

功能基因组学与肝脏疾病研究

成 军

成军, 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
成军, 男, 1963-08-17生, 山东省淄博市人, 汉族. 1986年毕业于第一军医大学军医系, 获医学学士学位, 1989年毕业于军医进修学院, 获传染病学硕士学位, 1994年毕业于北京医科大学, 获传染病学博士学位, 1994-11-17/1997-12-01在美国得克萨斯大学健康科学中心临床免疫与传染病学完成博士后研究, 主任医师. 主要从事传染病特别是病毒性肝炎的临床工作和基础研究, 主要学术研究方向是肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制. 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: 2003-06-24 接受日期: 2003-08-16

摘要

功能基因组学是指应用整体的研究技术阐明基因和蛋白的生物学功能. 因此, 需要发展一些强大的分析技术, 对基因和蛋白质的功能进行研究. 这必将为肝病学的研究提供了一个前所未有的发展机遇. 本文主要论述功能基因组学的先进技术在肝病领域的应用.

成军. 功能基因组学与肝脏疾病研究. 世界华人消化杂志 2004;12(1):1-5
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1.asp>

0 引言

人和模式生物的基因组序列测定完成之后, 今后基因组学(genomics)主要的工作就转移到基因组的结构与功能、表达调控、生物学意义和医学意义等研究领域, 即从结构基因组学(structural genomics)研究转向功能基因组学(functional genomics)研究^[1]. 面对庞大的核苷酸序列数据库, 强烈感到应用传统的理论和技术来解决这么庞大的数据库资料, 显得力不从心. 因此, 要开拓功能基因组的研究, 从理论和技术上必须进行革命性的变革. 功能基因组学的建立和发展, 同时也为肝病学的研究提供了一个前所未有的发展机遇. 随着功能基因组学研究理论和技术的不断进步, 必将进一步推动肝病学的研究进展^[2].

1 功能基因组学的定义和内涵

随着人和各种模式生物基因和基因组测序的完成, 生物学和医学正处在一个深刻变革的时代. 1986年美国科学家 Thomas Roderick 提出了基因组学, 又称为后基因组学(postgenomics), 是指对所有基因进行基因组作图(包括遗传图谱、物理图谱、转录图谱), 核苷酸序列

分析, 基因定位和基因功能分析的一门科学. 基因组学可以分为结构基因组学和功能基因组学, 功能基因组学是指应用整体的研究技术阐明这些基因和蛋白的生物学功能. 各种生物系统是一个复杂的系统, 基因组中基因的序列是一个庞大的数据库, 因此, 需要发展一些强大的分析技术, 代替传统的分析技术, 对这些基因和蛋白质的功能进行研究.

基因是DNA中的一些具有功能的单位, 在遗传信息的流向中, 首先由DNA转录生成中间产物RNA, 然后再翻译成具有生物学功能的蛋白质. 蛋白质是执行生命活动的基本成分. 作为基因的一段DNA, 一般包括调节基因序列和编码基因序列. 功能基因组学的主要任务就是阐明这些基因及其编码产物的结构与功能、表达与调控. 主要包括: 第一, 人类不同个体之间基因序列的区别; 第二, 决定疾病状态和疾病的易感性的人和人之间的基因差别; 第三, 引起疾病的各种病原体, 还包括大肠杆菌、酵母、果蝇、线虫等所有生物合成的每一种蛋白的功能; 第四, 不同蛋白协同完成生命活动的机制; 第五, 在特定细胞类型和特定时间段内, 并不是所有基因都具有表达活性, 决定基因选择性表达和活动的机制; 第六, 在多细胞生物中, 不同的基因表达在形成不同细胞和组织中的作用. 对于一种特定的基因或蛋白来说, 功能基因组学的任务就是阐明调节他复制与表达的因素、与之结合蛋白的类型及功能、对于其他基因类型表达的调节作用, 还要阐明这一基因或蛋白的生物学和医学意义. 这些都是功能基因组学研究的重要内容.

2 启动子DNA结合蛋白的研究

cDNA文库的构建及其应用这一功能基因组的研究技术在启动子DNA结合蛋白的研究中具有十分重要的地位. 表达型cDNA文库的构建及其合适的筛选技术是功能基因组学的重要研究途径之一. 因为一个质量较高的表达型cDNA文库, 代表了一种生物的各种各样的基因表达类型. 表达型cDNA文库的筛选, 不是针对个别的, 或者是少数基因的分析技术, 而是针对全基因组表达的基因范围的分析技术.

例如, 乙型肝炎病毒(HBV)是一种典型的嗜肝DNA病毒, 但是目前关于决定其嗜肝特性的分子生物学机制还不十分清楚^[3-5]. 一般认为, 肝细胞膜上的特异性受体以及肝细胞中存在的HBV基因启动子特异性的转录调节因子是决定HBV嗜肝特点的决定因素. HBV表

面抗原基因启动子 I (SP I) 是典型的肝细胞特异性的启动子, 因此考虑肝细胞中应该存在特有的 HBV SP I 的结合蛋白, 而且对于 SP I 的转录活性具有调节作用. 国内洪源 et al 首先应用酵母单杂交(yeast-one hybrid)技术对于 SP I 的结合蛋白进行筛选. 从肝细胞的 cDNA 文库中筛选得到数种 SP I 结合蛋白, 其中之一是未知功能蛋白, 命名为 SP I 结合蛋白 1(SBP1), 这一与 C/EBP β 同源的转录因子蛋白的表达对于 SP I 的转录活性具有显著的负调节作用, 共转染试验结果表明, SBP1 蛋白的表达对于 SP I 的转录活性的抑制率达到 65-73 %, 从而为 HBV SP I 的分子生物学调节机制开辟了新的研究方向. 酵母单杂交技术是应用表达型文库的筛选技术, 发现、鉴定启动子 DNA 结合蛋白的重要技术类型之一.

噬菌体展示(phage display)技术与表达型 cDNA 文库技术相结合, 也为启动子 DNA 结合蛋白的筛选提供了很有前途的功能基因组学研究技术^[6-13]. 应用噬菌体展示技术筛选启动子 DNA 结合蛋白, 首先如何使启动子 DNA 固相化, 曾经是一个难以解决的问题. 经过认真设计, 我们率先利用一端引物的生物素化修饰以及链亲和素的酶联免疫板包被技术, 巧妙地解决了多聚酶链反应(PCR)技术扩增的启动子 DNA 片段固相化的难题, 然后结合噬菌体展示、表达型 cDNA 文库的筛选, 建立了启动子 DNA 结合蛋白的筛选技术途径. 张忠东 et al 设计合成了 HBV 核心启动子(CP)DNA 序列特异性引物, 其中一条引物进行生物素化修饰, 以含有 HBV 全基因组的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 链亲和素包被, 并使 CP DNA 片段固相化, 然后进行 3-5 轮的肝细胞 T7 噬菌体表达型 cDNA 文库的“黏附-洗脱-扩增”的淘洗, 获得了特异性噬斑. 提取噬斑中的表达载体, 对于插入片段进行序列分析, 意外地发现羧肽酶 N(CPN)可以结合 CP DNA, 报告基因表达载体以及细胞的共转染实验研究结果表明, CPN 的表达可以显著提高 CP 的转录表达活性. 因此, 经过改进的噬菌体展示技术, 结合表达型 cDNA 文库的筛选技术, 为启动子 DNA 结合蛋白的筛选增添了又一个功能基因组研究策略和技术途径.

3 蛋白与蛋白分子之间的结合

研究蛋白-蛋白分子之间的相互结合作用, 是目前功能基因组学研究的重要内容, 同时也是蛋白质组学(proteinomics)的重要研究内容. 高通量筛选一种已知蛋白的结合蛋白, 较为常用的技术是酵母双杂交(yeast-two hybrid)技术、双向电泳(two-dimensional electrophoresis)技术、质谱分析技术(mass spectrometry)等. 利用酵母细胞的转录调节机制设计的蛋白-蛋白之间相互作用的研究技术, 结合表达型 cDNA 文库的筛选, 成为目前研究蛋白-蛋白之间结合的重要的功能基因组学研究技术. 特别是近年来增加了报告基因多重缺陷性培养基的筛选, 提高了真阳性率; 通过可以配合的 α 和 a 型单倍体酵母宿主细胞的引入, 提高了工作效率, 促进了酵

母双杂交技术的应用和发展^[14-23]. 李克 et al 构建了以丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白为诱饵的酵母表达载体, 对于肝细胞表达型 cDNA 文库进行筛选, 获得了一系列的与 HCV 核心蛋白的结合蛋白类型, 从而为阐明 HCV 核心蛋白这种具有多种生物学功能的蛋白的作用机制研究, 奠定了坚实的基础^[15]. 陆荫英 et al 对于 HBV 的各种蛋白的结合蛋白进行了系统的筛选, 王琳 et al 对于肝细胞表达的蛋白类型, 如肝再生增强因子(augmenter of liver regeneration, ALR)等的结合蛋白进行了文库级的筛选, 为阐明这些肝炎病毒蛋白以及人的蛋白的结合蛋白, 奠定了坚实的基础. 对于未知功能基因来说, 阐明其生物学功能具有很大的挑战性, 往往觉得无从下手. 利用功能基因组学的研究技术, 如利用酵母双杂交技术首先对其在细胞内结合的蛋白类型进行筛选, 则对于其细胞内定位和功能的预测具有很大的帮助. 例如, 我们曾经利用酵母双杂交技术对于丙型肝炎病毒核心蛋白的结合蛋白进行筛选, 获得了一种从未报道过的新基因, 命名为 HCBP6, 对于这一新基因的功能进行研究, 首先我们应用同样的酵母双杂交技术, 对 HCBP6 蛋白在细胞内结合的蛋白类型进行筛选研究. 筛选结果显示 HCBP6 蛋白与 Ran 结合蛋白 2(RanBP2)以及 RanBP2 样蛋白能够结合. 对 RanBP2 蛋白的亚细胞定位以及生物学功能进行分析, 发现 RanBP2 蛋白是负责细胞质、细胞核之间的大分子运输有关的核孔蛋白成分, 因而推测 HCBP6 蛋白的亚细胞定位在细胞核膜的胞质侧, 这一推测已经被免疫组织化学染色以及 HCBP6 与绿色荧光蛋白(GFP)的融合蛋白表达策略所证实. 从其结合蛋白的性质来看, HCBP6 可能与生物大分子在细胞质和细胞核之间的运输过程有关. 因此, 研究蛋白与蛋白之间的相互作用, 也是功能基因组学的重要内容和策略^[24-32].

4 差异显示研究技术

细胞甚至完整的生物表现出很大的差别. 这种差别肯定也是由基因及其表达的不同来决定的. 因此对于不同表型的 2 个系统的基因表达类型进行比较, 是发现和阐明表型相关基因的重要的研究策略. 目前研究中这种差异显示新的高通量表达分析方法包括微点阵(microarray)、基因表达序列分析(serial analysis of gene expression, SAGE)、DNA 芯片(DNA chip)、抑制性消减杂交技术(SSH)、代表性差异显示技术(RDA)、随意引物差异显示逆转录多聚酶链反应技术(AP-DD-RT-PCR)等. 目前较为常用的技术是基因芯片技术. 基因芯片技术由于具有高通量筛选的优势, 因此受到人们的广泛关注. 但是, 目前商业化途径的基因芯片的容量毕竟有限, 只是人体基因组中很少的一部分基因序列, 因而具有很大的局限性. 另外, 基因芯片中绝大多数是已知基因, 因此不能据此发现很多新的、未知功能的基因. 相对之下, SSH 是目前较为成熟的克隆与发现反式激活新基

因的不可替代的技术途径. 利用 SSH, 可以筛选得到肝炎病毒蛋白反式激活的靶基因, 不仅可以筛选得到功能已知的基因, 而且还能筛选到功能未知的基因类型. 因此, 抑制性消减杂交技术在相当一段时间内具有广泛的应用前景.

肝炎病毒蛋白具有反式激活作用早已被人们广泛认识到. 肝炎病毒蛋白对于肝细胞基因组表达的反式调节作用, 是肝炎病毒感染与肝细胞癌发生发展密切相关的重要的分子生物学机制^[33-35]. 分子生物学技术的发展, 为研究和克隆肝炎病毒蛋白反式激活基因的克隆化提供了前所未有的机遇. 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒都编码一些具有反式激活作用的肝炎病毒蛋白^[36-44]. HBxAg 的反式激活作用早已为人熟知, 近年来关于乙型肝炎病毒表面抗原截短型中蛋白(MHBs^t)的反式激活作用也逐渐受到重视. MHBs^t 的编码基因首先是在肝细胞癌(HCC)组织中发现的, 由于基因整合的缘故, HBsAg 基因片段不完整地整合到肝细胞基因组中, 从而产生了这种 MHBs^t. 最近, 我们在慢性乙型肝炎患者外周血中也发现了 MHBs^t 的存在, 因此, 关于 MHBs^t 的作用有了更为细致的认识^[45-49]. 如果这种 MHBs^t 在 HCC 的发生发展过程中起作用, 那么不仅仅是整合的 HBV DNA 编码这种反式激活肝炎病毒蛋白, 而且非整合型 HBV DNA 也具有编码这种反式激活剂的功能. 从而认为 MHBs^t 在 HCC 的发生发展过程中具有更为广泛的作用. HCV 病毒的核心蛋白、非结构蛋白 NS3 和 NS5A 都是明确的反式激活蛋白, 在 HCV 相关性的 HCC 发展过程中具有十分重要的作用. HBV 是一种 DNA 病毒, 在复制周期中通过前基因组 RNA 的逆转录机制, 而 HCV 是一种 RNA 病毒, 是 RNA-RNA 的复制过程. 因此, 这两种肝炎病毒的致病机制不完全相同. 但是, 共同的一点是这两种肝炎病毒的基因组都编码一些具有反式激活功能的蛋白质, 与 HCC 的形成机制有关.

我们利用基因芯片技术和 SSH 对于肝炎病毒蛋白的反式激活作用的靶基因进行了研究^[50-59]. 研究的结果既有已知功能的基因, 也发现了一些功能未知的基因类型. 例如, 我们在 MHBs^t 的反式激活研究中, 首先构建了 MHBs^t 的表达载体, 利用细胞的共转染技术, 证实这种 MHBs^t 具有反式激活 SV40 早期即刻启动子的作用. 然后, 利用 SSH, 对于转染表达 MHBs^t 表达载体的 Hep G2 细胞以及转染 pcDNA3 空白载体的 Hep G2 细胞的基因表达谱进行分析. 结果发现了一些 MHBs^t 反式激活的靶基因. 已知功能基因包括原癌基因 c-myc 这种具有复杂功能的肿瘤相关基因. 我们不但利用 SSH 筛选得到这种反式激活的现象, 而且利用 Western blot 杂交技术证实了 MHBs^t 的表达对于 c-myc 基因表达的反式激活效应. 利用 SSH, 我们不但得到一些功能已知基因, 而且还发现了一些肝炎病毒反式激活的未知功能基因, 为进一步研究和阐明肝炎病毒感染引起 HCC 的分子生物学机制, 开创了新的可能的研究方向. 与此同

时, 我们利用基因表达谱基因芯片技术, 对于 HCV 核心蛋白转染的 Hep G2 细胞系与转染空白载体的相同细胞系的基因表达谱进行了分析, 证实了 HCV 核心蛋白对于一部分功能已知基因的反式激活作用, 同时也发现了一些 HCV 核心蛋白反式激活的未知功能的新基因. 因此, 基因芯片技术和 SSH 是目前进行差异表达分析的有效工具^[60].

5 功能缺失表型分析策略

功能缺失表型(loss of function phenotype)的研究策略又称为反向功能基因组学(reverse functional genomics)策略, 是功能基因组的重要的研究策略之一. 功能缺失表型技术包括细胞系或动物的基因敲除(gene knock-out)技术、反义(antisense)技术、RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术等.

细胞系或整体动物的基因敲除技术, 目前虽然在操作上有一定的差别, 但都是利用了细胞内的同源基因重组的技术原理. 为了提高细胞内同源重组, 或者说基因打靶(gene targeting)的效率, 近年来逐步建立了一系列的正性、负性选择系统和技术, 进一步提高了基因打靶的效率. 从目前的发展来看, 细胞系的基因敲除和细胞核移植技术的结合逐步成熟, 将是基因敲除研究的主流发展方向.

反义分子包括反义寡聚脱氧核苷酸(ODN, oligodeoxynucleotide)、反义 RNA、核酶(ribozyme)以及多靶位的核酶(multi-target ribozyme)技术等. 反义 ODN 和 RNA 分子主要是通过与其靶 RNA 分子的结合, 形成杂种复合物分子, 激活、诱导内源性的蛋白酶类, 对于这类杂种分子进行消化, 反义分子与靶 RNA 分子同归于尽, 抑制靶 RNA 分子的作用. 核酶和多靶位核酶技术作用的原理, 不仅包括反义技术的作用原理, 而且还利用核酶 RNA 分子的酶学催化作用, 即分子剪刀对于靶 RNA 分子的剪切, 一分子的核酶 RNA 可以剪切多个分子的靶 RNA, 因此更加有效率. 目前根据核酶作用的基本原理, 构建了核酶活性中心两侧的侧翼序列为随机序列的核酶文库, 在功能基因组学研究中具有十分重要的应用前景. 利用随机核酶文库的构建, 对于抗 - Fas 抗体诱导的细胞凋亡(apoptosis)的相关基因进行研究, 也取得了很好的效果.

RNA 干扰现象从低等生物到人都是广泛存在的. 实验研究证明, RNA 干扰策略是功能缺失表型研究的有力工具. Kamath et al^[61] 构建了针对美丽隐杆线虫(*C. elegans*)16 757 个基因的特异性 RNAi 表达菌株, 占美丽隐杆线虫全部预测的 19 427 个基因的 86 %, 通过喂食含有 RNAi 表达载体的菌株, 在美丽隐杆线虫体内表达不同的 RNAi, 并对于 RNAi 表达导致的功能丧失表型进行分析. 其中最为常见的一种表型就是死胎, 共 929 种 RNAi, 占 5.5 %, 估计是占美丽隐杆线虫死胎相关基因的 75 %, 因此这一研究结果对于研究美丽隐

杆线虫的胚胎发育具有十分重要的意义, 是一个很好的研究起点. 第二位的功能缺失表型是运动失调, 这些基因的缺失导致神经肌肉系统的损害. 根据不同种属生物基因序列的保守性, 还鉴定出 33 个与人的疾病相似的功能缺失表型. 进一步表明了 RNAi 策略在人类疾病相关基因研究中的重要意义. RNAi 研究策略中, 可以根据基因的序列, 体外化学合成 21-23 nt 的双链 RNAi, 利用表达载体的构建以及体外转录制备 RNAi, 也可以构建 RNAi 的表达载体, 在体内进行表达. 由于 RNAi 是相互配对的双链 RNA 分子, 因此必须采用 2 种表达载体进行共转染, 配对的双链分别从不同的载体上表达, 然后以碱基配对方式结合成具有功能的 RNAi 分子. 为了简化 RNAi 表达载体的构建, Yu et al^[62] 构建了“发夹” RNAi (hairpin RNAi), 利用引物的特殊设计, 在一个表达载体上表达一段 RNA, 可以反折形成发夹 RNAi. RNAi 的有效性对于其序列的长度有严格的要求. 为了避免体内转录产物恰好在需要处结束, 减少不必要的 RNA 序列, 干扰 RNAi 的生物学功能, Yu et al 采用了小鼠的 U6 基因启动子, 这种 III 型基因启动子, 在 III 型 RNA 聚合酶的催化作用下, 模板序列的 3' - 末端只要存在 2-4 个 U, 就可以停止转录, 利用这样的启动子选择和模板 DNA 的设计, 就可以保证有效的转录以及在特定位置的转录终止, 保证 RNAi 的转录水平和 RNAi 的长度.

6 生物信息学技术

生物信息学是以生物大分子为研究对象, 以计算机为工具, 运用数学和信息科学的观点、理论和方法去研究生命现象、组织和分析呈指数级增长的生物信息数据的一门科学. 研究重点体现在基因组学和蛋白质两个方面. 首先是研究遗传物质的载体 DNA 及其编码的大分子量物质, 以计算机为工具, 研究各种学科交叉的生物信息学的方法, 找出其规律性, 进而发展出适合他的各种软件, 对逐步增长的 DNA 和蛋白质的序列和结构进行收集、整理、发布、提取、加工、分析和发现. 由数据库、计算机网络和应用软件三大部分组成, 其关注的研究热点包括: 序列对比, 基因识别和 DNA 序列分析, 蛋白质结构预测, 分子进化, 数据库中知识发现^[63, 64]. 这一领域的重大科学问题有: 继续进行数据库的建立和优化; 研究数据库的新理论、新技术、新软件; 进行若干重要算法的比较分析; 进行人类基因组的信息结构分析; 从生物信息数据出发开展遗传密码起源和生物进化研究; 培养生物信息专业人员, 建立国家生物医学数据库和服务系统. 1990 年代生物学数据的大量积累将导致新的理论发现或重大科学发现. 生物信息学是基于数据库与知识发现的研究, 对生命科学带来革命性的变化, 对肝脏疾病的研究将产生巨大的影响.

7 参考文献

- Escobar MA, Civerolo EL, Summerfelt KR, Dandekar AM. RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:13437-13442
- Kruger M, Beger C, Li QX, Welch PJ, Tritz R, Leavitt M, Barber JR, Wong-Staal F. Identification of eIF2 γ and eIF2 γ as cofactors of hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation using a functional genomics approach. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:8566-8571
- 成军, 斯崇文, 王勤环, 于敏. 人白介素 -2 基因转移表达及抗乙型肝炎病毒和诱导 LAK 细胞活性的研究. *中华医学杂志* 1995; 75:388-391
- 董菁, 成军, 王勤环, 王刚, 施双双, 夏小兵, 斯崇文. 外周血中乙型肝炎病毒截短型囊膜中蛋白基因的克隆化与分析. *中华肝脏病杂志* 2001;9:163-165
- 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 洪源, 皇甫竞坤, 王刚, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒逆转录酶区基因序列准种与变异研究. *解放军医学杂志* 2001;26:823-825
- Cheng J, Zhong YW, Liu Y, Dong J, Yang JZ, Zhang LX. Screening and identification of a humanized single chain variable region antibody for hepatitis C virus non-structural 3 protein. *Chin J Immunol* 2000;16:246-249
- 钟彦伟, 成军, 陈新华, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒 NS5A 抗原模拟表位. *世界华人消化杂志* 2002;10:133-136
- 钟彦伟, 成军, 施双双, 王刚, 夏小兵, 田小军, 李莉, 张玲霞. 抗丙肝病毒包膜蛋白 E2 人源单链抗体的制备及免疫组织化学研究. *中华肝脏病杂志* 2002;10:109-112
- 钟彦伟, 成军, 蔡炯, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒包膜蛋白 E2 抗独特型人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. *世界华人消化杂志* 2002;10:897-901
- Zhong YW, Cheng J, Wang G, Shi SS, Li L, Zhang LX, Chen JM. Preparation of human single chain Fv antibody against hepatitis C virus E2 protein and its identification in immunohistochemistry. *World J Gastroenterol* 2002;8:863-867
- 钟彦伟, 成军, 田小军, 陈新华, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 抗原模拟表位的筛选与鉴定. *中华传染病杂志* 2003;21:5-8
- 钟彦伟, 成军, 蔡炯, 张忠东, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒核心蛋白模拟表位. *解放军医学杂志* 2003;28:34-36
- 钟彦伟, 成军, 蔡炯, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒 NS4A 蛋白抗独特型人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. *解放军医学杂志* 2003;28:37-39
- Cheng J, Zhong YW, Liu Y, Dong J, Yang JZ, Chen JM. Cloning and sequence analysis of human genomic DNA of augments of liver regeneration. *World J Gastroenterol* 2000;6:275-277
- 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆 HCV 核心蛋白结合蛋白基因 1. *世界华人消化杂志* 2001; 9:1379-1383
- 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
- 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 李莉, 刘妍, 段惠娟. 丙型肝炎病毒 NS2 基因酵母双杂交“饵”载体构建及表达. *世界华人消化杂志* 2002;10:129-132
- 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 钟彦伟, 段惠娟, 洪源. 筛选与克隆肝再生增强因子结合蛋白的基因. *世界华人消化杂志* 2002;10:161-164
- 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 牟劲松, 洪源, 刘妍, 段惠娟, 王刚, 李莉, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白与染色体转位蛋白的相互作用. *中华医学杂志* 2002;82:673-677
- 王琳, 陆荫英, 成军, 于敏, 李克, 刘妍. 白介素 -18 逆转录病毒载体的构建及抗乙型肝炎病毒的研究. *解放军医学杂志* 2002;27: 699-701
- 陆荫英, 王琳, 刘妍, 于敏, 李克, 王业东, 张玲霞, 成军. 乙肝病毒核心抗原单链抗体细胞内免疫抗乙肝病毒基因治疗研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:765-769
- 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 邵得志, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 洪源, 陈菊梅. 筛选与克隆丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因. *中华实验和临床病毒学杂志* 2002;16:351-354
- 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟, 段惠娟, 芮莉莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白与载脂蛋白 AI 结合的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:1018-1021

1 Escobar MA, Civerolo EL, Summerfelt KR, Dandekar AM. RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall

- 24 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 刘妍, 王刚, 洪源, 王贺, 芮莉莉. 筛选与克隆丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白结合蛋白基因. 解放军医学杂志 2003;28:50-52
- 25 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源. 酵母双杂交技术筛选克隆丙型肝炎病毒 NS3 蛋白结合蛋白. 解放军医学杂志 2003;28:31-33
- 26 陆荫英, 李克, 王琳, 刘妍, 王业东, 成军, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前-S2 蛋白结合蛋白的筛选. 中华肝脏病杂志 2003;11:8-10
- 27 陆荫英, 王琳, 刘妍, 李克, 成军, 张玲霞, 李莉. 乙型肝炎病毒核心抗原与金属硫蛋白相互作用的研究. 解放军医学杂志 2003;28:161-163
- 28 Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Mu JS, Hong Y, Liu Y, Duan HJ, Wang G, Li L, Chen JM. Interaction between hepatitis C virus core protein and translin protein-a possible molecular mechanism for hepatocellular carcinoma and lymphoma caused by hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 2003;9:300-303
- 29 陆荫英, 王琳, 刘妍, 李克, 成军, 张玲霞, 李莉. 乙型肝炎病毒 e 抗原与金属硫蛋白相互作用的研究. 解放军医学杂志 2003;28:451-453
- 30 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 陈天艳, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟. 酵母双杂交技术筛选 Hcbp6 结合的肝细胞蛋白编码基因. 世界华人消化杂志 2003;11:385-388
- 31 陆荫英, 王琳, 成军, 李克, 刘妍, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选 HBcAg 肝细胞结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2003;11:426-429
- 32 陆荫英, 王琳, 李克, 刘妍, 成军, 张玲霞. HBcAg 肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆. 世界华人消化杂志 2003;11:422-425
- 33 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
- 34 夏小兵, 成军, 王刚, 杨继珍, 刘妍, 董菁, 王琳, 李克. 人肝再生增强因子在毕赤酵母中的表达. 世界华人消化杂志 2001;9:743-746
- 35 Dong J, Cheng J, Wang QH, Liu Y, Wang G, Shi SS, Xia XB, Shao Q, Si CW. The preliminary study on hepatitis B virus (HBV) quasispecies in patients with chronic HBV infection. *Chin J Infect Dis* 2001;19:199-203
- 36 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 董菁, 洪源, 张跃新, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因. 解放军医学杂志 2001;26:880-883
- 37 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒核心基因启动子序列突变及准种. 世界华人消化杂志 2001;9:1323-1325
- 38 董菁, 成军, 王勤环, 皇甫竞坤, 施双双, 张国庆, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 DNA 序列异质性及准种特点的研究. 中华医学杂志 2002;82:81-85
- 39 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 皇甫竞坤, 王刚, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒前 C/C 基因准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002;27:122-123
- 40 成军, 钟彦伟, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 杨守纯. 丙型肝炎病毒非结构区 NS3 基因在大肠杆菌中的可诱导性高表达. 中华实验和临床病毒学杂志 2002;16:85-87
- 41 董菁, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 X 基因准种特点的研究. 中国病毒学 2002;17:22-26
- 42 董菁, 李进, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 洪源, 王业东, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒基因组准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002;27:116-118
- 43 董菁, 成军, 皇甫竞坤, 洪源, 王刚, 陈国凤, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒序列个体化变异的初步观察. 解放军医学杂志 2002;27:119-121
- 44 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
- 45 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 蛋白反式调节基因的克隆化研究. 中华肝脏病杂志 2003;11:5-7
- 46 刘妍, 成军, 邵得志, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 李克, 李莉. HCV 核心蛋白与 HBV X 蛋白协同反式激活作用的研究. 中华实验和临床病毒学杂志 2003;17:39-41
- 47 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
- 48 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
- 49 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. HCV 核心蛋白与截短型 HBV 表面抗原中蛋白协同反式激活功能的研究. 中华肝脏病杂志 2002;10:354-357
- 50 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 韩萍, 牟劲松, 李克, 钟彦伟. 乙型肝炎病毒核心启动子区基因异质性及对其转录活性的影响. 解放军医学杂志 2002;27:128-130
- 51 韩萍, 刘妍, 成军, 王刚, 陆荫英, 李克, 李莉. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白上调 c-myc 基因表达的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:141-144
- 52 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
- 53 洪源, 成军, 董菁, 李克, 王琳, 王刚, 刘妍. 乙型肝炎病毒 HBsAg 重组疫苗与表面抗原 DNA 疫苗诱导 H-2^b 小鼠免疫应答的实验研究. 世界华人消化杂志 2002;10:137-140
- 54 王刚, 刘妍, 牟劲松, 洪源, 邵得志, 张耀新, 李莉, 成军. 大鼠肝再生相关基因 LRRP1 的克隆化. 世界华人消化杂志 2002;10:165-168
- 55 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒前 S2 基因序列异质性的研究. 中华内科杂志 2002;41:233-236
- 56 董菁, 施双双, 王业东, 皇甫竞坤, 洪源, 李莉, 张玲霞, 成军. 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;27:321-322
- 57 Dong J, Cheng J, Wang QH, Shi SS, Wang G, Si CW. Cloning and analysis of the genomic DNA sequence of augments of liver regeneration from rat. *Chin Med Sci J* 2002;17:63-67
- 58 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前-S1 基因酵母表达载体的构建及表达. 解放军医学杂志 2002;27:341-342
- 59 董菁, 成军, 王勤环, 刘妍, 王刚, 施双双, 夏小兵, 李克, 邵得志, 斯崇文. 乙型肝炎病毒囊膜中蛋白与白细胞介素-18 联合基因免疫的实验研究. 中华传染病杂志 2002;20:148-151
- 60 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
- 61 Kamath RS, Fraser AG, Dong Y, Poulin G, Durbin R, Gotta M, Kanapin A, Bot NL, Moreno S, Sohrmann M, Welchman DP, Zipperlen P, Ahringer J. Systemic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* 2003;421:231-237
- 62 Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;99:6047-6052
- 63 成军, 李克, 陆荫英, 王琳, 刘妍. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因和蛋白的生物信息学分析. 世界华人消化杂志 2003;11:378-384
- 64 钟彦伟, 成军, 张忠东, 孙敏, 李强, 李克, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 噬菌体表面展示技术筛选 HCBP6 人源单链可变区抗体. 世界华人消化杂志 2003;11:389-393