

- 20 Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997;337:1733-1745
- 21 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源单链可变区抗体的筛选与鉴定. *中国公共卫生* 2002;18:153-154
- 22 Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vector that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985;228:1315-1317
- 23 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;11:1131-1134
- 24 梁耀东, 成军, 陆荫英, 吴君, 程明亮. 乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1242-1245
- 25 邵清, 成军, 白雪帆. 乙型肝炎病毒X基因启动子结构及调节研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1240-1242
- 26 Bodoor K, Shaikh S, Enarson P, Chowdhury S, Salina D, Raharjo WH, Burke B. Function and assembly of nuclear pore complex proteins. *Biochem Cell Biol* 1999;77:321-329
- 27 Kuersten S, Arts GJ, Walther TC, Englmeier L, Mattaj IW. Steady-state nuclear localization of exportin-t involves RanGTP binding and two distinct nuclear pore complex interaction domains. *Mol Cell Biol* 2002;22:5708-5720
- 28 Becskei A, Mattaj IW. The strategy for coupling the RanGTP gradient to nuclear protein export. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:1717-1722
- 29 Pyhtila B, Rexach M. A gradient of affinity for the karyopherin Kap95p along the yeast nuclear pore complex. *J Biol Chem* 2003;278:42699-42709
- 30 Llen NP, Patel SS, Huang L, Chalkley RJ, Burlingame A, Lutzmann M, Hurt EC, Rexach M. Deciphering networks of protein interactions at the nuclear pore complex. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:930-946
- 31 Matsubayashi Y, Fukuda M. Nishida Evidence for existence of a nuclear pore complex-mediated, cytosol-independent pathway of nuclear translocation of ERK MAP kinase in permeabilized cells. *E J Biol Chem* 2001;276:41755-41760

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

β -微球蛋白对乙型肝炎病毒核心启动子转录活性的调节作用

高学松, 成军, 甄真, 杨艳杰, 黄燕萍, 郭江, 刘妍, 戴久增

高学松, 成军, 杨艳杰, 黄燕萍, 郭江, 刘妍, 戴久增, 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

甄真, 河北医科大学第三医院感染科 河北省石家庄市 050051

军队九五科技攻关项目, No.98D063

国家自然科学基金攻关项目, No.C03011402, No.C30070689

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 302

医院传染病研究所基因治疗研究中心. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933392 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-07-28 接受日期: 2004-09-30

摘要

目的: 研究 β_2 -m 对核心启动子表达的调节作用.

方法: 根据HBV核心启动子及 β_2 -微球蛋白的序列设计引物, 用聚合酶链反应(PCR)的方法分别扩增HBV核心启动子和 β_2 -微球蛋白基因, 分别构建HBV核心启动子的报告载体及 β_2 -微球蛋白的真核表达载体, 脂质体法瞬时转染HepG2细胞.

结果: 成功构建HBV核心启动子的报告载体及 β_2 -微球蛋白(β_2 -m)的真核表达载体. 脂质体法瞬时转染HepG2细胞48 h后, 核心启动子在 β_2 -微球蛋白(β_2 -m)的影响下, 其启动子活性降低2倍.

结论: β_2 -微球蛋白(β_2 -m)明显HBV核心启动子的表达.

高学松, 成军, 甄真, 杨艳杰, 黄燕萍, 郭江, 刘妍, 戴久增. β -微球蛋白对乙型肝炎病毒核心启动子转录活性的调节作用. *世界华人消化杂志* 2004;12

(10):2491-2494

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2491.asp>

0 前言

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、肝细胞癌的发生密切相关. 但HBV DNA复制的分子生物学机制仍不十分清楚. 为了寻找肝细胞中可能具有调节作用的蛋白, 前期研究中我们利用噬菌体表面展示技术, 以HBV核心启动子DNA为固相支持分子, 筛选人肝细胞cDNA文库, 获得了和HBV核心启动子结合的肝细胞蛋白- β_2 -微球蛋白(β_2 -m), 为深入研究其和HBV核心启动子结合的机制及功能, 我们分别构建了报告载体和真核表达载体, 共转染细胞, 阐明二者之间的关系.

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), CAT ELISA试剂盒(Roche), *EcoR* V、*Bam* H I、*Mlu* I、*Nhe* I(购置宝生物公司), 热循环仪、凝胶成像仪、酶联免疫吸附读数仪、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' 片段大小为 251 bp. 在引物 5' 端分别引入 *Mlu*I 和 *Nhe*I 位点, 由上海生工公司合成. 1.2.2 β -微球蛋白的扩增和克隆 根据 β_2 -微球蛋白基因序列设计引物. P3: 5' -GAT ATC ATG TCT CGC TCC GTG GCC TTA G-3', P4: 5' -GGA TCC TTA CAT GTC TCG ATC CCA-3' 在 5' -端分别引入 *Eco*R V、*Bam*HI 酶切位点. 引物由上海生工公司合成.

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 °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, 在铺有 IPTG/X-gal 的氨苄西林(LB/Amp)平板上进行蓝白斑菌落筛选, 挑取白色菌落采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 °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, 随机挑选在 LB/Amp 平板上生长的菌落, 采用碱裂解法提取质粒, 进行 *Mlu*I 和 *Nhe*I 双酶切鉴定.

1.2.4 重组表达载体 pcDNA3.1(-) β -m 的构建与鉴定 将噬斑的 PCR 纯化产物与 pGEM-Teasy 载体混合在 16 °C 条件下用 T4 DNA 连接酶连接过夜, 随后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态, 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 *Eco*R V 和 *Bam*H 双酶切回收相应的酶切片段在 16 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 *Eco*R V 和 *Bam*HI 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-promoter、pCAT-CP 和 pCAT-CP+pcDNA3.1(-) β_2 -m 通过脂质体瞬时共转染 HepG2 细胞, 用 ELISA 法检测氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达, 研究 pcDNA3.1(-) β_2 -M 对 pCAT-CP 功能的影响.

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 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析扩增片段为 206 bp, 与预期大小符合且无非特异扩增现象(图2). 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).

2.2 pcDNA3.1(-) β -m 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 β_2 -微球蛋白基因片段, PCR 产物经 1 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析扩增片段为

360 bp, 与预期大小符合且无非特异扩增现象(图3). 用双酶切所得片段连接到用相同的 *Eco*R V 和 *Bam*HI 所切的 pcDNA3.1(-) 中经酶切鉴定结果正确. 表明 pcDNA3.1(-) β_2 -m 质粒构建成功(图4).

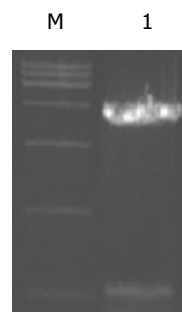


图1 pCAT-CP 重组质粒酶切鉴定. Lane M: 15 000 DNA Ladder; Lane 1: pCAT-CP *Mlu*I/*Nhe*I cut.

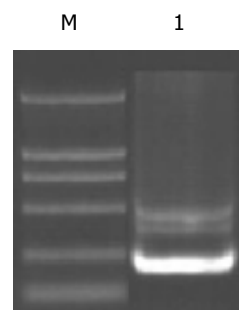


图2 HBV 核心启动子扩增片段 Lane M: 2000 DNA Ladder; Lane 1: HBV core promoter PCR.

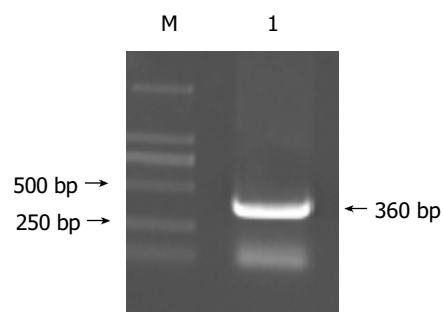


图3 β_2 -微球蛋白扩增片段. Lane M: 2000 DNA Ladder; Lane 1: β_2 -microglobulin PCR.

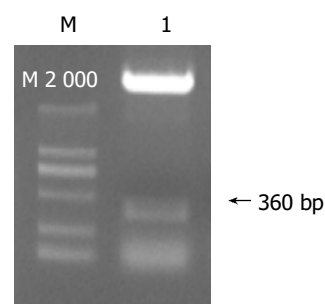


图4 pcDNA3.1(-) β -m 重组质粒的酶切鉴定. Lane M: 2000 DNA Ladder; Lane 1: pcDNA3.1(-) β -m *Eco*R V/*Bam*HI cut.

2.3 pcDNA3.1(-) β -m 对 pCAT-CP 的激活作用 用脂质体法瞬时转染 HepG2 细胞, 质粒用量 1 μ g, 脂质

体用量 3 μ L. 培养 48 h 后进行 ELISA 检测. 氯霉素乙酰转移酶(CAT)的 OD 值(见表 1, 图 5).

表 1 重组载体共转染 HepG2 细胞氯霉素乙酰转移酶检测结果

分组	质粒	A 值
1	pCAT-basic	0.021
2	pCAT-promoter	0.343
3	pCAT-CP	3.151
4	pCAT-CP-pcDNA3. 1(-)- β_2 m	1.524

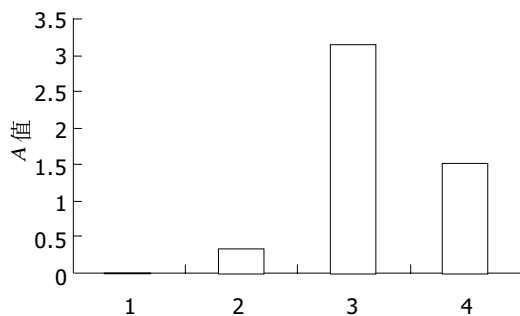


图 5 CAT-ELISA 检测结果.

3 讨论

乙型肝炎病毒(HBV)是一种严重危害人类健康的致病因子. HBV 属嗜肝 DNA 病毒, 其基因组为 3.2 kb 部分双链的环状 DNA. 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(preS/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. 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. 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^[1-8].

我们利用噬菌体展示技术以 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^[1]. 经同源性比较确定该蛋白与 β_2 -微球蛋白(β_2 -m)同源, 同源性为 95%.

人 β_2 微球蛋白基因(β_2 -microglobulin, β_2 -m)位于染色体 15 q 21-22.2, 成熟蛋白产物由 99 个氨基酸组成的单链多肽低分子蛋白, 分子量为 11.8 ku, 电泳在 β_2 区, 故称 β_2 微球蛋白. β_2 微球蛋白起源于人体间质, 上皮细胞和造血系统的正常细胞以及恶性肿瘤细胞均能合成, 细胞合成的 β_2 微球蛋白是人类组织相容性抗原的一部分, 存在于细胞膜. β_2 微球蛋白与免疫球蛋白

有结构同源性, 特别是 IgG 分子的 CH3 区. 在大多数类型细胞的细胞膜上都可以检测到 β_2 微球蛋白^[9-23]. β_2 微球蛋白与病毒性肝炎关系密切. 其作为 HLA-I 复合体的一部分, 与肝细胞表面病毒抗原递呈有关, 在对病毒感染免疫应答中起重要作用^[24-25]. Akdogan *et al*^[26] 研究发现使用 α 干扰素治疗转氨酶反复波动的慢性乙型肝炎患者, β_2 微球蛋白水平高者有较高应答的趋势, 治疗前后的水平有助与预测预后. 而 LAPinski *et al*^[27] 在研究 HCV 感染患者在使用 α 干扰素治疗期间, β_2 微球蛋白与 CD4 淋巴细胞之间关系时发现 β_2 微球蛋白显著升高是预后不良的指标, 开始治疗时 CD4 淋巴细胞数量增加预示治疗效果良好. β_2 微球蛋白. 丙型肝炎患者血清 β_2 微球蛋白水平高于健康对照组, 与疾病的病程与严重程度有关. 而且, 血清 β_2 微球蛋白水平与 HCV RNA 水平显著相关, 与 HCV 基因型无关^[28]. 在 HCV 感染相关的肝癌患者中, 血清 β_2 微球蛋白水平升高反映肿瘤的大小, 似乎是免疫应答中体液因素(如 IL-6)作用于肝细胞的结果. 免疫系统功能降低导致肝癌的进展和 β_2 微球蛋白的过度表达^[29].

总之, β_2 微球蛋白具有重要的免疫功能, 我们利用噬菌体展示技术筛选出与 HBV 核心启动子结合的 β_2 微球蛋白, 提示其与肝细胞和肝炎病毒相互作用, 在病毒性肝炎、肝硬化发生发展过程中起一定作用, 但是确切的分子生物学机制有待于进一步研究.

4 参考文献

- 1 张忠东, 成军, 钟彦伟, 王业东, 董菁, 陈天艳, 杨倩, 张树林. 应用噬菌体展示技术筛选乙型肝炎病毒核心启动子结合蛋白. 解放军医学杂志 2004;29:16-19
- 2 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
- 3 成军. 病毒性肝炎发病机制中的反式调节机制. 世界华人消化杂志 2003;11:888-896
- 4 成军, 刘研, 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
- 5 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
- 6 Cheng J. Molecular pathogenesis of viral hepatitis. J Gastroenterol Hepatol 2002;16:A185
- 7 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
- 8 邵清, 成军, 白雪帆. 乙型肝炎病毒 X 基因启动子结构及调节研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1240-1242
- 9 Wolcke J, Weinhold E. A DNA-binding peptide from a phage display library. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 2001;20:1239-1242
- 10 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
- 11 巨立中, 成军, 钟彦伟. 启动子 DNA 结合蛋白研究策略. 世界华人消化杂志 2004;12:141-142
- 12 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
- 13 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

- 14 Johnson JJ, Raney AK, McLachlan A. Characterization of a functional hepatocyte nuclear factor 3 binding site in the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *Virology* 1995; 208:147-1589
- 15 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
- 16 Burritt JB, Bow CW, Doss KW. Review: filamentous phage display of oligopeptide libraries. *Analytical Biochemistry* 1996; 238:1-13
- 17 Dunn IS. *In vitro* alpha-complementation of beta-galactosidase on a bacteriophage surface. *Eur J Biochem* 1996;242:720-726
- 18 Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* 1996;380:364-366
- 19 李强, 成军, 程明亮, 钟彦伟. 乙型肝炎病毒表面抗原基因启动子 I 结构及调节研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1002-1004
- 20 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
- 21 Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vector that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985; 228:1315-1317
- 22 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;11:1131-1134
- 23 梁耀东, 成军, 陆荫英, 吴君, 程明亮. 乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1242-1245
- 24 Hutteroth TH, Cleve H. Beta2-microglobulin: structure and function of an immunoglobulin-homologue. *Immun Infekt* 1976;4:110-115
- 25 Flisiak R, Prokopowicz D. Effect of misoprostol on serum beta2-microglobulin in the course of viral hepatitis B. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:1227-1230
- 26 Akdogan M, Senturk H, Mert A, Tabak F, Ozbay G. Acute exacerbation during interferon alfa treatment of chronic hepatitis B: frequency and relation to serum beta-2 microglobulin levels. *J Gastroenterol* 2003;38:465-470
- 27 LApinski TW, Kot A, Prokopowicz D. Concentration of b2-microglobulin and percentage of CD4 lymphocytes in peripheral blood in patients with chronic HCV infection during IFN- α therapy. *Med Sci Monit* 2002;8:CR538-542
- 28 Malaguarnera M, Restuccia S, Di Fazio I, Zoccolo AM, Trovato BA, Pistone G. Serum beta2-microglobulin in chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 1997;42:762-766
- 29 Malaguarnera M, Di Fazio I, Ferlito L, Pistone G, Laurino A, Vinci E, Mazzoleni G. Increase of serum beta2-microglobulin in patients affected by HCV correlated hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:937-939

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

肝移植围手术期低钾血症观察与分析

石 斌, 李玉民, 李 汛, 周文策, 曹 农, 杨清平, 张 磊, 孟文勃

石斌, 南京大学医学院临床学院 南京军区南京总医院解放军普通外科研究所 江苏省南京市 210002
李玉民, 李汛, 周文策, 曹农, 杨清平, 张磊, 孟文勃, 兰州医学院第一附属医院普外科 甘肃省兰州市 730000
甘肃省科学事业费科技项目(QS012-C33-31)
项目负责人: 李玉民, 730000, 甘肃省兰州市, 兰州医学院第一附属医院普外科, joyzb1969@sina.com
电话: 025-83202367
收稿日期: 2004-03-31 接受日期: 2004-08-31

摘要

目的: 探讨肝移植围手术期低钾血症发生的规律、原因及防治措施。

方法: 监测4例肝移植患者围手术期各时段的血钾值及所采取的相应治疗措施, 分析肝移植低钾血症的原因和机制。

结果: 4例肝移植患者围手术期均发生不同程度的低钾血症, 尤其在肝移植新肝灌注到术后24 h期间最易出现危险的低血钾状态, 术中血钾最低达 1.5 mmol/L, 全组术后 1 wk 平均血钾浓度为 3.0 ± 1.1 mmol/L, 至血钾纠正时平均总补钾量 260 mmol(19.5 g), 血钾纠正最短时间为 11 h, 最长为 98 h。

结论: 肝移植围手术期尤其术中及术后 24h 易发生低钾血症, 原因复杂, 纠正较为困难。

石斌, 李玉民, 李汛, 周文策, 曹农, 杨清平, 张磊, 孟文勃. 肝移植围手术期低钾血症观察与分析. *世界华人消化杂志* 2004;12(10):2494-2495
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2494.asp>

0 引言

严重低钾血症(<3.0 mmol/L)在外科临床并不少见, 在肝移植围手术期也时有发生. 我院 2001-09/2003-07 进行肝移植手术 4 例, 均不同程度发生了低钾血症, 分析研究发现肝移植过程中的严重低钾血症有其自身特点, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 我院 2001-09/2003-07 进行肝移植 4 例, 均为男性, 年龄 43-60(平均 53)岁. 乙肝后肝硬化失代偿 2 例, 乙肝后肝硬化合并原发性肝癌 1 例, 酒精性肝硬化 1 例. 背驮式肝移植 1 例, 非静脉转流条件下原位肝移植 3 例。

1.2 方法 用干燥空针抽静脉血 2-3 mL 注入肝素抗凝管(避免在输液肢体抽血), 经离心后取血清, 用美国 Beckman-CX7 全自动生化分析仪离子选择电极法测定血钾浓度. 补钾方法: 血钾在 2.5-3.0 mmol/L, 按每日 80-