

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c-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

应用表达谱芯片技术对NS5A TP7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

张健, 刘妍, 成军, 王琳, 邵清, 梁耀东, 李强, 刘敏, 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

张健, 男, 北京市人, 汉族, 医师, 内科传染病学专业硕士研究生, 主要从事传染病的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 human genes transactivated by NS5A TP7 by cDNA microarray assay

Jian Zhang, Yan Liu, Jun Cheng, Lin Wang, Qing Shao, Yao-Dong Liang, Qiang Li, Min Liu

Jian Zhang, Yan Liu, Jun Cheng, Lin Wang, Qing Shao, Yao-Dong Liang, Qiang Li, Min Liu, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Supported by Grants from National Natural Science Foundation of China, No. C030114020, 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 of genes trans-regulated by human gene 7 transactivated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus (NS5A TP7) by cDNA microarray assay.

METHODS: The recombinant expression plasmid pcDNA 3.1(-)-NS5A TP7 was constructed, and HepG2 cells were transfected. Total mRNA was isolated from the HepG2 cells transfected with pcDNA3.1(-) and pcDNA3-NS5A TP7, respectively. Microarray was conducted for screening of up- and down-regulated genes of both HepG2 cells.

RESULTS: After transfecting HepG2 cells, we found 4 genes were up-regulated, and 8 genes down-regulated.

CONCLUSION: cDNA microarray is successfully used to screen the genes trans-regulated by NS5A TP7, which brings some new clues for studying the trans-regulated and immune regulation mechanism of NS5A TP7.

Zhang J, Liu Y, Cheng J, Wang L, Shao Q, Liang YD, Li Q, Liu M. Screening and identification of human genes transactivated by NS5A TP7 by cDNA microarray assay. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004; 12(2):319-322

摘要

目的: 应用基因表达谱芯片研究丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活蛋白 7(human gene 7 transactivated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus, HCV NS5A TP7) 的反式调节基因.

方法: 构建 NS5A TP7 基因的真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5A TP7, 应用基因表达谱芯片技术对 pcDNA3.1(-)-NS5A TP7 转染的 HepG2(人肝母细胞瘤细胞系)细胞和转染空载体 pcDNA3.1(-) 的相同细胞的差异表达 mRNA 进行检测和分析.

结果: HepG2 细胞经转染 NS5A TP7 后, 有 12 条差异基因表达, 其中 4 条基因表达增强, 8 条基因表达降低.

结论: 应用基因表达谱芯片成功筛选了 NS5A TP7 的反式调节基因, 为进一步阐明 NS5A TP7 的反式激活作用及免疫调节机制提供了新的依据.

张健, 刘妍, 成军, 王琳, 邵清, 梁耀东, 李强, 刘敏. 应用表达谱芯片技术对 NS5A TP7 反式调节基因的研究. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):319-322
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/319.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)属于黄病毒属, 是含外膜蛋白的单股正链 RNA 病毒. 在大多数感染人群中 HCV 表现为持续性感染, 并可导致慢性肝炎、肝硬化, 或肝细胞癌, 而且与肝脏脂肪变、糖代谢紊乱有关^[1-10]. HCV 至少被分为 10 种结构蛋白和非结构蛋白, 其中非结构蛋白 NS5A 基因(位于 6 258 bp-7 601 nt 之间)编码的 58 kD 的 NS5A 蛋白(448 aa)具有多种生物学功能, 在 HCV 多蛋白的成熟和 RNA 的复制过程中具有十分重要的作用^[11-14]. 研究表明, NS5A 上存在干扰素 α (IFN α)敏感决定区 (ISDR), 与干扰素 α 治疗的敏感性相关^[15-16]; 此外, NS5A 还是一种作用很强转录激活因子^[17-21], 调控着细胞内许多病毒及细胞基因的转录, 与感染 HCV 的细胞发生恶性转化过程有关. 我实验室应用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)对 NS5A 的反式调节基因进行了初步的研究, 筛选出了一系列已知及未知功能基因, 并把其中一个未知功能基因克隆化, 命名为丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活蛋白 7(human gene 7 transactivated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus, HCV NS5A TP7)^[22]. 此外, 本实

实验室正在对 NS5ATP7 进行酵母双杂交研究, 观察与之有相互作用的蛋白. 为了从不同的角度对 NS5ATP7 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)^[23-26]对 NS5ATP7 反式调节的靶基因成功地进行了筛选, 为今后更加广泛深入地研究 NS5ATP7 的反式调节基因打下了基础.

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); Lipofectamine PLUS 转染试剂(Gibco 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 真核表达载体及细胞转染 NS5ATP7 蛋白真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-NS5ATP7 为本室构建. 用 Lipofectamine PLUS 转染试剂将 2 μg pcDNA3.1(-)-NS5ATP7 及 pcDNA3.1(-)空载体分别转染 35 mm 平皿 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞.

1.3 细胞 mRNA 提取 使用 mRNA Purification 试剂盒, 直接提取转染了 NS5ATP7 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.

1.4 探针标记 参照 Schena et al 的方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化. Cy3-dUTP 标记对照组细胞 mRNA (5 μg), Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA (5 μg). 乙醇沉淀后溶解在 20 μL 5 × SSC+0.2% SDS 杂交液中.

1.5 芯片制备 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、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 1 000-3 000 bp. 靶基因以 0.5 μg/μL 溶解于 3 × 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 0.2% SDS、水及 0.2% 的硼氢化钠溶液处理 10 min, 晾干备用.

1.6 杂交及洗涤 将基因芯片和杂交探针在 95 °C 水浴变性 5 min, 将混合探针加在基因芯片上, 置于 60 °C 杂交 15-17 h. 依次以 2 × SSC+0.2% SDS、0.1% × SSC + 0.2% SDS、0.1% × SSC 洗涤 10 min, 室温晾干.

1.7 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>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 总 RNA 及 mRNA 的定性、定量分析 总 RNA 的吸光度 A₂₆₀/A₂₈₀>1.89, 热稳定实验 70 °C 保温 1 h 与 -20 °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.

2.2 NS5ATP7 蛋白上调基因类型 在基因芯片的扫描分析中, 如果荧光染料的 Cy5/Cy3 比值在 2.000 以上, 就判断为 HCV NS5ATP7 蛋白的上调基因. 在本研究中发现有 4 种基因的表达水平上调 (表 1).

表 1 NS5ATP7 上调基因类型

编号	Cy3/Cy5 比值	基因名称
1	2.012	细胞色素 P450, 亚科 IIC (美芬妥英 4-羟化酶), 多肽 9 (CYP2C9)
2	2.092	干扰素诱导丙型肝炎相关的微管聚集物蛋白 (MTAP44)
3	2.134	钾内部校正通道, 亚科 J, 10 号 (KCNJ10)
4	2.288	钾电压门通道, KQT 样亚科, 3 号 (KCNQ3)

2.3 HCV NS5ATP7 蛋白下调基因类型 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 HCV NS5ATP7 蛋白的下调基因. 在本研究中发现有 8 种基因的表达水平下调 (表 2).

表 2 NS5ATP7 下调基因类型

编号	Cy3/Cy5 比值	基因名称
1	0.220	小的可诱导的细胞因子 A2 (单核细胞趋化性蛋白 1) (SCYA2)
2	0.227	异常的人体基因图, 染色体 X, dbl 同功型 (原癌基因)
3	0.294	主要组织相容性复合体 1- 样序列 (HLALS)
4	0.371	舒血管素 3 (前列腺特异抗原) (KLK3)
5	0.416	钙激活蛋白酶, 小亚单位 1 (CAPNS1)
6	0.422	蛋白激酶 C, α (PRKCA)
7	0.454	叶酸盐水解酶 1 (前列腺特异的膜抗原) (FOLH1)
8	0.472	前脑啡肽 (PENK)

3 讨论

丙型肝炎病毒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, 即: 结构蛋白 C、E1、E2、p7, 和非结构蛋白 NS2、NS3、

NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B^[27-32]。其中非结构蛋白 NS5A 具有多种生物学功能, HCV NS5A 是病毒编码的一种功能广泛的蛋白质, 参与许多重要的调节过程。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, p58 被认为是 p56 的超级磷酸化产物。由于 NS5A 表现出对抗干扰素 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。位于 NS5A 蛋白中央包括一段干扰素敏感决定区(ISDR), 该区被认为是介导 NS5A 与 IFN α 诱导的双链 RNA 依赖的蛋白激酶(PKR)结合的部位, 后者是 IFN α 诱导的早期细胞内抗病毒合成反应。同时 NS5A 显示出诱导 CXC 趋化因子、白介素 - 18(IL-18), 可抵消了 IFN α 抗病毒效应^[32-33]。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。不同磷酸化形式的 NS5A 蛋白具有反式激活作用是关于 NS5A 生物学功能研究的热点。研究发现, NS5A 片段转录激活作用最强的位点定位于 2 135 和 2 331 aa 之间。NS5A 的转录激活区域包括两个酸性氨基酸区(2 143-2 184, 2 220-2 273 aa)和一个脯氨酸富集区(2 282-2 327 aa)。酸性氨基酸区的酸性氨基酸残基的数量与 NS5A 的反式激活活性相关, 两个酸性氨基酸区是 NS5A 的转录激活作用的核心区域, 因此酸性氨基酸区的一些氨基酸的突变可明显影响 NS5A 的转录激活作用, 但是这些突变更多的是引起蛋白的二级结构的改变。Gong et al 研究发现, 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。通过反式激活作用, NS5A 还可抑制细胞周期调节基因 p21WAF1 的表达, 抑制 p53 介导的对转录的反式激活作用和细胞凋亡作用^[34-36]。

我实验室应用 SSH 技术对 NS5A 的反式调节基因进行了初步的研究, 筛选出了一系列已知及未知功能基因, 并把其中一个未知功能基因克隆化, 命名为 NS5ATP7。为进一步研究 NS5ATP7 的功能, 从而对 NS5A 的生理学功能有进一步的了解, 我们应用表达谱芯片技术对 NS5ATP7 的反式调节基因进行研究。

因基因表达谱芯片技术可快速有效地检测到 2 组组织或细胞基因表达谱的差异, 故在 HCV 感染及其致癌机制的研究中具有重要的应用价值。我们以 HepG2 细胞基因组 DNA 为模板, 应用聚合酶链反应技术(PCR)扩增的 NS5ATP7 基因片段, 常规分子生物学技术构建 NS5ATP7 的真核表达载体 pcDNA3- NS5ATP7, 利用脂质体转染技术转染 HepG2 细胞。从转染和非转染细胞 HepG2 种提取总 mRNA, 逆转录为 cDNA, 并进行基因芯片技术分析。结果表明, 细胞色素 P450、干扰素 α 诱导丙型肝炎相关的微管聚集物蛋白、钾电压门通道及钾内部矫正通道 4 种基因的表达水平上调, 主要组织

相容性复合体 1、钙激活蛋白酶、蛋白激酶 C 及叶酸盐水解酶 1 等 8 种基因的表达水平下调。总之, 本研究的结果表明, NS5ATP7 对于肝细胞的基因表达谱有显著的影响, 基因芯片技术是研究反式调节基因的有效技术。他为我们进一步深入研究 NS5ATP7 的反式调节基因的功能打下了重要基础。

4 参考文献

- 1 成军, 斯崇文, 刘芳华. HCV RNA 定量 PCR 检测研究进展. 国外医学·流行病学传染病学分册 1994;21:20-23
- 2 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
- 3 成军, 张玲霞. 抗 HCV 的基因治疗方案 - 从 HCV - 肝细胞相互作用的分子生物学机制设计. 国外医学·流行病学传染病学分册 1999;26:59-61
- 4 成军, 陈菊梅. 丙型肝炎新型治疗方法的研究进展. 国外医学·流行病学传染病学分册 1999;26:158-162
- 5 钟彦伟, 成军, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 张玲霞. 可溶性 HCV 非结构蛋白 NS3 人源单链抗体在大肠杆菌中的表达. 肝脏 1999;4:73-76
- 6 钟彦伟, 成军, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 张玲霞. HCV 非结构蛋白 NS3 人源单链抗体的筛选与鉴定. 中华传染病杂志 2000;18:84-87
- 7 成军, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒 3' - 非翻译区 RNA 结合蛋白的研究进展. 国外医学·病毒学分册 2000;7:17-21
- 8 成军, 张玲霞. 丙型肝炎病毒干扰素敏感决定区的研究进展. 国外医学·流行病学传染病学分册 2000;27:55-58
- 9 成军, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS4A 的研究进展. 国外医学·病毒学分册 2000;7:14-17
- 10 成军, 朱传琳. 丙型肝炎病毒感染慢性化的分子生物学机制. 国外医学·病毒学分册 2000;7:29-32
- 11 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
- 12 成军, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白的生物学调节作用. 国外医学·微生物学分册 2001;24:12-14
- 13 成军, 钟彦伟, 施双双, 倪勤, 刘妍, 王刚, 董菁, 夏小兵, 刘友昭, 王琳, 李克, 杨继珍, 邵得志, 陈菊梅. HCV 非结构蛋白 NS5A 人源单链可变区抗体基因的筛选与鉴定. 中华实验和临床病毒学杂志 2001;15:216-218
- 14 成军, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒 5' - 非翻译区及其结合蛋白的研究进展. 国外医学·微生物学分册 2001;24:7-9
- 15 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 北京: 人民军医出版社, 1997:37-42
- 16 Sato C. Effects of hepatitis C virus proteins on the interferon-stimulated signal transduction. *Nippon Rinsho* 2001;59:1271-1276
- 17 钟彦伟, 成军, 田小军, 陈新华, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 抗原模拟表位的筛选与鉴定. 中华肝脏病杂志 2002;10:266-268
- 18 成军. 慢性丙型病毒性肝炎肝脏脂肪变的机制及其意义. 世界华人消化杂志 2002;10:999-1003
- 19 Kato N, Lan KH, Ono-Nita SK. Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator. *J Virol* 1997;71:8856-8859
- 20 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
- 21 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 病毒启动子的研究. 军医进修学院学报 2003;24:81-83
- 22 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
- 23 成军. 基因芯片技术的原理及其在肝病研究中的应用. 中华肝脏病杂志 2002;10:302

- 24 Stipp D. Gene chip breakthrough. *Fortune* 1997;31:195-197
- 25 Chan K, Baker S, Kim CC. Genomic comparison of salmonella enterica serovars and salmonella bongori by Use of an S. enterica serovar typhimurium DNA microarray. *J Bacteriol* 2003;185:553-563
- 26 李瑶, 陈菊祥, 袁敏燕. 基因芯片的制备研究. 第二军医大学学报 2000;21:812-814
- 27 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
- 28 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
- 29 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
- 30 钟彦伟, 成军, 田小军, 陈新华, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 抗原模拟表位的筛选与鉴定. 中华肝脏病杂志 2002;10:266-268
- 31 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
- 32 Gale M Jr, Kwieciszewski B, Dossett M, Nakao H, Katze MG. Antiapoptotic and oncogenic potentials of hepatitis C virus are linked to interferon resistance by viral repression of the PKR protein kinase. *J Virol* 1999;73:6506-6516
- 33 Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, Ezelle HJ, Duverlie G, Barber GN, Levy DE, Mukaida N, Gretch DR. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* 2001;75:6095-6106
- 34 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
- 35 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
- 36 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

• 消息 •

国科技论文产出世界第五 医药卫生期刊竞争力强劲

健康报 记者张荔子 2003-12-10 报到: 这是一连串枯燥的数字, 却是大量科研人员辛勤一年的收获. 12月9日, 中国科学技术信息研究所在京发布的2002年度中国科技论文统计结果显示, 我国科技论文产出由2001年全世界第六位上升为第五位, 在世界论文总数中首次超过5%. 论文数据统计取自3种在国际上颇具影响的检索工具: 《科学引文索引》(SCI)、《工程索引》(EI)和《科学技术会议录索引》(ISTP). 2002年我国科技论文产出比2001年增长19.9%, 达77395篇, 占世界论文总数的5.37%. 排在前四位的国家依次是美国、日本、英国和德国. 我国国际论文被引用数和被引用次数也分别增长31.6%和33.3%, 其中临床医学国内论文数量和被引用次数居各学科第一, 基础医学论文在国内被引用次数排名第四. 临床医学和基础医学论文较以前都显示出更多的国际合作. 分类统计还排列出高等院校、科研机构、医疗机构各类机构论文产出和被引用情况前20位, 其中解放军总医院连续3年获国内科技论文被引用数量全国医疗机构第一名, 第四军医大学西京医院连续3年获国内科技论文数量全国医疗机构第一. 10位国际论文高产作者和高引用作者中有3位是来自上海第二医科大学的沈志祥、陈国强和牛超, 他们因在《血液》发表的论文被广泛引用而分别名列第三、六、九. 共有387种医药卫生类期刊进入今年的影响因子分类排序, 其中影响因子超过1的期刊有12种, 除《世界华人消化杂志》和《世界胃肠病学杂志》外, 其余10种均为“中华牌”期刊. 此外, 刚选出的第二届中国百种杰出学术期刊中, 19种医药卫生类期刊及其主编榜上有名. 纵观2002年中国科技论文各项统计, 可以看到中国科技论文数量和影响力水平继续保持上升趋势, 但中国与世界科技强国还有很大差距. 据《国际竞争力度报告》评价, 中国科技竞争力在49个被评价的国家和地区中处于中等偏下的水平. 据SCI统计, 中国论文平均被引用率低于世界平均水平.



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

