



行政院國家科學委員會專題研究計劃成果報告

C型肝炎病毒對腫瘤壞死因子 α 基因調控之研究

Studies on the Gene Regulation of Tumor Necrosis Factor- α

by the Hepatitis C virus

計劃編號: NSC 87-2314-B-041-005

執行期限: 86年8月至87年7月

主持人: 顏瑞鴻 嘉南藥理學院醫務管理系

分送

一、中文摘要

C型肝炎病毒感染後會造成慢性C型肝炎，而且與肝硬化及肝癌的形成有關，是目前全世界相當重視的病毒之一。在慢性C型肝炎患者體內發現，腫瘤壞死因子 α (tumor necrosis factor- α ; TNF- α)會比正常人分泌量高。TNF- α 可能在肝炎的肝臟病理變化中具有重要的意義，也和干擾素治療慢性C型肝炎的效果有關。C型肝炎病毒感染後，我們認為病毒基因產物可能是調控TNF- α 表現的重要因子之一，於是本實驗我們選擇病毒蛋白質中，具有基因調控功能的核心蛋白質進行研究。我們共同轉染核心蛋白質載體，與以TNF- α promoter連接CAT基因的載體，轉染至T細胞株H9細胞以及肝癌細胞株Huh7細胞，由CAT assay的結果發現，C型肝炎病毒核心蛋白質不能活化TNF- α promoter的活性，所以目前沒有証據顯示核心蛋白質能調控TNF- α 的基因表現，但是否可經由C型肝炎病毒其他基因產物來調控，有待更多實驗證明。

關鍵詞: C型肝炎病毒、核心蛋白質、腫瘤壞死因子

Abstract

The immunoregulatory cytokines may be important in the host response to hepatitis C virus infection. Among cytokines, tumor necrosis factor- α (TNF- α) has been involved in the pathogenesis of diversity of liver condition including viral hepatitis. The

Aims of this study is to investigate whether the HCV core protein could regulate the expression of TNF- α gene. In this study, H9 cells and Huh-7 cells were cotransfected with TNF-CAT constructs and HCV core effector plasmids, and a transient transfection assay to determine whether the viral protein regulated expression of the TNF gene. No TNF- α promoter activity was noted in the present of the core effector plasmids in two cell lines. These studies suggested that activation of TNF gene expression may be affected by other gene products or not associated with any viral products of HCV.

Keywords: hepatitis C virus、core protein、TNF- α promoter

二、緣由與目的

病毒感染宿主後，宿主細胞會產生一些細胞激素(cytokine)參與免疫反應(1,2)，而某些細胞激素則與病毒感染後所造成的臨床表現，以及病理變化有關，其中腫瘤壞死因子 α (tumor necrosis factor- α ; TNF- α)就是一個重要的細胞激素(1,3,4)。TNF- α 除了幫助宿主在病原感染後誘發免疫反應外，在發炎反應以及抗病毒的功能中皆有其重要性(5)。

最近由 Tilg 等人(6)的研究結果，發現感染C型肝炎病毒(hepatitis C virus; HCV)的病患血清中，有一些細胞激素如 interleukine 1 β (IL-1 β)以及 TNF- α 會被誘導而有較高表現量，Larrea 等人(7)也報

告在慢性 C 型肝炎患者的血清與 PBMC 中，偵測到 TNF- α 的大量表現，而且 TNF- α 的表現與干擾素治療慢性 C 型肝炎的效果有關，這些證據都顯示 TNF- α 的產生，對於肝炎的臨床表現可能相當重要。HCV 感染後如何刺激 TNF- α 基因的表現目前並不清楚，但由於 TNF- α 大量產生後，對於慢性 C 型肝炎臨床表現與治療有著重要的影響，所以研究 HCV 如何來影響 TNF- α 的表現有其重要性。

HCV 為 RNA 病毒，除了感染肝細胞外，也可以感染淋巴細胞(8,9)。HCV RNA 轉譯出一 polyprotein 後，切割修飾成一些病毒蛋白，包括核心蛋白質 (core protein), E1, E2/NS1, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b 等蛋白(10,15)。本研究為了瞭解 HCV 基因產物是否會影響 TNF- α 基因表現，我們選擇核心蛋白質來進行實驗。其原因主要有兩個：[1] 有證據顯示病毒產生的蛋白能活化 TNF- α 的表現。由 Geist 等人(11)的報告發現，CMV 誘導 TNF- α 的表現，可經由病毒 IE 基因產物來調控，所以 HCV 刺激 TNF- α 基因的表現，也可能是由病毒的蛋白來調控。[2] HCV 的核心蛋白質為可磷酸化的鹼性蛋白質(12)，目前已有許多功能被發現，尤其是具有調控其他基因的能力(13,14,16,17,)。本研究即針對核心蛋白質，是否能調節 TNF- α 基因表現進行研究，希望藉由此研究為模式，未來能進一步瞭解 HCV 在細胞激素基因調節上的角色，進而瞭解 HCV 造成慢性肝臟疾病的致病機轉。

三、結果與討論

為了在 cell culture system 中表現 HCV 核心蛋白質，我們成功構築了以 SV40 promoter 以及 CMV promoter 來表現核心蛋白質的 expression plasmids-- pSG-core 與 pcDNA3.1-core 兩個載體，這兩個載體可以比較 promoter 的強弱是否會影響實驗結果。將載體分別與 TNF- α promoter 攜帶 CAT reporter gene 的 pTNF-CAT plasmid，以 DEAE-Dextran 轉染方法，共同轉染於 H9 cells，以及用 LipofetAmine(GIBCO/

BRL) 轉染試劑，共同轉染於肝癌細胞株 Huh-7 cells，兩天後收取細胞蛋白質進行 CAT assay 來分析核心蛋白質是否能活化 TNF- α promoter。由 CAT assay 實驗結果發現，不論是在 T 細胞株或是在肝癌細胞株中，以 SV40 promoter 表現的核心蛋白質，沒有活化 TNF- α promoter 的能力；同樣的以 CMV promoter 表現的核心蛋白質，也沒有活化 TNF- α promoter 的能力。由本實驗的結果推論，full length 的核心蛋白質可能不具有調控 TNF- α promoter 的活性。

由最近的研究的結果顯示，核心蛋白質進入細胞中，可能產生兩種型式的蛋白(18)，其中 C 端被切割的核心蛋白質能進入細胞核，是否可能由此途徑活化基因，有待更進一步的證明。目前 C 型肝炎病毒的基因產物，除了核心蛋白質外，如 NS3、NS5A 等基因已有實驗數據證明具有活化或影響其他基因(19,20)，未來可以更進一步研究這些基因是否影響 TNF- α 基因的表現。

四、計劃成果自評

本成果報告研究內容是依原計劃內容進行，大部份預期目標皆有達成，但是所要瞭解的現象仍需更多的實驗才能證明。

五、參考文獻

1. Becker S, Quay J, Soukup J. Cytokine (tumor necrosis factor, IL-6, and IL-8) production by respiratory syncytial virus-infected human alveolar macrophages. *J Immunol* 1991;147:4307-4312.
2. Cacciarelli TV, Martinez MO, Gish RG, Villanueva JC, Krams SM. Immuno-regulatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection: pre- and posttreated with interferon alfa. *Hepatology*. 1996;24:6-9.
3. Gong JH, Sprenger H, Hinder F, Bender A, Schmidt A, Horch S, Nain M, et al. Influenza A virus infection of macrophages enhanced tumor

- necrosis factor-alpha (TNF- α) gene expression and lipopolysaccharide-triggered TNF- α release. *J Immunol* 1991;147:3507-3513.
4. Devictor D, Decimo D, Sebire G, Tardieu M, Hadchouel M. Enhanced tumor necrosis factor alpha in coronavirus but not in paracetamol-induced acute hepatic necrosis in mice. *Liver* 1992;12:205-208.
5. Nokta M, Matzke D, Jennings M, Schlick E, Nadler PI, Pollard R. In vivo administration of tumor necrosis factor-alpha is associated with antiviral activity in human peripheral mononuclear cells. *Soc Exp Biol Med* 1991;197:144-149.
6. Tilg H, Wilmer A, Vogel W, Herold M, Nolchen B, Judmaier G, Huber Ch. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastro-enterology* 1992;103:264-274.
7. Larrea E, Garcia N, Qian C, Civeira MP, Prieto J. Tumor necrosis factor alpha gene expression and response to interferon in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996;23:210-217.
8. Gil B, Quian C, Riezu-Boj JI, Civeira MP, Prieto J. Hepatic and extrahepatitic HCV RNA strands in chronic hepatitis C: different patterns of response to interferon treatment. *Hepatology* 1993;18:1050-1054.
9. Qian C, Camps J, Maluenda MD, Civeira MP, Prieto J. Replication of hepatitis C virus in peripheral blood mononuclear cells effect of alpha-interferon therapy. *J Hepatol* 1992;16:380-383.
10. Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM, Rice CM. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* 1993;67:1385-1395.
11. Geist LJ, Monick MM, Stinski MF, Hunninghake GW. The immediate early genes of human cytomegalovirus upregulation tumor necrosis factor-alpha gene expression. *J Clin Invest* 1994;93:474-478.
12. Shih CM, Lo SJ, Miyamura T, Chen SY, Lee YHW. Suppression of hepatitis B virus expression and replication by hepatitis C viral core protein in Huh-7 cells. *J Virol* 1993;67:5823-5832.
13. Chang SC, Yen JH, Kang HY, Jang MH, Chang MF. Nuclear localization signals in the core protein of hepatitis C virus. *Biochem & Biophys Res Commun* 1994;205:1284-1290.
14. Santolini E, Migliaccio G, LaMonica N. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol* 1994;68:3631-3641.
15. Yen JH, Chang SC, Hu CR, Chu SC, Lin SS, Hsieh YS, Chang MF. Cellular proteins specifically bind to the 5'-noncoding region of hepatitis C virus. *Virology* 1995;208:723-732.
16. Ray, R.B., R. Steele, K. Meyer, and Ray, R. Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *J. Biol. Chem.* 1997;272:10983-10986.
17. Ray RB, Lagging LM, Meyer K, Steele R, Ray R. Transcriptional regulation of cellular and viral promotores by the hepatitis C virus core protein. *Virus Research* 1995;37:209-220.
18. Yasui, K., Wakita, T., Tsukiyama-Kohara, K., Funahashi, S-J., Ichikawa, M., Kajita, T., Moradpour, D., Wands, J.R., and Kohara, D. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 1998;72:6048-6055.
19. Fujita, T., Ishido, S., Muramatsu, S., Itoh, M., and Hotta, H. Supression of actinomycin D-induced apoptosis by the NS3 protein of hepatitis C virus.

- Biochem & Biophys Res commun
1996; 229 :825-831.
- 20.Kato, N., Lan, K-H., Ono-Nita, S.K.,
Shiratori, Y., and Omata, M.
Hepatitis C virus nonstructural
region 5A protein is a potent
transcriptional activator. J Virol
1997;71:8856-8859.

