

丙型肝炎病毒 NS3 蛋白促进人源肝细胞的增殖及其相关机制研究^{*}

李 波 冯德云 程瑞雪 孙树艳 何琼琼 胡忠良 郑 晖 文继舫^{**}

(中南大学湘雅医学院病理教研室, 长沙 410013)

摘要 丙型肝炎病毒(HCV) NS3 蛋白与肝癌细胞(HCC)的发生密切相关, 但其机制尚不清楚. 既往体外研究极少采用 HCV 的自然宿主细胞——人肝细胞作为研究体系, 故所获研究结果有待进一步探讨和证实. 构建了表达 HCV NS3 蛋白的真核质粒, 通过稳定转染人源永生化肝细胞系 QSG7701, 建立了稳定表达 HCV NS3 蛋白的人源永生化肝细胞系 QSG7701/NS3, 以此为实验平台, 检测了细胞增殖的变化, 丝裂原蛋白激酶(MAPK)通路激酶磷酸化水平的改变及转录因子 AP-1、NF- κ B 和 STAT3 的活性变化. 结果表明: HCV NS3 蛋白可促进人源永生化肝细胞 QSG7701 的增殖, HCV NS3 蛋白激活 ERKs/AP-1 可能是其促进细胞增殖的重要机制, 并通过上调转录因子 NF- κ B 和 STAT3 的活性, 诱导宿主细胞急性炎症损伤.

关键词 丙型肝炎病毒 NS3 蛋白, 肝细胞, 丝裂原蛋白激酶 (MAPK), 增殖

学科分类号 R36

丙型肝炎病毒(HCV)感染已成为影响人类健康的重要问题之一, HCV 的致病机制研究中, 诸多证据显示 HCV NS3 蛋白与 HCV 相关性肝细胞癌(HCC)的发生密切相关^[1-3], 但它们究竟是通过何种方式使细胞恶性转化, 促进 HCC 的发生, 尚缺乏直接证据. 既往体外研究多采用非肝细胞系或肝癌细胞系, 而极少采用 HCV 的自然宿主细胞——人肝细胞作为研究体系, 故所获研究结果有待进一步探讨和证实. 鉴于此, 本研究构建了表达 HCV NS3 蛋白的真核质粒, 通过稳定转染人源永生化肝细胞系 QSG7701, 建立稳定表达 HCV NS3 蛋白的人源永生化肝细胞系 QSG7701/NS3, 以此为实验基础, 研究 HCV NS3 蛋白对肝细胞生物学特性的影响及其相关机制.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株. 质粒 p90HCVconFLlongpU^[4] (含 HCV 全长基因组 cDNA) 由 Rice 教授 (Department of Molecular Microbiology, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri) 赠送. 按碱裂法抽提质粒, 并用酶切鉴定后, 用作扩增 HCV NS3 片段的模板. 载体质粒 pcDNA3.1(+) 和大肠杆菌菌株 DH-5a、TG1 为本室保存.

1.1.2 细胞. 人源永生化肝细胞系 QSG7701, 购自

中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所; DMEM 高糖培养基加 10%灭活的新生小牛血清, 100 U/ml 青霉素, 100 U/ml 链霉素于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养, 传代.

1.1.3 引物. 针对 HCV NS3 基因片段设计引物, 5'端加入 *Hind* III 的酶切位点和起始密码子 ATG, 3'端加入终止密码子 TAA 和 *Bam* H I 的酶切位点. NS3-正义: 5' CCC AAG CTT ATG GCG CCC ATC ACG GCG TAC G 3'; 反义: 5' CG GGA TCC TTA CGT GAC GAC CTC CAG GTC GG 3'. 预计扩增 1 915 bp 的片段, 由上海博亚公司合成.

1.1.4 酶与试剂. Qiagen midi kit 质粒抽提试剂盒购自 Qiagen 公司; 脂质体 Lipofectin® Reagent Kit 系 Invitrogen 公司产品; G418 和细胞培养基 DMEM 均为 GIBCO 公司产品; 限制性内切酶 *Hind* III、*Eco*R I 和 *Bam*H I 购自 MBI 公司; T4 DNA 连接酶购自宝生物公司; 小牛血清为杭州四季青生物工程材料有限公司产品; 胰蛋白酶购自上海 Sangon 公司; PCR 试剂盒、RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit、DNA 分子质量标记均为 MBI 产品; TRIzol 购自 Gibco-BRL 公司.

^{*}国家自然科学基金资助项目(30270601).

^{**} 通讯联系人.

Tel: 0731-2650410, E-mail: jifangwen@hotmail.com

收稿日期: 2005-05-19, 接受日期: 2005-06-28

1.2 方法

1.2.1 表达质粒 pcDNA3.1/NS3 的构建. 通过 PCR 法从质粒 p90HCVconFLlongpU 中扩增目的片段,按照 PCR 产物凝胶纯化试剂盒(QIAGEN)说明书纯化 PCR 产物. 纯化的 PCR 产物和载体 pcDNA3.1(+)同时经 *Hind* III、*Bam* H I 双酶切,用 T4DNA 连接酶连接,经氨苄青霉素筛选阳性克隆,抽提质粒后进行酶切和测序鉴定.

1.2.2 稳定转染. 按 Lipofectin® Reagent(Invitrogen 公司)试剂盒说明书将质粒 pcDNA3.1/ NS3 和 pcDNA3.1(+)分别转染细胞,于含 400 mg/L G418 的选择培养基中筛选 2 周,隔天换液,直至阴性对照组未转染细胞全部死亡后,以 150 mg/L 的 G418 维持筛选,20 天后挑选单个克隆扩大培养,依次从 96 孔板→24 孔板→6 孔板→25ml 培养瓶→50 ml 培养瓶→100 ml 培养瓶中进行培养,建立稳定传代的转染细胞系,RT-PCR 和蛋白质印迹检测 HCV NS3 基因的转录与表达.

1.2.3 RT-PCR. 按照 TRIzol 抽提总 RNA 操作步骤提取总 RNA, DNase I 消化痕量 DNA 后,取 2 µg 总 RNA 进行 RT 反应,依据 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 操作步骤进行. 然后以 cDNA 为模板,PCR 扩增 HCV NS3 基因片段(676 bp, 4506~5181 nt),引物设计如下: 5' AGA CAT CTC ATC TTC TGC CAC TCA AA 3' (正义), 5' GGC GGA TCA AAC ACT TCC ACA TC 3' (反义). 扩增条件为: 95℃ 变性 5 min; 95℃ 45 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min. 同时以 β -actin mRNA 作为内对照,1%的凝胶电泳检测 HCV NS3 基因在 QSG7701 细胞系的转录水平.

1.2.4 蛋白质印迹. 细胞 1×10^6 个,预冷的 PBS 洗 3 次,加裂解液(10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 20% SDS, 5 mmol/L DTT, 10 mmol/L PMSF),冰上放置 10 min,超声 15 s, 94℃ 变性 5 min,冰上放置 5 min, 4℃ 1 2000 g 离心 10 min,收集全蛋白上清, BCA Protein Assay Reagent 定量,取 100 µg 已定量的总蛋白质在 12%不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电转移至硝酸纤维素膜,丽春红显色后将蛋白质条带扫描存入电脑(其信号强度作为衡量上样量一致的指标,即 loading control),5%脱脂奶粉封闭 1 h,分别加入抗 P38^{MAPK}、抗磷酸化 p38^{MAPK}(p-P38^{MAPK})、抗 HCV NS3 蛋白抗体(购自 Santa Cruz 公司)、抗

P44/P42^{MAPK}、抗磷酸化 P44/P42^{MAPK}(p-P44/P42^{MAPK})、抗 JNK 和抗磷酸化 JNK (p-JNK) 抗体 (Cell Singnaling 公司产品),室温下孵育 8~12 h, TBS 洗膜, 3×10 min, 分别用 HRP 标记的抗鼠、兔或山羊的 IgG 进行孵育, 37℃, 3 h, TBS 洗膜, 3×10 min, DAB 显色.

1.2.5 凝胶电泳迁移实验(EMSA). 10^7 细胞用冷的 PBS 洗 3 次,收集细胞,常温下 2 000 g 离心 3 min,重悬细胞于缓冲液 A 400 ml 中(10 mmol/L Hepes, pH 7.9, 10 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L EDTA, 0.2% NP-40, 1 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L PMSF, 1 mg/L 亮抑蛋白酶肽、抗蛋白酶、抑蛋白酶肽和抑胃酶肽),混匀后冰置 15 min,加入 10% NP-40 25 µl,剧烈震荡 15 s, 1 3000 g、离心 10 s,吸弃上清,加入 50 µl 缓冲液 B (20 mmol/L Hepes, pH 7.9, 420 mmol/L NaCl, 0.1 mmol/L EDTA, 1.5 mmol/L MgCl₂, 25% 甘油, 1 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L PMSF, 1 mg/L 亮抑蛋白酶肽、抗蛋白酶、抑蛋白酶肽和抑胃酶肽)中,冰置 30 min,剧烈震荡 15 s, 4℃、12 500 g 离心 10 min,取上清,BCA 法测浓度后 -70℃ 保存备用. 分别设计 STAT3、AP-1 与 NF- κ B 特异结合探针. AP-1-S: 5' CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA 3'; A: 5' TTC CGG CTG ACT CAT CAA GCG 3'; NF- κ B-S: 5' AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C 3'; A: 5' GCC TGG GAA AGT CCC CTC AAC T 3'; STAT3: S: 5' GAT CCT TCT GGG AAT TCC TAG ATC 3'; A: 5' GAT CTA GGA ATT CCC AGA AGG ATC 3'. 生物素进行 5'端标记(上海博亚公司),按照 LightShift Chemiluminescent EMSA Kit 方法操作,检测三者的 DNA 结合活性. 简单介绍如下:取 0.5ml EP 管依次加入下列成分,建立样本反应体系: 10× 结合缓冲液 2 µl; 50% 甘油 1 µl; 100 mmol/L MgCl₂ 1 µl; 1 g/L Poly (dI/dC) 1 µl; 1% NP-40 1 µl; 细胞核蛋白 x µl (根据蛋白质浓度调整,使总量一致); 生物素标记探针 2 µl; 加双蒸水至 20 µl (自由探针管不加入未标记探针和细胞核蛋白,竞争结合管同时加入 2 µl 标记探针和 2 µl 未标记探针),混均后室温下孵育 20 min,加入 5 µl 5×加样缓冲液,于 5%连续丙烯酰胺凝胶电泳,100 V 90 min,使溴酚蓝迁移至凝胶 3/4 处后进行转膜,然后将尼龙膜放入紫外交联仪中交联 60 s,将膜置于 20 ml LightShift™ 封闭缓冲液中封闭 15 min,再加入 66.7 µl LightShift™

Stabilized Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate 继续孵育 30 min, 1×清洗液洗涤 4×5 min; 置 30 ml LightShift™ 底物平衡缓冲液中平衡 5 min 后, 将膜置于 12 ml 发光底物工作液中孵育 5 min, 暗室下曝光、显影及定影。

1.2.6 MTT 分析. 用 0.02% EDTA 和 0.25%胰蛋白酶消化对数生长期细胞并计数, 调整细胞浓度为 1×10⁵ 个/ml, 接种于 96 孔板中, 各孔细胞数为 1×10⁴ 个. 加盖, 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 加 5 g/L 的 MTT 20 μl 于各孔中, 继续培养 4 h, 倒尽板中的培养液, 各孔加 150 μl DMSO, 轻轻振荡后用酶标仪 (波长 490 nm) 测定各孔的 A 值, A 值作纵坐标绘制直方图。

1.2.7 流式细胞术分析(FCM). 以 0.25%胰蛋白酶和 0.02%EDTA 消化细胞, 用含 10%小牛血清的培养基洗脱细胞后, 1 000 g 离心 10 min 收集细胞, PBS 洗涤 2 次后, 用 75%乙醇 (冰预冷) 固定, 经流式细胞仪测定并用 Cell Quest 软件分析各组细胞的周期分布。

2 结 果

2.1 实验分组

实验分为 5 组: ①, ②, ③ HCV NS3 蛋白表达质粒 pcDNA3.1/NS3 转染的 QSG7701 (QSG7701/NS3-1, -2, -3); ④空白质粒 pcDNA3.1 转染的 QSG7701 (QSG7701/ pcDNA3.1); ⑤未转染的 QSG7701。

2.2 HCV NS3 基因在 QSG7701 细胞中的表达

本次实验中, 获得 12 个 pcDNA3.1/NS3 阳性克隆, 为避免单个克隆带来实验结果的偏差, 随后的实验中选取 3 株 QSG7701/ NS3 单克隆细胞进行实验, 并与 QSG7701/ pcDNA3.1 细胞和未转染的 QSG7701 细胞同时进行 RT-PCR 和蛋白质印迹检测, 鉴定 HCV NS3 蛋白表达, 结果表明: QSG7701/ pcDNA3.1 细胞和未转染的 QSG7701 细胞中均未见 HCV NS3 基因的转录与表达 (图 1)。

2.3 HCV NS3 表达对细胞增殖的影响

利用 MTT 法检测 QSG7701/NS3-1, 2, 3、QSG7701 /pcDNA3.1 和 QSG7701 细胞的生存率, 结果显示三组 QSG7701/NS3 细胞表现出同样的增殖趋势, 增殖水平高于 QSG7701 /pcDNA3.1 和 QSG7701 细胞($P < 0.05$), 而 pcDNA3.1 /QSG7701 和 QSG7701 细胞增殖率之间无明显差异($P = 0.861$) (表 1)。

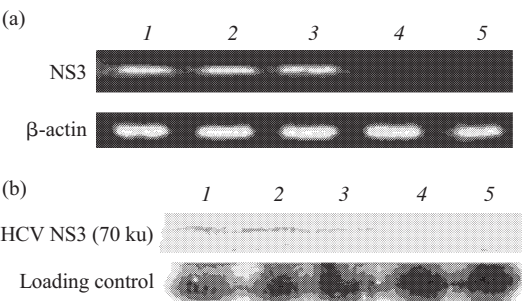


Fig.1 The transcription and expression of HCV NS3 in QSG7701

(a) RT-PCR analysis of HCV NS3, (b) Western-blot analysis of HCV NS3.

Table 1 MTT analysis of cell proliferation	
Groups	A ($\bar{x} \pm s$)
1. QSG7701/NS3-1	1.506 3 ± 0.063 29
2. QSG7701/NS3-2	1.360 5 ± 0.004 93
3. QSG7701/NS3-3	1.367 0 ± 0.072 36
4. QSG7701 /pcDNA3.1	1.135 3 ± 0.053 02
5. QSG7701	1.174 8 ± 0.062 59

F = 28.533, P < 0.05.

2.4 HCV NS3 表达对细胞周期的影响

利用 FCM 检测了 QSG7701/NS3-1, 2, 3、QSG7701 /pcDNA3.1 和 QSG7701 细胞的周期分布, 结果显示, 与 QSG7701 /pcDNA3.1 和 QSG7701 细胞相比较, QSG7701/NS3-1, 2, 3 三株表达 HCV NS3 蛋白的细胞出现相似的细胞周期分布的改变, 即 G1 期的细胞减少而 S 期的细胞增加, 提示 QSG7701/NS3 细胞具有增殖优势 (表 2)。

Table 2 FCM analysis of cell cycle			
Groups	G1%	G2%	S%
1. QSG7701/NS3-1	67.0	8.2	24.8
2. QSG7701/NS3-2	70.5	8.0	21.4
3. QSG7701/NS3-3	67.1	11.1	21.8
4. QSG7701/pcDNA3.1	77.0	8.3	13.9
5. QSG7701	81.4	7.2	11.5

2.5 HCV NS3 蛋白对 p44/42^{MAPK} 磷酸化的影响

在 HCV NS3 蛋白表达质粒转染的细胞、空白质粒转染细胞及未转染细胞中总 p44/42^{MAPK} 表达水平无显著差异. 但 HCV NS3 蛋白表达质粒转染的

细胞 P44/42^{MAPK} (p-P44/42^{MAPK}) 的磷酸化水平明显高于空白质粒转染细胞及未转染细胞 (图 2).

2.6 HCV NS3 蛋白对 P38^{MAPK} 磷酸化的影响

在 HCV NS3 蛋白表达质粒转染的细胞、空白质粒转染细胞及未转染细胞中总 P38^{MAPK} 和磷酸化

的 P38^{MAPK} 表达水平均无显著差异 (图 3).

2.7 HCV NS3 蛋白对 JNK 磷酸化的影响

在 HCV NS3 蛋白表达质粒转染的细胞、空白质粒转染细胞及未转染细胞中总 JNK 和磷酸化的 JNK (p-JNK) 表达水平均无显著差异 (图 4).

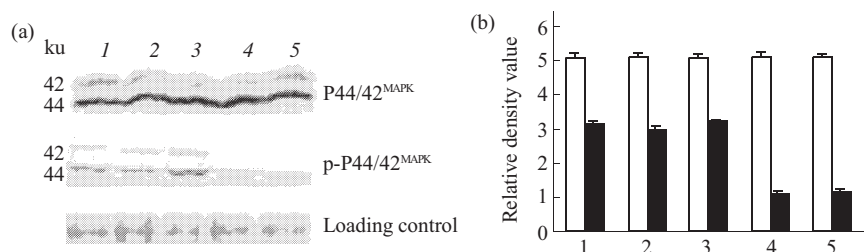


Fig.2 Western blot analysis of P44/42^{MAPK} and p-P44/42^{MAPK}

(a) Western blot. (b) Relative density value. □: P44/42; ■: p-P44/42.

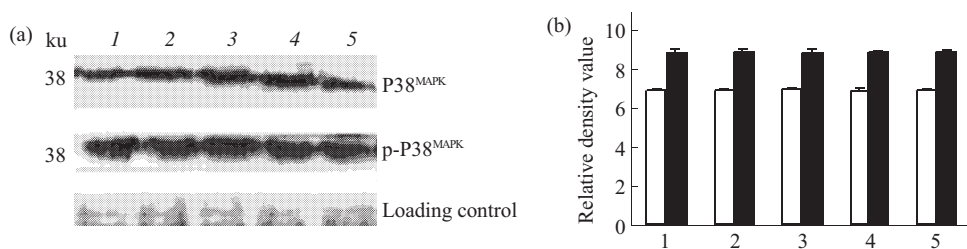


Fig.3 Western blot analysis of P38^{MAPK} and p-P38^{MAPK}

(a) Western blot. (b) Relative density value. □: P38; ■: p-P38.

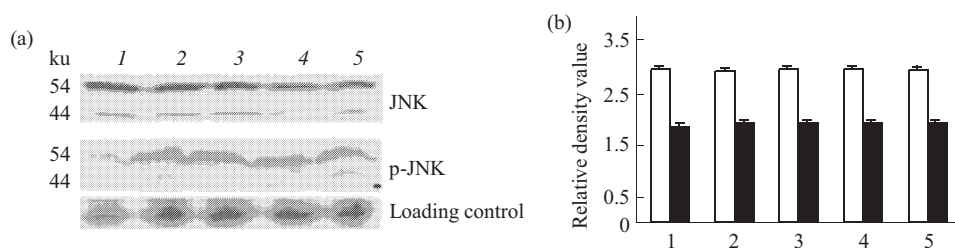


Fig.4 Western blot analysis of JNK and p-JNK

(a) Western blot. (b) Relative density value. □: JNK; ■: p-JNK.

2.8 HCV NS3 表达质粒转染细胞中核转录因子 NF-κB、AP-1 和 STAT3 活性的变化

DNA 结合活性是反应转录因子活性的一项重要指标, EMSA 结果显示 (图 5), NF-κB、AP-1 和

STAT3 的 DNA 结合活性在 3 株 QSG7701/NS3 细胞中明显高于 QSG7701/pcDNA3.1 和 QSG7701 细胞, 表明 HCV NS3 蛋白可增强 3 种转录因子的活性.

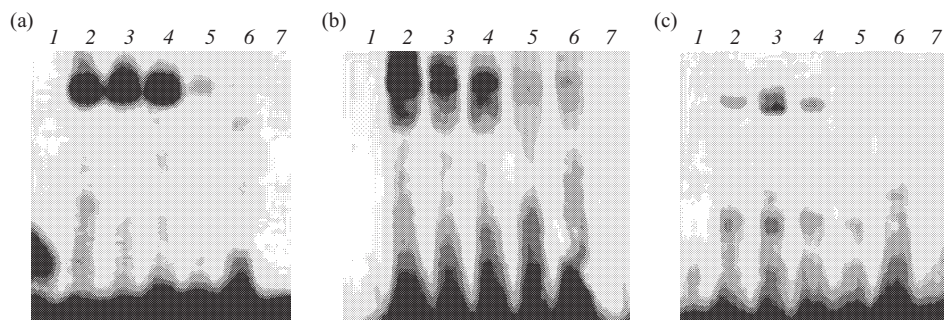


Fig.5 EMSA analysis of NF- κ B、AP-1 and STAT3

(a) AP-1, (b) NF- κ B, (c) STAT3. 1: Free probe; 2, 3, 4: QSG7701/NS3-1, 2, 3; 5: QSG7701/pcDNA3.1; 6: QSG7701; 7: Competition.

3 讨 论

关于 HCV NS3 蛋白对细胞增殖的影响, 前期研究报道的结论并不完全一致. Kwun 等^[5]和 Zemel 等^[6]发现稳定表达的 HCV NS3 蛋白可促进细胞的增殖; 而在短暂表达 HCV NS3 蛋白的细胞中, Siavoshian 等^[7]却观察到细胞增殖降低的现象. 可见不同的蛋白质表达方式对细胞生物学行为的影响可能具有不同的效应. 而 HCV 感染是一种持续状态, 其促癌效应也是病毒及其表达产物长期作用于宿主细胞的结果, 因此, 研究 HCV NS3 蛋白对细胞生物学行为的影响, 建立稳定表达体系能更真实地反应 HCV 感染的自然状态.

本研究以人源肝细胞为实验对象, 并以 HCV 全长基因组 cDNA 为模板, 扩增 HCV NS3 基因片段, 构建表达 HCV NS3 蛋白的真核质粒, 转染人源肝细胞 QSG7701, RT-PCR 和蛋白质印迹检测了 NS3 基因的转录与表达, 证实本研究建立的 HCV NS3 蛋白表达体系是成功和可靠的. 同时, MTT 结果显示 QSG7701/NS3 细胞增殖水平高于 QSG7701/pcDNA3.1 和 QSG7701 细胞, FCM 分析发现 QSG7701/NS3 细胞 G1 期细胞减少, 而 S 期细胞增多, 表明 HCV NS3 蛋白具有促进细胞增殖的效应.

细胞的增殖和凋亡受细胞信号转导通路的精细调控, 为进一步探讨 HCV NS3 蛋白促增殖的作用机制, 我们检测了稳定表达 HCV NS3 蛋白的人肝细胞中, MAPK 磷酸化水平的变化和转录因子 AP-1、NF- κ B、STAT3 的活性改变, 发现 HCV NS3 蛋白可通过上调 ERKs 磷酸化水平激活胞外信号调节激酶(ERK)通路, 同时促进转录因子 AP-1、

NF- κ B 和 STAT3 的活化.

ERK 信号通路在调控细胞增殖和细胞周期演进过程中具有重要作用. Raf-1 介导的细胞增殖效应依赖于 ERK 的活化程度^[8], 激活 ERKs 可促进细胞从 G1 期向 S 期演进, 以显性负性突变体抑制 ERK 的激活或反义干扰 Raf-1 可抑制细胞增殖^[9]. 同时, ERK1/ERK2 的激活与 p27kip1 稳定的功能状态成负相关^[10], p27kip1 通过抑制 CyclinE-Cdk2 复合体的活性阻滞细胞 G1/S 期演进^[11]. Yao 等^[12]在 T 细胞的实验研究中证实, HCV 核心蛋白通过这一机制抑制 T 细胞的增殖. 我们的前期研究也显示 ERKs 磷酸化水平下调, 在 HCV 核心蛋白抑制人源肝细胞 QSG7701 增殖过程中具有重要作用^[13]. 这些证据表明, ERK 通路是调控细胞增殖的一条重要效应通路. AP-1 作为 ERKs 下游重要的效应分子, 直接调控细胞周期素 CyclinD1 的表达^[14], 影响细胞周期演进. 研究表明, ERKs 通过间接方式激活 AP-1 刺激细胞增殖, 是 AP-1 诱导 CyclinD1 表达的结果^[15]. 利用反义寡核苷酸技术抑制 c-fos 或 c-jun 的活性, 使细胞在不同程度上表现出 G1 期向 S 期演进的停滞, 导致细胞增殖水平下降^[16]. 我们的研究结果显示, 表达 HCV NS3 蛋白的 QSG7701 细胞中, ERK 和 AP-1 的活性都增高, 因此 HCV NS3 蛋白激发的 ERK/AP-1 信号级联, 可能是其促使细胞从 G1 期向 S 期演进而增强细胞增殖能力的一种重要机制.

在肝癌细胞系(HepG2)和非肝细胞系(HeLa)中, Hassan 等^[17]研究了稳定表达的 HCV NS3 蛋白对细胞增殖的影响及其相关机制, 发现 HCV NS3 蛋白是通过 JNK/AP-1 途径介导细胞增殖, 而不影响

ERK和P38的活性,这与本研究的结果不一致,而本研究选用非肿瘤性人肝细胞系 QSG7701^[18],前期实验证实接种裸鼠不形成肿瘤^[3],表明其具有明显的不同于肿瘤细胞的生物学特性,因此推测 HCV NS3 蛋白的生物学效应可能具有细胞类型依赖性。

在支持 HCV 复制的细胞培养体系中, HCV 通过诱导宿主细胞的氧化应激反应激活 STAT3,同时 STAT3 又是干扰素抑制 HCV 复制的效应分子^[19,20]。此外, HCV NS3 蛋白激活 NF- κ B,主要介导宿主的炎症反应^[21,22]。因此,我们认为在人肝细胞 QSG7701 中, HCV NS3 蛋白促进 STAT3 和 NF- κ B 的激活,是 HCV 感染过程中诱导宿主细胞急性炎症损伤的重要机制^[23]。

参 考 文 献

- 1 Sakamuro D. Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH/3T3 cells. *J Virol*, 1995, **69** (6): 3893~3896
- 2 He Q Q, Cheng R X, Sun Y, *et al.* Hepatocyte transformation and tumor development induced by hepatitis C virus NS3 C-terminal deleted protein. *World J Gastroenterol*, 2003, **9** (3): 474~478
- 3 冯德云, 郑 晖, 颜亚晖, 等. 肝癌发生中丙型肝炎病毒 NS3 蛋白对 p53 基因蛋白表达的影响. *中华医学杂志*, 1998, **78** (4): 278~280
Feng D Y, Zheng H, Yan Y H, *et al.* *Natl Med J China*, 1998, **78** (4): 278~280
- 4 Kolykhalov A A, Agapov E V, Blight K J, *et al.* Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science*, 1997, **277** (5325): 570~574
- 5 Kwun H J, Jung E Y, Ahn J Y, *et al.* P53-dependent transcriptional repression of p21 (waf 1) by hepatitis C virus NS3. *J Gen Virol*, 2001, **82** (Pt 9): 2235~2241
- 6 Zemel R, Gerechet S, Greif H, *et al.* Cell transformation induced by hepatitis C virus NS3 serine protease. *J Viral Hepatitis*, 2001, **8** (2): 96~102
- 7 Siavoshian S, Abraham J D, Kieny M P, *et al.* HCV core, NS3, NS5A and NS5B proteins modulate cell proliferation independently from p53 expression in hepatocarcinoma cell lines. *Arch Virol*, 2004, **149** (2): 323~336
- 8 Sewing A, Wiseman B, Lloyd A, *et al.* High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol*, 1997, **17** (9): 5588~5597
- 9 Pages G, Lenormand P, L' Allemain G, *et al.* Mitogen-activated protein kinase p42^{MAPK} and p44^{MAPK} are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (18): 8319~8323
- 10 Zhang W, Liu H T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res*, 2002, **12** (1): 9~18
- 11 Kerkhoff E, Rapp U R. Cell cycle targets of Ras/Raf signalling. *Oncogene*, 1998, **17** (11 Reviews): 1457~1462
- 12 Yao Z Q, Eisen-Vandervelde A, Ray S, *et al.* HCV core/gC1qR interaction arrests T cell cycle progression through stabilization of the cell cycle inhibitor p27Kip1. *Virology*, 2003, **314** (1): 271~282
- 13 李 波, 冯德云, 程瑞雪, 等. HCV 核心蛋白对人源肝细胞生物学行为的影响. *中华医学杂志*, 2005, **85** (18): 1243~1248
Li B, Feng D Y, Cheng R X, *et al.* *Natl Med J China*, 2005, **85** (18): 1243~1248
- 14 Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, 2001, **20** (19): 2390~2400
- 15 Treinies I, Paterson H F, Hooper S, *et al.* Activated MEK stimulates expression of AP-1 components independently of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) but requires a PI3-kinase signal to stimulate DNA synthesis. *Mol Cell Biol*, 1999, **19** (1): 321~329
- 16 Kovary K, Bravo R. The jun and fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 1991, **11** (9): 4466~4472
- 17 Hassan M, Ghazlan H, Abdel-Kader O. Activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) signaling pathway is essential for the stimulation of hepatitis C virus (HCV) non-structural protein 3 (NS3)-mediated cell growth. *Virology*, 2005, **333** (2): 324~336
- 18 朱德厚, 王金兵. 人体肝癌宿主肝细胞系 (QSG7701) 的培养及其与肝癌细胞的比较. *肿瘤防治研究*, 1979, **5**: 7~9
Zhu D H, Wang J B. *Chin J Cancer Prevention and Treatment*, 1979, **5**: 7~9
- 19 Waris G, Turkson J, Hassanein T, *et al.* Hepatitis C virus (HCV) constitutively activates STAT-3 via oxidative stress: role of STAT-3 in HCV replication. *J Virol*, 2005, **79** (3): 1569~1580
- 20 Fimia G M, Evangelisti C, Alonzi T, *et al.* Conventional protein kinase C inhibition prevents alpha interferon-mediated hepatitis C virus replicon clearance by impairing STAT activation. *J Virol*, 2004, **78** (23): 12809~12816
- 21 Dolganiuc A, Oak S, Kodys K, *et al.* Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger toll-like receptor 2-mediated pathways and inflammatory activation. *Gastroenterology*, 2004, **127** (5): 1513~1524
- 22 Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, *et al.* Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology*, 2000, **32** (2): 405~412
- 23 Di Bisceglie A M. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 1997, **26** (3 Suppl 1): 34S~38S

The Mechanisms for HCV NS3 Protein Upregulating Cell Proliferation in Human Hepatocytes*

LI Bo, FENG De-Yun, CHENG Rui-Xue, SUN Shu-Yan,

HE Qiong-Qiong, HU Zhong-Liang, ZHENG Hui, WEN Ji-Fang**

(Department of Pathology, Xiangya Medical School, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract HCV NS3 protein plays an important role in the carcinogenesis of HCV related HCC. But the mechanism remains to be determined. The cell lines and transgenic mice used in previous studies were rarely based on HCV natural infection process, so the results acquired may need to be further evaluated. Under such background, the eukaryotic plasmid expressing HCV NS3 protein (pcDNA3.1/NS3) was constructed. Through transfecting the human hepatocyte line QSG7701 with pcDNA3.1/NS3, the research system expressing HCV NS3 protein was constructed successfully. On this basis, the effects of HCV NS3 on cell proliferation, the phosphorylation of MAP kinases and activity of transcription factors AP-1, NF- κ B and STAT3 were investigated. The results showed that HCV NS3 protein could enhance proliferation, up-regulate phosphorylation of Erks and the activity of transcription factors AP-1, NF- κ B and STAT3 in human hepatocytes. It is speculated that, HCV NS3 protein up-regulates ERKs/AP-1 activities is an important mechanism by which HCV NS3 protein enhances cell proliferation, its up-regulation of activity of transcription factors NF- κ B and STAT3 might be relevant to the acute hepatitis associated with HCV infection.

Key words hepatitis C virus NS3 protein, hepatocytes, MAPK, transcritcion factors

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30270601).

**Corresponding author . Tel: 86-731-2650410, E-mail: jifangwen@hotmail.com

Received: May 19, 2005 Accepted: June 28, 2005