

# 丙型肝炎病毒编码蛋白的生物学功能

唐霓

唐霓, 重庆医科大学病毒性肝炎研究所 感染性疾病分子生物学教育部重点实验室 重庆市 400016

唐霓, 研究员, 硕士生导师, 主要从事病毒性肝炎发病机制和肝细胞分化发育研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 30972586

通讯作者: 唐霓, 研究员, 400016, 重庆市渝中区医学院路1号, 重庆医科大学病毒性肝炎研究所, 感染性疾病分子生物学教育部重点实验室. nitang809@hotmail.com

电话: 023-68486780

收稿日期: 2009-09-15 修回日期: 2009-09-22

接受日期: 2009-09-28 在线出版日期: 2009-10-08

## Biological role of hepatitis C virus proteins

Ni Tang

Ni Tang, Key Laboratory of Molecular Biology of Infectious Diseases of the Ministry of Education, Institute for Viral Hepatitis, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30972586

Correspondence to: Ni Tang, Key Laboratory of Molecular Biology of Infectious Diseases of the Ministry of Education, Chongqing Medical University, 1 Yixueyuan Road, Chongqing 400016, China. nitang809@hotmail.com

Received: 2009-09-15 Revised: 2009-09-22

Accepted: 2009-09-28 Published online: 2009-10-08

## Abstract

Hepatitis C virus (HCV) is a major causative agent of chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. At present, the molecular pathogenesis of HCV-induced liver diseases is largely unknown. This review will highlight recent results providing an idea of how HCV structural and non-structural proteins affect RNA replication, viral particle assembly and release, and how these proteins interfere with the intracellular signaling pathways and finally evade host defense. Elucidation of the molecular mechanism by which HCV regulates host response may facilitate revealing targets for novel therapeutic vaccines and drugs.

**Key Words:** Hepatitis C virus; Viral protein; Virus-host interaction; Biological role

Tang N. Biological role of hepatitis C virus proteins. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(28): 2863-2870

## 摘要

丙型肝炎是由丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)引起的传染性疾病, 是慢性肝病的主要原因之一. 本文系统阐述病毒编码蛋白通过直接与细胞内重要调节分子结合, 以病毒-宿主细胞相互作用方式影响细胞重要的信号通路, 导致细胞增殖、分化等发生异常, 干扰机体免疫防御功能, 削弱宿主对HCV感染细胞的抗病毒应答, 有利于慢性持续性感染的建立, 最终促使HCV相关肝病的发生和发展. 加强对病毒蛋白生物学功能的研究, 将有助于探讨HCV致病机制和免疫逃逸机制, 对HCV特异靶向药物和治疗性疫苗的研究和开发也具有重要的意义.

**关键词:** 丙型肝炎病毒; 病毒蛋白; 病毒-宿主相互作用; 生物学功能

唐霓. 丙型肝炎病毒编码蛋白的生物学功能. *世界华人消化杂志* 2009; 17(28): 2863-2870

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2863.asp>

## 0 引言

丙型肝炎是由丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)引起的传染性疾病, 主要通过血源传播, 是慢性肝病的主要原因之一. 目前全球范围内HCV感染率约3%, 感染总人数超过2亿<sup>[1-2]</sup>, 我国约4000多万人感染HCV. 成年人感染HCV后, 慢性持续性感染高达60%-85%, 远远高于乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染慢性化率(5%-10%), 并可进一步发展成肝纤维化、肝癌<sup>[3-4]</sup>, 目前尚无预防HCV感染的疫苗和抗病毒药物, HCV感染已经成为严重威胁人类健康的社会公共卫生问题.

HCV相关的慢性肝损伤发生在病毒感染后多年, 传统观念认为机体免疫反应造成肝细胞的慢性炎症、细胞坏死和肝纤维化等在HCV相关肝病的发病中起主导地位. 随着HCV感染致病机制研究的进一步深入, “宿主因素”占致病主导地位的观念近年来有所改变, 目前更倾向认同“病毒-宿主”相互作用、相互影响最

## ■背景资料

HCV是有被膜的单股正链RNA病毒, 属黄病毒科丙型肝炎病毒属, 主要在肝细胞中复制, 是引起输血后非甲-非乙型肝炎的主要致病因子. HCV基因组变异大, 主要分为6个基因型, 80多个亚型. HCV相关的慢性肝损伤发生在病毒感染后多年, 传统观念认为机体免疫反应造成肝细胞的慢性炎症、细胞坏死和肝纤维化等在HCV相关肝病的发病中起主导地位. 随着HCV感染致病机制研究的进一步深入, “宿主因素”占致病主导地位的观念近年来有所改变, 目前更倾向认同“病毒-宿主”相互作用、相互影响最终导致疾病的发生. 加强对病毒蛋白生物学功能的研究, 将有助于探讨HCV致病机制和免疫逃逸机制, 对HCV特异靶向药物和治疗性疫苗的研究和开发也具有重要的意义.

## ■同行评议者

于颖彦, 教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院器官移植中心病理室

## ■相关报道

最近的研究表明病毒能够以直接的方式,即通过病毒-宿主细胞相互作用进而影响细胞重要的信号通路,导致细胞的增殖、分化等发生异常,干扰机体免疫防御功能,有利于慢性持续性感染的建立,最终促使HCV相关肝病的发生和发展。

终导致疾病的发生。最近的研究表明病毒能够以直接的方式,即通过病毒-宿主细胞相互作用进而影响细胞重要的信号通路,导致细胞的增殖、分化等发生异常,干扰机体免疫防御功能,有利于慢性持续性感染的建立,最终促使HCV相关肝病的发生和发展。

## 1 HCV编码蛋白生物学功能

HCV是有被膜的单股正链RNA病毒,属黄病毒科丙型肝炎病毒属,主要在肝细胞中复制,是引起输血后非甲-非乙型肝炎的主要致病因子。HCV基因组变异大,主要分为6个基因型,80多个亚型<sup>[5]</sup>。HCV基因组全长约9.6 kb,分为5'非翻译区(UTR),一个开放阅读框架(ORF)和3'非翻译区。5'UTR含有内部核糖体进入位点(IRES),3'UTR与复制起始有关。ORF编码一个约3008-3037个氨基酸的多蛋白前体,在宿主细胞信号肽酶和病毒蛋白酶的共同作用下加工成至少10种病毒蛋白,依次为NH<sub>2</sub>-Core-E1-E2-p7-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH<sup>[6]</sup>。最近发现了一个由Core编码序列的核糖体读码框架移位产生的约17 kDa蛋白,称为核糖体读码框移位替代蛋白(alternative ribosomal frameshift protein, ARFP)或F(frameshift)蛋白<sup>[7-8]</sup>。

### 1.1 结构蛋白生物学功能

1.1.1 核心蛋白: 核心蛋白位于HCV编码多蛋白前体N端,下游是被膜蛋白E1、E2;编码基因由573个核苷酸组成,编码191个氨基酸的核心蛋白。加工成熟的核心蛋白约有172-182个残基(P21),富含脯氨酸、精氨酸和赖氨酸,亲水性强,抗原性强,无糖基化位点,在病毒株和株之间相对保守<sup>[9]</sup>。核心蛋白除主要组成病毒核衣壳外,还具有多种功能:能与病毒RNA结合,调节HCV RNA转录,参与病毒颗粒装配,并与宿主细胞糖蛋白相互作用完成病毒颗粒的成熟与分泌<sup>[10]</sup>。

最近的研究表明,HCV核心蛋白同样在细胞信号转导、转录因子调控、细胞凋亡以及细胞的转化过程中发挥了重要作用。HCV核心蛋白具有促进细胞转化功能,HCV核心蛋白的转基因小鼠肝细胞增殖加快,肝细胞的氧化应激反应性明显增强,肝纤维化发生率增加<sup>[11]</sup>。目前对HCV核心蛋白促细胞增殖效应的作用机制尚不明确,推测与Cyclin E上调或STAT3磷酸化导致的MAPK通路活化相关,也有报道HCV核心蛋白转染HepG2细胞后激活NF- $\kappa$ B,进而增强

TGF- $\alpha$ 转录活性,最终活化MAPK/ERK通路刺激细胞增殖<sup>[12]</sup>。

核心蛋白能直接和P53<sup>[13]</sup>、P73<sup>[14]</sup>、pRb<sup>[15]</sup>等肿瘤抑制蛋白结合,调节Cyclin-依赖激酶(CDK)抑制因子P21/Waf的表达<sup>[16]</sup>,而P21/Waf是P53的转录调控靶位,核心蛋白通过直接调节Cyclin/CDK复合物的功能,参与细胞周期异常改变和肿瘤的发生。此外,核心蛋白还能与LZIP蛋白<sup>[17]</sup>、hnRNP K蛋白<sup>[18]</sup>、RNA解旋酶DEAD box DDX3蛋白<sup>[19]</sup>等结合。

在表达核心蛋白的细胞和转基因小鼠模型中证实core能与线粒体蛋白伴侣分子Prohibitin结合<sup>[20]</sup>,破坏Prohibitin与线粒体DNA编码的细胞色素C氧化酶(COX)的相互作用,导致COX活性下降,线粒体功能障碍,肝细胞氧化应激损伤。

1.1.2 E1和E2: 位于病毒表面的包膜糖蛋白,介导病毒与细胞表面受体结合和HCV入胞。E1和E2高度糖基化,形成一个非共价异二聚体。其中E2是与细胞膜上CD81和清道夫受体B1(SR-B1)结合的主要配体<sup>[21-22]</sup>。E2与IFN诱导的蛋白激酶PRK结合,抑制了IFN- $\gamma$ 的产生和NK细胞的细胞毒效应,是病毒逃逸机体免疫的重要因素之一<sup>[23]</sup>。

1.1.3 P7: 由63个氨基酸组成的疏水多肽,N端和C端均朝向ER腔,在ER膜上寡聚化并形成具备离子通道功能的疏水孔,P7不直接参与HCV病毒的复制,但对病毒的组装和释放具有重要作用<sup>[24]</sup>。

1.1.4 ARFP/F蛋白: 生物信息学分析表明HCV核心蛋白编码区存在一段高度保守的基因序列,最早被认为是维系HCV RNA的二级结构所需。1998年Walewski *et al*首次利用生物信息学证实核心蛋白读码框-2/+1位重叠有功能可变的开放阅读框<sup>[7]</sup>,随后在体外无细胞系统中成功鉴定了ARFP/F的表达<sup>[8]</sup>。

体外HCV亚病毒复制子模型实验表明,ARFP/F蛋白对于HCV复制不是必需的,但F蛋白基因序列中隐藏有保持RNA二级结构完整性的关键核苷酸(Stem-loop, SL47, nt 388-425; SL87, nt 428-508)<sup>[25]</sup>,一旦破坏了高度保守的RNA茎环结构,病毒基因组的复制和翻译将被阻断<sup>[26]</sup>。

ARFP/F蛋白能降低内源性P21 cdk的表达水平,通过与MM-1结合阻断MM-1对c-Myc的抑制作用<sup>[27]</sup>,增强c-Myc、下调P53的转录活性<sup>[28]</sup>,增加凋亡相关基因LGALS1, PRKCZ以及原癌基因FHL2的表达水平<sup>[29]</sup>。因此ARFP/F蛋白可能

参与感染肝细胞增殖、分化和凋亡调节, 并与HCV感染慢性化和细胞转化、肿瘤的发生密切相关。

研究还发现, ARFP/F蛋白可刺激树突状细胞IL-6, IL-8和MCP-1和MP-1 $\beta$ 的产生, 而IL-6, IL-8和MCP-1参与HCV感染慢性肝损伤的发生, 提示ARFP/F蛋白直接与肝纤维化进程中炎症因子异常高表达密切相关<sup>[30-31]</sup>。

前折叠素(prefoldin)与伴侣素(chaperon)结合作为伴侣复合物, 对真核细胞内肌球蛋白和微管蛋白的正确折叠发挥重要作用。HCV 1a F蛋白与细胞内前折叠素2(prefoldin 2, PFD2)相互作用, 干扰PFD复合物的正常功能, 导致微管蛋白细胞骨架的异常装配, 有助于HCV持续性、慢性感染状态的建立<sup>[32]</sup>。

## 1.2 非结构蛋白

1.2.1 NS2/3蛋白水解酶: NS2/3是翻译的第一个非结构蛋白, 负责NS2和NS3的分子内切割。其高度疏水性的N端包含了多个跨膜片段, 序列同源性分析表明: NS2/3与GB病毒、牛病毒性腹泻病毒(bovine viral diarrhea virus)NS2/3区域高度同源, 其中H952, E972, C993氨基酸残基在HCV所有基因型的NS2/3区高度保守<sup>[33]</sup>, 提示与蛋白水解酶功能密切相关。实验证实, NS2仅需NS3前两位氨基酸即能发挥基本水解酶活性, NS3的81-213位氨基酸包含了Zn<sup>2+</sup>结合位点, 是NS2蛋白水解酶的重要功能辅助区<sup>[34]</sup>。

NS2/3蛋白水解酶对HCV的复制是否必需目前还有一定争议。用去除NS2/3的HCV感染黑猩猩, 病毒丧失了持续感染的能力; 体外亚病毒复制子系统的复制也需要NS2/3蛋白酶的水解作用。体外有效复制的嵌合病毒株Con1, H77或J6其结构蛋白与JFH-1非结构蛋白的最佳连接部位均提示位于NS2第1个跨膜域之后<sup>[35]</sup>。但在Huh7细胞模型中, 去除NS2/3后HCV同样能够有效复制。由于HCV复制场所位于NS蛋白组成的膜网复合物中, 而NS2是一种靶向ER的膜内蛋白, 同时与其他NS蛋白的相互作用已被证实<sup>[36]</sup>, 因此推测NS2可能作为一种辅助分子间接参与病毒复制。

蛋白酶水解后的NS2对NS5A超磷酸化形式P58的产生有重要作用<sup>[37]</sup>, NS2还抑制NF- $\kappa$ B、亚铁螯合酶、SV40、CMV、TNF- $\alpha$ 等多种报告基因启动子的表达<sup>[38]</sup>, 瞬时转染和稳定表达HCV NS2的细胞增殖率减慢, 细胞周期捕获在S期, 同时细胞周期调节蛋白Cyclin A RNA和蛋白

的表达减少<sup>[39]</sup>。HCV NS2转基因小鼠肝组织内Fas介导的细胞凋亡和caspase3/7的活性被抑制, CIDE-B诱导的细胞凋亡也被抑制(CIDE-B, cell death-inducing DFF-like effector B, 细胞死亡诱导的DFF45样效应分子, 促进细胞死亡和DNA片段化)<sup>[40]</sup>。NS2还能与致炎因子CCL5/RANTZS的产生密切相关, 通过调节宿主细胞环境, 有利于病毒持续感染, 参与HCV致病机制的发生<sup>[41]</sup>。

1.2.2 NS3: 为69 kDa的多肽分子, 包含2个酶活性部位: N端1/3(1026-1206位氨基酸)为丝氨酸蛋白水解酶, 酶催化三联体为His 1083, Asp 1107以及Ser1165, 该水解酶需要NS4a作为共辅助分子, 切割所有的下游NS蛋白<sup>[42]</sup>。C端2/3包含RNA解旋酶/核苷三磷酸酶, NS3的蛋白水解酶和解旋酶对于HCV病毒复制至关重要。此外NS3/4a蛋白水解酶还参与HCV对机体固有免疫应答(innate immune)的逃逸: NS3/4a降解IFN诱导产生的RIG-1经典通路中关键辅助蛋白VISA, MAVS和cardif<sup>[43]</sup>, 切割Toll样受体转换因子TRIF<sup>[44]</sup>, 最终抑制I型IFN的产生, 削弱宿主细胞对HCV感染的抗病毒应答。

NS3 C端解旋酶与N端蛋白水解酶在功能上有一定交叉, 是DEXD/H-box解旋酶超家族成员之一<sup>[45]</sup>, 可以解开RNA-RNA底物, 参与病毒的早期装配。

1.2.3 NS4A: 由54个氨基酸组成, 作为NS3蛋白水解酶的共辅助分子, 其跨膜螺旋位于NS4A的N端疏水区, 能将NS3-NS4a复合物锚定于细胞膜内, 便于蛋白的水解和RNA复制<sup>[46]</sup>。NS4A中心区(21-34 aa)为NS3活化必需区, 而酸性C端通过调节NS5a磷酸化状态参与HCV的复制<sup>[47]</sup>。

1.2.4 NS4B: 为27 kDa的跨膜蛋白, 主要功能是诱导形成特异的“膜网结构”(Membranous web), 为HCV RNA在细胞内的复制场所<sup>[48]</sup>。NS4B能与NS3相互作用, 其基因多态性影响HCV复制效率。NS4B C端包含GTP结合位点, 初级内涵体蛋白Rab5能与NS4B C端结合, 参与复制复合物形成<sup>[49]</sup>。

1.2.5 NS5A: N端含有3个结构功能域<sup>[50]</sup>, 结构域I最大也最为保守, 为预测的RNA结合套状结构, 体外实验证实能与RNA结合。结构域II和III在不同基因型序列差异较大, 其中结构域III参与病毒的产生和释放: 在HCV cc模型中, 结构域III C端缺失或替代突变后, 不能产生感染性病毒颗粒。NS5A的磷酸化状态也与病毒的复制密切相关, 磷酸化NS5A的选择性抑制剂能刺激野生

## ■应用要点

加强对病毒蛋白的生物学功能研究, 将有助于探讨HCV致病机制和免疫逃逸机制, 特别是对HCV特异靶向药物的开发和治疗性疫苗的研究具有重要的意义。

## ■同行评价

本文对丙型肝炎病毒的结构研究进展进行了系统梳理, 引用文献恰当, 文笔流畅, 对于从事肝病以及病毒学研究的人员无疑起到了很好的参考作用。

表 1 HCV编码蛋白在病毒复制过程中的生物学功能

| 病毒蛋白         | 功能                                                                                                 | 参考文献        |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Core protein | 组成病毒核衣壳; 与病毒RNA结合, 调节HCV RNA转录; 参与病毒颗粒装配; 与LZIP蛋白、hnRNP K蛋白、RNA解旋酶DEAD box DDX3蛋白相互作用参与病毒颗粒的成熟与分泌。 | 9-10, 17-19 |
| E1和E2        | 介导病毒与细胞表面受体结合和HCV入胞。                                                                               | 21-22       |
| P7           | 参与病毒的组装和释放。                                                                                        | 24          |
| ARFP/F蛋白     | 对HCV复制不是必需的, 但带有保持HCV RNA二级结构完整性的关键核苷酸(SL47和SL87); 与PFD2相互作用, 有利于病毒持续感染状态的建立。                      | 25-26,32    |
| NS2/3        | 对病毒的复制是否必需存在争议, 可作为一种辅助分子间接参与病毒复制。                                                                 | 35-36       |
| NS3          | NS3蛋白水解酶和解旋酶对于HCV病毒复制至关重要, 还参与病毒的早期装配。                                                             | 42,45       |
| NS4A         | 为NS3蛋白水解酶的共辅助分子, 将NS3-NS4A复合物锚定于细胞膜内, 便于蛋白的水解和RNA复制; 通过调节NS5A磷酸化状态参与HCV的复制。                        | 46-47       |
| NS4B         | 诱导形成膜网结构, 为HCV RNA细胞内复制场所; 与Rab5结合, 参与病毒复制。                                                        | 48-49       |
| NS5A         | NS5A磷酸化状态与病毒的复制密切相关; N端结构域I能与RNA结合, 结构域Ⅲ参与病毒的产生和释放; 与hVAP-A, FBL2等结合, 调节病毒的复制。                     | 50-54       |
| NS5B         | RNA依赖的RNA聚合酶, 为病毒复制的关键酶。C端跨膜区与细胞膜的相互作用, 对HCV的复制也非常重要, CyPA(Cyclophilin A)与NS5B结合后可以明显抑制HCV RNA的复制。 | 58-61       |

表 2 HCV编码蛋白调控宿主细胞信号通路、参与慢性肝细胞损伤

| 病毒蛋白         | 功能                                                                                                     | 参考文献     |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Core protein | 激活NF- $\kappa$ B通路, 增强TGF- $\alpha$ 转录活性, 活化MAPK/ERK通路刺激细胞增殖。                                          | 12       |
|              | 和P53、P73、pRb等肿瘤抑制蛋白结合, 调节Cyclin-D依赖激酶(CDK)抑制因子P21/Waf的表达。                                              | 13-16    |
|              | 肝细胞增殖加快, 肝纤维化发生率增加; 与线粒体蛋白伴侣分子Prohibitin结合, 肝细胞的氧化应激反应性明显增强。                                           | 11-12,20 |
| E2           | 激活MAPK通路, 使ERK和P38磷酸化, 细胞增殖活跃。                                                                         | 63       |
| ARFP/F蛋白     | 降低内源性P21 cdk的表达水平, 通过与MM-1结合阻断MM-1对c-Myc的抑制作用, 增强P53、c-Myc的转录活性, 增加凋亡相关基因LGALS1, PRKCZ以及原癌基因FHL2的表达水平。 | 27-29    |
| NS2/3        | 抑制NF- $\kappa$ B、亚铁螯合酶、SV40、CMV、TNF- $\alpha$ 等多种报告基因启动子的表达。                                           | 38       |
|              | 抑制凋亡, 细胞增殖率减慢, 细胞周期调节蛋白Cyclin A表达减少。                                                                   | 39-40    |
|              | 与致炎因子CCL5/RANTZS的产生密切相关。                                                                               | 41       |
| NS3/4A       | 激活MAPK, TNF- $\alpha$ , EGF等信号通路, 调控细胞增殖与病毒复制。                                                         | 64-66    |
| NS4B         | 激活Akt通路, 增加sterol regulatory element-binding proteins(SREBPs)的转录。                                      | 67       |
| NS5A         | 干扰细胞内重要信号通路调节蛋白如Grb2, PI3K, P53或Raf-1的功能, 还可能调控细胞周期调节基因的表达, 进而影响细胞增殖和凋亡。                               | 55-57    |
| NS5B         | 与蛋白激酶C相关激酶2(PRK2)结合, 调节NS5b的磷酸化。                                                                       | 59       |

型HCV RNA的复制<sup>[51]</sup>。

此外, NS5A的磷酸化状态可影响其与囊泡转运蛋白hVAP-A相互作用<sup>[52]</sup>, 并最终调节病毒复制复合物的形成。宿主细胞的一些结合蛋白, 如FBL2(F-box和亮氨酸富集重复蛋白2), hVAP-B, FKBP8(免疫亲和素家族成员)等<sup>[53-54]</sup>通过与NS5A的结合, 对病毒复制发挥重要作用。NS5A还通过干扰细胞内重要信号通路调节蛋白如Grb2, PI3K, P53或Raf-1的功能, 调控细胞周期

调节基因的表达, 进而影响细胞增殖和凋亡<sup>[55-57]</sup>。

1.2.6 NS5B: 为68 kDa的多肽分子, 为RNA依赖的RNA聚合酶(RdRp), 主要生物学功能为合成HCV基因组互补的负链RNA<sup>[58]</sup>。NS5B晶体结构提示酶活性部位位于手指及拇指结构域, NS5B C端跨膜区与细胞膜相互作用, 对HCV的复制也非常重要。

蛋白激酶C相关激酶2(PRK2)与NS5B手指结构域结合, 调节NS5A的磷酸化状态<sup>[59]</sup>,



表 3 HCV编码蛋白逃逸机体固有免疫机制

| 病毒蛋白         | 功能                                                  | 参考文献  |
|--------------|-----------------------------------------------------|-------|
| Core protein | 上调蛋白磷酸酶2A和STAT1通路抑制分子PIAS1表达.                       | 68    |
|              | 干扰IFN传递的JAK/STAT信号通路, 活化抑制分子SOCS-3.                 | 69    |
|              | 与致炎因子IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8的产生和慢性肝损伤相关.       | 41    |
| E2           | 与IFN诱导的蛋白激酶PKR结合, 抑制IFN- $\gamma$ 的产生和NK细胞的细胞毒效应.   | 23    |
|              | 减少IFNAR1及IFNAR2膜受体数量, 阻断IFN- $\alpha$ 的STAT通路.      | 70    |
| ARFP/F蛋白     | 诱导IL-6, IL-8和MCP-1和MP-1 $\beta$ 的产生, 参与HCV感染肝损伤的发生. | 30-31 |
|              | 与细胞内前折叠素2(prefoldin 2, PFD2)相互作用, 导致微管蛋白细胞骨架的异常装配.  | 32    |
| NS3/4A       | 切割IFN活化经典通路的适配分子IPS-1/MAVS/cardif和TRIF, 抑制IFN信号通路.  | 43    |
|              | 切割Toll样受体转换因子TRIF, 抑制型IIFN的产生.                      | 44    |
|              | 直接与TBK1结合, 抑制IRF-3(干扰素调节因子3)的产生.                    | 71    |
| NS4b         | 与致炎因子IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8的产生和慢性肝损伤相关.       | 41    |
| NS5a         | 含有一段40aa片段, 为IFN敏感区(ISDR), 与IFN治疗反应性密切相关.           | 72    |
|              | 直接与PKR结合, 抑制PKR, 干扰2'-5' OAS产生.                     | 73-74 |
|              | 与致炎因子IL-8产生相关.                                      | 75    |
|              | 抑制TGF- $\beta$ 信号通路.                                | 76    |

hVAP-B、核仁素的甘氨酸/精氨酸富集区也能与NS5B结合<sup>[60]</sup>, 此外CyPA(Cyclophilin A)与NS5B结合后可以明显抑制HCV RNA的复制<sup>[61]</sup>.

HCV编码蛋白参与病毒复制、调控宿主细胞信号通路、参与慢性肝细胞损伤以及逃逸机体固有免疫的分子机制见表1-3.

2 结论

上述HCV编码蛋白的生物学功能, 仅仅是病毒完成复杂生活周期的一小部分. 加强对病毒蛋白的生物学功能研究, 将有助于探讨HCV致病机制和免疫逃逸机制, 特别是对HCV特异靶向药物的开发和治疗性疫苗的研究具有重要的意义. 比如了解NS3通过降解RIG-1经典通路中关键辅助蛋白以及TRIF抑制I型IFN的产生, 从而削弱宿主细胞对HCV感染的抗病毒应答, 已经设计和开发了针对NS3蛋白水解酶的抑制剂Telaprevir和boceprevir. 又如CyPA(Cyclophilin A)与NS5b结合后可以明显抑制HCV RNA的复制, 可以采用CyPA类似药物环孢霉素D(cyclosporin D)可以特异抑制病毒的复制. 再如对病毒复制过程关键酶NS5B晶体结构的详细解析, 对开发特异性阻断病毒复制的药物如R1626, VCH916等具有重要的指导意义<sup>[62]</sup>. 相信对HCV编码蛋白生物学功能的认识将随着生物信息学、结构生物学、分子病毒学等基础学科的不断发展和更新得到丰富和拓展.

3 参考文献

1 Tellinghuisen TL, Evans MJ, von Hahn T, You S, Rice CM. Studying hepatitis C virus: making the best of a bad virus. *J Virol* 2007; 81: 8853-8867

2 Bacon BR, McHutchison JG. Into the light: strategies for battling hepatitis C. *Am J Manag Care* 2007; 13 Suppl 12: S319-S326

3 Chisari FV. Unscrambling hepatitis C virus-host interactions. *Nature* 2005; 436: 930-932

4 Gale M Jr, Foy EM. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* 2005; 436: 939-945

5 Tan SL, He Y, Huang Y, Gale M Jr. Strategies for hepatitis C therapeutic intervention: now and next. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4: 465-470

6 Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5: 453-463

7 Walewski JL, Keller TR, Stump DD, Branch AD. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA* 2001; 7: 710-721

8 Xu Z, Choi J, Yen TS, Lu W, Strohecker A, Govindarajan S, Chien D, Selby MJ, Ou J. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J* 2001; 20: 3840-3848

9 McLauchlan J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat* 2000; 7: 2-14

10 Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus core protein: intriguing properties and functional relevance. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 202: 149-156

11 Moriya K, Nakagawa K, Santa T, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Miyazawa T, Ishibashi K, Horie T, Imai K, Todoroki T, Kimura S, Koike K. Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 2001; 61: 4365-4370

12 Aravalli RN, Steer CJ, Cressman EN. Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 48: 2047-2063

13 Levrero M. Viral hepatitis and liver cancer: the case

- of hepatitis C. *Oncogene* 2006; 25: 3834-3847
- 14 Alisi A, Giambartolomei S, Cupelli F, Merlo P, Fontemaggi G, Spaziani A, Balsano C. Physical and functional interaction between HCV core protein and the different p73 isoforms. *Oncogene* 2003; 22: 2573-2580
- 15 Cho J, Baek W, Yang S, Chang J, Sung YC, Suh M. HCV core protein modulates Rb pathway through pRb down-regulation and E2F-1 up-regulation. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1538: 59-66
- 16 Wang F, Yoshida I, Takamatsu M, Ishido S, Fujita T, Oka K, Hotta H. Complex formation between hepatitis C virus core protein and p21Waf1/Cip1/Sdi1. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 273: 479-484
- 17 Jin DY, Wang HL, Zhou Y, Chun AC, Kibler KV, Hou YD, Kung H, Jeang KT. Hepatitis C virus core protein-induced loss of LZIP function correlates with cellular transformation. *EMBO J* 2000; 19: 729-740
- 18 Koike K. Hepatitis C virus contributes to hepatocarcinogenesis by modulating metabolic and intracellular signaling pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S108-S111
- 19 Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. DDX3 DEAD-box RNA helicase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2007; 81: 13922-13926
- 20 Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H, Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Miyamura T, Suzuki T, Koike K. Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperon, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein. *Hepatology* 2009; 50: 378-386
- 21 Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998; 282: 938-941
- 22 Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 2002; 21: 5017-5025
- 23 Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999; 285: 107-110
- 24 Steinmann E, Penin F, Kallis S, Patel AH, Bartenschlager R, Pietschmann T. Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog* 2007; 3: e103
- 25 McMullan LK, Grakoui A, Evans MJ, Mihalik K, Puig M, Branch AD, Feinstone SM, Rice CM. Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 2879-2884
- 26 Vassilaki N, Friebe P, Meuleman P, Kallis S, Kaul A, Paranhos-Baccalà G, Leroux-Roels G, Mavromara P, Bartenschlager R. Role of the hepatitis C virus core+1 open reading frame and core cis-acting RNA elements in viral RNA translation and replication. *J Virol* 2008; 82: 11503-11515
- 27 Ma HC, Lin TW, Li H, Iguchi-Ariga SM, Ariga H, Chuang YL, Ou JH, Lo SY. Hepatitis C virus ARFP/F protein interacts with cellular MM-1 protein and enhances the gene trans-activation activity of c-Myc. *J Biomed Sci* 2008; 15: 417-425
- 28 Wu WB, Shao SW, Zhao LJ, Luan J, Cao J, Gao J, Zhu SY, Qi ZT. Hepatitis C virus F protein up-regulates c-myc and down-regulates p53 in human hepatoma HepG2 cells. *Intervirology* 2007; 50: 341-346
- 29 Dou J, Liu P, Wang J, Zhang X. Effect of hepatitis C virus core shadow protein expressed in human hepatoma cell line on human gene expression profiles. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1794-1800
- 30 Vassilaki N, Mavromara P. The HCV ARFP/F/core+1 protein: production and functional analysis of an unconventional viral product. *IUBMB Life* 2009; 61: 739-752
- 31 Fiorucci M, Boulant S, Fournillier A, Abraham JD, Lavergne JP, Paranhos-Baccalà G, Inchauspé G, Bain C. Expression of the alternative reading frame protein of Hepatitis C virus induces cytokines involved in hepatic injuries. *J Gen Virol* 2007; 88: 1149-1162
- 32 Tsao ML, Chao CH, Yeh CT. Interaction of hepatitis C virus F protein with prefoldin 2 perturbs tubulin cytoskeleton organization. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 348: 271-277
- 33 Welbourn S, Pause A. The hepatitis C virus NS2/3 protease. *Curr Issues Mol Biol* 2007; 9: 63-69
- 34 Schregel V, Jacobi S, Penin F, Tautz N. Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 5342-5347
- 35 Ikeda M, Yi M, Li K, Lemon SM. Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh7 cells. *J Virol* 2002; 76: 2997-3006
- 36 She Y, Han T, Ye L, Wu Z. Hepatitis C virus NS2/3 protease regulates HCV IRES-dependent translation and NS5B RdRp activity. *Arch Virol* 2009; 154: 1465-1473
- 37 Liu Q, Bhat RA, Prince AM, Zhang P. The hepatitis C virus NS2 protein generated by NS2-3 autocleavage is required for NS5A phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 254: 572-577
- 38 Kaukinen P, Sillanpää M, Kotenko S, Lin R, Hiscott J, Melén K, Julkunen I. Hepatitis C virus NS2 and NS3/4A proteins are potent inhibitors of host cell cytokine/chemokine gene expression. *Virol J* 2006; 3: 66
- 39 Yang XJ, Liu J, Ye L, Liao QJ, Wu JG, Gao JR, She YL, Wu ZH, Ye LB. HCV NS2 protein inhibits cell proliferation and induces cell cycle arrest in the S-phase in mammalian cells through down-regulation of cyclin A expression. *Virus Res* 2006; 121: 134-143
- 40 Erdtmann L, Franck N, Lerat H, Le Seyec J, Gilot D, Cannie I, Gripon P, Hibner U, Guguen-Guillouzo C. The hepatitis C virus NS2 protein is an inhibitor of CIDE-B-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2003; 278: 18256-18264
- 41 Sillanpää M, Kaukinen P, Melén K, Julkunen I. Hepatitis C virus proteins interfere with the activation of chemokine gene promoters and downregulate chemokine gene expression. *J Gen Virol* 2008; 89: 432-443
- 42 Johnson CL, Owen DM, Gale M Jr. Functional and therapeutic analysis of hepatitis C virus NS3.4A protease control of antiviral immune defense. *J Biol*

- Chem* 2007; 282: 10792-10803
- 43 Foy E, Li K, Sumpter R Jr, Loo YM, Johnson CL, Wang C, Fish PM, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M Jr. Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 2986-2991
  - 44 Li K, Foy E, Ferreon JC, Nakamura M, Ferreon AC, Ikeda M, Ray SC, Gale M Jr, Lemon SM. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 2992-2997
  - 45 Beran RK, Pyle AM. Hepatitis C viral NS3-4A protease activity is enhanced by the NS3 helicase. *J Biol Chem* 2008; 283: 29929-29937
  - 46 Wölk B, Sansonno D, Kräusslich HG, Dammacco F, Rice CM, Blum HE, Moradpour D. Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J Virol* 2000; 74: 2293-2304
  - 47 Lindenbach BD, Prágai BM, Montserret R, Beran RK, Pyle AM, Penin F, Rice CM. The C terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that regulates NS5A hyperphosphorylation and viral replication. *J Virol* 2007; 81: 8905-8918
  - 48 Egger D, Wölk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, Bienz K. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 2002; 76: 5974-5984
  - 49 Stone M, Jia S, Heo WD, Meyer T, Konan KV. Participation of rab5, an early endosome protein, in hepatitis C virus RNA replication machinery. *J Virol* 2007; 81: 4551-4563
  - 50 Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Gorbalenya AE, Rice CM. The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J Biol Chem* 2004; 279: 48576-48587
  - 51 Evans MJ, Rice CM, Goff SP. Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 13038-13043
  - 52 Hamamoto I, Nishimura Y, Okamoto T, Aizaki H, Liu M, Mori Y, Abe T, Suzuki T, Lai MM, Miyamura T, Moriishi K, Matsuura Y. Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. *J Virol* 2005; 79: 13473-13482
  - 53 Wang C, Gale M Jr, Keller BC, Huang H, Brown MS, Goldstein JL, Ye J. Identification of FBL2 as a geranylgeranylated cellular protein required for hepatitis C virus RNA replication. *Mol Cell* 2005; 18: 425-434
  - 54 Zhang Z, Harris D, Pandey VN. The FUSE binding protein is a cellular factor required for efficient replication of hepatitis C virus. *J Virol* 2008; 82: 5761-5773
  - 55 Tan SL, Nakao H, He Y, Vijaysri S, Neddermann P, Jacobs BL, Mayer BJ, Katze MG. NS5A, a nonstructural protein of hepatitis C virus, binds growth factor receptor-bound protein 2 adaptor protein in a Src homology 3 domain/ligand-dependent manner and perturbs mitogenic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 5533-5538
  - 56 Bürckstümmer T, Kriegs M, Lupberger J, Pauli EK, Schmittl S, Hildt E. Raf-1 kinase associates with Hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *FEBS Lett* 2006; 580: 575-580
  - 57 Street A, Macdonald A, Crowder K, Harris M. The Hepatitis C virus NS5A protein activates a phosphoinositide 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem* 2004; 279: 12232-12241
  - 58 Burton JR Jr, Everson GT. HCV NS5B polymerase inhibitors. *Clin Liver Dis* 2009; 13: 453-465
  - 59 Kim SJ, Kim JH, Kim YG, Lim HS, Oh JW. Protein kinase C-related kinase 2 regulates hepatitis C virus RNA polymerase function by phosphorylation. *J Biol Chem* 2004; 279: 50031-50041
  - 60 Shimakami T, Honda M, Kusakawa T, Murata T, Shimotohno K, Kaneko S, Murakami S. Effect of hepatitis C virus (HCV) NS5B-nucleolin interaction on HCV replication with HCV subgenomic replicon. *J Virol* 2006; 80: 3332-3340
  - 61 Yang F, Robotham JM, Nelson HB, Irsigler A, Kenworthy R, Tang H. Cyclophilin A is an essential cofactor for hepatitis C virus infection and the principal mediator of cyclosporine resistance in vitro. *J Virol* 2008; 82: 5269-5278
  - 62 Sakamoto N, Watanabe M. New therapeutic approaches to hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 2009; 44: 643-649
  - 63 Zhao LJ, Zhao P, Chen QL, Ren H, Pan W, Qi ZT. Mitogen-activated protein kinase signalling pathways triggered by the hepatitis C virus envelope protein E2: implications for the prevention of infection. *Cell Prolif* 2007; 40: 508-521
  - 64 Hassan M, Ghozlan H, Abdel-Kader O. Activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) signaling pathway is essential for the stimulation of hepatitis C virus (HCV) non-structural protein 3 (NS3)-mediated cell growth. *Virology* 2005; 333: 324-336
  - 65 Brenndörfer ED, Karthe J, Frelin L, Cebula P, Erhardt A, Schulte am Esch J, Hengel H, Bartenschlager R, Sällberg M, Häussinger D, Bode JG. Nonstructural 3/4A protease of hepatitis C virus activates epithelial growth factor-induced signal transduction by cleavage of the T-cell protein tyrosine phosphatase. *Hepatology* 2009; 49: 1810-1820
  - 66 Hassan M, Selimovic D, Ghozlan H, Abdel-Kader O. Induction of high-molecular-weight (HMW) tumor necrosis factor(TNF) alpha by hepatitis C virus (HCV) non-structural protein 3 (NS3) in liver cells is AP-1 and NF-kappaB-dependent activation. *Cell Signal* 2007; 19: 301-311
  - 67 Li S, Ye L, Yu X, Xu B, Li K, Zhu X, Liu H, Wu X, Kong L. Hepatitis C virus NS4B induces unfolded protein response and endoplasmic reticulum overload response-dependent NF-kappaB activation. *Virology* 2009; 391: 257-264
  - 68 Duong FH, Filipowicz M, Tripodi M, La Monica N, Heim MH. Hepatitis C virus inhibits interferon signaling through up-regulation of protein phosphatase 2A. *Gastroenterology* 2004; 126: 263-277
  - 69 Bode JG, Ludwig S, Ehrhardt C, Albrecht U, Erhardt A, Schaper F, Heinrich PC, Häussinger D. IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB J* 2003; 17: 488-490
  - 70 Lin W, Choe WH, Hiasa Y, Kamegaya Y, Blackard JT, Schmidt EV, Chung RT. Hepatitis C virus expression suppresses interferon signaling by

- degrading STAT1. *Gastroenterology* 2005; 128: 1034-1041
- 71 Sklan EH, Charuworn P, Pang PS, Glenn JS. Mechanisms of HCV survival in the host. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; 6: 217-227
- 72 Hayashi K, Katano Y, Honda T, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Nakano I, Urano F, Yoshioka K, Toyoda H, Kumada T, Goto H. Mutations in the interferon sensitivity-determining region of hepatitis C virus genotype 2a correlate with response to pegylated-interferon-alpha 2a monotherapy. *J Med Virol* 2009; 81: 459-466
- 73 Giménez-Barcons M, Wang C, Chen M, Sánchez-Tapias JM, Sáiz JC, Gale M Jr. The oncogenic potential of hepatitis C virus NS5A sequence variants is associated with PKR regulation. *J Interferon Cytokine Res* 2005; 25: 152-164
- 74 Krieger M, Bürckstümmer T, Himmelsbach K, Bruns M, Frelin L, Ahlén G, Sällberg M, Hildt E. The hepatitis C virus non-structural NS5A protein impairs both the innate and adaptive hepatic immune response in vivo. *J Biol Chem* 2009; 284: 28343-28351
- 75 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
- 76 Choi SH, Hwang SB. Modulation of the transforming growth factor-beta signal transduction pathway by hepatitis C virus nonstructural 5A protein. *J Biol Chem* 2006; 281: 7468-7478

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》正文要求

**本刊讯** 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写, 后空 1 格写标题; 2 级标题后空 1 格接正文。以下逐条陈述: (1) 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。(2) 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。(3) 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。(4) 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图 1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: ...; B: ...; C: ...; D: ...; E: ...; F: ...; G: ...。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  ( $P > 0.05$  不注)。如同一表中另有一套  $P$  值, 则<sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$ ; 第 3 套为<sup>e</sup> $P < 0.05$ , <sup>f</sup> $P < 0.01$ 。 $P$  值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P < 0.01$ ,  $t = 4.56$  vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、- 应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用  $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$  表达。黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小  $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$ , 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴。(5) 致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。(科学编辑: 李军亮 2009-10-08)