

- 25 Diao J, Khine AA, Sarangi F, Hsu E, Iorio C, Tibbles LA, Woodgett JR, Penninger J, Richardson CD. X protein of hepatitis B virus inhibits Fas-mediated apoptosis and is associated with up-regulation of the SAPK/JNK pathway. *J Biol Chem* 2001;276:8328-8340
- 26 Erhardt A, Hassan M, Heintges T, Haussinger D. Hepatitis C virus core protein induces cell proliferation and activates ERK, JNK, and p38 MAP kinases together with the MAP kinase phosphatase MKP-1 in a HepG2 Tet-Off cell line. *Virology* 2002;292:272-284

乙型和丙型肝炎病毒对ERK信号转导途径的影响

张健, 成军

张健, 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
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: 2003-06-24 接受日期: 2003-07-16

张健, 成军. 乙型和丙型肝炎病毒对ERK信号转导途径的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(1):158-160

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/158.asp>

0 引言

在病毒性肝炎的发病机制中, 病毒蛋白对肝细胞信号转导通路的影响是病毒感染以后形成慢性感染、肝纤维化、肝细胞癌的重要的分子生物学机制, 对于慢性肝炎的预后也有重要意义^[1-3]. 细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)亚族之一. MAPK是生物体内重要的信号转导系统之一, 参与介导生长、发育、分裂、分化、死亡以及细胞间的功能同步等多种细胞过程. 在哺乳动物细胞中已发现和克隆了ERK、JNK/SAPK、p38/RK、ERK5/BMK1四个MAPK亚族. 这些MAPK能被多种炎性刺激所激活, 并对炎症的发生、发展起重要调控作用. MAPK对细胞从整个G1期到S期起决定性作用. 具有双重特异性的MAP激酶的激酶(MEK1和MEK2)磷酸化和激活后, 可以激活ERK1和ERK2. 激活的ERK可使许多效应蛋白磷酸化, 这些效应蛋白包括细胞进展至S期所必需的蛋白表达的转录因子^[4]. MAP激酶系统很明显在细胞周期的G1期起作用, 也可能在G2/M期起作用. 已经证明细胞进入有丝分裂期后, 内源性ERK1和ERK2生化活性降低^[5-6], 也有人认为正常的MEK/ERK活性对细胞进入有丝分裂期是必需的^[7-8].

1 ERK与乙型肝炎病毒

乙型肝炎病毒(HBV)对肝细胞信号转导系统的影响,

不仅是HBV蛋白对肝细胞中信号转导的影响, 还包括肝细胞蛋白与HBV DNA调节序列的结合及调节. 但是, HBV蛋白对于肝细胞信号转导通路的影响是HBV感染以后形成慢性病毒感染、肝纤维化及肝细胞癌的重要的分子生物学机制. 乙型肝炎病毒X(HBx)蛋白是一种具有双重作用的转录激活因子, 在培养细胞中表达后, 可在细胞质刺激信号转导途径和细胞核内的转录因子中起到转录激活作用. 在细胞质内, HBx表现为刺激Ras-Raf-MAPK系统, HBx与MAPK信号转导系统的作用在HBV的各种蛋白中表现十分明显, 这可以部分解释其转录激活作用机制^[9].

Benn et al^[10]发现HBx蛋白对ERKs和c-Jun氨基端激酶(JNKs)有刺激作用. JNK被HBx活化后, c-Jun氨基端发生磷酸化, 引起AP-1 DNA结合活度的产生和活化, 包括瞬时的c-Fos蛋白的从头合成和c-Jun的持续合成. 新的c-Jun合成可被共表达的MAP激酶致活酶(MEKK-1)所阻断, 这就证明HBx通过激活JNK信号途径促进c-Jun的合成. c-fos基因与Raf-C4共表达, Raf-C4发生接触反应突变后可阻断c-fos的活性, 表明HBx通过作用于Ras-Raf途径产生c-Fos. HBx对ERK和JNK途径的活化作用导致AP-1-c-Jun二聚体复合物积累.

Nijhara et al^[11]通过研究发现, 伴随病毒核蛋白颗粒介导的HBV DNA的传递, 很大一部分肝细胞以剂量依赖性方式表达HBx蛋白, 进而导致肝细胞的ERK活性明显增强. HBx诱导的ERK活性可持续30d. 有趣的是, 发现c-Jun氨基末端激酶(JNKs)活性也可以持续30d. 这种构成的ERK和JNK激活作用作为HBx持续表达的结果也导致更下游元件刺激作用的持续, 例如c-Jun和c-Fos蛋白水平的增高伴随激活蛋白1结合活性的持续诱导.

HBx也可通过刺激细胞内的信号转导途径调节转录作用. Henkler et al^[12]研究了HBx对MAP激酶(Erk)和JNK/SAPK激活作用的效率, 证实了在静止细胞中对Erk/MAP激酶有刺激作用. 然而, 在分离的细胞中, AP-1独立的Erk激活作用和c-Jun(丝氨酸-63)的磷酸化作用可被HBx诱导, 而对Erk-2则不同. 这些证据提示HBx杂乱的激活Erk和JNK应答途径, 这种对信号系统的全面作用可能受外部丝裂原刺激素影响.

2 ERK与丙型肝炎病毒

丙型肝炎病毒(HCV)是一种正链RNA病毒, 其致病机制与DNA病毒和逆转录病毒有明显的区别. MAPK/ERK及其介导的细胞内信号转导是HCV蛋白作用的重要靶位. 通过与ERK的作用, HCV核心蛋白与MEK相互作用影响细胞的有丝分裂过程. 在有丝分裂期间MEK与ERK有活性分离现象. 有丝分裂的MEK1活性和其与ERK活性的分离作用依赖于细胞周期蛋白B-Cdc2的激活. 这种分离作用有许多机制. MEK1的氨基末端区域包含一个ERK结合区, 这个区域的突变, 由于炭疽

毒素致死因子或胱冬肽酶引起的蛋白分解缺失, 导致 MEK1 激活 ERK 的能力消失^[13-14]. 不论在何种细胞, ERK 结合区的缺失都可以完全抑制细胞质 ERK 的活性, 但是对 MEK1DN51 激活的细胞膜结构的 ERK 来说, ERK 结合区并不是必需的. 这种现象可能的机制为由于支架蛋白(例如 MP-1)可同时结合 MEK 和 ERK, 因此可从 MEK1DN51 补偿 ERK 结合区缺失的影响^[15]. 然而, 截短型的 MEK1DN51 在有丝分裂期激活膜结合 ERK 的能力消失, 说明抑制 MEK 对 ERK 激活能力的还有另外的有丝分裂特异性机制. 由于 ERK 可以上调细胞周期蛋白 B-Cdc2 抑制剂 WEE1 激酶, 因此可以延长进入有丝分裂期的时间^[16-17]. 可以推测膜相关的有丝分裂激活因子 MEK1 除了 ERK 之外还可能调节其他因子.

HCV 核心蛋白具有致癌特性, 但是其具体机制仍不很清楚. 为阐明 HCV 核心蛋白激活 MEK-ERK 途径的确切机制, Fukuda et al^[18]在一些细胞系中瞬时表达 HCV 蛋白, 并且应用 Gal4-EIk1 萤虫素酶测定法、体内 MAPK 激酶测定及斑点杂交分析研究信号转导途径. 结果发现, 当面对丝分裂素信号时, HCV 核心蛋白在 MEK 下游增强 Elk1 的激活作用, 而对 ERK 活性和 Elk1 的磷酸化作用并无影响. 这些证据表明, HCV 核心蛋白可能通过作用于典型的磷酸化作用过程中激活 Elk1. Giambartolomei et al^[19]发现在表达 HCV 核心蛋白的稳定细胞系中响应 EGF 的 Raf/MEK/Erk 途径的持续激活. HCV 基因型 1 和 3 的核心蛋白激活 MEK1 和 Erk1/2 MAP 激酶, 并且在血清缺乏条件下通过体外激酶测定内源性的 Raf1 和免疫检测过磷酸化的 Erk1 和 Erk2, 发现 HCV 核心蛋白的表达引起 Raf1 和 MAP 激酶基础活性增高. 此外, Erk1/2 和下游转录因子 Elk-1 的响应有丝分裂刺激物 EGF 的活性显著延长. HCV 核心蛋白直接激活 MAP 激酶系统的能力和延长其响应有丝分裂刺激物的活性可能促成 HCV 感染的肝细胞致癌性转化.

Yao et al^[20]发现 HCV 核心蛋白通过抑制 ERK 和 MEK 的磷酸化作用抑制补体依赖的调节途径的人 T 淋巴细胞应答. 补体蛋白参与对抗病原体的早期先天的免疫应答, 并且在清除宿主血液循环内的病毒抗原起到重要作用. 当感染 HCV 后, 个体首先在血液循环中表达的是 HCV 核心蛋白, 他可以通过与补体 C1q 受体的球状区域(gC1qR)的相互作用抑制人 T 细胞的增生. 为研究 HCV 核心蛋白/gC1qR 诱导的对 T 细胞增生的抑制作用的机制, Yao et al 检测了在 T 细胞激活早期阶段核心蛋白的作用. HCV 核心诱导的 ERK/MEK 有丝分裂素激活蛋白激酶的功能缺陷导致 IL-2 和 IL-2R α 基因转录抑制, 这种抑制作用会导致白介素 2(IL-2)产生和白介素 2 受体(IL-2R)表达的抑制. 重要的是, 抗-gC1qR 抗体处理后具有逆转 HCV 核心诱导的抑制 ERK/MEK 磷酸化作用的能力, 这就提示 HCV 核心和 gC1qR 的相互作用可以干扰 ERK/MEK 有丝分裂素激活蛋白激酶的活化. 这些结果说明 HCV 核心诱导的以补体依赖方式对 T 细

胞活化的阻碍作用对病毒感染后 HCV 的持续存在起到主要作用.

Zhu et al^[21]通过研究发现白介素-1(Interleukin-1, IL-1)在慢性丙型肝炎患者体内的产量下降, 说明 IL-1 与丙型肝炎病毒的清除有关. 应用亚基因组复制细胞系, 他们发现 IL-1 可以有效的抑制亚基因组 RNA 复制及病毒蛋白表达, 这种抑制效应与 ERK 的激活作用有关.

MAPK/ERK 与细胞的增生和组织的增生过程密切相关. 赵兰娟 et al^[22]应用人肝癌细胞系 HepG2 进行了研究. HepG2 细胞中 MAPK/ERK 蛋白在受到 HCV E2 蛋白的刺激以后发生磷酸化修饰, 而且 MAPK/ERK 的磷酸化与作用的 HCV E2 蛋白的浓度有关, 是一种剂量和时间依赖性的效应. MAPK/ERK 在 HepG2 受到 HCV E2 蛋白的刺激后被激活, 表明 HCV E2 参与了细胞内信号转导, 而且可能在 HCV 感染的致病过程中发挥重要作用.

3 参考文献

- 1 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
- 2 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
- 3 成军. 慢性丙型肝炎肝脂肪变的机制及其意义. 世界华人消化杂志 2002;10:999-1003
- 4 Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Muller R, Pouyssegur J. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem* 1996;271:20608-20616
- 5 Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Ueki K, Izumi T, Chatani Y, Kohno M, Kasuga M, Yazaki Y, Akanuma Y. Biphasic activation of two mitogen-activated protein kinases during the cell cycle in mammalian cells. *J Biol Chem* 1992;267:20293-20297
- 6 Edelmann HM, Kuhne C, Petritsch C, Ballou LM. Cell cycle regulation of p70 S6 kinase and p42/p44 mitogen-activated protein kinases in Swiss mouse 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 1996;271:963-971
- 7 Wright JH, Munar E, Jameson DR, Andreassen PR, Margolis RL, Seger R, Krebs EG. Mitogen-activated protein kinase kinase activity is required for the G(2)/M transition of the cell cycle in mammalian fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:11335-11340
- 8 Hayne C, Tzivion G, Luo Z. Raf-1/MEK/MAPK pathway is necessary for the G2/M transition induced by nocodazole. *J Biol Chem* 2000;275:31876-31882
- 9 Klein NP, Schneider RJ. Activation of Src family kinases by hepatitis B virus HBx protein and coupled signaling to Ras. *Mol Cell Biol* 1997;17:6427-6436
- 10 Benn J, Su F, Doria M, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein induces transcription factor AP-1 by activation of extracellular signal-regulated and c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinases. *J Virol* 1996;70:4978-4985
- 11 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
- 12 Henkler F, Lopes AR, Jones M, Koshy R. Erk-independent partial activation of AP-1 sites by the hepatitis B virus HBx protein. *J Gen Virol* 1998;79(Pt 11):2737-2742
- 13 Duesbery NS, Webb CP, Leppla SH, Gordon VM, Klimpel KR, Copeland TD, Ahn NG, Oskarsson MK, Fukasawa K, Paull KD, Vande Woude GF. Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science* 1998;280:734-737

- 14 McGuire TF, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D(3)-induced apoptosis of murine squamous cell carcinoma cells. Selective induction of caspase-dependent MEK cleavage and up-regulation of MEKK-1. *J Biol Chem* 2001;276:26365-26373
- 15 Schaeffer HJ, Catling AD, Eblen ST, Collier LS, Krauss A, Weber MJ. MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science* 1998; 281:1668-1671
- 16 Colanzi A, Deerinck TJ, Ellisman MH, Malhotra V. A specific activation of the mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MEK1) is required for Golgi fragmentation during mitosis. *J Cell Biol* 2000;149:331-339
- 17 Bardwell AJ, Flatau LJ, Matsukuma K, Thorner J, Bardwell L. A conserved docking site in MEKs mediates high-affinity binding to MAP kinases and cooperates with a scaffold protein to enhance signal transmission. *J Biol Chem* 2001;276: 10374-10386
- 18 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
- 19 Giambartolomei S, Covone F, Leviero 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
- 20 Yao ZQ, Nguyen DT, Hiotellis AI, Hahn YS. Hepatitis C virus core protein inhibits human T lymphocyte responses by a complement-dependent regulatory pathway. *J Immunol* 2001; 167:5264-5272
- 21 Zhu H, Liu C. Interleukin-1 inhibits hepatitis C virus subgenomic RNA replication by activation of extracellular regulated kinase pathway. *J Virol* 2003;77:5493-5498
- 22 赵兰娟, 刘厚奇, 曹洁. 丙型肝炎病毒 E2 蛋白对 HepG2 细胞 MAPK/ERK 的激活. *生物化学与生物物理学报* 2001;33:691-695

乙型和丙型肝炎病毒与转录因子 AP-1

王建军, 成军, 刘妍, 杨倩, 纪冬, 王春花

王建军, 成军, 刘妍, 杨倩, 纪冬, 王春花, 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

国家自然科学基金项目, No. C39970674, No. C03011402

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-06-24 接受日期: 2003-07-16

王建军, 成军, 刘妍, 杨倩, 纪冬, 王春花. 乙型和丙型肝炎病毒与转录因子 AP-1. *世界华人消化杂志* 2004;12(1):160-162

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/160.asp>

0 引言

在慢性病毒性肝炎的发病机制中, 病毒蛋白对肝细胞信号转导通路的影响是病毒感染以后形成慢性感染、肝纤维化、肝细胞癌的重要的分子生物学机制, 对于慢性肝炎的预后也有重要意义. 激活蛋白 1(AP-1)对于病毒性肝炎的发病机制有重要意义, 他最先被发现作为一种转录因子通过佛波酯肿瘤启动子乙酸盐(TPA)介导金属硫蛋白 II 基因的产生, 因此他的识别位点被称

为 TPA 响应元件(TRE)^[1]. 之后发现 AP-1 活性可被许多其他的刺激剂包括生长因子、细胞因子、T 细胞活化剂、神经递质和紫外线诱导产生^[2]. 病毒性肝炎的病毒蛋白通过与 AP-1 的相互作用可以部分解释病毒感染发病的分子生物学机制.

1 AP-1 参与转录调控的分子生物学机制

诱导 AP-1 活化可通过提高 AP-1 组分的丰度和激活其活性. AP-1 是 Jun 和 Fos 家族序列特异性转录激活剂. 通过使 Jun 和 Fos DNA 结合蛋白互相结合成同二聚体或异二聚体结合到一个通用的位点而发挥转录激活作用. 一些顺式元件响应一系列细胞外刺激素的刺激介导 c-fos 的产生^[3]. 一种 cAMP 响应因子响应神经递质和应用 cAMP 或 Ca 作为第二信使的多肽激素刺激分别激活蛋白激酶 A(PKA)或钙调素依赖的蛋白激酶^[4]. 一种血清响应因子(SRE)介导生长因子, 细胞因子和其他刺激丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)活化因子诱导的 c-fos 产生, 和 Sis 通过刺激激活 JAK 的蛋白激酶活性诱导增强子产生^[5]. 综合上述, 不难理解几乎任何可能的细胞外刺激物可诱导 c-Fos 的快速产生.

AP-1 组分通过他们的磷酸化作用来调节翻译后的调控形式已在 c-Jun、c-Fos 和 ATF2 中证实, 在其他 Jun 和 Fos 蛋白中也有类似的调控方式. 对于 c-Jun, 紧靠其基序的磷酸化作用位点通过 c-Jun 同型二聚体而不是通过 c-Jun/c-Fos 异二聚体抑制 DNA 结合^[6]. 另一方面, c-Jun 在反式激活区域 Ser-73 和 Ser-63 的磷酸化作用使其同型二聚体和与 c-Fos 形成的异二聚体都具有转录激活作用^[7]. 这些不能影响 DNA 结合活性的氨基酸残基被新发现的 MAPK 家族成员 Jun 或 JNKs 磷酸化^[8]. 到目前为止, JNKs 是可以有效的磷酸化 c-Jun 氨基末端的唯一的蛋白激酶, ERK1 或 ERK2 都不能磷酸化 c-Jun 氨基末端刺激位点, 相反可以磷酸化靠近 DNA 结合区羧基末端的抑制位点^[9]. 被 PKA 代替 JNK 磷酸化 c-Jun 的特异性突变体(Ser-73 磷酸化而 Ser-63 很少)有直接的反式激活功能^[10]. 磷酸化作用可以通过 CREB 结合蛋白(CBP)的募集来使 c-Jun 具有转录激活活性, CBP 由于其结合到磷光体 CREB, 另一种被 PKA 激活的 bZIP 转录因子而得名^[11]. 伴随着氨基端位点的磷酸化, c-Jun 可以结合 CBP, 并且 CBP 使其具有转录激活作用^[12]. CBP 连接 CREB 或 c-Jun 的磷酸化活性区域到基本转录激活结构.

2 AP-1 与乙型肝炎病毒

乙型肝炎病毒(HBV)感染为慢性病毒性肝炎的常见原因. Lee et al^[13]研究发现 HBV 基因增强子 1(Enh I)上有特异的 AP-1 结合位点. 病毒蛋白和一些其他的激活因子可通过与 AP-1 结合位点的作用调控 HBV 的转录与表达. 与 Jun 和 Fos 家族的相互作用也是影响 AP-1 功能的重要方式.