

# 应用抑制性消减杂交技术筛选三氧化二砷对肝细胞调节的差异表达基因

吴顺华, 成军, 郑玉建, 张跃新, 刘妍, 郭江, 张黎颖, 王国荃

吴顺华, 成军, 刘妍, 郭江, 张黎颖, 北京地坛医院传染病研究所  
北京市 100011  
吴顺华, 郑玉建, 张跃新, 王国荃, 新疆医科大学公共卫生学院环境与  
基因研究室 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054  
吴顺华, 男, 1974-09-12 生, 宁夏固原市人, 汉族, 2004 年新疆维吾尔自治  
区医科大学博士, 副教授, 主要从事环境与基因、病毒性肝炎的发病机理研究。  
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”科技攻关面上项目, No. 01MB135  
通讯作者: 成军, 100011, 北京东城区安外大街地坛公园 13 号, 北京市地  
坛医院传染病研究所。cj@genetherapy.com.cn  
电话: 010-64481639 传真: 010-64281540  
收稿日期: 2004-09-07 接受日期: 2005-05-25

## Screening and identification of target genes differentially expressed in HepG2 cells treated with arsenic trioxide by suppression subtractive hybridization technique

Shun-Hua Wu, Jun Cheng, Yu-Jian Zheng, Yue-Xin Zhang,  
Yan Liu, Jiang Guo, Li-Ying Zhang, Guo-Quan Wang

Shun-Hua Wu, Jun Cheng, Yan Liu, Jiang Guo, Li-Ying Zhang, Institute  
of Infectious Diseases, Beijing DiTan Hospital, Beijing 100011, China  
Shun-Hua Wu, Yu-Jian Zheng, Yue-Xin Zhang, Guo-Quan Wang, Insti-  
tute of Enviromental and Gene, Public Health College, Xinjiang Medical  
University, Xinjiang Urumqi 830054, China  
Supported by National Science Foundation of China, No.C03011402,  
No.C30070689; Returned Scholar Fundation of General Logistics De-  
partment of Chinese PLA, No. 98H038; the Science and Technique  
Foundation of Chinese PLA during the 9<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> Five-Year Period, No.  
98D063, No.01MB135; and the Science and Technique Foundation of  
Chinese PLA for Young Scholars during the 10<sup>th</sup> Five-Year Plan Period,  
No. 01Q138  
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Institute of Infectious Diseases,  
Beijing Ditan Hospital, Dongcheng District, 13 Anwai Avenue, Beijing  
100011, China. cj@genetherapy.com.cn  
Received: 2004-09-07 Accepted: 2005-05-25

## Abstract

**AIM:** To clone and identify human genes differentially ex-  
pressed in human hepatocarcinoma HepG2 cells treated  
with arsenic trioxide by constructing a subtractive cDNA  
library with suppression subtractive hybridization (SSH)  
technique, and to elucidate the molecular mechanism of  
arsenic trioxide in the regulation of liver cells.

**METHODS:** The mRNA was isolated from HepG2 cells  
treated with arsenic trioxide and PBS, respectively, and

then cDNA was synthesized. After digestion of restriction  
enzyme *Rsa*I, small sizes cDNA were obtained. Then the  
tester cDNA was subdivided into two portions and each  
was ligated with a different cDNA adaptor. After the tester  
cDNA was hybridized with driver cDNA (twice) and under-  
went nested polymerase chain reaction (PCR) (twice), the  
DNA fragment was subcloned into T/A plasmid vectors to  
establish the subtractive cDNA library. Amplification of the  
library was performed in *E. coli* strain JM109. The ampli-  
fied cDNA was sequenced and analyzed in GenBank with  
BLAST search after colony PCR.

**RESULTS:** The subtractive cDNA library of genes differ-  
entially expressed in HepG2 cells treated with arsenic  
trioxide was constructed successfully. The amplified li-  
brary contained 109 positive clones. Colony PCR showed  
that these clones all contained 200-1 000 bp inserts. Thirty-  
six clones were analyzed by sequencing and bioinformatics.  
The results showed there were 15 coding sequences with  
known function and 6 novel ones with unknown function.

**CONCLUSION:** A subtractive cDNA library of genes differ-  
entially expressed in HepG2 cells treated with arsenic tri-  
oxide was constructed successfully using SSH technique.

**Key Words:** Human hepatocarcinoma; Arsenic trioxide;  
Suppression subtractive hybridization; Polymerase chain  
reaction; Clone

Wu SH, Cheng J, Zheng YJ, Zhang YX, Liu Y, Guo J, Zhang LY,  
Wang GQ. Screening and identification of target genes differentially  
expressed in HepG2 cells treated with arsenic trioxide by suppres-  
sion subtractive hybridization technique. *Shijie Huaren Xiaohua*  
*Zazhi* 2005;13(13):1535-1539

## 摘要

**目的:** 应用抑制性消减杂交(suppression subtractive  
hybridization, SSH)技术构建 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 处理的人肝癌细胞  
系 HepG2 差异表达基因的 cDNA 消减文库, 筛选并克  
隆 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 调节相关基因, 阐明 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对肝细胞调节作  
用的分子生物学机制。

**方法:** 以 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 处理 HepG2 细胞, 同时以 PBS 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 并逆转录为 cDNA, 经 *RsaI* 酶切后, 将实验组 cDNA 分成两组, 分别与两种不同的接头衔接, 再与对照组 cDNA 进行两次消减杂交及两次抑制性多聚酶链反应(PCR), 将产物与 T/A 载体连接, 构建 cDNA 消减文库, 并转染大肠杆菌 JM109 进行文库扩增, 随机挑选克隆 PCR 扩增后进行测序及同源性分析。

**结果:** 成功构建三 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 处理 HepG2 细胞差异表达基因的 cDNA 消减文库。文库扩增后得到 109 个白色克隆, 进行菌落 PCR 分析, 均得到 200–1 000 bp 插入片段。挑取含有插入片段的 36 个克隆进行测序, 并通过生物信息学分析获得 15 种已知基因序列和 6 个未知功能的新基因。

**结论:** 应用 SSH 技术成功构建了 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 处理 HepG2 细胞差异表达基因的 cDNA 消减文库。

**关键词:** 肝癌; As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; 抑制性消减杂交; 多聚酶链反应; 克隆

吴顺华, 成军, 郑玉建, 张跃新, 刘妍, 郭江, 张黎颖, 王国荃. 应用抑制性消减杂交技术筛选三氧化二砷对肝细胞调节的差异表达基因. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1535–1539

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1535.asp>

## 0 引言

三氧化二砷(arsenic trioxide, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)用于维甲酸治疗失败的急性早幼粒细胞性白血病, 取得了满意的临床效果, 完全缓解率达到90%以上。近年来的研究发现 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 在体外对人的肝癌细胞株有抑制增殖、诱导凋亡的作用<sup>[1]</sup>。但 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 同时作为国际癌症研究机构(IARC) 1980年确定一种致癌物, 其确切的致癌机制尚未阐明。因此正确认识 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 的这种治/致癌的双向调节作用就显得尤为重要。抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)可以快速有效地检测到差异表达的基因<sup>[2]</sup>。我们应用 SSH 技术, 构建 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 作用于人肝癌细胞 HepG2 后差异表达基因的 cDNA 消减文库, 筛选并克隆 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对肝细胞调节作用的差异表达基因, 并应用生物信息学(bioinformatics)技术初步获得其基因序列。为深入了解 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 在肝癌治疗中的作用机制提供新的理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人肝癌细胞系 HepG2 细胞及大肠杆菌 JM109 (本室保存), mRNA Purification 试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech), PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒(Clontech), 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-T 载体(Promega)。DNA 序列测定由上海博亚公司完成。配制 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 溶液以 PBS 溶液作参比。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 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 及 PBS 加入细胞培养液中, 使 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 终浓度达到 5 μmol/L, 24 h 后收获细胞。使用 mRNA Purification 试剂盒, 直接提取 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 及 PBS 处理的 HepG2 细胞 mRNA, 经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计分别进行定性、定量分析。

**1.2 方法** 消减杂交文库的建立采用 PCR-Select cDNA Subtraction Kit, 常规 SSH 方法按说明书进行: 以 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 及 PBS 处理的 HepG2 细胞 mRNA 为模板逆转录合成双链 cDNA(dscDNA), 并分别标记为 Tester 和 Driver, dscDNA 经 *RsaI* (一种识别 4 碱基序列的内切酶) 消化, 产生相对较短的平端片段, 纯化酶切产物。将 Tester 的 dscDNA 分为两份, 分别连接试剂盒提供的特殊设计的寡核苷酸接头 Adapter 1 和 Adapter 2, 然后与过量的 Driver dscDNA 进行杂交; 合并两种杂交产物后再与 Driver dscDNA 作第 2 次杂交; 然后将杂交产物做选择性 PCR 扩增, 使 Tester dscDNA 中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增。将扩增产物与 pGEM-T 载体连接, 转化 JM109 感受态细菌, 在含氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37℃ 培养 18 h。挑取白色菌落, 增菌, 以 pGEM-T 载体多克隆位点两端 T7/SP6 引物进行菌落 PCR 扩增, 证明含有插入片段后(200–1 000 bp), 测序。应用生物信息学将测得序列与 GenBank 数据库进行 Blast 同源性分析。

## 2 结果

紫外分光检测显示, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 及 PBS 处理的 HepG2 细胞 mRNA 分别为 4.6 μg 和 5.5 μg,  $A_{260}/A_{280} = 2.199$ 。10 g/L 琼脂糖凝胶电泳见 mRNA 为大于 0.5 kb 清晰慧尾片状条带。将连接有 adaptor 1 和 adaptor 2 的 2 组 dscDNA 分别用不同的特异性引物(看家基因甘油三磷酸脱氢酶 G3PDH 引物)进行 28 个循环扩增, 产物用 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。结果显示 2 组 dscDNA 扩增产物浓度相当, 说明 dscDNA 已与接头高效率连接。分别以消减及未消减 PCR 产物为模板, 用 G3PDH 引物进行 PCR 扩增, 分别在 18, 23, 28, 33 次循环结束时从体系中吸取 5 μL 进行电泳鉴定。结果显示, 与未消减组 PCR 产物相比, 消减组 PCR 产物中 G3PDH 基因产物大大减少, 说明所构建的消减文库具有很高的消减效率(图 1)。杂交产物经 2 轮 PCR 扩增后, 菌落 PCR 扩增结果显示为 200–1 000 bp 大小不等的插入片段, 所获得的 36 个克隆中几乎均含有插入片段, 这些条带可能代表差异表达的基因片段(图 2)。随机挑选 36 个克隆测序, 与 GenBank 数据库进行初步比较。应用生物信息学技术分析发现, 36 个克隆均与已知基因的部分序列高度同源(98–100%), 编码 15 种已知蛋白, 6 种新的未知蛋白(表 1)。

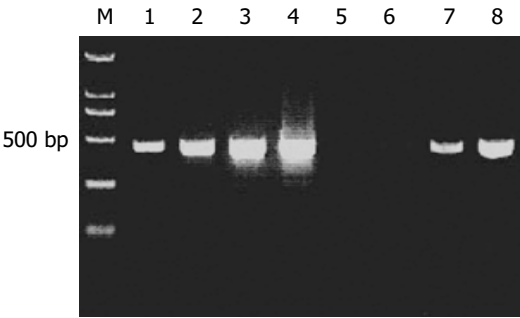


图1 消减效率分析结果. 引物为G3PDH3'和G3PDH5', 1-4为未消减组; 5-8为消减组. 均为18, 23, 28, 33个PCR循环次数.

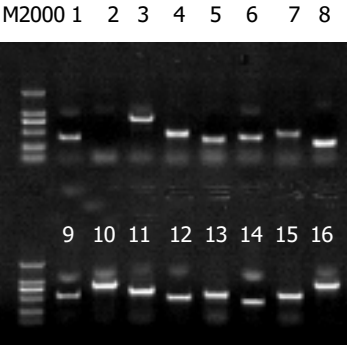


图2 部分阳性克隆(1-16)菌落PCR电泳鉴定.

表1 阳性克隆与 GenBank 同源序列比较结果

同源蛋白基因名称	相同克隆数	同源性
腺苷环化酶相关蛋白(CAP)	2	97%
小核糖体核蛋白(SNRPB)	2	100%
蛋白酶体亚单位 a2(PSMA2)	3	100%
蛋白酶体亚单位 a5(PSMA5)	1	100%
胶原结合蛋白	1	99%
转移粘连蛋白(AEG1)	1	99%
碳酸氢钠协同转运子(SLC4A7)	1	99%
CCAAT- 结合蛋白类似物(CCAAT-B)	1	97%
包被蛋白(COPA)	1	99%
半乳糖苷转移酶相关蛋白激酶(p58/GTA)	1	97%
铁蛋白重链多肽(FHP)	4	98%
铁蛋白轻链多肽(FLP)	4	100%
热休克蛋白 47(HSP47)	1	100%
热休克蛋白 89 a(HSP89 a)	1	99%
热休克蛋白 90a(HSP90a)	2	99%
推定蛋白 KIAA0172	1	99%
推定蛋白 MGC9084	1	98%
FLJ14185	1	100%
FLJ90301	1	97%
FLJ23322	1	100%
有丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)	1	100%
睾丸增强基因转录子(BAX inhibitor 1),	1	100%
人类染色体克隆	3	100%

3 讨论

三氧化二砷(arsenic trioxide, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)俗称砒霜, 是细胞凋亡诱导物, 其注射液已获得我国 SDA 和美国 FDA 批准上市. 肝细胞肝癌(Hepatocellular Carcinoma, HCC)是最常见的原发性肝癌, 同时也是一个常见的世界范围内的肿瘤<sup>[3-6]</sup>, 其恶性程度高预后差<sup>[7-10]</sup>. As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 在与肝癌细胞的研究表明, 他是较好的抗肿瘤药物之一. 但 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 同时作为一种致癌物, 可以引起包括皮肤异常改变和肺癌、膀胱癌、肝癌等其他内脏肿瘤的发生. 因此研究 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对肝细胞作用的机制在有效防治肝细胞癌方面有很重要的意义. As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 在体外引

起细胞代谢异常, 发生细胞凋亡, 下调抑凋亡基因 Bcl-2, 增加促凋亡基因 Bax 的表达以及改变二者之间的比例, 促使 Fas 基因的表达增强, 促进其凋亡<sup>[11-13]</sup>. 随着 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 广泛应用于抑制包括肝癌的其他实体肿瘤, 其抑癌作用机制的研究也更加深入. 抑制性消减杂交方法是近年发展起来的一项新的基因克隆技术, 与传统的方法比较, 具有实验周期短、易操作、可靠性高、假阳性率低等特点, 能有效地分离扩增低丰度特异表达的基因, 可以在较短的时间内获得较理想的实验结果<sup>[14]</sup>. 我们将 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 刺激肝母细胞瘤细胞系 HepG2, 并以 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 溶剂 PBS 刺激的相同细胞系作为对照, 以 2 种细胞系中提取的 mRNA 为起始材料, 应用 SSH 方法成功地构建了 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 激活相关基因差异表达的 cDNA 消减文库, 随机挑选 36 个克隆测序分析, 有 27 个克隆与已知功能的基因高度同源 (98-100%), 共编码 15 种基因. 6 个克隆为新的基因序列, 3 个染色体基因序列.

As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 可上调肝细胞许多功能蛋白的表达. 吴顺华 *et al*<sup>[15]</sup>应用低剂量 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对肝 HepG2 细胞基因表达谱调节的基因芯片研究发现, 5 μmol/L As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 诱导肝 HepG2 细胞差异表达基因 137 条, 其中 53 条基因表达上调. 包括人胰岛素生长因子 2 受体 (IGF2R), 人有丝分裂原激活蛋白 2 激酶 6 (MAP2K6) 等. Tchounwou *et al*<sup>[16]</sup>发现 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 上调谷胱甘肽转移酶, 金属硫蛋白 II, 热休克蛋白 HSP70, C-Fos, DNA 损伤组织蛋白 153, 45 (GADD153, 45), 葡萄糖调节蛋白 78 启动子 (GRP78), 以及异源物质反应元件 (XRE)、肿瘤抑制蛋白反应元件 (p53RE), 环磷酸昔反应元件 (CRE), 维甲酸反应元件 (RARE) 的表达. 我们发现 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 上调的 15 种已知功能蛋白可分为 7 类: (1) 细胞凋亡相关蛋白: (BAX inhibitor 1), Bax inhibitor-1 (BI-1) 是一种新的抗凋亡蛋白, 位于 12q12-q13, CDS 全长 711bp, 编码 237 aa, 信号肽区域 1-46, 6 个跨膜区 30-47, 51-73, 85-107, 112-134, 141-163, 早期研究命名为睾丸增强基因转录子 (TEGT), 受 Bcl-2 和 Bax 的调控. 现在证实 BI-1 可与 Bcl-2 和 Bcl-XL 相互作用, 而不是与 Bax 和 Bad, 当 BI-1 在恶性细胞中过度表达时, 可

以抑制由Bax和化疗药物诱导的细胞凋亡,而不是通过Fas(CD95)作用的<sup>[17]</sup>。(2)离子通道和运输蛋白:包被蛋白(COPA),碳酸氢钠协同转运子(SLC4A7),这是两种在物质转运和能量传递中起重要作用的蛋白。转移粘连蛋白(AEG1)是肿瘤转移的标志物之一。(3)细胞外基质:胶原结合蛋白,核糖体蛋白为细胞内结构的蛋白。腺苷酸环化酶相关蛋白(CAP)为广泛存在,高度保守,具有双重功能的蛋白质,其氨基末端是细胞响应上游的Ras调节信号系统,结合腺苷酸环化酶;而羧基末端结合球形肌动蛋白,改变微丝系统动态的重组,是保持正常细胞形态和生长所需要的<sup>[18]</sup>。Yu *et al*<sup>[19]</sup>证实As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>显著地抑制肝母细胞瘤HepG2细胞,改变了核基质蛋白的组成减少了HSC70的表达启动了级联反应以及多核功能最终导致细胞存活。(4)维持细胞稳定,促进损伤细胞再生、修复的基因:铁蛋白重(轻)链多肽:铁蛋白是体内主要储存铁的蛋白质,与体内铁的代谢密切相关。有研究发现肝脏中其水平的升高为抵抗氧化应激损伤的机制之一<sup>[20]</sup>, Gebel *et al*<sup>[21]</sup>发现低水平的砷介导的细胞毒性可以通过细胞耐受提高砷诱导的DNA损伤。近来还有研究认为铁蛋白重链基因有抗凋亡作用,可以使肝脏免受缺血性损伤<sup>[22]</sup>,因此间接的反映As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>可以改变细胞内铁负荷的平衡影响铁代谢。(5)分子伴侣蛋白:HSP47, HSP89, HSP90。HSP47作为细胞内质网的一种分子伴侣,参与内质网前胶原分子的折叠,组装和转运,促进胶原的合成并维持内质网非折叠分子稳定性,有助于从内质网到高尔基体的分子正确组装和转运<sup>[23]</sup>。HSP47在富含胶原的实体瘤中特异的表达增高,可作为肿瘤早期转移的标志物之一。HSP89是HSP90家族的新成员, HSP90是细胞内最活跃分子伴侣蛋白之一,许多信号转导蛋白的正常功能发挥都依赖于他。Lee *et al*<sup>[24]</sup>应用Strategic shotgun proteomics技术筛选肝HepG2蛋白表达谱与Hep3B相比发现16种蛋白包括热休克蛋白HSP90和异种核糖核蛋白(hnRNP A2/B1)存在显著的统计学意义,实验证明这些蛋白的差异表达与端粒酶的长度有关系。(6)信号转导通路蛋白:有丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)是一类广泛存在于真核细胞中的Ser/Thr蛋白激酶,是Ras途径中的下游信号分子,具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性,可激活C-Fos、C-Jun等转录调节因子,形成AP-1作用于核内,激活特定的基因从而传递信号。MAPK的激活需要其分子中特定的Tyr残基和Ser残基同时被磷酸化。MAPK信号通路具有调节细胞分裂和凋亡的作用。当细胞经As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>处理,则MAPK信号传导,同时应激胱冬肽酶-3(caspase-3)和信号调节激酶(ERK)和相关的C-Jun氨基末端激酶(JNK)、应激激

化蛋白激酶(SAPK),但p38MAP未被激活,抑制HepG2细胞iNOS的表达,结果表明被As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>诱导的信号转到通路激酶活性的改变可能不是细胞凋亡的主要因素<sup>[25]</sup>。As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>诱导凋亡可能与MAPK信号通路有关。最近的发现表明,慢性砷暴露导致的免疫毒性与砷直接作用于JAK酪氨酸激酶,从而强烈的抑制了STAT3酪氨酸磷酸化作用有关,而不影响其丝氨酸的磷酸化。砷完全阻断了STAT活性依赖的细胞因子信号抑制子(SOCS)的表达,激活了MAPK的活性<sup>[26]</sup>。(7)蛋白酶体:PSMA2, PSMA5,一般真核细胞主要有两种蛋白降解途径:一种是溶酶体途径,主要降解经胞吞进入细胞中的胞外蛋白质;另一种是非溶酶体途径,他主要经细胞颗粒中的蛋白酶体(proteasome)降解泛素化的胞内蛋白质。泛素-蛋白酶体(ubiquitin-proteasome)途径不仅是一种破坏陈旧或损伤蛋白质的重要机制之一,而且还是调节多种细胞生物学过程如细胞周期、基因转录调节、抗原递呈、免疫逃逸和耐药的关键机制<sup>[27]</sup>。20S蛋白酶体主要用于底物识别,参与底物降解。其活性调节因子主要有两种:19S调节复合体和11S(20S-PA28)调节复合体。20S蛋白酶体结合19S调节复合体后参与泛素化蛋白的降解,20S-PA28主要参与抗原递呈。26S蛋白酶体复合物由20S核心颗粒和19S帽结构组成,主要使蛋白在胞质中裂解为短肽片段。20S蛋白酶体有28个亚单位构成,PSMA2和PSMA5均是20S蛋白酶体亚单位,负责蛋白酶体的激活,抑制,调节,可能在肿瘤的转移和侵袭过程中发挥作用<sup>[28]</sup>。我们的结果暗示As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>可激活泛素-蛋白酶体调节通路。

总之,我们应用SSH技术成功构建了As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>处理HepG2细胞差异表达基因的cDNA消减文库。发现应用As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>刺激细胞后,有7类15种蛋白参与了细胞生长、代谢、维持细胞稳定及促进损伤细胞再生、修复以及抑制肿瘤的生长和转移的基因表达增高,这些基因影响了细胞凋亡、信号转导和蛋白降解等系统。提示As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>在抑制肝癌细胞中作用机制是多基因多通路共同作用的结果。

#### 4 参考文献

- 1 Siu KP, Chan JY, Fung KP. Effect of arsenic trioxide on human hepatocellular carcinoma HepG2 cells: inhibition of proliferation and induction of apoptosis. *Life Sci* 2002;71:275-285
- 2 Diatchenko L, Lukyanov S, Lau YF, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol* 1999;303:349-380
- 3 Anzola M. Hepatocellular carcinoma: role of hepatitis B and hepatitis C viruses proteins in hepatocarcinogenesis. *J Viral Hepat* 2004;11:383-393
- 4 Szabo E, Paska C, Kaposi Novak P, Schaff Z, Kiss A. Similarities and differences in hepatitis B and C virus induced hepatocarcinogenesis. *Pathol Oncol Res* 2004;10:5-11

- 5 Lee JH, Ku JL, Park YJ, Lee KU, Kim WH, Park JG. Establishment and characterization of four human hepatocellular carcinoma cell lines containing hepatitis B virus DNA. *World J Gastroenterol* 1999;5:289-295
- 6 Worman HJ, Lin F, Mamiya N, Mustacchia PJ. Molecular biology and the diagnosis and treatment of liver diseases. *World J Gastroenterol* 1998;4:185-191
- 7 He XX, Wang JL. The current status and prospect in the gene therapy of liver cancer. *Huaren Xiaohua Zazhi* 1998;6:158-159
- 8 Yang LJ, Wang WL. Preparation of monoclonal antibody against apoptosis-associated antigens of hepatoma cells by subtractive immunization. *World J Gastroenterol* 2002;8:808-814
- 9 Wang FS, Liu MX, Zhang B, Shi M, Lei ZY, Sun WB, Du QY, Chen JM. Antitumor activities of human autologous cytokine-induced killer (CIK) cells against hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol* 2002;8:464-468
- 10 Zhang G, Long M, Wu ZZ, Yu WQ. Mechanical properties of hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:243-246
- 11 Siu KP, Chan JY, Fung KP. Effect of arsenic trioxide on human hepatocellular carcinoma HepG2 cells: inhibition of proliferation and induction of apoptosis. *Life Sci* 2002;71:275-285
- 12 Kito M, Akao Y, Ohishi N. Arsenic trioxide-induced apoptosis and its enhancement by buthionine sulfoximine in hepatocellular carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291:861-867
- 13 Liu JW, Tang Y, Shen Y, Zhong XY. Synergistic effect of cell differential agent-II and arsenic trioxide on induction of cell cycle arrest and apoptosis in hepatoma cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:65-68
- 14 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
- 15 吴顺华, 郑玉建, 成军, 刘妍, 张跃新, 刘开泰, 钟彦伟, 吴煜. 低剂量三氧化二砷对 HepG2 细胞基因表达谱调节的影响. 世界华人消化杂志 2005;13:100-104
- 16 Tchounwou PB, Wilson BA, Ishaque AB. Atrazine potentiation of arsenic trioxide-induced cytotoxicity and gene expression in human liver carcinoma cells (HepG2). *Mol Cell Biochem* 2001;222:49-59
- 17 Xu Q, Reed JC. Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol Cell* 1998;1:337-346
- 18 Ksiazek D, Brandstetter H, Israel L, Bourenkov GP, Katchalova G, Janssen KP, Bartunik HD, Noegel AA, Schleicher M, Holak TA. Structure of the n-terminal domain of the adenylyl cyclase-associated protein (cap) from dictyostelium discoideum. *Structure (Camb)* 2003;11:1171-1178
- 19 Yu D, Wang ZH, Cheng SB. The effect of arsenic trioxide on the expression of Hsc and HNF4 in nuclear matrix proteins in HepG2 cells. *Anticancer Res* 2001;21:2553-2559
- 20 Erario MA, Gonzales S, Noriega GO, Tomaro ML. Bilirubin and ferritin as protectors against hemin-induced oxidative stress in rat liver. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2002;48:877-884
- 21 Gebel TW. Unanswered questions in arsenic toxicology. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2001;20:299-309
- 22 Berberat PO, Katori M, Kaczmarek E, Anselmo D, Lassman C, Ke B, Shen X, Busuttill RW, Yamashita K, Csizmadia E, Tyagi S, Otterbein LE, Brouard S, Tobiasch E, Bach FH, Kupiec-Weglinski JW, Soares MP. Heavy chain ferritin acts as an antiapoptotic gene that protects livers from ischemia reperfusion injury. *FASEB J* 2003;17:1724-1726
- 23 Tasab M, Batten MR, Bileid NJ. Hsp47: a molecular chaperone that interacts with and stabilizes correctly-folded procollagen. *EMBO J* 2000;19:2204-2211
- 24 Lee CL, Hsiao HH, Lin CW, Wu SP, Huang SY, Wu CY, Wang AH, Khoo KH. Shotgun proteomics approach for efficient construction of an expression map of targeted protein families in hepatoma cell lines. *Proteomics* 2003;3:2472-2486
- 25 Kang SH, Song JH, Kang HK, Kang JH, Kim SJ, Kang HW, Lee YK, Park DB. Arsenic trioxide-induced apoptosis is independent of stress-responsive signaling pathways but sensitive to inhibition of inducible nitric oxide synthase in HepG2 cells. *Exp Mol Med* 2003;35:83-90
- 26 Cheng HY, Li P, David M, Smithgall TE, Feng L, Lieberman MW. Arsenic inhibition of the JAK-STAT pathway. *Oncogene* 2004;23:3603-3612
- 27 Zavrski I, Jakob C, Schmid P, Krebbel H, Kaiser M, Fleissner C, Rosche M, Possinger K, Sezer O. Proteasome: an emerging target for cancer therapy. *Anticancer Drugs* 2005;16:475-481
- 28 Han YG, Liu HL, Zheng HJ, Li SG, Bi RC. Purification and refolding of human alpha5-subunit (PSMA5) of the 20S proteasome, expressed as inclusion bodies in Escherichia coli. *Protein Expr Purif* 2004;35:360-365

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 第十届全国肝癌学术会议征文通知

本刊讯 为交流各地肝癌临床和基础研究进展, 进一步提高肝癌的诊疗水平, 中国抗癌协会专业委员会将于 2005-09-21/2005-09-23 在江西省南昌市举办第十届全国肝癌学术会议, 现将征文范围及要求公布如下:

### 1 征文范围及要求

肝癌相关的病因、流行病学、基础及临床研究论文, 不接纳已发表的论文和综述. 征文应包括全文及 500 字以内的论文摘要 (包括目的、方法、结果、结论), 并加盖负责单位认可的公章.

### 2 论文寄送地址

上海市医学院路 136 号, 复旦大学肝癌研究所 任正刚 收, 邮编: 200032. 欢迎通过 E-mail 投稿, E-mail: renzg@zshospital.com 或 zgren@zshospital.net.