

- 25 成军, 钟彦伟, 施双双, 王刚, 董菁, 夏小兵, 杨继珍, 陈菊梅. HCV 非结构蛋白 NS5A 人源单链抗体可变区基因的筛选与鉴定. 中华微生物和免疫学杂志 2000;20:567
- 26 钟彦伟, 成军, 施双双, 杨继珍, 董菁, 夏小兵, 李克, 刘妍, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 人源单链抗体的筛选与表达. 中华中西医杂志 2001;2:97-99
- 27 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
- 28 Gong GZ, Waris G, Tanveer R. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9599-9604
- 29 Ghosh AK, Steele R, Meyer K. Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 1999;80:1179-1183
- 30 Kaneda Y, Yoshida MC, Kohno K, Uchida T, Okada Y. Chromosomal assignment of the gene for human elongation factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:3158-3162
- 31 Gasparini P, Calvano S, Memeo E, Bisceglia L, Zelante L. Assignment of ferritin L gene (FTL) to human chromosome band 19q13.3 by in situ hybridization. *Ann Genet* 1997;40:227-228
- 32 Guo W, Adams V, Mason J, McCabe ER. Identification of a ferritin light chain pseudogene near the glycerol kinase locus in Xp21 by cDNA amplification for identification of genomic expressed sequences. *Biochem Mol Med* 1997;60:169-173

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 •

胃黏膜细胞 hMSH2, hMLH1 和 p53 基因表达与幽门螺杆菌感染的关系

范凯, 马坚妹, 胡少为, 王朝晖, 刘敏, 吕申, 刘丽娜, 许国旺

范凯, 马坚妹, 大连医科大学解剖学教研室 辽宁大连市 116027
胡少为, 王朝晖, 刘敏, 吕申, 大连医科大学第二附属医院分子生物学实验室 辽宁省大连市 116027
刘丽娜, 大连医科大学第一附属医院消化内科 辽宁省大连市 116001
许国旺, 中国科学院大连化学物理研究所 辽宁省大连市 116011
中国科学院知识创新工程领域前沿基金资助项目, No. DIPCK2001A4
项目负责人: 吕申, 116027, 辽宁省大连市, 医科大学第二附属医院分子生物学实验室. fankai1973@yahoo.com.cn
电话: 0411-84687554
收稿日期: 2004-10-21 接受日期: 2004-10-27

摘要

目的: 探讨幽门螺杆菌(*H pylori*)感染与胃癌、癌旁及胃炎黏膜中 hMSH2, hMLH1 和 p53 基因表达的关系。

方法: 高中分化腺癌 22 例, 低分化腺癌 37 例, 黏液癌 17 例, 浅表性胃炎 38 例, 正常对照 10 例, 用快速尿素酶方法检测 *H pylori* 感染, 用免疫组化 SP 法检测 hMSH2, hMLH1 和 p53 基因的表达。

结果: (1)hMSH2 在胃癌中的表达阳性率显著高于癌旁组织、胃炎黏膜和正常对照(67.1% vs 35.5%, 42.1%, 30.0%; $P < 0.01$), 其中, 在低分化腺癌中阳性率显著高于高中分化腺癌和黏液癌(81.1% vs 54.5%, 52.9%; $P < 0.05$); hMLH1 在胃癌中的表达阳性率低于非癌组织, 但无显著性差异, 其中, 在黏液癌的阳性率显著低于其他两种腺癌(47.1% vs 81.8%, 97.2%; $P < 0.001$); p53 在胃癌中的表达阳性率显著高于癌旁组织、胃炎黏膜和正常对照(47.4% vs 7.9%, 0.0%, 0.0%; $P < 0.001$), 其中, 在黏液癌和低分化腺癌中的阳性率显著高于高中分化腺癌(64.7%, 54.1% vs 22.7%; $P < 0.05$)。

(2)在全部被检组织中, *H pylori* 感染组 hMSH2 和 hMLH1 的表达阳性率均低于相应的非感染组, 其中, 胃癌 *H pylori* 感染组 hMSH2 的表达阳性率显著低于非感染组(56.8% vs 81.3%)($P < 0.05$)。胃癌及癌旁组织 *H pylori* 感染组 p53 的表达阳性率均高于非感染组, 但无显著性差异。

结论: 胃癌的发生发展可能与 hMSH2 和 p53 基因的高表达有关; *H pylori* 感染影响 hMSH2, hMLH1 和 p53 基因的正常表达, 这可能是 *H pylori* 致癌的机制之一。

范凯, 马坚妹, 胡少为, 王朝晖, 刘敏, 吕申, 刘丽娜, 许国旺. 胃黏膜细胞 hMSH2, hMLH1 和 p53 基因表达与幽门螺杆菌感染的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2904-2907
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2904.asp>

0 引言

胃癌的发生发展涉及多种因素, *H pylori* 感染是其中值得关注的高危因素之一^[1-2]。*H pylori* 感染导致胃癌与癌基因、抑癌基因和错配修复(Mismatch repair, MMR)基因的改变有关。研究证实, MMR 基因能够纠正 DNA 复制过程中产生的碱基错配, 避免癌相关基因的突变, 保证基因的完整性和遗传的稳定性, 从而抑制癌的发生。目前已发现的人类 MMR 基因包括来自 MutS 家族的 hMSH2, hMSH3, hMSH6 及来自 MutL 家族的 hMLH1, hPMS1, hPMS2 和最新被鉴定出来的 hMLH3, 其中, 最早发现的 hMSH2(human MutS homolog 2 gene)和 hMLH1(human MutL homolog 1 gene)与胃癌关系密切^[3-4]。我们采用

免疫组化SP法,检测了hMSH2, hMLH1和p53在胃癌、癌旁、胃炎和正常黏膜中的表达,并分析了 *H. pylori* 感染与这三种基因表达的关系,进一步探讨 *H. pylori*感染在胃癌发生发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 76例胃癌标本来自大连医科大学第一附属医院2000–2002年胃镜下活检组织,其中男性55例,女性21例。患者年龄39–89岁,中位年龄65岁。经病理检查确诊,高中分化腺癌22例,低分化腺癌37例,黏液癌17例。38例胃炎标本均为浅表性胃炎,其中男性21例,女性17例,年龄23–71岁,中位年龄40岁。正常对照标本10例,为胃镜及组织学检查胃黏膜大致正常, *H. pylori*阴性,且无其他系统疾病者。其中男性4例,女性6例,年龄24–64岁,中位年龄44岁。胃癌组织中 *H. pylori*阳性44例,阴性32例;癌旁组织中 *H. pylori*阳性49例,阴性27例;胃炎黏膜中 *H. pylori*阳性26例,阴性12例。所有患者均未进行过抗 *H. pylori*治疗。组织切片经HE染色后,由两位有10 a以上工作经验的病理医师采用双盲法进行病理组织学诊断。

1.2 方法

1.2.1 *H. pylori*感染检测 快速尿素酶试验及HE染色^[5]:两项均为阳性,则判定该病例有 *H. pylori*感染。

1.2.2 hMSH2, hMLH1和p53蛋白的检测 采用抗hMSH2单克隆抗体(美国Calbiochem公司);抗hMLH1单克隆抗体(美国Pharmingen公司);抗p53单克隆抗体(DO7,美国Zymed公司);SP免疫组化试剂盒(美国Zymed公司)。标本经石蜡包埋后制成5 μm的切片,免疫组化过程按试剂盒说明书完成。已知阳性切片作阳性对照,以PBS代替一抗作阴性对照。三种蛋白的阳性表达均以细胞核内出现棕黄色颗粒为准。计数5个高倍视野或500个细胞,阳性细胞百分比大于20%定为阳性表达。

统计学处理 采用 χ^2 检验。

2 结果

表1 hMSH2, hMLH1和p53基因在不同黏膜组织中的表达

| 组别 | n | hMSH2 | | 表达阳性率(%) | hMLH1 | | 表达阳性率(%) | p53 | | 表达阳性率(%) |
|--------|----|-------|----|-------------------|-------|----|-------------------|-----|----|-------------------|
| | | – | + | | – | + | | – | + | |
| 胃癌组织 | 76 | 25 | 51 | 67.1 ^b | 14 | 62 | 81.6 | 40 | 36 | 47.4 ^d |
| 高中分化腺癌 | 22 | 10 | 12 | 54.5 | 4 | 18 | 81.8 | 17 | 5 | 22.7 ^e |
| 低分化腺癌 | 37 | 7 | 30 | 81.1 ^e | 1 | 36 | 97.2 | 17 | 20 | 54.1 |
| 黏液癌 | 17 | 8 | 9 | 52.9 | 9 | 8 | 47.1 ^b | 6 | 11 | 64.7 |
| 癌旁组织 | 76 | 49 | 27 | 35.5 | 7 | 69 | 90.8 | 70 | 6 | 7.9 |
| 胃炎黏膜 | 38 | 22 | 16 | 42.1 | 4 | 34 | 89.5 | 38 | 0 | 0.0 |
| 正常黏膜 | 10 | 7 | 3 | 30.0 | 2 | 8 | 80.0 | 10 | 0 | 0.0 |

$\chi^2 = 17.646$, ^b $P < 0.01$ vs 非癌组织; $\chi^2 = 52.479$, ^d $P < 0.001$ vs 非癌组织; $\chi^2 = 6.391$, ^e $P < 0.05$ vs 高中分化腺癌、黏液癌; $\chi^2 = 8.071$, ^b $P < 0.05$ vs 低分化腺癌、黏液癌; $\chi^2 = 19.564$, ^e $P < 0.001$ vs 其他两种腺癌。

2.1 胃癌、癌旁及胃炎黏膜 *H. pylori*感染率分别为57.9% (44/76), 64.5%(49/76)和68.4%(26/38), 三组之间无显著性差异。

2.2 hMSH2在胃癌中的表达阳性率显著高于非癌组织 ($P < 0.01$), 在低分化腺癌中的表达阳性率显著高于高中分化腺癌和黏液癌 ($P < 0.05$)。hMLH1在胃癌的表达阳性率低于非癌组织, 但无显著性差异 ($P > 0.05$), 其中在黏液癌的阳性表达率显著低于其他腺癌 ($P < 0.01$)。p53在胃癌中的表达阳性率显著高于非癌组织 ($P < 0.01$), 其中在黏液癌和低分化腺癌的阳性率显著高于高中分化腺癌 ($P < 0.05$) (表1)。

2.3 所有被检组织中, *H. pylori*感染组 hMSH2和hMLH1的表达阳性率均低于相应的非感染组, 其中, 胃癌 *H. pylori*感染和非感染组 hMSH2的表达有显著差异 ($P < 0.05$)。胃癌及癌旁组织 *H. pylori*感染组 p53的表达阳性率高于非感染组, 但无显著性差异 ($P > 0.05$) (表2)。

3 讨论

*H. pylori*是一种基因异质性生物,具有多种毒力因子,1994年被国际癌症研究会确定为胃癌I类致癌因子。研究证实,胃黏膜细胞中hMSH2和hMLH1基因的异常表达与 *H. pylori*感染有关^[6]。hMSH2和hMLH1具有识别和切除错配碱基的功能,在消化道和生殖腺等细胞增生活跃、DNA复制容易出现错误的部位常见这两种基因表达产物。研究发现,膀胱癌、宫颈癌、涎腺癌等恶性肿瘤中hMSH2的表达增强^[7–9]。在我们的研究中, hMSH2在胃癌中的表达增强,且在低分化腺癌的表达强于高分化腺癌。这表明细胞增生旺盛有助于hMSH2的表达上调,并提示hMSH2的高表达可以作为包括胃癌在内的某些恶性肿瘤发生的标志。此外,我们还发现hMLH1在胃癌的表达低于非癌组织,提示胃癌的发生可能与hMLH1的低表达有关,这与Kakar *et al*^[10]在大肠癌中的发现相似。hMLH1与hMSH2在表达上出现的不同,在一定程度上反映了二者功能上的区别。因此,联合检测这两种基因可能有助于预测胃癌的发生。

表2 hMSH2, hMLH1 和 p53 基因的表达与幽门螺杆菌感染的关系

| 组别 | n | hMSH2 | | 表达阳性率(%) | hMLH1 | | 表达阳性率(%) | p53 | | 表达阳性率(%) |
|------------------------------------|----|-------|----|-------------------|-------|----|----------|-----|----|----------|
| | | - | + | | - | + | | - | + | |
| <i>H. pylori</i> ⁺ 胃癌组织 | 44 | 19 | 25 | 56.8 ^a | 10 | 34 | 77.2 | 21 | 23 | 52.3 |
| <i>H. pylori</i> ⁻ 胃癌组织 | 32 | 6 | 26 | 81.3 | 4 | 28 | 87.5 | 19 | 13 | 40.6 |
| <i>H. pylori</i> ⁺ 癌旁组织 | 49 | 34 | 15 | 30.6 | 6 | 43 | 87.8 | 43 | 6 | 12.2 |
| <i>H. pylori</i> ⁻ 癌旁组织 | 27 | 15 | 12 | 44.4 | 1 | 26 | 96.3 | 27 | 0 | 0.0 |
| <i>H. pylori</i> ⁺ 胃炎黏膜 | 26 | 16 | 10 | 38.5 | 17 | 9 | 34.6 | 26 | 0 | 0.0 |
| <i>H. pylori</i> ⁻ 胃炎黏膜 | 12 | 6 | 6 | 50.0 | 7 | 5 | 41.7 | 12 | 0 | 0.0 |

$\chi^2=5.010$, ^a $P<0.05$ vs *H. pylori*⁻ 胃癌组织

p53基因是迄今发现的与人类肿瘤相关性最高的基因, 编码 *M. 53 000* 的核磷蛋白, 参与细胞增生调节。野生型 p53 使细胞 G₁ 期停滞, 损伤的 DNA 得以修复, 修复失败则诱导细胞凋亡。突变型 p53 则使 DNA 损伤的细胞不断增生为恶性肿瘤^[11-12]。p53 基因突变后, 其蛋白产物半衰期延长, 抗原性稳定, 可以用免疫组化法检测。我们发现, p53 在胃癌的表达阳性率显著高于癌旁组织, 在低分化腺癌的表达强于高分化腺癌, 在胃炎和正常黏膜中无表达, 表明 p53 与胃癌的发生和分化有关^[13-14]。

通过近几年来对 *H. pylori* 的深入研究, 大多数学者认为 *H. pylori* 感染所致的胃癌一般遵循从慢性浅表性胃炎、慢性萎缩性胃炎、肠上皮化生、不典型增生到胃癌的演变过程。然而, *H. pylori* 感染导致胃癌的分子机制仍不清楚, 推测可能是通过 *H. pylori* 产生损伤因素如细胞毒素等, 以及减弱胃黏膜的保护因素如维生素 C 等, 使组织损伤、胃黏膜上皮细胞增生加速, 以致基因突变, 使细胞向恶性转化。目前, 关于 *H. pylori* 感染与 p53 关系的研究报道很不一致。一些研究发现胃癌中 *H. pylori* 阳性者 p53 的突变率明显高于 *H. pylori* 阴性者, 这种胃癌与突变型 p53 过度表达密切相关^[15]; 而另有研究表明, p53 突变是不依赖 *H. pylori* 的事件, *H. pylori* 感染不会引起 p53 突变^[16-18]; 还有学者认为仅毒素相关蛋白(CagA)阳性 *H. pylori* 感染在胃癌 p53 突变中起重要作用^[19]。在我们的研究中, 胃癌及癌旁组织 *H. pylori* 感染组 p53 的表达阳性率均高于非感染组, 此差异虽不具有显著性, 但随着样本数量的增加, 这种趋势可能会更明显。这提示 *H. pylori* 感染可能促使 p53 基因突变, 突变产物失去抑癌活性, 促使胃黏膜细胞向恶性转化。

Kim *et al*^[6]发现, 在胃黏膜培养细胞的培养液中添加 *H. pylori* 后, hMLH1 和 hMSH2 基因的表达均下降, 故认为 *H. pylori* 感染能引起 hMLH1 和 hMSH2 表达降低。我们发现, 在所有被检测的组织中, *H. pylori* 感染组 hMLH1 和 hMSH2 的表达阳性率均低于相应的非感染组, 其中, 胃癌 *H. pylori* 感染组 hMSH2 的表达阳性率显著低于非感染组, 这证实了 Kim 的结论, 也进一步说明 *H. pylori* 感染不仅对 p53 等下游基因的表达有影响, 同时对 MMR 这类上游基因的表达也有一定影响, 而

这种影响导致 DNA 复制过程中产生的碱基错配不能得到及时有效的修复, 进而造成其他基因不能正常表达。然而, 这种影响是通过何种具体机制实现的, 目前还不能确定。

总之, 胃癌的发生发展与 hMSH2 和 p53 基因的高表达有关; *H. pylori* 感染影响 hMSH2, hMLH1 和 p53 基因的正常表达, 这可能是 *H. pylori* 致癌的机制之一。

4 参考文献

- 1 Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001;345:784
- 2 Wu AH, Crabtree JE, Bernstein L, Hawtin P, Cockburn M, Tseng CC, Forman D. Role of *Helicobacter pylori* CagA+ strains and risk of adenocarcinoma of the stomach and esophagus. *Int J Cancer* 2003;103:815-821
- 3 Fang DC, Wang RQ, Yang SM, Yang JM, Liu HF, Peng GY, Xiao TL, Luo YH. Mutation and methylation of hMLH1 in gastric carcinomas with microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 2003;9:655-659
- 4 Zhang QX, Ding Y, Le XP, Du P. Studies on microsatellite instability in p16 gene and expression of hMSH2 mRNA in human gastric cancer tissues. *World J Gastroenterol* 2003;9:437-441
- 5 王雪梅, 屈汉廷. 检测胃黏膜幽门螺杆菌感染不同方法之比较. *华人消化杂志* 1998;6:128-130
- 6 Kim JJ, Tao H, Carloni E, Leung WK, Graham DY, Sepulveda AR. *Helicobacter pylori* impairs DNA mismatch repair in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 2002;123:542-553
- 7 Leach FS, Hsieh JT, Molberg K, Saboorian MH, McConnell JD, Sagalowsky AI. Expression of the human mismatch repair gene hMSH2: a potential marker for urothelial malignancy. *Cancer* 2000;88:2333-2341
- 8 Castrilli G, Fabiano A, La Torre G, Marigo L, Piantelli G, Ranelletti FO, Piantelli M. Expression of hMSH2 and hMLH1 proteins of the human mismatch repair system in salivary gland tumors. *J Oral Pathol Med* 2002;31:234-238
- 9 陈炳锦, 石一复, 周彩云, 陈晓端. 错配修复基因 hMSH2 在宫颈腺癌组织中的表达. *现代妇产科进展* 2001;10:417-418
- 10 Kakar S, Burgart LJ, Thibodeau SN, Rabe KG, Petersen GM, Goldberg RM, Lindor NM. Frequency of loss of hMLH1 expression in colorectal carcinoma increases with advancing age. *Cancer* 2003;97:1421-1427
- 11 Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature* 1989;342:705-708
- 12 Miracco C, Spina D, Vindigni C, Filipe MI, Tosi P. Cell proliferation patterns and p53 expression in gastric dysplasia. *Int J Cancer* 1995;62:49-54

- 13 卢文, 陈丽英, 龚华实. 胃癌和癌前病变中幽门螺杆菌感染和增生细胞核抗原、p53、c-erbB-2 的表达. 中华肿瘤杂志 1999; 21:25-127
- 14 孟华, 刘丽娜, 吕申. 胃癌及癌前病变中胃黏膜上皮细胞增生及凋亡相关基因蛋白表达. 世界华人消化杂志 2004;12:494-496
- 15 高歌, 周长玉, 林种玉. 胃癌与 Hp 感染及 c-myc, P53 基因表达的关系. 世界华人消化杂志 2000;8:941-943
- 16 田素芳, 熊永炎, 余少平, 蓝菁. 胃癌及其有关病变的幽门螺杆菌感染与抑癌基因表达的相关性研究. 癌症 2002;21:970-973
- 17 杨桂彬, 胡伏连, 吕有勇. 胃黏膜病变演化过程中幽门螺杆菌感

- 染与 p53 变异和 MG-7 抗原及核仁组成区相关蛋白表达的关系. 中华医学杂志 2003;83:1332-1335
- 18 Blok P, Craanen ME, Offerhaus GJ, Dekker W, Kuipers EJ, Meuwissen SG, Tytgat GN. Molecular alteration in early gastric carcinoma. No apparent correlation with *Helicobacter pylori* status. *Am J Clin Pathol* 1999;111:241-247
- 19 Deguchi R, Takagi A, Kawata H, Inoko H, Miwa T. Association between CagA+ *Helicobacter pylori* infection and p53, ba-x and transforming growth factor-beta-RII gene mutations in gastric cancer patients. *Int J Cancer* 2001;91:481-485

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 •

肝细胞cDNA文库中乙型肝炎病毒前-前-S蛋白结合蛋白基因筛选

蔺淑梅, 张树林, 成 军, 刘 敏, 王 琳, 王建军, 杨 倩, 黄燕萍, 白桂芹

蔺淑梅, 张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
成军, 刘敏, 王琳, 王建军, 杨倩, 黄燕萍, 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

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: 010-66933392 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

摘要

目的: 筛选并克隆人肝细胞 cDNA 文库中与乙型肝炎病毒 (HBV) 前-前-S 蛋白相互作用蛋白的基因, 探讨前-前-S 在 HBV 致病中的作用。

方法: 构建前-前-S 的酵母细胞表达载体, 采用酵母双杂交系统筛选人肝细胞 cDNA 文库, 利用核苷酸数据库及生物信息学技术, 对于筛选结果进行分析。

结果: 获得了 54 个与前-前-S 蛋白特异性结合的阳性克隆, 其中包括 30 种已知蛋白基因和 8 个未知功能基因。

结论: 克隆出与乙型肝炎病毒前-前-S 蛋白结合的肝细胞蛋白基因, 为进一步研究前-前-S 在 HBV 致病中的作用奠定了基础。

蔺淑梅, 张树林, 成军, 刘敏, 王琳, 王建军, 杨倩, 黄燕萍, 白桂芹. 肝细胞 cDNA 文库中乙型肝炎病毒前-前-S 蛋白结合蛋白基因筛选. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2907-2910

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2907.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒 (HBV) 感染常见, 不仅引起急、慢性病

毒性肝炎, 而且与肝纤维化 (LF)、肝细胞癌 (HCC) 的发生发展密切相关^[1-12]. HBV 是很小的包膜病毒, 病毒基因组结构精密, 约 3 200 个碱基对 (bp), HBV 至少有含 4 个开放读码框架 (ORF), 分别命名为 S、C、P、X 区, 4 个 ORF 中表达的氨基酸长度不同, 其生物学功能也不相同, 其中全 S 区又因不同的起始密码子 (ATG) 而又人为的分为前-S1、前-S2 和 S 三个区, 前-S1、前-S2 和表面抗原主蛋白是按照同一开放读码顺序 (in frame) 进行翻译的. 最近董菁 *et al*^[13] 对于中国 HBV 流行株的全基因序列进行克隆和序列分析, 发现在前-S1 区之前还存在一个 ORF, 长度 135 bp, 编码 45 aa, 将其命名为前-前-S 区, 并在既往已克隆的 HBV 基因组中得到了证实. 杨倩 *et al*^[14] 对前-前-S 基因启动子序列的鉴定和转录活性的研究证实, 前-前-S- 基因 ORF 上游的序列具有启动子活性, 进一步证实了董菁发现的前-前-S 编码基因存在. 基因是通过蛋白质之间的相互作用而实现其功能的, 病毒蛋白和肝细胞蛋白之间的作用是病毒致病的关键^[15-16]. 为进一步研究前-前-S 基因在 HBV 致病中的作用, 我们利用酵母双杂交技术寻找其与肝细胞中相互作用的蛋白, 并进一步阐明其作用机制, 这对于明确 HBV 致病机制, 有效防治乙型肝炎有着重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料 pGBKT7-BD 克隆载体, *Saccharomyces cerevisiae* AH109 酵母株、Y187 酵母株 (K1612-1)、人 cDNA 肝细胞文库等均购自 Clontech 公司. 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- α -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