

# 乙型肝炎病毒 DNA 聚合酶 N 末端蛋白基因芯片研究

陈国凤, 王琳, 成军, 刘妍, 张健, 邵清, 张玲霞, 李莉

陈国凤, 王琳, 成军, 刘妍, 张健, 邵清, 张玲霞, 李莉, 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, 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. c.j@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:** 检测乙型肝炎病毒(HBV)DNA聚合酶N末端蛋白(TP)的表达对肝母细胞瘤细胞HepG2基因表达谱的影响, 进一步阐明TP在乙型肝炎慢性化及致肝细胞癌发生发展过程中的分子生物学机制。

**方法:** 根据AF384372 HBVDNA病毒株序列设计、合成HBV DNA P-TP基因序列特异性的引物, 以含有AF384372HBVDNA P全基因组cDNA的质粒G318A7作为模板, 应用聚合酶链反应(PCR)技术扩增TP蛋白编码基因片段, 以常规的分子生物学技术将获得的HBV DNA-TP编码基因片段克隆到TA载体中进行核苷酸序列的测定, 构建真核表达载体pcDNA3.1(-)-TP. 以脂质体转染肝母细胞瘤细胞系HepG2, 提取mRNA, 逆转录为cDNA, 与转染空白表达载体pcDNA3.1(-)的HepG2细胞进行DNA芯片分析。

**结果:** 构建的表达载体经过限制性内切酶分析和DNA序列测定, 证实准确无误。以单链可变区抗体的Western blot杂交技术证实构建的表达载体转染HepG2细胞之后有TP蛋白的表达, 提取高质量的mRNA并进行逆转录成为cDNA, 进行DNA芯片技术分析。在1152个基因表达谱的筛选中, 发现有111个基因表达水平显著上调, 88个基因表达水平显著下调。

**结论:** 应用基因表达谱芯片成功筛选了HBV DNA P-TP转染细胞后差异表达基因, 为进一步阐明TP蛋白致病的分子生物学机制提供依据。

陈国凤, 王琳, 成军, 刘妍, 张健, 邵清, 张玲霞, 李莉. 乙型肝炎病毒DNA聚合酶N末端蛋白基因芯片研究. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2911-2915  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2911.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒DNA聚合酶(HBV DNA P)N末端蛋白(TP)基因由534个核苷酸组成, 编码178个氨基酸, 具有多种功能, 主要是由前基因组RNA反转录负链DNA时作为

引物<sup>[1]</sup>. 近年研究表明HBV复制的第一步是HBV聚合酶识别5' - 末端的前基因组RNA的核壳包裹信号 $\epsilon$ . 利用 $\epsilon$ 的茎-环(stem-loop)结构域为模板, 聚合酶的TP内第96位酪氨酸残基为引物, 引导DNA的合成, 同时又是RNA衣壳体包裹信号 $\epsilon$ 的结合位点, 使聚合酶与前基因组RNA结合, 在RT作用下, 病毒RNA转化为DNA<sup>[1-6]</sup>.

我们应用基因芯片技术, 筛选HBV DNA P-TP基因转染细胞后差异表达的基因, 检测TP的表达对肝细胞基因表达谱的影响, 为深入了解HBV DNA P-TP蛋白在HBV病毒慢性感染及致肿瘤发生过程作用中的作用机制提供理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 主要试剂** 肝母细胞瘤细胞系HepG2细胞(由本室保存), 含有AF384372 HBVDNA P全基因组cDNA的质粒G318A7有本室合成并保存. 细胞培养相关试剂、总RNA提取试剂Trizol及真核表达载体pcDNA3.1(-)均购自Invitrogen公司. 人类基因组分类I芯片包括原癌基因和抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、细胞信号转导相关基因等1152个cDNA, 由上海联合基因有限公司提供. mRNA纯化试剂Oligotex mRNA Midi Kit 购自Qiagen公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 真核表达载体构建及细胞转染** 根据HBV DNA AF384372病毒株序列设计、合成HBV DNA P-TP基因序列特异性的引物, 上下游引物序列分别为: 5' - GAA TTC ATG ATG CCC CTA TCT TAT CAA-3', 5' - GGA TCC TTA CTC TTG TTC CCA AGA ATA-3', 下划线部分分别为引物两端内切酶EcoRI和BamHI的酶切位点. 以含有全长AF384372 HBV DNA P基因区的cDNA质粒G318A7作为模板, 应用聚合酶链反应(PCR)技术扩增HBV DNA P-TP的全长编码基因. 先克隆到TA载体中进行序列测定, 然后再亚克隆到真核表达载体pcDNA3.1(-)中, 构建真核表达载体pcDNA3.1(-)-TP. 在35 mm培养皿中常规培养HepG2细胞, 细胞生长至对数期时, 分别以脂质体转染试剂Lipofectamine PLUS将2  $\mu$ g pcDNA3.1(-)-TP和空载体pcDNA3.1(-)转染HepG2细胞, 48 h后收获细胞, 每5  $\times$  10<sup>6</sup>个细胞加入1 mL Trizol试剂, 立即于液氮中保存。

**1.2.2 总RNA提取及mRNA纯化** 使用Trizol试剂一步法提取转染pcDNA3.1(-)-TP和空载体pcDNA3.1(-)的细胞HepG2总RNA(分别标记为实验组和对照组), 样品经分光光度计检测吸光度A值, 并行热稳定实验,

于  $-20^{\circ}\text{C}$  和  $70^{\circ}\text{C}$  保温 1 h 后, 经琼脂糖凝胶电泳检测 28 S、18 S 条带变化. 纯化 mRNA 并行电泳检测.

1.2.3 探针标记及芯片制备 常规方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化. Cy3-dUTP 标记对照组细胞 mRNA ( $5\text{ }\mu\text{g}$ ), Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA ( $5\text{ }\mu\text{g}$ ). 乙醇沉淀后溶解在  $20\text{ }\mu\text{L}$   $5\times\text{SSC}+2\text{ g/L}$  SDS 杂交液中. 芯片包含的 1 152 个 cDNA 以通用引物进行 PCR 扩增, PCR 产物长度为 1 000–3 000 bp. 靶基因以  $0.5\text{ g/L}$  溶解于  $3\times\text{SSC}$  溶液中, 用 Cartesian 公司的 Cartesian 7 500 点样仪及 TeleChem 公司的硅烷化玻片进行点样. 玻片经水合 (2 h)、室温干燥 (30 min), 紫外线 UV 交联, 再分别用  $2\text{ g/L}$  SDS、水及  $2\text{ g/L}$  的硼氢化钠溶液处理 10 min, 晾干备用.

1.2.4 杂交及洗涤 将基因芯片和杂交探针在  $95^{\circ}\text{C}$  水浴变性 5 min, 将混合探针加在基因芯片上, 置于  $60^{\circ}\text{C}$  杂交 15–17 h. 依次以  $2\times\text{SSC}+2\text{ g/L}$  SDS、 $0.1\times\text{SSC}+2\text{ g/L}$  SDS、 $0.1\times\text{SSC}$  洗涤 10 min, 室温晾干.

1.2.5 检测与分析 用 General Scanning 公司的 ScanArray 3 000 扫描芯片. 用预先选定的内参照基因 (24 条管家基因, 每个基因点 2 个点, 共 48 个点) 对 Cy3 和 Cy5 的原始提取信号进行均衡和修正. 用 ImaGene 3.0 软件分析 Cy3、Cy5 两种荧光信号的强度, 计算 Cy5/Cy3 比值. 阳性结果判断:  $\text{Cy5/Cy3}>1.9$ , 红色荧光, 显示表达增强;  $\text{Cy5/Cy3}<0.5$ , 为绿色荧光, 显示表达减弱.

表 1 部分表达显著增强的基因

序号	GenBank 登录号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	NM_006597	Homo sapiens heat shock 70kD protein 8 (HSPA8), mRNA 热休克 70kD 蛋白 8 (HSPA8)	3.029
2	AF070674	Homo sapiens inhibitor of apoptosis protein-1 (MIHC) mRNA, complete cds 凋亡蛋白 1 抑制剂 (MIHC)	3.377
3	NM_006644	Homo sapiens heat shock 105kD (HSP105B), mRNA 热休克蛋白 105kD (HSP105B)	3.823
4	NM_002482	Homo sapiens nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding) (NASP), mRNA 核自身抗原精蛋白 (结合性组蛋白) (NASP)	4.553
5	NM_014887	Homo sapiens hypothetical protein from BCRA2 region (CG005), mRNA	4.602
6	AK055725	Homo sapiens cDNA FLJ31163 fis, clone KIDNE1000050	5.212
7	NM_003276	Homo sapiens thymopoietin (TMPO), mRNA 促胸腺生成素 (TMPO)	6.171
8	M11952	Human T-cell receptor rearranged beta chain gene V-region (V-D-J) V-beta-ATL12-2 T 细胞受体重新排列 $\beta$ 链可变区	10.280

表 2 部分表达显著降低的基因

序号	GenBank 登录号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	NM_005627	Homo sapiens serum/glucocorticoid regulated kinase (SGK), mRNA 血清 / 糖皮质激素调节激酶 (SGK)	0.097
2	NM_001961	Homo sapiens eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF2), mRNA 真核翻译延伸因子 2 (EEF2)	0.131
3	NM_001417	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 4B (EIF4B), mRNA 真核翻译起始因子 4B (EIF4B)	0.228
4	NM_003641	Homo sapiens interferon induced transmembrane protein 1 (9–27) (IFITM1), mRNA 干扰素诱导的跨膜蛋白 1 (9–27)	0.287
5	NM_005954	Homo sapiens metallothionein 3 (growth inhibitory factor (neurotrophic)) (MT3), mRNA 金属硫蛋白 3 (生长抑制因子) (MT3)	0.327
6	NM_002415	Homo sapiens macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor) (MIF), mRNA 巨噬细胞移动抑制因子 (糖基化抑制因子) (MIF)	0.375
7	NM_001551	Homo sapiens immunoglobulin (CD79A) binding protein 1 (IGBP1), mRNA (IGBP1) 免疫球蛋白 (CD79A) 结合蛋白 1	0.382
8	NM_003789	Homo sapiens TNFRSF1A-associated via death domain (TRADD), mRNA TNFRSF1A 相关的死亡域 (TRADD)	0.391

## 2 结果

2.1 HBV DNA P-TP 蛋白真核表达载体的构建 真核表达载体 pcDNA3.1(–)-TP 经过限制性内切酶作图分析和核苷酸序列的测定, 证实含有完整的开放读码框架, 序列准确无误. 以单链可变区抗体的 Western blot 杂交技术证实构建的表达载体转染 HepG2 细胞之后有 TP 蛋白的表达 (有关实验方法及结果将另文发表).

2.2 总 RNA 及 mRNA 的定性、定量分析 总 RNA 的吸光度  $A_{260}/A_{280}>2.0$ , 热稳定实验  $70^{\circ}\text{C}$  保温 1 h 与  $-20^{\circ}\text{C}$  1 h 电泳条带比较, 显示 28 S 条带无明显降解, 电泳结果证实已抽提高纯度的总 RNA. mRNA 主要集中于 0.9–4.0 kb 的连续条带.

2.3 芯片杂交体系验证及结果分析 在芯片上共有 1 152 个 cDNA. 为了监控芯片杂交技术体系的整个过程, 在芯片上设置了阴性对照 (8 条水稻基因, 共 8 个点), 这些点的杂交信号均很低, 证实了数据的可靠性. 由于实验组探针标记 Cy5 荧光素 (呈红色), 对照组探针标记 Cy3 荧光素 (呈绿色), 红绿颜色的差异就显示该基因在实验组和对照组中基因表达水平上的差异, 黄色代表表达水平无差异. 按阳性标准, 从 1 152 个基因中筛选出差异常表达基因共 199 条, 占 17.27%, 其中 111 条基因表达增强, 88 条基因表达降低.

2.4 差异表达基因分析 表达增强的基因主要有信号转导相关基因等 (表 1). 表达降低的基因主要有细胞转录翻译相关蛋白等 (表 2).

### 3 讨论

乙型肝炎病毒(HBV)是嗜肝DNA病毒的一种, HBV DNA的长度为3.2 kb, 具有4个开放读码框架(ORF), 分别编码HBV的表面抗原蛋白, 核心/e抗原蛋白, X蛋白以及HBV DNA聚合酶(HBV DNA P)<sup>[7]</sup>. HBV DNA P基因在ORF中最长, 并且与C、S、X基因区有重叠, 其编码的P蛋白含有3个功能域和1个无意义的隔离片(spacer), 排列顺序为N-末端蛋白(TP), 隔离片(spacer), 逆转录酶(RT)/DNA聚合酶和RNase H, 各区段分别在nt2307-2840、nt133-1128、nt1129-1621和nt2841-0-132<sup>[1]</sup>. 由于受到不能从病毒体直接纯化和在不同的系统中表达有活性的酶的限制, 目前对聚合酶及其所编码的各个功能区域蛋白质的功能的认识还不是很清楚. 目前研究显示, HBV DNA-TP对于完整的聚合酶功能是必要的, 在HBV聚合酶的TP内第96位酪氨酸残基, 是RNA衣壳体信号序列(称为 $\epsilon$ )的结合位点, 在前基因组RNA内用于负链DNA合成. 同时, TP在病毒复制过程中具有蛋白引导功能, 蛋白引导不仅需要病毒逆转录酶和 $\epsilon$  RNA模板, 也需要特异的宿主细胞因子(细胞蛋白), 包括热休克蛋白HSP90, 多种分子伴侣(cochaperone)蛋白, 还有一些不清楚的成分共同组成的核蛋白复合物. 有功能的复合物催化合成短链DNA引物, 该引物又作为 $\epsilon$ 与TP共价结合的模板<sup>[8-14]</sup>.

我们构建了真核细胞表达载体pcDNA3.1(-)-TP, 应用基因表达谱芯片对pcDNA3.1(-)-TP转染的HepG2细胞和以空载体转染的相同细胞系的mRNA进行检测, 通过分析二者之间基因表达的差异信息, 寻找TP蛋白表达对肝细胞基因表达谱的影响. 从表1列举了部分表达增强的基因及编码的蛋白, 如细胞伴侣蛋白(热休克蛋白)HSPA8, HSP105B; 促胸腺生成素(TMPO), T细胞受体重新排列 $\beta$ 链可变区, 凋亡蛋白1抑制剂(MIHC), 核自身抗原精蛋白(结合性组蛋白), 以及某些编码未知功能的蛋白的基因. 分析这些表达增强的基因及所编码的蛋白, HSPA8由HSP70家族基因编码, HSP70家族含有热的诱导剂和组成成分, 后者称为热休克同源蛋白, 这种蛋白与新合成的多肽结合使其更容易正确折叠. 他也在某些膜的成分通过细胞时起ATP酶的功能. HSP90, HSP70, HSP40, Hop/p60和p23均为细胞因子, HSP90和HSP70是ATP酶, 在ATP结合和水解时易于折叠, HSP40能刺激HSP70的ATP酶活性和调节HSP70的陪伴功能. P60能与HSP90和HSP70结合, p23为小的酸性磷蛋白, 与HSP90结合, 进一步提高重组动力学. RT被分子伴侣蛋白活化后是一个动力学过程, 依赖ATP水解和HSP90 ATP酶活性. HSP90及其相关产物在DHBV感染通过RNA信号 $\epsilon$ 与DHBV聚合酶结合对DHBV复制起重要作用. HSP70是HSP90联合体组成成分, 但HSP70可能直接与HBV聚合酶结合, 不需要HSP90参与<sup>[14-17]</sup>. TMPO含有TMPO  $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ , 广泛存在于核蛋白中, 在核包膜组织和细胞周期的调控中

起重要作用, Yokota *et al*<sup>[18]</sup>用抑制性消减杂交技术(SSH), 用Ptc(+/-)杂交鼠为实验动物, 发现TMPO在成纤维细胞瘤(MBs)中表达明显增高. Weber *et al*<sup>[19]</sup>发现TMPOs $\beta$ 在所有的癌细胞检测中都有高度表达, 在低增生的神经组织中表达非常低, 提示TMPOs beta表达可能与癌症发生相关, 可能作为新的肿瘤标记, 或者作为治疗肿瘤的新的靶目标. Gonser *et al*<sup>[20]</sup>研究发现TMPO的氨基酸残基RKDVY(TP5, 胸腺五肽)具有提高细胞免疫水平, 使不同细胞细胞数量和活性提高, 支持其具有多功能效力的推测, 但是在分子水平上机制不清. HBV DNA TP可能通过上调TMPO表达, 刺激机体的细胞免疫反应, 增强对病毒的清除作用, 但另一方面, 也可能是使HBV慢性感染导致肝癌的诱因之一. T细胞受体重新排列 $\beta$ 链可变区(TCRBV)是多基因家族, 含有I类和II类MHC分子假定的结合位点, BV5, BV6, BV7是多基因TCRBV成员. Meyer-Olson *et al*<sup>[21]</sup>利用黑猩猩的TCRBV图谱与人类相似的特点, 用黑猩猩感染HCV作为动物模型, 研究人类感染HCV的分子免疫机制. HBV DNA TP上调TCRBV, 可能对T细胞免疫反应起调节作用. HBV DNA TP对凋亡蛋白1抑制剂(hIAP-1)具有上调作用, hIAP-1由cDNAs CA2\_1编码. CA2\_1(hIAP-1)是由血管壁的内皮细胞和吞噬细胞发生炎症时表达的, 推测其对血管内皮细胞的凋亡起抑制作用<sup>[22]</sup>. 慢性HBV感染时, HBV通过诱导肝细胞凋亡导致肝细胞损害, 病毒与肝组织整合导致肝硬化、甚至肝癌发生, 但是否同时也有一些凋亡抑制因子存在, 使得肝细胞凋亡处于一种动态平衡的状态, 目前尚无相关资料, 需进一步研究HBV DNA TP对凋亡蛋白1抑制剂(hIAP-1)具有上调作用的意义. 核自身抗原精蛋白(结合性组蛋白)(NASP)是在人的睾丸中发现的核组蛋白结合蛋白, 但NASP功能还不是很清楚. 人的体细胞和睾丸NASP mRNAs在不同转换细胞中的表达和在人类肿瘤中的检测, 进一步证明NASP在细胞分裂周期中对分裂细胞起作用<sup>[23-24]</sup>. 此外HBV DNA TP还对一些未知功能的基因起上调作用.

表2列举了部分表达降低的基因及编码的蛋白, 如真核翻译延伸因子2(EEF2), 真核翻译抑制因子4B(EIF4B); TNFRSF1A相关的死亡域; 如干扰素诱导的跨膜蛋白1(9-27), 金属硫因3(生长抑制因子), 巨噬细胞移动抑制因子(糖基化抑制因子), 免疫球蛋白(CD79A)结合蛋白1; 血清/糖皮质激素调节激酶. 分析下调基因, 血清/糖皮质激素调节激酶在肝细胞基因筛选中有调节细胞水合或水肿的作用. 细胞水合作用是分解代谢的信号. SGK可刺激肝糖元分解和蛋白质分解, 抑制蛋白和糖原合成, 并且在激活某种钾钠氯通道方面也是重要的. TGF- $\beta$ 参与糖尿病的并发症的病理生理改变, 他可以刺激SGK在肝细胞内的表达. 因此, TGF- $\beta$ 和SGK在糖尿病肾病时表达提高, 提示SGK与疾病发展有关. 过氧化物酶增生体激活受体(PPAR $\gamma$ )不仅在脂肪细胞分化

和脂质代谢中起重要作用,而且在肾皮质集合管内通过刺激上皮钠通道(epithelial sodium channel, ENaC)的活性来调节钠的重吸收,使机体保持钠和水的动态平衡.PPAR $\gamma$ 可以调节 SGK1 活性,PPAR $\gamma$ 激动剂刺激肾皮质集合管细胞可以使 SGK1 的活性提高,导致细胞表面 ENaC- $\alpha$  水平增加.电泳淌度移动试验显示这是由于 PPAR $\gamma$ 与 SGK1 促进剂的特异性反应元件相结合的结果.

ENaC 由醛固酮和胰岛素共同调节,主要通过 SGK1 起作用.但 SGK 下调在乙肝病毒感染中的意义目前还不清楚,可能引起对钠和水及糖类、脂类代谢的调节作用下降,导致患者易表现为相应的代谢紊乱<sup>[25-27]</sup>.真核翻译延伸因子 2(EEF-2),编码 GTP 结合翻译延伸因子家族的成员,是真核细胞合成蛋白的必要因子.编码 EEF-2 的基因在人类第 19 号染色体上,推测其基因表达下调使蛋白合成能力下降. EIF4B 是多域蛋白,主要是在翻译开始时具有促进信使 RNA 与 40S 亚单位核糖体结合的一系列活性,具有 RNA 识别序列(RNA recognition motif domain)的关键结构,其基因下调可能使 RNA 的结合和延伸活性下降<sup>[28]</sup>,目前有关研究还较少,其对于慢性乙型肝炎病毒感染者的意义有待进一步研究.干扰素诱导的跨膜蛋白 1(9-27)(IFITM1),是人类  $\alpha$  和  $\gamma$  干扰素诱导的 1-8 基因家族成员,是白细胞表面蛋白,最早发现其对干扰素抑制细胞增生起媒介作用,以后又发现其可提高 RSa 细胞对 X 线的抵抗作用<sup>[29]</sup>,其基因表达下调可能导致白细胞等对干扰素作用不敏感,细胞对有害物质的侵袭抵抗力下降.金属硫因(metallothionein-III, MT-III),是金属结合蛋白,在许多组织中有表达,包括脑组织.金属硫因保护细胞和器官免受毒物和氧化剂损害,主要保护各种神经组织,尤其是脑组织免受缺氧的损害<sup>[30-31]</sup>.目前研究还发现 MT-III 通常在胃癌组织中表达明显减低,其机制不清,可能与 MT-III 基因内区 CpG 岛的过甲基化有关<sup>[32]</sup>.在慢性乙肝感染者体内表达下调,可能导致肝细胞抗病毒、抗氧化能力下降.巨噬细胞移动抑制因子(糖基化抑制因子)(MIF)是与细胞免疫、免疫控制以及炎症有关的淋巴因子.他通过抑制糖皮质激素的抗炎作用来调节宿主巨噬细胞防御功能.这种淋巴因子和 JAB1 蛋白在靠近细胞外膜的胞质内形成复合物,可能在形成完整信号通道方面起到附加作用<sup>[33-34]</sup>.同时, MIF 可以与凋亡相关蛋白 BNIP1 相互作用,具有抗凋亡的作用<sup>[35-36]</sup>.对 MIF 的进一步研究可能对人类的多种疾病提供新的治疗方法.免疫球蛋白结合蛋白 1(IGBP1),也称 B 细胞信号转换分子(alpha 4).这种基因被表达为 1.4 kb mRNA,存在于脾、淋巴结、胸腺、阑尾、外周血白细胞、骨髓、胎肝、心、脑、胎盘、骨骼肌、肾、胰腺中.人类 alpha 4 (IGBP1) 基因位于 X 染色体 q13.1-q13.3 上. TNFRSF1A 相关的死亡域(TRADD),是一个含有改造分子的死亡域蛋白(death domain protein, TRADD),同肿瘤坏死因子受体超家族成员 1A(TNFRSF1A)/TNFR1 相互作用,介导

程序性细胞死亡信号和 NF- $\kappa$ B 的激活.这个蛋白结合改造的蛋白 TRAF2,减少凋亡蛋白抑制剂(IAPs)的补充,抑制 TRAF2 介导的凋亡.这种蛋白也能与 TRAF2 受体和改造的蛋白 FADD/MORT1 相互作用,与 Fas 诱导的细胞死亡程序有关. TRAF 蛋白是 TNF 受体超家族的细胞活化、存活、抗凋亡功能的主要递质.既可以直接与受体相互作用又可以间接通过改造蛋白 TRADD 补充到活化的 TNF 受体中. TRADD 表达下调,可能使某些通过引起肿瘤细胞凋亡来达到抗肿瘤治疗作用的化疗药物效果减弱<sup>[37-39]</sup>.

总之,利用基因表达谱芯片技术研究 HBV DNA-TP 蛋白对肝细胞基因表达谱的影响,分析了 TP 蛋白对 HepG2 细胞中许多不同基因表达的调节作用,证明这些基因与细胞信号转导、细胞增生与分化、细胞凋亡等生物过程密切相关,对阐明 HBV DNA-TP 蛋白在慢性 HBV 感染导致的病理生理变化及致肝细胞肿瘤发生中的作用具有重要意义.

#### 4 参考文献

- 1 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001:27-28
- 2 Wang XT, Grammatikakis N, Hu JM. Role of p50/CDC37 in Hepadnavirus assembly and replication. *J Biol Chem* 2002; 277:24361-24367
- 3 Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, Schinazi RF. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* 2001;33:751-757
- 4 Jasper ZP, Robert EL, Rolf IC, Lena N. Properties of monoclonal antibodies directed against hepatitis B virus polymerase protein. *J Virol* 1999;73:4188-4196
- 5 Wang XT, Hu JM. Distinct Requirement for two stages of protein-primed initiation of reverse transcription in hepadnaviruses. *J Virol* 2002;76:5857-5865
- 6 Tang H, McLachlan A. A pregenomic RNA sequence adjacent to DR1 and complementary to epsilon influences hepatitis B virus replication efficiency. *Virology* 2002;303:199-210
- 7 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第 1 版. 北京: 人民军医出版社, 1997:83-103
- 8 陈国凤, 成军, 张玲霞, 李莉. 乙型肝炎病毒 DNA 聚合酶末端蛋白研究进展. 世界华人消化杂志 2004;12:391-393
- 9 陈国凤, 成军, 王琳, 张玲霞, 李莉. 乙型肝炎病毒 DNA 多聚酶 P 结构域研究进展. 世界华人消化杂志 2004;12:393-397
- 10 Li Z, Tyrrell DL. Expression of an enzymatically active polymerase of human hepatitis B virus in a coupled transcription-translation system. *Biochem Cell Biol* 1999;77:119-126
- 11 Kim Y, Hong YB, Jung G. Hepatitis B virus: DNA polymerase activity of deletion mutants. *Biochem Mol Biol Int* 1999;47: 301-308
- 12 Kim Y, Jung G. Active human hepatitis B viral polymerase expressed in rabbit reticulocyte lysate system. *Virus Genes* 1999;19:123-130
- 13 Miriam T, Peter LE, Thien T, Marc LM, Ming Q, Christopher JB, Allison RJ. Animal: DNA viruses: Sequence comparison of an Australian duck hepatitis B virus strain with other avian hepadnaviruses. *J Gen Virol* 2001;82:373-378
- 14 Cho G, Park SG, Jung G. Localization of HSP90 binding sites in the human hepatitis B virus polymerase. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:191-196
- 15 Cho G, Suh SW, Jung G. HBV polymerase interacts independently with N-terminal and C-terminal fragments of Hsp90beta. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;274:203-211

- 16 Hu JM, David T, Dana A, Wang XT. *In Vitro* reconstitution of functional hepadnavirus reverse transcriptase with cellular chaperone proteins. *J Virol* 2002;76:269-279
- 17 Park SG, Kyung RJ, Jung G. Hsp90 makes the human HBV Pol competent for *in vitro* priming rather than maintaining the human HBV Pol/pregenomic RNA complex. *Arch Biochem Biophys* 2002;401:99-107
- 18 Yokota N, Mainprize TG, Taylor MD, Kohata T, Loreto M, Ueda S, Dura W, Grajkowska W, Kuo JS, Rutka JT. Identification of differentially expressed and developmentally regulated genes in medulloblastoma using suppression subtraction hybridization. *Oncogene* 2004;23:3444-3453
- 19 Weber PJ, Eckhard CP, Gonser S, Otto H, Folkers G, Beck-Sickinger AG. On the role of thymopoietins in cell proliferation. Immunochemical evidence for new members of the human thymopoietin family. *Biol Chem* 1999;380:653-660
- 20 Gonser S, Crompton NE, Weber PJ, Beck-Sickinger AG, Folkers G. TP5 triggers signal transduction involving mitogen activated protein kinases in monocytes. *J Recept Signal Transduct Res* 1999;19:155-166
- 21 Meyer-Olson D, Brady KW, Blackard JT, Allen TM, Islam S, Shoukry NH, Hartman K, Walker CM, Kalams SA. Analysis of the TCR beta variable gene repertoire in chimpanzees: identification of functional homologs to human pseudogenes. *J Immunol* 2003;170:4161-4169
- 22 Horrevoets AJ, Fontijn RD, van Zonneveld AJ, de Vries CJ, ten Cate JW, Pannekoek H. Vascular endothelial genes that are responsive to tumor necrosis factor-alpha in vitro are expressed in atherosclerotic lesions, including inhibitor of apoptosis protein-1, stannin, and two novel genes. *Blood* 1999;93:3418-3431
- 23 Richardson RT, Bencic DC, O'Rand MG. Comparison of mouse and human NASP genes and expression in human transformed and tumor cell lines. *Gene* 2001;274:67-75
- 24 Richardson RT, Batova IN, Widgren EE, Zheng LX, Whitfield M, Marzluff WF, O'Rand MG. Characterization of the histone H1-binding protein, NASP, as a cell cycle-regulated somatic protein. *J Biol Chem* 2000;275:30378-30386
- 25 Hong G, Lockhart A, Davis B, Rahmoune H, Baker S, Ye L, Thompson P, Shou Y, O'Shaughnessy K, Ronco P, Brown J. PPARgamma activation enhances cell surface ENaCalpha via up-regulation of SGK1 in human collecting duct cells. *FASEB J* 2003;17:1966-1968
- 26 Farman N, Boulkroun S, Courtois-Coutry N. Sgk: an old enzyme revisited. *J Clin Invest* 2002;110:1233-1234
- 27 Lang F, Cohen P. Regulation and physiological roles of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase isoforms. *Sci STKE* 2001;108:17
- 28 Fleming K, Ghuman J, Yuan X, Simpson P, Szendroi A, Matthews S, Curry S. Solution structure and RNA interactions of the RNA recognition motif from eukaryotic translation initiation factor 4B. *Biochemistry* 2003;42:8966-8975
- 29 Kita K, Sugaya S, Zhai L, Wu YP, Wano C, Chigira S, Nomura J, Takahashi S, Ichinose M, Suzuki N. Involvement of LEU13 in interferon-induced refractoriness of human RSa cells to cell killing by X rays. *Radiat Res* 2003;160:302-308
- 30 Tanji K, Irie Y, Uchida Y, Mori F, Satoh K, Mizushima Y, Wakabayashi K. Expression of metallothionein-III induced by hypoxia attenuates hypoxia-induced cell death in vitro. *Brain Res* 2003;976:125-129
- 31 You HJ, Oh DH, Choi CY, Lee DG, Hahm KS, Moon AR, Jeong HG. Protective effect of metallothionein-III on DNA damage in response to reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 2002;1573:33-38
- 32 Deng D, El-Rifai W, Ji J, Zhu B, Trampont P, Li J, Smith MF, Powel SM. Hypermethylation of metallothionein-3 CpG island in gastric carcinoma. *Carcinogenesis* 2003;24:25-29
- 33 Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;3:791-800
- 34 Leng L, Metz CN, Fang Y, Xu J, Donnelly S, Baugh J, Delohery T, Chen Y, Mitchell RA, Bucala R. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med* 2003;197:1467-1476
- 35 Shen L, Hu J, Lu H, Wu M, Qin W, Wan D, Li YY, Gu J. The apoptosis-associated protein BNIP1 interacts with two cell proliferation-related proteins, MIF and GFER. *FEBS Lett* 2003;540:86-90
- 36 Nguyen MT, Lue H, Kleemann R, Thiele M, Tolle G, Finkelmeier D, Wagner E, Braun A, Bernhagen J. The cytokine macrophage migration inhibitory factor reduces pro-oxidative stress-induced apoptosis. *J Immunol* 2003;170:3337-3347
- 37 Thorburn J, Frankel AE, Thorburn A. Apoptosis by leukemia cell-targeted diphtheria toxin occurs via receptor-independent activation of Fas-associated death domain protein. *Clin Cancer Res* 2003;9:861-865
- 38 Rokudai S, Fujita N, Kitahara O, Nakamura Y, Tsuruo T. Involvement of FKHR-dependent TRADD expression in chemotherapeutic drug-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 2002;22:8695-8708
- 39 Park YC, Ye H, Hsia C, Segal D, Rich RL, Liou HC, Myszka DG, Wu H. A novel mechanism of TRAF signaling revealed by structural and functional analyses of the TRADD-TRAF2 interaction. *Cell* 2000;101:777-787