

私立東海大學生物學系

博士論文

指導教授：黃光裕博士

Guang-Yuh Hwang, Ph.D.

徐士蘭博士

Shih-Lan Hsu, Ph.D.

B 型肝炎病毒 X 蛋白質在肝癌形成過程的角色

**The role of hepatitis B virus X protein in
hepatocarcinogenesis**

研究生：王靜琪

Jing-Chyi Wang

中華民國九十三年六月

目 錄

論文內容	4
壹、摘要	4
中文摘要	4
英文摘要	6
貳、背景	8
B 型肝炎病毒	8
癌	10
HBx 蛋白質的重要性：組織、細胞和分子三層面	12
使用的實驗系統	20
參、方法	23
一、質體的架構和確認	23
二、細胞株和抗體	25
三、聚合酶鏈反應	26
四、pTREM 的質體取得	27
五、基因黏接	27
六、基因轉型	27
七、基因的大量化和純化	28

八、	大量質體純化	29
九、	細胞培養	29
十、	細胞轉染及穩定細胞株的選殖	29
十一、	蛋白質分析	30
十二、	免疫螢光染色	32
十三、	流式細胞分析儀分析	34
十四、	軟膠分析	34
十五、	外來細胞在裸鼠體表的癌化測試	35
肆、	結果	36
一、	建構誘發性的表達質體	36
二、	在穩定細胞株表達 pTREM-X	37
三、	Chang-HBx 的細胞生長	38
四、	Chang-HBx 細胞癌化能力的分析	40
伍、	討論	45
陸、	參考文獻	52
柒、	圖表	67
捌、	附錄	92
一、	材料	92

玖、個人資料 99

中文摘要

B 型肝炎病毒的最小開放讀碼區 HBx 所轉錄轉譯形成的 HBx 蛋白質是一多功性的蛋白質，而且 HBx 目前被認為參與肝癌的形成。然而，HBx 在其中的確切角色仍是矛盾的。我們已建立可誘發 HBx 基因表達的肝細胞株 Chang-HBx，和原本的肝細胞株 Chang liver cell 相比較，Chang-HBx 細胞在含血清培養液中的生長速率比 Chang liver cell 的快，但是在缺乏血清的培養液中，Chang-HBx 的生長速率則比 Chang liver cell 慢。在軟膠細胞群落形成的分析中，Chang-HBx 細胞株表現需要附著生長的特性且在 BALB/c 裸鼠體表下的癌生長測試中，表現 HBx 蛋白質的 Chang-HBx 能夠抑制癌的生長。另外，進行細胞流式分析的結果發現，在缺乏血清的培養下，表現 HBx 蛋白質的早期，Chang-HBx 細胞生長會停滯在 G1 期。因此 HBx 蛋白質在癌形成過程可能扮演抑制的角色。根據這些現象我們假設：營養不足可能可以作為探討 HBx 抑制肝癌形成的條件。所以在無血清培養 Chang-HBx 細胞的初步結果發現，Chang-HBx 細胞形態呈現延展的形狀，不像 Chang liver cell 或生長在血清中 Chang-HBx 的卵形細胞形態。而且在無血清培養的 72 小時中，Chang-HBx 細胞的細胞週期分子 cyclin

D1, cdk1, cdk2 和 p53 的蛋白質表現有變化，而在 120 小時的無血清培養後，Chang-HBx 細胞則有發生 apoptosis 的 DNA 斷裂現象。在 Chang-HBx 細胞形成肝癌組織的蛋白質萃取液則發現，cyclin A、cyclin B、cyclin D1、cdk2、cdk4、p53、Rb2、p21 的表現量比 Chang 的肝癌組織多，此分子堆積現象可能是 HBx 蛋白質長期表達所導致。綜合上述結果，Chang 肝細胞株表現 B 型肝炎病毒 X 蛋白質後呈現出 pro-apoptosis 的特性。

關鍵字：B 型肝炎病毒 X 蛋白質 (HBx)；癌化；動物模式

英文摘要

The hepatitis B virus X gene, which is the smallest open reading frame of HBV, encodes the HBx protein, has multiple functions and is involved in hepatocarcinogenesis. However, the exact role of HBx in hepatocarcinogenesis is still controversial. We have established an inducible (tet-off system) HBx-expressing cell line, Chang-HBx. As compared with the original of Chang liver cell line (ATCC CCL13), Chang-HBx grows faster in serum-containing medium but slower in serum-free medium. Chang-HBx colony-formation in soft agar shows an anchorage-demanding character and its tumorigenicity potential in BALB/C nude mice were substantially inhibited. HBx also causes the induction of G1 phase arrest of cell growth in early infection of HBV and therefore plays a negative role in tumorigenicity. The detailed exploration of the roles of HBx in hepatocarcinogenesis was then followed in the aspect of nutrient deficiency. The data show that the cell morphology of Chang-HBx was elongated in serum-free culture medium unlike the oval shape of Chang liver cell or Chang-HBx in 10% fetal calf serum culture medium. Protein expressions of cyclin D1, cdk1, cdk2, and p53 were also changed in a serum-free 72 hours culture. The apoptosis of these cells did occur in 120 hours culture. Analysis of protein extracts of tumors derived from Chang-HBx cells found that an accumulated expression of cyclin A, cyclin B, cyclin D1, cdk2, cdk4, p53,

Rb2, and p21 was observed. The result might be due to the long period expression of HBx protein. We conclude that the hepatitis B virus X protein presents a pro-apoptotic function in Chang liver cell.

Keywords: Hepatitis B virus X protein (HBx); Tumorigenicity; Animal model

前言

B 型肝炎病毒

B 型肝炎病毒是最小的動物病毒，病毒顆粒的直徑大小為 42 nm。屬於肝臟 DNA 病毒科 (hepadnaviridae)，也就是親肝臟性的 (hepatotropism) DNA 病毒。病毒基因組由 3,182 個核苷酸組成的部分雙股 DNA。含有 4 個開放讀碼區 (open reading frame)，包括 S, C, P 和 X 基因。S 基因的啟動子 (promoter) 是 pre-S1 和 pre-S2，C 基因的啟動子是 Cp，X 基因的啟動子是 Xp。整個基因組有兩個加強子 (enhancers)，Enhancer 1 和 Enhancer 2。所有的病毒 RNA 都使用相同的 polyadenylation 序列 (TATAAA) (Rusznak and Ganem, 1990)。四個開放讀碼區分別轉譯成四個病毒的蛋白質。S 基因轉譯成表面抗原 (HBsAg)、C 基因轉譯成核心抗原 (HBcAg) 和 e 抗原，同時 C 基因產生的 RNA 也是病毒的 pregenomic RNA，作為病毒 DNA 複製的模板、P 基因轉譯成核苷酸聚合酶和反轉錄酶、X 基因則轉譯成一段功能不清楚的蛋白質 (HBx) (Tiollais *et al.*, 1985)。表面抗原是病毒的外套蛋白質，顆粒大小為 22 nm，且是預防 B 型肝炎病毒使用的疫苗。核心抗原是病毒包裹基因組的核心蛋白質。核苷酸聚

合酶和反轉錄酶則使病毒基因複製並且使基因進行轉錄、轉譯。X 基因的轉錄需要 HBV 病毒的 X 基因啟動子和 enhancer1 片段的調節。X 蛋白質在病毒生活史中的功能仍然不清楚，但已知和 B 型肝炎病毒相近的 WHV，它的 X 蛋白質作用和病毒感染有關(Chen, *et al.*, 1993; Zoulim, *et al.*, 1994)，然而在 DHV 沒有 X 基因片段存在，同時感染個體也只產生極輕微的肝炎和幾乎不發生肝硬化、肝癌(Omata *et al.*, 1984; Sprengel *et al.*, 1988)；或許 X 蛋白質和慢性肝炎、肝癌的發生更有關係(Hwang *et al.*, 2003)。

當 B 型肝炎病毒感染寄主肝臟組織會發生肝炎 (hepatitis)。肝炎有兩種，包括急性肝炎 (acute hepatitis) 和慢性肝炎 (chronic hepatitis)；發生急性肝炎幾乎都能恢復成正常狀態，只有很少的時候急性肝炎(10 %)會轉成慢性肝炎，或者少於 1 % 轉變為猛爆性急性肝炎，其死亡率為 99.9 % (Hoofnagle *et al.*, 1987)。慢性肝炎有非活化性和活化性兩種，非活化性慢性肝炎是一般俗稱的慢性肝炎帶原者；活化性慢性肝炎則是很容易因為寄主免疫系統的作用，使肝組織發生纖維化形成肝硬化。肝硬化持續的發生就會轉變成肝癌。早在 1981 年，有關肝癌和 B 型肝炎病毒的關係已經被 Beasley 等人藉由流

行病學的調查方式證實。他們以台灣 22,070 男性公職人員為調查樣本，並進行個體病例追蹤調查。結果顯示 B 型肝炎病毒表面抗原攜帶者，也就是受 B 型肝炎病毒感染，他們發生肝癌和肝硬化的機率是遠大於非 B 型肝炎感染者。在 41 個肝癌死亡個體中有 40 位(91 %) 受到 B 型肝炎病毒感染，在 19 位肝硬化死亡個體中有 17 位(87 %) 受到病毒感染；而在 247 位其他原因死亡的個體只有 48 位(19 %)是病毒感染者。從流行病學的研究證據證明 B 型肝炎病毒感染和肝癌的存在有關係。而且從導致肝癌的因子中（包括 HBV, HCV, alcohol, aflatoxin, membranous obstruction of IVC, haemochromatosis, A1AT deficiency, tyrosinaemia, glycogen storage disease, 和 porphyria）得知，B 型肝炎病毒感染比其他因子的發現更普及且更具嚴重性（Anthony, 2001）。

癌

何謂致癌作用（carcinogenesis）？首先要先了解何謂 carcinogenesis，也就是癌的行成。carcino-字面上的意思是表皮細胞的，carcinoma 是從表皮細胞癌生出來的腫瘤，也是致癌作用的最終產物。環境中的致癌物質有放射線、UV 光、化學試劑、細菌或病

毒的感染，首先與這些物質接觸的就是表皮細胞；當組織的表皮細胞暴露在有致癌物質的環境時，細胞會因不同程度的暴露而有不同程度的傷害。細胞內有一套修補系統來復原這些傷害，降低細胞發生死亡的機率，通常這些修補作用都是成功的。受到輕微破壞的細胞，修補系統的保護可以使細胞完全恢復正常；如果受到較嚴重破壞的細胞無法修復成正常狀態，修補系統會啟動細胞的死亡程式，使細胞進行計劃性細胞死亡（programmed cell death）或稱作細胞凋亡（apoptosis）。有時候少數受傷的細胞在修補作用無法修復或者修復發生錯誤時，會啟動細胞不正常的生長模式。這些不正常的細胞常常有很大的機會發生轉型（transformation），細胞轉型則是發生致癌作用的起始點。從分子的角度來看，癌的形成需要三方面的基因參與調控，包括促進細胞增生，抑制細胞生長，以及調控細胞生存和死亡的基因。促進細胞增生的基因，例如是致癌基因（oncogene）（Sinn *et al.*, 1987），這些分子的特性是促進細胞的生長和增生，它們都需要細胞外訊號分子活化並且最後是作用在轉錄因子（transcriptional factor）上，這些表現量增加的轉錄因子會去開啟特定的基因表現促使細胞生長和增生，如果這些分子受到不正常調控，細胞生長速率改變，很容易造成細胞轉型；抑制細胞生長的基因，例如抑癌基因（tumor

suppressor gene) p53 (Lowe *et al.*, 1993), p53 蛋白質能夠調控細胞週期的進行和 DNA 修補系統的分調控，細胞週期是由 Cyclin 結合 CDK 的複合物分子調節的，在細胞週期的 G1 時期，p21 是主要抑制 CyclinD/CDK4 和 CyclinE/CDK2 的激酶活性，因此抑制細胞週期的進行 (Xiong, *et al.*, 1993)。p53 是調控 p21 表現的上游分子 (El-Deiry, 1998)。p53 的另一項功能是當 DNA 分子受損時，p53 調節 DNA 修補系統並且修復 DNA (Smith, *et al.*, 1995)。因此，當 p53 喪失功能時，細胞生長週期會失控且會累積 DNA 突變，變成轉型細胞；調控細胞生存和死亡的基因，例如 Bcl-2 家族的分調子 (Craig, 1995)。Bcl-2 是位於粒線體外膜的蛋白質，是一個抗細胞凋亡的分調子 (anti-apoptotic molecule)，在受體活化的 caspase8 誘發的細胞凋亡途徑中，Bcl-2 抑制 cytochrome C 從粒線體釋放出來。如果 Bcl-2 喪失功能，細胞中的許多分調子不受控制時，細胞也容易發生細胞轉型 (Deng and Podack, 1993)。從過去許多資料顯示，在 B 型肝炎病毒感調染導致肝癌的過程中，HBx 是主要的分調子，一般認為 HBx 蛋白質破壞了細胞生長的秩序 (Cromlish, 1996)。

HBx 蛋白質的重要性：分成組織、細胞及分調子三層面分別探討：

組織層次

從肝癌組織的免疫測試 (Su *et al.*, 1998) 和基因轉殖動物實驗 (Kim *et al.*, 1991; Koike *et al.*, 1994; Terradillos *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 1999) 證實, X 蛋白質的存在和肝癌形成有密切關係。在 Su 等人的實驗中 (Su *et al.*, 1998), 利用免疫測試的方法檢查急性肝炎、肝硬化、肝癌病人肝組織的切片。使用兩種多株抗體和一種單株抗體, 結果在 53.3% 肝硬化及 58.8% 肝癌組織偵測到有 X 蛋白質, 但在急性肝炎及輕微病症的組織中則測不到 X 蛋白質。在 Yu 等人的實驗 (Yu *et al.*, 1999), 他們利用基因轉殖鼠證明 B 型肝炎病毒 X 蛋白質和肝癌的關係。有 86% 的 X 基因轉殖鼠發生肝癌。其中小腫瘤在 15 到 18 個月的基因轉殖鼠是 100% 的發生率, 且 11 到 18 個月轉殖鼠平均發生率是 86%。肉眼可辨識的肝腫瘤在 11 到 18 個月 X 基因轉殖鼠的平均發生率是 64%。雖然這些結果顯示 X 蛋白質和肝癌發生關係密切, 但是其中的作用機制仍不清楚。偵測受 B 型肝炎病毒感染的肝炎組織中 X 蛋白質的量, 其中以慢性活性肝炎組織 (Wang *et al.*, 1991) 最多, 其次是慢性非活化性肝炎、肝硬化和肝癌組織 (Wang *et al.*, 1991), 而急性肝炎及輕微病症的組織中則測不到 X 蛋白質 (Su *et al.*, 1998)。由此顯示 X 蛋白質量的不

同，反應出不同的肝炎病程。由於 HBV 感染肝組織所引起的疾病和宿主免疫系統的作用有關，X 蛋白質在其中的影響則可能藉由轉錄轉活化 HBV 的核心基因的表現，而引起免疫系統的反應也是可能的。

細胞層次

在轉染細胞中，受到 X 蛋白質影響的那些細胞生理反應對於維持細胞的生存都是很重要的。所以這些細胞生理反應都被認為是 X 蛋白質導致肝癌發生的原因。將 HBV 基因組或者 X 基因感染到細胞中可將 fetal mouse hepatocyte line, FMH202-1 (Seifer *et al.*, 1991)、murine hepatocyte cell line, AML12 (Oguey *et al.*, 1996)、mouse hepatocyte line, FMH202 (Hohne *et al.*, 1990) 和 NIH3T3 (Shirakata *et al.*, 1989) 等細胞株轉型。過去許多研究將 X 基因轉染到細胞株中，發現在被轉染的細胞株中 X 蛋白質是多功能性的。在細胞核內，X 蛋白質具轉錄活化特性 (Balsano *et al.*, 1994; Renner *et al.*, 1995)，藉由和轉錄聚合酶及其他轉錄相關分子間的交互作用 (Barnabas *et al.*, 1997; Haviv *et al.*, 1998; Maguire *et al.*, 1991; Williams and Andrisani, 1995)，X 蛋白質間接轉活化許多細胞基因及其他病毒的基因 (Doong *et al.*, 1998; Twu and Robinson,

1989)；在細胞質，X 蛋白質干擾細胞質內訊號分子的正常活性，間接改變轉錄因子的活性也改變了基因的表現。另外 X 蛋白質會干擾 DNA 的修補系統 (Becker *et al.*, 1998; Jia *et al.*, 1999; Prost *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1994)，且改變 proteasome 的活性 (Hu *et al.*, 1999)，最近也發現 X 蛋白質會影響粒線體的功能 (Rahmani *et al.*, 2000; Takada *et al.*, 1999)。因為 X 蛋白質在細胞中有許多的功能，所以推測對肝癌的發生很重要。

分子層次

X 蛋白質是一轉錄活化蛋白質，藉由和轉錄聚合酶及其他轉錄相關分子間的交互作用，包括 CREB 的 Leucin zipper 區域 (Williams and Andrisani, 1995)，ATF-2 (Maguire *et al.*, 1991)，TFIIB (Haviv *et al.*, 1998)，bZip 轉錄因子 (Barnabas *et al.*, 1997)，p53 (Wang *et al.*, 1994)，RNA polymerase II (Lin *et al.*, 1998)，和 NF-IL6 (Ohno *et al.*, 1999)。

X 蛋白質轉錄轉活化許多細胞基因及其他病毒的基因，如 HIV-1 LTR (Twu and Robinson, 1989)，herpes simplex virus tk、Simian

virus 40、human immunodeficiency virus type I 和 type II 的 LTR、human T lymphotropic virus type I 的 LTR、mouse mammary tumor virus 的 LTR、Rous sarcoma virus 的 LTR (review by Jia *et al.*, 1999) 等。而細胞內可被 X 蛋白轉錄轉活化的基因有 Human MDR1 (Doong *et al.*, 1998)、proto-oncogenes c-myc 和 c-fos/c-jun、 α -anti-trypsin、 α -fetoprotein、 β -interferon、epidermal growth factor (EGF) receptor、metallothionein、RNA polymerase II 和 III、MHC I 和 II 相關基因、interleukin 8、和 intracellular adhesion molecules (review by Jia *et al.*, 1999)。Insulin-like growth factor receptor II (IGFR-2)、Tyrosine-protein kinase SKY、proto-oncogene Rhoa, multidrug resistance protein、p55CDC (cell division control protein)、CDK inhibitor p19 INK4D、coagulation factor II (thrombin) receptor、protein kinase MLK-3、MARCKS-related protein (MacMARCKS)、cAMP-dependent protein kinase type I- β regulatory chain、natural killer cell enhancing factor B (NKEFB)、heat shock 27 kDa protein (HSP27)、Glutathione S-transferase θ 1、Fast kinase (FAS-activated serine/threonine kinase)、Bak protein、Apoptotic cysteine

protease MCH4、nucleobindin、INI1、cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)、intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)、NADH-ubiquinone oxidoreductase B18 subunit、fibronectin receptor β subunit (integrin β 1)、macrophage colony stimulating factor-1 (M-CSF)、hepatoma-derived growth factor、fibroblast growth factor receptor 1、thymosin β -10、Acyl-CoA-binding protein、Insulin receptor (Han *et al.*, 2000)。相反的，也文獻報導有些基因的轉錄作用則受到 X 蛋白質的抑制，包括 DNA-binding protein inhibitor ID-1H、transferrin receptor (p90, CD71)、guanine nucleotide regulatory protein NET1、BCL2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3 (NIP3)、sterol regulatory element-binding protein (CNBP)、transcription elongation factor SII、 β -catenin、monocyte chemotactic protein 1、insulin-like growth factor binding protein 1、T lymphocyte-secreted protein I-309、和 Inhibin α chain (Han *et al.*, 2000)。

從過去有關於 X 蛋白質功能的探討得知，X 蛋白質除了具有轉錄

轉活化的能力外，同時也可調控細胞質中影響細胞生長的分子(Doria *et al.*, 1995)。在轉染細胞中，受到 X 蛋白質影響的細胞生理反應對於維持細胞生存是很重要的。在此我們探討的重點主要著重在 X 蛋白質干擾細胞訊號傳遞的作用上。先前已有許多實驗證實 X 蛋白質可調控數個細胞內某些重要訊息傳遞分子。這些分子決定了細胞的死亡和細胞的增生。例如經由調控 Fas ligand (Shin *et al.*, 1999) 和 p53 (Chirillo *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1995) 的分子途徑是促使細胞死亡；而調控 TNF α (Su and Schneider, 1997)、NF κ B (Weil *et al.*, 1999)、JAK/STAT (Lee and Yun, 1998) 及 Ras/Raf/MAPK (Benn and Schneider, 1994) 則可促使細胞增生。但這些不同實驗室有關 X 蛋白質與訊號分子間的作用，導致的生物現象結果，常有互相矛盾的結論；像是 X 蛋白質可以促使 Fas ligand 的釋放 (Shin *et al.*, 1999)，但卻會抑制 Fas 接受器的下游分子 caspase 3 (Gottlob *et al.*, 1998)；不同的基因轉染方式則得到 X 蛋白質會活化也會抑制 p53 的活性 (Chirillo *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1995)；X 蛋白質對於 Ras 分子的作用也得到有不同結果 (Benn and Schneider, 1994; Chirillo *et al.*, 1996; Klein and Schneider, 1997; Schuster *et al.*, 2000)。這些矛盾的結果可能是由於不同的基因表

現質體所表達的 X 基因產物量不同造成的 (Tarn *et al.*, 1999)。但這些結果並不能說明 X 蛋白質造成肝癌發生的機制。另外有報告指出 X 蛋白質會和 p53 分子結合 (Elmore *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1995) 並且抑制 p53 的轉錄作用、和 XPA 及 XPB 分子的結合 (Wang *et al.*, 1995)、進入細胞核 (Elmore *et al.*, 1997)、以及 p53 相關的 apoptosis 也受到抑制 (Wang *et al.*, 1995)，但確切的訊號途徑則不清楚。最近數個報告指出 X 蛋白質主要分布在細胞質且是位於粒線體 (mitochondria) 的位置 (Takada *et al.*, 1999; Rahmani *et al.*, 2000; Henkler *et al.*, 2001) 且 X 蛋白質和 p53 的分布位置是一樣的 (Takada *et al.*, 1999)。X 蛋白質會造成粒線體的堆積 (Takada *et al.*, 1999) 和改變粒線體膜勢位的改變 (Rahmani *et al.*, 2000) 但是沒有 cytochrome c 的釋放 (Rahmani *et al.*, 2000)。過去已經有實驗證明 X 蛋白質的 3 端會和 p53 的 3 端結合 (Elmore *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1995)，導致 apoptosis 的訊號途徑，但此實驗結果至今仍未有定論。近來發現當細胞遭受損壞時，p53 會快速的從細胞質轉移到粒線體的外膜上，而且 p53 也出現在粒線體內部，這些現象只和 p53 導致 apoptosis 有關，且會造成粒線體膜勢位的改變、cytochrome c 的釋放、和 procaspase 3 的活化 (Marchenko *et al.*,

2000)。粒線體是和細胞 apoptosis 有關的重要胞器，參與其中的訊號分子現在已經知道的有 cytochrome c, Smac/Diablo, apoptosis inducing factor (AIF), flavoprotein, procaspase 2, 3, 9 和 bcl-2 家族分子，包括 Bax, Bim, Bid (reviewed in Moll and Zaika, 2001)。其中只有 Bax 是可能和 p53 導致細胞 apoptosis 直接相關的訊號分子，但事實上並不確切 (reviewed in Marchenko *et al.*, 2000)。X 蛋白質導致 (Kim *et al.*, 1998) 或抑制 (Elmore *et al.*, 1997) p53 相關的 apoptosis 是不是也透過粒線體的相關訊號途徑則是未知。

使用的實驗系統

過去的實驗者大多使用基因持續表達的系統，且 X 蛋白質的表達量是過量的。因此我們認為 X 基因過度表達的系統並不能真正說明 X 蛋白質在肝細胞中的效應。我們將使用誘發性基因表達系統並且控制 X 蛋白質的表現量，在不同 X 蛋白質量下觀察產生的分子效應。目前比較穩定的基因誘發表現系統是細菌乳糖抑制系統 (bacterial lactose repressor system) 和依賴四環素表現系統 (tetracycline-dependent expression system)。這些系統含有調

節質體和反應質體。調節質體是 tet-lac-hyg 質體 (pTet-lac-hyg)；反應質體是 TREM 質體 (pTREM) 和 LacM 質體 (pLacM) (Liu *et al.*, 1998)。在調節質體中 CMV 促進子 (pCMV) 和 tk 促進子 (ptk) 分別是 tTA 和 LacI 的促進子。tTA 則會形成 tet-off 蛋白質，並結合在反應質體的 TRE 位置上；LacI 則會形成乳糖抑制物 (lactose repressor protein) 結合在反應質體的乳糖啟動子 (lactose operator)。Hygromycin 是其抗藥性選殖基因。在反應質體中，TRE 位置和乳糖 operator 會受到調節基因的產物調節其作用。X 基因建構在反應質體的多基因選殖位點 (multiple cloning site)，ampicillin 是抗藥性選殖基因。這兩個系統的調節機制不同。在細菌乳糖抑制系統中，以 IPTG 作為誘導物，IPTG 是乳糖類似物，不會受到分解。在沒有 IPTG 的情況下，細菌乳糖抑制系統的調節基因產生乳糖抑制分子，並抑制乳糖啟動子的轉錄起始活性，所以基因不能被轉錄生成；在加入 IPTG 之後，IPTG 和乳糖抑制物結合，使得乳糖啟動子可以進行基因轉錄。相反的，在依賴四環素表現系統中，tet-off 蛋白質結合在 TRE 位置上會一直使基因進行轉錄作用；四環素是這個系統的抑制物，當加入四環素時會結合 tet-off 蛋白質，因此抑制住基因的轉錄作用。這兩個系統的相異處是由誘導物或抑制物

做調節；相同處是不同量的誘導物或抑制物均可控制不同基因的表現量。我們將使用這兩種系統來做 X 基因的表現。

方法

一、質體的架構和確認

為了建立可誘發表達的質體系統。所使用的質體表現系統是 Tet-off 系統，其中表現質體是 pTREM (Clontech)。在 tet-off 質體表現系統中，扮演主要調控的分子是 tet-controlled transcriptional activator (tTA)，tTA 分子是由 tetracycline repressor 和 HSV (herpes simplex virus) VP16 的 activation domain 形成的結合蛋白質。當 tTA 結合蛋白質和 tetracycline-responsive element (TRE) 作用，會促進 pTREM 質體的轉錄作用進行，相反的，當加入 tetracycline 時，tetracycline 會和 tTA 蛋白質結合，導致 tTA 的分子構形改變，不能和 TRE 結合並導致 pTREM 質體的轉錄作用停止 (Gossen and Bujard, 1992)。X 基因將建構在反應質體中；除了 X 基因外，核心基因和表面基因也同時建構。而且也將觀察核心基因和表面基因的效應。這些病毒基因都有自己的促進子。建構的方式：HBx 基因的取得，HBx 的基因片段 (nt. 1230-1840) 是利用 PCR 的技術從 B 型肝炎病毒的基因組模板 (ayw subtype, Accession No. J02203) 中增幅出大量的 HBx 基因。使用

的寡核苷酸引子有正向引子 (5'CGGAATTCTTAGGCAGAGGTGAA3')，和反向引子 (5'CGGAATTCCAGCGCATGCGTGGAACC3')，在引子的兩端均加入一 EcoRI 的核酸內限制酶的切點，作為質體架構的使用。Xp、pTREM 頭尾以 EcoRI-EcoRI 限制酶切點黏接 (Xp 是以 PCR 的技術從病毒基因組得到的)，以 BamHI 確定方向；Xp、pLacM 的 Xp 頭尾是 SmaI-EcoRV (從 pBSKS-Xp 的 subclone 得到的；pBSKS-Xp 的建構是以 PCR 的技術從病毒基因組得到 Xp，並以 EcoRI-EcoRI 黏接)，pLacM 以頭尾 SmaI-SmaI 和 Xp 黏接，以 BamHI 確定方向；Cp、pTREM 頭尾以 EcoRI-EcoRI 限制酶切點黏接 (Cp 是以 PCR 的技術從病毒基因組得到的)，使用的寡核苷酸引子有正向引子 (5'CGGAATTCGTTGGGGGAGGAGATTAG3')，和反向引子 (5'CGGAATTCCTAACATTGAGATTCCCG3')，以 XbaI 確定方向；Cp、pLacM 的 Cp 頭尾是 SmaI-EcoRV (從 pBSKS-Xp 的 subclone 得到的；pBSKS-Cp 的建構是以 PCR 的技術從病毒基因組得到 Cp，並以 EcoRI-EcoRI 黏接)，pLacM 以頭尾 SmaI-SmaI 和 Cp 黏接，以 XbaI 確定方向；Sp、pTREM 頭尾以 SalI-SphI 限制酶切點黏接 (Sp 是以 PCR 的技術從病毒基因組得到的)，使用的寡核苷酸引子有正向引子 (5'GCGGTCGACTAGTTAATCATTACT3')，和反向引子

(5'GCGGCATGCTTAAATGTATAACCA3')，以 EcoRI 確定方向；Sp、pLacM 頭尾以 EcoRV-EcoRV 限制酶切點黏接 (Sp 是以 PCR 的技術從病毒基因組得到的)，以 XbaI 確定方向。建構完成的質體分別名為 pTREM-Xp、pLacM-Xp、pTREM-Cp、pLacM-Cp、pTREM-Sp 和 pLacM-Sp。初步得到質體後，接著進行基因插入檢查，方向檢查和核酸序列確認。

二、細胞株和抗體

本實驗中使用的細胞株有 293T。質體 pTREM-X 的正確性是在 293T 細胞中表達確認。在 X 基因建構到反應質體後，將進行穩定細胞株的挑選。使用的肝臟細胞株是 Huh7、HepG2、Hep3B 和 Chang liver cell 等細胞株。Huh7、HepG2、Hep3B 是人類肝癌細胞株，Chang liver cell 是一正常的肝細胞株，他屬於肝組織表皮細胞 (Chang, 1954)，而在此細胞則發現有 Hela 標記污染的情形 (Nelson-rees *et al.*, 1980)。Huh7 是帶有突變的 p53 和正常的 bcl-2，HepG2 是帶有正常的 p53 和 bcl-2，Hep3B 則不具有 p53 和 bcl-2；三種細胞株都不含 B 型肝炎病毒基因組或病毒顆粒，只有 Hep3B 有病毒的表面抗原基因並會表現表面抗原 (HBsAg)。p53 是抑癌基因 (tumor suppressor gene)，一般認為是細胞死亡相關的廣泛性基因；bcl-2 是反細胞凋亡的基因

(anti-apoptotic gene)，一般認為是保護免於細胞死亡的廣泛性基因。這兩個分子是決定細胞命運的重要分子。實驗中使用的抗體包括抗 HBx 的單株抗體是 Chemicon 公司生產的 Mab8419 和 Mab8429。抗 HBx 的多株抗體是在實驗是自行合成的抗 GST-X 的兔子多株抗體 (Hwang *et al.*, 2003)。它的抗原性已利用重組的 HBx 蛋白質和肝癌病人肝組織中存在 HBx 蛋白質表現做過確認。

三、聚合酶鏈反應

(polymerase chain reaction, 簡稱 PCR)

反應內容物:PCR反應溶劑、dNTP混合液 (ATP, TTP, CTP, GTP) (0.2mM)、正向引子 0.2 μ M、反向引子 0.2 μ M、HBV的基因模板 20 pg/ μ l、Hi-Taq polymerase 2U (Quality system) 和 ddH₂O 34.5 μ l。混合均勻後，加入等體積的棉子油。放置PCR機器 (Hybaid, Omn-E) 中進行反應，反應條件是一、95°C，5 分鐘，二、循環反應:95°C，1 分鐘，50°C，1 分鐘，72°C，2 分鐘，循環進行 30 次，三、72°C，10 分鐘。將PCR反應完成後得到的產物，經DNA電泳膠分析確認，並測量 HBx 基因的 PCR 產物濃度。從 PCR 得到 HBx 基因後，進行核酸的 phenol/chloroform/IAA 純化和酒精沉澱。用限制內切酶 EcoRI 切割

HBx基因的端點，並作純化。

四、pTREM 的質體取得

將 pTREM 質體從大腸桿菌(DH5 α)純化出來後，用限制內酶 EcoRI 切割 pTREM 質體，得到切割的線形 pTREM 質體後，進行質體的 phenol/chloroform/IAA 純化和酒精沉澱。

五、基因黏接

(Gene ligation)

將HBx基因片段和pTREM的線狀質體用T4 DNA ligases黏接。黏接作用的反應內容物有：黏接溶劑，0.5 mM ATP，T4 DNA ligase 2U (promega)，HBx基因片段 (insert)，pTREM質體 (vector)，和 ddH₂O。總反應體積 20 μ l。反應條件：37 $^{\circ}$ C，20 分鐘。所黏接形成的質體為pTREM-X。

六、基因轉型

(Transformation of DNA)

取大腸桿菌的適轉化細菌 (competent cell) 100 μ l，加入體積

小於總體積百分之十的質體量，混合均勻並放置冰上 10 分鐘。接著在 42 °C 水浴中放置 90 秒，之後馬上放在冰上 10 分鐘。加入 900 μ l LB 細菌培養液，在 37 °C 培養 1 小時。取菌液 100 μ l 均勻塗抹在含有 ampicillin 的 LB 培養基上，在 37 °C 培養 16 小時。所得到的細菌菌落可能含有送入的 pTREM-X 質體。挑選每個單一的細菌菌落在含有 ampicillin 的 LB 培養液中一一培養。將每一個菌落細菌中的質體抽出，並以 EcoRI 切割質體並作 DNA 電泳膠分析，若在一膠上可同時得到 HBx 基因和 pTREM 質體的 2 個片段，則可判定質體確實送入細菌中。

七、基因的大量化和純化

(Gene amplification and purification from *E. coli*)

挑取 DNA 轉型後得到的細菌菌落。培養在含有 ampicillin 的 3 ml LB 培養液，培養 16 小時。取 1.5 μ l 菌液，14000 rpm 離心 30 秒把細菌沉澱，去除上清。加入 100 μ l 含有 25 mM Tris-HCl、10 mM EDTA、50 mM glucose 的溶液，將細菌沉澱均質。之後加入 200 μ l 含有 0.2 N NaOH 和 1 % SDS 的溶液，混合均勻，置冰上 5 分鐘。5 分鐘後馬上加入 150 μ l 含有 5 M potassium acetate 和 glacial acetic acid 的溶

液，混合均勻，置冰上 5 分鐘。14000 rpm 離心 6 分鐘，取上清，加入等體積的 phenol/chloroform/IAA (25:24:1) 溶液，震盪 1 分鐘，14000 rpm 離心 3 分鐘，取上層水溶液。加入 10 分之 1 體積的 3 M NaOAc 及無水酒精，之後置 -80 °C 低溫狀態 30 分鐘。以 14000 rpm 離心 15 分鐘，去上清，再加入 70 % 酒精洗滌，14000 rpm 離心 5 分鐘，最後以真空乾燥機抽乾酒精並將 DNA 沉澱物溶於 20 μ l ddH₂O。於 -20 °C 低溫作保存。

八、大量質體純化

使用 VIogene 的 Viogene Ultrapure Plasmid Midprep System (Midiprep-V100) kit 抽取純化大量的質體

九、細胞培養

細胞培養在含有 5 % 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) 的 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 培養液中，培養於 5 % CO₂、37 °C 培養箱。

十、細胞轉染 (transfection) 及穩定細胞株的選殖

取 2×10^5 個細胞，用 35 mm plate (6 wells) 和 2 ml 的 5 % FBS DMEM，在 37 °C 和 5% CO₂ 條件培養 18 到 24 小時，使生長的細胞數達到 50–80 %。先配置溶液 A：(1– 2 µg) DNA + 0.1 ml SFM (serum free medium) 【pTet–Lac–Hyg (1 µg) : pTREM (1 µg) : pLacM (3 µg)】和溶液 B：2– 25 µl lipofectamine + 0.1 ml SFM。將溶液 A 和溶液 B 均勻混合，在室溫靜置 30 分鐘。同時用 2 ml SFM 洗滌細胞，一次。取 0.8 ml SFM 加到 A 和 B 的混合溶液中，均勻混合，將此溶液加到細胞中，在 37 °C 和 5 % CO₂ 條件下培養 5 小時。倒掉轉染液，並加入 2 ml 含 5 % FBS 的 DMEM 培養 24 小時。48 小時後開始以 hygromycin 篩選細胞株。Hygromycin 使用劑量分別為：Hep3B: 350 µg/ml, Huh7: 150 µg/ml, HepG2: 385 µg/ml, Chang liver cell: 150 µg/ml。Hygromycin 篩選時間為 20 天。之後再以 tetracycline 和 IPTG 篩選出能表達 X 基因的穩定細胞株。

十一、蛋白質分析

硫酸十二酯鈉聚丙烯醯胺膠片電泳

用 12.5 % 丙烯醯胺 (acrylamide) 的硫酸十二酯鈉聚丙烯醯胺膠片電泳 (sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel

electrophoresis, SDS-PAGE) 分離蛋白質分子，以 coomassie brilliant blue 染色。

蛋白質濃度測定

用雙辛可寧酸 (BCA, bicinchonic acid) 蛋白質分析試劑測試蛋白質濃度。以分光光度計波長 562 nm 測量吸光光度值。用牛血清白蛋白做為蛋白質標準濃度。

半乾式電泳轉移器

用半乾式電泳轉移器 (Trans-Blot SD) 將蛋白質分子從蛋白質電泳膠片轉移至硝基纖維素濾紙，硝基纖維素濾紙可與蛋白質分子形成非共價鍵緊密結合，以便於進行免疫測試。先將蛋白質用電泳膠分離；打開半乾式電泳轉移器的蓋子，及不銹鋼電極板 (負極)，用轉移緩衝液浸溼濾紙及硝基纖維濾紙，先放一張溼濾紙在儀器上，趕走氣泡，接著放上溼的硝基纖維濾紙，同樣的趕去氣泡，再放上蛋白質電泳膠片，使膠片完全至於硝基纖維濾紙上，並趕走氣泡，最後放上一層溼的濾紙，趕走氣泡；蓋上電擊板及安全蓋，通電，電壓介於 10 到 15 V 間，轉移 30 分鐘。轉移後，將硝基纖維濾紙保存 4 °C 中，

待免疫測試使用。

西方點墨免疫測試法

由硫酸十二酯鈉聚丙烯醯胺膠片蛋白質電泳分析將蛋白質分離，經半乾式電泳轉移器將蛋白質從電泳膠片上移轉至硝基纖維素濾紙 (nitrocellulose paper) 上，再以此濾紙進行免疫測試。免疫測試以 3 % 牛血清白蛋白 (溶在 TBST) 做空白抑制，在室溫下作用 30 分鐘後，用 TBST 洗滌 3 次每次 10 分鐘；再以 1 級抗體，在室溫下作用 30 分鐘後，用 TBST 洗滌 3 次每次 10 分鐘；以接有鹼性磷酸 (alkaline phosphatase) 的 2 級抗體，在室溫下作用 30 分鐘後，用 TBST 洗滌 3 次每次 10 分鐘；最後用含有 66 μ l NBT (nitro blue tetrazolium) 和 33 μ l BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indoxyl phosphate) 的 10 ml 鹼性磷酸鹽緩衝液在室溫下作用，顯色，有反應的呈藍紫色。或以 ECL plus 顯色系統 (Amersham) 測試，操作方式根據說明書；使用的二級抗體帶有 HRP (Horseradish Peroxidase)，加入 ECL plus 反應試劑後，進行底片感光。

十二、免疫螢光染色

以 5×10^4 個細胞種在直徑 1 cm 的圓形蓋玻片上 24 小時，用冰的 PBS 洗滌細胞 2 次後，加入 2 % paraformaldehyde，在室溫作用 20 分鐘，再以 PBS 在均速震盪器上洗滌 5 分鐘三次。加入 1 ml 含有 0.1 % Triton X-100，0.1 % goat serum 的 PBS，在室溫作用 30 分鐘。用 PBS 洗滌細胞 5 分鐘，3 次。剪裁略小於蓋玻片大小的 parafilm，並配置適當濃度的 1 級抗體 20 μ l。將 20 μ l 抗體加在蓋玻片上，並蓋上剪裁好的 parafilm，放在潮濕的 PBS 盒中，在 4 $^{\circ}$ C 作用 12 小時。加入適量的 PBS 洗掉一級抗體，再以 PBS 洗滌細胞 15 分鐘，3 次。配置 100 μ g/ml RNase（溶於 PBS），在 37 $^{\circ}$ C 作用 20 分鐘。用 PBS 洗 5 分鐘，3 次。在暗室中配置適當濃度的二級抗體 20 μ l，同一級抗體的作用方式，將包有鋁箔紙並可阻光的 PBS 潮濕盒放在 37 $^{\circ}$ C，作用 1 小時，加入適量的 PBS 洗掉二級抗體，再以 PBS 洗滌細胞 15 分鐘，3 次。在暗室中，加入 5 μ g/ml 的 PI，並在室溫中作用 30 分鐘。加入適量的 PBS 洗掉 PI，再以 PBS 洗滌細胞 10 分鐘，2 次。用 6.5 μ l 封片膠（glycerol : PBS = 1:1）滴在載玻片上，將蓋玻片反放置（細胞面朝下）在封片膠上，慢慢放下，並防止氣泡產生。在蓋玻片周圍用指甲油封住。

十三、流式細胞分析儀分析

(FACS 分析)

取至少 1×10^6 個細胞，在 70 % 酒精（溶於 PBS）中作固定，固定細胞條件為 4 °C，12 小時。加入含有 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 DNase-free RNase A 和 propidium iodide 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 PBS 溶液，在 37 °C 和細胞作用 30 分鐘，以進行 RNA 的清除和核酸（DNA）的染色。被 propidium iodide 標定的 DNA 則經由 FACScan 細胞流式分析儀（Becton Dickinson）偵測。經由機器設定，在吸取 10000 個細胞後，機器自動偵測由特定波長激發後所得到 propidium iodide 的標記訊號，然後再經由 ModFitLT MacV 2.0 Program（Becton Dickinson）軟體進行分析。

十四、軟膠分析

(Soft agar colony formation assay)

在 6 cm 細胞培養盤注入軟膠和 1×10^4 個 Chang 肝細胞株或 Chang-HBx 細胞（Hsu *et al.*, 1996）進行細胞貼附分析。在不含 tetracycline 的情況，軟膠的成分包括 0.3 % 的軟膠並含有 5 % fetal bovine serum 的 DMEM 細胞培養液。在軟膠的下層則先覆蓋一層硬膠以阻隔細胞和培養盤的附著，硬膠的成分是 1% agarose 和 5% fetal bovine serum 的 DMEM 細胞培養液。在軟膠培養第 14 天時進行拍照並

在培養第 21 天進行細胞群落計算。細胞群落計算是以 6 cm 盤上約略區分為 9 個 1 cm^2 的區域，將區域中的細胞群落計算並加總，結果以百分比表示。

十五、外來細胞在裸鼠體表的癌化測試

(Tumorigenicity in nude mice)

利用 4 到 8 週公的 Balb/c 裸鼠進行 Chang-HBx 細胞株的細胞轉型分析 (Hsu *et al.*, 1996)。Chang 肝細胞株 (ATCC CCL13) 作為控制組。在裸鼠體側腹部區，以皮下注射的方式注射 0.2 ml PBS 並含有 1×10^6 或 1×10^7 個細胞。每一星期作一次紀錄，以測量尺量取所形成組織塊的最長和最寬，並依此估算組織塊的體積。共紀錄 10 到 15 週。所得結果以圖表和裸鼠照片顯示。

結果

一、建構誘發性的表達質體

為了建構一可誘發表達的 HBx 質體，所得到的結果如下。6 個質體的基因插入和方向性檢查結果。基因插入檢查的結果：pLacM-Sp 得到 1.3 kb 的 DNA 片段，pTREM-Cp 和 pLacM-Cp 得到 0.7 kb 的 DNA 片段，pTREM-Xp 和 pLacM-Xp 得到 0.6 kb 的 DNA 片段（圖一）。方向檢查的結果：pTREM-Sp 得到 530 bp，pLacM-Sp 得到 700 bp，pTREM-Cp 得到 480 bp，pLacM-Cp 得到 330 bp，pTREM-Xp 得到 510 bp，pLacM-Xp 得到 460 bp（圖二）。從 HBV 基因組和 PCR 得到的 HBx 基因片段結果產物確認後，將此 HBx 基因片段黏接到 pTREM 質體中得到質體 pTREM-X（圖三），整個質體的大小為 4.4 kb。pTREM-X 的 HBx 基因片段插入是經由 EcoRI 核酸內切酶的確認，且 HBx 基因片段插入的方向性則經由 BamHI 核酸內切酶切割後作確認。為了確認 pTREM-X 的表達性和 pTREM-X 的表達是否可受到 tetracycline 的控制，利用 293T 細胞，將 pTREM-X 質體以 transient transfection 的方式送入細胞中，在處理 tetracycline 24 小時後，抽取細胞的總蛋白質並以 15 % SDS-PAGE 和 western blotting 配合 HBx 的單株抗體，分析 pTREM-X

表達 HBx 的情形。結果發現，在沒有 tetracycline 時，HBx 蛋白質的表達出現在各個不同的 regulatory 質體和 response 質體比例作 transient transfection 的 293T 細胞中（圖四），而處理 tetracycline 的 293T 轉染細胞則未表現 HBx 蛋白質。

二、在穩定細胞株表達 pTREM-X

為了探討 B 型肝炎病毒 X 蛋白質在寄主肝細胞中造成的可能影響。將反應質體 pTREM-Xp、pLacM-Xp、pTREM-Sp 和 pLacM-Sp 分別和調節質體 pTet-lac-hyg 共轉染(cotransfect)到 Chang liver、Huh7、HepG2 和 Hep3B 的細胞株中。另外，以 pTREM 和 pLacM 作為控制組。我們利用人類的肝細胞株 Chang liver cell，將 pTREM-X 送入細胞株建立一穩定細胞株。確認穩定細胞株表現 HBx 蛋白質的方式是西方點墨法 (western blotting)。在初步篩選穩定細胞株的過程中，利用兔子多株抗體 anti-GST-X 偵測在處理 tetracycline 後的細胞，其中的 HBx 蛋白質表現。篩選出一個表現 HBx 蛋白質的 Chang liver cell，我們將這個細胞株命名為 Chang 1-8 (Chang-HBx) (圖五)。Chang 1-8 的 HBx 蛋白質表現再確認則利用 HBx 蛋白質的單株抗體偵測。給予 Chang-HBx 細胞處理 tetracycline 或未處理 tetracycline

的 24 小時後，在缺乏 tetracycline 處理的細胞萃取液中都可偵測到誘發表現的 HBx 蛋白質，且在少量和多量體積的蛋白質電泳膠分析，結果均可測得 HBx 蛋白質的表現（圖六）。而且在處理 tetracycline 的 Chang-HBx 細胞萃取液中則未偵測到 HBx 蛋白質表現（圖六）。在未處理 tetracycline 的 Chang-HBx 細胞表現 HBx 蛋白質的偵測也利用收集不同時間點的細胞萃取液作確認，在 24 小時的時間內，HBx 蛋白質在 0.5 小時的時候開始表現，隨著時間的增加，HBx 蛋白質的表現也增加（圖七）。另外，也利用免疫螢光染色的方式偵測 Chang-HBx 細胞株的 HBx 蛋白質表現。在缺乏 tetracycline 處理後的 24 小時，使用 paraformaldehyde 固定細胞，並用抗 HBx 蛋白質的單株抗體和 FITC 標定的二級抗體偵測 HBx 蛋白質的表現。在光學顯微鏡下觀察到 HBx 蛋白質主要分布在 Chang-HBx 細胞質的部位（圖八）。在共軛焦顯微鏡則清楚看到 HBx 蛋白質主要分布在細胞核的周圍，少量分布在細胞質區域，而在 Chang liver cell 則未偵測到 HBx 蛋白質的表現（圖八）。

三、Chang-HBx 的細胞生長

HBx 蛋白質被認為參與肝癌的形成，有可能是 HBx 蛋白質對肝細

胞的生長速率有影響。所以，對於穩定細胞株的生理測試，首先檢查 Chang-HBx 在實驗室培養的生長情形。在 8 個實驗天中觀察 Chang-HBx 細胞生長密度，並以 Chang liver cell 作為控制組。在所有實驗中，處理 tetracycline 組的 Chang-HBx 細胞生長密度和 Chang liver cell 相似。在缺乏 tetracycline 的細胞生長密度則是在第 6 個實驗天時，Chang-HBx 的細胞數目是 Chang liver cell 的 1.5 倍。顯示在實驗室培養中，Chang-HBx 細胞的生長速率比 Chang liver cell 快（圖十）。另外，為了測試 Chang-HBx 的癌化能力，在實驗室以無血清培養 Chang-HBx 細胞，並觀察 Chang-HBx 再表現 HBx 蛋白質時的細胞生長速率。在每三天觀察紀錄細胞生長密度中，結果發現在第 9 個實驗天 Chang liver cell 的細胞生長密度是 Chang-HBx 的 6 倍，明顯的，在沒有血清作為營養供應的培養下，Chang-HBx 的細胞生長比 Chang liver cell 細胞慢（圖十一）。因此，Chang-HBx 細胞在無血清培養下極可能表現出一個正常細胞的特性。而且，在 72 小時的無血清培養中發現，Chang-HBx 有停滯在 G1 時期的現象，而 Chang liver cell 則沒有（圖十三、圖十四）。所以，在無血清培養時，Chang-HBx 的細胞或許是因為停滯在細胞週期的 G1 期才會有生長速率比 Chang liver cell 慢的現象。另外在細胞型態上，Chang-HBx 細胞株和 Chang

肝細胞株有些微的差異，在含血清的培養液 72 小時的培養下，兩種細胞都呈現圓卵型；而在無血清的 120 小時培養下，Chang 肝細胞株呈現圓卵型，Chang-HBx 細胞株則呈現長型（圖十二），顯示在無血清的情況兩種細胞的生長狀況不同。同時，在無血清培養 120 小時的時間中，Chang 肝細胞株和 Chang-HBx 肝細胞株均有圓起的亮點細胞，顯示著細胞有進入死亡的現象，而且 Chang-HBx 肝細胞株的細胞死亡情形較嚴重。

四、Chang-HBx 細胞癌化能力的分析

除了觀察表現 HBx 蛋白質的 Chang-HBx 在無血清培養時的生長情形，以判斷癌化能力外。另外，也以實驗室中軟膠分析 Chang-HBx 細胞的附著能力 (Shin *et al.*, 1975)，和在裸鼠表皮下注射 Chang-HBx 細胞觀察其癌形成的能力。軟膠培養下，癌細胞可在無貼附的情形顯現細胞轉型的特性，長出團狀細胞群，而正常細胞則無法在無貼附的環境生長。在缺乏 tetracyclin 的含 5% FBS DMEM 軟膠培養液中，培養 10 天之後，Chang liver cell 開始有團狀細胞生成，但 Chang-HBx 細胞則沒有（圖十五）。在軟膠中培養細胞 14 天後，將 Chang liver cell 形成的團狀細胞群拍照紀錄，並且計算顯微鏡視野下團狀細胞

群的數目。在直徑 6 公分細胞培養盤任選的 9 個區域，分別計算 Chang liver cell 和 Chang-HBx 的團狀細胞群生長情形。平均結果為 Chang liver cell 觀察到有 $5.7 \pm 2.4\%$ ，而 Chang-HBx 觀察到有 $0.3 \pm 0.29\%$ （圖十六），所以 Chang-HBx 細胞在軟膠中形成的團狀細胞數比 Chang liver cell 的少。

在活體內分析 Chang-HBx 細胞的癌化能力則是在裸鼠表皮下，以注射方式注入 1×10^7 的細胞，Chang liver cell 作為對照組（圖十七）。在細胞注射後，每個星期固定測量注射處長出的組織塊的大小，並估算體積，共紀錄 10 到 15 週，並在 15 週拍照紀錄。在相同的 1×10^7 個細胞注射後，Chang liver cell 所注射的裸鼠在第 6 週時長出體積為 1 立方公分的組織塊。然而同時 Chang-HBx 細胞所長出的組織塊則小於 0.1 立方公分（圖十八）。重複的實驗中均可發現相似的結果（圖二十）。為了證實 Chang liver cell 或 Chang-HBx 的組織塊所形成的組織結構，組織塊也進行切片和 HE 染色。結果經由台中榮民總醫院胃腸肝膽科主醫生確認，組織塊的結構主要有肝板細胞環狀圍繞中央靜脈的肝細胞構成且在細胞內部有多處 necrosis 發生為肝癌化的特徵（圖十九）。另外，也分析肝組織的肝癌分子表現，所使用的標記分子為

AFP (α -fetoprotein)，在Chang liver cell或Chang-HBx形成的組織塊均可偵測得到AFP的蛋白質表現，然而在細胞株的蛋白質萃取液中則未偵測到AFP的表現，在組織塊和細胞株中則都有cytokeratin 8/18 表皮細胞標記分子的蛋白質表現（圖二十一）。雖然過去的文獻記載Chang liver cell含有Hela的標記分子，但Chang liver cell的所形成的組織塊仍是肝組織且是癌化的組織。在裸鼠表皮下注射分析所得的組織塊，明顯的，Chang liver cell形成的組織塊比Chang-HBx形成的組織塊大。在肝癌組織塊形成的機率上，Chang liver cell是 100 % (9 隻老鼠長癌組織塊/9 隻老鼠注射細胞)，Chang-HBx是 66 % (6 隻老鼠長組織塊/9 隻老鼠注射細胞)。在實驗期間，裸鼠的生存率為Chang liver cell是 100 % (9/9)，Chang-HBx是 88 % (8/9) (圖二十二)。

從細胞生長和細胞癌化的測試結果可以得知，Chang-HBx 細胞株在表現 HBx 蛋白質後呈現為一較不具癌性的細胞株。在 Chang-HBx 細胞株表現的 HBx 蛋白質對 Chang 肝細胞株的分子運作的影響可以從上述的結果知道，需要血清的生長情形和需要貼附的生長，均和細胞週期的運轉分子有關。細胞週期的運轉分子包括有 cyclin/cdk 的聚

合分子如 cyclin A/cdk1、cyclin B/cdk1、cyclin A/cdk2、cyclin E/cdk2、Cyclin D/cdk4、Cyclin D/cdk6，Rb 磷酸化分子，p53，p21，p27。以西方點墨法偵測在無血清培養 Chang-HBx 細胞表現 HBx 蛋白質後在 24、48、72 小時的細胞蛋白質收集液中，有關細胞週期相關分子的表現情形，以 Chang 細胞株作為對照組。在 2 細胞株間表現有明顯變化的是 cyclin D1、cdk1、cdk2、p53，而沒有明顯變化的是 cdk4、cyclin E。在表現 HBx 蛋白質後 24 小時內明顯增加的分子為 cyclin D1 和 p53，明顯減少的分子為 cdk1、cdk2，而 Chang-HBx 貼附之後的 24、48 小時蛋白質表現量明顯增加的是 p53，蛋白質表現量降低的是 cyclin D1、cdk1 和 cdk2。(圖二十三)。

在裸鼠體表注射細胞所長出的癌組織中心部位多數呈現組織壞死狀態，這個結果有可能是癌組織生長過程中營養缺乏導致組織中央細胞無法存活的原因，HBx 蛋白質在這種營養缺乏的生長條件扮演的角色是未知的。為了了解在營養缺乏的情況下，表現 HBx 蛋白質可否直接導致細胞計畫性死亡的發生，所以在無血清的細胞培養條件培養 Chang-HBx 細胞株，並觀察發生細胞計畫性死亡的情形。收集細胞的 DNA，分析是否有細胞死亡的早期標記之一，DNA 斷片

的形成。結果發現，在無血清培養 48 小時（即細胞貼附後 24 小時）、72、96 小時中、Chang-HBx 細胞的 DNA 斷片有比對照組 Chang 細胞株的 DNA 斷片多的情形（圖二十四）。

此外，Chang-HBx 在裸鼠體表生長肝癌組織的情形和 Chang 肝細胞組比較是受到抑制的，而這現象則是由於長期表達 Chang-HBx 細胞長期表達 HBx 蛋白質的結果所造成。為了了解在形成的肝癌組織長期表達 HBx 蛋白質對 Chang 細胞株細胞週期分子影響的情形，以西方點墨法分析 Chang 肝細胞株和 Chang-HBx 細胞形成肝癌組織的蛋白質萃取液。結果發現，cyclin A、cyclin B、cyclin D1、cdk2、cdk4、p53、Rb2、p21 的表現量比 Chang 的肝癌組織多（圖二十五）。

討論

B 型肝炎病毒 X 蛋白質被認為參與在肝癌的形成過程 (Anthony, 2001)。HBx 蛋白質廣被接受的功能是轉錄轉活化細胞和病毒的基因 (Feitelson and Duan, 1997; Renner *et al.*, 1995; Shirakata *et al.*, 1989)。其他有關 HBx 功能的探討也發現 HBx 蛋白質會藉由影響訊號傳遞途徑而破壞細胞的生長秩序 (Feitelson and Duan, 1997)。然而有關 HBx 蛋白質在肝癌形成過程的角色，至今仍眾說紛紜。

在這個實驗中，我們建立誘發性基因表達的系統和穩定細胞株，且進一步確認穩定細胞株 Chang-HBx 表達 HBx 蛋白質後所表現出來的特性。為了避免在平時的細胞培養狀態下，使得 HBx 蛋白質在轉染的細胞中的過量表現並在細胞中堆積影響觀測的結果，我們選擇以 tetracycline 調控的 tet-off 基因表現系統，並將從 PCR 產物得到的 HBx 基因片段建立其中。Tet-off 基因系統中含有的 tetracycline response operon 是存在原核細胞中，所以 tetracycline 調控基因表現的時候並不影響寄主真核細胞中的基因運作 (Gossen and Bujard, 1992)。B 型肝炎的發生過程是由三個事件的循環所造成的，肝細胞

被病毒感染、受傷的肝細胞剔除、新的肝細胞生成。在每次 HBV 病毒的重新複製、病毒組合和再感染到新的肝細胞的過程，HBV 的各個分子的生成（如果對寄主細胞的組成有直接的影響）都是一次的肝炎事件的發生，而每一次合成的分子除了進行病毒顆粒組裝外，過多的分子則應該被寄主細胞的蛋白質分解系統清除，不會有堆積的情形（除非肝細胞的基因組受到嚴重破壞）。我們利用誘發表現的方式表現 HBx 蛋白質，從表現開始即以模擬 HBV 感染後表現 HBx 蛋白質的狀況，排除平時 HBx 蛋白質在細胞培養過程的堆積而造成在結果推測上不必要的疑慮。

在這個實驗的研究結果發現，和過去的許多報告一樣，HBx 蛋白質在 Chang 肝細胞株的表現主要分布在細胞質，且大多數是在細胞核的周圍。粗略的以不同離心轉速分離 Chang-HBx 細胞萃取液 (de Duve, 1975) 發現，HBx 表現出現在 Chang-HBx 的細胞核分離液中，但未出現在含有粒腺體和過氧小體或是細胞質液中。由此我們猜測，HBx 蛋白質表現在 Chang-HBx 的細胞核周圍，並且和某些胞器相黏接。而根據 Hoare 等人和 Henkler 等人在 2001 的發現，HBx 蛋白質表現量多的時候主要分布在細胞質，而當 HBx 蛋白質表現量少的時候則是分布

在細胞核內。

在細胞生長的分析中，和許多報告一樣，HBx 蛋白質的表現可以促進 Chang 肝細胞株的生長。然而，在無血清的培養狀況下，Chang-HBx 的細胞生長明顯的比 Chang 肝細胞株差。從 ATCC 的資料中知道 Chang 肝細胞株 (CCL13) 在大鼠 (hamster) 的體表可以生成癌組織。在我們的細胞生長結果中可以知道 Chang-HBx 細胞株的生長比起 Chang 肝細胞株是極需要血清提供養分，所以推測 Chang-HBx 細胞是較相似於正常細胞的狀態，而且，在表現 HBx 蛋白質時，Chang-HBx 的轉型能力呈現消失或者有被抑制，因而導致轉型能力的發生遲緩，這或許是因為 HBx 蛋白質抑制了帶有 Hela 標記的 Chang 肝細胞株的轉型能力。在營養缺乏的實驗室培養情況下，Chang-HBx 的生長則有稍微停滯在細胞週期 G1 期的情況。從這些結果我們猜想 HBx 蛋白質的功能和肝癌形成的抑制有關。

過去在 HBx 的動物體內模式的實驗中是利用 *HBx* 基因作為轉殖基因進行基因轉殖鼠的實驗，結果發現 HBx 蛋白質有促進肝組織癌化的能力 (Kim *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1999)，但也有相反的結果被

發現 (Billet *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1990; Tralhao *et al.*, 2002)。在我們的實驗中，老鼠是一個活體內模擬系統，以方便觀測人類肝細胞株 Chang-HBx 細胞的癌化情形。從結果得知，Chang-HBx 細胞在裸鼠體表的癌生長受到抑制，應該是在細胞注射後，癌組織開始產生的早期 (圖二十)。這個癌組織的形成受到抑制的現象則和在細胞實驗中以軟膠分析或無血清培養 Chang-HBx 的癌化能力受到抑制有相似的結果。相較活體內和活體外的結果，我們提出一合理的解釋，Chang-HBx 細胞在裸鼠體表的癌生長過程中比 Chang 肝細胞株需要更多的養分供給，如血液，而在 Chang-HBx 細胞癌化形成的早期，由於血液所提供的養分不足，導致 Chang-HBx 細胞生長進入 G1 期的停滯，就如同在實驗室中無血清培養的狀態相似，然而仍需要更多的證據支持。從整個實驗的結果，我們假設 HBx 蛋白質和 Chang 肝細胞株細胞週期進行的分子發生作用才會導致 Chang-HBx 細胞在營養缺乏的生長停滯在 G1 期。Chang-HBx 在活體內的生長受到 HBx 抑制，在過去也有報告支持 (Billet *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1990; Tralhao *et al.*, 2002)。而且，我們的實驗中所利用的鼠體系統或許可作為一個方便產生癌組織的動物模式。

由組織結構可知組織外側細胞以呈現完整細胞和肝組織型態為主，而在組織的中間區域，尤其是 Chang-HBx 的組織，其細胞型態大多已消失，且在組織切割處理時，組織中間區域已成潰爛狀態，所以猜測是由於養分供應不足導致的現象。養份供應不足的前因可能是一、細胞生長遠快於血管生成，二、肝細胞未發出誘導血管生長訊號，而養分供應不足的後果則可能是一、飢餓細胞進行計畫性細胞死亡 (apoptosis)，二、飢餓細胞質接受到自身或鄰近細胞的殺死效應 (necrosis)。在我們 *in vitro* 的實驗系統中，軟膠分析結果雖然與動物模式系統的癌形成雷同，但由於考慮到在裸鼠體表下的環境為一可貼附的環境，而非如同軟膠實驗中的不可貼附，所以在體外模擬實驗不考慮以軟膠系統分析。而以細胞在血清供應與否的營養條件，則較接近於上述所提的假設。在血清供應培養細胞下，表現 HBx 蛋白質的 Chang-HBx 確實比 Chang 肝細胞株生長快，有可能符合前因的第一個假設。在無血清供應的培養下，表現 HBx 蛋白質的 Chang-HBx 細胞生長則猜測較近似正常細胞的生理需求，其生長狀況比 Chang 肝細胞株差。這點則可能符合後果的假設。

偵測無血清條件下，表現 HBx 蛋白質對 Chang 肝細胞株的細胞週

期分子的影響，從蛋白質表現的結果可以知道表現 HBx 蛋白質後，p53、cyclin D1、cdk1 和 cdk2 的表現量有明顯的改變。在細胞貼附的早期（subculture 的 24 小時內）和完全貼附（subculture 的 24 小時後），cyclin D1、cdk1 和 cdk2 的表現由多變少，這個現象可能是造成無血清培養條件下，Chang-HBx 細胞生長停滯在 G1 期的原因，而 cyclin D1、cdk1 和 cdk2 的表現變化的原因則可能是營養條件不足和細胞無法貼附或者是調控其表現的分子受到 HBx 蛋白質影響，這些猜測都需要更進一步的證明。在無血清的條件下，Chang-HBx 細胞的 p53 的蛋白質表現一直都略比 Chang 肝細胞株的表現多，這個現象也符合 Chang-HBx 細胞的 G1 期停滯結果，然而 p53 表現量增加在這過程所扮演的功能需要進一步的釐清。在無血清培養的後期也發現，Chang-HBx 細胞發生計畫性死亡（DNA 斷片）的情形比 Chang 肝細胞多，這顯示 p53 蛋白質表現增加所造成的結果之一，是使 Chang-HBx 細胞走向細胞計畫性死亡，然而 p53 分子的表現量增加是否受到 HBx 蛋白質的影響需要再確認。

在長期表達 HBx 蛋白質的 Chang-HBx 肝癌組織偵測細胞週期分子發現 cyclin A、cyclin B、cyclin D1、cdk2、cdk4、p53、Rb2、p21 有

堆積的情形，這表示 HBx 蛋白質長期表達的結果可能影響 Chang 肝細胞內蛋白質分解系統的運作，有可能是如過去的文獻報導的 HBx 蛋白質影響 proteasome 的運作(Hu *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 1996; Sirma *et al.*, 1998)，又或者 HBx 增強上述分子的轉錄作用(Bouchard *et al.*, 2001)使它們的表現量增加，這些猜測都需要進一步的證明，而 Chang-HBx 細胞在裸鼠體表生長的肝癌組織的生長受到抑制，則可能是由於這些細胞週期分子堆積所導致。綜合上述結果，B 型肝炎病毒 X 蛋白質在肝癌形成過程是扮演抑制者的角色，而且在我們建立的系統中，HBx 蛋白質表現出 pro-apoptosis 的特性。

參考文獻

- Anthony, P.P. 2001. Hepatocellular carcinoma: an overview. *Histopathology* 39: 109-118.
- Arbuthnot, P., Capovilla, A., and Michael, K. 2000. Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: Effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JNK/STAT pathways. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15: 357-368.
- Balsano, C., Billet, O., Bennoun, M., Cavard, C., Zider, A., Grimber, G., Gioacchino, N., Briand, P., and Levrero, M. 1994. Hepatitis B virus X gene product acts as a transactivator *in vivo*. *J. Hepatol.* 21: 103-109.
- Barnabas, S., Hai, T., and Andrisani, O.M. 1997. The hepatitis B virus X protein enhances the DNA binding potential and transcription efficiency of bZip transcription factor. *J. Biol. Chem.* 272:20684-90.
- Beasley, R.P., Hwang, L.Y., Lin, C.C., and Chien, C.S. 1981. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: a prospective study of 22,797 men in Taiwan. *Lancet* 2: 1129-1133.
- Beasley, R.P. 1987. Hepatitis B virus: the major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 61: 1942-1956.
- Becker, S.A., Lee, T.-H., Butel, J.S., and Slagle, B.L. 1998. Hepatitis B virus X protein interferes with cellular DNA repair. *J. Virol.* 72: 266-272.
- Been, J., and Schneider, R.J. 1994. Hepatitis B virus HBx protein activates RAS-GTP complex formation and establishes a RAS, RAF, MAP kinase signaling cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10350-10354.
- Been, J., and Schneider, R.J. 1995. Hepatitis B virus HBx protein

- deregulated cell cycle checkpoint controls. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 11215-11219.
- Been, J., Su, F., Doria, M., and Schneider, R.J. 1996. Hepatitis B virus HBx protein induces transcription factor AP-1 by activation of extracellular signal-regulated and c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinases. J. Virol. 70: 4978-4985.
- Bergametti, F., Prigent, S., Lubet, B., Benoit, A., Tiollais, P., Sarasin, A., and Transy, C. 1999. The proapoptotic effect of hepatitis B virus HBx protein correlates with its transactivation activity in stably transfected cell lines. Oncogene 18: 2860-2871.
- Billet, O., Grimber, G., Levrero, M., Seye, K.A., Briand, P., and Joulin, V. 1995. In vivo activity of the hepatitis b virus core promoter: tissue specificity and temporal regulation. J. Virol. 69: 5912-5916.
- Bouchard, M., Giannakopoulos, S., Wang, E.H., Tanese, N., and Schneider, R.J. 2001. Hepatitis B virus HBx protein activation of cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 complexes and G₁ transit via a src kinase pathway. J. Virol. 75: 4247-4257.
- Chang, R.S.-M. 1954. Continuous subcultivation of epithelial-like cells from normal human tissues. P. S. E. B. M. 87: 440-443.
- Chang, T.-Y., Wen, Y.-Y., Yeh, H.-H., Wang, S.-T., Su, I.-J., and Liu, H.-S. 1999. Plasmid harboring *lac* repressor and tTA activator genes can regulate two inducible genes in mammalian cells. BioTechniques 27: 466-469.
- Chen, H.-S., Kaneko, S., Girones, R., Anderson, R.W., Hornbuckle, W.E., Tennant, B.C., Cote, P.J., Gerin, J.L., Purcell, R.H., and Miller, R.H. 1993. The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks. J. Virol. 67: 1218-1226.

- Chirillo, P., Falco, M., Puri, P.L., Artini, M., Balsano, C., Levrero, M., and Natoli, G. 1996. Hepatitis B virus pX activates NF- κ B-dependent transcription through a Raf-independent pathway. *J. Virol.* 70: 641-646.
- Chirillo, P., Pagano, S., Natoli, G., Puri, P.L., Burgio, V.L., Balsano, C., and Massimo, L. 1997. The hepatitis B virus X gene induces p53-mediated programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 8162-8167.
- Choi, B.H., Park, G.T., and Rho, H.M. 1999. Interaction of hepatitis B viral X protein and CCAAT/enhancer-binding protein α synergistically activates the hepatitis B viral enhancer II/pregenomic promoter. *J. Biol. Chem.* 274: 2858-65.
- Craig, R.W. 1995. The Bcl-2 gene family. *Cancer Biol.* 6: 35-43.
- Cromlish, J.A. 1996. Hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma: possible roles for HBx. *Trends microbiol.* 4: 270-4.
- de Duve, C. 1975. Exploring cells with a centrifuge. *Science* 189: 186-194.
- Deng, G., and Podack, E.R. 1993. Suppression of apoptosis in a cytotoxic T-cell line by interleukin 2-mediated gene transcription and deregulated expression of the protooncogene bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 2189-93.
- Diehl, P. 1996. Tet-off and Tet-on gene expression systems and cell lines. *Clontechiques* 11: 2-5.
- Doong, S.-L., Lin, M.-H., Tsai, M.-M., Li, T.-R., Chuang, S.-E., and Cheng, A.-L. 1998. Transactivation of the human MDR1 gene by hepatitis B virus X gene product. *J. Hepatol.* 29: 872-878.
- Doria, M., Klein, N., Lucito, R., and Schneider, R.J. 1995. The hepatitis B virus HBx protein is a dual specificity cytoplasmic activator of Ras and nuclear activator of transcription factors.

- EMBO J. 14: 4747-4757.
- el-Deiry, W.S. 1998. p21/p53, cellular growth control and genomic integrity. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 227: 121-37.
- Elmore, L.W., Hancock, A.R., Chang, S.F., Wang, X.W., Chang, S., Callahan, C.P., Geller, D.A., Will, H., and Harris, C.C. 1997. Hepatitis B virus X protein and p53 tumor suppressor interactions in the modulation of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 14707-14712.
- Fang, F., Orend, G., Watanabe, N., Hunter, T., and Ruoslahti, E. 1996. Dependence of cyclin E-CDK2 kinase activity on cell anchorage. *Science* 271: 499-502.
- Feitelson, M.A., and Duan, L.X. 1997. Hepatitis B virus X antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma. *Am. J. Pathol.* 150: 1141-1157.
- Galibert, F., Chen, T.N., and Mandart, E. 1982. Nucleotide sequence of a cloned woodchuck hepatitis virus genome: comparison with hepatitis B virus sequence. *J. Virol.* 41: 51-65.
- Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P., and Charnay, P. 1979. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature* 281: 646-650.
- Gottlob, K., Fulco, M., Levrero, M., and Graessmann, A. 1998. The hepatitis B virus HBx protein inhibits caspase 3 activity. *J. Biol. Chem.* 273: 33347-33353.
- Gossen, M., and Bujard, H. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547-5551.
- Greenblatt, M.S., Feitelson, M.A., Zhu, M., Bennett, W.P., Welsh, J.A., Jones, R., Borkowski, A., and Harris, C.C. 1997. Integrity of p53 in hepatitis B X antigen-positive and negative hepatocellular

- carcinomas. *Cancer Res.* 57: 426-432.
- Guadagno, T.M., Ohtsubo, M., Roberts, J.M., and Assoian, R.K. 1993. A link between cyclin A expression and adhesion-dependent cell cycle progression. *Science* 262: 1572-1575.
- Han, J., Yoo, H.Y., Choi, B.H., and Rho, H.M. 2000. Selective transcriptional regulations in the human liver cell by hepatitis B viral X protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272: 525-530.
- Haviv, I., Shamay, M., Doitsh, G., and Shaul, Y. 1998. Hepatitis B virus pX targets TFIIB in transcription coactivation. *Mol. Cell. Biol.* 18: 1562-1569.
- Henkler, F., Hoare, J., Waseem, N., Goldin, R.D., McGarvey, M.J., Koshy, R., and King, L.A. 2001. Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein. *J. Gen. Virol.* 82: 871-882.
- Henkler, F., Waseem, N., Golding, M.H.C., Alison, M.R., and Koshy, R. 1995. Mutant p53 but not hepatitis B virus X protein is present in hepatitis B virus-related human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 55: 6084-6091.
- Hoare, J., Henkler, F., Dowling, J.J., Errington, W., Goldin, R.D., Fish, D., and McGarvey, M.J. 2001. Subcellular localization of the X protein in HBV infected hepatocytes. *J. Med. Virol.* 64: 419-426.
- Höhne, M., Schaefer, S., Seifer, M., Feitelson, M.A., Paul, P., and Gerlich, W.H. 1990. Malignant transformation of immortalized transgenic hepatocytes after transfection with hepatitis B virus. *EMBO J.* 9: 1137-1145.
- Hoofnagle, J.H., Shafritz, D.A., and Popper, H. 1987. Chronic type B hepatitis and the "healthy" HBsAg carrier state. *Hepatology* 7: 758-763.
- Hsu, S.-L., Chen, M.-C., Chou, Y.-H., Hwang, G.-Y., and Yin, S.-C. 1999. Induction of p21^{CIP1/Waf1} and activation of p34^{cdc2} involved in

- retinoic acid-induced apoptosis in human hepatoma Hep3B cells. *Exp. Cell Res.* 248: 87-96.
- Hsu, S.-L., Lin, H.-M., and Chou, C.-K. 1996. Suppression of the tumorigenicity of human hepatoma Hep3B cells by long-term retinoic acid treatment. *Cancer Lett.* 99: 79-85.
- Hu, Z., Zhang, Z., Doo, E., Coux, O., Goldsberg, A.L., and Jake Liang, T. 1999. Hepatitis B virus X protein is both a substrate and a potential inhibitor of the proteasome complex. *J. Virol.* 73: 7231-40.
- Huang, J., Kwong, J., Sun, E.C., and Liang, T.J. 1996. Proteasome complex as a potential cellular target of hepatitis B virus X protein. *J. Virol.* 70: 5582-5591.
- Hwang, G.-Y., Lin, C.-Y., Huang, L.-M., Wang, Y.-H., Wang, J.-C., Hsu, C.-T., Yang, S.-S., and Wu, C.-C. 2003. Detection of the hepatitis B virus x protein (HBx) antigens and anti-HBx antibodies in cases of human hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Microbiol.* 41: 5598-5603.
- Jia, L., Wang, X.W., and Harris, C.C. 1999. Hepatitis B virus X protein inhibits nucleotide excision repair. *Int. J. Cancer* 80: 875-879.
- Kang, J.-S., and Krauss, R.S. 1996. Ras induces anchorage-independent growth by subverting multiple adhesion-regulated cell cycle events. *Mol. Cell. Biol.* 16: 3370-3380.
- Kang-Park, S., Lee, J.-H., Shin, J.-H., and Lee, Y.I. 2001. Activation of the IGF-II gene by HBV-X protein requires PKC and p44/p42 map kinase signalings. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283: 303-307.
- Kekule, A.S., Lauer, U., Weiss, L., Luber, B., and Hofschneider, P.H. 1993. Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumor promoter signaling pathway. *Nature* 361: 742-745.
- Kim, C.-M., Koike, K., Saito, I., Miyamura, T., and Jay, G. 1991. *HBx*

- gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 351: 317-320.
- Kim, H., Lee, H., and Yun, Y. 1998. X-gene product of hepatitis B virus induces apoptosis in liver cells. *J. Biol. Chem.* 273: 381-385.
- Klein, N.P., and Schneider, R.J. 1997. Activation of Src family kinases by hepatitis B virus HBx protein and coupled signaling to Ras. *Mol. Cell. Biol.* 17: 6427-6436.
- Klein, R., Schröder, C.H., and Zentgraf, H. 1991. Expression of the X protein of hepatitis B virus in insect cells using recombinant baculoviruses. *Virus Genes* 5: 157-174.
- Koike, K., Moriya, K., Iino, S., Yotsuyanagi, H., Endo, Y., Miyamura, T., and Kurokawa, K. 1994. High-level expression of hepatitis b virus HBx gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Hepatology* 19: 810-819.
- Koike, K., Shirakata, Y., Yaginuma, K., Arii, M., Takada, S., Nakamura, I., Hayashi, Y., Kawada, M., and Kobayashi, M. 1989. Oncogenic potential of hepatitis B virus. *Mol. Biol. Med.* 6: 151-160.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lara-Pezzi, E., Luis Armesilla, A., Majano, P.L., Miguel Redondo, J., and Lopez-Cabrera, M. 1998. The hepatitis B virus X protein activates nuclear factor of activated T cells (NF-AT) by a cyclosporin A-sensitive pathway. *EMBO J.* 17: 7066-77.
- Lee, T.H., Finegold, M.J., Shen, R.F., DeMayo, J.L., Woo, S.L., and Butel, J.S. 1990. Hepatitis B virus transactivator X protein is not tumorigenic in transgenic mice. *J. Virol.* 64: 5939-5947.
- Lee, Y.L., Lee, S., Lee, Y., Bong, Y.S., Hyun, S.W., Yoo, Y.D., Kim, S.J., Kim, Y.W., and Poo, H.R. 1998. The human hepatitis B virus

- transactivator x gene product regulates Sp1 mediated transcription of an insulin-like growth factor II promoter 4. *Oncogene* 16: 2367-2380.
- Lee, Y.H., and Yun, Y. 1998. HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling. *J. Biol. Chem.* 273: 25510-25515.
- Lin, Y., Tang, H., Nomura, T., Dorjsuren, D., Hayashi, N., Wei, W., Ohta, T., Roeder, R., and Murakami, S. 1998. The hepatitis B virus X protein is a co-activator of activated transcription that modulated the transcription machinery and distal binding activators. *J. Biol. Chem.* 273: 27097-27103.
- Liu, H.S., Lee, C.H., Lee, C.F., Su, I.J., and Chang, T.Y. 1998. Lac/Tet dual-inducible system functions in mammalian cell lines. *BioTechniques* 24: 624-632.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. 1999. *Molecular cell biology* 4th ed. W.H. Freeman and company, USA.
- Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jack, T., and Housman, D.E. 1993. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74: 957-967.
- Ludueno, M.A., Iverson, G.M., and Sussman, H.H. 1977. Expression of liver and placental alkaline phosphatases in Chang liver cells. *J. Cell Physiol.* 91: 119-29.
- Marchenko, N.D., Zaika, A., and Moll, U.M. 2000. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. *J. Biol. Chem.* 275: 16202-16212.
- Maguire, H.F., Hoeffler, J.P., and Siddiqui, A. 1991. HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions. *Science* 252: 842-844.
- Mason, W.S., Seal, G., and Summers, J. 1980. Virus of Pekin ducks

- with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J. Virol.* 36:829-36.
- Moll, U.M., and Zaika, A. 2001. Nuclear and mitochondrial apoptotic pathway of p53. *FEBS lett.* 493: 65-69.
- Murakami, S. 2001. Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator. *J. Gastroenterol.* 36: 651-60.
- Nelson-Rees, W.A., Hunter, L., Darlington, G.J., and O'Brien, S.J. 1980. Characteristics of hela strains: permanent vs. variable features. *Cytogenet. Cell Genet.* 27: 216-31.
- Nijhara, R., Jana, S.S., Goswami, S.K., Rana, A., Majumdar, S.S., Kumar, V., Sarkar, D.P. 2001. Sustained activation of mitogen-activated protein kinases and activator protein a by the hepatitis B virus X protein in mouse hepaocyte in vivo. *J. Virol.* 75: 10348-10358.
- Oguey, D., Dumenco, L.L., Pierce, R.H., and Fausto, N. 1996. Analysis of the tumorigenicity of the X gene of hepatitis B virus in a nontransformed hepatocyte cell lines and the effects of cotransfection with a murine p53 mutant equivalent to human codon 249. *Hepatology* 24: 1024-1033.
- Ohno, H., Kaneko, S., Lin, Y., Kobayashi, K., and Murakami, S. 1999. Human hepatitis B virus X protein augments the DNA binding of nuclear factor for IL-6 through its basic-leucine zipper domain. *J. Med. Virol.* 58: 11-18.
- Omata, M., Yokosuka, O., Imazeki, F., Matsuyama, Y., Uchiumi, K., Ito, Y., Mori, J., and Okuda, K. 1984. Transmission of duck hepatitis B virus from Chinese carrier ducks to Japanese ducklings: a study of viral DNA in serum and tissue. *Hepatology.* 4: 603-7.
- Ono, Y., Onda, H., Sarada, R., Igarashi, K., Sugino, Y., and Nishioka, K. 1983. The complete nucleotide sequences of cloned hepatitis B virus DNA subtype adr and adw. *Nucl. Acids Res.* 11: 1747-1757.

- Ozturk, M. 1999. Genetic aspects of hepatocellular carcinogenesis. *Semin. Liver Dis.* 19: 235-42
- Pasquinelli, C., Bhavani, K., and Chisari, F.V. 1992. Multiple oncogenes and tumor suppressor genes are structurally and functionally intact during hepatocarcinogenesis in hepatitis B virus transgenic mice. *Cancer Res.* 52: 2823-2829.
- Perini, G., Oetjen, E., and Green, M.R. 1999. The hepatitis B pX protein promotes dimerization and DNA binding of cellular basic region/leucine zipper proteins by targeting the conserved basic region. *J. Biol. Chem.* 274: 13970-13977.
- Prost, S., Ford, J.M., Taylor, C., Doig, J., and Harrison, D.J. 1998. Hepatitis B x protein inhibits p53-dependent DNA repair in primary mouse hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 273: 33327-33332.
- Rahmani, Z., Huh, K.-W., Lasher, R., and Siddiqui, A. 2000. Hepatitis B virus X protein colocalizes to mitochondria with a human voltage-dependent anion channel, HVDAC3, and alters its transmembrane potential. *J. Virol.* 74: 2840-2846.
- Renner, M., Haniel, A., Burgelt, E., Hofschneider, P.H., and Koch, W. 1995. Transactivating function and expression of the x gene of hepatitis B virus. *J. Hepatol.* 23: 53-65.
- Rossner, M.T. 1992. Review: Hepatitis B virus X-gene product: a promiscuous transcriptional activator. *J. Med. Virol.* 36: 101-117.
- Rusnak, R., and Ganem, D. 1990. Sequences 5' to the polyadenylation signal mediate differential poly(A) site use in hepatitis B viruses. *Genes Dev.* 4: 764-76.
- Schuster, R., Gerlich, W.H., and Schaefer, S. 2000. Induction of apoptosis by the transactivating domains of the hepatitis B virus X gene leads to suppression of oncogenic transformation of primary rat embryo fibroblasts. *Oncogene* 19: 1173-1180.

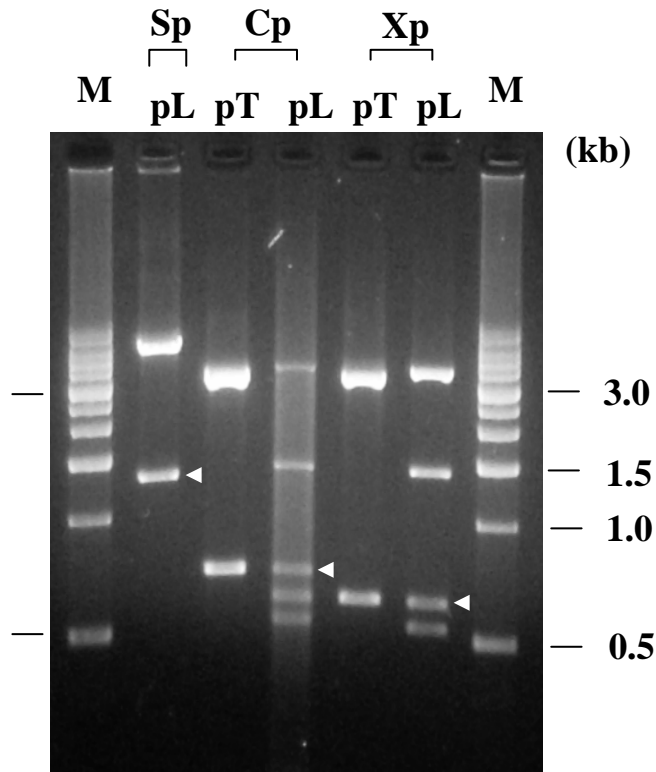
- Seeger, C., Ganem, D., and Varmus, H.E. 1984. Nucleotide sequence of an infectious molecularly cloned genome of ground squirrel hepatitis virus. *J. Virol.* 51: 367-375.
- Seifer, M., Hohne, M., Schaefer, S., and Gerlich, W.H. 1991. In vitro tumorigenicity of hepatitis B virus DNA and HBx protein. *J. Hepatol.* 13: s61-s65.
- Seto, E., Mitchell, P.J., and Yen, T.S. 1989. Transactivation by the hepatitis B virus X protein depends on AP-2 and other transcription factors. *Nature* 344: 72-74.
- Shek, N., Bartenschlager, R., Kuhn, C., and Schaller, H. 1991. Phosphorylation and rapid turnover of hepatitis B virus X protein expressed in HepG2 cells from a recombinant vaccine virus. *Oncogene* 6: 1735-1744.
- Shin, E.C., Shin, J.S., Park, J.H., Kim, H., and Kim, S.J. 1999. Expression of fas ligand in human hepatoma cell lines: role of hepatitis-B virus X (HBX) in induction of fas ligand. *Int. J. Cancer* 82: 587-591.
- Shin, S.-I., Freedman, V.H., Risser, R., and Pollack, R. 1975. Tumorigenicity of virus-transformed cells in nude mice is correlated specifically with anchorage independent growth in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 4435-4439.
- Shirakata, Y., Kawada, M., Fujiki, Y., Sano, H., Oda, M., Yaginuma, K., Kobayashi, M., and Koike, K. 1989. The x gene of hepatitis b virus induced growth stimulation and tumorigenic transformation of mouse NIH3T3 cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 80: 617-621.
- Sinn, E., Muller, W., Pattengale, P., Tepler, I., Wallance, R., and Leder, P. 1987. Coexpression of MMTV/v-ras and MMTV/c-myc genes in transgenic mice: synergistic action of oncogenes in vivo. *Cell* 49: 465-475.

- Sirma, H., Weil, R., Rosmorduc, O., Urban, S., Israël, A., Kremersdorf, D., and Bréchet, C. 1998. Cytosol is the prime compartment of hepatitis B virus X protein where it colocalizes with the proteasome. *Oncogene* 16: 2051-2063.
- Smith, M.L., Chen, I.T., Zhan, Q., O'Connor, P.M., Fornace, A.J.Jr. 1995. Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage. *Oncogene* 10: 1053-1059.
- Spaudau, D.F., Wang, H.-G.H., Fraser, M.J., and Lee, C.-H. 1991. A functional hepatitis B virus X protein produced in insect cells. *Virology* 185: 938-941.
- Sprengel, R., Kaleta, E.F., and Will, H. 1988. Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J. Virol.* 62: 3832-9.
- Su, F., and Schneider, R.J. 1997. Hepatitis B virus HBx protein sensitizes cells to apoptotic killing by tumor necrosis factor α . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 8744-8749.
- Su, Q., Schroder, C.H., Hofmann, W.J., Otto, G., Pichlmayr, R., and Bannasch, P. 1998. Expression of hepatitis B virus X protein in HBV-infected human livers and hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 27: 1109-1120.
- Su, Q., Schroder, C.H., Otto, G., and Bannasch, P. 2000. Overexpression of p53 protein is not directly related to hepatitis B X protein expression and is associated with neoplastic progression in hepatocellular rather than hepatic preneoplasia. *Mutant Res.* 462: 365-380.
- Szmunes, W. 1978. Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus: Evidence for a causal association. *Prog. Med. Virol.* 24: 40-69.

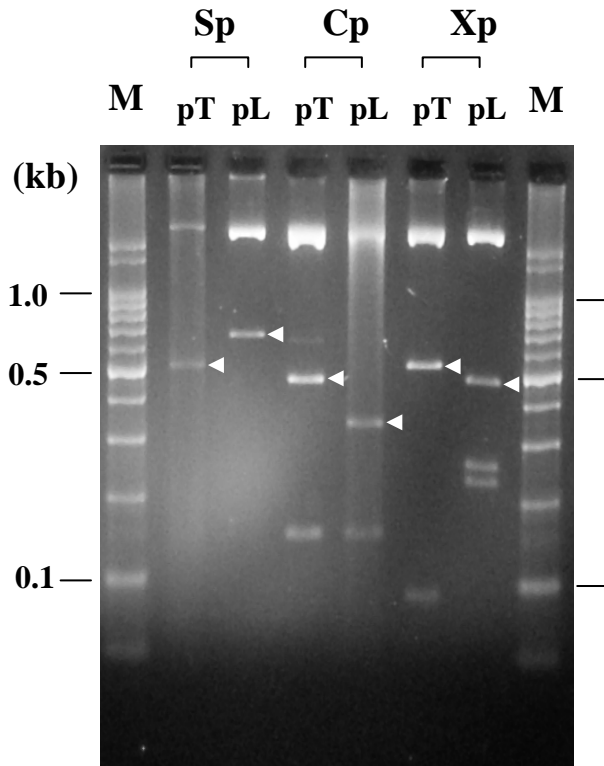
- Takada, S., Shirakata, Y., Kaneniwa, N., and Koike, K. 1999. Association of hepatitis B virus X protein with mitochondria causes mitochondrial aggregation at the nuclear periphery, leading to cell death. *Oncogene* 18: 6965-73.
- Tarn, C., Bilodeau, M.L., Hullinger, R.L. and Andrisani, O.M. 1999. Differential immediate early gene expression in conditional hepatitis B virus pX-transforming *versus* nontransforming hepatocyte cell lines. *J. Biol. Chem.* 274: 2327-2336.
- Terradillos, O., Billet, O., Renard, C.-A., Levy, R., Molina, T., Briand, P., and Buendia, M.A. 1997. The hepatitis B virus X gene potentiates c-myc-induced liver oncogenesis in transgenic mice. *Oncogene* 14: 395-404.
- Tiollais, P., Pourcel, C., and Dejean, A. 1985. The hepatitis B virus. *Nature* 317: 489-495.
- Tralhao, J.G., Roudier, J., Morosan, S., Giannini, C., Tu, H., Goulenok, C., Carnot, F., Zavala, F., Joulin V., Kremendorf, D. and Bréchet, C. 2002. Paracrine in vivo inhibitory effects of hepatitis B virus x protein (HBx) on liver cell proliferation: An alternative mechanism of HBx-related pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 6991-6996.
- Truant, R., Antunovic, J., Greenblatt, J., Prives, C., Cromlish, J.A. 1995. Direct interaction of the hepatitis B virus HBx protein with p53 response element-directed transactivation. *J. Virol.* 69: 1851-1859.
- Twu, J.-S. and Robinson, W.S. 1989. Hepatitis B virus X gene can transactivate heterologous viral sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2046-2050.
- Wang, H.D., Trivedi, A., and Johnson, D.L. 1997. Hepatitis B virus x protein induces RNA polymerase III-dependent gene transcription

- and increases cellular TATA-binding protein by activating the ras signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 17: 6838-6848.
- Wang, W., Thomas London, W., Lega, L., and Feitelson, M.A. 1991. HBxAg in the liver from carrier patients with chronic hepatitis and cirrhosis. *Hepatology* 14: 29-37.
- Wang, X.W., Forrester, K., Yen, H., Feitelson, M.A., Gu, J.-R., and Harris, C.C. 1994. Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2230-2234.
- Wang, X.W., Gibson, M.K., Vermeulen, W., Yeh, H., Forrester, K., Sturzbecher, H.-W., Hoeijmakers, J.H.J., and Harris, C.C. 1995. Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene. *Cancer Res.* 55: 6012-6016.
- Weil, R., Sirma, H., Giannini, C., Kremsdorf, D., Bessia, C., Dargemont, C., Brechot, C., and Israel, A. 1999. Direct association and nuclear import of the hepatitis B virus X protein with the NF- κ B inhibitor I κ B α . *Mol. Cell. Biol.* 19: 6345-6354.
- Williams, J.S., and Andrisani, O.M. 1995. The hepatitis B virus X protein targets the basic region-leucine zipper domain of CREB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3819-3823.
- Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D. 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366: 701-704.
- Yu, D.Y., Moon, H.B., Son, J.K., Jeong, S., Yu, S.L., Yoon, H., Han, Y.M., Lee, C.S., Park, J.S., Lee, C.H., Hyun, B.H., Murakami, S., and Lee, K.-K. 1999. Incidence of hepatocellular carcinoma in transgenic

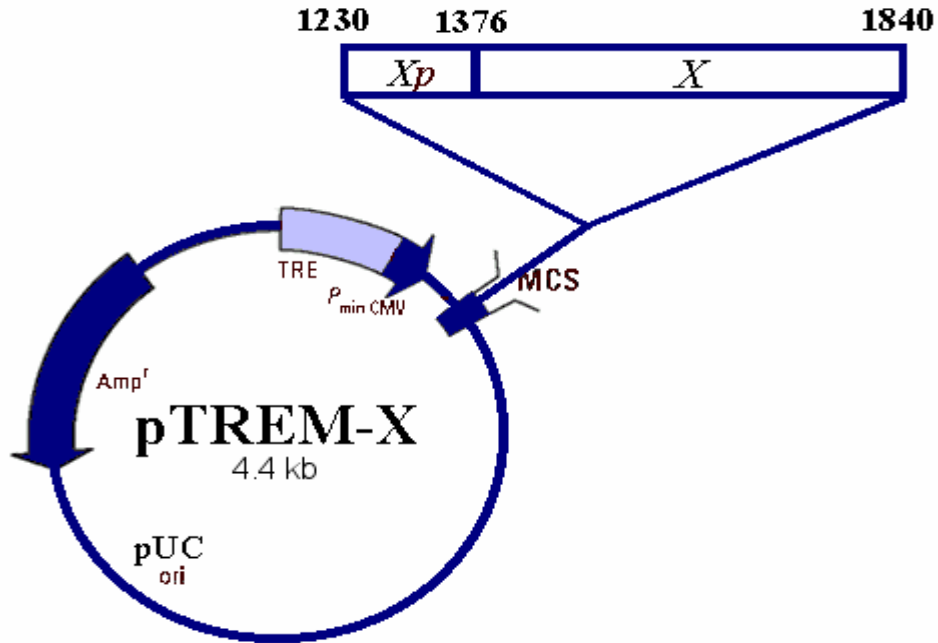
- mice expressing the hepatitis B virus X-protein. *J. Hepatol.* 31: 123-132.
- Zhu, X., Ohtsubo, M., Bohmer, R.M. Roberts, J.M., and Assoian, R.K. 1996. Adhesion-dependent cell cycle progression linked to the expression of cyclin D1, activation of cyclin E-cdk2, and phosphorylation of the retinoblastoma protein. *J. Cell. Biol.* 133: 391-403.
- Zoulim, F., Saputelli, J., and Seeger, C. 1994. Woodchuck hepatitis virus x protein is required for viral infection *in vivo*. *J. Virol.* 68: 2026-2030.



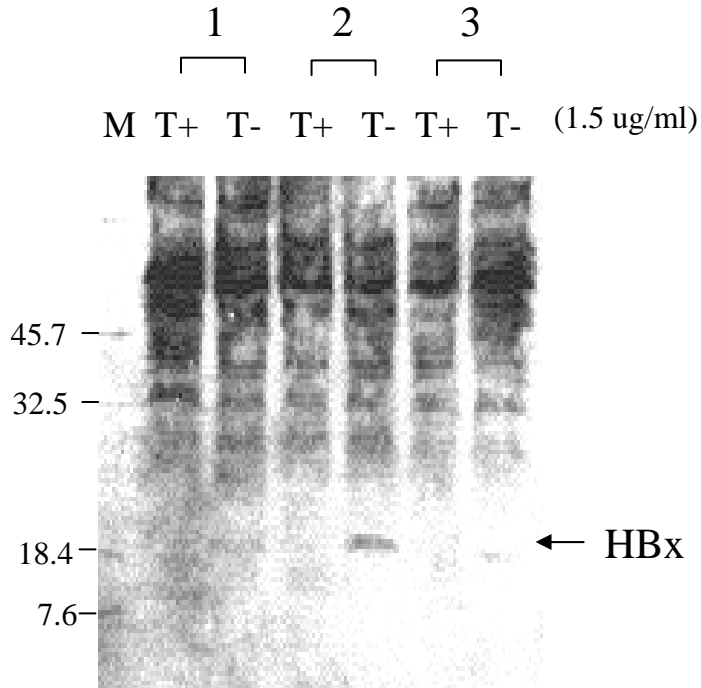
圖一、用限制內切酶確認質體pLacM-Sp, pTREM-Cp, pLacM-Cp, pTREM-Xp, pLacM-Xp的質體插入與否。以0.8% agarose gel分離DNA，圖中M表示1 kb DNA marker，Sp、Cp、Xp是指HBs、HBc、HBx的基因插入片段，均含有基因本身的促進子(promoter)。黑色箭頭指示的是DNA分子量的大小，白色箭頭指示的是預期的基因片段大小，片段大小分別是Sp: 1.4 kb, Cp: 0.8 kb, Xp: 0.7 kb。pT是pTREM，pL是pLacM。



圖二、用限制內切酶確認質體pTREM-Sp, pLacM-Sp, pTREM-Cp, pLacM-Cp, pTREM-Xp, pLacM-Xp的質體插入正確性。以1.2% agarose gel分離DNA，圖中M表示100 bp DNA marker，Sp、Cp、Xp是指HBs、HBc、HBx的基因插入片段，均含有基因本身的促進子(promoter)。黑色箭頭指示的是DNA分子量的大小，白色箭頭指示的是預期的基因片段大小，片段大小分別是pTREM-Sp: 0.53 kb, pLacM-Sp: 0.7 kb, pTREM-Cp: 0.49 kb, pLacM-Co: 0.33 kb, pTREM-Xp: 0.5 kb, pLacM-Xp: 0.5 kb。pT是pTREM，pL是pLacM。



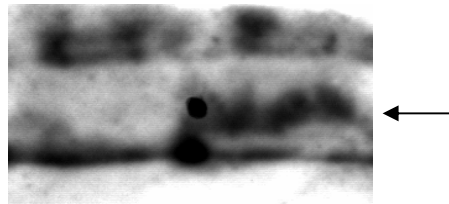
圖三、pTREM-X的質體圖。pTREM-X質體大小約4.4 kb，是由pTREM質體和HBx基因(核苷酸序列1230-1840)所組成。其中pTREM載體的結構由TRE, p_{min}CMV, multiple cloning site, Amp^r組成，HBx基因是由X基因本身的促進子和X基因片段組成。



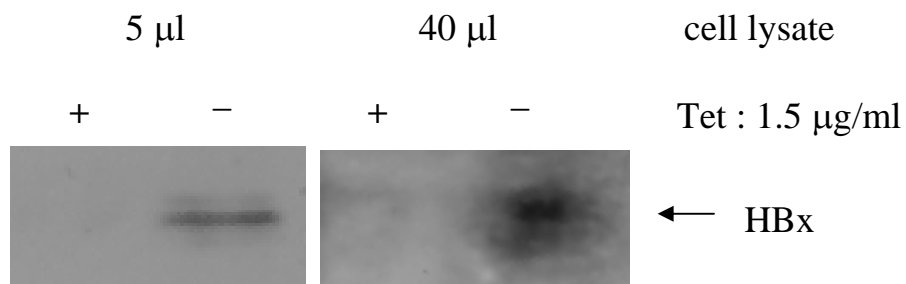
圖四、在293T細胞株用transient transfection的方式，以不同比例的pTet-Lac-Hyg: pTREM-X，分析pTREM-X表現HBx蛋白質的正確性。圖中1、2、3表示pTet-Lac-Hyg和pTREM-X的比例為0.5:0.5、0.5:1.0、0.5:1.5 (μg)。M是蛋白質的標準分子量。T+，是處理1.5 μg/ml的tetracycline，T-，是不處理tetracycline。箭頭標示為HBx蛋白質。

Cell lysate

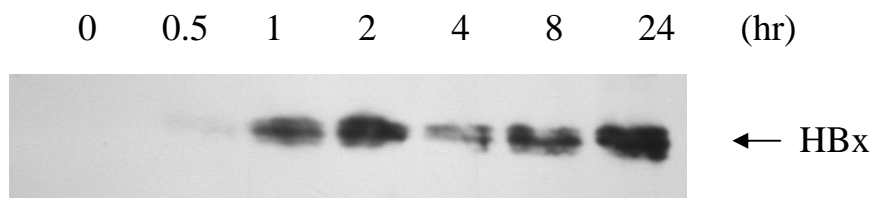
T+ T-



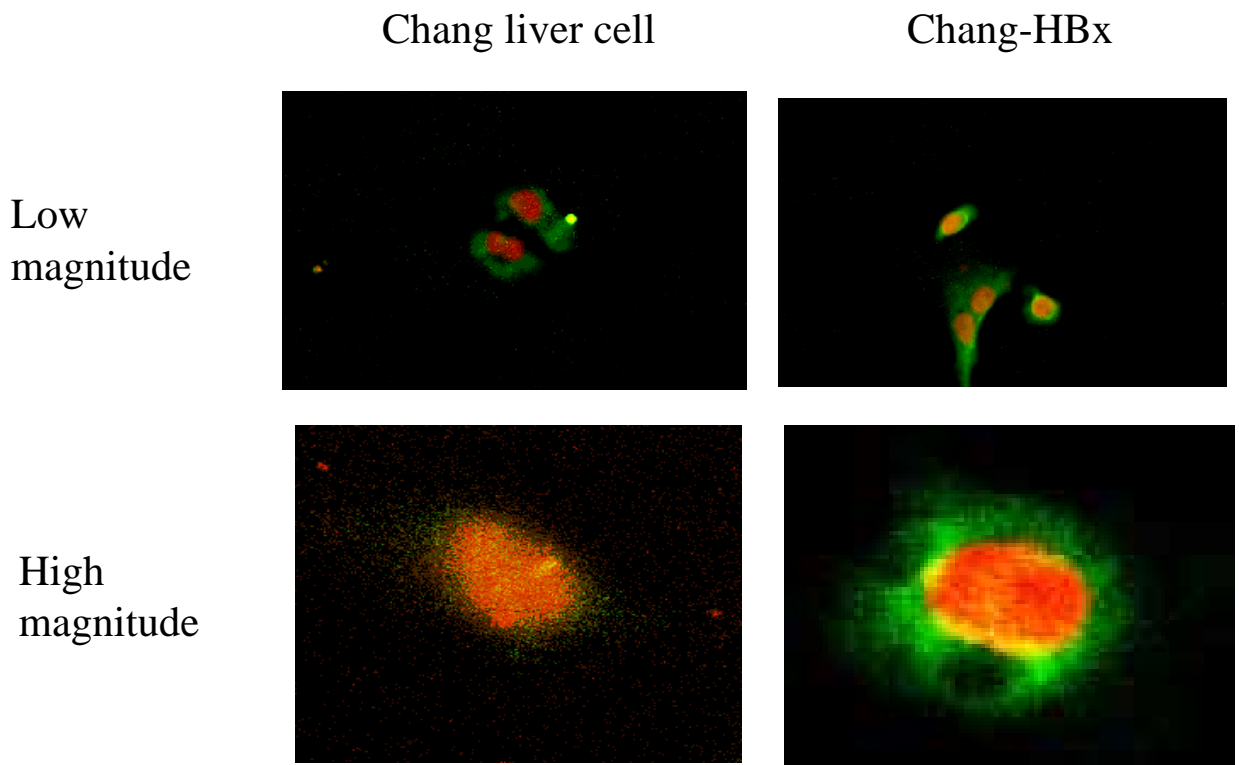
圖五、以GST-X的多株抗體(rabbit anti-GST-HBx IgG)進行穩定細胞株篩選得到一細胞株為Chang-HBx，在未處理tetracycline表現HBx蛋白質的結果。圖中M是蛋白質的標準分子量。T+，是處理1.5 $\mu\text{g/ml}$ 的tetracycline，T-，是不處理tetracycline。箭頭標示為HBx蛋白質。



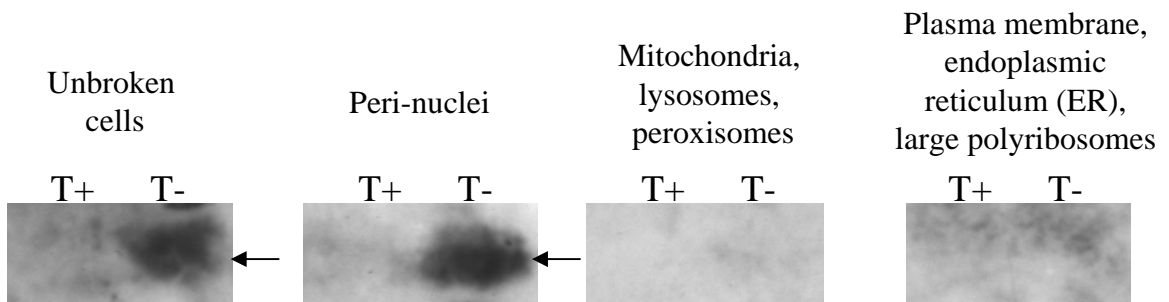
圖六、以HBx的單株抗體(MAB 8419)進行穩定細胞株Chang-HBx表現HBx蛋白質的結果。用不同體積的細胞萃取液5 μ l和40 μ l分別測試HBx蛋白質的表現。圖中T+，是處理1.5 μ g/ml的tetracycline，T-，是不處理tetracycline。箭頭標示為HBx蛋白質。



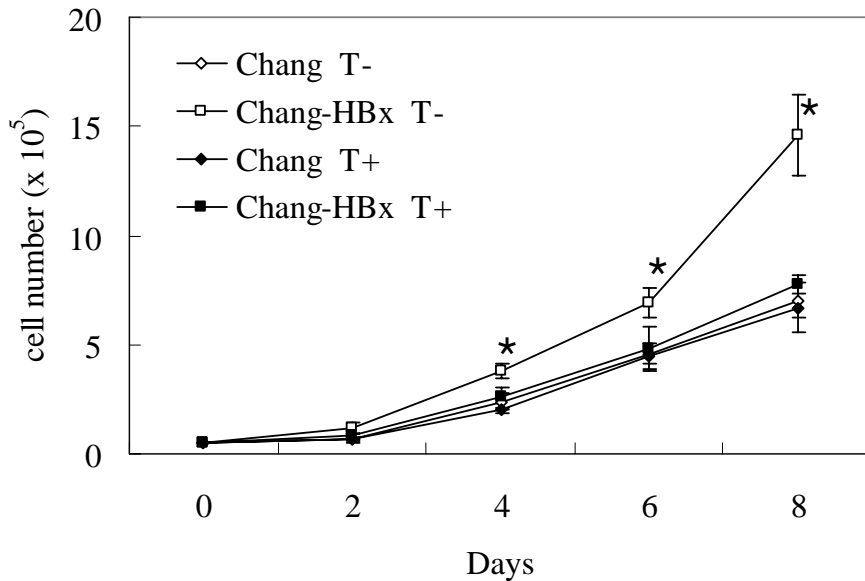
圖七、以HBx的單株抗體(MAB 8419)，不處理tetracycline的條件下，收取不同時間點Chang-HBx細胞萃取液，偵測HBx蛋白質的表現。所使用的時間點是0、0.5、1、2、4、8、24小時。箭頭標示為HBx蛋白質。



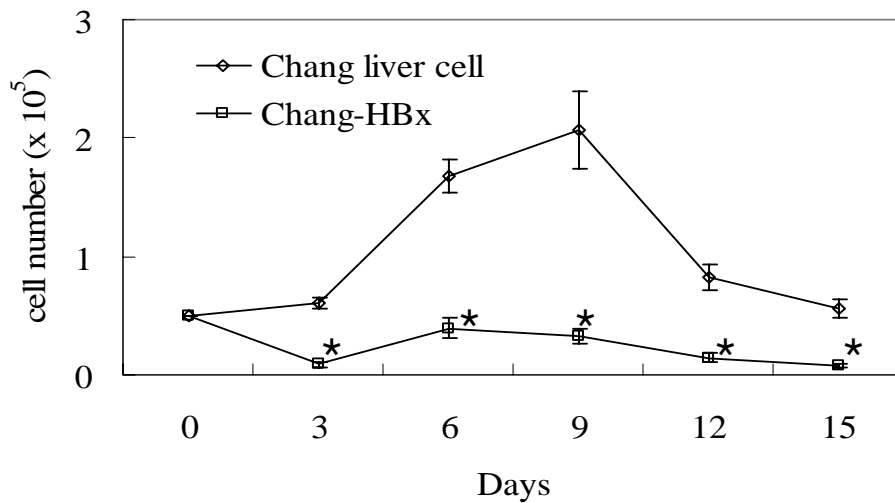
圖八、以免疫螢光法測試不處理tetracycline後第24小時，Chang-HBx細胞株表現HBx蛋白質的情形，以Chang liver cell 作為對照組。在200倍的顯微鏡視野下，以低和高解析度的顯微鏡照片圖表示。圖中紅色訊號顯示為propidium iodide染色，表示為細胞核，綠色訊號為FITC的螢光綠色訊號，表示為HBx蛋白質的表現。



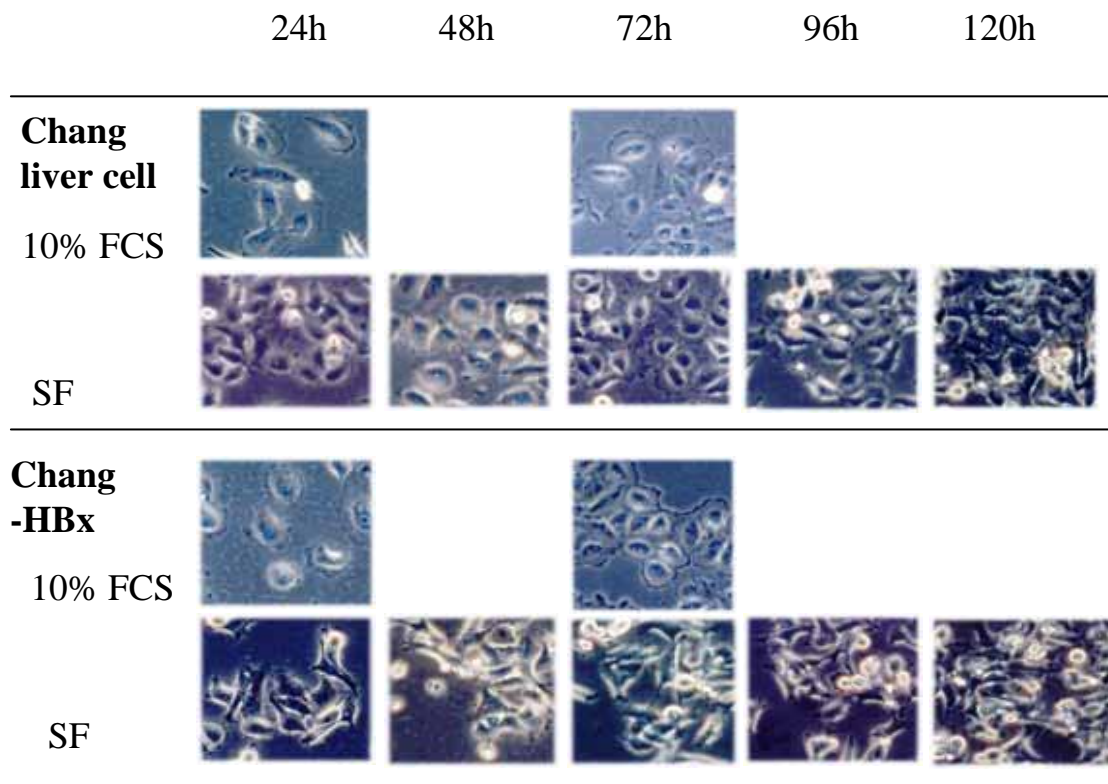
圖九、不同離心速率粗略將Chang-HBx細胞萃取液分層並以HBx單株抗體(MAB8419)分析HBx蛋白質的表現。約略分成細胞核層、粒腺體/lysosome/peroxisome層、細胞膜/ER/large polyribosome層。圖中T+，是處理1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的tetracycline，T-，是不處理tetracycline。箭頭標示為HBx蛋白質。



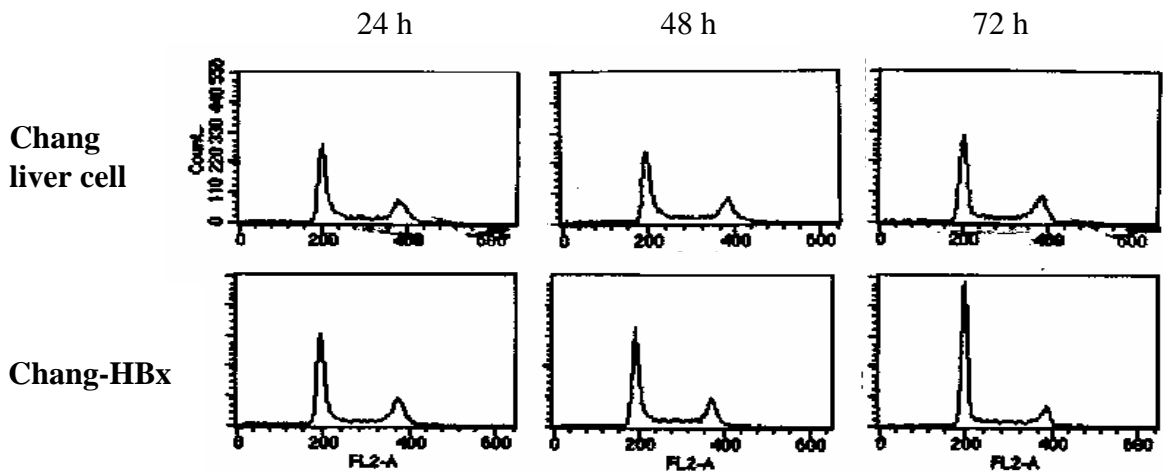
圖十、在含血清培養下的細胞生長曲線。種植 0.5×10^5 個細胞並作不同tetracycline(T+、T-)處理的條件，在第0、2、4、6、8小時收集細胞，並以trypan blue染色方式計算細胞數目。圖中縱軸為細胞數目，橫軸為細胞生長天數。星號(*)表示有顯著差異(ttest, $p < 0.05$)。菱形為Chang liver cell，方形為Chang-HBx細胞株，空心圖形為不處理tetracycline，實心圖形為處理 $1.5 \mu\text{g/ml}$ tetracycline。



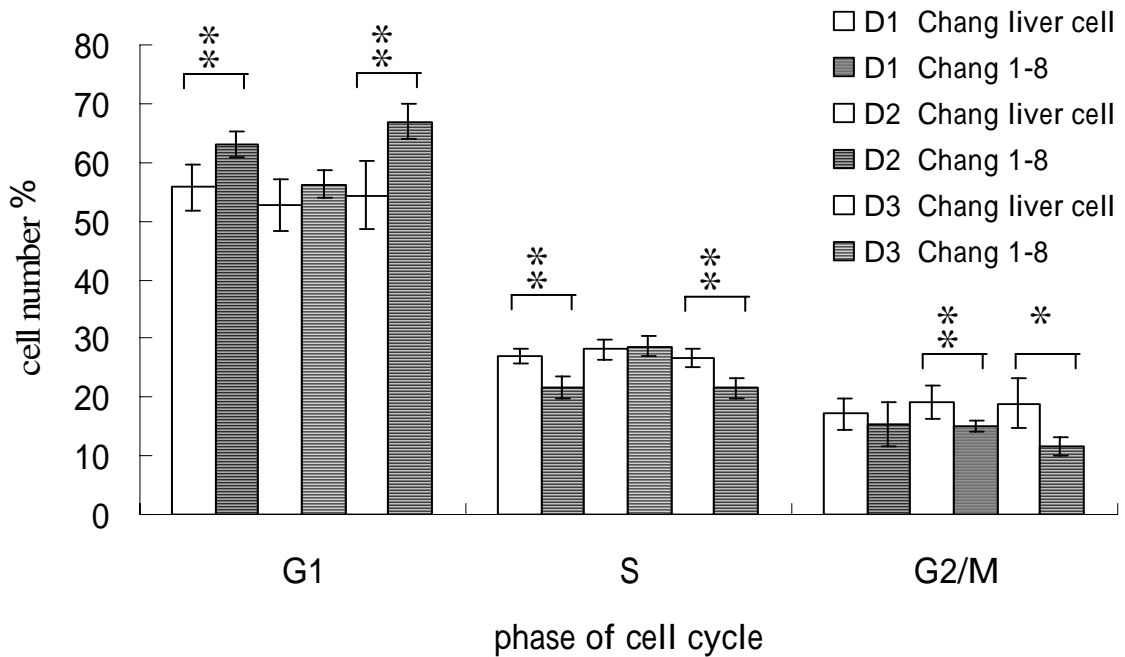
圖十一、在無血清培養下的細胞生長曲線。不處理 tetracycline 的情況下，種植 0.5×10^5 個細胞並在第 0、3、6、9、12、15 小時收集細胞，並以 trypan blue 染色方式計算細胞數目。圖中縱軸為細胞數目，橫軸為細胞生長天數。星號(*)表示有顯著差異(ttest, $p < 0.05$)。菱形為 Chang liver cell，方形為 Chang-HBx 細胞株。



圖十二、在含血清(10% FCS)和無血清(SF)培養條件下的細胞生長型態。圖示為在200倍的顯微鏡下觀察24、48、72、96、120小時的細胞型態。

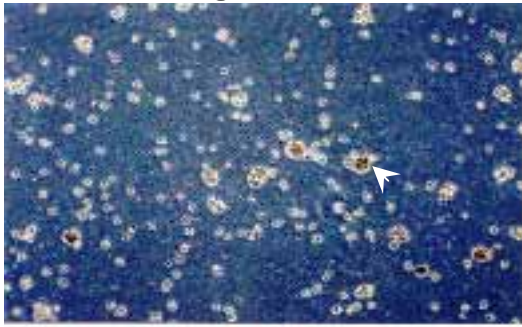


圖十三、細胞流式分析儀偵測propidium iodide染色的情形，分析無血清培養的細胞在第24、48、72小時的細胞週期分布。圖示分別是Chang liver cell和Chang-HBx細胞的結果，其中縱軸為細胞相對數量(%)，橫軸為PI染色得到的測量值。圖中第一個高峰為細胞處於細胞週期的G1期，第二高峰為G2/M期，介於第1個和第2個高峰之間的區域為S期。

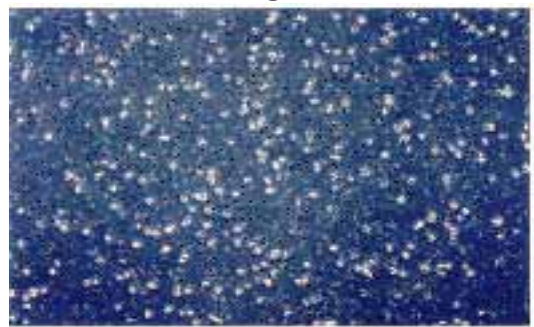


圖十四、細胞流式分析儀偵測propidium iodide染色的情形，分析無血清培養的細胞在第24、48、72小時的細胞週期分布數字化的結果。圖示分別是Chang liver cell和Chang-HBx(Chang 1-8)細胞的結果，其中縱軸為細胞相對數量(%), 橫軸為細胞週期的G1、S、G2/M三期。空心柱狀圖為Chang liver cell, 實心柱狀圖為Chang-HBx細胞。各細胞週期時期依次排列為24小時(D1)、48小時(D2)、72小時(D3)的相對細胞數量百分比。星號*表示2細胞間的结果具有顯著性差異(ttest, $p < 0.05$), **表示具有極顯性差異(ttest, $p < 0.01$)。

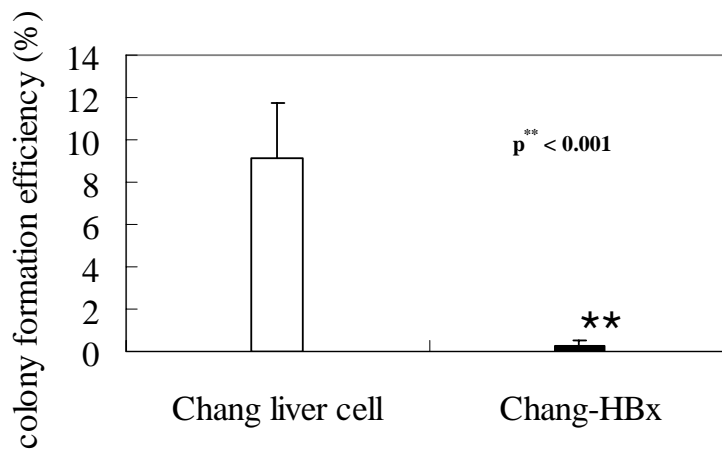
Chang liver cell



Chang-HBx



圖十五、軟膠分析細胞群落生長。1×10⁴個細胞在軟膠中生長2個星期後，Chang-HBx細胞和Chang liver cell分別在顯微鏡下以4倍的倍率拍照。圖中白色箭頭指示的為細胞生長形成的細胞群落。



圖十六、軟膠分析細胞群落生長的群落數量。1×10⁴個細胞在軟膠中生長3個星期後，計算6 cm培養盤中選取視野下的細胞群落數/選取視野下的總細胞數目，以百分比表示結果。**表示為極顯著差異(ttest, p<0.01)。

Chang liver cell

Chang-HBx



圖十七、在Balb/c裸鼠皮下進行細胞癌化能力的分析。圖中顯示為第15週Chang liver cell和Chang-HBx細胞在裸鼠的兩個腹側皮下生長情形。圖右下方的比例尺為1公分。

Chang liver cell



Chang-HBx



圖十八、在Balb/c裸鼠皮下進行細胞癌化能力的分析。圖中顯示為第10週Chang liver cell和Chang-HBx細胞在裸鼠的兩個腹側皮下生長情形，並在犧牲裸鼠後取出由細胞生長形成的組織塊。圖中使用的比例尺每一小隔為1 mm，10 mm=1公分。

Liver of
nude mice

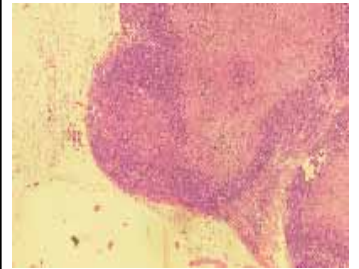
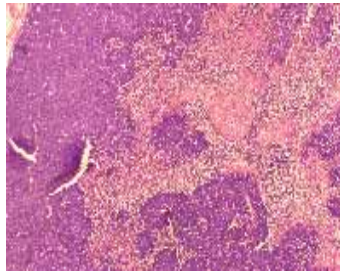
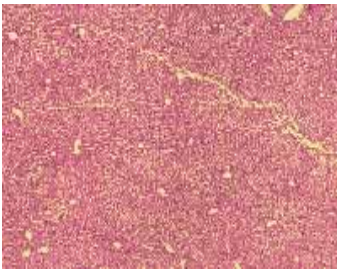
Tissues derived from
Chang liver cell

Tissues derived from
Chang-HBx

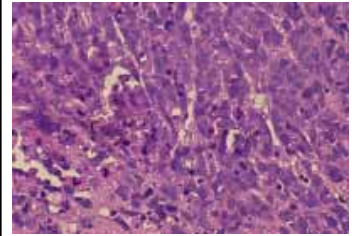
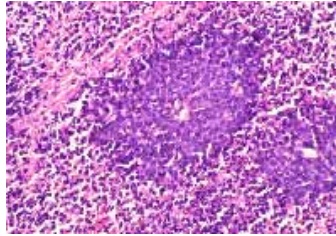
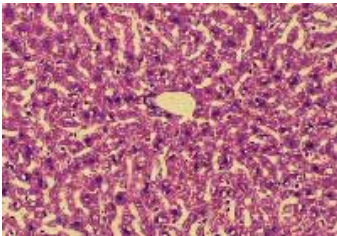
1x



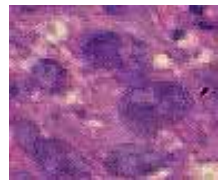
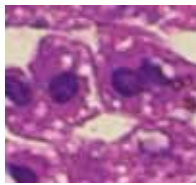
40x



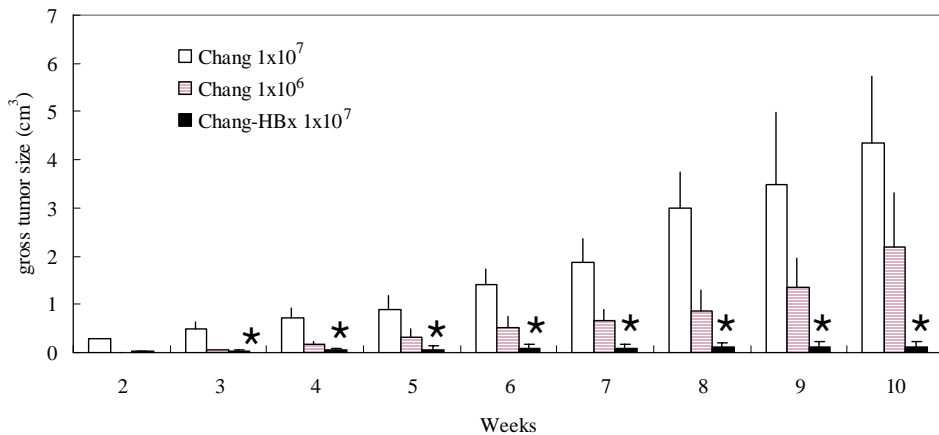
200x



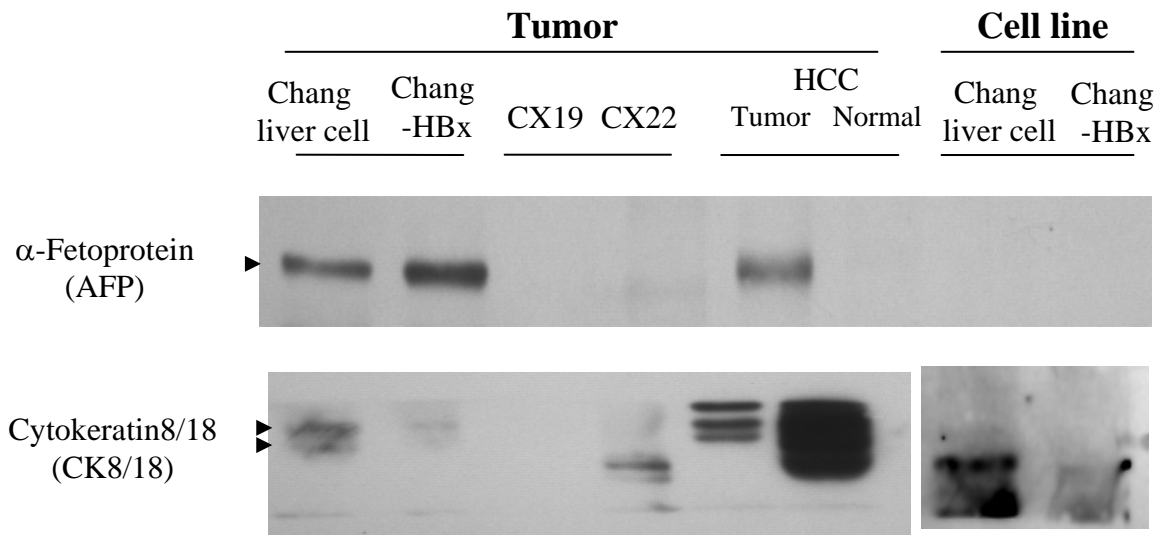
400x



圖十九、以石臘切片並HE(hematoxylin/eosin)染色的方法分析由細胞形成的組織塊。以裸鼠的肝組織作為對照組，圖中分別顯示為1x(目測)，40x、200x、400x(顯微鏡倍率)的結果。



圖二十、在Balb/c裸鼠皮下進行細胞癌化能力的分析。圖中顯示為第10週Chang liver cell和Chang-HBx細胞在裸鼠的兩個腹側皮下生長的每星期紀錄結果。Chang liver cell分別顯示 1×10^7 、 1×10^6 個細胞注射結果，Chang-HBx細胞顯示為 1×10^7 個細胞注射結果， 1×10^6 個Chang-HBx細胞注射後並未形成組織塊。*表示顯著差異 (ttest, $p < 0.05$)。

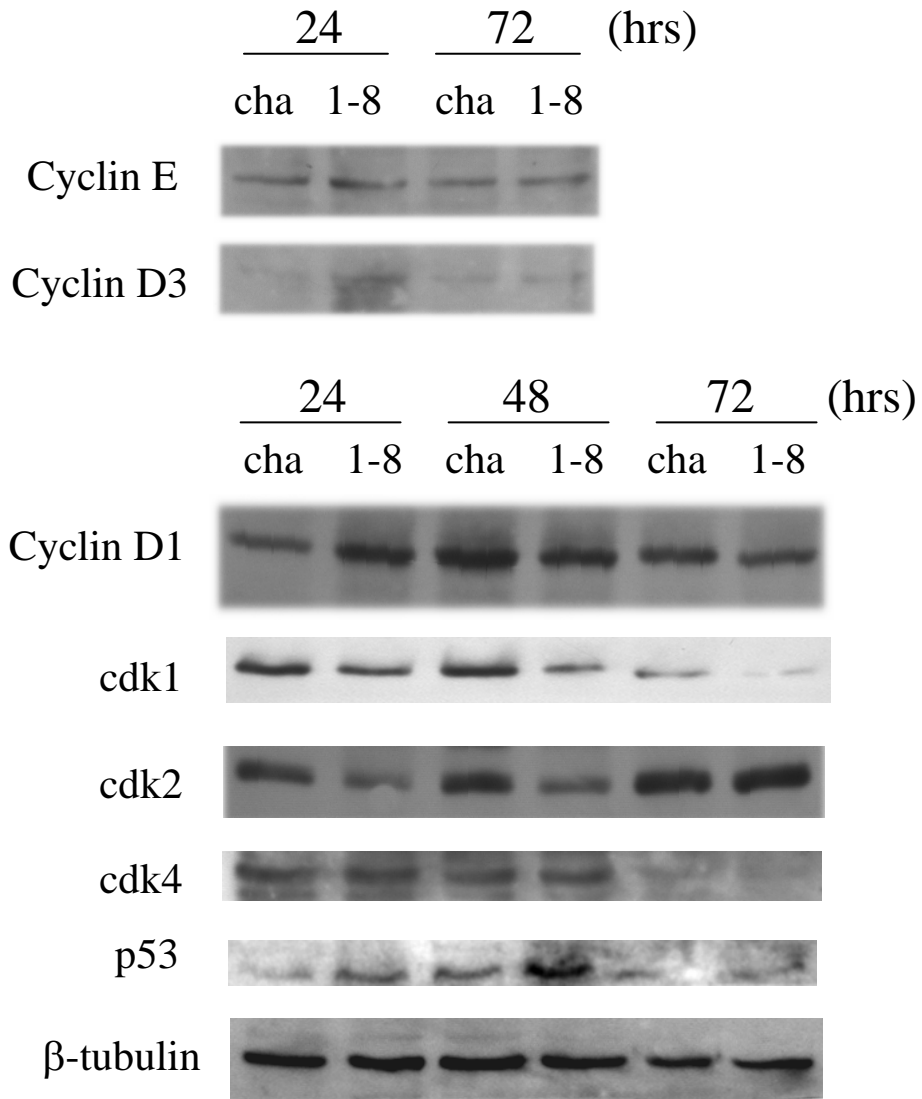


圖二十一、用西方點墨法和 α -fetoprotein抗體偵測的結果。每個well分別是裸鼠皮下生長的癌組織：Chang liver cell, Chang-HBx、子宮頸癌組織：Cx19, Cx22、2個肝癌病人組織、細胞株：Chang liver cell, Chang-HBx。分別以 α -fetoprotein(AFP)的抗體和cytokeratin 8/18(CK8/18)的抗體偵測。箭頭指示為偵測到的bands。

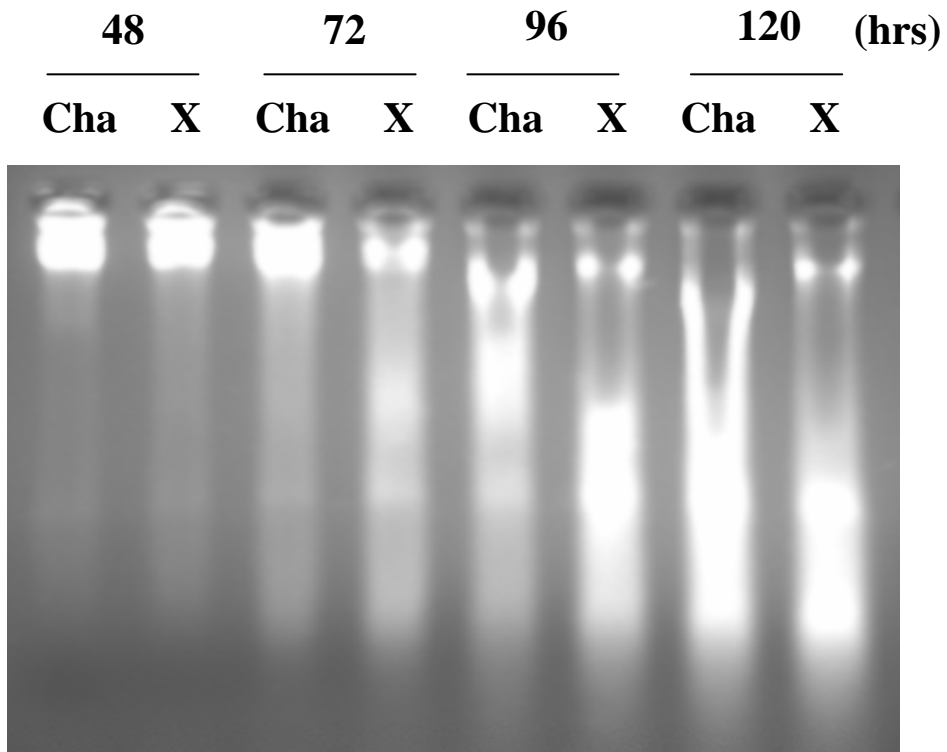
	Mice survival rate % (Survivor / total)	Tumor formation rate % (Formation one / total)	Total volume of tumors after injection for 10 weeks (cm ³)
Chang liver cell-injected nude mice	100 (9/9)	100 (9/9)	5.106±2.516
Chang-HBx cell-injected nude mice	88 (8/9)	66 (6/9)	0.914±0.799

(ttest, p**<0.0001)

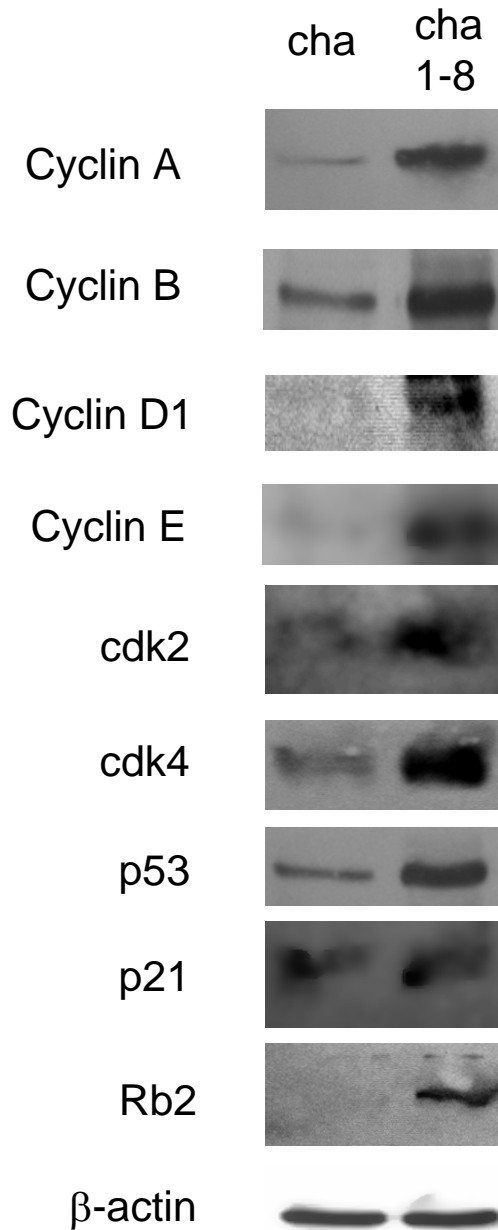
圖二十二、在Balb/c裸鼠皮下進行細胞癌化能力的分析。表中顯示的是所有進行分析的裸鼠個體器中老鼠的生存率(%)，肝癌組織形成率(%)，肝癌組織的總體積(cm³)。



圖二十三、用西方點墨法和cyclin D1, cdk1, cdk2, p53, cyclin D3, cyclin E抗體偵測的結果。在無血清培養下，分別收集24、48、72小時Chang liver cell(ch)和Chang-HBx(1-8)細胞萃取液。其中 β -tubulin為loading control。



圖二十四、在無血清培養下，分別收集48、72、96、120小時 Chang liver cell(cha)和Chang-HBx(1-8)漂浮的和貼附的所有細胞，抽取其細胞的DNA並以2% DNA電泳膠分析結果。



圖二十五、用西方點墨法和cyclin A、B、D1, cdk2、4, p53, p21、Rb2抗體偵測在裸鼠體表生長癌組織的萃取蛋白質的結果。分別以10 μ g的chang liver cell(ch)和chang-HBx(ch 1-8)衍生的癌組織萃取物作分析。

材料

DNA 抽取

Sol.I 50mM glucose, 25mM Tris-HCl pH8.0, 10mM EDTA pH8.0;
Sol.II 0.2N NaOH, 1% SDS; SolIII 5M potassium acetate,
11.5%glacial acetic acid; phenol/chloroform/ IAA 25:24:1; 3M
NaOAc; 無水酒精; 70%酒精; 去離子水

DNA 電泳膠

SeaKem LE agarose; 10mg/ml ethidium bromide; TBE 緩衝液 1L:
10.8g Tris base, 5.5g boric acid, 10mM EDTA pH8.0

Competent cell 製備

LB, LB agar 細菌培養液; 0.1M CaCl₂; 細菌保存液

細菌培養液

LB 1L: 10g tryptophan, 5g yeast-extract, 10g NaCl, pH7.0;
LB agar 1L: 10g tryptophan, 5g yeast-extract, 10g NaCl, pH7.0,

15g bacto-agar

細菌保存液

65% glycerol; 0.1M MgSO₄; 0.025 Tris-HCl pH8.0

核酸酵素切割

核酸限制內切酶; 緩衝液; 100ug/ml RNase; 去離子水

Transformation

Competent cell; DNA; LB 細菌培養液; LB agar 細菌培養液;

800ug X-gal;

800ug IPTG

PCR

50ul: 20uM HBs forward primer (#12500C)/reverse primer
(#6388G); HBx forward primer (#5871C)/reverse primer
(247426); HBc forward primer (#6359G)/reverse primer
(#6332G); 2.5U Taq polymerase/2U Hi-Taq polymerase; 緩衝

液; 0.2M dNTP 混合液; 0.1ng HBV 基因模板; 50ul 棉子油

電泳膠上純化 DNA

Qiaquick gel extraction kit; DNA 電泳膠; UV 燈; isopropanol

Ligation

Vector; Insert; T4 ligase; 緩衝液; 0.6mM ATP; 去離子水

核酸定序

3.3pM forward primer/reverse primer; 300ng DNA

5% FBS DMEM/ 10% FCS DMEM 肝細胞培養液

DMEM; 5% FBS/10% FCS; penicillin/streptomycin; L-glutamate;
non-essential amino acid

TEG

1L: 2.5mM EDTA; 2.8mM glucose; 0.4g KCl; 8g NaCl; NaHCO₃;

2mg phenol red; 0.5g Trypsin; pH7.0

細胞培養

5% FBS DMEM/ 10% FCS DMEM (Gibco BRL)細胞培養液; PBS; TEG;

37°C, 5% CO₂ 細胞培養箱

細胞儲存液

70% FBS/FCS; 20% DMEM; 10% DMSO

細胞計算

0.4% trypan blue(in PBS); 細胞計數器

Hygromycin 50%細胞致死率

Hygromycin B

細胞轉染 (Transfection)

DNA; Lipofectamine; DMEM; PBS; 5% FBS DMEM (Gibco BRL)細胞培養液;

穩定細胞株建立

Trensfection: DNA, Lipofectamine, DMEM, PBS, 5% FBS DMEM (Gibco BRL) 細胞培養液; Hygromycin; tetracycline; IPTG; HBx monoclonal antibody; GST-HBx polyclonal antibody;

pTet-Lac-Hyg 基因表現調控

Tetracycline; IPTG

蛋白質萃取

RIPA 緩衝液: 50mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 1% Nondiet P-40, 0.25% Na Deoxycholate, 5mM EDTA pH 8.0, 1mM EGTA pH 8.0, 5% 2-mercaptoethanol, 5 ug/ml leupeptin, 0.2 mM PMSF, 5 ug/ml aprotinin, 1 mM Na Vanadate, 1 mM NaF; PBS

蛋白質電泳膠

30% acrylamide: 30g acrylamide, 0.75g N, N'-methylenebisacrylamide; 1.5M Tris-HCl pH8.8; 1M Tris-HCl

pH6.8; 10% SDS; 10% ammonium persulfate; TEMED (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine)

2 倍蛋白質 loading dye

1M Tris-HCl pH6.8; 4% SDS; 0.2% bromophenol blue;
20%glycerol; 1M DTT

Coomassie blue 蛋白質染劑

2% Coomassie blue staining 溶液 500ml: 1g Coomassie
brilliant blue R250, 250ml methanol, 50ml acetic acid, 200ml H₂O

分部離心分離法(differential centrifugation)

西方點墨法

Transfer buffer 1 L: 5.82g Tris, 2.93g glycine, 9.375ml 10%
SDS; PVDF membrane, nitrocellulose membrane; Whatman 3MM paper;
methanol; 脫脂奶粉; antibodies; PBST: ; TBST: ;AP 緩衝液; AP
substrate:;ECL reagent

抗體

HBx; β -tubulin; Cyclin D1; CDK 4; Cyclin E; Cyclin B1; p53;
Rb 2;

免疫螢光細胞染色

PBS 緩衝液; 2% paraformaldehyde; Triton X-100; PBST; 潮濕
密封盒; paraffin; 100ug/ml RNase; 5ug/ml propidium iodide; 10%
normal goat serum; mounting medium (glycerol : PBS = 1 : 1);

指甲油

軟膠分析

2% agarose; 0.6% low melting agar (SeaPlaque, FMC); 2 倍
濃度的 5% FBS DMEM/ 10% FCS DMEM (Gibco BRL); 6 cm 細胞培養
盤

裸鼠分析

male BALB/c nude mice; PBS; 1ml 注射針筒

個人資料

姓名 王靜琪

性別 女

出生年月日 1975 年 1 月 4 日

籍貫 台灣省宜蘭縣

學歷 私立東海大學生物學系博士 (1999-2004)

私立東海大學生物學系碩士 (1996-1998)

私立東海大學生物學系學士 (1992-1996)

經歷 中研院分生所研究助理 (1998-1999)

私立東海大學生物學系分子生物學實驗室研究助理

私立東海大學生物學系免疫學、普通動物學、植物組織培養、
動物組織學、顯微技術學、微生物學、分子生物學等課程的
實驗助教

已發表著作：

1. 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 line. Virus Res. 102: 133-139.
2. Hwang, G.Y.*, Lin, C.Y., Huang, L.M., Wang, Y.H., Wang, J.C., Hsu, C.T., Yang, S.S., and Wu, C.C. 2003. Detections of the Hepatitis B

Virus X Protein (HBx) Antigen and Anti-HBx Antibodies in Cases of Human Hepatocellular Carcinoma. *J. of Clinical Microbiology* 41, 5598-5603.

3. Hwang, G.-Y., Wang, J.C., and Wu, C.C. 1999. Immunological characterization of two major secreted forms of recombinant hepatitis B virus e antigens. *Virus Res.* 59:203-210.

學術會議論文發表：

1. Wang, J.C., Hsu, S.L., and Hwang, G.Y. Inhibition of Tumorigenicity of the hepatitis B virus X gene in Chang liver cell line. The 18th Joint Annual Conference of Biomedical Science. March 22-23, 2003. Taipei, Taiwan.
2. Wang, J.C., Hwang, G.Y., and Wu, C.C. Immunological characterization of two major secreted forms of recombinant hepatitis B virus e antigen. The 15th Joint Annual Conference of Biomedical Science. March 25-26, 2000. Taipei, Taiwan.
3. Huang, C.C., Wang, J.C., Wu, C.C., and Hwang, G.-Y. Structural transformation of recombinant HBeAg by adding an unique signal peptide at N-terminus. The 14th Joint Annual Conference of Biomedical Science. April 10-11, 1999. Taipei, Taiwan.
4. Wang, J.C., Wu, C.C., and Hwang, G.Y. Recombinant Hepatitis B e antigen as Immunological agents for detection. The 13th Joint Annual Conference of Biomedical Science. April 18-19, 1998. Taipei, Taiwan.

Curriculum Vitae

Name: Jing-Chyi Wang

Birthday: January 4, 1975

Address: Department of Biology

University of Tunghai

Molecular Laboratories #513

181, Sec. 3, Chungkang Road,

Taichung, Taiwan, ROC

Phone: (886) 4-2359-0121#3240#22

FAX. (886) 4-2359-0296

E-mail: mrskate@hotmail.com

Education Background:

1999-2004 Ph.D. of Dept. of Biology, Tunghai University, Taiwan

1996-1998 Master of Dept. of Biology, Tunghai University, Taiwan

1992-1996 Bachelor of Dept. of Biology, Tunghai University, Taiwan

Professional Experience:

- Research assistant of Molecular Institute of Academia Sinica, Taipei, Taiwan (1998-1999)
- Research assistant of Dept. of Biology, Tunghai University, Taiwan
- Teaching assistant in immunology, animal science, plant tissue cultivate, histology, technic microscopy, microbiology, and molecular biology of Dept. of Biology, Tunghai University, Taiwan

Refereed Papers:

Wang, J.C., Hsu, S.L., and Hwang, G.Y. 2004. The role of hepatitis B virus X

protein in hepatocarcinogenesis. Ph.D. Dissertation 101pp. Tunghai University Press, Taiwan

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 line. *Virus Research* 102:133-139.

Hwang, G.Y., Lin, C.Y., Huang, L.M., Wang, Y.H., Wang, J.C., Hsu, C.T., Yang, S.S., and Wu, C.C. 2003. Detections of the Hepatitis B Virus X Protein (HBx) Antigen and Anti-HBx Antibodies in Cases of Human Hepatocellular Carcinoma. *J. Clin. Microbiol.* 41: 5598-5603.

Hwang, G.-Y., Wang, J.C., and Wu, C.C. 1999. Immunological characterization of two major secreted forms of recombinant hepatitis B virus e antigens. *Virus Res.* 59: 203-210.

Wang, J.C., and Hwang, G.Y. 1998. Epitope mapping of human hepatitis B virus e antigen. Master Dissertation 53pp. Tunghai University Press, Taiwan

Presentations in professional meetings:

Wang, J.C., Hsu, S.L., and Hwang, G.Y. Inhibition of Tumorigenicity of the hepatitis B virus X gene in Chang liver cell line. The 18th Joint Annual Conference of Biomedical Science. March 22-23, 2003. Taipei, Taiwan.

Wang, J.C., Hwang, G.Y., and Wu, C.C. Immunological characterization of two major secreted forms of recombinant hepatitis B virus e antigen. The 15th Joint Annual Conference of Biomedical Science. March 25-26, 2000. Taipei, Taiwan.

Huang, C.C., Wang, J.C., Wu, C.C., and Hwang, G.-Y. Structural transformation of

recombinant HBeAg by adding an unique signal peptide at N-terminus. The 14th Joint Annual Conference of Biomedical Science. April 10-11, 1999. Taipei, Taiwan.

Wang, J.C., Wu, C.C., and Hwang, G.Y. Recombinant Hepatitis B e antigen as Immunological agents for detection. The 13th Joint Annual Conference of Biomedical Science . April 18-19, 1998. Taipei, Taiwan.