

## 乙型肝炎病毒对c-fos基因表达调节的影响

党晓燕, 成军, 邓红

党晓燕, 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  
邓红, 西安交通大学第二医院传染科 陕西省西安市 710004  
国家自然科学基金资助项目, No. C39970674, No. C03011402  
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

党晓燕, 成军, 邓红. 乙型肝炎病毒对c-fos基因表达调节的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(4):938-940

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/938.asp>

### 0 引言

癌基因(oncogene)是一类编码关键性调控蛋白的正常细胞基因, 在正常情况下, 不表达或只有有限表达, 又称原癌基因(proto-oncogene). 当受到理化等因素刺激时, 他们可以异常表达, 导致细胞的增生、分化或癌变. 众所周知, 乙型肝炎病毒(HBV)不仅可引起急慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化和肝细胞癌(HCC)的发生及发展密切相关. 许多实验已证实肝细胞癌变过程涉及多种原癌基因的激活和突变, 其中HBV对原癌基因c-fos的激活及表达调节也越来越受到关注. 通过对HBV与c-fos之间表达调节的阐述, 有助于进一步了解HBV导致HCC的分子学机制.

### 1 c-fos 结构、功能及激活过程

c-fos原癌基因是最主要的即刻早期癌基因家族成员之一, 包括fra-1、fra-2、fosB的多基因家族中的一种. 单独的c-fos基因对细胞的生长、分化可能不起主要作用. 当细胞受到外界刺激时, 数十分钟即开始表达产物为55 kDa的c-Fos蛋白, 数十小时恢复至正常, 其存在于胎肝及中枢神经系统中, 半衰期短, 只有2 h. 表达的c-Fos蛋白立即转位至核内, 与另一种原癌基因c-jun的表达产物c-Jun核蛋白通过亮氨酸拉链形式形成Fos-Jun异源二聚体, 即构成特异的RNA多聚酶II转录因子激活蛋白-1(activation protein-1, AP-1)<sup>[1-7]</sup>, 他可存在于不同细胞类型中, 许多不同基因的调节区域都存在AP-1的结合位点. 但c-Fos蛋白自身不能形成同源二聚体, 也不能单独与AP-1结合位点结合. AP-1参与大量的生物过程包括细胞分化、增生、凋亡和致癌性转化. AP-1与DNA结合作为转录活化因子参与转录机制, 进一步激活目的基因的表达. 因此c-fos具有信号系统的特征, 可能参与胞质与胞核的信息传递.

c-fos基因能否参与转录和表达受多种因素制约, 不但受细胞内环境的影响, 还要受细胞外传递信号的

刺激, 从而引起c-fos表达的增强或抑制. c-fos基因启动子区有3个主要转录调控元素: cAMP反应元素(cAMP-response element, CRE)、血清反应元素(serum response element, SRE)及sis诱导元素(sis-inducible element, SRE). 上述元素的协同作用, 对c-fos基因在体内的正确表达起重要的调控作用.

c-Fos蛋白作为AP-1的成分, 被认为是参与细胞分裂, 分化以及转化的一种重要分子. 除了正常的促进细胞发育和生长外, c-Fos蛋白还通过抗增生而参与细胞的凋亡及细胞损伤的反应. 在c-fos和c-Jun的DNA结合域涉及额外的转录后调节, 即为半胱氨酸残基氧化作用的减少, 后者可能对DNA的连接有利. 在AP-1的功能调节过程中c-fos和c-Jun的磷酸化和去磷酸化作为翻译后调节具有重要的作用. 而且c-fos的C末端的磷酸化对负向自动调节和转化是重要的<sup>[8-9]</sup>.

c-fos基因可作为第三信使, 将外界刺激引起的第二信使介导的短时程信号, 在基因表达上转换为长时程信号. 研究证实至少有3种明确的第二信使能激活c-fos, 即甘油二酯(DG)依赖的蛋白激酶C(PKC), cAMP和钙调蛋白复合物(Ca<sup>2+</sup>-CaM). 报道称细胞因子、激素等刺激物作为第一信使作用于胞膜上的受体, 激活膜内第二信使, 后者在转而激活即刻早期基因(IEG)的转录, 该转录生成的mRNA逸出胞核至胞质, 翻译成fos、jun等核磷蛋白, 二者结合形成异源二聚体AP-1重新转位至核内, 结合到靶基因的DNA调节区, 进而调节靶基因表达和转录速率, 发生信使作用. 另有数据表明Stat3的磷酸化在HCC发生机制中可能是一个早期事件, 其激活了c-fos和c-jun基因, 或许有助于肝细胞的恶性变.

### 2 乙型肝炎病毒对c-fos基因表达的调节

原癌基因的表达与整合的DNA在肝细胞癌中要比正常肝脏中高的多. 由于HBV并非致癌病毒, 在感染肝细胞中无直接致癌作用, 甚至无致细胞病变效应, HBV的具有反式激活作用的蛋白可能参与转录的激活和调节过程, 刺激癌基因的激活和肝细胞的转化.

2.1 HBx对c-fos基因表达的调节 HBV编码一个16.5 kDa的蛋白称为X抗原<sup>[10]</sup>, 主要定位于胞质内, 且仅仅在胞质内发挥反式调节作用. 他可调节转录、细胞周期、增生、凋亡和DNA修复等多种宿主功能<sup>[11-13]</sup>. 虽然HBx不直接结合于双链DNA, 但核内的HBx可由结合于数个转录因子而被激活<sup>[14]</sup>, 而胞质内的成分触发了细胞间的信号路径<sup>[15]</sup>. HBx的激活定位于与特异的转录因子AP-1的结合位点. Murakami et al报道X序列即使切去了顶端, 仍保留他的反式激活功能, 表明了HBx介导的反式激活作用的重要性<sup>[16]</sup>. HBx在缺乏相应激活子的情况下不能激活DNA元件, 他需要有力的激活域以共转录. 一系列微弱的酸性激活域, 包括c-Jun激活域、c-fos激活域的两个亚区域对HBx的作用是不起作用的,

表明了HBx的效果不依赖于酸性激活域的酸性序列. 研究表明HBx能够刺激大量增强子-启动子单位的转录, 比如c-fos、c-Jun. 在X蛋白存在的情况下, c-fos、c-Jun基因可更好的表达.

转基因鼠实验表明HBx与HCC的发生机制直接相关<sup>[17]</sup>. HBx单独并不导致肿瘤形成, 但可以下调细胞进程而最终导致肝癌. Murakami et al报道HBx通过细胞间调节信号转导路径, 尤其是蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)<sup>[6]</sup>, Janus激酶(janus kinase)、JAK/转录信号转导子与激活子(signal transducers and activators of transcription, STAT)<sup>[18]</sup>、Src<sup>[19]</sup>及Ras信号<sup>[20-22]</sup>来间接激活c-fos转录. 胞质内HBx激活了Ras导致了Raf和丝分裂素激活蛋白激酶(MAPK)<sup>[15]</sup>, 引起Ras-Raf-MAPK级联反应, 介导c-fos的重新合成. 而且, Raf的接触突变体可阻止HBx的诱导基因c-fos. MAPK家族为丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)蛋白激酶, 他的激活需要分子中的酪氨酸(Tyr)和苏氨酸(Thr)同时磷酸化. MAPK被激活后致c-fos磷酸化, 以调节基因的转录和mRNA的翻译, 使细胞由G0期进入到G1期. 细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERKs)属于MAPK的一组成员, 研究表明ERKs在Ras依赖的路径中介导c-fos基因的激活<sup>[23-24]</sup>. 在分化的和分化差的肝细胞系中HBx均能快速激活丝分裂素激活蛋白激酶(MAPK)的ERK成分. 各种各样的Ras/MAPK信号级联激活ERK, 进一步触发了AP-1的诱导. Henkler et al<sup>[25]</sup>同样报道ERK/MAPK对c-fos的表达是重要的, ERK/MAPK的永久性阻滞可导致AP-1活动的降低. 然而ERK/MAPK暂时的抑制并不丧失AP-1的激活, 表明了HBx能通过另一种机制激活AP-1. 另有报道称HBx或作用于线粒体或作用于内质网或结合于二者触发Ca<sup>2+</sup>进入胞质. Ca<sup>2+</sup>短暂释放导致了脯氨酸富集的酪氨酸激酶2(Pyk2)的激活, Pyk2激酶结合且激活Src家族激酶. 激活的Src激酶通过促进与Shc和生长因子结合蛋白(Grb2)相关联而刺激Ras, 激活的Ras通过Raf有丝分裂原激活的蛋白激酶途径导致核内转录因子的激活, 如激活c-fos, 最终导致AP-1的激活. Balsano et al通过发现HBV X蛋白反式激活内源性c-fos和染色体外转染的c-fos调节序列<sup>[26]</sup>而证实c-fos在致癌机制的可能作用.

2.2 HBs对c-fos基因表达的调节 前-S2/S和前-S1均是潜在的反式激活子. HBV前-S/S区对c-fos具有反式激活作用. Beasley et al<sup>[27]</sup>报道HBsAg血清阳性的患者比HBsAg血清阴性的患者发生HCC要高100倍的风险. 在HCC组织中原癌基因的表达比正常肝脏显示出较高水平且与HBV DNA整合. 整合S蛋白的表达在HCC中或许激活了c-fos. Lauer et al<sup>[28]</sup>研究表明HBs的反式激活需要羧基末端截断而产生反式激活功能结合AP-1, HBs基因的截断发生在219-645核苷酸, HBV截短的S蛋白直接结合于转录因子结合位点而激活数个细胞和病毒启动子. 共转染实验证实HBV主要表面抗原的

3'-末端(S区域的426-855核苷酸)是X启动子-增强子调节元件的反式激活子. 以前实验发现HBV主要表面基因的3'-末端, 即636-746核苷酸在HCC组织中频繁的发现. Lauer et al<sup>[29]</sup>发现3'-端缺失羧基端的中等表面基因(前-S2/St)具有反式激活功能, 前-S2/St能够激活人癌基因c-fos的启动子.

### 3 参考文献

- 1 Twu JS, Schloemer RH. Transcriptional trans-activating function of hepatitis B virus. *J Virol* 1987;61:3448-3453
- 2 Spandau DF, Lee CH. Trans-activation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein. *J Virol* 1988;62:427-434
- 3 Zahm P, Hofschneider PH, Koshy R. The HBV X-ORF encodes a transactivator: a potential factor in viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 1988;3:169-177
- 4 Seto E, Mitchell PJ, Yen TS. Transactivation by the hepatitis B virus X protein depends on AP-2 and other transcription factors. *Nature* 1990;344:72-74
- 5 Twu JS, Lai MY, Chen DS, Robinson WS. Activation of protooncogene c-jun by the X protein of hepatitis B virus. *Virology* 1993;192:346-350
- 6 Kekule AS, Lauer U, Weiss L, Luber B, Hofschneider PH. Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumour promoter signalling pathway. *Nature* 1993;361:742-745
- 7 Natoli G, Avantiaggiati ML, Chirillo P, Costanzo A, Artini M, Balsano C, Levrero M. Induction of the DNA-binding activity of c-jun/c-fos heterodimers by the hepatitis B virus transactivator pX. *Mol Cell Biol* 1994;14:989-998
- 8 Ofir R, Dwarki VJ, Rashid D, Verma IM. Phosphorylation of the C terminus of Fos protein is required for transcriptional transrepression of the c-fos promoter. *Nature* 1990;348:80-82
- 9 Tratner I, Ofir R, Verma IM. Alteration of a cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation site in the c-Fos protein augments its transforming potential. *Mol Cell Biol* 1992;12:998-1006
- 10 Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature* 1985;317:489-495
- 11 Andrisani OM, Barnabas S. The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis. *Int J Oncol* 1999;15:373-379
- 12 Arbuthnot P, Capovilla A, Kew M. Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:357-368
- 13 Koike K, Takada S. Biochemistry and functions of hepatitis B virus X protein. *Intervirology* 1995;38:89-99
- 14 Maguire HF, Hoeffler JP, Siddiqui A. HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions. *Science* 1991;252:842-844
- 15 Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10350-10354
- 16 Murakami S. Hepatitis B virus X protein: structure, function and biology. *Intervirology* 1999;42:81-99
- 17 Kim CM, Koike K, Saito I, Miyamura T, Jay G. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 1991;351:317-320
- 18 Lee YH, Yun Y. HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling. *J Biol Chem* 1998;273:25510-25515
- 19 Klein NP, Schneider RJ. Activation of Src family kinases by hepatitis B virus HBx protein and coupled signaling to Ras. *Mol Cell Biol* 1997;17:6427-6436
- 20 Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein deregulates cell cycle checkpoint controls. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:11215-11219
- 21 Benn J, Su F, Doria M, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein induces transcription factor AP-1 by activation of extracellular signal-regulated and c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinases. *J Virol* 1996;70:4978-4985

- 22 Krajcsi P, Wold WS. Viral proteins that regulate cellular signaling. *J Gen Virol* 1998;79(Pt 6):1323-1335
- 23 Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* 1993; 7:2135-2148
- 24 Westwick JK, Cox AD, Der CJ, Cobb MH, Hibi M, Karin M, Brenner DA. Oncogenic Ras activates c-Jun via a separate pathway from the activation of extracellular signal-regulated kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:6030-6034
- 25 Henkler F, Lopes AR, Jones M, Koshy R. Erk-independent partial activation of AP-1 sites by the hepatitis B virus HBx protein. *J Gen Virol* 1998;79(Pt 11):2737-2742
- 26 Balsano C, Avantaggiati ML, Natoli G, De Marzio E, Will H, Perricaudet M, Levrero M. Full-length and truncated versions of the hepatitis B virus (HBV) X protein (pX) transactivate the cmyc protooncogene at the transcriptional level. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;176:985-992
- 27 Beasley RP. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1988;61:1942-1956
- 28 Lauer U, Weiss L, Hofschneider PH, Kekule AS. The hepatitis B virus pre-S/S(t) transactivator is generated by 3' truncations within a defined region of the S gene. *J Virol* 1992;66: 5284-5289
- 29 Lauer U, Weiss L, Lipp M, Hofschneider PH, Kekule AS. The hepatitis B virus preS2/St transactivator utilizes AP-1 and other transcription factors for transactivation. *Hepatology* 1994;19:23-31

## 丙型肝炎病毒核心蛋白与白介素-2启动子的调节

刘敏, 成军, 张树林

刘敏, 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  
张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061  
国家自然科学基金项目, No. C03011402, No. C39900130, 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

刘敏, 成军, 张树林. 丙型肝炎病毒核心蛋白与白介素-2启动子的调节. 世界华人消化杂志 2004;12(4):940-943

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/940.asp>

### 0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)持续感染, 增加了肝纤维化和肝细胞癌(HCC)的危险性, 其机制与HCV引起机体免疫调节障碍有关. HCV基因表达产物中, 高度保守的HCV核心(core)蛋白具有免疫调节功能. 辅助性T细胞产生白介素(IL-2), HCV患者IL-2表达分泌异常, 与痊愈有明显相关性. 研究表明HCV核心蛋白具有转录激活IL-2启动子的作用, 本文对此方面的研究作一综述.

### 1 HCV核心蛋白具有免疫调节功能

HCV感染是一个严重的影响人类健康的世界性问题. 80%的HCV感染慢性化, 且容易进展为肝硬化、HCC<sup>[1]</sup>. HCV不但感染肝细胞还能感染免疫细胞, 如巨噬细胞, B细胞和T细胞, 且具有改变免疫细胞功能的作用<sup>[2-4]</sup>. HCV RNA基因大约9.5 kb长, 编码一个长的多聚蛋白. 通过蛋白分解过程这个多聚蛋白可产生10个不同的结构和非结构蛋白. 结构蛋白核心蛋白和包膜蛋白E1、E2糖蛋白位于多聚蛋白的N-端部分, 在RNA复制中非结构(NS)蛋白在多聚蛋白的剩余部分. HCV基因产物中, 高度保守的HCV核心蛋白具有免疫调节功能<sup>[5-6]</sup>.

由于HCV仅感染人和黑猩猩, 且在细胞培养不能有效复制, 评价各个HCV编码蛋白在HCV感染过程中调节宿主免疫反应的能力比较困难. 因此, 许多的调控研究都是应用分子生物学技术, 在细胞系水平上进行的. 将重组痘苗病毒感染鼠表达HCV基因可作为一种方法评价特有的HCV多肽可能的免疫调节作用<sup>[7-8]</sup>. Large et al<sup>[9]</sup>运用此方法研究认为HCV感染早期阶段首先产生HCV核心蛋白, HCV核心蛋白通过抑制抗病毒的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)抑制宿主免疫反应. 核心蛋白的转基因鼠研究显示, T淋巴细胞反应, 包括干扰素 $\gamma$ (IFN $\gamma$ )和IL-2分泌表达, 与对照比较明显被抑制. HCV核心蛋白转基因鼠肝门束可见与血清谷丙转氨酶(ALT)升高相关的明显的淋巴细胞浸润. HCV核心蛋白编码转基因鼠的肝组织改变与慢性HCV感染的患者相似, 转基因鼠病灶也聚集在肝门和小叶. 非转基因同窝出生鼠和HCV核心蛋白转基因鼠生育的Fas缺陷Ipr鼠未见肝内淋巴细胞或肝损害. 推测T淋巴细胞的抑制也许增加外周血T淋巴细胞对Fas介导的凋亡的敏感性, T淋巴细胞核心蛋白表达对引起免疫调节障碍, 凋亡淋巴细胞在肝脏积聚和随后的肝脏损害起关键性作用<sup>[10]</sup>.

尽管中和性抗体提供保护性免疫, 大多数病毒感染通过CTL介导的免疫反应清除<sup>[11-12]</sup>. 但推测除了CTL的溶解, 抗病毒的细胞因子对于HCV感染的清除也很重要<sup>[13]</sup>. 抗病毒的细胞因子与I型免疫反应相关. HCV感染患者有明显的细胞因子增生. 急性HCV感染1型细胞因子IFN $\gamma$ 和IL-2分泌与痊愈有明显相关性<sup>[14]</sup>. 1型细胞因子见于HCV阳性健康人, 而2型细胞因子增生见于慢性HCV患者<sup>[15]</sup>. 体液免疫和细胞免疫的平衡由多种细胞因子调节. 辅助性T细胞产生的IL-2是一种T细胞特有的丝分裂素和分化因子<sup>[16]</sup>. 细胞因子反应的改变与HCV持续感染有关, 增加了肝纤维化和HCC的危险性. 研究HCV引起机体免疫调节障碍是有效的HCV治疗的关键.

### 2 IL-2启动子的转录调节机制

休眠状态的T细胞活化需要两种不同的信号. 第一种信号来自于T细胞抗原受体(TCR)识别抗原多肽和抗原呈