

- 学病毒学分册 2000;7:123-127
- 5 Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 2002;285:1-24
 - 6 Cooney RN. Suppressors of cytokine signaling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway. *Shock* 2002;17:83-90
 - 7 Schindler CW. Series introduction. JAK-STAT signaling in human disease. *J Clin Invest* 2002;109:1133-1137
 - 8 O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 2002;109(Suppl):S121-131
 - 9 Bhunia AK, Piontek K, Boletta A, Liu L, Qian F, Xu PN, Germino FJ, Germino GG. PKD1 induces p21 (waf1) and regulation of the cell cycle via direct activation of the JAK-STAT signaling pathway in a process requiring PKD2. *Cell* 2002;109:157-168
 - 10 Chen J, Clemens DL, Cederbaum AI, Gao B. Ethanol inhibits the JAK-STAT signaling pathway in freshly isolated rat hepatocytes but not in cultured hepatocytes or HepG2 cells: evidence for a lack of involvement of ethanol metabolism. *Clin Biochem* 2001;34:203-209
 - 11 Leonard WJ. Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction. *Int J Hematol* 2001;73:271-277
 - 12 Basu A, Meyer K, Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus core protein modulates the interferon-induced transacting factors of Jak/Stat signaling pathway but does not affect the activation of downstream IRF-1 or 561 gene. *Virology* 2001;288:379-390
 - 13 Heim MH, Moradpour D, Blum HE. Expression of hepatitis C virus proteins inhibits signal transduction through the Jak-STAT pathway. *J Virol* 1999;73:8469-8475
 - 14 Fredericksen B, Akkaraju GR, Foy E, Wang C, Pflugheber J, Chen ZJ, Gale MJ. Activation of the interferon-beta promoter during hepatitis C virus RNA replication. *Viral Immunol* 2002;15:29-40
 - 15 Pflugheber J, Fredericksen B, Sumpter R J, Wang C, Ware F, Sodora DL, Gale M Jr. Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:4650-4655
 - 16 Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9599-9604
 - 17 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
 - 18 Heim MH. Intracellular signalling and antiviral effects of interferons. *Dig Liver Dis* 2000;32:257-263
 - 19 Larrea E, Alberdi A, Castelruiz Y, Boya P, Civeira MP, Prieto J. Expression of interferon-alpha subtypes in peripheral mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C: a role for interferon-alpha5. *J Viral Hepat* 2001;8:103-110

丙型肝炎病毒与 MAPK 信号转导系统

成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳

成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳, 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 国家自然科学基金资助项目, No. C39970674, C03011402
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2002-10-29 接受日期: 2002-11-18

成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 丙型肝炎病毒与 MAPK 信号转导系统. 世界华人消化杂志 2003;11(4):466-469
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/466.htm>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)是一种正链 RNA 病毒, 其致病机制与 DNA 病毒和逆转录病毒有明显的区别^[1]. 在病毒的生活周期中, HCV 基因组编码多种结构和非结构蛋白, 自身结合形成同二聚体形式, 或与其他 HCV 病毒蛋白、细胞蛋白结合形成异二聚体, 甚至是多聚体形式在肝细胞内存在^[2]. 另外, 不同的磷酸化形式, 还可以发生细胞内转位, 对细胞的功能与调节产生影响. 在肝细胞质、细胞核中的 HCV 蛋白对肝细胞正常的信号转导通路进行干扰, 这是 HCV 致病机制的重要组成部分^[3]. 丝裂原激活蛋白激酶/细胞外信号调节激酶(MAPK/ERK)及其介导的细胞内信号转导是 HCV 蛋白作用的重要靶位, 了解 HCV 蛋白对 MAPK 信号转导通路的影响, 对于 HCV 慢性感染的形成, 甚至是 HCV 相关的肝细胞癌(HCC)的发生机制的研究具有重要意义^[4].

1 HCV 的包膜蛋白与 MAPK 信号转导

关于 HCV 受体的研究目前还没有定论, HCV 受体究竟是单一受体, 还是象人免疫缺陷病毒-1(HIV-1)那样具有主要受体和辅助受体目前尚不清楚^[5]. 目前的研究焦点是 CD81 低密度脂蛋白受体(LDL-R)等. 在四跨膜分子 CD81、CD81 分子在人肝细胞等细胞膜的表面表达, 这种蛋白与细胞内信号转导过程有关. 最近的研究结果表明人细胞膜上 CD81 的表达与 HCV 包膜糖蛋白 E2 及其进入肝细胞中的过程有关^[6]. 因此, CD81 分子作为 HCV 感染肝细胞的受体分子而得到广泛的关注. HCV E2-CD81 分子之间的相互作用与 HCV 感染及其致病机制密切相关, MAPK/ERK 与细胞的增生和组织的增生过程密切相关. 为了研究 HCV 对于 MAPK/ERK 的调节, Zhao et al^[7]应用人肝癌细胞系 HepG2 进行了研究. CD81 在 HepG2 细胞膜表面有一定水平的表达, 通过流式细胞学的免疫荧光技术的检测得到了证实. HepG2 细胞以不含胎牛血清(FCS)的 DMEM 培养基培养, 7 h 后, 以 HCV E2 蛋白处理不同的时间. 细胞内 MAPK/ERK 的状态以 Western blot 杂交、免疫组织化学和免疫荧光技术进行研究. HepG2 细胞中 MAPK/ERK 蛋白在受到 HCV E2 蛋白的刺激以后发生磷酸化修饰, 而且 MAPK/ERK 的磷酸化与作用的 HCV E2 蛋白的浓度有关, 是一种剂量和时间依赖性的效应. MAPK/ERK 在 HepG2 受到 HCV E2 蛋白的刺激后被激活, 表明 HCV E2-CD81 作用参与了细胞内信号转导, 可能在 HCV 感染的致病过程中发挥重要作用.

2 HCV 核心蛋白与 MAPK 信号转导

为了研究 HCV 的恶性转化作用, Tsuchihara et al^[8]建立了稳定表达 HCV 核心蛋白的 BALB/3T3 A31-I-1 细胞系, 这一细胞系在受到 HCV 核心蛋白与 v-H-ras 的基因共转染时, 就失去生长接触抑制, 发生形态学改变, 呈现非贴壁生长, 而且出现非血清依赖性生长的特点. 表

达 HCV 核心蛋白的细胞系在受到生长因子的刺激以后, 生长速度显著加快. 另外, 以人工合成的反义寡聚脱氧核糖核苷酸(ODN)阻断细胞中 HCV 核心基因的表达, 对于其生长具有一定的抑制作用. HCV 核心蛋白可激活 MAPK 和血清应答元件(SRE).

HCV 的基因分型和 HCV 核心蛋白的一级结构序列对于其功能也具有十分重要的意义. Giambartolomei et al^[9]研究证实 HCV 基因型 1a 和 3 的核心蛋白对于 MEK1 和 Erk1/2 MAPK 都有激活作用, HCV 核心蛋白持续表达可产生 Raf1 和 MAPKK 高基础水平的表达, 这种现象可以通过内源性 Raf1 活性的体外分析及高度磷酸化的 Erk1 和 Erk2 的水平检测而得到证实, 甚至在血清饥饿状态下也存在这种现象. Erk1/2 及其下游转录因子 Elk-1 的激活的时间在细胞受到 EGF 的刺激以后显著延长. 尽管存在 MAP 磷酸酶 MKP 的反馈调节, 表达 HCV 核心蛋白的细胞在受到 EGF 的刺激后这种激活仍然存在, 可能与 Raf-1 的持续激活有关. HCV 核心蛋白对于 MAPK 激酶链具有直接的激活作用, 这也是 HCV 核心蛋白对细胞具有转化作用的机制之一. Erhardt et al^[10]建立了四环素控制的表达全长(191 aa)或部分序列(160 aa)的 HepG2 细胞系. 发现 HCV 核心蛋白可以激活细胞外信号调节激酶(ERK)、c-jun N-末端激酶(JNK)、p38 丝裂原激活蛋白(MAP)激酶、诱导 MAP 激酶磷酸酶 MKP-1 的表达, 并促进细胞的增生. 同时伴有 c-Jun 和 ATF-2 的激活, 但没有 Elk-1 和 c-Fos 的激活. 另外, AP-1 的激活过程与 c-Fos 的状态无关. 全长或截短型 HCV 核心蛋白具有相似的作用.

HCV 核心蛋白对于细胞凋亡具有促进和抑制的双向调节作用, 主要决定于诱导细胞的刺激因素和当时细胞所处的状态有关. Takamatsu et al^[11]研究了 HCV 核心蛋白对血清饥饿诱导的细胞凋亡的影响进行了研究. 稳定表达 HCV 核心蛋白的 NIH 3T3 细胞系对于血清饥饿诱导的细胞凋亡具有一定的抑制作用. 但 p53、p21Waf1 和 Bax 在血清饥饿诱导后都有诱导性表达, 与 HCV 核心蛋白是否表达无关. 表明这种情况下的细胞凋亡是 p53 非依赖性的. 不表达 HCV 核心蛋白的细胞系, 细胞受到血清饥饿后诱导的细胞凋亡可由 p38/MAPK 的特异性抑制剂 SB203 580 部分逆转, 但在表达 HCV 核心蛋白的细胞系中没有阻断作用. 血清饥饿激活的 p38 MAPK, 在表达 HCV 核心蛋白的细胞系中, 其磷酸化形式的蛋白水平有显著下降. 表明 HCV 核心蛋白对于血清饥饿诱导的细胞凋亡具有抑制作用, 而且这种抑制作用是 p38 MAPK 激活依赖性的.

MAPK 信号转导系统在细胞的增生、恶性转化和应急应答的调节中具有重要作用. HCV 核心蛋白具有潜在的致癌作用, 但机制目前还不十分清楚. MAPK 细胞外信号调节激酶(ERK)的激酶(MEK)-ERK 信号转导途径及其下游的靶基因, 即血清应答元件(SRE), 在 BALB/3T3 表达 HCV 核心蛋白时被激活. 为了阐明 HCV 核心蛋白激活 MEK-ERK 途径的机制, Fukuda et al^[12]以 HCV 核心蛋白

瞬时转染几种不同的细胞系, 并应用 Gal4-Elk1 萤虫素酶报告基因表达载体. 体外 MAPK 的 Western blotting 杂交分析对其信号转导途径进行了研究. 发现存在有丝分裂原的刺激时, HCV 核心蛋白可增强 MEK 下游的 Elk1 的激活, 而对 ERK 活性及 Elk1 的磷酸化没有影响. 研究结果表明 HCV 核心蛋白可通过经典的磷酸化修饰链激活 Elk1. 说明 HCV 感染是引起肝细胞发生恶性转化的可能机制之一.

HCV 感染与 HCC 有关, 而 HCC 的发生与 MAPK/ERK 信号转导途径有关, 因此 Hayashi et al^[13]研究了 HCV 核心蛋白对于 MAPK/ERK 级联反应的影响. HCV 核心蛋白可显著激活 MAPK/ERK 的级联反应, 包括 Elk1. HCV 核心蛋白单独情况下就可以激活 MAPK/ERK. 有趣的是, Elk-1 的活性在受到促癌因子 12-O-十四酰佛波醇-13-乙酸酯(TPA)的作用下进一步升高, 但表达 HCV 核心蛋白的 NIH 3T3 和 HepG2 细胞受到 EGF 和 TGF 的刺激后, 没有进一步的升高. HCV 核心蛋白对 MAPK/ERK 的激活作用, 当被 MEK1 特异性抑制剂 PD98 059 阻断. 这些研究结果表明, HCV 核心蛋白激活 ERK 是肝细胞有丝分裂原介导的信号非依赖性的, 但与 TPA 有协同作用. HCV 核心蛋白可能存在对 MEK1 的调节作用, 或者对更为上游的信号转导环节产生影响.

在针对病原体的早期免疫应答过程中有补体成分的参与, 补体成分在清除病原体感染宿主血清中的抗原的过程中具有十分重要的作用. Yao et al^[14]研究表明 HCV 核心蛋白在 HCV 感染的初期首先表达, 并且在 HCV 感染宿主的血液循环中存在, 通过与补体受体的结合, 即 C1q 受体球状位点(gC1qR)的结合, 抑制 T 细胞的增生反应. 为了研究 HCV 核心蛋白与 C1qR 相互作用及其对 T 细胞增生的抑制作用及机制, 研究了 HCV 核心蛋白对于 T 细胞激活早期事件的影响. 发现 HCV 核心蛋白抑制 ERK 和丝裂原激活 ERK 激酶(MEK)蛋白的磷酸化. HCV 核心蛋白对于 ERK/MEK MAPK 的干扰, 造成了白介素-2(IL-2)和白介素-2受体(IL-2R)基因转录水平的下降, 最终造成 IL-2 的产生以及高亲和力 IL-2R 的表达水平的下降. 抗-gC1qR 抗体可以逆转 HCV 核心蛋白对 ERK/MEK 磷酸化水平的影响, 说明 HCV 核心蛋白和 gC1qR 与 ERK/MEK MAPK 的激活有关. 表明 HCV 核心蛋白可通过补体依赖性的调节途径阻断 T 细胞激活的细胞内事件, 在 HCV 慢性感染的形成过程中发挥重要作用.

3 HCV 非结构蛋白 NS3 与 MAPK 信号转导

慢性丙型肝炎发病机制中氧化应激产生的活性氧(ROS)发挥一定的作用. 吞噬细胞及激活的巨噬细胞释放的 ROS 是主要氧化应激产物的来源. 但是 HCV 蛋白作用于单个核细胞后产生活性氧的情况目前还不十分清楚. Bureau et al^[15]对于 HCV 刺激的单个核细胞产生活性氧的情况进行了研究. 健康正常人的外周血单个核细胞 PBMC 受到 HCV

的核心蛋白、NS3、NS4、NS5蛋白刺激以后,以化学发光技术对于产生的ROS进行了测定.发现只有NS3蛋白可以触发PBMC产生ROS,主要包括阴性氧离子. PBMC受到NS3刺激以后,出现快速而短暂的细胞内钙水平的升高.应用不同的代谢抑制剂,证实ROS的产生需要钙离子的流入,以及酪氨酸激酶以及应急激活蛋白激酶p38的参与.发现p47 (PHOX)发生磷酸化和细胞内转位,表明在这一过程中有NADPH氧化酶的参与. NS3对于佛波12-肉豆蔻酸-13乙酸盐(PMA)诱导的氧化爆发(oxidative burst)具有抑制作用. 研究结果表明HCV NS3蛋白可激活NADPH氧化酶,调节ROS的产生,在HCV感染的发病机制中具有一定作用.

4 HCV非结构蛋白NS5A与MAPK信号转导

丙型肝炎病毒NS5A蛋白对于PKR具有抑制作用. PKR所介导的IFN抗病毒作用部分地通过抑制eIF2的磷酸化,进而抑制mRNA翻译而实现的. He et al [16]研究了HCV NS5A蛋白对PKR mRNA翻译过程的抑制作用. 痘苗病毒载体VVE3L表达的蛋白是一种很强的抑制因子. 以IFN预处理表达缺陷型基因的VVDeltaE3L HeLa S3细胞,PKR和eIF2的磷酸化水平都显著升高.当表达NS5A蛋白VVNS5A的细胞系受到IFN刺激时,PKR和eIF2的磷酸化水平出现瞬时下降. 表达VVDeltaE3L的细胞系受到IFN的刺激以后,p38 MAPK活性升高,符合其位于PKR信号转导的下游的事实. 另外观察到这些细胞中eIF4E的磷酸化水平升高,这是p38下游的信号转导环节. 在VVNS5A感染的细胞系中这些调节作用都有不同程度的下降. NS5A还具有抑制表达NS5A蛋白受到表皮生长因子(EGF)激活时的p38-eIF4E磷酸化. NS5A诱导的eIF2和eIF4E磷酸化可能在调节mRNA翻译过程中有矛盾. 事实上表达VVNS5A的细胞系受到IFN的刺激以后,只是部分短暂地回复VVDeltaE3L细胞与病毒的mRNA翻译过程. 综上所述,NS5A作为一种PKR的抑制物,在总体上具有维持HCV感染早期mRNA翻译水平的功能,而感染晚期更使HCV mRNA适合帽状结构非依赖性的翻译过程.

在细胞内,HCV NS5A蛋白可在细胞丝氨酸/苏氨酸激酶的催化作用下发生磷酸化. 为了确定NS5A蛋白在细胞内磷酸化的位点,Reed et al [17]以同位素标记HCV-H NS5A的磷酸化多肽,进行纯化,对于磷酸化氨基酸残基位点进行分析,并通过Edman降解法证实. 发现HCV-H NS5A蛋白磷酸化的位点是Ser(2321). 这一磷酸化位点的确定,得到了另外2种方法研究结果的证实. 如对Ser(2321)突变为Ala,磷酸化蛋白修饰立即消失,对合成多肽片段的磷酸化修饰研究结果进行分析,证实NS5A蛋白的磷酸化修饰位点为Ser(2321). 对NS5A的Ser(2321)位点进行定点诱变,表明NS5A蛋白的磷酸化修饰是NS4A和PKR结合非依赖性的. NS5A蛋白富含脯氨酸的位点恰好位于Ser(2321)的周围,如PLPPRS(2321)PPVPPR,表明细胞内脯

氨酸特异性激酶是HCV NS5A磷酸化的激酶类型,这与以前以蛋白激酶抑制剂研究的结果是一致的.

NS5A蛋白分子结构中存在几个富含脯氨酸(proline-rich)的序列结构,与SH3结合位点结构一致,提示在信号转导的调节过程中具有十分重要的作用. NS5A可以与Grb2接头蛋白(adaptor protein)结合. Tan et al [18]以抗-Grb2抗体的免疫印迹分析结果表明,从表达HCV NS5A蛋白的HeLa S3细胞来源的免疫复合物,发现了NS5Ae可与Grb2结合. Grb2蛋白N-末端SH3结构域的突变明显影响与NS5A蛋白之间的结合,但C-末端的SH3位点的基因突变则影响不大. Grb2分子中2个位点同时突变则造成Grb2与NS5A蛋白之间的结合完全消失,说明Grb2蛋白分子中的这2个SH3结构域在与NS5A蛋白的结合过程中具有协同作用. NS5A的突变分析结果表明,富含脯氨酸的SH3结合区在所有基因型的HCV病毒株都是保守的[19,20]. NS5A蛋白在细胞内的表达抑制HeLa S3细胞中ERK1/2的磷酸化. 稳定表达NS5A蛋白的HeLa细胞在受到EGF的刺激后ERK1/2不发生磷酸化. 在这些细胞受到EGF的刺激后发生NS5A与Grb2蛋白之间的结合. 因此,NS5A可能是通过与选择性接头蛋白的结合干扰Grb2介导的信号转导.

5 参考文献

- 1 成军,杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第1版:人民军医出版社,1997:83-103
- 2 李克,王琳,成军,陆荫英,洪源,刘妍,张玲霞. 丙型肝炎病毒蛋白结合蛋白. 世界华人消化杂志 2002;10:215-217
- 3 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 4 成军,李克,陆荫英,董菁,李莉,王琳,钟彦伟. 丙型肝炎病毒调节基因区结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:223-225
- 5 陆荫英,李克,刘妍,王琳,成军,张玲霞. 乙型及丙型肝炎病毒受体的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:211-213
- 6 成军,张玲霞. CD81分子的生物学功能. 国外医学免疫学分册 2000;23:322-324
- 7 Zhao LJ, Liu HQ, Cao J, Feng GS, Qi ZT. Activation of intracellular MAPK/ERK initiated by hepatitis C virus envelope protein E2 in HepG2 cells. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao* 2001;33:691-692
- 8 Tsuchihara K, Hijikata M, Fukuda K, Kuroki T, Yamamoto N, Shimotohno K. Hepatitis C virus core protein regulates cell growth and signal transduction pathway transmitting growth stimuli. *Virology* 1999;258:100-106
- 9 Giambartolomei S, Covone F, Levrero M, Balsano C. Sustained activation of the Raf/MEK/Erk pathway in response to EGF in stable cell lines expressing the Hepatitis C Virus (HCV) core protein. *Oncogene* 2001;20:2606-2610
- 10 Erhardt A, Hassan M, Heintges T, Haussinger D. Hepatitis C virus core protein induces cell proliferation and activates ERK, JNK, and p38 MAP kinases together with the MAP kinase phosphatase MKP-1 in a HepG2 Tet-Off cell line. *Virology* 2002;292:272-284
- 11 Takamatsu M, Fujita T, Hotta H. Suppression of serum starvation-induced apoptosis by hepatitis C virus core protein. *Kobe J Med Sci* 2001;47:97-112
- 12 Fukuda K, Tsuchihara K, Hijikata M, Nishiguchi S, Kuroki T, Shimotohno K. Hepatitis C virus core protein enhances the activation of the transcription factor, Elk1, in response to mitogenic stimuli. *Hepatology* 2001;33:159-165
- 13 Hayashi J, Aoki H, Kajino K, Moriyama M, Arakawa Y, Hino O. Hepatitis C virus core protein activates the MAPK/ERK cascade synergistically with tumor promoter TPA, but not with epidermal growth factor or transforming growth factor alpha. *Hepatology* 2000;32:958-961

- 14 Yao ZQ, Nguyen DT, Hiotellis AI, Hahn YS. Hepatitis C virus core protein inhibits human T lymphocyte responses by a complement-dependent regulatory pathway. *J Immunol* 2001;167:5264-5272
- 15 Bureau C, Bernad J, Chaouche N, Orfila C, Beraud M, Gonindard C, Alric L, Vinel JP, Pipy B. Nonstructural 3 protein of hepatitis C virus triggers an oxidative burst in human monocytes via activation of NADPH oxidase. *J Biol Chem* 2001;276:23077-23083
- 16 He Y, Tan SL, Tareen SU, Vijaysri S, Langland JO, Jacobs BL, Katze MG. Regulation of mRNA translation and cellular signaling by hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *J Virol* 2001;75:5090-5098
- 17 Reed KE, Rice CM. Identification of the major phosphorylation site of the hepatitis C virus H strain NS5A protein as serine 2321. *J Biol Chem* 1999;274:28011-28018
- 18 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 USA* 1999;96:5533-5538
- 19 成军,陈菊梅. 丙型肝炎病毒NS5A蛋白的生物学调节作用. 国外医学微生物学分册 2001;24:12-14
- 20 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

肿瘤抑制因子 p21/waf1 与肝炎病毒复制与表达的调节研究

成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳

成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳,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
国家自然科学基金资助项目, No. C39970674, C03011402
项目负责人:成军,100039,北京市西四环中路100号,中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心,全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn
电话:010-66933391 传真:010-63801283
收稿日期:2002-10-29 接受日期:2002-11-18

成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳. 肿瘤抑制因子p21/waf1与肝炎病毒复制与表达的调节研究. 世界华人消化杂志 2003;11(4):469-471
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/469.htm>

0 引言

作为一种肿瘤抑制基因, p21/waf1 在细胞周期、细胞凋亡、信号转导以及癌变中具有十分重要的调节作用^[1]. 肝炎病毒,特别是乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)的感染,不仅引起急性和慢性病毒性肝炎,而且与肝纤维化、肝细胞癌(HCC)的发生、发展密切相关^[2]. 这些肝炎病毒感染靶细胞之后,在细胞内对于细胞正常的调节机制产生严重干扰,这是肝炎病毒致病的分子生物学机制的重要组成部分^[3]. 其中,肝炎病毒蛋白对于 p21/waf1 的异常调节具有十分重要的生物学和医学意义.

1 肝炎病毒蛋白与 p21/waf1 调节的相关性

肝炎病毒蛋白与 p21/waf1 调节之间的相关性已经积累了丰富的资料. 目前认为,细胞周期调节紊乱是HCC发生的重

要机制,但是,肝炎病毒对于细胞周期调节的影响目前还不清楚. Choi et al^[4]对于 HCC 组织中细胞周期素 D1、细胞周期素 E、p53、p27、p21/waf1、p16、Rb 和增生细胞核抗原(PCNA)蛋白的表达进行免疫组织化学研究,表明细胞周期素 D1 过表达与肿瘤进展到晚期、低度分化、肿瘤大小、微血管浸润、肝脏内转移、缺乏肿瘤包膜形成、浸润性生长、p53 表达异常、PCNA 表达水平升高等有关. 异常的 p53 表达与低分化程度有关. 细胞周期素 D1 或 p53 表达异常在异常增生中没有见到. 其中 p21/waf1 的调节异常值得重视. Crary et al^[5]应用免疫组织化学研究结果表明, p21/waf1 表达与肝细胞 Ki-67 这种肝细胞增生标志物和组织病理学特征相关. 正常的肝组织和非酒精性脂肪肝炎(NASH)组织中很少表达 p21/waf1 和 Ki-67 蛋白,在酒精性肝炎肝组织中 p21/waf1 表达水平升高,但 Ki-67 表达水平不变. 慢性丙型肝炎肝组织中 p21/waf1 的表达与 Ki-67 的表达以及炎症、纤维化程度显著相关. 说明肝脏炎症显著上调 p21/waf1 的表达,而且表达水平与疾病严重程度相关. Shi et al^[6]也发现 HCC 组织中出现 p53 相关的 p21/waf1 的表达水平改变.

肝炎病毒蛋白对于 p21/waf1 的影响,不仅表现在蛋白水平上,而且在转录水平上也有反应. Han et al^[7]对于表达 HBxAg 的细胞系进行了 588 个细胞基因的表达谱型基因芯片的分析,发现 2 个癌基因(IGFR-2, RhoA)、1 个细胞周期调节基因(p55CDC)、3 个细胞内信号转导相关基因(凝血酶受体, MLK-3, MacMARCKS),1 个应急应答蛋白基因(HSP27)、2 个细胞凋亡应答基因(FAST 激酶, Bak),1 个转录因子基因(p21/waf1)表达上调;而 1 个转录因子基因(转录延长因子 SII),2 个生长因子基因(单核细胞趋化蛋白 1, T-淋巴细胞分泌蛋白 I-309)显著下调.

关于肝炎病毒蛋白对于 p21/waf1 表达调节的研究结果也有不同的研究报道. Park et al^[8]研究发现 HBxAg 对肝细胞基因表达具有调节作用,改变了肝细胞对细胞凋亡刺激信号的敏感性,对肝细胞的生长阻滞进行异常调节. 对 p53 基因突变的肝癌细胞系 Hep3B 进行研究,稳定或瞬时表达 HBxAg 的肝癌细胞系 p21/waf1 的 mRNA 和蛋白表达水平上升,与细胞周期素依赖性激酶 2(CDK2)的结合能力提高,显著抑制细胞周期素 E-CDK2 相关的组蛋白 H1 的磷酸化修饰,增强 p21/waf1 基因启动子的表达活性. p21/waf1 基因启动子序列缺失突变研究结果表明,HBxAg 应答元件位于 p21/waf1 基因启动子序列转录起始位点上游,即 -1 185-1 482 nt 之间. 启动子序列的突变分析发现 HBxAg 应答元件与转录因子 ETS 结合位点相邻. 研究发现 HBxAg 可以克服 p53 的缺失,对其下游的信号转导系统产生影响,直接导致 p21/waf1 基因转录的激活. 提示 p21/waf1 抑制剂的开发在肝细胞癌的治疗中具有很大潜力,特别是在 p53 基因突变,有 HBV 感染时尤其如此. Su et al^[9]的研究发现黄曲霉毒素 B1(AFB1)与 HBV 感染在 p21/waf1 表达调节中具有协同作用.