

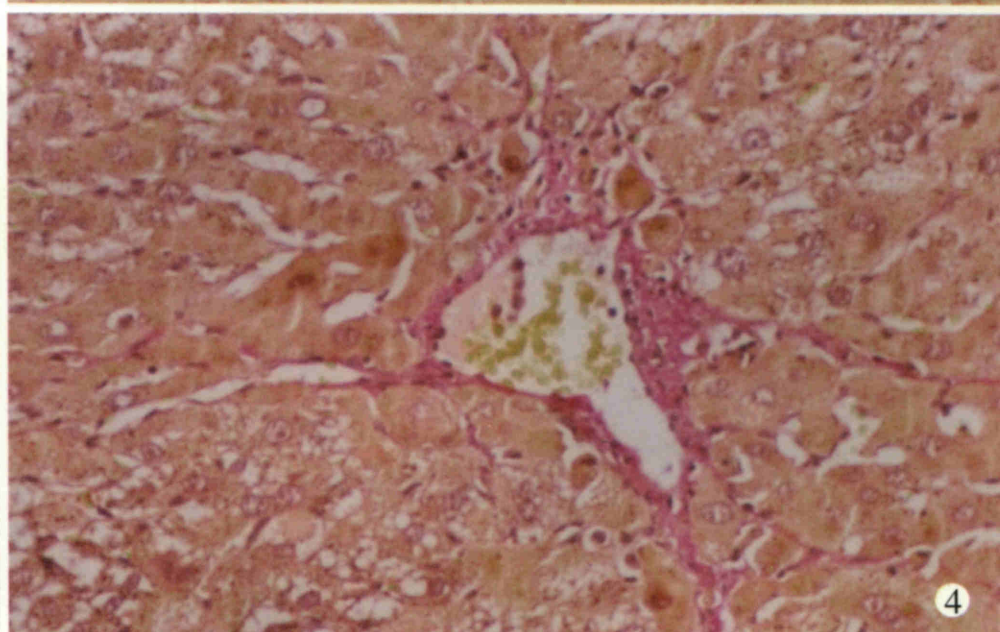
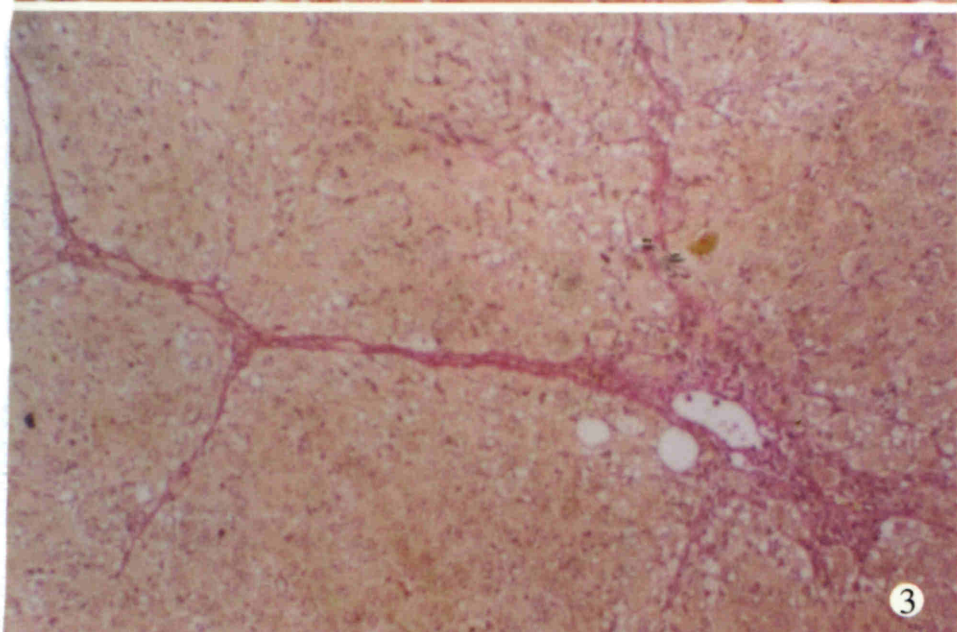
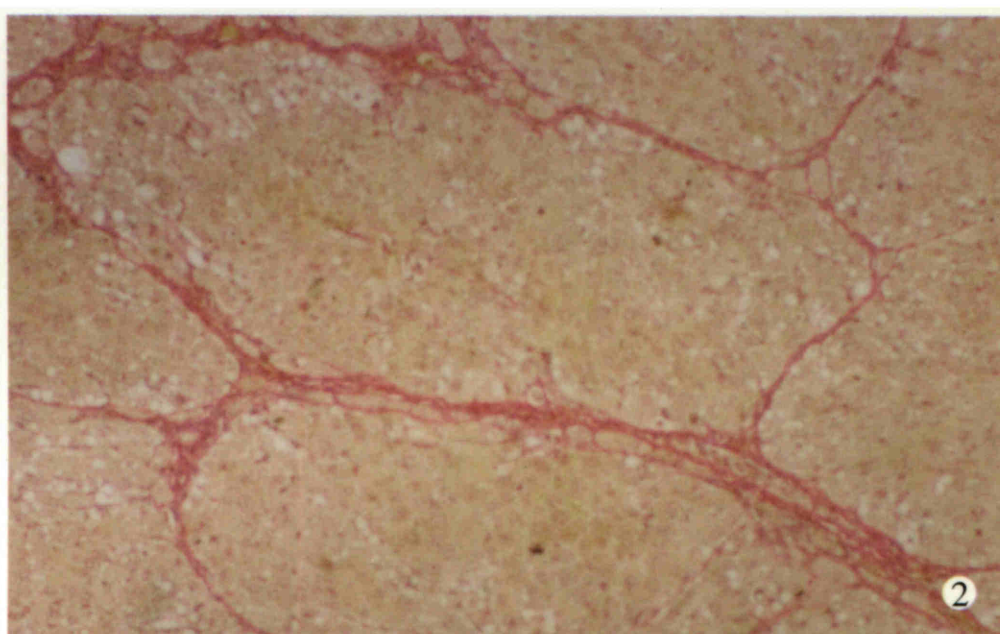
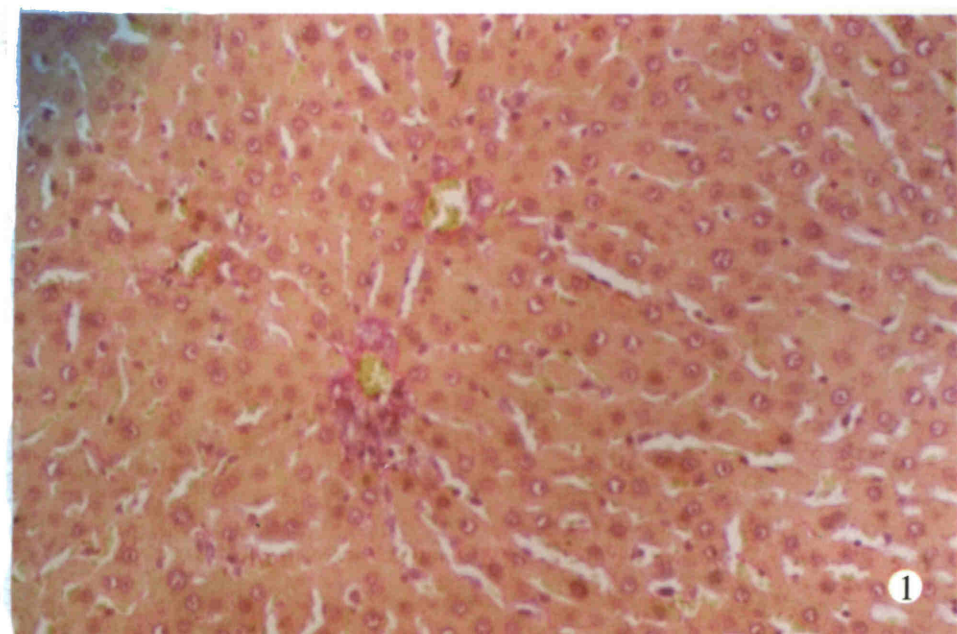
世界华人消化杂志®

**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.

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

杨倩, 刘妍, 成军, 李克, 王建军, 洪源, 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 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。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 human hepatitis C virus core protein-binding protein 6 on NACA gene promoter

Qian Yang, Yan Liu, Jun Cheng, Ke Li, Jian-Jun Wang, Yuan Hong, Shu-Lin Zhang

Qian Yang, Yan Liu, Jun Cheng, Ke Li, Jian-Jun Wang, Yuan Hong, 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, 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: By using yeast-two hybrid technique and bioinformatics analysis, human hepatitis C virus core protein-binding protein 6 (HCBP6) was screened and identified. To investigate activity of HCBP6 on α chain of nascent polypeptide-associated complex (NACA) promoter by co-transfection and reporter gene expression methods.

METHODS: Promoter DNA sequence for a subunit α of nascent polypeptide-associated complex was identified in GenBank by bioinformatics and amplified from HepG2 genome by polymerase chain reaction (PCR). The amplified product was cloned to pCAT3 vector. The NIH 3T3 and COS-7 cell line were transfected by pCAT3-NACA-p, the NIH 3T3 cell line was co-transfected by pCAT3-NACA-P and pcDNA3.1 (-)-HCBP6. The chloromycin acetyltransferase (CAT) activity was detected by an enzyme-linked immunoassay (ELISA) kit.

RESULTS: In all cell lines, we found pCAT3-NACA-p had higher activity of CAT than pCAT3-basic by ELISA kit. The expression of CAT tested in co-transfection was 4 times as higher as pCAT3-NACA-p plasmid.

CONCLUSION: HCBP6 has trans-activity on NACA promoter, and this result implicates HCBP6 can affect metabolism.

Yang Q, Liu Y, Cheng J, Li K, Wang JJ, Hong Y, Zhang SL. Up-regulating effect of human hepatitis C virus core protein-binding protein 6 on NACA gene promoter. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(7):959-962

摘要

目的: 探讨HCV核心蛋白结合蛋白6对新生多肽相关复合物 α 多肽启动子的激活作用。

方法: 以基因表达谱芯片技术筛选HCBP6表达质粒转染HepG2细胞后的差异表达基因为基础, 利用生物信息学技术确定NACA的启动子区域(NACA-p), 聚合酶链反应(PCR)扩增NACA-p, 克隆至真核表达载体pCAT3中, 构建pCAT3-NACA-p表达载体; 以该质粒转染COS-7、NIH 3T3细胞系, 用酶联免疫吸附方法(ELISA)检测氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达活性; 与pcDNA3.1(-)-HCBP6共转染NIH 3T3细胞系, 用ELISA法检测CAT的表达活性。

结果: 质粒pCAT3-NACA-p在NIH 3T3、COS-7细胞中能够激活CAT的表达; 共转染实验中pCAT3-NACA-p+pcDNA3.1(-)-HCBP6组CAT的表达活性是pCAT3-NACA-p的4倍。

结论: pCAT3-NACA-p具有启动子活性; HCV核心蛋白结合蛋白6对NACA-p有激活作用。本研究为探讨HCV核心蛋白结合蛋白6的功能提供新的实验及理论基础。

杨倩, 刘妍, 成军, 李克, 王建军, 洪源, 张树林. 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. 世界华人消化杂志 2003; 11(7):959-962

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/959.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白是一种多功能蛋白质, 除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及病毒基因表达的功能, 在HCV引起的慢性肝炎、肝硬化、肝癌的发病机制中起到重要的作用^[1,2]. 其中核心蛋白与宿主蛋白之间的相互作用可能是病毒持续感染的重要原因^[3-5]. 为了进一步探索核心蛋白与肝细胞之间的相互作用, 我室采用酵母双杂交系统3, 以HCV核心蛋白作为“诱饵”, 对肝细胞cDNA文库进行筛选, 获得了一些与核心蛋白结合的肝细胞蛋

白的编码基因,其中包括未知功能基因6号,命名为HCV核心蛋白结合蛋白6(HCBP6)^[6,7]。为进一步研究该基因的功能,利用基因表达芯片技术筛选HCBP6表达质粒转染HepG2细胞后的差异表达基因,发现HCBP6可上调一些基因的表达,其中包括新生多肽相关复合物 α 多肽(α subunit of nascent polypeptide-associated complex, NACA),本研究利用生物信息学手段对NACA 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HCBP6表达载体共转染,证明HCBP6对NACA启动子(promoter)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(-)-HCBP6.为本室保存。pEGM-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 NACA启动子结构分析 根据GenBank中NACA基因组序列,确定NACA的转录起始点,截取其上游963 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 CTG GGA AGG AGA ATC TGC AC-3';下游引物:5' -CTC GAG GTG CAG GGA ACG CGG AAC CAA G-3'。

1.2.2 质粒构建 PCR扩增NACA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pEGM-T-NACA-promoter,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-NACA-promoter。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-NACA-promoter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-NACA-promoter与pcDNA3.1(-)-HCBP6、质粒pCAT3-NACA-promoter与pcDNA3.1(-)空载体共转染。因pCAT3-NACA-promoter活性较强,将共转染剂量减至0.2 μ g。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 NACA启动子结构 根据GenBank中NACA基因组序列,确定NACA的转录起始点,截取其上游963 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,同时含有多个CCGCCC序列。

1	CTGGGAAGGA GAATCTGCAG CTTTATAATT TCAACATCGG CTAAATTGTC
51	GTGAACCTAA ACAATCAAAA GGGCCGGAAT CTATTTAAAG AGTTTATTCA
101	AGGGCAGTGT GAGGATGGAC CAACCAGAAA ACCTCCAAAG AATGGAGTCA
151	GCCTTCAGAA GTAGAGAAGT TACGATTTC TTTATTTAGG GAGACAGAGG
201	AGTTTTTAGC TGGATTACGT TATCCATACA AGGTTGGAAC ATAATTACAG
251	AATTTGGTTA CAAGAAGTGT TTTTTTTTGG GGGGGGGGCG GGGGTACAGC
301	TAACATTGTT TTACGAAGAG TTAAACACGC ATGAGTTGCT GTCATCTGGT
351	GACATCGTTT GAGTCTCTCT AGTCATTGAA CAGAACAAGA AAAATCGAAT
401	TAAATTTATA ATCTGAACTG AAGTTATATG TGACCCATCA CATCTCTCAA
451	GTTTTAAAAT GGGTTTTTTT GTTGTGTGTG ATGGGGGGGG AGAGGGTCCA
501	GCAGCTTTTA AATGTTTTCA CATCGTGTGT TCCAAAAATA ACTGTTTAGC
551	CTAAGTCACT TCCACCCTCC AATGTTGTGA ATGCAGTCTC TAGCATTGCG
601	TATTTAATGT CTCTTCTCTG CACTATTTGA GAAATCGCGA GGTGCGACTTA
651	ATACCGCAGT CGCCACTTCG CGGACCGGAG GCGCGAGTCT GCTTAGTTCT
701	GAGGACTGCG TGGGTCCGCG CAGAGAGCTC CTGCTAGGCC TGCGCGTCCC
751	GTTCTAAATT CTTACCCTTT AGTTCTTGTC ACCACCCCGG CCGTGGAAC
801	GGCCTGACAG TCACTCGTCA AAGGAAGTGG CTGCCGGCAG CTCTTGACCC
851	GGAATCGGAT CCTAGTCCCA CCCCTCCGC TCCAGGCTTC CTTCTGCAAC
901	GGGCGTGGT CACGCTCTCG CTCGGTCTTT CTGCCGCCAT CTTGGTTCCG
951	CGTTCCCTGC AC

图1 NACA转录启动子核苷酸序列。

2.2 重组质粒的构建 以 HepG2 基因组为模板, PCR 扩增 NACA 启动子 DNA 序列, 于 963 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, 显示两条带. 并送测序鉴定正确. 双酶切产物与 pCAT3 载体连接, 连接产物双酶切鉴定如图 1 所示(4 000 bp 的 pCAT3-basic 空载体和 963 bp 的 NACA-promoter DNA 片段)连接转化生长的菌落进行 PCR 鉴定, 如图 2 所示, 于 963 bp 处可见理想条带.

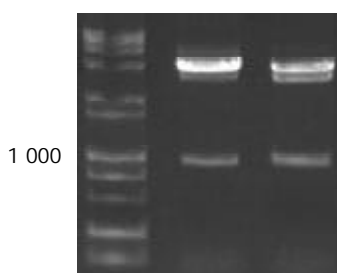


图2 pCAT3-NACA-promoter 双酶切(Kpn I/Xho I).

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-NACA-p 转染 COS-7、NIH 3T3 细胞, 如图 3 所示 pCAT3-NACA-p 具有启动子活性. 其中组 1 为 COS-7 细胞系; 组 2 为 NIH 3T3 细胞系. pCAT3-basic(阴性对照), pCAT3-control(阳性对照).

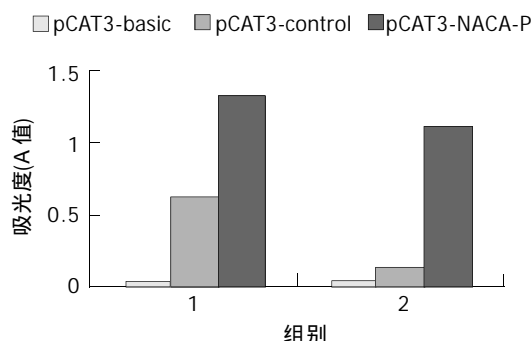


图3 pCAT3-NACA-p 转染 COS-7、NIH 3T3 细胞后 CAT 的表达. 组 1: COS-7 细胞系; 组 2: nih 3T3 细胞系 pCAT3-basic(阴性对照), pCAT3-control(阳性对照).

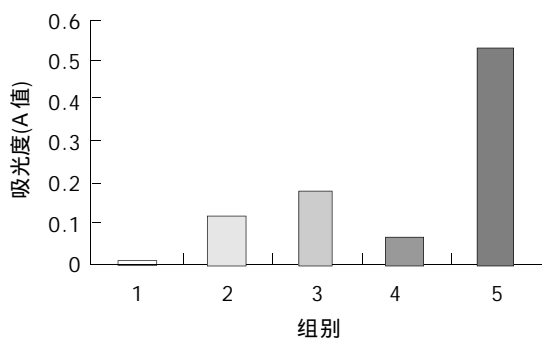


图4 共转染 NIH 3T3 细胞后 CAT 的表达. 1: pCAT3-basic; 2: pCAT3-control; 3: pCAT3-NACA; 4: pcDNA3.1(-)-vector(空载体); 5: pCAT3-NACA-p.

2.4 重组质粒 pCAT3-NACA-promoter 与 pcDNA3.1(-)-HCBP6 共转染 NIH 3T3 并检测报告基因 CAT 的表达.

共转染 pCAT3-NACA-promoter+pcDNA3.1(-)-HCBP6 时 CAT 的表达较对照质粒明显升高, 如图 4 所示, 说明 HCBP6 对 HCBP6 启动子具有激活作用. 其中组 1 为 pCAT3-basic, 组 2 为 pCAT3-control, 组 3 为 pCAT3-NACA, 组 4 为 pcDNA3.1(-)-vector(空载体), 组 5 为 pCAT3-NACA-p.

3 讨论

HCV 核心蛋白是一种多功能蛋白, 除了作为核壳蛋白具有病毒颗粒组装功能外, 还结合细胞内的蛋白质, 如载脂蛋白 AII、肿瘤坏死因子受体-1(TNFR-1)、淋巴瘤毒素- β 受体(LT- β R), 对细胞信号转导、宿主的免疫调节起作用^[8,9]. 为研究 HCV 核心蛋白与宿主肝细胞蛋白的相互作用, 我们将肝细胞 cDNA 文库与 HCV 核心蛋白“诱饵”进行酵母双杂交, 筛选并克隆了与 HCV 核心蛋白相互作用的新的蛋白质基因 HCBP6^[10,11]. 利用生物信息学技术, 我们确定了 HCBP6 的染色体定位, 运用在线软件对其蛋白质一级结构序列进行了分析, 为探讨 HCBP6 蛋白表达的特点及功能奠定了基础^[12,13]. 同时在四唑氮蓝(MTT)实验中发现 HCBP6 可以促进细胞生长, 与 HCV 核心质粒共转染研究中发现其在一定程度上可抑制 HCV 核心蛋白对 SV40 早期启动子的反式激活作用^[14]. 为进一步研究 HCBP6 的功能, 我们采用基因芯片方法筛选 HCBP6 基因转染细胞差异表达的基因, 结果表明 HCBP6 可上调一些基因的表达, 其中包括 NACA 基因^[15]. 根据 GenBank 中 NACA 基因组序列, 确定 NACA 的转录起始点^[16,17], 截取其上游 963 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 HCBP6 对 NACA 的表达确有激活作用. 对 HCBP6 的功能研究提供了新的依据.

新生多肽相关复合物由 α 、 β 两条肽链组成, 主要在胞质中分布^[18,19]. 研究发现去除 NAC 后, 细胞将产生两种缺陷: (1)与新生肽链信号肽链接并将其靶向与内质网连接的信号识别颗粒, 失去信号识别功能, 而与无信号肽的新生肽链交叉连接; (2)核糖体翻译与内质网膜错误连接的非分泌性的蛋白质^[20-22]. NACA 单独不能与核糖体连接, 但对核酸有较高的亲和力^[23,24]. Beatrix et al^[25]发现 NACA 除了能和 DNA 结合外, 还能与 RNA、mRNA、tRNA、7S LRNA 相结合, 并且可以进入核内^[26,27]. Mossabeh et al^[28]发现 NACA 可以诱导特异性皮炎患者特异性淋巴细胞增生反应, 并且与自发性 IgE 抗体特异性结合. Yotov et al^[29]研究表明富含脯氨酸的不同 NACA 拼接体可以激活肌球蛋白启动子的转录活性, 在调控肌源性细胞分化时的基因表达发挥重要作用. Moreau et al^[30]也证明 NACA 能够与 c-Jun 蛋白的 1-89 位氨基酸结合, 并且作为辅激活蛋白 NACA 可以与非磷酸化和 73 位丝氨酸磷酸化的 c-Jun 蛋白结合, 从而在成骨细胞分化过程中起到转录调节的作用.

HCBP6 的生物学功能目前仍不是很明确, 对其反

式激活作用的研究有助于探索其在细胞分化、信号传导中的作用. 并对 HCV 感染慢性化、HCV 引起原发性肝癌的致病机制提供新的研究方向.

4 参考文献

- 1 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
- 2 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
- 3 Liu Q, Tackney C, Bhat RA, Prince AM, Zhang P. Regulated processing of hepatitis C virus core protein is linked to subcellular localization. *J Virol* 1997;71:657-662
- 4 Yasui K, Wakita T, Tsukiyama-Kohara K, Funahashi SI, Ichikawa M, Kajita T, Moradpour D, Wands JR, Kohara M. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 1998;72:6048-6055
- 5 成军. 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
- 6 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 陆荫英, 李莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白基因的表达载体构建及在酵母中表达. 军医进修学院学报 2002;23:1-3
- 7 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆 HCV 核心蛋白结合蛋白基因 1. 世界华人消化杂志 2001;9:1379-1383
- 8 成军, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的研究进展. 国外医学病毒学分册 2000;7:123-127
- 9 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 董菁, 洪源, 张跃新, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 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
- 10 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 邵得志, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 洪源, 陈菊梅. 筛选与克隆丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因. 中华实验和临床病毒学杂志 2002;16:51-54
- 11 成军, 李克, 陆荫英, 董菁, 李莉, 王琳, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒调节基因区结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:223-225
- 12 成军, 李克, 陆荫英, 王琳, 刘妍. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因和蛋白的生物信息学分析. 世界华人消化杂志 2003;11(待发表)
- 13 Husmeier D, Wright F. Probabilistic divergence measures for detecting interspecies recombination. *Bioinformatics* 2001;17(Suppl 1):S123-131
- 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 刘妍, 成军, 李克, 杨倩, 陆荫英, 王琳, 王建军. 丙型肝炎核心蛋白结合蛋白 6 基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析. 世界华人消化杂志 2003;11(待发表)
- 16 Yotov WV, St-Arnaud R. Mapping of the human gene for the alpha-NAC/1.9.2 (NACA/1.9.2) transcriptional coactivator to Chromosome 12q23-24.1. *Mamm Genome* 1996;7:163-164
- 17 Wiedmann B, Sakai H, Davis TA, Wiedmann M. A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature* 1994;370:434-440
- 18 Shi X, Parthun MR, Jaehning JA. The yeast EGD2 gene encodes a homologue of the alpha NAC subunit of the human nascent-polypeptide-associated complex. *Gene* 1995;165:199-202
- 19 Reimann B, Bradsher J, Franke J, Hartmann E, Wiedmann M, Prehn S, Wiedmann B. Initial characterization of the nascent polypeptide-associated complex in yeast. *Yeast* 1999;15:397-407
- 20 Lauring B, Sakai H, Kreibich G, Wiedmann M. Nascent polypeptide-associated complex protein prevents mistargeting of nascent chains to the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5411-5415
- 21 Wiedmann B, Prehn S. The nascent polypeptide-associated complex (NAC) of yeast functions in the targeting process of ribosomes to the ER membrane. *FEBS Lett* 1999;458:51-54
- 22 Bacher G, Pool M, Dobberstein B. The ribosome regulates the GTPase of the beta-subunit of the signal recognition particle receptor. *J Cell Biol* 1999;146:723-730
- 23 Whitby MC, Dixon J. Fission yeast nascent polypeptide-associated complex binds to four-way DNA junctions. *J Mol Biol* 2001;306:703-716
- 24 Franke J, Reimann B, Hartmann E, Kohlerl M, Wiedmann B. Evidence for a nuclear passage of nascent polypeptide-associated complex subunits in yeast. *J Cell Sci* 2001;114:(Pt 14) 2641-2648
- 25 Beatrix B, Sakai H, Wiedmann M. The alpha and beta subunit of the nascent polypeptide-associated complex have distinct functions. *J Biol Chem* 2000;275:37838-37845
- 26 St-Arnaud R, Quelo II. Transcriptional coactivators potentiating AP-1 function in bone. *Front Biosci* 1998;3:D838-848
- 27 Goatley LC, Twigg SR, Miskin JE, Monaghan P, St-Arnaud R, Smith GL, Dixon LK. The African swine fever virus protein j4R binds to the alpha chain of nascent polypeptide-associated complex. *J Virol* 2002;76:9991-9999
- 28 Mossabeh R, Seiberler S, Mittermann I, Reininger R, Spitzauer S, Natter S, Verdino P, Keller W, Kraft D, Valenta R. Characterization of a novel isoform of alpha-nascent polypeptide-associated complex as IgE-defined autoantigen. *J Invest Dermatol* 2002;119:820-829
- 29 Yotov WV, St-Arnaud R. Differential splicing-in of a proline-rich exon converts alpha NAC into amuse-specific transcription factor. *Genes Dev* 1996;10:1763-1772
- 30 Moreau A, Yotov WV, Glorieux FH, St-Arnaud R. Bone-specific expression of the alpha chain of the nascent polypeptide-associated complex, a coactivator potentiating c-Jun-mediated transcription. *Mol Cell Biol* 1998;18:1312-1321



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

