

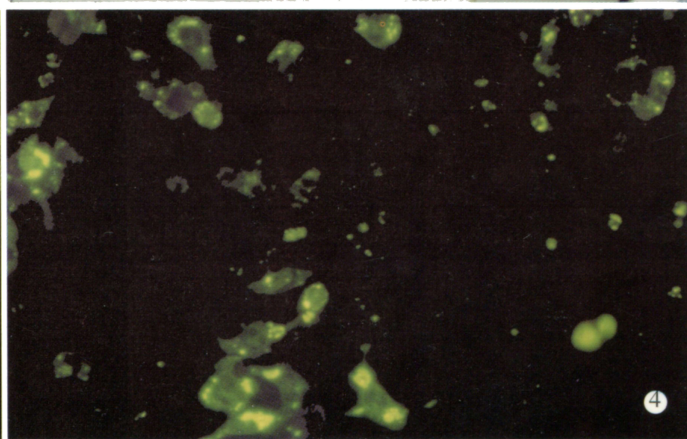
世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003 年 4 月 15 日 第 11 卷 第 4 期

(Volume 11 Number 4)



4/2003

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. 2001 年 JCR® 报告 WJG 影响因子 1.445. 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 4 月 15 日 第 11 卷 第 4 期 (总第 108 期)

述评

373 新基因结构与功能研究的策略 成军

病毒性肝炎

- 378 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因和蛋白的生物信息学分析 成军,李克,陆荫英,王琳,刘妍
- 385 酵母双杂交技术筛选 Hcbp6 结合的肝细胞蛋白编码基因 王琳,李克,成军,陆荫英,张健,陈天艳,洪源,刘妍,王刚,钟彦伟
- 389 噬菌体表面展示技术筛选 HCBP6 人源单链可变区抗体 钟彦伟,成军,张忠东,孙敏,李强,李克,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅
- 394 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析 刘妍,成军,李克,杨倩,陆荫英,王琳,王建军
- 399 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 反式激活的相关基因 牟劲松,刘妍,王刚,成军,段惠娟,李克,陆荫英,王琳,王惠芬

肝癌

- 404 单克隆抗体 3A5- 复方中药安迪偶联物的肝癌导向治疗 梁军,孙纪元,谢艳华,栗燕,闫露,王四旺
- 408 树突状细胞内外对肝癌细胞的抑制作用 郭建巍,秦力维,蔡美英,吕同德
- 411 肝癌组织中 survivin 蛋白表达的意义 陈涛,贾玉容,田伏洲,蔡忠红,李广阔
- 415 热休克蛋白 70 与 IL-2 对小鼠肝癌移植模型的治疗比较 傅庆国,沈晓东,孟凡东,郭仁宣
- 419 肝癌 DC 疫苗活化的 CTL 对人肝癌裸鼠皮下移植瘤的抑制作用 郭建巍,秦力维,蔡美英

基础研究

- 422 HBeAg 肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆 陆荫英,王琳,李克,刘妍,成军,张玲霞
- 426 酵母双杂交技术筛选 HBeAg 肝细胞结合蛋白基因 陆荫英,王琳,成军,李克,刘妍,张玲霞
- 430 大鼠肝卵圆细胞的生物学特征 陈耀凯,王宇明,李俊刚,郎松
- 434 肝硬变大鼠肝部分切除术后残肝 TGF- α 、HGF、PCNA 和 IGFBP-1s mRNA 的变化 陈平,李昆,董家鸿,韩本立
- 438 细菌内同源重组法构建 HBV S 区和 C 区基因非复制型腺病毒载体及其体外表达 黄呈辉,欧阳玲,马会慧,汤正好,李刚,姚集鲁
- 442 大鼠肠巨噬细胞 TNF α 表达及复方大承气汤的影响 陈海龙,王辉,李文利,范琦
- 446 家兔回肠淋巴管铸型的扫描电镜研究 滕诚毅,王晓平,魏双艳,王广友,汤凤彩

焦点论坛

- 450 酵母单杂交技术的原理及应用 马守东,洪源,成军
- 451 酵母双杂交系统的原理及应用 陈天艳,成军,张树林
- 456 抑制性消减杂交技术原理及应用 杨倩,成军,刘妍,王建军,张树林
- 459 噬菌体展示技术的原理及应用 张忠东,成军,张树林
- 461 基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用 刘妍,成军,王建军,杨倩,陆荫英
- 464 丙型肝炎病毒与 JAK-STAT 信号转导系统 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳
- 466 丙型肝炎病毒与 MAPK 信号转导系统 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳
- 469 肿瘤抑制因子 p21/waf1 与肝炎病毒复制与表达的调节研究 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳
- 472 乙型肝炎病毒对细胞信号转导的影响 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳
- 474 生物信息学技术与新基因的研究 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳

研究快报

- 478 中药复方肠安泰对肠癌肺转移模型小鼠肠黏膜固有层 B 细胞及 IL-12 的影响 王文萍,王垂杰,姜良铎,饭乡正明
- 481 细胞外信号调节激酶在胃癌组织中的表达及其与幽门螺杆菌感染的关系 褚传莲,李延青,张燕,李文婕,赵宪邨

研究快报	483 实验性肝纤维化形成过程中几种基质金属蛋白酶表达的研究 李保森,游绍莉,赵志海,辛绍杰,赵景民,王松山 486 鼠肝移植对胃黏膜损伤的实验研究 褚延魁,马庆久,鲁建国,刘维,何显力,杜锡林,乔庆,王胜智
临床经验	488 重叠丙型肝炎病毒感染在慢性乙型肝炎患者肝脏病变中的作用 商庆华,于建国,徐传镇,肖德明,尹燕明,陈崇兴,张光曙 491 正常人胃左静脉的声象图及血流动力学特征 夏建国,董胜翔,李凤华 494 手术与非手术治疗重症急性胰腺炎 120 例 金世龙,侯庆福,顾红光,王仁云,廖维健
消息	388 欢迎订阅 2003 年度世界华人消化杂志 393 欢迎订阅 2003 年度 World Journal of Gastroenterology® 398 中国科技期刊走向世界的步伐正在加快 403 世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版目次 407 提供您使用世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版 414 世界华人消化杂志和 WJG 获得商标注册 418 美国国立医学图书馆 2002 年度收录中国医学期刊名单 425 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 433 WJG 搭建我国消化化学基础和临床研究惟一国际交流的平台 437 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 477 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊
征文通知	429 第五届上海国际肝癌肝炎会议征文启事 480 全国第八届中西医结合普通外科学术研讨会征文通知
电子版	2003 世界华人消化杂志电子版 http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2003.htm 2002 世界华人消化杂志电子版 http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2002.htm 2001 世界华人消化杂志电子版 http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2001.htm 2003 World J Gastroenterol 电子版 http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2003.htm 2002 World J Gastroenterol 电子版 http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2002.htm 2001 World J Gastroenterol 电子版 http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2001.htm
读者来信	493
封面故事	377 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

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 2003-04-15
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 任师颜
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()》
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.

ISSN 1009-3079 邮发代号 国外代号 国内定价 广告经营许可证
CN 14-1260/R 82-262 M 4481 每期 24.00 元 全年 288.00 元 1401004000050

COMMENTARY

Strategy in study the structure and function of novel gene

Cheng J 373

VIRAL HEPATITIS

Bioinformatics analysis of human hepatitis C virus core protein-binding protein 6 gene and protein

Cheng J, Li K, Lu YY, Wang L, Liu Y 378

Screening of gene encoding of hepatic proteins interacting with Hcbp6 via yeast two hybridization

Wang L, Li K, Cheng J, Lu YY, Zhang J, Chen TY, Hong Y, Liu Y, Wang G, Zhong YW 385

Screen for human single chain variable region in antibody against human hepatitis C virus core protein binding protein 6

Zhong YW, Cheng J, Zhang ZD, Sun M, Li Q, Li K, Wang L, Li L, Zhang LX, Chen JM 389

Gene expression profile of HepG2 cell transfected with hepatitis C virus core protein-binding protein 6 gene

Liu Y, Cheng J, Li K, Yang Q, Lu YY, Wang L, Wang JJ 394

Cloning of genes transactivated by NS3 protein of HCV with suppressive and subtractive hybridization

Mu JS, Liu Y, Wang G, Cheng J, Duan HJ, Li K, Lu YY, Wang L, Wang HF 399

LIVER CANCER

Effect of monoclonal antibody 3A5 coupled with Chinese medicine compound Andi in targeted treatment of hepatocellular carcinoma

Liang J, Sun JY, Xie YH, Li Y, Yan L, Wang SW 404

Inhibition of dendritic cells against hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*

Guo JW, Qin LW, Cai MY, Lu TD 408

Expression of survivin protein in hepatocellular carcinoma tissues and its relationship with clinical pathological features and prognosis.

Chen T, Jia YR, Tian FZ, Cai ZH, Li GK 411

Comparison of therapeutic efficacy between tumor-derived heat shock protein 70 and interleukine-2

Fu QG, Shen XD, Meng FD, Guo RX 415

Cytotoxic lymphocytes primed by DC based hepatocellular carcinoma vaccine against growth of carcinoma xenograft on nude mice

Guo JW, Qin LW, Cai MY 419

BASIC RESEARCH

Screening and cloning of gene encoding HBcAg interacting protein in hepatocytes

Lu YY, Wang L, Li K, Cheng J, Liu Y, Zhang LX 422

Screening of HBcAg interacting proteins in hepatocytes with yeast-two hybrid technique

Lu YY, Wang L, Li K, Liu Y, Cheng J, Zhang LX 426

Biological characteristics of rat hepatic oval cells

Chen YK, Wang YM, Li JG, Lang S 430

Changes of TGF- α , HGF, PCNA and IGFBP-1s mRNA after partial hepatectomy in rat liver

Chen P, Li K, Dong JH, Han BL 434

Construction of replication-deficient recombinant adenoviral vector carrying HBV S and C region gene by homologous recombination in bacteria and its expression *in vitro*

Huang CH, Ou-Yang L, Ma HH, Tang ZH, Li G, Yao JL 438

TNF α expression and effects of Dachengqi Decoction compound in gut macrophages

Chen HL, Wang H, Li WL, Fan Q 442

Lymphatic corrosion casts in rabbit ileum: scanning electronmicroscopic studies

Teng CY, Wang XP, Wei SY, Wang GY, Tang FC 446

FOCUSED FORUM

Principle and applications of yeast single hybridization

Ma SD, Hong Y, Cheng J 450

Principle of yeast two hybridization and its applications

Chen TY, Cheng J, Zhang SL 451

Principle and applications of suppressive and subtractive hybridization technique

Yang Q, Cheng J, Liu Y, Wang JJ, Wang SL 456

Principle of phage display technique and its application

Zhang ZD, Cheng J, Zhong YW, Zhang SL 459

Gene chip technique in the pathogenesis of viral hepatitis

Liu Y, Cheng J, Wang JJ, Yang Q, Lu YY 461

Hepatitis C virus and signal transduction system of JAK-STAT

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 464

Hepatitis C virus and signal transduction system of MAPK

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 466

Tumor inhibitive factor p21/waf1 and regulation of replication and expression of hepatitis virus

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 469

Effect of Hepatitis B virus on cellular signal transduction

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 472

Study on Bioinformatics and new gene

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 474

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi \$

World Chinese Journal of Digestology
Monthly \$ \$

Founded on 15th January, 1993

Renamed on 25th January, 1998

Publication date 15th April, 2003

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

ISSN 1009-3079 **CN** 14-1260/R

Edited by Editorial Board of World Chinese Journal of Digestology
P.O.Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

77, Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Overseas Distributor China International Book Trading Corporation
P.O.Box 399, Beijing 100044, China **Code No.** M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

P.O.Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381892

Fax: +86-10-85381893

Email: wcjd @ wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

Copyright © 2003 by The WJG Press

Indexed/

Abstracted by

Chemical Abstracts

EMBASE/

Excerpta Medica

Abstract Journal

- 14 Yao ZQ, Nguyen DT, Hiotellis AI, Hahn YS. Hepatitis C virus core protein inhibits human T lymphocyte responses by a complement-dependent regulatory pathway. *J Immunol* 2001;167:5264-5272
- 15 Bureau C, Bernad J, Chaouche N, Orfila C, Beraud M, Gonindard C, Alric L, Vinel JP, Pipy B. Nonstructural 3 protein of hepatitis C virus triggers an oxidative burst in human monocytes via activation of NADPH oxidase. *J Biol Chem* 2001;276:23077-23083
- 16 He Y, Tan SL, Tareen SU, Vijaysri S, Langland JO, Jacobs BL, Katze MG. Regulation of mRNA translation and cellular signaling by hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *J Virol* 2001;75:5090-5098
- 17 Reed KE, Rice CM. Identification of the major phosphorylation site of the hepatitis C virus H strain NS5A protein as serine 2321. *J Biol Chem* 1999;274:28011-28018
- 18 Tan SL, Nakao H, He Y, Vijaysri S, Neddermann P, Jacobs BL, Mayer BJ, Katze MG. NS5A, a nonstructural protein of hepatitis C virus, binds growth factor receptor-bound protein 2 adaptor protein in a Src homology 3 domain/ligand-dependent manner and perturbs mitogenic signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:5533-5538
- 19 成军,陈菊梅. 丙型肝炎病毒NS5A蛋白的生物学调节作用. 国外医学微生物学分册 2001;24:12-14
- 20 刘妍,成军,陆荫英,李克. 乙型肝炎病毒蛋白反式激活基因的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:217-219

肿瘤抑制因子 p21/waf1 与肝炎病毒复制与表达的调节研究

成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳

成军,刘妍,陆荫英,李克,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
国家自然科学基金资助项目, No. C39970674, C03011402
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:2002-10-29 接受日期:2002-11-18

成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳. 肿瘤抑制因子p21/waf1与肝炎病毒复制与表达的调节研究. 世界华人消化杂志 2003;11(4):469-471
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/469.htm>

0 引言

作为一种肿瘤抑制基因, p21/waf1 在细胞周期、细胞凋亡、信号转导以及癌变中具有十分重要的调节作用^[1]. 肝炎病毒,特别是乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)的感染,不仅引起急性和慢性病毒性肝炎,而且与肝纤维化、肝细胞癌(HCC)的发生、发展密切相关^[2]. 这些肝炎病毒感染靶细胞之后,在细胞内对于细胞正常的调节机制产生严重干扰,这是肝炎病毒致病的分子生物学机制的重要组成部分^[3]. 其中,肝炎病毒蛋白对于 p21/waf1 的异常调节具有十分重要的生物学和医学意义.

1 肝炎病毒蛋白与 p21/waf1 调节的相关性

肝炎病毒蛋白与 p21/waf1 调节之间的相关性已经积累了丰富的资料. 目前认为,细胞周期调节紊乱是HCC发生的重

要机制,但是,肝炎病毒对于细胞周期调节的影响目前还不清楚. Choi et al^[4]对于 HCC 组织中细胞周期素 D1、细胞周期素 E、p53、p27、p21/waf1、p16、Rb 和增生细胞核抗原(PCNA)蛋白的表达进行免疫组织化学研究,表明细胞周期素 D1 过表达与肿瘤进展到晚期、低度分化、肿瘤大小、微血管浸润、肝脏内转移、缺乏肿瘤包膜形成、浸润性生长、p53 表达异常、PCNA 表达水平升高等有关. 异常的 p53 表达与低分化程度有关. 细胞周期素 D1 或 p53 表达异常在异常增生中没有见到. 其中 p21/waf1 的调节异常值得重视. Cray et al^[5]应用免疫组织化学研究结果表明, p21/waf1 表达与肝细胞 Ki-67 这种肝细胞增生标志物和组织病理学特征相关. 正常的肝组织和非酒精性脂肪肝炎(NASH)组织中很少表达 p21/waf1 和 Ki-67 蛋白,在酒精性肝炎肝组织中 p21/waf1 表达水平升高,但 Ki-67 表达水平不变. 慢性丙型肝炎肝组织中 p21/waf1 的表达与 Ki-67 的表达以及炎症、纤维化程度显著相关. 说明肝脏炎症显著上调 p21/waf1 的表达,而且表达水平与疾病严重程度相关. Shi et al^[6]也发现 HCC 组织中出现 p53 相关的 p21/waf1 的表达水平改变.

肝炎病毒蛋白对于 p21/waf1 的影响,不仅表现在蛋白水平上,而且在转录水平上也有反应. Han et al^[7]对于表达 HBxAg 的细胞系进行了 588 个细胞基因的表达谱型基因芯片的分析,发现 2 个癌基因(IGFR-2, RhoA)、1 个细胞周期调节基因(p55CDC)、3 个细胞内信号转导相关基因(凝血酶受体, MLK-3, MacMARCKS),1 个应急应答蛋白基因(HSP27)、2 个细胞凋亡应答基因(FAST 激酶, Bak),1 个转录因子基因(p21/waf1)表达上调;而 1 个转录因子基因(转录延长因子 SII),2 个生长因子基因(单核细胞趋化蛋白 1, T-淋巴细胞分泌蛋白 I-309)显著下调.

关于肝炎病毒蛋白对于 p21/waf1 表达调节的研究结果也有不同的研究报道. Park et al^[8]研究发现 HBxAg 对肝细胞基因表达具有调节作用,改变了肝细胞对细胞凋亡刺激信号的敏感性,对肝细胞的生长阻滞进行异常调节. 对 p53 基因突变的肝癌细胞系 Hep3B 进行研究,稳定或瞬时表达 HBxAg 的肝癌细胞系 p21/waf1 的 mRNA 和蛋白表达水平上升,与细胞周期素依赖性激酶 2(CDK2)的结合能力提高,显著抑制细胞周期素 E-CDK2 相关的组蛋白 H1 的磷酸化修饰,增强 p21/waf1 基因启动子的表达活性. p21/waf1 基因启动子序列缺失突变研究结果表明,HBxAg 应答元件位于 p21/waf1 基因启动子序列转录起始位点上游,即 -1 185-1 482 nt 之间. 启动子序列的突变分析发现 HBxAg 应答元件与转录因子 ETS 结合位点相邻. 研究发现 HBxAg 可以克服 p53 的缺失,对其下游的信号转导系统产生影响,直接导致 p21/waf1 基因转录的激活. 提示 p21/waf1 抑制剂的开发在肝细胞癌的治疗中具有很大潜力,特别是在 p53 基因突变,有 HBV 感染时尤其如此. Su et al^[9]的研究发现黄曲霉毒素 B1(AFB1)与 HBV 感染在 p21/waf1 表达调节中具有协同作用.

实验中 52.9% 的树驹发生 HCC, 而单纯感染 HBV 和单纯摄入 AFB1 的动物发生 HCC 分别只有 11.1% 和 15.8%, 对照组没有发现 HCC. 肝组织中胰岛素样生长因子-II (IGF-II) 的表达率分别为 82.4%、22.2%、26.3% 和 0, 有显著差异. p21/waf1 的表达分别为 29.4%、11.1%、15.8% 和 0, HBxAg 的表达在联合组也高于单纯 HBV 组 (52.9% 对 11.1%). 这些基因的过表达与 HCC 发生有关. 表明 p21/waf1 表达在 HBV 和 AFB1 协同诱发 HCC 中具有重要作用.

2 肝炎病毒蛋白结构及其对 p21/waf1 调节的影响

肝炎病毒蛋白的结构性质和特点是其调节 p21/waf1 表达的重要基础. HCV 核心蛋白对于 p21/waf1 基因表达具有直接的抑制作用. Jung et al^[10]研究了 HCV 核心蛋白对 p21/waf1 启动子活性的抑制作用. HCV 核心蛋白 N- 端部分缺失几乎完全失去 p21/waf1 启动子活性的抑制作用, 进一步研究表明 HCV 核心蛋白 84-191 aa 是其抑制 p21/waf1 表达的功能结构域. HCV 核心蛋白突变体 S99L 对 p21/waf1 基因的抑制作用与野生型基本相同, S116I 或 S116A 突变则导致 HCV 核心蛋白的抑制作用完全消失. S116D 突变体的抑制作用与野生型相似, 表明酸性的天门冬氨酸残基可以模拟磷酸化的效果. 当以蛋白激酶 A(PKA) 的抑制剂 H-89 进行处理时, HCV 核心蛋白的抑制作用呈现剂量依赖性的降低, 在浓度为 5 μ mg/L 时完全阻断. 相反, 以 PKA 的激活剂二丁酰 -cAMP 作用时, HCV 核心蛋白的抑制作用显著升高, 表明 HCV 核心蛋白对 p21/waf1 的抑制作用是通过 PKA 对其 S116 的磷酸化修饰来调节的. Wang et al^[11]应用谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST) 的 pull-down 分析, 证实 HCV 核心蛋白与 p21/waf1 可以形成复合物. 缺失定位分析结果表明, HCV 核心蛋白 N- 末端的 (24-52 aa) 和 p21/waf1 的 C- 末端的 (139-164 aa) 是这一复合物形成关键的结构基础. p21/waf1 蛋白在 147、149、150 等这些与 PCNA 结合相关的位点上发生突变, 并不影响与 HCV 核心蛋白的结合, 提示 p21/waf1 蛋白与 HCV 核心蛋白、PCNA 的结合结构基础截然不同. 由于与 p21/waf1 结合的位点十分接近, HCV 核心蛋白与 PCNA 蛋白之间存在与 p21/waf1 蛋白结合的竞争性抑制现象.

Suzuki et al^[12]研究证实 HCV 核心蛋白是遍在蛋白- 蛋白复合物降解途径作用的靶蛋白. 首先, HCV 核心蛋白的 C- 末端疏水区是代谢不稳定区, 与蛋白体抑制物共同孵育可以显著增加这种蛋白的积聚. 其次, 体内遍在蛋白化分析结果表明, 遍在蛋白的多个链上都有 HCV 核心蛋白的结合. 相反, 虽然稳定的 HCV 核心蛋白也可以遍在蛋白化, 但是只有单个或少数的遍在蛋白的结合位点. 因此, HCV 核心蛋白 C- 末端的遍在蛋白化影响 HCV 核心蛋白的代谢, 以进行调节.

3 肝炎病毒蛋白对 p21/WAF1 调节的 p53 蛋白的依赖性在正常的细胞信号转导过程中, p21/waf1 是 p53 蛋白调节作

用下游的一种靶分子. 因此, 肝炎病毒蛋白对于 p21/waf1 的调节可能会与 p53 蛋白的调节作用有关. Ahn et al^[13]研究了 HBxAg 蛋白对于 p21/waf1 的调节作用及其与 p53 蛋白之间的相互关系. HBxAg 是 HBV 引起 HCC 的主要因素, 在 HBxAg 的转基因小鼠模型中得到证实, 主要机制就是对一系列病毒和细胞的启动子序列的反式激活作用. 我们的研究证实表达 HBxAg 的细胞系的 p21/waf1 RNA 表达水平降低, 调节机制是对 p21/waf1 基因转录水平的抑制, 而且是 p53 依赖性的. 在 p21/waf1 基因的启动子序列中存在 Sp1 的结合位点, 因此推测 HBxAg 通过 Sp1 对 p21/waf1 基因表达进行负调节. 因为肿瘤抑制基因 p21/waf1 编码产物的表达在多种类型的组织和细胞中都存在, 而且是细胞周期素 -CDK 复合物和 DNA 合成的抑制剂, 诱导细胞在 G1-S 检验点进入阻滞状态, 因此 HBxAg 对于 p21/waf1 的调节在 HBV 引起的 HCC 中具有十分重要的地位和作用.

丙型肝炎病毒蛋白对于 p21/waf1 的调节作用也与 p53 蛋白密切相关. Ray et al^[14]应用 NIH3T3、HepG2、HeLa 细胞系的体外瞬时表达系统分别证实 HCV 核心蛋白对于 p21/waf1 基因启动子的表达具有显著的抑制作用. p21/waf1 基因启动子序列缺失突变分析表明 HCV 核心蛋白应答区位于 p53 结合位点. 凝胶迟滞分析表明 HCV 核心蛋白与 p21/waf1 基因启动子序列没有直接结合的功能. 因此, 认为 HCV 核心蛋白促进细胞增生的作用, 是通过未知细胞蛋白因子对 p21/waf1 转录激活抑制而实现的. Otsuka et al^[15]对于 HCV 各种蛋白对 p53 基因表达活性的影响进行了研究, 发现只有核心蛋白提高 p53 和 p21/waf1 的表达水平, 而后者是 p53 主要的作用靶蛋白. 以电泳泳动度迁移率分析 (EMSA) 法证实 HCV 核心蛋白不仅提高 p53 蛋白的 DNA 结合功能, 而且以启动子的报告基因技术证实核心蛋白对于 p53 基因的转录水平也有显著的增强作用. 在 GST 融合蛋白分析结果中发现, HCV 核心蛋白 C- 末端可以与 p53 直接结合, 另外 HCV 核心蛋白与 Htaf(II) 28 这种转录因子复合体的成分进行结合, 这些结果表明 HCV 核心蛋白与 p53 可以结合, 而且对于 p53 依赖性启动子的转录活性具有显著的调节作用. Lu et al^[16]研究证实 HCV 核心蛋白可以提高 p53 基因的转录水平, 不管这种 p53 基因是内源性的还是外源性的. HCV 核心蛋白对于 p53 基因的这种调节作用, 也得到 HCV 核心蛋白可以提高 p53 作用下游靶基因 p21/waf1 表达水平的佐证. HCV 核心蛋白通过对 p53 的调节来显著抑制肝癌细胞系的生长. 体外免疫共沉淀技术、GST pull-down 技术、Far-Western blot 分析技术等证实 HCV 核心蛋白和 p53 可以结合, 缺失作图分析证实 p53 蛋白 C- 末端部分 (366-380 aa) 是其与核心蛋白结合的位点. 研究结果提示 HCV 核心蛋白可能通过直接的物理结合激活 p53. HCV 核心蛋白对 p53 蛋白的持续激活是慢性 HCV 感染致病机制的重要组成部分.

Kwun et al^[17]研究, 证实 NS3 蛋白对于 p21/waf1 的

基因表达具有特异性的、剂量依赖性的抑制作用. 这种抑制作用是细胞类型非依赖性的, 而且与 HCV 核心蛋白具有协同作用. 当 p21/waf1 启动子序列中 p53 结合位点被缺失以后, NS3 蛋白对于 p21/waf1 启动子的抑制作用则完全消失, 提示 NS3 蛋白对于 p21/waf1 启动子活性的抑制作用是 p53 依赖性的. 另外, NS3 蛋白对于具有 p53 结合位点的其他启动子也具有抑制作用. 尽管 NS3 对于 p21/waf1 调节的功能域位于蛋白酶结构位点, 但是蛋白酶活性并不是其抑制作用所必须的. NS3 蛋白对于 p53 的基因转录和蛋白的稳定性都没有显著的影响, 因此推测 NS3 对于 p21/waf1 基因启动子序列的调节是通过 NS3 蛋白 -p53 蛋白之间的相互作用实现的. 表达 NS3 蛋白的 NIH 3T3 细胞系生长速度至少是母本细胞生长速度的 2 倍. 说明 NS3 蛋白对于 p21/waf1 蛋白的抑制作用可以促进细胞的增生. HCV NS5A 蛋白是一种磷酸化的蛋白, 与哺乳动物细胞中数种蛋白具有结合作用, 为了研究这种结合的生物学意义, Arima et al^[18]建立了 5 种四环素控制表达 HCV NS5A 蛋白的小鼠、人细胞系, 表达 NS5A 的这些细胞系均表现出生长迟滞现象, 细胞周期分析结果表明, 表达 NS5A 的人上皮细胞 S 的细胞比例下降, G2/M 期细胞比例上升, 可由 p53 依赖性的 p21/waf1 蛋白和 mRNA 表达水平的降低来解释. HCV NS5A 在体内和体外都能与 CDK1 结合, 在表达 NS5A 蛋白的细胞系中, 相当数量的 p21/waf1 与 CDK2 结合成复合物形式. CDK1 和细胞周期素 B1 蛋白表达水平也有相应下降, 与 G2/M 期细胞比例上升一致, 这些研究结果表明, NS5A 造成的细胞生长抑制和细胞周期调节异常, 主要是通过对 CDK1/2- 细胞周期素复合物的调节实现的. HCV NS5A 蛋白促进细胞生长, 在转录水平上影响 p53 信号转导系统下游分子 p21/waf1 启动子表达活性, Majumder et al^[19]对于 NS5A 介导的 p21/waf1 基因转录水平抑制的机制进行了研究. 通过应用 p53 野生型(+/+)纯合子缺失突变型(-/-)细胞系的研究, 发现 NS5A 蛋白对 p21/waf1 基因转录的抑制是 p53 依赖性的, 不仅如此, HCV NS5A 蛋白对于含有多个 p53 结合位点的人工合成的启动子指导的报告基因表达载体(PG13-LUC)的表达活性也具有显著的抑制作用. 以 pull-down 技术、体外免疫共沉淀技术和哺乳动物细胞双杂交技术证实 NS5A 与 p53 蛋白之间存在物理性结合. 共聚焦显微镜技术发现 p53 与 NS5A 蛋白在 HepG2 和 Saos-2 细胞中结合, 共同存在. 因此, 认为 NS5A 和 p53 之间的相互作用, 是 NS5A 蛋白对于 p21/waf1 基因表达活性进行调节, 进而引起 HCC 的重要机制之一.

Ghosh et al^[20]应用酵母双杂交技术证实 NS5A 与新型转录因子蛋白 SRCAP C- 末端序列结合, 这种结合也得到了哺乳动物细胞双杂交技术、体外 pull-down 技术以及体外免疫共沉淀技术等证实. 体外瞬时转染证实 SRCAP 可有效激活转录. SRCAP 增强 NS5A 蛋白的对 p21/waf1 启动子的转录抑制作用增强. NS5A 和 SRCAP 的

调节作用可能是 HCV 感染致病机制的重要组成部分.

4 参考文献

- 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, 1997:83-130
- 成军, 朱传琳. 丙型肝炎病毒感染慢性化的分子生物学机制. 国外医学病毒学分册 2000;7:29-32
- 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
- Choi YL, Park SH, Jang JJ, Park CK. Expression of the G1-S modulators in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma and dysplastic nodule: association of cyclin D1 and p53 proteins with the progression of hepatocellular carcinoma. *J Korean Med Sci* 2001;16:424-432
- Crary GS, Albrecht JH. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in human liver. *Hepatology* 1998;28:738-743
- Shi YZ, Hui AM, Takayama T, Li X, Cui X, Makuuchi M. Reduced p21(WAF1/CIP1) protein expression is predominantly related to altered p53 in hepatocellular carcinomas. *Br J Cancer* 2000;83:50-55
- Han J, Yoo HY, Choi BH, Rho HM. Selective transcriptional regulations in the human liver cell by hepatitis B viral X protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;272:525-530
- Park US, Park SK, Lee YI, Park TG. 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
- Su JJ, Qin GZ, Yan RQ, Huang DR, Yang C, Lotslikar PD. The expression of insulin-like growth factor II, hepatitis B virus X antigen and p21 in experimental hepatocarcinogenesis in tree shrews. *Ann Acad Med Singapore* 1999;28:62-66
- Jung EY, Lee MN, Yang HY, Yu D, Jang KL. The repressive activity of hepatitis C virus core protein on the transcription of p21(waf1) is regulated by protein kinase A-mediated phosphorylation. *Virus Res* 2001;79:109-115
- Wang F, Yoshida I, Takamatsu M, Ishido S, Fujita T, Oka K, Hotta H. Complex formation between hepatitis C virus core protein and p21Waf1/Cip1/Sdi1. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273:479-484
- Suzuki R, Tamura K, Li J, Ishii K, Matsuura Y, Miyamura T. Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus. *Virology* 2001;280:301-309
- Ahn JY, Chung EY, Kwun HJ, Jang KL. Transcriptional repression of p21 (waf1) promoter by hepatitis B virus X protein via a p53-independent pathway. *Gene* 2001;275:163-168
- Ray RB, Steele R, Meyer K, Ray R. Hepatitis C virus core protein represses p21WAF1/Cip1/Sid1 promoter activity. *Gene* 1998;208:331-336
- Otsuka M, Kato N, Lan K, Yoshida H, Kato J, Goto T, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus core protein enhances p53 function through augmentation of DNA binding affinity and transcriptional ability. *J Biol Chem* 2000;275:34122-34130
- Lu W, Lo SY, Chen M, Wu K, Fung YK, Ou JH. Activation of p53 tumor suppressor by hepatitis C virus core protein. *Virology* 1999;264:134-141
- Kwun HJ, Jung EY, Ahn JY, Lee MN, Jang KL. P53-dependent transcriptional repression of p21 (waf1) by hepatitis C virus NS3. *J Gen Virol* 2001;82:2235-2241
- Arima N, Kao CY, Licht T, Padmanabhan R, Sasaguri Y, Padmanabhan R. Modulation of cell growth by the hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *J Biol Chem* 2001;276:12675-12684
- Majumder M, Ghosh AK, Steele R, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A physically associates with p53 and regulates p21/waf1 gene expression in a p53-dependent manner. *J Virol* 2001;75:1401-1407
- Ghosh AK, Majumder M, Steele R, Yaciuk P, Chrivia J, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates transcription through a novel cellular transcription factor SRCAP. *J Biol Chem* 2000;275:7184-7188



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
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

