

种异常的内源性 lectin 或含涎酸的糖结合位点. 肿瘤细胞上的涎酸化糖蛋白结合点能识别血小板上的糖配体 lectin 分子. 所以, 在肝脏肿瘤被切除之后, 或肝癌患者接受肝移植后出现的转移有各种因素的影响, 但血流动力学的改变, 尤其是血液高凝状态和术后的损伤因素是不能忽视的促转移因素之一.

#### 4 参考文献

- 1 吴孟超. 原发性肝癌的诊断和治疗进展. 中国肿瘤 1999;8:18-20
- 2 吴孟超. 原发性肝癌的诊断和治疗进展. 中华外科杂志 1998;36:515-518
- 3 Mahla E, Lang T, Vicenzi MN, Werkgartner G, Maier R, Probst C, Metzler H. Thromboelastography for monitoring prolonged hypercoagulability after major abdominal surgery. *Anesth Analg* 2001;92:572-577
- 4 尹格平, 孙晓明, 方强三. 老年癌症患者手术前后血小板活化状态检测的临床意义. 中国肿瘤临床与康复 1998;5:26-28
- 5 Hu DD, Lin EC, Kovach NL, Hoyer JR, Smith JW. Biochemical Characterization of the binding of osteopontin to integrins  $\alpha v \beta 1$  and  $\alpha v \beta 5$ . *J Bio Chem* 1995;270:26232-26238
- 6 Liaw L, Lindner V, Schwartz SM, Chambers AF, Giachelli CM. Osteopontin and beta 3 integrin are coordinately expressed in regenerating endothelium in vivo and stimulate Arg-Gly-Asp-dependent endothelial migration in vitro. *Circ Res* 1995;77:665-672
- 7 Umansky V, Rocha M, Schirmmacher V. Liver endothelial cells: participation in host response to lymphoma metastasis. *Cancer Met Res* 1996;15:273-279

- 8 Hwang S, Lopez CA, Heck DE, Garder CR, Laskin DL, Laskin JD, Denhardt DT. Osteopontin inhibits induction of nitric oxide synthase gene expression by inflammatory mediators in mouse kidney epithelial cell. *J Biol Chem* 1994;269:711-715
- 9 Feng B, Rollo EE, Denhardt DT. Osteopontin (OPN) may facilitate metastasis by protecting cells from macrophage NO-mediated cytotoxicity: evidence from cell lines down-regulated for OPN expression by a targeted ribozyme. *Clin Exp Metastasis* 1995;13:453-462
- 10 Todo S, Furukawa H. Japanese study group on organ transplantation. Living donor liver transplantation for adult patients with hepatocellular carcinoma: experience in Japan. *Ann Surg* 2004;240:451-459
- 11 Ravaioli M, Ercolani G, Cescon M, Vetrone G, Voci C, Grigioni WF, D'Errico A, Ballardini G, Cavallari A, Grazi GL. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Further considerations on selection criteria. *Liver Transpl* 2004;10:1195-1202
- 12 Shetty K, Timmins K, Brensinger C, Furth EE, Rattan S, Sun W, Rosen M, Soulen M, Shaked A, Reddy KR, Olthoff KM. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma validation of present selection criteria in predicting outcome. *Liver Transpl* 2004;10:911-987
- 13 杨甲梅, 吴孟超, 陈汉, 张晓华, 周伟平, 严以群, 李波, 姚晓平, 吴伯文. 中晚期肝癌外科综合治疗的基本模式. 中华外科杂志 1996;34:537-539
- 14 白莉, 黄洁, 黄志强. 肝癌术后复发的影响因素分析. 中华实验外科杂志 1998;15:345-346
- 15 Cerutti E, Stratta C, Romagnoli R, Schellino MM, Skurzak S, Rizzetto M, Tamponi G, Salizzoni M. Thromboelastogram monitoring in the perioperative period of hepatectomy for adult living liver donation. *Liver Transpl* 2004;10:289-294

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 •

## 酵母双杂交技术筛选 HCV E1 蛋白结合的肝细胞蛋白基因

陈天艳, 蔺淑梅, 成军, 王琳, 张树林, 刘敏, 王建军, 黄燕萍, 杨媛, 白桂芹

陈天艳, 蔺淑梅, 成军, 王琳, 刘敏, 王建军, 黄燕萍, 杨媛, 白桂芹, 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

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, 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, 100039 c@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

### 摘要

目的: 用酵母双杂交技术筛选肝细胞中与HCV E1蛋白结合蛋白的编码基因.

方法: 用多聚酶链反应(PCR)法扩增HCV E1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pACT2的酵母细胞Y187进行配合, 在营养缺陷型培养基和X- $\alpha$ -半乳糖(X- $\alpha$ -gal)上进行双重筛选阳性菌落, 增菌后提出质粒, 转化入大肠杆菌(DH5 $\alpha$ ), 提出质粒并测序, 进行生物信息学分析.

结果: 获得了19个与E1蛋白特异性结合的阳性克隆, 其中16个克隆为已知蛋白基因和3个克隆为未知功能蛋白基因.

结论: 成功克隆出与丙型肝炎病毒E1蛋白结合的肝细胞蛋白, 为进一步研究HCV E1在HCV致病中的作用提供了新线索.

陈天艳, 蔺淑梅, 成军, 王琳, 张树林, 刘敏, 王建军, 黄燕萍, 杨媛, 白桂芹. 酵母双杂交技术筛选 HCV E1 蛋白结合的肝细胞蛋白基因. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2893-2895

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2893.asp>

## 0 引言

1989年发现的丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)是输血后病毒性肝炎的重要病原体,可引起急、慢性病毒性肝炎,与肝硬化、肝细胞癌(HCC)的发生密切相关<sup>[1-2]</sup>. HCV是单股正链RNA病毒,全长约9.6 ku核苷酸(nt),含有一个大的开放读码框架(ORF),编码3 010个氨基酸残基(aa)的病毒前体蛋白,多蛋白前体可被宿主和病毒的蛋白酶切割产生至少10个独特的蛋白. HCV包膜糖蛋白E1是一种多功能蛋白质,与HCV感染的慢性化和抗病毒免疫关系密切<sup>[3]</sup>. 我们利用酵母双杂交技术筛选肝细胞中与其相互作用的蛋白基因,进一步阐明E1在HCV致病中的作用机制及丙型肝炎防治具有重要意义.

## 1 材料和方法

1.1 材料 pGBKT7-BD克隆载体, AH109酵母株、Y187酵母株(K1612-1)、人cDNA肝细胞文库酵母、YPDA培养基、SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基, X- $\alpha$ -半乳糖苷酶(Gal)等购自Clontech公司,半硫酸腺苷、醋酸锂购自Sigma公司.复杂高效感受态(FSB)本室自制.大肠杆菌(DH5 $\alpha$ )本室保存.引物合成及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 用多聚酶链反应(PCR)法扩增HCV E1蛋白编码基因,连接入酵母表达载体pGBKT-7中构建诱饵质粒,酶切鉴定后,用醋酸锂法转入酵母细胞AH109,由本室构建<sup>[4]</sup>.

1.2.2 肝细胞文库的扩增与转化 按照文库扩增手册操作滴定肝细胞文库原液,欲达到 $3 \times 10^{12}$ /L,于LB-Amp琼脂平板进行扩增,刮取收集菌液,以Qiagen Maxi试剂盒提取质粒DNA,高效醋酸锂法转入酵母细胞Y187,于SD/-Leu琼脂培养基生长扩增,同时滴定转化文库,收集酵母菌落,以 $1 \times 10^6$ /份分装备用,由本室构建保存<sup>[5]</sup>.

1.2.3 诱饵与肝细胞文库的酵母配合 挑取在SD/-Trp选择培养基上生长转化子(计数大于 $1 \times 10^{12}$ /L)与肝细胞文库混合,30℃轻摇配合过夜,22 h后可见少许颗粒状物,显微镜下可见三叶状体.将配合产物铺板,SD/-

Trp/-Leu/-His 25块、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 25块.同时进行阳性对照实验及文库滴定.生长14 d后把长出的大于3 mm的酵母集落,在铺有X- $\alpha$ -半乳糖苷酶的QDO上检查 $\alpha$ -半乳糖苷酶活性,认为在QDO培养基上生长且出现蓝色菌落的配合为阳性集落.

1.2.4 阳性质粒的克隆和分析 挑取真正的阳性集落按照试剂盒提供的操作指南Lyticase法提取酵母质粒.提取的质粒以复杂冰冻高效感受态方法转化大肠杆菌,于含有氨苄青霉素的SOB平板培养,所获得的菌落酶切鉴定后测序.阳性克隆DNA测序后,提交GenBank比对,进行生物信息学分析.

## 2 结果

2.1 部分筛选克隆Bgl II酶切鉴定结果 pACT2内含有两个Bgl II酶切位点,分别位于多克隆位点两侧,使用该酶消化将释放出肝细胞文库片段(图1).

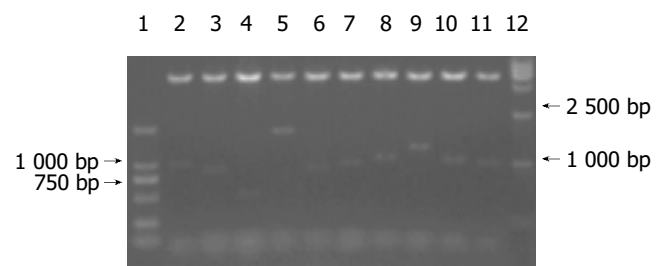


图1 部分不同的克隆Bgl II酶切鉴定. 1、12:泳道分别为DNA2000 Marker和DNA10000Marker, 2-11:泳道为不同克隆的酶切电泳图.

2.2 cDNA测序与同源性分析初步结果 配合后筛选出能在4缺(SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade)培养基和铺有X- $\alpha$ -gal的4缺培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落19个克隆测序,与GenBank数据库进行初步比较.3个为未知功能蛋白基因,其余16个均与已知基因的部分序列高度同源(99-100%),详细结果(表1).

## 3 讨论

丙型肝炎病毒感染易慢性化,与肝纤维化及肝细胞癌的发生、发展过程密切相关<sup>[6]</sup>.肝炎病毒蛋白与宿主蛋白相互作用,可能是病毒感染导致肝细胞损伤和HCC发生、发展的重要原因.酵母双杂交系统是一种分析真

表1 阳性克隆与GenBank同源序列比较

已知的同源序列编码蛋白	相同克隆数	同源性(%)
人类凝血因子IX	7	100
人类3-羟-3-甲基戊二酰-辅酶A合成酶2(线粒体)	2	97-100
人类富含亮氨酸重复序列免疫球蛋白超家族	1	100
人类转位子相关蛋白delta	1	100
人类核孔蛋白214 Ku(NUP214)	1	100
人类ELYS转录因子样蛋白TMBS62	4	99-100
未知功能基因	3	98-100

核细胞中蛋白-蛋白相互作用的一种有效的基因分析方法, 他的产生为研究蛋白在体内生理情况下的相互作用提供了一种遗传学方法。

我们采用酵母双杂交技术对HCV E1蛋白的肝细胞结合蛋白进行筛选, 共获得19个阳性克隆, 经过测序分析及与GenBank数据库进行比较, 其中16个克隆均为已知蛋白基因, 3个克隆为未知功能蛋白基因。其中筛选到值得注意的一些蛋白基因, 如血液病相关的蛋白包括凝血因子IX, 核孔蛋白214 ku, ELYS转录因子。凝血因子IX是血友病B相关因子, 血友病B是一种由于人凝血因子IX缺陷导致的遗传性严重出血性疾病, 临床治疗主要依靠输血或凝血酶原复合物, 因此容易感染获得性免疫缺陷综合征(AIDS)及肝炎病毒, 尤其是丙型肝炎病毒。我们的研究结果HCV E1蛋白可与凝血因子IX结合, 推测当血友病B患者合并HCV感染时, 是否会因为此作用影响到血友病B患者的病情, 具体的相互作用尚不知晓。ELYS是一个转录因子, 转录起始区包括的GATA-1, -2, -3, 热休克因子(HSF) 2, 及NF- $\kappa$ B的转录因子的DNA元件。ELYS是来源于卵黄囊的胚胎大分子, 可以在胞质和胞核之间穿梭, 具有转录激活和抑制域, 动物实验证实主要在胚胎造血组织表达, 即卵黄囊, 肝, 胸腺等, 在成年期表达下降。初步的研究结果表明ELYS似乎是一个与幼年期和成年期的造血事件有关的转录因子<sup>[7-8]</sup>。核孔蛋白214 ku(NUP214), 核孔复合体(NPC)是一个大的分子结构, 跨越真核核膜, 形成了一个通路调解核与细胞质间大分子流动, 已经证实不同的核孔蛋白在调解NPC功能及蛋白、RNAs核质转运中有独特的作用, 与人类某些疾病密切相关。核孔蛋白214 ku, 又称CAN, 为癌基因, 是真核细胞核孔复合体的成分之一, 包含核孔复合体特异蛋白的FG重复序列, 定位于核孔复合体胞质侧表面, 调控细胞周期进展、核质的转运。该基因3'-端在6号染色体与DEK基因形成融合基因, 与急性髓性白血病、骨髓增生异常综合征有关<sup>[9-11]</sup>。上述结果提示丙型肝炎病毒感染与血液系统疾病之间的关系值得我们进一步关注。

另外我们还筛选到富含亮氨酸重复序列免疫球蛋白超家族, 免疫球蛋白超家族在基因组中是蛋白领域中最大的家族之一, 也是多细胞真核生物最主要家族之一, 超家族成员与细胞识别、细胞表面受体、免疫系统的各种功能有关<sup>[12]</sup>。富含亮氨酸重复序列免疫球蛋白超家族(ISLR), 分子质量为46 ku, 包含亮氨酸

重复序列, 基因位于人类染色体15q23-q24。对于蛋白与蛋白相互作用、细胞黏附非常重要, 其本身也可与其他蛋白或细胞相互作用<sup>[13]</sup>。另一个是转位子相关蛋白(translocon-associated protein, TRAP)  $\delta$ , 是转膜蛋白复合体亚单位(以前称之为信号序列受体), 位于进入内质网的新生分泌蛋白上。参与激素原的生物合成<sup>[14]</sup>。

总之, 以上结果为我们了解HCV E1蛋白的生物学功能提供了新的线索, 病毒蛋白与肝细胞这些蛋白相互结合的具体的作用方式及功能还需进一步研究。

#### 4 参考文献

- 1 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
- 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 郝飞, 余宙耀. 丙型肝炎基础与临床. 北京: 人民卫生出版社, 1998:47
- 4 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
- 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 成军. 丙型肝炎病毒致病的分子生物学机制. 解放军医学杂志 2003;28:23-27
- 7 Kimura N, Takizawa M, Okita K, Natori O, Igarashi K, Ueno M, Nakashima K, Nobuhisa I, Taga T. Identification of a novel transcription factor, ELYS, expressed predominantly in mouse foetal haematopoietic tissues. *Genes Cells* 2002;7:435-446
- 8 Okita K, Nobuhisa I, Takizawa M, Ueno M, Kimura N, Taga T. Genomic organization and characterization of the mouse ELYS gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;305:327-332
- 9 Cronshaw JM, Matunis MJ. The nuclear pore complex: disease associations and functional correlations. *Trends Endocrinol Metab* 2004;15:34-39
- 10 Kraemer D, Wozniak RW, Blobel G, Radu A. The human CAN protein, a putative oncogene product associated with myeloid leukemogenesis, is a nuclear pore complex protein that faces the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1519-1523
- 11 Gould VE, Orucevic A, Zentgraf H, Gattuso P, Martinez N, Alonso A. Nup88 (karyoporin) in human malignant neoplasms and dysplasias: correlations of immunostaining of tissue sections, cytologic smears, and immunoblot analysis. *Hum Pathol* 2002;33:536-544
- 12 Teichmann SA, Chothia C. Immunoglobulin superfamily proteins in *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* 2000;296:1367-1383
- 13 Nagasawa A, Kubota R, Imamura Y, Nagamine K, Wang Y, Asakawa S, Kudoh J, Minoshima S, Mashima Y, Oguchi Y, Shimizu N. Cloning of the cDNA for a new member of the immunoglobulin superfamily (ISLR) containing leucine-rich repeat (LRR). *Genomics* 1997;44:273-279
- 14 Holthuis JC, van Riel MC, Martens GJ. Translocon-associated protein TRAP delta and a novel TRAP-like protein are coordinately expressed with pro-opiomelanocortin in *Xenopus* intermediate pituitary. *Biochem J* 1995;312:205-213