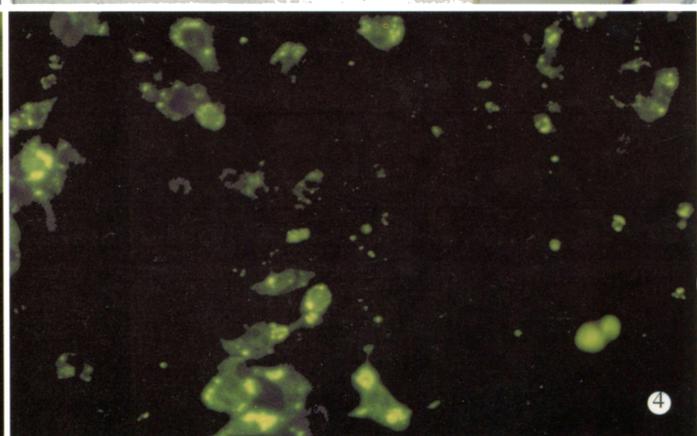
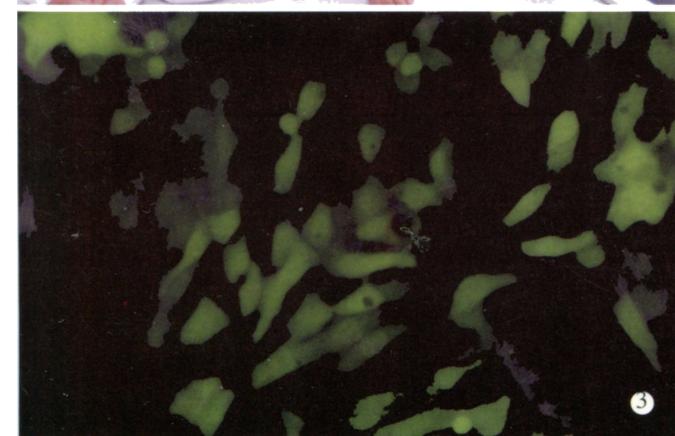


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003年4月15日 第11卷 第4期 (Volume 11 Number 4)



4/2003

ISSN 1009-3079



名誉总编辑
潘伯荣
总编辑
马连生

World Journal of Gastroenterology® 被 SCI®-E, Research Alert®, Current Contents®/Clinical Medicine, Journal Citation Reports®, Index Medicus, MEDLINE, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001年 JCR® 报告 WJG 影响因子 1.445. 世界华人消化杂志® 被 Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001年中国科技期刊引证报告: 世界华人消化杂志® 影响因子 3.733, WJG 影响因子 2.920.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

目次

2003年4月15日 第11卷 第4期(总第108期)

述评	373 新基因结构与功能研究的策略 成军
病毒性肝炎	378 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 成军,李克,陆荫英,王琳,刘妍
	385 酵母双杂交技术筛选Hcbp6结合的肝细胞蛋白编码基因 王琳,李克,成军,陆荫英,张健,陈天艳,洪源,刘妍,王刚,钟彦伟
	389 噬菌体表面展示技术筛选 HCBP6 人源单链可变区抗体 钟彦伟,成军,张忠东,孙敏,李强,李克,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅
	394 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 刘妍,成军,李克,杨倩,陆荫英,王琳,王建军
	399 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 牟劲松,刘妍,王刚,成军,段惠娟,李克,陆荫英,王琳,王惠芬
肝癌	404 单克隆抗体3A5-复方中药安迪偶联物的肝癌导向治疗 梁军,孙纪元,谢艳华,栗燕,闫露,王四旺
	408 树突状细胞内外对肝癌细胞的抑制作用 郭建巍,秦力维,蔡美英,吕同德
	411 肝癌组织中survivin蛋白表达的意义 陈涛,贾玉容,田伏洲,蔡忠红,李广阔
	415 热休克蛋白70与IL-2对小鼠肝癌移植模型的治疗比较 傅庆国,沈晓东,孟凡东,郭仁宣
	419 肝癌DC疫苗活化的CTL对人肝癌裸鼠皮下移植瘤的抑制作用 郭建巍,秦力维,蔡美英
基础研究	422 HBeAg肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆 陆荫英,王琳,李克,刘妍,成军,张玲霞
	426 酵母双杂交技术筛选HBeAg肝细胞结合蛋白基因 陆荫英,王琳,成军,李克,刘妍,张玲霞
	430 大鼠肝卵圆细胞的生物学特征 陈耀凯,王宇明,李俊刚,郎松
	434 肝硬变大鼠肝部分切除术后残肝TGF- α 、HGF、PCNA和IGFBP-1s mRNA的变化 陈平,李昆,董家鸿,韩本立
	438 细菌内同源重组法构建HBV S区和C区基因非复制型腺病毒载体及其体外表达 黄呈辉,欧阳玲,马会慧,汤正好,李刚,姚集鲁
	442 大鼠肠巨噬细胞TNF α 表达及复方大承气汤的影响 陈海龙,王辉,李文利,范琦
	446 家兔回肠淋巴管铸型的扫描电镜研究 滕诚毅,王晓平,魏双艳,王广友,汤凤彩
焦点论坛	450 酵母单杂交技术的原理及应用 马守东,洪源,成军
	451 酵母双杂交系统的原理及应用 陈天艳,成军,张树林
	456 抑制性消减杂交技术原理及应用 杨倩,成军,刘妍,王建军,张树林
	459 噬菌体展示技术的原理及应用 张忠东,成军,张树林
	461 基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用 刘妍,成军,王建军,杨倩,陆荫英
	464 丙型肝炎病毒与JAK-STAT信号转导系统 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳
	466 丙型肝炎病毒与MAPK信号转导系统 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳
	469 肿瘤抑制因子p21/waf1与肝炎病毒复制与表达的调节研究 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳
	472 乙型肝炎病毒对细胞信号转导的影响 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳
	474 生物信息学技术与新基因的研究 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳
研究快报	478 中药复方肠安泰对肠癌肺转移模型小鼠肠黏膜固有层B细胞及IL-12的影响 王文萍,王垂杰,姜良铎,饭乡正明
	481 细胞外信号调节激酶在胃癌组织中的表达及其与幽门螺杆菌感染的关系 褚传莲,李延青,张燕,李文婕,赵宪邨

研究快报	483 实验性肝纤维化形成过程中几种基质金属蛋白酶表达的研究 李保森,游绍莉,赵志海,辛绍杰,赵景民,王松山 486 鼠肝移植对胃黏膜损伤的实验研究 褚延魁,马庆久,鲁建国,刘维,何显力,杜锡林,乔庆,王胜智
临床经验	488 重叠丙型肝炎病毒感染在慢性乙型肝炎患者肝脏病变中的作用 商庆华,于建国,徐传镇,肖德明,尹燕明,陈崇兴,张光曙 491 正常人胃左静脉的声象图及血流动力学特征 夏建国,董胜翔,李凤华 494 手术与非手术治疗重症急性胰腺炎 120 例 金世龙,候庆福,顾红光,王仁云,廖维健
消息	388 欢迎订阅 2003 年度世界华人消化杂志 393 欢迎订阅 2003 年度 World Journal of Gastroenterology® 398 中国科技期刊走向世界的步伐正在加快 403 世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版目次 407 提供您使用世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版 414 世界华人消化杂志和 WJG 获得商标注册 418 美国国立医学图书馆 2002 年度收录中国医学期刊名单 425 世界胃肠病学杂志英文版获得 2003-2004 年国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助 433 WJG 搭建我国消化学基础和临床研究惟一国际交流的平台 437 世界胃肠病学杂志英文版获得第二届国家期刊奖百种重点期刊 477 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊
征文通知	429 第五届上海国际肝癌肝炎会议征文启事 480 全国第八届中西医结合普通外科学术研讨会征文通知
电子版	2003 世界华人消化杂志电子版 http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2003.htm 2002 世界华人消化杂志电子版 http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2002.htm 2001 世界华人消化杂志电子版 http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2001.htm 2003 World J Gastroenterol 电子版 http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2003.htm 2002 World J Gastroenterol 电子版 http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2002.htm 2001 World J Gastroenterol 电子版 http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2001.htm
读者来信	493
封面故事	377 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

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
(月刊)

创刊 1993-01-15
改刊 1998-01-25
出版 2003-04-15
原刊名 新消化病学杂志

总顾问 陈可冀	张金哲
黄象谦	张学庸
黄志强	赵东海
黎介寿	周殿元
刘耕陶	社长总编辑 马连生
裘法祖	中文编辑 潘伯荣
汤钊猷	王瑾晖
王宝恩	英文编辑 任师颜
危北海	排版 李少华
吴孟超	校对 李天华
吴咸中	

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
E-mail: wjgd@wjgnet.com
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)85381892
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 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)85381892
传真:(010)85381893
2003 年版权归世界胃肠病学杂志社所有

本刊已被国内外
检索系统收录
美国《化学文摘(CA)》
荷兰《医学文摘库/医学文摘(EM)》
俄罗斯《文摘杂志()》
中国科技论文统计与分析
中国学术期刊文摘
中国中医药信息服务网
中国生物医学文献光盘数据库
《中文科技资料目录(医药卫生)》
中国生物医学期刊目次数据库
中国医学文摘外科学分册(英文版)
中国医学文摘内科学分册(英文版)

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.

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 288.00 元	1401004000050

COMMENTARY

Strategy in study the structure and function of novel gene
Cheng J 373

VIRAL HEPATITIS

Bioinformatics analysis of human hepatitis C virus core protein-binding protein 6 gene and protein

Cheng J, Li K, Lu YY, Wang L, Liu Y 378

Screening of gene encoding of hepatic proteins interacting with Hcbp6 via yeast two hybridization

Wang L, Li K, Cheng J, Lu YY, Zhang J, Chen TY, Hong Y, Liu Y, Wang G, Zhong YW 385

Screen for human single chain variable region in antibody against human hepatitis C virus core protein binding protein 6

Zhong YW, Cheng J, Zhang ZD, Sun M, Li Q, Li K, Wang L, Li L, Zhang LX, Chen JM 389

Gene expression profile of HepG2 cell transfected with hepatitis C virus core protein-binding protein 6 gene

Liu Y, Cheng J, Li K, Yang Q, Lu YY, Wang L, Wang JJ 394

Cloning of genes transactivated by NS3 protein of HCV with suppressive and subtractive hybridization

Mu JS, Liu Y, Wang G, Cheng J, Duan HJ, Li K, Lu YY, Wang L, Wang HF 399

LIVER CANCER

Effect of monoclonal antibody 3A5 coupled with Chinese medicine compound Andi in targeted treatment of hepatocellular carcinoma

Liang J, Sun JY, Xie YH, Li Y, Yan L, Wang SW 404

Inhibition of dendritic cells against hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*

Guo JW, Qin LW, Cai MY, Lu TD 408

Expression of survivin protein in hepatocellular carcinoma tissues and its relationship with clinical pathological features and prognosis.

Chen T, Jia YR, Tian FZ, Cai ZH, Li GK 411

Comparison of therapeutic efficacy between tumor-derived heat shock protein 70 and interleukine-2

Fu QG, Shen XD, Meng FD, Guo RX 415

Cytotoxic lymphocytes primed by DC based hepatocellular carcinoma vaccine against growth of carcinoma xenograft on nude mice

Guo JW, Qin LW, Cai MY 419

BASIC RESEARCH

Screening and cloning of gene encoding HBcAg interacting protein in hepatocytes

Lu YY, Wang L, Li K, Cheng J, Liu Y, Zhang LX 422

Screening of HBcAg interacting proteins in hepatocytes with yeast-two hybrid technique

Lu YY, Wang L, Li K, Liu Y, Cheng J, Zhang LX 426

Biological characteristics of rat hepatic oval cells

Chen YK, Wang YM, Li JG, Lang S 430

Changes of TGF- α , HGF, PCNA and IGFBP-1s mRNA after partial hepatectomy in rat liver

Chen P, Li K, Dong JH, Han BL 434

Construction of replication-deficient recombinant adenoviral vector carrying HBV S and C region gene by homologous recombination in bacteria and its expression *in vitro*

Huang CH, Ou-Yang L, Ma HH, Tang ZH, Li G, Yao JL 438

TNF α expression and effects of Dachengqi Decoction compound in gut macrophages

Chen HL, Wang H, Li WL, Fan Q 442

Lymphatic corrosion casts in rabbit ileum: scanning electronmicroscopic studies

Teng CY, Wang XP, Wei SY, Wang GY, Tang FC 446

FOCUSED FORUM

Principle and applications of yeast single hybridization

Ma SD, Hong Y, Cheng J 450

Principle of yeast two hybridization and its applications

Chen TY, Cheng J, Zhang SL 451

Principle and applications of suppressive and subtractive hybridization technique

Yang Q, Cheng J, Liu Y, Wang JJ, Wang SL 456

Principle of phage display technique and its application

Zhang ZD, Cheng J, Zhong YW, Zhang SL 459

Gene chip technique in the pathogenesis of viral hepatitis

Liu Y, Cheng J, Wang JJ, Yang Q, Lu YY 461

Hepatitis C virus and signal transduction system of JAK-STAT

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 464

Hepatitis C virus and signal transduction system of MAPK

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 466

Tumor inhibitive factor p21/waf1 and regulation of replication and expression of hepatitis virus

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 469

Effect of Hepatitis B virus on cellular signal transduction

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 472

Study on Bioinformatics and new gene

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 474

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi \$

World Chinese Journal of Digestology
Monthly \$ \$

Founded on 15th January, 1993

Renamed on 25th January, 1998

Publication date 15th April, 2003

Honorary - Editor - in - Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor - in - Chief

Lian-Sheng Ma

ISSN 1009-3079 **CN** 4-1260/R

Edited by Editorial Board of World Chinese Journal of Digestology
P.O.Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

77, Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Overseas Distributor China International Book Trading Corporation
P.O.Box 399, Beijing 100044, China **Code No.**M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

P.O.Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381892

Fax: +86-10-85381893

Email: wjcd @ wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

Copyright © 2003 by The WJG Press

Indexed/

Abstracted by

Chemical Abstracts

EMBASE/

Excerpta Medica

Abstract Journal

新基因结构与功能研究的策略

成 军

成军,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
成军,男,1963-08-17生,山东省淄博市人,汉族.1986年毕业于第一军医大学军医学系,获医学学士学位,1989年毕业于军医进修学院,获传染病学硕士学位,1994年毕业于北京医科大学,获传染病学博士学位,1994-11-17至1997-12-01在美国得克萨斯大学健康科学中心临床免疫与传染病学完成博士后研究.回国后从事传染病特别是病毒性肝炎的临床医疗工作和基础研究工作,主要学术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,已出版专著5部,发表论文及综述300篇.
国家自然科学基金资助课题, No. C39970674, No. C03011402, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
项目负责人:成军,100039,北京市丰台路26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:2002-10-29 接受日期:2002-11-18

摘要

发现一种新的基因,同时把其编码的新蛋白的结构与生物学功能、与生物学和临床医学之间的相互关系、以及新基因表达调节的机制阐明,是目前基因的分子生物学研究领域中最具挑战性的工作.首先利用酵母双杂交(yeast two-hybrid)技术、酵母单杂交技术(yeast one-hybrid)、抑制性消减杂交(SSH, suppression subtractive hybridization)技术、基因芯片(DNA chip)技术、噬菌体表面展示(phage display)技术等获得蛋白结合蛋白的编码基因、差异表达的基因、DNA/RNA结合的蛋白基因等,或利用生物信息学技术获得推测的编码基因.然后,利用分子生物学技术和生物信息学技术相结合的手段,阐明新基因的功能、基因表达启动子的结构和调节机制基础,最终阐明新基因的结构和新蛋白的生物学功能,以及这种基因研究的可能临床医学意义.生物信息学技术与分子生物学技术的结合,是目前基因的分子生物学研究领域中的重要、有效的研究技术和方法.

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(4):373-377
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/373.htm>

0 引言

人类基因组计划(HGP, human genome project)完成以后,获得了大量的关于染色体DNA的基因序列的信息.这些基因序列,大部分(99%以上)是没有编码功能的重复基因序列,编码基因序列还不到整个基因组长度的百分之一.怎样确定编码基因序列,怎样确定新基因编码的蛋白质的结构与功能,怎样研究编码基因的表达与调节,怎样确定编码产物的生物学与医学的意义,等等,都是摆在我们面前的迫切任务^[1].所有这些内容,都是后基因组计划(post-HGP)的基本内容,也是在今后相当长的一段时

间内,基因的分子生物学研究领域的主要任务和内容^[2].目前,以基因的克隆化为主要目的综合的分子生物学技术结合生物信息学(bioinformatics)技术,是完成这一阶段性任务的重要策略.分子生物学技术研究的结果与数据库技术和计算机分析技术的结合,直接导致了生物信息学技术的产生,并随着分子生物学技术的开展,生物信息学技术不断完善;另外,生物信息学技术的出现,又极大地推动了分子生物学研究的快速发展^[3].

1 编码基因序列的研究

在基因克隆化的创新性科研工作中,首先必须得到感兴趣的编码基因片段.目前有几种技术手段可以应用.特种组织细胞cDNA文库的构建及大规模测序,基因芯片技术高通量筛选技术的应用,既是人类基因组计划的主要工具,也是后基因组计划必不可少的技术途径^[4].但是,由大规模随机测序获得的基因序列,一般来说得到的不是基因的全长序列,更谈不上基因的编码产物及功能.因此,在人类基因组计划基本完成以后,这些技术途径已经不再是主要的技术手段.相反,一些虽然不具备高通量筛选规模,但是功能筛选与基因的克隆化相耦联的研究技术显示出广阔的应用前景^[5].例如,以研究蛋白-蛋白相互结合作用的酵母双杂交技术及酵母三杂交(yeast three-hybrid)技术,由此发展而来的哺乳动物细胞的双杂交技术,就是研究蛋白-蛋白结合功能,同时又是克隆相关基因的技术途径^[6-8].应用这种技术,不仅可以获得蛋白质之间相互结合的功能研究信息,而且还能获得相应的基因序列,因而简洁高效.通过这种技术途径获得的新基因序列,虽然其功能的研究还需要进行许多工作,但是至少可以知道这种新蛋白与已知蛋白之间的结合关系;而蛋白-蛋白之间结合的关系,是研究新基因和新蛋白结构与功能的重要的突破线索.

在分子生物学研究领域,经常会遇到研究两个极为相似领域差异表达基因的筛选.例如,肿瘤组织和正常组织之间基因表达谱的差别,同一种细胞类型受到细胞因子或其他刺激因素作用之后基因表达谱发生的变化,一种基因转染细胞和仅转染空白表达载体之间基因表达谱的差别,发育不同阶段相同组织之间基因表达的不同,病变组织和正常组织之间基因表达的差别等.对于研究的基因类型没有事先的限制和先决条件,因此可以筛选得到已知和未知功能的基因.能够应用的技术类型包括抑制性消减杂交技术(SSH)、任意引物差

异显示逆转录多聚酶链反应(AP-DD-RT-PCR, arbitrary primer differential display reverse transcription polymerase chain reaction)、代表性差异分析技术(RDA, representative differential assay)等^[9-12]。随着噬菌体表面展示技术的不断发展,以及噬菌体展示文库构建及应用的拓展,这种技术不仅可以应用到抗体基因的筛选、模拟表位的筛选、抗独特型单链可变区抗体的筛选等,而且可以应用于蛋白结合蛋白的筛选和DNA/RNA结合蛋白的筛选^[13-22]。应用上述一些分子生物学技术筛选得到的基因片段,虽然只是编码基因区的基因片段,但是为阐明其功能奠定了基础。筛选DNA结合蛋白的技术还包括酵母单杂交技术以及其他一些蛋白质化学技术等。

无论采用的是酵母双杂交技术、酵母单杂交技术、抑制性消减杂交技术、基因芯片技术、还是噬菌体表面展示技术,筛选得到的基因一般都是编码基因的部分片段,要想进一步研究这些新基因的生物学功能和医学意义,必须首先获得编码基因的全长序列。获得全长编码基因的途径,一是分子生物学途径,一是生物信息学结合分子生物学途径,后者在研究中更为有效^[23-31]。既往对于已知基因序列两端未知基因序列的克隆化,根据多聚酶链反应(PCR)技术的原理,设计了特殊的技术方法,如5'-cDNA末端快速扩增法(5'-RACE)和3'-cDNA末端快速扩增法(3'-RACE)。这些技术在扩增cDNA片段两端的未知基因序列克隆中发挥过十分重要的作用。但目前则是生物信息学分析结合分子生物学的时代。利用美国国立生物工程信息学中心(NCBI)建立的核苷酸序列数据库,进行同源基因序列的比对,可以发现与已知功能或推断基因序列的同源基因。如果在这些数据库中没有发现同源的基因序列,还可以与表达序列标签(EST)数据库中的序列进行比对,可以人工拼接成为更长的cDNA片段^[32]。酵母双杂交技术和噬菌体表面展示技术中,由于文库构建过程中基因编码的框架结构是固定的,因此,结合基因序列的比对,以及根据Kozack原则,很容易确定该基因的全长编码序列。

利用5'-RACE或3'-RACE技术,或者结合生物信息学技术,首先确定新基因片段以及新型基因全长编码序列。此时,对于新基因的功能,我们还是知之甚少。此时,除了应用生物信息学技术对于该基因编码的产物进行一级结构和高级结构的预测,或者对于蛋白质分子结构中保守的功能位点进行预测之外,还可以应用前述的酵母双杂交技术,对于新型蛋白结合的蛋白进行筛选,获得重要功能的提示,或构建真核表达载体,利用细胞转染技术,结合DNA芯片和SSH技术,对于这种新型蛋白上调或下调的靶基因进行研究,获得新的线索,为进一步的实验研究设计,提供理论依据,最终阐明该新基因的生物学功能和医学意义^[33]。

如果筛选的是人的基因文库,那么首先得到的是人的cDNA序列。利用人类基因组DNA序列的数据库(htgs)同源序列进行比对,以及依据Chambon原则,可以确定其基因组DNA的序列结构,确定外显子(exon)和内含子(intron)的结构。同时,利用生物信息学技术,结合分子生物学技术,设计特异性核苷酸引物,利用逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)技术获得人、小鼠、大鼠、牛等生物品系的相应的全长编码的cDNA,并进行序列分析。同样,利用生物信息学技术,结合分子生物学技术,设计特异性核苷酸引物,利用PCR技术获得人、小鼠、大鼠等生物品系的相应的全长的基因组DNA,并进行序列分析^[34]。这样,通过分子生物学技术及生物信息学技术,就可以发现或确定新型基因的全长编码基因序列,并可以初步确定这些新基因编码产物的生物学意义或医学意义。

简单生物分子生物学的研究,也是新基因克隆化技术和思想的重要来源。例如:美丽线虫(*C. Elegans*)、果蝇(*Dros. phila*)、拟介南等在西方发达国家的分子遗传学研究中具有重要地位。2002年诺贝尔医学奖的三位获得者,因其在细胞程序化死亡(programmed cell death),即细胞凋亡(apoptosis)的研究领域中成绩卓著而获奖。正是这一重要领域,以美丽线虫作为研究模型,从而为哺乳动物细胞的细胞凋亡研究开辟了新的领域。首先,从美丽线虫的细胞凋亡分子调节机制中发现,Ced-3基因是促进美丽线虫细胞凋亡的重要基因,即细胞自杀基因(suicide gene)。利用生物信息学技术,对于当时核苷酸序列数据库中收录的基因序列和结构特点进行同源性分析,最终发现人白介素-1 β 转换酶(ICE, interleukin-1 β converting enzyme)的结构与之类似,其序列的同源性达到26%。这在线虫与人的这二种遗传背景相距甚远的生物中是绝无仅有的。经过随后的一系列结构与功能的研究,证实ICE基因也是主导哺乳动物细胞凋亡的基因,从而发现了人细胞中的第一个自杀基因。类似的例子还很多。关于线虫、果蝇、拟介南等生物的研究目的也是如此。因此,低等、简单生物系统的分子生物学研究,也是人类新基因克隆化的重要思路和指示源泉。

2 调节基因序列的研究

人类基因组计划获得大量的有关人类染色体基因序列的信息,为编码基因序列的确定提供了很大的帮助,同时为调节基因序列的确定也奠定了坚实的基础。利用分子生物学技术结合生物信息学技术,可以很容易地确定编码基因序列上游具有调节功能的基因序列。调节基因序列的确定是第一步,还必须采取综合的研究策略,对于其调节的特点及其调节的结构基础和机制进行研究。因为生物信息学技术的预测结果还是初步的,因此,其预测结果仅具有一定的参考价值^[35]。

首先,以发现的新基因的编码基因序列作为参照,对人的基因组DNA序列进行同源基因序列的比

对, 寻找与之同源的基因组 DNA 序列, 然后根据确定的翻译起始位点 ATG 三联体密码子, 上游约 3 000 nt 的基因序列, 该基因的调节序列, 特别是核心启动子的结构序列, 基本上就位于其中. 因为大部分的基因调节序列都位于翻译起始位点上游这一部分序列之中, 但是也有例外, 例如有些基因的增强子(enhancer)调节基因序列, 其位置离翻译起始位点可以很远, 甚至在编码基因序列之中. 根据生物信息学分析结果, 确定启动子等主要调节基因序列以后, 就可以着手设计序列特异性引物, 应用 PCR 技术扩增获得这一基因片段. 然后按照正确的方向, 将调节基因序列插入没有启动子序列的报告基因表达载体的上游, 构建新的报告基因表达载体, 利用真核细胞的转染技术, 证实这一段基因序列中存在的启动子序列对于下游报告基因表达的指导作用. 但是, 这种证实的结果只是初步的, 还要进行更为细致的研究. 例如, 利用分子生物学技术, 进行系列缺失突变体的构建, 结合细胞转染和报告基因表达水平的检测, 阐明核心启动子 DNA 序列的结构基础, 为下一步更为细致的研究奠定基础^[36].

真核细胞基因表达的调节机制是多水平的、复杂的, 但主要是转录水平的调节. 转录水平调节的结构基础就是启动子 DNA 序列和与之结合的蛋白质因子, 即细胞核内存在的转录因子蛋白. 通过 DNA 序列的缺失突变体的构建, 可以确定启动子 DNA 序列的基本核心结构, 对于其结合的蛋白质转录因子的类型及其作用机制, 有许多研究途径. 例如经典的研究技术就是同位素标记的 DNA 探针与细胞核蛋白结合的实验研究. 这种技术涉及蛋白质的分离纯化技术, 对于阐明启动子的结合蛋白研究虽然有用, 但效率不高. 酵母单杂交技术, 在筛选启动子 DNA 结合蛋白方面更为有效, 已经有许多成功的研究报道. 另外, 随着噬菌体表面展示技术的不断进步, 结合高质量噬菌体表面展示 cDNA 文库的构建及应用, 利用噬菌体表面展示技术研究启动子 DNA 结合蛋白业已成为可能. 利用引物合成的生物素化, 配合链亲和素的固相包被, 利用生物素-亲和素之间特异性的结合, 很容易实现启动子 DNA 的固相化, 结合表达型 cDNA 噬菌体文库的筛选, 可以筛选得到特定启动子 DNA 的结合蛋白, 阐明特定基因启动子序列的调节基础^[37]. 目前关于启动子 DNA 序列与转录因子蛋白结合的多样性资料已积累了不少, 并且根据这些资料建立的数据库和生物信息学技术也已经出现, 但是, 由于目前关于启动子 DNA 和转录因子蛋白之间结合的研究资料有限, 而且还因为转录因子蛋白及其结合的 DNA 序列的多样性, 目前根据生物信息学技术对于启动子序列与结构的预测、潜在的结合的转录因子蛋白类型的预测结果, 都是十分初步的, 仅供参考, 需要有更为合适的实际的分子生物学技术研究结果进行证实. 研究启动子 DNA 和转录因子蛋白的结合, 有用的研究技术还包括凝胶迟滞(gel retardation)试验, 即电

泳迁移率漂移分析(EMSA, electrophoresis mobility shift assay), 以及超级迁移率分析(super shift assay) 等^[38,39]. 这些都是证实启动子 DNA 与转录因子蛋白特异性结合的有效技术方法.

3 蛋白质分子结构与功能的分析

利用常规的分子生物学技术扩增、克隆一些编码基因, 甚至是采用综合的分子生物学技术获得未知功能的新基因, 目前也不是一件很难的事情. 但是, 获得新的编码基因序列之后, 新蛋白的生物学功能, 甚至其医学意义的研究, 目前仍然是分子生物学研究领域中最有挑战性的任务. 从目前可能实现的分子生物学技术途径来说, 只能是一步一步进行研究, 逐渐积累对于新蛋白功能的认识, 争取在达到一定程度时获得对于这种新蛋白生物学功能认识的突破. 利用 Northern blot 杂交技术, 可以阐明组织细胞的分布特点, 以及生理和病理状态下这种基因表达的方式和表达的水平, 从而据此可以推测这种新基因和新蛋白的生物学和医学意义. 也可以利用酵母双杂交技术, 首先阐明在自然状态下, 这种新型蛋白在细胞内的结合蛋白对象是什么, 因为细胞内蛋白的生物学功能, 蛋白与蛋白之间结合是十分重要的基础, 因此, 如果可以阐明在细胞内结合蛋白的类型, 对于其生物学功能的认识将提供十分重要的线索. 构建这种新型基因的真核表达载体, 转染合适的细胞系, 利用研究差异表达基因的 SSH 技术、表达谱基因芯片技术等, 研究这种新蛋白的表达对于靶细胞中基因表达谱的影响, 如果可以阐明这种蛋白上调或下调的靶基因类型, 将为研究新蛋白的生物学功能提供重要的线索和研究方向.

建立转基因动物(transgenic animal)模型、基因敲除(gene knock-out)模型、基因敲除细胞系等都是研究新基因生物学功能的重要研究技术手段. 对于某些重要功能基因的敲除模型研究, 一定要清楚某些重要基因的缺乏, 可能会导致胚胎发育的重要障碍, 以至于不能顺利建立该基因的基因敲除动物模型, 因此, 必须对于适龄转基因动物胚胎研究, 为阐明新蛋白的生物学功能提供突破口. 利用生物信息学技术对于新蛋白一级结构进行预测, 可以获得蛋白质一级结构中疏水位点的结构信息, 据此可以设计出抗原多肽, 人工合成抗原多肽以后, 可以进行动物免疫制备相应的多克隆抗体, 或者利用人源化单链可变区抗体(ScFv)的噬菌体文库的筛选, 获得特异性的人源化 ScFv. 具备抗体之后, 就可以开展许多研究工作, 例如 Western blot 杂交, 免疫组织化学研究, 阐明这种蛋白表达水平、表达方式与临床疾病演变之间的相互关系, 从而赋予新基因和新蛋白的生物学和医学意义^[40-45]. 虽然利用上述研究技术和研究途径, 不一定完全阐明该基因和蛋白的生物学功能, 但是, 这些结果的获得, 必然为新基因和新蛋白的生物学功能和医学意义研究奠定

坚实的基础,或者提供进一步研究的重要线索,为最终阐明其生物学作用探索出研究技术途径。

基因的分子生物学研究,不仅要发现新的编码基因,而且要阐明新基因的表达与调控机制及其编码产物的生物学功能和医学意义,这是目前基因分子生物学研究领域中最具挑战性的工作。基因分子生物学研究已经积累了大量、丰富的数据资料,在此基础上,结合数据库的建立和计算机分析技术的应用,产生了生物信息学技术这一崭新的交叉学科^[46-50]。分子生物学技术和生物信息学技术相互联系,相互促进。生物信息学技术本身就是从分子生物学技术发展起来的边缘交叉学科,同时生物信息学技术又为分子生物学技术的发展提供理论预测,提高了分子生物学技术的工作效率^[51-54]。但是还应看到,生物信息学技术的出现历史尚短,还很不完全,但相信随着分子生物学技术的不断发展,基因的分子生物学资料的不断积累和数据库的不断扩大,计算机分析技术的不断改进,将产生更为强有力的生物信息学技术,到时反过来促进基因的分子生物学技术的发展,为最终揭秘人体基因组的结构和功能,阐明发病机制,探索新型的疾病治疗和预防技术,为人类的健康事业做出应有的贡献^[55-57]。

4 参考文献

- Jain E. Current trends in bioinformatics. *Trends Biotechnol* 2002; 20:317-319
- Lahm A, Yagnik A, Tramontano A, Koch U. Hepatitis C virus proteins as targets for drug development: the role of bioinformatics and modelling. *Curr Drug Targets* 2002;3:281-296
- Jensen LJ, Gupta R, Blom N, Devos D, Tamames J, Kesmir C, Nielsen H, Staerfeldt HH, Rapacki K, Workman C, Andersen CA, Knudsen S, Krogh A, Valencia A, Brunak S. Prediction of human protein function from post-translational modifications and localization features. *J Mol Biol* 2002;319:1257-1265
- 成军. 临床精粹: 基因芯片技术的原理及其在肝病研究中的应用. *中华肝脏病杂志* 2002;10:302
- Fuchs R. From sequence to biology: the impact on bioinformatics. *Bioinformatics* 2002;18:505-506
- 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 牟劲松, 洪源, 刘妍, 段惠娟, 王刚, 李莉, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白与染色体转位蛋白的相互作用. *中华医学杂志* 2002;82:673-677
- 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 钟彦伟, 段惠娟, 洪源. 应用酵母双杂交技术筛选与克隆肝再生增强因子结合的蛋白基因. *世界华人消化杂志* 2002;10:161-164
- 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
- 刘妍, 成军. HBV 截短的表面抗原蛋白 MHBs' 的反式激活作用. *国外医学病毒学分册* 2000;7:190-193
- 王刚, 刘妍, 牟劲松, 洪源, 邵得志, 张跃新, 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
- 刘妍, 成军, 张跃新, 段惠娟, 牟劲松, 韩萍, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 截短型 HBsAg 中蛋白反式激活基因的克隆. *中华传染病杂志* 2002;20:31-34
- 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 董菁, 洪源, 张跃新, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因. *解放军医学杂志* 2001;26:880-883
- 钟彦伟, 成军, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 张玲霞. 可溶性 HCV 非结构蛋白 NS3 人源单链抗体在大肠杆菌中的表达. *肝脏* 1999;4:73-76
- 钟彦伟, 王松山, 赵景民, 成军, 张玲霞. 抗丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 单链抗体的制备及免疫组织化学研究. *中华实验与临床病毒学杂志* 2001;15:186-188
- 钟彦伟, 成军, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 张玲霞. 丙型肝炎病毒 NS3 蛋白人源基因工程单链抗体的高效表达. *中华肝脏病杂志* 2000;8:171-173
- 钟彦伟, 成军, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 张玲霞. HCV 非结构蛋白 NS3 人源单链抗体的筛选与鉴定. *中华传染病杂志* 2000;18:84-87
- Cheng J, Zhong YW, Liu Y, Dong J, Yang JZ, Zhang LX. Screening and identification of a humanized single chain variable region antibody for hepatitis C virus non-structural 3 protein. *Chin J Immunol* 2000;16:246-249
- 成军, 钟彦伟, 施双双, 倪勤, 夏小兵, 董菁, 王刚, 刘友昭, 王琳, 刘妍, 杨继珍, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒表面抗原人源单链可变区抗体基因的克隆与鉴定. *肝脏* 2000;5:130-132
- 钟彦伟, 成军, 施双双, 夏小兵, 王刚, 杨继珍, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS4A 人源单链抗体的筛选与鉴定. *免疫学杂志* 2000;16:422-424
- 成军, 施双双, 钟彦伟, 夏小兵, 王刚, 王琳, 刘妍, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白可溶性单链可变区抗体在大肠杆菌中的表达. *解放军医学杂志* 2000;25:394-397
- 成军, 钟彦伟, 施双双, 王刚, 董菁, 夏小兵, 杨继珍, 陈菊梅. HCV 非结构蛋白 NS5A 人源单链抗体可变区基因的筛选与鉴定. *中华微生物和免疫学杂志* 2000;20:567
- 钟彦伟, 成军, 施双双, 杨继珍, 董菁, 夏小兵, 李克, 刘妍, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 人源单链抗体的筛选与表达. *中华中西医结合杂志* 2001;2:97-99
- Cheng J, Zhong YW, Liu Y, Yang JZ. Cloning and sequence analysis of an amastin coding gene from *Leishmania major* Abdou. *Chinese Med J* 1999;112:698-700
- 成军, 钟彦伟, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 陈菊梅. 人肝再生增强因子基因组 DNA 的克隆化与序列分析. *传染病信息* 1999;12:62
- 成军, 钟彦伟, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 陈菊梅. 小鼠肝再生增强因子 cDNA 的克隆化与序列分析. *肝脏* 1999;4:138-140
- 成军, 斯崇文, 王勤环. 硕大利什曼原表面蛋白 "无鞭毛体蛋白 (amastin)" 的基因克隆化与序列分析. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志* 2000;18:30-32
- 成军, 钟彦伟, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 陈菊梅. 人肝再生增强因子基因组 DNA 的克隆化与序列分析. *中华肝脏病杂志* 2000;8:12-14
- Cheng J, Zhong YW, Liu Y, Dong J, Yang JZ, Chen JM. Cloning and sequence analysis of human genomic DNA of augmenter of liver regeneration. *World J Gastroenterol* 2000;6:275-277
- 成军, 钟彦伟, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 陈菊梅. 利什曼原虫无鞭毛体蛋白基因的克隆化与序列分析. *中华传染病杂志* 2001;19:27-31
- 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
- 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
- Britton RA, Eichenberger P, Gonzalez-Pastor JE, Fawcett P, Monson R, Losick R, Grossman AD. Genome-wide analysis of the stationary-phase sigma factor (Sigma-H) Regulon of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 2002;184:4881-4890
- Smith VA, Jarvis ED, Hartemink AJ. Evaluating functional network inference using simulations of complex biological systems. *Bioinformatics* 2002;18 (Suppl 1):S216-24
- Heber S, Alekseyev M, Sze SH, Tang H, Pevzner PA. Splicing graphs and EST assembly problem. *Bioinformatics* 2002;18 (Suppl 1):S181-188
- Torshin I. Structural criteria of biologically active RGD-sites for analysis of protein cellular function Da bioinformatics study. *Med Sci Monit* 2002;8:BR301-BR312
- Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, Wang YY, Chan DW. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin Chem* 2002;48:1296-1304
- 董菁, 施双双, 王业东, 皇甫乾坤, 洪源, 李莉, 张玲霞, 成军. cDNA 文库噬菌体展示法的建立及乙型肝炎病毒前 S1 蛋白结合蛋白筛选. *解放军医学杂志* 2002;27:321-322
- Cheng J, Zhong YW, Liu Y, Yang JZ. Dual peak expression of transcriptional factor Oct-1 in apoptotic Jurkat cell line induced by diethylstilbestrol. *Chinese J Immunol* 2000;16:81-83
- 成军, 斯崇文, 王勤环. 己烯雌酚诱导人 T 细胞肿瘤 Jurkat 细胞系凋亡中转录因子 Oct-1 的表达. *北京医科大学学报* 1999;31 (Suppl 2):17-19
- 成军, 钟彦伟, 施双双, 倪勤, 刘妍, 王刚, 董菁, 夏小兵, 刘友昭, 王琳, 李克, 杨继珍, 邵得志, 陈菊梅. HCV 非结构蛋白 NS5A 人源单链可变区抗体基因的筛选与鉴定. *中华实验与临床病毒学杂志* 2001;15:216-218
- 钟彦伟, 成军, 施双双, 夏小兵, 王刚, 杨继珍, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. *中华肝脏病杂志* 2001;9:217-219
- 钟彦伟, 成军, 王刚, 田小军, 陈新华, 李莉, 陈菊梅, 张玲霞. 乙型肝炎病毒核心抗原人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. *中国公共卫生* 2002;

18:153-154

43 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

44 钟彦伟,成军,陈新华,王刚,洪源,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS4A 抗原模拟表位的筛选和鉴定. *免疫学杂志* 2002;18:42-45

45 钟彦伟,成军,田小军,陈新华,李莉,张玲霞,陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 抗原模拟表位的筛选与鉴定. *中华肝脏病杂志* 2002;10:266-268

46 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

47 Blaschke C, Hirschman L, Valencia A. Information extraction in molecular biology. *Brief Bioinf* 2002;3:154-165

48 Stupka E. Large-scale open bioinformatics data resources. *Curr Opin Mol Ther* 2002;4:265-274

49 Walker M, Pavlovic V, Kasif S. A comparative genomic method for computational identification of prokaryotic translation initiation sites. *Nucleic Acids Res* 2002;30:3181-3191

50 Schonbach C, Kun Y, Brusica V. Large-scale computational identification of HIV T-cell epitopes. *Immunol Cell Biol* 2002;80:300-306

51 von Heijne G. Bioinformatics of membrane proteins. *Ernst Schering Res Found Workshop* 2002;17-27

52 Zhu Z, Pilpel Y, Church GM. Computational identification of transcription factor binding sites via a transcription-factor-centric clustering (TFCC) algorithm. *J Mol Biol* 2002;318:71-81

53 Brown CT, Rust AG, Clarke PJ, Pan Z, Schilstra MJ, De Buysscher T, Griffin G, Wold BJ, Cameron RA, Davidson EH, Bolouri H. New computational approaches for analysis of cis-regulatory networks. *Dev Biol* 2002;246:86-102

54 Brzeski H. An introduction to bioinformatics. *Methods Mol Biol* 2002;187:193-208

55 Stein L. Creating a bioinformatics nation. *Nature* 2002;417:119-120

56 Li B, Perabekam S, Liu G, Yin M, Song S, Larson A. Experimental and bioinformatics comparison of gene expression between T cells from TIL of liver cancer and T cells from UniGene. *J Gastroenterol* 2002;37:275-282

57 Bayat A. Science, medicine, and the future: Bioinformatics. *BMJ* 2002;324:1018-1022

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 封面故事 •

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

图 1 中华医学会传染病与寄生虫病学分会副主任委员、中国人民解放军第 302 医院传染病研究所副所长、基因治疗研究中心主任、病毒性肝炎治疗研究首席专家成军博士、教授、主任医师正在进行医疗教学查房。

图 2 基因治疗研究中心实验室一角。

图 3 绿色荧光蛋白(GFP)在小鼠成纤维细胞 NIH 3T3 中的表达。因为 GFP 没有特殊的亚细胞定位,因此 GFP 在 NIH 3T3 细胞中均匀分布。

图 4 基因治疗研究中心在人第 22 号染色体上发现的丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白结合蛋白 6(HCBP6)与 GFP 融合蛋白在 NIH 3T3 细胞中的表达。研究表明,HCBP6 蛋白在细胞中的分布是在细胞核核膜的胞浆侧。

(2003-03-20)

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

成军, 李克, 陆荫英, 王琳, 刘妍

成军, 李克, 陆荫英, 王琳, 刘妍, 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
成军, 男, 1963-08-17生, 山东省淄博市人, 汉族. 1986年毕业于第一军医大学军医系, 获医学学士学位, 1989年毕业于军医进修学院, 获传染病学硕士学位, 1994年毕业于北京医科大学, 获传染病学博士学位, 1994-11-17至1997-12-01在美国得克萨斯大学健康科学中心临床免疫与传染病学完成博士后研究. 回国后从事传染病特别是病毒性肝炎的临床医疗工作和基础研究工作, 主要学术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, 已出版专著5部, 发表论文及综述300篇.

国家自然科学基金资助项目, No.C39970674, C03011402, 归国留学人员科研启动基金资助项目, No.98H038

项目负责人: 成军, 100039, 北京市, 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: 010-6693 3391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2002-10-29 接受日期: 2002-11-28

Bioinformatics analysis of human hepatitis C virus core protein-binding protein 6 gene and protein

Jun Cheng, Ke Li, Yin-Ying Lu, Lin Wang, Yan Liu

Jun Cheng, Ke Li, Yin-Ying Lu, Lin Wang, Yan Liu, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Supported by grants from National Natural Science Foundation of China, No. C39970674, No. C03011402, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA, No. 98H038

Correspondence to: Jun Cheng, MD, PhD, Chief, Professor, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 26 Fengtai Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2002-10-29 Accepted: 2002-11-28

Abstract

AIM: To investigate the structure and function of gene encoding human hepatitis C virus core protein-binding protein 6 (HCBP6) with yeast two-hybrid technique and bioinformatics methods.

METHODS: Yeast two-hybrid technique and bioinformatics method were used to screen and identify the human HCBP6 gene and its amino acid sequences.

RESULTS: Human HCBP6 cDNA and genomic DNA sequences were identified. Human HCBP6 coded for 456 nt and corresponding protein was composed of 152 amino acids. The promoter sequence of HCBP6 gene was identified and promoter motif was predicted by 3 different bioinformatics methods. No intron in HCBP6 gene was identified by homologous search of cDNA and genomic DNA sequence database. The hydrophilic domain was predicted by bioinformatics methods, and the functional domains were determined with online search tools. Mouse HCBP6 gene was identified on the basis of the mouse homologous DNA sequence database. However, all data obtained from bioinformatics analysis were

preliminary and further study is required for confirmation.

CONCLUSION: The bioinformatics is a powerful method for the analysis and prediction of a new gene and corresponding protein. Although the predicted result is not accurate, it provides valuable information for further study.

Cheng J, Li K, Lu YY, Wang L, Liu Y. Bioinformatics analysis of human hepatitis C virus core protein-binding protein 6 gene and protein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(4):378-384

摘要

目的: 克隆丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白结合的肝细胞的蛋白基因, 对新发现的基因及编码产物的结构与功能, 及其基因表达的调节机制的结构基础进行生物信息学分析.

方法: 应用酵母双杂交技术, 以HCV的核心蛋白作为“诱饵(bait)”, 筛选鉴定与其结合的肝细胞中蛋白的编码基因. 应用生物信息学(bioinformatics)技术, 对其中筛选得到的人HCV核心蛋白结合蛋白6(HCBP6)全长基因及其编码产物的一级结构序列, 进行生物信息学分析. 获得该基因的基因组序列, 并利用同源基因序列的比对, 确定该基因在染色体上的定位, 并确定人HCBP6基因的内含子序列. 对其编码上游的基因组DNA序列进行分析, 获得该基因启动子序列的一些信息. 同时, 根据同源基因序列的比较, 确定了小鼠HCBP6的基因序列和氨基酸残基序列. 通过对氨基酸残基序列的疏水性特点的分析, 确定了HCBP6蛋白的潜在的抗原结构位点. 通过蛋白质一级结构的在线计算机软件的分析, 对人HCBP6蛋白质一级结构潜在的功能性结构位点进行了计算机辅助分析预测.

结果: 通过酵母双杂交技术的筛选和鉴定, 结合生物信息学分析, 证实人HCBP6基因由456 nt组成, 编码产物由152 aa组成. 人HCBP6的基因组DNA是没有内含子序列的DNA结构. 通过生物信息学技术分析, 确定人HCBP6基因组DNA定位于人22号染色体上. 在对人HCBP6基因启动子序列的生物信息学分析中发现了几段可能的启动子序列结构, 以及可能的转录因子蛋白潜在的结合位点. 利用同样的技术, 确定了小鼠的HCBP6的基因序列和蛋白质一级结构序列. 对人HCBP6的蛋白质一级结构序列进行分析, 发现在其序列中第80-110氨基酸残基序列之间存在疏水性结构位点, 提示抗原位点所在, 对其进行免疫学分析提供了可能. 利用在线软件, 对人的

HCBP6 蛋白质结构中潜在的功能位点进行了初步的预测, 为进一步研究 HCBP6 蛋白的生物学功能的实验研究, 提供了丰富的信息. 这些生物信息学分析的结果, 虽然目前还只是初步的, 有些还不能被实验所证实, 但是, 对新基因的结构与功能的研究来说, 毕竟这种生物信息学分析, 能够提供一些线索, 对下一步结构与功能分析实验的设计, 具有很大的帮助.

结论: 酵母双杂交技术结合生物信息学技术, 是克隆、分析蛋白结合蛋白的基因, 对于其功能结构域的预测的有效工具, 在病毒性肝炎的致病机制研究中具有重要应用前景.

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(4):378-384
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/378.htm>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)作为输血传播的非甲非乙型病毒性肝炎(NANBH)的主要病原体, 是一种单股正链 RNA 病毒, 属于黄病毒属, 因此 HCV 感染的发病机制与乙型肝炎病毒(HBV)这种 DNA 病毒可能有很大的区别^[1-4]. HCV 与肝细胞之间的相互作用, 可能是 HCV 感染发病机制的重要部分^[5-8]. HCV 基因组编码的核心(core)蛋白除了与 HCV RNA 结合, 保护 HCV RNA 免受 RNA 酶的消化作用, 维持 HCV RNA 的稳定性之外, 还具有一系列不同的生物学调节作用^[9-12]. HCV 核心蛋白作为一种反式激活蛋白, 对感染的肝细胞中基因表达谱产生影响, 同时, HCV 核心蛋白自身结合形成同二聚体结构, 也可以与肝细胞中其他类型的蛋白之间进行结合, 形成异二聚体或多聚体结构, 对肝细胞中的信号转导产生严重干扰. 通过这些生物学作用, 对肝细胞的细胞凋亡、细胞周期进行调节, 从而参与 HCV 感染的发病机制^[13-15]. HCV 感染除了引起急性和慢性病毒性肝炎、肝纤维化、肝细胞癌(HCC), 还包括肝脏脂肪变、B 细胞淋巴瘤、冷球蛋白血症等, 这些病理改变的分子生物学机制, 目前我们还知之甚少, 需要进行细致深入的探索, 以阐明 HCV 感染与这些病理改变之间的相互关系^[16-18]. 本研究我们采用酵母双杂交技术, 以 HCV 核心蛋白作为“诱饵”, 对肝细胞 cDNA 文库进行酵母双杂交筛选, 获得了一些与 HCV 核心蛋白结合的肝细胞中的蛋白的编码基因, 其中包括功能未知基因 6 号, 我们命名为 HCV 核心蛋白结合蛋白 6(HCBP6)^[12,19], 为了阐明 HCBP6 基因的生物功能, 我们对 HCBP6 基因进行了生物信息学分析.

1 材料和方法

1.1 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的酵母双杂交筛选应用酵母双杂交技术筛选 HCV 核心蛋白结合的肝细胞蛋白的研究原理、方法、操作步骤等参考基因治疗研究中心相关的研究论文^[12,17].

1.2 人丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因及蛋白一级结构的确定 利用核苷酸序列数据库和基因序列同源性在线分析途径(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast), 获得与酵母双杂交技术筛选结果同源性的核苷酸序列. 因为构建肝细胞表达型 cDNA 文库时, 插入位点的确定性, 因此, 筛选得到的序列的终止密码子可以根据与插入位点规定的 ORF 结构特点进行确定, 即序列中发现的第一个出现的框架内终止密码子就是该基因的终止密码子^[20]. 上游翻译起始密码子的确定, 就是根据该编码基因序列的三联体密码子结构上溯, 直至没有发现进一步的框架内翻译起始密码子(ATG)为止, 来确定该基因的翻译起始密码子. 另外, 还需要查对新基因的起始密码子是否符合 Kozack 结构原则^[21].

1.3 人丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6同源基因序列的搜索和比较 利用美国国立图书馆国立生物工程信息中心(NCBI)建立的核苷酸数据库(GenBank)以及同源基因序列的在线搜索分析(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)软件进行分析.

1.4 人丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因组结构的确定 以人 HCBP6 的 cDNA 序列为参照, 应用在线分析工具(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)分析, 确定人 HCBP6 的基因组 DNA 的核苷酸序列.

1.5 人丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因启动子的序列分析 首先以人 HCBP6 的 cDNA 序列为参照, 对 GenBank 数据库中与其同源的人基因组 DNA 序列进行搜寻, 确定人 HCBP6 基因组 DNA 序列中编码基因上游约 3 000 nt 的核苷酸序列, 并且认为人 HCBP6 基因启动子序列即位于此段序列之中. 然后采用 NCBI 的 GenBank 核苷酸数据库以及相关的 3 种基因启动子序列在线分析软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/promoter/>)、(http://www.fruitfly.org/cgi-bin/seq_tools/promoter.pl)和(<http://bimas.dcr.t.nih.gov/molbio/proscan/>)版本 1.7, 对潜在的启动子序列和可能的结合的转录因子蛋白的结构位点进行分析.

1.6 人丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6疏水位点的分析 利用核苷酸序列数据库以及在线软件(http://bioinformatics.weizmann.ac.il/hyd-bin/plot_hydroph.pl)对人 HCBP6 蛋白质一级结构序列进行分析, 发现疏水位点, 对 HCBP6 蛋白质一级结构中潜在的抗原位点进行分析预测.

2 结果

2.1 以 HCV 核心蛋白为“诱饵”对肝细胞文库酵母双杂交筛选结果 经过以 HCV 核心蛋白为“诱饵”的肝细胞 cDNA 文库的酵母双杂交筛选, 根据其能够突破 4 重缺陷型培养基的限制而生长, 且能够在 X- β -半乳糖苷酶(X- β -gal)培养基上变成蓝色酵母集落, 确定了能够与 HCV 核心蛋白结合的一系列阳性克隆. 根据克隆的随机编号, 将这一基因编码产物命名为 HCV 核心蛋白结合蛋白 6(HCBP6), 这一 cDNA 克隆的部分序列如图 1 所示. 根据建立肝细胞 cDNA 文库时外源基

因插入载体的位点及其上游翻译起始点 ATG 的序列, 以及此开放读码框架(ORF)的翻译终止密码子(TAA), 确定 HCBP6 基因编码产物羧基末端的这一段多肽片段 (GRVDGYIKVDWQRVEKDMKKAKEQLKIRKSNQIPTEVRS KAEEVVSFVKKNLVTGGFFGGFLLGMAS)是与 HCV 核心蛋白结合的结构域.

TCTATTCGATGATGAAGATACCCCACCAAACCCAAAAAA
 AGAGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTA
 CGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGCCCCGGG
 GATCCGAATTCGCGGCCGCGTCGACGGGTACATCAAAGT
 TGACTGGCAACGAGTGGAGAAGGACATGAAGAAAGCCAA
 AGAGCAGCTGAAGATCCGTAAGAGCAATCAGATACCTAC
 TGAGGTCAGGAGCAAAGCTGAGGAGGTGGTGTCAATTTGT
 GAAGAAGAATGTTCTAGTAACTGGGGGATTTTTCGGAGG
 CTTTCTGCTTGGCATGGCATCCTAAGGAAGATGACCTCA
 TGTTCAATGTTCTGGTTTTTTCCAGCCAGCAGCCTCTA
 CACTCCATCATAGGACATCGAGTCCCTCCTCCTTCTC
 CCATGCCTTCTCCCTGCCATGGCAAATCTGAGTGGCTT
 CTCTAAGCATCTGCTGGTACAAGTCAATGTGGCACCATG
 AGCTTCATGGTGGCAGAAGAGACAATAGTCCTTAGCTCT
 CCTCCAGTACACCCCTACTTGGCCAGTCTGTAGGCCAA
 CAAGAAGGTTCTTTACCCCATGCAAGAACACTTTATG
 AAGAACACATTACCAAGGATGGGTTTTGACCCGTGGGAAG
 GAATTAAGTGGGATNCCTTGAANAANGTTGGTCCCCAAA
 ACCTGNTTTGATTTTTGGGAAAAAGNAAAATAAGCCCCC
 ATTAGAATAAACCTTAAATTGGTGGTNGCCTTGCCATT
 GGGAA

图 1 HCBP6 阳性克隆的部分基因序列. 根据构建肝细胞cDNA文库时外源基因插入位点在EcoRI(GAATTC), 且其中的AA分成2个相邻的三联体密码子, 确定下游的编码产物氨基酸残基序列和终止密码子TAA.

2.2 人丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因序列的确定
 利用NCBI建立的核苷酸数据库同源基因序列的在线分析(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast), 在核苷酸序列数据库中检索, 与我们发现的 HCBP6 同源的核苷酸序列共有 6 个(表 1). 但这些基因序列的功能目前不清楚. 说明我们克隆的人肝细胞基因序列是新型基因序列, 而且在国际上首次证实 HCBP6 与 HCV 核心蛋白有结合功能. 通过核苷酸序列同源性分析发现两个显著的特点: (1)人和小鼠组织中, 都存在 HCBP6 不同的基因类型, 这种基因类型的生物学意义非常重要, 目前还不清楚; (2)人 HCBP6 和利用同样技术筛选鉴定的人 HCV 核心蛋白结合蛋白 1(HCBP1)两种基因序列的同源性在 44 % 以上, 提示这两种基因可能组成一个基因超家族, 也很可能还有其他超家族的成员有待于进一步的研究发现. 从目前的研究结果来看, HCBP6 的基因表达类型以 152 aa 为主, 但其他类型蛋白的生物学意义有待于进一步的研究.

表 1 HCBP6 基因的不同组织细胞来源和基因的剪切型

基因的种属与组织来源	核苷酸长度(nt)	氨基酸残基长度(aa)
人 眼睛 / 视网膜母细胞瘤	456	152
树突状细胞基因序列	417	139
22号染色体基因组 DNA 序列		
小鼠 新生小鼠头	456	152
脑海马回	456	152
睾丸	555	185

从核苷酸序列的同源性比较分析结果确定人 HCBP6 的 cDNA 序列长度为 456 bp, 编码产物 HCBP6 由 152 个氨基酸残基组成. 以此序列上溯, 上游序列中的 ATG 三联体密码子不再是框架内的 ATG; 下游首先出现的终止密码子是 TAA, 所以确定无疑. 本序列的 ATG 翻译起始密码子也符合 Kozack 原则(图 2).

```

ATG GAA ACA TCT GCC CCA CGT GCC GGA AGC
M E T S A P R A G S
CAA GTG GTG GCG ACA ACT GCG CGC CAC TCC
Q V V A T T A R H S
GCG GCC TAC CGC GCA GAT CCT CTA CGT GTG
A A Y R A D P L R V
TCC TCG CGA GAC AAG CTC ACC GAA ATG GCC
S S R D K L T E M A
GCG TCC AGT CAA GGA AAC TTT GAG GGA AAT
A S S Q G N F E G N
TTT GAG TCA CTG GAC CTT GCG GAA TTT GCT
F E S L D L A E F A
AAG AAG CAG CCA TGG TGG CGT AAG CTG TTC
K K Q P W W R K L F
GGG CAG GAA TCT GGA CCT TCA GCA GAA AAG
G Q E S G P S A E K
TAT AGC GTG GCA ACC CAG CTG TTC ATT GGA
Y S V A T Q L F I G
GGT GTC ACT GGA TGG TGC ACA GGT TTC ATA
G V T G W C T G F I
TTC CAG AAG GTT GGA AAG TTG GCT GCA ACA
F Q K V G K L A A T
GCT GTG GGA GGT GGA TTT TTT CTC CTT CAG
A V G G G F F L L Q
CTT GCA AAC CAT ACT GGG TAC ATC AAA GTT
L A N H T G Y I K V
GAC TGG CAA CGA GTG GAG AAG GAC ATG AAG
D W Q R V E K D M K
AAA GCC AAA GAG CAG CTG AAG ATC CGT AAG
K A K E Q L K I R K
AGC AAT CAG ATA CCT ACT GAG GTC AGG AGC
S N Q I P T E V R S
AAA GCT GAG GAG GTG GTG TCA TTT GTG AAG
K A E E V V S F V K
AAG AAT GTT CTA GTA ACT GGG GGA TTT TTC
K N V L V T G G F F
GGA GGC TTT CTG CTT GGC ATG GCA TCC TAA
G G F L L G M A S *
  
```

图 2 人丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 的基因序列和编码的蛋白质一级结构序列.

2.3 人 HCBP6 的基因组 DNA 结构 以人 HCBP6 的 cDNA 序列为参照, 应用 GenBank 数据库分析和在线分析工具(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)分析, 确定人 HCBP6 的 cDNA 与人 22 号染色体的基因组核苷酸序列 100% 同源, 所以将人的 HCBP6 基因定位于第 22 号染色体. 人 HCBP6 基因组序列与其 cDNA 序列完全同源, 未发现内含子(intron)序列.

2.4 人 HCBP6 疏水性位点的分析 利用在线软件(http://bioinformatics.weizmann.ac.il/hyd-bin/plot_hydroph.pl)对人 HCBP6 蛋白质一级结构序列进行分析, 发现疏水位点在蛋白质一级结构的第 80-110 氨基酸残基序列之间. 可以根据此序列人工合成抗原多肽, 进行动物免疫获得抗体或经过噬菌体表面展示技术筛选人源化单链可变区抗体(scFv), 进行免疫组织化学染色, 探讨正常肝组织中或在急性、慢性病毒性肝炎、肝硬化、肝细胞癌的肝组织中 HCBP6 蛋白表达的特点及变化规律.

2.5 人 HCBP6 的编码区上游的基因序列分析 对人 HCBP6 基因组 DNA 序列翻译起始密码子 ATG 上游的序列进行分析, 试图确定调节人 HCBP6 基因启动子序列的结构与调节基础. 对人 HCBP6 基因组序列翻译起始密码子上游的 3 000 nt 的序列(图 3)进行 3 种不同的在线软件的分析, 提示潜在的调节结构基础. 但是, 这些调节的结构基础只是生物信息学的初步分析, 还必须以实际的实验研究结果来进一步证实.

```

1 CCTAGTGCTCCATGATTTATATGGTGGGTGAAATATGAGAATAGAGT
51 ATTCCTTAGTGATAAACAGACATTTCTCCCTGATATCTCTATTGTAAG
101 CATATGTTAAGTGCCTTTTATGAATTACCTCGGTGTTATCTCCTTTATTC
151 CTCAATTTGTGAAGAATAAGCTCCATTTTGTAGATGTAACCTGAGGT
201 TTAGAATTTCTAAAAAGTAAAGTAACTCCAGATCCCTCTTTGTAGGA
251 TATTTTATAAGGTGACTTGGAAAAAGGTAGTGTTTAGAATAGGAGTGGCTC
301 CTGGGTCAATTGCTTTTCTTAAAGTGTCAACACTAATAAATGAATAGGGT
351 TATGTTTTTATTTAATAAAAAATATACAGTAAATGAGCATATACAGTT
401 AAAAGAATTTATAATGTCTGCCACTATAATCAGTTACCAGACAGTTTCA
451 TGGTCCAGAAAAATCCCTAACATAGGGTACTTTTAAACATTTTACAA
501 ATTACAATGAAAAAATTTGTGTAATCTGAACCAAGGCCATTTGAGGAGAA
551 AATAGTTTCTACTTGTAAATGGTAATTTATTTTAAATTTTATAGCAATTT
601 GCAAGTACCTTTTGAAGTATTATACAGTTGTATCTAAAAGTCACTATTA
651 ACTGTAGGGAAAAAAGTTTTGAGTAAACAGTATTTGCAAATATTTACA
701 TTGTATTTTCTCAGGATGTTTATCAGTTTTTGTGAAGTACTGCTACA
751 GTGACAAGACTCCTGAAGTCTCAACTGTAACAAAATTATAAAAACTAAGT
801 GCACATTTACAGACTCTTGGTCCAGTTGGGCTGTGCTTATATAGTCACGC
851 TAGATCCCACCTGATGGCAGCACCTATCTGGGACACTCGGCTTCTGGC
901 AGAGAAGATGGTGGTGCATGCGCTGGCTCTTAAAGCTGTTACAAACAAA
951 CCAAAGCAAGTGAATGGCTAAGCTGCAGGGCAGTGGCATGGGACTGAG
1001 GATTTGTGTTTCTGACAAGTCCAGGTGATGCTAATGCTACTGGCCTAC
1051 TGGCCCTACTTTGAGTAGCATGATTGGAACATTCTCAGCCCAAGAAGTA
1101 TTGGGGTGACTGACTGACTGACAAGCTTGTGGAGAATGCCACTGTCTGA
1151 ATATCTGTCCAGTTTGTATCTAGGCCTAGCGGAAAGGGACTAAACAGAAGT
1201 GCAGTCGATTTCCAGGTGAGGCTATCCAGCATATCTTGCTTATTGGAC
1251 AGATGTTGTCTAAGGTTAAGCCTGTTGTGCTGCACTCAGCAACTCTTT
    
```

```

1301 CCAACAATCTAAAATTATTTCTCAGCTTATTGTGTAATAAGGGTTTGT
1351 GTTCGTGGCTATGGAATTAATATGGCAAGTTTTCTTGTAGTCTCTCAAT
1401 ATCAAAAATAGGAAGGGTTATGTTACAGTTAGAAAAGACCAAAAGTCTAGT
1451 TGCTACAAAGGTTTGTACATTTGAAGTTTGTGGTTGCCATGGCTGGG
1501 CTCCGCTGACTCCAGAAACATCTAACTGGAACATTGCCAGTCTCATGAT
1551 AGGGAAAAATATGGAGAACAATCAGCTGGCTCTTCAAAGTATGCTGGGA
1601 AGTGATGCATATCATTAACTTCCCTCAGCCAAAGCAAGTACATACA
1651 GAGTAGTGGCTGTGGGACTGGGGAAGTATAATCTCCAGGGTAGCAGATA
1701 TTTTTGGACAATAATACAATCTACCATATCTTTCTAATTTTTCTTTGTCT
1751 ACAGTCCGTTTGTGCTGTTACATATTAAGCACTCTACCCTTGTGTT
1801 TGTGCTTCTTTGCTTATAACCCCAAGAAAGAGCCTTATTGTACAGATA
1851 GAAAATTATCTTTAAGAGGTGAAATTTATTTATCTCAGGTCACACACCC
1901 CAGGTGTTAGGATGAGATTCAAAATCCAAGTCTGCTCTTCAAGTTCAC
1951 CCTGCTGGAAGAATTTTGGCCCTGGCAGACTAGAGGGCAGACCCGAA
2001 CAAACTAGTTTTAGCTGGAAGTAAATAGACATCTGTTTCGATCTGAC
2051 AGCTTTTGGGATTAATACCCTTTATTTGTTAAAATAATTGAGCTAAAATA
2101 CGTTTTGTTTCATCCCATAAACCTATGGTGACAGAACAGAGAGCTACAT
2151 TCTAAAATTTGAAACAGATTGAGAAATGAGCTGAAAGTAAAGTTTTGGT
2201 CTGATTTCTACTAATCTTTTTTCTCCATTAATGCTGGATTCATGTTCTT
2251 CAGTAGCTCTCCCTCCCTCTGCCATCCAGTAAAGATATATATGTTGTA
2301 TATGTGTGTGTGTATATATACATATACACATATATACACATATACA
2351 TATATATACACATATAATACATATATACACATATATATACATATACAC
2401 ATATATACATATATATACACATATATAGATATATACATGCACACATACTT
2451 TTTTTGAGAGAAGTATTAAGGCAACTAATAACAGTTTTTCAAGTCTTCCAA
2501 AACAAATGATTAGAAAAGTCTTCTATTACATAAGTTTTTATCGCTCCAAT
2551 CAGCACAGTCTTGAATGCCATTTTTGCAGCGAGTTCTGGGAATGCAGGCA
2601 CAGTCAGCAAAGAAAACAGTATCACATCTCCAGCCTGAACACTTTGGGCA
2651 CTGTAAAACACTAGACAATTTTTATTTTAAAAACCATAACTGTTAAAAT
2701 GTCAAGGTGGACTGAAAAAGATATTATTGGAAAAGAAAATAGCCCCCTGGA
2751 TCTTAAAAATATTAGTGAAAACCTGCCAGCAGGAAAAATGTCAGATGTTT
2801 ATTAAAGATTCTACATATTTGGGTGAAAGAAATTTGTACTTTGAAAAGCCA
2851 AGACAAGTACTACCCCTCACCATCAGCCTAAAAATAAAGTACTGACATA
2901 TTACATAAATAAGAAAGGGTGTCTACACCCGCCGCTGAGCTCTGTGATGT
2951 AGCCGCTTGGGAGACTGCAAGCAGCCACGGCGCCCTCTCCGTGGGA
3001 ATG
    
```

图 3 人 HCBP6 基因上游非编码区基因序列.

第一种分析方法:采用在线分析软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/promoter/>), 以预测值为 2.0 作为其判断的 cut-off 值, 分析结果如下:

Promoter 2.0	Prediction	Results
Sequence, 3003 nucleotides		
Position	Score	Likelihood
600	0.596	Marginal prediction
1 000	1.055	Highly likely prediction
1 500	0.585	Marginal prediction

第二种分析方法:采用在线分析软件(http://www.fruitfly.org/cgi-bin/seq_tools/promoter.pl)进行分析, 以预测值为 0.80 作为其判断的 cut-off 值, 分析结果如下: Promoter predictions for 1 eukaryotic sequence with score cutoff 0.80 (transcription start shown in larger font):

3 讨论

研究新基因的结构与功能是目前分子生物学研究领域中最为具有挑战性的工作之一^[22,23]. 特别是人类基因组计划(HGP)完成以后, 进入到后基因组计划(Post-HGP), 新基因的功能研究任务更为紧迫. 随着各种生物种类基因序列的测定, 已经积累了大量的核苷酸序列, 建立了基因序列强大的数据库, 同时, 关于基因序列, 特别是编码的蛋白质一级结构序列和功能结构位点保守序列的数据库的建立, 结合计算机和计算机网络技术的不断进步, 使我们可以通过对基因序列和蛋白质序列的比较分析, 进行结构与功能相互关系的预测, 为进一步的分子生物学研究提供方向和理论根据^[24-26]. 但是, 应该清醒地认识到, 目前对基因序列和蛋白质一级结构序列的功能位点的认识还是初步的, 已经积累的核苷酸和蛋白质一级结构的数据库还是非常初步的, 关于这些数据的计算机分析工具也还是初步的, 因此, 关于这些数据的生物信息学分析结果, 还只能是具有一定的参考意义. 这些基于核苷酸和蛋白质结构特点、数据库的建立以及计算机分析为基础的所谓的生物信息学分析技术才刚刚开始. 这些生物信息学预测的结果有些具有一定的指导意义, 有些还不能完全照搬, 必须有实验结果的证实^[27].

研究未知功能基因或新基因, 可以从不同的角度入手. 我们在肝炎病毒致病的分子生物学机制研究中, 经常会遇到研究蛋白和蛋白间相互结合、作用, 病毒基因表达产物对肝细胞表达基因谱的影响^[28-30], 以及肝炎病毒蛋白的抗体^[31-44]、抗原(配体)、结合蛋白、模拟表位^[45-47]、DNA/RNA-结合蛋白的筛选等方面的问题, 其中现代分子生物学技术如酵母双杂交技术(yeast two-hybrid)^[48]、抑制性消减杂交技术(SSH)^[49]、噬菌体表面展示(phage display)技术^[50]等的应用, 都是研究蛋白质的功能与基因的克隆化相耦联的技术途径. 因为这些研究技术, 不是以研究对象的背景资料作为先决条件, 所以, 筛选的结果, 既能得到已知功能基因, 又能得到未知功能的基因. 对所得到的未知功能的基因序列的研究, 往往觉得无从下手. 生物信息学技术的分析可能会提供很好、很多有价值的信息. 我们利用酵母双杂交技术, 首先筛选到了HCV核心蛋白结合的蛋白, 在众多可以与HCV核心蛋白结合的蛋白质类型中, 包括已知蛋白基因, 例如, 载脂蛋白 A1(APO-A1)、载脂蛋白 A2(APO-A2)、染色体转位蛋白(translin)等^[5], 从这些研究结果, 我们开始重视了HCV感染与肝脏脂肪变的问题, 并进行了系统的研究, 为HCV感染引起肝脏脂肪变提供了许多证据, 发现了一些慢性丙型肝炎肝脏脂肪变的有规律的现象^[51,52]. 同时, 在酵母双杂交筛选过程中也得到了一些其他的信息, 例如获得了一些编码基因序列, 但这些蛋白的生物学功能目前还没有研究报道, 还不特别清楚. 因此, 对于这些未知功能基因的研究迫切需要新的思路. 当初, 获得部分基因序列以

后, 如果要对全长基因进行研究, 需要应用互补末端快速扩增(RACE)技术, 扩增其余部分的基因序列. 而现在只需要以此序列为参照, 利用 GenBank 的在线同源基因搜索, 就可以获得这部分序列, 快速有效, 十分简便. 如果我们得到的是人或小鼠等种属的基因类型, 利用同样的技术, 就可以得到其他种属的同源性的基因. 如在本研究中, 我们应用人 HCBP6 的 cDNA 序列作为参照, 进行 GenBank 数据库搜寻时, 就可以获得小鼠、大鼠、牛等种属生物的 HCBP6 的基因序列. 但是, 由于目前还没有得到全部的人类染色体的编码基因序列, 对于大部分功能位点结构更是所知甚少, 因此由此建立的蛋白质功能位点的预测软件还有许多不完善的地方. 因此, 目前应用计算机分析技术对新型蛋白质分子中功能结构进行预测, 都还是初步的, 其结果也仅供参考. 但是, 对蛋白质结构的疏水性位点的分析结果, 还是相对可靠的. 我们已经利用这些分析结果获得了人 HCBP6 蛋白的抗原位点, 而且通过噬菌体表面展示技术对半合成的抗体基因文库的筛选获得了相应的人源化单链可变区抗体^[33-43]. 生物信息学技术不仅可以用于结构基因的功能预测, 而且还可以用于调节基因的预测. 例如, 我们应用不同的生物信息学技术对人 HCBP6 基因编码区上游的核苷酸序列进行分析, 初步获得了 HCBP6 基因启动子的序列结构特点. 关于 HCBP6 基因启动子的功能分析, 目前我们的报告基因表达载体的构建以及细胞转染实验结果也证实了这一点.

总之, 目前以克隆新基因为目的的分子生物学技术, 其实实验结果的分析, 必须利用、结合生物信息学技术的研究成果, 根据生物信息学技术预测的初步结果, 进行实验设计, 以获得事半功倍的效果; 当然, 目前的生物信息学技术, 由于核酸和蛋白一级结构与功能之间的相互关系的研究资料还不是特别完整, 因此, 这种预测的结果也还是初步的. 某些方面的研究结果比较可靠, 例如对同源核苷酸序列的比对以及全基因的克隆化, 蛋白质一级结构的分析中关于疏水位点的确定等, 都还是具有一定的可信度的, 但是关于蛋白质功能结构位点的预测, 关于启动子序列中转录因子蛋白结合的种类以及结合位点的预测, 则与实际情况还有相当大的差距, 还需要进行不断的更新与改进. 现代分子生物学技术与生物信息学技术的结合, 相互补充和改进, 将是当前基因分子生物学研究、重大疾病发病的分子生物学机制研究的主流方向, 相信随着分子生物学技术本身的发展以及数据库和计算机分析技术的发展, 这些技术的综合运用, 将迎来分子医学发展的崭新阶段.

4 参考文献

- 1 成军, 杨守纯主编. 现代肝炎病毒分子生物学. 第 1 版. 北京: 人民军医出版社, 1997:83
- 2 成军. 病毒性肝炎的分子发病机制. 临床肝胆病杂志 2001;17:31-35
- 3 成军. 慢性病毒性肝炎发病的分子生物学机制研究进展. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128

- 4 Cheng J. Molecular pathogenesis of viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;16(Suppl):A185
- 5 李克,王琳,成军,陆荫英,洪源,刘妍,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
- 6 成军,陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的研究进展. 国外医学病毒学分册 2000;7:123-127
- 7 成军,张玲霞. CD81分子的生物学功能. 国外医学免疫学分册 2000;23:322-324
- 8 成军,朱传琳. 肝炎病毒对双链RNA激酶PKR的调节作用. 国外医学微生物学分册 2000;23:1-3
- 9 刘妍,成军,王刚,李克,段惠娟,王琳,董菁,洪源,张跃新,李莉,张玲霞,陈菊梅. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因. 解放军医学杂志 2001;26:880-883
- 10 成军,朱传琳. 丙型肝炎病毒感染慢性化的分子生物学机制. 国外医学病毒学分册 2000;7:29-32
- 11 成军. 丙型肝炎病毒基因组的翻译及其产物的加工. 国外医学微生物学分册 1995;18:14-16
- 12 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
- 13 刘妍,成军. 丙肝病毒致肝细胞癌分子生物学机制. 国外医学流行病学传染病学分册 2000;27:10-13
- 14 刘妍,成军,邵得志,王琳,钟彦伟,夏小兵. 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活SV40病毒早期启动子/增强子的研究. 军医进修学院学报 2001;22:186-188
- 15 成军,陈菊梅. 丙型肝炎病毒5' - 非翻译区及其结合蛋白的研究进展. 国外医学微生物学分册 2001;24:7-9
- 16 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区结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:223-225
- 17 李克,王琳,成军,陆荫英,张玲霞,牟劲松,洪源,刘妍,段惠娟,王刚,李莉,陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白与染色体转位蛋白的相互作用. 中华医学杂志 2002;82:673-677
- 18 Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Mu JS, Hong Y, Liu Y, Duan HJ, Wang G, Li L, 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
- 19 李克,王琳,成军,张玲霞,陆荫英,夏小兵,李莉,杨继珍. 丙型肝炎病毒核心蛋白基因表达载体的构建及在酵母中的表达. 军医进修学院学报 2002;23:1-3
- 20 李克,王琳,成军,张玲霞,陆荫英,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
- 21 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
- 22 Lahm A, Yagnik A, Tramontano A, Koch U. Hepatitis C virus proteins as targets for drug development: the role of bioinformatics and modelling. *Curr Drug Targets* 2002;3:281-96
- 23 Walewski JL, Gutierrez JA, Branch-Elliman W, Stump DD, Keller TR, Rodriguez A, Benson G, Branch AD. Mutation Master: profiles of substitutions in hepatitis C virus RNA of the core, alternate reading frame, and NS2 coding regions. *RNA* 2002;8:557-571
- 24 Husmeier D, Wright F. A Bayesian approach to discriminate between alternative DNA sequence segmentations. *Bioinformatics* 2002;18:226-234
- 25 Kernebeck T, Lohse AW, Grotzinger J. A bioinformatical approach suggests the function of the autoimmune hepatitis target antigen soluble liver antigen/liver pancreas. *Hepatology* 2001;34:230-233
- 26 Husmeier D, Wright F. Probabilistic divergence measures for detecting interspecies recombination. *Bioinformatics* 2001;17(Suppl 1):S123-S131
- 27 Klinck R, Westhof E, Walker S, Afshar M, Collier A, Aboul-Ela F. A potential RNA drug target in the hepatitis C virus internal ribosomal entry site. *RNA* 2000;6:1423-1431
- 28 Cheng J. Progress in gene therapy for liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14(Suppl):A261-A262
- 29 成军,陈菊梅. 丙型肝炎病毒NS5A蛋白的生物学调节作用. 国外医学微生物学分册 2001;24:12-14
- 30 成军,陈菊梅. 丙型肝炎病毒3' - 非翻译区RNA结合蛋白的研究进展. 国外医学病毒学分册 2000;7:17-21
- 31 钟彦伟,成军,刘妍,董菁,杨继珍,张玲霞. 丙型肝炎病毒NS3蛋白人源基因工程单链抗体的高效表达. 中华肝脏病杂志 2000;8:171-173
- 32 Cheng J, Zhong YW, Liu Y, Dong J, Yang JZ, Zhang LX. Screening and identification of a humanized single chain variable region antibody for hepatitis C virus non-structural 3 protein. *Chin J Immunol* 2000;16:246-249
- 33 钟彦伟,成军,施双双,夏小兵,王刚,杨继珍,陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS4A人源单链抗体的筛选与鉴定. 免疫学杂志 2000;16:422-424
- 34 成军,施双双,钟彦伟,夏小兵,王刚,王琳,刘妍,陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白可溶性单链可变区抗体在大肠杆菌中的表达. 解放军医学杂志 2000;25:394-397
- 35 成军,钟彦伟,施双双,王刚,董菁,夏小兵,杨继珍,陈菊梅. HCV非结构蛋白NS5A人源单链抗体可变区基因的筛选与鉴定. 中华微生物和免疫学杂志 2000;20:567
- 36 钟彦伟,成军,施双双,杨继珍,董菁,夏小兵,李克,刘妍,陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS5A人源单链抗体的筛选与表达. 中华中西医结合杂志 2001;2:97-99
- 37 钟彦伟,成军,施双双,王刚,夏小兵,田小军,李莉,张玲霞. 抗丙肝病毒包膜蛋白E2人源单链抗体的制备及免疫组织化学研究. 中华肝脏病杂志 2002;10:109-112
- 38 钟彦伟,王松山,赵景民,成军,张玲霞. 抗丙肝病毒非结构蛋白NS3单链抗体的制备及免疫组织化学研究. 中华实验与临床病毒学杂志 2001;15:186-188
- 39 成军,钟彦伟,施双双,倪勤,刘妍,王刚,董菁,夏小兵,刘友昭,王琳,李克,杨继珍,邵得志,陈菊梅. HCV非结构蛋白NS5A人源单链可变区抗体基因的筛选与鉴定. 中华实验与临床病毒学杂志 2001;15:216-218
- 40 钟彦伟,成军,施双双,夏小兵,王刚,杨继珍,陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. 中华肝脏病杂志 2001;9:217-219
- 41 成军,钟彦伟,施双双,夏小兵,王刚,陈菊梅. 丙型肝炎病毒E2蛋白人源单链可变区抗体的可溶性表达. 中国病毒学 2001;16:220-223
- 42 钟彦伟,成军,刘妍,董菁,杨继珍,张玲霞. 可溶性HCV非结构蛋白NS3人源单链抗体在大肠杆菌中的表达. 肝脏 1999;4:73-76
- 43 钟彦伟,成军,刘妍,董菁,杨继珍,张玲霞. HCV非结构蛋白NS3人源单链抗体的筛选与鉴定. 中华传染病杂志 2000;18:84-87
- 44 成军,钟彦伟,刘妍,董菁,杨继珍,杨守纯. 丙型肝炎病毒非结构区NS3基因在大肠杆菌中的可诱导性高表达. 中华实验与临床病毒学杂志 2002;16:85-87
- 45 钟彦伟,成军,陈新华,王刚,洪源,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS4A抗原模拟表位的筛选和鉴定. 免疫学杂志 2002;18:42-45
- 46 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
- 47 钟彦伟,成军,田小军,陈新华,李莉,张玲霞,陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS5A抗原模拟表位的筛选与鉴定. 中华肝脏病杂志 2002;10:266-268
- 48 陆荫英,李克,成军,王琳,刘妍,张玲霞. 乙型肝炎病毒前-S1基因酵母表达载体的构建及表达. 解放军医学杂志 2002;27:341-342
- 49 刘妍,成军,王刚,李克,段惠娟,王琳,董菁,洪源,张跃新,李莉,张玲霞,陈菊梅. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因. 解放军医学杂志 2001;26:880-883
- 50 董菁,施双双,王业东,皇甫竟坤,洪源,李莉,张玲霞,成军. cDNA文库噬菌体展示法的建立及乙型肝炎病毒前S1蛋白结合蛋白筛选. 解放军医学杂志 2002;27:321-322
- 51 成军,李莉,张玲霞,陈菊梅. 丙型肝炎病毒感染与脂类代谢的相关性. 肝脏 2002;7:56-58
- 52 李克,张玲霞,成军. 丙型肝炎病毒与脂质系统代谢关系的研究进展. 国外医学病毒学分册 2002;9:1-3

酵母双杂交技术筛选 Hcbp6 结合的肝细胞蛋白编码基因

王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 陈天艳, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟

王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 陈天艳, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟, 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

王琳, 女, 实验技师, 主要从事肝炎病毒蛋白结合蛋白和分子生物学调节机制的研究。

项目负责人: 成军, 100039, 北京市丰台路26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: 010-66933392 传真: 010-63801283

收稿日期: 2002-10-29 接受日期: 2002-11-28

Screening of gene encoding of hepatic proteins interacting with Hcbp6 via yeast two hybridization

Lin Wang, Ke Li, Jun Cheng, Yin-Ying Lu, Jian Zhang, Tian-Yan Chen
Yuan Hong, Yan Liu, Gang Wang, Yan-Wei Zhong

Lin Wang, Ke Li, Jun Cheng, Yin-Ying Lu, Jian Zhang, Tian-Yan Chen, Yuan Hong, Yan Liu, Gang Wang, Yan-Wei Zhong, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 26 Fengtai Road Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2002-10-29 Accepted: 2002-11-28

Abstract

AIM: To seek for hepatic proteins that interacted with protein encoded by Hcbp6 for exploring the biological function of Hcbp6.

METHODS: Hcbp6 gene was introduced into pGBKT7, and then transformed into yeast AH109, which was mated with yeast Y187 (α type) containing liver cDNA library plasmid in 2 \times YPDA medium. Diploid yeast was plated on synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) containing x- α -gal. Plasmids were extracted from positive colonies, and sequence analysis was performed by bioinformatics.

RESULTS: Four kind of proteins including paralectin, Ran binding protein 2, transmembrane transporting protein and albumin were identified to interact with Hcbp6 specifically.

CONCLUSION: Hcbp6 proteins may belong to or be associated with formation of secretory proteins, more study needs to be done for clarifying its biological function.

Wang L, Li K, Cheng J, Lu YY, Zhang J, Chen TY, Hong Y, Liu Y, Wang G, Zhong YW. Screening of gene encoding of hepatic proteins interacting with Hcbp6 via yeast two hybridization. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(4):385-388

摘要

目的: Hcbp6 是与核心蛋白相结合的未知功能蛋白基因, 为了初步提示他的生物学功能和在细胞中的存在形式,

采用酵母双杂交体系寻找与他相互作用的肝细胞蛋白, 探讨 Hcbp6 的生物功能。

方法: 应用酵母双杂交系统 3, 构建 Hcbp6 诱饵质粒并转化酵母 AH109, 与含人肝细胞 cDNA 文库质粒的酵母 Y187 进行配合, 在涂有 x- α -gal 营养缺陷型培养基 (SD/-Trp-Leu-His-Ade) 上筛选生长。挑选蓝色克隆, 提取此酵母克隆的质粒, 转化大肠杆菌提取质粒 DNA 后进行测序, 然后进行生物信息学分析。

结果: 筛选出 4 种与 Hcbp6 特异性相互作用的蛋白, 包括 Paralemm (PALM)、Ran 结合蛋白 2 (Ranbp2)、跨膜运输蛋白 21 (Tmp21) 和血清白蛋白。

结论: 推测该蛋白可能为一分泌性蛋白, 或与分泌蛋白的形成有关。进一步的生物学功能的研究需要更多的实验加以探讨。

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* 2002;11(4):385-388

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/385.htm>

0 引言

HCV 核心蛋白是病毒编码的一种重要的致病因子, 参与介导多种生物调节和病理反应过程, 其分子机制之一就是病毒与宿主细胞蛋白质间的相互作用。HCBP6 是以酵母双杂交技术筛选出能与 HCV 核心蛋白发生结合的蛋白^[1], 这种结合在体外实验得到了明确的证实。该蛋白在哺乳动物中比较保守, 从小鼠、大鼠、奶牛到人具有较高的同源性, 但是目前既没有功能上的研究, 也不知其对核心蛋白的作用。基于此, 我们再次采用酵母双杂交系统对 HCBP6 的结合蛋白基因进行筛选, 以期寻找 HCBP6 可能的生物学功能, 并为研究核心蛋白的致病机制提供一定的线索。

1 材料和方法

1.1 材料 预转化入酵母的对照质粒 AH109 (MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4, gal80, LYS2 GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2 URA3 MEL1TATA-lacZ MEL1) 酵母中含有 pGBKT7-53, 编码 DNA-BD/鼠 p53 融合蛋白, Y187 (MAT ura3-52, his3-200, Ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4, gal80, met-, URA3 GAL1UAS-GAL1TATA-lacZ MEL1) 酵

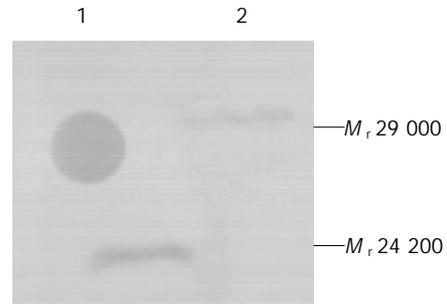
母中含有 pTD1-1, 由质粒 pACT2 中编码 AD/SV40 大 T 抗原融合蛋白. 预转化的 cDNA 肝文库(Y187), 由质粒 pACT2 表达 AD/cDNA 文库融合蛋白均购自 Clontech 公司(PT3183-1). 酵母双杂交系统3 含有 pGBKT7 DNA-BD 克隆载体、pGADT7 AD 克隆载体、pGBKT7-53 对照质粒、pGADT7-T 对照质粒、pGBKT7-Lam 对照质粒、pCL1 对照质粒、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*), AH109 酵母株、Y187 酵母株, 购自 Clontech 公司(K1612-1). Taq DNA 聚合酶购自 MBI 公司. T4 DNA 连接酶、EcoRI 和 BamHI 购自宝生物公司. c-myc 单克隆抗体本室自制, 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. 醋酸锂购自 Sigma 公司. 丙烯酰胺、N, N' - 亚甲双丙烯酰胺为 Promega 公司产品, TEMED 为宝林曼公司产品. X- γ -Gal 购自 Clontech 公司. 培养基:胰蛋白胨、酵母提取物为 OXOID 公司产品. 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 购自 Clontech 公司, 半硫酸腺苷购自 Sigma 公司.

1.2 方法 (1)载体的构建:“诱饵”质粒的建立. 将 HCV 核心蛋白基因用 T4 连接酶连于含有 GAL4 结合域的 pGBKT7 载体上构成诱饵质粒 pGBKT7- Hcbp6, 用醋酸锂法^[2]转入酵母细胞 AH109 后, Western blotting 杂交鉴定是否有融合蛋白表达, 并且在四缺培养基上培养排除其自身激活作用.(2)酵母配合实验:挑取在 SD/-Trp 培养基上含有 pGBKT7- Hcbp6 质粒的 AH109 酵母菌落(> 2 mm)数个接种于 SD/-Trp 液体培养基中, 30 250 rpm 振摇过夜. 第 2 天离心后重悬细胞约 5 mL, 计数>1 \times 10¹².L⁻¹ 细胞, 室温水浴中融化 1 份 1 mL 文库酵母培养物, 全部 5 mL 的 AH109 酵母细胞与 1 mL 的文库混合, 加入 45 mL 的 2 \times YPDA 后 30-50 r.min⁻¹30 培养配合过夜, 24 h 后进行离心用 YPDA 10mL 重悬细胞后铺 15 cm 的 SD/-Trp/-Leu/-His 平板 25 块和 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 25 块. 同时进行阳性对照实验及文库滴定. 生长 6-18 d 后把长出的 > 2 mm 的酵母集落, 在铺有 X- γ -Gal 的 QDO 上检查 X- γ -Gal 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. 酵母质粒提取转化大肠杆菌, 按试剂盒提供的操作指南 Lyticase 法进行. 挑取真正的阳性集落于 QDO 液体培养基中培养过夜后, 提取酵母质粒, 提取的质粒用电穿孔法^[3]转化大肠杆菌, 于含有氨苄青霉素的 LB 平板培养, 所获得菌落提取质粒后测序. 阳性克隆 DNA 测序后, 提交 GenBank 分析, 所获新的基因存入 GenBank 数据库.

2 结果

2.1 Hcbp6 蛋白表达的鉴定 “诱饵”载体 pGBKT7- Hcbp6 构建后转化到酵母 AH109 后能够稳定表达 HCBP6 融合蛋白(图 1). 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 18 200, 实验组因表达 HCBP6 融合蛋白其分子量为 38 985. Western 免疫印迹分析结果显示转化 pGBKT7 质粒组在 14 200 后有一特异表达带, 转化 pGBKT7- Hcbp6 质粒的酵母提取物于 40 000 左右有明显条带, 而未转化质粒组缺乏特异性反应带, 其分子量大小与理论值相符合.



1: pGBKT7 阳性对照组 2: pGBKT7- Hcbp6 实验组
图 1 pGBKT7- Hcbp6 蛋白 Western 免疫印迹分析.

2.2 部分筛选克隆 Bgl I 酶切鉴定结果 pACT2 内含有两个 Bgl I 酶切位点, 分别位于多克隆位点两侧, 使用该酶消化将释放出肝细胞文库片段(图 2).

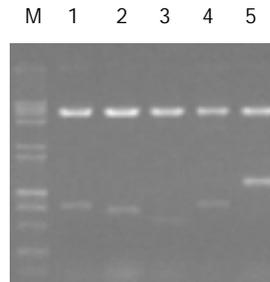


图 2 1-5 种不同的克隆 Bgl I 酶切鉴定.

2.3 cDNA 测序与同源性分析初步结果 挑选 8 个克隆测序, 与 GenBank 数据库进行初步比较, 已知基因的部分序列高度同源(99 %)(表 1).

表 1 1-5 种阳性克隆与 GenBank 同源序列比较

编号	已知的同源序列编码蛋白	相同克隆数	同源性
1	血清白蛋白(alb)	2	99
2	Paralemmin(PALM)	1	99
3	Ran 结合蛋白 2 (Ranbp2)	2	99
4	跨膜运输蛋白 21(TMP21)	1	99
5	DNA 序列	2	99

3 讨论

HCV 核心蛋白为一个多功能蛋白, 除组成蛋白衣壳外, 还能作用于多种病毒和细胞的启动子, 调控基因转录, 干扰其他病毒的复制, 促进宿主细胞的分化和恶化, HCV 的基因组为正链 RNA 病毒, 但是其复制和表达均在胞质内完成, 不涉及到逆转录过程, 核心蛋白的存在为 HCV 感染后致肝癌的发生机制提供基础^[4-10].

但是有关核心潜在的生物学功能还远不为人们了解, 在以酵母双杂交技术寻找与核心蛋白相互作用的蛋白质时, 我们分离并确定了未知功能蛋白基因 Hcbp6. Hcbp6 是日本等学者在小鼠肾等器官中进行 cDNA 文库测序时发现的, 蛋白全长 190 aa, Genbank 中的资料显示该基因在哺乳动物中较为保守, 组织分布广泛, 在人和小鼠的不同组织中存在不同的基因剪切型, 可以认为这是一个不断进化中的古老基因. 绿色荧光(EGFP)融合蛋白分析发现 HCBP6 以小泡状结构散布于核周的胞质或细胞器内, 而 EGFP 空白对照则均匀弥散于整个细胞质及核质中, 因此推测 HCBP6 可能以分泌蛋白的形式由内浆网和高尔基体合成并运输. 为了进一步探讨该未知蛋白的功能, 本实验再次以酵母双杂交系统从人肝细胞 cDNA 文库中筛选 HCBP6 的结合蛋白, 以期发现其部分下游信息和对 HCV 核心致病机制的影响.

我们此次共获得了 8 个阳性克隆, 经测序及回交分析证实了 Paralemmin(PALM)、Ran 结合蛋白 2 (Ranbp2)、跨膜运输蛋白 21(Tmp21)和血清白蛋白(alb)白四种特异性结合蛋白. Tmp21 是 p24 货物受体家族成员之一, 他与 p24a 被认为是 COP 小囊泡外衣蛋白的受体成分, 广泛分布于各类组织细胞内的微粒体膜、酶原颗粒膜和质膜表面, 与酵母蛋白 Emp24p 有部分同源性, 推测其功能与分泌蛋白从内浆网到高尔基体的运输以及小囊泡的寻靶作用有关. 免疫荧光实验显示此蛋白连续循环于中间区室元件(IC)和高尔基网络间, 侧面证实了他在高尔基器分泌通路中的运输行为^[11-15]. PALM 是一类推定的有关质膜融合的调节蛋白, 在人类不同组织细胞内均有表达, 神经元细胞中高丰度表达. PALM 与一类涉及到如吞噬、胞吐、突起形成、信号转导等快速质膜动力学事件的蛋白分子具有分子结构或免疫形态学上的共同特征, 以其羧基末端的 CaaX 基序通过脂类锚定在质膜内表面, 而氨基末端的卷曲螺旋可能具有象 t-SNATE 蛋白一样介导细胞内膜的小囊泡插入的活性. 有实验观察到过度表达的 PALM 确实可以扩张细胞边缘、放射出长的突起而形成奇怪的多叶型. PALM 也结合在微粒体和小囊泡等细胞内组分上, 推测同时存在小囊泡运输的活性^[16-20]. 另外一个感兴趣的蛋白质 RanBP2 定位于核孔复合物的浆膜侧并构成 Ran-GTP 酶在核浆膜面的结合域, 辅助 Ran 信号传导通路中的各种核过程包括核蛋白的双向运输、mRNA 的加工和输出及细胞周期的调节^[21-33]. HCBP6 与他的结合可能导致某些核功能的建立或改变, 也可以想象, 这种作用可能对 HCV 核心蛋白的核内转运有影响.

从本实验结果来看, HCBP6 与多种负责细胞内运输的蛋白发生结合, 提示其可能为一种分泌性蛋白质, 但是通过生物软件初步分析没有发现典型的信号肽序列, 因此需要更多的实验如免疫荧光实验观察他的亚细胞定位和体内运输行为, 进而揭示此蛋白的生

物学功能. 本实验采用的酵母双杂交技术是研究蛋白质间相互作用的经典方法, 具有假阳性率低、部分模拟体内环境等优点, 同时是建立全部蛋白质-蛋白质相互作用及其功能关系的图谱的重要手段, 为提示蛋白质在作用网络中所起的作用提供一条快速、便捷的途径^[31-33].

4 参考文献

- 1 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 洪源, 陈菊梅. 用酵母双杂交技术筛选与克隆丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白基因 6. 中华实验与临床病毒学杂志 2002;16:351-353
- 2 Gietz D, Jean A, Woods R, Schiestl R. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* 1992; 20:1425
- 3 颜子颖, 王海林. 精编分子生物学实验指南. 第 1 版. 北京: 科学出版社, 1998:23-24
- 4 郝飞, 余宙耀. 丙型肝炎基础与临床. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 1998:46-47
- 5 李克, 王琳, 成军. 丙型肝炎病毒核心蛋白基因表达载体的构建及在酵母中的表达. 军医进修学院学报 2002;23:1
- 6 李克, 王琳, 成军. 丙型肝炎病毒核心蛋白与染色体转位蛋白的相互作用. 中华医学杂志 2002; 82 :673
- 7 成军, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的研究进展. 国外医学病毒学分册 2000; 7:123-127
- 8 刘妍, 成军, 邵得志. 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活 SV40 病毒早期启动子 / 增强子的研究. 军医进修学院学报 2001; 22:186-188
- 9 Liu Q, Tackney C, Bhat RA, Prince AM, Zhang P. Regulated processing of hepatitis C virus core protein is linked to subcellular localization. *J Virol* 1997; 71:657-662
- 10 Yasui K, Wakita T, Tsukiyama-Kohara K, Funahashi SI, Ichikawa M, Kajita T, Moradpour D, Wands JR, Kohara M. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 1998;72:6048-6055
- 11 Blum R, Feick P, Puype M, Vandekerckhove J, Klengel R, Nastainczyk W, Schulz I. Tmp21 and p24A, two type I proteins enriched in pancreatic microsomal membranes, are members of a protein family involved in vesicular trafficking. *J Biol Chem* 1996; 271:17183-17189
- 12 Blum R, Pfeiffer F, Feick P, Nastainczyk W, Kohler B, Schafer KH, Schulz I. Intracellular localization and in vivo trafficking of p24A and p23. *J Cell Sci* 1999; 112:537-548
- 13 Horer J, Blum R, Feick P, Nastainczyk W, Schulz I. A comparative study of rat and human Tmp21 (p23) reveals the pseudogene-like features of human Tmp21-II. *DNA Seq* 1999; 10:121-126
- 14 Wang H, Kazanietz MG. Chimaerins, novel non-protein kinase C phorbol ester receptors, associate with Tmp21-I (p23): evidence for a novel anchoring mechanism involving the chimaerin C1 domain. *J Biol Chem* 2002; 277:4541-4550
- 15 Barr FA, Preisinger C, Kopajtic R, Korner R. Golgi matrix proteins interact with p24 cargo receptors and aid their efficient retention in the Golgi apparatus. *J Cell Biol* 2001;155:885-891
- 16 Burwinkel B, Miglierini G, Jenne DE, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, Ring HZ, Francke U, Kilmann MW. Structure of the human paralemmin gene (PALM), mapping to human chromosome 19p13.3 and mouse chromosome 10, and exclusion of coding mutations in grizzled, mocha, jittery, and hesitant mice. *Genomics* 1998; 49:462-466
- 17 Kutzleb C, Sanders G, Yamamoto R, Wang X, Lichte B, Petrasch-Parwez E, Kilmann MW. Paralemmin, a prenyl-palmitoyl-anchored phosphoprotein abundant in neurons and implicated in plasma membrane dynamics and cell process formation. *J Cell Biol* 1998; 143:795-813
- 18 Hu B, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Kilmann MW. The paralemmin protein family: identification of paralemmin-2, an isoform differentially spliced to AKAP2/AKAP-KL, and of palmdelphin, a more distant cytosolic relative. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285:1369-1376

- 19 El-Husseini AD, Craven SE, Brock SC, Bredt DS. Polarized targeting of peripheral membrane proteins in neurons. *J Biol Chem* 2001; 276:44984-44992
- 20 Andreu N, Escarceller M, Feather S, Devriendt K, Wolf AS, Estivill X, Sumoy L. PALML, a novel paralemmin-related gene mapping on human chromosome 1p21. *Gene* 2001; 278:33-40
- 21 Wu J, Matunis MJ, Kraemer D, Blobel G, Coutavas E. Nup358, a cytoplasmically exposed nucleoporin with peptide repeats, Ran-GTP binding sites, zinc fingers, a cyclophilin A homologous domain, and a leucine-rich region. *J Biol Chem* 1995; 270:14209-14213
- 22 Moroianu J, Hijikata M, Blobel G, Radu A. Mammalian karyopherin alpha 1 beta and alpha 2 beta heterodimers: alpha 1 or alpha 2 subunit binds nuclear localization signal and beta subunit interacts with peptide repeat-containing nucleoporins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:6532-6536
- 23 Seki T, Hayashi N, Nishimoto T. RCC1 in the Ran pathway. *J Biochem* 1996; 120:207-214
- 24 Chook YM, Cingolani G, Conti E, Stewart M, Vetter I, Wittinghofer A. Pictures in cell biology. Structures of nuclear-transport components. *Trends Cell Biol* 1999; 9:310-311
- 25 Nothwang HG, Rensing C, Kubler M, Denich D, Brandl B, Stubanus M, Haaf T, Kurmit D, Hildebrandt F. Identification of a novel Ran binding protein 2 related gene (RANBP2L1) and detection of a gene cluster on human chromosome 2q11-q12. *Genomics* 1998; 47:383-392
- 26 Wang LF, Zhu HD, Miao SY, Cao DF, Wu YW, Zong SD, Koide SS. Molecular cloning and characterization of a novel testis-specific nucleoporin-related gene. *Arch Androl* 1999; 42:71-84
- 27 Yaseen NR, Blobel G. GTP hydrolysis links initiation and termination of nuclear import on the nucleoporin nup358. *J Biol Chem* 1999; 274:26493-26502
- 28 Villa Braslavsky CI, Nowak C, Gorlich D, Wittinghofer A, Kuhlmann J. Different structural and kinetic requirements for the interaction of Ran with the Ran-binding domains from RanBP2 and importin-beta. *Biochemistry* 2000; 39:11629-11639
- 29 Pichler A, Gast A, Seeler JS, Dejean A, Melchior F. The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* 2002; 108:109-120
- 30 Walther TC, Pickersgill HS, Cordes VC, Goldberg MW, Allen TD, Mattaj JW, Fornerod M. The cytoplasmic filaments of the nuclear pore complex are dispensable for selective nuclear protein import. *J Cell Biol* 2002; 158:63-77
- 31 Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 1989; 340:245-246
- 32 Swinbanks D. Government backs proteome proposal. *Nature* 1995; 378:653
- 33 Frederickson RM. Macromolecular matchmaking: advances in two-hybrid and related technologies. *Curr Opin Biotechnol* 1998; 9:90-96

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎订阅 2003 年度世界华人消化杂志®

本刊讯 世界华人消化杂志®被美国《化学文摘》(Chemical Abstracts,CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica,EM)》和俄罗斯《文摘杂志》收录.国内被以下检索系统收录,分别为中国科技论文统计与分析(科技部列为中国科技论文统计源期刊之一),中国学术期刊文摘,中国生物医学文献光盘数据库,中文科技资料目录医药卫生,解放军医学图书馆CMCC系统,世界消化学网数据库,中国医学文摘外科学分册(英文版),中国医学文摘内科学分册(英文版),国家级火炬计划项目中国学术期刊综合评价数据库来源期刊.世界华人消化杂志®(原刊名新消化病学杂志)1995年度,1998年度,1999年度,2000年度2001年度,分别被评为山西省一级期刊.中国科技信息研究所信息分析研究中心期刊检索报告:2001年度世界华人消化杂志®总被引频次6468,影响因子3.733,即年指标0.747,他引总引比0.2,海外作者论文比0.012,地区分布数29,基金和资助论文比例0.176,指标综合加权评分76.96.世界华人消化杂志®大16开,128页,月刊,定价24.00元/期,邮发代号82-262.E-mail:wcjd@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com

(世界胃肠病学杂志社 2002-11-08)

噬菌体表面展示技术筛选HCBP6人源单链可变区抗体

钟彦伟,成军,张忠东,孙敏,李强,李克,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅

钟彦伟,成军,张忠东,孙敏,李强,李克,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅,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

钟彦伟,女,1965-11-02,吉林人,副研究员、汉族,硕士,主要从事噬菌体表面展示技术及其应用的研究。

国家自然科学基金资助项目, No.C 39970674, No.C03011402

项目负责人:成军,100039,北京市丰台路26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:2002-10-29 接受日期:2002-11-28

Screen for human single chain variable region in antibody against human hepatitis C virus core protein binding protein 6

Yan-Wei Zhong, Jun Cheng, Zhong-Dong Zhang, Min Sun, Qiang Li, Ke Li, Lin Wang, Li Li, Ling-Xia Zhang, Ju-Mei Chen

Yan-Wei Zhong, Jun Cheng, Zhong-Dong Zhang, Min Sun, Qiang Li, Ke Li, Lin Wang, Li Li, Ling-Xia Zhang, Ju-Mei Chen, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Supported by the grants from National Natural Scientific Foundation of China, No.C 639970674, No.C03011402

Correspondence to: Jun Cheng, MD, PhD, Professor, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2002-10-29 Accepted: 2002-11-28

Abstract

AIM: To screen human single chain variable fragment (scFv) in antibody against hepatitis C virus (HCV) core protein-binding protein 6 (HCBP6) by phage display technique to determine HCBP6 in human liver tissue.

METHODS: The semisynthetic phage antibody library was panned by HCBP6 peptide which was coated on a microtiter plate, after five rounds of bio-panning, 48 clones specific for HCBP6 were determined with the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The specificity of HCBP6 scFv was identified by ELISA, cross reaction with bovine serum albumin (BSA) and competition inhibition assay. The DNA sequence of the positive clone was determined.

RESULTS: Specific phage antibody against HCBP6 was enriched by 162 times after five rounds of panning with HCBP6 peptide. Binding activities of 48 clones with HCBP6 peptide were determined by ELISA, and the results indicated that 30 clones could bind to HCBP6 peptide, 7 clones had low absorbance value at A450 nm; Direct and competition inhibition ELISA showed that one clone named P24, exhibited specific binding to HCBP6 peptide. Data of DNA sequence showed that the scFv gene encoded 771 bp.

CONCLUSION: The scFv fragments to HCBP6 can be suc-

cessfully selected by phage display technique, which paves a way for study of distribution of HCBP6 in human liver tissues.

Zhong YW, Cheng J, Zhang ZD, Sun M, Li Q, Li K, Wang L, Li L, Zhang LX, Chen JM. Screen for human single chain variable region in antibody against human hepatitis C virus core protein binding protein 6. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;11(4):389-393

摘要

目的:制备丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白的肝细胞结合蛋白6(HCBP6)的特异性人源单链可变区抗体(scFv)。

方法:采用噬菌体表面展示技术,将生物合成的应用酵母双杂交技术筛选得到的HCV核心蛋白的肝细胞结合蛋白6(HCBP6)16肽固相包被于Nunc板,从噬菌体单链可变区抗体库中经过5轮“黏附-洗脱-扩增”筛选过程,随机挑选出48个克隆,利用酶联免疫黏附法(ELISA)、交叉反应和竞争抑制实验,对其进行免疫学检测,获得与HCBP6结合活性较强的单链可变区抗体片段的阳性克隆,并对HCBP6特异性scFv的编码序列进行序列测定分析。

结果:对噬菌体单链可变区抗体库经过5轮“黏附-洗脱-扩增”的筛选后,结合到包被平皿的噬菌体与第一轮相比,富集了162倍。用酶联免疫黏附法测定第5轮筛选后上清液中含有的噬菌体抗体与HCBP6结合活性。其中有30株克隆ELISA的吸光度(A450 nm)值较高(P8 0.77, P24 0.714, P26 0.728, P29 0.723, P38 0.803, P39 0.762, P43 0.747等)。对这些噬菌体抗体进行与牛血清白蛋白(BSA)的交叉反应后,确定其中有7株交叉反应较弱(P8 0.145, P24 0.119, P26 0.17, P29 0.186, P38 0.118, P39 0.138, P43 0.178),结合2次ELISA重复实验的A值及竞争抑制实验结果,最后确定1株(P24)阳性克隆。提取质粒, SfiI/NotI双酶切后,将片段亚克隆到pCANTAB5E载体,进行DNA序列测定, DNA大小为771 bp,符合人源单链可变区抗体典型的骨架区(FR)及互补决定区(CDR)的序列结构。

结论:用噬菌体抗体库技术能够成功地获得HCBP6的scFv。

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(4):389-393

http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/389.htm

0 引言

研究新基因的结构和功是前分子生物学研究领域的热门课题^[1,2]。随着人类基因组计划的完成,大量新基因的功能研究工作迫在眉睫。在病毒性肝炎研究领域,有关 HCV 与肝细胞之间如何相互作用、丙型肝炎病毒(HCV)能与肝细胞中哪种蛋白结合?这种结合蛋白在肝细胞中的分布如何?目前我们还知之甚少。其中一种有效的研究方法,就是利用生物信息学技术对新基因编码产物的抗原位点进行预测,以合成的抗原多肽对人源单链可变区抗体(scFv)的噬菌体文库进行筛选,再以获得的scFv 抗体进行研究。噬菌体表面展示技术是近年来出现的一种新技术,其原理是将外源蛋白基因通过与丝状噬菌体外壳蛋白基因融合而将外源蛋白表达在噬菌体颗粒的表面,该技术将噬菌体表面表达蛋白的表型和其编码基因的克隆化结合在一起,将识别相应抗原和进行再扩增的能力结合起来,不需免疫动物,绕过杂交瘤,可以在不知道抗原结构和功能的情况下,仅仅经过几轮黏附-洗脱-扩增的筛选过程,筛选得到该抗原特异性的单链抗体。该抗体可以作为一种新的诊断试剂,检测该抗原在肝细胞中的分布。本实验我们利用噬菌体表面展示技术筛选获得了与 HCBP6 结合活性较强的单链可变区抗体。

1 材料和方法

1.1 材料 HCBP6 蛋白生物信息学技术预测抗原表位的 16肽由北京赛百胜生物工程公司合成。人源化噬菌体抗体文库为轻链可变区和重链可变区经甘氨酸接头(Gly₄Ser)₃连接的抗体文库^[3-24]。辅助噬菌体 M13K07 购于 Pharmacia 公司, Wizard 质粒 DNA 提取纯化试剂盒购于 Promega 公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法 (1)特异性 HCBP6 单链可变区抗体的筛选:将噬菌体抗体库细胞接种于 50 mL 2 TY 培养基中,摇至 A600 nm 值为 0.5 时,加入辅助噬菌体 M13K07, 37 °C 静置 30 min, 4 5000 r/min 离心 10 min, 将沉淀转入 2TY(Amp/kan)培养基中,30 °C 振荡过夜。细菌培养液离心后,取上清,用 200 g/L PEG 沉淀浓缩噬菌体。用 HCBP6 多肽(20 mg/L)包被 Nunc 培养板,包被液为 0.05 mol/L NaHCO₃, pH 9.6 缓冲液,4 °C 过夜。以小牛血清白蛋白(BSA) 37 °C 封闭 2 h 后加入浓缩的噬菌体,室温 90 min,用 PBST 和 PBS 各快速洗涤 20 次,以 0.1 mol/L 三乙胺洗脱已黏附在皿上的噬菌体,然后用 1 mol/L Tris(pH 7.4)中和,再感染对数生长期的大肠杆菌受体菌 TG1,培养扩增使表达 HCBP6 特异性 scFv 的噬菌体得到富集。继续重复 5 次上述“黏附、洗脱、扩增”过程^[5,6]。(2)单链可变区抗体阳性克隆的鉴定:将最后一轮筛选得到的重组菌涂平皿,从中随机挑选 48 株单克隆菌株,置于 2 × TY(氨苄青霉素 100 mg/L, 10 g/L 葡萄糖)中, 37 °C 培养过夜。加入辅助噬菌体 M13K07 浸染后, 30 °C 培养过夜。上清液用于酶联免疫黏附法

(ELISA)检测。50 μL 噬菌体上清与等体积 20 g/L PBS/BSA 混合后,加入到包被有 HCBP6 的 ELISA 板中, 37 °C 孵育 1 h, 0.5 g/L PBS/Tween 洗 5 次,然后加入 1 5000 稀释的 HRP-兔抗 M13, 37 °C 孵育 1 h, TMB (3, 3, 5, 5, - 四甲基联苯胺)为底物显色。对筛选得到的阳性克隆重复 ELISA 检测过程。由于在筛选过程中,有 BSA 参与,因而从理论上讲有可能筛选到 BSA 特异性的单链可变区抗体。因此又以 BSA 作为包被抗原,结合与 BSA 的交叉反应情况,确定 7 株与 BSA 交叉反应较弱的阳性克隆进行竞争抑制实验,最后选定一个阳性克隆提取质粒,进行 DNA 序列测定。(3)竞争抑制实验:10 μL 噬菌体上清与等体积的以 20 g/L PBS/BSA 稀释的 2 μg/mL HCBP6 混匀,于 37 °C 孵育 30 min。加入到包被有 HCBP6 (0.2 μg/mL)的 ELISA 板中, 37 °C 孵育 1 h, 0.5 g/L PBS/Tween 洗 5 次,然后加入 1 5000 稀释的 HRP-兔抗 M13, 37 °C 孵育 1 h, M13K07 为阴性对照, TMB 为底物显色。(4)阳性克隆株 DNA 序列测定:对筛选得到的阳性克隆菌株按照 Wizard 质粒 DNA 纯化试剂盒方法提取质粒,经 SfiI/NotI 酶切鉴定后,亚克隆到 pCANTAB5E 载体,采用双脱氧末端终止法,由大连宝生物工程公司 (ABI 377 型自动测序仪)进行 DNA 序列测定。

2 结果

2.1 HCBP6 特异性人源化单链可变区抗体的筛选 以 HCBP6 抗原多肽作为固相化的抗原,对噬菌体单链可变区抗体库进行 5 轮“黏附-洗脱-扩增”的筛选。单链可变区抗体特异性噬菌体的富集结果见表 1。随着淘洗次数的增加,从固相平板洗脱下来的噬菌体数显示了增加的趋势,在第 5 轮筛选后结合到包被 HCBP6 抗原平皿的噬菌体与第一轮相比,富集了 162 倍(富集倍数 = 第 5 轮产出率 / 第 1 轮产出率)。

表 1 亲和黏附筛选对噬菌体抗体的富集

筛选次数	噬菌体数		产出率
	投入	捕获	
第 1 轮	4.5 × 10 ⁹	1.2 × 10 ⁷	0.26 %
第 2 轮	2.0 × 10 ⁹	1.8 × 10 ⁸	9.0 %
第 3 轮	1.5 × 10 ⁹	1.1 × 10 ⁸	7.3 %
第 4 轮	7.2 × 10 ⁸	2.5 × 10 ⁸	35.0 %
第 5 轮	6.0 × 10 ⁸	2.5 × 10 ⁸	42.0 %

产出率 = 捕获的噬菌体数量 / 所用的噬菌体数量

2.2 对 HCBP6 单链可变区抗体的鉴定 从第 5 轮筛选后得到的菌落中随机挑选 48 个克隆,用 ELISA 方法测定上清液中含有的 scFv 与 HCBP6 的结合活性。其中有 30 株上清 ELISA 的吸光度 A450 nm 值较高(P8 0.77, P24 0.714, P26 0.728, P29 0.723, P38 0.803, P39 0.762, P43 0.747 等)。对这些噬菌体抗体进行与牛血清白蛋白(BSA)的交叉反应后,确定其中有 7 株交叉反应较弱

(P8 0.145, P24 0.119, P26 0.17, P29 0.186, P38 0.118, P39 0.138, P43 0.178) (图 1).

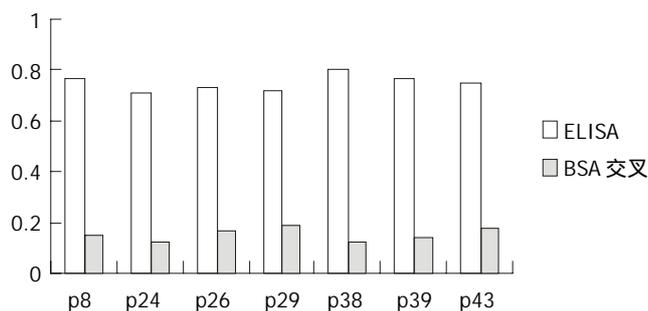


图 1 阳性克隆的 ELISA 及与 BSA 的交叉反应结果。

2.3 HCBP6 特异性 scFv 阳性克隆株竞争抑制实验及 DNA 序列测定 对筛选得到的阳性克隆取 10 μ L 噬菌体上清进行竞争抑制实验, 其中 P24 克隆抑制前 A450 nm 值为 0.526 ± 0.02 , 抑制后 A450 nm 值为 0.172 ± 0.01 , 根据抑制率公式: 抑制率 = (抑制前 A450 nm - 抑制后 A450 nm) / 抑制前 A450 nm \times 100%, 得出 P24 克隆抑制率为 67.3% (图 2)。用此菌株提取质粒, 进行 DNA 序列测定, DNA 大小为 771 bp。HCBP6 特异性 scFv 编码基因的核苷酸和编码产物的序列如图 3 所示。

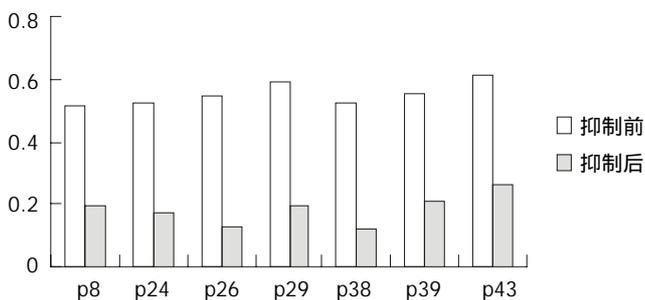


图 2 阳性克隆的竞争抑制实验结果。

heavy chain

```

1  ATG GCC CAG GTG CAG CTC GTG CAG TCT GGG GCT GAG
   M A Q V Q L V Q S G A E
   GTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC
   V K K P G A S V K V S C
49  AAG GCT TCT GGA TAC ACC TTC ACT AGC TAT GCT ATG
   K A S G Y T F T S Y A M
97  CDR1
   CAT TGG GTG CGC CAG GCC CCC GGA CAA AGG CTT GAG
   H W V R Q A P G Q R L E
145 TGG ATG GGA TGG ATC AAC GCT GGC AAT GGT AAC ACA
   W M G W I N A G N G N T
   CDR2
   AAA TAT TCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACC ATT
   K Y S Q K F Q G R V T I
193 ACC AGG GAC ACA TCC GCG AGC ACA GCC TAC ATG GAG
   T R D T S A S T A Y M E
241 CTG AGC AGC CTG AGG TCT GAA GAC ACG GCC GTG TAT
   L S S L R S E D T A V Y
289 TAC TGT GCA AGA AGT CGT AGG AAT TGG GGC CAA GGT
   Y C A R S R R N W G Q G
   CDR3

```

```

ACC CTG GTC ACC GTG TCG AGA GGT GGA GGC GGT TCA
   T L V T V S R G G G G S
377 GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG TCT GAG
   G G G G S G G G G S S E
385 CTG ACT CAG GAC CCT GCT GTG TCT GTG GCC TTG GGA
   L T Q D P A V S V A L G
433 CAG ACA GTC AGG ATC ACA TGC CAA GGA GAC AGC CTC
   Q T V R I T C Q G D S L
   CDR1
   AGA AGC TAT TAT GCA AGC TGG TAC CAG CAG AAG CCA
   R S Y Y A S W Y Q Q K P
481 GGA CAG GCC CCT GTA CTT GTC ATC TAT GGT AAA AAC
   G Q A P V L V I Y G K N
   CDR2
529 AAC CGG CCC TCA GGG ATC CCA GAC CGA TTC TCT GGC
   N R P S G I P D R F S G
577 TCC AGC TCA GGA AAC ACA GCT TCC TTG ACC ATC ACT
   S S S G N T A S L T I T
   GGG GCT CAG GCG GAA GAT GAG GCT GAC TAT TAC TGT
   G A Q A E D E A D Y Y C
625 AAC TCC CGG GAC AGC AGT GGT AAC CAT GTG GTA TTC
   N S R D S S G N H V V F
   CDR3
673 GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGT GCG GCC
   G G G T K L T V L G A A
721 GCA GGT GCG CCG GTG CCG TAT CCG GAT CCG CTG GAA
   A G A P V P Y P D P L E
   CCG CGT GCC GCA TAG
   P R A A *
Light chain

```

图 3 HCBP6 特异性 scFv 的基因序列及编码产物。

3 讨论

丙型肝炎病毒是输血后肝炎的重要病原体^[25,26]。全世界有大约 1.7 亿人患丙型肝炎, 但是只有 20-30% 的患者对干扰素 (IFN) 敏感, 而且 HCV 的持续感染与肝硬化和肝细胞癌有着密切的关系。最近的研究显示 HCV 基因组编码的核心蛋白除了与 HCV RNA 结合, 保护 HCV RNA 免受 RNA 酶的消化, 维持 HCV RNA 的稳定性之外, 还具有一系列不同的生物学调节作用^[27-37]。HCV 核心蛋白作为一种反式激活蛋白, 对于感染的肝细胞中基因表达谱产生影响, 同时, HCV 核心蛋白自身结合形成同二聚体结构, 也可以与肝细胞中其他类型的蛋白之间进行结合, 形成异二聚体、多聚体结构, 对肝细胞中的信号转导产生严重干扰。通过这些生物学作用, 对肝细胞的细胞凋亡、细胞周期进行调节, 从而参与 HCV 感染的发病机制。

HCV 核心蛋白位于病毒多肽的氨基末端, 被宿主的信号肽酶切割后产生。此蛋白被认为是病毒的核壳蛋白, 与其他的 HCV 结构与非结构蛋白相比, 其氨基酸序列高度保守。核心蛋白高度碱性, 无糖基化位点。目前的报道表明 HCV 核心蛋白可以结合病毒本身及细胞内的蛋白质。除形成同二聚体、多聚体, 还与 E1 蛋白形成异二聚体复合物。这些复合体的形成可能对 HCV 形态发生有重要作用^[38-50]。另外核心蛋白结合细胞蛋白

包括载脂蛋白 AII、肿瘤坏死因子受体 -1(TNFR-1)、淋巴毒素 -β 受体(LTβ-R),对细胞的信号转导、宿主的免疫起调节作用,并影响细胞的凋亡信号.还有研究证实 HCV 核心蛋白可反式调节病毒及细胞的一些基因的转录.最近的研究表明表达HCV 核心蛋白的转基因鼠不仅引起肝脂肪变性而且引起肝癌.所以HCV 核心蛋白是多功能蛋白,在 HCV 发病机制中起重要作用.

为了研究 HCV 核心蛋白能与肝细胞中哪种蛋白结合?这种结合蛋白在肝细胞中的分布如何?本实验室在以前的工作中采用酵母双杂交技术,以 HCV 核心蛋白作为“诱饵”,对于肝细胞 cDNA 文库进行酵母双杂交筛选,获得了一些与 HCV 核心蛋白结合的肝细胞中的蛋白的编码基因,其中包括功能未知基因6号,命名为 HCV 核心蛋白结合蛋白6(HCBP6).为了研究该蛋白合成的抗原多肽在肝组织的分布,我们利用噬菌体展示技术筛选得到了 HCBP6 的 scFv.本实验我们以 HCBP6 包被的固相抗原在第5轮筛选后,使结合 HCBP6 的噬菌粒富集了 162 倍.实验表明从噬菌体抗体库中筛选出的 HCBP6 scFv,具有较强的结合活性,且该方法具有简便、快速、经济等特点,避免了利用杂交瘤技术制备该抗体周期长、尤其是需要免疫动物等缺陷.ELISA 和竞争抑制实验结果表明筛选得到的 HCBP6 scFv 具有较高的结合活性和较好的特异性.本实验结果为开展用 HCBP6-scFv 检测 HCBP6 在肝细胞中的分布情况创造了条件.

4 参考文献

- 1 Lahm A,Yagnik A,Tramontano A,Koch U. Hepatitis C virus proteins as targets for drug development: the role of bioinformatics and modelling. *Curr Drug Targets* 2002;3:281-296
- 2 Walewski JL,Gutierrez JA,Branch-Elliman W,Stump DD,Keller TR,Rodriguez A, Benson G,Branch AD. Mutation Master: profiles of substitutions in hepatitis C virus RNA of the core:alternate reading frame,and NS2 coding regions. *RNA* 2002; 8:557-571
- 3 钟彦伟,成军. 体外突变提高单链抗体亲和力的研究进展. 国外医学流行病学传染病学分册 1999;26:100-102
- 4 钟彦伟,成军,刘妍,董菁,杨继珍,张玲霞. 可溶性 HCV 非结构蛋白 NS3 人源单链抗体在大肠杆菌中的表达. 肝脏 1999;4:73-76
- 5 钟彦伟,成军,刘妍,董菁,杨继珍,张玲霞. HCV 非结构蛋白 NS3 人源单链抗体的筛选与鉴定. 中华传染病杂志 2000;18:84-87
- 6 钟彦伟,成军,刘妍,董菁,杨继珍,张玲霞. 丙型肝炎病毒 NS3 蛋白人源基因工程单链抗体的高效表达. 中华肝脏病杂志 2000;8:171-173
- 7 钟彦伟,成军,施双双,夏小兵,王刚,杨继珍,陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS4A 人源单链抗体的筛选与鉴定. 免疫学杂志 2000;16:422-424
- 8 钟彦伟,成军,施双双,杨继珍,董菁,夏小兵,李克,刘妍,陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 人源单链抗体的筛选与表达. 中华中西医结合杂志 2001;2:97-99
- 9 钟彦伟,王松山,赵景民,成军,张玲霞. 抗丙肝病毒非结构蛋白 NS3 单链抗体的制备及免疫组织化学研究. 中华实验与临床病毒学杂志 2001;15:186-188
- 10 钟彦伟,成军,施双双,董菁,夏小兵,刘妍,李克,杨继珍. 抗 HBsAg 人源单链抗体的筛选与可溶性抗体的表达. 中国病毒学 2001;16:105-108
- 11 钟彦伟,成军,施双双,夏小兵,王刚,杨继珍,陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. 中华肝脏病杂志 2001; 9:217-219
- 12 钟彦伟,成军,王刚,田小军,陈新华,李莉,陈菊梅,张玲霞. 乙型肝炎病毒核心抗原人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. 中国公共卫生 2002;18:153-154
- 13 钟彦伟,成军,王刚,陈新华,李克,李莉,陈菊梅. 乙型肝炎病毒核心蛋白人源单链抗体在大肠杆菌中的表达. 免疫学杂志 2002;18:85-88
- 14 钟彦伟,成军,王刚,洪源,陈菊梅. 肝炎病毒基因工程抗体研究进展.

- 世界华人消化杂志 2002;10:219-221
- 15 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
- 16 钟彦伟,成军,施双双,王刚,夏小兵,田小军,李莉,张玲霞. 抗丙肝病毒包膜蛋白 E2 人源单链抗体的制备及免疫组织化学研究. 中华肝脏病杂志 2002;10:109-112
- 17 钟彦伟,成军,陈新华,王刚,洪源,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS4A 抗原模拟表位的筛选和鉴定. 免疫学杂志 2002;18:42-45
- 18 钟彦伟,成军,田小军,陈新华,李莉,张玲霞,陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 抗原模拟表位的筛选与鉴定. 中华肝脏病杂志 2002;10:266-268
- 19 钟彦伟,成军,施双双,赵景民,王刚,夏小兵,田小军,李莉,张玲霞. HBsAg 人源噬菌体单链抗体的筛选及其在临床治疗和诊断中的应用. 中华实验和临床病毒学杂志 2002;16:223-225
- 20 钟彦伟,成军,蔡炯,王刚,洪源,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅. 丙型肝炎病毒包膜蛋白 E2 抗独特型人源化单链可变区抗体的筛选与鉴定. 世界华人消化杂志 2002;10:897-901
- 21 钟彦伟,成军,陈新华,王刚,洪源,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅. 应用噬菌体随机肽库技术筛选丙型肝炎病毒 NS3 抗原模拟表位. 中国病毒学 2002; 17:202-205
- 22 Zhong YW,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 identification in immunohistochemistry. *World J Gastroenterol* 2002;8:863-867
- 23 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, 1997:213-220
- 24 成军. 病毒性肝炎的分子发病机制. 临床肝胆病杂志 2001;17(增刊): 31-35
- 25 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究进展. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 26 Cheng J. Molecular pathogenesis of viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;16(Suppl):A185
- 27 李克,王琳,成军,陆荫英,洪源,刘妍,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
- 28 成军,陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的研究进展. 国外医学病毒学分册 2000;7:123-127
- 29 成军,张玲霞. CD81 分子的生物学功能. 国外医学免疫学分册 2000; 23:322-324
- 30 成军,朱传琳. 肝炎病毒对双链 RNA 激酶 PKR 的调节作用. 国外医学微生物学分册 2000;23:1-3
- 31 成军,朱传琳. 丙型肝炎病毒感染慢性化的分子生物学机制. 国外医学病毒学分册 2000;7:29-32
- 32 成军. 丙型肝炎病毒基因组的翻译及其产物的加工. 国外医学微生物学分册 1995;18:14-16
- 33 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
- 34 成军,陈菊梅. 丙型肝炎病毒 5' - 非翻译区及其结合蛋白的研究进展. 国外医学微生物学分册 2001;24:7-9
- 35 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区结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:223-225
- 36 李克,王琳,成军,陆荫英,张玲霞,牟劲松,洪源,刘妍,段惠娟,王刚,李莉,陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白与染色体转位蛋白的相互作用. 中华医学杂志 2002;82:673-677
- 37 成军,任进余,李莉,陆志檬,李克,洪源,陆荫英,王刚,刘妍,张玲霞,陈菊梅. 丙型肝炎病毒结构基因转基因小鼠引起肝脏脂肪变. 世界华人消化杂志 2002;10:1022-1026
- 38 李克,王琳,成军,张玲霞,陆荫英,夏小兵,李莉,杨继珍. 丙型肝炎病毒核心蛋白基因表达载体的构建及在酵母中的表达. 军医进修学院学报 2002;23:1-3
- 39 李克,王琳,成军,张玲霞,陆荫英,李莉,刘妍,段惠娟. 丙型肝炎病毒 NS2 基因酵母双杂交“诱饵”载体构建及表达. 世界华人消化杂志 2002;10:129-132
- 40 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的蛋白基因. 世界华人消化杂志 2002;10: 161-164
- 41 Husmeier D,Wright F. A Bayesian approach to discriminate between alternative DNA sequence segmentations. *Bioinformatics* 2002;18:226-234
- 42 Kernebeck T,Lohse AW,Grotzinger J. A bioinformatical approach suggests the function of the autoimmune hepatitis target antigen

- soluble liver antigen/liver pancreas. *Hepatology* 2001;34:230-233
- 43 Husmeier D, Wright F. Probabilistic divergence measures for detecting interspecies recombination. *Bioinformatics* 2001;17 (Suppl 1): S123-S131
- 44 Klinck R, Westhof E, Walker S, Afshar M, Collier A, Aboul-Ela F. A potential RNA drug target in the hepatitis C virus internal ribosomal entry site. *RNA* 2000;6:1423-1431
- 45 Cheng J. Progress in gene therapy for liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14(Suppl):A261-A262
- 46 成军, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白的生物学调节作用. 国外医学微生物学分册 2001;24:12-14
- 47 成军, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒 3' - 非翻译区 RNA 结合蛋白的研究进展. 国外医学病毒学分册 2000;7:17-21
- 48 成军, 施双双, 钟彦伟, 夏小兵, 王刚, 王琳, 刘妍, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白可溶性单链可变区抗体在大肠杆菌中的表达. 解放军医学杂志 2000;25:394-397
- 49 李克, 张玲霞, 成军. 丙型肝炎病毒与脂质系统代谢关系的研究进展. 国外医学病毒学分册 2002;9:1-3
- 50 成军, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒感染与脂类代谢的相关性. 肝脏 2002;7:56-58

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎订阅 2003 年度 World Journal of Gastroenterology®

本刊讯 美国科学情报研究所 (ISI), 2001 年《期刊引用报告》(Journal Citation Reports, JCR®) 报道我国科技期刊 59 种, 其中包括医学领域 3 种, 分别为 WJG® 影响因子 1.445, 中国药理学报英文版影响因子 0.631, 中华医学杂志英文版影响因子 0.108. Science Citation Index- Expanded (SCI-E®) 收录世界领先的胃肠病学和肝病杂志 44 种, 其中包括 WJG®. Current Contents/Clinical Medicine® (即时目次 / 临床医学) 收录世界领先的 1130 种期刊和书所登载的文章, 社论, 会议摘要, 评论及其他重要信息的完整的书刊目次信息. 其中收录世界领先的胃肠病学和肝病杂志 36 种, 其中包括 WJG®. Clinical Medicine Citation Index® 收录世界领先的胃肠病学和肝病杂志 43 种, 其中包括 WJG®. WJG® 由 122 位胃肠病学者组成的编委会, 分布在 65 个国家和地区, 其中包括 53 个国家的胃肠病学会主席. 53 个国家和地区胃肠病学会为 WJG® 的合作伙伴. WJG® 被美国《医学索引 (Index Medicus / MEDLINE)》、美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库 / 医学文摘 (EMBASE / Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志》(Abstract Journal, AJ) 收录. 国内被中国科学引文索引, 中国科技论文统计与分析, 世界消化网数据库, 国家级火炬计划项目中国学术期刊综合评价数据库来源期刊. WJG®, 1999 年度, 2000 年度, 2001 年度被评为山西省一级期刊. 中华人民共和国科学技术部, 国科发财字[2001]340 号文件 2001-09-10 关于公布科技期刊方阵名单的通知. 按照期刊方阵入选要求和比例, 经部门推荐、专家评审, 最终从推荐名单中选出科技期刊 716 种进入中国期刊方阵, 其中“双高”期刊 40 种, “双奖”期刊 58 种, “双百”期刊 122 种, “双效”期刊 496 种. WJG® 在众多消化类期刊中唯一进入双百期刊行列. 中国科技信息研究所信息分析研究中心期刊检索报告: 2001 年 WJG® 总被引频次 1844, 影响因子 2.92, 即年指标 0.694, 他引总引比 0.52, 地区分布数 20, 基金和资助论文比例 0.549, 海外作者论文数 0.353, 指标综合加权评分 57.268. WJG® 2003 年月刊, 大 16 开, 256 页 / 期, 定价 50.00 元 / 期, 邮发代号 82-261. E-mail: wjg@wjgnet.com http://www.wjgnet.com

(世界胃肠病学杂志社 2002-10-18)

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

刘妍,成军,李克,杨倩,陆荫英,王琳,王建军

刘妍,成军,李克,杨倩,陆荫英,王琳,王建军,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

刘妍,女,1973-01-15生,辽宁海城市人,满族. 1995年北京医科大学本科毕业,军事医学科学院免疫学专业2002级硕士研究生,助理研究员,主要从事病毒性肝炎基础研究.

国家自然科学基金资助项目, No.C39970674, No.C03011402, 归国留学人员科研启动基金资助项目, No.98H038

项目负责人:成军,100039,北京市丰台路26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:2002-10-29 接受日期:2002-11-28

Gene expression profile of HepG2 cell transfected with hepatitis C virus core protein-binding protein 6 gene

Yan Liu, Jun Cheng, Ke Li, Qian Yang, Yin-Ying Lu, Lin Wang, Jian-Jun Wang

Yan Liu, Jun Cheng, Ke Li, Qian Yang, Yin-Ying Lu, Lin Wang, Jian-Jun Wang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Supported by grants from National Natural Science Foundation of China, No. C39970674, No. C03011402, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA, No. 98H038

Correspondence to: Jun Cheng, MD, PhD, Chief, Professor, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 26 Fengtai Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2002-10-29 Accepted: 2002-11-28

Abstract

AIM: To screen and clone genes of hepatic protein interacting with hepatitis C virus (HCV) core protein and analyze the gene expression profiles of HepG2 cell transfected with HCV core protein-binding protein 6 (HCBP6) gene.

METHODS: Using yeast two-hybrid system 3, bait plasmid of HCV core protein was constructed and genes encoding HCV core protein-binding protein were screened and identified. One gene named HCBP6 was identified. Human full-length encoding gene of HCBP6 and its amino acid sequences were identified by bioinformatics method, and the recombinant expression plasmid pcDNA3.1(-)-HCBP6 was constructed. mRNA from HepG2 cells transfected with pcDNA3.1(-)-HCBP6 and the empty vector were detected with cDNA microarray, respectively.

RESULTS: Human HCBP6 cDNA sequence was identified. The coding sequence for human HCBP6 consists of 456 nt and its protein consists of 152 aa. Twenty of 1152 genes obtained from gene expression profile analysis differed from those in GenBank, in which 13 genes were up-regulated and 7 genes

were down-regulated in HepG2 cells transfected with HCBP6 plasmid. These genes differentially regulated by HCBP6 protein included human genes encoding proteins involved in signal transduction, cell proliferation, differentiation, and growth regulation.

CONCLUSION: The bioinformatics combined yeast two hybrid technique is a powerful method for screening and analysis of genes of hepatic protein interacting with HCV core protein. The findings obtained by cDNA microarray technique provided significant data for preliminary understanding of the biological function of new gene, and also provided some clues for further clarifying the molecular biological processes of hepatocytes in interaction between HCV core protein and HCBP6.

Liu Y, Cheng J, Li K, Yang Q, Lu YY, Wang L, Wang JJ. Gene expression profile of HepG2 cell transfected with hepatitis C virus core protein-binding protein 6 gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(4):394-398

摘要

目的: 筛选并克隆丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白的肝细胞结合蛋白基因,并对新基因转染肝癌细胞的基因表达谱进行分析,探索该基因表达对肝细胞基因表达的调节机制。

方法: 应用酵母双杂交技术,以HCV的核心蛋白作为“诱饵(bait)”,筛选鉴定与其结合的肝细胞中蛋白的编码基因.应用生物信息学(bioinformatics)技术,分析其中筛选得到的人HCV核心蛋白结合蛋白6(HCBP6)基因的全长编码序列,并构建HCBP6基因的真核表达载体pcDNA3.1(-)-HCBP6.应用基因表达谱芯片技术对重组表达质粒pcDNA3.1(-)-HCBP6转染的HepG2细胞和空载体处理的相同细胞差异表达的mRNA进行检测。

结果: 通过酵母双杂交技术的筛选和鉴定,结合生物信息学分析,确定人的HCBP6基因由456 nt组成,编码152 aa的蛋白.基因表达谱芯片所检测的1152条目的基因均为GenBank中登录的基因,HCBP6表达质粒转染的细胞有20条差异表达基因,其中13条基因表达增强,7条基因表达降低.这些差异表达的基因与细胞信号转导、增生、分化及生长调节密切相关。

结论: 酵母双杂交技术结合生物信息学技术,是克隆蛋白结合蛋白的有效方法,基因表达谱芯片技术对于初步全面探索新基因的功能提供重要的资料.本实验结果为进一步阐明HCV核心蛋白与Hcbp6相互作用后的肝细胞生物

大分子变化提供了理论依据。

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(4): 394-398
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/394.htm>

0 引言

肝炎病毒蛋白与宿主蛋白相互作用, 可能是病毒感染导致肝细胞损伤、肝纤维化和肝细胞癌发生、发展的重要原因. 丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白是一种多功能蛋白质, 除了作为核壳蛋白具有病毒颗粒组装功能外, 还具有多种调控细胞及病毒基因表达、细胞凋亡、细胞增生与分化以及免疫调节等功能. 临床和实验研究显示 HCV 核心蛋白在病毒致病过程中起到重要的作用^[1-7].

为更好地了解 HCV 核心蛋白与肝细胞蛋白之间的相互作用, 我们采用酵母双杂交系统 3, 以 HCV 核心蛋白作为“诱饵”, 对于肝细胞 cDNA 文库进行酵母双杂交筛选, 获得了一些与 HCV 核心蛋白结合的肝细胞蛋白的编码基因, 其中包括功能未知基因 6 号, 我们命名为 HCV 核心蛋白结合蛋白 6(HCBP6). 为进一步探索该基因的功能, 我们应用基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)筛选 HCBP6 表达质粒转染 HepG2 细胞后的差异表达基因, 并应用生物信息学(bioinformatics)对差异表达的基因进行分析. 本研究为全面了解 HCBP6 基因在肝细胞中的生物过程提供理论基础.

1 材料和方法

1.1 HCV 核心蛋白结合蛋白的酵母双杂交筛选 应用酵母双杂交技术筛选 HCV 核心蛋白结合的肝细胞蛋白的研究原理、方法、操作步骤以及 HCBP6 基因真核表达载体的构建等参考基因治疗研究中心相关的研究论文^[8-11].

1.2 总 RNA 提取及 mRNA 纯化 在 35 mm 培养皿中常规培养肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞(由本室保存), 细胞生长至对数期时, 分别以脂质体转染试剂 Lipofectamine PLUS(购自 Invitrogen 公司)将 2 μ g pcDNA3.1(-)-HCBP6 和空载体 pcDNA3.1(-)转染 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞, 每 5 \times 10⁶ 个细胞加入 1 mL 总 RNA 提取试剂 Trizol(购自 Invitrogen 公司). 立即于液氮中保存. 使用 Trizol 试剂一步法提取 HCBP6 表达质粒 pcDNA3.1(-)-HCBP6 和空载体 pcDNA3.1(-)转染的 HepG2 细胞总 RNA (分别标记为实验组和对照组), 样品经分光光度计检测吸光度 A 值, 并行热稳定实验, 于 -20 和 70 保温 1 h 后, 经琼脂糖凝胶电泳检测 28 S、18 S 条带变化. 以 Qiagen 公司 Oligotex mRNA Midi Kit 纯化得 mRNA. 操作按说明书进行, 并行电泳检测.

1.3 探针标记及芯片制备 参照 Yang et al^[14]方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化. Cy3-dUTP 标记对照组细胞 mRNA(5 μ g), Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA(5 μ g). 乙醇沉淀后溶解在 20 μ L 5 \times SSC+2 g/L SDS 杂交液中.

芯片包含的 1 152 个 cDNA 由上海联合基因有限公司提供, 包括原癌基因和抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等. 以通用引物进行 PCR 扩增, PCR 产物长度为 1-3 kb. 靶基因以 0.5 μ g / μ L 溶解于 3 \times SSC 溶液中, 用 Cartesian 公司的 Cartesian 7 500 点样仪及 TeleChem 公司的硅烷化玻片进行点样. 玻片经水合(2 h)、室温干燥(0.5 h), UV 交联, 再分别用 2 g/L SDS、水及 2 g/L 的硼氢化钠溶液处理 10 min, 晾干备用.

1.4 杂交及洗涤 将基因芯片和杂交探针 95 水浴变性 5 min, 将混合探针加在基因芯片上, 置于 60 杂交 15-17 h. 依次以 2 \times SSC+2 g/L SDS、1 g/L \times SSC+2 g/L SDS、1 g/L \times SSC 洗涤 10 min, 室温晾干.

1.5 检测与分析 用 General Scanning 公司的 ScanArray 3 000 扫描芯片. 用预先选定的内参照基因(24 条管家基因, 每个基因点 2 个点, 共 48 个点)对 Cy3 和 Cy5 的原始提取信号进行均衡和修正. 用 ImaGene3.0 软件分析 Cy3、Cy5 两种荧光信号的强度, 计算 Cy5/Cy3 比值. 阳性结果判断: Cy5/Cy3 > 1.8, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3 < 0.7, 为绿色荧光, 显示表达减低.

2 结果

2.1 以 HCV 核心蛋白为“诱饵”对于肝细胞文库酵母双杂交筛选结果 经过以 HCV 核心蛋白为“诱饵”的肝细胞 cDNA 文库的酵母双杂交, 筛选出与 HCV 核心蛋白结合的一系列阳性克隆. 根据克隆的随机编号, 将这一基因编码产物命名为 HCV 核心蛋白结合蛋白 6(HCBP6), 该基因由 456 nt 组成, 编码 152 aa 组成的蛋白^[8-11].

2.2 总 RNA 及 mRNA 的定性、定量分析 提取 HCBP6 表达质粒 pcDNA3.1(-)-HCBP6 和空载体 pcDNA3.1(-)转染的 HepG2 细胞总 RNA, 测得吸光度 A₂₆₀/A₂₈₀ > 1.90, 热稳定实验 70 保温 1 h 与 -20 1 h 电泳条带比较, 显示 28 S 条带无明显降解, 电泳结果证实已抽提高纯度的总 RNA. mRNA 主要集中于 0.9-4.0 kb 的连续条带.

2.3 芯片杂交体系验证及结果分析 在芯片上共有 1 152 个 cDNA. 为了监控芯片杂交技术体系的整个过程, 在芯片上设置了阴性对照(8 条水稻基因, 共 8 个点), 这些点的杂交信号均很低, 证实了数据的可靠性. 由于实验组探针标记 Cy5 荧光素(呈红色), 对照组探针标记 Cy3 荧光素(呈绿色), 红绿颜色的差异就显示该基因在实验组和对照组中基因表达水平上的差异, 黄色代表表达水平无差异. 按阳性标准, 从 1 152 个基因中筛选出差异表达基因共 20 条, 其中 13 条基因表达增强, 7 条基因表达降低.

2.4 差异表达基因分析 表达增强的基因主要有四类: (1) 细胞生长调节相关基因, 如胰腺肿瘤相关蛋白, 神经纤维瘤 2 肿瘤抑制蛋白斯库瓦诺明的相互作用蛋白 1 以及 20 号染色体开放读框 1 等; (2) 细胞信号转

导相关基因,如表皮生长因子受体,神经生长因子 β 多肽,跨膜受体蛋白,蛋白磷酸酶2调节亚基等;(3) DNA复制及翻译相关基因,如RNA结合基序蛋白,微小染色体维持缺陷3蛋白,新生多肽相关复合体等;(4)免疫调节因

子,如白介素10受体.表达增强的基因见表1.表达降低的基因主要有:(1)过氧化酶相关基因,如细胞质的环氧化物水解酶,过氧化物歧化酶等;(2)线粒体相关的基因,如细胞色素P450等.表达降低的基因见表2.

表1 表达增强的基因

GenBank 登录号	编码蛋白	Cy5/Cy3
NM_005228	表皮生长因子受体 epidermal growth factor receptor (EGFR)	1.803
NM_025263	来源于 MHC-I 分子的富含脯氨酸的蛋白 CAT56 protein (CAT56)	1.833
NM_003564	平滑肌分化特异性蛋白 transgelin 2 (TAGLN2)	1.835
NM_005777	RNA 结合基序蛋白 RNA binding motif protein 6 (RBM6)	1.856
NM_002506	神经生长因子 多肽 nerve growth factor ,beta polypeptide (NGFB)	1.896
AF311912	胰腺肿瘤相关蛋白 pancreas tumor - related protein (FKSG12)	1.941
NM_001558	白介素10受体 interleukin 10 receptor , alpha (IL10RA)	1.959
Z17227	跨膜受体蛋白 transmembrane receptor protein	1.983
NM_014225	蛋白磷酸酶2调节亚基 protein phosphatase 2 , regulatory subunit A (PR 65)	2.083
NM_002388	微小染色体维持缺陷3蛋白 minichromosome maintenance deficient 3 (MCM3)	2.262
NM_014575	神经纤维瘤病2肿瘤抑制蛋白 schwannomin的相互作用蛋白1 schwannomin interacting protein 1 (SCHIP1)	2.362
NM_012112	20号染色体开放读框1 chromosome 20 open reading frame 1 (C20orf1)	2.486
NM_005594	a polypeptide (NACA)	4.750

表2 表达降低的基因

GenBank 登录号	编码蛋白	Cy5/Cy3
NM_005161	血管紧张素受体样蛋白1 angiotensin receptor-like 1 (AGTRL1)	0.485
NM_000732	T细胞抗原受体相关的复合物 链 CD3D antigen , delta polypeptide (TiT3 complex) (CD3D)	0.512
NM_001423	上皮膜蛋白1 epithelial membrane protein 1 (EMP1)	0.545
NM_001979	细胞质的环氧化物水解酶 epoxide hydrolase 2 , cytoplasmic (EPHX2)	0.611
NM_000104	细胞色素氧化酶 P450 cytochrome P450	0.665
NM_000699	胰腺淀粉酶 2A amylase , alpha 2A; pancreatic (AMY2A)	0.678
NM_000454	过氧化物歧化酶 superoxide dismutase 1 , soluble (SOD1)	0.689

3 讨论

HCV 基因组含有单一的开放读码框架,编码3010-3033个氨基酸残基的多肽前体,两侧是5' - 非翻译区及3' - 非翻译区.多肽前体至少被加工为10种结构蛋白和非结构蛋白,HCV各结构和非结构蛋白在肝细胞内并不是孤立存在的,与宿主肝细胞蛋白之间相互作用可能是HCV致病的分子生物学基础^[12-17].HCV核心蛋白是一种多功能蛋白质,除了作为核壳蛋白具有病毒颗粒组装功能外,还调控多种细胞及病毒基因启动子的活性,具有广泛的反式调节作用.研究显示,核心蛋白可以和宿主的多种蛋白质如淋巴毒素 β 受体、核糖核蛋白K、RNA螺旋酶、DBX等相互作用,影响细胞的正常生理过程^[18-21].表达HCV核心蛋白的转基因鼠不仅引起肝脂肪变性而且引起肝细胞癌^[22,23].可见HCV核心蛋白在HCV发病机制中起重要作用.为进一步研究HCV核心蛋白与宿主肝细胞蛋白的相互作用,我们用肝细胞cDNA文库与HCV核心蛋白诱饵进行酵母双杂

交,结合生物信息学分析,筛选并克隆了与HCV核心蛋白相互作用的新的蛋白质基因HCBP6^[9,11,24].我们构建了HCBP6基因的真核表达载体,初步研究发现该基因的表达在一定程度上抑制了HCV核心蛋白对SV40早期启动子的反式激活作用.本研究采用基因表达谱芯片方法筛选HCBP6基因转染细胞差异表达基因,以期综合分析HCBP6基因的生物功能.

基因表达谱芯片是将大量的基因特异探针或其cDNA片段固定在一块基因芯片上,对来源不同的个体、不同组织、不同细胞周期、不同发育阶段、不同分化阶段、不同病变、不同刺激(包括不同诱导、不同治疗手段)下的细胞内的mRNA或逆转录产物cDNA进行检测,从而大规模对这些基因表达的个体特异性、组织特异性、发育阶段特异性、分化阶段特异性、病变特异性、刺激特异性进行综合分析和判断^[25-28].本研究应用基因表达谱芯片对HCBP6表达质粒pcDNA3.1(-)-HCBP6转染的HepG2细胞和空载体处理的相同细胞差异表达的

mRNA 进行检测, 通过分析二者之间基因表达的差异信息, 寻找 HCBP6 上调或下调的基因. 在 1 152 个基因中筛选出 20 个差异表达基因, 这些差异调节基因大多与细胞信号传导、细胞增生分化、免疫调节、肿瘤发生等生物过程密切相关.

在表 1 的上调基因中, 有多条基因与细胞生长调节密切相关, 如神经纤维瘤病 2 肿瘤抑制蛋白斯库瓦诺明的相互作用蛋白 1 基因分布在人染色体 3q25, 斯库瓦诺明是负性生长调节因子, 可以与肝细胞生长因子调节的酪氨酸激酶作用底物(HRS)相互作用, 发挥其生物功能^[29]. 20 号染色体开放读框 1, 为细胞周期 S、G₂、M 期增生相关的核蛋白 P100, 该蛋白的检出预示肿瘤的预后差^[30]. HCBP6 蛋白通过调控上述基因的表达, 影响肝细胞基因的增生与分化, 可能是其协同 HCV 核心蛋白致病的主要机制之一. 一些细胞信号转导相关基因, 如表皮生长因子受体, 神经生长因子 β 多肽, 跨膜受体蛋白, 蛋白磷酸酶 2 调节亚基等基因的表达上调^[31], 表明 HCBP6 蛋白参与了细胞信号转导及细胞增生与分化的调控, 影响肝细胞基因组的表达. 微小染色体维持缺陷 3 蛋白是 DNA 复制中起重要作用的核蛋白^[32], 新生多肽相关复合体能够与核糖体携带的新生肽结合, 从而阻止新生肽与胞质中其他蛋白的异常相互作用, 此外, 该复合体是 12 号染色体的转录反式激活因子^[33]. 可见 HCBP6 蛋白在调节 DNA 复制及蛋白翻译成成熟修饰过程中起重要作用. 免疫调节因子, 白介素 10 受体表达增强, 提示 HCBP6 蛋白可能具有一定的免疫调节作用.

分析部分表达降低的基因主要有: 过氧化酶相关基因, 如过氧化物歧化酶, 在清除自由基介导的细胞内大分子损伤过程中起重要作用; 又如细胞质的环氧化物水解酶, 生理条件下, 能够水解经细胞色素 P450 催化产生的环氧化物为二醇, 自胆汁、尿中排泄. 当水解功能缺陷时, 环氧化物可在肝内蓄积, 与细胞内大分子物质共价结合, 导致一系列的病理改变. HCBP6 基因通过下调上述基因的表达水平, 在一定程度上妨碍了肝细胞的损伤后修复, 扰乱肝细胞生长调节, 甚至诱发自身免疫性肝损害及肝癌. 此外, 线粒体能量代谢相关的基因, 如细胞色素氧化酶 P450, 能够直接激活分子氧, 参与药物和毒物的转化. 该基因表达降低, 暗示机体对许多药物及毒物的摄取、转化发生障碍, 易积蓄中毒, 可见 HCBP6 基因通过下调细胞色素氧化酶 P450 的表达, 参与了肝脏的生物转化作用. HCBP6 还下调 T 细胞抗原受体相关复合物的表达, 参与 T 细胞免疫调节. 结合表 1 的结果, 我们发现 HCBP6 蛋白双相调节细胞的生长, HCBP6 独自存在是否足以引起细胞病变, 还需要深入研究, 而与 HCV 核心蛋白相互作用可能是 HCV 的致病机制之一.

总之, 利用基因表达谱芯片对 HCBP6 蛋白差异调节基因的表达研究表明, 细胞内 HCBP6 蛋白的过表达引起的生物过程涉及许多不同基因表达的变化, 这些基因与细胞信号转导、细胞增生与分化、免疫调节、

肿瘤发生、能量代谢及生物转化等生物过程密切相关. 本研究结果为进一步了解 HCBP6 基因的生物学功能及其与 HCV 核心蛋白相互作用过程中致病(癌)的分子生物学机制提供重要的线索.

4 参考文献

- Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-virus core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000; 32:405-412
- Ray RB, Lagging LM, Meyer K, Steele R, Ray R. Transcriptional regulation of cellular and viral promoters by the hepatitis C virus core protein. *Virus Res* 1995; 37: 209-220
- 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
- Cheng J. Molecular pathogenesis of viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:A185
- 刘妍, 成军. 丙肝病毒致肝癌的分子生物学机制. *国外医学流行病学传染病学分册* 2000; 27:10-13
- 刘妍, 成军, 邵得志, 王琳, 钟彦伟, 夏小兵. 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活 SV40 病毒早期启动子 / 增强子的研究. *军医进修学院学报* 2001;22:186-188
- 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 董菁, 洪源, 张跃新, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用抑制性消杂交技术克隆丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因. *解放军医学杂志* 2001;26:880-883
- 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 陆荫英, 夏小兵, 李莉, 杨继珍. 丙型肝炎病毒核心蛋白基因表达载体的构建及在酵母中的表达. *军医进修学院学报* 2002;23:1-3
- 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
- 李克, 王琳, 成军, 张玲霞. HCBP6 基因转染促进哺乳动物细胞增生作用的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:000-000
- 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* 2002;11:378-384
- Caselmann WH, Serwe M, Lehmann T, Ludwig J, Sproat BS, Engels JW. Design, delivery and efficacy testing of therapeutic nucleic acids used to inhibit hepatitis C virus gene expression in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol* 2000;6:626-629
- Song ZQ, Hao F, Min F, Ma QY, Liu GD. Hepatitis C virus infection of human hepatoma cell line 7721 in vitro. *World J Gastroenterol* 2001; 7:685-689
- Yang JM, Wang RQ, Bu BG, Zhou ZC, Fang DC, Luo YH. Effect of HCV infection on expression of several cancer associated gene products in HCC. *World J Gastroenterol* 1999;5:25-27
- Zhou HC, Xu DZ, Wang XP, Zhang JX, Huang Y, Yan YP, Zhu Y, Jin BQ. Identification of the epitopes on HCV core protein recognized by HLA A2 restricted cytotoxic T lymphocytes. *World J Gastroenterol* 2001;7:583-586
- 周永兴, 冯志华, 贾战生, 连建奇, 李谨肇, 李文波. 丙型肝炎病毒核心基因免疫研究. *世界华人消化杂志* 1998; 6:966-968
- 杜竞辉, 查文章. 丙型肝炎与原发肝癌关系研究现状. *世界华人消化杂志* 1999; 7:176-179
- 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 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
- Mamiya N, Worman HJ. Hepatitis C virus core protein binds to a DEAD box RNA helicase. *J Biol Chem* 1999;274:15751-15756
- You LR, Chen CM, Yeh TS, Tsai TY, Mai RT, Lin CH, Lee YH. Hepatitis C virus core protein interacts with cellular putative RNA helicase. *J Virol* 1999;73: 2841-2853
- Chen CM, You LR, Hwang LH, Lee YH. Direct interaction of hepatitis C virus core protein with the cellular lymphotoxin-beta receptor modulates the signal pathway of the lymphotoxin-beta receptor. *J Virol* 1997; 71:9417-9426
- Ray RB, Lagging LM, Meyer K, Ray R. Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. *J Virol* 1996; 70: 4438-4443
- Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Ishibashi K, Matsuura Y, Kimura S, Miyamura T, Koike K. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma

- in transgenic mice. *Nat Med* 1998;4:1065-1067
- 24 李克,王琳,成军,陆荫英,张玲霞,牟劲松,洪源,刘妍,段惠娟,王刚,李莉,陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白与染色体转位蛋白的相互作用. *中华医学杂志* 2002; 82:673-677
- 25 Schena M, Shalon D, Dais RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270:467-470
- 26 李瑶,陈菊祥,裘敏燕,应康,陈沁,符薇,王品,沈娴,谢毅,毛裕民. 基因芯片的制备研究. *第二军医大学学报* 2000; 21: 812-814
- 27 Zhang MQ. Large-scale gene expression data analysis: a new challenge to computational biologists. *Genome Res* 1999;9:681-688
- 28 Bigger CB, Brasky KM, Lanford RE. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol* 2001;75:7059-7066
- 29 Goutebroze L, Brault E, Muchardt C, Camonis J, Thomas G. Cloning and Characterization of SCHIP-1, a Novel Protein Interacting Specifically with Spliced Isoforms and Naturally Occurring Mutant NF2 Proteins. *Mol Cell Biol* 2000; 20:1699-1712
- 30 Heidebrecht HJ, Buck F, Steinmann J, Sprenger R, Wacker HH, Parwaresch R. p100: a novel proliferation associated nuclear protein specifically restricted to cell cycle phases S, G2, and M. *Blood* 1997;90:226-233
- 31 Sundaresan P, Farndale R. p38 mitogen-activated protein kinase dephosphorylation is regulated by protein phosphatase 2A in human platelets activated by collagen. *FEBS Lett* 2002; 528:139-148
- 32 Kubota Y, Mimura S, Nishimoto S, Takisawa H, Nojima H. Identification of the yeast MCM3-related protein as a component of Xenopus DNA replication licensing factor. *Cell* 1995; 81: 601-609
- 33 Wiedmann B, Sakai H, Davis TA, Wiedmann M. A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature* 1994;370:434-440

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国科技期刊走向世界的步伐正在加快

截止到2002年7月,中国被著名检索系统SCI收录的科技期刊数从63种增加到了67种.从制作SCI的美国ISI(美国科学情报所)发布的JCR(期刊引证报告)上的数据看,有指标数据的59种我国科技期刊中,80%以上的期刊影响因子呈上升趋势;约90%的总被引频次都提高了.

在2001年的JCR中,总被引频次超过1000次的中国科技期刊有4个,他们是《高等学校化学学报》(中文版)(1959次),《科学通报》(1628次),《物理学报》(中文版)(1227次),《中国物理快报》(1215次)首次有两个中国科技期刊的影响因子超过1,他们是《细胞研究》(2.102)和《世界胃肠病学杂志》(1.445),这两种期刊均为中国英文版科技期刊.

从期刊影响因子在本学科的排位看,进入SCIE的我国科技期刊,有8个期刊排在本学科的中上水平,他们是《力学学报》,《高等学校化学学报》(中文版),《中国物理》,《中国物理快报》,《科学通报》,《中国科学B》,《中国科学E》,《中国有色金属学报》.

在本学科国际期刊中,我国有10个期刊被引频次位于中上水平的.他们是:《科学通报》,《高等学校化学学报》(中文版),《中国科学A》,《物理学报》(中文版),《中华医学杂志》,《化学学报》(中文版),《中国物理快报》,《中国有色金属学报》(英文版),《中国科学B》,《中国药理学报》.

在SCI网络版收录的中国科技期刊中,有25个期刊是由中国科学出版社出版的,其中在JCR中有指标的期刊有18个.

另外,除SCI系统外,中国科技期刊被其他几个重要国际检索系统收录的数量也呈上升趋势.例如,在反映工程技术论文的历史超百年的检索系统《EI》(工程索引)中,中国被收录的科技期刊从最少时的40种,增加到了2000年的104种.这也直接反映了我国科技期刊被国际认可的程度.

国家科技部中国科技信息研究所,每年对我国科技期刊在国内的情况做出统计分析,定期出版《中国科技期刊引证报告》.以2000年数据看,我国科技期刊的平均影响因子由上一年的0.208上升到0.240,其中影响因子超过1的有20个;总被引频次的平均值达到了192.2次,总被引频次超过1000次的期刊有25个,其中《科学通报》的总被引频次达到了2979次.

目前,我国科技期刊数量已达到4600余种,已经形成了一定的规模,而且门类相对齐全,为我国基础研究的发展和科研成果转化为生产力做出了重要的贡献,但我们承认中国的科技期刊发展水平与世界发达国家之间存在较大的差距.随着中国加入WTO,对于中国的科技期刊,既是机遇又是挑战.我们相信,通过我国学术界和编辑部门的共同努力,一定会在不远的将来产生一批具有国际水准的科技期刊.

(2002-11-08)

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

牟劲松,刘妍,王刚,成军,段惠娟,李克,陆荫英,王琳,王惠芬

牟劲松,刘妍,王刚,成军,段惠娟,李克,陆荫英,王琳,王惠芬,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 北京市100039
牟劲松,男,1971-02-20生,汉族,1995年解放军第三军医大学毕业,医学硕士,主治医师,从事病毒性肝炎的临床治疗及实验研究。
国家自然科学基金资助项目, No.39970674
项目负责人:成军,100039,北京市丰台路26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。cj@genetherapy.com.cn
电话:010-66933392 传真:010-63801283
收稿日期:2002-10-29 接受日期:2002-11-28

Cloning of genes transactivated by NS3 protein of HCV with suppressive and subtractive hybridization

Jin-Song Mu, Yan Liu, Gang Wang, Jun Cheng, Hui-Juan Duan, Ke Li, Yin-Ying Lu, Lin Wang, Hui-Fen Wang

Jin-Song Mu, Yan Liu, Gang Wang, Jun Cheng, Hui-Juan Duan, Ke Li, Yin-Ying Lu, Lin Wang, Hui-Fen Wang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, P. R. China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. C39970674

Correspondence to: Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 26 Fengtai Road, Beijing, 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received:2002-10-29 Accepted:2002-11-28

Abstract

AIM:To construct a subtractive cDNA library of genes transactivated by NS3 protein of hepatitis C virus (HCV) with suppressive and subtractive hybridization technique and clone genes associated with transactivation.

METHODS:The mRNA was isolated from HepG2 cells transfected with pcDNA3.1(-)-NS3, and pcDNA3.1(-) empty vector, respectively; cDNA was synthesized. After digestion with restriction enzyme RsaI, cDNA fragments were obtained by restriction enzyme RsaI digestion. Tester cDNA was then divided into two groups and ligated to the specific adaptor 1 and adaptor 2, respectively. After tester cDNA was hybridized with driver cDNA twice and underwent two times of nested PCR, amplified cDNA fragments were subcloned into T/A plasmid vectors to set up the subtractive library. Amplification of the library was carried out with *E. coli* strain JM109. The cDNA was sequenced and analyzed in GenBank with Blast search after PCR.

RESULTS:The amplified library contained 70 positive clones. Results of PCR study indicated that 56 clones had inserts of 200-1 000 bp in length. Sequence analysis suggested that six novel cDNA sequences might be target genes transactivated by NS3 protein.

CONCLUSION:The subtractive library of genes transactivated by NS3 protein of HCV was constructed successfully.

Mu JS,Liu Y,Wang G,Cheng J,Duan HJ,Li K,Lu YY,Wang L,Wang HF. Cloning of genes transactivated by NS3 protein of HCV with suppressive and subtractive hybridization. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(4):399-403

摘要

目的:应用抑制性消减杂交技术(SSH)构建丙型肝炎病毒(HCV)非结构蛋白3(NS3)反式激活的相关基因cDNA消减文库,克隆HCV NS3反式激活相关基因。

方法:以HCV NS3表达质粒pcDNA3.1(-)-NS3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:文库扩增后得到70个白色克隆,经菌落PCR分析,得到56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6个差异表达的未知序列,可能是NS3反式激活的新的靶基因。

结论:成功构建HCV NS3反式激活的相关基因cDNA消减文库,为今后进一步分析、研究病毒蛋白的致病机制奠定基础。

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(4):399-403

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/399.htm>

0 引言

目前,丙型肝炎病毒(HCV)与肝细胞之间相互作用的分子生物学机制尚不完全清楚,其中,病毒编码的蛋白能够影响多种细胞信号转导途径,从而进一步影响肝细胞某些基因的表达、调控,可能是病毒感染导致肝细胞损伤和肝细胞癌发生、发展的重要原因^[1-10]。

HCV NS3在病毒多蛋白前体加工并转化为成熟蛋白的过程中,发挥了重要作用,非结构蛋白(NS)区

各蛋白的产生依赖于此蛋白对病毒多蛋白前体的酶解和修饰^[11-18]. 本实验应用抑制性消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)技术^[19-24], 构建 HCV NS3 反式激活的相关基因差异表达的 cDNA 消减文库, 通过对所得片段进行序列同源性分析, 筛选相关的靶基因, 为研究丙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 JM109(本室保存), pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen), Lipofectamine PLUS 转染试剂(Gibco), mRNA 纯化试剂盒(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 纯化试剂盒(Boehringer Mannheim), T7、SP6 通用引物及 pGEM-Teasy 载体(Promega). HCV NS3 真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-NS3 由本室构建.

1.2 方法 (1)细胞转染及细胞 mRNA 提取用 Lipofectamine PLUS 转染试剂将 2 μg pcDNA3.1(-)-NS3 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 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.(2) 双链 cDNA(dscDNA)合成 使用 PCR-Select cDNA Subtraction Kit, 以获得的 mRNA 为模板逆转录合成 cDNA. (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 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 作第 2 次杂交; 然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.(4) 克隆鉴定分析 扩增产物与 pGEM-Teasy 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 °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, 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(上海博亚公司). 应用生物信息学将测得序列与 GenBank 数据库进行同源性分析.

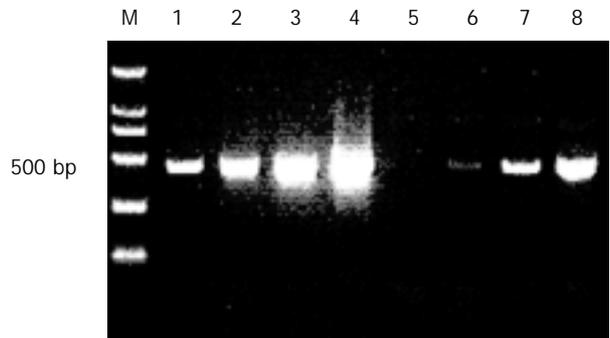
2 结果

2.1 mRNA 的定性、定量分析 使用高质量 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 4.54 μg 和 4.23 μg, A260/A280=1.7, 10 g/L 琼脂糖

凝胶电泳见 mRNA 为 >0.5 kb 清晰慧尾片状条带, 证实 mRNA 质量足.

2.2 dscDNA 两端连接效率检测 dscDNA 与接头连接效率的高低是决定抑制性消减杂交成败的最关键步骤. 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 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).



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

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 70 个克隆中有 56 个含有插入片段(图 2).

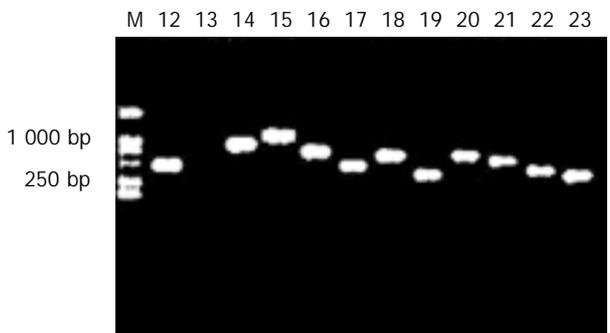


图 2 部分克隆(C12-23)菌落 PCR 鉴定电泳图.

2.5 cDNA 测序与同源性分析初步结果 对 56 个克隆测序, 与 GenBank 数据库进行初步比较. 其中 6 个克隆未检索到任何对应的相似序列, 可能代表了某些新基因. 其余 50 个均与已知基因的部分序列高度同源(92-100%)(表 1).

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(%)
HCV NS3 编码蛋白	6	100
核糖体蛋白	6	100
线粒体蛋白	2	100
血清白蛋白	1	99
角蛋白 18	1	99
硫氧还蛋白	1	99
亮氨酸富集重复蛋白	1	96
乳酸脱氢酶 A	1	100
磷脂酶 A2	1	100
酪氨酸磷酸酶	2	93
醛酮还原酶 C1	3	100
异柠檬酸脱氢酶 1	1	100
S-腺苷高半胱氨酸水解酶 1	2	99
RNA 聚合酶 I	1	100
RNA 解旋酶	2	100
T 细胞分化蛋白	2	100
丝裂素诱导蛋白	1	92
单核细胞向巨噬细胞分化相关蛋白	1	100
细胞周期进展蛋白 3	1	98
转录延伸因子 A(SII)/ 转录因子样蛋白 MRGX	1	100
真核翻译延伸因子	1	100
DEAD/H 盒蛋白多肽 1	1	99
GDA1/CD39 家族	1	99
TAR(HIV)RNA 结合蛋白 1	1	99
肿瘤生长因子 - β 超家族蛋白	2	99
白介素 1 受体	1	100
干扰素相关发生调节因子	1	97
染色体序列	5	100
新基因序列	2	
无法分析序列	4	
克隆总计	56	

3 讨论

HCV 基因组含有单一的开放读码框架, 编码 3 010-3 033 个氨基酸残基的多肽前体, 两侧是 5' - 非翻译区及 3' - 非翻译区, 多肽前体至少被加工为十种结构蛋白和非结构蛋白. 其中非结构蛋白 NS3 共有 631 个氨基酸组成, 具有丝氨酸蛋白酶、三磷酸核苷酶 (NTPase) 和解旋酶 (Helicase) 的功能, 在 HCV 多聚蛋白的成熟和病毒复制过程中发挥重要作用^[25-28], 同时, NS3 内部的裂解产物还具有致癌作用, 如裂解 c-raf 癌基因产物 N 末端使之激活, 启动肿瘤形成^[29-40].

近年的研究发现, NS3 是蛋白激酶 A (PKA) 和蛋白激酶 C (PKC) 介导的磷酸化作用的有效调节因子, 从而影响环磷酸腺苷 (cAMP) 及磷脂酰肌醇 (PI) 等信号转导通路中蛋白激酶的级联反应, 进而调节基因转录、激

活特定基因表达. NS3 调节 PKA 和 PKC 磷酸化作用活性, 是通过作为底物调节因子这种类似于分子伴侣的作用方式进行的^[1]. 另据报道, Kato et al^[2]通过对多种信号转导通路中共同出现的可诱导的增强子进行检测发现, NS3 可激活血清应答元件 (SRE)、激活蛋白 1 (AP-1)、血清应答因子 (SRF) 等增强子相关信号转导途径, 其中, SRE、AP-1 可调节、增强细胞的增生. 由此可见, HCV 非结构蛋白 NS3 的反式激活功能在 HCV 致病中发挥了重要作用, 那么, 细胞内 NS3 的表达, 究竟影响、激活了哪些特定基因的表达? 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 HCV NS3 基因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、研究病毒蛋白的致病机制奠定基础. SSH 是近年发展起来的一项基因克隆技术, 可以对两份 mRNA 样品进行比较, 并获得只存在于其中一份样品而不存在于另一份样品的基因克隆, 通过 SSH 构建的 cDNA 消减文库具有以下三个优点: (1) 高度特异性, 经过两轮消减杂交和两步抑制性 PCR, 极大提高了文库的特异性. (2) 高敏感性, SSH 技术使高、低丰度特异表达的基因均得到有效地分离扩增. (3) 高效率, 在一次 SSH 反应中可以同时分离几十甚至成百个差异表达的基因^[41-52].

我们应用 SSH 方法成功地构建了 HCV NS3 反式激活的相关基因差异表达的 cDNA 消减文库, 并进行测序分析, 结果主要包括 2 种类型, 第一种是已知基因的序列, 与 GenBank 中数据高度同源, 其中包括一些已知的看家基因序列和一些与细胞生长调节密切相关的基因序列, 如转录延伸因子 A(SII)/ 转录因子样蛋白 MRGX、真核翻译延伸因子、核糖体蛋白基因等, 与细胞的转录、翻译功能密切相关; HCV NS3 编码蛋白基因, 与转染的 NS3 基因的表达有关; 酪氨酸磷酸酶基因, 与肝脏发育、肝细胞再生、癌变有关^[53-63]; 肿瘤生长因子 - β 超家族蛋白、T 细胞分化蛋白基因与 T 细胞免疫应答相关^[28-30]. 第二种是未知序列, 共获得 6 个差异表达的未知序列, 可能代表了某些新基因, 进一步的分析和功能鉴定正在进行中.

在实验中, 克隆到了一些理论上似乎没有差异表达的基因, 这可能与 SSH 技术本身的一些特点有关. 实验过程较为复杂, 步骤较多, 因此筛选到一部分看家基因也是正常现象. 另一方面由于实验中各个步骤操作效率及 mRNA 丰度大小的差异, 部分 NS3 的反式激活基因也可能被漏掉, 并不能保证实验能够得到所有的反式激活靶基因. 本实验只是对反式激活的靶基因进行初步筛选分析, 是否是真正的 NS3 反式激活靶基因, 尚需进一步的研究加以证实. 但是由于不以研究对象的已知基因序列为前提, 为反式激活靶基因的研究提供了全新的探索方向, 不失为目前重要的研究技术和策略^[64-69].

4 参考文献

- 1 Borowski P, Heiland M, Feucht H, Laufs R. Characterisation of non-structural protein 3 of hepatitis C virus as modulator of protein phosphorylation mediated by PKA and PKC: evidences for action on the level of substrate and enzyme. *Arch Virol* 1999; 144:687-701
- 2 Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000; 32:405-412
- 3 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
- 4 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;10:209-225
- 5 李克,王琳,成军,陆荫英,洪源,刘妍,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
- 6 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区结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:223-225
- 7 成军,陈菊梅. 丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白的生物学调节作用. 国外医学微生物学分册 2001;24:12-14
- 8 成军,陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的研究进展. 国外医学病毒学分册 2000;7:123-127
- 9 成军,朱传琳. 丙型肝炎病毒感染慢性化的分子生物学机制. 国外医学病毒学分册 2000;7:29-32
- 10 成军,张玲霞. 丙型肝炎病毒干扰素敏感决定区的研究进展. 国外医学流行病学传染病学分册 2000;27:55-58
- 11 成军,钟彦伟,施双双,王刚,董菁,夏小兵,杨继珍,陈菊梅. HCV非结构蛋白 NS5A 人源单链抗体可变区基因的筛选与鉴定. 中华微生物和免疫学杂志 2000;20:567
- 12 钟彦伟,成军,施双双,杨继珍,董菁,夏小兵,李克,刘妍,陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 人源单链抗体的筛选与表达. 中华中西医结合杂志 2001;2:97-99
- 13 钟彦伟,王松山,赵景民,成军,张玲霞. 抗丙肝病毒非结构蛋白 NS3 单链抗体的制备及免疫组织化学研究. 中华实验与临床病毒学杂志 2001;15:186-188
- 14 成军,钟彦伟,施双双,倪勤,刘妍,王刚,董菁,夏小兵,刘友昭,王琳,李克,杨继珍,邵得志,陈菊梅. HCV 非结构蛋白 NS5A 人源单链可变区抗体基因的筛选与鉴定. 中华实验与临床病毒学杂志 2001;15:216-218
- 15 成军. 丙型肝炎病毒基因组的翻译及其产物的加工. 国外医学微生物学分册 1995;18:14-16
- 16 成军,陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS4A 的研究进展. 国外医学病毒学分册 2000;7:14-17
- 17 钟彦伟,成军,刘妍,董菁,杨继珍,张玲霞. 丙型肝炎病毒 NS3 蛋白人源基因工程单链抗体的高效表达. 中华肝脏病杂志 2000;8:171-173
- 18 Worman HJ, Lin F. Molecular biology of liver disorders: the hepatitis C virus and molecular targets for drug development. *World J Gastroenterol* 2000; 6:465-469
- 19 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
- 20 刘妍,成军,王刚,李克,段惠娟,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅. HCV 核心蛋白与截短型 HBV 表面抗原中蛋白协同反式激活功能的研究. 中华肝脏病杂志 2002;10:354-357
- 21 刘妍,成军,董菁,王琳,王刚,夏小兵. HBV X 蛋白与 HCV 核心蛋白协同反式激活 SV40 病毒早期启动子 / 增强子的研究. 中华实验与临床病毒学杂志 2002;16:39-41
- 22 刘妍,成军,王刚,李克,段惠娟,王琳,董菁,洪源,张跃新,李莉,张玲霞,陈菊梅. 应用抑制性消杂交技术克隆丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因. 解放军医学杂志 2001;26:880-883
- 23 成军,施双双,钟彦伟,夏小兵,王刚,王琳,刘妍,陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白可溶性单链可变区抗体在大肠杆菌中的表达. 解放军医学杂志 2000;25:394-397
- 24 Kato N. Molecular Virology of Hepatitis Virus. *Acta Med Okayama* 2001; 55:133-159
- 25 Casbarra A, Piaz FD, Ingallinella P, Orru S, Pucci P, Pessi A, Bianchi E. The effect of prime-site occupancy on the hepatitis C virus NS3 protease structure. *Protein Sci* 2002;11:2102-2112
- 26 刘妍,成军. HCV 致肝细胞癌分子生物学机制. 国外医学流行病学传染病学分册 2000; 27:10-13
- 27 Okuda K. Hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000;32(Suppl 1): 225-227
- 28 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
- 29 Von Stein OD, Thies WG, Hofmann M. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* 1997;25:2598-2602
- 30 Peng Y, Genin A, Spinner NB. The gene encoding human nuclear protein tyrosine phosphatase, PRL-1. Cloning, chromosomal localization, and identification of an intron enhancer. *J Biol Chem* 1998;273:17286-17295
- 31 成军,张玲霞. 抗 HCV 的基因治疗方案 - 从 HCV - 肝细胞相互作用的分子生物学机制设计. 国外医学流行病学传染病学分册 1999;26: 59-61
- 32 成军,陈菊梅. 丙型肝炎新型治疗方法的研究进展. 国外医学流行病学传染病学分册 1999;26:158-162
- 33 钟彦伟,成军,刘妍,董菁,杨继珍,张玲霞. 可溶性 HCV 非结构蛋白 NS3 人源单链抗体在大肠杆菌中的表达. 肝脏 1999;4:73-76
- 34 钟彦伟,成军,刘妍,董菁,杨继珍,张玲霞. HCV 非结构蛋白 NS3 人源单链抗体的筛选与鉴定. 中华传染病杂志 2000;18:84-87
- 35 成军,陈菊梅. 丙型肝炎病毒 3' - 非翻译区 RNA 结合蛋白的研究进展. 国外医学病毒学分册 2000;7:17-21
- 36 Cheng J, Zhong YW, Liu Y, Dong J, Yang JZ, Zhang LX. Screening and identification of a humanized single chain variable region antibody for hepatitis C virus non-structural 3 protein. *Chin J Immunol* 2000;16:246-249
- 37 钟彦伟,成军,施双双,夏小兵,王刚,杨继珍,陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS4A 人源单链抗体的筛选与鉴定. 免疫学杂志 2000;16: 422-424
- 38 钟彦伟,成军,施双双,夏小兵,王刚,杨继珍,陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. 中华肝脏病杂志 2001; 9:217-219
- 39 成军,钟彦伟,施双双,夏小兵,王刚,陈菊梅. 丙型肝炎病毒 E2 蛋白人源单链可变区抗体的可溶性表达. 中国病毒学 2001;16:220-223
- 40 刘妍,成军,邵得志,王琳,钟彦伟,夏小兵. 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活 SV40 病毒早期启动子 / 增强子的研究. 军医进修学院学报 2001;22:186-188
- 41 成军,陈菊梅. 丙型肝炎病毒 5' - 非翻译区及其结合蛋白的研究进展. 国外医学微生物学分册 2001;24:7-9
- 42 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
- 43 成军,钟彦伟,刘妍,董菁,杨继珍,杨守纯. 丙型肝炎病毒非结构区 NS3 基因在大肠杆菌中的可诱导性高表达. 中华实验与临床病毒学杂志 2002;16:85-87
- 44 李克,王琳,成军,张玲霞,陆荫英,夏小兵,李莉,杨继珍. 丙型肝炎病毒核心蛋白基因表达载体的构建及在酵母中的表达. 军医进修学院学报 2002;23:1-3
- 45 李克,王琳,成军,张玲霞,陆荫英,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
- 46 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
- 47 钟彦伟,成军,施双双,王刚,夏小兵,田小军,李莉,张玲霞. 抗丙肝病毒包膜蛋白 E2 人源单链抗体的制备及免疫组织化学研究. 中华肝脏病杂志 2002;10:109-112
- 48 成军,李莉,张玲霞,陈菊梅. 丙型肝炎病毒感染与脂类代谢的相关性. 肝脏 2002;7:56-58
- 49 李克,张玲霞,成军. 丙型肝炎病毒与脂质系统代谢关系的研究进展. 国外医学病毒学分册 2002;9:1-3
- 50 钟彦伟,成军,陈新华,王刚,洪源,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS4A 抗原模拟表位的筛选和鉴定. 免疫学杂志 2002;18:347-349
- 51 李克,王琳,成军,陆荫英,张玲霞,牟劲松,洪源,刘妍,段惠娟,王刚,李莉,陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白与染色体转位蛋白的相互作用. 中华医学杂志 2002;82:673-677
- 52 钟彦伟,成军,田小军,陈新华,李莉,张玲霞,陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 抗原模拟表位的筛选与鉴定. 中华肝脏病杂志 2002; 10:266-268
- 53 李克,王琳,成军,张玲霞,段惠娟,陆荫英,杨继珍,刘妍,邵得志,夏小兵,王刚,董菁,李莉,钟彦伟,洪源,陈菊梅. 筛选与克隆丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因. 中华实验与临床病毒学杂志 2002;16:51-54
- 54 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
- 55 钟彦伟, 成军, 蔡炯, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒包膜蛋白E2抗独特型人源化单链可变区抗体的筛选与鉴定. 世界华人消化杂志 2002;10:897-901
- 56 成军. 丙型肝炎与肝脏脂肪变的相关性. 中西医结合肝病杂志 2002;12:257-258
- 57 钟彦伟, 成军, 陈新华, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用噬菌体随机肽库技术筛选丙肝病毒 NS3 抗原模拟表位. 中国病毒学 2002;17:202-205
- 58 李莉, 成军, 李梵, 王建军, 张健, 吴勤, 韩萍, 陈国凤, 纪冬, 李克. 慢性丙型肝炎病毒性肝炎脂肪变的临床与病理学特点. 世界华人消化杂志 2002;10:1009-1013
- 59 张健, 成军, 李莉, 刘爱兵, 吴勤, 董菁, 王琳, 陆荫英. 慢性丙型肝炎患者血清载脂蛋白 AI 和 AII 水平的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1014-1017
- 60 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
- 61 成军, 任进余, 李莉, 陆志檬, 李克, 洪源, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒结构基因转基因小鼠引起肝脏脂肪变. 世界华人消化杂志 2002;10:1022-1026
- 62 陆荫英, 成军, 李克, 刘妍, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒进入肝细胞的机制研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1028-1029
- 63 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健. 丙型肝炎病毒蛋白与脂蛋白之间的相互作用. 世界华人消化杂志 2002;10:1030-1032
- 64 洪源, 成军, 李莉. 丙型肝炎病毒转基因小鼠模型的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1032-1034
- 65 董菁, 成军, 李莉. 脂肪肝形成的分子生物学机制. 世界华人消化杂志 2002;10:1035-1037
- 66 吴勤, 成军, 李莉. 酒精性脂肪肝的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1037-1038
- 67 韩萍, 成军, 李莉. 非酒精性脂肪肝. 世界华人消化杂志 2002;10:1038-1040
- 68 陈国凤, 成军, 李莉. 脂肪肝的诊断研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1040-1042
- 69 李莉, 成军, 陈国凤. 脂肪肝的治疗研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1042-1044

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版目次

2003 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2003.htm> 2002 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2002.htm> 2001 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2001.htm> 2000 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2000.htm> 1999 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1999.htm> 1998 华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1998.htm> 1997 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1997.htm> 1996 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1996.htm> 1995 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1995.htm> 1994 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1994.htm> 1993 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1993.htm>

2003 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2003.htm> 2002 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2002.htm> 2001 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2001.htm> 2000 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2000.htm> 1999 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1999.htm> 1998 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1998.htm> 1997 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1997.htm> 1996 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1996.htm> 1995 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1995.htm>

以上电子版如您需要请 email 回复, 免费提供您使用. Email 地址: wjg@wjgnet.com. 以后将新出版的世界华人消化杂志(月刊 15 日出版)和 World J Gastroenterol 电子版(月刊 15 日出版)电子版用 email 发给您收. 希望您推荐 10 位消化专业工作者的 email 地址, 让您的朋友也能获得电子版.

(世界胃肠病学杂志社 2003-01-15)

单克隆抗体3A5 - 复方中药安迪偶联物的肝癌导向治疗

梁 军,孙纪元,谢艳华,栗 燕,闫 露,王四旺

梁军,中国人民解放军第四军医大学唐都医院放疗科 陕西省西安市 710038
孙纪元,谢艳华,王四旺,中国人民解放军第四军医大学药物研究所 陕西省
西安市 710032
栗燕,闫露,中国人民解放军第四军医大学西京医院综合诊疗科 陕西省西
安市 710032
梁军,男,1964-06-24 生,吉林省吉林市人,汉族,医学硕士,主治医师,讲师。
陕西省中医药基金课题, No.00531
项目负责人:王四旺,710032,陕西省西安市长乐西路17号,中国人民解放军第
四军医大学药物研究所, wangsiw@fmmu.edu.cn
电话:029-3377181 传真:029-3377181
收稿日期:2002-12-08 接受日期:2002-12-22

Effect of monoclonal antibody 3A5 coupled with Chinese medicine compound Andi in targeted treatment of hepatocellular carcinoma

Jun Liang, Ji-Yuan Sun, Yan-Hua Xie, Yan Li, Lu Yan, Si-Wang Wang

Jun Liang, Department of Radiotherapy, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China
Ji-Yuan Sun, Yan-Hua Xie, Si-Wang Wang, Institute of Pharmaceuticals, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China
Yan Li, Lu Yan, Department of Comprehensive Diagnosis and Therapy, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China
Supported by the Fund for Traditional Chinese Medicine Research of Shaanxi Province, No.00531
Correspondence to: Dr. Si-Wang Wang, Institute of Pharmaceuticals, Fourth Military Medical University, Changle Xi Road, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. wangsiw@fmmu.edu.cn
Received: 2002-12-08 Accepted: 2002-12-22

Abstract

AIM: To explore the anti-tumor effect of monoclonal antibody 3A5 coupled with Chinese medicine compound Andi injection in targeted treatment of hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: Monoclonal antibody 3A5 was used to prepare conjugates with Andi powder. The immunoreactivity of the conjugates on human HCC BEL-7402 cell was detected by ELISA. The targeted therapeutic effects of 12, 24 and 50 mg/kg conjugates were observed in mice/nude mice transplantation tumor models. The positive control group was treated with 5-FU.

RESULTS: The detection of clone production indicated that 3A5-Andi has more cytotoxicity than Andi, and their IC_{50} were 2.8 mg/L and 5.1 mg/L respectively ($P < 0.01$). The survival rates of 24 mg/kg and 50 mg/kg of 3A5-Andi *ip* on mice transplantation ascites H₂₂ HCC were 133% and 167% respectively ($P < 0.05$), but those of 12 mg/kg and 24 mg/kg of Andi only were 112% and 138% respectively ($P < 0.05$). The inhibitory rates of 24 mg/kg of 3A5-Andi and 12 mg/kg of Andi *iv* on nude mice transplanted human HCC BEL-7402 cell tumor were 63.5% and 52.5% respectively ($P > 0.05$). The inhibitory rates of 24 mg/kg 3A5-Andi and 12 mg/kg Andi *pt* on human HCC BEL-7402 cell were 75.4% and 61.0%

respectively ($P > 0.05$).

CONCLUSION: 3A5-Andi conjugates have a tumor targeted therapeutic effect. This effect is stronger than that of Andi only on nude mice transplanted human HCC BEL-7402, and the administration of *pt* is better than that of *iv*.

Liang J, Sun JY, Xie YH, Li Y, Yan L, Wang SW. Effect of monoclonal antibody 3A5 coupled with Chinese medicine compound Andi in targeted treatment of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(4):404-407

摘要

目的: 探讨单克隆抗体 3A5 - 复方中药安迪粉针剂偶联物 (3A5 - Andi) 的肝癌导向治疗作用。

方法: 用单克隆抗体 3A5 与安迪粉针剂 (Andi) 制备偶联物, ELISA 检测 3A5 - Andi 偶联物保持对人肝癌 BEL - 7402 细胞的免疫反应性; 采用小鼠/裸鼠移植性肿瘤模型, 5-FU 为阳性对照组, 观察 12、24 和 50 mg/kg 的导向治疗作用。

结果: 克隆生成法显示, 3A5 - Andi 具有比 Andi 更强的细胞毒性, 二者的 IC_{50} 分别为 2.8 mg/L 和 5.1 mg/L ($P < 0.01$)。24 mg/kg 和 50 mg/kg 3A5 - Andi *ip* 对小鼠移植性腹水型 H₂₂ 肝癌的生命延长率 (LPR) 分别为 133% 和 167% ($P < 0.05$); 而 12 mg/kg 和 24 mg/kg Andi 的 LPR 分别为 112% 和 138% ($P < 0.05$)。24 mg/kg 3A5 - Andi 和 12 mg/kg Andi *iv* 对裸鼠移植性人肝癌 BEL - 7402 细胞瘤的瘤重抑制率分别为 63.5% 和 52.2% ($P > 0.05$)。24 mg/kg 3A5 - Andi 和 12 mg/kg Andi *pt* 对 BEL - 7402 人肝癌的抑制率分别为 75.4% 和 61.0% ($P > 0.05$)。

结论: 3A5 - Andi 偶联物具有一定的肿瘤导向治疗作用; 3A5 - Andi 与 Andi 比较, 3A5 - Andi 对裸鼠移植人肝癌 BEL - 7402 具有较强的治疗作用; *pt* 方式 3A5 - Andi 比 *iv* 疗效更好。

梁军,孙纪元,谢艳华,栗燕,闫露,王四旺. 单克隆抗体3A5 - 复方中药安迪偶联物的肝癌导向治疗. 世界华人消化杂志 2003;11(4):404-407
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/404.htm>

0 引言

我们以往的研究已经证实复方中药安迪粉针剂 (Andi) 具有明显抗肿瘤活性, 而毒副作用较低。目前, 随着单克隆抗体产品, 如 Herceptin、Rituxan 及 Panorex 等在美国及欧洲的批准上市, 使得以单抗为载体的抗肿瘤导向药物研究再度引起人们的关注。肝癌在我国常见。所以, 我们采用抗人肝癌大鼠型单克隆抗体 3A5 与 Andi

制成偶联物, 并就偶联物的肿瘤导向治疗作用进行了实验研究.

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌 BEL-7 402 细胞, 由本校病理学教研室惠赠, 引株采用含 100 ml/L 小牛血清 -RPMI1 640 培养液, 于 50 ml/L CO₂, 37 °C, 100 % 湿度的 HEL-LAB 型 CO₂ 培养箱(美国生产)内培养, 每周传代 2 次; Balb/c (nu/nu) 裸鼠, ; 昆明小鼠, 雌雄兼用; 6-7 wk, 18.5-20.6 g; 动物购自第四军医大学实验动物中心; 抗肝癌大鼠单克隆抗体 3A5 为 IgG 型单抗, 与人肝癌细胞 BEL-7402 呈强阳性反应. Andi 为本校药物研究所生产(蟾酥和人参组成), 按文献[1]方法制备. 批号: 20000318. 碳二亚胺(EDC)、N- 羟基琥珀酰亚胺均购自 Sigma 公司.

1.2 方法 单克隆抗体 3A5 的制备与纯化按文献[J Immunol Methods 1984;71:9]提供的方法进行, 取杂交瘤腹水用 MARK 3-Sepharose 4B 亲和层析柱纯化, 依次用 PBS, PBS+2.5 mol/L NaCl 和 0.1 mol/L 甘氨酸 - 盐酸缓冲液洗脱, 将第 2 蛋白峰用 0.3 mol/L Tris-HCl(pH 8.0) 缓冲液中和后, 再用 PBS 透析、浓缩备用. 单抗 3A5 与 Andi 偶联物的制备按文献[Methods Enzymol 1983;93:168]活潑酯法制备, 滴定透析外液, 测定其中 Andi 量, 推算偶联物中 Andi 的含量并计算单抗与药物的浓度比. 免疫反应性检测采用 ELISA 法测定 3A5 对人肝癌 BEL-7402 细胞的免疫反应性[Methods Enzymol 1983;92:168]. 采用克隆生成测定法观察 3A5-Andi 对 BEL-7402 细胞杀伤作用, 取对数生长的肿瘤细胞接种于 96 孔培养板中, 每孔 50 个细胞, 培养 24 h. 加入待测样品, 每一药物浓度设 4 个平行孔, 各药物均用无血清 RPMI1640 培养液稀释, 对照组(CN)只加无血清 RPMI 1 640 培养液, 每孔加液 50 μL. 药物与细胞接触 24 h, 吸去培养液, 用无血清 RPMI 1 640 培养液洗 2 次, 然后加入含血清的 RPMI 1 640 新鲜培养液, 继续培养. 接种 7 d 后在倒置显微镜下数细胞集落数(细胞数超过 30 个以上), 以 CN 组细胞集落数为 100 %, 求得药物不同浓度下的集落生成率. 对小鼠 H₂₂ 腹水型肝癌的影响实验: 18-22 g 昆明小鼠腹腔接种 H₂₂ 细胞 6 × 10⁶/L. 次日 ip 12, 24, 50 mg/kg 3A5-Andi 和 6, 12, 24 mg/kg Andi, 1 次/d, 共 18 次; CN 组 ip NS. 记录动物存活时间, 按公式 $(t_1/t_2 - 1) \times 100\%$ 计算生命延长率[increase life span ILS; t₁ 治疗组动物生存时间, t₂ CN 组动物生存时间]; 实验过程中每 5 d 测量动物体质量 1 次. 对人肝癌裸鼠移植瘤的影响: 将直径 2 mm 的 BEL-7 402 人肝癌瘤块接种于 balb/c (nu/nu) 裸鼠右腋下. 于接种后 3 d iv 和瘤体周围注射(pt) 3A5-Andi 和 Andi, 3A5-Andi 的剂量为 24 mg/kg, Andi 的剂量为 12 mg/kg, 2d / 次, 共 6 次. CN 组动物 iv 和 pt 生理盐水(NS). 各组动物均为 8 只. 治疗期间每 5 d 测量肿瘤长径 a (cm) 以及与其相垂直的短径 b (cm) 1 次并按下式计算瘤质量: $m(\text{瘤})/g = (a \times b^2) \times 0.5$. 于 30 d 后

处死动物, 剥离瘤块称质量, 并计算抑瘤率.

统计学处理 采用多样本秩和检验方法(Kruskal-Wallis 法)检验 ILS; 单因素方差分析法检验瘤质量差异.

2 结果

纯化 3A5 抗体对 BEL-7 402 细胞呈强阳性反应. 经测定偶联物中的 3A5 与 Andi 浓度比约为 1 : 68. 将 3A5 单抗与 3A5-Andi 分别以 PBS 倍比稀释成一系列浓度, 用 ELISA 法测定他们对靶细胞 BEL-7 402 的反应性. 结果表明偶联物中 3A5 反应性未见明显改变(图 1)

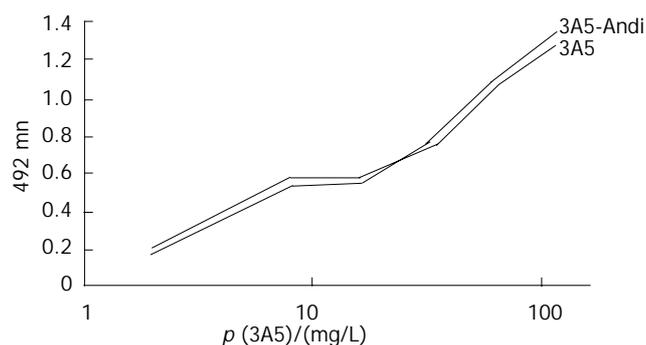


图 1 3A5-Andi 及 3A5 单抗对人肝癌 BEL-7 402 细胞的免疫反应性.

2.1 对人肝癌细胞的杀伤作用 克隆形成测定结果, 药物与细胞作用 24 h, 3A5-Andi 和 Andi 对人肝癌 BEL-7 402 细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 2.8 mg/L 和 5.1 mg/L. 3A5-Andi 对靶细胞的杀伤力强于 Andi (图 2).

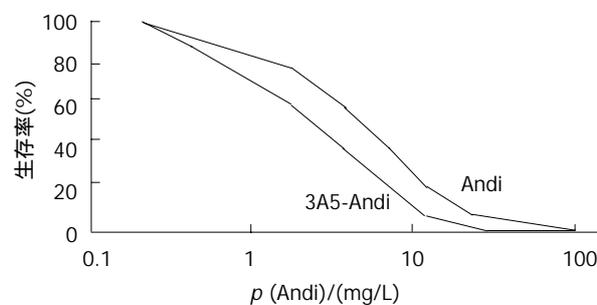


图 2 3A5-Andi 和 Andi 对人肝癌 BEL-7 402 细胞的抑制作用.

2.2 对腹水型 H₂₂ 肝癌荷瘤小鼠的影响 3A5-Andi 对腹水型 H₂₂ 肝癌荷瘤小鼠的治疗作用明显强于 Andi 组(P < 0.01). 50 mg/kg 3A5-Andi 组观察 60 d 尚存活 3 只动物, 解剖发现腹腔内无腹水和肿瘤(表 1).

2.3 对裸鼠人肝癌移植性肿瘤的影响 3A5-Andi 对移植人肝癌 BEL-7 402 肿瘤的生长, 在接种后 15 d 内不明显, 15 d 后 CN 组肿瘤生长速度明显加快, 而 3A5-Andi 和 Andi 治疗组则显著抑制, 其抑制程度 3A5-Andi 强于 Andi 组, 且随时间延长而抑制作用更趋显著. 12 mg/kg Andi iv 组抑瘤率为 52.2 %; 24 mg/kg 3A5-Andi iv 组肿瘤抑制率为 63.5 %, 但二者比较无显著性差异(P > 0.05, 表 2); pt 给药方式, 二者的抑瘤率分别为 61.0 % 和 75.4 % (P > 0.05).

表1 Andi及3A5-Andi对腹水型H₂₂肝癌荷瘤小鼠的LPR (n=20)

分组	给药量/mg/kg	t(中位生存)/d	LPR/%	存活动物数/60 d
CN	10(H ₂ O)	13.5		
Andi	24	32.1 ^b	138	2
Andi	12	28.6 ^b	112	1
Andi	6	25.5 ^b	89	0
3A5-Andi	50	36.1 ^b	167	3
3A5-Andi	24	31.5 ^b	133	2
3A5-Andi	12	29.0 ^b	115	1

^bP < 0.01 vs CN.

表2 Andi及3A5-Andi对裸鼠移植人肝癌BEL-7 402的治疗作用(n=8)

分组	剂量/mg/kg	给药途径	m(裸鼠)/g [*]	m(瘤)/g	抑瘤率/%
CN	10	pt	4.01 ± 1.06	1.95 ± 1.21	
Andi	12	pt	5.63 ± 1.38	0.76 ± 0.49 ^b	61.0
3A5-Andi	24	pt	6.11 ± 1.40	0.48 ± 0.22 ^b	75.4
CN	10	iv	3.88 ± 0.97	1.86 ± 0.92	
Andi	12	iv	5.57 ± 1.24	0.89 ± 0.52 ^d	52.2
3A5-Andi	24	iv	5.35 ± 1.26	0.67 ± 0.25 ^d	63.5

^{*}为实验末与实验前裸鼠的体质量差值。

^bP < 0.01 vs CN(pt); ^dP < 0.05 vs CN(iv).

3 讨论

近年来,对中草药抗肝癌的作用和机制进行了广泛研究^[2-13]. Andi抑制癌细胞生长的途径是多方面的. 梁军 et al^[1]的研究表明, Andi对HL-60细胞具有显著的诱导分化作用. 在孙纪元 et al^[4]的研究中,已发现Andi具有促进⁶⁰Co-射线照后小鼠骨髓造血干细胞(CFU-S)向粒-单核系祖细胞(CFU-GM)分化的作用,并使白细胞升高. 单抗和单抗导向药物经区域性给药后(包括动脉灌注、腔内给药、瘤内或瘤旁给药),由于其具有大分子的药代动力学性质,使得偶联物在肿瘤部位滞留时间延长,局部浓度高,且减少了非肿瘤组织对导向药物的摄取,从而具有独特的应用价值,在临床应用中已取得一定的治疗效果,成为导向治疗中值得重视的方法^[15-31]. 安迪粉针剂与抗肝癌大鼠单抗3A5偶联对肿瘤的治疗作用还未见报道.

我们将安迪粉针剂与抗肝癌大鼠单抗3A5偶联,观察其经静脉给药和肿瘤局部给药对肿瘤的治疗作用. 结果表明,3A5-Andi保持3A5单抗对BEL-7402细胞的免疫反应性,与3A5单抗相比活性相当. 克隆生成法测定结果,3A5-Andi保持了Andi的细胞毒活性. 对小鼠腹水型H₂₂肝癌的治疗结果表明:3A5-Andi比Andi具有较强的治疗作用,其中ip 50 mg/kg 3A5-Andi观察60 d时尚存活3只动物,经解剖发现腹腔内无腹水及肿瘤. 对裸鼠人肝癌BEL-7 402细胞移植瘤的治疗结果表明,3A5-Andi抑瘤作用强于Andi;pt的治疗效果

优于iv方式.

总之,实验结果提示:(1)3A5-Andi偶联物具有一定的肿瘤导向治疗作用.(2)3A5-Andi与Andi比较,3A5-Andi对裸鼠移植人肝癌BEL-7 402具有较强的治疗作用;(3)pt方式3A5-Andi比iv疗效更好.

4 参考文献

- Liang J, Sun JY, Xie YH, Wang SW, Li YR. Inducement of differentiation of HL-60 cells by Chinese medicine Andi. *Disi Junyi Daxue Xuebao* 2001;23:318-319
- Wang XL, Liu P, Liu CH, Liu C. Effects of coordination of FZHY decoction on functions of hepatocytes and hepatic satellite cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:663-665
- Meng ZQ, Guo WJ, Yu EX, Song MZ, Huang WX. Inhibition of telomerase activity and induced apoptosis of liver cancer cell SMMC-7721 by drug serum of Jianpi Liqi herbs. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:879-882
- Jiang SM, Xiao ZM, Song JG, Xu ZH, Ma SL. Effects of BPF extracts on proliferation and mitochondria metabolism of human hepatoma SMMC-7 721 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:310-313
- Huang ZM, Yang XB, Cao WB, Chen HY, Zhang JZ, Teng L, Chen HS, Cai GM, Liu DP. Inhibition of Qinling Chongji on HBsAg and HBeAg secretion in cultured cell line 2215. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:184-186
- Guo WJ, Yu EX, Zheng SG, Shen ZZ, Luo JM, Wu GH, Xia SA. Study on the apoptosis and cell cycle arrest in human liver cancer SMMC7721 cells induced by Jianpiliqi herbs. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:52-55
- Xiao ZM, Song JG, Xu ZH, Zhang SY, Jiang SM. The effects of the extracts from AMB on proliferation and mitochondria metabolism of human hepatoma SMMC-7721 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:46-48
- Yin F, Yao SK, Wu XM, Gao HS, Li ZH. Serapharmacological study of Ganzheng oral solution on proliferation and expression of ERK in SMMC721 cells with transforming growth factor α . *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1017-1020
- Fan JJ, Jia ZP, Xie JW, Ma J, Wang R, Xie H, Xu LT. Synergistic anti-hepatoma effect and its mechanism of Stelleria chamaejasme mouse drug-serum with cytotoxic chemotherapeutic agents in vitro. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1008-1012
- Han JQ, Hu C, Liu SX, Xiu HM, Xu Z, Hu DR. The mechanism of the Chinese herbal compound in protecting hepatocyte in vitro. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:902-906
- Si WK, Pan J, Lu H, Li ZQ. Study on matrine inhibiting proliferation of HepG2 cell and the relation between its dosage and inhibiting style. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:185-189
- Shi LC, Wu WY, Zhang WB, Qu YQ, Tan M, Xiao CM. Effect of curcuma aramatica oil on proliferating cell nuclear antigen of hepatoma in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:156-157
- Liu X, Yuan JP, Chung CK, Chen XJ. Antitumor activity of the sporoderm-broken germinating spores of Ganoderma lucidum. *Cancer Lett* 2002;182:155-161
- Sun JY, Xie YH, Wang SW. Pharmacodynamic Studies of Chinese medicine Andi in rats with Aplastic Anemia. *Disi Junyi Daxue Xuebao* 2001;23:329
- Sun ZW, Liu YF, Ma LH, Li GH. A preliminary study on targeting effect of scFv₍₂₅₎ fusing to TNF α against hepatocellular carcinoma. *Xibao Yu Fenzi Mianyi Zazhi* 2001:125
- Li M, Li H, Xiao L, Jiang Z, Li H, Mu J. Antitumor activity of the lysates prepared from anti-CD3 antibody activated killer cells. *Huaxi Yike Daxue Xuebao* 2000;31:49-51
- Nakamoto Y, Kaneko S, Fan H, Momoi T, Tsutsui H, Nakanishi K, Kobayashi K, Suda T. Prevention of hepatocellular carcinoma development associated with chronic hepatitis by anti-fas ligand antibody therapy. *J Exp Med* 2002;21:1105-1111
- 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

- 19 Jiang P, He S, Zhang C. In vitro hepatic targeting tendency of galactosyl-anti CD3 McAb-TILS. *Huaxi Yike Daxue Xuebao* 1999; 30:72-74
- 20 Yang LJ, Sui YF, Chen ZN. Preparation and activity of conjugate of monoclonal antibody HAb18 against hepatoma F(ab')(2) fragment and staphylococcal enterotoxin A. *World J Gastroenterol* 2001;7:216-221
- 21 Bian HJ, Chen ZN, Deng JL. Direct technetium-99m labeling of anti-hepatoma monoclonal antibody fragment: a radioimmunoconjugate for hepatocellular carcinoma imaging. *World J Gastroenterol* 2000;6:348-352
- 22 Liu X, Shang B, Liu X. Inhibition of the growth of hepatoma and hepatic metastasis by pingyangmycin conjugated with Fab' fragment of monoclonal antibody. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2001;81:201-204
- 23 Chen BM, Cheng TL, Tzou SC, Roffler SR. Potentiation of antitumor immunity by antibody-directed enzyme prodrug therapy. *Int J Cancer* 2001;94:850-858
- 24 Koning GA, Morselt HW, Gorter A, Allen TM, Zalipsky S, Kamps JA, Scherphof GL. Pharmacokinetics of differently designed immunoliposome formulations in rats with or without hepatic colon cancer metastases. *Pharm Res* 2001;18:1291-1298
- 25 You SY, Zhang CY, Yi XP, Huang W. Evaluation of clinical significance of isoferritin by development of new monoclonal antibodies specific for acidic isoferritin. *Hybridoma* 2001;20:243-248
- 26 Wei YQ, Huang MJ, Yang L, Zhao X, Tian L, Lu Y, Shu JM, Lu CJ, Niu T, Kang B, Mao YQ, Liu F, Wen YJ, Lei S, Luo F, Zhou LQ, Peng F, Jiang Y, Liu JY, Zhou H, Wang QR, He QM, Xiao F, Lou YY, Xie XJ, Li Q, Wu Y, Ding ZY, Hu B, Hu M, Zhang W. Immunogene therapy of tumors with vaccine based on Xenopus homologous vascular endothelial growth factor as a model antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:11545-11550
- 27 Yoshida Y, Myozaki M, Kuroda E, Yamashita U. Cytotoxic effect of an anti-liver monoclonal autoantibody obtained after neonatal thymectomy in mice. *J Autoimmun* 2001;16:373-382
- 28 Oriuchi N. Immunoscintigraphy and radioimmunotherapy of cancer using monoclonal antibodies. *Gan To Kagaku Ryoho* 1999; 26:762-767
- 29 Shigeoka H, Karsten U, Okuno K, Yasutomi M. Inhibition of liver metastases from neuraminidase-treated colon 26 cells by an anti-Thomsen-Friedenreich-specific monoclonal antibody. *Tumour Biol* 1999;20:139-146
- 30 Yamamoto K, Kitamura K, Nishida S, Ichikawa D, Okamoto K, Yamaguchi T, Takahashi T. Iodine-131 human-mouse chimeric Fab monoclonal antibody A7 guided surgery for colorectal cancer patients: a pilot study. *Surg Today* 1999;29:190-193
- 31 Mohr L, Schauer JI, Boutin RH, Moradpour D, Wands JR. Targeted gene transfer to hepatocellular carcinoma cells in vitro using a novel monoclonal antibody-based gene delivery system. *Hepatology* 1999;29:82-89

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

提供您使用世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版

本刊讯 世界华人消化杂志(原新消化病学杂志)从 1993-2002 年的电子版全部出版. 世界华人消化杂志过刊索引: 新消化病学杂志, 1993(1-4 期); 新消化病学杂志, 1994(1-4 期); 新消化病学杂志, 1995(1-4 期); 新消化病学杂志, 1996(1-12 期); 新消化病学杂志, 1997(1-12 期); 华人消化杂志, 1998(1-12 期); 世界华人消化杂志, 1999(1-12 期); 世界华人消化杂志, 2000(1-12 期); 世界华人消化杂志, 2001(1-12 期). 世界华人消化杂志现刊索引: 2002(1-12 期).

World Journal of Gastroenterology(原中国新消化病学杂志)从 1993-2002 年的电子版全部出版. 过刊索引: China Natl J New Gastroenterol, 1995(1 期); China Natl J New Gastroenterol, 1996(1-4 期); China Natl J New Gastroenterol, 1997(1-4 期); World J Gastroenterol, 1998(1-6 期); World J Gastroenterol, 1999(1-6 期); World J Gastroenterol, 2000(1-6 期); World J Gastroenterol, 2001(1-6 期). 现刊索引: World J Gastroenterol, 2002(1-6 期).

世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 的电子版网址如下: 2002 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2002.htm> 2001 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2001.htm> 2000 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2000.htm> 1999 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1999.htm> 1998 华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1998.htm> 1997 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1997.htm> 1996 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1996.htm> 1995 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1995.htm> 1994 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1994.htm> 1993 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1993.htm> 2002 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2002.htm> 2001 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2001.htm> 2000 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2000.htm> 1999 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1999.htm> 1998 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1998.htm> 1997 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1997.htm> 1996 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1996.htm> 1995 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1995.htm>

(世界胃肠病学杂志社 2002-12-28)

树突状细胞体内外对肝癌细胞的抑制作用

郭建巍,秦力维,蔡美英,吕同德

郭建巍,吕同德,兰州军区兰州总医院实验科 甘肃省兰州市 730050
秦力维,兰州军区兰州总医院眼科 甘肃省兰州市 730050
蔡美英,四川大学华西基础医学院免疫教研室 四川省成都市 610041
郭建巍,男,1965-08-03生,甘肃省临夏市人,汉族.医学博士,主治医师.主要从事肿瘤免疫学方面的研究.
项目负责人:郭建巍,730050,甘肃省兰州军区兰州总医院实验科. jwkuo@sohu.com
电话:0931-8975413
收稿日期:2002-11-19 接受日期:2002-11-28

Inhibition of dendritic cells against hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*

Jian-Wei Guo, Li-Wei Qin, Mei-Ying Cai, Tong-De Lu

Jian-Wei Guo, Tong-De Lu, Department of Laboratory, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province China
Li-Wei Qin, Department of Ophthalmology, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province China
Mei-Ying Cai, Department of immunology, School of Basic Medical Sciences, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, Sichuan Province China
Correspondence to: Dr. Jian-Wei Guo, Department of Laboratory, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province China. jwkuo@sohu.com
Received: 2002-11-19 Accepted: 2002-11-28

Abstract

AIM: To estimate the growth inhibition of hepatocellular carcinoma (HCC) cells *in vitro* and *in vivo* by human dendritic cells (DCs).

METHODS: High purity DCs were obtained from cultured plastic-adherent monocytes isolated from healthy human peripheral blood with GM-CSF and IL-4. The levels of IL-12 and TNF were analyzed in liquids of cultured medium by ELISA and MTT reduction assay respectively. Fas-L expression on DC was also detected by flow cytometry. Growth inhibition test of DC against HCC cell lines was also performed. Transplanted human HCC on nude mouse was treated with DCs.

RESULTS: Inhibitory effects on the growth of human HCC lines and other cancer cells were observed by DCs *in vitro*. DCs prevented the HCC xenograft from growth on nude mouse with a prophylaxis rate of 97%.

CONCLUSION: DCs not only inhibit the growth of human HCC *in vitro* but also prevent the growth of HC xenograft on nude mouse *in vivo*.

Guo JW, Qin LW, Cai MY, Lu TD. Inhibition of dendritic cells against hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003; 11(4):408-410

摘要

目的: 研究树突状细胞对肝癌等肿瘤细胞的直接作用。

方法: 用 rhGM-CSF 和 rhIL-4 从健康人外周血诱导树突状细胞, 用 ELISA 和 MTT 法分别检测 DC 培养上清液中 IL-12 和 TNF 水平, 用 MTT 法检测 DC 对肝癌细胞 SMMC-7 721、QGY-7 703、HEPG-2、Alexander, 胃癌细胞 SGC-7 901, 慢性髓原性白血病细胞 K562、Burkitt's 淋巴瘤细胞 Raji 和正常人二倍体细胞的抑制作用, 同时用流式细胞术检测 DC 表面 FasL 的表达, 最后用 DC 进行人肝癌裸鼠皮下抑制瘤的抑制试验。

结果: 诱导 7 d 的 DC 对 4 种肝癌细胞和胃癌细胞均有不同程度抑制作用, 随着效靶比的增加, DC 对肝癌细胞和胃癌细胞的抑制作用逐渐增加; DC 预防人肝癌裸鼠皮下移植瘤, 其抑制率为 97%。

结论: DC 进入机体后也可以非特异性抑制方式发挥抑癌作用, 本研究丰富和拓展了肝癌 DC 疫苗的内容, 为今后肝癌 DC 疫苗的研究奠定了基础。

郭建巍,秦力维,蔡美英,吕同德. 树突状细胞体内外对肝癌细胞的抑制作用. 世界华人消化杂志 2003;11(4):408-410
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/408.htm>

0 引言

树突状细胞(DC)是体内功能最强的抗原提呈细胞(APC),也是天然免疫和获得性免疫的重要调节剂^[1,2]. 表面具有高密度的抗原呈递分子(MHC- 和 MHC-)和共刺激分子(CD40, ICAM-1/CD54, ICAM-3/C. D50, IFA-3/CD58, B7-1/CD80, B7-2/CD86)等,因而成为功能强大的 APC. DC 激活的 T 细胞免疫在抗肿瘤过程中起着主导作用^[3-8]. 我们研究体外培养的 DC 对人肝癌裸鼠皮下移植瘤的直接预防作用如下。

1 材料和方法

1.1 材料 重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF PEPRO TECH);重组人白介素-4(rhIL-4 PEPRO TECH);鼠抗人DC单克隆抗体^[9](镇江医学院许化溪教授馈赠);兔抗鼠FITC标记二抗(华美生物工程公司);RPMI1640(Gibco公司);淋巴细胞分离液(上海试剂二厂);生物素化羊抗鼠 IgG, HRP 标记链亲和素(streptoavidin),北京中山生物技术有限公司;内源性生物素封闭试剂(avidin biotin blocking system, 武汉博士德生物有限公司);鼠抗人肝癌单克隆抗体mcAb18(由本研究室刘小波博士馈赠);新生小牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所);BCG HSP

70 和肝癌细胞可溶性抗原(本实验室自己制备); 4 周龄 Balb/c 裸鼠, 雌雄各半(由华西医科大学实验动物中心提供); 正常人外周血源于 18-25 岁健康志愿者. SPF 级动物实验室(华西医科大学实验动物中心提供); SPSS10.0 for Windows 统计软件.

1.2 方法 收集 6-9 d DC^[10]培养上清, -20 °C 冻存备用. 待样品收集齐后, 统一进行检测. 在酶标板孔中分别加入样品或不同浓度的 IL-12 标准品(500 - 15.625 ng/L) 100 μ L, 室温(20-25 °C)反应 120 min, PBS 洗板 4 次后分别加入检测剂工作液, 每孔 100 μ L, 室温孵育 60 min, PBS 洗板 4 次, 加入底物, 室温避光显色 10-30 min, 2 mol/L H₂SO₄ 终止后 450 nm 测光密度值(A 值), 结果用 3 孔均值表示. 调整对数生长期 L929 细胞浓度为 2 \times 10⁸ 个/L, 加入 96 孔细胞培养板, 每孔 100 μ L, 37 °C 培养 24 h 后弃上清, 分别加入待测标本及 TNF 标准品(250 KU/L、125 KU/L、62.5 KU/L、31.25 KU/L、15.6 KU/L、7.8 KU/L、0 KU/L), 每份标本 3 复孔. 最后加入放线菌素 D(100 mg/L)10 μ L, 同时设细胞对照和空白对照. 37 °C 含 50 mL/L CO₂ 的培养箱中培养 24 h, 离心, 弃上清, 每孔加入 MTT(5 g/L) 10 μ L, 继续孵育 4 h. 离心, 弃上清, 加入 DMSO 100 μ L, 振荡后 570 nm 比色测 A 值. 按下式计算各孔细胞死亡百分率, 间接反映 TNF 生物学活性. 并绘制 TNF 标准曲线. 细胞死亡率 %=[1 - (实验组 A 值 - 空白组 A 值)/(对照组 A 值 - 空白组 A 值)] \times 100%. 常规法诱导 DC, 分为 2 组, 一组于诱导 7 d 加入 LPS 10 mg/L, 一组不加, 37 °C 含 50 mL/L CO₂ 的培养箱中培养 24 h, PBS 洗涤 2 次, 用 40 g/L 多聚甲醛 4 °C 固定 30 min, PBS 洗涤 2 次, 加入兔抗人 Fas-L 多克隆抗体 100 μ L, 4 °C 120 min, PBS 洗涤 2 次, 加入羊抗兔 -FITC 二抗 100 μ L, 以正常人淋巴细胞作阴性对照, 4 °C 120 min, PBS 洗涤 2 次, 流式细胞术检测细胞表面 Fas-L 表达.

1.2.1 DC 对肝癌细胞的生长抑制试验^[11] 收集诱导 7 d 的 DC, 分为 2 组, 一组直接加入 96 孔细胞培养板中, 另一组加 LPS 10 g/L 后再加入 96 孔细胞培养板, 每一组 DC 细胞浓度分别为 2 \times 10⁵/孔和 1 \times 10⁵/孔(效靶比分别为 2/1, 1/1), 靶细胞分别为肝癌细胞 SMMC-7 721, QGY-7 703, HEPG-2, Alexander, 胃癌细胞 SGC-7 901, 慢性髓原性白血病细胞 K562, Burkitt's 淋巴瘤细胞 Raji 和正常人二倍体细胞, 靶细胞浓度为 1 \times 10⁵/孔, 同时做每种靶细胞和效应细胞对照各 3 复孔. 效应细胞与靶细胞混合培养 16 h, 加入 5 g/L MTT 10 μ L 继续培养 8 h. 离心培养板(2 000 r/min, 10 min), 弃去上清, 每孔加 DMSO 100 μ L, 于 570 nm 处测定 A 值. 按抑制率=[1 - (实验孔 A 值 - 效应细胞对照孔 A 均值)/靶细胞对照孔 A 均值] \times 100% 计算实验结果; 用肝癌细胞 Alexander 和胃癌细胞 SGC-7 901 分别作靶细胞, 以效靶比 10/1, 5/1, 2.5/1 重复以上实验, 并计算抑制率.

1.2.2 DC 预防人肝癌裸鼠皮下移植瘤 收集诱导 7 d 的 DC, PBS 洗 3 次后, 调整细胞浓度为 1 \times 10⁹/L, 于裸鼠左侧背部皮下注射, 每只 1 mL, 共 6 只; 另取 6 只裸鼠, 每只背部皮下注射 1 mL 生理盐水作阴性对照. 同时于裸鼠右侧腋窝皮下接种人肝癌 SMMC-7 721 细胞 5 \times 10⁶/只, 每只液体总量为 0.2 mL, 每 3 d 观察移植肿瘤生长情况, 共观察 30 d. 在无菌条件下取裸鼠移植瘤称重, 按公式: 抑制率=[(对照组平均瘤质量 - 实验组平均质量)/对照组平均瘤质量] \times 100% 计算肿瘤抑制率.

2 结果

DC 培养 7d 上清中 IL-12 水平为最高(图 1). 正常人 DC 培养液中基本上无 TNF 表达. 效靶比为 1 : 1 时, 诱导 7 d 的 DC 对 4 种肝癌细胞和胃癌细胞均有不同程度抑制作用(抑制率 22.8-49.2%), 但不抑制正常人二倍体细胞生长. 加入 LPS 后, DC 对 4 种肝癌细胞和胃癌细胞的抑制减弱(图 2). 随着效靶比增加为 2.5 : 1、5 : 1 和 10 : 1 时, 诱导 7 d 的 DC 对肝癌细胞和胃癌细胞的抑制作用逐渐增加(图 3).

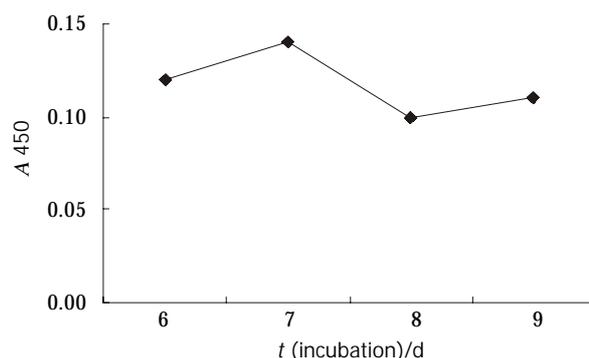


图 1 不同培养时间 DC 分泌 IL-12 的水平.

经 LPS 作用后, DC 表面 Fas-L 的表达略低于诱导 7 d 未处理 DC, 平均荧光强度分别为 3.29 和 6.04(P < 0.05). DC 预防人肝癌裸鼠皮下移植瘤, 对肝癌细胞的抑制率为 97%, 而 IL-2 条件下培养的淋巴细胞(即 LAK 细胞)对肝癌细胞的抑制率仅为 70%, 说明 DC 预防人肝癌裸鼠皮下移植瘤有效(P < 0.05).

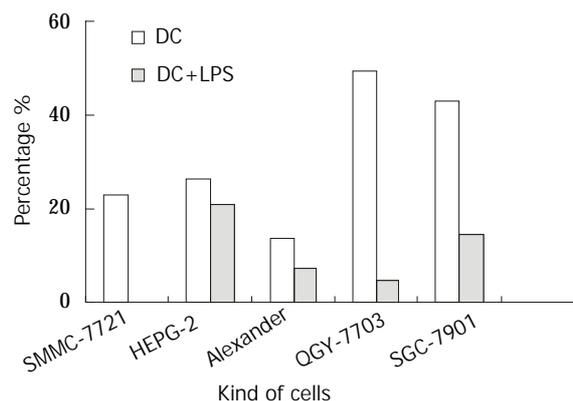


图 2 DC 对肝癌细胞的抑制作用.

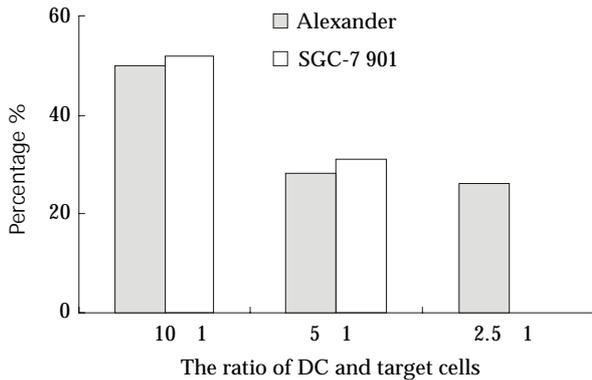


图3 DC对肿瘤细胞的抑制作用。

3 讨论

DC最初以其独特的形态而得名。正常情况下，体内绝大多数DC处于非成熟(immature)状态，主要位于肠黏膜等易于外来抗原接触的部位，仅表达低水平的共刺激分子和黏附分子，不能激活T细胞。能有效捕捉抗原，具极强的抗原加工和处理能力。成熟DC则主要迁移(migration)至外周淋巴器官，其捕获抗原的能力下降，但可激发有抗原受体的T细胞^[12,13]。DC的两大功能在时相上分开，这恰与其生物学功能相适应。在T细胞分化过程中可溶性CK的作用已得到确认，研究最彻底的CK为IL-12，他是DC的关键性产物。无论是从IL-12产生能力，还是IL-12产生水平上，DC对Th0来说是Th1和Th2型细胞因子的良好诱生剂。IL-12作用于Th0使之分化为Th1，这在IL-12或STAT4缺陷动物和缺乏IL-12受体的人身上已被证明^[14,15]。IL-12主要通过IL-2协同诱导CTL的分化；刺激活化CD3⁺T细胞(包括CD4⁺和CD8⁺)增生；协同IL-2诱导CD56⁺NK细胞及LAK细胞增生而发挥作用^[16-18]。

在以往的研究中，都比较重视DC对淋巴细胞的活化，以诱导抗原特异性CTL，这也是DC最重要的功能之一。既然非成熟DC能有效捕捉抗原，具极强的抗原加工和处理能力，而成熟与非成熟之间的界限又不是非常明显，那么，外周血单核细胞经细胞因子诱导后分化的DC是否仍保留有这样的功能呢？带着这一有趣的问题我们用DC对一系列肿瘤细胞进行了抑制性实验，结果表明：

DC对四种肝癌细胞及其他肿瘤细胞均有不同程度的抑制作用，而经LPS处理后的DC对四种肝癌细胞及其他肿瘤细胞的抑制作用明显减弱，说明DC经LPS诱导使其成熟后其对肿瘤细胞的抑制作用明显减弱。因为非成熟DC主要通过巨胞饮、受体介导的内吞及吞噬三种方式摄取抗原，而成熟DC捕捉抗原能力下降，因此推测DC对四种肝癌细胞及其他肿瘤细胞的抑制作用可能是通过吞噬途径实现的。肝癌组织中Fas抗原检出率分别为31.7%^[19]和52.8%^[20]。我们的研究中，LPS作用前后DC细胞表面FAS-L的表达分别为：6.04%和3.29%。因此，在DC对肝癌细胞的作用中，Fas和Fas

配体途径发挥了一定的作用。至于DC抑制肿瘤细胞的其他因素还有待于以后更深入的研究。本研究中，DC对人肝癌裸鼠皮下移植瘤的直接抑制率为97%，表明DC疫苗进入机体后可以非特异性抑制和特异性免疫应答两种方式发挥作用，丰富了和扩展了肝癌DC疫苗的内容，为今后肝癌DC疫苗的临床研究及应用奠定了重要基础。

4 参考文献

- Mule JJ. Dendritic cells: at the clinical crossroads. *J Clin Invest* 2000;105:707-708
- Lipscomb MF, Masten BJ. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* 2002;82:97-130
- Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N. Dendritic cell subsets: the ultimate T cell differentiation decision Makers? *Gut* 1999;45:640-641
- Rommel E, Terracciano L, Noppen C, Zajac P, Heberer M, Spagnoli GC, Padovan E. Modulation of dendritic cell phenotype and mobility by tumor cells in vitro. *Hum Immunol* 2001;62:39-49
- Rawson P, Hermans IF, Huck SP, Roberts JM, Pircher H, Ronchese F. Immunotherapy with dendritic cells and tumor major histocompatibility complex class I-derived peptides requires a high density of antigen on tumor cells. *Cancers Res* 2000;60:4493-4498
- Reinhard G, Marten A, Kiske SM, Feil F, Bieber T, Schmidt-Wolf IG. Generation of dendritic cell-based vaccines for cancer therapy. *Br J Cancer* 2002;86:1529-1533
- Burdin N, Moingeon P. Cancer vaccines based on dendritic cells loaded with tumor-associated antigens. *Cell Biol Toxicol* 2001;17:67-75
- Meidenbauer N, Andreesen R, Mackensen A. Dendritic cells for specific cancer immunotherapy. *Biol Chem* 2001;382:507-520
- 许化溪, 王胜军, 潘志超, 严俊, 臧磊, 马斌, 邵启祥, 李娜, 刘恭植. 人树突状细胞单克隆抗体的制备及其应用. *中华医学杂志* 1999;79:195-396
- 郭建巍, 蔡美英. 人外周血中树突状细胞的诱导和鉴定. *华西医科大学学报* 2002;33:68-71
- Chapoval AI, Tamada K, Chen L. In vitro growth inhibition of a broad spectrum of tumor cell lines by activated human dendritic cells. *Blood* 2000;95:2346-2351
- Winzler C, Rovere P, Rescigno M, Granucci F, Penna G, Adorini L, Zimmermann VS, Davoust J, Ricciardi-Castagnoli P. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med* 1997;185:317-328
- Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995;182:389-400
- 郭建巍, 蔡美英. Th细胞的活化与树突状细胞. *国外医学免疫学分册* 2002;25:13-16
- Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 1999;20:561-567
- Heath WR, Carbone FR. Cross-presentation, dendritic cells, Tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2001;19:47-64
- Schuhbauer DM, Mitchison NA, Mueller B. Interaction within clusters of dendritic cells and helper T cells during initial Th1/Th2 commitment. *Eur J Immunol* 2000;30:1255-1262
- Toes RE, Schoenberger SP, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ. CD40-CD40Ligand interactions and their role in cytotoxic T lymphocyte priming and anti-tumor immunity. *Semin Immunol* 1998;10:443-448
- 张俊峰, 石学涛, 衣龙海, 李胜. Fas/FasL在肝癌免疫逃避中的作用探讨. *山东医药* 2002;42:1-2
- 彭志海, 韩国新, 唐华美. bcl-2和Fas/FasL系统在肝癌细胞凋亡中的作用. *中华实验外科杂志* 2000;17:38-39

肝癌组织中 survivin 蛋白表达的意义

陈涛,贾玉容,田伏洲,蔡忠红,李广阔

陈涛,贾玉容,田伏洲,蔡忠红,李广阔,成都军区总医院全军普通外科中心
四川省成都市 610083

陈涛,男,1970-11-05生,四川省成都市人,汉族,1994年第二军医大学本科毕业,2002年第三军医大学博士毕业,主治医师.主要从事消化系统肿瘤研究.
项目负责人:陈涛,610083,四川省成都市,成都军区总医院全军普通外科中心.
chentttt@yahoo.com

电话:028-86570353

收稿日期:2002-10-08 接受日期:2002-10-30

Expression of survivin protein in hepatocellular carcinoma tissues and its relationship with clinical pathological features and prognosis

Tao Chen, Yu-Rong Jia, Fu-Zhou Tian, Zhong-Hong Cai, Guang-Kuo Li

Tao Chen, Yu-Rong Jia, Fu-Zhou Tian, Zhong-Hong Cai, Guang-Kuo Li, Center of General Surgery, General Hospital of Chengdu Command, Chengdu 610083, Sichuan Province China

Correspondence to: Dr. Tao Chen, Center of General Surgery, General Hospital of Chengdu Command, Chengdu 610083, Sichuan Province China. chentttt@yahoo.com

Received: 2002-10-08 Accepted: 2002-10-30

Abstract

AIM: To investigate the expression of survivin protein in human hepatocellular carcinoma (HCC) and its relationship with clinical features and prognosis of patients with HCC.

METHODS: The expression of survivin protein and the proliferation of tumor cells marked by PCNA in 48 cases of HCC were assessed by immunohistochemical method. TUNEL method was used to detect apoptosis.

RESULTS: The survivin protein was expressed in 31 of 48 cases of HCC (64.6%). Expression of survivin protein was significantly higher in those of Edmondson grade - than in those of grade - (88.0% vs 39.1%, $P=0.013$). The ratio of proliferative index to apoptotic index was significantly higher in HCC with positive survivin expression than that with negative survivin expression (1.8 vs 1.1, $P=0.045$). The survival rate of three years of patients with positive survivin expression was significantly lower than that of patients with negative survivin expression (70.6% vs 35.5%, $P=0.011$).

CONCLUSION: The expression of survivin may play an important role in breaking the balance of proliferation and apoptosis of HCC cells and is closely associated with prognosis of patients with HCC.

Chen T, Jia YR, Tian FZ, Cai ZH, Li GK. Expression of survivin protein in hepatocellular carcinoma tissues and its relationship with clinical pathological features and prognosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(4): 411-414

摘要

目的:研究survivin蛋白在人肝癌组织中的表达与临床病理特征及预后的关系。

方法:应用免疫组织化学染色对48例肝癌中survivin蛋白与增生细胞核抗原(PCNA)的表达情况进行检测,采用TUNEL方法检测细胞凋亡,结合临床病理特征及预后进行分析。

结果:48例肝癌中survivin蛋白表达阳性率为64.6%。Edmondson分级 - 级患者survivin蛋白表达明显低于 - 级患者(39.1% vs 88.0%, $P=0.013$)。survivin蛋白表达阳性者肝癌细胞增生凋亡比显著高于表达阴性者(1.8 vs 1.1, $P=0.045$)。survivin蛋白表达阴性患者与表达阳性患者比较,1 a生存率差异无显著意义,但3 a生存率前者显著高于后者(70.6% vs 35.5%, $P=0.011$)。

结论:survivin蛋白对破坏肝癌细胞增生凋亡平衡、促进肝癌细胞快速增生具有重要作用,survivin蛋白的表达可以作为预后不良的重要指标。

陈涛,贾玉容,田伏洲,蔡忠红,李广阔. 肝癌组织中survivin蛋白表达的意义. *世界华人消化杂志* 2003;11(4):411-414

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/411.htm>

0 引言

细胞增生与凋亡的异常与肿瘤的发生发展密切相关^[1-5]。survivin是新近发现的一种IAP家族成员,特异性地表达于胚胎发育组织以及多数人类肿瘤细胞^[6-9],通过特异性地抑制凋亡信号转导过程中最下游的效应分子caspase-3的活性而阻断凋亡的发生过程,在促进肿瘤的发生发展过程中具有重要的作用^[10-13]。我们采用原位末端标记法(TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling, TUNEL)、免疫组织化学染色技术检测肝癌组织中细胞增生与凋亡及survivin表达,并结合临床病理特征进行分析,以探讨survivin在肝癌组织中的表达与肝癌细胞增生与凋亡异常的关系及其临床病理学意义。

1 材料和方法

1.1 材料 1994/1996年手术切除肝癌标本48例,男39例,女9例;年龄16-81(平均48.7)岁;肿瘤直径2.6-21(平均8.9)cm,其中 ≥ 5 cm 34例(70.8%), < 5 cm 14例(29.2%);合并门静脉癌栓或肝内转移者22例(45.8%);Edmondson 级5例(10.4%), 级14例(29.2%),

级 19 例(39.6 %), 级 10 例(20.8 %);临床病理 期 6 例(12.5 %), 期 14 例(29.2 %), 期 28 例(58.3 %). 标本均经 40 g/L 甲醛固定, 石蜡包埋, 5 μm 连续切片. 羊抗人 survivin 多克隆抗体(Santa Cruz, USA); 鼠抗人增生细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)单克隆抗体(武汉博士德); SP 试剂盒、DAB 试剂盒(北京中山); 细胞凋亡原位检测试剂盒(in situ cell death detection kit, AP, roche, USA)

1.2 方法 肝癌组织细胞凋亡的原位检测—TUNEL 染色按照 TUNEL 试剂盒说明进行, 以不含末端脱氧核苷酸转移酶的标记液(Bottle 2:Label solution)代替 TUNEL 反应液作阴性对照; 以 DNase 预处理 10 min 再接 TUNEL 染色步骤作阳性对照. 光镜下观察 TUNEL 染色切片的显色反应, 结合形态学改变确定凋亡细胞. 随机选择 5 个肿瘤区内 200 倍(20 × 10 倍)视野, 计数癌细胞数及凋亡细胞数, 计算凋亡指数(AI)=(凋亡细胞数 / 癌细胞数) × 100 %. 肝癌组织 PCNA 蛋白表达的免疫组织化学染色按照 SP 法常规操作进行, 以 PBS 代替一抗作阴性对照, 正常兔血清代替一抗作替代对照. 光镜下观察免疫组化染色切片的显色反应, 随机选择 5 个肿瘤区内 200 倍(20 × 10 倍)视野, 计数癌细胞数及染色阳性细胞数, 计算增生指数(PI)=(PCNA 染色阳性细胞数 / 癌细胞数) × 100 %. 计算细胞增生凋亡比 =PI/AI. 肝癌组织 survivin 蛋白表达的免疫组织化学染色按照 SP 法常规操作进行, 阳性对照参照 Santa Cruz 公司提供的阳性对照片. 光镜下观察免疫组化染色切片的显色反应, 随机选择 5 个肿瘤区内 200 倍(20 × 10 倍)视野, 计数癌细胞数及染色阳性细胞数, 以百分率表示, 阳性细胞数 ≥ 10 % 判为阳性, 阳性细胞数 < 10 % 判为阴性.

统计学处理 结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS10.0 软件进行 χ^2 检验和 t 检验分析.

2 结果

2.1 肝癌组织自发性细胞凋亡与增生 肝癌组织中 PCNA 阳性产物呈棕黄色颗粒状, 定位于肝癌细胞核, 细胞质未见着色. PCNA 阳性细胞在肝癌组织内呈散在分布(图 1). 凋亡细胞胞质浓缩, 细胞体积较小, 核呈红色或粉红色着色, 呈碎点状, 结构消失, 形态不规则, 大小不一致(图 2). 肝癌组织中细胞增生凋亡比与肿瘤分化程度有关, 而与其他临床病理特征如患者性别、年龄、肿瘤直径、临床分期及门静脉癌栓或肝内转移均无关. 肿瘤分化较好者, 肝癌细胞增生凋亡比明显低于分化较差者, 在 Edmondson 分级 - 级和 - 级患者肝癌细胞增生凋亡比分别为 0.8 ± 0.4 和 2.3 ± 1.4 , 二者差异极显著($P < 0.001$).

2.2 肝癌组织 survivin 蛋白表达情况 survivin 蛋白主要表达于肝癌细胞质, SP 染色可见胞质内棕黄色颗粒, 阳性细胞在肝癌组织内呈散在分布(图 3). 48 例肝细胞癌中 31 例 survivin 蛋白表达阳性, 阳性表达率为 64.6 %.

survivin 蛋白表达及细胞增生凋亡比与肿瘤分化程度有关, 而与其他临床病理特征如患者性别、年龄、肿瘤直径、临床分期及门静脉癌栓或肝内转移均无关. 肿瘤分化较差者, survivin 蛋白表达率及细胞增生凋亡比明显高于分化较好者, 在 Edmondson 分级 - 级和 - 级患者 survivin 蛋白表达率分别为 39.1 % 和 88.0 % 二者差异极显著($P < 0.001$).

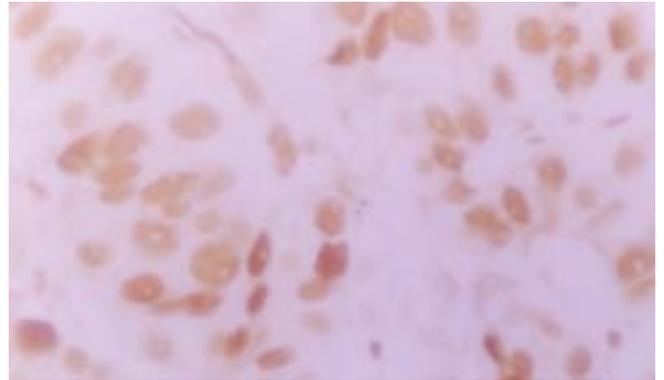


图 1 肝癌 PCNA 蛋白表达阳性呈棕黄色, 定位于细胞核, 散在分布. SP × 400

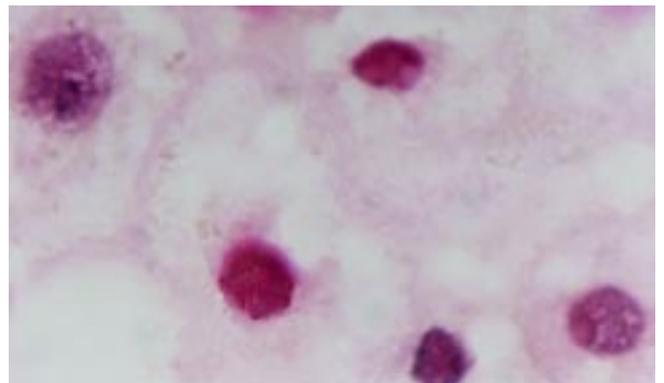


图 2 肝癌凋亡细胞及散在的凋亡小体. TUNEL × 1 000(AP 染色)



图 3 肝癌 Survivin 蛋白表达阳性, 细胞内棕黄色细颗粒状阳性产物. SP × 1 000

2.3 肝癌组织 survivin 蛋白表达与细胞增生凋亡比及预后的关系 在 survivin 蛋白表达阳性及阴性患者, 肝癌细胞增生凋亡比分别为 1.8 ± 1.3 和 1.1 ± 1.0 , 二者差异显著, survivin 蛋白表达阳性患者增生凋亡比显著高于表达阴性者($P < 0.05$). 同时, survivin 表达阴性患者与表达阳性患者比较, 1 a 生存率无显著差异, 但 3 a

生存率显著高于后者, 两组分别为 70.6 % 和 35.5 % (P < 0.05, 表 1).

表 1 Survivin 蛋白表达与术后生存率关系

Survivin 表达	n	增生指数	凋亡指数	增生/凋亡比 (PI/AI)	1 a 生存率 (%)	3 a 生存率 (%)
阴性组	17	4.9 ± 5.0	5.5 ± 2.5	1.1 ± 1.0	88.2 %	70.6 %
阳性组	31	10.9 ± 9.6 ^b	6.3 ± 3.3	1.8 ± 1.3 ^a	67.7 %	35.5 % ^a

^aP < 0.05, ^bP < 0.01 vs 阴性组.

3 讨论

肝癌的发生发展取决于细胞增生和死亡相互作用的结果^[14-18]. 我们采用免疫组化方法及 TUNEL 染色方法结合细胞形态学观察对肝癌组织中肝癌细胞 PCNA 的表达及肝癌细胞凋亡进行了研究. 首次尝试了将细胞增生率与凋亡率之比作为反映肝癌组织中细胞增生与凋亡的平衡的指标. 结果发现, 原发性肝癌组织中细胞增生率与凋亡率之比能够较好地反映细胞增生与凋亡的动态平衡的破坏, 他与肿瘤分化程度有关, 而与其他临床病理特征如患者性别、年龄、肿瘤直径、临床分期及门静脉癌栓或肝内转移均无关. Edmonson 分级 - 级患者, 细胞增生/凋亡比显著低于 Edmonson 分级 - 级患者. 同时在 survivin 表达阳性的患者其细胞增生/凋亡比较表达阴性患者明显升高, 相应的 3 a 生存率也显著降低. 这与 Yamamoto et al^[19-22]的研究发现随着肝癌分化程度的降低, 肝癌细胞凋亡率逐渐增高, 同时细胞增生率的增高更加显著的结果是一致的.

Ito et al^[23]研究了 survivin 在人肝癌细胞株的表达及功能, 发现在所检测的 4 株肝癌细胞株中均有 survivin 表达, 并能够促进肝癌细胞增生, 但 survivin 在肝癌组织中的表达的研究至今未见报道. 我们采用免疫组织化学染色的方法观察了 48 例肝癌组织中 survivin 的表达, 结果发现 31 例 (64.6 %) 的肝癌中有 survivin 表达, 与既往在其他类型肿瘤组织中对 survivin 表达的研究结果相类似^[24-28]. 统计学分析表明, 除肿瘤细胞分化程度外, survivin 与其余临床病理因素均无显著相关性, 在 Edmonson 分级 - 级患者, 其表达显著低于 Edmonson 分级 - 级患者, 这可能是分化较差的肝癌组织中 survivin 基因表达上调的结果, 但其表达与年龄、性别、肿瘤大小、临床分期以及门静脉癌栓及肝内转移无关, 表明肝癌是一种多因素、多阶段、长期相互作用的结果, 是一个多基因、多步骤的生物学行为改变的过程, 是癌基因的激活和抑癌基因的失活共同作用的结果, 也是细胞增生与凋亡的动态平衡失调的结果, survivin 基因在其发生发展过程中的某一方面发挥了作用. 与 survivin 在其他肿瘤中的研究情况不同的是, 我们发现在肝癌组织中 survivin 基因的表达与肝癌细胞凋亡指数并无明显关系, 这可能是由于在肝癌组织中影响细胞凋亡的因素太多^[29-34], 导

致 survivin 的作用被掩盖. 但进一步的分析表明, survivin 的表达与肝癌组织细胞增生/凋亡比有关, survivin 表达阴性者肝癌细胞增生/凋亡比显著低于表达阳性者. 由于肝癌的发生可以视为肿瘤细胞增生活跃以及凋亡抑制打破了细胞增生与死亡的动态平衡, 从而导致细胞的无限增生与恶性转化所致^[30-34], 而组织细胞的增生/凋亡比能够更好地反映细胞增生与死亡之间的动态平衡的状态从而更好地体现其生物学行为特性, 这一结果也表明了 survivin 在破坏肝癌细胞增生与凋亡间平衡, 使肿瘤细胞获得生长优势中发挥了重要作用. 分化较好的肝癌细胞 survivin 表达较低, 这说明低分化肝癌细胞逃避凋亡并快速增生的功能至少部分地通过 survivin 的表达而获得. survivin 表达阴性患者与表达阳性患者比较, 1 a 生存率无显著差异, 但 3 a 生存率显著高于后者. 这些结果都提示 survivin 在肝癌的生长过程中发挥了重要的作用, survivin 的表达可以作为预后不良的重要指标.

4 参考文献

- Kyriazanos ID, Tachibana M, Dhar DK, Shibakita M, Ono T, Kohno H, Nagasue N. Expression and prognostic significance of S100A2 protein in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Oncol Rep* 2002;9:503-510
- Wu K, Li Y, Zhao Y, Shan YJ, Xia W, Yu WP, Zhao L. Roles of Fas signaling pathway in vitamin E succinate-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:982-986
- Liu LX, Liu ZH, Jiang HC, Qu X, Zhang WH, Wu LF, Zhu AL, Wang XQ, Wu M. Profiling of differentially expressed genes in human gastric carcinoma by cDNA expression array. *World J Gastroenterol* 2002;8:580-585
- Poulaki V, Mitsiades CS, Kotoula V, Tseleni-Balafouta S, Ashkenazi A, Koutras DA, Mitsiades N. Regulation of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in thyroid carcinoma cells. *Am J Pathol* 2002;161:643-654
- Wu MY, Liang YR, Wu XY, Zhuang CX. Relationship between Egr-1 gene expression and apoptosis in esophageal carcinoma and precancerous lesions. *World J Gastroenterol* 2002;8:971-975
- Frost M, Jarboe EA, Orlicky D, Gianani R, Thompson LC, Enomoto T, Shroyer KR. Immunohistochemical localization of survivin in benign cervical mucosa, cervical dysplasia, and invasive squamous cell carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2002;117:738-744
- Nasu S, Yagihashi A, Izawa A, Saito K, Asanuma K, Nakamura M, Kobayashi D, Okazaki M, Watanabe N. Survivin mRNA expression in patients with breast cancer. *Anticancer Res* 2002;22:1839-1843
- Yu J, Leung WK, Ebert MP, Ng EK, Go MY, Wang HB, Chung SC, Malfertheiner P, Sung JJ. Increased expression of survivin in gastric cancer patients and in first degree relatives. *Br J Cancer* 2002;87:91-97
- Sarela AI, Verbeke CS, Ramsdale J, Davies CL, Markham AF, Guillou PJ. Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2002;86:886-892
- Verdecia MA, Huang H, Dutil E, Kaiser DA, Hunter T, Noel JP. Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat Struct Biol* 2000;7:602-608
- Sarela AI, Macadam RC, Farmery SM, Markham AF, Guillou PJ. Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut* 2000;46:645-650
- Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000;6:127-134
- Islam A, Kageyama H, Takada N, Kawamoto T, Takayasu H,

- Isogai E, Ohira M, Hashizume K, Kobayashi H, K aneko Y, Nakagawara A. High expression of survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene* 2000;19:617-623
- 14 Shan CM, Li J. Study of apoptosis in human liver cancers. *World J Gastroenterol* 2002;8:247-252
- 15 Kalogeraki A, Garbagnati F, Santinami M, Zoras O. DNA fragmentation and cell proliferation correlated with tumor grade in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002;96:301-305
- 16 Rocken C, Carl-McGrath S. Pathology and pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis* 2001;19:269-278
- 17 Kalogeraki A, Garbagnati F, Santinami M, Zoras O. DNA fragmentation and cell proliferation correlated with tumor grade in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002;96:301-305
- 18 Park YN, Chae KJ, Kim YB, Park C, Theise N. Apoptosis and proliferation in hepatocarcinogenesis related to cirrhosis. *Cancer* 2001;92:2733-2738
- 19 Tannapfel A, Geissler F, Kockerling F, Katalinic A, Hauss J, Wittekind C. Apoptosis and proliferation in relation to histopathological variables and prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Pathol* 1999;187:439-445
- 20 Yamamoto K, Takenaka K, Kajiyama K, Shimada M, Shirabe K, Taketomi A, Maeda T, Sugimachi K. Cell proliferation and cell loss in nodule-in-nodule hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1999; 46:813-819
- 21 Ito Y, Matsuura N, Sakon M, Takeda T, Umeshita K, Nagano H, Nakamori S, Dono K, Tsujimoto M, Nakahara M, Nakao K, Monden M. Both cell proliferation and apoptosis significantly predict shortened disease-free survival in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 1999; 81:747-751
- 22 Hino N, Higashi T, Nouse K, Nakatsukasa H, Tsuji T. Apoptosis and proliferation of human hepatocellular carcinoma. *Liver* 1996; 16:123-129
- 23 Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka T, Fujikawa K, Ito M, Takas K, Moriyama M, Kawano H, Hayashida M, Nakano T, Suzuki A. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000;31:1080-1085
- 24 Sasaki T, Lopes MB, Hankins GR, Helm GA. Expression of survivin, an inhibitor of apoptosis protein, in tumors of the nervous system. *Acta Neuropathol (Berl)* 2002;104:105-109
- 25 Dong Y, Sui L, Watanabe Y, Sugimoto K, Tokuda M. Survivin expression in laryngeal squamous cell carcinomas and its prognostic implications. *Anticancer Res* 2002;22:2377-2383
- 26 Sarela AI, Verbeke CS, Ramsdale J, Davies CL, Markham AF, Guillou PJ. Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2002;86:886-892
- 27 Takai N, Miyazaki T, Nishida M, Nasu K, Miyakawa I. Survivin expression correlates with clinical stage, histological grade, invasive behavior and survival rate in endometrial carcinoma. *Cancer Lett* 2002;184:105-116
- 28 Wakana Y, Kasuya K, Katayanagi S, Tsuchida A, Aoki T, Koyanagi Y, Ishii H, Ebihara Y. Effect of survivin on cell proliferation and apoptosis in gastric cancer. *Oncol Rep* 2002;9:1213-1218
- 29 Jiang S, Song MJ, Shin EC, Lee MO, Kim SJ, Park JH. Apoptosis in human hepatoma cell lines by chemotherapeutic drugs via Fas-dependent and Fas-independent pathways. *Hepatology* 1999;29:101-110
- 30 Guo XZ, Shao XD, Liu MP, Xu JH, Ren LN, Zhao JJ, Li HY, Wang D. Effect of bax, bcl-2 and bcl-xL on regulating apoptosis in tissues of normal liver and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:1059-1062
- 31 Ikeguchi M, Hirooka Y, Kaibara N. Quantitative analysis of apoptosis-related gene expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002;95:1938-1945
- 32 Garcia EJ, Lawson D, Cotsonis G, Cohen C. Hepatocellular carcinoma and markers of apoptosis (bcl-2, bax, bcl-x): prognostic significance. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002;10:210-217
- 33 Paiva C, Oshima CT, Lanzoni VP, Forones NM. Apoptosis, PCNA and p53 in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2002; 49:1058-1061
- 34 Lamboley C, Bringuier AF, Camus E, Lardeux B, Groyer A, Feldmann G. Overexpression of the mouse Fas gene in human Hep3B hepatoma cells overcomes their resistance to Fas-mediated apoptosis. *J Hepatol* 2002;36:385-394

世界华人消化杂志和 WJG 获得商标注册

本刊讯 世界华人消化杂志和 World Journal of Gastroenterology 经中华人民共和国国家工商行政管理总局商标局核定使用商品 (第 16 类), 获得商标注册。

世界华人消化杂志® 注册有效期限自公元 2002-11-14 至 2012-11-13 止。商标注册证第 2001071 号。

World Journal of Gastroenterology® 注册有效期限自 2002-11-14 至 2012-11-13 止。商标注册证第 2001158 号。

(世界胃肠病学杂志社 2002-12-18)

热休克蛋白70与IL-2对小鼠肝癌移植模型的治疗比较

傅庆国,沈晓东,孟凡东,郭仁宣

傅庆国,沈晓东,孟凡东,郭仁宣,中国医科大学附属第一医院普外二科 辽宁省沈阳市 110001

傅庆国,男,1966-01-10生,辽宁省沈阳市人,汉族,1989年锦州医学院本科毕业,学士,1999年于中国医科大学获博士学位,副教授,副主任医师,主要从事肿瘤生物治疗方面研究,已发表相关论文16篇。

项目负责人:傅庆国,110001,辽宁省沈阳市,中国医科大学附属第一医院普外二科. qingguofu@hotmail.com.

电话:024-23256666-6237

收稿日期:2002-07-16 接受日期:2002-12-01

Comparison of therapeutic efficacy between tumor-derived heat shock protein 70 and interleukine-2

Qing-Guo Fu, Xiao-Dong Shen, Fan-Dong Meng, Ren-Xuan Guo

Qing-Guo Fu, Xiao-Dong Shen, Fan-Dong Meng, Ren-Xuan Guo, Second General Surgery Department, First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Qing-Guo Fu, The Second General Surgery Department, First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. qingguofu@hotmail.com

Received: 2002-07-16 Accepted: 2002-12-01

Abstract

AIM: To compare and analyze the therapeutic effect of tumor-derived heat shock protein 70 and globally accepted interleukin-2, to evaluate the anti-tumor capacity of HSP70, and to provide significant information for HSP70 administration to treat human cancers.

METHODS: Cell Culture, techniques for protein extraction and purification, SDS-PAGE, Western-blot and animal experiment were used in this study.

RESULTS: Both IL-2 and HSP70 showed therapeutic effect in tumor-bearing mice. The best effect was observed in 100 000 U IL-2 and 10 µg HSP70 administrations, and partial efficacy was found in 50 000 U IL-2 and 5 µg HSP70 administrations. The effect of 100 000 U IL-2 was nearly as good as that of 5 µg HSP70. About 40 % mice receiving HSP70 10 µg administration survived over 90 days, the average survival period of this group was over 56.8 days, whereas the control group was 17.3 days, IL-2 50 000 group, 26.3 days, IL-2 100 000 group, 36.6 days, and 5 µg HSP70 group, 27.7 days. Significant difference was found ($P < 0.05$) when compared with the HSP70 10 µg group and control group.

CONCLUSION: HSP70 has a specific anti-tumor effect and obviously exceeded IL-2. Those data provide significant information for the treatment of human cancers.

Fu QG, Shen XD, Meng FD, Guo RX. Comparison of therapeutic efficacy between tumor-derived heat shock protein 70 and interleukine-2. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(4):415-418

摘要

目的: 比较分析肿瘤热休克蛋白70(HSP70)与IL-2对小鼠肝癌移植模型的治疗作用,评价HSP70的疗效,为应用HSP70治疗人类恶性肿瘤提供有重要参考价值的实验依据。

方法: 细胞培养、蛋白质纯化技术、电泳技术、Western-blot法、动物实验等。

结果: IL-2及HSP70对小鼠肝癌移植模型均有治疗作用,其中IL-2 10万U、HSP70 10 µg效果最佳,IL-2 5万U及HSP70 5 µg有部分治疗作用,10万U的IL-2与5 µg HSP70治疗效果相当,HSP70 10 µg治疗后有40%小鼠移植肿瘤全部消退,长期生存790 d,与对照组及其他各组相比,差异具有显著性($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

结论: HSP70具有良好的抗肿瘤免疫活性,其疗效明显优于IL-2,本研究对于应用HSP70治疗人类的恶性肿瘤有十分重要的借鉴意义。

傅庆国,沈晓东,孟凡东,郭仁宣. 热休克蛋白70与IL-2对小鼠肝癌移植模型的治疗比较. *世界华人消化杂志* 2003;415-418

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/415.htm>

0 引言

恶性肿瘤的免疫疗法已经成为继手术、放化疗之后的又一重要的肿瘤综合治疗手段^[1-8],随着特异性肿瘤抗原的发现和研究的不断发展,研究应用肿瘤特异性抗原,进行人类恶性肿瘤的治疗已成为一个重要的方向^[9-18]。国内外对肿瘤热休克蛋白70(Heat Shock Protein 70, HSP70)进行了深入的研究,发现HSP70确有明显的特异性的抗肿瘤作用^[19-22],不但能够使健康小鼠获得100%的保护性作用,而且能使荷瘤小鼠的肿瘤生长受到明显的抑制,部分动物长期生存、肿瘤全部消退,而IL-2经过多年的实验与临床研究证实^[23-25],其中治疗有效率在20%左右,为评价HSP70的治疗作用,作者以近交系615系小鼠对HSP70及IL-2的治疗作用进行动物实验对照,以此为HSP70的应用提供有实用意义的参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料 将 5×10^9 个HcaF细胞置于40 ml低渗缓冲液(30 mmol/L NaHCO₃, 0.5 mmol/L 苯甲基磺酰氟, pH7.2)中,以超声粉碎机破碎,4 100 000 g超速离心2 h,取上清过ConA-Sepharose柱,收集未结合

组分, 4 缓冲液 A (20 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L NaCl, 15 mmol/L β- 巯基乙醇, 3 mmol/L MgCl₂, pH7.5)中透析过夜, 然后将样品加到 ADP-agarose 柱上, 结合部分用含3 mmol/L ADP的缓冲液A进行洗脱, 将洗脱液加于 Mono Q柱, 用 FPLC系统进行分离, 200-500 mmol/L 梯度 NaCl 洗脱, 分别收集各洗脱峰蛋白, 4 缓冲液 B(10 mmol/L Tris-HCl, pH7.5)中透析过夜. 将各色谱柱分离的样品及 Mono Q 柱的各洗脱峰样品在 100 g/L SDS-PAGE 上进行分子量及纯度测定, 银染色, 再转印至硝酸纤维素膜上, 以抗 HSP70 单抗为一抗, 碱性磷酸酶标记的羊抗小鼠 IgG 为二抗, 进行免疫印迹分析. 提取的 HSP70 以(动物实验)来鉴定其抗肿瘤活性.

1.2 方法 动物分为对照组、 HSP70 5 μg 组 2 个、 HSP70 10 μg 组 2 个, IL-2 5 万 U 组 2 个、 IL-2 10 万 U 组 2 个, “ IL-2 化 ” 组分别用于观察治疗作用. 治疗方法: 接种 HcaF 细胞 1 × 10⁶ 个 / 只, 7 d 成瘤后, HSP70: 第 1 个月 1 次 /wk 连 4 次; 第 2 个月 10 d / 次连 3 次; 以后 15 d / 次至实验结束. IL-2: 5 万 U、 10 万 U 1 次 /d, 连 5 d 皮下注射; 2 000 U 1 次 /d, 连 10 d 皮下注射; 2 000 U 2 次 /wk 皮下注射, 至实验结束. “ IL-2 化 ” 组, 在对照组全部死亡后, 取 5 只健康小鼠先于 1 wk 连用 IL-2 10 万 U/d, 连 5 d, 作者称其为 “ IL-2 化 ” (Interleukine-2 Preparation). 于第 8 天接种 HcaF 细胞 1 × 10⁶ 个 / 只, (同时)再取一组 IL-2 10 万 U 和 HSP70 10 μg 治疗组小鼠于不同于上次接种部位与 IL-2 化组同时再次接种 HcaF 细胞 1 × 10⁶ 个 / 只(活细胞率 >96%), 同时停止治疗, 观察各组小鼠的肿瘤生长情况.

2 结果

经过二次亲和层析和 Mono Q 柱的分离后, 得到纯度较高的分子质量约为 70 kD 的蛋白质, 经免疫印迹分析证实该蛋白质即为 HSP70(图1). 经毛细管电泳分析纯度达 100%.

IL-2 与 HSP70 对小鼠肿瘤均有较明显的抑制作用, 应用免疫治疗后, 小鼠的生存期均有延长, 与对照组相比差异显著(P <0.01 或 0.05). 但 HSP70 较 IL-2 具有更显著的治疗作用, IL-2 治疗组无一长期生存, 而 HSP70 10 μg 组有 40% 的小鼠经治疗后获长期生存 790 d, 其肿瘤最终全部消退(表 1).

为明确 HSP70 与 IL-2 治疗作用的不同, 我们设一 IL-2 化组, 对比观察再接种后肿瘤的再发率及对生存期、 生存率的影响(表 2). IL-2 10 万 U 治疗后及预先应用 IL-2 均不能抑制肿瘤的发展, 而应用 HSP70 10 μg 后无一小鼠出现肿瘤, “ IL-2 化 ” 组的生存期与对照组无差异显著性(P >0.25), 肿瘤大小及肿瘤重量之间亦无

显著性差异(P >0.25), 但应用 IL-2 治疗后未出现腹水.

表 1 IL-2 及 HSP70 治疗结果

分组	肿瘤大小 (cm)	肿瘤质量(g)	腹水量 (g)	腹水出现率(%)	生存天数(d)	长期生存率(%)
对照组	1.92 ± 0.43	3.89 ± 1.57	10.8 ± 2.3	100	17.3 ± 5.6	-
I5 组 1	1.86 ± 1.78	3.74 ± 0.93	6.4 ± 4.8	60	26.3 ± 3.1	-
I10 组 1	1.93 ± 2.18	3.69 ± 0.47	1.0 ± 2.0	20	36.6 ± 4.8	-
H5 组 1	1.63 ± 0.34	3.54 ± 0.64	3.0 ± 0.8	40	27.7 ± 5.6	-
H10 组 1	0.36 ± 0.11	0.56 ± 0.15	-	-	>56.8 ± 32.4	40

表 2 HcaF 细胞再接种结果

分组	肿瘤大小 (cm)	肿瘤质量(g)	腹水量 (g)	生存天数(d)	腹水出现率(%)	长期生存率(%)
对照组	1.92 ± 0.43	3.89 ± 1.57	10.8 ± 2.3	17.3 ± 5.6	100	-
IL-2 治疗组 2(n=4)	1.96 ± 0.38	3.62 ± 0.88	-	29.1 ± 8.7	-	-
“ IL-2 化 ” 组	1.95 ± 0.64	3.31 ± 0.86	1.0 ± 2.0	18.2 ± 3.7	20	-
H10 治疗组 2	-	-	-	>58.7 ± 28.9	-	40



图 1 对照组、 I5、 I10、 H5、 和 H10 组小鼠的肿瘤切除标本(从左至右).



图 2 对照组、 I5、 I10、 IL-2 化和 I10 组 2、 H10 组 2 小鼠的肿瘤切除标本(从左至右).

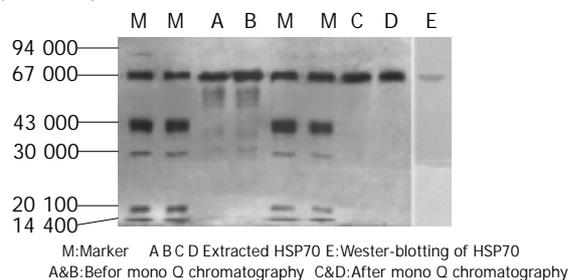


图 3 HSP70 的 SDS-PAGE 和 Western-blot 结果.

3 讨论

HSP70 在很多恶性肿瘤组织中均有较高的表达, 实验研究证明肿瘤组织来源的 HSP70 是一种肿瘤特异性抗原, 诱导体内 CD₈⁺T 淋巴细胞成为肿瘤特异性的 CTL 并使 Th1 型细胞因子升高^[28], 具有特异的抗肿瘤作用^[29-34], HSP70 具有良好的应用前景, 研究其治疗作用, 评价其疗效有重要的实用意义. IL-2 是由活化的 T 淋巴细胞产生的具有调节免疫功能和抗肿瘤作用的重要的细胞因子, 已证明其对肿瘤的有效率为 20% 左右, IL-2 通过增强 LAK、NK、TIL 等促进其他细胞因子的表达等作用, 调节机体的免疫功能, 发挥抗肿瘤免疫效应^[35-40].

本研究证实, IL-2 及 HSP70 均具有抑制肿瘤的作用, 通过比较分析, 表明应用 10 万 U IL-2 与 HSP70 5 μg 的治疗作用相当, 而应用 10 μg HSP70 显示了显著的治疗及抑瘤作用, 该组小鼠不但肿瘤显著缩小, 而且 40% 获长期生存, 肿瘤完全消退, 充分证明 HSP70 的抗肿瘤作用明显优于 IL-2.

为进一步研究 HSP70 与 IL-2 在治疗作用上的差异, 作者进行了再接种实验, 结果表明, 应用 IL-2 治疗后或预先应用 IL-2 都不能有效地抑制肿瘤的进展, 提示 IL-2 的应用要足量、连续, 而停用 IL-2 后抗肿瘤免疫功能亦减弱, IL-2 不能使机体维持长期的、主动的抗肿瘤免疫效应, 这正是由于 IL-2 不具特异性抗肿瘤作用的表现. 但应用 HSP70 治疗后再接种 HcaF 细胞, 无一小鼠再发生肿瘤, 且生存率及生存期限未受到影响, 证明 HSP70 能够诱导机体产生特异性的抗肿瘤免疫效应, 这种效应在治疗停止后可在相对较长时间内维持, 有助于延缓肿瘤的复发, 更加证明 HSP70 具有 IL-2 不可比拟的优越性. 我们以 IL-2 作为已为大多数学者所认可的治疗作用为参照, 研究了 HSP70 的治疗作用, 结果显示, HSP70 较 IL-2 具有显著的抑瘤和治疗作用, 更主要的是 HSP70 诱导的抗肿瘤免疫在停止治疗后仍可在较长时间内维持, 这对防止肿瘤复发、延缓肿瘤进展, 有重要意义, 本研究对于研究以 HSP70 治疗人类的恶性肿瘤有重要的参考价值.

4 参考文献

- 1 Fu QG, Meng FD, Shen XD, Guo RX. Efficacy of intraperitoneal thermochemotherapy and immunotherapy in intraperitoneal recurrence after gastrointestinal cancer resection. *World J Gastroenterol* 2002;8:1019-1022
- 2 Huang J, Cai MY, Wei DP. HLA class I expression in primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:654-657
- 3 Jin J, Yang JY, Liu J, Kong YY, Wang Y, Li GD. DNA immunization with fusion genes encoding different regions of hepatitis C virus E2 fused to the gene for hepatitis B surface antigen elicits immune responses to both HCV and HBV. *World J Gastroenterol* 2002;8:505-510
- 4 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
- 5 Zhang J, Zhang JK, Zhuo SH, Chen HB. Effect of a cancer vaccine prepared by fusions of hepatocarcinoma cells with dendritic cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:690-694
- 6 Lu RR, Shou NH, Jiang XH. Study on the colorectal lymphatic metastasis related tumor cell proliferation activity and cytokone levels. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:455-456
- 7 Luo ZB, Luo YH, Lu R, Jin HY, Zhang PB, Xu CP. Immunohistochemical study on in gastric dendritic mucosa of patients with gastric and cancer precancerous lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:400-402
- 8 Qian SB, Chen SS. Transduction of human hepatocellular carcinoma cells with human alpha-interferon gene via retroviral vector. *World J Gastroenterol* 1998;4:210-213
- 9 Ren JM, Zou QM, Wang FK, He Q, Chen W, Zen WK. PELA microspheres loaded *H. pylori* lysates and their mucosal immune response. *World J Gastroenterol* 2002;8:1098-1102
- 10 Guo DL, Dong M, Wang L, Sun LP, Yuan Y. Expression of gastric cancer-associated MG7 antigen in gastric cancer, precancerous lesions and *H. pylori*-associated gastric diseases. *World J Gastroenterol* 2002;8:1009-1013
- 11 Zhong YW, Cheng J, Wang G, Shi SS, Li L, Zhang LX, Chen JM. Preparation of human single chain Fv antibody against hepatitis C virus E2 protein and its identification in immunohistochemistry. *World J Gastroenterol* 2002;8:863-867
- 12 Liu LX, Jiang HC, Liu ZH, Zhou J, Zhang WH, Zhu AL, Wang XQ, Wu M. Integrin gene expression profiles of human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:631-637
- 13 Liu LX, Liu ZH, Jiang HC, Qu X, Zhang WH, Wu LF, Zhu AL, Wang XQ, Wu M. Profiling of differentially expressed genes in human gastric carcinoma by cDNA expression array. *World J Gastroenterol* 2002;8:580-585
- 14 Woitas RP, Petersen U, Moshage D, Brackmann HH, Matz B, Sauerbruch T, Spengler U. HCV-specific cytokine induction in monocytes of patients with different outcomes of hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2002;8:562-566
- 15 Guan XJ, Guan XJ, Wu YZ, Jia ZC, Shi TD, Tang Y. Construction and characterization of an experimental ISCOMS-based hepatitis B polypeptide vaccine. *World J Gastroenterol* 2002;8:294-297
- 16 Shen LZ, Wu WX, Xu DH, Zheng ZC, Liu XY, Ding Q, Hua YB, Yao K. Specific CEA-producing colorectal carcinoma cell killing with recombinant adenoviral vector containing cytosine deaminase gene. *World J Gastroenterol* 2002;8:270-275
- 17 Ji WS, Hu JL, Qiu JW, Pan BR, Peng DR, Shi BL, Zhou SJ, Wu KC, Fan DM. Relationship between genotype and phenotype of flagellin C in Salmonella. *World J Gastroenterol* 2001;7:864-867
- 18 Schray DP, Kouttab N, Hearing VJ, Wanebo HJ. Synergistic effect of interleukin-2 and a vaccine of irradiated melanoma cells transfected to secrete staphylococcal enterotoxin A. *Clin Exp Metastasis* 2002;19:43-53
- 19 Li MS, Yuan AL, Zhang WD, Liu SD, Lu AM, Zhou DY. Dendritic cells in vitro induce efficient and specific anti-tumor immune response. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:161-163
- 20 Chen HB, Zhang JK, Huang ZL, Sun JL, Zhou YQ. Effect of cytokines on dendritic cells against human hepatoma cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:191-193
- 21 Wei CY, Li T, Zhang CM, Yang NW, Tan YC. Treating primary liver cancer with S-TIL combining Chinese traditional medicine. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:478
- 22 Du QY, Wang FS, Xu DP, Liu H, Lei ZY, Liu MX, Wang YD, Chen JM, Wu ZZ. Cytotoxic effects of CIK against hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:863-866
- 23 Zheng N, Ye SL, Sun RX, Zhao Y, Tang ZY. Effects of cryopreservation and phenylacetate on biological characters of adherent LAK cells from patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:233-236
- 24 Indaram AV, Nandi S, Weissman S, Lam S, Bailey B, Blumstein M, Greenberg R, Bank S. Elevated basal intestinal mucosal cytokine levels in asymptomatic first-degree relatives of patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2000;6:49-52
- 25 Zeis M, Zunkel T, Steinmann J, Schmitz N, Uharek L. Enhanced antitumor effectiveness of idiotype vaccination induced by the administration of Flt3 ligand combined with interleukin 2 against a murine myeloma. *Br J Haematol* 2002;117:93-102
- 26 傅庆国, 孟凡东, 郭克建, 沈晓东, 郭仁宣. 热休克蛋白 70 对荷瘤鼠的治疗作用. *免疫学杂志* 2002;6:17-18
- 27 Rosenberg SA, Mule JJ, Spiess PJ. Regression of established pul-

- monary metastases and subcutaneous tumor mediated by the systemic administration of high-dose recombinant interleukin 2. *J Exp Med* 1985;5:1165-1188
- 28 傅庆国,孟凡东,郭仁宣.热休克蛋白70诱导抗肿瘤免疫的机制研究. *细胞与分子免疫学杂志* 2002;4:393-394
- 29 Robert J, Gantress J, Rau L, Bell A, Cohen N. Minor histocompatibility antigen-specific MHC-restricted CD8 T cell responses elicited by heat shock proteins. *J Immunol* 2002;168:1697-1703
- 30 Manjili MH, Wang XY, Park J, Facciponte JG, Repasky EA, Subject JR. Immunotherapy of cancer using heat shock proteins. *J Front Biosci* 2002;7:43-52
- 31 Schueller G, Paolini P, Friedl J, Stift A, Dubsky P, Bachleitner-Hofmann T, Jakesz R, Gnant M. Heat treatment of hepatocellular carcinoma cells: increased levels of heat shock proteins 70 and 90 correlate with cellular necrosis. *Anticancer Res* 2001;21:295-300
- 32 Multhoff G, Pfister K, Botzler C, Jordan A, Scholz R, Schmetzer H, Burgstahler R, Hiddemann W. Adoptive transfer of human natural killer cells in mice with severe combined immunodeficiency inhibits growth of Hsp70-expressing tumors. *Int J Cancer* 2000;88:791-797
- 33 Vanaja DK, Grossmann ME, Celis E, Young CY. Tumor prevention and antitumor immunity with heat shock protein 70 induced by 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate cells. *Cancer Res* 2000;60:4714-4718
- 34 Oamoto M, Tazawa K, Kawagoshi T, Maeda M, Honda T, Sakamoto T, Tsukada K. The combined effect against colon-26 cells of heat treatment and immunization with heat treated colon-26 tumour cell extract. *Int J Hyperthermia* 2000;16:263-273
- 35 Liu XJ, Wang BM. Biotherapy to esophageal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1027-1029
- 36 Liu JD, Chai YH. Randomized contrasted trial of the therapeutic effect of 5-FU+LV combining IFN/IL-2 to developed pancreatic cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:828
- 37 Dietz AB, Litzow MR, Bulur PA, Vuk-Pavlovic S. Transgenic interleukin 2 secreted by CML dendritic cells stimulates autologous TH1 T cells. *S Cytotherapy* 2001;3:97-105
- 38 Budagian V, Nanni P, Lollini PL, Musiani P, Di Carlo E, Bulanova E, Paus R, Bulfone-Paus S. Enhanced inhibition of tumour growth and metastasis, and induction of antitumour immunity by IL-2-IgG2b fusion protein. *Scand J Immunol* 2002;55:484-492
- 39 Ewan PW. New insight into immunological mechanisms of venom immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001;1:367-374
- 40 Liu Z, Smyth FE, Renner C, Lee FT, Oosterwijk E, Scott AM. Antirenal cell carcinoma chimeric antibody G250: cytokine enhancement of in vitro antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother* 2002;51:171-177

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

美国国立医学图书馆 2002 年度收录中国医学期刊名单

(2002-07-19)

本刊讯 美国《医学索引 (Index Medicus /MEDLINE, IM) 是世界上公认的重要的医学检索工具, 由世界上最大的医学信息中心 - 美国国立医学图书馆 (National Library of Medicine, NLM) 编辑出版. 2002 年度美国国立医学图书馆收录我国医学期刊 58 种, 分别为法医学杂志 (中), 湖南医科大学学报 (中), 华西口腔医学杂志 (中), 华西医科大学学报 (中) 环境科学 (中), 临床耳鼻咽喉科杂志 (中), 色谱 (中), 生理科学进展 (中), 生理学报 (中) 生物工程学报 (中), 生物化学与生物物理杂志 (中), 生物医学工程杂志 (中) 实验生物学报 (中), **世界胃肠病学杂志 (英)**, 同济医科大学学报 (英), 微生物学报 (中) 卫生研究 (中), 细胞研究 (英), 香港医学杂志 (英) 亚洲男科学杂志 (英文版), 亚洲太平洋公共健康杂志 (英), 眼科学报 (中), 药学学报 (中), 遗传学报 (中), 应用生态学报 (中) 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 (中), 中国科学 (C 辑) (英), 中国修复重建外科杂志 (中) 中国药理学报 (英), 中国医疗器械杂志 (中), 中国医学科学院学报 (英), 中国医学科学院学报 (中), 中国应用生理学杂志 (中), 中国中西医结合杂志 (中), 中国中药杂志 (中) 中华病理学杂志 (中), 中华创伤杂志 (英), 中华妇产科杂志 (中), 中华肝脏病杂志 (中) 中华结核和呼吸杂志 (中), 中华口腔医学杂志 (中), 中华内科杂志 (中), 中华烧伤杂志 (中), 中华实验和临床病毒学杂志 (中), 中华外科杂志 (中), 中华血液学杂志 (中), 中华眼科学杂志 (中), 中华医学遗传学杂志 (中), 中华医学杂志 (英), 中华医学杂志 (中), 中华预防医学杂志 (中), 中华整形烧伤外科杂志 (中), 中药材 (中), 中医杂志 (英).

(世界胃肠病学杂志社 2002-10-18)

肝癌 DC 疫苗活化的 CTL 对人肝癌裸鼠皮下移植瘤的抑制作用

郭建巍,秦力维,蔡美英

郭建巍,兰州军区兰州总医院实验科 甘肃省兰州市 730050
秦力维,兰州军区兰州总医院眼科 甘肃省兰州市 730050
蔡美英,四川大学华西基础医学院免疫教研室 四川省成都市 610041
郭建巍,男,1965-08-03 生,甘肃省临夏市人,汉族. 医学博士,主治医师. 主要从事肿瘤免疫学方面的研究.
项目负责人:郭建巍,730050,甘肃省兰州市,兰州军区兰州总医院实验科.
jwkuo@sohu.com
电话:0931-8975413
收稿日期:2002-11-12 接受日期:2002-11-28

Cytotoxic lymphocytes primed by DC based hepatocellular carcinoma vaccine against growth of carcinoma xenograft on nude mice

Jian-Wei Guo, Li-Wei Qin, Mei-Ying Cai

Jian-Wei Guo, Department of Laboratory, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China
Li-Wei Qin, Department of Ophthalmology, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province China
Mei-Ying Cai, Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, Sichuan Province China
Correspondence to: Dr. Jian-Wei Guo, Department of Laboratory, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province China. jwkuo@sohu.com
Received: 2002-11-12 Accepted: 2002-11-28

Abstract

AIM: To investigate the cytotoxic lymphocyte (CTL) primed by DC based hepatocellular carcinoma (HCC) vaccine against the growth of the carcinoma xenograft on nude mice.

METHODS: High purity of dendritic cells (DCs) were obtained and the immune responses of lymphocytes primed by BCG HSP70 activated DCs were loaded with HCC associated antigens to prepare DC based HCC vaccine. The nude mouse model bearing human HCC xenografts was established and the characteristics of the tumor were identified with immunohistochemical techniques. Transplanted human HCC on nude mouse was treated with freezing and antibiotic HCC specific lymphocytes.

RESULTS: Lymphocytes primed by DCs based HCC vaccine had the specific cytotoxicity against HCC lines. The CTL after freezing and antibiotics could prevent and treat HCC xenograft on nude mice with a preventive rate of 97 %.

CONCLUSION: DCs not only inhibit the growth of human HCC and other cancer cells *in vitro*, but also prevent the growth of HCC xenograft on nude mice *in vivo*.

Guo JW, Qin LW, Cai MY. Cytotoxic lymphocytes primed by DC based hepatocellular carcinoma vaccine against growth of carcinoma xenograft on nude mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(4):419-421

摘要

目的:本研究探讨肝癌 DC 疫苗活化的 CTL 对人肝癌裸鼠皮下抑制瘤的抑制作用。

方法:将负载肝癌相关抗原 DC 经 BCG HSP70 活化后制成肝癌 DC 疫苗,用此肝癌 DC 疫苗诱导的肝癌特异性淋巴细胞预防和治疗人肝癌裸鼠皮下移植瘤,同时观察 DC 对人肝癌裸鼠皮下移植瘤的直接预防作用和冷冻复苏后肝癌特异性淋巴细胞对人肝癌裸鼠皮下移植瘤的预防和治疗作用。

结果:DC 对肝癌细胞的抑制率为 97 %,用冷冻复苏后的 CTL 预防人肝癌裸鼠皮下移植瘤,对肝癌细胞的平均抑制率为 96 %;冷冻复苏后的 CTL 治疗人肝癌裸鼠皮下移植瘤,对肝癌细胞的抑制率为 98 %。

结论:本研究结果为肝癌 DC 疫苗的进一步深入研究及今后的临床应用奠定良好的基础。

郭建巍,秦力维,蔡美英. 肝癌 DC 疫苗活化的 CTL 对人肝癌裸鼠皮下移植瘤的抑制作用. *世界华人消化杂志* 2003;11(4):419-421
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/419.htm>

0 引言

树突状细胞(DC)是体内功能最强的抗原提呈细胞(APC),也是天然免疫和获得性免疫的重要调节剂^[1]. 我们的前期研究结果表明:在体外,DC 负载肝癌细胞溶解物^[2]、hAFP218-226 位 LLNQHACAV HLA-A2 限制性九肽^[3]和凋亡的肝癌细胞均可诱导出肝癌特异性 CTL,并特异性杀伤肝癌细胞.现将进一步探讨体外培养的、负载肝癌相关抗原 DC 诱导的肝癌特异性淋巴细胞预防和治疗人肝癌裸鼠皮下移植瘤,及 DC 对人肝癌裸鼠皮下移植瘤的直接预防作用,并观察冷冻复苏后肝癌特异性淋巴细胞对人肝癌裸鼠皮下移植瘤的预防和治疗作用如下。

1 材料和方法

1.1 材料 重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF Pepro Tech);重组人白介素-4(rhIL-4 Pepro Tech);鼠抗人 DC 单克隆抗体(镇江医学院许化溪教授馈赠);兔抗鼠 FITC 标记二抗(华美生物工程公司);RPMI1640 (Gibco);淋巴细胞分离液(上海试剂二厂);生物素化羊抗鼠 IgG、HRP 标记链亲和素(streptoavidin),北京中山

生物技术有限公司;内源性生物素封闭试剂(avidin biotin blocking system, 武汉博士德生物有限公司);鼠抗人肝癌单克隆抗体mcAb18(由本研究室刘小波博士馈赠);新生小牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所);BCG HSP 70 和肝癌细胞可溶性抗原(本实验室自己制备);四周龄 Balb/c 裸鼠,雌雄各半(由华西医科大学实验动物中心提供);正常人外周血源于18-25岁健康志愿者.SPF 级动物实验室(华西医科大学实验动物中心提供);SPSS10.0 for Windows 统计软件.

1.2 方法 收集诱导7d的DC^[4],调整细胞密度为 $5 \times 10^6/L$,加入24孔细胞培养板,每孔1 mL,同时每孔加入肝癌可溶性抗原120 g/L, BCG HSP70 10 g/L,于37℃培养4 h,用不完全RPMI1640洗涤3次,将负载肝癌可溶性抗原后的DC与自身淋巴细胞以1:6混合后用含300 KU/L 基因重组IL-2的完全RPMI 1640分瓶培养,分别在培养的第3,5天换液,7 d收集淋巴细胞备用.人肝癌裸鼠皮下移植瘤的普通石蜡切片用Triton-X-100,1 g/L 柠檬酸三钠处理10 min,PBS洗2次各5 min,用7.5 mL/L H₂O₂阻断内源性过氧化物酶15 min,PBS洗两次各3 min,加1:200稀释的正常羊血清100 μL,置湿盒内37℃,30 min,滤纸吸去血清;分别加20 g/L 100 μL 鼠抗人肝癌单克隆抗体和PBS(作空白对照),置湿盒内37℃,1 h,取出4℃过夜,PBS洗2次各5 min,滴加1:200稀释的生物素化羊抗鼠IgG抗体50 μL,置湿盒内37℃,30 min,PBS泡洗2次各5 min,滴加1:200稀释的HRP标记链亲和素,置湿盒内37℃,30 min,PBS泡洗2次各5 min;加DAB工作液50 μL,镜下观察适时终止,自来水充分冲洗,最后苏木精复染、脱色、返蓝、逐级脱水、透明、封片,普通光学显微镜观察.

1.2.1 DC 预防人肝癌裸鼠皮下移植瘤 收集诱导7 d的DC,PBS洗3次后,调整细胞浓度为 $1 \times 10^9/L$,于裸鼠左侧背部皮下注射,每只1 mL,共6只;另取6只裸鼠,每只背部皮下注射1 mL生理盐水作阴性对照.同时于裸鼠右侧腋窝皮下接种人肝癌SMMC-7721细胞 $5 \times 10^6/只$,每只液体总量为0.2 mL,每3 d观察移植肿瘤生长情况,共观察30 d.在无茵条件下取裸鼠移植瘤称质量,按公式:抑制率=[对照组平均瘤质量-实验组平均瘤质量]/对照组平均瘤质量]×100%计算肿瘤抑制率.

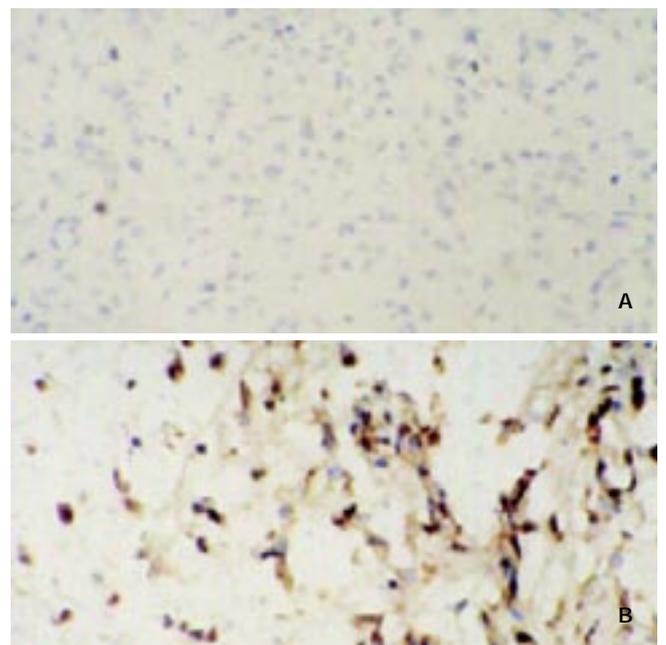
1.2.2 肝癌特异性淋巴细胞预防肝癌裸鼠皮下移植瘤^[6] 收集肝癌特异性淋巴细胞,PBS洗3次,调整细胞浓度为 $1 \times 10^9/L$,于裸鼠左侧背部皮下注射,每只1 mL,共6只;另取6只裸鼠,每只左侧背部皮下注射1 mL生理盐水作阴性对照.同时于裸鼠右侧腋窝皮下接种SMMC-7721细胞 $5 \times 10^6/只$,每只液体总量为0.2 mL,每3 d观察移植肿瘤生长情况,共观察30 d,取裸鼠移植瘤称质量后按上述公式计算肿瘤抑制率.

1.2.3 冻存和复苏后肝癌特异性淋巴细胞预防和治疗人

肝癌裸鼠皮下移植瘤 收集肝癌特异性淋巴细胞,用不完全RPMI 1640洗涤3次,用1 mL冻存液(含100 g/L DMSO的FCS)调整细胞密度为 $2 \times 10^6/mL$,加入冻存管.置-20℃冰箱4 h后移入液氮气态4 h,最后转入液态,保存30 d.使用时将冻存管迅速取出,放入37℃水浴箱,待完全融化后加入含预热RPMI 1640的离心管中,1500 r/min离心5 min,用不完全RPMI 1640洗涤3次,苔盼蓝染色检查细胞活力后备用.预防组:收集冻存复苏后肝癌特异性淋巴细胞,PBS洗3次,苔盼蓝染色调整活细胞浓度为 $1 \times 10^9/L$.取6只裸鼠,于每只左侧背部皮下注射复苏后的肝癌特异性淋巴细胞,每只1 mL;另取6只裸鼠,每只左侧背部皮下注射1 mL生理盐水作阴性对照.于裸鼠右侧腋窝皮下接种SMMC-7721细胞 $5 \times 10^6/只$,每只液体总量为0.2 mL,每3 d观察移植肿瘤生长情况,共观察30 d.取裸鼠移植瘤称质量,按1.2.1中的公式计算肿瘤抑制率.治疗组:先于12只裸鼠右侧腋窝皮下接种SMMC-7721细胞 $5 \times 10^6/只$,每只液体总量0.2 mL,7 d后于6只裸鼠左侧背部皮下分别注射浓度为 $1 \times 10^9/L$ 冻存复苏后肝癌特异性淋巴细胞1 mL;在另6只裸鼠左侧背部皮下注射1 mL生理盐水作阴性对照.每3 d观察移植肿瘤生长情况,共观察30 d.取裸鼠移植瘤称质量,按1.2.1中的公式计算肿瘤抑制率.

2 结果

于裸鼠腋窝皮下接种 $5 \times 10^6/只$ 人肝癌细胞SMMC-7721后,6只裸鼠均有肿瘤生长,解剖后平均瘤重大于1 g.免疫细胞组化LSAB法结果 阳性染色呈棕黄色.大多数分裂及非分裂细胞都有着强弱不一阳性着色,阳性染色分布于胞质、核周及胞膜,相应的空白对照均未见阳性染色(图1).



A:negative control B:

图1 裸鼠人肝癌皮下移植瘤的免疫组织化学特征(×200).

DC 预防人肝癌裸鼠皮下移植瘤, 对肝癌细胞的抑制率为 97%, 而 IL-2 条件下培养的淋巴细胞(即 LAK 细胞)对肝癌细胞的抑制率仅为 70%, 说明 DC 预防人肝癌裸鼠皮下移植瘤有效($P < 0.05$).

肝癌特异性淋巴细胞预防人肝癌裸鼠皮下移植瘤, 对肝癌细胞的抑制率均为 96%, IL-2 条件下培养的淋巴细胞(即 LAK 细胞)预防人肝癌裸鼠皮下移植瘤抑制率仅为 70%, 说明肝癌特异性淋巴细胞预防人肝癌裸鼠皮下移植瘤有效($P < 0.05$).

用冷冻复苏后的 CTL 预防人肝癌裸鼠皮下移植瘤, 对肝癌细胞的平均抑制率为 96%; 冷冻复苏后的 CTL 治疗人肝癌裸鼠皮下移植瘤, 对肝癌细胞的抑制率为 98%, 相同条件下培养的淋巴细胞对人肝癌裸鼠皮下移植瘤抑制率仅为 70%, 说明冷冻复苏后的 CTL 预防和治疗人肝癌裸鼠皮下移植瘤均有效($P < 0.05$).

3 讨论

肿瘤生物治疗中存在的一个主要问题, 即大多数人类肿瘤细胞抗原类型仍未得到明确的鉴定, 而已知的肿瘤相关抗原是否真正代表肿瘤排斥抗原缺乏体内实验证据^[6]. 前期研究表明: 在体外负载肝癌细胞可溶性抗原的 DC 活化的自身淋巴细胞主要为 CD4⁺T 细胞同时还有部分 CD8⁺T 细胞, 可有效杀伤肝癌细胞; 同时, 活化细胞培养上清和细胞中可分别检测到 Th1 型细胞因子 TNF 和 IEN- γ 也能抑制肝癌细胞生长^[2]. 因此, 用 DC 负载已建株的肝癌细胞可溶性抗原诱导肝癌特异性免疫应答意义深远. 用 BCG 预防和治疗膀胱和泌尿道转移癌已有 20 多年的历史, 并显示出良好的效果^[7,8]. HSP 是 BCG 胞质的一种重要成分, 存在于 BCG 培养物中, 是一种高度保守的胞内蛋白, 其合成在受到一系列应急刺激后(温度增加、营养缺乏、有毒刺激等)显著增加. 除此之外, 肿瘤细胞转染分枝杆菌 HSP 基因后也可以使宿主免于肿瘤的攻击^[9]. 鉴于 BCG HSP70 独特的生物学特性, 本研究首次用其活化负肝癌相关抗原后的 DC, 制成肝癌 DC 疫苗, 以更有效激发针对肝癌特异性的免疫应答^[10-16].

目前, 国内仅有个别 DC 肿瘤疫苗临床应用的研究报告^[17], 大部分工作仍主要集中于基础研究和临床前准备阶段. 李明松 et al^[18,19]研究表明: 胃癌、大肠癌、肝癌、卵巢癌患者外周血 DC 体外诱导的抗肿瘤细胞免疫反应不仅能预防而且能抑制人裸鼠移植瘤生长; DCs 能从凋亡胆管癌细胞有效提呈肿瘤抗原并诱导显著的杀伤胆管癌细胞的免疫反应^[20]; 从外周血单核细胞中诱导出大批量的 DCs, 这些 DCs 可被低温保存而不改变其功能. 在以上研究的基础上, 本研究改进传统 DC 诱导方法, 获得高纯度 DC 后, 在体外负载中国人自己建株的国人肝癌细胞 SMMC-7 721 可溶性抗原, 经 BCG HSP70 活化后制成肝癌 DC 疫苗, 并诱导具有生物学活性的肝癌特异性 CTL. 冷冻复苏后的 CTL 不但可预防

人肝癌裸鼠皮下移植瘤, 而且可抑制人肝癌裸鼠皮下移植瘤生长. 由于肝癌 DC 疫苗是以活细胞的形式进入机体、并活化机体免疫系统, 因此我们也评价了 DC 在体内对人肝癌裸鼠皮下移植瘤的直接作用, 研究证明 DC 对人肝癌裸鼠皮下移植瘤的直接抑制率为 97%. 表明 DC 疫苗进入机体后可以非特异性抑制和特异性免疫应答两种方式发挥作用, 丰富了和扩展了肝癌 DC 疫苗的内容, 为今后肝癌 DC 疫苗的临床研究及应用奠定了重要基础.

4 参考文献

- Mule JJ. Dendritic cells: at the clinical crossroads. *J Clin Invest* 2000;105:707-708
- 郭建巍, 蔡美英, 秦力维, 董薇, 魏大鹏. 树突状细胞负载肝癌可溶性抗原后的免疫应答. *免疫学杂志* 2002;18:123-127
- 郭建巍, 蔡美英. 树突状细胞负载 AFP 表位肽抗原后的免疫应答. *中华肝脏病杂志* 2002;10:178-180
- 郭建巍, 蔡美英. 人外周血中树突状细胞的诱导和鉴定. *华西医科大学学报* 2002;33:68-71
- 李明松, 袁爱力, 刘思德, 张振书. 树突状细胞诱导的抗大肠癌免疫预防裸鼠移植瘤发生并抑制其生长. *肿瘤* 1999;19:280-283
- Nouri-Shirazi M, Banchereau J, Bell D, Burkeholder S, Kraus ET, Davoust J, Palucka KA. Dendritic cells capture killed tumor cells and present their antigens to elicit tumor-specific immune responses. *J Immunol* 2000;165:3797-3803
- Lamm DL. Long-term results of intravesical therapy for superficial bladder cancer. *Urol Clinics N Am* 1992;19:573-579
- Kamat AM, Lamm DL. Immunotherapy for bladder cancer. *Curr Urol Rep* 2001;2:62-69
- Lukacs KV, Lowrie DB, Stokes RW, Colston MJ. Tumor cells transfected with a bacterial heat-shock gene lose tumorigenicity and induce protection against tumors. *J Exp Med* 1993;178:343-348
- Tsuji S, Matsumoto M, Takeuchi O, Akira S, Azuma I, Hayashi A, Toyoshima K, Seya T. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors. *Infect Immun* 2000;68:6883-6890
- Kim KD, Lee HG, Kim JK, Park SN, Choe IS, Choe YK, Kim SJ, Lee E, Lim JS. Enhanced antigen-presenting activity and tumour necrosis factor- α -independent activation of dendritic cells following treatment with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *Immunology* 1999;97:626-633
- Jiao X, Lo-Man R, Guernonprez P, Fiette L, Deriaud E, Burgaud S, Gicquel B, Winter N, Leclerc C. Dendritic cells are host cells for mycobacteria in vivo that trigger innate and acquired immunity. *J Immunol* 2002;168:1294-1301
- Tsuji S, Matsumoto M, Takeuchi O, Akira S, Azuma I, Hayashi A, Toyoshima K, Seya T. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors. *Infect Immun* 2000;68:6883-6890
- Demangel C, Britton WJ. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts. *Immunol Cell Biol* 2000;78:318-324
- Hashimoto K, Maeda Y, Kimura H, Suzuki K, Masuda A, Matsuoka M, Makino M. *Mycobacterium leprae* infection in monocyte-derived dendritic cells and its influence on antigen-presenting function. *Infect Immun* 2002;70:5167-5176
- Demangel C, Bean AG, Martin E, Feng CG, Kamath AT, Britton WJ. Protection against aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection using *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin-infected dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999;29:1972-1979
- 李明松, 袁爱力, 黄建翔, 钟翰辉, 张振书. 树突状细胞诱导的抗肿瘤免疫抑制肝癌患者术后复发和转移. *中华肝胆外科杂志* 2001;7:98-99
- 李明松, 袁爱力, 陈学清, 赖卓胜, 钟翰辉, 张振书, 周殿元. 树突状细胞体外诱导抗卵巢癌免疫反应. *实用肿瘤学杂志* 1999;13:251-252
- 李明松, 袁爱力, 潘德春, 陈春龙, 张振书. 树突状细胞诱导抗胃癌移植瘤免疫. *胃肠病学和肝病学杂志* 1999;8:259-260
- 吴刚, 韩本立, 裴雪涛. 人树突状细胞体外提呈凋亡胆管癌细胞抗原的研究. *第二军医大学学报* 2000;16:8-12

HBeAg 肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆

陆荫英,王琳,李克,刘妍,成军,张玲霞

陆荫英,王琳,李克,刘妍,成军,张玲霞,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
陆荫英,女,1973-08-27生,贵州省贵阳市人,汉族,1995年贵阳医学院临床医学系毕业,博士生,主治医师,主要从事肝病的基础及临床研究。
军队回国留学人员启动基金资助课题, No.98H038
项目负责人:成军,100039,北京市,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:010-66933392 传真:010-63801283
收稿日期:2002-10-29 接受日期:2002-11-28

Screening and cloning of gene encoding HBeAg interacting protein in hepatocytes

Yin-Ying Lu, Lin Wang, Ke Li, Yan Liu, Jun Cheng, Ling-Xia Zhang

Yin-Ying Lu, Lin Wang, Ke Li, Yan Liu, Jun Cheng, Lin-Xia Zhang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
Correspondence to: Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2002-10-29 Accepted: 2002-11-28

Abstract

AIM: To screen hepatic proteins interacting with hepatitis B virus e antigen (HBeAg) with yeast-two hybrid technique for investigating the function of HBeAg protein.

METHODS: HBeAg bait plasmid was constructed by ligating the HBeAg gene with plasmid pGBKT7, then transformed into yeast α -AH109. The transformed yeast cells were amplified and mated with yeast cells α -Y187 containing liver cDNA library plasmid pCAT2 in 2 \times YPDA medium. Diploid yeast cells were plated on synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) and synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) containing x- α -gal for selecting twice and screening. After extracting plasmid from blue colonies, plasmid was transformed into competence E.coli and analyzed by DNA sequencing. Twenty genes were obtained from 39 positive colonies, which included five new genes.

RESULTS: Twenty genes in thirty nine positive colonies were obtained including three metallothionein 2 A, eight complement component 8 alpha polypeptide, one complement component 1q, one complement factor H, one retinoic acid receptor responder (tazarotene induced), two cytochrome b, three D-amino-acid oxidase, three ferritin light polypeptide, two NAD(P)H dehydrogenase β , four aldolase B, one CD81, one syndecan 1, one 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2, one dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A transcript variant 1, one 3-hydroxysteroid epimerase, one ATP synthase 6 and five new genes.

CONCLUSION: Genes encoding HBeAg interacting proteins in hepatocytes were successfully cloned and the results provided some new clues for studying the biological functions of

HBeAg and its associated proteins.

Lu YY, Wang L, Li K, Liu Y, Cheng J, Zhang LX. Screening and cloning of gene encoding HBeAg interacting protein in hepatocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(4):422-425

摘要

目的: HBeAg 被认为与 HBV 引起免疫耐受、免疫系统功能障碍有关。筛选并克隆人肝细胞 cDNA 文库中与乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)相互作用蛋白的基因,明确其具体作用机制。

方法: 应用酵母双杂交系统 3, 将多聚酶链反应(PCR)法扩增的 HBeAg 基因连接入酵母表达载体 pGBKT7 中构建诱饵质粒, 转化酵母细胞 AH109 并在其内表达, 然后与转化了人肝 cDNA 文库质粒 pACT2 的酵母细胞 Y187 进行配合, 在营养缺陷型培养基和 X- α -半乳糖(X- α -gal)上进行双重筛选阳性菌落, 提取阳性酵母菌落的质粒转化大肠杆菌, 接种在氨苄青霉素-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: 成功克隆出 HBeAg 基因并在酵母细胞中表达, 与肝 cDNA 文库配合后选出既能在四缺(SD/-Trp-Leu-Ade-His)培养基又能在铺有 X- α -gal 的四缺培养基上生长, 并变成蓝色的真阳性菌落 39 个, 其中有 5 个未知基因, 3 个含金属硫蛋白 2A 基因的菌落, 8 个补体 8 基因, 1 个补体因子 H, 1 个补体 1q, 1 个维甲酸受体应答元件 2 基因、2 个细胞色素 b 基因、3 个铁蛋白轻链, 2 个 NAD(P)H 脱氢酶亚基, 1 个 3-羟基类固醇表位酶, 1 个 3-羟基, 3-甲基戊二酰辅酶 A 合成酶, 1 个双-特异性酪氨酸-Y-磷酸化调节激酶 1A 转录子突变体, 1 个 Syndecans-1, 3 个 2 胺氧化酶, 4 个醛缩酶 B, 1 个 CD81, 1 个 ATP 合成酶 6 基因。

结论: 成功克隆出乙型肝炎病毒 e 抗原的结合蛋白, 为进一步研究 HBeAg 在病毒装配、分泌、影响宿主免疫系统功能等方面的具体作用提供了新线索。

陆荫英,王琳,李克,刘妍,成军,张玲霞. HBeAg 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(4):422-425
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/422.htm>

0 引言

乙型肝炎病毒 e 抗原 是核壳蛋白的分泌型, 现普遍认为

为他是一种免疫耐受因子, 调节免疫发病机制^[1]. 研究表明 HBeAg 可阻断细胞毒性 T 淋巴细胞, 优先清除对 HBcAg 特异的 Th1 细胞, 使免疫应答转换为 Th2 细胞亚型, 将免疫攻击有感染的肝细胞转移开, 在感染个体引起免疫耐受状态(高水平的病毒血症和对感染细胞免疫反应的抑制), 使 HBV 逃避免疫清除, 得以在健康携带者中长期存在^[2]. 但 HBeAg 与肝细胞之间的相互作用的机制不清, 此方面的研究较少, 我们认为从寻找 HBeAg 与肝细胞间的相互作用蛋白入手, 进一步探明具体机制, 可发现一些新的线索^[3-8].

1 材料和方法

1.1 材料

AH109 酵母菌株(MA Ta, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4, gal80, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2URA3::MEL1_{TATA}-lac Z MEL1)、预转化的 cDNA 肝文库(Y187)、pGBKT7-BD 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- β -gal 购于 Clontech 公司. 大肠杆菌 DH5 及 HBV ayw 亚型基因全序列质粒载体 pCP10 为本室保存, c-myc 单克隆抗体本室自制, 由购自 ATCC 的 1-9E10.2 杂交瘤产生. 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 购于北京中山生物公司. Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、EcoR I 和 Pst I 购于 Takara 生物公司. 丙烯酰胺、N, N'-亚甲双丙烯酰胺、IPTG 及 X- β -Gal 及 pGEM-T 载体购于 Promega 公司. TEMED 购于宝林曼公司. 醋酸锂、半硫酸腺苷购于 Sigma 公司. HBeAg 扩增引物(P1 5' -GAATTC ATGCAACTTTTTTCACCTCTG 3', P2 5' -CTGCAG GCCCAAAGCCACCCAAGGC 3', 合成及 DNA 测序由上海博亚公司承担.

1.2 方法

(1) 诱饵质粒的构建及表达: PCR 扩增 HBeAg 基因与 pGBKT7 载体连接, 酶切鉴定后转化入酵母菌株 AH109, 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 HBeAg 在酵母中的表达. (2) 诱饵与肝文库的酵母配合: 挑取在 SD/-Trp 培养基上生长的 pGBKT7-HBcAg 质粒的酵母 AH109 菌落 1 到数个接种于 SD/-Trp 培养基中, 30-250 r·min⁻¹ 振摇过夜, 次日离心后用 2 × YPDA 培养液 5 mL 重悬细胞, 计数细胞数 > 1 × 10¹²·L⁻¹ 时与 1 mL 的肝文库酵母细胞在 50 mL 2 × YPDA 中 30-50 r·min⁻¹ 配合 18-24 h, 离心用 1 × YPDA 10 mL 重悬细胞, 分别取 250 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 1:10、1:100、1:1000 铺于 SD/-Trp/-Leu 培养基上检验配合效率. 生长 6-18 d 后挑取大于直径 3 mm 的菌落再次画线于铺有 X- β -gal 的 4 缺培养基上检查 X- β -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. 提取阳性酵母细胞中

的质粒, 电穿孔法转化大肠杆菌, 氨苄青霉素平板筛选阳性克隆并测序.

2 结果

2.1 pGBKT7-HBeAg 重组诱饵质粒的构建及表达

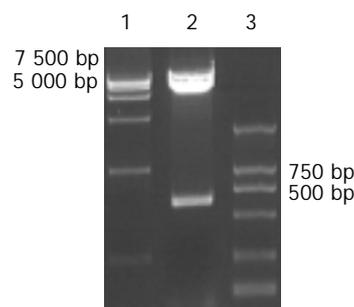
利用自行设计的引物 P1\ P2 成功扩增出 HBeAg 基因片段, 测序结果显示完全符合报告序列. 用 EcoR I 及 Pst I 双酶切所得片段, 连接到用相同酶所切的 pGBKT7 载体中, 经酶切鉴定结果正确(图1). 由此表明 HBeAg 基因已按正确方向克隆入酵母表达载体 pGBKT7 中, pGBKT7-HBeAg 质粒构建成功. 用醋酸锂法将诱饵质粒转化入酵母 AH109 株后在 SD/-Trp 培养基上筛选生长 6-8 d, 挑取阳性菌落培养后提取酵母蛋白质, 进行 SDS-PAGE 和 Western 免疫印迹分析结果(图 2). 结果显示对照无表达, 而转化了 pGBKT7-HBeAg 的酵母蛋白提取物 Western 印迹分析可见明显目的条带, 且无杂带, 说明 HBeAg 基因已成功地在酵母中表达.

2.2 诱饵与肝文库酵母菌株配合结果

配合后筛选出既能在四缺(SD/-Trp-Leu-Ade-His)培养基又能在铺有 X- β -乳糖(X- β -gal)的四缺培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落(表 1).

表 1 HBeAg 与肝文库筛选结果

同源蛋白质	同源性	相同克隆数
维甲酸受体应答元件 3(他佐罗汀诱导)	100 %	1
醛缩酶 B	100 %	4
NADH 脱氢酶 β	99 %	2
补体蛋白 H	100 %	1
补体 1q	99 %	1
补体 C8A	100 %	8
金属硫蛋白 2A	100 %	3
2 胺氧化酶	99 %	3
细胞色素 B	99 %	2
3- 羟基类固醇表位酶	99 %	1
铁蛋白轻链	100 %	3
未知蛋白	99 %	5
CD81	100 %	1
3- 羟基, 3- 甲基戊二酰辅酶 A 合成酶	99 %	1
双- 特异性酪氨酸 -Y- 磷酸化调节激酶 1A 转录子突变体 1	99 %	1
Syndecans-1	100 %	1
ATP 合成酶 6	100 %	1



1、3 DNA Marker, 2、pGBKT7-HBeAg
图 1 pGBKT7-HBeAg 质粒 EcoR I 和 Pst I 酶切鉴定.



图2 pGBKT7-HBeAg 酵母表达 Western 免疫印迹分析.

3 讨论

HBeAg 作为一种免疫调节因子,可调节宿主的免疫应答,抑制宿主 T 细胞的细胞毒活性,形成对 HBV 感染的免疫耐受性^[9-13]. HBeAg 对病毒复制和装配并非必要,不是病毒的结构成分,但却含有病毒的高度保守的体液和细胞抗原靶位,与 HBcAg 有部分共同的序列,有相同的抗原靶位,当 HBeAg 发生突变时,失去血清中 HBeAg 的调节,表达 HBcAg 的肝细胞经受增强的 T 细胞的细胞毒作用,导致病情加重^[14-16]. 血中抗 HBe 长期阳性的患者,发生肝硬化、肝癌的机率较高,原因不清. HBeAg 是否还通过其他途径影响免疫应答,损害肝细胞的功能,是否参与肝细胞癌的发生,如何作用,是研究 HBeAg 复杂功能中需要解决的关键点^[17]. 寻找肝细胞中 HBeAg 的相互作用蛋白,并进一步探明其机制,对解答上述问题有着重要意义.

酵母双杂交系统 3 在增加了报告基因的基础上,利用 a 型和 型酵母配合的形成二倍体细胞内,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,免去了需要共转染两种质粒所带来的低效率问题,并将真阳性率提高到 95%,大大增强了结果的可靠性^[18-22]. 我们应用此技术构建了 pGBKT7-HBeAg 诱饵表达质粒,在预转化的人肝 cDNA 文库中“钓”出与 HBeAg 有相互作用的蛋白基因 39 种,其中 34 种为已知序列,5 种为未知基因.

在已知序列中,CD81,又名抗增生抗体识别靶分子-1(TAPA-1),是一种 M_r 26 kD 的四跨膜蛋白分子(tetraspanin superfamily, TM4SF)家族中的一员,有特殊的四次跨膜结构,在细胞膜上可与 CD4、CD8、CD19、CD21、CD82、Leu13、HLA-DR 和 3β1 整合素等结合,调节跨膜信号转导,推测 CD81 可能是 HCV 感染靶细胞的受体蛋白^[23],发现 HBeAg 能与 CD81 结合,使 CD81 的功能变得更复杂. 有报道铁过载可增加 HBV 所致的肝细胞损害^[24], Dimitrijevic et al 在 HBV 肝脏活检标本中发现部分肝细胞中有血铁质和铁蛋白沉积,且缺少 HBV 感染特征性的镜面细胞,说明 HBV 感染的发病与铁代谢可能有一定的联系; Bayraktar et al^[25] 发现个体的血清铁含量与 IFN 治疗效果有密切关系,在血清铁含量高的 HBV 患者中,应用去铁铵联合治疗,可降低患者血清铁含量,增加患者对 IFN 的反应

性,提高治疗效率,但具体机制不清,我们发现 HBeAg 可与铁蛋白相互作用,为研究铁代谢异常与 HBV 感染的关系打开了新的突破口. 3-羟化类固醇表位酶有 3-甾酮还原酶的活性,能还原外周组织细胞中的甾酮类, HBeAg 与之结合可部分解释 HBV 感染所引起的激素代谢失常^[26]. HBeAg 与补体 8、补体因子 H 和补体 1 结合,提示 HBeAg 能通过补体途径影响免疫系统功能,为研究 HBV 免疫损害方面的机制提出了新的思路^[27].

维甲酸有抑制生长和细胞分化的活性,被用来治疗增生过长性疾病,鳞癣、光化性角化病、某些肿瘤,他佐罗汀是人工合成的视黄醛,临床用于治疗鳞癣, Daniel et al 用差异显示 PCR 技术筛选到他佐罗汀诱导基因-3(即维甲酸受体应答元件 3),与 II 级肿瘤抑制基因 H-rev 107 同源,与抑制增生有关,在多种组织中有表达,但在肿瘤细胞系和部分原发性肿瘤中表达减少,推测其可能是一种生长调节因子介导视黄醛的生长抑制效应^[28-30]. 有报道在肿瘤蛋白中 D-氨基酸含量明显增多, D-氨基酸氧化酶能催化产生过氧化氢 H₂O₂,在体外诱导肿瘤细胞凋亡^[31]. Syndecans 是一种细胞外基质,包括一系列跨膜硫酸(类肝素蛋白多糖)乙酰肝素糖蛋白家族中的基因,通过与不同的效应器(包括肝素结合生长因子、可溶性基质成分)相互作用来调节细胞活动, Syndecans-1 存在于上皮细胞和正常肝细胞中. 在肝炎和肝硬化患者肝细胞的胞质和胞质中、胆管上皮细胞中有表达,但在原发性肝癌(HCC)患者中 Syndecans-1 表达减少,且减少程度与肝癌的恶性程度正相关,在伴肝内、外转移的患者肝脏中表达缺失,在两种低分化型肝癌细胞系中 Syndecans-1 的 mRNA 和蛋白水平显著降低,转染 Syndecans-1 基因能抑制肝癌细胞的浸润性,表明 Syndecans-1 的表达水平是 HCC 具有高度转移趋势的标志, Syndecans-1 对 HCC 来说是重要的转移抑制因子^[32-34]. HBeAg 能与以上几种物质相互作用,提示 HBeAg 在 HBV 致肝细胞癌的机制方面也起着一定的效应.

以上结果为 HBeAg 致病性的研究提供了许多很有价值的线索,但具体、确切的作用原理还需进一步证实和深入探讨,以获得更加有说服力的证据.

4 参考文献

- Zhevachevsky NG, Nomokonova NY, Beklemishev AB, Belov GF. Dynamic study of HBsAg and HBeAg in saliva samples from patients with hepatitis B infection: diagnostic and epidemiological significance. *J Med Virol* 2000;61:433-438
- Milich DR. Do T cells "see" the hepatitis B core and e antigens differently? *Gastroenterology* 1999;116:765-768
- 陆荫英,李克,成军,王琳,刘妍,段惠娟,张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 基因酵母表达载体的构建与表达. *世界华人消化杂志* 2002;10:15-18
- 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的蛋白基因. *世界华人消化杂志* 2002;10:161-164
- 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

- 6 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. 世界华人消化杂志 2002;10:129-132
- 7 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 牟劲松, 洪源, 刘妍, 段惠娟, 王刚, 李莉, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白与染色体转位蛋白的相互作用. 中华医学杂志 2002;82:673-677
- 8 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前-S1 基因酵母表达载体的构建及表达. 解放军医学杂志 2002;27:341-342
- 9 Barth H, Klein R, Berg PA, Wiedenmann B, Hopf U, Berg T. Induction of T helper cell type 1 response and elimination of HBeAg during treatment with IL-12 in a patient with therapy-refractory chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001;48:553-555
- 10 Merkle H, Deuschle T, Gastrock-Balitsch I, Nusser P, Knehr S, Reifenberg K. H-2(d) mice born to and reared by HBeAg-transgenic mothers do not develop T cell tolerance toward the hepatitis B virus core gene products. *Virology* 2000;273:149-159
- 11 Khakoo SI, Ling R, Scott I, Dodi AI, Harrison TJ, Dusheiko GM, Madrigal JA. Cytotoxic T lymphocyte responses and CTL epitope escape mutation in HBsAg, anti-HBe positive individuals. *Gut* 2000;47:137-143
- 12 Zavaglia C, Severini R, Tinelli C, Franzone JS, Airoldi A, Tempini S, Bettale G, Ideo G. A randomized, controlled study of thymosin-alpha1 therapy in patients with anti-HBe, HBV-DNA-positive chronic hepatitis B. *Dig Dis Sci* 2000;45:690-696
- 13 Krastev Z, Jelev D, Antonov K, Alagozian V, Kotzev I. Chronic HBV infection. Immunomodulation with levamisole in viremic HBeAg positive or anti-HBe positive patients—a pilot study. *Hepatology* 1999;46:3184-3188
- 14 Papatheodoridis GV, Hadziyannis SJ. Diagnosis and management of pre-core mutant chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2001;8:311-321
- 15 Khakoo SI, Ling R, Scott I, Dodi AI, Harrison TJ, Dusheiko GM, Madrigal JA. Cytotoxic T lymphocyte responses and CTL epitope escape mutation in HBsAg, anti-HBe positive individuals. *Gut* 2000;47:137-143
- 16 Dong J, Cheng J, Wang Q, Huang FJ, Shi S, Zhang G, Hong Y, Li L, Si C. The study on heterogeneity of hepatitis B virus DNA. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:81-85
- 17 Riedl P, Stober D, Oehninger C, Melber K, Reimann J, Schirmbeck R. Priming Th1 immunity to viral core particles is facilitated by trace amounts of RNA bound to its arginine-rich domain. *J Immunol* 2002;168:4951-4959
- 18 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
- 19 Nagpal S, Ghosh CR, Chandraratna RA. Identification of nuclear receptor interacting proteins using yeast two-hybrid technology. *Methods Mol Biol* 2001;176:359-376
- 20 Serebriiskii IG, Toby GG, Finley RL Jr, Golemis EA. Related Articles Genomic analysis utilizing the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2001;175:415-454
- 21 Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486
- 22 Zhen Z. Progress in proteomics. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2001;17:491-493
- 23 Flint M, Maidens C, Loomis-Price LD, Shotton C, Dubuisson J, Monk P, Higginbottom A, Levy S, McKeating JA. Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J Virol* 1999;73:6235-6244
- 24 Cao Z, Bai Y, Yang X, Liu J, Li B, Li F. Study of iron metabolism abnormality in the hepatocyte damage of hepatitis B. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2001;9:37-39
- 25 Bayraktar Y, Saglam F, Temizer A, Uzunalimodlu B, van Thiel DH. The effect of interferon and desferrioxamine on serum ferritin and hepatic iron concentrations in chronic hepatitis B. *Hepatology* 1998;45:2322-2327
- 26 Huang XF, Luu-The V. Gene structure, chromosomal localization and analysis of 3-ketosteroid reductase activity of the human 3(alpha)->beta)-hydroxysteroid epimerase. *Biochim Biophys Acta* 2001;1520:124-130
- 27 Chen J, Chen M, Zhao B, Wang Y. Effects of acupuncture on the immunological functions in hepatitis B virus carriers. *J Tradit Chin Med* 1999;19:268-272
- 28 Ruiz A, Kuehn MH, Andorf JL, Stone E, Hageman GS, Bok D. Genomic organization and mutation analysis of the gene encoding lecithin retinol acyltransferase in human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:31-37
- 29 Jing C, El-Ghany MA, Beesley C, Foster CS, Rudland PS, Smith P, Ke Y. Tazarotene-induced gene 1 (TIG1) expression in prostate carcinomas and its relationship to tumorigenicity. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:482-490
- 30 Duvic M, Helekar B, Schulz C, Cho M, Disepio D, Hager C, DiMao D, Hazarika P, Jackson B, Breuer-McHam J, Young J, Clayman G, Lippman SM, Chandraratna RAS, Robinson NA, Deucher A, Ecker RL, Nagpal S. Expression of a retinoid-inducible tumor suppressor, tazarotene-inducible gene-3, is decreased in psoriasis and skin cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:3249-3259
- 31 Fang J, Sawa T, Akaike T, Maeda H. Tumor-targeted delivery of polyethylene glycol-conjugated D-amino acid oxidase for anti-tumor therapy via enzymatic generation of hydrogen peroxide. *Cancer Res* 2002;62:3138-3143
- 32 Fujimoto Y, Kohgo Y. Alteration of genomic structure and/or expression of cancer associated genes in hepatocellular carcinoma. *Rinsho Byori* 1998;46:9-14
- 33 Fujimoto Y, Kohgo Y. Syndecan-1. *Nippon Rinsho* 2001;59(Suppl 6):184-188
- 34 Jacobs W, Bogers J, Van Marck E. Distinct B-cell populations are present in hepatic and intestinal *Schistosoma mansoni* granulomas. *Acta Gastroenterol Belg* 1999;62:178-181

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界胃肠病学杂志英文版获得 2003 - 2004 年 国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助

本刊讯 世界胃肠病学杂志英文版(*World Journal of Gastroenterology*)申报的 2002 年度国家自然科学基金重点学术期刊专项基金项目,经专家评审,国家自然科学基金委员会委会议审定,予以批准资助(项目批准号: 30224801),资助期限 2 年,2003 - 2004 年,资助强度每年 8 万元。

2002 年度重点学术期刊专项基金资助 30 本学术期刊,分别为天体物理学报(英),计算数学(英),理论物理通讯(英)中国物理快报(英),力学学报(英),分析化学,高等学校化学学报,化学学报,化学通报,中国化学工程学报(英),世界胃肠病学杂志(英),作物学报,中国农业科学,中国中西医结合杂志,中国药理学报(英),生物化学与生物物理学报,细胞研究(英),植物学报(英),大气科学进展(英),地球物理学报,地质学报(英),金属学报,稀土学报(英),材料科学技术(英),稀有金属材料与工程,电力系统自动化,计算机科学技术学报(英),管理科学学报,中国科学(中、英),科学通报(中、英)。

(世界胃肠病学杂志社 2002-10-18)

酵母双杂交技术筛选 HBcAg 肝细胞结合蛋白基因

陆荫英,王琳,成军,李克,刘妍,张玲霞

陆荫英,王琳,成军,李克,刘妍,张玲霞,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 100039
陆荫英,女,1973-08-27生,贵州省贵阳市人,汉族,博士生,主治医师,主要从事肝病的基础及临床研究。

项目负责人:成军,100039,北京市,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:010-66933392 传真:010-63801283

收稿日期:2002-10-29 接受日期:2002-11-28

Screening of HBcAg interacting proteins in hepatocytes with yeast-two hybrid technique

Yin-Ying Lu, Lin Wang, Jun Cheng, Ke Li, Yan Liu, Ling-Xia Zhang

Yin-Ying Lu, Lin Wang, Jun Cheng, Ke Li, Yan Liu, Ling-Xia Zhang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Correspondence to: Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn

Received:2002-10-29 Accepted:2002-11-28

Abstract

AIM:To screen proteins in hepatocytes interacting with hepatitis B virus core protein (HBcAg) with yeast-two hybrid technique for investigating the biological functions of HBcAg.

METHODS:The HBcAg gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and HBcAg bait plasmid was constructed with yeast-two hybrid system 3, then transformed into yeast AH109. The transformed yeast mated with yeast Y187 containing liver cDNA library plasmid in 2 × YPDA medium. Diploid yeast was plated on synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) and synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) containing X-α-gal for selecting two times and screening. After extracting and sequencing of plasmid from blue colonies, the results were analyzed by bioinformatics.

RESULTS:Sixteen colonies were sequenced, of which, two colonies were metallothionein 2A, one NAD(P)H dehydrogenase, one complement component 8 α polypeptide, one retinoic acid receptor responder (tazarotene induced), one cytochrome b, one cytochrome c oxidase subunit II, one albumin, two DAZ associated protein 2, two mitochondrial ribosomal protein L41 and four new genes with unknown function.

CONCLUSION:Genes of HBcAg interacting proteins in hepatocytes were successfully cloned and the results provided some new clues for studying the biological functions of HBcAg and its associated proteins.

Lu YY, Wang L, Cheng J, Li K, Liu Y, Zhang LX. Screening of HBcAg interacting proteins in hepatocytes with yeast-two hybrid technique. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(4):426-429

摘要

目的:乙型肝炎病毒(HBV)核心蛋白(HBcAg)在HBV感染的肝细胞中可同时存在于筛选并克隆人肝细胞cDNA文库中与HBcAg相互作用蛋白的基因。

方法:用多聚酶链反应(PCR)法扩增HBcAg基因,连接入酵母表达载体pGBKT7中构建诱饵质粒,转化酵母细胞AH109并在其内表达,然后与转化了人肝cDNA文库质粒pACT2的酵母细胞Y187进行配合,在营养缺陷型培养基和X-α-半乳糖(X-α-gal)上进行双重筛选阳性菌落,PCR从中扩增出目的片段并测序,进行生物信息学分析。

结果:成功克隆出HBcAg基因并在酵母细胞中表达,配合后选出既能在四缺(SD/-Trp-Leu-Ade-His)培养基又能在铺有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16个,其中含金属硫蛋白A2基因的菌落有2个、未知基因4个、补体8基因1个、NAD(P)H脱氢酶亚基1个、维甲酸受体应答元件2基因1个、细胞色素c氧化酶基因1个、细胞色素b基因1个、DAZ相关蛋白2基因2个、线粒体核蛋白L41基因2个、人血白蛋白基因1个。

结论:成功克隆出乙型肝炎病毒核心蛋白的结合蛋白,为进一步研究HBcAg在病毒装配、损害肝细胞、感染致病等方面的具体作用提供了新线索。

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(4):426-429

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/426.htm>

0 引言

在乙型肝炎病毒(HBV)的生活周期中,病毒核心抗原(HBcAg)、病毒mRNA和DNA聚合酶共同构成核心颗粒,在核心颗粒中完成病毒DNA的合成^[1,2]. HBcAg具有保护病毒mRNA,防止其被RNA酶降解的作用,对于乙肝病毒前基因组RNA的装配、基因组DNA的合成具有重要的作用. HBV在肝细胞内复制后,膜上有HBcAg的表达,HBcAg与HBeAg一同成为细胞毒性T细胞(Tc)细胞识别的主要靶抗原,HBcAg既可作为T细胞依赖性抗原,也可作为非T细胞依赖性抗原,诱导强烈CTL应答^[3];B细胞刺突尖部有HBcAg的抗原决定簇,可产生相应的体液免疫反应^[4]. HBcAg在HBV的装配和致病机制中是必不可少的,利用酵母双杂交技术寻找其与肝细胞中相互作用的蛋白,并进一步探明

具体作用机制, 对于明确 HBV 致病机制, 有效防治乙型肝炎有着重要意义^[5-10].

1 材料和方法

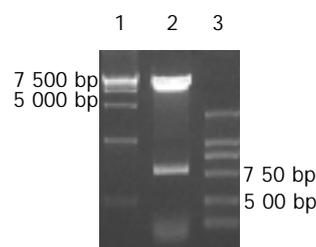
1.1 材料 AH109 酵母菌株(MA Ta, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4, gal80, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2URA3::MEL1_{TATA}-lac Z MEL1)、预转化的 cDNA 肝文库(Y187)、pGBKT7-BD 克隆载体及酵母 YPD 培养基、SD/-Trp、SD/-Leu, SD/-Trp/-Leu/-His, SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 等培养基、X- β -gal 购于 Clontech 公司. 大肠杆菌 DH5 及 HBV ayw 亚型基因全序列质粒载体 pCP10 为本室保存, c-myc 单克隆抗体本室自制, 由购自 ATCC 的 1-9E10.2 杂交瘤产生. 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 购于北京中山生物公司. Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、EcoR I 和 Pst I 购于 Takara 生物公司. 丙烯酰胺、N, N'-亚甲双丙烯酰胺、IPTG 及 X- β -Gal 及 pGEM-T 载体购于 Promega 公司. TEMED 购于宝林曼公司. 醋酸锂、半硫酸腺苷购于 Sigma 公司. HBcAg 扩增引物(P1 5' GAATTCATGGA CATCGACCCCTTATAA3', P2 5' CTGCAGAACATTG AGATTCCCGAGAT3'), 肝文库插入序列扩增引物(P3 5' -CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC-3', P4 5' -GTGAACTTGC GGGGTTTTTCAGTATCTACGA-3') 合成及 DNA 测序由上海博亚公司承担.

1.2 方法 (1) 诱饵质粒的构建及表达: PCR 扩增 HBcAg 基因与 pGBK-T7 载体连接, 酶切鉴定后转化入酵母菌株 AH109, 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 HBcAg 在酵母中的表达. (2) 诱饵与肝文库的酵母配合: 挑取在 SD/-Trp 培养基上生长的 pGBKT7-HBcAg 质粒的酵母 AH109 菌落一到数个接种于 SD/-Trp 培养基中, 30 250 r·min⁻¹ 振摇过夜, 次日离心后用 2 × YPDA 培养液 5 ml 重悬细胞, 计数细胞数 > 1 × 10¹²·L⁻¹ 时与 1 ml 的肝文库酵母细胞在 50 ml 2 × YPDA 中 30 30-50 r·min⁻¹ 配合 18-24 h, 离心用 1 × YPDA 10 ml 重悬细胞, 分别取 250 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 10、1 100、1 1 000 铺于 SD/-Trp/-Leu 培养基上检验配合效率. 生长 6-18 d 后挑取大于直径 3 mm 的菌落再次画线于铺有 X- β -gal 的 4 缺培养基上检查 X- β -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. PCR 扩增出文库靶基因片段后测序并进行生物信息学分析.

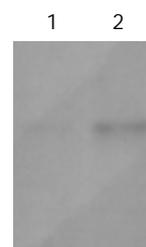
2 结果

2.1 pGBKT7-HBcAg 重组诱饵质粒的构建及表达 利用自行设计的引物 P1/P2 成功扩增出 HBcAg 基因片段, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析显示扩增片段约

549 bp, 与预期片段符合, 且无非特异扩增现象, 测序结果显示完全符合报告序列. 用 EcoRI 及 PstI 双酶切所得片段, 连接到用相同酶所切的 pGBKT7 载体中, 经酶切鉴定结果正确(图1). 由此表明 HBcAg 基因已按正确方向克隆入酵母表达载体 pGBKT7 中, pGBKT7-HBcAg 质粒构建成功. 用醋酸锂法将诱饵质粒转化入酵母 AH109 株后在 SD/-Trp 培养基上筛选生长 6-8 d, 挑取阳性菌落培养后提酵母蛋白质, 进行 SDS-PAGE 和 Western 免疫印迹分析结果(图2). 结果显示对照无表达而转化了 pGBKT7-HBcAg 的酵母蛋白提取物 Western 印迹分析可见明显目的条带且无杂带, 说明 HBcAg 基因已成功地在酵母中表达.



1、3 DNA Marker, 2、pGBKT7-HBcAg.
图1 pGBKT7-HBcAg 质粒 EcoRI 和 PstI 酶切.



1、5 ul 上样, 2、10 ul 上样.
图2 pGBKT7-HBcAg 酵母细胞表达 Western 免疫印迹分析.

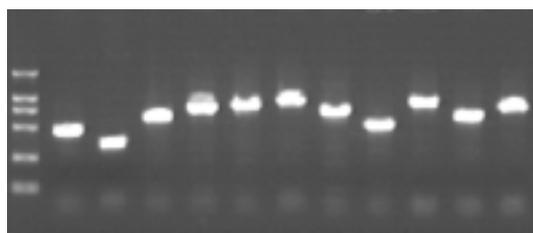


图3 部分文库筛选菌落 PCR 扩增结果.

2.2 诱饵与肝文库酵母菌株配合结果 配合后筛选出既能在 4 缺(SD/-Trp-Leu-Ade-His)培养基又能在铺有 X- β -半乳糖(X- β -gal)的 4 缺培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落 16 个, 用文库扩增引物 PCR 扩增出目的片段(图3)并测序, 结果在 GeneBank 中进行分析, 发现其中含金属硫蛋白 2A 基因的菌落有 2 个, 补体 8 基因 1 个, NAD(P)H 脱氢酶亚基 1 个、维甲酸受体应答元件 2 基因 1 个、细胞色素 c 氧化酶基因 1 个、细胞色素 b 基因 1 个、DAZ 相关蛋白 2 基因 2 个、线粒体核蛋白 L41 基因 2 个、人血白蛋白基因 1 个, 未知基因 4 个, 见表 1.

表1 HBcAg 肝文库筛选结果

同源蛋白质	同源性	相同克隆数
维甲酸受体应答元件 2	100 %	1
补体 8A	98 %	1
金属硫蛋白 2A	100 %	2
细胞色素 B	100 %	1
未知蛋白	98 %	4
线粒体核蛋白 L41	100 %	2
DAZ 相关蛋白 2	100 %	2
细胞色素 C 氧化酶	99 %	1
人血白蛋白	100 %	1
NADH 脱氢酶亚基 4	100 %	1

3 讨论

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相互作用提供了遗传学方法.酵母双杂交系统通过将两个推定相互作用的蛋白 X 和 Y 被分别融合到一酵母转录激活因子 GAL4 的 BD 和 AD 上, X 与 Y 的相互作用重构了激活因子导致下游报告基因的转录,产生容易探测到的表型.我们选用的 Clontech 公司的酵母双杂交系统 -3, 在下游有 3 种报告基因分别为组氨酸、腺苷和半乳糖苷酶(LacZ), 加上两种载体中分别带有的亮氨酸、色氨酸, 使得真阳性菌落能在铺有 X- β -gal 并缺乏上述 4 种营养的培养板上生长并呈现出蓝色. 由于增加了报告基因的种类, 使单个报告基因自激活出现假阳性的几率大大降低, 筛选结果的真阳性率可达 95 %^[11-15].

HBcAg 有保守的三维结构, 受细胞激酶或病毒编码的激酶作用部分磷酸化^[16], HBcAg 有鱼精蛋白样亲细胞核性的羧基末端, 可介导核内转运信号, 使大量 HBcAg 进入细胞核内, 而其他嗜肝 DNA 病毒的核壳蛋白都不核内转运, 人肝细胞核内 HBcAg 的功能不明.在病毒成熟过程中, 核壳和外膜相互作用, 形成病毒颗粒分泌的信号^[17,18]. HBcAg 有高免疫原性, 几乎所有 HBV 感染者均产生抗 HBc, 同时是 CTL 免疫应答的靶抗原, 对于 HBcAg 的免疫应答在病毒清除中可能有重要作用. HBcAg 与肝细胞蛋白的相互作用是病毒装配、释放、清除过程中关键的环节, 找出其间的联系对于探明 HBV 致病机制, 寻找有效的防治方法有着深远意义^[19-26].

我们在真核表达载体 pGBKT7 中构建 pGBKT7-HBcAg 诱饵质粒并在酵母菌株 AH109 中表达了 HBcAg 基因, 与人肝 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 16 种. 其中, 金属硫蛋白系存在于人体及哺乳动物肝内的一种富含金属和半胱氨酸的小分子蛋白质, 在体内具有拮抗重金属(汞和铝)和抗辐射(包括紫外线), 消除自由基、修复受损组织等

功效, 他还能生物体提供多种微量元素(如锌、铜、钴等), 与 HBcAg 结合可能是机体自身保护反应的一种, 是否可以用他作为 HBV 的辅助用药^[27-29]. 临床上 HBV 的感染者中, 男性发生慢性化、重症化及肝硬化的几率远大于女性, 曾有人提出可能跟雌激素作用有关, 但未找到确切的证据, HBV 感染发展的性别差异的原因至今仍是未知数. 位于 Y 染色体上的 DAZ 基因和位于常染色体上的 DAZ 类似基因 DAZL1, 编码一种只在精子细胞中表达的 RNA 结合蛋白, 他们与果蝇属 不育基因同源, 在 DAZL1 敲除的鼠发生不育, 说明 DAZ 基因在精子发生过程中起作用. 所有的哺乳动物常染色体都有 DAZL1 的同源基因, 而 DAZ 基因只存在于猿和部分种类的猴中, 二者的 C- 末端重复序列有所不同. 有人用 DAZ 做诱饵, 酵母双杂交技术筛选获得与之有相互作用但功能未知的 DAZ 相关蛋白 2 (DAZAP2), 我们用 HBcAg 在肝文库中也筛选到该蛋白, 并有两个克隆, 提示 HBV 感染发生、发展的性别差异可能与之有关系^[30-32]. HBcAg 与线粒体核蛋白 L41、NADH 脱氢酶亚基 4、细胞色素 C 氧化酶、细胞色素 B 等有作用, 支持 HBcAg 通过肝细胞线粒体介导 HBV 的复制和装配. 新基因的发现也为我们研究 HBcAg 的功能提出了新线索, 但需要进一步研究证实.

4 参考文献

- Pumpens P, Grens E. Hepatitis B core particles as a universal display model: a structure-function basis for development. *FEBS Lett* 1999;442:1-6
- Le S, Pogam S, Shih C. Influence of a putative intermolecular interaction between core and the Pre-S1 domain of the large envelope protein on hepatitis B virus. *J Virol* 2002;76:6510-6517
- Livingston BD, Crimi C, Fikes J, Chesnut RW, Sidney J, Sette A. Immunization with the HBV core 18-27 epitope elicits CTL responses in humans expressing different HLA-A2 supertype molecules. *Hum Immunol* 1999;60:1013-1017
- Lazdina U, Cao T, Steinbergs J, Alheim M, Pumpens P, Peterson DL, Milich DR, Leroux-Roels G, Sallberg M. Molecular basis for the interaction of the hepatitis B virus core antigen with the surface immunoglobulin receptor on naive B cells. *J Virol* 2001;75:6367-6374
- Lu YY, Li K, Cheng J, Wang L, Liu Y, Duan HJ, Zhang LX. Cloning and expression of hepatitis B virus X gene in yeast. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:15-18
- Wang L, Li K, Cheng J, Lu YY, Wang G, Liu Y, Duan HJ, Hong Y. Screening and cloning of the genes of protein interacting with human augmenter of liver regeneration. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:161-164
- Li K, Wang L, Cheng J, Zhang LX, Duan HJ, Lu YY, Yang JZ, Liu Y, Hong Y, Xia XB, Wang G, Dong J, Li L, Zhong YW, Chen JM. Screening and cloning of gene of hepatocyte protein 1 interaction with HCV core proyein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1379-1383
- Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Liu Y, Duan HJ. Expression of NS2 gene of hepatitis C virus from yaest two hybrid 'Bait' vector in yeast. *Sijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:129-132
- Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Mu JS, Liu Y, Duan HJ, Wang G, Li L. Mutunal interaction between hepatitis C virus core protein and translin, a recombination hotspot binding protein. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:1-5
- Lu YY, Li K, Cheng J, Wang L, Liu Y, Zhang LX. Cloning and expression of pre-s1 gene of hepatitis B virus in yeast. *Jiefangjun Yixue Zazhi* 2002;27:341-342
- 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
- 12 Nagpal S, Ghosn CR, Chandraratna RA. Identification of nuclear receptor interacting proteins using yeast two-hybrid technology. *Methods Mol Biol* 2001;176:359-376
- 13 Serebriiskii IG, Toby GG, Finley RL Jr, Golemis EA. Related Articles Genomic analysis utilizing the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2001;175:415-454
- 14 Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486
- 15 Zhen Z. Progress in proteomics. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2001;17:491-493
- 16 Kann M, Sodeik B, Vlachou A, Gerlich WH, Helenius A. Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 1999;145:45-55
- 17 Watts NR, Conway JF, Cheng N, Stahl SJ, Belnap DM, Steven AC, Wingfield PT. The morphogenic linker peptide of HBV capsid protein forms a mobile array on the interior surface. *EMBO J* 2002;21:876-884
- 18 Karpenko LI, Ivanisenko VA, Pika IA, Chikaev NA, Eroshkin AM, Veremeiko TA, Ilyichev AA. Insertion of foreign epitopes in HBcAg: how to make the chimeric particle assemble. *Amino Acids* 2000;18:329-337
- 19 Huang CJ, Chen YH, Ting LP. Hepatitis B virus core protein interacts with the C-terminal region of actin-binding protein. *J Biomed Sci* 2000;7:160-168
- 20 Fehr T, Skrastina D, Pumpens P, Zinkernagel RM. T cell-independent type I antibody response against B cell epitopes expressed repetitively on recombinant virus particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9477-9481
- 21 Sijts AJ, Ruppert T, Reherrmann B, Schmidt M, Koszinowski U, Kloetzel PM. Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes. *J Exp Med* 2000;191:503-514
- 22 Pumpens P, Grens E. HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes. *Intervirology* 2001;44:98-114
- 23 Tsai SL. Immunopathogenesis of viral hepatitis B and C. *Changcheng Yixue Zazhi* 1999;22:159-170
- 24 Ulrich R, Koletzki D, Lachmann S, Lundkvist A, Zankl A, Kazaks A, Kurth A, Gelderblom HR, Borisova G, Meisel H, Kruger DH. New chimeric hepatitis B virus core particles carrying hantavirus (serotype Puumala) epitopes: immunogenicity and protection against virus challenge. *J Biotechnol* 1999;73:141-153
- 25 Murray K, Shiau AL. The core antigen of hepatitis B virus as a carrier for immunogenic peptides. *Biol Chem* 1999;380:277-283
- 26 Cao T, Meuleman P, Desombere I, Sallberg M, Leroux-Roels G. In vivo inhibition of anti-hepatitis B virus core antigen (HBcAg) immunoglobulin G production by HBcAg-specific CD4(+) Th1-type T-cell clones in a hu-PBL-NOD/SCID mouse model. *J Virol* 2001;75:11449-11456
- 27 Quaife CJ, Cherne RL, Newcomb TG. Metallothionein overexpression suppresses hepatic hyperplasia induced by hepatitis B surface antigen. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;155:107-116
- 28 Okazaki Y, Namikawa K, Minami T. Studies of metals and metallothionein in tissue. *Yakugaku Zasshi* 2000;120:282-289
- 29 Smolarek C, Stremmel W. Therapy of wilson disease. *Z Gastroenterol* 1999;37:293-300
- 30 Brekhman V, Itskovitz-Eldor J, Yodko E, Deutsch M, Seligman J. The DAZL1 gene is expressed in human male and female embryonic gonads before meiosis. *Mol Hum Reprod* 2000;6:465-468
- 31 Tsui S, Dai T, Roettger S, Schempp W, Salido EC, Yen PH. Identification of two novel proteins that interact with germ-cell-specific RNA-binding proteins DAZ and DAZL1. *Genomics* 2000;65:266-273
- 32 Dorfman DM, Genest DR, Reijo Pera RA. Human DAZL1 encodes a candidate fertility factor in women that localizes to the prenatal and postnatal germ cells. *Hum Reprod* 1999;14:2531-2536

第五届上海国际肝癌肝炎会议征文启事

为了加强国际及沪港学术交流, 进一步提高肝癌和肝炎防治研究水平, 由上海国际肝癌肝炎会议组织委员会(复旦大学、上海第二医科大学、第二军医大学、中国科学院上海分院、上海市卫生局)和程思远国际肝炎研究基金会(香港)联合主办, 定于2004-02-14~17日在香港召开“2004年港沪国际肝癌肝炎会议-第五届上海国际肝癌肝炎会议、第三届程思远肝炎研究基金会国际学术会议”, 会议规模定为1200人, 大会主席为中国工程院院士、复旦大学汤钊猷教授和香港大学医学院林兆鑫教授、大会邀请程思远、吴阶平两位副委员长为名誉主席, 并由国内吴孟超等与美、英、法、德、日等国和香港地区的著名教授担任共同主席。会议邀请国内外著名学者80人作专题报告。欢迎国内外从事肝炎和肝癌基础与临床研究的专家、学者参加大会。投稿(请撰写中英文摘要)及联系事项寄:200023, 上海市医学院路136号, 复旦大学肝癌研究所国际会议秘书处收。电话:(021)64041990-2436, 传真:(021)64037181; 电子信箱: qiusj68@zshospital.net。有关会议的详情及注册, 请查询www.hepa2004.org 网址。

大鼠肝卵圆细胞的生物学特征

陈耀凯,王宇明,李俊刚,郎松

陈耀凯,王宇明,李俊刚,郎松,中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所 重庆市 400038
陈耀凯,男,1966-12-27生,河南省固始县人,博士后,副教授,副主任医师,发表论文50篇,参加编著8部,获军队科技进步奖1项,目前主要从事生物人工肝细胞材料的研究。
国家自然科学基金资助课题, No. 30070347 和全军“十五”计划面上项目资助课题, No. 01MA177
项目负责人:王宇明,400038,重庆市沙坪坝区高滩岩正街30号,中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所。wym417@mail.tmmu.com.cn 电话:023-68754141
收稿日期:2002-11-11 接受日期:2002-11-29

Biological characteristics of rat hepatic oval cells

Yao-Kai Chen, Yu-Ming Wang, Jun-Gang Li, Song Lang

Yao-Kai Chen, Yu-Ming Wang, Jun-Gang Li, Song Lang, Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Supported by grants from National Natural Science Foundation of China, No. 30070347
Correspondence to: Yu-Ming Wang, Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. wym417@mail.tmmu.com.cn
Received: 2002-11-11 Accepted: 2002-11-29

Abstract

AIM: To observe the morphological parameters, phenotypes and evolution of hepatic oval cells in rats.

METHODS: Rat models for hepatic oval cell proliferation were established, and cell image analysis and immunohistochemical staining of hepatic oval cells were performed on the tissue sections.

RESULTS: Hepatic oval cells were characterized by small size, oval shape and ovoid nuclei. The plasma of the cells was positive for cytokeratin (CK) 19, OV6, alpha-fetal protein (AFP) and vimentin staining, and negative for leucocyte common antigen (LCA) staining. The nuclei were positive for proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Some hepatocyte-like cells were discerned around the portal tracts and these cells were positive for CK19 and OV6 staining.

CONCLUSION: Hepatic oval cells differ from hepatocytes morphologically and express the phenotypes of ductular cells and hepatocytes. Hepatocyte-like cells are most likely the intermediate transition cells between hepatic oval cells and hepatocytes.

Chen YK, Wang YM, Li JG, Lang S. Biological characteristics of rat hepatic oval cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(4):430-433

摘要

目的:观察大鼠肝卵圆细胞的形态学参数、细胞表型及分化演变等生物学特征。

方法:建立大鼠肝卵圆细胞增生模型,在肝组织切片上对大鼠肝卵圆细胞进行细胞图像分析及免疫组化染色。

结果:肝卵圆细胞体积小、外形及胞核为椭圆形;胞质对细胞角蛋白(CK)19, OV6, 甲胎蛋白(AFP)及波形蛋白染色呈阳性,对白细胞共同抗原(LCA)染色呈阴性,胞核对增生细胞核抗原(PCNA)染色呈阳性;在汇管区外周部位可见肝细胞样细胞, CK19 及 OV6 染色呈阳性。

结论:肝卵圆细胞在形态学上明显不同于肝细胞,同时具有胆管细胞及肝细胞的表型;肝细胞样细胞为肝卵圆细胞向肝细胞演变的中间过渡细胞。

陈耀凯,王宇明,李俊刚,郎松. 大鼠肝卵圆细胞的生物学特征. *世界华人消化杂志* 2003;11(4):430-433
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/430.htm>

0 引言

肝卵圆细胞(hepatic oval cells)等肝干/祖细胞(liver stem/progenitor cells)有可能借助细胞移植、生物人工肝及肝组织工程技术在肝衰竭及遗传性肝病治疗中发挥重要作用^[1-20]。为进一步了解肝卵圆细胞的主要生物学特征,我们在已建立的大鼠肝卵圆细胞增生模型基础上^[21],对大鼠肝卵圆细胞的形态学参数、细胞表型及分化演变等生物学特征进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料 小鼠抗大鼠细胞角蛋白CK19抗体为Chemicon公司产品(克隆号E6),小鼠抗大鼠OV6抗体由美国Brown大学Hixson教授惠赠,小鼠波形蛋白抗体为Dako公司产品(克隆号V9),小鼠抗大鼠增生细胞核抗原(PCNA)抗体为Zymed公司产品(克隆号PC10),小鼠抗大鼠白细胞共同抗原(LCA)抗体及小鼠抗大鼠甲胎蛋白(AFP)抗体购自北京中山生物制品公司。

1.2 方法 选择体质量150g左右的Wistar大鼠(第三军医大学动物研究所提供),2-3月龄,单只分笼饲养1wk以上,通过胃管灌喂2-乙酰氨基苄(2-acetaminofluorene, AAF, Sigma公司),1次/d,连续4d,第5天在戊巴比妥全身麻醉下行2/3肝切除(手术当日不灌喂AAF),第6天继续灌喂,连续1wk。AAF溶于M400的聚乙二醇,给予20mg/kg。手术后10-14d处死大鼠,留取肝组织以40g/L甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,5μm连续切片备用。连续石蜡切片经脱蜡后,以30ml/L过氧化氢溶液浸泡10min灭活内源性过氧化物

酶; 抗原热修复后以正常山羊血清封闭, 然后加第一抗体工作液 4 过夜; 加生物素标记的第二抗体 37 45 min; 加结合过氧化物酶链霉亲和素 37 45 min; 加新鲜配制的 DAB, 显微镜下观察 5-10 min, 棕黄色染色为阳性信号; 以 PBS 代替第一抗体作为阴性对照. 肝卵圆细胞图像分析采用 Tiger 细胞图像分析仪(重庆大学 ICT 中心研制)在肝组织切片上测定肝卵圆细胞的面积(A)、最大直径(D)及形态因子(Q).

统计学处理 u 检验.

2 结果

术后 10-14 d 大鼠肝组织内可见明显的肝卵圆细胞增生反应, 细胞增生部位多位于汇管区及小叶间胆管附近. 所见到的肝卵圆细胞核呈卵圆形, 胞质较少, 细胞体积较小, 约相当于肝细胞体积的 1/4-1/6, 细胞直径约 8-15 μm . 增生的肝卵圆细胞大小及分布不均匀, 呈簇状分布, 且由汇管区向肝实质内延伸(图 1). 采用细胞图像分析仪分别测定肝卵圆细胞及肝细胞的形态学参数, 结果见表 1. 选择肝卵圆细胞增生反应明显的 6 个区域的肝卵圆细胞的形态学参数进行图像分析, 结果见表 2. 免疫组化染色结果显示, 肝卵圆细胞胞质 CK19, OV6, AFP 及波形蛋白染色均呈阳性信号(图 2), LCA 染色呈阴性, 肝卵圆细胞胞核 PCNA 染色呈阳性信号. 远离汇管区的部位, 存在部分肝细胞样细胞(hepatocyte-like cells), 这类细胞的形态学特征介于肝卵圆细胞与肝细胞之间, 且具细胞肝卵圆细胞表型, CK19 及 OV6 染色呈弱阳性(图 3, 图 4).

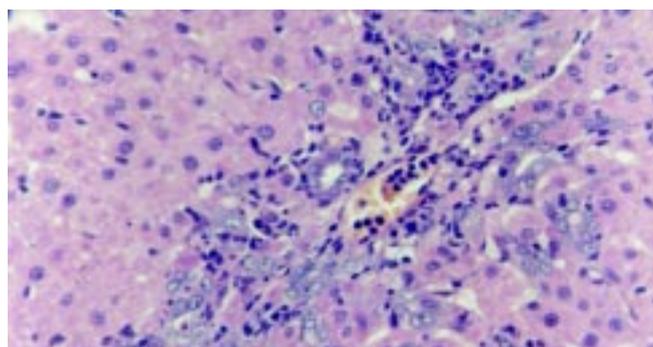


图 1 术后 6 d, 汇管区肝卵圆细胞大小及分布不均一向肝实质内延伸 HE $\times 200$.

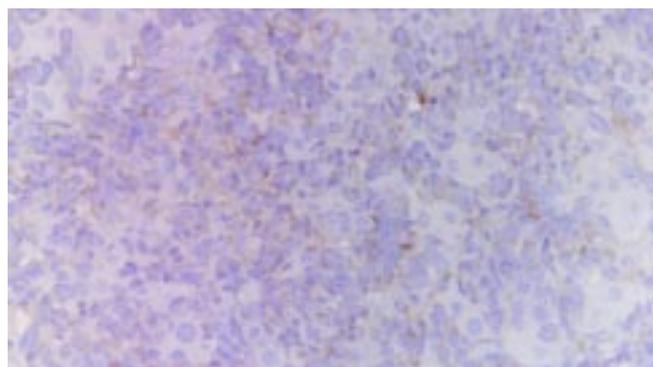


图 2 部分肝卵圆细胞 AFP 阳性 $\times 200$.

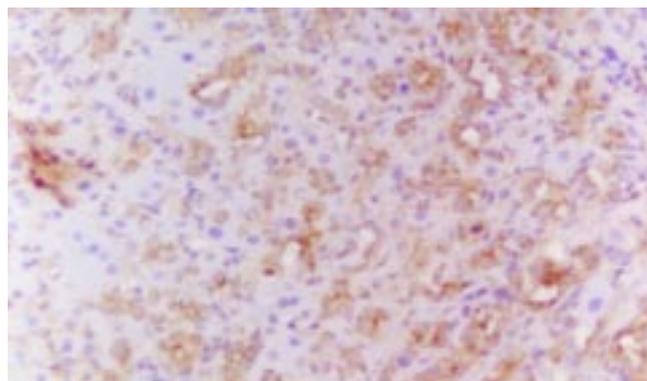


图 3 增生的肝卵圆细胞 CK19 阳性, 肝细胞 CK19 阴性, 远离汇管区的部分肝细胞样细胞 CK19 弱阳性 $\times 200$.

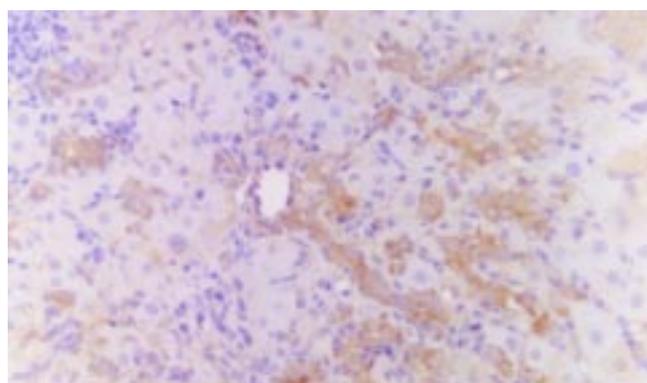


图 4 增生的肝卵圆细胞 OV6 阳性, 肝细胞 OV6 阴性, 远离汇管区的部分肝细胞样细胞 OV6 弱阳性 $\times 200$.

表 1 肝卵圆细胞与肝细胞图像分析结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

测定细胞数	A(μm^2)	D(μm)	Q	
肝细胞	61	38.6 \pm 1.1	22.3 \pm 4.3	1.1 \pm 0.1
肝卵圆细胞	97	19.5 \pm 5.9 ^b	12.4 \pm 7.4 ^b	1.8 \pm 0.5 ^b

^bP < 0.001, vs 肝细胞; Q 为最大直径与最小直径的比值.

表 2 大鼠肝内增生的肝卵圆细胞图像分析结果 ($\bar{x} \pm s$)

测定细胞数	A(μm^2)	D(μm)	Q	
1	67	22.1 \pm 18.6	12.8 \pm 5.2	1.9 \pm 0.6
2	45	20.9 \pm 12.0	14.2 \pm 5.9	1.9 \pm 0.8
3	59	19.4 \pm 12.6	13.7 \pm 3.8	2.0 \pm 0.9
4	91	21.4 \pm 13.0	14.2 \pm 4.8	1.9 \pm 0.7
5	38	17.4 \pm 15.1	9.2 \pm 4.9	2.3 \pm 1.1
6	74	19.5 \pm 12.3	10.4 \pm 8.7	1.8 \pm 0.7

3 讨论

1956 年 Farber 在研究大鼠肝细胞癌变机制时, 发现一类体积小、卵圆形核、胞核大、胞质少且浅染的细胞, 常见于肝致癌剂处理的大鼠肝内, 于是首次提出“卵圆细胞”这一名词用来描述、区分此类细胞. 后来的研究发现, 卵圆细胞同时具有胆管细胞与肝细胞的表型, 且可进一步分化为肝细胞及胆管上皮细胞, 因而认为其是一种肝干/祖细胞^[22-26]. 我们在以卵圆细胞

为关键词查阅 Medline 时,发现约 1/3 的文献并非特指肝脏内的卵圆细胞,所有外形呈卵圆形的细胞均被称为卵圆细胞,因此我们提出肝脏内的卵圆细胞应称为肝卵圆细胞更为贴切,以免引起概念上的混淆. 在新近的国外文献中,肝卵圆细胞这一名称的使用越来越多^[1-31].

本研究结果显示,肝卵圆细胞具有以下形态学特征:(1)细胞体积明显小于肝细胞;(2)细胞呈卵圆细胞或椭圆形,与肝细胞差异显著;(3)细胞体积不均一,大小差异较大;(4)细胞核所占比重大,核/浆比例较大.由表1可直观地看出,肝卵圆细胞与肝细胞在形态学方面有很大的差异,前者最大直径及细胞截面积均明显小于后者,肝细胞基本为圆形,形状因子(最大直径/最小直径)接近1,而肝卵圆细胞的形状因子明显大于1.由表2可明显地看出肝卵圆细胞的不均一性,6个区域内的细胞形态学参数有一定差异(尽管无统计学意义),同一区域的细胞形态学参数间有较大的标准差,这些都说明肝卵圆细胞是个不均一的细胞群体,这一结果与肝卵圆细胞的异质性是一致的.

肝卵圆细胞表达的多种抗原可经免疫组化方法检测,但细胞标志物缺乏特异性.目前已筛选出一些肝卵圆细胞高度表达的标志物,主要有实质中间丝波形蛋白、CK(包括CK7、CK8、K18及CK19等)、OV6,以及干细胞因子(stem cell factor, SCF)及其受体 c-kit 等,其中以 CK19 及 OV6 表达最强.特异性较差的标志物主要有:CK14 仅见于少数肝卵圆细胞;OC2 和 OC3 见于肝卵圆细胞亚群;BD1 仅见于成熟胆管上皮而非肝卵圆细胞,细胞表面糖蛋白 Thy-1、SCF 及其受体 c-kit 以及唾液粘蛋白 CD34 亦见于血液干细胞;有多种标志物与骨髓相似,这可解释为何骨髓外造血常见于肝卵圆细胞活化的肝脏,当肝卵圆细胞分化成肝细胞后这些标志物亦随之消失.当肝卵圆细胞侵入肝实质时常表达 AFP 和白蛋白,此后随着肝细胞分化 AFP 不再表达. LCA 是炎症细胞的重要标志之一,本研究中肝卵圆细胞 LCA 染色呈阴性反应,也证实本文结果中所见的目标细胞为肝卵圆细胞而非炎症细胞.本研究结果显示,采用 CK19、OV6、AFP、波形蛋白、PCNA 及 LCA 等细胞标志进行免疫组织化学染色取得了较好的效果,结合细胞的形态学特征,可很好地了解肝卵圆细胞的增生情况.本研究结果还显示,肝卵圆细胞对同一细胞标志的染色存在强弱差异,这种差异可能与细胞的分化状态不同有关,也是细胞异质性的重要表现形式.

关于肝卵圆细胞向肝细胞的演变过程,本研究的初步观察结果显示肝卵圆细胞增生反应多开始于汇管区,并由此向肝小叶内延伸与扩展,这不仅提示肝卵圆细胞起源于胆管,而且还提示肝卵圆细胞有向肝细胞分化与演变的趋势.从细胞表型上看,随着肝卵圆细胞向肝小叶的延伸,CK19 与 OV6 表达有减弱倾向,位于汇管区与肝小叶之间的部分肝细胞样细胞 CK19 及

OV6 染色呈弱阳性,再加上其细胞形态介于肝卵圆细胞与肝细胞之间,因而可以推断这些细胞是肝卵圆细胞向肝细胞分化与演变的中间过渡细胞.

4 参考文献

- Xiao JC, Ruck P, Adam A, Wang TX, Kaiserling E. Small epithelial cells in human liver cirrhosis exhibit features of hepatic stem-like cells: immunohistochemical, electron microscopic and immunoelectron microscopic findings. *Histopathology* 2003;42: 141-149
- Zhang Y, Bai XF, Huang CX. Hepatic stem cells: existence and origin. *World J Gastroenterol* 2003;9: 201-204
- Lowes KN, Croager EJ, Olynyk JK, Abraham LJ, Yeoh GC. Oval cell-mediated liver regeneration: Role of cytokines and growth factors. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18: 4-12
- Braun KM, Thompson AW, Sandgren EP. Hepatic microenvironment affects oval cell localization in albumin-urokinase-type plasminogen activator transgenic mice. *Am J Pathol* 2003;162: 195-202
- Fausto N, Campbell JS. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev* 2003;120:117-130
- Oh SH, Hatch HM, Petersen BE. Hepatic oval 'stem' cell in liver regeneration. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13:405-409
- Crosby HA, Nijjar SS, de Goyet Jde V, Kelly DA, Strain AJ. Progenitor cells of the biliary epithelial cell lineage. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13:397-403
- Libbrecht L, Roskams T. Hepatic progenitor cells in human liver diseases. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13:389-396
- Cao Y, Merling A, Crocker PR, Keller R, Schwartz-Albiez R. Differential expression of beta-galactoside alpha2,6 sialyltransferase and sialoglycans in normal and cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Lab Invest* 2002;82: 1515-1524
- Naves MM, Silveira ER, Dagli ML, Moreno FS. Effects of beta-carotene and vitamin A on oval cell proliferation and connexin 43 expression during hepatic differentiation in the rat (1). *J Nutr Biochem* 2001;12: 685-692
- Yang L, Li S, Hatch H, Ahrens K, Cornelius JG, Petersen BE, Peck AB. In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:8078-8083
- Gournay J, Auvigne I, Pichard V, Ligeza C, Bralet MP, Ferry N. In vivo cell lineage analysis during chemical hepatocarcinogenesis in rats using retroviral-mediated gene transfer: evidence for dedifferentiation of mature hepatocytes. *Lab Invest* 2002;82: 781-788
- Svetlov SI, Sautin YY, Crawford JM. EDG receptors and hepatic pathophysiology of LPA and S1P: EDG-ology of liver injury. *Biochim Biophys Acta* 2002;1582: 251-256
- Tan J, Hytioglou P, Wiczorek R, Park YN, Thung SN, Arias B, Theise ND. Immunohistochemical evidence for hepatic progenitor cells in liver diseases. *Liver* 2002;22:365-373
- Croager EJ, Smith PG, Yeoh GC. Ethanol interactions with a choline-deficient, ethionine-supplemented feeding regime potentiate pre-neoplastic cellular alterations in rat liver. *Carcinogenesis* 2002; 23:1685-1693
- Bisgaard HC, Holmskov U, Santoni-Rugiu E, Nagy P, Nielsen O, Ott P, Hage E, Dalhoff K, Rasmussen LJ, Tygstrup N. Heterogeneity of ductular reactions in adult rat and human liver revealed by novel expression of deleted in malignant brain tumor 1. *Am J Pathol* 2002;161:1187-1198
- Forbes S, Vig P, Poulsom R, Thomas H, Alison M. Hepatic stem cells. *J Pathol* 2002;197:510-518
- Sautin YY, Jorgensen M, Petersen BE, Saulnier-Blache JS, Crawford JM, Svetlov SI. Hepatic oval (stem) cell expression of endothelial differentiation gene receptors for lysophosphatidic acid in mouse chronic liver injury. *J Hematother Stem Cell Res* 2002;11:643-649
- Cassiman D, Libbrecht L, Sinelli N, Desmet V, Denef C, Roskams T. The vagal nerve stimulates activation of the hepatic progenitor cell compartment via muscarinic acetylcholine receptor type 3. *Am J Pathol* 2002;161: 521-530

- 20 Ruck P, Xiao JC. Stem-like cells in hepatoblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2002;39: 504-507
- 21 陈耀凯, 王宇明, 李俊刚, 郎松. 大鼠肝卵圆细胞增生模型的建立与优化. *中华肝脏病杂志* 2002;10:185-188
- 22 Thami GP, Kaur S, Kanwar AJ. Association of juvenile xanthogranuloma with cafe-au-lait macules. *Int J Dermatol* 2001;40: 283-285
- 23 Faris RA, Konkin T, Halpert G. Liver stem cells: a potential source of hepatocytes for the treatment of human liver disease. *Artif Organs* 2001;25: 513-521
- 24 Petersen BE. Hepatic "stem" cells: coming full circle. *Blood Cells Mol Dis* 2001;27: 590-600
- 25 Libbrecht L, De Vos R, Cassiman D, Desmet V, Aerts R, Roskams T. Hepatic progenitor cells in hepatocellular adenomas. *Am J Surg Pathol* 2001;25:1388-1396
- 26 Feldmann G. Liver transplantation of hepatic stem cells: potential use for treating liver diseases. *Cell Biol Toxicol* 2001;17: 77-85
- 27 Ma X, Qiu DK, Peng YS. Immunohistochemical study of hepatic oval cells in human chronic viral hepatitis. *World J Gastroenterol* 2001;7: 238-242
- 28 Yin L, Lynch D, Ilic Z, Sell S. Proliferation and differentiation of ductular progenitor cells and littoral cells during the regeneration of the rat liver to CCl₄/2-AAF injury. *Histol Histopathol* 2002; 17: 65-81
- 29 Gordon GJ, Butz GM, Grisham JW, Coleman WB. Isolation, short-term culture, and transplantation of small hepatocyte-like progenitor cells from retrorsine-exposed rats. *Transplantation* 2002; 73: 1236-1243
- 30 Vessey CJ, de la Hall PM. Hepatic stem cells: a review. *Pathology* 2001; 33:130-141
- 31 Paku S, Schnur J, Nagy P, Thorgeirsson SS. Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver. *Am J Pathol* 2001;158:1313-1323

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

WJG 搭建我国消化学基础和临床研究惟一国际交流的平台

World Journal of Gastroenterology® (ISSN 1007-9327 CN 14-1219/R) 2003 年由双月刊改为月刊, 加快刊出周期, 展示我国在国际上的食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、Hp 等方面基础和临床研究的成果。

WJG 1998 年被美国科学引文索引(SCI-E)收录。SCI-E 收录文献的作者、题目、源期刊、摘要、关键词等以外, 还收录论文的参考文献, 从而把一篇论文和其他论文之间有意义的联系勾画出来, 也就是把发表论文的两位作者和两位作者群体之间的学术联系显示出来等特点。作为一种比较客观和定量的评价方式之一, 已愈来愈受到科学界的重视。当 WJG 出版 20 天后, 国际上的胃肠病学和肝病专家即可在 ISI Web of SCIENCE(<http://www.isinet.com/isi/journals/index.html>)上看到论文的摘要、参考文献、被引用的次数、关键词、单位名称、通讯地址等信息。

WJG 1998 年被美国《医学索引》(Index Medicus / MEDLINE)收录。WJG 电子版摘要及全文在印刷版出版前 15 天, 国际上的胃肠病学和肝病专家即可在 PubMed(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/jrbrowser.cgi>)上阅读到论文的摘要及全文, 包括彩色、黑白、线条图照片。世界胃肠病学杂志社将 WJG 和世界华人消化杂志出版的过刊和现刊全部放在 www.wjgnet.com 上供国际和国内消化病学者免费使用。WJG 是惟一全面反映我国消化学专家研究成果的平台之一, 让世界更多的学者在 PubMed 或 www.wjgnet.com 上免费看到来自我国胃肠病学和肝病专家撰写的具有中国特色的创新原始论文。

总之, WJG 提供了一个与世界胃肠病学和肝病专家进行有效的学术交流平台, 促进消化病研究成果的快速发展。

(世界胃肠病学杂志社)

肝硬化大鼠肝部分切除术后残肝 TGF- α 、HGF、PCNA 和 IGFBP-1s mRNA 的变化

陈平,李昆,董家鸿,韩本立

陈平,李昆,董家鸿,韩本立,中国人民解放军第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所 重庆市 400038

陈平,男,1964年生,四川省眉山市人,汉族,1997年第三军医大学肝胆外科博士研究生毕业,博士,副教授,副主任医师,硕士生导师,主要从事肝胆外科、腹腔镜外科临床及肝再生的实验研究。

国家自然科学基金课题, No. 30070746

项目负责人:陈平,400038,重庆市沙坪坝区高滩岩正街30号,中国人民解放军第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所. chenping@263.net

电话:023-65318301-73083

收稿日期:2002-11-19 接受日期:2002-11-29

Changes of TGF- α , HGF, PCNA and IGFBP-1s mRNA after partial hepatectomy in rat liver

Ping Chen, Kun Li, Jia-Hong Dong, Ben-Li Han

Ping Chen, Kun Li, Jia-Hong Dong, Ben-Li Han, Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Medical University, Chongqing 400038, China
Ping Chen, Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Medical University, Chongqing 400038, China

Supported by National Natural Scientific Foundation of China, No. 30070746

Correspondence to: Dr. Ping Chen, Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Medical University, Chongqing 400038, China. chenping@263.net

Received:2002-11-19 Accepted:2002-11-29

Abstract

AIM: To explore expression of TGF- α , HGF, PCNA and IGFBP-1s mRNA in hepatocyte and Kuffer cell (KC) and to study the effects of KC on liver regeneration after partial hepatectomy in cirrhotic rats.

METHOD: Using the model of partial hepatectomy in cirrhotic rats, we separated hepatocytes and KCs and employed Northern hybridization.

RESULTS: The expression of HGF mRNA in KC was earlier than that of hepatocyte, and peaked at 6 hr after operation. But the expression contents of TGF- α mRNA in hepatocyte was more than that of KC. The expression contents of IGFBP-1s mRNA in hepatocyte was lower and KC had no expressions. The expression of PCNA mRNA in hepatocyte was markedly depressed at 6h postoperation.

CONCLUSION: The expression of HGF and TGF- α mRNA is correlated with liver regeneration after operation in cirrhotic rats. TGF- α is very important for liver regeneration. The lower expression of IGFBP-1s mRNA shows the metabolic damage in cirrhotic rats postoperatively, but the expression of PCNA mRNA indicates the ability of liver regeneration.

Chen P, Li K, Dong JH, Han BL. Changes of TGF- α , HGF, PCNA and IGFBP-1s mRNA after partial hepatectomy in rat liver. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(4):434-437

摘要

目的:探讨肝硬化状态下肝部分切除术后肝细胞和 KC TGF- α 、HGF、PCNA 和 IGFBP-1s 的 mRNA 表达,进一步阐明 KC 在肝细胞再生中的作用。

方法:复制我们建立的大鼠肝硬化肝切除模型,分离肝细胞和 KC,提取 RNA,采用 Northern 杂交。

结果:KC 其 HGF mRNA 表达较肝细胞为早,在术后 6 h 点达到高峰。但肝细胞 TGF- α mRNA 表达含量明显高于 KC 的表达。肝细胞 IGFBP-1s mRNA 的表达含量低,术后 6 h 点相对较高。KC IGFBP-1s mRNA 未见表达。肝细胞 PCNA mRNA 的表达在术后 6 h 其含量达到最低点,明显受抑制。

结论:HGF 和 TGF- α mRNA 表达与肝硬化大鼠的肝细胞再生密切相关,而 TGF- α 是肝细胞再生中最重要的物质。IGFBP-1s mRNA 表达降低反应了肝硬化大鼠术后肝细胞代谢明显受损,而 PCNA mRNA 表达可提示肝细胞增生能力。

陈平,李昆,董家鸿,韩本立. 肝硬化大鼠肝部分切除术后残肝 TGF- α 、HGF、PCNA 和 IGFBP-1s mRNA 的变化. *世界华人消化杂志* 2003;11(4):434-437
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/434.htm>

0 引言

正常状态下肝部分切除术后 TGF- α (转化生长因子)、表皮生长因子(EGF)和 HGF(肝细胞生长因子)等具有强力促进肝细胞再生作用^[1-6]。但在肝硬化状态下肝部分切除术后这些细胞因子 mRNA 表达的情况及在肝再生中的作用仍不清楚。我们研究肝硬化大鼠肝部分切除术后肝细胞和 KC TGF- α , HGF, 增生细胞核抗原(PCNA)和胰岛素样生长因子黏附蛋白(IGFBP-1s)的 mRNA 表达,结果如下。

1 材料和方法

1.1 材料 皮下注射的四氯化碳(CCL₄)油溶液加口服乙醇的方法制作肝硬化模型^[7],在动物稳定 1 wk 后可进行实验。肝部分切除采用乙醚麻醉,腹部正中切口,切除大鼠肝脏的左叶和中叶,切除量占全肝的 70%。观察点为术后 6, 24, 48, 72 h 和术后 1 wk。采用 Ambrus te al^[8]的方法。

1.2 方法 参照 Promega 公司试剂盒的技术操作手册提取

总 RNA. 分别收集 1×10^8 肝细胞和 KC, 采用此法均可获得满意的 RNA. RNA 纯度的评价和定量: 用分光光度计在波长 260 nm 和 280 nm 下分别测定. HGF、TGF- α 、PCNA 和 IGFBP-1 细胞因子的 cDNA 探针的合成与纯化. 大鼠 HGF DNA 探针序列: 参照 Webber 设计的序列^[9]: 5' -GCTGCAGCTGGGAAATGTTAAGATCTGTTTGGC-3'. TGF- α DNA 探针序列: 参照 Lee 设计的序列^[10]: 5' -CCATGTAAACAATATTG-3'. PCNA DNA 探针序列: 参照 Morishita 设计的序列^[11]: 5' -TTTGAGGCACGCCTGATC-3'. IGFBP-1s DNA 探针序列: 参照 Lee 设计的序列^[12]: 5' -GCATGGATCAGGGAGGAAACAACCTTCAGT-3'. 按以上 DNA 序列在本校生物化学教研室 DNA 合成仪上合成. 合成后按分子克隆实验指南的方法进行纯化. 使探针浓度为 200 mg/L. 用放射性同位素 ³²P 对 HGF, TGF- α , PCNA 和 IGF 细胞因子的 cDNA 探针的标记, 采用 Boehringer 公司提供的 DNA 5' 末端标记试剂盒. 参照 J. 萨姆布鲁克分子克隆实验指南第 2 版科学出版社, 1996:362 进行^[13].

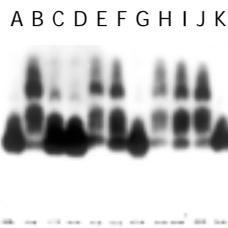
2 结果

2.1 RNA 纯度的评价和定量 将提取的 RNA 2 ul + 998 ul 双蒸水, 在波长 260 nm 和 280 nm 时用分光光度计(BECKMAN DU-600)测定其吸光度. 结果 260 nm/280 nm A 值 > 1.6 < 2.0, 表明 RNA 提取纯度较高. 根据公式可计算出每个样品 RNA 含量: A 值 $\times 40 \mu\text{g}/1000 \mu\text{g} \times 1000/2 = \text{mg/L}$

表 1 11 个样品 RNA 含量 (mg/L)

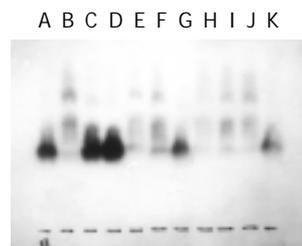
样品	RNA 含量				
	6 h	24 h	48 h	72 h	1 wk
C-PH 组:					
HC	8.186	7.170	6.884	6.734	4.302
KC	2.074	3.786	4.334	2.889	3.848
SO 组肝细胞	1.612				

2.2 HGF mRNA 的表达 用 rHGF cDNA 探针检测到 6.0 Kb 的 mRNA, 肝硬变大鼠的肝细胞 rHGF 有一定表达. KC 其 HGF mRNA 表达较肝细胞为早, 在术后 6 h 点达到高峰. 而肝细胞 HGF mRNA 表达在术后 6 h 点含量最低, 以后逐渐升高, 在术后 48h 点达到最高峰.(见图 1).



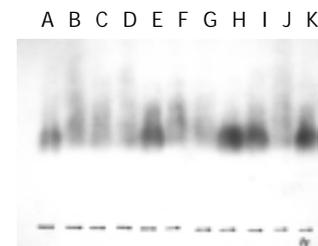
B-F C-PH 组术后 6,24,48,72 h 和 1 wk 的肝细胞.
G-K C-PH 组术后 6,24,48,72 h 和 1 wk 的 KC.
A 肝硬变大鼠肝细胞.
图 1 肝细胞和 KC HGF mRNA 表达.

TGF- α mRNA 的表达: 用 TGF- α cDNA 探针检测到 4.5 Kb 的 mRNA. 肝硬变大鼠的肝细胞有表达. 虽然 KC 其 TGF- α mRNA 表达较肝细胞为早, 在术后 6 h 点达到高峰. 但肝细胞 TGF- α mRNA 表达含量明显高于 KC 的表达, 提示肝细胞 TGF- α mRNA 在肝细胞再生中的作用可能大于 KC. 另一方面, 肝细胞 TGF- α mRNA 高表达持续时间长, 从术后 24 h 至术后 1 wk, 但高峰是术后 24-48 h (见图 2).



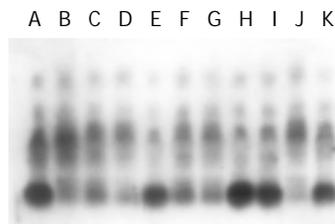
B-F C-PH 组术后 6,24,48,72 h 和 1 wk 的肝细胞.
G-K C-PH 组术后 6,24,48,72 h 和 1 wk 的 KC.
A 肝硬变大鼠肝细胞.
图 2 肝细胞和 KC TGF- α mRNA 表达.

IGFBP-1s mRNA 的表达: 与对照组比较, 肝细胞 IGFBP-1s mRNA 的表达含量低, 从片上来看, 隐约可见, 术后 6 h 点相对较高. KC IGFBP-1s mRNA 未见表达. 说明肝硬变大鼠术后肝细胞 IGFBP-1s mRNA 的表达抑制(见图 3).



B-F C-PH 组术后 6,24,48,72 h 和 1 wk 的肝细胞.
G-K C-PH 组术后 6,24,48,72 h 和 1 wk 的 KC.
A 肝硬变大鼠肝细胞.
图 3 肝细胞和 KC IGFBP-1s mRNA 表达.

PCNA mRNA 的表达: 与对照组比较, 肝细胞 PCNA mRNA 的表达在术后 6 h 其含量达到最低点, 明显受抑制, 在术后 24-48 h 期间达到高峰. 与肝细胞有所不同, KC 其 PCNA mRNA 的表达轻度增高后, 逐渐下降, 至术后 1 wk 时达到高峰(见图 4).



B-F C-PH 组术后 6,24,48,72 h 和 1 wk 的肝细胞.
G-K C-PH 组术后 6,24,48,72 h 和 1 wk 的 KC.
A 肝硬变大鼠肝细胞.
图 4 肝细胞和 KC PCNA mRNA 表达.

3 讨论

人们最早认识到 HGF 是促进肝细胞再生最重要的物质, Grunnet et al [14-16]对肝损伤和修复时细胞生长因子的 mRNA 表达的研究发现, 大鼠肝部分切除术后与假手术组比较, 大鼠肝、脾和肾的 HGF mRNA 表达无明显增高, 我们的结果可以看出, KC 其 HGF mRNA 表达较肝细胞为早, 在术后 6 h 点达到高峰. 而肝细胞 HGF mRNA 表达在术后 6 h 点含量最低, 以后逐渐升高, 在术后 48 h 点达到最高峰, 但其峰值的表达低于 KC. 单纯 CCl4 诱导组(对照组)肝细胞有一定的 HGF mRNA 表达, 相似于 Tomiya et al [17,18]的结果. 说明 KC 在应激状态下作出的反应快于肝细胞, HGF 主要来源于肝脏非实质肝细胞, 如 KC, 但作用于肝细胞, 说明 HGF 参与了肝细胞再生[19-22].

TGF- 和 HGF 一样, 是刺激肝细胞生长非常重要的细胞因子[25-27]. 在 CCl4 肝损伤时, TGF- mRNA 表达的高峰在实验的 48-72 h, 相当于同期的 DNA 的合成[23,24]. 我们应用 TGF- cDNA 探针采用 Northern 印迹杂交技术来分析肝硬变大鼠术后肝细胞和 KC 的 TGF- mRNA 的表达. 结果显示, 虽然 KC 其 TGF- mRNA 表达较肝细胞为早, 在术后 6 h 点达到高峰. 但肝细胞 TGF- mRNA 表达含量明显高于 KC 的表达, 提示肝细胞 TGF- mRNA 在肝细胞再生中的作用可能大于 KC. 另一方面, 肝细胞 TGF- mRNA 高表达持续时间长, 从术后 24 h-1 wk, 但高峰是术后 24-48 h. 结果表明, TGF- 很可能是肝细胞再生过程中最重要的因子, 因为肝细胞表达其 mRNA 的量且早, 提示 TGF- 很可能参与肝细胞再生启动.

IGFBP-1s 对胰岛素样生长因子有重要的调节作用, 对肝细胞再生有正负两方面的调节作用[28]. Lee et al [12]认为 IGFBP-1s mRNA 的表达与肝细胞蛋白质合成功能相一致, mRNA 表达的峰值在部分肝切除术后 2-3 h, IGFBP-1s 表达的增加对于调节胰岛素样生长因子对肝细胞代谢和生长的影响将起重要作用. 我们的结果显示: 与对照组比较, 肝细胞 IGFBP-1s mRNA 的表达含量低, 从片上来看, 隐约可见, 术后 6 h 点相对较高. KC IGFBP-1s mRNA 未见表达. 说明肝硬变大鼠术后肝细胞 IGFBP-1s mRNA 的表达抑制, 肝细胞代谢功能明显受损.

在细胞增生过程中, PCNA 主要出现在细胞周期的 S 期, 他与 DNA 合成, 胸腺嘧啶激酶活性有密切关系[29-31]. 与对照组比较, 肝细胞 PCNA mRNA 的表达在术后 6 h 其含量达到最低点, 明显受抑制, 在术后 24-48 h 期间达到高峰. 与肝细胞有所不同, KC 其 PCNA mRNA 的表达轻度增高后, 逐渐下降, 至术后 1 wk 达到高峰.

我们认为, HGF 和 TGF- mRNA 表达与肝硬变大鼠的肝细胞再生密切相关, 而 TGF- 是肝细胞再生中最重要的物质. IGFBP-1s mRNA 表达降低反应了肝

硬变大鼠术后肝细胞代谢明显受损, 而 PCNA mRNA 表达可提示肝细胞增生能力. 在肝细胞再生过程中, 细胞因子相互依赖, 相互作用, 共同推动肝细胞再生.

4 参考文献

- 1 Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000;32(Suppl 1):19-31
- 2 陈平, 韩本立, 李昆, 段恒春. 枯否细胞在肝硬变大鼠肝叶部分切除术后肝细胞再生过程中的双相调节作用. *中华实验外科杂志* 1998; 15:347-349
- 3 Court FG, Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Maddern GJ. The mystery of liver regeneration. *Br J Surg* 2002;89:1089-1095
- 4 Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997;276:60-66
- 5 Kountouras J, Boura P, Lygidakis NJ. Liver regeneration after hepatectomy. *Hepatogastroenterology* 2001;48:556-562
- 6 Tilg H. Cytokines and liver diseases. *Can J Gastroenterol* 2001; 15:661-668
- 7 陈平, 李昆, 董家鸿. 肝硬变大鼠肝部分切除术动物模型的制作及评价. *第三军医大学学报* 2002;24:488-490
- 8 Armbrust T, Nordmann B, Kreissig M, Ramadori G. C1Q synthesis by tissue mononuclear phagocytes from normal and from damaged rat liver: up-regulation by dexamethasone, down-regulation by interferon gamma, and lipopolysaccharide. *Hepatology* 1997;26:98-106
- 9 Webber EM, FitzGerald MJ, Brown PI, Bartlett MH, Fausto N. Transforming growth factor-alpha expression during liver regeneration after partial hepatectomy and toxic injury, and potential interactions between transforming growth factor-alpha and hepatocyte growth factor. *Hepatology* 1993;18:1422-1431
- 10 Lee DC, Rose TM, Webb NR, Todaro GJ. Cloning and sequence analysis of a cDNA for rat transforming growth factor-alpha. *Nature* 1985;313:489-491
- 11 Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Nakajima M, Zhang L, Kaneda Y, Ogihara T, Dzau VJ. Single intraluminal delivery of antisense cdc2 kinase and proliferating-cell nuclear antigen oligonucleotides results in chronic inhibition of neointimal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:8474-8478
- 12 Lee J, Greenbaum L, Haber BA, Nagle D, Lee V, Miles V, Mohn KL, Bucan M, Taub R. Structure and localization of the IGFBP-1 gene and its expression during liver regeneration. *Hepatology* 1994;19:656-665
- 13 J.萨姆布鲁克, EF.弗里奇, T.曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南. 第2版. 科学出版社, 1996:362-371
- 14 Grunnet N, Peng X, Tygstrup N. Growth factors and gene expression in cultured rat hepatocytes. *J Hepatol* 1999;31:117-122
- 15 Diehl AM. Liver regeneration. *Front Biosci* 2002;7:301-314
- 16 Kaibori M, Inoue T, Sakakura Y, Oda M, Nagahama T, Kwon AH, Kamiyama Y, Miyazawa K, Okumura T. Impairment of activation of hepatocyte growth factor precursor into its mature form in rats with liver cirrhosis. *J Surg Res* 2002;106:108-114
- 17 Tomiya T, Ogata I, Fujiwara K. Transforming growth factor alpha levels in liver and blood correlate better than hepatocyte growth factor with hepatocyte proliferation during liver regeneration. *Am J Pathol* 1998;153:955-961
- 18 Takeishi T, Hirano K, Kobayashi T, Hasegawa G, Hatakeyama K, Naito M. The role of Kupffer cells in liver regeneration. *Arch Histol Cytol* 1999;62:413-422
- 19 Pediaditakis P, Lopez-Talavera JC, Petersen B, Monga SP, Michalopoulos GK. The processing and utilization of hepatocyte growth factor/scatter factor following partial hepatectomy in the rat. *Hepatology* 2001;34:688-693
- 20 Masson S, Daveau M, Francois A, Bodenart C, Hiron M, Teniere P, Salier JP, Scotte M. Up-regulated expression of HGF in rat liver cells after experimental endotoxemia: a potential pathway for enhancement of liver regeneration. *Growth Factors* 2001;18:237-250
- 21 Wang X, DeFrances MC, Dai Y, Pediaditakis P, Johnson C, Bell A, Michalopoulos GK, Zarnegar R. A mechanism of cell survival: sequestration of Fas by the HGF receptor Met. *Mol Cell* 2002;9: 411-421
- 22 Ogura Y, Hamanoue M, Tanabe G, Mitsue S, Yoshidome S, Nuruki K, Aikou T. Hepatocyte growth factor promotes liver

- regeneration and protein synthesis after hepatectomy in cirrhotic rats. *Hepatogastroenterology* 2001;48:545-549
- 23 Enami Y, Kato H, Murakami M, Fujioka T, Aoki T, Niiya T, Murai N, Ohtsuka K, Kusano M. Anti-transforming growth factor-beta1 antibody transiently enhances DNA synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Hepatobil Pancreat Surg* 2001; 8: 250-258
- 24 Tomiya T, Hayashi S, Yanase M, Umeda N, Tani M, Yamada S, Masaki N, Ogata I, Fujiwara K. Serum transforming growth factor-alpha level can be a parameter for evaluating liver regeneration after partial hepatectomy in patients with liver cancer. *Semin Oncol* 1997;24(Suppl 6):S6-14-S6-17
- 25 Stolz DB, Mars WM, Petersen BE, Kim TH, Michalopoulos GK. Growth factor signal transduction immediately after two-thirds partial hepatectomy in the rat. *Cancer Res* 1999;59:3954-3960
- 26 Hashimoto M, Kothary PC, Eckhauser FE, Raper SE. Treatment of cirrhotic rats with epidermal growth factor and insulin accelerates liver DNA synthesis after partial hepatectomy. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13:1259-1265
- 27 Masson S, Daveau M, Hiron M, Lyoumi S, Lebreton JP, Teniere P, Scotte M. Differential regenerative response and expression of growth factors following hepatectomy of variable extent in rats. *Liver* 1999;19:312-317
- 28 Skrtic S, Wallenius K, Sjogren K, Isaksson OG, Ohlsson C, Jansson JO. Possible roles of insulin-like growth factor in regulation of physiological and pathophysiological liver growth. *Horm Res* 2001;55(Suppl 1):1-6
- 29 Moriuchi A, Hirono S, Ido A, Ochiai T, Nakama T, Uto H, Hori T, Hayashi K, Tsubouchi H. Additive and inhibitory effects of simultaneous treatment with growth factors on DNA synthesis through MAPK pathway and G1 cyclins in rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:368-373
- 30 Alhonen L, Rasanen TL, Sinervirta R, Parkkinen JJ, Korhonen VP, Pietila M, Janne J. Polyamines are required for the initiation of rat liver regeneration. *Biochem J* 2002;362:149-153
- 31 Takasaki Y, Kogure T, Takeuchi K, Kaneda K, Yano T, Hirokawa K, Hirose S, Shirai T, Hashimoto H. Reactivity of anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) murine monoclonal antibodies and human autoantibodies to the PCNA multiprotein complexes involved in cell proliferation. *J Immunol* 2001;166:4780-4787

世界胃肠病学杂志英文版获得第二届国家期刊奖百种重点期刊

本报讯 为了进一步繁荣期刊出版事业, 2002年9月, 经中共中央宣传部同意, 新闻出版总署决定举办第二届国家期刊奖评选活动. 经过反复审核, 全国共推荐出参评科技期刊522种. 这些参评期刊经过评选办公室的参评资格审查、出版规范审查、广告内容审查后, 由专家组和评选工作委员会进行评选. 2002年12月初产生评选入围期刊, 并将初评结果在《光明日报》、《科技日报》、《中国新闻出版报》和《中国图书商报》公示, 接受全社会的监督, 最终评出国家期刊奖科技类30名, 国家期刊奖提名奖50名, 国家期刊奖百种重点期刊99名. 世界胃肠病学杂志英文版(World Journal of Gastroenterology) 获得第二届国家期刊奖百种重点期刊, 并荣获获奖证书、奖杯和获奖徽标.

国家期刊奖是期刊业中最权威的、也是最具影响的奖项. 我们衷心感谢全体编委及作者、读者对世界胃肠病学杂志英文版的支持, 希望在今后能继续得到大家的关心爱护和大力支持, 争取更大的成绩.

细菌内同源重组法构建HBV S区和C区基因非复制型腺病毒载体及其体外表达

黄呈辉,欧阳玲,马会慧,汤正好,李刚,姚集鲁

黄呈辉,马会慧,汤正好,李刚,姚集鲁,中山大学附属第三医院传染科实验室 广东省广州市 510630
欧阳玲,深圳市宝安区中心血站 广东省深圳市 518101
黄呈辉,男,1967-09-03,江西于都人,汉族. 1990年江西医学院本科毕业,1997年首都医科大学硕士研究生毕业,现在为中山大学中山医学院博士研究生,主治医师. 主要从事病毒性肝炎研究工作.
国家自然科学基金资助课题, No.30200243
项目负责人:黄呈辉,510630,广东省广州市石牌岗顶,中山大学附属第三医院传染科实验室. chuih67@163.com
电话:020-87596042
收稿日期:2002-11-06 接受日期:2002-11-18

Construction of replication-deficient recombinant adenoviral vector carrying HBV S and C region gene by homologous recombination in bacteria and its expression *in vitro*

Cheng-Hui Huang, Ling Ou-Yang, Hui-Hui Ma, Zheng-Hao Tang, Gong Li, Ji-Lu Yao

Cheng-Hui Huang, Hui-Hui Ma, Zheng-Hao Tang, Gong Li, Ji-Lu Yao, Department of Infectious Diseases, the Third Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, 510630, Guangdong Province China
Ling Ou-Yang, Shenzhen Baoan Blood Center, Shenzhen 518101, Guangdong Province China
Supported by the National Science Foundation of China, No.30200243
Correspondence to: Dr. Cheng-Hui Huang, Department of Infectious Diseases, the Third Hospital Affiliated Sun Yat-Sen University, Guangzhou, 510630, Guangdong Province China. chuih67@163.com
Received: 2002-11-06 Accepted: 2002-11-18

Abstract

AIM: To construct recombinant adenoviral vector carrying HBV S and C region gene by homologous recombination in bacteria and to detect its expression *in vitro*.

METHODS: HBV pre-S₂/S genes and pre-C/C genes were amplified by PCR and were cloned to adenoviral shuttle plasmid pAdTrack-CMV, respectively. Then the resultant pAd Track-CMV-HBs or pAdTrack-CMV-HBe was cotransfected into BJ5183 bacteria with the plasmid pAdeasy-1. The adenoviral plasmid carrying HBV S and C gene (pAd-HBs and pAd-HBe) was generated with homologous recombination in bacteria and the adenoviruses were produced in 293 cells. Both 293 and Vero cells were infected with adenoviruses and the expression of HBsAg and HBeAg was detected by RT-PCR and ELISA *in vitro*.

RESULTS: The titer of Ad-HBs and Ad-HBe adenoviruses was up to 5×10^{12} pfu/L after proliferation in 293 cells. HBsAg and HBeAg were expressed efficiently in 293 and Vero cells after infection.

CONCLUSION: The recombinant adenoviruses expressing

HBsAg or HBeAg were constructed successfully and can be used further in gene therapy of HBV.

Huang CH, Ou -Yang L, Ma HH, Tang ZH, Li G, Yao JL. Construction of replication-deficient recombinant adenoviral vector carrying HBV S and C region gene by homologous recombination in bacteria and its expression *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(4):438-441

摘要

目的: 构建表达乙肝病毒表面抗原(HBsAg)和e抗原(HBeAg)的非复制型重组腺病毒载体, 并检测他能否在真核细胞中有效表达目的基因。

方法: 扩增乙肝病毒(HBV)前S₂/S基因和前C/C基因片段, 分别亚克隆到腺病毒穿梭质粒pAdTrack-CMV上, 与5型腺病毒骨架质粒pAdeasy-1共转染BJ5183细菌, 经细菌内同源重组产生分别携带HBV S区和C区基因的重组腺病毒载体pAd-HBs和pAd-HBe, 经脂质体法转化293细胞包装产生重组腺病毒Ad-HBs和Ad-HBe; 体外转染293和Vero细胞, RT-PCR和ELISA法检测目的基因的表达。

结果: 构建了表达HBsAg和HBeAg基因的重组腺病毒, 病毒滴度可达 5×10^{12} pfu/L, 并能在真核细胞中有效表达目的基因。

结论: 成功构建表达HBsAg和HBeAg的重组腺病毒载体, 为进一步开展HBV基因治疗研究提供实验基础。

黄呈辉, 欧阳玲, 马会慧, 汤正好, 李刚, 姚集鲁. 细菌内同源重组法构建HBV S区和C区基因非复制型腺病毒载体及其体外表达. *世界华人消化杂志* 2003;11(4):438-441

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/438.htm>

0 引言

重组非复制型腺病毒作为基因治疗和蛋白表达载体, 已经成为基因治疗研究中应用最为广泛的载体之一^[1-4]. 我们采用一种新的细菌内同源重组系统^[5], 构建携带增强型绿色荧光蛋白(enhanced GFP, EGFP)基因和乙型肝炎病毒(HBV)S和C区基因的重组腺病毒, 并检测他在真核细胞中的表达, 为开展乙肝的基因免疫治疗提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料 携带EGFP基因的腺病毒穿梭质粒pAdTrack-CMV, E1区和E3区缺失的复制缺陷5型腺病毒骨架质

粒 pAdeasy-1, 大肠杆菌 XL1-Blue, BJ 5 183 和 DH10B 由北京协和医院许志勤博士惠赠; 携带 HBV adr 亚型全基因的 PBR322 质粒由本实验室保存; 限制性内切酶 Pme 和 Pac 购自 NEB 公司, Not , Kpn , Bgl 和 DNase 购自 TaKaRa 公司; 人胚肾 293 细胞和绿猴肾细胞(Vero)购自武汉大学典型培养物保藏中心; 低血清培养基 Opti-MEM , DMEM, 胎牛血清(FBS)和 DNA 转染试剂盒 lipofectamine 2 000 购自 Life Tech 公司; HBsAg ELISA 检测试剂购于荷兰欧嘉隆公司, HBeAg ELISA 检测试剂购于厦门新创公司.

1.2 方法

1.2.1 腺病毒穿梭载体 pAdTrack-CMV-HBs 和 pAdTrack-CMV-HBe 的构建

根据 HBV S 和 C 区开放读码框序列, 设计合成 2 对引物, 由上海生工生物公司合成, 引物序列如下: PS1: 5' -TTACAGATCTATGCAGTGGA ACTCCAC-3'; PS2: 5' -TTCGCGCCGCTAGGGTTTA AATGTATACC-3'; PE1: 5' -TACGGTACCATGCAAC TTTTTCACCTCTGCCTAATC-3'; PE2: 5' -TTGCGGC CGCTAACATTGAGATTCCCGAGA-3'; 其中引物 PS1 和 PS2 用于扩增 HBV pre-S2/S 基因片段, 在引物的 5' 端分别加上 Bgl 和 Not 限制性酶切位点; 引物 PE1 和 PE2 用于扩增 HBV pre-C/C 基因, 在引物的 5' 端分别加上 Kpn 和 Not 限制性酶切位点. 以插入 HBV adr 亚型全基因的 PBR322 质粒为模板进行 PCR 扩增, 条件为: 94 , 180 s 预变性; 94 , 40 s; 55 , 50 s; 72 , 90 s, 扩增 35 个循环, 最后 72 延伸 10 min. 扩增片段用 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳, 目的片段切胶回收纯化后, 连接到 pBluscript KS(+)-T 载体上, 转化 XL1-Blue 宿主菌, 挑阳性质粒, 经测序序列正确后, 用相应的内切酶 Bgl 和 Not 、 Kpn 和 Not 双酶切后, 定向亚克隆到 pAdTrack-CMV 质粒上, 电转化 DH10B 细菌后, 筛选重组 pAdTrack-CMV-HBs 和 pAdTrack-CMV-HBe 质粒.

1.2.2 E.coli 内同源重组构建 pAd-HBs 和 pAd-HBe 腺病毒载体

取 0.1-0.5 μ g 的 pAdTrack-CMV-HBs 或 pAdTrack-CMV-HBe 质粒, Pme 酶切线性化后溶解于 6 μ L 无菌水中, 与 1 μ L (0.1 μ g) pAdEasy-1 质粒一起加入到 20 μ L 电穿孔感受态大肠杆菌 BJ 5 183 中, 混匀后加入预冷的 2.0 mm 电转化杯中, 冰浴 5 min, 在 2.5 kV/200 /25 μ f 条件下电转化, 菌液在 SOC 培养液 1 mL 中 37 孵育 10-20 min, 涂 4 个 25 mg/L 卡那霉素 LB 平板, 37 过夜培养 16-20 h, 挑选 10-24 个小菌落, 碱裂解法小提质粒, 7 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 挑选质粒大小大于 pAdEasy-1 的质粒, 并用 Pac 酶切鉴定, 取阳性质粒 1 μ L 电转化 DH10B 菌, 用 Promega 提取试剂盒进行质粒的提取和纯化.

1.2.3 重组腺病毒 Ad-HBs 和 Ad-HBe 的包装

转染前 1 d, 在 T-25 培养瓶中接种 2×10^6 293 细胞, 至转染时细胞约为 50-70% 汇合度. 取质粒 pAd-HBs 或 pAd-HBe

各 4 μ g 分别用 Pac 酶切, 酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀, 溶于无菌去离子水 20 μ L 中, 再加 lipofectamine 2 000 20 μ L 一起混合于 500 μ L Opti-MEM , 室温孵育 10-30 min 后, lipofectamine - DNA 混合物加入培养瓶, 放回 37 50 mL/L CO₂ 孵箱孵育 4 h, 弃去含 lipofectamine-DNA 混合物的培养液上清, 换成含 100 mL/L FBS 的完全 DMEM 培养液. 培养 18 h 后通过荧光显微镜观察 EGFP 的表达, 转染后 7-10 d 后离心收集细胞, 弃上清, 细胞沉淀悬浮于 2 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)中, 37 /-70 反复冻溶 4 次, 离心留上清. 取病毒上清 1.0 mL 再转染 T-25 瓶 50-70% 汇合的 293 细胞, 转染后 3-5 d, 当大约 1/3-1/2 的 293 细胞脱落时, 离心收集细胞, 按上述方法收集病毒, 再重复扩增培养 1 次, 收集第 3 代病毒进行滴度(pfu/L)测定^[3].

1.2.4 目的基因 HBsAg 和 HBeAg 在真核细胞中的表达

取病毒上清, 按 MOI 为 10 转染 293 和 Vero 细胞, 荧光显微镜下观察 EGFP 的表达, 转染第 3-5 天, 95% 以上细胞出现 EGFP 的表达, 吸取上清进行 ELISA 测定; 用细胞刮子刮下细胞, PBS 洗 3 次, 用 TRIZOL 试剂提取细胞中总 RNA, 用 DNase 消化污染的 DNA 后, 分别用引物 PS1/PS2 和 PE1/PE2 进行 RT-PCR 检测.

2 结果

2.1 E.coli 内同源重组产生腺病毒质粒 pAd-HBs 和 pAd-HBe

PCR 扩增 pre-S2/S 基因片段约 872 bp, pre-C/C 基因片段约 657 bp, 重组到 pBluscript KS(+)-T 载体上进行测序, 测序结果未发现突变情况. 双酶切后定向亚克隆到 pAdTrack-CMV 质粒上, 产生重组腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV-HBs 和 pAdTrack-CMV-HBe, 与 0.1 μ g pAdEasy-1 共转化 BJ 5 183 菌, 获得数百个克隆, 挑选 10-24 个克隆经碱裂解法提质粒, 7 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 片段大小大于 pAdEasy-1 的质粒为阳性重组质粒; 用 Pac 酶切, 阳性重组腺病毒质粒 pAd-HBs 或 pAd-HBe 出现一条大的片段(约 35 kb)和一条小的片段(4.5 kb, 见图 1).

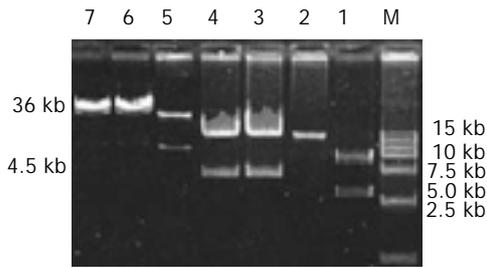
2.2 重组腺病毒 Ad-HBs 和 Ad-HBe 的包装

取 Pac 酶切后的质粒 pAd-HBs 或 pAd-HBe, 用脂质体法转染 293 细胞, 18 h 后荧光显微镜下可见 293 细胞内有 EGFP 的表达, 之后 EGFP 表达逐日增多, 于转染后 5 d 达高峰, 7-10 d 后收种病毒; 取 1/3-1/2 病毒上清再转染 T-25 瓶 50-70% 汇合的 293 细胞, 转染 18 h 后, 1/3 以上细胞可见 EGFP 的表达, 3-5 d 出现明显细胞病变(CPE). 取第 3 代病毒进行滴度(pfu/L)测定, 病毒滴度达到 5×10^{12} pfu/L.

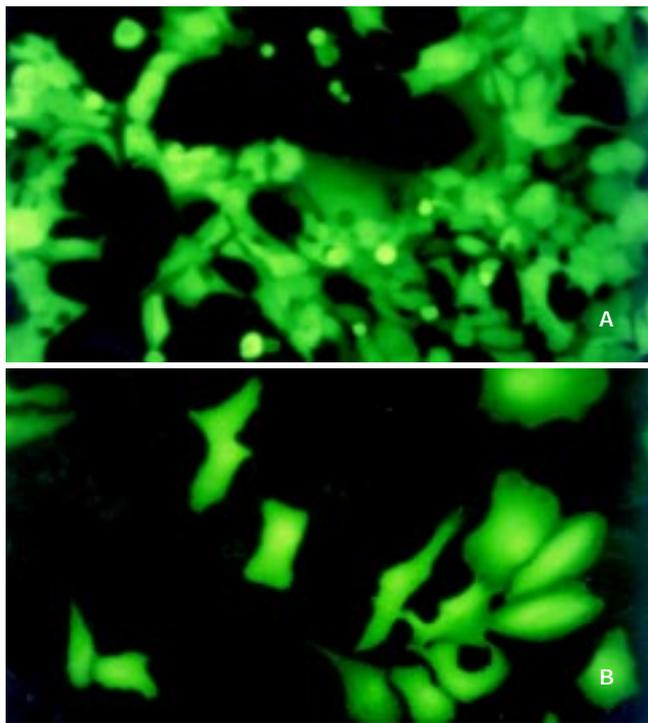
2.3 重组腺病毒 Ad-HBs 和 Ad-HBe 在真核细胞中的高效表达

制备的 Ad-HBs 和 Ad-HBe 腺病毒带有 2 个独立的 CMV 启动子表达盒, 一个表达目的基因 HBsAg 或 HBeAg, 一个表达 EGFP. 18 h 后在荧光显微镜下观察到 293 和 Vero 细胞中 EGFP 荧光, 可间接反映目的

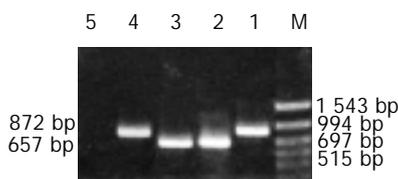
基因的表达(图2). 取第3代腺病毒转染293和Vero细胞, 经RT-PCR检测, 分别扩增出872 bp和657 bp 预计大小的片段(图3), 表明重组腺病毒 Ad-HBs 和 Ad-HBe 在293和Vero细胞均能有效转录. 重组腺病毒 Ad-HBs 转染293和Vero细胞72 h, ELISA检测细胞培养上清中HBsAg A值均大于3.229 (C.O=0.102); 重组腺病毒 Ad-HBe 转染293和Vero细胞72 h, ELISA检测细胞培养上清中HBeAg A值均分别为0.996和0.806 (C.O=0.105).



M:DNA Marker DL15 000; 1:pAdTrack-CMV/pac I; 2:pAdEasy-1/ pac I; 3: pAd-HBs/ pac I; 4: pAd-HBe/ pac I; 5: pAdEasy-1; 6: pAd-HBs; 7: pAd-HBe
图1 重组腺病毒质粒 pAd-HBs 和 pAd-HBe 构建和鉴定.



A: In 293 cells(X200) B: In Vero cells(X200)
图2 腺病毒 Ad-HBs 转染293和Vero细胞后EGFP的表达(72 h).



M: PCR Marker; 1: Ad-HBs transfected 293; 2: Ad-HBe transfected 293; 3: Ad-HBe transfected Vero; 4: Ad-HBs transfected Vero; 5: Negative control
图3 RT-PCR检测HBV S和C基因在真核细胞中的转录.

3 讨论

乙型肝炎病毒感染是当前危害人类健康的重要传染病之一^[6,7], 虽然抗病毒药物如干扰素、核苷类似物治疗显示一定的效果, 但停药后易复发, 难于取得持久的疗效^[8-11]. 基因疫苗和基因治疗作为近年发展的一种新的抗病毒途径, 在控制HBV感染方面已经显示其良好的应用前景^[12-14]. 目前, HBV的基因治疗主要有反义寡核苷酸, 核酶和基因免疫(又称DNA疫苗)三个主要治疗策略^[15-22]. 基因免疫是将编码抗原的外源基因插入合适的表达载体中, 再以载体免疫机体, 使目的基因在机体内高效表达, 达到基因治疗的目的^[23]. 质粒表达载体是目前使用最多基因免疫的载体, 它具有诸多优点^[24], 但也存在明显不足, 如质粒载体导入细胞效率低, 诱发免疫效果较弱, 安全性尚无定论等^[25]. 腺病毒载体是目前更具前途的用于基因治疗的表达载体, 它具有基因组的结构简单, 分子背景比较清楚, 易于改造和操作, 载体制备较容易; 宿主广泛, 包装容量大, 感染率高, 又有较强的靶细胞特异性; 病毒基因不整合到宿主基因中, 安全性好; 既可以在肠道繁殖, 也可以在呼吸道繁殖, 便于疫苗制成后的使用和推广; 腺病毒载体感染宿主细胞表达的目的抗原, 较质粒载体更近似病原体感染, 易获得更强的免疫应答^[26,27]. 因此, 腺病毒成为继逆转录病毒之后被广泛应用于基因免疫和基因治疗研究的病毒载体^[28-33].

HBV S区基因编码的乙肝表面抗原(HBsAg), 具有潜在T细胞激活表位, 能介导CTL细胞发挥抗HBV作用^[34]; 同时, 还可以能够刺激体内产生中和抗体抗-HBs, 具有清除病毒感染的作用^[35], 因此, HBsAg可作为乙型肝炎基因免疫治疗的有效靶抗原. 我们构建的重组腺病毒 Ad-HBs 和 Ad-HBe, 分别携带 HBV S区基因和 C区基因, 在真核细胞中可高效表达 HBsAg 和 HBeAg. 另外, 我们制备的重组腺病毒 Ad-HBs 和 Ad-HBe 是 E1, E3 区缺失的复制缺陷5型腺病毒, 由于 E1 区基因为腺病毒复制所必需, 因此需要由转化了 E1 区基因的包装细胞系(293 细胞)提供反式补偿, 重组腺病毒才能复制和扩增. 这种复制缺陷型重组腺病毒仍具有感染靶细胞的能力但不发生复制, 因而不会直接造成靶细胞的损害, 有利于其基因治疗研究中的应用^[36]. 另外, 复制缺陷型重组腺病毒缺失的病毒早期基因 E1 区, 编码多种与病毒的免疫逃避有关的蛋白(如 E1A, E1B-19K 和 E1B-55K)^[37], 与复制型腺病毒相比, 复制缺陷型重组腺病毒不仅安全, 而且以低剂量方式产生抗原蛋白, 不裂解细胞, 故抗原蛋白表达持久, 有利于激发长期的免疫反应^[38].

由于腺病毒基因组较大(约 36 kb), 很难选择合适的限制性内切酶直接进行分子克隆, 因此, 构建腺病毒载体时, 通常将腺病毒基因组左端制备成含 E1 区缺失的穿梭质粒, 然后将目的基因插入穿梭质粒的多克隆位点, 再与含腺病毒基因组的质粒共转染至

293 或 911 细胞内进行同源重组, 再通过空斑筛选来鉴定扩增重组^[39]. 这种传统构建重组腺病毒载体的方法虽然非常有效, 但由于在哺乳细胞 293 或 911 内同源重组的效率低, 需要多次空斑筛选, 因而制备出腺病毒的时间较长, 妨碍其广泛应用. 本研究采用一种新的腺病毒载体制备系统 AdEasy^[5], 该系统在高效的原核细胞的大肠杆菌中进行同源重组, 经抗生素培养板筛选重组, 极大简化载体的构建过程. 构建的腺病毒载体上携带有增强型绿色荧光蛋白(EGFP)示踪基因, 可以很方便通过荧光显微镜观察腺病毒的包装、检测病毒滴度和了解目的基因在真核细胞中的表达情况, 而不采用观察细胞病毒病变和空斑实验鉴定病毒包装成功与否, 以及采用空斑实验检测病毒的滴度等. 采用本系统可以方便快捷构建腺病毒载体, 大大节省时间. 本研究成功制备表达 HBsAg 基因和 HBeAg 的重组腺病毒载体, 并能够在真核细胞中获得高效稳定的表达, 这一初步研究结果为乙肝病毒基因免疫和基因治疗的临床应用研究提供了理论依据.

4 参考文献

- Xiang ZQ, Yang Y, Wilson JM, Ertl HC. A replication-defective human adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier. *Virology* 1996;219: 220-227
- Magovern CJ, Mack CA, Zhang J, Rosengart TK, Isom OW, Crystal RG. Regional Angiogenesis induced in nonischemic tissue by an adenoviral vector expressing vascular endothelial growth factor. *Hum Gene Ther* 1997;8:215
- 郝春秋, 周永兴, 冯志华, 李谨谦, 贾战生, 王平忠. HCV C 基因腺病毒表达载体骨架质粒 pAd.HCV-C 的构建、鉴定及表达. *世界华人消化杂志* 2001;9:635-639
- 潘欣, 潘卫, 柯重伟, 张斌, 曹广文, 戚中田. 腺病毒载体介导四环素调控的 DT/VEGF 体系的基因治疗. *世界华人消化杂志* 2000;8: 1121-1126
- He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:2509-2514
- 游晶, 孔蕾, 庄林, 李惠萍, 卢绍蓉, 曹云峰. 急性病毒性肝炎 2116 例血清病原学分析. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 636-637
- 沈宏辉, 邹正升, 陈菊梅, 辛绍杰, 邢汉前, 李建宇, 刘艳萍, 李保森. 慢性重型肝炎 122 例的死因比较分析. *世界华人消化杂志* 2001;9:1084-1086
- 游晶, 庄林, 唐宝璋, 杨惠, 杨微波, 李武, 张宏丽, 张艳梅, 张禄, 严绍明. 干扰素联合胸腺肽治疗慢性乙型肝炎. *世界华人消化杂志* 2001;9:388-391
- 甄真, 周俊英, 周复红, 刘金星, 李兵顺. IFN- γ 治疗慢性肝炎血清肝纤维化指标的变化. *世界华人消化杂志* 2001;9:1093-1094
- Wolters LM, Hansen BE, Niesters HG, de Man RA. Viral dynamics in chronic hepatitis B patients treated with lamivudine, lamivudine-famciclovir or lamivudine-ganciclovir. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:1007-1011
- Yang SS, Hsu CT, Hu JT, Lai YC, Wu CH. Lamivudine does not increase the efficacy of interferon in the treatment of mutant type chronic viral hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2002;8:868-871
- Chiou HC, Lucas MA, Coffin CC, Banaszczyk MG, Ill CR, Lollo CP. Gene therapy strategies for the treatment of chronic viral hepatitis. *Expert Opin Biol Ther* 2001;1:629-639
- Xu CT, Pan BR. Current status of gene therapy in gastroenterology. *World J Gastroenterol* 1998;4:85-89
- Dai WJ, Jiang HC. Advances in gene therapy of liver cirrhosis: a review. *World J Gastroenterol* 2001;7:1-8
- Wu CH, Zeng Z, Wang QH, Yu M. Experimental study of inhibition of hepatitis B by dual-target antisense RNA. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2001; 25:605-608
- Robaczewska M, Guerret S, Remy JS, Chemin I, Offensperger WB, Chevallier M, Behr JP, Podhajka AJ, Blum HE, Trepo C, Cova L. Inhibition of hepadnaviral replication by polyethylenimine-based intravenous delivery of antisense phosphodiester oligodeoxynucleotides to the liver. *Gene Ther* 2001; 8: 874-881
- Putlitz J, Wieland S, Blum HE, Wands JR. Antisense RNA complementary to hepatitis B virus specifically inhibits viral replication. *Gastroenterology* 1998; 115: 702-713
- Feng Y, Kong YY, Wang Y, Qi GR. Antiviral activity of a hammerhead ribozyme against HBV in HepG2.2.15 cells. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao* 2002; 34: 204-208
- Song YH, Lin JS, Liu NZ, Kong XJ, Xie N, Wang NX, Jin YX, Liang KH. Anti-HBV hairpin ribozyme-mediated cleavage of target RNA *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2002;8:91-94
- Wen SJ, Xiang KJ, Huang ZH, Zhou R, Qi XZ. Construction of HBV-specific ribozyme and its recombinant with HDV and their cleavage activity *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2000;6:377-380
- Feng Y, Kong YY, Wang Y, Qi GR. Intracellular inhibition of the replication of hepatitis B virus by hammerheadribozymes. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:1125-1130
- Sallberg M, Hughes J, Javadian A, Ronlov G, Hultgren C, Townsend K, Anderson CG, O'Dea J, Alfonso J, Eason R, Murthy KK, Jolly DJ, Chang SM, Mento SJ, Milich D, Lee WT. Genetic immunization of chimpanzees chronically infected with the hepatitis B virus, using a recombinant retroviral vector encoding the hepatitis B virus core antigen. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 1719-1729
- Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dworki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 1993;259:1745-1749
- Ertl HC, Xiang ZQ. Genetic Immunization. *Viral Immunol* 1996;9: 1-9
- Mendez S, Belkaid Y, Seder RA, Sacks D. Optimization of DNA vaccination against cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 2002;20: 3702-3708
- Mitani K, Graham FL, Caskey CT, Kochanek S. Rescue, propagation, and partial purification of a helper virus-dependent adenovirus vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3854-3858
- Fisher KJ, Choi H, Burda J, Chen SJ, Wilson JM. Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis. *Virology* 1996;217:11-22
- Wang L, Qi X, Sun Y, Liang L, Ju D. Adenovirus-mediated combined P16 gene and GM-CSF gene therapy for the treatment of established tumor and induction of antitumor immunity. *Cancer Gene Ther* 2002;9:819-824
- 陈洁平, 林晨, 徐采朴, 张雪艳, 付明, 邓友平, 隗月, 吴旻. 重组反义 c-myc 腺病毒对人胃癌细胞的体内及体外分子治疗. *世界华人消化杂志* 1999;7:482-486
- 陈洁平, 林晨, 徐采朴, 张雪艳, 付明, 邓友平, 隗月, 吴旻. 腺病毒介导 RA538 及反义 c-myc 在不同细胞系中作用及其机制. *世界华人消化杂志* 2000;8:266-270
- 鲁建国, 林晨, 黄志强, 吴金生, 付明, 张雪艳, 梁萧, 姜秀, 吴旻. 腺病毒介导的 p16 和顺铂的联合应用对胆管癌细胞系 QBC939 的生长抑制作用. *世界华人消化杂志* 2000;8:641-645
- 施明, 王福生, 高兰英. 腺病毒载体的研究进展. *世界华人消化杂志* 2000;8:1282-1286
- Zhou Z, Zhang DF, Ren H. Humoral immunization and cell-mediated immunization evoked by HBsAg and B7-2 Ag co-expression recombinant adenovirus vector. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2001;9:111-113
- Davis HL, Schirmbeck R, Reimann J, Whalen RG. DNA-mediated immunization in mice induces a potent MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocyte response to the hepatitis B envelope protein. *Hum Gene Ther* 1995;6:1447-1456
- 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
- Bett AJ, Haddara W, Prevec L, Graham FL. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:8802-8806
- Barry M, McFadden G. Apoptosis regulators from DNA viruses. *Current Opinion Immunol* 1998;10:422-430
- Morsy MA, Gu M, Motzel S, Zhao J, Lin J, Su Q, Allen H, Franklin L, Parks RJ, Graham FL, Kochanek S, Bett AJ, Caskey CT. An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:7866-7871
- Krougliak V, Graham FL. Development of cell lines capable of complementing E1, E4 and protein IX defective adenovirus type 5 mutants. *Human Gene Therapy* 1995;6:1575-1586

大鼠肠巨噬细胞 TNF α 表达及复方大承气汤的影响

陈海龙,王 辉,李文利,范 琦

陈海龙,王辉,大连医科大学附属第一医院 辽宁省大连市 116011
李文利,范琦,辽宁省农科院大连生物技术研究所 辽宁省大连市 116011
陈海龙,男,1962-08-30生,吉林省农安人,汉族.1987年白求恩医科大学本科毕业,1990年大连医科大学硕士毕业,1996年天津医科大学博士毕业,教授,博士生导师,享受国务院特殊津贴,主要从事胆胰疾病的中西医结合诊治研究,发表论文 50 篇.

国家自然科学基金资助课题, No.39700194

项目负责人:陈海龙,116011,辽宁省大连市中山路 222 号,大连医科大学附属第一医院. hailong_chen@x263.net

电话:0411-3635963-3003 传真:0411-3622844

收稿日期:2002-11-06 接受日期:2002-11-13

TNF α expression and effects of Dachengqi Decoction in compound in gut macrophages

Hai-Long Chen, Hui Wang, Wen-Li Li, Qi Fan

Hai-Long Chen, Hui Wang, Wen-Li Li, Qi Fan, The First Affiliated Hospital, Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39700194

Correspondence to: Dr. Hai-Long Chen, First Affiliated Hospital, Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province China.

hailong_chen@x263.net

Received: 2002-11-06 Accepted: 2002-11-13

Abstract

AIM: To explore the rule of producing TNF α in gut macrophages through respects of gene expression and protein synthesis of TNF α and to observe the effect of dexamethasone (DEX), monoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha (TNF α moAb) and Fufang Dachengqi Decoction compound on TNF α production.

METHODS: The cultured rat gut macrophages were divided into five groups: control group (group C), lipopolysaccharide (LPS) group (group L), DEX treated group (group L+D), TNF α -MoAb treated group (group L+M), LPS plus Fufang Da Chengqi Decoction treated group (group L+F). Each group was divided into four phases: cultured for 3, 6, 12, and 24 h. The supernatants were collected and frozen at -70 until TNF α was determined, and the cells were used to isolate the RNA. TNF α levels were determined by radioimmunoassay method. The expression of TNF α mRNA was evaluated by RT-PCR.

RESULTS: The level of TNF α and expression of TNF α mRNA significantly increased at each phase in group L. The level of TNF α significantly decreased at each phase in group L+D, group L+M and group L+F compared with group L. The expression of TNF α mRNA in each treatment group had no obvious difference, compared with group L in 3 h, but group L+D and group L+F significantly decreased in 6, 12, and 24h. Group L+M still showed no obvious difference.

CONCLUSION: Gut macrophage induced by LPS can produce more TNF α through its gene expression and protein synthesis.

DEX, Fufang Dachengqi Decoction can suppress the TNF α mRNA transcription and protein synthesis of TNF α ; TNF α -moAb only lowered the level of TNF α protein. The three drugs have protective effects in inflammatory mediators reaction, gut barrier damage and multiple organ dysfunction syndrome (MODS).

Chen HL, Wang H, Li WL, Fan Q. TNF α expression and effects of Dachengqi Decoction in compound in gut macrophages. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(4):442-445

摘要

目的:探讨体外培养的肠巨噬细胞分泌TNF α 的规律及地塞米松、TNF α 单克隆抗体及复方大承气汤对LPS诱导的肠巨噬细胞 TNF α 产生的影响。

方法:体外分离培养大鼠肠巨噬细胞. 设对照组、脂多糖组、地塞米松处理组、TNF α 单抗处理组和复方大承气汤处理组. 每组分别在 3 h, 6 h, 12 h 和 24 h 取上清液, 用放免法检测 TNF α 浓度. 并分别收集肠巨噬细胞, 提取 RNA, 采用 RT-PCR 法相对定量 TNF α mRNA.

结果:肠巨噬细胞经脂多糖(LPS)诱导后,各时相TNF α 分泌及 TNF α mRNA 表达均明显增加;地塞米松、TNF α 单克隆抗体及复方大承气汤处理后,各时相TNF α 分泌都较脂多糖(LPS)诱导组显著下降,各处理组TNF α mRNA 表达在 3h 时与脂多糖(LPS)诱导组比较无明显差异,6h、12h、24h,地塞米松、复方大承气汤处理组显著降低,而 TNF α 单克隆抗体处理组无明显差异。

结论:LPS 是肠巨噬细胞分泌 TNF α 的有效激活剂,地塞米松、复方大承气汤能从蛋白质及核酸水平抑制 TNF α 的产生,而 TNF α 单克隆抗体只能从蛋白质水平抑制 TNF α 的产生。

陈海龙,王辉,李文利,范琦. 大鼠肠巨噬细胞 TNF α 表达及复方大承气汤的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11(4):442-445

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/442.htm>

0 引言

在严重感染(急性胰腺炎、急性胆道感染、外科腹内感染等)和创伤(烧伤等)应激状态下,肠道屏障常受到损害,产生肠源性感染和内毒素血症,引起机体严重的全身反应和病理损害,导致 MODS 而死亡^[1-9]. 单核巨噬细胞系统(包括腹腔巨噬细胞、肝脏 Kupffer 细胞、肺巨噬细胞等)分泌的肿瘤坏死因子(TNF α)是机体

炎症反应的主要致病因子. 炎症反应的正确调控成为目前研究的热点. 肠巨噬细胞是其中一部分, 也是肠道屏障的重要功能细胞. 但是单独分离出来的肠巨噬细胞分泌 TNF α 的规律的研究尚未见报道. 我们通过体外分离和培养大鼠肠巨噬细胞, 研究其分泌 TNF α 的规律, 特别是在脂多糖刺激下 TNF α mRNA 表达及地塞米松、TNF α 单克隆抗体特别是通里攻下中药复方大承气汤对 LPS 诱导的肠巨噬细胞 TNF α 分泌及 TNF α mRNA 表达产生的影响, 以进一步明确肠道巨噬细胞在肠道屏障功能中的地位, 在机体全身和肠道局部炎症反应中的作用, 为临床上正确调控炎症反应, 保护肠道屏障提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料

SD 健康大鼠, 质量 220-250 g, 由大连医科大学实验动物中心提供; RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司; 等渗细胞分离液(Percoll solution, 由 1 份 10 × Dulbecco's 磷酸盐缓冲生理盐水和 9 份细胞分离液构成. 不同浓度的 Percoll 溶液用 1 × Dulbecco's 磷酸盐缓冲生理盐水稀释; 胶原酶 IV 及脂多糖(购自 Sigma 公司); RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒(大连宝生物公司); 大鼠 TNF α 放免检测试剂盒(解放军总医院科技开发中心放免所); 复方大承气汤: 由大黄、川朴、枳实、芒硝、连翘、栀子和牡丹皮等组成, 其中大黄后下, 芒硝冲用. 由大连医科大学中西医结合急腹症研究所制备, 以原液再经抽提、过滤制成精制药液, 含生药 1 kg/L.

1.2 方法

肠巨噬细胞分离和培养参照文献[10]: 大鼠以密闭 CO₂ 笼处死, 迅速取全肠. 用冷 PBS(pH=7.4)液冲洗肠腔, 纵向剖开, 置入含 1 g/L EDTA 的 Hanks 平衡盐溶液中, 37 °C 水浴振荡 60 min. 弃上清, 用 5 g/L 胶原酶 IV 消化 2 h. 所得细胞悬液以尼龙网过滤. 再以 Hanks 液洗涤, 重悬于 500 g/L 等渗细胞分离液, 离心, 2 000 r·min⁻¹, 4 °C, 15 min. 收集沉淀, 得肠巨噬细胞, 以无钙、镁 Hanks 液洗涤 3 遍. 用胎盘蓝染色, 细胞活力约为 90%. 计数巨噬细胞, 以 RPMI 1640 培养基调细胞浓度至 2 × 10⁸/L. 加入 24 孔培养板, 每孔 1 mL, 置于 37 °C, 50 mL/L CO₂ 培养箱中培养. 第 1 组: 对照组, 细胞上清液中加入培养基 0.05 mL. 第 2 组: 脂多糖诱导组, 加脂多糖(LPS, 终浓度 10 mg/L)0.05 mL. 第 3 组: 地塞米松处理组, 加脂多糖(LPS, 终浓度 10 mg/L)0.025 mL,

同时加入地塞米松(终浓度 10⁻⁶ mmol/L)0.025 mL. 第 4 组: TNF α 单抗处理组, 加脂多糖(LPS, 终浓度 10 mg/L)0.025 mL, 同时加入 TNF α 单抗(终浓度 10⁻¹ mmol/L)0.025 mL. 第 5 组: 复方大承气汤处理组, 加脂多糖(LPS, 终浓度 10 mg/L)0.025 mL, 同时加入复方大承气汤(终浓度 1:100)0.025 mL. 每组分 4 个时相: 3 h, 6 h, 24 h, 每时相 6 个孔, 分别取上清液. -70 °C 保存, 用于检测 TNF α . 细胞用于提取 RNA, RT-PCR 法检测 TNF α mRNA. TNF α 检测用放免法.

TNF α mRNA 表达采用 RT-PCR 法. 细胞总 RNA 提取, 按试剂盒操作. 细胞总 RNA 稀释至 1 g/L. 取 1 μ g 用于合成 cDNA 单链. cDNA 单链的合成, 反应条件: 30 °C 10 min, 42 °C 30 min, 95 °C 5 min, 循环一次. 产物取 1 μ L 用于 PCR 反应. PCR 反应 TNF α 引物: P(T1) 5' -GGATCATCTTCTCAAACACTCG-3' P(T2) 5' -TCACAGAGCAATGACTCCAAA - 3' 其扩增片段为 348 个碱基. β -肌动蛋白引物^[11](β -actin 作为内参照, 用于 TNF α mRNA 相对定量): P(A1) 5' -TAAAGACCTCTATGCCAACAC - 3' P(A2) 5' -TAAAGCCATGCCAAA TGTCTC - 3' 其扩增片段为 348 个碱基. 扩增步骤: 变性温度 94 °C, 45 s, 退火温度 55 °C, 45 s, 延伸温度 72 °C, 1 min, 循环 35 次后, 72 °C, 延伸 10 min. 产物取 10 μ L, 16 g/L 凝胶电泳. 紫外灯下照相, 胶片经密度扫描, 得 TNF α 带与 β -肌动蛋白(β -actin)带的密度比.

统计学处理 所有数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 结果以 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析, 以 P < 0.05 为检验显著性标准.

2 结果

2.1 肠巨噬细胞上清液 TNF α 浓度

正常细胞(对照组)培养上清液中 TNF α 浓度较低, 经 LPS 刺激后, 各时相均明显增高(P < 0.01), 3 h 增加明显, 6 h 达到高峰, 12 h 开始下降, 24 h 逐渐降低. 应用地塞米松、TNF α 单克隆抗体及复方大承气汤处理后, 各时相上清液 TNF α 浓度均较相应的脂多糖诱导组明显降低(P < 0.01, 表 1).

2.2 肠巨噬细胞 TNF α mRNA 表达

正常细胞(对照组)无明显 TNF α mRNA 表达, 经 LPS 诱导后 TNF α mRNA 表达增加, 3 h 增加明显, 6 h 达到高峰, 12-24 h 逐渐降低. DEX 处理组、复方大承气汤处理组 TNF α

表 1 各组细胞上清液中 TNF α 浓度(μ g/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	3 h	6 h	12 h	24 h
对照组	0.095 \pm 0.011	0.093 \pm 0.007	0.091 \pm 0.009	0.055 \pm 0.016
LPS 诱导组	1.575 \pm 0.129 ^b	1.978 \pm 0.083 ^b	1.977 \pm 0.076 ^b	1.639 \pm 0.058 ^b
DEX 处理组	0.787 \pm 0.041 ^d	1.208 \pm 0.278 ^d	0.680 \pm 0.077 ^d	0.495 \pm 0.010 ^d
复方大承气汤处理组	0.996 \pm 0.123 ^d	1.326 \pm 0.096 ^d	0.879 \pm 0.080 ^d	0.774 \pm 0.069 ^d
TNF α 单抗处理组	0.619 \pm 0.034 ^d	1.132 \pm 0.108 ^d	0.592 \pm 0.045 ^d	0.531 \pm 0.023 ^d

^aP < 0.05, ^bP < 0.01, vs 对照组比较; ^cP < 0.05, ^dP < 0.01 vs LPS 诱导组比较.

mRNA 表达与 LPS 诱导组比较，3 h 皆无显著性差异 (P >0.05)，6 h，12 h，24 h 则明显降低(P <0.05-0.01，

图 1，表 2)。TNF α 单克隆抗体处理组与 LPS 诱导组比较，各时相皆无明显差异。

表 2 各组肠巨噬细胞 TNF α mRNA 表达(TNF α /actin 积分光度值, $\bar{x} \pm s$)

组别	3 h	6 h	12 h	24 h
对照组	-	-	-	-
LPS 诱导组	0.676 \pm 0.005	0.905 \pm 0.015	0.367 \pm 0.004	0.117 \pm 0.017
DEX 处理组	0.667 \pm 0.010	0.350 \pm 0.052 ^b	0.228 \pm 0.015 ^b	0.018 \pm 0.006 ^a
复方大承气汤处理组	0.672 \pm 0.010	0.343 \pm 0.012 ^b	0.112 \pm 0.011 ^b	0.017 \pm 0.009 ^a
TNF α 单抗处理组	0.671 \pm 0.010	0.918 \pm 0.002	0.358 \pm 0.009	0.124 \pm 0.012

^aP <0.05, ^bP <0.01 vs 内毒素诱导组比较.



M:Marker; 1:3 h 的正常细胞(N₃); 2:3 h 的 LPS 诱导细胞(L₃); 3:3 h 的 DEX 处理细胞(D₃); 4:3 h 的复方大承气汤处理细胞(F₃); 5:3 h 的 TNF α Ab 处理细胞 (M₃); 6:N₆; 7 :L₆; 8:D₆; 9:F₆; 10:M₆; 11:N₁₂; 12:L₁₂; 13:D₁₂; 14:F₁₂; 15:M₁₂; 16:N₂₄; 17:L₂₄; 18:D₂₄; 19:F₂₄;20:M₂₄
图 1 RT-PCR 检测各组肠巨噬细胞 TNF α mRNA.

3 讨论

肠巨噬细胞是肠道发挥屏障功能的重要组成部分，同时他还是机体单核 - 巨噬细胞系统的成员之一，也是肠产生 TNF α 的主要细胞^[12]。肠巨噬细胞受到内毒素等因素攻击可以释放大量的 TNF α ，除了通过内分泌形式进入血循环，作用于肝、肺、肾等产生远隔器官损害外，还可通过旁分泌形式对邻近肠上皮细胞发生作用，从而影响肠道的屏障功能^[13-25]。因此，研究肠巨噬细胞表达和分泌炎性递质的规律及中西药物影响具有重要意义。我们发现，肠巨噬细胞在正常情况下有低量的 TNF α 分泌，无明显基因表达。在 LPS(10 mg/L)作用下，TNF α 分泌及 TNF α mRNA 表达都明显增加，3 h，6 h 增加明显，6 h 相对较高，12 h，24 h 逐渐降低，但仍高于正常水平。表明肠道巨噬细胞在肠道屏障中具有双重作用。必须在不同时期进行正确调控，才能发挥其保护作用，减少或消除其损伤作用。目前较多应用地塞米松^[26-28]、TNF α 单克隆抗体^[29,30]及中药来阻断 TNF α 损伤作用^[28-34]。本实验探讨这三种不同中西药物对 LPS 诱导的肠巨噬细胞表达和分泌 TNF 的影响。地塞米松对 LPS 诱导的肠巨噬细胞 TNF α 分泌及基因表达具有明显的抑制作用。TNF α 单克隆抗体对 LPS 诱导的肠巨噬细胞 TNF α 蛋白质分泌有明显的抑制作用，而对基因表达无抑制作用。

复方大承气汤可抑制 LPS 诱导的肠巨噬细胞 TNF α 的分泌及基因表达。复方大承气汤是由经典通里攻下名方大承气汤加减而成。由大连医科大学中西医结合急腹症研究所组方配制，广泛应用于临床的常用方剂。主

要用于治疗急性肠梗阻、急性阑尾炎、急性胰腺炎、急性腹腔感染等疾病。有关实验表明，此方有增强胃肠道推进运动作用，增加肠血流量，降低血管通透性，以及抑菌抗感染，减轻肠源性内毒素血症，保护胃肠黏膜等作用^[31-34]。但此药对肠巨噬细胞及其分泌 TNF α 的影响，还未见深入研究。本实验通过复方大承气汤直接作用于体外培养的肠巨噬细胞，结果表明，其可以较强抑制炎性递质 TNF α 的分泌和 mRNA 的表达。作用机制尚不完全清楚，估计可能与下调核转录因子(NF-kappaB)及调节细胞内 cGMP 和 cAMP 的比例等有关。

总之，这三种药物都可不同程度抑制 TNF α 介导的炎症反应，但从作用环节和药理效应方面看，地塞米松又是一个对机体免疫功能具有一定损害作用的免疫抑制药，而且主要作用于基因转录阶段，当炎症进展，蛋白质已经大量表达时就显得无能为力。TNF α 单克隆抗体只是对已经表达的蛋白质具有中和作用，对于炎症反应的初始步骤基因水平的阻抑则不起作用，而且生产工艺复杂，价格昂贵，广泛应用于临床尚需时日。

中药药源广泛、价廉、易得。他的作用又是多方面多层次的，不仅在基因转录、蛋白质表达水平，还是在效应阶段都起作用。另外他在整体水平上可以通过扶正祛邪、改善微循环、增强内稳态，直接中和、拮抗抑制细菌内毒素、保护肠道屏障功能和其他脏器功能等发挥作用。如果与地塞米松、TNF α 单克隆抗体等配合应用，将是一种很好的中西医结合形式。必将优势互补、相得益彰，为临床上保护肠屏障，防治 MODS 提供有效方法。

4 参考文献

- 1 Deitch EA. Multiple organ failure:pathophysiology and potential future therapy. *Ann Surg* 1992;216:117-134
- 2 Swank GM, Deitch EA. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. *World J Surg* 1996;20:411-417
- 3 Goris RJ. MODS/SIRS:result of an overwhelming inflammatory response? *World J Surg* 1996;20:418-421
- 4 Han DW. Intestinal endotoxemia as a pathogenetic mechanism in liver failure. *World J Gastroenterol* 2002;8:962-965
- 5 Zhao LF, Han DW. Clinical significance of endotoxemia in liver

- diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:391-393
- 6 Nolan JP, Camara DS. Intestinal endotoxins as co-factors in liver injury. *Immunol Invest* 1989;18:325-337
- 7 Pugin J, Chevreton JC. The intestine-liver-lung axis in septic syndrome. *Schweiz Med Wochenschr* 1991;121:1538-1544
- 8 Towfigh S, Heisler T, Rigberg DA, Hines OJ, Chu J, McFadden DW, Chandler C. Intestinal ischemia and the gut-liver axis: an in vitro model. *J Surg Res* 2000;88:160-164
- 9 Koo DJ, Zhou M, Jackman D, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH, Wang P. Is gut the major source of proinflammatory cytokine release during polymicrobial sepsis? *Biochim Biophys Acta* 1999;1454:289-295
- 10 Ogle CK, Mao JX, Wu JZ, Ogle JD, Alexander JW. The 1994 lindberg award. The production of tumor necrosis factor, interleukin-1, interleukin-6, and prostaglandin E2 by isolated enterocytes and gut macrophages: effect of lipopolysaccharide and thermal injury. *J Burn Rehabil* 1994;15: 470-477
- 11 Nedel U, Zakut R, Shani M, Levy Z, Yaffe D, Neuman S. The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic beta-actin gene. *Nucleic Acid Res* 1983;11:1759-1771
- 12 Yuan J, Xiao G, Zhou L. A study of the expression and localization of tumor necrosis factor mRNA in small intestine of rats after severe burn. *Zhonghua Zhengxing Shaoshang Waik Zazhi* 1996;12:163-166
- 13 Nathens AB, Rotstein OD, Dackiw AP, Marshall JC. Intestinal epithelial cells down-regulate macrophage tumor necrosis factor-alpha secretion: a mechanism for immune homeostasis in the gut-associated lymphoid tissue. *Surgery* 1995;118:343-350
- 14 Nilsen EM, Johansen FE, Jahnsen FL, Lundin KE, Scholz T, Brandtzaeg P, Haraldsen G. Cytokine profiles of cultured microvascular endothelial cells from the human intestine. *Gut* 1998;42:635-642
- 15 Tan X, Hsueh W, Gonzalez-Crussi F. Cellular localization of tumor necrosis factor (TNF)-alpha transcripts in normal bowel and in necrotizing enterocolitis. TNF gene expression by Paneth cells in intestinal eosinophils, and macrophages. *Am J Pathol* 1993;142:1858-1865
- 16 Kwon JH, Keates S, Bassani L, Mayer LF, Keates AC. Colonic epithelial cells are a major site of macrophage inflammatory protein 3alpha (MIP-3alpha) production in normal colon and inflammatory bowel disease. *Gut* 2002;51:818-826
- 17 Cong B, Li SJ, Yao YX, Zhu GJ, Ling YL. Effect of cholecystokinin octapeptide on tumor necrosis factor alpha transcription and nuclear factor-kappaB activity induced by lipopolysaccharide in rat pulmonary interstitial macrophages. *World J Gastroenterol* 2002;8:718-723
- 18 Fujiie S, Hieshima K, Izawa D, Nakayama T, Fujisawa R, Ohyanagi H, Yoshie O. Proinflammatory cytokines induce liver and activate regulated chemokine/macrophage inflammatory protein 3alpha/CCL20 in mucosal epithelial cells through NF-kappa B [correction of NK-KappaB]. *Int Immunol* 2002;13:1255-1263
- 19 O'Keefe J, Lynch S, Whelan A, Jackson J, Kennedy NP, Feighery C. Flow cytometric measurement of intracellular migration inhibition factor and tumour necrosis factor alpha in the mucosa of patients with coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 2001;125:376-382
- 20 Koksoy C, Kuzu MA, Kuzui-Ergun H, Gurhan I. Role of tumor necrosis factor in lung injury caused by intestinal ischaemia-reperfusion. *Br J Surg* 2001;88:464-468
- 21 Zareir M, Singh PK, Irvine EJ, Sherman PM, McKay DM. Monocyte/macrophage activation by normal bacteria and bacterial products: implications for altered epithelial function in Crohn's disease. *Am J Pathol* 2001;158:1101-1109
- 22 Woywodt A, Ludwig D, Neustock P, Kruse A, Schwarting K, Jantschek G, Kirchner H, Stange EF. Mucosal cytokine expression, cellular markers and adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:267-276
- 23 Sun Z, Olanders K, Lason A, Dib M, Annborn M, Andersson K, Wang X, Andersson R. Effective treatment of gut barrier dysfunction using an antioxidant, a PAF inhibitor, and monoclonal antibodies against the adhesion molecule PECAM-1. *J Surg Res* 2002;105:220-233
- 24 Forsythe RM, Xu DZ, Lu Q, Deitch EA. Lipopolysaccharide-induced enterocyte-derived nitric oxide induces intestinal monolayer permeability in an autocrine fashion. *Shock* 2002;17:180-184
- 25 Gong JP, Wu CX, Liu CA, Li SW, Shi YJ, Yang K, Li Y, Li XH. Intestinal damage mediated by kupffer cells in rats with endotoxemia. *World J Gastroenterol* 2002;8:923-927
- 26 Beutler B, Krochin N, Milsark IW, Luede C, Cerami A. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. *Science* 1986;232:977-982
- 27 Beutler B, Cerami A. Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *N Engl J Med* 1987;316:379-384
- 28 Giroir BP. Mediators of septic shock: new approaches for interrupting the endogenous inflammatory cascade. *Crit Care Med* 1993;21:780-789
- 29 Wanner GA, Muller PE, Ertel W, Bauer M, Menger MD, Messmer K. Differential effect of anti-TNF-alpha antibody on proinflammatory cytokine release by Kupffer cells following liver ischemia and reperfusion. *Shock* 1999;11:391-395
- 30 Yao YM. Protective effect of monoclonal antibody of tumor necrosis factor-alpha for vital organ in a model suffering from intestinal ischemia and reperfusion injury. *Zhonghua Waik Zazhi* 1993;31:497-500
- 31 Chen HL. Exploration on essence of yang-ming fu-shi syndrome from viewpoint of traditional Chinese medicine combined with Western medicine. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 1993;13:690-691
- 32 Chen HL, Wu XZ, Gan FL. Protective effects of tongli gongxia herbs on gut barrier in rat with multiple organ dysfunction syndrome. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2000;20:120-122
- 33 Wu XZ. Traditional Chinese therapy of acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:417-418
- 34 Yue MX. Combined treatment of abdominal diseases with MODS by Chinese medicine. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:937-941

家兔回肠淋巴管铸型的扫描电镜研究

滕诚毅,王晓平,魏双艳,王广友,汤凤彩

滕诚毅,牡丹江医学院解剖教研室 黑龙江省牡丹江市 157001
王晓平,艾默尔大学细胞生物学系 美国亚特兰大 30033
魏双艳,哈尔滨医科大学保健医院内科 黑龙江省哈尔滨市 150086
王广友,汤凤彩,哈尔滨医科大学神经生物学教研室 黑龙江省哈尔滨市 150086
滕诚毅,男,1961-02-14生,黑龙江省哈尔滨人,汉族,牡丹江医学院解剖教研室
副教授,主要从事淋巴系统的研究。
国家自然科学基金资助的科研项目, No.39070462
项目负责人:汤凤彩,150086,黑龙江省哈尔滨市南岗区保健路157号,哈尔滨医
科大学神经生物学教研室。 tangfc@ems.hrbmu.edu.cn
电话:0451-6662943 传真:0451-6669576
收稿日期:2002-10-09 接受日期:2002-11-04

Lymphatic corrosion casts in rabbit ileum: scanning electronmicroscopic studies

Cheng-Yi Teng, Xiao-Ping Wang, Shuang-Yan Wei, Guang-You Wang,
Feng-Cai Tang

Cheng-Yi Teng, Department of Anatomy, Mudanjiang Medical College,
Mudanjiang 157011, Heilongjiang Province, China
Xiao-Ping Wang, Department of Cell Biology, Emory University,
Atlanta 30033, USA
Shuang-Yan Wei, Department of Internal Medicine, Health Care Hospital of
Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Guang-You Wang, Feng-Cai Tang, Department of Neurobiology,
Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Supported by the National Science Foundation of China, No.39070462
Correspondence to: Prof. Feng-Cai Tang, Department of Neurobiology,
Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province,
China. tangfc@ems.hrbmu.edu.cn
Received: 2002-10-09 Accepted: 2002-11-04

Abstract

AIM: To investigate the three-dimensional organization and fine distribution of the lymphatics in rabbit ileum.

METHODS: Lymphatic corrosion cast with the Mercor were used for scanning electron microscopy (SEM), and semithin sections were used for light microscopy. The Mercor injected intraparenchymally into ileum wall were cut and put in a concentrated NaOH solution until the tissues were corroded away, and observed under SEM.

RESULTS: The central lacteals were found in the intestinal villi. The villi of the ileum contained two to three lacteals. The central lacteals were drained into the mucosal lymphatic capillary plexus. From the plexus, the lymphatic capillary descended into the lymphatics of submucosal layer and muscular layer. Then they were led into the serosal lymphatics and drained into the lymphatics of intestine mesentery. The cast of the lymphatics showed an appearance of a string of heads and the notch corresponding to the bicuspid valve of the lymphatics.

CONCLUSION: The three-dimensional organization of central lacteals and lymphatics in the rabbit ileum is demonstrated by lymphatic corrosion casts. Numerous impressions of the

endothelial nuclei, rich central lacteals and lymphatic capillary plexus in the ileum mucosa, lymphatic capillary and lymphatics in the submucosa and muscular layer are observed on the lymphatic corrosion cast.

Teng CY, Wang XP, Wei SY, Wang GY, Tang FC. Lymphatic corrosion casts in rabbit ileum: scanning electronmicroscopic studies. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(4):446-448

摘要

目的: 观察家兔回肠淋巴管的三维结构和微细分布。

方法: 淋巴管铸型样品, 通过扫描电子显微镜进行观察; 半薄切片样品, 用光镜进行观察。淋巴管铸型剂是 Mercor, 采用回肠壁间接注射法。将注入铸型剂的回肠壁切下, 置入 NaOH 水溶液中腐蚀, 直到肠壁组织完全脱离为止, 然后将淋巴管铸型样品置于扫描电子显微镜下观察。

结果: 在小肠绒毛内清晰地显示出中央乳糜管, 每个绒毛中有 2-3 个中央乳糜管。中央乳糜管与黏膜层毛细淋巴管丛相连接。黏膜层毛细淋巴管注入黏膜下层淋巴管, 后者与肌层淋巴管相吻合。肌层淋巴管连接浆膜层淋巴管, 然后汇入小肠系膜淋巴管。淋巴管呈串珠样外观, 其表面存有双凹切迹, 该处相当于淋巴瓣的部位。铸型表面还可以见到淋巴管内皮细胞核的压迹。

结论: 淋巴管铸型清晰地显示家兔回肠壁黏膜层丰富的中央乳糜管和毛细淋巴管丛以及黏膜下层、肌层毛细淋巴管和大量的淋巴管的三维结构。

滕诚毅, 王晓平, 魏双艳, 王广友, 汤凤彩. 家兔回肠淋巴管铸型的扫描电镜研究. *世界华人消化杂志* 2003;11(4):446-448

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/446.htm>

0 引言

小肠淋巴管的形态研究, 已有不少报道^[1-19], 但对回肠壁各层毛细淋巴管、淋巴管的微细分布和各层淋巴管道的流注关系, 仍有不同观点^[1-8]。应用合成树脂 (Mercor) 制备回肠淋巴管铸型, 研究回肠壁内各层淋巴管道的立体形态和微细分布, 国内尚无报道。我们采用 Mercor 淋巴管间接注射法^[20,21], 进行淋巴管铸型, 在扫描电镜下, 观察了家兔回肠淋巴管道的立体结构。

1 材料和方法

1.1 材料 成年健康家兔 16 只, 雌雄不拘。其中 2 只制备回肠的半薄切片, 两只做回肠的石蜡组织切片, 其

余 12 只制备回肠的淋巴管铸型样品. 铸型剂是 Mercox, 为日本东京生产的一种颗粒微细而均匀的合成树脂 (Velenehospital, Tokyo, Japan).

1.2 方法 在戊巴比妥麻醉下, 打开家兔腹腔. 用 1 ml 或 2 ml 注射器, 连接特制的淋巴管注射针头, 吸入混有硬化剂 MA 的 Mercox 溶液, 在解剖显微镜下, 用手推法将 Mercox 溶液注入回肠黏膜层和黏膜下层^[5,12]. 当观察到蓝色的铸型剂已到达回肠系膜时, 切下该段回肠. 在对系膜缘打开肠腔, 进行流水冲洗, 而后黏膜面向上固定于塑料板上, 浸于生理盐水中, 置 60 温箱内 2 h. 取出样品, 依次浸入 200 g/L NaOH 水溶液和 150 g/L NaOH 水溶液中各 2 h, 当肠壁组织完全被腐蚀后, 样品经流水冲洗, 用眼科器械清除表面渗出物. 样品浸于蒸馏水中冰冻, 并切成 4 × 4 mm 的小块, 经 37 温箱干燥, 固定于扫描电镜样品台上, 进行导电处理后, 于离子喷涂器内喷金, 取加速电压 10-15KV, 于 S-520 扫描电镜下观察和摄片^[12,13]. 家兔回肠材料经透射电镜样品系列处理后, 包埋于 Epn 812 中, 做半薄切片, 次甲基蓝一天青 染色, 在光镜下进行观察.

2 结果

2.1 黏膜层的淋巴管道 在小肠绒毛黏膜上皮的深侧有中央乳糜管. 中央乳糜管起于盲端, 盲端对向回肠的腔面. 其纵轴与回肠的横径平行. 中央乳糜管呈顶端膨大(直径 70-120 μm)的杵状, 基部变细(直径 20-40 μm)后, 直接注入黏膜层毛细淋巴管丛(图 1, 2). 中央乳糜管长度 150-280 μm, 密度 6-9 个/mm². 在一个小肠绒毛内可见到 2-3 个中央乳糜管. 黏膜层的毛细淋巴管特别丰富, 其走行弯曲, 互相连续成丛(图 1), 其直径 15-20 μm. 根据半薄切片光镜的观察, 黏膜层毛细淋巴管丛位于黏膜固有层的深侧, 黏膜肌的浅方(图 3). 从黏膜层毛细淋巴管丛向深方发出许多吻合支, 穿过黏膜肌注入黏膜下层淋巴管丛(图 1).

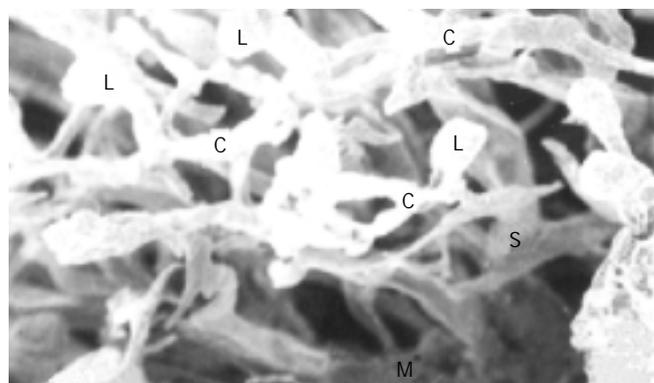


图 1 家兔回肠黏膜层的淋巴管铸型样品. SEM × 70, 标尺 = 50 μm L: 中央乳糜管; C: 毛细淋巴管丛; S: 黏膜下淋巴管; M: 肌层淋巴管.

2.2 黏膜下层、肌层和浆膜层的淋巴管道 家兔回肠黏膜下层有丰富的淋巴管, 并彼此吻合形成黏膜下淋巴

管丛, 从该丛发出侧支进入肌层, 与肌层淋巴管相交通(图 1). 肌层淋巴管注入浆膜层淋巴管, 最后汇入小肠系膜集合淋巴管. 在黏膜下层、肌层和浆膜层也见到带盲端的毛细淋巴管, 但数量较少. 在半薄切片上可以见到淋巴瓣(图 3), 在淋巴管铸型样品上, 也可见到淋巴瓣的双凹压迹及圆形或卵圆形的淋巴管内皮细胞核的压迹(图 4).

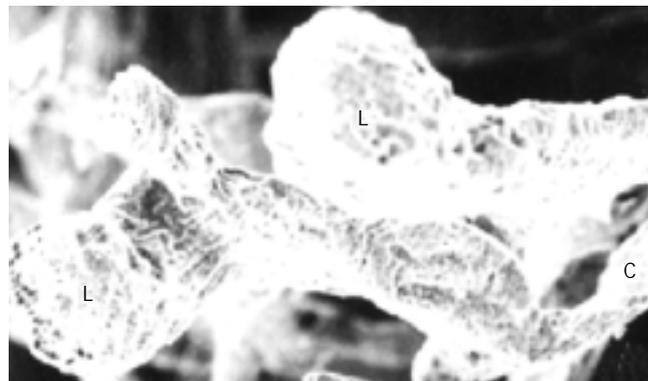


图 2 放大的中央乳糜管(L)和黏膜层毛细淋巴管(C), SEM × 250, 标尺 = 50 μm.

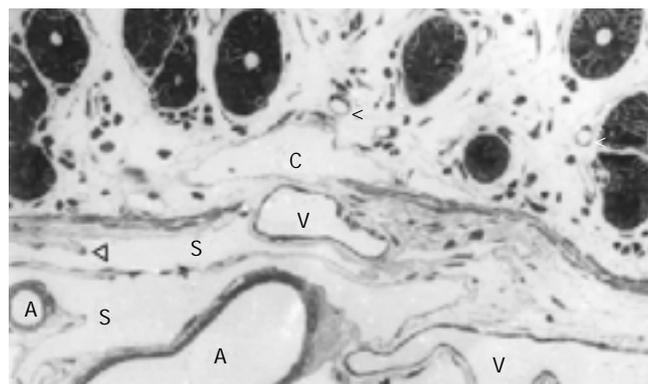


图 3 半薄切片样品. 显示黏膜层毛细淋巴管(C)、毛细血管(<), 黏膜下层淋巴管(S)、淋巴瓣()和静脉(V)、动脉(A) × 200, 标尺 = 20 μm.

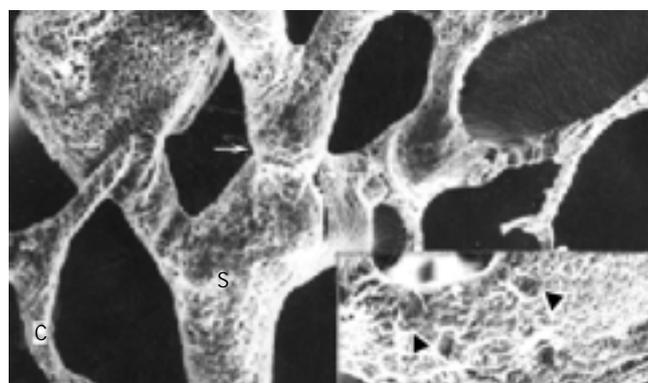


图 4 淋巴管铸型样品. 显示黏膜层毛细淋巴管(C)和较大淋巴管上淋巴瓣的双凹压迹(), 右下角的图显示淋巴管内皮细胞核的压迹() SEM × 400(右下角的图 × 800, 标尺 = 10 μm)标尺 = 50 μm.

3 讨论

以 Mercox 做铸型剂, 采用淋巴管间接注射法, 可以清晰地显示小肠器官内淋巴管的三维结构及微细分布, 这是以往其他研究方法无可比拟的^[1,20,21], 但也

必须注意在注入铸型剂时, 针尖切勿刺入大血管. 在观察和分析结果时也要与血管铸型相鉴别^[6]. 通过淋巴管铸型扫描技术及半薄切片的双重观察, 进一步证实家兔回肠具有丰富的淋巴管道^[20,21]. 本研究在家兔回肠黏膜层观察到大量的中央乳糜管和毛细淋巴管丛, 这与徐玉东 et al^[1]、郑国宝 et al^[2]的结果一致. Fukushima et al^[9]在大鼠小肠内观察到, 小肠绒毛内相邻的几个中央乳糜管的基部相互连接成窦; 本研究在家兔回肠未见到此种情况. 我们观察到家兔回肠内的中央乳糜管没有相互融合, 而是直接注入黏膜层毛细淋巴管网. 在黏膜层未有见到较粗的淋巴管, 这与有些学者^[5]的报道不同, 回肠大量的中央乳糜管、毛细淋巴管和淋巴管与小肠的吸收功能, 肠道免疫相适应^[22-31].

4 参考文献

- Xu YD, Tang FC, Zhong SQ, Hai LS, Zhang YF, Xu QJ, Wang YX. Scanning electron microscopy of jejunum lymphatic casts in rabbit. *Zhong guo Jiepo Xuebao* 1996;27:349-351.
- Zheng GB, Wang YX. Fine distribution of intramural lymphatics of small intestine. *Zhongguo Jiepo Xue* 1997;20:490-493
- Shimoda H, Kato S, Kudo T, Usui T. Lymphatic network and nerve plexus in the myenteric layer of the monkey jejunum: a topographic study using an enzyme-histochemical method. *Arch Histol Cytol* 1998;61:65-73
- Azzali G. Ultrastructure of small intestine submucosal and serosal-muscular lymphatic vessels. *Lymphology* 1982;15:106-111
- Ohtani O, Ohtsuka A. Three-dimensional organization of lymphatics and their relationship to blood vessels in rabbit small intestine. A scanning electron microscopic study of corrosion casts. *Arch Histol Jap* 1985;48:255-268
- Yamanaka Y, Araki K, Ogata T. Three-dimensional organization of lymphatics in the dog small intestine: a scanning electron microscopic study on corrosion casts. *Arch Histol Cytol* 1995; 58:465-474
- Khoo SM, Edwards GA, Porter CJ, Charman WN. A conscious dog model for assessing the absorption, enterocyte-based metabolism, and intestinal lymphatic transport of halofantrine. *J Pharm Sci* 2001;90:1599-1607
- Hokari R, Miura S, Nagata H, Fujimori H, Koseki S, Kato S, Kurose I, Sekizuka E, Granger DN, Ishii H. Intercellular cell adhesion molecule-1 regulates lymphocyte movement into intestinal microlymphatics of rat Peyer's patches. *J Leukoc Biol* 2001; 70:896-902
- Fukushima K, Sasaki I, Masuda T, Nagura H, Naito H, Funayama Y, Matsuno S. Three-dimensional structure of mucosal and submucosal lymphatics in rat small intestine. *Tohoku J Exp Med* 1998;185:9-14
- Caliph SM, Charman WN, Porter CJ. Effect of short-, medium-, and long-chain fatty acid-based vehicles on the absolute oral bioavailability and intestinal lymphatic transport of halofantrine and assessment of mass balance in lymph-cannulated and non-cannulated rats. *J Pharm Sci* 2000;89:1073-1084
- Ichikawa S, Shiozawa M, Iwanaga T, Uchino S. Immunohistochemical demonstration of peptidergic nerve fibers associated with the central lacteal lymphatics in the duodenal villi of dogs. *Arch Histol Cytol* 1991;54:241-248
- Drake RE, Abbott RD. Effect of increased neck vein pressure on intestinal lymphatic pressure in awake sheep. *Am J Physiol* 1992; 262:892-894
- Kellersman R, Zhong R, Kiyochi H, Garcia B, Grant DR. Reconstruction of the intestinal lymphatic drainage after small bowel transplantation. *Transplantation* 2000;69:10-16
- Thielke KH, Pabst R, Rothkotter HJ. Quantification of proliferating lymphocyte subsets appearing in the intestinal lymph and the blood. *Clin Exp Immunol* 1999;117:277-284
- Lowden S, Heath T. Lymphatic drainage from the distal small intestine in sheep. *J Anat* 1993;183:13-20
- Yasunaga A, Kato S, Uchida Y, Miyauchi R. Enzyme-histochemical study on the fine distribution of the intramural lymphatics at the ileocecal junction of the monkey intestine. *Okajimas Folia Anat Jpn* 1991;68:259-269
- Benoit JN, Zawieja DC. Effects of f-Met-Leu-Phe-induced inflammation on intestinal lymph flow and lymphatic pump behavior. *Am J Physiol* 1992;262:199-202
- Ichikawa S, Kyoda K, Iwanaga T, Fujita T, Uchino S. Nerve terminals associated with the central lacteal lymphatics in the duodenal and ileal villi of the monkey. *Acta Anat (Basel)* 1993; 146:14-21
- Ichikawa S, Sreedharan SP, Goetzl EJ, Owen RL. Immunohistochemical localization of peptidergic nerve fibers and neuro-peptide receptors in Peyer's patches of the cat ileum. *Regul Pept* 1994;54:385-395
- Tang FC, Wang YX, Han MD, Li YL, Hai LS. Observation of the corrosion casts of stomach lymphatics in the rabbit. *Acta Anatomica Sinica* 1992;23:333-336
- Tang FC, Zhang YF, Xu YD, Zhong SQ, Wang XP, Wang YX. Scanning electron microscopic studies of lymphatic corrosion casts in the rabbit appendix. *China Natl J New Gastroenterol* 1996;2:238-240
- Tsilibary EC, Wissig SL. Lymphatic absorption from the peritoneal cavity: regulation of patency of mesothelial stomata. *Microvasc Res* 1983;25:22-39
- Leak LV, Burke JF. Fine structure of the lymphatic capillary and the adjoining connective tissue area. *Am J Anat* 1966;118:785-809
- Dobbins WO, Rollins EL. Intestinal mucosal lymphatic permeability: An electron microscopic study of endothelial vesicles and cell junctions. *J Ultrastruc Res* 1970;33:29-59
- Sacchi G, Weber E, Agliano M, Comparini L. Subendothelial nerve fibers in bovine mesenteric lymphatics: An ultrastructural and immunohistochemical study. *Lymphology* 1994;27:90-96
- Guarna M, Pucci AM, Alessandrini C, Volpi N, Fruschelli M, D'Antona D, Fruschelli C. Peptidergic innervation of mesenteric lymphatics in guinea pigs: An immunocytochemical and pharmacological study. *Lymphology* 1991;24:161-164
- McHale NG, Roddie IC. The effect of transmural pressure on pumping activity in isolated bovine lymphatic vessels. *J Physiol* 1976;261:255-269
- Alessandrini C, Gerli R, Sacchi G, Ibba L, Pucci AM, Fruschelli C. Cholinergic and adrenergic innervation of mesenteric lymph vessels in guinea pig. *Lymphology* 1981;14:1-6
- Nikles SA, Heath TJ. Pathways of lymph flow through intestinal lymph nodes in the horse. *Anat Rec* 1992;232:126-132
- Lowden S, Heath T. Ileal Peyer's patches in pigs: intercellular and lymphatic pathways. *Anat Rec* 1994;239:297-305
- Serizawa H, Miura S, Tashiro H, Imaeda H, Shiozaki H, Ohkubo N, Kimura H, Tanaka S, Tsuchiya M. Alteration of mucosal immunity after long-term ingestion of an elemental diet in rats. *J Parenter Enteral Nutr* 1994;18:141-147

酵母单杂交技术的原理及应用

马守东,洪源,成军

马守东,洪源,成军,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
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:2002-10-29 接受日期:2002-11-18

马守东,洪源,成军. 酵母单杂交技术的原理及应用. 世界华人消化杂志 2003; 11(4):450-451
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/450.htm>

0 引言

酵母单杂交(yeast one hybrid)技术是体外分析DNA与细胞内蛋白质相互作用的一种方法,通过对酵母细胞内报告基因表达状况的分析,来鉴别DNA结合位点并发现潜在的结合蛋白基因,或对DNA结合位点进行分析.运用此技术,能筛选到与DNA结合的蛋白质,并可直接从基因文库中得到编码该蛋白质的核苷酸序列,而无需复杂的蛋白质分离纯化操作,故在蛋白研究中,具有一定的优势;而且,酵母属真核细胞,通过酵母系统得到的结果比其他体外技术获得的结果更能体现真核细胞内基因表达调控的真实情况.

1 酵母单杂交技术的原理

酵母单杂交技术最早是1993年由Li et al^[1,2]从酵母双杂交技术发展而来,酵母双杂交技术通过对报告基因的表达型进行检测以实现蛋白质间相互作用的研究^[3-6],而酵母单杂交技术则通过对报告基因的表达型检测,分析DNA、蛋白之间的相互作用,以研究真核细胞内的基因表达调控.

目前认为真核生物的转录起始需要转录因子的参与.这些转录因子通常由一个DNA特异性结合功能域和一个或多个与其他调控蛋白相互作用的激活功能域组成,即DNA结合结构域(DNA-binding domain, BD)和转录激活结构域(activation domain, AD).用于酵母单杂交系统的酵母GAL4蛋白即是一种典型的转录因子.研究^[2]表明GAL4的DNA结合结构域靠近羧基端,含有几个锌指结构,可激活酵母半乳糖苷酶的上游激活位点(UAS);而转录激活结构域可与RNA聚合酶或转录因子TFIID相互作用,提高RNA聚合酶的活性.在这一过程中,DNA结合结构域和转录激活结构域可完全独立地发挥作用.据此,我们可将GAL4的DNA结合结构域置换为其他蛋白,只要他能与我们想要了解的目的基因相互作用,就照样可以通过其转录激活结构域激活RNA聚合酶,从而启动对下游报告基因的转录.正是基于这一

理论,酵母单杂交系统由2部分组成:(1)将文库蛋白片段与GAL4转录激活域融合表达的cDNA文库质粒;(2)含有目的基因和下游报告基因的质粒.在实验中,首先将报告质粒整合入酵母基因组,产生带有目的基因的酵母报告株;再将文库质粒转化入报告株;若存在文库蛋白与目的基因的相互作用,可通过对报告基因的表达将文库蛋白的基因筛选出来.

2 酵母单杂交技术的应用

酵母单杂交技术是建立在许多真核转录因子在结构和功能上是由独立的DNA结合结构域和DNA激活结构域组成的基础上,这使得研究者可以构建不同的基因融合体,在酵母中表达融合蛋白,以同时结合特异的目的基因和激活转录.理论上,在酵母单杂交技术中,任何目的基因都可捕获能与目标因子特异结合的蛋白^[2].

目前,酵母单杂交技术的应用可以归纳为以下二类:

2.1 鉴别DNA结合位点,并发现潜在的结合蛋白基因
目前对于酵母单杂交技术的应用主要体现在这方面. Chew et al^[7]应用酵母单杂交技术证实了在大鼠脑中存在的COUP-TF、EAR2和NURR1等蛋白质是GRIK5基因的内含子结合蛋白,从而进一步验证了多种核孤儿受体可通过与内含子序列结合发挥其调控神经递质受体基因作用的假设. Wei et al^[8]1999年运用此技术确定了特异性结合于海胆胚胎孵化酶(SpHE)基因调控区域的反式激活因子SpEst4. Sieweke et al^[9]运用酵母单杂交技术对转录辅助因子进行了筛选. Huang et al^[10]为分离与人 β -珠蛋白基因上游沉默子片段相互作用的蛋白,运用酵母单杂交技术,利用人肝cDNA文库进行筛选,得到能与其结合的蛋白RPL3(ribosomal protein L3),并通过电泳迁移率变动实验(EMSA)和竞争抑制实验证实其确有结合该沉默子活性,进而说明RPL3通过与人 β -珠蛋白基因上游沉默子结合,在胚胎阶段的沉默人 β -珠蛋白基因表达中扮演了重要角色. Liao et al^[11]于2002年运用酵母单杂交技术筛选出了能与大鼠谷胱甘肽S-转移酶(GST)P增强子GPE核心序列相互作用的转录因子,经对2个阳性克隆pYGPE1和pYGPE2的鉴定发现pYGPE1的插入片段与大鼠原癌基因c-jun cDNA具有99%同源性,其编码的氨基酸残基序列与大鼠c-jun蛋白具有100%同源性,pYGPE2的插入片段与大鼠线粒体腺苷酸转位酶cDNA具有99%同源性,其编码的氨基酸序列与大鼠腺苷酸转位酶具有100%同源性,并由此得出结论c-jun蛋白和线粒体腺苷酸转位酶可能是作用于GPE的反式激活因子.

2.2 对DNA结合结构域进行分析
如果能得到DNA结合结构域的结构信息,就可以用酵母单杂交技术对该结构域进行分析^[2].早在1993年,就有人^[12,13]用酵母单杂交技术对2个不同的锌指蛋白的DNA结合结构域进行了分析. Lisowsky et al^[14]在1999年使用酵母单杂交技术,利用一个“GC”富集区序列筛选出一种新的具有转

录激活活性的锌指蛋白, 由于其结合的序列富含“GC”, 故命名为 GC-box 结合蛋白. Mak et al^[15]运用此技术测试哺乳动物具有基本的螺旋-环-螺旋(bHLH)结构的转录因子,通过对肌调节因子4(MRF4)的研究,证实它具有转录活性,并进一步证明运用酵母单杂交技术能在哺乳动物 cDNA 文库中筛选出与 E-box DNA 相互作用的新的 bHLH 蛋白. Nishiyama et al^[16]运用酵母单杂交技术并结合点突变方法对转录活性片段 Elf-1 进行分析,确定具有转录活性的区域位于第 87-175 碱基区.

3 存在问题及解决办法

3.1 在鉴别 DNA 结合位点中存在的缺陷 由于细胞技术的先天局限性,即影响因子多,因此,可能有内源性的酵母表达激活物与 DNA 结合位点结合,并激活报告基因的表达,则相应的目的基因片段可能因此而被漏检.这个问题在试图鉴定某基因组中所有的 DNA 结合位点时就会暴露出来.此缺陷的补救需要一个更加随机的文库.例如,可以用含有更多的已突变的片段构建一个随机剪切的 DNA 片段库.另一个比较关心的问题就是此技术的检测灵敏度,有报道^[2]显示此系统对于 HIS3 基因表达是非常灵敏的,即使是很弱的、甚或非特异性的相互作用都能被检测到,这些非特异的相互作用可通过其他技术^[2]避免,但这也可能导致此方法灵敏度的过度下降.

3.2 在 DNA 结合结构域分析中存在的缺陷 用酵母单杂交技术分析突变导致 DNA 结合结构域改变的局限在于此方法的灵敏度依靠 DNA 结合结构域功能选择,只有当突变影响了 DNA 结合结构域的功能时,才能被发现.改进的方法是在培养基中选择合适的半乳糖浓度^[2],以减少杂交激活子的激活活性,或用不同的阴性对照等方法.

总之,随着生物化学及分子生物学技术的不断发展,越来越多的大分子间相互作用被人们所认识,这将有助于人们阐明生物体内各种生物学过程的发生情况,并可能由此发现新的基因工程药物.酵母单杂交技术作为一种研究生物大分子间的相互作用的体外、细胞内技术,从 1993 年发展至今,已有近 10 a 时间,虽然有关的报道不是很多,但在生物学研究领域,特别是在研究 DNA-蛋白质相互作用方面他还是显示出了巨大的应用潜力,而且,由酵母单杂交技术衍生出的反向单杂交技术及单-双杂交技术更是拓宽了其应用范围^[17].运用酵母单杂交技术不但可以验证许多已知的 DNA-蛋白质间相互作用,而且可以发现新的 DNA-蛋白质间相互作用,并由此发现新的基因.相信随着酵母单杂交技术的不断发展和完善,必将在科研、临床及生产中得到更加广泛的应用.

4 参考文献

- 1 Li JJ, Herskowitz I. Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. *Science* 1993;262:1870-1873
- 2 Liu JD, Wilson TE, Milbrandt J, Johnston M. Identifying DNA-

- binding sites and analyzing DNA-binding domains using a yeast selection system. *Methods* 1993;5:125-137
- 3 Alexander MK, Bourns BD, Zakian VA. One-hybrid systems for detecting protein-DNA interactions. *Methods Mol Biol* 2001; 177:241-259
- 4 Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9578-9582
- 5 Chevray P, Nathans D. Protein interaction cloning in yeast: identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:5789-5793
- 6 Dalton S, Treisman R. Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. *Cell* 1992;68:597-612
- 7 Chew LJ, Huang F, Boutin JM. Identification of nuclear orphan receptors as regulators of expression of a neurotransmitter receptor gene. *J Biol Chem* 1999;274:29366-29375
- 8 Wei Z, Angerer RC, Angerer LM. Identification of a new sea urchin ets protein, SpEts4, by yeast one-hybrid screening with the hatching enzyme promoter. *Mol Cell Biol* 1999;19:1271-1278
- 9 Sieweke M. Detection of transcription factor partners with a yeast one hybrid screen. *Methods Mol Biol* 2000;130:59-77
- 10 Huang J, Hou CH, Qian RL. Screening of genes related to the expression of human epsilon-globin Gene by using yeast one-hybrid system. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao* 2001;33:246-250
- 11 Liao MX, Liu DY, Zuo J, Fang FD. Yeast one-hybrid system used to identify the binding proteins for rat glutathione S-transferase P enhancer I. *Biomed Environ Sci* 2002;15:36-40
- 12 Wilson TE, Day ML, Pexton T, Padgett KA, Johnston M, Milbrandt J. In vivo mutational analysis of the NGFI-A zinc fingers. *J Biol Chem* 1992;267:3718-3724
- 13 Wilson TE, Padgett KA, Johnston M, Milbrandt J. A genetic method for defining DNA-binding domains: application to the nuclear receptor NGFI-B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90: 9186-9190
- 14 Lisowsky T, Polosa PL, Sagliano A, Roberti M, Gadaleta MN, Cantatore P. Identification of human GC-box-binding zinc finger protein, a new Kruppel-like zinc finger protein, by the yeast one-hybrid screening with a GC-rich target sequence. *FEBS Lett* 1999;453:369-374
- 15 Mak KL, Longcor LC, Johnson SE, Lemercier C, To RQ, Konieczny SF. Examination of mammalian basic helix-loop-helix transcription factors using a yeast one-hybrid system. *DNA Cell Biol* 1996;15:1-8
- 16 Nishiyama C, Takahashi K, Ohtake Y, Yokota T, Okumura K, Ogawa H, Ra C. Analysis of transactivation region of Elf-1 by using a yeast one-hybrid system. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002;66:1105-1107
- 17 廖名湘,方福德. 酵母单杂交体系 - 一种研究 DNA-蛋白质相互作用的有效方法. *中国医学科学院学报* 2000;22:388-391

酵母双杂交系统的原理及应用

陈天艳,成军,张树林

陈天艳,成军,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,全军病毒性肝炎研究重点实验室 北京市 100039
张树林,西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
项目负责人:成军,100039,北京市,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. cj@genetherapy.com.cn
电话:010-66933391 传真:010-63801283
收稿日期:2002-10-29 接受日期:2002-11-18

陈天艳,成军,张树林. 酵母双杂交系统的原理及应用. *世界华人消化杂志* 2003;11(4):451-455

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/451.htm>

录激活活性的锌指蛋白, 由于其结合的序列富含“GC”, 故命名为 GC-box 结合蛋白. Mak et al [15] 运用此技术测试哺乳动物具有基本的螺旋-环-螺旋(bHLH)结构的转录因子, 通过对肌调节因子 4(MRF4)的研究, 证实它具有转录活性, 并进一步证明运用酵母单杂交技术能在哺乳动物 cDNA 文库中筛选出与 E-box DNA 相互作用的新的 bHLH 蛋白. Nishiyama et al [16] 运用酵母单杂交技术并结合点突变方法对转录活性片段 Elf-1 进行分析, 确定具有转录活性的区域位于第 87-175 碱基区.

3 存在问题及解决办法

3.1 在鉴别 DNA 结合位点中存在的缺陷 由于细胞技术的先天局限性, 即影响因子多, 因此, 可能有内源性的酵母表达激活物与 DNA 结合位点结合, 并激活报告基因的表达, 则相应的目的基因片段可能因此而被漏检. 这个问题在试图鉴定某基因组中所有的 DNA 结合位点时就会暴露出来. 此缺陷的补救需要一个更加随机的文库. 例如, 可以用含有更多的已突变的片段构建一个随机剪切的 DNA 片段库. 另一个比较关心的问题就是此技术的检测灵敏度, 有报道^[2]显示此系统对于 HIS3 基因表达是非常灵敏的, 即使是很弱的、甚或非特异性的相互作用都能被检测到, 这些非特异的相互作用可通过其他技术^[2]避免, 但这也可能导致此方法灵敏度的过度下降.

3.2 在 DNA 结合结构域分析中存在的缺陷 用酵母单杂交技术分析突变导致 DNA 结合结构域改变的局限在于此方法的灵敏度依靠 DNA 结合结构域功能选择, 只有当突变影响了 DNA 结合结构域的功能时, 才能被发现. 改进的方法是在培养基中选择合适的半乳糖浓度^[2], 以减少杂交激活子的激活活性, 或用不同的阴性对照等方法.

总之, 随着生物化学及分子生物学技术的不断发展, 越来越多的大分子间相互作用被人们所认识, 这将有助于人们阐明生物体内各种生物学过程的发生情况, 并可能由此发现新的基因工程药物. 酵母单杂交技术作为一种研究生物大分子间的相互作用的体外、细胞内技术, 从 1993 年发展至今, 已有近 10 a 时间, 虽然有关的报道不是很多, 但在生物学研究领域, 特别是在研究 DNA-蛋白质相互作用方面他还是显示出了巨大的应用潜力, 而且, 由酵母单杂交技术衍生出的反向单杂交技术及单-双杂交技术更是拓宽了其应用范围^[17]. 运用酵母单杂交技术不但可以验证许多已知的 DNA-蛋白质间相互作用, 而且可以发现新的 DNA-蛋白质间相互作用, 并由此发现新的基因. 相信随着酵母单杂交技术的不断发展和完善, 必将在科研、临床及生产中得到更加广泛的应用.

4 参考文献

- 1 Li JJ, Herskowitz I. Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. *Science* 1993;262:1870-1873
- 2 Liu JD, Wilson TE, Milbrandt J, Johnston M. Identifying DNA-

- binding sites and analyzing DNA-binding domains using a yeast selection system. *Methods* 1993;5:125-137
- 3 Alexander MK, Bourns BD, Zakian VA. One-hybrid systems for detecting protein-DNA interactions. *Methods Mol Biol* 2001; 177:241-259
- 4 Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9578-9582
- 5 Chevray P, Nathans D. Protein interaction cloning in yeast: identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:5789-5793
- 6 Dalton S, Treisman R. Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. *Cell* 1992;68:597-612
- 7 Chew LJ, Huang F, Boutin JM. Identification of nuclear orphan receptors as regulators of expression of a neurotransmitter receptor gene. *J Biol Chem* 1999;274:29366-29375
- 8 Wei Z, Angerer RC, Angerer LM. Identification of a new sea urchin ets protein, SpEts4, by yeast one-hybrid screening with the hatching enzyme promoter. *Mol Cell Biol* 1999;19:1271-1278
- 9 Sieweke M. Detection of transcription factor partners with a yeast one hybrid screen. *Methods Mol Biol* 2000;130:59-77
- 10 Huang J, Hou CH, Qian RL. Screening of genes related to the expression of human epsilon-globin Gene by using yeast one-hybrid system. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao* 2001;33:246-250
- 11 Liao MX, Liu DY, Zuo J, Fang FD. Yeast one-hybrid system used to identify the binding proteins for rat glutathione S-transferase P enhancer I. *Biomed Environ Sci* 2002;15:36-40
- 12 Wilson TE, Day ML, Pexton T, Padgett KA, Johnston M, Milbrandt J. In vivo mutational analysis of the NGFI-A zinc fingers. *J Biol Chem* 1992;267:3718-3724
- 13 Wilson TE, Padgett KA, Johnston M, Milbrandt J. A genetic method for defining DNA-binding domains: application to the nuclear receptor NGFI-B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90: 9186-9190
- 14 Lisowsky T, Polosa PL, Sagliano A, Roberti M, Gadaleta MN, Cantatore P. Identification of human GC-box-binding zinc finger protein, a new Kruppel-like zinc finger protein, by the yeast one-hybrid screening with a GC-rich target sequence. *FEBS Lett* 1999;453:369-374
- 15 Mak KL, Longcor LC, Johnson SE, Lemercier C, To RQ, Konieczny SF. Examination of mammalian basic helix-loop-helix transcription factors using a yeast one-hybrid system. *DNA Cell Biol* 1996;15:1-8
- 16 Nishiyama C, Takahashi K, Ohtake Y, Yokota T, Okumura K, Ogawa H, Ra C. Analysis of transactivation region of Elf-1 by using a yeast one-hybrid system. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002;66:1105-1107
- 17 廖名湘, 方福德. 酵母单杂交体系 - 一种研究 DNA-蛋白质相互作用的有效方法. *中国医学科学院学报* 2000;22:388-391

酵母双杂交系统的原理及应用

陈天艳, 成军, 张树林

陈天艳, 成军, 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, 全军病毒性肝炎研究重点实验室 北京市 100039
张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
项目负责人: 成军, 100039, 北京市, 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. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2002-10-29 接受日期: 2002-11-18

陈天艳, 成军, 张树林. 酵母双杂交系统的原理及应用. *世界华人消化杂志* 2003;11(4):451-455

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/451.htm>

0 引言

蛋白质和蛋白质的相互作用是很多生命现象的基础. 随着分子生物学技术的发展,特别是人类基因组计划的完成,使人类对基因的结构和功能的认识不断加深,但基因编码的蛋白质的功能研究尚是一个难题. 酵母双杂交(yeast two hybrid)技术是利用酵母遗传学方法分析蛋白质之间的相互作用,该方法建立以来,经过不断的完善和发展,不但可以检测已知蛋白质之间的相互作用,更重要的在于发现新的与已知蛋白相互作用的未知蛋白.

1 酵母双杂交技术的基本思想

酵母双杂交由 Fields et al^[1]在 1989 年提出. 他的产生是基于对真核细胞转录因子特别是酵母转录因子 GAL4 性质的研究. GAL4 包括两个彼此分离的但功能必需的结构域. 位于 N 端 1-174 位氨基酸残基区段的 DNA 结合域(DNA binding domain, DNA-BD)和位于 C 端 768-881 位氨基酸残基区段的转录激活域(Activation domain, AD). DNA-BD 能够识别位于 GAL4 效应基因(GAL4-responsive gene)的上游激活序列(Upstream activating sequence, UAS),并与之结合. 而 AD 则是通过与转录机构(transcription machinery)中的其他成分之间的结合作用,以启动 UAS 下游的基因进行转录. DNA-BD 和 AD 单独分别作用并不能激活转录反应,但是当二者在空间上充分接近时,则呈现完整的 GAL4 转录因子活性并可激活 UAS 下游启动子,使启动子下游基因得到转录.

Fields et al 建立了一个双杂交系统, DB 与 X 蛋白融合, AD 与 Y 蛋白融合,如果 X、Y 之间形成蛋白-蛋白复合物,使 GAL4 两个结构域重新构成,启动特异基因序列的转录. 他们利用 Snf1 与 Snf4 的相互作用,将 Snf1 与 DB 融合, Snf4 与 AD 融合,构建在穿梭质粒上. 其中 Snf1 是一种依赖于丝氨酸、苏氨酸的蛋白激酶, Snf4 是他的一个结合蛋白. 研究者将二种穿梭质粒转化酵母 GGY:171 菌株,该菌株含有 LacZ 报告基因,并已去除相应转录因子基因. 该实验的结果表明由 Snf1 和 Snf4 相互作用使得 AD 和 BD 在空间上接近,激活了报告基因 LacZ 的转录. 一般地,将 DB-X 的融合蛋白称作诱饵(bait),X 往往是已知蛋白, AD-Y 称作猎物(pre),能显示诱饵和猎物相互作用的基因称报告基因,通过对报告基因的检测,反过来可判断诱饵和猎物之间是否存在相互作用.

2 酵母双杂交技术的改进和发展

酵母双杂交系统的出现,为研究蛋白质之间的相互作用提供了很好的工具,但这一技术也存在着许多缺陷,如假阳性和假阴性,检测敏感度不高,通过不断的改进,提高了双杂交系统的灵敏度和特异性. (1)酵母接合型的引入: Bendixen et al^[2]通过酵母接合型的引用,避免了两次转化操作,同时又提高了双杂交的效率. 在酵母有

性生殖过程中涉及到二种配合类型:a 接合型和 接合型,这二种单倍体之间接合能形成二倍体细胞,根据酵母有性生殖这一特点,他们将文库质粒转化 接合型酵母细胞,“诱饵”表达载体转化 a 接合型细胞. 然后分别铺筛选平板使细胞长成菌苔,再将二种菌苔复印到同一个三重筛选平板上,只有诱饵和靶蛋白发生了相互作用的二倍体细胞才能在此平板上生长. 单倍体细胞或虽然是二倍体细胞但 DB 融合蛋白和 AD 融合蛋白不相互作用的都被淘汰. 阳性克隆则进一步通过 β -半乳糖苷酶活力进行鉴定. 这项改进不仅简化了实验操作,而且也提高了双杂交的筛选效率. Fromont-Racine et al^[3]则是把二种细胞直接在滤膜上混合,然后铺到选择性平板上,避免了繁琐的复印操作,使工作效率进一步提高. (2)诱饵表达载体:常用的有二种,酵母细胞的 GAL4 和来自大肠杆菌的 LexA,二者的差别在于 LexA 不具有核定位序列.(3)猎物表达载体:酵母 GAL4 的转录激活域;来自单纯疱疹病毒的 VP16,其转录活性较高;来自大肠杆菌的 B42 转录活性弱,但可缓和有毒性的基因表达对细胞的影响.(4)报告基因多样化:在酵母双杂交系统建立的初期阶段,由于仅仅采用 β -半乳糖苷酶这一单一的报告基因体系,而这种报告基因的表达往往不能十分严谨地加以控制,因此容易产生一些假阳性,灵敏度也不高. 现大多数酵母双杂交系统利用酵母营养缺陷特点引入额外的报告基因,如广泛采用的 HIS3 基因. 经过改造的带有 HIS3 报告基因的酵母细胞,只有当 HIS3 被启动表达才能在缺乏组氨酸的选择性培养基上生长, HIS3 报告基因的转录表达是由“诱饵”和“猎物”的相互作用所启动的. James et al^[4]于 1996 年构建了 PJ69-4A 菌株,内含三种不同的报告基因(ADE2、HIS3 和 LacZ),分别受三种不同的启动子(GAL2、GAL1 和 GAL7)调控,而这三种不同的启动子都由 GAL4 激活,该菌株可灵敏地检测出很弱的结合作用,又显著地消除了假阳性.

此后,研究人员在 Fields et al 的酵母双杂交原理基础上创建了很多新的方法和系统,使检测范围扩大,不仅能检测蛋白的相互作用,而且还能研究 RNA、DNA 与蛋白质的相互作用. 下面将感兴趣的几个系统给予介绍.

在酵母双杂交系统中, BD-X 与 AD-Y 在酵母细胞核内发生相互作用,表达的融合蛋白需定向到核内来激活报告基因的转录,这就可能限制了大量非核内蛋白质如膜受体蛋白质,细胞外分泌蛋白质等在此系统中的应用. Aronheim et al^[5]将蛋白间相互作用场所从核内转移到酵母细胞膜上进行,构建了 Sos 恢复系统(Sos recruitment system, SRS). 基本思想如下:人的鸟苷酸交换因子(guanyl nucleotide exchange factor, GEF)-Sos 蛋白是一种胞质蛋白,而酵母的鸟苷酸交换因子-cdc25 蛋白定位在内膜上,可将相关受体信号传导给 Ras 蛋白. 酵母细胞的一种温度敏感菌株-ras 途径突变体由于缺乏鸟苷酸交换因子 cdc25,而不能将外来信号传递给膜上的 Ras 蛋白,致使该酵母突变体在 36[°]C 不能存活,如果人为引入正常

的 GEF(Sos 蛋白), 并且使得 GEF 能与 Ras 蛋白足够接近, 则可以弥补这一缺陷. 为此, Aronheim et al 将 GEF 蛋白与蛋白质 X 融合, 将蛋白质 Y 与豆蔻酰化信号相连, 使 Y 定位于膜上. 这样, 若 X 与 Y 结合, X 连同的蛋白(GEF)就会定位于膜上, 从而得以靠近膜上的 Ras 蛋白, 激活 ras 途径, 完成 Sos 过程, 在 36 生长. 这一系统的提出大大扩展了经典杂合系统的探索领域, 而且冲破了许多局限. 使一些不基于转录读出的转录激活因子和抑制因子能够利用该技术进行研究, 许多蛋白质在胞质内表达可能比在核内更有生理功能, 一些蛋白的表达对酵母有毒性, 蛋白和 Sos 融合后毒性则可以减弱. 利用该技术 Aronheim et al 找到了 c-Jun 的两个新的作用蛋白 JDP1 和 JDP2.

此后, Hubsman et al^[6]构建了 RRS 系统(reverse ras recruitment system). 将诱饵蛋白定位于膜上, 而猎物“prey”则与胞质中的突变体融合, 从而进一步扩大了应用范围. 目前酵母双杂交系统主要还是以酵母细胞核做为相互作用的反应场所, 外源基因的转录、翻译、蛋白产物的修饰、折叠及细胞内定位等过程是在酵母细胞中完成的. 但酵母毕竟是一种低等的真核生物, 他的各种生物学功能, 尤其是蛋白质的翻译后修饰如 N 端糖基化, 二硫键形成等的水平还很难与高等真核生物相比拟. 因此要进一步研究蛋白质产物的生物学功能, 还必须建立高等生物体系的双杂交系统. 近几年来, 已初步建立了哺乳动物细胞双杂交系统^[7,8]. 在此系统中, 采用单纯疱疹病毒的 VP16 编码区取代 GAL4 的 AD 区段, 同时又引入另一个含有氯霉素乙酰转移酶(chloramphenicol acetyltransferase, CAT)报告基因的表达载体, 其活性可以在细胞提取物中检测, 采用磷酸钙共沉淀法, 转入 HeLa 细胞中进行培养. 该系统成功地验证了小鼠 p53 蛋白与 SV40 大 T 抗原间的蛋白质相互作用, 得到了和酵母双杂交技术相同的结果, 在哺乳动物细胞中能更好的模仿体内蛋白-蛋白的相互作用. Rossi et al^[9]利用 β -半乳糖苷酶构建的杂合体系成功地在成肌细胞中得到表达, 并检测了 FRAP 与 FKBP12 二种蛋白质之间的相互作用.

另外, 研究蛋白质的结构功能特点、作用方式过程, 有时还要通过突变、加抑制剂等手段破坏蛋白质间的相互作用. Vidal et al^[10]发展了逆双杂交系统(reverse two-hybrid system). 其关键是报告基因 URA3 的引入. URA3 基因编码的酶是尿嘧啶合成的关键酶. 该酶能把 5-氟乳清酸(5-FOA)转化成对细胞有毒的物质. Vidal et al 通过改造 URA3 基因的启动子内引入 GAL4 的结合位点. 只有当“诱饵”和“猎物”相互作用激活 URA3 基因的表达时, 这个改造的酵母菌株才能在缺乏尿嘧啶的选择性培养基上生长. 但在含有 5-FOA 的完全培养基上, “诱饵”和“猎物”的相互作用则抑制细胞的生长. 然而如果目的蛋白, 即与 DB 或 AD 融合的蛋白质发生了突变或者由于外加药物的干扰不再相互作用, URA3 基因不表达,

则细胞能在含有 5-FOA 的完全培养基上生长. 通过这种方法, Vidal et al 筛选到了转录因子 E2F1 的突变物, 这些突变物仍然能结合视网膜母细胞瘤蛋白 RB, 但是丧失了同另外一种称为 DP1 蛋白的结合能力, 结果得到了体外结合实验的验证. 通过对这些突变蛋白基因的测序, 他们又发现了新的 E2F1 同 DP1 结合的位点.

此外, 酵母单杂交技术研究蛋白质和 DNA 的相互作用, 小配体三杂交则研究受体与有机小配体之间的作用, RNA 三杂交系统则分析 RNA 与蛋白之间相互作用^[11,12].

3 应用

自酵母双杂交系统建立以来, 得到了迅速发展, 成为蛋白质研究工作中有力的工具. 人类基因计划的即将完成, 随之而来的是基因功能的研究, 特别是基因表达蛋白质功能的研究更为重要. 生物体内多种蛋白质的相互作用, 形成复杂的调节网络, 在很大程度上决定细胞内信息系统, 信号转导及细胞周期调节. 已有学者应用酵母双杂交技术对酵母基因组学进行研究^[13], 这将为今后大规模的人类基因组学研究探索方法, 积累经验. 另外, 病原体蛋白和机体蛋白质之间的相互作用也是疾病发生、发展的物质基础. 深入研究这些相互作用对于揭示某些疾病如病毒性肝炎、艾滋病等的发病机制, 寻找可能的新的治疗方法有重要意义. 下面仅将这方面的研究工作做一简要介绍.

乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)感染可引起慢性肝炎、肝硬化、肝肿瘤, 严重危害着人民群众的健康. 但目前致病机制尚未完全阐明, 治疗研究进展缓慢. 病毒蛋白与肝细胞蛋白之间相互作用是病毒致病的关键之一, 通过与肝细胞中的许多蛋白质的相互作用, 介导病毒进入肝细胞, 改变这些蛋白质的活性功能, 进一步调节改变细胞功能, 影响病毒复制, 造成机体免疫功能失调, 慢性化及肿瘤的发生.

目前鉴定的与 HBV 不同蛋白相互作用的蛋白质有十几种. 其中 HBxAg 作用复杂, 有反式激活作用, 研究较多. 1995 年 Fischer et al^[14]用酵母双杂交方法, 克隆了与其他生物 28 kD 亚单位相似的蛋白质序列可以和 HBxAg 结合. HBxAg 结合到特殊的蛋白酶体亚单位, 干扰其降解过程, 提示 HBxAg 对转录过程的作用可能是间接的. 而与这个 28 kD 的蛋白酶体亚单位结合可能提示 HBxAg 具有多重功能. Hu et al^[15]认为 HBxAg 既是蛋白酶体复合体的底物又是潜在的抑制因子, 他们用酵母双杂交技术等方法证明, HBxAg 可以和 26 S 蛋白酶体的两个亚单位结合. 在 HepG2 细胞中表达 HBxAg 降低蛋白酶体的糜蛋白酶及胰酶样活性以及被辅酶 Q 结合的溶菌酶的水解, 表明了 HBxAg 可作为蛋白酶体的抑制因子. 这可能是 HBV 感染的重要特性, 其机制可能是帮助稳定病毒基因产物和抑制抗原提呈. Zhang et al^[16]描绘了 HBxAg 和蛋白酶体相互作用的结构和功能. 用酵

母双杂交的方法鉴定了蛋白酶体亚单位 PSMA7 与 HBxAg 特异相互作用. 又证实与 PSMC1(19S 蛋白酶组分的 ATPase 样亚单位)的相互作用. 与 PSMA7 和 PSMC1 相互作用的 HBxAg 的关键序列对 X 蛋白作为转录辅助因子功能很重要. PSMC1 的过度表达在哺乳动物细胞中似乎抑制各种报告基因的表达,但可以被 HBxAg 的过度表达所克服. 另外, HBxAg 的表达抑制了细胞中 c-Jun 和辅酶 Q-精氨酸- β -半乳糖苷酶的周转,这两个是已知的辅酶 Q-蛋白酶通路的底物. 研究提示蛋白酶体复合体是 HBxAg 的细胞靶位的功能基础. Lee et al [17]则证实 HBxAg 可以和可能的细胞 DNA 修复蛋白结合. 他们用酵母双杂交技术方法证明一种蛋白(X-associated protein 1, XAP-1)与 HBxAg 有相互作用,此蛋白与 UV 损伤 DNA 结合蛋白(UV-DDB)同源(来自猴细胞文库),UV-DDB 可能涉及 DNA 修复, X 蛋白和此蛋白相互作用可在一定程度上解释乙型肝炎病毒双链的修复以及修饰细胞转录过程,解释了 HBV 在肝癌发生过程中起到辅助因子的作用. Barak et al [18]研究了 HBxAg 和人免疫缺陷病毒(HIV)的 Tat 结合蛋白 1(Tbp1)的相互作用,应用基于胞质的酵母双杂交筛选鉴定出 Tbp1,一个新的与 HBxAg 相互作用蛋白. Tbp1 在酵母和动物细胞内均和 HBxAg 有相互作用. HBxAg 和 Tbp1 相互作用具有功能性意义调节 HBV 转录. Tbp1 同源物如 Sug1,是蛋白酶 19 S 调节帽颗粒的已知成员,涉及转录共激活. Tbp1 和 Sug1 与多重病毒效应蛋白包括 HIV Tat、SV40 大 T 抗原和腺病毒 E1A 作用,而这些蛋白是病毒癌基因的重要表位.

Harvey et al [19]为研究 HBV 受体使用酵母双杂交方法研究 L-HBsAg 的前 S1 区筛选人肝文库,一个未鉴定蛋白和一个线粒体中蛋白可以和前 S1 相互作用. 起相互作用的两个蛋白用 Far-Western 及竞争实验分析,证明这个未鉴定蛋白作用有特异性. 竞争实验表明 HBV 而不是纯化的 HBsAg 可以和前 S1 进行竞争,阻止谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)-前-S1 融合蛋白结合到未鉴定蛋白而不是线粒体蛋白. 这个未鉴定蛋白与 GST 表达成融合蛋白可以和 HBV 以直接方式结合,但不能确定这个蛋白是否是 HBV 受体.

由此可见 HBV 与细胞许多蛋白质相互作用,其中 HBxAg 作用较广泛,对细胞的调节,是通过细胞中许多蛋白质作用而完成的. 对此进行深入研究,可能为致病机制提供新的线索.

HCV 是一个应用分子生物学技术克隆的 RNA 病毒,至今无有效的病毒培养系统. 但近年来对病毒的基因及病毒的蛋白有了更多的认识,通过酵母双杂交等技术,很多病毒蛋白与细胞蛋白质间的相互作用被确定. HCV 核心蛋白与人体作用复杂,有反式激活细胞基因表达的作用. Matsumoto 和 Chen et al [20,21]用酵母双杂交技术对人肝 cDNA 文库进行筛选,一半以上的克隆都是淋巴毒素 β 受体(LT- β R)胞质域,是肿瘤坏死因子受体家族的成员之一. HCV 核心蛋白与 LT- β R 结合,表明这个蛋

白可能有免疫调节功能,可能部分解释病毒持续感染机制. Chen et al 进一步证实 HCV 核心蛋白可与 LT- β R 结合,在一些细胞中,核心蛋白通过此通路起到调节作用. 他们的发现提示 HCV 核心蛋白增加 LT- β R 的生物功能,引起 HCV 感染细胞的发病. You et al [22]为了解 HCV 核心蛋白的反式激活机制,克隆了一个 cDNA 编码 DEAD 盒家族中推定的 RNA 解旋酶称为 CAP-Rf, HCV 核心蛋白的全长成熟形式和 C 末端截短形式均可以和这个蛋白结合. CAP-Rf 所涉及基因表达的调节及 HCV 核心蛋白启动 CAP-Rf 的反式激活能力可能是通过复合体形式和 CAP-Rf ATPase-dATPase 活性调节. 这些发现表明 HCV 已经进化了一种特殊机制通过其核壳蛋白涉及 RNA 代谢,并提示核心蛋白对宿主细胞的多重作用. 我们通过酵母双杂交技术,克隆一个 HCV 核心蛋白结合蛋白(HCBP6),由 456 nt 组成,编码 152 个氨基酸残基,位于人 22 号染色体上,初步研究表明可能和体内蛋白运输有关.

HCV NS5A 是 HCV 的非结构蛋白之一,本身是磷酸蛋白,在病毒复制中可能起作用,也可能与 HCV 对干扰素 (IFN) 耐受有一定作用. Ghosh et al [23]用酵母双杂交技术证明了 NS5A 与新鉴定的细胞转录因子 SRCAP 相互作用,可能是 NS5A 对细胞生长调节的机制之一. Tu et al [24]认为 NS5A 是磷酸蛋白具有隐性反式激活作用,他们用酵母双杂交的方法在人肝文库中筛选出 N-己基顺丁烯二酰亚胺(N-ethylmaleimide)敏感因子附着蛋白受体样蛋白,命名为人囊泡-相关膜蛋白相关蛋白-33 (vesicle-associated membrane protein-associated protein, hVAP-33). hVAP-33 与 NS5A 和 NS5B 的作用部位不同,NS5A 结合到 hVAP-33 的 C 末端,而 NS5B 结合到 hVAP-33 的 N 末端,这些相互作用提示了 HCV RNA 复制复合体的膜相关机制,进一步表明 NS5A 是作为病毒 RNA 复制复合体的一部分.

王琳 et al [25]还发现 HCV 核心蛋白和 NS5A 均可和载脂蛋白 A1(apoA1)相互作用,这种结合可能干扰破坏了肝细胞脂类代谢的正常途径,使肝细胞中脂类代谢机制发生改变,最终在肝细胞中累积并出现脂肪滴,形成小泡型、大泡型或大小泡混合型的肝脏脂肪变. Shi et al [26]也通过对 HepG2 和人肝 cDNA 文库的酵母双杂交筛选到 apoA1,一个高密度脂蛋白成分,与 NS5A 相互作用,提示 NS5A 参与脂代谢紊乱的病理过程,可以解释 HCV 感染后普遍存在的肝脏脂肪变性.

应用酵母双杂交技术研究 HIV 蛋白与机体蛋白质之间的相互作用则更为广泛. 艾滋病是由于 HIV 感染破坏 CD4⁺ 细胞,致使机体免疫力下降,导致各种机会性感染和肿瘤的发生. HIV 是目前所发现的调节机制最为复杂的病毒类型之一,其中包含着复杂的反式调节机制. Kamine et al [27]用人 B 淋巴文库与 HIV-1 反式激活因子 Tat 做酵母双杂交技术筛选,筛选到一个新的克隆 (Tip60)与蛋白的 N 端功能区域相互作用,可以使 Tat 反

式激活作用在没有增加 HIV 启动子基础作用下提高 4 倍, 提示 Tip60 可能是 Tat 的辅助因子, 对 HIV 基因表达有影响. Tat 介导的激活作用需要 CycT1/CDK9 复合物 (P-TEFb) 的补充, Fraldi et al^[28]通过双杂交及三杂交技术发现了 CycT1 与 CDK9 及 Tat/TAR 特异的结合位点, 这些发现提示可设计一个正确的位点缺失的 P-TEFb 复合物干扰 Tat 的功能.

HHR23A 是进化的保守基因家族成员, 与核苷酸的删除和修复相关, Withers-Ward et al^[29]研究认为与 HIV-1 的 Vpr 相互作用, 过量表达 HHR23A 或切断 Vpr 结合区, 则使 Vpr 产生的 G2 阻止作用减弱. 这些结果提示 Vpr 干扰蛋白的正常功能或与 DNA 修复相关的蛋白的正常功能, 干扰了从 G2 到 M 周期的信号传递. Gragerov et al^[30]的结果也显示 HHR23A 对 Vpr 引导的细胞周期停止有减缓作用, 而对 Vpr 的转录辅助因子功能无影响. Gupta et al^[31]通过酵母双杂交技术发现新的 HIV 颗粒相关与基质相作用的蛋白 VAN, 在大多数人组织中表达, 在核和胞质间穿梭, 组织培养中过量表达可以有效地抑制 HIV 的复制. 结果提示 VAN 可调节核基质的定位.

尽管越来越多的新的作用蛋白质被发现, 但 HBV、HCV、HIV 感染的发病机制未完全阐明, 要彻底阐明并完全治疗还有漫长而艰苦的路. 酵母双杂交技术的发展和革新, 使之已成为很多实验室研究蛋白质相互作用和蛋白质结构功能的必要手段. 但是要看到他只是反映蛋白质间可能发生的作用, 还必须通过其他手段来证实, 特别是要和生理病理机制相结合, 才不会被误导.

4 参考文献

- Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 1989;340:245-246
- Bendixen C, Gangloff S, Rothstein R. A yeast mating-selection scheme for detection of protein-protein interactions. *Nucleic Acids Res* 1994; 22:1778-1779
- Fromont-Racine M, Rain JC, Legrain P. Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nature Genet* 1997;16:277-282
- James P, Halladay J, Craig EA. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 1996;144: 1425-1436
- Aronheim A, Zandi E, Hennemann H, Elledge SJ, Karin M. Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Mol Cell Biol* 1997;17:3094-3102
- Hubsman M, Yudkovsky G, Aronheim A. A novel approach for the identification of protein-protein interaction with integral membrane proteins. *Nucleic Acids Res* 2001;29:E18
- Vidal M, Braun P, Chen E, Boeke JD, Harlow E. Genetic characterization of a mammalian protein-protein interaction domain by using a yeast reverse two-hybrid system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10321-10326
- Chiu M, Katz H, Berlin V. RAP1. a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:12574-12578
- Rossi F, Charlton CA, Blau HM. Monitoring protein-protein interactions in intact eukaryotic cells by α -galactosidase complementation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94: 8405-8410
- Vidal M, Brachmann R K, Fattaey A, Hodow E, Boeke JD. Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein and protein-DNA interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:10315-10320
- Li JJ, Herskowitz I. Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. *Science* 1993; 262: 1870-1874
- Licitra EJ, Liu J. A three-hybrid system for detecting small ligand-protein receptor interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:12817-12821
- Frederickson RM. Micromolecular matchmaking: advances in two-hybrid and related technologies. *Curr Opin Biotech* 1998; 9: 90-98
- Fischer M, Runkel L, Schaller H. HBxAg protein of hepatitis B virus interacts with the C-terminal portion of a novel human proteasome alpha-subunit. *Virus Genes* 1995;10:99-102
- Hu Z, Zhang Z, Doo E, Cou XO, Goldberg AL, Liang TJ. Hepatitis B virus X protein is both a substrate and a potential inhibitor of the proteasome complex. *J Virol* 1999; 73:7231-7240
- Zhang Z, Torii N, Furusaka A, Malayaman N, Hu Z, Liang TJ. Structural and functional characterization of interaction between hepatitis B virus X protein and the proteasome complex. *J Biol Chem* 2000;275:15157-15165
- Lee TH, Elledge SJ, Butel JS. Hepatitis B virus X protein interacts with a probable cellular DNA repair protein. *J Virol* 1995;69:1107-1114
- Barak O, Aronheim A, Shaul Y. HBV X protein targets HIV Tat-binding protein 1. *Virology* 2001;283:110-120
- Harvey TJ, Macnaughton TB, Park DS, Gowans EJ. A cellular protein which binds hepatitis B virus but not hepatitis B surface antigen. *J Gen Virol* 1999;80:607-615
- Matsumoto M, Hsieh TY, Zhu N, VanArsdale T, Hwang SB, Jeng KS, Gorbale nya AE, Lo SY, Ou JH, Ware CF, Lai MM. Hepatitis C virus core protein interacts with the cytoplasmic tail of lymphotoxin-beta receptor. *J Virol* 1997;71:1301-1309
- Chen CM, You LR, Hwang LH, Lee YH. Direct interaction of hepatitis C virus core protein with the cellular lymphotoxin-beta receptor modulates the signal pathway of the lymphotoxin-beta receptor. *J Virol* 1997;71:9417-9426
- You LR, Chen CM, Yeh TS, Tsai TY, Mai RT, Lin CH, Lee YH. Hepatitis C virus core protein interacts with cellular putative RNA helicase. *J Virol* 1999;73:2841-2853
- Ghosh AK, Majumder M, Steele R, Yaciuk P, Chrivia J, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates transcription through a novel cellular transcription factor SRCAP. *J Biol Chem* 2000;275:7184-7188
- Tu H, Gao L, Shi ST, Taylor DR, Yang T, Mircheff AK, Wen Y, Gorbalenya AE, Hwang SB, Lai MM. Hepatitis C virus RNA polymerase and NS5A complex with a SNARE-like protein. *Virology* 1999; 263:30-41
- 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A1结合的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1018-1021
- Shi ST, Polyak SJ, Tu H, Taylor DR, Gretch DR, Lai MN. Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins. *Virology* 2002;292:198-210
- Kamine J, Elangovan B, Subramanian T, Coleman D, Chinnadurai G. Identification of a cellular protein that specifically interacts with the essential cysteine region of the HIV-1 Tat transactivator. *Virology* 1996;216:357-366
- Fraldi A, Licciardo P, Majello B, Giordano A, Lania L. Distinct regions of cyclin T1 are required for binding to CDK9 and for recruitment to the HIV-1 Tat/TAR complex. *J Cell Biochem* 2001; 81:247-253
- Withers-Ward ES, Jowett JB, Stewart SA, Xie YM, Garfinkel A, Shibagaki Y, Chow SA, Shah N, Hanaoka F, Sawitz DG, Armstrong RW, Souza LM, Chen IS. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr interacts with HHR23A, a cellular protein implicated in nucleotide excision DNA repair. *J Virol* 1997;71:9731-9742
- Gragerov A, Kino T, Ilyina-Gragerova G, Chrousos GP, Pavlakis GN. HHR23A, the human homologue of the yeast repair protein RAD23, interacts specifically with Vpr protein and prevents cell cycle arrest but not the transcriptional effects of Vpr. *Virology* 1998;245:323-330
- Gupta K, Ott D, Hope TJ, Siliciano RF, Boeke JD. A human nuclear shuttling protein that interacts with human immunodeficiency virus type 1 matrix is packaged into virions. *J Virol* 2000;74: 11811-11824

抑制性消减杂交技术原理及应用

杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 张树林

杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 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
张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
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. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2002-10-29 接受日期: 2002-11-18

杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 张树林. 抑制性消减杂交技术原理及应用. 世界华人消化杂志 2003;11(4):456-458
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/456.htm>

0 引言

抑制性消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)技术是一种鉴定、分离组织细胞中选择性表达基因的技术. 其原理是以抑制性多聚酶链反应(PCR)反应为基础的cDNA消减杂交技术. 通过合成两个不同的接头, 连接于测试cDNA片段的5'末端, 达到选择性扩增差异性表达的cDNA片段, 抑制非目的cDNA的扩增. 该技术与其他消减杂交技术相比具有假阳性率低、敏感性高、效率高等优点而得到广泛应用.

1 抑制性消减杂交技术产生的背景

高等真核生物细胞中约含有4-10万个不同的基因, 但在生物体的发育过程中只有15%的基因得以表达. 这些基因的选择性表达决定了生物体的各项生命活动: 个体的发育和分化、体内稳态的维持、细胞周期的调控、衰老、细胞凋亡等. 因此要了解人体各项生命活动的调控机制, 就必须将这些差异表达的基因分离、鉴定并作深入研究, 为此人们建立了一系列研究基因表达差异的方法.

cDNA消减杂交技术是一类较早建立的技术^[1], 其原理是将来比较基因表达差异的双方cDNA进行杂交, 通过羟基磷灰石层析、亲和素-生物素结合等方法, 从杂交混合物中分离、鉴定出未杂交的部分. 应用这些方法曾分离、鉴定出一些重要基因, 例如T细胞受体(TCR)等, 但不能有效获得低丰度的转录物, 需多步的杂交层析过程. 1992年Liang et al^[2,3]建立了mRNA差异显示法(mRNA differential display)或称差异显示逆转录PCR(differential display reverse transcription PCR, DD-RT-PCR), 其特点是原理简单、灵敏度高, 但是假阳性率高达70%. 1993年Lisitsyn et al^[4,5]在进一步完善DD-RT-PCR基础上发展了代表性差异分析法(representational difference analysis, RDA), 该技术充分发挥了PCR以指数扩增双链模板, 而以线性扩增单链模板的特性, 通过消减和富集, 使得目的基因片段得到特异性扩增,

但仍需多次杂交、PCR步骤, 较为繁琐. 1994年Hubank et al^[6]将RDA技术改良, 设计了cDNA-RDA方法, 该方法用于比较具有相近遗传背景、表型不同的两组cDNA之间的差异, 但如果两组cDNA之间存在较大差异, 以及某些基因在检测子中存在上调表达时, 此方法显得力不从心, 很难达到预期的目的. 1996年Diachenko et al^[7,8]在RDA的基础上发展了抑制性消减杂交技术, 他克服了DD-RT-PCR法的假阳性较高和RDA法消减杂交轮次较多的缺点, 适用于克隆分析造成某种特殊表型的目的基因及其功能.

2 抑制性消减杂交方法的原理

抑制性消减杂交技术是一种以抑制性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. 通过合成两个不同的接头, 接于经限制性内切酶消化后的测试cDNA片段的5'末端, 将测试和驱动进行两轮杂交. 标准化步骤均等了测试中的cDNA单链丰度, 消减杂交步骤去除测试和驱动之间的共同序列. 利用抑制性PCR选择性扩增目的cDNA片段, 同时抑制非目的cDNA的扩增. 因此, 抑制性消减杂交技术显著增加了获得低丰度差异表达的cDNA的概率. 所谓抑制性PCR是利用链内退火优于链间退火, 使非目的序列片段两端的长反向重复序列在退火时产生“锅柄样”结构, 无法与引物配对, 从而选择性抑制非目的序列片段扩增^[9]. 抑制性消减杂交技术的基本实验过程如下. 首先, 将要进行比较的两种组织或细胞来源的mRNA样品反转录为cDNA, 把含有目的基因的cDNA称为测试(tester), 把参考cDNA称为驱动(driver), 用同一种限制性内切酶Rsa I切割, 产生末端平头的片段, 将测试cDNA分为两份, 每份连接不同的接头, 即: 接头1(adaptor 1)和接头2(adaptor 2). 接头为双链DNA片段, 且5'-端均无磷酸基, 这样保证只有接头中的长链可以与cDNA的5'-末端连接, 两个接头含有可识别的序列. 接下来进行两次杂交. 第一次杂交在每个测试里加入过量驱动, 然后变性、退火, 根据杂交动力学第二定律, 即丰度越高的分子退火速度越快, 因此测试cDNA与驱动cDNA相同片段大都形成异源双链分子, 使得差异表达的单链分子得到富集. 第二次杂交, 将进行过首次杂交的两组样品不经变性而直接混合, 只有剩下的经过消减并平均化了的差异表达的单链cDNA可以重新结合为新的杂交体分子, 这种杂交体分子两端带有不同的接头1和接头2, 加入新鲜变性的驱动进行第二轮消减杂交, 进一步富集差异表达的杂交体分子, 并用DNA酶补平末端, 这样差异表达的测试序列-杂交体分子5'-和3'-端就有了进行巢式PCR所需的不同的退火位点. 最后, 进行两次PCR反应, 第一次PCR只有两端连接有不同接头的双链cDNA片段才得以指数扩增, 而其他形式如一端有接头, 而另一端无接头的只能线性扩增, 没有

引物结合点的不能扩增,还有两端为同一接头的形成袢状而无法获得指数扩增.利用巢式引物进行第二次PCR,富集差异表达的基因片段.PCR产物可以被直接插入T载体,或者利用接头1上的NotI/SmaI/XmaI位点和接头2R上的EagI位点进行定向克隆,或者接头与cDNA连接处的RsaI位点平端克隆.然后利用测序和杂交分析来分析差异表达的序列,或者用PCR产物作探针来筛选DNA文库.

3 抑制性消减杂交技术的优点

在分离、克隆差异表达的基因序列片段中,抑制性消减杂交技术具有独特的优点.虽然基因芯片技术在差异表达基因谱分析中也很有用,但是,所进行筛选的基因片断的种类是人为限制的.因为基因芯片制备过程中基因的种类和数量就已经决定了检测结果的范围.但是抑制性消减杂交技术的研究目的和可能得到的结果则不受预先设置条件的限制.换句话说,抑制性消减杂交技术更适合差异表达的新基因的克隆化.此外还有以下一些特点:(1)在分离稀少基因方面具有优势:cDNA消减杂交、代表性差异分析、mRNA差异显示方法都不能分离到低丰度的差异表达基因.而抑制性消减杂交技术对高、低丰度的差异表达基因都能有效分离.这一重要优点主要归功于均等(normalization)过程,实验证明经过一轮消减可对稀少转录物富集达1 000-5 000倍^[10].(2)效率高:一次SSH反应可同时分离到几十到几百个差异表达的基因.(3)简便易行:抑制性消减杂交技术所采用的方法简单、成熟、易掌握、易操作.(4)假阳性率低:采用两次消减杂交和两次PCR,保证该方法有较高特异性.有关报道证明抑制性消减杂交方法假阳性率可降至6%.(5)筛选周期短:应用这种方法一般3-4 d即可获得差异表达基因片段的cDNA.

4 抑制性消减杂交技术的应用

抑制性消减杂交技术自1996年报道以来,该技术已被多名研究者采用,并与其他分子生物学技术相结合,克隆了多种新基因.

在慢性肝炎、肝纤维化和肝细胞癌的发生发展中基因调控的研究应用.乙型肝炎、丙型肝炎慢性化机制目前尚不清楚,HBV、HCV进入肝细胞后,病毒基因组表达的反式激活蛋白对肝细胞基因组具有反式调节作用^[11,12],从而影响肝细胞生长调节,可能是HBV、HCV感染慢性化及发生恶性转化的重要分子生物学机制之一.刘妍 et al^[13]在研究乙型肝炎X蛋白(HBxAg)反式激活作用时,应用SSH方法构建了HBxAg反式激活相关基因差异表达的cDNA消减文库,随机挑选65个克隆测序分析,结果主要包括2种类型,第一种是已知基因的序列,与GenBank中数据高度同源(96-100%),其中包括一些已知的看家基因序列和一些与细胞生长调节密切相关的基因序列,如真核翻译启动因子、核糖

体蛋白编码基因,与细胞的转录、翻译功能密切相关;乙型肝炎病毒X基因,与转染的HBx基因的表达有关;胶质母细胞瘤放大的分泌蛋白,肿瘤抑制因子ST13, Bcl-2结合蛋白Nip3,可能与肝细胞凋亡及恶性转化密切相关;S100钙结合蛋白,鸟嘌呤核苷酸蛋白(G-蛋白)与细胞周期生长调节及信号转导途径密切相关.第二种是未知基因序列,共获得15个差异表达的未知序列,其功能有待进一步研究.同时应用抑制性消减杂交技术构建HCV核心蛋白反式激活基因差异表达的cDNA消减文库^[14],经测序分析后,所得克隆包括6个未知序列,56个已知的看家基因及与细胞生长调节密切相关的基因如WEE1.这些研究结果对阐明乙、丙型肝炎慢性化及HBV、HCV致肝细胞癌发生之间的关系具有重要的理论意义.Nagayama et al^[15]在研究自身免疫性肝炎(AIH)发病机制的过程中,利用SSH技术,发现AIH肝细胞干扰素诱导蛋白10(interferon inducible protein 10, IP10)mRNA表达较正常肝细胞明显增强,同时运用免疫组化方法证明IP-10在AIH肝细胞中过量表达,且运用逆转录PCR分析63例不同类型肝炎组织标本,AIH中IP-10表达明显高于其他类型肝炎,因此作者认为IP-10表达升高是AIH的标志,IP-10在AIH的发病机制中起重要作用.在肝纤维化研究方面,Cassiman et al^[16]利用SSH技术比较正常鼠HSC与D-半乳糖胺诱发肝炎鼠的HSC mRNA表达差异,结果发现B-晶体蛋白(alpha B-crystallin, ABCRYS)表达上调.实验证实,在人和鼠HSC体外细胞培养中加入gal内毒素后也发现ABCRYS mRNA表达升高,作者认为,ABCRYS可能是HSC激活后的早期标志,有利于HSC存活,对其研究将有利于了解肝纤维化发展的机制.

抑制性消减杂交技术在肿瘤相关基因克隆化中也有重要的应用前景.在肿瘤相关基因的研究中,Miyasaka et al^[17]利用SSH技术研究丙型肝炎相关肝癌及癌旁组织基因表达不同,发现了一些过度表达的基因,7个已知基因包括灶性粘连激酶(focal adhesion kinase,FAK)、结肠癌缺失基因(deleted in colon cancer)、鸟嘌呤结合阻止蛋白(guanine binding inhibitory protein)、M130、胃蛋白酶原C(pepsinogen C)、谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase)、鸟氨酸转氨酶(ornithine aminotransferase)以及2个未知基因(HCC-1和HCC-2).其中灶性粘连激酶磷酸化激活后能阻止凋亡,胃蛋白酶原C的表达在前列腺癌中受雄激素水平的调节^[18],而HCC是以男性为主的疾病^[19],胃蛋白酶原C和灶性粘连激酶在HCC发生中的作用尚不明确,但HCC中二者过度表达可能为研究HCC发病机制提供新的方向.Piter et al^[20]用SSH获得肾细胞癌组织与非转化肾组织差异表达基因,共获得9个在肾细胞癌中差异表达的cDNA,序列分析表明7个与已知基因同源,2个为新基因,克隆的7个已知基因中的5个与肿瘤的恶性表型有关.Wang et al^[21]用SSH技术在食管癌中鉴定出一个命名为EC45基因,其在70%

食管癌中过度表达,且与核糖体蛋白L15的开放读码框架有100%同源性.说明SSH对肿瘤组织是一种高灵敏度的有效的鉴别差异表达序列的方法.

在器官发育方面,Diachenko et al^[7]用SSH技术建立了一个睾丸特异性cDNA文库,用消减的cDNA混合物作为一个杂交探针来鉴定人Y染色体基因库的同源性,进一步证实了这个人类DNA是以睾丸特异性方式而表达.在免疫学方面,Roh et al^[22]在研究破骨细胞分化过程中基因的调控作用时,将SSH技术与cDNA微阵列技术相结合,建立了破骨细胞与巨噬细胞、破骨细胞与树突状细胞mRNA差异性表达文库,以及TRANCE诱导造血干细胞分化为破骨细胞过程中mRNA差异性表达文库,提供了研究破骨细胞分化基因调节及骨肿瘤相关基因的新方法.Li et al^[23]用SSH方法检测了人类特异性过敏源性Th2细胞中差异表达基因,分析并鉴定出72个序列,这种差异性Th2基因文库可能阐明Th2细胞功能和变态反应性疾病的遗传学基础.Wang et al^[24]在寻找脑局部缺血耐受的相关基因中,用SSH方法筛选出差异表达基因基质金属蛋白酶-1抑制剂编码基因,提示其在局部缺血耐受中发挥潜在作用.

高等真核生物的所有生命现象,例如细胞生长、器官形成、恶性转化都是基因选择性表达的结果,要弄清这些生命现象的分子调节机制,就要对选择性表达的基因进行分离、克隆、序列分析,然后研究其氨基酸组成,表达产物结构、功能等.抑制性消减杂交技术为寻找表达基因和研究已知基因的新生物学功能提供了一个有利工具.并且由于抑制性消减杂交技术可用于比较不同细胞、不同组织的基因表达差异,因此必将在生物发育、细胞调控、肿瘤、衰老及组织损伤的研究中得到越来越广泛的应用.

5 参考文献

- Lamar EE, Palmer E. Y-encoded, species-specific DNA in mice: evidence that the Y chromosome exists in two polymorphic forms in inbred strains. *Cell* 1984;37:171-177
- Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 1992; 257:967-971
- Liang P, Averboukh L, Keyomarsi K, Sager R, Pardee AB. Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. *Cancer Res* 1992; 52:6996-6998
- Lisitsyn NA. Representational difference analysis: finding the differences between genomes. *Trends Genet* 1995;11:303
- Lisitsyn N, Wigler M. Cloning the difference between two complex genomes. *Science* 1993; 259:946-951
- Hubank M, Schatz DG. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res* 1994;22:5640-5648
- Diachenko L, Lau YC, 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
- Diachenko L, Lukyanov S, Lau YF, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol* 1999; 303:349-380
- Siebert PD, Chenchik A, Kellogg DE, Lukyanov KA, Lukyanov SA. An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 1995;23:1087-1091
- Ji W, Wright MB, Cai L, Flament A, Lindpaintner K. Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes. *BMC Genomics* 2002; 3:12
- Rossner MT. Hepatitis B virus x-gene product: a promiscuous transcriptional activator. *J Med Virol* 1992; 36:101-117
- Kato N, Yoshida H, Kioko OS, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C virus C-virus core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412
- 刘妍,成军,张跃新,段惠娟,牟劲松,韩萍,李克,李莉,张玲霞,陈菊梅. 应用抑制性消减杂交技术克隆截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活基因. *中华传染病杂志* 2002;20:218-221
- 刘妍,成军,王刚,李克,段惠娟,李莉. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因. *解放军医学杂志* 2001; 26:880-883
- Nagayama K, Enomoto N, Miyasaka Y, Kurosaki M, Chen CH, Sakamoto N, Nakagawa M, Sato C, Tazawa J, Ikeda T. Overexpression of interferon gamma-inducible protein 10 in the liver of patients with type I autoimmune hepatitis identified by suppression subtractive hybridization. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:2211-2217
- Cassiman D, Roskams T, van Pelt J, Libbrecht L, Aertsen P, Crabbe T, Vankelecom H, Deneef C. Alpha B-crystallin expression in human and rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2001;35:200-207
- Miyasaka Y, Enomoto N, Nagayama K, Izumi N, Marumo F, Watanabe M, Sato C. Analysis of differentially expressed genes in human hepatocellular carcinoma using suppression subtractive hybridization. *Br J Cancer* 2001; 85:228-234
- Konishi N, Nakaoka S, Matsumoto K, Nakamura M, Kuwashima S, Hiasa Y, Cho M, Uemura H, Hirao Y. Expression of pepsinogen androgen and estrogen receptors in human prostate carcinoma. *Pathol Int* 1999; 49:203-207
- Nagasue N, Yu L, Yukaya H, Kohno H, Nakamura T. Androgen and oestrogen receptors in hepatocellular carcinoma and surrounding liver parenchyma: impact on intrahepatic recurrence after hepatic resection. *Br J Surg* 1995; 82:542-547
- Piter C, Stassar M, Zoller M. Identification of renal-cell-carcinoma-related cDNA clones by suppression subtractive hybridization. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999;125:487-492
- Wang Q, Yang C, Zhou J, Wang X, Wu M, Liu Z. Cloning and characterization of full-length human ribosomal protein L15 cDNA which was overexpression in esophageal cancer. *Gene* 2001; 263:205-209
- Roh J, Altmann CR, Socci ND, Merkov L, Kim N, So H, Lee O, Takami M, Brivanlou AH, Choi Y. Gene expression profiling of osteoclast differentiation by combined suppression subtractive hybridization and cDNA microarray analysis. *DNA Cell Biol* 2002; 21:541-549
- Li XD, Essayan DM, Liu MC, Beatty TH, Huang SK. Profiling of differential gene expression in activated, allergen-specific human Th2 cells. *Genes Immun* 2001; 2:88-98
- Wang X, Yaish-Ohad S, Li X, Barone FC, Feuerstein GZ. Use of suppression subtractive hybridization strategy for decreased tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 gene expression in brain ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18:1173-1177

噬菌体展示技术的原理及应用

张忠东,成军,张树林

张忠东,成军,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
张树林,西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
项目负责人:成军,100039,北京市,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. cj@genetherapy.com.cn
电话:010-66933391 传真:010-63801283
收稿日期:2002-10-29 接受日期:2002-11-18

张忠东,成军,张树林. 噬菌体展示技术的原理及应用. 世界华人消化杂志 2003; 11(4):459-461
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/459.htm>

0 引言

1985年Smith^[1]首次证实丝状噬菌体fd基因组能通过基因工程的手段进行改造,将EcoR^I内切酶的部分基因片段(171 bp和132 bp)与p₃基因融合,获得的重组噬菌体可在体外稳定增生,表达产物能被抗EcoR^I内切酶抗体所识别. 1988年Parmley et al^[2]将已知抗原决定簇与p₃的N端融合呈现在表面,可特异性地被抗体选择出来,并提出通过构建随机肽库可以了解抗体识别的抗原决定簇表位的设想. 1990年McCafferty et al^[3]也报道了用噬菌体展示技术筛选溶菌酶的单链抗体的方法,从而开始了这项技术的广泛应用的新时代.

1 噬菌体的基本特征

噬菌体属于单链DNA病毒,包括f1、fd和M13三类. 噬菌体DNA在细菌内滚环复制,细菌不被裂解,但生长速度减慢,而且可分泌出大量成熟的噬菌体颗粒. 噬菌体的单链DNA长约7 000 bp,不同类型噬菌体其一级结构极为相似,基因组编码11种蛋白质,其中5种为结构蛋白,与噬菌体展示密切相关的是二种不同的结构蛋白p₃和p₈. 噬菌体单链DNA被包裹在大约2 700-3 000个主要衣壳蛋白p₃分子组成的管状结构中,另外次要衣壳蛋白p₆通过和大肠杆菌的F菌毛结合而引起感染,是噬菌体感染宿主所必需的. p₃前体由73个氨基酸残基组成,其中信号肽为23个氨基酸残基,根据构成外壳的功能可分为四个区,6-24氨基酸残基区域占据噬菌体表面的大部分,25-35氨基酸残基区域高度疏水性,C端(35-50氨基酸残基区域)与DNA相结合,构成完整的内壁,N端(1-5氨基酸残基区域)为可活动的、外露在噬菌体表面的肽段,是插入外源基因的最佳位置. p₈前体由424个氨基酸残基组成,形成3-5个拷贝,位于噬菌体的尾部,他由四个功能区组成,信号肽区(18个氨基酸残基)引导p₈至细菌胞间质,在p₈分泌后被细菌蛋白酶水解,其后的穿膜区与噬菌体的侵入有关,受体结合区负责结合F菌毛,而C端的疏水区组装前黏附在细菌内膜

上,组装后这段氨基酸序列锚在噬菌体外壳上,穿膜区是最外露的区域,因而成为插入外源基因的理想位置.

2 噬菌体展示技术的基本原理

噬菌体展示技术是一种基因表达产物和亲和选择相结合的技术,他以改构的噬菌体为载体,把待选基因片段定向插入噬菌体外壳蛋白质基因区,使外源多肽或蛋白质表达并展示于噬菌体表面,进而通过亲和富集法表达有特异肽或蛋白质的噬菌体. 其建立基于三个原因:(1)在p₃和p₈衣壳蛋白的N端插入外源基因,形成的融合蛋白表达在噬菌体颗粒的表面,不影响和干扰噬菌体的生活周期,同时保持的外源基因天然构象,也能被相应的抗体或受体所识别;(2)利用固定与固相支持物的靶分子,采用适当的淘洗(panning)方法,洗去非特异结合的噬菌体,筛选出目的噬菌体;(3)外源多肽或蛋白质表达在噬菌体的表面,而其编码基因作为病毒基因组中的一部分可通过分泌型噬菌体的单链DNA测序推导出来. 该技术实现了基因型和表型的转换.

噬菌体结构蛋白p₃和p₈均可作为载体来展示外源多肽或蛋白质,在基因操作上,他们基本相同. 在信号肽与成熟蛋白质编码区之间有单一的克隆位点便于插入,插入的外源多肽或蛋白质以融合的形式表达出来并分泌到胞间质内,当宿主蛋白酶切除信号肽后,融合蛋白组装成熟,呈现在病毒粒子的表面,新的N端位置正是外源蛋白或多肽的插入点. 与p₃基因融合时拷贝数低(不超过5个),这可以减少多价结合,利于选择高亲和力的配体分子,可容许插入大的片段. 与p₈基因融合时,拷贝数高(2 700个),当将属于多肽的表位用作免疫源时可产生良好的免疫应答,具有反应优势,故在疫苗开发上具有潜在的应用价值.

亲和筛选可用直接法和间接法. 直接法是将蛋白质分子耦联到固相支持物上,文库噬菌体与固相支持物温育,洗去未结合的噬菌体,既获得亲和噬菌体;间接法是将生物素标记的蛋白质分子与文库噬菌体温育后铺在结合有链亲和素的平皿上,洗去未结合的噬菌体,保留的就是结合状态的噬菌体,再洗脱结合的噬菌体,用这部分噬菌体感染细菌,扩增噬菌体,开始新一轮的筛选,通过几次这样的亲和纯化反应,就能选择性地富集并特异性扩增结合这种蛋白质或DNA分子的噬菌体. 筛选出的噬菌体的结合特性可以进一步验证并从DNA序列推导出来,分析各个克隆间编码短肽的一致序列,以确证筛选的特异性. 最后,利用化学合成含一致序列的氨基酸短肽,研究他们的亲和特性并推测可能配体的生物学活性和结合或游离状态的结构特点.

3 噬菌体展示技术的应用

3.1 噬菌体随机多肽文库 肽库是感染性噬菌体的集合,其中每个病毒粒子的衣壳表面都含有以融合蛋白形式显露的唯一的核苷酸顺序编码寡肽,通过选择步骤可以富集与靶分子结合的噬菌体. 构建随机多肽文库一般先

体外合成编码短肽的随机 DNA 片段,经 PCR 扩增或杂交使其形成携带适当酶切位点的基因片段,或经 PCR 扩增某特定基因后再用 DNase 酶解,使其形成长短不一的小基因片段.随机肽库的应用范围依采用的筛选分子而言,这些筛选分子包括抗体、小分子、细胞表面受体类、细胞分子类、完整细胞等,这些分子称为受体类.筛选出的结合该类受体的目的分子称为配体.用纯化的单克隆抗体作受体,进行抗体的表位分析应用最广泛也最成熟,筛选出的配体通常表明了抗原抗体的结合部位. Blond-Elguindi et al^[4]采用甲胎蛋白(AFP)洗脱的策略筛选出 Bip 结合短肽的共有序列,阐明 Bip 识别和蛋白质折叠的机制.用细胞表面的天然受体作筛选分子是筛选技术的一大进步, Doorbar et al^[5]采用竞争洗脱的方法筛选出细胞表面受体特异性结合的短肽, Pasqualini et al^[6]成功地筛选出肠和胃组织特异性的短肽,预示有可能用于体内基因的定向转移.噬菌体展示技术也可以用于病毒的诊断、治疗和疫苗的发展, Folgori et al^[7]以乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)为模型,用乙型肝炎患者特异性血清筛选肽库,用免疫印迹鉴定噬菌体表位,用正常人血清反向筛选,最终得到的短肽可模拟 HBsAg 并由竞争结合试验验证. Motti et al^[8]在对 HBV 的研究中,用抗病毒单克隆抗体筛选出模拟表位,免疫后可引起机体特异性的对 HBsAg 的机体免疫,提示模拟短肽可用于疫苗的发展. Arnon et al^[9]用八肽随机肽库筛选曼氏血吸虫的模拟表位,认为模拟表位可以作为多肽疫苗的重要成分.利用肽库技术确定了沙眼衣原体主要外壳蛋白的表位^[10]、HCV 核心抗原表位^[11]、HIV gp 120 蛋白和 HCV 核心蛋白的表位^[12].利用噬菌体肽库技术已经确定了许多蛋白分子的相互作用位点,包括组成的 SH3 与酪氨酸蛋白激酶的结合位点^[13]、胞质蛋白 p47phox 与细胞色素 b558 的结合位点^[14].用亲和纯化的 HLA-DR13 从噬菌体肽库中钓出与之结合的多肽,通过 MHC 与多肽的结合基序分析 MHC-I 分子的结合特点^[15]. Wrighton et al^[16]筛选到具有促红细胞生成素(EPO)功能活性的由二键连接的环形短肽.他用重组可溶性红细胞生成素受体(EPO-R)先筛选与 gp120 融合表达的构象约束型噬菌体八肽库,得到与 EPO-R 特异性结合,且不与牛血清白蛋白(BSA)、肿瘤坏死因子受体(TNFR)的胞外区、神经生长因子受体(NGF-R)、白介素-2 受体(IL-2R)的 α 和 β 亚基以及 E 选择素结合的环肽^[16].

3.2 噬菌体抗体库 噬菌体抗体库技术利用丝状噬菌体载体构建抗体文库,通过已知抗原筛选特异性高亲和性抗体的技术. McCaffery et al^[9]首先证明,完整的抗体可变区可表达于噬菌体的表面,通过亲和筛选获得了与已知抗原特异性结合的单链抗体片段, Hogrefe et al^[17]又从构建的 Fab 文库筛选到特异的 Fab 片段.

每种抗体的可变区由超变区和骨架区(FR)组成,超变区又称互补决定区(CDR)决定抗原的结合位点,其氨基酸序列变异较大,而连接超变区的骨架区很保守.噬

菌体抗体库运用了三项实验技术:(1)逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)技术,用一种引物克隆出全套免疫球蛋白可变区基因;(2)采用大肠杆菌分泌表达具有生物活性的抗体功能片段;(3)噬菌体表面展示技术的建立,其主要技术流程是,从免疫或不经免疫的人和小鼠的脾淋巴细胞中提取 mRNA,反转录成 cDNA,使用与抗体可变区基因两侧保守区互补的引物,通过多聚酶链反应(PCR)分别扩增抗体可变区的重链(VH)和轻链(VL)基因,构建文库.插入噬菌体载体后有二种表达模式,即表达 scFv 单链抗体或 Fab 抗体,scFv 由 VH 和 VL 之间通过人工接头相连;而 Fab 片段的 VH+CH1 和 VL+CL 分别插入不同的噬菌体载体,二种重组噬菌体超感染同一宿主菌,VL+CL 就可与 VH+CH1 片段通过二硫键结合形成 Fab 片段.将噬菌体抗体文库通过特异性抗原的筛选,就可以得到含特异性抗体片段的噬菌体.

噬菌体抗体库技术模拟了机体免疫系统的选择作用,呈现在噬菌体表面的抗体能够在体外用固相化抗原进行筛选,同时由于噬菌体对大肠杆菌的感染性,噬菌体抗体库技术能够以淘筛的方式,为快速选择特异性抗体提供简便而高效的操作系统,具体的步骤:(1)噬菌体黏附靶抗原.(2)反复洗涤去除非特异性结合,洗脱并收集与抗原结合的噬菌体.(3)再次感染大肠杆菌,使特异的噬菌体抗体淘筛.除此之外,也有用固相淘筛、捕获淘筛、完整细胞淘筛、组织淘筛及器官淘筛等方法获得结合抗体成功的报道,但各有侧重,为噬菌体抗体的淘筛增添新的途径^[18]. Clackson et al^[19]首先把他用到 scFv 的表达中来.他使用基因工程改造噬菌体载体,再在辅助者(helper)噬菌体的帮助下,结果使 scFv 在噬菌体的衣壳蛋白 G3P 的顶部表达.这种 scFv 已具有结合活性,因此能很方便地从一个库中筛选出需要的 scFv 噬菌粒(phagemid)来.1996 年, Tang et al^[20]用噬菌体展示技术的方法,对一个连接肽库作了筛选,结果得到很多结合能力较强的 scFv 的连接肽.

3.3 蛋白质的定向改造 蛋白质的定向改造指的是用盒式突变、错误倾向 PCR 等方法来突变蛋白质或结构域的某一特定编码序列,产生蛋白质或结构域的突变文库呈现在噬菌体表面,通过亲和筛选获得所需的已定向改变的噬菌体克隆,他们的一级结构可以从 DNA 的序列中推导出来.可用来筛选具有更强受体结合能力的细胞因子、新的酶抑制剂、转录因子的 DNA 结合新位点、新的细胞因子拮抗剂、新型酶和增强生物学活性的蛋白质等.

3.4 cDNA 文库的表达筛选 cDNA 文库的表达筛选系统除利用噬菌体、酵母双杂交系统外,噬菌体表面展示技术也可达到同样的目的^[21-23].cDNA 编码的所有蛋白质融合在 fos 结构域 C 末端,与 Jun-g 或 Jun-g 结构域相互作用;也可将 cDNA 直接融合在 p 的 C 末端;另外是直接利用蛋白质之间的相互作用来选择 cDNA,将目的蛋白和 cDNA 文库分别与 g 的 C 末端

和N端融合,如果目的蛋白与某一个cDNA的蛋白相互作用,g蛋白的二个功能域将彼此互补导致有感染性的病毒产生.噬菌体展示技术引出了分子文库的概念,根据文库呈现的部位不同,有噬菌体表面展示文库、细菌表面展示文库、质粒展示文库和核糖体文库,也可以是用化学方法合成的肽库或小分子化合物库.其中噬菌体表面展示技术比较成熟,根据文库内分子的性质可以分为cDNA文库、随机肽库、抗体文库、蛋白质文库等.目前已越来越广泛地用于抗原表位分析、蛋白质-蛋白质相互作用位点分析、酶作用底物的分析、寻找具有生物功能的蛋白的模拟肽、先导化合物的发现、分离与鉴定疾病特异性抗原模拟肽、筛选细胞和器官特异性结合肽、研究蛋白质与核酸结合特性、定位信号转导途径等.该技术迅速发展的原因是他有效地实现了基因型和表型的转换,在分子克隆的基础上,实现蛋白质构想的体外控制,从而可获得具有生物学活性的表达产物.若将蛋白质三维结构预测、分子模拟技术及噬菌体表面展示技术完美融合,对分子相互作用、分子识别、受体作用、酶学机制以及疫苗的研究进程将起极大的推动作用.

4 参考文献

- Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985; 228:1315-1317
- Parmley SF, Smith GP. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 1988;73:305-318
- McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 1990;348:552-554
- Blond-Elguindi S, Cwirla SE, Dower WJ, Lipshutz RJ, Sprang SR, Sambrook JF, Gething MJ. Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *Cell* 1993;75:717-728
- Doorbar J, Winter G. Isolation of a peptide antagonist to the thrombin receptor using phage display. *J Mol Biol* 1994;244:361-369
- Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* 1996;380:364-366
- Folgori A, Tafi R, Meola A, Felici F, Gafre G, Cortese R, Monaci P, Nicosia A. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. *EMBO J* 1994;13:2236-2243
- Motti C, Nuzzo M, Meola A, Galfre G, Felici F, Cortese R, Nicosia A, Monaci P. Recognition by human sera and immunogenicity of HBsAg mimotopes selected from an M13 phage display library. *Gene* 1994; 146:191-198
- Arnon R, Tarrab-Hazdai R, Steward M. A mimotope peptide-based vaccine against *Schistosoma mansoni*: synthesis and immunology. *Immunology* 2000;101:555-562
- Zhong G, Smith GP, Berry J, Brunham RC. Conformational mimicry of a chlamydial neutralization epitope on filamentous phage. *J Biol Chem* 1994;269:24183-24188
- Rodriguez-Lopez M, Riezu-Boj JI, Ruiz M, Berasain C, Civeira MP, Prieto J, Borrás-Cuesta F. Immunogenicity of variable regions of hepatitis C virus proteins: selection and modification of peptide epitopes to assess hepatitis C virus genotypes by ELISA. *J Gen Virol* 1999;80:727-738
- Grihalde ND, Cheny CJ, Golden A, Gubbins E, Mandecki W. Epitope mapping of anti-HIV and anti-HCV monoclonal antibodies and characterization of epitope mimics using a filamentous phage peptide library. *Gene* 1995;166:187-195
- Sparks AB, Quilliam LA, Thorn JM, Der CJ, Kay BK. Identifica-

- tion and characterization of Src SH3 ligands from phage-displayed random peptide libraries. *J Biol Chem* 1994;269:23853-23856
- Deleo FR, Yu L, Burritt JB, Loetterle LR, Bond CW, Jesaitis AJ, Quinn MT. Mapping sites of interaction of p47-phox and flavocytochrome b with random-sequence peptide phage display libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7110-7114
- Davenport MP, Quinn CL, Valsasini P, Sinigaglia F, Hill AV, Bell JI. Analysis of peptide-binding motifs for two disease associated HLA-DR13 alleles using an M13 phage display library. *Immunology* 1996; 88:482-486
- Wrighton NC, Farrell FX, Chang R, Rashyp AK, Barbone FP, Mulcahy LS, Johnson OL, Barrett RW, Jolliffe LK, Dower WJ. Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. *Science* 1996; 273:458-464
- Hogrefe HH, Mullinax RL, Lovejoy AE, Hay BN, Sorge JA. A bacteriophage lambda vector for the cloning and expression of immunoglobulin Fab fragments on the surface of filamentous phage. *Gene* 1993;128:119-126
- Breitling F, Dubel S, Seehaus T, Klewinghaus I, Little M. A surface expression vector for antibody screening. *Gene* 1991;104:147-153
- Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter G. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 1991; 352:624-628
- Tang Y, Jiang N, Parakh C, Hilvert D. Selection of linkers for a catalytic single chain antibody using phage display technology. *J Biol Chem* 1996;271:15682-15686
- Rhyner C, Kodzius R, Cramer R. Direct selection of cDNAs from filamentous phage surface display libraries: potential and limitations. *Curr Pharm* 2002;3:13-21
- Cramer R, Walter G. Selective enrichment and high-throughput screening of phage surface-displayed cDNA libraries from complex allergenic systems. *Comb Chem High Throug Screen* 1999;2: 63-72
- Cramer R, Kodzius R. The powerful combination of phage surface display of cDNA libraries and high throughput screening. *Comb Chem High Througput Screen* 2001; 4:145-155

基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用

刘妍,成军,王建军,杨倩,陆荫英

刘妍,成军,王建军,杨倩,陆荫英,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,全军病毒性肝炎研究重点实验室 北京市 100039 国家自然科学基金资助项目, No. C39970674, C03011402
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:2002-10-29 接受日期:2002-11-18

刘妍,成军,王建军,杨倩,陆荫英. 基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用. 世界华人消化杂志 2003;11(4):461-463
<http://www.wjnet.com/1009-3079/11/461.htm>

0 引言

基因芯片(gene chip)也称为 DNA 微距阵(DNA microarray)、DNA 芯片(DNA chip)等,是近年发展起来的一项前沿生物技术.他是指将大量靶基因或寡核苷酸片段有序地高密度地排列固定于玻片、硅片等固相载体上,然后与

和N端融合,如果目的蛋白与某一个cDNA的蛋白相互作用,g蛋白的二个功能域将彼此互补导致有感染性的病毒产生.噬菌体展示技术引出了分子文库的概念,根据文库呈现的部位不同,有噬菌体表面展示文库、细菌表面展示文库、质粒展示文库和核糖体文库,也可以是用化学方法合成的肽库或小分子化合物库.其中噬菌体表面展示技术比较成熟,根据文库内分子的性质可以分为cDNA文库、随机肽库、抗体文库、蛋白质文库等.目前已越来越广泛地用于抗原表位分析、蛋白质-蛋白质相互作用位点分析、酶作用底物的分析、寻找具有生物功能的蛋白的模拟肽、先导化合物的发现、分离与鉴定疾病特异性抗原模拟肽、筛选细胞和器官特异性结合肽、研究蛋白质与核酸结合特性、定位信号转导途径等.该技术迅速发展的原因是他有效地实现了基因型和表型的转换,在分子克隆的基础上,实现蛋白质构想的体外控制,从而可获得具有生物学活性的表达产物.若将蛋白质三维结构预测、分子模拟技术及噬菌体表面展示技术完美融合,对分子相互作用、分子识别、受体作用、酶学机制以及疫苗的研究进程将起极大的推动作用.

4 参考文献

- Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985; 228:1315-1317
- Parmley SF, Smith GP. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 1988;73:305-318
- McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 1990;348:552-554
- Blond-Elguindi S, Cwirla SE, Dower WJ, Lipshutz RJ, Sprang SR, Sambrook JF, Gething MJ. Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *Cell* 1993;75:717-728
- Doorbar J, Winter G. Isolation of a peptide antagonist to the thrombin receptor using phage display. *J Mol Biol* 1994;244:361-369
- Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* 1996;380:364-366
- Folgori A, Tafi R, Meola A, Felici F, Gafre G, Cortese R, Monaci P, Nicosia A. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. *EMBO J* 1994;13:2236-2243
- Motti C, Nuzzo M, Meola A, Galfre G, Felici F, Cortese R, Nicosia A, Monaci P. Recognition by human sera and immunogenicity of HBsAg mimotopes selected from an M13 phage display library. *Gene* 1994; 146:191-198
- Arnon R, Tarrab-Hazdai R, Steward M. A mimotope peptide-based vaccine against *Schistosoma mansoni*: synthesis and immunology. *Immunology* 2000;101:555-562
- Zhong G, Smith GP, Berry J, Brunham RC. Conformational mimicry of a chlamydial neutralization epitope on filamentous phage. *J Biol Chem* 1994;269:24183-24188
- Rodriguez-Lopez M, Riezu-Boj JI, Ruiz M, Berasain C, Civeira MP, Prieto J, Borrás-Cuesta F. Immunogenicity of variable regions of hepatitis C virus proteins: selection and modification of peptide epitopes to assess hepatitis C virus genotypes by ELISA. *J Gen Virol* 1999;80:727-738
- Grihalde ND, Cheny CJ, Golden A, Gubbins E, Mandecki W. Epitope mapping of anti-HIV and anti-HCV monoclonal antibodies and characterization of epitope mimics using a filamentous phage peptide library. *Gene* 1995;166:187-195
- Sparks AB, Quilliam LA, Thorn JM, Der CJ, Kay BK. Identifica-

- tion and characterization of Src SH3 ligands from phage-displayed random peptide libraries. *J Biol Chem* 1994;269:23853-23856
- Deleo FR, Yu L, Burritt JB, Loetterle LR, Bond CW, Jesaitis AJ, Quinn MT. Mapping sites of interaction of p47-phox and flavocytochrome b with random-sequence peptide phage display libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7110-7114
- Davenport MP, Quinn CL, Valsasint P, Sinigaglia F, Hill AV, Bell JI. Analysis of peptide-binding motifs for two disease associated HLA-DR13 alleles using an M13 phage display library. *Immunology* 1996; 88:482-486
- Wrighton NC, Farrell FX, Chang R, Rashyp AK, Barbone FP, Mulcahy LS, Johnson OL, Barrett RW, Jolliffe LK, Dower WJ. Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. *Science* 1996; 273:458-464
- Hogrefe HH, Mullinax RL, Lovejoy AE, Hay BN, Sorge JA. A bacteriophage lambda vector for the cloning and expression of immunoglobulin Fab fragments on the surface of filamentous phage. *Gene* 1993;128:119-126
- Breitling F, Dubel S, Seehaus T, Klewinghaus I, Little M. A surface expression vector for antibody screening. *Gene* 1991;104:147-153
- Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter G. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 1991; 352:624-628
- Tang Y, Jiang N, Parakh C, Hilvert D. Selection of linkers for a catalytic single chain antibody using phage display technology. *J Biol Chem* 1996;271:15682-15686
- Rhyner C, Kodzius R, Cramer R. Direct selection of cDNAs from filamentous phage surface display libraries: potential and limitations. *Curr Pharm* 2002;3:13-21
- Cramer R, Walter G. Selective enrichment and high-throughput screening of phage surface-displayed cDNA libraries from complex allergenic systems. *Comb Chem High Throug Screen* 1999;2: 63-72
- Cramer R, Kodzius R. The powerful combination of phage surface display of cDNA libraries and high throughput screening. *Comb Chem High Througput Screen* 2001; 4:145-155

基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用

刘妍,成军,王建军,杨倩,陆荫英

刘妍,成军,王建军,杨倩,陆荫英,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,全军病毒性肝炎研究重点实验室 北京市 100039 国家自然科学基金资助项目, No. C39970674, C03011402
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:2002-10-29 接受日期:2002-11-18

刘妍,成军,王建军,杨倩,陆荫英. 基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用. 世界华人消化杂志 2003;11(4):461-463
<http://www.wjnet.com/1009-3079/11/461.htm>

0 引言

基因芯片(gene chip)也称为 DNA 微距阵(DNA microarray)、DNA 芯片(DNA chip)等,是近年发展起来的一项前沿生物技术.他是指将大量靶基因或寡核苷酸片段有序地高密度地排列固定于玻片、硅片等固相载体上,然后与

待测的标记样品的基因按碱基互补配对原理进行杂交,通过激光共聚焦荧光检测系统等对芯片进行扫描,再经计算机软件处理,从而获取大量生命信息.该技术可以将极其大量的探针同时固定于支持物上,所以一次可以对大量的生物分子进行检测分析,从而解决了传统核酸印记杂交(southern blotting 和 northern blotting 等)技术复杂、自动化程度低、检测目的分子数量少、低通量等不足.该技术的出现使全面综合分析某些生命现象成为可能.基因芯片技术在疾病基因和各种病原体的诊断、基因表达谱、基因功能、基因突变、病毒检测、发现新基因、疾病发生发展的分子机制、基因药物设计及药物筛选等生物医学领域具有广泛的应用价值^[1-6].在肝炎病毒的研究中也有十分重要的应用前景.

1 指导临床治疗

临床上,在药物疗效与副作用方面,患者的反应有很大差异,主要是由于个体遗传学上存在差异(单核苷酸多态性,SNP),导致对药物产生不同的反应.利用基因芯片技术可以对患者先进行诊断再针对每个患者具体情况实施个体优化治疗.此外,在治疗中,许多同种疾病的具体病因是因人而异的,用药也应因人而异.例如,HBV有较多亚型,HBV基因的多个位点(S、P及C基因区)容易发生变异^[7-10].如将这些基因突变部位的全部序列构建为HBV基因多态性检测芯片,则可对肝炎病毒基因组的突变、基因准种(quasispecies)特点及优势种群的漂变(shift)等特点进行监测,快速地检测患者是这一个或那一个或多个基因同时发生突变,从而可以对症下药,这对指导用药和防止HBV耐药性很有意义.

拉咪呋啶是目前治疗HBV感染的主要药物之一,该药为核苷类似物,能够与HBV DNA多聚酶YMDD(酪氨酸-蛋氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸)基序特异性结合,防止复制中间体的延伸,从而起到抑制病毒复制的作用.在药物和人体免疫选择压力下,YMDD基序易发生二种突变株,即蛋氨酸-异亮氨酸(M-I)和蛋氨酸-缬氨酸(M-V),突变的HBV对拉咪呋啶不再敏感^[11].目前对变异株的检测与分析仅限于RT-PCR产物序列测定法,单链构象多态性分析与温度梯度凝胶电泳法以及凝胶转移法等.这些方法存在着方法烦琐、费时、只能检测单个位点突变、不能提供全面的变异株情况等特点.基因芯片因其高通量的特点在这方面具有巨大潜力.可以应用基因芯片技术检测YMDD基序的突变,对乙肝患者接受治疗时(尤其是在治疗中出现症状反复的患者)的治疗方案选择非常重要.

2 丙型肝炎病毒(HCV)分型检测

HCV感染不但可引起急、慢性病毒性肝炎,而且可导致肝纤维化(LC),甚至肝细胞癌(HCC).在日本,丙型肝炎是肝癌的最主要原因,在我国肝癌患者中丙肝或合并丙肝的比例也不低,因此在感染早期进行治疗是十分

必要的,国内外的临床治疗研究表明:干扰素的治疗效果与HCV的基因(亚)型的种类有关.干扰素对3a型的患者治疗效果最好,1a型次之,1b则几乎没有疗效^[12-20].干扰素价格昂贵而且副反应很大,因此,在治疗前应用基因芯片检测患者体内的HCV基因(亚)型,能为患者提供更有效的治疗方案.

3 研究疾病的分子生物学发病机制

肝炎病毒感染肝细胞以后,肝炎病毒蛋白的表达,不仅对于肝炎病毒的生活周期具有重要意义,而且对于肝细胞基因表达谱产生重要影响.肝炎病毒蛋白无论是在细胞核中分布直接影响肝细胞的基因表达,还是通过与转录因子蛋白之间的作用间接影响肝细胞的基因表达,都会对肝细胞的基因表达谱产生显著的影响.这也是肝炎病毒感染肝细胞以后形成慢性感染、肝纤维化和肝细胞癌的重要的分子生物学机制^[21-23].我们曾经应用表达谱基因芯片技术研究HCV核心蛋白作用于肝母细胞瘤细胞系HepG2后,肝细胞基因表达谱的变化,发现多种与细胞生长调节、细胞凋亡、细胞信号传导通路密切相关的基因表达上调或下调,对于从总体水平全面了解HCV致病的分子生物学机制具有重要意义.HCV非结构蛋白在病毒复制和肝病病理过程中同样起着重要作用.cDNA表达谱芯片可观察非结构蛋白对肝癌细胞基因表达的影响.用cDNA芯片检测HCV非结构蛋白诱导下肝癌细胞株的生长、代谢过程、细胞周期及转录因子的变化,发现这些表达的基因与病毒感染与肝癌形成有着密切联系,为病毒的致癌机制研究提供线索,同时也为抗病毒研究提供有力依据.

目前的基因芯片技术存在二个突出的缺点,一个是假阳性率偏高,一个是需要首先对检测标本进行多聚酶链反应(PCR)扩增.假阳性率太高,严重影响其临床应用的价值,而需要首先进行扩增,徒然增加了操作的复杂性,而不是直接对标本进行检测,相对于PCR检测技术并没有明显的操作简化,这也是限制基因芯片技术广泛应用的重要原因.相对于基因诊断来说,基因芯片技术假阳性率偏高并不影响其在发病机制研究中的应用,因为通过基因芯片技术所筛选得到的信息只是初步的,还需要通过Northern Blotting杂交等下游的分子生物学技术进行证实,因此不受这一缺点的影响.基因芯片高通量筛选的特点,可以使这种研究的效率得到显著的提高,这是其显著的优点.

此外,对于肝癌组织与正常肝脏组织基因表达谱的比较研究,对于阐明肝癌发生的分子生物学机制、寻求新型肝癌诊断的分子生物学标志也具有十分重要的意义.

4 研究新型药物与疫苗

新药作用机制的研究其关键的内容之一就是药物作用靶点的确定,应用基因芯片技术,选择合适的药物作用的靶细胞,以不同的药物剂量和不同的药物作用时

间, 确定药物作用靶细胞后与基因表达水平改变之间的量效和时效关系, 然后获取药物在一定浓度、一定时间条件下作用的细胞和未经处理的细胞, 同样条件进行表达谱基因芯片的检测, 最终确定药物所作用的基因靶点, 从而阐明药物作用的机制. 这种研究结果, 对于设计针对此靶点的更为有效的新型药物具有重要的指导意义. 已知膦甲酸钠具有一定的抗 HBV 的作用, 但其作用机制目前还不是特别清楚. 在临床应用中发现膦甲酸钠对于机体的免疫调节功能具有一定的影响, 因此我们曾经应用基因表达谱芯片, 对于膦甲酸钠作用的 T 淋巴细胞系 Jurkat 细胞受到膦甲酸钠的刺激以后, 基因表达谱的改变进行了研究. 发现膦甲酸钠对于 Jurkat 细胞中一系列基因的表达具有显著的调节作用. 这与我们应用抑制性消减杂交技术 (SSH) 证实膦甲酸钠可以上调 Jurkat 细胞中胸腺素 等基因的表达的结论是一致的.

另一方面, 肝脏是罹患多种感染性疾病的重要器官, 因此, 针对这些病原体特异性疫苗的研究尤为重要. 基因芯片技术的出现和应用, 在新型疫苗的研究中也具有十分重要的应用前景. 以不同的病原体成份进行免疫刺激, 然后以基因芯片技术对于构建的疫苗的免疫应答方式和机制所涉及的靶基因谱进行检测, 从而阐明不同疫苗成份在诱导免疫保护作用中的性质和特点, 以高通量的手段, 解决新型疫苗的候选分子. 这是目前进行新型疫苗研究很有希望的研究手段, 在预防肝脏感染性疾病新型疫苗的研究中具有重要应用前景.

总之, 基因芯片技术作为一种强有力探索未知表达基因的新方法, 可以从总体高度了解二种不同组织表达图谱的变化信息, 为全局理解基因功能和基因之间的相互关系及致病机制提供线索. 而且高通量、自动化的操作更能适应后基因组时代的要求. 在不久的将来, 基因芯片有望进一步阐明病毒性肝炎发生机制和发现新的标志物用于分子诊断. 从长远角度来看, 基因芯片有助于确认病毒感染的肝脏组织的分泌性蛋白基因, 提高血清学诊断水平, 同时也将推动抗病毒治疗的发展.

5 参考文献

- Schena M, Shalon D, Dais RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270: 467-470
- Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, Dais RW. Parallel human genome analysis: microarraybased expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93: 10614-10619
- Wodicka L, Dong H, Mittmann M, Ho MH, Lockhardt DJ. Genome-wide expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 1997; 14: 1675-1680
- Zhang MQ. Large-scale gene expression data analysis: a new challenge to computational biologists. *Genome Res* 1999;9: 681-688
- Yang GP, Ross DT, Kuang WW, Brown PO, Weigel RJ. Combining SSH and cDNA microarray for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 1517-1523
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999; 286: 531-537
- Zhuang L, You J, Ma YL. The mutations in various genic regions of hepatitis B virus DNA. *Xin Xiaohuabingxue Zazhi* 1997;5:331-332
- Yu LC, Gu CH. Mutation of hepatitis B virus and its association with liver diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999; 7:978-979
- Wu XN. Update therapy of chronic hepatitis B in China: Recent progress. *China Natl J New Gastroenterol* 1996; 2:65-68
- Qiu AG, Qiu RB, Miao Y, Fu ZL, Zhang YR, Zheng YQ, Hong YS, Wu BS, Jiang YP, Qian CF. Clinical study on therapeutic effect of three cycle natural therapy on chronic hepatitis B and C. *World J Gastroenterol* 1998; 4(Suppl 2):82
- Wakil SM, Kazim SN, Khan LA, Raisuddin S, Parvez MK, Guptan RC, Thakur V, Hasnain SE, Sarin SK. Prevalence and profile of mutations associated with lamivudine therapy in Indian patients with chronic hepatitis B in the surface and polymerase genes of hepatitis B virus. *J Med Virol* 2002;68:311-318
- He YW, Liu W, Zen LL, Xiong KJ, Luo DD. Effect of interferon in combination with ribavirin on the plus and minus strands of HCV RNA in patients with chronic hepatitis C. *China Natl J New Gastroenterol* 1996;2:179-181
- Tang ZY, Qi JY, Shen HX, Yang DL, Hao LJ. Short- and long-term effect of interferon therapy in chronic hepatitis C. *China Natl J New Gastroenterol* 1997;3:77
- Huang F, Zhao GZ, Li Y. HCV genotypes in hepatitis C patients and their clinical significances. *World J Gastroenterol* 1999;5:547-549
- Yan XB, Wu WY, Wei L. Clinical features of infection with different genotypes of hepatitis C virus. *Huaren Xiaohua Zazhi* 1998; 6: 653-655
- Wang PZ, Zhou YX. Study on hepatitis C virus genotyping in Xi'an area. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999; 7:757-759
- Worman HJ, Lin F. Molecular biology of liver disorders: the hepatitis C virus and molecular targets for drug development. *World J Gastroenterol* 2000; 6(Suppl 3):7
- Tang BZ, Zhuang L, You J, Zhang HB, Zhang L. Seven years follow up on trial of Interferon alpha in patients with HCV RNA positive chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2000;6(Suppl 3):68
- Wietzke-Braun P, Meier V, Braun F, Ramadori G. Combination of low-dose ribavirin and interferon alfa 2a therapy followed by interferon alfa 2a monotherapy in chronic HCV infected nonresponders and relapsers after interferon alfa 2a monotherapy. *World J Gastroenterol* 2001; 7:222-227
- Liang XS, Zhang SL, Di PC, Lin SM. Serum hepatitis C virus RNA in patients with chronic hepatitis C virus infection treated with interferon- α . *Xin Xiaohuabingxue Zazhi* 1997; 5:311-312
- Huang Y, Uchiyama Y, Fujimura T, Kanamori H, Doi T, Takamizawa A, Kodama T. A human hepatoma cell line expressing hepatitis c virus nonstructural proteins tightly regulated by tetracycline. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;271:732-740
- Honda M, Kaneko S, Kawai H, Shirota Y, Kobayashi K. Differential gene expression between chronic hepatitis B and C hepatic lesion. *Gastroenterology* 2001;120:955-966
- Bigger CB, Brasky KM, Lanford RE. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol* 2001;75:7059-7066

丙型肝炎病毒与 JAK-STAT 信号转导系统

成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳

成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳,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 国家自然科学基金资助项目, No. C39970674, C03011402
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. cj@genetherapy.com.cn
电话:010-66933391 传真:010-63801283
收稿日期:2002-10-29 接受日期:2002-11-18

成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳. 丙型肝炎病毒与 JAK-STAT 信号转导系统. 世界华人消化杂志 2003;11(4):464-466
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/464.htm>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)感染具有显著的慢性化倾向,而且只有部分患者对于干扰素(IFN)的治疗有较好的应答.为什么会存在这种情况和差别,这是与HCV-肝细胞之间相互作用的分子生物学机制和基础来决定的^[1].关于HCV分子生物学调节机制以及细胞信号转导的研究进展和研究结果表明,HCV RNA和/或其编码的蛋白分子,对于感染细胞的信号转导及其应答机制产生影响,是造成HCV慢性感染和对于IFN治疗应答率偏低的重要原因^[2].Janus激酶-信号转导和转录激活子(JAK-STAT)信号转导系统是细胞因子信号转导的主要途径,研究表明,HCV对于肝细胞信号转导具有显著的影响^[3].

1 JAK-STAT 信号转导系统的组成和调节机制

在众多的细胞信号转导路径中,JAK-STAT信号转导通路主要是负责细胞外多肽或细胞因子刺激信号通过跨膜受体的转导,直接作用于细胞核中的基因的启动子序列,不需要第二信使进行转录调节^[4].从进化角度,从低级的真核细胞到人类,这一信号转导通路都是高度保守的.JAK-STAT信号转导通路似乎是细胞早期在适应细胞间信号转导过程中逐渐形成的.JAK-STAT信号转导通路受到大量来自细胞内部和环境因素的影响.

在研究细胞因子信号转导的过程中发现了JAK-STAT系统.细胞因子与相关的细胞膜上的特异性受体结合以后,通过酪氨酸激酶JAK系统激活了STATs.STATs一旦被激活,就形成同二聚体,并且发生细胞内转位到细胞核内,以对靶基因的表达进行调节^[5].过去几年中对于JAK-STAT信号转导途径进行了系统的研究,鉴定了多种STATs和调节蛋白.到目前为止,在哺乳动物的细胞内总共鉴定了7种STATs蛋白,STATs最主要的功能就是介导细胞因子的信号转导途径.

在细胞内部,还存在着JAK-STAT信号转导系统的拮抗系统.细胞因子信号转导抑制因子(SOCS)就是细胞

因子和生长因子信号通过JAK-STAT系统进行信号转导的抑制因子^[6].细胞因子通过JAK-STAT进行的信号转导,调控一系列的生物应答,包括免疫应答,细胞生长与分化,以及造血过程等.SOCS家族由8种蛋白组成,包括CIS蛋白,以及SOCS1-SOCS7.这些蛋白分子的结构中部都有SH2结构域(domain),还有保守的C-末端序列,称为SOCS盒式(box)结构.这些蛋白都有独特的N-末端结构.细胞因子和生长因子的刺激都能诱导SOCS1-3和CIS的表达,抑制JAK-STAT介导的细胞因子信号转导,形成了经典的负反馈环.

关于JAK-STAT信号转导系统的研究具有多方面的意义.JAK-STAT信号转导途径在细胞因子的信号转导以及细胞发育和生存过程中具有十分重要的作用^[7,8].Bhunja et al^[9]研究了JAK-STAT信号转导系统异常与多囊肾疾病(PKD)之间的关系.多囊肾疾病是一种常染色体显性遗传性疾病,其特点就是在肾脏或其他器官中出现囊性改变,原因就是PKD1或PKD2基因发生突变.多囊蛋白-1(polycystin-1)具有激活JAK-STAT信号转导的作用,籍此也可以上调p21/waf1的表达,并诱导产生细胞周期的G0/G1阻滞.这一过程需要有多囊蛋白-2这种通道蛋白的参与,这是一种重要的辅助因子.基因突变造成多囊蛋白-1/2结合特点发生改变,导致这一激活系统产生障碍.PKD1基因敲除小鼠的胚胎STAT1蛋白磷酸化和p21/waf1的诱导过程有显著障碍.这些结果表明,多囊蛋白-1/2复合物的功能之一就是调节JAK-STAT系统,可以解释这些基因突变之后,为什么会产生异常的生长调节.

为了阐明酒精性肝损伤的分子生物学机制,Chen et al^[10]研究了酒精对于肝细胞中JAK-STAT急性调节作用.以新鲜分离的大鼠肝细胞和HepG2细胞进行了研究.新鲜分离的肝细胞受到急性酒精处理以后,白介素-6(IL-6)和IFN- γ 即获的STAT信号受到抑制,但对于培养的肝细胞和HepG2细胞,乙醇脱氢酶(ADH)基因转导和细胞色素P450(2E1)基因转导的HepG2细胞的信号转导系统没有影响.酒精对于新鲜分离肝细胞的作用,也不受ADH抑制因子4-甲基吡唑(4-MP)的拮抗.以乙醛或者过氧化氢急性作用于肝细胞,也没有抑制STAT的信号转导系统.进一步的研究结果表明,对于这些抑制作用应答的缺失,也不是由于肝细胞增生发生改变,或者与胶原的接触有关.

2 丙型肝炎病毒核心蛋白与 JAK-STAT 信号转导

丙型肝炎病毒核心蛋白是HCV基因组编码的一种结构蛋白,具有多种生物学调节作用,与JAK-STAT信号转导系统的调节有密切的关系.JAK-STAT信号转导系统是IFN和I型细胞因子广泛采用的信号转导途径.这些细胞因子首先激活JAK激酶,然后磷酸化和激活STAT蛋白.在磷酸化和激活之前,STAT蛋白存在与细胞质之中,激活之后就发生细胞内转位,到达细胞核中,对

于肝细胞基因组的表达进行调控^[11]。研究发现, HCV 抑制 IFN 介导的 JAK-STAT 信号转导系统, 主要机制是阻断 IFN 刺激的基因因子 3(ISGF3)复合物的形成。但是其下游的信号转导通路以及主要的 HCV 蛋白类型目前还不是特别清楚。Basu et al^[12]对 HCV 核心蛋白对 IFN 和 IFN 介导的 JAK-STAT 信号转导的影响进行了研究。HCV 核心蛋白的表达对于 IFN 诱导的 STAT1 表达具有显著的下调作用, 凝胶迟滞分析(gel retardation assay)表明表达 HCV 核心蛋白的细胞, 受到 IFN 刺激后反式激活因子 GAF 和 ISGF3 的形成显著降低。蛋白表达和 RNase 保护研究结果表明, GAF 或 ISGF3 形成能力的降低, 与 STAT1 蛋白表达水平的降低有关。但这些信号转导途径的改变对于下游靶基因如 IFN 调节因子-1(IRF-1)、561 的表达没有显著影响。以 HCV 结构和非结构基因稳定转染的细胞, 也有类似的效应, 原因不清楚。

3 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 与 JAK-STAT 信号转导 Heim et al^[13]建立四环素应答元件严谨控制的 HCV 全长编码区表达型转染细胞系, 并研究了 HCV 蛋白对 IFN 介导的信号转导的影响。HCV 蛋白的表达, 强烈抑制 IFN 介导的 JAK-STAT 系统的信号转导。这种抑制作用与 STAT 酪氨酸磷酸化下游的信号转导途径有关, 而且对于 JAK-STAT 信号转导途径的抑制作用不仅限于 IFN , 而且可抑制白血病抑制因子(LIF)诱导 STAT3 的信号转导。但对于 TNF 诱导的转录因子 NF- κ B 的激活没有影响。HCV 干扰 IFN 介导的 JAK-STAT 信号转导, 与对 IFN 治疗的抗性作用无关, 而可能是与 HCV 感染后免疫逃逸以及慢性感染的形成过程有关。

HCV 亚基因组复制子(replicon)在肝细胞中的复制, 可刺激干扰素 β (IFN β)启动子, 并使人肝癌细胞系产生 IFN β 。研究发现, HCV RNA 的复制可激活 NF- κ B 和 IFN 调节因子(IRF-1)的激活和 DNA 结合功能^[14]。在细胞核中, 激活形式的 IRF-3 也增多。含有 HCV 复制子的肝癌细胞系, 由 IFN β 激活的一系列的抗病毒作用基因的基础表达水平都显著提高。HCV RNA 的复制, 可刺激细胞抗病毒机制, 并使细胞进入抗病毒状态。稳定的 HCV RNA 复制要面对一些抗病毒作用机制的应答, 提示 HCV 可能会编码一种或多种病毒蛋白, 克服细胞产生的这些抗病毒机制, 以形成慢性感染。

Pflugheber et al^[15]应用 HCV 亚基因组复制子细胞模型, 研究了 HCV-肝细胞之间的相互作用的可能机制。研究结果证实, HCV RNA 亚基因组的复制可刺激双链 RNA(dsRNA)的信号转导系统, 阻断 IRF-1 和 PKR 的信号转导, 与 dsRNA 结合以及抑制 dsRNA 对 PKR 的激活作用有关。NS5A 蛋白单独情况下就足以阻断 IRF-1 的激活以及 dsRNA 依赖性 IRF-1 基因表达的诱导。PKR 结合位点及其附近核苷酸序列的突变, 可以解除 NS5A 的这些抑制作用, 导致 IRF-1 表达水平升

高, HCV RNA 复制水平降低。这些研究结果表明在 dsRNA 信号转导中具有重要作用的 PKR, 以及病毒感染激活的 IRF-1 的功能异常, 是 HCV NS5A 阻断宿主抗病毒应答以及形成慢性感染的主要机制。HCV NS5A 具有通过氧化应激机制诱导细胞质中转录因子 NF- κ B 和 STAT-3 的作用^[16]。NS5A 可导致细胞内钙的异常。Ca²⁺ 所介导的信号触发线粒体活性氧成分的提高, 导致转录因子蛋白 NF- κ B 和 STAT-3 向细胞核内的转位。研究表明 NS5A 可以持续激活 STAT-3。在抗氧化剂吡咯烷二氨基甲酸酯(PDTC)、N-乙酰半胱氨酸(NAC)或 Ca²⁺ 螯合剂(EGTA-AM, TMB-8), 存在的条件下, NS5A 诱导的 NF- κ B 和 STAT-3 的激活作用消失。HCV NS5A 与对 IFN 的抗性有关, 其机制之一就是 NS5A 对于 IFN 诱导关键酶, 即双链 RNA 激活的蛋白激酶(PKR)抑制作用, 但 IFN 敏感和抵抗的 HCV NS5A 在 HeLa 细胞中对于 ISGF-3 的表达的影响没有显著的差别^[17]。NS5A 蛋白缺失氨基末端 110、222 和 334 个氨基酸残基, 以及羧基末端缺失 117、230 氨基酸残基时, 对于 IFN 诱导 ISGF-3 的表达也没有显著的影响。HCV NS5A 的表达也不影响 IFN 诱导的 STAT-1 酪氨酸磷酸化以及上调 PKR 及 MHC-I 抗原的表达。但 NS5A 可以诱导人细胞中 IL-8 mRNA 和蛋白的表达, 这一效应与体外 NS5A 抑制 IFN 的抗病毒作用有关。NS5A 可诱导 IL-8 启动子指导的报告基因的表达, 这种调节作用与 IL-8 启动子序列中 133 bp 的序列有关。氨基末端缺失 110、222 个氨基酸残基的 NS5A 突变体, 具有比全长 NS5A 更强的诱导 IL-8 启动子活性作用, 因为这种突变形式的 NS5A 蛋白更能分布在细胞核中。IL-8 启动子突变研究表明, NF- κ B 和 AP-1 转录因子的结合是 NS5A 对其进行调节的必要环节。因此, HCV NS5A 蛋白对于趋化因子的调节, 也是影响细胞对 IFN 敏感性的重要机制之一。

在 HCV 感染者外周血单个核细胞(PBMC)受到 IFN 的刺激以后, IRF-1 mRNA 和 IRF-1/IRF-2 比率较正常人显著升高。Sendai 病毒刺激以后, 正常人和 HCV 感染者的 PBMC 的 IRF-1、IRF-2 和 IFN mRNAs, 以及 IFN 蛋白表达水平也显著高于基础水平。自然感染 HCV 诱导 PBMC 的 IFN γ 表达水平升高。这些细胞体外感染 Sendai 病毒可以提高正常人和 HCV 感染者的 IFN γ 的表达水平。病毒感染诱导的 IFN 表达具有型特异性, 认为 HCV 感染可以特异性地诱导 PBMC 中 IFN γ 的表达^[18,19]。

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,朱传琳.丙型肝炎病毒感染慢性化的分子生物学机制.国外医学病毒学分册 2000;7:29-32
- 3 Aaronson DS,Horvath CM. A road map for those who know JAK-STAT. *Science* 2002; 296:1653-1655
- 4 成军,陈菊梅.丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的研究进展.国外医

- 学病毒学分册 2000;7:123-127
- 5 Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 2002;285:1-24
 - 6 Cooney RN. Suppressors of cytokine signaling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway. *Shock* 2002;17:83-90
 - 7 Schindler CW. Series introduction. JAK-STAT signaling in human disease. *J Clin Invest* 2002;109:1133-1137
 - 8 O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 2002;109(Suppl):S121-131
 - 9 Bhunia AK, Piontek K, Boletta A, Liu L, Qian F, Xu PN, Germino FJ, Germino GG. PKD1 induces p21 (waf1) and regulation of the cell cycle via direct activation of the JAK-STAT signaling pathway in a process requiring PKD2. *Cell* 2002;109:157-168
 - 10 Chen J, Clemens DL, Cederbaum AI, Gao B. Ethanol inhibits the JAK-STAT signaling pathway in freshly isolated rat hepatocytes but not in cultured hepatocytes or HepG2 cells: evidence for a lack of involvement of ethanol metabolism. *Clin Biochem* 2001;34:203-209
 - 11 Leonard WJ. Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction. *Int J Hematol* 2001;73:271-277
 - 12 Basu A, Meyer K, Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus core protein modulates the interferon-induced transacting factors of Jak/Stat signaling pathway but does not affect the activation of downstream IRF-1 or 561 gene. *Virology* 2001;288:379-390
 - 13 Heim MH, Moradpour D, Blum HE. Expression of hepatitis C virus proteins inhibits signal transduction through the Jak-STAT pathway. *J Virol* 1999;73:8469-8475
 - 14 Fredericksen B, Akkaraju GR, Foy E, Wang C, Pflugheber J, Chen ZJ, Gale MJ. Activation of the interferon-beta promoter during hepatitis C virus RNA replication. *Viral Immunol* 2002;15:29-40
 - 15 Pflugheber J, Fredericksen B, Sumpter R J, Wang C, Ware F, Sodora DL, Gale M Jr. Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:4650-4655
 - 16 Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9599-9604
 - 17 Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, Ezelle HJ, Duverlie G, Barber GN, Levy DE, Mukaida N, Gretch DR. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* 2001;75:6095-6106
 - 18 Heim MH. Intracellular signalling and antiviral effects of interferons. *Dig Liver Dis* 2000;32:257-263
 - 19 Larrea E, Alberdi A, Castelruiz Y, Boya P, Civeira MP, Prieto J. Expression of interferon-alpha subtypes in peripheral mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C: a role for interferon-alpha5. *J Viral Hepat* 2001;8:103-110

丙型肝炎病毒与 MAPK 信号转导系统

成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳

成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳, 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 国家自然科学基金资助项目, No. C39970674, C03011402
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: 2002-10-29 接受日期: 2002-11-18

成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 丙型肝炎病毒与 MAPK 信号转导系统. 世界华人消化杂志 2003;11(4):466-469
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/466.htm>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)是一种正链 RNA 病毒, 其致病机制与 DNA 病毒和逆转录病毒有明显的区别^[1]. 在病毒的生活周期中, HCV 基因组编码多种结构和非结构蛋白, 自身结合形成同二聚体形式, 或与其他 HCV 病毒蛋白、细胞蛋白结合形成异二聚体, 甚至是多聚体形式在肝细胞内存在^[2]. 另外, 不同的磷酸化形式, 还可以发生细胞内转位, 对细胞的功能与调节产生影响. 在肝细胞质、细胞核中的 HCV 蛋白对肝细胞正常的信号转导通路进行干扰, 这是 HCV 致病机制的重要组成部分^[3]. 丝裂原激活蛋白激酶/细胞外信号调节激酶(MAPK/ERK)及其介导的细胞内信号转导是 HCV 蛋白作用的重要靶位, 了解 HCV 蛋白对 MAPK 信号转导通路的影响, 对于 HCV 慢性感染的形成, 甚至是 HCV 相关的肝细胞癌(HCC)的发生机制的研究具有重要意义^[4].

1 HCV 的包膜蛋白与 MAPK 信号转导

关于 HCV 受体的研究目前还没有定论, HCV 受体究竟是单一受体, 还是象人免疫缺陷病毒-1(HIV-1)那样具有主要受体和辅助受体目前尚不清楚^[5]. 目前的研究焦点是 CD81 低密度脂蛋白受体(LDL-R)等. 在四跨膜分子 CD81、CD81 分子在人肝细胞等细胞膜的表面表达, 这种蛋白与细胞内信号转导过程有关. 最近的研究结果表明人细胞膜上 CD81 的表达与 HCV 包膜糖蛋白 E2 及其进入肝细胞中的过程有关^[6]. 因此, CD81 分子作为 HCV 感染肝细胞的受体分子而得到广泛的关注. HCV E2-CD81 分子之间的相互作用与 HCV 感染及其致病机制密切相关, MAPK/ERK 与细胞的增生和组织的增生过程密切相关. 为了研究 HCV 对于 MAPK/ERK 的调节, Zhao et al^[7]应用人肝癌细胞系 HepG2 进行了研究. CD81 在 HepG2 细胞膜表面有一定水平的表达, 通过流式细胞学的免疫荧光技术的检测得到了证实. HepG2 细胞以不含胎牛血清(FCS)的 DMEM 培养基培养, 7 h 后, 以 HCV E2 蛋白处理不同的时间. 细胞内 MAPK/ERK 的状态以 Western blot 杂交、免疫组织化学和免疫荧光技术进行研究. HepG2 细胞中 MAPK/ERK 蛋白在受到 HCV E2 蛋白的刺激以后发生磷酸化修饰, 而且 MAPK/ERK 的磷酸化与作用的 HCV E2 蛋白的浓度有关, 是一种剂量和时间依赖性的效应. MAPK/ERK 在 HepG2 受到 HCV E2 蛋白的刺激后被激活, 表明 HCV E2-CD81 作用参与了细胞内信号转导, 可能在 HCV 感染的致病过程中发挥重要作用.

2 HCV 核心蛋白与 MAPK 信号转导

为了研究 HCV 的恶性转化作用, Tsuchihara et al^[8]建立了稳定表达 HCV 核心蛋白的 BALB/3T3 A31-I-1 细胞系, 这一细胞系在受到 HCV 核心蛋白与 v-H-ras 的基因共转染时, 就失去生长接触抑制, 发生形态学改变, 呈现非贴壁生长, 而且出现非血清依赖性生长的特点. 表

- 学病毒学分册 2000;7:123-127
- 5 Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 2002;285:1-24
 - 6 Cooney RN. Suppressors of cytokine signaling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway. *Shock* 2002;17:83-90
 - 7 Schindler CW. Series introduction. JAK-STAT signaling in human disease. *J Clin Invest* 2002;109:1133-1137
 - 8 O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 2002;109(Suppl):S121-131
 - 9 Bhunia AK, Piontek K, Boletta A, Liu L, Qian F, Xu PN, Germino FJ, Germino GG. PKD1 induces p21 (waf1) and regulation of the cell cycle via direct activation of the JAK-STAT signaling pathway in a process requiring PKD2. *Cell* 2002;109:157-168
 - 10 Chen J, Clemens DL, Cederbaum AI, Gao B. Ethanol inhibits the JAK-STAT signaling pathway in freshly isolated rat hepatocytes but not in cultured hepatocytes or HepG2 cells: evidence for a lack of involvement of ethanol metabolism. *Clin Biochem* 2001;34:203-209
 - 11 Leonard WJ. Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction. *Int J Hematol* 2001;73:271-277
 - 12 Basu A, Meyer K, Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus core protein modulates the interferon-induced transacting factors of Jak/Stat signaling pathway but does not affect the activation of downstream IRF-1 or 561 gene. *Virology* 2001;288:379-390
 - 13 Heim MH, Moradpour D, Blum HE. Expression of hepatitis C virus proteins inhibits signal transduction through the Jak-STAT pathway. *J Virol* 1999;73:8469-8475
 - 14 Fredericksen B, Akkaraju GR, Foy E, Wang C, Pflugheber J, Chen ZJ, Gale MJ. Activation of the interferon-beta promoter during hepatitis C virus RNA replication. *Viral Immunol* 2002;15:29-40
 - 15 Pflugheber J, Fredericksen B, Sumpter R J, Wang C, Ware F, Sodora DL, Gale M Jr. Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:4650-4655
 - 16 Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9599-9604
 - 17 Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, Ezelle HJ, Duverlie G, Barber GN, Levy DE, Mukaida N, Gretch DR. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* 2001;75:6095-6106
 - 18 Heim MH. Intracellular signalling and antiviral effects of interferons. *Dig Liver Dis* 2000;32:257-263
 - 19 Larrea E, Alberdi A, Castelruiz Y, Boya P, Civeira MP, Prieto J. Expression of interferon-alpha subtypes in peripheral mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C: a role for interferon-alpha5. *J Viral Hepat* 2001;8:103-110

丙型肝炎病毒与 MAPK 信号转导系统

成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳

成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳, 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 国家自然科学基金资助项目, No. C39970674, C03011402
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: 2002-10-29 接受日期: 2002-11-18

成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 丙型肝炎病毒与 MAPK 信号转导系统. 世界华人消化杂志 2003;11(4):466-469
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/466.htm>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)是一种正链 RNA 病毒, 其致病机制与 DNA 病毒和逆转录病毒有明显的区别^[1]. 在病毒的生活周期中, HCV 基因组编码多种结构和非结构蛋白, 自身结合形成同二聚体形式, 或与其他 HCV 病毒蛋白、细胞蛋白结合形成异二聚体, 甚至是多聚体形式在肝细胞内存在^[2]. 另外, 不同的磷酸化形式, 还可以发生细胞内转位, 对细胞的功能与调节产生影响. 在肝细胞质、细胞核中的 HCV 蛋白对肝细胞正常的信号转导通路进行干扰, 这是 HCV 致病机制的重要组成部分^[3]. 丝裂原激活蛋白激酶/细胞外信号调节激酶(MAPK/ERK)及其介导的细胞内信号转导是 HCV 蛋白作用的重要靶位, 了解 HCV 蛋白对 MAPK 信号转导通路的影响, 对于 HCV 慢性感染的形成, 甚至是 HCV 相关的肝细胞癌(HCC)的发生机制的研究具有重要意义^[4].

1 HCV 的包膜蛋白与 MAPK 信号转导

关于 HCV 受体的研究目前还没有定论, HCV 受体究竟是单一受体, 还是象人免疫缺陷病毒-1(HIV-1)那样具有主要受体和辅助受体目前尚不清楚^[5]. 目前的研究焦点是 CD81 低密度脂蛋白受体(LDL-R)等. 在四跨膜分子 CD81、CD81 分子在人肝细胞等细胞膜的表面表达, 这种蛋白与细胞内信号转导过程有关. 最近的研究结果表明人细胞膜上 CD81 的表达与 HCV 包膜糖蛋白 E2 及其进入肝细胞中的过程有关^[6]. 因此, CD81 分子作为 HCV 感染肝细胞的受体分子而得到广泛的关注. HCV E2-CD81 分子之间的相互作用与 HCV 感染及其致病机制密切相关, MAPK/ERK 与细胞的增生和组织的增生过程密切相关. 为了研究 HCV 对于 MAPK/ERK 的调节, Zhao et al^[7]应用人肝癌细胞系 HepG2 进行了研究. CD81 在 HepG2 细胞膜表面有一定水平的表达, 通过流式细胞学的免疫荧光技术的检测得到了证实. HepG2 细胞以不含胎牛血清(FCS)的 DMEM 培养基培养, 7 h 后, 以 HCV E2 蛋白处理不同的时间. 细胞内 MAPK/ERK 的状态以 Western blot 杂交、免疫组织化学和免疫荧光技术进行研究. HepG2 细胞中 MAPK/ERK 蛋白在受到 HCV E2 蛋白的刺激以后发生磷酸化修饰, 而且 MAPK/ERK 的磷酸化与作用的 HCV E2 蛋白的浓度有关, 是一种剂量和时间依赖性的效应. MAPK/ERK 在 HepG2 受到 HCV E2 蛋白的刺激后被激活, 表明 HCV E2-CD81 作用参与了细胞内信号转导, 可能在 HCV 感染的致病过程中发挥重要作用.

2 HCV 核心蛋白与 MAPK 信号转导

为了研究 HCV 的恶性转化作用, Tsuchihara et al^[8]建立了稳定表达 HCV 核心蛋白的 BALB/3T3 A31-I-1 细胞系, 这一细胞系在受到 HCV 核心蛋白与 v-H-ras 的基因共转染时, 就失去生长接触抑制, 发生形态学改变, 呈现非贴壁生长, 而且出现非血清依赖性生长的特点. 表

达 HCV 核心蛋白的细胞系在受到生长因子的刺激以后, 生长速度显著加快. 另外, 以人工合成的反义寡聚脱氧核糖核苷酸(ODN)阻断细胞中 HCV 核心基因的表达, 对于其生长具有一定的抑制作用. HCV 核心蛋白可激活 MAPK 和血清应答元件(SRE).

HCV 的基因分型和 HCV 核心蛋白的一级结构序列对于其功能也具有十分重要的意义. Giambartolomei et al^[9]研究证实 HCV 基因型 1a 和 3 的核心蛋白对于 MEK1 和 Erk1/2 MAPK 都有激活作用, HCV 核心蛋白持续表达可产生 Raf1 和 MAPKK 高基础水平的表达, 这种现象可以通过内源性 Raf1 活性的体外分析及高度磷酸化的 Erk1 和 Erk2 的水平检测而得到证实, 甚至在血清饥饿状态下也存在这种现象. Erk1/2 及其下游转录因子 Elk-1 的激活的时间在细胞受到 EGF 的刺激以后显著延长. 尽管存在 MAP 磷酸酶 MKP 的反馈调节, 表达 HCV 核心蛋白的细胞在受到 EGF 的刺激后这种激活仍然存在, 可能与 Raf-1 的持续激活有关. HCV 核心蛋白对于 MAPK 激酶链具有直接的激活作用, 这也是 HCV 核心蛋白对细胞具有转化作用的机制之一. Erhardt et al^[10]建立了四环素控制的表达全长(191 aa)或部分序列(160 aa)的 HepG2 细胞系. 发现 HCV 核心蛋白可以激活细胞外信号调节激酶(ERK)、c-jun N-末端激酶(JNK)、p38 丝裂原激活蛋白(MAP)激酶、诱导 MAP 激酶磷酸酶 MKP-1 的表达, 并促进细胞的增生. 同时伴有 c-Jun 和 ATF-2 的激活, 但没有 Elk-1 和 c-Fos 的激活. 另外, AP-1 的激活过程与 c-Fos 的状态无关. 全长或截短型 HCV 核心蛋白具有相似的作用.

HCV 核心蛋白对于细胞凋亡具有促进和抑制的双向调节作用, 主要决定于诱导细胞的刺激因素和当时细胞所处的状态有关. Takamatsu et al^[11]研究了 HCV 核心蛋白对血清饥饿诱导的细胞凋亡的影响进行了研究. 稳定表达 HCV 核心蛋白的 NIH 3T3 细胞系对于血清饥饿诱导的细胞凋亡具有一定的抑制作用. 但 p53、p21Waf1 和 Bax 在血清饥饿诱导后都有诱导性表达, 与 HCV 核心蛋白是否表达无关. 表明这种情况下的细胞凋亡是 p53 非依赖性的. 不表达 HCV 核心蛋白的细胞系, 细胞受到血清饥饿后诱导的细胞凋亡可由 p38/MAPK 的特异性抑制剂 SB203 580 部分逆转, 但在表达 HCV 核心蛋白的细胞系中没有阻断作用. 血清饥饿激活的 p38 MAPK, 在表达 HCV 核心蛋白的细胞系中, 其磷酸化形式的蛋白水平有显著下降. 表明 HCV 核心蛋白对于血清饥饿诱导的细胞凋亡具有抑制作用, 而且这种抑制作用是 p38 MAPK 激活依赖性的.

MAPK 信号转导系统在细胞的增生、恶性转化和应急应答的调节中具有重要作用. HCV 核心蛋白具有潜在的致癌作用, 但机制目前还不十分清楚. MAPK 细胞外信号调节激酶(ERK)的激酶(MEK)-ERK 信号转导途径以及其下游的靶基因, 即血清应答元件(SRE), 在 BALB/3T3 表达 HCV 核心蛋白时被激活. 为了阐明 HCV 核心蛋白激活 MEK-ERK 途径的机制, Fukuda et al^[12]以 HCV 核心蛋白

瞬时转染几种不同的细胞系, 并应用 Gal4-Elk1 萤虫素酶报告基因表达载体. 体外 MAPK 的 Western blotting 杂交分析对其信号转导途径进行了研究. 发现存在有丝分裂原的刺激时, HCV 核心蛋白可增强 MEK 下游的 Elk1 的激活, 而对 ERK 活性及 Elk1 的磷酸化没有影响. 研究结果表明 HCV 核心蛋白可通过经典的磷酸化修饰链激活 Elk1. 说明 HCV 感染是引起肝细胞发生恶性转化的可能机制之一.

HCV 感染与 HCC 有关, 而 HCC 的发生与 MAPK/ERK 信号转导途径有关, 因此 Hayashi et al^[13]研究了 HCV 核心蛋白对于 MAPK/ERK 级联反应的影响. HCV 核心蛋白可显著激活 MAPK/ERK 的级联反应, 包括 Elk1. HCV 核心蛋白单独情况下就可以激活 MAPK/ERK. 有趣的是, Elk-1 的活性在受到促癌因子 12-O-十四酰佛波醇-13-乙酸酯(TPA)的作用下进一步升高, 但表达 HCV 核心蛋白的 NIH 3T3 和 HepG2 细胞受到 EGF 和 TGF 的刺激后, 没有进一步的升高. HCV 核心蛋白对 MAPK/ERK 的激活作用, 当被 MEK1 特异性抑制剂 PD98 059 阻断. 这些研究结果表明, HCV 核心蛋白激活 ERK 是肝细胞有丝分裂原介导的信号非依赖性的, 但与 TPA 有协同作用. HCV 核心蛋白可能存在对 MEK1 的调节作用, 或者对更为上游的信号转导环节产生影响.

在针对病原体的早期免疫应答过程中有补体成分的参与, 补体成分在清除病原体感染宿主血清中的抗原的过程中具有十分重要的作用. Yao et al^[14]研究表明 HCV 核心蛋白在 HCV 感染的初期首先表达, 并且在 HCV 感染宿主的血液循环中存在, 通过与补体受体的结合, 即 C1q 受体球状位点(gC1qR)的结合, 抑制 T 细胞的增生反应. 为了研究 HCV 核心蛋白与 C1qR 相互作用及其对 T 细胞增生的抑制作用及机制, 研究了 HCV 核心蛋白对于 T 细胞激活早期事件的影响. 发现 HCV 核心蛋白抑制 ERK 和丝裂原激活 ERK 激酶(MEK)蛋白的磷酸化. HCV 核心蛋白对于 ERK/MEK MAPK 的干扰, 造成了白介素-2(IL-2)和白介素-2受体(IL-2R)基因转录水平的下降, 最终造成 IL-2 的产生以及高亲和力 IL-2R 的表达水平的下降. 抗-gC1qR 抗体可以逆转 HCV 核心蛋白对 ERK/MEK 磷酸化水平的影响, 说明 HCV 核心蛋白和 gC1qR 与 ERK/MEK MAPK 的激活有关. 表明 HCV 核心蛋白可通过补体依赖性的调节途径阻断 T 细胞激活的细胞内事件, 在 HCV 慢性感染的形成过程中发挥重要作用.

3 HCV 非结构蛋白 NS3 与 MAPK 信号转导

慢性丙型肝炎发病机制中氧化应激产生的活性氧(ROS)发挥一定的作用. 吞噬细胞及激活的巨噬细胞释放的 ROS 是主要氧化应激产物的来源. 但是 HCV 蛋白作用于单个核细胞后产生活性氧的情况目前还不十分清楚. Bureau et al^[15]对于 HCV 刺激的单个核细胞产生活性氧的情况进行了研究. 健康正常人的外周血单个核细胞 PBMC 受到 HCV

的核心蛋白、NS3、NS4、NS5蛋白刺激以后,以化学发光技术对于产生的ROS进行了测定.发现只有NS3蛋白可以触发PBMC产生ROS,主要包括阴性氧离子. PBMC受到NS3刺激以后,出现快速而短暂的细胞内钙水平的升高.应用不同的代谢抑制剂,证实ROS的产生需要钙离子的流入,以及酪氨酸激酶以及应急激活蛋白激酶p38的参与.发现p47 (PHOX)发生磷酸化和细胞内转位,表明在这一过程中有NADPH氧化酶的参与. NS3对于佛波12-肉豆蔻酸-13乙酸盐(PMA)诱导的氧化爆发(oxidative burst)具有抑制作用. 研究结果表明HCV NS3蛋白可激活NADPH氧化酶,调节ROS的产生,在HCV感染的发病机制中具有一定作用.

4 HCV非结构蛋白NS5A与MAPK信号转导

丙型肝炎病毒NS5A蛋白对于PKR具有抑制作用. PKR所介导的IFN抗病毒作用部分地通过抑制eIF2的磷酸化,进而抑制mRNA翻译而实现的. He et al [16]研究了HCV NS5A蛋白对PKR mRNA翻译过程的抑制作用. 痘苗病毒载体VVE3L表达的蛋白是一种很强的抑制因子. 以IFN预处理表达缺陷型基因的VVDeltaE3L HeLa S3细胞,PKR和eIF2的磷酸化水平都显著升高.当表达NS5A蛋白VVNS5A的细胞系受到IFN刺激时,PKR和eIF2的磷酸化水平出现瞬时下降. 表达VVDeltaE3L的细胞系受到IFN的刺激以后,p38 MAPK活性升高,符合其位于PKR信号转导的下游的事实. 另外观察到这些细胞中eIF4E的磷酸化水平升高,这是p38下游的信号转导环节. 在VVNS5A感染的细胞系中这些调节作用都有不同程度的下降. NS5A还具有抑制表达NS5A蛋白受到表皮生长因子(EGF)激活时的p38-eIF4E磷酸化. NS5A诱导的eIF2和eIF4E磷酸化可能在调节mRNA翻译过程中有矛盾. 事实上表达VVNS5A的细胞系受到IFN的刺激以后,只是部分短暂地回复VVDeltaE3L细胞与病毒的mRNA翻译过程. 综上所述,NS5A作为一种PKR的抑制物,在总体上具有维持HCV感染早期mRNA翻译水平的功能,而感染晚期更使HCV mRNA适合帽状结构非依赖性的翻译过程.

在细胞内,HCV NS5A蛋白可在细胞丝氨酸/苏氨酸激酶的催化作用下发生磷酸化. 为了确定NS5A蛋白在细胞内磷酸化的位点,Reed et al [17]以同位素标记HCV-H NS5A的磷酸化多肽,进行纯化,对于磷酸化氨基酸残基位点进行分析,并通过Edman降解法证实. 发现HCV-H NS5A蛋白磷酸化的位点是Ser(2321). 这一磷酸化位点的确定,得到了另外2种方法研究结果的证实. 如对Ser(2321)突变为Ala,磷酸化蛋白修饰立即消失,对合成多肽片段的磷酸化修饰研究结果进行分析,证实NS5A蛋白的磷酸化修饰位点为Ser(2321). 对NS5A的Ser(2321)位点进行定点诱变,表明NS5A蛋白的磷酸化修饰是NS4A和PKR结合非依赖性的. NS5A蛋白富含脯氨酸的位点恰好位于Ser(2321)的周围,如PLPPRS(2321)PPVPPR,表明细胞内脯

氨酸特异性激酶是HCV NS5A磷酸化的激酶类型,这与以前以蛋白激酶抑制剂研究的结果是一致的.

NS5A蛋白分子结构中存在几个富含脯氨酸(proline-rich)的序列结构,与SH3结合位点结构一致,提示在信号转导的调节过程中具有十分重要的作用. NS5A可以与Grb2接头蛋白(adaptor protein)结合. Tan et al [18]以抗-Grb2抗体的免疫印迹分析结果表明,从表达HCV NS5A蛋白的HeLa S3细胞来源的免疫复合物,发现了NS5Ae可与Grb2结合. Grb2蛋白N-末端SH3结构域的突变明显影响与NS5A蛋白之间的结合,但C-末端的SH3位点的基因突变则影响不大. Grb2分子中2个位点同时突变则造成Grb2与NS5A蛋白之间的结合完全消失,说明Grb2蛋白分子中的这2个SH3结构域在与NS5A蛋白的结合过程中具有协同作用. NS5A的突变分析结果表明,富含脯氨酸的SH3结合区在所有基因型的HCV病毒株都是保守的[19,20]. NS5A蛋白在细胞内的表达抑制HeLa S3细胞中ERK1/2的磷酸化. 稳定表达NS5A蛋白的HeLa细胞在受到EGF的刺激后ERK1/2不发生磷酸化. 在这些细胞受到EGF的刺激后发生NS5A与Grb2蛋白之间的结合. 因此,NS5A可能是通过与选择性接头蛋白的结合干扰Grb2介导的信号转导.

5 参考文献

- 1 成军,杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第1版:人民军医出版社,1997:83-103
- 2 李克,王琳,成军,陆荫英,洪源,刘妍,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
- 3 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
- 4 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区结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:223-225
- 5 陆荫英,李克,刘妍,王琳,成军,张玲霞. 乙型及丙型肝炎病毒受体的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:211-213
- 6 成军,张玲霞. CD81分子的生物学功能. 国外医学免疫学分册 2000;23:322-324
- 7 Zhao LJ, Liu HQ, Cao J, Feng GS, Qi ZT. Activation of intracellular MAPK/ERK initiated by hepatitis C virus envelope protein E2 in HepG2 cells. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao* 2001;33:691-692
- 8 Tsuchihara K, Hijikata M, Fukuda K, Kuroki T, Yamamoto N, Shimotohno K. Hepatitis C virus core protein regulates cell growth and signal transduction pathway transmitting growth stimuli. *Virology* 1999;258:100-106
- 9 Giambartolomei S, Covone F, Levrero M, Balsano C. Sustained activation of the Raf/MEK/Erk pathway in response to EGF in stable cell lines expressing the Hepatitis C Virus (HCV) core protein. *Oncogene* 2001;20:2606-2610
- 10 Erhardt A, Hassan M, Heintges T, Haussinger D. Hepatitis C virus core protein induces cell proliferation and activates ERK, JNK, and p38 MAP kinases together with the MAP kinase phosphatase MKP-1 in a HepG2 Tet-Off cell line. *Virology* 2002;292:272-284
- 11 Takamatsu M, Fujita T, Hotta H. Suppression of serum starvation-induced apoptosis by hepatitis C virus core protein. *Kobe J Med Sci* 2001;47:97-112
- 12 Fukuda K, Tsuchihara K, Hijikata M, Nishiguchi S, Kuroki T, Shimotohno K. Hepatitis C virus core protein enhances the activation of the transcription factor, Elk1, in response to mitogenic stimuli. *Hepatology* 2001;33:159-165
- 13 Hayashi J, Aoki H, Kajino K, Moriyama M, Arakawa Y, Hino O. Hepatitis C virus core protein activates the MAPK/ERK cascade synergistically with tumor promoter TPA, but not with epidermal growth factor or transforming growth factor alpha. *Hepatology* 2000;32:958-961

- 14 Yao ZQ, Nguyen DT, Hiotellis AI, Hahn YS. Hepatitis C virus core protein inhibits human T lymphocyte responses by a complement-dependent regulatory pathway. *J Immunol* 2001;167:5264-5272
- 15 Bureau C, Bernad J, Chaouche N, Orfila C, Beraud M, Gonindard C, Alric L, Vinel JP, Pipy B. Nonstructural 3 protein of hepatitis C virus triggers an oxidative burst in human monocytes via activation of NADPH oxidase. *J Biol Chem* 2001;276:23077-23083
- 16 He Y, Tan SL, Tareen SU, Vijaysri S, Langland JO, Jacobs BL, Katze MG. Regulation of mRNA translation and cellular signaling by hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *J Virol* 2001;75:5090-5098
- 17 Reed KE, Rice CM. Identification of the major phosphorylation site of the hepatitis C virus H strain NS5A protein as serine 2321. *J Biol Chem* 1999;274:28011-28018
- 18 Tan SL, Nakao H, He Y, Vijaysri S, Neddermann P, Jacobs BL, Mayer BJ, Katze MG. NS5A, a nonstructural protein of hepatitis C virus, binds growth factor receptor-bound protein 2 adaptor protein in a Src homology 3 domain/ligand-dependent manner and perturbs mitogenic signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:5533-5538
- 19 成军,陈菊梅. 丙型肝炎病毒NS5A蛋白的生物学调节作用. 国外医学微生物学分册 2001;24:12-14
- 20 刘妍,成军,陆荫英,李克. 乙型肝炎病毒蛋白反式激活基因的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:217-219

肿瘤抑制因子 p21/waf1 与肝炎病毒复制与表达的调节研究

成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳

成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳,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
国家自然科学基金资助项目, No. C39970674, C03011402
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:2002-10-29 接受日期:2002-11-18

成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳. 肿瘤抑制因子p21/waf1与肝炎病毒复制与表达的调节研究. 世界华人消化杂志 2003;11(4):469-471
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/469.htm>

0 引言

作为一种肿瘤抑制基因, p21/waf1 在细胞周期、细胞凋亡、信号转导以及癌变中具有十分重要的调节作用^[1]. 肝炎病毒,特别是乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)的感染,不仅引起急性和慢性病毒性肝炎,而且与肝纤维化、肝细胞癌(HCC)的发生、发展密切相关^[2]. 这些肝炎病毒感染靶细胞之后,在细胞内对于细胞正常的调节机制产生严重干扰,这是肝炎病毒致病的分子生物学机制的重要组成部分^[3]. 其中,肝炎病毒蛋白对于 p21/waf1 的异常调节具有十分重要的生物学和医学意义.

1 肝炎病毒蛋白与 p21/waf1 调节的相关性

肝炎病毒蛋白与 p21/waf1 调节之间的相关性已经积累了丰富的资料. 目前认为,细胞周期调节紊乱是HCC发生的重

要机制,但是,肝炎病毒对于细胞周期调节的影响目前还不清楚. Choi et al^[4]对于 HCC 组织中细胞周期素 D1、细胞周期素 E、p53、p27、p21/waf1、p16、Rb 和增生细胞核抗原(PCNA)蛋白的表达进行免疫组织化学研究,表明细胞周期素 D1 过表达与肿瘤进展到晚期、低度分化、肿瘤大小、微血管浸润、肝脏内转移、缺乏肿瘤包膜形成、浸润性生长、p53 表达异常、PCNA 表达水平升高等有关. 异常的 p53 表达与低分化程度有关. 细胞周期素 D1 或 p53 表达异常在异常增生中没有见到. 其中 p21/waf1 的调节异常值得重视. Crary et al^[5]应用免疫组织化学研究结果表明, p21/waf1 表达与肝细胞 Ki-67 这种肝细胞增生标志物和组织病理学特征相关. 正常的肝组织和非酒精性脂肪肝炎(NASH)组织中很少表达 p21/waf1 和 Ki-67 蛋白,在酒精性肝炎肝组织中 p21/waf1 表达水平升高,但 Ki-67 表达水平不变. 慢性丙型肝炎肝组织中 p21/waf1 的表达与 Ki-67 的表达以及炎症、纤维化程度显著相关. 说明肝脏炎症显著上调 p21/waf1 的表达,而且表达水平与疾病严重程度相关. Shi et al^[6]也发现 HCC 组织中出现 p53 相关的 p21/waf1 的表达水平改变.

肝炎病毒蛋白对于 p21/waf1 的影响,不仅表现在蛋白水平上,而且在转录水平上也有反应. Han et al^[7]对于表达 HBxAg 的细胞系进行了 588 个细胞基因的表达谱型基因芯片的分析,发现 2 个癌基因(IGFR-2, RhoA)、1 个细胞周期调节基因(p55CDC)、3 个细胞内信号转导相关基因(凝血酶受体, MLK-3, MacMARCKS),1 个应急应答蛋白基因(HSP27)、2 个细胞凋亡应答基因(FAST 激酶, Bak),1 个转录因子基因(p21/waf1)表达上调;而 1 个转录因子基因(转录延长因子 SII),2 个生长因子基因(单核细胞趋化蛋白 1, T-淋巴细胞分泌蛋白 I-309)显著下调.

关于肝炎病毒蛋白对于 p21/waf1 表达调节的研究结果也有不同的研究报道. Park et al^[8]研究发现 HBxAg 对肝细胞基因表达具有调节作用,改变了肝细胞对细胞凋亡刺激信号的敏感性,对肝细胞的生长阻滞进行异常调节. 对 p53 基因突变的肝癌细胞系 Hep3B 进行研究,稳定或瞬时表达 HBxAg 的肝癌细胞系 p21/waf1 的 mRNA 和蛋白表达水平上升,与细胞周期素依赖性激酶 2(CDK2)的结合能力提高,显著抑制细胞周期素 E-CDK2 相关的组蛋白 H1 的磷酸化修饰,增强 p21/waf1 基因启动子的表达活性. p21/waf1 基因启动子序列缺失突变研究结果表明,HBxAg 应答元件位于 p21/waf1 基因启动子序列转录起始位点上游,即 -1 185-1 482 nt 之间. 启动子序列的突变分析发现 HBxAg 应答元件与转录因子 ETS 结合位点相邻. 研究发现 HBxAg 可以克服 p53 的缺失,对其下游的信号转导系统产生影响,直接导致 p21/waf1 基因转录的激活. 提示 p21/waf1 抑制剂的开发在肝细胞癌的治疗中具有很大潜力,特别是在 p53 基因突变,有 HBV 感染时尤其如此. Su et al^[9]的研究发现黄曲霉毒素 B1(AFB1)与 HBV 感染在 p21/waf1 表达调节中具有协同作用.

- 14 Yao ZQ, Nguyen DT, Hiotellis AI, Hahn YS. Hepatitis C virus core protein inhibits human T lymphocyte responses by a complement-dependent regulatory pathway. *J Immunol* 2001;167:5264-5272
- 15 Bureau C, Bernad J, Chaouche N, Orfila C, Beraud M, Gonindard C, Alric L, Vinel JP, Pipy B. Nonstructural 3 protein of hepatitis C virus triggers an oxidative burst in human monocytes via activation of NADPH oxidase. *J Biol Chem* 2001;276:23077-23083
- 16 He Y, Tan SL, Tareen SU, Vijaysri S, Langland JO, Jacobs BL, Katze MG. Regulation of mRNA translation and cellular signaling by hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *J Virol* 2001;75:5090-5098
- 17 Reed KE, Rice CM. Identification of the major phosphorylation site of the hepatitis C virus H strain NS5A protein as serine 2321. *J Biol Chem* 1999;274:28011-28018
- 18 Tan SL, Nakao H, He Y, Vijaysri S, Neddermann P, Jacobs BL, Mayer BJ, Katze MG. NS5A, a nonstructural protein of hepatitis C virus, binds growth factor receptor-bound protein 2 adaptor protein in a Src homology 3 domain/ligand-dependent manner and perturbs mitogenic signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:5533-5538
- 19 成军,陈菊梅. 丙型肝炎病毒NS5A蛋白的生物学调节作用. 国外医学微生物学分册 2001;24:12-14
- 20 刘妍,成军,陆荫英,李克. 乙型肝炎病毒蛋白反式激活基因的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:217-219

肿瘤抑制因子 p21/waf1 与肝炎病毒复制与表达的调节研究

成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳

成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳,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
国家自然科学基金资助项目, No. C39970674, C03011402
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:2002-10-29 接受日期:2002-11-18

成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳. 肿瘤抑制因子p21/waf1与肝炎病毒复制与表达的调节研究. 世界华人消化杂志 2003;11(4):469-471
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/469.htm>

0 引言

作为一种肿瘤抑制基因, p21/waf1 在细胞周期、细胞凋亡、信号转导以及癌变中具有十分重要的调节作用^[1]. 肝炎病毒,特别是乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)的感染,不仅引起急性和慢性病毒性肝炎,而且与肝纤维化、肝细胞癌(HCC)的发生、发展密切相关^[2]. 这些肝炎病毒感染靶细胞之后,在细胞内对于细胞正常的调节机制产生严重干扰,这是肝炎病毒致病的分子生物学机制的重要组成部分^[3]. 其中,肝炎病毒蛋白对于 p21/waf1 的异常调节具有十分重要的生物学和医学意义.

1 肝炎病毒蛋白与 p21/waf1 调节的相关性

肝炎病毒蛋白与 p21/waf1 调节之间的相关性已经积累了丰富的资料. 目前认为,细胞周期调节紊乱是HCC发生的重

要机制,但是,肝炎病毒对于细胞周期调节的影响目前还不清楚. Choi et al^[4]对于 HCC 组织中细胞周期素 D1、细胞周期素 E、p53、p27、p21/waf1、p16、Rb 和增生细胞核抗原(PCNA)蛋白的表达进行免疫组织化学研究,表明细胞周期素 D1 过表达与肿瘤进展到晚期、低度分化、肿瘤大小、微血管浸润、肝脏内转移、缺乏肿瘤包膜形成、浸润性生长、p53 表达异常、PCNA 表达水平升高等有关. 异常的 p53 表达与低分化程度有关. 细胞周期素 D1 或 p53 表达异常在异常增生中没有见到. 其中 p21/waf1 的调节异常值得重视. Crary et al^[5]应用免疫组织化学研究结果表明, p21/waf1 表达与肝细胞 Ki-67 这种肝细胞增生标志物和组织病理学特征相关. 正常的肝组织和非酒精性脂肪肝炎(NASH)组织中很少表达 p21/waf1 和 Ki-67 蛋白,在酒精性肝炎肝组织中 p21/waf1 表达水平升高,但 Ki-67 表达水平不变. 慢性丙型肝炎肝组织中 p21/waf1 的表达与 Ki-67 的表达以及炎症、纤维化程度显著相关. 说明肝脏炎症显著上调 p21/waf1 的表达,而且表达水平与疾病严重程度相关. Shi et al^[6]也发现 HCC 组织中出现 p53 相关的 p21/waf1 的表达水平改变.

肝炎病毒蛋白对于 p21/waf1 的影响,不仅表现在蛋白水平上,而且在转录水平上也有反应. Han et al^[7]对于表达 HBxAg 的细胞系进行了 588 个细胞基因的表达谱型基因芯片的分析,发现 2 个癌基因(IGFR-2, RhoA)、1 个细胞周期调节基因(p55CDC)、3 个细胞内信号转导相关基因(凝血酶受体, MLK-3, MacMARCKS),1 个应急应答蛋白基因(HSP27)、2 个细胞凋亡应答基因(FAST 激酶, Bak),1 个转录因子基因(p21/waf1)表达上调;而 1 个转录因子基因(转录延长因子 SII),2 个生长因子基因(单核细胞趋化蛋白 1, T-淋巴细胞分泌蛋白 I-309)显著下调.

关于肝炎病毒蛋白对于 p21/waf1 表达调节的研究结果也有不同的研究报道. Park et al^[8]研究发现 HBxAg 对肝细胞基因表达具有调节作用,改变了肝细胞对细胞凋亡刺激信号的敏感性,对肝细胞的生长阻滞进行异常调节. 对 p53 基因突变的肝癌细胞系 Hep3B 进行研究,稳定或瞬时表达 HBxAg 的肝癌细胞系 p21/waf1 的 mRNA 和蛋白表达水平上升,与细胞周期素依赖性激酶 2(CDK2)的结合能力提高,显著抑制细胞周期素 E-CDK2 相关的组蛋白 H1 的磷酸化修饰,增强 p21/waf1 基因启动子的表达活性. p21/waf1 基因启动子序列缺失突变研究结果表明,HBxAg 应答元件位于 p21/waf1 基因启动子序列转录起始位点上游,即 -1 185-1 482 nt 之间. 启动子序列的突变分析发现 HBxAg 应答元件与转录因子 ETS 结合位点相邻. 研究发现 HBxAg 可以克服 p53 的缺失,对其下游的信号转导系统产生影响,直接导致 p21/waf1 基因转录的激活. 提示 p21/waf1 抑制剂的开发在肝细胞癌的治疗中具有很大潜力,特别是在 p53 基因突变,有 HBV 感染时尤其如此. Su et al^[9]的研究发现黄曲霉毒素 B1(AFB1)与 HBV 感染在 p21/waf1 表达调节中具有协同作用.

实验中 52.9% 的树驹发生 HCC, 而单纯感染 HBV 和单纯摄入 AFB1 的动物发生 HCC 分别只有 11.1% 和 15.8%, 对照组没有发现 HCC. 肝组织中胰岛素样生长因子 -II (IGF-II) 的表达率分别为 82.4%、22.2%、26.3% 和 0, 有显著差异. p21/waf1 的表达分别为 29.4%、11.1%、15.8% 和 0, HBxAg 的表达在联合组也高于单纯 HBV 组 (52.9% 对 11.1%). 这些基因的过表达与 HCC 发生有关. 表明 p21/waf1 表达在 HBV 和 AFB1 协同诱发 HCC 中具有重要作用.

2 肝炎病毒蛋白结构及其对 p21/waf1 调节的影响

肝炎病毒蛋白的结构性质和特点是其调节 p21/waf1 表达的重要基础. HCV 核心蛋白对于 p21/waf1 基因表达具有直接的抑制作用. Jung et al [10] 研究了 HCV 核心蛋白对 p21/waf1 启动子活性的抑制作用. HCV 核心蛋白 N- 端部分缺失几乎完全失去 p21/waf1 启动子活性的抑制作用, 进一步研究表明 HCV 核心蛋白 84-191 aa 是其抑制 p21/waf1 表达的功能结构域. HCV 核心蛋白突变体 S99L 对 p21/waf1 基因的抑制作用与野生型基本相同, S116I 或 S116A 突变则导致 HCV 核心蛋白的抑制作用完全消失. S116D 突变体的抑制作用与野生型相似, 表明酸性的天门冬氨酸残基可以模拟磷酸化的效果. 当以蛋白激酶 A (PKA) 的抑制剂 H-89 进行处理时, HCV 核心蛋白的抑制作用呈现剂量依赖性的降低, 在浓度为 5 $\mu\text{mg/L}$ 时完全阻断. 相反, 以 PKA 的激活剂二丁酰 -cAMP 作用时, HCV 核心蛋白的抑制作用显著升高, 表明 HCV 核心蛋白对 p21/waf1 的抑制作用是通过 PKA 对其 S116 的磷酸化修饰来调节的. Wang et al [11] 应用谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST) 的 pull-down 分析, 证实 HCV 核心蛋白与 p21/waf1 可以形成复合物. 缺失定位分析结果表明, HCV 核心蛋白 N- 末端的 (24-52 aa) 和 p21/waf1 的 C- 末端的 (139-164 aa) 是这一复合物形成关键的结构基础. p21/waf1 蛋白在 147、149、150 等这些与 PCNA 结合相关的位点上发生突变, 并不影响与 HCV 核心蛋白的结合, 提示 p21/waf1 蛋白与 HCV 核心蛋白、PCNA 的结合结构基础截然不同. 由于与 p21/waf1 结合的位点十分接近, HCV 核心蛋白与 PCNA 蛋白之间存在与 p21/waf1 蛋白结合的竞争性抑制现象.

Suzuki et al [12] 研究证实 HCV 核心蛋白是遍在蛋白 - 蛋白复合物降解途径作用的靶蛋白. 首先, HCV 核心蛋白的 C- 末端疏水区是代谢不稳定区, 与蛋白体抑制物共同孵育可以显著增加这种蛋白的积聚. 其次, 体内遍在蛋白化分析结果表明, 遍在蛋白的多个链上都有 HCV 核心蛋白的结合. 相反, 虽然稳定的 HCV 核心蛋白也可以遍在蛋白化, 但是只有单个或少数的遍在蛋白的结合位点. 因此, HCV 核心蛋白 C- 末端的遍在蛋白化影响 HCV 核心蛋白的代谢, 以进行调节.

3 肝炎病毒蛋白对 p21/WAF1 调节的 p53 蛋白的依赖性在正常的细胞信号转导过程中, p21/waf1 是 p53 蛋白调节作

用下游的一种靶分子. 因此, 肝炎病毒蛋白对于 p21/waf1 的调节可能会与 p53 蛋白的调节作用有关. Ahn et al [13] 研究了 HBxAg 蛋白对于 p21/waf1 的调节作用及其与 p53 蛋白之间的相互关系. HBxAg 是 HBV 引起 HCC 的主要因素, 在 HBxAg 的转基因小鼠模型中得到证实, 主要机制就是对一系列病毒和细胞的启动子序列的反式激活作用. 我们的研究证实表达 HBxAg 的细胞系的 p21/waf1 RNA 表达水平降低, 调节机制是对 p21/waf1 基因转录水平的抑制, 而且是 p53 依赖性的. 在 p21/waf1 基因的启动子序列中存在 Sp1 的结合位点, 因此推测 HBxAg 通过 Sp1 对 p21/waf1 基因表达进行负调节. 因为肿瘤抑制基因 p21/waf1 编码产物的表达在多种类型的组织和细胞中都存在, 而且是细胞周期素 - CDK 复合物和 DNA 合成的抑制剂, 诱导细胞在 G1 - S 检验点进入阻滞状态, 因此 HBxAg 对于 p21/waf1 的调节在 HBV 引起的 HCC 中具有十分重要的地位和作用.

丙型肝炎病毒蛋白对于 p21/waf1 的调节作用也与 p53 蛋白密切相关. Ray et al [14] 应用 NIH3T3、HepG2、HeLa 细胞系的体外瞬时表达系统分别证实 HCV 核心蛋白对于 p21/waf1 基因启动子的表达具有显著的抑制作用. p21/waf1 基因启动子序列缺失突变分析表明 HCV 核心蛋白应答区位于 p53 结合位点. 凝胶迟滞分析表明 HCV 核心蛋白与 p21/waf1 基因启动子序列没有直接结合的功能. 因此, 认为 HCV 核心蛋白促进细胞增生的作用, 是通过未知细胞蛋白因子对 p21/waf1 转录激活抑制而实现的. Otsuka et al [15] 对于 HCV 各种蛋白对 p53 基因表达活性的影响进行了研究, 发现只有核心蛋白提高 p53 和 p21/waf1 的表达水平, 而后者是 p53 主要的作用靶蛋白. 以电泳泳动度迁移率分析 (EMSA) 法证实 HCV 核心蛋白不仅提高 p53 蛋白的 DNA 结合功能, 而且以启动子的报告基因技术证实核心蛋白对于 p53 基因的转录水平也有显著的增强作用. 在 GST 融合蛋白分析结果中发现, HCV 核心蛋白 C- 末端可以与 p53 直接结合, 另外 HCV 核心蛋白与 Htaf (II) 28 这种转录因子复合体的成分进行结合, 这些结果表明 HCV 核心蛋白与 p53 可以结合, 而且对于 p53 依赖性启动子的转录活性具有显著的调节作用. Lu et al [16] 研究证实 HCV 核心蛋白可以提高 p53 基因的转录水平, 不管这种 p53 基因是内源性的还是外源性的. HCV 核心蛋白对于 p53 基因的这种调节作用, 也得到 HCV 核心蛋白可以提高 p53 作用下游靶基因 p21/waf1 表达水平的佐证. HCV 核心蛋白通过对 p53 的调节来显著抑制肝癌细胞系的生长. 体外免疫共沉淀技术、GST pull-down 技术、Far-Western blot 分析技术等证实 HCV 核心蛋白和 p53 可以结合, 缺失作图分析证实 p53 蛋白 C- 末端部分 (366-380 aa) 是其与核心蛋白结合的位点. 研究结果提示 HCV 核心蛋白可能通过直接的物理结合激活 p53. HCV 核心蛋白对 p53 蛋白的持续激活是慢性 HCV 感染致病机制的重要组成部分.

Kwun et al [17] 研究, 证实 NS3 蛋白对于 p21/waf1 的

基因表达具有特异性的、剂量依赖性的抑制作用. 这种抑制作用是细胞类型非依赖性的, 而且与 HCV 核心蛋白具有协同作用. 当 p21/waf1 启动子序列中 p53 结合位点被缺失以后, NS3 蛋白对于 p21/waf1 启动子的抑制作用则完全消失, 提示 NS3 蛋白对于 p21/waf1 启动子活性的抑制作用是 p53 依赖性的. 另外, NS3 蛋白对于具有 p53 结合位点的其他启动子也具有抑制作用. 尽管 NS3 对于 p21/waf1 调节的功能域位于蛋白酶结构位点, 但是蛋白酶活性并不是其抑制作用所必须的. NS3 蛋白对于 p53 的基因转录和蛋白的稳定性都没有显著的影响, 因此推测 NS3 对于 p21/waf1 基因启动子序列的调节是通过 NS3 蛋白 -p53 蛋白之间的相互作用实现的. 表达 NS3 蛋白的 NIH 3T3 细胞系生长速度至少是母本细胞生长速度的 2 倍. 说明 NS3 蛋白对于 p21/waf1 蛋白的抑制作用可以促进细胞的增生. HCV NS5A 蛋白是一种磷酸化的蛋白, 与哺乳动物细胞中数种蛋白具有结合作用, 为了研究这种结合的生物学意义, Arima et al^[18]建立了 5 种四环素控制表达 HCV NS5A 蛋白的小鼠、人细胞系, 表达 NS5A 的这些细胞系均表现出生长迟滞现象, 细胞周期分析结果表明, 表达 NS5A 的人上皮细胞 S 的细胞比例下降, G2/M 期细胞比例上升, 可由 p53 依赖性的 p21/waf1 蛋白和 mRNA 表达水平的降低来解释. HCV NS5A 在体内和体外都能与 CDK1 结合, 在表达 NS5A 蛋白的细胞系中, 相当数量的 p21/waf1 与 CDK2 结合成复合物形式. CDK1 和细胞周期素 B1 蛋白表达水平也有相应下降, 与 G2/M 期细胞比例上升一致, 这些研究结果表明, NS5A 造成的细胞生长抑制和细胞周期调节异常, 主要是通过对 CDK1/2- 细胞周期素复合物的调节实现的. HCV NS5A 蛋白促进细胞生长, 在转录水平上影响 p53 信号转导系统下游分子 p21/waf1 启动子表达活性, Majumder et al^[19]对于 NS5A 介导的 p21/waf1 基因转录水平抑制的机制进行了研究. 通过应用 p53 野生型(+ / +)纯合子缺失突变型(- / -)细胞系的研究, 发现 NS5A 蛋白对 p21/waf1 基因转录的抑制是 p53 依赖性的, 不仅如此, HCV NS5A 蛋白对于含有多个 p53 结合位点的人工合成的启动子指导的报告基因表达载体(PG13-LUC)的表达活性也具有显著的抑制作用. 以 pull-down 技术、体外免疫共沉淀技术和哺乳动物细胞双杂交技术证实 NS5A 与 p53 蛋白之间存在物理性结合. 共聚焦显微镜技术发现 p53 与 NS5A 蛋白在 HepG2 和 Saos-2 细胞中结合, 共同存在. 因此, 认为 NS5A 和 p53 之间的相互作用, 是 NS5A 蛋白对于 p21/waf1 基因表达活性进行调节, 进而引起 HCC 的重要机制之一.

Ghosh et al^[20]应用酵母双杂交技术证实 NS5A 与新型转录因子蛋白 SRCAP C- 末端序列结合, 这种结合也得到了哺乳动物细胞双杂交技术、体外 pull-down 技术以及体外免疫共沉淀技术等证实. 体外瞬时转染证实 SRCAP 可有效激活转录. SRCAP 增强 NS5A 蛋白的对 p21/waf1 启动子的转录抑制作用增强. NS5A 和 SRCAP 的

调节作用可能是 HCV 感染致病机制的重要组成部分.

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, 1997:83-130
- 2 成军, 朱传琳. 丙型肝炎病毒感染慢性化的分子生物学机制. 国外医学病毒学分册 2000;7:29-32
- 3 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
- 4 Choi YL, Park SH, Jang JJ, Park CK. Expression of the G1-S modulators in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma and dysplastic nodule: association of cyclin D1 and p53 proteins with the progression of hepatocellular carcinoma. *J Korean Med Sci* 2001;16:424-432
- 5 Crary GS, Albrecht JH. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in human liver. *Hepatology* 1998;28:738-743
- 6 Shi YZ, Hui AM, Takayama T, Li X, Cui X, Makuuchi M. Reduced p21(WAF1/CIP1) protein expression is predominantly related to altered p53 in hepatocellular carcinomas. *Br J Cancer* 2000;83:50-55
- 7 Han J, Yoo HY, Choi BH, Rho HM. Selective transcriptional regulations in the human liver cell by hepatitis B viral X protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;272:525-530
- 8 Park US, Park SK, Lee YI, Park TG. Hepatitis B virus-X protein upregulates the expression of p21waf1/cip1 and prolongs G1>S transition via a p53-independent pathway in human hepatoma cells. *Oncogene* 2000;19:3384-3394
- 9 Su JJ, Qin GZ, Yan RQ, Huang DR, Yang C, Lotslikar PD. The expression of insulin-like growth factor II, hepatitis B virus X antigen and p21 in experimental hepatocarcinogenesis in tree shrews. *Ann Acad Med Singapore* 1999;28:62-66
- 10 Jung EY, Lee MN, Yang HY, Yu D, Jang KL. The repressive activity of hepatitis C virus core protein on the transcription of p21(waf1) is regulated by protein kinase A-mediated phosphorylation. *Virus Res* 2001;79:109-115
- 11 Wang F, Yoshida I, Takamatsu M, Ishido S, Fujita T, Oka K, Hotta H. Complex formation between hepatitis C virus core protein and p21Waf1/Cip1/Sdi1. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273:479-484
- 12 Suzuki R, Tamura K, Li J, Ishii K, Matsuura Y, Miyamura T. Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus. *Virology* 2001;280:301-309
- 13 Ahn JY, Chung EY, Kwun HJ, Jang KL. Transcriptional repression of p21 (waf1) promoter by hepatitis B virus X protein via a p53-independent pathway. *Gene* 2001;275:163-168
- 14 Ray RB, Steele R, Meyer K, Ray R. Hepatitis C virus core protein represses p21WAF1/Cip1/Sid1 promoter activity. *Gene* 1998;208:331-336
- 15 Otsuka M, Kato N, Lan K, Yoshida H, Kato J, Goto T, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus core protein enhances p53 function through augmentation of DNA binding affinity and transcriptional ability. *J Biol Chem* 2000;275:34122-34130
- 16 Lu W, Lo SY, Chen M, Wu K, Fung YK, Ou JH. Activation of p53 tumor suppressor by hepatitis C virus core protein. *Virology* 1999;264:134-141
- 17 Kwun HJ, Jung EY, Ahn JY, Lee MN, Jang KL. P53-dependent transcriptional repression of p21 (waf1) by hepatitis C virus NS3. *J Gen Virol* 2001;82:2235-2241
- 18 Arima N, Kao CY, Licht T, Padmanabhan R, Sasaguri Y, Padmanabhan R. Modulation of cell growth by the hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *J Biol Chem* 2001;276:12675-12684
- 19 Majumder M, Ghosh AK, Steele R, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A physically associates with p53 and regulates p21/waf1 gene expression in a p53-dependent manner. *J Virol* 2001;75:1401-1407
- 20 Ghosh AK, Majumder M, Steele R, Yaciuk P, Chrivia J, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates transcription through a novel cellular transcription factor SRCAP. *J Biol Chem* 2000;275:7184-7188

乙型肝炎病毒对细胞信号转导的影响

成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳

成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳,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 国家自然科学基金资助项目, No. C39970674, C03011402

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:2002-10-29 接受日期:2002-11-18

成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳. 乙型肝炎病毒对细胞信号转导的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(4):472-474

<http://www.wjnet.com/1009-3079/11/472.htm>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)是嗜肝DNA病毒的一种,HBV DNA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,X蛋白以及HBV DNA的聚合酶.此外,HBV DNA结构中还有4段启动子、2段增强子以及与HBV DNA复制过程密切相关的顺向重复序列1、2(DR1、DR2)等^[1].感染肝细胞之后,HBV对于肝细胞的信号转导系统的影响,不仅是HBV蛋白对于肝细胞中信号转导的影响,还包括肝细胞蛋白与HBV DNA调节序列的结合及其调节.但是,HBV蛋白对于肝细胞信号转导通路的影响是HBV感染以后形成慢性感染、肝纤维化、肝细胞癌的重要的分子生物学机制^[2].

1 HBV与MAPK信号转导系统

在HBV蛋白反式激活研究中,发现HBV S基因编码的表面抗原大蛋白(LHBs)和C-末端截短型表面抗原中蛋白(MHBs^t)都是HBV基因组编码的反式激活蛋白,其反式激活作用主要取决于前-S2位点在胞质中的朝向^[3-5].MHBs^t是一种蛋白激酶C(PKC)依赖型的反式激活剂,在Ser28位点上发生磷酸化修饰.这一磷酸化位点的存在是决定其反式激活作用的关键结构基础.MHBs^t触发PKC依赖性的c-Raf-1/Erk2信号转导系统,这是MHBs^t激活转录因子蛋白AP-1和NF-κB的先决条件.为了研究这种反式激活作用的生理和病理学意义,Hiltdt et al^[6]建立了肝脏特异性表达MHBs^t的转基因小鼠模型,发现c-Raf-1/Erk2信号转导系统处于持续激活状态,造成肝脏细胞处于持续增生状态.超过15月龄的转基因小鼠,肝脏肿瘤的发生率显著升高.这些研究资料表明,LHBs和MHBs^t这些具有反式激活作用的病毒蛋白,通过增生控制关键酶促进肿瘤的形成.

HBV的X蛋白在慢性HBV感染的肝癌形成过程中具有十分重要的作用^[7].Lee et al^[8]利用四环素调节系统,建立了稳定转染的分化(3pX-1)和去分化(4pX-1)的肝细

胞系,只有3pX-1细胞系通过Ras-Raf-MAPK的激活导致肝细胞的恶性转化,表达HBxAg的4pX-1细胞系只有持续的c-jun N-末端激酶(JNK)激活,但没有恶性转化功能.为了阐明3pX-1和4pX-1细胞系的这种差别,首先对其生活周期的调节进行了研究.表达HBxAg的3pX-1细胞系表现出G1、S和G2/M期的进展,主要表现在细胞周期素D1、A和B1表达水平的升高,以及细胞周期素依赖性激酶Cdc2激酶的激活.表达HBxAg的4pX-1细胞系,则表现出G1、S的进入,之后便是S期的停止,以及Cdc2激酶激活缺如.有意思的是4pX-1细胞具有选择性的HBxAg诱导的细胞周期素依赖性激酶抑制因子p21(Cip1)、肿瘤抑制因子p19(ARF)和细胞凋亡诱导基因bax、胰岛素样生长因子结合蛋白-3(IGFBP-3)的表达.尽管HBxAg的表达诱导出现了生长阻滞和细胞凋亡基因的表达,以及缺乏HBxAg依赖性Cdc2的激活,但是4pX-1细胞系未能出现HBxAg依赖性的G2/M期阻滞或细胞凋亡.受到抗肿瘤药噻氮酯达唑(Nocodazole)处理以后,4pX-1细胞出现G2/M期阻滞,并出现HBxAg依赖性的多核细胞的形成,类似人免疫缺陷病毒-1(HIV-1)Tax蛋白转化的细胞性质.认为在4pX-1细胞中,HBxAg的表达异常调节了G2/M周期的检验点,因而阻断了HBxAg蛋白表达诱导的细胞凋亡.

HBxAg的表达及其肝细胞中多种不同基因表达的异常调节是HBV感染引起肝细胞癌的重要分子生物学机制.但以表达HBxAg的表达载体转染可以感染HBV的成人肝细胞,却没有发现恶性转化的现象.Nijhara et al^[9]利用肝细胞特异性的病毒表达载体,对HBxAg的体内作用及机制进行了研究.发现以病毒体方式转染HBxAg的DNA,可以使>50%的肝细胞表达HBxAg,而且还有剂量依赖性特征.在表达HBxAg的转基因小鼠的肝脏中细胞外信号调节激酶(ERKs)的表达水平显著上升.静脉注射ERKs中的抑制剂PD98059,可以抑制ERKs的激活,说明HBxAg MEK在激活ERKs的重要性.HBxAg诱导的ERK活性,可以持续30 d.同时见到JNKs的持续激活也可以达到30 d.这种持续的ERK和JNK的激活,也同时导致下游的一些信号转导途径的持续激活,例如c-Jun和c-Fos蛋白的持续表达以及AP-1转录因子功能的持续存在.这些都支持HBxAg在肝细胞的恶性转化中具有十分重要的作用.

HBxAg似乎通过异常激活RAS-RAF-MAPK和JNK信号转导途径参与肝细胞恶性转化的过程.Tarn et al^[10]建立了表达HBxAg的AML12永生细胞系,包括分化的3pX-1细胞系和去分化的4pX-1的细胞系.结果表明,HBxAg的条件表达,仅导致3pX-1细胞发生恶性转化,本研究对于体外酶学活性进行了比较,体内研究发现HBxAg逆向激活3pX-1细胞系的RAS-RAF-MAPK和JNK系统,在细胞系4pX-1则无此现象.持续的HBxAg依赖性的RAS-RAF-MAPK激活,在3pX-1细胞系中可以见到,但HBxAg依赖性的JNK系统激活则仅见于未

发生恶性转化的4pX-1细胞系. HBxAg激活不同的激酶系统, 导致不同的cAMP- 应答元件结合蛋白和c-Jun等的反应不同, 从而决定了3pX-1和4pX-1细胞系生长特性的差别. 在细胞核中定位表达的HBxAg的变异体, 激活RAS-RAF-MAPK系统的能力较弱, 恶性转化作用显著降低. 因此认为HBxAg持续表达与RAS-RAF-MAPK的持续激活是肝细胞恶性转化的重要机制.

研究发现, 蛋白激酶C(PKC)和丝裂原激活蛋白(MAPK)可以使重组的HBxAg蛋白发生磷酸化. 尽管体外PKC和MAPK可以使HBxAg发生磷酸化, 但蛋白激酶A(PKA)或酪蛋白激酶II(casein kinase II, CKII)却不能使HBxAg发生磷酸化. PKC或MAPK导致HBxAg丝氨酸位点上发生磷酸化^[11]. 研究表明HBxAg可通过对Sp1的影响调节胰岛素样生长因子II(IGF II)启动子4(P4)的表达活性^[12, 13]. PKC和HBxAg通过Sp1调节IGF-II P4转录活性, PKC激活后, 或持续表达PKC的载体转染以后, 可以提高Sp1的磷酸化水平, 还可以提高HBxAg转染的HepG2细胞中IGF-II P4的转录活性. PKC的抑制剂Go6976抑制PKC的活性后, 可以降低Sp1的磷酸化修饰, 降低IGF-II P4的转录活性, 以及IGF-II mRNA的表达水平. 以MAPK细胞外信号调节激酶(MEK)的抑制剂U0126抑制细胞中MEK的激活, 降低Sp1的磷酸化, 降低P4转录活性和IGF-II mRNA的转录水平, 这些研究结果表明, PKC和p44/p42 MAPK信号转导链在Sp1介导的IGF-II基因表达激活中具有十分重要的意义.

2 HBV与细胞JAK-STAT信号转导系统

在肝细胞癌形成的早期阶段, HBxAg抑制p53蛋白的功能, 晚期阶段有突变的p53蛋白的不断累积, HBxAg抑制细胞凋亡, 但同时也具有诱导细胞凋亡的功能. HBxAg对于细胞凋亡的调节作用, 不仅在肝细胞癌的形成过程中具有重要意义, 在慢性HBV感染的形成过程中也具有十分重要的意义. HBxAg对损伤DNA的修复具有抑制作用, 主要是通过p53或其他损伤DNA结合蛋白(DDB)之间的结合实现的. 此外, HBxAg能够激活细胞的信号转导链, 如MAPK和JAK/STAT信号转导系统等. 这些都与肝细胞癌的形成过程有关^[14]. 在表达HBV蛋白的细胞系中, JAK/STAT信号转导通路发生异常^[15]. HBxAg在HBV DNA复制和HCC的形成过程中都具有十分重要的作用. 但HBxAg的作用机制目前还不十分清楚. HBxAg对于多种信号转导系统都有重要的调节作用, 包括对Ras/MAPK信号转导链的激活和p53的抑制. Lee et al^[16]的研究表明HBxAg可以激活Jak-STAT信号转导系统, 第一步, 首先建立了持续表达HBxAg的细胞系, 并研究了STAT3和STAT5的酪氨酸位点的磷酸化修饰, 证实HBxAg可以持续激活这两种转录因子蛋白. 同时, HBxAg可以提高STAT的DNA结合能力和转录激活作用. HBxAg可以特异性地提高酪氨酸磷酸

化水平, 及体内Jak1的激酶活性, 但对于Jak2或Tyk2没有影响, 这种作用主要是通过HBxAg与Jak1之间的蛋白-蛋白相互作用而实现的. 这些结果清楚地表明HBxAg可以作为JAK/STAT信号转导系统的诱导剂, 从而可以解释HBxAg在肝脏疾病形成过程中作用机制的多样性.

3 乙型肝炎病毒与c-raf-1/Erk2信号转导

LHBs和MHBs^s是HBV DNA编码的反式激活作用蛋白家族的两个重要成员. 这二种反式激活蛋白的作用主要依赖于前-S2位点在细胞质内的朝向. HBsAg中蛋白羧基末端截短型是一种复杂的反式激活剂. HBsAg中蛋白羧基末端截短型可以在PKC的催化下发生Ser28位点的磷酸化修饰. 这一磷酸化修饰位点的完整性是其反式激活作用的结构基础. 截短型HBsAg中蛋白触发PKC依赖性的c-Raf-1/Erk2信号转导途径, 激活转录因子AP-1的NF- κ B的表达. Hildt et al^[17]建立了肝脏特异性表达截短型HBsAg蛋白的转基因小鼠, 可以观察到前-S2位点依赖性的持续的c-Raf-1/Erk2信号转导系统的激活, 导致肝细胞增生水平的提高. 在15月龄的转基因小鼠中, 肝脏肿瘤的发生率显著提高. 提示HBsAg大蛋白和羧基末端截短型的HBsAg中蛋白通过对于关键酶的活性调节发挥促癌作用.

流行病学调查结果表明, HBV携带者罹患HCC的危险度是HBV非携带者的10倍. 几乎所有的HBV相关性肝细胞癌(HCC)都有HBV DNA与肝细胞染色体的整合. 整合的HBV DNA可以编码两种反式激活蛋白分子, 即HBxAg和前-S2反式激活剂, 包括HBsAg大蛋白和中蛋白的羧基末端截短形式. 前-S2的激活作用决定于前-S2位点在细胞质中的朝向. 前-S2位点的作用是PKC依赖性的磷酸化修饰. 前-S2与PKC β 亚单位结合, 触发PKC依赖性的c-Raf-1/MAP2激酶信号转导链, 造成转录因子AP-1和NF- κ B等的激活. 另外, 通过这一信号转导链的激活, 前-S2反式激活剂可以提高肝细胞的增生能力. 根据肿瘤形成的“二步”理论(发癌和促癌), 前-S2反式激活剂通过激活PKC/c-Raf-1/MAP2-激酶链, 起到促癌的作用. 含有关键性突变位点的细胞(处于发癌阶段的细胞)在表达这一反式激活剂时, 就容易被选择出来, 进入促癌阶段^[18, 19]. 这种肝癌发生的多阶段特点可能是解释HCC发生、发展需要很长时间的的特点.

C-末端发生缺失突变的HBsAg中蛋白, 是一种转录激活蛋白. 这种反式激活作用依赖于HBsAg中蛋白前-S2的N-末端在细胞质中的朝向. 野生型HBsAg中蛋白, 前-S2位点随着翻译过程的进行, 转位到内质网(ER)腔内. 研究结果^[20]表明, HBsAg大蛋白的前-S2位点在翻译之后, 首先位于ER膜的胞质面, 因此如何解释HBsAg大蛋白与截短型HBsAg中蛋白具有类似

的反式激活作用,目前还没有定论。HBsAg大蛋白与截短型HBsAg中蛋白一样,可以激活一系列的启动子元件。有足够的资料表明,PKC依赖性的AP-1和NF- κ B的激活是HBsAg大蛋白作用的主要机制。在PKC作用的下游,c-Raf-1激酶是HBsAg大蛋白激活AP-1和NF- κ B的先决条件,因为抑制c-Raf-1激酶的活性,就可以阻断HBsAg大蛋白对AP-1和NF- κ B的反式激活作用。

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,1997:83-103
- 2 刘妍,成军.丙肝病毒致肝细胞癌的分子生物学机制.国外医学流行病学传染病学分册 2000;27:10-13
- 3 刘妍,成军. HBV截短的表面抗原蛋白MHBs^s的反式激活作用.国外医学病毒学分册 2000;7:190-193
- 4 刘妍,成军,董菁,夏小兵,李克,杨继珍.截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的初步研究.肝脏 2001;6:8-10
- 5 刘妍,成军,陆荫英,李克.乙型肝炎病毒蛋白反式激活基因的研究.世界华人消化杂志 2002;10:217-219
- 6 Hildt E, Munz B, Saher G, Reifenberg K, Hofschneider PH. The PreS2 activator MHBs(t) of hepatitis B virus activates c-raf-1/Erk2 signaling in transgenic mice. *EMBO J* 2002;21:525-535
- 7 陆荫英,刘妍,成军,张玲霞.乙型肝炎病毒X蛋白的功能研究进展.国外医学病毒学分册 2002;9:33-36
- 8 Lee S, Tarn C, Wang WH, Chen S, Hullinger RL, Andrisani OM. Hepatitis B virus X protein differentially regulates cell cycle progression in X-transforming versus nontransforming hepatocyte (AML12) cell lines. *J Biol Chem* 2002;277:8730-8740
- 9 Nijhara R, Jana SS, Goswami SK, Rana A, Majumdar SS, Kumar V, Sarkar DP. Sustained activation of mitogen-activated protein kinases and activator protein 1 by the hepatitis B virus X protein in mouse hepatocytes in vivo. *J Virol* 2001;75:10348-10358
- 10 Tarn C, Lee S, Hu Y, Ashendel C, Andrisani OM. Hepatitis B virus X protein differentially activates RAS-RAF-MAPK and JNK pathways in X-transforming versus non-transforming AML12 hepatocytes. *J Biol Chem* 2001;276:34671-34680
- 11 Lee YI, Kim SO, Kwon HJ, Park JG, Sohn MJ, Jeong SS. Phosphorylation of purified recombinant hepatitis B virus-X protein by mitogen-activated protein kinase and protein kinase C in vitro. *J Virol Methods* 2001;95:1-10
- 12 Kondoh N, Wakatsuki T, Hada A, Shuda M, Tanaka K, Arai M, Yamamoto M. Genetic and epigenetic events in human hepatocarcinogenesis. *Int J Oncol* 2001;18:1271-1278
- 13 Kang-Park S, Lee JH, Shin JH, Lee YI. Activation of the IGF-II gene by HBV-X protein requires PKC and p44/p42 map kinase signalings. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;283:303-307
- 14 Arbuthnot P, Capovilla A, Kew M. Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:357-368
- 15 Heim MH. Intracellular signalling and antiviral effects of interferons. *Dig Liver Dis* 2000;32:257-263
- 16 Lee YH, Yun Y. HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling. *J Biol Chem* 1998;273:25510-25515
- 17 Hildt E, Hofschneider PH. The PreS2 activators of the hepatitis B virus: activators of tumour promoter pathways. *Recent Results Cancer Res* 1998;154:315-329
- 18 刘妍,董菁,皇甫竞坤,成军,王刚,王琳,李莉.乙型肝炎病毒X基因异质性及其反式激活功能的影响.解放军医学杂志 2002;27:125-127
- 19 刘妍,董菁,成军,夏小兵,李克,王琳,施双双,段惠娟,杨继珍.乙型肝炎病毒X基因在真核细胞中的表达及反式激活SV40病毒早期启动子的研究.解放军医学杂志 2001;26:404-406
- 20 Hildt E, Saher G, Bruss V, Hofschneider PH. The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. *Virology* 1996;225:235-239

生物信息学技术与新基因的研究

成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳

成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳,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 国家自然科学基金资助项目, No.C39970674, C03011402
项目负责人:成军,10039,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:010-6693 3391 传真:010-6380 1283
收稿日期:2002-10-29 接受日期:2002-11-18

成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳.生物信息学技术与新基因的研究.世界华人消化杂志 2003;11(4):474-477

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/474.htm>

0 引言

新基因的克隆化无异是生物医学领域创新知识源泉的重要组成部分.这一任务,不仅是人类基因组计划(HGP)的核心内容,同时也是后基因组计划(post-HGP)的重要内容.多年来,随着以人的基因克隆化为主的不同生物类型基因克隆化研究的进展,已然积累了大量的不同生物的基因序列、蛋白质的氨基酸残基序列,同时对于不同生物种属之间基因序列、蛋白质以及结构序列的保守结构位点也积累了丰富的资料,并据此建立了庞大的数据库系统.对于这些数据的分析,必须依靠计算机分析技术.计算机分析技术的不断发展,为这些资料和数据的分析建立了一些有效的分析技术.因此,自然而然就将基因和蛋白质结构的资料与计算机分析技术结合起来,形成了目前极具潜力的新兴交叉学科-生物信息学(bioinformatics)技术^[1].生物信息学技术的形成和发展,大大促进了以基因的分子生物学为核心内容的现代生物医学的发展,以基因的分子生物学为核心内容的理论和技术,已经成为生物学领域、医学领域重要的创新知识源泉.

1 基因序列和氨基酸残基序列同源性比对及其应用

基因序列和蛋白质一级结构序列的同源性比对,是目前生物信息学技术中最基本、应用最广泛的技术之一.随着基因和蛋白一级结构序列数据库的不断扩充,人们甚至单单从数据库的计算机分析就可以克隆新的基因.目前以美国国家生物工程信息学中心(NCBI national center of bioengineering information)建立的核苷酸序列数据库(GenBank)及其相应的检索分析系统的应用最为广泛^[2].

基因序列同源性的比对,对于分析基因组DNA序列以及完成新基因的染色体定位也是极为便捷的.将确定的新基因的编码基因序列作为参照,对于GenBank数据库中高通量基因序列(htgs)数据库中基因组DNA序列进行同源性对比,当发现与新基因的cDNA序列完全同源

的反式激活作用,目前还没有定论。HBsAg大蛋白与截短型HBsAg中蛋白一样,可以激活一系列的启动子元件。有足够的资料表明,PKC依赖性的AP-1和NF- κ B的激活是HBsAg大蛋白作用的主要机制。在PKC作用的下游,c-Raf-1激酶是HBsAg大蛋白激活AP-1和NF- κ B的先决条件,因为抑制c-Raf-1激酶的活性,就可以阻断HBsAg大蛋白对AP-1和NF- κ B的反式激活作用。

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,1997:83-103
- 2 刘妍,成军.丙肝病毒致肝细胞癌的分子生物学机制.国外医学流行病学传染病学分册 2000;27:10-13
- 3 刘妍,成军. HBV截短的表面抗原蛋白MHBs^s的反式激活作用.国外医学病毒学分册 2000;7:190-193
- 4 刘妍,成军,董菁,夏小兵,李克,杨继珍.截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的初步研究.肝脏 2001;6:8-10
- 5 刘妍,成军,陆荫英,李克.乙型肝炎病毒蛋白反式激活基因的研究.世界华人消化杂志 2002;10:217-219
- 6 Hildt E, Munz B, Saher G, Reifenberg K, Hofschneider PH. The PreS2 activator MHBs(t) of hepatitis B virus activates c-raf-1/Erk2 signaling in transgenic mice. *EMBO J* 2002;21:525-535
- 7 陆荫英,刘妍,成军,张玲霞.乙型肝炎病毒X蛋白的功能研究进展.国外医学病毒学分册 2002;9:33-36
- 8 Lee S, Tarn C, Wang WH, Chen S, Hullinger RL, Andrisani OM. Hepatitis B virus X protein differentially regulates cell cycle progression in X-transforming versus nontransforming hepatocyte (AML12) cell lines. *J Biol Chem* 2002;277:8730-8740
- 9 Nijhara R, Jana SS, Goswami SK, Rana A, Majumdar SS, Kumar V, Sarkar DP. Sustained activation of mitogen-activated protein kinases and activator protein 1 by the hepatitis B virus X protein in mouse hepatocytes in vivo. *J Virol* 2001;75:10348-10358
- 10 Tarn C, Lee S, Hu Y, Ashendel C, Andrisani OM. Hepatitis B virus X protein differentially activates RAS-RAF-MAPK and JNK pathways in X-transforming versus non-transforming AML12 hepatocytes. *J Biol Chem* 2001;276:34671-34680
- 11 Lee YI, Kim SO, Kwon HJ, Park JG, Sohn MJ, Jeong SS. Phosphorylation of purified recombinant hepatitis B virus-X protein by mitogen-activated protein kinase and protein kinase C in vitro. *J Virol Methods* 2001;95:1-10
- 12 Kondoh N, Wakatsuki T, Hada A, Shuda M, Tanaka K, Arai M, Yamamoto M. Genetic and epigenetic events in human hepatocarcinogenesis. *Int J Oncol* 2001;18:1271-1278
- 13 Kang-Park S, Lee JH, Shin JH, Lee YI. Activation of the IGF-II gene by HBV-X protein requires PKC and p44/p42 map kinase signalings. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;283:303-307
- 14 Arbuthnot P, Capovilla A, Kew M. Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:357-368
- 15 Heim MH. Intracellular signalling and antiviral effects of interferons. *Dig Liver Dis* 2000;32:257-263
- 16 Lee YH, Yun Y. HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling. *J Biol Chem* 1998;273:25510-25515
- 17 Hildt E, Hofschneider PH. The PreS2 activators of the hepatitis B virus: activators of tumour promoter pathways. *Recent Results Cancer Res* 1998;154:315-329
- 18 刘妍,董菁,皇甫竞坤,成军,王刚,王琳,李莉.乙型肝炎病毒X基因异质性及对其反式激活功能的影响.解放军医学杂志 2002;27:125-127
- 19 刘妍,董菁,成军,夏小兵,李克,王琳,施双双,段惠娟,杨继珍.乙型肝炎病毒X基因在真核细胞中的表达及反式激活SV40病毒早期启动子的研究.解放军医学杂志 2001;26:404-406
- 20 Hildt E, Saher G, Bruss V, Hofschneider PH. The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. *Virology* 1996;225:235-239

生物信息学技术与新基因的研究

成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳

成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳,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 国家自然科学基金资助项目, No. C39970674, C03011402
项目负责人:成军,10039,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:010-6693 3391 传真:010-6380 1283
收稿日期:2002-10-29 接受日期:2002-11-18

成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳.生物信息学技术与新基因的研究.世界华人消化杂志 2003;11(4):474-477

<http://www.wjngnet.com/1009-3079/11/474.htm>

0 引言

新基因的克隆化无异是生物医学领域创新知识源泉的重要组成部分.这一任务,不仅是人类基因组计划(HGP)的核心内容,同时也是后基因组计划(post-HGP)的重要内容.多年来,随着以人的基因克隆化为主的不同生物类型基因克隆化研究的进展,已然积累了大量的不同生物的基因序列、蛋白质的氨基酸残基序列,同时对于不同生物种属之间基因序列、蛋白质以及结构序列的保守结构位点也积累了丰富的资料,并据此建立了庞大的数据库系统.对于这些数据的分析,必须依靠计算机分析技术.计算机分析技术的不断发展,为这些资料和数据的分析建立了一些有效的分析技术.因此,自然而然就将基因和蛋白质结构的资料与计算机分析技术结合起来,形成了目前极具潜力的新兴交叉学科-生物信息学(bioinformatics)技术^[1].生物信息学技术的形成和发展,大大促进了以基因的分子生物学为核心内容的现代生物医学的发展,以基因的分子生物学为核心内容的理论和技术,已经成为生物学领域、医学领域重要的创新知识源泉.

1 基因序列和氨基酸残基序列同源性比对及其应用

基因序列和蛋白质一级结构序列的同源性比对,是目前生物信息学技术中最基本、应用最广泛的技术之一.随着基因和蛋白一级结构序列数据库的不断扩充,人们甚至单单从数据库的计算机分析就可以克隆新的基因.目前以美国国家生物工程信息学中心(NCBI national center of bioengineering information)建立的核苷酸序列数据库(GenBank)及其相应的检索分析系统的应用最为广泛^[2].

基因序列同源性的比对,对于分析基因组DNA序列以及完成新基因的染色体定位也是极为便捷的.将确定的新基因的编码基因序列作为参照,对于GenBank数据库中高通量基因序列(htgs)数据库中基因组DNA序列进行同源性对比,当发现与新基因的cDNA序列完全同源

的基因组 DNA 序列时, 根据 Chambon 原则, 内含子(intron)的序列总是以 GT 开始, 以 AG 结束, 就可以确定该基因的基因组 DNA 序列的结构, 及外显子(exon)-内含子序列结构. 因为在 htgs 数据库收录的基因组 DNA 序列, 其染色体的来源是十分清楚的, 因此就很容易、很方便地将该基因组进行染色体的定位, 而不再需要进行荧光原位杂交(FISH)的常规的基因染色体定位技术. 可见基因的生物信息学技术的发展对于基因组 DNA 序列的确定和在染色体上的定位是多么重要. 我们根据基因序列同源性的比较, 曾经以人肝再生增强因子(ALR, augmenter of liver regeneration)的基因序列为参照, 确定了人 ALR 基因组 DNA 序列、小鼠 ALR 的 cDNA 序列, 甚至克隆了大鼠的 ALR 的假基因(pseudogene)序列^[3-10].

核苷酸、蛋白质一级结构的序列对比, 不限于两两比较的方式, 多个序列彼此之间序列的比较技术, 逐渐发展成为遗传树分析法. 例如, 对于一个慢性乙型肝炎患者血清中乙型肝炎病毒(HBV)的基因序列进行克隆测定, 同时对于可能是传染源的血清标本中 HBV 基因序列进行测定比较, 就可以确定 HBV 的传染源. 即根据多个 HBV DNA 序列的比对分析, 判断序列的相似性, 确定彼此之间的序列的同源性, 从而确定传染源. 同样的道理, 对于一系列不同生物特定基因序列进行克隆分析、比较, 即可以确定彼此之间的亲缘关系, 并绘制成图谱, 进行分类, 这就是遗传分类学(cladistics).

2 基因启动子序列的预测分析

真核细胞的基因表达调节虽然是多个水平的调节, 但主要是转录水平的调节. 转录水平的调节基础就是转录因子蛋白与启动子 DNA 序列之间的结合和激活. 转录因子蛋白的结构可以分成结合域(BD, binding domain)以及激活域(AD, activation domain). 作为基因启动子 DNA 的序列也具有特征性的结构. 但是相比较而言, 目前基因启动子以及转录因子蛋白结合的种类, 积累的资料还十分有限, 数据库容量偏小, 计算技术相对滞后, 其预测结果仅供参考, 还必须结合其他的分子生物学技术进行证实.

一般情况下, 确定了一种新基因的编码区序列之后, 通过与 htgs 数据库的同源性比对, 可以很方便地确定其相应的基因组 DNA 序列. 在确定编码基因的起始密码子之后, 指导基因表达的启动子序列一般位于其上游基因序列 300-3 000 nt 之间, 鲜有例外. 可以从翻译起始密码子上有的基因组 DNA 序列, 选取 3 000 nt 左右的核苷酸序列进行生物信息学分析. 例如可以应用在线软件分析技术, 或自行研发的启动子序列分析技术等软件分析, 如: <http://www.cbs.dtu.dk/services/promoter/>、http://www.fruitfly.org/cgi-bin/seq_tools/promoter.pl, <http://bimas.dcrn.nih.gov/molbio/proscan/> 等. 根据这些软件分析的结果, 首先确定进行缺失突变体构建时应该采用的引物序列, 如果一段序列的缺失导

致报告基因表达水平的升高, 那么说明这一段基因序列存在着启动子的静息子(silencer)的序列, 对于基因的表达水平具有负调节作用. 通过逐步缺失的策略, 最终确定启动子 DNA 的核心序列. 报告基因表达载体的构建以及细胞转染技术, 仍然是目前研究基因启动子序列活性最为基本的方法.

研究转录因子蛋白的结合及其对基因表达水平的调节作用和性质有许多技术, 但是利用生物信息学技术预测的启动子 DNA 序列的结合的转录因子蛋白结果只有部分参考的意义. 凝胶迟滞(gel shift)试验、超级迁移实验(super shift)、竞争性结合实验、酵母单杂交技术(yeast one hybrid)、噬菌体展示技术(phage display)等在转录因子蛋白与启动子 DNA 序列结合的研究中具有重要应用前景.

3 不同种属基因序列的克隆化及其分析

细胞凋亡(apoptosis)是生命活动的重要形式. 2002年的诺贝尔医学奖就颁给了3位在细胞凋亡研究领域做出突出贡献的科学家. 早期的细胞凋亡研究, 相当一部分的工作是在一种称为美丽线虫(*C. elegans*)的简单生物模型上进行的. 例如在美丽线虫凋亡相关基因研究中, 发现 Ced-3 基因与线虫细胞凋亡有关, 被称为线虫细胞的自杀基因. 根据不同生物同源基因序列的比对, 发现 Ced-3 蛋白与人白介素-1 β 转换酶(ICE)的蛋白质一级结构序列同源性达到 26%, 这种同源性在两种遗传背景相去甚远的物种的基因之间是鲜见的. 因此初步认为人的 ICE 基因是细胞凋亡促进基因, 即人细胞的自杀基因. 通过对人 ICE 基因对于细胞凋亡的研究, 发现 ICE 的确可以促进细胞凋亡, 从而直接导致了人类第一个自杀基因的发现与鉴定. 这是生物信息学技术, 基因序列同源性比对在发现新基因或基因的新功能方面一个十分成功的例子. 随着核苷酸数据库的容量不断加大, 计算机分析技术的不断进步, 关于不同生物种属之间序列的比对在发现新基因或发现基因的新功能方面越来越重要.

在生物进化过程中, 不同生物种属的基因都是高度保守的. 因此, 通过核苷酸序列同源性的比对, 就可以对来源于不同生物种类的同源基因序列进行分析. 这种分析过程也是新基因克隆化的重要途径. 例如, 我们在利什曼原虫新基因的克隆研究中, 为了探索与免疫应答的相关分子, 筛选基因疫苗的更好的靶抗原蛋白编码基因, 就是利用了生物信息学技术. 首先确定利什曼原虫这种细胞内寄生的原虫类型, 虫体表面的蛋白质抗原具有更多的与机体的免疫系统接触的机会, 在机体抗寄生虫免疫应答中具有重要作用^[11,12]. 因此, 计划对于利什曼原虫表面蛋白分子进行研究, 以期有所发现. 为了完成这一研究, 我们首先对于 GenBank 核苷酸数据库中收录的锥虫(*T. cruzi*)的基因序列进行检索分析, 在 GenBank 我们首先发现了无鞭毛体蛋白(amastin)的编码基因序列. 然后以此序列作为参照, 利用 BLAST 作为检索工具, 对于 GenBank 中所收录的利什曼原虫的同源性基因序列进

行搜索,结果找到了一段309 nt的基因片段来源于硕大利什曼原虫(*L. major*)。随后,我们利用这一片段作为探针,对于硕大利什曼原虫的cDNA文库进行杂交筛选,最终获得了硕大利什曼原虫的无鞭毛体蛋白的编码基因。随后我们对于其他株的利什曼原虫的无鞭毛体蛋白的编码基因序列也进行了克隆与分析,获得了显著的进展^[13-20]。这一基因序列是利什曼原虫基因组中的第一个无鞭毛体的基因序列,对于研究利什曼原虫与宿主细胞之间的相互作用研究具有重要意义。

数据库的相似性搜索使我们能够从数据库中存在的数十万个基因序列中可以挑选出可能同感兴趣的序列有关联的序列,这个方法有时会导致意想不到的收获,用这种策略获得成功的第一个例子就是发腺病毒肿瘤基因 *v-sis* 是细胞中编码血小板衍生因子(PDGF)的正常细胞基因的一个变体形式。那个时候,序列的数据库还不是很大,因此这一发现令人称奇。随着数据库的不断扩大,基本上可以检索到大部分基因的同源序列。

4 调节作用靶基因的分析

对于一种新基因生物学和医学意义的认识,可以从多方面入手。其中对于这种蛋白的表达及其在细胞中对于基因表达谱的影响研究,也是重要的突破口。获得基因差异表达谱的手段很多,可以从蛋白方面入手,也可以从基因的克隆化方面入手。从目前的研究技术来看,以基因芯片技术和抑制性消减杂交(SSH)技术最为有效。首先构建这种新基因的真核表达载体,然后与该空白载体分别转染相同的细胞获细胞系,同时提取mRNA、逆转录为cDNA,进行差异表达分析,获得差异表达的基因片段。因为目前的差异表达分析技术不能完全排除假阳性,因此还必须首先借助杂交技术排除假阳性的可能^[21-31]。

获得差异表达基因片段之后,因为这些基因片段有些是编码基因区片段,有些是非编码区基因片段,而且位于上游还是下游也不能一下得到确定,这就要借助生物信息学分析技术的力量。随着核苷酸序列数据库的不断扩大,大部分的基因序列片段经过核苷酸序列同源性的比对就可以迅速得到确定。如果在已经登录的基因序列数据库中没有发现同源基因序列时,需要进行相对复杂的生物信息学技术的分析,同时也蕴藏着发现新的基因序列的可能。首先可根据基因序列同源性对比的原则,以新发现的cDNA片段序列作为参照,对于GenBank数据库来源于人的表达序列标签(human EST)数据库以BLAST为检索工具进行同源序列的比对。一般可以发现多个与之同源的EST序列,然后根据这些同源的EST序列进行电子拼接,得到更长的cDNA片段,然后对于这一cDNA片段6种可能的开放读码框架(ORF, open reading frame)进行计算机预测。一般来讲,除了个别的基因之外,其编码基因序列都在100个氨基酸残基以上,即>300 bp的ORF要得到特别的重视。之后以此ORF为参照,利

用上述核苷酸序列同源性比对的原则,确定相应的基因组DNA序列,基因组DNA序列的确定对于新基因编码取得确定同样具有决定性的意义。从确定的基因组DNA序列中,首先要检查该新基因序列的起始密码子(ATG)是否符合Kozak^[32]原则,即ATG周围的序列是否是哺乳动物细胞起始密码子序列特定性的结构。大部分人的基因序列都符合这一特点。如果能够证实这一新基因的起始密码子序列符合Kozak原则,那么关于这一新基因序列的起始密码子的确定就可以认为是基本正确的。关于终止密码子序列的确定在生物信息学理论中同样有章可循。在人类大部分基因的基因组DNA序列中,终止密码子序列是TAA、或者TAG、TGA,但无论是哪一种终止密码子,在其后大约200-600 nt的位置上,都有mRNA的加尾信号(tailing signal),即AATAA序列,有时这一加尾信号序列还多次重复出现,保证基因转录得到及时终止,在转录终止的mRNA尾部,加上数量不等的多聚腺苷酸,对于维持所转录的mRNA的稳定性至关重要,同时也是调节mRNA稳定性,调节基因翻译水平和表达时空的重要机制之一。如果在编码基因序列下游可以确定明确的多聚腺苷酸信号序列,那么这一新基因的生物信息学预测结果基本是可信的。

5 参考文献

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Meyers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;215:403-410
- Zhang J, Madden TL. Power BLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. *Genome Res* 1997;7:649-656
- 成军, 钟彦伟, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 陈菊梅. 人肝再生增强因子基因组DNA的克隆化与序列分析. 传染病信息 1999;12:62
- 成军, 钟彦伟, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 陈菊梅. 小鼠肝再生增强因子cDNA的克隆化与序列分析. 肝脏 1999;4:138-140
- 成军, 钟彦伟, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 陈菊梅. 人肝再生增强因子基因组DNA的克隆化与序列分析. 中华肝脏病杂志 2000;8:12-14
- Cheng J, Zhong YW, Liu Y, Dong J, Yang JZ, Chen JM. Cloning and sequence analysis of human genomic DNA of augmenter of liver regeneration. *World J Gastroenterol* 2000;6:275-277
- 成军. 肝再生增强因子超家族研究进展. 生物学杂志 2000;17:4-6
- 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
- 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
- 成军主编. 程序性细胞死亡与疾病. 第1版. 北京:北京医科大学、协和医科大学联合出版社, 1997:125-129
- 成军, 斯崇文, 王勤环. 硕大利什曼原表面蛋白"无鞭毛体蛋白(amastin)"的基因克隆化与序列分析. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 2000;18:30-32
- 成军, 钟彦伟, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 陈菊梅. 利什曼原虫无鞭毛体蛋白基因的克隆化与序列分析. 中华传染病杂志 2001;19:27-31
- 成军, 钟彦伟, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 陈菊梅. 墨西哥利什曼原虫无鞭毛体蛋白的基因克隆化与序列分析. 中国人兽共患病杂志 2000;16:39-41
- 成军, 钟彦伟, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 陈菊梅. 巴西利什曼原虫无鞭毛体蛋白的基因克隆化与序列分析. 寄生虫与医学昆虫学报 2000;7:193-197
- 成军, 钟彦伟, 刘妍, 杨继珍, 董菁. 亚马逊利什曼原虫无鞭毛体蛋白的基因克隆化与序列分析. 中国地方病杂志 2001;20:175-177
- 成军, 夏小兵, 王刚, 刘妍, 钟彦伟, 王琳, 杨继珍. 杜氏利什曼原虫蛋白磷酸酶2C的基因克隆化与序列分析. 中国人兽共患病杂志 2001;17:37-39
- Melby PC, Yang J, Zhao W, Perez LE, Cheng J. *Leishmania donovani* p36 (LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral *Leishmaniasis*. *Infect Immun* 2001;69:4719-4725

- 18 成军,夏小兵,王刚,刘妍,钟彦伟,王琳,杨继珍. 硕大利什曼原虫激活蛋白激酶C受体的基因克隆化与序列分析. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志* 2001;19:373-374
- 19 成军,夏小兵,王刚,刘妍,钟彦伟,杨继珍. 巴西利什曼原虫激活蛋白激酶C受体的基因克隆化与序列分析. *寄生虫与医学昆虫学报* 2001;8:193-198
- 20 成军,夏小兵,王刚,刘妍,钟彦伟,王琳,杨继珍. 杜氏利什曼原虫激活蛋白激酶C受体的基因克隆化与序列分析. *中国人兽共患病杂志* 2002;18:24-27
- 21 董菁,成军,王勤环,王刚,施双双,夏小兵,斯崇文. 外周血中乙型肝炎病毒截短型囊膜中蛋白基因的克隆化与分析. *中华肝脏病杂志* 2001;9:163-165
- 22 刘妍,成军,王刚,李克,段惠娟,王琳,董菁,洪源,张跃新,李莉,张玲霞,陈菊梅. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因. *解放军医学杂志* 2001;26:880-883
- 23 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
- 24 倪勤,成军,李莉,夏光明,王红旗,王刚. 肝移植术后败血症患者粪肠球菌PBP4基因的克隆化与分析. *中华医药杂志* 2001;1:1-3
- 25 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. *Hepatobil Pancreatic Dis Int* 2002;1:87-91
- 26 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
- 27 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的蛋白基因. *世界华人消化杂志* 2002;10:161-164
- 28 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, 1997:204-210
- 29 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
- 30 李克,王琳,成军,张玲霞,段惠娟,陆荫英,杨继珍,刘妍,邵得志,夏小兵,王刚,董菁,李莉,钟彦伟,洪源,陈菊梅. 筛选与克隆丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因. *中华实验与临床病毒学杂志* 2002;16:51-54
- 31 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
- 32 Kozak M. Interpreting cDNA sequence, some insights from studies on translation. *Mamm Genome* 1996;7:563-574

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊

本刊讯 期刊的学术质量是一个综合指标, 1999 年中国科技信息所研制了中国科技期刊综合指标评价体系, 该指标体系已应用于中国科协一年一度的期刊择优资助工作中. 综合指标评价体系是根据期刊的多项重要指标, 如被引总频次、影响因子、即年指标、基金论文比、他引总引比、扩散因子等对期刊分学科进行综合打分. 通过对中国科技论文与引文数据库收录的科技期刊进行综合评定, 今年中国科学技术信息研究所首次评出了中国百种杰出学术期刊. 世界华人消化杂志荣获 2001 年度百种中国杰出学术期刊称号.

(世界胃肠病学杂志 2002-12-18)

中药复方肠安泰对肠癌肺转移模型小鼠肠黏膜固有层B细胞及IL-12的影响

王文萍,王垂杰,姜良铎,饭乡正明

王文萍,辽宁中医学院附属医院肿瘤内科 辽宁省沈阳市 110032
 王垂杰,辽宁中医学院附属医院消化内科 辽宁省沈阳市 110032
 姜良铎,北京中医药大学东直门医院内科 北京市 100029
 饭乡正明,日本国立癌中心细胞增生实验室 日本东京 104-0045
 辽宁省科委基金资助课题, No.962243
 项目负责人:王文萍,110032,辽宁省沈阳市皇姑区崇山东路79号,辽宁中医学院附属医院. wenpingwang.263.net
 电话:024-23887357 传真:024-23887357
 收稿日期:2002-11-21 接受日期:2003-01-18

摘要

目的:探讨中药复方肠安泰对肠管绒毛黏膜固有层B细胞及IL-12的影响及其与肺转移的关系。

方法:经皮下植入大肠癌高度肺转移细胞(Co26Lu),建立大肠癌肺转移小鼠动物模型,采用ABC免疫染色及免疫荧光染色方法做相关分析。

结果:荷瘤治疗组与荷瘤对照组相比IgA、IgM及IL-12阳性细胞在小肠绒毛黏膜固有层均有显著意义的增加。两组数值依次为 172.3 ± 6.7 , 59.2 ± 5.3 , 79.6 ± 4.1 ; 131.2 ± 5.3 , 45.1 ± 4.3 , 24.4 ± 2.5 ($P < 0.01$)。

结论:中药复方肠安泰预防大肠癌肺转移的机制,与其促进了荷瘤小鼠小肠绒毛黏膜固有层B细胞的活化及IL-12的诱导有关。

王文萍,王垂杰,姜良铎,饭乡正明. 中药复方肠安泰对肠癌肺转移模型小鼠肠黏膜固有层B细胞及IL-12的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(4):478-480
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/478.htm>

0 引言

大肠癌是常见的消化道恶性肿瘤,手术是治疗大肠癌的主要手段,但术后5a生存率一直徘徊在50-55%,50a来并无显著提高,成为手术失败的主要原因。根据中医基础理论^[1]本研究提出肿瘤转移“痰毒流注”病机假说^[2-4],研制中药复方肠安泰进行预防大肠癌转移的研究。实验证明中药复方肠安泰预防大肠癌(Co26Lu)肺转移机制中,T细胞、NK细胞及细胞因子IFN γ 发挥着重要的作用^[5,6]。本实验的目的在于探讨中药复方肠安泰对肠管绒毛黏膜固有层B细胞及IL-12的影响及其与肺转移的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 CDF1系5WK小鼠(购自日本CharlesRiver公司)30只,体质量23-26g分笼饲养,自由饮水,饲料为繁殖用固性饲料(CLEA日本),动物室为无菌条

件,控制温度,12h明暗周期。给予1wk的预备饲养,待小鼠6wk时进行实验。中药复方肠安泰为省科委基金课题观察处方,由藤梨根,黄芪,补骨脂,鸡血藤组成。所有生药均购自辽宁中医学院附属医院,由辽宁中医学院中药系醇提精制成干膏。山羊抗小鼠IgA抗体,工作浓度1:16,山羊抗小鼠IgM抗体,工作浓度1:128,购于美国Sigma公司,大鼠抗小鼠IL-12抗体,工作浓度2 μ g/L,购于美国PharMingen公司,ABC免疫组化试剂盒购于美国VectorLaboratories,Inc公司。大肠癌高度肺转移细胞(Co26Lu)由日本国立癌中心饭乡正明惠赠。

1.2 方法 将小鼠随机分成正常对照组、荷瘤对照组及荷瘤治疗组,每组10只小鼠。正常对照组为非造模组。荷瘤对照组为造模组:将Co26Lu细胞皮下注入小鼠右大腿,每只0.1mL,含 1×10^5 个癌细胞。荷瘤治疗组:从小鼠造模后3d开始,每天灌胃予肠安泰0.75g/Kg,持续给药18d。正常对照组,荷瘤对照组小鼠于每日相同时间,用相同方法给予等量生理盐水。灌胃18d后24h,乙醚麻醉小鼠,解剖取小肠、大肠,4%丙酮固定,标本切除,石蜡包埋,制成3 μ m切片备用。小肠、大肠的IL-12细胞均采用ABC免疫组化方法染色,方法参见试剂盒说明书进行。主要步骤为:切片按常规脱蜡处理至水,1mL/L牛奶浸泡20min,PBS漂洗5min,每片加入一抗20 μ L,室温2h,PBS漂洗3次各5min,在含30mL/L的H₂O₂的Metoh中浸泡5min,PBS漂洗3次各5min,加入二抗(黄色液3滴,蓝色液1滴)20 μ L,室温1h,PBS漂洗15min,加入(ABC盒的A液2滴,B液2滴)20 μ L,常温1h,PBS漂洗3次各5min,0.1g/L的DAB/0.3mL/L的H₂O₂显色,流水冲洗10min,苏木紫核染色2sec,经过脱水,透澈及封入剂封入。在高倍光镜下,随机观察相连10个绒毛,计数小肠、大肠的绒毛黏膜固有层的IL-12阳性细胞数,IL-12阳性细胞在细胞核上出现棕色颗粒。免疫荧光染色:切片按常规脱蜡处理至水,1mL/L的牛奶浸泡20min,PBS漂洗5min,加入含有FITC的一次抗体,室温放置60min,用PBS洗3次,干燥后加盖玻片,暗处保存。在高倍光镜下,随机观察相连10个绒毛,计数小肠、大肠的绒毛黏膜固有层的IL-12阳性细胞及IgA,IgM阳性细胞数,IgA,IgM阳性细胞在细胞核上出现荧光。

统计学处理 数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采

用日本医学统计软件,组间 IgA、IgM 及 IL-12 阳性细胞的对比用 Dunnett's T 检验。

2 结果

2.1 小肠绒毛黏膜固有层 B 细胞及 IL-12(表 1) 小肠绒毛黏膜固有层的 IgA、IgM 阳性细胞数,荷瘤对照组与正常对照组相比,均有显著增高,有统计学意义($P < 0.01$)。荷瘤治疗组与荷瘤对照组相比也具有显著性差别($P < 0.01$);小肠绒毛黏膜固有层的 IL-12 阳性细胞数,荷瘤对照组与正常对照组相比,有增高趋势,但无统计学意义。荷瘤治疗组与荷瘤对照组相比具有显著性增高($P < 0.01$)。

2.2 大肠绒毛黏膜固有层 B 细胞及 IL-12(表 1) 荷瘤对照组与正常对照组相比,大肠绒毛黏膜固有层的 IgA、IgM 及 IL-12 阳性细胞均有增高趋势,但无统计学意义。大肠的荷瘤治疗组与荷瘤对照组相比 IgM 有增高趋势,但无统计学意义,而 IgA 及 IL-12 组有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 中药复方肠安泰对肠绒毛黏膜固有层 B 细胞及 IL-12 的影响($n = 10$, $\bar{x} \pm s$ 阳性细胞数/10 个肠绒毛)

分组		IgA	IgM	IL-12
小肠	正常对照组	88.6 ± 3.2	26.7 ± 3.6	18.2 ± 2.1
	荷瘤对照组	131.2 ± 5.3 ^a	45.1 ± 4.3 ^a	24.4 ± 2.5
	荷瘤治疗组	172.3 ± 6.7 ^a	59.2 ± 5.3 ^a	79.6 ± 4.1 ^a
大肠	正常对照组	42.7 ± 2.6	18.4 ± 1.9	10.5 ± 1.6
	荷瘤对照组	50.1 ± 3.2	26.7 ± 2.1	16.1 ± 1.9
	荷瘤治疗组	65.4 ± 4.1 ^b	30.0 ± 2.9	25.6 ± 2.1 ^b

^a $P < 0.01$ vs 正常对照组; ^b $P < 0.05$ vs 荷瘤对照组。

3 讨论

肠道黏膜是一个非常复杂的免疫部位或免疫器官,黏膜淋巴细胞具有归巢性,口服具有免疫作用的药物可以引起黏膜的免疫反应,也能引起系统免疫反应,因此黏膜是宿主防御的第一道防线。肠道黏膜固有层的淋巴细胞 LPL 位于上皮层下,是黏膜免疫系统 MIS 受作用于黏膜表面的特异抗原物质发展而成,在预防肿瘤转移中发挥着重要的作用^[7-10]。

阻止肿瘤转移免疫机制的研究多从 T 淋巴细胞角度探讨^[11-15]。对体液免疫研究者较少,有临床研究发现大肠癌患者的免疫球蛋白中的 IgG、IgM 处于正常水平,而 IgA 则明显低于正常值^[16]。本实验显示肿瘤(Co26Lu)发生及肿瘤转移初期,小肠的肠管绒毛黏膜固有层的 IgA 及 IgM B 细胞均有增加趋势,但这种程度的增加,仅仅是机体产生的肿瘤免疫反应或是免疫刺激,并未能达到抑制肿瘤生长及转移的作用。而中药复方肠安泰显著地、有意义地增加了荷瘤小鼠 IgA、IgM B 细胞及细胞因子 IL-12 在小肠绒毛黏膜固有层的分布。表明中药复方肠安泰抗大肠癌肺转移(Co26Lu)的机制与 B 细胞和细胞因子 IL-12 在小肠内增加有关,IL-12 的抗肿

瘤作用特别是其抗转移活性尤其令人注目^[17-22]。许多肿瘤动物实验模型表明,IL-12 可在肿瘤的微环境中达到持久的局部浓度,能抑制肿瘤的生长或使肿瘤完全消退,阻止恶性转移,抑制远处肿瘤的生长^[23-27]。更重要的是,IL-12 使一些动物显示持久的系统免疫,对肿瘤的再攻击具有保护作用^[28-31]。IL-12 通过调节 NK 细胞、巨噬细胞介导的非特异性免疫和 Th 细胞、细胞毒性 T 细胞介导的特异性免疫作用^[32]。

过去实验表明中药复方肠安泰能够增加 T 细胞及 NK 细胞在小肠黏膜固有层的数量^[5],并能通过诱导 IFN 的产生而抑制肿瘤生长和转移^[6]。也就是说中药复方肠安泰一方面在来源于 B 细胞的 IL-12 介导下,产生 IFN 而发挥抗肿瘤转移的作用,另一方面诱导产生的 IL-12 的抗肿瘤作用可能是由于 CD8+T、NK 细胞所介导的。在整个免疫应答过程中,小肠黏膜固有层淋巴细胞起主导作用,大肠黏膜固有层淋巴细胞起辅助作用。

4 参考文献

- 王文萍,姜良铎. 肿瘤转移器官特异性发生机制与中医经络藏象理论. 北京中医药大学学报 2002;25:11-13
- 王文萍,王垂杰,姜良铎. 肿瘤转移“痰毒流注”理论形成基础及实践意义. 中国中医基础医学杂志 2002;8:324-326
- 王文萍,王垂杰. 中医学对大肠癌肿瘤转移的认识及对策. 中医药学刊 2002;14:41-42
- 王文萍,姜良铎,刘明. 肿瘤转移“痰毒流注”病机假说的研究思路. 辽宁中医杂志 2002;3:137-138
- 王文萍,姜良铎,王垂杰,饭乡正明. 中药复方肠安泰胶囊对大肠癌肺转移模型小鼠肠黏膜 T 细胞及 NK 细胞的诱导. 北京中医药大学学报 2001;4:34-36
- 王文萍,姜良铎,王垂杰,饭乡正明. 肠安泰对 IFN 的诱导及肺转移的抑制. 中国中医基础医学杂志 2002;12:23-24
- Mowat AM, Smith RE, Donachie AM, Furrrie E, Grdic D, Lycke N. Oral vaccination with immune stimulating complexes. *Immunol Lett* 1999;65:133-140
- Angstrom J, Backstrom M, Berntsson A, Karlsson N, Holmgren J, Karlsson KA, Lebens M, Teneberg S. Novel carbohydrate binding site recognizing blood group A and B determinants in a hybrid of cholera toxin and Escherichia coli heat-labile enterotoxin B-subunits. *J Biol Chem* 2000;275:3231-3238
- Del Giudice G, Pizza M, Rappuoli R. Mucosal delivery of vaccines. *Methods* 1999;19:148-155
- Wang WP, Iigo M, Sato J, Sekine K, Adachi I, Tsuda H. Activation of intestinal mucosal immunity in tumor-bearing mice by lactoferrin. *Jpn J Cancer Res* 2000;91:1022-1027
- 王文萍,饭乡正明,津田洋幸. 大肠癌及癌转移的预防与 Lactoferrin. 肿瘤学杂志 2002;1:55-56
- 吕仁荣,寿楠海,姜希宏. 大肠癌细胞增生活性和细胞免疫水平与淋巴结转移规律的研究. 世界华人消化杂志 2001;9:455-456
- 吴金生,谭文军,赖大年. 胃癌术后输注脂肪乳对 IL-12 及细胞免疫功能的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:712-713
- 李明松,袁爱力,张万岱,陈学清,张亚历,周殿元. 大肠癌患者外周血树突状细胞免疫功能研究. 世界华人消化杂志 1999;7:429
- 赵任,郁宝铭,郑民华,李东华,张国弛,朱佑明,胡宝瑜. 硒对淋巴细胞杀伤大肠癌细胞的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:80-83
- 赵任,郁宝铭,张国弛,郑民华,李东华,黄梁,邹鸿志. 手术前后硒对大肠癌患者的免疫功能及抗氧化功能的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:1013-1016
- Martinet O, Ermekova V, Qiao JQ, Sauter B, Mandeli J, Chen L, Chen SH. Immunomodulatory gene therapy with interleukin 12 and 4-1BB ligand: long-term remission of liver metastases in a mouse model. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:931-936
- Wang Z, Qiu SJ, Ye SL, Tang ZY, Xiao X. Combined IL-12 and GM-CSF gene therapy for murine hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther* 2001;8:751-758

- 19 Rakhmilevich AL, Janssen K, Hao Z, Sondel PM, Yang NS. Interleukin-12 gene therapy of a weakly immunogenic mouse mammary carcinoma results in reduction of spontaneous lung metastases via a T-cell-independent mechanism. *Cancer Gene Ther* 2000;7:826-838
- 20 Fuji N, Ueda Y, Fujiwara H, Toh T, Yoshimura T, Yamagishi H. Antitumor effect of alpha-galactosylceramide (KRN7000) on spontaneous hepatic metastases requires endogenous interleukin 12 in the liver. *Clin Cancer Res* 2000;6:3380-3387
- 21 Worth LL, Jia SF, Zhou Z, Chen L, Kleinerman ES. Intranasal therapy with an adenoviral vector containing the murine interleukin-12 gene eradicates osteosarcoma lung metastases. *Clin Cancer Res* 2000;6:3713-3718
- 22 Iwazawa T, Chau GY, Mori T, Dookeran KA, Rubin JT, Watkins S, Robbins PD, Lotze MT, Tahara H. Potent antitumor effects of intra-arterial injection of fibroblasts genetically engineered to express IL-12 in liver metastasis model of rat: no additional benefit of using retroviral producer cell. *Cancer Gene Ther* 2001;8:17-22
- 23 Mariani E, Meneghetti A, Tarozzi A, Cattini L, Facchini A. Interleukin-12 induces efficient lysis of natural killer-sensitive and natural killer-resistant human osteosarcoma cells: the synergistic effect of interleukin-2. *Scand J Immunol* 2000;51:618-625
- 24 Nakui M, Ohta A, Sekimoto M, Sato M, Iwakabe K, Yahata T, Kitamura H, Koda T, Kawano T, Makuuchi H, Taniguchi M, Nishimura T. Potentiation of antitumor effect of NKT cell ligand, alpha-galactosylceramide by combination with IL-12 on lung metastasis of malignant melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 2000;18:147-153
- 25 Kishida T, Asada H, Satoh E, Tanaka S, Shinya M, Hirai H, Iwai M, Tahara H, Imanishi J, Mazda O. In vivo electroporation-mediated transfer of interleukin-12 and interleukin-18 genes induces significant antitumor effects against melanoma in mice. *Gene Ther* 2001;8:1234-1240
- 26 Shin T, Nakayama T, Akutsu Y, Motohashi S, Shibata Y, Harada M, Kamada N, Shimizu C, Shimizu E, Saito T, Ochiai T, Taniguchi M. Inhibition of tumor metastasis by adoptive transfer of IL-12-activated Valpha14 NKT cells. *Int J Cancer* 2001;91:523-528
- 27 Smyth MJ, Cretney E, Takeda K, Wiltrott RH, Sedger LM, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *J Exp Med* 2001;193:661-670
- 28 Melero I, Mazzolini G, Narvaiza I, Qian C, Chen L, Prieto J. IL-12 gene therapy for cancer: in synergy with other immunotherapies. *Trends Immunol* 2001;22:113-115
- 29 Mikyskova R, Bubenik J, Mendoza L, Vonka V, Smahel M, Simova J, Jandlova T. Local cytokine treatment of HPV16-associated tumours results in inhibition of their lung metastases. *Clin Exp Metastasis* 2000;18:581-587
- 30 Gambotto A, Tuting T, McVey DL, Kovacs I, Tahara H, Lotze MT, Robbins PD. Induction of antitumor immunity by direct intratumoral injection of a recombinant adenovirus vector expressing interleukin-12. *Cancer Gene Ther* 1999;6:45-53
- 31 Aruga A, Tanigawa K, Aruga E, Yu H, Chang AE. Enhanced adjuvant effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-12 compared with either alone in vaccine-induced tumor immunity. *Cancer Gene Ther* 1999;6:89-95
- 32 杨家和,钱其军,吴孟超,郭亚平. 白介素12:重要的免疫调节因子. 世界华人消化杂志 1999;7:71-72

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 征文通知 •

全国第八届中西医结合普通外科学术研讨会征文通知

由中国中西医结合学会急腹症专业委员会主办,大连医科大学附属第一医院承办的全国第八届中西医结合普通外科学术研讨会将于2003年6月中旬在辽宁省大连市召开,现将征文通知如下。

1 征文内容:

(1)急性及性胰腺炎的中西医结合基础实验研究和临床经验总结。(2)肝胆疾病的中西医结合基础实验研究和临床经验总结。(3)梗阻性黄疸的诊断和中西医结合治疗经验。(4)肝胆、胰腺疾病的影像学诊断及中西医结合介入治疗(5)中西医结合胃肠疾病的基础实验研究和临床经验总结。(6)

有关肝胆胰腺胃肠疾病新技术、新进展的应用经验。(7)中西医结合治疗中晚期肿瘤的基础与临床研究(8)有关肝胆胃肠疾病的腹腔镜,内窥镜诊治新技术和新方法。

2 征文要求:

(1)文章未公开发表过(包括会议及杂志)。(2)请寄4000字以内全文及600字以内摘要打印稿各一份,摘要应包括目的,方法,结果和结论四部分,不投摘要者恕不能收入汇编。(3)投稿时请附软盘,用word软件输入,注明作者姓名,单位,邮编并加盖公章或附单位介绍信。(4)稿件请于2003年4月15日前(以邮戳为准)寄至大连医科大学附属第一医院,陈海龙教授收,地址:大连市中山路222号,邮编:116011。(5)欢迎网上投稿,Email:hailong_chen@x263.net。

3本次会议将邀请著名中西医结合专家做专题讲座。中国中西医结合普通外科专业委员会将会同中国中西医结合外科杂志对全部征文进行优秀论文评选,获奖者除参加大会交流外,还将被授予中国中西医结合学会优秀论文证书。参会者将被授予国家级继续教育学分。

中国中西医结合学会普通外科(急腹症)专业委员会

2003-03-08

细胞外信号调节激酶在胃癌组织中的表达及其与幽门螺杆菌感染的关系

褚传莲,李延青,张 燕,李文婕,赵宛邨

褚传莲,济南市第三人民医院 山东省济南市 250101
李延青,张燕,李文婕,赵宛邨,山东大学齐鲁医院 山东省济南市 250012
项目负责人:李延青,250012,山东省济南市文化西路40号,山东大学齐鲁医院
消化内科. chucl@sanlian.com.cn
电话:0531-6921941-5314
收稿日期:2002-10-07 接受日期:2002-10-29

摘要

目的:研究胃癌组织中细胞外信号调节激酶(ERK)的表达与幽门螺杆菌(*H.pylori*)的感染情况,探讨胃癌组织中 ERK 的表达与 *H.pylori* 感染的关系。

方法:ERK 的表达采用免疫组化 S-P 法,用改良 Giemsa 染色、快速尿素酶试验和 *H.pylori* -IgG 检测胃癌组织中 *H.pylori* 感染情况。

结果:ERK1、ERK2 在胃癌组织的细胞质和 / 或细胞核中表达, ERK1、ERK2 在胃癌组织中表达的阳性率分别为 82.5 % 和 77.5 %, 在高 - 中分化腺癌、低分化腺癌、黏液腺癌和未分化癌中表达的阳性率均无显著性差异($P > 0.05$)。ERK1、ERK2 的表达与胃癌的分期无关($P > 0.05$)。 *H.pylori* 阳性胃癌患者 ERK1、ERK2 的表达阳性率均明显高于 *H.pylori* 阴性患者($P < 0.05$)。

结论:人胃癌组织中 ERK1、ERK2 的表达与 *H.pylori* 感染有关, *H.pylori* 感染可能通过 ERK 信号传导途径诱导胃上皮细胞的增生, 与胃癌发生有关。

褚传莲,李延青,张燕,李文婕,赵宛邨. 细胞外信号调节激酶在胃癌组织中的表达及其与幽门螺杆菌感染的关系. 世界华人消化杂志 2003;11(4):481-482
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/481.htm>

0 引言

分子生物学研究发现, 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)介导的细胞内信号传递是受体酪氨酸蛋白激酶信息传递的主要途径之一, 可将胞外刺激传导至细胞核内, 参与细胞生长、分化、增生的调节^[1]。细胞外信号调节激酶(extracellular-signal regulated proein kinase, ERK)是 MAPK 系统的重要成员。利用免疫组织化学方法染色检测胃癌组织中 ERK 的表达及其与 类致癌原幽门螺杆菌(*H.pylori*)感染的关系, 国内外尚无报道。本实验的目的是研究人胃癌组织中 ERK 的表达及其与 *H.pylori* 感染的关系, 探讨 ERK 信号传导通路在 *H.pylori* 相关性胃癌发生中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 随机选择山东大学齐鲁医院 2001 年行胃癌切

除术的患者为研究对象, 术前均经病理证实, 除外 4 wk 内服用过抗 *H.pylori* 药物及抗生素患者, 共 40 例患者入选, 其中男 24 例, 女 16 例, 年龄 36-81 岁, 平均(57.6 ± 4.5)岁, 按细胞分化程度, 高 - 中分化腺癌 10 例, 低分化腺癌 16 例, 黏液腺癌 11 例, 未分化癌 3 例。胃癌标本按 TNM 分期, 期 4 例, 期 7 例, 期 21 例, 期 8 例。所取标本均经 100 mL/L 甲醛固定、石蜡包埋、连续切片贴于涂有 APES 的玻璃片上备用。所检患者均同时抽取空腹静脉血 2 mL(1 0000 g/min 离心, 取上清, -20 保存备用)做 *H.pylori*-IgG 检测。兔抗人 ERK1、ERK2 抗体购自北京中山生物技术公司(为 Santa Cruz 公司产品), S-P 试剂盒购自福州迈新生物技术公司, DAB 显色试剂为北京中山生物工程公司生产, 抗 *H.pylori* -IgG 及快速尿素酶试剂为福建三强公司生产。

1.2 方法

1.2.1 ERK1、ERK2 的表达 采用免疫组化 S-P 法, 操作步骤按说明书进行。用 100 mL/L 正常山羊血清代替一抗作为阴性对照, 在光镜下观察。以细胞质或 / 和细胞核内出现棕黄色颗粒为阳性, 将细胞染色强度和阳性细胞百分数分为 4 级, 阳性细胞 $< 5\%$ 为 0 分, 5-30 % 为 1 分, 30-75 % 为 2 分, $> 75\%$ 为 3 分; 根据黄色的深浅将无显色评为 0 分, 淡黄色评为 1 分, 桔黄色评为 2 分, 棕黄色评为 3 分。将二者评分相加除以 2 作为该片的最终评分, 将 0 分定为阴性(-), 0.5-1 分定为弱阳性(+), 1.5-2.5 分定为强阳性(++)。

1.2.2 *H.pylori* 的检测 采用改良 Giemsa 染色, 快速尿素酶试验, 血清 *H.pylori* -IgG 检测(金标渗滤斑点法)。按中华医学会有关 *H.pylori* 若干问题的共识意见^[2], 以上任意两项阳性则确定为 *H.pylori* 感染, 其中仅一项阳性或均阴性为无 *H.pylori* 感染。

统计学处理 应用 SAS 软件包进行 χ^2 检验或 Fisher 精确检验。取 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 胃癌组织中 ERK1、ERK2 的表达 ERK1、ERK2 在胃癌组织中呈细胞质和 / 或细胞核着色, 主要为癌细胞阳性, 阳性细胞呈片状、小巢状排列。ERK1、ERK2 在胃癌组织中的表达阳性率分别为 82.5 % 和 77.5 %, 按细胞分化程度, ERK1 在高 - 中分化腺癌、低分化腺癌、黏液腺癌和未分化癌中表达阳性率分别为 80 %、87.7 %、72.72 % 和 66.66 %, ERK2 在高 - 中分化腺癌、低分化腺癌、黏液腺癌和未分化癌中表达阳性率分别为 77.78 %、81.25 %、72.72 % 和 100 %, 二者的表

达在胃癌的不同分化程度之间均无显著性差异($P > 0.05$). 按 TNM 分期, ERK1、ERK2 在 I 期、II 期、III 期和 IV 期胃癌中的表达阳性率之间无显著性差异($P > 0.05$).

2.2 H.pylori 感染对胃癌组织中 ERK1、ERK2 表达的影响 胃癌组织中 H.pylori 的感染率为 70%, 按 H.pylori 感染状态分组, H.pylori 阳性患者 ERK1、ERK2 的表达阳性率分别为 75% 和 64.29%, H.pylori 阴性患者 ERK1、ERK2 的表达阳性率为 50% 和 41.6%, 二者相比差异均有显著性($P < 0.05$).

3 讨论

近年研究发现, 肿瘤的发生、发展是细胞增生和细胞凋亡失平衡、细胞过度增生的结果. H.pylori 感染与人胃癌发生有关, 是胃癌发生的“启动子”之一^[3,4]. H.pylori 感染后胃上皮细胞的增生增加, 根除 H.pylori 可使胃上皮细胞增生数降至正常水平^[5,6], 但是 H.pylori 感染致细胞增生的机制尚不清楚. Ras/Raf/ERK 信号传导通路是细胞增生、分化的基本信号传导通路^[7]. ERK 包括两个高度同源的亚类 ERK1 和 ERK2, 其相对分子量分别为 44 kD、42 kD, 活化后可由细胞质转移至细胞核内, 磷酸化活化一系列转录因子(包括 ELK-1, SAP-1, c-myc, STAT 等)而起生物学作用. 体外研究发现^[8], H.pylori 提取物作用于胃癌细胞后可使 ERK 活性明显升高, 经血清饥饿后更明显, 而 H.pylori 对来自大鼠胚胎的胃正常细胞 ERK 的活性无影响. Meyer-ter-Vehn et al^[9] 也发现 H.pylori 可激活 ERK/MAPK 级联反应, 导致 Erk-1 的磷酸化, 并可增加原癌基因 c-fos 的转录. 突变的 H.pylori 菌株不诱导 MAPK 活性及 c-fos 和 c-jun 的激活. 最近 Mitsuno et al^[10] 还对不同 H.pylori 菌株与胃癌细胞共同培养发现, H.pylori 通过 ERK/MAPK 信号级联途径可激活胃上皮细胞内血清应答元素 (serum response element) 和转录因子激活蛋白 1 (AP-1) 的交叉激活. 本研究利用免疫组化研究人胃癌组织中 ERK 的表达与 H.pylori 感染的关系, 发现胃癌组织中 ERK1、ERK2 呈高表达, 并且发现阳性颗粒主要位于细胞质和细胞核内, 而正常的胃黏膜组织无表达, 提示 ERK 与胃癌有关. 按照 H.pylori 感染状态分组, H.pylori 阳性的胃癌患者 ERK 的表达明显高于非 H.pylori 感染者, 与此方面已有的研究结果一致, 说明胃癌组织中 H.pylori 感染与 ERK 的表达相关, H.pylori 感染可能通过 ERK 信号途径刺激胃

上皮细胞的增生, 可能与胃癌的发生有关.

H.pylori 接触胃上皮细胞后如何激活胃上皮细胞内 ERK 信号传导通路? 研究发现^[11] H.pylori 可能通过表皮生长因子受体激活小 GTP 结合蛋白而激活 Ras/Raf/ERK, 反过来又调节 ERK1、ERK2 的磷酸化, 并且 cagA 阳性 H.pylori 较 cagA 阴性 H.pylori 激活 ERK 活性的作用更大. 说明 H.pylori 的致病因素细胞毒素相关基因蛋白-CagA 可能在诱导 ERK 活性方面起作用. 已有研究显示 CagA 可经 I 型分泌系统进入宿主细胞, 但是他与 ERK/MAPK 级联反应的关系仍不清楚, 尚需今后进一步的研究.

4 参考文献

- 1 Sugiura R, Toda T, Dhut S, Shuntoh H, Kuno T. The MAPK kinase Pex acts as a phosphorylation-dependent molecular switch. *Nature* 1999;399:479-482
- 2 中华医学会消化病学分会. 幽门螺杆菌若干问题的共识意见. *中华消化杂志* 2000;20:117-118
- 3 Martin-de-Argila C, Boixeda D, Redondo C, Alvarez I, Gisbert JP, Garcia Plaza A, Canton R. Relation between histologic subtypes and location of gastric cancer and *Helicobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol* 1997;32:303-307
- 4 Forman D, Newell DG, Fullerton F, Yarnell JW, Stacey AR, Wald N, Sitas F. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *BMJ* 1991;302:1302-1305
- 5 Brenes F, Ruiz B, Correa P, Hunter F, Rhamakrishnan T, Fonham E, Shi TY. *Helicobacter pylori* causes hyperproliferation of the gastric epithelium: pre- and post-eradication indices of proliferating cell nuclear antigen. *Am J Gastroenterol* 1993; 88:1870-1875
- 6 Bechi P, Balzi M, Becciolini A, Maugeri A, Raggi CC, Amorosi A, Dei R. *Helicobacter pylori* and cell proliferation of the gastric mucosa: possible implications for gastric carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 1996;91:271-276
- 7 Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 1995; 9: 726-735
- 8 Chen YC, Zhang JZ, Li T, Sheng T, Zhu WY. The effect of *Helicobacter pylori* on the activity of extracellular signal regulated kinase in human and rat gastric epithelial cells. *J Beijing Med Univ* 2000;2:109-112
- 9 Meyer-ter-Vehn T, Covacci A, Kist M, Pahl HL. *Helicobacter pylori* activates mitogen-activated protein kinase cascades and induces expression of the proto-oncogenes c-fos and c-jun. *J Biol Chem* 2000;275:16064-16072
- 10 Mitsuno Y, Maeda S, Yoshida H, Hirata Y, Ogura K, Akanuma M, Kawabe T, Shiratori Y, Omata M. *Helicobacter pylori* activates the proto-oncogene c-fos through SRE transactivation. *Bio Chem Biophys Res Commun* 2002;291: 868-874
- 11 Keates S, Sougioultzis S, Keates AC, Zhao D, Peek RM Jr, Shaw LM, Kelly CP. Cag+ *Helicobacter pylori* induce transactivation of the epidermal growth factor receptor in AGS gastric epithelial cells. *J Biol Chem* 2001;276:48127-48134

实验性肝纤维化形成过程中几种基质金属蛋白酶表达的研究

李保森,游绍莉,赵志海,辛绍杰,赵景民,王松山

李保森,游绍莉,赵志海,辛绍杰,赵景民,王松山,中国人民解放军第302医院二科 北京市 100039
总后卫生部“九五”军队科研基金资助课题, No.1998M152
项目负责人:赵景民,100039,北京市丰台路26号,中国人民解放军第302医院二科. jmjzhao@hotmail.com
电话:010-66933422
收稿日期:2002-06-27 接受日期:2002-11-09

摘要

目的:研究基质金属蛋白酶及基质金属蛋白酶抑制因子在大鼠实验性肝纤维化形成过程中的作用及表达。

方法:应用免疫组织化学和核酸原位杂交法研究 MMP-1、MMP-2、TIMP-1 蛋白及其 mRNA 和 MT₁-MMP mRNA 在四氯化碳实验性大鼠肝纤维化形成过程中的表达变化。

结果:在肝脏间质细胞和部分肝细胞中表达。在纤维化形成过程中 MMP-1、MMP-2、TIMP-1 蛋白及其 mRNA 和 MT₁-MMP mRNA 的表达程度与肝纤维化程度密切相关。

结论:肝脏间质细胞是 MMP_s 及 TIMP_s 主要细胞来源,部分肝细胞也有表达。MMP_s 及 TIMP_s 在肝纤维化形成过程中共同发挥作用。

李保森,游绍莉,赵志海,辛绍杰,赵景民,王松山. 实验性肝纤维化形成过程中几种基质金属蛋白酶表达的研究. 世界华人消化杂志 2003;11(4):483-485
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/483.htm>

0 引言

目前,有关肝纤维化时基质代谢的研究不断深入,特别是基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)及其抑制因子(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)因参与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的降解,在肝纤维化发生中的作用受到较大重视^[1-18]。但他们种类繁多,在肝纤维化发生、发展中的动态变化及其相互关系尚缺乏完整及全面的认识,我们用免疫组织化学和核酸原位杂交(nucleic acid in situ hybridization, ISH)方法研究几种具有代表性的 MMP_s 及 TIMP_s 在四氯化碳实验性大鼠肝纤维化形成过程中的表达变化,以期初步探讨肝纤维化形成机制。

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar 大鼠 35 只,体重约 100 g,购自北京通利实验动物养殖场。

1.2 方法 (1)建立肝纤维化动物模型:大鼠随机分为 5 组,每组 5 只,其余 10 只为对照组。按照赵景民 et al^[19]报道的方法建立四氯化碳(CCL₄)毒性肝纤维化模型。四氯化碳,橄榄油购自北京中山生物有限公司。首次四氯

化碳浓度为 750 ml/L,此后为 500 ml/L,于大鼠皮下注射,2 次/wk,0.3 ml/100 g,单周饲普通饲料,双周饲玉米面。对照组大鼠饲普通饲料,不予药物注射。1-5 组分别于 2、4、6、8、10 wk 停止药物注射,次日断头处死大鼠,同时每次处死 2 只对照组大鼠,切取部分肝脏,迅速投入 100 ml/L 缓冲甲醛固定。(2)核酸原位杂交:实验肝组织石蜡切片以漂片法作核酸原位杂交。生物素标记 MMP-1、MMP-2 寡核苷酸探针,购自北京中山生物有限公司。MMP-1cDNA 序列:5' -AAA ACG AAG AGA ATT TTG ACT CTC CAG AAA GCT AAT AGC TGG-3' -Biotin, MMP-2cDNA 序列:5' -GGA GCA TGG CGA TGG ATA CCC CTT TGA CGG TAA GGA CGG ACT CCT-3' -Biotin。MT₁-MMP mRNA 探针序列参照 Okada et al^[20]的 cDNA 序列,序列为:5' -CCT GAT GAC GAT CGC CGT GGC ATC CAG CAA CTT TAT GGA AGC AAG-3' -Biotin,由赛百盛公司合成寡核苷酸探针。TIMP-1 探针序列参照 Carmichael et al^[21]的 cDNA 序列,序列为:5' -GAA CAG GGC CCT GAT CAC CAG GTC AGA GTT GCA GAA GGC AGT CTG TGG ATG-3' -Biotin,由赛百盛公司合成寡核苷酸探针。用碱性磷酸酶标记的链霉亲和素(Streptavidin,购自北京中山生物有限公司)作杂交后免疫组织化学染色,NBT/BCIP 显色,在细胞核或细胞质内出现蓝紫色杂交信号为阳性,未出现特异性染色为阴性。常规设置阴性对照。(3)免疫组织化学染色:实验肝组织石蜡切片经常规脱蜡至水洗,加过氧化物酶阻断液孵育 20 min,1 g/L 胰酶 37 消化 40-50 min。PBS 洗涤,小牛血清白蛋白封闭 20 min,加第一抗体工作液 4 过夜,加第二抗体工作液和第三抗体工作液各孵育 40 min 左右,然后加新鲜配制的 DAB,显微镜下观察 3-10 min,阳性信号为棕褐色染色。以 PBS 代替第一抗体作为阴性对照。第一抗体鼠抗人 MMP-1、MMP-2,与大鼠有交叉反应,购自 Dako 公司,工作浓度为 1:10;ABC 二抗工作浓度 1:400,ABC 三抗工作浓度 1:700。鼠抗人 TIMP-1 购自 Biovation 公司,与大鼠有交叉反应。鼠抗人 TIMP1 抗体工作浓度 1:5,ABC 二抗工作浓度 1:300,ABC 三抗工作浓度 1:400。第二抗体均为马抗鼠 IgG;第三抗体链霉亲和素辣根过氧化物酶(Streptavidin/HRP)均购自北京中山生物有限公司。(4)常规染色:常规 HE 染色,按 2000 年全国传染病学术会议修订标准,S 代表纤维化程度,以 0-4 分期。(5)原位杂交及免疫组化染色结果判定:常规按阴性(-)、弱阳性(+)、中度阳性(++)、强阳性(+++)纪录。

统计学处理 采用 Spearman 等级相关分析。

2 结果

2.1 肝脏纤维化程度 结果表明随着药物注射时间的延长,肝纤维化程度不断加重(表1).注射药物2、4 wk时肝脏脂肪变性明显,伴轻-中度肝纤维化,注射药物10 wk时,肝脏表现为典型肝硬化,有的大鼠出现腹水.

表1 实验性大鼠肝纤维化建立情况

分组	肝纤维化程度				
	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄
注射药物 2 wk 组	1	4	0	0	0
注射药物 4 wk 组	0	1	4	0	0
注射药物 6 wk 组	0	0	1	2	2
注射药物 8 wk 组	0	0	0	2	3
注射药物 10 wk 组	0	0	0	0	5
对照组	10	0	0	0	0

表2 MMP-1、MMP-2 在肝纤维化形成过程中的表达

分组	n	表达强弱							
		-		+		++		+++	
		MMP-1	MMP-2	MMP-1	MMP-2	MMP-1	MMP-2	MMP-1	MMP-2
对照	10	6	4	4	6	0	0	0	0
S ₀₋₁	6	0	0	5	6	1	0	0	0
S ₂₋₃	9	0	0	1	1	5	7	3	1
S ₄	10	0	0	1	1	3	3	6	6

MMP-1 与 MMP-1 mRNA, MMP-2 与 MMP-2 mRNA 结果一致.

表3 MT₁-MMP mRNA、TIMP-1 在肝纤维化形成过程中的表达

分组	n	表达强弱							
		-		+		++		+++	
		MT ₁ -MMP mRNA	TIMP-1						
对照	10	4	2	6	8	0	0	0	0
S ₀₋₁	6	0	0	5	4	1	2	0	0
S ₂₋₃	9	0	0	2	1	6	6	1	2
S ₄	10	0	0	1	0	2	2	7	8

TIMP-1 与 TIMP-1 mRNA 结果一致.

3 讨论

大量研究表明肝纤维化发生、发展过程中ECM处在不断代谢更新、降解重塑的动态平衡中, MMPs正是降解ECM的主要酶系, MMPs是以ECM为主要底物的一组金属依赖性蛋白酶的总称,目前人体已发现的MMP有17种. MMPs种类繁多,按照作用底物不同, MMP可分为3类: (1)间质胶原酶(interstitial collagenase)类; (2) 型胶原酶; (3)基质酶类; (4)膜型基质金属蛋白酶^[1-5,7-11,17,18,22,23].

MMP-1是间质胶原酶的代表酶,与肝纤维化的发生发展紧密相关^[18,24]. 本研究表明在肝纤维化形成过程中, MMP-1 mRNA及其蛋白的表达增强. MMP-1是除中性粒细胞胶原酶外,唯一特异性分解肝脏

2.2 在肝脏中的表达 正常肝组织中可见MMP-1及其mRNA、MMP-2及其mRNA、MT₁-MMP mRNA、TIMP-1及其mRNA的表达,但量较小,仅见于个别间质细胞和肝细胞. 肝纤维化形成过程中他们主要分布于小叶内、中央静脉周围及纤维间隔处,主要表达于星状、梭形间质细胞,部分肝细胞亦有表达.

2.3 MMP-1、MMP-1 mRNA、MMP-2、MMP-2 mRNA在肝纤维化形成过程中的表达(表2) MMP-1、MMP-1 mRNA、MMP-2、MMP-2 mRNA在肝纤维化形成过程中与正常对照组比较均显著表达(P < 0.01),随着肝纤维化程度增加表达均明显增强(P < 0.01).

2.4 MT₁-MMP mRNA、TIMP-1和TIMP-1 mRNA在肝纤维化形成过程中的表达(表3) MT₁-MMP mRNA、TIMP-1和TIMP-1 mRNA在肝纤维化形成过程中与正常对照组比较显著表达(P < 0.01),随着肝纤维化程度增加表达明显增强(P < 0.01).

型胶原的胶原酶,在肝纤维化时表达增强,从而降解胶原纤维,对抗肝纤维化发生,但总体是合成大于降解,ECM降解虽然加强,但结果“失代偿”.

MMP-2是 型胶原酶的代表,又称明胶酶A,主要分解 型胶原及明胶,也可分解 、 X型胶原. 关于MMP-2在肝纤维化发生、发展中的意义,目前尚有争议,但随着肝纤维化的发展, MMP-2 mRNA及其蛋白的表达增强基本形成共识^[2,3,7,10],这与我们的结果一致. 肝窦基底膜的毛细血管化是肝纤维化的病理生理基础,而窦周出现的 型胶原及FN、LN是基底膜的主要成分,因此特异性的MMP-2在肝纤维化发生发展中起重要意义. 肝纤维化早期,在致肝纤维化因

素作用下, MMP-2 可能起到降解破坏正常基底膜作用, 从而为“重塑”基底膜结构打下基础, 随着肝纤维化的发展, Ⅰ型胶原及 FN、LN 的大量沉积, 基底膜的毛细血管化的形成, 另一方面 MMP-2 通过反馈调节加强又起到降解沉积 Ⅰ型胶原, 维持细胞内环境平衡, 阻止肝纤维化的发展作用, 但总体是基质的合成大于降解, 肝纤维化形成。

MT₁-MMP 是基质金属蛋白酶基因家族中的一类新组群, 现发现有 6 个成员^[20], 目前报道与肝纤维化有关的主要是 MT₁-MMP. MT₁-MMP 结合 TIMP, 进而结合 MMP-2 的羧基端位点, 形成 MMP-2/TIMP-2/MT₁-MMP 复合物, 从而激活潜在型 MMP-2. 在该实验中, 肝纤维化形成过程中 MT₁-MMP mRNA 表达随肝纤维程度升高而增强与 MMP-2 表达趋势一致, 充分说明他在肝纤维化发生、发展过程中起重要作用。

TIMP 能抑制活性基质金属蛋白酶, 并结合非活性型 MMP-2、MMP-9 而抑制其活化, 因此间接对细胞外基质的合成及降解起调节作用^[2,5,7,10,11]. 我们实验表明, 在肝纤维化形成发展过程中 TIMP-1 表达随肝纤维程度升高而增强, 这与其他报道一致^[10]. 该结果提示在 CCL₄ 损害过程中, 随着肝纤维化的进展, TIMP-1 表达持续增强, 通过抑制胶原酶活性, 阻止过量胶原的降解, 从而促进肝纤维化的发生、发展, 这是肝纤维化形成的重要原因。

通过以上分析, 可见 MMP_s 及 TIMP_s 在肝纤维化发生、发展中共同发挥作用, 相互制约、相互协调, 使 ECM 处于不断合成与降解的代谢过程中, 当肝脏受慢性损害, 他们制约不平衡时则导致 ECM 合成增多, 肝纤维化形成。

关于 MMPs 及 TIMP_s 在肝脏中的细胞来源目前尚未完全阐明. 我们观察到在肝纤维化形成过程中主要表达于脂肪变性区域、“纤维细胞间隔”、纤维间隔周围的星状、梭形间质细胞, 推测为活化的肝星形细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 和肌纤维母细胞. 同时我们还发现纤维间隔周围的部分肝细胞也有 MMPs 及 TIMP_s 的表达, 而远离损伤区域和纤维间隔的肝细胞则几乎没有 MMPs 及 TIMP_s 的表达. 推测这些表达 MMPs 及 TIMP_s 的肝细胞是一部分“特化”的肝细胞, 这部分肝细胞表达 MMPs 及 TIMP_s 的原因可能是由于正常肝细胞中即存在编码的基因, 平时并不被翻译表达, 只有在肝组织受损, 受到周围环境中的某种“信号”的诱导后, 才表达以参与肝纤维化的形成. 由于肝细胞数目巨大, 因此进一步研究这部分“特化”肝细胞的机制有重要意义。

4 参考文献

- Selmi C, Zuin M, Meda F, Podda M, Biondi ML, Cecchini F. Common variants of the matrix metalloproteinase-3 (stromelysin) gene promoter in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 2002; 122:247-248
- Giannelli G, Bergamini C, Marinocci F, Fransvea E, Quaranta

- M, Lupo L, Schiraldi O, Antonaci S. Clinical role of MMP-2/TIMP-2 imbalance in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2002; 97:425-431
- Lichtinghagen R, Michels D, Haberkorn CI, Arndt B, Bahr M, Flemming P, Manns MP, Boeker KH. Matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-7, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are closely related to the fibroproliferative process in the liver during chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001;34:239-247
- 李文才, 张锦生, 黄光存, 朱虹光, 张秀荣, 张月娥. 肝素对大鼠肝星状细胞生长、细胞外基质和基质金属蛋白酶基因表达的影响. *中华肝脏病杂志* 2000;8:200-202
- Knittel T, Mehde M, Grundmann A, Saile B, Scharf JG, Ramadori G. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochem Cell Biol* 2000; 113:443-453
- Okazaki I, Watanabe T, Hozawa S, Arai M, Maruyama K. Molecular mechanism of the reversibility of hepatic fibrosis: with special reference to the role of matrix metalloproteinases. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(Suppl):D26-D32
- Lichtinghagen R, Huegel O, Seifert T, Haberkorn CI, Michels D, Flemming P, Bahr M, Boeker KH. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and their inhibitors in peripheral blood cells of patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2000; 46:183-192
- Hironaka K, Sakaida I, Matsumura Y, Kaino S, Miyamoto K, Okita K. Enhanced interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-13) production of Kupffer cell by gadolinium chloride prevents pig serum-induced rat liver fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 267:290-295
- Murawaki Y, Ikuta Y, Okamoto K, Koda M, Kawasaki H. Serum matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) concentration in patients with chronic liver disease. *J Hepatol* 1999;31:474-481
- Walsh KM, Timms P, Campbell S, MacSween RN, Morris AJ. Plasma levels of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitors of metalloproteinases -1 and -2 (TIMP-1 and TIMP-2) as noninvasive markers of liver disease in chronic hepatitis C: comparison using ROC analysis. *Dig Dis Sci* 1999;44:624-630
- 黄宇琦, 高毅, 杨继震, 方石岗, 王宇. 大鼠肝纤维化基质金属蛋白酶及其抑制因子的表达. *世界华人消化杂志* 1999;7:795-796
- 陈平圣, 翟为溶, 张月娥, 张锦生. 缺氧对肝星状细胞产生胶原及胶原降解酶的影响. *世界华人消化杂志* 2000;8:586-587
- 姚树坤, 殷飞. 肝纤维化的早期诊断. *世界华人消化杂志* 2000;8: 681-683
- 崔东来, 姚希贤. 肝纤维化的血清学检测. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 683-684
- 姜慧卿, 张晓岚. 肝纤维化的发生机制. *世界华人消化杂志* 2000;8: 687-689
- 白文元, 姚希贤, 冯丽英. 肝纤维化的研究现状. *世界华人消化杂志* 2000;8:1267-1268
- 蒋泽生, 高毅. 基质金属蛋白酶的生物学特性及其在肝癌浸润转移中的作用. *世界华人消化杂志* 2000;8:1403-1404
- 向德栋, 李奇芬, 王宇明, 王雅凡. 维生素 E 剂对肝脏星状细胞 Ⅰ型前胶原和 MMP1 mRNA 表达的影响. *世界华人消化杂志* 1999;7:1085
- 赵景民, 张月娥, 王新禾, 翟为溶, 朱腾方, 凌玉琴, 应越英. Ito 细胞在大鼠实验性肝硬化中的动态研究. *中华病理学杂志* 1991;20:91-94
- Okada A, Bellocq JP, Rouyer N, Chenard MP, Rio MC, Chambon P, Basset P. Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:2730-2734
- Carmichael DF, Sommer A, Thompson RC, Anderson DC, Smith CG, Welgus HG, Stricklin GP. Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83: 2407-2411
- 洪照友, 俞金龙, 张云生, 高毅. 基质金属蛋白酶 -9, CD34 的表达与肝癌侵袭转移的关系. *世界华人消化杂志* 2001;9:170-174
- Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinase: structures, evolution and Diversification. *FASEB J* 1998;12:1075-1095
- Murawaki Y, Ikuta Y, Idobe Y, Kawasaki H. Serum matrix metalloproteinase-1 in patients with chronic viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:138-145

鼠肝移植对胃黏膜损伤的实验研究

褚延魁,马庆久,鲁建国,刘 维,何显力,杜锡林,乔 庆,王胜智

褚延魁,马庆久,鲁建国,何显力,杜锡林,乔庆,王胜智,中国人民解放军第四军医大学唐都医院普通外科 陕西省西安市 710038
刘维,中国人民解放军第四军医大学西京医院供应室 陕西省西安市 710032
项目负责人:褚延魁,710038,陕西省西安市,中国人民解放军第四军医大学唐都医院普通外科. tdsurg@fmmu.edu.cn
电话:029-3377732
收稿日期:2002-10-29 接受日期:2002-11-14

摘要

目的:观察肝移植术后胃黏膜的病理变化。

方法:采用二袖套法+肝动脉重建吻合合法行鼠肝移植,经组织病理和电镜切片观察肝移植后胃黏膜的组织结构和细胞结构的变化。

结果:肝移植后胃黏膜组织结构表现为充血、水肿、溃疡、糜烂形成。

结论:肝移植伴随胃黏膜的损伤,需要预防治疗。

褚延魁,马庆久,鲁建国,刘维,何显力,杜锡林,乔庆,王胜智. 鼠肝移植对胃黏膜损伤的实验研究. 世界华人消化杂志 2003;11(4):486-487
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/486.htm>

0 引言

理论上讲,一切肝病用常规的内外科所有方法不能治愈,而预计在短期内无法避免死亡者,均可作肝移植。目前,肝移植已成为公认的治疗肝病的有效手段,且取得了满意的结果,但肝移植需阻断肝门血流,造成胃肠道淤血,势必对胃黏膜造成损伤,国内尚未见关于此方面的报道^[1-7],我们在成功地对大鼠进行肝移植手术的基础上,观察胃黏膜的组织病理及电镜变化,为预防肝移植后的上消化道出血,提高患者的生存质量提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 SD 大鼠 70 只(第四军医大学动物中心提供),体质量(280 ± 60 g),受体体质量等于或略重于供体,随机分组。受体术前禁食 4 h,不禁水清洁手术。
1.2 方法 肝移植手术方法采用二袖套法+肝动脉重建

吻合法,手术过程分为(1)供肝切取;(2)受体肝切除;(3)肝移植等三部分,其中肝上下腔静脉,门静脉采用袖套法吻合,肝下腔静脉及肝动脉吻合采用缝合法,血管缝合借助手术显微镜操作。于肝移植后 1 h、24 h、72 h 分别心脏穿刺取血装入加有抑肽酶 1 000 u, 100 g/L EDTA-Na₂ Leoul 的离心管中,4℃, 3 000 rpm, 15 min, 留取血样分装,置于 -70℃ 超低温冰箱保存,待测肝功能,留取部分胃黏膜组织,常规石蜡切片,HE 染色,镜下行病理学观察。留取部分胃黏膜组织,切成 2 × 3 mm 长条形,戊二醛固定,电镜检查,血中谷丙转氨酶,谷草转氨酶由本院检验科协助检查。

统计学处理 实验结果均表示为 $\bar{x} \pm s$ 采用团体 t 检验, P < 0.05 为显著水平。

2 结果

2.1 本组肝移植实验动物肝缺血无肝期平均为 15.6 ± 3.2 min, 术后动物苏醒, 肝脏恢复血供, 并有胆汁流出, 移植成功。

2.2 肝移植对转氨酶的影响 见表 1。

2.3 光镜观察结果 光镜下胃黏膜组织结构变化主要为充血、水肿, 部分大鼠胃黏膜形成溃疡、糜烂, 但病变局限于黏膜浅层, 呈灶性分布, 部分大鼠可见黏膜上皮脱落。炎细胞浸润程度不等, 可见嗜酸性粒细胞及中性粒细胞浸润。

2.4 透射电镜观察结果 透射电镜下可见细胞水肿, 线粒体肿胀, 线粒体嵴模糊不清, 大量的滑面内质网扩张, 核膜不清, 染色质浓集, 可见浆细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、中性细胞浸润, 部分大鼠可见壁细胞染色质变淡, 核出现溶解, 细胞器空化, 核膜不清, 以上变化水肿以移植后 1 h 为主, 坏死性变化以术后 24 h 为主, 72 h 组和治疗组鼠胃黏膜病变程度均有减轻。

3 讨论

以手术方法植入一个或部分健康的肝脏, 从而获得肝功能的正常恢复, 称为肝移植。肝移植起始于 1950

表 1 实验动物肝功能检测结果(n = 10)

	对照	肝移植			肝移植 + 法莫替丁 OLT+Famotidine		
		1 h	24 h	72 h	1 h	24 h	72 h
ALT	63 ± 13	189 ± 36 ^a	453 ± 67 ^a	387 ± 45 ^a	177 ± 28 ^a	426 ± 53 ^a	356 ± 41 ^a
AST	85 ± 26	241 ± 55 ^b	632 ± 108 ^b	412 ± 54 ^b	228 ± 40 ^b	397 ± 57 ^b	341 ± 39 ^b

^aP < 0.01, ^bP < 0.01 vs 对照。

年,迄今已50 a.目前,肝移植作为一种治疗终末期肝病的临床手段在全世界广泛应用.已有上百家肝移植中心分布在全球,肝移植的总例数已超过3万例.肝移植的效果也有了明显的改进,最长存活者已超过25 a,大多数存活5 a以上的患者都过着正常生活.

肝移植治疗肝脏疾病取得了满意的效果,但肝移植必然要阻断门静脉血流,造成胃肠道淤血,势必对胃黏膜造成损伤,特别是近年来肝移植用于治疗门脉高压症^[8-13],许多作者发现肝移植术无论从降低门脉压力、预防术后再出血,提高存活率等各方面都优于常规的断流及分流手术,得到广泛应用^[14-18].而门脉高压常伴有不同程度的门脉高压性胃炎,阻断门静脉造成的胃肠道淤血势必加重对胃黏膜的损伤,需要作进一步的研究.

本实验结果表明:肝移植后,胃黏膜组织出现充血、水肿、部分大鼠胃黏膜有溃疡形成,与对照组比较表明肝移植缺血再灌注对胃黏膜造成损伤,胃黏膜病变以炎症性变为主,尽管病变局限在黏膜浅层,但仍可形成黏膜的出血,部分胃黏膜形成溃疡,是造成术后患者上消化道出血的主要原因.肝移植肝缺血再灌注造成胃黏膜损伤的原因,作者认为与阻断门脉及肝动脉造成胃肠道淤血,局部缺氧,引起氧自由基及肿瘤坏死因子,白介素类物质增多,造成对胃黏膜的损害有关.透射电镜下见细胞内线粒体肿胀、嵴模糊不清,大量滑面内质网扩张,核膜不清,染色质浓集,并有炎性细胞浸润,同样支持胃黏膜在移植后出现损伤的结论.

实验结果表明,水肿性改变以术后1 h为主,而24 h主要表现为坏死性变化,72 h和法莫替丁治疗组,胃黏膜病变程度均有减轻,提示我们对移植后的胃黏膜损伤的预防及治疗应在术前进行,并应持续治疗3 d以上,法莫替丁治疗,由于抑制了胃液的分泌,减少了胃黏膜的损伤因素,减轻了对胃黏膜的损伤.起到了胃黏膜的保护作用.

总之,通过对正常鼠肝移植后胃黏膜病理改变的观察,我们发现肝移植伴随远隔器官-胃黏膜的损伤,需要我们在临床工作中加以预防治疗.

4 参考文献

- 付福民.大鼠原位肝移植方法探讨及免疫反应的观察.中华器官移植杂志 1987;8:50-51
- 曾琪华,孙君泓,吴孟超.三袖套法大鼠原位肝移植.中华器官移植杂志 1989;10:159-161
- Putnam CW,Porter KA,Weil R 3rd,Reid HA,Starzl TE. Liver transplantation for Budd chiari syndrome. *JAMA* 1976;236:1142-1146
- Glenn H. Liver transplantation for the Budd chiari syndrome. *Ann Surg* 1990;211:43-46
- Knoop M, Lemmens HP, Bechstein WO, Blumhardt G, Schattenfroh N, Keck H, Neuhaus P. Treatment of Budd chiari syndrome with ortho topic liver transplantation and long-term anti loagulation. *Clic Transplant* 1994;8:67-72
- 陈大志,刘爱武,陈嘉薇.原位肝移植后门脉高压和脾功能亢进的恢复过程.中华器官移植杂志 1998;10:240-242
- 夏穗生.我国肝移植现状.世界华人消化杂志 1999;7:645-646
- Kasahara M, Ohwada S,Takeichi T,Kaneko H,Tomomasa T, Morikawa A,Yonemura K,Asonuma K,Tanaka K,Kobayashi K, Saheki T,Takeyoshi I,Morishita Y.Living related liver transplantation for type II citrullinemia using a graft from heterozygote donor. *Transplantation* 2001;71:157-159
- Kim YS,Moon JI,Jeong HJ,Kim MS,Kim SI, Choi KH, Lee HY, Han DS, Park K.Live donor renal allograft in end-stage renal failure patients from immunoglobulin A nephropathy. *Transplantation* 2001; 71:233-238
- Sugawara Y, Makuuchi M,Takayama T,Imamura H,Dowaki S, Mizuta K,Kawarasaki H, Hashizume K.Small-for-size grafts in living-related liver transplantation. *J Am Coll Surg* 2001;192:510-513
- Colle I, Van Vlierberghe H, Troisi R, De Hemptinne B,De Vos M.Living related adult-to-adult liver transplantation: which patient should benefit from this technique? *Acta Gastroenterol Beelg* 2001;64:6-8
- Hui AM,Makuuchi M,Takayama T,Sano K,Kubota K,Harihara Y,Matsunami H.Left hemihepatectomy in living donors with a thick middle hepatic vein draining the caudal half of the right liver. *Transplantation* 2000;69:1499-1501
- Kiuchi T, Kasahara M, Uryuhara K, Inomata Y,Uemoto S, Asonuma K,Egawa H,Fujita S,Hayashi M,Tanaka K. Impact of graft size mismatching on graft prognosis in liver transplantation from living donors. *Transplantation* 1999;67:321-327
- 次秀丽,王宝恩,张淑文,张宁宁. Ips+tnf 致休克大鼠胃肠运动及屏障功能的改变.世界华人消化杂志 1999;7:510-512
- Kamada N,Calne RY.Orthotopic liver transplantation in the rat. technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage. *Transplantation* 1979;28:47-50
- Guan WX,Dou KF,Li KZ, Gao ZQ,Fu YC. Long term survivor of living related liver transplantation. *Zhongguo Putong Waiké Zazhi* 2000;9:64-67
- 朱金照,杨国汉,冷恩仁,陈东风.中药的促胃肠动力作用.世界华人消化杂志 1999;7:689-690
- 严家春,陈文笔,马勇,孙新华.试论肝硬变的组织病理学分期.世界华人消化杂志 1999;7:841-844

重叠丙型肝炎病毒感染在慢性乙型肝炎患者肝脏病变中的作用

商庆华,于建国,徐传镇,肖德明,尹燕明,陈崇兴,张光曙

商庆华,于建国,徐传镇,陈崇兴,张光曙,中国人民解放军第88医院济南军区肝病研究所 山东省泰安市 271000
肖德明,山东省泰安市中心医院感染病科 山东省泰安市 271000
尹燕明,泰山医学院附属医院感染病科 山东省泰安市 271000
项目负责人:商庆华,271000,山东省泰安市,中国人民解放军第88医院济南军区肝病研究所. shangqh@163.com
电话:0538-6213002 传真:0538-6215563
收稿日期:2002-08-04 接受日期:2002-12-03

摘要

目的:观察重叠丙型肝炎病毒(HCV)感染对慢性乙型肝炎(CHB)患者肝脏病变的近期及远期影响。

方法:选择6 mo-15 a前后行两次肝脏穿刺活体组织学检查的CHB患者230例两次同期血清标本应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术进行了HCV-RNA检测,并将血清HCV-RNA阳性与阴性患者近期肝脏病变及血清HCV-RNA持续阳性患者(随访时间 4.12 ± 1.46 a)与随访时间具有可比性的持续阴性患者远期肝脏病变分别进行了回顾性对比分析。

结果:血清HCV-RNA阳性41例(17.83%)。血清HCV-RNA阳性患者近期肝组织炎症活动度(G1、G2、G3、G4例数分布分别为5、8、16、12)与纤维化程度(S0、S1、S2、S3、S4分布分别为1、3、8、19、10)与阴性患者(G1、G2、G3、G4例数分布分别为37、60、57、35;S0、S1、S2、S3、S4分布分别为8、20、63、69、29)差异具有显著性意义($P < 0.05$)。随访结束时血清HCV-RNA持续阳性患者29例。HCV-RNA持续阳性患者与116例持续阴性患者远期肝组织炎症活动度(加重、无变化、好转例数分布分别为12、10、7;24、24、68)与纤维化程度(加重、无变化、好转例数分布分别为15、8、6;27、26、63)差异亦具有显著性意义($P < 0.05$)。

结论:重叠HCV感染加重CHB患者肝脏病变,并加速其进展。

商庆华,于建国,徐传镇,肖德明,尹燕明,陈崇兴,张光曙. 重叠丙型肝炎病毒感染在慢性乙型肝炎患者肝脏病变中的作用. 世界华人消化杂志 2003;11(4):488-490
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/488.htm>

0 引言

传播途径的相似,使慢性乙型肝炎(CHB)患者重叠丙型肝炎病毒(HCV)感染较为常见。重叠HCV感染在CHB患者肝脏损害中的意义,目前的报道大多为根据临床表现、血清肝功能生化试验指标间接推断,缺乏病理学、尤其是远期病理学观察;而我们的临床与病理学相关研究表明,根据临床表现、血清肝功能生化试验指标判断CHB患者的肝脏损害情况存在较大误差,肝脏穿

刺活体组织学检查才是判断其肝脏损害的金标准^[1]。我们多年来根据自愿原则已开展两次以上肝穿刺活检患者300例^[1]。选择其中于6 mo-15 a前后行2次肝穿刺活检的CHB患者230例两次同期血清标本进行了HCV-RNA检测,并将肝脏病理学变化与HCV感染的关系进行了回顾性对比分析,观察重叠HCV感染在CHB患者肝脏病变中的意义,以期完善对此问题的认识。

1 材料和方法

1.1 材料 230例CHB患者均为多年来收治的住院患者,男158例,女72例,平均年龄34.8岁;所有患者血清HBsAg阳性6月以上,且经病理学证实,诊断分型依照2000-09(西安)第十次全国病毒性肝炎与肝病学术会议修订的病毒性肝炎防治方案^[2],并排除甲、丁、戊、庚型肝炎病毒、输血传播病毒(TTV)、巨细胞病毒(CMV)、EB病毒(EBV)现症感染及酒精性、药物性、自身免疫性等肝病。

1.2 方法

1.2.1 血清乙、丙型肝炎病毒标志物检测 以酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法检测HBVM(HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、抗-HBc、抗-HBc-IgM)。HBV-DNA、HCV-RNA(部分病例为血清库中保存血清)检测采用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)、逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-PCR, RT-PCR)法。试剂盒为北京医科大学肝病研究所产品,操作步骤严格按照说明书进行。

1.2.2 肝脏穿刺活体组织学检查 所有患者于6 mo-15 a前后以Menghini快速穿刺法行两次肝穿刺活检,肝组织以10%甲醛固定,制成4 μm切片,HE、网状纤维染色,依照上述防治方案做肝组织炎症活动度与纤维化程度观察,并做两次病变对比(加重、无明显变化、好转)。每次肝穿刺活检同时采血5 ml,置血清库中保存。

1.2.3 治疗方法 所有患者均予维生素类药物及由我所研制、泰安泰来药业有限公司生产的免疫调节剂泰来肽(抗乙肝胎盘肽,国药准字1999 S-01号)^[3-5],部分患者联用核苷类药物拉米夫定。

统计学处理 肝脏炎症活动度与纤维化程度结果比较采用Ridit分析进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 血清HCV-RNA阳性与阴性CHB患者近期肝脏病理学比较 230例CHB患者共检出血清HCV-RNA阳性

41例。无论血清HCV-RNA阳性还是阴性CHB患者肝脏病变均可见小叶内肝细胞的变性、点、灶状坏死、汇管区淋巴细胞、单核细胞的浸润,但血清HCV-RNA阳性病例肝细胞脂肪变性、汇管区淋巴滤泡形成、胆管损伤等更为多见;同时近期肝组织炎症活动度及纤维化程度明显加重($P < 0.05$)。见表1。

表1 血清HCV-RNA阳性与阴性CHB患者近期肝脏炎症活动度及纤维化程度比较

分组	n	炎症活动度 ^a				纤维化程度 ^a				
		G1	G2	G3	G4	S0	S1	S2	S3	S4
HCV-RNA(+)组	41	5	8	16	12	1	3	8	19	10
HCV-RNA(-)组	189	37	60	57	35	8	20	63	69	29

^a $P < 0.05$ vs HCV-RNA(-)组。

2.2 血清HCV-RNA阳性与阴性CHB患者远期肝脏病理学比较 6 mo-15 a后血清HCV-RNA持续阳性患者29例(随访时间 4.12 ± 1.46 a)。为比较重叠HCV感染对CHB患者肝脏病变的远期影响,选择随访时间等方面具有可比性的血清HCV-RNA持续阴性CHB患者116例(1:4配对)作远期肝脏病理学变化比较。结果发现两组患者均有部分病例加重、进展为早期肝硬化、肝硬化。但血清HCV-RNA持续阳性CHB患者较持续阴性患者远期肝脏病理学加重更为明显($P < 0.05$)。结果见表2。

表2 血清HCV-RNA持续阳性与持续阴性CHB患者远期肝脏炎症活动度及纤维化程度变化比较

分组	n	炎症活动度 ^b			纤维化程度 ^b		
		加重	无变化	好转	加重	无变化	好转
HCV-RNA持续(+)组	29	12	10	7	15	8	6
HCV-RNA持续(-)组	116	24	24	68	27	26	63

^b $P < 0.05$ vs HCV-RNA持续(-)组。

3 讨论

HBV、HCV感染呈世界性分布^[6-8]。目前全球约有3.5亿慢性HBV携带者(占世界人口5%),亚洲和非洲人群中HBV携带率为8-15%,我国为9.75%。HBV携带者中50-70%存在病毒活跃复制,为CHB;同时全球约有1.7亿人感染HCV,抗-HCV流行率西欧为0.6-7.5%、东欧1-5%、美国1.8%、赤道非洲6.5%、埃及20%、日本0.2-3.9%、我国0.8-3.2%,为HBV携带者人数的二分之一^[9-11];且二者具有相似的传播途径,同时已有研究表明HBV感染增加肝组织对HCV的亲合力,且HBV感染封闭了机体的免疫功能,使HCV易感性增加^[12],故CHB重叠HCV感染的现象较为常见。因此研究重叠HCV感染的CHB患者的临床与病理学特点,对阐明HBV、HCV双重感染的相互作用及其防治具有重要意义。

在慢性HBV感染者中,HCV感染的状况,报道不一,有报道10-15%、18-20%,甚至有报道达

30%以上^[13-15]。这与世界各地的卫生状况、血液及血制品管理、经济条件等因素有关。本研究对230例CHB患者血清标本进行了HCV-RNA检测,结果发现HCV-RNA阳性41例,感染率达17.85%,进一步表明CHB患者HCV感染的现象的确常见。

CHB患者重叠其他肝炎病毒感染,始终是国内外学者们关注的重要课题。如重叠HAV感染加重CHB肝组织炎症活动度,但并不影响纤维化程度^[16];但重叠HGV感染对CHB肝组织炎症活动度及纤维化程度却无明显影响^[17,18];重叠TTV感染对CHB病程及预后均无影响^[19,20];重叠HDV感染常使病变迅速进展为肝硬化和肝衰竭、肝癌^[21-23]。重叠HCV感染对CHB患者肝脏损害的影响,研究亦较多,但大多根据临床表现、血清肝功能生化试验指标间接推断,缺乏病理学、尤其是远期病理学观察;且意见不一,一种意见说既无病情加重,亦无组织学改变的减轻,并未加速进展导致肝硬化^[12,24,25],但大多数学者则认为,二者感染导致病情加重,临床上以纳差、黄疸、腹水及低蛋白血症发生率高,并以慢性活动性肝炎及失代偿期肝硬化最多见,或表现重型肝炎^[12,13,26-34]。本研究运用两次肝穿刺活检技术对230例CHB患者中重叠与未重叠HCV感染者近期与0.5-15 a后肝脏病变分别进行了对比观察,结果发现血清HCV-RNA阳性病例无论近期还是远期肝组织炎症活动度及纤维化程度均较阴性病例明显加重($P < 0.05$)。从而表明重叠HCV感染并不像重叠HAV、HGV感染那样,而是加重CHB肝组织炎症活动度及纤维化程度,并加速其进展。

HBV感染的自然史研究表明,CHB预后不良,部分病例最终演变为肝硬化、肝癌或重型肝炎死亡^[35-40],因此筛选出影响CHB预后的因素,对CHB患者的防治具有重要意义;而本研究结果提示重叠HCV感染即是CHB预后不良的重要影响因素之一。因此,对CHB患者尽可能避免血液及血制品输入,同时如出现下列征象应警惕HCV感染^[12]:病情好转后,突然出现黄疸;ALT持续不降或反复升高;低白蛋白血症且进行性加重;慢性肝炎出现亚急性重症表现;肝硬化出现多种并发症;e抗原转化为e抗体后仍有肝脏炎症表现,在排除e抗原阴性的变异型HBV或HDV感染后,则常常存在HCV感染。干扰素是目前国际公认的有效抗肝炎病毒药物^[41,42],但已有研究表明,HBV、HCV双重感染者抗病毒药物 α 干扰素疗效差^[43,44],同时重叠HCV感染亦影响CHB免疫调节剂疗效^[45];但最近意大利学者^[13]对重叠HCV感染的CHB患者应用大剂量 α 干扰素6-9 MU,3次/wk \times 6 mo,我们^[45]应用大剂量免疫调节剂泰来肽均证明效果较好,因此可予应用。

4 参考文献

- 1 甘天福,张光曙,丁明权,杜庆苓,林国贤,赵汇川,于建国. 3 600例肝穿活检病理与临床分析. 前卫医药杂志 1996;13:212-214
- 2 中华医学会传染病与寄生虫病学分会肝病学分会联合修订. 病毒

- 性肝炎防治方案. 中华传染病杂志 2001;19:56-62
- 3 张光曙. 胎盘转移因子的研究与应用. 第1版.北京:中国科学技术出版社, 1992:17-338
 - 4 张光曙,孙思财,韩纪举,赵汇川,郭庆福. 抗乙型肝炎转移因子的特异免疫活性观察. 解放军医学杂志 1994;19:447-449
 - 5 商庆华,于建国,徐传镇,韩纪举,张光曙. HGV感染在慢性乙型肝炎患者抗乙型肝炎治疗中的远期疗效及预后中的意义. 临床军医杂志 2000;28:442-444
 - 6 Befeler AS, Di-Bisceglie AM. Hepatitis B. *Infect Dis Clin North Am* 2000;14:617-632
 - 7 Evens AA, London WT. Epidemiology of hepatitis B. In: Zuckerman AJ, Thomas HC. Virus Hepatitis. 2nd eds. London: Churchill Livingstone 1998:107-114
 - 8 Cheney CP, Chopra S, Graham C. Hepatitis C. *Infect Dis Clin North Am* 2000;14:633-667
 - 9 庄辉. 病毒性肝炎的流行病学及预防. 中国医学论坛报世界胃肠病学大会特刊 2002;28:28
 - 10 刘耕陶,斯崇文,王勤环,陈立华,陈鸿珊,徐道振,张玲霞,王宝恩,王灵台,李燕. 对我国慢性病毒性肝炎防治与研究工作的建议. 中华医学杂志 2002;82:74-76
 - 11 成军. 慢性丙型肝炎肝脏脂肪变的机制及其意义. 世界华人消化杂志 2002;10:999-1003
 - 12 姚鹏,陈乃玲,贾克明. 丙型肝炎病毒与其他病毒的联合感染. 国外医学流行病学传染病学分册 1998;25:62-64
 - 13 Villa E, Grottola A, Buttafoco P, Colantoni A, Bagni A, Ferretti I, Cremonini C, Bertani H, Manenti F. High doses of α -interferon are required in chronic hepatitis due to coinfection with hepatitis B virus and hepatitis C virus: long-term results of a prospective randomized trial. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2973-2977
 - 14 Zarski JP, Bohn B, Bastie A, Pawlowsky JM, Baud M, Bost-Bezeaux F, Tran van Nhieu J, Seigneurin JM, Buffet C, Dhumeaux D. Characteristics of patients with dual infection by hepatitis B and C viruses. *J Hepatol* 1998;28:27-33
 - 15 Berger A, Doerr HW, Rabenau HF, Weber B. High frequency of HCV infection in individual with isolated antibody to hepatitis B core antigen. *Intervirology* 2000;43:71-76
 - 16 商庆华,于建国,张学平,安永,徐传镇,陈崇兴,张光曙. 重叠甲型肝炎病毒感染对慢性乙型肝炎影响的对比研究. 解放军医学杂志 2002;27:504-506
 - 17 商庆华,于建国,张光曙,徐传镇,陈崇兴. 庚型肝炎病毒感染对慢性乙型肝炎患者肝脏病变作用的动态观察. 中华医学杂志 2001;81:1365-1368
 - 18 商庆华,于建国,王磊,张光曙,陈崇兴,景敏. HGV-RNA阳性与阴性慢性乙型肝炎患者的对比研究. 胃肠病学和肝病杂志 2000;9:48-53
 - 19 刘玉兰,朱元民,陈红松,王宇. TT病毒在肝病患者的感染状况及致病性. 世界华人消化杂志 2002;10:1143-1148
 - 20 赵岩,王江滨. 长春地区TTV感染与其他病毒性肝病关系的流行病学调查. 世界华人消化杂志 2001;9:747-750
 - 21 Conjeevaram HS, Di Bisceglie AM. Natural history. In: Zuckerman AJ, Thomas HC. Viral Hepatitis. 2nd eds, London: Churchill Livingstone 1998:379-385
 - 22 Fattovich G, Giustina G, Christensen E, Pantalena M, Zagni I, Realdi G, Schalm SW. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. *Gut* 2000;46:420-426
 - 23 Zar T, Sharar Z, Mughal M, McClintock C. Severe hepatitis due to HBV-HDV coinfection. *Conn Med* 2001;65:649-652
 - 24 Kazemi-Shirazi L, Petermann D, Muller C. Hepatitis B virus DNA in sera and liver tissue of HBsAg negative patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2000;33:785-790
 - 25 Amarapurkar D. Natural history of hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(Suppl E):105-110
 - 26 Jain A, Kar P, Madan K, Das UP, Budhiraja S, Gopalkrishna V, Sharma JK, Das BC. Hepatitis C virus infection in sporadic fulminant viral hepatitis in north India: cause or co-factor? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:1231-1237
 - 27 Sagnelli E, Coppola N, Scolastico C, Filippini P, Santantonio T, Stroffolini T, Piccinino F. Virologic and clinical expressions of reciprocal inhibitory effect of hepatitis B, C and delta viruses in patients with chronic hepatitis. *Hepatology* 2000;32:1106-1110
 - 28 李进秋,司佩任,杨令国,刘本玉,闵建荣,孙振华,程淑梅. HBV感染者HCV的重叠感染关系研究. 新消化病学杂志 1996;4:15-17
 - 29 任仲轩,裴王秀,王麟士,刘金星. 慢性乙型肝炎重叠感染后血清病毒标志物的变化. 新消化病学杂志 1996;4:379-380
 - 30 杨冬明. 特殊人群血清抗-HCV检测及甲、乙、丙型肝炎重叠感染分析. 新消化病学杂志 1995;3:84-86
 - 31 向德栋,李奇芬,魏永利,王宇明. 57例HDV/HBV合并感染者的随访观察. 世界华人消化杂志 2000;8:235-236
 - 32 朱斌,周汉高,张惠泉. 慢性乙型肝炎重叠HCV,HDV感染80例分析. 世界华人消化杂志 1999;7:1102-1103
 - 33 柯伟民,黄仰甦,李建国,姚集鲁. 慢性乙型肝炎发生致死性肝衰竭的病因研究. 世界华人消化杂志 2001;9:453-454
 - 34 吴君,程明亮,丁一生,刘仁才,李佳,王万灵,胡蓬. 病毒性肝炎肝硬化危险因素5a追踪调查. 世界华人消化杂志 2000;8:1365-1367
 - 35 Hsu YS, Chien RN, Yeh CT, Sheen IS, Chiou HY, Chu CM, Liaw YF. Long-term outcome after spontaneous HBeAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2002;35:1522-1527
 - 36 Steinmuller T, Seehofer D, Rayes N, Muller AR, Settmacher U, Jonas S, Neuhaus R, Berg T, Hopf U, Neuhaus P. Increasing applicability of liver transplantation for patients with hepatitis B-related liver disease. *Hepatology* 2002;35:1528-1535
 - 37 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
 - 38 于建国,薛佩莲,吕敏和. 病毒性肝炎及肝病学基础与临床研究的新进展. 世界华人消化杂志 2002;10:712-716
 - 39 李莉,成军,李梵,王建军,张健,吴勤,韩萍,陈国凤,纪冬,李克. 慢性丙型肝炎肝脏脂肪变的临床与病理学特点. 世界华人消化杂志 2002;10:1009-1013
 - 40 施红,王福生. 影响HBV感染慢性化的宿主因素及其在乙型肝炎防治中的意义. 世界华人消化杂志 2001;9:66-69
 - 41 游晶,庄林,唐宝璋,杨惠,杨微波,李武,张宏丽,张艳梅,张禄,严绍明. 干扰素联合胸腺肽治疗慢性乙型肝炎. 世界华人消化杂志 2001;9:388-391
 - 42 徐克成. 肝病治疗的若干最新进展. 世界华人消化杂志 2000;8:190-195
 - 43 Fukuda R, Ishimura N, Hamamoto S, Moritani M, Uchida Y, Ishihara S, Akagi S, Watanabe M, Kinoshita Y. Co-infection by serologically-silent hepatitis B virus may contribute to poor interferon response in patients with chronic hepatitis C by down-regulation of type-1 interferon receptor gene expression in the liver. *J Med Virol* 2001;63:220-227
 - 44 De Maria N, Colantoni A, Fnedlander L, Leandro G, Idilman R, Harig J, Van Thiel DH. The impact of previous HBV infection on the course of chronic hepatitis c. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3529-3536
 - 45 商庆华,于建国,肖德明,张学平,安永,徐传镇,张光曙. 重叠丙型肝炎病毒感染对慢性乙型肝炎患者免疫调节剂泰来肽治疗的影响与对策. 临床军医杂志 2002;30:285-288

正常人胃左静脉的声象图及血流动力学特征

夏建国,董胜翔,李凤华

夏建国,李凤华,上海第二医科大学附属仁济医院超声科 上海市 200127
董胜翔,上海第二医科大学附属仁济医院急诊科 上海市 200127
项目负责人:夏建国,200127,上海市东方路1630号,上海第二医科大学附属仁济医院超声科. xiahu@citiz.net
电话:021-58752345 转 3211
收稿日期:2002-10-22 接受日期:2002-12-12

摘要

目的:研究胃左静脉(LGV)的超声解剖及其血流动力学特征.

方法:测定正常组胃左静脉内径,观察其走向及汇合点,确定血流方向和流速,并以门脉高压者作为对照组,观察胃左静脉与门脉的汇合点.

结果:71.5%的胃左静脉得到确认,96.5%的胃左静脉汇合于脾静脉或脾门静脉交界处.

结论:大多数人的胃左静脉可以用彩色多普勒超声检测到,并可以作为早期诊断门脉高压的重要指标.

夏建国,董胜翔,李凤华. 正常人胃左静脉的声象图及血流动力学特征. 世界华人消化杂志 2003;11(4):491-493

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/491.htm>

0 引言

正常人胃左静脉(LGV)及其血流动力学的彩色多普勒检测国内外报道很少.但是,它是门脉高压时引起食管胃底静脉曲张的重要血管.本文目的是利用彩色超声检测正常人胃左静脉的声象图和血流动力学特征.现报道如下:

1 材料和方法

1.1 材料 本研究对200名正常人胃左静脉(LGV)内径、走行、血流速度和血流方向进行检测,并统计胃左静脉与腹腔干及门脉的关系.年龄14-91岁,男93名,女107名.同时检测200例门脉高压脾肿大患者(其中包括20例门脉有瘤栓、7例门脉畸形的胃左静脉与门脉系统的关系,年龄24-68岁,男110例,女90例.仪器:HPSONO4 500彩色多普勒超声诊断仪,探头频率3.5 MHz,用MO光盘或打印后扫描至电脑硬盘保存.

1.2 方法 受检者一般空腹,取平卧位或左右侧卧位,肝胆脾胰和门脉系统常规检查后,于剑突纵切及斜切,仔细检查胃左静脉走行及汇合点,彩色多普勒超声检测血流的方向,在平静呼吸时嘱患者暂停呼吸,测定最宽处管腔的内径及血流频谱.声束与血管的夹角尽量保持在 $< 60^\circ$.交界部的确定:脾静脉肠系膜上静脉与门脉主干汇合的较宽部位.

统计学处理用SPSS10.0软件计算,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用相关分析.

2 结果

200名正常人中有143名(71.5%)胃左静脉得到确认,有39名(19.5%)由于肠气的干扰或肥胖无法显示腹腔动脉和胃左静脉周围的结构.有18名(9%)腹腔动脉周围结构能显示清楚,但是胃左静脉仍无法探测到,可能的原因是由于胃左静脉管腔的内径确实非常细.200例肝硬化患者中有176例(88%)的胃左静脉得到确认.胃左静脉终止点可有三种情况(表1):(1)78例(54.5%)止于脾静脉(图1);60例(42%)止于脾门静脉交汇处(图2);(3)5例(3.5%)胃左静脉止于门脉主干(图3).有62.2%(89/143)的正常人测及满意的血流频谱,平均流速约 18.5 ± 6.5 cm/s,范围在5.6-32.9 cm/s,血流频谱形态随腹腔动脉及其分支的搏动而有上下起伏(图4),96.6%(86/89)正常人胃左静脉血流方向向肝,有3.4(3/89)的正常胃左静脉血流方向离肝,其中有1例胃左静脉扩张扭曲(图5),血流方向离肝(图6).143例胃左静脉内径见表2.胃左静脉的走行见表3.

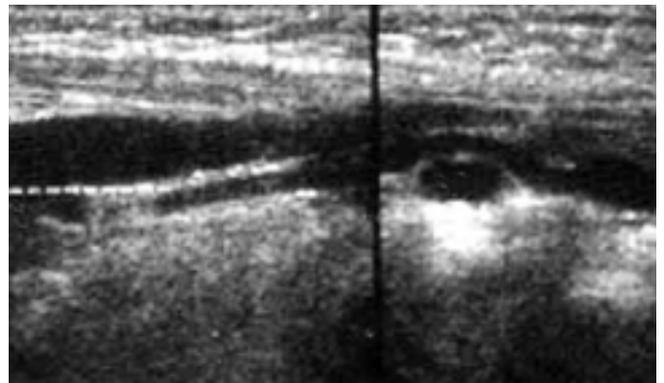


图1 胃左静脉越过脾动脉止于脾静脉,内径2.04 mm.



图2 胃左静脉经过肝动脉后方止于脾门静脉交汇处,内径3.37 mm.

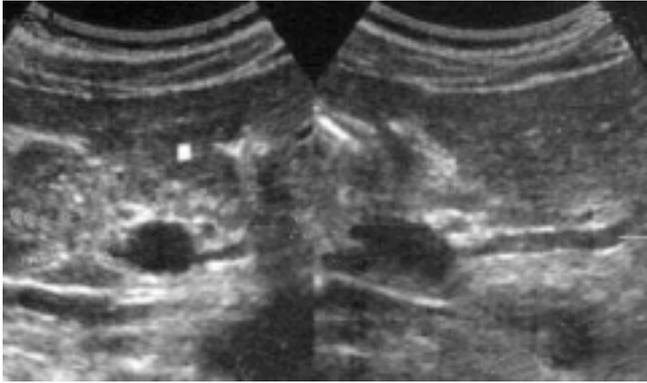


图3 胃左静脉经过肝固有动脉的后方止于门脉主干,内径 6.3 mm.

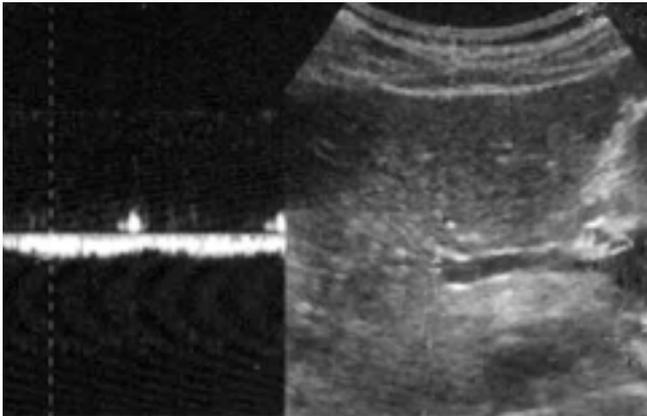


图4 胃左静脉内的血流频谱,血流方向向肝,流速 7 cm/s.

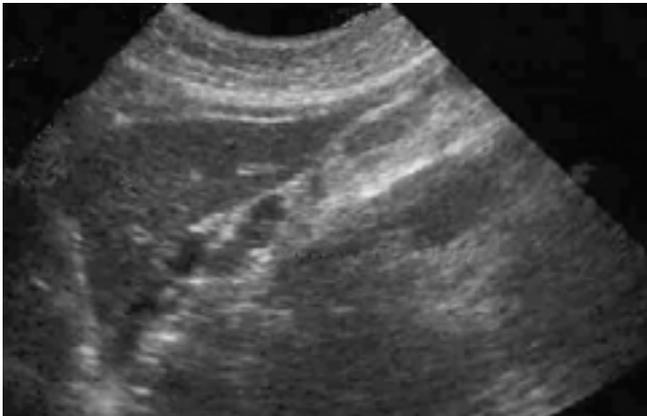


图5 胃左静脉扩张扭曲,最宽处 1.0 cm.

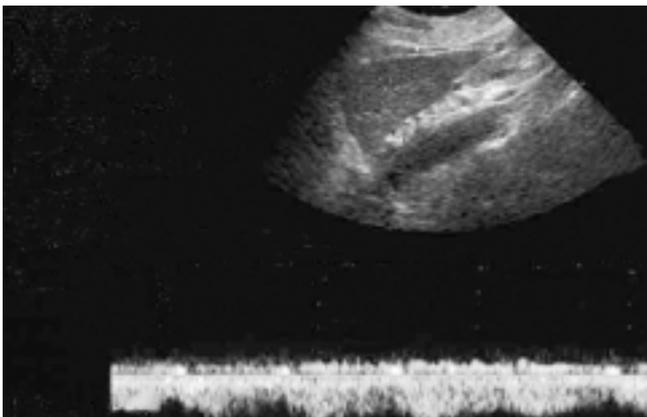


图6 胃左静脉扩张扭曲,血流方向离肝,最大流速 40 cm/s.

表1 胃左静脉在门脉系统的终止点

门脉主干	脾门静脉交界处	脾静脉	参考文献
47.9 %	7.3 %	42.7 %	2
24 %	59 %	17 %	3
25 %	45 %	30 %	4
30 %	33 %	37 %	1
5(3.5%)	60(42%)	78(54.5%)	A
6(3.4%)	81(46%)	89(50.6%)	B

2和3是尸解研究的资料;4为门高压患者经肝门脉造影得到的资料;1为两维超声的资料;A为本次研究的正常人资料;B为本次研究的门高压的资料;A、B两组资料的相关系数 r =0.989.

表2 胃左静脉的内径

终止部位	n	平均内径 mm	内径范围 mm
脾静脉	78	3.07 ± 0.91	1.12-5.24
交界处	60	2.87 ± 0.65	2.12-4.24
主干	5	2.01 ± 0.81	0.91-5.81

表3 胃左静脉与腹腔动脉干及其分支的关系

终止点	n	位于动脉的前方	位于动脉的后方
脾静脉	78	70(90%)	8(10%)
交界处	60	2(3%)	58(97%)
主干	5	0	5(100%)

3 讨论

胃左静脉(LGV)又称为胃冠状静脉,沿胃小弯在小网膜两层间与胃左动脉伴行,然后向右注入门静脉,有时注入脾静脉.胃左静脉在贲门处与注入奇静脉、半奇静脉的食管静脉有吻合.门脉高压时,胃左静脉处于门脉与胸腔负压的奇静脉之间,较门脉的其他属支更易受影响,成了门脉高压时血液反流的主要通道.是一条相当重要的血管.因此,我们观察了正常人群胃左静脉的彩色多普勒超声的特点.

超声可显示大部分正常人的胃左静脉,其显示率在 71.5 %,比 Roi^[1]在 1993 年报道的正常人胃左静脉的显示率 46 %(86/187)高 25.5 个百分点.这与仪器的进步及观察的方法有关,在腹壁比较薄的正常人中,我们用高频探头观察,可以发现直径 1 mm 左右的胃左静脉.胃左静脉在肝左外叶的后下方,胃小弯的上方,或与身体长轴平行、或斜行、或垂直.其上端指向贲门,下端与门脉系统连接.走行时越过腹腔动脉干分支的前方或后方,在越过动脉前后方时,管腔的内径有时可见受压变细.绝大多数的胃左静脉汇合点在脾静脉或门脾静脉交界部,与文献[1-4]报道的不尽一致.分析其中原因:(1)可能汇合点在门脉主干的胃左静脉其管腔特别细,不能被超声检出;(2)可能胃左静脉本身就主要汇合在脾静脉或交界部;(3)也有可能将汇合在主干的胃左静脉算作汇合在交界处.同时我们发现了另一个现

象,终止于脾静脉的胃左静脉绝大多数越过脾动脉前方,终止于交界处或主干的胃左静脉绝大多数在肝动脉的后方经过,与文献[1]报道基本一致。

胃左静脉的彩色血流及频谱的特征:正常人胃左静脉的血流频谱与门脉系统的其他各部分支不同,以随动脉的搏动而上下起伏为主,在同时测及胃左静脉和动脉的频谱时,发现低谷是在动脉的收缩期,特别是越过脾动脉终止于脾静脉的胃左静脉更明显。流速的变化范围也比较大,主要的问题可能是测量时的角度太大,因为胃左静脉的走行大多数与声束垂直。同时我们发现Valsalva试验时,有一小部分正常人的胃左静脉内不能测及血流频谱及彩色血流,在一部分有胃左静脉反流的患者中,Valsalva时,反流的血流频谱就消失,因此我们在患者平静呼吸时嘱暂停呼吸,此时可以测及比较满意的血流频谱。

认识正常人胃左静脉的彩色多普勒超声的特点,具有相当重要的临床意义,因为目前尚未找到无创伤、无痛苦的评价早期门脉高压的好方法。临床诊断门脉高压症的三大特点为脾脏肿大、侧枝循环形成及腹水。一般认为内镜发现食管静脉曲张,是评价门脉高压症的可靠方法^[5],有学者认为超声诊断可以根据肝脏回声、门静脉直径、脾静脉直径、脾脏厚度等4项指标进行综合分析,可以作为准确的诊断门脉高压症的影像

学标准^[6]。而在我们的实践中,许多门静脉直径未见增宽时,以及在胃左静脉内径还没有增宽时,在胃左静脉内已见离肝血流频谱;并且在部分晚期肝硬化的患者中门静脉内径也不超过1.3-1.4 cm。因此,超声诊断门脉高压症应该根据多方面的声象图表现综合起来考虑,如果再加上胃左静脉的超声多普勒表现,就有可能更早的发现门脉高压的存在。但是,需要注意的是:由于正常人胃左静脉的流速及内径变化范围比较大,我们认为尚不能根据内径的扩大和流速的减慢来诊断门脉高压的存在。胃左静脉内有反流,再加上肝脾的声象图特征,可能是诊断早期门脉高压的好方法。

4 参考文献

- 1 Roi DJ. Ultrasound anatomy of the left gastric vein. *Clin Radiol* 1993; 47: 396-398
- 2 姜本均,韩景茹,周庭永,马贻玲,曾令全,时德. 胃底、贲门及食管区静脉的应用解剖. *中国临床解剖学杂志* 1994;12:88-90
- 3 Douglass BE, Baggenstoss AH, Hollinshead WH. The anatomy of the portal vein and its tributaries. *Surg Gynecol Obstetrics* 1950; 91:562-576
- 4 Widrich WC, Srinivasan M, Semine MC, Robbins AH. Collateral pathways of the left gastric vein in portal hypertension. *Am J Roentgenol* 1984;142:375-382
- 5 刘泽富,白雪帆. 传染科医师进修必读. 第1版.北京:人民军医出版社, 1997:99-105
- 6 李梅春,周永兴,郝春秋,雷香娥,李光玉. B型超声对门脉高压症的诊断价值. *世界华人消化杂志* 1999;4:306-308

• 读者来信 •

编辑:您好!我是西安交大第二医院消化科在读博士,以下是我近来收集的一些临床医师E-mail地址.年前我已给您发过几批,不知您是否有印象.我和周围的医师都认为《世界华人消化杂志》和《World Journal of Gastroenterology》是两本特别好的医学杂志,其刊登的论著参考价值高,可读性很强,能及时、免费得到每期电子版,是一件再好不过的事,我们感谢您!现在进职称等许多方面都要求SCI收录的论著,您创办的贵刊使我们消化界的医生比别的专业多了一些机会,很令他们羡慕,我们也感谢您!今后我还会陆续将收集到的一些内科医生的E-mail地址发给您。

对于贵刊一点建议,我们希望每期发表文章的数量能再多一些;贵刊的网页上,是否能增加“搜索引擎”,以便查阅引用相关文章。(柴宁莉)

手术与非手术治疗重症急性胰腺炎 120 例

金世龙,候庆福,顾红光,王仁云,廖维健

金世龙,候庆福,顾红光,王仁云,廖维健,中国人民解放军第三军医大学大坪医院肝胆外科 重庆市 400042
项目负责人:金世龙,400042,重庆市,中国人民解放军第三军医大学大坪医院肝胆外科.
电话:023-68757247
收稿日期:2002-10-08 接受日期:2002-10-30

摘要

目的:探讨重症急性胰腺炎外科治疗成功的关键.

方法:通过对 120 例重症急性胰腺炎救治经验的总结,分析手术和非手术治疗效果.

结果:手术治疗 75 例,治愈 59 例,死亡 16 例;非手术治疗 45 例,治愈 39 例,死亡 6 例,两种治疗效果无统计学差别($P > 0.05$).合并 ARDS 而肺功能未纠正施行胰腺引流,死亡率明显升高($P < 0.01$),休克、胰性脑病和全腹膜炎的患者手术与否无明显差异($P > 0.05$).与死亡率有关的合并症为休克、ARDS、全身感染、胰周脓肿大出血和胰性脑病,分别占 SAP 死亡率的 36.3%、27.2%、13.6%、13.6% 和 9.1%.重症急性胰腺炎外科治疗由过去过分强调手术转变为过分依赖非手术治疗,许多患者或死于不当手术,或死于未及时手术.

结论:重症急性胰腺炎最佳治疗方法只有一个,手术与否、何时手术,如何选择和把握是临床外科医生治疗成功的关键.

金世龙,候庆福,顾红光,王仁云,廖维健.手术与非手术治疗重症急性胰腺炎 120 例.世界华人消化杂志 2003;11(4):494-496

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/494.htm>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)迄今仍是一种并发症多、死亡率高、治疗棘手的外科急腹症.由过去早期积极手术治疗过渡到现在早期非手术的“个体化治疗方案”的原则逐步为大家所接受.然而,提倡非手术治疗的同时也不能忽视手术治疗,因为手术指征、手术时机和手术方式的选择将直接影响患者的预后.我们对 20 a 来收治的 120 例 SAP 患者进行总结和分析,将我们的经验和教训报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 1982-10/2002-02 我院共收治 SAP 120 例,男 65 例,女 55 例,年龄 9-82(平均 51.4)岁.患者主要临床表现为上腹部持续性剧痛、腹膜刺激征、血尿酸淀粉酶,血象升高,血性腹水、不同程度的全身性和局

部并发症, B 超及 CT 扫描下的胰腺和胰周围病变,按照我国标准均符合 SAP 条件^[1-3].其中 SAP 合并胆总管结石 15 例,胆囊结石 27 例,十二指肠乳头周围憩室炎 2 例,外伤性 SAP 1 例.

1.2 方法 1982/1997 我院对 SAP 患者采用早期积极手术治疗(诊断明确).1997 年后 SAP 患者多数采用非手术的综合治疗,尤其是对胰腺炎病理生理变化认识深入和生长抑素(施他宁)使用,手术病例明显减少.仅下列情况下需手术处理:(1)胆源性胰腺炎并胆道梗阻或化脓性胆囊炎,应尽早手术;(2)SAP 合并腹腔感染,诊断成立即手术引流;(3)对于需要手术的 SAP 患者在休克、ARDS 基本纠正,血压和呼吸稳定后才能手术处理胰腺;(4)在 SAP 时又不能除外脏器破裂穿孔者应手术探查.

本组 SAP 患者 120 例,手术治疗 75 例(62.5%),手术引流含大量胰酶和有毒物质的腹水,清除坏死已脱落的胰腺组织,胰腺周围放置单腔或双腔引流管.胆总管结石伴急性胆管炎同时施行胆总管探查、T 管引流术.急性胆囊炎同时施行胆囊切除术或胆囊造口术.非手术治疗 45 例,方法包括:(1)补充血容量,纠正水电解质紊乱,改善胰腺微循环;(2)禁食、胃肠减压;(3)营养治疗;(4)防治感染;(5)抑制胃液、胰液分泌(施他宁)和抑胰酶制剂;(6)加强重要脏器监测,早期积极处理多器官功能不全.

2 结果

2.1 SAP 治疗的一般情况 本组 SAP 120 例,治愈 98 例(81.7%),死亡 22 例,死亡率为 18.3%,发生各种并发症 75 例(62.5%).手术治疗 75 例(62.5%),治愈 59 例(78.6%),死亡 16 例(21.3%).非手术治疗 45 例(37.5%),治愈 39 例(86.6%),死亡 6 例(15.4%).手术和非手术治疗组治愈率和死亡率差异无统计学差异($P > 0.05$).

2.2 SAP 并发症及预后和 22 例 SAP 死亡的直接原因 SAP 常见的并发症是胰周脓肿、休克、ARDS、胰性脑病、代谢性酸中毒、全身性感染、肾功能不全和大出血,其发生率分别为 23.3%、13.3%、13.3%、11.6%、8.3%、6.6%、5.8% 和 5.0%.在这些 SAP 的并发症中,与死亡率有关的合并症(表 2)为休克、ARDS、全身感染、胰周脓肿和胰性脑病、大出血,分别占 SAP 死亡率的 36.3%、27.2%、13.6%、13.6% 和 9.1%.

2.3 手术和非手术治疗对 SAP 死亡率的影响 合并 ARDS 的 SAP 患者手术引流胰腺后死亡率非常显著高于非手术的综合治疗($P < 0.01$).合并休克、胰性脑病和全腹膜炎的 SAP 患者,采用手术引流胰腺和非手术的综合治

疗, 其死亡率无统计学差异($P > 0.05$).

表1 SAP 并发症及预后

并发症	n	死亡(%)	并发症	n	死亡(%)
休克	16	9(7.5)	出血	6	4(3.3)
全身感染	8	4(3.3)	胰性脑病	14	7(5.8)
ARDS	16	7(5.8)	代谢性酸中毒	10	1(0.9)
肾功能不全	7	4(3.3)	胰周脓肿	28	3(2.5)

表2 22例 SAP 患者死亡直接原因

致死性并发症	n	死亡	百分比(%)
休克	16	8	36.4
ARDS	16	6	27.3
全身性或腹腔感染	8	3	13.6
胰周脓肿大出血	6	3	13.6
胰性脑病	14	2	9.1

表3 SAP 合并全腹膜炎、ARDS、休克和胰性脑病的预后与手术关系

	手术(胰腺手术)				非手术		
	n	n	治愈	死亡	n	治愈	死亡
ARDS	16	10	4	6	6	5	1 ^a
休克	16	7	3	4	9	4	5 ^b
胰性脑病	14	10	5	5	3	2	1 ^b
全腹膜炎	69	42	33	9	27	21	6 ^b

^a $P < 0.01$, ^b $P > 0.05$.

3 讨论

SAP 不仅并发症多、死亡率高, 而且治疗棘手, 是医学史上争论最多的问题之一, 治疗归属多次在内、外科之间徘徊. 国内在 1970 年代以前, SAP 的手术治疗尚未开展, 重症者几乎无救治的希望. 到 1970 年代以后, 随着手术治疗的开展, 越来越多的患者经手术治疗治愈, 导致了扩大手术范围的倾向, 使疗效长期停留在 70 % 的水平. 到 1990 年代初, 认识到胰腺坏死感染与否是影响其自然转归的关键因素, 因而提出了根据坏死是否感染选择手术指征的“个体化治疗”方案^[3]. 此后 SAP 的手术和非手术治疗同时得到的发展, 目前 SAP 总体治愈率达到 83 %, 手术治疗达到 70 %, 非手术治疗达到 90 %, 征服 SAP 成了外科医师的热点. 我们通过对我院 20 a 收治的 120 例 SAP 治疗结果进行分析, 主要有以下几点体会.

3.1 避免过度强调手术治疗的倾向 在 1982/1997 年间我们对 SAP 患者早期采用积极的手术原则, 手术指征掌握宽松, 似乎手术越早越好, 有时入院数小时立即手术, 这样产生 3 个不良后果: (1) 死亡率高. 在我们手术治疗的 SAP 患者中, 8 例在手术后 1 d 内死亡, 其中 2 例手术后全麻根本未醒就死亡. 这是因为在 SAP 早期 3 h 内, 体液丢失可能大于 30 %, 处于休克前期状

态, 入院后体液补充不够, 加上 ARDS、手术创伤和麻醉打击, 患者更难承受, 表 2 提示 16 例休克导致 8 例死亡, 多数在 1982/1997 年间. 表 3 显示, 合并 ARDS 的 SAP 患者, 在 ARDS 未纠正情况下手术引流胰腺, 死亡率会非常显著升高($P < 0.01$), 因此即使需要手术, 如手术时机掌握不准, 也会影响治疗效果. (2) 引流不彻底易形成脓肿. 在 SAP 早期胰腺缺血坏死范围不确定, 未形成明确分界线, 手术时只能清除坏死脱落的组织. 有些缺血变黑的胰腺可以恢复正常, 其结构完整, 手术不便于清除; 有些坏死范围进一步发展, 产生新的坏死组织. 手术目的是引流, 不能阻止胰腺进一步坏死, 因此在引流物选择和位置不当时, 极易形成胰周脓肿. 本组 1 例青年男性 SAP 患者, 入院 3 h 即行手术, 手术中见胰腺大范围变黑, 在切开胰腺包膜减压时损伤其上缘静脉血管, 造成大出血, 用止血纱布填塞止血, 胰周放 3 根单腔引流管引流结束手术. 术后 1 wk 出现腹痛、发热及血象高, CT 检查诊断为胰周脓肿, 先后 5 次手术清理脓肿均不能治愈, 最后脓肿腐蚀周围大血管, 因大出血死亡. 这种手术引流不彻底易形成脓肿的情况已有报道^[4]. (3) 手术引流将胰腺无菌性坏死变成细菌感染性脓肿. 多数 SAP 急性期不一定存在细菌感染, 少量坏死组织可以吸收, 即使大范围组织坏死, 在一定时间也不一定有感染. 一旦手术引流加冲洗, 外界细菌沿引流管逆行感染和肠道细菌易位, 易造成胰周细菌性脓肿, 尤其腹腔灌洗, 会增加感染的机会. 引流通畅对治疗有利, 但引流物选择和位置不当, 极易形成胰周细菌性脓肿. 胰周细菌性脓肿的后续处理复杂, 易引起大出血和脏器穿孔等并发症.

3.2 避免过度强调非手术治疗的倾向 SAP 的治疗有两种选择, 即手术治疗和非手术治疗, 但是对一个具体患者在病程的某一点而言, 必然只有一种治疗更为合适. 在 SAP 急性期非手术治疗的原则下, 近些年有的医师一味追求非手术治疗的倾向比较普遍和严重, 使那些需要手术的病例失去治愈的机会. 本组有 2 例 SAP 伴腹腔严重感染, 急需手术引流便于控制感染, 而其家属考虑自身经济利益, 不在手术同意书上签字, 致使患者发展为败血症及感染性休克死亡(表 2). 本组另 1 例 SAP 患者, 入院时为急性轻症胰腺炎, 2 d 后病情转重, 出现严重腹痛、心慌及全腹膜炎及精神症状, 5 d 后出现腹胀, 两侧腹腔局限性包快, 穿刺抽出黑色混浊腹水, 腹水淀粉酶较高, 腹水常规检查见脓细胞, 此时患者一般情况良好, 应手术引流, 但医生仍坚持非手术治疗. 非手术治疗 1 mo 内患者腹胀加重, 发展到不能进食, CT 检查发现腹膜后间隙大量积液, 经腹腔穿刺抽出脓液, 立即转为手术引流. 术中发现腹腔内清洁无腹水, 腹膜后间隙广泛感染, 吸出脓液 5 000 mL, 黑色淤泥样坏死组织 500 g, 术后引流脓液 300-600 mL/d, 术后 30 d 脓腔大出血无法救治死亡. 如果在穿刺抽出黑色混浊腹水时手术引流, 脓肿减压后不一定会在整个

腹膜后间隙扩展。“个体化治疗”原则强调应根据SAP的不同病因、不同病期、感染与否而做不同处理,使SAP的治疗转化为“手术治疗”及“非手术治疗”的双轨方式,不能片面地强调某一方面的作用。

3.3 SAP手术指征和手术时机再探讨 从治愈率看,手术治疗75例,治愈率77.3%,非手术治疗45例,治愈率86.6%,手术和非手术治疗组治愈率差异无统计学意义($P > 0.05$)。似乎非手术治疗效果更好,但我们不应忽视非手术治疗的SAP患者病情较轻的现实,而近几年手术病例病情重、并发症多的特征,二者缺乏可比性。对于手术指征和时机,1982/1997年对SAP患者采用积极早期手术治疗,治愈率只有77.3%。1997年后SAP患者多数采用非手术综合治疗,尤其是对胰腺炎病理生理变化认识的深入和生长抑素(施他宁)的使用,手术病例明显减少,SAP手术指征更为严格,手术时机也有一定限制,治愈率上升到86.6%。仅下列情况下需手术处理:(1)胆源性胰腺炎并胆道梗阻或化脓性胆管炎,应尽早手术引流胆道,以去除病因,减缓病情发展。对胆囊结石而胆道梗阻不明显者,应当在胰腺炎控制以后,做胆囊切除术,以免再发;(2)SAP合并腹腔感染,诊断成立即手术引流;(3)需要手术的SAP患者在休克或ARDS基本纠正,血压和呼吸功能基本稳定后才能手术处理胰腺炎;(4)在SAP不肯定又不能除外脏器破裂穿孔者应手术探查;(5)假性胰腺囊肿于3-6 mo后行囊肿空肠内引流术。

3.4 需要借助手术解决的问题 胆源性胰腺炎并胆道梗阻或化脓性胆管炎,应尽早手术引流胆道,以去除病因,减缓病情发展。如果抓住了这一时机,患者常能转危为安,而时机一旦失去,病情常常急转直下。对胆囊结石而胆道梗阻不明显者,应当在胰腺炎控制以后,做胆囊切除术,以免再发。

需要通过手术清除酶性毒性渗液,缓解腹内高压和腹膜后感染,以减轻全身性影响和脏器功能障碍者,见于发展极快的暴发性胰腺炎。及时手术将大量的腹腔和胰周腹膜后间隙的渗液引出,加以手术继续灌洗,可以减轻毒素吸收对全身的影响,结合严密的监护和脏器功能支持,能增加暴发性胰腺炎患者的生存机会。

胰腺及胰外坏死组织感染、坏死感染组织液化包裹、脓肿形成或囊肿感染都需要做病灶清除引流。经非手术治疗控制的病例,胰腺或胰周出现含有液体和

坏死组织的包裹性病灶,CT显示低密度区,首先要考虑为局限性坏死包裹,不要不加排除地诊断为假性囊肿,造成治疗的延误。如果患者有明显症状,做出手术选择不难,而那些被认为没有明显症状的病例则需要仔细分析鉴别,如有上腹饱胀、呕吐等消化道症状、慢性消耗或出冷汗等症状,CT病灶不均质、不缩小,都是选择手术治疗的依据,不要等出现脏器功能受损,如呼吸功能不全和脑病症状,才考虑手术。对于直径大于6 cm或持续增大、或者有压迫症状的假性囊肿也应手术引流。

3.5 应重视SAP并发症防治 过去外科医生将主要精力放在控制胰腺炎症上,对SAP并发症重视不够,强调早期积极手术治疗时,往往不纠正心肺脑功能紊乱,就上台手术,影响患者预后。经过总结和分析发现SAP患者的病情与胰腺的病变程度和有无并发症有直接关系,胰腺的病变越重,其合并症越多,预后越差。在这些SAP的并发症中,ARDS、休克、胰性脑病、全身感染和脓腔大出血,分别占SAP死亡率的27.2%、36.3%、9.1%、13.6%和13.6%^[5,6]。本组结果提示,在各种并发症中休克、ARDS及肺功能不全、胰性脑病、全身感染胰周脓肿和大出血是死亡的主要原因,其死亡率分别为7.5%、5.8%、5.8%、3.3%、2.5%和3.3%。全腹膜炎是SAP的腹部典型表现,虽与SAP病情严重程度和死亡率有关,但具体分析每1例患者,全腹膜炎几乎都与上面四种并发症相伴随,单独出现并不会引起死亡。肾功能不全亦有一定发生率,治疗中只要补足液体和血液透析,对SAP合并肾功能不全未引起死亡。

4 参考文献

- 1 Douzinas EE, Tsidiemidou PD, Pitaridis MT, Andrianakis I, Bobota-Chloraki A, Katsouyanni K, Sfyra D, Malagari K, Roussos C. The regional production of cytokines and lactate in sepsis-related multiple organ failure. *Am J Resp Crit Care Med* 1997;155:53-59
- 2 刘德宝,严律南,张肇达.重症急性胰腺炎435例的手术治疗时机和指征探讨. *中华普通外科杂志* 2000;15:277-279
- 3 中华医学会外科学胰腺外科组.重症急性胰腺炎诊治草案. *中华肝胆外科杂志* 2002;8:110-111
- 4 金世龙,王代科,王仁云,顾红光.急性出血坏死性胰腺炎术后胰周脓肿的预防. *中国普外基础与临床杂志* 1998;5:345-346
- 5 金世龙,张天迹,顾红光,王仁云,廖维健.急性重症胰腺炎的致死性并发症分析. *第三军医大学学报* 2002;24:450-452
- 6 金世龙,张天迹,王仁云,廖维健,宋小文,周月庆.急性重症胰腺炎心肺脑病损伤的诊治. *世界华人消化杂志* 2001;9:1221-1223



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

