

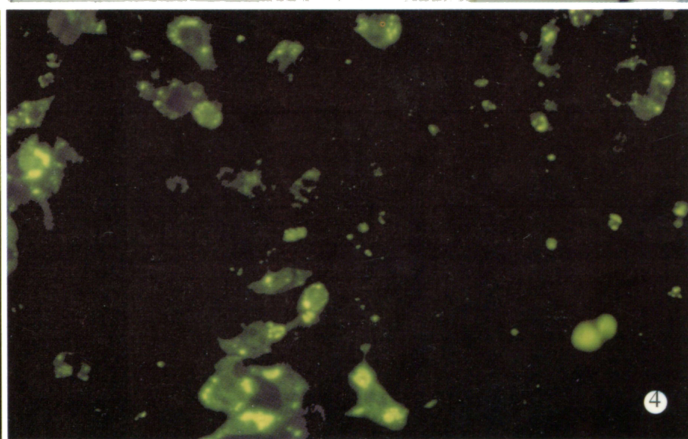
世界华人消化杂志®

**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

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

黄呈辉, 马会慧, 汤正好, 李刚, 姚集鲁, 中山大学附属第三医院传染科实验室 广东省广州市 510630
欧阳玲, 深圳市宝安区中心血站 广东省深圳市 518101
黄呈辉, 男, 1967-09-03, 江西于都人, 汉族. 1990年江西医学院本科毕业, 1997年首都医科大学硕士研究生毕业, 现在为中山大学中山医学院博士研究生, 主治医师. 主要从事病毒性肝炎研究工作.
国家自然科学基金资助课题, No.30200243
项目负责人: 黄呈辉, 510630, 广东省广州市石牌岗顶, 中山大学附属第三医院传染科实验室. chuih67@163.com
电话: 020-87596042
收稿日期: 2002-11-06 接受日期: 2002-11-18

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

Cheng-Hui Huang, Ling Ou-Yang, Hui-Hui Ma, Zheng-Hao Tang, Gong Li, Ji-Lu Yao

Cheng-Hui Huang, Hui-Hui Ma, Zheng-Hao Tang, Gong Li, Ji-Lu Yao, Department of Infectious Diseases, the Third Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, 510630, Guangdong Province China
Ling Ou-Yang, Shenzhen Baoan Blood Center, Shenzhen 518101, Guangdong Province China
Supported by the National Science Foundation of China, No.30200243
Correspondence to: Dr. Cheng-Hui Huang, Department of Infectious Diseases, the Third Hospital Affiliated Sun Yat-Sen University, Guangzhou, 510630, Guangdong Province China. chuih67@163.com
Received: 2002-11-06 Accepted: 2002-11-18

Abstract

AIM: To construct recombinant adenoviral vector carrying HBV S and C region gene by homologous recombination in bacteria and to detect its expression *in vitro*.

METHODS: HBV pre-S₂/S genes and pre-C/C genes were amplified by PCR and were cloned to adenoviral shuttle plasmid pAdTrack-CMV, respectively. Then the resultant pAdTrack-CMV-HBs or pAdTrack-CMV-HBe was cotransfected into BJ5183 bacteria with the plasmid pAdeasy-1. The adenoviral plasmid carrying HBV S and C gene (pAd-HBs and pAd-HBe) was generated with homologous recombination in bacteria and the adenoviruses were produced in 293 cells. Both 293 and Vero cells were infected with adenoviruses and the expression of HBsAg and HBeAg was detected by RT-PCR and ELISA *in vitro*.

RESULTS: The titer of Ad-HBs and Ad-HBe adenoviruses was up to 5×10^{12} pfu/L after proliferation in 293 cells. HBsAg and HBeAg were expressed efficiently in 293 and Vero cells after infection.

CONCLUSION: The recombinant adenoviruses expressing

HBsAg or HBeAg were constructed successfully and can be used further in gene therapy of HBV.

Huang CH, Ou-Yang L, Ma HH, Tang ZH, Li G, Yao JL. Construction of replication-deficient recombinant adenoviral vector carrying HBV S and C region gene by homologous recombination in bacteria and its expression *in vitro*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(4):438-441

摘要

目的: 构建表达乙肝病毒表面抗原(HBsAg)和e抗原(HBeAg)的非复制型重组腺病毒载体, 并检测他能否在真核细胞中有效表达目的基因。

方法: 扩增乙肝病毒(HBV)前S₂/S基因和前C/C基因片段, 分别亚克隆到腺病毒穿梭质粒pAdTrack-CMV上, 与5型腺病毒骨架质粒pAdeasy-1共转染BJ5183细菌, 经细菌内同源重组产生分别携带HBV S区和C区基因的重组腺病毒载体pAd-HBs和pAd-HBe, 经脂质体法转化293细胞包装产生重组腺病毒Ad-HBs和Ad-HBe; 体外转染293和Vero细胞, RT-PCR和ELISA法检测目的基因的表达。

结果: 构建了表达HBsAg和HBeAg基因的重组腺病毒, 病毒滴度可达 5×10^{12} pfu/L, 并能在真核细胞中有效表达目的基因。

结论: 成功构建表达HBsAg和HBeAg的重组腺病毒载体, 为进一步开展HBV基因治疗研究提供实验基础。

黄呈辉, 欧阳玲, 马会慧, 汤正好, 李刚, 姚集鲁. 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. 世界华人消化杂志 2003;11(4):438-441

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/438.htm>

0 引言

重组非复制型腺病毒作为基因治疗和蛋白表达载体, 已经成为基因治疗研究中应用最为广泛的载体之一^[1-4]. 我们采用一种新的细菌内同源重组系统^[5], 构建携带增强型绿色荧光蛋白(enhanced GFP, EGFP)基因和乙型肝炎病毒(HBV)S和C区基因的重组腺病毒, 并检测他在真核细胞中的表达, 为开展乙肝的基因免疫治疗提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料 携带EGFP基因的腺病毒穿梭质粒pAdTrack-CMV, E1区和E3区缺失的复制缺陷5型腺病毒骨架质

粒 pAdeasy-1, 大肠杆菌 XL1-Blue, BJ 5 183 和 DH10B 由北京协和医院许志勤博士惠赠; 携带 HBV adw 亚型全基因的 PBR322 质粒由本实验室保存; 限制性内切酶 Pme 和 Pac 购自 NEB 公司, Not , Kpn , Bgl 和 DNase 购自 TaKaRa 公司; 人胚肾 293 细胞和绿猴肾细胞(Vero)购自武汉大学典型培养物保藏中心; 低血清培养基 Opti-MEM , DMEM, 胎牛血清(FBS)和 DNA 转染试剂盒 lipofectamine 2 000 购自 Life Tech 公司; HBsAg ELISA 检测试剂购于荷兰欧嘉隆公司, HBeAg ELISA 检测试剂购于厦门新创公司。

1.2 方法

1.2.1 腺病毒穿梭载体 pAdTrack-CMV-HBs 和 pAdTrack-CMV-HBe 的构建

根据 HBV S 和 C 区开放读码框序列, 设计合成 2 对引物, 由上海生工生物公司合成, 引物序列如下: PS1: 5' -TTACAGATCTATGCAGTGGA ACTCCAC-3'; PS2: 5' -TTCGCGGCCGCTAGGGTTTA AATGTATACC-3'; PE1: 5' -TACGGTACCATGCAAC TTTTTCACCTCTGCCTAATC-3'; PE2: 5' -TTGCGGC CGCTAACATTGAGATTCCCGAGA-3'; 其中引物 PS1 和 PS2 用于扩增 HBV pre-S2/S 基因片段, 在引物的 5' 端分别加上 Bgl 和 Not 限制性酶切位点; 引物 PE1 和 PE2 用于扩增 HBV pre-C/C 基因, 在引物的 5' 端分别加上 Kpn 和 Not 限制性酶切位点。以插入 HBV adr 亚型全基因的 PBR322 质粒为模板进行 PCR 扩增, 条件为: 94 , 180 s 预变性; 94 , 40 s; 55 , 50 s; 72 , 90 s, 扩增 35 个循环, 最后 72 延伸 10 min。扩增片段用 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳, 目的片段切胶回收纯化后, 连接到 pBluscript KS(+)-T 载体上, 转化 XL1-Blue 宿主菌, 挑选阳性质粒, 经测序序列正确后, 用相应的内切酶 Bgl 和 Not 、 Kpn 和 Not 双酶切后, 定向亚克隆到 pAdTrack-CMV 质粒上, 电转化 DH10B 细菌后, 筛选重组 pAdTrack-CMV-HBs 和 pAdTrack-CMV-HBe 质粒。

1.2.2 E.coli 内同源重组构建 pAd-HBs 和 pAd-HBe 腺病毒载体

取 0.1-0.5 μ g 的 pAdTrack-CMV-HBs 或 pAdTrack-CMV-HBe 质粒, Pme 酶切线性化后溶解于 6 μ L 无菌水中, 与 1 μ L (0.1 μ g) pAdeasy-1 质粒一起加入到 20 μ L 电穿孔感受态大肠杆菌 BJ 5 183 中, 混匀后加入预冷的 2.0 mm 电转化杯中, 冰浴 5 min, 在 2.5 kV/200 /25 μ f 条件下电转化, 菌液在 SOC 培养液 1 mL 中 37 孵育 10-20 min, 涂 4 个 25 mg/L 卡那霉素 LB 平板, 37 过夜培养 16-20 h, 挑选 10-24 个小菌落, 碱裂解法小提质粒, 7 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 挑选质粒大小大于 pAdeasy-1 的质粒, 并用 Pac 酶切鉴定, 取阳性质粒 1 μ L 电转化 DH10B 菌, 用 Promega 提取试剂盒进行质粒的提取和纯化。

1.2.3 重组腺病毒 Ad-HBs 和 Ad-HBe 的包装

转染前 1 d, 在 T-25 培养瓶中接种 2×10^6 293 细胞, 至转染时细胞约为 50-70 % 汇合度。取质粒 pAd-HBs 或 pAd-HBe

各 4 μ g 分别用 Pac 酶切, 酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀, 溶于无菌去离子水 20 μ L 中, 再加 lipofectamine 2 000 20 μ L 一起混合于 500 μ L Opti-MEM , 室温孵育 10-30 min 后, lipofectamine - DNA 混合物加入培养瓶, 放回 37 50 mL/L CO₂ 孵箱孵育 4 h, 弃去含 lipofectamine-DNA 混合物的培养液上清, 换成含 100 mL/L FBS 的完全 DMEM 培养液。培养 18 h 后通过荧光显微镜观察 EGFP 的表达, 转染后 7-10 d 后离心收集细胞, 弃上清, 细胞沉淀悬浮于 2 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)中, 37 /-70 反复冻溶 4 次, 离心留上清。取病毒上清 1.0 mL 再转染 T-25 瓶 50-70 % 汇合的 293 细胞, 转染后 3-5 d, 当大约 1/3-1/2 的 293 细胞脱落时, 离心收集细胞, 按上述方法收集病毒, 再重复扩增培养 1 次, 收集第 3 代病毒进行滴度(pfu/L)测定^[3]。

1.2.4 目的基因 HBsAg 和 HBeAg 在真核细胞中的表达

取病毒上清, 按 MOI 为 10 转染 293 和 Vero 细胞, 荧光显微镜下观察 EGFP 的表达, 转染第 3-5 天, 95 % 以上细胞出现 EGFP 的表达, 吸取上清进行 ELISA 测定; 用细胞刮子刮下细胞, PBS 洗 3 次, 用 TRIZOL 试剂提取细胞中总 RNA, 用 DNase 消化污染的 DNA 后, 分别用引物 PS1/PS2 和 PE1/PE2 进行 RT-PCR 检测。

2 结果

2.1 E.coli 内同源重组产生腺病毒质粒 pAd-HBs 和 pAd-HBe

PCR 扩增 pre-S2/S 基因片段约 872 bp, pre-C/C 基因片段约 657 bp, 重组到 pBluscript KS(+)-T 载体上进行测序, 测序结果未发现有突变情况。双酶切后定向亚克隆到 pAdTrack-CMV 质粒上, 产生重组腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV-HBs 和 pAdTrack-CMV-HBe, 与 0.1 μ g pAdeasy-1 共转化 BJ 5 183 菌, 获得数百个克隆, 挑选 10-24 个克隆经碱裂解法提质粒, 7 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 片段大小大于 pAdeasy-1 的质粒为阳性重组质粒; 用 Pac 酶切, 阳性重组腺病毒质粒 pAd-HBs 或 pAd-HBe 出现一条大的片段(约 35 kb)和一条小的片段(4.5 kb, 见图 1)。

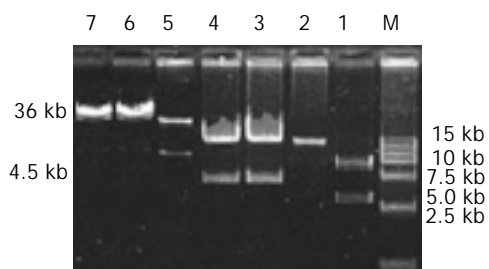
2.2 重组腺病毒 Ad-HBs 和 Ad-HBe 的包装

取 Pac 酶切后的质粒 pAd-HBs 或 pAd-HBe, 用脂质体法转染 293 细胞, 18 h 后荧光显微镜下可见 293 细胞内有 EGFP 的表达, 之后 EGFP 表达逐日增多, 于转染后 5 d 达高峰, 7-10 d 后收种病毒; 取 1/3-1/2 病毒上清再转染 T-25 瓶 50-70 % 汇合的 293 细胞, 转染 18 h 后, 1/3 以上细胞可见 EGFP 的表达, 3-5 d 出现明显细胞病变(CPE)。取第 3 代病毒进行滴度(pfu/L)测定, 病毒滴度达到 5×10^{12} pfu/L。

2.3 重组腺病毒 Ad-HBs 和 Ad-HBe 在真核细胞中的高效表达

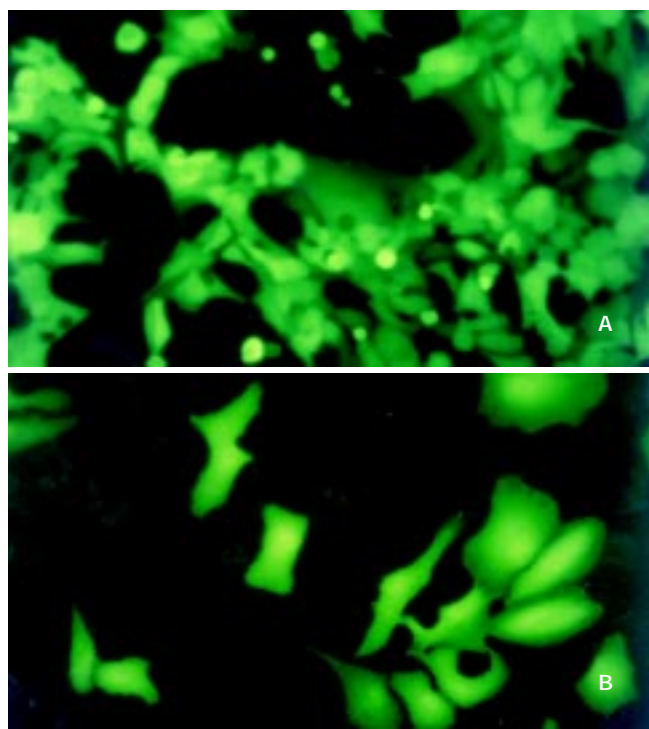
制备的 Ad-HBs 和 Ad-HBe 腺病毒带有 2 个独立的 CMV 启动子表达盒, 一个表达目的基因 HBsAg 或 HBeAg, 一个表达 EGFP。18 h 后在荧光显微镜下观察到 293 和 Vero 细胞中 EGFP 荧光, 可间接反映目的

基因的表达(图2)。取第3代腺病毒转染293和Vero细胞,经RT-PCR检测,分别扩增出872 bp和657 bp预计大小的片段(图3),表明重组腺病毒Ad-HBs和Ad-HBe在293和Vero细胞均能有效转录。重组腺病毒Ad-HBs转染293和Vero细胞72 h,ELISA检测细胞培养上清中HBsAg A值均大于3.229 (C.O=0.102);重组腺病毒Ad-HBe转染293和Vero细胞72 h,ELISA检测细胞培养上清中HBeAg A值均分别为0.996和0.806 (C.O=0.105)。



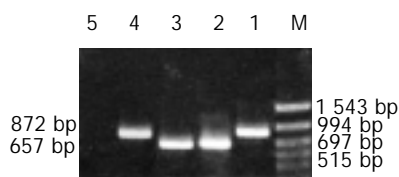
M:DNA Marker DL15 000; 1:pAdTrack-CMV/pac I; 2:pAdEasy-1/pac I; 3: pAd-HBs/ pac I; 4: pAd-HBe/ pac I; 5: pAdEasy-1; 6: pAd-HBs; 7: pAd-HBe

图1 重组腺病毒质粒 pAd-HBs 和 pAd-HBe 构建和鉴定。



A: In 293 cells($\times 200$) B: In Vero cells($\times 200$)

图2 腺病毒Ad-HBs转染293和Vero细胞后EGFP的表达(72 h)。



M: PCR Marker; 1: Ad-HBs transfected 293; 2: Ad-HBe transfected 293; 3: Ad-HBe transfected Vero; 4: Ad-HBs transfected Vero; 5: Negative control

图3 RT-PCR检测HBV S和C基因在真核细胞中的转录。

3 讨论

乙型肝炎病毒感染是当前危害人类健康的重要传染病之一^[6,7],虽然抗病毒药物如干扰素、核苷类似物治疗显示一定的效果,但停药后易复发,难于取得持久的疗效^[8-11]。基因疫苗和基因治疗作为近年发展的一种新的抗病毒途径,在控制HBV感染方面已经显示其良好的应用前景^[12-14]。目前,HBV的基因治疗主要有反义寡核苷酸、核酶和基因免疫(又称DNA疫苗)三个主要治疗策略^[15-22]。基因免疫是将编码抗原的外源基因插入合适的表达载体中,再以载体免疫机体,使目的基因在机体内高效表达,达到基因治疗的目的^[23]。质粒表达载体是目前使用最多基因免疫的载体,它具有诸多优点^[24],但也存在明显不足,如质粒载体导入细胞效率低,诱发免疫效果较弱,安全性尚无定论等^[25]。腺病毒载体是目前更具前途的用于基因治疗的表达载体,它具有基因组的结构简单,分子背景比较清楚,易于改造和操作,载体制备较容易;宿主广泛,包装容量大,感染率高,又有较强的靶细胞特异性;病毒基因不整合到宿主基因中,安全性好;既可以在肠道繁殖,也可以在呼吸道繁殖,便于疫苗制成后的使用和推广;腺病毒载体感染宿主细胞表达的目的抗原,较质粒载体更近似病原体感染,易获得更强的免疫应答^[26,27]。因此,腺病毒成为继逆转录病毒之后被广泛应用于基因免疫和基因治疗研究的病毒载体^[28-33]。

HBV S区基因编码的乙肝表面抗原(HBsAg),具有潜在T细胞激活表位,能介导CTL细胞发挥抗HBV作用^[34];同时,还可以能够刺激体内产生中和抗体抗-HBs,具有清除病毒感染的作用^[35],因此,HBsAg可作为乙型肝炎基因免疫治疗的有效靶抗原。我们构建的重组腺病毒Ad-HBs和Ad-HBe,分别携带HBV S区基因和C区基因,在真核细胞中可高效表达HBsAg和HBeAg。另外,我们制备的重组腺病毒Ad-HBs和Ad-HBe是E1, E3区缺失的复制缺陷5型腺病毒,由于E1区基因为腺病毒复制所必需,因此需要由转化了E1区基因的包装细胞系(293细胞)提供反式补偿,重组腺病毒才能复制和扩增。这种复制缺陷型重组腺病毒仍具有感染靶细胞的能力但不发生复制,因而不会直接造成靶细胞的损害,有利于其基因治疗研究中的应用^[36]。另外,复制缺陷型重组腺病毒缺失的病毒早期基因E1区,编码多种与病毒的免疫逃避有关的蛋白(如E1A, E1B-19K和E1B-55K)^[37],与复制型腺病毒相比,复制缺陷型重组腺病毒不仅安全,而且以低剂量方式产生抗原蛋白,不裂解细胞,故抗原蛋白表达持久,有利于激发长期的免疫反应^[38]。

由于腺病毒基因组较大(约36 kb),很难选择合适的限制性内切酶直接进行分子克隆,因此,构建腺病毒载体时,通常将腺病毒基因组左端制备成含E1区缺失的穿梭质粒,然后将目的基因插入穿梭质粒的多克隆位点,再与含腺病毒基因组的质粒共转染至

293 或 911 细胞内进行同源重组, 再通过空斑筛选来鉴定扩增重组^[39]. 这种传统构建重组腺病毒载体的方法虽然非常有效, 但由于在哺乳细胞 293 或 911 内同源重组的效率低, 需要多次空斑筛选, 因而制备出腺病毒的时间较长, 妨碍其广泛应用. 本研究采用一种新的腺病毒载体制备系统 AdEasy^[5], 该系统在高效的原核细胞的大肠杆菌中进行同源重组, 经抗生素培养板筛选重组, 极大简化载体的构建过程. 构建的腺病毒载体上携带有增强型绿色荧光蛋白(EGFP)示踪基因, 可以很方便通过荧光显微镜观察腺病毒的包装、检测病毒滴度和了解目的基因在真核细胞中的表达情况, 而不采用观察细胞病毒病变和空斑实验鉴定病毒包装成功与否, 以及采用空斑实验检测病毒的滴度等. 采用本系统可以方便快捷构建腺病毒载体, 大大节省时间. 本研究成功制备表达 HBsAg 基因和 HBeAg 的重组腺病毒载体, 并能够在真核细胞中获得高效稳定的表达, 这一初步研究结果为乙肝病毒基因免疫和基因治疗的临床应用研究提供了理论依据.

4 参考文献

- Xiang ZQ, Yang Y, Wilson JM, Ertl HC. A replication-defective human adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier. *Virology* 1996;219: 220-227
- Magovern CJ, Mack CA, Zhang J, Rosengart TK, Isom OW, Crystal RG. Regional Angiogenesis induced in nonischemic tissue by an adenoviral vector expressing vascular endothelial growth factor. *Hum Gene Ther* 1997;8:215
- 郝春秋, 周永兴, 冯志华, 李谨革, 贾战生, 王平忠. HCV C 基因腺病毒表达载体骨架质粒 pAd-HCV-C 的构建、鉴定及表达. *世界华人消化杂志* 2001;9:635-639
- 潘欣, 潘卫, 柯重伟, 张斌, 曹广文, 戚中田. 腺病毒载体介导四环素调控的 DT/VEGF 体系的基因治疗. *世界华人消化杂志* 2000;8: 1121-1126
- He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:2509-2514
- 游晶, 孔蕾, 庄林, 李惠萍, 卢绍蓉, 曹云峰. 急性病毒性肝炎 2116 例血清病原学分析. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 636-637
- 沈宏辉, 邹正升, 陈菊梅, 辛绍杰, 邢汉前, 李建宇, 刘艳萍, 李保森. 慢性重型肝炎 122 例的死因比较分析. *世界华人消化杂志* 2001;9:1084-1086
- 游晶, 庄林, 唐宝璋, 杨惠, 杨微波, 李武, 张宏丽, 张艳梅, 张禄, 严绍明. 干扰素联合胸腺肽治疗慢性乙型肝炎. *世界华人消化杂志* 2001;9:388-391
- 甄真, 周俊英, 周复红, 刘金星, 李兵顺. IFN- γ 治疗慢性肝炎血清肝纤维化指标的变化. *世界华人消化杂志* 2001;9:1093-1094
- Wolters LM, Hansen BE, Niesters HG, de Man RA. Viral dynamics in chronic hepatitis B patients treated with lamivudine, lamivudine-famciclovir or lamivudine-ganciclovir. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:1007-1011
- Yang SS, Hsu CT, Hu JT, Lai YC, Wu CH. Lamivudine does not increase the efficacy of interferon in the treatment of mutant type chronic viral hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2002;8:868-871
- Chiou HC, Lucas MA, Coffin CC, Banaszczyk MG, Ill CR, Lollo CP. Gene therapy strategies for the treatment of chronic viral hepatitis. *Expert Opin Biol Ther* 2001;1:629-639
- Xu CT, Pan BR. Current status of gene therapy in gastroenterology. *World J Gastroenterol* 1998;4:85-89
- Dai WJ, Jiang HC. Advances in gene therapy of liver cirrhosis: a review. *World J Gastroenterol* 2001;7:1-8
- Wu CH, Zeng Z, Wang QH, Yu M. Experimental study of inhibition of hepatitis B by dual-target antisense RNA. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2001; 25:605-608
- Robaczewska M, Guerret S, Remy JS, Chemin I, Offensperger WB, Chevallier M, Behr JP, Podhajski AJ, Blum HE, Trepo C, Cova L. Inhibition of hepadnaviral replication by polyethylenimine-based intravenous delivery of antisense phosphodiester oligodeoxynucleotides to the liver. *Gene Ther* 2001; 8: 874-881
- Putlitz J, Wieland S, Blum HE, Wands JR. Antisense RNA complementary to hepatitis B virus specifically inhibits viral replication. *Gastroenterology* 1998; 115: 702-713
- Feng Y, Kong YY, Wang Y, Qi GR. Antiviral activity of a hammerhead ribozyme against HBV in HepG2.2.15 cells. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao* 2002; 34: 204-208
- Song YH, Lin JS, Liu NZ, Kong XJ, Xie N, Wang NX, Jin YX, Liang KH. Anti-HBV hairpin ribozyme-mediated cleavage of target RNA *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2002;8:91-94
- Wen SJ, Xiang KJ, Huang ZH, Zhou R, Qi XZ. Construction of HBV-specific ribozyme and its recombinant with HDV and their cleavage activity *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2000;6:377-380
- Feng Y, Kong YY, Wang Y, Qi GR. Intracellular inhibition of the replication of hepatitis B virus by hammerheadribozymes. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:1125-1130
- Sallberg M, Hughes J, Javadian A, Ronlov G, Hultgren C, Townsend K, Anderson CG, O'Dea J, Alfonso J, Eason R, Murthy KK, Jolly DJ, Chang SM, Mento SJ, Milich D, Lee WT. Genetic immunization of chimpanzees chronically infected with the hepatitis B virus, using a recombinant retroviral vector encoding the hepatitis B virus core antigen. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 1719-1729
- Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 1993;259:1745-1749
- Ertl HC, Xiang ZQ. Genetic Immunization. *Viral Immunol* 1996;9: 1-9
- Mendez S, Belkaid Y, Seder RA, Sacks D. Optimization of DNA vaccination against cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 2002;20: 3702-3708
- Mitani K, Graham FL, Caskey CT, Kochanek S. Rescue, propagation, and partial purification of a helper virus-dependent adenovirus vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3854-3858
- Fisher KJ, Choi H, Burda J, Chen SJ, Wilson JM. Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis. *Virology* 1996;217:11-22
- Wang L, Qi X, Sun Y, Liang L, Ju D. Adenovirus-mediated combined P16 gene and GM-CSF gene therapy for the treatment of established tumor and induction of antitumor immunity. *Cancer Gene Ther* 2002;9:819-824
- 陈洁平, 林晨, 徐采朴, 张雪艳, 付明, 邓友平, 隗月, 吴旻. 重组反义 c-myc 腺病毒对人胃癌细胞的体内及体外分子治疗. *世界华人消化杂志* 1999;7:482-486
- 陈洁平, 林晨, 徐采朴, 张雪艳, 付明, 邓友平, 隗月, 吴旻. 腺病毒介导 RA538 及反义 c-myc 在不同细胞系中作用及其机制. *世界华人消化杂志* 2000;8:266-270
- 鲁建国, 林晨, 黄志强, 吴金生, 付明, 张雪艳, 梁萧, 姜秀, 吴旻. 腺病毒介导的 p16 和顺铂的联合应用对胆管癌细胞系 QBC939 的生长抑制作用. *世界华人消化杂志* 2000;8:641-645
- 施明, 王福生, 高兰英. 腺病毒载体的研究进展. *世界华人消化杂志* 2000;8:1282-1286
- Zhou Z, Zhang DF, Ren H. Humoral immunization and cell-mediated immunization evoked by HBsAg and B7-2 Ag co-expression recombinant adenovirus vector. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2001;9:111-113
- Davis HL, Schirmbeck R, Reimann J, Whalen RG. DNA-mediated immunization in mice induces a potent MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocyte response to the hepatitis B envelope protein. *Hum Gene Ther* 1995;6:1447-1456
- 洪源, 成军, 董菁, 李克, 王琳, 王刚, 刘妍. 乙型肝炎病毒 HBsAg 重组疫苗与表面抗原 DNA 疫苗诱导 H-2^b 小鼠免疫应答的实验研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:137-140
- Bett AJ, Haddara W, Prevec L, Graham FL. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:8802-8806
- Barry M, McFadden G. Apoptosis regulators from DNA viruses. *Current Opinion Immunol* 1998;10:422-430
- Morsy MA, Gu M, Motzel S, Zhao J, Lin J, Su Q, Allen H, Franklin L, Parks RJ, Graham FL, Kochanek S, Bett AJ, Caskey CT. An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:7866-7871
- Krougliak V, Graham FL. Development of cell lines capable of complementing E1, E4 and protein IX defective adenovirus type 5 mutants. *Human Gene Therapy* 1995;6:1575-1586



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

