

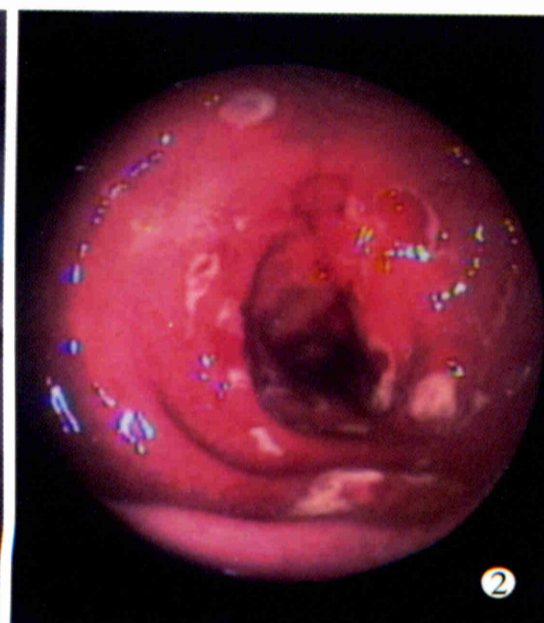
世界华人消化杂志®

**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 - 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

陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 邵清, 李克, 张玲霞, 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
陆荫英, 女, 1973-08-27生, 贵州省贵阳市人, 汉族, 博士, 2003年军医进修学院毕业, 主治医师。主要从事肝病的基础及临床工作。
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、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 a gene coding for novel mutant of asialoglycoprotein receptor 2 binding to hepatitis B virus X protein in hepatocytes

Yin-Ying Lu, Tian-Yan Chen, Jun Cheng, Yao-Dong Liang, Lin Wang, Yan Liu, Jian Zhang, Qing Shao, Ke Li, Ling-Xia Zhang

Yin-Ying Lu, Tian-Yan Chen, Jun Cheng, Yao-Dong Liang, Lin Wang, Yan Liu, Jian Zhang, Qing Shao, Ke Li, Ling-Xia Zhang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuan Zhonglu, 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: The pathogenesis of HBV-induced malignant transformation is incompletely understood. The X protein of hepatitis B virus (HBxAg) is a multifunctional protein that can influence a variety of signal transduction pathways within the cell and is essential for establishing natural viral infection, it also has been implicated in the development of liver cancer associated with chronic infection. Further understanding of the interaction between HBxAg and proteins in hepatocytes is of great significance for the prevention of the development of hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: HBxAg bait plasmid was constructed by ligating the HBxAg gene with a yeast expression vector pGBKT7, then transformed into yeast AH109 (a type). The transformed yeast cells were amplified and mated with yeast cells Y187 (α type) containing liver cDNA library plasmid pCAT2 in 2xYPD medium. Diploid yeast cells were plated on synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) and syn-

thetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) containing x-α-gal for selection twice. Plasmid of true positive blue colonies was extracted and analysed by DNA sequencing and blast in genbank. After the complete sequence of the novel mutant of asialoglycoprotein receptor 2 (ASGPR2) was amplified from the mRNA of HepG2 cell by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and cloned into pGADT7 vector, the recombinant plasmid was translated by using reticulocyte lysate and analysed by immunoprecipitation technique *in vitro* together with HBxAg.

RESULTS: Eighteen genes in forty-one positive colonies were obtained, one of them is a novel mutant of ASGPR2, which is 80 % homologous to natural ASGPR2. The complete sequence of the mutant was amplified from the mRNA of HepG2 cell by RT-PCR successfully. The interaction between HBx and ASGPR2 mutant was further confirmed by immunoprecipitation technique.

CONCLUSION: Interaction between HBx and ASGPR2 mutant can be observed in both yeast cell and *in vitro*.

Lu YY, Chen TY, Cheng J, Liang YD, Wang L, Liu Y, Zhang J, Shao Q, Li K, Zhang LX. Cloning of a gene coding for novel mutant of asialoglycoprotein receptor 2 binding to hepatitis B virus X protein in hepatocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1126-1130

摘要

目的: 筛选并克隆鉴定人肝细胞中与乙型肝炎病毒(HBV) X蛋白(HBxAg)相互作用蛋白的基因, 明确HBxAg在HBV感染及致癌过程中的具体作用。

方法: 用多聚酶链反应(PCR)法扩增HBxAg基因, 连接入酵母表达载体pGBKT7中构建诱饵质粒, 转化酵母细胞AH109并在其内表达, 然后与转化了人肝cDNA文库质粒的酵母细胞Y187进行配合, 在营养缺陷型培养基上进行双重筛选阳性菌落, PCR从中扩增出阳性目的片段并测序, 进行生物信息学分析。根据Genbank中的序列信息设计引物, 从HepG2细胞的mRNA中逆转录出去唾液酸蛋白受体2(ASGPR2)突变体的完整序列, 克隆到另一酵母表达载体pGADT7中, 体外免疫共沉淀再次证明HBxAg与ASGPR2突变体的结合作用。

结果: 成功克隆出HBxAg基因并在酵母细胞中表达, 配合后选出既能在四缺(SD/-Trp-Leu-His-Ade)培养基又能分解X-α-半乳糖(X-α-gal)变成蓝色的真阳性菌落41个, 其中有一个是ASGPR2的新突变体。HepG2细胞的mRNA中能逆转录出ASGPR2的全基因序列,

体外免疫共沉淀结果证实该突变体与HBxAg在体外也有结合作用。

结论: 成功克隆出HBxAg的肝细胞结合蛋白, 发现一新的ASGPR2突变体, 并证实HBxAg与ASGPR2突变体在体外及酵母细胞内均有结合作用。

陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 邵清, 李克, 张玲霞. 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. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1126-1130

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1126.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)慢性感染是引发肝细胞癌的主要危险因素, HBV编码的X蛋白(HBxAg)具有潜在的致癌作用, 在多种基因发生异常转化的过程中起转录协同激活作用, 但具体机制不清^[1-4]. 许多研究提示HBV X蛋白能抑制肿瘤抑制蛋白P53的功能并影响多种信号转导途径, 对多种增强子及启动子有反式激活作用^[5-7];还可以抑制肝细胞DNA的损伤修复, 激活细胞信号级联包括促分裂原蛋白激酶(MAPK), Janus家族酪氨酸激酶(JAK)/信号转导子和转录通路激活因子(STAT), 对肝细胞的生长繁殖、细胞凋亡和细胞生长检测点的调节有着广泛的影响, 在HBV诱导肝细胞癌的发生中起着重要作用^[8-10]. 筛选肝细胞中与HBxAg的结合蛋白对探讨HBV致癌的细胞效应机制提供重要线索。

1 材料和方法

1.1 材料 AH109酵母菌株(MA Ta, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4^Δ, gal80^Δ, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2URA3::MEL1_{TATA}-lac Z MEL1)、预转化的cDNA肝文库(Y187)、pGBKT7-BD克隆载体及酵母YPD培养基、SD/-Trp、SD/-Leu, SD/-Trp-Leu-His, SD/-Trp-Leu-His-Ade等培养基、X-α-gal 购于Clontech公司. 大肠杆菌DH5α及HBV ayw亚型基因全序列质粒载体pCP10、HepG2细胞为本室保存, c-myc单克隆抗体本室自制. 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠IgG购于北京中山生物公司. Taq DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、EcoRI和PstI、BamHI购于Takara生物公司. 丙烯酰胺、N, N'-亚甲双丙烯酰胺、IPTG及X-β-Gal及pGEM-T载体、Trizol总RNA提取试剂盒、RT-PCR试剂盒购于Promega公司. TEMED购于宝林曼公司. 醋酸锂、半硫酸腺苷购于Sigma公司. HBxAg基因扩增引物(P1 5'-GAATTCATGGCTGCTAGGCTGTGCTG-3'和P2 5'-CTGCAGATGGTGCTGGTGCG CAGACC-3'), 肝文库插入基因序列扩增引物(P3 5'-CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC-3', P4 5'-GTGAACTTGCGG GGTTCAGTATCTACGA-3'), 去唾液酸蛋白受体突变体基因扩增引物(P5 5'-GAATTCATG

GCCAAGGACTTTCAAGATATCC-3', P6 5'-GGATCCTCAGGCC ACCTCGCCGGTGGCATTG-3')合成及DNA测序由上海博亚公司承担。

1.2 方法

1.2.1 诱饵质粒的构建及表达 PCR扩增HBxAg基因与pGBKT7载体连接, 酶切鉴定后醋酸锂法将诱饵质粒转化入酵母AH109株后在SD/-Trp培养基上筛选生长6-8 d, 挑取阳性菌落培养后提酵母蛋白质, 用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和Western免疫印迹法验证HBxAg在酵母中的表达。

1.2.2 诱饵与肝文库的酵母配合 挑取在SD/-Trp培养基上生长的pGBKT7-HBxAg质粒的酵母AH109菌落一到数个接种于SD/-Trp培养基中, 30℃ 250 r·min⁻¹振摇过夜, 次日离心后用2×YPDA培养液5 mL重悬细胞, 计数细胞数大于1×10¹²·L⁻¹时与1 mL的肝文库酵母细胞在50 mL 2×YPDA中30℃ 30-50 r·min⁻¹配合18-24 h, 离心用1×YPDA 10 mL重悬细胞, 分别取250 μL铺于15 cm的SD/-Trp-Leu-His(3缺), SD/-Trp-Leu-His-Ade(4缺)培养基各25块上, 同时将配合产物按1:10、1:100、1:1 000铺于SD/-Trp-Leu培养基上检验配合效率. 生长6-18 d后挑取大于直径3 mm的菌落再次划线于铺有X-α-gal的4缺培养基上检查X-α-gal酶活性, 在此培养基上能生长且变成蓝色的为真阳性菌落. PCR扩增出目的片段后测序并进行生物信息学分析。

1.2.3 新基因全序的克隆及重组表达载体的构建 根据Genbank的序列信息设计引物P5、P6, 以HepG2细胞的mRNA为模板, 逆转录PCR(RT-PCR)扩增ASGPR2基因的全序列, 送DNA测序鉴定后EcoRI、BamHI双酶切克隆入酵母表达载体pGADT7。

1.2.4 体外免疫共沉淀 TNT网织红细胞裂解物体外翻译HBxAg和ASGPR2突变体(在此过程中掺入³⁵S), 二者各取5 μl在1.5 mL的微离心管中冰上混合, 30℃孵育1 h, 加入470 μL免疫共沉淀缓冲液、10 μL G蛋白-琼脂糖珠、10 μL c-myc单克隆抗体、4℃孵育2 h. 14 000 r·min⁻¹离心1-2 min, 弃上清. 加入TBST 0.5 mL洗3次, 加15 μL SDS上样缓冲液, 80℃加热变性5 min, 瞬时离心后将上清10 μL上样到SDS-PAGE胶上电泳, 清洗固定凝胶后, 恒定60℃真空干燥40 min, -20℃条件下放射自显影。

2 结果

2.1 pGBKT7-HBx重组诱饵质粒的构建及表达 扩增出的HBxAg基因连接到pGBKT7载体中经酶切鉴定结果正确. 转化入酵母AH109株筛选到阳性菌落, 提酵母蛋白质进行SDS-PAGE和Western免疫印迹分析, 结果显示对照无表达而转化了pGBKT7-HBx的酵母蛋白提取物Western印迹分析可见明显目的条带, 说明HBxAg基因已成功地在酵母中表达。

2.2 诱饵与肝文库酵母菌株配合结果 配合后筛选出既能在四缺(SD/-Trp-Leu-Ade-His)培养基又能在铺有X-

α -半乳糖(X- α -gal)的四缺培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落41个,用文库扩增引物PCR扩增出目的片段并测序,结果在GeneBank中进行分析,发现其中1个含ASGPR2突变体基因。

2.3 新基因全序的克隆及重组结果 用引物P5、P6从HepG2细胞的mRNA中逆转录扩增出ASGPR2突变体基因的全序列(图1,2),测序鉴定正确后克隆入酵母表达载体pGADT7,酶切鉴定结果正确(图3)。

```

      M A K D F Q D I Q Q L S S E E N D H
1  ATG GCC AAG GAC TTT CAA GAT ATC CAG CAG CTG AGC TCG GAG GAA AAT GAC CAT
      P F H Q G E G P G T R R L N P R R G
55 CCT TTC CAT CAA GGT GAG GGG CCA GGC ACT CGC AGG CTG AAT CCC AGG AGA GGA
      N P F L K G P P P A Q P L A Q R L C
109 AAT CCA TTT TTG AAA GGG CCA CCT CCT GCC CAG CCC CTG GCA CAG CGT CTC TGC
      S M V C F S L L A L S F N I L L L V
163 TCC ATG GTC TGC TTC AGT CTG CTT GCC CTG AGC TTC AAC ATC CTG CTG CTG GTG
      V I C V T G S Q S A Q L Q A E L R S
217 GTC ATC TGT GTG ACT GGG TCC CAA AGT GCA CAG CTG CAA GCC GAG CTG CGG AGC
      L K E A F S N F S S S T L T E V Q A
271 CTG AAG GAA GCT TTC AGC AAC TTC TCC TCG AGC ACC CTG ACG GAG GTC CAG GCA
      I S T H G G S V G D K I T S L G A K
325 ATC AGC ACC CAC GGA GGC AGC GTG GGT GAC AAG ATC ACA TCC CTA GGA GCC AAG
      L E K Q Q Q D L K A D H D A L L F H
379 CTG GAG AAA CAG CAG CAG GAC CTG AAA GCA GAT CAC GAT GCC CTG CTC TTC CAT
      L K H F P V D L R F V A C Q M E L L
433 CTG AAG CAC TTC CCC GTG GAC CTG CGC TTC GTG GCC TGC CAG ATG GAG CTC CTC
      H S N G S Q R T C C P V N W V E H Q
487 CAC AGC AAC GGC TCC CAA AGG ACC TGC TGC CCC GTC AAC TGG GTG GAG CAC CAA
      G S C Y W F S H S G K A W A E A E K
541 GGC AGC TGC TAC TGG TTC TCT CAC TCC GGG AAG GCC TGG GCT GAG GCG GAG AAG
      Y C Q L E N A H L V V I N S W E E Q
595 TAC TGC CAG CTG GAG AAC GCA CAC CTG GTG GTC ATC AAC TCC TGG GAG GAG CAG
      K F I V Q H T N P F N T W I G L T D
649 AAA TTC ATT GTA CAA CAC ACG AAC CCC TTC AAT ACC TGG ATA GGT CTC ACG GAC
      S D G S W K W V D G T D Y R H N Y K
703 AGT GAT GGC TCT TGG AAA TGG GTG GAT GGC ACA GAC TAT AGG CAC AAC TAC AAG
      N W A V T Q P D N W H G H E L G G S
757 AAC TGG GCT GTC ACT CAG CCA GAT AAT TGG CAC GGG CAC GAG CTG GGT GGA AGT
      E D C V E V Q P D G R W N D D F C L
811 GAA GAC TGT GTT GAA GTC CAG CCG GAT GGC CGC TGG AAC GAT GAC TTC TGC CTG
      Q V Y R W V C E K R R N A T G E V A
865 CAG GTG TAC CGC TGG GTG TGT GAG AAA AGG CGG AAT GCC ACC GGC GAG GTG GCC
      *
919 TGA

```

图1 ASGPR 突变体基因序列图(Genbank 号: AF 529374).

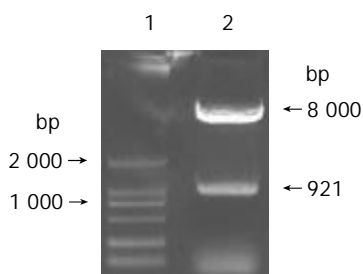
```

      188      205
G: TGGGTCCCAAAGTGAGGGTCACAGAGGTGCACAGCTGCAAGCCGA
M: TGGGTCCCAAAGTG.....CAC.....AGCTGCAAGCCGA
      244      248
68      69
G: AAGG.....GCCA
M: AAGGTGAGGGGCCAGGCACTCGCAGGCTGAATCCCAGGAGAGGAAATCCATTTTGAAGGGCCA
68      126

```

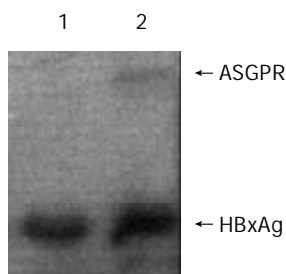
G: Genbank 的序列; M: 受体突变体序列

图2 新的去唾液酸蛋白受体突变体与 Genbank 中去唾液酸蛋白受体2的DNA序列比较。



1: DNA Marker; 2: pGADT7-ASGPR 质粒 EcoRI/PstI 双酶切
图 3 pGADT7-ASGPR 质粒酶切鉴定.

2.4 体外免疫共沉淀结果 放射自显影照片结果显示, 在泳道 2 出现各自的两条带的分子量大小正确, 说明 HBxAg 与该去唾液酸蛋白受体新的突变体在体外也能结合(图 4).



1:HBxAg; 2:HBxAg+ASGPR
图 4 体外免疫共沉淀图.

3 讨论

HBV 慢性感染可导致肝硬化、肝细胞癌发生, 其中 HBxAg 在致瘤方面的作用尤为重要, 已有研究证实 HBxAg 引起细胞基因异常是导致肝细胞癌过程中肝细胞异常增生的早期事件, 但具体机制尚未清楚. 近年来发现 HBxAg 的功能非常复杂^[11], 他能通过不同途径 (包括刺激蛋白激酶活性) 影响信号转导通路、反式激活各种细胞及病毒的启动子及增强子、抑制 P53 蛋白作用、妨碍 DNA 损伤修复, 并能通过诱导或封闭细胞凋亡来协调细胞增生及程序性坏死间的平衡^[12-19], 从而引起肝细胞基因突变, 肝细胞癌的发生. 持续低水平的 HBxAg 表达可导致 HCC 的发生, 但 HBxAg 的结构中不含能提供其细胞定位及在病毒感染肝细胞中起作用的特定的核定位信号、DNA 结合位点及其他的蛋白质结构域. 明确 HBxAg 在肝细胞中到底与哪些蛋白质因子相互作用、如何作用, 对于研究 HBV 在自然感染中所起的具体生物学功能是非常关键的^[20-26].

酵母双杂交系统是新近发展起来的一种分子生物学技术, 能有效分析真核细胞中蛋白-蛋白、蛋白-DNA、蛋白-RNA 相互作用. 该系统通过将两个推定相互作用的用蛋白 X 和 Y 被分别融合到一酵母转录激活因子的 BD 和 AD 上, X 与 Y 的相互作用重构了激活因子的完整性能导致下游“报告基因”的转录, 产生易探测到的表型, 间接证实 X 与 Y 蛋白间的结合作用^[27-30]. 利用 Clontech 公司新推出的酵母双杂交系统 3, 我们在

真核表达载体 pGBKT7 中构建 pGBKT7-HBx 诱饵质粒并在酵母菌株 AH109 中表达了 HBxAg 基因, 与人肝 cDNA 文库的酵母菌株 Y187 进行配合, 筛选出与之相互作用的蛋白基因 18 种, 其中一个基因与 ASGPR2 的基因高度同源, 推测是一个新的突变体, 该突变体在第 68-69 位碱基间比 ASGPR2 基因多 57 个碱基, 在 244-248 位碱基间较 ASGPR2 基因少 15 个碱基.

体内糖蛋白通过去唾液酸糖蛋白途径代谢, 他们被去唾液酸后通过去唾液酸糖蛋白受体在肝脏被吸收. 由于肝细胞表面富含 ASGPR, ASGPR 现已被用做多种抗-HBV 药物的肝细胞靶向载体, 以增强抗肝炎病毒药物的疗效^[31]. 有报道从患者体内分离出的 HBV 病毒粒子能与 ASGPR 结合, 进一步研究发现 HBV 是通过前 S1 相关的包膜结合位点与 ASGPR 结合, 介导肝细胞对 HBV 病毒粒子的胞饮作用, 可能是 HBV 进入肝细胞的一个机制^[32,33]. 在本项研究中发现 HBxAg 能与 ASGPR2 结合, 对于研究 HBxAg 在 HBV 感染及 HCC 发生中的具体功能又提出了新的线索, 二者结合后会引起哪些的生物学效应是下一步研究的重点.

4 参考文献

- Koike K, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Kyoji M. Molecular mechanism of viral hepatocarcinogenesis. *Oncology* 2002;62: 29-37
- 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
- Yeh CT. Hepatitis B virus X protein: searching for a role in hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:339-341
- Feitelson MA, Duan LX. Hepatitis B virus X antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 1997;150:1141-1157
- Feitelson MA. Hepatitis B x antigen and p53 in the development of hepatocellular carcinoma. *J Hepatobil Pancreat Surg* 1998;5:367-374
- Wang XW. Microinjection technique used to study functional interaction between p53 and hepatitis B virus X gene in apoptosis. *Mol Biotechnol* 2001;18:169-177
- 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
- Diao J, Garces R, Richardson CD. X protein of hepatitis B virus modulates cytokine and growth factor related signal transduction pathways during the course of viral infections and hepatocarcinogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; 12:189-205
- Arbuthnot P, Capovilla A, Kew M. Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:357-368
- Mosialos G. The role of Rel/NF-kappa B proteins in viral oncogenesis and the regulation of viral transcription. *Semin Cancer Biol* 1997;8:121-129
- Murakami S. Hepatitis B virus X protein: structure, function and biology. *Intervirology* 1999;42:81-99
- 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 TFIIF 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
- 14 Diao J, Khine AA, Sarangi F, Hsu E, Iorio C, Tibbles LA, Woodgett JR, Penninger J, Richardson CD. X protein of hepatitis B virus inhibits Fas-mediated apoptosis and is associated with up-regulation of the SAPK/JNK pathway. *J Biol Chem* 2001;276:8328-8340
- 15 Yun C, Lee JH, Park H, Jin YM, Park S, Park K, Cho H. Chemotherapeutic drug, adriamycin, restores the function of p53 protein in hepatitis B virus X (HBx) protein-expressing liver cells. *Oncogene* 2000;19:5163-5172
- 16 Park US, Park SK, Lee YI, Park JG, Lee YI. Hepatitis B virus-X protein upregulates the expression of p21waf1/cip1 and prolongs G1→S transition via a p53-independent pathway in human hepatoma cells. *Oncogene* 2000;19:3384-3394
- 17 Su Q, Schroder CH, Otto G, Bannasch P. Overexpression of p53 protein is not directly related to hepatitis B x protein expression and is associated with neoplastic progression in hepatocellular carcinomas rather than hepatic preneoplasia. *Mutat Res* 2000;462:365-380
- 18 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
- 19 Jia L, Wang XW, Harris CC. Hepatitis B virus X protein inhibits nucleotide excision repair. *Int J Cancer* 1999;80:875-879
- 20 Lu YY, Li K, Cheng J, Wang L, Liu Y, Duan HJ, Zhang LX. Cloning and expression of hepatitis B virus X gene in yeast. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:15-18
- 21 Wang L, Li K, Cheng J, Lu YY, Wang G, Liu Y, Duan HJ, Hong Y. Screening and cloning of the genes of protein interacting with human augments of liver regeneration. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:161-164
- 22 Li K, Wang L, Cheng J, Zhang LX, Duan HJ, Lu YY, Yang JZ, Liu Y, Hong Y, Xia XB, Wang G, Dong J, Li L, Zhong YW, Chen JM. Screening and cloning of gene of hepatocyte protein 1 interaction with HCV core protein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1379-1383
- 23 Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Li L, Liu Y, Duan HJ. Expression of NS2 gene of hepatitis C virus from yeast two hybrid 'Bait' vector in yeast. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:129-132
- 24 Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Mu JS, Liu Y, Duan HJ, Wang G, Li L. Mutual interaction between hepatitis C virus core protein and translin, a recombination hotspot binding protein. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:1-5
- 25 Lu YY, Li K, Cheng J, Wang L, Liu Y, Zhang LX. Cloning and expression of pre-S1 gene of hepatitis B virus in yeast. *Jiefangjun Yixue Zazhi* 2002;27:341-342
- 26 Lu YY, Li K, Liu Y, Wang L, Cheng J, Zhang LX. Cloning and expression of PreS2 gene of hepatitis B virus in yeast. *Weichangbingxue He Ganbingxue Zazhi* 2002;11:222-224
- 27 Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486
- 28 Zhen Z. Progress in proteomics. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2001;17:491-493
- 29 Serebriiskii IG, Toby GG, Finley RL Jr, Golemis EA. Genomic analysis utilizing the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2001;175:415-454
- 30 Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486
- 31 Treichel U, Meyerzum-Buschenfelde KH, Dienes HP, Gerken G. Receptor-mediated entry of hepatitis B virus particles into liver cells. *Arch Virol* 1997;142:493-498
- 32 De Meyer S, Gong ZJ, Suwandhi W, van Pelt J, Soumillion A, Yap SH. Organ and species specificity of hepatitis B virus (HBV) infection: a review of literature with a special reference to preferential attachment of HBV to human hepatocytes. *J Viral Hepat* 1997;4:145-153
- 33 Fiume L, Di Stefano G, Busi C, Mattioli A, Bonino F, Torrancia-Cerenzia M, Verme G, Rapicetta M, Bertini M, Gervasi GB. Liver targeting of antiviral nucleoside analogues through the asialoglycoprotein receptor. *J Viral Hepat* 1997;4:363-370

世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊

本刊讯 期刊的学术质量是一个综合指标, 1999 年中国科技信息所研制了中国科技期刊综合指标评价体系, 该指标体系已应用于中国科协一年一度的期刊择优资助工作中。综合指标评价体系是根据期刊的多项重要指标, 如被引总频次、影响因子、即年指标、基金论文比、他引总引比、扩散因子等对期刊分学科进行综合打分。通过对中国科技论文与引文数据库收录的科技期刊进行综合评定, 今年中国科学技术信息研究所首次评出了中国百种杰出学术期刊。世界华人消化杂志荣获 2001 年度百种中国杰出学术期刊称号。

(世界胃肠病学杂志 2002-12-18)



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

