

丙型肝炎病毒蛋白的分子生物学研究进展

王 迪, 张 雪, 杨复华, 李文鑫**

(武汉大学生命科学院, 湖北武汉, 430072)

The Molecular Biology of Hepatitis C Virus Proteins

WANG Di, ZHANG Xue, YANG Fu-hua, LI Wen-xin**

(College of life sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

关键词: 丙型肝炎病毒; 结构蛋白; 非结构蛋白; 分子生物学

中图分类号: R512.6

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2004)05-0526-05

丙型肝炎病毒 (*Hepatitis C virus*, HCV) 是造成慢性肝炎, 肝硬化及肝癌的重要原因之一。目前全球发现约有 1 亿 7 千万人口感染 HCV。HCV 的急性感染通常是没有症状的, 但 50%~80% 的病人会转变成慢性感染患者, 而且大约 20% 的患者会在 20 年内转变成肝硬化。一旦确诊为肝硬化, 每年将会有 1%~5% 的病人发展成为肝癌, 严重地威胁着人类的健康^[1]。目前人们对 HCV 的致病机制以及病理发生过程了解的并不是很透彻, 也缺乏针对 HCV 有效的保护性疫苗和治疗方法。目前治疗 HCV 主要是通过 α -干扰素 (INF- α) 与病毒唑 (ribavirin) 的组合法, 但成功率仅有 45% 左右, 而且副作用大, 这些治疗上的困难在很大程度上是由于缺少有效的 HCV 体外复制系统, 这也成为人类最终战胜 HCV 的主要障碍。近些年来, HCV 的研究进展主要体现在对其基因组及其结构蛋白与非结构蛋白有了更深一步的认识, 同时对 HCV 自我复制过程中的起始阶段有了一定的了解。

1 HCV 基因组的结构

HCV 是单链正链的 RNA 病毒, 属黄病毒科 (*Flaviviridae*) 科。虽然 HCV 的基因组较小, 但仍然分为许多不同功能的基因, 这些基因的表达产物在 HCV 不同阶段的生活史中都发挥着重要的作用。HCV 的基因组大小为 9.6kb, 包括一个大的开放阅读框 (ORF) 和两侧的 5', 3' 非编码区 (NTRs)^[1]。核糖体通过进入 HCV 5' NTR 端的内部核糖体进入位点 (IRES) 将 HCV 基因组翻译成聚蛋

白前体。翻译结束后, 前体聚蛋白被宿主和病毒的蛋白酶共同切割成为 10 个有独立功能的 HCV 蛋白, 根据功能的不同分别命名为 C、E1、E2、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B, 排列顺序为 NH₂-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH (图 1)。另外存在一种 F 蛋白 (for frameshift protein) 或称为 ARFP 蛋白 (for alternate reading frame protein), 是由 HCV 的 C 蛋白 (core protein) 的重叠阅读框翻译得来的, 功能目前还不清楚^[2-4]。根据功能的不同, 将 10 种 HCV 蛋白划分为结构蛋白和非结构蛋白两大类。它们不但在 HCV 的生活史中发挥着重要的作用, 而且也影响着宿主细胞的信号传导、凋亡及物质代谢等一系列生化过程^[5]。

2 结构蛋白

2.1 Core

C 蛋白位于整个聚蛋白的 N 末端, 是病毒衣壳 (capsid) 的组成部分, 可以通过与病毒 RNA 的结合来调节 HCV 基因组的翻译, 并通过与糖蛋白作用组装出完整的 HCV 病毒颗粒。通常情况下, C 蛋白是磷酸化的^[6], 主要结合在细胞膜上, 可以与 II 型载脂蛋白 (apolipoprotein II) 结合, 说明 C 蛋白是一种脂质结合蛋白^[7,8]。目前证实 C 蛋白可以导致微粒体中的甘油三酸脂转移蛋白的活性降低, 从而抑制极低密度脂蛋白 (very low-density lipoprotein) 的组装和分泌^[9]。

人们在研究 C 蛋白的细胞转录调控功能时发现

收稿日期: 2004-02-17 修回日期: 2004-04-16

作者简介: 王迪 (1980-), 男, 辽宁鞍山籍, 硕士研究生, 研究方向为细胞与分子生物学

** 通讯作者。 Corresponding author. Tel: 86-27-87682831, E-mail: liwxlab@whu.edu.cn

C 蛋白可以与细胞质内信号传导通路分子相互作用, 从而调节特定基因的表达^[10]。如 C 蛋白在 IL-6 和 IFN- γ 不同刺激因子的刺激下会对信号传导分子

JAK-STAT 的表达分别产生上调和下调的作用^[11]。但同时也发现, 当采用的实验系统不同时, C 蛋白对于同一个调控路径的作用可能是上调, 也可能是下调。

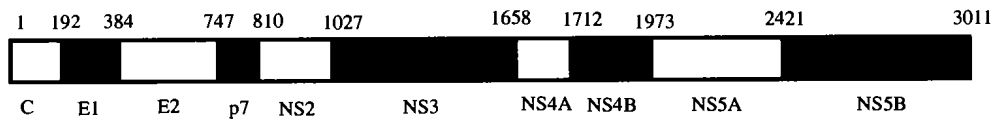


图 1 HCV 基因组结构

Fig. 1 Structure of HCV genome

C 蛋白还可以参与对细胞凋亡的调控, 如可以抑制 c-myc 诱导产生的细胞凋亡^[12]。而且 C 蛋白与肿瘤坏死因子 (TNF) 受体的结合以及与淋巴毒素 β (lymphotoxin β) 受体的结合都可以调控细胞的凋亡^[13-14]。除了这些功能, C 蛋白还可以与很多细胞内源蛋白因子相互作用来反式调控一系列的生理、病理过程如细胞的信号传导、脂类代谢以及癌的发生等。

2.2 E1、E2 和 p7

E1 和 E2 蛋白是高度糖基化的包膜蛋白, 可以相互作用形成非共价的异源二聚体, 这个过程对于 E1 和 E2 的稳定与加工十分重要^[15]。在这种异源二聚体的 C 末端存在一段跨膜结构域, 具有保持内质网的特性^[16]。E1、E2 可以与 ER 陪伴蛋白 (ER chaperones), 例如 Bip 蛋白、clanexin 以及肌网蛋白 (calreticulin) 相互作用, 参与糖蛋白的加工和成熟过程^[17]。

E2 蛋白与病毒受体、tetraspanin、CD81 及低密度脂蛋白的受体也会发生相互作用, 具体的功能仍在研究中。除此之外, E2 蛋白还可以抑制细胞信号传导中的依赖 RNA 的蛋白激酶 (PKR) 的活性, 这可能是造成 HCV 对 α -干扰素抗病毒作用产生抑制作用的原因之一^[18]。

p7 是从 E2 蛋白上切割下来的一段含有 63 个氨基酸的多肽, 其在结构上有两个跨膜结构域。目前还没有确定与 p7 相互作用的因子有哪些, 只是在拓扑学和亚细胞定位上对其有了初步的了解, 证实 p7 是一种小的跨膜蛋白, 可能参与病毒的组装和膜运输^[19]。

3 非结构蛋白

3.1 NS2

通常情况下, NS2 蛋白并不是直接从 HCV 聚蛋白前体上切割下来的, 而是由 NS2 C 末端的二分之一与 NS3 N 末端的三分之一共同组成一种依赖

Zn²⁺ 的蛋白酶, 在宿主细胞分子伴侣蛋白 hsp90 的调控下先将 NS2-NS3 复合物从聚蛋白前体上切割下来, 再将 NS2 与 NS3 分割开来^[20]。这种 NS2-NS3 蛋白酶在 HCV 基因组的复制过程中也起着重要的作用。目前还没有发现当 NS2 从 NS2-NS3 复合体上切割下来后会行使何种功能, 而且 NS2 对于 HCV 的体外复制也不是必需的。

3.2 NS3

NS3 除了与 NS2 形成具有自我切割功能的蛋白酶复合体外, 它的 N 末端还可以与 NS4A 特定部位形成另一种异源二聚体: NS3-NS4A 复合体。该二聚体具有显著的丝氨酸蛋白酶活性, 主要负责切割 HCV 聚蛋白上的 NS3/NS4A、NS4A/NS4B、NS4B/NS5A 和 NS5A/NS5B 连接位点。其中 NS3 的 C 末端结构域有三磷酸核苷酶 (NTPase) 和解旋酶活性, 是 HCV 基因组的复制和翻译过程重要的功能元件^[20]。NS3 首先与单链 RNA 底物结合, 利用其 ATP 酶活性水解 ATP 获取能量, 供复制所需, 再利用其解旋酶活性将双链 RNA 从 3' 端向 5' 端方向解链, 将模板与子链分开。另外发现 NS3 的这种解链机制也可以作用于双链 DNA^[21]。

在细胞信号传导过程中, NS3 通过与蛋白激酶 A (PKA) 的结合, 抑制其在受到刺激时催化细胞核内特定因子磷酸化的活性, 从而影响细胞内的信号传导。另外, NS3 蛋白还可以通过与蛋白激酶 C (PKC) 磷酸化的正常底物竞争, 与 PKC 结合来抑制其参与的信号传导过程^[22]。而 NS3 与细胞凋亡的关系则主要体现在 NS3 可以与肿瘤抑制因子 P53 相互作用来调节细胞的凋亡^[23]。

3.3 NS4A

NS4A 是仅由 54 个氨基酸组成的小蛋白质。其 C 末端是 20 个高度疏水的氨基酸, 可以形成 α -螺旋参与 NS3-NS4A 蛋白酶在细胞膜上的锚定过程。实验发现, NS4A 可以将 NS3 定位于细胞核周围的内质网膜上^[24]。而且 NS4A 蛋白的中间结构域还可

以与 NS3 结合以调节 NS3 的丝氨酸蛋白酶活性和解旋酶活性,更有研究显示,这种调节作用主要表现为抑制作用^[25]。

3.4 NS4B

NS4B 是一种分子量为 27kDa 的疏水蛋白。目前还没有发现与其直接作用的细胞因子,只是推测其也是作为 NS3-NS4A 蛋白酶的一个辅助因子参与 HCV 基因组的复制和翻译过程。

3.5 NS5A

NS5A 是一种高度磷酸化的非结构蛋白,分子量为 58kDa。目前证实有很多激酶参与了 NS5A 的磷酸化过程,而且 NS5A 的磷酸化水平在 HCV 基因组的复制和翻译过程中也起着调节的作用^[23]。重要的是,NS5A 可能是导致目前主要依赖于 α -干扰素治疗 HCV 的疗法成功率低的原因之一。因为 NS5A 可以诱导白细胞介素 (IL)-8 的表达使 HCV 对 IFN 的抗病毒作用产生抑制,同时 NS5A 蛋白上的干扰素敏感性决定位点 (interferon sensitivity determining region, ISDR) 可以通过与依赖 RNA 的蛋白激酶 (PKR) 结合抑制细胞对 IFN 的应答^[26]。目前关于 NS5A 与 PKR 的作用机制及其对 IFN 应答反应的影响已成为研究的热点。

NS5A 在细胞凋亡过程的功能主要表现为调控蛋白激酶 A (PKA) 的表达。在 NS5A 蛋白中隐含着一段核定位信号,但实验中发现,全长的 NS5A 蛋白并不能进入到细胞核中,只有在细胞进入凋亡期时,才可以进入到细胞核内发挥蛋白激酶 A (PKA) 转录调控因子的作用。目前认为是凋亡细胞中的 caspase 家族切割了 NS5A 全长蛋白致使其内部隐含的核定位信号暴露出来,从而使 NS5A 进入细胞核内发挥功能^[27]。另外 NS5A 还可以调控依赖 P53 的 p21/Waf-1 基因的表达参与细胞的凋亡调控。

在 HCV 基因组的复制过程中,NS5A 可以与 HCV 复制过程中的核心酶—依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 (RdRp) NS5B 相互作用来调节其聚合酶的活性,如发现 NS5A 的 105-162 位氨基酸和 277-334 位氨基酸对于 NS5B 与模板 RNA 的结合就有着关键的作用,如果这两段序列发生突变,将大大影响 NS5B 的复制效率。NS5A 对 NS5B 的调节作用主要有两种方式:一种是 NS5A 与 NS5B 结合抑制其 RdRp 活性;另一种则是通过非化学计量 (nonstoichiometric) 的方式刺激 NS5B 的 RdRp 活性^[29,30]。

3.6 NS5B

NS5B 是目前了解较为清楚的 HCV 蛋白,能与

其作用的蛋白因子也有很多,但最重要的功能还是作为 HCV 复制过程的核心酶对 HCV 起着至关重要的作用。HCV 的复制首先是以 HCV 基因组的正链 RNA 为模板合成互补的负链 RNA,然后以该负链 RNA 为模板合成互补的基因组 RNA,从而完成 HCV 基因组的复制。在整个复制过程中,NS5B 作为 RdRp 起着关键的作用,同时也成为设计抗 HCV 药物时考虑的重要靶蛋白。

全长的 NS5B 蛋白由 591 个氨基酸组成,其催化中心是由 N 末端的 530 个氨基酸组成,而 C 末端的最后 21 个疏水氨基酸则负责将 NS5B 锚定在细胞膜上,同时与 NS5B 的催化中心相互作用来调节 NS5B 的聚合酶活性。NS5B 的三级结构中包括“手掌”(palm)、“手指”(fingers)和“拇指”(thumb)三种亚结构,其中 palm 的功能是形成核苷酸转移反应的催化中心;Fingers 主要是与复制所需的三磷酸核苷酸相互作用,而 thumb 则是在 RNA 的复制起始和延伸过程中发挥重要的作用^[31]。另外 NS5B 的结构中还含有一段位于 fingers 和 thumb 之间的独特结构,称为“A1-loop”,由 NS5B 的第 12 位氨基酸到第 46 位氨基酸组成。这段结构为 NS5B 形成封闭的构象提供了许多连接位点,如果这段序列发生突变将会造成 NS5B 活性的大幅降低^[32]。fingers 和 thumb 之间还存在一个特异性的 GTP 结合位点,作为能变构的特异性调控位点在复制过程中发挥作用。目前这样的位点也成为设计抗 HCV 药物时考虑的重要靶位点^[31]。所以研究 NS5B 精细的三级结构及其功能对于了解 HCV 的整个复制过程有着重要的意义。

在未受 HCV 感染的正常细胞中并不表达依赖 RNA 模板合成的 RNA,推测在正常细胞中可能存在着特异性针对 NS5B 的抑制物,能够阻止 HCV 的复制。目前人们已经在体外纯化了 NS5B 蛋白,对其生化性质也有了一定的了解,发现 NS5B 的结构中具有 RdRp 特有的 Gly-Asp-Asp (GDD) 结构序列。但是全长的 NS5B 单体的催化活性并不是很高,推测可能与其结构上的一些缺陷有关^[20]。当 NS5B 形成寡聚体后,其 RdRp 的活性将大大增强,其中的 18 位 Glu 和 502 位 His 起着关键的作用^[33]。另外在 NS5B 聚合酶中还存在着一个由 5 个氨基酸组成的 NTP 通道,负责将足量的 NTP 运输到 NS5B 的激活位点用于合成子链 RNA^[32]。

4 HCV 基因组复制的起始

NS5B 聚合酶使用的模板可以是正链 RNA,也

可以是负链 RNA; 可以是病毒 RNA, 也可以是非病毒 RNA, 但不能是双链 RNA。虽然正、负链 RNA 都可以作为复制的模板, 但通过检测受到 HCV 感染的肝组织中的 RNA 表达水平, 发现正链 RNA 的表达水平是负链 RNA 表达水平的 10 倍之多, 推测 HCV 可能优先利用负链 RNA 作为复制模板^[34]。

NS5B 与基因组 RNA 3'末端的 poly (U) 区及上游保守的茎环 (stem-loop) 结构相结合启动 HCV 的复制^[35]。目前发现 NS5B 的起始方式主要有两种: “copy-back” 起始和 “de novo” 起始。最早发现的 “copy-back” 起始是一种自身引发的复制方式。但 HCV 在体内复制时广泛采用方式并不是 “copy-back”, 而是后来发现的利用 GTP 为复制起始核苷酸的 “de novo” 复制, 虽然这种复制需要在高浓度的 GTP 条件下进行, 但该复制过程中不会有遗传信息的丢失, 而且不需要额外的酶来合成引物或将模板 RNA 与子链 RNA 分割开来, 所以是 HCV 在体内复制时通常采用的方式^[36]。

5 HCV 疫苗

HCV 侵入人体内会产生一种针对其表面膜蛋白抗原决定部位的中和抗体。但这种由人体自发产生的体液免疫反应是不足以抵抗 HCV 感染的, 而且这种体液免疫有较强的个体差异性^[37], 因此研制一种有效针对 HCV 的疫苗已成为研究的热点。目前, HCV 疫苗的研究工作存在着很多困难。首先, HCV 感染人体后在机体内的滴度很低, 通常只能通过 PCR 反应才能检测出来; 其次, HCV 的遗传是不均一的, 到目前为止, 发现 HCV 拥有 6 种分化体形式, 11 种基因型和至少 100 种亚型, 这就使得由一种基因型 HCV 感染引起的免疫反应可能无法抑制由另一种基因型 HCV 引起的再度感染; 再次, 到目前为止, 发现能被 HCV 感染的物种只有人和黑猩猩, 这就使得在研制 HCV 疫苗的过程中, 成本大大提高; 最后, 缺乏有效的 HCV 体外复制模型, 加之 HCV 在体外复制过程中效率很低, 也成为目前迫切需要解决的问题^[38]。尽管如此, 近些年人们在研制 HCV 疫苗的过程还是取得了一定的进展。最初的 HCV 疫苗是在黑猩猩的体内注射 HCV 包膜糖蛋白 (E1/E2), 以 MF59 作为辅剂以产生高水平的中和抗体, 结果显示这种抗体对于低剂量同种基因型的 HCV 感染有一定的抑制作用。也有实验将 HCV 的 C 蛋白作为 E1/E2 糖蛋白疫苗的辅剂, 以解决不同基因型 HCV 混合感染的问题, 因为 C 蛋白在 HCV 的进化过程中有着较高的保守性。

HCV 疫苗研究的另一个进展是将 HCV 蛋白掺入到重组的病毒中, 通过感染其他细胞如昆虫细胞产生类似于 HCV 的蛋白颗粒, 或者在烟草细胞中表达 HCV E2 蛋白的高突变区, 作为特异性针对 HCV 的疫苗。目前随着 DNA 疫苗研究的进展, 将包含有编码 HCV E2 蛋白基因的重组质粒 DNA 作为免疫原来刺激机体产生针对 HCV 的抗体, 但这种疫苗的不足在于无法产生消除性免疫^[39]。尽管近些年 HCV 疫苗研究取得了一定的成果, 但尚不能令人满意。提高疫苗的免疫应答水平及效价成为 HCV 疫苗研制中的关键问题, 同时疫苗的安全性也成为急需解决的问题。

6 问题与展望

目前对丙型肝炎病毒的了解还很不透彻, 许多工作包括揭示 HCV 的毒粒结构、了解早期和晚期的 HCV 生活史、RNA 复制的调控机理以及 HCV 诱导肝病发生的病理过程都需要人们去不断地探索。1996 年 Behrens 等首次报道了 HCV NS5B 具有 RdRp 活性, 是 HCV 基因组 RNA 复制的关键酶, 随后对 HCV RdRp 及其在 HCV 基因组复制中的作用进行了一系列探索。HCV NS5B 具有 RdRp 特性, 但不完全具有 HCV RNA 特异性结合作用, 提示 HCV 在体内复制可能要有其他病毒蛋白或细胞蛋白质因子参与, 因此寻找并鉴定这些病毒或细胞来源的辅助因子是系统研究 HCV RNA 复制过程要解决的首要问题。由于缺乏有效的 HCV 感染细胞模型, 严重阻碍了 HCV 体内复制及其调节机制和抗病毒药物研究。随着对 HCV 分子生物学研究的不断深入将有助于人们设计出新的有效地抗 HCV 药物及针对 HCV 的治疗方法, 弥补目前尚无法有效预防和治疗 HCV 的不足。

参考文献

- [1] Rosen H R, Gretch D R. Hepatitis C virus: current understanding and prospects for future therapies[J]. *Mol Med Today*, 1999, 5: 393-399.
- [2] Walewski J L, Keller T R, Stump D D, *et al.* Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame[J]. *RNA*, 2001, 7: 710-721.
- [3] Xu Z, Choi J, Yen T S, *et al.* Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift[J]. *EMBO J*, 2001, 20: 3840-3848.
- [4] Varaklioti A, Vassilaki N, Georgopoulou U, *et al.* Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 177713-177721.
- [5] Boulant S, Becchi M, Penin F, *et al.* Unusual multiple recoding events leading to alternative forms of hepatitis C virus core protein from genotype 1b[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 45785-45792.
- [6] Shioh Y C, Chih F K, Chun M C, *et al.* Mechanisms for inhibition of

- hepatitis B virus gene expression and replication by hepatitis C virus core protein[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278:591-607.
- [7] Barba G, Harper F, Harada T, *et al.* Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94:1200-1205.
- [8] Hope R G, Murphy D J, Mc Lauchlan J. The domains required to direct core proteins of hepatitis C virus and GB virus-B to lipid droplets share common features with plant oleosin proteins[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 4261-4270.
- [9] Shi S T, Polyak S J, Tu H, *et al.* Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins [J]. *Virology*, 2002, 292:198-210.
- [10] Ratna B R, Asish K. G, *et al.* Functional analysis of a transrepressor domain in the hepatitis C virus core protein[J]. *Virus Research*, 1999, 59: 211-217.
- [11] Atsushi H, Kazuyoshi O, Hisashi I, *et al.* Hepatitis C virus core protein differently regulates the JAK-STAT signaling pathway under interleukin-6 and interferon- γ stimuli[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 28562-28571.
- [12] Ratna B R, Keith M, Ranjit R. Suppression of apoptotic cell death by hepatitis C virus core protein[J]. *Virology*, 1996, 226:176-182.
- [13] Zhu N, Khoshnan A, Schneider R, *et al.* Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor-1 and enhances TNF-induced apoptosis[J]. *J Virol*, 1998, 72: 3691-3697.
- [14] Matsumoto M, Hsieh T Y, Zhu N, *et al.* Hepatitis C virus core protein interacts with the cytoplasmic tail of lymphotoxin- β receptor[J]. *J Virol*, 1997, 71: 1301-1309.
- [15] Cocquerel L, Meunier J C, Op de Beeck A, *et al.* Coexpression of hepatitis C virus envelope proteins E1 and E2 in cis improves the stability of membrane insertion of E2[J]. *J Gen Virol*, 2001, 82: 1629- 1635.
- [16] Darius M, Volker B, Rainer G, *et al.* Hepatitis C: molecular virology and antiviral targets[J]. *Trends in Mole Med*, 2002, 8: 476-487.
- [17] Choukhi A, Ung S, Wychowski C, *et al.* Involvement of endoplasmic reticulum chaperones in the folding of hepatitis C virus glycoproteins [J]. *J Virol*, 1998, 72: 3851-3858.
- [18] Chunfu W, Jill P, Rhea S, *et al.* Alpha interferon induces distinct translational control programs to suppress hepatitis C virus RNA replication[J]. *J Virol*, 2003, 77: 3898-3912.
- [19] Carrere K S, Montpellier P C, Cocquerel L, *et al.* Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus[J]. *J Virol*, 2002, 76: 3720-3730.
- [20] Raffaele D F, Licia T, Sergio A, *et al.* Approaching a new era for hepatitis C virus therapy: inhibitors of the NS3-4A serine protease and the NS5B RNA-dependent RNA polymerase[J]. *Antiviral Research*, 2003, 58:1-16.
- [21] Mikhail K L, Smítá S P. Helicase from hepatitis C virus, energetics of DNA binding[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 29377-29385.
- [22] Borowski P, Heiland M, Feucht H, *et al.* Characterisation of non-structural protein 3 of hepatitis C virus as modulator of protein phosphorylation mediated by PKA and PKC: evidence for action on the level of substrate and enzyme[J]. *Arch Virol*, 1999, 144:681-701.
- [23] Ishido S, Hotta H. Complex formation of the nonstructural protein 3 of hepatitis C virus with the p53 tumor suppressor[J]. *FEBS Lett*, 1998, 438: 258- 262.
- [24] Wolk B, Sansonno D, Krausslich H G, *et al.* Subcellular localization stability and trans-cleavage of hepatitis C virus NS3-4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines[J]. *J Virol*, 2000, 74: 2293-2304.
- [25] Sabina P, Agoritsa V, Maria N, *et al.* Modulation of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity by the non-structural (NS)3 helicase and the NS4B membrane protein[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 45670-45679.
- [26] Polyak S J, Khabar K S, Paschal D M, *et al.* Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response[J]. *J Virol*, 2001, 75: 6095-6106.
- [27] Satoh S, Hirota M, Noguchi T, *et al.* Cleavage of hepatitis C virus nonstructural protein 5A by a caspase-like proteases in mammalian cells[J]. *Virology*, 2000, 270: 476-487.
- [28] Majumder M, Ghosh A K, Steele R, *et al.* Hepatitis C virus NS5A physically associates with p53 and regulates p21/waf1 gene expression in a p53-dependent manner[J]. *J Virol*, 2001, 75:1401-1407.
- [29] Yukinhiro S, Hong L, Weiping Q, *et al.* Hepatitis C virus NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277:11149- 11155.
- [30] G Waris, A Siddiqui. Regulatory mechanism of viral hepatitis B and C[J]. *J Biosci*, 2003, 28:311-321.
- [31] Michelle P Walker, Zhi Hong. HCV RNA-dependent RNA polymerase as a target for antiviral development[J]. *Cur Opin Pharmacol*, 2002, 2: 1-6.
- [32] Patrick L, Vladimir A, Atul A A, *et al.* Modulation of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity by structure-based site-directed mutagenesis[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 38838-38846.
- [33] Weiping Q, Hong L, Takahiro N, *et al.* Oligomeric interaction of hepatitis C virus NS5B is critical for catalytic activity of RNA-dependent RNA polymerase[J]. *Cur Opin Pharmacol*, 2002, 2:1-6.
- [34] Dashyant D, Kevin J D, Victor K J, *et al.* Identification and biological characterization of heterocyclic inhibitors of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 38322- 38327.
- [35] Takahito K, Koyu H, Michinori K, *et al.* Promoter/Origin structure of the complementary strand of hepatitis C virus genome[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 28700-28705.
- [36] Sandrine R, Michel V, Leila S C, *et al.* HCV RNA-dependent RNA polymerase replicates in vitro the 3'terminal region of the minus-strand viral RNA more efficiently than the 3'terminal region of the plus RNA[J]. *Eur. J Biochem* 2001, 268: 5857-5867.
- [37] Abrignani S, Rosa D. Perspectives for a hepatitis C virus vaccine[J]. *Clin Diag Virol*, 1998, 10:181-185.
- [38] Sergio A, Michael H, Henry H H. Perspectives for a vaccine against hepatitis C virus[J]. *J Hepatol* 1999, 31: 259-263.
- [39] Raymond S. Koff. Hepatitis vaccines: recent advances[J]. *Inter J Parasitol*, 2003, 33: 517-523.