

应用基因表达谱芯片技术筛选 HBV 前 - S2 蛋白反式调节基因

纪冬, 成军, 董菁, 刘妍, 王建军, 郭江

纪冬, 成军, 董菁, 刘妍, 王建军, 郭江, 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重点实验室 北京市 100039

纪冬, 男, 1975-12-05 生, 河北省怀来县人, 汉族, 2002 年解放军军医进修学院传染病学硕士生, 医师, 从事病毒性肝炎的临床治疗及实验研究。

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重点实验室。cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-03-15 接受日期: 2004-05-11

Screening and identification of genes trans-regulated by HBV pre-S2 protein with cDNA microarray

Dong Ji, Jun Cheng, Jing Dong, Yan Liu, Jian-Jun Wang, Jiang Guo

Dong Ji, Jun Cheng, Jing Dong, Yan Liu, Jian-Jun Wang, Jiang Guo, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Supported by National Natural Science Foundation No. C03011402, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of Chinese PLA

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2004-03-15 Accepted: 2004-05-11

Abstract

AIM: To understand the target genes up-regulated or down-regulated by HBV pre-S2 protein, we compared the differentially expressed genes between the hepatoblastoma cell line HepG2 transfected by pcDNA3.1(-) and pcDNA3.1-preS2, respectively with cDNA microarray technique.

METHODS: The HBV pre-S2 coding DNA fragment was amplified with polymerase chain reaction (PCR) technique by using G376-7 plasmid containing the full length of HBV genome as the template. The expressive vector of pcDNA3.1-preS2 was constructed by routine molecular biological methods. The HepG2 cells were transfected by pcDNA3.1(-) and pcDNA3.1-preS2, respectively, using FuGENE6 transfection reagent. The total RNA was isolated and reversely transcribed. The cDNAs were subjected for microarray screening with 1 152 cDNA probes.

RESULTS: The expressive vector was constructed and confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing analysis. High quality mRNA and cDNA were prepared and

successful microarray screening conducted. From the scanning results, it was found 42 genes were up-regulated and 36 genes down-regulated by pre-S2 protein of HBV.

CONCLUSION: HBV pre-S2 protein is a transactivator. The expression of pre-S2 protein affects the expression spectrum of HBV infected hepatocyte.

Ji D, Cheng J, Dong J, Liu Y, Wang JJ, Guo J. Screening and identification of genes trans-regulated by HBV pre-S2 protein with cDNA microarray. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(7):1559-1563

摘要

目的: 乙型肝炎病毒(HBV)前-S2蛋白是由HBV S基因编码的具有多种功能的蛋白质。前-S2蛋白的表达对于HBV感染肝细胞的基因表达谱具有显著影响。为了研究前-S2蛋白反式调节的靶基因, 我们应用基因芯片技术对于pcDNA3.1(-)和pcDNA3.1(-)-preS2分别转染的HepG2细胞的基因表达谱进行分析。

方法: 以含有HBV全基因组的质粒G376-7(GenBank号: AF384371)作为模板, 应用聚合酶链反应(PCR)技术扩增前-S2蛋白编码基因片段, 以常规的分子生物学技术构建表达载体pcDNA3.1(-)-preS2。以脂质体技术转染肝母细胞瘤细胞系HepG2, 提取总mRNA, 逆转录为cDNA, 与转染空白表达载体pcDNA3.1(-)的HepG2细胞进行DNA芯片分析并比较。

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, 提取高质量的总mRNA并进行逆转录成为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42个基因表达水平显著上调, 36个基因表达水平显著下调。

结论: HBV的前-S2蛋白是一种反式激活因子, 前-S2基因的表达对于肝细胞基因表达谱有显著影响。

纪冬, 成军, 董菁, 刘妍, 王建军, 郭江. 应用基因表达谱芯片技术筛选 HBV 前-S2 蛋白反式调节基因. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1559-1563
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1559.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)属于嗜肝DNA病毒, 可以导致肝脏的急、慢性感染^[1-10]。急性感染可以进展为严重的病患, 大约0.5%的患者死于暴发性肝衰竭。慢性感染易发

展为肝硬化及肝细胞癌(HCC), 流行病学研究表明HBV携带者患癌的可能性明显高于正常人. 然而HBV在肝癌发病中的作用机制尚不十分清楚, 研究揭示了HBV进入肝细胞后, 可以与肝细胞染色体整合并编码两种反式调节因子: HBV X蛋白(HBxAg)和前-S2反式激活因子家族: 表面抗原大蛋白(LHBs)和羧基端截短型表面抗原中蛋白(MHBs¹). 尽管LHBs与MHBs¹具有反式激活作用, 但更进一步的研究表明主要是前-S区对于反式激活具有关键性的作用, 为了研究前-S2蛋白对于宿主细胞基因的上调、下调作用, 我们应用基因表达谱芯片技术, 对于前-S2蛋白基因和空白表达载体转染肝母细胞瘤细胞系HepG2进行筛选, 试图从前-S2蛋白的表达对于肝细胞基因表达谱的影响这一角度, 探索HBV感染的发病机制, 包括HBV相关的HCC发生发展的分子生物学机制^[11-14].

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); FuGENE6转染试剂(Roche); mRNA Purification试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech); PCR-Select cDNA Subtraction试剂盒, 50 × PCR Enzyme Mix, Advantage PCR Cloning试剂盒(Clontech); High Pure PCR Product Purification试剂盒(Boehringer Mannheim); T7, SP6通用引物及pGEM-Teasy载体(Promega).

1.2 方法

1.2.1 真核表达载体的构建及细胞转染 根据董菁 et al^[15-18]发表的adr亚型HBV的基因序列, 在编码区的上游和下游分别设计合成一对寡聚核苷酸引物(上游: 5'-GAT ATC ATG CAG TGG AAC TCC ACC-3'; 下游: 5'-GGA TCC TTA GTT CGG TGC AGG GTC-3'), 在引物的两端分别引入了EcoR V和BamH I酶切位点, 引物由上海博亚公司合成. 使用25 μL反应体系, 以G376-7(GenBank号: AF384371)质粒DNA为模板, 放入PE9600 PCR仪中扩增. 扩增条件: 94 °C变性30 s, 61 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 循环35次后, 72 °C保温10 min. 9 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果. 扩增的HBV前-S2蛋白编码基因首先克隆到TA载体中进行序列测定, 然后亚克隆到真核表达载体pcDNA3.1(-)中, 构建真核表达载体pcDNA3.1(-)-preS2. 用FuGENE6转染试剂将2 μg pcDNA3.1(-)-preS2及pcDNA3.1(-)空载体分别转染35 mm平皿HepG2细胞, 48 h后收获细胞. 使用mRNA Purification试剂盒, 直接提取转染了前-S2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.

1.2.2 基因表达谱芯片检测 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+2 g/L SDS杂交液中. 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 g/L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2 g/L SDS、水及2 g/L 硼氢化钠溶液处理10 min, 晾干备用. 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+2 g/L SDS, 0.1 × SSC+2 g/L SDS, 0.1 × SSC洗涤10 min, 室温晾干. 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 HBV前-S2蛋白真核表达质粒pcDNA3.1(-)-preS2由本室构建. 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 HBV前-S2蛋白反式调节基因 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HBV前-S2蛋白的上调基因, 如果荧光染料的Cy5/Cy3比值在0.500以下, 就判断为前-S2蛋白的下调基因. 我们发现42种基因的表达水平上调(表1), 有36种基因的表达水平下调(表2).

表1 HBV前-S2蛋白上调基因类型

编号	Cy3/Cy5	基因名称
1	2.008	p53结合蛋白(MDM4)
2	2.043	促胸腺生成素(TMPO)
3	2.077	TGF-β1IRα
4	2.117	真核翻译起始因子3亚单位9(EIF3S9)
5	2.143	NCK相关蛋白1(NCKAP1)
6	2.147	B细胞慢性淋巴细胞白血病/淋巴瘤10(BCL10)
7	2.159	CD24抗原(小细胞肺癌簇4抗原)
8	2.173	核糖体蛋白S31(MRPS31)
9	2.179	CGI-107蛋白
10	2.230	肿瘤坏死因子(配体)超家族成员10(TNFSF10)
11	2.285	未知功能蛋白(FLJ20432)
12	2.325	组[织]胺-N-甲基转移酶(HNMT)
13	2.398	TRAIL受体2

14	2.462	凋亡相关的 RNA 结合蛋白(NAPOR -3)	17	0.385	ATP 合酶
15	2.485	胱冬肽酶 9(caspase 9)	18	0.400	RNA 多聚酶 I(RPA40)
16	2.495	翻译抑制蛋白 p14.5(UK114)	19	0.401	钙联接蛋白(CANX)
17	2.535	蛋白激酶 C(PKC)	20	0.403	干扰素 γ 受体 1(IFNGR1)
18	2.570	丝氨酸 - 苏氨酸激酶(KDS)	21	0.418	BCL2/ 腺病毒 E1B(19 kD)相互作用蛋白 3(BNIP3)
19	2.644	γ - 氨基丁酸(GABA) B 受体 1(GABBR1)	22	0.420	亮氨酸拉链(肿瘤中下调)1 (LDOC1)
20	2.667	KIAA1544 蛋白	23	0.422	胰岛素受体(INSR)
21	2.683	KIAA0583 蛋白	24	0.426	巨噬细胞游走抑制因子
22	2.717	B 细胞 RAG 相关蛋白(BRAG)	25	0.427	可溶性鸟苷酸环化酶 1 α 3(GUCY1A3)
23	2.741	胱冬肽酶 6(caspase 6)	26	0.431	热休克蛋白 2 (HSJ2)
24	2.754	酪蛋白激酶 1, α 1(CSNK1A1)	27	0.437	锌指蛋白 183 (RING finger, C3HC4 type) (ZNF183)
25	2.915	KIAA0156 蛋白	28	0.438	金属硫蛋白 3 (神经生长抑制因子) (MT3)
26	2.935	T 细胞白血病易位改变基因(TCTA)	29	0.439	干燥综合征抗原 B (自身抗原 La) (SSB)
27	3.045	溶血磷脂酶 I(LYPLA1)	30	0.445	CGI-26 蛋白(LOC51071)
28	3.067	γ - 氨基丁酸(GABA)A 受体	31	0.453	金属蛋白酶 1 (MP1)
29	3.088	乳酸脱氢酶 B	32	0.462	肿瘤易感基因 101 (TSG101)
30	3.109	凋亡蛋白 1 抑制子(MIHC)	33	0.471	转化生长因子 β 1(TGFB1)
31	3.210	翻译延长因子	34	0.474	CD59 抗原 p18-20
32	3.310	转化生长因子 β 受体 I	35	0.479	基质金属蛋白酶 1(MMP1)
33	3.616	可溶性鸟苷酸环化酶 beta3(GUCY1B3)	36	0.489	细胞死亡防御因子 1(defender against cell death 1, DAD1)
34	4.005	甘氨酸脒基转移酶(GATM)			
35	4.025	假想蛋白 BCRA2			
36	4.211	FKBP 相关蛋白(FAP48)			
37	4.513	CDC23			
38	4.777	未知功能(KIAA0205)蛋白			
39	4.900	硫氧还蛋白还原酶 1(TXNRD1)			
40	5.985	神经降压素(NTS)			
41	8.141	人蛋白激酶 2 型 调节亚单位(cAMP- 依赖)(PRKAR2B)			
42	9.770	巨噬细胞, 成红细胞黏附因子(MAEA)			

表 2 HBV 前 -S2 蛋白下调基因类型

编号	Cy3/Cy5	基因名称
1	0.256	谷氧还蛋白(硫醇转移酶)(GLRX)
2	0.289	核糖体蛋白 L32(RPL32)
3	0.297	胱冬肽酶 4(caspase 4)
4	0.322	死亡相关蛋白 6(DAXX)
5	0.330	钙调素结合蛋白 1(CALD1)
6	0.336	TRAF 和 TNF 受体相关蛋白(AD022)
7	0.344	SUMO-1 激活酶亚单位 1(SAE1)
8	0.351	未知功能蛋白(FLJ30414)
9	0.364	热休克 70kD 蛋白 9B(HSPA9B)
10	0.366	磷酸硒合成酶 2(SPS2)
11	0.368	层粘连蛋白 2(LAMB2)
12	0.371	CD14 抗原(CD14)
13	0.375	未知功能蛋白(HSPC111)
14	0.378	TNF 受体相关因子 2(TRAF2)
15	0.381	激肽释放酶 2(KLK2)
16	0.384	G 蛋白结合蛋白 CRFG(CRFG)

3 讨论

基因表达谱芯片(DNA microarray)技术可以将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^[19-25]. HBV 基因组可以分为 4 个区, 其中 S 区编码病毒的包膜蛋白, 具有一个开放读码框(ORF), 通过 3 个起始密码子(ATG)可以分为 3 个编码区, 分别编码前 -S1, 前 -S2 和 S 蛋白. 通过不同的 ATG 起始密码子, 共合成 3 种包膜蛋白, 分别是大蛋白(LHBs, 前 S1+ 前 S2+S 蛋白), 中蛋白(MHBs, 前 -S2+S 蛋白), 小蛋白(SHBs, S 蛋白)^[26-30]. 其中 LHBs 和 MHBs^t 具有反式调节作用, 主要依赖于指向胞质区的前 -S2 区(最小功能单位). MHBs^t 是种变异的病毒表面抗原中蛋白, 缺失了位于 C- 末端的膜定位信号, 使 MHBs^t 具备内质网(ER)定位功能, 未能进入分泌途径而在 ER 滞留, 其前 -S2 区指向胞质区, 从而有机会与胞质蛋白相互作用, 发挥其广泛的反式激活效应; 全长的乙肝病毒表面抗原中蛋白(MHBs)的前 -S2 区指向 ER 腔, 进入高尔基复合体而分泌. 所以说 MHBs^t 的反式激活功能依赖于其 N- 末端前 -S2 区的胞质定位功能. 具有反式激活功能的截短位点是在一定的范围之内, 缺失突变的范围是决定该截短型分子是否具有反式激活作用的重要因素, MHBs^t 至少完全缺失蛋白 C- 末端 S 区的疏水区, 才具有反式激活功能; S 区的 N- 末端疏水区 是反式激活所必需的, 因为蛋白与膜的结合是转录激活功能所必需的, 这段核苷酸序列被

称为“反式活性开启区”(trans-activity-on region, TAO). 进一步研究表明, MHBs[†]的最小反式激活单元定位于4-53氨基酸残基(aa), MHBs[†]53是最小的转录激活因子, 是一种非膜结合类型的MHBs[†], 就是说, 仅前-S2区(1-55 aa)就足以介导反式效应^[31-32]. 前-S2结构域可以与蛋白激酶C(PKC) α/β 结合, 发生磷酸化反应触发了PKC依赖的c-Raf-1/MPKKK(丝裂激活蛋白激酶激酶激酶)信号转导系统, 从而激活转录子, 如激活蛋白-1(AP-1)、细胞核因子- κ B(NF- κ B)、激活蛋白-2(AP-2)、血清应答因子(SRF)、Sp1和c-myc、c-fos启动子, 参与病毒感染后的炎症反应和肝细胞癌的发生^[33-38], 根据致癌两步模型: 起始/促进, 前-S2蛋白具有的肿瘤启动子样的功能: 具有关键性突变(起始)的细胞可以被阳性选择出来(促进), 这个过程也许可以用来解释HCC发展过程中潜伏期长的原因^[39-41].

为进一步研究前-S2蛋白的反式激活作用, 我们利用基因芯片技术对其上调、下调基因进行分析. 结果表明, 42种基因的表达水平显著上调, 36种基因的表达水平显著下调. 在上调基因中, 如凋亡相关的RNA结合蛋白(NAPOR-3)、胱冬肽酶9(caspase 9)、胱冬肽酶6(caspase 6)、凋亡蛋白1抑制子(MIHC)等均参与了细胞凋亡的控制机制, 影响正常细胞的生长状态, 从而为HBV在肝细胞中复制提供良好的环境. 蛋白激酶C(PKC)、丝氨酸-苏氨酸激酶(KDS)、酪蛋白激酶1, α 1(CSNK1A1)、人蛋白激酶2型 β 调节亚单位(cAMP-依赖)(PRKAR2B)等为体内蛋白磷酸/去磷酸化的重要调节剂, 是重要的信号转导通路MAPK级联中重要的组成部分, 此信号转导系统对大量的细胞内、外刺激的转导起着中枢性调节作用, 从而控制细胞的生长、增生、凋亡, 如进入细胞周期、控制核苷酸的生物合成、G2/M期的转变、M期高尔基体的裂解和纺锤体的形成等. 此系统是由多组具有丝/苏氨酸特异性的, 脯氨酸指导的蛋白激酶所组成, 可以被细胞外多种刺激所激活, 其主要功能为信息传递的中转站, 与细胞表面受体、特异性转录因子以及其他调控蛋白相互作用, 从而使细胞外信号来调节特异性基因的表达^[42-48]. 在下调基因中, 钙调素结合蛋白1(CALD1)、钙联接蛋白(CANX)、金属硫蛋白3(MT3)、金属蛋白酶1(MP1)、基质金属蛋白酶1(MMP1)等与体内金属代谢有关. 胰岛素受体(INSR)的下调可以导致机体对胰岛素的敏感性下降, 这也可能是HBV所致的肝源性糖尿病的发病机制之一. 慢性肝病患者约50-80%有糖耐量减退, 其中20-30%最终发展为糖尿病. 肝源性糖尿病的发生是胰岛素抵抗及分泌进行性损害的共同结果, 目前认为胰岛素抵抗的原因之一就是外周组织胰岛素受体数目减少及生理作用下降, 使这些组织对胰岛素生理作用的敏感性降低, 形成胰岛素抵抗. 临床上也有报告肝硬化糖耐量减退者, 肝细胞、脂肪细胞和肌肉细胞胰岛素受体数及亲和力降低, 使胰岛素外周效应减弱.

本实验从病毒学的角度证实了以上的观点.

在本实验中还有4个未知功能的新基因, 2个上调基因, 2个下调基因. 对于每一条基因片段的序列提交GenBank进行同源基因序列的搜索, 确认所得基因片段的独特性, 然后依据GenBank数据库EST中的同源基因片段进行电子拼接, 根据Kozak规则和终止密码子下游的多聚腺苷酸信号序列, 确定完整的编码基因序列, 分别命名为HBV PS2TP1(前-S2蛋白反式调节蛋白1), PS2TP2, PS2TP3, PS2TP4, GeneBank注册号分别为: AY561706, AY561707, AY561704, AY561705. 这些新基因的功能正在进一步研究中.

4 参考文献

- 1 Ma C, Sun W, Tian P, Wang X, Liu S, Zhang L, Cao Y, Zhu F, Zhang Q. Effect of preS2 antisense RNA on hepatocellular carcinoma with a novel delivery system. *Chin Med J (Engl)* 2003;116:717-720
- 2 成军. 乙型肝炎病毒DNA整合的机制及后果. 世界华人消化杂志 2004;12:420-427
- 3 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩, 王琳. 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. 世界华人消化杂志 2004;12:327-331
- 4 Ferrari C, Missale G, Boni C, Urbani S. Immunopathogenesis of hepatitis B. *J Hepatol* 2003;39(Suppl 1):S36-S42
- 5 Pawlowsky JM. Hepatitis B virus (HBV) DNA assays (methods and practical use) and viral kinetics. *J Hepatol* 2003;39(Suppl 1):S31-S55
- 6 Wang Y, Cui F, Lv Y, Li C, Xu X, Deng C, Wang D, Sun Y, Hu G, Lang Z, Huang C, Yang X. HBsAg and HBx knocked into the p21 locus causes hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology* 2004;39:318-324
- 7 纪冬, 成军, 刘妍, 王建军, 杨倩, 党晓燕, 王春花. 乙型肝炎病毒X蛋白反式激活基因6的克隆和鉴定. 世界华人消化杂志 2003;11:1874-1877
- 8 陆荫英, 刘妍, 成军, 梁耀东, 陈天艳, 邵清, 王琳, 张玲霞. 应用表达谱芯片技术对乙型肝炎病毒前-S2抗原结合蛋白S2-29反式调节基因的研究. 世界华人消化杂志 2004;12:58-61
- 9 刘妍, 成军, 王建军, 杨倩. 核转录因子Rel/NF- κ B与乙型肝炎病毒. 世界华人消化杂志 2004;12:145-148
- 10 Soussan P, Pol S, Garreau F, Brechot C, Kremsdorf D. Vaccination of chronic hepatitis B virus carriers with preS2/S envelope protein is not associated with the emergence of envelope escape mutants. *J Gen Virol* 2001;82(Pt 2):367-371
- 11 纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花. 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对MAPKKK蛋白信号转导的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:1959-1962
- 12 纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花. 乙型和丙型肝炎病毒对MEKK1蛋白信号转导途径的影响. 世界华人消化杂志 2004;12:162-165
- 13 张健, 成军. 乙型和丙型肝炎病毒对ERK信号转导途径的影响. 世界华人消化杂志 2004;12:158-160
- 14 王琳, 李克, 成军, 张健, 刘敏. 乙型和丙型肝炎病毒对JNK/SAPK转导途径的影响. 世界华人消化杂志 2004;12:155-158
- 15 成军, 董菁, 洪源, 钟彦伟, 刘妍, 王刚, 王琳. 乙型肝炎病毒中国流行株全基因的克隆与序列分析. 世界华人消化杂志 2003;11:1083-1090
- 16 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
- 17 成军, 董菁, 刘妍, 李莉, 斯崇文, 王勤环, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒准种研究的临床意义. 世界华人消化杂志 2002;10:209-211
- 18 成军, 董菁. 乙型肝炎病毒基因组结构与功能复杂性的新认识. 世界华人消化杂志 2003;11:1073-1080
- 19 成军. 功能基因组学与肝脏疾病研究. 世界华人消化杂志 2004;12:1-5
- 20 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

- 21 刘妍, 成军, 李克, 杨倩, 陆荫英, 王琳, 王建军. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析. 世界华人消化杂志 2003;11:394-398
- 22 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
- 23 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
- 24 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式调节基因的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:943-946
- 25 Bangur CS, Switzer A, Fan L, Marton MJ, Meyer MR, Wang T. Identification of genes over-expressed in small cell lung carcinoma using suppression subtractive hybridization and cDNA microarray expression analysis. *Oncogene* 2002;21:3814-3825
- 26 Borchani-Chabchoub I, Mokdad-Gargouri R, Gargouri A. Glucose dependent [correction of dependant] negative translational control of the heterologous expression of the preS2 HBV antigen in yeast. *Gene* 2003;311:165-170
- 27 Qin S, Tang H, Zhao LS, He F, Lin Y, Liu L, He XM. Cloning of HBsAg-encoded genes in different vectors and their expression in eukaryotic cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:1111-1113
- 28 Park JH, Lee MK, Kim HS, Kim KL, Cho EW. Targeted destruction of the polymerized human serum albumin binding site within the preS2 region of the HBV surface antigen while retaining full immunogenicity for this epitope. *J Viral Hepat* 2003;10:70-79
- 29 Tai PC, Suk FM, Gerlich WH, Neurath AR, Shih C. Hypermodification and immune escape of an internally deleted middle-envelope (M) protein of frequent and predominant hepatitis B virus variants. *Virology* 2002;292:44-58
- 30 Zhang SL, Yue YF, Bai GQ, Shi L, Jiang H. Mechanism of intrauterine infection of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2004;10:437-438
- 31 Hu YP, Yao YC, Li JX, Wang XM, Li H, Wang ZH, Lei ZH. The cloning of 3, truncated preS/S gene from HBV genomic DNA and its expression in transgenic mice. *World J Gastroenterol* 2000;6:734-737
- 32 韩萍, 刘妍, 成军, 王刚, 陆荫英, 李克, 李莉. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白上调 c-myc 基因表达的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:141-144
- 33 Guo SP, Wang WL, Zhai YQ, Zhao YL. Expression of nuclear factor in hepatocellular carcinoma and its relation with the X protein of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2001;7:340-344
- 34 Hildt E, Munz B, Saher G, Reifenberg K, Hofschneider PH. The PreS2 activator MHBs(t) of hepatitis B virus activates c-raf-1/Erk2 signaling in transgenic mice. *EMBO J* 2002;21:525-535
- 35 Cho EW, Park JH, Yoo OJ, Kim KL. Translocation and accumulation of exogenous hepatitis B virus preS surface proteins in the cell nucleus. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 6):1115-1123
- 36 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1245-1247
- 37 Robek MD, Boyd BS, Wieland SF, Chisari FV. Signal transduction pathways that inhibit hepatitis B virus replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:1743-1747
- 38 刘妍, 成军, 王琳, 王建军, 陆荫英, 李克. 羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活基因 1 的克隆化研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1102-1106
- 39 Hildt E, Hofschneider PH. The PreS2 activators of the hepatitis B virus: activators of tumour promoter pathways. *Recent Results Cancer Res* 1998;154:315-329
- 40 Henkler FF, Koshy R. Hepatitis B virus transcriptional activators: mechanisms and possible role in oncogenesis. *J Viral Hepat* 1996;3:109-121
- 41 Stockl L, Berting A, Malkowski B, Foerste R, Hofschneider PH, Hildt E. Integrity of c-Raf-1/MEK signal transduction cascade is essential for hepatitis B virus gene expression. *Oncogene* 2003;22:2604-2610
- 42 Nishihama R, Ishikawa M, Araki S, Soyano T, Asada T, Machida Y. The NPK1 mitogen-activated protein kinase kinase is a regulator of cell-plate formation in plant cytokinesis. *Genes Dev* 2001;15:352-363
- 43 Takeda K, Matsuzawa A, Nishitoh H, Ichijo H. Roles of MAPKKK ASK1 in stress-induced cell death. *Cell Struct Funct* 2003;28:23-29
- 44 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 肿瘤抑制因子 p21/waf1 与肝炎病毒复制与表达的调节研究. 世界华人消化杂志 2003;11:469-471
- 45 Nijhara R, Jana SS, Goswami SK, Rana A, Majumdar SS, Kumar V, Sarkar DP. Sustained activation of mitogen-activated protein kinases and activator protein 1 by the hepatitis B virus X protein in mouse hepatocytes in vivo. *J Virol* 2001;75:10348-10358
- 46 Rabe C, Cheng B, Caselmann WH. Molecular mechanisms of hepatitis B virus-associated liver cancer. *Dig Dis* 2001;19:279-287
- 47 Erhardt A, Hassan M, Heintges T, Haussinger D. Hepatitis C virus core protein induces cell proliferation and activates ERK, JNK, and p38 MAP kinases together with the MAP kinase phosphatase MKP-1 in a HepG2 Tet-Off cell line. *Virology* 2002;292:272-284
- 48 Shimotohno K, Watashi K, Tsuchihara K, Fukuda K, Marusawa H, Hijikata M. Hepatitis C virus and its roles in cell proliferation. *J Gastroenterol* 2002;37:50-54