

- Pardo M, Carreno V. Hepatitis B virus-specific T-cell proliferation and cytokine secretion in chronic hepatitis B e antibody-positive patients treated with ribavirin and interferon alpha. *Hepatology* 2001;33:295-300
- 20 邢同京, 章廉, 卢桥生, 侯金林, 冯筱榕, 骆抗先. 慢性乙型肝炎用干扰素治疗的 Th1/Th2 应答. *中华医学杂志* 2000;80:268-270
- 21 张萍, 吴文漪, 魏来. 乙型病毒性肝炎患者外周血 T 辅助细胞 1、2 型细胞因子含量的测定及临床意义. *徐州医学院学报* 2001;21:304-306
- 22 胡章勇, 章廉, 文维群, 张明霞, 王燕军, 钱毅, 骆抗先. 干扰素治疗对慢性乙型肝炎患者 CTL 活性的影响. *中华免疫学杂志* 2002;18:59-61
- 23 戴炜, 余卫业, 姜荣龙. 慢性重型肝炎外周血单个粒细胞内干扰素和白细胞介素的表达及意义. *中华肝病杂志* 2001;9(增刊):64-65
- 24 陆荫英, 陈天艳, 成军, 邵清, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 李克, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选鉴定乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白新基因 C-12 的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1122-1125
- 25 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆 HCV 核心蛋白结合蛋白基因 1. *世界华人消化杂志* 2001;9:1379-1383
- 26 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 基因酵母表达载体的构建及表达. *世界华人消化杂志* 2002;10:15-18
- 27 陆荫英, 王琳, 李克, 刘妍, 成军, 张玲霞. HBeAg 肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆. *世界华人消化杂志* 2003;11:422-425
- 28 张健, 成军, 王琳, 邵清, 陆荫英, 梁耀东, 陈天艳, 洪源. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5B 结合蛋白的酵母双杂交筛选研究. *解放军医学杂志* 2003;28:768-770

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

应用基因表达谱芯片技术筛选 NS3TP1 转染细胞差异表达基因

纪冬, 成军, 刘妍, 王建军, 郭江

纪冬, 成军, 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研究重点实验室 北京市 100039 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: 2004-03-15 接受日期: 2004-05-11

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3(NS3)反式激活基因1(NS3TP1)的表达对肝母细胞瘤细胞 HepG2 基因表达谱的影响, 进一步 NS3TP1 蛋白可能的分子生物学功能。

方法: 设计并合成 NS3TP1 基因序列特异性的引物, 应用聚合酶链反应(PCR)技术扩增 NS3TP1 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(-)-NS3TP1. 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 26 个基因表达水平显著上调, 14 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 NS3TP1 转染细

胞后差异表达基因, 为进一步阐明 NS3TP1 蛋白可能的生物学功能及 HCV 的致病机制提供理论依据。

纪冬, 成军, 刘妍, 王建军, 郭江. 应用基因表达谱芯片技术筛选 NS3TP1 转染细胞差异表达基因. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1707-1711

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1707.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, 在大多数感染人群中表现为持续感染, 常导致急慢性肝炎、肝硬化和肝癌^[1-10]. 虽然 HCV 致病机制尚不完全清楚, 但病毒基因组编码的蛋白与肝细胞蛋白之间的相互作用肯定起着关键的作用. HCV 基因组具有一个长约 9 400 bp 的单一开放读码框(ORF), 编码一个多肽前体, 在病毒及肝细胞酶的作用下进行剪切, 产生至少 10 种具有不同功能的蛋白. 其中 HCV 非结构蛋白 3(NS3)具有丝氨酸蛋白酶、三磷酸核苷酶(NTPase)和解旋酶(helicase)的功能, 在 HCV 多聚蛋白的成熟和病毒复制过程中发挥重要作用, 并且对于宿主多种基因具有反式激活作用, 影响细胞的功能, 诸如细胞增生、凋亡, 甚至是 HCV 的致癌作用^[11-15]. 我们对 NS3 反式激活基因进行筛选和克隆化研究^[16-19], 发现了 NS3 蛋白上调一些基因的表达, 并且包括一些未知功能基因, 其中之一命名为 NS3TP1, 利用生物信息学技术确定其 ORF, 并对其进行了克隆化研究, 顺利得到了 NS3TP1 基因编码序列, 该新基因的 ORF 长度为 1 932 个核苷酸(nt), 编码产物由 642 个氨基酸残基(aa)组成 (GenBank 号: AY116969)^[20].

为了探索 NS3TP1 的生物学功能, 深入了解 HCV NS3 蛋白的反式激活作用, 我们构建了 NS3TP1 基因的真核表达载体, 应用基因表达谱芯片技术^[21], 筛选 NS3TP1 基因转染细胞后差异表达的基因, 检测 NS3TP1 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 的致病机制及探索新基因的功能提供了新的方向.

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态大肠杆菌 DH5 α 由本室保存; pcDNA3.1(-)真核表达载体购自 Invitrogen 公司; FuGENE6 转染试剂购自 Roche 公司; mRNA Purification 试剂盒购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司; PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50 \times PCR Enzyme Mix, Advantage PCR Cloning 试剂盒均购自 Clontech 公司; T7, SP6 通用引物及 pGEM-Teasy 载体购自 Promega. 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.

1.2 方法

1.2.1 真核表达载体及细胞转染 设计合成 NS3TP1 基因序列特异性引物(上游: 5' - GAT ATC AAT GTG TGG CAT TTG TTG -3' 下游: 5' - GGA TCC TGT TAC ATT GTG AAT CAC -3', 在引物的两端分别引入了 EcoRV 和 BamHI 酶切位点(划线部分), 引物由上海博亚公司合成. 使用 25 μ L 反应体系, 以 HepG2 细胞 cDNA 为模板, 放入 PE 9600 PCR 仪中扩增. 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 循环 35 次后, 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min. 9 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果. 扩增的 NS3TP1 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(-)-NS3TP1. 用 FuGENE6 转染试剂将 2 μ g pcDNA3.1(-)-NS3TP1 及 pcDNA3.1(-)空载体分别转染 35 mm 平皿 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞.

1.2.2 芯片制备 使用 mRNA Purification 试剂盒, 直接提取转染了 NS3TP1 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. 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+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 \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(30 min), 紫外线(UV)交联, 再分别用 2 g/L SDS, 水及 2 g/L 的硼氢化钠溶液处理 10 min, 晾干备用. 将基因芯片和杂交探针在 95 $^{\circ}$ 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+2 g/L SDS, 0.1 \times SSC+2 g/L SDS, 0.1 \times 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 NS3TP1 蛋白的表达载体构建 真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-NS3TP1 经过限制性内切酶分析和核苷酸序列的测定, 证实含有完整的开放读码框, 序列准确无误.

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 A260/A280 分别为 2.045 和 1.995, 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. 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, 在芯片上设置阴性对照(8 条水稻基因, 共 8 个点), 在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 40 条, 其中 26 条基因表达增强(表 1), 14 条基因表达降低(表 2).

表 1 NS3TP1 蛋白上调基因类型

编号	Cy3/Cy5	基因名称
1	2.009	KIAA0009 gene product
2	2.012	肿瘤差异表达 1(TDE1)
3	2.057	泛素特异性蛋白酶 1(USP1)
4	2.064	甘氨酸胺基转移酶(GATT)
5	2.080	cAMP 应答元件结合蛋白 CRE-BPa
6	2.093	cullin 2 (CUL2)
7	2.104	早老因子 2(阿尔茨海默病 4) (PSEN2)
8	2.121	胱冬肽酶 6(caspase 6)
9	2.131	组织蛋白酶 K(CTSK)
10	2.149	维生素 A 反应性细胞骨架相关蛋白(JWA)
11	2.195	FYN 结合蛋白(FYB)
12	2.210	TRAIL 受体 2
13	2.215	可溶性鸟苷酸环化酶 3(GUCY1B3)

14	2.262	乳酸脱氢酶 B
15	2.263	M 期磷蛋白(MPHOSPH1)
16	2.268	转化生长因子(TGF) β 受体 1(TGF- β RI)
17	2.360	SMAP-3 蛋白
18	2.371	固醇 - C5 - 脱氢酶
19	2.402	谷氨酸盐受体
20	2.411	[α]鲨烯环氧酶(SQLE)
21	2.428	FKBP 相关蛋白(FAP48)
22	2.528	转录因子 7(T- 细胞特异性, HMG 盒) (TCF7)
23	2.537	B- 细胞慢性淋巴细胞性白血病 10(BCL10)
24	2.263	CD24 抗原(小细胞肺癌簇 4 抗原)
25	2.923	胆囊收缩素型 - A 受体
26	3.129	cAMP 依赖的蛋白激酶(PRKAR2B)

表 2 NS3TP1 蛋白下调基因类型

编号	Cy3/Cy5	基因名称
1	0.367	金属蛋白酶的抑制因子 1
2	0.426	金属硫蛋白 1G(MT1G)
3	0.431	免疫球蛋白(CD79A)结合蛋白 1 (IGBP1)
4	0.444	调钙蛋白的结合蛋白质 1(CALD1)
5	0.453	RNA 结合蛋白 S1, 丝氨酸富含结构域(RNPS1)
6	0.455	RAC1 配体(POR1)
7	0.459	RAS 同源基因家族成员 C (ARHC)
8	0.464	DEAD/H(Asp - Glu - Ala - Asp/His)盒蛋白(DDX21)
9	0.465	KIAA0943 蛋白
10	0.471	SUMO-1 激活酶亚单位 1(SAE1)
11	0.486	突触素样蛋白(SYPL)
12	0.490	谷胱甘肽 S- 转移酶 M3(GSTM3)
13	0.498	精氨酸琥珀酸盐合成酶(ASS)
14	0.499	G 蛋白途径抑制子 1(GPS1)

3 讨论

HCV NS3 不仅和病毒复制和成熟相关,而且他可以反式激活宿主细胞内多种基因表达,从对肝细胞的生长、代谢、甚至是恶性转化产生重要影响,尽管在 HCV 蛋白尤其是 NS3 的结构、功能上积累了很多数据,可是关于他们在细胞内的靶位及影响却知之甚少,还处在一个逐渐摸索的阶段.前一阶段,我们运用抑制性消减杂交技术构建出 HCV NS3 反式激活基因差异表达的 cDNA 消减文库,并发现了一些新基因^[22-23],其中一个命名为 NS3TP1,对其进行克隆化研究,为深入研究 NS3 蛋白的生物学功能迈出了可喜的一步.对于一个新蛋白来说,由于以往对其没有认识,需要对他的表达调控、翻译后修饰、生物功能以及相互作用等方面进行研究,这是一项有挑战性的工作,这种思路有望对 HCV 感染的诊断、预后及疗效判断等提出新的参考.为进一步研究 NS3TP1 这一新基因的功能,明确 HCV NS3 在丙型肝炎发病机制中的作用,我们构建 NS3TP1 基因真核表达

载体 pcDNA3.1(-)-NS3TP1,利用基因芯片技术筛选 NS3TP1 转染细胞差异表达基因,推测其在体内可能存在功能的线索.结果表明,26 种基因的表达水平显著上调,14 种基因的表达水平显著下调.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,使得对 NS3TP1 蛋白在机内的作用有了更进一步的了解,对 NS3 蛋白功能和复杂性、多样性也有了更加深刻的体会.

分析上调基因,cAMP 应答元件结合蛋白 CRE-BPa 是 CRE-BP1 家族的新成员,含有推定的金属指状结构和由碱性氨基酸簇和亮氨酸拉链组成的 DNA 结合功能域,CRE-BPa 能特异性的与 CRE 结合形成同源二聚体,与转录因子 c-JUN 或 CRE-BP1 结合成异源二聚体,是 CRE 依赖的转录反式激活因子^[24].转化生长因子 β 受体 I(TGF- β RI)是丝氨酸/苏氨酸激酶膜受体家族的成员,TGF- β RI 激酶过表达,能促进多种信号传导途径的激活,对于肿瘤细胞的迁移,以及重要的致瘤事件如 Smad2/Smad3 的磷酸化是必需的^[25-26].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原活化蛋白激酶 (MAPK)以及细胞外信号调节激酶 1(ERK1)的活化^[27-29].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^[30].B 细胞慢性淋巴细胞性白血病 10(BCL10)是作为低度 B 细胞淋巴瘤相关基因得到鉴定的,是一种含有胱冬肽酶募集结构域(caspase recruitment domain, CARD)的蛋白,同时属于黏膜相关淋巴组织(mucosa-associated lymphoid tissue, MALT)B 淋巴瘤中鉴定的断裂位点的基因,在淋巴细胞中抗原受体介导的 NF- κ B 激活过程中是必需的.BCL10 是一种介导细胞凋亡信号转导的因子,主要的分子机制就是通过不同的磷酸化修饰,与 cIAP 结合替代与 TRAF2 结合^[31-35].FKBP 相关蛋白(FAP48)是细胞内与免疫调节有密切关系的蛋白,可以与肽基脯氨酰异构酶 FK506 结合蛋白 59(FK506-binding protein 59, FKBP59)和 FKBP12 蛋白结合,由于其 M_r 48 000,故命名为 FKBP 相关蛋白(FAP48),此 3 种蛋白均具有大环内酯类分子的结合位点,可能是这些免疫抑制剂药物受体的天然的共同配体分子.FAP48 与 FKBP 分子之间的结合可被大环内酯类物质 FK506 所阻断,说明免疫亲和素分子中的结合位点与 FK506 的结合位点相重叠.FAP48 的过表达可以抑制细胞的增生,在免疫调节及临床疾病的发生、发展过程中具有十分重要的作用^[36-40].我室应用基因芯片研究 HBV 截短型表面抗原中蛋白(MHBs⁺)、HBxAg、HCV NS3 等反式激活蛋白的调节基因时,均发现 FAP48 可以明显上调,与本实验一起,提示了肝炎病毒蛋白与细胞内 FAP48 蛋白的表达水平密切相关,可能是 HBV、HCV 感染慢性的的重要机制之一^[41-43].

在下调基因中, 钙调素结合蛋白 1(CALD1)、金属硫蛋白 1G(MT1G)、金属蛋白酶的抑制因子 1 等与体内金属代谢有关。DEAD/H 盒蛋白 DDX21 是推定的重要的 RNA 解旋酶, 参与众多细胞的 RNA 二级结构加工过程, 如翻译起始、核糖体 RNA 合成及加工过程, DDX21 在肿瘤组织中低表达, 而在正常组织中有显著的高水平表达, NS3TP1 对 DDX21 的表达有下调作用, 提示 NS3TP1 蛋白在一定程度上可能下调细胞核糖体 RNA 加工与合成^[44]。

随着后基因组时代的到来, 越来越多的未知功能蛋白质被发现, 对新蛋白的生物学功能、与其他蛋白质间的相互作用以及他们在疾病发生、发展、转化过程中的变化规律的研究成为今天生命科学最重要的热点之一, 同时由于新技术的不断创新, 使一系列的研究成为可能^[45]。利用基因表达谱芯片能进行大规模筛选的优点, 我们从 1 152 中基因中筛选出 NS3TP1 基因转染细胞差异表达的基因, 基于上述结果的提示, 使我们可以设计相应的实验去进行更深入的研究, 为更加全面地了解新基因 NS3TP1 的功能作铺垫, 也为更多新基因功能研究工作积累了经验。

4 参考文献

- 1 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
- 2 Tomei L, Altamura S, Bartholomew L, Bisbocci M, Bailey C, Bosserman M, Cellucci A, Forte E, Incitti I, Orsatti L, Koch U, De Francesco R, Olsen DB, Carroll SS, Migliaccio G. Characterization of the inhibition of hepatitis C virus RNA replication by nonnucleosides. *J Virol* 2004;78:938-946
- 3 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 丙型肝炎病毒蛋白结合蛋白. 世界华人消化杂志 2002;10:215-217
- 4 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
- 5 Thelu MA, Drouet E, Hilleret MN, Zarski JP. Lack of clinical significance of variability in the internal ribosome entry site of hepatitis C virus. *J Med Virol* 2004;72:396-405
- 6 巨立中, 成军, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒复制模型系统. 世界华人消化杂志 2003;11:1954-1956
- 7 Lucas M, Vargas-Cuero AL, Lauer GM, Barnes E, Willberg CB, Semmo N, Walker BD, Phillips R, Klenerman P. Pervasive influence of hepatitis C virus on the phenotype of antiviral CD8+ T cells. *J Immunol* 2004;172:1744-1753
- 8 Wang QC, Nie QH, Feng ZH. RNA interference: Antiviral weapon and beyond. *World J Gastroenterol* 2003;9:1657-1661
- 9 纪冬, 成军, 王建军. 丙型肝炎病毒复制子的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1014-1017
- 10 Bahr MJ, el Menuawy M, Boeker KH, Musholt PB, Manns MP, Lichtinghagen R. Cytokine gene polymorphisms and the susceptibility to liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Liver Int* 2003;23:420-425
- 11 He QQ, Cheng RX, Sun Y, Feng DY, Chen ZC, Zheng H. Hepatocyte transformation and tumor development induced by hepatitis C virus NS3 c-terminal deleted protein. *World J Gastroenterol* 2003;9:474-478
- 12 Wang W, Lahser FC, Yi M, Wright-Minogue J, Xia E, Weber PC, Lemon SM, Malcolm BA. Conserved C-terminal threonine of hepatitis C virus NS3 regulates autoproteolysis and prevents product inhibition. *J Virol* 2004;78:700-709
- 13 Tardif KD, Mori K, Siddiqui A. Hepatitis C virus subgenomic replicons induce endoplasmic reticulum stress activating an intracellular signaling pathway. *J Virol* 2002;76:7453-7459
- 14 Wu MX. Roles of the stress-induced gene IEX-1 in regulation of cell death and oncogenesis. *Apoptosis* 2003;8:11-18
- 15 Lehoux S, Tedgui A. All strain, no gain: stretch keeps proliferation at bay via the NF-kappaB response gene iex-1. *Circ Res* 2003;93:1139-1141
- 16 牟劲松, 刘妍, 王刚, 成军, 段惠娟, 李克, 陆荫英, 王琳, 王惠芬. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 反式激活的相关基因. 世界华人消化杂志 2003;11:399-403
- 17 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 张树林. 抑制性消减杂交技术原理及应用. 世界华人消化杂志 2003;11:456-458
- 18 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
- 19 刘妍, 成军, 牟劲松, 陆荫英, 王建军, 杨倩, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 与乙型肝炎病毒 X 蛋白协同反式激活作用的研究. 解放军医学杂志 2003;28:47-49
- 20 纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 王春花, 党晓燕. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 反式激活基因 1 的克隆化研究. 胃肠病学和肝病杂志 2003;12:237-240
- 21 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
- 22 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
- 23 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
- 24 Nomura N, Zu YL, Maekawa T, Tabata S, Akiyama T, Ishii S. Isolation and characterization of a novel member of the gene family encoding the cAMP response element-binding protein CRE-BP1. *J Biol Chem* 1993;268:4259-4266
- 25 Itoh S, Thorikay M, Kowanez M, Moustakas A, Itoh F, Heldin CH, ten Dijke P. Elucidation of Smad requirement in transforming growth factor-beta type I receptor-induced responses. *J Biol Chem* 2003;278:3751-3761
- 26 Bourguignon LY, Singleton PA, Zhu H, Zhou B. Hyaluronan promotes signaling interaction between CD44 and the transforming growth factor beta receptor I in metastatic breast tumor cells. *J Biol Chem* 2002;277:39703-39712
- 27 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
- 28 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
- 29 纪冬, 成军. 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对 MKP 蛋白信号转导影响的研究. 胃肠病学和肝病杂志 2003;12:200-202
- 30 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
- 31 成军, 刘妍, 杨倩. 丙型肝炎病毒蛋白对 Bcl-10 蛋白信号转导的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:1948-1951
- 32 Thome M, Tschopp J. Bcl10. *Curr Biol* 2002;12:R45
- 33 Ruland J, Duncan GS, Elia A, del Barco Barrantes I, Nguyen L, Plyte S, Millar DG, Bouchard D, Wakeham A, Ohashi PS, Mak TW. Bcl10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF-kappaB and neural tube closure. *Cell* 2001;104:33-42
- 34 Muto A, Ruland J, McAllister-Lucas LM, Lucas PC, Yamaoka S, Chen FF, Lin A, Mak TW, Nunez G, Inohara N. Protein kinase C-associated kinase (PKK) mediates Bcl10-independent NF-kappa B activation induced by phorbol ester. *J Biol Chem* 2002;277:31871-31876
- 35 Yui D, Yoneda T, Oono K, Katayama T, Imaizumi K, Tohyama M. Interchangeable binding of Bcl10 to TRAF2 and cIAPs regulates apoptosis signaling. *Oncogene* 2001;20:4317-4323
- 36 成军, 刘妍, 杨倩, 王建军, 洪源, 王琳. 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对 FAP48 信号转导的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:1962-1965
- 37 Sinars CR, Cheung-Flynn J, Rimerman RA, Scammell JG, Smith DF, Clardy J. Structure of the large FK506-binding protein FKBP51, an Hsp90-binding protein and a component of steroid receptor complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:868-873

- 38 Vermeer H, Hendriks-Stegeman BI, van der Burg B, van Buul-Offers SC, Jansen M. Glucocorticoid-induced increase in lymphocytic FKBP51 messenger ribonucleic acid expression: a potential marker for glucocorticoid sensitivity, potency, and bioavailability. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:277-284
- 39 Krummrei U, Baulieu EE, Chambraud B. The FKBP-associated protein FAP48 is an antiproliferative molecule and a player in T cell activation that increases IL2 synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2444-2449
- 40 Neye H. Mutation of FKBP associated protein 48 (FAP48) at proline 219 disrupts the interaction with FKBP12 and FKBP52. *Regul Pept* 2001;97:147-152
- 41 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;11:930-933
- 42 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
- 43 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
- 44 Valdez BC, Yang H, Hong E, Sequitin AM. Genomic structure of newly identified paralogue of RNA helicase II/Gu: detection of pseudogenes and multiple alternatively spliced mRNAs. *Gene* 2002;284:53-61
- 45 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

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

基因表达谱芯片筛选双环醇作用HepG2细胞后的差异表达基因

王建军, 成军, 刘妍, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 王春花

王建军, 成军, 刘妍, 杨倩, 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
国家自然科学基金攻关项目, No. C030114020, No. C30070689, No. C39970674, No. C39900130
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: 2004-03-15 接受日期: 2004-05-11

摘要

目的: 应用基因表达谱芯片技术了解双环醇在肝细胞中可能上调或下调的基因, 了解其可能的调节功能线索。

方法: 以双环醇处理HepG2细胞, 同时以二甲基硫氧化物(DMSO)处理的相同细胞系作为对照; 24 h后制备细胞裂解液, 提取mRNA. 应用基因表达谱芯片技术对差异表达mRNA进行检测和分析。

结果: 经基因表达谱芯片分析, 12种基因的表达水平上调, 9种基因的表达水平下调。

结论: 筛选到的一些与细胞周期、蛋白质的翻译合成、能量代谢、体内免疫调节、细胞凋亡及细胞内的信号传导方面的起重要作用及肿瘤发生相关的基因, 推测了双环醇可能存在的调控机制的线索, 尚需进一步的实验证明。

王建军, 成军, 刘妍, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 王春花. 基因表达谱芯片筛选双环醇作用HepG2细胞后的差异表达基因. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1711-1714
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1711.asp>

0 引言

百赛诺(双环醇片)是由中国医学科学院药物研究所研发, 北京协和药厂生产, 经国家药品监督管理局批准上市的国家一类抗肝炎化学合成新药, 是我国第一个有自主知识产权的国家一类新药. 双环醇对各种原因引起的肝损伤有明显的保护作用, 近年来广泛应用于病毒性肝炎的治疗中. 我们应用基因表达谱芯片技术, 筛选双环醇作用人肝癌细胞系HepG2细胞后差异表达基因, 并应用生物信息学(bioinformatics)技术对差异表达的基因进行分析. 双环醇作用HepG2细胞后差异表达基因的研究, 为深入了解双环醇在肝细胞内的调节作用机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞系 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. 双环醇为二甲基硫氧化物(DMSO)水溶液. 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将双环醇及DMSO加入细胞培养液中, 使双环醇终浓度达到 1×10^{-5} mol/L, 24 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 方法

1.2.1 总 RNA 提纯及 mRNA 纯化 使用 Trizol 试剂一步法提取双环醇及 DMSO 处理的 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 和 70 保温 1 h 后, 经琼脂糖凝胶电泳检测 28 s、18 s 条带变化. 以