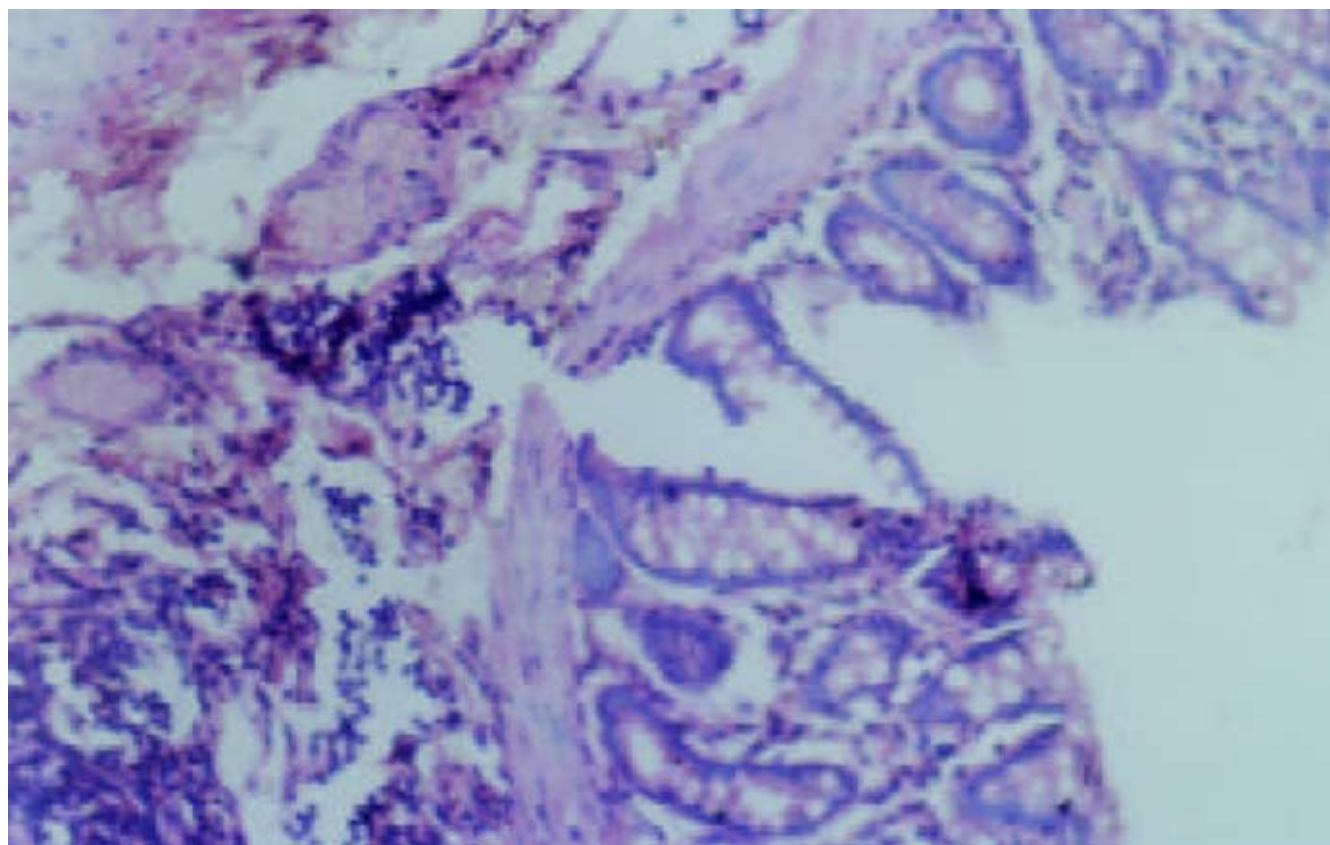


世界华人消化杂志

**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

杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 洪源, 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

杨倩, 女, 1970-11-06, 广西桂平人, 汉族. 1994年西安医科大学本科毕业, 1999年西安医科大学硕士毕业, 目前为西安交通大学第一医院博士研究生, 主要从事传染病临床与基础研究工作.

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 and identification of genes transactivated by NS5A-TP4 protein by cDNA microarray assay

Qian Yang, Jun Cheng, Yan Liu, Jian-Jun Wang, Yuan Hong, Shu-Lin Zhang

Qian Yang, Jun Cheng, Yan Liu, Jian-Jun Wang, Yuan Hong, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Shu-Lin Zhang, Xi'an Jiaotong University First Hospital, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Supported by the National Natural Science Foundation 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 study the molecular mechanism of NS5A-TP4 in the up- and down-regulated genes of hepatocyte by cDNA microarray assay.

METHODS: HepG2 cells were transfected by recombinant expression plasmid pcDNA3.1(-)-NS5A-TP4. Total RNA was isolated from the transfected HepG2 cells with pcDNA3.1(-) and pcDNA3.1(-)-NS5A-TP4, respectively. cDNA was prepared by reverse transcription. cDNA microarray was conducted for screening of up- and down-regulated genes of both HepG2 cells.

RESULTS: After screening with cDNA microarray, we found that 12 genes were up-regulated, and 6 genes down-regulated. Some of them were involved in cell signal transduction, cell proliferation, and carcinogenesis.

CONCLUSION: cDNA microarray is an important choice for the analysis of target genes of NS5A-TP4 transactivation. The obtained sequences bring some new clues for studying the

biological functions of NS5A-TP4 and infection mechanism of HCV.

Yang Q, Cheng J, Liu Y, Wang JJ, Hong Y, Zhang SL. Screening and identification of genes transactivated by NS5A-TP4 protein by cDNA microarray assay. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(2):311-314

摘要

目的: 对新基因NS5A-TP4转染肝癌细胞的基因表达谱进行分析, 探索该基因表达对肝细胞基因表达的调节机制及其生物学功能.

方法: 应用生物信息学(bioinformatics)技术, 分析我室通过抑制性消减杂交技术筛选得到的新基因NS5A-TP4的全长编码序列, 并NS5A-TP4构建基因的真核表达载体pcDNA3.1(-)-NS5A-TP4. 应用基因表达谱芯片技术对重组表达质粒pcDNA3.1(-)-NS5A-TP4转染的HepG2细胞和空载体处理的相同细胞差异表达的mRNA进行检测.

结果: 确定基因NS5A-TP4由762 nt组成, 编码253 aa的蛋白. 基因表达谱芯片所检测的1152条目的基因均为GenBank中登录的基因, NS5A-TP4表达质粒转染的细胞有18条差异表达基因, 其中12条基因表达增强, 6条基因表达降低. 这些差异表达的基因与细胞信号转导、凋亡、生长调节密切相关.

结论: 基因表达谱芯片技术可为初步探索新基因的功能提供重要的资料. 本实验结果为进一步阐明NS5A-TP4生物学功能及HCV-NS5A的致病机制提供了理论依据.

杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 洪源, 张树林. 基因表达谱芯片技术筛选NS5A-TP4蛋白反式调节基因. 世界华人消化杂志 2004;12(2):311-314

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/311.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)是含外膜蛋白的单股正链RNA病毒, 属黄病毒科肝炎病毒类. 在大多数感染人群中丙型肝炎病毒表现为持续性感染, 并可导致慢性肝炎、肝硬化, 或肝细胞癌. HCV基因组包括5'非编码区, 一个长约9400 bp的单一开放阅读框(open reading frame, ORF)和3'非编码区(3' non-encode region, 3'-NCR), 其中ORF包括结构区(structural region)和非结构区(nonstructural region), 在非结构基因区中有NS2, NS3, NS4A, NS5A和NS5B区等^[1-2]. 近年来, HCV NS5A区的结构与功能倍受关注, 研究者发现在NS5A蛋白2209-2248 aa间存在一个与干扰素治疗效果紧密相关的

区域,称为“干扰素敏感决定区(interferon sensitivity determining region, ISDR)”。他们认为 ISDR 氨基酸序列的变异与 IFN 的应答率直接相关。在体外实验中证实 NS5A 对于 HCV 体外复制有重要作用,更为重要的是 NS5A 对细胞周期及细胞生长具有调节作用,可能与慢性肝炎、肝细胞癌的发生发展有着密切的关系^[3-5]。我室利用 SSH 技术,对于 NS5A 表达载体转染的肝母细胞瘤细胞系 HepG2 的基因表达谱变化进行比较研究,发现了 NS5A 蛋白可上调一些基因的表达。其中包括未知功能基因,命名为 NS5ATP4^[6-7]。为了从不同的角度对 NS5A 的反式调节基因进行验证及研究,我们应用基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)对 NS5ATP4 反式调节的靶基因进行了筛选,为今后更加广泛深入地研究新基因 NS5ATP4 功能及 NS5A 的反式调节作用打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞由本室保存,细胞培养相关试剂及总 RNA 提取试剂 Trizol 均购自 Gibco 公司,脂质体转染试剂 FuGENE6 购自罗氏公司,NS5ATP4 真核表达质粒由本室构建。

1.2 方法

1.2.1 SSH 筛选 HCV-NS5A 差异性显示 cDNA 文库,具体方法、操作参考文献[8]。

1.2.2 细胞培养及取材 NS5ATP4 真核表达质粒由本室构建。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 FuGENE6 将 2 μ g pcDNA3.1(-)-NS5ATP4 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^[9-11]。

1.2.3 总 RNA 提取 使用 Trizol 试剂一步法提取 pcDNA 3.1(-)-NS5ATP4 和空载体 pcDNA3.1(-) 转染的 HepG2 细胞总 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。

1.2.4 探针标记 参照 Schena et al^[27] 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。

1.2.5 芯片制备 芯片包含的 1 152 个 cDNA 由上海联合基因有限公司提供,包括原癌基因、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、信号转导相关基因等。以通用引物进行 PCR 扩增,PCR 产物长度为 1 000 bp-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 7500 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。

1.2.6 预杂交 将预杂交液放入 95 $^{\circ}$ C 水浴锅内变性 2 min,

将待预杂交的芯片放入 95 $^{\circ}$ C 水浴锅内变性 30 s,芯片取出后即放入无水乙醇中 30 s,晾干。将已变性的预杂交液加到芯片的点样区域内,盖上盖玻片,放入杂交箱内 42 $^{\circ}$ C 预杂交 5-6 h。

1.2.7 杂交及洗涤 将探针置于 95 $^{\circ}$ C 水浴中变性 2 min;芯片置于 95 $^{\circ}$ C 水浴中变性 30 s,芯片取出浸无水乙醇 30 s,探针取出后迅速置于冰上。将探针置于芯片上,用盖玻片覆盖,置于杂交舱中,用 Parafilm 密封,放入 42 $^{\circ}$ C 杂交箱内杂交过夜(16-18 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。

1.2.8 扫描与分析 用 General Scanning 公司的 ScanArray 3000 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 ImageGene3.0 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>2.0,红色荧光,显示表达增强; Cy5/Cy3<0.5,为绿色荧光,显示表达减弱。

2 结果

2.1 以我室通过 SSH 筛选得到的 HCV-NS5A 差异性显示 cDNA 文库为基础,将其中一个新基因命名为 NS5ATP4,电子推定其编码的氨基酸序列,以人肝癌细胞 cDNA 为模板,对 NS5ATP4 进行了克隆化研究,得到了 NS5ATP4 的编码的氨基酸序列。

2.2 总 RNA 的定性、定量分析 总 RNA 的吸光度 A260/A280>1.92,热稳定实验 70 $^{\circ}$ C 保温 1 h 与 -20 $^{\circ}$ C 1 h 的电泳条带比较,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。

表1 NS5A-TP4 上调表达基因

编号	Cy5/Cy3	基因名称
1	2.014	NCK 相关蛋白(NCKAP1)
2	2.026	小诱导细胞因子 A3(SCYA3)
3	2.030	富含半胱氨酸的血管生成诱导因子(CYR61)
4	2.081	来自 BCRA2 区域的猜想蛋白(CG005)
5	2.154	肿瘤抑制亚转移物候选物 1
6	2.226	未知功能基因 FLJ21985
7	2.236	核转录因子 NF κ B1
8	2.326	plexin C1 (PLXNC1)
9	2.519	谷胱甘肽过氧化物酶 1(GPX1)
10	2.655	细胞色素 P450, 亚家族 IID 多肽 6
11	2.699	硫氧还蛋白还原酶 1(TXNRD1)
12	3.169	T 细胞受体重排 β 链基因 V 区(V-D-J)

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。为了监控芯片杂交体系,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 18 条, 其中 12 条基因表达增强(表 1), 6 条基因表达降低(表 2).

2.4 芯片结果

表 2 NS5A - TP4 下调表达基因

编号	Cy5/Cy3	基因名称
1	0.367	干扰素诱导的丙型肝炎相关微管聚合蛋白(MTAP44)
2	0.410	transgelin 2(TAGLN2)
3	0.435	G 蛋白信号 5 调节子(RGS5)
4	0.455	HGF 激活因子(HGFAC)
5	0.467	exostoses (multiple)-like 3 (EXTL3)
6	0.496	prefoldin 5(PFDN5)

3 讨论

基因芯片(gene chip)也称为 DNA 微距阵(DNA microarray)、DNA 芯片(DNA chip)等, 是近年发展起来的一项前沿生物技术. 他是指将大量靶基因或寡核苷酸片段有序地高密度地排列固定于玻片、硅片等固相载体上, 然后与待测的标记样品的基因按碱基互补配对原理进行杂交, 通过激光共聚焦荧光检测系统等对芯片进行扫描, 再经计算机软件处理, 从而获取大量生命信息. 该技术可以将极其大量的探针同时固定于支持物上, 所以一次可以对大量的生物分子进行检测分析, 从而解决了传统核酸印记杂交(southern blotting 和 northern blotting 等)技术复杂、自动化程度低、检测目的分子数量少、低通量等不足. 该技术的出现使全面综合分析某些生命现象成为可能^[12].

HCV 基因组的翻译是在有关酶的作用下合成一个长约 3 011 氨基酸的多蛋白前体, 然后在宿主信号肽酶和病毒编码的蛋白酶作用下裂解为各种蛋白. NS5A 是非结构蛋白的一种, 哺乳动物细胞表达的 NS5A 蛋白以两种形式存在, 分子量分别为 56 kD 和 58 kD, p58 被认为是 p56 的超级磷酸化产物, 目前认为 NS5A 蛋白是在细胞蛋白激酶作用下发生磷酸化修饰后发挥生物调节作用的^[13-14]. 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. 尽管 NS5A 蛋白是存在于胞质中, 但其具有功能性核定位信号(nucleic localization signal, NLS)序列, 即 PPRKKRVV (354-362 aa), 因此有核信号转导功能. 研究者发现 NS5A 蛋白可以抑制细胞周期调节基因 p21/WAF1 的转录, 而后者是介导细胞凋亡的 p53 的下游效应基因, 说明 NS5A 对细胞凋亡有抑制作用, 对细胞生长有促进作用^[15-18]. 我室利用 SSH 筛选出 HCV NS5A 反式激活基因差异表达的 cDNA 消减文库, 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性.

电子拼接推定该基因的 ORF 获得相应的全长编码基因, 将该未知功能基因命名为 NS5ATP4. 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 NS5ATP4 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 NS5ATP4 编码序列. NS5ATP4 的 ORF 长度为 762 bp, 编码 253 个氨基酸残基, NS5ATP4 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 NS5ATP4 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^[19]. 结果表明, 12 种基因的表达水平上调, 6 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, 如: 细胞色素 P450, HGF 激活因子, 谷胱甘肽过氧化酶 1, 肿瘤抑制亚转移物候选物 1. CD95 (CD95/APO-1) 受体/CD95 配体 (CD95L) 是调节不同细胞凋亡的关键信号传导系统. 表达水平上调的基因谷胱甘肽过氧化酶 1 能够阻断 CD95 诱导的凋亡, 保护细胞免受过氧化作用诱发的凋亡^[20-21]. 表达水平上调的基因富含半胱氨酸的血管生成诱导因子(CYR61)是生长调节因子家族成员之一, 能够与细胞外基质、细胞表面受体结合促进细胞生长、迁移. 研究者发现 CYR61 能够通过激活 MAPK 和 Akt 信号转导途径, 诱导胸壁肿瘤的形成及肿瘤血管化. 研究者亦发现 CYR61 是整合素受体的配体之一, 当配体与整合素受体结合可以介导细胞内外的信号传导, 从而激活五种与血管化有关的反应, 包括: 上皮细胞的黏附、迁移、增生、存活、血管化^[22-25]. 在下调表达的基因中, transgelin 2 的缺失与肿瘤的发生密切相关, Shields et al^[26-29]在研究胸壁及大肠肿瘤时, 发现癌基因 Ras 依赖于 Raf 和非依赖于 Raf 的信号转导中, Ras 均抑制 transgelin 2 基因的表达^[26-29]. 对新基因的研究及其功能的确定是分子生物学领域一项很具有挑战性的工作, 基因芯片技术是研究反式调节基因的有效技术^[30-31].

本研究结果表明, NS5A - TP4 对于肝细胞的基因表达谱有显著的影响, 他上调一些抑制细胞凋亡或与细胞信号转导有关的基因表达, 为我们进一步深入研究 NS5A - TP4 的功能提供了理论依据, 并为 HCV 感染慢性化机制及 HCV 致癌机制提供了新的研究方向.

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 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, 1997:89-103
- 4 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 张树林. 丙型肝炎病毒 5' - 非翻译区的结构与功能研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1020-1022
- 5 Francois C, Duverlie G, Rebouillat D, Khorsi H, Castelain S, Blum HE, Gatinol A, Wychowski C, Moradpour D, Meurs EF. Expression of hepatitis C virus proteins interferes with the antiviral action of interferon independently of PKR-mediated control of protein synthesis. *J Virol* 2000;74:5587-5596
- 6 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
- 7 成军. 慢性丙型肝炎肝脂肪变性的机制及其意义. 世界华人消化杂志 2002;10:999-1003
- 8 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
- 9 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白 3 反式调节靶基因. 世界华人消化杂志 2003;11:930-934
- 10 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式调节基因的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:939-942
- 11 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选乙型肝炎病毒 X 蛋白反式调节基因. 世界华人消化杂志 2003;11:920-924
- 12 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的应用. 世界华人消化杂志 2003;11:461-463
- 13 成军. 丙型肝炎病毒基因组的翻译及其产物的加工. 国外医学微生物学分册 1995;18:14-16
- 14 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
- 15 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
- 16 Lan KH, Sheu ML, Hwang SJ, Yen SH, Chen SY, Wu JC, Wang YJ, Kato N, Omata M, Chang FY, Lee SD. HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 2002;21:4801-4811
- 17 Shirota Y, Luo H, Qin W, Kaneko S, Yamashita T, Kobayashi K, Murakami S. Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. *J Biol Chem* 2002;277:11149-11155
- 18 Gimenez-Barcons M, Franco S, Suarez Y, Fornis X, Ampurdanes S, Puig-Basagoiti F, Sanchez-Fueyo A, Barrera JM, Llovet JM, Bruix J, Sanchez-Tapias JM, Rodes J, Saiz JC. High amino acid variability within the NS5A of hepatitis C virus (HCV) is associated with hepatocellular carcinoma in patients with HCV-1b-related cirrhosis. *Hepatology* 2001;34:158-167
- 19 杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 王春花, 纪冬, 党晓燕. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活基因 4 的克隆化研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2003;12:248-250
- 20 Gouaze V, Andrieu-Abadie N, Cuvillier O, Malagarie-Cazenave S, Frisach MF, Mirault ME, Levade T. Glutathione peroxidase-1 protects from CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277:42867-42874
- 21 Wedi B, Straede J, Wieland B, Kapp A. Eosinophil apoptosis is mediated by stimulators of cellular oxidative metabolisms and inhibited by antioxidants: involvement of a thiol-sensitive redox regulation in eosinophil cell death. *Blood* 1999;94:2365-2373
- 22 Kolesnikova TV, Lau LF. Human CYR61-mediated enhancement of bFGF-induced DNA synthesis in human umbilical vein endothelial cells. *Oncogene* 1998;16:747-754
- 23 Tsai MS, Bogart DF, Li P, Mehmi I, Lupu R. Expression and regulation of Cyr61 in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 2002;21:964-973
- 24 Leu SJ, Lam SC, Lau LF. Pro-angiogenic activities of CYR61 (CCN1) mediated through integrins α v β 3 and α 6 β 1 in human umbilical vein endothelial cell. *J Biol Chem* 2002;277:46248-46255
- 25 Grzeszkiewicz TM, Lindner V, Chen N, Lam SC, Lau LF. The angiogenic factor cysteine-rich 61 (CYR61, CCN1) supports vascular smooth muscle cell adhesion and stimulates chemotaxis through integrin α (6) β (1) and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Endocrinology* 2002;143:1441-1450
- 26 Shields JM, Rogers-Graham K, Der CJ. Loss of transgelin in breast and colon tumors and in RIE-1 cells by Ras deregulation of gene expression through Raf-independent pathways. *J Biol Chem* 2002;277:9790-9799
- 27 Lawson D, Harrison M, Shapland C. Fibroblast transgelin and smooth muscle SM22 α are the same protein, the expression of which is down-regulated in many cell lines. *Cell Motil Cytoskeleton* 1997;38:250-257
- 28 Prinjha RK, Shapland CE, Hsuan JJ, Totty NF, Mason JJ, Lawson D. Cloning and sequencing of cDNAs encoding the actin cross-linking protein transgelin defines a new family of actin-associated proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* 1994;28:243-255
- 29 Shapland C, Hsuan JJ, Totty NF, Lawson D. Purification and properties of transgelin: a transformation and shape change sensitive actin-gelling protein. *J Cell Biol* 1993;121:1065-1073
- 30 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 生物信息学技术与新基因的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:474-477
- 31 成军. 新基因结构与功能研究的策略. 世界华人消化杂志 2003;11:373-377

World Journal of Gastroenterology 稿件管理

为了加快《World Journal of Gastroenterology, WJG》稿件管理的信息化、电子化进程, 提高办刊质量, 规范编辑工作流程, 提高工作效率, 我们成功开发了世界胃肠病学杂志社稿件管理系统, 并于 2003-04-15 投入使用, 来稿登记、稿件回执、稿件初审、二审(包括选择审稿专家和发送审稿通知书)、审稿意见、终审定稿、发送录用通知书、退稿、编辑加工、数据交换、网上投稿查询等, 全部实现了自动生成, 电子化处理. 作者在 WJG 网上投稿查询系统内提交用户名(第一作者)和密码(文章编号)后可查询到稿件的处理状态, 如编号、刊名、题名、作者、收稿日期、送审日期、接受日期、退稿日期、发票编号、待发表日期、入卷(期)和出版页码等在内的 28 个项目.



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

