

東海大學生命科學系碩士論文

在 CCL13-HBx (Chang-HBx) 穩定細胞株中 HBx 蛋白質造成細胞凋亡的影響

Apoptotic effect induced by hepatitis B virus X protein (HBx) in the CCL13-HBx (Chang-HBx) stable cell line

研究生：蔡薰毅

Ju-I Tsai

指導教授：黃光裕 博士

Guang-Yuh Hwang, Ph.D.

中華民國九十八年六月

致謝

回想起碩士班的生涯，時間實在是轉眼飛逝。從另一個學校來到東海大學，內心與現實層面的適應，對我而言都是一種挑戰。首先我要感謝的是我的指導教授黃光裕老師，謝謝黃老師在這兩年的時間裡，願意給我時間摸索，給我機會犯錯，給我機會努力。感謝鄭葦教授，無私的提供細胞培養的耗材，讓我能以細胞株完成實驗。也感謝台中榮總徐士蘭博士讓我有機會以裸鼠作為實驗動物，並且幫助、提醒我釐清問題，同時，也承蒙胡承波教授、蔡玉真老師給予實驗邏輯上的指正。所有口試老師們在整個實驗上的指導，對我而言都是非常寶貴的意見。

另一方面，感謝郭展延博士以及余振源學長、林成翰學長在忙碌之餘，仍抽空給予我實驗上的引導。榮總方面，非常感謝楊志學學長多次親自指導裸鼠皮下誘發 HCC 的技術。路上也仰賴碩士班同學，黃鈺婷（呷噹）、張育菁（小毛巾）以及陳靜怡（仔仔），陪伴我一起度過艱困的時刻，獨自在深夜安靜的實驗室，失敗裡有你們的身影和我一起奮鬥，讓我覺得自己並不孤獨，忽然就有了力量。哥哥蔡覺毅醫師、實驗室滕傑林醫師，大學同學高林賢，也都在精神層面帶給我很大的支持與鼓勵。實驗室裡的大學部學弟妹，周姿妤（姿姿）、陳俊名（小白）在這段期間幫忙我處理實驗室的基礎工作，也讓我覺得感動。當然，十分感激父母在我求學期間提供無虞的經濟條件，讓我能夠順利完成大學甚至是碩士班學業。劉宜芳與李慧儒小姐在實驗室相關行政事物的協助亦是不可或缺。

這一份碩士論文何其微小，卻是必須成就在那麼多的幫助裡。感謝二十多年生命裡曾經幫助過我的所有師長、同學、學長姐弟妹、朋友、家人，我知道一帆風順不容易，未來意即更多的考驗的開始，我相信你們曾經的付出，永遠都會是我最佳的動力。一直這麼相信，人生像是小星星變奏曲，有時燦爛，有時黯淡，但那都是絕美的風景。謝謝你們讓我記得世界的美麗，願你們也能與我分享眼裡的美景。一直覺得自己很幸運，被給予的其實太多，但是自己的力量又何其微薄，我只能期許自己夠珍惜，在往後的日子裡，也許有一天，能夠把這些曾經得到的幸運，再送出去。

目錄

中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
論文正本	
前言.....	3
一、 B 型肝炎病毒 (HBV)	3
1.1 B 型肝炎病毒簡介.....	3
1.2 B 型肝炎病毒生活週期.....	4
二、 HBx 蛋白質 (HBx)	4
三、 HBx 與細胞凋亡 (apoptosis)	5
3.1 細胞凋亡的研究.....	6
3.1.1 外因性途徑.....	8
3.1.2 內因性途徑.....	10
3.2 HBx 細胞凋亡對細胞凋亡的影響.....	11
3.2.1 HBx 抑制細胞凋亡的研究.....	11
3.2.2 HBx 促進細胞凋亡的研究.....	13
研究目的與重要性.....	18
目標 1、在裸鼠所誘發的 HCC 中，先再次檢視 DNA 片段化的結果， 確定細胞凋亡現象的發生。.....	21

目標 2、在 CCL13-HBx 穩定細胞株中，是否在表現 HBx 的情形下， 誘發細胞凋亡現象的發生。.....	21
目標 3、在 CCL13-HBx 穩定細胞株中，HBx 是否有會調控 caspase-3 蛋白質的表現量，以及 caspase-3 及 caspase-8、caspase-9 的活性。...21	21
目標 4、在 CCL13-HBx 穩定細胞株中，是否可能會透過內因性中介 (intrinsic-mediated) 途徑誘發細胞凋亡現象的發生。.....	22
目標 5、在 CCL13-HBx 穩定細胞株中，是否可能會透過外因性中介 (extrinsic-mediated) 途徑誘發細胞凋亡現象的發生。.....	23
材料與方法.....	24
結果.....	36
討論.....	47
參考文獻.....	55
圖目.....	61
附圖.....	74
個人資料.....	80

中文摘要

B 型肝炎病毒的 X 蛋白質 (HBx) 在宿主細胞生長上扮演關鍵性的角色。我們將 CCL13 和 CCL13-HBx 穩定細胞株注射於 4-8 週大的裸鼠，在 HBx 存在的細胞，其誘發之 HCC 尺寸顯著的較小。在 CCL13-HBx 穩定細胞株中，HBx 會負向調控 Wnt-3 / β -catenin，透過抑制 GSK-3 β / β -catenin cascade 路徑而抑制細胞增生，同時透過促進細胞凋亡，引起細胞死亡。然而，在 CCL13-HBx 穩定細胞株中牽涉的分子機制並不清楚。我們將探討 HBx 蛋白質的表現是否誘發細胞凋亡，以及是否可能透過外因性 (死亡受器-中介) 以及內因性 (粒線體-中介) 的凋亡路徑，達到細胞死亡的作用。在 CCL13-HBx 穩定細胞株中，可明顯偵測到 DNA 片段化和 TUNEL 等 DNA 斷裂的訊號。此外，利用西方點墨法分析，我們也發現 HBx 的誘導下，caspase-3 的表現量會上升。同時，在 HBx 的誘導下 caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 的活性也會增加。在內因性訊息傳遞方面，也藉由 JC-1 染色見到粒線體膜電位的下降。在西方點墨法裡，促凋亡蛋白質 Bax、Bad 表現量有少量的增加，而細胞質中的 Cytochrome C 同時也發現在 HBx 的誘導下增加。在外因性依賴的途徑中 caspase-8 是主要的分子。我們的研究也發現在 HBx 的誘導下，caspase-8 的表現量會上升。在 HBx 表現時使用 caspase-8 抑制劑 Z-IETD-FMK，caspase-8 和 caspase-3 的表現量將明顯減少。我們同時也發現在抑制劑 Z-IETD-FMK 的使用下，會使得細胞生長抑制以及細胞凋亡的現象，包含 DNA 片段化以及 TUNEL 訊號均減少。總結前言，這樣的結果顯示 HBx 可能透過內因性以及外因性途徑同時誘發細胞凋亡的發生。

Abstract

The hepatitis B virus X protein (HBx) plays a critical role in host proliferation cell growth. We have injected CCL13 and CCL13-HBx cell lines into 4 to 8 weeks old nude mice, and the tumor size of the induced-HCC (hepatocellular carcinoma) was significantly reduced by HBx. HBx downregulated the Wnt-3/ β -catenin by repressing cell proliferation via GSK-3 β / β -catenin cascade and caused cell death by triggering cell apoptosis in a CCL13-HBx stable cell line. However, the molecular mechanism involved in apoptotic pathway in a CCL13-HBx stable cell line was still unclear. We focused on signaling pathway whether apoptosis can be observed through extrinsically (death receptor-mediated) and intrinsically (mitochondria-mediated). The phenomena of apoptosis including DNA fragmentation and the TUNEL signal assay were confirmed by CCL13-HBx stable cell lines upon HBx induction. These results showed that the expression of caspase-3 was increased upon HBx induction by Western blotting. Furthermore, caspase-3, caspase-8 and caspase-9 activity were also increased upon HBx induction. In the intrinsic pathway, the loss of mitochondrial membrane potential was also observed by JC-1 staining. The expression of pro-apoptotic proteins, Bax and Bad were slightly increased and Cytochrome C was also increased upon HBx induction. Caspase-8 is the main molecule in the extrinsic-dependent pathway. The expression of caspase-8 was also increased upon HBx induction by Western blotting. In presence of caspase-8 inhibitor, Z-IETD-FMK, the expression of caspase-8 and caspase-3 were decreased upon HBx induction. We also found that the cell growth inhibition and the phenomena of apoptosis including TUNEL signal and DNA fragmentation were rescued in presence of Z-IETD-FMK. Taken together, these data suggested that HBx may induce apoptosis through both the extrinsic and intrinsic pathways.

前言

一、B 型肝炎病毒 (Hepatitis B virus, 簡稱 HBV)

(1.1)、B 型肝炎病毒簡介

HBV 是典型的肝炎病毒科 (hepadnaviridae)，是為小型 DNA 病毒，宿主主要以靈長類動物為主，具有可以嵌入宿主 DNA 的特性。其基因組為環形，長為 3.2 kb，具部分雙股螺旋，包括較短的正股以及完全 (full-length) 的負股，由四個 overlapping 的 ORF (open reading frame) 構成 (Seegre and Mason, 2000)。

HBV 共有四個 ORF (open reading frame)，分別為 C、S、P 與 X。C 讀碼區可做出由 183 個胺基酸組成的核心抗原 (core antigen, HBcAg)，可以形成病毒的外鞘 (nucleocapsid)，而另一個由同讀碼區產生的 e 抗原 (e antigen, HBeAg) 則會在病毒在大量複製，傳染性強時出現；S 讀碼區則產生表面抗原 (surface antigen, HBsAg)，大小為 226 個胺基酸；P 讀碼區則能轉錄產生 832 個胺基酸，其中包含 DNA 聚合酶 (DNA polymerase) 和反轉錄酶 (reverse transcriptase) (Bouchard and Schneider, 2004) (Zhang et al., 2006)。

目前 HBV 的感染被認為與 HCC (Hepatocellular carcinoma) 的形成具有強烈的相關性 (Block et al., 2003)。同時在本實驗室最初的實驗結果中顯示，在 HCC 病患的血清中，有 70% 的比例具有抗 HBx 抗體的反應，而由病患肝臟組織中萃取的蛋白質經西方點墨法證實，也有 85% 均可被專一性的 HBx 抗體偵測到 (Hwang et al., 2003)。

(1.2)、B 型肝炎病毒生活週期 (Life cycle)

在病毒進入肝細胞後，核殼體 (nucleocapsids) 攜帶 HBV DNA 進入宿主核內，此時環形 DNA 會改變形式成為 cccDNA (covalently closed circular DNA)，繼而成為病毒四個 RNA 的模版。製造出的 mRNA 會在細胞質中轉譯成 HBV 蛋白質。其中最大的 RNA (pre-genome RNA) 可作為 HBV 複製的模版。經由聚合酶 (polymerase) 以及反轉錄酶 (reverse transcriptase) 的作用，將其轉錄成為完整的負股 DNA 以及正股 DNA。在複製完成時，將可藉由內質網及高基氏體再由胞內分泌出去 (Rehermann and Nascimbeni, 2005)。

二、HBx 蛋白質 (HBx)

HBx 如前述是由 HBV 所產生的一個小型蛋白質，由 154 個胺基酸構成。分子量約為 17kDa。由於無法由胺基酸序列推測其同源蛋白質及其功能，故命名為 HBx (Miller and Robinson, 1986)。目前 HBx 被認為是一個多功能的非結構性蛋白，會刺激 HBV 的轉錄和複製增加，而同時 HBV 也會需要增加 HBx 來進行共同活化 (coactivation) (Murakami, 2001)。

目前已知 HBx 的功能如下列所述：可調整基因的轉錄、基因毒性壓力反應 (genotoxin stress responses)、訊號傳遞、蛋白質的降解，細胞週期的控制和致癌性 (carcinogenesis)，同時也與細胞增殖與細胞程式凋亡有關 (Murakami, 1999)。HBx 在扮演活化轉錄活化的角色上，可在核中和轉錄因子直接產生交互作用，進而具有活化轉錄的功能，作用於包含致癌基因、細胞激素和生長因子；若在細胞質中則會活化訊號傳遞路徑，如 Src、Jak1、MAP kinase、PI3K kinase、PKC-binding protein (Um et al., 2006) (Murakami, 1999)。

三、HBx 與細胞凋亡 (apoptosis)

一般而言，細胞死亡 (cell death) 可被區分成程式細胞凋亡 (programmed cell death) 和非程式細胞凋亡 (non-programmed cell

death)，而前者又可區分為細胞凋亡（apoptosis）和自體吞噬（autophagy），後者則主要指細胞壞死（necrosis）。總體而言，細胞程式凋亡最大的不同是不會引發發炎反應，對於生物體而言是對周圍組織及細胞傷害性較小的方式。

（3.1） 細胞凋亡的研究

細胞凋亡在生理學上將可消去受損壞以及不被需要的細胞，並且不會引發額外發炎反應的計畫性死亡。Apoptosis 源自希臘，意涵為葉子凋落，在生物體中是指自主性所引發的自殺性細胞死亡。這在器官發育以及維持細胞正常數目和生理功能上扮演很重要的角色。而若是細胞凋亡的機制出現問題，就可能使細胞生長失控，這將可能導致癌症的發生。

凋亡細胞最主要的變化是核內染色質緊縮，形成染色質塊，並產生染色質邊聚（margination），即週邊偏移，指染色質會聚集在核膜的邊緣，或是在核中央產生染色質中聚（centronation）。之後，將會發生細胞核膜的崩解，細胞核的分解，以及細胞型態上突起(blebbing)的產生，這個時候會形成凋亡小體（apoptotic body），將 DNA 斷片、細胞碎片和胞器等包裹，交由吞噬細胞吞噬。在細胞凋亡中，DNA

在核小體連接部位經由核酸內切酶作用，將會發生斷裂，產生的 DNA 斷片，會形成 180-200 bp 或其整數倍的片段化情形，在洋菜膠體 (agarose gel) 電泳中將會呈現梯狀分佈 (ladder)，這常被用來作為細胞凋亡的指標性現象 (Mills et al., 1999) (Saraste and Pulkki, 2000)。

而誘發細胞凋亡的原因，又可大致廣泛的分成兩大類：

1. 外因性途徑 (The extrinsic pathway)

主要指的就是由死亡受器 (death receptor) 所引發，直接活化下游 caspase cascade 所造成的細胞凋亡，例如 Fas / FasL 一旦接受訊號活化，將會藉由 DSIC (death-inducing signaling complex) 包含 FADD (Fas-associated death domain)，將可以藉此聚集 pro-caspase-8，繼而啟動 caspase 的一連串反應，導致細胞發生凋亡 (Putcha et al., 2002)。

2. 內因性途徑 (The intrinsic pathway)

主要指的就是透過調節 Bcl-2 相關家族的蛋白質，造成粒線體電位下降，同時釋放有關粒線體引發細胞凋亡的蛋白質，如 Cytochrome C，繼而活化 caspase-9，最後經由 caspase-3 繼而引發細胞凋亡的發生 (Putcha et al., 2002)。

(3.1.1) 外因性途徑 (The extrinsic pathway)

死亡受器 (death receptor) 所引發的細胞凋亡，是 caspase cascade 的活化所引起的連鎖效應。caspase 的全名為 cysteine-dependent aspartate-specific proteases，其未活化的前驅狀態具有 4 個 domains：包含 N 端的 polypeptide (prodomain)；大次單元 (large subunit)；連結區域 (linker region)，含 Asp residues；以及小次單元 (small subunit) (Nicholson and Thornberry, 1997)。而 caspase 要進行活化時，會發生 proteolytic cleavage，去除 prodomain 和 linker region，並組合 large subunit 和 small subunit，形成活化態的形式。caspase 在因為功能上面的不同，可以大致分為三種：(1) 細胞激素成熟、發炎反應；具有較長的 prodomain (large prodomain)，包含 caspase-1、caspase-4、caspase-5、caspase-12、caspase-13、caspase-14，與發炎反應相關；(2) 細胞凋亡的起始，主要指 initiator caspase；具有較長的 prodomain (large prodomain)，其中內含 DED (death effector domain)，包含 caspase-8、caspase-10、caspase-9、caspase-2 為代表，具有啟動 caspase cascade 的特性；(3) 細胞凋亡的傳遞，主要指 effector caspase；具有較短的 prodomain (short prodomain)，包括 caspase-3、caspase-6、caspase-7 為主，可以將路徑中傳遞的訊息放大，造成下游

效應 (Chowdhury et al., 2008) (Hill et al., 2003) (Nuñez et al., 1998)。

而其中 caspase-2 原本被認為是 initiator caspase，但是在 2006 年有文獻指出，在缺乏 caspase-8 的人類 T 細胞株 (HUT7) 中，caspase-2 並不能起始細胞凋亡的發生，所以雖然 caspase-2 目前仍被歸類為 initiator caspase，但實際上只會協助細胞凋亡的發生，並不能直接起始細胞凋亡的發生 (Lavrik et al., 2006)。

caspase-8

caspase-8 會與死亡受器直接連結，被認為是 TNF- α receptor (TNF- α R)、Fas 引發細胞凋亡路徑必須的存在。如果有不正常的表現，將會影響鼠胚心臟發育，使其在發育早期就發生死亡 (Varfolomeev et al., 1998)。

在外因性的途徑上，將可透過死亡受器促進細胞凋亡的發生。目前細胞死亡受器約可分成三類，分別是：FasL / Fas (CD95)、TNF- α /TNF- α R 以及 TRAIL (TNF- α apoptosis inducing ligand)/CD5、6。若以 Fas 為例，在有 ligand 傳入時，會使得受器上的 DD (death

domain) 和細胞中的 FADD (Fas associated death domain orotein) 結合，並藉由 FADD 上另一個 death effector domain (DED) 與 pro-caspase-8 結合，此時 pro-caspase-8 會進行 autocleavage，繼而活化下游 caspase-3，啟動細胞凋亡發生 (Mak and Yeh, 2002) (Ashkenazi, 2008) (Ashkenazi, 2002)。

caspase-3

caspase-3 是細胞凋亡中一個非常重要的分子，無論是外因性或內因性途徑，最後都會活化 caspase-3，因此將可啟動名叫 CAD (caspase-activated DNase) 的核酸酶，繼而使得 DNA 被切割產生片段化，促使細胞凋亡的發生 (Nuñez et al., 1998) (Lechardeur et al., 2004) (Nagata, 2000)。

(3.1.2) 內因性途徑 (The intrinsic pathway)

另一方面，在粒腺體所引發的細胞凋亡途徑中，主要是過過 Bcl-2 家族來調控，如促凋亡蛋白 Bad、Bax 以及抑凋亡蛋白 Bcl-2 來進行，當 Bad 自細胞調節蛋白 14-3-3 脫離後，將可以易位至粒腺體外膜，與抑凋亡蛋白 Bcl-2 結合，此時將不能再執行原本可抑制促凋亡蛋白

質 Bax 的作用，繼而使 Bax 形成 homo-oligomer，繼而引發粒腺體外膜產生通道，並且發生粒線體電位下降的情形，此時將會導致粒線體中的 Cytochrome C 釋出，Cytochrome C 將會和 Apaf-1 形成凋亡小體 (apoptosome)，活化 pro-caspase-9，使其形成 dimer，進而啟動 caspase cascade，最後活化 caspase-3，造成細胞凋亡的發生 (Putcha et al., 2002) (Nuñez et al., 1998)。

(3.2) HBx 對於細胞凋亡的影響

HBx 對於細胞凋亡的影響，仍然是有分歧的，所以下文各就兩邊，包含 HBx 抑制細胞凋亡，以及 HBx 促進細胞凋亡加以回顧。

(3.2.1) HBx 抑制細胞凋亡的研究

在 Madden 等人的研究中，偵測在轉殖 X 基因的小鼠中與野生型小鼠 TUNEL 的訊號，發現 HBx 的存在並不能明顯引發細胞凋亡現象的增加 (Madden, et al., 2000)。同時在 Chang liver cell line 中，轉染 HBx 的質體，HBx 會透過與 p53 產生交互作用，進而抑制 PTEN，使 AKT 活化，而使細胞存活，阻止細胞凋亡 (Chung et al., 2003)。

在 Gottlob 等人的實驗中，以 REV2 cell (rat fibroblast cell) 以轉染的方式表現 HBx 時，將會使得 DNA 片段化的結果減輕，同時 caspase-3 活性也有降低的情形發生 (Gottlob et al., 1998)。

同時也有文獻指出，在 HepG2 細胞株中，同時表現 HBx 和 URG7，將會一方面使得 caspase-3、caspase-8 活性下降，阻斷 TNF- α 引發的細胞凋亡，另一方面則透過抑制 PI3K/AKT 訊號傳遞路徑，繼而抑制 GSK-3 β 來抑制細胞凋亡 (Pan et al., 2007)。

而在 Lee 等人的研究中，於 Chang cell line 中轉染 HBx，在無血清培養條件下，有 HBx 者的存活率將會高於正常 Chang cell line。同時無血清培養條件下，在 Chang liver cell line 中，將可以在 24、48 小時看到 DNA 片段化情形產生，但在有轉染 HBx 者則發現 DNA ladder 情形有減少的現象，並且 caspase-3 的活性相較之下有降低的傾向。此篇研究證實了 HBx 會透過 HBx-PI3K-AKT-Bad 訊息傳遞路徑，活化 PI3K，磷酸化 AKT 於 Ser-437，引發 Bad P-136 的磷酸化，透過增加細胞存活的階梯反應 (survival signaling cascade)，抑制細胞凋亡 (Lee et al., 2001)。

(3.2.2) HBx 促進細胞凋亡的研究

而死亡受體 TRIAL，最近有文獻指出，在表現 HBx 的情形下，將會增加 TRIAL 在 mRNA 上的轉錄，同樣的，TRIAL 蛋白質的表現量在細胞萃取液中也有增加的傾向，同時若將轉染表現 HBx 蛋白質的 HepG2 細胞與人類正常功能的初級肝臟細胞一起培養，則其具有將正常肝細胞殺死的能力 (Yang et al., 2007)。

而在同時表現 HBx 與 Bcl-2 的基因轉殖鼠 (AX26/pk-hbc1-2) 中，以腹腔注射 Fas 來誘發細胞凋亡，可以發現其中單純表現 HBx 與 HBx/Bcl-2 時，其肝臟組織切片的 TUNEL stain 細胞凋亡的比例是很相似的 (25.6%、24.6%)，相較之下，單純 overexpression 人類 Bcl-2 的品系則只有 11.6% 的肝細胞凋亡；overexpression 人類 Bcl-2 的基因轉殖鼠，在接受 Fas 注射誘發細胞凋亡現象在 48 小時時存活率有 79%，而表現 HBx 與 HBx/Bcl-2 則均只有 25% 的轉殖鼠存活。以上結果暗示了 HBx 的存在具有抵抗 Bcl-2 抑制細胞凋亡的潛力，而同時，作者也發現 HBx 不會與 Bcl-2 家族的蛋白質直接結合，包含 Bcl-2、Bax (Terradillos et al., 2002)。

同樣以 Fas 來誘發細胞凋亡現象發生，在 Terradillos 等人的研究中，有轉殖 HBx 基因的老鼠以 TUNEL 來偵測肝細胞產生的細胞凋亡比例，是未轉殖前的兩倍，同時在 MMT 的存活率分析中，也顯示出具有表現 HBx 的細胞株，將會使其對於 Fas 誘發的細胞凋亡更敏感，肝細胞株生存率由與表現 HBx 的組別相比由 70-80% 下降至 21-48%，而這樣的情形的產生將與 p53 的表現無關 (Terradillos et al., 1998)。

而在 Chang liver cell line 中，加入 TNF- α 誘導細胞凋亡發生，此時以 trypan blue 染色，計算細胞凋亡比例，發現在 TNF- α 存在之下 Chang liver cell line 會出現約 20% 的細胞凋亡比例，但若同時再表現 HBx，則會使細胞凋亡的比例上升至 60%，此時也可觀察到發生 DNA ladder 的現象發生。而若是在 HBx 序列加上 NLS，會使 HBx 表達於細胞核內，另外在 HBx 序列加上 SLN 作為對照組，觀察對細胞凋亡的影響，結果顯示具有 NLS 的 HBx 會大幅的增加約 40% 細胞凋亡的發生率。這暗示了 HBx 在 Chang liver cell line 所引發的細胞凋亡現象是透過在細胞質中影響訊息傳遞路徑而發生 (Su and Schneider, 1997)。

同樣在 Chang liver cell line 中以轉染的方式來表現 HBx，在 Kim 等人的研究中，藉由細胞流式儀的分析，也看到在 TNF- α dose-dependent 的誘導之下，Annexin V（早期 apoptosis 指標）及 7-AAD（晚期 apoptosis 指標）都有增加的傾向；另外，同時也發現 TNF- α 和 Fas 的誘導之下，caspase-8 以及 caspase-3 活性均有提高的傾向，這另一方面也暗示了，在 Chang liver cell line 中，caspase 的活化可能透過 TNF- α 和 Fas 進而引發（Kim and Seong, 2003）。

而在 HBx 的相關文獻中，透過內因性，經由粒線體而引發的細胞凋亡而目前研究顯示，HBx 也會影響粒線體。在 Takada 的研究中，HuH7 細胞株培養，並轉染 HBx 質體情形之下，使用免疫螢光染色將可見到 HBx 在粒線體周圍聚集，同時也偵測到 TUNEL 及 Cytochrome C 的訊號，並推測會因此引起細胞凋亡（Takada et al., 1999）。

另一方面，也有研究指出，在以轉染來表現 HBx 的情形下，HuH7 細胞株會發生型態上的斑點化（blebbing），同時在螢光顯微鏡下可以看到 HBx 將會和粒線體表達的位置相重疊（localization），此時以 JC-1 測量粒線體的電位，發現在 localization 的位置將會有電位下降的情形發生；同時作者也去以西方點墨法檢測 Cytochrome C 的

釋出，並沒有發現增加的情形。另一方面，作者也去使用廣泛性 caspase 抑制劑 Z-VAD-FMK 與專一性 caspase-3 抑制劑 Z-DEVD-FMK 來觀察對細胞 blebbing 的影響，結果發現以廣泛性 caspase 抑制劑處理時抑制細胞 blebbing 時，可以以 dose-dependent 的方式見到抑制效果，然而專一性 caspase-3 抑制劑 Z-DEVD-FMK 則否，因此作者認為在 HuH7 細胞株中，HBx 誘發的細胞凋亡將不會透過 Cytochrome C / caspase-3 的途徑 (Shirakata and Kioke, 2003)。

而最近有研究顯示，在 HepG2 細胞株中，以轉染方式表現 HBx，透過免疫沈澱法證明 HBx 會和 Bcl-2 家族中 class-II 的促凋亡分子 (pro-apoptotic) :Bax 產生交互作用，使其與細胞中調節蛋白 14-3-3 分子的結合變弱，繼而使得 Bax 釋出轉位至粒線體的表現量增加，並且降低粒線體膜電位，增加下游 Cytochrome C 釋出，並提高 caspase-3 的活性，而統計中 DNA 的凝集現象也提高，誘使細胞凋亡發生(Kim et al., 2008)。

另外，本實驗室的先前研究中，CCL13-HBx 穩定細胞株 (Chang-HBx stable cell line) 在細胞凋亡的部分，也透過 DNA 片段化 (DNA fragmentation)，caspase-3 活性、TUNEL 螢光染色以及

流式細胞儀 sub-G1 尖峰產生的檢測中，發現 HBx 將會誘導細胞株產生細胞凋亡現象的發生 (Kuo et al., 2008a)。

而若將前段所述的 CCL13-HBx 穩定細胞株以及原本 CCL13 cell line (Chang liver cell line) 注射於裸鼠皮下，可以明顯的看見表現 HBx 的情形下其腫瘤尺寸將大幅減小，直徑只有 5-12 mm，相較於 CCL13 cell line 的 14-32 mm，是十分不同的 (Wang et al., 2004)。此腫瘤經證明具有 HCC (Hepatocellular carcinoma) 的分子標記 (Kuo et al., 2008c)。而在西方點墨法上，促凋亡蛋白質，如 p53、Bax、Bad、caspase-8、caspase-3 以及其他分子 GSK-3 β 均被正向調控，而抑凋亡蛋白質，如 Bcl-2 以及其他分子 β -catenin 則是被負向調控，而且在 HBx 誘發之 HCC 中，可明顯看到 DNA 片段化的產生，證實 CCL13-HBx 穩定細胞株在 *in vivo* 誘發的 HCC 中，其產生的生長抑制現象有透過細胞凋亡而產生的；同時初步在二維電泳中，找到磷酸化的 MLC (Myosin Light Chain) 將會被正向調控，但詳細的分子機制並不清楚 (Kuo et al., 2008c)。但文獻指出，在細胞凋亡中發生細胞型態變化時，磷酸化的 MLC 將會增加 (Sebbagh et al., 2001)。這也說明了我們實驗室所建構的細胞株，在誘導表達 HBx 時，有促進細胞凋亡的現象發生，但詳細可能機制，仍需要進一步研究。

研究目的與重要性

在本實驗室先前的研究中，於 CCL13 cell line（又稱 Chang liver cell line）的基礎上建構了穩定表達 HBx 的細胞株，稱為 CCL13-HBx 穩定細胞株（又稱 Chang-HBx stable cell line），在移除四環黴素（tetracyclin，簡稱 tet）0.5 小時之後，在 tet-off 系統之下就可以表現 HBx 蛋白質，而 HBx 的表現量也會隨著時間的增加而逐漸增加（Wang et al., 2004）。在移除四環黴素的條件（即表達 HBx 蛋白質時）下，發現 CCL13-HBx 穩定細胞株相對於 CCL13 cell line，在含血清的培養條件下生長較慢，同時以流式細胞儀偵測，發現有細胞週期（G1/S）遲滯的情形。而將此細胞株在裸鼠體內施行皮下注射，誘發腫瘤產生，發現在三週開始，表現 HBx 的情形中腫瘤的大小將顯著小於只注射 CCL13 cell line 誘發出的腫瘤，因此認為腫瘤的生成在 HBx 的表現下將會受到抑制（Wang et al., 2004）。此腫瘤在後續實驗中已證實具有 AFP(Alpha-fetoprotein)，確實是為 HCC (Hepatocellular carcinoma) (Kuo et al., 2008c)。

同時，實驗室也回到細胞株中進行基礎研究 CCL13-HBx stable cell line 的特性，在 Kuo 的研究中指出，在培養液移除四環黴素的情況下（即表現 HBx 蛋白質），細胞生長將會顯著被抑制，同時也再

次以西方點墨法證實細胞週期遲滯 (G1/S) 現象。同樣在西方點墨法的檢測下，發現 PCNA (細胞增生標記) 的表現量在 HBx 的影響下逐漸減少，相對 p53 (細胞凋亡標記) 表現量逐漸增加，因此，為了試著釐清分子機制，因而以 microarray 來偵測，在 RT-PCR 上發現 Wnt-3 有被正向調控的情形發生。接下來隨即證實，在蛋白質層級上，HBx 將會正向調控 GSK-3 β ，並負向調控 Wnt-3、 β -catenin，而因此造成細胞增生的抑制 (Kuo et al., 2008a)。

Kuo 等人在後續的研究中指出，在 CCL13-HBx stable cell line 中，HBx 會透過抑制 Wnt / β -catenin 訊息傳遞路徑，繼而抑制細胞生長；在 HBx 表現的情形下，若同時加以處理 GSK-3 β 的抑制劑 (TDZD-8、BIO)，則可以使得 β -catenin 進核的量增加，若統計同時間點的細胞數目，與只表現 HBx 的細胞數目相較，則發現有抑制劑時將可以顯著的增加細胞的數目 (Kuo et al., 2008b)。

至此，在 HBx 導致細胞生長抑制是透過抑制細胞增生的部分已經找出相關機制，但細胞生長抑制的現象可能同時是透過抑制細胞增生和促進細胞凋亡來達到平衡，而這部份的相關性在我們的細胞株中仍待探討。

所以，在 Kuo 2008 年的研究中，將前段所述的 CCL13-HBx stable cell line 以及原本 CCL13 cell line 的分析回到裸鼠皮下注射所誘發的 HCC 上進行分析。將以 CCL13 cell line 以及穩定表達 HBx 的細胞株 CCL13-HBx stable cell line 注射於裸鼠皮下誘發的腫瘤中，發現在表達 HBx 的情形下，西方點墨法的結果顯示，促凋亡蛋白質，如 p53、Bax、Bad、caspase-8、caspase-3 均被正向調控，而抑凋亡蛋白質，如 Bcl-2 以及其他分子 β -catenin 則是被負向調控，而且可在裸鼠皮下誘發之 HCC 中，明顯看到 DNA 片段化的產生，證實 CCL13-HBx stable cell line 在 *in vivo* 誘發的 HCC 中產生的生長抑制也有發現有透過細胞凋亡的可能性 (Kuo et al., 2008c)。但詳細的分子機制並不清楚。

綜合上述結果，由於有關在 CCL13-HBx stable cell line 中的研究中發現，經由細胞凋亡所引起的細胞生長抑制現象，是存在其可能性的，但是，相關的途徑仍尚未明朗。所以我的研究方向是回到 CCL13-HBx stable cell line 中，嘗試以細胞株層次先進行基礎研究，再次確定在 HBx 的存在下，導致細胞凋亡現象的發生，以及尋找有關細胞凋亡可能透過的相關途徑。

目標 1、在裸鼠所誘發的 HCC 中，先再次檢視 DNA 片段化的結果，確定細胞凋亡現象的發生。

由於接下來，我將以細胞凋亡作為主要研究方向，所以我將先再次重複先期前實驗室 Wang 的實驗 (Wang et al., 2004)，確定裸鼠皮下 HCC 的形成，是否會有被 HBx 抑制的情形發生；另外，也將抽取 HCC 組織中的 Genomic DNA，由 agarose gel 電泳來觀察 DNA 片段化的發生，以支持回到 CCL13-HBx 細胞株的接續研究。

目標 2、在 CCL13-HBx 穩定細胞株中，是否在表現 HBx 的情形下，誘發細胞凋亡現象的發生。

若在裸鼠所誘發的 HCC 中確實 HBx 會有細胞凋亡誘發的現象產生，則接下來我將必須回到 CCL13-HBx 穩定細胞株中，再次確定 HBx 蛋白質的表達，並且確認在 HBx 的表達中，細胞凋亡現象如 DNA 片段化，藉由 agarose gel 電泳以及 TUNEL stain 的技術來其確定細胞凋亡的現象的發生。

目標 3、在 CCL13-HBx 穩定細胞株中，HBx 是否有會調控 caspase-3 蛋白質的表現量，以及 caspase-3 及 caspase-8、caspase-9 的活性。

由於在細胞凋亡中，caspase cascade 最下游分子 caspase-3 被認為扮演著很關鍵性的角色，因為一旦 caspase-3 活化，就會引發 DNA 片段化的現象發生，同時，無論是外因性或內因性細胞凋亡途徑，都將透過 caspase-3 造成影響，因此，在進行細胞凋亡的研究時，我首先將確認在 HBx 蛋白質表達的情形下，caspase-3 在蛋白質的表現量是否會受到影響。同時，也將觀察細胞凋亡相關 caspase，包含最下游 caspase-3，以及內因性途徑代表 caspase-9、外因性途徑代表 caspase-8 的活性表現是否有在 HBx 表達下受到任何影響。

目標 4、在 CCL13-HBx 穩定細胞株中，是否可能會透過內因性中介 (intrinsic-mediated) 途徑誘發細胞凋亡現象的發生。

由於內因性途徑主要牽涉的是粒線體相關的分子，由於在我的實驗系統中，並不能清楚指出 HBx 如何去產生調控，所以泛稱為內因性中介 (intrinsic-mediated) 途徑。內因性中介途徑主要指的就是 Bcl-2 家族，在這裡我也將挑選典型指標 Bcl-2、Bcl-xl、Bax、Bad 觀察蛋白質層次上的表現量，同時，也將透過西方點墨法來偵測 total Cytochrome C 的蛋白質表現量。另也將透過 JC-1 stain，以螢光顯微鏡來簡單的觀察粒線體電位的變化，試著利用 JC-1 dye 在粒線體電位較高時會呈現橘紅色螢光，而電位下降時轉變成為綠色螢光，進而分

析在 CCL13-HBx stable cell line 中細胞凋亡經由內因性途徑的可能性。

目標 5、在 CCL13-HBx 穩定細胞株中，是否可能會透過外因性中介 (extrinsic-mediated) 途徑誘發細胞凋亡現象的發生。

由於外因性中介途徑主要指的就是藉由死亡受器引起的 caspase cascade，由於在實驗中 HBx 只於細胞內表達，並不考慮直接與死亡受器的影響，所以稱為外因性中介 (extrinsic-mediated) 途徑。我挑選其中最上游的 caspase-8 作為主要指標，先觀察在表現 HBx 時，是否會對 caspase-8 在蛋白質層次上的表現量造成影響。

接下來，為了更加確定 caspase-8 是否在其中扮演角色，我將以 caspase-8 專一性抑制劑 Z-IETD-FMK 來專一的阻斷 caspase-8 的活化，並且觀察在使用抑制劑的情形下，對於細胞的生長，以及 caspase-8 以及 caspase-3 在蛋白質層次上的表現量，同時，也測量加入專一性抑制劑時 caspase-8 的活性是否有有效降低，以及觀察細胞凋亡的典型現象 DNA 片段化以及 TUNEL stain 的結果，試著分析在 CCL13-HBx stable cell line 中細胞凋亡經由外因性中介途徑的可能性。

材料與方法

一、細胞培養

CCL13 cell line (Chang cell line) 是人類的肝細胞株，屬於肝組織表皮細胞 (Chang, 1954)。而以 CCL13 cell line 作為基礎，實驗室先前 Wang 等人的研究中，已於其上建構了 tet-off 的系統，並命名成為 CCL13-HBx stable cell line，其特性是可利用四環黴素 (tetracycline, 簡稱 tet) 來控制 HBx 蛋白質的表現，在加入 tet 時，細胞就無法表現 HBx 蛋白質，而若是移去 tet，HBx 蛋白質將可以被順利的表達 (Wang et al., 2004)。

CCL13-HBx stable cell line 在進行細胞培養時是為貼壁式細胞，細胞培養在含有 10% 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) 與 1.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ tetracycline 的 DMEM 培養液中 (pH 7.2)，培養於 37°C、5% CO_2 細胞培養箱內。在收集細胞時間點 0 小時前，應先換 1 次 DMEM 培養液，確保細胞維持健康狀況，2 小時後，再做收集細胞之標準處理。同一時間為起始點，另欲收集連續時間點為 96 小時之後之細胞樣品，亦需在 0 小時起始時，先更換含 tet 的 DMEM 兩小時後，才能更換無 tet 的 DMEM，進行 HBx 蛋白質的表達；而中途在 48 小時時，可進行一次無 tet 之 DMEM 更換，並最後於 96 小時之時間點收取細胞。

二、外來細胞在裸鼠體表的癌化測試

將CCL13以及CCL13-HBx穩定細胞株，分別於已培養細胞之T 25 flask中加入trypsin/EDTA溶液，置於37°C下2分鐘，使細胞脫離貼附表面，收集細胞懸浮液，以常溫，1000rpm，5分鐘離心，去除上層溶液，重新以DMEM打散後計數，將定量細胞液分裝至各管中。之後再以常溫，1000rpm，5分鐘離心，去除上層溶液，將定量細胞溶於1倍已回溫之37°C PBS中打散待用，需盡快至動物房，運送途中需以體溫保存，勿插於冰上。將4至8週大的公裸鼠取出以左手確實固定，右手持針筒先吸取細胞懸浮液，再裝上針頭，將裸鼠身體轉至腹側朝上，持針人身體與針頭平行，下針時需避開腹部血管，針口微微向上，於腹部皮下單側下針，下針後針尖於皮下向前移動約1-2公分，以穩定速度開始注入，每隻注射 8×10^6 細胞數目之細胞懸浮液。每星期以游標尺測量腫瘤大小，並且每週更換2次墊料、飲水及食物。持續10週之後，將裸鼠犧牲。所得結果以照片顯示。

三、細胞生長曲線

以6 well 進行細胞培養，在實驗起始時於無 tet 之細胞培養液

中加入不同濃度之 Z-IETD-FMK 抑制劑，混和均勻後加入容器中進行細胞培養，並於時間點時去除舊培養液，以一倍 PBS 潤洗三次，加入 trypsin/EDTA 溶液，置於 37°C 下 2 分鐘，使細胞脫離貼附表面，收集細胞懸浮液，以 1000rpm，15 分鐘離心。之後再加入 DMEM 將沈澱的細胞回溶，並且打散使其均勻分佈。此時加入 trypan blue solution (SIGMA) 與細胞均質懸浮液 1:1 等量混合，置於 37°C 下 5 分鐘，將準備好的細胞液加入計數孔隙中，以血球計數器進行細胞計數。計數時去除藍色死細胞，而將結果製表，觀察是否有統計上的意義。

四、蛋白質的萃取

將培養之 CCL13-HBx 穩定細胞株置於冰上，以平面迴轉式震盪器震盪，50rpm，15 分鐘後，將舊培養液 2000rpm，5 分鐘離心，去除上清液後，再以 1 倍 PBS 加入細胞培養容器內，以貼壁式細胞專用刮刀將細胞刮下，收集細胞液，再次以 2000rpm，5 分鐘離心，之後再將沈澱細胞移至微量離心管備用。

加入適當 RIPA buffer (50mM Tris-HCl, pH 7.4; 1% NP-40; 0.25% sodium deoxycholate; 150mM NaCl; 1mM EGTA)，於 4°C 冰上作用中 1 小時，並且每 15 分鐘震盪 1 次。均質之細胞萃取液，以低溫離心機，4°C 下，10000g (rcf) 離心 15 分鐘，收集上清液，測量蛋白質濃度。

此時管底沈澱將可用於抽取 Genomic DNA。

五、蛋白質濃度測量 (Bradford Assay)

以 BIO-RAD Protein assay (catalog#500-0006) 試劑進行操作，蛋白質和染劑 Coomassie Brilliant Blue R-250 結合後，會使染劑之最大吸收峰由 465nm 移至 595nm，而 595nm 的吸光值會隨著蛋白質量的增加而增加，不易受到鹽類及其他細胞成分影響，是頗為靈敏的蛋白質定量法。將 protein assay dye reagent 和二次水以 1:4 的比例混合均勻，成為 working reagent，分裝至各管。標準曲線以加入各濃度 BSA 標準液作為基準，而樣品蛋白質則以 5 倍稀釋進行測量。各管加入蛋白質後與 working reagent 迅速混合均質，置於 37°C，反應五分鐘後以 OD₅₉₅，測量吸光值，紀錄蛋白質濃度。

六、蛋白質電泳分析

以 10-15% 之十二烷基硫酸鈉聚丙稀胺凝膠電泳 (sodium dodecylsulfate poly acryamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 進行蛋白質分析。下膠為 running gel，含 10-15% acrylamide，待其凝固後，以二次水洗去殘膠，再製作上膠 stacking gel，含 4.5%

acrylamide，整體厚度為 0.75mm 之膠體。先將備製好的膠體置於 running buffer (running buffer : 25 mM Tris-base, 192 mM glycine, 3.47 mM SDS) 中，並沖洗齒縫清除殘膠備用。將均質後組織液萃取之蛋白質定量，加入等體積 sample buffer (1% SDS, 5% mercap-toethanol, 20 % glycerol, 0.1 % BPB : Bromo-phenol-blue, 50mM Tris-HCl pH6.8)，置於沸騰二次水中 5 分鐘使其 denature，冷卻後離心，將 protein maker (Prestained Protein Ladder, Fermentas) 與蛋白質樣本依序將其加入膠體孔隙中。上層 stacking gel 以 50 伏特通電約二十分鐘，待樣品已通過於 stacking gel 集中後，再以 70 伏特跑下層 running gel 約二至三小時來進行電泳分離。

七、西方點墨法 (Western blotting)

將聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜置於 100% 甲醇短暫溼潤去除疏水性後，去除甲醇，用二次水 1 分鐘兩次洗淨，再浸入轉印緩衝溶液 (transfer buffer) 中六分鐘備用；同時切下 stacking gel 以及 3M 濾紙同樣浸於轉印緩衝溶液中，將濾紙 3 張一疊為單位，浸泡轉印緩衝溶液取出後，由下而上以濾紙-PVDF-膠體-濾紙的方式重疊，以刮刀去除可能氣泡後，以半乾式轉漬儀

(Tran-Blot[®] SD, Semi-Dry Transfer Cell, BioRad) 通電流為 20 伏特，30-45 分鐘依照不同比例膠體調整轉漬時間，將膠體蛋白質轉漬至 PVDF 膜上。

將轉漬完成的 PVDF 置於 Blocking solution (5% 脫脂牛奶 / PBST) 中於 37°C，作用 1 小時，使膜均勻被蛋白質覆蓋，之後以 PBST (PBS 內含 0.05% Tween-20) 清洗 5 分鐘兩次後，加入特定比例的稀釋抗體，4°C 作用 over night，隔日再 PBST 清洗 5 分鐘兩次，10 分鐘一次後，加入特定比例稀釋的二級抗體(內含 3% skimmed milk)，以 37°C，1 小時後，以 PBST 清洗 5 分鐘 4 次，10 分鐘 2 次。

顯影時使用 ECL 試劑(Immoblion[™] Western Chemiluminescent HRP Substrate, MILLPORE) 以等倍率體積，避光混合之後，加於 PVDF 膜上產生反應，同時於暗房中以數位攝影系統紀錄影像。

八. Genomic DNA 的抽取

這裡使用 Tissue & cell Genomic DNA Purification Kit (GeneMark, Cat# :DP021-150) 抽取 Genomic DNA。將在前述組織均質液中最後離心之沈澱物加入 1 倍冰的 PBS 200 μ l 以及 RNaseA 4 μ l，並且 vortex，置於 37°C，反應 4 分鐘，後再加入 binding solution

200 λ 、proteinase K 20 λ ，置於 56°C 水浴槽，中途每隔 30 分鐘需 vortex 一次，水浴至沈澱物消失。之後再加入 binding solution 200 λ ，vortex 後置於 70°C block 10 分鐘。將管內混合液再加入酒精 (Ethanol) 200 λ ，vortex 過後通入 kit 提供的 column，離心 12000rpm，1 分鐘。去下層液，再加入 binding solution 300 λ ，同樣離心 12000rpm，1 分鐘。去下層液，再加入 wash solution 700 λ ，同樣離心 12000rpm，1 分鐘，去下層液，本步驟重複兩次後，將 column 再次空離，12000rpm，1 分鐘，以完全去除多餘酒精。置於 37°C，使 column 乾燥。隔日以 60 至 70°C 之 Elution solution 適量加入 column 中靜置，並置於 70°C 水浴槽內 5 分鐘，之後以 14000rpm，3 分鐘進行離心，將 Genomic DNA 溶至最後萃取溶液中。

九、2% 洋菜膠膠體之配製

以二次水沖洗塑膠盤、膠體製作盤和電泳梳 (comb)。取 1 克 agarose 加入 50 mL 1 倍 TAE buffer 配置 2% agarose gel，經微波加熱使洋菜膠溶解，稍待降溫後，以 20mL : 1 μ L 的比例添加 10mg / mL 溴化乙錠 (ethidium bromide, EtBr)，混合均勻後將洋菜膠溶液倒入鑄膠器中，靜置至冷卻成型，將電泳梳輕拉出膠體。之後，在電泳槽中置入洋菜膠體，倒入稀釋至 1 倍之 TAE buffer (GeneMark,

Cat#GB01-1) 蓋過膠體備用。

十、DNA Ladder 電泳分析

取經分離純化的 DNA 產物及適量的 6X DNA loading dye (0.15 % bromophenol blue, 50 % glycerol) 充分混合後，注入洋菜膠體中後以電壓 50 伏特進行電泳分離，DNA maker 使用 100bp DNA Ladder H3 (Finemaker™, cat. no. DM-H3) 待 bromophenol blue 跑至離膠體底部理想距離時，即可關閉電源。

將 agarose gel 從電泳槽取出，於 UV-light box (Tep-20.M, VILBEL LOURMAT, 96W, EEC)，並以 UV 光激發視其結果，觀察並照相。

十一、TUNEL 染色法 (TUNEL stain)

TUNEL stain 全名為 Terminal deoxyribonucleotidyl transferase (TdT) -mediated deoxyl-UTP-bioten nick end labeling (TUNEL) stain，是利用 TdT 將可以把綠色螢光 (green fluorescence) 標定的 dUTP 接於 DNA 斷片 3' 末端，再以螢光顯微鏡觀察螢光結果。

首先，在細胞培養階段，將蓋玻片浸於 75%酒精而後過火，置於將 6 well 中，滅菌後進行細胞培養。在欲進行 TUNEL stain 時，將細胞移入 4°C，降溫 15 分鐘後，移走舊的培養液，再加入冰的 1 倍 PBST (含 0.3% Tritonx-100)，潤洗三次，馬上去除 PBST。此時將事先以 4% PA/PBST 過 0.22 μ m filter 之等溫溶液加入盤中固定細胞，37°C，60 分鐘。此時 PBST 自冰箱取出後，此後將維持與細胞同等溫度條件。固定完成後，去除 PA，加入 1 倍 PBST，以平面式震盪器，80rpm，每次 5 分鐘，潤洗三次，去除液體。此時使玻片周圍稍微乾燥，同時利用 TUNEL apoptosis detection kit (*In situ* cell death detection kit, fluorescein, cat. no. 11684795910, Roche)，將其中 Enzyme solution 以 Label solution 稀釋至建議濃度，之後將準備好的 TUNEL reaction mixture 每片 10 λ 置於石蠟膜上，將玻片自 6 well 撬起，倒放其上，於 37°C，反應 60 分鐘，此步驟開始至封片結束前，需全程避光。將玻片置回 6 well 盤內，正面朝上之後，利用 1 倍的 PBST 以平面迴轉式震盪器 80rpm，沖洗三次，每次 5 分鐘。最後待稍微玻片乾燥時，以螢光專用封片膠 GEL/MOUNT™ (biomeda, cat. no. M01) 封片，3 小時後，即可以於螢光顯微鏡進行下觀察。

十二、粒線體電位測量 (JC-1 stain)

JC-1 dye 全名為 5, 5', 6, 6' -tetrachloro-1, 1' 3, 3' -tetraethyl-benzimidazolyl-carbocyanine Chloride，是可在活細胞上進行粒線體染色的染劑。粒線體本身帶有負電荷，使得陽離子性質的 JC-1 dye 就可能被吸引可以進入粒線體累積，形成 J-aggregates，呈現紅色螢光 (590nm)；在電位降低時，JC-1 dye 就不能累積在粒線體中，因此，JC-1 dye 會存在細胞質中，以 monomer 形式呈現綠色螢光 (527nm) (Chaoui et al., 2006)。所以 JC-1 dye 可說是一個很好的 potential-dependent 染劑，可用來測量粒線體電位的變化。

首先，在細胞培養階段，將蓋玻片浸於 75%酒精而後過火，置於將 6 well 中，滅菌後進行細胞培養。在欲進行 JC-1 stain 時，必須先去除舊培養液，此時以無血清 DMEM 每 well 每次 1ml 潤洗細胞，重複三次，已確保完全清除含血清培養液。此時避光，以每 $5 \mu\text{m/ml}$ 的濃度加入 JC-1 (5mM 溶於 5ml 無血清 DMEM 培養液中) 後均勻混合，每 well 加入 1.5ml 均質含 JC-1 之無血清 DMEM 培養液，之後所有步驟至封片需全程避光。再移回細胞培養箱反應 5 小時，收細胞時，將細胞移入 4°C 預冷。降溫 15 分鐘後，移走舊的培養液，再加入冰的 1 倍 PBS，潤洗三次，馬上去除 PBS。此時將事先以 4% PA/PBS 過 $0.22 \mu\text{m}$ filter 之等溫溶液加入盤中，固定細胞， 37°C ，60 分鐘。

此時 PBS 自冰箱取出後，此後將維持與細胞同等溫度條件。固定完成後，去除 PA，加入 1 倍 PBS 每 well 2ml，以平面式震盪器，150rpm，每次 5 分鐘，潤洗三次，再以每次 10 分鐘，重複兩次後，去除液體。此時使玻片周圍稍微乾燥，就可以以螢光專用封片膠 GEL/MOUNT™ (Biomed, cat. no. M01) 封片，3 小時後，即可以於螢光顯微鏡進行下觀察。

十三、Caspase 活性測量

將培養之 CCL13-HBx 穩定細胞株置於冰上，以平面迴轉式震盪器震盪，50rpm，15 分鐘後，將舊培養液 2000rpm，5 分鐘離心，去除上清液後，再以 1 倍 PBS 加入細胞培養容器內，以貼壁式細胞專用刮刀將細胞刮下，收集細胞液，再次以 2000rpm，5 分鐘離心，之後再將沈澱細胞移至微量離心管備用。

以 Caspase-1/ICE Fluorometric Assay Kit (Biovision) 進行活性分析。將細胞以兩倍體積的方式加入 Kit 提供之 lysis buffer，每五分鐘 pipetting 一次，重複 6 次。之後，以超高速低溫離心機，55000rpm，33 分鐘進行離心，取上清液分裝至新管，即為萃取出之蛋白質。將蛋白質加入 G-250 (Coomassie Brilliant blue)，均勻後即可馬上進行蛋白質濃度測定 (原理同前述 Bradford Assay)。將蛋白質定量每 well

至少 100 μ m 以上，並補 Kit 提供之 lysis buffer 至 96well 中，至每 well 均為等體積。以前述之體積為基準，補等體積 Kit 之 reaction buffer，並按照 1 μ m 蛋白質：1 λ 之體積之加入反應之 substrate，同時加入 100 λ reaction buffer：1 λ DDT 之比例，混合後分裝至各 well 中。置於 37°C 起始反應，此時依照狀況調整，每 0.5 小時至 2 小時，以 Fluoroskan Ascent (Labsystem) 測量波長(excitation wavelength：405 nm，emission wavelength：510nm)，並記錄結果，以時間為橫軸，取最高點視為該分子活性數值。將數值量化，觀察在統計上的意義。

結果

結果 1、HBx 蛋白質的表達下，在裸鼠模式所誘發的 HCC，可看到尺寸抑制的現象，同時抽取組織的 Genomic DNA，可以 agarose 電泳的方式，看到 DNA 片段化的發生。

在圖 1 中，是以 CCL13 及 CCL13-HBx 穩定細胞株分別於 Balb/c 裸鼠皮下，於腹部單側，以皮下注射 8×10^6 細胞數目，來誘發 HCC 生成。在第十週時，表達 HBx 的情況下，HCC 組織尺寸將出現減小的傾向，這樣的結果與 Wang 等人 2004 年的文獻是相類似的 (Wang et al, 2004)。而將在裸鼠中誘發的 HCC 組織，抽取 Genomic DNA，並利用 2% 洋菜膠膠體將其進行電泳分析，將可以看到在 CCL13 細胞株所誘發之 HCC 中，並沒有辦法看到 DNA 片段化的情形發生，而相對的，在 CCL13-HBx 穩定細胞株-HBx 穩定細胞株所誘發的 HCC 中，有明確的 DNA ladder 產生 (圖 2)，這點與 Kuo 2008 年的文獻一致 (Kuo et al, 2008c)。所以依照上述結果，確實在 HCC 中 HBx 的表達下，有腫瘤生長抑制以及細胞凋亡的現象，所以我將回到 CCL13-HBx 穩定細胞株中，觀察在表現 HBx 的情形下，是否同樣會引發細胞凋亡現象的發生，做進一步的分析。

結果 2、在 CCL13-HBx 穩定細胞株中，在表現 HBx 的情形下，透過以細胞進行 TUNEL stain 以及 Genomic DNA 萃取進行 agarose 電泳，確定了細胞凋亡現象的誘發。

在 CCL13-HBx 穩定細胞株中，我藉由 Wang 所建構的 tet-off 系統，作為表達 HBx 的模式。如附圖 2，在 tet-off 系統裡，細胞在含有胎牛血清的 DMEM 中，如果有 tet (tetracycline) 存在，則此時 tet 將會與 tTA (tetracycline-controlled transactivator) 鍵結，這時候 tet 就會無法與 TRE (Tet-response element) 結合，使得 HBx 蛋白質的產生被 off，此時 HBx 蛋白質將不會被表達。而若是移走 tet，此時沒有 tet 的干擾，rTA 將可以順利的與 TRE 結合，繼而使得 HBx 蛋白質可以順利表達。

圖 3 裡，將細胞培養於 T25 flask 中，並在 0 小時以及 120 小時收集細胞，將收集之細胞分別抽取 Genomic DNA，並利用 2% 洋菜膠膠體將其進行電泳分析，將可以看到在 CCL13-HBx 穩定細胞株中，於 0 小時（即沒有表現 HBx 的情形下），並沒有辦法看到 DNA 片段化的情形發生，在表達 HBx 120 小時後，可以見到明確的 DNA ladder 產生。而相對的，在 tet 存在的情況下（即不表現 HBx），同樣收集 0 小時以及 120 小時的細胞，抽取 Genomic DNA 並進行電泳分析，則

沒有 DNA 片段化的情形發生。而在 HBx 蛋白質的誘導下會產生 DNA ladder 的現象，這點也與 Kuo 2008 年的文獻一致 (Kuo et al, 2008a)。

另外，同時在實驗中也於 6 well 中放置蓋玻片，並將細胞培養培養於上，並在 0 小時以及 96 小時進行 TUNEL stain 分析。在圖 4 中可見到，在沒有表現 HBx 的 0 小時視野下。幾乎無法偵測到綠色螢光的訊號；相對的在表達 HBx 96 小時之後，將可以明顯在視野下看到綠色螢光的訊號的產生。統計視野中綠色螢光的訊號，以量化的結果呈現，則可見到在 HBx 的表現下，綠色螢光訊號將顯著的多於沒有表現 HBx 的 0 小時。DAPI 染色則可代表存在於視野下之細胞核。

由上述兩個結果發現，確實在 CCL13-HBx 穩定細胞株中，HBx 的表達將會導致細胞凋亡現象的發生。

由於細胞凋亡的現象已經確定，但在 CCL13-HBx 穩定細胞株中可能路徑尚未明朗，所以接下來我將試著透過外因性中介途徑以及內因性途徑來嘗試找出其可能性。

結果 3、在 CCL13-HBx 穩定細胞株中，HBx 蛋白質的表現，會使 full length caspase-3 蛋白質的表現量有增加的傾向發生；另外，在 HBx 蛋白質的誘導之下，caspase-3 的活性將有顯著性的升高，而 caspase-8、caspase-9 亦均有顯著增加的傾向發生。

由於外因性與內因性誘發細胞凋亡，最下游都會透過 caspase-3 繼而啟動 DNA 片段化等現象，所以我將先藉由西方點墨法，觀察在蛋白質層次上 caspase-3 的表現是否受到 HBx 的影響。在圖 5 中，收集 0 小時與 96 小時細胞進行蛋白質萃取，在不含 tet 的情形下，HBx 將可以順利表達，同時 full length caspase-3 也有表現量提高的情形發生。而相對的，tet 存在的情形下，則無法偵測到 HBx 蛋白質的產生，在這同時，full length caspase-3 的表現量並沒有受到影響。在圖 6 裡，可以看到 caspase-3 的活性將會顯著的增加，而在這同時，caspase-8、caspase-9 活性的增加亦具有顯著性。圖 6 顯示了在 HBx 蛋白質表現下，與 0 小時相較，caspase-8 的活性上升約 2 倍，而 caspase-9 活性的活性上升約 2.6 倍。這暗示了 HBx 蛋白質的確會對內因性途徑以及外因性途徑造成影響，繼而可能導致 caspase-3 的活化，使得細胞凋亡發生。

結果 4、在 CCL13-HBx 穩定細胞株中，透過粒線體電位的下降及 Bcl-2 家族的蛋白質表現，HBx 蛋白質可能會透過內因性 (intrinsic-mediated) 中介途徑，誘發細胞凋亡現象的發生。

由於已經確認 full length caspase-3 在 HBx 的表達下將會有提高蛋白質表現量的情形發生，所以接下來我將把焦點放在細胞凋亡的可能

途徑。

內因性途徑主要是指透過粒線體相關途徑，包含 Bcl-2 家族，以及 Bad、Bcl-2、Bax，繼而影響粒線體電位，使 Cytochrome C 釋出。

由於已經發覺 HBx 將會使 caspase-9 活性上升（圖 6），因此，我將先就 HBx 蛋白質是否會影響粒線體電位來做觀察。在測量粒線體電位上，我簡單的以 JC-1 dye 來進行染色，JC-1 dye 在電位高時將會聚集於粒線體形成 J-aggregates，呈現紅色螢光（590nm），而在電位降低時，JC-1 dye 就不能累積在粒線體中，分散於細胞質中，以 monomer 形式呈現綠色螢光（527nm）。在圖 7 中，100 倍以及 400 倍視野中，表現 HBx 的情形下，CCL13-HBx 穩定細胞株細胞培養的染色結果將明顯可以看到在 48 到 96 小時，可見到細胞粒線體漸次電位下降，螢光染色由橘紅色轉變為呈現綠色，藉由由小至大的倍率來加以觀察（圖 7）也可見到同樣的情形，則可以說明了在 CCL13-HBx 穩定細胞株中，HBx 的表達的確可能透過影響粒線體而使其電位下降。

另外，也嘗試透過在西方點墨法，來觀察 HBx 存在下是否對 Bcl-2 家族造成影響。圖 8 中，與 anti-apoptotic 功能相關的 Bcl-xl 以及 Bcl-2，在表達 HBx 時，並沒有看到蛋白質表現量受到改變，但在 pro-apoptotic 功能的分子，包含 Bad 以及 Bax 上，在表達 HBx 的情形下，則有輕

微增加的傾向；而 HBx 存在時，也會使得 total 的 Cytochrome C 表現量增加。若反之沒有 HBx 存在的條件下，Bcl-2 家族與 anti-apoptotic 功能相關的 Bcl-xl 以及 Bcl-2，pro-apoptotic 功能的分子 Bad 以及 Bax，以及 Cytochrome C 在蛋白質表現量上均沒有變化的情形產生。

綜合以上，在 CCL13-HBx 穩定細胞株中，HBx 可能透過內因性途徑，影響 Bcl-2 家族的表現，使 pro-apoptotic 功能的分子 Bad 以及 Bax 在蛋白質層次上有輕微增加的傾向，也會使得 total 的 Cytochrome C 表現量增加，同時使得粒線體電位下降，並可能因此促進 caspase-9 活性增加，進而導致細胞凋亡的發生。

結果 5、在 CCL13-HBx 穩定細胞株中，HBx 蛋白質可能會透過外因性中介 (extrinsic-mediated) 途徑誘發細胞凋亡現象的發生，並藉由 Z-IETD-FMK 的使用，發現細胞數目增加，細胞凋亡的現象有減輕的情形發生。

如前述，不止內因性，同時 caspase-8 活性亦在 HBx 的表達下顯著上升，這提供了外因性途徑同時也會影響 caspase-3 表現的可能，因此，我將焦點放在外因性 caspase cascade 最上游 initiator caspase 的 caspase-8，作為主要的觀察對象。

在圖 9 西方點墨法的結果中，HBx 表現時，full length 的 caspase-8

表現量在表現 HBx 蛋白質 96 小時後具有升高的傾向，換言之，HBx 的存在將會提高 full length caspase-8 的表現量，同一時間，cleaved caspase-8 也同樣有增加的傾向。對照沒有表現 HBx 的情況下，full length caspase-8 以及 cleaved caspase-8 的蛋白質表現量將沒有變化發生。因此，結合在 HBx 的表現下 caspase-8 活性顯著升高（圖 6），以及 full length caspase-8、cleaved caspase-8 蛋白質有增加的傾向，這顯示了 HBx 蛋白質在 CCL13-HBx 穩定細胞株中造成的細胞凋亡現象，可能是有透過外因性中介途引發徑的。

為了更進一步確定其中 caspase-8 在細胞凋亡中扮演角色的可能性，所以我使用 caspase-8 專一性的抑制劑 Z-IETD-FMK 加入細胞培養液中培養 96 小時，來進行 caspase-8 活化的阻斷，再觀察對於細胞生長以及相關外因性中介細胞凋亡分子上游 caspase-8，以及最下游 caspase-3 在蛋白質層次的表現，以及在細胞數目和細胞凋亡現象上產生的影響。

Z-IETD-FMK 是專一性的 caspase-8 抑制劑，大小為 654Da，可與 caspase 結合於蛋白質活化位（active site of the protease），使 caspase 不能被活化切割。其中 Z（benzyloxycarbonyl group）以及 FMK（fluoromethyl ketone）被加上於 N-terminus 和 O-methyl side chain，來幫助提高滲透作用。而使用 Z-IETD-FMK，肺癌細胞將中可見 full

length caspase-8 在其作用下逐漸減少，同時無法偵測到被切割的 caspase-8 (p41/43) 的產生 (Yu et al., 2003)。

在 Kuo 2008 年的文獻指出，在 CCL13-HBx 穩定細胞株中，HBx 的表達將會造成細胞生長的抑制 (Kuo et al., 2008a)。而在此處我以 Z-IETD-FMK 處理，隨著劑量由 0 至 5 μ M 的逐漸增高，將可以看到細胞的數目有明顯增加的趨勢 (圖 9)。所以在 CCL13-HBx 穩定細胞株中 HBx 造成的生長抑制，可以以抑制劑 Z-IETD-FMK 加以反轉，代表細胞凋亡確實在細胞生長抑制上扮演了一部份的角色。

而同時我也在表達 HBx 的情況下，以由低至高濃度 (0、0.1、1、5 μ M) 的 Z-IETD-FMK 加入不含 tet 之 DMEM 細胞培養液中 96 小時後，收集細胞進行西方點墨法分析。在逐漸升高 Z-IETD-FMK 作用濃度時，可以發現在蛋白質層次上，full length caspase-8 確實有被專一性的阻斷，full length caspase-8 蛋白質表現量隨著 Z-IETD-FMK 濃度提高而逐漸下降，同時 cleaved caspase-8 也呈現減少的趨勢；在 full length caspase-3 的蛋白質表現上，同樣也有發現表現量下降的情形 (圖 11)。雖然在以 5 μ M Z-IETD-FMK 作用之下 full length caspase-8 的蛋白質表現量有升高的情形發生，但是 cleaved caspase-8 以及其下游 caspase-3 的表現量依舊是下降的，所以推測原因可能是因為細胞為了欲進行細胞凋亡而促使過量生成 full length

caspase-8，因而引發這樣的現象。另外，在加入 Z-IETD-FMK 的情形下，同時也去測量 caspase-8 活性是否確實因為抑制劑而降低，在圖 11 中可同時見到，在加入 Z-IETD-FMK $1\ \mu\text{M}$ 時，caspase-8 的活性與 0 小時相較將會具有顯著性的下降。而為了減少實驗上的不必要干擾，所以接下來將保守的以 $1\ \mu\text{M}$ 的 Z-IETD-FMK 進行細胞凋亡現象上的檢測。

在細胞凋亡的現象上，同樣在 6 well 中放置蓋玻片，並將細胞培養培養於上，在表現 HBx 的情形下，於 96 小時進行 TUNEL stain 分析。圖 12 中也經由 $1\ \mu\text{M}$ Z-IETD-FMK caspase-8 抑制劑的使用，可以明顯在視野下看到原本在 96 小時的綠色螢光訊號在使用 Z-IETD-FMK 後有減少的傾向。統計視野中綠色螢光的訊號，以量化的結果呈現，則可見到在 HBx 的表現下，使用 Z-IETD-FMK 時，綠色螢光訊號將顯著的少於單純表現 HBx 的 96 小時細胞。DAPI 染色則可代表存在於視野下之細胞核。

另外，原本在表現 HBx 時應該造成的細胞凋亡現象，DNA 片段化的現象，藉由抽取 Genomic DNA 並利用 2% 洋菜膠膠體進行的電泳分析中，在圖 13 中將可見到，隨著 Z-IETD-FMK 劑量逐漸增加，DNA 片段化的情形也有相對應的減輕發生。

由於如果專一性的去使用 Z-IETD-FMK caspase-8 抑制劑，在

caspase-8 活性顯著下降時，將可以看到細胞數目的增加具有顯著性，同時西方點墨法中 full length caspase-8 和 cleaved caspase-8，以及其下游 caspase-3 在蛋白質表現量上的減少，而在細胞凋亡現象上包含 DNA 片段化的減輕，以及 TUNEL 訊號上的減少，都有反轉的效果發生。這樣的結果建議，在 CCL13-HBx 穩定細胞株中，被 HBx 誘發所進行的細胞凋亡現象，可能是有透過外因性中介途徑，進而引發細胞凋亡，產生部分細胞生長抑制作用。

所以，綜合上述的實驗結果，在 CCL13-HBx 穩定細胞株中表現 HBx 蛋白質時，將可以透過西方點墨法見到 full length caspase-3 蛋白質的表現量提高，同時 caspase-3 活性有顯著性的增加，而在內因性途徑方面，HBx 蛋白質會影響 Bcl-2 家族的表現，使 pro-apoptotic 功能的分子 Bad 以及 Bax 在蛋白質層次上有輕微增加的傾向，也會使得 total 的 Cytochrome C 表現量增加，同時使得粒線體電位下降，caspase-9 的活性亦有顯著性提高；而外因性途徑方面，可以透過西方點墨法見到 full length caspase-8 和 cleaved caspase-8 的蛋白質表現量在 HBx 蛋白質的表現下提高，caspase-8 的活性亦有顯著性增加，若以 caspase-8 抑制劑處理，在 caspase-8 活性顯著下降的情形下，將能顯著增加細胞數目並且反轉細胞凋亡現象包含 DNA ladder 以及 TUNEL 訊號的產生。總結以上結果，也就是說，在 CCL13-HBx 穩

定細胞株中，HBx 可能同時透過內因性以及外因性途徑，進而導致細胞凋亡的發生。

討論

HBx 蛋白質目前被認為在肝癌形成上扮演著一定的角色 (Bouchard and Schneider, 2004)。而目前在 HBx 促進細胞凋亡的說法上，文獻中認為可能是經由外因性途徑以及內因性途徑進而促使細胞凋亡的發生。

細胞凋亡的可能途徑：HBx 透過外因性途徑促進細胞凋亡

HBx 蛋白質目前在很多細胞株中，都有看到細胞株透過外因性途徑而促進細胞凋亡的現象。

透過外因性途徑方面，在 Yang 2007 年的研究中，在 HepG2 細胞中轉染來表現 HBx 蛋白質，將使得 TRAIL (死亡受體的一種) 釋放增加 (Yang et al., 2007)。另外，以 TNF- α 來誘導細胞凋亡的發生，caspase-8 和 caspase-3 的活性都有提高的傾向，同時也在 caspase-8 的抑制劑使用下，將能降低 caspase-8 與 caspase-3 的活性 (Kim and Seong, 2003)。

在 Kim 等人的研究中，同樣以轉染的方式，在 Chang liver cell line 中表現 HBx，以 TNF- α 來誘導細胞凋亡的發生，相較於控制組，caspase-8 和 caspase-3 的活性都有提高的傾向，若是以 Fas 誘發來

誘導細胞凋亡的發生，caspase-8 的活性也在轉染 HBx 的情形下有提高的傾向 (Kim and Seong, 2003)。同時，Su 與 Schneider 的結果中，也使用 TNF- α (死亡受體的一種) 來誘導細胞凋亡的發生，在表現 HBx 時，將會見到細胞死亡數目有升高的趨勢 (Su and Schneider, 1997)。

而在實驗室先前的研究裡，使用 CCL13-HBx stable cell line (即 Chang-HBx stable cell line)，藉由其可以穩定表達 HBx 的特性，在 Kuo 等人 2008 年的研究中指出，caspase-3 的活性將會在 HBx 的表現下提高 (Kuo et al., 2008a)，另外，在裸鼠皮下誘發的 HCC 組織中，HBx 表現下，透過西方點墨法將可以看到 caspase-3、caspase-8 蛋白質表現量都有上升的趨勢 (Kuo et al., 2008c)。

而在我的實驗結果中，不止在 CCL13-HBx cell line 在裸鼠皮下誘發的 HCC 中可見到 DNA 片段化的情形 (圖 2)，在 CCL13-HBx stable cell line 中表現 HBx 蛋白質的情形下亦是 (圖 3)，而 full length caspase-8 和 cleaved caspase-8 (圖 9)，以及其下游 full length caspase-3 (圖 5) 均有蛋白質表現量上升的趨勢發生，而 caspase-8、caspase-3 的活性也在 HBx 表現時有增加的情形發生 (圖 6)。另外，在加入抑制劑 1 μ M 的同時，caspase-8 的活性亦有顯著下降 (圖 11)，而此時細胞數目將顯著上升 (圖 10)，full length caspase-8 和 cleaved

caspase-8 在蛋白質表現量上亦逐漸下降 (圖 11)，最下游 TUNEL 訊號 (圖 12) 以及 DNA 片段化 (圖 13) 亦可見到其有減少的現象。這樣的結果，暗示了 caspase-8 在 HBx 造成的細胞凋亡中可能具有一定的角色。

細胞凋亡的可能途徑：HBx 透過內因性途徑促進細胞凋亡

同時，在 Kim 等人 2008 的研究中，於 HepG2 細胞轉染表現 HBx 時，可以見到 caspase-3 的活性有提高的現象發生，另外，在無血清的條件下將會增加粒線體電位 30% 的下降，並且 Cytochrome C 的釋放也有增加的傾向，另外透過西方點墨法，在無血清與 10% 血清的情形下均有發生促凋亡蛋白質 Bax 轉位至粒線體的情形發生 (Kim et al., 2008)。

在 Takada 1999 年的研究中，以 HuH7 cell line 作為實驗工具，發現 HBx 的表現會與粒線體的位置重疊，同時，透過 JC-1 stain 看到 HBx 表現的位置將產生電位下降的情形發生 (Takada et al., 1999)。另外，Shirakata 與 Kioke 在 2003 年也有研究指出，在以轉染來表現 HBx 的情形下，可以以螢光顯微鏡下可以看到 HBx 將會和粒線體表達的位置相重疊 (localization)，也能以 JC-1 測量到粒線體

電位下降的情形發生 (Shirakata and Kioke, 2003)。

然而，在過去文獻中，尚未有報導指出，在 CCL13 cell line (Chang liver cell line) 中，HBx 可能透過內因性途徑進而促進細胞凋亡。

而在我的實驗結果中，發現 CCL13-HBx stable cell line (即 Chang-HBx stable cell line) 在 HBx 表現的情形下，會使得 caspase-9 活性有上升的傾向發生 (圖 6)，因而更進一步透過 JC-1 stain，發現粒線體電位會隨著時間而逐漸下降 (圖 7)，另外，相關的 Bcl-2 家族分子，在促進細胞凋亡方面具代表性的分子 Bax、Bad 在蛋白質層次上將會有輕微的增加 (圖 8)。換言之，這樣的結果建議了在 CCL13-HBx cell line 中，HBx 可能會透過內因性途徑進而促進細胞凋亡。

造成細胞凋亡可能原因：HBx 在轉錄上的調控

由於在我的實驗結果中，看到在 HBx 蛋白質的表現下，相關分子在蛋白質層次的表現上均有受到影響，因此，實驗中細胞凋亡的發生，推測可能存在經由透過影響轉錄作用，引發相關蛋白質表現量的差異，繼而引發細胞凋亡的可能性。在過去的文獻中指出，HBx 本身就具有成為轉錄因子 (transcription factor) 的能力，可以透過本

身或是與其他轉錄因子例如 TFIIB 或是 p53 等蛋白質產生交互作用，進而對於轉錄發生調控，同時，HBx 的存在位置也可能存在細胞質及細胞核中 (Murakami, 1999) (Zhang et al., 2006)。

而在實驗室先前的實驗中，Kuo 2008 年曾經以西方點墨法證明在 HBx 表現下，p53 的蛋白質表現量將會逐漸增加 (Kuo et al., 2008a)。p53 本身亦可成為轉錄因子，被認為具有引發細胞週期延遲以及細胞凋亡的能力，過去有研究發現 p53 具有活化 caspase-8 的能力 (Ding et al., 1998)，同時，p53 也會刺激死亡受體 TRAIL 以及 Fas 的表現量增加 (Bennett et al., 1998) (Wu et al., 1997)。p53 下游目標基因之一，也包含與粒線體相關的 PUMA 以及 Bcl-2 家族的促凋亡蛋白質 Bax，甚至包含 Bid (Haupt et al., 2003)。因此，在我所做為研究工具的 CCL13-HBx cell line (即 Chang-HBx stable cell line) 中，先前已經證實 p53 表現量有上升的情形發生，然而，是不是藉此而進一步在轉錄層次促使細胞凋亡相關分子的表現，繼而促使細胞凋亡發生，則仍待進一步的實驗設計方能探討。

細胞凋亡中透過外因性途徑以及內因性途徑產生的交互作用

在我的實驗結果中，看到的結果是 HBx 蛋白質的存在下，會透過內因性途徑及外因性途徑促進細胞凋亡的發生，然而，到底哪一個是主要導致細胞凋亡發生的途徑，則需要更清楚的設計實驗才能進行精確的解釋。目前而言，在圖 6 中，看到的是 caspase-3 活性有顯著性增加，與 0 小時相較，約為 2 倍，這樣上升的趨勢與 caspase-3 西方點墨法的結果符合，而內因性途徑的代表 caspase-9 的活性，上升的倍數與 0 小時相較約為 2.6 倍，則較外因性途徑的代表 caspase-8（與 0 小時相較約 2 倍）為多；另外，在 caspase-8 專一性抑制劑使用時，最下游細胞 TUNEL 訊號以及 DNA 片段化的情形，以及西方點墨法中，減輕的結果也沒有預期中強烈，這可能某方面暗示了內因性途徑的重要性。

另外，其中外因性途徑 caspase-8 可能藉由切割 Bid 使其轉變為 tBid，進而促進粒線體凋亡的發生，所以外因性途徑以及內因性途徑是可能產生交互作用的，但這部分必須視細胞的種類以及器官的特異性而定，並非每種細胞均會發生（Adams and Cory, 2007）。目前知道此途徑會發生在老鼠的肝臟細胞中（Yin et al., 1999）以及 HepG2 細胞株中（Oh and Lee, 2004）。但目前在其他肝細胞株如 CCL13 cell line（Chang liver cell line）則仍待釐清。

HCC 與 HBx

目前而言，HBV 的感染被認為與 HCC 的形成具有強烈的相關係 (Block et al., 2003)，而在 Hwang 等人的研究中，也有在人類 HCC 組織中偵測到 HBx 蛋白質的表現 (Hwang et al., 2003)。但是 HBx 蛋白質在目前的研究中，仍然無法被說明與 HCC 的形成具有直接的相關連性。

在我的實驗中，以 CCL13-HBx 穩定細胞株作為研究工具，觀察到 HBx 的表現將會導致細胞凋亡的發生。而將其拓展至裸鼠的 *in vivo* 層次，會見到 HBx 具有抑制 HCC 尺寸的能力。然而，無論是細胞株實驗或是以裸鼠進行 *in vivo* 的實驗，都極難將這樣的推測套用於人類 HCC 發生上。在人類 HCC 的發生中，首先是並非所有 HCC 均由於 HBV 感染所引起，黃麴毒素以及酒精的濫用都可能引起病變 (Block et al., 2003)。若假設其 HCC 發生原因是由 HBV 所誘發，意即 HBV 感染肝細胞繼而引發病變發生，在這同時 HBV 將會同時表現四個 ORF。在文獻回顧中提到，HBx 的表現可能抑制或促進細胞凋亡，這是指在細胞株或基因轉殖鼠中單一的表現 HBx 而言。有文獻指出，在另外一株能夠表達 HBx 的人類肝細胞穩定細胞株 BEL7402-HBx 中，如果同時時間再去

轉染 HBc (core antigen, HBcAg), 將會使得在細胞株中以 TRAIL (死亡受體中的一種) 誘發的細胞凋亡程度明顯下降, 作者認為 HBc 的存在將可阻斷 HBx 所產生的促凋亡效應 (XLiang et al., 2009)。另外, Hep3B 細胞株原本就具有具有表達 HBs (surface antigen, HBsAg) 的特性, 在此時同樣轉染去表現 HBx 蛋白質, 以 TNF- α 來誘發細胞凋亡現象的發生, 此時有 HBx 者之細胞死亡率仍然較沒有表現 HBx 者高出一倍 (Miao et al., 2006)。因此, 在細胞株層次上, 仍然難以回答在人類病患的 HCC 中, HBx 的表現是否會促進細胞凋亡的發生。

另外, 即便是以裸鼠的模擬 *in vivo* 層次, 除了如上述所討論是單純表現 HBx 單一蛋白質之外, 其生理環境亦有相當大的差異, 在人類肝臟 HCC 的生成中, 可能受到肝臟其他相關人類的生長因子、細胞激素調控, 另外, 甚至血管新生都有可能對 HCC 的發生造成影響, 我覺得皮下注射細胞株這樣簡單的過程, 並不足夠去全方位模擬出在人體中發生 HCC 的過程。而實際上, 很多病毒的感染中, 都會使得細胞發生細胞凋亡的現象 (Boya et al., 2004)。不過, 以皮下注射來誘發非原位性的腫瘤發生, 以作為研究的模式, 仍是癌症相關研究中十分普遍並可得到認同的作法。

參考文獻

- Adams, J. M. and Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, **26**, 1324-1337.
- Ashkenazi, A. (2008) Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, **19**, 325-331.
- Ashkenazi, A. (2002) Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev*, **2**, 420-430.
- Bennett, M., Macdonald, K., Chan, S. W., Luzio, J. P., Simari, R. and Weissberg, P. (1998) Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science*, **282**, 290-293.
- Bouchard, M. J. and Schneider, R. J. (2004) The enigmatic X gene of hepatitis B virus. *J Virol*, **78**, 12725-12734.
- Boya, P., Pauleau, A. L., Poncet, D., Gonzalez-Polo, R. A., Zamzami, N. and Kroemer, G. (2004) Viral protein targeting mitochondria : controlling cell death. *Biochim Biophys Acta*, **1659**, 178-189.
- Block, T. M., Mehta, A. S., Fimmel, C. J. and Jordan, R. (2003) Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, **22**, 5093-5107.
- Cha, M. Y., Kim, C. M., Park, Y. M. and Ryu, W. S. (2004) Hepatitis B virus X protein is essential for the activation of Wnt/beta-catenin signaling in hepatoma cells. *Hepatology*, **39**, 1683-1693.
- Chowdhury, I., Tharakan. B. and Bhat, G. K. (2008) Caspase - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **151**, 10-27.
- Chang, R. S. (1954) Continuous subcultivation of epithelial-like cells from normal human tissues. *Proc Soc Exp Biol Med*, **87**, 440-443.

Chaoui, D., Faussat, A. M., Majdak, P., Tang, R., Perrot, J. Y., Pasco, S., Klein, C., Marie, J. P. and Legrand, O. (2006) JC-1, a sensitive probe for a simultaneous detection of P-glycoprotein activity and apoptosis in leukemic cells. *Cytometry B Clin Cytom*, **70**, 189-196.

Chung, T. W., Lee, Y. C., Ko, J. H. and Kim, C. H. (2003) Hepatitis B virus X protein modulates the expression of PTEN by inhibition the function of p53, a transcriptional activator in liver cells. *Cancer Res*, **63**, 3453-3458.

Ding, H. F., McGill, G., Rowan, S., Schmaltz, C., Shimamura, A. and Fisher, D. E. (1998) Oncogene-dependent regulation of caspase activation by p53 protein in a cell-free system. *J Biol Chem*, **273**, 28378-28383.

Gottlob, K., Fulco, M., Levrero, M, and Graessmann, A. (1998) The Hepatitis B Virus HBx Protein Inhibits Caspase 3 Activity. *J Biol Chem*, **50**, 33347–33353.

Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z. and Haupt, Y. (2003) Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci*, **116**, 4077-4085.

Hill, M. M., Adrain, C. and Martin, S. J. (2003) Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows. *Mol Interv*, **3**, 19-26.

Hwang, G. Y., Lin, C. Y., Huang, L. M., Wang, Y. H., Wang, J. C., Hus, C.T., Yang, S. S. and Wu, C. C. (2003) Detection of the Hepatitis B Virus X Protein (HBx) antigen and anti-HBx antibodies in case of human hepatic carcinoma. *J Clin Microbiol*, **41**, 5598-5603.

Kim, H. J., Kim, S. Y., Kim, J., Lee, H., Choi, M., Kim, J. K. and Ahn, J. K. (2008) Hepatitis B virus X protein induces apoptosis by enhancing translocation of Bax to mitochondria. *IUBMB life*, **60**, 473-480.

Kim, K. H. and Seong, B. L. (2003) Pro-apoptotic function of HBV X protein by interaction with c-FLIP and enhancement of death-inducing signal. *EMBO*, **22**, 2104-2116.

Kuo, C. Y., Wang, J. C., Wu, C. C, Hsu, S. L. and Hwang, G. Y. (2008a) Effect of Hepatitis B Virus X protein (HBx) on cell growth inhibition in a CCL13-HBx stable cell line. *Intervirology*, **51**, 26–32

Kuo, C. Y, Wu, C. C, Hsu, S. L. and Hwang, G. Y. (2008b) HBx inhibits the growth of CCL13-HBX-stable cells via the GSK-3 β / β -catenin cascade. *Intervirology*, **51**, 130-136.

Kuo, C. Y., Wang, J. C., Wu C. C., Hsu, S. L. and Hwang, G. Y. (2008c) Functional characterization of hepatitis B virus X protein based on the inhibition of tumorigenesis in nude mice injected with CCL13-HBx cells. *Intervirology*, **51**, 253-260.

Lavrik, I. N., Golks A, Baumann, S. and Krammer, P. H. (2006) Caspase-2 is activated at the CD95 death-inducing signaling complex in the course of CD95-induced apoptosis. *Blood*, **108**, 559-565.

Lee, Y. I., Kang-Park, S., Do, S. I. and Lee, Y. I. (2001) The hepatitis B virus-X protein activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem*, **276**, 16969-16977.

Madden, C. R., Finegold, M. J. and Slagle, B. L. (2000) Expression of Hepatitis B virus X protein does not alter the accumulation of spontaneous mutations in transgenic mice. *J Virol*, **74**, 5266-5272.

Mak, T. W. and Yeh, W. C. (2002) Signaling for survival and apoptosis in the immune system. *Arthritis Res*, **4**, 243-252.

Mills, J. C., Stone, N. L. and Pittman, R. N. (1999) Extranuclear apoptosis: the role of the cytoplasm in the execution phase. *J Cell Biol*, **146**, 703-708.

Miller, R. H. and Robinson, W. S. (1986) Common evolutionary origin of hepatitis B virus and retroviruses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **83**, 2531-2535.

Miao, J., Chen, G. G., Chun, S. Y. and Lai, P. P. P. S. (2006) Hepatitis B virus X protein induced apoptosis in hepatoma cells through inhibiting Bcl-xL expression. *Cancer Lett*, **8**, 115-124.

Murakami, S. (1999) Hepatitis B virus X protein: structure, function and biology. *Intervirology*, **42**, 81-99.

- Murakami, S. (2001) Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator. *J Gastroenterol*, **36**, 651-660.
- Nagata, S. (2000) Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res*, **256**, 12-18.
- Nicholson, D. W. and Thornberry, N. A. (1997) Caspase: killer protease. *Trends Biochem Sci*, **22**, 299-306.
- Nuñez, G., Benedict, M. A., Hu, Y. and Inohara, N. (1998) Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*, **17**, 3237-3245.
- Oh, S. H. and Lee, B. H. (2004) A ginseng saponin metabolite-induced apoptosis in HepG2 cells involves a mitochondria-mediated pathway and its downstream caspase-8 activation and Bid cleavage. *Toxicol Appl Pharmacol*, **194**, 221-229.
- Pan, J., Lina, Z., Wallet, S. and Feitelson, M. A. (2007) The hepatitis B x antigen effector , URG7, blocks by activation of phosphoinositol 3-kinase and β -catenin. *J Virol*, **88**, 3275-3285.
- Putcha, G. V., Harris, C. A., Moulder, K. L., Easton, R. M., Thompson C. B. and Jr, E. M. J. (2002) Intrinsic and extrinsic pathway signaling during neuronal apoptosis : lesson from analysis of mutant mice. *J Cell Biol*, **157**, 441-453.
- Rehermann, B. and Nascimbeni, M. (2005) Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus C virus infection. *Nat Rev Immuno*, **5**, 215-229.
- Saraste, A. and Pulkki, K. (2000) Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*, **45**, 528-537.
- Sebbagh, M., Renovize, C., Hamelin, J., Riche, N., Bertoglio, J. and Breard, J. (2001) Caspase-3-mediated cleavage of ROCK1 induces MLC phosphorylation and apoptosis membrane blebbing. *Nat cell Biol*, **3**, 346-352.
- Seegre, C. and Mason, W. S. (2000) Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol boil Rev*, **64**, 51-68.
- Shirakata, Y. and Koike, K. (2003) Hepatitis B virus X protein induces cell death by causing loss of mitochondrial membrane potential. *J Biol Chem*, **278**, 22071-22078.

Su, F. and Shneider, R. J. (1997) Hepatitis B virus HBx protein sensitizes cells to apoptotic killing by tumor necrosis factor α . *Proc Natl Acad Sci USA*, **16**, 8744-8749.

Takada, S., Shirakata, Y., Kaneniwa, N. and Kioke, K. (1999) Association of hepatitis B virus X protein with mitochondria causes mitochondrial aggregation at the nuclear periphery, leading to cell death. *Oncogene*, **18**, 6965-6973.

Terradillos, O., Pollicino, T., Lecoeur, H., Tripod, M., Gougeon, M. L., Tiollais, P. and Buendia, M. A. (1998) p53-independent apoptotic effect of the hepatitis B virus HBx protein *in vivo* and *in vitro*. *Oncogene*, **17**, 2115-2123.

Terradillos, O., de La Coste, A., Pollicino, T., Neuveut, C., Sitterlin, D., Lecoeur, H., Gougeon, M. L., Kahn, A. and Buendia, M. A. (2002) The hepatitis B virus X protein abrogates Bcl-2-mediated protection against Fas apoptosis in the liver. *Oncogene*, **21**, 377-386.

Um, H. R., Lim, W. C., Chaea, S. Y., Park, S., Park, J. H. and Cho, H. (2006) Raf-1 and protein kinase B regulate cell survival through the activation of NF- κ B in hepatitis B virus X-expressing cells. *Virus Res*, **125**, 1-8.

Varfolomeev, E. E, Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J. S., Mett, I. L., Rebrikov, D., Brodianski, V. M., Kemper, O. C., Kollet, O., Lapidot, T., Soffer, D., Sobe, T., Avraham, K. B., Goncharov, T., Holtmann, H., Lonai, P. and Wallach, D. (1998) Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*, **9**, 267-276.

Wu, G. S., Burns, T. F., McDonald, E. R., 3rd, Jiang, W., Meng, R., Krantz, I. D., Kao, G., Gan, D. D., Zhou, J. Y. and Muschel, R. (1997) KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat. Genet*, **17**, 141-143.

Wang, J. C., Hsu, S. L. and Hwang, G. Y. (2004) Inhibition of tumorigenicity of the hepatitis B virus X gene in Chang liver cell. *Virus Research*, **102**, 133-139.

XLiang, F. D., Liu, Y., Gao, L., Han, L, Liu, S, Cui, M., Shi, Y., Cao, L., Ma, C., Zang, L., Chen, Y. and Sun, W. (2009) Hepatitis B virus core protein inhibits TRAIL-induced apoptosis of hepatocytes by blocking DR5 expression. *Cell Death Differ*, **16**, 219-229.

Yang, Y., Zheng, L., Lv, G., Jin, X. and Sheng, J. (2007) Hepatocytes treated with HBV X protein as cytotoxic effector kill primary hepatocytes by TNF-Alpha-Related apoptosis-induced ligand-mediated mechanism. *Intervirology*, **50**, 323-327.

Yu, W., Sanders, B. G. and Kline, K. (2003) RRR-alpha-tocopheryl succinate-induced apoptosis of human breast cancer cells involves Bax translocation to mitochondria. *Cancer Res*, **15**, 2483-2491.

Yin, X. M, Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K. A. and Korsmeyer, S. J. (1999) Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature*, **400**, 886-891.

Zhang, X. D., Zhang, H. and Ye, L. (2006) Effect of hepatitis B virus X protein on the development of liver cancer. *J Lab Clin Med*, **147**, 58-66.

圖目

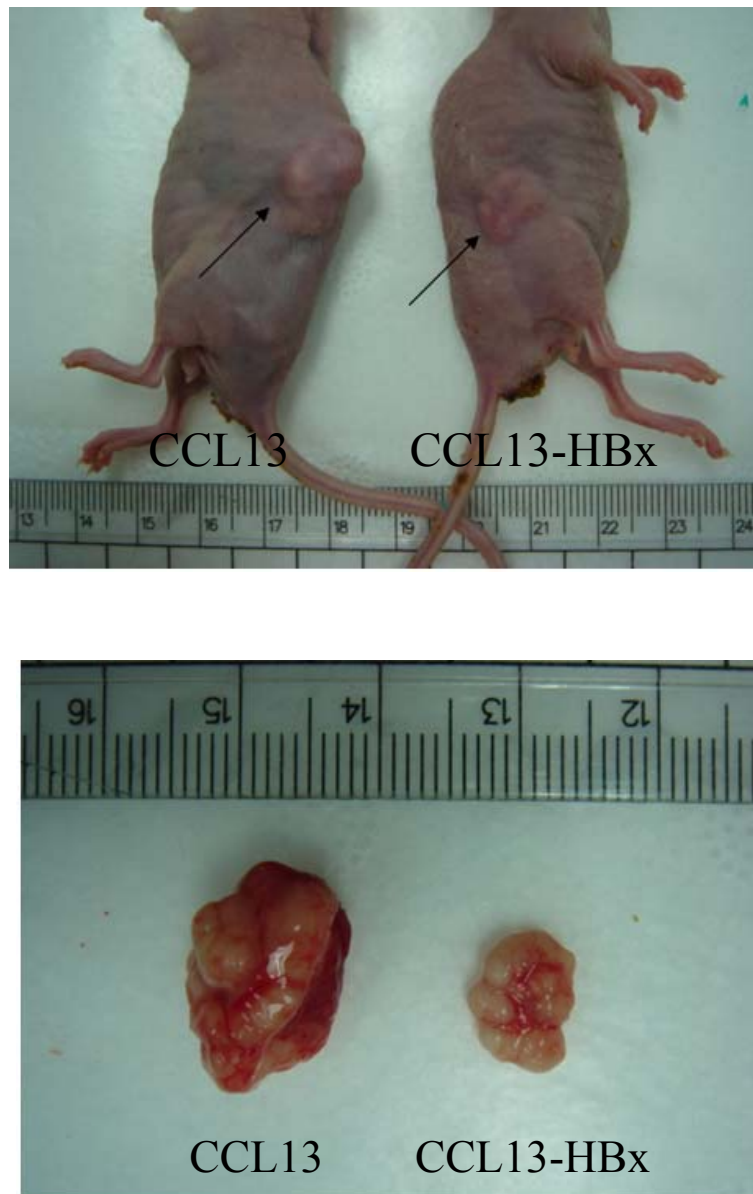


圖 1、在裸鼠皮下進行癌化能力的分析 (Tumorigenicity test in nude mice)。在 Balb/c 裸鼠皮下注射 CCL13 及 CCL13-HBx 穩定細胞株引誘發的 HCC 有尺寸抑制的情形發生。將 CCL13 及 CCL13-HBx 穩定細胞株兩種細胞株在皮下誘發 HCC (Hepatocellular carcinoma) 的產生，圖中為實驗起始第十週犧牲裸鼠後取出之 HCC 組織。

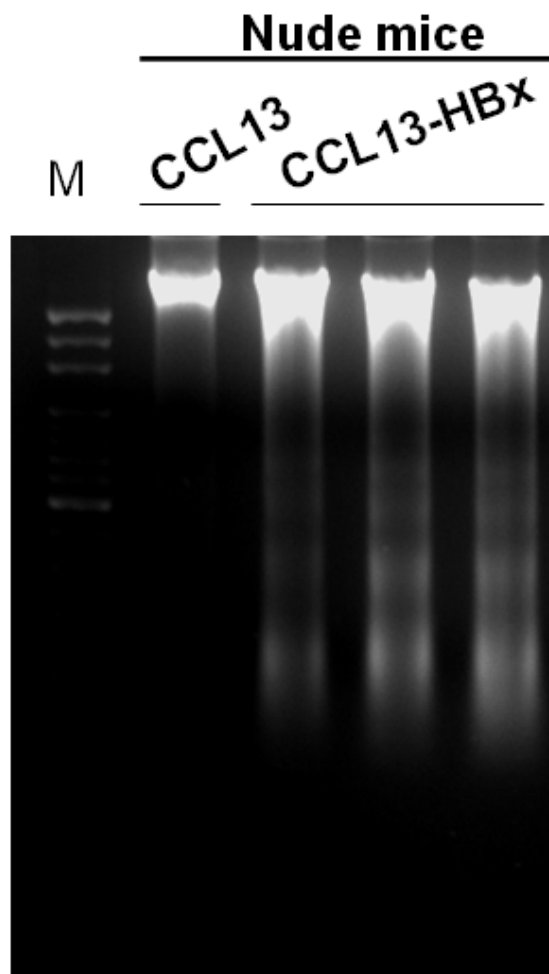


圖 2、以 2% 洋菜膠體電泳電泳 (Agarose gel electrophoresis) 分析在 HCC 組織中抽取之 Genomic DNA。在裸鼠皮下注射 CCL13 及 CCL13-HBx 穩定細胞株，將兩種細胞株在皮下形成的 HCC，進行組織均質後抽取 Genomic DNA，可看到在 HBx 誘導的組織中，Genomic DNA 具有片段化現象的發生，DNA ladder 的出現，亦即代表有細胞凋亡的現象發生。M 為 DNA marker。

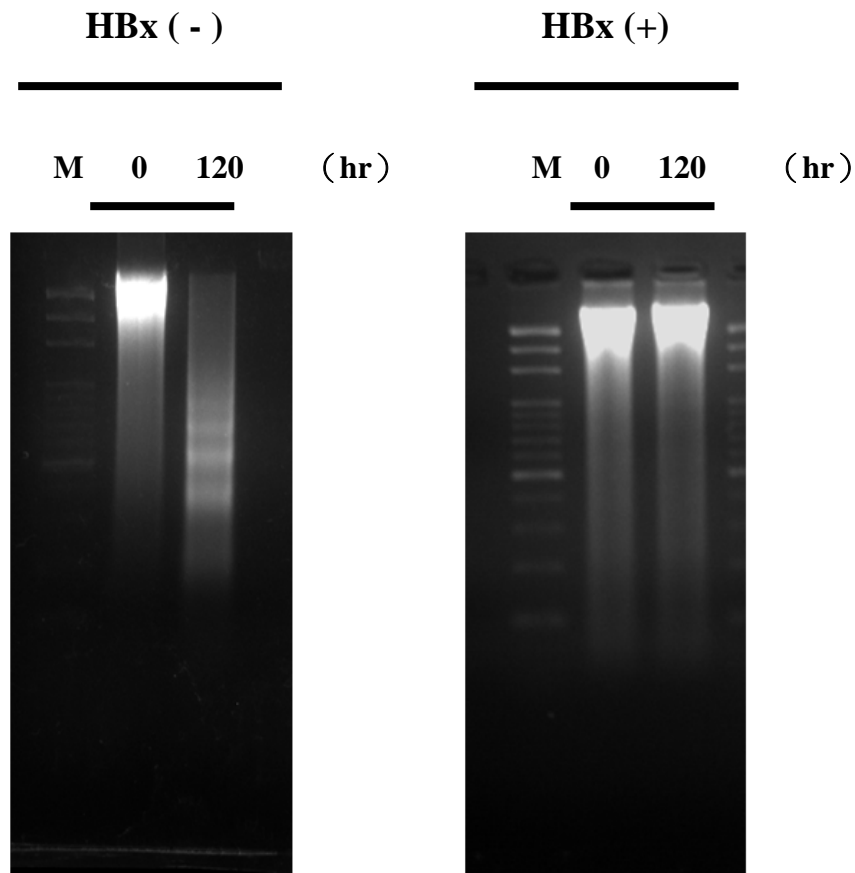


圖 3、以 2% 洋菜膠體電泳電泳 (Agarose gel electrophoresis) 分析在 CCL13-HBx 穩定細胞株中抽取之 Genomic DNA。在細胞培養移除 tet，表現 HBx 蛋白質 120 小時後，與 0 小時的細胞相較，可以清楚的看到 DNA ladder 的產生，代表 HBx 的誘導下會發生細胞凋亡的現象，反之，在沒有表現 HBx 的情形下，則 0 小時與 120 小時均無 DNA ladder 的出現。M 為 DNA marker。

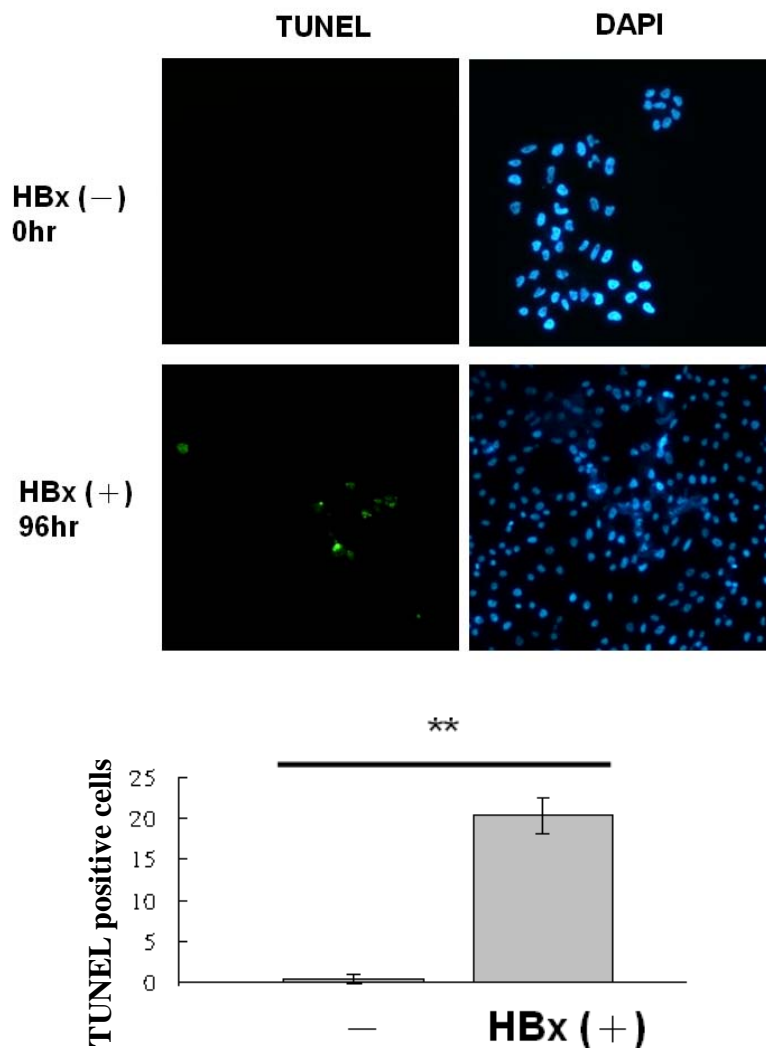


圖 4、以螢光顯微鏡 (Fluorescence microscopy) 分析 CCL13-HBx 穩定細胞株於視野下 TUNEL 訊號的產生，並以統計方式量化。在細胞培養移除 tet，持續表達 HBx 蛋白質 96 小時後，可以以螢光顯微鏡攝像清楚的看到綠色螢光 (TUNEL 訊號的產生)，代表 HBx 的誘導下會發生細胞凋亡的現象。以量化的結果來統計，96 小時的細胞 TUNEL 訊號將顯著的高於 1 小時的細胞。圖中 DAPI 染色代表視野下的細胞核。

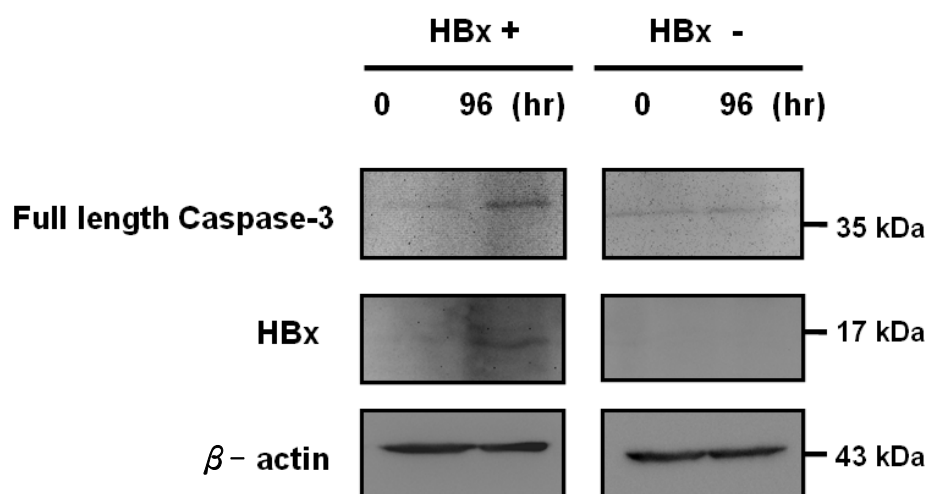


圖 5、以西方點墨法 (Western blot) 分析在 CCL13-HBx 穩定細胞株中 caspase-3 的蛋白質表現量。在細胞培養移除 tet，持續表達 HBx 蛋白質 96 小時後，可以以西方點墨法看到 full length caspase-3 在蛋白質表現量有增加的趨勢發生。而在沒有 HBx 表現的情形之下，full length caspase-3 則沒有表現量的差異。 β -actin 為 loading control。

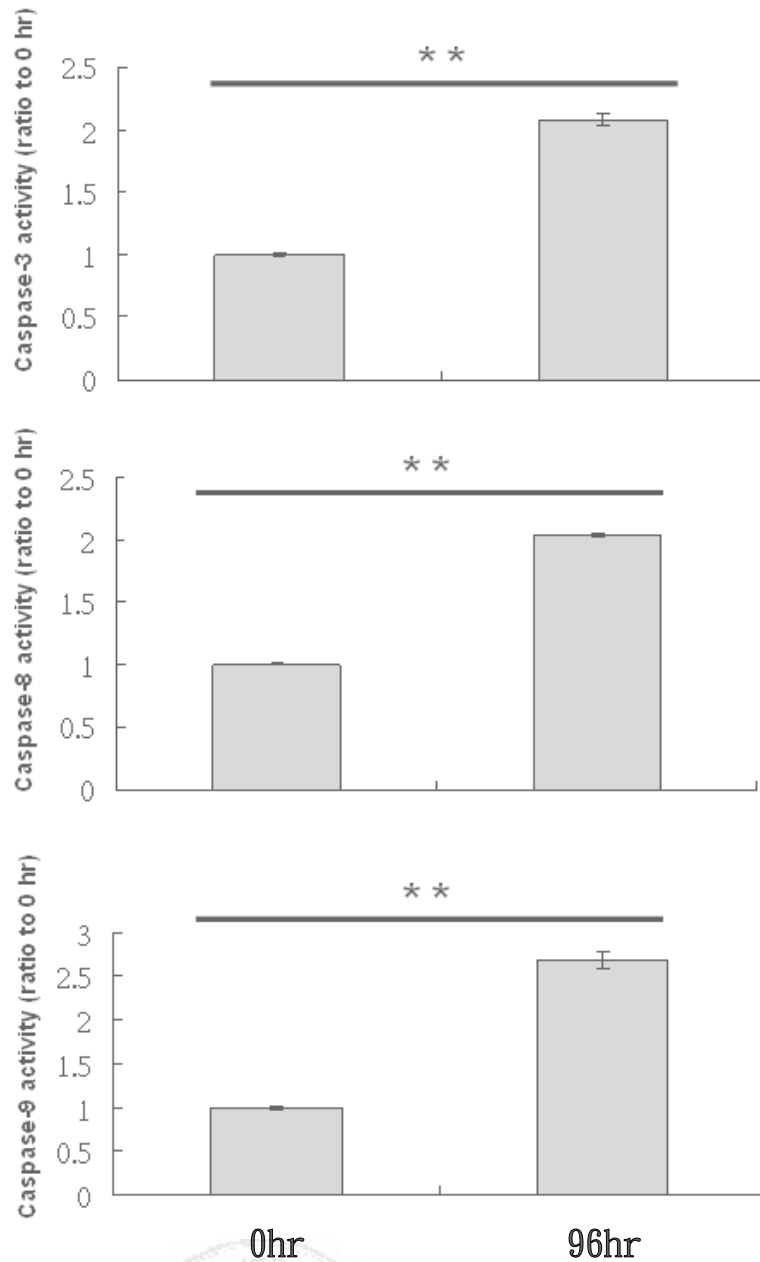


圖 6、以 Fluoroskan Ascent 測量在 HBx 蛋白質表達後 caspase 的活性變化。在細胞培養移除 tet，持續表達 HBx 蛋白質 96 小時後，可以看到 caspase-3、caspase-8 以及 caspase-9 的活性將有顯著性增加的傾向發生，與 0 小時相較，caspase-3 以及 caspase-8 活性約上升 2 倍，caspase-9 活性則約上升 0 小時之 2.6 倍。

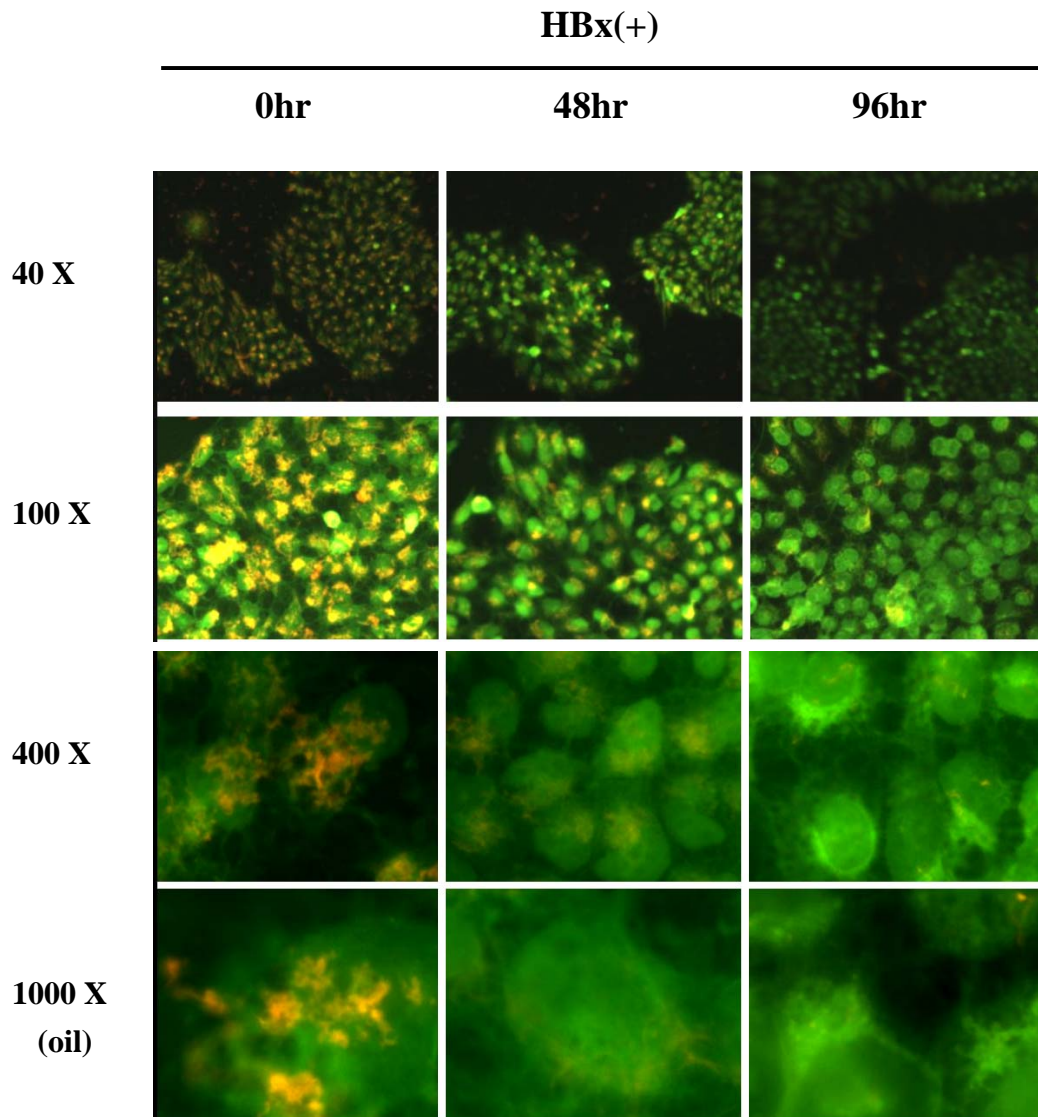


圖 7、以螢光顯微鏡 (Fluorescence microscopy) 於視野下分析 JC-1 stain 後 CCL13-HBx 穩定細胞株粒線體電位的變化。在細胞表現 HBx 蛋白質 48 小時以及 96 小時後，可以清楚的看到藉由 JC-1 累積在粒線體中，以 J-aggregates 形式產生橘紅色螢光，在 HBx 表達下，JC-1 自粒線體釋出於細胞質，轉變成 monomer 形式產生綠色螢光，代表細胞發生粒線體電位的下降。圖中以螢光顯微鏡進行攝像觀察，分別為 40 倍、100 倍、400 倍、1000 倍 (油鏡) 由小至大等倍呈現視野影像。

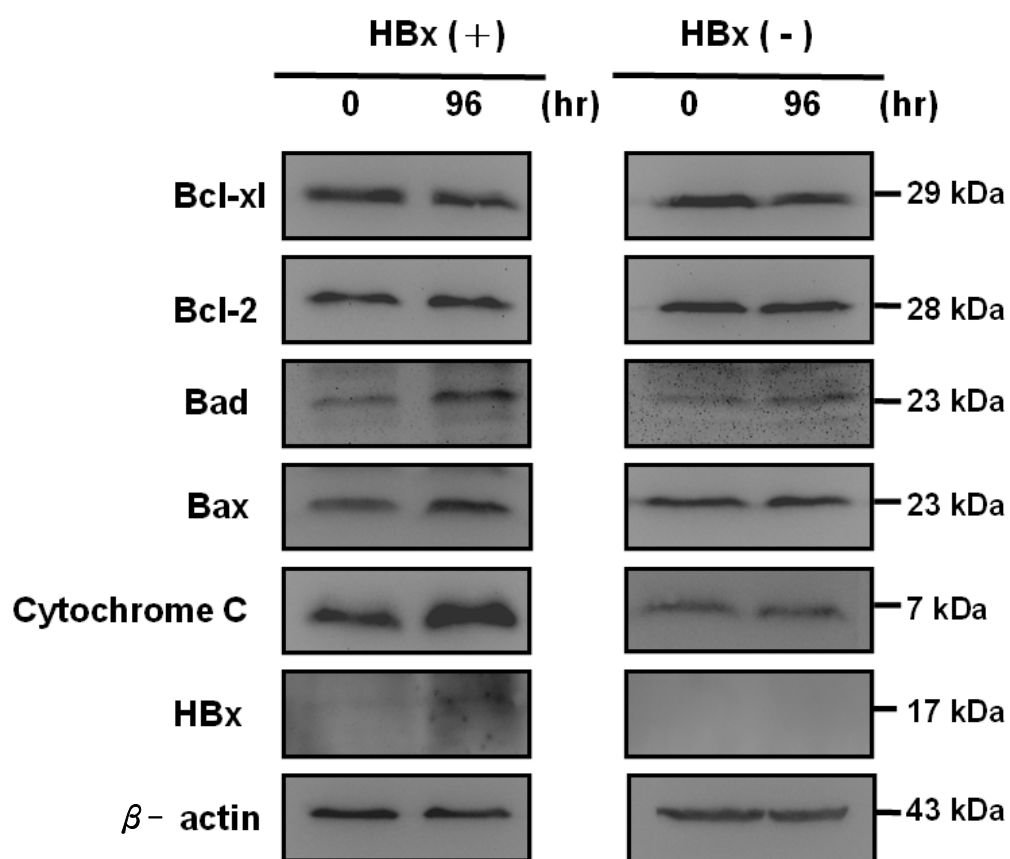


圖 8、以西方點墨法 (Western blot) 分析在 CCL13-HBx 穩定細胞株中 Bcl-2 家族，包含 Bcl-xl、Bcl-2、Bad、Bax 以及 Cytochrome C 的蛋白質表現量。在細胞培養移除 tet，持續表達 HBx 蛋白質 96 小時後，可以以西方點墨法看到 Bcl-2 家族相關在蛋白質層次上，包含抑制凋亡蛋白質 Bcl-xl 以及 Bcl-2 的表現量上沒有明顯的變化，而促凋亡蛋白質方面包含 Bad、Bax 上，蛋白質表現量則有輕微增加的趨勢發生；另外，Cytochrome C 的蛋白質表現量也有增加的情形發生。 β -actin 為 loading control。

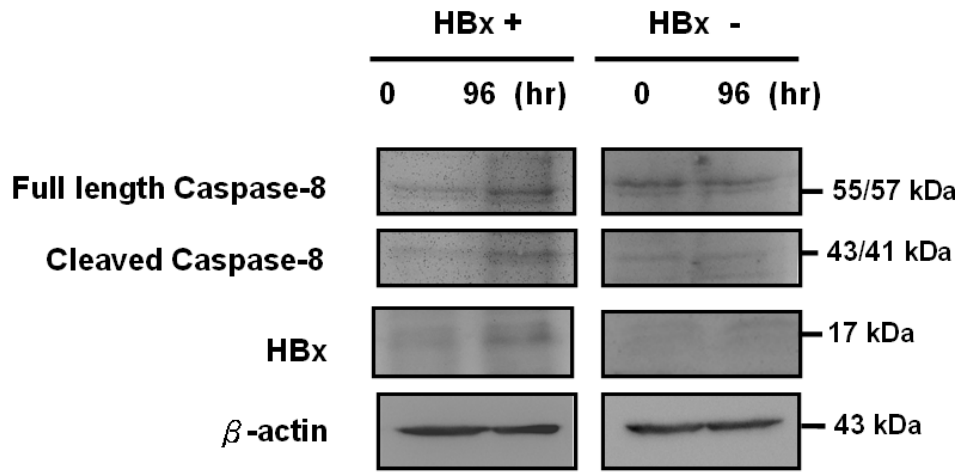


圖 9、以西方點墨法 (Western blot) 分析在 CCL13-HBx 穩定細胞株中 caspase-8 的蛋白質表現量。在細胞培養移除 tet，持續表達 HBx 蛋白質 96 小時後，可以以西方點墨法看到 caspase-8 在蛋白質層次上，包含 full length caspase-8 和 cleaved caspase-8，以均有表現量上升的趨勢發生。而在沒有 HBx 表現的情形之下，full length caspase-8 和 cleaved caspase-8 則沒有表現量的差異。 β -actin 為 loading control。

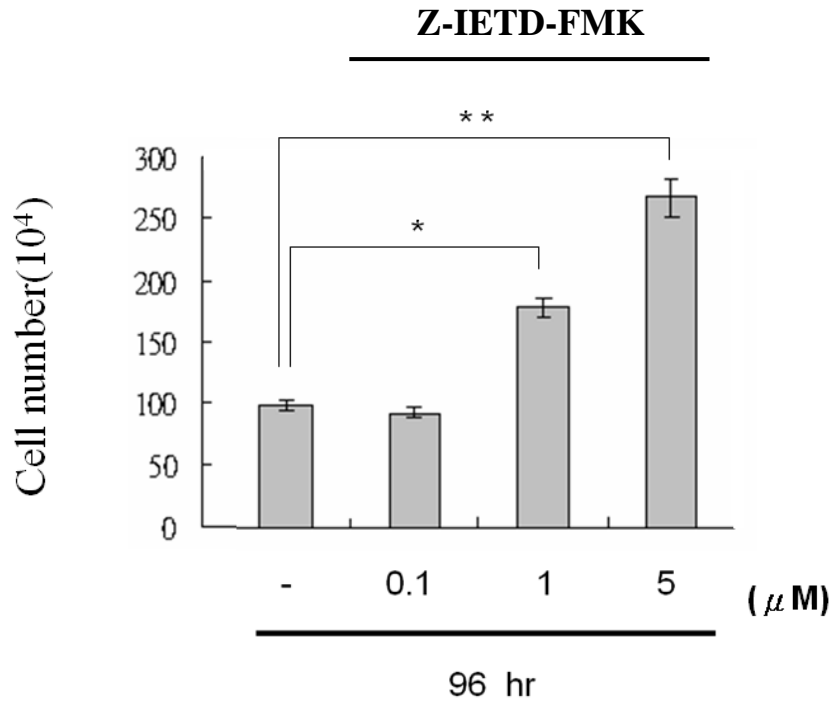


圖 10、在 CCL13-HBx 穩定細胞株中加入 caspase-8 專一性抑制劑 Z-IETD-FMK，並以血球計數器分別計算細胞數目，以統計方法量化。在 HBx 的表現下，加入 caspase-8 專一性抑制劑 Z-IETD-FMK，隨著劑量的逐漸增加，在統計上細胞數目有顯著增加的情形。

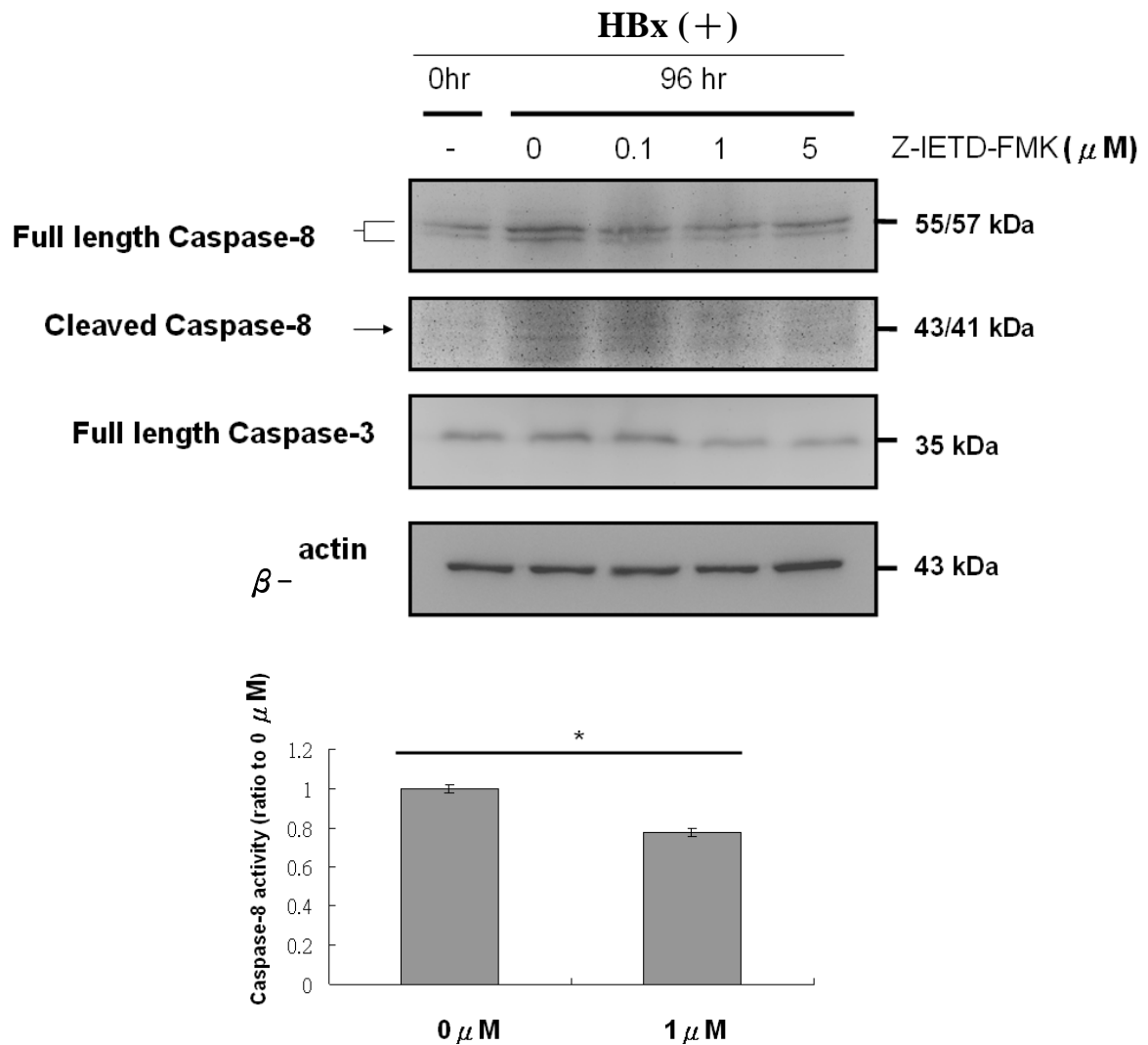


圖 11、以西方點墨法 (Western blot) 分析在 CCL13-HBx 穩定細胞株中加入 caspase-8 專一性抑制劑 Z-IETD-FMK，caspase-8 的蛋白質表現量，同時測量 caspase-8 活性。在細胞培養移除 tet，表達 HBx 蛋白質 96 小時後，可看到 full length caspase-8、cleaved caspase-8 蛋白質隨著抑制劑 Z-IETD-FMK 濃度的增加的影響而漸次的下降，而 caspase-3 蛋白質的表現量同樣減少，相較於沒有表現 HBx (Tet+) 時則不受影響， β -actin 為 loading control。而 1 μ M 的 Z-IETD-FMK 將具有使 caspase-8 活性顯著下降的能力。

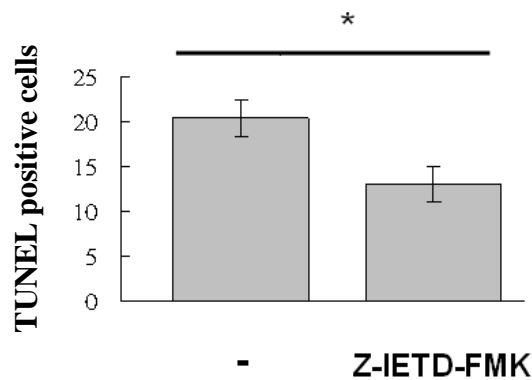
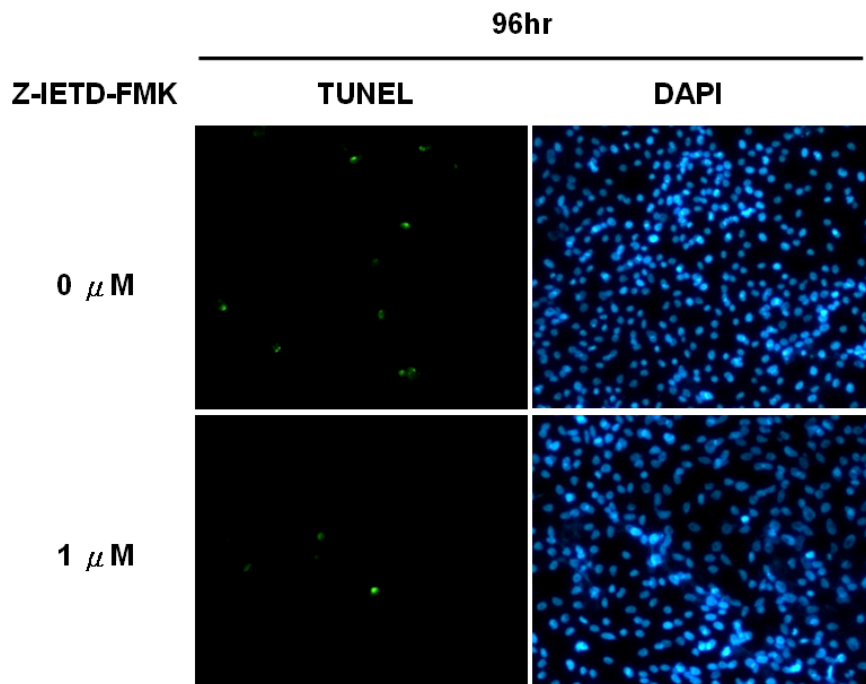


圖 12、以螢光顯微鏡(Fluorescence microscopy)分析在 CCL13-HBx 穩定細胞株中，加入 caspase-8 專一性抑制劑 Z-IETD-FMK，於視野下 TUNEL 訊號的發生，並以統計方式量化。在細胞培養移除 tet 表現 HBx 96 小時後，可以清楚的看到 TUNEL 訊號的產生在 Z-IETD-FMK 的作用下有減輕的現象，具有顯著性的差異。圖中 DAPI 染色代表視野下的細胞核。

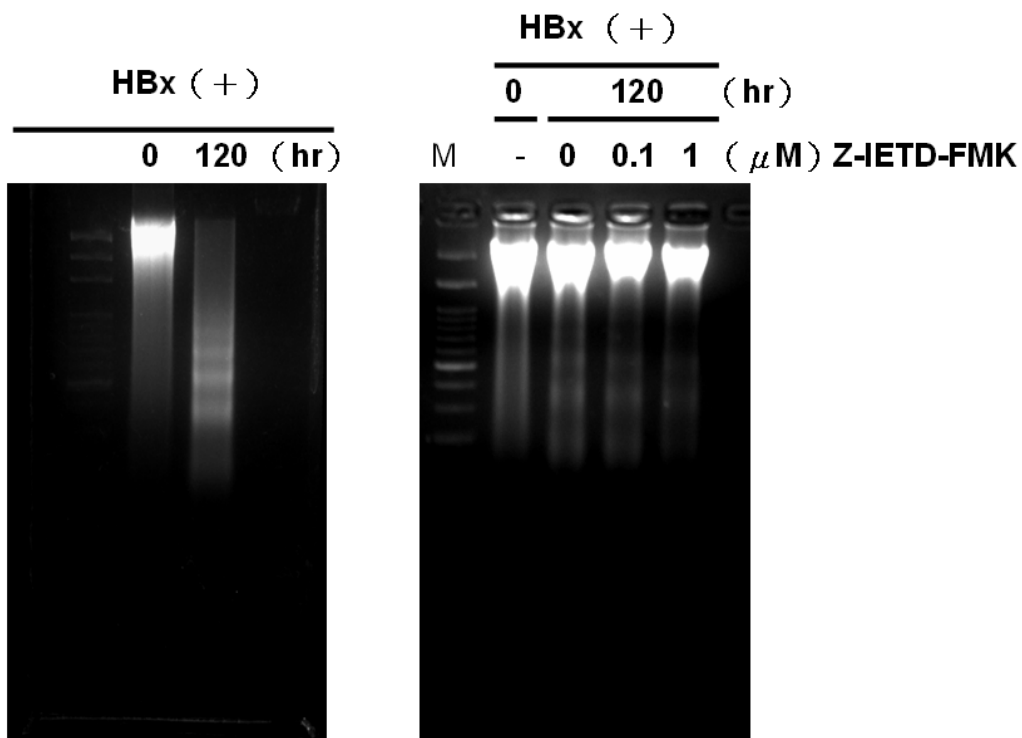
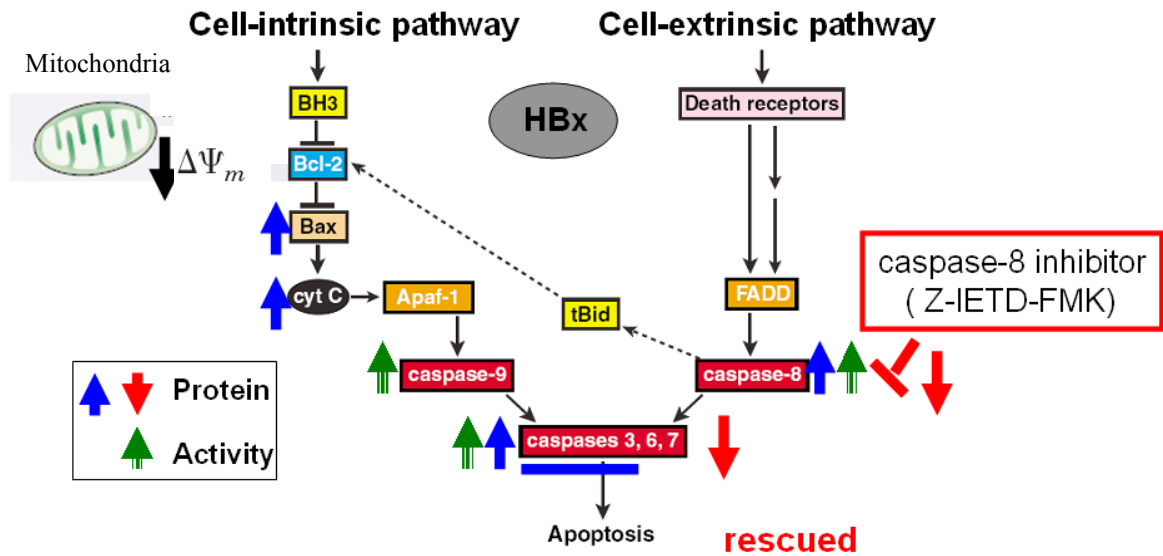
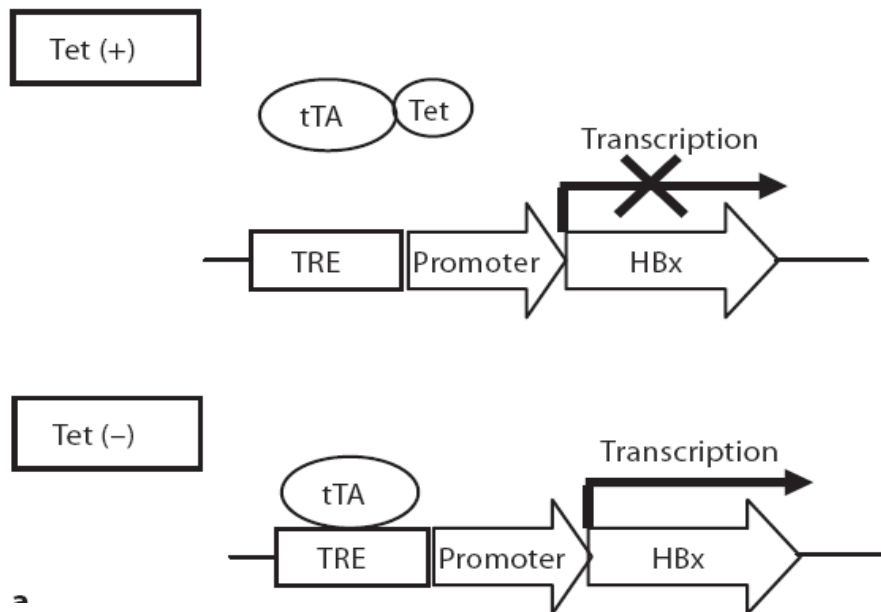


圖 13、在 CCL13-HBx 穩定細胞株中加入 caspase-8 專一性抑制劑 Z-IETD-FMK，並分別抽取 Genomic DNA 以 2% 洋菜膠體電泳電泳 (Agarose gel electrophoresis) 分析。在細胞培養移除 tet，表現 HBx 蛋白質 120 小時後，可以清楚的看到 DNA ladder 的產生在抑制劑的作用下減輕的現象。M 為 DNA marker。



附圖1、細胞死亡之途徑。在CCL13-HBx stable cell line中，HBx 蛋白質存在時，可能經由外因性途徑（extrinsic pathway）和內因性途徑（intrinsic pathway），分別由Bcl-2家族以及死亡受器引發細胞凋亡的發生（modify from Adams and Cory, 2007）。



附圖 2、CCL13-HBx stable cell line 之 Tet-off 系統模式。圖中所示，在一般培養狀況下，假如培養液中含有 tetracycline (Tet+)，此時基因產物 HBx 蛋白質將無法生成，即系統無法啟動 (turn off)；另一方面，移除 tetracycline 後 (Tet-)，此時基因產物 HBx 蛋白質將可以順利表達，即系統可以啟動 (turn on)。而可藉由 Tet 來控制 HBx 蛋白質的表現系統，稱為 Tet-off 系統模式 (Wang et al., 2004)。

附表 3、抗體名稱及使用條件，及相關藥劑、抑制劑、染劑列表

No.	Name	Species	Company	Conditions
1	HBx	R	—	一抗/1:1000，4°C，over night 二抗/1:3000，RT，1hr (含 3%脫脂牛奶)
2	Caspase-8	M	Cell Signaling # 9746	一抗/1:1000，4°C，over night 二抗/1:3000，RT，1hr (含 3%脫脂牛奶)
3	Caspase-3	R	Cell Signaling # 9662	一抗/1:1000，4°C，over night 二抗/1:3000，RT，1hr (含 3%脫脂牛奶)
4	Bax	R	Santa Cruz # sc-493	一抗/1:1000，4°C，over night 二抗/1:3000，RT，1hr (含 3%脫脂牛奶)
5	Bcl-2	M	Santa Cru # sc-7382	一抗/1:1000，4°C，over night 二抗/1:3000，RT，1hr (含 3%脫脂牛奶)
8	Bcl-xl	R	Santa Cruz # sc-643	一抗/1:1000，4°C，over night 二抗/1:3000，RT，1hr (含 3%脫脂牛奶)
9	Cytochrome C	M	Santa Cruz # sc-13156	一抗/1:1000，4°C，over night 二抗/1:3000，RT，1hr (含 3%脫脂牛奶)
10	Bad	M	BD # B36420	一抗/1:1000，4°C，over night 二抗/1:3000，RT，1hr (含 3%脫脂牛奶)
11	Actin	M	Sigma # A5316	一抗/1:10000，4°C，over night 二抗/1:10000，RT，1hr
12	Z-IETD-FMK	—	BioVision # 1064-100	Stock 2mM，依不同條件以序 列稀釋法稀釋至需求濃度
13	JC-1	—	BioVision # 1130-5	Stock 5mM，以無血清 DMEM 進行稀釋至 5µm/ml
14	DAPI	—	Sigma # D8417	1:1000，RT，6min

▲ Species (宿主的來源): M: mouse derived; R: rabbit derive

10X PBS

NaH ₂ PO ₄	2.03g
Na ₂ HPO ₄	11.49g
NaCl	85g

in 1L ddH₂O

10X PBST

NaH ₂ PO ₄	2.03g
Na ₂ HPO ₄	11.49g
NaCl	85g
Tween 20	5ml

in 1L ddH₂O (store in 4°C)

10X PBS (TUNEL stain)

NaH ₂ PO ₄	1.015g
Na ₂ HPO ₄	5.745g
NaCl	42.5g
Tritinx-100	15ml

in 500mL ddH₂O

30% Bis-Acrylamide

Acrylamide 29g

N,N'-Methylene-bis-Acrylamide 1g

in 100mL ddH₂O

Stripping buffer

Tris-Hcl 3.78g

SDS 10g

2-ME(2-mercaptoethanol) 3.5ml

in 500mL ddH₂O

Transfer buffer

Glycine 2.9g

Tris-Base 5.8g

0.037% SDS 0.37g

Methanol 200ml

in 1L ddH₂O (store in 4°C)

10X Running buffer

Tris-Base	30.3g
Glycine	144g
SDS	10g

in 1L ddH₂O

G-250(coomassie Brilliantblau)

G-250 (Merck, Nr.426555)	100mg
95% EtOH	50ml
85% ortho-phosphoric acid	10g
Milli-Q	850ml

total 300ml

個人簡歷表

中文姓名：蔡薰毅

英文姓名：Ju-I Tsai

出生年月：1984 年 3 月 4 日

出生地：高雄市

E-mail：tincta@gmail.com

嗜好：寫作、閱讀

主要學歷：

2003 年～2007 年 大葉大學 分子生物科技學系 學士

2007 年～2009 年 東海大學 生命科學系 生物醫學組 碩士

主要經歷：

大葉大學動物基因轉殖研究室 大學部專題生

東海大學生命科學系普通生物學（一）實驗助教

東海大學生命科學系普通生物學（二）實驗助教

榮譽：

2009 年 台中榮總-東海大學合作計畫 壁報報告第一名