

# 世界华人消化杂志

**WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

**Shijie Huaren Xiaohua Zazhi**

2004 年 2 月 15 日 第 12 卷 第 2 期 (Volume 12 Number 2)



**2/2004**

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊,  
2003年百种中国杰出学术期刊,  
《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学  
类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊.  
世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》,  
荷兰《医学文摘库/医学文摘》,  
俄罗斯《文摘杂志》收录.

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2004 年 2 月 15 日 第 12 卷 第 2 期 (总第119期)

述 评	253 肝炎病毒蛋白对肝细胞基因组转录调节及信号转导机制的影响 成军
胃 癌	258 胃癌线粒体DNA拷贝量的变化 韩琤波, 李凡, 杨雪飞, 毛晓韵, 吴东瑛, 辛彦 262 胃癌前病变p21 <sup>ras</sup> , c-erbB-2, p53表达与中医证候的关系 胡玲, 劳绍贤 266 胃癌淋巴结转移预测的多因素分析 黄宝俊, 徐惠绵, 赵雨杰, 王天骄, 田大彤, 陈峻青
肝 癌	271 人鼠嵌合Fab抗体通用表达载体的构建和抗人肝癌相关抗原HAb18G嵌合Fab抗体的表达 邢金良, 杨向民, 张思河, 姚西英, 梁瑞安, 陈志南 276 肝癌细胞H <sub>22</sub> 与树突状细胞杂交瘤苗的实验研究 张娟, 张锦堃, 卓少宏 280 肝细胞癌hOGG1 mRNA及其蛋白的表达 周秀敏, 林菊生, 章金艳, 张莉, 周鹤俊 283 小鼠AFP-CTLA4融合蛋白真核表达载体的构建及鉴定 田耕, 易继林
病毒性肝炎	286 丙型肝炎病毒核心蛋白结合视黄醇脱氢酶11蛋白 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 钟彦伟 291 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A结合蛋白37小鼠同源基因的克隆化及结构分析 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 钟彦伟 298 新生儿HBe Ag在HBV宫内感染中的作用 邵中军, 门可, 徐剑秋, 徐德忠, 闫永平, 张景霞 302 应用抑制性消减杂交技术筛选TAHCCP2的反式调节基因 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 徐志强, 王春花 306 基因表达谱芯片筛选NS5ATP3转染细胞差异表达基因 刘妍, 杨倩, 成军, 王建军, 纪冬, 党晓燕, 王春花 311 基因表达谱芯片技术筛选NS5A-TP4蛋白反式调节基因 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 洪源, 张树林 315 HCV包膜糖蛋白E2基因的克隆、蛋白表达及纯化 杜德伟, 贾战生, 秦鸿雁, 刘秋平, 周永兴, 韩 骅 319 应用表达谱芯片技术对NS5ATP7反式调节基因的研究 张健, 刘妍, 成军, 王琳, 邵清, 梁耀东, 李强, 刘 敏 323 应用表达谱芯片技术筛选NS5ATP9反式调节基因的研究 李强, 梁耀东, 成军, 王琳, 王建军, 张健, 刘妍, 程明亮 327 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒反式调节靶基因的抑制性消减杂交和基因芯片分析结果的比较 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩, 王琳 332 多对型特异性引物巢式PCR检测湖南省乙肝病毒基因型 温志立, 谭德明
基础研究	336 人肝素酶基因正反义腺病毒表达载体的构建及鉴定 蔡永国, 房殿春, 杨仕明, 罗元辉, 杨孟华, 王东旭 339 正常与硬化肝组织基因表达差异的初步分析 刘连新, 陈志宏, 武林枫, 李宏伟, 刘芝华, 姜洪池, 王秀琴, 吴 旻 344 癌基因对大鼠肝卵圆细胞分化和转化的影响 廖 冰, 薛 玲, 何萍, 赵国强, 车丽洪 347 中药抗纤软肝颗粒抑制PDGF诱导的肝星状细胞MEK-1和c-fos表达 杨 玲, 朱清静, 笪邦红, 张赤志

	<p>351 实验性肝硬化大鼠小肠血红素氧合酶的表达 田德安, 周晓黎</p> <p>355 胃黏膜保护剂预防幽门螺杆菌培养上清液所致小鼠胃黏膜损伤 崔梅花, 胡伏莲, 董欣红</p> <p>359 结肠充气CT对检测大肠肿瘤的敏感性和特异性 王毅, 龚水根, 张伟国, 陈金华, 张连阳, 陈金萍</p> <p>363 胃溃疡大鼠胃泌素、生长抑素和GD细胞的变化 孙凤莲, 宋于刚, 覃汉荣</p> <p>367 当归多糖对大鼠乙酸性结肠炎的保护作用 刘少平, 董卫国, 余保平, 罗和生, 于皆平, 吴东方</p> <p>371 达纳康对大鼠溃疡性结肠炎细胞因子的影响 周燕红, 于皆平, 何小飞, 余细球</p>
临床研究	<p>376 恶性腹水基质金属蛋白酶活性分析 孙晓敏, 董卫国, 余保平, 罗和生, 于皆平</p> <p>379 慢性浅表性胃炎脾胃湿热证与水通道蛋白4蛋白表达的关系 周正, 劳绍贤, 黄志新, 张向菊, 黄烈平, 匡忠生</p> <p>382 肠易激综合征患者肠黏膜肥大细胞的变化 王静, 梁列新, 张志雄, 李国华, 钱伟, 侯晓华</p> <p>385 MRI评估肝硬化再生结节和退变结节 徐海波, 孔祥泉, 熊茵, 冯敢生</p>
焦点论坛	<p>390 卵巢巨大巧克力囊肿误诊为结核性腹膜炎7 a 1例 冯莉娟, 张桂英, 陈凤英, 晏仲舒</p> <p>391 乙型肝炎病毒DNA聚合酶末端蛋白研究进展 陈国凤, 成军, 张玲霞, 李莉</p> <p>393 乙型肝炎病毒DNA 多聚酶P结构域研究进展 陈国凤, 成军, 王琳, 张玲霞, 李莉</p> <p>397 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对转录因子ATF-1的调节 王春花, 成军, 郎振为, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕</p> <p>401 乙型和丙型肝炎病毒与胱冬肽酶3的关系 纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花</p> <p>403 乙型和丙型肝炎病毒对转录因子Nur77的调节 成军</p> <p>406 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对层粘连蛋白表达的调节 王建军, 成军, 刘妍, 杨倩, 纪冬, 王春花</p> <p>408 转录因子C/EBPb的生物学功能 成军</p> <p>412 活性氧簇与肝炎病毒的关系 梁耀东, 成军, 吴君, 程明亮</p> <p>414 趋化因子与病毒性肝炎的关系 陆荫英, 成军, 张玲霞</p> <p>417 病毒性肝炎发病机制中环氧合酶的作用 刘敏, 成军, 张树林</p>
文献综述	<p>420 乙型肝炎病毒DNA整合的机制及后果 成军</p> <p>428 基质金属蛋白酶及其抑制物与实验性肝纤维化 郑伟达, 王小众</p> <p>432 建议将亚临床型肝性脑病更名为轻微型肝性脑病 贾林</p> <p>434 右叶部分肝移植临床解剖进展 刘静, 高毅, 钟世镇</p> <p>439 肝素酶: 抗肿瘤转移的新靶点 陈陵, 杨仕明, 房殿春, 王东旭</p> <p>443 肠道上皮特异性基因CDX2 宋艳, 李凌</p> <p>446 细胞凋亡与肝移植免疫耐受 刘静, 汪爽, 高毅, 孙尔维</p> <p>450 自身免疫性肝炎诊断与治疗 欧强, 谭德明</p> <p>454 VEGF在肝癌中作用 邓靖宇, 何生</p>
研究快报	<p>459 胰腺癌组织中COX-2和Bcl-2蛋白的表达及其意义 刘希双, 李玉军, 田宇彬, 张翠萍, 孙显路, 魏良洲, 薛会光, 刘思良</p> <p>461 3种富集胃癌患者外周血中胃癌细胞方法的比较 陈健, 郭俊明, 金之瑾, 肖丙秀</p> <p>464 肠缺血再灌注对小肠屏障、吸收、通透和传输功能的影响 黎君友, 孙丹, 吕艺, 晋桦, 胡森, 盛志勇</p> <p>467 MUC5AC蛋白在大肠肿瘤中的表达及意义 卜晓东, 李俐, 黄培林, 樊克武, 赵建华</p> <p>469 卵巢巨大巧克力囊肿误诊为结核性腹膜炎7 a 1例 冯莉娟, 张桂英, 陈凤英, 晏仲舒</p> <p>471 肛管直肠原发性恶性黑色素瘤临床病理特点 赵尔增, 张建中, 岳茂兴</p> <p>473 细胞周期蛋白D1 RT-PCR ELISA的建立及其初步应用 陈兵, 张雪, 府伟灵, 常杭花, 刘为纹, 徐采朴, 史景泉</p> <p>476 胃肠激素与不同类型反流所致食管炎的相关性 王雯, 李兆申, 许国铭, 张志坚, 林克荣</p> <p>477 尼美舒利对结肠癌细胞ICAM-1 mRNA表达的影响 刘伟, 张超</p>

## 临床经验

- 480 腹腔镜次/全结肠切除术治疗结肠慢传输性便秘4例 张连阳, 刘宝华, 陈金萍, 文亚洲
- 481 内镜下氩离子凝固术治疗胃肠息肉 毛振彪, 黄介飞, 陆静娴, 俞智华, 倪润洲
- 483 肝硬化门脉系统食管侧支血流动力学与血浆内皮素的关系 肖际东, 李瑞珍, 周平, 朱文晖
- 485 大黄与促肝细胞生长素联合治疗重型肝炎 黄以群, 林珍辉, 纪树梅, 王喻, 王崇国
- 487 5 km长跑对新兵胆囊排空及胃肠激素的影响 李小丽, 郝悦, 杨凤江, 邹勤, 李智力, 李晓春
- 488 药物性肝病41例 苏淑慧, 王春平, 李迎新, 冯永毅
- 490 数字化成像结肠双对比造影检查345例 何发清, 官泳松, 王小林, 郭兵文, 孙龙
- 492 胃十二指肠隐匿性穿孔的诊断与治疗4例 詹世林, 吴良平, 蒲森水
- 494 胃癌及癌前病变中胃黏膜上皮细胞增生及凋亡相关基因蛋白表达 孟华, 刘丽娜, 吕申
- 497 胃十二指肠疾病与幽门螺杆菌感染的相关性分析 周惠萌, 范欣敏
- 499 原发性胆汁性肝硬化37例临床分析 董正芳, 程留芳
- 501 射频消融联合局部热化疗治疗特殊部位肝脏恶性肿瘤 田伏洲, 陈涛, 蔡忠红, 陈琪
- 503 卵巢巨大巧克力囊肿误诊为结核性腹膜炎7 a 1例 冯莉娟, 张桂英, 陈凤英, 晏仲舒

## 封面故事

- 371 达纳康对大鼠溃疡性结肠炎细胞因子的影响  
周燕红, 于皆平, 何小飞, 余细球 世界华人消化杂志 2004; 12(2): 371-375  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v12/i2/371.htm>

## 国际会议

- 13th United European Gastroenterology Week, UEGW  
October 15-20, 2005
- American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting  
October 28-November 2, 2005
- ISGCON 2005  
November 11-15, 2005  
[isgcon2005@yahoo.co.in](mailto:isgcon2005@yahoo.co.in)  
[www.isgcon2005.com](http://www.isgcon2005.com)
- Advanced Capsule Endoscopy Users Course  
November 18-19, 2005  
[www.asge.org/education](http://www.asge.org/education)
- II Latvian Gastroenterology Congress  
November 29, 2005  
[gec@stradini.lv](mailto:gec@stradini.lv)  
[www.gastroenterologs.lv](http://www.gastroenterologs.lv)
- 2005 CCFA National Research and Clinical Conference - 4th Annual Advances in the Inflammatory Bowel Diseases  
December 1-3, 2005  
[c.chase@imedex.com](mailto:c.chase@imedex.com)  
[www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm](http://www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm)
- 10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus  
February 22-25, 2006  
[isde@sapmea.asn.au](mailto:isde@sapmea.asn.au)  
[www.isde.net](http://www.isde.net)

# 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  
(半月刊)

创刊 1993-01-15  
改刊 1998-01-25  
出版 2004-02-15  
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生

编辑部主任 张海宁 中文编辑 潘伯荣 张海宁

英文编辑 张海宁 排版校对 张敏 张勇 李琪

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

出版 世界胃肠病学杂志社  
100023, 北京市2345信箱  
E-mail: [wcjd@wjgnet.com](mailto:wcjd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

电话: 010-85381901  
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, 北京市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: 010-85381901  
传真: 010-85381893

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 2003年百种中国杰出学术期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊. 世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录.

### 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.

2005年版版权归世界胃肠病学杂志社所有

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576.00元

广告经营许可证  
1401004000050

[www.wjgnet.com](http://www.wjgnet.com)

合, 阳性对照 M2 识别全长的聚合酶和含有 N 末端的降解产物, 1B4、2C8、7C3 识别聚合酶 N 末端抗原决定基, 8D5 识别隔离片区, 9F9 识别聚合酶 C-末端的抗原决定基。能够免疫沉淀聚合酶的所有聚合酶单克隆抗体均经体外引导抑制试验, 了解他们在体外抑制引导酶活性的作用。考马斯亮蓝染色蛋白胶显示在不同的单抗中聚合酶沉淀的量。M2 单抗作为免疫沉淀和体外引导的阳性对照。C7-57 为阴性对照。结果, 单抗 9F9 无引导活性抑制, 2C8 的 86% 体外引导活性被抑制。8D5 的 14% 被抑制, 等量的 1B4 和 7C3 分别有 98% 和 81% 被抑制。提示 TP 特异的单抗能抑制聚合酶的体外引导活性。在体外引导测试中, 只有对 TP 特异的单抗, 显示对聚合酶功能有抑制作用。提示, 抗体介导的对 TP 的干扰可能用于检测 HBV 复制。进一步研究出能干扰聚合酶功能的单抗, 对研究抗 HBV 复制的制剂可能有意义<sup>[17]</sup>。

#### 4 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, 1997:83-103
- 2 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床. 第 2 版, 北京: 人民卫生出版社, 2001:27-28
- 3 Li Z, Tyrrell DL. Expression of an enzymatically active polymerase of human hepatitis B virus in an coupled transcription-translation system. *Biochem Cell Biol* 1999;77:119-126
- 4 Kim Y, Hong YB, Jung G. Hepatitis B virus: DNA polymerase activity of deletion mutants. *Biochem Mol Biol Int* 1999;47:301-308
- 5 Kim Y, Jung G. Active human hepatitis B viral polymerase expressed in rabbit reticulocyte lysate system. *Virus Genes* 1999;19:123-130
- 6 Miriam T, Peter LE, Thien T, Marc LM, Ming Q, Christopher JB, Allison RJ. Animal: DNA viruses: sequence comparison of an Australian duck hepatitis B virus strain with other avian hepadnaviruses. *J Gen Virol* 2001;82:373-378
- 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 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
- 9 陆荫英, 王琳, 成军, 李克, 刘妍, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选 HBcAg 肝细胞结合蛋白基因. *世界华人消化杂志* 2003;11:426-429
- 10 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 王琳, 王刚, 李莉. 乙型肝炎病毒 X 基因异质性及对其反式激活功能的影响. *解放军医学杂志* 2002;27:125-127
- 11 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 蛋白及反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. *解放军医学杂志* 2001;26:404-406
- 12 董菁, 成军, 皇甫竞坤, 洪源, 王刚, 陈国凤, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒序列准种个体化特征的研究. *解放军医学杂志* 2002;27:119-121
- 13 董菁, 刘妍, 皇甫竞坤, 施双双, 王刚, 洪源, 陈国凤, 李莉, 陈菊梅, 成军. 乙型肝炎病毒表面抗原一级结构多态性的初步研究. *胃肠病学和肝病学杂志* 2002;11:130-135
- 14 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 乙型肝炎病毒对细胞信号转导的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11:472-474
- 15 Wang XT, Grammatikakis N, Hu JM. Role of p50/CDC37 in Hepadnavirus assembly and replication. *J Biol Chem* 2002;277:24361-24367
- 16 Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, Schinazi RF. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* 2001;33:751-757
- 17 zu Putlitz J, Lanford RE, Carlson RI, Notvall L, de la Monte SM, Wands JR. Properties of monoclonal antibodies directed against hepatitis B virus polymerase protein. *J Virol* 1999;73:4188-4196
- 18 Wang XT, Hu JM. Distinct requirement for two stages of protein-primed Initiation of reverse transcription in hepadnaviruses. *J Virol* 2002;76:5857-5865
- 19 Tang H, McLachlan A. A pregenomic RNA sequence adjacent to DR1 and complementary to epsilon influences hepatitis B virus replication efficiency. *Virology* 2002;303:199-210
- 20 Beck J, Nassal M. Reconstitution of a functional duck hepatitis B virus replication initiation complex from separate reverse transcriptase domains expressed in Escherichia coli. *J Virol* 2001;75:7410-7419
- 21 Yao E, Gong YH, Chen N, Tavis JE. The majority of duck hepatitis B virus reverse transcriptase in cells is nonencapsidated and is bound to a cytoplasmic structure. *J Virol* 2000;74:8648-8657
- 22 Cho G, Park SG, Jung G. Localization of HSP90 binding sites in the human hepatitis B virus polymerase. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:191-196
- 23 Cho G, Suh SW, Jung G. HBV polymerase interacts independently with N-terminal and C-terminal fragments of Hsp90beta. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;274:203-211
- 24 Hu JM, David T, Dana A, Wang XT. In vitro reconstitution of functional hepadnavirus reverse transcriptase with cellular chaperone proteins. *J Virol* 2002;76:269-279
- 25 Gyo Park S, Kyung Rho J, Jung G. Hsp90 makes the human HBV Pol competent for in vitro priming rather than maintaining the human HBV Pol/pregenomic RNA complex. *Arch Biochem Biophys* 2002;401:99-107
- 26 Park SG, Jung G, Human Hepatitis B virus polymerase interacts with the molecular chaperonin Hsp60. *J Virol* 2001;75:6962-6968
- 27 Park SG, Lim SO, Jung G. Binding site analysis of human HBV pol for molecular chaperonin, hsp60. *Virology* 2002;298:116-123

## 乙型肝炎病毒DNA 多聚酶P结构域研究进展

陈国凤, 成军, 王琳, 张玲霞, 李莉

陈国凤, 成军, 王琳, 张玲霞, 李莉, 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, No. C39900130, 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: 2003-07-12 接受日期: 2003-08-16

陈国凤, 成军, 王琳, 张玲霞, 李莉. 乙型肝炎病毒 DNA 多聚酶 P 结构域研究进展. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):393-397

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/393.asp>

### 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)属嗜肝 DNA 病毒属, 是一组以侵袭肝脏为主的病毒, 主要感染哺乳动物和鸟类。HBV DNA 的长度为 3.2 kb, 具有 4 个开放读码框架(ORF), 分别编码 HBV 的表面抗原蛋白, 核心/e 抗原蛋白, X 蛋白以及 HBV DNA 多聚酶(HBV DNA P)<sup>[1]</sup>。HBV DNA P 基因在 ORF 中最长, 并且与 C、S、X 基因区有重叠,



其编码的P蛋白含有N-末端蛋白(TP)、逆转录酶(RT)/DNA多聚酶、RNase H和隔离片(spacer, SP)等4个结构域,各结构域分别位于2307-2840 nt、133-1128 nt、1129-1621 nt和2841-0-132 nt<sup>[2]</sup>。目前对多聚酶及其所编码的各个结构域的研究取得了一定的进展。

### 1 多聚酶结构域的结构和功能

嗜肝病毒逆转录酶(多聚酶)含有的4个区域中,末端蛋白和隔离片对嗜肝病毒多聚酶是独特的,末端蛋白内的第96位酪氨酸残基可引导DNA合成,并使多聚酶与病毒DNA共价结合,隔离片无已知的功能,只是将末端蛋白和其他分子连接起来,逆转录酶和RNase H包含2个已知的酶活性位点,后二者与其他相关的逆转录病毒和逆转录因子的多聚酶是一致的<sup>[3-6]</sup>。Lott et al用昆虫细胞同时感染独立表达核心蛋白和多聚酶的杆状病毒,结果发现核心蛋白与多聚酶相互作用的几个特征:(1)核心蛋白与表达全长的多聚酶及多聚酶的TP、RT、RNase H每个区域共同沉淀;(2)核心蛋白的共同沉淀不依赖 $\epsilon$ 凸出环序列;(3)核心蛋白-多聚酶复合物在蔗糖梯度分析中作为完整的衣壳体移动。为分辨核心蛋白识别多聚酶的必备的结构和序列,用突变的核心蛋白,如2-4个氨基酸插入或羧基端缺失突变,观察与多聚酶的相互作用。结果提示核壳体构成是必需的,但对于同多聚酶相互作用是不够的,多聚酶的TP和RT与核心蛋白的相互作用有不同需要。为了解核心蛋白在多聚酶上的结合位点,对一组多聚酶的TP和RT结构域的N-末端和C-末端缺失突变体与核心蛋白的相互作用进行观察,至少检出多聚酶上的3个独立的核心蛋白结合位点<sup>[7]</sup>。Lin et al研究两个自然发生的HBV颗粒56和2-18,核酸序列有98.7%的同源性,但是复制效率不同。转染到HepG2细胞后,从56转染细胞的细胞内病毒核心颗粒分离出的HBV DNA明显高于2-18。用功能域基因替代法研究二者复制效率差异的结构基础。将2-18中的完整P基因和TP、SP、RT和RNase H分别用56相应区域替代形成全长嵌合基因组。细胞转染分析提示,2-18的全部P基因组用56的P基因替代使病毒复制轻度增强。惟一获得像56颗粒体的高复制效率的嵌合基因组是用56的RT替代2-18的RT的基因组。在RT区域内,2-18与56的氨基酸差异在617位(蛋氨酸对亮氨酸)、652位(丝氨酸对脯氨酸)、682位(缬氨酸对亮氨酸)。652位氨基酸上的点突变是这种复制效率差异的原因。HBV RT结构域的同源性模型研究提示652位氨基酸残基从脯氨酸到丝氨酸突变可能影响对模板-引物相互作用的HBV RT的构造,导致多聚酶活性减弱<sup>[8]</sup>。Li et al在T7噬菌体启动子的调控下构建HBV多聚酶cDNA并在兔的网状细胞裂解液中表达,组成一对转录翻译系统。在指定位点的突变中进一步证实重组多聚酶cDNA产生3种产物:全长蛋白(约94 kD),内在的始动蛋白(约81 kD),N-末端蛋白(约40 kD)。体

外表达的多聚酶具有蛋白引物的活性,由体外<sup>32</sup>P标记的-dGTP全长多聚酶和TP引导的检测可得到证实<sup>[9]</sup>。Kim et al对人HBV多聚酶的N-末端或C-末端和DNA多聚酶的结构域同时缺失形成变异株,并在大肠杆菌中表达,经直链淀粉柱层析法纯化后,其纯化蛋白的DNA依赖性DNA多聚酶活性与野毒株进行比较,结果TP与SP缺失分别可以使酶活性减少到70%,而RNase H缺失对多聚酶活性的影响要大于前二者。单个RT或将其N-末端缺失仍能保持酶活性<sup>[10]</sup>。将人的HBV多聚酶在兔网状细胞裂解系统中表达。表达蛋白显示出DNA依赖性的DNA多聚酶活性,在体外转录和翻译产生分子量大约100 kD的大蛋白。HBV DNA多聚酶pH 7.5和温度37℃时聚合反应最佳,同时,多聚酶活性需要有MnCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>(最好是MnCl<sub>2</sub>)。在75 mM NaCl或100 mM KCl存在时活性较好(以75 mM NaCl时更好)<sup>[11]</sup>。Miriam et al对澳大利亚鸭乙型肝炎病毒(AusDHBV)进行克隆和测序,并与其他嗜肝病毒进行比较。在澳大利亚DHBV及其他鸟类嗜肝病毒中包括3个与病毒复制有关的重要特征:(1)69个nt粘端重叠区,保持染色体组环状结构,包含1对12 nt顺式重叠序列DR1(2 541-2 552 nt)和DR2(2 483-2 494 nt);(2)多聚腺苷酰信号序列(2 778-2 783 nt),对终止病毒mRNA转录是必须的;(3)在多聚酶的TP内第96位酪氨酸残基,是RNA衣壳体信号序列(称为 $\epsilon$ )的结合位点,在前基因组RNA内用于负链DNA合成。20条已发表的鸟类嗜肝病毒比较发现,在第500 nt部位(编码隔离片区)替代或缺失突变最常见,前-S/S基因(1 290-1 793 nt)S段和前-C段(2 524-2 652 nt),编码逆转录酶区域,替代和缺失很罕见,是迄今为止所有DHBV病毒中最保守的<sup>[12]</sup>。

### 2 多聚酶与细胞因子

Hu et al认为HBV逆转录的过程通过独特的蛋白引导机制开始的。病毒逆转录酶首先以他的RNA模板装配成核蛋白(RNP)复合物,然后逆转录酶本身作为蛋白质引物开始DNA的合成。RNP形成和蛋白引导需要宿主细胞因子的辅助,包括分子伴侣热休克蛋白90(HSP90)。研究发现:(1)通过构建两个迷你RT(miniRT)表达片段,pcDNA-miniRT1(miniRT1)将改建后的DHBV RT多肽的N-末端(1-17 aa),C-末端(734-786 aa),隔离片(245-352 aa)切除;pcDNA-miniRT2(miniRT2)在miniRT1基础上将C-末端进一步截短(575-786 aa)。MiniRT1含564个残基(野毒株786残基),MiniRT2含394残基。MiniRT1与野毒株RT一样具有蛋白引导功能,MiniRT2具有完整的 $\epsilon$ 结合的活性,但是仅有极少的蛋白引导活性(为野毒株的1-5%)。这两个mini-RT蛋白含有与HSP90和p23相关的结合域。再者,同全长RT一样,他们需要陪护蛋白进行 $\epsilon$ 结合和蛋白引导。HSP90能识别TP和RT域上的两个特异区域,含有两个陪护蛋白结合区域的截短逆转录酶(mini-RT)蛋白保留了全部的 $\epsilon$ 结合活性,

对RNP形成和蛋白引导是必要的; (2)在体外用高浓度的盐和非离子洗涤液使逆转录酶和细胞因子(HSP90)解离, 单独表达逆转录酶, 纯化的逆转录酶失去了 $\varepsilon$ 结合和蛋白引导的功能. 但含有HSP90和ATP的网状细胞裂解液能恢复这种功能. 一种特殊的HSP90抑制剂, 在 $\varepsilon$ 结合前加入, 能降低MiniRT1的蛋白引导活性. 然而, 如果 $\varepsilon$ 已经与mini-RT结合(在翻译反应时)后再加入, 则对蛋白引导无作用. 说明药物特异性的阻滞 $\varepsilon$  RNA与mini-RT相互作用, 对DNA合成本身无作用. HSP90对RT与RNA的结合, 不仅起到建立的功能, 而且还有维护的功能; (3)在RT合成过程中不需要HSP90, 但HSP90可激活转译后的RT. 在细菌中成功表达两个mini-RT蛋白并且用亲和素标记纯化. 用真核细胞提取液重构时, 纯化的RT蛋白具有特异的 $\varepsilon$ 结合和蛋白引导活性. RT活性的重构是依赖ATP的过程和需要HSP90功能. 细菌没有功能性的真核细胞HSP90陪伴系统, 提示RT合成不需要HSP90, 只不过在转译后能激活RT<sup>[13]</sup>. 进一步研究证明HSP90的几个辅因子(cochaperone)在体外足以保持重组DHBV逆转录酶的 $\varepsilon$ 结合和蛋白引导活性, 维持重组逆转录酶活性需要HSP90、HSP70、HSP40、Hop/p60等4种蛋白, 逆转录酶被陪伴蛋白激活是一个动力学过程, 需要ATP水解和HSP90 ATP酶活性. HSP90和HSP70是ATP酶, 在ATP结合和水解时易于折叠, HSP40能刺激HSP70的ATP酶活性和调节HSP70的陪护功能. p60能与HSP90和HSP70结合, p23为小的酸性磷蛋白质, 与HSP90结合, 进一步提高重组动力学. 2个截短的迷你型DHBV RT与谷胱甘肽S-转移酶(GST)形成融合蛋白GST-miniRT1和GST-miniRT2, 在大肠杆菌中表达并纯化, 另外还构建了有两个氨基酸替换而不能与 $\varepsilon$  RNA结合的突变型MiniRT2/CA29和在RT的活性位点两个氨基酸替换(YMDD变成YMHA), 使RT失去活性的MiniRT1/YMHA. 在重构蛋白引导反应中, 显示在兔的网状细胞裂解液中, 依靠HSP90的存在, GST-miniRT1在体外有强烈的蛋白引导活性. 用已知的HSP90陪伴联合体的组成成分代替兔的网状细胞裂解液, 刺激蛋白引导, 结果, HSP90、HSP70、Hop, 和Ydj1(HSP40), 在一起能重新组成蛋白引导反应, 单独或任何2个或3个蛋白组合几乎是无效的, 偶尔HSP70加Ydj1能微弱刺激蛋白引导反应, 但比4种相加效力小得多. 同时, 这种蛋白引导反应与陪伴蛋白浓度呈正相关. 4种纯化的陪伴蛋白重新组成的蛋白引导活性较网状细胞裂解液要低, 可能是二者动力学差异所致. 适当延长作用时间, 可以使陪伴蛋白的引导活性提高. 蛋白引导与RT的催化活性有关, miniRT1/YMHA因失去了活性位点的突变RT完全没有蛋白引导的作用<sup>[14]</sup>. Wang et al 构建了在逆转录酶的C-末端截短的DHBV RT (DHBV mini-RT蛋白)具有全部的蛋白引导活性, 即第一个核苷共价结合到蛋白质(RT的脱氧核苷酸). 但没有任何DNA聚合作

用. 另一个RT区域的短小序列特点是对逆转录酶的脱氧核苷酸是无关紧要的, 但对于DNA的聚合作用却是必不可少的. 这些结果揭示了蛋白引导的2个不同阶段, 即第1个核苷与RT(RT脱氧核苷酸或蛋白引导的起点)的首次接触, 和随后的DNA合成(聚合)成完整的蛋白引物. 用两个模型观察在蛋白引导反应中2个不同阶段对不同序列片段的要求. 体外蛋白引导反应时用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 标记核苷前体. MiniRT2的蛋白引导活性与MiniRT1相近. MiniRT2能与GTAA DNA寡聚体的第1个核苷(dGMP)共价结合, 说明能进行引导反应的第1步(dGMP与RT结合, 形成RT脱氧核苷酸), 但是不能与第2、第3个核苷dAMP结合, 也不能与第2个核苷TMP结合. 而MiniRT1的降解产物与MiniRT2分子量大小相似者能与 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dGTP}$ 结合, 但与 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 或 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{TTP}$ 仅有微量结合. 相反, MiniRT1的稍长一点的降解产物(介于MiniRT1和MiniRT2之间), 则可以与完整的MiniRT1一样, 能够与上述3种核苷结合. 用哺乳动物细胞纯化的MiniRT2与上述从细菌中纯化的MiniRT2在蛋白引导和反应条件方面相似. 构建另一条C-末端截短的RT片段, 其位置选在MiniRT1(734位aa)和MiniRT2(575位aa), 以便找出在蛋白引导反应中对DNA聚合是重要的(而对开始是无关紧要的)序列. 切断位点选在PmlI酶切位点(661位aa), 仍能保证相当量的dGTP和dATP结合, 提示RT的C-末端125个氨基酸(661-786 aa)对蛋白引导反应无影响, 而557-661的81个氨基酸序列可能为蛋白引导的开始阶段向聚合阶段转变所必需. TP、RT和 $\varepsilon$ RNA之间特殊的相互作用对嗜肝病毒的pgRNA包装是非常重要的, 同时需要C-末端RNase H域. 蛋白-蛋白、蛋白-RNA之间相互作用需要RNA包装可能强调TP-RT-RNA之间相互制约<sup>[6]</sup>. Cho et al 认为HSP90及其相关产物在DHBV感染通过RNA信号 $\varepsilon$ 与DHBV多聚酶结合对DHBV复制起重要作用. 同理, 用兔网状细胞裂解液中合成人HBV多聚酶蛋白在体外与HSP90形成联合体, HSP90用MBP共纯化, 多聚酶蛋白在HepG2细胞中表达, 提示在体内人的HBV多聚酶与HSP90相关. 为了对HSP90的作用位点进行定位, HBV多聚酶翻译的几个缺失突变与抗HSP90抗体在体外共沉淀, 结果提示TP的C-末端和RT单独与HSP90发生作用<sup>[15]</sup>. Cho et al 研究显示HBV多聚酶单独与HSP90的N-末端和C-末端相互作用, HSP90的N-末端片段(1-302 aa)与HBV多聚酶的TP和RP都有相互作用, 而C-末端片段(438-723 aa)仅与RT相互作用, 其中间片段(327-438 aa)则与HBV多聚酶无相互作用<sup>[16]</sup>. Gyoo et al 证明HSP90可以被抗-HSP90抗体抑制; 在体外HSP90被含有1%NP-40的1M NaCl解吸后几乎完全失去了对在昆虫细胞内表达的HBV多聚酶的引导活性. 人HBV多聚酶与前基因组RNA结合与鸭HBV多聚酶不同, HSP90不仅维持人HBV多聚酶与前基因组RNA结合的联合体, 而

且使HBV多聚酶能胜任在体外引导作用。HSP70是HSP90联合体组成成分,但HSP70可能直接与HBV多聚酶结合不需要HSP90参与<sup>[17]</sup>。Park et al 构建了杆状病毒载体pFPoIE,编码人HBV多聚酶开放读码框架(ORF)和3'-非翻译区(NTR)含有DR2、DR1和 $\varepsilon$ 凸出环, $\varepsilon$ 凸出环对引导HBV复制起模板作用。构建的含HBV多聚酶的重组质粒经M2琼脂珠纯化,SDS-PAGE电泳及考马斯亮蓝染色后,可得一条约60 kD的蛋白质带,经N-末端氨基酸测序并经BLAST程序进行同源性分析,然后进行免疫斑点分析和体外引导试验,结果提示陪伴蛋白(chaperonin) HSP60与HBV P之间有特异性的相互作用关系。HSP60与HBV多聚酶相互作用,是使HBV多聚酶变成活性状态的重要阶段。HSP60在体外强烈影响HBV多聚酶活性:(1)通过蛋白特异性抗体封闭HSP60,可降低HBV多聚酶活性;(2)在ATP存在的情况下增加HSP60,可提高多聚酶活性;(3)ATP与HSP60共同激活HBV多聚酶。体内试验显示,通过C $\Delta$ 540(变异的HSP60)抑制细胞内的HSP60,可导致HBV多聚酶活性的降低。因此,HSP60与HBV多聚酶相互作用对激活HBV多聚酶是有明显意义的<sup>[18]</sup>。进一步在昆虫细胞中使用重组杆状病毒表达多聚酶的几个缺失突变的蛋白质,然后用M2免疫共沉淀,显示HSP60结合到HBV P需要两个在P上的最小位点:TP(aa1-199)和RH(680-842 aa)。在人的HBV宿主细胞HepG2中显示HBV P也可以与HSP60结合;HSP60通过与TP和RH位点结合激活HBV P,而P与HSP60结合不需要前基因组RNA<sup>[19]</sup>。Wang et al 发现HSP90的靶蛋白从类固醇受体和蛋白激酶到逆转录酶,这些蛋白之间从结构到功能均无相似之处。用PropSearch软件分析,发现RT与丝氨酸/苏氨酸的蛋白激酶c-Raf在氨基酸组成上高度相似。丝氨酸/苏氨酸和酪氨酸-蛋白激酶(CDK4和v-Src)是HSP90的靶蛋白,p50(CDC37)是HSP90的辅因子,p50能与这些激酶和HSP90特异结合。发现p50/CDC37能在体内及体外与RT特异性相互作用。其意义在于p50/CDC37能调节RT的体外蛋白引导活性和在感染细胞中RNA包装和DNA合成活性。证明p50/CDC37是宿主细胞进行嗜肝病毒复制时的辅因子。在细菌中表达并纯化的GST-MiniRT蛋白用结合到单抗M2珠上的纯化的p50 孵化,结果,GST-MiniRT1和GST-MiniRT2能直接与p50和p50 $\delta$ C(变异的p50)结合,提示,DHBV RT能在体外直接与p50结合,不需要HSP90或其他细胞因子参与。细胞内试验也提示,mini-RT蛋白和TP在没有HSP90的情况下直接与p50结合<sup>[3]</sup>。

### 3 多聚酶结构域与抗病毒治疗

全球有3亿以上人口成为HBV的慢性携带者,HBV感染是一个严重的公共健康问题。慢性HBV携带的最大危害是发展为肝硬化和肝癌<sup>[13, 20-25]</sup>。核苷类似物如拉米夫定等是目前效果较好的抗病毒治疗制剂,但长期抗病

毒治疗(大于6 mo)可引起病毒变异,病情反复,甚至病情急剧加重,导致死亡<sup>[26-29]</sup>。最常见的病毒变异为多聚酶结构域的(YMDD)的第204位蛋氨酸被异亮氨酸取代(M204I)(ATG $\rightarrow$ ATT)成为YIDD,或蛋氨酸被缬氨酸取代(M204V)成为YVDD<sup>[4, 26-27]</sup>,其他病毒变异还有426位亮氨酸被异亮氨酸取代(L426I)和550位蛋氨酸被异亮氨酸取代(M550I),以及L528M, M552V, M552I<sup>[28]</sup>变异, L526M、M550V、M550I<sup>[29]</sup>等。因此,掌握抗病毒治疗和停药的正确时机,克服病毒变异是提高治疗成功率的关键。

### 4 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, 1997:83-103
- 2 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2001:27-28
- 3 Wang X, Grammatikakis N, Hu J. Role of p50/CDC37 in hepadnavirus assembly and replication. *J Biol Chem* 2002; 277:24361-24367
- 4 Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, Schinazi RF. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* 2001;33:751-757
- 5 zu Putlitz J, Lanford RE, Carlson RI, Notvall L, de la Monte SM, Wands JR. Properties of monoclonal antibodies directed against hepatitis B virus polymerase protein. *J Virol* 1999;73:4188-4196
- 6 Wang X, Hu J. Distinct requirement for two stages of protein-primed initiation of reverse transcription in hepadnaviruses. *J Virol* 2002;76:5857-5865
- 7 Lott L, Beames B, Notvall L, Lanford RE. Interaction between hepatitis B virus core protein and reverse transcriptase. *J Virol* 2000;74:11479-11489
- 8 Lin X, Yuan ZH, Wu L, Ding JP, Wen YM. A single amino acid in the reverse transcriptase domain of hepatitis B virus affects virus replication efficiency. *J Virol* 2001;75:11827-11833
- 9 Li Z, Tyrrell DL. Expression of an enzymatically active polymerase of human hepatitis B virus in a coupled transcription-translation system. *Biochem Cell Biol* 1999;77:119-126
- 10 Kim Y, Hong YB, Jung G. Hepatitis B virus: DNA polymerase activity of deletion mutants. *Biochem Mol Biol Int* 1999;47:301-308
- 11 Kim Y, Jung G. Active human hepatitis B viral polymerase expressed in rabbit reticulocyte lysate system. *Virus Genes* 1999;19:123-130
- 12 Triyatni M, Ey P, Tran T, Le Mire M, Qiao M, Burrell C, Jilbert A. Sequence comparison of an Australian duck hepatitis B virus strain with other avian hepadnaviruses. *J Gen Virol* 2001; 82(Pt 2):373-378
- 13 Hu JM, Anselmo D. In Vitro reconstitution of a functional duck hepatitis B virus reverse transcriptase: posttranslational activation by HSP90. *J Virol* 2000;74:11447-11455
- 14 Hu J, David T, Dana A, Wang XT. In vitro reconstitution of functional hepadnavirus reverse transcriptase with cellular chaperone proteins. *J Virol* 2002;76:269-279
- 15 Cho G, Park SG, Jung G. Localization of HSP90 binding sites in the human hepatitis B virus polymerase. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:191-196
- 16 Cho G, Suh SW, Jung G. HBV polymerase interacts independently with N-terminal and C-terminal fragments of HSP90 $\beta$ . *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 274: 203-211
- 17 Gyoo Park S, Kyung Rho J, Jung G. HSP90 makes the human HBV Pol competent for in vitro priming rather than maintaining the human HBV Pol/pregenomic RNA complex. *Arch Biochem Biophys* 2002;401:99-107
- 18 Park SG, Jung G. Human Hepatitis B virus polymerase interacts with the molecular chaperonin Hsp60. *J Virol* 2001;75: 6962-6968



- 19 Park SG, Lim SO, Jung G. Binding site analysis of human HBV pol for molecular chaperonin, HSP60. *Virology* 2002; 298:116-123
- 19 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 乙型肝炎病毒对细胞信号转导的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:472-474
- 20 刘妍, 成军. HBV 截短的表面抗原蛋白 MHBs<sup>1</sup> 的反式激活作用. 国外医学病毒学分册 2000;27:10-13
- 21 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
- 22 陆荫英, 王琳, 成军, 李克, 刘妍, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选 HBcAg 肝细胞结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2003;11:426-429
- 23 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 王琳, 王刚, 李莉. 乙型肝炎病毒 X 基因异质性及对其反式激活功能的影响. 解放军医学杂志 2002; 27:125-127
- 24 董菁, 成军, 皇甫竞坤, 洪源, 王刚, 陈国凤, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒序列准种个体化特征的研究. 解放军医学杂志 2002;27: 119-121
- 25 董菁, 刘妍, 皇甫竞坤, 施双双, 王刚, 洪源, 陈国凤, 李莉, 陈菊梅, 成军. 乙型肝炎病毒表面抗原一级结构多态性的初步研究. 胃肠病学和肝病杂志 2002;11:130-135
- 26 Ben-Ari Z, Mor E, Tur-Kaspa R. Experience with lamivudine therapy for hepatitis B virus infection before and after liver transplantation, and review of the literature. *J Intern Med* 2003;253:544-552
- 27 Ogata N, Ichida T, Aoyagi Y, Kitajima I. Development of peptide nucleic acid mediated polymerase chain reaction clamping (PMPC)-direct sequencing method for detecting lamivudine-resistant hepatitis B virus (HBV) variants with high sensitivity and specificity. *Rinsho Byori* 2003;51:313-319
- 28 Wang JH, Lu SN, Lee CM, Lee JF, Chou YP. Fatal hepatic failure after emergence of the hepatitis B virus mutant during lamivudine therapy in a patient with liver cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:366-369
- 29 Ben-Ari Z, Daudi N, Klein A, Sulkes J, Papo O, Mor E, Samra Z, Gadba R, Shouval D, Tur-Kaspa R. Genotypic and phenotypic resistance: longitudinal and sequential analysis of hepatitis B virus polymerase mutations in patients with lamivudine resistance after liver transplantation. *Am J Gastroenterol* 2003; 98:151-159

## 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对转录因子 ATF - 1 的调节

王春花, 成军, 郎振为, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕

王春花, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 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

郎振为, 首都医科大学佑安医院病理科 北京市 100054  
国家自然科学基金项目, 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: 2003-07-12 接受日期: 2003-08-16

王春花, 成军, 郎振为, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕. 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对转录因子 ATF - 1 的调节. 世界华人消化杂志 2004;12(2):397-400

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/397.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)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(HCC)的发生密切相关. 虽然HBV和HCV感染与HCC之间的关系已经得到确定, 但是具体的分子生物学机制还不十分清楚. 由于肝炎病毒可以影响肝细胞信号转导, 引起细胞的病变及恶性转化<sup>[1]</sup>, 而激活转录因子 - 1 (activating transcription factor - 1, ATF - 1)是重要的细胞信号转导途径中的转录因子, 因此深入研究二者的相互关系对肝炎病毒的发病机制研究有进一步的帮助.

## 1 激活转录因子 - 1 的结构和功能特点

激活转录因子 - 1 是一种具有碱性 - 亮氨酸拉链结构 (basic leucine zipper, bZIP) 的 cAMP 应答元件结合的蛋白质 (cAMP - responsive element binding protein, CREB) 家族中的转录因子, 具有广泛的转录调节作用.

1.1 CREB 家族 碱性 - 亮氨酸拉链家族结构的特点是蛋白质分子的肽链上每隔 6 个氨基酸就有一个亮氨酸残基, 结果就导致这些亮氨酸残基都在  $\alpha$  螺旋的同一个方向出现. 两个相同结构的两排亮氨酸残基就能以疏水键结合成二聚体, 该二聚体的另一端的肽段富含碱性氨基酸残基, 借其正电荷与 DNA 双螺旋链上带负电荷的磷酸基团结合. 若不形成二聚体则对 DNA 的亲合力明显降低. 亮氨酸拉链是最简单的二聚作用界面之一. 它能够介导有高度选择性的, 非常重要的蛋白质结合作用. 他最早是作为 C/EBP 和 GCN4 蛋白中序列以及许多转录因子相互作用的界面而被鉴定和认识的. 这些蛋白质可以识别两类 DNA 元件: AP - 1/TRE 和 ATF/CRE 序列. AP - 1/TRE 元件有保守的 TGACTCA, 他是一个拟二元对称. 与这个位点结合的蛋白质包括 Fos 和 Jun 家族, 他们可以被促进有丝分裂的、诱导分化的和神经原专一的刺激所诱导. 但是, 来自与 CREB 家族的转录因子虽然也有亮氨酸拉链, 他们却不与 DNA 中的 AP - 1 结合位点相互作用, 而去与 DNA 序列中的 ATF/CRE 元件结合, 其含有 TGACGTCA 保守序列, 他是一个二元对称. 与这个位点结合的蛋白质基因的表达与 cAMP、钙和病毒所诱导的反应有关

通过利用 cAMP 应答元件 (CRE) 寡核苷酸探针筛选细菌  $\lambda$  gt11 表达文库<sup>[2]</sup>和参照纯化的 CREB 蛋白的氨基酸序列而设计的寡核苷酸引物进行的多聚酶链反应 (PCR) 扩增<sup>[3]</sup>得到了 CREB 的 cDNAs. 随后陆续鉴定出 CREB 家族的另两个成员: ATF - 1 和 cAMP 反应元件调节器 (cAMP response element modulator, CREM)<sup>[4]</sup>. CREB 家族的这 3 个成员 (CREB、CREM、ATF - 1) 都包含一致的蛋白激酶 A (PKA) 磷酸化位点在体内都可被 cAMP 调节. 经由羧基端的碱性 - 亮氨酸拉链基序<sup>[5]</sup>, 这也是另外几个核内因子 ATF - 2、jun、fos、myc<sup>[6]</sup> 的保守序列, CREB, ATF - 1、CREM 以二聚体形式结合到 DNA 上. 尽管亮氨酸拉链的二聚化作用结构域被认为能



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](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

