

世界华人消化杂志®

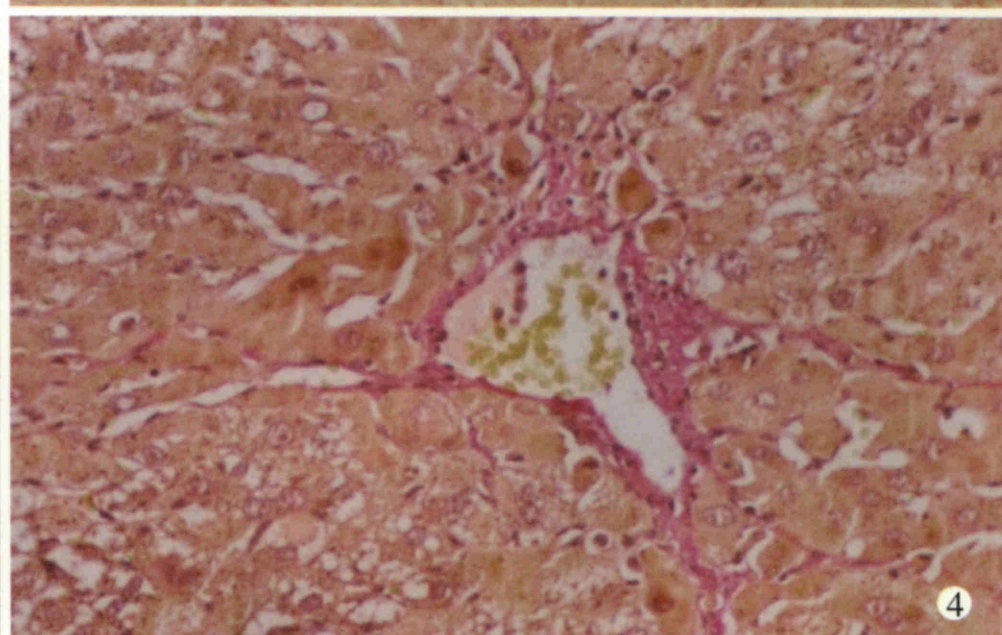
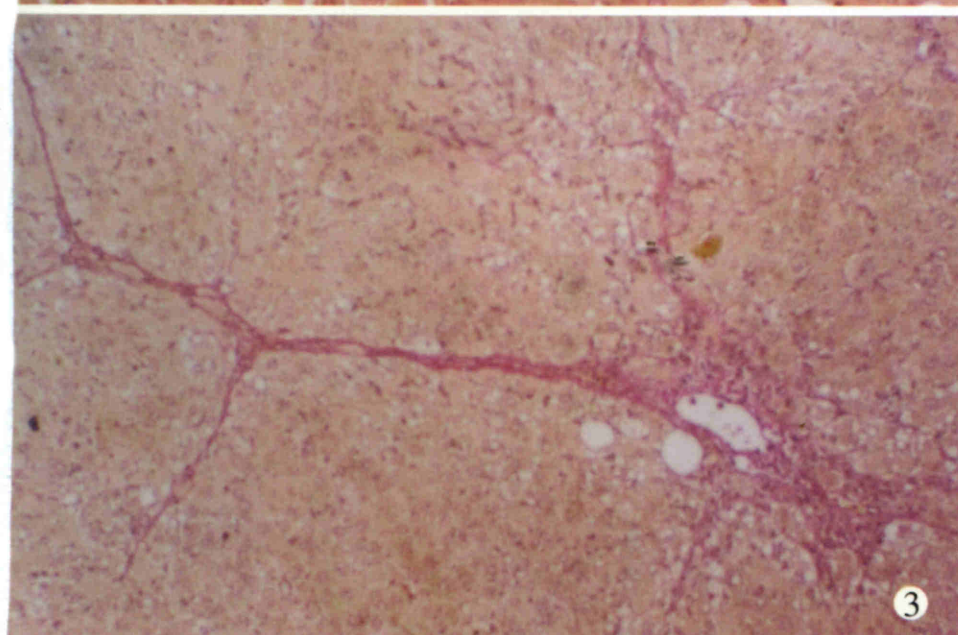
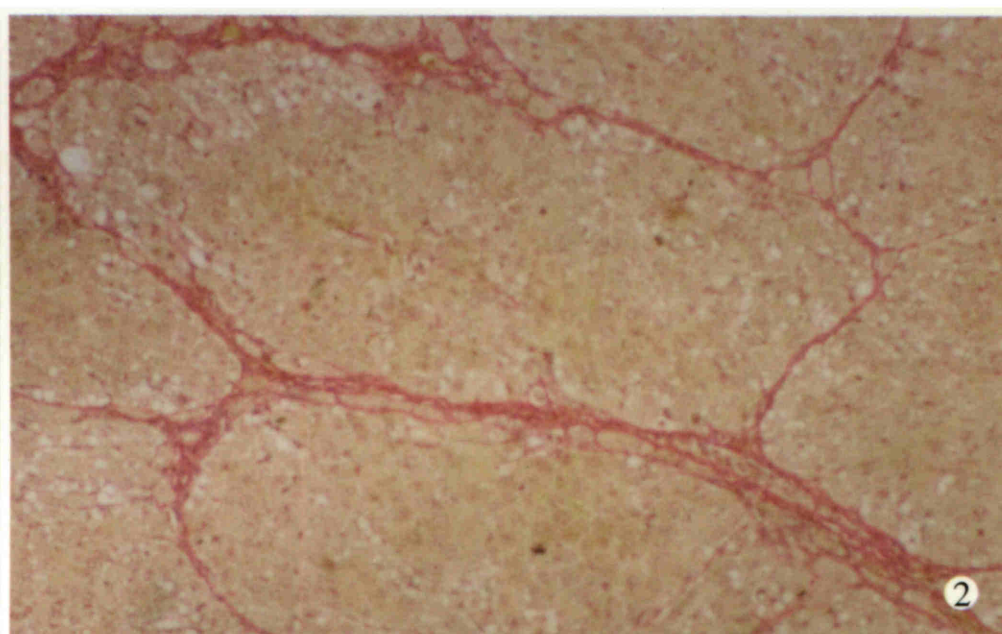
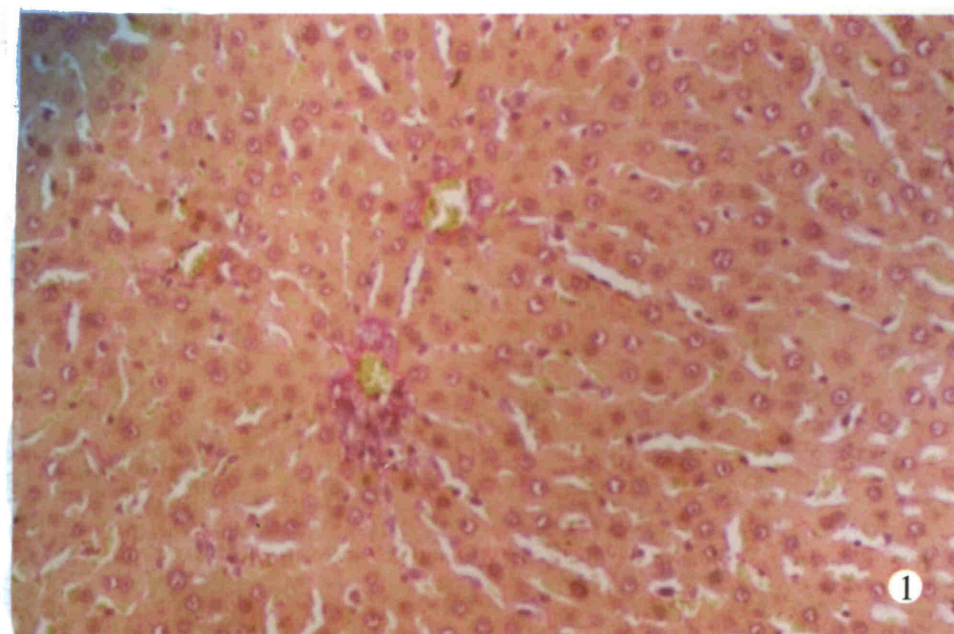
WORLD CHINESE

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

<p>焦点论坛</p>	<p>1014 丙型肝炎病毒复制子的研究 纪冬, 成军, 王建军</p> <p>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</p> <p>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</p> <p>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</p> <p>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</p>
<p>课堂讨论</p>	<p>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</p>
<p>文献综述</p>	<p>1035 骨髓源性肝干细胞的研究进展 杨明智, 彭志海</p> <p>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</p> <p>1040 趋化因子与肝病的研究进展 胡迎宾, 田德安, 刘南植</p> <p>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</p> <p>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</p> <p>1050 结直肠癌发病率及解剖部位变化趋势 谢正勇, 卿三华</p> <p>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</p> <p>1059 NO 和 VIP 与胃肠电 - 机械活动的关系 章敏, 曲瑞瑶</p> <p>1064 TK 基因治疗胃肠道肿瘤的研究进展 刘占奎, 张超</p> <p>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</p>
<p>消 息</p>	<p>907 欢迎订阅 2003 年度世界华人消化杂志</p> <p>915 欢迎订阅 2003 年度 World Journal of Gastroenterology®</p> <p>946 世界华人消化杂志和 WJG 获得商标注册</p> <p>950 中国科技期刊走向世界的步伐正在加快</p> <p>954 世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版目次</p> <p>985 美国国立医学图书馆 2002 年度收录中国医学期刊名单</p> <p>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</p> <p>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</p> <p>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</p> <p>1058 提供您使用世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版</p> <p>1063 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊</p> <p>附 1 Journal Citation Reports 2002-China</p> <p>附 2 Journal Citation Reports 2002-GASTROENTEROLOGY & HEPATOLOGY</p> <p>附 3 2003 年 Index Medicus 收录中国期刊</p> <p>附 4 2003 年 ISI 收录中国科技期刊</p>
<p>封面故事</p>	<p>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</p>

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.

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

洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 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
洪源, 男, 1974-12, 福建省莆田市人, 汉族. 1998年毕业于第四军医大学医学系, 获医学学士学位, 目前在解放军军医进修学院攻读内科学硕士学位, 主要课题方向是肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制.
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: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-01-11 接受日期: 2003-03-21

Genes trans-regulated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus with microarray assay

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

Yuan Hong, Yan Liu, Jun Cheng, Qian Yang, Jian-Jun 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 genes trans-regulated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus by microarray assay.

METHODS: The recombinant expression plasmid pcDNA3.1(-)-NS5A was constructed, and HepG2 cells were transfected. Total mRNA was isolated from the HepG2 cells transfected with pcDNA3.1(-) and pcDNA3-NS5A, respectively. Microarray was employed for detecting and analyzing of both mRNA from the HepG2 cells.

RESULTS: After transfecting HepG2 cells, we found 28 genes have been up-regulated, and 26 genes down-regulated. Their encoding proteins were involved in cell signal transduction, cell proliferation and differentiation.

CONCLUSION: Microarray technology is successfully used to screen the genes trans-regulated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus, which brings some new clues for studying the trans-regulated and immune regulation mechanism of NS5A.

Hong Y, Liu Y, Cheng J, Yang Q, Wang JJ. Genes trans-regulated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus with microarray assay. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(7):939-942

摘要

目的: 应用基因表达谱芯片研究丙型肝炎病毒(HCV)非结构蛋白5A(NS5A)的反式调节基因。

方法: 构建 NS5A 基因的真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5A, 应用基因表达谱芯片技术对 pcDNA3.1(-)-NS5A 转染的 HepG2(人肝母细胞瘤细胞系)细胞和转染空载体的相同细胞的差异表达 mRNA 进行检测和分析。

结果: HepG2 细胞经转染 NS5A 后, 有 54 条差异基因表达, 其中 28 条基因表达增强, 26 条基因表达降低。这些差异表达的基因与细胞的增生、分化及细胞的信号转导密切相关。

结论: 应用基因表达谱芯片成功筛选了丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 的反式调节基因, 为进一步阐明丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 的反式激活作用及免疫调节机制提供了新的依据。

洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 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. *世界华人消化杂志* 2003;11(7):939-942

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/939.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)属于黄病毒属, 是含外膜蛋白的单股正链RNA病毒。在大多数感染人群中丙型肝炎病毒表现为持续性感染, 并可导致慢性肝炎、肝硬化, 或肝细胞癌, 而且与肝脏脂肪变、糖代谢紊乱有关^[1-10]。其基因组含有单一的开放读码框架, 编码 3 010-3 033 个氨基酸残基的多肽前体, 两侧是 5' - 非翻译区及 3' - 非翻译区。因为 HCV 的基因复制形式没有经过 DNA 阶段, 不存在 HCV 基因组与肝细胞基因组 DNA 的整合, 所以, HCV 主要是通过基因组编码蛋白和肝细胞蛋白之间的相互作用及肝细胞蛋白与 HCV 调节基因的相互作用造成对肝细胞的损伤。其多肽前体至少被加工为十种结构蛋白和非结构蛋白, 其中非结构蛋白 NS5A 基因(位于 6 258-7 601 nt 之间)编码的 58 kD 的 NS5A 蛋白(448 aa)具有多种生物学功能, 在 HCV 多蛋白的成熟和 RNA 的复制过程中具有十分重要的作用^[11-14]。研究表明, NS5A 上存在干扰素 α 敏感决定区(ISDR), 与干扰素治疗的敏感性相关^[15,16]; 此外, NS5A 还是一种作用很强转录激活因子^[17-21], 调控着细胞内许多病毒及细胞基因的转录, 与感染 HCV 的细胞发生恶性转化过程有关。对于 NS5A 蛋白的反式调节功能, 我实验室已证明他可以反

式激活SV40早期启动子/增强子^[21]. 并应用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)对NS5A的反式调节基因进行了初步的研究^[22]. 为了从不同的角度对NS5A的反式调节基因进行验证及研究, 我们应用基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)^[23-26]对于HCV的NS5A反式调节的靶基因成功地进行了筛选, 为今后更加广泛深入地研究NS5A的反式调节基因打下了基础.

1 材料和方法

1.1 材料 人肝母细胞瘤细胞系HepG2细胞由本室保存, 细胞培养相关试剂及总RNA提取试剂Trizol购自Gibco公司, FuGENE购自Roche公司, 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A真核表达质粒由本室构建^[21]. 表达谱芯片由上海联合基因有限公司提供.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和取材 在35 mm培养皿中常规培养HepG2细胞, 细胞生长至对数期时, 以脂质体转染试剂FuGENE分别将2 µgpcDNA3.1(-)-NS5A和空载体pcDNA3.1(-)转染HepG2细胞, 48 h后收获细胞, 每5×10⁶个细胞加入1 mL Trizol试剂, 立即于液氮中保存.

1.2.2 总RNA提取 使用Trizol试剂一步法提取丙型肝炎病毒非结构蛋白5A表达质粒pcDNA3.1(-)-NS5A和空载体pcDNA3.1(-)转染的HepG2细胞总RNA(分别标记为实验组和对照组), 样品经分光光度计检测吸光度A值, 并行热稳定实验, 于-20℃和70℃保温1 h后, 经琼脂糖凝胶电泳检测28S、18S条带变化.

1.2.3 探针标记 参照Schen et al^[27]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 SC+2 g/L SDS杂交液中.

1.2.4 芯片制备 芯片包含的1 152个cDNA, 包括原癌基因、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), 紫外线交联, 再分别用2 g/L SDS、双蒸水及2 g/L 硼氢化钠溶液处理10 min, 晾干备用.

1.2.5 预杂交 将预杂交液放入95℃水浴锅内变性2 min, 将待预杂交的芯片放入95℃水浴锅内变性30 s, 芯片取出后即放入无水乙醇中30 s, 晾干. 将已变性的预杂交液加到芯片的点样区域内, 盖上盖玻片, 放入杂交箱内42℃预杂交5-6 h.

1.2.6 杂交及洗涤 将探针置于95℃水浴中变性2 min; 芯片置于95℃水浴中变性30 s, 芯片取出浸于无水乙醇30 s, 探针取出后迅速置于冰上. 将探针置于芯片上, 用盖玻片覆盖, 置于杂交舱中, 用Parafilm密封, 放入42℃杂交箱内杂交过夜(16-18 h). 依次以2×SSC+2 g/L

SDS、1:1 000 SSC+2 g/L SDS、1:1 000 SSC洗涤10 min, 室温晾干.

1.2.7 扫描与分析 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 总RNA的定性、定量分析 总RNA的吸光度A260/A280>1.92, 热稳定实验70℃保温1 h与-20℃1 h的电泳条带比较, 显示28S条带无明显降解, 电泳结果证实已抽提高纯度的总RNA.

2.2 芯片杂交体系验证及结果分析 在芯片上共有1 152个cDNA. 为了监控芯片杂交体系, 在芯片上设置了阴性对照(8条水稻基因, 共8个点), 这些点的杂交信号均很低, 证实了数据的可靠性. 由于实验组探针标记Cy5荧光素(呈红色), 对照组探针标记Cy3荧光素(呈绿色), 红绿颜色的差异就显示该基因在实验组和对照组中基因表达水平上的差异, 黄色代表表达水平无差异. 按阳性标准, 从1 000个基因中筛选出差异表达基因共54条, 占5.4%, 其中28条基因表达增强, 26条基因表达降低.

2.3 差异表达基因分析 表达增强的基因有28条(表1). 表达降低的基因有26条(表2).

表1 表达显著增加的基因

编号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	晶状体上皮衍生生长因子	2.023
2	RET 指蛋白	2.035
3	神经紧张素(NTS)	2.042
4	γ氨基丁酸A受体α 5(GABRA5)	2.096
5	未知克隆 KAlA04052	2.149
6	DNA 介导的RNA聚合酶2, 多肽B(POLR2B)	2.167
7	淋巴细胞性白血病缺失因子2(DLEU2)	2.169
8	Cullin 蛋白2(CUL2)	2.179
9	造血细胞特异性Lyn底物1(HCLS1)	2.225
10	冯希林综合征特异蛋白(VHL)	2.238
11	半乳糖基转移酶相关蛋白激酶	2.239
12	未知克隆 MGC: 9535	2.266
13	溶酶体相关膜蛋白2(LAMP2)	2.324
14	甾醇C5脱氢酶(SC5DL)	2.330
15	未知蛋白 KIAA0824	2.341
16	TGF-β II R-α	2.369
17	斯库瓦诺明相互作用蛋白1(SCHIP1)	2.373
18	谷氨酸受体3(GRM3)	2.375
19	类DnaJ的热休克蛋白40(HLJ1)	2.380
20	蛋白酪氨酸磷酸酶IV A型, 1号(PTP4A1)	2.391
21	B细胞 CLL/淋巴瘤10因子(BCL10)	2.408
22	XI型胶原蛋白α1(COL11A1)	2.425
23	cAMP依赖调控的蛋白激酶II型β PRKAR2B)	2.462
24	Ran结合蛋白2(RanBP2alpha)	2.471
25	未知蛋白 KIAA0035	2.574
26	未知克隆 HEPO1185	2.586
27	推定蛋白 FLJ20507	2.702
28	未知蛋白 KIAA1641	3.401

表2 表达显著降低的基因

编号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	热休克蛋白 1A(HSPA1A)	0.217
2	肌动蛋白结合 LIM 蛋白 1(ABLIM)	0.328
3	核受体亚家族 3, C 族 1 号(NR3C1)	0.338
4	基质金属蛋白酶 1(MMP1)	0.352
5	多囊肾病相关蛋白 1(PKD1)	0.365
6	含 TCP1 的伴侣蛋白,亚单位 6A(CCT6A)	0.403
7	组织蛋白酶 D(CTSD)	0.418
8	MMSET 型 1(WHSC1)	0.420
9	缬氨酰 tRNA 合成酶 2(VARS2)	0.426
10	钙激活蛋白酶小亚单位 1(CAPNS1)	0.428
11	甲状球蛋白(TG)	0.430
12	白介素 7 受体(IL7R)	0.433
13	孕激素诱导蛋白(DD5)	0.438
14	与 κ B 结合蛋白相关的核因子(NFR κ B)	0.444
15	推定蛋白 FLJ20432	0.448
16	肌球蛋白相关蛋白 8(MTMR8)	0.458
17	激酶锚定蛋白 12(AKAP12)	0.458
18	结肠癌抗原 3(SDCCAG3)	0.458
19	视网膜母细胞瘤 1(RB1)	0.459
20	肾上腺素氧化酶 A(MAOA)	0.467
21	未知蛋白 KIAA1723	0.472
22	蛋白激酶抑制物 α (PKIA)	0.479
23	白介素 3 受体 α (IL3RA)	0.483
24	细胞色素 P450, 亚家族 XI A(CYP11A)	0.485
25	细胞周期蛋白激酶(CDKL2)	0.487
26	S100 钙结合蛋白 A11(S100A11)	0.495

3 讨论

研究显示丙型肝炎病毒(HCV)感染与肝纤维化及肝细胞癌(HCC)的发生密切相关, 其中病毒编码的 NS5A 蛋白起着重要的作用. HCV NS5A 位于 HCV 多蛋白的羧基末端, 是丝氨酸磷酸化蛋白质, 依磷酸化程度的不同而产生两种不同分子量大小的多肽 p56 和 p58. 由于 NS5A 表现出对抗干扰素 α (IFN α) 的治疗效应而引起人们广泛的关注, NS5A 能够与肝细胞中的 IFN 刺激蛋白 - 双链 RNA 依赖的激酶(PKR)相互作用, 抑制 PKR 的功能, 从而下调 IFN 刺激的抗病毒效应^[15,16]. Kato et al^[19,20]研究发现, NS5A 是转录反式激活因子, 其羧基末端富含酸性氨基酸及脯氨酸, 这是真核细胞转录因子特有的结构特征, 但是其参与细胞转录调节的机制仍不十分清楚. 一般来说, 转录的反式激活因子是在细胞核中起作用的, 而 NS5A 定位于细胞内质网, 因此推测 NS5A 可能参与了细胞信号传导途径. NS5A 能够反式激活核转录因子 NF- κ B 及 STAT3, 在细胞炎症反应、肿瘤发生及转移过程中起重要作用^[28]. Ghosh et al^[29]研究发现, NS5A 蛋白能够抑制细胞周期调节基因 p21^{WAF1}, 激活

人肝癌细胞中增生细胞核抗原(PCNA)基因, 从而调节细胞凋亡, 促进细胞增生. NS5A cDNA 能够使转染的小鼠成纤维细胞 NIH 3T3 具有转化特性, 且转化细胞移植入裸鼠体内可形成纤维肉瘤灶, 这一证据直接证明了 HCV NS5A 蛋白的恶性转化潜能.

因基因表达谱芯片技术可快速有效地检测到两组组织或细胞基因表达谱的差异, 故在 HCV 感染及其致癌机制的研究中具有重要的应用价值. Girard et al^[30]应用基因芯片技术, 对于转染了 NS5A 蛋白的肝癌细胞系在受干扰素刺激后的基因表达谱变化进行了研究. 他们发现 50 种基因的表达水平变化在 2 倍以上, 41 种表达上调, 9 种表达下降. 其中表达影响最大的基因是 OAS-p69. 表达 NS5A 的肝癌细胞系 Huh7 中 IL-8 的表达水平显著上调. 向 Huh7 培养系统中加入白介素 8(IL-8), 就象转染 NS5A 基因一样, 抑制干扰素诱导的抗病毒活性, 包括下调 OAS-p69 基因的表达. 本实验我们用分子生物学技术构建了 NS5A 的真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5A, 并用空载体作为阴性对照, 利用脂质体转染 HepG2 细胞, 之后从中提取总 RNA, 逆转录为 cDNA, 进行基因芯片技术分析. 结果表明, 28 种基因的表达水平上调, 26 种基因的表达水平下调. 这些基因包括细胞生长、细胞凋亡、信号传导、免疫调节、肿瘤发生等基因, 其中在上调基因中, 有多条基因与免疫调节相关, 如淋巴细胞性白血病缺失因子 2、B 细胞 CLL/淋巴瘤 10 因子及斯库瓦诺明相互作用蛋白 1, 斯库瓦诺明是负性生长调节因子, 可以与肝细胞生长因子调节的酪氨酸激酶作用底物(HRS)相互作用, 发挥其生物功能^[31], 而 cAMP 依赖调控的蛋白激酶的表达增强则提示 NS5A 在细胞信号转导的重要步骤中可能起着一定作用. 在下调基因中, 钙激活蛋白酶、白介素 7 受体、白介素 3 受体、细胞周期蛋白激酶、S100 钙结合蛋白、蛋白激酶抑制物及 κ B 结合蛋白相关的核因子的差异表达表明 NS5A 与细胞信号传导, 细胞周期调节及免疫调节有关. 将这一结果与应用 SSH 技术对 NS5A 反式调节基因的结果比较, 发现都有未知蛋白 KIAA1641 的上调表达, 我们下一步将对这一未知蛋白进行更深入的研究.

总之, 本研究的结果表明, NS5A 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反式调节基因的有效技术. 他为我们进一步深入研究 NS5A 的反式调节基因及其抗干扰素治疗的机制打下了重要基础.

4 参考文献

- 1 Zandman-Goddard G, Levy Y, Weiss P, Shoenfeld Y, Langevitz P. Transverse myelitis associated with chronic hepatitis C. *Clin Exp Rheumatol* 2003; 21:111-113
- 2 Moriguchi H, Kobayashi M, Chung RT, Sato C. Optimal IFN therapy for 40-year-old patients with severe HCV-1b infection. *Gastroenterology* 2003;124:1166-1167
- 3 Chowdhury A, Santra A, Chaudhuri S, Dhali GK, Chaudhuri S, Maity SG, Naik TN, Bhattacharya SK, Mazumder DN. Hepatitis C virus infection in the general population: A com-

- munity-based study in west bengal, India. *Hepatology* 2003; 37:802-809
- 4 Ioannou GN, Dominitz JA, Weiss NS, Heagerty PJ, Kowdley KV. Racial differences in the relationship between hepatitis C infection and iron stores. *Hepatology* 2003;37:795-801
- 5 Ryu KJ, Kim JH, Lee SW. Ribozyme-mediated selective induction of new gene activity in hepatitis C virus internal ribosome entry site-expressing cells by targeted trans-splicing. *Mol Ther* 2003;7:386-395
- 6 Kasuno K, Ono T, Matsumori A, Nogaki F, Kusano H, Watanabe H, Yodoi J, Muso E. Hepatitis C virus-associated tubulointerstitial injury. *Am J Kidney Dis* 2003;41:767-775
- 7 Chen S, Wang Y. Genetic variation characteristics of the envelope region of hepatitis C virus in the patients with chronic hepatitis. *Zhonghua Shiyao He Linchuang Bingduxue Zazhi* 2002; 16:219-222
- 8 Hui CK, Belaye T, Montegrando K, Wright TL. A comparison in the progression of liver fibrosis in chronic hepatitis C between persistently normal and elevated transaminase. *J Hepatol* 2003;38:511-517
- 9 Fang CT, Tobler LH, Haesche C, Busch MP, Phelps B, Lepar G. Fluctuation of HCV viral load before seroconversion in a healthy volunteer blood donor. *Transfusion* 2003;43:541-544
- 10 Sunagawa H, Takayama H, Yamashiro T, Sasaki H, Sashida Y, Matsuura K, Kayou M. Hepatocellular carcinoma in a patient with primary biliary cirrhosis and seronegativity for markers of hepatitis B virus and hepatitis C virus: report of a case. *Surg Today* 2003;33:219-223
- 11 Sarrazin C, Berg T, Lee JH, Teuber G, Dietrich CF, Roth WK, Zeuzem S. Improved correlation between multiple mutations within the NS5A region and virological response in European patients chronically infected with hepatitis C virus type 1b undergoing combination therapy. *J Hepatol* 1999;30:1004-1013
- 12 Zech B, Kurtenbach A, Krieger N, Strand D, Blencke S, Morbitzer M, Salassidis K, Cotten M, Wissing J, Obert S, Bartenschlager R, Herget T, Daub H. Identification and characterization of amphiphysin II as a novel cellular interaction partner of the hepatitis C virus NS5A protein. *J Gen Virol* 2003;84:555-560
- 13 Georgopoulou U, Caravokiri K, Mavromara P. Suppression of the ERK1/2 signaling pathway from HCV NS5A protein expressed by herpes simplex recombinant viruses. *Arch Virol* 2003; 148:237-251
- 14 Qadri I, Iwahashi M, Simon F. Hepatitis C virus NS5A protein binds TBP and p53, inhibiting their DNA binding and p53 interactions with TBP and ERCC3. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1592:193-204
- 15 Sarrazin C, Herrmann E, Bruch K, Zeuzem S. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein and interferon resistance: a new model for testing the reliability of mutational analyses. *J Virol* 2002; 76:11079-11090
- 16 Sato C. Effects of hepatitis C virus proteins on the interferon-stimulated signal transduction. *Nippon Rinsho* 2001;59:1271-1276
- 17 Ghosh AK, Majumder M, Steele R, Yaciuk P, Chrivia J, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates transcription through a novel cellular transcription factor SRCAP. *J Biol Chem* 2000;275:7184-7188
- 18 成军. 慢性丙型肝炎肝脂肪变性的机制及其意义. *世界华人消化杂志* 2002;10:999-1003
- 19 Kato N, Lan KH, Ono-Nita SK, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator. *J Virol* 1997; 71:8856-8859
- 20 Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412
- 21 刘妍,段惠娟,成军,王建军,陆荫英,牟劲松,王琳,张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活 SV40 病毒启动子的研究. *军医进修学院学报* 2003;28:40
- 22 刘妍,陆荫英,成军,王建军,李莉,张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因的克隆化研究. *解放军医学杂志* 2003;28:40-43
- 23 Jain KK. Current trends in molecular diagnostics. *Med Device Technol* 2002;13:14-18
- 24 Ruano JM, Glidle A, Cleary A, Walmsley A, Aitchison JS, Cooper JM. Design and fabrication of a silica on silicon integrated optical biochip as a fluorescence microarray platform. *Biosens Bioelectron* 2003;18:175-184
- 25 Barsky V, Perov A, Tokalov S, Chudinov A, Kreindlin E, Sharonov A, Kotova E, Mirzabekov A. Fluorescence data analysis on gel-based biochips. *J Biomol Screen* 2002;7:247-257
- 26 Chan K, Baker S, Kim CC, Detweiler CS, Dougan G, Falkow S. Genomic comparison of salmonella enterica serovars and salmonella bongori by use of an S. enterica serovar typhimurium DNA microarray. *J Bacteriol* 2003;185: 553-563
- 27 Schena M, Shalon D, Dais RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270:467-470
- 28 Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddigui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9599-9604
- 29 Ghosh AK, Steele R, Meyer K, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 1999;80:1179-1183
- 30 Girard S, Shalhoub P, Lescure P, Sabile A, Misek DE, Hanash S, Brechot C, Beretta L. An altered cellular response to interferon and up-regulation of interleukin-8 induced by the hepatitis C viral protein NS5A uncovered by microarray analysis. *Virology* 2002;295:272-283
- 31 Goutebroze L, Brault E, Muchardt C, Camonis J, Thomas G. Cloning and characterization of SCHIP-1, a novel protein interacting specifically with spliced isoforms and naturally occurring mutant NF2 Proteins. *Mol Cell Biol* 2000;20:1699-1712



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

