

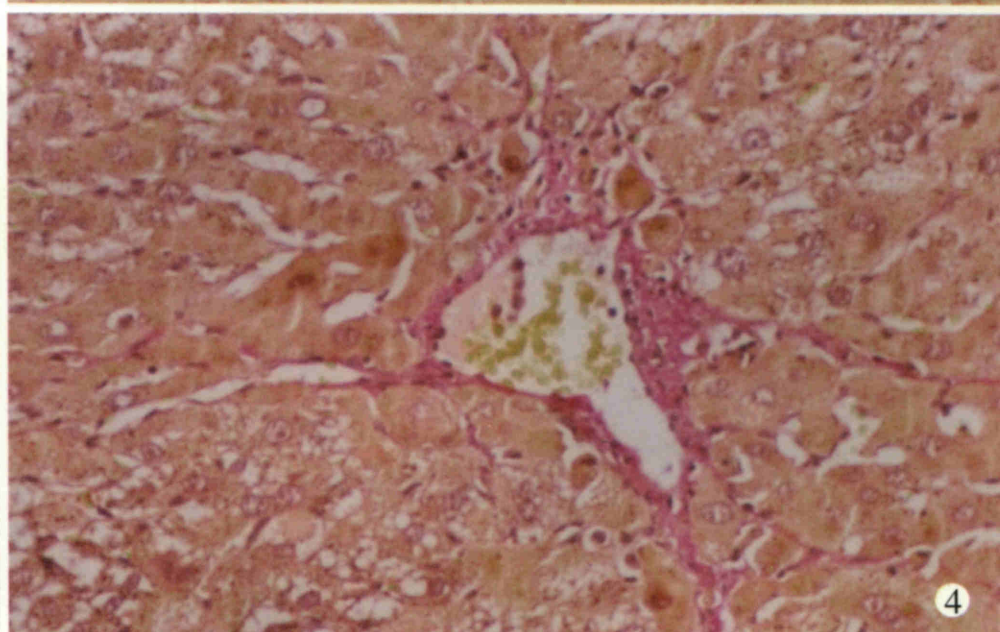
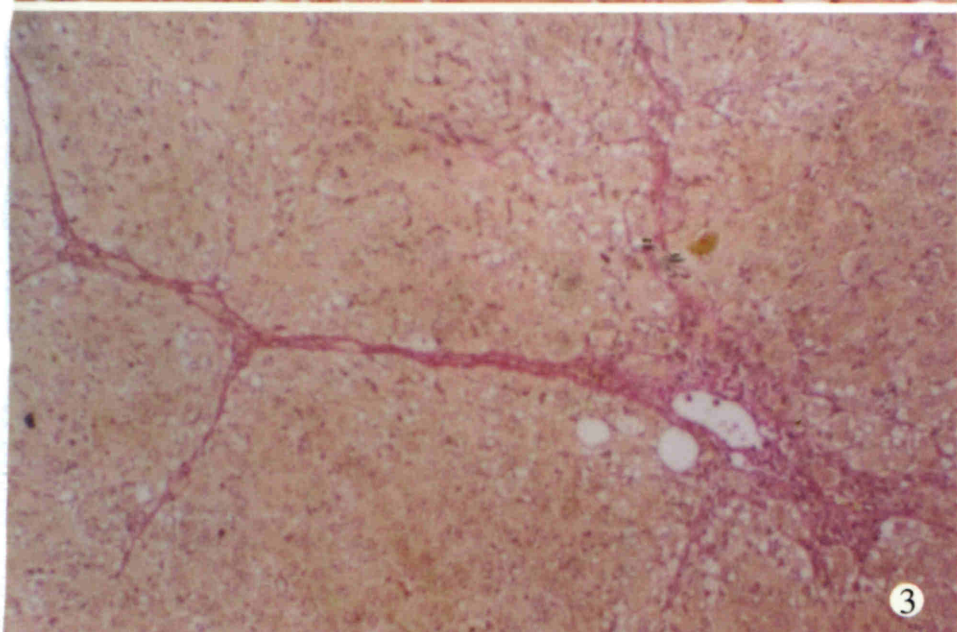
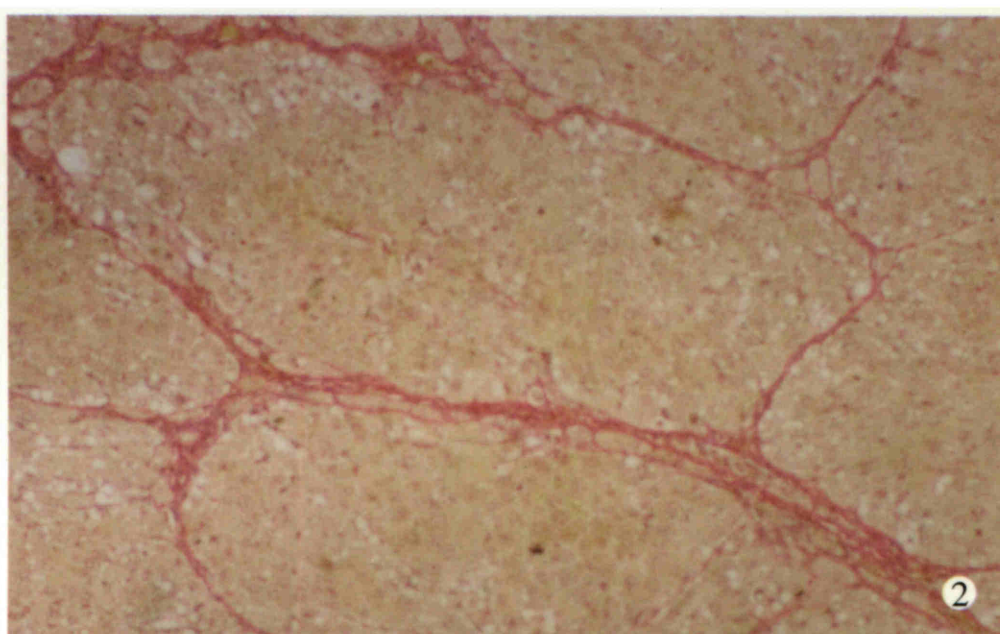
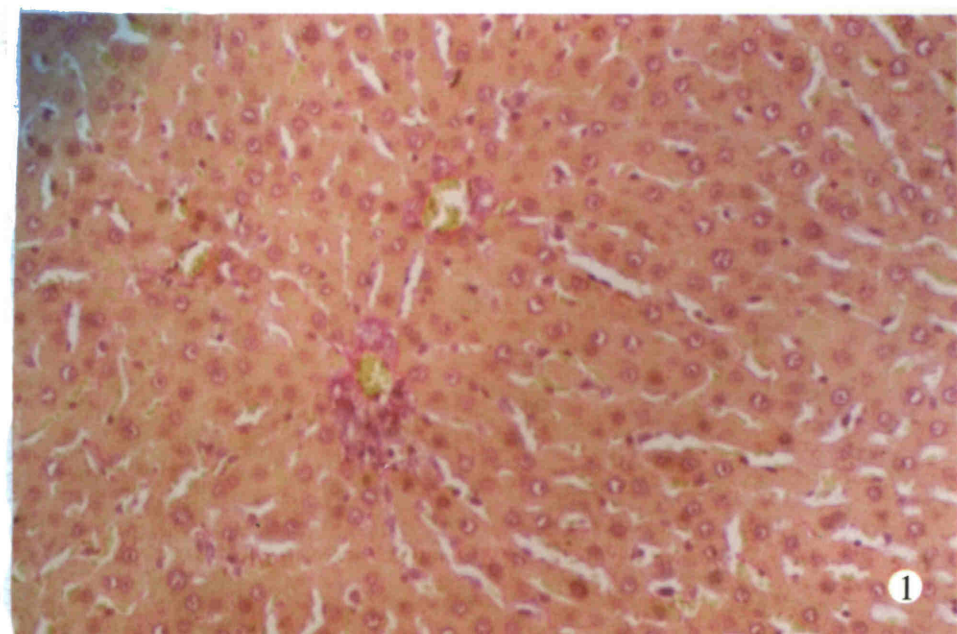
# 世界华人消化杂志®

**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  $\alpha$  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 HepG<sub>2</sub> 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 PGE<sub>2</sub> 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 p<sup>53</sup> 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.



# 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

王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰, 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 100039  
王建军, 男, 汉族, 1975-06 生, 吉林省通化市人, 1999 年毕业于第一军医大学, 现为军医进修学院 2001 级内科学专业硕士研究生, 主要从事肝炎病毒蛋白的反式调节作用研究。

国家自然科学基金资助项目, No. C39970674, No. C03011402

归国留学人员科研启动基金资助项目, No. 98H038

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

## Upregulating effect of hepatitis C virus core protein on NIP3 gene

Jian-Jun Wang, Yan Liu, Jun Cheng, Qian Yang, Yan-Jie Yang

Jian-Jun Wang, Yan Liu, Jun Cheng, Qian Yang, Yan-Jie Yang, 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. C39970674, No. C03011402, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA, No. 98H038.

Correspondence to: 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 investigate the transactivating effect of HCV core protein on NIP3 gene and the molecular biological mechanisms of HCV core protein in HCV pathogenicity.

**METHODS:** Polymerase chain reaction (PCR) technique was employed to amplify the sequence of NIP3 promoter from HepG2 genomic DNA, and the product was cloned into pGEM-T vector. The NIPP gene was cut from T-NIPP by SacI and Bgl, and then was cloned into pCAT3 basic, named pCAT3-NIPP. pCAT3-NIPP was transfected into the NIH3T3 cell line and cotransfected NIH3T3 cells with pcDNA3.1(-)-core by FuGENE 6 transfection reagents. The NIH3T3 cells transfected with pCAT3-basic as negative control. The activity of CAT in NIH3T3 cells transfected was detected by an ELISA kit after 48 hours, which reflect the transactivating function of HCV core protein to NIP3 gene promoter.

**RESULTS:** The expressive vector pcDNA3.1(-)-core and report vector pCAT3-NIPP have been constructed and confirmed by restriction enzyme digestion and sequencing. The expression of CAT in NIH3T3 cells transfected with pCAT3-NIPP and pcDNA3.1(-)-core was 3.6 times as higher as that of pCAT3-basic, and 1.9 times as higher as that of pCAT3-NIPP.

**CONCLUSION:** It is suggested that HCV core protein can transactivate NIP3 gene promoter and upregulate the expression of NIP3 gene.

Wang JJ, Liu Y, Cheng J, Yang Q, Yang YJ. Upregulating effect of hepatitis C virus core protein on NIP3 gene. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(7):951-954

## 摘要

**目的:** 了解丙型肝炎病毒核心蛋白和NIP3基因的表达式的关系, 研究HCV核心蛋白在HCV致病的分子生物学机制中的作用。

**方法:** 聚合酶链反应(PCR)扩增NIP3基因启动子, 以T-A克隆法, 将NIPP基因片段连入载体pGEM-T. 获得的质粒pT-NIPP, 和报告质粒pCAT3-basic 分别用 SacI 和 Bgl II 双酶切后构建报告载体pCAT3-NIPP, 分别以重组报告载体pCAT3-NIPP和pcDNA3.1(-)-core应用FuGENE 6 转染试剂瞬时转染 NIH3T3 细胞, 以转染 pCAT3 basic 的 HepG2 细胞为阴性对照, 48 h 后收获细胞. 应用酶联免疫黏附方法(ELISA)检测细胞中氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达活性, 以了解HCV核心蛋白对NIP3基因启动子的反式激活作用。

**结果:** 构建的表达载体 pcDNA3.1(-)-core 和报告载体 pCAT3-NIPP 经过序列分析和酶切鉴定正确. pCAT3-NIPP 和 pcDNA3.1(-)-core 瞬时转染的 NIH3T3 细胞中的 CAT 表达活性为 pCAT3-NIPP 的 1.9 倍, 是 pCAT3 basic 的 3.6 倍, 明显升高。

**结论:** 丙型肝炎病毒核心蛋白可反式激活 NIP3 基因启动子, 进而上调 NIP3 基因的表达。

王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰. 丙型肝炎病毒核心蛋白上调 NIP3 基因表达研究. 世界华人消化杂志 2003;11(7):951-954

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/951.asp>

## 0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)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. 多肽前体至少被加工为十种结构蛋白和非结构蛋白, 其中核心区(1-573 nt)编码的 21 kDa HCV 核衣壳蛋白(191 aa)是一种多功能蛋白质, 在 HCV 致病过程中可能起着重要的作用<sup>[1-5]</sup>, 最近研究其与 HCV 感染后脂肪肝的形成也有一定关系<sup>[6-8]</sup>. 本研究采用基因重组技术构建 pCAT3-NIPP、pcDNA3.1(-)-core 报告基因载体, 应用报告基因氯霉素乙酰转移酶(CAT)共转染瞬时表达系统, 测得下游 CAT 基因的表达增强. 证明 HCV 核心蛋白可上调 NIP3 启动子活性, 进而上调 NIP3 基因的表达, 从而为研究 HCV 致病的分子生物学机制提供了证据。

## 1 材料和方法

1.1 实验材料及主要试剂 (1)菌种及细胞株: 重组表达载体 pcDNA3.1(-)-core 为本室构建, 人肝母细胞瘤细胞系 Hep G2 细胞及大肠杆菌 JM109 菌株为本室保存. (2) 工具酶: Tag DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶及限制性内切酶均购自 Takara 公司. (3)试剂盒: 质粒 DNA 提取试剂盒, 中间载体 pGEM-T 及报告质粒 pCAT3-basic 均购自 Promega 公司; CAT-ELISA 检测试剂盒及质粒 DNA 转染试剂盒购自 Roche 公司. 其他生化试剂购自 Sigma 公司.

1.2 目的基因的扩增与纯化 以 Hep G2 细胞基因组 DNA 为模板, 设计引物. 在上下游引物的 5' 端分别引入 XhoI 和 Bgl II 单一酶切位点, PCR 扩增包含 NIPP 基因启动子全序列的 DNA 片段, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 切胶, 回收纯化.

1.3 CAT3 报告载体的构建、纯化和 DNA 测序 以 T-A 克隆法, 用 T4 DNA 连接酶将 NIPP 基因片段连入载体 pGEM-T. 将获得的质粒 pT-NIPP, 和报告质粒 pCAT3-basic 分别用 SacI 和 Bgl II 双酶切后用 T4 DNA 连接酶进行定向连接, 产物转化 JM109 宿主菌, 筛选抗氨苄青霉素阳性菌落; 提取质粒, 再次双酶切及单酶切鉴定正向插入克隆, 命名为 pCAT3-NIPP.

1.4 真核表达载体的鉴定 将 pcDNA3.1(-)-core 质粒分别进行 EcoRI/BamHI 双酶切和 HindIII 单酶切及 PCR 鉴定. PCR 鉴定核心基因的上下游引物分别为: 5' - C G C A G A A T T C A T G A G C A C G A A T C C T A A - 3', 5' - A T A T G G A T C C A G G C T G A A G C G G G C A C A - 3'. 最后测序鉴定. DNA 测序由上海博亚公司完成.

1.5 细胞转染及 Weep 活性检测 磁珠法提取质粒 pCAT3-NIPP 以备转染, 以标准方案培养 NIH3T3 细胞. 具体转染方法参照转染说明书进行. 转染 48 h 后收集细胞, 收集细胞裂解液, 用于 CAT 活性检测.

1.6 pcDNA3.1(-)-core 与 pCAT3-NIPP 共转染实验 pcDNA3.1(-)-core 与 pCAT3-NIPP 共转染 Hep G2 细胞, 同时以转染 pCAT3-NIPP 的 NIH3T3 细胞作阴性对照. 转染 48 h 后, 收集细胞裂解液, 用于 CAT 活性检测. 所有实验严格平行操作.

1.7 CAT 含量检测 按照试剂盒说明书进行. 取 1.0 ng/ml 的 CAT 标准品(试剂盒提供)及细胞裂解液 200  $\mu$ l 加入已包被抗体的 96 孔板中, 37  $^{\circ}$ C 温育 2 h, 再依次加入第一抗体(地高辛标记的抗 -CAT)、第二抗体(偶联有过氧化物酶的地高辛抗体抗 -DIG-POD) 200  $\mu$ l 37  $^{\circ}$ C 温育 1 h 后, 加入过氧化物酶的底物室温显色 10-30 min. 用酶标仪检测标本在 415 nm 波长的吸光度, 其数值反映细胞提取物中的 CAT 表达水平. 以未作转染的细胞裂解液平行实验作空白对照.

## 2 结果

2.1 重组质粒的酶切鉴定 pCAT3-NIPP 鉴定电泳图谱如图 1 所示, 构建的中间载体 pT-NIPP 以 XhoI/Bgl II 双

酶切电泳图谱为两条带: 1 851 bp (NIPP 基因片段)、3 015 bp (pGEM-T 空载体); DNA 测序证实重组质粒含有 1 851 bp 核苷酸的目的基因, 读码框架正确. 中间载体 pT-NIPP 以 SacI/Bgl II 双酶切为两条带: 730 bp (NIPP 基因片段)、4 055 bp (pGEM-T 空载体 + 一部分 NIPP 基因片段) 重组质粒 pCAT3-NIPP 分别以 SacI/Bgl II 双酶切鉴定均显示 730 bp 正向插入条带. 以 Pvu II 单酶切可见 419 bp 和 4 313 bp 两条带, 说明重组质粒 pCAT3-NIPP 构建正确.

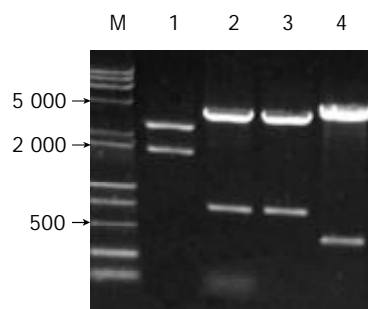


图 1 pCAT3-NIPP 鉴定电泳图谱. 1 pT-NIPP XhoI/Bgl II 双酶切; 2 pT-NIPP SacI/Bgl II 双酶切; 3 pCAT3-NIPP SacI/Bgl II 双酶切 4 Pvu II 单酶切 M.DNA Marker (15 000 bp+2 000 bp).

2.2 表达质粒的鉴定 pcDNA3.1(-)-core 鉴定电泳图谱如图 2 所示, 双酶切显示两条带(4 900 bp 空载体和 573 bp HCV core 基因片段), 单酶切为约 5 500 bp 一条带(4 900 bp+573 bp). 以 pcDNA3.1(-)-core 质粒作模板, PCR 可见 573 bp 的产物. 测序证实该重组质粒读码框架正确.

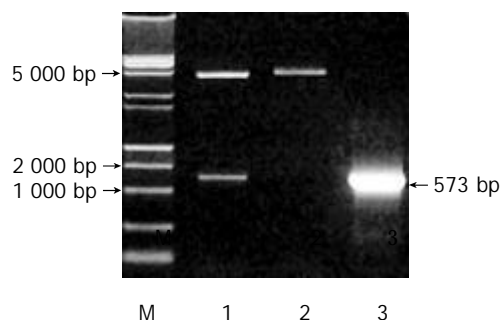


图 2 pcDNA3.1(-)-core 鉴定电泳图谱. 1 EcoRI/BamHI 双酶切; 2 HindIII 单酶切; 3 质粒 PCR 产物; M DNA Marker (15 000 bp+2 000 bp).

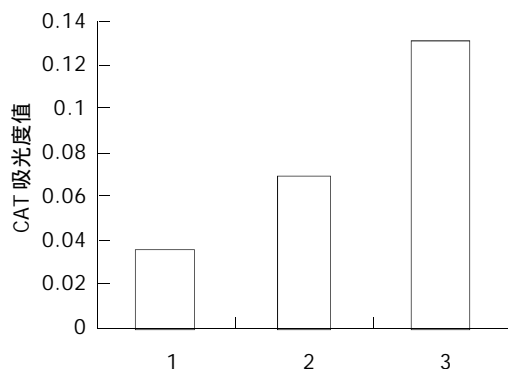


图 3 CAT 酶表达结果. 1 pCAT3 basic; 2 pCAT3-Weep; 3 pcDNA3.1(-)-core + pCAT3-Weep.

2.3 重组质粒 pcDNA3.1(-)-core 与 pCAT3-NIPP 共转

染实验结果 空载体对照组 pCAT3 basic 的 CAT 的吸光度值为 0.036, pCAT3-NIPP 的 CAT 的吸光度值为 0.069, 共转染 pcDNA3.1(-)-core/pCAT3-NIPP 的 NIH3T3 细胞 CAT 的吸光度值为 0.131, 共转染 pcDNA3.1(-)-core/pCAT3-NIPP CAT 的表达明显增强, 是 CAT3 空载体的 3.6 倍, 是 pCAT3-Weep 的 1.8 倍, 说明 HCV 核心蛋白对 NIP3 基因启动子有反式激活作用, 转录激活 NIP3 基因启动子的活性, 使其下游 CAT 基因的表达增强(图 3)。

### 3 讨论

尽管 HCV 发展为慢性感染的机制还是不很清楚, 感染 HCV 后较高比例的慢性化提示 HCV 可能有特定的机制可以绕开宿主的免疫反应. 细胞凋亡被认为是由宿主的 CTL 和 NK 细胞清除病毒的通常方式. 许多病毒基因组编码的蛋白可抑制细胞凋亡, 进而使病毒逃避宿主免疫系统的攻击<sup>[9]</sup>, HCV 核心蛋白除了作为核壳蛋白具有病毒颗粒组装功能外, 还具有多种调控细胞、病毒基因表达、细胞生长以及免疫调节等功能, 在 HCV 的致病过程中起重要作用. 关于他在细胞凋亡中的作用, 目前还有争议. 有研究显示 HCV 核心蛋白既可以抑制 Fas-和 TNF 诱导的细胞凋亡作用, 又可以加强这种作用<sup>[10-13]</sup>. Gross et al<sup>[14]</sup>应用转基因小鼠研究发现 HCV 核心蛋白通过 Fas 介导的细胞凋亡和外周血 T 细胞的肝浸润引起肝损伤. Chen et al<sup>[15]</sup>认为 HCV 核心蛋白可以抑制 Fas 介导的 p38 信号途径, 结果是加强了 Fas 介导的细胞死亡作用. 当然, 也有人认为在体内正常的内源性的 TNF 应答情况下, HCV 核心蛋白既不能加强也不能抑制细胞凋亡作用<sup>[16]</sup>.

细胞凋亡被抗细胞凋亡的 Bcl-2 家族蛋白和各种前凋亡蛋白的相互作用来调控, 这些前凋亡蛋白中也包括一些 Bcl-2 家族蛋白<sup>[17]</sup>. 有证据显示 Bcl-2 因子中前凋亡因子和抗凋亡因子的比例可以调节细胞在响应凋亡信号时线粒体的完整性的敏感性<sup>[18]</sup>. Nip3 是一种线粒体蛋白, 在细胞内瞬时表达时可以诱导细胞凋亡, 并且可加强其他细胞死亡信号诱导的细胞凋亡<sup>[19]</sup>. Bcl-2 可抑制 Nip3 的作用, 但作用时间短暂<sup>[20-22]</sup>. 亦有报道认为 Nip3 引起细胞坏死的作用较细胞凋亡作用更强<sup>[23]</sup>. Soguero et al<sup>[24]</sup>研究发现低氧可激活 Nip3 编码基因的表达, 进而导致在持续缺氧情况下细胞的程序性死亡. 腺病毒属的 E1B19K 结合蛋白 B5 可抑制 Nip3 基因诱导的细胞凋亡<sup>[25]</sup>. 近来研究发现 HCV 核心蛋白在通过加强 Bcl-x 的表达线粒体水平抑制细胞凋亡作用, 进而抑制胱冬肽酶 3 激酶活性<sup>[26-28]</sup>. 也有人认为 HCV 核心蛋白是加强还是抑制细胞凋亡取决于凋亡诱导因子的刺激和细胞的环境<sup>[29]</sup>.

本研究采用基因重组技术, 自 NIP3 基因上游自碱基 ATG 上推 1 851 个碱基, 以 Hep G2 细胞基因组 DNA 为模板, 设计引物. 在上下游引物的 5' 端分别引入

XhoI 和 Bgl II 单一酶切位点 PCR 扩增 DNA 片段, 与 pGEM-T 载体连接命名为 T-NIPP. 以 SacI 和 Bgl II 酶切可能包含 NIP3 基因启动子全序列的 731bp 的 DNA 片段构建 pCAT3-NIPP 报告基因载体. 应用报告基因氯霉素乙酰转移酶(CAT)共转染瞬时表达系统, 与 pcDNA3.1(-)-core 共转染 NIH3T3 细胞, 测得共转染 pcDNA3.1(-)-core / pCAT3-NIPP CAT 的表达明显增强, 是 CAT3 空载体的 3.6 倍, 是 pCAT3-Weep 的 1.8 倍, 说明 HCV 核心蛋白对 NIP3 基因启动子有反式激活作用, 转录激活 Wee1 基因启动子的活性. 证明 HCV 核心蛋白可上调 NIP3 启动子活性, 进而上调 NIP3 基因的表达, 提示 HCV 核心蛋白可能有加强细胞凋亡的作用, 从而为研究 HCV 致病的分子生物学机制提供了证据.

### 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, 1997:37-42
- 2 姚杰, 贾战生. 丙型肝炎病毒 E2 包膜糖蛋白的研究近况. 国外医学·流行病学传染病学分册 2002;29:339-342
- 3 成军, 朱传琳. 丙型肝炎病毒感染慢性化的分子生物学机制. 国外医学病毒学分册 2000;7:29-32
- 4 焦成松, 周永兴. 丙型肝炎病毒细胞模型研究进展. 国外医学·流行病学传染病学分册 2000;27:105-109
- 5 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 6 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟, 段惠娟, 芮莉莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白与载脂蛋白 A1 结合的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1018-1021
- 7 成军, 任进余, 李莉, 陆志檬, 李克, 洪源, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒结构基因转基因小鼠引起肝脏脂肪变. 世界华人消化杂志 2002;10:1022-1026
- 8 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健. 丙型肝炎病毒蛋白与脂蛋白之间的相互作用. 世界华人消化杂志 2002;10:1030-1032
- 9 Moretta A. Molecular mechanisms in cell-mediated cytotoxicity. *Cell* 1997;90:13-18
- 10 Hahn CS, Cho YG, Kang BS, Lester IM, Hahn YS. The HCV core protein acts as a positive regulator of fas-mediated apoptosis in a human lymphoblastoid T cell line. *Virology* 2000;276:127-137
- 11 Honda A, Hatano M, Kohara M, Arai Y, Hartatik T, Moriyama T, Imawari M, Koike K, Yokosuka O, Shimotohno K, Tokuhisa T. HCV-core protein accelerates recovery from the insensitivity of liver cells to Fas-mediated apoptosis induced by an injection of anti-Fas antibody in mice. *J Hepatol* 2000;33:440-447
- 12 Rubbia-Brandt L, Taylor S, Gindre P, Quadri R, Abid K, Spahr L, Negro F. J Pathol Lack of in vivo blockade of Fas- and TNFR1-mediated hepatocyte apoptosis by the hepatitis C virus. *J Pathol* 2002;197:617-623
- 13 Farooq M, Kim Y, Im S, Chung E, Hwang S, Sohn M, Kim M, Kim J. Cloning of BNIP3h, a member of proapoptotic BNIP3 family genes. *Exp Mol Med* 2001;33:169-173
- 14 Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:1899-1911
- 15 Chen G, Cizeau J, Vande Velde C, Park JH, Bozek G, Bolton J, Shi L, Dubik D, Greenberg A. Nix and Nip3 form a subfamily of pro-apoptotic mitochondrial proteins. *J Biol Chem* 1999;274:7-10
- 16 Chen G, Ray R, Dubik D, Shi L, Cizeau J, Bleackley RC, Saxena S, Gietz RD, Greenberg AH. The E1B 19K/Bcl-2-binding protein Nip3 is a dimeric mitochondrial protein that activates apoptosis. *J Exp Med* 1997;186:1975-1983
- 17 Yasuda M, Theodorakis P, Subramanian T, Chinnadurai G. Adenovirus E1B-19K/BCL-2 interacting protein BNIP3 contains a BH3 domain and a mitochondrial targeting sequence.

- J Biol Chem* 1998;273:12415-12421
- 18 Sowter HM, Ratcliffe PJ, Watson P, Greenberg AH, Harris AL. HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res* 2001; 61:6669-6673
  - 19 Matsushima M, Fujiwara T, Takahashi E, Minaguchi T, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Suzumori K, Nakamura Y. Isolation, mapping, and functional analysis of a novel human cDNA (BNIP3L) encoding a protein homologous to human NIP3. *Genes Chro Cancer* 1998;21:230-235
  - 20 Bruick RK. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:9082-9087
  - 21 Otsuka M, Kato N, Taniguchi H, Yoshida H, Goto T, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus core protein inhibits apoptosis via enhanced Bcl-xL expression. *Virology* 2002;296:84-93
  - 22 Takamatsu M, Fujita T, Hotta H. Suppression of serum starvation-induced apoptosis by hepatitis C virus core protein. *Kobe J Med Sci* 2001;47:97-112
  - 23 Zhu N, Khoshnan A, Schneider R, Matsumoto M, Dennert G, Ware C, Lai MM. Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J Virol* 1998;72:3691-3697
  - 24 Soguero C, Joo M, Chianese-Bullock KA, Nguyen DT, Tung K, Hahn YS. Hepatitis C virus core protein leads to immune suppression and liver damage in a transgenic murine model. *J Virol* 2002;76:9345-9354
  - 25 Ohi N, Tokunaga A, Tsunoda H, Nakano K, Haraguchi K, Oda K, Motoyama N, Nakajima T. A novel adenovirus E1B19K-binding protein B5 inhibits apoptosis induced by Nip3 by forming a heterodimer through the C-terminal hydrophobic region. *Cell Death Differ* 1999;6:314-325
  - 26 Yang SH, Lee CG, Lee CW, Choi EJ, Yoon SK, Ahn KS, Sung YC. Hepatitis C virus core inhibits the Fas-mediated p38 mitogen activated kinase signaling pathway in hepatocytes. *Mol Cells* 2002;13:452-462
  - 27 Hahn CS, Cho YG, Kang BS, Lester IM, Hahn YS. The HCV core protein acts as a positive regulator of fas-mediated apoptosis in a human lymphoblastoid T cell line. *Virology* 2000;276:127-137
  - 28 Honda M, Kaneko S, Shimazaki T, Matsushita E, Kobayashi K, Ping LH, Zhang HC, Lemon SM. Hepatitis C virus core protein induces apoptosis and impairs cell-cycle regulation in stably transformed Chinese hamster ovary cells. *Hepatology* 2000;31:1351-1359
  - 29 Sun J, Bodola F, Fan X, Irshad H, Soong L, Lemon SM, Chan TS. Hepatitis C virus core and envelope proteins do not suppress the host's ability to clear a hepatic viral infection. *J Virol* 2001;75:11992-11998

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版目次

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> 2000 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2000.htm> 1999 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1999.htm> 1998 华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1998.htm> 1997 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1997.htm> 1996 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1996.htm> 1995 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1995.htm> 1994 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1994.htm> 1993 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1993.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> 2000 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2000.htm> 1999 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1999.htm> 1998 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1998.htm> 1997 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1997.htm> 1996 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1996.htm> 1995 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1995.htm>

(世界胃肠病学杂志社 2003-01-15)



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](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

