

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE

JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003年7月15日 第11卷 第7期

(Volume 11 Number 7)



7/2003

ISSN 1009-3079



名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

World Journal of Gastroenterology® 被 SCI®-E, Research Alert, Current Contents®/Clinical Medicine, Journal Citation Reports, Index Medicus, MEDLINE, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2002 年 JCR® 报告 WJG 影响因子 2.532. 世界华人消化杂志® 被 Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001 年中国科技期刊引证报告: 世界华人消化杂志® 影响因子 3.733, WJG 影响因子 2.920.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2003 年 7 月 15 日 第 11 卷

第 7 期 (总第 111 期)

述 评

- 881 一种新型传染病: 严重急性呼吸综合征 聂青和, 罗新栋, 惠武利
888 病毒性肝炎发病机制中的反式调节机制 成军
897 老年消化系疾病的中西医结合治疗 张万岱

肝 癌

- 900 经动脉灌注蜂毒素-聚乳酸/羟乙酸微球治疗大鼠肝肿瘤 凌昌全, 李琦, 刘晓华, 陈庆华, 彭永海, 罗若茵, 黄雪强
904 大鼠肝癌形成过程中癌基因表达变化的意义 薛玲, 廖冰, 赵国强, 胡瑞德, 车丽洪, 董郡
908 参白胶囊诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡 吴苏冬, 刘长利, 王慧川, 鲍德虎
912 肝细胞癌肝动脉化疗栓塞后 PCNA 和 nm23-H1/NDPK 的研究 冯勇, 赵玲, 张爱华, 刘康达, 刘来村, 王彦辉, 尹进强, 杨秉辉
916 TDI-FP 法分析肝细胞癌组织中 HBV 核心启动子双突变 吕贯廷, 卢冰, 白玉杰, 张剑, 阎小君

病毒性肝炎

- 920 基因表达谱芯片技术筛选乙型肝炎病毒 X 蛋白反式调节基因 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩
925 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式激活基因 10 的克隆化研究 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚
930 基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白 3 反式调节靶基因 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩
935 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活基因 10 的克隆化研究 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚
939 应用表达谱芯片技术对丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式调节基因的研究 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军
943 应用表达谱芯片技术对截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式调节基因的研究 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军
947 丙型肝炎病毒核心蛋白上调细胞周期调节蛋白 Wee1 基因表达研究 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰
951 丙型肝炎病毒核心蛋白上调 NIP3 基因表达研究 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰
955 丙型肝炎病毒核心蛋白上调层粘蛋白 B1 链基因启动子表达活性的研究 杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 杨艳杰, 张树林
959 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 上调新生多肽相关复合物 α 多肽基因的表达 杨倩, 刘妍, 成军, 李克, 王建军, 洪源, 张树林
963 乙型肝炎肝纤维化及癌变时脾脏超声影像, HBV e 系统及 APF 水平 柯伟民, 林国莉, 叶一农, 赖菁, 李建国
966 乙型肝炎病毒核壳蛋白变异株在 HepG₂ 细胞的 HLA-I 表达 陈伟红, 何海棠, 张明霞, 刘志华, 周永兴

基础 研究

- 970 联合应用粉防己碱与甘草酸抑制肝纤维化大鼠细胞外基质表达 王志荣, 陈锡美, 李定国, 魏红山, 黄新, 展玉涛, 陆汉明
975 复方红景天干预肝纤维化大鼠胶原代谢 曾维政, 吴晓玲, 蒋明德, 邓桂英, 陈晓斌, 张勇, 秦建平, 徐辉
979 选择性环氧合酶-2 抑制剂 Celebrex 对胰腺癌 PGE₂ 和血管内皮因子表达的影响 谢传高, 王兴鹏, 董育玮, 杜勤, 蔡建庭, 钱可大
982 早期肠道营养减轻烧伤后肠黏膜损伤的机制研究 彭毅志, 袁志强, 肖光夏
986 胃肠道平滑肌细胞作为 eNOS 基因转移靶细胞的研究 宁守斌, 张忠兵, 沈茜, 谢渭芬, 杨秀疆, 赵新, 信栓力
990 内皮素-1 特异性抗体对应激性胃黏膜损伤的保护作用 段义民, 李兆申, 湛先保, 龚燕芳, 许国铭
994 肠三叶因子在胃黏膜应激性损伤中的修复作用 李兆申, 聂时南, 湛先保, 龚燕芳, 屠振兴, 许国铭
997 p⁵³ 突变与 VEGF 在大鼠胃癌中的表达及中药胃康宁的防治作用 李庆明, 余谦, 闵存云

焦 点 论 坛

- 1001 乙型和丙型肝炎病毒蛋白反式激活作用机制及其意义的研究进展 成军
1002 乙型肝炎病毒表面抗原基因启动子 I 结构及调节研究 李强, 成军, 程明亮, 钟彦伟
1004 乙肝病毒表面抗原基因启动子 II 的结构及调节研究 梁耀东, 成军, 陆荫英, 吴君, 程明亮
1006 乙型肝炎病毒核心启动子的结构及调节研究 杨艳杰, 成军, 陈东风, 刘妍, 杨倩, 王建军
1008 乙型肝炎病毒增强子的结构和调控研究 王建军, 成军, 刘妍, 张忠东, 杨倩, 杨艳杰
1011 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活作用的研究 杨艳杰, 成军, 陈东风, 钟彦伟, 张忠东, 李强

焦点论坛	1014 丙型肝炎病毒复制子的研究 纪冬, 成军, 王建军 1018 丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白的反式激活作用研究 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰 1020 丙型肝炎病毒 5' - 非翻译区的结构与功能研究 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 张树林 1023 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对 14-3-3 蛋白信号转导的影响 成军 1027 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对蛋白酪氨酸激酶信号转导的影响 张忠东, 成军, 钟彦伟, 张树林
课堂讨论	1031 北京大学医学部研究生分子肿瘤学课堂讨论及学术论坛纪要 吕有勇, 许小青
文献综述	1035 骨髓源性肝干细胞的研究进展 杨明智, 彭志海 1037 ERK 信号传导通路与肝星状细胞周期调控 蒋明德, 马洪德, 解方为 1040 趋化因子与肝病的研究进展 胡迎宾, 田德安, 刘南植 1043 游离脂肪酸、胰岛素抵抗与非酒精性脂肪性肝炎 高志强, 陆付耳 1046 KAI1 基因在胰腺癌中抗转移作用的研究 任丽楠, 刘民培, 郭晓钟, 徐建华, 安天义 1050 结直肠癌发病率及解剖部位变化趋势 谢正勇, 卿三华 1054 微阵列技术及其在消化系疾病研究中的应用进展 李新华, 张万岱, 肖冰, 张振书 1059 NO 和 VIP 与胃肠电 - 机械活动的关系 章敏, 曲瑞瑶 1064 TK 基因治疗胃肠道肿瘤的研究进展 刘占奎, 张超 1068 自由基损伤在幽门螺杆菌相关胃病中的作用 陶惠, 朱道银, 邹全明, 毛旭虎
消 息	907 欢迎订阅 2003 年度世界华人消化杂志 915 欢迎订阅 2003 年度 World Journal of Gastroenterology® 946 世界华人消化杂志和 WJG 获得商标注册 950 中国科技期刊走向世界的步伐正在加快 954 世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版目次 985 美国国立医学图书馆 2002 年度收录中国医学期刊名单 993 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 1030 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 1053 WJG 搭建我国消化学基础和临床研究惟一国际交流的平台 1058 提供您使用世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版 1063 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊 附 1 Journal Citation Reports 2002-China 附 2 Journal Citation Reports 2002-GASTROENTEROLOGY & HEPATOLOGY 附 3 2003 年 Index Medicus 收录中国期刊 附 4 2003 年 ISI 收录中国科技期刊
封面故事	970 联合应用粉防己碱与甘草酸抑制肝纤维化大鼠细胞外基质表达 王志荣, 陈锡美, 李定国, 魏红山, 黄新, 展玉涛, 陆汉明

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 2003-07-15
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 张建中
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(PЖ)》
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.

基因表达谱芯片技术筛选乙型肝炎病毒X蛋白反式调节基因

成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩

成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩, 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
成军, 男, 1963-08-17 生, 山东省淄博市人, 汉族. 1986年毕业于第一军医大学军医系, 获医学学士学位, 1989年毕业于军医进修学院, 获传染病学硕士学位, 1994年毕业于北京医科大学, 获传染病学博士学位, 1994-11-17/1997-12-01在美国得克萨斯大学健康科学中心临床免疫与传染病学完成博士后研究, 教授, 主任医师. 现任中华医学会传染病与寄生虫病学分会副主任委员、中华医学会热带病与寄生虫病学分会全国常委、全军医学科学技术委员会传染病与寄生虫病学分会委员. 目前从事传染病特别是病毒性肝炎的临床医疗工作和基础研究工作, 学术研究方向是肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制. 已出版专著 5 部, 发表论文及综述 300 篇.
国家自然科学基金攻关项目, No.C03011402, No.C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No.98D063
军队出国留学人员启动基金项目, No.98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No.01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135
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、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: 2003-01-11 接受日期: 2003-03-21

Screening and identification of genes transactivated by hepatitis B virus X protein by microarray assay

Jun Cheng, Yan Liu, Yuan Hong, Jian-Jun Wang, Qian Yang

Jun Cheng, Yan Liu, Yuan Hong, Jian-Jun Wang, Qian Yang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing, China
Supported by Grants from National Natural Science Foundation No. C03011402, No.C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA.
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Professor, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-01-11 Accepted: 2003-03-21

Abstract

AIM: Hepatitis B virus X protein (HBxAg) is a strong transactivator implicating in the transformation of normal hepatocyte and carcinogenesis. To understand the molecular mechanism of HBxAg in the up- and down-regulated genes of hepatocyte, we conducted microarray assay.

METHODS: The coding sequence of HBxAg was amplified by polymerase chain reaction (PCR) by using pCP10 containing the full length HBV genome DNA as the template. The expression of HBxAg in the transfected HepG2 cells was confirmed by Western blot methods. Total mRNA was isolated from the transfected HepG2 cells with pcDNA3.1 (-) and pcDNA3-HBxAg, respectively. cDNA was prepared by reverse transcription. Microarray was conducted for screening of up- and down-regulated genes of both HepG2 cells.

RESULTS: The expressive vector of pcDNA3-HBxAg has been constructed and confirmed by restriction enzyme digestion

and DNA sequencing. The expression of HBxAg has been confirmed by Western blot analysis. After screening with DNA microarray, we found 16 genes have been up-regulated, and 58 genes have been down-regulated.

CONCLUSION: The HBxAg is a very strong transactivator. Microarray is an important choice for the analysis of target genes of HBxAg transactivation.

Cheng J, Liu Y, Hong Y, Wang JJ, Yang Q. Screening and identification of genes transactivated by hepatitis B virus X protein by microarray assay. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(7):920-924

摘要

目的: 乙型肝炎病毒(HBV)基因组编码的HBxAg是一种很强的反式激活(transactivation)病毒蛋白, 在正常肝细胞的恶性转化(transformation)以及肝细胞癌(HCC)的形成过程中具有十分重要的作用. 为了阐明HBxAg的表达对于肝细胞基因表达谱的影响, 我们应用基因芯片技术, 对于转染和未转染的HepG2细胞进行了分析.

方法: 以含有全长乙型肝炎病毒基因的pCP10质粒作为模板, 应用聚合酶链反应技术(PCR)扩增的HBxAg基因片段, 常规分子生物学技术构建HBxAg的真核表达载体pcDNA3-HBxAg, 利用脂质体转染技术转染HepG2细胞, HBxAg蛋白的表达以Western blot杂交技术证实. 从转染和非转染细胞HepG2中提取总mRNA, 逆转录为cDNA, 并进行基因芯片技术分析.

结果: 经过限制性内切酶分析和序列测定, 证实pcDNA3-HBxAg构建正确. HBxAg在HepG2细胞中的表达以Western blot杂交技术得到证实. 对于HBxAg重组表达载体和空白载体转染的HepG2细胞的基因表达谱, 利用基因芯片技术进行分析. 结果表明, 16种基因的表达水平上调, 58种基因的表达水平下调. 这些基因包括细胞生长、细胞凋亡、信号转导等基因, 相信这些类型的基因在HBxAg的恶性转化中具有十分重要的作用.

结论: HBxAg是一种病毒反式激活蛋白, 对于肝细胞基因表达谱有显著影响; 基因芯片技术是分析病毒反式激活蛋白反式调节基因表达谱的重要技术途径.

成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选乙型肝炎病毒X蛋白反式调节基因. 世界华人消化杂志 2003;11(7):920-924
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/920.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)属于嗜肝 DNA 病毒, 长期的临床观察和广泛的流行病学调查结果表明, HBV 感染与肝细胞癌(HCC, hepatocellular carcinoma)的发生、发展密切相关, 但是关于 HBV 感染引起 HCC 的机制, 虽然已经积累了大量的资料, 但是目前还没有定论^[1-10]. HBV 感染引起 HCC 的机制, 部分通过 HBV DNA 与肝细胞基因组 DNA 之间的整合, 造成肝细胞染色体的不稳定性, 甚至是染色体的异常转位, 整合位点病毒的基因启动子强制性地激活肝细胞生长的相关基因, 造成 HBV 感染肝细胞的过度生长^[11-20]. HBV 感染的肝细胞成为机体免疫系统识别与攻击的对象, 肝脏炎症的长期存在, 造成肝细胞坏死与再生持续存在, HBV 的感染, 导致肝细胞对于环境中的致癌因素, 如黄曲霉毒素(aflatoxin)等作用的敏感性提高, 造成肝细胞的基因突变, 基因突变的不断积累, 在一定条件下发生 HCC, 这一过程十分漫长, 这也与临床上长期受到 HBV 感染的患者, 很多年之后才发生 HCC 的现象是一致的^[21-30]. 近年来, 随着分子生物学技术和理论的应用, 人们认识到 HBV 感染引起的 HCC, 与 HBV 基因组编码的具有反式激活作用的病毒蛋白的反式激活作用有关^[31-40]. 这种反式激活作用具有双重含义, 对于癌基因的激活, 以及对于抑癌基因的抑制. 近年来由于差异表达技术以及微矩阵(microarray)技术的应用, 对于各种肝炎病毒的结构和非结构蛋白反式激活的靶基因进行了筛选鉴定, 获得了大量有参考价值的资料, 但是还需要更为广泛深入的研究^[41-50]. 我们应用基因表达谱芯片技术, 对于 HBV 的 HBxAg 表达反式调节的靶基因进行筛选鉴定, 试图寻找 HBV 感染时, HBxAg 对于肝细胞基因表达谱的影响, 探索 HCC 发生的分子生物学机制.

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态大肠杆菌 JM109(本室保存), pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen); Lipofectamine PLUS 转染试剂(Gibco), mRNA Purification 试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech), PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50×PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒(Clontech), High Pure PCR Product Purification 试剂盒(boehringer mannheim), T7、SP6 通用引物及 pGEM-Teasy 载体(Promega).

1.2 方法

1.2.1 真核表达载体及细胞转染 HBV HBxAg 蛋白真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-HBxAg 为本室构建^[25]. 用 Lipofectamine PLUS 转染试剂将 2 μg pcDNA3.1(-)-HBxAg 及 pcDNA3.1(-)空载体分别转染 35 mm 平皿 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞.

1.2.2 细胞 mRNA 提取 使用 mRNA Purification 试剂盒, 直接提取转染了 HBxAg 表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA, 经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性定量分析.

1.2.3 探针标记 参照 Schena et al 的方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化. Cy3-dUTP 标记对照组细胞 mRNA(5 μg), Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA(5 μg). 乙醇沉淀后溶解在 20 μl 5 × SSC+0.2 % SDS 杂交液中.

1.2.4 芯片制备 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 1 000-3 000 bp. 靶基因以 0.5 μg/μl 溶解于 3 × 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(30 min), 紫外线(UV)交联, 再分别用 0.2 % SDS、水及 0.2 g/L 的硼氢化钠溶液处理 10 min, 晾干备用.

1.2.5 杂交及洗涤 将基因芯片和杂交探针在 95 °C 水浴变性 5 min, 将混合探针加在基因芯片上, 置于 60 °C 杂交 15-17 h. 依次以 2 × SSC+0.2 % SDS、0.1 % × SSC+0.2 % SDS、0.1 % × SSC 洗涤 10 min, 室温晾干.

1.2.6 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 > 2.0, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3 < 0.5, 为绿色荧光, 显示表达减弱.

2 结果

2.1 HBV HBxAg 蛋白的表达载体构建 HBV HBxAg 蛋白真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-HBxAg 由本室构建^[2].

2.2 总 RNA 及 mRNA 的定性、定量分析 总 RNA 的吸光度 A₂₆₀/A₂₈₀>1.89, 热稳定实验 70 °C 保温 1 h 与 -20 °C 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 HBV HBxAg 蛋白上调基因类型 (表 1).

表 1 HBV HBxAg 蛋白上调基因类型

编号	Cy3/Cy5 比值	基因名称
1	2.047	组氨 N- 甲基转移酶(HNMT)
2	2.052	RET 指状蛋白样蛋白 1
3	2.071	蛋白激酶 cAMP 依赖性调节 II 型 β(PRKAR2B)
3	2.079	钠通道 VI 型 α 多肽(SCN6A)
4	2.114	EGF 受体(EGFR)
5	2.136	钾离子内流通道亚家族 J 成员 3(KCNJ3)
6	2.141	IV 型胶原 α 5(COL4A5)
7	2.181	p53 结合蛋白 MDM4
8	2.218	果蝇花生样蛋白 2(PNUTL2)
9	2.232	细胞色素 C 氧化酶亚单位 VIII(COX8)
10	2.329	FKBP 相关蛋白(FAP48)
11	2.338	丝裂原激活蛋白激酶激酶激酶 3(MAP4K3)
12	2.471	鸟苷酸环化酶 1β 3(GUCY1B3)
13	2.591	促胸腺生成素(TMPO)
14	2.741	肌管蛋白相关蛋白 6
15	2.888	推定蛋白 FLJ11806
16	3.290	S100 钙结合蛋白 A11(S100A11)

2.4 HBV HBxAg 蛋白下调基因 在基因芯片的扫描分析中, 如果荧光染料的 Cy5/Cy3 比值在 0.500 以下, 就判断为 HCV NS3 蛋白得下调基因. 在本研究中发现有 34 种基因的表达水平下调(表 2).

表 2 HBV HBxAg 蛋白下调基因类型

编号	Cy3/Cy5 比值	基因名称
1	0.201	硫氧还蛋白还原酶(TXNRD1)
2	0.245	酵母 RAD23 基因同源基因 A(RAD23A)
3	0.250	酵母线粒体内膜转位酶 17 同源基因 B(TIM17B)
3	0.259	TNF 受体超家族成员 5(TNFRSF5)
4	0.262	蛋白磷酸酶 2A α 型(PPP2R1A)
5	0.273	prosaposin(PSAP)
6	0.286	S-腺苷同型半胱氨酸羧化酶(AHCY)
7	0.288	脚手架黏附因子 B(SAFB)
8	0.297	细胞色素 P450 超家族 XXVIIA(CYP27A1)
9	0.300	MGC15351
10	0.303	死亡相关蛋白 3(DAD3)
11	0.305	推定蛋白 FLJ20500
12	0.314	细胞膜糖蛋白(GP110)
13	0.319	热休克蛋白 70A1(HSP1A1)
14	0.323	金属蛋白酶 1(MP1)
15	0.327	组织蛋白酶 D(CTSD)
16	0.327	RNA 多聚酶 II 多肽 E(POLR2E)
17	0.341	4-氨基丁酸氨基转移酶(ABAT)
18	0.350	推定肌管蛋白相关蛋白 8(MTMR8)
19	0.357	肌动蛋白结合 LIM 蛋白 1(ABLIM)
20	0.360	支链酮酸脱氢酶 E1(BCKDHA)
21	0.360	二肽酶 1(DPEP1)
22	0.368	肿瘤蛋白 D52 样蛋白 2(TPD52L2)
23	0.372	推定蛋白 KIAA0123
24	0.375	前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/kexin 7(PCSK7)
25	0.387	缬氨酰-tRNA 合成酶 2(VARS2)
26	0.395	未知基因 23856
27	0.396	酵母 hnRNP 甲基转移酶样蛋白 2(HRMT1L2)
28	0.401	胸腺嘧啶脱氢酶 1(TK1)
29	0.414	谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)
30	0.414	肌型丙酮酸激酶(PKM2)
31	0.424	苯丙氨酸 t-RNA 合成酶样蛋白(FARSL)
32	0.426	Transgelin 2 蛋白(TAGLN2)
33	0.430	干扰素诱导蛋白 35
34	0.436	未知基因序列 zj99f11.r1
35	0.438	CGI-69 蛋白(LOC51629)
36	0.439	蛋白磷酸酶 1, α 型催化亚单位(PPP1CA)
37	0.447	肌醇 1, 3, 4 三磷酸 5/6 激酶(ITPK1)
38	0.447	组织特异性移植抗原 P35B(TSTA3)
39	0.447	热休克蛋白 75(TRAP1)
40	0.450	NADH 脱氢酶
41	0.450	ras 同源基因家族 C(ARHC)
42	0.452	核孔蛋白 153 kD(NUP153)
43	0.459	4 跨膜位点亚家族 A1(MS4A1)
44	0.461	真核翻译起始因子 3 亚单位 8(EIF3S8)
45	0.463	组织蛋白酶 E(CTSE)
46	0.465	磷酸甘露糖突变酶 1(PMM1)
47	0.465	微管蛋白 β 2(TUBB2)
48	0.467	黑色素瘤抗原家族 D1(MAGED1)
49	0.470	颗粒蛋白(GRN)
50	0.474	calpain 小亚单位 1(CAPNS1)
51	0.475	推定蛋白 FLJ21819
52	0.478	黑色素瘤抗原家族 D12(MAGED2)
53	0.483	氯离子通道蛋白 6(CLCN6)
54	0.484	类固醇生成的急性调节蛋白相关蛋白(MLN64)
55	0.485	烯醇化酶 3(ENO3)
56	0.496	真核翻译延伸因子 2(EEF2)
57	0.497	小细胞核核糖体蛋白多肽 A(SNRPA)
58	0.497	TGF β 受体 1(TGFB1)

3 讨论

早期研究发现, 整合的病毒 DNA 编码的 HBxAg 是一种重要的转录激活因子, 对乙型肝炎的慢性化和促进肝细胞的恶性转化有密切关系. 研究 HBxAg 功能的方法大多数采用瞬时表达系统, 将含有 X 基因的表达载体与报告基因载体用共转染的方式来研究. HBxAg 的功能状态与其细胞定位有关, 核内 HBxAg 可通过与 DNA 结合蛋白作用, 激活转录因子或基本转录过程, 通过反式激活转录元件而促进病毒的复制^[51-60]. HBxAg 还能在 DNA 水平激活转录. 已有报道 HBxAg 可以与多种转录激活因子发生相互作用, 这些因子包括 Oct1、ATF、ATF2、CREB3、Egr1、p53、IL-6 及含有 bZip 区的一些因子. 而胞质中的 HBxAg 则主要通过刺激信号转导途径而引起一系列的反应, 激活 AP-1、NF- κ B 等一批转录因子, 干扰细胞内信号转导通路反式激活转录, 导致细胞的转录、增生^[61-70].

HBxAg 功能域的分析, 研究认为, N 末端和 C 末端对其反式激活都不重要, 转录活性区位于 32-148 aa 内: 其中 32-66 区可能为结合功能域, 而 105-148 区富含负电荷, 是其他反式激活因子的典型激活功能域所具有的特征. Arii et al 认为有 3 个关键功能域: 第 46-52 aa (尤其是 Pro-46、His-49、His-52), 第 61-69 aa (尤其是 Cys-61、Gly-67、Pro-68、Cys-69), 第 132-139 aa (尤其是 Phe-132、Cys-137、His-139), 这三段序列在不同的嗜肝病毒中高度保守, 第一段序列形成组氨酸/天冬氨酸功能样特征, 第二与第三段序列与 Kunitz 样丝氨酸蛋白酶抑制剂的 Kunitz 功能区高度同源. N 末端 5-27 aa 或 C 末端 143-154 aa 缺失, 对 HBxAg 活性没有影响^[71-80]. HBxAg 基因序列是高度保守的, 我们在以 HBxAg 基因序列为靶区域, 研究 HBV 在慢性感染患者体内的存在状态时发现, HBxAg 基因具有准种特点, 在其羧基末端存在相对的高变区. 进一步研究发现 HBxAg 基因的异质性和准种特点对于其反式激活作用具有显著的影响^[81-84]. 这些研究结果的差异, 可能是 HBxAg 在不同细胞通过不同因子或途径起作用而导致所需的功能域不同所致.

研究发现 HBxAg 的反式激活作用呈现明显的广谱性, 能够反式激活多种同源或异源的病毒或细胞转录调节基因区, 包括 HBV 增强子/核心启动子、S 基因启动子, SV40 的增强子及早期启动子, 单纯疱疹病毒胸腺嘧啶核苷激酶启动子(HSV-TK), 人 T 淋巴细胞 I 型病毒(HTLV-1)的长末端重复序列(LTR)、人免疫缺陷病毒 I 型(HIV-1)、劳氏肉瘤病毒(RSV)及 β -干扰素等的启动子. HBxAg 也可反式激活聚合酶(pol)I、II、III 启动子, 并且对 c-myc、HLA-DR、MHC-I 及 IL-8 等都有反式激活作用.

我们以含有全长乙型肝炎病毒基因的 pCP10 质粒作为模板, 应用聚合酶链反应技术(PCR)扩增的 HBxAg 基因片段, 常规分子生物学技术构建 HBxAg 的真核表

达载体 pcDNA3-HBxAg, 利用脂质体转染技术转染 HepG2 细胞, HBxAg 蛋白的表达以 Western blot 杂交技术证实. 从转染和非转染细胞 HepG2 种提取总 mRNA, 逆转录为 cDNA, 并进行基因芯片技术分析. 结果表明, 16 种基因的表达水平上调, 58 种基因的表达水平下调. 这些基因包括细胞生长、细胞凋亡、信号转导等基因, 相信这些类型的基因在 HBxAg 的恶性转化中具有十分重要的作用.

Wu et al^[85]应用 NCI 建立的含有 2 208 基因点的 Oncochip microarray 系统, 对于新鲜分离的人肝细胞与表达 HBxAg 的人 HCC 细胞系 SK-Hep-1 的基因表达谱进行了比较分析. 基因芯片的研究结果又通过 Northern blot 杂交分子进行证实. 发生变化的基因类型包括一些癌基因如 c-myc、c-myb, 肿瘤抑制基因如 APC、p53、WAF1、WT1 等. 进一步证实了 HBxAg 的恶性转化作用机制主要是通过对于癌基因和肿瘤抑制基因的异常调节而实现的.

Han et al^[86]对于稳定表达 HBxAg 的 HepG2(HepG2-HBx) 的基因表达谱进行分析, 在 588 个靶基因中, 2 种癌基因 IGFR-2、RhoA 和 1 种细胞周期调节基因 p55CDC, 以及 3 种信号转导基因如凝血酶受体(thrombin receptor)、MLK-3、MacMARCKS, 1 种应急应答基因 HSP27, 2 种细胞凋亡调节基因 FAST 激酶、Bak, 1 种转录因子 p21/WAF 基因的表达水平显著上调. 1 种转录因子即转录延长因子 SII (transcription elongation factor SII), 2 种生长因子如单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein 1)、T 淋巴细胞分泌蛋白 I-309 (T-lymphocyte-secreted protein I-309)显著下调. 这些研究结果表明, HBxAg 对于肝细胞的基因表达谱有显著的影响, 基因芯片技术是研究基因表达谱改变的有效分析技术^[87-98].

4 参考文献

- 1 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 北京: 第 1 版. 人民军医出版社, 1997:42-46
- 2 成军, 斯崇文. 转导肝细胞基因治疗研究进展. 中华内科杂志 1993; 32:195-197
- 3 成军, 斯崇文. 抗病毒基因治疗研究进展. 中华实验和临床病毒学杂志 1993;7:436-439
- 4 董菁, 成军, 王勤环, 刘友昭, 王刚, 施双双, 夏小兵, 邵清, 斯崇文. 慢性乙型肝炎患者体内乙型肝炎病毒准种特点的初步研究. 中华内科杂志 2000;39:838-839
- 5 赵鸿, 成军, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 S 基因单独和联合白介素-12 诱导小鼠产生特异性免疫应答. 中华传染病杂志 2000;18:190-191
- 6 柯亨宁, 斯崇文, 成军, 于敏, 刘丹, 田秀兰. 表面抗原 DNA 疫苗诱导小鼠体液免疫及抑制转基因鼠表面抗原的产生. 中华内科杂志 2000;39:319-322
- 7 成军, 钟彦伟, 施双双, 倪勤, 夏小兵, 董菁, 王刚, 刘友昭, 王琳, 刘妍, 杨继珍, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒表面抗原人源单链可变区抗体基因的克隆与鉴定. 肝脏 2000;5:130-132
- 8 成军, 斯崇文. HBV DNA 转染细胞系的建立及应用研究进展. 国外医学·流行病学传染病学分册 1994;21:60-64
- 9 成军. 病毒基因组的反式调控及其在抗病毒基因治疗方案设计中的应用. 国外医学·流行病学传染病学分册 1994;21:241-244
- 10 成军, 斯崇文. 肝脏疾病基因治疗研究进展. 临床肝胆病杂志 1995; 11:1-4
- 11 成军, 斯崇文, 王勤环, 于敏. 人白介素-2 基因表达载体的构建及抗乙型肝炎病毒作用. 中华肝脏病杂志 1995;3:67-70
- 12 Dong J, Cheng J, Wang QH, Liu Y, Wang G, Shi SS, Xia XB, Shao Q, Si CW. The preliminary study on hepatitis B virus (HBV) quasispecies in patients with chronic HBV infection.

- Chin J Infect Dis* 2001;19:199-203
- 13 成军. 决定乙型肝炎病毒嗜肝特性的分子机制. 国外医学病毒学分册 1995;2:78-81
- 14 成军, 斯崇文, 王勤环, 于敏. 人白介素-2 基因转移表达及抗乙型肝炎病毒和诱导 LAK 细胞活性的研究. 中华医学杂志 1995;75:388-391
- 15 赵鸿, 成军, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 S 基因单独与白介素-12 基因联合免疫小鼠诱生的体液免疫应答. 传染病信息 1999;12:69-71
- 16 董菁, 成军, 王勤环, 皇甫竟坤, 施双双, 张国庆, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 DNA 序列异质性及准种特点的研究. 中华医学杂志 2002;82:81-85
- 17 Cheng J. Progress in gene therapy for liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14(Suppl):A261-262
- 18 成军. 肝再生增强因子超家族研究进展. 生物学杂志 2000;17:4-6
- 19 刘妍, 成军. HBV 截短的表抗原蛋白 MHBs 的反式激活作用. 国外医学病毒学分册 2000;7:190-193
- 20 董菁, 成军, 王勤环, 王刚, 施双双, 夏小兵, 斯崇文. 外周血中乙型肝炎病毒截短型囊膜中蛋白基因的克隆化与分析. 中华肝脏病杂志 2001;9:163-165
- 21 刘妍, 成军, 董菁, 夏小兵, 李克, 杨继珍. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的初步研究. 肝脏 2001;6:8-10
- 22 钟彦伟, 成军, 施双双, 董菁, 夏小兵, 刘妍, 李克, 杨继珍. 抗 HBsAg 人源单链抗体的筛选与可溶性抗体的表达. 中国病毒学 2001;16:105-108
- 23 柯亨宁, 斯崇文, 成军, 于敏, 刘丹. HBsAg 及其与小鼠白介素-18 融合蛋白表达质粒的构建和 DNA 免疫. 中华传染病杂志 2001;19:77-80
- 24 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 洪源, 皇甫竟坤, 王刚, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒逆转录酶基因序列准种与变异特点的研究. 病毒学报 2001;17:270-272
- 25 刘妍, 董菁, 成军, 夏小兵, 李克, 王琳, 施双双, 段惠娟, 杨继珍. 乙型肝炎病毒 X 基因在真核细胞中的表达及反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. 解放军医学杂志 2001;26:404-406
- 26 成军, 李莉. 胸腺素 α 1 在慢性病毒性肝炎治疗中的应用. 国外医学病毒学分册 2001;8:55-59
- 27 成军. 乙型肝炎病毒准种研究的意义. 中华传染病杂志 2001;19:5-6
- 28 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 洪源, 皇甫竟坤, 王刚, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒逆转录酶区基因序列准种与变异研究. 解放军医学杂志 2001;26:823-825
- 29 成军. 病毒性肝炎的分子发病机制. 临床肝胆病杂志 2001;17(增刊):31-35
- 30 成军, 李莉. 阿地福韦在慢性乙型肝炎治疗中的应用. 国外医学病毒学分册 2001;8:85-91
- 31 洪源, 成军. 乙型肝炎病毒 mRNA 转录后剪接的研究进展. 国外医学病毒学分册 2001;8:115-119
- 32 皇甫竟坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒核心基因启动子序列突变及准种. 世界华人消化杂志 2001;9:1323-1325
- 33 成军, 朱传琳. 肝炎病毒对双链 RNA 激酶 PKR 的调节作用. 国外医学微生物学分册 2000;23:1-3
- 34 成军, 董菁. 乙型肝炎病毒前基因组启动子的结构与调节机制. 中华医学研究杂志 2001;1:122-125
- 35 Zhao H, Cheng J, Si CW. Effects of IL-12 on the immune response in mice inoculated with nucleic acid vaccine expressing S protein of hepatitis B virus. *Chin Med J* 2001;114:47-52
- 36 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 皇甫竟坤, 王刚, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒前 C/C 基因准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002;27:122-123
- 37 成军, 李莉. 清除乙型肝炎病毒的非细胞裂解机制. 世界华人消化杂志 2002;10:73-76
- 38 董菁, 成军, 王勤环, 王刚, 施双双, 刘妍, 夏小兵, 李莉, 张国庆, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 C 基因启动子区准种与变异特点的研究. 中华实验与临床病毒学杂志 2002;16:264-266
- 39 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 基因酵母表达载体构建及表达. 世界华人消化杂志 2002;10:15-18
- 40 董菁, 施双双, 皇甫竟坤, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 X 基因准种特点的研究. 中国病毒学 2002;17:22-26
- 41 Zhang Z, Torii N, Furusaka A, Malayaman N, Hu Z, Liang TJ. Structural and functional characterization of interaction between hepatitis B virus X protein and the proteasome complex. *J Biol Chem* 2000;275:15157-15165
- 42 Dorjsuren D, Lin Y, Wei W, Yamashita T, Nomura T, Hayashi N, Murakami S. RMP, a novel RNA polymerase II subunit 5-interacting protein, counteracts transactivation by hepatitis B virus X protein. *Mol Cell Biol* 1998;18:7546-7555
- 43 Lee Y, Bong Y, Poo H, Lee Y, Park J, Oh S, Sohn M, Lee S, Park U, Kim N, Hyun S. Establishment and characterization of cell lines constitutively expressing hepatitis B virus X-protein. *Gene* 1998;207:111-118

- 44 Melegari M, Scaglioni PP, Wands JR. Cloning and characterization of a novel hepatitis B virus x binding protein that inhibits viral replication. *J Virol* 1998;72:1737-1743
- 45 Kuzhandaivelu N, Cong YS, Inouye C, Yang WM, Seto E. XAP2, a novel hepatitis B virus X-associated protein that inhibits X transactivation. *Nucleic Acids Res* 1996;24:4741-4750
- 46 Cheong JH, Yi M, Lin Y, Murakami S. Human RPB5, a subunit shared by eukaryotic nuclear RNA polymerases, binds human hepatitis B virus X protein and may play a role in X transactivation. *EMBO J* 1995;14:143-150
- 47 Kim YH, Kang SK, Lee YI. Functional analysis of hepatitis B virus transactivator X: implication of the leucine zipper-like region and C-terminal seven conserved amino acids in functional regions. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;197:894-903
- 48 Nakatake H, Chisaka O, Yamamoto S, Matsubara K, Koshy R. Effect of X protein on transactivation of hepatitis B virus promoters and on viral replication. *Virology* 1993;195:305-314
- 49 Wu JY, Zhou ZY, Judd A, Cartwright CA, Robinson WS. The hepatitis B virus-encoded transcriptional trans-activator hbx appears to be a novel protein serine/threonine kinase. *Cell* 1990;63:687-695
- 50 Jameel S, Siddiqui A, Maguire HF, Rao KV. Hepatitis B virus X protein produced in *Escherichia coli* is biologically functional. *J Virol* 1990;64:3963-3966
- 51 洪源, 成军. 肝炎病毒 DNA 疫苗的研究. 世界华人消化杂志 2002; 10:221-222
- 52 董菁, 成军, 王勤环, 刘友昭, 王刚, 施双双, 夏小兵, 邵清, 斯崇文. 慢性乙型肝炎患者体内乙型肝炎病毒准种特点的初步研究. 临床肝胆病杂志 2002;18:17-19
- 53 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒蛋白结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:213-215
- 54 刘妍, 成军, 陆荫英, 李克. 乙型肝炎病毒蛋白反式激活基因的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:217-219
- 55 陆荫英, 李克, 刘妍, 王琳, 成军, 张玲霞. 乙型及丙型肝炎病毒受体的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:211-213
- 56 成军, 董菁, 刘妍, 李莉, 斯崇文, 王勤环, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒准种研究的临床意义. 世界华人消化杂志 2002;10:209-221
- 57 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
- 58 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒前 S2 基因序列异质性的研究. 中华内科杂志 2002;41:1-4
- 59 成军, 李莉. 拉米夫定在肝脏移植患者乙型肝炎再感染预防与治疗中的应用 - 第36届欧洲肝病年会巡礼. 国外医学病毒学分册 2001; 8:185-189
- 60 Cheng J. Molecular pathogenesis of viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;16(Suppl):A185
- 61 成军, 李莉. 恩替卡韦及其抗 HBV 效果. 国外医学·流行病学传染病学分册 2002;29:12-14
- 62 董菁, 施双双, 王业东, 皇甫竞坤, 洪源, 李莉, 张玲霞, 成军. cDNA 文库噬菌体展示法的建立及乙型肝炎病毒前 S1 蛋白结合蛋白筛选. 解放军医学杂志 2002;27:321-322
- 63 成军, 李莉. 新型抗乙型肝炎病毒药物氟胞苷的作用及机制. 世界感染杂志 2002;2:1-4
- 64 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竞坤, 洪源, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 C 基因启动子区异质性检测的初步研究. 临床检验杂志 2002;20:72-74
- 65 Lu YY, Li K, Cheng J, Wang L, Liu Y, Zhang LX. Cloning and expression of pre-S1 gene of hepatitis B virus in yeast. *Hepatobiliary Pancreatic Dis Int* 2002;1:238-242
- 66 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
- 67 董菁, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒前 C/C 基因准种与变异特点的研究. 中华微生物学与免疫学杂志 2002;22:27
- 68 董菁, 成军, 王勤环, 刘妍, 王刚, 施双双, 夏小兵, 李克, 邵得志, 斯崇文. 乙型肝炎病毒囊膜中蛋白与白介素 - 18 联合基因免疫的实验研究. 中华传染病杂志 2002;20:148-151
- 69 陆荫英, 刘妍, 成军, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 蛋白的功能研究进展. 国外医学病毒学分册 2002;9:33-36
- 70 王琳, 陆荫英, 成军, 于敏, 李克, 刘妍. 白介素 - 18 逆转录病毒载体的构建及抗乙型肝炎病毒的研究. 解放军医学杂志 2002;27:699-701
- 71 刘妍, 成军, 张跃新, 段惠娟, 牟劲松, 韩萍, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 截短型 HBsAg 中蛋白反式激活基因的克隆. 中华传染病杂志 2002;20:218-221
- 72 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉. 乙型肝炎病毒表面抗原 / 抗体同时阳性患者体内 S 基因序列的分析研究. 中国公共卫生 2002;18:535-537
- 73 董菁, 刘妍, 皇甫竞坤, 施双双, 王刚, 洪源, 陈国凤, 李莉, 陈菊梅, 成军. 乙型肝炎病毒表面抗原基因多态性的初步研究. 胃肠病学和肝病杂志 2002;11:130-135
- 74 陆荫英, 成军, 张玲霞. 分子伴侣及其与乙型肝炎病毒的关系. 胃肠病学和肝病杂志 2002;11:177-180
- 75 成军, 李莉. 抗肝炎病毒序贯治疗方案的研究进展. 国外医学病毒学分册 2002;9:75-79
- 76 陆荫英, 王琳, 刘妍, 于敏, 李克, 王业东, 张玲霞, 成军. 乙型肝炎病毒核心抗原单链抗体细胞内免疫抗乙肝病基因治疗研究. 世界华人消化杂志 2002;10:765-769
- 77 刘妍, 成军, 董菁, 王琳, 王刚, 夏小兵. HBV X 蛋白与 HCV 核心蛋白协同反式激活 SV40 病毒早期启动子 / 增强子的研究. 中华实验与临床病毒学杂志 2002;16:39-41
- 78 Deng H, Dong J, Cheng J, Huangfu JK, Shi SS, Hong Y, Ren XM, Li L. Quasispecies groups in the core promoter region of hepatitis B virus. *Hepatobiliary Pancreatic Dis Int* 2002;1:392-396
- 79 钟彦伟, 成军, 施双双, 赵景民, 王刚, 夏小兵, 田小军, 李莉, 张玲霞. HBsAg 人源噬菌体单链抗体的筛选及其在临床治疗和诊断中的应用. 中华实验和临床病毒学杂志 2002;16:223-225
- 80 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 洪源, 郎振为, 皇甫竞坤, 李莉, 斯崇文. HBsAg 中蛋白与 IL - 18 联合核酸免疫 HBsAg 转基因小鼠的实验研究. 中华微生物与免疫学杂志 2002;22:518-519
- 81 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. HCV 核心蛋白与截短型 HBV 表面抗原中蛋白协同反式激活功能的研究. 中华肝病杂志 2002;10:354-357
- 82 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前 - S2 基因酵母表达载体的构建及表达. 胃肠病学和肝病杂志 2002;11:222-224
- 83 陆荫英, 王琳, 刘妍, 于敏, 李克, 张玲霞, 王业东, 成军. 乙型肝炎病毒表面抗原单链抗体细胞内免疫抗乙肝病基因治疗研究. 军医进修学院学报 2003;24:49-51
- 84 吴欣, 黄祖瑚, 成军, 吴兴柳, 董菁, 陆北川. 白介素 - 12 和白介素 - 18 质粒对 HBcAg DNA 疫苗诱导小鼠(H-2d)体液免疫应答的影响. 南京医科大学学报 2002;22:284-287
- 85 Wu CG, Salway DM, Forgues M, Valerie K, Farnsworth J, Markin RS, Wang XW. Distinctive gene expression profiles associated with hepatitis B virus x protein. *Oncogene* 2001;20:3674-3682
- 86 Han J, Yoo HY, Choi BH, Rho HM. Selective transcriptional regulations in the human liver cell by hepatitis B viral X protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;272:525-530
- 87 夏小兵, 成军, 杨继珍, 钟彦伟, 王刚, 方洪清, 刘妍, 李克, 董菁. 抗 HBsAg 单链抗体靶向干扰素的构建及原核表达. 中华肝病杂志 2002;10:28-30
- 88 钟彦伟, 成军, 王刚, 田小军, 陈新华, 李莉, 陈菊梅, 张玲霞. 乙型肝炎病毒核心抗原人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. 中国公共卫生 2002;18:153-154
- 89 成军. 乙型肝炎病毒基因异质性及准种特点研究的临床意义. 解放军医学杂志 2002;27:112-115
- 90 董菁, 李进, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 洪源, 王业东, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒基因组准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002;27:116-118
- 91 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 王刚, 王琳, 李莉. 乙型肝炎病毒 X 基因异质性及其反式激活功能的影响. 解放军医学杂志 2002;27:125-127
- 92 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 韩萍, 牟劲松, 李克, 钟彦伟. 乙型肝炎病毒核心启动子区基因异质性及对其转录活性的影响. 解放军医学杂志 2002;27:128-130
- 93 成军, 董菁. 乙型肝炎病毒前基因组启动子的调节机制. 国外医学·流行病学传染病学分册 2002;29:15-18
- 94 董菁, 成军, 皇甫竞坤, 洪源, 王刚, 陈国凤, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒序列个体化变异的初步观察. 解放军医学杂志 2002;27: 119-121
- 95 钟彦伟, 成军, 王刚, 陈新华, 李克, 李莉, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒核心蛋白人源单链抗体在大肠杆菌中的表达. 免疫学杂志 2002;18:85-88
- 96 韩萍, 刘妍, 成军, 王刚, 陆荫英, 李克, 李莉. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白上调 c - myc 基因表达的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:141-144
- 97 Twu JS, Wu JY, Robinson WS. Transcriptional activation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat by hepatitis B virus X-protein requires de novo protein synthesis. *Virology* 1990;177:406-410
- 98 Sninsky JJ, Siddiqui A, Robinson WS, Cohen SN. Cloning and endonuclease mapping of the hepatitis B viral genome. *Nature* 1979;279:346-348



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

