

应用抑制性消减杂交技术克隆NS5A-TP2(615)反式激活基因

杨倩, 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 董菁, 张树林

杨倩, 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 董菁, 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
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
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: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-02-14 接受日期: 2004-10-18

摘要

目的: 应用抑制性消减杂交技术构建人类新基因 NS5ATP2 (615) 反式激活基因差异表达的 cDNA 消减文库, 克隆 NS5ATP2 反式激活相关基因, 了解该基因的可能生物学功能。

方法: 构建 NS5ATP2 表达质粒 pcDNA3.1(-)NS5ATP2-TP2 转染 HepG2 细胞, 以空载体 pcDNA3.1(-) 转染的 HepG2 细胞为对照; 提取转染后细胞的 mRNA, 反转录为 cDNA。半定量 RT-PCR 显示实验组 NS5ATP2 的转录水平明显高于对照组。cDNA 经 *Rsa*I 酶切后, 将实验组 cDNA 分成两组, 分别与两种不同的接头衔接, 再与对照组 cDNA 进行两次消减杂交及两次抑制多聚酶链反应 (PCR), 将产物与 pEGM-Teasy 载体连接, 构建 cDNA 消减文库, 并转染大肠杆菌进行文库扩增, 随机挑选克隆 PCR 扩增后进行测序及同源性分析。

结果: 成功构建人类新基因 NS5ATP2 反式激活基因差异表达的 cDNA 消减文库。文库扩增后得到 76 个白色克隆, 进行菌落 PCR 分析, 均得到 200-1000 bp 插入片段。挑取含有插入片段的 32 个克隆进行测序, 并通过生物信息学分析获得 17 种已知功能基因序列, 和 2 个未知功能基因。

结论: 应用 SSH 技术成功构建了 NS5ATP2 反式激活基因差异表达的 cDNA 消减文库。该文库的建立为阐明 NS5ATP2 生物学功能提供理论依据。

杨倩, 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 董菁, 张树林. 应用抑制性消减杂交技术克隆 NS5A-TP2(615) 反式激活基因. 世界华人消化杂志 2005;13(1):82-85
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/82.asp>

0 引言

HCV NS5A 对细胞周期及细胞生长具有调节作用, 可能与慢性肝炎、肝细胞癌的发生发展有着密切的关系^[1-3]。我室对 NS5A 反式激活基因进行克隆化研究, 发现了 NS5A 蛋白的上调一些基因的表达。其中包括未知功能基因, 命名为 NS5ATP2^[4]。利用生物信息学技术确定其开放读码框架 (ORF), 并对其进行了克隆化研究, 在克隆化研究过程中我们不仅顺利得到了 NS5ATP2 基因编码序列, 同时意外得到了 NS5ATP2 的不同剪接体, 将其命名为 NS5ATP2

(512)。为探究新基因的功能提供新的依据^[5]。为了解其细胞内功能, 我们利用抑制性消减杂交技术构建 NS5ATP2 作用于肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞后反式调节的 cDNA 消减文库, 筛选差异表达的基因片段, 并应用生物信息学进行分析, 为了解 NS5ATP2 的功能、进一步探讨 HCV 发病及致癌机制提供新的研究方向。

1 材料与方法

1.1 材料 肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞及大肠杆菌 DH5 α (本室保存), pcDNA3.1(-) 真核表达载体 (Invitrogen), FuGENE6 转染试剂 (Roche), QuikPreP micro mRNA Purification 试剂盒, PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒 (Clontech), 50 \times PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒 (Clontech), High Pure PCR Product Purification 试剂盒 (Promega), pGEM-Teasy 载体 (Promega) T7、SP6 通用引物 (上海博亚公司合成)。真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-NS5ATP2 (615) 由本室构建。DNA 序列测定由上海申友公司完成。

1.2 方法 (1) 半定量 RT-PCR 检测 pcDNA3.1(-)-NS5ATP2 (615) 转录水平: 根据 NS5A TP2 (615) 的 ORF 设计上下游引物, 上游引物 5' -GGA TTC ATG GCT TCG GTC TCC TCT GC-3' 下游引物 5' -GGT ACC TCA GGA GTG TGG CTC ACT GG-3' 以看家基因 β -actin 为内参。将经分光光度计定量分析的 mRNA 分别稀释为 0.5 μ g/L, 各取 0.5 μ L 进行反转录, 以反转录产物为模板, 进行 PCR。(2) 真核表达载体的细胞转染及 mRNA 提取: 用 FuGENE6 转染试剂将 2 μ g pcDNA3.1(-)-NS5A TP2 (615) 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 QuikPreP micro mRNA Purification 试剂盒从 HepG2 细胞中直接提取重组表达质粒及空载体的 HepG2 细胞的 mRNA, 经分光光度计分别进行定量分析。(3) 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: 以转染了重组表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA 为模板逆转录合成双链 cDNA (dscDNA), 并分别标记为 Tester 和 Driver, dscDNA 经 *Rsa*I (一种识别 4 碱基序列的内切酶) 消化, 产生相对较短的平端片段, 纯化酶切产物。将 Tester 的 dscDNA 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 dscDNA 进行杂交; 合并两种杂交产物后再与 Driver dscDNA 作第 2 次杂交; 然后将杂交产物做选择性 PCR 扩增, 使 Tester dscDNA 中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增。(4) 消减文库扩增及克隆分析: 扩增产物与 pGEM-Teasy 载

体连接, 转化DH5 α 感受态细菌, 在含氨苄青霉素的LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37 $^{\circ}$ C培养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, 证明含有插入片段后(200-1 000 bp), 测序. 应用生物信息学将测得序列与 GenBank 数据库进行在线同源性分析(www.ncbi.nlm.gov/blast/blast.cgi).

2 结果

2.1 mRNA 的定性、定量分析 紫外分光检测显示, 转染了真核表达质粒及空载体的 HepG2 细胞提取 mRNA 分别为 2.1 μ g 和 3.3 μ g, $A_{260}/A_{280}=1.79$. 2.0 g/L 琼脂糖凝胶电泳 mRNA 为大于 0.5 kb 清晰慧尾片状条带, 证实 mRNA 质量完全满足进行消减杂交的要求.

2.2 NS5A TP2(615) 转录水平检测 半定量 RT-PCR 产物 9 g/L 琼脂糖凝胶电泳显示: 转染了质粒 pcDNA3.1(-)-NS5A TP2(615) 的细胞中 NS5A TP2(615) 转录水平明显高于转染空载体的细胞, 以空载体 mRNA 为模板的 RT-PCR 产物凝胶电泳图中可以看见 NS5A TP2(615) 的可变见解体 NS5A TP2(512) 的表达(图 1).

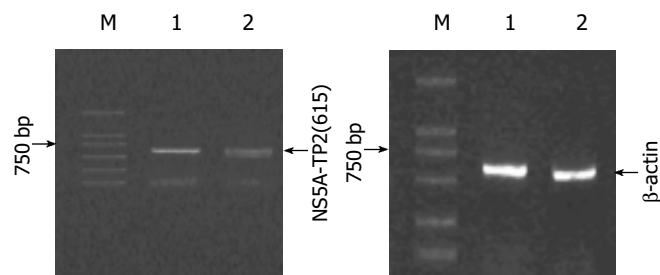


图1 NS5A TP2(615)转录水平检测. 1: RT-PCR 模板 mRNA 来自于转染质粒 pcDNA3.1(-)-NS5A TP2(615); 2: RT-PCR 模板 mRNA 来自于转染空载体 pcDNA3.1(-); M: Marker.

2.3 cDNA 消减文库消减效率的鉴定 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 μ L 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 2).

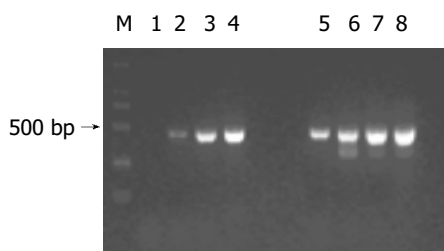


图2 消减效率分析结果. 1-4: 未消减组, 5-8: 消减组, 循环次数分别为 18、23、28、33.

2.4 差异表达 cDNA 片段的扩增及克隆 杂交产物经两轮 PCR 扩增后, 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 76 个克隆中几乎均含有插

入片段, 这些条带可能代表差异表达的基因片段(图 5).

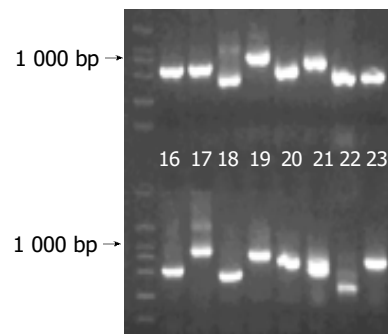


图3 部分克隆(NS5ATP(615))菌落 PCR 鉴定电泳图.

2.5 cDNA 测序与同源性分析结果 挑选 30 个克隆测序, 与 GenBank 数据库进行初步比较. 其中 17 个克隆均与已知基因的部分序列高度同源(96-100%), 2 个克隆未发现与已知功能基因高度同源, 部分结果(表 1).

表1 部分阳性克隆与 GenBank 已知功能基因同源序列比较结果

已知功能基因	克隆数	同源性
纤连蛋白(fibronectin)	2	99%
脂肪酰辅酶 A 连接酶(fatty-acid-Coenzyme A ligase)	1	98%
过量表达的胸壁肿瘤蛋白(over-expressed breast tumor protein, OBTP)	3	98%
NADH 脱氢酶(NADH dehydrogenase)	2	98%
脱氢酶 dihydrodiol dehydrogenase	1	99%
肺癌癌基因(lung cancer oncogene 1)	1	97%
真核翻译延伸因子 1(eukaryotic translation elongation factor 1)	2	99%
核糖体蛋白 L27(ribosomal protein L27)	2	100%
核糖体蛋白 S6(ribosomal protein S6)	1	99%

3 讨论

丙型肝炎病毒的 NS5A 蛋白是一种具有广泛反式激活作用的蛋白质分子, 其羧基末端富含酸性氨基酸及脯氨酸, 这是真核细胞转录因子特有的结构特征. 一般来说, 转录的反式激活因子是在细胞核中起作用的, 而 NS5A 主要定位于细胞内质网(ER), 因此推测 NS5A 可能参与了细胞信号传导途径^[6]. NS5A 的生物学作用还包括对细胞周期及细胞生长的调节^[7-10]. 我室利用抑制性消减杂交技术^[11], 对于 NS5A 表达载体转染的肝母细胞瘤细胞系 HepG2 的基因表达谱变化进行比较研究, 发现了 NS5A 蛋白可以反式激活一些基因的表达. 其中包括未知功能基因, 命名为 NS5ATP 2. 我们对其进行了克隆化研究, 成功获得了 NS5ATP2 的编码序列, 其开放读码框架 ORF 区为 615 个核苷酸, 编码 205 个氨基酸, 其氨基酸序列 “masvssatfsghgarsllqflrlvgqlkrvprtgvvyrnvrpessvshmyrmavmamvikddrlnkdcvrlalvhdmaecivgdiapareeamkqitdnipkeekhrqllpedlrkelyelweeyetqssaakfvkldqcemilqaseyedlehkpgrlqdfdstagkfnhpeivqlvseleerstniaaaasephs”.

在此过程中我们意外发现了 NS5A ATP2 基因的不同剪切体, 对 NS5A ATP2 基因组进行分析, 确定了该基因剪切体的编码序列, 并进行了克隆化研究. 并将其命名为 NS5A ATP2 (512), 其 ORF 为 216 个核苷酸, 编码 72 个氨基酸. 为进一步对新基因功能进行研究我们建立了 NS5A ATP2 抑制性消减杂交文库, 对反式激活哪些基因进行了克隆化研究. 挑选文库中 30 个克隆送测序进行鉴定, 结果发现 NS5A ATP2 可上调一些与细胞代谢、肿瘤发生、肝纤维化有关的基因. 例如: 过量表达的胸壁肿瘤蛋白, 虽然该基因的功能并不明确, 但研究表明在胸壁肿瘤组织中该基因表达明显升高^[12]; 肺癌癌基因 1 亦与肿瘤的发生密切相关^[13]. 纤连蛋白在肝纤维化、肝硬化的发生发展中起着重要的作用^[14-17], NS5A ATP2 上调该基因的表达是否与丙型肝炎肝硬化有关有待进一步研究. 在筛选的文库基因中还发现与肝细胞胆汁代谢有关的脂肪酸辅酶 A, 研究表明脂肪酸辅酶 A 与类固醇激素代谢有关^[18-19].

在对 NS5A ATP2 研究的同时我们运用同样的方法对其可变剪接体 NS5A ATP2 (512) 的功能进行了研究. 与 NS5A ATP2 (512) 抑制性消减文库结果相比, 我们发现二者均可上调一些与肿瘤发生相关的基因. 人类基因组可能有约 35 000 个基因, 生物的复杂性与其基因组基因数量似乎存在明显差异. 原因在蛋白质组. 基因重排, RNA 编辑, 和可变剪接等机制可以从一个基因产生多种蛋白, 从而使蛋白质组中蛋白质的数量超过基因组中基因的数量^[20-22]. 其中, 从影响的基因数量和生物种类范围来看, 可变剪接是扩大蛋白质多样性的最重要的机制. 单独一个基因通过可变剪接产生的十几种剪接异构体的现象很常见^[23-25]. 有些基因甚至能够产生成千上万种剪接异构体一个基因通过可变剪接产生多个转录异构体, 各个不同的转录异构体编码结构和功能不同的蛋白质, 他们分别在细胞/个体分化发育不同阶段, 在不同的组织, 有各自特异的表达和功能^[26-27]. 因此, 可变剪接是一种在转录后 RNA 水平调控基因表达的重要机制. 我们利用抑制性消减杂交技术对 NS5A ATP2 和其可变剪接体 NS5A ATP2 (512) 功能学进行了初步研究, 两者功能上到底是相互依赖还是相互抑制有待进一步探索.

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 Girard S, Vossman E, Misek DE, Podevin P, Hanash S, Brechot C, Beretta L. Hepatitis C virus NS5A-regulated gene expression and signaling revealed via microarray and comparative promoter analyses. *Hepatology* 2004;40:708-718
- 3 Franco S, Gimenez-Barcons M, Puig-Basagoiti F, Furcic I, Sanchez-Tapias JM, Rodes J, Saiz JC. Characterization and evolution of NS5A quasispecies of hepatitis C virus genotype 1b in patients with different stages of liver disease. *J Med Virol* 2003;71:195-204
- 4 刘妍, 陆荫英, 成军, 王建军, 李莉, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因的克隆化研究. 解放军医学杂志 2003;28:40-43
- 5 杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 王春花, 纪冬, 党晓燕. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因 2 基因组 DNA 结构分析及其不

- 6 同剪切体的克隆化研究. 世界华人消化杂志 2004;12:801-804
- Street A, Macdonald A, Crowder K, Harris M. The Hepatitis C virus NS5A protein activates a phosphoinositide 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem* 2004;279:12232-12241
- 7 Sarcar B, Ghosh AK, Steele R, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A mediated STAT3 activation requires co-operation of Jak1 kinase. *Virology* 2004;322:51-60
- 8 Macdonald A, Crowder K, Street A, McCormick C, Harris M. The hepatitis C virus NS5A protein binds to members of the Src family of tyrosine kinases and regulates kinase activity. *J Gen Virol* 2004;85(Pt 3):721-729
- 9 Qadri I, Iwahashi M, Simon F. Hepatitis C virus NS5A protein binds TBP and p53, inhibiting their DNA binding and p53 interactions with TBP and ERCC3. *Biochim Biophys Acta* 2002;1592:193-204
- 10 Goh PY, Tan YJ, Lim SP, Lim SG, Tan YH, Hong WJ. The hepatitis C virus core protein interacts with NS5A and activates its caspase-mediated proteolytic cleavage. *Virology* 2001;290:224-236
- 11 Ji W, Wright MB, Cai L, Flament A, Lindpaintner K. Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes. *BMC Genomics* 2002;3:12
- 12 Wu I, Moses MA. Cloning of a cDNA encoding an isoform of human protein phosphatase inhibitor 2 from vascularized breast tumor. *DNA Seq* 2001;11:515-518
- 13 Weber HC, Walters J, Leyton J, Casibang M, Purdom S, Jensen RT, Coy DH, Ellis C, Clark G, Moody TW. A bombesin receptor subtype-3 peptide increases nuclear oncogene expression in a MEK-1 dependent manner in human lung cancer cells. *Eur J Pharmacol* 2001;412:13-20
- 14 Schlaf G, Schmitz M, Heine I, Demberg T, Schieferdecker HL, Gotze O. Upregulation of fibronectin but not of entactin, collagen IV and smooth muscle actin by anaphylatoxin C5a in rat hepatic stellate cells. *Histol Histopathol* 2004;19:1165-1174
- 15 Astrof S, Crowley D, George EL, Fukuda T, Sekiguchi K, Hanahan D, Hynes RO. Direct test of potential roles of EIIIA and EIIIB alternatively spliced segments of fibronectin in physiological and tumor angiogenesis. *Mol Cell Biol* 2004;24:8662-8670
- 16 Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Di Sario A, Saccomanno S, Bendia E, Benedetti A, Greenwel P. Intracellular signaling pathways involved in acetaldehyde-induced collagen and fibronectin gene expression in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2001;33:1130-1140
- 17 Kato R, Kamiya S, Ueki M, Yajima H, Ishii T, Nakamura H, Katayama T, Fukai F. The fibronectin-derived antiadhesive peptides suppress the myofibroblastic conversion of rat hepatic stellate cells. *Exp Cell Res* 2001;265:54-63
- 18 Sung YK, Hwang SY, Park MK, Farooq M, Han IS, Bae HI, Kim JC, Kim M. Glypican-3 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2003;94:259-262
- 19 Richardson AJ, Easton T, Puri BK. Red cell and plasma fatty acid changes accompanying symptom remission in a patient with schizophrenia treated with eicosapentaenoic acid. *Eur Neuropsychopharmacol* 2000;10:189-193
- 20 Zolfaghari R, Ross AC. Cloning, gene organization and identification of an alternative splicing process in lecithin:retinol acyltransferase cDNA from human liver. *Gene* 2004;341:181-188
- 21 Ghosh A, Stewart D, Matlashewski G. Regulation of human p53 activity and cell localization by alternative splicing. *Mol Cell Biol* 2004;24:7987-7997
- 22 Akgul C, Moulding DA, Edwards SW. Alternative splicing of Bcl-2-related genes: functional consequences and potential therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:2189-2199
- 23 Ellington WR, Yamashita D, Suzuki T. Alternative splicing produces transcripts coding for alpha and beta chains of a hetero-dimeric phosphagen kinase. *Gene* 2004;334:167-174
- 24 Resch A, Xing Y, Modrek B, Gorlick M, Riley R, Lee C. Assess-

- ing the impact of alternative splicing on domain interactions in the human proteome. *J Proteome Res* 2004;3:76-83
- 25 Wagner EJ, Baines A, Albrecht T, Brazas RM, Garcia-Blanco MA. Imaging alternative splicing in living cells. *Methods Mol Biol* 2004;257:29-46
- 26 Sorek R, Shamir R, Ast G. How prevalent is functional alternative splicing in the human genome? *Trends Genet* 2004;20:68-71
- 27 Black DL. Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology. *Cell* 2000;103:367-370

编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

· 研究快报 ·

慢性HBV感染肝炎突发患者外周血病毒抗原表位肽特异性CTL的数量研究

王 洪, 周吉军, 夏 杰, 王宇明

王洪, 周吉军, 夏杰, 王宇明, 中国人民解放军第三军医大学附属西南医院感染病分院 重庆市 400038
 国家自然科学基金资助项目, No.30200242
 项目负责人: 周吉军, 400038, 重庆市高滩岩, 中国人民解放军第三军医大学附属西南医院感染病分院. zjcrk@mail.tmmu.edu.cn
 电话: 023-68754475
 收稿日期: 2004-07-31 接受日期: 2004-09-25

摘要

目的: 了解慢性乙肝患者肝炎突发时抗原特异性 CTL 反应水平。

方法: 用四个 HBV 抗原表位肽四聚体(HBcAg18-27, HBsAg183-191, HBeAg335-343, 多聚酶P的575-583)对外周血中抗原特异性 CTL 进行检测, 分析健康献血员和慢性乙型肝炎患者病毒抗原表位肽特异性 CTL 的出现频率。

结果: 6例 HLA-A2 阳性献血员, 6例 HLA-A2 阴性的 HBV 感染患者, 抗原表位肽特异性四聚体阳性细胞占 CD8 细胞的最高百分比为 0.02%, 以 0.02% 为四聚体检测阈值。29 例 HLA-A2 阳性慢性 HBV 感染患者, 其中 27 例外周血四聚体细胞阳性, 检出率 93.1%。肝功能 ALT 在正常上限 5-10 倍者四聚体阳性细胞比例描写高于其他组($P < 0.05$)。

结论: HLA- 表位肽四聚体技术直接检测外周血中抗原特异性 CTL 具有特异性高, 敏感性强的特点。大部分慢性 HBV 感染患者体内仍存在抗原特异性的 CD8 细胞, 而且肝炎突发时抗原特异性细胞数量增加。

王洪, 周吉军, 夏杰, 王宇明. 慢性 HBV 感染肝炎突发患者外周血病毒抗原表位肽特异性 CTL 的数量研究. 世界华人消化杂志 2005;13(1):85-88
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/85.asp>

0 引言

HBV 是非直接致细胞病变病毒, 机体免疫反应是感染发病的主要原因。细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)和 Th 细胞, 特别是 CTL 不仅在清除病毒, 而且在肝组织损伤中起主要作用^[1-2], 并且认为 CTL 以直接溶解感染肝细胞的方式造成肝损伤。慢性乙型肝炎的自然发展过程

是肝炎突发(hepatitis flares)和消退(remissions)反复交替、发展的过程。肝炎突发常指在慢性 HBV 感染过程中病情稳定或基本稳定一段时间后再次发作, 肝转氨酶的波动, 当 ALT 升高超过正常上限 3 倍以上时, 定义为肝炎突发(hepatic flares or acute exacerbation)^[3]。肝炎突发根据肝功能 ALT 水平分为轻、中、重三型, 其 ALT 水平分别是正常上限的 3-5 倍、5-10 倍、大于 10 倍。肝炎突发不仅仅是 ALT 的波动, 而且常伴有血清 HBV DNA 的波动和 HBeAg 血清学转换(HBeAg → 抗-HBe)^[4]并且可能获得控制病毒的效果。大量临床资料显示, 肝炎突发患者抗病毒治疗效果好于静止期慢性乙型肝炎患者^[5-6], 提示肝炎突发时机体免疫反应可能增强。有研究认为肝炎突发可能是受 HLA- I 限制的针对 HBV 抗原的 CTL 作用的结果, 免疫反应是肝炎突发的主要原因^[7]。研究肝炎突发时抗原特异性 CTL 数量和功能的变化, 不仅有利于阐明肝炎突发的免疫发病机制, 而且还可以指导临床抗病毒治疗。我们采用了 MHC- I 限制的 HLA-A2 病毒抗原表位的四聚体, 建立了体外直接检测抗原表位特异性 CTL 的方法, 并用该方法研究肝炎突发患者抗原特异性 CTL 出现频数。现过程总结如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病例 65 例慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)感染患者来源于我科住院和门诊部, 其中男性 50 例, 女 15 例, 男女比 3.3 : 1, 年龄 18-50 岁平均年龄 27.4 岁。经检测 HBsAg 阳性, HBcAg-IgG 阳性, 或者 HBV DNA 阳性, 诊断标准参照 2000 年第十次全国传染病和寄生虫学会和肝病分会联合修订的病毒性肝炎防治方案。经检测 HLA-A2 阳性 29 例为实验研究组;另随意挑选 6 例 HLA-A2 阴性慢性乙型肝炎患者为对照组。实验研究组按 ALT 水平将慢性 HBV 感染患者分为静止组 9 例(ALT < 40 U/L, 正常上限 upper limit of normal, ULN, 肝炎突发组 11 例(ALT 200-400 U/L, 5-10×ULN), 重型突发组 9 例