

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.

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

王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰, 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

王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰. 丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白的反式激活作用研究. 世界华人消化杂志 2003;11(7):1018-1020
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1018.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)是一种单股正链 RNA 病毒, 编码一种多蛋白分子, 在病毒和宿主细胞蛋白酶的共同裂解作用下, 至少裂解为 3 种结构蛋白(C、E1 和 E2)和 6 种非结构蛋白(NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B)^[1,2]. NS5A 是非结构蛋白的一种, 哺乳动物细胞表达的 NS5A 蛋白以两种形式存在, 分子量分别为 56 kD 和 58 kD. HCV NS5A 是 HCV 基因组编码的一种最为重要的具有多种生物学活性的非结构蛋白质^[3-5], 是 HCV 基因组编码的一种具有反式激活作用等多种生物学活性的非结构蛋白质. 其基因序列的变异, 决定部分 HCV 病毒株对于 IFN- α 治疗的疗效应答. HCV NS5A 蛋白还具有结合双链 RNA 激酶(PKR)的生物学活性, 对于 HCV 感染的靶细胞的细胞周期与细胞凋亡的分子生物学调节机制密切相关^[6].

1 NS5A 反式激活作用位点

反式激活作用(transactivation)是基因组中一部分基因片段通过其转录或翻译产物(通常为编码蛋白), 激活另一部分基因片段的转录调节序列, 上调基因的表达. 近年研究发现, NS5A 是转录反式激活因子, 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. 但是其参与细胞转录调节的机制仍不清楚^[7-9]. 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 定位于细胞内质网(ER), 因此推测 NS5A 可能参与了细胞信号转导途径.

最近的研究表明缺失 N-末端 146 个氨基酸残基和 DNA 结合区域在 GAL4(一种酵母细胞转录激活因子)的 HCV NS5A 蛋白可强烈的激活酵母和哺乳动物细胞的转录活性. 结合到 GAL4 DNA 结合区域的全长的 HCV NS5A 蛋白并没有激活转录的作用, NS5A 片段转录激活作用最强的位点定位于 2 135 和 2 331 位氨基酸残基之间^[10]. NS5A 的转录激活区域包括两个酸性氨基酸区(2 143-2 184, 2 220-2 273 氨基酸残基)和一个脯氨酸

富集区(2 282-2 327 氨基酸残基), 被认为是 NS5A 的转录活性区域^[11]. 酸性氨基酸区的酸性氨基酸残基的数量与 NS5A 的反式激活活性相关, 两个酸性氨基酸区是 NS5A 的转录激活作用的核心区域, 因此酸性氨基酸区 2 的一些氨基酸的突变可明显影响 NS5A 的转录激活作用, 但是这些突变更更多的是引起蛋白的二级结构的改变^[12]. 脯氨酸富集区被认为对 NS5A 的转录激活作用只有一定的加强作用, 相对而言并不重要.

蛋白 N-末端的功能了解的很少, 据推测 N-末端的功能区域可与 C-末端的酸性区域形成分子内的结合位点, 并可以掩盖酸性氨基酸区域的转录激活作用. 在 HCV 感染细胞, NS5A 与其他细胞或病毒蛋白的相互作用可能会改变这种结构并使酸性氨基酸区域发挥转录激活作用^[11], 这种假设仍处在实验阶段. 尽管已有明确证据显示 NS5A 蛋白全长定位于细胞质内, 在细胞核内仍可以检测到 NS5A 的 N-末端的定位信号^[13], 这就提示这部分结构可进入细胞核内并成为转录激活因子的一部分.

Satoh et al^[14]检测了各种不同的 N-或 C-端片段在细胞内瞬时转染后的表达及分析他们的亚细胞定位. N-末端定位于细胞核, 并且 NS5A N-末端的 27 个氨基酸序列有足够的能力使正常的核蛋白滞留在细胞质内. 这些发现说明 NS5A 的细胞质定位首先是由分子的 N-末端决定的. 另外在瞬时表达细胞中, NS5A 蛋白存在蛋白的分解处理过程. 在这些细胞中, 裂解片段发生在 NS5A 的一些 C-和 N-末端. 细胞内的这些片段可被凋亡调节素激活, 被天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶抑制剂 Z-VAD-FMK 抑制, 提示天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶类蛋白水解酶对 NS5A 的裂解有一定作用. 基于 NS5A 变异分析的结果, 可以预测一个缺失了 NS5A C-末端和 N-末端, 长 155 到 389 个氨基酸残基的片段, 包含这些氨基酸序列的多肽产物定位于细胞核. 此外, 只有在共同产生蛋白激酶 A(PKA)的 α 催化亚单位时, 一种包含 Gal4 DNA 结合区的融合蛋白与这种片段融合, 才表现转录活性, 提示这种片段的转录活性受 PKA 调控. 这些结果说明 NS5A 的这种天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶类蛋白水解酶裂解产物对感染 HCV 的宿主细胞基因的转录活动起调控作用.

2 NS5A 反式激活作用因子

Gong et al^[15]研究发现, NS5A 能够反式激活核转录因子 NF- κ B 及 STAT3, 在细胞炎症反应、肿瘤发生及转移过程中起重要作用. NS5A 在细胞质内通过氧化应激作用激活 NF- κ B 和 STAT-3 转录因子. NS5A 引起细胞内钙离子的紊乱. Ca^{2+} 作为第二信使激发线粒体内的活性氧簇的水平, 使 NF- κ B 和 STAT-3 易位入细胞核内. 有证据表明 STAT-3 的激活部分有 NS5A 的作用. 在抗氧化剂[pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), N-乙酰-L-半胱氨酸 (NAC)]或者 Ca^{2+} 拮抗剂(EGTA-AM, TMB-8)作用

下, NS5A 诱导的 NF- κ B 和 STAT-3 的反式激活作用消失了. 这些结果说明了 NS5A 可引起细胞内与病毒感染相关的病理改变的发病机制.

Ghosh et al^[16]研究发现, NS5A 蛋白能够抑制细胞周期调节基因 p21WAF1 的表达, 已知 p21WAF1 是细胞周期调节中的一种主要的抑制作用蛋白类型, HCV NS5A 对于 p21WAF1 表达的抑制, 实际上就是对于细胞周期的促进作用. HCV NS5A 对于细胞周期的调节作用还表现在激活人肝癌细胞中增生的细胞核抗原(PCNA)基因, 从而调节细胞凋亡, 促进细胞增生. 研究证实, 将 HCV NS5A 导入到小鼠成纤维细胞 NIH 3T3 中, 可以导致其贴壁非依赖性生长以及获得在裸小鼠体内形成肿瘤病灶的能力. 这些都是 HCV NS5A 通过反式激活作用对于靶细胞中细胞周期调节机制干扰的结果, 可能是 HCV 感染致肝细胞恶性转化的重要机制之一.

Lan et al^[17]研究了 HCV NS5A 在 HCV 的致癌转换中起重要作用. 由于肿瘤抑制因子 p53 对阻止细胞的致癌性转化有重要作用, 故研究了 HCV NS5A 对 p53 功能影响. 应用体内和体外免疫共沉淀和共聚焦显微镜来研究 HCV NS5A 和 p53 的相互作用. HCV NS5A 与 p53 在细胞核周区域直接结合. 通过报告基因分析, HCV NS5A 抑制 p53 引起的对复制的反式激活作用. 应用 FLAG- 和 FLAG-NS5A Hep3B 稳定细胞系, 发现 HCV NS5A 可下调 p53 活化的 Hep3B 细胞引起内源性的 p21/waf1 的表达. 在伴有 p53 的 NS5A 稳定转染和瞬时转染的 Hep3B 细胞系中, 应用流式细胞分析检测 NS5A 对 p53 介导的细胞凋亡的作用. NS5A 可解除 p53 介导的细胞凋亡的作用, 并且这种抑制作用与 NS5A 与 p53 结合能力的有关. 另外, HCV NS5A 在细胞内和与 p53 激活有重要作用的 hTAF(II)32 有相互作用并在细胞内的定位相同. 这些结果显示 HCV NS5A 在细胞质与 p53 和 hTAF(II)32 有相互作用并部分抑制其功能, 并且抑制 p53 介导的对转录的反式激活作用和细胞凋亡作用, 可能对 HCV 感染的致癌作用有重要意义.

Polyak et al^[18]研究发现, NS5A 在人细胞内的表达诱导白介素 8(IL-8) mRNA 和蛋白的产生, 并且这种效用与在体外检测到的抑制 IFN 的抗病毒作用有关. NS5A 诱导由 IL-8 启动子诱导的报告基因的复制, 并且 IL-8 启动子的最初的 133 bp 是 NS5A 反式激活作用所必须的最小范围. NS5A- δ N110 和 NS5A- δ N222 刺激 IL-8 启动子的产生比 NS5A 全蛋白水平更高. 另外, IL-8 启动子的诱发突变提示 NF- κ B 和 AP-1 对 NS5A- δ N222 反式激活肿瘤坏死因子 α 有重要意义, 并且 NF-IL-6 抑制这种作用. 还有研究发现 NS5A 可以通过抑制细胞内 IFN 诱导的 PKR 蛋白激酶的活性对抗 IFN 的抗病毒作用^[19,20]. 上述说明 NS5A 可通过多种机制抑制 IFN 的抗病毒作用, 并提供了 NS5A 蛋白复制作用的生物学效应的第一手证据. 在 HCV 感染时, 病毒蛋白可能诱导趋化因子的产生并对 HCV 对抗病毒药的抵抗作用和致病

机制有作用.

总之, NS5A 是 HCV 基因组编码的一种具有反式激活作用等多种生物学活性的非结构蛋白质. NS5A 片段转录激活作用最强的位点定位于 2 135 和 2 331 位氨基酸残基之间. 通过反式激活作用, NS5A 可激活核转录因子 NF- κ B 及 STAT3, 抑制细胞周期调节基因 p21WAF1 的表达, 抑制 p53 介导的对转录的反式激活作用和细胞凋亡作用, 通过多种机制抑制 IFN 的抗病毒作用, 对于 HCV 感染的靶细胞的细胞周期与细胞凋亡的分子生物学调节机制密切相关, 决定部分 HCV 病毒株对于 INF- α 治疗的疗效应答, 对于 HCV 在宿主体内的存活及宿主细胞的癌变有重要意义.

3 参考文献

- 1 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, 1997:42-46
- 2 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
- 3 成军. 丙型肝炎病毒干扰素敏感决定区的研究进展. 国外医学·流行病学传染病学分册 2000;27:55-58
- 4 钟彦伟, 成军, 陈新华, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒 NS5A 抗原模拟表位. 世界华人消化杂志 2002;10:133-136
- 5 成军, 钟彦伟, 施双双, 刘妍, 王刚, 董菁, 夏小兵, 陈菊梅. HCV 非结构蛋白 NS5A 人源单链可变区抗体基因的筛选与鉴定. 中华实验和临床病毒学杂志 2001;15:216-218
- 6 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
- 7 Kato N, Lan KH, Ono-Nita SK, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator. *J Virol* 1997;71:8856-8859
- 8 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
- 9 Chung KM, Song OK, Jang SK. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A contains potential transcriptional activator domains. *Mol Cells* 1997;7:661-667
- 10 Tanimoto A, Ide Y, Arima N, Sasaguri Y, Padmanabhan R. The amino terminal deletion mutants of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A function as transcriptional activators in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236:360-364
- 11 Pawlotsky JM, Germanidis G. The non-structural 5A protein of hepatitis C virus. *J Viral Hepat* 1999;6:343-356
- 12 Fukuma T, Enomoto N, Marumo F, Sato C. Mutations in the interferon-sensitivity determining region of hepatitis C virus and transcriptional activity of the nonstructural region 5A protein. *Hepatology* 1998;28:1147-1153
- 13 Ide Y, Zhang L, Chen M, Inchauspe G, Bahl C, Sasaguri Y, Padmanabhan R. Characterization of the nuclear localization signal and subcellular distribution of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *Gene* 1996;182:203-211
- 14 Satoh S, Hirota M, Noguchi T, Hijikata M, Handa H, Shimotohno K. Cleavage of hepatitis C virus nonstructural protein 5A by a caspase-like protease(s) in mammalian cells. *Virology* 2000;270:476-487
- 15 Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF- κ B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98: 9599-9604
- 16 Ghosh AK, Steele R, Meyer K, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 1999;80:1179-1183
- 17 Lan KH, Sheu ML, Hwang SJ, Yen SH, Chen SY, Wu JC, Wang

- YJ, Kato N, Omata M, Chang FY, Lee SD. HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 2002; 21:4801-4811
- 18 Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, Ezelle HJ, Duverlie G, Barber GN, Levy DE, Mukaida N, Gretch DR. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* 2001;75:6095-6106
- 19 Tan SL, Katze MG. How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology* 2001; 284:1-12
- 20 Sato C. Effects of hepatitis C virus proteins on the interferon-stimulated signal transduction. *Nippon Rinsho* 2001 ;59:1271-1276

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

杨倩, 成军, 刘妍, 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
张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
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@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

杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 张树林. 丙型肝炎病毒5' - 非翻译区的结构与功能研究. 世界华人消化杂志 2003;11(7):1020-1022

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1020.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)是含外膜蛋白的单股正链RNA病毒, 属黄病毒科肝炎病毒类. 在大多数感染人群中丙型肝炎病毒表现为持续性感染, 并可导致慢性肝炎、肝硬化, 或肝细胞癌^[1,2]. 从不同患者中分离的病毒表现出明显的序列差异, 从同一患者分离的病毒呈现出准种的特点. 然而5' - 非翻译区(5' -NTR, 5' -nontranslated RNA)在HCV不同基因型却相对保守和稳定, 这种序列保守的特点可能在病毒基因组的复制和翻译中起着重要的作用^[3,4].

1 5' - 非翻译区的结构特点

HCV为单股正链RNA, 全长大约9 500核苷酸(nt), 含有一个大的开放读码框架(ORF, open reading frame), 位于ORF上游的是5' -NTR^[5]. 1991年, Han et al^[6]采用引物延长与PCR相结合的方法克隆了HCV 5' -NTR的完整序列, 得到的序列长341 nt, 这一结果亦得到了其他人的证实. 但是, 也有短的HCV 5' -NTR序列的报道, 为319或324 nt^[7,8]. 这些短的5' -NTR可能是HCV基因组在体内被切割或基因变异的结果.

HCV整个基因组与黄病毒属病毒极为相似, 但HCV

5' -NTR结构却类似痘病毒属病毒, 而与黄病毒属病毒明显不同^[9]. 与痘病毒属病毒一样, HCV 5' -NTR有3-5个小的ORF. 有关这些小的ORF是否被翻译和有何功能, 目前尚不清楚, Yoo et al^[10]认为这些小的ORF可能是HCV病毒蛋白前体翻译的一种负性调节结构. Rijnbrand et al^[11]研究发现5' -NTR中含有3-5个AUG三联子, 其中一些AUG在HCV基因组中较为保守, 这5个三联子分别位于13、32、85、96、215 nt. 利用核苷酸诱变方法研究AUG在HCV翻译中的作用, 结果表明13、32、215的AUG变异对蛋白的翻译无明显影响, 而85 nt或96 nt的变异会严重影响内部核糖体进入位点(IRES, internal ribosomal entry site)功能, 并且发现核糖体只能识别342 nt的AUG作为蛋白翻译的起始密码子.

Bukh et al^[12]在HCV 5' -NTR中发现了三个高度保守的结构域, 分别位于3-65、178-199、246-263 nt, 后两个区域与病毒的进化有关, 前一个区域毗邻启动多蛋白翻译的真实启动子AUG, Bukh et al认为, 这个结构域对于HCV RNA多蛋白体的翻译至关重要, 这一假设在以后的体内、外翻译实验中陆续得到了证实. 虽然5' -NTR序列保守稳定, 但也发现了一些位于该区的变异. 5' -NTR有限的序列变异基本位于155-170 nt和117-132 nt, 从而形成两个基元(motif). HCV 5' -NTR发生的核苷酸变异多为互补突变, 两个基元随机发生1-3 nt共突变的机率很小, 说明5' -NTR序列变异不是随机发生的^[13,14].

Brown et al^[15]采用计算机模拟折叠程序对5' -NTR保守区进行处理, 计算热力学自由能, 建立了HCV 5' -NTR的二级结构模型, 该结构模型被双链及单链的RNase敏感实验所证实, 即双链及单链RNase可以分别在HCV 5' -NTR的双链区及单链区切割HCV RNA. 根据HCV 5' -NTR二级结构的特征, 可分为4个RNA结构域^[16-18]: 结构域I呈发夹状, 位于5-20 nt, 目前认为结构域I的缺失可增强RNA的翻译, 表明其可能具有翻译调节作用; 结构域II是一个大的茎-环结构, 对于其功能仍存在争议, 但大数学者认为结构域II可增强RNA的翻译表达. 结构域III所含核苷酸最多, 结构也最复杂, 由一个长的不规则螺旋结构和多个分枝状茎-环结构组成, 结构域III是蛋白翻译的核心部位, 结构高度保守, 参与形成对蛋白翻译有重要作用的RNA假结; 结构域IV的5' -端是一段短的单链区, 3' -端的小茎环结构与真实启动密码子AUG相连, 部分学者认为结构域IV的稳定能够提高翻译效率.

2 5' - 非翻译区的功能

2.1 翻译启动功能 HCV RNA多蛋白前体的翻译启动方式与小RNA病毒相似, 是采用一种不同于一般病毒的独特方式: 核糖体着陆启动病毒多蛋白的翻译. 该领域最早的研究工作是由Tsukiyama-kohara et al^[19]开展的. 为探讨HCV RNA的翻译启动方式, 构建了含有两个表达基



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

