

· 综述 ·

丙型肝炎病毒非结构蛋白NS5A反式调节蛋白9的研究进展

周利 成军

【摘要】 HCV NS5A反式调节蛋白9 (NS5ATP9), 是一种增殖细胞核抗原结合因子, 在生物体内参与多种功能, 如细胞增殖、分化、凋亡及DNA复制、损伤修复和信号转导等, 在肿瘤的发生发展中也起着一定作用。本文将对NS5ATP9的前期研究进行总结, 以利于后期对其作用机制和其他功能进行深入探究。

【关键词】 HCV NS5A反式调节蛋白9; 增殖细胞核抗原; 肝纤维化; 自噬; 抑癌基因

The progress of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A trans-regulated protein 9 (NS5ATP9)

Zhou Li, Cheng Jun. Peking University Ditan Teaching Hospital; Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University; Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Beijing 100015, China

Corresponding author: Cheng Jun, Email: chengj0817@sina.cn

【Abstract】 Hepatitis C virus nonstructural protein NS5A trans-regulated protein 9 (NS5ATP9) is a proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-binding protein, which plays a functional role in many aspects of the organisms, such as cell growth, differentiation, apoptosis; DNA duplication and repair, signal transmission and so on. It also takes part in the tumorigenesis and development. This review summarized the previous understanding of NS5ATP9, which may be in favour of deciphering its regulatory mechanisms and other functions in later study.

【Key words】 NS5A trans-regulated protein 9 (NS5ATP9); Proliferating cell nuclear antigen (PCNA); Liver fibrosis; Autophagy; Cancer suppressor gene

一、NS5ATP9的发现及命名

HCV基因组由约9.6 kb的核苷酸构成单一开放读码框, 编码3 010~3 033个氨基酸残基。蛋白前体可裂解加工为10种结构蛋白和非结构蛋白。其中非结构蛋白NS5A具有多种生物学功能, 不仅参与HCV多种蛋白的成熟、RNA的复制, 同时NS5A还是一种作用很强的转录激活因子, 能影响细胞信号转导途径, 激活多种病毒及细胞基因启动子, 调节细胞生长、凋亡、免疫和代谢等功能, 能够下调干扰素的抗病毒作用, 推测NS5A可能与HCV感染后原发性肝癌有关, 而NS5A抑制剂具有很强的抗病毒作用, 新型药物Daclatasvir和Ledipasvir等近年来备受人们关注, 其疗效已在II~III期临床试验中得到验证。

NS5ATP9是李强等^[1]利用抑制性消减杂交技

术, 构建HCV NS5A反式激活基因差异表达的cDNA消减文库时, 发现的一个功能未知新基因, 命名为NS5ATP9, 其核苷酸序列在GenBank中收录号为AF529370。该基因定位于15q22.1, 全长336 bp, 编码111个氨基酸残基。在NCBI的基因数据库中还有其他命名, 最早命名为KIAA0101, 是2001年Yu等^[2]通过酵母双杂交技术筛选出来的与增殖细胞核抗原 (proliferation cell nuclear antigen, PCNA) 相结合的蛋白, 称为PCNA相关蛋白 (PCNA-associated factor, PAF), 因其蛋白分子量大小为15 kDa故又命名为p15 (PAF)。Mizutani等^[3]利用基因芯片技术研究发现了NS5ATP9在间质性甲状腺癌中高表达, 这是一种与间质性甲状腺癌有关的新型基因, 将其命名为OEATC-1 (overexpressed in anaplastic thyroid carcinoma-1)。Petroziello等^[4]利用抑制性消减杂交技术结合生物信息学表达阵列技术发现了19个之前未报道的非小细胞肺癌相关基因, 分别命名为L1~L19, 其中L5即NS5ATP9。

二、NS5ATP9的结构特点及分布

NS5ATP9同其他增殖细胞核抗原结合蛋白一样,

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2015.04.003

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 81470863); 北京市医院管理局重点医学专业发展计划 (扬帆计划/肝炎专业) (No. ZYLX201402)

作者单位: 100015 北京, 北京大学北京地坛医院教学医院; 首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所; 新发突发传染病研究北京市重点实验室

通讯作者: 成军, Email: chengj0817@sina.cn

含有谷氨酰胺, 甲硫氨酸/异亮氨酸/亮氨酸, 苯丙氨酸3个高度保守序列构成的模体PIP盒, 通过瞬时转染技术和免疫沉淀技术证实, 其与PCNA结合过程中PIP盒必不可少; 而且NS5ATP9和p21与增殖细胞核抗原结合存在竞争关系^[2]。在正常组织中NS5ATP9分布存在特异性, 在肝脏、胰腺和胎盘中高表达, 在心脏和成人脑中检测不到^[2]。在多数肿瘤组织中NS5ATP9呈高表达, 如间质性甲状腺癌^[3]、非小细胞肺癌^[4]、肝癌^[5-6]、胃癌^[7]、原发性肺癌^[8]和乳腺癌^[9]等, 并且与肿瘤的预后密切相关, 而在结肠癌、胰腺癌中呈低表达^[2]。NS5ATP9的亚细胞主要定位于细胞浆的线粒体和细胞核内^[9], 在核内和线粒体的分布比率因不同细胞种类而不同。

三、NS5ATP9的表达调控

巨立中等^[10]应用生物信息学技术推测NS5ATP9起始密码子ATG上游661 bp核苷酸序列存在真核生物启动子元件TATA盒, 并成功验证该序列具有指导转录的活性。该课题组用噬菌体展示技术分析筛选出与NS5ATP9启动子DNA结合的蛋白包括: 补体C3、人血清白蛋白、人核糖体蛋白20S、 α 1微球蛋白和甲胎蛋白等, 提示NS5ATP9基因的转录调节机制较为复杂^[11]。在以往研究发现HCV NS5A能上调NS5ATP9的表达的基础上, Li等^[12]进一步应用噬菌体展示技术和凝胶电泳迁移率实验显示NS5A可以通过NF- κ B与NS5ATP9启动子结合发挥调节作用。此外雌激素、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等能下调NS5ATP9的表达, 而紫外线(ultraviolet ray, UV)、E2F和四甲基对苯醌可以使其表达上调。

PCNA为DNA聚合酶 δ 的辅助蛋白, 在细胞增殖的启动上起重要作用。有研究显示, UV照射前, NS5ATP9主要分布在线粒体, UV照射后NS5ATP9逐渐向核内分布, 当其在核内分布达到高峰时, p53也处于最大激活状态, NS5ATP9和PCNA、p33ING1b共定位现象显著增加^[13]。Turchi等^[14]进一步阐明了在紫外照射DNA损伤时, ATF3的表达被抑制, 直接反射性的调节NS5ATP9, 使其表达代偿性增加, 这一机制主要受Rb/E2F调节^[15], 当Rb/E2F抑制G1向S期的转换作用丧失后, NS5ATP9表达增加, 从而促进DNA合成和S期进展。蛋白的泛素化修饰是DNA损伤和修复过程的重要机制, Povlsen等^[16]研究显示NS5ATP9的动态泛素化在保证DNA的完整性中起重要作用。当DNA损伤后不能及时、正确的修复, DNA的复制、转录过程就会出现异常, 甚至导致疾病的发生。

四、NS5ATP9的功能探索

李强等^[17]应用表达谱芯片技术筛选NS5ATP9反式调节基因, 筛选出的差异表达的基因涉及细胞信号传导、炎症反应、肿瘤的发生、能量代谢和免疫调节等生物过程, 分析表达增强的基因包括: 与人肿瘤自身

抗体IgG有关的NY-REN-62; 基因变异可导致精神发育迟缓脆性X染色体综合征的FMR1; 与细胞分化有关的硫氧还蛋白家族成员TXNRD1。表达降低的基因主要有: 在细胞因子、趋化因子、生长因子、细胞黏附分子和急性时相蛋白都能检测到的NF- κ B; 编码细胞色素P450超家族酶的CYP2D6; 对 γ -氨基丁酸起分解代谢的作用, 抑制神经递质转化为琥珀酸半醛的4-氨基丁酸氨基转移酶(ABAT); 能编码基质金属蛋白酶的天然抑制因子的TIMP1等13个基因, 这些说明NS5ATP9具有多种生物调节功能。同时该实验室应用酵母双杂交技术筛选了人白细胞中与NS5ATP9蛋白结合蛋白的编码基因, 为深入研究NS5ATP9的功能奠定了基础^[18]。

五、NS5ATP9与疾病的关系

1. NS5ATP9在肿瘤中的研究: 肿瘤是一种基因病, 但并非是遗传的, 是指细胞在致癌因素作用下, 基因发生了改变, 失去对其生长的正常调控, 导致异常增生。以前的研究已经表明, NS5ATP9在正常组织中表达缺失或呈现低表达, 在肿瘤中的表达会发生变化^[2], 但是研究结论并不完全一致。

在肝癌研究中, Mizutani等^[3]研究显示NS5ATP9的表达明显下调, Wang等^[5]阐明NS5ATP9可以通过MEK/ERK通路抑制肝癌细胞系增殖, 该基因可能作为一个抑癌基因参与HCV的致癌机制。与之相反, Yuan等^[19]分析了大量肝癌患者的标本, 结果显示, NS5ATP9是个独立的危险因子, 在肝癌中的高表达能够预测癌症的不良预后和肿瘤的早期复发。Su等^[6]发现在外周血单个核细胞中NS5ATP9的高表达, 对检测肝癌的敏感性和特异性较CEA、CD44V明显提高。Liu等^[20]发现在肝癌细胞中NS5ATP9可通过抑制p53的乙酰化, 抑制阿霉素诱导的细胞凋亡, 推测抑制NS5ATP9的功能有望研究新型治疗肝癌药物。而Ghasemi等^[21]在体外实验中发现护肝药水飞蓟宾可能会抑制NS5ATP9的表达, 提示NS5ATP9可作为潜在的药物治疗靶点。

随着自噬成为继凋亡后生命科学领域研究的热点, 自噬与肿瘤关系也备受人们关注。本课题组Quan等^[22]研究发现NS5ATP9可以通过上调Beclin-1的表达诱导细胞自噬的发生。Beclin-1是调节自噬的重要基因, 其不仅参与自噬体的形成过程, 还通过抗紫外线相关基因的产物蛋白(UVRAG)和Rubicon形成复合体共同调节自噬体的成熟过程^[23]。应用siRNA技术后在NS5ATP9蛋白表达缺失的细胞内表达NS5A, 检测到Beclin-1启动子活性减弱, 同时, LC3 I 到LC3 II 转换的诱导作用也减弱。说明NS5ATP9作为NS5A的反式激活蛋白对于NS5A调控Beclin-1自噬中起重要作用^[24]。而在干扰掉Beclin-1蛋白的表达后, NS5A和NS5ATP9对细胞自噬泡累积的增加作用显著减弱, 提

示NS5ATP9和NS5A对细胞自噬的诱导作用是Beclin-1依赖性的。该结论为HCV NS5A的致癌机制和细胞自噬与肿瘤的关系提供了新线索。

Shubbar等^[9]在乳腺癌中发现NS5ATP9在mRNA水平表达增高,但其蛋白水平与临床病理参数和疾病相关存活率无相关性,推测NS5ATP9可能只与肿瘤发生的始动环节有关。Zhu等^[7]在胃癌组织中发现高表达NS5ATP9的患者复发率升高,存活率降低,干扰掉NS5ATP9的细胞活力下降,侵袭性和迁移性也减弱。同时,NS5ATP9的表达与胃癌细胞的分化程度有关,NS5ATP9蛋白的表达越高,分化程度越低。Mizutani等^[3]发现NS5ATP9/OEATC-1在间质性甲状腺癌中高表达,在体外KTA2细胞中,沉默NS5ATP9表达后,细胞生长受到抑制。Cheng等^[25]研究显示,食管癌中NS5ATP9的高表达和肿瘤TNM分期、对化疗药物的抵抗、肿瘤复发及存活率密切相关。微阵列基因组杂交技术显示NS5ATP9的表达水平可以改变染色体的稳定性,造成不良预后和低存活率。

在多种肿瘤组织中NS5ATP9阳性细胞数显著增多,且细胞内NS5ATP9的表达水平也显著增加,推测这种变化可能与肿瘤的发生、发展、预后密切相关。但这仅是在不同肿瘤的初步探索,且病例数较少,NS5ATP9的差异表达能否做为细胞异常增殖的标志,作为肿瘤早期诊断、治疗疗效等参考指标,还需进一步验证。

2. NS5ATP9在肝纤维化中的作用: NS5ATP9是作为增殖细胞核抗原结合因子发现的,国内外研究集中在与肿瘤的发生、发展、预后等领域,此类文献也较多,而尚无文献报道与纤维化的关系。

本实验室应用cDNA微阵列(cDNA microarray)技术在过表达NS5ATP9的HepG2细胞中,检测肝纤维化相关基因mRNA的表达水平,发现COL 13A1、PDGF-C、MMP-3、MMP-9和LTBP-2等存在差异性表达,提示NS5ATP9可能与肝纤维化相关。而在HBV相关肝纤维化肝脏组织中,免疫组织化学方法检测结果显示NS5ATP9的表达水平随着肝纤维化程度的升高而下降;免疫荧光双重染色方法在肝纤维化模型小鼠肝脏组织冰冻切片中,NS5ATP9与 α -SMA在活化的肝星状细胞内存在共定位现象。这些结果进一步说明NS5ATP9可能在肝星状细胞活化及纤维化中起一定作用。

Zhang等^[26]在体外实验研究证实NS5ATP9可以通过抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,调控TGF- β 1/Smad 3信号通路等多种途径抑制肝星状细胞活化及纤维化发生、发展过程。同时免疫共沉淀的方法确定了NS5ATP9与Smad 3可以结合,而Smad 3是肝纤维化经典信号通路中的重要分子,此发现提示两者的结合可能NS5ATP9调控肝纤维化机制中具有重要意义。激

光共聚焦显微镜也验证了两者的相互作用在体内确实存在。进一步的研究显示NS5ATP9能够抑制Smad 3发生磷酸化,从而抑制Smad 3向细胞核转位,抑制肝星状细胞的活化。但是NS5ATP9在TGF- β 1/Smad 3信号通路和肝星状细胞活化中的具体作用机制,仍然不是十分清楚,还需要进一步深入探究。

3. NS5ATP9在血液病中的作用: 造血干细胞具有良好的分化增殖能力,这一特征和肿瘤细胞极其相似。Amrani等^[27]研究发现,骨髓造血干细胞中NS5ATP9的高表达在造血作用中起重要作用。NS5ATP9敲除的大鼠模型中,造血干细胞向多能造血祖细胞的转化受阻,其中以淋巴祖细胞数量减少为主,而这种减少作用主要是通过p53介导的细胞凋亡实现的。在缺失NS5ATP9的大鼠骨髓造血干细胞内检测到活性氧的增加亦可以导致淋巴祖细胞的减少,造血活性下降。由此推测和恶性肿瘤息息相关的基因NS5ATP9在骨髓的造血过程中也有重要意义,NS5ATP9可能和血液病也存在一定的联系。也有研究显示,在滤泡淋巴瘤中NS5ATP9表达增高。

4. NS5ATP9的其他作用: 帕金森病(Parkinson's disease, PD)是中老年人神经系统常见的一种慢性退行性病变。以进行性运动迟缓、肌肉僵直、震颤及运动障碍为主要临床症状。鱼藤精、1-甲基-4-苯基吡啶(MPP⁺)脂溶性很强,极易被多巴胺神经元摄取,实验中常被用来诱导帕金森病模型。韩威^[28]在探讨鱼藤精诱导PC12细胞毒性作用时,应用MALDI-TOF质谱鉴定发现NS5ATP9蛋白显著上调,推测NS5ATP9可能参与鱼藤精的毒性作用。Xu等^[29]用MPP⁺处理PC12细胞后,毒性机制的研究中发现PCNA相关蛋白表达增高2倍以上,由此推测,NS5ATP9可能和神经系统疾病也存在一定联系。

NS5ATP9表达谱基因芯片结果提示,NS5ATP9生物学功能可能是通过调节膜蛋白上的离子通道活性和信号转导等机制来实现其对机体免疫应答的调节,这可能和一些肿瘤疾病的致病机制相关。在肾移植后免疫反应中,NS5ATP9表达亦显著升高。

六、总结与展望

目前,越来越多的研究显示,NS5ATP9涉及到一系列细胞生物学事件的调控,如上所述包括DNA复制、细胞增殖、细胞周期、细胞凋亡以及细胞的侵袭和转移等。虽然有些实验结果不相一致,可能和NS5ATP9在不同器官、组织、细胞中的表达量和机体所处的状态不同有关。

综上所述,从NS5ATP9发现至今,对它的研究已经取得了许多重要成果。NS5ATP9参与多种生物学现象已经比较清楚,但具体机制还不是完全明确。因此全面鉴定NS5ATP9的转录及其表达调控机制,深入研究其在疾病发生发展中的分子作用机制是研究人员的

当务之急。相信随着相关发病机制、作用机理的逐渐阐明, 这些理论研究定会为临床预防、诊断和治疗奠定坚实的基础。

参考文献

- 李强, 梁耀东, 成军, 等. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS5A反式激活基因NS5ATP9克隆化研究[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2003, 12(3): 254-256.
- Yu P, Huang B, Shen M, et al. p15(PAF), a novel PCNA associated factor with increased expression in tumor tissues. *Oncogene*, 2001, 20(4): 484-489.
- Mizutani K, Onda M, Asaka S, et al. Overexpressed in anaplastic thyroid carcinoma-1 (OEATC-1) as a novel gene responsible for anaplastic thyroid carcinoma[J]. *Cancer*, 2005, 103(9): 1785-1790.
- Petroziello J, Yamane A, Westendorf L, et al. Suppression subtractive hybridization and expression profiling identifies a unique set of genes overexpressed in non-small-cell lung cancer[J]. *Oncogene*, 2004, 23(46): 7734-7745.
- Wang Q, Wang Y, Li Y, et al. NS5ATP9 Contributes to inhibition of cell proliferation by hepatitis C virus (HCV) nonstructural protein 5A (NS5A) via MEK/extracellular signal regulated kinase (ERK) pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(5): 10539-10551.
- Su X, Zhang T, Cheng P, et al. KIAA0101 mRNA overexpression in peripheral blood mononuclear cells acts as predictive marker for hepatic cancer[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(3): 2681-2686.
- Zhu K, Diao D, Dang C, et al. Elevated KIAA0101 expression is a marker of recurrence in human gastric cancer[J]. *Cancer Sci*, 2013, 104(3): 353-359.
- Kato T, Daigo Y, Aragaki M, et al. Overexpression of KIAA0101 predicts poor prognosis in primary lung cancer patients[J]. *Lung Cancer*, 2012, 75(1): 110-118.
- Shubbar E, Kovacs A, Hajizadeh S, et al. Elevated cyclin B2 expression in invasive breast carcinoma is associated with unfavorable clinical outcome[J]. *BMC Cancer*, 2013, 13(1): 1-10.
- 巨立中, 钟彦伟, 成军, 等. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS5A反式激活基因NS5A-TP9启动子序列的确定及转录活性的鉴定[J]. 中西医结合肝病杂志, 2003, 13(6): 357-359.
- 巨立中, 钟彦伟, 成军. 应用噬菌体展示技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白NS5A反式激活基因NS5A-TP9启动子DNA的结合蛋白[J]. 中西医结合肝病杂志, 2003, 13(6): 363-365.
- Li K, Ma Q, Shi L, et al. NS5ATP9 gene regulated by NF-kappaB signal pathway[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2008, 479(1): 15-19.
- Simpson F, van Bueren KL, Butterfield N, et al. The PCNA-associated factor KIAA0101/p15 (PAF) binds the potential tumor suppressor product p33ING1b[J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(1): 73-85.
- Turchi L, Fareh M, Aberdam E, et al. ATF3 and p15PAF are novel gatekeepers of genomic integrity upon UV stress[J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(5): 728-737.
- Chang CN, Feng MJ, Chen YL, et al. p15 (PAF) is an Rb/E2F-regulated S-phase protein essential for DNA synthesis and cell cycle progression[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61196.
- Povlsen LK, Beli P, Wagner SA, et al. Systems-wide analysis of ubiquitylation dynamics reveals a key role for PAF15 ubiquitylation in DNA-damage bypass[J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(10): 1089-1098.
- 李强, 梁耀东, 成军, 等. 应用表达谱芯片技术筛选NS5ATP9反式调节基因的研究[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(2): 323-326.
- 李强, 梁耀东, 成军, 等. 应用酵母双杂交技术筛选人白细胞中与NS5ATP9蛋白结合蛋白的编码基因[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(4): 828-831.
- Yuan RH, Jeng YM, Pan HW, et al. Overexpression of KIAA0101 predicts high stage, early tumor recurrence, and poor prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(18 Pt 1): 5368-5376.
- Liu L, Chen X, Xie S, et al. Variant 1 of KIAA0101, overexpressed in hepatocellular carcinoma, prevents doxorubicin-induced apoptosis by inhibiting p53 activation[J]. *Hepatology*, 2012, 56(5): 1760-1769.
- Ghasemi R, Ghaffari SH, Momeny M, et al. Multitargeting and antimetastatic potentials of silibinin in human HepG-2 and PLC/PRF/5 hepatoma cells[J]. *Nutr Cancer*, 2013, 65(4): 590-599.
- Quan M, Liu S, Li G, et al. A functional role for NS5ATP9 in the induction of HCV NS5A-mediated autophagy[J]. *J Viral Hepat*, 2014, 21(6): 405-415.
- Liang C, Feng P, Ku B, et al. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG[J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(7): 688-699.
- Shi L, Zhang SL, Li K, et al. NS5ATP9, a gene up-regulated by HCV NS5A protein[J]. *Cancer Lett*, 2008, 259(2): 192-197.
- Cheng Y, Li K, Diao D, et al. Expression of KIAA0101 protein is associated with poor survival of esophageal cancer patients and resistance to cisplatin treatment in vitro[J]. *Lab Invest*, 2013, 93(12): 1276-1287.
- Zhang M, Zhang J, Liu S, et al. NS5ATP9 Suppresses activation of human hepatic stellate cells, possibly via inhibition of Smad3/Phosphorylated-Smad3 expression[J]. *Inflammation*, 2015, 38(1): 278-289.
- Amrani YM, Gill J, Matevossian A, et al. The Paf oncogene is essential for hematopoietic stem cell function and development[J]. *J Exp Med*, 2011, 208(9): 1757-1765.
- 韩威. 鱼藤酮对PC12细胞毒性作用机制的蛋白质组学研究//胡林森主编. 神经病学[M]. 2007: 30-31.
- Xu Z, Patterson TA, Wren JD, et al. A microarray study of MPP+-treated PC12 cells: mechanisms of toxicity (MOT) analysis using bioinformatics tools[J]. *BMC Bioinformatics*, 2005, 6(Suppl 2): S8-S21.

(收稿日期: 2014-11-02)

(本文编辑: 孙荣华)

周利, 成军. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS5A反式调节蛋白9的研究进展 [J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2015, 9(4): 447-450.