

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

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

成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚, 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

军队回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: 010-6693-3391 传真: 010-6380-1283

收稿日期: 2003-01-11 接受日期: 2003-03-21

Identification and characterization of gene 10 transactivated by hepatitis B virus X protein with DNA microarray assay

Jun Cheng, Yan Liu, Yuan Hong, Lin Wang, Yan-Wei Zhong, Jing Dong, Gang Wang

Jun Cheng, Yan Liu, Yuan Hong, Lin Wang, Yanwei Zhong, Jing Dong, Gang Wang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Supported by the National Natural Science Foundation of China No. C03011402, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA, No.98H038

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhonglu, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2003-01-11 Accepted: 2003-03-21

Abstract

AIM: To study the target genes transactivated by HBxAg.

METHODS: Specific primers were designed and synthesized according to the HBV DNA sequence of subtype. Polymerase chain reaction (PCR) was conducted to amplify HBxAg coding sequence by using pCP10 plasmid containing 2 copies of head to tail HBV DNA as the template. The expressive vector of pcDNA3-HBxAg was constructed for the transfection of hepatoblastoma cell line HepG2 by Lipofectamine PLUS reagent. Total RNA was prepared from HepG2 and HepG2 cells transfected by pcDNA-HBxAg vector. The RNA was reversely transcribed for further microarray assay.

RESULTS: From the microarray assay, 16 genes were found to be up-regulated, and 58 genes down-regulated. Among

them, one gene named XTP10 without known function with 1 206 nt in length, was up-regulated. The encoded protein consisted of 401 amino acid residues (aa).

CONCLUSION: HBxAg is a potential transactivator. DNA microarray is a liable and efficient method for analysis of differentially expressed genes. Molecular biological methods in combination with bioinformatics pave the way for the discovery of new genes transactivated by HBxAg with unknown functions.

Cheng J, Liu Y, Hong Y, Wang L, Zhong YW, Dong J, Wang G. Identification and characterization of gene 10 transactivated by hepatitis B virus X protein with DNA microarray assay. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(7):925-929

摘要

目的: 乙型肝炎病毒(HBV)X蛋白(HBxAg)是一种具有反式激活作用的病毒蛋白质。为了探索HBxAg蛋白反式激活作用新的靶基因, 利用基因芯片技术(DNA chips)对于表达和不表达HBxAg的HepG2细胞的基因表达谱进行比较, 以期发现HBxAg蛋白反式激活作用的新靶点, 为阐明HBxAg的反式激活作用分子生物学机制, 以及HBV相关的肝细胞癌(HCC)形成的分子生物学机制开辟新的研究方向。

方法: 以含有2拷贝头尾连接的HBV DNA的质粒pCP10作为模板, 根据ayw亚型的HBV DNA序列设计、合成引物, PCR扩增产物克隆到真核表达载体pcDNA3.1(-)中, 转染肝母细胞瘤细胞系HepG2, 提取RNA并进行逆转录。进行基因芯片技术分析。以生物信息学技术, 克隆、鉴定新基因。

结果: 在16种HBxAg上调的靶基因中, 其中包括未知功能基因, 利用生物信息学技术, 获得HBxAg蛋白反式激活作用的新型靶基因, 开放读码框架(ORF)长度为1 206个核苷酸(nt), 编码产物由401个氨基酸残基(aa)组成, 命名为XTP10。

结论: HBxAg是一种具有反式激活作用的蛋白。基因芯片技术是进行基因表达谱分析的可靠、有效技术。分子克隆技术结合生物信息学技术, 是目前鉴定、克隆未知功能新基因的有效技术途径。

成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚。乙型肝炎病毒X蛋白反式激活基因10的克隆化研究。世界华人消化杂志 2003;11(7):925-929

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/925.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)基因组中最小的开放读码框架

(ORF)编码的X蛋白(HBxAg)是一种具有反式激活(transactivation)作用的病毒蛋白,在HBV感染肝细胞的恶性转化中具有十分重要的作用^[1-4].关于HBxAg反式激活作用的机制以及在肝细胞癌(HCC, hepatocellular carcinoma)发生发展中的作用,已经十分明确,但是,还有许多方面没有阐明^[5-7].为了寻找HBxAg反式激活的新的靶基因,我们应用基因芯片(DNA chips)技术,对于HBxAg蛋白反式激活作用的靶基因进行筛选,证实一种未知功能基因是HBxAg反式激活作用的靶基因,对于其基因序列进行了分析.

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×CR 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 乙型肝炎病毒 X 蛋白真核表达载体的构建 以含有2拷贝头尾连接的HBV DNA的质粒pCP10作为模板,根据 ayw 亚型的HBV DNA 序列设计、合成引物,进行PCR扩增.扩增的HBxAg的编码基因首先克隆到TA载体中进行序列测定,然后亚克隆到真核表达载体pcDNA3.1(-)中,构建真核表达载体pcDNA3.1(-)-HBxAg^[8].

1.2.2 肝母细胞瘤细胞系 HepG2 的转染 肝母细胞瘤细胞系 HepG2 以 RPMI1640 完全培养基培养,前1 d传代,75 %融合度的细胞,应用Lipofectamine PLUS转染试剂进行转染,真核表达载体质粒DNA用量为1 μg.转染后48 h收获细胞^[9-13].

1.2.3 总 RNA 的提取和逆转录 应用 Trizol 试剂盒提取转染细胞的总 RNA,并进行逆转录^[14].

1.2.4 基因芯片技术分析 按照联合基因公司的基因表达谱芯片产品说明,进行基因表达谱分析.

2 结果

2.1 乙型肝炎病毒X蛋白真核表达载体的构建及细胞转染 经过限制性内切酶消化作图分析,以及插入基因片段的核苷酸序列分析,证实构建的真核表达载体正确^[8].

2.2 总 RNA 的提取和逆转录 获得 RNA 总量为 2.6 μg,并进行逆转录^[8].

2.3 基因芯片技术分析 经过基因芯片技术分析,证实转染真核表达载体pcDNA3-HBxAg的HepG2细胞与转染空白载体pcDNA3.1(-)的HepG2细胞进行比较,发现HBxAg蛋白上调的靶基因有16种,下调的靶基因有58种.

2.4 新基因的序列分析 在16种HBxAg上调的靶基因中,其中包括未知功能基因,利用美国国立卫生院(NIH)国立医学图书馆(NLM)国立生物工程中心(NCBI)建立的核苷酸序列数据库(GenBank)及其同源基因序列的搜索(BLASTN),获得HBxAg蛋白反式激活作用的新型靶基因(图1),命名为XTP10.新基因的开放读码框架(ORF)长度为1206个核苷酸(nt),编码产物由401个氨基酸残基(aa)组成.新基因的核苷酸序列在GenBank中登录,登录号为NM_024824.

```
ATG ATC TCA TTG ACG AAG ACC TCA ACT TTG
M I S L T K T S T L
TGC AGG AGA ATC CCT TAT CTC AGA AAA AAA
C R R I P Y L R K K
CCT ACA GTG ACA CTT ACA TAT GGT TCT TCT
P T V T L T Y G S S
CGC CCT TCT ATT GAA ATT TAT CGA CCA CCT
R P S I E I Y R P P
GCA AGT AGA AAT GCA GAT AGT GGT GTT CAT
A S R N A D S G V H
TTA AAC AGG TTG CAA TTT CAA CAG CAG CAG
L N R L Q F Q Q Q Q
AAT AGT ATT CAT GCT GCC AAG CAG CTT GAT
N S I H A A K Q L D
ATG CAG AGT AGT TGG GTA TAT GAA ACA GGA
M Q S S W V Y E T G
CGT TTG TGT GAA CCA GAG GTG CTT AAC AGC
R L C E P E V L N S
TTA GAA GAA ACG TAT AGT CCG TTC TTT AGA
L E E T Y S P F F R
AAC AAC TCG GAG AAA ATG AGT ATG GAG GAT
N N S E K M S M E D
GAA AAC TTT CGG AAG AGA AAG TTG CCT GTG
E N F R K R K L P V
GTA AGT TCA GTT GTT AAA GTA AAA AAA TTC
V S S V V K V K K F
AAT CAT GAT GGA GAA GAG GAG GAA GAA GAT
N H D G E E E E E D
GAT GAT TAC GGG TCT CGA ACA GGA AGC ATC
D D Y G S R T G S I
TCC AGC AGT GTG TCT GTG CCT GCA AAG CCT
S S S V S V P A K P
GAA AGG AGA CCT TCT CTT CCA CCT TCT AAA
E R R P S L P P S K
CAA GCT AAC AAG AAT CTG ATT TTG AAG GCT
Q A N K N L I L K A
ATA TCT GAA GCT CAA GAA TCC GTA ACA AAA
I S E A Q E S V T K
ACA ACT AAC TAC TCT ACA GTT CCA CAG AAA
T T N Y S T V P Q K
```

```

CAG ACA CTT CCA GTT GCT CCC AGA ACT CGA
Q   T   L   P   V   A   P   R   T   R
ACT TCT CAA GAA GAA TTG CTA GCA GAA GTG
T   S   Q   E   E   L   L   A   E   V
GTC CAG GGA CAA AGT AGG ACC CCC AGA ATA
V   Q   G   Q   S   R   T   P   R   I
AGT CCC CCC ATT AAA GAA GAG GAA ACA AAA
S   P   P   I   K   E   E   E   T   K
GGA GAT TCT GTA GAA AAA AAT CAA GCT GAG
G   D   S   V   E   K   N   Q   A   E
ATG AGT GAA CTG AGT GTG GCA CAG AAA CCA
M   S   E   L   S   V   A   Q   K   P
GAA AAA CTT TTG GAG CGC TGC AAG TAC TGG
E   K   L   L   E   R   C   K   Y   W
CCT GCT TGT AAA AAT GGG GAT GAG TGT GCC
P   A   C   K   N   G   D   E   C   A
TAC CAT CAC CCC ATC TCA CCC TGC AAA GCC
Y   H   H   P   I   S   P   C   K   A
TTC CCC AAT TGT AAA TTT GCT GAA AAA TGT
F   P   N   C   K   F   A   E   K   C
TTG TTT GTT CAC CCA AAT TGT AAA TAT GAT
L   F   V   H   P   N   C   K   Y   D
GCA AAG TGT ACT AAA CCA GAT TGT CCC TTC
A   K   C   T   K   P   D   C   P   F
ACT CAT GTG AGT AGA AGA ATT CCA GTA CTG
T   H   V   S   R   R   I   P   V   L
TCT CCA AAA CCA GTT GCA CCA CCA GCA CCA
S   P   K   P   V   A   P   P   A   P
CCT TCC AGT AGT CAG CTC TGC CGT TAC TTC
P   S   S   S   Q   L   C   R   Y   F
CCT GCT TGT AAG AAG ATG GAA TGT CCC TTC
P   A   C   K   K   M   E   C   P   F
TAT CAT CCA AAA CAT TGT AGG TTT AAC ACT
Y   H   P   K   H   C   R   F   N   T
CAA TGT ACA AGA CCG GAC TGC ACA TTC TAC
Q   C   T   R   P   D   C   T   F   Y
CAT CCC ACC ATT AAT GTC CCA CCA CGA CAT
H   P   T   I   N   V   P   P   R   H
GCC TTG AAA TGG ATT CGA CCT CAA ACC AGC
A   L   K   W   I   R   P   Q   T   S
GAA TAG
E   *

```

图1 HBxAg反式激活靶基因XTP10核苷酸及其编码产物序列。

3 讨论

肝炎病毒的基因组编码一系列具有反式激活作用的病毒蛋白质,例如HBV基因组编码的羧基末端截短型表面抗原中蛋白(MHBst)、HBxAg,丙型肝炎病毒(HCV)基因组编码的核心(core)蛋白、非结构蛋白3(NS3)、非

结构蛋白5A(NS5A)等都已经证明是具有反式激活作用的病毒蛋白类型^[15-19]。研究反式激活作用蛋白靶基因的技术,主要是基于差异显示技术原理建立的一些分子生物学技术。例如,任意引物差异显示逆转录多聚酶链反应(AP-DD-RT-PCR, arbitrary primer differential display reverse transcription polymerase chain reaction)技术、代表性差异显示技术(RDA, representative differential display)、抑制性消减杂交技术(SSH, suppression subtractive hybridization)等。随着分子生物学技术、计算机分析技术、自动化技术的结合建立起来的微矩阵(microarray)技术,对于差异表达基因进行高通量筛选成为可能^[20,21]。这些技术在分析反式激活靶基因的研究中各有利弊。微矩阵技术具有简便、高通量、可以同时处理大量标本的优点,但是其筛选的范围主要决定于基因芯片上所点(印刷)核苷酸探针的种类和数量。人类基因组计划(HGP)的研究之初,估计人染色体中的表达基因可能在10万个左右,目前根据染色体的精确作图分析,以及部分序列测定与分析的结果来看,人染色体中编码基因的数量可能要少于10万个。目前对于人染色体中的编码基因还没有完全阐明,所以目前的基因芯片受到基因类型选择和芯片容量的限制,只能是对于人染色体编码基因的一小部分进行筛选研究,而对于另一部分就有遗漏的缺陷。关于RDA、AP-DD-RT-PCR和SSH等技术,虽然他们没有微矩阵技术高通量的特点,但是这些技术对于筛选对象基因没有先决条件,对于人染色体基因组表达的基因类型是随机性地筛选,因此可以筛选得到微矩阵技术筛选不到、从来没有进行过研究的基因类型。因此,从技术本身来看,研究基因表达谱的差异,这些技术都有用武之地,相互补充^[22-29]。

关于HBxAg的反式激活作用,特别是结构与功能之间相互关系既往已经进行了深入的研究和探索。HBxAg蛋白功能域的分析:Guo et al^[30]认为至少有一个位于103-117 aa的功能域对其作用非常重要。Madden et al^[31]结果显示,N末端和C末端对其反式激活都不重要,认为转录活性区位于32-148 aa内: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;32-66 aa区可能为结合功能域。Haviv et al^[32]认为C末端134-139 aa(LGGCRHK)较保守,缺失后HBxAg的反式转录活性几乎完全丧失。Bouchard et al^[33]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X蛋白活性没有影响。但也有相互矛盾的结果,可能是HBxAg蛋白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。

慢性 HBV 感染者, HBxAg 蛋白在 HCC 形成过程中具有十分重要的意义. Ogden et al^[34]发现 HBxAg 的反式激活功能, Vero 细胞中表达的 HBxAg 蛋白能够增强人干扰素 β (IFN β) 调控序列控制下的氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 表达. 后来的研究发现 HBxAg 蛋白可作用于多种基因的增强子和启动子元件, 包括 HBV 的增强子和 C 基因的启动子、SV40 早期增强子 / 启动子、多种病毒的长末端重复序列 (LTR)、人 IFN β 基因调控序列, 对 c-myc、人白细胞抗原 -DR (HLA-DR)、主要组织相容性抗原 -I (MHC-I) 及白介素 -8 (IL-8) 等都有反式激活作用. 为了研究 HBV 感染者 HBxAg 蛋白在肝细胞恶性转化过程中的具体作用, Lee et al^[35]构建了受四环素严格调控的 HBxAg 蛋白表达载体, 建立表达 HBxAg 蛋白的分化细胞系 3pX-1 和去分化细胞系 4pX-1. 只有 3pX-1 细胞系有恶性转化的现象, 主要机制就是持续的 Ras-Raf-MAPK 系统的激活. 没有发生转化的 4pX-1 细胞系具有持续的 JNK 信号转导系统的激活. HBxAg 蛋白在 3pX-1 和 4pX-1 细胞系中参与的信号转导通路是有差别的. 对于这 2 个细胞系的细胞周期参数进行比较研究, 3pX-1 细胞系表现出 HBxAg 蛋白依赖性的 G1、S 和 G2/M 期的进展, 表现为细胞周期素 D1、A 和 B1 的表达水平升高, Cdc2 激酶的激活等. 在 4pX-1 细胞系中可以见到 HBxAg 蛋白依赖性的 G1 和 S 期的进入, 之后是 S 期的停止, 缺乏 Cdc2 激酶的激活. 4pX-1 细胞系表现出 HBxAg 蛋白诱导的细胞周期素依赖性蛋白激酶抑制剂 p21(Cip1)、肿瘤抑制蛋白 p19(ARF)、细胞凋亡蛋白 bax 以及胰岛素样生长因子结合蛋白 -3 (IGFBP-3) 的表达. 尽管出现了 HBxAg 蛋白诱导的生长停滞, 也没有 Cdc2 的激活, 但 4pX-1 细胞系并没有出现 HBxAg 蛋白依赖性 G2/M 阻滞或细胞凋亡. HBV 的 HBxAg 蛋白可以诱导 Fas 配体 (FasL) 的表达, 从而帮助肝细胞癌 (HCC) 细胞逃避宿主的免疫监视系统.

HBxAg 蛋白对于细胞基因表达的影响是十分广泛的, 这也是 HBV 相关的 HCC 发生发展的重要机制所在. 但是, 关于 HBxAg 蛋白的分子生物学作用机制, 大部分都是以肝癌细胞系作为细胞模型进行研究的, Nijhara et al^[36]构建了转导正常肝细胞的有效基因转移途径, 结果表明, 这种基因转移技术可以使 50% 以上的细胞表达 HBxAg 蛋白. Tarn et al^[37]的结果证实 HBxAg 引起的肝细胞的恶性转化过程与 RAS-RAF-MAPK 和 JNK 信号转导到途径有关. Kang-Park et al^[38]证实 HBxAg 蛋白通过转录因子 Sp1 调节胰岛素样生长因子 II (IGF II) 启动子 4 的活性. 在这一调节系统中, PKC 和 p44/p42MAPK 是必须的. 首先, PMA 对 PKC 的激活, 或者 PKC 的表达载体可以促进 Sp1 转录因子的磷酸化, 提高 P4 启动子得转录活性. PKC 的抑制剂 Go6976 可以降低 Sp1 的磷酸化, 同时降低 P4 启动子的活性以及 IGF-II mRNA 的转录表达水平. MEK 激活抑制剂 U0126 降低 Sp1 的磷酸化水平, P4 启动子活性和 IGF-II mRNA 转录表达水平下降. 这些结果说明 PKC、p44/p42 MAPK 信号转导通路是

HBxAg 通过 Sp1 介导的 IGF-II 基因激活的重要条件. Pflum et al^[39]证实, HBxAg 与 CREB 之间可以结合, 并且可以促进这种蛋白的 DNA 结合能力. HBxAg 在反式激活靶基因转录调节的机制中, 需要 Ser-133 位点没有发生磷酸化修饰的 CREB 的参与. HBxAg 可以上调 Camp 应答基因的表达, 说明在肝细胞的增生, 直至肝细胞的恶性转化过程中都有十分重要的作用. Park et al^[40]应用 p53 基因发生突变的 Hep3B 细胞系进行了研究, 以 HBxAg 表达载体进行稳定转化时, p21(waf1/cip1)mRNA 转录和蛋白表达水平显著升高, 与 CDK2 结合的水平显著升高, 显著抑制了细胞周期素 E 和 CDK2 复合物的形成以及组蛋白 H1 的磷酸化修饰, p21 启动子活性增强. 利用基因突变技术, 证实 p21 启动子在 -1 185 和 -1 482 nt 之间. 基因突变分析结果表明, HBxAg 应答位点与 ets 因子结合位点重叠. 说明在这一细胞系中, HBxAg 可以克服由于 p53 功能缺失造成的下游 p21(waf1/cip1) 表达调节的障碍^[41-47].

需要强调的是, 目前对 HBxAg 反式激活的研究结果也存在不一致性, 甚至有矛盾的结果. 因为研究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进行共转染实验. 分析其原因可能包括: 体外细胞培养研究单个病毒蛋白的孤立的效应可能与体内整体细胞蛋白的效应不同, 因为体内多种病毒蛋白可能具有协同或拮抗作用; 其次, 转染细胞中蛋白表达水平也会影响观察到的效应, 体外试验中目的蛋白都是过表达, 而病毒蛋白在患者体内水平通常很低; 第一, 不同的细胞类型将有不同的应答; 第二, 细胞培养环境不可能完全真实地反映活体内环境; 最后, 应用报告基因瞬时转染观察的效应不可能完全模拟病毒蛋白对内源性细胞基因的作用^[48,49].

关于未知功能新基因的发现是近年来分子生物学领域中的热点问题. 早期的研究工作主要是通过所谓的反向遗传学 (reverse genetics) 技术, 即首先发现或针对一种生物学现象, 利用蛋白化学和分析化学技术, 将这种生物学现象相关的主要蛋白进行分离纯化, 然后对于纯化的蛋白进行末端部分序列测定, 再根据基因序列编码的简并原则, 设计引物或探针, 进行 PCR 扩增, 或者对于相应的 cDNA 文库进行筛选, 以获得相应的编码基因. 因为这一技术相对于遗传学中心法则来说, 不是遗传信息 DNA-RNA-蛋白的流向, 而正好与之相反, 因此称为反向遗传学技术. 这一技术的主要缺点就是技术要求高, 过程十分复杂. 以 DNA 操作技术与功能研究相结合的技术最为有效. 随着核苷酸序列数据库的建立和容量的不断扩大, 以及计算分析技术的不断进步, 随之而来的生物信息学技术在分子生物学研究中的地位越来越重要. 事实证明, 分子克隆技术与生物信息学技术的结合, 是目前克隆和鉴定未知功能基因最有效的研究技术.

4 参考文献

- 1 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第 1 版. 北京: 人民军医出版社, 1997: 42-46

- 2 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 免疫小鼠产生的特异性免疫应答. 中华传染病杂志 2000;18:190-191
- 3 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抗可变区抗体基因的克隆与鉴定. 肝脏 2000;5:130-1325
- 4 成军,斯崇文. HBV DNA 转染细胞系的建立及其应用研究进展. 国外医学·流行病学传染病学分册 1994;21:60-64
- 5 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
- 6 Cheng J. Progress in gene therapy for liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14(Suppl):A261-A262
- 7 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
- 8 刘妍,董菁,成军,夏小兵,李克,王琳,施双双,段惠娟,杨继珍. 乙肝病毒 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
- 9 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
- 10 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
- 11 董菁,成军,王勤环,施双双,洪源,皇甫竞坤,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
- 12 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
- 13 洪源,成军. 乙型肝炎病毒 mRNA 转录后剪接加工的研究进展. 国外医学病毒学分册 2001;8:115-119
- 14 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
- 15 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
- 16 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
- 17 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
- 18 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
- 19 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 X 基因准种特点的研究. 中国病毒学 2002;17:22-26
- 20 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
- 21 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
- 22 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
- 23 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
- 24 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
- 25 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
- 26 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;10:209-211
- 27 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
- 28 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
- 29 董菁,施双双,王业东,皇甫竞坤,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
- 30 Guo SP, Wang WL, Zhai YQ, Zhao YL. Expression of nuclear factor-kappa B in hepatocellular carcinoma and its relation with the X protein of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2001;7:340-344
- 31 Madden CR, Finegold MJ, Slagle BL. Altered DNA mutation spectrum in aflatoxin b1-treated transgenic mice that express the hepatitis B virus x protein. *J Virol* 2002;76:11770-11774
- 32 Haviv I, Shamay M, Doitsh G, Shaul Y. Hepatitis B virus pX targets TFIIB in transcription coactivation. *Mol Cell Biol* 1998;18:1562-1569
- 33 Bouchard MJ, Wang LH, Schneider RJ. Calcium signaling by HBx protein in hepatitis B virus DNA replication. *Science* 2001;294:2376-2378
- 34 Ogden SK, Lee KC, Barton MC. Hepatitis B viral transactivator HBx alleviates p53-mediated repression of alpha-fetoprotein gene expression. *J Biol Chem* 2000;275:27806-27814
- 35 Lee S, Tarn C, Wang WH, Chen S, Hullinger RL, Andrisani OM. Hepatitis B virus X protein differentially regulates cell cycle progression in X-transforming versus nontransforming hepatocyte (AML12) cell lines. *J Biol Chem* 2002;277:8730-8740
- 36 Nijhara R, Jana SS, Goswami SK, Rana A, Majumdar SS, Kumar V, Sarkar DP. Sustained activation of mitogen-activated protein kinases and activator protein 1 by the hepatitis B virus X protein in mouse hepatocytes in vivo. *J Virol* 2001;75:10348-10358
- 37 Tarn C, Zou L, Hullinger RL, Andrisani OM. Hepatitis B virus X protein activates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in dedifferentiated hepatocytes. *J Virol* 2002;76:9763-9772
- 38 Kang-Park S, Lee JH, Shin JH, Lee YI. Activation of the IGF-II gene by HBV-X protein requires PKC and p44/p42 map kinase signalings. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;283:303-307
- 39 Pflum MK, Schneider TL, Hall D, Schepartz A. Hepatitis B virus X protein activates transcription by bypassing CREB phosphorylation, not by stabilizing bZIP-DNA complexes. *Biochemistry* 2001;40:693-703
- 40 Park US, Park SK, Lee YI, Park JG, Lee YI. Hepatitis B virus-X protein upregulates the expression of p21waf1/cip1 and prolongs G1->S transition via a p53-independent pathway in human hepatoma cells. *Oncogene* 2000;19:3384-3394
- 41 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. *Hepatobil Pancreatic Dis Int* 2002;1:238-242
- 42 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
- 43 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
- 44 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
- 45 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
- 46 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
- 47 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. 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
- 48 陆荫英,王琳,刘妍,于敏,李克,王业东,张玲霞,成军. 乙肝病毒核心抗原单抗抗体细胞内免疫抗乙肝病毒基因治疗研究. 世界华人消化杂志 2002;10:765-769
- 49 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. *Hepatobil Pancreatic Dis Int* 2002;1:392-396



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

