

图2 透射电镜显示示踪剂镧在大鼠肠黏膜的情况. A: 对照组, 没有镧的沉积; B: 研究组, 镧沉积在上皮细胞之间和上皮细胞下面的固有层细胞之间; C: 研究组, 可见镧沉积在不同细胞连接处.

是否发生细菌和内毒素的移位, 目前的研究较少^[12]. 因为采用CCl₄制成的动物模型在腹水出现后继续用药容易造成动物死亡, 我们在研究中采用调整用药的办法, 研究中没有动物死亡. 我们的动物模型更加确切的模拟了人肝硬化门静脉高压症^[13].

我们的研究显示, 门静脉高压的大鼠门静脉、体静脉和腹水中内毒素水平平均高于对照组, 肠系膜淋巴结中的细菌检出率也高于对照组. 提示在肝硬化门静脉高压症的情况下确实可以发生细菌和及其组成成分(内毒素)的移位.

重金属镧目前是研究黏膜屏障的一种有效手段, 一般是在体外对黏膜屏障通透性进行研究. 与其他的一些研究肠黏膜屏障的方法比, 具有直接和简便的优点. 在接下来透射电镜下的观察发现, 镧沉积在上皮细胞之间以及上皮细胞下面的固有细胞层, 因为镧的直径为4 nm, 正常情况下不能通过细胞和细胞间隙, 如果已经通过, 说明其通透性明显升高. 本文是首次报道在肝硬化门静脉高压症时肠道黏膜通透性变化的研究. 本研究显示: 肝硬化门静脉高压时肠黏膜屏障的通透性增强主要在肠黏膜上皮细胞间, 而不是如某些报告所描述的上皮细胞本身的通透性增高. 接下来在上皮细胞层下面的固有层中也出现了镧的沉积, 而微静脉和微淋巴管均从固有层里收集液体进入循环, 所以说在肝硬化门静脉高压症时肠道黏膜的通透性升高在上皮细胞之间^[14-15].

肝硬化门静脉高压时肠黏膜屏障的通透性增强的原因有以下几个方面: (1) 门静脉高压症可能因为门静脉系统的压力升高引起肠壁的水肿和充血而引起通透性的增强. (2) 淋巴引流不畅导致末梢的微淋巴管压力升高, 引起细胞水肿, 导致上皮细胞之间的通透性增强. (3) 肠道淤血后肠管内的细菌过度繁殖. 通透性增强后使得活细菌或细菌的成分, 如内毒素或细菌DNA容易通过黏膜进入循环之中, 引起一系列病理生理改变^[16-17].

总之, 门静脉高压症时肠黏膜上皮细胞之间, 而不是上皮细胞本身的通透性增高, 可能是导致细菌和内毒素的移位的途径.

4 参考文献

- 1 Thalheimer U, Triantos CK, Samonakis DN, Patch D, Burroughs AK. Infection, coagulation, and variceal bleeding in cirrhosis. *Gut* 2005;54:556-563
- 2 Wiest R, Garcia-Tsao G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology* 2005;41:422-433
- 3 Garcia-Tsao G, Wiest R. Gut microflora in the Pathogenesis of the complications of cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:353-372
- 4 姚国相, 沈忠义. 门静脉高压症时细菌移位与内毒素血症和一氧化氮之间关系的实验研究. *中华普通外科杂志* 2001;49:1567-1570
- 5 Chiva M, Guarner C, Peralta C, Llovet T, Gomez G, Soriano G, Balanzo J. Intestinal mucosal oxidative damage and bacterial translocation in cirrhotic rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15:145-150
- 6 Sola R, Soriano G. Why do bacteria reach ascitic fluid? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:351-354
- 7 Cirera I, Bauer TM, Navasa M, Vila J, Grande L, Taura P, Fuster J, Garcia-Valdecasas JC, Lacy A, Suarez MJ, Rimola A, Rodes J. Bacterial translocation of enteric organisms in Patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2001;34:32-37
- 8 Caly WR, Strauss E. A prospective study of bacterial infection in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1993;18:353-358
- 9 Sheer TA, Runyon BA. Spontaneous bacterial peritonitis. *Dig Dis* 2005;23:39-46
- 10 Ramachandran A, Prabhu R, Thomas S, Reddy JB, Pulimood A, Balasubramanian KA. Intestinal mucosal alterations in experimental cirrhosis in the rat: role of oxygen free radicals. *Hepatology* 2002;35:622-629
- 11 Deitch EA. Simple intestinal obstruction causes bacterial translocation in man. *Arch Surg* 1989;124:699-701
- 12 Wiest R, Cadelina G, Milstien S, McCuskey RS, Garcia-Tsao G, Groszmann RJ. Bacterial translocation up-regulates GTP-cyclohydrolase I in mesenteric vasculature of cirrhotic rats. *Hepatology* 2003;38:1508-1515
- 13 Arendt T. Penetration of lanthanum through the main pancreatic duct epithelium in rats following exposure to infected human bile. *Dig Dis Sci* 1991;36:75-81
- 14 Runyon BA, Borzio M, Young S, Squier SU, Guarner C, Runyon MA. Effect of selective bowel decontamination with Norfloxacin on spontaneous bacterial Peritonitis, translocation, and survival in an animal model of cirrhosis. *Hepatology* 1995;21:1719-1724
- 15 Alexander JW, Boyce ST, Babcock GF, Gianotti L, Peck MD, Dunn DL, Pyles T, Childress CP, Ash SK. The Process of microbial translocation. *Ann Surg* 1990;212:496-511
- 16 Deitch EA, Bridge RM. Effect of stress and trauma on bacterial translocation from the gut. *J Surg Res* 1987;42:536-542
- 17 Cole GT, Seshan KR, Pope LM, Yancey RJ. Morphological aspects of gastrointestinal tract invasion by *Candida albicans* in the infant mouse. *J Med Vet Mycol* 1988;26:173-185

应用抑制性消减杂交技术克隆乙型肝炎病毒前-X蛋白反式激活基因

杨倩, 张黎颖, 成军, 洪源, 刘妍, 王琳, 董菁, 张树林

杨倩, 张黎颖, 成军, 洪源, 刘妍, 王琳, 董菁, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011

张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061

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, 100039, 北京市东城区安外大街地坛公园 13号, 北京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: 2005-01-17 接受日期: 2005-05-25

摘要

目的: 应用抑制性消减杂交(SSH)技术构建乙型肝炎病毒(HBV)前-X基因反式激活基因差异表达的cDNA消减文库, 克隆前-X反式激活相关基因, 了解该段基因的可能生物学功能。

方法: 构建表达质粒pcDNA3.1(-)-前-X, 转染HepG2细胞, 以空载体pcDNA3.1(-)转染的HepG2细胞为对照; 提取转染后细胞的mRNA, 反转录为cDNA。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多聚酶链反应(PCR), 将产物与pGEM-Teasy载体连接, 构建cDNA消减文库, 并转染大肠杆菌进行文库扩增, 随机挑选克隆PCR扩增后进行测序及同源性分析。

结果: 成功构建前-X基因反式激活基因差异表达的cDNA消减文库。文库扩增后得到45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30个克隆进行测序, 并通过生物信息学分析获得13种已知功能基因序列。

结论: 应用SSH技术成功构建了前-X基因反式激活基因差异表达的cDNA消减文库。该文库的建立为阐明该基因生物学功能提供理论依据。

杨倩, 张黎颖, 成军, 洪源, 刘妍, 王琳, 董菁, 张树林. 应用抑制性消减杂交技术克隆乙型肝炎病毒前-X蛋白反式激活基因. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1609-1611

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1609.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)为3.2 kb部分双链的DNA病毒, 其基因组结构紧密, 特点为结构基因与调节基因序列之间重叠, 甚至结构基因序列之间重叠。1979年Gelibert *et al*首次报告了HBV DNA的全基因序列并确定4个主要的开放读码框架(ORF): P、前-S/S、前-C/C和X。研究者对这一界定沿用至今。关于这一紧密DNA结构中是否存在

新的编码序列, 一直没有进行系统的研究。在1990年代曾有日本学者报道在X基因上游存在一段新的基因, 但并未对该基因的真实性及生物学功能进行研究^[1]。我们课题组通过分子流行病学研究、上游启动子活性鉴定, 确定了前-X基因存在的真实性, 并利用分子生物学技术对其功能进行了研究^[2-4]。为了研究HBV感染肝细胞之后, 前-X基因编码的前-X蛋白对于肝细胞的基因表达谱的影响, 我们应用抑制性消减杂交(SSH)技术对于表达和不表达前-X蛋白的肝母细胞瘤细胞系HepG2的基因表达类型进行了差异比较。

1 材料和方法

1.1 材料 肝母细胞瘤细胞系HepG2细胞及大肠杆菌DH5 α (本室保存), pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen), FuGENE6转染试剂(Roche), TRIZOL提取试剂(LIFE TECHNOLOGIES), poly A T tract mRNA Isolation system III试剂盒(Promega), PCR-Select cDNA Subtraction试剂盒(Clontech), 50 \times PCR Enzyme Mix, Advantage PCR Cloning试剂盒(Clontech), High Pure PCR Product Purification试剂盒(Promega), pGEM-Teasy载体(Promega)。真核表达质粒pcDNA3.1(-)-前X由本室构建。DNA序列测定由上海申友公司完成。

1.2 方法

1.2.1 真核表达载体的细胞转染及mRNA提取 用FuGENE6转染试剂将2 μ g pcDNA3.1(-)-前-X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QuikPrePmico mRNA Purification试剂盒从HepG2细胞中直接提取重组表达质粒及空载体的HepG2细胞的mRNA, 经分光光度计分别进行定量分析。

1.2.2 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: 以转染了重组表达质粒及空载体的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Rsa I(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。

1.2.3 消减文库扩增及克隆分析 扩增产物与pGEM-

Teasy 载体连接, 转化 DH5 α 感受态细菌, 在含氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 18 h. 挑取白色菌落, 增菌, 以 pGEM-Teasy 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 数据库进行在线同源性分析 (www.ncbi.nlm.gov/blast/blast.cgi).

2 结果

2.1 mRNA 的定性、定量分析 紫外分光检测显示, 转染了真核表达质粒及空载体的 HepG2 细胞提取 mRNA 分别为 3.2 μ g 和 3.6 μ g, $A_{260}/A_{280} = 1.79$. 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳 mRNA 为大于 0.5 kb 清晰慧尾片状条带, 证实 mRNA 质量完全满足进行消减杂交的要求.

2.2 cDNA 消减文库消减效率的鉴定 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 μ L 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).

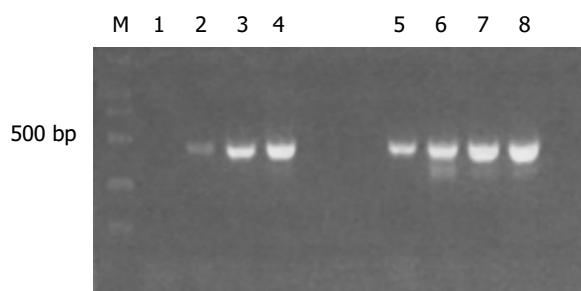


图1 消减效率分析结果. 1–4: 消减组, 引物为 G3PDH3'、5', PCR 循环次数分别为 18、23、28、33; 5–8: 未消减组, 引物为 G3PDH3'、5', PCR 循环次数分别为 18、23、28、33.

2.3 差异表达 cDNA 片段的扩增及克隆 杂交产物经两轮 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 85 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).

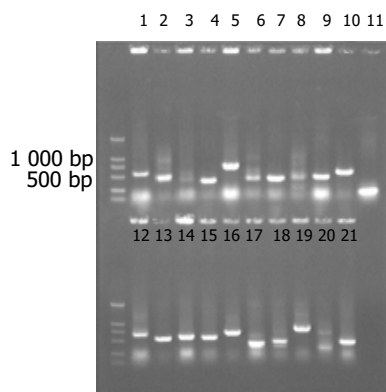


图2 部分克隆菌落 PCR 鉴定电泳图.

2.4 cDNA 测序与同源性分析结果 挑选 30 个克隆测序, 与 GenBank 数据库进行初步比较. 其中 13 个克隆均与已知基因的部分序列高度同源 (96–100%) (表 1).

表1 阳性克隆与 GenBank 已知功能基因同源序列比较结果

已知基因	相同克隆数	同源性
A174 线粒体	2	100%
细胞核核糖体 A1	1	95%
RNA 结合蛋白	3	94%
核糖体蛋白 L31	1	100%
NEDD5	1	99%
跨膜 4 超家族成员 1	2	100%
胎盘绒毛细胞表达的 mRNA	3	99%

3 讨论

SSH 技术是一种以抑制 PCR 反应为基础, 将标准化测试 cDNA 单链步骤和消减杂交步骤合为一体的技术^[5–6]. 抑制消减杂交技术对高、低丰度的差异表达基因都能有效分离, 在分离稀少基因方面比 cDNA 消减杂交、代表性差异分析、mRNA 差异显示方法具有明显优势; 一次 SSH 反应可同时分离到几十到几百个差异表达基因^[7–8].

应用软件的蛋白质分析功能分析了前-X 基因的完全表达产物. 前-X 区编码多肽含有 5 个 C, 可能形成多个二硫键, 易于产生新的二级结构. 前-X 多肽含有 24 个极性氨基酸, 形成一个亲水功能域, 可能影响到整个蛋白的空间构象. 根据针对前-X 多肽的氨基酸组成分析, 发现该区域含有多个 S, 可能是磷酸化的重要区域, 与细胞内信号转导有关. 我们利用 SSH 技术分别对前-X 和全-X 对人肝癌细胞系基因表达谱的改变进行了研究, 力图阐述这个新基因的功能. 成功构建前-X 基因真核表达质粒, 转染 HepG2 细胞, 利用 SSH 技术对差异性表达基因进行同源性分析后发现, 上调表达基因包括核糖体, 转膜蛋白等^[9–10]. 转膜蛋白参与肿瘤细胞的转移和细胞间的黏附. 上调表达胎盘绒毛细胞中的 mRNA, 有 3 个相同克隆, 是否与 HBV 垂直传播有关, 值得进一步探讨.

NEDD5 是近年来发现的哺乳动物 septin 蛋白家族中的一个成员, 具有 GTPase 酶活性. 类似于酵母和果蝇的 septin 蛋白, 与细胞浆移动移动相关. Kinoshita *et al*^[11] 研究发现鼠 NEDD5 基因编码一个 41.5 ku 的 GTP 酶, 类似于酵母及果蝇的细胞浆移动必须蛋白-septin 蛋白. 在细胞分裂间期和后期, NEDD5 聚集成纤维状或粒状结构, 有赖于细胞的生长状态. 富含 NEDD5 的纤维可被微注射 GTP γ S 和缺乏 GTP 结合活性的 NEDD5 突变体破坏, 提示 GTP 的水解需要 NEDD5 的集合装配. 富含 NEDD5 的纤维也可以与肌动蛋白束和局灶性黏附复合物相互作用, 也可被细胞松弛素 D、C3 毒素及血清饥饿所破坏, 认为 NEDD5 在细胞间期与基于肌动蛋白的细胞骨架系统由功能性相互作用. 从细胞分裂后期至末期, NEDD5 则聚积在收缩环附

近,直到最后形成中间体.Vega *et al*^[12]研究神经细胞中NEDD5与胞外复合物之间的关系,以及NEDD5在分化的pc12细胞中的突触生长中的角色发现,当应用神经生长因子诱导分化时,内源性NEDD5在未分化的pc12细胞中富集在核周,成放射状向外形成锥形.NEDD5与其他septin蛋白家族成员相同,可与小鼠脑细胞裂解物中的胞外复合物及微管蛋白共沉淀.GTPase缺陷的NEDD5过表达可促使PC12细胞异常突触的生长.这一结果表明NEDD5与其他septin蛋白一起共同与囊泡外复合物及微管蛋白相互作用,推测NEDD5的GTPase活性可能是神经突生长的重要因素.总之,NEDD5可能为神经细胞极化所必需,也许在神经细胞分化过程中通过促进囊泡外复合物的功能起作用.目前HBV感染后只有在引起肝性脑病时患者才会出现神经精神症状,但是在之前有没有神经系统的病变基础,目前很少有人报道,而且肝性脑病的发生机制目前仍然处于研究当中,本文发现前X-蛋白可以激活NEDD5基因的表达,提示有必要对肝性脑病的发病机制,以及HBV感染者的神经系统是否存在潜在的或前期的病变进行研究.

总之,本研究对于前-X基因的分析鉴定,为前-X和全-X功能的研究,为进一步了解HBV的发病机理提供了新的方向.

4 参考文献

- 1 Takahashi K, Akahane Y, Hino K, Ohta Y, Mishiro S. Hepatitis B virus genomic sequence in the circulation of hepatocellular carcinoma patients: comparative analysis of 40 full-length isolates. *Arch Virol* 1998;143:2313-2326
- 2 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前-X编码基因的界定. 世界华人消化杂志 2003;11:1097-1101
- 3 杨倩, 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组前-X-S基因区的分子流行病学研究. 世界华人消化杂志 2004;12:785-789
- 4 董菁, 杨倩, 成军. 乙型肝炎病毒基因组前-X区的分子流行病学研究. 世界华人消化杂志 2004;12:794-800
- 5 Yokota N, Mainprize TG, Taylor MD, Kohata T, Loreto M, Ueda S, Dura W, Grajkowska W, Kuo JS, Rutka JT. Identification of differentially expressed and developmentally regulated genes in medulloblastoma using suppression subtraction hybridization. *Oncogene* 2004;23:3444-3453
- 6 Majda BT, Meloni BP, Rixon N, Knuckey NW. Suppression subtraction hybridization and northern analysis reveal upregulation of heat shock, trkB, and sodium calcium exchanger genes following global cerebral ischemia in the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;93:173-179
- 7 Su ZZ, Kang DC, Chen Y, Pekarskaya O, Chao W, Volsky DJ, Fisher PB. Identification of gene products suppressed by human immunodeficiency virus type 1 infection or gp120 exposure of primary human astrocytes by rapid subtraction hybridization. *J Neurovirol* 2003;9:372-389
- 8 Kiss C, Nishikawa J, Dieckmann A, Takada K, Klein G, Szekely L. Improved subtractive suppression hybridization combined with high density cDNA array screening identifies differentially expressed viral and cellular genes. *J Virol Methods* 2003; 107:195-203
- 9 Hashida H, Takabayashi A, Tokuhara T, Hattori N, Taki T, Hasegawa H, Satoh S, Kobayashi N, Yamaoka Y, Miyake M. Clinical significance of transmembrane 4 superfamily in colon cancer. *Br J Cancer* 2003;89:158-167
- 10 Solmi R, De Sanctis P, Zucchini C, Ugolini G, Rosati G, Del Governatore M, Coppola D, Yeatman TJ, Lenzi L, Caira A, Zanotti S, Taffurelli M, Carinci P, Valvassori L, Strippoli P. Search for epithelial-specific mRNAs in peripheral blood of patients with colon cancer by RT-PCR. *Int J Oncol* 2004;25: 1049-1056
- 11 Kinoshita M, Kumar S, Mizoguchi A, Ide C, Kinoshita A, Haraguchi T, Hiraoka Y, Noda M. Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. *Genes Dev* 1997;11:1535-1547
- 12 Vega IE, Hsu SC. The septin protein Nedd5 associates with both the exocyst complex and microtubules and disruption of its GTPase activity promotes aberrant neurite sprouting in PC12 cells. *Neuroreport* 2003;14:31-37

编辑 王谨晖 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 •

广东中西医结合、中医消化病学术会议

本刊讯 广东中西医结合、中医消化病学术会议定于2005-11在广州召开,现将征稿通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文、结构式摘要(800字左右)各一份,电脑打印(附软盘),2005-09-30截稿。

2 联系方式

广东省广州市广州大道北1838号南方医院消化科 智发朝 教授,电话:020-65641531。