

- 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<sup>[1]</sup>. 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<sup>[2]</sup>. 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<sup>[3]</sup>. 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<sup>[4]</sup>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<sup>[5]</sup>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<sup>[6]</sup>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<sup>[7]</sup>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<sup>[8]</sup>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<sup>[9]</sup>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.

实验中 52.9% 的树驹发生 HCC, 而单纯感染 HBV 和单纯摄入 AFB1 的动物发生 HCC 分别只有 11.1% 和 15.8%, 对照组没有发现 HCC. 肝组织中胰岛素样生长因子 - II (IGF-II) 的表达率分别为 82.4%、22.2%、26.3% 和 0, 有显著差异. p21/waf1 的表达分别为 29.4%、11.1%、15.8% 和 0, HBxAg 的表达在联合组也高于单纯 HBV 组 (52.9% 对 11.1%). 这些基因的过表达与 HCC 发生有关. 表明 p21/waf1 表达在 HBV 和 AFB1 协同诱发 HCC 中具有重要作用.

## 2 肝炎病毒蛋白结构及其对 p21/waf1 调节的影响

肝炎病毒蛋白的结构性质和特点是其调节 p21/waf1 表达的重要基础. HCV 核心蛋白对于 p21/waf1 基因表达具有直接的抑制作用. Jung et al [10] 研究了 HCV 核心蛋白对 p21/waf1 启动子活性的抑制作用. HCV 核心蛋白 N- 端部分缺失几乎完全失去 p21/waf1 启动子活性的抑制作用, 进一步研究表明 HCV 核心蛋白 84-191 aa 是其抑制 p21/waf1 表达的功能结构域. HCV 核心蛋白突变体 S99L 对 p21/waf1 基因的抑制作用与野生型基本相同, S116I 或 S116A 突变则导致 HCV 核心蛋白的抑制作用完全消失. S116D 突变体的抑制作用与野生型相似, 表明酸性的天门冬氨酸残基可以模拟磷酸化的效果. 当以蛋白激酶 A (PKA) 的抑制剂 H-89 进行处理时, HCV 核心蛋白的抑制作用呈现剂量依赖性的降低, 在浓度为 5  $\mu\text{mg/L}$  时完全阻断. 相反, 以 PKA 的激活剂二丁酰 - cAMP 作用时, HCV 核心蛋白的抑制作用显著升高, 表明 HCV 核心蛋白对 p21/waf1 的抑制作用是通过 PKA 对其 S116 的磷酸化修饰来调节的. Wang et al [11] 应用谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST) 的 pull-down 分析, 证实 HCV 核心蛋白与 p21/waf1 可以形成复合物. 缺失定位分析结果表明, HCV 核心蛋白 N- 末端的 (24-52 aa) 和 p21/waf1 的 C- 末端的 (139-164 aa) 是这一复合物形成关键的结构基础. p21/waf1 蛋白在 147、149、150 等这些与 PCNA 结合相关的位点上发生突变, 并不影响与 HCV 核心蛋白的结合, 提示 p21/waf1 蛋白与 HCV 核心蛋白、PCNA 的结合结构基础截然不同. 由于与 p21/waf1 结合的位点十分接近, HCV 核心蛋白与 PCNA 蛋白之间存在与 p21/waf1 蛋白结合的竞争性抑制现象.

Suzuki et al [12] 研究证实 HCV 核心蛋白是遍在蛋白 - 蛋白复合物降解途径作用的靶蛋白. 首先, HCV 核心蛋白的 C- 末端疏水区是代谢不稳定区, 与蛋白体抑制物共同孵育可以显著增加这种蛋白的积聚. 其次, 体内遍在蛋白化分析结果表明, 遍在蛋白的多个链上都有 HCV 核心蛋白的结合. 相反, 虽然稳定的 HCV 核心蛋白也可以遍在蛋白化, 但是只有单个或少数的遍在蛋白的结合位点. 因此, HCV 核心蛋白 C- 末端的遍在蛋白化影响 HCV 核心蛋白的代谢, 以进行调节.

## 3 肝炎病毒蛋白对 p21/WAF1 调节的 p53 蛋白的依赖性在正常的细胞信号转导过程中, p21/waf1 是 p53 蛋白调节作

用下游的一种靶分子. 因此, 肝炎病毒蛋白对于 p21/waf1 的调节可能会与 p53 蛋白的调节作用有关. Ahn et al [13] 研究了 HBxAg 蛋白对于 p21/waf1 的调节作用及其与 p53 蛋白之间的相互关系. HBxAg 是 HBV 引起 HCC 的主要因素, 在 HBxAg 的转基因小鼠模型中得到证实, 主要机制就是对一系列病毒和细胞的启动子序列的反式激活作用. 我们的研究证实表达 HBxAg 的细胞系的 p21/waf1 RNA 表达水平降低, 调节机制是对 p21/waf1 基因转录水平的抑制, 而且是 p53 依赖性的. 在 p21/waf1 基因的启动子序列中存在 Sp1 的结合位点, 因此推测 HBxAg 通过 Sp1 对 p21/waf1 基因表达进行负调节. 因为肿瘤抑制基因 p21/waf1 编码产物的表达在多种类型的组织和细胞中都存在, 而且是细胞周期素 - CDK 复合物和 DNA 合成的抑制剂, 诱导细胞在 G1 - S 检验点进入阻滞状态, 因此 HBxAg 对于 p21/waf1 的调节在 HBV 引起的 HCC 中具有十分重要的地位和作用.

丙型肝炎病毒蛋白对于 p21/waf1 的调节作用也与 p53 蛋白密切相关. Ray et al [14] 应用 NIH3T3、HepG2、HeLa 细胞系的体外瞬时表达系统分别证实 HCV 核心蛋白对于 p21/waf1 基因启动子的表达具有显著的抑制作用. p21/waf1 基因启动子序列缺失突变分析表明 HCV 核心蛋白应答区位于 p53 结合位点. 凝胶迟滞分析表明 HCV 核心蛋白与 p21/waf1 基因启动子序列没有直接结合的功能. 因此, 认为 HCV 核心蛋白促进细胞增生的作用, 是通过未知细胞蛋白因子对 p21/waf1 转录激活抑制而实现的. Otsuka et al [15] 对于 HCV 各种蛋白对 p53 基因表达活性的影响进行了研究, 发现只有核心蛋白提高 p53 和 p21/waf1 的表达水平, 而后者是 p53 主要的作用靶蛋白. 以电泳泳动度迁移率分析 (EMSA) 法证实 HCV 核心蛋白不仅提高 p53 蛋白的 DNA 结合功能, 而且以启动子的报告基因技术证实核心蛋白对于 p53 基因的转录水平也有显著的增强作用. 在 GST 融合蛋白分析结果中发现, HCV 核心蛋白 C- 末端可以与 p53 直接结合, 另外 HCV 核心蛋白与 Htaf (II) 28 这种转录因子复合体的成分进行结合, 这些结果表明 HCV 核心蛋白与 p53 可以结合, 而且对于 p53 依赖性启动子的转录活性具有显著的调节作用. Lu et al [16] 研究证实 HCV 核心蛋白可以提高 p53 基因的转录水平, 不管这种 p53 基因是内源性的还是外源性的. HCV 核心蛋白对于 p53 基因的这种调节作用, 也得到 HCV 核心蛋白可以提高 p53 作用下游靶基因 p21/waf1 表达水平的佐证. HCV 核心蛋白通过对 p53 的调节来显著抑制肝癌细胞系的生长. 体外免疫共沉淀技术、GST pull-down 技术、Far-Western blot 分析技术等证实 HCV 核心蛋白和 p53 可以结合, 缺失作图分析证实 p53 蛋白 C- 末端部分 (366-380 aa) 是其与核心蛋白结合的位点. 研究结果提示 HCV 核心蛋白可能通过直接的物理结合激活 p53. HCV 核心蛋白对 p53 蛋白的持续激活是慢性 HCV 感染致病机制的重要组成部分.

Kwun et al [17] 研究, 证实 NS3 蛋白对于 p21/waf1 的

基因表达具有特异性的、剂量依赖性的抑制作用. 这种抑制作用是细胞类型非依赖性的, 而且与 HCV 核心蛋白具有协同作用. 当 p21/waf1 启动子序列中 p53 结合位点被缺失以后, NS3 蛋白对于 p21/waf1 启动子的抑制作用则完全消失, 提示 NS3 蛋白对于 p21/waf1 启动子活性的抑制作用是 p53 依赖性的. 另外, NS3 蛋白对于具有 p53 结合位点的其他启动子也具有抑制作用. 尽管 NS3 对于 p21/waf1 调节的功能域位于蛋白酶结构位点, 但是蛋白酶活性并不是其抑制作用所必须的. NS3 蛋白对于 p53 的基因转录和蛋白的稳定性都没有显著的影响, 因此推测 NS3 对于 p21/waf1 基因启动子序列的调节是通过 NS3 蛋白 -p53 蛋白之间的相互作用实现的. 表达 NS3 蛋白的 NIH 3T3 细胞系生长速度至少是母本细胞生长速度的 2 倍. 说明 NS3 蛋白对于 p21/waf1 蛋白的抑制作用可以促进细胞的增生. HCV NS5A 蛋白是一种磷酸化的蛋白, 与哺乳动物细胞中数种蛋白具有结合作用, 为了研究这种结合的生物学意义, Arima et al<sup>[18]</sup>建立了 5 种四环素控制表达 HCV NS5A 蛋白的小鼠、人细胞系, 表达 NS5A 的这些细胞系均表现出生长迟滞现象, 细胞周期分析结果表明, 表达 NS5A 的人上皮细胞 S 的细胞比例下降, G2/M 期细胞比例上升, 可由 p53 依赖性的 p21/waf1 蛋白和 mRNA 表达水平的降低来解释. HCV NS5A 在体内和体外都能与 CDK1 结合, 在表达 NS5A 蛋白的细胞系中, 相当数量的 p21/waf1 与 CDK2 结合成复合物形式. CDK1 和细胞周期素 B1 蛋白表达水平也有相应下降, 与 G2/M 期细胞比例上升一致, 这些研究结果表明, NS5A 造成的细胞生长抑制和细胞周期调节异常, 主要是通过对 CDK1/2- 细胞周期素复合物的调节实现的. HCV NS5A 蛋白促进细胞生长, 在转录水平上影响 p53 信号转导系统下游分子 p21/waf1 启动子表达活性, Majumder et al<sup>[19]</sup>对于 NS5A 介导的 p21/waf1 基因转录水平抑制的机制进行了研究. 通过应用 p53 野生型(+ / +)纯合子缺失突变型(- / -)细胞系的研究, 发现 NS5A 蛋白对 p21/waf1 基因转录的抑制是 p53 依赖性的, 不仅如此, HCV NS5A 蛋白对于含有多个 p53 结合位点的人工合成的启动子指导的报告基因表达载体(PG13-LUC)的表达活性也具有显著的抑制作用. 以 pull-down 技术、体外免疫共沉淀技术和哺乳动物细胞双杂交技术证实 NS5A 与 p53 蛋白之间存在物理性结合. 共聚焦显微镜技术发现 p53 与 NS5A 蛋白在 HepG2 和 Saos-2 细胞中结合, 共同存在. 因此, 认为 NS5A 和 p53 之间的相互作用, 是 NS5A 蛋白对于 p21/waf1 基因表达活性进行调节, 进而引起 HCC 的重要机制之一.

Ghosh et al<sup>[20]</sup>应用酵母双杂交技术证实 NS5A 与新型转录因子蛋白 SRCAP C- 末端序列结合, 这种结合也得到了哺乳动物细胞双杂交技术、体外 pull-down 技术以及体外免疫共沉淀技术等证实. 体外瞬时转染证实 SRCAP 可有效激活转录. SRCAP 增强 NS5A 蛋白的对 p21/waf1 启动子的转录抑制作用增强. NS5A 和 SRCAP 的

调节作用可能是 HCV 感染致病机制的重要组成部分.

#### 4 参考文献

- 1 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学, 第1版. 北京人民军医出版社, 1997:83-130
- 2 成军, 朱传琳. 丙型肝炎病毒感染慢性化的分子生物学机制. 国外医学病毒学分册 2000;7:29-32
- 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 Choi YL, Park SH, Jang JJ, Park CK. Expression of the G1-S modulators in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma and dysplastic nodule: association of cyclin D1 and p53 proteins with the progression of hepatocellular carcinoma. *J Korean Med Sci* 2001;16:424-432
- 5 Crary GS, Albrecht JH. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in human liver. *Hepatology* 1998;28:738-743
- 6 Shi YZ, Hui AM, Takayama T, Li X, Cui X, Makuuchi M. Reduced p21(WAF1/CIP1) protein expression is predominantly related to altered p53 in hepatocellular carcinomas. *Br J Cancer* 2000;83:50-55
- 7 Han J, Yoo HY, Choi BH, Rho HM. Selective transcriptional regulations in the human liver cell by hepatitis B viral X protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;272:525-530
- 8 Park US, Park SK, Lee YI, Park TG. Hepatitis B virus-X protein upregulates the expression of p21waf1/cip1 and prolongs G1>S transition via a p53-independent pathway in human hepatoma cells. *Oncogene* 2000;19:3384-3394
- 9 Su JJ, Qin GZ, Yan RQ, Huang DR, Yang C, Lotslikar PD. The expression of insulin-like growth factor II, hepatitis B virus X antigen and p21 in experimental hepatocarcinogenesis in tree shrews. *Ann Acad Med Singapore* 1999;28:62-66
- 10 Jung EY, Lee MN, Yang HY, Yu D, Jang KL. The repressive activity of hepatitis C virus core protein on the transcription of p21(waf1) is regulated by protein kinase A-mediated phosphorylation. *Virus Res* 2001;79:109-115
- 11 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
- 12 Suzuki R, Tamura K, Li J, Ishii K, Matsuura Y, Miyamura T. Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus. *Virology* 2001;280:301-309
- 13 Ahn JY, Chung EY, Kwun HJ, Jang KL. Transcriptional repression of p21 (waf1) promoter by hepatitis B virus X protein via a p53-independent pathway. *Gene* 2001;275:163-168
- 14 Ray RB, Steele R, Meyer K, Ray R. Hepatitis C virus core protein represses p21WAF1/Cip1/Sid1 promoter activity. *Gene* 1998;208:331-336
- 15 Otsuka M, Kato N, Lan K, Yoshida H, Kato J, Goto T, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus core protein enhances p53 function through augmentation of DNA binding affinity and transcriptional ability. *J Biol Chem* 2000;275:34122-34130
- 16 Lu W, Lo SY, Chen M, Wu K, Fung YK, Ou JH. Activation of p53 tumor suppressor by hepatitis C virus core protein. *Virology* 1999;264:134-141
- 17 Kwun HJ, Jung EY, Ahn JY, Lee MN, Jang KL. P53-dependent transcriptional repression of p21 (waf1) by hepatitis C virus NS3. *J Gen Virol* 2001;82:2235-2241
- 18 Arima N, Kao CY, Licht T, Padmanabhan R, Sasaguri Y, Padmanabhan R. Modulation of cell growth by the hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *J Biol Chem* 2001;276:12675-12684
- 19 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
- 20 Ghosh AK, Majumder M, Steele R, Yaciuk P, Chrivia J, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates transcription through a novel cellular transcription factor SRCAP. *J Biol Chem* 2000;275:7184-7188