

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.

病毒性肝炎发病机制中的反式调节机制

成 军

成军, 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

成军,男,1963-08-17生,山东省淄博市人,汉族. 1986年毕业于第一军医大学军医系,获医学学士学位,1989年毕业于军医进修学院,获传染病学硕士学位,1994年毕业于北京医科大学,获传染病学博士学位,1994-11-17/1997-12-01在美国得克萨斯大学健康科学中心临床免疫与传染病学完成博士后研究,教授,主任医师. 现任中华医学会传染病与寄生虫病学分会副主任委员、中华医学会热带病与寄生虫病学分会全国常委、全军医学科学技术委员会传染病与寄生虫病学分会委员. 目前从事传染病特别是病毒性肝炎的临床医疗工作和基础研究工作,学术研究方向是肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制,已出版专著5部,发表论文及综述300篇.

国家自然科学基金资助课题, No.C39970674, No.C03011402,军队回国留学人员启动基金项目, No.98H038

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:2003-01-13 接受日期:2003-02-18

摘要

病毒性肝炎的发病机制中涉及到复杂的反式调节(trans-regulation)机制. 肝炎病毒的反式调节机制至少包括三方面的含义: 一方面是肝炎病毒蛋白对于肝细胞基因组表达调节的反式调节,即肝炎病毒蛋白与肝细胞基因组启动子DNA结合,对于肝细胞基因表达谱产生影响; 第二方面是肝细胞蛋白对于肝炎病毒基因表达的反式调节. 肝炎病毒属于简单的生物类型,要完成其生活周期,必须借助于肝细胞中的蛋白成分,肝细胞中特有的一些蛋白成分,与肝炎病毒基因组DNA/RNA结合,对于肝炎病毒基因表达进行调节,这也是决定肝炎病毒嗜肝特性的重要的分子生物学机制; 第三方面是肝炎病毒蛋白对于肝炎病毒基因组表达的反式调节. 这是所有病毒复制和表达调节的一般机制. 关于肝炎病毒反式调节机制的研究,主要是阐明肝炎病毒为何在肝细胞中的复制和表达处于最佳状态,阐明肝炎病毒的致病机制,有助于据此设计新型的抗肝炎病毒的治疗技术和治疗方法.

成军. 病毒性肝炎发病机制中的反式调节机制. 世界华人消化杂志 2003;11(7):888-896

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/888.asp>

0 引言

基因表达的调节方式分为顺式(cis)调节和反式(trans)调节,肝炎病毒基因表达的调控也不例外. 分子结构内部的基因表达调节元件的作用形式称为顺式调节,而分子间的基因表达调节元件的作用形式称为反式调节. 例如,肝炎病毒基因启动子对于本身下游编码基因的转录表达的调节就属于分子内部不同部分之间的调节,称为顺式调节;而与肝炎病毒DNA/RNA结合的肝炎病毒蛋白、肝细胞蛋白对于肝炎病毒基因表达的调节则

称为反式调节. 肝炎病毒与哺乳动物细胞的基因表达调节的机制相类似,主要是转录水平的反式调节机制. 乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)虽然分属于DNA病毒和RNA病毒,但是,这两种肝炎病毒的基因复制和表达均存在复杂的调节机制,其中反式调节机制是重要的组成部分^[1]. HBV基因编码的蛋白除了与自身的基因组DNA/RNA结合并进行调控之外,某些肝炎病毒的蛋白如HBxAg、截短型表面抗原中蛋白(MHBs^d),HCV基因编码的核心蛋白、NS3蛋白、NS5A蛋白等都具有显著的肝细胞靶基因的反式调节功能^[2-4]. 同时,HBV的DNA、RNA以及HCV RNA等调节基因区等都有肝细胞蛋白的结合位点,肝细胞蛋白与这些调节基因之间的结合,调节这些肝炎病毒的基因表达与转录,也是决定这些肝炎病毒均具有一定程度的嗜肝特性的分子生物学机制^[5,6].

1 肝炎病毒蛋白对于肝炎病毒基因的反式调节

HBV基因表达的精确调节是HBV DNA复制过程中的必须环节. HBV的基因组是在前-C/基因组启动子(CP)、表面抗原基因启动子SP I、SP II和X基因启动子(XP)的分别调节作用下进行的. 除了SP I之外,其他的所有启动子DNA序列都缺乏典型的转录起始复合物典型的TATA盒式结构,因此代表了一类特殊类型的启动子序列结构. 在HBV DNA序列之中,还存在着2段启动子序列和一些负性调节元件,提示HBV DNA的复制过程受到严密的调控. 所有这些顺式调节元件都包埋在基因组的编码基因序列之中,说明HBV DNA是一种紧密结构,最大程度地利用了较小的基因结构,发挥最大的调节功能,利用率之高,实为罕见. HBV DNA的这些调控元件也都是肝细胞特异性的,这也是决定HBV嗜肝特性的重要的分子生物学机制. HBV基因编码的一些蛋白对于HBV DNA/RNA的结合与调节是HBV反式调节机制中重要的内容和组成部分^[7]. HCV的基因表达调节也是如此,5'-非翻译区(5'-NTR)和3'-非翻译区(3'-NTR)的RNA序列,是关于HCV复制和表达的关键的基因结构序列. HCV的5'-NTR可以折叠成为4段茎环(stem-loop)结构,主要与HCV RNA的复制过程的调节有关,3'-NTR则主要与HCV RNA的复制过程有关. 肝炎病毒蛋白的结合实现其自身的反式调节机制.

HBV DNA的复制与逆转录病毒的复制过程不同,不需要有核苷酸片段作为引物,可直接从称为 ϵ (epsilon)元件的RNA茎环结构开始合成全新的HBV RNA分子. 从

ε 开始合成一小段 DNA, 与 P 蛋白共价相连, 然后合成就停止. 起始位点的选择和合成停止的信号就包含在 P 蛋白/ ε 元件形成的复合物中. 因为 P 蛋白的活性是细胞分子伴侣依赖性的, 因此利用体外兔网织裂解物进行鸭 HBV DNA P 蛋白的体外翻译, 也可以形成这种复合物. 根据共价结合的鸭 HBV DNA P 蛋白的标记, 可以研究引物合成过程中 ε RNA 元件的功能. 应用这一体外系统, 结合一系列的 RNA-DNA 突变体, 发现在第 57 个核苷酸茎-环结构的 5 个核糖基团才是功能性模板, 模板区只有一个残基, 在低位的茎结构的顶端有 2 个碱基, 都是基本结构的组成部分. 2'-OH-基团的存在以及起始位点稍下游碱基性质包含起始位点的选择和合成停止的信号. 具有复制功能的嗜肝病毒核心颗粒的装配需要核心蛋白、聚合酶与病毒前基因组中包装信号 ε 之间的相互作用. 核心蛋白 N-末端部分(aa 1-149)可以自发地装配成核壳结构, 而 C-末端部分(aa 150-183)可与前基因组 RNA 结合. Waris et al.^[8] 构建了 2 种 HBV 核心蛋白的突变体(C144Arg 和 C144Lys), 其 C-末端的 SPRRR(Ser-Pro-Arg-Arg-Arg)基序以精氨酸或赖氨酸残基替换, 以研究这一基序在前基因组装配和病毒成熟中的作用. 以表达突变或野生型核心蛋白的表达质粒与缺失核心蛋白编码区的质粒共转染人肝癌细胞系 HuH-7, 研究反式互补对于病毒复制效率的影响. 在所有共转染的细胞质中, 都存在密度有差别的核颗粒, 但由 C144Arg 和 C144Lys 突变体构成的核颗粒由于缺乏内源性的聚合酶活性, 不能修复 HBV DNA. 另外, 以 pHBVC144Arg 或 pHBVC144Lys 与产生具有复制功能的核颗粒的质粒进行共转染, HBV DNA 的修复信号下降 40-80 倍, 这是因为野生型与突变型结合形成的嵌合体, 对于 HBV DNA 修复功能的影响. 提示位于核心蛋白 C-末端的 SPRRR 基序对于 HBV DNA 的复制和成熟非常关键.

2 肝炎病毒蛋白对于肝细胞基因表达的反式调节

2.1 HBV 截短型表面抗原中蛋白的反式激活作用

乙型肝炎病毒基因组编码的蛋白作为反式激活因子, 对肝细胞某些基因表达调控的影响, 可能是 HBV 致癌的主要因素. 早期研究多集中在整合的病毒 DNA 编码的 HBxAg 蛋白的功能上, 证实 HBxAg 蛋白是一种具有广泛活性的反式激活因子, 对乙型肝炎的慢性化和促进肝细胞的恶性转化有密切关系; 近年研究发现, 从肝癌细胞系或肝癌组织中亚克隆出的截短型前-S2/S 基因表达产物羧基末端的截短型分子 MHBs^t 也具有反式激活功能. 我们构建了一种含有约 500 bp MHBs^{t167} 基因的真核表达载体 pcDNA3.1(-)-Mt, 该基因编码的 MHBs 167 位氨基酸残基以后的羧基末端截短. pcDNA3.1(-)-Mt 瞬时转染 COS-7 细胞, 用前-S2 单克隆抗体检测到截短型蛋白 MHBs^{t167} 的表达, 并且 1:32 倍稀释还可检测到 MHBs^{t167} 蛋白阳性. 与报告质粒 pSV-lacZ 共转染 COS-7 细胞, 明显促进 β -gal 的表达, 证明 pcDNA3.1(-)-Mt 能

增强 pSV-lacZ 的 SV40 启动子的功能, 编码的 MHBs^{t167} 是一种反式激活因子, 而全长的 MHBs 无此功能^[9,10].

目前研究表明, MHBs^t 的反式激活效应可能与蛋白激酶 C(PKC)依赖的信号转导途径有关, 前-S2 区域与 PKC α/β 结合发生磷酸化反应, 触发 PKC 依赖的 c-Raf-1/MAP2-激酶信号转导链式反应, 结果激活了转录因子如 AP-1、NF- κ B、AP-2、SRE、Sp1 和 c-myc、c-fos 启动子, 参与病毒感染后的炎症反应和肝细胞癌的发生. MHBs^t 蛋白结构的改变, 缺失了位于 C-末端的膜定位信号, 使 MHBs^t 在未能进入分泌途径而在内质网(ER)中滞留, 其前-S2 区指向胞质区与胞质蛋白相互作用, 产生转录激活功能; 而全长的 MHBs 蛋白的前-S2 区指向 ER 腔, 进入高尔基复合体而分泌. 所以说 MHBs^t 的反式激活功能依赖于其 N-末端前-S2 区的胞质定位功能. 而缺失突变的范围是决定该截短型分子是否具有反式激活作用的重要影响因素, MHBs^t 至少完全缺失蛋白 C-末端 S 区的疏水区 III, 才具有反式激活功能; S 区的 N-末端疏水区 I 是反式激活所必需的, 因为蛋白与膜的结合是转录激活功能所必需的, 这段序列被称为“反式活性开启区”(trans-activity-on region, TAO). 进一步研究表明, MHBs^t 的最小反式激活单元定位于 4-53 氨基酸残基, MHBs^{t53} 是最小的转录激活因子, 是一种非膜结合类型的 MHBs^t, 就是说, 仅前-S2 区(aa 1-55)就足以介导反式效应, 说明作为反式激活剂的 MHBs^t 大小范围是很大的. 我们目前正在构建不同截短范围的表达载体, 进一步研究 MHBs^t 的反式激活功能, 筛选和克隆其反式激活的靶基因^[11,12].

2.2 乙型肝炎病毒 X 蛋白的反式激活作用

慢性 HBV 感染者, HBxAg 蛋白在 HCC 形成过程中具有十分重要的意义. Ogden et al.^[13] 发现 HBxAg 的反式激活功能, Vero 细胞中表达的 HBxAg 蛋白能够增强人干扰素 β (IFN- β) 调控序列控制下的氯霉素乙酰转移酶(CAT)表达. 后来的研究发现 HBxAg 蛋白可作用于多种基因的增强子和启动子元件, 包括 HBV 的增强子和 C 基因的启动子、SV40 早期增强子/启动子、多种病毒的长末端重复序列(LTR)、人 IFN- β 基因调控序列, 对 c-myc、人白细胞抗原-DR(HLA-DR)、主要组织相容性抗原-I(MHC-I)及白介素-8(IL-8)等都有反式激活作用. 为了研究 HBV 感染者 HBxAg 蛋白在肝细胞恶性转化过程中的具体作用, Lee et al.^[14] 构建了受四环素严格调控的 HBxAg 蛋白表达载体, 建立表达 HBxAg 蛋白的分化细胞系 3pX-1 和去分化细胞系 4pX-1. 只有 3pX-1 细胞系有恶性转化的现象, 主要机制就是持续的 Ras-Raf-MAPK 系统的激活. 没有发生转化的 4pX-1 细胞系具有持续的 JNK 信号转导系统的激活. HBxAg 蛋白在 3pX-1 和 4pX-1 细胞系中参与的信号转导通路是有差别的. 对于这 2 个细胞系的细胞周期参数进行比较研究, 3pX-1 细胞系表现出 HBxAg 蛋白依赖性的 G1、S 和 G2/M 期的进展, 表现为细胞周期素 D1、A 和 B1 的表达水平升高, Cdc2

激酶的激活等. 在 4pX-1 细胞系中可以见到 HBxAg 蛋白依赖性的 G1 和 S 期的进入, 之后是 S 期的停止, 缺乏 Cdc2 激酶的激活. 4pX-1 细胞系表现出 HBxAg 蛋白诱导的细胞周期素依赖性蛋白激酶抑制剂 p21(Cip1)、肿瘤抑制蛋白 p19(ARF)、细胞凋亡蛋白 bax 以及胰岛素样生长因子结合蛋白-3(IGFBP-3)的表达. 尽管出现了 HBxAg 蛋白诱导的生长停滞, 也没有 Cdc2 的激活, 但 4pX-1 细胞系并没有出现 HBxAg 蛋白依赖性 G2/M 阻滞或细胞凋亡.

HBV 的 HBxAg 蛋白可以诱导 Fas 配体(FasL)的表达, 从而帮助肝细胞癌(HCC)细胞逃避宿主的免疫监视系统. Lee et al^[15]研究了 HBxAg 蛋白诱导转录因子 Nur77 基因的表达. Nur77 是细胞核内的一种孤儿受体, 在 FasL 表达上调中具有重要作用. 以表达 HBxAg 蛋白的 Chang X-34 细胞系进行研究时, 发现 HBxAg 蛋白的表达可以诱导 Nur77 的表达. 将反义基因或者负显性突变体导入细胞中对于 Nur77 基因的表达进行阻断时, 可以显著阻断 HBxAg 蛋白对于 FasL 的基因表达的诱导. 说明 Nur77 在 HBxAg 蛋白诱导 FasL 的表达过程中具有重要的作用. 进一步的研究结果表明, 表达 HBxAg 蛋白的细胞系具有较高的 Nur77 转录水平以及 DNA 的结合能力, 说明 Nur77 在 HBxAg 蛋白诱导 Fas/FasL 信号转导过程中具有关键的调节作用.

HBxAg 蛋白对于细胞基因表达的影响是十分广泛的, 这也是 HBV 相关的 HCC 发生发展的重要机制. 但是, 关于 HBxAg 蛋白的分子生物学作用机制, 大部分都是以肝癌细胞系作为细胞模型进行研究的, Nijhara et al^[16]构建了转导正常肝细胞的有效基因转移途径, 结果表明, 这种基因转移技术可以使 50% 以上的细胞表达 HBxAg 蛋白. Tarn et al^[17]证实 HBxAg 引起的肝细胞的恶性转化过程与 RAS-RAF-MAPK 和 JNK 信号转导途径有关. Kang-Park et al^[18]证实 HBxAg 蛋白通过转录因子 Sp1 调节胰岛素样生长因子 II(IGF II)启动子 4 的活性. 在这一调节系统中, PKC 和 p44/p42 MAPK 是必须的. 首先, PMA 对 PKC 的激活, 或者 PKC 的表达载体可以促进 Sp1 转录因子的磷酸化, 提高 P4 启动子的转录活性. PKC 的抑制剂 Go6976 可以降低 Sp1 的磷酸化, 同时降低 P4 启动子的活性以及 IGF-II mRNA 的转录表达水平. MEK 激活抑制剂 U0126 降低 Sp1 的磷酸化水平, P4 启动子活性和 IGF-II mRNA 转录表达水平下降. 这些结果说明 PKC、p44/p42 MAPK 信号转导通路是 HBxAg 通过 Sp1 介导的 IGF-II 基因激活的重要条件. Pflum et al^[19]证实, HBxAg 与 CREB 之间可以结合, 并且可以促进这种蛋白的 DNA 结合能力. HBxAg 在反式激活靶基因转录调节的机制中, 需要 Ser-133 位点没有发生磷酸化修饰的 CREB 的参与. HBxAg 可以上调 Camp 应答基因的表达, 说明在肝细胞的增生, 直至肝细胞的恶性转化过程中都有十分重要的作用. Park et al^[20]对 p53 基因发生突变的 Hep3B 细胞系进行了研究, 以 HBxAg 表达载体进行稳定转化时, p21(waf1/cip1)mRNA 转录和蛋白表达水

平显著升高, 与 CDK2 结合的水平显著升高, 显著抑制了细胞周期素 E 和 CDK2 复合物的形成以及组蛋白 H1 的磷酸化修饰, p21 启动子活性增强. 利用基因突变技术, 证实 p21 启动子在 -1185 和 -1482 nt 之间. 基因突变分析结果表明, HBxAg 应答位点与 ets 因子结合位点重叠. 说明在这一细胞系中, HBxAg 可以克服由于 p53 功能缺失造成的下游 p21(waf1/cip1)表达调节的障碍.

HBxAg 蛋白功能域的分析: Guo et al^[21]认为至少有一个位于 103-117 aa 的功能域对其作用非常重要. Madden et al^[22]结果显示, N 末端和 C 末端对其反式激活都不重要, 认为转录活性区位于 32-148 aa 内: 105-148 区富含负电荷, 是其他反式激活因子的典型激活功能域所具有的特征; 32-66 aa 区可能为结合功能域. Shamay et al^[23]认为 C 末端 134-139 aa(LGGCRHK)较保守, 缺失后 HBxAg 的反式转录活性几乎完全丧失. Bouchard et al^[24]认为有 3 个关键功能域: 第 46-52 aa(尤其是 Pro-46、His-49、His-52), 第 61-69 aa(尤其是 Cys-61、Gly-67、Pro-68、Cys-69), 第 132-139 aa(尤其是 Phe-132、Cys-137、His-139), 这三段序列在不同的嗜肝病毒中高度保守, 第一段序列形成组氨酸/天冬氨酸功能样特征, 第二与第三段序列与 Kunitz 样丝氨酸蛋白酶抑制剂的 Kunitz 功能区高度同源. N 末端 5-27 aa 或 C 末端 143-154 aa 缺失, 对 X 蛋白活性没有影响. 但也有相互矛盾的结果, 可能是 HBxAg 蛋白在不同细胞通过不同因子或途径起作用而导致所需的功能域不同所致.

需要强调的是, 目前对 HBxAg 反式激活的研究结果也存在不一致性, 甚至有矛盾的结果. 因为研究大多数采用瞬时表达系统, 将含有 X 基因的表达载体与报告基因载体用共转染实验. 分析其原因可能包括: 体外细胞培养研究单个病毒蛋白的孤立的效应可能与体内整体细胞蛋白的效应不同, 因为体内多种病毒蛋白可能具有协同或拮抗作用; 其次, 转染细胞中蛋白表达水平也会影响观察到的效应, 体外试验中目的蛋白都是过表达, 而病毒蛋白在患者体内水平通常很低; 第一, 不同的细胞类型将有不同的应答; 第二, 细胞培养环境不可能完全真实地反映活体内环境; 最后, 应用报告基因瞬时转染观察的效应不可能完全模拟病毒蛋白对内源性细胞基因的作用.

2.3 丙型肝炎病毒核心蛋白的反式调节 丙型肝炎病毒核心蛋白是 HCV 基因组编码的一种结构蛋白, 具有多种生物学调节作用, 与 JAK-STAT 信号转导系统的调节有密切关系^[25]. JAK-STAT 信号转导系统是干扰素 α (IFN α) 和 I 型细胞因子广泛采用的信号转导途径. 这些细胞因子首先激活 JAK 激酶, 然后磷酸化和激活 STAT 蛋白. 在磷酸化和激活之前, STAT 蛋白存在于细胞质之中, 激活之后就发生细胞内转位, 到达细胞核中, 对肝细胞基因组的表达进行调控. 研究发现, HCV 抑制 IFN α 介导的 JAK-STAT 信号转导系统, 主要机制是阻断 IFN α

刺激的基因因子3(ISGF3)复合物的形成. 但是其下游的信号转导通路以及主要的 HCV 蛋白类型目前还不是特别清楚. Li et al^[26]对 HCV 核心蛋白对于 IFN α 和干扰素 γ (IFN γ)介导的 JAK-STAT 信号转导的影响进行了研究. HCV 核心蛋白的表达对于 IFN α 诱导的 STAT1 表达具有显著的下调作用, 凝胶阻滞分析(gel retardation assay)表明表达 HCV 核心蛋白的细胞, 受到 IFN α 刺激后反式激活因子 GAF 和 ISGF3 的形成显著降低. 蛋白表达和 RNase 保护研究表明, GAF 或 ISGF3 形成能力的降低, 与 STAT1 蛋白表达水平的降低有关. 但这些信号转导途径的改变对于下游靶基因如 IFN α 调节因子 -1(IRF-1)、561 的表达没有显著影响. 以 HCV 结构和非结构基因稳定转染的细胞, 也有类似的效应, 原因不清楚.

为了研究 HCV 的恶性转化作用, Kim et al^[27]建立了稳定表达 HCV 核心蛋白的 BALB/3T3 A31-I-1 细胞系, 这一细胞系在受到 HCV 核心蛋白与 v-H-ras 的基因共转染时, 就失去生长接触抑制, 发生形态学改变, 呈现非贴壁生长, 而且出现非血清依赖性生长的特点. 表达 HCV 核心蛋白的细胞系在受到生长因子的刺激以后, 生长速度显著加快. 另外, 以人工合成的反义寡聚脱氧核糖核苷酸(ODN)阻断细胞中 HCV 核心基因的表达, 对于其生长具有一定的抑制作用. HCV 核心蛋白可激活 MAPK 和血清应答元件(SRE).

HCV 的基因分型和 HCV 核心蛋白的一级结构序列对于其功能也具有十分重要的意义. Lee et al^[28]研究证实 HCV 基因型 1 a 和 3 的核心蛋白对于 MEK1 和 Erk1/2 MAPK 都有激活作用, HCV 核心蛋白持续表达可产生 Raf1 和 MAPKK 高基础水平的表达, 这种现象可以通过内源性 Raf1 活性的体外分析及高度磷酸化的 Erk1 和 Erk2 的水平检测而得到反映, 甚至在血清饥饿状态下也存在这种现象. Erk1/2 及其下游转录因子 Elk-1 的激活时间在细胞受到 EGF 的刺激以后显著延长. 尽管存在 MAP 磷酸酶 MKP 的反馈调节, 表达 HCV 核心蛋白的细胞在受到 EGF 的刺激后这种激活仍然存在, 可能与 Raf-1 的持续激活有关. HCV 核心蛋白对于 MAPK 激酶链具有直接的激活作用, 这也是 HCV 核心蛋白对于细胞具有转化作用的机制之一. Ahn et al^[29]建立了四环素控制的表达全长(191 aa)或部分序列(160 aa)的 HepG2 细胞系. 发现 HCV 核心蛋白可以激活细胞外信号调节激酶(ERK)、c-jun N-末端激酶(JNK)、p38 丝裂原激活蛋白(MAP)激酶、诱导 MAP 激酶磷酸酶 MKP-1 的表达, 并促进细胞的增生. 同时伴有 c-jun 和 ATF-2 的激活, 但没有 Elk-1 和 c-fos 的激活. 另外, AP-1 的激活过程与 c-fos 的状态无关. 全长或截短型 HCV 核心蛋白具有相似的作用.

HCV 核心蛋白对于细胞凋亡具有促进和抑制的双向调节作用, 主要决定于诱导细胞的刺激因素和当时细胞所处的状态. Tsuei et al^[30]研究了 HCV 核心蛋白对于血清饥饿诱导的细胞凋亡的影响进行了研究. 稳定表达 HCV 核心蛋白的 NIH 3T3 细胞系对于血清饥饿诱导的细

胞凋亡具有一定的抑制作用. 但 p53、p21Waf1 和 Bax 在血清饥饿诱导后都有诱导性表达, 与 HCV 核心蛋白是否表达无关. 表明这种情况下的细胞凋亡是 p53 非依赖性的. 不表达 HCV 核心蛋白的细胞系, 细胞受到血清饥饿后诱导的细胞凋亡可由 p38/MAPK 的特异性抑制剂 SB203580 部分逆转, 但在表达 HCV 核心蛋白的细胞系中没有阻断作用. 血清饥饿激活的 p38 MAPK, 在表达 HCV 核心蛋白的细胞系中, 其磷酸化形式的蛋白水平有显著下降. 表明 HCV 核心蛋白对于血清饥饿诱导的细胞凋亡具有抑制作用, 而且这种抑制作用是 p38 MAPK 激活依赖性的.

MAPK 信号转导系统在细胞的增生、恶性转化和应激应答的调节中具有重要作用. HCV 核心蛋白具有潜在的致瘤作用, 但机制目前还不十分清楚. MAPK 细胞外信号调节激酶(ERK)的激酶(MEK)-ERK 信号转导途径以及其下游的靶基因, 即血清应答元件(SRE), 在 BALB/3T3 表达 HCV 核心蛋白时被激活. 为了阐明 HCV 核心蛋白激活 MEK-ERK 途径的机制, Huang et al^[31]以 HCV 核心蛋白瞬时转染几种不同的细胞系, 并应用 Gal4-Elk1 萤虫素酶报告基因表达载体、体外 MAPK 的 Western blot 杂交分析对其信号转导途径进行了研究. 发现存在有丝分裂原的刺激时, HCV 核心蛋白可增强 MEK 下游的 Elk1 的激活, 而对 ERK 活性及 Elk1 的磷酸化没有影响. 研究结果表明 HCV 核心蛋白可通过经典的磷酸化修饰链激活 Elk1. 说明 HCV 感染引起肝细胞发生恶性转化的可能的机制之一.

HCV 感染与 HCC 有关, 而 HCC 的发生与 MAPK/ERK 信号转导途径有关, 因此 Pileri et al^[32]研究了 HCV 核心蛋白对于 MAPK/ERK 级联反应的影响. HCV 核心蛋白可显著激活 MAPK/ERK 的级联反应, 包括 Elk1. HCV 核心蛋白单独情况下就可以激活 MAPK/ERK. 有趣的是, Elk-1 的活性在受到促癌因子 12-O-四萜酸佛波乙酯(12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate, TPA)的作用下进一步升高, 但表达 HCV 核心蛋白的 NIH 3T3 和 HepG2 细胞受到表皮生长因子(EGF)和肿瘤坏死因子 α (TGF α) 的刺激后, 没有进一步的升高. HCV 核心蛋白对 MAPK/ERK 的激活作用, 当受到 MEK1 特异性抑制剂 PD98059 时则被阻断. 这些研究结果表明, HCV 核心蛋白激活 ERK 是肝细胞有丝分裂原介导的信号非依赖性的, 但与 TPA 有协同作用. HCV 核心蛋白可能存在对 MEK1 的调节作用, 或者对更为上游的信号转导环节产生影响.

在针对病原体的早期免疫应答过程中有补体成分的参与, 补体成分在清除病原体感染宿主血清中的抗原中具有十分重要的作用. Rice et al^[33]研究表明 HCV 核心蛋白在 HCV 感染的初期首先表达, 并且在 HCV 感染宿主的血液循环中存在, 通过与补体受体的结合, 即 C1q 受体球状位点(gC1qR)的结合, 抑制 T 细胞的增生反应. 为了研究 HCV 核心蛋白与 C1qR 相互作用及其对 T 细胞增生的抑制作用及机制, 研究了 HCV 核心蛋白对于 T

细胞激活早期事件的影响.发现HCV核心蛋白抑制ERK和丝裂原激活ERK激酶(MEK)蛋白的磷酸化.HCV核心蛋白对于ERK/MEK MAPK的干扰,造成了白介素-2(IL-2)和白介素-2受体 α (IL-2R α)基因转录水平的下降,最终造成IL-2的产生以及高亲和力IL-2R的表达水平的下降.抗-gC1qR抗体可以逆转HCV核心蛋白对ERK/MEK磷酸化水平的影响,说明HCV核心蛋白和gC1qR与ERK/MEK MAPK的激活有关.表明HCV核心蛋白可通过补体依赖性的调节途径阻断T细胞激活的细胞内事件,在HCV慢性感染的形成过程中发挥重要作用.

2.4 丙型肝炎病毒的NS3蛋白的反式调节 慢性丙型肝炎发病机制中氧化应激产生的活性氧(ROS)发挥一定的作用.吞噬细胞及激活的巨噬细胞释放的ROS是主要氧化应激产物的来源.但是HCV蛋白作用于单个核细胞后产生活性氧的情况目前还不十分清楚.Higginbottom et al^[34]对于HCV刺激的单个核细胞产生活性氧的情况进行了研究.健康正常人的外周血单个核细胞(PBMC)受到HCV的核心蛋白、NS3、NS4、NS5蛋白刺激以后,以化学发光技术对于产生的ROS进行了测定.发现只有NS3蛋白可以触发PBMC产生ROS,主要包括阴离子氧离子.PBMC受到NS3刺激以后,出现快速而短暂的细胞内钙水平的升高.应用不同的代谢抑制剂,证实ROS的产生需要钙离子的流入,以及酪氨酸激酶以及应激激活蛋白激酶p38的参与.发现p47(PHOX)发生磷酸化和细胞内转位,表明在这一过程中有NADPH氧化酶的参与.NS3对于佛波豆蔻酸乙酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)诱导的氧化爆发(oxidative burst)具有抑制作用.研究结果表明HCV NS3蛋白可激活NADPH氧化酶,调节ROS的产生,在HCV感染的发病机制中具有一定作用.

2.5 丙型肝炎病毒的NS5A蛋白的反式调节 Flint et al^[35]建立四环素应答元件严谨控制的HCV全长编码区表达型转染细胞系,并研究了HCV蛋白对IFN α 介导的信号转导的影响.HCV蛋白的表达,强烈抑制IFN α 介导的JAK-STAT系统的信号转导.这种抑制作用与STAT酪氨酸磷酸化下游的信号转导途径有关,而且对于JAK-STAT信号转导途径的抑制作用不仅限于IFN α ,而且可抑制白血病抑制因子(LIF)诱导STAT3的信号转导.但对于TNF α 诱导的转录因子NF- κ B的激活没有影响.HCV干扰IFN α 介导的JAK-STAT信号转导,与对IFN α 治疗的抗性作用无关,而可能与HCV感染后免疫逃逸以及慢性感染的形成过程有关.

HCV亚基因组复制子(replicon)在肝细胞中的复制,可刺激干扰素 β (IFN β)启动子,并使人肝癌细胞系产生IFN β .研究发现,HCV RNA的复制可激活NF- κ B和IFN调节因子(IRF-1)的激活和DNA结合功能.在细胞核中,激活形式的IRF-3也增多.含有HCV复制子的肝癌细胞系,由IFN β 激活的一系列的抗病毒作用基因的基础表达水平都显著提高.HCV RNA的复制,可刺激细胞抗病毒机制,并使细胞进入抗病毒状态.稳定的HCV RNA

复制要面对一些抗病毒作用机制的应答,提示HCV可能会编码一种或多种病毒蛋白,克服细胞产生的这些抗病毒机制,以形成慢性感染.

Flint et al^[36]应用HCV亚基因组复制子细胞模型,研究了HCV-肝细胞之间相互作用的可能机制.研究结果证实,HCV RNA亚基因组的复制可刺激双链RNA(dsRNA)的信号转导系统,阻断IRF-1和PKR的信号转导,与dsRNA结合以及抑制dsRNA对PKR的激活作用有关.NS5A蛋白单独情况下就足以阻断IRF-1的激活以及dsRNA依赖性IRF-1基因表达的诱导.PKR结合位点及其附近核苷酸序列的突变,可以解除NS5A的上述抑制作用,导致IRF-1表达水平升高,HCV RNA复制水平降低.这些研究结果表明在dsRNA信号转导中具有重要作用的PKR,以及病毒感染激活的IRF-1的功能异常,是HCV NS5A阻断宿主抗病毒应答以及形成慢性感染的主要机制.HCV NS5A具有通过氧化应激机制诱导细胞质中转录因子NF- κ B和STAT-3的作用.NS5A可导致细胞内钙的异常.Ca²⁺所介导的信号触发线粒体活性氧成分的提高,导致转录因子蛋白NF- κ B和STAT-3向细胞核内的转位.研究表明NS5A可以持续激活STAT-3.在抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸(NAC)或Ca²⁺螯合剂(EGTA-AM, TMB-8)存在的条件下,NS5A诱导的NF- κ B和STAT-3的激活作用消失.HCV NS5A与对IFN α 的抗性有关,其机制之一就是NS5A对于IFN α 诱导关键酶,即双链RNA激活的蛋白激酶(PKR)的抑制作用,但IFN α 敏感和抵抗的HCV NS5A在Hela细胞中对于ISGF-3的表达的影响没有显著的差别.NS5A蛋白缺失氨基末端110、222和334个氨基酸残基,以及羧基末端缺失117、230氨基酸残基时,对于IFN α 诱导ISGF-3的表达也没有显著的影响.HCV NS5A的表达也不影响IFN α 诱导的STAT-1酪氨酸磷酸化以及上调PKR及MHC-I抗原的表达.但NS5A可以诱导人细胞中IL-8 mRNA和蛋白的表达,这一效应与体外NS5A抑制IFN α 的抗病毒作用有关.NS5A可诱导IL-8启动子指导的报告基因的表达,这种调节作用与IL-8启动子序列中133 bp的序列有关.氨基末端缺失110、222个氨基酸残基的NS5A突变体,具有比全长NS5A更强的诱导IL-8启动子活性作用,因为这种突变形式的NS5A蛋白更能分布在细胞核中.IL-8启动子突变研究表明,NF- κ B和AP-1转录因子的结合是NS5A对其进行调节的必要环节.因此,HCV NS5A蛋白对于趋化因子的调节,也是影响细胞对于IFN α 敏感性的重要机制之一.

在HCV感染者外周血单个核细胞(PBMC)受到IFN α 的刺激以后,IRF-1 mRNA和IRF-1/IRF-2比率较正常人显著升高.Sendai病毒刺激以后,正常人和HCV感染者外周血单个核细胞的IRF-1、IRF-2和IFN α mRNAs,以及IFN α 蛋白表达水平也显著高于基础水平.自然感染HCV诱导PBMC的IFN α 5表达水平升高.这些细胞体外感染Sendai病毒可以提高正常人和HCV感染者的IFN α 8的表达水平.病毒感染诱导的IFN α

表达具有型特异性, 认为 HCV 感染可以特异性地诱导 PBMC 中 IFN α 5 的表达^[37].

丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白对于 PKR 具有抑制作用. PKR 所介导的 IFN α 抗病毒作用部分地通过抑制 eIF2 α 的磷酸化, 进而抑制 mRNA 翻译而实现. Lahm et al^[38] 研究了 HCV NS5A 蛋白对 PKR 影响 mRNA 翻译过程的抑制作用. 痘苗病毒载体 VV E3L 表达的蛋白是 PKR 很强的一种抑制因子. 以 IFN α 预处理表达缺陷型基因的 VVDeltaE3L HeLa S3 细胞, PKR 和 eIF2 α 的磷酸化水平都显著升高. 当表达 NS5A 蛋白的 VVNS5A 细胞系受到 IFN α 刺激时, PKR 和 eIF2 α 的磷酸化水平出现瞬时下降. 表达 VVDeltaE3L 的细胞系受到 IFN α 的刺激以后, p38 MAPK 活性升高, 符合其位于 PKR 信号转导的下游的事实. 另外观察到这些细胞中 eIF4E 的磷酸化水平升高, 这是 p38 下游的信号转导环节. 在 VVNS5A 感染的细胞系中这些调节作用都有不同程度的下降. NS5A 还具有抑制表达 NS5A 蛋白受到 EGF 激活时的 p38-eIF4E 磷酸化的作用. NS5A 诱导的 eIF2 α 和 eIF4E 磷酸化可能在调节 mRNA 翻译过程中有矛盾. 事实上表达 VVNS5A 的细胞系受到 IFN α 的刺激以后, 只是部分短暂地回复 VVDeltaE3L 细胞与病毒的 mRNA 翻译过程. 综上所述, NS5A 作为一种 PKR 的抑制物, 在总体上具有维持 HCV 感染早期 mRNA 翻译水平的功能, 而感染晚期更使 HCV mRNA 适合帽状结构非依赖性的翻译过程.

在细胞内, HCV NS5A 蛋白可在细胞丝氨酸/苏氨酸激酶的催化作用下发生磷酸化. 为了确定 NS5A 蛋白在细胞内磷酸化的位点, Borowski et al^[39] 以同位素标记 HCV-H NS5A 的磷酸多肽, 进行纯化, 对于磷酸化氨基酸残基位点进行分析, 并通过 Edman 降解法证实. 发现 HCV-H NS5A 蛋白磷酸化的位点是 Ser(2 321). 这一磷酸化位点的确定, 得到了另外 2 种方法研究结果的证实. 如对于 Ser(2 321) 突变为 Ala, 磷酸化蛋白修饰立即消失, 对于合成多肽片段的磷酸化修饰研究结果进行分析, 证实 NS5A 蛋白的磷酸化修饰位点为 Ser(2 321). 对于 NS5A 的 Ser(2 321) 位点进行定点诱变, 表明 NS5A 蛋白的磷酸化修饰是 NS4A 和 PKR 结合非依赖性的. NS5A 蛋白富含脯氨酸的位点恰好位于 Ser(2 321) 的周围, 如 PLPPPRS(2 321)PPVPPPR, 表明细胞内脯氨酸特异性激酶是 HCV NS5A 磷酸化的激酶类型, 这与以前以蛋白激酶抑制剂研究的结果是一致的.

NS5A 蛋白分子结构中存在几个富含脯氨酸(proline-rich)的序列结构, 与 SH3 结合位点结构一致, 提示在信号转导的调节过程中具有十分重要的作用. NS5A 可以与 Grb2 接头蛋白(adaptor protein)结合. Kato et al^[40] 以抗-Grb2 抗体的免疫印迹分析结果表明, 从表达 HCV NS5A 蛋白的 HeLa S3 细胞来源的免疫复合物, 发现了 NS5A 与 Grb2 的结合. Grb2 蛋白 N-末端 SH3 结构域的突变显著影响与 NS5A 蛋白之间的结合, 但 C-末端的 SH3 位点的基因突变则影响不大. Grb2 分子中 2 个位点同时突变

则造成 Grb2 与 NS5A 蛋白之间的结合完全消失, 说明 Grb2 蛋白分子中的这 2 个 SH3 结构域在与 NS5A 蛋白的结合过程中具有协同作用. NS5A 的突变分析结果表明, 富含脯氨酸的 SH3 结合区在所有基因型的 HCV 病毒株都是保守的. NS5A 蛋白在细胞内的表达抑制 HeLa S3 细胞中 ERK1/2 的磷酸化. 稳定表达 NS5A 蛋白的 HeLa 细胞在受到 EGF 的刺激后 ERK1/2 不发生磷酸化. 在这些细胞受到 EGF 的刺激后发生 NS5A 与 Grb2 蛋白之间的结合. 因此, NS5A 可能是通过与选择性接头蛋白的结合, 干扰 Grb2 介导的信号转导.

3 肝细胞蛋白对于肝炎病毒基因表达的反式调节

3.1 肝细胞蛋白对于 HBV DNA 元件的调节作用 HBV DNA 中的 CP 指导两个相关的 RNA 分子的转录, 即前-C 和核心 RNA 的转录. 既往的研究表明, 慢性 HBV 感染者的 CP 经常发生 2 个核苷酸的突变, 从而造成核受体结合位点与转录因子(HNF-1)的结合能力下降, 造成转录水平的抑制. 这种基因突变同时也造成与 X 蛋白编码区的 2 个密码子的变化. Li et al^[41] 的研究结果表明, X 蛋白及其突变体在体内外可以与 HNF-1 结合. X 蛋白及其突变体都可以提高 HNF-1 的基因转录水平以及与 X 蛋白的结合能力. 这一结果首次发现了 X 蛋白能够促进转录因子蛋白的 DNA 结合活性. X 蛋白及其突变体在刺激 HNF-1 活性中的作用不同, 仅仅小量的 X 突变体蛋白就可以产生较大的反式激活作用, 显著提高 HNF-1 的 DNA 结合能力. X 蛋白与突变体蛋白之间的这种差别, 在 HBV 感染的致病机制中具有重要意义, 也说明了不同的 CP 结构具有不同的 HNF-1 的结合位点的原因.

干扰素刺激应答元件(ISRE)/干扰素调节元件(IRE)位于 HBV DNA 的 1 091-1 100 nt 之间, 恰好位于增强子 I(Enh I)/X 基因启动子区, 与 XP 活性调节密切相关, 增强子 I/X 基因启动子/ISRE/IRE 组成了一个功能性的调节集团, 与 IFN α 和 ISGF3 的特异性转录激活过程有关.

3.2 肝细胞蛋白对于丙型肝炎病毒基因元件的调节作用 丙型肝炎病毒基因组结构的 5'-NTR 具有特殊的二级结构形式, 这是保证 HCV 进行正确翻译过程的重要的先决条件之一. HCV RNA 5'-NTR 的核苷酸长度为 341 nt. 研究表明, 几乎所有这些核苷酸都参与了内部核糖体进入位点(IRES)的形成. 其基本的二级结构包括四个茎-环(stem-loop)结构, 即第 I-IV 茎-环结构^[42]. 研究表明, 这四段不同的二级结构形式, 在 HCV RNA 翻译过程中都具有十分重要的作用^[43,44]. 每一个不同的茎-环结构通过与不同的翻译有关的蛋白质因子的结合, 对 HCV RNA 的翻译过程起重要的调节作用.

丙型肝炎病毒 RNA 5'-NTR 的翻译起始过程是一种由 IRES 介导的帽状结构形成非依赖性的过程. Worman et al^[45] 应用研究 RNA-蛋白结合的紫外交联技术, 证实多聚嘧啶核苷酸序列结合蛋白(PTB)能够至少与 5'-NTR 中的 3 段不同的结构区段进行结合, 在 HCV RNA 5'-NTR

的翻译过程中发挥重要的调节作用. 对于 PTB 蛋白结合的这三段 5' -NTR 的核苷酸序列进行分析, 证实都有高度保守的多聚嘧啶核苷酸序列. 应用 HCV RNA 5' -NTR 结构区的序列而设计的竞争性核苷酸序列进行的竞争性结合实验研究结果表明, 这种结合是蛋白质因子类型和核苷酸序列特异性的过程. 应用免疫沉淀技术证实, 从 HeLa 细胞中提取的 PTB 蛋白的同分异构体形式的这种蛋白, 能够与 HCV RNA 5' -NTR 结合. 以 PTB 的单克隆抗体事先将 HeLa 细胞中的 PTB 蛋白免疫清除的实验结果表明, PTB 蛋白与 HCV RNA 5' -NTR 的结合, 是 HCV RNA 翻译过程所必须的步骤. 另外还发现, 如果向免疫清除 HeLa 蛋白混合物中再补足 PTB 蛋白, 也不能有效地恢复由 HCV RNA 5' -NTR 介导的翻译过程, 说明除了 PTB 蛋白之外, HCV RNA 5' -NTR 介导的翻译过程, 还必须有另外的 PTB 蛋白质相关因子的参与. 也就是说, 在以 PTB 蛋白特异性单克隆抗体免疫清除 PTB 蛋白的同时, 可能也将另外的与 HCV RNA 翻译有关的 PTB 结合蛋白一起去除了. 因此, 单纯向这种蛋白复合物中添加 PTB 蛋白是远远不够的. 要完成 HCV RNA 的翻译过程, 必须有包括 PTB 蛋白等多种细胞蛋白质因子的参与.

Casbarra et al^[46]的研究表明, La 自身抗原(La autoantigen)也是一种 HCV RNA 5' -NTR 结合蛋白, 并对 HCV RNA 的翻译起始活动具有关键的调节作用. 同样也是应用紫外交联技术对于 HCV RNA 结合蛋白的种类进行了分析. 结果表明, La 自身抗原是 HCV RNA 5' -NTR 特异性结合的蛋白质分子. 进一步的研究表明, 几乎完整 HCV RNA 5' -NTR 的 341 个核苷酸组成的茎 - 环结构, 都是与 La 自身抗原进行结合所必须的, 而且这种 RNA - 蛋白之间的结合, 可以启动 HCV RNA 的翻译过程. 有趣的是, HCV RNA 结构中的翻译起始点(AUG)也是 5' -NTR 与 La 自身抗原结合的必备条件. 如果将完整 HCV RNA 5' -NTR 的核苷酸序列, 只是缺失掉 AUG 或替换成其他核苷酸, 则不具备与野生型 HCV RNA 5' -NTR 竞争性结合 La 自身抗原的能力. 说明 La 自身抗原与 HCV RNA 之间的结合过程, 不仅是茎 - 环二级结构完整性依赖性的, 同时也是翻译起始密码子依赖性的. 因此 La 自身抗原是调节 HCV RNA 翻译活动的重要的宿主细胞的蛋白质因子.

Fukuda et al^[47]对多聚胞嘧啶结合蛋白 1(PCBP-1)和 PCBP-2 等 HCV RNA 5' -NTR 特异性结合蛋白进行了研究. 首先以与谷胱甘肽 S- 转移酶(GST)融合蛋白的形式, 以大肠杆菌表达 PCBP-1 和 PCBP-2 重组蛋白, 并证实了与 HCV RNA 进行特异性结合的能力. 制备了 PCBP-2 的特异性抗血清, 同时证实了这种特异性抗血清能够与 HCV RNA 5' -NTR 和从 HeLa 细胞质提取的蛋白三者共同形成超级复合物. 对于这种结合的 HCV RNA 5' -NTR 的结构依赖性进行研究, 发现几乎所有的内部核糖体进入位点(IRES)的核苷酸序列, 都是与

PCBP-2 结合所必备的. 说明 HCV RNA 5' -NTR 与 PCBP-2 之间的结合, 是 IRES 序列依赖性的, 而且也是 IRES 结构完整性依赖性的. 根据 PCBP-2 在细胞内的分布特点, 认为 HCV RNA 5' -NTR 与 PCBP-2 之间的结合发生在 HCV 感染细胞的细胞质内.

丙型肝炎病毒这些结构比较简单的生物类型, 一般来讲, 都必须借助于感染的宿主细胞内的环境因素, 才能完成其生活周期. HCV RNA 5' -NTR 仅有 341 个核苷酸长度, 但是却指导长达 10 kb 的开放读码框架(ORF)的翻译过程, 因此, 除了其自身的基因组翻译成的蛋白质分子以外, 还必须借助于感染宿主细胞的一些蛋白质因子. 自然想到的是细胞中一些参与蛋白翻译过程的蛋白质因子. Tsuchihara et al^[48]研究了真核细胞翻译起始因子(eIF3)在 HCV RNA 翻译起始过程中的作用. 研究结果表明, eIF3 能够与 HCV 以及经典猪发热病毒(CSFV)RNA 中的 IRES 结合, 对这两种病毒的翻译起始具有重要的调节作用. 利用化学和酶学足迹法对于 eIF3' -IRES 复合物进行分析, 结果表明, eIF3 的结合可以保护 IRES 第 III 茎 - 环结构中的 IIIb 位点的茎部顶端单链核苷酸序列区. 应用 RNA 酶 ONE 和 V1 两种酶的足迹实验都得到了相同的研究结果. 以引物延伸实验也证实了茎 - 环结构 IIIb 或者其相邻的 IIIc 发夹状结构的完整性, 都是 eIF3 与 IRES 区结合所必备的条件. 以 ³²P- 标记的 HCV RNA 探针进行的紫外交联实验的研究结果表明, HCV RNA 的 5' -NTR 至少与 eIF3 蛋白复合物中的 4 种蛋白质成分(P170, P116, P66 和 P47)进行结合. 这一研究结果表明, 病毒的 IRES 蛋白翻译过程, 是要通过借助病毒感染细胞翻译起始蛋白质因子的作用才能实现的.

Reed et al^[49]以高度保守的 HCV RNA 5' -NTR 为探针, 应用凝胶电泳迁移率法, 对于 HCV RNA 5' -NTR 结合的蛋白质成分进行了研究, 以阐明 HCV 感染的靶细胞中的某些蛋白质成分对于 HCV 复制和表达过程的调节作用. 结果发现分子量为 87 kD 和 120 kD 的两种蛋白质分子能够与 HCV RNA 的 5' -NTR 区进行特异性结合. 对于 HCV RNA 5' -NTR 序列结构特点, 与细胞蛋白结合的序列结构依赖性进行研究, 发现 5' -NTR 的 131-253 nt 之间的核苷酸序列, 是这两种蛋白结合的关键序列结构. 如果将 5' -NTR 中的第 III 段茎 - 环结构中的多聚嘧啶区的核苷酸序列 191-UCCUUUCUU-199, 换成 191-UCCUUUggU-199 时, 这种 RNA - 蛋白复合物则不再形成. 因此, 87 kD 和 120 kD 这两种细胞蛋白是 5' -NTR 第 III 茎 - 环结构结合特异性的蛋白质分子, 但多聚嘧啶核苷酸区发生基因突变时, 仅仅造成 87 kD 蛋白与 5' -NTR 结合能力的丧失, 而对于 120 kD 蛋白与 5' -NTR 的结合没有显著的影响. 作者根据这些研究结果, 提出 87 kD 蛋白与 HCV RNA 的复制过程有关, 而 120 kD 的蛋白质则与 HCV RNA 5' -NTR 的翻译过程有关.

4 肝炎病毒反式调节机制研究的意义

4.1 促进对肝炎病毒分子生物学的研究 肝炎病毒在肝细胞中的复制和表达存在十分复杂的机制, 虽然肝炎病毒, 特别是乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒主要是感染肝细胞, 但是对其他细胞类型也具有一定的感染能力. 决定HBV、HCV嗜肝细胞特性的分子生物机制, 主要还是肝细胞中存在特殊的大分子环境, 适合肝炎病毒完成其复制和表达的生活周期, 这种大分子条件是肝细胞中所存在的蛋白质成分, 这些蛋白质成分与肝炎病毒基因组DNA/RNA的结合以及反式调节, 决定了肝炎病毒相对嗜肝细胞的特点. 因此, 关于肝炎病毒反式调节机制的研究, 从理论上可以加深对于肝炎病毒的分子生物学调控机制的深入了解, 为探索抗肝炎病毒的新技术、新疗法奠定坚实的理论基础^[50,51].

4.2 促进新型治疗技术和方法发展 肝炎病毒存在复杂的反式调节机制, 这一特点也是设计新型治疗技术和方法的重要理论根据. 例如显负性突变体(dominant negative mutant)的设计与抗乙型肝炎病毒复制的研究, 利用反式调节机制提高基因治疗中目的基因的表达水平, 或者作为基因治疗的目的基因何时表达的开关, 都有重要的意义.

显负性突变体的构建, 在抗病毒基因治疗新兴技术的设计中具有重要地位. 乙型肝炎病毒的核心蛋白等其他类型的病毒蛋白在HBV的复制和表达过程具有十分重要的促进和调节作用. 如果构建核心蛋白的突变体, 作为基因治疗的目的基因进行表达, 这种显负性突变体的表达, 可以竞争地结合野生型核心蛋白的结合靶位, 但是却缺乏野生型核心蛋白的反式调节作用. 从一定程度上形成了竞争性结合抑制, 对于乙型肝炎病毒的复制和表达进行有效抑制, 实现抗病毒的基因治疗^[52,53].

利用反式调节机制提高目的基因表达水平和作为基因治疗时目的基因表达的开关, 不仅仅限于肝炎病毒的新型治疗技术的设计, 在人免疫缺陷病毒(HIV)的新型治疗技术和方法的设计中得到更为广泛的应用. 已知HIV的长末端重复序列中存在HIV基因编码的反式激活蛋白Tat的应答元件, 在HIV的复制和表达的调节中具有重要作用. 因此, 将干扰素 α 的编码基因构建到LTR启动子序列的下游, 构建基因治疗的表达载体, 如果没有反式激活剂Tat蛋白的存在时, 目的基因的表达水平只是处于很低的水平, 但是当环境中因为出现HIV的感染而表达反式激活剂Tat蛋白时, 受到反式激活以后, 基因治疗的靶基因, 即干扰素的表达水平显著升高, 与基础表达水平相比较可以提高200倍. 这种反式激活作用机制至少具有两方面的意义, 一是可以满足基因治疗过程中目的基因表达水平普遍偏低的情况, 另外, 这种反式调节机制, 更加适合基因治疗目的基因表达水平调节的目的, 即没有HIV感染时, 基因治疗的目的基因表达水平可以只是很低的基础水平的表达, 不至于基因治疗目的基因持续高水平的表达导致机体功能的紊乱, 但是一旦有感染存在时, 就立即启动目的基因的

表达, 进行抗HIV的基因治疗. 随着基因治疗的效果的显现, 病毒复制表达水平又进一步降低, 环境中的反式激活病毒蛋白水平下降, LTR中的启动子活性又开始逐渐下降, 目的基因水平的表达也随之进一步下降, 恢复到对机体影响较小的基础表达水平, 以减少基因治疗目的基因高水平持续表达所带来的可能的毒副作用. 因此, 可以实现抗病毒基因治疗过程中目的基因表达水平的实时调控. 这一点是其他的基因治疗技术和方案所不能比拟的. 因此, 病毒基因表达的反式调节机制在新型抗病毒基因治疗技术的设计中也有重要的应用前景.

Basu et al^[54]在研究脊髓灰质炎病毒(PV)IRES介导的PV病毒基因组翻译过程调节的过程中, 发现一小段来源于酵母细胞的RNA片段(60 nt), 对于PV的IRES介导的翻译功能具有显著的抑制作用. 这一小段RNA片段即称为抑制性RNA(IRNA)片段. 联想到HCV RNA的翻译过程也是由IRES结构介导的, 因而推测这种IRNA片段可能对HCV的翻译功能也有抑制作用. Heim et al^[55]构建了HCV IRES介导的报道基因表达载体和IRNA的表达载体, 共同转染肝癌细胞系Huh7时, 发现IRNA的表达, 对于HCV RNA IRES介导的翻译活性具有明显的抑制作用. 持续IRNA表达对于Huh7细胞系的生长特点没有显著的影响. 同时注意到, IRNA的表达只是抑制由IRES介导的帽状结构形成非依赖性的翻译过程, 而对于宿主细胞的帽状结构形成依赖性翻译机制没有显著的影响^[56,57]. 当以HCV IRES与PV的其他部分重组构建嵌合病毒时, IRNA也能显著抑制这种嵌合病毒的复制和表达. 研究表明, IRNA对于HCV RNA 5' -NTR翻译机制的干扰和抑制作用, 主要是通过对La自身抗原与HCV RNA 5' -NTR结合过程的抑制作用而实现的. 因此, 对HCV RNA 5' -NTR结构及其结合蛋白的研究将为抗HCV新型治疗方法的设计奠定坚实的基础.

5 参考文献

- 1 成军, 张玲霞. 抗HCV的基因治疗方案—根据HCV与肝细胞相互作用的分子生物学机制设计. 国外医学流行病学传染病学分册 1999;26:59-61
- 2 刘妍, 董菁, 成军, 钟彦伟, 夏小兵, 李克, 王琳, 施双双, 段惠娟. 乙型肝炎病毒X蛋白反式激活SV40病毒早期启动子的研究. 解放军医学杂志 2001;26:404-406
- 3 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
- 4 成军, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS4A的研究进展. 国外医学病毒学分册 2000;7:14-17
- 5 成军, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒3' -非翻译区RNA结合蛋白的研究进展. 国外医学病毒学分册 2000;7:17-21
- 6 成军, 张玲霞. 丙型肝炎病毒基因的干扰素敏感决定区. 国外医学流·行病学传染病学分册 2000;27:55-58
- 7 刘妍, 成军, 董菁, 李克, 夏小兵, 王刚, 杨继珍, 王琳. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的初步研究. 肝脏 2001;6:8-10
- 8 Waris G, Siddiqui A. Interaction between STAT-3 and HNF-3 leads to the activation of liver-specific hepatitis B virus enhancer 1 function. *J Virol* 2002;76:2721-2729
- 9 董菁, 成军, 王勤环, 王刚, 施双双, 刘妍, 夏小兵, 斯崇文. 外周血中乙型肝炎病毒截短型囊膜蛋白基因的克隆化与序列分析. 中华肝脏病杂志 2001;9:163-165
- 10 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

- 11 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 表面抗原中蛋白协同反式激活功能. 中华肝脏病杂志 2002;10:354-357
- 12 刘妍,成军,张跃新,段惠娟,牟劲松,韩萍,李莉,张玲霞,陈菊梅. 截短型 HBsAg 中蛋白反式激活基因的克隆. 中华传染病杂志 2002;20:218-221
- 13 Ogden SK, Lee KC, Barton MC. Hepatitis B viral transactivator HBx alleviates p53-mediated repression of alpha-fetoprotein gene expression. *J Biol Chem* 2000;275:27806-27814
- 14 Lee S, Tarn C, Wang WH, Chen S, Hullinger RL, Andrisani OM. Hepatitis B virus X protein differentially regulates cell cycle progression in X-transforming versus nontransforming hepatocyte (AML12) cell lines. *J Biol Chem* 2002;277:8730-8740
- 15 Lee MO, Kang HJ, Cho H, Shin EC, Park JH, Kim SJ. Hepatitis B virus X protein induced expression of the Nur77 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:1162-1168
- 16 Nijhara R, Jana SS, Goswami SK, Rana A, Majumdar SS, Kumar V, Sarkar DP. Sustained activation of mitogen-activated protein kinases and activator protein 1 by the hepatitis B virus X protein in mouse hepatocytes in vivo. *J Virol* 2001;75:10348-10358
- 17 Tarn C, Lee S, Hu Y, Ashendel C, Andrisani OM. Hepatitis B virus X protein differentially activates RAS-RAF-MAPK and JNK pathways in X-transforming versus non-transforming AML12 hepatocytes. *J Biol Chem* 2001;276:34671-34680
- 18 Kang-Park S, Lee JH, Shin JH, Lee YI. Activation of the IGF-II gene by HBV-X protein requires PKC and p44/p42 map kinase signalings. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;283:303-307
- 19 Pflum MK, Schneider TL, Hall D, Schepartz A. Hepatitis B virus X protein activates transcription by bypassing CREB phosphorylation, not by stabilizing bZIP-DNA complexes. *Biochemistry* 2001;40:693-703
- 20 Park US, Park SK, Lee YI, Park JG, Lee YI. 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
- 21 Guo SP, Wang WL, Zhai YQ, Zhao YL. Expression of nuclear factor-kappa B in hepatocellular carcinoma and its relation with the X protein of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2001;7:340-344
- 22 Madden CR, Slagle BL. Stimulation of cellular proliferation by hepatitis B virus X protein. *Dis Markers* 2001;17:153-157
- 23 Shamay M, Barak O, Doitsh G, Ben-Dor I, Shaul Y. Hepatitis B virus pX interacts with HBXAP, a PHD finger protein to coactivate transcription. *J Biol Chem* 2002;277:9982-9988
- 24 Bouchard M, Giannakopoulos S, Wang EH, Tanese N, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activation of cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 complexes and G1 transit via a Src kinase pathway. *J Virol* 2001;75:4247-4257
- 25 成军. 慢性丙型肝炎病毒肝脏脂肪变的机制及其意义. 世界华人消化杂志 2002;10:999-1003
- 26 Li J, Ou JH. Differential regulation of hepatitis B virus gene expression by the Sp1 transcription factor. *J Virol* 2001;75:8400-8406
- 27 Kim H, Lee YH, Won J, Yun Y. Through induction of juxtaposition and tyrosine kinase activity of Jak1, X-gene product of hepatitis B virus stimulates Ras and the transcriptional activation through AP-1, NF-kappaB, and SRE enhancers. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;286:886-894
- 28 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
- 29 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
- 30 Tsuei DJ, Chang MH, Chen PJ, Hsu TY, Ni YH. Characterization of integration patterns and flanking cellular sequences of hepatitis B virus in childhood hepatocellular carcinomas. *J Med Virol* 2002;68:513-521
- 31 Huang JM, Huang TH, Qiu HY, Fang XW, Zhuang TG, Qiu JW. Studies on the integration of hepatitis B virus DNA sequence in human sperm chromosomes. *Asian J Androl* 2002;4:209-212
- 32 Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998;282:938-941
- 33 Rice CM. Is CD81 the key to hepatitis C virus entry? *Hepatology* 1999;29:990-992
- 34 Higginbottom A, Quinn ER, Kuo CC, Flint M, Wilson LH, Bianchi E, Nicosia A, Monk PN, McKeating JA, Levy S. Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *J Virol* 2000;74:3642-3649
- 35 Flint M, Dubuisson J, Maidens C, Harrop R, Guile GR, Borrow P, McKeating JA. Functional characterization of intracellular and secreted forms of a truncated hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J Virol* 2000;74:702-709
- 36 Flint M, Maidens C, Loomis-Price LD, Shotton C, Dubuisson J, Monk P, Higginbottom A, Levy S, McKeating JA. Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J Virol* 1999;73:6235-6244
- 37 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
- 38 Lahm A, Yagnik A, Tramontano A, Koch U. Hepatitis C virus proteins as targets for drug development: the role of bioinformatics and modelling. *Curr Drug Targets* 2002;3:281-296
- 39 Borowski P, Heiland M, Feucht H, Laufs R. Characterisation of non-structural protein 3 of hepatitis C virus as modulator of protein phosphorylation mediated by PKA and PKC: evidences for action on the level of substrate and enzyme. *Arch Virol* 1999;144:687-701
- 40 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
- 41 Li J, Xu Z, Zheng Y, Johnson DL, Ou JH. Regulation of hepatocyte nuclear factor 1 activity by wild-type and mutant hepatitis B virus X proteins. *J Virol* 2002;76:5875-5881
- 42 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
- 43 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
- 44 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
- 45 Worman HJ, Lin F. Molecular biology of liver disorders: the hepatitis C virus and molecular targets for drug development. *World J Gastroenterol* 2000;6:465-469
- 46 Casbarra A, Piaz FD, Ingallinella P, Orru S, Pucci P, Pessi A, Bianchi E. The effect of prime-site occupancy on the hepatitis C virus NS3 protease structure. *Protein Sci* 2002;11:2102-2112
- 47 Fukuda K, Tsuchihara K, Hijikata M, Nishiguchi S, Kuroki T, Shimotohno K. Hepatitis C virus core protein enhances the activation of the transcription factor, Elk1, in response to mitogenic stimuli. *Hepatology* 2001;33:159-165
- 48 Tsuchihara K, Hijikata M, Fukuda K, Kuroki T, Yamamoto N, Shimotohno K. Hepatitis C virus core protein regulates cell growth and signal transduction pathway transmitting growth stimuli. *Virology* 1999;258:100-106
- 49 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
- 50 皇甫竟坤,董菁,邓红,成军,施双双,洪源,任喜民,李莉. 乙型肝炎病毒核心基因启动子序列突变及接种. 世界华人消化杂志 2001;9:1323-1325
- 51 成军,董菁. 乙型肝炎病毒前基因组启动子的结构与调节机制. 中华医学研究杂志 2001;1:122-125
- 52 成军,李莉,张玲霞,陈菊梅. 丙型肝炎病毒感染与脂类代谢的相关性. 肝脏 2002;7:56-58
- 53 董菁,施双双,皇甫竟坤,成军,王勤环,李莉,斯崇文. 乙型肝炎病毒 X 基因接种特点的研究. 中国病毒学 2002;17:22-26
- 54 Basu A, Meyer K, Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus core protein modulates the interferon-induced transacting factors of Jak/Stat signaling pathway but does not affect the activation of downstream IRF-1 or 561 gene. *Virology* 2001;288:379-390
- 55 Heim MH, Moradpour D, Blum HE. Expression of hepatitis C virus proteins inhibits signal transduction through the Jak-STAT pathway. *J Virol* 1999;73:8469-8475
- 56 韩萍,刘妍,成军,王刚,陆荫英,李克,李莉. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白上调 c-myc 基因表达的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:141-144
- 57 陆荫英,刘妍,成军,张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 蛋白的功能研究进展. 国外医学病毒学分册 2002;9:33-36



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

