

世界华人消化杂志

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2005 年 7 月 28 日 第 13 卷 第 14 期 (Volume 13 Number 14)



14/2005

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊,
2003年百种中国杰出学术期刊,

《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学
类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊.

世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》,
荷兰《医学文摘库/医学文摘》,
俄罗斯《文摘杂志》收录.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2005 年 7 月 28 日

第 13 卷

第 14 期

(总第142期)

述 评

- 1645 进一步加强慢性肝炎、肝纤维化治疗研究 姚希贤, 崔东来
1650 胃肠道生理功能的再认识与肠衰竭 丁连安, 黎介寿

胃 癌

- 1652 AGS细胞系中12-LOX的表达及其抑制剂对细胞增殖的影响
黄彩云, 陈丰霖, 李建英, 陈治新, 王小众

肝 癌

- 1658 Maxizyme对肝癌突变抑癌基因p53的抑制作用 李岩, 林菊生, 孔心涓
1663 肝癌组织中TGF- β 1、TGF- β 1R II和NF- κ B的表达
缪林, 张锁林, 季国忠, 范志宁, 刘政, 张平, 杨春
1667 肝细胞癌组织和外周血中肿瘤/睾丸抗原SSX-2和SSX-5的表达
吴力群, 王新建, 张斌, 卢云, 杨金镛
1673 肝细胞肝癌患者肿瘤/睾丸抗原SSX-1及NY-ESO-1mRNA的表达意义
吴力群, 王新建, 卢云, 张斌, 杨金镛
1679 重组人内皮抑素真核表达载体pCD-sEndo的构建和表达 邵俊伟, 刘然义, 易继林, 卢绮萍, 黄文林
1684 蛋白质芯片飞行质谱技术检测体外培养的肝癌细胞株与转染HBV的肝癌细胞株蛋白质的差异表达
丁守怡, 钱冬萌, 闫志勇, 宋旭霞, 牟文凤, 王斌

病毒性肝炎

- 1688 酵母双杂交技术筛选白细胞cDNA文库中新基因NS2TP蛋白结合蛋白基因
张黎颖, 成军, 邓红, 郭江, 郭风劲, 王巧侠
1692 抗HBV多聚酶TP区VH抗体体外可抑制HBV复制 于俊岩, 兰林, 王宇明, 丁世涛
1696 黑龙江地区乙型肝炎病毒耐药变异与基因型 李迪, 张淑云, 谷鸿喜, 程险峰, 王晓燕
1700 丙型肝炎病毒非结构蛋白2反式调节基因NS2TP的克隆化 张黎颖, 成军, 邓红, 刘妍, 王琳

基础研究

- 1705 苷脱氨酶基因对小鼠大剂量化疗的保护作用
路平, 王永来, 金锋, 陈波, 姚凡, 王舒宝, 陈峻青, 徐惠绵, 赵实诚
1713 三氧化二砷注射液对胰腺癌细胞系PC-3的体外作用 刘静冰, 秦叔逵, 李进
1717 消炎痛和阿斯匹林对C57BL/6和Balb/c小鼠胃酸分泌的效应 王昌成
1721 ^{103}Pd 诱导犬胆管增殖平滑肌细胞凋亡及对相关基因的影响
何贵金, 吴荣, 高沁怡, 许书河, 高红, 姜维国, 蒋涛, 戴显伟, 马凯

文献综述

- 1725 热休克蛋白家族与肝癌的关系 吴顺华, 成军, 郑玉建
1731 HCV的基因型及其变异与肝细胞癌的关系 韩苏夏, 刘正稳, 马瑾璐
1734 移植肝细胞基因调控研究 林勇, 曾欣
1737 三氧化二砷治疗肝癌的分子机制 吴顺华, 成军, 郑玉建
1744 丁酸钠抗肿瘤作用的新进展 崔路佳, 高善玲, 裴风华
1747 聚乙二醇 α -干扰素治疗慢性乙型肝炎的研究进展 周平, 谢仁江
1750 人类免疫缺陷病毒与黏膜免疫 杨贵波, 邵一鸣

研究快报

- 1760 胰腺外分泌功能研究大鼠模型的建立 陈小燕, 李兆申, 屠振兴, 曹晓鹏
1762 乳杆菌细胞壁表面黏附相关蛋白的提取和鉴定 王斌, 魏泓
1766 幽门螺杆菌和促胃液素在胃癌前病变中的作用 郑宗茂, 吴灵飞, 冯家琳, 李国平, 王炳周
1768 表皮生长因子及其受体mRNA在胃溃疡发生与愈合过程中的表达 谭永港, 舒晴, 邱猛进, 张永锋
1770 巢式PCR-RFLP法对湖南省乙型肝炎病毒Bj和Ba基因亚型的初步鉴定
温志立, 谭德明, 杨铁一, 徐铿
1773 阿霉素对胃癌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的影响 邢承忠, 路平, 郭晓临, 刘瑾, 徐惠绵, 袁媛
1776 BALB/C小鼠炎症性肠病动物模型建立方法探讨 刘敬军, 郑长青, 潘丽丽, 闻英, 胡刚正

临床经验	1779 社会因素对老年人群幽门螺杆菌感染的影响 张玫, 汤哲, 汤欣, 蔡玲, 牛小羽, 孙书春 1781 口服药物致食管溃疡22例 王孟春, 张丽瑶, 钟琳琳 1782 经内镜乳头括约肌预切开术在困难ERCP中的应用 王庆, 秦明放, 勾承月, 李宁, 王震宇, 邹富胜 1785 肠镜检查肠道准备无效率的影响因素 蔡文智, 智发朝, 李凤伶, 陈秀云, 姜泊 1787 中国人与非洲黑人 <i>H. pylori</i> 相关胃十二指肠疾病发生情况比较及分析 廖常奎, Geojanna GA 1790 大肠癌术后时辰化疗联合中医时间医学治疗的临床研究 张思奋, 罗湛滨, 吴文江, 何晶, 范小华 1792 幽默疗法辅助治疗慢性萎缩性胃炎53例 阮鹏, 阮浩然 1794 肝炎肝硬化患者血清IL-10、IL-18水平及意义 谭永港, 刘俊, 丁世华, 刘新民 1797 暴发性胰腺炎时腹腔室隔综合征的联合治疗40例 孙早喜, 孙诚谊
致 谢	1800 致谢世界华人消化杂志编委
封面故事	1652 AGS细胞系中12-LOX的表达及其抑制剂对细胞增殖的影响 黄彩云, 陈丰霖, 李建英, 陈治新, 王小众 世界华人消化杂志 2005;13(14):1652-1657 http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v13/i14/1652.htm
国际会议	13th United European Gastroenterology Week, UEGW October 15-20, 2005 American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting October 28-November 2, 2005 ISGCON 2005 November 11-15, 2005 isgcon2005@yahoo.co.in isgcon2005.com Advanced Capsule Endoscopy Users Course November 18-19, 2005 www.asge.org/education II Latvian Gastroenterology Congress November 29, 2005 gec@stradini.lv www.gastroenterologs.lv 2005 CCFA National Research and Clinical Conference - 4th Annual Advances in the Inflammatory Bowel Diseases December 1-3, 2005 c.chase@imedex.com www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm 10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus February 22-25, 2006 isde@sapmea.asn.au www.isde.net

<div>世界华人消化杂志</div> <div>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</div> <div>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (半月刊) 创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2005-07-28 原刊名 新消化病学杂志</div> <div>名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生 编辑部主任 张海宁 中文编辑 潘伯荣 张海宁 英文编辑 张海宁 排版校对 张敏 张勇 李琪</div>	<div>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 出版 世界胃肠病学杂志社 100023, 北京市2345信箱 E-mail: wjgd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com 电话: 010-85381901 传真: 010-85381893 印刷 北京科信印刷厂 发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱) 订购 全国各地邮电局 邮购 世界胃肠病学杂志社发行部 (100023, 北京市2345信箱) 电话: 010-85381901 传真: 010-85381893</div>	<div>世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 2003年百种中国杰出学术期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊. 世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录.</div> <div>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</div> <div>2005年版权归世界胃肠病学杂志社所有</div>
--	---	---

ISSN 1009-3079	邮发代号	国外代号	国内定价	广告经营许可证
CN 14-1260/R	82-262	M 4481	每期24.00元 全年576.00元	1401004000050

www.wjgnet.com

酵母双杂交技术筛选白细胞 cDNA 文库中新基因 NS2TP 蛋白结合蛋白基因

张黎颖, 成军, 邓红, 郭江, 郭风劲, 王巧侠

张黎颖, 成军, 郭江, 郭风劲, 王巧侠, 北京地坛医院传染病研究所
北京市 100011

邓红, 西安交通大学第二医院感染科 陕西省西安市 710004

张黎颖, 女, 1978-10-26 生, 陕西省西安市人, 汉族, 2002 年毕业于西安交通大学临床医学系, 获医学学士学位, 2005 年毕业于西安交通大学医学系, 获医学硕士学位, 主要研究方向是肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制。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

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: 2005-01-10 接受日期: 2005-05-25

Screening of proteins binding to NS2TP from leukocyte cDNA library by yeast two-hybrid technique

Li-Ying Zhang, Jun Cheng, Hong Deng, Jiang Guo, Feng-Jin Guo, Qiao-Xia Wang

Li-Ying Zhang, Jun Cheng, Jiang Guo, Feng-Jin Guo, Qiao-Xia Wang, Institute of Infectious Diseases, Ditan Hospital, Beijing 100011, China
Hong Deng, Department of Infectious Diseases, the Second Hospital, Xi'an Jiaotong University Xi'an 710004, China

Supported by National Science Foundation of China, No.C03011402, No.C30070689; Returned Scholar Foundation of General Logistics Department of Chinese PLA, No. 98H038; the Science and Technique Foundation of Chinese PLA during the 9th and 10th Five-Year Period, No. 98D063, No.01MB135; and the Science and Technique Foundation of Chinese PLA for Young Scholars during the 10th Five-Year Plan Period, No. 01Q138

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, 13 Ditan Park, Anwai Street, Dongcheng District, Institute of Infectious Diseases, Ditan Hospital, Beijing 100011, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2005-01-10 Accepted: 2005-05-25

Abstract

AIM: To screen the proteins binding to a transregulated protein of hepatitis C virus (HCV) NS2 protein (NS2TP) by yeast two-hybrid technique, and to investigate the pathogenesis of HCV and the biological functions of NS2TP.

METHODS: NS2TP bait plasmid pGBKT7-NS2TP was constructed by ligating the NS2TP gene into yeast expression plasmid pGBKT7. Then pGBKT7-NS2TP was used to transform yeast cells AH109 (α type). Thereafter, the transformed yeast cells were amplified and mated with yeast cells Y187 (α type) containing leukocyte cDNA li-

brary plasmid pCAT2 in 2 \times YPDA medium. The obtained diploid yeast cells were plated on synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) and SD/-Trp-Leu-His-Ade containing x- α -gal for selection twice. The plasmids of positive colonies were extracted and analyzed by DNA sequencing and BLAST search in GenBank.

RESULTS: Twenty-five proteins binding to NS2TP were screened, including cytochrome P450 2E1, decorin, p68, β -2-microglobulin, and carboxypeptidase N precursor (CPN2), etc whose functions had been known. Three proteins with unknown function were screened at the same time.

CONCLUSION: These results bring some new clues for studying the biological functions of the novel gene NS2TP and the pathogenesis of HCV.

Key Words: Hepatitis C virus; yeast two-hybrid; NS2TP

Zhang LY, Cheng J, Deng H, Guo J, Guo FJ, Wang QX. Screening of proteins binding to NS2TP from leukocyte cDNA library by yeast two-hybrid technique. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005; 13(14):1688-1691

摘要

目的: 筛选 HCV 非结构蛋白 2(NS2)反式调节蛋白(NS2TP)的结合蛋白, 探讨 HCV 的致病机制及新蛋白 NS2TP 的生物学功能。

方法: 应用酵母双杂交系统 3, 将 PCR 法扩增的 NS2TP 基因连接入酵母表达载体 pGBKT7 中构建诱饵质粒, 转化单倍体酵母细胞 AH109 并在其内表达, 然后与转化了人白细胞文库质粒 pACT2 的单倍体酵母细胞 Y187 进行配合, 在营养缺陷型培养基和 X- α -半乳糖(X- α -gal)上进行双重筛选, 提取阳性酵母菌落的质粒转化大肠杆菌氨苄青霉素-LB 平板上选择并测序, 结果在 GenBank 中进行生物信息学分析。

结果: 筛选出与 NS2TP 结合的蛋白基因 25 个, 其中包括细胞色素 p450 2E1、核心蛋白聚糖、p68、 β 2 微球蛋白、羧肽酶 N2 等已知功能基因及 3 个未知功能序列。

结论: 为阐明新蛋白 NS2TP 的分子生物学功能及 HCV 的致病机制提供了新的思路。

关键词: 病型肝炎病毒; 酵母双杂交; NS2TP 蛋白

张黎颖, 成军, 邓红, 郭江, 郭风劲, 王巧侠. 酵母双杂交技术筛选白细胞 cDNA 文库中新基因 NS2TP 蛋白结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2005;13(14): 1688-1691
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1688.asp

0 引言

NS2TP是我室利用抑制性消减杂交技术从肝母细胞瘤细胞系HepG2细胞中筛选出来的新型蛋白基因,其开放读码框架(ORF)长度为456个核苷酸(nt),编码产物由151个氨基酸残基(aa)组成,我们已经成功的进行了克隆化,并且应用蛋白免疫印记法(Western blotting)验证在酵母细胞AH109中成功表达融合蛋白.HCV感染可引起肝炎、肝硬化、肝癌、及脂肪肝等,严重危害着我国的人群健康,但其致病机制目前还不十分清楚,我们发现了HCV NS2可下调NS2TP在HepG2细胞中的表达^[1-2],为进一步研究NS2TP是否是HCV引起肝病的一条途径,本研究应用酵母双杂交技术筛选白细胞文库中NS2TP蛋白的结合蛋白基因。

1 材料和方法

1.1 材料 AH109酵母菌株(MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4^A, gal80^A, LYS2: GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2URA3::MEL1TATA-lac Z MEL1)、预转化的cDNA白细胞文库(Y187)、pGBKT7-BD、pGADT7-AD克隆载体及酵母YPD培养基、SD/-Trp、SD/-Leu, SD/-Trp-Leu-His, SD/-Trp-Leu-His-Ade等培养基、X- α -gal 购于Clontech公司. 大肠杆菌DH5 α 为本室保存. Taq DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、EcoR I和Pst I购于Takara生物公司. c-Myc mAb本室自制,由购自ATCC的1-9E10.2杂交瘤产生. 辣根过氧化物酶酶标羊抗鼠IgG为中山生物公司产品. 丙烯酰胺、N, N' - 亚甲双丙烯酰胺、IPTG及pGEM-T载体购于Promega公司. 醋酸锂、半硫酸腺苷购于Sigma公司. HepG2细胞购于中科院上海细胞生物研究所. NS2TP PCR引物:有意链:5'-GAA TTC ATG CCG CGT GGA AGC CGA-3',反义链:5'-GGA TCCTTA GGC CAA TCC GTT TGC-3'由上海生工公司合成. DNA测序由上海华诺公司承担。

1.2 方法 PCR扩增NS2TP基因与pGEM-T克隆载体连接,转化大肠杆菌DH5 α ,测序正确后,提取质粒与pGBKT7空载体同时进行EcoR I/BamH I双酶切后将NS2TP连入pGBKT7载体,转化大肠杆菌DH5 α ,应用Vector NTI Suite 8.0分析质粒pGBKT7-NS2TP,选择内切酶进行酶切鉴定正确后,醋酸锂法转入酵母菌株AH109,铺SD/-Trp-His-Ade /kana(4缺+亮

氨酸)培养基,观察2 wk,排除自激活现象,同时铺SD/-Trp/kana(缺色氨酸)培养基,30℃孵育5-7 d,提取酵母蛋白质用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和Western免疫印迹法验证NS2TP在酵母中的表达.挑取在SD/-Trp培养基上生长的pGBKT7-HBeAg质粒的酵母AH109单个菌落(2-3 mm)接种于SD/-Trp培养基中,30℃ 250 r/min振摇16-24 h,紫外分光光度计测OD₆₀₀ = 0.8-1.0时与1 mL的白细胞文库酵母细胞在50 mL 2×YPDA中30℃ 30-50 r/min配合18-24 h,离心用1×YPDA 8 mL重悬细胞,分别取220 μ L铺于15 cm的SD/-Trp-Leu-His(3缺),SD/-Trp-Leu-His-Ade(4缺)培养基各25块上,同时将配合产物按1:100、1:1 000、1:10 000铺于SD/-Trp, SD/-Leu, SD/-Trp-Leu培养基上检验配合效率.30℃孵育6-18 d.挑取大于直径3 mm的菌落再次画线于铺有X- α -gal的4缺培养基上检查X- α -gal酶活性,在此培养基上能生长且变成蓝色的为真阳性菌落.按照试剂盒提供的操作指南Lyticase法提取酵母质粒,转化大肠杆菌DH5 α ,于含有氨苄青霉素的SOB平板筛选阳性克隆,BgIII酶切鉴定插入200-1 000 bp的序列后进行测序.结果提交GenBank比对,进行生物信息学分析。

2 结果

NS2TP的PCR扩增结果(图1),DNA测序鉴定后EcoR I、BamH I双酶切克隆入酵母表达载体pGBKT7,应用Vector NTI Suite 8.0分析质粒pGBKT7-NS2TP,

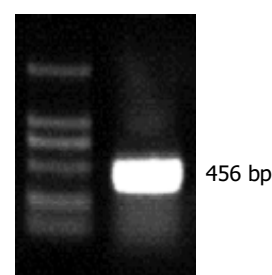


图1 NS2TP RT-PCR.

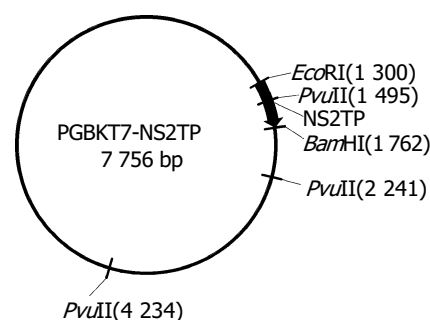


图2 应用Vector NTI Suite 8.0分析质粒pGBKT7-NS2TP, PvuII酶切应得到三个片段:746 bp, 1 993 bp, 5 017 bp.

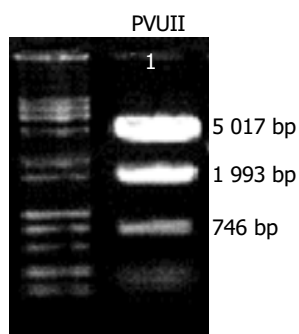


图3 pGBKT7-NS2TP质粒 *Pvu*II 酶切.

选择 *Pvu*II 进行酶切鉴定, 应得到三个片段, 分别为: 746 bp, 1 993 bp, 5 017 bp (图2). 酶切鉴定结果见图3. 将“诱饵”载体 pGBKT7-NS2TP 构建后转化到酵母AH109后能够稳定表达NS2TP融合蛋白(图4). 阳性对照组含有DNA结合片段Gal41-147氨基酸及c-Myc标签的总分子量为 M_r 20 757, 实验组因表达NS2TP融合蛋白为 37 518. Western免疫印迹分析结果显示转化pGBKT7质粒组在 M_r 201 000 后有一特异表达带, 转化pGBKT7-NS2TP质粒的酵母提取物于 M_r 38 000 左右有明显条带. 以1:1 000稀释的配合产物在SD/-Trp, SD/-Leu, SD/-Trp-Leu培养基生长的克隆数分别为: 57, 81, 7. 计算可得Y187的成活性为 5.7×10^8 cfu/L, 为限制部分, 二倍体的成活性为 7×10^7 cfu/L, 配合效率为12.3%. 4缺/X- α -gal培养基筛选真阳性菌落(图5). 部分筛选克隆BglIII酶切鉴定结果见图6. 挑选42个阳性克隆进行测序, 得到25种已知蛋白基因及3种未知功能基因(表1).

3 讨论

酵母双杂交系统3, 利用a型和 α 型酵母配合形成二倍体细胞内诱饵质粒与文库质粒所表达的蛋白质可以相互作用的原理, 免去了需要共转染文库质粒与诱饵质粒所带来的低效率问题. 而且由于有3个报告基因用来筛选及严格的对照阳性率达到95%以上. 本课题组应用抑制性消减杂交技术发现、注册并体外克隆了HCV NS2反式调节新基因NS2TP, 为研究NS2TP的



图5 蓝色为阳性, 白色为阴性4缺/X- α -gal培养基筛选真阳性菌落.

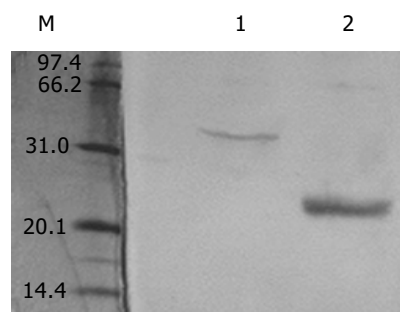


图4 pGBKT7-NS2TP蛋白 Western免疫印迹分析. 1: pGBKT7-NS2TP实验组; 2: pGBKT7 阳性对照组.

生物学功能, 我们采用酵母双杂交技术筛选了白细胞文库中NS2TP蛋白结合蛋白的基因, 得到细胞色素p450 2E1 (CYP2E1)、核心蛋白聚糖 (Decorin, DCN)、P68、 β 2 微球蛋白、羧肽酶 N2, 金属硫蛋白 2A, 胰岛素样生长因子、纤维蛋白原等, 均在细胞因子相互作用网络中具有重要的作用, 与生物信息学分析结果一致, 下面对部分结合蛋白的功能进行阐述.

CYP2E1 属P450 (CYP) 超家族, 是一类重要的氧化代谢酶, 他不仅参与催化多种外源性物质, 如小分子溶剂、癌前物质和药物, 而且参与内源性物质的代谢, 如脂肪酸和酮体^[1]. CYP2E1 可被乙醇诱导, 同其他细胞色素P450相比, 可以产生更多的活性氧, 如超氧自由基和H₂O₂, 在酒精性肝病的机制中起到重要作用. 除此外, 游离脂肪酸 (FFA) 也是CYP2E1的重要底物之一, 可诱导CYP2E1升高, 脂质过氧化加剧, 导致抗氧化能力减弱, 氧化与抗氧化机制失衡的结果是自由基的生成增多, 自由基不但氧化细胞膜的脂质, 更重要的是氧化细胞膜的蛋白, 最终导致肝细胞结构与功能的损害, 因此CYP2E1也被认为与非酒精性脂肪肝的预后密切相关^[2]. 戴军 *et al*^[3] 研究发现正常肝组织内, CYP2E1 表达仅见于中央静脉周围区, 主要表达于肝腺泡 III 区, 肝细胞质和细胞膜可见CYP2E1表达, 但在CCL₄模型肝组织中, 其表达强度增加, 分布的方式亦发生改变, 可见于肝腺泡 I 和 II 区, 与肝细胞脂肪变分布相一致, 在假小叶的肝细胞中不见表达, 认为CYP2E1表达与肝纤维化发生有关. 而NS2TP

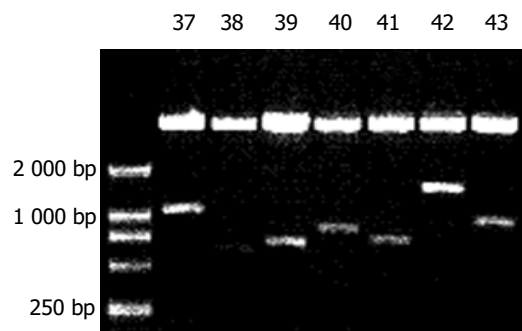


图6 部分筛选克隆 *Bgl*III 酶切鉴定.

表1 筛选阳性克隆测序后在 GeneBank 上的比对结果

序号	已知的同源序列编码蛋白	相同克隆数	同源性(%)
1	线粒体基因	4	98
2	β 2 微球蛋白	2	100
3	补体 1 因子	1	100
4	金属硫蛋白 2A	2	100
5	contactin 4	1	100
6	胰岛素样生长因子	1	99
7	羧肽酶 N2	1	99
8	细胞色素 p450 2E1	1	99
9	载脂蛋白 H	5	99
10	硒结合蛋白	1	100
11	CD200 细胞表面糖蛋白	1	100
12	硒蛋白	3	98
13	P68	1	97
14	Zn- α -2 糖蛋白	3	99
15	Decorin	1	99
16	丝氨酸/半胱氨酸蛋白酶抑制剂	1	100
17	甘露糖结合蛋白	1	100
18	激肽原	1	99
19	乙酰乙酰 C o A 硫解酶	1	100
20	Ga 黏素	1	100
21	纤维蛋白原	1	100
22	真核翻译起始因子 3	1	97
23	甘氨酸胺基转移酶	1	98
24	白蛋白	2	100
25	血管紧张素原	1	97
26	未知功能基因 1-3	3	97-100

可能作为 HCV NS2 与 CYP2E1 作用的中间桥梁, 其具体的作用有待于进一步研究.

除 CYP2E1 外, 我们还对 DCN 很感兴趣, 他属于小分子、间质性、富含亮氨酸蛋白聚糖家族成员, 是一种多效性分子, 有抑制细胞生长的作用, 参与构成调控细胞增殖的负反馈环路. 研究表明, DCN 和细胞膜上细胞外液 (ECF) 受体结合, 启动了 MAP 激酶/P21 等的信号转到途径^[4]. Kotaka *et al*^[5] 证明肝癌细胞和正常肝细胞相比 DCN 表达明显下降. 而 HCV NS2 下调 NS2TP 的表达, 是否使其对 DCN 抑制细胞生长的协同作用减弱, 导致肝炎后肿瘤的发生. P68 是另一个与

NS2TP 结合的重要蛋白, 他的首次发现是因为他与 SV40 大 T 抗原免疫交叉反应^[6], 属于 DEAD 盒 RNA 解旋酶超家族, 具有高度保守性, 定位于细胞分裂末期的新鲜核仁, 参与 RNA 的剪切、加工、转录和翻译, 具有重要的功能. 研究发现^[7], HCV NS5B 可与内源性 P68 相互作用, NS5B 的过表达可引起 P68 的重新分布, 即从核仁到胞质. 在转染 HCV RNA 全长基因的细胞中, 采用 siRNA 技术敲除内源性 P68 基因, 结果发现以正链 RNA 为模板形成的负链 RNA 显著减少, 而在 NS5B 过表达的细胞中, 虽保留 P68 基因仍然可引起负链 RNA 显著减少, 推测 NS5B 可与 P68 结合从而阻断 P68 与病毒复制酶的作用, 引起病毒复制减少. 而在我们的研究中, 作为 NS2 下调的蛋白 NS2TP 也可与 P68 结合, 究竟有发挥着什么作用, 是否是 HCV NS2 下调 NS2TP 蛋白, 使 P68 释放, 从而催化病毒复制酶的活性, 使病毒复制得以顺利进行.

总之, NS2TP 可能介导 HCV 病毒和宿主相互作用, 是各种导致病毒清除和慢性感染以及肝病发生发展过程中很重要的一个环节, 而作为一种新基因, 对他的进一步研究将为阐明 HCV 感染及慢性肝炎、肝纤维化和肝癌的病理机制提出新的思路.

4 参考文献

- Lieber CS. Cytochrome P-450E1: its physiological and pathological role. *Physiol Rev* 1997;77:517-544
- Chalasani N, Gorski JC, Asghar MS, Asghar A, Foresman B, Hall SD, Crabb DW. Hepatic cytochrome P450E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003;37:544-550
- 戴军, 陆伦根, 曾民德, 李继强, 华静, 茅益民, 范竹萍, 彭延申, 邱德凯. 肝细胞色素 P450 2E1 在实验性肝纤维化组织中的表达. *肝脏* 2000;5:16-17
- Hino N, Higashi T, Nouse K, Nakatsukasa H, Tsuji T. Apoptosis and proliferation of human hepatocellular carcinoma. *Liver* 1996;16:123-129
- Kotaka M, Chen GG, Lai PB, Lau WY, Chan PK, Leung TW, Li AK. Analysis of differentially expressed genes in human hepatocellular carcinoma using suppression subtractive hybridization. *Br J Cancer* 2001;85:228-234
- Ford MJ, Anton IA, Lane DP. Nuclear protein with sequence homology to translation initiation factor eIF-4A. *Nature* 1988;332:736-738
- Goh PY, Tan YJ, Lim SP, Tan YH, Lim SG, Fuller-Pace F, Hong W. Cellular RNA helicase p68 relocalization and interaction with the hepatitis C virus (HCV) NS5B protein and the potential role of p68 in HCV RNA replication. *J Virol* 2004;78:5288-5298

编辑 潘伯荣 审读 张海宁