

乙型肝炎病毒X蛋白与去唾液酸糖蛋白受体2突变体相互作用的研究

陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 邵清, 李克, 张玲霞

陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 邵清, 李克, 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, 博士, 2003年军医进修学院毕业, 主治医师。主要从事肝病的基础及临床工作。

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

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: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-16

Cloning of a gene coding for novel mutant of asialoglycoprotein receptor 2 binding to hepatitis B virus X protein in hepatocytes

Yin-Ying Lu, Tian-Yan Chen, Jun Cheng, Yao-Dong Liang, Lin Wang, Yan Liu, Jian Zhang, Qing Shao, Ke Li, Ling-Xia Zhang

Yin-Ying Lu, Tian-Yan Chen, Jun Cheng, Yao-Dong Liang, Lin Wang, Yan Liu, Jian Zhang, Qing Shao, Ke Li, Ling-Xia Zhang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuan Zhonglu, Beijing 100039, China
Supported by Grants from National Natural Science Foundation No. C03011402, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA.

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-03-08 Accepted: 2003-04-16

Abstract

AIM: The pathogenesis of HBV-induced malignant transformation is incompletely understood. The X protein of hepatitis B virus (HBxAg) is a multifunctional protein that can influence a variety of signal transduction pathways within the cell and is essential for establishing natural viral infection, it also has been implicated in the development of liver cancer associated with chronic infection. Further understanding of the interaction between HBxAg and proteins in hepatocytes is of great significance for the prevention of the development of hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: HBxAg bait plasmid was constructed by ligating the HBxAg gene with a yeast expression vector pGBKT7, then transformed into yeast AH109 (a type). The transformed yeast cells were amplified and mated with yeast cells Y187 (α type) containing liver cDNA library plasmid pCAT2 in 2xYPDA medium. Diploid yeast cells were plated on synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) and syn-

thetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) containing x- α -gal for selection twice. Plasmid of true positive blue colonies was extracted and analysed by DNA sequencing and blast in genbank. After the complete sequence of the novel mutant of asialoglycoprotein receptor 2 (ASGPR2) was amplified from the mRNA of HepG2 cell by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and cloned into pGADT7 vector, the recombinant plasmid was translated by using reticulocyte lysate and analysed by immunoprecipitation technique *in vitro* together with HBxAg.

RESULTS: Eighteen genes in forty-one positive colonies were obtained, one of them is a novel mutant of ASGPR2, which is 80 % homologous to natural ASGPR2. The complete sequence of the mutant was amplified from the mRNA of HepG2 cell by RT-PCR successfully. The interaction between HBx and ASGPR2 mutant was further confirmed by immunoprecipitation technique.

CONCLUSION: Interaction between HBx and ASGPR2 mutant can be observed in both yeast cell and *in vitro*.

Lu YY, Chen TY, Cheng J, Liang YD, Wang L, Liu Y, Zhang J, Shao Q, Li K, Zhang LX. Cloning of a gene coding for novel mutant of asialoglycoprotein receptor 2 binding to hepatitis B virus X protein in hepatocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1126-1130

摘要

目的: 筛选并克隆鉴定人肝细胞中与乙型肝炎病毒(HBV) X蛋白(HBxAg)相互作用蛋白的基因, 明确HBxAg在HBV感染及致癌过程中的具体作用。

方法: 用多聚酶链反应(PCR)法扩增HBxAg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文库质粒的酵母细胞Y187进行配合, 在营养缺陷型培养基上进行双重筛选阳性菌落, PCR从中扩增出阳性目的片段并测序, 进行生物信息学分析。根据Genbank中的序列信息设计引物, 从HepG2细胞的mRNA中逆转录出去唾液酸蛋白受体2(ASGPR2)突变体的完整序列, 克隆到另一酵母表达载体pGADT7中, 体外免疫共沉淀再次证明HBxAg与ASGPR2突变体的结合作用。

结果: 成功克隆出HBxAg基因并在酵母细胞中表达, 配合后选出既能在四缺(SD/-Trp-Leu-His-Ade)培养基又能分解X- α -半乳糖(X- α -gal)变成蓝色的真阳性菌落41个, 其中有一个是ASGPR2的新突变体。HepG2细胞的mRNA中能逆转录出ASGPR2的全基因序列,

体外免疫共沉淀结果证实该突变体与 HBxAg 在体外也有结合作用。

结论: 成功克隆出 HBxAg 的肝细胞结合蛋白, 发现一新的 ASGPR2 突变体, 并证实 HBxAg 与 ASGPR2 突变体在体外及酵母细胞内均有结合作用。

陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 邵清, 李克, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 蛋白与去唾液酸糖蛋白受体 2 突变体相互作用的研究. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1126-1130

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1126.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)慢性感染是引发肝细胞癌的主要危险因素, HBV 编码的 X 蛋白(HBxAg)具有潜在的致癌作用, 在多种基因发生异常转化的过程中起转录协同激活作用, 但具体机制不清^[1-4]. 许多研究提示 HBV X 蛋白能抑制肿瘤抑制蛋白 P53 的功能并影响多种信号转导途径, 对多种增强子及启动子有反式激活作用^[5-7]; 还可以抑制肝细胞 DNA 的损伤修复, 激活细胞信号级联包括促分裂原蛋白激酶(MAPK), Janus 家族酪氨酸激酶(JAK)/ 信号转导子和转录通路激活因子(STAT), 对肝细胞的生长繁殖、细胞凋亡和细胞生长检测点的调节有着广泛的影响, 在 HBV 诱导肝细胞癌的发生中起着重要作用^[8-10]. 筛选肝细胞中与 HBxAg 的结合蛋白对探讨 HBV 致癌的细胞效应机制提供重要线索。

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^Δ, gal80^Δ, 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-α-gal 购于 Clontech 公司. 大肠杆菌 DH5 α 及 HBV ayw 亚型基因全序列质粒载体 pCP10、HepG2 细胞为本室保存, c-myc 单克隆抗体本室自制. 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、EcoRI 和 PstI、BamH 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、Trizal 总 RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒购于 Promega 公司. TEMED 购于宝林曼公司. 醋酸锂、半硫酸腺苷购于 Sigma 公司. HBxAg 基因扩增引物(P1 5'-GAATTCATGGCTGCTAGGCTGTGCTG-3' 和 P2 5'-CTGCAGATGGTGGTGGTGGCAGACC-3'), 肝文库插入基因序列扩增引物(P3 5'-CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC-3', P4 5'-GTGAACTTGCGG GGTTCAGTATCTACGA-3'), 去唾液酸糖蛋白受体突变体基因扩增引物(P5 5'-GAATTCATG

GCCAAGGACTTTCAAGATATCC-3', P6 5'-GGATCCTCAGGCC ACCTCGCCGGTGGCATTCC-3')合成及 DNA 测序由上海博亚公司承担。

1.2 方法

1.2.1 诱饵质粒的构建及表达 PCR 扩增 HBxAg 基因与 pGBKT7 载体连接, 酶切鉴定后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, 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 HBxAg 在酵母中的表达。

1.2.2 诱饵与肝文库的酵母配合 挑取在 SD/-Trp 培养基上生长的 pGBKT7-HBxAg 质粒的酵母 AH109 菌落一到数个接种于 SD/-Trp 培养基中, 30 °C 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, 计数细胞数大于 1 × 10¹²·L⁻¹ 时与 1 mL 的肝文库酵母细胞在 50 mL 2 × YPDA 中 30 °C 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 μL 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-α-gal 的 4 缺培养基上检查 X-α-gal 酶活性, 在此培养基上能生长且变成蓝色的为真阳性菌落. PCR 扩增出目的片段后测序并进行生物信息学分析。

1.2.3 新基因全序的克隆及重组表达载体的构建 根据 Genbank 的序列信息设计引物 P5、P6, 以 HepG2 细胞的 mRNA 为模板, 逆转录 PCR(RT-PCR)扩增 ASGPR2 基因的全序列, 送 DNA 测序鉴定后 EcoR I、BamH I 双酶切克隆入酵母表达载体 pGADT7。

1.2.4 体外免疫共沉淀 TNT 网织红细胞裂解物体外翻译 HBxAg 和 ASGPR2 突变体(在此过程中掺入 ³⁵S), 二者各取 5 μl 在 1.5 mL 的微离心管中冰上混合, 30 °C 孵育 1 h, 加入 470 μL 免疫共沉淀缓冲液、10 μL G 蛋白-琼脂糖珠、10 μL c-myc 单克隆抗体、4 °C 孵育 2 h. 14 000 r·min⁻¹ 离心 1-2 min, 弃上清. 加入 TBST 0.5 mL 洗 3 次, 加 15 μL SDS 上样缓冲液, 80 °C 加热变性 5 min, 瞬时离心后将上清 10 μL 上样到 SDS-PAGE 胶上电泳, 清洗固定凝胶后, 恒定 60 °C 真空干燥 40 min, -20 °C 条件下放射自显影。

2 结果

2.1 pGBKT7-HBx 重组诱饵质粒的构建及表达 扩增出的 HBxAg 基因连接到 pGBKT7 载体中经酶切鉴定结果正确. 转化入酵母 AH109 株筛选到阳性菌落, 提酵母蛋白质进行 SDS-PAGE 和 Western 免疫印迹分析, 结果显示对照无表达而转化了 pGBKT7-HBx 的酵母蛋白提取物 Western 印迹分析可见明显目的条带, 说明 HBxAg 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-

α -半乳糖(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41个,用文库扩增引物PCR扩增出目的片段并测序,结果在GeneBank中进行分析,发现其中1个含ASGPR2突变体基因.

2.3 新基因全序的克隆及重组结果 用引物P5、P6从HepG2细胞的mRNA中逆转录扩增出ASGPR2突变体基因的全序列(图1, 2),测序鉴定正确后克隆入酵母表达载体pGADT7,酶切鉴定结果正确(图3).

```

      M A K D F Q D I Q Q L S S E E N D H
1  ATG GCC AAG GAC TTT CAA GAT ATC CAG CAG CTG AGC TCG GAG GAA AAT GAC CAT
      P F H Q G E G P G T R R L N P R R G
55  CCT TTC CAT CAA GGT GAG GGG CCA GGC ACT CGC AGG CTG AAT CCC AGG AGA GGA
      N P F L K G P P P A Q P L A Q R L C
109 AAT CCA TTT TTG AAA GGG CCA CCT CCT GCC CAG CCC CTG GCA CAG CGT CTC TGC
      S M V C F S L L A L S F N I L L L V
163 TCC ATG GTC TGC TTC AGT CTG CTT GCC CTG AGC TTC AAC ATC CTG CTG CTG GTG
      V I C V T G S Q S A Q L Q A E L R S
217 GTC ATC TGT GTG ACT GGG TCC CAA AGT GCA CAG CTG CAA GCC GAG CTG CGG AGC
      L K E A F S N F S S S T L T E V Q A
271 CTG AAG GAA GCT TTC AGC AAC TTC TCC TCG AGC ACC CTG ACG GAG GTC CAG GCA
      I S T H G G S V G D K I T S L G A K
325 ATC AGC ACC CAC GGA GGC AGC GTG GGT GAC AAG ATC ACA TCC CTA GGA GCC AAG
      L E K Q Q Q D L K A D H D A L L F H
379 CTG GAG AAA CAG CAG CAG GAC CTG AAA GCA GAT CAC GAT GCC CTG CTC TTC CAT
      L K H F P V D L R F V A C Q M E L L
433 CTG AAG CAC TTC CCC GTG GAC CTG CGC TTC GTG GCC TGC CAG ATG GAG CTC CTC
      H S N G S Q R T C C P V N W V E H Q
487 CAC AGC AAC GGC TCC CAA AGG ACC TGC TGC CCC GTC AAC TGG GTG GAG CAC CAA
      G S C Y W F S H S G K A W A E A E K
541 GGC AGC TGC TAC TGG TTC TCT CAC TCC GGG AAG GCC TGG GCT GAG GCG GAG AAG
      Y C Q L E N A H L V V I N S W E E Q
595 TAC TGC CAG CTG GAG AAC GCA CAC CTG GTG GTC ATC AAC TCC TGG GAG GAG CAG
      K F I V Q H T N P F N T W I G L T D
649 AAA TTC ATT GTA CAA CAC ACG AAC CCC TTC AAT ACC TGG ATA GGT CTC ACG GAC
      S D G S W K W V D G T D Y R H N Y K
703 AGT GAT GGC TCT TGG AAA TGG GTG GAT GGC ACA GAC TAT AGG CAC AAC TAC AAG
      N W A V T Q P D N W H G H E L G G S
757 AAC TGG GCT GTC ACT CAG CCA GAT AAT TGG CAC GGG CAC GAG CTG GGT GGA AGT
      E D C V E V Q P D G R W N D D F C L
811 GAA GAC TGT GTT GAA GTC CAG CCG GAT GGC CGC TGG AAC GAT GAC TTC TGC CTG
      Q V Y R W V C E K R R N A T G E V A
865 CAG GTG TAC CGC TGG GTG TGT GAG AAA AGG CGG AAT GCC ACC GGC GAG GTG GCC
      *
919 TGA

```

图1 ASGPR 突变体基因序列图(Genbank 号: AF 529374).

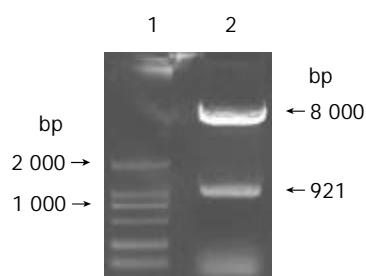
```

      188                205
G: TGGGTCCCAAAGTGAGGGTCACAGAGGTGCACAGCTGCAAGCCGA
M: TGGGTCCCAAAGTG.....CAC.....AGCTGCAAGCCGA
      244                248
      68                69
G: AAGG.....GCCA
M: AAGGTGAGGGCCAGGCACTCGCAGGCTGAATCCCAGGAGAGGAAATCCATTTTGAAGGGCCA
      68                126

```

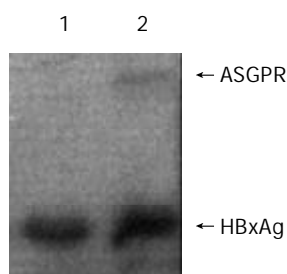
G: Genbank 的序列; M: 受体突变体序列

图2 新的去唾液酸蛋白受体突变体与 Genbank 中去唾液酸蛋白受体2的DNA序列比较.



1: DNA Marker; 2: pGADT7-ASGPR 质粒 EcoRI/PstI 双酶切
图 3 pGADT7-ASGPR 质粒酶切鉴定.

2.4 体外免疫共沉淀结果 放射自显影照片结果显示, 在泳道 2 出现各自的两条带的分子量大小正确, 说明 HBxAg 与该去唾液酸蛋白受体新的突变体在体外也能结合(图 4).



1:HBxAg; 2:HBxAg+ASGPR
图 4 体外免疫共沉淀图.

3 讨论

HBV 慢性感染可导致肝硬化、肝细胞癌发生, 其中 HBxAg 在致瘤方面的作用尤为重要, 已有研究证实 HBxAg 引起细胞基因异常是导致肝细胞癌过程中肝细胞异常增生的早期事件, 但具体机制尚未清楚. 近年来发现 HBxAg 的功能非常复杂^[11], 他能通过不同途径(包括刺激蛋白激酶活性)影响信号转导通路、反式激活各种细胞及病毒的启动子及增强子、抑制 P53 蛋白作用、妨碍 DNA 损伤修复, 并能通过诱导或封闭细胞凋亡来协调细胞增生及程序性坏死间的平衡^[12-19], 从而引起肝细胞基因突变, 肝细胞癌的发生. 持续低水平的 HBxAg 表达可导致 HCC 的发生, 但 HBxAg 的结构中不含能提供其细胞定位及在病毒感染肝细胞中起作用的特定的核定位信号、DNA 结合位点及其他的蛋白质结构域. 明确 HBxAg 在肝细胞中到底与哪些蛋白质因子相互作用、如何作用, 对于研究 HBV 在自然感染中所起的具体生物学功能是非常关键的^[20-26].

酵母双杂交系统是新近发展起来的一种分子生物学技术, 能有效分析真核细胞中蛋白-蛋白、蛋白-DNA、蛋白-RNA 相互作用. 该系统通过将两个推定相互作用的用蛋白 X 和 Y 被分别融合到一酵母转录激活因子的 BD 和 AD 上, X 与 Y 的相互作用重构了激活因子的完整性能导致下游“报告基因”的转录, 产生易探测到的表型, 间接证实 X 与 Y 蛋白间的结合作用^[27-30]. 利用 Clontech 公司新推出的酵母双杂交系统 3, 我们在

真核表达载体 pGBKT7 中构建 pGBKT7-HBx 诱饵质粒并在酵母菌株 AH109 中表达了 HBxAg 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 18 种, 其中一个基因与 ASGPR2 的基因高度同源, 推测是一个新的突变体, 该突变体在第 68-69 位碱基间比 ASGPR2 基因多 57 个碱基, 在 244-248 位碱基间较 ASGPR2 基因少 15 个碱基.

体内糖蛋白通过去唾液酸糖蛋白途径代谢, 他们被去唾液酸后通过去唾液酸糖蛋白受体在肝脏被吸收. 由于肝细胞表面富含 ASGPR, ASGPR 现已被用做多种抗-HBV 药物的肝细胞靶向载体, 以增强抗肝炎病毒药物的疗效^[31]. 有报道从患者体内分离出的 HBV 病毒粒子能与 ASGPR 结合, 进一步研究发现 HBV 是通过前 S1 相关的包膜结合位点与 ASGPR 结合, 介导肝细胞对 HBV 病毒粒子的胞饮作用, 可能是 HBV 进入肝细胞的一个机制^[32,33]. 在本项研究中发现 HBxAg 能与 ASGPR2 结合, 对于研究 HBxAg 在 HBV 感染及 HCC 发生中的具体功能又提出了新的线索, 二者结合后会引起哪些的生物学效应是下一步研究的重点.

4 参考文献

- Koike K, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Kyoji M. Molecular mechanism of viral hepatocarcinogenesis. *Oncology* 2002;62:29-37
- Andrisani OM, Barnabas S. The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis. *Int J Oncol* 1999;15:373-379
- Yeh CT. Hepatitis B virus X protein: searching for a role in hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:339-341
- Feitelson MA, Duan LX. Hepatitis B virus X antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 1997;150:1141-1157
- Feitelson MA. Hepatitis B x antigen and p53 in the development of hepatocellular carcinoma. *J Hepatobil Pancreat Surg* 1998;5:367-374
- Wang XW. Microinjection technique used to study functional interaction between p53 and hepatitis B virus X gene in apoptosis. *Mol Biotechnol* 2001;18:169-177
- Huo TI, Wang XW, Forgues M, Wu CG, Spillare EA, Giannini C, Brechot C, Harris CC. Hepatitis B virus X mutants derived from human hepatocellular carcinoma retain the ability to abrogate p53-induced apoptosis. *Oncogene* 2001;20:3620-3628
- Diao J, Garces R, Richardson CD. X protein of hepatitis B virus modulates cytokine and growth factor related signal transduction pathways during the course of viral infections and hepatocarcinogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001;12:189-205
- 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
- Mosialos G. The role of Rel/NF-kappa B proteins in viral oncogenesis and the regulation of viral transcription. *Semin Cancer Biol* 1997;8:121-129
- Murakami S. Hepatitis B virus X protein: structure, function and biology. *Intervirology* 1999;42:81-99
- Lee YI, Kang-Park S, Do SI, Lee YI. The hepatitis B virus-X protein activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem* 2001;276:16969-16977
- Jaitovich-Groisman I, Benlimame N, Slagle BL, Perez MH, Alpert L, Song DJ, Fotouhi-Ardakani N, Galipeau J, Alaoui-Jamali MA. Transcriptional regulation of the TFIIF transcription repair components XPB and XPD by the hepatitis B virus

- x protein in liver cells and transgenic liver tissue. *J Biol Chem* 2001;276:14124-14132
- 14 Diao J, Khine AA, Sarangi F, Hsu E, Iorio C, Tibbles LA, Woodgett JR, Penninger J, Richardson CD. X protein of hepatitis B virus inhibits Fas-mediated apoptosis and is associated with up-regulation of the SAPK/JNK pathway. *J Biol Chem* 2001;276:8328-8340
 - 15 Yun C, Lee JH, Park H, Jin YM, Park S, Park K, Cho H. Chemotherapeutic drug, adriamycin, restores the function of p53 protein in hepatitis B virus X (HBx) protein-expressing liver cells. *Oncogene* 2000;19:5163-5172
 - 16 Park US, Park SK, Lee YI, Park JG, Lee YI. 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
 - 17 Su Q, Schroder CH, Otto G, Bannasch P. Overexpression of p53 protein is not directly related to hepatitis B x protein expression and is associated with neoplastic progression in hepatocellular carcinomas rather than hepatic preneoplasia. *Mutat Res* 2000;462:365-380
 - 18 Schuster R, Gerlich WH, Schaefer S. Induction of apoptosis by the transactivating domains of the hepatitis B virus X gene leads to suppression of oncogenic transformation of primary rat embryo fibroblasts. *Oncogene* 2000;19:1173-1180
 - 19 Jia L, Wang XW, Harris CC. Hepatitis B virus X protein inhibits nucleotide excision repair. *Int J Cancer* 1999;80:875-879
 - 20 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
 - 21 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 augments of liver regeneration. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:161-164
 - 22 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 protein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1379-1383
 - 23 Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Li L, Liu Y, Duan HJ. Expression of NS2 gene of hepatitis C virus from yeast two hybrid 'Bait' vector in yeast. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:129-132
 - 24 Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Mu JS, Liu Y, Duan HJ, Wang G, Li L. Mutual interaction between hepatitis C virus core protein and translin, a recombination hotspot binding protein. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:1-5
 - 25 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
 - 26 Lu YY, Li K, Liu Y, Wang L, Cheng J, Zhang LX. Cloning and expression of PreS2 gene of hepatitis B virus in yeast. *Weichangbingxue He Ganbingxue Zazhi* 2002;11:222-224
 - 27 Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486
 - 28 Zhen Z. Progress in proteomics. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2001;17:491-493
 - 29 Serebriiskii IG, Toby GG, Finley RL Jr, Golemis EA. Genomic analysis utilizing the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2001;175:415-454
 - 30 Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486
 - 31 Treichel U, Meyerzum-Buschenfelde KH, Dienes HP, Gerken G. Receptor-mediated entry of hepatitis B virus particles into liver cells. *Arch Virol* 1997;142:493-498
 - 32 De Meyer S, Gong ZJ, Suwandhi W, van Pelt J, Soumillion A, Yap SH. Organ and species specificity of hepatitis B virus (HBV) infection: a review of literature with a special reference to preferential attachment of HBV to human hepatocytes. *J Viral Hepat* 1997;4:145-153
 - 33 Fiume L, Di Stefano G, Busi C, Mattioli A, Bonino F, Torrani-Cerenzia M, Verme G, Rapicetta M, Bertini M, Gervasi GB. Liver targeting of antiviral nucleoside analogues through the asialoglycoprotein receptor. *J Viral Hepat* 1997;4:363-370

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。