

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

文献综述

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

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

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

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

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

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
	黄象谦
	黄志强
	黎介寿
	刘耕陶
	裘法祖
	汤钊猷
	王宝恩
	危北海
	吴孟超
	吴咸中

张哲	张学庸	赵东海	周殿元	马连生	潘伯荣	王瑾晖	张建中	李少华	李天华
社长总编辑	中文编辑	英文编辑	排版	校对					

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

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

- 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)

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

CN 14-1260/R

邮发代号

82-262

国外代号

M 4481

国内定价

每期 24.00 元 全年 288.00 元

广告经营许可证

1401004000050

www.wjgnet.com

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

杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 杨艳杰, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗中心 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
杨倩, 女, 32岁, 广西桂平人, 博士研究生, 主要从事传染病临床与基础研究工作。
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。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

Up-regulating effect of hepatitis C virus core protein on laminin B1 chain gene promoter

Qian Yang, Yan Liu, Jun Cheng, Jian-Jun Wang, Yan-Jie Yang, Shu-Lin Zhang

Qian Yang, Yan Liu, Jun Cheng, Jian-Jun Wang, Yan-Jie Yang, Shu-Lin Zhang, 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: Jun Cheng, MD, PhD, 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: HCV core protein is a potential transactivator for a broad spectrum of hepatocellular genes. To investigate activity of HCV core protein on laminin B1 chain promoter, we use co-transfection methods and reporter gene expression in hepatoblastoma cell.

METHODS: LAMB-p sequence was identified in GenBank by bioinformatics and amplified from HepG2 genome by polymerase chain reaction (PCR). The amplified product was cloned into pCAT3 vector. The NIH 3T3 and COS-7 cell line were transfected by pCAT3-LAMB-p, the NIH 3T3 cell line was co-transfected by pCAT3-LAMB-p and pcDNA3.1 (-)-core. The choloraphenical acetyltransferase (CAT) activity was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit.

RESULTS: In all cell lines, we found pCAT3-LAMB-p had higher activity of CAT than pCAT3-basic by ELISA kit. The expression of CAT in co-transfection was 3.3 times as higher as that of pCAT3-LAMB-p plasmid.

CONCLUSION: HCV-core protein has transactivity on LAMB

promoter, and this result is implicating in the pathogenesis of fibrosis related to HCV infection

Yang Q, Liu Y, Cheng J, Wang JJ, Yang YJ, Zhang SL. Up-regulating effect of hepatitis C virus core protein on laminin B1 chain gene promoter. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(7):955-958

摘要

目的: 探讨丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白对层粘蛋白B1链(LAMB)启动子转录的激活作用。

方法: 以我室构建的HCV核心蛋白反式调节基因的cDNA文库抑制性消减杂交(SSH)筛选结果为基础, 利用生物信息学技术确定LAMB的启动子区域(LAMB-p), 聚合酶链反应(PCR)扩增LAMB-p, 克隆至真核表达载体pCAT3中, 构建pCAT3-LAMB-p表达载体; 以该质粒转染COS-7、NIH 3T3细胞系, 用酶联免疫黏附方法(ELISA)法检测测氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达活性; 与pcDNA3.1(-)-core共转染NIH 3T3细胞系, 用ELISA法检测CAT的表达活性。

结果: 质粒pCAT3-LAMB-p在NIH 3T3、COS-7细胞中能够激活CAT的表达; 共转染实验中pCAT3-LAMB-p+pcDNA3.1(-)-core组CAT的表达活性是pCAT3-LAMB-p的3.3倍。

结论: 构建的pCAT3-LAMB-p具有启动子活性; HCV核心蛋白对LAMB-p有激活作用。本研究为利用SSH技术研究HCV核心蛋白致肝细胞癌机制提供新的实验及理论基础。

杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 杨艳杰, 张树林. 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. 世界华人消化杂志 2003;11(7):955-958
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/955.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)基因组是一种单股正链RNA, 全长约9 500个核苷酸(nt), 含有一个大的开放读码框架(ORF), 编码3 010-3 033个氨基酸残基(aa)的多肽前体, 多肽前体至少被加工为10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^[1], 近年来研究发现, 核心蛋白可以定位于细胞核内, 并对多种病毒和细胞基因起调节作用^[2-4]. 我室利用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)筛选出HCV核心蛋白上调表达的一些已知和未知的基因, 其中包

括层粘连蛋白B1链(LAMB, laminin B1 chain)基因. 本研究利用生物信息学手段对LAMB基因5'上游调控序列进行分析、克隆, 并与报告基因氯霉素乙酰转移酶(CAT)构建表达质粒, 与核心蛋白表达载体共转染, 证明核心蛋白对LAMB启动子具有激活作用, 使下游CAT基因的表达增强.

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌 JM109, 细胞株 COS-7、NIH 3T3、pcDNA3.1(-)-core 为本室保存. pGEM-T、pCAT3 载体购自 Promega 公司, 脂质体 FuGENE6 购自 Roche 公司, Taq DNA 聚合酶购自鼎国生物公司, 限制性内切酶 Kpn I、Xho I 购自 Takara 公司. 质粒 DNA 提取试剂盒 (Promega 公司), 玻璃奶 DNA 回收试剂盒(博大公司), CAT ELISA 试剂盒(Roche 公司). 引物合成、核苷酸序列测序由上海博亚公司完成.

1.2 方法

1.2.1 LAMB 启动子结构分析 根据 GenBank 中 LAMB 基因组序列, 确定 LAMB 的翻译起始点, 截取其上游 798 bp, 设计并合成引物, 在上下游引物的 5' 端分别加上 Kpn I 和 Xho I. 上游引物: 5' -GGT ACC GTC GCG CCCATC CCA AGC TC-3' 下游引物: 5' -CTC GAG ATG CCG GTC CCC TGC AGC CA-3'.

1.2.2 质粒构建 PCR 扩增 LAMB 启动子序列, 玻璃奶纯化回收 DNA 片段, 在 T4 DNA 连接酶的作用下, 与 pGEM-T 载体连接, 转化大肠杆菌 JM109, 挑取在选择平皿(Amp, X-gal/IPTG)生长的白色菌落提取质粒, 经酶切(Kpn I/Xho I)及测序鉴定. Kpn I/Xho I 双酶切重组质粒 pGEM-T-LAMBp, 玻璃奶纯化回收酶切产物, 定向克隆至 pCAT3 载体, 构建成重组质粒 pCAT3-LAMBp. 经双酶切及菌落PCR鉴定连接产物. 试剂盒方法提取质粒以备转染.

1.2.3 细胞培养及转染 COS-7、NIH 3T3 细胞系在含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中生长. 细胞生长至 50-80% 时采用脂质体转染法, 具体转染方法参照 FuGENE6 说明书进行. 质粒 pCAT3-p 转染 30 h 后收获细胞.

1.2.4 共转染实验 NIH 3T3 细胞生长至 50-80% 时, 质粒 pCAT3-p 与 pcDNA3.1(-)-core、质粒 pCAT3-p 与 pcDNA3.1(-) 空载体共转染. 具体转染方法参照 FuGENE6 说明书进行. 转染 30 h 后收获细胞.

1.2.5 CAT 表达量的检测 将收获的细胞进行裂解, 提取上清液, 取 200 μ l 用于检测 CAT 的表达量. 具体方法严格按照 CAT ELISA 试剂盒说明书进行. 在 415 nm 光波下测吸光度 A 值.

2 结果

2.1 LAMB 启动子结构 根据 GenBank 中 LAMB 基因组序列, 确定 LAMB 的翻译起始点, 选取其上游 798 bp, 其核苷酸序列见图 1. 对此序列进行分析发现有多个

TATA 盒存在, G+C 含量为 65%, 同时含有多个 CCGCCC 序列.

```

                                CGCGCC  CATCCCAAGC  TCTTGATAC
TAGGGGCGGA  GAGGAAGTGT  CACTTTCTAA  AGAACAAACA  CGACAGGTCG
ACCCTGT TTC  TAAAGGGTTA  ACCCGCCTTC  CCCGAGCGCA  CCGCACGAGA
GTTTATAGCG  TGGGCACGTT  TGGTGATTCA  CTCTTGCGA  ACGTAAATGC
GCGAGTCCGC  GGTAGGTCCC  GCCGGCCCC  TGGCTGGGCA  ACCTGAAAAC
CCACCTCGGA  GACGCCCCCA  CGCATCCGCC  CCCCTCGCTG  GACGGCCCCG
CCGCGCGCCG  TTCTGGGACG  CGCACCCCG  GGCGGACCCG  CCCTGGGACC
TGGAAGCGCC  CCAGCCCCGC  AGCGATCGCA  GATTCTGGCT  TCAAACAAA
GAGGCGCCCC  GGGGGGTGGG  ACCGGGACCT  CACCCGGTCC  TCGCAGAGTT
GCGGCCGCC  GCCCTTCAG  CCCCGGCTCT  CCGTATGCGC  ATGAGCAGAG
GCGCCTCCCT  CTGTTCTCCT  CAAGGCTAAA  CTTTCTAATT  CCCTTCTTTG
GGCTCGGGGG  CTCCCGGAGC  AGGGCGAGAG  CTCGCGTCGC  CGGGTGAGGA
GAACAAAGTG  GCTGCACGAT  TTTCCCACT  TTCCAGCCCA  CCCCCCGCTT
CCGTGGGAGC  GACAGGAAAT  GGAAGGGCGC  CTCTTCTCTC  TTTGAACATT
TGCTTTTTTT  CCCCTCCTTT  CCACCTCTCC  AGAAAGGAAG  ACGGGAAGAA
AGGGCAGGCG  GCTCGGCGGG  CGTCTTCTCC  ACTCCTCTGC  CGCGTCCCCG
TGGCTGCAGG  GAGCCGGCAT

```

图1 LAMB 翻译起始位点上游核苷酸序列.

2.2 重组质粒的构建 以来源于 HepG2 细胞的基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 LAMB 启动子 DNA 序列, 结果如图 2 所示, 于 790 bp 处出现理想条带. 将扩增产物与 pGEM-T 载体连接, 双酶切鉴定, 结果如图 3 所示, 显示两条带(3 000 bp 的 pGEM-T 载体和 790 bp 的 LAMB-p DNA 片段), 并送测序鉴定正确. 双酶切产物与 pCAT3 载体连接, 双酶切鉴定如图 4 所示(4 000 bp 的 pCAT3-basic 空载体和 790 bp 的 LAMB-p DNA 片段), 连接转化生长的菌落进行 PCR 鉴定, 如图 5 所示, 于 790 bp 处可见理想条带.

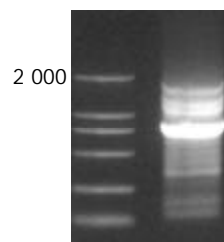


图2 以 HepG2 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 LAMB 启动子序列.

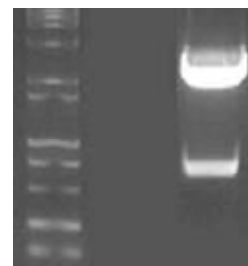


图3 pGEM-T-LAMBp 双酶切(Kpn I/Xho I).

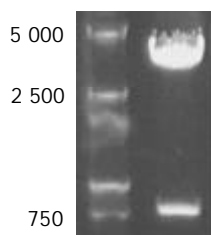


图4 pCAT3-LAMB-p 双酶切(Kpn I/Xho I)。

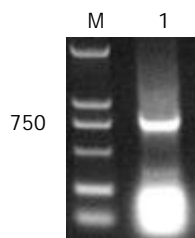


图5 pCAT3-LAMB-p 菌落 PCR。

2.3 重组质粒转染实验及报告基因 CAT 的检测 将重组质粒 pCAT3-LAMB-p 转染 COS-7、NIH 3T3 细胞, 如表 1 所示, pCAT3-LAMB-p 具有启动子活性。

表1 pCAT3-LAMB-p 转染 COS-7、NIH 3T3 细胞中后 CAT 的表达

组别	质粒	吸光度(A 值)
阴性对照 COS-7	pCAT3-basic	0.050
阴性对照 NIH 3T3	pCAT3-basic	0.060
阳性对照 COS-7	pCAT3-control	1.258
阳性对照 NIH 3T3	pCAT3-control	0.258
实验组 COS-7	pCAT3-LAMB-p	1.046
实验组 NIH 3T3	pCAT3-LAMB-p	0.129

2.4 重组质粒 pCAT3-LAMB-p 与 pcDNA3.1(-)-core 共转染 COS-7 并检测报告基因 CAT 的表达 共转染 pCAT3-LAMB-p+pcDNA3.1(-)-core 时 CAT 的表达较对照质粒明显升高, 如表 2 所示, 说明 HCV 核心蛋白对 LAMB 启动子具有激活作用。

表2 pCAT3-LAMB-p+pcDNA3.1(-)-core 共转染后 CAT 的表达

组别	质粒	吸光度(A 值)
阴性对照组	pCAT3-basic	-0.059
阳性对照组	pCAT3-control	0.138
实验对照组	pCAT3-LAMB-p	0.338
共转染组	pCAT3-LAMB-p+pcDNA3.1(-)-core	1.006

3 讨论

丙型肝炎病毒(HCV)易在感染个体中形成持续感染状态, 并容易发展为慢性肝炎、肝硬化(LC), 甚至肝细胞癌(HCC)^[5-7], 其确切的机制仍不明确。HCV 核心蛋白是一种多功能蛋白质, 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^[8,9]。实验研究显示核心蛋白对细胞信号转导途径, 尤其是 NF- κ B、AP-1 和 SRE 相关途径具有明显的反式激活作用^[10-12]; 在 HepG2 细胞中, 核心蛋白激活人胰岛素样生长因子 II (IGF-II) 基因、和 SV40 早期启动子^[13-15]; 核心蛋白还能抑制或增强 p53 基因启动子功能^[16,17]。HCV 核心蛋白的反式激活功能在 HCV 致病中发挥重要的作用, 研究其作用分子生物学机制有助于理解 HCV 感染的慢性化和致癌作用。我室采用抑制性消减杂交方法^[18]克隆 HCV 反式激活基因, 成功地构建了 HCV 核心蛋白反式激活相关基因差异表达的 cDNA 消减文库。其中发现 HCV 核心蛋白可上调 LAMB 基因的表达^[19]。为了进一步研究 HCV 核心蛋白是否对 LAMB 的表达有激活作用, 根据 GenBank 中 LAMB 基因组序列^[20], 确定 LAMB 的翻译起始点, 截取其上游 798 bp 核苷酸序列进行克隆, 并构建含报告基因 CAT 的重组质粒, 结果发现 HCV 核心蛋白对 LAMB 的表达确有激活作用, 证实了 cDNA 消减文库的发现。

层粘连蛋白是细胞外基质成分, 主要存在于基底膜的透明层, 对细胞的黏附、移行和增生均有影响^[21,22]。层粘连蛋白由 A、B1、B2 三条链组成。其中 LAMB 是其主要的活性区域, 含有与分布在肿瘤和上皮细胞上的受体高度亲和的配体区^[23-25]。虽然一些正常实质细胞能够表达层粘连蛋白^[26,27], 但 Geerts et al^[28]利用原位杂交技术在正常鼠肝细胞中未发现层粘连蛋白 mRNA 的表达。目前研究表明, 层粘连蛋白参与肿瘤的血管形成, 促进肿瘤的转移^[29,30]。HCV 核心蛋白上调 LAMB 表达的生物学意义并不明确, 但由于层粘连蛋白参与血管基底膜的形成及促进肿瘤的转移, 可能与肝纤维化、肝硬化时肝窦血管化及肝癌的扩散有关。本研究为进一步探讨 HCV 感染的发病机制、HCV 核心蛋白致癌的分子生物学机制提供新的研究基础。

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 Shrivastava A, Manna SK, Ray R, Aggarwal BB. Ectopic expression of hepatitis C virus core protein differentially regulates nuclear transcription factors. *J Virol* 1998;72:9722-9728
- 3 Flichman D, Cello J, Castano G, Campos R, Sookoian S. In vivo down regulation of HIV replication after hepatitis C superinfection. *Medicina (B Aires)* 1999;59:364-366
- 4 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 表面抗原中蛋白的协同反式激活功能. *中华肝脏病学杂志* 2002;10:354-356
- 5 刘妍, 成军. HCV 致肝细胞癌的分子生物学机制. *国外医学·流行病学传染病学分册* 2000;27:10-13
- 6 Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, Hu PY, Miller JK, Gerber MA, Sampliner RE. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. the sentinel counties chronic non-A, non-B hepatitis study team. *N Engl J Med* 1992;327:1899-1905
- 7 Saito I, Miyamura T, Ohbayashi A, Harada H, Katayama T, Kikuchi S, Watanabe Y, Koi S, Onji M, Ohta Y. Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepato-

- cellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:6547-6549
- 8 MacDonald AJ, Duffy M, Brady MT, McKiernan S, Hall W, Hegarty J, Curry M, Mills KH. CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons. *J Infect Dis* 2002; 185:720-727
- 9 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
- 10 Chung YM, Park KJ, Choi SY, Hwang SB, Lee SY. Hepatitis C virus core protein potentiates TNF-alpha-induced NF-kappaB activation through TRAF2-IKKbeta-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;284:15-19
- 11 Erhardt A, Hassan M, Heintges T, Haussinger D. Hepatitis C virus core protein induces cell proliferation and activates ERK, JNK, and p38 MAP kinases together with the MAP kinase phosphatase MKP-1 in a HepG2 Tet-Off cell line. *Virology* 2002; 292:272-284
- 12 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
- 13 Chang J, Yang SH, Cho YG, Hwang SB, Hahn YS, Sung YC. Hepatitis C virus core from two different genotypes has an oncogenic potential but is not sufficient for transforming primary rat embryo fibroblasts in cooperation with the H-ras oncogene. *J Virol* 1998;72:3060-3065
- 14 刘妍,成军,邵得志,王琳,钟彦伟,夏小兵. 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活 SV40 病毒早期启动子 / 增强子的研究. 军医进修学院学报 2001;22:186-188
- 15 Lee S, Park U, Lee YI. Hepatitis C virus core protein transactivates insulin-like growth factor II gene transcription through acting concurrently on Egr1 and Sp1 sites. *Virology* 2001;283:167-177
- 16 Otsuka M, Kato N, Lan K, Yoshida H, Kato J, Goto T, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus core protein enhances p53 function through augmentation of DNA binding affinity and transcriptional ability. *J Biol Chem* 2000;275:34122-34130
- 17 Lu W, Lo SY, Chen M, Wu K, Fung YK, Ou JH. Activation of p53 tumor suppressor by hepatitis C virus core protein. *Virology* 1999;264:134-141
- 18 Diatchenko L, Lau YF, 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
- 19 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
- 20 Pikkarainen T, Eddy R, Fukushima Y, Byers M, Shows T, Pihlajaniemi T, Saraste M, Tryggvason K. Human laminin B1 chain. A multidomain protein with gene (LAMB1) locus in the q22 region of chromosome 7. *J Biol Chem* 1987;262:10454-10462
- 21 Graf J, Ogle RC, Robey FA, Sasaki M, Martin GR, Yamada Y, Kleinman HK. A pentapeptide from the laminin B1 chain mediates cell adhesion and binds the 67 000 laminin receptor. *Biochemistry* 1987;26:6896-6900
- 22 Vuolteenaho R, Chow LT, Tryggvason K. Structure of the human laminin B1 chain gene. *J Biol Chem* 1990;265:15611-15616
- 23 Nelson J, Scott WN, Allen WE, Wilson DJ, Harriott P, McFerran NV, Walker B. Murine epidermal growth factor peptide (33-42) binds to a YIGSR-specific laminin receptor on both tumor and endothelial cells. *J Biol Chem* 1996;271:26179-26186
- 24 Massia SP, Rao SS, Hubbell JA. Covalently immobilized laminin peptide Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) supports cell spreading and co-localization of the 67-kilodalton laminin receptor with alpha-actinin and vinculin. *J Biol Chem* 1993;268:8053-8059
- 25 Terranova VP, Rao CN, Kalebic T, Margulies IM, Liotta LA. Laminin receptor on human breast carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:444-448
- 26 Bissell D. Connective tissue metabolism and hepatic fibrosis: an overview. *Semin Liver Dis* 1990;10:1-83
- 27 Maher JL, McGuire R. Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cell during hepatic fibrosis in vivo. *J Clin Invest* 1990;86: 1641-1648
- 28 Geerts A, Greenwel P, Cunningham M, De Bleser P, Rogiers V, Wisse E, Rojkind M. Identification of connective tissue gene transcripts in freshly isolated parenchymal, endothelial, Kupffer and fat-storing cells by Northern hybridization analysis. *J Hepatol* 1993;19:148-158
- 29 Soini Y, Autio-Harmainen H. Synthesis and degradation of basement membranes in benign and malignant salivary gland tumours. A study by in situ hybridization. *J Pathol* 1993;170: 291-296
- 30 Soini Y, Hurskainen T, Hoyhtya M, Oikarinen A, Autio-Harmainen H. 72 KD and 92 KD type IV collagenase, type IV collagen, and laminin mRNAs in breast cancer: a study by in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 1994;42:945-951



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

