

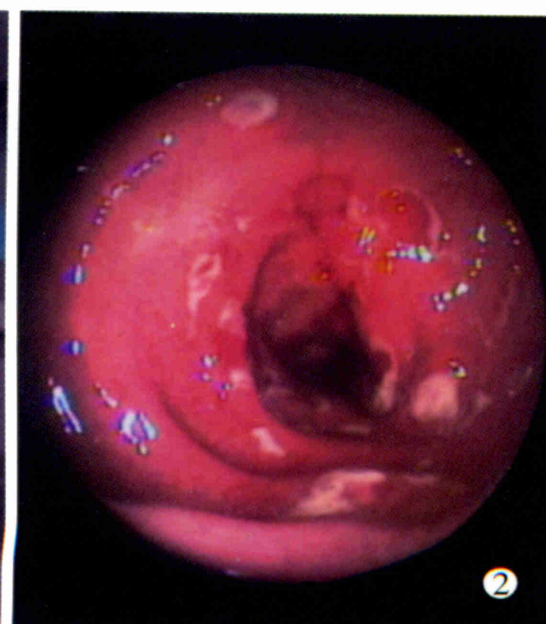
世界华人消化杂志®

**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 张金哲
黄象谦 张学庸
黄志强 赵东海
黎介寿 周殿元
刘耕陶 社长总编辑 马连生
裘法祖 中文编辑 潘伯荣
汤钊猷 王瑾晖
王宝恩 英文编辑 朱丽虹
危北海 排版 李少华
吴孟超 校对 李天华
吴咸中

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
030001, 山西省太原市双塔西街 77 号
E-mail:wcjd@wjgnet.com
出版 世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市 2345 信箱
E-mail: wcjd @ wjgnet.com
http://www.wjgnet.com
电话 (010)85381892
传真 (010)85381893
印刷 北京科信印刷厂
发行 国内 北京报刊发行局
国外 中国国际图书贸易总公司
(100044, 北京 399 信箱)
订购 全国各地邮电局
邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023, 北京市 2345 信箱)
电话:(010)85381892
传真:(010)85381893
2003 年版权归世界胃肠病学杂志社所有

本刊已被国内外
检索系统收录
美国《化学文摘(CA)》
荷兰《医学文摘库/医学文摘(EM)》
俄罗斯《文摘杂志(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.

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

张忠东, 成军, 钟彦伟, 杨倩, 王业东, 董菁, 杨艳杰, 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

张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061

张忠东, 男, 34岁, 汉族, 主治医师, 西安交通大学第一医院传染科2000年级内科传染病学硕士学位研究生, 主要研究乙型肝炎病毒的基因表达调控。

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 characterization of a human hepatocyte protein, carboxypeptidase N, which binds and activates core promoter of hepatitis B virus

Zhong-Dong Zhang, Jun Cheng, Yan-Wei Zhong, Qian Yang, Ye-Dong Wang, Jing Dong, Yan-Jie Yang, Shu-Lin Zhang

Zhong-Dong Zhang, Jun Cheng, Yan-Wei Zhong, Qian Yang, Ye-Dong Wang, Jing Dong, Yan-Jie Yang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing, 100039, China

Shu-Lin Zhang, The First Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shann'xi Province, 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: Infection of hepatitis B virus (HBV) causes acute and chronic hepatitis and is closely associated with the development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). Molecular biological studies have considerably advanced our understanding of how the HBV genome operates, providing important new clues to the natural history of HBV-related diseases and, potentially, new therapeutical avenues. The HBV genome consists of 3.2 kb of circular DNA encoding four overlapping reading frames driven by promoter and enhancer elements. The HBV core promoter has been especially targeted for detailed molecular analysis, for its pivotal role in the hepatotropism and early life cycle of HBV. The core promoter can be divided into two elements: the basal core promoter (BCP) and the core upstream regulatory sequence (CURS). We previously had used phage display to screen the human liver cDNA library. A binding-protein of HBV core promoter, homologous with carboxypeptidase N (CPN), has been identified. Carboxypeptidase N is a plasma metalloprotease that cleaves basic amino acid residues from the C terminal of peptides and

proteins. The enzyme plays a central role in regulating the biologic activity of peptides such as kinases and anaphylatoxins. The aim of this study was to observe the effect of carboxypeptidase N on HBV core promoter expression, to construct recombinant plasmid for transfection into cell and to investigate the role of carboxypeptidase in replication and expression of HBV DNA.

METHODS: PCR was performed to amplify the gene of HBV core promoter from the plasmid pCP10 containing the whole fragment of HBV. The core promoter region was amplified using the following primers: sense, 5'-ACG CGT CCA AGG TCT TAC ATA AG-3', and antisense, 5'-GCT AGC ATG ATT AGG CAG AGG TG-3', (spanning the HBV nucleotides 1643 nt to 1849 nt). Subcloning and sequencing of PCR products were performed by using the TA cloning kits. After *Mlu*I and *Nhe*I digestion the sizes of the inserts were determined by agarose gel electrophoresis. The fragments were introduced into the restriction sites *Mlu*I and *Nhe*I of the multiple cloning sites of the pCAT basic (without any promoter) or promoter reporter. Equally, PCR was performed to amplify the gene of carboxypeptidase N, using the following primers: sense, 5'-GAA TTC ATG CTC GGG GAT CCG AAT TC-3', and antisense, 5'-GGA TCC TCA AGA CCC GTT TAG AGG CC-3'. After *Eco*R I and *Bam*H I digestion, the PCR fragments were cloned into the restriction sites *Eco*R I and *Bam*H I of the multiple cloning sites of the pcDNA3.1(-). Murine fibroblast cell NIH 3T3 were in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10 % fetal bovine serum under 5 % CO₂ at 37 °C. DNA transfection by the liposomes method was performed. For analysis, the cells were harvested 48 h after transfection. Transfection efficiency was routinely checked by cotransfecting 0.2 µg of pCAT as an internal standard.

RESULTS: HBV core promoter gene was successfully cloned into pCAT named pCAT-CP. Carboxypeptidase N gene was successfully cloned into pcDNA3.1 (-) named pcDNA3.1(-)-CPN. The recombined vectors were transferred into NIH 3T3 cell simultaneously to measure the expression of CAT. The results showed that the HBV core promoter of expression was upregulated 5-6 fold by the expression of carboxypeptidase N.

CONCLUSION: Our findings suggest that carboxypeptidase N could bind HBV core promoter *in vivo*, and upregulate the expression of HBV core promoter, which pave the way for further studying the regulatory mechanism of HBV DNA.

Zhang ZD, Cheng J, Zhong YW, Yang Q, Wang YD, Dong J, Yang YJ, Zhang SL. Cloning and characterization of a human hepatocyte protein, carboxypeptidase N, which binds and activates core promoter of hepatitis B virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1131-1134

摘要

目的: 乙型肝炎病毒(HBV)的感染, 不仅引起急、慢

性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化、肝细胞癌的发生发展密切相关. 为深入研究 HBV 调节表达的机制, 我们应用噬菌体展示技术, 以 HBV 核心启动子 DNA 片段为固相支持物, 筛选肝细胞 cDNA 文库, 获得 HBV 核心启动子的肝细胞结合蛋白 - 羧肽酶 N(CPN). CPN 是一种从多肽和蛋白质 C 端氨基酸残基分离的血浆金属蛋白酶, 他在调节激肽和过敏毒素的生物活性上起关键作用. CPN 是分子量 280 kD 的四聚体, 包含两个 50 kD 酶性亚单位和两个 83 kD 调节亚单位. 核心启动子产生两个 3.5 kb RNA: 前 - 核心和前基因组 RNA. 前 - 核心 RNA 编码前 - 核心蛋白和 e 抗原, 前基因组 RNA 不仅作为 mRNA 编码核心蛋白和聚合酶蛋白, 而且与病毒蛋白一起包埋入核衣壳, 作为模板逆转录. 前基因组 RNA 的表达调控在病毒复制周期中起着关键作用. 核心启动子分为两部分: 基本核心启动子和核心上游调节元件(CURS), 其上游为负性调节元件(NER, 1616-1621 nt). CPD 在体内与 HBV 核心启动子结合的作用还不清楚, 我们分别构建 HBV 核心启动子及羧肽酶 N 的重组载体, 通过脂质体转染 NIH 3T3 细胞, 研究 CPN 对核心启动子的调节表达.

方法: 根据 HBV 核心启动子及羧肽酶 N 的序列设计引物, 在核心启动子的引物两端引入 Mlu I 和 Nhe I 的酶切位点, 在羧肽酶 N 的引物两端引入 EcoR I 和 BamH I 的酶切位点. 用聚合酶链反应(PCR)的方法分别扩增 HBV 核心启动子和羧肽酶 N 基因, 克隆到 pGEM-Teasy 载体上. 核心启动子经 Mlu I 和 Nhe I 双酶切回收连接到同样酶切的 pCAT 载体上, 羧肽酶 N 经 EcoR I 和 BamH I 双酶切回收连接到同样酶切的 pcDNA3.1(-)质粒上, 构建 HBV 核心启动子的报告载体及羧肽酶 N 的真核表达载体, 脂质体法瞬时转染 NIH 3T3 细胞.

结果: HBV 核心启动子和羧肽酶 N(CPN)的 PCR 产物经 1 % 琼脂糖电泳鉴定与预期大小符合, 分别为 206 bp 和 580 bp. 重组载体经双酶切鉴定后, 证明 HBV 核心启动子的报告载体及羧肽酶 N (CPN)的真核表达载体构建成功. 脂质体法瞬时转染 NIH 3T3 细胞 48 h 后, 用 ELISA 法检测 β -gal 的表达, 显示核心启动子在羧肽酶 N(CPN)的影响下, 其活性有大约 5-6 倍的增加. 通过体内实验证明羧肽酶 N(CPN)可以上调 HBV 核心启动子的表达.

结论: HBV 核心启动子结合蛋白羧肽酶 N (CPN)与 HBV 核心启动子共转染细胞, 明显调节 HBV 核心启动子的表达, 为进一步研究 HBV 复制的分子生物学机制提供了新的理论基础.

张忠东, 成军, 钟彦伟, 杨倩, 王业东, 董菁, 杨艳杰, 张树林. 羧肽酶 N 调节乙型肝炎病毒核心启动子表达活性的研究. 世界华人消化杂志 2003;11(8): 1131-1134

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1131.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)的感染, 不仅引起急、慢性病毒

性肝炎, 而且与肝纤维化、肝细胞癌的发生发展密切相关^[1,2]. 但是, 目前除了部分慢性乙型肝炎患者对干扰素 α (IFN α), 或部分患者对于核苷类似物拉米夫定的治疗有部分应答之外, 还缺乏确切有效的治疗方法^[3,4]. 其原因是对 HBV DNA 复制的分子生物学机制还不十分清楚.

我们利用噬菌体展示技术, 以 DNA 为固相支持分子, 筛选肝细胞 cDNA 文库, 获得了和 HBV 核心启动子结合的肝细胞蛋白 - 羧肽酶 N (CPN), 在国内外首次进行了以噬菌体展示技术筛选启动子的结合蛋白的研究. 为深入研究其和 HBV 核心启动子结合的机制及功能, 我们分别构建报告载体和表达载体, 进行共转染细胞, 阐明二者相互作用的意义, 为进一步研究 HBV 复制的分子生物学机制提供了新的理论基础.

1 材料和方法

1.1 材料 质粒 pGEM-Teasy 和 pcDNA3.1(-)(Promega 公司), Taq 酶、琼脂糖、dNTP、T4 DNA 连接酶、RNA 酶、玻璃奶 DNA 回收试剂盒(博大科技), EcoR I、BamH I、Mlu I、Nhe I (购置宝生物公司), 热循环仪、凝胶成像仪、酶联黏附读数仪、大肠杆菌 DH5 α 、pCP10 质粒为本实验室保存.

1.2 方法

1.2.1 HBV 核心启动子的扩增和克隆 根据 HBV ayw 的基因序列, 用 Vector NT I 软件设计引物, 在编码区的上游和下游分别设计合成一对寡核苷酸引物, P1: 5' -ACG CGT CCA AGG TCT TAC ATA AG-3', P2: 5' -GCT AGC ATG ATT AGG CAG AGG TG-3', 在引物 5' 端分别引入 Mlu I 和 Nhe I 位点, 由赛百盛公司合成.

1.2.2 羧肽酶的扩增和克隆 根据羧肽酶 N cDNA 序列, 包含从 ATG 至 TAA 为止的全编码区, 用 Vector NT I 软件设计引物. 引物由上海博亚公司合成. P1: 5' -GAA TTC ATG CTC GGG GAT CCG AAT TC-3' 在 5' -端引入 EcoR I 酶切位点, P2: 5' -GGA TCC TCA AGA CCC GTT TAG AGG CC-3' 在 5' -端引入 BamH I 酶切位点.

1.2.3 重组报告载体 pCAT-CP 的构建与鉴定 将 HBV 核心启动子 PCR 纯化产物与 pGEM-Teasy 载体混合, 在 16 $^{\circ}$ C 条件下用 T4 DNA 连接酶连接过夜, 随后转化用氯化钙法制备的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在铺有 IPTG/X-gal 的氨苄西林平板上进行蓝白斑菌落筛选, 挑取白色菌落用碱裂解法提取质粒, 进行酶切鉴定. 此质粒及 pCAT Basic 均用 Mlu I 和 Nhe I 双酶切, 回收相应的酶切片段, 在 16 $^{\circ}$ C 条件下用 T4 DNA 连接酶连接过夜, 随后转化用氯化钙法制备的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 随机挑选在 LB/Amp 平板上生长的菌落, 碱裂解法提取质粒, 进行 Mlu I 和 Nhe I 双酶切鉴定.

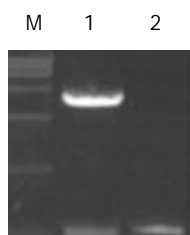
1.2.4 重组表达载体 pcDNA3.1(-)-CPN 的构建与鉴定 将噬斑的 PCR 纯化产物与 pGEM-Teasy 载体混合, 在 16 $^{\circ}$ C 条件下用 T4 DNA 连接酶连接过夜, 随后转化用

氯化钙法制备的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在铺有 IPTG/X-gal 的氨苄西林平板上进行蓝白斑菌落筛选, 挑取白色菌落用碱裂解法提取质粒, 进行酶切鉴定. 此质粒及载体 pcDNA3.1(-)均用 EcoR I 和 BamH I 双酶切, 回收相应的酶切片段, 在 16 $^{\circ}\text{C}$ 条件下用 T4 DNA 连接酶连接过夜, 随后转化用氯化钙法制备的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 随机挑选在 LB/Amp 平板上生长的菌落, 碱裂解法提取质粒, 进行 EcoR I 和 BamH I 双酶切鉴定.

1.2.5 转染细胞 分别用磁珠法提取质粒, 将 pCAT basic、pCAT+pcDNA3.1(-)、pCAT-CP 和 pCAT-CP+ pcDNA3.1(-)-CPN 通过脂质体瞬时共转染 NIH 3T3 细胞, 用 ELISA 法检测氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达, 研究 pcDNA3.1(-)-CPN 对 pCAT-CP 的功能影响.

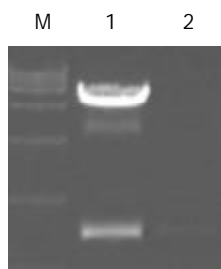
2 结果

2.1 pCAT-CP 重组质粒的酶切鉴定 利用自行设计的引物 P1/P2 成功扩增出 HBV 核心启动子基因片段, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增片段约为 206 bp, 与预期大小符合, 且无非特异扩增现象. 用双酶切所得片段, 连接到用相同的 Mlu I 和 Nhe I 所切的 pCAT 中经酶切鉴定结果正确. 表明 pCAT-CP 质粒构建成功(图1).



Lane M: 15 000 DNA Ladder; Lane 1: pCAT-CP Mlu I /Nhe I cut; Lane 2: HBV core promoter PCR
图1 pCAT-CP 重组质粒的酶切鉴定.

2.2 pcDNA3.1(-)-CPN 重组质粒的酶切鉴定 利用自行设计的引物 P3/P4 成功扩增出羧肽酶N基因片段, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增片段约为 580 bp, 与预期大小符合, 且无非特异扩增现象. 用双酶切所得片段, 连接到用相同的 EcoR I 和 BamH I 所切的 pcDNA3.1(-)中经酶切鉴定结果正确. 表明 pcDNA3.1(-)-Carb 质粒构建成功(图2).



Lane M: 15 000 DNA ladder; Lane 1: pcDNA3.1(-)-CPN EcoR I / BamH I cut; Lane 2: CPN PCR
图2 pcDNA3.1(-)-CPN 重组质粒的酶切鉴定.

2.3 pcDNA3.1(-)-CPN 对 pCAT-CP 的激活作用 用脂质体法转染 NIH 3T3 细胞, 脂质体用量 6 μl . 培养 48 h 后, 进行 ELISA 检测. 氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达见表1, pCAT-CP 实验组酶的表达是 pCAT 的 3 倍, 而 pcDNA3.1(-)-CPN+pCAT-CP 实验 CAT 的表达是 pCAT-CP 的近 6 倍, 证明 CPN 对 HBV 核心启动子有激活作用.

表1 重组载体共转染 NIH 3T3 细胞氯霉素乙酰转移酶检测结果

质粒	CAT 值
pCAT	0.007
pCAT-CP+pcDNA3.1(-)	0.094
pCAT-CP	0.023
pCAT-CP+pcDNA3.1(-)-CPN	0.130

3 讨论

肝炎病毒感染所引起的一系列肝脏疾病, 发病机制非常复杂, 涉及到肝炎病毒与肝细胞大分子之间的复杂的相互作用^[1-3]. 乙型肝炎病毒是一种严重危害人类健康的致病因子. HBV 的感染除引起慢性乙型肝炎和肝硬化外, 还与肝癌的发生有密切关系^[4-7]. HBV 属嗜肝 DNA 病毒, 其基因组为 3.2 kb 部分双链的环状 DNA. 他的复制需要一个 RNA 中间物 - 前基因组 RNA, 经过反转录产生新的 DNA 分子^[8-10]. HBV 基因组的功能单位十分密集, 高度压缩, 重复利用. 目前已确定有四个主要的开放阅读框架, 分别负责编码核心抗原(pre-C/C)、核酸聚合酶(P)、表面抗原(pre-S/S)和 X 蛋白(X). 这些基因的表达受到顺式元件 - 启动子和增强子的调控^[11-13]. 目前在 HBV 基因组已发现并鉴定的顺式元件有四个启动子(C、X、SP I、SP II)、两个增强子(Enh I 和 Enh II)和糖皮质激素应答元件. 由于病毒的复制是病毒致病机制的重要环节, 病毒基因的表达与调控又是病毒复制研究的核心问题. 另外, 虽然 HBV 感染具有相对泛嗜性的特点, 但是却主要在肝细胞中进行复制, 引起肝脏的病变, 因而推测肝细胞中存在肝细胞特有的蛋白质因子与 DNA 结合, 控制 HBV DNA 复制表达. 因此通过研究与 HBV 基因的表达调控结合的肝细胞特异性蛋白质因子, 对于了解 HBV 的致病机制、HBV 与肝癌的关系以及对乙型肝炎和肝癌的预防和治疗均有重要意义.

核心启动子产生两个 3.5 kb RNA: 前 - 核心和前基因组 RNA. 前 - 核心 RNA 编码前核心蛋白和 e 抗原, 前基因组 RNA 不仅作为 mRNA 编码核心和聚合酶蛋白, 而且与病毒蛋白一起包埋入核衣壳, 作为模板逆转录. 前基因组 RNA 的表达调控在病毒复制周期中起着关键作用. 核心启动子分为两部分: 基本核心启动子和核心上游调节元件(CURS), 其上游为负性调节元件(NER, 1 616-1 621 nt), CURS 能激活邻近下游的 BCP.

真核细胞的基因表达调节虽然发生在多个水平上, 但是主要的还是转录水平和转录后水平上进行调节. 基因表达的调节又分为顺式(cis)调节和反式(trans)调节. 与转录活性有关的启动子结合的转录因子蛋白的结合与

调节尤其重要^[14]. Wolcke et al^[15]应用噬菌体表面展示技术对 DNA 甲基转移酶 M. TaqI 识别的 DNA 序列的结合蛋白进行了筛选. Cicchini et al^[16]以高度分化的以高度分化的 MMH E14 小鼠肝细胞癌细胞细作为来源构建了噬菌体 cDNA 表面展示文库, 研究 DNA- 蛋白之间的相互作用. 以肝脏中富有的转录因子蛋白肝细胞核因子 1 α (HNF1 α) 基因启动子 DNA 作为固相基质进行筛选, 以确定与之结合的蛋白序列.

在国内外我们首次利用噬菌体展示技术^[17-28], 以 DNA 为固相分子, 筛选肝细胞文库, 研究启动子结合蛋白. 获得了与 HBV 核心启动子结合的蛋白, 经同源性比较确定该蛋白与羧肽酶 N(CPN)高度同源, 同源性为 99%. CPN 是由两个 50 kD 小亚单位和两个 83 kD 大亚单位组成的锌指样金属蛋白酶^[29], 小亚单位包含蛋白酶的酶活性, 而糖基化的亚单位保护酶避免降解及从血流中滤过, 亚单位通过非共价键形成四聚体. CPN 由肝脏产生, 进入血流的激肽^[30]、血管舒张素^[30]、血小板因子^[31]这些有生物活性的多肽, 能被 CPN 分离其羧基末端的精氨酸和赖氨酸残基, 也可分离补体 C3a 和 C5a 羧基末端的精氨酸^[30]. 补体级联反应产生的 C3a 和 C5a 能诱导平滑肌舒张、血管舒张和白细胞趋化, 以及肥大细胞释放组胺, CPN 极大地减少 C3a 和 C5a 的生物学活性. CPN 基因 5' - 端的结构分析显示有与肝特异表达相关的转录因子结合位点, 对应三种不同蛋白的 9 个转录因子结合位点位于转录起始位点上游 916 bp. 这三种蛋白分别是肝细胞核因子 5 (HNF-5)、AP-2 和 CCAAT/ 增强子结合蛋白 (C/EBP). HNF-5 是肝特异转录因子, 在 5' - 端有 7 个识别位点. AP-2 在非肝组织表达, 作为抑制子. C/EBP 存在于肝和脂肪组织. 这些研究表明 CPN 局限于肝脏^[2], 而 Sato et al^[31]认为不仅在肝脏, 而且胃、肺、肠、脾、肾也有表达. 而我们的结果与此不完全一致, 为阐明二者结合的意义, 我们分别成功构建了 HBV 核心启动子的报告载体和羧肽酶的表达载体, 将二者共转染 NIH 3T3 细胞, 证明在体内羧肽酶 N 可以明显调节 HBV 核心启动子的表达. 此项实验结果为研究影响 HBV 复制机制开辟了新的思路和途径. 我们准备进一步研究二者在体外的结合特性.

4 参考文献

- 1 成军. 慢性病毒性肝炎发病的机制分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 2 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
- 3 Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997;337:1733-1745
- 4 Yuh CH, Chang YL, Ting LP. Transcriptional regulation of precore and pregenomic RNAs of hepatitis B virus. *J Virol* 1992;66:4073-4084
- 5 Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* 1981;21:1129-1133
- 6 Wright TL, Lau JY. Clinical aspects of hepatitis B virus infection. *Lancet* 1993;342:1340-1344

- 7 Ganem D. Oncogenic viruses. Of marmots and men. *Nature* 1990;347:230-232
- 8 Ganem D, Varmus HE. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem* 1987;56:651-693
- 9 Gerlich WH, Robinson WS. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* 1980;21:801-809
- 10 Robinson WS, Miller RH, Marion PL. Hepadnaviruses and retroviruses share genome homology and features of replication. *Hepatology* 1987;7:645-73S
- 11 Nassal M, Schaller H. Hepatitis B virus replication. *Trends Microbiol* 1993;1:221-228
- 12 Kaneko S, Miller RH. X-region-specific transcript in mammalian hepatitis B virus-infected liver. *J Virol* 1988;62:3979-3984
- 13 Siddiqui A, Jameel S, Mapoles J. Expression of the hepatitis B virus X gene in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:2513-2517
- 14 成军, 李克, 陆荫英, 董菁, 李莉, 王琳, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒调节基因区结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:223-225
- 15 Wolcke J, Weinhold E. A DNA-binding peptide from a phage display library. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2001;20:1239-1242
- 16 Cicchini C, Ansuini H, Amicone L, Alonzi T, Nicosia A, Cortese R, Tripodi M, Luzzago A. Searching for DNA-protein interactions by Lambda phage display. *J Mol Biol* 2002;322:697-706
- 17 Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985;228:1315-1317
- 18 Parmley SF, Smith GP. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 1988;73:305-318
- 19 McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 1990;348:552-554
- 20 董菁, 施双双, 王业东, 钟彦伟, 王刚, 王琳. cDNA 文库噬菌体展示法的建立及乙型肝炎病毒前 S1 蛋白结合蛋白筛选. 解放军医学杂志 2002;27:321-323
- 21 成军, 钟彦伟, 施双双, 倪勤, 夏小兵, 王刚, 刘友昭, 王琳, 刘妍, 杨继珍, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒表面抗原人源单链可变区抗体基因的克隆与鉴定. 肝脏 2000;5:130-133
- 22 钟彦伟, 成军, 施双双, 夏小兵, 王刚, 杨继珍, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. 中华肝脏病杂志 2001;9:217-219
- 23 成军, 钟彦伟, 施双双, 夏小兵, 王刚, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒 E2 蛋白人源单链可变区抗体的可溶性表达. 中国病毒学 2001;16:220-223
- 24 钟彦伟, 成军, 王刚, 田小军, 陈新华, 李莉, 陈菊梅, 张玲霞. 乙型肝炎病毒核心抗原人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. 中国公共卫生 2002;18:153-154
- 25 Levin Y, Skidgel RA, Erdos EG. Isolation and characterization of the subunits of human plasma carboxypeptidase N (kininase I). *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:4618-4622
- 26 Belew M, Gerdin B, Lindeberg G, Porath J, Saldeen T, Wallin R. Structure-activity relationships of vasoactive peptides derived from fibrin or fibrinogen degraded by plasmin. *Biochim Biophys Acta* 1980;621:169-178
- 27 Bokisch VA, Muller-Eberhard HJ. Anaphylatoxin inactivator of human plasma: its isolation and characterization as a carboxypeptidase. *J Clin Invest* 1970;49:2427-2436
- 28 Grange T, Roux J, Rigaud G, Pictet R. Cell-type specific activity of two glucocorticoid responsive units of rat tyrosine aminotransferase gene is associated with multiple binding sites for C/EBP and a novel liver-specific nuclear factor. *Nucleic Acids Res* 1991;19:131-139
- 29 Li L, Liao WS. An upstream repressor element that contributes to hepatocyte-specific expression of the rat serum amyloid A1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264:395-403
- 30 Ren Y, Reddy SA, Liao WS. Purification and identification of a tissue-specific repressor involved in serum amyloid A1 gene expression. *J Biol Chem* 1999;274:37154-37160
- 31 Sato T, Miwa T, Akatsu H, Matsukawa N, Obata K, Okada N, Campbell W, Okada H. Pro-carboxypeptidase R is an acute phase protein in the mouse, whereas carboxypeptidase N is not. *J Immunol* 2000;165:1053-1058



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

