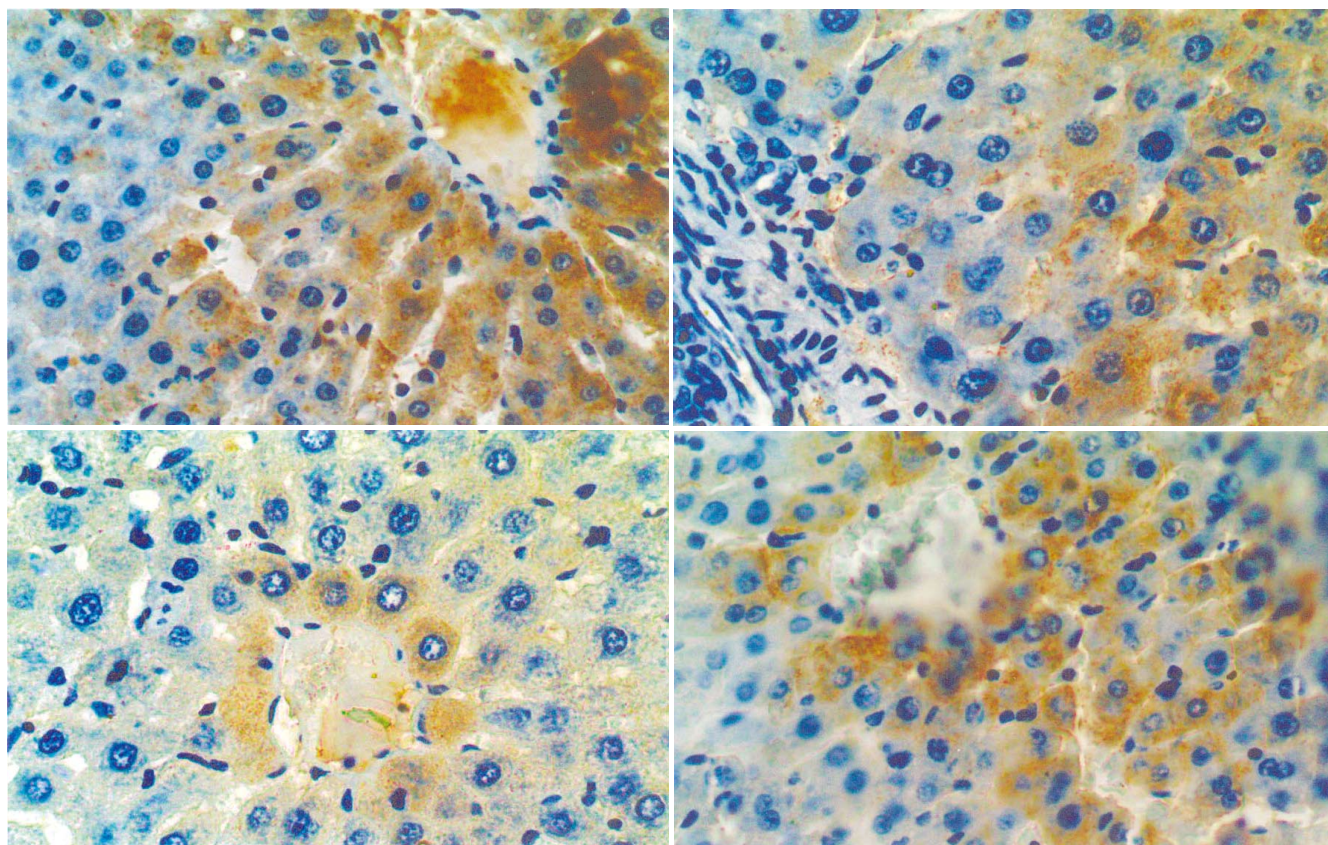


世界华人消化杂志

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2005 年 10 月 15 日 第 13 卷 第 19 期 (Volume 13 Number 19)



19/2005

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10月15日

第13卷

第19期

(总第147期)

述

评

- 2289 胃癌表遗传学的研究进展 滕玥, 戴冬秋
2294 胃肠癌术后应用抗生素致伪膜性肠炎 马振海, 戴冬秋, 徐惠绵

基础 研究

- 2297 谷氨酰胺对大鼠肝脏缺血再灌注损伤时肝组织谷胱甘肽含量和Bcl-2、Bax蛋白表达的影响
贾昌俊, 戴朝六, 张旭, 徐锋, 崔凯, 许永庆
2302 生存素siRNA表达质粒对MGC-803细胞增殖的影响
赵伟红, 郭俊明, 肖丙秀, 管忠, 肖东升
2306 人F3-GRIM19基因的克隆与表达 孙厚良, 刘洋, 李甲初, 曾昭淳
2310 解偶联蛋白-2在大鼠非酒精性脂肪肝中的表达
顾小红, 张云东, 冯爱娟
2314 COX-2在Barrett食管和食管腺癌中的表达及意义
刘心娟, 王邦茂, 阎雪燕, 刘文天, 吕宗舜, 张洁
2318 奥曲肽联合汉防己甲素对人胃癌细胞增殖的影响
王龙, 朱金水, 陈维雄, 朱励, 达伟, 王秀玲
2323 EB潜伏膜蛋白表达与肠上皮化生胃黏膜幽门螺杆菌感染的相关性
刘东屏, 于继红, 李茵茵, 王炳元
2327 瘦素及硬脂酰CoA去饱和酶-1在高脂饮食大鼠非酒精性脂肪肝发病中的作用
陆元善, 范建高, 方继伟, 丁晓东, 杨兆瑞
2332 从肠肌间神经丛抑制性神经递质的改变探讨IBS不同亚型的发病机制
徐俊荣, 罗金燕, 尚磊, 孔武明

临 床 研究

- 2339 便秘型肠易激综合征结肠黏膜组织蛋白质组双向凝胶电泳分析
彭丽华, 杨云生, 孙刚, 王巍峰
2343 生理盐水冲洗提高多层CT门脉造影图像质量的临床研究 肖亮, 徐克

文 献 综 述

- 2349 与胃癌相关的DNA甲基化研究进展 张晔, 袁媛
2355 胃肠黏膜抗损伤和修复新进展 王玮, 孙梅
2360 钙和维生素D预防结直肠癌的机制及其临床应用 陆嵘, 房静远
2364 重症急性胰腺炎并发肾损害的发病机制 张喜平, 王蕾

研究 快报

- 2371 应用抑制性消减杂交技术克隆乙型肝炎病毒DNA PTP1的反式调节基因
高学松, 成军, 甄真, 郭江, 张黎颖, 陶明亮
2375 活血健脾补肾法对结肠炎小鼠结肠组织TNF- α 及其mRNA表达的影响
张永锋, 陈如山, 吴正治, 李明, 陈曼茵
2378 蜜调通关散及其拆方对家兔肠道作用机制 梁劲军, 黄阳勇, 庆方
2381 复方甘草甜素下调细胞周期素依赖性激酶1启动子表达
王志凌, 成军, 张连峰, 邵凤娟, 刘蔚, 刘妍, 陶明亮

临 床 经 验

- 2386 内镜下双重色素法联合超声内镜对食管早期癌及癌前病变的诊断价值
刘一品, 黄留业, 李延青
2389 中医药对乙型肝炎患者肝癌前期状态的干预17例
屠红, 张菁, 成伟中, 韩镭, 陆敏, 曹宏伟, 陈复华, 耿沁
2392 奥沙拉秦钠对溃疡性结肠炎一氧化氮合酶表达的影响 郝俊鸣, 江学良, 佟艳铭
2395 应用SELDI-TOF-MS技术建立直肠癌筛选血清蛋白质指纹图谱模型
闫志勇, 钱冬萌, 丁守怡, 宋旭霞, 王斌
2398 消化道肿瘤CT动脉造影分析83例 朱晓玲, 冯妹婷
2401 脐血与新鲜冰冻血浆治疗慢性重型肝炎的疗效比较
卢家桀, 唐红, 王晓辉, 刘真真, 叶慧

致 谢	2404 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	2293 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 2301 第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议征文通知 2309 2006年世界华人消化杂志由半月刊改为旬刊出版发行 2317 第一届全国临床营养支持学术会议通知 2326 2006年即将召开的国际会议 2331 消化道肿瘤外科治疗2006高级论坛征文通知 2338 《世界华人消化杂志》欢迎投稿 2348 WJG和世界华人消化杂志全文网站免费开通 2363 首届北京地坛感染病学术会议 2385 2006年第5届全国肝脏疾病学术研讨会议征文通知
封面故事	贾昌俊, 戴朝六, 张旭, 徐锋, 崔凯, 许永庆. 谷氨酰胺对大鼠肝脏缺血再灌注损伤时肝组织谷胱甘肽含量和 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(19):2297-2301 http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2297.asp
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 www.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

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

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 2005-10-15
原刊名 新消化病学杂志

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

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

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.

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.

2005年版权归世界胃肠病学杂志社所有

ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

邮发代号
82-262

国外代号
M 4481

国内定价
每期24.00元 全年576.00元

广告经营许可证
1401004000050

www.wjgnet.com

World Chinese Journal of Digestology

October 2005 Contents in Brief Volume 13 Number 19

EDITORIAL

Advancement in research of gastric cancer epigenetics

Teng Y, Dai DQ 2289

Pseudomembrane colitis induced by usage of antibiotic after gastric intestinal cancer operation

Ma ZH, Dai DQ, Xu HM 2294

BASIC RESEARCH

Effects of glutamine on glutathione content and expression of Bcl-2 and Bax protein during hepatic ischemia and reperfusion injury in rats

Jia CJ, Dai CL, Zhang X, Xu F, Cui K, XU YQ 2297

Effects of survivin siRNA expression plasmid on proliferation of MGC-803 cells

Zhao WH, Guo JM, XIAO BX, Guan Z, Xiao DS 2302

Cloning and expression of human F3-GRIM19 gene

Sun HL, Liu Y, Li JC, Zeng ZC 2306

Expression of uncoupling protein 2 in nonalcoholic fatty liver of rats

Gu XH, Zhang YD, Feng AJ 2310

Expression of COX-2 in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma and its significance

Liu XJ, Wang BM, Yan XY, Liu WT, LV ZS, Zhang J 2314

Inhibitory effects of tetrandrine combined with octreotide on proliferation of gastric cancer cell lines cultured *in vitro*

Wang L, Zhu JS, Chen WX, Zhu L, Da W, Wang XL 2318

Relationship between expression of Epstein-Barr virus latent membrane protein and *H pylori* infection in gastric mucosa with intestinal metaplasia

Liu DP, Yu JH, Li YY, Wang BY 2323

Roles of leptin and stearyl-CoA desaturase-1 in pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease induced by a fat-rich diet

Lu YS, Fan JG, Fang JW, Ding XD, Yang ZR 2327

Role of inhibitory neurotransmitter of myoenteric plexus in carcinogenesis of irritable bowel syndrome with different subtypes

Xu JR, Luo JY, Shang L, Kong WM 2332

CLINICAL RESEARCH

Proteomic analysis of colonic mucosa by two-dimensional gel electrophoresis in constipation-predominant irritable bowel syndrome

Peng LH, Yang YS, Sun G, Wang WF 2339

Clinical application of normal saline flush in multi-detector CT photography on portal vein

Xiao L, Xu K 2343

REVIEW

Advancement in research of gastric cancer related DNA methylation

Zhang Y, Yuan Y 2349

New advancement in rehabilitation and anti-damage of gastric intestinal mucosa

Wang W, Sun M 2355

Mechanism and clinical usage of calcium and vitamin D in prevention of rectal cancer

Lu R, Fang JY 2360

Mechanism of severe acute pancreatitis combined with renal damage

Zhang XP, Wang L 2364

BRIEF REPORT

Cloning of hepatitis B virus DNA PTP1 transactivating genes by suppression subtractive hybridization technique

Gao XS, Cheng J, Zhen Z, Guo J, Zhang LY, Tao ML 2371

Effects of *Huoxue*, *Jianpi* and *Bushen* recipe on expression of TNF- α and its mRNA in mice with colitis

Zhang YF, Chen RS, Wu ZZ, Li M, Chen MY 2375

Effects of *Mitiao Tongguansan* decoction and its different ingredients on function of intestinal tract in rabbits

Liang JJ, Huang YY, Qing F 2378

Down-regulatory effects of glycyrrhizin on expression of cyclin-dependent kinase 1 gene promoter

Wang ZL, Cheng J, Zhang LF, Shao FJ, Liu W, Liu Yan, Tao ML 2381

CLINICAL PRACTICE

Evaluation of double staining combined with endosonography in detection of early esophageal cancer and precancerous lesions

Liu YP, Huang LY, Li YQ 2386

Traditional Chinese Medicine intervention for development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B: an analysis of 17 cases

Tu H, Zhang J, Cheng WZ, Han L, Lu M, Cao HW, Chen FH, Geng Q 2389

Effects of olsalazine sodium on expression of nitric oxide synthase in patients with ulcerative colitis: an analysis of 36 cases

Hao JM, Jiang XL, Tong YM 2392

Establishment of serum protein pattern model for screening rectal carcinoma by SELDI-TOF-MS

Yan ZY, Qian DM, Ding SY, Song XX, Wang B 2395

Analysis of artery computed tomography angiography for digestive tumor in 83 cases

Zhu XL, Feng ST 2398

Indexed/Abstracted by Chemical Abstracts, EMBASE/ Excerpta Medica and Abstract Journals

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

World Chinese Journal of Digestology Monthly
Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date October 15, 2005

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of

World Chinese Journal of Digestology
PO Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Overseas Distributor

China International Book Trading Corporation
PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press
PO Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381901

Fax: +86-10-85381893

Email: wjcd @ wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2005 by The WJG Press

应用抑制性消减杂交技术克隆乙型肝炎病毒DNA PTP1的反式调节基因

高学松, 成军, 甄真, 郭江, 张黎颖, 陶明亮

高学松, 成军, 郭江, 张黎颖, 陶明亮, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011

甄真, 河北医科大学第三医院感染科 河北省石家庄市 050051

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: 2005-03-01 接受日期: 2005-07-05

Cloning of hepatitis B virus DNA PTP1 transactivating genes by suppression subtractive hybridization technique

Xue-Song Gao, Jun Cheng, Zhen Zhen, Jiang Guo, Li-Ying Zhang, Ming-Liang Tao

Xue-Song Gao, Jun Cheng, Jiang Guo, Li-Ying Zhang, Ming-Liang Tao, Institute of Infectious Diseases, Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Zhen Zhen, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No.C03011402, No.C30070689; Returned Scholarship of General Logistics Department of Chinese PLA, No.98H038; the Key Technology Research and Development Program of Chinese PLA during the 9th Five-Year Plan Period, No.98D063; the Key Technology Research and Development Program of Chinese PLA for Distinguished Young Scholars during the 10th Five-Year Plan Period, No.01Q138; and the Scientific Research Program of Chinese PLA during the 10th Five-Year Plan Period, No.01MB135

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

Received: 2005-03-01 Accepted: 2005-07-05

Abstract

AIM: To clone and identify the new target genes transactivated by DNAPTP1 of the hepatitis B virus with the suppression subtractive hybridization technique and bioinformatics.

METHODS: The mRNA was isolated from HepG2 cells transfected with pcDNA3.1 (-)-DNAPTP1, and then it was transcribed into the cDNA. The pcDNA3.1 (-) empty vector was used as control. After digested by *Rsa* I, the tester cDNA was then divided into two groups and ligated with two different adaptors. After the tester cDNA was hybridized twice with the driver cDNA and underwent two times of nested polymerase

chain reaction (PCR), the amplified cDNA fragments were subcloned into pGEM-Teasy plasmid vectors to construct the subtractive library. The library was amplified by *E. coli* strain DH5 α . The randomly picked cDNA was sequenced and analyzed in the GenBank after the PCR.

RESULTS: The cDNA subtractive library of HBV PTP1 transactivating genes was successfully constructed. The amplified library contained 60 positive clones, from which 32 inserts with 200-1 000 bp in length were obtained. Three differentially expressed protein genes and 4 sequences with unknown function were found by sequence analysis.

CONCLUSION: The obtained genes may code the proteins involved in the regulation of cell cycle, metabolism, immunity and cell apoptosis.

Key Words: Hepatitis B virus; DNA polymerase; Trans-regulation; Suppression subtractive hybridization

Gao XS, Cheng J, Zhen Z, Guo J, Zhang LY, Tao ML. Cloning of hepatitis B virus DNA PTP1 transactivating genes by suppression subtractive hybridization technique. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(19):2371-2374

摘要

目的: 应用抑制性消减杂交技术及生物信息学技术筛选并克隆乙型肝炎病毒DNA PTP1反式激活的新型靶基因。

方法: 以HBV DNAPTP1表达质粒pcDNA3.1(-)- DNAPTP1转染HepG2细胞, 以空载体pcDNA3.1(-)为对照; 制备转染后的细胞裂解液, 提取mRNA并逆转录为cDNA, 经*Rsa* I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聚合酶链反应(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DNAPTP1反式激活基因差异表达的cDNA消减文库。文库扩增后得到60个白色克隆, 经菌落PCR分析, 得到32个200-1 000 bp插入片段。对所得片段测序, 并进行同源性分析, 获得3个差异表达的已知蛋白基因和4个未知功能的染色体序列。

结论: 筛选到的cDNA全长序列, 包括一些与细胞生长调节、物质代谢、免疫及细胞凋亡密切相关的蛋白编码基因, 推测了DNAPT1可能存在的调控机制的线索。

关键词: 乙型肝炎病毒; DNA聚合酶; 反式调节; 抑制性消减杂交

高学松, 成军, 甄真, 郭江, 张黎颖, 陶明亮. 应用抑制性消减杂交技术克隆乙型肝炎病毒DNAPT1的反式调节基因. 世界华人消化杂志 2005;13(19):2371-2374

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2371.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)是嗜肝DNA病毒的一种, HBV DNA的长度为3.2 kb, 具有4个开放读码框架(ORF), 分别编码HBV的表面抗原蛋白、核心/e抗原蛋白、X蛋白以及HBV DNA聚合酶(HBV DNA P)^[1-3]. HBV DNA P基因产物是一种多蛋白, 参与病毒复制的全过程, 每一成分蛋白分别在不同环节发挥作用. 目前只知道HBV DNA P在HBV的复制过程中具有聚合酶/逆转录酶的活性, 但是, HBV DNA P在肝细胞中表达之后, 对于肝细胞本身有什么样的影响一直没有系统的研究. HBV DNA P蛋白在肝细胞中产生之后, 通过对于肝细胞信号转导的影响, 改变肝细胞的基因表达谱, 这是HBV感染肝细胞的重要的致病机制.

我们已经应用抑制性消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)技术^[4,5]研究了HBV DNA P的反式激活靶基因, 筛选到了一系列未知功能基因, 其中一个命名为乙型肝炎病毒DNA聚合酶反式激活蛋白1(human gene 1 transactivated by hepatitis B virus DNA polymerase, DNAPT1)^[6]. 为进一步研究DNAPT1与乙型肝炎病毒致病性的关系, 我们应用抑制性消减杂交技术, 筛选DNAPT1蛋白反式激活作用相关的靶基因, 为研究DNAPT1蛋白的生物学功能及乙型肝炎病毒致病机制提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2细胞及感受态大肠杆菌DH5 α (本室保存), pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen), FuGENE6转染试剂(Roche), mRNA纯化试剂盒(Amersham Pharmacia Biot ech), PCR-Select cDNA Subtraction试剂盒(Clontech), 50 \times PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning试剂盒(Clontech), High Pure PCR Product纯化试剂盒(Boehringer Mannheim), T7、SP6通用引物及pGEM-Teasy载体(Promega). HBV DNAPT1真核表达质粒pcDNA3.1(-)-DNAPT1由本室构建.

1.2 方法

1.2.1 真核表达载体的细胞转染 用FuGENE6转染试剂将2 μ g pcDNA3.1(-)-DNAPT1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 细胞mRNA提取 用mRNA纯化试剂盒, 直接提取转染了重组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.

1.2.3 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: 转染了重组表达质粒及空载体的HepG2细胞cDNA分别标记为Tester和Driver, 经*Rsa* I消化, 产生相对较短的平端片段, 纯化酶切产物. 将Tester的cDNA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 cDNA进行杂交; 合并两种杂交产物后再与Driver cDNA做第2次杂交; 最后将杂交产物做选择性PCR扩增, 使Tester cDNA中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增.

1.2.4 消减文库扩增及克隆鉴定分析 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16-18 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, 产物经20 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定, 证明含有插入片段(200-1 000 bp)后, 测序(上海联合基因公司). 应用生物信息学将测得序列与GenBank数据库进行同源性分析.

2 结果

2.1 mRNA的定性、定量分析 使用高质量的mRNA是保证cDNA高产量的前提. 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mRNA分别为3.74 μ g和4.22 μ g, $A_{260}/A_{280} = 2.17$, 10 g/L琼脂糖凝胶电泳见mRNA为>0.5 kb清晰慧尾片状条带.

2.2 dscDNA两端连接效率检测 将连接有Adaptor 1和Adaptor 2的两组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. 结果显示两组dscDNA扩增产物浓度相当, 说明dscDNA已与接头高效率连接.

2.3 cDNA消减文库消减效率的鉴定 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 mL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).

2.4 差异表达cDNA片段的扩增及克隆 杂交产物经两轮PCR扩增后, 凝胶电泳显示部分差异表达的cDNA条带, 这些条带可能代表差异表达的基因片段. 对差异表达基因片段进行菌落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60个克隆中几乎均含有插入片段(图2).

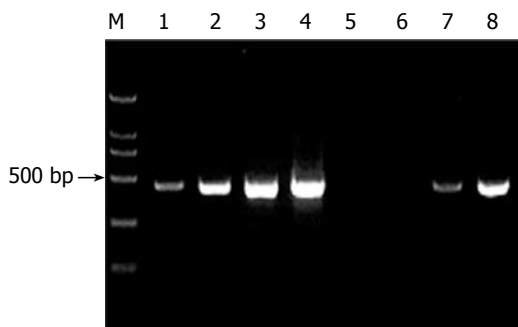


图1 消减效率分析结果. 1-4: 未消减组; 5-8: 消减组, 循环次数分别为18, 23, 28, 33.

2.5 cDNA测序与同源性分析初步结果 对32个克隆测序, 与GenBank数据库进行初步比较. 其中19个克隆分别与5条未知功能染色体序列同源, 可能代表了某些新基因. 其余31个均与已知基因的部分序列高度同源

表1 阳性克隆插入片段与GenBank同源序列比较结果

已知的同源序列编码蛋白	相同克隆数	同源性(%)
甲胎蛋白	1	100
细胞分裂周期素26 (CDC26)	2	100
原胶原-脯氨酸 α 多肽1 (脯氨酰-4羟化酶 α 多肽1 P4HA1)	1	96
酪蛋白激酶2 β 多肽 (CK2B)	1	99
线粒体39S核糖体蛋白L27	1	100
细胞色素C氧化酶8A亚单位(COX8A)	1	99
丝氨酸/苏氨酸激酶25	1	100
帕金森病蛋白7	1	98
核糖体蛋白质S3	1	100
苏氨酰基tRNA合成酶	1	100
人类蛋白酶体 α 亚型7	1	88
未知功能序列	12	95-100

(85-100%)(表1).

3 讨论

HBV DNA P存在于Dane颗粒核心内, 是一种依赖于DNA的DNA聚合酶, 其功能与修补及延伸双链DNA的短链有关. HBV DNA P基因在ORF中最长, 并且与C、S、X基因区有重叠, 其编码的P蛋白含有3个功能域和1个无意义的间隔区, 分别是末端蛋白(TP)、反转录酶(RT)和RNA酶H(RNase H), 各区段分别在2 307-2 840 nt、133-1 128 nt、1 129-1 621 nt, 其间的2 841-0-132 nt为不编码的间隔区. 在4个区域中, 末端蛋白作用独特, 末端蛋白内的第96位酪氨酸残基可引导DNA合成, 并使多聚酶与病毒DNA共价结合, 间隔区无已知的功能, 只是将末端蛋白和其他分子连接起来, 反转录酶和RNase H包含2个已知的酶活性位点, 后两者与其他相关的逆转录病毒和逆转录因子的多聚酶是一致的^[7-11]. 既往的研究多集中于HBV DNA P在病毒生活周期中的作用机制, 但随着对HBV致病机制研究的深入, 发现许多病

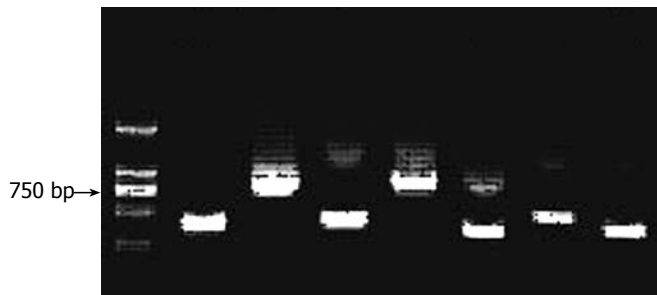


图2 部分克隆(C12-23)菌落PCR鉴定电泳图.

毒基因组的反式激活蛋白, 以其表达产物的间接方式参与另外一些基因的功能调节. 由于受到不能从病毒体直接纯化和在不同的系统中表达有活性酶的限制, 目前对聚合酶及其所编码的各个功能区域蛋白质的功能的认识还不是很清楚. 肝细胞内表达的DNAPT1是否也能激活某些特定基因的表达? 这些表达产物对细胞的损害、增生分化的作用如何? 基于上述研究目的, 我们采用抑制性消减杂交方法, 克隆DNAPT1基因片段转染细胞, 反式激活差异表达的基因, 构建其cDNA消减文库, 为今后进一步分析和研究病毒蛋白的致病机制奠定基础.

与传统的方法比较, SSH方法具有实验周期短、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. 实验应用SSH方法成功地构建了DNAPT1反式激活相关基因差异表达的cDNA消减文库, 随机挑选32个克隆测序, 并与GenBank数据库进行同源性比较分析, 其中包括一些细胞内结构与细胞生长相关蛋白, 如线粒体蛋白、核糖体蛋白, 在细胞生长、分化、黏附中发挥重要作用; 甲胎蛋白与肝细胞恶性增生相关, 作为肝细胞癌的血清标志物已被公认; 分裂后期促进复合物(APC)是一种细胞周期调节泛素-蛋白连接酶, 调节有丝分裂中的重要事件, 例如分裂后期的起始与末期的退出. 细胞分裂周期素26(CDC26)是其家族成员, 对于细胞分裂、分化起重要作用^[12]. 细胞色素C氧化酶是一种线粒体呼吸链的末端转移酶, 细胞色素C氧化酶8对于细胞内最高呼吸水平和细胞色素C氧化酶的活性至关重要^[13]. 原胶原-脯氨酸 α 多肽1(脯氨酰-4羟化酶 α 多肽1, P4HA1)在胶原合成中发挥重要作用. 它通过使脯氨酸羟基化来催化4-羟脯氨酸的形成. 与肝纤维化、肝硬化形成过程密切相关^[14]. Sakaida *et al*^[15]研究脯氨酰-4羟化酶抑制剂(HOE 077)在小鼠的肝纤维化的形成中的作用时发现, 该抑制剂可以抑制脯氨酸羟基化和星状细胞的激活, 从而降低原胶原和组织金属蛋白酶抑制剂1(TIMP-1) mRNA的表达. 有学者研究发现, 细胞缺氧导致细胞外基质主要是胶原的合成与分解的平衡被打破, 可以上调原胶原-脯氨酸 α 多肽在转录和翻译的水平, 在纤维肉瘤细胞HT1080中, 短期的缺氧有利于原胶

原-脯氨酸 α 多肽的表达和抑制MMPs的合成。但在长期缺氧时,抗纤维化的机制占了主导作用,虽然原胶原-脯氨酸 α 多肽仍在高水平表达,但胶原形成是由MMPs合成与活性抑制的解除决定的^[16]。胶原病理沉积,肝小叶结构紊乱,肝细胞功能受损最终导致肝纤维化、肝硬化的形成。脯氨酰-4羟化酶是细胞内胶原处理的关键酶。使用其抑制剂S 4682可以在培养的肝星状细胞中降低羟脯氨酸的合成。使用C14标记脯氨酸,可以发现S 4682可以抑制肝内胶原的羟基化。在CCl₄造成的肝损伤模型中,血清III型原胶原N肽(PIIINP)显著升高,使用S 4682降低胶原沉积和PIIINP水平,减少了腹水的发生^[17]。蛋白激酶CK2是一种普遍存在的丝氨酸/苏氨酸激酶,是一种稳定的 $\alpha_2\beta_2$ 的四聚物。 α 为接触反应亚基, β 亚基为调节亚基。在体外CK2 β 亚基在调节CK2的接触反应中发挥核心作用。CK2 β 亚基的N末端包含的最小功能域:两个锌指结构域是CK2 β 二聚体结构的中枢,特异序列是核运输的工具。在这个区域包含核运输的信号系统^[18]。通过CK2 β 介导,蛋白激酶CK2可以使CDC25B磷酸化,调节CDC25B的活性,在有丝分裂的起始阶段发挥重要作用^[19]。Shimada *et al*^[20]在使用酵母双杂交筛选人类疱疹病毒6直接早期(immediate early, IE)蛋白2结合蛋白时发现CK2 β 可与HHV-6 IE2特异性结合,并被体外免疫共沉淀等试验证实,说明CK2 β 在病毒的复制中可能影响病毒和细胞RNA的转录和翻译。人免疫缺陷病毒-1(HIV-1)Rev蛋白是转录后调节蛋白,穿梭于感染细胞的细胞核和细胞质之间,通过控制mRNAs的核浆转运的速率调节HIV蛋白的表达,HIV Rev蛋白的磷酸化严格依赖CK2 β ,磷酸化位点外的底物(substrate)的构象改变可以明显改变HIV Rev蛋白的磷酸化。同时Rev调节CK2的多种属性,如自磷酸化作用、对钙调蛋白的接触反应活性和聚阳离子效应剂的灵敏度,他们的共同特性就是都包含有 β 亚单位^[21]。以上提示DNAPT1可能与病毒感染后的转录与翻译有关。

通过对DNAPT1的上述反式激活基因的分析,我们发现其在细胞内表达后,部分涉及细胞生长、分化、物质和能量代谢、信号转导、肿瘤发生等方面的基因表达增加,提示DNAPT1对体内多个系统都存在影响。

4 参考文献

- 1 成军,杨守纯.现代肝炎病毒分子生物学.第1版.北京:人民军医出版社 1997; 44-104
- 2 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
- 3 成军.乙型和丙型肝炎病毒与肝细胞之间相互作用的分子生物学机制研究进展.世界华人消化杂志 2002; 10: 109-211
- 4 Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F,

- Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 6025-6030
- 5 Rebrikov DV, Desai SM, Siebert PD, Lukyanov SA. Suppression subtractive hybridization. *Methods Mol Biol* 2004; 258: 107-134
- 6 张黎颖,成军,邓红,王春花,刘妍.乙型肝炎病毒DNA聚合酶逆转录酶蛋白反式调节基因1的克隆化研究.胃肠病学和肝病杂志 2004; 13: 466-470
- 7 骆抗先.乙型肝炎基础和临床.第2版.北京:人民卫生出版社, 2001; 27-28
- 8 Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, Schinazi RF. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* 2001; 33: 751-757
- 9 zu Putlitz J, Lanford RE, Carlson RI, Notvall L, de la Monte SM, Wands JR. Properties of monoclonal antibodies directed against hepatitis B virus polymerase protein. *J Virol* 1999; 73: 4188-4196
- 10 Wang X, Hu J. Distinct requirement for two stages of protein-primed initiation of reverse transcription in hepadnaviruses. *J Virol* 2002; 76: 5857-5865
- 11 王春花,郎振为,成军,吴煜,杨艳杰,张黎颖,党晓燕.应用抑制性消减杂交技术筛选HBV DNA聚合酶中RNase H的反式调节基因.世界华人消化杂志 2004; 12: 1564-1568
- 12 Gmachl M, Gieffers C, Podtelejnikov AV, Mann M, Peters JM. The RING-H2 finger protein APC11 and the E2 enzyme UBC4 are sufficient to ubiquitinate substrates of the anaphase-promoting complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 8973-8978
- 13 Huttemann M, Schmidt TR, Grossman LI. A third isoform of cytochrome c oxidase subunit VIII is present in mammals. *Gene* 2003; 312: 95-102
- 14 Helaakoski T, Veijola J, Vuori K, Rehn M, Chow LT, Taillon-Miller P, Kivirikko KI, Pihlajaniemi T. Structure and expression of the human gene for the alpha subunit of prolyl 4-hydroxylase. The two alternatively spliced types of mRNA correspond to two homologous exons the sequences of which are expressed in a variety of tissues. *J Biol Chem* 1994; 269: 27847-27854
- 15 Sakaida I, Uchida K, Hironaka K, Okita K. Prolyl 4-hydroxylase inhibitor (HOE 077) prevents TIMP-1 gene expression in rat liver fibrosis. *J Gastroenterol* 1999; 34: 376-377
- 16 Fahling M, Perlewitz A, Doller A, Thiele BJ. Regulation of collagen prolyl 4-hydroxylase and matrix metalloproteinases in fibrosarcoma cells by hypoxia. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2004; 139: 119-126
- 17 Bickel M, Baringhaus KH, Gerl M, Gunzler V, Kanta J, Schmidts L, Stapf M, Tschank G, Weidmann K, Werner U. Selective inhibition of hepatic collagen accumulation in experimental liver fibrosis in rats by a new prolyl 4-hydroxylase inhibitor. *Hepatology* 1998; 28: 404-411
- 18 Filhol O, Nueda A, Martel V, Gerber-Scokaert D, Benitez MJ, Souchier C, Saoudi Y, Cochet C. Live-cell fluorescence imaging reveals the dynamics of protein kinase CK2 individual subunits. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 975-987
- 19 Theis-Febvre N, Filhol O, Froment C, Cazales M, Cochet C, Monsarrat B, Ducommun B, Baldin V. Protein kinase CK2 regulates CDC25B phosphatase activity. *Oncogene* 2003; 22: 220-232
- 20 Shimada K, Kondo K, Yamanishi K. Human herpesvirus 6 immediate-early 2 protein interacts with heterogeneous ribonucleoprotein K and casein kinase 2. *Microbiol Immunol* 2004; 48: 205-210
- 21 Meggio F, Marin O, Boschetti M, Sarno S, Pinna LA. HIV-1 Rev transactivator: a beta-subunit directed substrate and effector of protein kinase CK2. *Mol Cell Biochem* 2001; 227: 145-151