

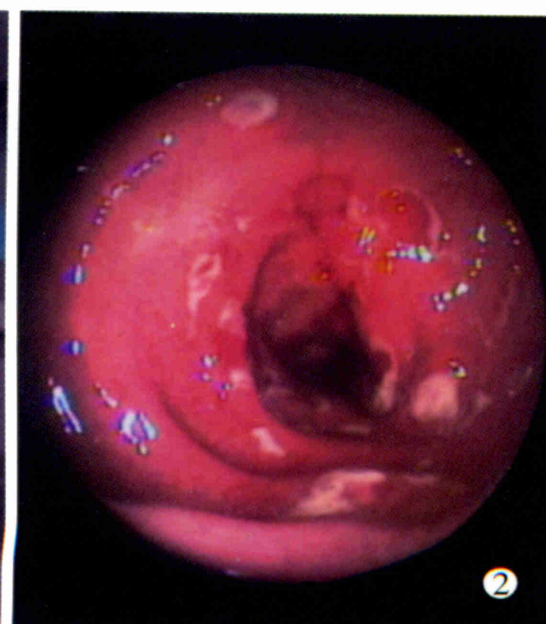
世界华人消化杂志®

**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

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

刘双虎, 谭德明, 侯珏, 胡国龄, 中南大学湘雅医院传染病科 湖南省长沙市 410008

刘双虎, 男, 1963-02-28, 湖南省攸县人, 汉族, 1986年中山医科大学本科毕业, 1995年湖南医科大学博士毕业, 副教授. 主要从事传染病的临床与基础研究, 主要研究方向为病毒性肝炎.

卫生部科研基金课题, No.98-1-120

项目负责人: 刘双虎, 410008, 湖南省长沙市湘雅路 141 号, 中南大学湘雅医院传染病科. liushuanghu@hotmail.com

电话: 0731-4327221 传真: 0731-4327332

收稿日期: 2002-11-19 接受日期: 2002-12-02

Cloning and expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) gene in Chinese

Shuang-Hu Liu, De-Ming Tan, Jue Hou, Guo-Ling Hu

Shuang-Hu Liu, De-Ming Tan, Jue Hou, Guo-Ling Hu, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Xiangya Hospital, Central-South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Supported by Natural Science Foundation of the Ministry of Health of China, No.98-1-120

Correspondence to: Dr. Shuang-Hu Liu, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Xiangya Hospital, Central-South University, Changsha 410008, Hunan Province, China. liushuanghu@hotmail.com

Received: 2002-11-19 Accepted: 2002-12-02

Abstract

AIM: To clone the Chinese gene of TIMP-1 and express the fusion protein MBP-TIMP-1.

METHODS: The fragment of TIMP-1 gene from the liver tissue of indigenous Hunan residents was amplified by RT-nest-PCR and it was cloned, sequenced by gene recombinations techniques. Fusion protein MBP-TIMP-1 was expressed in *E.coli*, analysed by SDS-PAGE and Western blot and purified by affinity chromatography.

RESULTS: The sequence of cloned Chinese TIMP-1 gene was 624 bp. It is homologous with the reported other human TIMP-1 gene sequence. Fusion protein MBP-TIMP-1 was 66 kd and is of the antigenicity of TIMP-1. The MBP-TIMP-1 was purified by affinity chromatography.

CONCLUSION: The Chinese gene of TIMP-1 was cloned and MBP-TIMP-1 was expressed and purified successfully *in vitro*. It may be useful to the diagnosis of liver fibrosis.

Liu SH, Tan DM, Hou J, Hu GL. Cloning and expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) gene in Chinese. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1164-1167

摘要

目的: 克隆和表达中国人金属基质蛋白酶组织抑制因子-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases-1; TIMP-1) 基因, 获

得具有抗原性的人TIMP-1蛋白.

方法: 用 RT-nest-PCR 扩增 TIMP-1 编码区基因片段, 用基因重组技术构建含该片段的重组质粒并进行序列分析. 在大肠杆菌 *E.coli* 中表达融合蛋白 MBP-TIMP-1, 用 SDS-PAGE 和 Western-blot 对重组蛋白进行分析鉴定, 并用亲和层析试剂盒纯化融合蛋白 MBP-TIMP-1.

结果: 经核苷酸序列分析表明, 本研究克隆的中国人 TIMP-1 为 624bp, 与报道的国外 TIMP-1 基因序列同源. 经 SDS-PAGE 和 Western blot 表明, 表达的融合蛋白 MBP-TIMP-1 分子质量为 66 Ku, 具有 TIMP-1 的抗原性, 并可进行亲和层析纯化.

结论: 克隆了中国人 TIMP-1 基因, 表达和纯化了具有免疫原性的融合蛋白 MBP-TIMP-1, 他将对于肝纤维化的诊断有一定作用.

刘双虎, 谭德明, 侯珏, 胡国龄. 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. *世界华人消化杂志* 2003;11(8):1164-1167

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1164.asp>

0 引言

慢性肝病是我国常见病及多发病^[1-3], 肝纤维化是各种慢性肝病向肝硬化发展的重要途径, 其机制十分复杂^[4-6]. 目前的研究结果认为肝细胞外基质(extracellular matrix; ECM)合成与降解的失衡, 导致 ECM 在肝脏内过度沉积是肝纤维化形成的主要机制^[7-9]. ECM 的代谢受基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases; MMP)及 TIMP 的共同调节^[10]. 在慢性肝病患者的血清中, TIMP-1 的含量随肝纤维化的进展而增加, 认为 TIMP 上升是机体降解胶原的能力下降, 肝硬化形成的标志^[11, 12]. 为了进一步研究 TIMP-1 的临床应用价值, 提高我国肝硬化的临床诊断水平, 我们利用基因工程技术, 克隆, 表达了中国人 TIMP-1 基因, 对其蛋白质进行抗原性分析, 将为进一步研究国产的血清 TIMP-1 诊断试剂盒奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 取自于我院外科肝叶切除术患者的肝组织, 提取总 RNA, 经 RT-nest-PCR 扩增 TIMP-1 基因. PCR 引物根据文献(Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 2407)报

告的 TIMP-1 序列合成. 外引物为(+)-5-CCA GAG AGA CAC CAG AGA-3, (-)-5-TGT GCA GGC TTC AGC TTC -3; 内引物为(+)-5-TTA GGA TCC ACC ATG GCC CCC TTT G-3; (-)-5-ACG AAG CTT GAT TCA GGC TAT CTG G-3. 1.2 方法 应用 TRIzol Reagent RNA 分离液(GIBCO BRL)提取肝组织总 RNA, 用 MMLV 逆转录酶(Promega)按试剂盒要求合成 cDNA, 然后行 Nest-PCR 扩增 TIMP-1 基因, PCR 条件为: 94 °C, 4 min → 94 °C, 1 min, 58 °C, 1 min, 72 °C, 1 min, ×35 循环 → 72 °C, 5 min. 第 1 次 PCR 与第 2 次 PCR 条件相同. PCR 产物为 648 bp, 经纯化后与 PUC-T 质粒克隆载体(上海生工公司)连接, 转化于 JM109 大肠杆菌, 经蓝/白筛选及质粒 DNA 限制性内切酶片段分析获取含人 TIMP-1 基因片段的重组质粒(PUC-TIMP-1), 对此重组质粒用 ABI PRISM (TM)377XL DNA Sequencer 全自动测序仪(PE 公司)进行序列分析, 并与已报道的人与动物 TIMP-1 的序列进行比较. 用限制酶 BamH1 及 Hind III 从重组质粒 PUC-TIMP-1 中切出 TIMP-1 基因片段, 将其克隆于表达载体 PMAL-CRI 中麦芽糖结合蛋白(MBP)表达基因的下游, 转化入大肠杆菌, 经前述筛选方法取得含 TIMP-1 基因片段的重组表达质粒 PAML-TIMP-1 (PT-1)及其基因工程菌 PMAL-TIMP-1/JM109 (PT-1/JM109), 将上述基因工程菌 PT-1/JM109 过夜增生, 按 1:50 的比例接种于 LB 培养基 500 ml, 继续培养到 A₆₀₀ 为 0.6 时加入 IPTG 到终浓度为 0.3 mmol/L, 诱导表达 4 h, 收集细菌, 进行 SDS-PAGE, 和 Western blot 分析(一抗为兔抗人 TIMP-1 IgG 抗体, 二抗为羊抗兔 IgG 抗体, 二者均购于武汉博士德生物试剂公司)以确定其抗原性. 最后用 IPTG 大量诱导增生的基因工程菌 PT-1/JM109, 收集细菌, 菌体经超声波破碎后, 用 Amyrose resin 层析试剂盒 (new england biolabs, USA)对表达的融合蛋白进行亲和层析(按说明书进行), 纯化融合蛋白 MBP-TIMP-1.

2 结果

2.1 人 TIMP-1 基因片段的序列 我们克隆的人 TIMP-1 基因片段, 经 DNA 序列分析, 此克隆片段编码区序列为 624 bp(图 1). 与已报道的国外 TIMP1 基因相比较, 长度相同, 变异不明显; 但与鼠, 羊的 TIMP1 基因相比较, 差异较大(表 1).

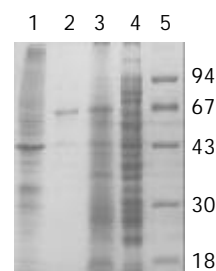
表 1 中国人 TIMP-1 基因片段核苷酸(nt)与推断氨基酸(aa)序列的比较 (%)

	人 TIMP1 ^[13]	人 TIMP1 ^[14]	鼠 TIMP-1 ^[15]	羊 TIMP-1 ^[16]
nt	99.35	99.67	72.81	80.86
aa	99.52	99.04	76.32	86.73

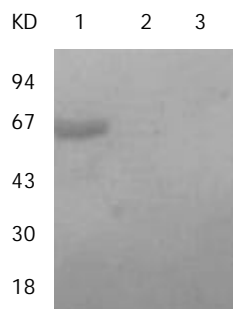
1	atggccccctt gagccccctgct tctggcatcctg ttgtgctgtg	48
	M A P F E P L A S G I L L L L W	
49	ctgatagccccc agcaggcctgct acctgtgtccct cccaccacag	96
	L I A P S R A C T C V P P H P Q	
97	acggccttctgc aattccgacctc gtcacaggggcc aagttcgtggg	144
	T A F C N S D L V I R A K F V G	
145	acaccagaagtc aaccagaccacc ttataccagcgt tatgagatcaag	192
	T P E V N Q T T L Y Q R Y E I K	
193	atgaccaagatg tataaagggttc caagccttaggg gatgccgtgac	240
	M T K M Y K G F Q A L G D A A D	
241	atccggttctgc tacacccccgcg atggagagtgtc tgcggatacttc	288
	I R F V Y T P A M E S V C G Y F	
289	cacaggtccac aaccgcagcgag gagtttctcatt gctgaaaaacta	336
	H R S H N R S E E F L I A G K L	
337	caggatggactc ttgcacatcacc acctgcagtttc gtgctccctgg	384
	Q D G L L H I T T C S F V A P W	
387	aacagcctgagc ttagctcagcgc cggggcttcacc aagacctacact	432
	N S L S L A Q R R G F T K T Y T	
433	gttgctgtgag gaatgcacagt ttccctgttta tccatcccctgg	480
	V G C E E C T V F P C L S I P T	
481	aaactgcagagt ggcactcattgc ttgtggacggac cagctctccaa	528
	K L Q S G T H C L W T D Q L L Q	
529	ggctctgaaaag ggcttcacgtcc cgtcacctgtcc tgcctgcctcgg	576
	G S E K G F Q S R H L A C L P R	
577	gagccagggtg tgcacctggcag tccctgcgttcc cagatagcctga	624
	E P G L C T W Q S L R S Q I A	

图 1 中国人 TIMP-1 基因片段的序列.

2.2 TIMP1 基因片段的体外表达 基因工程菌 PT-1/JM109 在 IPTG 的诱导下在体外进行了表达, 经 SDS-PAGE 电泳后可以看到一条 66 Ku 的浓蛋白带, 而在空载质粒菌 PMAL/JM109 及单纯的 JM109 泳道均无此蛋白带. 此蛋白带为 MBP (42 Ku) 与 TIMP-1 (24 Ku) 的融合蛋白 MBP-TIMP-1, 大小约 66 Ku. 此结果与预期的相符合. 在 PMAL/JM109 泳道上, 可见 42 Ku 的浓蛋白带, 此为 MBP. 用 Amyrose resin 层析试剂盒对表达的融合蛋白进行亲和层析, 得到了纯化的融合蛋白 MBP-TIMP-1 (图 2). 为了进一步证明 66 Ku 蛋白含有 TIMP-1, 进行了 Western blot 分析, 结果表明 66 Ku 蛋白能与兔抗人 TIMP-1 IgG 抗体起反应, 形成浓显色带, 而与 MBP 无反应, 在空载质粒菌 PMAL/JM109 及单纯的 JM109 泳道均无显色带形成(图 3).



1 PMAL/JM109; 2 纯化的融合蛋白 MBP-TIMP-1; 3 PT-1/JM109; 4 JM109; 5 标准蛋白质分子量(94 Ku, 67 Ku, 43 Ku, 30 Ku, 18 Ku)
图 2 表达产物的 SDS-PAGE 分析.



1 PT-1/JM109; 2 PMAL/JM109; 3 JM109 标准蛋白质分子质量(94 Ku, 67 Ku, 43 Ku, 30 Ku, 18 Ku)

图3 表达产物的 Western blot 分析。

3 讨论

肝纤维化是慢性肝病的主要发展过程, 其机制比较复杂, 众多的细胞因子参与了肝纤维化和肝硬化形成过程的调节^[17-20], 但肝硬化形成最终与 ECM 的降解失衡, ECM 在肝脏中沉积有关^[21-24]. TIMP-1 是调节肝内 ECM 沉积的重要因素, 主要通过抑制 MMPs 对 ECM 的降解, 使 ECM 在肝脏内沉积增加, 也可通过抑制已活化的星状细胞的细胞凋亡, 使得星状细胞持续活化, 加剧了肝内的 ECM 形成和堆积, 促进了肝硬化的形成^[25, 26]. 尽管 Vaillant et al^[27]未能观察到血清 TIMP-1 水平升高与曼氏血吸虫病患者肝纤维化进展的相互关系, 但很多研究发现在肝炎肝硬化患者的 TIMP-1 的水平明显的高于无肝硬化的病毒性肝炎患者^[28-30]. 王泰龄 et al^[31]发现与肝纤维化有关的血清标志, 包括 IV 型胶原、层连蛋白、透明质酸和 TIMP-1 等与肝组织的炎症活动度和肝纤维化呈正相关. 聂青和 et al 应用致敏红细胞固相吸附试验(solid-phase absorption to sensitized erythrocytes; SPASE)检测了肝炎肝硬化患者血清中 TIMP-1 的阳性率达 73.6%, 明显高于急性(16.4%)和慢性(33.3%)肝炎组. 在血清 TIMP-1 阳性的肝硬化患者的肝组织中的 TIMP-1 表达的阳性率达 100%. 说明 TIMP-1 的阳性与肝纤维化的进展有关, 对肝硬化患者 TIMP-1 是一种非常具有诊断价值的指标^[32, 33]. Walsh et al^[34]研究了 43 例慢性丙型肝炎患者肝组织病理学改变与血浆 TIMP-1 的相互关系, 发现 TIMP-1 水平的升高与肝组织炎症活动度, 包括肝细胞坏死、门区炎症细胞浸润和纤维化程度呈正相关, 指出血浆 TIMP-1 正常者可排除晚期肝病; 而血浆 TIMP-1 升高对慢性肝病的进展期具有较大的诊断价值. Boeker et al^[35]分析了不同血清肝纤维化标志的意义, 发现血清 TIMP-1 水平随慢性肝病的进展稳步递升, 对肝纤维化诊断的敏感性和特异性分别为 67% 和 88%, 对肝硬化诊断的敏感性近 100%, 特异性也高达 75%; 认为 TIMP-1 对肝硬化的诊断价值大于其他有关的血清酶学和血清白蛋白的检测。

由于 TIMP-1 对肝炎肝硬化的诊断价值得到了充分的肯定, 我们认为有必要克隆和表达 TIMP-1 基因, 让其为我们对肝硬化患者诊断服务, 提高肝硬化的临床诊断水平. 为此我们用 RT-nest-PCR 方法扩增了中国

人 TIMP-1 基因序列, 其长度为 624 bp. 与国外报道的 TIMP-1 基因序列相比较, 长度相等, 核苷酸和氨基酸序列的同源性分别为 99.35% 和 99.67%. 提示不同人种之间 TIMP-1 无明显差异. 与鼠, 羊等动物的 TIMP-1 基因序列相比较, 其同源性分别为 72.81% 和 80.86%, 提示 TIMP-1 基因序列存在一定的种属差异性。

我们将 TIMP-1 基因片段亚克隆到表达质粒 PMAL-CRI 表达 MBP 的基因下游, 在体外用大肠杆菌 JM109 经 IPTG 诱导表达了融合蛋白 MBP-TIMP-1, 经 SDS-PAGE 分析, 该蛋白分子量为 66 KD, 与预期的大小相符. 用 Amyrose resin 层析试剂盒对该融合蛋白进行亲和层析, 得到了纯化的融合蛋白 MBP-TIMP-1 (图3). 为了证明 MBP-TIMP-1 具有一定的诊断价值, 我们用兔抗人 TIMP-1 IgG 抗体对此蛋白进行了 Western blot 分析, 结果表明 MBP-TIMP-1 可与兔抗人 TIMP-1 IgG 抗体起反应, 形成显色带, 而单纯的 MBP 及大肠杆菌菌体蛋白与兔抗人 TIMP-1 IgG 抗体不起反应, 无显色带形成 (图4), 提示本研究表达的融合蛋白具有 TIMP-1 的抗原活性. 研究结果表明本研究成功克隆了人 TIMP-1 基因, 表达和纯化了具有 TIMP-1 抗原活性的融合蛋白 TIMP-1, 为进一步建立人 TIMP-1 诊断试剂盒奠定了基础. 我们将进一步研究应用 MBP-TIMP-1 融合蛋白检测 TIMP-1 的价值。

4 参考文献

- 辛绍杰, 张玲霞, 朱传琳, 胡谨华, 段学章, 张敏, 游绍莉, 胡良平, 皇甫玉珊, 赵志海, 赵景民, 毛远丽. 慢性病毒性肝炎临床与病理的诊断标准. 世界华人消化杂志 2001;9:726-727
- 周永兴. 隐匿性 HBV 感染是一个潜在的威胁. 世界华人消化杂志 2003;11:246-248
- 游晶, 庄林, 唐宝璋, 杨惠, 杨微波, 李武, 张宏丽, 张艳梅, 张禄, 严绍明. 干扰素联合胸腺肽治疗慢性乙型肝炎. 世界华人消化杂志 2001;9:388-391
- 吴君, 程明亮, 丁一生, 刘仁才, 李佳, 王万灵, 胡莲. 病毒性肝炎肝硬化危险因素 5 年追踪调查. 世界华人消化杂志 2000;8:1365-1367
- 白文元, 姚希贤, 冯丽英. 肝纤维化的研究现状. 世界华人消化杂志 2000;8:1267-1268
- Schneiderhan W, Schmid-Kotsas A, Zhao J, Grunert A, Nussler A, Weidenbach H, Menke A, Schmid RM, Adler G, Bachem MG. Oxidized low-density lipoproteins bind to the scavenger receptor, CD36, of hepatic stellate cells and stimulate extracellular matrix synthesis. *Hepatology* 2001;34:729-737
- 周光德, 赵景民. 细胞外基质在肝内的代谢与肝纤维化的形成. 世界华人消化杂志 2002;10:57-59
- 刘成海, 李风华, 顾宏图, 胡义扬, 刘平, 刘成. γ -干扰素对大鼠二甲基亚硝胺肝纤维化肝脏胶原代谢的作用. 世界华人消化杂志 2002;10:313-316
- 谢清芬, 林勇. 细胞外基质降解与肝脏纤维化治疗. 世界华人消化杂志 2002;10:61-63
- 孟二红, 赵景民, 王松山, 刘旺霞, 刘平, 周光德, 张泰和. 基质金属蛋白酶在非酒精性脂肪性肝炎患者肝组织中的表达. 世界华人消化杂志 2002;10:1257-1260
- 崔立红, 叶剑雄. 细胞外基质在肝脏纤维化诊断中的应用. 世界华人消化杂志 2002;10:60-61
- 谢玉梅, 聂青和, 周永兴, 程勇前, 康文臻. 地高辛素标记探针原位杂交技术检测肝硬化组织中 TIMPs mRNA. 世界华人消化杂志 2001;9:251-254
- Carmichael DF, Sommer A, Thompson RC, Anderson DC, Smith CG, Welgus HG, Stricklin GP. Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:2407-2411

- 14 Opbroek A, Kenney MC, Brown D. Characterization of a human corneal metalloproteinase inhibitor (TIMP-1). *Curr Eye Res* 1993;12:877-883
- 15 Okada A, Garnier JM, Vicaire S, Basset P. Cloning of the cDNA encoding rat tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) amino acid comparison with other TIMPs, and gene expression in rat tissues. *Gene* 1994;147:301-302
- 16 Smith GW, Goetz TL, Anthony RV, Smith MF. Molecular cloning of an ovine ovarian tissue inhibitor of metalloproteinases: ontogeny of messenger ribonucleic acid expression and in situ localization within preovulatory follicles and luteal tissue. *Endocrinology* 1994;134:344-352
- 17 刘芳, 刘金星, 曹治宸, 李兵顺, 赵彩彦, 孔丽, 甄真. 慢性肝病患者血清 TGF- β 1 与肝纤维化指标和肝组织病理的关系. 世界华人消化杂志 1999;7:519-521
- 18 黄宇琦, 王宇, 高毅, 魏银燕, 李朝龙, 杨继震. α - 干扰素对大鼠肝纤维化间质胶原酶基因表达的调控. 世界华人消化杂志 2000;8:579-580
- 19 Raetsch C, Jia JD, Boigk G, Bauer M, Hahn EG, Riecken EO, Schuppan D. Pentoxifylline downregulates profibrogenic cytokines and procollagen I expression in rat secondary biliary fibrosis. *Gut* 2002;50:241-247
- 20 崔东来, 姚希贤. 肝纤维化的血清学检测. 世界华人消化杂志 2000;8:683-684
- 21 Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Yanase K, Namisaki T, Imazu H, Fukui H. Tissue inhibitor of metalloproteinases -1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse. *Hepatology* 2002;36(4 Pt 1):850-860
- 22 Sakaida I, Uchida K, Hironaka K, Okita K. Prolyl 4-hydroxylase inhibitor (HOE 077) prevents TIMP-1 gene expression in rat liver fibrosis. *J Gastroenterol* 1999;34:376-377
- 23 Kossakowska AE, Edwards DR, Lee SS, Urbanski LS, Stabbler AL, Zhang CL, Phillips BW, Zhang Y, Urbanski SJ. Altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental biliary fibrosis. *Am J Pathol* 1998;153:1895-1902
- 24 Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:373-384
- 25 Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, Benyon C, Iredale JP. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 2002;277:11069-11076
- 26 宋刘来, 罗和生, 余保平. 肝细胞生长因子抗肝纤维化作用及对 MMP-1, TIMP-1 表达的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:209-213
- 27 Vaillant B, Chiamonte MG, Cheever AW, Soloway PD, Wynn TA. Regulation of hepatic fibrosis and extracellular matrix genes by the Th response: new insight into the role of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *J Immunol* 2001;167:7017-7026
- 28 Boker KH, Pehle B, Steinmetz C, Breitenstein K, Bahr M, Lichtinghagen R. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver and serum/plasma in chronic active hepatitis C and HCV-induced cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 2000;47:812-819
- 29 Lichtinghagen R, Michels D, Haberkorn CI, Arndt B, Bahr M, Flemming P, Manns MP, Boeker KH. Matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-7, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are closely related to the fibroproliferative process in the liver during chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001;34:239-247
- 30 Kasahara A, Hayashi N, Mochizuki K, Oshita M, Katayama K, Kato M, Masuzawa M, Yoshihara H, Naito M, Miyamoto T, Inoue A, Asai A, Hijioka T, Fusamoto H, Kamada T. Circulating matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as serum markers of fibrosis in patients with chronic hepatitis C. Relationship to interferon response. *J Hepatol* 1997;26:574-583
- 31 Wang T, Wang B, Liu X. Correlation of serum markers with fibrosis staging in chronic viral hepatitis. *Zhonghua Binglixue Zazhi* 1998;27:185-190
- 32 Nie QH, Cheng YQ, Xie YM, Zhou YX, Bai XG, Cao YZ. Methodologic research on TIMP-1, TIMP-2 detection as a new diagnostic index for hepatic fibrosis and its significance. *World J Gastroenterol* 2002;8:282-287
- 33 Nie Q, Zhou Y, Xie Y. Expression and significance of tissue inhibitors of metalloproteinases-1 and -2 in serum and liver tissue of patients with liver cirrhosis. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2001;81:805-807
- 34 Walsh KM, Timms P, Campbell S, MacSween RN, Morris AJ. Plasma levels of matrix metalloproteinase-2 (MMP2) and tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and -2 (TIMP-1 and TIMP-2) as noninvasive markers of liver disease in chronic hepatitis C: comparison using ROC analysis. *Dig Dis Sci* 1999;44:624-630
- 35 Boeker KH, Haberkorn CI, Michels D, Flemming P, Manns MP, Lichtinghagen R. Diagnostic potential of circulating TIMP-1 and MMP-2 as markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chim Acta* 2002;316:71-81



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

