

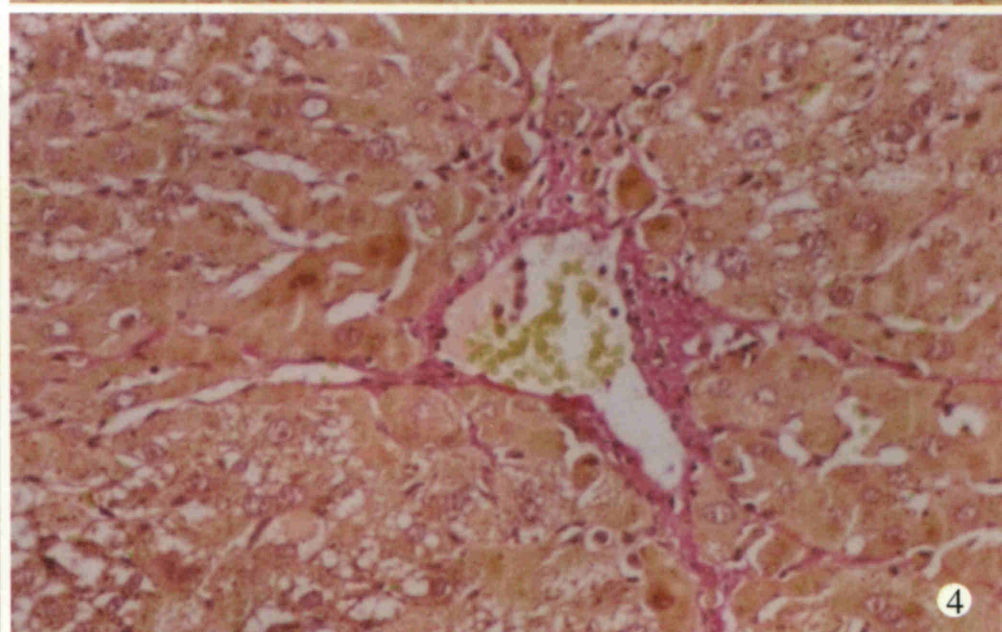
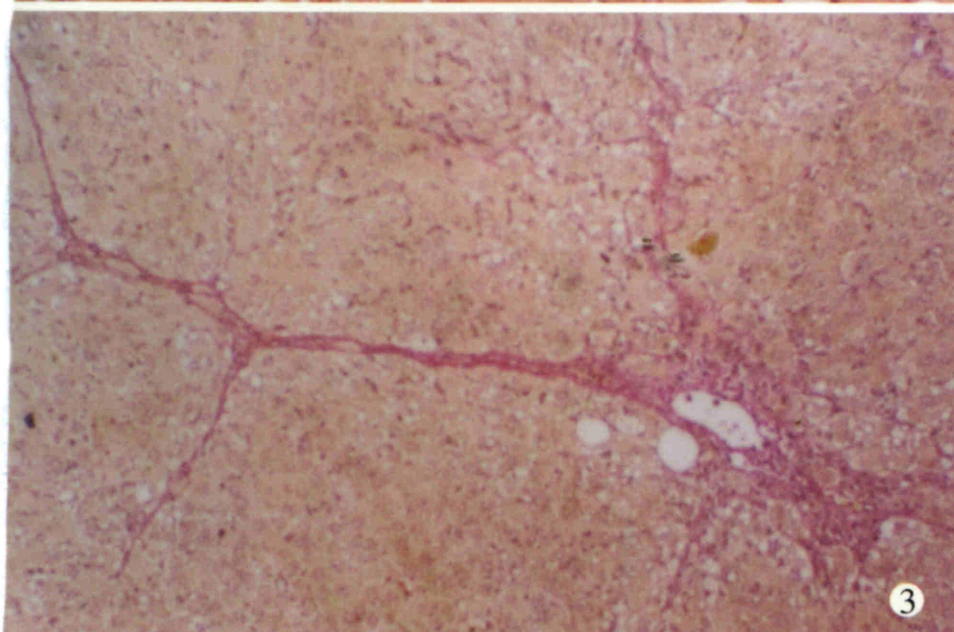
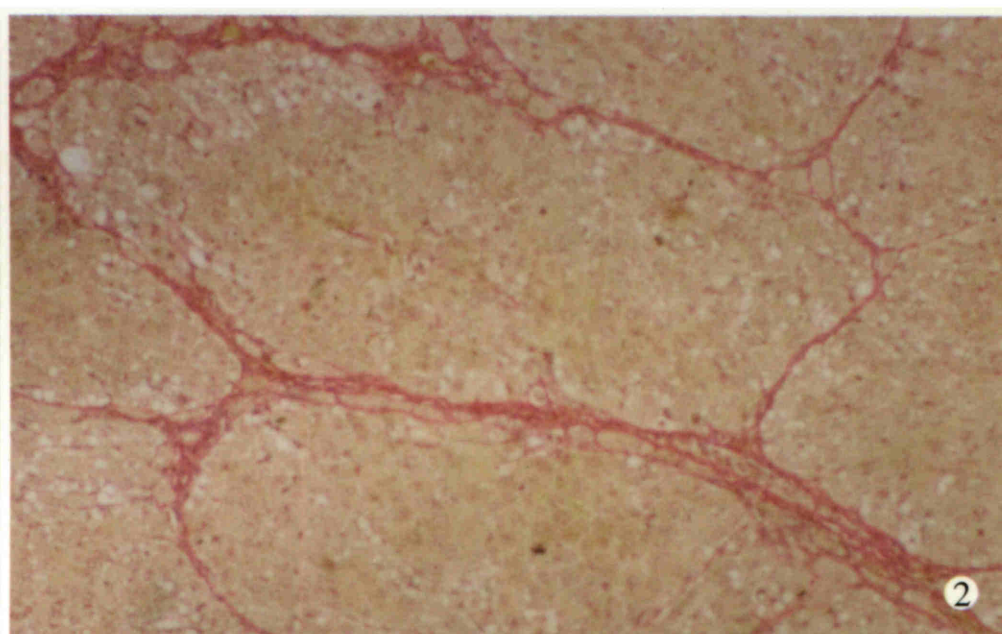
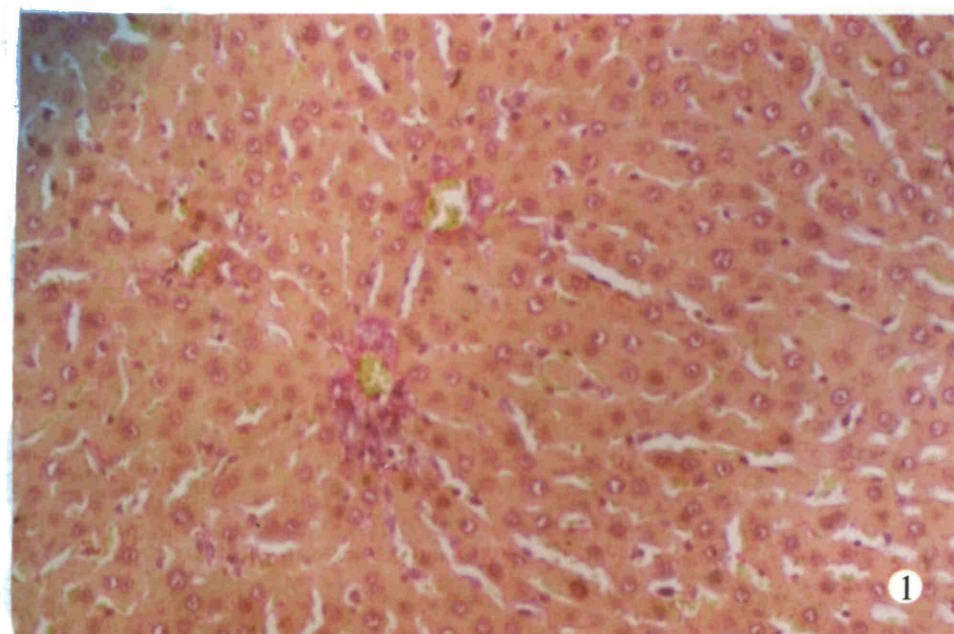
世界华人消化杂志®

**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 α 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 HepG₂ 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 PGE₂ 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 p⁵³ 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.

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^[29].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^[30].

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

毒, 发展为慢性感染, 从而更易演变为肝硬化和肝细胞肝癌, 目前世界范围都大约有 1.7 亿人口感染了 HCV^[1], 由于其高流行性、隐匿的病程和持续感染的诊断不足使得其成为严重的医学和社会经济学问题. 病毒基因组约在 10 a 以前就被鉴定出来, 并且引起了对 HCV 基因结构、病毒蛋白结构和生化特征的研究. 但由于 HCV 基因组表现出显著的序列变异, 尤其是在 E2 包膜蛋白编码区的高变区, 并且在全球范围内, HCV 的基因型多达 30 个^[2]. HCV 在体外自主复制水平极低, 且其唯一的可感染动物为黑猩猩, 故缺少有效的细胞培养系统和经济的小动物模型来研究 HCV 复制及其致病机制, 使得对于病毒生活周期和抗病毒药物的研究进展缓慢. 研究者们进行了大量的尝试来克服这个困难, 直到 1999 年, 才有了突破性的进展: 建立了一个有效的细胞培养模型 - 复制子(replicon)系统, 这个系统的基础是: 使用基因工程构建的亚基因组的 HCV RNA 在转染的人肝癌细胞系 Huh-7 细胞中可以自主复制^[3-5]. 本文对于 HCV 细胞培养系统及其应用进行阐述.

1 丙型肝炎病毒

HCV 为单股正链 RNA 病毒, 属于黄病毒属. HCV 基因组全长约 9.6 kb, 含有: (1) 一个大的开放阅读框(ORF), 编码约 3 010 氨基酸长的多聚蛋白前体, 这个蛋白前体通过宿主和病毒蛋白酶的裂解作用产生至少 10 个蛋白, 排列如下: 氨基端(NH₂) - 核心蛋白(core) - 包膜蛋白 1(envelope, E1) - E2 - p7 - 非结构蛋白 2(nonstructural protein 2, NS2) - NS3 - NS4A - NS4B - NS5A - NS5B - 羧基端(COOH)^[6]. 这些病毒蛋白并不仅在病毒复制中起作用, 也影响宿主细胞内多种功能. (2) 基因组 5' - 端为 5' - 非翻译区(NTR), 全长 341 个核苷酸(nt)^[7], 位于 ORF 的上游, 在 5' - NTR 中存在一个内部核糖体进入位点(IRES), 它是一种最复杂的顺式激活元件, 指导核糖体 40 S 亚基与 ORF 的起始密码子 AUG 相结合, 从而指导 ORF 的翻译, 最近一些研究表明其还具有调节 HCV RNA 复制的作用^[8]. (3) ORF 下游是 3' - NTR: 其长度是可变的, 包括三个结构: 一个短的约 40 个 nt 的可变序列, 其后有终止密码子, 他对于 HCV 基因组的复制并不是必需的^[9]; 大约 30-150 nt 的多聚 poly(U/UC) 序列; 大约 98 nt 的高度保守的“X 尾”异源多聚序列, 其 3' - 末端有一个 46 nt 的序列可形成稳定的茎 - 环(stem-loop) 结构, 他对于体内及细胞培养系统的 RNA 复制来说是必需的. NS5B 蛋白为 RNA 依赖的 RNA 多聚酶(RNA-dependent RNA polymerase, RDRP), 由于其缺少校读功能, 使得 HCV RNA 突变率高达每年 5×10^{-3} /位点, 从而导致一个相当大的准种池(pool of quasispecies)^[10].

HCV 不是逆转录病毒, 其复制过程并不与人类免疫缺陷病毒(HIV)那样先逆转录为 DNA. HCV 复制的简单过程可以描述为: (1) 黏附和穿入宿主细胞; (2) 释放病毒正链 RNA; (3) ORF 的翻译和多聚蛋白的加工; (4) 包含了至少

NS3-5B, 很有可能还有细胞内蛋白的复制酶复合物的装配; (5) 通过中间产物(负链 RNA)产生正链 RNA 子代; (6) 新的病毒颗粒的形成, 通常通过胞质内质网的出芽来获得其包膜蛋白; (7) 病毒子代的释放, 可能是通过高尔基体进行运输. 所有这些步骤都发生于胞质内, 并且在胞质内可以发现 HCV 蛋白与细胞内膜紧密相关^[11].

2 丙型肝炎病毒复制子

丙型肝炎复制子系统是由德国美因兹 Johannes-Gutenberg 大学的病毒研究所的 Bartenschlager et al 建立的. Bartenschlager 及其小组^[12]于 1999 年从感染患者的肝脏组织中分离出 HCV 基因组, 并对其克隆进行重新构建, 剪切掉一部分片段, 又增加了新的片段, 包括一个抗生素耐受基因, 并将其转染入人肝癌细胞系 Huh-7 中, 通过在含有硫酸新霉素(G418)的培养基中培养后, 可以获得 G418 耐受的细胞克隆, 这些细胞克隆可以持续的表达 HCV 复制子 RNA, 从而建立了有效复制的 HCV 细胞培养系统, 但其复制效率较低, 平均 10^6 个细胞中只有一个是合乎要求的. 美国华盛顿大学医学院分子微生物学系的 Blight 和纽约 Rockefeller 大学丙型肝炎研究中心的 Rice et al 在此基础上改进了这个系统, 寻找能够使复制子更加有效复制的突变株, 他们发现了称为 S1179I 的变异株, 感染了存在此种突变的复制子宿主细胞 10 个中就有 1 个可以产生足够多的病毒蛋白, 使得研究者在短时间内进行基因研究, 而不用依赖于繁琐的细胞选择技术^[13].

复制子的基本结构包含: (1) 带有 HCV 5' - NTR 和部分编码核心蛋白区域(核苷酸 342 到 377/389); (2) 新霉素磷酸转移酶基因(neo^R), 他的表达可以产生对 G418 的耐受; (3) 来自于鼠脑心肌炎病毒(EMCV)的 IRES(E-I), 他指导 HCV 非结构蛋白的翻译; (4) HCV RNA 非结构蛋白编码区(NS2/NS3 到 NS5B); (5) 3' - NTR^[14]. 其中位于 5' - NTR 的 HCV IRES 指导的第一个顺反子(neo^R)的翻译, EMCV IRES 指导的第二个顺反子(NS3-5B)的翻译. HCV IRES 上游的序列对于 RNA 复制来说是必需的; HCV 5' - NTR 头 125 个核苷酸对于 RNA 复制来说已经足够, 但这种复制子的增生会受到严重损害; 高水平的 RNA 复制需要位于 IRES 内的序列^[15]. 在 NS5A 区的干扰素敏感决定区(ISDR)和蛋白激酶 R(PKR)结合位点附近的一个小结构域内可产生多种适应性突变, 从而增加复制子的复制效率^[16].

丙型肝炎复制子的基本功能是其可在 Huh-7 细胞系中可以自主复制, 产生较高水平的 HCV RNA, 并且由于复制子中携带有耐新霉素的基因, 故其可以在含有新霉素的培养系统中被选择出来. 许多研究者发现了可以使复制效率更加有效的适应性突变株, 特别是在 NS5B 区的单个氨基酸的置换, 使得复制子的克隆形成能力增加了至少 1 000 倍. Ikeda et al^[17]报道了来自于 HCV-N 序列的复制子并不需要适应性突变就可以具有较高的克隆形成能力, 其原因是这种序列较其他的 ISDR 区多了 4 个

氨基酸的插入. 这些系统的 RNA 含量高, 甚至可以使用 Northern 印迹法或使用 ^3H - 尿嘧啶的代谢性放射标记法进行检测, 使得研究者有足够多的条件来对 HCV 进行分子病毒学的研究^[18,19].

Pietschmann et al^[20]报道了含有复制子的细胞的特点: (1)在含有复制子的细胞内缺少细胞毒性效应. HCV RNA 的复制依赖于细胞的生长, 而且没有超微结构的改变或是生长属性的改变, 提示了 HCV RNA 以及病毒 NS3-5B 蛋白并无细胞毒性, 肝脏的损伤是由抗病毒的免疫反应所引起的. (2)HCV 复制子在 G418 存在的条件下的稳定性. 复制子可以在连续的选择压力条件下稳定在细胞内传代, 而当一定的时间过去后, 即使去除选择性条件, HCV 复制子 RNA 也可以达到一个很明显的水平, 这些结果说明含有 HCV 复制子的细胞可以很好的反应出体内病毒的持续感染. (3)细胞生长对 HCV RNA 复制的影响. 宿主的细胞因子活性和数量对于 RNA 复制、翻译是必须的.

3 丙型肝炎病毒复制子的应用

3.1 复制子对于研究 HCV 复制过程的应用 HCV RNA 复制的详细机制尚不清楚, 由于复制子的出现, 使得许多研究得以进行, 获得了大量有价值的资料, 并且丰富了对 HCV RNA 的了解. HCV 感染宿主细胞后, 可以引起宿主细胞的抗病毒反应, 部分是通过病毒双链 RNA (dsRNA) 复制产物的积蓄所引起的. dsRNA 提供了激活特异性转录因子 (包括 NF κ B, IRF-1 和 IRF-3) 的直接信号, 这就刺激了宿主抗病毒和抗增生基因的产生及表达. IFN γ 、IRF-1 的激活被认为通过一个 PKR 依赖的途径进行的^[21], PKR 确实是一个上游的 IRF-1 激活信号的转导物, 在感染期间, PKR 启动了一个 dsRNA 介导的信号层叠并且导致了 IRF-1 的磷酸化以及 IRF-1 的 DNA 结合功能的激活. 激活的 IRF-1 在干扰素刺激反应启动子元件 (IFN-stimulated response promoter element, ISRE) 内与 IRF-E 结合并参与了细胞基因 (间接刺激适应性免疫反应来抑制病毒复制) 的反应. 不同的研究显示 IRF-1 的 DNA 结合活性和反式激活功能是由 PKR 为信号, 磷酸化直接指导的, 如 Hiscott et al^[22]证实了在 IRF-1 中的两串调节性磷酸化位点也影响其反式激活功能, Rahat et al^[23]阐述了磷酸化介导了 IRF-1 的 DNA 结合活性及其对 HLA-DR α 的反式激活活性.

值得注意的, E2 蛋白的表达, 曾被描述为一个 PKR 抑制子, 其实并不影响 IRF-1 的激活. 与这个发现相一致的是, 发现了 E2 并不阻断体内细胞的 dsRNA 介导的 PKR 的激活. 这可能是由于 E2 在内质网内腔的持续存在或者 E2 不同的糖基化抑制了其于 PKR 的相互作用, 或者说 E2 可以调节 PKR 而独立于 dsRNA 和 IRF-1^[24]. dsRNA 信号的阻断定位于病毒 NS5A 蛋白, NS5A 蛋白是丝氨酸残基在一种未知的细胞激酶作用下磷酸化的产物. NS5A 磷酸化至少有两种确定的形式, p56 (基础磷酸化形式) 和 p58 (超磷酸化形式). NS5A 可以与干扰素介导的、

dsRNA 激活的 PKR 相互作用, 从而调整 IFN 刺激的抗病毒反应, 他在 HCV 复制期间使 PKR 局部化并抑制 PKR 对于 dsRNA 的激活. 在 NS5A 的 PKR 结合域内或邻近的突变解除了对于 IRF-1 调节途径的抑制, 导致了 IRF-1 依赖的抗病毒效应器基因的反应和与之伴随的 HCV RNA 复制效率的下降. 提示了 NS5A 通过阻止 IRF-1 的激活以及破坏宿主抗病毒途径影响了 HCV 的持续感染. 在 NS5A 区明显集中的突变提示了 NS5A 对于体外 HCV 复制的建立是非常重要的. 一个可能性就是 NS5A 介导了宿主蛋白抑制 HCV 复制的互相作用. 在 NS5A 区的突变也许中断了这种互相作用, 破坏 IRF-1 的激活, 并且通过 PKR 影响宿主基因表达, 因此使得 HCV 得以持续复制.

HCV RNA 复制可以触发细胞内基因的表达和激活启动子, 这依赖于 IRF-1 和 NS5A, 尽管 NS5A 抑制 PKR, 也可以抑制 IRF-1 依赖的基因表达 (包括 IFN α 和 IFN β 基因). 最近的研究表明 IRF-1 与 IRF-3 和 IRF-7 互相协作来对一定范围内的抗病毒反应进行的调节, 创造更加合适的细胞环境来保持 HCV 的复制.

3.2 复制子对于研究、发展抗病毒药物的应用 对于 HCV 感染, 唯一的抗病毒方案为干扰素或与利巴韦林联合使用, 但是其持续显效率并不高, 在前者为 10-20%, 后者为 30-40%, 对于不显效的患者, 尚无替代的疗法. 而 HCV 复制子系统的出现对于发展和评估抗病毒药物也非常有用^[25]. 首先, 众所周知, 抗病毒治疗的初始靶位点是: (1)病毒蛋白 NS2/3 和 NS3 (与 NS4A) 的处理过程; (2)使用 NS3 解旋酶和 NS5B RDRP 的病毒 RNA 的复制过程; (3)病毒调节元件, 如 5' -UTR 和 3' -UTR^[26]. 其中绝大部分可以在复制子中编码, 并且他们对于复制也是必需的. (a)复制子可以在细胞中稳定的复制. (b)细胞可以适应不同的培养形式, 如 96 孔板等. (c)通过使用一个高度的细胞培养适应性复制子, 可以建立细胞系, 并使之携带选择性的 HCV RNA 亚基因组 (带有可以很容易检测到的标记基因).

由于 HCV 存在较大的变异, 以及由此引起的耐药, 所以针对不同靶位点的联合抗病毒治疗是非常重要的. 目前大量的研究都是可以使用复制子系统来进行的. Guo et al^[27]报道了亚基因复制子对于 IFN α 敏感, 并且可以将其半衰期减少为 12 h. Frese et al^[28,29]证实了 IFN α 对于 HCV 复制的抑制并不依赖于 MxA 蛋白 (Mx 蛋白为高度保守的、大的 GTP 酶, 人 MxA 蛋白在某些病毒中具有抗正、负链 RNA 的作用), 并研究了 IFN γ 对于病毒蛋白合成及 RNA 复制的抑制作用, 他们发现: (1)IFN γ 抑制 HCV 蛋白的积聚. (2)IFN γ 抑制 HCV RNA 的积聚. (3)IFN γ 对于 HCV 复制子的抑制并不是通过后来的 I 型 IFN 的产生所介导的. (4)HCV 复制子耐受一氧化氮 (NO) 浓度的增加. (5)HCV 复制子的抑制并不是由色氨酸的消耗所介导的. 从而得出结论: IFN γ 对于 HCV 的控制有着重要的作用. NK 细胞、细胞毒性 T 细胞和其他的免疫细胞清除 HCV 并不仅仅是通过直接清除感染的肝细胞, 也通

过产生 IFN γ 来发挥抗病毒作用. 这个结论使得抗病毒治疗出现了新的途径.

虽然在此方面有了许多进展, 但系统的一些属性必须考虑: (1) 既然 HCV RNA 的复制与宿主细胞的增生相耦联, 抑制宿主细胞生长的复合物也会减少复制子 RNA 的水平. 因此, 只有当细胞毒性或细胞抑制的效应被排除后, 才可以得出其特异性抑制 HCV 复制的结论. (2) 并不能排除结构蛋白对复合物抗病毒效果或对抗病毒耐受的影响. 通过亚基因组的复制子的药物筛选实验的抑制性药物也应该对具有自主复制能力的全长 HCV 基因组的细胞系有效. 尽管使用这样细胞系的初始筛选是可以的, 但当使用全长 HCV 基因组时需要更加高的生物安全性也使得这种药物筛选方法有了限制. (3) 细胞培养适应性突变也可以改变蛋白的生物化学属性使之对抗病毒药的敏感性产生变化. 研究者发现了在大约 20 种携带复制子的不同的细胞系都带有一个不同的细胞培养适应性突变. 因此为了寻找抑制 NS5B RDRP, 可以使用不仅是在 NS5B 区适应性突变的细胞系来进行实验^[30].

4 丙型肝炎病毒复制子的前景

HCV 复制子系统的产生研究者有了很好的 HCV 研究工具, 但尽管有这个进步, 对于细胞培养系统的进一步优化还需要大量的工作. 例如, 直到现在, 只有 Huh-7 细胞支持 HCV RNA 的复制, 而对于其他的细胞系的感染, 包括 HCV 可以感染的细胞(如 HepG2 或 PH5CH)等的尝试都失败了. 这也许与 Huh-7 宿主细胞因素的构成不同于其他细胞系有关. 另一个困难是, 虽然目前已可以将全长 HCV 基因组构建入复制子系统中, 但 HCV 复制子系统所产生的 HCV RNA 均不具有感染性, 因此现在的 HCV 复制子系统只能用于研究 HCV 复制的机制, 而不能用于研究其如何来感染宿主细胞的机制. 最后, 我们需要的仍然是一个可以有效的产生感染性 HCV 的系统和一个可以得到的细胞系. 虽然我们现在还不能预言还需多长时间才能得到这样的系统, 但是最近几年的研究还可以使我们很乐观的认为这将出现在不远的将来.

5 参考文献

- Cohen J. The scientific challenge of hepatitis C. *Science* 1999; 285:26-30
- Kato N. Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama* 2001;55:133-159
- Cheney IW, Naim S, Lai VC, Dempsey S, Bellows D, Walker MP, Shim JH, Horscroft N, Hong Z, Zhong W. Mutations in NS5B polymerase of hepatitis C virus: impacts on in vitro enzymatic activity and viral RNA replication in the subgenomic replicon cell culture. *Virology* 2002;297:298-306
- Greive SJ, Webb RI, Mackenzie JM, Gowans EJ. Expression of the hepatitis C virus structural proteins in mammalian cells induces morphology similar to that in natural infection. *J Viral Hepat* 2002;9:9-17
- De Tomassi A, Pizzuti M, Graziani R, Sbardellati A, Altamura S, Paonessa G, Traboni C. Cell clones selected from the Huh7 human hepatoma cell line support efficient replication of a subgenomic GB virus B replicon. *J Virol* 2002;76:7736-7746
- Tardif KD, Mori K, Siddiqui A. Hepatitis C virus subgenomic replicons induce endoplasmic reticulum stress activating an intracellular signaling pathway. *J Virol* 2002;76:7453-7459
- Rosenberg S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. *J Mol Biol* 2001;313:451-464
- Zhao WD, Wimmer E. Genetic analysis of a poliovirus/hepatitis C virus chimera: new structure for domain II of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J Virol* 2001;75:3719-3730
- Friebe P, Bartenschlager R. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* 2002;76:5326-5338
- Kolykhalov AA, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM. Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J Virol* 2000;74:2046-2051
- Mottola G, Cardinali G, Ceccacci A, Trozzi C, Bartholomew L, Torrisi MR, Pedrazzini E, Bonatti S, Migliaccio G. Hepatitis C virus nonstructural proteins are localized in a modified endoplasmic reticulum of cells expressing viral subgenomic replicons. *Virology* 2002;293:31-43
- Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999;285:110-113
- Marshall E. Hepatitis C: New 'replicon' yields viral proteins. *Science* 2000;290:1870-1871
- Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 2000;290:1972-1974
- Friebe P, Lohmann V, Krieger N, Bartenschlager R. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* 2001;75:12047-12057
- Lanford RE, Bigger C. Advances in model systems for hepatitis C virus research. *Virology* 2002;293:1-9
- Ikeda M, Yi M, Li K, Lemon SM. Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh7 cells. *J Virol* 2002;76:2997-3006
- Krieger N, Lohmann V, Bartenschlager R. Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J Virol* 2001;75:4614-4624
- Lohmann V, Korner F, Dobierzewska A, Bartenschlager R. Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J Virol* 2001;75:1437-1449
- Pietschmann T, Lohmann V, Rutter G, Kurpanek K, Bartenschlager R. Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J Virol* 2001;75:1252-1264
- Fredericksen B, Akkaraju GR, Foy E, Wang C, Pflugheber J, Chen ZJ, Gale M Jr. Activation of the interferon-beta promoter during hepatitis C virus RNA replication. *Viral Immunol* 2002;15:29-40
- Hiscott J, Lin R. A role for casein kinase II phosphorylation in the regulation of IRF-1 transcriptional activity. *Mol Cell Biochem* 1999;191:169-180
- Rahat MA, Chernichovski I, Lahat N. Increased binding of IFN regulating factor 1 mediates the synergistic induction of CIITA by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha in human thyroid carcinoma cells. *Int Immunol* 2001;13:1423-1432
- Pflugheber J, Fredericksen B, Sumpter R Jr, Wang C, Ware F, Sodora DL, Gale M Jr. Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:4650-4655
- Randall G, Rice CM. Hepatitis C virus cell culture replication systems: their potential use for the development of antiviral therapies. *Curr Opin Infect Dis* 2001;14:743-747
- Locarnini SA, Bartholomew S. Advances in hepatitis C: What is coming in the next 5 years? *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:442-447
- Guo JT, Bichko VV, Seeger C. Effect of alpha interferon on the hepatitis C virus replicon. *J Virol* 2001;75:8516-8523
- Frese M, Pietschmann T, Moradpour D, Haller O, Bartenschlager R. Interferon-alpha inhibits hepatitis C virus subgenomic RNA replication by an MxA-independent pathway. *J Gen Virol* 2001; 82:723-733
- Frese M, Schwarze V, Barth K, Krieger N, Lohmann V, Mihm S, Haller O, Bartenschlager R. Interferon-gamma inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs. *Hepatology* 2002;35:694-703
- Bartenschlager R, Lohmann V. Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. *Antiviral Res* 2001;52:1-17



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

