

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

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

陈国凤, 成军, 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

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(2):391-393

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/391.asp>

0 引言

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)^[1]. 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, SP), 排列顺序为N-末端蛋白(TP), 隔离片, RT/DNA聚合酶和RNase H. 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.

1 末端蛋白的结构和功能

HBV DNA P基因编码TP、RT、RNase H和隔离片, 各区段分别在2 307-2 840 nt、133-1 128 nt、1 129-1 621 nt和2 841-0-132 nt^[2]. Li et al 在T7噬菌体启动子的调控下构建HBV聚合酶cDNA并在兔的网状细胞裂解液中表达, 组成一对转录翻译系统. 在指定位点的突变中进一步证实重组聚合酶cDNA产生3种产物: 全长蛋白(约94 kD), 内在的始动蛋白(约81 kD), N-TP(约40 kD). 体外表达的聚合酶具有蛋白引物的活性, 由体外³²P标记的-dGTP全长聚合酶和TP引导的检测可得到证实^[3]. Kim et al^[4]对人HBV聚合酶的N-末端或C-末端和DNA聚合酶的结构域同时删除, 并在大肠杆菌中表达, 经直链淀粉柱层析法纯化后, 其纯化蛋白的DNA依赖性DNA聚合酶活性与野毒株进行比较, 证明TP和SP删除分别可以使酶活性减少到70%, 而RNase H删除对聚合酶活性的影响要大于前二者. 单纯RT或将RT的N末端删除后仍能保持聚合酶活性. 将人的HBV聚合酶在兔网状细胞裂解系统中表达, 表达蛋白显示出DNA依赖性的DNA聚合酶活性, 在体外转录

和翻译产生分子量大约100 kD的大蛋白. HBV DNA聚合酶可以被阿菲迪霉素(抗病毒抗生素)和NEM抑制, 在pH7.5和温度37℃时聚合反应最佳, 同时, 聚合酶活性需要有MnCl₂或MgCl₂(在MnCl₂时更佳). 在75 mm NaCl或100 mm KCl存在时活性较好(75 mm NaCl时活性更佳). 对聚合酶蛋白删除后的聚合活性研究显示, TP对于完整的聚合酶功能是必要的, 隔离片删除可能降低P蛋白的稳定性^[5]. Miriam et al^[6]对澳大利亚鸭乙型肝炎病毒(AusDHBV)进行克隆和测序, 并与其他嗜肝病毒进行比较. 在澳大利亚DHBV及其他鸟类嗜肝病毒中包括3个与病毒复制有关的重要特征: (1)69个nt粘端重叠区, 保持染色体组环状结构, 包含1对12 nt顺式重叠序列DR1(2 541-2 552 nt)和DR2(2 483-2 494 nt). (2)多聚腺苷酰信号序列(2 778-2 783 nt), 对终止病毒mRNA转录是必须的. (3)在聚合酶的TP内第96位酪氨酸残基, 是RNA衣壳体信号序列(称为 ϵ)的结合位点, 在前基因组RNA内用于负链DNA合成. 20条已发表的鸟类嗜肝病毒比较发现, 在第500 nt部位(编码隔离片区)替代或删除突变最常见, 前-S/S基因(1 290-1 793 nt)S段和前-C段(2 524-2 652 nt), 编码RT区域, 替代和缺失很罕见, 是迄今为止所有DHBV病毒中最保守的. 嗜肝病毒RT含有的4个区域中, TP和隔离片对嗜肝病毒聚合酶是独特的, TP内的第96位酪氨酸残基可引导DNA合成, 并使聚合酶与病毒DNA共价结合, 隔离片无已知的功能, 只是将TP和其他分子连接起来, RT和RNase H包含两个已知的酶活性位点, 后者与其他相关的逆转录病毒和聚合酶是一致的^[7-18].

2 末端蛋白与HBV复制

HBV含3.2 kb碱基部分双链DNA基因组, 是由3.5 kb前基因组病毒转录的逆转录核壳包裹形成的. 病毒复制的第一步是HBV聚合酶识别5'-末端的前基因组RNA的核壳包裹信号 ϵ . 利用 ϵ 的茎-环(stem-loop)结构域为模板, 聚合酶的TP域的酪氨酸残基为引物, 使聚合酶与前基因组RNA结合, 在RT作用下, 病毒RNA转化为DNA^[19]. Beck et al^[20]利用在兔的网状细胞裂解液(RRL)中, 产生DHBV DNA P蛋白的翻译复合物, 并且为克服该系统翻译能力有限, 影响对复合物进一步分析的缺点. 先在大肠杆菌内表达产生大量DHBV DNA P蛋白, 然后在RRL中的进行核蛋白复合物的重构. 因为以往在细菌中产生全长P蛋白的尝试没有成功, 于是单独在大肠杆菌中表达TP和RT-RNase H(RT-RH). 结果, TP和C-末端经微小修改后的RT-RH, 也能有相当量的表达, 当加入到RRL时, 能进行 ϵ -依赖性DNA引物合成, 证明翻译后的活化. Yao et al^[21]发现75% DHBV RT在转染LMH细胞中不是按已知的途径, 而是在细胞中与核心蛋白或核壳体分开存在. 在感染的鸭肝中, 未被核壳包裹的RT也是大量存在的, 他们作为亚型的序列联合体, 最易在转译后修正产生. 仅有极少的亚型

被核壳包裹成病毒核心颗粒, 没有被核壳包裹的RT大量存在于感染的鸭肝内, 以复合物的形式存在于细胞质中. RT在结构上仅有部分与核心蛋白重叠, 这种结构不受封闭的壳体的影响. 这提出了RT可能的代谢作用是转译后被调节, RT在复制周期中的作用可能比已知的要多.

嗜肝病毒(HBV)RT与前基因组RNA模板上的RNA信号 ε 的特异结合, 并且靠RT自身引导(蛋白引导). 蛋白引导不仅需要病毒RT和 ε 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 ε 与TP共价结合的模板. Cho et al 认为HSP90及其相关产物在DHBV感染通过RNA信号 ε 与DHBV聚合酶结合对DHBV复制起重要作用. 同理, 用兔网状细胞裂解液中合成人HBV聚合酶蛋白在体外与HSP90形成联合体, HSP90用MBP共纯化, 聚合酶蛋白在HepG2细胞中表达, 提示在体内人的HBV聚合酶与HSP90相关. 为了对HSP90的作用位点进行定位, HBV聚合酶翻译的几个删除突变与抗HSP90抗体在体外共沉淀, 结果提示TP的C末端和RT单独与HSP90发生作用^[22]. Cho et al^[23]研究显示HBV聚合酶单独与Hsp90的N末端和C末端相互作用, Hsp90的N末端片段(1-302 aa)与HBV聚合酶的TP和RP都有相互作用, 而C末端片段(438-723 aa)仅与RT相互作用, 其中间片段(327-438 aa)则与HBV聚合酶无相互作用. Hu et al^[24]研究证明DHBV RT需要宿主细胞因子的辅助进行RT与 ε 的特异结合和蛋白引导功能. RT与 ε 交互作用和蛋白引导需要Hsp90. Hsp90的几个辅因子在体外足以保持重组RT活性, 与 ε 结合和蛋白引导. 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、酸性磷蛋白质, 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. 两个截短的迷你型DHBV RT融合蛋白GST-mini-RT1和GST-miniRT2在大肠杆菌中表达并纯化, 另外还构建了不能与 ε RNA结合的RT突变型Mini-RT2/CA29, 无活性的RT Mini-RT1/YMHA. 经过对蛋白引导反应和RNA结合试验, 结果, Hsp90、Hsp70、Hop、Ydj1(Hsp40)在一起能重新组成蛋白引导反应, 单独或任何两个或三个蛋白组合是无效的, 偶尔Hsp70加Ydj1能微弱刺激蛋白引导反应, 但比4种相加效力小得多. 同时, 这种蛋白引导反应与陪伴蛋白浓度呈正相关. 与RT的催化活性有关, 对失去了活性位点的突变RT完全没有蛋白引导的作用. Gyoo et al 证明Hsp90可以被抗-Hsp90抗体抑制; 在体外Hsp90被含有1% NP-40的

1 M氯化钠解吸后几乎完全失去了对在昆虫细胞内表达的HBV聚合酶的引导活性. Hsp90不仅维持人HBV聚合酶与前基因组RNA结合的联合体, 而且使HBV聚合酶能胜任在体外引导作用. 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^[25].

Park et al^[26]构建了杆状病毒载体pFPolE, 编码人HBV聚合酶开放读码框架(ORF)和3'-非翻译区(NTR)含有DR2、DR1和 ε 环, ε 环对引导HBV复制起模板作用. 构建的含HBV聚合酶的重组质粒经M2琼脂珠纯化, SDS-PAGE电泳及考马斯亮蓝染色后, 可得一条约60 kD蛋白带, 经N末端氨基酸测序并经BLAST程序进行同源性分析, 然后进行免疫斑点分析和体外引导试验, 结果提示分子伴侣蛋白Hsp60与HBV Pol之间有特异性的相互作用关系. Hsp60与HBV聚合酶相互作用, 是使HBV聚合酶变成活性状态的重要阶段. Hsp60在体外强烈影响HBV聚合酶活性: (1)通过蛋白特异性抗体封闭Hsp60, 可降低HBV聚合酶活性; (2)通过增加ATP中的Hsp60, 可提高聚合酶活性; (3)ATP与Hsp60共同激活HBV聚合酶. 体外试验显示, 通过C Δ 540(变异的Hsp60)可抑制细胞内的Hsp60, 可导致HBV聚合酶活性的降低. 因此, Hsp60与HBV聚合酶相互作用对激活HBV聚合酶有明显意义. 进一步在昆虫细胞中使用重组杆状病毒表达聚合酶的几个缺失突变的蛋白质, 然后用M2免疫共沉淀, 显示Hsp60结合到HBV P需要两个最小位点: TP(1-199 aa)和RH(680-842 aa). 在人的HBV宿主细胞HepG2中显示HBV P也可以与Hsp60结合; Hsp60通过与TP和RH位点结合激活HBV P, 而HBV P与Hsp60结合不需要前基因组RNA^[27].

Wang et al 将C末端切断后的Mini-RT2中去除N末端和隔离片后形成RT变异体, 观察其结合dATP的情况, 结果, RT变异体能够完成与dGTP的结合, 但不能与dATP结合. TP和RT之间相互作用与其他病毒的蛋白引物和独立的DNA聚合酶残基有着重要差异. TP、RT和 ε RNA之间特殊的相互作用对嗜肝病毒的pgRNA包装是非常重要的, 同时需要C末端RNase H域. 蛋白-蛋白, 蛋白-RNA之间相互作用需要RNA包装可能强调TP-RT- ε RNA之间相互制约^[18].

3 TP与单克隆抗体

Jasper et al 用重组的人HBV聚合酶(HBV P)在感染了杆状病毒的昆虫细胞内表达并纯化产生了6个对HBV P蛋白的单克隆抗体(单抗). 单抗1B4、7C3和10B9识别聚合酶TP的20-30 aa抗原决定基, 单抗2C8识别TP的8-20氨基酸抗原决定基, 单抗8D5识别隔离片的225-250 aa抗原决定基, 单抗9F9识别RNase H的800-832 aa抗原决定基. 鼠的B细胞HBV P抗原决定基显示被定位在N-和C-末端蛋白和隔离片区域. Western blot和免疫沉淀法示: 已知单抗与聚合酶的N末端结

合, 阳性对照 M2 识别全长的聚合酶和含有 N 末端的降解产物, 1B4、2C8、7C3 识别聚合酶 N 末端抗原决定基. 8D5 识别隔离片区, 9F9 识别聚合酶 C-末端的抗原决定基. 能够免疫沉淀聚合酶的所有聚合酶单克隆抗体均经体外引导抑制试验, 了解他们在体外抑制引导酶活性的作用. 考马斯亮蓝染色蛋白胶显示在不同的单抗中聚合酶沉淀的量. M2 单抗作为免疫沉淀和体外引导的阳性对照. C7-57 为阴性对照. 结果, 单抗 9F9 无引导活性抑制, 2C8 的 86% 体外引导活性被抑制. 8D5 的 14% 被抑制, 等量的 1B4 和 7C3 分别有 98% 和 81% 被抑制. 提示 TP 特异的单抗能抑制聚合酶的体外引导活性. 在体外引导测试中, 只有对 TP 特异的单抗, 显示对聚合酶功能有抑制作用. 提示, 抗体介导的对 TP 的干扰可能用于检测 HBV 复制. 进一步研究出能干扰聚合酶功能的单抗, 对研究抗 HBV 复制的制剂可能有意义^[17].

4 参考文献

- 1 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
- 2 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
- 3 Li Z, Tyrrell DL. Expression of an enzymatically active polymerase of human hepatitis B virus in an coupled transcription-translation system. *Biochem Cell Biol* 1999;77:119-126
- 4 Kim Y, Hong YB, Jung G. Hepatitis B virus: DNA polymerase activity of deletion mutants. *Biochem Mol Biol Int* 1999;47:301-308
- 5 Kim Y, Jung G. Active human hepatitis B viral polymerase expressed in rabbit reticulocyte lysate system. *Virus Genes* 1999;19:123-130
- 6 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
- 7 刘妍, 成军, 董菁, 李克, 夏小兵, 王刚, 杨继珍, 王琳. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的初步研究. *肝脏* 2001;6:8-10
- 8 刘妍, 成军, 陆荫英, 李克. 乙型肝炎病毒蛋白反式激活基因的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:217-219
- 9 陆荫英, 王琳, 成军, 李克, 刘妍, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选 HBcAg 肝细胞结合蛋白基因. *世界华人消化杂志* 2003;11:426-429
- 10 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 王琳, 王刚, 李莉. 乙型肝炎病毒 X 基因异质性及对其反式激活功能的影响. *解放军医学杂志* 2002;27:125-127
- 11 刘妍, 董菁, 成军, 钟彦伟, 夏小兵, 李克, 王琳, 施双双, 段惠娟. 乙型肝炎病毒 X 蛋白及反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. *解放军医学杂志* 2001;26:404-406
- 12 董菁, 成军, 皇甫竞坤, 洪源, 王刚, 陈国凤, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒序列准种个体化特征的研究. *解放军医学杂志* 2002;27:119-121
- 13 董菁, 刘妍, 皇甫竞坤, 施双双, 王刚, 洪源, 陈国凤, 李莉, 陈菊梅, 成军. 乙型肝炎病毒表面抗原一级结构多态性的初步研究. *胃肠病学和肝病学杂志* 2002;11:130-135
- 14 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 乙型肝炎病毒对细胞信号转导的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11:472-474
- 15 Wang XT, Grammatikakis N, Hu JM. Role of p50/CDC37 in Hepadnavirus assembly and replication. *J Biol Chem* 2002;277:24361-24367
- 16 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
- 17 zu Putlitz J, Lanford RE, Carlson RI, Notvall L, de la Monte SM, Wands JR. Properties of monoclonal antibodies directed against hepatitis B virus polymerase protein. *J Virol* 1999;73:4188-4196
- 18 Wang XT, Hu JM. Distinct requirement for two stages of protein-

- primed Initiation of reverse transcription in hepadnaviruses. *J Virol* 2002;76:5857-5865
- 19 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
- 20 Beck J, Nassal M. Reconstitution of a functional duck hepatitis B virus replication initiation complex from separate reverse transcriptase domains expressed in Escherichia coli. *J Virol* 2001;75:7410-7419
- 21 Yao E, Gong YH, Chen N, Tavis JE. The majority of duck hepatitis B virus reverse transcriptase in cells is nonencapsidated and is bound to a cytoplasmic structure. *J Virol* 2000;74:8648-8657
- 22 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
- 23 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
- 24 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
- 25 Gyo Park S, Kyung Rho J, 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
- 26 Park SG, Jung G, Human Hepatitis B virus polymerase interacts with the molecular chaperonin Hsp60. *J Virol* 2001;75:6962-6968
- 27 Park SG, Lim SO, Jung G. Binding site analysis of human HBV pol for molecular chaperonin, hsp60. *Virology* 2002;298:116-123

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

陈国凤, 成军, 王琳, 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 国家自然科学基金项目, No. C39970674, No. C03011402, No. C39900130, 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

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(2):393-397

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/393.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)属嗜肝 DNA 病毒属, 是一组以侵袭肝脏为主的病毒, 主要感染哺乳动物和鸟类. 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 多聚酶(HBV DNA P)^[1]. HBV DNA P 基因在 ORF 中最长, 并且与 C、S、X 基因区有重叠,



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

