 淋巴细胞, 优先清除对 HBcAg 特异的 Th1 细胞, 使免疫应答转换为 Th2 细胞亚型, 将免疫攻击有感染的肝细胞转移开, 在感染个体引起免疫耐受状态(高水平的病毒血症和对感染细胞免疫反应的抑制), 使 HBV 逃避免疫清除, 得以在健康携带者中长期存在<sup>[2]</sup>. 但 HBeAg 与肝细胞之间的相互作用的机制不清, 此方面的研究较少, 我们认为从寻找 HBeAg 与肝细胞间的相互作用蛋白入手, 进一步探明具体机制, 可发现一些新的线索<sup>[3-8]</sup>.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** AH109 酵母菌株(MA Ta, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4, gal80, LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3, GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2URA3::MEL1<sub>TATA</sub>-lac Z MEL1)、预转化的 cDNA 肝文库(Y187)、pGBKT7-BD 克隆载体及酵母 YPD 培养基、SD/-Trp、SD/-Leu, SD/-Trp/-Leu/-His, SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 等培养基、X- $\beta$ -gal 购于 Clontech 公司. 大肠杆菌 DH5 及 HBV ayw 亚型基因全序列质粒载体 pCP10 为本室保存, c-myc 单克隆抗体本室自制, 由购自 ATCC 的 1-9E10.2 杂交瘤产生. 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 购于北京中山生物公司. Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、EcoR I 和 Pst I 购于 Takara 生物公司. 丙烯酰胺、N, N'-亚甲双丙烯酰胺、IPTG 及 X- $\beta$ -Gal 及 pGEM-T 载体购于 Promega 公司. TEMED 购于宝林曼公司. 醋酸锂、半硫酸腺苷购于 Sigma 公司. HBeAg 扩增引物(P1 5'-GAATTC ATGCAACTTTTTTACCTCTG 3', P2 5'-CTGCAG GCCCAAAGCCACCCAAGGC 3', 合成及 DNA 测序由上海博亚公司承担.

**1.2 方法** (1)诱饵质粒的构建及表达:PCR 扩增 HBeAg 基因与 pGBKT7 载体连接, 酶切鉴定后转化入酵母菌株 AH109, 提取酵母蛋白质用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和 Western 免疫印迹法验证 HBeAg 在酵母中的表达. (2)诱饵与肝文库的酵母配合:挑取在 SD/-Trp 培养基上生长的 pGBKT7-HBcAg 质粒的酵母 AH109 菌落 1 到数个接种于 SD/-Trp 培养基中, 30~250 r·min<sup>-1</sup> 振摇过夜, 次日离心后用 2 × YPDA 培养液 5 mL 重悬细胞, 计数细胞数>1 × 10<sup>12</sup>·L<sup>-1</sup> 时与 1 mL 的肝文库酵母细胞在 50 mL 2 × YPDA 中 30~50 r·min<sup>-1</sup> 配合 18-24 h, 离心用 1 × YPDA 10 mL 重悬细胞, 分别取 250  $\mu$ L 铺于 15 cm 的 SD/-Trp/-Leu/-His(3 缺), SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade(4 缺)培养基各 25 块上, 同时将配合产物按 1:10、1:100、1:1 000 铺于 SD/-Trp/-Leu 培养基上检验配合效率. 生长 6-18 d 后挑取大于直径 3 mm 的菌落再次画线于铺有 X- $\beta$ -gal 的 4 缺培养基上检查 X- $\beta$ -gal 酶活性, 在此培养基上能生长且变成蓝色的为真阳性菌落. 提取阳性酵母细胞中

的质粒, 电穿孔法转化大肠杆菌, 氨苄青霉素平板筛选阳性克隆并测序.

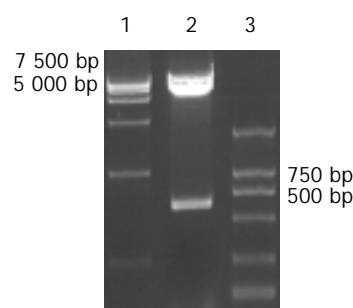
## 2 结果

**2.1 pGBKT7-HBeAg 重组诱饵质粒的构建及表达** 利用自行设计的引物 P1/P2 成功扩增出 HBeAg 基因片段, 测序结果显示完全符合报告序列. 用 EcoR I 及 Pst I 双酶切所得片段, 连接到用相同酶所切的 pGBKT7 载体中, 经酶切鉴定结果正确(图1). 由此表明 HBeAg 基因已按正确方向克隆入酵母表达载体 pGBKT7 中, pGBKT7-HBeAg 质粒构建成功. 用醋酸锂法将诱饵质粒转化入酵母 AH109 株后在 SD/-Trp 培养基上筛选生长 6-8 d, 挑取阳性菌落培养后提取酵母蛋白质, 进行 SDS-PAGE 和 Western 免疫印迹分析结果(图 2). 结果显示对照无表达, 而转化了 pGBKT7-HBeAg 的酵母蛋白提取物 Western 印迹分析可见明显目的条带, 且无杂带, 说明 HBeAg 基因已成功地在酵母中表达.

**2.2 诱饵与肝文库酵母菌株配合结果** 配合后筛选出既能在四缺(SD/-Trp-Leu-Ade-His)培养基又能在铺有 X- $\beta$ -半乳糖(X- $\beta$ -gal)的四缺培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落(表 1).

表 1 HBeAg 与肝文库筛选结果

同源蛋白质	同源性	相同克隆数
维甲酸受体应答元件 3(他佐罗汀诱导)	100 %	1
醛缩酶 B	100 %	4
NADH 脱氢酶 $\beta$	99 %	2
补体蛋白 H	100 %	1
补体 1q	99 %	1
补体 C8A	100 %	8
金属硫蛋白 2A	100 %	3
2 胺氧化酶	99 %	3
细胞色素 B	99 %	2
3- 羟基类固醇表位酶	99 %	1
铁蛋白轻链	100 %	3
未知蛋白	99 %	5
CD81	100 %	1
3- 羟基, 3- 甲基戊二酰辅酶 A 合成酶	99 %	1
双 - 特异性酪氨酸 -Y- 磷酸化调节激酶 1A	99 %	1
转录子突变体 1		
Syndecans-1	100 %	1
ATP 合成酶 6	100 %	1



1、3 DNA Marker, 2、pGBKT7-HBeAg  
图 1 pGBKT7-HBeAg 质粒 EcoR I 和 Pst I 酶切鉴定.



图2 pGBKT7-HBeAg 酵母表达 Western 免疫印迹分析.

### 3 讨论

HBeAg 作为一种免疫调节因子,可调节宿主的免疫应答,抑制宿主 T 细胞的细胞毒活性,形成对 HBV 感染的免疫耐受性<sup>[9-13]</sup>. HBeAg 对病毒复制和装配并非必要,不是病毒的结构成分,但却含有病毒的高度保守的体液和细胞抗原靶位,与 HBcAg 有部分共同的序列,有相同的抗原靶位,当 HBeAg 发生突变时,失去血清中 HBeAg 的调节,表达 HBcAg 的肝细胞经受增强的 T 细胞的细胞毒作用,导致病情加重<sup>[14-16]</sup>. 血中抗 HBe 长期阳性的患者,发生肝硬化、肝癌的机率较高,原因不清. HBeAg 是否还通过其他途径影响免疫应答,损害肝细胞的功能,是否参与肝细胞癌的发生,如何作用,是研究 HBeAg 复杂功能中需要解决的关键点<sup>[17]</sup>. 寻找肝细胞中 HBeAg 的相互作用蛋白,并进一步探明其机制,对解答上述问题有着重要意义.

酵母双杂交系统 3 在增加了报告基因的基础上,利用 a 型和 型酵母配合的形成二倍体细胞内,诱饵质粒与文库质粒所表达的蛋白质可以相互作用的原理,免去了需要共转染两种质粒所带来的低效率问题,并将真阳性率提高到 95%,大大增强了结果的可靠性<sup>[18-22]</sup>. 我们应用此技术构建了 pGBKT7-HBeAg 诱饵表达质粒,在预转化的人肝 cDNA 文库中“钓”出与 HBeAg 有相互作用的蛋白基因 39 种,其中 34 种为已知序列,5 种为未知基因.

在已知序列中,CD81,又名抗增生抗体识别靶分子-1(TAPA-1),是一种 M<sub>r</sub> 26 kD 的四跨膜蛋白分子(tetraspanin superfamily, TM4SF)家族中的一员,有特殊的四次跨膜结构,在细胞膜上可与 CD4、CD8、CD19、CD21、CD82、Leu13、HLA-DR 和 3β1 整合素等结合,调节跨膜信号转导,推测 CD81 可能是 HCV 感染靶细胞的受体蛋白<sup>[23]</sup>,发现 HBeAg 能与 CD81 结合,使 CD81 的功能变得更复杂. 有报道铁过载可增加 HBV 所致的肝细胞损害<sup>[24]</sup>, Dimitrijevic et al 在 HBV 肝脏活检标本中发现部分肝细胞中有血铁质和铁蛋白沉积,且缺少 HBV 感染特征性的镜面细胞,说明 HBV 感染的发病与铁代谢可能有一定的联系; Bayraktar et al<sup>[25]</sup> 发现个体的血清铁含量与 IFN 治疗效果有密切关系,在血清铁含量高的 HBV 患者中,应用去铁铵联合治疗,可降低患者血清铁含量,增加患者对 IFN 的反应

性,提高治疗效率,但具体机制不清,我们发现 HBeAg 可与铁蛋白相互作用,为研究铁代谢异常与 HBV 感染的关系打开了新的突破口. 3-羟化类固醇表位酶有 3-甾酮还原酶的活性,能还原外周组织细胞中的甾酮类, HBeAg 与之结合可部分解释 HBV 感染所引起的激素代谢失常<sup>[26]</sup>. HBeAg 与补体 8、补体因子 H 和补体 1 结合,提示 HBeAg 能通过补体途径影响免疫系统功能,为研究 HBV 免疫损害方面的机制提出了新的思路<sup>[27]</sup>.

维甲酸有抑制生长和细胞分化的活性,被用来治疗增生过长性疾病,鳞癣、光化性角化病、某些肿瘤,他佐罗汀是人工合成的视黄醛,临床用于治疗鳞癣, Daniel et al 用差异显示 PCR 技术筛选到他佐罗汀诱导基因-3(即维甲酸受体应答元件 3),与 II 级肿瘤抑制基因 H-rev 107 同源,与抑制增生有关,在多种组织中有表达,但在肿瘤细胞系和部分原发性肿瘤中表达减少,推测其可能是一种生长调节因子介导视黄醛的生长抑制效应<sup>[28-30]</sup>. 有报道在肿瘤蛋白中 D-氨基酸含量明显增多, D-氨基酸氧化酶能催化产生过氧化氢 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,在体外诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[31]</sup>. Syndecans 是一种细胞外基质,包括一系列跨膜硫酸(类肝素蛋白多糖)乙酰肝素糖蛋白家族中的基因,通过与不同的效应器(包括肝素结合生长因子、可溶性基质成分)相互作用来调节细胞活动, Syndecans-1 存在于上皮细胞和正常肝细胞中. 在肝炎和肝硬化患者肝细胞的胞质和胞质中、胆管上皮细胞中有表达,但在原发性肝癌(HCC)患者中 Syndecans-1 表达减少,且减少程度与肝癌的恶性程度正相关,在伴肝内、外转移的患者肝脏中表达缺失,在两种低分化型肝癌细胞系中 Syndecans-1 的 mRNA 和蛋白水平显著降低,转染 Syndecans-1 基因能抑制肝癌细胞的浸润性,表明 Syndecans-1 的表达水平是 HCC 具有高度转移趋势的标志, Syndecans-1 对 HCC 来说是重要的转移抑制因子<sup>[32-34]</sup>. HBeAg 能与以上几种物质相互作用,提示 HBeAg 在 HBV 致肝细胞癌的机制方面也起着一定的效应.

以上结果为 HBeAg 致病性的研究提供了许多很有价值的线索,但具体、确切的作用原理还需进一步证实和深入探讨,以获得更加有说服力的证据.

### 4 参考文献

- 1 Zhevachevsky NG, Nomokonova NY, Beklemishev AB, Belov GF. Dynamic study of HBsAg and HBeAg in saliva samples from patients with hepatitis B infection: diagnostic and epidemiological significance. *J Med Virol* 2000;61:433-438
- 2 Milich DR. Do T cells "see" the hepatitis B core and e antigens differently? *Gastroenterology* 1999;116:765-768
- 3 陆荫英,李克,成军,王琳,刘妍,段惠娟,张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 基因酵母表达载体的构建与表达. *世界华人消化杂志* 2002;10:15-18
- 4 王琳,李克,成军,陆荫英,王刚,刘妍,钟彦伟,段惠娟,洪源. 筛选与克隆肝再生增强因子结合的蛋白基因. *世界华人消化杂志* 2002;10:161-164
- 5 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

- 6 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 李莉, 刘妍, 段惠娟. 丙型肝炎病毒 NS2 基因酵母双杂交“饵”载体构建及表. 世界华人消化杂志 2002;10:129-132
- 7 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
- 8 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前-S1 基因酵母表达载体的构建及表达. 解放军医学杂志 2002;27:341-342
- 9 Barth H, Klein R, Berg PA, Wiedenmann B, Hopf U, Berg T. Induction of T helper cell type 1 response and elimination of HBeAg during treatment with IL-12 in a patient with therapy-refractory chronic hepatitis B. *Hepatogastroenterology* 2001;48:553-555
- 10 Merkle H, Deutsche T, Gastrock-Balitsch I, Nusser P, Knehr S, Reifenberg K. H-2(d) mice born to and reared by HBeAg-transgenic mothers do not develop T cell tolerance toward the hepatitis B virus core gene products. *Virology* 2000;273:149-159
- 11 Khakoo SI, Ling R, Scott I, Dodi AI, Harrison TJ, Dusheiko GM, Madrigal JA. Cytotoxic T lymphocyte responses and CTL epitope escape mutation in HBsAg, anti-HBe positive individuals. *Gut* 2000;47:137-143
- 12 Zavaglia C, Severini R, Tinelli C, Franzoni JS, Airolidi A, Tempini S, Bettale G, Ideo G. A randomized, controlled study of thymosin- $\alpha$ 1 therapy in patients with anti-HBe, HBV-DNA-positive chronic hepatitis B. *Dig Dis Sci* 2000;45:690-696
- 13 Krastev Z, Jelev D, Antonov K, Alagozian V, Kotzev I. Chronic HBV infection. Immunomodulation with levamisole in viremic HBeAg positive or anti-HBe positive patients-a pilot study. *Hepatogastroenterology* 1999;46:3184-3188
- 14 Papatheodoridis GV, Hadziyannis SJ. Diagnosis and management of pre-core mutant chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2001;8:311-321
- 15 Khakoo SI, Ling R, Scott I, Dodi AI, Harrison TJ, Dusheiko GM, Madrigal JA. Cytotoxic T lymphocyte responses and CTL epitope escape mutation in HBsAg, anti-HBe positive individuals. *Gut* 2000;47:137-143
- 16 Dong J, Cheng J, Wang Q, Huang FJ, Shi S, Zhang G, Hong Y, Li L, Si C. The study on heterogeneity of hepatitis B virus DNA. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:81-85
- 17 Riedl P, Stober D, Oehninger C, Melber K, Reimann J, Schirmbeck R. Priming Th1 immunity to viral core particles is facilitated by trace amounts of RNA bound to its arginine-rich domain. *J Immunol* 2002;168:4951-4959
- 18 Wang XZ, Jiang XR, Chen XC, Chen ZX, Li D, Lin JY, Tao QM. Seek protein which can interact with hepatitis B virus X protein from human liver cDNA library by yeast two-hybrid system. *World J Gastroenterol* 2002;8:95-98
- 19 Nagpal S, Ghosh CR, Chandraratna RA. Identification of nuclear receptor interacting proteins using yeast two-hybrid technology. *Methods Mol Biol* 2001;176:359-376
- 20 Serebriiskii IG, Toby GG, Finley RL Jr, Golem EA. Related Articles Genomic analysis utilizing the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2001;175:415-454
- 21 Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486
- 22 Zhen Z. Progress in proteomics. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2001;17:491-493
- 23 Flint M, Maidens C, Loomis-Price LD, Shotton C, Dubuisson J, Monk P, Higginbottom A, Levy S, McKeating JA. Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J Virol* 1999;73:6235-6244
- 24 Cao Z, Bai Y, Yang X, Liu J, Li B, Li F. Study of iron metabolism abnormality in the hepatocyte damage of hepatitis B. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2001;9:37-39
- 25 Bayraktar Y, Saglam F, Temizer A, Uzunalimodlu B, van Thiel DH. The effect of interferon and desferrioxamine on serum ferritin and hepatic iron concentrations in chronic hepatitis B. *Hepatogastroenterology* 1998;45:2322-2327
- 26 Huang XF, Luu-The V. Gene structure, chromosomal localization and analysis of 3-ketosteroid reductase activity of the human 3( $\alpha$ → $\beta$ )-hydroxysteroid epimerase. *Biochim Biophys Acta* 2001;1520:124-130
- 27 Chen J, Chen M, Zhao B, Wang Y. Effects of acupuncture on the immunological functions in hepatitis B virus carriers. *J Tradit Chin Med* 1999;19:268-272
- 28 Ruiz A, Kuehn MH, Andorf JL, Stone E, Hageman GS, Bok D. Genomic organization and mutation analysis of the gene encoding lecithin retinol acyltransferase in human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:31-37
- 29 Jing C, El-Ghany MA, Beesley C, Foster CS, Rudland PS, Smith P, Ke Y. Tazarotene-induced gene 1 (TIG1) expression in prostate carcinomas and its relationship to tumorigenicity. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:482-490
- 30 Duvic M, Helekar B, Schulz C, Cho M, Disepio D, Hager C, DiMao D, Hazarika P, Jackson B, Breuer-McHam J, Young J, Clayman G, Lippman SM, Chandraratna RAS, Robinson NA, Deucher A, Ecker RL, Nagpal S. Expression of a retinoid-inducible tumor suppressor, tazarotene-inducible gene-3, is decreased in psoriasis and skin cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:3249-3259
- 31 Fang J, Sawa T, Akaike T, Maeda H. Tumor-targeted delivery of polyethylene glycol-conjugated D-amino acid oxidase for anti-tumor therapy via enzymatic generation of hydrogen peroxide. *Cancer Res* 2002;62:3138-3143
- 32 Fujimoto Y, Kohgo Y. Alteration of genomic structure and/or expression of cancer associated genes in hepatocellular carcinoma. *Rinsho Byori* 1998;46:9-14
- 33 Fujimoto Y, Kohgo Y. Syndecan-1. *Nippon Rinsho* 2001;59(Suppl 6):184-188
- 34 Jacobs W, Bogers J, Van Marck E. Distinct B-cell populations are present in hepatic and intestinal *Schistosoma mansoni* granulomas. *Acta Gastroenterol Belg* 1999;62:178-181

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

• 消息 •

## 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

本刊讯 世界胃肠病学杂志英文版(*World Journal of Gastroenterology*®)申报的 2002 年度国家自然科学基金重点学术期刊专项基金项目,经专家评审,国家自然科学基金委员会委会议审定,予以批准资助(项目批准号: 30224801).资助期限 2 年,2003 - 2004 年,资助强度每年 8 万元。

2002 年度重点学术期刊专项基金资助 30 本学术期刊,分别为天体物理学报(英),计算数学(英),理论物理通讯(英)中国物理快报(英),力学学报(英),分析化学,高等学校化学学报,化学学报,化学通报,中国化学工程学报(英),世界胃肠病学杂志(英),作物学报,中国农业科学,中国中西医结合杂志,中国药理学(英),生物化学与生物物理学报,细胞研究(英),植物学报(英),大气科学进展(英),地球物理学报,地质学报(英),金属学报,稀土学报(英),材料科学技术(英),稀有金属材料与工程,电力系统自动化,计算机科学技术学报(英),管理科学学报,中国科学(中、英),科学通报(中、英)。

(世界胃肠病学杂志社 2002-10-18)





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](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

