

世界华人消化杂志®

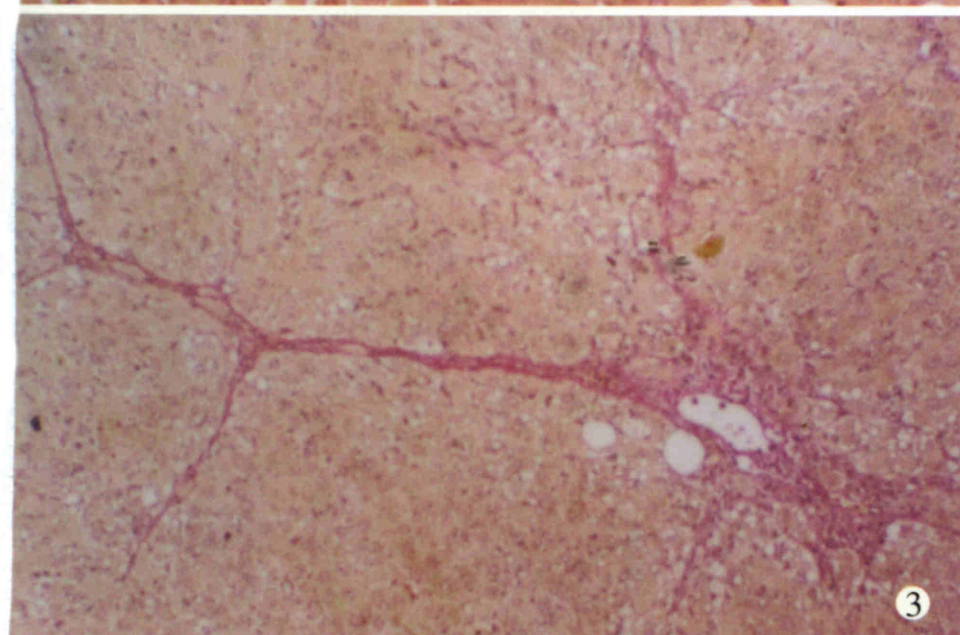
WORLD CHINESE

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

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

陈伟红, 周永兴, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院传染科 陕西省西安市 710038
何海棠, 张明霞, 刘志华, 中国人民解放军第一军医大学南方医院传染科 广东省广州市 510515
陈伟红, 女, 1964 - 10 - 13 生, 浙江省嘉兴市人, 汉族, 医学博士生, 讲师。
项目负责人: 陈伟红, 710038, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院传染科。 chenwhong101@163.com
电话: 029 - 3377752 传真: 029 - 3537377
收稿日期: 2002 - 10 - 09 接受日期: 2002 - 11 - 09

Expression of HLA-I on HepG₂ cells by hepatitis B virus nucleocapsid mutants

Wei-Hong Cheng, Hai-Tang He, Ming-Xia Zhang, Zhi-Hua Liu, Yong-Xing Zhou

Wei-Hong Cheng, Yong-Xing Zhou, Department of Infectious Diseases, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China.
Hai-Tang He, Ming-Xia Zhang, Zhi-Hua Liu, Department of Infectious Diseases, Nanfang Hospital, the First Military Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China.
Correspondence to: Wei-Hong Cheng, Department of Infectious Diseases, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. chenwhong101@163.com
Received: 2002-10-09 Accepted: 2002-11-09

Abstract

AIM: To study the expression of HLA-I/antigen peptide complex on HepG₂ cells transfected with HBV (adr) wild type and nucleocapsid protein mutants.

METHODS: The site-directed mutation was performed to introduce nucleocapsid protein point mutations V60 and L97 into 1.2 copies of HBV genome plasmid p3.8 II. After identification of DNA sequence and biological activities, the plasmid p3.8 II and mutant plasmid constructs were subcloned respectively into EB virus based vector EBO-plpp for stable expression. The vector constructed EBO-wild type, EBO-V60, and EBO-L97 were analyzed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing, then transfected into HepG₂ cells via the liposome technique, respectively. HBV antigen in their culture supernatants was quantified by Abbott kits. The cells were stained with murine monoclonal antibody anti-HLA-ABC conjugated directly to FITC, and expression of HLA-I on their membrane was analyzed by flow-cytometry.

RESULTS: Restriction enzyme digestion of 3 vector constructs showed two bands similar to HBV 1.2 copies genome and EBO vector, respectively. Analysis of DNA sequence confirmed the mutated nucleotides of EBO-V60 and EBO-L97 (i.e nt2078 C → G, nt2189 A → C). The expression of HBeAg S/CO in culture supernatant of EBO-wild type was much higher than that of mutant EBO-V60 and EBO-L97, while the expression of HBsAg S/N in three constructs had similar level, indicating similar transfecting rate in this experiment.

The expression of HLA-I on HepG₂ cells transfected with EBO empty vector was at low level. Fluorescence intensity of HLA-I expression of transfected cells was elevated by EBO-wild type (18.2), while that of L97 was increased to 34.5 and V60 declined to 3.4.

CONCLUSION: HBV might enhance the expression of HLA-I/antigen peptide complex on HepG₂ cells. Hot-spot mutations of HBV nucleocapsid protein L97 and V60 could influence the expression level of HLA-I on host cells.

Chen WH, He HT, Zhang MX, Liu ZH, Zhou YX. Expression of HLA-I on HepG₂ cells by hepatitis B virus nucleocapsid mutants. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(7):966-969

摘要

目的: 研究HBV adr亚型野生株和核壳蛋白变异株在HepG₂细胞表面的HLA - I/抗原肽复合物的表达。

方法: 通过定点突变技术将1.2拷贝HBV野生型质粒p3.8 II构建成核壳蛋白变异株V60和L97。经序列测定和生物学活性检测后,野生株和变异株重组质粒分别亚克隆入EB病毒表达载体EBO-plpp以稳定表达。重组载体EBO-野生株、EBO-V60和EBO-L97分别作内切酶双酶切和序列测定鉴定,再用脂质体介导转染HepG₂细胞,ELISA(Abbott)试剂盒定量检测各株培养上清HBV抗原,转染细胞用FITC标记的鼠抗HLA-ABC单抗染色,流式细胞术分析细胞表面HLA-I表达。

结果: 3株重组载体经内切酶消化,电泳后显示2条区带,分别与1.2拷贝HBV基因组和EBO载体大小相同。测序结果证实EBO-V60和EBO-L97分别在nt2078 C → G和nt2189 A → C,保持原定点突变。EBO-野生株的培养上清HBeAg定量S/CO值明显高于变异株V60和L97,3株HBsAg定量S/N值接近,HBsAg表达相近表明实验的转染效率相当。EBO空载体转染的HepG₂细胞HLA-I轻微表达,3株重组载体转染细胞HLA-I的荧光强度不同,野生株增强为18.2, L97明显升高至34.5,而V60降低至3.4。

结论: HBV能增强HepG₂细胞表面HLA-I/抗原肽复合物的表达,核壳蛋白热点变异V60和L97可使宿主细胞HLA-I表达发生变化。

陈伟红,何海棠,张明霞,刘志华,周永兴. 乙型肝炎病毒核壳蛋白变异株在HepG₂细胞的HLA - I表达. 世界华人消化杂志 2003;11(7):966-969
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/966.asp>

0 引言

细胞表面的人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)是激发并调节机体 T 细胞免疫应答的关键分子, HLA 与 HBV 的感染、病毒诱导的免疫应答和免疫病理的相关性已受到广泛关注^[1-9]. HBV C 基因编码的核壳蛋白是免疫应答的主要靶抗原, 免疫效应细胞 CTL 通过 TCR 识别并结合 HLA - I/病毒肽复合物实施细胞毒作用. 慢性感染者的 HBV C 基因长期处于免疫选择压力下常发生聚集性变异, 其中 AA97 的点突变占错义变异 45 % 以上^[10-12]. 我国 HBV 主要流行亚型 adr 型的 C 基因变异中以 AA97 的异亮氨酸 ATC → 亮氨酸 CTC(L97)为最常见, AA60 亮氨酸 CTG → 缬氨酸 GTG(V60)为另一热点变异. 我们构建 HBV(adr)全基因野生株及 L97, V60 变异株 EBO 真核表达载体, 体外实验分析各株诱导 HepG₂ 细胞表面 HLA - I/抗原肽复合物表达的特性, 探讨核壳蛋白热点变异对 HLA - I 表达的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 含 1.2 拷贝 HBV adr 亚型基因组质粒 p3.8 II 由中国科学院生物化学研究所汪垣教授惠赠, 为野生株 3.2 kb 基因组 3' 端重叠 587 bp(nt1 402-1 987)片段插入 pBS⁺ 的重组质粒. EB 病毒稳定真核表达载体 EBO-plpp 由美国 Scripps 研究所 Francis V. Chisari 博士惠赠. 根据 Gan et al (Zhongguo Kexue B Gi 1986;1:55-65)报道的我国 HBV adr 核苷酸序列设计 PCR 引物(表 1).

表 1 PCR 引物核苷酸序列

引物		序列(5' → 3')
L97 点突变引物	L1	GGCCTAAAACTCAGACAACATA
	L2	TAGTTGTCTGAGTTTTAGGCC
V60 点突变引物	V1	AGGCAAGCTATTGTGTGTTGGGGTG
	V2	CACCCCAACACACAATAGCTTGCCT
测序引物	Pee2	GCGGGTACCCTAACATTGAGATTCCCG
亚克隆引物	P1	GCTGTCGACCGCTTGATGCCT
	P2	CCTTCTCGGTACCGGGGATCTA
		Sal I Kpn I

1.2 方法 p3.8 II 变异株重组质粒的构建采用 Quik ChangTM 定点突变试剂盒(Stratagene), 以质粒 p3.8 II DNA 为模板, 分别加入 L97 及 V60 点突变引物 L₁, L₂ 及 V₁, V₂ 进行定点突变, 构建成 p3.8 II L97 和 p3.8 II V60 重组质粒. 变异株重组质粒用 Pee₂ 引物扩增后进行全自动测序(上海基康生物公司). 将 p3.8 II 野生株(WT)及变异株重组质粒以脂质体(Gibco)介导分别转染 HepG₂ 细胞, 用含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养液(Gibco)培养 96 h, 收集细胞和培养上清, 用 Southern 印迹杂交(HBV 地高辛标记探针)分析细胞内 HBV DNA 的复制, ELISA 法测定上清中 HBV 抗原, 以检测其生物活性. EBO - 野生株及变异株重组载体的亚克隆构建以 p3.8 II WT,

p3.8 II L97 及 p3.8 II V60 质粒 DNA 为模板, 各自加入 5' 端带 Sal I 及 Kpn I 酶切位点的引物 P₁ 及 P₂, 用 Z-Taq DNA 聚合酶(TaKaRa)进行 PCR 扩增, 各株 PCR 产物及 EBO-plpp 载体分别用 Sal I 及 Kpn I (Promega)双酶切, 电泳后凝胶回收, 用 T₄ DNA 连接酶(Promega)在 16 °C 连接过夜, 转化感受态细菌 XL-1, 筛选阳性克隆. 各株重组载体阳性克隆用 Sal I 及 Kpn I 双酶切, 进行凝胶电泳. 以 Pee₂ 引物 PCR 扩增各株阳性克隆, 再次作自动化测序(上海基康生物公司). 将 EBO-WT, EBO-L97, EBO-V60 重组载体及 EBO 空载体 DNA 各 2 μg, 经脂质体 10 μL 介导转染 HepG₂ 细胞, 用潮霉素 200 mg/L 筛选, 每 2 d 定量更换培养液, 建立各株稳定表达的细胞. 转染实验重复进行 3 次. 用 ELISA (Abbott)试剂盒测定各株细胞培养上清中 HBsAg 和 HBeAg 的含量, 分别以 S/N 值和 S/CO 值表示. 收集各株转染的 HepG₂ 细胞 2 × 10⁶ 个, 以 FITC 标记的鼠抗 HLA - ABC 单克隆抗体(Phar Mingen)室温避光染色 30 min, PBS 洗 2 次, 40 mL/L 多聚甲醛固定, 以未转染的 HepG₂ 细胞作阴性对照, 用流式细胞仪检测, 分析 5 × 10⁴ 个细胞的荧光强度.

2 结果

2.1 p3.8 II 变异株重组质粒序列测定及生物活性检测 变异株质粒 DNA 测序结果, p3.8 II L97 的 nt2189 A → C, p3.8 II V60 的 nt 2 078 C → G, 证实定点突变. p3.8 II 变异株及 p3.8 II 野生株转染细胞的 Southern 印迹杂交显示在 3.8 kb 处呈现一明显杂交带, 符合目的基因组大小, 表明所构建的重组质粒均能在细胞内复制, 细胞培养上清中均测出 HBsAg 和 HBeAg, 有 HBV 抗原表达.

2.2 EBO 重组载体的酶切鉴定及序列测定 所构建的 EBO-WT, EBO-97 及 EBO-V60 重组载体 DNA 各经 Sal I 及 Kpn I 内切酶双酶切, 电泳后均出现二条区带, 分别与 HBV 目的基因组及 EBO 表达载体的大小相符. EBO-L97 及 EBO-V60 DNA 测序结果显示均保持原定的点突变.

2.3 EBO 重组载体转染细胞培养上清 HBsAg 和 HBeAg 定量检测 3 次转染实验的细胞培养上清中 HBV 抗原平均含量, 3 株表达的 HBeAg S/CO 值不同, EBO-L97 及 EBO-V60 均明显低于 EBO-WT, 3 株上清的 HBsAg S/N 值接近, 表达水平相似(表 2).

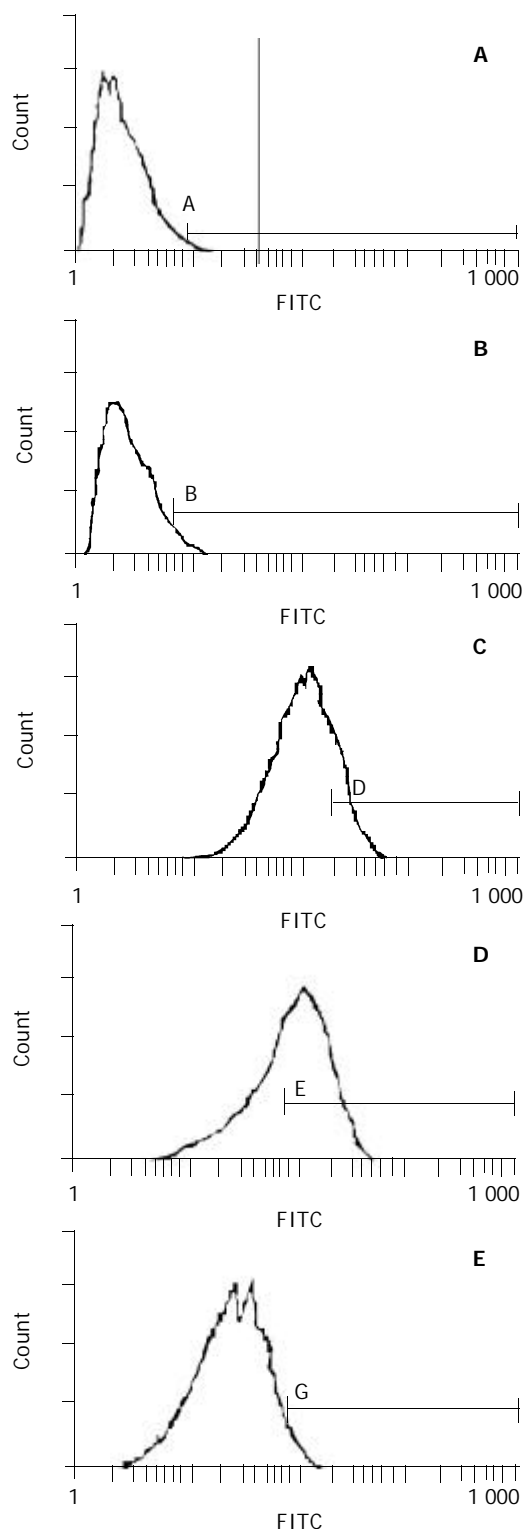
表 2 转染细胞培养上清 HBV 抗原含量

HBV 抗原	EBO-WT	EBO-L97	EBO-V60
HBsAg(S/N)	4.34	3.96	4.18
HBeAg(S/CO)	3.30	0.98	1.52

HBsAg 含量 S/N 参考值 < 2.00 HBeAg 含量 S/CO 参考值 < 1.00.

2.4 宿主细胞表面 HLA - I 表达 流式细胞术分析测定 3 批转染实验的 HepG₂ 细胞. 未转染的及 EBO 空载体转染

的 HepG₂ 细胞表面的 HLA-I 为轻微表达, 其荧光强度为 1.8 和 2.2. 3 株重组载体转染细胞的 HLA-I 表达水平各不相同, 野生株的 HLA-I 荧光强度增强为 18.2, L97 变异株升高至 34.5, 而 V60 变异株表达的荧光强度仅为 3.4 (图 1).



A: 空白未转染; B: EBO 空载体转染;
C: EBO-WT 转染; D: EBO-L97 转染; E: EBO-V60 转染
图 1 流式细胞仪对 HepG₂ 细胞表面 HLA-I 表达的检测。

3 讨论

HBV 并非直接导致肝细胞病变, 而是其编码蛋白与机

体免疫应答相互作用后, 引起肝组织发生免疫病理损伤, 同时抑制和清除细胞内外病毒, 在免疫应答过程中 HLA-I 类分子限制的特异性 CD₈⁺T 细胞的细胞毒作用十分重要^[13-18]. 正常肝细胞表面不表达或仅微量表达 HLA-I 类分子. 研究已表明 HBV 感染者肝细胞膜上 HLA-I 表达强度与肝组织病变活动性及损伤程度往往呈正相关, 急性重型肝炎患者为强表达, 慢性感染者在免疫耐受期为弱表达, 免疫激活期 HLA-I 表达增强, 肝组织炎症活动, 部分病毒被清除^[4,6,19]. 机体内细胞膜上 HLA-I 的表达受到病毒及免疫细胞激活后产生的细胞因子及其他诸多方面的诱导和调节^[20,21], 建立细胞模型可探讨病毒本身与宿主细胞间的相互作用. 由于 HBV 基因组结构复杂, 编码基因相互重叠, 基因内部有调节序列^[10,22,23], 单一基因片段的体外表达有局限性, 用全基因重组质粒转染细胞更接近病毒在体内的复制、表达、加工和分泌情况. 我们用 HBV adr 亚型野生株含 1.2 拷贝基因组质粒 p3.8 II, 对核壳蛋白热点变异 97 位氨基酸及 60 位氨基酸分别进行定点突变, 再双酶切定向亚克隆入 EB 病毒真核表达载体 EBO-plpp, 能在转染的 HepG₂ 细胞中稳定表达, HepG₂ 细胞的 HLA 抗原型别以 HLA-A2 为主, HLA-A2 在亚洲人群中携带频率最高, 因而本实验采用了较合理的细胞模型^[24-26], 进行核壳蛋白密码子点突变的 HLA-I 表达的研究. 实验结果显示, HBV 野生株重组载体 EBO-WT 较 EBO-plpp 空白载体转染和未转染的 HepG₂ 细胞表面 HLA-I 表达明显增强, 与国外 (Zhou et al 1990, Takehara et al 1992) 体外表达的研究结果相同, 初步表明 HBV 病毒自身可增强细胞膜上 HLA-I 表达. 其他病毒可上调感染细胞 HLA-I 表达的实验研究报道也不少, 如黄热病病毒家族、呼吸道合胞病毒、单纯疱疹病毒、人副流感病毒 3 型等^[27-31].

EBO-WT, EBO-L97 及 EBO-V60 重组载体转染 HepG₂ 细胞稳定传代后, 培养上清中 HBV 抗原定量检测结果, 3 株表达 HBeAg 的水平不同, L97 及 V60 变异株的 HBeAg S/CO 值明显较野生株为低, 3 株的 HBsAg S/N 值接近, HBsAg 表达水平相近, 表明重组载体转染率及检测结果相当, 因而其转染细胞膜上 HLA-I 表达分析有一定可比性. 流式细胞术分析 3 株宿主细胞 HLA-I 表达, L97 变异株 HLA-I 荧光强度高于野生株, 而 V60 变异株表达强度低于野生株, 表明 HBV 核壳蛋白单个错义点突变可使宿主细胞表面 HLA-I 表达发生差异. Yuan et al^[32-34] 用 HBV adr 亚型双拷贝基因组的核壳蛋白变异株做体外实验, 发现 L97(I97L) 及 V60(L60V) 变异在 HepG₂ 细胞内的复制水平与野生株相近, 但 L97 分泌未成熟的 (含 ssDNA) Dane 颗粒, 且颗粒数量明显增加, V60 则分泌成熟的 Dane 颗粒, 其量下降 3-6 倍, 充分说明 HBV 核壳蛋白上述密码子错义突变能引起病毒的表达、加工、分泌等生物学功能的变化. 我国 HBV 感染率高^[35-40], 关于 HBV 转染细胞中内源性细胞因子对

HLA - I 表达的影响以及核壳蛋白 L97 及 V60 变异导致宿主细胞 HLA-I 表达变化的机制, 均有待深入研究探讨.

4 参考文献

- Ahn SH, Han KH, Park JY, Lee CK, Kang SW, Chon CY, Kim YS, Park K, Kim DK, Moon YM. Association between hepatitis B virus infection and HLA-DR type in Korea. *Hepatology* 2000; 31:1371-1373
- Neumann UP, Langrehr JM, Naumann U, Lang M, Rayes N, Steinmuller T, Radtke C, Neuhaus P. Impact of HLA-compatibilities in patients undergoing liver transplantation for HBV-cirrhosis. *Clin Transplant* 2002;16:122-129
- Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis* 2002; 2:43-50
- Jang YG, Wang YM. HLA complex and hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1150-1153
- Zhang XQ, Zhang R, Gu CH, Wang YM. Significance of ICAM-1 and HLA-DR expression in liver of hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:233-234
- Si H, Wang FS. Host factors in chronicity of hepatitis b virus infection and their significances in clinic. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:66-69
- Jiang YG, Wang YM, Li QF. Significance of HLA-DR antigen expression in chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:835-836
- Jiang YG, Wang YM, Li QF. Expression and significance of HLA-DR antigen and heat shock protein 70 in liver biopsy specimens of chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:907-910
- Jiang YG, Wang YM, Li QF. Expression and significance of HLA-DR antigen and heat shock protein 70 in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1139-1142
- Hunt CM, McGill JM, Allen MI, Condreay LD. Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. *Hepatology* 2000;31:1037-1044
- Preikschat P, Gunther S, Reinhold S, Will H, Budde K, Neumayer HH, Kruger DH, Meisel H. Complex HBV populations with mutations in core promoter, C gene, and pre-S region are associated with development of cirrhosis in long-term renal transplant recipients. *Hepatology* 2002;35:466-477
- Yuan TT, Sahu GK, Whitehead WE, Greenberg R, Shih C. The mechanism of an immature secretion phenotype of a highly frequent naturally occurring missense mutation at codon 97 of human hepatitis B virus core antigen. *J Virol* 1999;73:5731-5740
- Reignat S, Webster GJ, Brown D, Ogg GS, King A, Seneviratne SL, Dusheiko G, Williams R, Maini MK, Bertoletti A. Escaping high viral load exhaustion: CD8 cells with altered tetramer binding in chronic hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2002;195:1089-1101
- Sobao Y, Tomiyama H, Sugi K, Tokunaga M, Ueno T, Saito S, Fujiyama S, Morimoto M, Tanaka K, Takiguchi M. The role of hepatitis B virus-specific memory CD8 T cells in the control of viral replication. *J Hepatol* 2002;36:105-115
- Matsumura S, Yamamoto K, Shimada N, Okano N, Okamoto R, Suzuki T, Hakoda T, Mizuno M, Higashi T, Tsuji T. High frequency of circulating HBeAg-specific CD8 T cells in hepatitis B infection: a flow cytometric analysis. *Clin Exp Immunol* 2001;124:435-444
- Maini MK, Reignat S, Boni C, Ogg GS, King AS, Malacarne F, Webster GJ, Bertoletti A. T cell receptor usage of virus-specific CD8 cells and recognition of viral mutations during acute and persistent hepatitis B virus infection. *Eur J Immunol* 2000;30:3067-3078
- Maini MK, Boni C, Lee CK, Larrubia JR, Reignat S, Ogg GS, King AS, Herberg J, Gilson R, Alisa A, Williams R, Vergani D, Naoumov NV, Ferrari C, Bertoletti A. The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2000;191:1269-1280
- Maini MK, Boni C, Ogg GS, King AS, Reignat S, Lee CK, Larrubia JR, Webster GJ, McMichael AJ, Ferrari C, Williams R, Vergani D, Bertoletti A. Direct *ex vivo* analysis of hepatitis B virus-specific CD8(+)T cells associated with the control of infection. *Gastroenterology* 1999;117:1386-1396
- Stolarz W, Wiczowski A, Wojnicz R, Dziambor A, Kepa L, Biskupska-Karasinska M. The HLA-I and HLA- II expression evaluation in liver biopsy specimens of patients with chronic viral hepatitis. *Przegl Epidemiol* 1999;53:385-393
- Nassal M. Hepatitis B virus replication: novel roles for virus-host interactions. *Intervirology* 1999;42:100-116
- Dorries R. The role of T-cell-mediated mechanisms in virus infections of the nervous system. *Curr Top Microbiol Immunol* 2001;253:219-245
- Zoulim F, Trepo C. New antiviral agents for the therapy of chronic hepatitis B virus infection. *Intervirology* 1999;42:125-144
- Shan H, Niitsuma H, Nagasaki F, Cervantes J, Ojima T, Ueno Y, Kobayashi K, Ishii M, Shimosegawa T. Analysis of the entire nucleotide sequence of hepatitis B virus: characteristics of HBeAg-positive asymptomatic carriers, HBeAb positive asymptomatic carriers and patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res* 2002;23:251-252
- Detema G, Mulder A, Claas FH, van den Elsen PJ. Detection and characterization of HLA class I molecules in the supernatant of an hepatocarcinoma cell line and of EBV-transformed B cell lines. *Hum Immunol* 1999;60:435-441
- Keskinen P, Nyqvist M, Sareneva T, Pirhonen J, Melen K, Julkunen I. Impaired antiviral response in human hepatoma cells. *Virology* 1999;263:364-375
- Huang J, Cai MY, Wei DP. HLA class I expression in primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:654-657
- Momburg F, Mullbacher A, Lobigs M. Modulation of transporter associated with antigen processing (TAP)-mediated peptide import into the endoplasmic reticulum by flavivirus infection. *J Virol* 2001;75:5663-5671
- Wang SZ, Hallsworth PG, Dowling KD, Alpers JH, Bowden JJ, Forsyth KD. Adhesion molecule expression on epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. *Eur Respir J* 2000;15:358-366
- Jamaluddin M, Wang S, Garofalo RP, Elliott T, Casola A, Baron S, Brasier AR. IFN-beta mediates coordinate expression of antigen-processing genes in RSV-infected pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280:L248-257
- Abendroth A, Simmons A, Efsthathiou S, Pereira RA. Infection with an H2 recombinant herpes simplex virus vector results in expression of MHC class I antigens on the surface of human neuroblastoma cells *in vitro* and mouse sensory neurons *in vivo*. *J Gen Virol* 2000;81(Pt 10):2375-2383
- Gao J, De BP, Banerjee AK. Human parainfluenza virus type 3 up-regulates major histocompatibility complex class I and II expression on respiratory epithelial cells: involvement of a STAT1- and CIITA-independent pathway. *J Virol* 1999;73:1411-1418
- Yuan TT, Tai PC, Shih C. Subtype-independent immature secretion and subtype-dependent replication deficiency of a highly frequent, naturally occurring mutation of human hepatitis B virus core antigen. *J Virol* 1999; 73:10122-10128
- Yuan TT, Shih C. A frequent, naturally occurring mutation (P130T) of human hepatitis B virus core antigen is compensatory for immature secretion phenotype of another frequent variant (I97L). *J Virol* 2000;74:4929-4932
- Yuan TT, Le Pogam S, Sahu GK, Chatterjee S, Shih C. Low-level secretion of human hepatitis B virus virions caused by two independent, naturally occurring mutations (P5T and L60V) in the capsid protein. *J Virol* 2000;74:9099-9105
- Li H, Li RC, Liao SS, Gong J, Zeng XJ, Li YP. Long-term effectiveness of infancy low-dose hepatitis B vaccine immunization in Zhuang minority area in China. *World J Gastroenterol* 1999;5:122-124
- Wang Y, Liu H, Zhou Q, Li X. Analysis of point mutation insite 1896 of HBV precore and its detection in the tissues and serum of HCC patients. *World J Gastroenterol* 2000;6:395-397
- Chen XS, Wang GJ, Cai X, Yu HY, Hu YP. Inhibition of hepatitis B virus by oxymatrine *in vivo*. *World J Gastroenterol* 2001;7:49-52
- Wang FS, Xing LH, Liu MX, Zhu CL, Liu HG, Wang HF, Lei ZY. Dysfunction of peripheral blood dendritic cells from patients with chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2001;7:537-541
- Song YH, Lin JS, Liu NZ, Kong XJ, Xie N, Wang NX, Jin YX, Liang KH. Anti-HBV hairpin ribozyme-mediated cleavage of target RNA *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2002;8:91-94
- Wei J, Wang YQ, Lu ZM, Li GD, Wang Y, Zhang ZC. Detection of anti-preS1 antibodies for recovery of hepatitis B patients by immunoassay. *World J Gastroenterol* 2002;8:276-281



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

