

# 酵母双杂交技术筛选肝细胞中与乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 C-12 相互作用蛋白的研究

梁耀东, 陆荫英, 成军, 李强, 王琳, 吴君, 程明亮

梁耀东, 陆荫英, 成军, 李强, 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

吴君, 程明亮, 贵阳医学院第一附属医院感染科 贵州省贵阳市 550004  
梁耀东, 男, 1973-11-10 生, 广西贵港市人, 壮族, 硕士研究生, 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: 2003-06-07 接受日期: 2003-06-18

## Screening of a new gene C-12 coding for a hepatitis B virus core antigen interacting protein in hepatocytes by yeast-two hybrid technique

Yao-Dong Liang, Yin-Ying Lu, Jun Cheng, Qiang Li, Lin Wang, Jun Wu, Ming-Liang Cheng

Yao-Dong Liang, Yin-Ying Lu, Jun Cheng, Qiang Li, Lin Wang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Jun Wu, Ming-Liang Cheng, The First Affiliated Hospital, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

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

Received: 2003-06-07 Accepted: 2003-06-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the biological functions of a new gene C-12 coding for a hepatitis B virus core protein interacting protein in hepatocytes.

**METHODS:** A new gene C-12 was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and C-12 bait plasmid was constructed by using yeast-two hybrid system 3, then transformed into yeast AH109. The transformed yeast mated with yeast Y187 containing liver cDNA library plasmid in 2xYPDA 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- $\alpha$ -gal for selecting two times and screening. After extracting and sequencing of plasmid from blue colonies, we underwent analysis by bioinformatics.

**RESULTS:** Twenty-one colonies were sequenced. Among them, there colonies were metallothionein 2A, one cathepsin B, one apolipoprotein M, three cytochrome C oxidase II, one receptor protein tyrosine kinase variant EphB4v1, one KH type splicing regulatory protein, one phosphatidylinositol glycan, class Q, transcript variant 1, two ferritin, light polypeptide, one ornithine decarboxylase 1, one

coagulation factor IX, one bacterial acetolactate synthase, one calpain-like protease, one ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5, one inter-alpha (globulin) inhibitor H4 and two new genes with unknown function.

**CONCLUSION:** A new gene of C-12 interacting protein is successful cloned and the results bring some new clues for studying the biological functions of HBcAg and associated protein C-12.

Liang YD, Lu YY, Cheng J, Li Q, Wang L, Wu J, Cheng ML. Screening of a new gene C-12 coding for a hepatitis B virus core antigen interacting protein in hepatocytes by yeast-two hybrid technique. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(12):1862-1865

## 摘要

**目的:** 筛选并克隆人肝细胞中与HBcAg肝细胞结合蛋白C-12新基因相互作用蛋白的基因, 进一步探讨HBcAg结合蛋白C-12新基因的生物学功能。

**方法:** 用多聚酶链反应(PCR)法扩增C-12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- $\alpha$ -半乳糖(X- $\alpha$ -gal)上进行双重筛选阳性菌落并测序, 进行生物信息学分析。

**结果:** 成功克隆出C-12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- $\alpha$ -gal的四缺培养基上生长, 并变成蓝色的真阳性菌落21个, 其中含金属硫蛋白A2基因的菌落有3个、组织蛋白酶B基因1个、载脂蛋白M基因1个、细胞色素C氧化酶II基因3个、人类受体蛋白酪氨酸激酶变异因子基因1个、KH型剪接调控蛋白基因1个、磷脂酰肌醇脱酰酶聚糖Q转录变异因子1基因1个、铁蛋白轻链基因2个、鸟氨酸脱羧酶1基因1个、血液凝固因子IX基因1个、乙酰乳酸合酶基因1个、钙激活蛋白酶基因1个、核外三磷酸盐双磷脂酰水解酶5基因1个、血浆 $\alpha$ -球蛋白抑制因子H4基因1个和未知蛋白基因2个。

**结论:** 成功克隆出乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白C-12新基因相互作用蛋白的编码基因, 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.

梁耀东, 陆荫英, 成军, 李强, 王琳, 吴君, 程明亮. 酵母双杂交技术筛选肝细胞中与乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 C-12 相互作用蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2003;11(12):1862-1865

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1862.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)核心抗原(HBcAg)由乙型肝炎病毒的 C 基因的 C 区编码, 由 183 个氨基酸残基(aa)组成, 分子量为 21-22 kD. HBcAg 是组成核壳的主要成分, 在乙型肝炎病毒的生活周期中, 病毒核心抗原、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. 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, 他还与病毒成熟、识别包膜蛋白以及病毒向细胞外释放等过程密切相关<sup>[1-6]</sup>. 利用酵母双杂交技术, 我们寻找一种新基因, 命名为 C-12, 编码产物可以与 HBcAg 蛋白结合, 我们推测这种结合蛋白可能与 HBV RNA/DNA 之间有着某种关系. 但是这种新基因在细胞中的生物学功能目前还不清楚, 为了寻找这种 HBcAg 结合蛋白 C-12 的功能学特点, 我们再一次应用酵母双杂交技术, 筛选 C-12 蛋白与肝细胞中相互作用的蛋白, 并进一步探明具体作用机制, 对明确 HBV 致病机制, 有效防治乙型肝炎有着深远的意义<sup>[7-10]</sup>.

## 1 材料和方法

1.1 材料 pGBKT7-BD 克隆载体、pGADT7-AD 克隆载体、pGBKT7-53 对照质粒、pGBKT7-Lam 对照质粒, *Saccharomyces cerevisiae* AH109 酵母株、Y187 酵母株 (K1612-1)、预转化入酵母的对照质粒 pGBKT7-53 (AH109)、编码 DNA-BD/鼠 p53 融合蛋白、pTD1-1 (Y187)、质粒 pACT2 中编码 AD/SV40 大 T 抗原融合蛋白、以及预转化的 cDNA 肝文库(Y187)、质粒 pACT2 表达 AD/cDNA 文库融合蛋白(PT3183-1), 以上产品均购自 Clontech 公司. 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, X- $\alpha$ -半乳糖苷酶(Gal)等购自 Clontech 公司, 半硫酸腺苷、醋酸锂购自 Sigma 公司. C-12 新基因扩增引物(P1 5'-GAA TTC ATG GAC ATC GAC CCT TAT AA-3', P2 5'-GGA TCC ACA TTG AGA TTC CCG AGA T-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 Trizol RNA 提取试剂盒提取 HepG2 细胞的 RNA, 逆转录成 cDNA, 以 cDNA 为模板, 用 P1、P2 引物 PCR 扩增出 C-12 新基因的完整序列, DNA 测序正确, 经 Eco RI 和 Bam HI 酶切后与 pGBKT7 载体连接, 酶切鉴定后转化入酵母菌株 AH109, 并在四缺培养基上培养以排除其自身激活作用<sup>[11, 12]</sup>.

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-C-12 质粒的酵母 AH109 菌落 2 个 (3 mm 大小)接种于 SD/-Trp 培养基中, 30 °C 250 r/min 振荡过夜, 次日离心后用 2 × YPDA 培养液 5 ml 重悬细胞, 计数细胞数大于  $1 \times 10^{12}$ /L 时与 1 ml 的肝文库酵母细胞在 50 ml 2 × YPDA 中 30 °C 30-50 r/min 配合 24 h, 3 300 rpm 离心 10 min 后, 用 0.25 × YPDA 10 ml 重悬细胞, 分别取 250  $\mu$ 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 18 d 后挑取大于直径 3 mm 的菌落再次划线于铺有 X- $\alpha$ -gal 的 4 缺培养基上检查 X- $\alpha$ -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.

1.2.3 阳性质粒的克隆和分析 挑取真正的阳性菌落按照试剂盒提供的操作指南 Lyticase 法提取酵母质粒. 提取的质粒以复杂冰冻高效感受态方法转化大肠杆菌, 于含有氨苄青霉素的 SOB 平板培养, 所获得的菌落酶切鉴定后测序. 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 部分筛选克隆 Bgl II 酶切鉴定结果 pACT2 内含有两个 Bgl II 酶切位点, 分别位于多克隆位点两侧, 使用该内切酶消化将释放出肝细胞文库的基因片段(图 1).

表 1 诱饵与肝文库酵母菌株配合结果

筛选出的目的基因	同源性	相同克隆数
组织蛋白酶 B	99 %	1
载脂蛋白 M	98 %	1
细胞色素 C 氧化酶 II	97-99 %	3
人类受体蛋白酪氨酸激酶 EPHB4 变异因子	99 %	1
KH 型剪接调控蛋白	98 %	1
磷脂酰肌醇脱酰酶聚糖 Q 转录变异因子 1	97 %	1
铁蛋白轻链	99 %	2
鸟氨酸脱羧酶 1	99 %	1
金属硫蛋白 2A	98-100 %	3
血液凝固因子 IX	100 %	1
乙酰乳酸合酶	99 %	1
钙激活蛋白酶	98 %	1
核外三磷酸盐双磷脂酰水解酶 5	99 %	1
血浆 $\alpha$ -球蛋白抑制因子 H4	99 %	1
未知蛋白基因	100 %	2

2.2 cDNA 测序与同源性分析初步结果 配合后筛选出既能在 4 缺(SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade)培养基又能在铺有 X- $\alpha$ -gal 的 4 缺培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落 21 个克隆测序, 与 GenBank 数据库进行初步比较. 其中有 2 个克隆为新基因, 其余 19 个均与已知基

因的部分序列高度同源(97% - 100%), 详细结果见表 1.

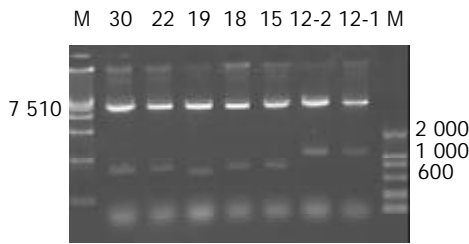


图 1 部分不同克隆的 Bgl II 酶切鉴定.

### 3 讨论

人类基因组计划(HGP)研究自从开展以来, 已经取得了举世瞩目的成就. 随着基因组测序工作的完成, 接下来就是研究基因的功能. 因为基因是通过蛋白质之间的相互作用而发挥功能的, 蛋白质之间的相互作用是很多生命现象的基础, 故基因表达的蛋白质的功能研究尤显重要. 乙型肝炎病毒是嗜肝 DNA 病毒, 可以引起慢性肝炎, 肝硬化及肝癌等, 目前全世界有 3.5 亿人感染, HBV 为了适应生存环境的变化, 特别是在宿主免疫和抗病毒药物的压力下, HBV 的 4 个基因区都可能发生突变, 有的突变改变了病毒的致病性, 或影响宿主对病毒的免疫应答、抗病毒药物的疗效和乙肝疫苗的免疫效果, 治疗及预防效果均不佳, 且预后极差. 乙肝病毒严重危害着人类的健康, HBcAg 与肝细胞蛋白的相互作用是 HBV 病毒在装配、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<sup>[13-17]</sup>.

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一种新的遗传学方法. 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 的结合域(BD)和激活域(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. 我们选用的是 Clontech 公司的酵母双杂交系统 -3, 其在下游有 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- $\alpha$ -gal 并缺乏上述 4 种氨基酸营养的培养板上生长并呈现出蓝色. 该系统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概率大大降低, 筛选结果的真阳性率可达 95%<sup>[18-22]</sup>.

我们在真核表达载体 pGBKT7 中构建 pGBKT7-C-12 蛋白基因诱饵质粒并在酵母菌株 AH109 中表达了 C-12 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 14 种. 其中, 金属硫蛋白(Metallothionein, MT)是 1957 年 Margoshes 和 Vallee 从动物器官分离出的一种蛋白质, 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(镉、汞和铝)和抗辐射(包括紫外线)、消除自由基、修复受损组织等功能, 他还能生物体提供多种微量元素(如锌、铜、钴等)<sup>[23, 24]</sup>. 本室曾利用该技术发现 HBcAg 能与其结合, 本次实验, 再次予以证实; 其能与细胞色素 C 氧化酶、组织蛋白酶 B、乙酰乳酸合酶等多种蛋白酶结合, 支持 HBcAg 通过肝细胞线粒体介导 HBV 的复制和装配; 其还能与 KH 型剪接调控蛋白(KSRP)相结合, KSRP 可能是调控增强子序列外显子剪切的因子, 进一步证实了 HBcAg 在病毒复制过程中起着相当关键的作用<sup>[25, 26]</sup>.

本次实验, 让我们更感兴趣的是 C-12 新基因所编码的蛋白能与铁蛋白相结合, 铁蛋白是由去铁蛋白和铁核心构成, 主要经肝脏合成, 其铁核心部分具有强大的结合铁和贮备铁的能力. 有资料表明, 在应用  $\alpha$ -干扰素( $\alpha$ -IFN)抗乙型肝炎病毒的过程中, 体内血清铁蛋白水平与 IFN 的应答有关, 当铁蛋白水平增高时, IFN 的应答降低, 当血清铁蛋白在 300 ng ml<sup>-1</sup> 时, IFN 有 93% 不能应答<sup>[27]</sup>. 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, 增加患者对干扰素的应答水平, 具体机制还不清楚, 可能与患者血清铁蛋白及肝脏贮备铁浓度的变化引起肝脏游离铁池减少有关<sup>[28]</sup>. 在乙型肝炎患者中, 过量铁的摄入可以加重乙型肝炎病毒对肝细胞的损伤, 同时与肝细胞癌(HCC)的发生也有关系<sup>[29-31]</sup>. 有文献报道, 在乙型肝炎患者肝脏活组织检查中曾发现肝细胞有血铁质和铁蛋白沉着<sup>[32]</sup>, 在很多年前就有的这些关于铁蛋白与 HBV 病毒致病有关的文献报道, 一直缺乏相对确实的依据. 我室曾通过改进的酵母双杂交技术发现 HBeAg 能与铁蛋白结合, 今天, 我们再次利用该技术证实了铁蛋白确能跟 HBV 所编码的蛋白在体内相结合, C-12 新基因所编码的蛋白可能起着桥梁作用. 这些发现, 为临床上治疗乙肝的同时, 降低铁的摄入这一方法提供了某种理论依据. C-12 新基因的功能值得我们进一步研究.

### 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, 1997:18-168
- 2 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
- 3 Le 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 secretion. *J Virol* 2002;76:6510-6517
- 4 Daub H, Blencke S, Habenberger P, Kurtenbach A, Dennenmoser J, Wissing J, Ullrich A, Cotten M. Identification of SRPK1 and SRPK2 as the major cellular protein kinases phosphorylating hepatitis B virus core protein. *J Virol* 2002;76:8124-8137
- 5 Duclos-Vallee JC, Capel F, Mabit H, Petit MA. Phosphorylation of the hepatitis B virus core protein by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein kinase activity. *J Gen Virol* 1998;79(Pt 7):1665-1670
- 6 Kau JH, Ting LP. Phosphorylation of the core protein of hepatitis B virus by a 46-kilodalton serine kinase. *J Virol* 1998;72:3796-3803

- 7 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
- 8 Wang L, Li K, Cheng J, Lu YY, Wang G, Liu Y, Zhong YW, 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
- 9 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
- 10 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
- 11 Lu YY, Wang L, Cheng J, Li K, Lu Y, Zhang LX. Screening of HBcAg antigen interacting proteins in hepatocytes with yeast-two hybrid technique. *Shijie Huanren Xiaohua Zazhi* 2003;11:426-429
- 12 Lu YY, Wang L, Li K, Liu Y, Cheng J, Zhang LX. Screening and cloning of gene antigen HBcAg interacting proteins in hepatocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:422-425
- 13 Zhuang L, You J, Tang BZ, Ding SY, Yan KH, Peng D, Zhang YM, Zhang L. Preliminary results of thymosin- $\alpha$ 1 versus interferon- $\alpha$ -treatment in patients with HBeAg negative and serum HBV DNA positive chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2001;7:407-410
- 14 He XS, Huang JF, Chen GH, Fu Q, Zhu XF, Lu MQ, Wang GD, Guan XD. Orthotopic liver transplantation for fulminant hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2000;6:398-399
- 15 Wang Y, Liu H, Zhou Q, Li X. Analysis of point mutation in site 1896 of HBV precore and its detection in the tissues and serum of HCC patients. *World J Gastroenterol* 2000;6:395-397
- 16 Qin LL, Su JJ, Li Y, Yang C, Ban KC, Yian RQ. Expression of IGF- II, p53, p21 and HBxAg in precancerous events of hepatocarcinogenesis induced by AFB1 and/or HBV in tree shrews. *World J Gastroenterol* 2000;6:138-139
- 17 Cheng ML, Wu YY, Huang KF, Luo TY, Ding YS, Lu YY, Liu RC, Wu J. Clinical study on the treatment of liver fibrosis due to hepatitis B by IFN- $\alpha$ (1) and traditional medicine preparation. *World J Gastroenterol* 1999;5:267-269
- 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, Ghosn 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. 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 Okazaki Y, Namikawa K, Minami T. Studies of metals and metallothionein in tissue. *Yakugaku Zasshi* 2000;120:282-289
- 24 Smolarek C, Stremmel W. Therapy of Wilson disease. *Z Gastroenterol* 1999;37:293-300
- 25 Min H, Turck CW, Nikolic JM, Black DL. A new regulatory protein, KSRP, mediates exon inclusion through an intronic splicing enhancer. *Genes Dev* 1997;11:1023-1036
- 26 Ring HZ, Vameghi-Meyers V, Nikolic JM, Min H, Black DL, Francke U. Mapping of the KHSRP gene to a region of conserved synteny on human chromosome19p13.3 and mouse chromosome 17. *Genomics* 1999;56:350-352
- 27 Bayraktar Y, Koseoglu T, Temizer A, Kayhan B, Van Thiel DH, Uzunalimoglu B. Relationship between the serum alanine aminotransferase level at the end of interferon treatment and histologic changes in wild-type and precore mutant hepatitis B virus infections. *J Viral Hepat* 1996;3:137-142
- 28 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. *Hepatogastroenterology* 1998;45:2322-2327
- 29 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
- 30 Mandishona E, MacPhail AP, Gordeuk VR, Kedda MA, Pater-son AC, Rouault TA, Kew MC. Dietary iron overload as a risk factor for hepatocellular carcinoma in Black Africans. *Hepatology* 1998;27:1563-1566
- 31 Piperno A, Fargion S, D'Alba R, Roffi L, Fracanzani AL, Vecchi L, Failla M, Fiorelli G. Liver damage in Italian patients with hereditary hemochromatosis is highly influenced by hepatitis B and C virus infection. *J Hepatol* 1992;16:364-368
- 32 Dimitrijevic J, Bojanic N, Skaro-Milic A, Mijuskovic P, Ilic S, Nozic D. Morphologic characteristics of HBV markers and products of iron metabolism in liver tissue in patients with hepatitis B virus. *Vojnosanit Pregl* 1992;49:477-483