

# 世界华人消化杂志®

## WORLD CHINESE

## JOURNAL OF DIGESTOLOGY

### Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003年7月15日 第11卷 第7期

(Volume 11 Number 7)



## 7/2003

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. 2002 年 JCR® 报告 WJG 影响因子 2.532. 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 7 月 15 日 第 11 卷 第 7 期 (总第 111 期)

## 述 评

- 881 一种新型传染病: 严重急性呼吸综合征 聂青和, 罗新栋, 惠武利  
888 病毒性肝炎发病机制中的反式调节机制 成军  
897 老年消化系疾病的中西医结合治疗 张万岱

## 肝 癌

- 900 经动脉灌注蜂毒素-聚乳酸/羟乙酸微球治疗大鼠肝肿瘤 凌昌全, 李琦, 刘晓华, 陈庆华, 彭永海, 罗若茵, 黄雪强  
904 大鼠肝癌形成过程中癌基因表达变化的意义 薛玲, 廖冰, 赵国强, 胡瑞德, 车丽洪, 董郡  
908 参白胶囊诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡 吴苏冬, 刘长利, 王慧川, 鲍德虎  
912 肝细胞癌肝动脉化疗栓塞后 PCNA 和 nm23-H1/NDPK 的研究 冯勇, 赵玲, 张爱华, 刘康达, 刘来村, 王彦辉, 尹进强, 杨秉辉  
916 TDI-FP 法分析肝细胞癌组织中 HBV 核心启动子双突变 吕贯廷, 卢冰, 白玉杰, 张剑, 阎小君

## 病毒性肝炎

- 920 基因表达谱芯片技术筛选乙型肝炎病毒 X 蛋白反式调节基因 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩  
925 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式激活基因 10 的克隆化研究 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚  
930 基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白 3 反式调节靶基因 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩  
935 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活基因 10 的克隆化研究 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚  
939 应用表达谱芯片技术对丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式调节基因的研究 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军  
943 应用表达谱芯片技术对截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式调节基因的研究 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军  
947 丙型肝炎病毒核心蛋白上调细胞周期调节蛋白 Wee1 基因表达研究 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰  
951 丙型肝炎病毒核心蛋白上调 NIP3 基因表达研究 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰  
955 丙型肝炎病毒核心蛋白上调层粘蛋白 B1 链基因启动子表达活性的研究 杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 杨艳杰, 张树林  
959 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 上调新生多肽相关复合物  $\alpha$  多肽基因的表达 杨倩, 刘妍, 成军, 李克, 王建军, 洪源, 张树林  
963 乙型肝炎肝纤维化及癌变时脾脏超声影像, HBV e 系统及 APF 水平 柯伟民, 林国莉, 叶一农, 赖菁, 李建国  
966 乙型肝炎病毒核壳蛋白变异株在 HepG<sub>2</sub> 细胞的 HLA-I 表达 陈伟红, 何海棠, 张明霞, 刘志华, 周永兴

## 基础 研究

- 970 联合应用粉防己碱与甘草酸抑制肝纤维化大鼠细胞外基质表达 王志荣, 陈锡美, 李定国, 魏红山, 黄新, 展玉涛, 陆汉明  
975 复方红景天干预肝纤维化大鼠胶原代谢 曾维政, 吴晓玲, 蒋明德, 邓桂英, 陈晓斌, 张勇, 秦建平, 徐辉  
979 选择性环氧合酶-2 抑制剂 Celebrex 对胰腺癌 PGE<sub>2</sub> 和血管内皮因子表达的影响 谢传高, 王兴鹏, 董育玮, 杜勤, 蔡建庭, 钱可大  
982 早期肠道营养减轻烧伤后肠黏膜损伤的机制研究 彭毅志, 袁志强, 肖光夏  
986 胃肠道平滑肌细胞作为 eNOS 基因转移靶细胞的研究 宁守斌, 张忠兵, 沈茜, 谢渭芬, 杨秀疆, 赵新, 信栓力  
990 内皮素-1 特异性抗体对应激性胃黏膜损伤的保护作用 段义民, 李兆申, 湛先保, 龚燕芳, 许国铭  
994 肠三叶因子在胃黏膜应激性损伤中的修复作用 李兆申, 聂时南, 湛先保, 龚燕芳, 屠振兴, 许国铭  
997 p<sup>53</sup> 突变与 VEGF 在大鼠胃癌中的表达及中药胃康宁的防治作用 李庆明, 余谦, 闵存云

## 焦 点 论 坛

- 1001 乙型和丙型肝炎病毒蛋白反式激活作用机制及其意义的研究进展 成军  
1002 乙型肝炎病毒表面抗原基因启动子 I 结构及调节研究 李强, 成军, 程明亮, 钟彦伟  
1004 乙肝病毒表面抗原基因启动子 II 的结构及调节研究 梁耀东, 成军, 陆荫英, 吴君, 程明亮  
1006 乙型肝炎病毒核心启动子的结构及调节研究 杨艳杰, 成军, 陈东风, 刘妍, 杨倩, 王建军  
1008 乙型肝炎病毒增强子的结构和调控研究 王建军, 成军, 刘妍, 张忠东, 杨倩, 杨艳杰  
1011 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活作用的研究 杨艳杰, 成军, 陈东风, 钟彦伟, 张忠东, 李强



焦点论坛	1014 丙型肝炎病毒复制子的研究 纪冬, 成军, 王建军 1018 丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白的反式激活作用研究 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰 1020 丙型肝炎病毒 5' - 非翻译区的结构与功能研究 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 张树林 1023 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对 14-3-3 蛋白信号转导的影响 成军 1027 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对蛋白酪氨酸激酶信号转导的影响 张忠东, 成军, 钟彦伟, 张树林
课堂讨论	1031 北京大学医学部研究生分子肿瘤学课堂讨论及学术论坛纪要 吕有勇, 许小青
文献综述	1035 骨髓源性肝干细胞的研究进展 杨明智, 彭志海 1037 ERK 信号传导通路与肝星状细胞周期调控 蒋明德, 马洪德, 解方为 1040 趋化因子与肝病的研究进展 胡迎宾, 田德安, 刘南植 1043 游离脂肪酸、胰岛素抵抗与非酒精性脂肪性肝炎 高志强, 陆付耳 1046 KAI1 基因在胰腺癌中抗转移作用的研究 任丽楠, 刘民培, 郭晓钟, 徐建华, 安天义 1050 结直肠癌发病率及解剖部位变化趋势 谢正勇, 卿三华 1054 微阵列技术及其在消化系疾病研究中的应用进展 李新华, 张万岱, 肖冰, 张振书 1059 NO 和 VIP 与胃肠电 - 机械活动的关系 章敏, 曲瑞瑶 1064 TK 基因治疗胃肠道肿瘤的研究进展 刘占奎, 张超 1068 自由基损伤在幽门螺杆菌相关胃病中的作用 陶惠, 朱道银, 邹全明, 毛旭虎
消 息	907 欢迎订阅 2003 年度世界华人消化杂志 915 欢迎订阅 2003 年度 World Journal of Gastroenterology® 946 世界华人消化杂志和 WJG 获得商标注册 950 中国科技期刊走向世界的步伐正在加快 954 世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版目次 985 美国国立医学图书馆 2002 年度收录中国医学期刊名单 993 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 1030 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 1053 WJG 搭建我国消化学基础和临床研究惟一国际交流的平台 1058 提供您使用世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版 1063 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊 附 1 Journal Citation Reports 2002-China 附 2 Journal Citation Reports 2002-GASTROENTEROLOGY & HEPATOLOGY 附 3 2003 年 Index Medicus 收录中国期刊 附 4 2003 年 ISI 收录中国科技期刊
封面故事	970 联合应用粉防己碱与甘草酸抑制肝纤维化大鼠细胞外基质表达 王志荣, 陈锡美, 李定国, 魏红山, 黄新, 展玉涛, 陆汉明

# 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 2003-07-15  
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 张建中
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:wcjd@wjgnet.com  
出版 世界胃肠病学杂志社  
100023, 北京市 2345 信箱  
E-mail: wcjd @ 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(PЖ)》  
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.



- promoter. *J Biol Chem* 1999;274:2858-2865
- 16 Sun CT, Lo WY, Wang IH, Lo YH, Shiou SR, Lai CK, Ting LP. Transcription repression of human hepatitis B virus genes by negative regulatory element-binding protein/SON. *J Biol Chem* 2001;276:24059-24067
  - 17 Lee SG, Rho HM. Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B viral X protein. *Oncogene* 2000;19:468-471
  - 18 Lee H, Kim HT, Yun Y. Liver-specific enhancer II is the target for the p53-mediated inhibition of hepatitis B viral gene expression. *J Biol Chem* 1998;273:19786-19791
  - 19 Lai CK, Ting LP. Transcriptional repression of human hepatitis B virus genes by a bZIP family member, E4BP4. *J Virol* 1999;73:3197-3209
  - 20 Alcantara FF, Tang H, McLachlan A. Functional characterization of the interferon regulatory element in the enhancer 1 region of the hepatitis B virus genome. *Nucleic Acids Res* 2002;30:2068-2075
  - 21 Nakao K, Nakata K, Yamashita M, Tamada Y, Hamasaki K, Ishikawa H, Kato Y, Eguchi K, Ishii N. p48 (ISGF-3gamma) is involved in interferon-alpha-induced suppression of hepatitis B virus enhancer-1 activity. *J Biol Chem* 1999;274:28075-28078
  - 22 Schulte-Frohlinde E, Seidler B, Burkard I, Freilinger T, Lersch C, Erfle V, Foster GR, Classen M. Different activities of type I interferons on hepatitis B virus core promoter regulated transcription. *Cytokine* 2002;17:214-220
  - 23 Lee JH, Rho HM. Nuclear factor of activated T cells (NFAT1-C) represses the enhancer II and pregenomic promoter (EnII/Cp) of hepatitis B virus (HBV) through its responsive site GGAGA and nullifies the HBx-driven transcriptional activation. *IUBMB Life* 2001;51:255-261
  - 24 David-Cordonnier MH, Hamdane M, D' Halluin JC. c-Myb protein binds to the EP element of the HBV enhancer and regulates transcription in synergy with NF-M. *Biochim Biophys Acta* 1999;1446:82-92
  - 25 Xie Y, Li M, Wang Y, Hofschneider PH, Weiss L. Site-specific mutation of the hepatitis B virus enhancer II B1 element: effect on virus transcription and replication. *J Gen Virol* 2001;82:531-535
  - 26 Honda A, Yokosuka O, Suzuki K, Saisho H. Detection of mutations in hepatitis B virus enhancer 2/core promoter and X protein regions in patients with fatal hepatitis B virus infection. *J Med Virol* 2000;62:167-176
  - 27 Honda A, Yokosuka O, Ehata T, Tagawa M, Imazeki F, Saisho H. Detection of mutations in the enhancer 2/core promoter region of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus infection: comparison with mutations in precore and core regions in relation to clinical status. *J Med Virol* 1999;57:337-344

## 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活作用的研究

杨艳杰, 成军, 陈东风, 钟彦伟, 张忠东, 李强

杨艳杰, 成军, 钟彦伟, 张忠东, 李强, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039  
陈东风, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院消化内科 重庆市 400038  
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@genetheray.com.cn  
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283  
收稿日期: 2003-01-11 接受日期: 2003-02-16

杨艳杰, 成军, 陈东风, 钟彦伟, 张忠东, 李强. 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活作用的研究. 世界华人消化杂志 2003;11(7):1011-1014

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1011.asp>

### 0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)是1989年应用分子生物学技术克隆

成功的一个RNA病毒, 属黄病毒科, 可引起慢性肝炎、肝硬化及肝细胞肝癌, 目前有1.7亿人感染, 干扰素联合利巴韦林是其治疗方案, 但是疗效不佳<sup>[1-9]</sup>. 目前世界各国都在积极研究其发病机制, 探索新的治疗措施. 但由于HCV的宿主范围较窄, 只能在人及黑猩猩中繁殖, 为研究带来一定困难. HCV是怎样与宿主细胞相互作用的, 世界上进行了广泛的研究. 现在一致认为病毒进入到肝细胞后, 肝炎病毒蛋白在肝细胞内不是孤立存在, 病毒基因组在肝细胞内有两种调节方式; 其一是顺式调节, 如启动子及增强子序列, 以直接方式影响另外一些基因组的功能, 是基因组内部调节方式; 其二是反式调节, 即基因组中一部分基因片段通过其转录或翻译产物产生对另一部分基因片段表达的调节方式, 如病毒基因组表达的反式激活蛋白, 以表达产物的间接方式参与另外一些基因功能调节, 可以对基因组内部的基因, 甚至对其他细胞或病毒的基因组有调控作用. 这种病毒蛋白对肝细胞基因组的反式调节作用, 影响了肝细胞的基因表达谱, 是病毒感染慢性化以及引起感染的肝细胞发生恶性转化的分子生物学机制之一<sup>[6-8]</sup>. 特别是HCV各蛋白组分(C、E1、E2、P7、NS2、NS3、NS4a、NS4b、NS5a和NS5b)与人体蛋白之间的相互作用, 为HCV所致疾病的发病机制提供了线索.

### 1 丙型肝炎病毒基因组基本结构

HCV基因组是一单股正链RNA, 全长大约由9 400核苷酸(nucleotide, nt)组成, 含有一个大的开放读码框架(open reading frame, ORF), ORF几乎跨越HCV基因组, 可编码一大约3 010个氨基酸残基(aa)的病毒前体蛋白(precursor polypeptide). HCV基因组5' - 末端为非编码区(untranslating region, 5' - UTR), 位于ORF的上游, 含有3~4个小的ORF. HCV基因组的3' - 末端为3'非编码区(3' - UTR), 位于ORF的下游, 可含有多聚(A)或多聚(U)尾. 5' - UTR和3' - UTR在病毒的复制和稳定病毒的生物学形状等方面起重要作用. 根据所编码蛋白的结构和功能, 可将基因组分为结构基因(structural gene)和非结构基因(nonstructural gene). 结构基因分为核心区(core region)和包膜基因(envelope gene), 分别编码病毒的核心蛋白和包膜蛋白, 这些蛋白参与病毒颗粒的组装, 故又称结构蛋白. 非结构(NS)基因包括NS2、NS3、NS4和NS5基因, 分别编码NS2-5等4种蛋白, 这些蛋白不构成病毒颗粒的结构成分, 主要与病毒的复制有关, 如作为信号酶、螺旋酶和RNA聚合酶等, 故又称为非结构蛋白或功能蛋白. 不同国家和地区分离的HCV株其基因结构有一定的差别. HCV基因组结构与人类黄病毒属和动物瘟病毒属中某些病毒如日本脑炎病毒、登革热病毒和牛腹泻病毒等基因组有许多共同特征, 这些共同特征对于了解HCV分子生物学特性很有帮助. 这些共同特征包括: (1)病毒基因组长度相似, 复制时都先编码一个大的病毒前体蛋白, 然后在病毒和宿主的蛋白酶的作用下

分解成单一病毒蛋白; (2)NS3 和 NS5 蛋白中某些部位氨基酸序列有高度同源性. 如第1 230-1 500 位有能与 NTP 结合的螺旋酶残基, 第2 703-2 739 位含 Gly-Asp-Asp 基元, 这在病毒编码 RNA 依赖的 RNA 聚合酶方面具有高度保守性; (3)病毒蛋白的疏水性相似, 由此可以研究病毒蛋白的抗原性及其可能在宿主细胞内的存在部位.

## 2 HCV 核心蛋白结构及其对基因的调节作用

HCV 核心区基因位于 HCV 基因组 1-573 nt 位点, 编码核衣壳蛋白(又称之为核心蛋白或 C 蛋白). C 蛋白由 191 个氨基酸残基组成, 分子量为 21 kD, 其中含有许多脯氨酸、精氨酸和赖氨酸残基, 因而表现为嗜碱性. 完整的全长 C 蛋白称 p22, 本身缺乏 N-糖基化位点, 其 C 端 20 个氨基酸具有高度疏水性, 可能是作为信号序列(signal sequence). p22 在参与病毒组装前, 需要进一步加工和修饰, 能较好地保证检测感染者血清中相应的抗体.

近年来研究发现, C 蛋白具有对多种基因的调控作用. HCV 和 HBV 重叠感染的一个重要特征是出现病毒干扰现象, 即导致乙型肝炎病毒(HBV)病毒血清标志物的消失或病毒复制水平的下降. 为探讨这一现象的发生机制, 有研究者构建了全长和部分长度的 HCV 结构区(C、E1 和 E2/NS1)基因表达载体, 然后与 HBV 表达载体共转染人肝癌细胞系 HuH-7 细胞. 结果发现, HBsAg 和 HBeAg 表达量均明显减少, 释放入培养细胞上清液的病毒颗粒也明显减少. 如果用完整的或编码 N 端 122 aa 的 C 区基因替代上述 HCV 结构区, 可以得到类似的结果, 表明 HCV C 基因及其表达与 HBV 基因组的复制和表达明显相关. 提取细胞核中的 RNA 所做的 Northern 印迹实验显示, HBV 前基因组 RNA 的产生也同时减少, 提示这种抑制作用可能发生在转录水平以及前基因组 RNA 衣壳化(encapsidation), 其进入胞核内的时间(第 6 天)恰好与 HBV 出现复制和表达减少的时间相吻合, 因而得出结论, 上述抑制作用是由 HCV C 基因的表达产物 -C 蛋白所致, C 蛋白可能是一种基因调节蛋白的说法也由此而生.

C 蛋白的磷酸化 - 去磷酸化是实现 HBV 复制抑制的重要条件. 对 C 蛋白的磷酸化过程进行了研究发现, 其磷酸化是由蛋白激酶 A 和蛋白激酶 C 催化完成, 磷酸化位点位于 C 蛋白 99 位和 116 位 aa, 如果采用点突变方法, 将这两个丝氨酸换成丙氨酸, 丧失了对 HBV 的抑制作用, 说明 C 蛋白对 HBV 的抑制受磷酸激酶 A 和磷酸激酶 C 的控制. C 蛋白对 HBV 复制的抑制作用的确切机制尚不清楚. 有研究观察到 C 蛋白能够结合 HBV 复制中间体, 因而推测可能通过影响 HBV 的翻译和装配实现抑制 HBV 复制效应.

此外研究发现, C 蛋白具有多种调控细胞、病毒基因表达、细胞生长以及免疫调节等功能, 对细胞信号转导途径, 尤其是 NF- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ -gene binding)即  $\kappa$  基因结合核因子、激活蛋白 1 (activator protein-1,

AP-1)和血清效应元件 (serum response element, SRE)相关途径具有明显的增强作用, 影响相关的靶基, 如 c-myc、c-fos、c-jun 等基因, 劳氏肉瘤病毒长末端序列(long terminal repeat, LTR)、猴空泡病毒 40 早期启动子和 p53 基因启动子的功能<sup>[10,11]</sup>. Giambartolomei et al<sup>[12]</sup> 认为, 感染 HCV 的肝细胞发生肿瘤的机制是由于在稳定表达 C 蛋白的细胞系中干扰了肝细胞的正常信号转导过程. Lee et al<sup>[13]</sup> 研究证实 HCV 核心在胰岛素样生长因子 2 (insulin-like growth factor II, IGF-II)的转录过程中充当着反式激活子的作用. HCV 核心蛋白通过 Sp1 和 Egr1 这 2 个顺式作用元件作用于 IGF-II 的启动子 4(P4)使内源性的 IGF-II 表达增强, 因 Sp1 和 Egr1 均可以结合到 IGF-II P4 上并能最大限度的调节其活性. 而且, HCV 核心刺激 SP1 和 Egr1 磷酸化, 并通过 HCV 核心的转染上调 SP1 和 Egr1 结合 DNA 的活性. 用 HCV 核心转染 HepG2 细胞可刺激蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)膜异位, 用钙磷酸蛋白 C (calphostin C, PKC 抑制剂)处理 HCV 核心转染的细胞, 可阻止 SP1 和 Egr1 诱导的 DNA 结合活性, 最终阻止 IGF-II 基因的反式激活转录在肝细胞癌发生过程中, 增强的 SP1 和 Egr1 磷酸化形式的 DNA 结合活性对于调节 IGF-II 基因表达和促进细胞分化或许是一个很重要的机制. 这个研究结果表明, HCV 核心蛋白通过 PKC 信号传导通路在 IGF-II 的转录中作为一个正调节因子, 而且 SP1 和 Egr1 是其在 IGF-II 转录调节过程的直接靶位, 这些对于 HCV 所致肝细胞癌的致病机制起着非常重要作用.

## 3 HCV 核心蛋白对蛋白的反式调节作用

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. 表达 HCV 核心蛋白的肝肿瘤细胞可以引起细胞脂肪变性, 转基因小鼠出现肿瘤, 因此 HCV 核心蛋白在肝脏疾病中起重要作用. 为了弄清其作用机制, 进行了很多研究, 其中蛋白之间的相互作用研究比较广泛.

HCV 核心蛋白与淋巴毒素  $\beta$  受体胞质尾部相互作用, Matsumoto 和 Chen et al<sup>[14,15]</sup> 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  $\beta$  受体(LT- $\beta$ R)胞质域, 是肿瘤坏死因子受体家族的一个成员. 他们的结合被谷胱甘肽 S 转移酶(GST)融合蛋白结合实验和蛋白印迹分析所证实. 结合定位在这个受体的胞质尾部的 58 aa 区, 在核心蛋白上定位在 36-91 aa (蛋白亲水区). 在哺乳动物细胞中核心蛋白与膜 LT- $\beta$ R 结合. 因为这个受体生发中心的形成以及外周淋巴样器官的发育调节, 淋巴结发育凋亡信号, HCV 核心蛋白与 LT- $\beta$ R 结合, 表明这个蛋白可能有免疫调节功能, 可能解释病毒持续感染和发病机制. Owsianka et al<sup>[16]</sup> 进一步证实 HCV 核心蛋白可与 LT- $\beta$ R 结合, 在一些细胞中, 通过此通路核心蛋白起到调节作用. LT- $\beta$ R/LT- $\alpha$  1,  $\beta$ 2 受体 - 配体相互作用的已知作用是外周淋巴样器官和触发细胞裂解活性以及 NF- $\kappa$ B 活性, 他们的发现

提示 HCV 核心蛋白增强 LT- $\beta$ R 生物功能, 引起 HCV 感染细胞的发病。

核心蛋白与异源核糖核蛋白 K (hnRNP K) 结合。Hsieh et al<sup>[16]</sup>鉴定出 hnRNP K 可以与核心蛋白相互作用, 这个蛋白证实是转录因子。这两个蛋白可以部分共定位在核内。核心蛋白结合 hnRNP K 的位置在 25-91 aa 区, 是氨基端的亲水区。hnRNP K 的核心蛋白结合域定位在 250-392 aa, 含有 3 个脯氨酸丰富区。再者, HCV 核心蛋白可以释放 hnRNP K 对胸腺嘧啶激酶基因启动子的抑制活性。这两个蛋白的特异性结合可能破坏了 hnRNP K 多重功能, 部分地解释了 HCV 发病机制。

HCV 核心蛋白与细胞推定的 RNA 解旋酶相互作用, You et al<sup>[17]</sup>为了了解 HCV 核心蛋白的反式激活机制, 克隆了一个 cDNA 编码的 DEAD 盒家族中推定的 RNA 解旋酶称为 CAP-Rf, 与别的 RNA 解旋酶(如 DBX 和 DBY 鼠 mDEAD3 和 PL10, 这个家族的蛋白一般涉及翻译、剪切, 发育和细胞生长)具有 95 % 同源性。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。HCV 结合区域定位在氨基端的 40 aa 区及 CAP-Rf 的 C 末端, 这个区域包括 RNA 结合和 ATP 水解功能。免疫印迹或免疫荧光分析表明内源性 CAP-Rf 主要定位在核中, 在细胞质中较少; 与 FLAG 标签融合后与 HCV 核心蛋白既在核内又在胞质中共定位。与别的 RNA 解旋酶相似, 这个细胞 RNA 解旋酶具有核苷三磷酸酶-脱氧核苷三磷酸酶活性, 但这个活性可以被各种形式的同源多聚核苷所抑制, 被核心蛋白所加强。再者在人肝肿瘤细胞系 Huh-7 中瞬时表达 HCV 核心蛋白增强了 CAP-Rf 反式激活活性。总的来说 CAP-Rf 所涉及基因表达的调节及 HCV 核心蛋白启动 CAP-Rf 反式激活能力可能是通过复合体形式和 CAP-Rf ATPase 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, 这个特征说明了核心蛋白对宿主细胞的多重作用。

HCV 核心蛋白与人 DEAD 盒蛋白 DDX3 相互作用, Owsianka et al<sup>[18]</sup>用酵母双杂交克隆了推定的 RNA 解旋酶 C 末端 253 aa, DEAD 盒蛋白命名为 DDX3。细菌表达 GST-DDX3 融合蛋白能特异地拉住体外翻译的放射标记的 HCV 核心蛋白。用多克隆抗血清免疫荧光染色 HeLa 细胞显示 DDX3 融合蛋白主要位于核壳而胞质中较少。用表达 HCV 的结构蛋白(core, E1, E2)的痘苗病毒感染细胞后 DDX3 和核心蛋白共定位在细胞质的核周区的特定区域。结合区在核心蛋白的 C 末端 RS 样域。人 DDX3 是推定的 RNA 解旋酶, 是一种高度保守的 DEAD 盒亚族 - 包括鼠 PL10 排列, 非洲爪蟾的 An3 和酵母的 Ded1 的一个成员。他们在 RNA 代谢或基因表达中的作用是未知的。

Mamiya et al<sup>[19]</sup>同样证明了 HCV 核心蛋白与 DEAD 盒的 RNA 解旋酶结合。用同样的方法分离到 DEAD 盒蛋白 DBX。DBX 和鼠 PL10(ATP 依赖的 RNA 解旋酶)的氨基酸序列高度一致。体外实验也证明了他们的相互作用。哺

乳动物细胞表达发现 HCV 核心蛋白和 DBX 被共同定位在内浆网。酿酒酵母突变株中 DBX 可以互补 Ded1p (主要的 DEAD 盒 RNA 解旋酶功能)的功能。HCV 核心蛋白可以抑制 DBX 补充的突变酵母生长, 但是不会抑制 Ded1 表达的酵母生长。HCV 核心蛋白也抑制带帽的但不抑制不带帽的 RNA 的体外翻译。结果表明了核心蛋白和这个宿主细胞蛋白相互作用涉及 RNA 代谢, 所以 HCV 可能抑制 mRNA 翻译机制。

Sabile et al<sup>[20]</sup>发现 HCV 核心蛋白可以调节细胞的脂肪代谢, 用酵母双杂交的方法发现病毒的核心蛋白可以和载脂蛋白 A II 结合。结合域在核心蛋白 C 末端。又在建立好的细胞模型 - 氯贝特引起 HepG2 细胞 apoA II 表达的升高。在用降脂药物非诺贝酸(fenofibric acid)处理后, 发现 apoA II 和核心蛋白的分泌平行升高。这个效应可用贝布雷非德菌素 A(brefeldin A)所消除, 表明非诺贝酸干预细胞脂代谢后直接影响 HCV 核心蛋白的表达型。HCV 核心蛋白与 14-3-3 蛋白相互作用激活激酶 Raf-1。Aoki et al<sup>[21]</sup>鉴定了 14-3-3 蛋白家族的一个成员与 HCV 核心蛋白相互作用, 14-3-3 蛋白以磷酸丝氨酸依赖方式结合 HCV 核心蛋白。导入 HCV 核心蛋白可以使得 HepG2 中和酵母遗传分析中的 Raf-1 激酶活性明显。结果表明了 HCV 核心蛋白通过和 14-3-3 蛋白相互作用表现出一种新型的 Raf-1 激酶激活蛋白特性, 可能对肝细胞的生长起调节作用。

Cho et al<sup>[22]</sup>报告, C 蛋白可通过上调细胞周期蛋白 E 而促进细胞增生。用 C 蛋白转染 Rat-1 细胞系后, 其 pRb 水平下降, 而 E2F-1 上调, 细胞的增长率升高, 并对凋亡敏感<sup>[23]</sup>。补体受体 gC1qR 和 HCV 核心蛋白相互作用抑制 T-淋巴细胞增生。Kittlesen et al<sup>[24]</sup>采用酵母双杂交方法用核心蛋白筛选人 T 细胞文库鉴定出编码 gC1q 受体基因(gC1qR)。C1q 是 gC1qR 的配体涉及宿主的早期感染防御。与 C1q 一样, HCV 核心能够抑制 T 细胞增生应答。在 T 细胞增生分析中这个核心诱导的抗 T 细胞增生可以被加入抗 gC1qR Ab 扭转。进一步生化分析核心蛋白和 gC1qR 相互作用指出 HCV 核心蛋白结合到 gC1qR 的 188-259 aa 区, 这个位置与结合 C1q 的区域不同。HCV 核心蛋白可以抑制 T 细胞应答可能对于 HCV 在人类中持续感染有重要意义<sup>[25]</sup>。

国内有人<sup>[26]</sup>通过共转染实验证实 HCV 核心蛋白与截短型的 HBV 表面抗原中蛋白具有协同的反式激活作用。临床上部分患者有 HBV 和 HCV 的重叠感染, 这两种病毒蛋白可同时表达于肝细胞中, 因此可能与两种肝炎病毒重叠感染的不同临床特征有一定关系。国内也有研究者<sup>[27]</sup>发现 HCV 核心蛋白还可以和一些未知功能的基因的相互作用值得进一步研究。

总之, 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 酶的消化作用, 维持 HCV RNA 的稳定性外, 还具有一系列不同的生物学调节作用<sup>[25,27,28]</sup>。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,形成异二聚体或多聚体结构,对于肝细胞中的信号转导产生严重干扰.通过这些生物学作用,对于肝细胞的凋亡、细胞周期进行调节,从而参与HCV感染的发病机制<sup>[29]</sup>.HCV感染除了引起急性和慢性病毒性肝炎、肝细胞癌、肝纤维化、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<sup>[30]</sup>.

#### 4 参考文献

- He YW, Liu W, Zen LL, Xiong KL, Luo DD. Effect of interferon in combination with ribavirin on the plus and minus strand of HCV RNA in patients with chronic hepatitis C. *China Natl J New Gastroenterol* 1996;2:179-181
- Wei L, Wang Y, Chen HS, Tao QM. Sequencing of hepatitis C virus cDNA with polymerase chain reaction directed sequencing. *China Natl J New Gastroenterol* 1997;3:12-15
- Zhang SL, Liang XS, Lin SM, Qiu PC. Relation between viremia level and liver disease in patients with chronic HCV infection. *China Natl J New Gastroenterol* 1996;2:115-117
- 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
- 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
- Feng DY, Chen RX, Peng Y, Zheng H, Yan YH. Effect of HCV NS (3) protein on p53 protein expression in hepatocarcinogenesis. *World J Gastroenterol* 1999;5:45-46
- 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 non-responders and relapsers after interferon alfa-2a monotherapy. *World J Gastroenterol* 2001;7:222-227
- Maier KP. Iron, HCV and the liver. *China J New Gastroenterol* 1997;3:61-63
- Yu SJ. A comparative study on proliferating activity between HBV related and HCV related small HCC. *China Natl J New Gastroenterol* 1997;3:236-237
- 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
- Ray RB, Steele R, Meyer K, Ray R. Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 1997;272:10983-10986
- 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
- Lee S, Park U, Lee YI. Hepatitis C virus core protein transactivates insulin-like growth factor II gene transcription through acting concurrently on Egr1 and Sp1 sites. *Virology* 2001;283:167-177
- Matsumoto M, Hsieh TY, Zhu N, VanArsdale T, Hwang SB, Jeng KS, Gorbalenya 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
- Hsieh TY, Matsumoto M, Chou HC, Schneider R, Hwang SB, Lee AS, Lai MM. Hepatitis C virus core protein interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K. *J Biol Chem* 1998;273:17651-17659
- 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
- Owsianka AM, Patel AH. Hepatitis C virus core protein interacts with a human -DEAD box protein DDX3. *Virology* 1999;257:330-340
- Mamiya N, Worman HJ. Hepatitis C virus core protein binds to a DEAD box RNA helicase. *J Biol Chem* 1999;274:15751-15756
- Sabile A, Perlemuter G, Bono F, Kohara K, Demaugre F, Kohara M, Matsuura Y, Miyamura T, Brechot C, Barba G. Hepatitis C virus core protein binds to apolipoprotein AII and its secretion is modulated by fibrates. *Hepatology* 1999;30:1064-1076
- Aoki H, Hayashi J, Moriyama M, Arakawa Y, Hino O. Hepatitis C virus core protein interacts with 14-3-3 protein and activates the kinase Raf-1. *J Virol* 2000;74:1736-1741
- Cho JW, Baek WK, Suh SI, Yang SH, Chang J, Sung YC, Suh MH. Hepatitis C virus core protein promotes cell proliferation through the upregulation of cyclin E expression levels. *Liver* 2001;21:137-142
- Cho J, Baek W, Yang S, Chang J, Sung YC, Suh M. HCV core protein modulates Rb pathway through pRb down-regulation and E2F-1 up-regulation. *Biochim Biophys Acta* 2001;1538:59-66
- Kittleson DJ, Chianese-Bullock KA, Yao ZQ, Braciale TJ, Hahn YS. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *J Clin Invest* 2000;106:1239-1249
- 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,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 表面抗原中蛋白的协同反式激活功能. 中华肝脏病杂志 2002;10:354-355
- 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
- 成军. 丙型肝炎病毒基因组的翻译极其产物的加工. 国外医学微生物学分册 1995;18:14-16
- 刘妍,成军. HCV 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
- 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

## 丙型肝炎病毒复制子的研究

纪冬,成军,王建军

纪冬,成军,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  
项目负责: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:010-66933392 传真:010-63801283  
收稿日期:2003-01-11 接受日期:2003-02-16

纪冬,成军,王建军. 丙型肝炎病毒复制子的研究. 世界华人消化杂志 2003;11(7):1014-1017

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1014.asp>

## 0 引言

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)的感染是急、慢性肝病的主要致病因素之一,他的感染通常是亚临床的,或只出现轻微的症状,但大约80%的患者难以清除病



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](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

