

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 ^{ras} , 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 ₂₂ 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
www.isgcon2005.com
- Advanced Capsule Endoscopy Users Course
November 18-19, 2005
www.asge.org/education
- II Latvian Gastroenterology Congress
November 29, 2005
gec@stradini.lv
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
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
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
<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/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

基因表达谱芯片筛选NS5A TP3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

刘妍, 杨倩, 成军, 王建军, 纪冬, 党晓燕, 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

刘妍, 女, 1973-01-15生, 辽宁省海城市人, 满族, 1995年北京医科大学毕业, 军事医学科学院免疫学专业2002级硕士学位研究生, 助理研究员。主要从事肝炎病毒的分子生物学与病毒性肝炎的发病机制的研究。

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: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-07-12 接受日期: 2003-08-16

Screening of genes differentially expressed in HepG2 cells transfected with gene 3 transactivated by hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5ATP3) using cDNA microarray

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

Yan Liu, Qian Yang, Jun Cheng, Jian-Jun Wang, Dong Ji, Xiao-Yan Dang, 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 No. C03011402, No. C30070689

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: NS5ATP3 obtained from suppression subtractive hybridization screening is a novel gene transactivated by nonstructural protein 5A (NS5A) of hepatitis C virus (HCV), which possesses unknown function. To study the difference in gene expression in human hepatoblastoma cell line HepG2 cells transfected with NS5ATP3-expressing plasmid and further elucidate its potential molecular biological function, we compared the differentially expressed genes between the HepG2 transfected by pcDNA3.1(-)-NS5ATP3 and pcDNA3.1(-), respectively by cDNA microarray technique.

METHODS: Sequence specific primers were designed and synthesized and the NS5ATP3 DNA fragment was amplified with polymerase chain reaction (PCR) technique. The expressive vector of pcDNA3.1(-)-NS5ATP3 was constructed by routine molecular biological methods. cDNA microarray technology was employed to detect the mRNA from the HepG2 cells transfected with pcDNA3.1(-)-NS5ATP3 and pcDNA3.1(-), respectively using lipofectamine.

RESULTS: The expressive vector has been constructed and

confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing analysis. High quality mRNA and cDNA were prepared and successful microarray screening was conducted. The scanning results indicated that among 1 152 genes which were gotten from gene expression profile analysis, there were 21 differences in which 6 genes were up-regulated and 18 genes were down-regulated in NS5ATP3-expressing HepG2 cells. These genes differentially regulated by NS5ATP3 included human genes encoding proteins involved in cell signal transduction, cell apoptosis, cell proliferation and differentiation.

CONCLUSION: cDNA microarray technology is successfully used to screen the genes differentially expressed in NS5ATP3-expressing HepG2 cells, which brings some new clues for studying the potential molecular mechanism of NS5ATP3 protein.

Liu Y, Yang Q, Cheng J, Wang JJ, Ji D, Dang XY, Wang CH. Screening of genes differentially expressed in HepG2 cells transfected with gene 3 transactivated by hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5ATP3) using cDNA microarray. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):306-310

摘要

目的: 应用基因芯片技术, 检测丙型肝炎病毒(HCV)非结构蛋白5A(NS5A)反式激活基因NS5ATP3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NS5ATP3蛋白可能的分子生物学功能。

方法: 设计并合成NS5ATP3基因序列特异性的引物, 应用聚合酶链反应(PCR)技术扩增NS5ATP3蛋白编码基因片段, 以常规的分子生物学技术将获得的NS5ATP3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(-)-NS5ATP3。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cDNA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。提取高质量的mRNA, 逆转录为cDNA, 进行DNA芯片技术分析。在1 152个基因表达谱的筛选中, 发现有6个基因表达水平显著上调, 18个基因表达水平显著下调。

结论: 应用基因表达谱芯片技术成功筛选了NS5ATP3转染细胞后差异表达基因, 为进一步阐明NS5ATP3蛋白可能的生物学功能提供依据。

刘妍, 杨倩, 成军, 王建军, 纪冬, 党晓燕, 王春花. 基因表达谱芯片筛选NS5ATP3转染细胞差异表达基因. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):306-310
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/306.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)感染, 与肝纤维化和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)发生发展过程密切相关, 而病毒基因组编码的蛋白与宿主肝细胞蛋白之间的相互作用, 可能是HCV致病(癌)的重要分子机制. 研究发现, HCV非结构蛋白5A(HCV NS5A)基因(位于6 258-7 601 nt之间)编码的56 kD的NS5A蛋白(448 aa)除了参与HCV多蛋白的成熟和RNA的复制过程外, 还具有多种生物学功能. 不同磷酸化形式的NS5A蛋白具有反式激活作用更是目前关于NS5A生物学功能研究的热点, NS5A蛋白是一种作用很强的转录激活因子, 能够影响细胞信号转导途径, 激活多种病毒及细胞基因启动子, 调控着细胞基因的转录, 推测NS5A蛋白的这种反式激活作用, 可能是HCV感染与肝细胞癌发生发展密切相关的重要分子生物学机制^[1-3]. 本室在利用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)筛选NS5A蛋白反式激活作用的部分靶基因时, 结合生物信息学技术(bioinformatics)克隆了NS5A蛋白反式激活作用的新靶基因, 即HCV NS5A蛋白反式激活基因3(NS5ATP3), 该新基因的开放读码框架(ORF)长度为1 572个核苷酸(nt), 编码产物由524个氨基酸残基(aa)组成^[4-6].

为了探索NS5ATP3的生物学功能, 深入了解HCV NS5A蛋白的反式激活作用, 我们构建了NS5ATP3基因真核表达载体, 应用基因表达谱芯片技术, 筛选NS5ATP3基因转染细胞后差异表达的基因, 检测NS5ATP3蛋白的表达对肝细胞基因表达谱的影响, 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 肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞由本室保存, 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 1 152 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 设计并合成 NS5ATP3 基因序列特异性引物, 上下游引物序列分别为: 5' - GAA TTC ATG GTG CCG CCA CGA CGC CAT C-3', 5' - GGA TCC CTA ACT AGC TCC ATC CTC CTG-3' 下划线部分为引物两端的酶切位点, EcoRI 和 BamHI. 以转染了 HCV NS5A 表达载体的 HepG2 细胞 cDNA 作为模板, 应用聚合酶链反应(PCR)技术扩增 NS5ATP3 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(-)-NS5ATP3. 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 μ g pcDNA3.1(-)-NS5ATP3 和空载体 pcDNA3.1(-) 转染 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞, 每 5×10^6 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(-)-NS5ATP3 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 $^{\circ}$ C 和 70 $^{\circ}$ 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 μ g), Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA (5 μ g). 乙醇沉淀后溶解在 20 μ L 5 \times SSC+0.2% 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 μ g/ μ L 溶解于 3 \times 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(0.5 h), UV 交联, 再分别用 0.2% SDS、水及 0.2% 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 $^{\circ}$ C 水浴变性 5 min, 将混合探针加在基因芯片上, 置于 60 $^{\circ}$ C 杂交 15-17 h. 依次以 2 \times SSC+0.2% SDS、0.1% \times SSC+0.2% SDS、0.1% \times 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: Cy5/Cy3>1.9, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3<0.6, 为绿色荧光, 显示表达减弱.

2 结果

2.1 NS5ATP3 蛋白真核表达载体的构建 真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5ATP3 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^[6].

2.2 总 RNA 及 mRNA 的定性、定量分析 实验组和对照组总 RNA 的吸光度比值 A₂₆₀/A₂₈₀ 分别为 1.998 和 2.014, 热稳定实验 70 $^{\circ}$ C 保温 1 h 与 -20 $^{\circ}$ 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 (图 1). 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表达基因共24条,其中6条基因表达增强,18条基因表达降低.

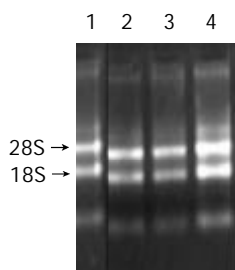


图1 总RNA 1%琼脂糖凝胶电泳. 1, 2: 对照组; 3, 4: 实验组.

2.4 差异表达基因分析 NS5ATP3上调基因类型: 在基因芯片的扫描分析中,如果荧光染料的Cy5/Cy3比值在1.900以上,就判断为NS5ATP3的上调基因.在本研究中发现有6种基因的表达水平上调(表1).

NS5ATP3下调基因类型: 在基因芯片的扫描分析中,如果荧光染料的Cy5/Cy3比值在0.500以下,就判断为NS5ATP3的下调基因.在本研究中发现有18种基因的表达水平下调(表2).

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_013230	小细胞肺癌相关抗原 CD24	1.955
2	D50683	转化生长因子 β II 受体 α	1.983
3	L04569	L 型电压依赖的钙离子通道 α 1 亚单位 hHT	1.991
4	NM_004661	细胞周期分裂蛋白 CDC23	2.068
5	NM_002736	cAMP 依赖的蛋白激酶调节亚单位 II β PRKAR2B	2.073
6	AF012086	Ran 结合蛋白 RanBP2 α	2.183

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	AL117234	定位于 X 染色体上的新基因	0.147
2	NM_003034	唾液转移酶 8A	0.240
3	NM_014337	肽基辅氨酰异构 PPIL2	0.280
4	NM_001764	CD1B 抗原 β 多肽	0.307
5	NM_002982	小的可诱导细胞因子 A2	0.326
6	NM_022110	FK506 结合蛋白样蛋白	0.355
7	NM_007177	TU3A 蛋白	0.355
8	NM_000844	谷氨酸酯受体	0.358
9	NM_014451	甲状旁腺激素应答的骨肉瘤 B1 蛋白	0.361
10	NM_000851	谷胱甘肽 S 转移酶	0.371
11	NM_001775	CD38 抗原 δ 多肽	0.374
12	NM_001648	前列腺特异性抗原	0.376
13	NM_003254	金属蛋白酶 1 组织抑制因子	0.395
14	BC004309	RAS 癌基因家族成员 RAB4	0.414
15	NM_000732	CD3D 抗原 δ 多肽	0.414
16	NM_014020	LR8 蛋白	0.434
17	NM_002183	白介素 3 受体 α IL3RA	0.447
18	NM_000609	基质细胞来源因子 1	0.493

3 讨论

HCV 基因组含有单一的开放读码框架,编码3 010-3 033个氨基酸残基的多蛋白肽前体,两侧是5' - 非翻译区及3' - 非翻译区,多肽前体至少被加工为10种结构蛋白和非结构蛋白^[7-9].临床和实验研究显示,HCV 核心蛋白、非结构蛋白3(NS3)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,分别在HCV 感染及致肝细胞癌(HCC)发生发展过程中扮演重要的角色^[10-11].非结构蛋白5A(NS5A)蛋白也不例外^[4-5].HCV NS5A 位于HCV 多蛋白的羧基末端,是丝氨酸磷酸化蛋白质,依磷酸化程度的不同而产生两种不同分子量大小的多肽 p56 和 p58.由于NS5A表现出对抗干扰素 α (IFN α)的治疗效应而引起人们广泛的关注,NS5A 能够与肝细胞中的 IFN α 刺激蛋白 - 双链 RNA 依赖的激酶 (PKR)相互作用,抑制 PKR 的功能,从而下调 IFN α 刺激的抗病毒效应^[12-13].近年研究发现,NS5A 是转录反式激活因子,其羧基末端富含酸性氨基酸及脯氨酸,这是真核细胞转录因子特有的结构特征.但是其参与细胞转录调节的机制仍不十分清楚.一般来说,转录的反式激活因子是在细胞核中起作用的,而NS5A 定位于细胞内质网(ER),因此推测NS5A 必定参与了细胞信号传导途径.NS5A 能够反式激活核转录因子 NF- κ B 及 STAT3,在细胞炎症反应、肿瘤发生及转移过程中起重要作用^[14].Ghosh et al^[15]研究发现,NS5A 蛋白能够抑制细胞周期调节基因 p21WAF1,激活人肝癌细胞中增生的细胞核抗原基因(PCNA),从而调节细胞凋亡,促进细胞增生.NS5A cDNA 能够使转染的小鼠成纤维细胞 NIH 3T3 具有转化特性,且转化细胞移植入裸鼠体内可形成纤维肉瘤灶,这一证据直接证明了HCV NS5A蛋白的恶性转化潜能.可见,HCV 非结构蛋白NS5A的反式激活功能在HCV 致病中发挥了重要作用,那么,肝细胞内表达的NS5A蛋白,究竟激活了哪些特定基因的表达?这些表达产物对细胞的损害、增生分化的作用如何?

基于上述研究目的,我们采用抑制性消减杂交方法,成功筛选并克隆了HCV 非结构蛋白NS5A 基因转染细胞反式激活基因cDNA文库,对挑选的克隆进行分析发现其中一个新基因与GenBank 中注册的已知功能基因序列没有同源.电子拼接推定该基因的开放读码框架,获得相应的全长编码基因,将该未知功能基因命名为NS5ATP3.根据这一序列设计引物,以人肝癌细胞cDNA 为模板,PCR 反应扩增NS5ATP3 基因序列.反应产物经测序完全符合计算机分析结果,这表明我们已顺利得到了NS5ATP3 编码序列.NS5ATP3 的ORF 长度为1 572 bp,编码524个氨基酸残基的蛋白,然而NS5ATP3 基因的生物学功能及其在丙型肝炎发病机制中的作用目前还不清楚,为进一步研究NS5ATP3 的生物学功能,我们利用基因芯片技术对其上调、下调基因进行分析^[16-18].结果表明,6种基因的表达水平上调,18种基因的表达水平下调.这些基因包括细胞生长、

细胞凋亡、信号转导、免疫调节、肿瘤发生等基因。

分析表达增强的基因, B 淋巴细胞表面的分化抗原 CD24 是 B 细胞表面的信号转导分子, 能够调节多种信号活化的应答, 能诱导 B 淋巴细胞凋亡, 下游信号分子是丝裂素活化的蛋白激酶有丝分裂原激活蛋白基酶 (MAPK) 的激活以及细胞外信号调节的激酶 1 (ERK1) 的活化。研究还发现, CD24 抗原是肝细胞癌细胞中高度表达的基因, 与 p53 基因突变及肿瘤分化高度相关, CD24 抗原是潜在的肝细胞肿瘤早期标志基因^[19-20]。细胞分裂周期蛋白 CDC23 与酿酒酵母的 CDC23 高度同源, 是促进细胞分裂后期复合物 (anaphase-promoting complex, APC) 的成员, 对于细胞周期由 G2 期向 M 期过渡是必不可少的, APC 能够催化细胞周期蛋白 B 与泛素 (cyclin B-ubiquitin) 形成共轭复合物, 在泛素介导的细胞周期蛋白 B 的蛋白水解过程中起重要作用, 推测 NS5ATP3 通过上调 CDC23 的表达对细胞周期有调控作用^[21]。L 型电压依赖的钙离子通道是细胞电信号转导途径中重要的调节因子^[22], cAMP 依赖的蛋白激酶调节亚单位 II β PRKAR2B 是参与细胞信号转导途径主要因子^[23]。Ran 是真核细胞核运输过程中必需的小 GTP 酶, 在细胞 mRNA 加工, 细胞周期调节等方面发挥作用, Ran 结合蛋白 2 即 RanBP2 是核孔蛋白, 在细胞核浆物质转运过程中起重要作用^[24], NS5ATP3 通过上调上述基因的表达, 提示该蛋白可能对细胞信号传递途径及核内外物质运输等过程有正调控作用, 而促进某些与细胞转录调节密切相关的基因, 如癌基因的转录, 在 HCV 感染过程中发挥一定的作用。

分析表达降低的基因, 胸腺细胞抗原 CD1B 是参与胸腺细胞分化以及抗原递呈的非专职递呈抗原, 能够向 T 细胞递呈各种不同的短链糖脂类抗原, 而树突状细胞 (DC) 递呈的是长链糖脂类抗原^[25-26]。TU3A 是编码 144 个氨基酸残基的肿瘤抑制因子, 在肾细胞肿瘤中该基因的表达下调, 并发现广泛存在的缺失突变, 该基因是否在其他肿瘤如肝细胞肿瘤中也具有同样的生物行为有待于进一步研究^[27-28]。甲状旁腺激素 (PTH) 应答的骨肉瘤 B1 蛋白是 PTH 刺激下调的造骨细胞功能形成过程中表达的一个新蛋白, 在骨形成时参与甲状旁腺激素的调节^[29]。谷胱甘肽 S 转移酶 M5 属于 mu 类, 具有对亲电子化合物的解毒功能, 包括致癌物质、治疗药物、环境毒素和氧化应激产物等有害物质通过与谷胱甘肽结合而发挥其解毒功效, 该基因的变异可以改变个体对致癌物质和毒物的易感性, 同时也影响某些药物的毒性和药效^[30]。CD38 蛋白是广泛表达于各种细胞和组织尤其是白细胞的一种多功能的胞外酶, 参与细胞黏附、信号转导和钙信号传递等生物过程^[31]。CD3D 抗原 δ 多肽是与 T 淋巴细胞表面的抗原受体结合的小完整膜蛋白, 能将活化信号转移到细胞内, 参与免疫信息的传递^[32-33]。LR8 蛋白是应用差异显示方法从肺纤维细胞克隆的未知功能蛋白^[34]。已知趋化因子是一类与靶细胞表面特异性受

体结合而活化并介导白细胞迁移的蛋白, 依据半胱氨酸残基的位置不同而分为 4 类: C、CC、CXC 和 CX3C。而 CXCR4 受体的配体 - 基质细胞来源因子 SDF1 是直接激活并介导白细胞迁移的趋化因子, 又称为 CXC 趋化因子, 是免疫缺陷病毒 HIV-1 入侵 T 细胞的辅助受体分子, 是通过 G 蛋白耦连的 7 个跨膜受体而行使淋巴细胞趋化效应, 同时这 7 个跨膜受体也是免疫缺陷病毒 HIV-1 入侵 T 细胞的辅因子。SDF1 是 HIV-1 入侵细胞的辅因子 LESTR 的生物配体, 能够激活细胞内游离钙, 抑制 HIV-1 病毒感染 T 细胞^[35-36]。NS5ATP3 通过下调上述基因的表达水平, 推测其在调节细胞免疫应答、信号转导及物质代谢等方面具有一定作用。

总之, 利用基因表达谱芯片分析了 NS5ATP3 蛋白对肝细胞基因表达谱的影响, NS5ATP3 蛋白能够上调或下调 HepG2 细胞中许多不同基因表达的变化, 这些基因变化是复杂的, 有的甚至是矛盾的, 这些基因与细胞信号转导、细胞增生与分化、免疫应答、物质运输、细胞凋亡等生物过程密切相关。本实验结果对于初步了解新基因 NS5ATP3 在肝细胞中的生物学效应提供某些线索, 当然, 还需要进一步的实验加以深入研究。

4 参考文献

- Neddermann P, Clementi A, De Francesco R. Hyperphosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein requires an active NS3 protease, NS4A, NS4B, and NS5A encoded on the same polyprotein. *J Virol* 1999;73:9984-9991
- Rosenberg S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. *J Mol Biol* 2001;313:451-464
- 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-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412
- 刘妍, 段惠娟, 成军, 王建军, 陆荫英, 牟劲松, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. 军医进修学院学报 2003;24:81-83
- 刘妍, 陆荫英, 成军, 王建军, 李莉, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因的克隆化研究. 解放军医学杂志 2003;28:40-43
- 刘妍, 杨倩, 成军, 王建军, 纪冬, 王春花, 党小燕, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因 NS5ATP3 的克隆化研究. 解放军医学杂志 2004;(待发表)
- Kato N. Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama* 2001;55:133-159
- De Francesco R. Molecular virology of the hepatitis C virus. *J Hepatol* 1999;31(Suppl 1):47-53
- Kim JE, Song WK, Chung KM, Back SH, Jang SK. Subcellular localization of hepatitis C viral proteins in mammalian cells. *Arch Virol* 1999;144:329-343
- 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 董菁, 洪源, 张跃新, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因. 解放军医学杂志 2001;26:880-883
- 刘妍, 成军, 牟劲松, 陆荫英, 王建军, 李克, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. 解放军医学杂志 2003;28:44-46
- Koch JO, Bartenschlager R. Modulation of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A, and NS4B. *J Virol* 1999;73:7138-7146
- Sato C. Effects of hepatitis C virus proteins on the interferon-stimulated signal transduction. *Nippon Rinsho* 2001;59:1271-1276

- 14 Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9599-9604
- 15 Ghosh AK, Steele R, Meyer K, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 1999;80(Pt 5):1179-1183
- 16 Lakhani SR, Ashworth A. Microarray and histopathological analysis of tumours: the future and the past? *Nat Rev Cancer* 2001;1:151-157
- 17 Kaminski S. DNA microarrays-a methodological breakthrough in genetics. *J Appl Genet* 2002;43:123-130
- 18 刘妍, 成军, 王建军, 杨倩, 陆荫英. 基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用. *世界华人消化杂志* 2003;11:461-463
- 19 Kay R, Rosten PM, Humphries RK. CD24, a signal transducer modulating B cell activation responses, is a very short peptide with a glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor. *J Immunol* 1991;147:1412-1426
- 20 Huang LR, Hsu HC. Cloning and expression of CD24 gene in human hepatocellular carcinoma: a potential early tumor marker gene correlates with p53 mutation and tumor differentiation. *Cancer Res* 1995;55:4717-4721
- 21 Zhao N, Lai F, Fernald AA, Eisenbart JD, Espinosa R, Wang PW, Le Beau MM. Human CDC23: cDNA cloning, mapping to 5q31, genomic structure, and evaluation as a candidate tumor suppressor gene in myeloid leukemias. *Genomics* 1998; 53:184-190
- 22 Schultz D, Mikala G, Yatani A, Engle DB, Iles DE, Segers B, Sinke RJ, Weghuis DO, Klockner U, Wakamori M. Clonal expression of the alpha 1 subunit of the L-type voltage-dependent calcium channel from normal human heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:6228-6232
- 23 Solberg R, Sistonen P, Traskelin AL, Berube D, Simard J, Krajci P, Jahnsen T, de la Chapelle A. Mapping of the regulatory subunits RI beta and RII beta of cAMP-dependent protein kinase genes on human chromosome 7. *Genomics* 1992;14:63-69
- 24 Nothwang HG, Rensing C, Kubler M, Denich D, Brandl B, Stubanus M, Haaf T, Kurnit D, Hildebrandt F. Identification of a novel Ran binding protein 2 related gene (RANBP2L1) and detection of a gene cluster on human chromosome 2q11-q12. *Genomics* 1998;47:383-392
- 25 Moody DB, Briken V, Cheng TY, Roura-Mir C, Guy MR, Geho DH, Tykocinski ML, Besra GS, Porcelli SA. Lipid length controls antigen entry into endosomal and nonendosomal pathways for CD1b presentation. *Nat Immunol* 2002;3:435-442
- 26 Sugita M, Cao X, Watts GF, Rogers RA, Bonifacio JS, Brenner MB. Failure of trafficking and antigen presentation by CD1 in AP-3-deficient cells. *Immunity* 2002;16:697-706
- 27 Wang L, Darling J, Zhang JS, Liu W, Qian J, Bostwick D, Hartmann L, Jenkins R, Bardenhauer W, Schutte J, Opalka B, Smith DI. Loss of expression of the DRR 1 gene at chromosomal segment 3p21.1 in renal cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;27:1-10
- 28 Yamato T, Orikasa K, Fukushige S, Orikasa S, Horii A. Isolation and characterization of the novel gene, TU3A, in a commonly deleted region on 3p14.3-->p14.2 in renal cell carcinoma. *Cytogenet Cell Genet* 1999;87:291-295
- 29 Adams AE, Rosenblatt M, Suva LJ. Identification of a novel parathyroid hormone-responsive gene in human osteoblastic cells. *Bone* 1999;24:305-313
- 30 Xu S, Wang Y, Roe B, Pearson WR. Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion. *J Biol Chem* 1998;273:3517-3527
- 31 Munshi CB, Graeff R, Lee HC. Evidence for a causal role of CD38 expression in granulocytic differentiation of human HL-60 cells. *J Biol Chem* 2002;277:49453-49458
- 32 Gold DP, Clevers H, Alarcon B, Dunlap S, Novotny J, Williams AF, Terhorst C. Evolutionary relationship between the T3 chains of the T-cell receptor complex and the immunoglobulin supergene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84: 7649-7653
- 33 Kastrup J, Pedersen LO, Dietrich J, Lauritsen JP, Menne C, Geisler C. In vitro production and characterization of partly assembled human CD3 complexes. *Scand J Immunol* 2002;56: 436-442
- 34 Lurton J, Rose TM, Raghu G, Narayanan AS. Isolation of a gene product expressed by a subpopulation of human lung fibroblasts by differential display. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:327-331
- 35 Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996; 382:829-833
- 36 Barbero S, Bajetto A, Bonavia R, Porcile C, Piccioli P, Pirani P, Ravetti JL, Zona G, Spaziante R, Florio T, Schettini G. Expression of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor 1 in human brain tumors and their involvement in glial proliferation in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 2002;973:60-69

World Journal of Gastroenterology 栏目设置

《World Journal of Gastroenterology, WJG》主要开设以下栏目。(1)文献综述: 基于作者自己研究为主的综述性论文。(2)特色栏目 如食管癌、胃癌、肝癌、病毒性肝炎、中医中药、中西医结合等, 具有我国特色及国际领先水平的原创性研究论文。(3)基础研究 报道学术价值高、实验数据完整、具有原始性和创新性的研究成果。(4)临床研究 报道安全性和有效性的随机、双盲双模拟、多中心平行对照临床试验的临床研究论文。(5)研究快报 报道具有原始性和创新性的阶段性成果。(6)病例报告: 报道对临床工作者有指导意义的个案。



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
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

