

## 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对胱冬肽酶基因表达的调节作用

王春花, 成军, 郎振为, 张黎颖, 王建军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕

王春花, 成军, 张黎颖, 王建军, 杨倩, 纪冬, 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, 10039, 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: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

王春花, 成军, 郎振为, 张黎颖, 王建军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕. 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对胱冬肽酶基因表达的调节作用. 世界华人消化杂志 2004;12(4): 928-932

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/928.asp>

### 0 引言

细胞凋亡(apoptosis) 又称细胞程序化死亡(programmed cell death, PCD), 是细胞死亡形式之一, 他以细胞DNA发生特异性的降解, 形态上表现为核固缩、胞膜发泡和凋亡小体形成成为特征. PCD由天门冬氨酸(Asp)特异性半胱氨酸(Cys)蛋白酶(Caspate-specific cysteinyl proteinase), 即胱冬肽酶(Caspase或Casp)家族介导. 活化的胱冬肽酶触发酶级联效应, 引起染色体DNA的降解及细胞解体<sup>[1]</sup>. 胱冬肽酶家族是PCD过程的关键元件, 他的激活与超常表达均引起细胞凋亡, 因此又称死亡蛋白酶, 他们通过与众多蛋白质因子的相互作用调控PCD. 近来大量的研究表明, 胱冬肽酶家族触发的细胞凋亡在肝细胞损伤过程中发挥重要作用, 例如有研究间接认为暴发性肝炎的发生与细胞凋亡有关<sup>[2]</sup>, 并且慢性乙型肝炎与慢性丙型肝炎患者肝活检标本中, 肝细胞凋亡率明显高于正常人, 前者在平均6%左右, 后者在1%以下, 两组在统计学上有显著差异. 慢性病毒性肝炎病理改变中常见嗜酸性小体, 局灶性死亡, 现在认为均是细胞凋亡的典型表现, 而且, 经干扰素 $\alpha$  (IFN $\alpha$ )治疗后, 肝脏的凋亡情况明显改善, 肝功能发生好转<sup>[3]</sup>. 这些都提示细胞凋亡与慢性病毒性肝炎有关. 许多研究越来越显示肝炎病毒蛋白通过对胱冬肽酶家族基因表达的调节而参与了肝细胞的凋亡过程.

### 1 胱冬肽酶蛋白酶家族

1.1 胱冬肽酶蛋白酶家族的结构以及生物学特性 胱冬肽酶蛋白酶家族也称为ICE/CED-3家族<sup>[4]</sup>, 是一组与细胞因子成熟和细胞凋亡有关的蛋白酶, 是美丽隐杆线虫(caenorhabditis elegans)死亡基因CED-3的同源物. 胱冬肽酶蛋白酶家族是新一族细胞凋亡蛋白酶, 在细

胞凋亡过程中起“刽子手”的作用. 该家族的主要特征: 活性是由活性中心的半胱氨酸上的巯基发挥的, 所以属于半胱氨酸酶类. 这个家族的蛋白酶具有特异性地在特定的氨基酸序列中将肽链从天门冬氨酸之后切断的活性; 与线虫主要死亡基因Ced-3编码的蛋白CED-3的氨基酸序列有29%的同源性. 在含有半胱氨酸活性位点的氨基酸残基是保守的, 都为QACRG5肽.

未活化的胱冬肽酶家族蛋白酶是以酶原形式存在的, 酶原的氨基端有一段被称为“原结构域”(pro-domain)的序列. 酶原活化时不但要将原结构域切除, 并且要将剩余部分剪切成一大一小两个亚基, 分别称为p20和p10, 活性酶就是由这两种亚基以(p20/p10)<sub>2</sub>的形式组成的. 这种活化反应也是Asp特异的, 剪切发生在酶原中保守序列的Asp与其后的氨基酸残基之间, 一般是先切下羧基端的小亚基, 然后再从大亚基的氨基端切去原结构域. 这种剪切可以是酶原及中间活性酶自我催化, 也可以是其他白介素-1 $\beta$ 转换酶(ICE)家族蛋白酶的作用, 还有其他酶类如颗粒酶B参与.

已命名的胱冬肽酶家族成员均已克隆成功, 他们不但在氨基酸序列上具有同源性, 而且在空间结构上也很相似. 目前已经获得了胱冬肽酶-1(ICE)和胱冬肽酶-3(CPP32)的X线结晶图像, 结果显示他们具有相似的空间结构, 在p20的C-端和p10的N-端有200多个氨基酸残基的序列尤为保守, 在空间结构上组成相似的 $\beta$ 折叠中心和相邻的 $\alpha$ 螺旋, 保守的、对蛋白酶活性有特殊意义的氨基酸残基均位于这一段, 并形成特定的结构. 不同源的序列主要存在于p20的N-端和p20与p10交界处, 这两个部位的氨基酸残基在蛋白酶活化过程中一般被全部或部分切除.

所有的成员都保守性地包含有与底物P1Asp作用的氨基酸残基, 如在ICE中, 他们是催化中心的Cys285, 与酶/抑制剂复合物的巯基半缩醛以氢键结合的His237, 以及可以稳定反应中间物氧阴离子的Gly238. 另外, Arg179、Arg341、Gln383和Ser347形成容纳P1Asp的“口袋”, Ser339靠近Cys285的巯基, 以氢键结合P1位的酰胺. 与P2-P4作用的氨基酸残基则变异比较大, 这可能是各个成员识别不同底物的特异性之所在. 在活性Cys周围的氨基酸序列也很保守, 一般都有Gln-Ala-Cys-Arg-Gly(QACRG)五肽序列, 在胱冬肽酶-8、胱冬肽酶-10中为QACQG, 在胱冬肽酶-9中是QACGG, 这三个成员都有一个氨基酸残基的变异, 但这种变异不影响蛋白酶的剪切活性和特异性.

1.2 胱冬肽酶蛋白酶家族成员及其生物学效应 经过近几年的工作, 目前已经从人和动物细胞中克隆到10几种这样的蛋白酶. 1996年Alnemrie et al<sup>[4]</sup>提出将人源性的ICE/CED-3蛋白酶统一命名为“天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶”, 即胱冬肽酶, 将已经克隆出来的ICE蛋白酶依次命名为胱冬肽酶-1至胱冬肽酶-14, 其中

胱冬肽酶 11、12 鼠类同系物尚未在人类细胞中发现。胱冬肽酶 p 按功能为启动子胱冬肽酶(胱冬肽酶 -2、8、9、10)和效应子胱冬肽酶 -3、6、7)。效应子被启动子激活, 执行最终的亡效应。而启动子胱冬肽酶则被特定的结合蛋白、其胱冬肽酶及本身激活<sup>[5]</sup>。这些结合蛋白质将凋亡信号和胱冬肽酶联系起来, 决定两种基本凋亡途径, 即线粒体途径和死亡受体途径。按照结构同源性的不同, 可以将胱冬肽酶蛋白酶分为 3 个组, 即胱冬肽酶 -1、4、5、11, 胱冬肽酶 -3、6、7、8、10 以及胱冬肽酶 -2、9, 分别以胱冬肽酶 -1、胱冬肽酶 -2 和胱冬肽酶 -3 为代表。其中胱冬肽酶 -1 即 ICE, ICE 基因定位于染色体 11q13-23, 编码的 ICE 前体(pro-ICE)全长 404 aa, 约 45 kD, 蛋白酶活性中心是位于 283-287 aa 位置的 Gln-Ala-Cys-Arg-Gly (QACRG)五肽序列, 其中 Cys285 是发挥酶切活性的关键残基。ICE 最初是从人单核细胞 THP-1 中分离得到的, 可以将 34 kD 的 IL-1 前体(pro-IL-1)剪切为 17 kD 的成熟 IL-1, 这种剪切对于 IL-1 活性的发挥是必须的。不表达 ICE 的细胞系转化白介素 -1(IL-1)基因后可以产生前-IL-1, 但不能分泌有活性的成熟 IL-1; ICE 特异性抑制剂可以阻断金黄色葡萄球菌刺激引起的 IL-1 的分泌。在小鼠成纤维细胞中过度表达引起细胞凋亡, 而牛痘病毒基因 CrmA (cytokine response modified antigen)<sup>[6]</sup>和哺乳动物的原癌基因 Bcl-2 可特异地抑制 ICE 介导的细胞凋亡。胱冬肽酶 -1 以前体形式存在于胞质, 他的激活依赖胱冬肽酶 -11。胱冬肽酶 -11 过度表达同样诱导感染细胞凋亡, 其凋亡诱导作用也被 CrmA 和 Bcl-2 对抗。胱冬肽酶 -11 似乎特异地激活胱冬肽酶 -1, 实验表明, 缺乏胱冬肽酶 -11 时, 胱冬肽酶 -1 的作用消失<sup>[7]</sup>。

胱冬肽酶 -3 又分别命名为 CPP32(cysteine protease protein, 32kD)、prICE、凋亡素 (apopain)和 Yama(印度传说中的死亡之神), 现在一般认为胱冬肽酶 -3 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶, 也是细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)细胞杀伤机制的重要组成部分。前-胱冬肽酶 -3 含有 277 aa, 分子量约 32 kD, 与 ICE 有 30% 同源性, 与 CED-3 有 35% 同源, 是胱冬肽酶家族中与 CED-3 同源性最高的, 不论从结构同源性还是从底物特异性来看都与 CED-3 很相似, 所以有人认为他是 CED-3 在哺乳动物中的同源蛋白。胱冬肽酶 -3 的原结构域明显短于 ICE 只有 28 aa, 但蛋白酶活性中心和与结合底物有关的保守的氨基酸均与 ICE 一致。胱冬肽酶 -3 在细胞凋亡中起着不可替代的作用, 胱冬肽酶 -3 基因转染昆虫 Sf9 细胞后引起细胞凋亡, 这个过程可以被 Bcl-2 阻断; 在发生凋亡的细胞提取液中去掉胱冬肽酶 -3 后, 这些提取液就失去了诱导细胞凋亡的能力; 再加入纯化的胱冬肽酶 -3 后他就又恢复了致凋亡的功能。胱冬肽酶 -3 可以被多种因素活化, 在 CTL 细胞的杀伤作用中, 他既可被 Fas/FasL 途径活化, 也可以通

过颗粒酶 B 途径活化。胱冬肽酶 -3 最主要的底物是多聚(ADP-核糖)聚合酶 (poly (ADP-ribose) polymerase, PARP), 该酶与 DNA 修复、基因完整性监护有关。

胱冬肽酶 -8 曾分别命名为 FLICE(FADD-like ICE)、MACH(MORT1-associated CED-3 homolog)和 Mch5 (mammalian ced homolog 5)。胱冬肽酶 -8 前体共有 479 aa, 分子量为 55 kD, 其显著的特点是在 N-端有 2 个 70 aa 左右的结构域, 与 FADD 的 N-端的死亡效应结构域 (death effector domain, DED)同源, 这种同源的结构域可以发生相互聚合, 提供了胱冬肽酶 -8 与 FADD 相互结合的一个部位<sup>[8]</sup>。正由于胱冬肽酶 -8 具有 FADD 样 DED 结构域, 并且能够通过 DED 结构域与 FADD 结合, 所以胱冬肽酶 -8 可以在凋亡过程中与细胞膜受体发生联系, 从而将细胞膜事件转化为细胞质事件。他们认为, 在非活化情况下胱冬肽酶 -8 的两个 FADD 样 DED 结构是互相结合在一起的。当细胞膜表面的 Fas 与其配体 FasL 或相应的单抗结合后, 受体发生多聚化, 引起 FADD 与受体胞质区死亡结构域互相结合。这种结合使 FADD 的 DED 结构域发生变构, 变构后的 DED 可以与胞质中胱冬肽酶 -8 的一个 DED 结构域结合, 使胱冬肽酶 -8 的两个 DED 结构域分开, 同时使胱冬肽酶 -8 的 ICE 同源区释放出来, 恢复蛋白酶活性, 通过自我催化生成活性形式的胱冬肽酶 -8 蛋白酶, 后者再作用于胞质中其他 ICE 家族蛋白酶, 使他们发生逐级活化。

1.3 胱冬肽酶家族蛋白酶在细胞凋亡中的活化顺序 胱冬肽酶蛋白酶在死亡受体介导的细胞凋亡中起着中心的作用<sup>[9]</sup>。Fas 与配体结合而活化后, 首先引起 YVAD 和 zVAD 敏感的 ICE 家族蛋白酶活化, 然后再活化 DEVD 敏感的蛋白酶。其中胱冬肽酶 -8 是这一凋亡过程中首先被活化的 ICE 家族蛋白酶。胱冬肽酶 -8 活化后, 一方面他可以剪切活化胱冬肽酶 -3、胱冬肽酶 -7、胱冬肽酶 -4、胱冬肽酶 -9 和胱冬肽酶 -10, 通过这些蛋白酶剪切底物使凋亡得以进行; 另一方面, 他的活性可以被 CrmA 所抑制, 籍此可作为细胞凋亡负调控因素作用的环节。胱冬肽酶 -8 的活化可以是 Fas 与其配体结合引起的 FADD 蛋白与胱冬肽酶 -8 结合的结果, 也可能是颗粒酶 B、ICE 等作用的结果。所以其他能够引起细胞凋亡的因素也可以通过激活颗粒酶 B 或 ICE 来激活凋亡信号转导途径。胱冬肽酶 -8 活化后引起胱冬肽酶 -3 和胱冬肽酶 -7 活化, 这两种酶都可以剪切 PARP, 引起 DNA 的降解。另外胱冬肽酶 -3 还可以活化胱冬肽酶 -6, 后者可以降解层蛋白 B。此外, U1 核糖体蛋白的 70 kD 亚基(U1-70 K)、DNA 依赖的蛋白 (DNA-PK)的催化亚基、微丝相关蛋白 Gas-2、 $\beta$ -肌动蛋白、蛋白激酶 Cd(PKCD)、视网膜母细胞瘤蛋白、DNA 拓扑异构酶 I 和 II 等也都可能作为胱冬肽酶 -3 和胱冬肽酶 -6 的作用底物。在哺乳动物细胞的凋亡过程中胱冬肽酶 -3、6、7 是与 CED-3 最相似的蛋白酶, 他

们完成了大部分剪切底物的作用,发挥了CED-3在美丽线虫中发挥的作用<sup>[10]</sup>。

目前认为,能够将细胞膜事件与细胞质事件联系起来的蛋白质除了FADD/胱冬肽酶-8通路外还有其他形式,新发现的胞质蛋白CRADD可以将RIP与胱冬肽酶-2联系起来。另外,胱冬肽酶-10和胱冬肽酶-9都被证明可以在凋亡信号传导过程中先于其他蛋白酶活化,并通过其酶活性将信号传给其他胱冬肽酶蛋白酶。其他ICE家族蛋白酶虽然也在不同程度上参与凋亡过程,但具体细节还不十分清楚,他们可能是在不同细胞和组织起作用,也有可能是作为后备机制辅助上述途径的进行。

## 2 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对胱冬肽酶基因表达的调节

### 2.1 丙型肝炎病毒蛋白对胱冬肽酶基因表达的调节

丙型肝炎病毒(HCV)隶属于黄病毒科,是非甲非乙型肝炎的主要病原体。大约50%的感染患者转为慢性,最常见为慢性活动型肝炎,最终可以发展为肝硬化和肝细胞癌。在肝细胞受到损伤时,有些被称为死亡因子的细胞因子被激活,如Fas L/Fas抗体,肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF $\alpha$ )、转化生长因子 $\beta$ 1(TGF $\beta$ 1)、干扰素 $\gamma$ (IFN $\gamma$ )等,通过与靶细胞上的受体结合,引起凋亡的发生。已有研究报道暴发性肝炎<sup>[2]</sup>和慢性病毒性肝炎<sup>[3]</sup>的发生均与细胞凋亡有关。无论是受体介导的传导,还是通过颗粒-排粒途径,细胞凋亡时,在引起DNA降解之前几乎都存在一个共同的通路,即靶细胞内的胱冬肽酶的激活,尤其是胱冬肽酶-3的激活最为重要<sup>[11]</sup>。为了阐明作为凋亡关键执行者的胱冬肽酶蛋白酶家族是否参与了HCV感染的发病机制以及胱冬肽酶的活性如何作用导致肝损伤,Bantel et al<sup>[12]</sup>运用免疫组织化学和Western blot检测了胱冬肽酶-3,胱冬肽酶-7和PARP三者截短型的活性形式,而非胱冬肽酶和PARP的非活化前体形式。作者发现对比正常对照,HCV患者的肝小叶中胱冬肽酶的活性是明显升高的。有趣的是这些免疫反应细胞还没有表现出明显的凋亡形态。胱冬肽酶的活性程度和疾病的分级显著相关,例如炎症坏死度。相反,与其他的一些常用的代表指标没有相关性,例如血清转氨酶和病毒载量。在炎症分度为0活检标本中只有7.7%的肝细胞检测出胱冬肽酶-3的活化,而炎症分度为3活检标本中有20.9%的细胞染色阳性。这些资料表明胱冬肽酶蛋白酶家族的活化参与了HCV相关的肝损伤。而且,对于胱冬肽酶的活性检测可作为早期肝损害的一种可靠的指示标签,这可能会开辟针对HCV感染的新的诊断和治疗策略。

持续性的HCV感染经常进展为慢性肝炎,肝硬化和肝细胞肿瘤。现在普遍认为,抗肿瘤药的抗癌机制之一为抗肿瘤药诱导肿瘤细胞发生凋亡。也有文献报道抗肿瘤药也可诱导正常肝细胞凋亡,如Tsuki-date et al<sup>[13]</sup>发现,经秋水仙碱与长春新碱处理后的体外培养的肝

细胞,出现细胞凋亡所具有的典型的生化学特征,即梯状DNA电泳图谱。联系到许多抗肿瘤药的肝毒性,不难推测肿瘤的发生与细胞凋亡的抑制有关。HCV抑制细胞凋亡的机制已报道有多种。

HCV可通过自身的病毒蛋白抑制Fas介导的凋亡而造成持续感染。Machida et al<sup>[14]</sup>利用能表达核心蛋白、E1、E2和NS2蛋白的HCV转基因鼠来研究HCV蛋白对Fas信号的作用影响。HCV转基因鼠的转基因表达可导致对致死量的Fas抗体的耐受。在表达HCV蛋白的小鼠肝脏中凋亡细胞明显减少。病理组织学和DNA片断分析揭示了HCV蛋白抑制Fas介导的细胞凋亡。通过检测胱冬肽酶活性,发现HCV蛋白能抑制胱冬肽酶-9和-3/7而非胱冬肽酶-8的活性。在表达HCV蛋白的小鼠中细胞色素C从线粒体的释放受到抑制。这些资料表明HCV蛋白可通过压制细胞色素C从线粒体的释放因而抑制胱冬肽酶-9和-3/7的活性,而直接或间接抑制Fas介导的凋亡和死亡。

借助增强肝细胞自身的凋亡抑制剂的活性而逃避凋亡,造成持续感染。Otsuka et al<sup>[15]</sup>采用瞬时转染了HCV核心蛋白的HepG2细胞系来研究核心蛋白对于细胞凋亡的作用机制。首先发现核心蛋白能抑制位于胱冬肽酶-8下游和胱冬肽酶-3上游的凋亡级联反应。其次在表达核心蛋白的细胞中,bcl-xl的mRNA水平是增高的,并进一步发现是由于核心蛋白通过细胞外调节激酶途径增强了bcl-xl启动子的活性。作者认为核心蛋白通过增强bcl-xl的表达从而抑制胱冬肽酶-3活性,可以在线粒体水平上抑制细胞凋亡。

在HCV感染期间,核心蛋白可通过促进免疫细胞的凋亡,减弱免疫细胞的免疫清除杀伤功能有利于HCV的持续感染。Hahn et al<sup>[16]</sup>将核心蛋白瞬时稳定转染到人类T淋巴细胞系Jurkat中,研究发现对比转染空载体DNA的对照细胞,表达核心蛋白的Jurkat细胞对Fas介导的凋亡敏感性增加。并证实核心蛋白结合到胞质中的Fas结构域可以增强Fas介导的凋亡下游信号。核心蛋白的表达不改变细胞表面Fas的表达,这表明表达核心蛋白的细胞对Fas配体敏感性增加并不是由于Fas的表达上调。而且,作者还观察到表达核心蛋白的细胞中胱冬肽酶-3的活性增强。

HCV可保护肝细胞逃避机体细胞因子介导的凋亡。Ghosh et al<sup>[17]</sup>研究发现表达NS5A的HepG2细胞表现出对TNF $\alpha$ 介导的凋亡过程的抑制作用。NS5A蛋白可阻断胱冬肽酶-3的激活,抑制对凋亡作用底物PARP的蛋白水解作用。作者认为NS5A蛋白可保护细胞免于TNF $\alpha$ 介导的凋亡。HCV肝炎病毒蛋白之间可借助胱冬肽酶家族蛋白酶相互作用,传达调控信号完成发病机制的一系列级联反应。Goh et al<sup>[18]</sup>利用酵母双杂交系统筛选发现HCV核心蛋白和NS5A间存在着一种新的相互作用,并在体外通过结合试验和免疫共沉淀加以证实。有趣的是,当核心蛋白和NS5A共表达于哺乳动物细胞中时,

NS5A被剪切成特定大小的片段. 核心蛋白的过度表达产生了许多濒临死亡的圆形细胞, 可见到诸如DNA阶梯和截短型PARP1(poly ADP-ribose polymerase 1), 而此二者都是凋亡的指示信号. 进一步发现NS5A的蛋白水解和这些凋亡事件能被胱冬肽酶抑制剂Z-VAD所抑制, 这暗示着核心蛋白诱导凋亡, NS5A能被胱冬肽酶剪切. 作者认为在HCV感染细胞中, 核心蛋白可能提供了内部的凋亡信号, 产生截短型的NS5A. 核心蛋白-NS5A这种相互作用以及NS5A剪切体下游的生物学功能, Satoh et al<sup>[19]</sup>进行了更深入的研究, 发现这种截短型的NS5A与核定位有关, 并参与了宿主细胞的转录调节.

**2.2 乙型肝炎病毒蛋白对胱冬肽酶基因表达的调节** 乙型肝炎病毒的慢性感染是引发人肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的主要危险因素. HCC的发生似乎与凋亡密切相关, 凋亡过程的中断可能导致HCC的发生. 已有相关多种报道HBV可通过干预肝细胞的凋亡机制, 造成肝炎病毒的持续性感染而诱发HCC. 例如, TNF相关性凋亡的配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)在多种癌症中能继续诱导凋亡. TRAIL也是一种临床癌症治疗药物. Yano et al<sup>[20]</sup>研究发现在HBV相关性HCC中, 肿瘤组织中胱冬肽酶-3的活性和TRAIL-R1、-R2的表达明显低于邻近的非肿瘤组织. HBV相关性HCC揭示了能显著性抑制胱冬肽酶-3的活性, 抑制凋亡. TRAIL-R1、-R2表现出与胱冬肽酶-3的活性协调一致的相关性, 均与HCC的凋亡机制紧密相连. 生存素(survivin)作为一种抗凋亡蛋白在绝大多数人类肿瘤中是过度表达的. Marusawa et al<sup>[21]</sup>发现其能与细胞内HBxAg结合蛋白(hepatitis B X-interacting protein, HBXIP)形成复合物, HBXIP最初被发现是因为其能与HBX蛋白相互作用. 生存素-HBXIP复合物, 而非单独的生存素或HBXIP, 能结合到前-胱冬肽酶-9阻止其募集到APAF1上, 从而选择性抑制线粒体/细胞色素C介导的凋亡过程. 病毒的HBxAg蛋白也能与生存素-HBXIP复合物结合, 通过生存素依赖途径从而抑制胱冬肽酶的活化. 这样HBXIP作为生存素的协同因子, 在细胞凋亡机制和病毒病原体所致的肝细胞致癌作用间充当了桥梁连接作用. Yeh et al<sup>[22]</sup>筛选鉴定出台湾肝癌患者中普遍存在着新型突变体HBx-A31, 并且发现在HepG2细胞中这种突变体增强TNF $\alpha$ 诱导升高的CPP32/胱冬肽酶-3活性的作用是减弱的. 作者认为这种突变体是病毒逃避免疫监督的一种策略, 并有助于多步肝细胞致癌过程.

除了通过抑制凋亡致病外, 调控肝细胞对凋亡机制超敏也是HBV造成肝细胞损伤的发病机制之一. Kim et al<sup>[23]</sup>发现HBX蛋白表达能针对TNF $\alpha$ 和抗-Fas的治疗产生胱冬肽酶-8和胱冬肽酶-3的过度激活, 这种激活导致对凋亡机制敏感. 作者报道HBX与c-FLIP (cellular FLICE inhibitory protein)共定位于胞质并能直接

相互作用, 而c-FLIP是死亡诱导信号复合物(death-inducing signaling complex, DISC)的一个关键调节因子. c-FLIP的过度表达能保护细胞免于HBX介导的凋亡. 并且, c-FLIP以及胱冬肽酶-8抑制剂也能保护细胞免于HBX介导的凋亡. 这些资料表明HBX能废止c-FLIP的凋亡抑制功能, 从而导致细胞即使在阈值浓度以下也对TNF $\alpha$ 凋亡信号产生超敏反应. 该研究为HBV感染者出现肝内细胞生长下调现象提供了一个新的发病机制, 并为干预HBV相关的肝脏肿瘤和疾病的治疗策略提供了新的靶位.

近来的研究多认为肝炎病毒引起的肝细胞损伤与细胞凋亡有密切的关系, 抑制或促进肝细胞凋亡都可以是肝炎病毒的致病机制. 作为凋亡信号传递途径中特殊的死亡信号分子胱冬肽酶家族, 其与肝炎病毒蛋白间的相互作用也日益受到人们的关注. 阐明肝炎病毒蛋白调节胱冬肽酶家族基因表达的机制, 可望为研制凋亡干预剂提供方向. 虽然在这一方面研究仍处在体外实验及动物实验水平, 但是随着研究的深入各种凋亡干预剂的运用可望为临床上各种病毒性肝病的防治提供新的思路, 探索新的路径.

### 3 参考文献

- 1 欧阳植庭. 上皮细胞钙粘素及其与肿瘤的关系. 中国现代医学杂志 1999;9:32-34
- 2 Patel T, Roberts LR, Jones BA, Gores GJ. Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver disease: an overview. *Semin Liver Dis* 1998;18:105-114
- 3 Lau JY, Xie X, Lai MM, Wu PC. Apoptosis and viral hepatitis. *Semin Liver Dis* 1998;18:169-176
- 4 Alnemrie ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996;87:171
- 5 李志英, 向阳, 杨秀玉. 表皮生长因子受体及mm23-H1在滋养细胞肿瘤中表达的相关性及临床意义. 中华肿瘤杂志 2000;6:500-501
- 6 Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14486-14491
- 7 Wang S, Miura M, Jung YK, Zhu H, Li E, Yuan J. Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. *Cell* 1998;92:501-509
- 8 Srinivasula SM, Ahmad M, Otilie S, Bullrich F, Banks S, Wang Y, Fernandes-Alnemri T, Croce CM, Litwack G, Tomaselli KJ, Armstrong RC, Alnemri ES. FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. *J Bio Chem* 1997;272:18542-18545
- 9 Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Daugas E, Wang HG, Geley S, Fassy F, Reed JC, Kroemer G. The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. *J Exp Med* 1997;186:25-37
- 10 Vaux DL, Strasser A. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2239-2244
- 11 Jeon BS, Kholodilov NG, Oo TF, Kim SY, Tomaselli KJ, Srinivasan A, Stefanis L, Burke RE. Activation of caspase-3 in developmental models of programmed cell death in neurons of the substantia nigra. *J Neurochem* 1999;73:322-333
- 12 Bantel H, Lugering A, Poremba C, Lugering N, Held J, Domschke W, Schulze-Osthoff K. Caspase activation correlates with the degree of inflammatory liver injury in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2001;34:758-767

- 13 Tsuki-date K, Yamamoto K, Snyder JW, Farber JL. Microtubule antagonists activate programmed cell death (apoptosis) in cultured rat hepatocytes. *Am J Pathol* 1993;143:918-925
- 14 Machida K, Tsukiyama-Kohara K, Seike E, Tone S, Shibasaki F, Shimizu M, Takahashi H, Hayashi Y, Funata N, Taya C, Yonekawa H, Kohara M. Inhibition of cytochrome c release in Fas-mediated signaling pathway in transgenic mice induced to express hepatitis C viral proteins. *J Biol Chem* 2001;276:12140-12146
- 15 Otsuka M, Kato N, Taniguchi H, Yoshida H, Goto T, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus core protein inhibits apoptosis via enhanced Bcl-xL expression. *Virology* 2002;296:84-93
- 16 Hahn CS, Cho YG, Kang BS, Lester IM, Hahn YS. The HCV core protein acts as a positive regulator of fas-mediated apoptosis in a human lymphoblastoid T cell line. *Virology* 2000;276:127-137
- 17 Ghosh AK, Majumder M, Steele R, Meyer K, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein protects against TNF-alpha mediated apoptotic cell death. *Virus Res* 2000;67:173-178
- 18 Goh PY, Tan YJ, Lim SP, Lim SG, Tan YH, Hong WJ. The hepatitis C virus core protein interacts with NS5A and activates its caspase-mediated proteolytic cleavage. *Virology* 2001;290:224-236
- 19 Satoh S, Hirota M, Noguchi T, Hijikata M, Handa H, Shimotohno K. Cleavage of hepatitis C virus nonstructural protein 5A by a caspase-like protease(s) in mammalian cells. *Virology* 2000;270:476-487
- 20 Yano Y, Hayashi Y, Nakaji M, Nagano H, Seo Y, Ninomiya T, Yoon S, Wada A, Hirai M, Kim SR, Yokozaki H, Kasuga M. Different apoptotic regulation of TRAIL-caspase pathway in HBV- and HCV-related hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Med* 2003;11:499-504
- 21 Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I, Reed JC. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J* 2003;22:2729-2740
- 22 Yeh CT, Shen CH, Tai DI, Chu CM, Liaw YF. Identification and characterization of a prevalent hepatitis B virus X protein mutant in Taiwanese patients with hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2000;19:5213-5220
- 23 Kim KH, Seong BL. Pro-apoptotic function of HBV X protein is mediated by interaction with c-FLIP and enhancement of death-inducing signal. *EMBO J* 2003;22:2104-2116

## 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒蛋白对亮氨酸拉链蛋白LZIP的调节

刘妍, 成军

刘妍, 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  
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, 10039, 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](mailto:cj@genetherapy.com.cn)

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

刘妍, 成军. 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒蛋白对亮氨酸拉链蛋白LZIP的调节. 世界华人消化杂志 2004;12(4):932-935

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/932.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、HCV感染与肝细胞癌之间的关系已经得到确定, 但是具体的分子生物学机制还有许多工作要做. 其中肝炎病毒编码蛋白对于肝细胞基因组表达的反式调节作用, 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, 从而调节肝细胞的生长、代谢、凋亡及恶性转化, 在病毒感染致病机制中起着重要作用<sup>[1-5]</sup>. 人碱性亮氨酸拉链蛋白LZIP是碱性亮氨酸拉链蛋白家族重要成员之一, 在肝炎病毒致肝细胞癌发生过程中发挥重要作用.

## 1 LZIP蛋白的基本结构及其功能调节

1.1 碱性亮氨酸拉链蛋白家族 碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP), 即bZip结构, 就是在许多细胞调控蛋白中发现的一段富含亮氨酸的序列, 这个区域易形成两亲性 $\alpha$ 螺旋或卷曲构象. 最早发现于CCAAT/增强子结合蛋白(CCAAT/enhancer binding protein, C/EBP), C/EBP家族的羧基端35个氨基酸残基具有能够形成 $\alpha$ 螺旋结构的特点, 每隔6个氨基酸残基即出现一个亮氨酸残基, 这就导致第7个亮氨酸残基都在螺旋的同一个方向出现. 由于这类蛋白质都以二聚体形式与DNA结合, 两个分子 $\alpha$ 螺旋的亮氨酸一侧是形成二聚体的基础, 形同拉链. 然而亮氨酸拉链并非直接结合DNA, 而是以肽链氨基端富含碱性氨基酸的20-30个N-端结构域与DNA结合, 若不形成二聚体则这个碱性区对DNA的亲合力明显降低, 因此这类蛋白质的DNA结合结构域实际是以碱性区和亮氨酸拉链结构的整体作为基础. 与C/EBP氨基酸序列类似, 许多转录调控蛋白质如Jun、Fos和myc蛋白等, 均含有bZip结构, 统称为碱性亮氨酸拉链家族蛋白质, bZIPs蛋白是真核生物最大、最保守的一类转录因子<sup>[6]</sup>.

1.2 LZIP蛋白的基本结构 人LZIP蛋白是碱性亮氨酸拉链家族蛋白质成员之一, 对bZIPs蛋白质家族遗传树分析显示, LZIP蛋白是独立的一个分支, 而不与其他bZIPs蛋白如Jun、Fos、ATF1、ATF6、CREB、CREM等形成同簇. LZIP蛋白由371个氨基酸残基(aa)组成, N-末端(1-151 aa组成)含有宿主细胞因子HCF-1结合基序(host cell factor-binding motifs, HBM), HBM由4个氨基酸残基组成(DHTY), 富含酸性氨基酸, Glu或Asp比例约占20.5%; 位于LZIP蛋白中间的是碱性亮氨酸拉链DNA结合区, 富含赖氨酸和精氨酸(152-171 aa组成), 此区的作用是与DNA结合并可形成 $\alpha$ 螺旋; 178-220 aa组成螺旋了的螺旋功能域(coiled-coil domains), 是LZIP蛋白质同二聚体或异二聚体形成区域; C-末端(221-371 aa组成)富含脯氨酸, Pro比例约占11%. 大量的疏水氨基酸残基(亮氨酸)分散存在于两个末