

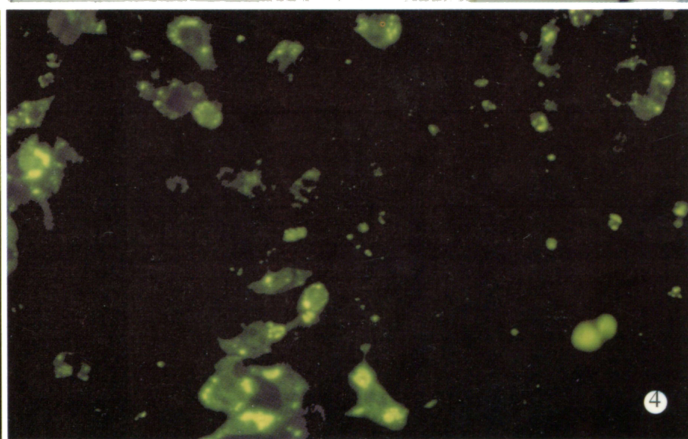
世界华人消化杂志®

**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

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

杨倩,成军,刘妍,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
张树林,西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
项目负责人:成军,100039,北京市西四环中路100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. cj@genetherapy.com.cn
电话:010-66933391 传真:010-63801283
收稿日期:2002-10-29 接受日期:2002-11-18

杨倩,成军,刘妍,王建军,张树林. 抑制性消减杂交技术原理及应用. 世界华人消化杂志 2003;11(4):456-458

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/456.htm>

0 引言

抑制性消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)技术是一种鉴定、分离组织细胞中选择性表达基因的技术. 其原理是以抑制性多聚酶链反应(PCR)反应为基础的 cDNA 消减杂交技术. 通过合成两个不同的接头, 连接于测试 cDNA 片段的 5' 末端, 达到选择性扩增差异性表达的 cDNA 片段, 抑制非目的 cDNA 的扩增. 该技术与其他消减杂交技术相比具有假阳性率低、敏感性高、效率高等优点而得到广泛应用.

1 抑制性消减杂交技术产生的背景

高等真核生物细胞中约含有 4-10 万个不同的基因, 但在生物体的发育过程中只有 15 % 的基因得以表达. 这些基因的选择性表达决定了生物体的各项生命活动: 个体的发育和分化、体内稳态的维持、细胞周期的调控、衰老、细胞凋亡等. 因此要了解人体各项生命活动的调控机制, 就必须将这些差异表达的基因分离、鉴定并作深入研究, 为此人们建立了一系列研究基因表达差异的方法.

cDNA 消减杂交技术是一类较早建立的技术^[1], 其原理是将来比较基因表达差异的双方 cDNA 进行杂交, 通过羟基磷灰石层析、亲和素-生物素结合等方法, 从杂交混合物中分离、鉴定出未杂交的部分. 应用这些方法曾分离、鉴定出一些重要基因, 例如 T 细胞受体(TCR)等, 但不能有效获得低丰度的转录物, 需多步的杂交层析过程. 1992 年 Liang et al^[2,3]建立了 mRNA 差异显示法(mRNA differential display)或称差异显示逆转录 PCR (differential display reverse transcription PCR, DD-RT-PCR), 其特点是原理简单、灵敏度高, 但是假阳性率高达 70 %. 1993 年 Lisitsyn et al^[4,5]在进一步完善 DD-RT-PCR 基础上发展了代表性差异分析法(representational difference analysis, RDA), 该技术充分发挥了 PCR 以指数扩增双链模板, 而以线性扩增单链模板的特性, 通过消减和富集, 使得目的基因片段得到特异性扩增,

但仍需多次杂交、PCR 步骤, 较为繁琐. 1994 年 Hubank et al^[6]将 RDA 技术改良, 设计了 cDNA-RDA 方法, 该方法用于比较具有相近遗传背景、表型不同的两组 cDNA 之间的差异, 但如果两组 cDNA 之间存在较大差异, 以及某些基因在检测子中存在上调表达时, 此方法显得力不从心, 很难达到预期的目的. 1996 年 Diachenko et al^[7,8]在 RDA 的基础上发展了抑制性消减杂交技术, 他克服了 DD-RT-PCR 法的假阳性较高和 RDA 法消减杂交轮次较多的缺点, 适用于克隆分析造成某种特殊表型的目的基因及其功能.

2 抑制性消减杂交方法的原理

抑制性消减杂交技术是一种以抑制性 PCR 反应为基础, 将标准化测试 cDNA 单链步骤和消减杂交步骤合为一体的技术. 通过合成两个不同的接头, 接于经限制性内切酶消化后的测试 cDNA 片段的 5' 末端, 将测试和驱动进行两轮杂交. 标准化步骤均等了测试中的 cDNA 单链丰度, 消减杂交步骤去除测试和驱动之间的共同序列. 利用抑制性 PCR 选择性扩增目的 cDNA 片段, 同时抑制非目的 cDNA 的扩增. 因此, 抑制性消减杂交技术显著增加了获得低丰度差异表达的 cDNA 的概率. 所谓抑制性 PCR 是利用链内退火优于链间退火, 使非目的序列片段两端的长反向重复序列在退火时产生“锅柄样”结构, 无法与引物配对, 从而选择性抑制非目的序列片段扩增^[9]. 抑制性消减杂交技术的基本实验过程如下. 首先, 将要进行比较的两种组织或细胞来源的 mRNA 样品反转录为 cDNA, 把含有目的基因的 cDNA 称为测试(tester), 把参考 cDNA 称为驱动(driver), 用同一种限制性内切酶 Rsa I 切割, 产生末端平头的片段, 将测试 cDNA 分为两份, 每份连接不同的接头, 即: 接头 1(adaptor 1)和接头 2(adaptor 2). 接头为双链 DNA 片段, 且 5' - 端均无磷酸基, 这样保证只有接头中的长链可以与 cDNA 的 5' - 末端连接, 两个接头含有可识别的序列. 接下来进行两次杂交. 第一次杂交在每个测试里加入过量驱动, 然后变性、退火, 根据杂交动力学第二定律, 即丰度越高的分子退火速度越快, 因此测试 cDNA 与驱动 cDNA 相同片段大都形成异源双链分子, 使得差异表达的单链分子得到富集. 第二次杂交, 将进行过首次杂交的两组样品不经变性而直接混合, 只有剩下的经过消减并平均化了的差异表达的单链 cDNA 可以重新结合为新的杂交体分子. 这种杂交体分子两端带有不同的接头 1 和接头 2, 加入新鲜变性的驱动进行第二轮消减杂交, 进一步富集差异表达的杂交体分子, 并用 DNA 酶补平末端, 这样差异表达的测试序列-杂交体分子 5' - 和 3' - 端就有了进行巢式 PCR 所需的不同的退火位点. 最后, 进行两次 PCR 反应, 第一次 PCR 只有两端连接有不同接头的双链 cDNA 片段才得以指数扩增, 而其他形式如一端有接头, 而另一端无接头的只能线性扩增, 没有

引物结合点的不能扩增,还有两端为同一接头的形成袢状而无法获得指数扩增.利用巢式引物进行第二次PCR,富集差异表达的基因片段.PCR产物可以被直接插入T载体,或者利用接头1上的NotI/SmaI/XmaI位点和接头2R上的EagI位点进行定向克隆,或者接头与cDNA连接处的RsaI位点平端克隆.然后利用测序和杂交分析来分析差异表达的序列,或者用PCR产物作探针来筛选DNA文库.

3 抑制性消减杂交技术的优点

在分离、克隆差异表达的基因序列片段中,抑制性消减杂交技术具有独特的优点.虽然基因芯片技术在差异表达基因谱分析中也非常有用,但是,所进行筛选的基因片断的种类是人为限制的.因为基因芯片制备过程中基因的种类和数量就已经决定了检测结果的范围.但是抑制性消减杂交技术的研究目的和可能得到的结果则不受预先设置条件的限制.换句话说,抑制性消减杂交技术更适合差异表达的新基因的克隆化.此外还有以下一些特点:(1)在分离稀少基因方面具有优势:cDNA消减杂交、代表性差异分析、mRNA差异显示方法都不能分离到低丰度的差异表达基因.而抑制性消减杂交技术对高、低丰度的差异表达基因都能有效分离.这一重要优点主要归功于均等(normalization)过程,实验证明经过一轮消减可对稀少转录物富集达1 000-5 000倍^[10].(2)效率高:一次SSH反应可同时分离到几十到几百个差异表达的基因.(3)简便易行:抑制性消减杂交技术所采用的方法简单、成熟、易掌握、易操作.(4)假阳性率低:采用两次消减杂交和两次PCR,保证该方法有较高特异性.有关报道证明抑制性消减杂交方法假阳性率可降至6%.(5)筛选周期短:应用这种方法一般3-4 d即可获得差异表达基因片段的cDNA.

4 抑制性消减杂交技术的应用

抑制性消减杂交技术自1996年报道以来,该技术已被多名研究者采用,并与其他分子生物学技术相结合,克隆了多种新基因.

在慢性肝炎、肝纤维化和肝细胞癌的发生发展中基因调控的研究应用.乙型肝炎、丙型肝炎慢性化机制目前尚不清楚,HBV、HCV进入肝细胞后,病毒基因组表达的反式激活蛋白对肝细胞基因组具有反式调节作用^[11,12],从而影响肝细胞生长调节,可能是HBV、HCV感染慢性化及发生恶性转化的重要分子生物学机制之一.刘妍 et al^[13]在研究乙型肝炎X蛋白(HBxAg)反式激活作用时,应用SSH方法构建了HBxAg反式激活相关基因差异表达的cDNA消减文库,随机挑选65个克隆测序分析,结果主要包括2种类型,第一种是已知基因的序列,与GenBank中数据高度同源(96-100%),其中包括一些已知的看家基因序列和一些与细胞生长调节密切相关的基因序列,如真核翻译启动因子、核糖

体蛋白编码基因,与细胞的转录、翻译功能密切相关;乙型肝炎X基因,与转染的HBx基因的表达有关;胶质母细胞瘤放大的分泌蛋白,肿瘤抑制因子ST13, Bcl-2结合蛋白Nip3,可能与肝细胞凋亡及恶性转化密切相关;S100钙结合蛋白,鸟嘌呤核苷酸蛋白(G-蛋白)与细胞周期生长调节及信号转导途径密切相关.第二种是未知基因序列,共获得15个差异表达的未知序列,其功能有待进一步研究.同时应用抑制性消减杂交技术构建HCV核心蛋白反式激活基因差异表达的cDNA消减文库^[14],经测序分析后,所得克隆包括6个未知序列,56已知的看家基因及与细胞生长调节密切相关的基因如WEE1.这些研究结果对阐明乙、丙型肝炎慢性化及HBV、HCV致肝细胞癌发生之间的关系具有重要的理论意义.Nagayama et al^[15]在研究自身免疫性肝炎(AIH)发病机制的过程中,利用SSH技术,发现AIH肝细胞干扰素诱导蛋白10(interferon inducible protein 10, IP10)mRNA表达较正常肝细胞明显增强,同时运用免疫组化方法证明IP-10在AIH肝细胞中过量表达,且运用逆转录PCR分析63例不同类型肝炎组织标本,AIH中IP-10表达明显高于其他类型肝炎,因此作者认为IP-10表达升高是AIH的标志,IP-10在AIH的发病机制中起重要作用.在肝纤维化研究方面,Cassiman et al^[16]利用SSH技术比较正常鼠HSC与D-半乳糖胺诱发肝炎鼠的HSC mRNA表达差异,结果发现B-晶体蛋白(alpha B-crystallin, ABCRYS)表达上调.实验证实,在人和鼠HSC体外细胞培养中加入gal内毒素后也发现ABCRYS mRNA表达升高,作者认为,ABCRYS可能是HSC激活后的早期标志,有利于HSC存活,对其研究将有利于了解肝纤维化发展的机制.

抑制性消减杂交技术在肿瘤相关基因克隆化中也有重要的应用前景.在肿瘤相关基因的研究中,Miyasaka et al^[17]利用SSH技术研究丙型肝炎相关肝癌及癌旁组织基因表达不同,发现了一些过度表达的基因,7个已知基因包括灶性粘连激酶(focal adhesion kinase,FAK)、结肠癌缺失基因(deleted in colon cancer)、鸟嘌呤结合阻止蛋白(guanine binding inhibitory protein)、M130、胃蛋白酶原C(pepsinogen C)、谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase)、鸟氨酸转氨酶(ornithine aminotransferase)以及2个未知基因(HCC-1和HCC-2).其中灶性粘连激酶磷酸化激活后能阻止凋亡,胃蛋白酶原C的表达在前列腺癌中受雄激素水平的调节^[18],而HCC是以男性为主的疾病^[19],胃蛋白酶原C和灶性粘连激酶在HCC发生中的作用尚不明确,但HCC中二者过度表达可能为研究HCC发病机制提供新的方向.Piter et al^[20]用SSH获得肾细胞癌组织与非转化肾组织差异表达基因,共获得9个在肾细胞癌中差异表达的cDNA,序列分析表明7个与已知基因同源,2个为新基因,克隆的7个已知基因中的5个与肿瘤的恶性表型有关.Wang et al^[21]用SSH技术在食管癌中鉴定出一个命名为EC45基因,其在70%

食管癌中过度表达, 且与核糖体蛋白 L15 的开放读码框架有 100 % 同源性. 说明 SSH 对肿瘤组织是一种高灵敏度的有效的鉴别差异表达序列的方法.

在器官发育方面, Diachenko et al^[7]用 SSH 技术建立了一个睾丸特异性 cDNA 文库, 用消减的 cDNA 混合物作为一个杂交探针来鉴定人 Y 染色体基因库的同源性, 进一步证实了这个人类 DNA 是以睾丸特异性方式而表达. 在免疫学方面, Roh et al^[22]在研究破骨细胞分化过程中基因的调控作用时, 将 SSH 技术与 cDNA 微阵列技术相结合, 建立了破骨细胞与巨噬细胞、破骨细胞与树突状细胞 mRNA 差异性表达文库, 以及 TRANCE 诱导造血干细胞分化为破骨细胞过程中 mRNA 差异性表达文库, 提供了研究破骨细胞分化基因调节及骨肿瘤相关基因的新方法. Li et al^[23]用 SSH 方法检测了人类特异性过敏源性 Th2 细胞中差异表达基因, 分析并鉴定出 72 个序列, 这种差异性 Th2 基因文库可能阐明 Th2 细胞功能和变态反应性疾病的遗传学基础. Wang et al^[24]在寻找脑局部缺血耐受的相关基因中, 用 SSH 方法筛选出差异表达基因基质金属蛋白酶 -1 抑制剂编码基因, 提示其在局部缺血耐受中发挥潜在作用.

高等真核生物的所有生命现象, 例如细胞生长、器官形成、恶性转化都是基因选择性表达的结果, 要弄清这些生命现象的分子调节机制, 就要对选择性表达的基因进行分离、克隆、序列分析, 然后研究其氨基酸组成, 表达产物结构、功能等. 抑制性消减杂交技术为寻找表达基因和研究已知基因的新生物学功能提供了一个有利工具. 并且由于抑制性消减杂交技术可用于比较不同细胞、不同组织的基因表达差异, 因此必将在生物发育、细胞调控、肿瘤、衰老及组织损伤的研究中得到越来越广泛的应用.

5 参考文献

- Lamar EE, Palmer E. Y-encoded, species-specific DNA in mice: evidence that the Y chromosome exists in two polymorphic forms in inbred strains. *Cell* 1984;37:171-177
- Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 1992; 257:967-971
- Liang P, Averboukh L, Keyomarsi K, Sager R, Pardee AB. Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. *Cancer Res* 1992; 52:6996-6998
- Lisitsyn NA. Representational difference analysis: finding the differences between genomes. *Trends Genet* 1995;11:303
- Lisitsyn N, Wigler M. Cloning the difference between two complex genomes. *Science* 1993; 259:946-951
- Hubank M, Schatz DG. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res* 1994;22:5640-5648
- Diachenko L, Lau YC, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:6025-6030
- Diachenko L, Lukyanov S, Lau YF, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol* 1999; 303:349-380
- Siebert PD, Chenchik A, Kellogg DE, Lukyanov KA, Lukyanov SA. An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 1995;23:1087-1091
- Ji W, Wright MB, Cai L, Flament A, Lindpaintner K. Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes. *BMC Genomics* 2002; 3:12
- Rossner MT. Hepatitis B virus x-gene product: a promiscuous transcriptional activator. *J Med Virol* 1992; 36:101-117
- Kato N, Yoshida H, Kioko OS, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C virus C-virus core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412
- 刘妍, 成军, 张跃新, 段惠娟, 牟劲松, 韩萍, 李克, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用抑制性消减杂交技术克隆截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活基因. *中华传染病杂志* 2002;20:218-221
- 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 李莉. 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
- Nagayama K, Enomoto N, Miyasaka Y, Kurosaki M, Chen CH, Sakamoto N, Nakagawa M, Sato C, Tazawa J, Ikeda T. Overexpression of interferon gamma-inducible protein 10 in the liver of patients with type I autoimmune hepatitis identified by suppression subtractive hybridization. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:2211-2217
- Cassiman D, Roskams T, van Pelt J, Libbrecht L, Aertsen P, Crabbe T, Vankelecom H, Deneef C. Alpha B-crystallin expression in human and rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2001;35:200-207
- Miyasaka Y, Enomoto N, Nagayama K, Izumi N, Marumo F, Watanabe M, Sato C. Analysis of differentially expressed genes in human hepatocellular carcinoma using suppression subtractive hybridization. *Br J Cancer* 2001; 85:228-234
- Konishi N, Nakaoka S, Matsumoto K, Nakamura M, Kuwashima S, Hiasa Y, Cho M, Uemura H, Hirao Y. Expression of pepsinogen androgen and estrogen receptors in human prostate carcinoma. *Pathol Int* 1999; 49:203-207
- Nagasue N, Yu L, Yukaya H, Kohno H, Nakamura T. Androgen and oestrogen receptors in hepatocellular carcinoma and surrounding liver parenchyma: impact on intrahepatic recurrence after hepatic resection. *Br J Surg* 1995; 82:542-547
- Piter C, Stassar M, Zoller M. Identification of renal-cell-carcinoma-related cDNA clones by suppression subtractive hybridization. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999;125:487-492
- Wang Q, Yang C, Zhou J, Wang X, Wu M, Liu Z. Cloning and characterization of full-length human ribosomal protein L15 cDNA which was overexpression in esophageal cancer. *Gene* 2001; 263:205-209
- Roh J, Altmann CR, Socci ND, Merkov L, Kim N, So H, Lee O, Takami M, Brivanlou AH, Choi Y. Gene expression profiling of osteoclast differentiation by combined suppression subtractive hybridization and cDNA microarray analysis. *DNA Cell Biol* 2002; 21:541-549
- Li XD, Essayan DM, Liu MC, Beaty TH, Huang SK. Profiling of differential gene expression in activated, allergen-specific human Th2 cells. *Genes Immun* 2001; 2:88-98
- Wang X, Yaish-Ohad S, Li X, Barone FC, Feuerstein GZ. Use of suppression subtractive hybridization strategy for decreased tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 gene expression in brain ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18:1173-1177



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

