

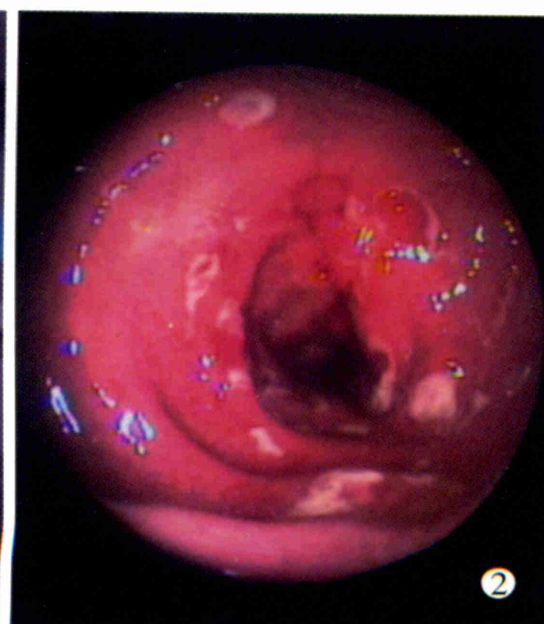
世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003年8月15日 第11卷 第8期

(Volume 11 Number 8)



8/2003

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 8 月 15 日 第 11 卷 第 8 期 (总第 112 期)

述 评

- 1073 乙型肝炎病毒基因组结构与功能复杂性的新认识 成军, 董菁
1081 重视溃疡性结肠炎的诊断和个体化规范化治疗 江学良

病毒性肝炎

- 1083 乙型肝炎病毒中国流行株全基因的克隆与序列分析 成军, 董菁, 洪源, 钟彦伟, 刘妍, 王刚, 王琳
1091 乙型肝炎病毒基因组中前 - 前 -S 区编码基因的界定 董菁, 成军
1097 乙型肝炎病毒基因组中前 -X 编码基因的界定 董菁, 成军
1102 羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活基因 1 的克隆化研究 刘妍, 成军, 王琳, 王建军, 陆荫英, 李克
1107 乙型肝炎病毒 X 蛋白激活基因 1 的克隆化与序列分析 刘妍, 成军, 王琳, 王建军, 陆荫英, 李克
1114 乙型肝炎病毒前 -S2 蛋白结合蛋白基因 S2-29 的克隆化研究 陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 李克, 张健, 邵清, 张玲霞
1118 酵母双杂交技术筛选鉴定乙型肝炎病毒 e 抗原结合蛋白 E-19 的研究 陆荫英, 邵清, 成军, 陈天艳, 王琳, 梁耀东, 刘妍, 张健, 李克, 张玲霞
1122 酵母双杂交技术筛选鉴定乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白新基因 C-12 的研究 陆荫英, 陈天艳, 成军, 邵清, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 李克, 张玲霞
1126 乙型肝炎病毒 X 蛋白与去唾液酸糖蛋白受体 2 突变体相互作用的研究 陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 邵清, 李克, 张玲霞
1131 羧肽酶 N 调节乙型肝炎病毒核心启动子表达活性的研究 张忠东, 成军, 钟彦伟, 杨倩, 王业东, 董菁, 杨艳杰, 张树林
1135 丙型肝炎病毒 NS5A 基因变异与干扰素疗效的关系 张琳, 赵桂珍, 石理兰, 曹丽
1139 汉族人 IL-12b 和 IL-10 启动子区基因多态性与 HBV 感染的相关性 李永纲, 刘明旭, 王福生, 金磊, 洪卫国

基础 研 究

- 1144 肝外胆管癌组织 BAG-1 与 BAD 表达与凋亡调控的原位定量研究 闫庆国, 师建国, 黄高昇, 张传山, 李青, 胡沛臻, 王文亮
1148 牛磺酸脱氧胆酸损伤线粒体诱导 HepG2 细胞凋亡 李光明, 谢青, 周霞秋, 俞红, 郭清, 廖丹, 李定国
1152 肝硬化大鼠肝部分切除后肝细胞生长周期的调控 陈平, 李昆, 董家鸿, 韩本立
1156 苦参碱对大鼠原位肝移植冷缺血再灌注中肝窦内皮细胞损伤的影响 仇毓东, 朱新华, 史敏科, 丁义涛
1160 犬肝动脉输注阿霉素联合血液灌流的研究 张志友, 张文怡, 钱绍诚
1164 中国人金属基质蛋白酶组织抑制因子 -1 基因的克隆与表达 刘双虎, 谭德明, 侯珏, 胡国龄
1168 卡托普利对肝纤维化模型鼠 MMP-2, 3 TIMP-2, 3 表达的影响 李乾, 张桂英, 李新华, 徐美华
1172 垂体后叶素和特利加压素降低门胆汁性肝硬化大鼠门静脉高压对肝组织氧分压的影响 祝建波, 邓利群, 王思元
1175 电泳法检测肝和血清中醇脱氢酶同工酶 宓庆梅, 曹鲁宁, 高春芳
1178 肝细胞生成素核受体的确定及特性 王阁, 陈东风, 胡铭, 王军, 樊丽琳, 张晓荣
1182 PD98059 对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞增生的影响 马洪德, 蒋明德, 钟显飞, 解方为, 曾维政
1185 雌二醇对肝纤维化大鼠 I, III 型胶原及 TGF β_1 表达的影响 许君望, 龚均, 冯新利, 茆新明, 罗金燕, 董蕾, 贾皓, 徐贵平
1189 大鼠急性酒精性脂肪肝造模方法的改进 冯志强, 沈志祥, 谭诗云, 罗和生, 漆楚波, 郭洁, 李海霞
1193 丁酸钠联合穿琥宁对人大肠癌细胞 HCT-8 增生的影响 布立民, 纪欣, 韩英, 陈刚, 王志红, 孙淑红
1197 大肠癌组织胸苷磷酸化酶 / 血小板衍生内皮细胞生长因子的表达及意义 余细球, 邓长生, 朱尤庆, 程芳洲
1200 多粘菌素 B 及其模拟肽体外抗内毒素的实验研究 万志红, 王宇明, 刘国栋
1203 肥大细胞在胃嗜酸性肉芽肿发病中的作用 高振军, 罗和生, 操寄望, 余保平, 宋刘来

临床研究	1207 鱼腥草治疗初发型溃疡性结肠炎的临床研究 江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 尚瑞莲, 齐凤 1211 奥沙拉秦钠治疗慢性反复发作型溃疡性结肠炎随机对照研究 江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 尚瑞莲, 齐凤 1214 抗栓灵含片治疗伴有血小板活化的难治性溃疡性结肠炎 江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 尚瑞莲, 齐凤 1219 胃癌前病变演变过程中凋亡相关蛋白和PCNA的表达意义 伍银桥, 王孟薇, 吴本俨, 尤纬缔, 祝庆孚 1223 汉防己甲素抑制肝癌细胞增生的作用 荆绪斌, 李涛, 杨绮华, 郭光华, 胡辉, 陈素钻 1227 美蓝染色放大电子结肠镜观察结肠息肉与组织病理学的关系 苏鲁, 潘洪珍, 翁敬飏, 徐艺华, 陈芳, 洪梅燕 1230 肝硬化患者血浆胃动素、胆囊收缩素、生长抑素及其胃电的改变 张蓉, 闻勤生, 黄裕新, 赵海峰, 田力 1234 肠易激综合征 402 例发病时间分布及症状特征 许小幸, 李定国, 宋光辉, 周惠清, 刘清华
焦点论坛	1237 乙型肝炎病毒基因组结构与功能复杂性的研究进展 成军 1238 准种是乙型肝炎病毒存在的基本方式 成军, 董菁, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚 1240 乙型肝炎病毒 X 基因启动子结构及调节研究 邵清, 成军, 白雪帆 1242 乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的研究 梁耀东, 成军, 陆荫英, 吴君, 程明亮 1245 羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的研究 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩 1248 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式激活作用的研究 杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 洪源, 张树林 1250 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对于细胞周期素 A 的调节研究 成军, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚 1255 乙型和丙型肝炎病毒对细胞周期素及细胞周期素依赖性蛋白激酶的调节 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩 1258 乙型和丙型肝炎病毒对 MAPKK 信号转导的影响 张忠东, 成军, 钟彦伟, 张树林 1261 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 1264 RNA 干扰与抗肝炎病毒治疗前景的研究 成军, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚
临床经验	1222 一氧化碳中毒伴筋膜间隙综合征的综合治疗 邹淑杭, 马丽萍, 金镇勋, 贺红, 王一玲, 李冰 1267 胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤 21 例 樊丽琳, 陈东风
病例报告	1143 成人不典型郎格罕组织细胞增生症 1 例 王巍峰, 黄启阳, 王志强, 杨云生 1147 慢性酒精性肝损伤致 Gilbert 综合征样改变 1 例 张文瑾, 王晓峰, 赵景民 1192 小肠血管结构不良 2 例 冯瑞娥, 赵大春, 陈杰
消息	1080 欢迎订阅 2003 年度世界华人消化杂志 1090 欢迎订阅 2003 年度 World Journal of Gastroenterology® 1130 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊 1155 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 1226 WJG 搭建我国消化学基础和临床研究惟一国际交流的平台
封面故事	1138 溃疡性结肠炎的基础和临床研究

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 2003-08-15
原刊名 新消化病学杂志

总顾问 陈可冀
黄象谦
黄志强
黎介寿
刘耕陶
裘法祖
汤钊猷
王宝恩
危北海
吴孟超
吴咸中

社长总编辑 马连生
中文编辑 潘伯荣
王瑾晖
英文编辑 朱丽虹
排版 李少华
校对 李天华

张金哲
张学庸
赵东海
周殿元

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(PJ)》
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
CN 14-1260/R

邮发代号 82-262

国外代号 M 4481

国内定价 每期 24.00 元 全年 288.00 元

广告经营 14010040

50

www.wjgnet.com

删除分析实验显示 EF-C 位点(mp1163)需要 X 启动子全部活性, 涉及 NF-1a 位点时需足够的 X 启动子基础活性. NF-1a 位点的 PCR 定向接头分区诱变实验中并没有使启动子活性下降, 提示此位点并不是启动子必需成分. 增强子 I 复杂甚至部分重复的蛋白质 DNA 相互作用对于全部 X 启动子活性是必需的. 必需的基础启动子成分的缺乏提示 2 个分离的 HBV 增强子成分是由基因整合作用生成一个原始的增强子成分.

Xu et al^[15]将 HBV 质粒同 p73 α 和 p73 β 表达载体共转染进 HepG2 细胞, 表面抗原和 e 抗原用 ELISA 检测, 病毒转录合成用 Northern blotting 评价. HBV 调控元件增强子 I /X 启动子活性用萤虫素酶测定来评价. 结果显示 p73 α 和 p73 β 通过下调增强子 I /X 启动子活性来抑制表面抗原和 e 抗原表达, 但 p73 β 比 p73 α 作用更强. p73 α 和 p73 β 均为 p53 家族成员.

Choi et al^[16]将激活转录因子 2 (ATF2) 表达载体与连接了 CAT 的 X 启动子质粒共转染进 HepG2 细胞, 结果抑制了 X 启动子活性. 通过 HBV E 成分, 活化的激活蛋白 1 (AP1) 介导 HBx 转录高达 35 倍, 当 ATF2 存在时其激活活性被抑制, 提示 X 启动子自活化的作用被 ATF2 所抑制. AP1 介导的基础转录和 HBx 造成 X 启动子自活化. 在 HBV E 成分中由于 AP1 和 ATF2 结合位点是重叠的, ATF2 对 X 启动子活性的抑制作用与 AP1 结合位点是竞争的, 并且形成 ATF2-Jun 异二聚体与 AP1 成分是一致的. X 小启动子有 1 个 ATF2 结合位点, 并可被 ATF2 激活. ATF2 对 X 蛋白有综合调节作用.

Choi et al^[17]用 5' 串行缺失分析的方法对 X 小启动子进行研究, X 小启动子位于 X-ORF 中间的 5' - 端, 实验发现了 1 个 X 小启动子的阳性调节序列, 2 个细胞的蛋白 p110 和 p33 分别约束此调节序列的 3' 端 - 和 5' - 端. p33 和 p110 分别的结合位点缺失突变分别导致阳性成分活性的下降和升高, 因此对 p33 的功能而言, p33 具有反式激活作用, p110 具有抑制作用. P110 体外磷酸化减少了他的靶 DNA 结合能力可进一步证明这一点.

3 参考文献

- Guo SP, Ma ZS, Wang WL. Construction of eukaryotic expression vector of HBV x gene. *World J Gastroenterol* 1999;5: 351-352
- Tang RX, Gao FG, Zeng LY, Wang YW, Wang YL. Detection of HBV DNA and its existence status in liver tissues and peripheral blood lymphocytes from chronic hepatitis B patients. *World J Gastroenterol* 1999;5:359-361
- Qin LL, Su JJ, Li Y, Yang C, Ban KC, Yian RQ. Expression of IGF- II, p53, p21 and HBxAg in precancerous events of hepatocarcinogenesis induced by AFB1 and/or HBV in tree shrews. *World J Gastroenterol* 2000;6:138-139
- Wang Y, Liu H, Zhou Q, Li X. Analysis of point mutation in site 1896 of HBV precore and its detection in the tissues and serum of HCC patients. *World J Gastroenterol* 2000;6:395-397
- 骆抗先, 朱幼芙. 乙型肝炎基础和临床. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001:25-33
- Zheng YW, Riegler J, Wu J, Yen TS. Novel short transcripts of hepatitis B virus X gene derived from intragenic promoter. *J*

- Biol Chem* 1994;269:22593-22598
- Zhang P, Raney AK, McLachlan A. Characterization of the hepatitis B virus X-and nucleocapsid gene transcriptional regulatory elements. *Virology* 1992;191:31-41
- Treinin M, Laub O. Identification of a promoter element located upstream from the hepatitis B virus X gene. *Mol Cell Biol* 1987;7:545-548
- Fukai K, Takada S, Yokosuka O, Saisho H, Omata M, Koike K. Characterization of a specific region in the hepatitis B virus enhancer I for the efficient expression of X gene in the hepatic cell. *Virology* 1997;236:279-287
- Takada S, Kaneniwa N, Tsuchida N, Koike K. Hepatitis B virus X gene expression is activated by X protein but repressed by p53 tumor suppressor gene product in the transient expression system. *Virology* 1996;216:80-89
- Nakamura I, Koike K. Identification of a binding protein to the X gene promoter region of hepatitis B virus. *Virology* 1992; 191:533-540
- Yaginuma K, Nakamura I, Takada S, Koike K. A transcription initiation site for the hepatitis B virus X gene is directed by the promoter-binding protein. *J Virol* 1993;67:2559-2565
- Guo WT, Bell KD, Ou JH. Characterization of the hepatitis B virus EnhI enhancer and X promoter complex. *J Virol* 1991; 65:6686-6692
- Gustin K, Shapiro M, Lee W, Burk RD. Characterization of the role of individual protein binding motifs within the hepatitis B virus enhancer I on X promoter activity using linker scanning mutagenesis. *Virology* 1993;193:653-660
- Xu ZH, Zhao MJ, Li TP. p73beta inhibits transcriptional activities of enhancer I and X promoter in hepatitis B virus more efficiently than p73alpha. *World J Gastroenterol* 2002;8:1094-1097
- Choi CY, Choi BH, Park GT, Rho HM. Activating transcription factor 2 (ATF2) down-regulates hepatitis B virus X promoter activity by the competition for the activating protein 1 binding site and the formation of the ATF2-Jun heterodimer. *J Biol Chem* 1997;272:16934-16939
- Choi CY, Park GT, Rho HM. A positive regulatory sequence of hepatitis B viral small X promoter. *Eur J Biochem* 1996;239: 579-587

乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的研究

梁耀东, 成军, 陆荫英, 吴君, 程明亮

梁耀东, 成军, 陆荫英, 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
吴君, 程明亮, 贵阳医学院第一附属医院感染科 贵州省贵阳市 550004
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: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-16

梁耀东, 成军, 陆荫英, 吴君, 程明亮. 乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1242-1245

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1242.asp>

0 引言

基因组研究自从开展以来, 已经取得了举世瞩目的成就. 随着基因组测序工作的完成, 接下来就是研究基因的功能. 因为基因是通过蛋白质之间的相互作用而发挥功能的, 蛋白质之间的相互作用是很多生命现象的基础, 故基因表达的蛋白质的功能研究尤为重要. 乙型肝炎

炎病毒(HBV)是嗜肝 DNA 病毒, 可以引起慢性肝炎、肝硬化及肝癌等, 目前全世界有 3.5 亿人感染, HBV 为了适应生存环境的变化, 特别是在宿主免疫和抗病毒药物的压力下, HBV 的 4 个基因区都可能发生突变, 有的突变改变了病毒的致病性, 或影响宿主对病毒的免疫应答、抗病毒药物的疗效和乙肝疫苗的免疫效果, 治疗及预防效果均不佳, 且预后极差^[1-7]. HBV 的四个结构蛋白开放读码框(open reading frame, ORF) S、C、P、X 分别编码前-S1、前-S2、HBsAg、HBcAg、HBeAg、病毒多聚酶及 HBxAg 等 7 种蛋白质, 1990 年代末以来, 一系列的遗传、生化方法尤其是酵母双杂交技术等的发展, 为研究 HBV 与人体蛋白质之间的相互作用打下了坚实的基础. 在上述七种蛋白中, 由于 HBcAg 结构和功能的特殊性, 目前对其结合蛋白的研究还比较少.

1 HBcAg 的结构及功能

HBcAg 由 HBV 的 C 基因编码, 分子量为 21-22 kD. C 基因可分为前-C(pre-c)区和 C 区, 前-C 区位于 1 814-1 901 nt 之间, 编码一段 29 个氨基酸残基(aa)组成的多肽叫前 C-蛋白. C 区位于 1 901-2 450 核苷酸(nt)之间, 编码 183 aa 组成的 C 蛋白(乙型肝炎病毒核心抗原, HBcAg), 而由前-C 和 C 蛋白基因共同编码的 212 aa 组成的多肽, 称乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg). C 基因有两个 ATG 起始码, 形成至少四条多肽(p25、p22、p21 及 p17)^[8].

HBV 核壳由 240 个或 180 个 HBcAg 亚单位组成对称的正二十面体结构, 各亚单位间必须有确定的分子界面方能形成如此特异的结构, 其内侧与 P 蛋白及基因组 RNA 结合, 外侧与 HBsAg 结合. p21 HBcAg 自 C 基因的第二个 ATG 起始合成, 是组成核壳的主要成分, 由 183-185 aa 组成, 除负责形成特殊的结构外, 尚参与 RNA 包装、DNA 合成、病毒成熟、识别包膜蛋白以及病毒向细胞外释放等过程. p22 蛋白能够形成与 p21 蛋白相似的核壳, 二者也可以形成杂交核壳. 核壳表面有特征性的刺突及核孔, 推测其基本亚单位为锤头状二聚物, 且折叠成放射状排列的四条 α 螺旋, 中间第 78-82 aa 是主要免疫区(MIR), 位于核壳刺突的尖部. 除刺突外, 位于 C 末端 α 螺旋尾部的 127-133 aa, 是除刺突外的另一个 B 细胞识别位点. 尽管 HBcAg 不象其他许多病毒那样折叠成 β 片层, 但所形成的核壳仍具有许多功能信息.

HBcAg 有稳定的三维结构, 大致可分为核壳装配区(1-149 aa)和核酸结合区(150-183 aa). HBcAg 的双体在装配区自发地组装进入核壳, 有文献报道, 在大肠杆菌、酵母和哺乳动物细胞中表达 C 基因, 均可得到 27 nm 的核心颗粒, 表明 HBcAg 不需任何其他蛋白的参与即可自我装配成核心颗粒; 核酸结合区是精氨酸富集区, 可与前基因组 RNA 结合, 将其包裹进入核心.

HBcAg 的羧基末端是与 RNA/ DNA 的结合区段, 也与 DNA 聚合酶的包装信号 ϵ 结合有关; 其具有鱼精蛋白样亲核性, 可介导细胞核内转运信号, 当大量 HBcAg 进入细胞核内后, 其他嗜肝 DNA 病毒表达的核壳蛋白都不能被转运至核内. HBcAg 羧基端鱼精蛋白样精氨酸丰富区第 150-183 aa 很重要, 删除此段, 虽仍能形成颗粒样核壳, 与全长形成的核壳在高分辨率冷冻电镜下观察无明显差异, 但较不稳定, 并且通常为空壳. 应用核磁共振(NMR)分析 HBcAg 颗粒, 发现 C 末端鱼精蛋白样区在颗粒内部的位置不固定. Metzger et al^[9]研究还发现在第 150 aa 后有很大的容量连接其他蛋白, 仍能形成大颗粒.

Conway et al^[10]通过 HBcAg 颗粒对蛋白酶耐性研究, 发现仅有的蛋白酶敏感区 145-147 aa 位于装配区与核酸结合区交界处, 这一区域形成臂状结构. 如果 138 位脯氨酸由甘氨酸所替代, 则能阻止 HBcAg 聚合成颗粒, 而替换第 134、135 和 144 位脯氨酸, 则对核壳的形成无影响.

König et al^[11]研究辨认出两个相互作用区, 一为 78-117 aa, 可能形成二聚体的界面; 二是 113-143 aa, 与 HBcAg 多聚体的形成有关. Kratz et al^[12]发现第 73-94 aa 之间对 HBcAg 自身装配并非必需, 在此区插入 238 aa 仍能暴露于核壳表面. Borisova et al^[13]研究发现任意插入一个仅 5 aa 的前-S1 序列, 如果删除 HBcAg 第 79-88 aa, 可产生特异性抗前-S1 蛋白免疫力, 而当未删除或删除过多的氨基酸(79-93 aa)时, 则免疫力很弱, 删除 79-81 aa, 尽管仍能被抗-HBc 多克隆抗体所识别, 已足以避免 HBcAg 原有的免疫原性.

HBcAg 基因的进化最明显, 他是唯一未被其他基因覆盖的基因, 其与狨猴 HBV(WMHBV)的 HBcAg 序列同源性约为 85-87%. HBV 按基因结构分为 A、B、C、D、E、F 6 个基因型; 根据核心基因又可分为 I 型和 II 型, 两种基因型的易变区分别为 88-99 和 48-60 aa, 大致 HBcAg 74-101 aa 属于高变区^[14, 15].

HBcAg 有较强的免疫原性, 对 HBcAg 的免疫应答反应在宿主对病毒的清除过程中可能有重要作用. HBcAg 的表位主要决定于 HBcAg 的空间构型, 有研究表明, HBcAg 的主要 B 细胞表位在第 107-118 aa 和 77-82 aa 等区段; T 淋巴细胞表位是一些在亲水区的较小的(几个至几十个)寡肽; 细胞毒性 T 淋巴细胞的识别部位由第 84-101 aa 和第 17-28 aa 等区段组成.

2 HBcAg 的结合蛋白

HBcAg 可组成 Dane 颗粒, 并释放入血, 也可在肝细胞膜上表达, 或游离的 HBcAg 与抗-HBc-IgM 特异性结合形成循环免疫复合物. HBcAg 具有很强的免疫原性, 既是 T 细胞依赖性又是非 T 细胞依赖性抗原, 也是杀伤性 T 细胞识别并清除 HBV 感染细胞的靶抗原.

由于感染肝细胞中细胞质和核中存在核心抗原, 核

心蛋白肝细胞内的分布与病毒的复制状态和疾病的活动状态高度相关. Huang et al^[16]研究了HBV核心蛋白与肌动蛋白结合蛋白的C末端区相互作用. 他们用核心蛋白的羧基末端研究与细胞蛋白的相互作用, 因为这一段和病毒的复制周期有关如RNA包装和DNA合成. 用酵母双杂交的方法筛选出了一个cDNA克隆编码人肌动蛋白结合蛋白的C末端区-ABP-276/278, 这个相互作用均用体内实验所证实. 另外, ABP-276/278的C末端区可以和核心蛋白的全长相互作用. 因为这个区域既存在于核心区也存在于前核心区, 所以HBV的核心蛋白和前核心蛋白都可以和ABP-276/278的C末端相互作用. 与HBV核心蛋白相互作用的ABP-276/278的最小区是C末端的199 aa相应于ABPs中的间隔铰链区II的24个重复的第23重复区. HBV复制中ABP潜在功能和他在慢性肝炎患者中在病理改变中所起作用还在研究.

核心蛋白是人乙肝病毒核心颗粒的主要组成部分, 核心颗粒和核心蛋白在病毒的复制中起重要的作用, 包括RNA包装, DNA的合成及病毒包膜蛋白的识别等. 核心蛋白大部分是含磷蛋白, 如果不是, 则在核心蛋白C末端的3个SPRRR序列中的丝氨酸残基发生磷酸化. HBcAg磷酸化后暴露出其核内定位信号, HBcAg与核小孔复合物结合进入核内, 因此HBcAg磷酸化是病毒基因进入核内所必需的. 在包装了病毒聚合酶和基因组RNA后, HBcAg开始发生磷酸化, 这可以作为基因成熟的一个信号.

Kau et al^[17]从细胞内核糖体相关蛋白成分研究发现一种丝氨酸激酶能特异地结合和磷酸化核心蛋白的C末端部分, 这一激酶被命名为核心相关激酶(Core-associated kinase, CAK), CAK可被激酶抑制因子如肝素及 Mn^{2+} 等抑制, 而不被亚麻酸、DRB、H89及H7等抑制, 表明可通过蛋白激酶A和C将其区分开来; 其还可通过肝素琼脂糖CL-6B和磷酸纤维素P11柱来部分纯化; 通过Western法检测出三种46、35、13 kD的蛋白质, 被证明与核心蛋白的C末端有作用, 且其仅仅在被洗脱部分含有CAK活性; 通过胶内(in-gel)法激酶分析表明, 46 kD的激酶的部分能激活和磷酸化上述核心蛋白的C末端, 表明46 kD的CAK激酶最有可能是核心相关激酶, 同时还发现一种类似的46 kD激酶, 其表现为对CAK激酶的抑制. 在纯化的细胞内核心颗粒和细胞外42 nm病毒中, 均提示CAK是核心颗粒相关激酶的候选子.

乙肝病毒HBcAg可以与46 kD的丝氨酸激酶结合而发生磷酸化, 乙肝病毒核心蛋白的磷酸化被证实对于前基因RNA组装入病毒核壳是很必须的, 但宿主细胞激酶对介导HBV的复制这必须的一步还没有被清楚了解. Daub et al^[18]在人肝细胞瘤HuH-7细胞裂解物中发现两种激酶, M_r 分别为95和115 kD, 他们能与乙肝病毒核心蛋白特异性结合并使其富含精氨酸的C末端磷酸化, 95 kD的激酶通过质量光谱测定法纯化后, 发

现其性质类似于SR蛋白特异激酶1(SRPK1). 依据这一发现, 通过免疫印迹法鉴定出115 kD激酶为SRPK2相关激酶. 两种激酶磷酸化乙肝病毒核心蛋白在体内外作用于同一丝氨酸末端; 而且, 在所有细胞裂解物内均发现有乙肝病毒核心蛋白激酶, 表明SRPK1和SRPK2的生物化学性质是相同的, 通过层吸法测量结合物, 我们也了解到他们既不是周期素依赖性蛋白激酶Cdc 2和Cdk 2, 也不是蛋白激酶C. 多有文献报道乙肝病毒核心蛋白的磷酸化与乙肝病毒核心蛋白激酶的活性有关, SRPK1和SRPK2是在乙肝病毒感染过程中介导乙肝病毒核心蛋白磷酸化的最有可能的细胞内蛋白激酶.

在病毒成熟过程中, 核壳与外膜蛋白相互作用, 形成病毒颗粒分泌的信号. Poisson et al^[19]通过体外实验发现前-S1蛋白的第13位氨基酸的C末端可以与HBcAg有效的结合, 其他位点则不能结合; 而且, 还发现HBsAg的第56-80位氨基酸也能与HBcAg有效的结合, 这两种反应可能是乙肝病毒维持正常的形态功能所必需. 其具体作用, 有待作体内实验进一步证实.

本实验室近来通过酵母双杂交技术研究发现, HBcAg与线粒体核蛋白L41、NADH脱氢酶亚基4、细胞色素C氧化酶、细胞色素B等有相互作用, 支持HBcAg通过肝细胞线粒体介导HBV的复制和装配; HBcAg还可与金属硫蛋白相互作用, 推断可能是机体自身保护反应的一种, 是否具有阻断病毒复制、清除病毒的效应还需要进一步验证, 如果上述推断成立的话, 将为抗HBV治疗方法的寻找开辟新的道路, 以上结果本室将于近期内报道. 同时我们还发现HBcAg能与其他16种蛋白基因相互作用, 其中4种为未知蛋白基因, 其具体作用, 尚在研究中.

总之, 乙肝病毒HBV和体细胞中的多种蛋白有相互作用, HBV结合蛋白的研究为HBV的生物作用和相关疾病的发病机制的研究提供了线索, 说明了一些蛋白质与人体相互作用后所能导致的结果, 部分地解释了乙肝病毒对人体的作用形式为什么如此多样变化, 所引起的病理生理改变为什么如此广泛. HBV结合蛋白尤其是HBxAg对细胞的调节作用比较重要, 研究也比较多, HBcAg在细胞调节中也起到一定的作用, 但目前对其报道较少. HBcAg及其他乙肝病毒蛋白与宿主蛋白之间的相互作用值得进一步研究.

3 参考文献

- 1 Zhuang L, You J, Tang BZ, Ding SY, Yan KH, Peng D, Zhang YM, Zhang L. Preliminary results of Thymosin- α 1 versus interferon- α treatment in patients with HBeAg negative and serum HBV DNA positive chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2001;7:407-410
- 2 He XS, Huang JF, Chen GH, Fu Q, Zhu XF, Lu MQ, Wang GD, Guan XD. Orthotopic liver transplantation for fulminant hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2000;6:398-399
- 3 Wang Y, Liu H, Zhou Q, Li X. Analysis of point mutation in site 1896 of HBV precore and its detection in the tissues and serum of HCC patients. *World J Gastroenterol* 2000;6:395-397
- 4 Qin LL, Su JJ, Li Y, Yang C, Ban KC, Yian RQ. Expression of

- IGF- II, p53, p21 and HBxAg in precancerous events of hepatocarcinogenesis induced by AFB1 and/or HBV in tree shrews. *World J Gastroenterol* 2000;6:138-139
- 5 Cheng ML, Wu YY, Huang KF, Luo TY, Ding YS, Lu YY, Liu RC, Wu J. Clinical study on the treatment of liver fibrosis due to hepatitis B by IFN- α (1) and traditional medicine preparation. *World J Gastroenterol* 1999;5:267-269
- 6 Tang RX, Gao FG, Zeng LY, Wang YW, Wang YL. Detection of HBV DNA and its existence status in liver tissues and peripheral blood lymphocytes from chronic hepatitis B patients. *World J Gastroenterol* 1999;5:359-361
- 7 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒蛋白结合蛋白的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:213-215
- 8 Scaglioni PP, Melegari M, Wands JR. Posttranscriptional regulation of hepatitis B virus replication by the precore protein. *J Virol* 1997;71:345-353
- 9 Metzger K, Bringas R. Proline-138 is essential for the assembly of hepatitis B virus core protein. *J Gen Virol* 1998;79(Pt 3):587-590
- 10 Conway JF, Cheng N, Zlotnick A, Stahl SJ, Wingfield PT, Steven AC. Localization of the N terminus of hepatitis B virus capsid protein by peptide-based difference mapping from cryoelectron microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14622-14627
- 11 Konig S, Beterams G, Nassal M. Mapping of homologous interaction sites in the hepatitis B virus core protein. *J Virol* 1998;72:4997-5005
- 12 Kratz PA, Bottcher B, Nassal M. Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:1915-1920
- 13 Borisova G, Borschukova O, Skrastina D, Dislers A, Ose V, Pumpens P, Grens E. Behavior of a short pre S1 epitope on the surface of hepatitis B core particles. *Biol Chem* 1999;380:315-324
- 14 孙殿兴, 胡学玲, 胡大荣. 乙型肝炎病毒核心蛋白作为免疫载体的结构与功能基础. *国外医学病毒学分册* 2000;7:151-155
- 15 孙殿兴, 胡大荣, 邬光惠. HBV 核心蛋白结构及其在基因治疗策略上的应用. *国外医学·流行病学传染病学分册* 2001;28:19-24
- 16 Huang CJ, Chen YH, Ting LP. Hepatitis B virus core protein interacts with the C-terminal region of actin-binding protein. *J Biomed Sci* 2000;7:160-168
- 17 Kau JH, Ting LP. Phosphorylation of the core protein of hepatitis B virus by a 46-kilodalton serine kinase. *J Virol* 1998;72:3796-3803
- 18 Daub H, Blencke S, Habenberger P, Kurtenbach A, Dennenmoser J, Wissing J, Ullrich A, Cotten M. Identification of SRPK1 and SRPK2 as the major cellular protein kinases phosphorylating hepatitis B virus core protein. *J Virol* 2002;76:8124-8137
- 19 Poisson F, Severac A, Hourieux C, Goudeau A, Roingeard P. Both pre-S1 and S domains of hepatitis B virus envelope proteins interact with the core particle. *Virology* 1997;228:115-120

羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的研究

成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩

成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩, 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 国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No.98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
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: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-16

成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11(8):1245-1247
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1245.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)的感染, 不仅引起急、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化、肝细胞癌的发生、发展过程密切相关^[1-5]. 病毒进入到肝细胞之后, 肝炎病毒蛋白在肝细胞内不是孤立存在的, 病毒基因组在肝细胞内具有两种调控方式: 其一是顺式调节, 如启动子及增强子序列, 以直接方式影响另外一些基因组的功能, 是基因组内部调节方式; 其二是反式调节, 即基因组中一部分基因片段通过其转录或翻译产物产生对另一部分基因片段表达的调节方式, 如病毒基因组表达的反式激活蛋白, 以其表达产物的间接方式参与另外一些基因的功能调节, 可以对基因组内部的基因片段, 甚至可以对另外细胞或病毒的基因组有调控作用. 这种病毒蛋白对肝细胞基因组的反式调节作用, 影响了肝细胞的基因表达谱, 是病毒感染慢性化以及引起感染的肝细胞发生恶性转化的重要的分子生物学机制之一^[6-8].

1 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白(MHBst)的反式调节
近年研究发现, 从肝癌细胞系或肝癌组织甚至是外周血中克隆出的截短型前-S2/S基因表达产物羧基末端的截短型分子 MHBst, 能够调控肝细胞某些基因表达从而影响细胞生长调节, 也具有反式激活功能. MHBst 的反式激活效应可能与蛋白激酶 C(PKC)依赖的信号传导途径有关, 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- 激酶信号传递链式反应, 结果激活了转录因子如激活蛋白-1(AP-1)、细胞核因子- κ B(NF- κ B)、激活蛋白-2(AP-2)、血清应答因子(SRF)、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^[9-15].

这种变异的病毒表面抗原中蛋白, 缺失了位于 C-末端的膜定位信号, 使 MHBst 具备内质网(ER)定位功能, 未能进入分泌途径而在 ER 滞留, 其前-S2 区指向胞质区, 从而有机会与胞质蛋白相互作用, 发挥其广泛的反式激活效应; 全长的乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白(MHBs)的前-S2 区指向 ER 腔, 进入高尔基复合体而分泌. 所以说 MHBst 的反式激活功能依赖于其 N-末端前-S2 区的胞质定位功能. 具有反式激活功能的截短位点是在一定的范围之内, 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因素, MHBst 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, 这段核苷酸序列被称为“反式活性开启区”(trans-activity-on region, TAO). 进一步研究表明, MHBst 的最小反式激活单元定位于 4-53 氨基酸残基(aa), MHBst53 是其中最小的转录激活因子, 是一种非膜结合类型的 MHBst, 就是说, 仅前-S2 区(1-55 aa)就足以介导反式效应, 说明作为反式激活因子的 MHBst 大小范围是很大的^[16-23].



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

