

丙型肝炎病毒非结构蛋白与宿主细胞蛋白相互作用的研究进展

张丹, 冯国和

张丹, 冯国和, 中国医科大学附属盛京医院感染科 辽宁省沈阳市 110004

作者贡献分布: 张丹与冯国和对此文所作贡献均等; 此研究内容由冯国和设计; 本论文写作由张丹完成。

通讯作者: 冯国和, 教授, 110004, 辽宁省沈阳市三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院感染科. fenggh@sj-hospital.org
电话: 024-96615-62101

收稿日期: 2010-10-12 修回日期: 2010-11-24

接受日期: 2010-12-01 在线出版日期: 2011-01-18

Advances in research of interaction between hepatitis C virus nonstructural proteins and host proteins

Dan Zhang, Guo-He Feng

Dan Zhang, Guo-He Feng, Department of Infectious Diseases, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Professor Guo-He Feng, Department of Infectious Diseases, Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Avenue, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. fenggh@sj-hospital.org

Received: 2010-10-12 Revised: 2010-11-24

Accepted: 2010-12-01 Published online: 2011-01-18

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) is another common cause of chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma after hepatitis B virus (HBV). Up to now, the mechanisms by which HCV promotes persistent infection and cancer remain unclear, and there are neither effective drugs nor vaccines against HCV available. Interaction between virus proteins and host proteins is a hot topic in research of the pathogenesis of viral hepatitis. Recent research shows that interaction between HCV nonstructural proteins and host proteins has an important impact on viral replication, carcinogenesis, interferon resistance, and disorders of glycometabolism and lipid metabolism. This paper summarizes the recent advances in research of interaction between HCV nonstructural proteins and host proteins.

Key Words: Hepatitis C virus; Nonstructural protein; Protein-protein interaction; Carcinogenesis; Inter-

feron resistance

Zhang D, Feng GH. Advances in research of interaction between hepatitis C virus nonstructural proteins and host proteins. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(2): 161-169

摘要

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)是继乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)之后另一个导致慢性肝炎、肝硬化和肝癌的常见原因。目前HCV致病及致癌机制仍不清楚,也缺乏针对HCV有效的治疗方法及疫苗预防。肝炎病毒蛋白与受染细胞蛋白之间相互作用是肝炎发病机制研究的热点内容。近年研究发现HCV非结构蛋白通过与细胞蛋白相互作用对病毒自身复制、致癌、干扰素抵抗、糖及脂代谢异常等产生重要影响。本文就近年来HCV非结构蛋白与细胞蛋白相互作用的系列研究作一综述。

关键词: 丙型肝炎病毒; 非结构蛋白; 蛋白质相互作用; 致癌作用; 干扰素抵抗

张丹, 冯国和. 丙型肝炎病毒非结构蛋白与宿主细胞蛋白相互作用的研究进展. 世界华人消化杂志 2011; 19(2): 161-169

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/161.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染呈全球分布,全球HCV平均感染率约为3%,约有1.3-1.7亿人感染HCV^[1]。我国属HCV的中、高流行区,普通人群中抗HCV阳性率约为3.2%,约4 000万人感染HCV。由于HCV的广泛流行及高致病性,HCV感染已成为一个世界性的公共卫生问题。HCV是单股正链RNA病毒,属黄病毒科HCV属,基因组全长为9.6 kb,包括1个大的开放阅读框(open reading frame, ORF)和两侧的5'、3'非编码区(untranslated region, UTR),核糖体通过进入HCV 5'UTR的内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)将HCV基因组翻

■背景资料

HCV是继HBV之后另一个引起慢性肝炎并导致肝硬化、肝癌的重要原因。目前HCV致病及致癌机制仍不清楚,近年在HCV非结构蛋白与宿主细胞蛋白相互作用方面有很多研究报道,此方面研究对认知HCV致病及致癌机制、做好该病预防有重要意义。

■同行评议者

任浩,副教授,中国人民解放军第二军医大学微生物学教研室

■ 研发前沿

HCV蛋白与受染细胞蛋白之间相互作用及相关信号转导的重点环节是HCV致病机制领域的研究热点, 阐明其蛋白与受体作用位点及环节有助于对HCV持续性感染与致癌机制等内容的深入阐述。

译成1个聚蛋白前体。该蛋白前体在宿主和病毒蛋白酶的裂解作用下产生至少10种蛋白质: 核心蛋白(core, C)、包膜蛋白1(envelope 1, E1)、E2、P7、非结构蛋白2(nonstructural protein 2, NS2)、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B。另外, 存在1种阅读框替代蛋白(alternative reading frame protein, ARFP), 又称F(frameshift)蛋白, 是由C蛋白的重叠阅读框翻译获得。肝炎病毒蛋白与受染细胞蛋白之间相互作用包括蛋白与蛋白之间直接结合作用、双方蛋白反式调节对方基因表达模式和水平作用。关于HCV C蛋白的作用先前已有所总结^[2], 近年有诸多学者探讨了HCV非结构蛋白的功能, 并对其与宿主细胞蛋白相互作用特点有了较深入的研究。

1 HCV非结构蛋白的构成

HCV非结构蛋白由NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A及NS5B 6种蛋白质构成, 其中NS2基因位于HCV基因组2 769-3 419核苷酸(nucleotide, nt)位点, 编码217个氨基酸。NS2蛋白是一个强疏水性跨膜蛋白, 与NS3蛋白共同组成具有自我切割功能的NS2-3蛋白酶复合物。NS3基因位于HCV基因组3 420-5 312 nt位点, 编码631个氨基酸。NS3蛋白具有NS2-3蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、RNA解旋酶和三磷酸核苷酶(NTPase)等活性, 丝氨酸蛋白酶催化NS3/4A、4A/4B、4B/5A和5A/5B的降解, NTPase及RNA解旋酶能使NS3蛋白结合到HCV基因组的3'末端上, 在病毒RNA复制中发挥调节作用。NS3基因为研发疫苗和抗HCV药物的重要靶点之一。NS4A基因位于HCV基因组5 313-5 474 nt位点, 编码54个氨基酸。NS4A蛋白作为NS3丝氨酸蛋白酶的辅助因子, 与NS3蛋白形成稳定的蛋白复合物, 对丝氨酸蛋白酶活性有重要的调节作用。NS4B基因位于HCV基因组5 475-6 257 nt位点, 编码261个氨基酸。NS4B蛋白是一种高度疏水的膜相关定位蛋白, 可调节NS5B蛋白RNA依赖的RNA聚合酶(RNA dependent RNA polymerase, RdRp)的活性。NS5A基因位于HCV基因组6 258-7 601 nt位点, 编码448个氨基酸。NS5A蛋白是磷酸化的非结构蛋白, 参与了HCV多种蛋白的成熟和RNA复制, 有基础磷酸化的56 000 Da(p56)和高度磷酸化的58 000 Da(p58)两种形式。NS5B基因位于HCV基因组7 602-9 371 nt位点, 编码591个氨基酸。NS5B蛋白具有RdRp的活性, 该酶是HCV RNA复制的关键酶, 且哺乳动物细胞中不存在类似的RdRp

指导的RNA合成过程, 因此RdRp及其编码基因NS5B成为抗HCV药物研究的一个理想靶位^[3,4]。

2 HCV非结构蛋白-细胞蛋白相互作用与HCV复制

HCV RNA的复制在HCV非结构蛋白和细胞蛋白组成的蛋白复合物中进行, 该复合物与细胞核周内质网膜相连。NS5A和NS5B与内质网膜上人载体相关性膜蛋白hVAP-33结合并相互作用, 形成一个能被细胞激酶作用的功能复合体^[5]。因为HCV复制被认为是在内质网衍生出的新的膜结构上进行的, 故有理由推测HCV复制需要利用宿主的囊泡膜运输通路。Sklan等^[6]的实验证实了该假设, 研究发现HCV NS5A可与宿主蛋白TBC1D20相互作用, TBC1D20含有一个TBC(Tre-2/Bub2/Cdc16)结构域, 后者存在于大多数已知的Rab(ras-like in rat brain)蛋白的GTP酶活化蛋白(GTPase-activating protein, GAP)中, Rab蛋白是小分子GTP结合蛋白家族Ras超家族中最大的亚家族, 在囊泡的形成、转运、黏附、锚定、融合等过程中起重要作用, GAP调控着Rab蛋白的活性, 是囊泡运输的主要调节因子。而TBC1D20为Rab1的GAP, 涉及内质网和高尔基复合体间的顺式转运的调节, 去除Rab1明显降低了HCV RNA的复制水平, 说明Rab1在HCV复制过程中起着重要作用。上述结果提示NS5A与TBC1D20的相互作用能够促进膜相关的HCV RNA复制。

HCV NS5A的磷酸化状态对HCV RNA复制有重要影响。Neddermann等^[7]报道在体外实验中大量高度磷酸化形式的NS5A(p58)可抑制HCV复制, 然而当p58的量减少后再给予涉及NS5A磷酸化的蛋白激酶抑制剂, 发现HCV RNA复制被完全阻断。这些结果提示p58与p56的比值对HCV复制的影响可能更为重要, 具体机制及NS5A磷酸化在体内如何影响HCV复制仍不清楚。Amphiphysin II蛋白是一种c-Myc N-末端连接蛋白, 可通过与c-Myc相互作用而抑制与该癌基因相关的细胞癌变。Masumi等^[8]报道在哺乳动物细胞中HCV NS5A可以与人Amphiphysin II蛋白相互作用, 体外实验显示二者间的相互作用可抑制NS5A磷酸化, Amphiphysin II蛋白的SH3(src homology 3)结构域为影响NS5A磷酸化的关键部位。而Amphiphysin II蛋白对NS5A磷酸化的调节进一步如何影响HCV复制尚未见报道。Chen等^[9]报道HCV NS5A可以通过与极体样激酶1(polo-like kinase 1, Plk1)相互作用而调节HCV复制。Plk1是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,

其结构高度保守, 参与细胞周期不同阶段检查点的精密调控, 是维持细胞周期正常运行的一种关键物质. 在HCV复制子细胞及HCV感染细胞中去除Plk1均会减弱HCV RNA复制及非结构蛋白的产生, 然而对宿主细胞生长及细胞周期却无显著影响, 正因为Plk1对HCV复制及宿主细胞生长的这种不同影响, 使其成为抗HCV治疗的另一个潜在靶位. 进一步的体外实验研究显示Plk1可以磷酸化NS5A形成p58及p56两种形式, 而去除Plk1的细胞中p58/p56低于对照组, 提示Plk1作为NS5A的一个磷酸激酶而间接调节HCV RNA复制.

FK506结合蛋白(FK506-binding proteins, FKBP)是免疫抑制剂FK506的受体, 广泛存在于淋巴组织、神经组织、骨骼肌、心脏等多种组织细胞中, 具有免疫抑制、细胞周期调节及通道活性调控等重要的生理功能. Okamoto等^[10]研究发现HCV NS5A可以与FKBP8的TPR结构域结合, 并再与热休克蛋白90(heat shock protein 90, HSP90)形成复合物, 参与HCV复制. 其中NS5A 121位点的缬氨酸或异亮氨酸在与FKBP8的特异性结合中至关重要, 此氨基酸位点在HCV所有基因型中高度保守, 他的变异将明显抑制HCV复制^[11]. 因此, 阻断NS5A 121位氨基酸与FKBP8的TPR结构域的特异性作用可能成为抗HCV治疗的另一个理想靶点. Taguwa等^[12]应用酵母双杂交技术从人类cDNA文库中筛选出一个新的HCV NS5A结合蛋白-hB-ind1(human butyrate-induced transcript 1), 发现其可通过卷曲螺旋结构与不同基因型的NS5A相互作用而促进HCV复制, 并且发现hB-ind1可以与HSP90相互作用, 该作用可进一步被FKBP8的表达而强化, NS5A、FKBP8、hB-ind1及HSP90共同形成复制复合物, 基于HSP90具有分子伴侣活性, 推测hB-ind1通过参与HSP90的分子伴侣通路而在HCV复制复合物的正确折叠方面发挥重要作用. Gonzalez等^[13]应用共焦显微镜技术证实HSP40和HSP70可以与HCV NS5A相互作用, NS5A可增强HCV IRES介导的翻译, 而去除HSP70后这种增强作用被减弱. HSPs合成抑制剂槲皮素(Quercetin)可显著减弱NS5A对HCV复制的增强作用, 此可能与其抑制HSP40及HSP70的作用有关, 提示槲皮素在抗HCV方面有潜在的治疗作用.

亲环素(cyclophilins, CyPs)是一个具高度保守性的多功能蛋白家族, 也是免疫抑制剂环孢素A(cyclosporin A, CsA)的蛋白受体, 除了具

有肽酰-脯氨酰顺-反异构酶(peptidyl-prolyl-cis-trans-isomerase, PPIase)活性外, CyPs还在蛋白折叠、细胞凋亡、信号传导等生物学过程中发挥重要作用. CsA及其衍生物在HCV亚基因组复制子系统中能够抑制HCV复制^[14,15]. 进一步对其受体CyPs的研究中发现CyPs为HCV复制的辅因子, CyPA及CyPB分别被报道可与HCV NS5B相互作用并增强后者的RNA结合活性而促进HCV复制^[16,17], 推测CsA通过与CyPs的竞争性结合而阻断后者对HCV复制的促进作用, 从而发挥抗HCV作用. 但关于何种CyPs在上述过程中起作用目前尚有争论^[16,17]. 进一步阐明CsA抗HCV的作用机制将有助于发现新的治疗靶点及抗HCV新药. Brenndörfer等^[18]研究发现HCV NS3/4A可以通过下调T淋巴细胞蛋白酪氨酸磷酸酶(T cell protein tyrosine phosphatase, TC-PTP)而增强上皮生长因子(epithelial growth factor, EGF)受体/Akt信号通路活性, Akt在维持病毒复制中起着关键作用.

HCV复制需要病毒及宿主的多种因素参与, HCV非结构蛋白通过与宿主蛋白的相互作用来调节HCV复制, 其中NS5A及NS5B的作用尤为受关注, 阐明参与HCV复制的宿主蛋白作用有助于抗HCV新药的研发.

3 HCV非结构蛋白-细胞蛋白相互作用与致癌作用

HCV与肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)关系密切, 但HCV致肝癌的机制至今仍未明了. 目前认为, HCV无逆转录酶活性, 也不与宿主基因整合, 并且其本身没有已知的癌基因. 其致癌作用可能与细胞凋亡受抑、细胞周期改变、肿瘤相关基因的异常表达及细胞信号传导异常等有关, HCV非结构蛋白在其中发挥了一定的作用.

3.1 影响细胞凋亡 细胞凋亡是机体抵抗病毒持续感染和感染扩散的重要防御机制, 对阻止肿瘤的发生、发展有着十分重要的作用. 目前认为有3条通路参与凋亡的发生: 线粒体通路、死亡受体通路和内质网通路, 后者是近年来发现的一条新的细胞凋亡途径. 在这些凋亡途径中, 一系列蛋白酶相继被激活而促进凋亡的发生, 其中含半胱氨酸的天冬氨酸酶(cysteine containing aspartate specific protease, caspase)是细胞凋亡下游的关键酶, 是凋亡执行的重要效应分子. HCV非结构蛋白可与调控细胞凋亡的诸多细胞蛋白相互作用而抑制凋亡的发生.

■ 相关报道

Chen等报道Plk1作为HCV NS5A的一个磷酸激酶可通过与其相互作用而调节HCV复制, 去除Plk1会减弱HCV RNA复制, 而对宿主细胞生长无显著影响. 提示Plk1可能成为抗HCV治疗的一个理想靶点.

■创新盘点

本文从肝炎病毒蛋白与宿主细胞蛋白相互作用的角度综述了HCV非结构蛋白在HCV复制、致癌、干扰素抵抗、糖及脂代谢异常等方面的重要作用。

肝脏特异的促凋亡因子CIDE-B(cell death-inducing DFFA-like effector B)作为CIDE凋亡诱导因子家族中的一员,其C端结构域有很强的细胞凋亡诱导活性,可通过线粒体释放细胞色素C介导的caspase途径引起细胞凋亡。Erdtmann等^[19]应用酵母双杂交方法筛选人肝cDNA文库,发现NS2蛋白可与CIDE-B的凋亡结构域相互作用,从而抑制CIDE-B诱导的细胞凋亡。Kou等^[20]应用谷胱甘肽巯基转移酶(glutathione s-transferase, GST)pull-down实验发现真核细胞延伸因子1A(eukaryotic elongation factor 1A, eEF1A)可与HCV NS4A相互作用,削弱cap依赖的及HCV IRES介导的翻译,并呈剂量依赖关系。eEF1A不仅仅是翻译必需的蛋白,而且是一个重要的多功能蛋白,参与许多重要的细胞过程和疾病。eEF1A被报道与凋亡有关,当eEF1A在细胞中大量存在时,细胞处于凋亡前的状态;而eEF1A缺少时,则处于抗凋亡状态。由此推论,NS4A可能通过与eEF1A相互作用而抑制凋亡。

HCV NS5A可以与磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)相互作用,并增强其催化亚单位的磷酸转移酶活性,进而激活PI3K/Akt/PKB信号通路^[21,22]。PI3K/Akt信号通路被认为是细胞内最重要的生存通路,其最明显的作用是抑制细胞凋亡^[23]。因此NS5A通过与PI3K的作用而最终抑制细胞凋亡,可能与肝癌的发生有一定关系。Bid蛋白是Bcl-2家族中的一个促凋亡蛋白,通过死亡受体途径激活细胞凋亡。卡配因(calpain)是一种细胞内普遍存在的钙依赖性半胱氨酸蛋白酶,可介导细胞凋亡的发生。Simonin等^[24]发现HCV NS5A可以活化calpain,进一步导致Bid蛋白降解,从而抑制死亡受体介导的凋亡信号传导。Peng等^[25]研究发现HCV NS5A可以与细胞蛋白FKBP38相互作用而抑制细胞凋亡。其具体机制为: NS5A可以增加哺乳动物的雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)的两种底物-S6K1及4EBP1的磷酸化水平,提示NS5A可调节mTOR活化,进而通过mTOR通路抑制caspase-3的活化,抑制细胞凋亡。进一步研究显示, NS5A对mTOR的活化及通过mTOR产生的凋亡抑制作用均依赖于NS5A-FKBP38的相互作用。

3.2 调控细胞周期 HCV慢性感染导致肝癌的另一机制是诱发细胞周期阻滞。Yang等^[26]在HCV NS2蛋白对细胞生长和细胞周期进程的影响研究中发现NS2基因稳定表达的细胞株的细胞周

期在S期的比例显著增加,提示NS2蛋白能够阻止细胞周期停留在S期,可能的机制为NS2通过下调周期素A的表达来抑制细胞生长,这有利于HCV复制。Wu等^[27]研究发现表达HCV NS5A蛋白的培养细胞显示出G₂/M细胞周期阻滞及染色体非整倍性,而*aspm*(abnormal spindle-like, microcephaly associated)基因编码的有丝分裂纺锤体蛋白ASPM可减弱这种细胞周期阻滞, NS5A可经由PKR-p38信号通路抑制*aspm*基因的启动子活性而下调ASPM蛋白的表达,从而诱导与肝癌发生相关的异常有丝分裂细胞周期。

毛细血管扩张-共济失调突变(ataxia-telangiectasia mutated, ATM)基因在细胞DNA双链损伤修复时具有启动效应,其编码的ATM蛋白是一种重要的细胞周期检验点激酶,参与磷酸化并激活、调控多种参与细胞周期调控和DNA损伤修复的蛋白,其中包括细胞周期检验点激酶2(checkpoint kinase 2, Chk2)。Ariumi等^[28]发现敲除ATM激酶或Chk2的Huh7细胞中HCV RNA复制明显受到抑制,与此一致的是ATM激酶抑制剂能够抑制HCV RNA复制。进一步研究发现HCV NS3/4A可以与ATM相互作用, NS5B可以与ATM及Chk2相互作用。上述实验结果提示, HCV可能截获ATM与Chk2以参与HCV RNA复制,从而导致细胞DNA损伤修复能力下降。Lai等^[29]亦发现HCV NS3/4A可通过与ATM相互作用使细胞对电离辐射的敏感性增加,损害DNA修复效率。由此,细胞DNA受到损伤时不能得到及时有效的修复,细胞在病理状态下继续增殖分化,最后必然导致细胞的功能和表型的改变,可能是HCV致癌机制之一。

细胞周期素D1(cyclin D1)是细胞周期G₁/S期监控点重要的正向调控因子。cyclin D1与细胞周期依赖性激酶4(cyclin dependent kinase, CDK4)/CDK6结合,使后者激活,活化的CDK4使视网膜母细胞瘤蛋白(retinoblastoma protein, pRb)磷酸化而导致他与转录因子E2F的解离,发挥E2F转录因子的作用,使细胞通路越过G₁期限制点进入S期。Raychaudhuri等^[30]研究发现HCV NS5A可上调cyclin D1及CDK4,进而使RNA聚合酶I的DNA结合转录因子-上游结合因子(upstream binding factor, UBF)高度磷酸化,从而激活rRNA转录, rRNA合成与细胞生长速度密切相关,并且在多种肿瘤中可看到其合成增加。

3.3 影响肿瘤相关基因的表达 肿瘤相关基因包括癌基因、原癌基因、病毒癌基因、肿瘤抑制

基因、肿瘤转移相关基因和肿瘤耐药基因等, 对肿瘤发生、发展、治疗及预后发挥着重要作用. HCV非结构蛋白通过与肿瘤相关基因表达产物的相互作用, 在HCV致癌过程中产生影响.

HCV NS3蛋白可以与人类v-k1-ras2鼠kirsten肉瘤病毒致癌基因同源物(KRAS)蛋白相互作用^[31]. K-ras是活性最强的癌基因之一, 其突变株与17%-25%的人类肿瘤有关, 可能是由于这些激活的K-ras突变株可以通过降低内在GTP酶活性和增强对GAPs的抗性, 导致KRAS大量聚集在活化GTP结合的部位^[32]. Wu等^[33]通过GST pull-down、免疫共沉淀及其焦免疫荧光技术证实HCV NS5B可以与M2型丙酮酸激酶(M2 type pyruvate kinase, M2PK)相互作用. 丙酮酸激酶是糖酵解途径的关键激酶, M2PK在肿瘤细胞中明显过表达, 表现为肿瘤细胞特异性的代谢特征, 因此也称为肿瘤M2型丙酮酸激酶, 因此推测HCV NS5B参与了肝癌细胞的合成.

P53是体内重要的抑癌蛋白, 通过反式激活或抑制下游基因的功能而发挥其生物效应, 是甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)基因表达的主要抑制因子. 细胞增殖抑制基因P21/waf1是P53的下游调控因子, P53基因突变会诱导P21蛋白产生减少, 使细胞周期调节紊乱, 而导致细胞增殖失控, 引起肿瘤发生. Majumder等^[34]报道HCV NS5A能与P53结合形成复合物, 导致P53功能的失活, 从而抑制了P21/waf1的产生, 促成肝细胞癌变. 研究发现非受体蛋白酪氨酸激酶Syk为人乳腺癌的抑癌基因. Inubushi等^[35]应用免疫组织化学方法发现内源性的Syk在正常肝细胞质中呈弥散性表达, 但在HCV感染的肝细胞中位于细胞膜附近呈片状表达, 进而用免疫沉淀法在Huh7细胞中证实NS5A可以与Syk相互作用, 作用位点位于NS5A的N末端1-175氨基酸, NS5A可抑制Syk的酶活性及Syk介导的磷脂酶C-γ1的磷酸化, 提示NS5A可能通过此机制参与肝细胞癌变. pRb是体内一种重要的抑癌蛋白, 是E2F转录因子活性调控和G₁期向S期转化的关键因素. Munakata等^[36]报道HCV NS5B可以与pRb形成复合物, 使pRb降解, 进而使pRb对E2F的抑制作用减弱, 促进细胞周期由G₁期进入S期, 刺激细胞增生. 其进一步研究发现, pRb的降解是通过依赖NS5B的泛素-蛋白酶体通路实现的, 而pRb的依赖NS5B的泛素化作用需要E6相关蛋白(E6-associated protein, E6AP)的泛素连接酶活性, E6AP也可以依赖NS5B的方式与pRb形成复

合物^[37]. 可见HCV NS5B通过下调pRb诱导肝癌的发生.

3.4 作用于细胞信号传导途径 异常的信号传导在肿瘤细胞的发生、生长、分化、存活中起着非常重要的作用. 肿瘤细胞中主要的信号通路包括蛋白酪氨酸激酶(protein-tyrosine kinase, PTK)/Ras/丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路、NF-κB信号通路等. Li等^[38]报道HCV NS4B可通过Ca²⁺信号传导及活性氧的产生以剂量依赖方式活化多功能转化因子NF-κB, 促进NF-κB经由PTK磷酸化作用易位入细胞核. NF-κB可对抗TNF-α诱导的细胞凋亡, 提示NS4B可诱导细胞内的生存信号, 促进细胞无限增殖. Park等^[39]在HCV NS5A对Wnt/β-catenin信号传导通路的影响研究中发现NS5A可与内源性β-catenin直接作用并共定位于胞质中, 通过增强β-catenin的稳定性而增强β-catenin介导的转录活性. Wnt/β-catenin信号传导通路异常具有致癌作用, 参与胃癌、食管癌及肝细胞癌等多种人体恶性肿瘤的形成^[40-42], 提示NS5A可能直接参与Wnt/β-catenin介导的肝细胞癌形成.

4 HCV非结构蛋白-细胞蛋白相互作用与干扰素抵抗

目前丙型肝炎的主要治疗药物是聚乙二醇干扰素(pegylated interferon, Peg-IFN)联合利巴韦林, 在标准治疗方案下约50%的HCV-1型感染者及80%的HCV-2、3型感染者可获得持续病毒学应答^[43]. 研究HCV的IFN耐受机制并阻断其耐受作用, 对于丙型肝炎的有效治疗有重要意义.

IFN活性由Janus激酶-信号传导和转录激活因子(Janus kinase-signal transducer and activators of transcription, JAK-STAT)信号途径所介导. IFN通过和靶细胞的受体结合后, Jak1和Tyk2激酶活化, 进而使STAT1和STAT2磷酸化, 磷酸化的STAT1和STAT2及IFN调节因子9组成异源三聚体复合物, 即干扰素刺激因子3(IFN-stimulated gene factor 3, ISGF3). ISGF3转到细胞核内并与干扰素刺激反应元件(interferon-stimulated response element, ISRE)结合, 从而上调许多IFN刺激基因的表达. 由IFN激活细胞基因编码的抗病毒蛋白包括双链RNA激活的蛋白激酶(double strand RNA activated protein kinase, PKR)、2', 5'-寡聚腺苷酸合成酶(oligoadenylate synthetase, OAS)、Mx蛋白以及磷酸二酯酶. PKR在双链RNA存在下产生自身磷酸化而被激活, 活化的

■应用要点

本文从蛋白质相互作用角度阐述了HCV非结构蛋白的作用及致病机制, 为HCV治疗药物及疫苗预防的研究提供了理论依据.

■同行评价

本文学术较高,有助于读者理解并加深非结构蛋白在病毒复制和感染、病毒慢性感染以及HCV所致HCC中的作用,并对开展抗HCV的新型药物靶点及新型疫苗研制提供了信息。

PKR能够识别真核细胞起始因子-2(eukaryotic initiation factor-2, eIF-2),并使eIF-2的A亚基51位丝氨酸磷酸化,从而阻止病毒复制和蛋白合成。由PKR介导的eIF-2A磷酸化作用在抗病毒过程中具有重要作用,目前研究认为它是病毒发生变异逃避PKR抗病毒作用使其抵抗IFN治疗的主要机制之一。

位于HCV NS5A的第2209-2248位氨基酸序列与其IFN疗效密切相关,称其为干扰素敏感决定区(interferon sensitivity determining region, ISDR), ISDR是PKR结合域的一部分,可与PKR作用而削弱IFN的抗病毒功能^[44]。已有诸多学者进行了ISDR与HCV IFN耐受的相关性研究,有研究提示ISDR与HCV IFN抵抗相关^[45],但也有ISDR与HCV IFN疗效无关的研究报道^[46,47],尤其对欧美国家人群的诸多研究表明了ISDR与HCV耐受IFN无关。总之,目前对于ISDR变异与HCV IFN抵抗之间的关系尚未取得广泛一致的意见。由此,有研究者认为HCV NS5A能以ISDR变异及PKR抑制之外的机制发挥IFN抵抗的作用^[44]。

Taguchi等^[48]采用共聚焦扫描技术发现NS5A和2', 5'-OAS共定位于细胞质中的核周,免疫共沉淀显示NS5A和2', 5'-OAS可形成复合体,NS5A结合部位为氨基末端1/3部分的1-148位氨基酸。当用脑心肌炎病毒作为攻击病毒时,NS5A可削弱IFN的抗病毒作用。NS5A(1-148)ISDR及PKR结合序列缺失,不能通过抑制PKR来削弱IFN抗病毒作用。因此,Taguchi等提出: NS5A能以与2', 5'-OAS相互作用的机制削弱干扰素抗病毒的作用。Lan等^[49]在三个肝细胞来源的细胞系Hep3B、J5和Huh7中应用免疫共沉淀及共聚焦显微镜检查探讨HCV NS5A对IFN- α 信号传导的影响,发现NS5A瞬时或稳定的表达均可抑制STAT1磷酸化,并表现为剂量依赖关系,从而进一步抑制ISGF3的活化及ISRE诱导的基因表达,提示NS5A影响JAK-STAT信号传导途径可能是HCV干扰素抵抗的机制之一。另有研究显示NS5A在Hela细胞中的表达可诱导产生白细胞介素8(interleukin 8, IL-8),从而在体外抑制IFN的活性。同时在临床研究中,亦发现IL-8与HCV的干扰素抵抗有关,获得持续病毒学应答的HCV-1型感染者血清IL-8水平明显低于未获得应答者^[50]。

HCV非结构蛋白中除NS5A与干扰素抵抗的研究较多外,亦有研究发现其他非结构蛋白在HCV IFN抵抗中也起到一定的作用。HCV感染首先由胞质中的RNA解旋酶RIG-I检测到,

之后与定位于线粒体膜的MAVS/IPS-1-1/VISA/Cardif蛋白结合,进而激活IKK- ϵ 激酶,进一步使干扰素调节因子3(interferon regulatory factor-3, IRF-3)和IRF-7磷酸化,IFN的表达受IRFs的调控,其中IRF-3和IRF-7是IFN表达必需的IFN转录因子。NS3/4A可以结合MAVS/IPS-1-1/VISA/Cardif蛋白并使其裂解,从而阻止IRF-3和IRF-7的磷酸化,抑制IFN的合成^[51,52]。表达HCV NS4B的Huh7细胞中IFN- α 诱导的磷酸化STAT1减少,同时,IFN- α 诱导的I型IFN受体的表达水平降低^[53],提示NS4B可能参与HCV的IFN抵抗。

5 HCV非结构蛋白-细胞蛋白相互作用与糖、脂代谢异常

慢性丙型肝炎也是一种代谢性疾病,代谢异常是HCV致病机制的重要组成部分。近年来,流行病学调查表明HCV慢性感染常伴有糖、脂肪代谢性疾病,并已经证实HCV慢性感染与糖尿病和脂肪肝等代谢性疾病的发生密切相关^[54-56],但确切分子机制尚不明确。

胡传翠等^[31]应用酵母双杂交技术从人胰腺细胞cDNA文库中筛选出与HCV 1b亚型NS3蛋白相互作用的结合蛋白的编码基因,并进一步研究其功能,实验中共筛选出能与NS3蛋白相互作用的已知胰腺细胞蛋白基因11种,吴扬等^[57]用同样方法筛选出能与NS2蛋白相互作用的已知胰腺细胞蛋白基因7种,这些蛋白以参与三大物质消化、吸收的酶类为主,其中参与糖、脂类代谢的酶主要有弹性蛋白酶、胰蛋白酶(原)、胰脂肪酶及胰淀粉酶等。推测HCV NS2及NS3蛋白可能与胰腺细胞中的蛋白结合后进一步导致胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)和糖、脂类代谢异常,最终发展为2型糖尿病、脂肪肝、代谢综合征等代谢性疾病。

Oem等^[58]通过固醇调节元件结合蛋白1c(sterol regulatory element-binding protein 1c, SREBP-1c)的启动子-荧光素酶报告基因实验发现NS2蛋白在Huh7细胞中可激活SREBP-1c的转录,NS2蛋白的表达还可以引起脂肪酸合酶(fatty acid synthase, FAS)转录的上调。Park等^[59]发现HCV NS4B能够增强SREBPs的转录活性及SREBPs和FAS的蛋白表达水平,此外,NS4B对HCV核心蛋白介导的SREBP-1转录活性的增强有协同作用。这些结果提示NS2及NS4B通过调节SREBP信号通路在HCV相关的肝脏脂肪变中发挥着重要作用。

6 结论

近年来, 针对HCV非结构蛋白结构与功能的研究进展极快. 不仅非结构蛋白的分子结构已被解析出来, 而且许多重要功能被陆续发现. HCV非结构蛋白通过与细胞蛋白相互作用在病毒自身复制、HCV的持续感染和致癌作用、干扰素抵抗、糖及脂代谢异常等方面发挥着重要作用. 但到目前为止, HCV非结构蛋白与细胞蛋白相互作用的研究多采用将表达病毒蛋白的载体转染入实验所用细胞, 实验所用细胞也多为癌细胞系或永生细胞系, 两者都涉及异常基因表达, 因此与HCV感染体内正常的肝细胞存在差异. 亟待研发建立高效HCV感染的细胞模型与适宜的小动物模型, 对HCV蛋白与细胞蛋白相互作用的深入研究将有助于设计出抗HCV的新型药物, 并为疫苗的研究提供基础.

7 参考文献

- Baldo V, Baldovin T, Trivello R, Floreani A. Epidemiology of HCV infection. *Curr Pharm Des* 2008; 14: 1646-1654
- 张莉莉, 冯国和. 丙型肝炎病毒核心蛋白作用研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2019-2024
- De Francesco R, Migliaccio G. Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature* 2005; 436: 953-960
- Lindenbach BD, Rice CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 2005; 436: 933-938
- Huang Y, Staschke K, De Francesco R, Tan SL. Phosphorylation of hepatitis C virus NS5A non-structural protein: a new paradigm for phosphorylation-dependent viral RNA replication? *Virology* 2007; 364: 1-9
- Sklan EH, Serrano RL, Einav S, Pfeffer SR, Lambright DG, Glenn JS. TBC1D20 is a Rab1 GTPase-activating protein that mediates hepatitis C virus replication. *J Biol Chem* 2007; 282: 36354-36361
- Neddermann P, Quintavalle M, Di Pietro C, Clementi A, Cerretani M, Altamura S, Bartholomew L, De Francesco R. Reduction of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by selective inhibition of cellular kinases activates viral RNA replication in cell culture. *J Virol* 2004; 78: 13306-13314
- Masumi A, Aizaki H, Suzuki T, DuHadaway JB, Prendergast GC, Komuro K, Fukazawa H. Reduction of hepatitis C virus NS5A phosphorylation through its interaction with amphiphysin II. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336: 572-578
- Chen YC, Su WC, Huang JY, Chao TC, Jeng KS, Machida K, Lai MM. Polo-like kinase 1 is involved in hepatitis C virus replication by hyperphosphorylating NS5A. *J Virol* 2010; 84: 7983-7993
- Okamoto T, Nishimura Y, Ichimura T, Suzuki K, Miyamura T, Suzuki T, Moriishi K, Matsuura Y. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *EMBO J* 2006; 25: 5015-5025
- Okamoto T, Omori H, Kaname Y, Abe T, Nishimura Y, Suzuki T, Miyamura T, Yoshimori T, Moriishi K, Matsuura Y. A single-amino-acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. *J Virol* 2008; 82: 3480-3489
- Tagawa S, Okamoto T, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Moriishi K, Matsuura Y. Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *J Virol* 2008; 82: 2631-2641
- Gonzalez O, Fontanes V, Raychaudhuri S, Loo R, Loo J, Arumugaswami V, Sun R, Dasgupta A, French SW. The heat shock protein inhibitor Quercetin attenuates hepatitis C virus production. *Hepatology* 2009; 50: 1756-1764
- Nakagawa M, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe Y, Kanazawa N, Koyama T, Kurosaki M, Maekawa S, Yamashiro T, Chen CH, Itsui Y, Kakinuma S, Watanabe M. Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313: 42-47
- Paeshuyse J, Kaul A, De Clercq E, Rosenwirth B, Dumont JM, Scalfaro P, Bartenschlager R, Neyts J. The non-immunosuppressive cyclosporin DEBIO-025 is a potent inhibitor of hepatitis C virus replication in vitro. *Hepatology* 2006; 43: 761-770
- 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
- Heck JA, Meng X, Frick DN. Cyclophilin B stimulates RNA synthesis by the HCV RNA dependent RNA polymerase. *Biochem Pharmacol* 2009; 77: 1173-1180
- 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
- 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
- Kou YH, Chou SM, Wang YM, Chang YT, Huang SY, Jung MY, Huang YH, Chen MR, Chang MF, Chang SC. Hepatitis C virus NS4A inhibits cap-dependent and the viral IRES-mediated translation through interacting with eukaryotic elongation factor 1A. *J Biomed Sci* 2006; 13: 861-874
- Hu XF, Deng XZ, Diao ZY, Zhang Y, Zhou ZA, Liu Y. [Expression of HCV NS5A gene in HepG2 cell and the effect of the NS5A expression on PI3K in vitro]. *Xibao Yu Fenzi Mianyixue Zazhi* 2007; 23: 1133-1135
- 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
- d'Anglemont de Tassigny A, Berdeaux A, Souktani R, Henry P, Ghaleh B. The volume-sensitive chloride channel inhibitors prevent both contractile dysfunction and apoptosis induced by doxorubicin through PI3kinase, Akt and Erk 1/2. *Eur J Heart Fail* 2008; 10: 39-46
- Simonin Y, Disson O, Lerat H, Antoine E, Binamé F, Rosenberg AR, Desagher S, Lassus P, Bioulac-Sage P, Hibner U. Calpain activation by hepatitis C virus proteins inhibits the extrinsic apoptotic signaling

- pathway. *Hepatology* 2009; 50: 1370-1379
- 25 Peng L, Liang D, Tong W, Li J, Yuan Z. Hepatitis C virus NS5A activates the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway, contributing to cell survival by disrupting the interaction between FKBP38-binding protein 38 (FKBP38) and mTOR. *J Biol Chem* 2010; 285: 20870-20881
- 26 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
- 27 Wu SC, Chang SC, Wu HY, Liao PJ, Chang MF. Hepatitis C virus NS5A protein down-regulates the expression of spindle gene *Aspm* through PKR-p38 signaling pathway. *J Biol Chem* 2008; 283: 29396-29404
- 28 Ariumi Y, Kuroki M, Dansako H, Abe K, Ikeda M, Wakita T, Kato N. The DNA damage sensors ataxia-telangiectasia mutated kinase and checkpoint kinase 2 are required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2008; 82: 9639-9646
- 29 Lai CK, Jeng KS, Machida K, Cheng YS, Lai MM. Hepatitis C virus NS3/4A protein interacts with ATM, impairs DNA repair and enhances sensitivity to ionizing radiation. *Virology* 2008; 370: 295-309
- 30 Raychaudhuri S, Fontanes V, Barat B, Dasgupta A. Activation of ribosomal RNA transcription by hepatitis C virus involves upstream binding factor phosphorylation via induction of cyclin D1. *Cancer Res* 2009; 69: 2057-2064
- 31 胡传翠, 张锦前, 王琦, 李国力, 李朝品, 成军. 酵母双杂交技术筛选人胰腺细胞中HCV 1b NS3结合蛋白基因. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 454-458
- 32 Kranenburg O. The KRAS oncogene: past, present, and future. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1756: 81-82
- 33 Wu X, Zhou Y, Zhang K, Liu Q, Guo D. Isoform-specific interaction of pyruvate kinase with hepatitis C virus NS5B. *FEBS Lett* 2008; 582: 2155-2160
- 34 Majumder M, Ghosh AK, Steele R, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A physically associates with p53 and regulates p21/waf1 gene expression in a p53-dependent manner. *J Virol* 2001; 75: 1401-1407
- 35 Inubushi S, Nagano-Fujii M, Kitayama K, Tanaka M, An C, Yokozaki H, Yamamura H, Nuriya H, Kohara M, Sada K, Hotta H. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with and negatively regulates the non-receptor protein tyrosine kinase Syk. *J Gen Virol* 2008; 89: 1231-1242
- 36 Munakata T, Nakamura M, Liang Y, Li K, Lemon SM. Down-regulation of the retinoblastoma tumor suppressor by the hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 18159-18164
- 37 Munakata T, Liang Y, Kim S, McGivern DR, Huibregtse J, Nomoto A, Lemon SM. Hepatitis C virus induces E6AP-dependent degradation of the retinoblastoma protein. *PLoS Pathog* 2007; 3: 1335-1347
- 38 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
- 39 Park CY, Choi SH, Kang SM, Kang JI, Ahn BY, Kim H, Jung G, Choi KY, Hwang SB. Nonstructural 5A protein activates beta-catenin signaling cascades: implication of hepatitis C virus-induced liver pathogenesis. *J Hepatol* 2009; 51: 853-864
- 40 Oguma K, Oshima H, Aoki M, Uchio R, Naka K, Nakamura S, Hirao A, Saya H, Taketo MM, Oshima M. Activated macrophages promote Wnt signalling through tumour necrosis factor-alpha in gastric tumour cells. *EMBO J* 2008; 27: 1671-1681
- 41 Salahshor S, Naidoo R, Serra S, Shih W, Tsao MS, Chetty R, Woodgett JR. Frequent accumulation of nuclear E-cadherin and alterations in the Wnt signaling pathway in esophageal squamous cell carcinomas. *Mod Pathol* 2008; 21: 271-281
- 42 Lee HH, Uen YH, Tian YF, Sun CS, Sheu MJ, Kuo HT, Koay LB, Lin CY, Tzeng CC, Cheng CJ, Tang LY, Tsai SL, Wang AH. Wnt-1 protein as a prognostic biomarker for hepatitis B-related and hepatitis C-related hepatocellular carcinoma after surgery. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 1562-1569
- 43 Zeuzem S. Interferon-based therapy for chronic hepatitis C: current and future perspectives. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2008; 5: 610-622
- 44 Tan SL, Katze MG. How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology* 2001; 284: 1-12
- 45 Yen YH, Hung CH, Hu TH, Chen CH, Wu CM, Wang JH, Lu SN, Lee CM. Mutations in the interferon sensitivity-determining region (nonstructural 5A amino acid 2209-2248) in patients with hepatitis C-1b infection and correlating response to combined therapy of pegylated interferon and ribavirin. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 72-79
- 46 Kmiecik D, Kruszyna Ł, Migdalski P, Łaciński M, Juszczak J, Trzeciak WH. Mutations within protein kinase R-binding domain of NS5A protein of hepatitis C virus (HCV) and specificity of HCV antibodies in pretreatment sera of HCV-chronically infected patients and their effect on the result of treatment. *Jpn J Infect Dis* 2006; 59: 92-99
- 47 Aslan N, Bozdayi AM, Cetinkaya H, Sarioğlu M, Türkay C, Bozkaya H, Karayalçın S, Yurtaydin C, Uzunalımoğlu O. The mutations in ISDR of NS5A gene are not associated with response to interferon treatment in Turkish patients with chronic hepatitis C virus genotype 1b infection. *Turk J Gastroenterol* 2004; 15: 21-26
- 48 Taguchi T, Nagano-Fujii M, Akutsu M, Kadoya H, Ohgimoto S, Ishido S, Hotta H. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with 2',5'-oligoadenylate synthetase and inhibits antiviral activity of IFN in an IFN sensitivity-determining region-independent manner. *J Gen Virol* 2004; 85: 959-969
- 49 Lan KH, Lan KL, Lee WP, Sheu ML, Chen MY, Lee YL, Yen SH, Chang FY, Lee SD. HCV NS5A inhibits interferon-alpha signaling through suppression of STAT1 phosphorylation in hepatocyte-derived cell lines. *J Hepatol* 2007; 46: 759-767
- 50 Mihm U, Herrmann E, Sarrazin U, von Wagner M, Kronenberger B, Zeuzem S, Sarrazin C. Association of serum interleukin-8 with virologic response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2004; 40: 845-852
- 51 Hiscott J, Lacoste J, Lin R. Recruitment of an interferon molecular signaling complex to the mitochondrial membrane: disruption by hepatitis C virus NS3-4A protease. *Biochem Pharmacol* 2006; 72: 1477-1484
- 52 Li XD, Sun L, Seth RB, Pineda G, Chen ZJ. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to

- evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 17717-17722
- 53 Xu J, Liu S, Xu Y, Tien P, Gao G. Identification of the nonstructural protein 4B of hepatitis C virus as a factor that inhibits the antiviral activity of interferon-alpha. *Virus Res* 2009; 141: 55-62
- 54 张锦前, 范小玲. 慢性丙型肝炎与代谢综合征. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3482-3486
- 55 Jármy K, Karácsony G, Nagy A, Schaff Z. Changes in lipid metabolism in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6422-6428
- 56 Wang CS, Wang ST, Yao WJ, Chang TT, Chou P. Hepatitis C virus infection and the development of type 2 diabetes in a community-based longitudinal study. *Am J Epidemiol* 2007; 166: 196-203
- 57 吴扬, 张锦前, 宁明. 胰腺细胞中与HCV NS2蛋白相互作用蛋白中代谢相关基因的筛选. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 2574-2578
- 58 Oem JK, Jackel-Cram C, Li YP, Zhou Y, Zhong J, Shimano H, Babiuk LA, Liu Q. Activation of sterol regulatory element-binding protein 1c and fatty acid synthase transcription by hepatitis C virus non-structural protein 2. *J Gen Virol* 2008; 89: 1225-1230
- 59 Park CY, Jun HJ, Wakita T, Cheong JH, Hwang SB. Hepatitis C virus nonstructural 4B protein modulates sterol regulatory element-binding protein signaling via the AKT pathway. *J Biol Chem* 2009; 284: 9237-9246

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 ¹ $P < 0.05$, ² $P < 0.01$; 第 3 套为 ³ $P < 0.05$, ⁴ $P < 0.01$. 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/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/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 $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴. (5) 致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.