

- 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 MEK-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.

整合的HBV DNA可编码两种转录激活因子: HBxAg蛋白和前-S2激活剂. 前-S2激活剂的激活功能基于其细胞质内前-S2区定位. 前-S2区有PKC依赖的磷酸化作用. 前-S2区可结合蛋白激酶C(PKC) α/β 并且激发PKC依赖的c-Raf-1/MAP2激酶信号转导系统的活化, 最终导致转录因子如AP-1和NF- κ B的激活. 此外, 通过这种信号系统的激活, 前-S2激活剂引起肝细胞增生率增加. 依据致癌作用的二步方式(起始和加速), 前-S2激活剂可以通过激活PKC/c-Raf-1/MAP2激酶信号级联系统起到类似肿瘤启动子的功能. 这样一种多阶段的进程在肝细胞癌(HCC)的潜伏期内可能长期起作用^[14].

HBxAg蛋白引起的不同细胞基因的转录激活作用是HBV相关的肝细胞癌发生机制之一^[15]. HBxAg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, 他可在细胞质刺激信号转导途径和细胞核内的转录因子起到转录激活作用. 在细胞质内, HBxAg表现为刺激Ras-Raf-MAPK系统, 这个系统对转录因子AP-1的激活作用十分重要^[16]. Lee et al 研究了HBxAg与潜在的致癌物和反式激活病毒早期蛋白如Ad5 E1A、HPV-16 E6和SV40 T的相互作用. 在HBxAg存在下, 只有HPV-16 E6对Enl有明显的协同反式激活作用. 进一步应用Enl启动子的缺失, 异种启动子和突变来分析HPV-16 E6的功能, 结果显示这种协同效用由Enl上的E因子的AP-1位点介导, 通过直接激活AP-1的活性来实现, 这就证明了HBV感染的细胞伴随其他病毒感染如HPV-16能够增强HBV和其他癌基因在增强子的AP-1位点的转录激活作用. HBxAg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^[17]研究了HBxAg对MAP激酶(Erk)和JNK/SAPK激活作用的效率, 证实静止细胞中对Erk/MAP激酶有刺激作用. 然而, 在分离的血细胞中, 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HBxAg诱导, 而对Erk-2则否. 这些证据提示HBxAg杂乱地激活Erk和JNK应答途径, 这种对信号系统的全面作用可能受外部的丝分裂原刺激素影响.

HBxAg启动子被认为是可被HBxAg蛋白本身自动调节, 也可以与许多细胞调节蛋白相互作用. Choi et al^[18]应用X启动子氯霉素乙酰基转移酶质粒与转录激活因子2(ATF2)表达载体共转染HepG2细胞研究了ATF2对X启动子的作用. HBxAg在HBV E区活化AP-1介导的转录作用, 这种转录活性在ATF2存在时被抑制, 提示ATF2通过抑制AP-1介导的HBxAg基本转录位点抑制X启动子的自活化. 由于AP-1和ATF2的结合位点在HBV E区有重叠, ATF2对X启动子的抑制作用通过ATF2-Jun异二聚体与AP-1因子竞争结合位点来实现. 然而, 少部分X启动子有一个ATF2结合位点, 可以被ATF2激活. 这些证据提示X蛋白的合成被ATF2特异性的调节.

Choi et al^[19]应用氯霉素乙酰转移酶(CAT)系统发现

胰岛素以剂量依赖作用刺激HBV X启动子的转录活性. 一种阻止AP-1结合到E位点的突变可以去除胰岛素对HBV X启动子的激活作用. 另外, 在HepG2细胞中, 胰岛素通过作用于HBV的E位点和与AP-1相同的结合位点激活极少量的胸腺嘧啶核苷激酶(tk)基因启动子的活性. 应用胰岛素处理的HepG2细胞核提取物移动迁移率电泳分析(EMSA)发现, 胰岛素实际上增强核蛋白结合到HBV E位点和同样的AP-1结合位点. HBV E和AP-1的低聚核苷酸是这种结合作用的有效竞争剂. 这些结果说明胰岛素通过HBV Enl的AP-1结合位点提高HBxAg蛋白的表达. 因此推测胰岛素可能通过与其他细胞癌基因相互作用增大HBV感染细胞发展为肝癌过程中HBxAg的作用. Banerjee et al^[20]发现在HBV感染细胞中, 应用黄曲毒素B(AFB)和苯并芘(BP)处理24 h后, HepG2细胞中AP-1升高5-10倍, 同时HBsAg也增加. 提示一些致癌物质诱导的转录激活因子可能影响病毒的致癌作用, 引起细胞癌变.

3 AP-1与丙型肝炎病毒

丙型肝炎病毒(HCV)感染后, 进展为慢性病毒性肝炎和HCC的频率相对较高. 但是他的分子生物学机制还不是很清楚. 既往研究发现, 持续表达HCV核心蛋白的转基因小鼠经常发展为HCC, 提示核心蛋白在HCC形成过程中可能起到重要作用. HCV核心蛋白核包含定位信号区类似序列, 并且对细胞的新陈代谢有多种作用, 在转录调控, 细胞凋亡和恶性转换中扮演重要角色^[21].

Meng et al^[22]应用报道基因测定显示极少量的MCP-1启动子翻译起始位点上游128个核苷酸对HCV介导的活化作用是最佳的. 应用EMSA分析和抗-AP-1抗体分析发现HCV诱导在这一区域的AP-1结合活性. 转染的全长HCV-S1上调AP-1结合活性和的转录. Kato et al^[23]研究了7种HCV蛋白(核心蛋白、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A和NS5B)和4种HBV蛋白(前-C、C、聚合酶、X蛋白). 发现在这11种蛋白中, HCV核心蛋白对细胞内信号系统影响最强, 尤其是NF- κ B、AP-1、SRE相关信号途径, 其水平较这些信号途径公认的反式作用因子HBxAg蛋白要强. 此外, HCV核心蛋白通过NF- κ B和AP-1激活IL-8启动子. HCV核心蛋白与JNK和MAPKK有协同激活作用, 而JNK和MAPKK可以调节AP-1的活性, 这就提示HCV核心蛋白可能通过JNK和MAPKK共同激活AP-1^[24]. Tsutsumi et al^[25]研究发现在HCV感染相关HCC中, c-Jun氨基末端激酶, AP-1的活性及下游的效应因子活性均升高, 因此, 体内细胞因子的表达伴随AP-1的激活和核心蛋白的表达可能在持续HCV感染的肝细胞恶性转化中可能有重要作用.

许多研究提示HCV非结构蛋白5A(NS5A)与HCV感染后对于干扰素 α (IFN- α)治疗的抵抗作用有关. Polyak et al^[26]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片段. 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 对肿瘤坏死因子 α 存在下 NS5A- δ N222 的反式激活有重要意义, 并且 NF-IL-6 可以抑制这种作用. 这就提示 AP-1 在 HCV 感染后对 IFN- α 治疗的抵抗作用方面起到一定的作用.

4 参考文献

- Lee W, Haslinger A, Karin M, Tjian R. Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. *Nature* 1987; 325:368-372
- Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1991;1072:129-157
- Treisman R. The serum response element. *Trends Biochem Sci* 1992;17:423-426
- Sheng M, Thompson MA, Greenberg ME. CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science* 1991;252:1427-1430
- Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994;264:1415-1421
- Boyle WJ, Smeal T, Defize LH, Angel P, Woodgett JR, Karin M, Hunter T. Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell* 1991;64:573-584
- Deng T, Karin M. c-Fos transcriptional activity stimulated by H-Ras-activated protein kinase distinct from JNK and ERK. *Nature* 1994;371:171-175
- Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 1994;76:1025-1037
- Chou SY, Baichwal V, Ferrell JE Jr. Inhibition of c-Jun DNA binding by mitogen-activated protein kinase. *Mol Biol Cell* 1992;3:1117-1130
- Smeal T, Hibi M, Karin M. Altering the specificity of signal transduction cascades: positive regulation of c-Jun transcriptional activity by protein kinase A. *EMBO J* 1994;13:6006-6010
- Kwok RP, Lundblad JR, Chivria JC, Richards JP, Bachinger HP, Brennan RG, Roberts SG, Green MR, Goodman RH. Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 1994;370:223-236
- Arias J, Alberts AS, Brindle P, Claret FX, Smeal T, Karin M, Feramisco J, Montminy M. Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature* 1994;370:226-229
- Lee DH, Choi BH, Rho HM. The synergistic transactivation of the hepatitis B viral (HBV) pregenomic promoter by the E6 protein of human papillomavirus type 16 (HPV-16 E6) with HBV X protein was mediated through the AP1 site of E element in the enhancer I (EnI) in human liver cell. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;265:62-66
- Hildt E, Hofschneider PH. The PreS2 activators of the hepatitis B virus: activators of tumour promoter pathways. *Recent Results Cancer Res* 1998;154:315-329
- 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
- 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
- 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;79:2737-2742
- 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 BH, Park CJ, Rho HM. Insulin activates the hepatitis B virus X gene through the activating protein-1 binding site in HepG2 cells. *DNA Cell Biol* 1998;17:951-956
- Banerjee R, Caruccio L, Zhang YJ, McKercher S, Santella RM. Effects of carcinogen-induced transcription factors on the activation of hepatitis B virus expression in human hepatoblastoma HepG2 cells and its implication on hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 2000;32:367-374
- Isoyama T, Kuge S, Nomoto A. The core protein of hepatitis C virus is imported into the nucleus by transport receptor Kap123p but inhibits Kap121p-dependent nuclear import of yeast AP1-like transcription factor in yeast cells. *J Biol Chem* 2002;277:39634-39641
- Meng SH, Garzino-Demo A, Hong W, Hwee TY, Joo TY, Goh PY, Gee LS, Pheng LS. Expression of a full-length hepatitis C virus cDNA up-regulates the expression of CC chemokines MCP-1 and RANTES. *Virology* 2002;303:253-277
- 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
- Shrivastava A, Manna SK, Ray R, Aggarwal BB. Ectopic expression of hepatitis C virus core protein differentially regulates nuclear transcription factors. *J Virol* 1998;72:9722-9728
- Tsutsumi T, Suzuki T, Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Matsuura Y, Kimura S, Koike K, Miyamura T. Alteration of intrahepatic cytokine expression and AP-1 activation in transgenic mice expressing hepatitis C virus core protein. *Virology* 2002;304:415-424
- 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

乙型和丙型肝炎病毒对 MEKK1 蛋白信号转导途径的影响

纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花

纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 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

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

纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花. 乙型和丙型肝炎病毒对 MEKK1 蛋白信号转导途径的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(1):162-165
http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/162.asp