

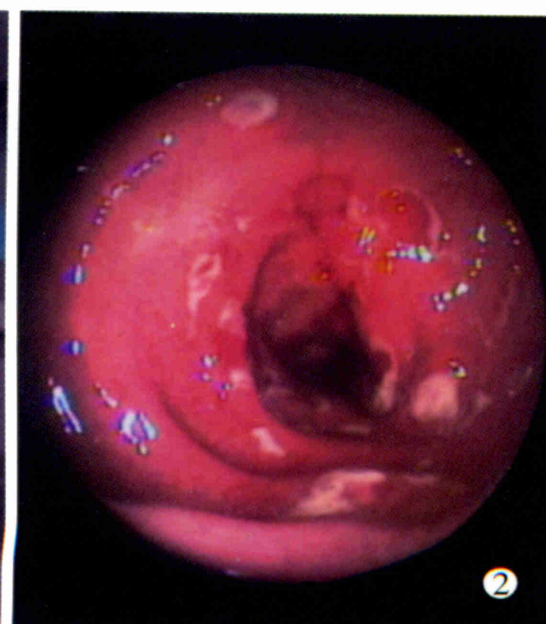
# 世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003年8月15日 第11卷 第8期

(Volume 11 Number 8)



**8/2003**

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 8 月 15 日 第 11 卷 第 8 期 (总第 112 期)

述 评

- 1073 乙型肝炎病毒基因组结构与功能复杂性的新认识 成军, 董菁  
1081 重视溃疡性结肠炎的诊断和个体化规范化治疗 江学良

病毒性肝炎

- 1083 乙型肝炎病毒中国流行株全基因的克隆与序列分析 成军, 董菁, 洪源, 钟彦伟, 刘妍, 王刚, 王琳  
1091 乙型肝炎病毒基因组中前-S 区编码基因的界定 董菁, 成军  
1097 乙型肝炎病毒基因组中前-X 编码基因的界定 董菁, 成军  
1102 羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活基因 1 的克隆化研究 刘妍, 成军, 王琳, 王建军, 陆荫英, 李克  
1107 乙型肝炎病毒 X 蛋白激活基因 1 的克隆化与序列分析 刘妍, 成军, 王琳, 王建军, 陆荫英, 李克  
1114 乙型肝炎病毒前-S2 蛋白结合蛋白基因 S2-29 的克隆化研究 陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 李克, 张健, 邵清, 张玲霞  
1118 酵母双杂交技术筛选鉴定乙型肝炎病毒 e 抗原结合蛋白 E-19 的研究 陆荫英, 邵清, 成军, 陈天艳, 王琳, 梁耀东, 刘妍, 张健, 李克, 张玲霞  
1122 酵母双杂交技术筛选鉴定乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白新基因 C-12 的研究 陆荫英, 陈天艳, 成军, 邵清, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 李克, 张玲霞  
1126 乙型肝炎病毒 X 蛋白与去唾液酸糖蛋白受体 2 突变体相互作用的研究 陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 邵清, 李克, 张玲霞  
1131 羧肽酶 N 调节乙型肝炎病毒核心启动子表达活性的研究 张忠东, 成军, 钟彦伟, 杨倩, 王业东, 董菁, 杨艳杰, 张树林  
1135 丙型肝炎病毒 NS5A 基因变异与干扰素疗效的关系 张琳, 赵桂珍, 石理兰, 曹丽  
1139 汉族人 IL-12b 和 IL-10 启动子区基因多态性与 HBV 感染的相关性 李永纲, 刘明旭, 王福生, 金磊, 洪卫国

基础 研 究

- 1144 肝外胆管癌组织 BAG-1 与 BAD 表达与凋亡调控的原位定量研究 闫庆国, 师建国, 黄高昇, 张传山, 李青, 胡沛臻, 王文亮  
1148 牛磺酸脱氧胆酸损伤线粒体诱导 HepG2 细胞凋亡 李光明, 谢青, 周霞秋, 俞红, 郭清, 廖丹, 李定国  
1152 肝硬化大鼠肝部分切除后肝细胞生长周期的调控 陈平, 李昆, 董家鸿, 韩本立  
1156 苦参碱对大鼠原位肝移植冷缺血再灌注中肝窦内皮细胞损伤的影响 仇毓东, 朱新华, 史敏科, 丁义涛  
1160 犬肝动脉输注阿霉素联合血液灌流的研究 张志友, 张文怡, 钱绍诚  
1164 中国人金属基质蛋白酶组织抑制因子-1 基因的克隆与表达 刘双虎, 谭德明, 侯珏, 胡国龄  
1168 卡托普利对肝纤维化模型鼠 MMP-2, 3 TIMP-2, 3 表达的影响 李乾, 张桂英, 李新华, 徐美华  
1172 垂体后叶素和特利加压素降低门胆汁性肝硬化大鼠门静脉高压对肝组织氧分压的影响 祝建波, 邓利群, 王思元  
1175 电泳法检测肝和血清中醇脱氢酶同工酶 宓庆梅, 曹鲁宁, 高春芳  
1178 肝细胞生成素核受体的确定及特性 王阁, 陈东风, 胡铭, 王军, 樊丽琳, 张晓荣  
1182 PD98059 对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞增生的影响 马洪德, 蒋明德, 钟显飞, 解方为, 曾维政  
1185 雌二醇对肝纤维化大鼠 I, III 型胶原及 TGF  $\beta_1$  表达的影响 许君望, 龚均, 冯新利, 茆新明, 罗金燕, 董蕾, 贾皓, 徐贵平  
1189 大鼠急性酒精性脂肪肝造模方法的改进 冯志强, 沈志祥, 谭诗云, 罗和生, 漆楚波, 郭洁, 李海霞  
1193 丁酸钠联合穿琥宁对人大肠癌细胞 HCT-8 增生的影响 布立民, 纪欣, 韩英, 陈刚, 王志红, 孙淑红  
1197 大肠癌组织胸苷磷酸化酶 / 血小板衍生内皮细胞生长因子的表达及意义 余细球, 邓长生, 朱尤庆, 程芳洲  
1200 多粘菌素 B 及其模拟肽体外抗内毒素的实验研究 万志红, 王宇明, 刘国栋  
1203 肥大细胞在胃嗜酸性肉芽肿发病中的作用 高振军, 罗和生, 操寄望, 余保平, 宋刘来



临床研究	1207 鱼腥草治疗初发型溃疡性结肠炎的临床研究 江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 尚瑞莲, 齐凤 1211 奥沙拉秦钠治疗慢性反复发作型溃疡性结肠炎随机对照研究 江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 尚瑞莲, 齐凤 1214 抗栓灵含片治疗伴有血小板活化的难治性溃疡性结肠炎 江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 尚瑞莲, 齐凤 1219 胃癌前病变演变过程中凋亡相关蛋白和PCNA的表达意义 伍银桥, 王孟薇, 吴本俨, 尤纬缔, 祝庆孚 1223 汉防己甲素抑制肝癌细胞增生的作用 荆绪斌, 李涛, 杨绮华, 郭光华, 胡辉, 陈素钻 1227 美蓝染色放大电子结肠镜观察结肠息肉与组织病理学的关系 苏鲁, 潘洪珍, 翁敬飏, 徐艺华, 陈芳, 洪梅燕 1230 肝硬化患者血浆胃动素、胆囊收缩素、生长抑素及其胃电的改变 张蓉, 闻勤生, 黄裕新, 赵海峰, 田力 1234 肠易激综合征 402 例发病时间分布及症状特征 许小幸, 李定国, 宋光辉, 周惠清, 刘清华
焦点论坛	1237 乙型肝炎病毒基因组结构与功能复杂性的研究进展 成军 1238 准种是乙型肝炎病毒存在的基本方式 成军, 董菁, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚 1240 乙型肝炎病毒 X 基因启动子结构及调节研究 邵清, 成军, 白雪帆 1242 乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的研究 梁耀东, 成军, 陆荫英, 吴君, 程明亮 1245 羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的研究 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩 1248 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式激活作用的研究 杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 洪源, 张树林 1250 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对于细胞周期素 A 的调节研究 成军, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚 1255 乙型和丙型肝炎病毒对细胞周期素及细胞周期素依赖性蛋白激酶的调节 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩 1258 乙型和丙型肝炎病毒对 MAPKK 信号转导的影响 张忠东, 成军, 钟彦伟, 张树林 1261 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 1264 RNA 干扰与抗肝炎病毒治疗前景的研究 成军, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚
临床经验	1222 一氧化碳中毒伴筋膜间隙综合征的综合治疗 邹淑杭, 马丽萍, 金镇勋, 贺红, 王一玲, 李冰 1267 胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤 21 例 樊丽琳, 陈东风
病例报告	1143 成人不典型郎格罕组织细胞增生症 1 例 王巍峰, 黄启阳, 王志强, 杨云生 1147 慢性酒精性肝损伤致 Gilbert 综合征样改变 1 例 张文瑾, 王晓峰, 赵景民 1192 小肠血管结构不良 2 例 冯瑞娥, 赵大春, 陈杰
消 息	1080 欢迎订阅 2003 年度世界华人消化杂志 1090 欢迎订阅 2003 年度 World Journal of Gastroenterology® 1130 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊 1155 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 1226 WJG 搭建我国消化学基础和临床研究惟一国际交流的平台
封面故事	1138 溃疡性结肠炎的基础和临床研究

# 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 2003-08-15  
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

社长总编辑 马连生  
中文编辑 潘伯荣  
王瑾晖  
英文编辑 朱丽虹  
排版 李少华  
校对 李天华

张金哲  
张学庸  
赵东海  
周殿元

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(PJ)》  
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.

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 14010040

50

www.wjgnet.com



# 羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活基因1的克隆化研究

刘妍, 成军, 王琳, 王建军, 陆荫英, 李克

刘妍, 成军, 王琳, 王建军, 陆荫英, 李克, 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

刘妍, 女, 1973-01-15生, 辽宁省海城市人, 满族, 1995年北京医科大学毕业, 军事医学科学院免疫学专业2002级硕士学位研究生, 助理研究员。主要从事肝炎病毒的分子生物学与病毒性肝炎的发病机制的研究。

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、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: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-16

## Cloning of gene 1 transactivated by C-terminally truncated middle surface protein of hepatitis B virus

Yan Liu, Jun Cheng, Lin Wang, Jian-Jun Wang, Yin-Ying Lu, Ke Li

Yan Liu, Jun Cheng, Lin Wang, Jian-Jun Wang, Yin-Ying Lu, Ke Li, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Supported by Grants from National Natural Science Foundation No. C03011402, No.C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA.

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2003-03-08 Accepted: 2003-04-16

## Abstract

**AIM:** To investigate the transactivation effects of C-terminally truncated middle surface protein (MHBst) of hepatitis B virus (HBV) by differential display method. To clone new gene with unknown function that could be transactivated by MHBst with suppression subtractive hybridization (SSH), and pave the way for the study and better understanding of the transactivation effects of MHBst.

**METHODS:** Polymerase chain reaction (PCR) technique was employed to amplify the coding sequence of MHBst, and the expressive vector pcDNA3.1-MHBst was constructed by routine molecular biological method. The differentially expressed genes were screened and identified by SSH method between the HepG2 cells transfected with pcDNA3.1-MHBst and the vector pcDNA3.1, respectively. Bioinformatics techniques were used to search homologously expressed sequence tag (EST) and full-length coding sequence transactivated by MHBst. The mRNA was purified from HepG2 cells and the DNA fragment was amplified by reverse transcription PCR (RT-PCR) technique. The coding se-

quence was analyzed by bioinformatics. The new gene transactivated by MHBst was designated as target gene 1 transactivated by truncated middle surface protein of HBV (TTP1).

**RESULTS:** The expressive vector pcDNA3.1-MHBst was constructed and confirmed by restriction enzyme digestion and sequencing. SSH method was employed for the screening and identification of the differentially expressed genes from the HepG2 cells transfected with pcDNA3.1-MHBst and pcDNA3.1, respectively. Among the target genes, we identified a new gene with unknown function and deposited its sequence into GenBank. From the homology search, we evaluated this gene as a new gene with unknown function.

**CONCLUSION:** The gene 1 transactivated by C-terminally truncated middle surface protein of hepatitis B virus was identified.

Liu Y, Cheng J, Wang L, Wang JJ, Lu YY, Li K. Cloning of gene 1 transactivated by C-terminally truncated middle surface protein of hepatitis B virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1102-1106

## 摘要

**目的:** 研究乙型肝炎病毒(HBV)羧基末端截短型表面抗原中蛋白(MHBst)的反式激活作用, 利用差异显示技术, 筛选克隆 MHBst 蛋白的反式激活作用的靶基因, 发现新型基因, 为阐明 MHBst 对于肝细胞表达基因谱的影响, 探索新的研究方向。

**方法:** 利用多聚酶链反应技术(PCR)扩增MHBst的编码基因片段, 构建真核表达载体 pcDNA3.1-MHBst, 转染肝母细胞瘤细胞系 HepG2, 与仅转染空白载体 pcDNA3.1 的 HepG2 细胞进行差异显示, 利用抑制性消减杂交技术(SSH)克隆鉴定 MHBst 的反式激活作用的靶基因, 通过生物信息学技术, 确定新基因的序列, 设计序列特异性引物, 利用 HepG2 细胞来源的 mRNA 进行逆转录 PCR (RT-PCR) 扩增, 克隆新基因, 并对于新基因的序列以及编码基因产物序列进行分析。利用生物信息学技术确定 TTP1 基因是新基因。

**结果:** 构建表达载体 pcDNA3.1-MHBst, 经过序列分析和酶切鉴定正确。转染 HepG2 细胞系, 利用 SSH 技术获得差异表达的基因片段。经对于美国生物工程信息学中心(NCBI)建立的核苷酸序列的数据库(GenBank)检索, 证实这是一个新型基因片段。通过对于同源基因序列的比对, 根据 Kozak 规则和终止密码子下游的多聚腺苷酸信号序列, 确

定新基因的序列, 将这种 MHBst 反式激活的新基因命名为 TTP1, 并在 GenBank 中注册登录。

结论: 克隆并鉴定了乙型肝炎病毒羧基末端截短型表面抗原中蛋白反式激活作用的新型靶基因 TTP1, 为今后研究 MHBst 的反式激活作用, 开辟了新的研究方向和可能。

刘妍, 成军, 王琳, 王建军, 陆荫英, 李克. 羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活基因 1 的克隆化研究. 世界华人消化杂志 2003;11(8): 1102 - 1106

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1102.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)与肝细胞之间的相互关系非常复杂. HBV 既需要肝细胞中的蛋白质成分的结合与调控, 决定其嗜肝细胞的特性, 同时 HBV 基因组表达的蛋白对于肝细胞的基因表达谱产生影响, 参与 HBV 的致病过程<sup>[1-12]</sup>. HBV 编码蛋白由于其细胞内分布和功能的特点, 某些结构形式的病毒蛋白对于肝细胞的基因表达谱具有显著影响. 羧基末端截短型的表面抗原中蛋白(MHBst)就是其中的典型代表. 具有反式激活作用的MHBst是从肝癌细胞中整合的 HBV DNA 序列中鉴定的, 对于其反式激活作用进行了广泛的研究, 认为 MHBst 是 HBV 感染引发肝细胞癌(HCC)的重要机制<sup>[13-28]</sup>. 但是, 最近我们从慢性乙型病毒性肝炎患者外周血中也克隆到了 MHBst 的编码基因, 说明 MHBst 编码基因除了与肝细胞基因组整合的存在方式之外, 在外周血中也是存在的. 关于外周血中 MHBst 编码基因的发现, 拓展了 MHBst 存在的意义和研究范围<sup>[29-34]</sup>.

关于 MHBst 的反式激活作用, 首先在体外实验中以异源性启动子指导的报告基因的表达得到了证实. 构建了 MHBst 的表达载体, 与 SV40 早期启动子指导的氯霉素乙酰化转移酶(CAT)的表达载体进行共转染试验, 发现 MHBst 的表达对于 SV40 的启动子活性具有显著的激活作用, 通过抑制性消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)技术的筛选, 我们也筛选到 MHBst 的反式激活作用的靶基因, 而且我们应用 Western blot 杂交技术证实 MHBst 对于肝细胞中的原癌基因 c-myc 的表达上调作用. 同时, 我们还克隆、鉴定了一种未知功能的新基因, 命名为羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活基因 1(TTP1), 提示 MHBst 反式激活作用具有新的靶位。

## 1 材料和方法

1.1 材料 肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞及大肠杆菌 JM109(本室保存), pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen), Lipofectamine PLUS 转染试剂(Gibco), mRNA Purification 试剂盒(ampersham pharmacia biotech), PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒(Clontech), 50 × PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒(Clontech), High Pure

PCR Product Purification 试剂盒(Boehringer Mannheim), T7、SP6 通用引物及 pGEM-Teasy 载体(Promega)<sup>[35]</sup>.

### 1.2 方法

1.2.1 真核表达载体的构建及细胞转染 MHBst真核表达质粒pcDNA3.1(-)-Mt167由本室构建<sup>[36]</sup>. 用Lipofectamine PLUS 转染试剂将 2 μg pcDNA3.1(-)-Mt167 及 pcDNA3.1(-)空载体分别转染 35 mm 平皿 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞.

1.2.2 细胞 mRNA 提取 使用 mRNA Purification 试剂盒, 直接提取转染了重组表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA, 经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性、定量分析.

1.2.3 双链 cDNA(dscDNA)合成 使用 PCR-Select cDNA Subtraction Kit 中的试剂, 以获得的 mRNA 为模板逆转录合成 cDNA.

1.2.4 消减杂交文库的建立 采用 PCR-Select cDNA Subtraction Kit, 常规 SSH 方法按说明书进行: 转染了重组表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 cDNA 分别标记为 Tester 和 Driver, 经 Rsa I (一种识别 4 碱基序列的内切酶)消化, 产生相对较短的平端片段, 纯化酶切产物. 将 Tester 的 cDNA 分为两份, 分别连接试剂盒提供的特殊设计的寡核苷酸接头 Adapter 1 和 Adapter 2, 然后与过量的 Driver cDNA 进行杂交; 合并两种杂交产物后再与 Driver cDNA 作第 2 次杂交; 然后将杂交产物做选择性 PCR 扩增, 使 Tester cDNA 中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增.

1.2.5 克隆鉴定分析 扩增产物与 pGEM-Teasy 载体连接, 转化 JM109 感受态细菌, 在含氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37 °C 培养 18 h. 挑取白色菌落, 增菌, 以 pGEM-Teasy 载体多克隆位点两端 T7/SP6 引物进行菌落 PCR 扩增, 证明含有插入片段后(200-800 bp), 测序(上海博亚公司). 应用生物信息学将测得序列与 GenBank 数据库进行同源性分析.

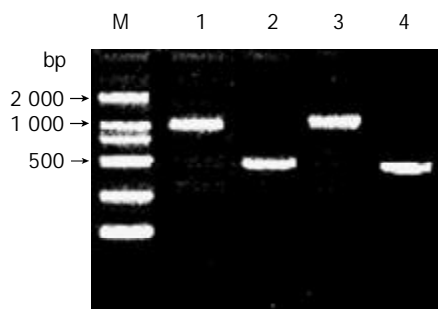
1.2.6 多聚酶链反应扩增 设计引物 5' -ATG GAC CTT CAG GCC GCC GGG GCC CAG GCG-3' 和 5' -TCA ATC TTC AGC ATC GTC AAA CTG TCC TGT-3' 从 HepG2 细胞提取 mRNA, 逆转录后进行 PCR 扩增, 进行 Teasy 载体的克隆化, 测序.

## 2 结果

2.1 mRNA 的定性、定量分析 使用高质量的 mRNA 是保证 cDNA 高产量的前提. 紫外分光检测显示, 转染了真核表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA 分别为 5.64 μg 和 5.20 μg, A260/A280=1.95. 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳见 mRNA 为大于 0.5 kb 清晰慧尾片状条带, 证实 mRNA 质优量足.

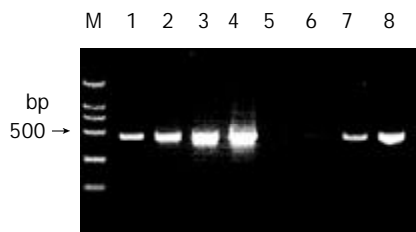
2.2 dscDNA 两端连接效率检测 dscDNA 与接头连接效率的高低是决定抑制性消减杂交成败的最关键步骤. 将连接有 adaptor 1 和 adaptor 2 的两组 dscDNA 分别用不同

的特异性引物(看家基因甘油三磷酸脱氢酶 G3PDH 引物)进行 28 个循环扩增,产物用 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定.结果显示两组 dscDNA 扩增产物浓度相当,说明 dscDNA 已与接头高效率连接(图 1).



M: DNA Marker; 1: dscDNA 与 adaptor 1 连接, 上游引物为接头部序列, 下游引物为 G3PDH 3'; 2: dscDNA 与 adaptor 1 连接, 上游引物为 G3PDH 5', 下游引物为 G3PDH 3'; 3: dscDNA 与 adaptor 2 连接, 上游引物为接头部序列, 下游引物为 G3PDH 3'; 4: dscDNA 与 adaptor 2 连接, 上游引物为 G3PDH 5', 下游引物为 G3PDH 3' 图 1 接头连接效率分析结果.

**2.3 cDNA 消减文库消减效率的鉴定** 分别以消减及未消减 PCR 产物为模板,用 G3PDH 引物进行 PCR 扩增,分别在 18、23、28、33 次循环结束时从体系中吸取 5  $\mu$ L 进行电泳鉴定.结果显示:与未消减组 PCR 产物相比,消减组 PCR 产物中 G3PDH 基因产物大大减少,说明所构建的消减文库具有很高的消减效率(图 2).



M: DNA Marker; 1-4: 未消减组, 引物为 G3PDH3', 5', PCR 循环次数分别为 18、23、28、33; 5-8: 消减组, 引物为 G3PDH3', 5', PCR 循环次数分别为 18、23、28、33 图 2 消减效率分析结果.

**2.4 差异表达 cDNA 片段的扩增** 杂交产物经两轮 PCR 扩增后,凝胶电泳显示部分差异表达的 cDNA 条带,这些条带可能代表差异表达的基因片段(图 3).

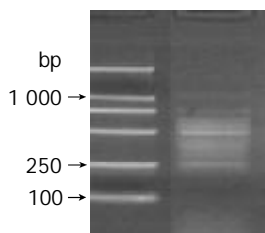


图 3 消减杂交 PCR 产物电泳图.

**差异表达基因片段的克隆** 菌落 PCR 扩增结果显示为 200-800 bp 大小不等的插入片段(图 4),所获得的 94 个克隆中均含有插入片段.

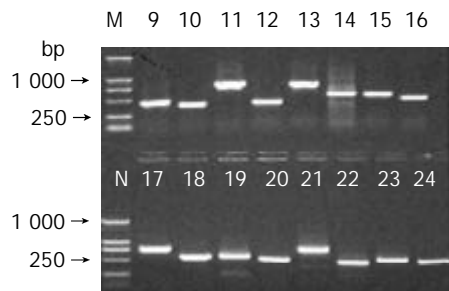


图 4 部分克隆(9-24)菌落 PCR 鉴定电泳图.

**2.5 cDNA 测序与同源性分析初步结果** 挑选 50 个克隆测序,与 GenBank 数据库进行初步比较.其中 4 个克隆未检索到任何对应的相似序列,可能代表了某些新基因,进一步的分析鉴定出一个未知功能的新基因,即 TTP1.

**2.6 新基因序列 TTP1** 新基因长度为 555 nt,四种核苷酸组成分别为 A135、C 147、G 170、T 103, GC 比率占 57%,编码的蛋白由 184 aa 组成,序列如图 5 所示. TTP1 基因序列已经在 GenBank 中注册,注册号为 AF407672.

```

ATG GAC CTT CAG GCC GCC GGG GCC CAG GCG
M D L Q A A G A Q A
CAG GGG GCC GCG GAG CCG TCT CGG GGC CCG
Q G A A E P S R G P
CCG CTG CCT AGC GCG CGG GGG GCG CCC CCC
P L P S A R G A P P
AGC CCG GAG GCT GGC TTT GCT ACA GCT GAC
S P E A G F A T A D
CAC TCC AGT CAG GAG AGA GAG ACT GAG AAG
H S S Q E R E T E K
GCT ATG GAT CGA CTA GCC CGT GGA ACA CAG
A M D R L A R G T Q
AGC ATT CCT AAT GAC AGT CCT GCC CGG GGT
S I P N D S P A R G
GAG GGC ACC CAT TCT GAA GAG GAA GGC TTT
E G T H S E E E G F
GCC ATG GAT GAG GAG GAC TCT GAT GGA GAA
A M D E E D S D G E
CTG AAT ACC TGG GAG CTG TCA GAA GGG ACA
L N T W E L S E G T
AAC TGT CCA CCC AAG GAA CAG CCT GGC GAT
N C P P K E Q P G D
CTT TTT AAT GAG GAC TGG GAC TCG GAG TTG
L F N E D W D S E L
AAA GCA GAT CAA GGG AAT CCA TAT GAT GCT
K A D Q G N P Y D A
GAC GAC ATC CAG GAG AGC ATT TCT CAA GAG
D D I Q E S I S Q E
CTT AAA CCT TGG GTG TGC TGT GCC CCA CAA
L K P W V C C A P Q
GGA GAC ATG ATC TAT GAC CCC AGC TGG CAC
G D M I Y D P S W H
CAT CCG CCT CCA CTG ATA CCC TAT TAT TCC
H P P P L I P Y Y S
AAG ATG GTC TTT GAA ACA GGA CAG TTT GAC
K M V F E T G Q F D
GAT GCT GAA GAT TGA
D A E D *

```

图 5 TTP1 基因核苷酸序列及编码产物序列.

### 3 讨论

乙型肝炎病毒 MHBst 具有复杂的分子生物学调节功能. Caselmann et al<sup>[23]</sup> 构建了羧基末端缺失 167 aa 的表面抗原中蛋白的表达载体 MHBst167, 首先验证了对于 HBV 本身调节元件的作用. 在以 CAT 作为报告基因的细胞共转染实验研究中, 发现 MHBst167 对于 HBV 的增强子 I 的活性具有促进作用, 但是对于 HBV 的其他调节元件如 X 启动子、S1 和 S2 启动子、增强子 II、核心启动子等没有反式激活作用目前还没有证据表明 MHBst167 与 DNA 之间具有直接的结合作用, 因此认为 MHBst167 主要是通过通过与细胞和内转录因子蛋白的相互作用, 间接产生转录调节作用. 因此, MHBst167 在细胞内的蛋白-蛋白相互作用的研究也十分重要. 在体外的 DNA-蛋白结合的电泳泳动度迁移率试验(EMSA)中, 发现转录因子蛋白 Sp1、AP1、NF- $\kappa$ B 等都是 MHBst167 反式激活作用的介导因子. 但是 CREB、NF1 或肝特异性因子 C/EBP 与此无关. 这些研究结果表明 MHBst167 是具有多种调节作用的蛋白. 其作用没有显著的肝细胞特异性, 但影响的基因类型在肝细胞的增生和炎症中具有十分重要的作用.

Lauer et al<sup>[27]</sup> 从肝癌组织中克隆了羧基末端截短型的前-S2/St, 既往的研究证实前-S2/St 具有激活原癌基因 c-myc、c-fos 的功能, 因此对于 AP1 转录因子的作用进行了研究. 如果在 c-myc 基因启动子的序列中, 缺失掉 AP1 (Jun-Fos) 转录因子蛋白的结合序列, 前-S2/St 激活 c-myc 启动子的活性就消失. 如果在基因的启动子区插入多个 AP-1 的结合序列, 就可以具备前-S2/St 诱导的功能. 抑制 AP-1 的激活, 就可以抑制前-S2/St 的反式激活作用. 除了 AP-1 之外, 前-S2/St 还可以激活另外一个与之无关的转录因子 NF- $\kappa$ B 和 AP-2 的功能, 表明前-S2/St 可以通过几种不同的机制间接影响细胞基因的转录功能. 因为转录因子 AP-1 的调节涉及到一系列的与肿瘤有关的基因的表达, 因此前-S2/St 的反式激活作用在 HBV 感染相关的 HCC 的发生发展中具有十分重要的作用.

MHBst 的反式激活作用可能与其在细胞内的亚细胞定位有关. Hildt et al<sup>[37]</sup> 在昆虫细胞 Sf9 中表达了羧基末端缺失 76 aa 的表面抗原中蛋白 MHBst76, 在蛋白水平上研究了 MHBst76 的生物学功能. 研究发现 MHBst76 在细胞内与内质网(ER)有关, 在高尔基体中停留. MHBst76 蛋白是否经过糖基化修饰对于其反式激活功能没有显著影响. 以大肠杆菌表达的 MHBst76 也同样具有反式激活作用.

Natoli et al<sup>[38,39]</sup> 为了研究 MHBst 的结构与反式激活功能相互之间的关系, 进行了一系列的缺失突变分析. 构建一系列的 MHBst 基因, 在腺病毒主要晚期启动子的指导下表达, 利用 c-myc 和 c-fos 的调节序列作为反式激活作用的靶基因进行研究. S 基因的缺失突变研究证实, 疏水区的缺失突变的范围超过第一个内质网插

入信号(ER signal I)时反式激活作用就消失, 说明这一结构对于其反式激活作用非常重要. 发现转录因子 TRE、SRE、NF- $\kappa$ B 等在 MHBst 的反式激活作用都有重要的地位和作用.

对于 HBV 基因组编码的 MHBst 反式激活作用目前有了公认的认识, 但是其作用的机制研究还处于初步阶段<sup>[40-44]</sup>. 虽然已经积累了一些资料, 但是关于 MHBst 的反式激活作用的具体的分子生物学机制目前还有许多环节没有阐明, 研究 MHBst 反式激活作用及其靶基因的方法有多种, 其中之一就是基因表达谱的差异分析技术. 近几年来根据差异表达的原理建立的技术包括差异杂交技术、任意引物差异显示逆转录多聚酶链反应(AP-DD-RT-PCR)、抑制性消减杂交技术、基因芯片(DNA chip)技术等. 相比较而言, 基因芯片的高通量筛选更有吸引力, 但目前商业途径服务的基因芯片的容量一般较小, 只是基因组表达基因类型的一小部分, 而且大部分都是已知功能的基因, 对于以发现新基因为主要目的的研究不合适. 经过进一步的改进, 抑制性消减杂交技术也具有其独特优点. 因为这一技术对于要研究的对象不进行特别的要求, 因此更加适合新基因的克隆化研究. 我们构建了 MHBst 的表达载体, 转染以后在 HepG2 细胞中得到了 MHBst 的表达, 通过与仅转染空白载体的 HepG2 细胞的比较, 发现一个基因片段与目前 GenBank 中收录的已知功能的基因没有同源性, 通过对于 GenBank 中收录的表达序列标签(EST)的比较, 克隆了 MHBst 蛋白反式激活的新基因 TTP1. 关于新基因 TTP1 的结构与功能、表达与调控, 以及其生物学和临床医学意义, 正在研究之中.

### 4 参考文献

- 1 成军, 李莉. 清除乙型肝炎病毒的非细胞裂解机制. 世界华人消化杂志 2002;10:73-76
- 2 皇甫竟坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒核心基因启动子序列突变及接种. 世界华人消化杂志 2001;9:1323-1325
- 3 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 基因酵母表达载体的构建与表达. 世界华人消化杂志 2002;10:15-18
- 4 洪源, 成军. 肝炎病毒 DNA 疫苗的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:221-223
- 5 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒蛋白结合蛋白研究. 世界华人消化杂志 2002;10:213-215
- 6 陆荫英, 李克, 刘妍, 王琳, 成军, 张玲霞. 乙型及丙型肝炎病毒受体的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:211-213
- 7 成军, 董菁, 刘妍, 李莉, 斯崇文, 王勤环, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒准种研究的临床意义. 世界华人消化杂志 2002;10:209-211
- 8 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
- 9 洪源, 成军, 董菁, 李克, 王琳, 王刚, 刘妍. 乙型肝炎病毒 HBsAg 重组疫苗与表面抗原 DNA 疫苗诱导 H-2<sup>b</sup> 小鼠免疫应答的实验研究. 世界华人消化杂志 2002;10:137-140
- 10 皇甫竟坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒前 S2 基因序列异质性的研究. 中华内科杂志 2002;41:1-4
- 11 陆荫英, 王琳, 刘妍, 于敏, 李克, 王业东, 张玲霞, 成军. 乙肝病毒核心抗原单链抗体细胞内免疫抗乙肝病毒基因治疗研究. 世界华人消化杂志 2002;10:765-769
- 12 Tu H, Bonura C, Giannini C, Mouly H, Soussan P, Kew M, Paterlini-Brechot P, Brechot C, Kremsdorf D. Biological impact of natural COOH-terminal deletions of hepatitis B virus

- X protein in hepatocellular carcinoma tissues. *Cancer Res* 2001; 61:7803-7810
- 13 韩萍, 刘妍, 成军, 王刚, 陆荫英, 李克, 李莉. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白上调 c-myc 基因表达的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:141-144
- 14 Huo TI, Wang XW, Forgues M, Wu CG, Spillare EA, Giannini C, Brechot C, Harris CC. Hepatitis B virus X mutants derived from human hepatocellular carcinoma retain the ability to abrogate p53-induced apoptosis. *Oncogene* 2001;20:3620-3628
- 15 Gilbert S, Galarneau L, Lamontagne A, Roy S, Belanger L. The hepatitis B virus core promoter is strongly activated by the liver nuclear receptor fetoprotein transcription factor or by ectopically expressed steroidogenic factor 1. *J Virol* 2000;74:5032-5039
- 16 Gottlob K, Pagano S, Levrero M, Graessmann A. Hepatitis B virus X protein transcription activation domains are neither required nor sufficient for cell transformation. *Cancer Res* 1998; 58:3566-3570
- 17 Su TS, Hwang WL, Yauk YK. Characterization of hepatitis B virus integrant that results in chromosomal rearrangement. *DNA Cell Biol* 1998;17:415-425
- 18 Caselmann WH, Renner M, Schluter V, Hofschneider PH, Koshy R, Meyer M. The hepatitis B virus MHBst167 protein is a pleiotropic transactivator mediating its effect via ubiquitous cellular transcription factors. *J Gen Virol* 1997;78:1487-1495
- 19 Kumar V, Jayasuryan N, Kumar R. A truncated mutant (residues 58-140) of the hepatitis B virus X protein retains transactivation function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5647-5652
- 20 Henkler FF, Koshy R. Hepatitis B virus transcriptional activators: mechanisms and possible role in oncogenesis. *J Viral Hepat* 1996;3:109-121
- 21 Mita E, Hayashi N, Kamada T. Transactivation function of X gene-cellular gene fusion product or 3' truncated pre S2/S gene cellular gene fusion product from integrated hepatitis B virus DNA. *Nippon Rinsho* 1995;53(Suppl):89-93
- 22 Wei Y, Etienne J, Fourel G, Vitvitski-Trepo L, Buendia MA. Hepadna virus integration generates virus-cell cotranscripts carrying 3' truncated X genes in human and woodchuck liver tumors. *J Med Virol* 1995;45:82-90
- 23 Caselmann WH. Transactivation of cellular gene expression by hepatitis B viral proteins: a possible molecular mechanism of hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 1995;22(Suppl 1):34-37
- 24 Natoli G, Avantaggiati ML, Chirillo P, De Marzio E, Collepardo D, Falco M, Balsano C, Levrero M. Modulation of intracellular signal transduction pathways by the hepatitis B virus transactivator pX. *J Hepatol* 1995;22(Suppl 1):14-20
- 25 Murakami S, Cheong JH, Kaneko S. Human hepatitis virus X gene encodes a regulatory domain that represses transactivation of X protein. *J Biol Chem* 1994;269:15118-15123
- 26 Tsuei DJ, Hsu TY, Chen JY, Chang MH, Hsu HC, Yang CS. Analysis of integrated hepatitis B virus DNA and flanking cellular sequences in a childhood hepatocellular carcinoma. *J Med Virol* 1994;42:287-293
- 27 Lauer U, Weiss L, Lipp M, Hofschneider PH, Kekule AS. The hepatitis B virus preS2/St transactivator utilizes AP-1 and other transcription factors for transactivation. *Hepatology* 1994;19:23-31
- 28 刘妍, 成军. HBV 截短的表面抗原蛋白 MHBs<sup>+</sup> 的反式激活作用. *国外医学病毒学分册* 2000;7:190-193
- 29 董菁, 成军, 王勤环, 王刚, 施双双, 夏小兵, 斯崇文. 外周血中乙型肝炎病毒截短型囊膜中蛋白基因的克隆化与分析. *中华肝脏病杂志* 2001;9:163-165
- 30 刘妍, 董菁, 成军, 夏小兵, 李克, 王琳, 施双双, 段惠娟, 杨继珍. 乙肝病毒 X 基因在真核细胞中的表达及反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. *解放军医学杂志* 2001;26:404-406
- 31 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 王刚, 王琳, 李莉. 乙型肝炎病毒 X 基因异质性及对其反式激活功能的影响. *解放军医学杂志* 2002; 27:125-127
- 32 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 韩萍, 牟劲松, 李克, 钟彦伟. 乙型肝炎病毒核心启动子区基因异质性及对其转录活性的影响. *解放军医学杂志* 2002;27:128-130
- 33 刘妍, 成军, 陆荫英, 李克. 乙型肝炎病毒蛋白反式激活基因的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:217-219
- 34 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 表面抗原中蛋白协同反式激活功能的研究. *中华肝脏病杂志* 2002;10:354-357
- 35 刘妍, 成军, 张跃新, 段惠娟, 牟劲松, 韩萍, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 截短型 HBsAg 中蛋白反式激活基因的克隆. *中华传染病杂志* 2002;20:218-221
- 36 刘妍, 成军, 董菁, 夏小兵, 李克, 杨继珍. 截短型乙肝病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的初步研究. *肝脏* 2001;6:8-10
- 37 Hildt E, Urban S, Lauer U, Hofschneider PH, Kekule AS. ER-localization and functional expression of the HBV transactivator MHBst. *Oncogene* 1993;8:3359-3367
- 38 Natoli G, Avantaggiati ML, Balsano C, De Marzio E, Collepardo D, Elfassi E, Levrero M. Characterization of the hepatitis B virus preS/S region encoded transcriptional transactivator. *Virology* 1992;187:663-670
- 39 Natoli G, Balsano C, Avantaggiati ML, De Marzio E, Artini M, Collepardo D, Elfassi E, Levrero M. Truncated pre-S/S proteins transactivate multiple target sequences. *Arch Virol Suppl* 1992;4:65-69
- 40 Yamamoto S, Nakatake H, Kawamoto S, Takimoto M, Koshy R, Matsubara K. Transactivation of cellular promoters by an integrated hepatitis B virus DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;192:111-118
- 41 Nakatake H, Yamamoto S, Matsubara K. Trans-activating function of integrated hepatitis B virus. *Nippon Rinsho* 1993; 51:357-363
- 42 Kwee L, Lucito R, Aufiero B, Schneider RJ. Alternate translation initiation on hepatitis B virus X mRNA produces multiple polypeptides that differentially transactivate class II and III promoters. *J Virol* 1992;66:4382-4389
- 43 Takada S, Koike K. Trans-activation function of a 3' truncated X gene-cell fusion product from integrated hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:5628-5632
- 44 Kekule AS, Lauer U, Meyer M, Caselmann WH, Hofschneider PH, Koshy R. The preS2/S region of integrated hepatitis B virus DNA encodes a transcriptional transactivator. *Nature* 1990;343:457-461





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

