

在肝脏再生的调节机制中,一系列的生长因子参与这一复杂的调节过程,如肝细胞生长因子(HGF)、肝再生增强因子(ALR)、表皮生长因子(EGF)等.特别是ALR在肝脏再生中的作用近年来受到了广泛的重视.寻找与肝脏再生相关的新型蛋白药物,利用基因重组技术表达纯化促进肝脏再生的新型药物,具有十分重要的意义.我们利用基因工程技术,经过发酵和蛋白质纯化等过程,制备了重组的人ALR蛋白,在体内实验中发现这种生长因子蛋白可以显著减轻四氯化碳引起的小鼠的急性肝损伤,为进一步推进重组ALR的产业化,奠定了坚实的基础^[16-19].

4 参考文献

- 1 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
- 2 成军. 病毒性肝炎发病机制相关基因克隆化的研究策略. 解放军医学杂志 2003;28:757-761
- 3 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
- 4 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
- 5 纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花. 应用抑制性消减杂交技术克隆和筛选丙型肝炎病毒NS3蛋白反式激活基因1的反式调节基因. 世界华人消化杂志 2004;12:843-846
- 6 党晓燕, 成军, 邓红, 王建军, 杨倩, 刘妍, 纪冬, 王春花. 应用抑制性消减杂交技术克隆HCV NS3蛋白反式激活基因2的上调基因. 世界华人消化杂志 2004;12:847-850
- 7 王刚, 刘妍, 牟劲松, 洪源, 邵得志, 张耀新, 李莉, 成军. 大鼠肝再生相关基因LRRP1的克隆化. 世界华人消化杂志 2002;10:165-168
- 8 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 王刚, 张玲霞. 牛丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6同源基因的克隆化研究. 中国人兽共患病杂志 2003;19:73-76
- 9 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 王刚, 张玲霞. 猪丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6同源基因的克隆化研究. 生物学杂志 2003; 20:10-13
- 10 成军, 李克, 王琳, 刘妍, 钟彦伟, 李莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6猴同源基因的克隆化与序列分析. 中西医结合肝病杂志 2003;14:354-357
- 11 董菁, 成军, 王勤环, 刘友昭, 王刚, 施双双, 钟彦伟. 大鼠肝再生增强因子基因组DNA的克隆化与序列分析. 临床肝胆病杂志 2001;17:36-37
- 12 董菁, 成军, 刘友昭, 王勤环, 王刚, 施双双. 大鼠肝再生增强因子假基因的克隆化与序列分析. 中华肝脏病杂志 2001;9:105-107
- 13 夏小兵, 成军, 王刚, 杨继珍, 刘妍, 董菁, 王琳, 李克. 人肝再生增强因子在毕赤酵母中的表达. 世界华人消化杂志 2001;9:743-746
- 14 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 钟彦伟, 段惠娟, 洪源. 筛选与克隆肝再生增强因子结合蛋白的基因. 世界华人消化杂志 2002;10:161-164
- 15 成军, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 肝再生增强因子的作用机制. 临床肝胆病杂志 2002;18:146-148
- 16 王永华, 成军, 洪源, 王琳, 刘妍, 张健, 李克. 重组人肝再生增强因子对小鼠CCl₄中毒性肝损伤的治疗作用. 世界华人消化杂志 2004;12:859-861
- 17 Cheng J, Wang L, Li K, Lu YY, Liu Y, Duan HJ, Hong Y, Wang G, Li L, Zhang LX. Cloning and expression of the gene of human augmenter of liver regeneration in yeast cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002;1:87-91
- 18 Dong J, Cheng J, Wang QH, Shi SS, Wang G, Si CW. Cloning and analysis of the genomic DNA sequence of augmenter of liver regeneration from rat. *Chin Med Sci J* 2002;17:63-67
- 19 Cheng J, Wang L, Li K, Lu YY, Wang G, Liu Y, Zhong YW, Duan HJ, Hong Y, Li L, Zhang LX, Chen JM. Screening of augmenter of liver regeneration-binding proteins by yeast-two hybrid technique. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003;2:81-84

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 •

酵母双杂交筛选白细胞中新基因NS3TP6结合蛋白基因

邵清, 成军, 白雪帆, 王琳, 张健, 卢成哲, 梁耀东, 刘敏, 李强

邵清, 成军, 王琳, 张健, 梁耀东, 刘敏, 李强, 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

白雪帆, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院传染科 陕西省西安市 710039
卢成哲, 中国人民解放军解放军第206医院CT室 吉林省通化市 134001
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: 用酵母双杂交技术筛选白细胞中与丙型肝炎病毒(HCV)非结构蛋白3(NS3)反式调节靶基因编码产物NS3TP6

蛋白结合蛋白的基因。

方法: 用多聚酶链反应(PCR)法扩增HCV NS3TP6蛋白基因, 连接入酵母表达载体pGBKT-7中构建诱饵质粒, 转化酵母细胞AH109并在其内表达, 然后与转化了人白细胞文库质粒的酵母细胞Y187进行配合, 在营养缺陷型培养基上进行双重筛选阳性菌落, 增菌后提取质粒, 转化入大肠杆菌, 提取质粒并测序, 进行生物信息学分析。

结果: 成功克隆出HCV NS3TP6蛋白基因并在酵母细胞中表达 配合后选出在四缺(SD/-Trp-Leu-Ade-His)培养基和铺有X-α-半乳糖(X-α-gal)的四缺培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落共7个, 其中3个人类白细胞CD14抗原, 1个人类免疫球蛋白轻链, 3个人类推定蛋白基因

(AC124014, AC097504, AC023785).

结论: 成功克隆出 NS3TP6 蛋白的结合蛋白, 为进一步研究 HCV 的作用提供了新线索.

邵清, 成军, 白雪帆, 王琳, 张健, 卢成哲, 梁耀东, 刘敏, 李强. 酵母双杂交筛选白细胞中新基因 NS3TP6 结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2004;12(7): 1717-1720

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1717.asp>

0 引言

目前, 丙型肝炎病毒(HCV)感染 还缺乏特异有效的治疗措施^[1-5], 探索新型防治 HCV 感染的新方法刻不容缓. 目前关于HCV感染及其致病的分子生物学机制研究还有相当多的未知领域. 探索防治 HCV 感染的新技术, 必须从 HCV 致病的分子生物学机制入手.

丙型肝炎病毒(HCV)是单股正链RNA病毒, 其中非结构蛋白 NS3 基因编码为 70 kD 的 NS3 蛋白(631 aa)是一种多功能蛋白质, 具有丝氨酸蛋白酶、三磷酸核苷酸酶(NTPase)和 RNA 解旋酶(helicase)的功能, 在 HCV 复制及表达产物多蛋白裂解加工上起重要作用^[6-10]. 研究表明^[11-15], HCV NS3 蛋白还可能通过反式激活作用, 调控细胞内多种病毒及细胞基因的转录, 在 HCV 致病(癌)过程中起着重要的作用. 我们应用微矩阵(microarray)技术对于表达 HCV NS3 载体转染的 HepG2 细胞进行研究, 阐明了 NS3 蛋白反式激活作用的部分靶基因, 同时我们结合生物信息学技术(bioinformatics)克隆了 NS3 蛋白反式激活作用的新靶基因, 即丙型肝炎病毒 NS3 蛋白反式激活基因 6(NS3TP6 Genbank NM_025190), 为进一步研究 HCV NS3TP6 蛋白与免疫系统的关系, 我们用酵母双杂交技术筛选白细胞中与 HCV NS3TP6 蛋白结合蛋白基因^[16-24]. 从而为 HCV NS3 蛋白反式激活作用的新靶基因(HCV NS3TP6)研究提供新的方向.

1 材料和方法

1.1 材料 *Saccharomyces cerevisiae* AH109 酵母株、Y187 酵母株(K1612-1)、cDNA 淋巴文库, 酵母 YPDA 培养基、SD/-Trp 培养基 SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade, X- α -半乳糖苷酶(Gal)等购自 Clontech 公司, 半硫酸腺苷、醋酸锂购自 Sigma 公司. 复杂高效感受态(FSB), 本室自制. 大肠杆菌(DH5 α), 本室保存.

1.2 方法 HCV NS3TP6 的酵母表达载体 pGBKT7-HCV NS3TP6 用醋酸锂法转入酵母细胞 AH109 由本室构建. cDNA 白文库进行增菌后, 提出质粒, 转化入酵母细胞(Y187), 经文库滴定, 确定文库细胞计数大于 1×10^{12} /L. 挑取在 SD/-Trp 选择培养基上生长转化子(计数大于 1×10^{12} /L)与淋巴文库混合, 30 轻摇配合过夜, 24 h 后铺板 SD/-Trp/-Leu/-His 25 块、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 25 块. 同时进行阳性对照实验及文库滴定. 生长 16 d 后把长出的大于 3 mm 的酵母集落, 在铺

有 X- α -半乳糖苷酶的 QDO 上检查 α -半乳糖苷酶活性, 认为在 QDO 培养基上生长且出现蓝色菌落的配合为阳性集落. 挑取真正的阳性集落按照试剂盒提供的操作指南 Lyticase 法提取酵母质粒. 提取的质粒以复杂冰冻高效感受态方法转化大肠杆菌, 于含有氨苄青霉素的 SOB 平板培养, 所获得的菌落经 BglIII 酶切鉴定后测序. 阳性克隆 DNA 测序后, 提交 GenBank 进行核苷酸序列同源性比对, 进行生物信息学分析.

2 结果

cDNA 测序与同源性分析初步结果配合后筛选出在 4 缺(SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade)培养基和铺有 X- α -gal 的 4 缺培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落 7 个克隆测序, 与 GenBank 数据库进行初步比较, 结果(见表 1).

表 1 cDNA 测序与同源性分析初步结果

序号	筛选出的目的基因	同源性	相同克隆数
1	人类白细胞 CD14 抗原	96-99%	3
2	人类免疫球蛋白 lambda 轻链	95%	1
3	人类推定蛋白 1	98%	1
4	人类推定蛋白 2	98%	1
5	人类推定蛋白 3	94%	1

3 讨论

丙型肝炎病毒(HCV)基因组编码的非结构蛋白 3(NS3)是一种具有多种生物学功能的蛋白质. 除了具有丝氨酸蛋白酶、RNA 解旋酶等之外, 对于 HCV 基因组表达的结构和非结构蛋白的结构与功能具有重要的调节作用^[22-30]. 病毒的基因表达调节与真核细胞相似^[31-33], 主要是转录水平为主的多水平的调节机制, HCV 的表达调节也不例外, 即病毒借助感染的宿主细胞的一些复制和表达的辅助元件完成其生活周期及致病过程. 转录水平的调节根据调节的机制和参与的因素不同, 可以分成顺式(cis)调节和反式(trans)调节两种. 所谓的顺式调节就是分子结构内部的调节, 例如基因启动子序列对基因的转录活性的调节, 增强子序列对启动子转录活性的调节都属于此类. 反式调节的结果, 从调节靶点的效果来看可以分成 2 类: 上调(up-regulation)和下调(down-regulation). 从参与的反式调节的因素来看, 可以分成病毒对病毒的反式调节、病毒对于肝细胞蛋白编码基因的反式调节、肝细胞蛋白对于病毒基因表达的反式调节等几种不同的情况. 肝炎病毒蛋白作为一类反式激活因子, 常常改变肝细胞中细胞周期(cell cycle)、细胞凋亡(apoptosis)、细胞分化(differentiation)、信号转导(signal transduction)等的相关基因的表达, 在肝炎病毒的致病性和肝细胞癌的发生发展中具有十分重要的作用和意义. HCV 感染肝细胞之后, 也存在复杂的反式调节作用, 临床和实验研究显示 HCV 感染与肝细胞癌

(HCC)发生发展过程密切相关,其中病毒NS3蛋白起到重要的作用. HCV NS3蛋白对细胞信号转导途径,尤其是血清应答元件(SRE). 激活蛋白1(AP-1)、血清应答因子(SRF)等信号转导途径具有增强作用. Sakamuro et al 研究显示^[34], NS3 cDNA 能够使转染的小鼠成纤维细胞NIH 3T3具有转化特性,且转化细胞移植入裸鼠体内可形成纤维肉瘤灶,直接证明了HCV NS3蛋白的恶性转化潜能. NS3还可能通过解旋酶活性诱导肝细胞基因组的不稳定性,甚至发生突变. 另外, NS3能与蛋白激酶A(PKA)催化亚单位特异结合,可能干扰RNA与细胞内信号转导过程,严重干扰细胞正常功能. 刘妍 et al 研究表明NS3基因重组表达载体在HepG2细胞中表达相应的蛋白^[35],对SV40早期启动子具有反式激活作用,从而使SV40启动子下游的CAT基因表达增强. 这些都是HCV NS3通过反式激活作用对于靶细胞中细胞周期调节机制干扰的结果,说明HCV NS3蛋白的反式激活功能在HCV致病中发挥重要的作用,研究其作用分子生物学机制有助于理解HCV感染的慢性化和致癌作用机制. 我们应用微矩阵(microarray)技术对于表达HCV NS3载体转染的HepG2细胞进行研究,阐明了NS3蛋白反式激活作用的部分靶基因,同时我们结合生物信息学技术(bioinformatics)克隆了NS3蛋白反式激活作用的新靶基因,即丙型肝炎病毒NS3蛋白反式激活基因6(NS3TP6 Genbank NM_025190),为进一步研究HCV NS3TP6蛋白与免疫系统的关系,我们用酵母双杂交技术筛选白细胞中与HCV NS3TP6蛋白结合蛋白基因^[36-40].

酵母双杂交系统是近年来新发展起来的一种分析真核细胞中蛋白-蛋白、蛋白-DNA、蛋白-RNA相互作用的一种有效的基因分析方法,他的产生为研究蛋白在体内生理情况下的相互作用提供了一种新的遗传学方法. 酵母双杂交系统通过将两个推定有相互作用的蛋白X和Y分别融合到一酵母转录激活因子的BD和AD上,X与Y的相互作用重构了激活因子,从而导致下游“报告基因”的转录,产生容易探测到的表型^[41-46]. 我们使用的是酵母双杂交系统^{3[3]}. 实验中我们在真核表达载体pGBK-T7中构建pGBKT7-HCV NS3TP6诱饵质粒并在酵母菌株AH109中表达了HCV NS3TP6基因,与转化人白细胞cDNA文库的酵母菌株Y187进行配合,筛选出与之相互作用的蛋白基因5种,其中包括人类白细胞CD14抗原,人类免疫球蛋白轻链,3种人类推定蛋白基因(AC124014, AC097504, AC023785). 人类免疫球蛋白轻链的功能是识别抗原,在细胞信号传导中起重要的作用. 人类白细胞CD14抗原是内毒素或脂多糖受体(LPS),与肝细胞和免疫细胞的凋亡和HCV感染后免疫障碍有关^[47-53]. Caradonna et al 研究表明LPS可特异性地与单核/巨噬细胞表面受体CD14结合^[47],在HCV感染的患者内毒素血症致肝细胞损伤的过程中起着重要的作用. Mammaev et al 研究表明CD14的表达与肝细胞凋亡正相关^[48],经 α 干扰素治疗,CD14的表

达降低. Nakamoto et al 用CD14+单核细胞与CD8+和CD4+T淋巴细胞共孵育的方法^[49],得出CD8+和CD4+T淋巴细胞下降的结果,其研究表明CD14的表达与CD8+和CD4+T淋巴细胞的凋亡有关.

通过以上结果提供的这些线索,我们可以进行更深入的研究,进一步弄清各种蛋白与HCV NS3TP6的相互作用及HCV NS3TP6确切的作用,为寻找阻断HCV感染及HCC发生的有效方法探索新道路. 当然,这些结合蛋白的发现只是研究病毒蛋白功能的一个起点,在极其复杂的体内环境中,需要更多的实验证据来揭示这种结合的生物学意义.

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 成军, 李莉. 清除乙型肝炎病毒的非细胞裂解机制. 世界华人消化杂志 2002;10:73-76
- 3 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
- 4 成军. 慢性丙型肝炎肝脂肪变的机制及其意义. 世界华人消化杂志 2002;10:999-1003
- 5 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
- 6 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒X基因酵母表达载体构建及表达. 世界华人消化杂志 2002;10:15-18
- 7 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 李莉, 刘妍, 段惠娟. 丙型肝炎病毒NS2基因酵母双杂交“饵”载体构建及表达. 世界华人消化杂志 2002;10:129-132
- 8 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
- 9 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 陆荫英, 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
- 10 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒蛋白结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:213-215
- 11 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
- 12 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 钟彦伟, 段惠娟, 洪源. 筛选与克隆肝再生增强因子结合蛋白的基因. 世界华人消化杂志 2002;10:161-164
- 13 陆荫英, 王琳, 刘妍, 于敏, 李克, 王业东, 张玲霞, 成军. 乙肝病毒核心抗原单链抗体细胞内免疫抗乙肝病毒基因治疗研究. 世界华人消化杂志 2002;10:765-769
- 14 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 陈天艳, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟. 酵母双杂交技术筛选Hcbp6结合的肝细胞蛋白编码基因. 世界华人消化杂志 2003;11:385-388
- 15 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
- 16 陆荫英, 王琳, 李克, 刘妍, 成军, 张玲霞. HBcAg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
- 17 夏小兵, 成军, 王刚, 杨继珍, 刘妍, 董菁, 王琳, 李克. 人肝再生增强因子在毕赤酵母中的表达. 世界华人消化杂志 2001;9:743-746
- 18 皇甫竟坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒核心基因启动子序列突变及接种. 世界华人消化杂志 2001;9:1323-1325
- 19 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
- 20 洪源, 成军, 董菁, 李克, 王琳, 王刚, 刘妍. 乙型肝炎病毒HbsAg

- 重组疫苗与表面抗原 DNA 疫苗诱导 H-2^b 小鼠免疫应答的实验研究. 世界华人消化杂志 2002;10:137-140
- 21 王刚, 刘妍, 牟劲松, 洪源, 邵得志, 张耀新, 李莉, 成军. 大鼠肝再生相关基因 LRRP1 的克隆化. 世界华人消化杂志 2002;10:165-168
- 22 Hohda M, Misumi Y, Yamamoto A, Yano A, Nakamura N, Ikehara Y. Identification and characterization of a novel Golgi protein, GCP60, that interacts with the integral membrane protein giantin. *J Biol Chem* 2001;276:45298-45306
- 23 Rao MA, Cheng H, Quayle AN, Nishitani H, Nelson CC, Rennie PS. Ran BPM, a nuclear protein that interacts with and regulates transcriptional activity of androgen receptor and glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 2002;277:48020-48027
- 24 Nakamura M, Masuda H, Horii J, Kuma K, Yokoyama N, Ohba T, Nishitani H, Miyata T, Tanaka M, Nishimoto T. When overexpressed, a novel centrosomal protein, RanBPM, causes ectopic microtubule nucleation similar to gamma-tubulin. *J Cell Biol* 1998;143:1041-1052
- 25 Wang D, Li Z, Messing EM, Wu G. Activation of Ras/Erk pathway by a novel MET-interacting protein RanBPM. *J Biol Chem* 2002;277:36216-36222
- 26 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
- 27 Wang XZ, Jiang XR, Chen XC, Chen ZX, Li D, Lin JY, Tao QM. Seek protein which can interact with hepatitis B virus X protein from human liver cDNA library by yeast two-hybrid system. *World J Gastroenterol* 2002;8:95-98
- 28 Nagpal S, Ghosh CR, Chandraratna RA. Identification of nuclear receptor interacting proteins using yeast two-hybrid technology. *Methods Mol Biol* 2001;176:359-376
- 29 Serebriiskii IG, Toby GG, Finley RL Jr, Golemis EA. Genomic analysis utilizing the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2001;175:415-454
- 30 Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486
- 31 Zhong Y, Cheng J, Wang G, Shi SS, Zhang LX, Li L, Chen JM. The preparation of human single chain Fv antibody against hepatitis C virus E2 protein and its application in immunohistochemistry. *World J Gastroenterol* 2002;8:863-867
- 32 Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Mu JS, Hong Y, Liu Y, Duan HJ, Wang G, Li Li, Chen JM. Interaction between hepatitis C virus core protein and translin protein- a possible molecular mechanism for hepatocellular carcinoma and lymphoma caused by hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 2003;9:300-303
- 33 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟, 段惠娟, 芮莉莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白与载脂蛋白 AI 结合的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1018-1021
- 34 成军, 李克, 陆荫英, 王琳, 刘妍. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因和蛋白的生物信息学分析. 世界华人消化杂志 2003;11:378-384
- 35 钟彦伟, 成军, 张忠东, 孙敏, 李强, 李克, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 噬菌体表面展示技术筛选 Hcbp6 人源单链可变区抗体. 世界华人消化杂志 2003;11:389-393
- 36 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
- 37 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
- 38 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活基因 10 的克隆化研究. 世界华人消化杂志 2003;11:935-938
- 39 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
- 40 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
- 41 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚. 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式激活基因 10 的克隆化研究. 世界华人消化杂志 2003;11:925-929
- 42 成军. 病毒性肝炎发病机制中的反式调节机制. 世界华人消化杂志 2003;11:880-889
- 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 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
- 45 Caradonna L, Mastronardi ML, Magrone T, Cozzolongo R, Cuppone R, Manghisi OG, Caccavo D, Pellegrino NM, Amoroso A, Jirillo E, Amati L. Biological and clinical significance of endotoxemia in the course of hepatitis C virus infection. *Curr Pharm Des* 2002;8:995-1005
- 46 Mammaev SN, Lukina EA, Lugovskaia SA, Levina AA, Shul'pekova IuO, Pochtar' ME, Ivashkin VT. Cytokine production in patients with chronic viral hepatitis C during treatment with interferon-alpha. *Klin Lab Diagn* 2001;8:45-48
- 47 Nakamoto Y, Kaneko S, Kobayashi K. Monocyte-dependent cell death of T lymphocyte subsets in chronic hepatitis C. *Immunol Lett* 2001;78:169-174
- 48 Voiculescu CL, Balasoiu M, Turculeanu A, Radu C, Avramescu C, Radu E. Different patterns of some systemic immunological cell markers in HIV only, and HIV/hepatitis C-infected children. *Pediatr AIDS HIV Infect* 1996;7:31-36
- 49 Kolarski V, Petrova D, Naumova E, Mikhailova A, Teokharov P, Dzhonova D, Todorov A, Slavchev B, Diankova L. The systemic and local immune responses in patients with alcoholic liver cirrhosis depending on hepatitis C viral infection (HCV). *Vutr Boles* 1999;31:23-27
- 50 Jirillo E, Greco B, Caradonna L, Satalino R, Amati L, Cozzolongo R, Cuppone R, Manghisi OG. Immunological effects following administration of interferon-alpha in patients with chronic hepatitis C virus (CHCV) infection. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1996;18:355-374
- 51 Holzer TJ, Heynen CA, Kennedy MM, Peterson DA. Altered lymphocyte phenotypes and proliferative responses in chimpanzees infected with hepatitis C virus. *J Med Primatol* 1991;20:295-301
- 52 Sakamuro D, Furukawa T, Takegami T. Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *J Virol* 1995;69:3898-3894
- 53 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