

## 目錄

目錄.....	1
中文摘要.....	4
英文摘要.....	7
前言.....	10
一、 子宮頸癌與人類乳突瘤病毒的關係.....	10
二、 人類乳突瘤病毒的基本特性.....	10
三、 過去對於病毒變異體的研究.....	12
三、 上游調控區對人類乳突瘤病毒早期基因 <i>E6</i> 、 <i>E7</i> 的調控.....	13
四、 人類乳突瘤病毒上游調控區的組織專一性表現與細胞轉錄因 子的關係.....	14
材料與方法.....	17
一、 引子序列.....	17
二、 寡核酸序列.....	19
三、 檢體.....	21
四、 初級細胞與細胞株的培養.....	21
五、 基因體的萃取.....	21
六、 聚合? 連鎖反應-南方墨漬法.....	22
七、 人類乳突瘤病毒 18 型(HPV-18) <i>E6</i> 序列變異體的確認.....	23

八、質體構築.....	23
九、信使核醣核酸 ( messenger RNA ) 的萃取及 RT-PCR.....	25
十、細胞轉染 ( transfection ) .....	26
十一、冷光報導基因測試( Luciferase assay ).....	26
十二、核蛋白質的萃取.....	27
十三、寡核酸序列的黏合.....	28
十四、電泳飄移測試 ( Electrophoresis Mobility Shift Assay; EMSA ).....	28
十五、以磁珠 ( Dynabeads M-280 ) 純化 DNA 結合蛋白.....	28
十六、統計分析.....	30
<b>第一部份：台灣子宮頸癌患者中人類乳突瘤病毒之盛行率以及 HPV-18 E6 變異體之分析.....</b>	<b>31</b>
<b>結果.....</b>	<b>32</b>
一、子宮頸癌患者之人類乳突瘤病毒感染分型.....	32
二、HPV-18 E6 的變異體分析.....	33
<b>討論.....</b>	<b>34</b>
一、在台灣子宮頸癌患者之人類乳突瘤病毒 18 型盛行率較高....	34
二、嵌入病患基因體中的 HPV-18 E6 的變異體.....	37
<b>第二部分：人類乳突瘤病毒 18 型之 5' 端上游調控區具有潛在靜默子</b>	

的功能.....	38
結果.....	39
一、HPV-18 早期基因在不同細胞間的表現.....	39
二、HPV-18 及-16 之上游調控區在不同細胞間的活性.....	40
三、HPV-18 及-16 <i>URR</i> 系列刪減對於活性的影響.....	41
四、與 HPV-18 <i>URR</i> 作用的細胞因子.....	44
五、參與 HPV-18 <i>URR</i> 5'端靜默子功能的細胞因子.....	45
討論.....	48
一、HPV-18 <i>URR</i> 的組織專一性表現.....	48
二、HPV-18 <i>URR</i> 的 5'端具有潛在的靜默子.....	50
三、與 HPV-18 <i>URR</i> 5'端潛在靜默子作用的細胞因子.....	53
參考文獻.....	57
表目錄.....	65
圖目錄.....	66
表說明.....	67
圖說明.....	70
附錄目錄.....	82
附錄說明.....	83
個人資料.....	86

## 中文摘要

子宮頸癌是第二常見的女性癌症，而人類乳突病毒（human papillomavirus; HPV）被認為是導致子宮頸癌的一個重要因子，其中又以 HPV-16 型以及 HPV-18 型為主要致癌的兩種血清型。由本實驗室之前的研究，我們認為 HPV-18 在台灣具有盛行率。而 HPV 的早期基因產物被認為可以跟細胞中某些重要蛋白質作用而阻斷其正常功能，其中 E6 以及 E7 蛋白質更是與子宮頸癌的發生有密切關連。E6 蛋白質可以與抑癌因子 p53 作用並進而使其降解；E7 蛋白質可以與 pRb 蛋白質結合，使 E2F-pRb 複合體分離，而導致細胞基因的轉錄活化。在此報告中，第一部份是從子宮頸癌病患組織中尋找出 HPV-18 的變異體。25 位子宮頸癌患者經由臨床確診並取得檢體，其 HPV 的感染類型是藉由 PCR 以及南方墨漬法加以確認，結果發現 HPV-18 之感染盛行率達到 100%，而在這 25 位患者中有 7 位共同感染了 HPV-16（28%）。嵌入患者基因體的 HPV-18 E6 基因片段則利用 PCR 增幅並選殖出來，定序後取得其序列。在分析後發現 25 位患者都具有同一靜默變異，位於 E6 開放讀碼區第 183 個鹼基，由 C 變成 G。因此在這一部份，我們得知受檢測的 25 位患者都具有 HPV-18 的感染，與世界性的感染盛行率不同，我們同時發現這些患者中增幅出來的 HPV-18 E6 有一個特有的靜默變異位於 E6 開放讀碼區第 183

個鹼基，由 C 變成 G。另外，藉由組織學的研究，我們也認為 HPV-18 與腺癌具有高度相關性，顯示 HPV-18 在某些細胞型態中具有專一性。因此，本報告的第二部份是嘗試將影響 HPV-18 在不同細胞中表現差異的因子找出。過去的研究指出 HPV-18 以及 HPV-16 在不同細胞中具有不同的表現特異性，受到細胞轉錄因子經由病毒基因的上游調控區（upstream regulatory region; *URR*）進行精密的調控。為了驗證 HPV-18 及 HPV-16 型上游調控區在不同細胞間的表現特異性，我們將全長之病毒之上游調控區構築到含有報導基因之無啟動子載體，再將之轉染至 HeLa、NIH 3T3 以及 U2OS 三個細胞株並測量其報導基因活性，結果顯示病毒之調控區在不同細胞間呈現了不同的活性。我們同時構築、並轉染了系列刪減之病毒上游調控區片段，發現在 HPV-18 及 HPV-16 型上游調控區的 5' 端存在一個靜默子的區域，而且發現 HPV-18 *URR* 之潛在靜默子在 U2OS 細胞株中表現極大的抑制能力。而為了知道有哪些細胞因子參與其中，我們設計，並合成了數對核酸序列進行核酸-蛋白質結合反應，並藉由電泳飄移試驗（EMSA）來分析，由結果得知有兩個主要的結合區域，一個是中央的增強子區域，另外一個則是被我們認為是潛在靜默子的 5' 端區域。為了得到直接的分子證據，我們也利用 biotin 標定之 HPV-18 型 5' 端 *URR* 片段與三種細胞株之核蛋白質進行結合反應以純化結合在這

些片段上之細胞轉錄因子，同時利用這些純化核蛋白質與寡核酸片段反應，由飄移測試的結果後我們認為 TBP、CEBP 以及 YY-1 在 HPV-18 的 5'端 *URR* 可能形成轉錄因子複合體，而能抑制其表現活性。而在 HeLa 以及 NIH 3T3 中，HPV-18 全長 *URR* 仍有顯著報導基因活性的原因，可能是因為有另外一個細胞轉錄因子 Oct-1 與 TBP 競爭結合位點而造成抑制複合體無法形成，導致在上述兩種細胞中，全長的 HPV-18 *URR* 仍能維持活性。

關鍵字：子宮頸癌、人類乳突瘤病毒、靜默子、上游調控區、轉錄因子

## 英文摘要

Cervical cancer is the second leading cancer in women worldwide. It has been considered that HPV was a marked factor of cervical cancer. The most common types that lead cervical cancer are HPV-16 and HPV-18. In previous studies, we concluded that the prevalence of HPV-18 is high and consistent in Taiwan. It also has been known that the products of HPV early genes can interact with cellular proteins in disrupting their normal functions. Particularly, overexpressions of the high-risk HPV early genes *E6* and *E7* were associated with the development of cervical cancer by interrupting the normal functions of p53 and E2F-pRb complex. The first part of this report is the identification of the variants of integrated HPV-18 *E6* gene in the prevalence infection of HPV-18 of cervical cancer patients. Twenty-five cervical cancer patients were clinically identified and the biopsies were obtained. The infectious HPV types were identified by PCR and Southern blotting analysis. The prevalence of HPV infection in our 25 cases was HPV-18 (100%) and 7 out of these 25 (28%) cases were co-infected with HPV-16. The DNA fragments of the integrated HPV-18 *E6* were amplified by PCR and cloned. The nucleotide sequences were obtained by sequencing. We found the most dominant mutation among 25 tested patients was a silence mutation C183G of the *E6* coding region. In conclusion of the first part, the prevalent HPV infectious serotype is HPV-18, which differs from the worldwide prevalent type. We also identified HPV-18 *E6* variants had a unique

silence mutation located on C183G in E6 coding region. Moreover, we suggest that HPV-18 was highly associated with adenocarcinoma by histological study. This result implicated that HPV-18 showed cell-specificity in some cell types, and therefore the second part of this dissertation is the studies of differential expressions of HPV-18 in cells. Previous studies indicated HPV-18 and HPV-16 exhibited different specificities in various cells that may be controlled by transcriptional factors via the upstream regulatory region (*URR*). To verify the specificities of HPV-18 and HPV-16 *URR* in cells, the full-length *URRs* of HPV-18 and HPV-16 were constructed into the promoter-less vector, and then transfected to HeLa, NIH 3T3 and U2OS cells to investigate activities by luciferase assays. Results showed that the relative activities of viral promoters were far different among cells. We also transfected the serially deleted *URR* constructs of HPV-18 and HPV-16 into cells. We found a strong silencer on the *URR* 5' regions in both serotypes, and the potential silencer of HPV-18 *URR* exhibited the strong inhibition in U2OS. To position the cellular transcription factors involved in cell specificity, we synthesized the oligo nucleotides and performed the electrophoretic mobility shift assay (EMSA) to investigate the binding of transcriptional factors among cells. We observed two major binding regions located on the central enhancer and the 5'-end, silencer regions. To obtain the direct molecular evidences, we also used the biotinylated fragments of HPV-18 *URR* 5'-end to purify the bound proteins from cell nuclear extracts and performed the shift assay. These results indicated that the binding of TBP, CEBP and YY-1 may form a complex and inhibit the activities in cells. Moreover, our data also implicated the binding of

Oct-1 in HeLa and NIH 3T3 may disrupt the formation of inhibitory complex on HPV-18 *URR* 5'-end by steric competition with overlapped TBP binding site in maintaining parts of activities in HeLa and NIH 3T3 cells.

Key words: cervical cancer, human papillomavirus (HPV), silencer, upstream regulatory region (URR), transcription factor

# 前言

## 一、子宮頸癌與人類乳突瘤病毒的關係

子宮頸癌是目前全世界女性第二常見的癌症，多因為性接觸而感染，而目前知道人類乳突瘤病毒（human papillomavirus; HPV）與子宮頸癌的發生有密切的關連（Bosch *et al.*, 2002; Wolf and Ramirez, 2001）。而在行政院衛生署近二十年來的流行病學研究中，女性因子宮頸癌死亡的排名仍然高居因惡性腫瘤死亡的前五名中，顯示在台灣地區，此一疾病依然威脅著婦女同胞的生命。

目前人類乳突瘤病毒已被發現具有超過一百種以上的血清型，而被定出完整序列的約有八十餘種，在這些不同的血清型中，以致癌風險性加以區分，則可以分為兩大群，一群是低風險群，包括血清型 6、11 等等；另一群是高風險群，包括血清型 16、18 等等（McMurray *et al.*, 2001）。在主要會引發子宮頸細胞病變的高風險群人類乳突瘤病毒中，感染比率最高的是血清型 16，佔 58%，其次是血清型 18，佔 12%，而血清型 45 以及 31 則分別佔 5% 以及 4%，其餘的則由其他較不常見的人類乳突瘤病毒血清型感染所致（Bosch *et al.*, 2002）。

## 二、人類乳突瘤病毒的基本特性

一般的人類乳突瘤病毒基因體約長 7800 到 7900 鹼基對，以環狀雙股 DNA 型式存在於病毒顆粒中，其基因體可分為三個部分，早

刪除：實驗目的

在高風險群之人類乳突瘤病毒參與子宮頸癌病變的過程中，病毒的早期致癌基因扮演著非常重要的角色，其將正常細胞轉型的能力已經有許多

格式化的字體：18 點

刪除：症

刪除：et al.,

刪除：

刪除：幾

刪除：%

刪除：%

刪除：%

刪除：%

刪除：剩下

刪除：

刪除：清除

刪除：監視而被去除。如果病

刪除：瘍

刪除：瘤」。如果感染的是高

刪除：

刪除：形

刪除：體

期基因( early genes ) 晚期基因( late genes ),以及上游調控區( upstream regulatory region )( Corden *et al.*, 1999; Wolf and Ramirez, 2001 ) (附錄

刪除: *et al.*,

二)。早期基因中, E1 以及 E2 蛋白質與病毒 DNA 的複製有關, E4 蛋白質則與病毒的組裝有關, E5 蛋白質則可以與宿主細胞膜上的接受器作用, 可能與刺激細胞的增生有關。晚期基因則包含了兩個結構性的蛋白質, L1 以及 L2, 這兩個蛋白質是組成病毒顆粒殼蛋白體的主成分, L1 為主要的結構蛋白質, 而 L2 則為次要結構蛋白質 ( Wolf and Ramirez, 2001 ) 上游調控區則是可以藉由病毒本身的基因產物, 或者是細胞中的轉錄調節因子, 來控制病毒基因體的複製或是早期基因表現 ( Berg and Stenlund, 1997; Romanczuk and Howley, 1992; Sanclemente and Gill, 2002 )

刪除: *et al.*,

刪除:;

E6 與 E7 蛋白質在目前的研究中是與子宮頸癌發生最有關連的兩個分子, E6 蛋白質可以與 E6-AP ( E6-associated protein ) 形成複合體, 其功能類似 ubiquitin-protein ligase ( E3 ), 而此複合體又能與腫瘤抑制因子 p53 結合, 在 ubiquitin 與 ubiquitin activating enzyme ( E1 ) 結合而活化, 再由 ubiquitin-conjugating enzyme ( E2 ) 置換 E1 之後, 與前述三分子之複合體 ( E6-E6AP-p53 ) 作用, 將 ubiquitin 結合至 p53 上, 導致腫瘤抑制因子 p53 經由 ubiquitin protease 的途徑而降解 ( Scheffner *et al.*, ; 1993; Talis *et al.*, 1998 )

E7 蛋白質則會與另一個腫瘤抑制因子 Rb 蛋白質結合，阻止 Rb 蛋白質的正常功能。Rb 蛋白質在 G0 或者 G1 期的細胞中通常處於低磷酸化狀態而與轉錄因子 E2F 結合，阻止 E2F 的刺激轉錄功能，而當細胞需要進入 S 期時，Rb 會被過磷酸化而將 E2F 釋放出來進而刺激其他基因的表現，使細胞進入細胞週期。而在被感染的細胞中，E7 蛋白質會與 Rb 結合而使得 E2F 被釋放出來，造成下游基因的表現使得細胞進入細胞週期 ( Chan *et al.*, 2001; Dyson, 1998; Wiman, 1993 )。

當正常的子宮頸上皮細胞受到人類乳突瘤病毒感染時，病毒可能會被免疫系統去除。如果病毒逃過免疫系統的防禦能力而持續發展，在感染低風險型的病毒之個體，細胞可能會發展成「疣」或「良性腫瘤」。如果感染的是高風險型的病毒，則在長期感染的狀況下，病毒的 DNA 會嵌入宿主細胞的染色體而失去病毒本身的調控蛋白 E2，導致 E6 以及 E7，會大量表現造成宿主細胞的異常增生，最後造成癌化 ( Bosch *et al.*, 2002; Huibregtse and Scheffner, 1994; Munger and Howley, 2002 )。

### 三、過去對於病毒變異體的研究

病毒在感染宿主細胞後，會利用產生變異體的方式來增加再感染的機會，或者是要躲避宿主免疫系統的攻擊，例如感冒病毒或者是 B 型肝炎病毒 ( Ferguson *et al.*, 2003; Hwang *et al.*, 2003 ) 由肝癌病患基

因體中分離出來的 B 型肝炎病毒之 *x* 基因,其最常出現的變異體就位於 B- 或者 T 細胞的抗原決定基區域 (Hwang *et al.*, 2003 )。另外一方面,過去對於 HPV18 型 E6 基因之變異體的研究,顯示在子宮頸癌病患中最常分離出之變異體為在鹼基位置 350 由 T 變異為 G 之變異體 (Brady *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 1999 )。此一變異會使得 E6 的第八十三個氨基酸由 Leucine 變成 Valine ,而這個位置也剛好座落在 E6 的抗原決定基上 (Villada *et al.*, 2000 )。這顯示病毒的基因變異可能的確與躲避宿主免疫反應有關 (Brady *et al.*, 1999; Zehbe *et al.*, 1998 )。

#### 四、上游調控區對人類乳突瘤病毒早期基因 E6、E7 的調控

高風險人類乳突瘤病毒早期基因 E6、E7 的過度表現,會使得細胞的腫瘤抑制因子失去其正常功能,而造成其過度表現的主因,則是因為在癌化過程中,病毒基因會嵌入宿主的基因體,導致病毒原有的調節機制失效所致 (Bosch *et al.*, 2002; Corden *et al.*, 1999; Jeon and Lambert, 1995 )。

人類乳突瘤病毒早期基因的控制是由病毒基因體中的上游調控區 (upstream regulatory region; URR), 或稱長控制區 (long control region; LCR ) 所調控, 調控因子則是包含了病毒本身的早期基因 E2 以及細胞轉錄因子 (Berg and Stenlund, 1997; Romanczuk and Howley, 1992; Sanclemente and Gill, 2002 ) 在病毒進行複製或者表現早期基因

刪除:

E6 與 E7 蛋白質在目前的  
研究中是與子宮頸癌發生最  
有關連的兩個分子, E6 蛋白  
質可以與 E6-AP  
( E6-associated protein ) 形成  
複合體, 其功能類似  
ubiquitin-protein ligase ( E3 ),  
可以與 ubiquitin activating  
enzyme ( E1 ) 及  
ubiquitin-conjugating enzyme  
( E2 ) 合作, 導致腫瘤抑制  
因子 p53 經由 ubiquitin  
protease 的途徑而降解  
( Scheffner *et al.*, 1993; Talis  
*et al.*, 1998 )

E7 蛋白質則會與另一個  
腫瘤抑制因子 Rb 結合, 阻止  
Rb 的正常功能。Rb 蛋白質在  
G0 或者 G1 期的細胞中通常  
處於低磷酸化狀態而與轉錄  
因子 E2F 結合, 阻止 E2F 的  
刺激轉錄功能, 而當細胞需要  
進入 S 期時, Rb 會被過磷酸  
化而將 E2F 釋放出來進而刺  
激其他基因的表現, 使細胞進  
入細胞週期。而在被感染的細  
胞中, E7 蛋白質會與 Rb 結合  
而使得 E2F 被釋放出來, 造  
成下游基因的表現使得細胞  
強迫進入細胞週期 ( Chan *et al.*, 2001; Dyson 1998; Wiman  
1993 )

刪除: 癌化

刪除: E1 及 E2

刪除: ;

時, E1 及 E2 會互相作用並與複製起始點形成複合體 ( E1-E2-ori complex ), 使病毒基因得以複製 ( Berg and Stenlund, 1997 )。而早期基因 E6、E7 的表現則與 E2 有密切的關係 ( Desaintes *et al.*, 1997; Moon *et al.*, 2001; Wells *et al.*, 2000 )。當病毒感染初期, 在 URR 起動子與增強子序列上, 具有四個 E2 蛋白質的結合位置 ( E2 binding site ; E2BS ), 在細胞株的研究顯示, 當 E2 蛋白質結合在這些位置時, 會使得早期癌化基因 E6、E7 的表現受到抑制, 使病毒早期基因表現降低, 甚至使細胞生長停滯或凋亡 ( Demeret *et al.*, 1997; Desaintes *et al.*, 1997; Dowhanick *et al.*, 1995; Goodwin *et al.*, 1998; Moon *et al.*, 2001; Morgan *et al.*, 1998; Romanczuk and Howley, 1992; Wells *et al.*, 2000 )。

刪除: 体

刪除: reference

## 五、人類乳突瘤病毒上游調控區的組織專一性表現與細胞轉錄因子的關係

過去以 HPV-16 URR 的增強子在多種上皮細胞株或者纖維母細胞株表現報導基因的實驗, 證實位於 HPV-16 URR 的增強子 ( 約在轉錄起始點至上游 400 bps 之區域 ) 會專一性的在上皮細胞或其衍生細胞株 ( SiHa、HT3、HaCaT 以及 HD2 ) 強烈表現, 而在纖維母細胞株 ( MRHF、c127、NIH 3T3 以及 Rat2 ) 中則幾乎沒有活性 ( Chong *et al.*, 1991 ) 而使用更多不同的 HPV 血清型進行類似的實驗也有相同的結果 ( Sailaja *et al.*, 1999 ), 該實驗發現 HPV-16 以及 HPV-18 的增強子

( HPV-16 之實驗約在轉錄起始點至上游 550 bps 之區域; HPV-18 之實驗約在轉錄起始點至上游 500 bps 之區域 ) 在上皮細胞 ( HeLa 以及 HaCaT ) 中具有強烈活性 , 而在纖維母細胞 ( MRHF ) 中僅具微弱活性。但是如果將全長的 HPV-18 URR 與病毒早期基因 E6、E7 轉染到 NIH 3T3 中 , 則可偵測到病毒核酸的表現 ( Bedell *et al.*, 1987 ) , 這顯示就算在同一種細胞株中 , 不同血清型的 HPV 會展現不同的組織特異性。

調節早期基因的起動子-增強子 ( promoter-enhancer ) 位於 URR 轉錄起始點上游 400 500 bps 左右, 包含了許多細胞轉錄因子的結合位點, 如 NF1、AP1、Oct-1、SP1 及 YY1 等 ( Bednarek *et al.*, 1998; Chong *et al.*, 1991; Demeret *et al.*, 1997 ) , 這一個區域的轉錄因子結合位點具有增強子的特性, 使病毒早期基因能~~在上皮細胞大量表現~~ ( Demeret *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2003; Sailaja *et al.*, 1999 ) 但是由哪些因子決定其表現 , 則沒有明確的被確認。而另外一組類似的實驗 , 則是利用 HPV-18 URR 作為起動子 , 將帶有報導基因的質體轉染進不同細胞株之後 , 發現在人類子宮頸癌 HeLa 細胞株中具有高活性 , 而在肝癌細胞株 HepG2 中則僅有較低活性 ( Bauknecht *et al.*, 1995 ) 。

而在 Baunknecht 等人更進一步的分析之後 , 發現在 HPV-18URR 的增強子-起動子區域中 , 具有一個可做為開關的複合體 ( switch

格式化:字型:斜體

刪除:附近

刪除:這些細胞轉錄因子與起動子之間的作用使得人類乳突瘤病毒的早期基因表現具有組織特異性而可以在上皮細胞被活化表現

格式化:字型:斜體

region), 由 C/EBP、YY1 以及 TBP 所構成, 當此複合體形成時, 可使得轉染至 HeLa 細胞的報導基因大量表現, 而轉染至 HepG2 細胞的幾乎無表現, 但是當 YY1 結合位點被點突變置換之後, 轉染至 HeLa 細胞的報導基因活性大幅下降, 而轉染至 HepG2 細胞的報導基因活性則反之有上升的趨勢 (Bauknecht *et al.*, 1995; Bauknecht *et al.*, 1996; Bauknecht and Shi, 1998)。此一結果顯示在病毒基因的表現機制中, 細胞轉錄因子與病毒上游調控區的結合參與其中, 並扮演了重要的角色, 其細微的改變可以決定病毒基因是否在不同型式的細胞中表現, 或者是將表現的趨勢進行大幅度的改變。

在本系列實驗中, 從第一部份, 鑑定子宮頸癌病人檢體開始, 確認 HPV-18 型為主要的感染類型後, 便針對 HPV-18 為主要血清型進行研究, 在第二部分實驗中, 利用 HPV-18 以及-16 型的 *URR* 序列在不同細胞株中對於目標基因的表現作分析, 再藉由系列刪減 HPV-18 *URR* 表現報導基因的實驗設計, 嘗試將控制 HPV-18 病毒基因表現的重要因子找出來, 進而瞭解病毒在宿主細胞表現的詳細機制。

格式化: 字型: 斜體

格式化: 字型: 斜體

刪除:

在過去的研究中, 發現高風險群的人類乳突瘤病毒可以將正常的細胞, 包括人類的 articular chondrocyte (Grigolo *et al.*, 2002) 角質細胞 (Zhou *et al.*, 1996) 外子宮頸細胞 (Yokoyam *et al.*, 1995) 包皮角質細胞 (Durst *et al.*, 1995) 及乳腺上皮細胞 (Band *et al.*, 1990) 等轉型成不朽細胞, 而將 E2 表現於被人類乳突瘤病毒轉型的細胞株中則會降低其早期基因的表現並抑制細胞生長 (Desaintes *et al.*, 1997; Dowhanick *et al.*, 1995; Goodwin *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2002; Moon *et al.*, 2001; Wells *et al.*, 2000)。但是也由於 E2 對於細胞生長的抑制性, 使得可穩定表現 E2 的人類乳突瘤病毒轉型細胞株無法被建立 (Thierry and Yaniv, 1987), 所以在本研究中, 將嘗試利用小鼠子宮頸上皮細胞為材料, 以人類乳突瘤病毒 18 型早期癌化基因 E6、E7 轉染至初級培養細胞, 建立正常細胞癌化模式, 並嘗試利用可誘發之基因表現系統, 將人類乳突瘤病毒早期癌化基因調節因子 E2 表現於已轉型之小鼠子宮頸上皮細胞, 檢測其調節機制, 並可利用基因微陣列對於轉型前及轉型後的細胞進行基因差異性表現的大量篩選, 以更進一步釐清人類乳

... [5]

# 實驗材料與方法

刪除: (Primary culture) 將轉 [6]

## 一、引子序列 (HPV 部分標示其位於病毒基因體之核酸位置)

b-actin 311F CTA CAA TGA GCT GCG TGT  
b-actin 838R AAG GAA GGC TGG AAG AGT  
**18URRE6E7-F CCC CCC AAG CTT ATG TGT GTG TGT ATA TAT ATA TAC**  
( 7137~7161 )  
**18URRE6E7-R CCC CCC AAG CTT TAT TTT TAT TTT ACT GCT GGG ATG**  
**CAC AC** ( 907~889 )  
**16URRE6E7-F CGC TCG AGG TAT TGT ATG TAT GTT GA** ( 7155~7172 )  
**16URRE6E7-R CGC TCG AGT TTA TTT TTA TTA TGG TTT CTG AGA AC**  
( 858~842 )  
**18URRf126 CGA AGC TTG GTA TGT GGC ATT** ( 7262~7276 )  
**18URRf292 CGA AGC TTA TCC TAC AAT CCT** ( 7428~7442 )  
**18URRf444 CGA AGC TTT GGC GCA TAT AA** ( 7581~7594 )  
**18URRf611 CGA AGC TTT CAT GTC CAA CA** ( 7748~7761 )  
**18URRf729 CGA AGC TTT TAA CAA TTG TA** ( 9~22 )  
**18URRr137 GCC ACA TAC CAA CAA ATA** ( 7272~7256 )  
**18URRr300 GTA GGA TAA AAT GGA TGC** ( 7436~7419 )  
**18URRr449 CCA AAG AGG CGC GCC AAT** ( 7585~7568 )  
**18URRr614 AAA GTA GTT GTA CAA GCC** ( 7750~7733 )  
**18URRr758 CCC TTT TTT ATA TAC TAC** ( 37~23 )  
**18URR-R GCA AGC TTA GTA TTG TGG TGT GTT TC** ( 104~87 )  
18URRf001-biotin Biotin~**TAT GTG TGT GTG TAT ATA** ( 7137~7154 )  
18URRf126-biotin Biotin~**TTG GTA TGT GGC ATT** AAA ( 7262~7279 )  
16URRf157 CGC TCG AGC AAC ATA AAT AAA C ( 7311~7325 )  
16URRf320 CGC TCG AGG CAC AAA ATG TGT T ( 7474~7488 )  
16URRf441 CGC TCG AGC CAT TGT TTT TTA CA ( 7596~7610 )  
16URRf597 CGC TCG AGT TTA AAC TTC TAA G ( 7751~7765 )  
16URRf712 CGC TCG AGG GTT ACA CAT TTA C ( 7866~7880 )  
16URRr158 GCA TGA CAC AAT AGT TAC ( 7312~7295 )  
16URRr322 GCC AAA AAG CAT GCA ACC ( 7476~7459 )  
16URRr442 GGA ATG GTT GGC AAG CAG ( 7597~7580 )  
16URRr597 CCT TAT GCC AAA TAT GCA ( 7751~7734 )  
16URRr714 CCC AAA ATC GGT TTG CAC ( 7867~7851 )  
16URR-R GCC TCG AGA AAA TGT CTG CTT TA TAC ( 82~64 )  
**tetRF ATG TCT AGA TTA GAT AAA AG**

格式化:字型:粗體

格式化:字型:粗體

格式化:字型:(中文)標楷體

<u>tetRR</u>	<u>GAC CCA CTT TCA CAT TTA AG</u>	格式化:字型:(中文)標楷體
<u>HPV18E6F</u>	<u>CGG AAT TCA TGG CGC GCT TTG AG ( 105~119 )</u>	格式化:字型:(中文)標楷體
<u>HPV18E6R</u>	<u>CGG AAT TCT TAT ACT TGT GTT TC ( 581~567 )</u>	格式化:字型:(中文)標楷體
<u>HPV18E7F</u>	<u>CGG AAT TCA TGC ATG GAC CTA AG ( 590~604 )</u>	格式化:字型:(中文)標楷體
<u>HPV18E7R</u>	<u>CGG AAT TCT TAC TGC TGG GAT GC ( 907~893 )</u>	格式化:字型:(中文)標楷體
HPV18L16672	GGG CAA TAT GAT GCT ACC ( 6672~6689 )	格式化:字型:(中文)標楷體
HPV18L1R	CGG AAT TCT TAC TTC CTG GCA CG ( 7136~7122 )	格式化:字型:(中文)標楷體
<u>HPV16E6F</u>	<u>ATG CAC CAA AAG AGA ACT GC ( 83~102 )</u>	格式化:字型:(中文)標楷體
<u>HPV16E6R</u>	<u>TTA CAG CTRG GGT TTC TCT AC ( 559~540 )</u>	格式化:字型:(中文)標楷體
		格式化:字型:(中文)標楷體
		格式化:字型:(中文)標楷體
		格式化:字型:(中文)標楷體

## 二、寡核酸序列 (標示相對於轉錄起始點之位置)

( <http://www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>;

Bednarek *et al.*, 1998; Butz and Hoppe-Seyler, 1993; [Chong \*et al.\*, 1991](#);

Demeret *et al.*, 1997 )

**TBP-1** ( -815 -801 ) R: **ggc gca acc a** F: **ata tat aca t**

F: **tgt ata tat ata tac** R: **atg tat ata t**

R: **gta tat ata tat aca** **C/EBP-4** ( -607 -598 )

F: **tgg gtg ttg c** **Oct1-2** ( -320 -294 )

**TBP-2** ( -690 -681 ) R: **gca aca ccc a** F: **ttg ctt gca taa cta tat**

F: **gca tta aat a** **cca ctc cct**

R: **tat tta atg c** **C/EBP-5** ( -443 -434 ) R: **agg gag tgg ata tag tta**

F: **cta ttg caa a** **tgc aag caa**

**TBP-3** ( -591 -582 ) R: **ttt gca ata g**

F: **ggc tat ata t** **Oct1-3** ( -272 -263 )

R: **ata tat agc c** **C/EBP-6** ( -375 -366 ) F: **gca cat att t**

F: **gca tat aag gc** R: **aaa tat gtg c**

**TBP-4** ( -567 -558 ) R: **gcc tta tat gc**

F: **agt tat aaa a** **Oct1-4** ( -243 -233 )

R: **ttt tat aac t** **C/EBP-7** ( -323 -309 ) F: **cta att gca tac ttg gc**

F: **caa ttg ctt gca taa** R: **gcc aag tat gca att ag**

**TBP-5/6** ( -82 -73/-35

-26 ) R: **tta tgc aag caa ttg** **Oct1-5** ( -163 -154 )

F: **gta tat aaa a** **C/EBP-8** ( -262 -253 ) F: **gct gtg cat a**

R: **ttt tat ata c** F: **tag ttt gtt t** R: **tat gca cag c**

R: **aaa caa act a**

**C/EBP-1** ( -761 -752 ) **Oct1-6** ( -35 -26 )

F: **tgt atg att g** **C/EBP-9** ( -253 -243 ) F: **gta tat aaa a**

R: **caa tca tac a** F: **ttt act taa gc** R: **ttt tat ata c**

R: **gct taa gta aa**

**C/EBP-2** ( -688 -679 ) **SP1-1** ( -607 -598 )

F: **att aaa taa a** **C/EBP-10** ( -68 -59 ) F: **tgg gtg ttg c**

R: **ttt att taa t** F: **gag taa ccg a** R: **gca aca ccc a**

R: **tgc gtt act c**

**C/EBP-3** ( -651 -642 ) **SP1-2** ( -390 -381 )

F: **tgg ttg cgc c** **Oct1-1** ( -808 -799 ) F: **gcg cgc ctc t**

刪除:建立小鼠子宮頸上皮 [7]

刪除:化至適切化細胞中 培 [8]

格式化 [9]

刪除:殖

刪除:殖

刪除:化至適切化細胞中 培 [10]

格式化 [11]

格式化 [12]

格式化 [13]

格式化 [14]

格式化 [15]

格式化 [16]

格式化 [17]

格式化 [18]

格式化 [19]

格式化 [20]

格式化 [21]

格式化 [22]

格式化 [23]

格式化 [24]

格式化 [25]

格式化 [26]

格式化 [27]

格式化 [28]

格式化 [29]

格式化 [30]

格式化 [31]

格式化 [32]

格式化 [33]

格式化 [34]

格式化 [35]

格式化 [36]

格式化 [37]

格式化 [38]

格式化 [39]

格式化 [40]

格式化 [41]

格式化 [42]

格式化 [43]

格式化 [44]

格式化 [45]

R: <u>aga ggc ggc c</u>	R: <u>aca agc caa g</u>	格式化: 字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫
<u>SRF-1</u> (-709 -700)	<u>YY1-1</u> (-521 -512)	格式化: 字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫
F: <u>cta tat ttg t</u>	F: <u>ctc cat ttt g</u>	格式化 ... [66]
R: <u>aca aat ata g</u>	R: <u>caa aat gga g</u>	格式化 ... [67]
<u>SRF-2</u> (-589 -580)	<u>YY1-2</u> (-115 -93)	格式化: 字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫
F: <u>cta tat att g</u>	F: <u>cta tac ttt tca tta ata ctt</u>	格式化: 字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫
R: <u>caa tat ata g</u>	tt	格式化: 字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫
	R: <u>aaa agt att aat gaa aag</u>	格式化 ... [68]
<u>SRF-3</u> (-385 -376)	<u>tat ag</u>	格式化 ... [69]
F: <u>cct ctt tgg c</u>		格式化: 字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫
R: <u>gcc aaa gag g</u>	<u>API-1</u> (-356 -347)	格式化: 字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫
	F: <u>tat tag tca t</u>	格式化: 字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫
<u>NF1-1</u> (-488 -479)	R: <u>atg act aat a</u>	格式化: 字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫
F: <u>ttt ggc tta t</u>		格式化: 字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫
R: <u>ata agc caa a</u>	<u>API-2</u> (-173 -164)	格式化 ... [70]
	F: <u>ata tga cta a</u>	格式化: 字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫
<u>NF1-2</u> (-443 -435)	R: <u>tta gtc ata t</u>	格式化: 字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫
F: <u>ctg gca cta ttg caa</u>		格式化 ... [71]
R: <u>tgg caa tag tgc cag</u>		格式化: 字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫
<u>NF1-3</u> (-426 -417)		格式化 ... [72]
F: <u>ctt ttg ggc a</u>		格式化 ... [73]
R: <u>tgc cca aaa g</u>		格式化 ... [74]
		格式化 ... [75]
		格式化 ... [76]
<u>NF1-4</u> (-394 -373)		格式化 ... [77]
F: <u>att ggc ggc cct ctt tgg</u>		格式化 ... [78]
<u>ggc a</u>		格式化 ... [79]
R: <u>tgc gcc aaa gag ggc ggc</u>		格式化 ... [80]
<u>caa t</u>		格式化 ... [81]
		格式化 ... [82]
		格式化 ... [83]
		格式化 ... [84]
<u>NF1-5</u> (-279 -270)		格式化 ... [85]
F: <u>ctt tta ggc a</u>		格式化 ... [86]
R: <u>tgc cta aaa g</u>		格式化 ... [87]
		格式化 ... [88]
		格式化 ... [89]
<u>NF1-6</u> (-232 -223)		格式化 ... [90]
F: <u>ctt ggc ttg t</u>		格式化 ... [91]
		格式化 ... [92]

### 三、檢體

25 位患者經彰化基督教醫院婦產科主治醫師臨床診斷為子宮頸癌確認患者，告知術後檢體將進行科學檢驗同意後，經手術後取得檢體並將檢體立即冷凍於-80 冰箱。

### 四、初級細胞與細胞株的培養

初級小鼠子宮頸細胞取自五至八週的母鼠，小鼠斷頸後以解剖工具將子宮頸取下，於無菌的 PBS 中將周邊結締組織清除後，轉置於新培養皿上，於無菌的 PBS 中將組織解成小塊後，轉移至含有角質細胞培養液 ( Defined Keratinocyte-SFM, Gibco, USA ) 的培養皿中，以含 5%CO<sub>2</sub> , 37 的培養箱培養。

細胞株( 人類子宮頸癌上皮細胞株 HeLa : ATCC number CCL-2 ; 小鼠纖維母細胞株 NIH 3T3 : ATCC number CRL-1658 ; 人類骨肉瘤細胞株 U2OS : ATCC number HTB-96 ) 解凍後，以含有 10%FBS 的 DMEM 培養於 37 含有 5%CO<sub>2</sub> 的培養箱，以標準程序進行繼代培養。

### 五、Genomic DNA 的萃取

將 5 × 5 mm<sup>3</sup> 的檢體取出剪碎，置於 1 ml 的 lysis buffer 中( 50mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 100 μg/ml protease K, 1

% SDS ), 於 37 培養箱中放置過夜。混合的組織液以相等體積的 phenol 搖晃均勻後, 以 14,000rpm 分離 5 分鐘後取上清液, 重複一次後, 再以等體積 chloroform 混勻, 以 14,000rpm 分離 5 分鐘後取上清液, 將 10%體積的 3M sodium acetate (pH 4.6) 與兩倍半體積的無水酒精加入分離後的上清液, 置於-20 沈降, 以 14,000 rpm 於 4 離心 15 分鐘後, 移除上清液, 並以 70%酒精清洗, 再以 14,000 rpm 離心 5 分鐘, 移除上清液後乾燥, 沈澱下來的 DNA 以不含 DNase 的二次水回溶並儲存於-20 備用。

## 六、聚合? 連鎖反應-南方墨漬法

可能嵌入患者 genomic DNA 的病毒基因以專一性引子增幅之, 取 1  $\mu$ g 的 genomic DNA 分別進行下列反應。HPV-16 E6 片段使用 HPV16E6F / HPV16E6R 引子對, HPV-18 E6、E7 及 L1 部分片段分別使用 HPV18E6F / HPV18E6R 引子對、HPV18E7F / HPV18E7R 引子對及 HPV18L16672 / HPV18L1R 引子對進行 PCR 反應。先以 94 預熱 5 分鐘, 再以適當的黏合溫度進行 30 個熱循環後, 最後以 72 進行 5 分鐘的最後延伸。

增幅後的基因片段以 1.5 %的瓊脂凝膠進行電泳分離後, 進行 15 分鐘的 depurination ( 0.25M HCl ), 30 分鐘兩次的 denaturation ( 0.5M NaOH, 1.5M NaCl ), 最後進行 30 分鐘兩次的 neutralization ( 1M

格式化: 字型: (中文) 標楷體, 14 點

格式化: 字型: (中文) 標楷體, 14 點

Tris-HCl pH 8.0, 1.5M NaCl ), 將處理過後的膠片以 10X SSC 溶液轉移到帶正電荷的硝酸纖維膜上。轉移後具有病毒基因的膜先於 42 水浴進行前雜合一小時 ( 50%formamide, 5X SSC, 5X Denhard's, 10  $\mu$ g/ml ssDNA, 1%SDS ), 再以經  $^{32}$ P 標定後的病毒基因片段( HPV16 E6、HPV-18 E6 )於 42 水浴進行雜合過夜。雜合完畢之硝酸纖維膜以 wash buffer I ( 2X SSC, 0.05% SDS ) 於室溫中清洗 30 分鐘, 再以 wash buffer II ( 0.1X SSC, 0.1% SDS ) 於 52 水浴中清洗至背景值消失後, 在暗房中壓片後置於 -80 冰箱中進行曝光。

## 七、人類乳突瘤病毒 18 型 E6 序列變異體的確認

前述由 genomic DNA 增幅之 HPV-18 E6 基因片段, 以 pCRII-TOPO TA 載體 ( Invitrogen, USA ) 接合後進行篩選, 篩選出的菌落經廠商定序之後與資料庫中的 HPV-18 E6 序列 ( accession number NC\_001357 ) 比對, 找出可能的變異體。

## 八、質體構築

pTetOff-18URRE6E7 之構築如附錄二左圖。利用聚合? 連鎖反應, 以 HPV-18 基因體為模版, 設計一組引子 ( 18URRE6E7-F / 18URRE6E7-R ), 包含了 HPV-18 上游完整 URR 以及早期基因 E6、E7 之完整序列, 並於引子之兩端設計 Hind III 之限制內切? 切割位

格式化: 字型: 14 點, 粗體, 非全部大寫

刪除:

格式化: 第一行: 1.92 字元

點, 另外再於 3'端引子設計終端 poly(A) 訊號, 進行以下反應: 94 5 分鐘, 之後進入 94 1 分鐘, 52 30 秒, 72 2 分鐘共 30 循環, 最終延長為 72 5 分鐘。反應產物以 1% 洋菜凝膠電泳進行分析。

將經過純化的 pTet-Off 質體以及由聚合? 連鎖反應的產物

URR-E6-E7 片段以限制內切? Hind III 於 37 下切割後, 以 T4 接合? 於 16 反應過夜, 再將接合之產物轉化至適切化細胞中, 培養於含有 50 µg/ml Ampicillin 的 LB 洋菜凝膠上, 於 37 培養箱中培養過夜, 再挑選菌落進行篩選。

格式化: 靠左, 縮排: 第一行: 1.92 字元

pTetOff-1816 之構築如附錄二右圖。將 HPV-16 URR-E6-E7 片段以專一性引子組 (16URRE6E-F / 16URRE6E-R) 進行 PCR 增幅後, 以 Xho I 對 PCR 產物以及前述構築好之 pTetOff-18URRE6E7 質體於 37 進行剪切後, 以 T4 接合? 於 16 反應過夜再將接合之產物轉化至適切化細胞中, 培養於含有 50 µg/ml Ampicillin 的 LB 洋菜凝膠上, 於 37 培養箱中培養過夜, 再挑選菌落進行篩選。

刪除: , ,

以 pGL3-Basic 為載體構築的全長 URR 以及其系列刪減 (series deletion) 片段質體, 則是利用不同的順向引子, 於 HPV18 為 18URRE6E7-F、18URRf126、18URRf292、18URRf444、18URRf611、18URRf729 與逆向引子 18URR-R 進行增幅反應, PCR 產物以及載體以 Hind III 剪切後以 T4 接合? 進行黏合, 再將接合之產物轉化至適

格式化: 字型: (中文) 標楷體, 14 點

切化細胞中，培養於含有 50  $\mu$ g/ml Ampicillin 的 LB 洋菜凝膠上，於

37 培養箱中培養過夜，再挑選菌落進行篩選（附錄二下圖）。 構築

好的質體分別為 pGL3-18URR (pGL318-Full)、pGL318-698、

pGL318-532、pGL318-380、pGL318-213 以及 pGL318-95。

HPV16的全長URR 以及其URR 系列刪減片段質體則是使用順向  
引子 16URR-F、16URRf157、16URRf320、16URRf441、16URRf597、

16URRf712 與逆向引子 16URR-R 進行增幅反應，PCR 產物以及載體

以 Xho I 剪切後以 T4 接合<sup>?</sup> 進行黏合，再將接合之產物轉化至適切

化細胞中，培養於含有 50  $\mu$ g/ml Ampicillin 的 LB 洋菜凝膠上，於 37

培養箱中培養過夜，再挑選菌落進行篩選（附錄二下圖）。 構築好

的質體分別為 pGL3-16URR (pGL316-Full)、pGL316-667、

pGL316-506、pGL316-385、pGL316-228 以及 pGL316-114。

格式化:字型:(中文)標楷體,  
14 點

## 九、信使核糖核酸 ( messenger RNA ) 的萃取及 RT-PCR

將培養之細胞刮下後以 1 ml TRI-reagent (Invitrogen, USA) 溶解，震盪後冰上靜置 5 分鐘，加入 0.2 ml chloroform 震盪均勻，冰上靜置 10 分鐘，以 4℃，14,000 rpm 離心 15 分鐘，將上清液取到新微量離心管，加入 0.7 倍體積之 iso-propanol，震盪均勻後於冰上靜置 10 分鐘，以 4℃，14,000 rpm 離心 8 分鐘後，移除上清液並以 70% 酒精清洗沈澱，再以 4℃，14,000 rpm 離心 5 分鐘後，將沈澱乾燥並以

RNase-free 的二次水回溶 取 2  $\mu\text{g}$  萃取後之 RNA, 以 Omniscript RT kit (Qiagen, USA) 進行反轉錄反應, 以使用說明建議之配方於 37  $^{\circ}\text{C}$  乾浴 60 分鐘後立即使用或者保存於  $-20^{\circ}\text{C}$ 。將反轉錄合成之 cDNA 做為模版進行 PCR, 以目標基因之專一性引子 (見引子列表) 以適當黏合溫度進行 30 個熱循環後, 以 1% 瓊脂凝膠電泳進行分離。

## 十、細胞轉染 (transfection)

於欲進行轉染實驗之前一天, 將  $2 \times 10^4$  的細胞 (小鼠子宮頸初級培養細胞為  $10^4$  個) 培養於 24 孔盤上, 隔天將 0.3  $\mu\text{g}$  純化之欲轉染質體與 25  $\mu\text{l}$  不含血清無抗生素之 DMEM 混合, 同時另外將 1  $\mu\text{l}$  Lipofectamine (Invitrogen, USA) 與 25  $\mu\text{l}$  不含血清無抗生素之 DMEM 混合, 再將上述兩者混合後置於室溫反應 30 分鐘, 此時將前一天培養之細胞取出, 移除培養液後, 加入 200  $\mu\text{l}$  不含血清之 DMEM, 另外將 150  $\mu\text{l}$  不含血清無抗生素之 DMEM 加入前述反應之 DNA-Lipofectamine 混合液, 將總和 200  $\mu\text{l}$  之 DNA-Lipofectamine 混合液緩慢滴入 24 孔盤中, 將細胞繼續培養 6 小時, 加入含有兩倍量血清之 DMEM 繼續培養, 隔天將培養液移除後以正常配方之 DMEM 培養至進行後續實驗為止。

## 十一、冷光報導基因測試 (Luciferase assay)

將培養有轉染欲測試之質體的細胞取出，將 24 孔盤中的 DMEM 移除後，於室溫中加入 100 ul 的 Bright-Glo Luciferase Assay Buffer (Promega, USA)，進行 2 分鐘的溶解反應，再加入 100 ul 的 Bright-Glo Luciferase Assay Substrate (Promega, USA)，立即以 luminometer (Turner Designs, USA, model: TD-20/20) 讀取 30 秒，記錄其數值。

## 十二、核蛋白質的萃取

將培養在 25T 培養盒的細胞自培養箱取出，置於冰上冷卻，將培養液移除後，以 4℃ 的 PBS 清洗兩次，加入 800 ul 冰 PBS 將細胞刮下，於 4℃ 以 1500x g 離心 5 分鐘，將 PBS 移除後，加入 500 ul 的 hypotonic buffer (10 mM HEPES pH7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM PMSF, 20 μg/ml aprotinin, 0.5 mM DTT, 0.5% NP-40)，搖晃均勻後靜置於冰上 15 分鐘，接著於 4℃ 以 6000x g 離心 15 分鐘，上清液即為細胞質蛋白質 (cytoplasmic protein)，將沈澱以 800 ul basal buffer (不含 NP-40 的 hypotonic buffer) 清洗，再以 4℃，6000x g 離心 15 分鐘去除上清液，加入 100 ul 的 hypertonic buffer (20 mM HEPES pH7.9, 400 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM PMSF, 20 μg/ml aprotinin, 0.5 mM DTT, 0.2 mM EDTA, 10% glycerol) 後，於室溫搖晃 30 分鐘，再於 4℃ 以 10,000x g 離心 30 分鐘，上清液即為核蛋白質 (crude nuclear extract)，測定濃度之後以小容量分裝並保存於-80

冰箱。

### 十三、寡核酸序列的黏合

將合成好的寡核酸序列(見寡核酸序列列表)稀釋為 10  $\mu\text{g}/\text{ul}$  , 將互補的寡核酸序各取 50  $\mu\text{g}$  混合於總體積 100  $\text{ul}$  之 buffer 中 ( 25  $\text{mM}$  Tris  $\text{pH}7.5$ , 180  $\text{mM}$  NaCl, 1  $\text{mM}$  EDTA ), 於水浴中煮沸 5 分鐘後, 將水浴靜置使溫度緩慢回復到室溫即可。

### 十四、電泳飄移測試 ( Electrophoresis Mobility Shift Assay; EMSA )

將欲進行測試的 DNA 片段, 以 T4 PNK ( New England Biolabs, England ) 進行  $^{32}\text{P}$  的標定, 標定後的 DNA 片段取約 20  $\text{ng}$  與 2  $\mu\text{g}$  的 nuclear extract( Dynabeads M-280 純化的則是取 0.1  $\mu\text{g}$  )於 binding buffer ( 10  $\text{mM}$  Tris  $\text{pH}7.5$ , 50  $\text{mM}$  NaCl, 1  $\text{mM}$  EDTA, 2.5% glycerol, 0.05% NP-40, 5  $\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ , 0.5  $\text{mg}/\text{ml}$  BSA, 0.025  $\mu\text{g}/\text{ul}$  Poly(dI-dC) (dI-dC) ) 中, 在室溫進行 30 分鐘的反應後, 以 5% TBE-PAGE 進行電泳分離, 泳動完成的電泳膠片, 以濾紙墊底加熱抽乾水分之後, 包覆保鮮膜並於片匣中曝光。

### 十五、以磁珠 ( Dynabeads M-280 ) 純化 DNA 結合蛋白質

將具有磁性、streptavidin 標定的 Dynabeads M-280 ( Invitrogen, USA ) 混合均勻後吸取出需要的用量到微量離心管, 以磁鐵將磁珠吸

附約 1-2 分鐘，將液體移除，加入於移除液體約等量的 B&W buffer (5mM Tris-HCl pH7.5, 0.5mM EDTA, 1M NaCl )，搖晃均勻後再以磁鐵吸附 1-2 分鐘，移除液體後重複一次，再將磁珠以 B & W buffer 回溶到適當的濃度備用。

為了將可能影響病毒早期基因表現的細胞因子找出，我們使用

Biotin 標定的引子進行 PCR，共使用三對引子組合：18URRf001-biotin

/ 18URRr137、18URRf126-biotin / 18URRr300 以及 18URRf001-biotin

/ 18URRr300，分別合成 18URR-bio1、18URR-bio2 及 18URR-bio3 三

段 HPV-18 URR 5'端片段 將純化過後的 biotin 標定 DNA 片段取 1 μ

g 與 150 μg 清洗過的磁珠混合於 1x 的 B & W buffer 中，在室溫下反

應 1 小時使 DNA 與磁珠連結在一起，以磁鐵將磁珠吸附 1-2 分鐘後

將液體移除並以 B & W buffer 清洗 2-3 次，加入萃取後的核蛋白質

(HeLa、U2OS 1 mg; NIH 3T3 500 μg) 後在室溫中於 binding buffer

(10mM Tris pH7.5, 50mM NaCl, 1mM EDTA, 2.5% glycerol, 0.5

mg/ml BSA, 0.025 μg/ul Poly(dI-dC) (dI-dC) ) 中反應至少 30 分鐘。

將微量離心管置於磁鐵上 1-2 分鐘後移除上清液，以不含 BSA 但含

0.1 μg/ul Poly(dI-dC) (dI-dC) 的 binding buffer 清洗三次後，將黏接上

DNA 片段的蛋白質以 elution buffer (7M Urea, 2M Thiourea, 2%

CHAPS, 1/50 v/v Tributylphosphine solution) 於室溫中反應 30 分鐘析

格式化: 字型: (中文) 標楷體,  
14 點

格式化: 字型: (中文) 標楷體,  
14 點

格式化: 字型: (中文) 標楷體,  
14 點

出。蛋白質以 Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, USA) 於 595nm 波長進行定量後，以小容量分裝保存於-80 。

## 十六、統計分析

於相對活性比較實驗中，結果以平均值 ±標準差於圖顯示，結果以 Student's *t*-test 分析，\*表示  $p < 0.05$  顯著差異，\*\*表示  $p < 0.01$  極顯著差異。

第一部份：台灣子宮頸癌患者中人類乳突瘤病毒之盛行率以及

HPV-18 *E6* 變異體之分析

格式化:字型:14 點

刪除:初步

## 結果

### 一、子宮頸癌患者之人類乳突瘤病毒感染盛行率

以人類乳突病毒血清型 18 以及血清型 16 之 E6 基因為探針，分別與以病人檢體萃取之 genomic DNA 為模版所增幅出可能的人類乳突病毒血清型 18 及血清型 16 之全長 E6 基因片段進行雜合，結果如圖一所示。以人類乳突病毒血清型 18 E6 之引子進行增幅，所有的病人檢體中都可以血清型 18 的 E6 基因探針偵測出 (圖一，上)。而以人類乳突病毒血清型 16 E6 之引子進行增幅並以血清型 16 E6 基因探針加以偵測，則只有第 2、8、16、17、21、23 及 24 號病人可偵測到此一基因片段 (圖一，下)。由此結果可知所有的病人均受到人類乳突病毒血清型 18 的感染 (100%)，而少數合併感染人類乳突病毒血清型 16 (28%)。

刪除:增幅出血清型 18 之 E6

刪除:基因片段

格式化:字型:非粗體

刪除:上)

格式化:字型:非粗體

刪除:下

格式化:字型:非粗體

格式化:字型:非粗體

而為了確認此一結果，我們也使用 HPV-18 型不同的病毒基因專一性引子進行測試。在過去的研究中得知，在長期感染的狀況下，完整的 HPV-18 E6 以及 E7 通常會嵌入宿主染色體，而 L1 則是部分嵌入 (Corden *et al.*, 1999)，因此我們另外使用 E7 以及部分的 L1 進行測試。由 PCR 的結果 (圖二) 得知，HPV-18 的 E7 以及部分的 L1 基因片段也插入了所有病患的基因體中，由此結果可以證實在本實驗

中所檢測的病患的確都有 HPV-18 之長期感染 ( Chang *et al.*, 2005 )。

格式化:字型:粗體

## 二、HPV-18 E6 的變異體分析

嵌入病患染色體的 HPV-18 E6 基因片段以 pCRII-TOPO TA cloning kit 進行選殖後，送交定序並與 NCBI 資料庫進行比對分析，結果如表一所示。在嵌入子宮頸癌患者基因體的 HPV-18 E6 基因中，都可以發現與參考序列不同的變異，位於 E6 開放讀碼區的 C183G，但是此一變異對於轉譯並無影響，此一含氮鹼基的改變並不改變胺基酸序列，為一靜默變異。其中還有數個變異同時存在，但並無一致性 ( Chang *et al.*, 2005 )。

## 討論

### 一、在臺灣子宮頸癌患者之人類乳突瘤病毒 18 型盛行率較高

過去的文獻中，一般都表示 HPV-16 為主要的感染類型，而 HPV-18 為相對次要之感染型 ( Bosch *et al.*, 2002; Munoz, 2000 )，在臺灣本地的研究，過去也有類似的報導，表示 HPV-16 為主要的感染血清型 ( Shyu *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1997 )。而在本實驗中，我們所取得的 25 位子宮頸癌患者的檢體中，經由南方墨漬法的結果，我們確認在這 25 位患者中，全部 ( 100% ) 都有 HPV-18 的感染，而其中的 7 位 ( 28% ) 具有 HPV-16 的共同感染 ( 圖一 )。這樣的結果與過去文獻所報導的有極大的不同。為了驗證我們的結果無誤，我們又以 PCR 進行病毒早期基因 E7 以及結構蛋白 L1 基因部分序列的增幅，所得到的結果同樣支持 HPV-18 的感染 ( 圖二 ) ( Chang *et al.*, 2005 )。在本實驗室另外一組針對蛋白質方面的研究，以西方墨漬法所做的分析也得到同樣的結論，顯示所有的檢體都有 HPV-18 早期基因 E6 以及 E7 蛋白質的表現 ( Kuo *et al.*, un-publish data )。在過去的研究中，也的確有報告指出在細胞病變較嚴重的病患中，其 HPV-18 的盛行率較 HPV-16 來的高 ( Shyu *et al.*, 2001 )，但是由於我們所得到的檢體並無癌前病患，因此無法證實這一個相關性。

而在其他國家對於 HPV 盛行率的研究中，也有非 HPV-16 盛行的

報導，例如在墨西哥就有報導指出，該研究中的患者其盛行之血清型為 HPV-58 (Gonzalez-Losa *et al.*, 2004)，或者是在雅加達所進行的研究 (Schellekens *et al.*, 2004)，顯示 HPV-18 以及 16 均有高盛行率 (39% 及 44%)。另外一方面，在子宮頸病變患者中多種血清型的共同感染似乎也是普遍的現象，其共同感染率從 13% 到 40% 不等 (Cuschieri *et al.*, 2004; Sasagawa *et al.*, 2001; Schellekens *et al.*, 2004)，同時也指出，多血清型的共同感染可能與 adenosquamous carcinoma 有關 (Huang *et al.*, 2004; Schellekens *et al.*, 2004)，但是在我們的實驗檢體中並沒有發現這樣的現象。我們在組織學上面的研究 (Kuo *et al.*, un-publish data)，主要是將檢體區分為鱗狀上皮癌 (SCC; squamous carcinoma) 以及腺癌 (ADC; adenocarcinoma)，再將組織型態與感染的病毒血清型做一比較 (表二)，結果顯示只有 30.7% 的鱗狀上皮癌有 HPV-16 的共同感染，而在腺癌中則完全沒有 (0%)，這樣的結果似乎暗示著兩種血清型有不同的組織特異性。而在過去的文獻中也有類似的報導，顯示在腺癌中，HPV-18 有較高的盛行率 (Sasagawa *et al.*, 2001; Schellekens *et al.*, 2004; Tseng *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1997)，但是因為我們所取得的樣本數有限，並無法下肯定的結論，只能表示確有這樣的趨勢可被觀察到，但是在最新的回顧文獻中，則清楚的表示 HPV-18 確實與腺癌具有關連性 (Woodman *et al.*, 2007) 而這樣的結

果，則引導我們一個思考方向，就是不同血清型的病毒對於不同細胞的專一性可能不盡相同，因此我們將在第二部分的實驗中，嘗試回答這個問題。

另外，我們所取得的檢體大部分來自同一個地區（88%來自同一個縣市），但是除此之外並無其他資料顯示病患之間具有關連性，包括年齡、病情的嚴重程度等，因此本實驗中的結果並不能完全套用在全台灣，可能是具有區域性而非普遍的現象。而即使同樣在台灣所進行的研究，不同區域所做出來的結果也有些許的差異，一項在 1999 至 2004 年針對 1246 名婦女進行的研究指出（Chen *et al.*, 2006），在這群病理診斷具有細胞異常病變的患者中，HPV 感染盛行率最高的漸次為 HPV-16、-52 以及-58。而另外一個團隊則是得到 HPV16、-18、58、-52、-51 以及-56 具有較高盛行率的結果（Jeng *et al.*, 2005）。而針對南台灣進行的調查，則發現除了 HPV-16 為具有最高盛行率之感染型外，HPV-58 以及-52 也有相當高的感染盛行率（Lin *et al.*, 2006）。而以花蓮為主的小規模區域性調查則發現以 HPV-16 為主（Hsu *et al.*, 1997）。在台中所進行的研究，除了前述的結果外，也有報告指出 HPV-16 與-18 具有相近的盛行率（Lee *et al.*, 1998）。這些結果無法簡單劃分台灣的感染類型，而是在不同區域中，呈現不同的感染盛行率，顯示人類乳突瘤病毒的感染盛行率與區域性的關連。

## 二、嵌入病患基因體中的 HPV-18 E6 的變異體

過去對於 HPV-18 E6 變異體的研究，發現在癌變的組織中所分離出來的病毒基因序列具有變異的程度較原型 (prototype) 來的多，主要是認為變異體較容易逃脫免疫系統的排除反應 (Zehbe *et al.*, 1998)，而在過去較為常見的變異體，在病毒基因體核酸位置 350 (E6 開放讀碼區之核酸位置 246) 的 T 變異為 G (Brady *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 1999) 在我們的檢體中並未發現，而與資料庫中的索引序列 NC\_001357 (reference sequence) 比對後，最主要的變異體為在開放讀碼區核酸位置 183 的 C 變異為 G (表一)，其他還包含了開放讀碼區核酸位置 36、64、95、107、171、200、276、334、350 及 356 的零星變異 (表一) (Chang *et al.*, 2005)。由於這個主要變異並未造成胺基酸序列的改變，因此與病毒基因的功能無關，而這一個變異雖然在索引序列中視為一變異，但是在其他的 HPV-18 亞型，例如歐洲變異型 (European) 或者非洲變異型 (African) 中卻為常態存在 (Cruz-Hernandez *et al.*, 2005)，顯示這一個沈默變異在區域的普遍性。

第二部分：人類乳突瘤病毒 18 型之 5' 端上游調控區具有潛在靜默子  
的功能

## 結果

### 一、HPV-18 早期基因在不同細胞間的表現

由於在前述實驗中，我們得知在取得的樣本中，HPV-18 為主要的感染型，因此探討 HPV-18 早期致癌基因的表現相形重要。而在過去對於組織專一性的研究中，HPV-16 在上皮細胞中具有專一的活性，而在纖維母細胞則無 (Chong *et al.*, 1991)，同時 HPV-18 也被認為有類似的表現特異性，但似乎與 HPV-16 不盡相同，就算是同為纖維母細胞，也可能具有表現活性 (Bedell, *et al.*, 1987)，因此在我們的實驗中，首先必須先瞭解，在上皮細胞以及纖維母細胞中，HPV-18 早期基因的表現是否有專一性表現。

我們首先構築了一個帶有 HPV-18 上游調控區以及兩個早期基因 E6、E7 的質體 pTetOff-18URRE6E7 (附錄二左圖)，將此質體轉染到人類子宮頸癌上皮細胞株 (HeLa)、小鼠子宮頸初級培養細胞 (Cervix) 以及小鼠纖維母細胞株 (NIH 3T3) 中。轉染 48 小時之後將 RNA 萃取出來進行 RT-PCR 後，發現在 HeLa、Cervix 以及 NIH 3T3 三種細胞中，都可以得到 HPV-18 E6 以及 E7 的基因產物 (圖三)，與過去的實驗結果相符，但由於我們並沒有進行 HPV-16 的轉染測試，因此將同時轉染這兩種血清型其全長 URR 以及早期基因 E6 E7 進行比較

為了要釐清 HPV-18 與 HPV-16 是否具有差異性的表現，我們接

著將帶有 HPV-16 全長 *URR* 以及兩個早期基因 *E6*、*E7* 的基因片段構築到上述之質體，經由選殖後得到這一個同時帶有 HPV-18 以及 HPV-16 *URR*、*E6* 跟 *E7* 的質體 pTetOff-1816 (附錄二右圖)。我們將此質體轉染進入 HeLa 以及 NIH 3T3 細胞株後，進行 RT-PCR 確認病毒早期基因的表現，結果發現轉染 pTetOff-1816 質體的細胞，無論是 HPV-18 或者是 HPV-16 的早期基因都能增幅出基因產物 (圖四)，包含原來認為是不會有 HPV-16 早期基因表現的 NIH 3T3 細胞。由於這樣的結果僅僅在於核酸層次進行探討，並無法顯示是否真的有蛋白質產物的合成，因此在後續的實驗中，我們將改用特定的報導基因進行測試。

## 二、HPV-18 及-16 之上游調控區在不同細胞間的活性

我們使用帶有冷光報導基因 Luciferase 的載體 pGL3-basic，將 HPV-18 以及 HPV-16 的全長上游調控區構築進入此一不具啟動子活性的載體後，將構築好的質體分別轉染進 HeLa、NIH 3T3 以及 U2OS 細胞株中，經 48 小時的轉染後，將細胞以 Lysis buffer 打破後，與 substrate 反應後立即以 Luminometer 讀取數值，數值將與 pGL3-basic 的結果進行標準化，並以 t-test 檢定。

在不同細胞間的報導基因活性以相對活性表示 (Relative Luciferase Activities)，結果發現在 HeLa 細胞中，HPV-18 以及 HPV-16

均具有高度活性（圖五，上圖），這個結果與過去的描述相符，顯示高風險之HPV的確會在上皮細胞大量表現其早期基因。而在NIH 3T3中，我們則發現 HPV-16 的確在此一細胞株中沒有顯著活性（圖五，中圖），而 HPV-18 則是具有顯著的活性，這一結果雖然與之前我們所做 RT-PCR 的結果不同，但是因為本實驗採用報導基因活性做測試，因此可信度較核酸層次來的高。而在 U2OS 細胞中，兩種 HPV 血清型都沒有顯著活性（圖五，下圖）。這個實驗的結果顯示，這兩種高風險型的 HPV 在不同細胞株間的是具有表現特異性的。

### 三、HPV-18 及-16 *URR* 系列刪減對於活性的影響

由於過去常使用來進行病毒早期基因表現的 *URR* 片段，多半侷限於轉錄起始點上游 400-500 鹼基長的啟動子-增強子片段，而在前述實驗我們則是使用全長的 *URR* 片段，因此我們利用不同的引子增幅出長度不同，包含全長到刪減至剩下 95 個鹼基的系列刪減 HPV-18 *URR* 片段（圖六，左上）。將這些不同長度的 HPV-18 *URR* 片段構築到 pGL3-basic 載體中，再轉染到目標細胞中觀察其報導基因的表現。

我們將這七個含有不同長度 HPV-18 *URR* 片段的質體（pGL3-Full、pGL318-698、pGL318-532、pGL318-380、pGL318-213、pGL318-95、pGL3-basic）轉染到 HeLa、NIH 3T3 以及 U2OS 三種前面測試過的細胞株中，經 48 小時的轉染後，將細胞以 Lysis buffer 打

破後，與 substrate 反應後立即以 Luminometer 讀取數值，數值將與 pGL3-basic 的結果進行標準化，結果如圖六所示。

我們可以看到，隨著 HPV-18 *URR* 長度的變化，從全長到刪減 5' 端至剩下 532 鹼基長時，其報導基因相對活性不管在 HeLa、NIH 3T3 或者是 U2OS 細胞中都是逐漸上升，而在剩下 532 鹼基長時達到最高點（圖六）。如果將其繼續進行 5' 端刪減，則發現其報導基因相對活性會迅速的降低，當刪減至剩下 213 鹼基長時，報導基因便幾乎不具活性。由這樣的結果我們可以得到兩個結果，第一，全長的 HPV-18 *URR* 並不提供最強的活性，最高的活性出現在 5' 端被刪減後的片段（pGL318-532）。第二，因系列刪減所導致的活性提升，會使得原本在全長 HPV-18 *URR* 不具報導基因活性的 U2OS 細胞，以刪減後的質體（pGL318-532）轉染後具有高度活性。綜合這兩個結果，我們可以推測在 HPV-18 *URR* 的 5' 端可能具有一個抑制下游基因表現的靜默子（silencer）存在，將系列刪減的活性結果與 HPV-18 *URR* 位置做比對，我們可以的到這樣的區分圖（圖七）。因為在刪減掉 5' 端部分後活性有顯著提升的現象，因此我們推測在 HPV-18 *URR* -825 -532 具有可能的靜默子，在中央的 -532 -213 就如同過去所知，具有一段組織專一性增強子（enhancer），而 3' 端 -213 -1 則是包含轉錄起動子（promoter）以及病毒基因複製起始點（ori）。

我們也同時在 HPV-16 *URR* 增幅出類似的系列刪減片段，並構築到 pGL3-basic 載體中 (圖八, 左), 將此七個帶有不同長度的 HPV-16 *URR* 片段的質體 ( pGL316-F、 pGL316-667、 pGL316-506、 pGL316-385、 pGL316-228、 pGL316-114、 pGL3-basic) 轉染到 NIH 3T3 以及 U2OS 細胞中, 經 48 小時的轉染後, 將細胞以 Lysis buffer 打破後, 與 substrate 反應後立即以 Luminometer 讀取數值, 數值與 pGL3-basic 的結果進行標準化之後, 結果如圖八所示。

就如同 HPV-18 *URR* 的系列刪減一樣, HPV-16 *URR* 的系列刪減也會造成報導基因表現活性的改變 (圖八), 最大的相對活性出現在 5' 端刪減後的質體, 不同的是在轉染至 NIH 3T3 後, 最大的相對活性出現在與 HPV-18 類似的 pGL316-506 片段 (圖八, 右上), 但是在 U2OS 中, 最大相對活性則出現在 pGL316-667 (圖八, 右下) 中。由這樣的結果, 顯示 HPV-16 與 HPV-18 類似, 在 *URR* 的 5' 端都具有一個可能的靜默子。

而當我們將 HPV-18 與 HPV-16 系列刪減的活性放在一起比較時, 則出現了有趣的現象 (圖九)。在 NIH 3T3 細胞中, 原本不具活性的 HPV-16 *URR*, 在刪減之後其相對活性大幅提高, 甚至略微超越 HPV-18 相似刪減的片段 (圖九, 上圖)。但是在 U2OS 中, 雖然刪減掉 5' 端會使得 HPV-16 *URR* 的活性稍微提高, 但與 HPV-18 比較後,

顯示在 U2OS 細胞中，HPV-18 *URR* 可以在刪減掉可能的靜默子後回復活性，而 HPV-16 *URR* 則在 U2OS 細胞中沒有顯著活性（圖九，下圖），顯示同屬於高風險性的這兩種 HPV 在不同細胞間仍然具有各自的表現特異性。

#### 四、與 HPV-18 *URR* 作用的細胞因子

由轉染不同細胞以及系列刪減的活性測試中，我們發現 HPV-18 *URR* 在不同細胞中具有不同的活性表現，同時其 5' 端可能存在一個可抑制下游基因表現的靜默子。在過去的文獻中，細胞中的轉錄因子（transcription factor）在 HPV 早期基因的表現及調控上扮演重要的角色，因此我們將 HPV-18 *URR* 送至資料庫進行比對，並且與過去的研究加以比對後（Bauknecht *et al.*, 1995; Bauknecht *et al.*, 1996; Bednarek *et al.*, 1998; Butz and Hoppe-Seyler, 1993），得到一系列可能會與轉錄因子結合的寡核酸序列（見材料與方法寡核酸序列部分，相對位置見圖十），將這些成對的互補序列黏合後，以 <sup>32</sup>P 標定後與 HeLa NIH 3T3 以及 U2OS 的核蛋白質進行電泳飄移測試。

我們將標定後的 TBP（依從 HPV-18 *URR* 之 5' 端至 3' 端的順序，依序為 1-5 號）C/EBP（同前，依序為 1-10 號）Oct-1（同前，依序為 1-6 號）NF-1（同前，依序為 1-6 號）SP-1（同前，依序為 1-2 號）SRF（同前，依序為 1-3 號）YY-1（同前，依序為 1-2 號）以

及 AP-1 (同前, 依序為 1-2 號) 序列分別與 2  $\mu$ g 或者 5  $\mu$ g 的核蛋白質進行結合反應, 再進行電泳飄移測試, 結果整理如表三。整體而言, HeLa 細胞中的核蛋白質與寡核酸序列具有最好的結合反應, 而 NIH 3T3 以及 U2OS 的反應較弱 但是如果將用來反應的核蛋白質增加, 則結合反應率也跟著上升, 顯示這樣的蛋白質-寡核酸序列結合反應與核蛋白質的量有關, 但是在本次的實驗中並沒有將核蛋白質的量增加到飽和點, 因此並無法知道有多少蛋白質能夠結合在這些序列上。

將表三所得到的結果, 與預測的轉錄因子結合位置分佈綜合分析後, 可以得到如圖十的轉錄因子結合分佈圖, 從 HeLa 的結合圖來看, 我們能夠輕易的發現有兩個主要的轉錄因子結合區域, 一個是中央的組織專一增強子區域, 另一個是 5' 端的潛在靜默子區域, 而在 NIH 3T3 以及 U2OS 細胞中結合的位置則相對較少, 可能是因為在不同細胞中, 轉錄因子的濃度具有差異所導致 (Chong *et al.*, 1991)。

## 五、參與 HPV-18 URR 5'端靜默子功能的細胞因子

由系列刪減活性測試中, 我們知道在 HPV-18 URR 的 5' 端部分有一個潛在的靜默子, 但是從 EMSA 的結果中, 並無法直接判斷出有哪些細胞中的轉錄因子可能參與其中, 因為除了我們所推測可能的分子之外, 還有可能是未知的因子所導致, 因此我們必須將可能結合在

5'端的分子分離出來進行分析。

我們利用標定有 biotin 的順向引子與相對的反向引子進行 PCR，將 HPV-18 URR 5'端增幅出來（引子對請見材料與方法十五），其相對位置如圖十一所示。我們將已經初步萃取之核蛋白質與帶有 biotin 的 HPV-18 URR 片段：18URR-bio1（-825 -689）18URR-bio2（-700 -526）以及 18URR-bio3（-825 -526）混合反應後，利用附著於磁珠上面的 streptavidin 與 biotin 黏結沈降，將可以與這三個片段結合的蛋白質全部分離出來後，再將析出之蛋白質與確認會有正反應的寡核酸序列進行 EMSA，來釐清有哪些細胞轉錄因子參與其中。

由於經由這樣純化過後蛋白質的量極少，無法進行蛋白質定序確認為何種分子，只能使用寡核酸序列與之結合來判定可能是哪些相關的分子，結果如圖十一所示，由於以圖片表示會過於紊亂，將結果整理如圖十二。我們可以發現，純化過的核蛋白質其結合率比單純萃取之核蛋白質高（圖十二），可能是因為經由特定序列純化後其可反應分子濃度提高許多所致。

從寡核酸序列與純化蛋白的結合實驗結果中，我們發現 HeLa 細胞的純化核蛋白質除了 SRF 以及 AP-1 寡核酸序列之外，幾乎都有顯著的結合反應，而在之前的 EMSA 實驗中，我們也觀察到類似的結果（圖十），而較為意外的是，原本並無預測有結合位置的 NF-1 以及

YY-1 的寡核酸序列，在與純化核蛋白質反應後，也出現了飄移的現象（圖十一），顯示 HeLa 細胞的核蛋白質在經過三個 biotinylated 片段（18URR-bio1/2/3）純化後的純化核蛋白質中，有這兩種蛋白質的相關蛋白質。而同樣的結果也發生在 NIH 3T3 以及 U2OS 的實驗結果中，除了因為經純化後可反應分子濃度提高而可以被結合的寡核酸序列，如在未純化前，NIH 3T3 的核蛋白質只有 TBP 以及 C/EBP 的寡核酸序列有正反應，U2OS 的核蛋白質同樣也只能與 TBP 以及 C/EBP 的寡核酸序列進行正反應（圖十），但是在純化後，NIH 3T3 的 18URR-bio1 純化核蛋白質，增加了 Oct-1 以及 YY-1 寡核酸序列的正反應，18URR-bio2 的純化核蛋白質增加了 NF-1、SP-1 以及 YY-1 寡核酸序列的正反應。而在 U2OS 細胞的實驗中，18URR-bio1 的純化核蛋白質增加了 YY-1 寡核酸序列的正反應，18URR-bio2 的純化核蛋白質增加了 SP-1 以及 YY-1 寡核酸序列的正反應。

## 討論

### 一、HPV-18 *URR* 的組織專一性表現

過去以 HPV-16 *URR* 的增強子在多個上皮細胞株或者纖維母細胞株表現報導基因的實驗，證實 HPV-16 *URR* 的增強子會專一性的在上皮細胞或其衍生細胞強烈表現，而在纖維母細胞中則幾乎沒有活性 (Chong *et al.*, 1991) 而使用多種 HPV 血清型 (HPV-1、-2a、-4、-8、-11、-16、-18) 進行類似的實驗也有相同的結果 (Sailaja *et al.*, 1999)，該實驗發現 HPV-16 以及 HPV-18 的增強子在上皮細胞 (HeLa 以及 HaCaT) 中具有強烈報導基因活性而在纖維母細胞 (MRHF) 中僅具微弱活性。但是較早的研究中，以全長 HPV-18 *URR* 與病毒早期基因 *E6*、*E7* 轉染 NIH 3T3 細胞株卻可以以北方點墨法偵測到病毒核酸的表現 (Bedell *et al.*, 1987) 這樣的差異，Taniguchi 等人表示，可能是因為所採用實驗系統的不同所導致 (Taniguchi *et al.*, 1993)，但是針對不同血清型的病毒在不同細胞株的特異性似乎還是無法獲得解答。

在本實驗中，我們利用了 HPV-18 以及 HPV-16 本身的上游調控區 *URR* 表現其早期基因 *E6* 以及 *E7*，以 RT-PCR 的檢測發現這兩種 HPV 的基因產物都能在 HeLa 以及 NIH 3T3 被偵測到 (圖三、圖四)。在過去的實驗中，HPV-18 的早期病毒基因的確會在這些種細胞中表現 (Bedell *et al.*, 1987; Chong *et al.*, 1991)，但是 HPV-16 則是在過去

的研究中知道，在 NIH 3T3 有兩種相左的描述，一種顯示不具活性 (Chong *et al.*, 1991), 另外一方則表示可偵測到核酸表現並且可以導致細胞的轉型 (Bedell *et al.*, 1987)。因此這樣的增幅是否為真，必須進一步的加以證實，因為在過去的文獻中顯示，HPV 的上游調控區可以轉錄出不同長度之 RNA (Offord and Beard, 1990), 但是並不一定具有轉譯成蛋白質產物的能力，因此可能只是在核酸層次被偵測到，而在蛋白質層次並無病毒基因產生，為了避免這樣子的誤差，我們改採用報導基因 Luciferase 來檢測 HPV 的表現特異性。

我們將全長的 HPV-18 以及 HPV-16 的 *URR* 分別構築到 pGL3-basic 載體中，轉染至 HeLa、NIH 3T3 以及 U2OS 細胞中，以 Luminometer 檢測其活性表現 (圖五)，結果證實在上皮細胞中，這兩種血清型之 HPV *URR* 均具有高度活性 (圖五，上)，而在纖維母細胞 NIH 3T3 中只有 HPV-18 *URR* 具有活性表現而 HPV-16 *URR* 則沒有顯著活性 (圖五，中)，也就是說以報導基因測試的結果，與過去的文獻具有一致性。而在骨肉瘤細胞株 U2OS 中，我們則發現這兩種血清型均沒有顯著活性 (圖五，下)。綜合這些測試，我們知道 HPV-18 以及 HPV-16 的 *URR* 在上皮細胞株 HeLa、纖維母細胞 NIH 3T3 以及骨肉瘤細胞株 U2OS 中具有不同的特異性表現，顯示在病毒感染細胞後，因其被感染細胞類型以及感染的 HPV 血清型的不同，可能會導

致病毒基因的活化與否，進而導致細胞是否會產生病變而癌化，也因此在此我們針對檢體中不同組織學的癌組織作感染型分析時，會發現在腺癌的檢體中完全沒有 HPV-16 的共同感染（表二），其中就有可能是因為 HPV-16 雖然能夠進入細胞，但是卻無法表現其基因所致，而在過去的研究中，有部分也的確認為 HPV 18 與腺癌有較高的關連性（Sasagawa *et al.*, 2001; Schellekens *et al.*, 2004; Tseng *et al.*, 1996; Woodman *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 1997），但到目前為止，還沒有辦法解釋其機制為何，但是一般認為與細胞中存在不同的轉錄調節因子有關，因此我們必須將 HPV-18 *URR* 做進一步的功能性區域分析。

## 二、HPV-18 *URR* 的 5'端具有潛在的靜默子

為了要釐清細胞因子如何作用於 HPV-18 *URR* 上，我們將 HPV-18 *URR* 的 5'端進行系列刪減並構築到前述之報導基因載體 pGL3-basic 中，再轉染進入前面進行活性測試的三種細胞株中，經由 Luminometer 測定後得到相對活性進行比較。而從結果來說（圖六），全長的 HPV-18 *URR* 在經過 5'端的刪減之後，其相對活性會大幅度的提升，而在刪減至剩下 3'端 532 鹼基長時達到最高，而在過去的研究中，認為位於 *URR* 中央，在轉錄起始點上游 400-500 鹼基長的區域為其增強子-啟動子區域（Bauknecht *et al.*, 1992; Butz and Hoppe-Seyler, 1993; Sailaja *et al.*, 1999），而在我們的實驗中，證實了這個區域的 HPV-18 *URR* 也

提供了高度的報導基因活性。但反過來說，正因為刪減掉其 5'端片段才導致活性的大幅提昇，顯示在被刪減掉的區域，具有抑制活性的功能存在，因此我們認為在 HPV-18 URR 的 5'端 300 鹼基長的區域具有靜默子的功能。而在過去以 HPV-18 URR 所進行類似的刪減實驗時，也發現 5'端 URR 區域（-650 之後）幾乎不具活性，而將 5'端作系列刪減時，活性也有略微上升的現象，但是其幅度並沒有本實驗中來的顯著（Gius *et al.*, 1988）。而在 U2OS 細胞株中所進行的系列刪減實驗，則給了我們一個有趣的結果（圖六，右下），原本在全長 HPV-18 URR 的活性測試中，U2OS 細胞株並不具顯著的活性（圖五，下），但是在我們將 5'的潛在靜默子刪減之後，其相對活性戲劇性的提升，顯示 HPV-18 URR 的增強子區域受到 5'端靜默子的強力調控而喪失其活性。而我們也同時對 HPV-16 URR 做了類似的系列刪減試驗，發現在 HPV-16 URR 也有類似的性質，顯示在其 5'端具有一個靜默子存在（圖八）。但是將 HPV-18 與 HPV-16 URR 系列刪減的結果一併比較時，又有不一樣的結果出現（圖九）。在 NIH 3T3 細胞株中顯示在 HPV-16 URR 5'端進行刪減後，其相對活性在 pGL316-506 達到最大值，同時其相對活性甚至略大於 HPV-18 相對的 5'端刪減質體（圖九，上圖），這一點與文獻中表示在 NIH 3T3 中，HPV-16 幾乎不具活性相抵觸（Chong *et al.*, 1991），但是我們也發現，該作者在做活性測試時，

只取 HPV-16 *URR* 中央區域的增強子( HPV-16 genome nt. 7454-7854 ) 進行實驗，同時，在另外一個進行與我們類似的 HPV-16 *URR* 系列刪減實驗中，顯示在刪減 5'端剩下約 500 鹼基長時，在 NIH 3T3 細胞中的報導基因表現最為強烈 ( Taniguchi *et al.*, 1993 )，這樣的結果被認為是因為測試的報導基因系統，或者是使用的啟動子不一樣所導致，因此並不影響在我們的實驗中所認為 HPV-18 以及 16 *URR* 在 5' 具有潛在靜默子的結論。同時，在該篇文獻中，也利用 HeLa 進行 HPV-16 *URR* 系列刪減實驗，其結果也與前述我們利用 HPV-18 *URR* 系列刪減實驗的結果類似 ( Taniguchi *et al.*, 1993 ) 另外在 U2OS 細胞株所進行的系列刪減測試，將 HPV-18 以及 HPV-16 一起比較的結果 ( 圖九，下圖 )，發現縱使在 HPV-16 *URR* 5'端刪減後有相對活性提升的現象，但是實際上並不顯著，與 HPV-18 *URR* 5'端刪除後相對活性顯著提升的結果完全不同。從 HPV-18 與 HPV-16 *URR* 系列刪減在不同細胞株間相對活性的比較中可以知道，雖然在這兩種血清型之間的 *URR* 其功能相似，都是具有 5'端區域潛在靜默子-中央區域增強子-3'區域啟動子及複製起始點的功能性結構 ( 圖七 )，但是在不同細胞株間的表現特異性仍然具有相當大的不同，尤其是 HPV-18 *URR* 系列刪減在 U2OS 細胞中的相對表現之實驗結果，更顯示細胞因子對於病毒基因的調控性之重要，因此找出與 HPV-18 *URR* 5'端靜默子作用

的細胞分子，可能是一個可以用來降低 HPV 早期基因表現，同時避免細胞受病毒早期基因轉化的重要策略。

### 三、與 HPV-18 *URR* 5'端潛在靜默子作用的細胞因子

為了將可以與 HPV-18 *URR* 5'端靜默子作用的細胞因子找出，我們將 HPV-18 *URR* 序列與資料庫以及文獻進行比對（見材料與方法，寡核酸序列部分），將可能的序列一一合成寡核酸序列，並將這些寡核酸序列與三種細胞株的核蛋白質進行反應後，進行電泳飄移測試，並配合這些細胞轉錄因子的相關位置加以分析（圖十）。因為在實驗中並未將反應核蛋白質加到飽和點，因此在本實驗中可能無法反映出所有能被細胞轉錄因子結合的情形，但 HeLa 的結合圖來看，有兩個主要的轉錄因子結合區域可被區分開來，一個是中央的組織專一增強子區域（-213 -532），另一個是 5'端的潛在靜默子區域（-532 -825），而在 NIH 3T3 以及 U2OS 細胞中結合的位置則相對較少，過去的文獻認為可能是轉錄因子的濃度具有差異的原因（Chong *et al.*, 1991），而在我們的實驗中，增加反應核蛋白質的量的確也有正反應上升的現象（表三），顯示細胞內轉錄因子的濃度可能與 HPV 的表現活性有關。

我們更進一步試著將這些可能與 HPV-18 *URR* 5'端序列反應的分子純化出來，利用 biotin 標定的核酸片段，與核蛋白質反應後，利用

帶有 streptavidin 的磁珠將核酸片段以及結合其上的蛋白質沉降下來，再將這些純化核蛋白質與前述位在 *URR* 5'端潛在靜默子或者確定三種細胞株皆有正反應的寡核酸序列進行電泳飄移測試，同時與前述預測之細胞轉錄因子結合位點以及反應片段相對位置一起比對，結果如圖十一，整理後如圖十二。從結果來看，我們可以發現經過純化的核蛋白質，與寡核酸序列結合的反應有增加的現，可能是因為經過純化濃縮後，細胞轉錄因子的濃度提升所致。同時我們分別比較這三種細胞株，在 18*URR*-bio1/2/3 純化核蛋白質的組成差異，結果發現結合在 HPV-18 *URR* 5'端區域的 NF-1/SP-1 則可能參與部分的活性化功能，因為在 U2OS 的 18*URR*-bio1 純化核蛋白質中，並沒有看到 NF-1 以及 SP-1 相關蛋白質的正反應（圖十二，下圖 U2OS 欄），而由全長 HPV-18 *URR* 在不同細胞的相對活性測試中，在 HeLa 以及 NIH 3T3 中是具有相對顯著活性的（圖五，上及中圖）。而在 HPV-18 *URR* 5' 潛在靜默子區域提供抑制功能的，可能是 TBP/CEBP/YY-1 的作用，在過去的研究中，發現這三個分子會形成一個複合體，並在 HPV-18 *URR* 表現上扮演開關的角色( [Baunknecht et al., 1992](#); [Baunknecht et al., 1995](#); [Baunknecht et al., 1996](#); [Baunknecht and Shi, 1998](#) )，如果此分子在 3'端形成，則可以提供活化的功能，但如果在 5'端形成，可能就會造成結構上的障礙而阻斷下游基因的活化，但是同時我們也注意到，

格式化:字型:斜體

格式化:字型:斜體

格式化:字型:斜體

這三種被測試的細胞中都有這三個相關蛋白質的正反應，卻只有在 U2OS 細胞株中具有最強的抑制作用（圖五，下圖），最有可能的原因就在於，從 U2OS 的 18URR-bio1 純化核蛋白質中，我們沒有辦法觀察到具有 Oct-1 相關蛋白質的存在（圖十二，下圖 U2OS 欄），而在 HeLa 以及 NIH 3T3 的純化核蛋白質中，都可以發現有 Oct-1 相關蛋白質的正反應（圖十二，下圖 HeLa 以及 NIH 3T3 欄），同時從轉錄因子結合相對位置圖中（圖十二，上圖），我們可以發現 Oct-1 的可能結合位點剛好與 TBP 可能結合位點重疊，而在 HeLa 以及 NIH 3T3 中，Oct-1 相關蛋白質的結合可能阻斷了前述抑制複合體（TBP/CEBP/YY-1）的形成而保有部分活性，因而造成了 HPV-18 URR 在這三種細胞株具有表現特異性的現象。

在本實驗中，我們從子宮頸癌患者的檢體分析中，得知在我們取得的檢體中，HPV-18 具有極高的盛行率，因而在本實驗室中，研究的方向便著重於 HPV-18 上，接著在細胞的轉染實驗中，確認 HPV-18 以及 HPV-16 全長 URR 在不同細胞株之間的特異性，同時利用系列刪減實驗確認在這兩種血清型的 URR 之 5'端都具有潛在的靜默子區域，而且不同細胞間仍然具有其特異性。而由 biotin 標定之 HPV-18 5'端 URR 序列純化核蛋白質之後進行電泳飄移測試，我們再將可能參與在靜默子功能的細胞轉錄因子複合體 TBP/CEBP/YY-1 找出，同時

指出 Oct-1 可能會阻斷該抑制複合體的形成而使得 HeLa 以及 NIH 3T3 不會因此而喪失所有的活性，可惜的是，由於我們在蛋白質層次缺少如西方點墨法以及蛋白質定序等直接證據證明這些細胞轉錄因子確實作用其上，也缺少 foot-printing 的實驗證實這些細胞轉錄因子確實的結合位置，在未來可能需要藉由這些實驗將直接證據補齊，或者利用點突變分析，將前述的細胞轉錄因子結合位點破壞後，再進行同樣的系列刪減活性測試以及電泳飄移實驗來確認我們在這個實驗中所歸納出的結論。

## 參考文獻

刪除：——分頁符號——

刪除：

——分頁符號——

- Bauknecht, T., Angel, P., Royer, H.-D., and zur Hausen, H. (1992). Identification of a negative regulatory domain in the human papillomavirus type 18 promoter: interaction with the transcriptional repressor YY1. *EMBO J.* *11*, 4607-4617.
- Bauknecht, T., Jundt, F., Herr, I., Oehler, T., Delius, H., Shi, Y., Angel, P., and zur Hausen, H. (1995). A switch region determines the cell type-specific positive or negative action of YY1 on the activity of the human papillomavirus type 18 promoter. *J. Virol.* *69*, 1-12.
- Bauknecht, T., See, R. H., and Shi, Y. (1996). A novel C/EBP -YY1 complex controls the cell-type-specific activity of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region. *J. Virol.* *70*, 7695-7705.
- Bauknecht, T., and Shi, Y. (1998). Overexpression of C/EBP represses human papillomavirus type 18 upstream regulatory region activity in HeLa cells by interfering with the binding of TATA-binding protein. *J. Virol.* *72*, 2113-2124.
- Bedell, M. A., Jones, K. H., and Laimins, L. A. (1987). The E6-E7 region of human papillomavirus type 18 is sufficient for transformation of NIH 3T3 and rat-1 cells. *J. Virol.* *61*, 3635-3645.
- Bednarek, P. H., Lee, B. J., Gandhi, S., Lee, E., and Philips, E. (1998). Novel binding sites for regulatory factors in the human papillomavirus type 18 enhancer and promoter identified by *in vivo* footprinting. *J. Virol.* *72*, 708-716.
- Berg, M., and Stenlund, A. (1997). Functional interactions between papillomavirus E1 and E2 proteins. *J. Virol.* *71*, 3853-3863.
- Bosch, F. X., Lorincz, A., Munoz, N., Meijer, C. J. L. M., and Shah, K. V. (2002). The causal relation between human papillomavirus and

cervical cancer. *J. Clin. Path.* 55, 244-265.

Brady, C. S., Duggan-Keen, M. F., Davidson, J. A., Varley, J. M., and Stern, P. L. (1999). Human papillomavirus type 16 E6 variants in cervical carcinoma: relationship to host genetic factor and clinical parameters. *J. Gen. Virol.* 80, 3233-3240.

Butz, K., and Hoppe-Seyler, F. (1993). Transcriptional control of human papillomavirus (HPV) oncogene expression: composition of the HPV type 18 upstream regulatory region. *J. Virol.* 67, 6476-6486.

Chan, H. M., Smith, L., and Thangue, N. B L. (2001). Role of LXCXE motif-dependent interactions in the activity of the retinoblastoma protein. *Oncogene* 20, 6152-6163.

Chang, C.-H., Chen, T.-H., Hsu, R.-C., Chou, P.-H., Yang, J.-J., and Hwang, G.-Y. (2005). The prevalence of HPV-18 and variants of E6 gene isolated from cervical cancer patients in Taiwan. *J. Clin. Virol.* 32,33-37.

Chen C. -A., Liu, C. -Y., Chou, H. -H., Chou, C. -Y., Ho, C. -M., Twu, N. -F., Kan, Y. -Y., Chuang, M. -H., Chu, T. -Y., and Hsieh, C. -Y. (2006). The distribution and differential risks of human papillomavirus genotypes in cervical preinvasive lesions: A Taiwan cooperative oncologic group study. *Int. J. Gynecol. Cancer* 16, 1801-1808.

Chong, T., Apt, D., Gloss, B., Isa, M., and Bernard, H.-U. (1991). The enhancer of human papillomavirus type 16: binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF1, and AP-1 participate in epithelial cell-specific transcription. *J. Virol.* 65, 5933-5943.

Corden, S. A, Sant-Cassia, L. J., Easton, A. J., and Morris, A. G. (1999). The integration of HPV-18 DNA in cervical carcinoma. *Mol. Path.* 52, 275-282.

Cruz-Hernandez, E., Garcia-Carranca, A., Mohar-Betancourt, A., Duenas-Gonzales, A., Contreras-Paredes, A., Perez-Cardenas, E.,

删除: Brady, C. S.,  
Duggan-Keen, M. F., Davidson,  
J. A., Varley, J. M., and Stern, P.  
L. (1999). Human  
papillomavirus type 16 E6  
variants in cervical carcinoma :  
relationship to host genetic  
factor and clinical parameters.  
*J. Gen. Virol.* 80,3233-3240.

Herrera-Goepfert, R., and Lizano-Soberon, M. (2005). Differential splicing of E6 within human papillomavirus type 18 variants and functional consequences. *J. Gen. Virol.* 86, 2459-2468.

Cuschieri, K. S., Cubie, H. A., Whitley, M. W., Seagar, A. L., Arends, M. J., Moore C, Gilkisson, G., and McGoogan, E. (2004). Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *J. Clin. Pathol.* 57, 68-72.

Demeret, C., Desaintes, C., Yaniv, M., and Thierry, F. (1997). Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J. Virol.* 71, 9343-9349.

Desaintes, C., Demeret, C., Goyat, S., Yaniv, M., and Thierry, F. (1997). Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. *EMBO J.* 16, 504-514.

Dowhanick, J. J., McBride, A. A., and Howley, P. M. (1995). Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. *J. Virol.* 69, 7791-7799.

Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 12, 2245-2262.

Ferguson, N. M., Galvani, A. P., and Bush, R. M. (2003). Ecological and immunological determinants of influenza evolution. *Nature* 422, 428-433.

Gius, D., Grossman, S., Bedell, M. A., and Lamins, L. A. (1988). Inducible and constitutive enhancer domains in the noncoding region of human papillomavirus type 18. *J. Virol.* 62, 665-672.

Goodwin, E. C., Naeger, L. K., Breiding, D. E., Androphy, E. J., and DiMaio, D. (1998). Transactivation-competent bovine papillomavirus E2 protein is specifically required for efficient repression of human papillomavirus oncogene expression and for acute growth inhibition of cervical carcinoma cell lines. *J. Virol.* 72, 3925-3934.

Gonzalez-Losa, M. R., Rosado-Lopez, I., Valdez-Gonzalez, N., and Puerto-Solis, M. (2004). High prevalence of human papillomavirus type 58 in Mexico colposcopy patients. *J. Clin. Virol.* 29, 202-205.

Hsu, Y. -H., Wei, T. -C., Horng, I. J., Jan, W. -C., and Su, I. -J. (1997). Prevalence of human papilloma virus 16 and 18 in cervical cancer in Hualian, estern Taiwan. *Kaohsiung J. Med. Sci.* 13, 315-319.

Hu, X., Guo, Z., Tianyun, P., Ponten, F., Wilander, E., Andersson, S., and Ponten J. (1999). HPV typing and HPV 16 E6-sequence variations in synchronous lesions of cervical squamous-cell carcinoma from Swedish patients. *Int. J. Cancer* 83, 34-37.

Huang, L. W., Chao, S.L., Chen, P. H., and Chou, H. P. (2004). Multiple HPV genotypes in cervical carcinomas: improved DNA detection and typing in archival tissues. *J. Clin. Virol.* 29, 271-276.

Huibregtse, J. M., and Scheffner, M. (1994). Mechanisms of tumor suppressor protein inactivation by the human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins. *Semi. Virol.* 5, 357-367.

Hwang, G. -Y., Huang, C. -J., Lin, C. -Y., and Wu, C. -C. (2003). Dominant mutations of hepatitis B virus variants in hepatoma accumulate in B-cell and T-cell epitope of HBx antigen. *Virus Res.* 92, 157-164.

Jeng, C. -C., Ko, M. -L., Ling, Q. -D., Shen, J., Lin, H. -W., Tzeng, C. -R., Ho, C. -M., Chien, T. -Y., and Chen, S. -C. (2005). Prevalence of cervical human papillomavirus in Taiwanese women. *Clin. Invest. Med.* 28, 261-266.

Jeon, S., and Lambert, P. F. (1995). Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increase stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. USA* 92, 1654-1658.

Kuo, C. -Y., Lee, C. -J., Cheng, C. -C., Chang, C. -H., Chen, T. -H., Hsu,

删除: Gross Mesilary, S.,  
Reinstein, E., Bercovich, B.,  
Tobias, K. E., Schwartz, A. L.,  
Kahana, C., and Ciechanover,  
A. (1998). Basal and human  
papillomavirus E6  
oncoprotein -induced  
degradation of Myc proteins  
by the ubiquitin pathway. *Proc.  
Natl. Acad. USA* 95,  
8058-8063.

Hu, X., Guo, Z., Tianyun, P.,  
Ponten, F., Wilander, E.,  
Andersson, S., and Ponten, J.  
(1999). HPV typing and HPV  
16 E6-sequence variations in  
synchronous lesions of cervical  
squamous-cell carcinoma from  
Swedish patients. *Int. J. Cancer*  
83, 34-37.

R. -C., Chou, P. -H., and Hwang, G. -Y. Elevated titers and seropositivity of anti-E6 in sera among patients with cervical cancer. (submitted)

Lee, M. -F., Chang, M. -C., and Wu, C. -C. (1998). Detection of human papillomavirus types in cervical adenocarcinoma by the polymerase chain reaction. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 63, 265-270.

Lin, H., Ma. Y. -Y., Moh, J. -S., Ou, Y. -C., Shen, S. -Y., and ChangChien, C. -C. (2006). High prevalence of genital human papillomavirus type 52 and 58 infection in women attending gynecologic practitioners in South Taiwan. *Gynecol. Oncol.* 101, 40-45.

McMurray, H. R., Nguyen, D., Westbrook, T. F., and Mcance, D. J. (2001). Biology of human papillomaviruses. *J. Exp. Path.* 82, 15-33.

Moon, M. S., Lee, C. J., Um, S. J., Park, J. S., Yang, J. M., and Hwang, E. S. (2001). Effect of BPV1 E2-mediated inhibition of E6/E7 expression in HPV16-positive cervical carcinoma cells. *Gynecol. Oncol.* 80, 168-175.

Morgan, I. M., Grindlay, G. J., and Campo, M. S. (1998). Epithelial specific transcriptional regulation of the bovine papillomavirus 4 promoter by E2. *J. Gen. Virol.* 79, 501-508.

Munger, K., and Howley, P. M. (2002). Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res.* 89, 213-228.

Munoz N. (2000). Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J. Clin. Virol.* 19,1-5.

Offord, E. A., and Beard, P. (1990). A member of the activator protein 1 family found in keratinocytes but not in fibroblasts required for transcription from a human papillomavirus type 18 promoter. *J. Virol.* 64, 4792-4798.

Park, J. S., Rhyu, J. W., Kim, C. J., Kim, H. S., Lee, S. Y., Kwon, Y. I., Namkoong, S. E., Sin, H. S., and Um, S. J. (2003). Neoplastic change

删除: Odunsi, K. O., and Ganesan, T. S. (1997). The roles of the human major histocompatibility complex and human papillomavirus infection in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Clin. Oncol.* 9, 4-13.

of squamo-columnar junction in uterine cervix and vaginal epithelium by exogenous estrogen in HPV-18 *URR E6/E7* transgenic mice. *Gynecol. Oncol.* 89, 360-368.

Romanczuk, H., and Howley, P. M. (1992). Disruption of either the *E1* or the *E2* regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc. Natl. Acad. USA* 89, 3159-3163.

Sailaja, G., Watts, R. M., and Bernard, H.-U. (1999). Many different papillomaviruses have low transcriptional activity in spite of strong epithelial specific enhancers. *J. Gen. Virol.* 80, 1715-1724.

Sanclimente, G., and Gill D. K. (2002). Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *J. Euro. Acad. Dermatol. Venereol.* 16, 231-240.

Sasagawa, T., Basha, W., Yamazaki, H., and Inoue, M. (2001). High-risk and multiple human papillomavirus infections associated with cervical abnormalities in Japanese women. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 10, 45-52.

Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D., and Howley, P. M. (1993). The HPV16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495-505.

Schellekens, M. C., Dijkman, A., Aziz, M. F., Siregar, B., Comain, S., Kolkman-Uljee, S., Peters, L. A. W., and Fleuren, G. J. (2004). Prevalence of single and multiple HPV types in cervical carcinomas in Jarkata, Indonesia. *Gynecol. Oncol.* 93, 49-53.

Shyu, J. S., Chen, C. J., Chiu, C. C., Huang, S. C., Harn, H. J. (2001). Correlation of human papillomavirus 16 and 18 with cervical neoplasia in histological typing and clinical stage in Taiwan: an *in-situ* polymerase chain reaction approach. *J. Surg. Oncol.* 78, 101-109.

Taniguchi, A., Kikuchi, K., Nagata, K., and Yasumoto, S. (1993). A cell-type-specific transcription enhancer of type 16 human papillomavirus (HPV-16)-P97 promoter is defined with

删除: Rustgi, A. K., Dyson, N., and Bernards, R. (1991). Amino-terminal domains of *c-myc* and *N-myc* proteins mediate binding to the retinoblastoma gene product. *Nature* 352, 541-544.

HPV-associated cellular events in human epithelial cell lines. *Virology* 195, 500-510.

Talis, A. L., Huibregtse, J. M., and Howley, P. M. (1998). The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative cells. *J. Biol. Chem.* 273, 6439-6445.

Tseng, H. H., Wang, J. S., and Kan, Y. Y. (1996). Human papillomavirus detection in adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the uterine cervix in Taiwan. *Chin. Med. J. (Taipei)* 57, 47-53.

Villada, I. B., Beneton, N., Bony, C., Connan, F., Bianchi, A., Saiag, P., Lévy, J. P., Guillet, J. g., and Choppin, J. (2000). Identification in humans of HPV-16 E6 and E7 protein epitopes recognized by cytolytic T lymphocytes in association with HLA-B18 and determination of the HLA-B18-specific binding motif. *Eur. J. Immunol.* 30, 2281-2289.

格式化

Wells, S. I., Francis, D. A., Karpova, A. Y., Dowhanick, J. J., Benson, J. D., and Howley, P. M. (2000). Papillomavirus E2 induces senescence in HPV-positive cells via pRB- and p21<sup>CIP</sup>-dependent pathways. *EMBO J.* 19, 5762-5771.

Wiman, K. G. (1993). The retinoblastoma gene: role in cell cycle control and cell differentiation. *FASEB J.* 7, 841-845.

Wolf, J. K., and Ramirez, P. T. (2001). The molecular biology of cervical cancer. *Cancer Invest.* 19, 621-629.

Woodman, C. B., Collins, S. I., and Young, L. S. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat. Rev. Cancer.* 7, 11-22.

Wu, C. H., Lee, M. F., Chang, M. C., and Ho, S. C. (1994). Detection of human papillomavirus types in cervical lesions of patients from Taiwan by the polymerase chain reaction. *Sex Transm. Dis.* 21, 309-314.

Yang, Y. C., Shen, J., Tate, J. E., Wang, K. G., Su, T. H., Wang, K. L., Jeng, C. J., Chen, H. S., Chiang, S., and Crum, C. P. (1997). Cervical cancer in young women in Taiwan: prognosis is independent of papillomavirus or tumor cell type. *Gynecol. Oncol.* 64, 59-63.

Zehbe, I., Wilander, E., Delius, H., and Tommasino, M. (1998). Human papillomavirus 16 *E6* variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res.* 58, 829-833.

## 表目錄

表一：子宮頸癌病人基因中嵌入 HPV-18 *E6* 基因的變異體

表二：子宮頸癌檢體的組織學診斷

表三：利用 EMSA 檢測不同細胞株的核蛋白與寡核酸片段之

結合

## 圖目錄

[圖一: 利用南方墨漬法進行子宮頸癌病人之人類乳突瘤病毒感染分型](#)

### 檢測

圖二、利用 PCR 檢測嵌入病人 genome 的 HPV-18 基因

[圖三: pTetOff-18URRE6E7 在不同細胞株中的表現](#)

[圖四: pTetOff-1816 在不同細胞株中的表現](#)

圖五: HPV 上游調控區 (URR) 在不同細胞間的活性

圖六: 系列刪減的 HPV-18 URR 片段在不同細胞間的活性

圖七: HPV-18 URR 不同區域的特性

圖八: 系列刪減的 HPV-16 URR 片段在不同細胞間的活性

圖九: HPV-18 以及 HPV-16 URR 系列刪減活性比較

圖十: 不同細胞株中轉錄因子可能的結合位置

圖十一: 利用純化後的核蛋白質與寡核酸序列進行電泳飄移測試

圖十二: 可能與 HPV-18 URR 5'端結合的細胞轉錄因子

表一：子宮頸癌病人基因中嵌入 HPV-18 *E6* 基因的變異體

Variants	Numbers <sup>#</sup> of patients	Results*
C183G only	16	Prototype
with A36G and A171G	1	Prototype
with A64G and A95G	1	N22D C32Y
with A95G	1	C32Y
with A107G	1	K36R
with A200G	1	K67R
with A276G	1	Prototype
with T334C	1	Prototype
with A350G	1	Prototype
with G356A	1	R119K
<b>Total</b>	<b>25</b>	

# 所有檢體均包含 C183G 變異，人數表示還有多少額外的變異出現在同一個檢體。

\* 含氮鹽基的變異所導致的胺基酸序列變異 (Chang *et al.*, 2005 )

表二：子宮頸癌檢體的組織學診斷

Diagnosis*	Numbers of patients	HPV-16 co-infection
SCC	13/25	4/13 (30.7%)
ADC	9/25	0/9 (0%)

\*由專科醫師診斷為鱗狀上皮癌 ( SCC; squamous cervical carcinoma ) 或者是腺癌 ( ADC; adenocarcinoma ), 但其餘三個檢體因取樣的關係難以判別屬於何種組織。共同感染 HPV16 的百分比也同時被指出 ( Chang *et al.*, 2005 )

表三：利用 EMSA 檢測不同細胞株的核蛋白與寡核酸片段之結合

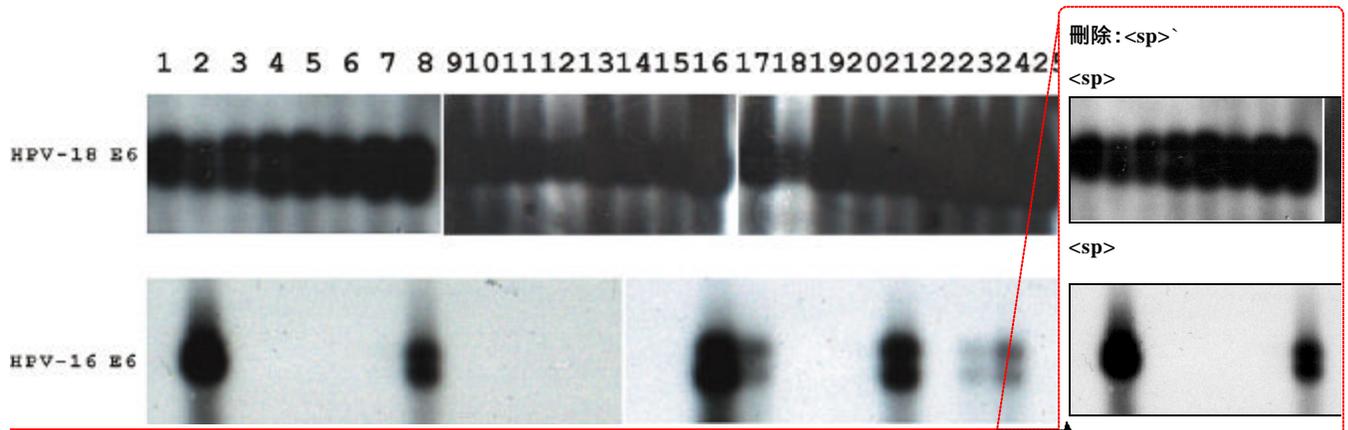
	TBP					C/EBP										Oct-1											
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6						
HeLa	●	●	●			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●							●	●	●	●		
NIH3T3	○									○			○									●		○			
U2OS	●	○								○			○									●		●			

	NF-1						SP-1		SRF			YY-1		AP-1		
	1	2	3	4	5	6	1	2	1	2	3	1	2	1	2	
HeLa	○	●	○	●	○	●	●	●			●		●		●	●
NIH3T3		○			○											
U2OS		●			●								●			

使用的寡核酸片段參考材料與方法，實心圓表示使用 2 μg 核蛋白質具有正反應；空心圓表示使用 5 μg 核蛋白質進行結合新增的正反應。

← 格式化: 內文, 縮排: 左: 0 cm, 第一行: 0 cm



圖一: 利用南方墨漬法進行子宮頸癌病人之人類乳突瘤病毒感染分型

**檢測**

(上) 以人類乳突病毒 18 型 E6 基因為探針，偵測由檢體萃取的 genomic DNA 為模版增幅之人類乳突病毒 18 型 E6 基因片段。(下) 以人類乳突病毒 16 型 E6 基因為探針，偵測由檢體萃取的 genomic DNA 為模版增幅之人類乳突病毒 16 型 E6 基因片段 (Chang *et al.*, 2005 )

刪除: <sp>\'

<sp>

刪除: <sp>

格式化: 字型: (中文) 標楷體

格式化: 字型: (中文) 標楷體, 12 點

刪除:

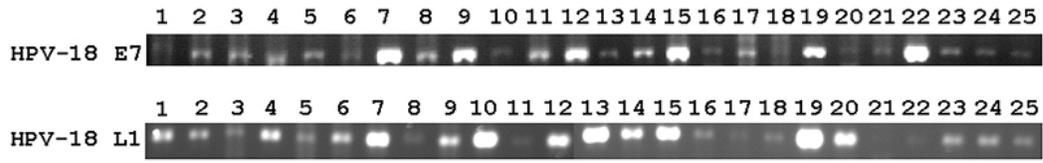
刪除:

格式化: 字型: 粗體

刪除: 上

刪除: 下

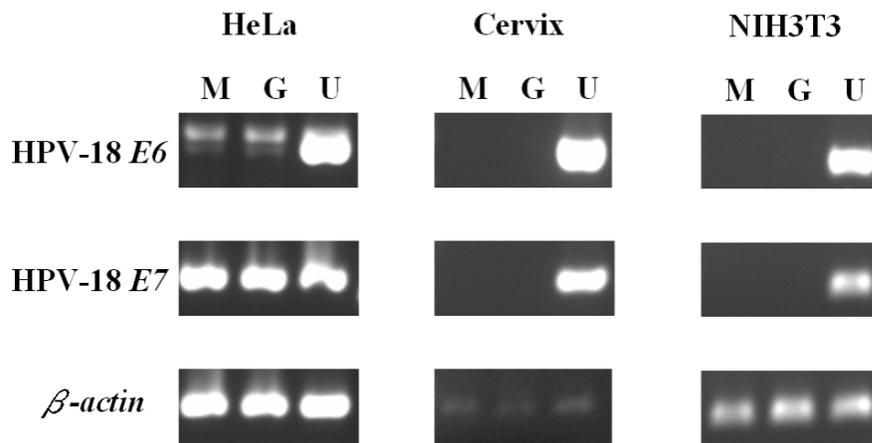
格式化: 縮排: 第一行: 0 cm



## 圖二、利用 PCR 檢測嵌入病人 genome 的 HPV-18 基因

利用 HPV-18 *E7* 及 *L1* 基因的專一性引子增幅後，發現不論是 HPV-18 *E7* (上圖)，或者是 *L1* (下圖)，均有嵌入病人 genome 的現象，此結果與南方點墨法一致 (Chang *et al.*, 2005)。

← 格式化: 本文 2, 靠左



刪除:

<sp><sp>

格式化: 字型: 12 點

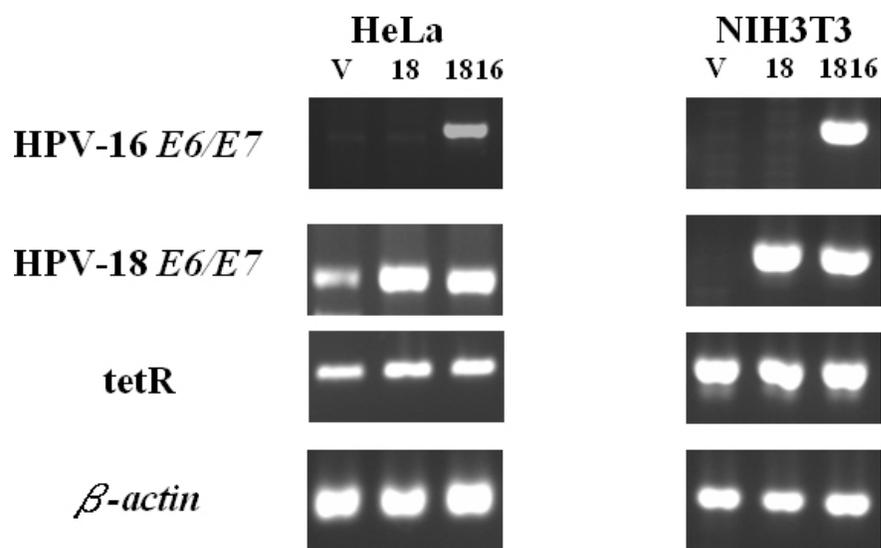
**圖三：pTetOff-18URRE6E7 在不同細胞株中的表現**

格式化: 字型: 粗體

格式化: 字型: 粗體

以三種細胞：人類子宮頸上皮細胞株 (HeLa)、小鼠子宮頸初級培養細胞 (Cervix) 以及小鼠纖維母細胞株 (NIH3T3)，分別進行無質體轉染 (M)，轉染 GFP (G) 以及轉染 pTetOff-18URRE6E7 質體 (U) 後，以 HPV-18 型 E6、E7 以及 *actin* 基因之引子對進行反轉錄聚合? 連鎖反應的結果。 -*actin* 為 internal control。

刪除:C



圖四：pTetOff-1816 在不同細胞株中的表現

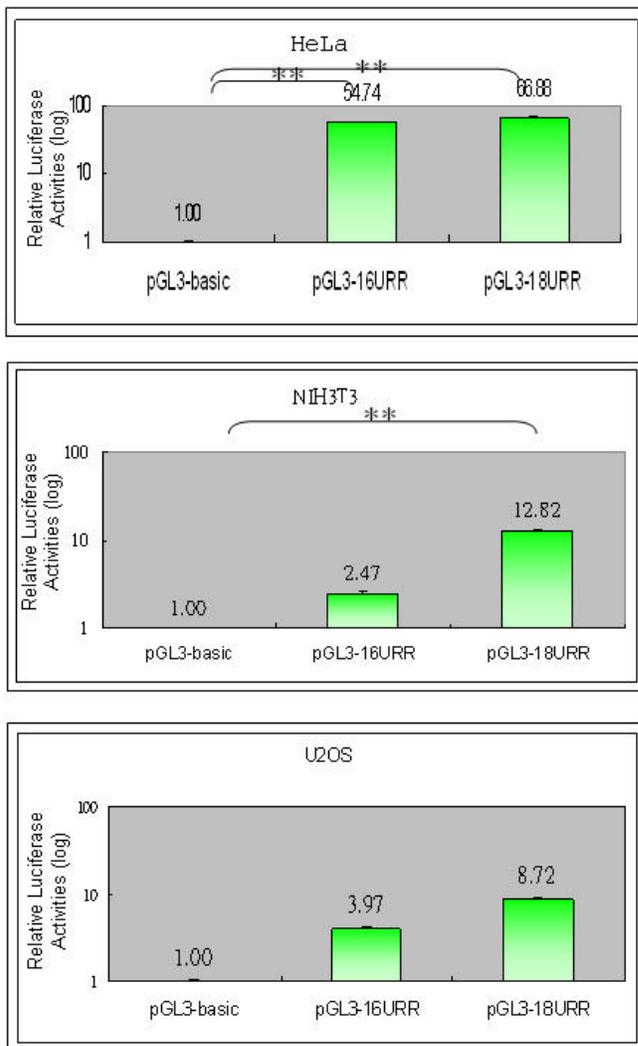
以人類子宮頸上皮細胞株 ( HeLa ) 以及小鼠纖維母細胞株 ( NIH3T3 ), 分別進行空載體轉染 ( V ), 轉染 pTetOff-18URRE6E7 ( 18 ) 以及轉染 pTetOff-1816 質體 ( 1816 ) 後, 以 HPV-16 型 *E6-E7*、HPV-16 型 *E6-E7*、*tetR* 基因以及 *-actin* 基因之引子對進行反轉錄聚合? 連鎖反應的結果。 *tetR* 為載體的 control , *-actin* 為 internal control。

格式化:字型:粗體

格式化:字型:粗體

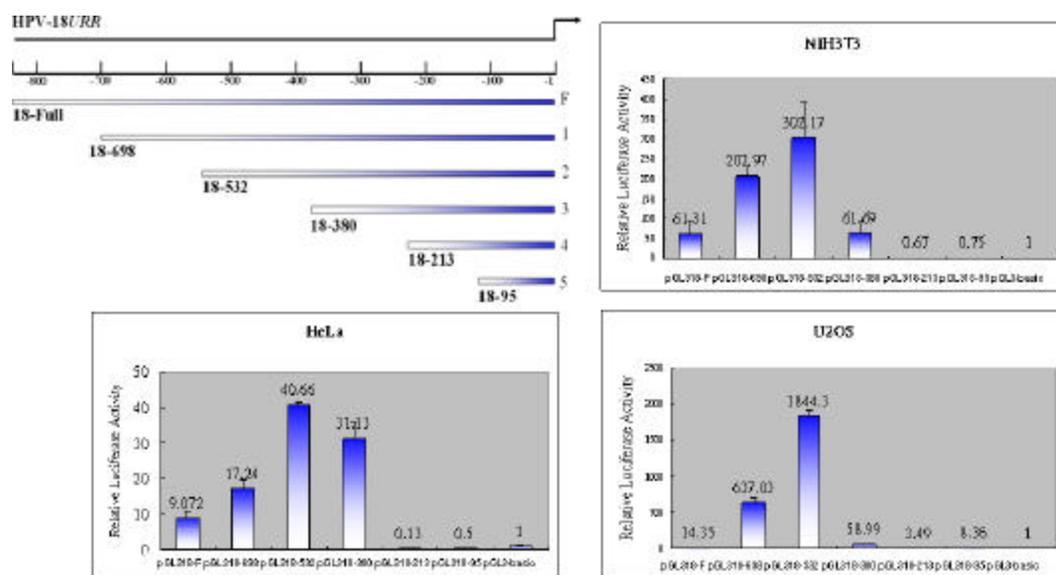
格式化:字型:粗體

刪除:C



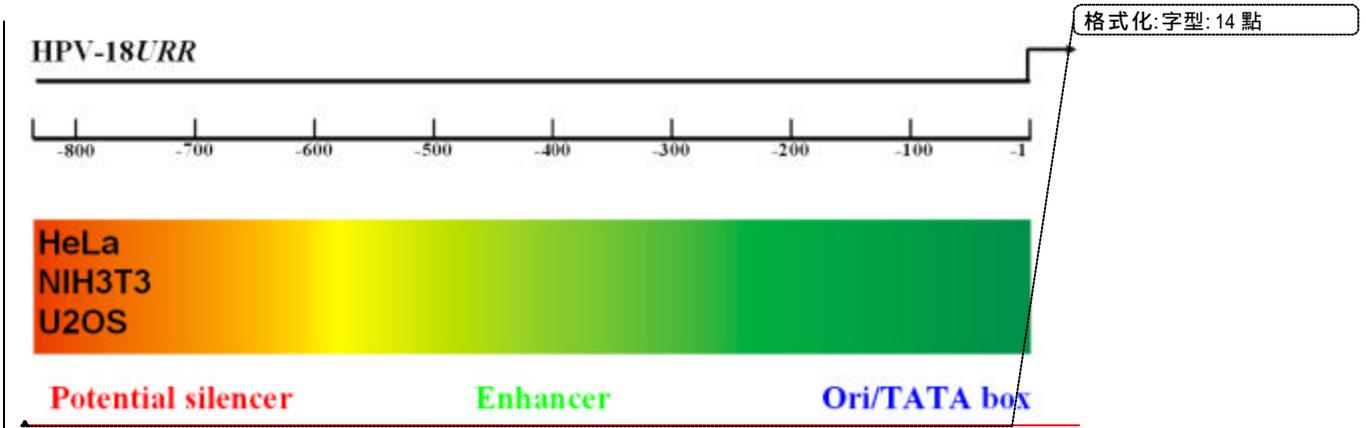
圖五：HPV 上游調控區（URR）在不同細胞間的活性

將各自構築有 HPV-18 以及 HPV-16 全長 URR 片段的報導基因載體分別轉染進 HeLa、NIH 3T3 及 U2OS 細胞中，以 Luminometer 讀取報導基因活性後分析。於 HeLa 中（上圖），HPV-18 與 HPV-16 均有高活性，而兩者之間無差異。在 NIH 3T3 中（中圖），則只有 HPV-18 URR 具有活性。在 U2OS 中（下圖），HPV-18 與 HPV-16 URR 均無表現活性。（\*\* $p < 0.05$ ， $n = 3$ ）



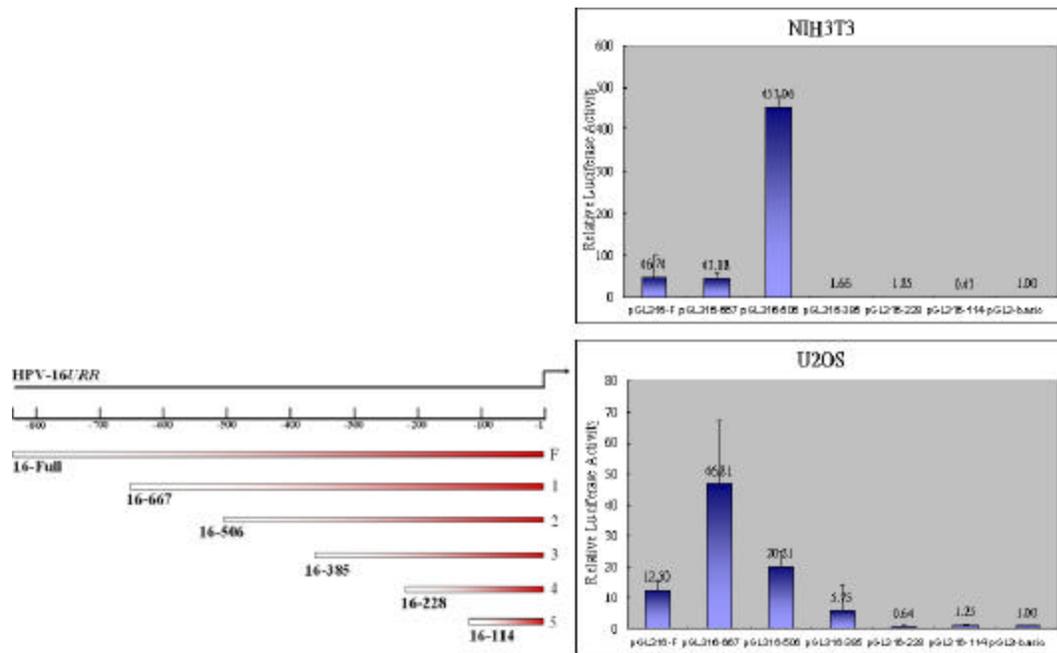
圖六：系列刪減的 HPV-18 URR 片段在不同細胞間的活性

將不同長度由 5' 端漸次刪減的 HPV-18 URR 片段（由左至右：pGL318-Full、pGL318-698、pGL318-532、pGL318-380、pGL318-213、pGL318-95 以及 pGL3-basic）轉染進 HeLa、NIH 3T3 以及 U2OS 細胞中，以 Luminometer 讀取其報導基因活性後分析相對活性。在三種細胞株中，經刪減後的 URR 片段均有活性升高的現象，其最大值出現在 pGL318-532，之後則隨著片段縮短而迅速降低其活性。原本在 U2OS 細胞株中不具有表現活性的 HPV-18 全長 URR，在刪減至 pGL318-532 時其活性大幅上升，顯示在 HPV-18URR 的 5' 端可能具有靜默子的特性。



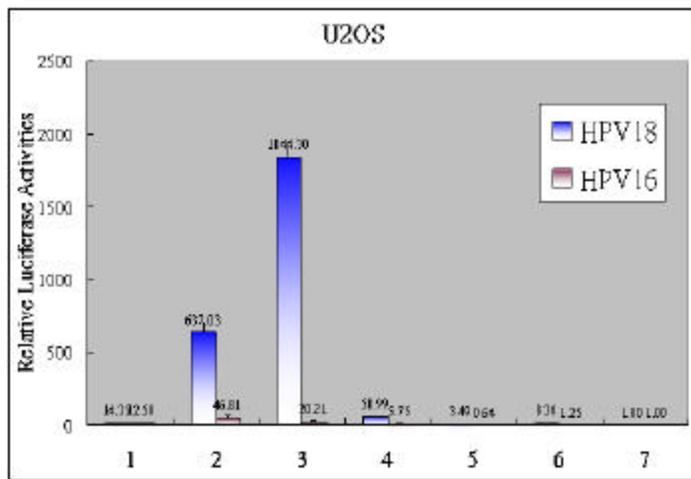
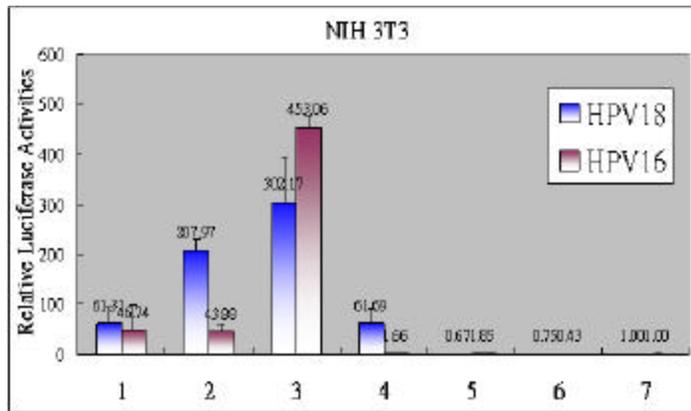
圖七：HPV-18 *URR* 不同區域的特性

根據之前的文獻以及我們對於系列刪減活性測試的結果，我們可將 HPV-18 *URR* 區分為三個不同的功能區，包括 3' 端的複製起始以及轉錄起始點 ( Ori/TATA box ) 中央區的組織專一性增強子 ( Enhancer ) 和 5' 端可能存在的靜默子區域 ( Silencer )。



圖八：系列刪減的 HPV-16 URR 片段在不同細胞間的活性

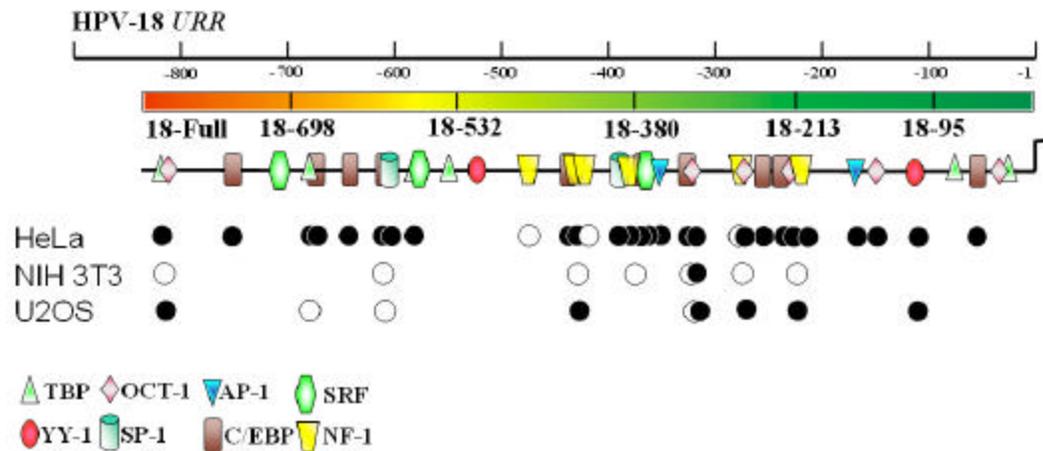
將不同長度由 5' 端漸次刪減的 HPV-16 URR 片段（由左至右：pGL316-Full、pGL316-667、pGL316-506、pGL316-385、pGL316-228、pGL316-114 以及 pGL3-basic）轉染進 NIH 3T3 以及 U2OS 細胞中，以 Luminometer 讀取其報導基因活性後分析相對活性。結果在 HPV-16 URR 的系列刪減中發現有類似 HPV-18 URR 系列刪減的現象，在 5' 端刪減後有活性增加的現象，顯示在 HPV-16 URR 5' 端同樣可能有靜默子的特性。



- 1: Full-length HPV-18 or -16 URR
- 2: HPV-18 or -16 deletion construct 1
- 3: HPV-18 or -16 deletion construct 2
- 4: HPV-18 or -16 deletion construct 3
- 5: HPV-18 or -16 deletion construct 4
- 6: HPV-18 or -16 deletion construct 5
- 7: pGL3-basic

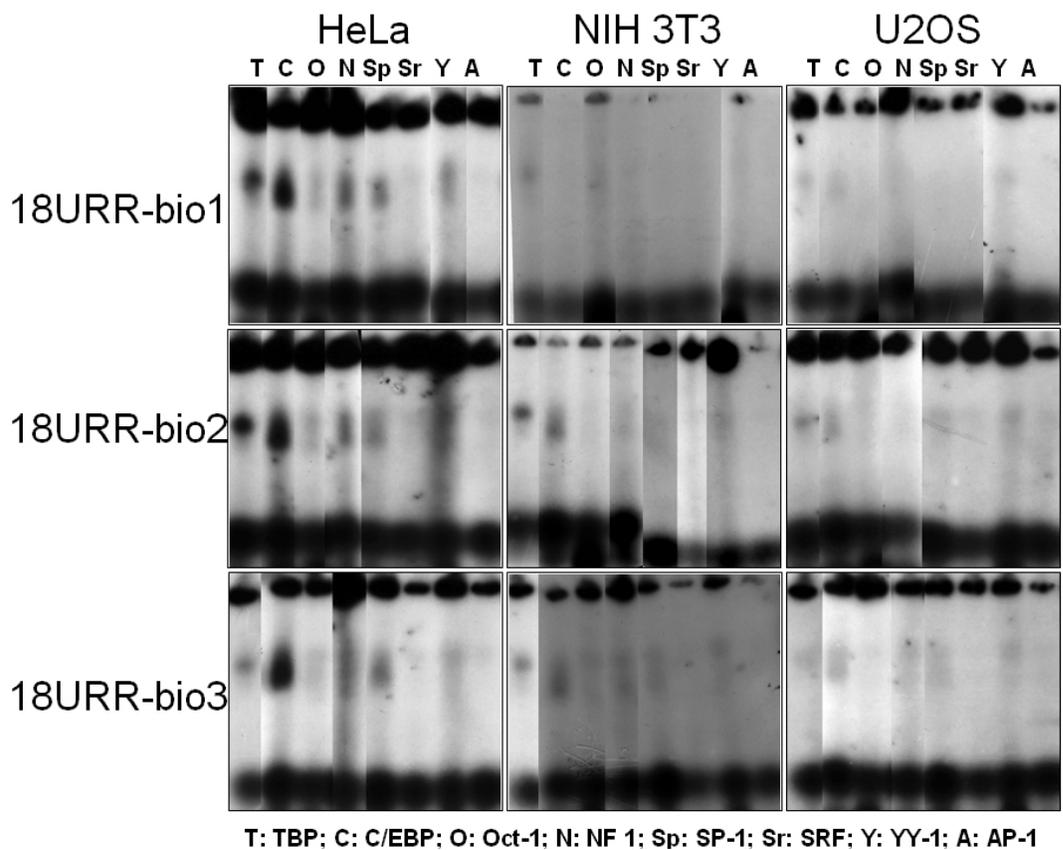
圖九：HPV-18 以及 HPV-16 URR 系列刪減活性比較

將 HPV-18 以及 HPV-16 URR 的系列刪減相對活性標準化之後，放在一起比較，我們發現雖然兩種血清型的 HPV 同樣可能具有 5' 端靜默子存在，但是又存在著表現特異性。在 NIH 3T3 中，HPV-16 URR 刪減 5' 端後提高的相對活性較 HPV-18 稍高（上圖），但是在 U2OS 中，HPV-16 URR 刪減後所提升的相對活性依然不具顯著性，而 HPV-18 URR 在經過 5' 刪減後會顯著的提升其相對活性，顯示這兩種高風險性血清型的特異性（下圖）。



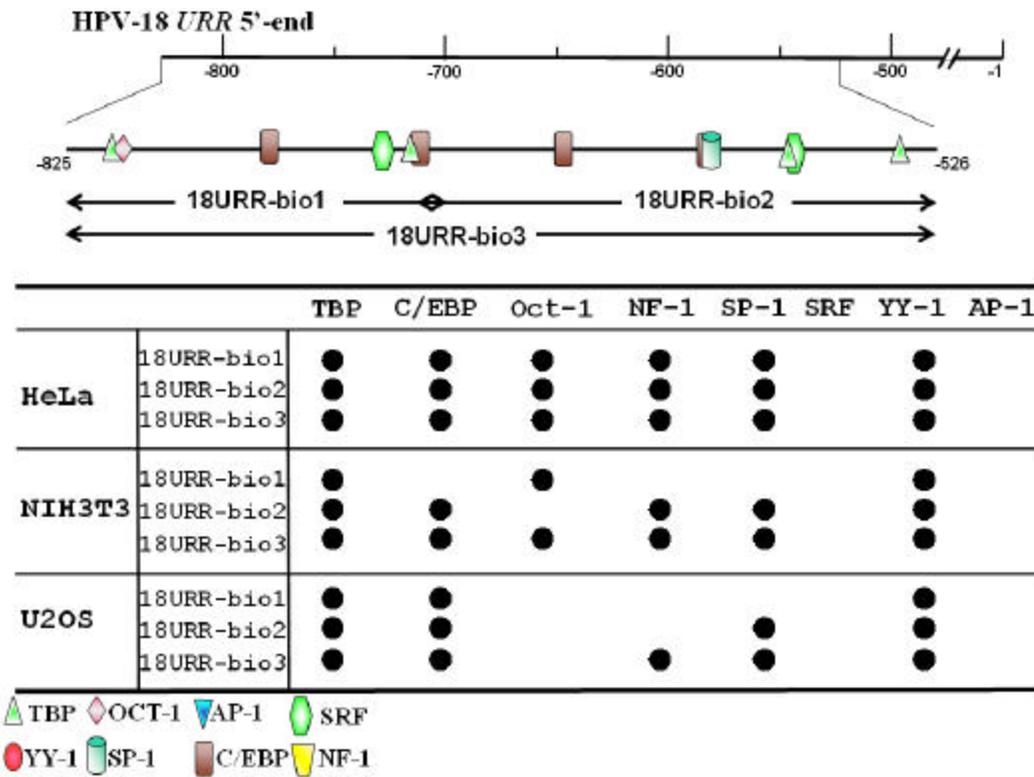
圖十：不同細胞株中轉錄因子可能的結合位置

將 HPV-18 URR 的序列由資料庫以及文獻比對後 ( [http://darwin.nmsu.edu/~molb470/fall2003/Projects/solorz/aliBaba\\_2\\_1.htm](http://darwin.nmsu.edu/~molb470/fall2003/Projects/solorz/aliBaba_2_1.htm); Bednarek *et al.*, 1998; [Chong \*et al.\*, 1991](#); Demeret *et al.*, 1997 ), 得到一系列細胞轉錄因子可能的結合位點, 再將系列刪減相對位置與寡核酸序列 EMSA 的結果 (表三) 合併顯示之後得到不同細胞株中核蛋白質結合的相對位置結果。實心圓表示使用 2  $\mu$ g 核蛋白質具有正反應; 空心圓表示使用 5  $\mu$ g 核蛋白質進行結合新增的正反應。



圖十一：利用純化後的核蛋白質與寡核酸序列進行電泳飄移測試

利用 biotin 標定的 DNA 片段，將不同細胞中能結合於其上的核蛋白質純化出來後，再與寡核酸序列進行電泳飄移測試得到的結果。三種細胞和蛋白質與三段 biotin 標定片段交互純化得到的九種純化核蛋白質分別與八種轉錄因子結合序列進行電泳飄移測試後，將有明顯反應的整理於圖十二。



圖十二：可能與 HPV-18 *URR* 5'端結合的細胞轉錄因子

將圖十一的結果，與落在 HPV-18 *URR* 5'端，預測之細胞轉錄因子的相對位置以及 biotin 標定片段位置標示出並整理成表。實心圓表示具有明顯反應。

## 附錄目錄

格式化: 字型: 14 點

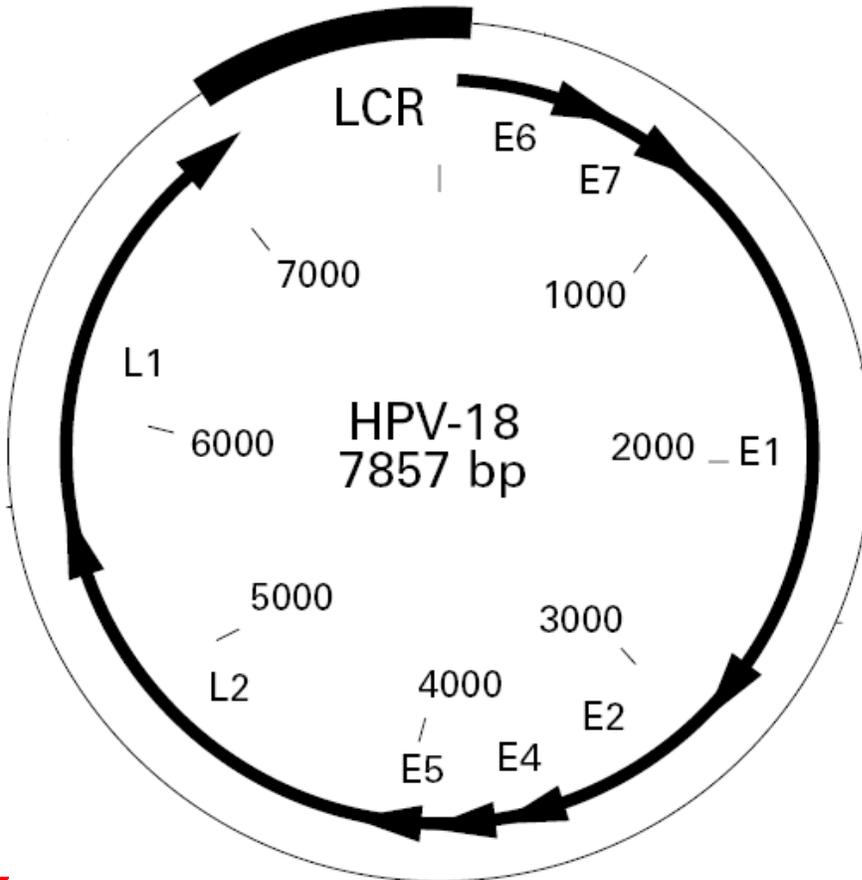
附錄一：人類乳突瘤病毒 18 型基因結構

附錄二：質體構築示意圖

附錄三：轉錄因子描述

## 附錄

### 附錄一：人類乳突瘤病毒 18 型基因結構



(Corden *et. al.*, 1999)

刪除:

分頁符號

格式化: 字型: 14 點

刪除: 一、Tet-Off 系統示意圖

**BD™ Tet-Off**

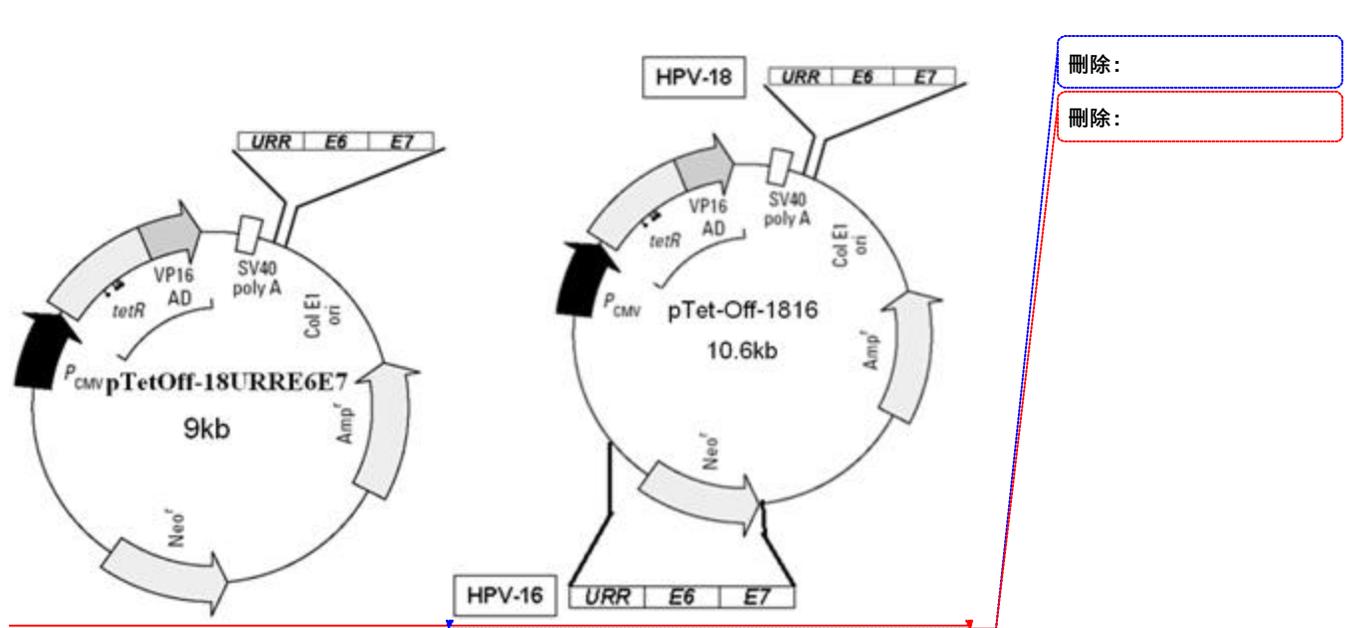
刪除:

格式化: 字型: (中文) 標楷體

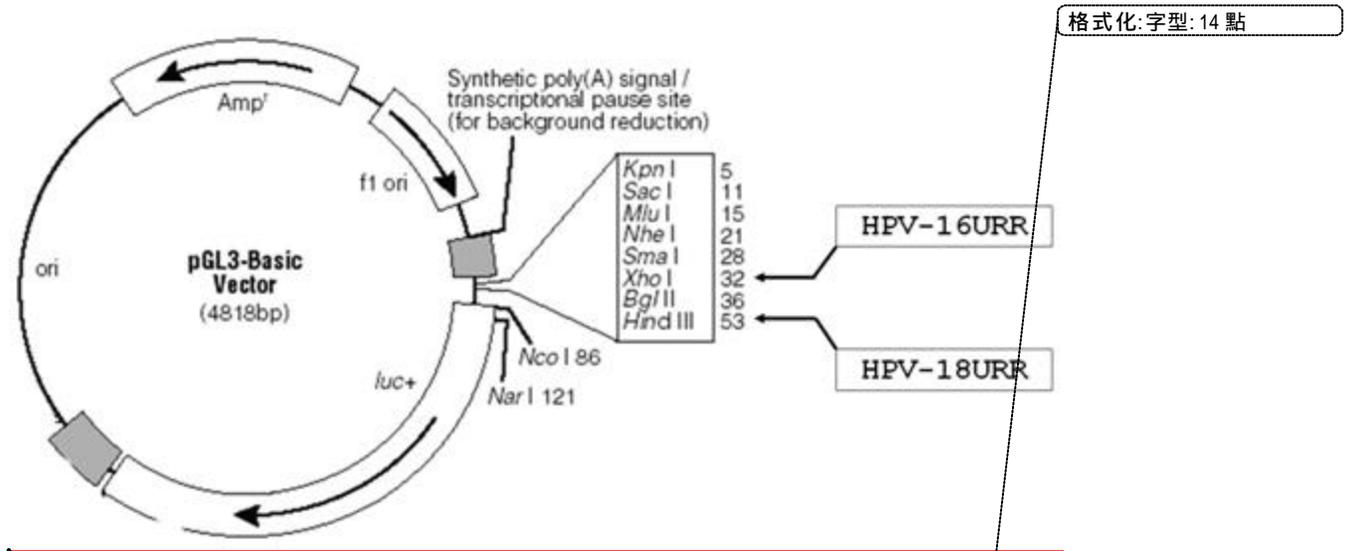
附錄二：質體構築示意圖

pTet-Off-18URRE6E7 (左) pTet-Off-1816 (右) 以及 pGL3-basic 與

HPV-18 或-16URR 片段構築位點 (下)



刪除:  
刪除:



格式化:字型: 14 點

### 附錄三：轉錄因子描述

TBP : TATA-binding protein; 339 a. a.; 37.7 kDa

C/EBP ( / ) : CCAAT enhancer binding protein; ( / ) : 358/345  
a. a.; 37.6/36.1 kDa

Oct-1 : Octamer-binding transcription factor 1; 743 a. a.; 76.5 kDa

NF-1 : nuclear factor-1; 175 a. a.; 19.2 kDa

SP-1 : simian-virus-40-protein-1; 785 a. a.; 80.7 kDa

SRF : serum response factor; 508 a. a.; 51.6 kDa

YY-1 : Yin Yang-1; 414 a. a.; 44.8 kDa

AP-1 : activator protein-1; formed by c-Fos ( 380 a. a.; 40.7 kDa ) and  
c-Jun ( 331 a. a.; 35.7 kDa )

(<http://www.gene-regulation.com/pub/databases/transfac/cl.html>;  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Protein>)

## 個人資料

中文姓名：張智翔

英文姓名：Chang Chih-Hsiang

出生日期：1976 年 3 月 22 日

戶籍地址：台南市東門路三段 179 巷 161 號

電子信箱：[milkpa@gmail.com](mailto:milkpa@gmail.com)

學歷：東海大學生物系學士

東海大學生物系碩士

經歷：東海大學生物系兼任助教

東海大學實驗動物小組委員

東海大學永續教育計畫兼任助理

逢甲大學兼任講師

論文發表：

期刊論文

**Chang, C. -H.**, Chen, T. -H., Hsu, R. -C., Chou, P. -H., Yang, J. -J., and Hwang, G. -Y. (2005). The prevalence of HPV-18 and variants of *E6* gene isolated from cervical cancer patients in Taiwan. **J. Clin. Virol.** 32:33-37.

Kuo, C. -Y., Lee, C. -J., Cheng, C. -C., **Chang, C. -H.**, Chen, T. -H., Hsu, R. -C., Chou, P. -H., and Hwang, G. -Y. Elevated titers and seropositivity of anti-E6 in sera among patients with cervical cancer. (submitted)

**Chang, C. -H.,** Yang, J. -J., and Hwang, G. -Y. Identification of a potential silencer in the 5'-end of human papillomavirus type 18 upstream regulatory region. (In preparation)

#### 研討會論文

**Chang, C. -H.,** Kuo, C. -Y., Cheng, C. -C., Chen, T. -H., and **Hwang, G. -Y.** The molecular, histological and serological studies of HPV-18 E6 and L1 cervical cancer patients. The 43th American Society for Cell Biology, San Francisco, USA. Dec. 13-17, 2003

**Chang, C. -H.,** Chen, T. -H., Hsu, R -C., Chou, P. -H., Yang, J. -J., and Hwang, G. -Y. The prevalence of HPV-18 and variants of E6 gene isolated from cervical cancer patients in Taiwan. The 20th Biology Summer Camp. 18-20 Aug. 2004. Taichung, Taiwan.

**Chang, C. -H.,** Yang, J. -J., and Hwang, G. -Y. The comparison of activities of HPV-18 and HPV-16 URRs among different cell types. The American Society for Cell Biology, 44th annual meeting, Dec. 4-8 2004. Washington, DC. USA.

## 實驗目的

在高風險群之人類乳突瘤病毒參與子宮頸癌病變的過程中，病毒的早期致癌基因扮演著非常重要的角色，其將正常細胞轉型的能力已經有許多的驗證。而在分子層次上的研究多半是以容易操作及維持的不朽細胞株做為材料，但是由於細胞株為已轉型的細胞，如要進行病毒基因導致轉型的研究則較為不適當。同時，過去的研究多半都是對於血清型 16 作為研究主體，而在本實驗室之前對於台灣子宮頸癌患者的研究中，發現血清型 18 型為主要的感染型式，因此，未來的研究將以初級培養的子宮頸上皮細胞做為材料，針對血清型 18 的早期致癌基因來探討。在本研究計畫中，將會嘗試達成以下目的：

- 一、建立小鼠子宮頸細胞的初級培養，並利用具有組織專一性的啟動子啟動人類乳突瘤病毒 18 型早期致癌基因 *E6* 及 *E7*，將子宮頸的上皮細胞轉型成為不朽細胞株。

二、將人類乳突瘤病毒早期基因 *E2* , 構築於可誘發的基因表現系統上, 對表現致癌基因 *E6*、*E7* 的子宮頸上皮細胞株進行調控的研究。

三、轉型前後的小鼠子宮頸上皮細胞在基因表現上的差異性, 利用基因微陣列 ( microarray ) 或差異性表現聚合 ? 連鎖反應 ( differential-expressed polymerase chain reaction ) 進行大量篩選, 並選擇可能受到影響的候選基因做進一步的確認及檢測。

### **Specific Aims**

Cervical cancer is the secondary most common cancer in women worldwide. It has been considered that HPV was a marked factor of cervical cancer. Recently, at least 80 different types of HPV have been characterized. These types are usually broken down into low-risk (non-oncogenic) and high-risk (oncogenic) two groups. The most common types that lead cervical cancer are HPV-16 and HPV-18. In previous studies, we have

known the products of HPV early genes can interact with some important cellular proteins to disrupt their normal functions. Particularly, the E6 and E7 were associated with the development of cervical cancer. The E6 protein affects on the cellular tumor suppressor, p53, and degrades it. On the other hand, the E7 protein binds to Rb protein, dissociates the E2F-Rb complex, and results in stimulating transcription of cellular genes.

---

分頁符號

---

分頁符號

## 前言

第 10 頁: [2] 刪除

milkpa

2003/11/6 10:02:00 PM

當正常的子宮頸上皮細胞受到人類乳突瘤病毒感染時，病毒可能會被免疫系統

第 10 頁: [3] 刪除

milkpa

2006/8/9 3:50:00 PM

監視而被去除。如果病毒逃過免疫系統的防禦能力而持續發展，在感染低風險型的病毒之個體，細胞可能會發展成「疣」或「良性腫

瘤」。如果感染的是高風險型的病毒，則在長期感染的狀況下，病毒的 DNA 會嵌入宿主細胞的染色體而失去調控，某些病毒蛋白質，如 E6 以及 E7，會大量表現造成宿主細胞的異常增生，最後導致癌化 ( Bosch *et al.*, 2002 )

在過去的研究中，發現高風險群的人類乳突瘤病毒可以將正常的細胞，包括人類的 articular chondrocyte ( Grigolo *et al.*, 2002 ) 角質細胞 ( Zhou *et al.*, 1996 ) 外子宮頸細胞 ( Yokoyam *et al.*, 1995 ) 包皮角質細胞 ( Durst *et al.*, 1995 ) 及乳腺上皮細胞 ( Band *et al.*, 1990 ) 等轉型成不朽細胞。而將 E2 表現於被人類乳突瘤病毒轉型的細胞株中則會降低其早期基因的表現並抑制細胞生長 ( Desaintes *et al.*, 1997; Dowhanick *et al.*, 1995; Goodwin *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2002; Moon *et al.*, 2001; Wells *et al.*, 2000 ) 但是也由於 E2 對於細胞生長的抑制性，使得可穩定表現 E2 的人類乳突瘤病毒轉型細胞株無法被建立 ( Thierry and Yaniv, 1987 )，所以在本研究中，將嘗試利用小鼠子宮頸上皮細胞為材料，以人類乳突瘤病毒 18 型早期癌化基因 E6、E7 轉染至初級培養細胞，建立正常細胞癌化模式，並嘗試利用可誘發之基因表現系統，將人類乳突瘤病毒早期癌化基因調節因子 E2 表現於

已轉型之小鼠子宮頸上皮細胞，檢測其調節機制，並可利用基因微陣列對於轉型前及轉型後的細胞進行基因差異性表現的大量篩選，以更進一步釐清人類乳突瘤病毒早期癌化基因對於細胞基因調節的機制。

( Primary culture ) 將轉染至誘發 ( Transfection )

3、檢測細胞轉型。( Serum independence、soft agar assay and tumorigenicity ) 表現 ( Construction ) 將表現轉染至已轉型之小鼠子宮頸上皮細胞株 ( Inducible expression ) ( Microarray hybridization ) ( dPCR and cloning )

### 建立小鼠子宮頸上皮細胞系

犧牲五至八週大的雌性小鼠，取出子宮頸組織，以無菌之解剖工具剪切成小碎塊，再置於培養液 ( DMEM , 20% FBS 及 10ng/ml EGF ) 中以 5% CO<sub>2</sub> 在 37 培養箱中進行培養。

構築四環素 ( Tetracycline ) 抑制基因表現系統 ( Tet-Off gene

expression system )

## 1、四環素抑制誘發基因表現系統 ( Tet- Off gene expression system )

簡介

四環素抑制/誘發基因表現系統 ( Tet- Off / On gene expression system ) 是一種可以利用培養液中四環素的有無來調控目標基因是否表現的可誘發系統 ( inducible system )。於本實驗中我選擇使用四環素抑制基因表現系統 ( BD Tet-Off Gene Expression System, BD Biosciences Clontech Inc., USA, Cat.No. 630921or K1620-1 ) , 作為細胞模式中是否誘發表現特定基因的系統。

四環素抑制基因表現系統的特性是當細胞培養液中加入適當濃度的四環素時, 可以與 tTA ( tetracycline-controlled transactivator ) 結合, 使 tTA 無法與 TRE ( tetracycline-response element ) 進行轉活化作用, 誘發下游基因的表現。當四環素由培養液中移除時, tTA 便可以接上 TRE 進行轉活化作用, 使下游基因表現。

## 2、構築 pTet-Off-URR-E6-E7 載體

, 1

利用聚合? 連鎖反應, 以 HPV-18 基因體為模版, 設計一組引子, 包

含了 HPV-18 上游之 *URR* ( upstream regulatory region ) 以及早期基因 *E6*、*E7* 之完整序列，並於引子之兩端設計 *HindIII* 之限制內切？切割位點，另外再於 3' 端引子 U67r 設計終端 poly(A) 訊號：U67f：  
5'-CCCCCAAGCTTATGTGTGTGTGTATATATATATAC-3'、

U67r：

5'-CCCCCAAGCTTTATTTTTATTTTACTGCTGGGATGCACAC-3'

進行以下反應：94 5 分鐘，之後進入 94 1 分鐘，52 30 秒，72

2 分鐘共 30 循環，最終延長為 72 5 分鐘。反應產物以 1% 洋菜凝膠電泳進行分析。

將經過純化的 pTet-Off 質體以及由聚合？連鎖反應的產物

*URR-E6-E7* 片段以限制內切？*HindIII* 於 37 下切割後，以 T4 接合？於 16 反應過夜，再將接合之產物轉

化至適切化細胞中，培養於含有 50  $\mu$ g/ml Ampicillin 的 LB 洋菜凝膠上，於 37 培養箱中培養過夜，再挑選菌落進行篩選。

### 3、構築 pTRE2-hyg-E2f-Luc 以及 pTRE2-hyg-E2t-Luc 載體

由於在已由人類乳突瘤病毒基因轉型的細胞株內無法長期穩定的表現 E2 ( Thierry and yaniv, 1987 )，因此需要以可誘發模式將 *E2*

構築於細胞中。人類乳突瘤病毒 E2 基因包含了幾個功能性區域：N 端的轉活化區域 (transactivation)、中央連結區 (hinge) 以及 C 端的 DNA 結合與雙體化區 (DNA binding and dimerization) (Antson *et al.*, 2000; Steger *et al.*, 2002)。在此研究中，將使用全長 (E2f) 以及 N 端切斷 (E2t) 的 E2 蛋白質進行 E2 蛋白質對於人類乳突瘤病毒早期基因的抑制作用探討，2 和 3 (Desaintes *et al.*, 1997; Dowhanick *et al.*, 1995; Goodwin *et al.*, 1998; Wells *et al.*, 2000)。

利用聚合？連鎖反應，以 HPV-18 基因體為模版，設計三條加入限制內切？BamHI 切位的引子：E2ff：

5'-CCCGGATCCATGCAGACACCGAAGGAAACC-3'，E2r：

5'-CCCGGATCCCATTGTCATGTATCCCACC-3'，以及另外設計加入轉錄起始點的 E2ft：

5'-CCCGGATAAATGGATTGTAATGACTCTATG TGC-3'。分別以 E2ff-E2r 以及 E2ft-E2r 兩組引子對進行以下反應：94 5 分鐘，之後進入 94 1 分鐘，52 30 秒，72 1 分鐘共 30 循環，最終延長為 72 5 分鐘。反應產物以 1% 洋菜凝膠電泳進行分析。

將經過純化的 pTRE2-hyg-Luc 質體以及由聚合？連鎖反應的產物

E2f (full length E2) 以及 E2t (truncated E2) 片段以限制內切？

BamHI 於 37 下切割後，以 T4 接合？於 16 反應過夜，再將接合

## 之產物分別轉

第 19 頁: [9] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
-----------------	--------	-----------------------

字型: 粗體

第 19 頁: [10] 刪除	milkpa	2006/8/9 2:48:00 PM
-----------------	--------	---------------------

化至適切化細胞中，培養於含有 50  $\mu$ g/ml Ampicillin 的 LB 洋菜凝膠上，於 37 培養箱中培養過夜，再挑選菌落進行篩選。

第 19 頁: [11] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [12] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [13] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [14] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [15] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [15] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [16] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [17] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [17] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [18] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [19] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [20] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [20] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [21] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [22] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [22] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [23] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [24] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [25] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [25] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [26] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [27] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [27] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [28] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [29] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [30] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [30] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [31] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [32] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [33] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [34] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [34] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [35] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		

第 19 頁: [36] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [36] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [37] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [38] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [39] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [39] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [40] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [41] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [42] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [43] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [43] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [44] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [44] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [45] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [46] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [47] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [47] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [48] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [49] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [50] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [51] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [52] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [52] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [53] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [54] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 19 頁: [54] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [55] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [56] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [57] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [57] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [58] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [59] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [59] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [60] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [61] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [62] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [63] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		

第 19 頁: [63] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [64] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [65] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 19 頁: [65] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 20 頁: [66] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 20 頁: [66] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 20 頁: [67] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 20 頁: [67] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 20 頁: [68] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 20 頁: [68] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 20 頁: [69] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 20 頁: [69] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 20 頁: [70] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 20 頁: [70] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 20 頁: [71] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 20 頁: [71] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 20 頁: [72] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 20 頁: [73] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 20 頁: [73] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 20 頁: [74] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 20 頁: [75] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 20 頁: [76] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 20 頁: [76] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 20 頁: [77] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 20 頁: [78] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
------------------	--------	-----------------------

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 20 頁: [79] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 20 頁: [79] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 20 頁: [80] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 20 頁: [81] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 20 頁: [82] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 20 頁: [82] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 20 頁: [83] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 20 頁: [84] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 20 頁: [85] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 20 頁: [85] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 20 頁: [86] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		
第 20 頁: [87] 格式化	milkpa	2006/8/10 11:26:00 AM
字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫		

第 20 頁: [88] 格式化 milkpa 2006/8/10 11:26:00 AM

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 20 頁: [88] 格式化 milkpa 2006/8/10 11:26:00 AM

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 20 頁: [89] 格式化 milkpa 2006/8/10 11:26:00 AM

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 20 頁: [90] 格式化 milkpa 2006/8/10 11:26:00 AM

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 20 頁: [91] 格式化 milkpa 2006/8/10 11:26:00 AM

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 20 頁: [91] 格式化 milkpa 2006/8/10 11:26:00 AM

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫

第 20 頁: [92] 格式化 milkpa 2006/8/10 11:26:00 AM

字型: (中文) 標楷體, 非全部大寫