

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 β_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

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

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 and identification of human gene 1 transactivated by hepatitis B virus X antigen

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 study the transactivation effects of HBxAg, and clone the target genes of HBxAg transactivating effects, in order to help understand the mechanism of pathogenesis of HBxAg.

METHODS: Polymerase chain reaction (PCR) was employed to amplify the coding sequence of HBxAg. The hepatoblastoma cell HepG2 was transfected by pcDNA3.1(-) and pcDNA3.1(-)-X, respectively. Total mRNA was purified from the HepG2 cells transfected and suppression subtractive hybridization (SSH) method was used to analyze the differentially expressed DNA sequence between the two groups. The sequences were searched for homologous DNA sequence from GenBank. The new DNA sequence was confirmed and the full-length coding sequence was identified according to the Kozak rule and the existence of polyadenyl signal sequences. Reverse transcription PCR (RT-PCR) was used to amplify the new gene by using mRNA from HepG2 cell as the template. The coding sequence for the new gene was deduced according to the nucleotide sequence.

RESULTS: PCR technique was employed to amplify the coding sequence for HBxAg by using pCP10 plasmid containing

whole HBV genome as the template. The recombinant plasmid expressing HBxAg was confirmed by restriction enzyme digestion and sequencing. HepG2 cells were transfected with pcDNA3.1(-) and pcDNA3.1(-)-X by lipofectamine, respectively. Total mRNA was purified from transfected HepG2 cell, and suppression subtractive hybridization method was used for the screening and identification of differentially expressed genes by these two cell groups. After sequencing, each DNA sequence was compared with the genes deposited in the GenBank and the new gene with no homology with known genes in this database was identified. Electric polymerase chain reaction was conducted for the cloning of the full-length DNA of the new gene and in conjunction with Kozak rule and the existence of polyadenyl signal sequence. RT-PCR technique was used to amplify the new gene, named as XTP1, from the mRNA of HepG2 cells. The sequence for the XTP1 gene was deposited into GenBank, and the accession number is AF488828.

CONCLUSION: A new gene named XTP1 which is transactivated by hepatitis B virus X protein has been successfully cloned by molecular biological methods. These results pave the way for the study of the molecular mechanism of HBxAg transactivating effects and the development of new therapy for chronic hepatitis B.

Liu Y, Cheng J, Wang L, Wang JJ, Lu YY, Li K. Cloning and identification of human gene 1 transactivated by hepatitis B virus X antigen. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1107-1113

摘要

目的: 利用分子生物学技术, 研究乙型肝炎病毒(HBV)X蛋白(HBxAg)的反式激活作用, 克隆 HBxAg 反式激活作用的靶基因, 为进一步探索 HBxAg 的反式激活作用, 以及反式激活作用的靶基因, 阐明 HBV 感染引起慢性肝炎、肝细胞癌(HCC)发生发展的分子生物学机制, 为探索新型预防和治疗方法、寻求新型途径奠定理论基础。

方法: 利用聚合酶链反应(PCR)技术, 扩增 HBxAg 的编码基因, 构建表达载体 pcDNA3.1(-)-X, 转染肝母细胞瘤细胞系 HepG2, 与转染空白载体的 HepG2 细胞对照组分别提取总 mRNA, 并进行抑制性消减杂交(SSH)分析。对于获得的差异表达基因片段序列的同源性基因进行搜索, 确认为与已知的功能基因无同源性之后, 利用表达序列标签(EST)序列的搜索和比对, 进行电子拼接, 完成新基因序列的确定。然后自 HepG2 细胞提取总 mRNA, 应用生物信息学技术确定的新基因的序列设计特异性引物, 进行逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)技术的扩增, 获得阳性克隆之后, 进行鉴定并对克隆的基因及其编码产物的序列进行分析。

结果: PCR技术扩增获得的HBxAg基因序列, 经过限制性酶切鉴定和序列测定证实无误. 转染HepG2细胞并提取足量的mRNA, 利用SSH技术进行分析, 获得的基因片段序列分析结果表明, 其中之一为新型基因片段序列, 与GenBank中注册的已知功能基因序列没有同源性. 通过对EST数据库中注册的基因片段序列同源性的搜索和比对, 电子拼接成功, 根据基因起始密码子的Kozak规则和终止密码子下游保守的多聚腺苷酸信号序列, 确定新型基因序列. 从HepG2细胞提取总mRNA, 以RT-PCR技术, 扩增获得该新基因的全基因序列, 并测序证实, 命名为XTP1, 在GenBank中注册, 注册号为AF488828.

结论: 利用分子生物学技术与生物信息学技术相结合, 发现并鉴定、克隆了HBxAg的反式激活作用的新基因XTP1, 并为进一步研究HBxAg的反式激活作用的分子生物学机制和探索新型治疗技术奠定了基础.

刘妍, 成军, 王琳, 王建军, 陆荫英, 李克. 乙型肝炎病毒X蛋白激活基因1的克隆化与序列分析. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1107-1113
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1107.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)的X基因编码产物(HBxAg)是一种具有反式激活作用的病毒蛋白. 各种血清型和基因型的HBV编码的HBxAg大小不等, 但一般由145-154个氨基酸残基(aa)组成, HBxAg蛋白的氨基末端相对保守, 但羧基末端相对高变^[1-15]. 近年来研究的资料表明, HBV X基因可以发生插入、缺失、碱基颠换、终止密码子的提前出现以及准种(quasispecies)等特点, 在发现HBxAg的初期阶段, 并不清楚其生物学功能. 目前认为其主要的生物学功能就是作为HBV基因组表达的反式调节蛋白, 在HBV基因组的复制和表达过程中具有十分重要的作用^[16-20]. HBxAg的反式激活功能不仅仅限于HBV基因组中不同的调节基因序列, 而且对于其他一系列不同病毒的基因启动子的活性、肝细胞等宿主细胞某些重要基因的表达调节也产生影响. HBxAg对于肝细胞等的基因表达谱的影响在HBV感染的致病机制过程中具有十分重要的地位和作用. 这一作用机制是HBV感染相关性肝细胞癌(HCC)发生发展的重要分子生物学机制. 近年来在细胞凋亡(apoptosis)和细胞周期的分子生物学调控方面的研究进展积累了丰富的资料^[21-24]. 相信HBxAg对于HBV感染肝细胞的细胞凋亡和细胞周期的调控是HBV感染引起HCC的重要的分子生物学基础.

关于HBxAg反式激活的靶基因的研究已经积累了丰富的资料, 使我们对于HBxAg的反式激活作用及其部分机制有了清楚的了解^[25-27]. 但是, 关于HBxAg的反式激活作用的分子生物学机制研究仍然有许多方面知之甚少, 需要利用现代的分子生物学技术进行新的开拓. 我们利用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive

hybridization, SSH), 对于表达HBxAg载体转染的HepG2细胞进行研究, 阐明了部分HBxAg的反式激活作用的靶基因, 同时我们结合生物信息学技术(bioinformatics)克隆了HBxAg蛋白反式激活作用的新的靶基因, 即乙型肝炎病毒X蛋白激活基因1(XTP1), 从而为HBxAg反式激活作用的研究提供能了新的研究方向.

1 材料和方法

1.1 材料 DNA回收纯化试剂购于Bio 101公司, 克隆载体pCR2.1及细胞转染试剂lipofectamine购于Invitrogen公司, T4 DNA连接酶、限制性内切酶购自Takara公司, 质粒提取试剂及 β -gal检测试剂购自Promega公司. 抑制性消减杂交试剂盒及相关试剂购自Clontech公司.

1.2 方法

1.2.1 目的基因的扩增与纯化 以质粒pCP10中所含的HBV_{ayw}亚型的DNA序列为模板, 用PCR方法扩增HBxAg基因片段. 采用冷启动方式进行PCR, 参数为94℃预变性1 min, 94℃50 s, 55℃50 s, 72℃40 s, 共30个循环; 72℃延伸10 min. PCR产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳, 切胶, 回收纯化500 bp DNA条带.

1.2.2 真核表达载体的构建、纯化和DNA测序 以T-A克隆法, 将目的基因片段插入载体pCR2.1, XhoI单酶切, 电泳鉴定插入基因片段的定向性. 将获得的质粒pCR2.1-X和真核表达载体pcDNA3.1(-)分别用Hind III和Apa I双酶切, 用T4 DNA连接酶进行定向连接, 产物转化DH5 α 细菌, 筛选抗氨苄青霉素阳性菌落; 提取质粒, 酶切及PCR鉴定含有HBxAg基因的阳性克隆, 命名为pcDNA3.1(-)-X. DNA测序由Takara公司完成.

1.2.3 HBxAg蛋白在COS-7细胞中的瞬时表达 试剂盒方法提取质粒以备转染, 以标准方案培养COS-7细胞. 具体转染方法参照说明书进行. 转染48 h后, 收集细胞, 以ELISA方法检测细胞中HBxAg蛋白的瞬时表达.

1.2.4 pcDNA3.1(-)-X与pSV-lacZ共转染COS-7细胞 用0.1-1.2 μ g不同梯度pSV-lacZ质粒转染COS-7, 检测 β -gal的表达, 选择合适的报告质粒用量. 再用一定量的pSV-lacZ和pcDNA3.1(-)-X, 不同比例的脂质体共转染COS-7, 检测 β -gal的表达, 选择最佳脂质体用量. β -gal的检测采用Promega试剂盒方法. 以选择的最佳量脂质体、报告质粒pSV-lacZ和pcDNA3.1(-)、pcDNA3.1(-)-X(本室构建)、pcDNA3.1(-)-X共转染COS-7, 检测 β -gal的表达, 观察不同质粒对pSV-lacZ SV40启动子功能的影响^[28,29].

1.2.5 抑制性消减杂交筛选流程 见文献[30]. 简言之, 以空白载体pcDNA3.1(-)和表达HBxAg的pcDNA3.1(-)-X分别转染HepG2细胞, 提取mRNA, 进行逆转录, 经过SSH的2轮杂交和2轮扩增, 获得差异表达的基因片段. 对于PCR扩增的差异表达基因片段进行TA克隆化, 对于阳性集落进行序列分析, 对于每一条基因片段的序列提交GenBank进行同源基因序列的搜索, 确认所

得基因片段的独特性, 然后依据表达序列标签(EST)数据库中的同源基因片段进行电子拼接, 根据 Kozak 规则和终止密码子下游的多聚腺苷酸信号序列, 确定完整的编码基因序列。

1.2.6 新基因的PCR 扩增与序列分析 根据电子拼接序列的新基因序列, 设计新基因的序列特异性的引物, 利用从 HepG2 细胞来源的 mRNA, 经过 RT-PCR 技术的扩增与克隆技术, 获得阳性克隆并进行序列分析。

2 结果

2.1 重组质粒的酶切鉴定 的 HBxAg 基因约 500 bp. 构建的中间载体 pCR2.1-X 用 EcoRI 单酶切, 电泳图谱为两条带: 500 bp(HBxAg 基因片段)、3 900 bp (pCR2.1 空载体), 而以 Hind III 和 Apa I 双酶切所得基因片段定向插入 pcDNA3.1(-)载体后, 酶切和 DNA 测序证实读码框架正确, 保证了其表达产物的正确性。

2.2 HBxAg 蛋白在 COS-7 的瞬时表达 ELISA 方法检测转染 pcDNA3.1(-)-X 的 COS-7 细胞裂解液的 HBxAg 蛋白, 结果为阳性。

2.3 pcDNA3.1(-)-X 编码的 HBxAg 反式激活作用 以 1.2 μ g 3 种质粒与 0.3 μ g 报告质粒 pSV-lacZ 共转染 COS-7 细胞(2 者以 4 : 1 的比例效果最佳), 脂质体用量 6 μ L. pcDNA3.1(-)-X 实验组酶的表达是空质粒的 4.5 倍, 可见 pcDNA3.1(-)-X 明显促进 β -gal 的表达, 而 pcDNA3.1(-)则无作用, 说明 HBxAg 对 SV40 启动子有反式激活作用, 增强 pSV-lacZ 基因的 β -gal 的表达。

2.4 抑制性消减杂交技术筛选 经过对于转染细胞的差异表达基因序列的比较分析, 发现一段基因序列与 GenBank 中注册的已知功能基因序列没有同源。

2.5 新基因序列的部分特点 新基因序列命名为 XTP1, 在 GenBank 中的注册号 AF488828, 基因序列的长度为 1 143 bp, 其中 A 为 343、C 为 223、G 为 252、T 为 325, GC 含量为 42%。XTP1 基因序列及其编码产物如图 1 所示。

```

ATG AAT TCT GAG ATG TGG TAC AAG CGT CAC
M N S E M W Y K R H
AGT ATT GCA ATT GGA GAG GTG CCA GCT TGC
S I A I G E V P A C
CGT CTT GTC CAC CGC AGA CAG CTG ACA GAG
R L V H R R Q L T E
GCC AAT GTA GAA GAG ATA TGG AAG TCT ATG
A N V E E I W K S M
ACA TTA TCA TAC TTA CAG AAA ATT CTT GGC
T L S Y L Q K I L G
CTG GAT TCC TTA GAA GAA GTT TTA GAC GTC
L D S L E E V L D V
AAA CTT GTC AAT TCG AAG TTC ATC ATC CAT
K L V N S K F I I H
AAT GTA TAT AGT GTT AGC AAG CAG GGA GTT
N V Y S V S K Q G V

```

```

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

```

*

图1 XTP1 基因序列及其编码产物序列。

3 讨论

关于反式激活作用蛋白的靶基因及其作用的分子生物学机制研究,近年来建立了一系列的技术和方法,例如反式激活蛋白表达载体的构建、细胞转染技术,结合基因表达谱的比较分析技术,如消减杂交技术(subtractive hybridization)、任意引物差异显示逆转录多聚酶链反应(AP-DD-RT-PCR, arbitrary primer differential display reverse transcription polymerase chain reaction)、DNA芯片(DNA chip)、代表性差异显示分析技术(RDA, representative differential assay)以及抑制性消减杂交技术(SSH)等.这些技术各有优缺点.基因芯片技术的发展,使高通量筛选的效率显著提高,但是目前由于技术方面的原因,选择的目的基因类型还只是人类基因组中所表达的基因的一小部分,而且大部分基因只是功能已知的基因,因此尽管基因芯片技术的应用具有广泛的发展前景,但目前至少是选择的目的基因片段偏少、不利于克隆未知功能基因的研究.经过多次改进的SSH技术也具有其他技术所不能比拟的优势,经过2次均等化和2次杂交的SSH技术,假阳性率得到了显著抑制,并适合丰度较低基因的克隆化,由于对于研究对象没有先决条件,因此可能会筛选得到未知功能的新基因.这是SSH技术的突出的优点所在^[31-39].我们应用SSH技术对于反式激活作用蛋白的激活的靶基因进行克隆研究,获得了成功.不仅筛选到HBxAg反式激活作用的已知功能的基因,同时还筛选到了HBxAg蛋白反式激活作用的新型靶基因XTP1,从而为HBxAg的反式激活作用的分子生物学机制研究开辟了新的道路.

近年来肝炎病毒编码产物的反式激活作用得到了空前的重视. HBV基因组编码的X蛋白和羧基末端截短的表面抗原中蛋白(MHBst),以及丙型肝炎病毒(HCV)基因编码的核心蛋白、非结构蛋白3(NS3)、非结构蛋白5A(NS5A)等都已经得到证实具有反式激活作用.但是这些蛋白的反式激活作用的特点和机制有所差别. Tu et al^[40]首次发现X蛋白的反式激活功能,由Vero细胞表达的X蛋白能够增强人干扰素 β (IFN β)调控序列控制下的氯霉素乙酰转移酶(CAT)表达.后来的研究发现X蛋白主要作用于多种基因的增强子和启动子元件,包括HBV的增强子和C基因的启动子、SV40早期增强子/启动子、多种病毒的长末端重复序列(LTR)、人IFN β 基因调控序列,对c-myc、人白细胞抗原(HLA)-DR、主要组织相容性复合体(MHC)-I及白介素8(IL-8)等都有反式激活作用.

对于乙型肝炎病毒的X蛋白功能域的分析阐明了HBxAg结构与功能之间的关系.研究认为至少有一个位于103-117 aa的功能域对其作用非常重要. N末端和C末端对其反式激活都不重要,认为转录活性区位于32-148 aa内,105-148 aa区富含负电荷,是其他反式激活因子的典型激活功能域所具有的特征;32-66 aa区可能为结合功能域. Takada et al 认为C末端134-139 aa

(LGGCRHK)较保守,缺失后X的反式转录活性几乎完全丧失. 成军 et al^[26]认为有3个关键功能域:第46-52 aa(尤其是Pro-46、His-49、His-52),第61-69 aa(尤其是Cys-61、Gly-67、Pro-68、Cys-69),第132-139 aa(尤其是Phe-132、Cys-137、His-139),这3段序列在不同的嗜肝病毒中高度保守,第1段序列形成组氨酸/天冬氨酸功能样特征,第2与第3段序列与Kunitz样丝氨酸蛋白酶抑制剂的Kunitz功能区高度同源. N末端的5-27 aa或C末端143-154 aa缺失,对X蛋白活性没有影响.但也有相互矛盾的结果,可能是X蛋白在不同细胞通过不同因子或途径起作用而导致所需的功能域不同所致^[41-44].

X基因编码蛋白反式激活作用的特点:(1)X蛋白是非特异性的反式激活因子,其作用具有广谱性.来源于许多细胞的X蛋白都具有反式激活作用,如人正常细胞或癌细胞、肝源性或非肝源性细胞,以及其他哺乳动物细胞,甚至昆虫或大肠杆菌等.其激活的靶基因也有多种.(2)X蛋白是对自己或异源基因的增强子或启动子作用,促进转录起始作用.(3)在同一细胞X蛋白对顺式元件似乎有相当的特异性,当顺式元件不同时,其反式激活作用相差悬殊.而且X蛋白的作用具有时间依赖性.(4)X蛋白的作用显示出细胞依赖性,仅有很少启动子在任何细胞中都能被反式激活^[45-47].

乙型肝炎病毒对于肝细胞的作用机制包括对于Ras-Raf-MAPK信号转导途径的影响. Ras是目前所知最保守的一族膜相关的G结合类癌基因,对细胞生长、增生、发育、分化及癌细胞产生起重要作用. 编码产物Ras是一大族小的单聚体GTP/GDP结合蛋白,因为 M_r 21 000 Da,因而也称之为p21. 结合GTP为活性状态,结合GDP为非活性状态.研究表明^[48-50],培养细胞中HBxAg的表达可刺激Ras-GTP复合物的形成,提示HBxAg与Ras信号途径存在一定的关系.现在普遍认为,HBxAg反式激活通过2种模式起作用,第1种模式,认为HBxAg通过与DNA结合蛋白的结合激活大量转录因子和(或)激活转录的基本元件.随着对HBxAg研究的深入,另1种模式被越来越多的学者重视,即认为HBxAg的反式激活是通过刺激细胞内信号转导途径而起作用.在此模式里HBxAg可以激活大量的转录元件,包括AP-1(activator protein 1, c-Jun/c-Fos)、AP-2、AP-3、CRE(cyclic adenosine monophosphate response element)、SRE(serum response element)、NF- κ B(nuclear factor κ B)、Oct-1等.其中研究比较多的是HBxAg对AP-1和NF- κ B的激活^[51,52].

研究发现,在转染细胞中HBxAg表达可以诱导Ras-GTP复合物的形成以及有丝分裂原蛋白激酶(MAPK)的活化,从而通过Ras-MAPK途径激活转录因子.这一激活可因转染细胞Ras和Raf的显性负突变(dominant negative mutant)而阻断,而与蛋白激酶C(PKC)抑制剂的存在无关.进一步研究发现,由HBxAg刺激合成的Ras-GTP复合物可通过激活Raf转换其上游活化信号,促使其下游元件发生磷酸化. Raf一旦被活化,就作为MAPKKK

(MEKK)将MAPKK(MEK)磷酸化而激活, MEK活化后进而使MAPK磷酸化而活化, 活化的MAPK可以使包括AP-1、AP-2和NF- κ B在内的多种转录因子活化, 促进转录的发生. 通过HBxAg刺激Ras活化机制的研究, 发现HBxAg激活Ras途径是通过HBxAg作为Src家族的酪氨酸激酶的胞质内激活剂, 而诱导Ras上游的激活蛋白Shc、Grb2、SOS的联系, 同时在不改变Ras特殊的GTP酶激活蛋白活性的情况下, 使GTP和Ras结合, 但HBxAg本身并不参与复合物的形成. 例如v-Src介导强烈的Shc酪氨酸磷酸化, 引起与Grb2的联系及Ras信号途径的激活. 同样的c-Src可诱导Shc酪氨酸磷酸化, 进而导致Shc与Grb2结合, 最终激活Ras. HBxAg在不含血清的NIH 3T3细胞能强烈刺激Src家族激酶, 从而激活整个Ras途径. 最近的研究表明, HBxAg还可直接通过激活Src酪氨酸激酶启动一个高水平的病毒复制, 其机制是HBxAg在细胞中通过Src介导的途径刺激病毒前基因组mRNA逆转录为cDNA所致^[53].

研究报道HBxAg能促进NF- κ B依赖的转录活性, NF- κ B为P50/P65或P52/P65组成的二聚体, 在生理条件下, 胞质中存在许多NF- κ B抑制因子, 包括I κ B α 、I κ B β 、BCL-3、NF- κ B1蛋白前体(P105)等. HBxAg可促进I κ B降解以及RelA从NF- κ B1蛋白前体中释放出来, 从而使NF- κ B的活性得以发挥. 并且抑制Ras活性可阻止对NF- κ B激活. 同时发现HBx并不与NF- κ B直接发生作用, 说明HBx对NF- κ B的激活可能是通过Ras途径完成的. 但也有与此相矛盾的报道, 认为HBxAg与其他NF- κ B诱导剂肿瘤坏死因子(TNF)、白介素-1(IL-1)等作用机制不同, 其刺激NF- κ B抑制剂I κ B降解并不依赖Ras、Raf-1、PKC的活化, 推测可能与其他机制有关^[54-56].

HBxAg可通过活化MAPK方式诱导AP-1, 控制AP-1活化的MAPK方式有两种, 一种是细胞外信号调节激酶(ERKs), 为依赖Ras的一种c-Fos的重要激活剂. 另一种MAPK是c-Jun N末端蛋白激酶(JNKs), 功能是使c-Jun N末端磷酸化. 较早的资料表明, Ras激活ERKs是通过Raf途径完成的, 而JNKs的活化是由MEKK-1控制的, 由Ras-MEKK-1途径可介导中等水平的JNKs活化, JNKs活化以及c-Jun N末端磷酸化被认为在c-Jun合成过程形成一个正性自动调控圈. 因此认为HBx诱导AP-1可能通过两个途径完成, 一是通过依赖Ras的ERKs刺激c-Fos的合成, 另一条途径是活化JNKs使c-Jun N末端磷酸化进而诱导c-Jun的大量合成. c-Fos和c-Jun是构成AP-1的两个亚单位, 他们的大量合成是AP-1活化的基础. AP-1直接结合特异序列的AP-1启动子上游反应元件, 使转录水平上调, 完成信号转导^[56-58].

HBxAg激活Ras信号转导途径还被认为与HBxAg激活RNA聚合酶III转录tRNA有关. 研究发现HBxAg可刺激细胞内TATA结合蛋白(TBP)增高^[59]. 另外, 相关的研究资料也提出, 表达HBxAg基因的细胞TBP mRNA

的水平可稳定增高, 该研究还证明, HBxAg通过Ras/Raf-1信号途径的激活可刺激TBP启动子的转录. TBP是转录因子IIIB(TFIIIB)复合物的亚单位, 为细胞基因转录所需的转录因子, 可控制RNA聚合酶III的转录, 即TBP增高可使RNA聚合酶III活性增强. 通过分析依赖RNA聚合酶基因启动子和Copia启动子的表达以及TBP水平的检测, 表明HBxAg介导依赖RNA聚合酶III的反式激活及其增加细胞内TBP水平的能力有赖于Ras的活化. 进一步研究表明, 通过HBxAg介导的Ras刺激依赖RNA聚合酶III的基因可发生于各类细胞而不受细胞类型的限制. RNA聚合酶III主要负责tRNA和5S RNA的转录, 被认为是维持细胞旺盛生长的必需因子, 例如猴病毒促进细胞转化的基本特征之一是tRNA的合成显著上升, 因此认为, HBxAg促进RNA聚合酶III转录活性可能与其致癌有一定关系. HBxAg也可反式激活依赖RNA聚合酶I的启动子, 该启动子负责28S、18S、5.8S rRNA的转录合成, 而HBxAg诱导RNA聚合酶I基因的活性也是由Ras的激活所介导^[60-63].

HBxAg可通过Ras途径刺激细胞周期的进程, 使细胞从G0期进入S期至少缩短12 h. 增强细胞通过G0/G1和G2/M检查点(checkpoint)控制, 从而促进细胞的增生^[64].

此外, HBxAg蛋白具有的另外的一些特性也许有助于人们对其作用机制的进一步了解. HBxAg蛋白能进入细胞转录因子CREB和ATF-2的蛋白-蛋白复合物中, 扩展这些调节蛋白的DNA结合特异性, 这也可能是HBxAg蛋白参与转录调节的一种机制. 在大肠杆菌中表达的HBxAg蛋白对人免疫缺陷病毒-1(HIV-1)的LTR所引导的转录有反式激活作用, 并发现此蛋白具有内源性丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的活性. 研究发现HBxAg蛋白与V-abl及小鼠c-abl基因座编码的p18蛋白同源, 而此蛋白具有酪氨酸激酶活性, 从而提出了HBxAg蛋白通过共价修饰细胞因子或酶而引起激活的机制. 对HBxAg蛋白的分析还发现它具有Kunitz型的丝氨酸蛋白酶抑制子的Kunitz功能域顺序. 此顺序的突变导致反式激活作用的完全丧失, 因此HBxAg蛋白与这种抑制物或其同类物相似, 可与丝氨酸蛋白酶自然的抑制子竞争, 结合肝细胞来源的特异的丝氨酸蛋白酶, 从而扰乱细胞内转录因子的蛋白水解途径, 而执行其反式激活作用. 由此可见HBxAg蛋白激活途径的多样性^[65-70].

需要强调的是, 目前对HBxAg反式激活的研究结果也存在不一致性, 甚至有矛盾的结果. 因为研究大多数采用瞬时表达系统, 将含有X基因的表达载体与报告基因载体用共转染实验. 分析其原因可能包括: (1)体外细胞培养研究单个病毒蛋白的孤立的效应可能与体内整体细胞蛋白的效应不同, 因为体内多种病毒蛋白可能具有协同或拮抗作用; (2)转染细胞中蛋白表达水平也会影响观察到的效应, 体外试验中目的蛋白都是过表达, 而病毒蛋白, 尤其是HBxAg蛋白在患者体内水

平通常很低; (3)不同的细胞类型将有不同的应答; (4)细胞培养环境不可能完全真实地反映活体内环境; (5)应用报告基因瞬时转染观察的效应不可能完全模拟病毒蛋白对内源性细胞基因的作用^[71-75]。

4 参考文献

- Schuster R, Hildt E, Chang SF, Terradillos O, Pollicino T, Lanford R, Gerlich WH, Will H, Schaefer S. Conserved transactivating and pro-apoptotic functions of hepadnaviral X protein in ortho- and avihepadnaviruses. *Oncogene* 2002; 21:6606-6613
- Carretero M, Gomez-Gonzalo M, Lara-Pezzi E, Benedicto I, Aramburu J, Martinez-Martinez S, Redondo J, Lopez-Cabrera M. The hepatitis B virus X protein binds to and activates the NH(2)-terminal trans-activation domain of nuclear factor of activated T cells-1. *Virology* 2002;299:288-300
- Li J, Xu Z, Zheng Y, Johnson DL, Ou JH. Regulation of hepatocyte nuclear factor 1 activity by wild-type and mutant hepatitis B virus X proteins. *J Virol* 2002;76:5875-5881
- Zhang Z, Torii N, Furusaka A, Malayaman N, Hu Z, Liang TJ. Structural and functional characterization of interaction between hepatitis B virus X protein and the proteasome complex. *J Biol Chem* 2000;275:15157-15165
- Reifenberg K, Wilts H, Lohler J, Nusser P, Hanano R, Guidotti LG, Chisari FV, Schlicht HJ. The hepatitis B virus X protein transactivates viral core gene expression in vivo. *J Virol* 1999; 73:10399-10405
- Kim JH, Rho HM. Activation of the human transforming growth factor alpha (TGF-alpha) gene by the hepatitis B viral X protein (HBx) through AP-2 sites. *Mol Cell Biochem* 2002; 231:155-161
- Assogba BD, Choi BH, Rho HM. Transcriptional activation of the promoter of human cytomegalovirus immediate early gene (CMV-IE) by the hepatitis B viral X protein (HBx) through the NF-kappaB site. *Virus Res* 2002;84:171-179
- Arima T, Nakao K, Nakata K, Ishikawa H, Ichikawa T, Hamasaki K, Ishii N, Eguchi K. Transactivation of human alpha-fetoprotein gene by X-gene product of hepatitis B virus in human hepatoma cells. *Int J Mol Med* 2002;9:397-400
- Xu Z, Yen TS, Wu L, Madden CR, Tan W, Slagle BL, Ou JH. Enhancement of hepatitis B virus replication by its X protein in transgenic mice. *J Virol* 2002;76:2579-2584
- Majano P, Lara-Pezzi E, Lopez-Cabrera M, Apolinario A, Moreno-Otero R, Garcia-Monzon C. Hepatitis B virus X protein transactivates inducible nitric oxide synthase gene promoter through the proximal nuclear factor kappaB-binding site: evidence that cytoplasmic location of X protein is essential for gene transactivation. *Hepatology* 2001;34:1218-1224
- Zhang Z, Torii N, Hu Z, Jacob J, Liang TJ. X-deficient woodchuck hepatitis virus mutants behave like attenuated viruses and induce protective immunity in vivo. *J Clin Invest* 2001; 108:1523-1531
- Lee MO, Kang HJ, Cho H, Shin EC, Park JH, Kim SJ. Hepatitis B virus X protein induced expression of the Nur77 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:1162-1168
- Murakami S. Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator. *J Gastroenterol* 2001;36:651-660
- Lee JH, Rho HM. Nuclear factor of activated T cells (NFAT1-C) represses the enhancer II and pregenomic promoter (EnII/Cp) of hepatitis B virus (HBV) through its responsive site GGAGA and nullifies the HBx-driven transcriptional activation. *IUBMB Life* 2001;51:255-261
- Kim H, Lee YH, Won J, Yun Y. Through induction of juxtaposition and tyrosine kinase activity of Jak1, X-gene product of hepatitis B virus stimulates Ras and the transcriptional activation through AP-1, NF-kappaB, and SRE enhancers. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;286:886-894
- Hoare J, Henkler F, Dowling JJ, Errington W, Goldin RD, Fish D, McGarvey MJ. Subcellular localisation of the X protein in HBV infected hepatocytes. *J Med Virol* 2001;64:419-426
- 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
- Bouchard M, Giannakopoulos S, Wang EH, Tanese N, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activation of cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 complexes and G1 transit via a Src kinase pathway. *J Virol* 2001;75:4247-4257
- Lee YI, Kang-Park S, Do SI, Lee YI. The hepatitis B virus-X protein activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem* 2001;276:16969-16977
- Jaitovich-Groisman I, Benlimame N, Slagle BL, Perez MH, Alpert L, Song DJ, Fotouhi-Ardakani N, Galipeau J, Alaoui-Jamali MA. Transcriptional regulation of the TFIIH transcription repair components XPB and XPD by the hepatitis B virus x protein in liver cells and transgenic liver tissue. *J Biol Chem* 2001;276:14124-14132
- Goila R, Banerjee AC. Inhibition of hepatitis B virus X gene expression by novel DNA enzymes. *Biochem J* 2001;353:701-708
- 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
- 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
- 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 基因酵母表达载体构建及表达. *世界华人消化杂志* 2002;10: 15-18
- 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
- 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
- 陆荫英, 刘妍, 成军, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 蛋白的功能研究进展. *国外医学病毒学分册* 2002;9:33-36
- 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
- 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
- 刘妍, 成军, 陆荫英, 王刚, 牟劲松, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式激活基因克隆化的研究. *中华肝脏病杂志* 2003;11:5-7
- 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
- 刘妍, 陆荫英, 成军, 王建军, 李莉, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因的克隆化研究. *解放军医学杂志* 2003; 28:40-43
- 刘妍, 成军, 李克, 杨倩, 陆荫英, 王琳, 王建军. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 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;11:394-398
- 牟劲松, 刘妍, 王刚, 成军, 段惠娟, 李克, 陆荫英, 王琳, 王惠芬. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 反式激活的相关基因. *世界华人消化杂志* 2003;11:399-403
- 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 张树林. 抑制性消减杂交技术原理及应用. *世界华人消化杂志* 2003;11:456-458
- 刘妍, 成军, 王建军, 杨倩, 陆荫英. 基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用. *世界华人消化杂志* 2003;11:461-463
- 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 乙型肝炎病毒对细胞信号转导的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11:472-474
- 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 生物信息学技术与新基因的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:474-477
- 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. HCV 核心蛋白与截短型 HBV 表面抗原蛋白协同反式激活功能的研究. *中华肝脏病杂志* 2002;10:354-357
- 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
- Pflum MK, Schneider TL, Hall D, Schepartz A. Hepatitis B virus X protein activates transcription by bypassing CREB phosphorylation, not by stabilizing bZIP-DNA complexes. *Biochemistry* 2001;40:693-703
- Pan J, Duan LX, Sun BS, Feitelson MA. Hepatitis B virus X protein protects against anti-Fas-mediated apoptosis in human liver cells by inducing NF-kappa B. *J Gen Virol* 2001;82:171-182

- 43 Yeh CT, Shen CH, Tai DI, Chu CM, Liaw YF. Identification and characterization of a prevalent hepatitis B virus X protein mutant in Taiwanese patients with hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2000;19:5213-5220
- 44 Kong HJ, Hong SH, Lee MY, Kim HD, Lee JW, Cheong J. Direct binding of hepatitis B virus X protein and retinoid X receptor contributes to phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transactivation. *FEBS Lett* 2000;483:114-118
- 45 Chen WN, Oon CJ, Leong AL, Koh S, Teng SW. Expression of integrated hepatitis B virus X variants in human hepatocellular carcinomas and its significance. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276:885-892
- 46 Sitterlin D, Bergametti F, Tiollais P, Tennant BC, Transy C. Correct binding of viral X protein to UVDDB-p127 cellular protein is critical for efficient infection by hepatitis B viruses. *Oncogene* 2000;19:4427-4431
- 47 Lee YI, Lee S, Das GC, Park US, Park SM, Lee YI. Activation of the insulin-like growth factor II transcription by aflatoxin B1 induced p53 mutant 249 is caused by activation of transcription complexes; implications for a gain-of-function during the formation of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2000;19:3717-3726
- 48 Wentz MJ, Becker SA, Slagle BL. Dissociation of DDB1-binding and transactivation properties of the hepatitis B virus X protein. *Virus Res* 2000;68:87-92
- 49 Weinberg M, Passman M, Kew M, Arbuthnot P. Hammerhead ribozyme-mediated inhibition of hepatitis B virus X gene expression in cultured cells. *J Hepatol* 2000;33:142-151
- 50 Sohn S, Jaitovitch-Groisman I, Benlimame N, Galipeau J, Batist G, Alaoui-Jamali MA. Retroviral expression of the hepatitis B virus x gene promotes liver cell susceptibility to carcinogen-induced site specific mutagenesis. *Mutat Res* 2000;460:17-28
- 51 Tarn C, Zou L, Hullinger RL, Andrisani OM. Hepatitis B virus X protein activates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in dedifferentiated hepatocytes. *J Virol* 2002;76:9763-9772
- 52 Yun C, Um HR, Jin YH, Wang JH, Lee MO, Park S, Lee JH, Cho H. NF-kappaB activation by hepatitis B virus X (HBx) protein shifts the cellular fate toward survival. *Cancer Lett* 2002;184:97-104
- 53 Shih WL, Kuo ML, Chuang SE, Cheng AL, Doong SL. Hepatitis B virus X protein inhibits transforming growth factor-beta -induced apoptosis through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 2000;275:25858-25864
- 54 Murakami S. Hepatitis B virus X protein: structure, function and biology. *Intervirology* 1999;42:81-99
- 55 Schuster R, Gerlich WH, Schaefer S. Induction of apoptosis by the transactivating domains of the hepatitis B virus X gene leads to suppression of oncogenic transformation of primary rat embryo fibroblasts. *Oncogene* 2000;19:1173-1180
- 56 Barnabas S, Andrisani OM. Different regions of hepatitis B virus X protein are required for enhancement of bZip-mediated transactivation versus transrepression. *J Virol* 2000;74:83-90
- 57 Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriya K, Fujie H, Tsutsumi T, Kanegae Y, Kimura S, Saito I, Koike K. Induction of apoptosis after switch-on of the hepatitis B virus X gene mediated by the Cre/loxP recombination system. *J Gen Virol* 1999;80:3257-3265
- 58 Lee DH, Choi BH, Rho HM. The synergistic transactivation of the hepatitis B viral (HBV) pregenomic promoter by the E6 protein of human papillomavirus type 16 (HPV-16 E6) with HBV X protein was mediated through the AP1 site of E element in the enhancer I (EnI) in human liver cell. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;265:62-66
- 59 Sirma H, Giannini C, Poussin K, Paterlini P, Kremsdorf D, Brechot C. Hepatitis B virus X mutants, present in hepatocellular carcinoma tissue abrogate both the antiproliferative and transactivation effects of HBx. *Oncogene* 1999;18:4848-4889
- 60 Hu Z, Zhang Z, Doo E, Coux O, Goldberg AL, Liang TJ. Hepatitis B virus X protein is both a substrate and a potential inhibitor of the proteasome complex. *J Virol* 1999;73:7231-7240
- 61 Andrisani OM, Barnabas S. The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis. *Int J Oncol* 1999;15:373-379
- 62 Bergametti F, Prigent S, Lubet B, Benoit A, Tiollais P, Sarasin A, Transy C. The proapoptotic effect of hepatitis B virus HBx protein correlates with its transactivation activity in stably transfected cell lines. *Oncogene* 1999;18:2860-2871
- 63 Perini G, Oetjen E, Green MR. The hepatitis B pX protein promotes dimerization and DNA binding of cellular basic region/leucine zipper proteins by targeting the conserved basic region. *J Biol Chem* 1999;274:13970-13977
- 64 Hsu DK, Dowling CA, Jeng KC, Chen JT, Yang RY, Liu FT. Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1999;81:519-526
- 65 Kim YK, Junn E, Park I, Lee Y, Kang C, Ahn JK. Repression of hepatitis B virus X gene expression by hammerhead ribozymes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257:759-765
- 66 Nomura T, Lin Y, Dorjsuren D, Ohno S, Yamashita T, Murakami S. Human hepatitis B virus X protein is detectable in nuclei of transfected cells, and is active for transactivation. *Biochim Biophys Acta* 1999;1453:330-340
- 67 Amaro MJ, Bartolome J, Carreno V. Hepatitis B virus X protein transactivates the inducible nitric oxide synthase promoter. *Hepatology* 1999;29:915-923
- 68 Chomarat P, Rice JM, Slagle BL, Wild CP. Hepatitis B virus-induced liver injury and altered expression of carcinogen metabolising enzymes: the role of the HBx protein. *Toxicol Lett* 1998;102-103:595-601
- 69 Choi BH, Park GT, Rho HM. Interaction of hepatitis B viral X protein and CCAAT/ enhancer-binding protein alpha synergistically activates the hepatitis B viral enhancer II/pregenomic promoter. *J Biol Chem* 1999;274:2858-2865
- 70 Azizan A, Cong YS, Shain K, Tsai SC, Yao YL, Olashaw N, Seto E. Transactivation by expression of the hepatitis B virus X protein with an inducible system. *Mol Biol Rep* 1998;25:231-236
- 71 Wang HD, Trivedi A, Johnson DL. Regulation of RNA polymerase I-dependent promoters by the hepatitis B virus X protein via activated Ras and TATA-binding protein. *Mol Cell Biol* 1998;18:7086-7094
- 72 Lara-Pezzi E, Armesilla AL, Majano PL, Redondo JM, Lopez-Cabrera M. The hepatitis B virus X protein activates nuclear factor of activated T cells (NF-AT) by a cyclosporin A-sensitive pathway. *EMBO J* 1998;17:7066-7077
- 73 Gottlob K, Fulco M, Levrero M, Graessmann A. The hepatitis B virus HBx protein inhibits caspase 3 activity. *J Biol Chem* 1998;273:33347-33353
- 74 Dorjsuren D, Lin Y, Wei W, Yamashita T, Nomura T, Hayashi N, Murakami S. RMP, a novel RNA polymerase II subunit 5-interacting protein, counteracts transactivation by hepatitis B virus X protein. *Mol Cell Biol* 1998;18:7546-7555
- 75 Lin Y, Tang H, Nomura T, Dorjsuren D, Hayashi N, Wei W, Ohta T, Roeder R, Murakami S. The hepatitis B virus X protein is a co-activator of activated transcription that modulates the transcription machinery and distal binding activators. *J Biol Chem* 1998;273:27097-27103



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

