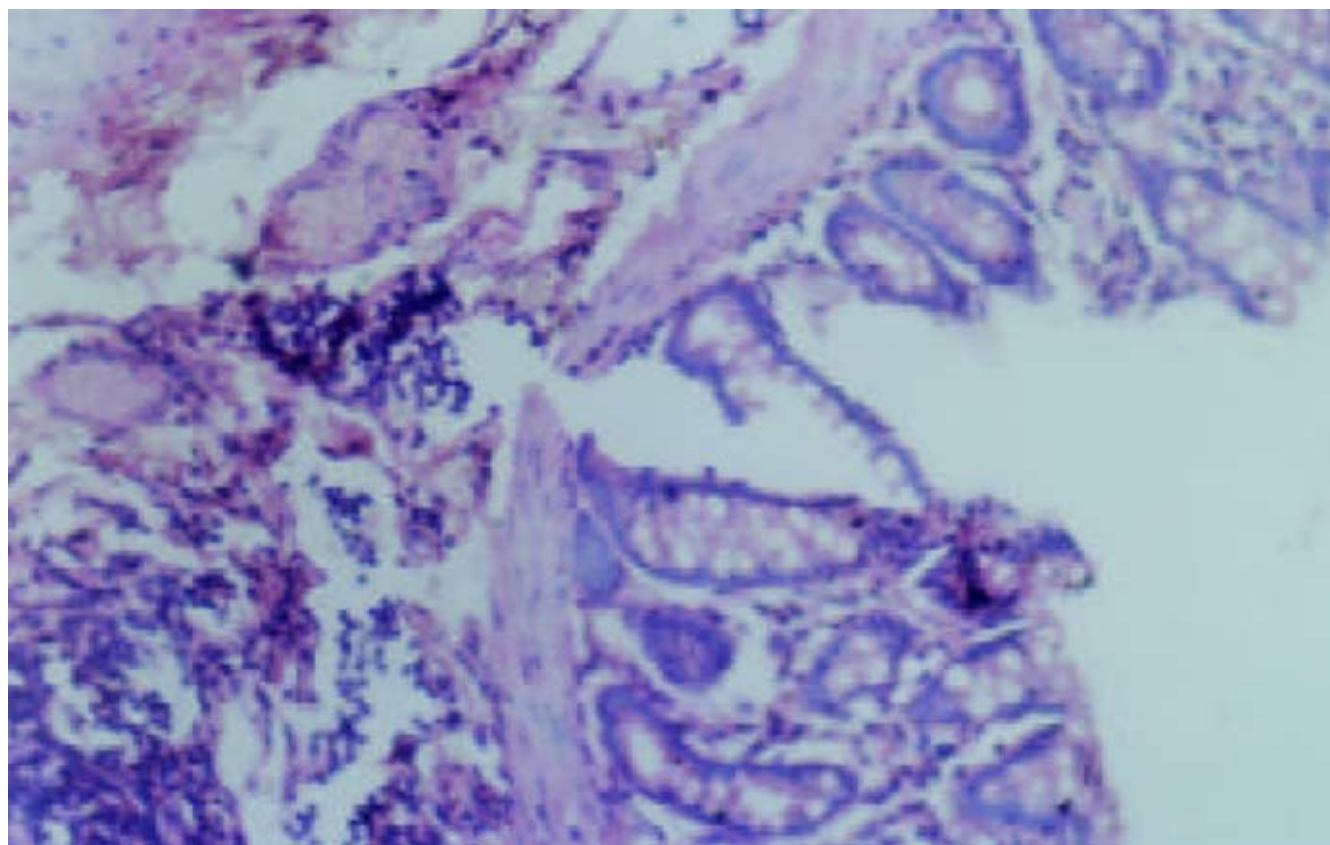


# 世界华人消化杂志

**WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

**Shijie Huaren Xiaohua Zazhi**

**2004 年 2 月 15 日      第 12 卷      第 2 期      (Volume 12 Number 2)**



**2/2004**

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊,  
2003年百种中国杰出学术期刊,  
《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学  
类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊.  
世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》,  
荷兰《医学文摘库/医学文摘》,  
俄罗斯《文摘杂志》收录.

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2004 年 2 月 15 日 第 12 卷 第 2 期 (总第119期)

述 评	253 肝炎病毒蛋白对肝细胞基因组转录调节及信号转导机制的影响 成军
胃 癌	258 胃癌线粒体DNA拷贝量的变化 韩琤波, 李凡, 杨雪飞, 毛晓韵, 吴东瑛, 辛彦 262 胃癌前病变p21 <sup>ras</sup> , c-erbB-2, p53表达与中医证候的关系 胡玲, 劳绍贤 266 胃癌淋巴结转移预测的多因素分析 黄宝俊, 徐惠绵, 赵雨杰, 王天骄, 田大彤, 陈峻青
肝 癌	271 人鼠嵌合Fab抗体通用表达载体的构建和抗人肝癌相关抗原HAb18G嵌合Fab抗体的表达 邢金良, 杨向民, 张思河, 姚西英, 梁瑞安, 陈志南 276 肝癌细胞H <sub>22</sub> 与树突状细胞杂交瘤苗的实验研究 张娟, 张锦堃, 卓少宏 280 肝细胞癌hOGG1 mRNA及其蛋白的表达 周秀敏, 林菊生, 章金艳, 张莉, 周鹤俊 283 小鼠AFP-CTLA4融合蛋白真核表达载体的构建及鉴定 田耕, 易继林
病毒性肝炎	286 丙型肝炎病毒核心蛋白结合视黄醇脱氢酶11蛋白 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 钟彦伟 291 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A结合蛋白37小鼠同源基因的克隆化及结构分析 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 钟彦伟 298 新生儿HBe Ag在HBV宫内感染中的作用 邵中军, 门可, 徐剑秋, 徐德忠, 闫永平, 张景霞 302 应用抑制性消减杂交技术筛选TAHCCP2的反式调节基因 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 徐志强, 王春花 306 基因表达谱芯片筛选NS5ATP3转染细胞差异表达基因 刘妍, 杨倩, 成军, 王建军, 纪冬, 党晓燕, 王春花 311 基因表达谱芯片技术筛选NS5A-TP4蛋白反式调节基因 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 洪源, 张树林 315 HCV包膜糖蛋白E2基因的克隆、蛋白表达及纯化 杜德伟, 贾战生, 秦鸿雁, 刘秋平, 周永兴, 韩 骅 319 应用表达谱芯片技术对NS5ATP7反式调节基因的研究 张健, 刘妍, 成军, 王琳, 邵清, 梁耀东, 李强, 刘 敏 323 应用表达谱芯片技术筛选NS5ATP9反式调节基因的研究 李强, 梁耀东, 成军, 王琳, 王建军, 张健, 刘妍, 程明亮 327 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒反式调节靶基因的抑制性消减杂交和基因芯片分析结果的比较 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩, 王琳 332 多对型特异性引物巢式PCR检测湖南省乙肝病毒基因型 温志立, 谭德明
基础研究	336 人肝素酶基因正反义腺病毒表达载体的构建及鉴定 蔡永国, 房殿春, 杨仕明, 罗元辉, 杨孟华, 王东旭 339 正常与硬化肝组织基因表达差异的初步分析 刘连新, 陈志宏, 武林枫, 李宏伟, 刘芝华, 姜洪池, 王秀琴, 吴 旻 344 癌基因对大鼠肝卵圆细胞分化和转化的影响 廖 冰, 薛 玲, 何萍, 赵国强, 车丽洪 347 中药抗纤软肝颗粒抑制PDGF诱导的肝星状细胞MEK-1和Ic-fos表达 杨 玲, 朱清静, 笪邦红, 张赤志

	<p>351 实验性肝硬化大鼠小肠血红素氧合酶的表达 田德安, 周晓黎</p> <p>355 胃黏膜保护剂预防幽门螺杆菌培养上清液所致小鼠胃黏膜损伤 崔梅花, 胡伏莲, 董欣红</p> <p>359 结肠充气CT对检测大肠肿瘤的敏感性和特异性 王毅, 龚水根, 张伟国, 陈金华, 张连阳, 陈金萍</p> <p>363 胃溃疡大鼠胃泌素、生长抑素和GD细胞的变化 孙凤莲, 宋于刚, 覃汉荣</p> <p>367 当归多糖对大鼠乙酸性结肠炎的保护作用 刘少平, 董卫国, 余保平, 罗和生, 于皆平, 吴东方</p> <p>371 达纳康对大鼠溃疡性结肠炎细胞因子的影响 周燕红, 于皆平, 何小飞, 余细球</p>
临床研究	<p>376 恶性腹水基质金属蛋白酶活性分析 孙晓敏, 董卫国, 余保平, 罗和生, 于皆平</p> <p>379 慢性浅表性胃炎脾胃湿热证与水通道蛋白4蛋白表达的关系 周正, 劳绍贤, 黄志新, 张向菊, 黄烈平, 匡忠生</p> <p>382 肠易激综合征患者肠黏膜肥大细胞的变化 王静, 梁列新, 张志雄, 李国华, 钱伟, 侯晓华</p> <p>385 MRI评估肝硬化再生结节和退变结节 徐海波, 孔祥泉, 熊茵, 冯敢生</p>
焦点论坛	<p>390 卵巢巨大巧克力囊肿误诊为结核性腹膜炎7 a 1例 冯莉娟, 张桂英, 陈凤英, 晏仲舒</p> <p>391 乙型肝炎病毒DNA聚合酶末端蛋白研究进展 陈国凤, 成军, 张玲霞, 李莉</p> <p>393 乙型肝炎病毒DNA 多聚酶P结构域研究进展 陈国凤, 成军, 王琳, 张玲霞, 李莉</p> <p>397 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对转录因子ATF-1的调节 王春花, 成军, 郎振为, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕</p> <p>401 乙型和丙型肝炎病毒与胱冬肽酶3的关系 纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花</p> <p>403 乙型和丙型肝炎病毒对转录因子Nur77的调节 成军</p> <p>406 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对层粘连蛋白表达的调节 王建军, 成军, 刘妍, 杨倩, 纪冬, 王春花</p> <p>408 转录因子C/EBPb的生物学功能 成军</p> <p>412 活性氧簇与肝炎病毒的关系 梁耀东, 成军, 吴君, 程明亮</p> <p>414 趋化因子与病毒性肝炎的关系 陆荫英, 成军, 张玲霞</p> <p>417 病毒性肝炎发病机制中环氧合酶的作用 刘敏, 成军, 张树林</p>
文献综述	<p>420 乙型肝炎病毒DNA整合的机制及后果 成军</p> <p>428 基质金属蛋白酶及其抑制物与实验性肝纤维化 郑伟达, 王小众</p> <p>432 建议将亚临床型肝性脑病更名为轻微型肝性脑病 贾林</p> <p>434 右叶部分肝移植临床解剖进展 刘静, 高毅, 钟世镇</p> <p>439 肝素酶: 抗肿瘤转移的新靶点 陈陵, 杨仕明, 房殿春, 王东旭</p> <p>443 肠道上皮特异性基因CDX2 宋艳, 李凌</p> <p>446 细胞凋亡与肝移植免疫耐受 刘静, 汪爽, 高毅, 孙尔维</p> <p>450 自身免疫性肝炎诊断与治疗 欧强, 谭德明</p> <p>454 VEGF在肝癌中作用 邓靖宇, 何生</p>
研究快报	<p>459 胰腺癌组织中COX-2和Bcl-2蛋白的表达及其意义 刘希双, 李玉军, 田宇彬, 张翠萍, 孙显路, 魏良洲, 薛会光, 刘思良</p> <p>461 3种富集胃癌患者外周血中胃癌细胞方法的比较 陈健, 郭俊明, 金之瑾, 肖丙秀</p> <p>464 肠缺血再灌注对小肠屏障、吸收、通透和传输功能的影响 黎君友, 孙丹, 吕艺, 晋桦, 胡森, 盛志勇</p> <p>467 MUC5AC蛋白在大肠肿瘤中的表达及意义 卜晓东, 李俐, 黄培林, 樊克武, 赵建华</p> <p>469 卵巢巨大巧克力囊肿误诊为结核性腹膜炎7 a 1例 冯莉娟, 张桂英, 陈凤英, 晏仲舒</p> <p>471 肛管直肠原发性恶性黑色素瘤临床病理特点 赵尔增, 张建中, 岳茂兴</p> <p>473 细胞周期蛋白D1 RT-PCR ELISA的建立及其初步应用 陈兵, 张雪, 府伟灵, 常杭花, 刘为纹, 徐采朴, 史景泉</p> <p>476 胃肠激素与不同类型反流所致食管炎的相关性 王雯, 李兆申, 许国铭, 张志坚, 林克荣</p> <p>477 尼美舒利对结肠癌细胞ICAM-1 mRNA表达的影响 刘伟, 张超</p>

## 临床经验

- 480 腹腔镜次/全结肠切除术治疗结肠慢传输性便秘4例 张连阳, 刘宝华, 陈金萍, 文亚洲
- 481 内镜下氩离子凝固术治疗胃肠息肉 毛振彪, 黄介飞, 陆静娴, 俞智华, 倪润洲
- 483 肝硬化门脉系统食管侧支血流动力学与血浆内皮素的关系 肖际东, 李瑞珍, 周平, 朱文晖
- 485 大黄与促肝细胞生长素联合治疗重型肝炎 黄以群, 林珍辉, 纪树梅, 王喻, 王崇国
- 487 5 km长跑对新兵胆囊排空及胃肠激素的影响 李小丽, 郝悦, 杨凤江, 邹勤, 李智力, 李晓春
- 488 药物性肝病41例 苏淑慧, 王春平, 李迎新, 冯永毅
- 490 数字化成像结肠双对比造影检查345例 何发清, 官泳松, 王小林, 郭兵文, 孙龙
- 492 胃十二指肠隐匿性穿孔的诊断与治疗4例 詹世林, 吴良平, 蒲森水
- 494 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 孟华, 刘丽娜, 吕申
- 497 胃十二指肠疾病与幽门螺杆菌感染的相关性分析 周惠萌, 范欣敏
- 499 原发性胆汁性肝硬化37例临床分析 董正芳, 程留芳
- 501 射频消融联合局部热化疗治疗特殊部位肝脏恶性肿瘤 田伏洲, 陈涛, 蔡忠红, 陈琪
- 503 卵巢巨大巧克力囊肿误诊为结核性腹膜炎7 a 1例 冯莉娟, 张桂英, 陈凤英, 晏仲舒

## 封面故事

- 371 达纳康对大鼠溃疡性结肠炎细胞因子的影响  
周燕红, 于皆平, 何小飞, 余细球 世界华人消化杂志 2004; 12(2): 371-375  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v12/i2/371.htm>

## 国际会议

- 13th United European Gastroenterology Week, UEGW  
October 15-20, 2005
- American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting  
October 28-November 2, 2005
- ISGCON 2005  
November 11-15, 2005  
[isgcon2005@yahoo.co.in](mailto:isgcon2005@yahoo.co.in)  
[www.isgcon2005.com](http://www.isgcon2005.com)
- Advanced Capsule Endoscopy Users Course  
November 18-19, 2005  
[www.asge.org/education](http://www.asge.org/education)
- II Latvian Gastroenterology Congress  
November 29, 2005  
[gec@stradini.lv](mailto:gec@stradini.lv)  
[www.gastroenterologs.lv](http://www.gastroenterologs.lv)
- 2005 CCFA National Research and Clinical Conference - 4th Annual Advances in the Inflammatory Bowel Diseases  
December 1-3, 2005  
[c.chase@imedex.com](mailto:c.chase@imedex.com)  
[www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm](http://www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm)
- 10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus  
February 22-25, 2006  
[isde@sapmea.asn.au](mailto:isde@sapmea.asn.au)  
[www.isde.net](http://www.isde.net)

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名  
陈可冀 题写版权刊名  
(半月刊)

创刊 1993-01-15  
改刊 1998-01-25  
出版 2004-02-15  
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生

编辑部主任 张海宁 中文编辑 潘伯荣 张海宁

英文编辑 张海宁 排版校对 张敏 张勇 李琪

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会  
030001, 山西省太原市双塔西街77号

出版 世界胃肠病学杂志社  
100023, 北京市2345信箱  
E-mail: [wcjd@wjgnet.com](mailto:wcjd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

电话: 010-85381901  
传真: 010-85381893

印刷 北京科信印刷厂

发行 国内: 北京报刊发行局  
国外: 中国国际图书贸易总公司  
(100044, 北京市399信箱)

订购 全国各地邮电局

邮购 世界胃肠病学杂志社发行部  
(100023, 北京市2345信箱)  
电话: 010-85381901  
传真: 010-85381893

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 2003年百种中国杰出学术期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊. 世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录.

### 特别声明

本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.

2005年版版权归世界胃肠病学杂志社所有

ISSN 1009-3079  
CN 14-1260/R

邮发代号  
82-262

国外代号  
M 4481

国内定价  
每期24.00元 全年576.00元

广告经营许可证  
1401004000050

[www.wjgnet.com](http://www.wjgnet.com)

# 应用抑制性消减杂交技术筛选TAHCCP2的反式调节基因

王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 徐志强, 王春花

王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 徐志强, 王春花, 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

王建军, 男, 汉族, 1975-06生, 吉林省通化市人, 1999年毕业于第一军医大学, 现为军医进修学院2001级内科传染病学专业硕士研究生, 主要从事肝炎病毒蛋白的反式调节作用研究。

国家自然科学基金攻关项目, No.C03011402, No.C30070689, No.C39970674, No.C39900130, 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: 2003-07-12 接受日期: 2003-08-16

## Screening and cloning of the target genes transactivated by TAHCCP2 using suppression subtractive hybridization technique

Jian-Jun Wang, Yan Liu, Jun Cheng, Qian Yang, Dong Ji, Xiao-Yan Dang, Zhi-Qiang Xu, Chun-Hua Wang

Jian-Jun Wang, Yan Liu, Jun Cheng, Qian Yang, Dong Ji, Xiao-Yan Dang, Zhi-Qiang Xu, Chun-Hua Wang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China Supported by National Natural Science Foundation of China, No. C03011402, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA, No. 98H038

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn Received: 2003-07-12 Accepted: 2003-08-16

## Abstract

**AIM:** To clone and identify human genes transactivated by TAHCCP2 by constructing a cDNA subtractive library with suppression subtractive hybridization technique.

**METHODS:** Suppression subtractive hybridization (SSH) and bioinformatics techniques were used for screening and cloning of the target genes transactivated by TAHCCP2 protein. The mRNA was isolated from HepG2 cells transfected with pcDNA3.1(-)-TAHCCP2 and pcDNA3.1(-) empty vector, respectively, and SSH method was employed to analyze the differentially expressed DNA sequence between the two groups. After restriction enzyme Rsa I digestion, small sizes cDNAs were obtained. Then tester cDNA was divided into two groups and ligated to the specific adaptor 1 and adaptor 2, respectively. After tester cDNA was hybridized with driver cDNA twice and underwent two times of nested PCR and then was subcloned into T/A plasmid vectors to set up the subtractive library. Amplification of the library was carried out with E. coli strain JM109. The cDNA was sequenced and analyzed in GenBank with Blast search after PCR.

**RESULTS:** The subtractive library of genes transactivated by TAHCCP2 was constructed successfully. The amplified library contained 70 positive clones. Colony PCR showed that these clones contained 200-1 000 bp inserts. Sequence analysis was performed in 32 clones, and the full length sequences were obtained with bioinformatics method. Altogether 15 coding sequences were achieved.

**CONCLUSION:** The obtained sequences may be target genes transactivated by TAHCCP2 among which some genes coding proteins involve in cell cycle regulation, metabolism, immunity and cell apoptosis. Advanced experiments need to be done to prove this finding.

Wang JJ, Liu Y, Cheng J, Yang Q, Ji D, Dang XY, Xu ZQ, Wang CH. Screening and cloning of the target genes transactivated by TAHCCP2 using suppression subtractive hybridization technique. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(2):302-305

## 摘要

**目的:** 筛选与克隆TAHCCP2的反式激活基因, 了解其可能存在的调节功能线索。

**方法:** 应用抑制性消减杂交(SSH)技术及生物信息学(bioinformatics)技术筛选并克隆TAHCCP2反式激活的新型靶基因。以TAHCCP2表达质粒pcDNA3.1(-)-TAHCCP2转染HepG2细胞, 以空载体pcDNA3.1(-)为平行对照, 制备转染后的细胞裂解液, 提取mRNA并逆转录为cDNA, 经Rsa I酶切后, 将实验组cDNA分成两组, 分别与两种不同的接头衔接, 再与对照组cDNA进行两次消减杂交及两次抑制性聚合酶链反应(PCR), 将产物与T/A载体连接, 构建cDNA消减文库, 并转染大肠杆菌进行文库扩增, 随机挑选克隆PCR扩增后进行测序及同源性分析。

**结果:** 成功构建人TAHCCP2反式激活基因差异表达的cDNA消减文库。文库扩增后得到70个阳性克隆, 进行菌落PCR分析, 均得到200-1 000 bp插入片段。对插入片段测序, 并通过生物信息学分析获得其全长基因序列, 结果共获得15种编码基因。

**结论:** 筛选到的cDNA全长序列, 包括一些与细胞生长调节、物质代谢、免疫及细胞凋亡密切相关的蛋白编码基因, 推测了TAHCCP2可能存在的调控机制的线索, 尚需进一步的实验证明。

王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 徐志强, 王春花. 应用抑制性消减杂交技术筛选TAHCCP2的反式调节基因. 世界华人消化杂志 2004;12(2): 302-305

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/302.asp>



## 0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)基因组含有单一的开放读码框架, 编码 3 010-3 033 个氨基酸残基(aa)的多蛋白前体, 两侧是 5' - 非翻译区及 3' - 非翻译区. 多蛋白前体至少被加工为 10 种结构蛋白和非结构蛋白, 其中核心区(1-573 nt)编码的 21 kD HCV 核衣壳蛋白(191 aa)是一种多功能蛋白质, 能够影响多种细胞信号转导途径, 激活多种病毒及细胞基因启动子, 具有广泛的反式激活作用<sup>[1-6]</sup>, 最近研究还发现其与 HCV 感染后脂肪肝的形成也有一定关系<sup>[7-9]</sup>, 在 HCV 致病过程中可能起着重要的作用. 本室利用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH), 对于表达 HCV 核心蛋白载体转染的 HepG2 细胞进行研究, 结合生物信息学技术(bioinformatics)克隆了 HCV 核心蛋白反式激活作用的新靶基因, 命名为 HCV 核心蛋白反式激活基因 2 (TAHCCP2). 继续应用抑制性消减杂交技术筛选与克隆 TAHCCP2 反式激活的基因, 推测其在体内可能存在功能的线索, 为研究 HCV 的致病机制及探索未知基因的功能提供了新的方向.

## 1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态大肠杆菌 JM109(本室保存), pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen 公司); FuGENE6 转染试剂(Roche 公司), mRNA Purification 试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech 公司), PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50×PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒(Clontech 公司), High Pure PCR Product Purification 试剂盒(Boehringer Mannheim 公司), T7、SP6 通用引物及 pGEM-Teasy 载体(Promega 公司).

### 1.2 方法

1.2.1 消减杂交文库的建立及克隆分析 分别将 pcDNA3.1(-)-core 及 pcDNA3.1(-)空载体转染 HepG2 细胞, 48 h 后提取 mRNA, 按 PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒扩增差异表达的 cDNA. 对于所获基因片段序列分析表明, 其中之一为新型基因片段, 与 GenBank 中注册的已知功能基因序列没有同源性, 利用表达序列标签(EST)序列的搜索和比对, 进行电子拼接, 根据基因起始密码子的 Kozak 规则和终止密码子下游保守的多聚腺苷酸信号序列, 确定新型基因序列. 从 HepG2 细胞提取总 RNA, 以逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)技术扩增获得该新基因的全长序列, 并测序证实, 命名为 HCV 核心蛋白反式激活基因 2(TAHCCP2), 在 GenBank 中注册, 注册号为 AY039043. TAHCCP2 基因的编码序列全长为 429 个核苷酸(nt), 编码产物由 142 个氨基酸残基(aa)组成.

1.2.2 真核表达载体及细胞转染 TAHCCP2 真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-TAHCCP2 由本室构建. 用 FuGENE6 转染试剂将 2 μg pcDNA3.1(-)-TAHCCP2 及 pcDNA3.1(-)空载体分别转染 35 mm 平皿 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞.

1.2.3 细胞 mRNA 提取 使用 mRNA Purification 试剂盒,

直接提取转染了核心表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA, 经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性定量分析.

1.2.4 双链 cDNA(dscDNA)合成 用 Clontech 公司的 PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit 中的试剂, 以获得的 mRNA 为模板逆转录合成 cDNA.

1.2.5 消减杂交文库的建立 采用 Clontech 公司的 PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit<sup>[3]</sup>, 常规 SSH 方法按说明书进行: 转染了核心表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 cDNA 分别标记为 Tester 和 Driver, 经 Rsa I (一种识别 4 碱基序列的内切酶)消化, 产生相对较短的平端片段, 纯化酶切产物. 将 Tester 的 cDNA 分为两份, 分别连接试剂盒提供的特殊设计的寡核苷酸接头 Adapter 1 和 Adapter 2, 然后与过量的 Driver cDNA 进行杂交; 合并两种杂交产物后再与 Driver cDNA 作第 2 次杂交; 然后将杂交产物做选择性 PCR 扩增, 使 Tester cDNA 中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增.

1.2.6 克隆鉴定分析 扩增产物与 pGEM-Teasy 载体连接, 转化 JM109 感受态细菌, 在含氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37 °C 培养 18 h. 挑取白色菌落, 增菌, 以 pGEM-Teasy 载体多克隆位点两端 T7/SP6 引物进行菌落 PCR 扩增, 证明含有插入片段后(100-1 000 bp), 测序(上海申友公司). 应用生物信息学将测得序列 GenBank 数据库进行同源性分析.

## 2 结果

2.1 pcDNA3.1(-)-TAHCCP2 的表达载体构建 TAHCCP2 真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-TAHCCP2 经测序及酶切鉴定均正确.

2.2 mRNA 的定性定量分析 使用高质量的 mRNA 是保证 cDNA 高产量的前提. 紫外分光检测显示, 转染了 pcDNA3.1(-)-TAHCCP2 质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA 分别为 4.64 μg 和 4.38 μg, A260/A 280=1.87. 1.0% 琼脂糖凝胶电泳见 mRNA 为大于 0.5 kb 清晰慧尾片状条带.

2.2 dscDNA 两端连接效率检测 dscDNA 与接头连接效率的高低是决定抑制性消减杂交成败的最关键步骤. 将连接有 adaptor 1 和 adaptor 2 的两组 dscDNA 分别用不同的特异性引物(看家基因甘油三磷酸脱氢酶 G3PDH 引物)进行 28 个循环扩增, 产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定. 结果显示两组 dscDNA 扩增产物浓度相当, 说明 dscDNA 已与接头高效率连接.

2.3 cDNA 消减文库消减效率的鉴定 分别取 1 μL 抑制性及非抑制性 PCR 产物为模板, 用看家基因 G3PDH 引物进行 PCR 扩增, 分别在 18、23、28、33 次循环结束时从体系中吸取 5 μL 进行电泳鉴定. 结果显示: 与非抑制性 PCR 产物相比, 抑制性 PCR 产物中 G3PDH 基因产物大大减少, 说明所构建的消减文库具有很高的消减效率(图 1).

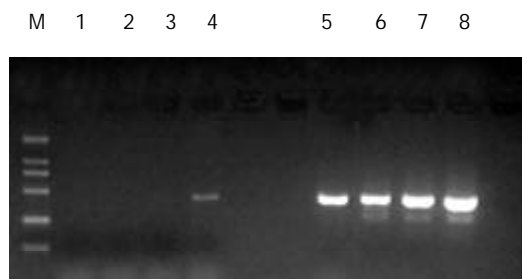


图1 消减效率分析结果. 1-4: 消减组, 引物为 G3PDH3'、5', PCR 循环次数分别为 18、23、28、33; 5-8: 未消减组, 引物为 G3PDH3'、5', PCR 循环次数分别为 18、23、28、33.

2.4 差异表达 cDNA 片段的扩增及克隆 杂交产物经两轮 PCR 扩增后, 菌落 PCR 扩增结果显示为 200-1 000 bp 大小不等的插入片段, 所获得的 70 个克隆中几乎均含有插入片段, 这些条带可能代表差异表达的基因片段(图 2).

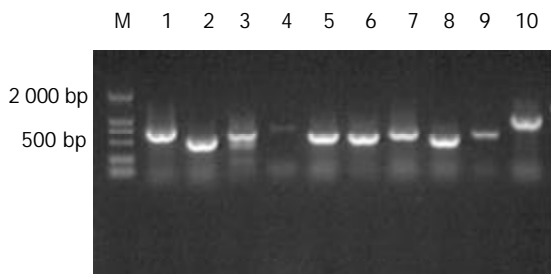


图2 部分克隆菌落 PCR 鉴定电泳图.

2.5 cDNA 测序与同源性分析初步结果 挑选其中 32 个克隆测序, 与 GenBank 数据库进行初步比较. 有 32 个与已知基因的部分序列高度同源(98-100%), 详细结果见表 1.

表 1 阳性克隆与 GenBank 同源序列比较结果

同源蛋白名称	同源菌株	同源性
1 核糖体蛋白	5	98-100%
2 线粒体单倍型基因	4	99-100%
3 二氢乙醇脱氢酶	3	99%
4 血栓粘素 1	1	98%
5 纤维连接蛋白 1	4	99-100%
6 白蛋白	4	99-100%
7 肿瘤排斥抗原 1	1	99%
8 结缔组织生长因子 3' 非翻译区	1	100%
9 前列腺结合蛋白	1	100%
10 硬脂酰辅酶 A 脱氢酶	1	99%
11 苯丙氨酸羟化酶	1	100%
12 载脂蛋白 H	2	100%
13 丝氨酸/苏氨酸激酶 19	1	100%
14 真核翻译延长因子 1	2	100%
15 包涵素重链多肽	1	99%

### 3 讨论

HCV 核心蛋白是一种多功能蛋白质, 除了作为核壳蛋白具有病毒颗粒组装功能外, 还具有多种调控细胞、

病毒基因表达、细胞生长以及免疫调节等功能. 研究证实核心蛋白也是一种反式激活蛋白, 甚至其作用还要超过 X 蛋白<sup>[10-11]</sup>. 核心蛋白对细胞信号转导途径, 尤其是核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)、激活因子 1(AP-1)和血浆反应因子(SRE)相关途径具有明显的增强作用<sup>[12]</sup>; 在 HepG2 细胞中, 核心蛋白激活人 c-myc 基因、劳氏肉瘤病毒长末端重复序列(RSV-LTR)和 SV40 早期启动子<sup>[13]</sup>; 核心蛋白还能抑制或增强 p53 基因启动子功能<sup>[14-15]</sup>, 这些证据表明核心蛋白具有潜在的致癌作用. 近来研究还发现 HCV 核心蛋白可与细胞内的一些细胞凋亡因子作用, 促进细胞凋亡<sup>[16-20]</sup>. 也有人发现 HCV 核心蛋白启动 CAP-Rf 反式激活能力可能是通过复合形式和 cDNA 编码的 DEAD 盒家族中推定的 RNA 解旋酶(CAP-Rf ATP 酶)活性调节, 表明 HCV 已经进化了一种特殊机制, 通过其核壳蛋白涉及 RNA 代谢<sup>[21]</sup>. Aoki et al<sup>[22]</sup>发现 HCV 核心蛋白通过和 14-3-3 蛋白相互作用表现出一种新型的 Raf-1 激酶激活蛋白特性, 可能对肝细胞的生长起调节作用. HCV 核心蛋白的反式激活功能在 HCV 致病中发挥重要的作用, 研究其作用分子生物学机制有助于理解 HCV 感染的慢性化和致癌作用机制. 本室利用 SSH, 对于表达 HCV 核心蛋白载体转染的 HepG2 细胞进行研究, 结合生物信息学技术(bioinformatics)克隆了 HCV 核心蛋白反式激活作用的新靶基因, 命名为 HCV 核心蛋白反式激活基因 2(TAHCCP2), 并构建其真核表达载体 TAHCCP2-cDNA3.1(-). 继续应用 SSH 技术筛选与克隆 TAHCCP2 反式激活的基因, 推测其在体内可能存在功能的线索.

SSH 方法是近年发展起来的一项新的基因克隆技术, 与传统的方法比较, 具有实验周期短、易操作、可靠性高、假阳性率低等特点, 能有效地分离扩增低丰度特异表达的基因, 可以在较短的时间内获得较理想的实验结果<sup>[23]</sup>. 我们将真核表达载体 pcDNA3.1(-)-TAHCCP2, 转染肝母细胞瘤细胞系 HepG2, 并以转染空白载体的相同细胞系作为对照, 以 2 种转染的细胞系中提取的 mRNA 为起始材料, 应用 SSH 方法成功地构建了 TAHCCP2 反式激活相关基因差异表达的 cDNA 消减文库, 挑选 32 个克隆测序分析, 结果主要包括 (1)细胞内结构与细胞生长相关蛋白, 如线粒体蛋白、核糖体蛋白、包涵素重链多肽为细胞内结构蛋白、血栓粘素 1(THBS1)、纤维连接蛋白 1(FN1)真核翻译延长因子在细胞生长、分化、黏附中起重要作用. (2)参与细胞内物质代谢的蛋白基因, 如白蛋白在各种物质代谢中起运输作用, 并且是维持血浆胶体渗透压的重要物质. 硬脂酰辅酶 A 脱氢酶(SCD), 参与体内脂肪的合成过程, 其升高可能会增加体内不饱和脂肪酸的合成. 苯丙氨酸羟化酶(PAH), 催化苯丙氨酸转化成酪氨酸的酶, 他调控苯丙氨酸在体内的分解代谢. 二氢乙醇脱氢酶是肝内多环芳香烃代谢重要的酶, 最近研究发现, 大约 40% 的 HCC 患者中表达显著降低. 然而, 在肝肿瘤的边缘区域表达增高, 并且增高的水平与肿瘤的大小和病情的进展相关<sup>[24]</sup>. 还有

人发现其在可检测到的非小细胞肺癌可能是早期而非进展期生化指标<sup>[25]</sup>。在卵巢肿瘤中其表达可诱导对顺铂药物治疗肿瘤的抵抗作用<sup>[26]</sup>。载脂蛋白H在减少甘油三酯, 增加脂蛋白脂肪酶方面有一定作用<sup>[27]</sup>, 对低密度脂蛋白的氧化有类似抗氧化剂的作用, 可以抑制胆固醇从细胞外易位到巨噬细胞内<sup>[28]</sup>。研究还发现其在止血和产生抗磷脂抗体方面有作用<sup>[29]</sup>, 体外可影响巨噬细胞对表面包含磷脂酰丝氨酸颗粒的摄取, 如凋亡的胸腺细胞和单层囊泡一样。介导体内衰老细胞的祛除作用, 所以对细胞凋亡可能有一定作用。(3)与机体免疫功能相关的蛋白基因, 如肿瘤排斥抗原1与体内的抗肿瘤免疫相关。前列腺结合蛋白包括C1、C2、C3三种成分, 形成两种不同的二聚体(C1-C3H和C2-C3), 最近研究表明前列腺类固醇结合蛋白他是一种免疫抑制因子, 可以保护精子免受女性生殖道免疫损伤。丝氨酸/苏氨酸激酶被认为可调节C-fos和p27基因的表达, 并且参与对细胞凋亡的调节, 可以抑制前凋亡蛋白的活性, 抑制T细胞的活性。(4)与肝损伤后纤维化作用密切相关的基因, 如结缔组织生长因子, 在纤维化损伤时表达增加的前纤维化基因分子, 可刺激结缔组织细胞增生, 引起组织纤维化<sup>[1]</sup>, 与肝纤维化相关。他的表达增强可能与丙型肝炎患者肝硬化发病机制有一定关系。

通过对TAHCCP2的上述反式激活基因的分析, 我们发现他与体内物质代谢尤其是脂肪代谢关系较密切, 并且对细胞分化生长与纤维化也有一定关系, 能在病毒感染后肝纤维化方面有一定的作用。另外, 他也可能负性调节体内的某些免疫反应。TAHCCP2是正常人体存在的基因, 在病毒蛋白NS5A的存在下其功能被进一步激活。关于其在体内与各种活性因子的具体调节机制, 仍需进一步实验来验证。

#### 4 参考文献

- 1 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
- 2 Cheng J. Molecular pathogenesis of viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;16(Suppl):A185
- 3 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 丙型肝炎病毒蛋白结合蛋白. 世界华人消化杂志 2002;10:215-217
- 4 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结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:223-225
- 5 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
- 6 Sato C. Effects of hepatitis C virus proteins on the interferon-stimulated signal transduction. *Nippon Rinsho* 2001;59:1271-1276
- 7 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
- 8 成军, 任进余, 李莉, 陆志檬, 李克, 洪源, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒结构基因转基因小鼠引起肝脏脂肪变. 世界华人消化杂志 2002;10:1022-1026
- 9 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健. 丙型肝炎病毒蛋白与脂蛋白之间的相互作用. 世界华人消化杂志 2002;10:1030-1032
- 10 刘妍, 成军, 陆荫英, 王刚, 牟松松, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒X蛋白反式激活基因克隆化研究. 中华肝脏病杂志 2003;11:5-10
- 11 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表面抗原中蛋白的协同反式激活功能. 中华肝脏病杂志 2002;10:354-357
- 12 Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-virus core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412
- 13 Chang J, Yang SH, Cho YG, Hwang SB, Hahn YS, Sung YC. Hepatitis C virus core from different genotypes has an oncogenic potential but is not sufficient for transforming primary rat embryo fibroblasts in cooperation with the H-ras oncogene. *J Virol* 1998;72:3060-3065
- 14 Ray RB, Steele R, Meyer K, Ray R. Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 1997; 272:10983-10986
- 15 Lu W, Lo SY, Chen M, Wu K, Fung YK, Ou JH. Activation of p53 tumor suppressor by hepatitis C virus core protein. *Virology* 1999;264:134-141
- 16 Hahn CS, Cho YG, Kang BS, Lester IM, Hahn YS. The HCV core protein acts as a positive regulator of fas-mediated apoptosis in a human lymphoblastoid T cell line. *Virology* 2000;276:127-137
- 17 Honda A, Hatano M, Kohara M, Arai Y, Hartatik T, Moriyama T, Imawari M, Koike K, Yokosuka O, Shimotohno K, Tokuhisa T. HCV-core protein accelerates recovery from the insensitivity of liver cells to Fas-mediated apoptosis induced by an injection of anti-Fas antibody in mice. *J Hepatol* 2000;33:440-447
- 18 Rubbia-Brandt L, Taylor S, Gindre P, Quadri R, Abid K, Spahr L, Negro F. Lack of in vivo blockade of Fas- and TNFR1-mediated hepatocyte apoptosis by the hepatitis C virus. *J Pathol* 2002;197:617-623
- 19 Farooq M, Kim Y, Im S, Chung E, Hwang S, Sohn M, Kim M, Kim J. Cloning of BNIP3h, a member of proapoptotic BNIP3 family genes. *Exp Mol Med* 2001;33:169-173
- 20 Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999;13: 1899-1911
- 21 You LR, Chen CM, Yeh TS, Tsai TY, Mai RT, Lin CH, Lee YH. Hepatitis C virus core protein interacts with cellular putative RNA helicase. *J Virol* 1999;73:2841-2853
- 22 Aoki H, Hayashi J, Moriyama M, Arakawa Y, Hino O. Hepatitis C virus core protein interacts with 14-3-3 protein and activates the kinase Raf-1. *J Virol* 2000;74:1736-1741
- 23 Kuang WW, Thompson DA, Hoch RV, Weigel RJ. Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor-positive breast carcinoma cell line. *Nucleic Acids Res* 1998;26:1116-1123
- 24 Yang MD, Wu CC, Chiou SH, Chiu CF, Lin TY, Chiang IP, Chow KC. Reduction of dihydrodiol dehydrogenase expression in resected hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2003;10:271-276
- 25 Chen CY, Hsu CP, Hsu NY, Shih CS, Lin TY, Chow KC. Expression of dihydrodiol dehydrogenase in the resected stage I non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2002;9:515-519
- 26 Deng HB, Parekh HK, Chow KC, Simpkins H. Increased expression of dihydrodiol dehydrogenase induces resistance to cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 2002; 277:15035-15043
- 27 Takada D, Ezura Y, Ono S, Iino Y, Katayama Y, Xin Y, Wu LL, Larringa-Shum S, Stephenson SH, Hunt SC, Hopkins PN, Emi M. Apolipoprotein H variant modifies plasma triglyceride phenotype in familial hypercholesterolemia: a molecular study in an eight-generation hyperlipidemic family. *J Atheroscler Thromb* 2003;10:79-84
- 28 Lin KY, Pan JP, Yang DL, Huang KT, Chang MS, Ding PY, Chiang AN. Evidence for inhibition of low density lipoprotein oxidation and cholesterol accumulation by apolipoprotein H (beta2-glycoprotein I). *Life Sci* 2001;69:707-719
- 29 Mehdi H, Manzi S, Desai P, Chen Q, Nestlerode C, Bontempo F, Strom SC, Zarnegar R, Kamboh MI. A functional polymorphism at the transcriptional initiation site in beta2-glycoprotein I (apolipoprotein H) as associated with reduced gene expression and lower plasma levels of beta2-glycoprotein I. *Eur J Biochem* 2003;270:230-238





Published by **Baishideng Publishing Group Inc**  
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,  
CA 94588, USA  
Fax: +1-925-223-8242  
Telephone: +1-925-223-8243  
E-mail: [bpgoffice@wjgnet.com](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

