

· 论 著 ·

乙肝病毒 X 蛋白 HLA-A0201 限制性 CTL 表位的筛选与鉴定

朱 焱, 李 卡, 郭瀛军, 孙树汉* (第二军医大学基础部医学遗传学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:**应用 T2 细胞结合实验以及亲和力稳定性实验鉴定由网络表位预测服务和通用原则预测得到的乙肝病毒 X 蛋白(HBx)来源的 HLA-A0201 限制性 CTL 表位。**方法:**选择中国人群最常见的 B、C 基因型中的 adw、adr 血清型的乙肝病毒 X 基因序列,通过网络在线表位筛选服务,分析得到共同并且得分较高的表位,并根据超基序、延展基序及量化基序方案等通用表位筛选原则进行进一步的筛选,得到 4 条较为理想的九肽(HBx1, HBx2, HBx3, HBx4)作为候选表位。随后借助于流式细胞技术,通过 T2 细胞实验分析各候选肽以及阳性、阴性、空白对照的荧光系数,从而对所筛选的表位进行体外鉴定。**结果:**获得的 4 个候选表位(HBx1: VLCLRPVGA, HBx2: CLFKDWEEL, HBx3: VLHKRTLGL, HBx4: HLSLRGLPV)中 HBx2 的亲和力较高,HBx2 和 HBx4 的稳定性较好。**结论:**CLFKDWEEL 是一种乙肝病毒 X 蛋白潜在的 HLA-A0201 限制性 CTL 表位,下一步可通过体内试验对其免疫原性作一步的验证。

[关键词] 肝炎病毒,乙型;HLA-A0201;HBx;表位;筛选;鉴定;T 淋巴细胞,细胞毒性;流式细胞术

[中图分类号] R 373.21 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)11-1169-06

Screening and identification of HLA-A0201 restricted CTL epitope from hepatitis B virus X protein *in vitro*

ZHU Yan, LI Ka, GUO Ying-jun, SUN Shu-han* (Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To identify the HLA-A0201 restricted CTL epitopes derived from hepatitis B virus X protein predicted by computer program and general principles *in vitro*. **Methods:** HBx gene sequences of Hepatitis B virus genotypes B/C and serotypes adw/adr, with the highest frequencies in Chinese, were computed and analyzed by screening service offered by Internet combined with peptide supermotif, extended motif and quantitative motif prediction. Four most ideal nine-peptides (HBx1, HBx2, HBx3, and HBx4) were selected as candidate peptides. Using flow cytometry, the fluorescence index of both control and experimental groups were detected and the 4 nine-peptides were evaluated with T2 binding assay and DC₅₀ assay. **Results:** The nine-peptides VLCLRPVGA (HBx1), CLFKDWEEL (HBx2), VLHKRTLGL (HBx3) and HLSLRGLPV (HBx4) were selected as candidate targets. Among the 4 candidate peptides, HBx2 showed higher HLA-A0201 affinity and HBx2, HBx4 showed better stability. **Conclusion:** Our study indicates that CLFKDWEEL might be a potential HLA-A0201 restricted CTL epitope from hepatitis B virus X protein; further study is needed for verification of its immunity *in vivo*.

[KEY WORDS] hepatitis B virus; HLA-A0201; HBx; epitope; screening; identification; T-lymphocytes, cytotoxic; flow cytometry

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(11):1169-1174]

病毒性肝炎是我国的常见病和多发病,据卫生部公布的 2005 年度传染病疫情信息显示,我国乙型肝炎患者人数列所有传染病第二位,仅次于肺结核。乙型肝炎病毒的慢性感染是导致肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的主要危险因素之一^[1]。乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)基因组的负链核酸序列上有四个开放阅读框,HBx 是其中最小的一个,由 154 个氨基酸构成,相对分子质量约为 17 500^[2]。最新的一些研究表明 HBx 编码的 X 蛋白是一种多功能蛋白,为病毒基因组转录所必需,它可以影响病毒的复制、DNA 修复、细胞生长以及凋亡等^[3]。HBx 在乙肝以及由乙肝所引起的肝硬化、肝癌的肝组织中较其他亚基具有更高的表达率^[4]。因此对 HBx 进行更加深入的研究具有极其重要的理论和临床意义。

细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)是免疫系统中细胞免疫应答的核心成分,通过 T 细胞受体与带有外源蛋白片段 MHC-I 类分子互相作用溶解、杀伤靶细胞。其中与 MHC-I 类分子结合的外源蛋白片段(抗原肽)即 CTL 表位,在 CTL 的活化过程中扮演关键角色,决定了 CTL 的特异性杀伤效应,从而在机体免疫中发挥着重要的作用^[5]。表位是抗原中能被免疫细胞特异性识别的线性片段或空间构象性结构,是引起免疫应答和免疫反应的基本单位,抗原表位的选择是关系

[基金项目] 国家自然科学基金重大研究计划项目(30530660)。Supported by Major Research Plan of National of Natural Science Foundation of China (30530660)。

[作者简介] 朱 焱,硕士生。

* Corresponding author. E-mail: shsun@vip. sina. com

到能否获得特异性抗体的关键^[6]。由于 HBx 表位可以被 HLA-A2、HLA-A3、HLA-A24 等不同的 MHC-I 类分子所递呈,我国 HLA-A2 阳性人群高达 50%^[7],因此研究 HLA-A0201 限制性的表位更具有现实意义。

尽管目前已经有研究者根据筛选原则提出了一些潜在可能的 HLA-A0201 限制性的 HBx 表位,但是很多研究发现预测结合不等于真正结合,并且结合也不等于真正具有免疫原性^[8],因此有必要通过体内、体外实验对这些表位的结合能力、免疫原性进行进一步的鉴定。T2 细胞是检测抗原多肽与 HLA-A0201 分子结合力的工具细胞之一,它表面空载的 HLA-A0201 分子表达极不稳定,但当外源抗原肽与之结合后 HLA-A0201 表达的稳定性得到提高,因此 HLA-A0201 表达量的高低就能够直接反映目的抗原肽与 HLA-A0201 结合能力的强弱^[9]。

本研究旨在借助于一些成熟的研究、分析手段,选择中国人最常见 HBV/B 基因型中的 adw 血清型和 HBV/C 基因型中的 adr 血清型序列,筛选得到 HBx 的 HLA-A0201 限制性 CTL 表位,并对其进行鉴定。

1 材料和方法

1.1 细胞株、主要仪器及试剂 人 TAP-缺陷型细胞株 T2 购自 ATCC(Manassas, VA, USA)。流式细胞仪为 FACSCalibur(BD PharmingenTM, USA),数据采集与分析使用软件 CellQuest Pro、FITC 标记的小鼠抗人 HLA-A0201 单克隆抗体 BB7.2(BD PharmingenTM, USA); β 2 微球蛋白(Sigma);胞外布雷菲德菌素(Brefeldin-A)购自 SERVA 公司;培养细胞用的培养基 D-MEM 高糖、小牛血清均为 Gibco 公司产品,其他常用试剂的配置均按照《分子克隆实验指南》^[10]相关附录和配方配制。

1.2 获得 HBV 序列 根据基因序列的差异,HBV 分为 8 个不同的基因型,即:A、B、C、D、E、F、G 和 H。同时,根据外膜蛋白的个别氨基酸的差异,HBV 又可分为不同的血清亚型^[11]。我国以 HBV/B 基因型的 adw 血清型和 HBV/C 基因型的 adr 血清型较为多见,其中 C 型与慢性乙肝病情的加重及发展为肝硬化的可能有密切的关系^[12-13]。我们选择 HBV/B 基因型的 adw 血清型(AAL49992, ABK13705, ABK27214, ABK27207)和 HBV/C 基因型 adr 血清型的序列(AAL07390, AAW03312, BAC65198, BAC65197)作为预测序列。

1.3 HBx 表位的预测

1.3.1 远程预测 分别通过 3 个提供在线表位预

测服务的网络服务站点(http://bimas.dcrct.nih.gov/molbio/hla_bind/; <http://www.imtech.res.in/raghava/propred1/index.html>; <http://www.syfpeithi.de/Scripts/MHCServer.dll/EpitopePrediction.h>)对可能的 HBx 来源的 HLA-A0201 限制性 CTL 表位进行了初步的预测^[14]。

1.3.2 超基序方案 结合抗原肽的超基序是指同一 HLA 家族,或者是不同家族的 HLA 同种异型分子可以接纳的抗原肽通常具有由相同或相似的锚着残基构成的肽基。例如当 HLA-A2 超基序中位于肽链 2 位(P2)氨基酸残基及羧基末端 9 位(P9)氨基酸残基为丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、蛋氨酸(M)、苏氨酸(T)时,肽与 HLA-A2 分子有高亲和力^[15]。根据这一原则,我们对远程预测得到的 CD8⁺T 淋巴细胞表位进行进一步筛选。

1.3.3 延展基序方案 抗原肽与 HLA-A0201 分子的有效结合(高、中等结合力)不仅与主要锚着残基有关,还应考虑到二级锚着残基的存在以及不利于结合的氨基酸残基的缺失。理想的抗原肽中不应该包含不利于结合的氨基酸残基,或者有利于结合的氨基酸残基应多于不利的氨基酸残基^[16]。根据延展基序方案,我们对根据超基序方案所筛选出的 CD8⁺T 淋巴细胞表位进行了进一步筛选,以期提高预测的准确率。

1.3.4 量化基序方案 量化基序方案是在超基序方案和延展基序方案基础上的一种深化,其原理是假设在抗原肽与 HLA-A0201 分子的结合中,抗原肽的侧链效应(锚定、抑制或中性),主要是依赖与相应的氨基酸残基在肽中所处的位置,而受相邻的氨基酸残基的影响较小。因此在一定范围内,可以假设在某一多肽序列中每个氨基酸残基相互独立的影响整个肽与 MHC-I 类分子的结合,而该抗原肽的结合能就是每个位置氨基酸残基结合能的总和。我们通过量化基序方案对筛选出的 CD8⁺T 淋巴细胞表位进行了进一步筛选,从而得到了更为准确的预测结果^[17]。

1.4 多肽的合成 本实验中所使用的 5 条九肽由上海波泰生物科技有限公司合成、纯化、分析以及鉴定。

1.5 细胞培养 实验中所使用的 T2 细胞在含有 10% 小牛血清的 D-MEM 高糖的培养基中培养,培养环境为 37℃、5% CO₂ 浓度。

1.6 T2 细胞结合实验 收集 T2 细胞,预冷的 PBS 洗涤 3 次,加入无血清的 D-MEM 高糖培养基,将细胞接种于 24 孔细胞培养板中,每孔接种的细胞数约为 2×10^5 ,将已知的阳性肽(HBc:FLPSDFPSI)作为阳性对照、未加肽刺激的单纯 T2 细胞作为背景

对照,每孔中加入候选多肽(终浓度为 $50 \mu\text{mol/L}$)和 $\beta 2$ 微球蛋白(终浓度为 $2.5 \mu\text{g/ml}$),每个实验组重复 3 个复孔,将细胞置于 37°C 、 5% CO_2 孵箱中进行孵育。18 h 后,重新收集细胞,预冷的 PBS 洗涤 3 遍,加入 FITC 标记的 HLA-A0201 特异性的单克隆抗体 BB7.2 ($2 \mu\text{l/孔}$),室温下孵育 10 min, PBS 洗涤 3 次后,流式细胞仪检测荧光强度。

以荧光系数(FI)作为亲和性的衡量指标。平均荧光系数大于 1 的多肽被认为与 HLA-A0201 分子具有较高亲和力。荧光系数(FI) = (样本平均荧光强度 - 背景平均荧光强度) / 背景平均荧光强度。

1.7 多肽亲和力稳定性分析 收集 T2 细胞,接种于 72 孔细胞培养板中,每孔接种的细胞数约为 2×10^5 ,加入无血清 DMEM 高糖培养基、 $\beta 2$ 微球蛋白(终浓度为 $2.5 \mu\text{g/ml}$)以及表位肽(终浓度为 $50 \mu\text{mol/L}$)共同孵育, 37°C 、 5% CO_2 孵箱里培养过夜(18 h);用 PBS 洗涤 3 次以去除多余表位肽,加入无血清的 DMEM 高糖培养基、Brefeldin-A(终浓度 $10 \mu\text{g/ml}$)的孵育以阻断新合成的 HLA-A0201 分子在 T2 细胞表面的表达; 37°C 、 5% CO_2 孵箱中孵育 1 h 后,收集细胞, PBS 洗涤 3 次,重新置于孵箱中进行孵育,以两个小时为时间间隔,于不同的时间点(0、2、4、6、8 h)收集细胞,每一时间点收集 3 个复孔,每孔细胞中加入 FITC 标记的 HLA-A0201 特异性的单克隆抗体 BB7.2,室温下孵育 10 min。PBS 洗涤 3 次,流式细胞仪检测荧光强度以衡量肽诱导的 HLA-A0201 的表达量(每个时间点的 T2 细胞的

荧光强度 = 用肽孵育的 T2 细胞的荧光强度 - 用相同方式处理但未孵育肽的 T2 细胞的荧光强度)。计算 50% MHC-肽复合物丢失时间(DC_{50})。

2 结果

2.1 HBx 表位肽的选择以及实验分组 分别通过 3 个网络服务站点以及筛选原则预测得到分值较高的九肽,应用超基序、延展基序以及量化基序方案进一步筛选出 4 条 HBx 表位作为候选表位(表 1)。

表 1 候选表位多肽

Tab 1 List of candidate peptides

Name	Subsequence	Position	Score*	Genotype	Serotype
HBx1	VLCLRPVGA	15-23	8.446	C/B	adr/adw
HBx2	CLFKDWEEL	115-123	65.841	C/B	adr/adw
HBx3	VLHKRTLGL	92-100	36.316	C	adr
HBx4	HLSLRGLPV	52-60	2.365	C/B	adr/adw
HBc	FLPSDFFPSI	18-27			

* Estimated half-time of dissociation ($T_{1/2}$) of HLA-A0201 peptide complexes calculated using the website: http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/

2.2 各肽与 HLA-A0201 亲和力的分析 以 HBc: FLPSDFFPSI 作为阳性对照,不加肽的 T2 细胞作为空白对照。通过流式细胞仪分析收集不同实验组的 5 000 荧光单位,获取其荧光情况(图 1),每一实验组实验重复 3 次。

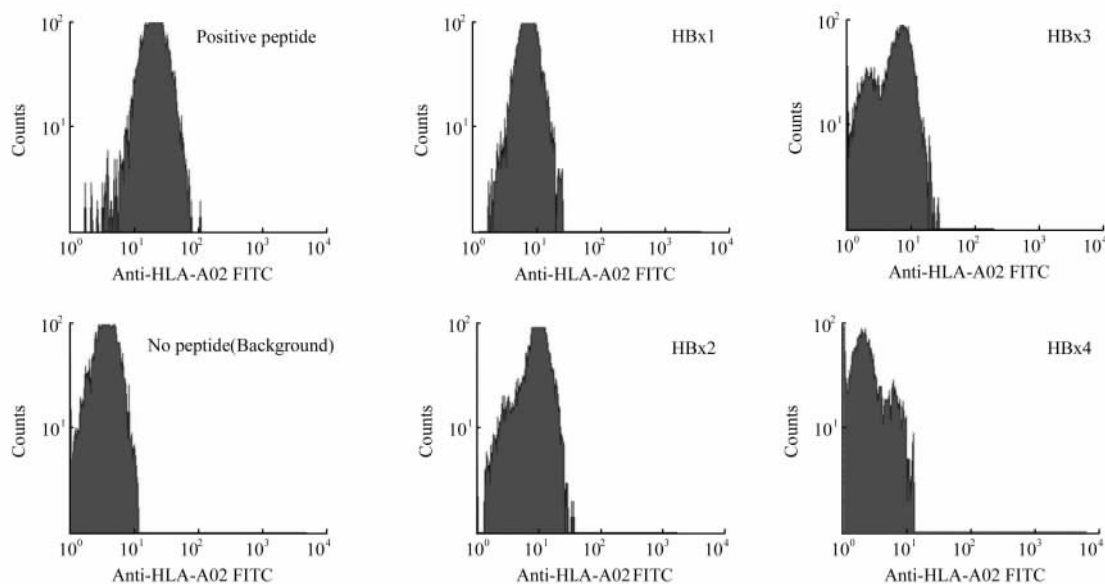


图 1 各肽的荧光分析结果

Fig 1 Fluorescence analysis of experimental and control groups in T2-binding assay

借助于 BD 公司的专用软件 CellQuest 分析各实验组细胞的荧光系数(表 2),并根据荧光系数分析各肽与 HLA-A0201 分子的亲和力。结果 4 条候选表位中 HBx2 荧光系数大于 1,说明其与 T2 细胞

表面负载的 HLA 分子具有较高的亲和力; HBx1、HBx3 和 HBx4 荧光系数小于 1,说明其与 T2 细胞表面负载的 HLA 分子没有明显的亲和力。

表 2 各表位肽在不同的时间点与 HLA-A0201 分子的亲和力

Tab 2 HLA-A0201 binding affinity to peptides at different time points

Name	Sequence position in HBx	FI*	FI				
			0 h	2 h	4 h	6 h	8 h
HBx1	VLCLRPVGA	0.549 5	0.66	0.23	0.11	0.08	0.07
HBx2	CLFKDWEEL	1.116 4	1.03	0.48	0.37	0.36	0.35
HBx3	VLHKRTLGL	0.252	0.36	0.16	0.10	0.07	0.06
HBx4	HLSLRGLPV	0.090 5	0.18	0.09	0.05	0.03	0.02
Positive peptide	FLPSDFFPSI	2.213 36	2.40	1.96	1.86	1.81	1.78
Background	-	0.210 2	0.35	0.34	0.32	0.31	0.34

* FI=(sample MFI-background MFI)/background MFI; FI>1 is regarded as high-affinity

2.3 各肽亲和力稳定性分析 以各实验组候选肽刺激 T2 细胞 18 h 后,对不同时间点的荧光系数进行检测,分析各肽在不同时间点的荧光系数变化情况(表 2)。

计算得到各实验组中 DC₅₀ 的值分别为: DC_{50(positive)} = 6.49 h, DC_{50(HBx1)} = 1.53 h, DC_{50(HBx2)} = 2.29 h, DC_{50(HBx3)} = 1.8 h, DC_{50(HBx4)} = 2.51 h, 将 DC₅₀>2 作为判断各候选肽与 HLA 分子的结合稳定性高低的判别标准,可以得到如下结论:4 个候选肽中,HBx2 和 HBx4 的结合稳定性较高。

根据 T2 细胞实验的结果,我们认为九肽 CLFKDWEEL 是一种潜在的 HLA-A0201 限制性的 HBx 表位。

3 讨论

HBV 的感染能够导致包括肝炎、肝硬化、肝细胞癌在内的多种肝脏疾病^[18]。其中在肝细胞癌组织中发现,HBV 基因组能够整合到肝癌细胞的 DNA 中,而最新研究也表明乙型肝炎患者发生肝细胞癌的概率比正常人群高 5~30 倍^[12]。很多研究显示 HBV 编码的 X 蛋白与肝细胞癌的发生、发展具有重要联系^[5];因此,对 HBx 抗原及相应抗体的检测和研究既有助于将其作为一种 HBV 感染的分子诊断手段又能够揭示 HBV 感染导致肝细胞癌分子机制。

乙肝病毒入侵的过程中,细胞毒性 T 淋巴细胞并不能识别完整的病毒蛋白,仅能识别提呈在 HLA 分子沟中的 8~10 个氨基酸的短肽(表位),进而清

除病毒。MHC 分子与抗原肽的有效结合是鉴定 CTL 表位的重要因素^[6],而抗原表位的鉴定对于生物技术研究、分子诊断都具有重要的意义,很多特异性 T 细胞应答的检测技术(如四聚体技术等)都依赖于相关表位的鉴定,因此筛选、鉴定得到一个较理想的 HBx 抗原肽并将其应用于相关的技术中,就成为 HBx 研究的一个先决条件。T 细胞表位鉴定上的主要突破是发现特定 MHC 分子的配体在特定位置有化学性质相似的氨基酸残基,称之为锚着残基(motif),而锚着残基被用于 T 细胞表位的预测,成为最为成功的策略之一(超基序方案)^[15],我们利用 3 个不同的网站预测中国人常见的 HBV/B 的 adw 和 HBV/C 的 adr 序列,筛选出的 4 条表位在 3 个不同的网站中排名都位居前列,提示预测的 4 条表位与 HLA-A0201 分子具有较高的亲和力。预测的 4 条表位 P2 与 P9 的氨基酸残基都存在于 L、A、V、I 之间,符合超基序方案。

但是,抗原肽与 MHC 分子结合的预测不能仅仅依据主要锚着残基,还应考虑到二级锚着残基的存在及不利于结合的残基的缺失(延展基序方案),而我们所选择的四条多肽其他位置上的氨基酸残基符合有利于多肽与 HLA-A0201 分子的结合这一规律。在超基序方案和延展基序方案的基础上,基于下列假设——抗原肽的侧链效应(锚定、抑制或中性),主要是依赖于相关残基在肽中所处的位置,而受相邻残基的影响较小,Parker 等^[11]分析了 154 个九肽与 HLA-A0201 分子的亲和力,得到一个包含 180 个系数的结合矩阵,其中每一个系数反映了相

关残基在该位置的结合能。各残基的结合系数乘以标准系数 0.151,即为该肽的结合能,当结合能 ≥ 5 时,可以确定为稳定结合,反之则认为结合不稳定(量化基序方案)^[17,19]。我们所选择的 4 条多肽的结合能均高于 5,且为所有多肽中结合能最高者。

从超基序方案、延展基序方案,到量化基序方案,预测准确率不断得到提高。但是有研究发现,预测的结合与实际生理状态下的结合之间并没有必然的联系,并且根据各种方案计算实际的表位肽,却经常得到阴性结果^[9],因此通过体内、体外的 CTL 结合实验对表位预测结果进行验证是不可或缺的。内源性抗原递呈途径中必需的 TAP 缺陷的 T2 细胞表面空载的 HLA-A0201 分子表达极不稳定,递呈后很快降解。当外源性的抗原肽与之结合后,稳定了 HLA-A0201 的表达。抗原肽与 HLA-A0201 分子的结合力越强,HLA-A0201 分子表达就越强。T2 细胞表面 HLA-A0201 分子表达量的增加可以直观地反映目的抗原肽与 HLA-A0201 的结合力。我们利用了 T2 细胞的这一特性,借助于 T2 细胞结合实验以及亲和力稳定性实验对预测出的 4 条的抗原肽进行了体外鉴定。据文献报道 $FI > 1$ 表明表位和 HLA-A0201 分子有较高的亲和力^[20],我们通过流式细胞仪检测细胞表面的荧光强度,再通过公式计算得出 HBx2 的荧光系数大于 1 ($FI = 1.1164$),证明该预测具有较高的亲和力。HBx1、HBx3 和 HBx4 均小于 1 提示这 3 条表位与 HLA-A0201 分子的亲和力较低。同时,通过检测不同时间点的荧光强度,计算获得肽-MHC 复合物的降解情况,分析肽与 HLA 分子结合的稳定性。我们的结果显示 HBx2-MHC 复合物的解离时间在 4 个候选肽中较长 ($DC_{50} = 2.29$ h)。因此,综合结合实验和亲和力稳定性实验的结果,我们认为 HBx2 (CLFKD-WEEL) 是潜在的 HLA-A0201 限制性 CTL 表位。

有趣的是,在我们所预测的 4 条多肽中,除 HBx2 的综合得分较高以外,HBx3 的得分也较高,其预测排名均高于 HBx1 和 HBx4。但是我们发现,在 T2 结合实验中,HBx3 的结合力 ($FI = 0.252$) 低于 HBx1 ($FI = 0.5495$);而在亲和力稳定性实验中,HBx3 的稳定性 ($DC_{50} = 1.8$ h) 也不低于 HBx4 ($DC_{50} = 2.51$ h)。我们的结果充分说明预测的结合与实际生理状态下的结合之间的确具有较大的差距。以往的实验以及亲和力稳定性实验表明,

某些多肽虽然在体外证实可与 MHC-I 类分子有效结合,但可能因为在体内抗原加工过程中不能被蛋白酶体正常降解、或不能被抗原加工相关转运体 (transporter associated with antigen processing, TAP) 所转运,从而不能被递呈到细胞表面,或者虽然被递呈但却不是免疫优势表位,或者体内 T 细胞库缺失针对该表位的 TCR,因而不能成为真正的表位^[21],因此,体外检测的结合也并不能等同于体内的结合,更不能等同于具备真正的免疫原性。HBx2 是否具备真正的免疫原性,是否能够诱导机体产生免疫反应,还需要体内实验予以验证,目前我们正进行动物实验以进一步确认该肽是否可作为一种真正的 CTL 表位应用于临床诊断与治疗。

尽管计算机预测已成为许多免疫学家所熟悉的工具,但还需要不断地补充新的实验数据以更新或拓展这些程序。目前筛选表位的方法还有 DNA 微阵列技术、血清学分析重组 cDNA 表达库 (SEREX) 技术等,将这些方法与计算机表位预测方法结合起来将会大大增加表位的筛选效率和数量,以用于较大范围疾病的免疫学治疗。

[参考文献]

- [1] Tharayil V S, Roberts L R. Molecular targets for therapy of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma [J]. *Minerva Gastroenterol Dietol*, 2006, 52: 387-406.
- [2] Bruss V. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid [J]. *Virus Res*, 2004, 106: 199-209.
- [3] Chung T W, Lee Y C, Ko J H, et al. Hepatitis B virus X protein modulates the expression of PTEN by inhibiting the function of p53, a transcriptional activator in liver cells [J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 3453-3458.
- [4] Tang H, Oishi N, Kaneko S, et al. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein [J]. *Cancer Sci*, 2006, 97: 977-983.
- [5] Andersen M H, Schrama D, Thor Straten P, et al. Cytotoxic T cells [J]. *J Invest Dermatol*. 2006, 126: 32-41.
- [6] Hagemann M. Computers aid vaccine design [J]. *Science*, 2000, 290: 80-82.
- [7] Liang B, Zhu L, Liang Z, et al. A simplified PCR-SSP method for HLA-A2 subtype in a population of Wuhan, China [J]. *Cell Mol Immunol*, 2006, 3: 453-458.
- [8] Andersen M H, Tan L, Søndergaard I, et al. Poor correspondence between predicted and experimental binding of peptides to class I MHC molecules [J]. *Tissue Antigens*, 2000, 55: 519-531.
- [9] Kuzushima K, Hayashi N, Kimura H, et al. Efficient identification of HLA-A * 2402 restricted cytomegalovirus-specific CD8⁺ T-cell epitopes by a computer algorithm and an enzyme-

- linked immunospot assay [J]. *Blood*, 2001, 98:1872-1881.
- [10] Sambrook, Joseph. *Molecular cloning: a Laboratory Manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 1564-1604.
- [11] Faure E. Alternative peptide-fusion proteins generated by out-of-frame mutations, just upstream ORFs or elongations in mutants of human hepatitis B viruses [J]. *Virus Res*, 2006, 117: 185-201.
- [12] Akuta N, Kumada H. Influence of hepatitis B virus genotypes on the response to antiviral therapies [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2005, 55:139-142.
- [13] Du H, Li T, Zhang H Y, et al. Correlation of hepatitis B virus (HBV) genotypes and mutations in basal core promoter/pre-core with clinical features of chronic HBV infection [J]. *Liver Int*, 2007, 27:240-246.
- [14] Qin E, Zhu Q, Yu M, et al. A complete sequence and comparative analysis of a SARS-associated virus (isolate BJ01) [J]. *Chin Sci Bull*, 2003, 48:941-948.
- [15] Doytchinova I A, Guan P, Flower D R. Quantitative structure-activity relationships and the prediction of MHC supermotifs [J]. *Methods*, 2004, 34:444-453.
- [16] Ruppert J, Sidney J, Celis E, et al. Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2. 1 molecules [J]. *Cell*, 1993, 74:929-937.
- [17] Mallios R R. Class II MHC quantitative binding motifs derived from a large molecular database with a versatile iterative step-wise discriminant analysis meta-algorithm [J]. *Bioinformatics*, 1999, 15:432-439.
- [18] 高志良, 林潮双. 慢性肝炎的临床诊治现状 [J]. *广东医学*, 2006, 8:1115-1116.
- [19] Doytchinova I, Hemsley S, Flower D R. Transporter associated with antigen processing preselection of peptides binding to the MHC: a bioinformatic evaluation [J]. *J Immunol*, 2004, 173: 6813-6819.
- [20] Wang B, Chen H, Jiang X, et al. Identification of an HLA-A * 0201-restricted CD8⁺ T-cell epitope SSp-1 of SARS-CoV spike protein [J]. *Blood*, 2004, 104:200-206.
- [21] Andersen M H, Bonfill J E, Neisig A, et al. Phosphorylated peptides can be transported by TAP molecules, presented by class I MHC molecules, and recognized by phosphopeptide-specific CTL [J]. *J Immunol*, 1999, 163:3812-3818.
- [收稿日期] 2007-03-11 [修回日期] 2007-09-17
[本文编辑] 尹 茶

· 消 息 ·

《第二军医大学学报》征订启事

《第二军医大学学报》是由第二军医大学主办的国内外公开发行的(CN31-1001/R, ISSN 0258-879X)的综合性医药卫生类学术期刊, 1980年6月创刊。本刊面向全国和海外作者征稿, 主要报道基础、临床、预防、军事医学、药理学和中国医学等领域的最新科研成果。由著名肝胆外科专家、国家最高科技奖获得者吴孟超院士任主编。辟有: 院士论坛、专家论坛、专题报道、论著、研究快报、临床病理(例)讨论、个案报告等栏目。读者对象主要为从事医药卫生工作的中高级科研、医疗、教学、预防机构人员和高等医药院校的师生。

本刊一直被《中文核心期刊要目总览》确认为“中国综合性医药卫生类核心期刊”; 是“中国科学引文数据库统计源期刊”、“中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊”; 被包括万方数据——中国数字化期刊群、中国学术期刊综合评价数据库等在内的国内所有重要检索系统收录, 并被荷兰《医学文摘》(EMBASE)、美国《化学文摘》(CA)、英国国际农业与生物科学中心(CA-BI)文摘数据库、俄罗斯《文摘杂志》(PЖ)、波兰《哥白尼索引》等国际检索系统收录。先后获得“第二届国家期刊奖百种重点期刊奖”、“第三届国家期刊奖提名奖”和“首届全国高校精品科技期刊奖”。

本刊为月刊, A4开本, 80g铜版纸彩色双胶印刷, 每期定价15元, 全年共180元。可在当地邮局订阅(邮发代号4-373), 漏订者可来函本刊编辑部办理邮购。

地址: 上海市翔殷路800号《第二军医大学学报》编辑部, 邮编: 200433

联系人: 商素芳 电话: 021-25074352, 021-25074340 转 824 分机

E-mail: bxue@smmu.edu.cn 或 bxue304@yahoo.com.cn

网址: <http://www.ajsmmu.cn> 或 <http://journals.smmu.edu.cn>