

國立臺灣大學醫學院生物化學暨分子生物學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Biochemistry and Molecular Biology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

肝癌自體抗原之鑑定與生物標記開發

Identification of Autoantigens as Biomarkers in

Hepatocellular Carcinoma



施函君

Han-Chun Shih

指導教授：周綠蘋 博士

Advisor: Lu-Ping Chow, Ph.D.

中華民國 99 年 7 月

July, 2010

## 誌謝

碩士班兩年的生涯有如光陰似箭，這兩年來真的受到許多人太多的幫助，最感謝的當然是我的指導教授周綠蘋老師，感謝周老師給我機會進入實驗室學習磨練，感謝周老師不厭其煩的殷切指導、導正觀念，不僅訓練獨立思考與解決問題的能力，更讓我成長了許多，在此獻上最誠摯的敬意與謝意。

此外，也感謝陳健弘醫師、劉俊仁老師以及蔡孟勳老師百忙之中撥空前來參加我的學位口試、審核論文，修正邏輯與觀念上的盲點，並提供諸多寶貴的建議，得以讓論文撰寫更完美。

另外，在這期間也特別感謝文雅學姊這兩年來的實驗教導，讓我從對實驗懵懂懂到能獨立勇於面對實驗上的挫折，學姊總是不時的指導我，討論實驗方向，抽空指導我的論文寫作，總是不厭其煩的幫助我，真的非常非常感謝學姊。

本論文的完成，尚需感謝眾多人的幫助與鼓勵。首先，特別感謝正妹淑儀、帥氣育正、囂張聖燁總是聽我抱怨幫我分憂解勞，給予我關懷與鼓勵。接著，感謝學長姐竺陵、郁鈴、舒涵、音秀、千玲、成州、景光、昭圻、瑞傑、李豪、聰彥，同學宛欣及學妹書宇給予實驗上的鼎力相助及生活上的無限歡笑與回憶。

最後當然要感謝我的家人，感謝爸爸、媽媽、哥哥無私的付出與鼓勵，對我無限的關懷與疼愛，使我得以無後顧之憂的順利完成學業，願將這份榮譽和喜悅與你們共享。

## 摘要

肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是台灣最常見的惡性腫瘤之一，位居台灣十大癌症死亡原因的前二位。目前肝癌血液檢查的診斷方式是偵測甲型胎兒蛋白 (alpha-fetoprotein, AFP) 的含量，若 AFP 的量超過 20 ng/mL 則可能罹患肝癌，然而在慢性肝炎病人中肝細胞再生時 AFP 也會增高表特異性不佳，此外腫瘤小於兩公分的肝癌病人 AFP 的靈敏度只有 43 %，顯示 AFP 在肝癌早期無法成為有效的檢測工具，因此尋找有效的生物標記作為診斷肝癌早期的指標是非常重要的。腫瘤細胞異常表現的蛋白質會引發身體的免疫反應產生自體抗體 (autoantibody)，這些引起免疫反應的蛋白質稱為腫瘤相關抗原 (tumor-associated antigen, TAA)，過去利用血清蛋白質體分析 (serological proteome analysis, SERPA) 鑑定到數個可能為肝癌 TAA 的蛋白質，挑選肝癌血清反應較高的蛋白質 hnRNP L、DEAD、lamin A/C 與 hnRNP B1 作確認。由一維電泳免疫轉染法發現肝癌病人血清與 hnRNP L 及 DEAD 反應頻率較高，分別為 64.5 % 和 67.7 %，與正常人、B 型肝炎帶原者及肝硬化病人血清比較都有顯著差異， $p$  value 小於 0.01。肝癌病人血清與 hnRNP L 或 DEAD 有反應的頻率是 85.5 % 特異性為 45 %。肝癌病人血清與 hnRNP L 和 DEAD 同時有反應的頻率是 46.8 % 特異性為 95 %。利用酵素連結免疫吸附分析 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 發現肝癌病人血清對具有抗原決定部位 (epitope) 之短肽 hnRNP L 反應頻率較好，與其他三組血清比較  $p$  value 小於 0.01。為了實行多重生物標記偵測，初步利用 Illumina Veracode Carboxyl Beads 作為 multiplexed protein assay，發現肝癌病人血清與短肽 hnRNP L 反應的頻率是 67.0 %，與其他三組血清比較  $p$  value 小於 0.01。這些結果顯示 hnRNP L 與 DEAD 可為肝癌的 TAA，且短肽 hnRNP L 較適合作為肝癌生物標記。

關鍵字：肝癌，甲型胎兒蛋白，腫瘤相關抗原，hnRNP L，Illumina Veracode Carboxyl Beads

## Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC), one of malignant tumors in Taiwan, is the top two causes of cancer death. Serum alpha-fetoprotein (AFP), at a cutoff value of 20 ng/mL, is currently the most widely used tumor marker for diagnosis of HCC. However, some patients with cirrhosis or hepatic inflammation can have an elevated AFP. Furthermore, sensitivity of AFP decreases to 43 % when tumor diameter is less than 2 cm. It shows that AFP can't be an effective early detection tool for HCC so it's important to find valid biomarkers as early indicators of HCC. Abnormal proteins, also known as tumor-associated antigens (TAAs), expressed by tumor cells would trigger the immune response to generate autoantibodies. Many TAAs were identified by serological proteome analysis (SERPA) and four proteins, hnRNP L, DEAD, lamin A/C, and hnRNP B1, were selected to do further research. Using 1D immunoblot, hnRNP L and DEAD were identified as HCC-related antigens, showing a higher seropositivity, 64.5 % and 67.7 %, in HCC patients than in controls, HBV-carrier, or cirrhosis patients. In addition, combination of hnRNP L or DEAD showed a high seropositivity, 85.5 %, in HCC patients, and specificity is 45 %. Combination of hnRNP L and DEAD showed a high specificity, 95 %, and sensitivity is 46.8 %. It also showed that the peptide epitope of hnRNP L had a higher seropositivity in HCC patients than other three groups by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). For detecting multiple biomarkers, Illumina Veracode Carboxyl Beads as multiplexed protein assay was used to screen the peptide of hnRNP L, and results indicated that the seropositivity is 67 % in HCC patients. In brief, hnRNP L and DEAD may be HCC-related antigens, and the epitope of hnRNP L is better to be a biomarker for early diagnosis of HCC.

Keywords: hepatocellular carcinoma, alpha-fetoprotein, tumor-associated antigen, hnRNP L, Illumina Veracode Carboxyl Beads

## 縮寫

AFP: Alpha-Fetoprotein

APS: Ammonium Persulfate

BCA: Bicinchoninic Acid

BSA: Bovine Serum Albumin

CBB: Coomassie Brilliant Blue

DCP: Des- $\gamma$ -Carboxy Prothrombin

DEAE: Diethylaminoethyl

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DTT: Dithiothreitol

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid

FPLC: Fast Protein Liquid Chromatography

HBV: Hepatitis B Virus

HCC: Hepatocellular Carcinoma

HCV: Hepatitis C Virus

IEF: Isoelectrofocusing

IPG: Immobilized pH Gradient Gel

kDa: Kilo Dalton (s)

LC: Cirrhosis

MAPPING: Multiple Affinity Protein Profiling

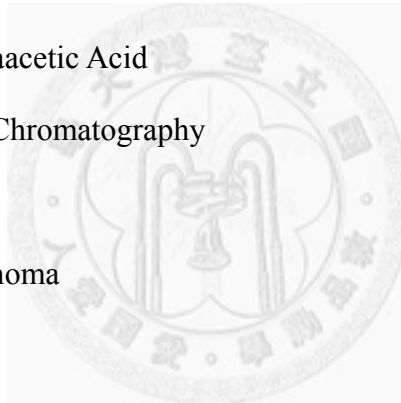
PAGE: Polyacrylamide Gel Electrophoresis

PBS: Phosphate-Buffered Saline

pI: Isoelectric Point

PVDF: Polyvinylidene Difluoride

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate



SERPA: Serological Proteome Analysis

SEREX: Serological Identification of Antigens by Recombinant Expression Cloning

TAA: Tumor-Associated Antigen

TEMED: N, N, N', N''-tetramethylenediamine



# 目錄

口試委員會審定書.....	i
誌謝.....	ii
中文摘要.....	iii
英文摘要.....	iv
縮寫.....	v
目錄.....	vii
第一章 導論.....	1
第一節 肝癌.....	1
第二節 肝癌診斷方法.....	4
第三節 肝癌腫瘤標記在臨床上之應用.....	6
第四節 本論文之實驗動機與策略.....	11
第二章 實驗材料.....	14
第一節 肝癌細胞株與生物檢體.....	14
第二節 藥品與試劑組.....	14
第三節 一級與二級抗體.....	16
第四節 重要儀器及相關耗材.....	17
第三章 實驗方法.....	19
第一節 肝癌細胞株之培養與其蛋白質之萃取.....	19
第二節 蛋白質定量、電泳與染色.....	20
第三節 蛋白質免疫定量分析法.....	24
第四節 差異性蛋白質鑑定.....	27
第五節 表現及純化重組蛋白質.....	28
第六節 Illumina Veracode Carboxyl Beads 作為 multiplexed protein assay.....	32
第七節 統計分析.....	35

第四章 實驗結果.....	36
第一節 肝癌相關的自體抗原之鑑定.....	36
第二節 利用一維電泳免疫轉染法確認 hnRNP L、DEAD、lamin A/C 與 hnRNP B1 是否可作為肝癌的生物標記.....	36
第三節 利用酵素連結免疫吸附分析法確認 hnRNP L 199-264、hnRNP L、 DEAD 與 lamin A/C 是否可作為肝癌的生物標記.....	39
第四節 VeraCode Carboxyl Beads 作為 mutiplexed protein assay 篩檢 hnRNP L 199-264.....	41
第五章 討論.....	43
第一節 實驗方法討論.....	43
第二節 hnRNP L 在癌化可能的角色.....	46
第三節 DEAD 在癌化可能的角色.....	47
第四節 本研究之缺陷.....	48
第五節 結論.....	48
第六節 未來展望.....	49
參考文獻.....	50
圖表.....	57



# 第一章 導論

## 第一節 肝癌

### 一、肝癌的臨床病理

肝癌 (liver cancer) 是在全球人口統計中發生最為頻繁的癌症之一，其死亡率在全世界癌症高居第三。在台灣，肝癌也名列台灣十大癌症死亡原因的前兩名。肝癌是泛指肝臟的惡性腫瘤，涵蓋各種肝臟本身所長出來的原發性肝癌 (primary liver cancer)，以及由其他器官轉移到肝臟的轉移性肝癌 (secondary liver cancer)。原發性肝癌又包含各種惡性腫瘤，這是由於肝臟器官是由許多種類的細胞所組成，最主要的成份是肝細胞，其他還有膽管細胞、血管細胞、平滑肌細胞、脂肪組織、淋巴組織等，其各自可能發展成為肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)、膽管癌、血管肉瘤以及平滑肌瘤等等 [1]。其中，肝細胞癌在肝癌中占了約 90%，膽管癌在肝癌中占約不到 10%，其餘則更少。

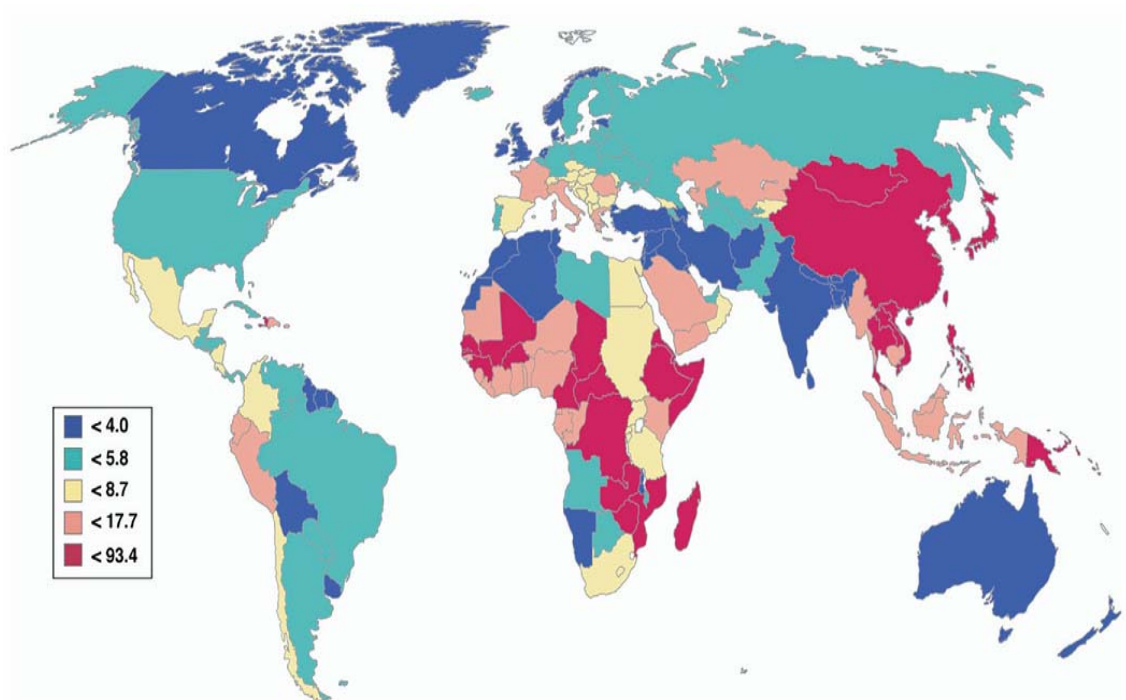
### 二、肝癌的流行病學

#### 1. 在台灣的发生率

肝細胞癌 (以下簡稱肝癌) 的發生率在男性是每十萬人有二十五人，在女性是每十萬人有十人。年發生率在慢性 B 型肝炎病人中是 0.826%，在大於三十五歲的慢性 B 型肝炎病人中是 2.77%，在肝硬化的病人中是 5.6%，在 B 型肝炎病毒表面抗原陰性的肝硬化病人是 4.5-6.2%，在 B 型肝炎病毒表面抗原陽性的肝硬化病人是 5.7-7.7%。[57]

#### 2. 地理上的差異性

肝癌在全球的分布，主要是分布在沙哈拉沙漠以南的非洲，還有東亞地區，中國就占了超過 50% [2] (圖 A)。在台灣，肝癌的死亡率在東部山區顯著較高，在西部山區則較低，最高的死亡率見於澎湖群島 [57]，值得注意的是部分高死亡率區域恰好也是烏腳病盛行區，此點顯示環境因素對肝癌的發生也占重要地位。



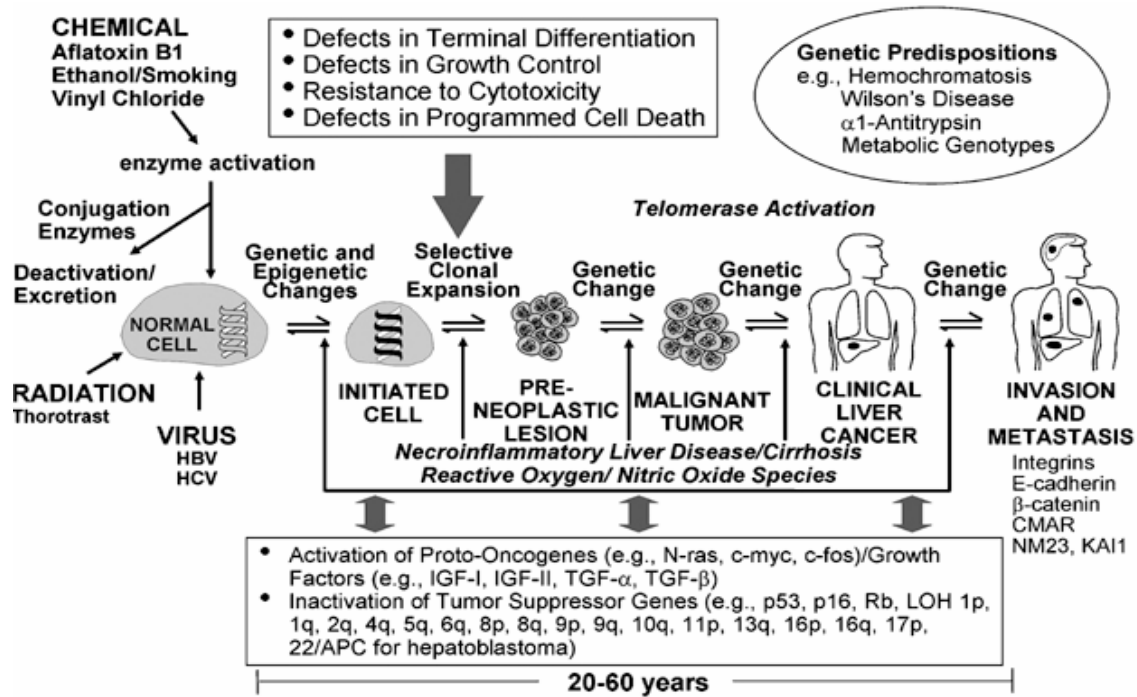
(圖 A：紅色區塊是肝癌在全球分布最多的區域，如沙哈拉沙漠以南的非洲、東亞地區等。[2])

### 3. 性別、年齡與肝癌的關係

男性罹患肝癌的比率大約是女性的四到八倍，且從肝癌死亡率的長期趨勢看來，男性的死亡率增加，而女性則無多大的改變 [57]，此種男女有別的結果暗示除了 B 型肝炎病毒之外，其他的因素 (如性荷爾蒙) 在肝癌的病因學上佔有很重要的角色。另外，肝癌最盛行的年齡見於 50 至 60 歲之間，小於 40 歲罹患肝癌者只佔 10%。

### 4. 肝癌的危險因子 (risk factor)

肝癌如何發生，至今仍不清楚，而肝癌相關的危險因子包括 B 型肝炎病毒、C 型肝炎病毒、酒精、藥物、黴菌毒素、血色素沈積症以及任何原因所引起的肝硬化等，均可導致肝癌 [3] (圖 B)。



(圖 B：肝癌常見的危險因子有 B、C 型肝炎病毒，還有化學物質包含了黃麴毒素、抽菸喝酒等。[3])

### **B型肝炎病毒 (Hepatitis B Virus, HBV)**

B 型肝炎病毒是肝癌最關鍵的危險因子 [4, 5]。據估計全世界有三億五千萬的人口為 B 型肝炎病毒之帶原者，亦即在他們的周邊血液中可偵測到 B 型肝炎表面抗原 (HBsAg)，而其大部分是從母親懷孕或是在嬰幼兒期受感染所導致。在 B 型肝炎病毒盛行的地區，肝癌好發於男性，發生率比約為女性的七倍。有肝癌家族史的 B 型肝炎帶原者，發生肝癌的危險性則更高。

### **C型肝炎病毒 (Hepatitis C Virus, HCV)**

C 型肝炎病毒和肝癌的關係是近十年才被確認 [5, 6]，C 型肝炎病毒也是經由血液傳遞，而且是歐洲、日本及美洲主要的肝癌危險因子。已開發國家的肝癌發生率上升，可能和三十年前 C 型肝炎病毒之盛行有關。相較於 B 型肝炎病毒相關的肝癌病人，C 型肝炎病毒相關的肝癌病人其肝臟可能沒有較嚴重的肝硬化或纖維化。

### **肝硬化 (Cirrhosis, LC)**

肝硬化和許多病因有關，包括 B 型肝炎病毒、C 型肝炎病毒、慢性酒精濫用、代謝異常和其他可能毒性物質，這些原因皆可能使肝細胞損傷、再生而導致肝硬化。然而，台灣大部分肝硬化病人皆是由 B 型肝炎病毒、C 型肝炎病毒所引起 [7]。肝硬化和細胞損傷及替代的速率上升有關。

### **黃麴毒素 (Aflatoxin, AFB1)**

黃麴毒素是由黃麴菌和相關黴菌產生，是動物強力致癌物，在亞洲因食物儲存方式，也是主要致病因子。黃麴毒素 [8] 在非洲及東南亞地區的肝癌發展上扮演很重要的角色，且還發現非洲和東南亞的居民血清中有較高的黃麴毒素嵌合物之濃度。有流行病學研究指出，受到黃麴毒素嚴重污染的地區，通常有較高的肝癌發生率，而黃麴毒素也可能是 B 型肝炎病毒帶原者發生肝癌的另一導致因素。

### **酗酒**

肝癌最大的禍首，除 B 型及 C 型肝炎病毒外，酗酒也是最常見的危險因子之一 [9, 10, 11]，每日飲酒超過八十克且超過十年者，則罹患肝癌的危險性增加五倍，若每日飲用不超過八十克，則危險性不高 [58]。對酒精性肝硬化的病患，每年發生肝癌的機率約 1 %；另外，肝癌也可發生在沒有肝硬化的酒精性肝病病患身上。對於 B 型肝炎帶原病患而言，飲酒則會增加三到四倍罹患肝癌的危險性；對 C 型肝炎病患飲酒則增加約兩倍罹患肝癌的危險性。

### **藥物**

某些藥物服用過量有可能會導致肝癌，尤其是調節體質的藥物，例如類固醇、男性荷爾蒙、動情素及蛋白質荷爾蒙等等 [12]。

## **第二節 肝癌診斷方法**

### **一、血液檢查**

抽血檢驗是診斷肝癌最簡單方便的方法之一 [13]。其中又以血清中的甲型胎兒蛋白 (alpha-fetoprotein, AFP) 最常見，可作為肝癌的腫瘤標記。正常人的甲型胎

兒蛋白一般來說應在 20 ng/mL 以下，如果超過了這個上限，就有可能罹患肝癌。但是，肝臟在發炎後、細胞再生時，或懷孕婦女，其甲型胎兒蛋白也會升高。所以，通常檢驗甲型胎兒蛋白外會再配合影像檢查才能作出準確的判斷。一般而言，85% 大型肝癌之甲型胎兒蛋白會升高，但是三公分以下的小型肝癌，大約只有三分之二的病人甲型胎兒蛋白會升高。因此，檢查時甲型胎兒蛋白值正常並不能完全排除不會罹患肝癌。

## 二、影像檢查

影像檢查包括腹部肝臟超音波掃描、腹部電腦斷層檢查、血管攝影及核磁共振檢查 [14]。對於肝癌的診斷十分具有參考價值，也能彌補血清檢驗之不足。

### 1. 超音波掃描

超音波掃描是近年來診斷肝癌最常使用的影像檢查工具 [15]，它最大的好處就是方便且不具侵襲性，病人也不會有痛苦。對於肝內的腫瘤，即使小至一公分，都可以偵測出來。超音波除了可以偵測肝癌的大小、位置之外，肝癌是否有侵入血管或膽管，病人有沒有腹水或肝硬化，都可以看得出來。因此對於這些情況的瞭解，對選擇治療方式時具有相當重要的參考價值。然而超音波掃描的準確性與檢查者的經驗技術相當有關係，有時單純的超音波掃描無法正確分辨腫瘤的性質，所以往往還是需要進一步檢查加以確定。

### 2. 電腦斷層或核磁共振檢查

電腦斷層或核磁共振檢查，對於肝腫瘤的性質可提供進一步的訊息 [16]。有時候病人的甲型胎兒蛋白持續升高，但在超音波掃描卻找不到可疑的病兆，例如有些肝癌是屬於浸潤型，而非明顯的腫塊，在超音波掃描上無法區分肝癌與肝硬化之差異性，需要仰賴其他影像檢查加以判別。電腦斷層或核磁共振掃描，也可檢查肝外之淋巴結或腹腔內的大血管有沒有受到侵害，對於肝癌的治療有重大的影響。電腦斷層掃描缺點是須要注射顯影劑，有極小部份的人會對顯影劑過敏。

### 3. 血管攝影

血管攝影，因為它具有侵襲性，病人接受這種檢查時程序比較繁複，也比較痛苦。所以如果遇到以下這些情況，需要藉由血管攝影來檢查：

- (1) 甲型胎兒蛋白的值持續上升，但其他檢查項目都無法發現肝癌時。
- (2) 超音波、電腦斷層和核磁共振掃描等都沒有辦法確定肝腫瘤的特性時。
- (3) 藉由血管攝影檢查進一步確定肝癌腫瘤的數目，因為腫瘤的數目常常會影響肝癌治療的方式。

### 三、組織病理檢查

診斷肝癌最直接的方式應當是病理組織的診斷。病理組織取得的方式有兩種：穿刺或開刀。肝穿刺 (liver biopsy) 是在超音波引導下用細針直接刺入病人的肝臟採取組織切片 [17, 18]。開刀則必須進行剖腹後再切取肝臟腫瘤組織。一般來說，如果抽血檢查甲型胎兒蛋白異常升高，配合其他檢查也顯示有肝癌，則可考慮直接加以治療。但是，如果連血管攝影都無法確定肝腫瘤的性質時，便必須考慮穿刺切片。

## 第三節 肝癌腫瘤標記在臨床上之應用

### 一、生物標記與腫瘤標記的定義

生物個體在發育生長的過程中，隨著生理的變化，體內如 mRNA、蛋白質、荷爾蒙等生物分子也會有不同程度的增減。當細胞受到刺激時所造成的 DNA 突變或修飾，或是當細胞嚴重受損而使得蛋白質流失至血液或體液 (如胸水、腹水)，上述產生質變或量變的生物分子，可反應出生物個體當下的生理狀況，因此稱生物標記 (biomarker)。

腫瘤標記 (tumor marker) 有兩個層面的定義。廣泛的定義泛指任何與惡性腫瘤有關聯者，可藉以表現腫瘤的存在，病患身上血液、尿液或身體組織成份因癌症而有所改變，都是屬於腫瘤標記，可以預測腫瘤發展所引發的危機或未來的行

徑，亦即在有癌細胞狀況下，由癌細胞或正常細胞直接產生的物質都可能可以作為腫瘤標記。狹義的定義是指在血清、血漿或尿液中循環之腫瘤相關標記。在臨床上，要有癌症發生後就可以早期偵測到身體所含的最小腫瘤，這需仰賴分析方法之靈敏度，另外，臨床醫師也關心這標記對研究學者想找的腫瘤的特異性是否值得信賴。

## 二、腫瘤標記在癌症檢測與診斷上的應用

癌症是目前人類醫學所面臨最重要的課題之一，現今對於癌症的腫瘤標記之研究開發也是越來越熱門了 [19, 20]，這是由於科學家們希望能藉由腫瘤標記作為偵測癌症早期發現的指標 [21]，利用血清腫瘤標記檢測，讓罹癌患者能及早發現，增加治癒機會。然而，目前能廣泛應用到臨床癌症檢測的腫瘤標記仍然很有限。近年來臨床上常用的癌症腫瘤標記包括 CA125 在卵巢癌的檢測 [22]、PSA 在前列腺癌的檢測 [23]、CA15-3 在乳癌的檢測 [24] 以及 AFP 在肝癌的檢測 [25, 26, 27] 等等。以下針對診斷肝癌常用之血清腫瘤標記做介紹：

### 甲型胎兒蛋白 (alpha-fetoprotein, AFP)

AFP 是一個醣蛋白 (雙鏈醣複合物)，分子量約 70 kDa 左右。在健康個體中，其平均濃度約 10 ng/mL。臨床上已將 20 ng/mL 作為診斷肝癌的篩檢值 (cutoff value)。雖然 AFP 是臨床上使用最久的肝癌標記，但它在早期診斷上有其限制。事實上，AFP 在其他疾病狀態下也會升高。百分之二十慢性肝炎病人血清中 AFP 有上升現象；在肝硬化病人中，百分之二十到五十病人 AFP 上升；此外 AFP 在肝癌病人上有起伏的情形，這些都使得在臨床上很難判斷肝臟是處於再生或發炎狀態，顯示 AFP 作為肝癌標記其特異性不佳，約在 80 %-99.4 % [28]。另外，根據文獻顯示，在腫瘤細胞小於兩公分時，AFP 的靈敏度也不理想，只有 43.5 % [29]。而且因為影像醫學技術的進步，早期診斷小型肝癌的機率也已上升許多。

### 脫羧基凝血酶 (des- $\gamma$ -carboxy prothrombin, DCP)

DCP 是一個不正常的凝血酶原 (prothrombin)，其蛋白 N 端十個麩氨酸

(glutamic acid) 皆沒有羧化，因此失去凝血活性，若偵測到 DCP 含量超過 40 mAU/mL 則可能罹患肝癌。雖然 DCP 比較具肝癌特異性，但是比 AFP 出現來的晚，因此在早期診斷上也比較不適合。DCP 其靈敏度約在 48.2 % [29, 30]，而特異性則有 95.9 %。DCP 在某些疾病狀態下也會上升，像是阻塞性黃疸和肝內膽囊炎，因此必須加以辨識。

### 甲型胎兒蛋白異質體 3 (AFP-L3)

AFP-L3 是總 AFP 中帶醣的部分，一般臨床篩檢值為 10 %，若是超過 10 %，則極有可能已經有肝癌生成或發生肝癌的機率增加。AFP-L3 診斷肝癌的特異性大於 95 %，靈敏度為 51 %。在腫瘤細胞小於兩公分時，AFP-L3 的靈敏度會下降到 35-45 % [13, 14]。

### 三、腫瘤相關抗原與其血清自體抗體之介紹

由於血液的檢測是最簡單快速且沒有侵略性的，因此一般所希望找的腫瘤標記為血清腫瘤標記，也就是在細胞要癌化時，在血液中會大量產生的即可作為血清腫瘤標記。血清腫瘤標記的種類有很多，其中血清自體抗體 (serum autoantibody) 就是本實驗室想探討的對象。

過去偵測血液中自體抗體的含量，往往是為了檢測是否有自體免疫疾病產生，當細菌或病毒感染並暴露出相似自身蛋白的抗原分子時，當宿主體內正常且隱藏性的抗原釋放到血液進入循環系統時，或自身蛋白突變等眾多原因，都有可能使免疫系統誤認為非自身的物質進而攻擊。而近年來，在許多癌症病患上，發現也有自體抗體的產生，最早的例子是在黑色素瘤 (melanoma) 中鑑定到腫瘤相關的自體抗原 [31]。

腫瘤抗原，是指細胞癌變過程中出現的新抗原及過度表達的抗原物質的總稱 [32]。若此抗原是腫瘤細胞特有的，或只存在於某種腫瘤細胞而不存在於正常細胞的新抗原，則稱作為腫瘤特異抗原 (tumor-specific antigen, TSA)，鑒於此類抗原一般通過動物腫瘤移植排斥實驗所證實，故又稱為腫瘤特異性移植抗原，然而，絕



大部份之腫瘤目前並無腫瘤特異抗原被發現；若是非腫瘤細胞所特有的、正常細胞和其他組織上也存在的抗原，只是其含量在細胞癌變的時候有明顯增高，此類抗原稱為**腫瘤相關抗原** (tumor-associated antigens, TAA)。

一般來說，腫瘤相關抗原都是經過後轉譯的修飾才會被免疫系統視為外來物，這些後轉譯的修飾包括糖化、磷酸化、氧化及蛋白質切割等，可導致新的 epitope 產生，或增加自身 epitope 所呈現的時間，使得容易被主要組織相容複合體及 T 細胞受體辨認、親合力變高，進而引發自體免疫反應。自體免疫反應下的產物便是自體抗體產生，因此，就可以藉由偵測血液中的自體抗體作為診斷早期癌症的指標 [31, 32, 33]，另外有的也可作為癌症上的免疫治療。

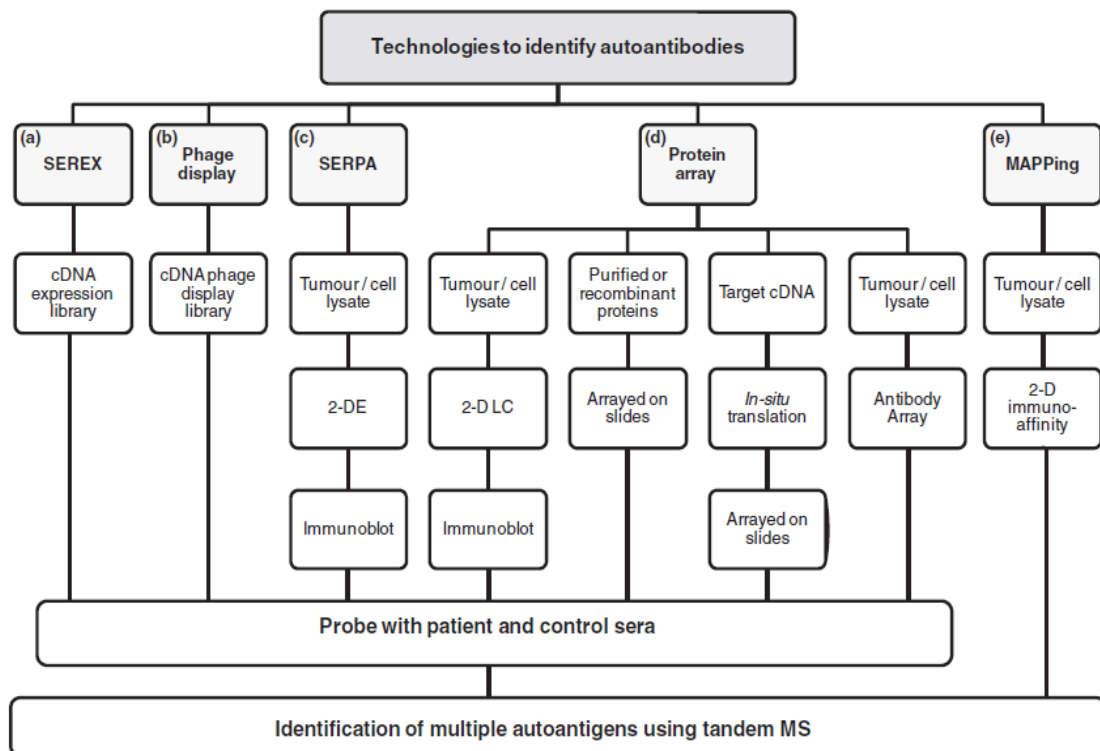
在許多研究上發現，大多的腫瘤相關抗原不是新生的抗原，而是自身抗原的異常表現所導致，最有名的例子便是肺癌病人中 p53 的點突變造成大量自體抗體的產生 [31]。這是由於在肺癌病人中，p53 在外顯子 (exon) 四到六的區域發生高突變點 (hot-spot)，使得 p53 的穩定度增加，進而增加免疫系統與其辨認的機會才導致 p53 自體抗原產生。更有趣的是，抗 p53 自體抗體與自體抗原辨認的位置，並非突變的區域，而是 p53 的 N 或 C 端區域，這更說明了自身蛋白質異常的穩定度亦可導致自體免疫。

至今對於腫瘤相關抗原所引發的體液性免疫反應的機制仍不是很清楚，但已經有許多假說被提出來 [31]。最常被大家所提及的假說是，異常癌細胞的死亡，由於癌細胞的死亡常常是伴隨著 necrosis 產生而非正常 apoptosis，因此會導致細胞內蛋白質的釋放，經由這樣反覆進行異常癌細胞死亡並暴露胞內蛋白質於血液中，使得自身的蛋白質被免疫系統辨認而成為自體抗原。另外一種常見的假說是，在正常細胞凋亡下，有些腫瘤相關抗原會吸引白血球及未成熟的樹突狀細胞前來，與這些免疫細胞的專一性受體作交互作用，腫瘤相關抗原這種趨化性活性便會引起細胞性免疫反應的產生。

不論如何，抗腫瘤相關抗原的血清自體抗體可以應用在癌症的早期診斷以及

治療是無庸置疑的。最近幾年，許多鑑定腫瘤相關抗原或其血清自體抗體的方法也已被發展出來。主要用來尋找腫瘤相關抗原的五大技術有，SEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning)、phage-display libraries、SERPA (serological proteome analysis)、protein array、MAPPING (multiple affinity protein profiling) [37, 38]。

SEREX 是利用病人的血清篩檢來自癌病變組織的 cDNA 表現資料庫，來找尋並鑑定腫瘤相關抗原。Phage display 是把蛋白質表現在 phage 的外表上，然後利用這種攜帶了特定的蛋白質的 phage，利用蛋白質彼此之間的交互作用去篩選想要的腫瘤相關抗原。SERPA 是利用病人血清篩檢癌細胞蛋白質，鑑定出可能的腫瘤相關抗原。Protein array 是將要篩檢的蛋白質點在晶片上，再與病人血清反應藉以鑑定腫瘤相關抗原。MAPPING 是經由兩次的免疫親合層析法，先以正常人血清去掉非專一的腫瘤相關抗原，再以病人血清抓住專一性的腫瘤相關抗原，並作質譜分析鑑定。[38] (圖 C)



(圖 C：鑑定腫瘤相關抗原以及其自體抗體的五大方法。[38])

## 四、蛋白質體學在癌症腫瘤標記的研究上之應用

當一個健康的細胞轉變成癌化的細胞時，不僅僅是基因上的改變，最終帶來的影響是蛋白質上量與質的改變。由於質譜學技術的不斷進步，突破了過去不能分析微量蛋白的限制，提高蛋白質鑑定的效率與可行性，使得蛋白質體學近年來發展極為快速，成為可以廣泛應用於各種領域的技術，尤其是在醫學領域當中，可應用於癌症的檢測與生物標記的發展上。

蛋白質體技術主要可分為兩層面，一是高解析度的蛋白質分離技術，另一個則是蛋白質身分鑑定所需的質譜技術。二次元膠體電泳有許多優點，像是容易取得、高解析度、分離蛋白質異構物或是特定修飾等等，然而，也有一些缺點存在，像是極端酸性或鹼性蛋白質分離效果差、分子量太大或太小不易在膠體上分離等等。另一類蛋白質體的技術轉向非膠體為基礎，亦即多維液相層析，蛋白質被水解為胜肽後，經不同性質管柱做液相層析分離，最後由質譜儀分析，優點是可以偵測到低含量蛋白質。近幾年來，常會結合二次元膠體電泳、多維液相層析與質譜學技術來找尋癌症相關之腫瘤標記 [34, 35, 36]，是蛋白質體學中使用最頻繁的工具。

## 第四節 本論文之實驗動機與策略

### 一、實驗動機

肝癌可以說是台灣的國民病，由於 B 肝及 C 肝的患者眾多，讓肝癌每年都在癌症排行榜上位居前一、二名。在台灣有許多病人被診斷出來為肝癌的時候都已經屬於末期，癒後情況並不理想。相對的，如果肝癌的高危險群都能定期接受檢查，早期發現肝癌，其實治癒的機會非常大。

近年來常使用的肝癌血清腫瘤標記 AFP [29]、DCP [30] 及 AFP-L3 [13, 14]，不是特異性不佳就是靈敏度不佳。AFP 升高不能排除發炎或其他疾病影響的可能

性，其特異性不佳。若是腫瘤標記 AFP 與 DCP 偵測出來的值沒有超過篩檢值，也不能完全解釋為沒有罹患肝癌。所以，為了解決單一腫瘤標記特異性不高或靈敏度不高的問題，許多研究逐漸朝向複合型的生物標記開發，期望透過多個腫瘤標記的篩選，提高診斷的特異性或靈敏度。因此，本實驗主要的研究目的是希望能利用蛋白質體學的技術，透過統計學的計算，尋找出有效的肝癌腫瘤相關抗原及其自體抗體，建立肝癌的複合型腫瘤標記，並期望可藉由診斷這些肝癌相關自體抗體，在臨床上作為肝癌早期檢測之指標。

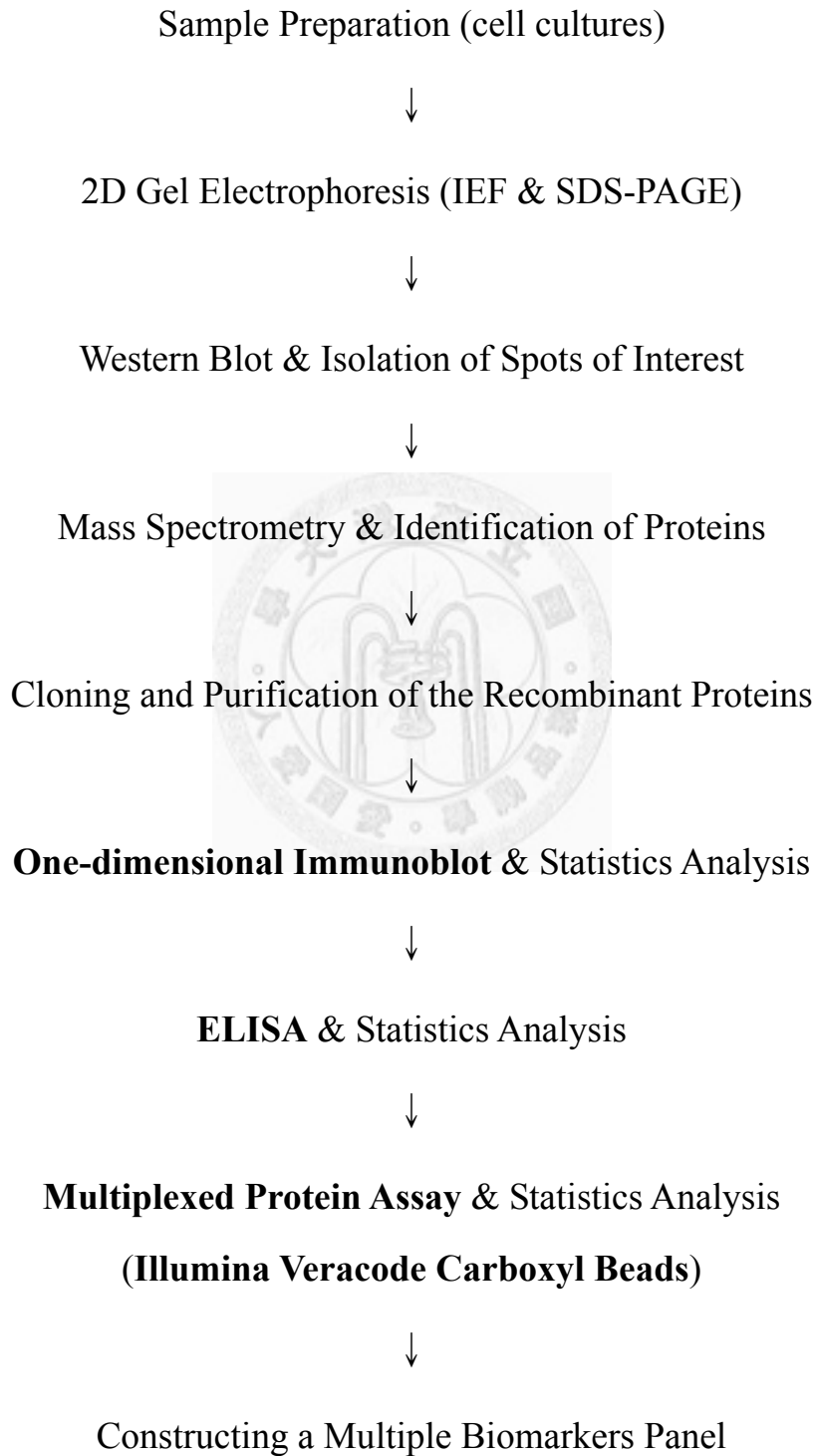
## 二、實驗策略

本實驗室過去利用血清蛋白質體分析 (serological proteome analysis, SERPA) 技術 [37, 38]，將 Hep3B 的總蛋白質利用二維電泳展開，一部份利用西方墨點法把膠體上的蛋白質轉印到 PVDF 膜上，再分別以正常人、B 型肝炎帶原者、肝硬化病人與肝癌病人的血清作為一級抗體去和 PVDF 膜上的蛋白質反應，另一部份作 CBB 的染色，挑選只有在肝癌病人這組有反應的點，將染上 CBB 膠片的該點，挖點作膠體內水解，並利用質譜分析作蛋白質的身分鑑定，鑑定到二十二種可能為肝癌腫瘤相關抗原的蛋白質，接著，利用二維電泳及西方墨點法，分別用正常人、B 型肝炎帶原者、肝硬化病人及肝癌病人血清各十個與膠片上蛋白質作反應，挑選與血清反應頻率盛行率較高的四個蛋白質，作後續的篩選。

因此，首先會先將四個蛋白質 (hnRNP L、DEAD、lamin A/C 與 hnRNP B1) 用一維電泳及免疫轉染法來篩選，利用適當的統計分析做確認，挑選出多個可能具有潛力作為肝癌腫瘤標記的肝癌腫瘤相關抗原。接著，再進一步利用酵素連結免疫吸附分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 作篩選，看是否可應用於酵素連結免疫吸附分析法上，並利用統計分析計算哪些有顯著差異。最後，也會初步利用 Illumina Veracode Carboxyl Beads 多重蛋白偵測 (multiplexed protein assay) 這項技術 [39, 40]，篩選過去實驗室找到的 epitope hnRNP L 199-264，比較一般酵素連結免疫吸附分析法偵測以及此項多重蛋白技術的優缺點，希望能將兩

種以上的腫瘤相關抗原應用在 Illumina Veracode Carboxyl Beads，並能對臨床診斷早期肝癌上有所助益。

### 三、實驗流程大綱



## 第二章 實驗材料

### 第一節 肝癌細胞株與生物檢體

#### 一、肝癌之細胞株

Hep3B，人類肝癌細胞株，分化良好，有腫瘤生成的特性，來源取自 ATCC® HB-8064™。

#### 二、生物檢體

肝疾病病人的血清，由台大醫院內科部主治醫師陳健弘醫師所提供，包含肝癌病人、肝硬化病人、B型肝炎帶原病人之血清。正常人的血清是由本實驗室同仁所提供的，作為實驗控制組的正常人之血清，定義為臨床上並未診斷出有任何肝臟疾病或癌症的正常人之血清。

### 第二節 藥品與試劑組

#### 一、藥品

藥品名稱	廠牌
DMEM	HYCLONE
Fetal Bovine Serum	HYCLONE
Penicillin/Streptomycin	INVITROGEN
Trypsin-EDTA	INVITROGEN
Phosphate Balanced Saline	HYCLONE
Bovine Serum Albumin	SIGMA
Acrylamide	Amercham Bioscience
N,N'-methylene-bis-acrylamide	Amercham Bioscience
Tris	Amercham Bioscience

SDS	Amercham Bioscience
Urea	Amercham Bioscience
DTT	Amercham Bioscience
Triton X-100	Amercham Bioscience
Tween 20	SIGMA
2-β-mercaptoethanol	MERCK
Comassie Blue	SIGMA
TEMED	MERCK
Bromophenol Blue	SIGMA
Ethanol	SIGMA
Methanol	MERCK
Glycerol	SIGMA
Imidazole	SIGMA
Potassium Chloride	SIGMA
Sodium Hydroxide	SIGMA
Glycine	SIGMA
Isopropanol	MERCK
Acetonitrile	MERCK
Acetic Acid	MERCK
Sodium Azide	SIGMA
HCl	SIGMA
NaOH	SIGMA
NaCl	SIGMA
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	和光純藥工業
NaHCO <sub>3</sub>	和光純藥工業

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	和光純藥工業
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	和光純藥工業
IPTG	SIGMA
Lysozyme	SIGMA
Sulfo-NHS	PIERCE
EDC	SIGMA
MES	SIGMA
LWM	Bio-Rad

## 二、試劑

試劑名稱	廠牌
BCA Protein Assay Reagent	PIERCE
2D Quant Kit	Amercham Bioscience
Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent	SIGMA
SureBlue Reserve™ TMB Microwell Peroxidase Substrate	SIGMA

## 第三節 一級與二級抗體

### 一、一級抗體

抗體名稱	廠牌
Anti-GST	Cell Signaling
Anti-His Tag	Santa Cruz

### 二、二級抗體

抗體名稱	廠牌
------	----



HRP-conjugated rabbit anti-human IgG	Santa Cruz
HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG	Santa Cruz
HRP-conjugated donkey anti-goat IgG	Santa Cruz
Anti-human IgG, Cy3 labeled	PIERCE

## 第四節 重要儀器及相關耗材

### 一、儀器

儀器名稱	廠牌
Ultrospec 3000 Spectrophotometer	Amercham Bioscience
Electrophoresis Power Supply 301/1001	Amercham Bioscience
Coulter Microfuge R Centrifuge	BECKMAN
Ultracentrifuge	BECKMAN
Microcentrifuge	BECKMAN
6173 pH Meter	JENCO
1020 Centrifuge	KUBOTA
Dry Bath Incubator	Major Science
Shaker	ORBITAL
Pipett	GILSON
Orbital Shaker	TKS
Hotplate Stirrer	Jlab Tech
TM-325 autoclave	TOMIN
Multichannel Pipett	RANIN

### 二、耗材

耗材名稱	廠牌
------	----

PVDF Transfer Membrane	MILLIPORE
96 Well Microplate	COSTAR
96 Stripwell Plate	THERMO
Paraffin	MENASHA
X-Film	FUJI
Tips	RANIN
Eppendorf	CORNING
Centrifuge Tube	BIOMAN



## 第三章 實驗方法

### 第一節 肝癌細胞株之培養與其蛋白質之萃取

#### 一、肝癌細胞株之培養

##### 1. 培養液 (medium) 配置

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 粉末狀培養基以二次蒸餾水完全溶解，加入 3.7 g 碳酸氫鈉，待其完全溶解將培養基調到 pH 7.2-7.4，以二次蒸餾水補到 1 L，接著通過 0.22  $\mu\text{m}$  細胞培養專用的無菌過濾膜，分裝備用。使用之前加入胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 及青黴素與鏈黴素 (penicillin/streptomycin, PS)，使最終濃度為 10 % FBS 以及 1 % PS。

##### 2. 細胞株培養 (cell culture)

肝癌細胞株以底面積七十五平方公分的培養瓶 (T75 flask) 培養，放置在 37°C、5 % CO<sub>2</sub> 的恆溫培養箱中。等到細胞長到八分滿時，以 PBS (phosphate-buffered saline) 沖洗細胞兩次，再加入含有 0.2 % EDTA 及 0.5 % 胰蛋白酶 (trypsin) 緩衝液 1 mL 使細胞剝落，在培養箱中靜置三到五分鐘，加入 1 mL 的培養液使胰蛋白酶的作用停止，將細胞均勻打散後，重新分配適量細胞到培養瓶或培養皿 (cell culture dish) 繼代培養 (sub-culture)。

#### 二、蛋白質之萃取

收集五大盤直徑十五公分的培養皿之肝癌細胞株 Hep3B，倒掉培養液並以 PBS 洗兩次，每盤加入適量 PBS 將細胞刮取下來收集到離心管中，以 1000 rpm 離心三分鐘，吸掉上清液，接著用 cell wash buffer 洗三次，收集成一管。加入適量 2D sample buffer，利用超音波震盪 sonicate 30 秒 (pulse on 5 秒，pulse off 5 秒)，以 13000 rpm 離心約 10 分鐘，取上清液，置於 -20°C 或 -80°C 保存。

## 第二節 蛋白質定量、電泳與染色

### 一、蛋白質濃度的測定

#### 1. BCA Protein Assay

用 BSA (bovine serum albumin) 建立一標準曲線，將試劑 A 與試劑 B 以體積 50:1 的比例混合配成操作溶液，每個樣品各取 10  $\mu$ L 加到 100  $\mu$ L 的操作溶液中混合均勻，在 37°C 下反應 30 分鐘，測定在 595 nm 時的吸光值。樣品濃度可由標準曲線換算而來。

#### 2. 2-D Quant Kit

用 BSA 建立一標準曲線，將相同體積待測樣品 (< 50  $\mu$ L) 置入 1.5 mL 試管中，每個樣品加入 500  $\mu$ L precipitant 劇烈搖晃並置於室溫下 2-3 分鐘。再加入 500  $\mu$ L co-precipitant 並混合均勻，以 14500 rpm 離心約 5 分鐘去上清液。接著加入 100  $\mu$ L copper solution 和 400  $\mu$ L 去離子水，劇烈震盪以溶解蛋白質樣品。最後加入 1 mL 呈色劑在室溫下靜置 15-20 分鐘，用 ELISA reader 測定在 480 nm 之吸光值，樣品濃度可由標準曲線換算而來。

### 二、一維膠體電泳——十二烷基磺酸鈉-聚丙烯醯胺膠體電泳法 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

#### 1. 膠體玻璃之架設

先取兩塊洗淨烘乾後的平面玻璃 (mini gel: 10  $\times$  10.5 cm, normal gel: 15  $\times$  15 cm)，以凹型的軟質膠片作為 spacer (12  $\times$  15  $\times$  0.1 cm)，以鐵夾夾住玻璃左右側，直立於桌上。

#### 2. 聚丙烯醯胺膠體之配製

Separating Gel 配製：取 A solution 3.4 mL、B solution 2 mL 及去離子水 2.7 mL，接著加入 5  $\mu$ L TEMED 以及 55  $\mu$ L 10% APS 混合均勻。將凝膠溶液注入裝置好的玻璃中，並在凝膠上方加入甲醇，靜置於室溫下。

Stacking Gel 配製：取 A solution 300  $\mu$ L、C solution 500  $\mu$ L 及去離子水 1.2 mL，接著加入 3  $\mu$ L TEMED 以及 9  $\mu$ L 10 % APS 混合均勻。將凝膠到入已凝固的 separating gel 上 (要先倒掉上方甲醇)，插入尺梳 (comb)，使 stacking gel 凝成凹槽狀，靜置於室溫下。

◎Mini-Gel 配方如下：

Unit: mL	Separating Gel					Stacking Gel
Percentage	7.5 %	10 %	12.5 %	15 %	17.5 %	-
Solution A	2.0	2.7	3.4	4.0	4.9	0.3
Solution B	2.0	2.0	2.0	2.0	2.1	-
Solution C	-	-	-	-	-	0.5
ddH <sub>2</sub> O	4.0	3.4	2.7	2.0	1.4	1.2
TEMED	5	5	5	5	5	3
10 % APS	55	55	55	55	55	9

◎各項溶液成分如下：

A solution：30 % acrylamide，0.8 % N,N'-methylene-bis-acrylamide。

B solution：1.5 M Tris-HCl，pH 8.8 緩衝溶液。(0.4 % SDS)

C solution：0.5 M Tris-HCl，pH 6.8 緩衝溶液。(0.4 % SDS)

### 3. 電泳緩衝溶液 (running buffer) 製備

取 3.0 g Tris-base、14.4 g glycine 以及 1.0 g SDS，補去離子水至 1 L，最後配成 25 mM Tris、192 mM glycine 以及 0.1 % SDS，且 pH 8.3。

### 4. 蛋白質樣品的處理 (sample preparation)

取適量的蛋白質量，加入 2X sample buffer (0.5 M Tris-HCl pH 6.8、10 % SDS、50 % glycerol、 $\beta$ -mercaptoethanol、coomassie brilliant blue)，置於 95°C 水浴加熱十分鐘。

將鑄好的膠的橡膠膠條拿掉，固定玻璃片在電泳槽中，有凹槽的一面朝內。

使電泳槽住滿電泳緩衝液，逐一加入處理好的蛋白樣品。電泳槽上層為負極，下層則為正極，固定安培數來進行電泳約兩小時（每片 15 mA，電壓不超過 200 V）。待指示劑跑到膠體最底部即完成電泳。

本實驗採用的標準蛋白質分子量 (Low-range Protein Molecular Weight Markers)

如下：

蛋白質名稱	分子量 (kDa)
Phosphorylase B	97.4
Bovine serum albumin	66.2
Ovalbumin	45.6
Carbonic anhydrase	31.0
Soybean trypsin inhibitor	21.5
Lysozyme	14.4

### 三、二維膠體電泳——等電點聚焦電泳法 (isoelectric focusing, IEF) 以及 SDS-PAGE

#### 1. 第一維：等電點聚焦電泳法 (IEF)

先將等電點梯度膠條 (immobilized pH gradient, IPG) 放入水合的容器槽中。加入水合化緩衝液 (8 M urea、0.5 % Pharmalyte 3-10、16 mM DTT、0.003 % Triton X-100、1 % Orange G)，置於水平桌面，水合時間約為 16 小時。

取 1 mg 的樣品以 100  $\mu$ L 樣品緩衝液 (8 M urea、2 % Pharmalyte 3-10、60 mM DTT、0.5 % Triton X-100、0.003 % bromophenol blue) 溶解，超音波震盪五分鐘，並在 37°C 下放置 1 小時以增加溶解度，以 13000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液即可開始進行第一維的 IEF 電泳分析。

取 pH 3.0-10.0 已水合的 IPG 電泳膠片，放入水平電泳槽中，再架上樣品槽，使之輕輕接觸 IPG 電泳膠片即可。接著加入 50-100  $\mu$ L 樣品溶液，再以覆蓋液蓋過電泳膠片的表面。將電源供應器調整成電源起始電壓在一分鐘內達到 500 V 並

且維持 5 小時，之後使電壓以梯度的方式漸增至 2000 V，自此維持 14 小時左右。

## 2. 第二維：十二烷基磺酸鈉-聚丙烯醯胺膠體電泳法 (SDS-PAGE)

將完成的第一維電泳的 IPG 膠片浸潤在平衡緩衝液 (6 M urea、1 % SDS、30 % glycerol、16 mM DTT、0.01 % bromophenol blue、10 mM Tris-HCl pH 6.8)，平衡十五分鐘。接著轉移 IPG 膠片到 SDS-PAGE 電泳裝置上進行第二維分析。第二維所製備的膠片大小為 26 × 20 公分，其濃度為 12.5 %。電源供應以固定 20 mA 但電壓不超過 200 V 為限。

## 四、電泳後的膠片染色

### 1. CBB 染色

#### (1) 染色

將跑完的電泳膠片取下浸泡在染色液中，均勻搖晃，室溫下約三十分鐘，直到整張膠片都染成深藍色，即可倒掉染液準備退染。

◎染色液配置：先將 240 mL 工業甲醇、160 mL 二次蒸餾水以及 200 mL 醋酸混合均勻，再加入四錠的 PhastGel™ Blue R-350 (Amersham Bioscience)，完全溶解後補二次蒸餾水到 2 L，過濾不溶物質即可使用。

#### (2) 退染

倒掉染液之後，加入適量的褪色液，旁邊可放擦手紙巾增加退染速度，褪至背景接近透明為止，再用二次蒸餾水來清洗，即可浸泡在乾淨的二次蒸餾水中保存。

◎褪色液配置：250 mL 工業甲醇以及 70 mL 醋酸，補二次蒸餾水到 1 L 混合均勻後即可使用。

### 2. 硝酸銀染色 (silver staining)

#### (1) 銀染染色流程

將跑完的電泳膠片取下置入塑膠盒中，加入固定溶液 (fixation solution) 反應

30 分鐘。倒掉固定溶液，加入感應溶液 (sensitizing solution) 反應 30 分鐘。反應完後倒掉感應溶液，以二次蒸餾水清洗三次，每次 5 分鐘，接著加入銀染反應溶液 (silver reaction solution) 反應 20 分鐘。倒掉溶液之後，再以二次蒸餾水洗兩次，每次 1 分鐘，再加入呈色溶液 (developing solution) 呈色約 2-5 分鐘，不可過長 (否則會染太深)，視染色深淺來移除溶液，最後加入終止溶液 (stopping solution) 室溫搖晃 10 分鐘，置換成二次蒸餾水即可保存。

## (2) 各項試劑成分

Fixation Solution : 40 mL 95 % 酒精，10 mL 醋酸，補二次水至 100 mL。

Sensitizing Solution : 30 mL 95 % 酒精，0.5 mL glutaraldehyde，4.0 mL sodium thiosulphate，6.8 g sodium acetate，補水至 100 mL。

Silver Reaction Solution : 10 mL silver nitrate solution，40  $\mu$ L formaldehyde，補水至 100 mL。

Developing Solution : 2.5 g sodium carbonate，20  $\mu$ L formaldehyde，補水至 100 mL。

Stopping Solution : 1.46 g EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，補水至 100 mL。

## 第三節 蛋白質免疫定量分析法

### 一、西方墨點法 (Western Blot)

#### 1. 蛋白質的轉染

準備好與膠片大小相同的 PVDF 轉印膜，先將 PVDF 轉印膜浸潤在 100 % 甲醇，使它從疏水性變成具有親水性的特質，再將它與跑好的膠片一起浸潤在轉印時所需的緩衝溶液 (10 mM CAPS、10 % MeOH，pH 11.0) 至少 3 分鐘。石墨板上依序鋪上 (1) 三張已浸潤過緩衝液的濾紙 (2) PVDF 之轉印膜 (3) 跑好的膠片 (4) 三張已浸潤過緩衝液的濾紙，鋪蓋的過程不可有氣泡產生，也要注意保持 PVDF 轉印膜以及膠片的濕潤，最後蓋上會接負極的石墨版。轉印所使用的毫安



培數為膠片的面積，通電時間約為 4 小時。

轉印結束之後，取出 PVDF 轉印膜染 fast green 染劑 (0.1 g fast green、10 mL acetic acid、26.3 mL 95 % ethanol，補水至體積 100 mL)，以確定蛋白質的位置及轉印效率。加入 fast green 數秒之後，即可用甲醇及去離子水清洗，待背景洗淨後再浸潤甲醇來風乾，剪裁並標示蛋白質名稱，即可準備進行抗體偵測。

## 2. 抗體與蛋白質反應

將 PVDF 轉印膜以甲醇浸潤後，即可泡在含有 5 % 脫脂奶粉的 TN 緩衝溶液 (20 mM pH 7.5 Tris-HCl、0.15 M NaCl) 中，室溫搖晃大約 1 小時以進行 blocking 的動作。倒掉反應液體，加入稀釋在含有 1 % 脫脂奶粉 TNT 緩衝溶液 (20 mM pH 7.5 Tris-HCl、0.15 M NaCl、0.5 % Tween 20) 的一級抗體 (血清抗體稀釋 1:1000)，置於 4°C 搖晃反應大約 16 小時。倒掉一級抗體並以 TNT 洗六次，每次 10 分鐘。再來進行二級抗體偵測，加入稀釋在含有 1 % 脫脂奶粉 TNT 緩衝溶液的二級抗體 (HRP-conjugated rabbit anti-human IgG antibody, 1:25000)，置於室溫搖晃大約 1 小時。倒掉二級抗體以 TNT 洗六次，每次 10 分鐘。

將 PVDF 轉印膜鋪在玻璃片上，加入適量的反應液 (Western Lightning™ Western Blot Chemiluminescence Reagent)，兩種溶液等體積並混合均勻，反應兩分鐘後吸掉多餘液體，即可將 PVDF 轉印膜放入暗盒 (cassette)，於暗房放入 X 光底片進行壓片，計時 3-5 分鐘。接著將底片放入顯影液直到可見陽性反應，水洗後再浸泡在定影液直到透明為止，用水洗淨後風乾保存。

## 二、酵素連結免疫吸附分析法 (enzyme-link immunosorbent assay, ELISA)

### 1. 溶液配製

Coating Buffer：1.59 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>，2.93 g NaHCO<sub>3</sub>，補水至 1 L，pH 9.5。

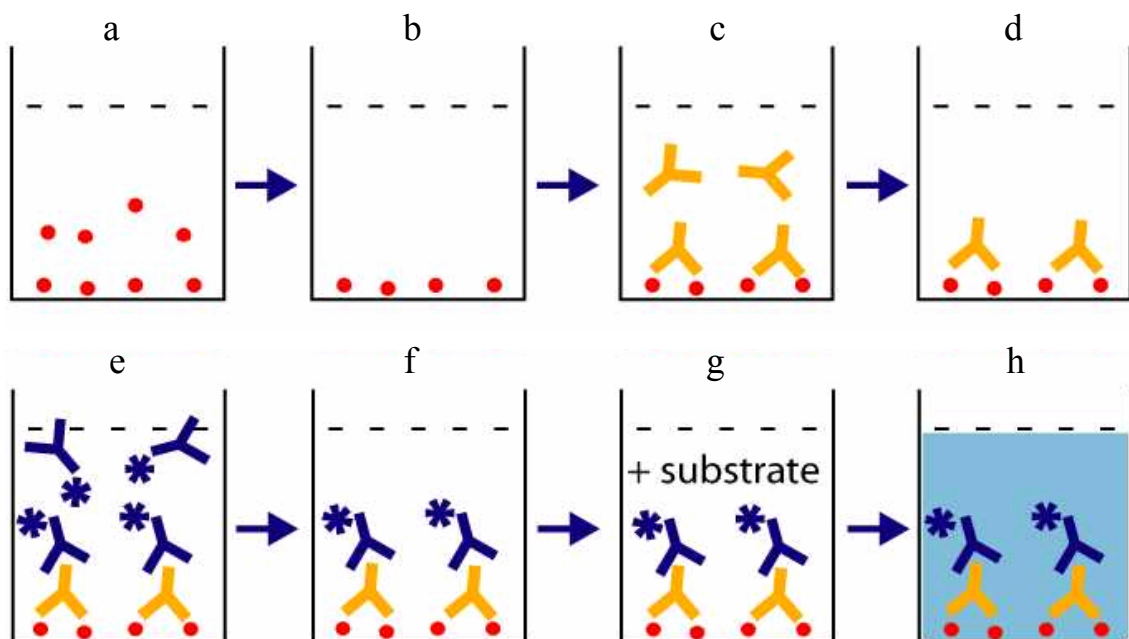
Blocking Buffer：0.1 % BSA，0.02 % thimerosal，配製在 PBS 中。

Wash Buffer：0.02 % Tween 20，0.02 % thimerosal，配製在 PBS 中。

## 2. 操作流程 (圖 D)

準備適當的蛋白質樣品濃度，取出來加到 carbonate-bicarbonate 緩衝溶液中。接著加到 96 孔盤之中，每個 well 約加 100  $\mu\text{L}$ ，室溫下搖晃八小時。倒掉 96 孔盤中的液體，用 PBS 洗 2-3 次。加入 200  $\mu\text{L}$  的 blocking 緩衝液 (含有 1% 脫脂奶粉的 PBS 緩衝液)，室溫下反應 2-3 小時。作用完後倒掉液體，加入 100  $\mu\text{L}$  含有 1% 脫脂奶粉以及 0.05% Tween 20 的 PBS 緩衝液，再加入 2  $\mu\text{L}$  稀釋過二十倍的血清作為一抗 (亦即最後變成稀釋為一千倍)，室溫下反應約一小時。反應完後倒掉液體，並且每個 well 用 200  $\mu\text{L}$  含有 0.05% Tween 20 的 PBS 洗兩次。最後加入稀釋 5000 倍的二抗 (HRP-conjugated rabbit anti-human IgG antibody)，配在含有 1% 脫脂奶粉以及 0.05% Tween 20 的 PBS 緩衝液，室溫下反應約 1 小時。反應完後倒掉液體，並且每個 well 用 200  $\mu\text{L}$  含有 0.05% Tween 20 的 PBS 洗兩次。

抗體辨識完後，接下來要進行呈色反應。首先每個 well 加入 100  $\mu\text{L}$  反應溶液，室溫下搖晃 30 分鐘 (可看見溶液變為藍色)。接著加入 100  $\mu\text{L}$  的硫酸溶液 (700  $\mu\text{L}$  硫酸、30 mL ddH<sub>2</sub>O) 來中止反應，此時可看見溶液變成淡黃色。最後放入 ELISA reader 的儀器中，偵測波長 450 nm 之吸光值，即可分析數據。



(圖 D:ELISA 操作流程。a. 固定蛋白 b. 洗掉沒結合之蛋白質 c. 加入血清抗體 d. 洗掉非專一的抗體 e. 加入二抗 f. 洗掉非專一的二抗 g. 加入受質 h. 呈色。)

## 第四節 差異性蛋白質鑑定

### 一、膠體內的水解 (in-gel digestion)

將已完成 CBB 染色的膠體上的蛋白質用手術刀切出，置於 1 mL 50 % acetonitrile/50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  褪染，把膠切成 1 mm 見方並置於 100 % acetonitrile 中脫水，去除 acetonitrile 後用真空乾燥機 (Speed Vac) 將膠體水分完全去掉。接著加入含有定序級的胰蛋白酶 (0.1 mg/mL in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) 之緩衝液，使得膠體重新水合，置於 37°C 水浴並使胰蛋白酶作用 12 小時。作用完全後將樣品 spin down 加入 50  $\mu\text{L}$  1 % TFA 萃取消肽，再加入 0.1 % TFA/50 % acetonitrile 再萃取一次。兩次萃取消液集中成一管，並用冷凍乾燥機將液體抽乾，最後用 10  $\mu\text{L}$  0.1 % TFA 來回溶。取一支含 C18 ZipTip，裝上 10  $\mu\text{L}$  吸取器上，吸取 100 % acetonitrile 使其浸潤然後排掉，重複三次。吸取平衡溶液 (0.1 % TFA) 然後排掉，重複兩次。吸取準備去鹽的樣品七到十個循環，使蛋白質留在 C18 管住內。最後吸取清洗溶液 (0.1 % TFA)，並排掉以洗去鹽類 (此步驟需要在乾淨的試管中進行)，即可得到去鹽肽樣品。

### 二、質譜分析及蛋白質鑑定

將肽樣品以 C18 前濃縮管住 (5 mm  $\times$  250  $\mu\text{m}$ , PepMap C18, LC-Packing, Amsterdam, Netherlands) 提高樣品濃度，再以一逆向管住 (reverse phase nanocolumn, 15 cm  $\times$  75  $\mu\text{m}$ , LC-Packing) 進行液相層析以及分離肽片段。流動相為 0.5 % FA，並在一小時內拉 5-95 % CAN 線性梯度進行沖提，流速 200 nL/min。利用電噴灑離子化 (electron spray ionization) 方式使肽片段離子化，再用 Qstar XL Q-TOF 串聯式質譜儀進行肽片段篩選、裂解及定序。所得到的質譜

資料，利用 Analyst QS 軟體進行分析整理，並且利用 Mascot 軟體進行蛋白質的鑑定，其所使用的資料庫為 NCBI nonredundant 資料庫。

## 第五節 表現及純化重組蛋白質

### 一、基因轉形 (transformation)

利用熱休克 (heat-shock) 的方式，使細胞膜的結構鬆動，將外來的質體基因送入勝任細胞 (competent cell) 之中。試先建構好帶有重組蛋白質的質體。

首先將勝任細胞 100-200  $\mu\text{L}$  從  $-80^{\circ}\text{C}$  取出放在冰上解凍，加入 0.5-1  $\mu\text{L}$  質體基因，輕拍管壁混合均勻，切記不可離心，置於冰上作用 20 分鐘。接著放到  $42^{\circ}\text{C}$  水浴槽加熱進行熱休克 1 分鐘，再馬上置於冰上約 3-5 分鐘。加 1 mL LB 培養液，在  $37^{\circ}\text{C}$  培養箱培養 30-60 分鐘。離心 13500 rpm 約一分鐘，吸掉 1 mL 上清液，剩下的混合均勻並加到培養基上塗菌，培養基須含有篩選用的抗生素 (ampicillin or kanamycin)，置於  $37^{\circ}\text{C}$  培養箱培養約 12-16 小時，即可冰在  $-4^{\circ}\text{C}$  保存備用。

### 二、表現純化蛋白

取一點菌放到 5 mL 含有篩選用抗生素的 LB 培養液中，在  $37^{\circ}\text{C}$  培養箱中培養約 12-16 小時。隔天再將 5 mL 菌液加到 250 mL 含有篩選用抗生素的 LB 培養液之中，在  $37^{\circ}\text{C}$  下培養，直到菌液在波長 600 nm 時的吸光值介於 0.4-0.6 即可。

取異丙基硫代半乳糖苷 (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside, IPTG) 加到培養液中，使 IPTG 濃度在 0.2-1.0 mM，置於  $37^{\circ}\text{C}$  培養箱中培養三小時，使菌大量表現重組蛋白，即可收集菌液。收集菌液至 250 mL 離心管，在高速離心機離心 6500 rpm 20 分鐘  $4^{\circ}\text{C}$ ，倒掉菌液，加適量 PBS 清洗沉澱物，再次離心 6500 rpm 20 分鐘  $4^{\circ}\text{C}$ ，去上清液。

1. 純化 hnRNPL、DEAD、lamin A/C 與 hnRNP B1 (其為接到 pET28a 載體上，並使 N 端帶有 His Tag 以利純化，純化過程中這些重組蛋白為可溶性的)：

加入 25 mL 含有 1 % Triton X-100 的 PBS 緩衝液，混合均勻，置於 -80°C 破菌 20 分鐘，解凍後再加入 25 mg lysozyme 置於冰上作用 20 分鐘，接著再次放入 -80°C 冷凍破菌。解凍之後，超音波震盪 30 秒 (pulse on 5 秒，pulse off 5 秒) 打斷 DNA，用高速離心機離心 13500 rpm 20 分鐘 4°C，取上清液。

事先準備好 1 mL 的 HisPur™ Cobalt Resin beads，beads 先用 PBS 洗三次，再加入上清液中，在 4°C 下搖晃反應 30-60 分鐘。接著離心 1000 rpm 30 秒 去上清液，離下來的 beads 用 PBS 洗三次，加到 column 填補，待多餘的容易都流出後，再加入含有 glutathione 的 PBS 競爭沖洗，便可將表現的重組蛋白純化出來。

2. 純化 GST 與 hnRNPL 199-264 (其為接到 pGEX-6p-1 載體上，並使 N 端帶有 GST 以利純化，純化過程中這些重組蛋白為不可溶的)：

加入 25 ml 8 M urea，混合均勻，置於 -80°C 破菌 20 分鐘，解凍後再加入 25 mg lysozyme 置於冰上作用 20 分鐘，接著再次放入 -80°C 冷凍破菌。解凍之後，超音波震盪 30 秒 (pulse on 5 秒，pulse off 5 秒) 打斷 DNA，用高速離心機以 13500 rpm 在 4°C 離心 20 分鐘，取上清液。

事先準備好 1 mL 的 Glutathione Sepharose™ beads，beads 先用 PBS 洗一次、用 8 M urea 洗三次，再加入上清液中，在室溫下搖晃反應 30-60 分鐘。接著離心 1000 rpm 30 秒去上清液，離下來的 beads 用 8 M urea 洗三次，加到 column 填補，待多餘的容易都流出後，再加入含有 imidazole 的 8 M urea 競爭沖洗，分別用 50 mM imidazole 洗兩次、用 100 mM imidazole 洗兩次，便可將表現的重組蛋白純化出來。

### 三、利用快速液相層析 (Fast Protein Liquid Chromatography, FPLC)

#### 提高蛋白質的純度

利用快速液相層析儀來萃取純度更高的蛋白質溶液。其中又可細分為三種層析的方式：(1) 膠體過濾法 (gel extraction)，是以膠體間的縫隙大小和形狀來分離蛋白質，若是大分子的或是形狀怪異的都會因為不容易通過膠體而緩慢移動，相反者則會快速地通過管柱，達到分離蛋白質的效果。(2) 離子交換法 (ion exchange)，利用蛋白質在不同 pH 值中有不同帶電荷，而選用各種材質與蛋白質間的親和力強弱達到分離效果。(3) 親合層析法 (affinity chromatography)，利用蛋白質分子表面上的專一性分子與管柱內的填充液之間的鍵結關係，達到分離效果。而本實驗所使用的層析方式是陰離子交換樹脂 (anion exchange)。

#### 1. 藥品試劑準備

20 % EtOH

ddH<sub>2</sub>O

Binding buffer：Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>—NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 緩衝系統，pH 8.5

Elution buffer：Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>—NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 緩衝系統 (含有 1 M NaCl)，pH 8.5

◎所有的緩衝液都要通過 47 nm filter 以及真空抽氣

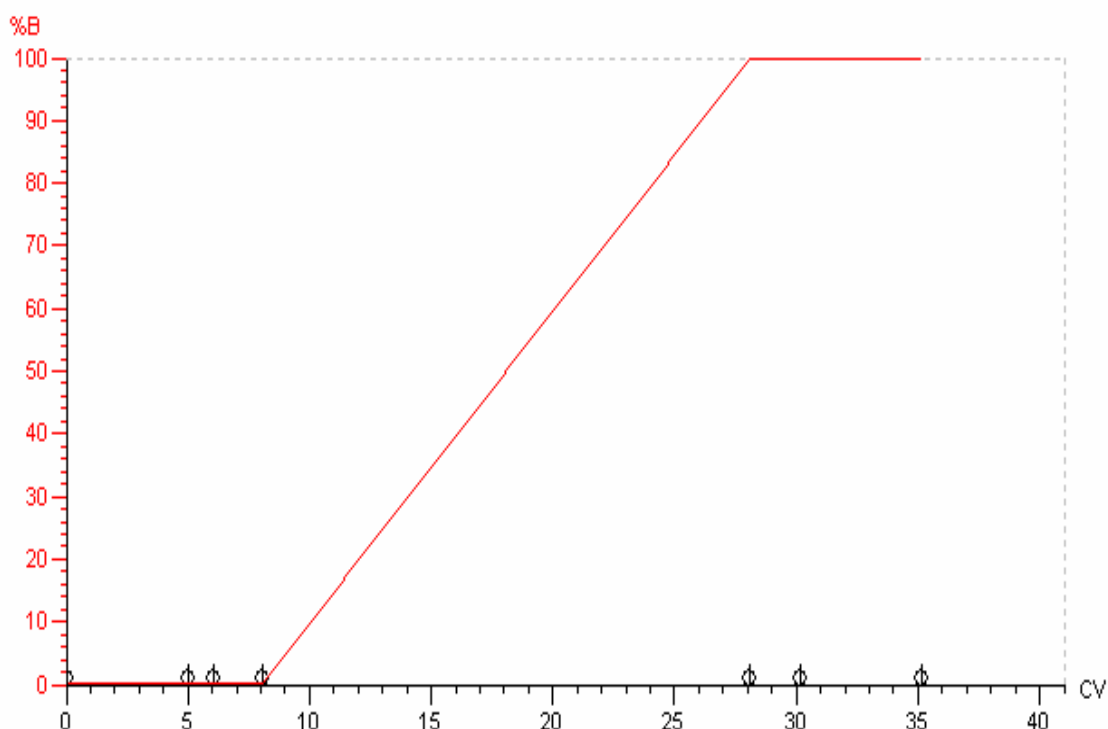
◎蛋白質樣品需利用透析來置換成 binding buffer (要過 filter 但不抽氣)

#### 2. 操作流程 (圖 E)

首先將浸泡在 20 % EtOH 的幫浦移至 ddH<sub>2</sub>O 中，利用流速 10 mL/min 使得幫浦 A 與 B 置換成 ddH<sub>2</sub>O，再利用流速 1 mL/min 將所有的管線置換成 ddH<sub>2</sub>O，清洗 10 分鐘。此時可利用 ddH<sub>2</sub>O 清洗針頭和樣品迴路 (sample loop)，另外也將陰離子交換樹脂的管柱 (DEAE column) 接上同樣置換成 ddH<sub>2</sub>O 約 10 分鐘。

再來將幫浦 A 移至 binding buffer、幫浦 B 移至 elution buffer 中，利用流速 10 mL/min 使幫浦 A 與 B 置換成緩衝液，再利用流速 1 mL/min 將所有的管線以

及管柱置換成緩衝液，流洗 10 分鐘。此時，利用 binding buffer 來清洗針頭和 sample loop。



(圖 E：FPLC 設定。前五分鐘用 wash buffer 平衡，注入樣品，再來兩分鐘洗掉未結合蛋白，最後用 elute buffer 將蛋白競爭下來 (20 分鐘達到 1 M NaCl) )。

為了確保管柱乾淨，在注入樣品前，會先用 elution buffer 流洗管線和管柱，再用 binding buffer 平衡回來，清洗時所拉的梯度為 5 分鐘就達到 100 % 的鹽濃度，流速則為 1 mL/min。設定電腦模式，在 5 分鐘前會用緩衝液來平衡，接著注入樣品 (1 mL/min)，待 5 分鐘後再開始拉鹽的梯度 (20 分鐘達到 100 % 的鹽濃度)。

設定好電腦模式後，就可以注入蛋白質樣品，開始作陰離子交換樹脂層析。層析過程中若出現很 sharp 的 peak，則有很大的可能是蛋白質被流洗下來，收集此刻流洗下來的蛋白質樣品，作 SDS-PAGE 的分析，確認哪一個 fraction 是要的蛋白，再作去鹽濃縮即可保存使用。

## 二、去鹽、濃縮、置換緩衝溶液

蛋白質樣品經過 FPLC 純化後，需再將很多管收集成一管，並且將緩衝溶液

置換成 PBS 或 0.1 M MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) 以作後續實驗之用。本實驗是利用超微膜過濾法 (ultrafiltration, UF)，來同時達到去鹽、濃縮與置換溶液的作用。首先將蛋白質樣品置入 10 kDa 孔徑 15 mL 蛋白質濃縮過濾離心管 (amicon ultra)，離心 8000 rpm 適當時間直到上層液體剩下 0.5-1 mL。加入適當量 PBS 或 0.1 M MES，再次離心 8000 rpm 適當時間直到上層液體剩下 0.5-1 mL，此步驟重複 3-4 次，即可達到置換緩衝液的功用。另外，若蛋白質樣品少時，可用小的 500  $\mu$ L 蛋白質濃縮過濾離心管；若是蛋白質樣品很多時，可用 50 mL 蛋白質濃縮過濾離心管。在使用超微膜過濾法後，可跑膠確認蛋白質樣品，再作蛋白濃度定量即可保存以作後續實驗。

## 第六節 Illumina Veracode Carboxyl Beads 作為

### Multiplexed Protein Assay

Veracode Carboxyl Beads 是由 Illumina 公司發展而來的一項新技術，與酵素連結免疫吸附分析很類似，可以作為一個平台偵測不同樣品中的蛋白。但不一樣的是，這個技術可以在同一個反應槽中同時偵測多個的蛋白質 (multiplexed protein assay) 且是高通量的。

也就是說，可以利用這項技術在同一個反應槽中，置入兩種以上的蛋白質，加上病人的血清抗體做偵測後，可同時在同一個反應槽中，偵測到血清抗體對這兩個或多個的蛋白質是否有反應，是一個方便又快速的平台。若此技術能好好應用在臨床方面，相信對診斷甚至治療是一大突破。

#### 1. 試劑準備

0.1 M MES, pH 4.5

Sulfo-NHS (新鮮配製, 50 mg/mL in 0.1 M MES, pH 4.5)

EDC (新鮮配製, 50 mg/mL in 0.1 M MES, pH 4.5)

含有 0.2% Tween 20 之 PBS



含有 0.05 % Tween 20 之 PBS

1 M NaCl in ultra-pure water

含有 1 % BSA 之 PBS

含有 1 % BSA 之 PBST (0.05 % Tween 20)

## 2. 操作流程 (圖 F)

### (1) 蛋白質固定化 (protein immobilization)

先將一管 carboxyl beads 及所需緩衝液回溫，因所有反應要在室溫下，carboxyl beads 用 1 mL 0.1 M MES 洗三次，每次要混合均勻 30 秒，短暫離心使得 beads 沉澱，慢慢去上清液。加入 600  $\mu$ L 含 50 mg/mL Sulfo-NHS 之 0.1 M MES，混合均勻，接著加入 600  $\mu$ L 含 50 mg/mL EDC 之 0.1 M MES，混合均勻，室溫旋轉 100 rpm 反應 1 小時。短暫離心使 beads 沉降下來，慢慢去上清液，用 1 mL 0.1 M MES 洗兩次。準備好 500  $\mu$ g/mL 蛋白質樣品 (配在 0.1 M MES)，取 300  $\mu$ L 加到 carboxyl beads 中，室溫旋轉 100 rpm 反應 1 小時。

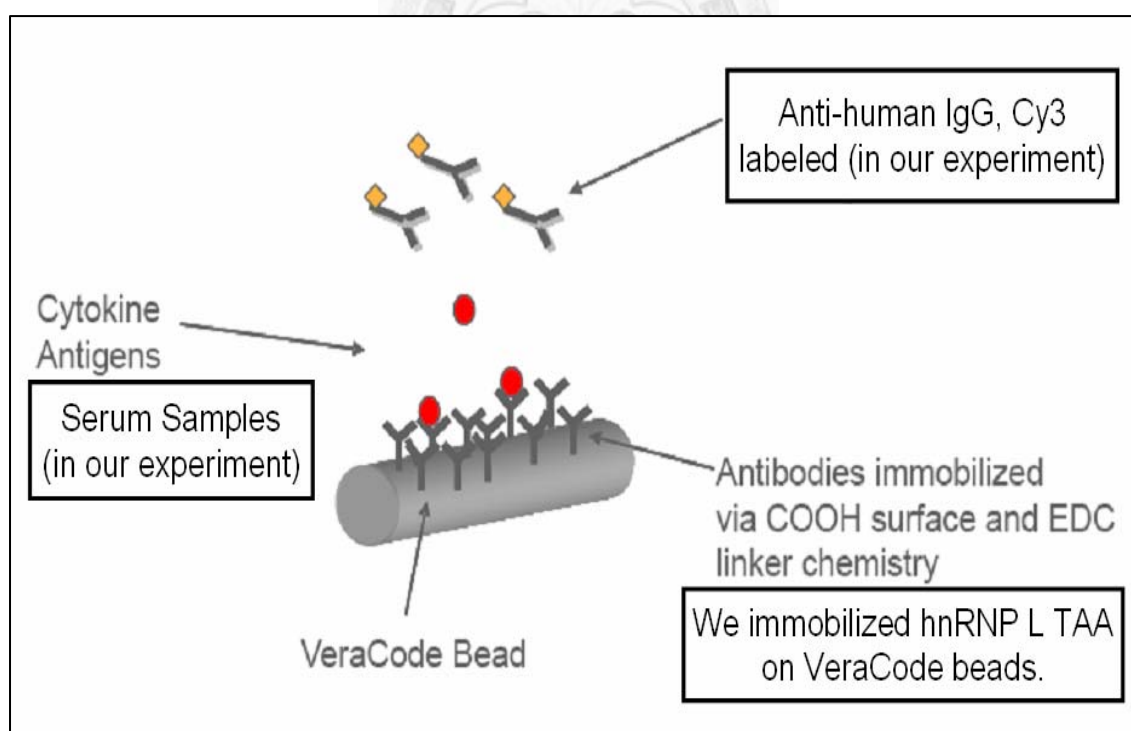
短暫離心去上清液，用含有 0.2 % Tween 20 之 PBS 洗兩次，接著用 1 M NaCl 洗兩次，最後泡在 1 M NaCl 室溫下旋轉 100 rpm 反應 1 小時，可去掉非專一性的結合之蛋白質。短暫離心去上清液，用含有 1 % BSA 之 PBS 洗兩次，泡在其中室溫下旋轉 100 rpm 反應 1 小時，再次用含 1 % BSA 之 PBS 洗兩次，最後便可保存於 4°C 以備用。

### (2) 多個蛋白質偵測 (multiple protein assay)

將泡在含有 1 % BSA 之 PBS 的 carboxyl beads 拿出來回溫，利用 VeraCode bead kitting system 來做 kitting。首先準備 160 mL PBS 加入 kitting 塑膠盒中，再加入已 coating 好蛋白質的 carboxyl beads，依序放入 kitting 用的設備裝置，最後放上 kitting 用的 96 孔盤 (孔要朝下) 並蓋上塑膠蓋。前後左右均勻且快速的搖晃盒子 45 秒 (每次前後四下，左右四下)，接著很快的將盒子倒過來放，用力正面敲五下並靜置 2 分鐘。前後左右的邊緣各敲五下，再用力正面敲五

下，把卡在邊緣的 beads 敲下來，靜置 2 分鐘。最後再用力正面敲五下靜置 2 分鐘，等待 beads 沉降完全。接著把蓋子打開，靜置 2 分鐘等水流完，小心取出 96 孔盤放在紙巾上並吸掉多餘液體，將 96 孔盤中的 PBS 置換成含有 1 % BSA 之 PBS 即可保存在 4°C。

加入 50  $\mu\text{L}$  含有 1 % BSA 之 PBST，使孔盤中的溶液為 100  $\mu\text{L}$  含有 1 % BSA 之 PBST，依序加入正常人的血清以及病人血清 (稀釋約 1000 倍)，室溫下搖晃 600 rpm 約 1 小時，離心 1500 rpm 5 秒，用含有 0.05 % Tween 20 之 PBS 洗四次。接著加入配在 1 % BSA 之 PBST 之二級抗體 (anti-human IgG, Cy3 labeled, 稀釋約 100 倍)，室溫下搖晃 600 rpm 約 1 小時，離心 1500 rpm 5 秒，用含有 0.05 % Tween 20 之 PBS 洗四次。事先讓機器暖機初使化，設定電腦模式，打好資料備用。將 96 孔盤置於 BeadXpress reader 中，green PMT 設在 0.75-1 皆可，等待機器讀取並分析、儲存數據。



(圖 F：VeraCode carboxyl beads 之 multiplexed protein assay 的反應流程概觀。

(Illumina, Inc, 2006, Introduction to Illumina's VeraCode Technology))

## 第七節 統計分析

經一維電泳免疫染色、酵素連結免疫吸附分析與 VeraCode carboxyl beads 篩選出來的結果，會使用卡方檢測 (chi-square test) 來做統計分析，計算實驗組別之間對血清反應的個數其差異性為何，藉以找出適合作腫瘤標記的腫瘤相關抗原。(p value < 0.01 為顯著差異，p value < 0.05 則為有差異)

另外，也會計算不同的兩個蛋白質同時對血清有反應的個數，並作卡方檢測及相對勝算比 (odds ratio) 的分析，藉以找出哪些蛋白質結合在一起來診斷早期肝癌時，可提高特異性或靈敏度。



## 第四章 實驗結果

### 第一節 肝癌相關的自體抗原之鑑定

本實驗室過去利用血清蛋白質體分析技術，分別用正常人的血清、B 型肝炎帶原者的血清、肝硬化病人的血清或肝癌病人的血清，與肝癌細胞株 Hep3B 的蛋白質萃取物進行反應，比對各組血清與蛋白質反應的點，挑出與肝癌血清反應較好的作質譜分析及身分鑑定。鑑定到二十二種蛋白質，利用二維電泳及西方墨點法，分別用正常人、B 型肝炎帶原者、肝硬化病人及肝癌病人血清各十個與膠片上蛋白質作反應，挑選與血清反應頻率盛行率較高的四個蛋白質，分別為 hnRNP L、DEAD、lamin A/C 與 hnRNP B1，作後續實驗一維電泳免疫轉染的分析，確認這四個肝癌產生的腫瘤相關自體抗原是否可以作為肝癌腫瘤標記。

### 第二節 利用一維電泳免疫轉染法確認 hnRNP L、DEAD、lamin A/C 與 hnRNP B1 是否可作為肝癌的生物標記

#### 一、重組蛋白 hnRNP L、DEAD、lamin A/C 與 hnRNP B1 純化結果

##### 1. 重組蛋白質之質體建構

首先，將挑選的四個蛋白質 hnRNP L、DEAD、lamin A/C 及 hnRNP B1 之 cDNA 分別接到 pET28a 載體 (vector)，並使蛋白質的 N 端帶有組胺酸 (His Tag) 以利之後的純化。

##### 2. 重組蛋白質之表現純化

接著，將建構好的重組蛋白之質體 (plasmid) 轉形到 BL21 (DE3) 大腸桿菌中，利用此系統進行重組蛋白的大量表現，之後再用 HisPur™ Cobalt Resin beads 純化所表現的重組蛋白 (Figure 1)。圖一A圖是四個重組蛋白質純化後進行 SDS-PAGE 經由 CBB 染色的結果，B圖為四個純化的重組蛋白質利用西方墨點法與 anti-His Tag 抗體反應的結果，第一條是 hnRNP L 分子量在 66 kDa，第二條

是 DEAD 分子量在 70 kDa，第三條是 lamin A/C 分子量是 64 kDa，第四條是 hnRNP B1 分子量是 30 kDa。四個純化後的重組蛋白都有作質譜分析，確認其為要的蛋白質。

## 二、肝癌病人與 hnRNP L 和 DEAD 的血清反應在各組間比較有顯著差異

### 1. 一維電泳與西方墨點法 (One-dimensional Immunoblot)

加入適量的重組蛋白到樣品槽中，進行 SDS-PAGE 電泳後，將膠片轉印到 PVDF 膜上，將 PVDF 膜裁切成 0.3 cm 寬度，每條含有約 0.3  $\mu$ g 的重組蛋白與血清進行西方墨點法。所選用的血清抗體分成四組，第一組為正常人的血清共 20 個，第二組為 B 型肝炎帶原者的血清共 50 個 (但與 hnRNP L 反應的個數為 69 個)，第三組為肝硬化病人的血清共 20 個 (但與 hnRNP L 反應的個數為 78 個)，第四組為肝癌病人血清共 62 個 (圖二只有四個重組蛋白分別與 18 個血清反應的結果)。圖二是將 hnRNP L、DEAD、lamin A/C 及 hnRNP B1 純化的重組蛋白質分別與 7 個 B 型肝炎帶原者血清 (lanes 1-7)、7 個肝癌病人血清 (lanes 8-14) 和 4 個正常人血清 (lanes 15-18) 反應的結果，由結果顯示血清中如果存在自體抗體則會與膜上的重組蛋白反應產生明顯黑色的色帶。最後，計算四種重組蛋白在各組有血清反應的個數及無血清反應的個數。結果如表一可看到，所有正常人血清均不會對四種重組蛋白產生反應，在 hnRNP L 蛋白方面，B 型肝炎帶原者血清呈現陽性有反應的有 6 個 (此組血清與 hnRNP L 反應的總個數為 69 個)、與肝硬化病人血清有反應的有 11 個 (此組血清與 hnRNP L 反應的總個數為 78 個)、與肝癌病人的血清有反應的有 40 個 (即 64.5 % 的肝癌病人有 hnRNP L 的自體抗體)。B 型肝炎帶原者血清與 DEAD 有反應的有 12 個、肝硬化病人血清有反應的有 6 個、肝癌病人的血清有反應的有 42 個 (即 67.7 % 的肝癌病人有 DEAD 的自體抗體)。B 型肝炎帶原者血清與 lamin A/C 有反應的有 5 個、肝硬化病人血清有反應的有 6 個、肝癌病人的血清有反應的有 26 個 (即 41.9 %

的肝癌病人有 lamin A/C 的自體抗體)。B 型肝炎帶原者血清與 hnRNP B1 有反應的有 11 個、肝硬化病人血清有反應的有 4 個、肝癌病人的血清有反應的有 27 個 (即 43.6 % 的肝癌病人有 hnRNP B1 的自體抗體)。

## 2. 統計分析 (Statistical Analysis)

接著利用卡方檢定探討各組血清反應的結果是否有顯著差異。從表一和表二可看到，不論是哪個重組蛋白質，肝癌病人組別與正常人組別比較，都有明顯地顯著差異。

肝癌病人血清與 hnRNP L 反應的頻率是 64.5 %，與其他三組血清比較都有顯著差異 ( $p < 0.0001$ ，肝癌與肝硬化組別比較的勝算比為 8.68)。肝癌病人血清與 DEAD 反應的頻率是 67.7 %，與其他三組血清比較都有顯著差異 (與正常人血清和 B 型肝炎帶原者血清比較  $p < 0.0001$ ，與肝硬化病人血清比較  $p = 0.0029$ ，肝癌與肝硬化組別比較的勝算比為 4.65)。肝癌病人血清與 lamin A/C 反應的頻率是 41.9 %，與正常人血清和 B 型肝炎帶原者血清比較有顯著差異 (分別是  $p = 0.0005$  及  $p = 0.0002$ )，與肝硬化病人血清比較無顯著差異 ( $p = 0.3414$ ，肝癌與肝硬化組別比較的勝算比為 1.64，信賴區間有小於 1 不可信)。肝癌病人血清與 hnRNP B1 反應的頻率是 43.6 %，與正常人血清比較有顯著差異 ( $p = 0.0003$ )，與 B 型肝炎帶原者和肝硬化病人血清比較無顯著差異 (分別是  $p = 0.0166$  及  $p = 0.0590$ ，肝癌與肝硬化組別比較的勝算比為 2.69，信賴區間有小於 1 不可信)。

另外，為了解決單一腫瘤標記特異性不高或靈敏度不高的問題，許多研究逐漸朝向複合型的生物標記開發，期望透過多個腫瘤標記的篩選，提高診斷的特異性或靈敏度，因此也計算當同時有兩種蛋白對同個血清有反應的個數與顯著差異。當同時 hnRNP L 或 DEAD 一方與肝癌病人血清有反應的頻率是 85.5 %，與其他三組血清比較皆有顯著差異 (與正常人血清和 B 型肝炎帶原者血清比較  $p < 0.0001$ ，與肝硬化病人血清比較  $p = 0.0042$ )，但特異性較低。當同時 hnRNP L 和 DEAD 與肝癌病人血清有反應的頻率是 46.8 %，與其他三組血清比較皆有顯著差

異 (與正常人血清比較  $p = 0.0001$ ，與 B 型肝炎帶原者血清比較  $p < 0.0001$ ，與肝硬化病人血清比較  $p = 0.0007$ )，但特異性較高。而其他蛋白質的組合，肝癌病人血清與其他三組血清比較的顯著差異，都沒有比 hnRNPL 和 DEAD 之組合來得好。

### 第三節 利用酵素連結免疫吸附分析法確認 hnRNPL

#### 199-264、hnRNPL、DEAD 與 lamin A/C 是否可作為肝癌的生物標記

經一維電泳免疫轉染法之結果作統計分析，結果顯示 hnRNPL 和 DEAD 對血清的反應在肝癌病人組別與其他三組組別比較時皆有顯著性差異，所以優先選擇 hnRNPL 和 DEAD 作酵素連結免疫吸附分析篩檢。另外，本實驗室找到 hnRNPL 自體抗原與血清抗體反應的 epitope，大約是界在核酸序列 199-264 處，因此也純化 hnRNPL 199-264 作酵素連結免疫吸附分析。

#### 一、重組蛋白質 hnRNPL 199-264 與 GST 的純化結果

##### 1. hnRNPL 199-264 與 GST 重組蛋白的表現與純化

將 hnRNPL 199-264 片段的 cDNA 接到 pGEX-6p-1 載體表現，並使重組蛋白質的 N 端帶有麩胺基硫 S 轉換酶 (glutathione S-transferase, GST) 以方便之後的純化。將建構好的重組蛋白之質體轉形到 BL21 (DE3) 大腸桿菌中，利用此系統進行重組蛋白的大量表現，之後再用 Glutathione Sepharose™ 純化所表現的重組蛋白 hnRNPL 199-264，進行 SDS-PAGE 以作確認 (Figure 3)。圖三A圖是重組蛋白純化後進行 SDS-PAGE 電泳後經由 CBB 染色的結果，B圖是四個純化的重組蛋白質利用西方墨點法與 anti-GST 抗體反應的結果。第一條是 GST 分子量在 21 kDa，第四條是 GST-hnRNPL 199-264 分子量是 31 kDa。四個純化後的重組蛋白都有打質譜儀，確認它們的身分無誤。

## 2. 利用快速液相層析提高 hnRNP L 199-264 與 GST 重組蛋白質的純度

由於酵素連結免疫吸附分析需要高純度蛋白質，因此將經過 Glutathione Sepharose™ beads 初步純化的重組蛋白質 hnRNP L 199-264 與 GST 利用快速液相層析之 DEAE 陰離子交換樹脂的管柱進一步純化，確定可以去除掉大分子量的不純物質 (Figure 4)。hnRNP L 199-264 快速液相層析的結果如圖四A圖所示，在清洗並平衡完所有管線以及 DEAE 管柱後，開始用含有 NaCl 的緩衝液將與 DEAE 管柱結合的重組蛋白流洗下來，設定在 20 分鐘後達到 1 M NaCl，可以看到在用 NaCl 高鹽流洗後的第五分鐘的 fraction 第五管，偵測到高量的蛋白質沖提出來，之後便進行 SDS-PAGE 電泳作確認。圖四B圖是 hnRNP L 199-264 作快速液相層析後收集 fraction 電泳後的結果，可以看到確實在 fraction 第五管到第九管是主要的重組蛋白質 hnRNP L 199-264，而也可以發現在第十九管分子量 60 kDa 左右處的不純物質有被分離開來。

## 二、肝癌病人與全長或片段的 hnRNP L 的血清反應在各組間比較有顯著差異

針對 hnRNP L 199-264、hnRNP L、DEAD 和 lamin A/C 作酵素連結免疫吸附分析的實驗，分別用四組血清抗體作反應，第一組是正常人血清 10 個、第二組是 B 型肝炎帶原者血清 28 個、第三組是肝硬化病人血清 40 個以及第四組肝癌病人血清 80 個，另外，血清反應吸光值的篩檢值為正常人血清反應的平均吸光值加兩倍標準差。首先看到圖五，肝癌病人血清與 hnRNP L 199-264 反應的頻率是 56.3 %、平均吸光值 0.50 (篩檢值為 0.28)，與其他三組血清比較都有顯著差異 (與正常人血清比較  $p = 0.0008$ ，與 B 型肝炎帶原者血清比較  $p = 0.0044$ ，與肝硬化病人血清比較  $p = 0.0012$ )。肝癌病人血清與全長 hnRNP L 反應的頻率是 62.5 %、平均吸光值 0.78 (篩檢值為 0.52)，與正常人血清和 B 型肝炎帶原者血清比較有顯著差異 (分別是  $p = 0.0002$  及  $p < 0.0001$ )，與肝硬化病人血清比較無顯著差異 ( $p = 0.0375$ )。比較全長 hnRNP L 及其片段 199-264 對血清的反應，可以



明顯看到是不太一樣的，一是全長的蛋白質測出的讀值都偏高顯示其反應情形也較高（此處可能是因為全長蛋白純度不夠造成讀值上升），二是全長的 hnRNP L 蛋白質無法區分肝癌與肝硬化病人。

接著看到圖六，肝癌病人血清與 DEAD 反應的頻率是 53.8 %、平均吸光值 0.23 (篩檢值為 0.21)，與正常人血清和 B 型肝炎帶原者血清比較有顯著差異 (分別是  $p = 0.0013$  及  $p = 0.0003$ )，與肝硬化病人血清比較無顯著差異 ( $p = 0.0138$ )，顯著差異沒有比一維電泳免疫染色的結果來得明顯。另外，由圖七也發現，肝癌病人血清與 lamin A/C 反應的頻率是 50 %、平均吸光值 0.29 (篩檢值為 0.23)，與正常人血清和肝硬化病人血清比較有顯著差異 (分別是  $p = 0.0027$  及  $p = 0.0039$ )，與 B 型肝炎帶原者血清比較無顯著差異 ( $p = 0.1920$ )，v 顯著差異與一維電泳免疫染色的結果類似。

#### 第四節 VeraCode Carboxyl Beads 作為 Multiplexed Protein Assay 篩檢 hnRNP L 199-264

從前面實驗確認 hnRNP L 及 DEAD 此兩種肝癌相關自體抗原，可作為肝癌潛在的生物標記，所以希望能應用在可同時偵測多個抗原的 VeraCode carboxyl beads 之技術上。hnRNP L 及 DEAD 兩個重組蛋白在大腸桿菌表現系統中主要位於不可溶部分，在純化過程需利用尿素來將蛋白溶出幫助純化，但是由於 VeraCode carboxyl beads 這個技術平台不能允許有尿素的存在，所以 hnRNP L 及 DEAD 兩個純化出來的不可溶蛋白質無法應用在這項平台上，因此，選擇 hnRNP L 199-264 這個可溶性蛋白質來做。

將蛋白質 hnRNP L 199-264 共價結合在 carboxyl beads 上之後，分別用四組血清抗體作反應，第一組為正常人血清 6 個、第二組是 B 型肝炎帶原者血清 10 個、第三組是肝硬化病人血清 10 個以及第四組肝癌病人血清 18 個，另外，血清反應吸光值的篩檢值一樣是正常人血清反應的平均吸光值加兩倍標準差。結果

圖八可以看到，肝癌病人血清與 hnRNPL 199-264 反應的頻率是 67%、平均螢光強度為 1716.05 (篩檢值為 437)，與其他三組血清比較都有顯著差異 (與正常人血清比較  $p = 0.0046$ ，與 B 型肝炎帶原者血清比較  $p = 0.0006$ ，與肝硬化病人血清比較  $p = 0.0006$ )。若是從酵素連結免疫吸附分析的結果取出相同血清樣本來計算，肝癌病人血清與 hnRNPL 199-264 反應的頻率是 67%、平均吸光值 0.73 (篩檢值為 0.26)，與正常人血清比較有顯著差異 ( $p = 0.0046$ )，與 B 型肝炎帶原者和肝硬化病人血清比較無顯著差異 (分別是  $p = 0.0180$  及  $p = 0.0623$ )。比較 VeraCode carboxyl beads 與酵素連結免疫吸附分析法，不僅可以發現 VeraCode carboxyl beads 技術較能區分肝癌病人組別反應弱的血清與其他組別無反應血清，而且在血清樣本數少的時候來作統計，肝癌組別就能與其他組別有顯著差異。



## 第五章 討論

### 第一節 實驗方法討論

#### 一、血清蛋白質體分析技術之優缺點

近年來已發展出幾種方法來鑑定腫瘤相關抗原，而本實驗所選擇的方法是血清蛋白質體分析法 (SERPA) [37, 38]，不但可以鑑定出生物體內的腫瘤相關抗原，也可鑑定出有經過後轉譯修飾的、甚至是同源異構體 (isoform) 的腫瘤相關抗原；但是這個篩選方法也有一些缺陷，對於本身含量較低的蛋白質或膜蛋白，不易在此方法中鑑定到。除了血清蛋白質體分析這方法外，另外還有 SEREX、蛋白晶片、抗體晶片也可用來篩選這些蛋白。SEREX 主要是利用 phage 來表現蛋白質，鑑定可能的腫瘤相關抗原，但是利用 phage 系統對於後轉譯修飾的蛋白質卻很難被鑑定到。蛋白晶片是將專一性的腫瘤蛋白質或是經過萃取的腫瘤細胞蛋白質點在晶片上進行篩選，是非常靈敏且高通量的篩選方法，但缺點是晶片材料較貴，而且需要準備純度很高、品質很好的蛋白質，在準備方面需花較多的時間。抗體晶片則是將抗體點在晶片上與癌症組織的蛋白質萃取物進行反應，也是非常靈敏且高通量的篩選方法，但缺點是除了也很昂貴之外，需要準備專一性很好的抗體。蛋白質晶片和抗體晶片除了可用在篩選外，在後續的實驗，也可用來作為再次驗證腫瘤相關抗原，以確保找到的腫瘤相關抗原之正確性；而除了利用晶片來再次驗證之外，酵素連結免疫吸附分析也是非常普遍作為驗證且可以定量的工具，不但靈敏性非常高，而且也常被應用在臨床診斷與治療上。

#### 二、蛋白質的純度

在利用一維免疫轉染法大量篩選血清的實驗中，用來與血清反應的自體抗原是利用大腸桿菌系統大量表現並純化的，為了確定表現的正確性，不論是哪一個重組蛋白，都會作質譜分析，確定表現出來的蛋白質是實驗需要的。另外，看到重組蛋白質與血清反應後的結果，在調整好重組蛋白表現與純化的條件以及

loading 的量之後，其不純物質包括大腸桿菌的蛋白質會減少，也不容易被血清抗體所辨認，所以不論在一維免疫轉染法還是酵素連結免疫吸附分析理論上是不會影響訊號的判定的。而在酵素連結免疫吸附分析法與 VeraCode carboxyl beads 技術所使用的 hnRNP L 199-264 片段和用來做 negative control 的 GST，除了有物質身分鑑定之外，也有經過快速液相層析法來提高純度，可以去掉大分子的不純物質，因為此不純的蛋白質在做一維免疫染色時，會隨機地與病人血清作反應，因此若能去掉這部分不純的蛋白，在酵素連結免疫吸附分析法與 VeraCode carboxyl beads 技術分析時，才不會有錯誤的訊號產生，以提高數據的正確性。

### 三、酵素連結免疫吸附分析之優缺點

酵素連結免疫吸附試驗是一種常用的固相酵素免疫測定方法，Engvall 和 Perlmann 在 1971 年最先應用此法進行了 IgG 定量測定，並命名為酵素連結免疫吸附分析。酵素連結免疫吸附分析方法至今已被廣泛應用在各種抗原和抗體測定 [41, 42]，是免疫診斷中的一項新技術，主要是應用於大分子抗原和小分子抗原的定量測定，根據已使用的結果，認為酵素連結免疫吸附分析方法具有靈敏、特異、簡單、快速、穩定及易於自動化操作等眾多的特點。不僅適用在臨床標本的檢查，而且由於一天之內可以檢查幾百甚至上千份的標本，因此也適用在血清流行病學調查。本法不僅可以用來測定抗原，而且也可用來測定體液中的自體抗原，所以也是一種早期診斷的良好方法。但酵素連結免疫吸附分析測定中影響因素較多，而且其操作過程中有一定的技術要求，在臨床檢驗中除了正常反應之外，有時也會見到一些錯誤結果（即假陽性或假陰性結果）。引起酵素連結免疫吸附分析測定錯誤結果的原因主要有：(1) 樣本因素 (2) 試劑因素 (3) 操作因素。

在本實驗結果，只有 hnRNP L 199-264 重組蛋白質，與血清反應的結果和全長 hnRNP L 在一維免疫染色的結果相似，肝癌病人血清組別與其他三組血清組別比較時都有顯著差異  $p$  value 小於 0.01。可是不一樣的是，有些在一維免疫染色法有反應之血清樣本，在酵素連結免疫吸附分析卻沒有反應，反之亦然，這表示

酵素連結免疫吸附分析和一維電泳免疫染色之結果不是完全相配對，可能是因為在一維電泳免疫染色之中蛋白質是屬完全打開的狀態，而且反應的位置明確不易被不純物質所影響，而在酵素連結免疫吸附分析則是隨機與盤子來結合，加上有不純物質的影響，這很可能使得蛋白質的 epitope 與自體抗體的結合受到影響。另外，看到 hnRNP L 199-264 與全長的 hnRNP L，也發現到與血清有反應的樣本也不太一致，可能的原因有兩個，一是 hnRNP L 199-264 是屬於摺疊完全的有結構性之蛋白質，而全長 hnRNP L 是屬於已變性的無結構性的蛋白質，血清抗體辨認它們 epitope 之處，有可能是不一樣的。另一個原因是，根據一些文獻指出 [43, 44]，腫瘤自體抗原的產生有可能是癌細胞分泌出來的或是癌細胞死掉後才釋放到血液中，被自身免疫系統辨認才有這些自體抗原產生，若是癌細胞分泌出來的蛋白質其摺疊完整的可能性很大，然而，若是癌細胞死掉後才釋放到血液中，則有可能蛋白質已經變性才形成了腫瘤自體抗原，因此不論是 hnRNP L 199-264 還是全長的 hnRNP L，其結果都有可能發生也還需要再驗證。

#### **四、VeraCode Carboxyl Beads 技術之優缺點**

VeraCode Carboxyl Beads 這項技術是利用 bead 上的條碼來區分所結合上去的物質如蛋白質、胜肽、核酸或其他 ligand，至今已有很多 DNA 或 RNA 的研究有應用在這項技術上面 [45, 46]。而在蛋白質偵測上，VeraCode Carboxyl Beads 技術就如同 Multiplexed ELISA Assay，可以在同一個反應槽中偵測到最多 48 種的蛋白質，蛋白質與 bead 的結合是共價鍵的方式，不但形成的肽鍵很穩定，也不易產生非專一性的鍵結。優點是快速，一個血清樣本可以一次偵測很多蛋白質，而且血清與蛋白質所用的量與酵素連結免疫吸附分析差不多，省時省錢又不浪費資源。然而，這項技術也有幾個缺點，就是在反應過程中，不能有尿素之干擾，如此一來便不能使用不可溶的蛋白質。

因此本實驗只選擇 hnRNP L 199-264 這個可溶性蛋白質，並挑幾個血清樣本來做試驗，結果與顯著差異性皆與酵素連結免疫吸附分析類似，而且肝癌病人血

清組別與其他三組的血清組別比較，其差異值可以拉大，這也表示 VeraCode Carboxyl Beads 技術是非常靈敏的，可以在血清樣本數少的狀況下，其數值就有統計上的意義。另外，在蛋白質與 carboxyl beads 結合的部份，雖然此項技術與酵素連結免疫吸附分析一樣不能知道結合的效率，亦即無法確切知道在該濃度反應之下，是否所有的蛋白質都有結合上去，即便如此，但是由於 carboxyl beads 所帶的 carboxyl group 可以確保其結合的方位性，使得重組蛋白質 hnRNP L 199-264 至少不會因為接了 GST 而影響到結合效率。

## 第二節 hnRNP L 在癌化可能的角色

hnRNP L 是屬於 hnRNP (heterogenous ribonucleoprotein) 複合物的一員，含有可與 DNA、RNA 或蛋白質交互作用的區域，近年來最熱門主要是關注在其與 RNA 交互作用所帶來的影響，而它在轉錄作用、mRNA 運送、mRNA 形成、轉譯作用等都扮演很重要的角色 [47, 48]。hnRNP L 與其他 hnRNP 一樣主要存在於細胞核中，少數是在細胞核外。目前已經知道 hnRNP L 可與 PCBP2、HNRPK、PTBP1 結合。另外，hnRNP L 在癌症中也有許多研究顯示，它可使得 C 型肝炎病毒轉譯作用增加 [49]，維持血管內皮細胞生長因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) [50] 及葡萄糖轉運體 (glucose transporter, GLUT) 之 mRNA 的穩定性 [51]，也可穩定並增加一氧化氮合成酶 (nitric oxide synthase) 其 pre-mRNA 剪接 (splicing) 的發生 [52]，許多現象都反映了 hnRNP L 主要是藉由影響某些基因的 pre-mRNA 修飾作用 (processing)，進而使得細胞發生癌化現象。

根據文獻顯示，hnRNP L 在類風濕性關節炎這個疾病可作為一自體抗原 [53]，可應用在免疫化學、病理學等上面。另外，有文獻指出在癌化的狀態下，會改變細胞中的訊息傳遞路徑 [54]，而造成一些 splicing machinery 增加或減少的不平衡的現象進而改變 splicing 使得原本表現 isoform B 轉變成為 isoform A，而這段轉譯出來的氨基酸序列可能是不被免疫系統所容忍的，便可能會引起自體免

疫。而本實驗室懷疑 hnRNP L 可能也有類似的現象，因此之後會對 hnRNP L 進行 immunogenic epitope mapping 並進一步分析肝癌病人組織之中 hnRNP L 異構體的表現情形，看看在 hnRNP L 蛋白是否有 cancer specific antigenic epitopes 的現象。目前已知道有個 hnRNP L-like 的蛋白質，又稱作為 hnRNP LL，大部分病人血清對 hnRNP L 有反應主要是認到 LL，而非少了前端 glycine-rich domain 的 isoform b 又稱 hnRNP LS。

### 第三節 DEAD 在癌化可能的角色

DEAD (DEAD/H box polypeptide) 被推測可能為 RNA 解旋酵素 (RNA helicase) [55]，在 RNA 二級結構的改變扮演重要角色，影響到 RNA 的 processing，牽涉到初步的轉譯作用、細胞核與粒線體的 splicing、核糖體與 spliceosome 的組裝等。在細胞功能上，主要是影響到胚胎形成、精子生成、細胞生長與分裂等，近年來也發現與細胞增生及癌細胞形成有關。

目前與癌症密切相關的 DEAD 有很多種，DDX1、DDX2、DDX5、DDX6、DDX9 等等，DDX1 在神經母細胞瘤以及視網膜母細胞瘤表現量都會明顯地增高，DDX2 在黑色素瘤與肝細胞癌也會大量表現，DDX5 會參與 c-H-ras 的 alternative splicing、在大腸癌中大量表現，DDX6 會參與並提高 c-myc 的轉譯作用、也在大腸癌中大量表現，DDX9 會與抑癌因子交互作用且在肺癌中大量表現，而本實驗在質譜儀打到的是 DDX3，在最近幾年也發現與癌症有密切相關。根據文獻指出，DDX3 在乳癌中是扮演致癌的角色 [56]，若在 MCF 10A 細胞大量表現 DDX3 會導致上皮間葉細胞瘤，並且有 invasion 的能力；然而，也有研究表示在表皮鱗狀細胞癌，會從細胞核跑到細胞質，扮演 growth-suppressive 功能、調控 p21 的轉錄活性，最終達到抑制癌細胞生長的功能。

## 第四節 本研究的缺陷

過去本實驗室選用肝癌細胞株 Hep3B，即含有 B 型肝炎病毒的基因，利用血清蛋白質體分析技術，鑑定並挑選四個可能為肝癌相關抗原的蛋白。然而由於每種肝癌細胞株分別有不同的特性，利用不同肝癌細胞株所鑑定到的肝癌相關抗原可能會有所不同，因此若是能直接選用肝癌病人組織作為材料會更好。

本實驗在利用一維電泳免疫轉染法篩選 hnRNP L、DEAD、lamin A/C 及 hnRNP B1 時，所選用的血清為正常人、B 型肝炎帶原者、肝硬化病人及肝癌病人的，然而由於尚未取得每個血清樣本本身的 AFP 含量的資料，以及肝癌病人的腫瘤大小，所以還沒有辦法比較 AFP 及所挑選的四個蛋白質，在腫瘤小於兩公分時的靈敏度的差異。

## 第五節 結論

由本實驗室過去鑑定到的、可能成為肝癌潛在生物標記的腫瘤相關自體抗原，挑選了研究上與癌症密切相關的幾個蛋白質 (hnRNP L、DEAD、lamin A/C、hnRNP B1) 作一維電泳以及免疫染色分析，利用卡方檢測統計分析，計算肝癌病患與正常人之血清抗體對蛋白質的反應是否有顯著性差異，發現肝癌病人血清相較於其他組別的血清，肝癌病患血清對 hnRNP L 與 DEAD 反應性都較強，有顯著性差異，而 lamin A/C 與 hnRNP B1 對血清的反應較差，統計結果也較沒差異。另外，肝癌病患同時偵測到 hnRNP L 和 DEAD 自體抗體的頻率為 46.8%，其靈敏度只比用 AFP 診斷小於兩公分腫瘤的靈敏度高 2%，但特異性高達 95%。肝癌病患只要偵測到 hnRNP L 或 DEAD 自體抗體的頻率為 85.5%，雖然靈敏度夠高，但其特異性卻有可能下降到 45%，比 AFP 偵測的特異性低很多。因此，雖然結合多種生物標記藉以提高特異性與靈敏度是目前的主流，但要提高靈敏度又同時維持其特異性，就目前來看還是有些許困難，可能需要讓 hnRNP L 再搭配其他肝癌相關抗原，才有辦法同時兼顧偵測自體抗體的特異性和靈敏度。



由於希望能夠把 hnRNP L 與 DEAD 應用到臨床檢測上，因此選擇了最常使用的酵素連結免疫吸附分析去做篩選進行統計分析，發現 hnRNP L 與 DEAD 的結果與一維電泳免疫染色之結果沒有完全符合，可能是不純物質導致，或是沒有抓到最佳蛋白質濃度的條件。接著看到由本實驗室找到的 hnRNP L 之 epitope 即 hnRNP L 199-264，與血清反應結果可發現，在統計上肝癌病人血清相較於其他組別的血清，確實有顯著性差異，而且差異性較 hnRNP L 好也明顯。

最後選擇了可以在同一個反應槽中同時偵測到多種蛋白質的方法 VeraCode Carboxyl Beads 技術，看是否能將所找到的腫瘤自體抗原應用在此技術上，若是可以想必能使診斷過程上更快速。因此選擇一個重組蛋白質 hnRNP L 199-264 做試驗，結果顯示肝癌病患血清對蛋白的螢光強度約為 2000-7000，而肝硬化病人血清對蛋白的反應值約 100-400，B 型肝炎帶原者的血清對蛋白的反應值約 100-300，正常人血清對蛋白的反應值約在 200 左右，統計分析結果也有顯著差異，而且其差異的值比酵素連結免疫吸附分析更大。因此，未來期望能讓 hnRNP L 配合其它抗原以提高特異性和靈敏度，並能應用在 VeraCode Carboxyl Beads 上，作為診斷肝癌早期的工具。

## 第六節 未來展望

未來，會探討在肝癌病人腫瘤細胞小於兩公分時，hnRNP L 及 DEAD 診斷的靈敏度，是否相較於 AFP 更適合做為肝癌生物標記。此外，也會將 hnRNP L 或 DEAD 搭配 AFP，看靈敏度是否比單獨用 AFP 作診斷來的好。另外，也會針對 Illumina Veracode Carboxyl Beads 作進一步開發，希望能實行在同一個反應槽中就能同時偵測兩種以上的自體抗體，縮短偵測時間增加效率。期望將來能使 hnRNP L 搭配其它肝癌相關自體抗原應用在 Illumina Veracode Carboxyl Beads 上並作為診斷肝癌早期的工具，實行多重生物標記偵測以提高特異性或靈敏度。

## 參考文獻

1. De Medicina, F., de Gastrohepatología, G., and de Antioquia, U. Pathology of liver tumors. *Suplemento Iatreia*. **2007**, *20*, S16-S17.
2. El-Serag, H. B., and Rudolph, L. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. **2007**, *132*, 2557-2576.
3. Hussain, S. P., Schwank, J., Staib, F., Wang, X. W., and Harris, C. C. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene*. **2007**, *26*, 2166-2176.
4. Seeger, C., and Mason, W. S. Hepatitis B virus biology. *Microbiol. Mol. Biol. R.* **2000**, *64*, 51-68.
5. Fung, J., Lai, C. L., and Yuen, M. F. Hepatitis B and C virus-related carcinogenesis. *Clin. Microbiol. Infec.* **2009**, *15*, 964-970.
6. El-Serag, H. B. Hepatocellular carcinoma and hepatitis C in the United States. *Hepatology*. **2002**, *36*, S74-S83.
7. Fattovich, G., Stroffolini, T., Zagni, I., and Donato, F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: Incidence and risk factors. *Gastroenterology*. **2004**, *127*, S35-S50.
8. Jackson, P. E., and Groopman, J.D. Aflatoxin and liver cancer. *Best Pract. Res. Cl. Ga.* **1999**, *13*, 545-555.
9. Morgan, T. R., Mandayam, S., and Jamal, M. M. Alcohol and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. **2004**, *127*, S87-S96.
10. Naccarato, R., and Farinati, F. Hepatocellular-carcinoma, alcohol, and cirrhosis – facts and hypothesis. *Digest. Dic. Sci.* **1991**, *36*, 1137-1142.
11. Donato, F., Tagger, A., Gelatti, U., Parrinello, G., Boffetta, P., Albertini, A., Decarli, A., Trevisi, P., Ribero, M. L., Martelli, C., Porru, S., and Nardi, G. Alcohol and hepatocellular carcinoma: The effect of lifetime intake and hepatitis virus

- infections in men and women. *Am. J. Epidemiol.* **2002**, *155*, 323-331.
12. Giannitrapani, L., Soresi, M., La Spada, E., Cervello, M., D'Alessandro, N., and Montalto, G. Sex hormones and risk of liver tumor. *Ann. Ny. Acad. Sci.* **2006**, *1089*, 228-236.
  13. Malaguarnera, G., Giordano, M., Paladina, I., Berretta, M., Cappellani, A., and Malaguarnera, M. Serum markers of hepatocellular carcinoma. *Dig. Dis. Sci.* **2010**.
  14. Gomaa, A. I., Khan, S. A., Leen, E. L. S., Waked, I., and Taylor-Robinson, S. D. Diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* **2009**, *15*, 1301-1314.
  15. Squillante, M. M., Cellerinoc, C., Clementea, R., Tontia, P., Giuliania, A., Fusillib, S., Siena, D. A., Pompili, M., and Caturelli, E. Pulsed Doppler US diagnosis of hepatocellular carcinoma and other liver focal lesions. *Eur. J. Ultrasound.* **1995**, *2*, 269-272.
  16. Zhao, H., Yao, J. L., Wang, Y., and Zhou, K. R. Detection of small hepatocellular carcinoma: Comparison of dynamic enhancement magnetic resonance imaging and multiphase multirow-detector helical CT scanning. *World J. Gastroenterol.* **2007**, *13*, 1252-1256.
  17. Schölmerich, J., and Schacherer, D. Diagnostic biopsy for hepatocellular carcinoma in cirrhosis: useful, necessary, dangerous, or academic sport? *Gut.* **2010**.
  18. Caturelli, E., and de Sio, I. Biopsy diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* **2008**, *47*, 2145-2145.
  19. Toniolo, P., Boffetta, P., Shuker, D. E. G., Rothman, N., Hulka, B., and Pearce, N. Application of biomarkers in cancer epidemiology. *Epidemiology.* **1998**, *9*, 681-682.
  20. Pepe, M. S., Etzioni, R., Feng, Z. D., Potter, J. D., Thompson, M. L., Thornquist, M., Winget, and M., Yasui, Y. Phases of biomarker development for early detection

- of cancer. *J. Natl. Cancer I.* **2001**, *93*, 1054-1061.
21. Sturgeon, C. Practice guidelines for tumor marker use in the clinic. *Clin. Chem.* **2002**, *48*, 1151-1159.
  22. Ian, J., and Robert, C. B. The CA 125 tumour-associated antigen: a review of the literature. *Hum. Reprod.* **1989**, *4*, 1-12.
  23. Partin, A. W., Catalona, W. J., Southwick, P. C., Subong, E. N. P., Gasior, G. H., and Chan, D. W. Analysis of percent free prostate-specific antigen (PSA) for prostate cancer detection: Influence of total PSA, prostate volume, and age. *Urology.* **1996**, *48*, 55-61.
  24. Dnistrian, A. M., Schwartz, M. K., Greenberg, E. J., Smith, C. A., and Schwartz, D. C. CA 15-3 and carcinoembryonic antigen in the clinical-evaluation of breast-cancer. *Clin. Chim. Acta.* **1991**, *200*, 81-93.
  25. Yoon, S. K. Recent advances in tumor markers of human hepatocellular carcinoma. *Intervirolgy.* **2008**, *51*, 34-41.
  26. Li, D., Mallory, T., and Satomura, S. AFP-L3: a new generation of tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Clin. Chim. Acta.* **2001**, *313*, 15-19.
  27. Nakatsura, T., Yoshitake, Y., Senju, S., Monji, M., Komori, H., Motomura, Y., Hosaka, S., Beppu, T., Ishiko, T., Kamohara, H., Ashihara, H., Katagiri, T., Furukawa, Y., Fujiyama, S., Ogawa, M., Nakamura, Y., and Nishimura, Y. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **2003**, *306*, 16-25.
  28. Daniele, B., Bencivenga, A., Megna, A. S., and Tinessa, V. Alpha-fetoprotein and ultrasonography screening for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* **2004**, *127*, S108-S112.
  29. Wang, C. S., Lin, C. L., Lee, H. C., Chen, K. Y., Chiang, M. F., Chen, H. S., Lin, T. J., and Liao, L. Y. Usefulness of serum des-gamma-carboxy prothrombin in

- detection of hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* **2005**, *11*, 6115-6119.
30. Grazi, G. L., Mazziotti, A., Legnani, C., Jovine, E., Miniero, R., Gallucci, A., Palareti, G., and Gozzetti, G. The role of tumor markers in the diagnosis of hepatocellular carcinoma, with special reference to the des-gamma-carboxy prothrombin. *Liver Transplant. Sur.* **1995**, *1*, 249-255.
31. Zhang, J. Y., and Tan, E. M. Autoantibodies to tumor-associated antigens as diagnostic biomarkers in hepatocellular carcinoma and other solid tumors. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2010**, *10*, 321-328.
32. Tan, E. M., and Zhang, J. Y. Autoantibodies to tumor-associated antigens: reporters from the immune system. *Immunol. Rev.* **2008**, *222*, 328-340.
33. Hung, C. F., Wu, T. C., Monie, A., and Roden, R. Antigen-specific immunotherapy of cervical and ovarian cancer. *Immunol. Rev.* **2008**, *222*, 43-69.
34. Desmetz, C., Maudelonde, T., Mange, A., and Solassol, J. Identifying autoantibody signatures in cancer: a promising challenge. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2009**, *6*, 377-386.
35. Diamandis, E. P. Analysis of serum proteomic patterns for early cancer diagnosis: Drawing attention to potential problems. *J. Natl. Cancer I.* **2004**, *96*, 353-356.
36. Poon, T. C. W., and Johnson, P. J. Proteome analysis and its impact on the discovery of serological tumor markers. *Clin. Chim. Acta.* **2001**, *313*, 231-239.
37. Desmetz, C., Cortijo, C., Mange, A., and Solassol, J. Humoral response to cancer as a tool for biomarker discovery. *J. Proteomics.* **2009**, *72*, 982-988.
38. Tan, H. T., Low, J., Lim, S. G., and Chung, M. C. M. Serum autoantibodies as biomarkers for early cancer detection. *FEBS J.* **2009**, *276*, 6880-6904.
39. Chen, Y., Zhou, Y. S., Qiu, S. M., Wang, K. J., Liu, S. W., Peng, X. X., Li, J. F., Tan, E. M., and Zhang, J. Y. Autoantibodies to tumor-associated antigens combined with

abnormal alpha-fetoprotein enhance immunodiagnosis of hepatocellular carcinoma.

*Cancer Lett.* **2010**, 289, 32-39.

40. Quinn, J., Gratalo, D., Haden, K., and Moon, J. Accurate multiplex cytokine assay developed with VeraCode technology. **2008**.
41. Himoto, T., Kuriyama, S., Zhang, J. Y., Chan, E. K. L., Kimura, Y., Masaki, T., Uchida, N., Nishioka, M., and Tan, E. M. Analyses of autoantibodies against tumor-associated antigens in patients with hepatocellular carcinoma. *Int. J. Oncol.* **2005**, 27, 1079-1085.
42. Garcia, H. H., Harrison, L. J. S., Parkhouse, R. M. E., Montenegro, T., Martinez, S. M., Tsang, V. C. W., and Gilman, R. H. A specific antigen-detection ELISA for the diagnosis of human neurocysticercosis. *T. Roy. Soc. Trop. Med. H.* **1998**, 92, 411-414.
43. Bei, R., Budillon, A., Reale, M. G., Capuano, G., Pomponi, D., Budillon, G., Frati, L., and Muraro, R. Cryptic epitopes on alpha-fetoprotein induce spontaneous immune responses in hepatocellular carcinoma, liver cirrhosis, and chronic hepatitis patients. *Cancer Res.* **1999**, 59, 5471-5474.
44. Lubin, R., Schlichtholz, B., Bengoufa, D., Zalzman, G., Tredaniel, J., Hirsch, A., Defromental, C. C., Preudhomme, C., Fenaux, P., Fournier, G., Mangin, P., Laurentpuic, P., Pelletier, G., Schlumberger, M., Desgrandchamps, F., Leduc, A., Peyrat, J. P., Janin, N., Bressac, B., and Soussi, T. Analysis of p53 antibodies in patients with various cancers define B-Cell epitopes of human p53: Distribution on primary structure and exposure on protein surface1. *Cancer Res.* **1993**, 53, 5872-5876.
45. Hernandez-Vargas, H., Lambert, M. P., Le Calvez-Kelm, F., Gouysse, G., McKay-Chopin, S., Tavtigian, S. V., Scoazec, J. Y., and Herceg, Z. Hepatocellular carcinoma displays distinct DNA methylation signatures with potential as clinical

- predictors. *PLoS ONE*. **2010**, *5*, e9749.
46. Du, R., Tantisira, K., Carey, V., Bhattacharya, S., Metje, S., Kho, A. T., Klanderma, B. J., Gaedigk, R., Lazarus, R., Mariani, T. J., Leeder, S., and Weiss, S. T. Platform dependence of inference on gene-wise and gene-set involvement in human lung development. *BMC Bioinformatics*. **2009**, *10*, 189.
  47. Krecic, A. M., and Swanson, M. S. hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1999**, *11*, 363-371.
  48. Dreyfuss, G., Matunis, M. J., Pinolroma, S., and Burd, C. G. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 289-321.
  49. Hahn, B., Kim, Y. K., Kim, J. H., Kim, T. Y., and Jang, S. K. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L interacts with the 3' border of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J. Virol.* **1998**, *72*, 8782-8788.
  50. Shih, S. C., and Claffey, K. P. Regulation of human vascular endothelial growth factor mRNA stability in hypoxia by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 1359-1365.
  51. Hamilton, B. J., Nichols, R. C., Tsukamoto, H., Boado, R. J., Pardridge, W. M., and Rigby, W. F. C. hnRNP A2 and hnRNP L bind the 3' UTR of glucose transporter 1 mRNA and exist as a complex in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **1999**, *261*, 646-651.
  52. Hui, J., Stangl, K., Lane, W. S., and Bindereif, A. hnRNP L stimulates splicing of the *eNOS* gene by binding to variable-length CA repeats. *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 33-37.
  53. Siapka, S., Patrino-Georgoula, M., Vlachoyiannopoulos, P. G., and Guialis, A. Multiple specificities of autoantibodies against hnRNP A/B proteins in systemic rheumatic diseases and hnRNP L as an associated novel autoantigen. *Autoimmunity*. **2007**, *40*, 223-233.

54. Yang, F., Chen, I. H., Xiong, Z. Y., Yan, Y., Wang, H., and Yang, X. F. Model of stimulation-responsive splicing and strategies in identification of immunogenic isoforms of tumor antigens and autoantigens. *Clin. Immunol.* **2006**, *121*, 121-133.
55. Gustafson, E. A., and Wessel, G. M. DEAD-box helicases: Posttranslational regulation and function. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **2010**, *395*, 1-6.
56. Botlagunta, M., Vesuna, F., Mironchik, Y., Raman, A., Lisok, A., Winnard, P., Mukadam, S., Van Diest, P., Chen, J. H., Farabaugh, P., Patel, A. H., and Raman, V. Oncogenic role of DDX3 in breast cancer biogenesis. *Oncogene.* **2008**, *27*, 3912-3922.
57. 林敬斌醫師-肝癌在台灣
58. 中國醫藥大學附設醫院肝病中心-網站





## 圖表

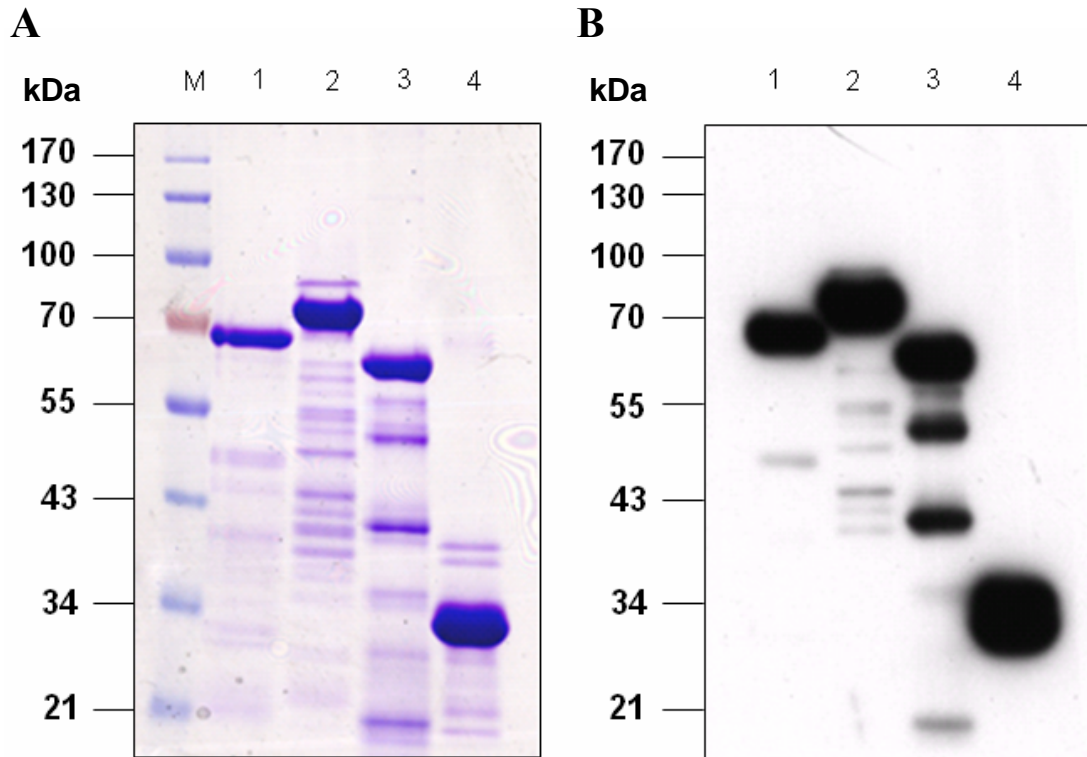
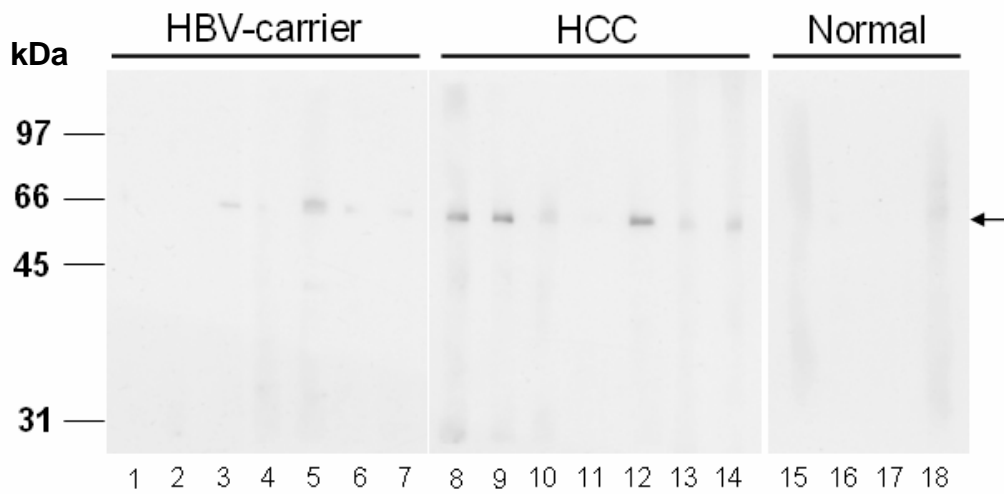


Figure 1. **Purification of the recombinant proteins.** A. Purified recombinant hnRNP L (lanes 1), DEAD (lanes 2), lamin A/C (lanes 3) and hnRNP B1 (lanes 4) were electrophoresed on a 12.5 % SDS gel and detected by Coomassie Blue. B. Purified recombinant hnRNP L (lanes 1), DEAD (lanes 2), lamin A/C (lanes 3) and hnRNP B1 (lanes 4) were transferred to a PVDF membrane and immunoblotted with anti-HisTag antibody. Lane M, molecular mass markers.

**A**



**B**

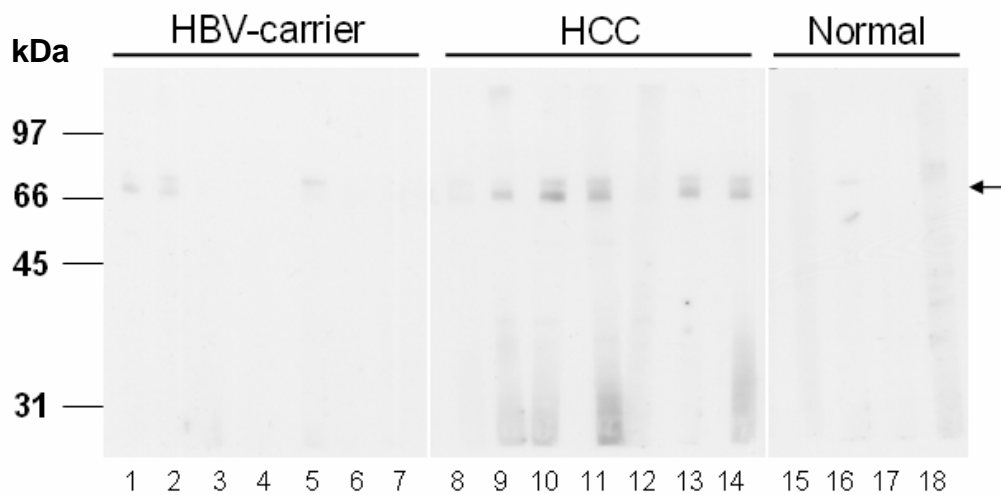
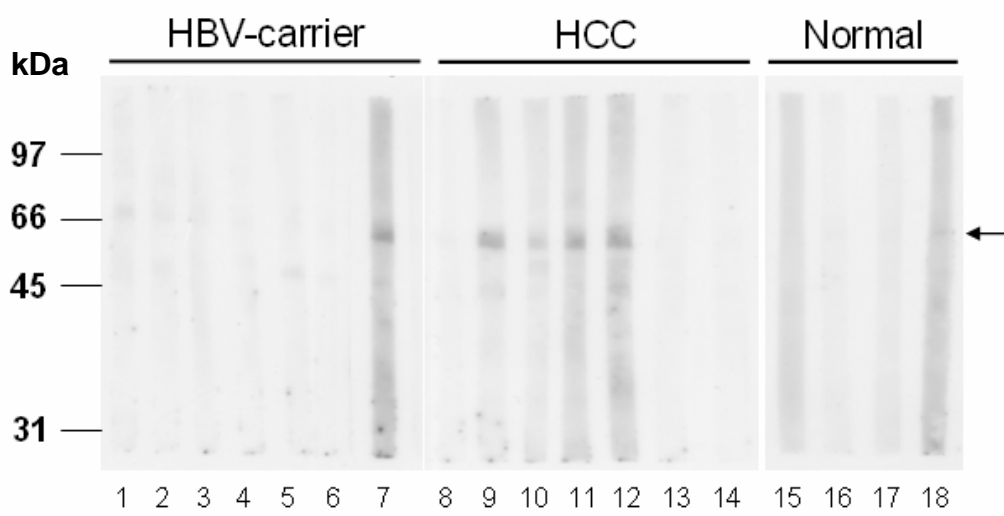


Figure 2. **One-dimensional immunoblotting of recombinant proteins using serum samples.** Recombinant proteins (A, hnRNP L, 66 kDa; B, DEAD, 70 kDa) were electrophoresed on a 10 % SDS gel, transferred to a PVDF membrane and immunoblotted with sera from HBV-carrier patients (A, B, lanes 1-7), HBV-carrier patients with HCC (A, B, lanes 8-14), or normal individuals (A, B, lanes 15-18).

C



D

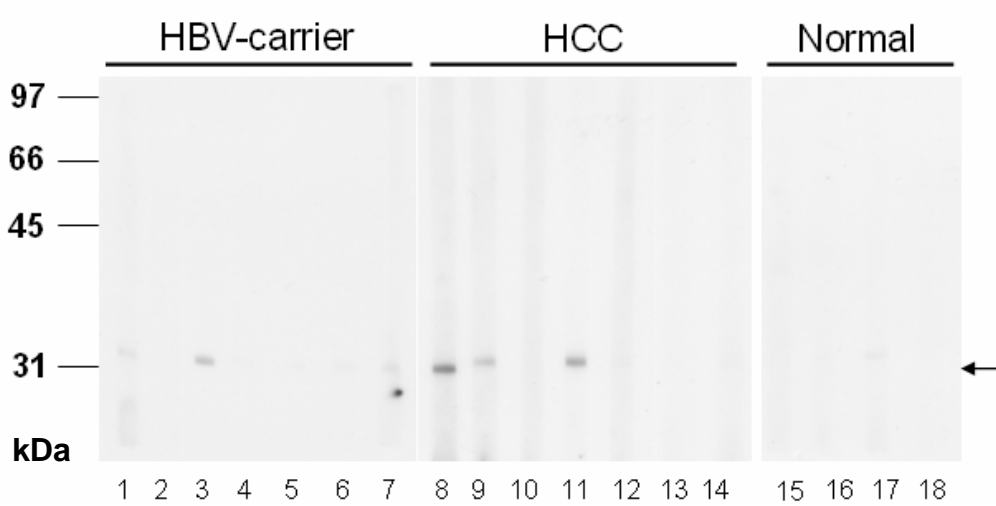


Figure 2. (continued) **One-dimensional immunoblotting of recombinant proteins using serum samples.** Recombinant proteins (C, lamin A/C, 64 kDa; D, hnRNP B1, 30 kDa) were electrophoresed on a 10 % SDS gel, transferred to a PVDF membrane and immunoblotted with sera from HBV-carrier patients (C, D, lanes 1-7), HBV-carrier patients with HCC (C, D, lanes 8-14), or normal individuals (C, D, lanes 15-18).

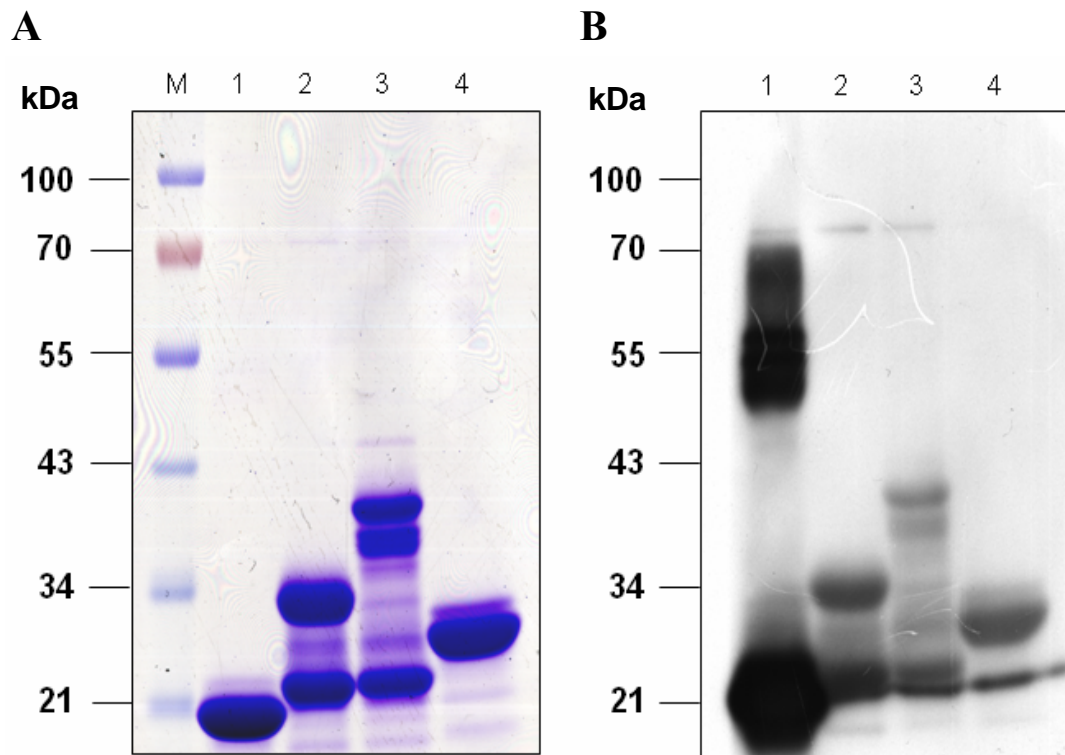


Figure 3. **Purification of the recombinant proteins.** A. Purified recombinant GST (lanes 1), hnRNP L 52-265 (lanes 2), hnRNP L 52-399 (lanes 3) and hnRNP L 199-264 (lanes 4) were electrophoresed on a 12.5 % SDS gel and detected by Coomassie Blue. B. Purified recombinant GST (lanes 1), hnRNP L 52-265 (lanes 2), hnRNP L 52-399 (lanes 3) and hnRNP L 199-264 (lanes 4) were transferred to a PVDF membrane and immunoblotted with anti-GST antibody. Lane M, molecular mass markers.

**A**

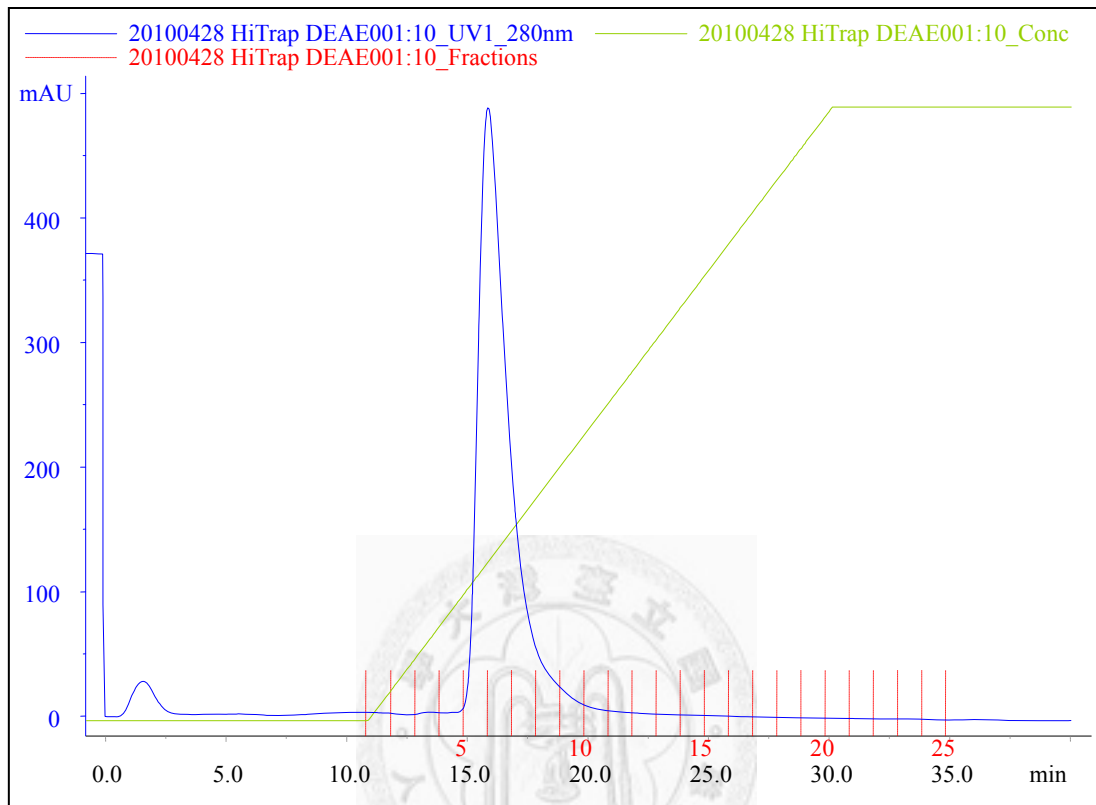


Figure 4. **Purification of hnRNP L 199-264 by FPLC using a DEAE anion exchange column.** (A) FPLC was performed at 1 ml/min with 10 mM phosphate buffer (pH 8.5) and a linear gradient of NaCl. mAU represents milli absorbance units at 280 nm.

**B**

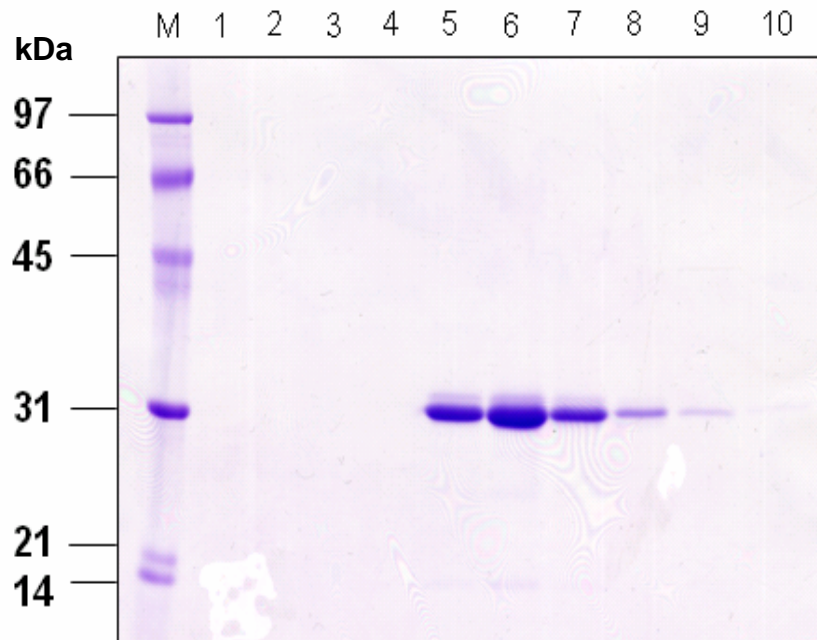


Figure 4. (continued) **Purification of hnRNP L 199-264 by FPLC using a DEAE anion exchange column.** (B) SDS/PAGE analysis of recombinant proteins hnRNP L 199-264 and each of the numbered fractions. Lanes 5-9, hnRNP L 199-264. Lane M, molecular mass markers.

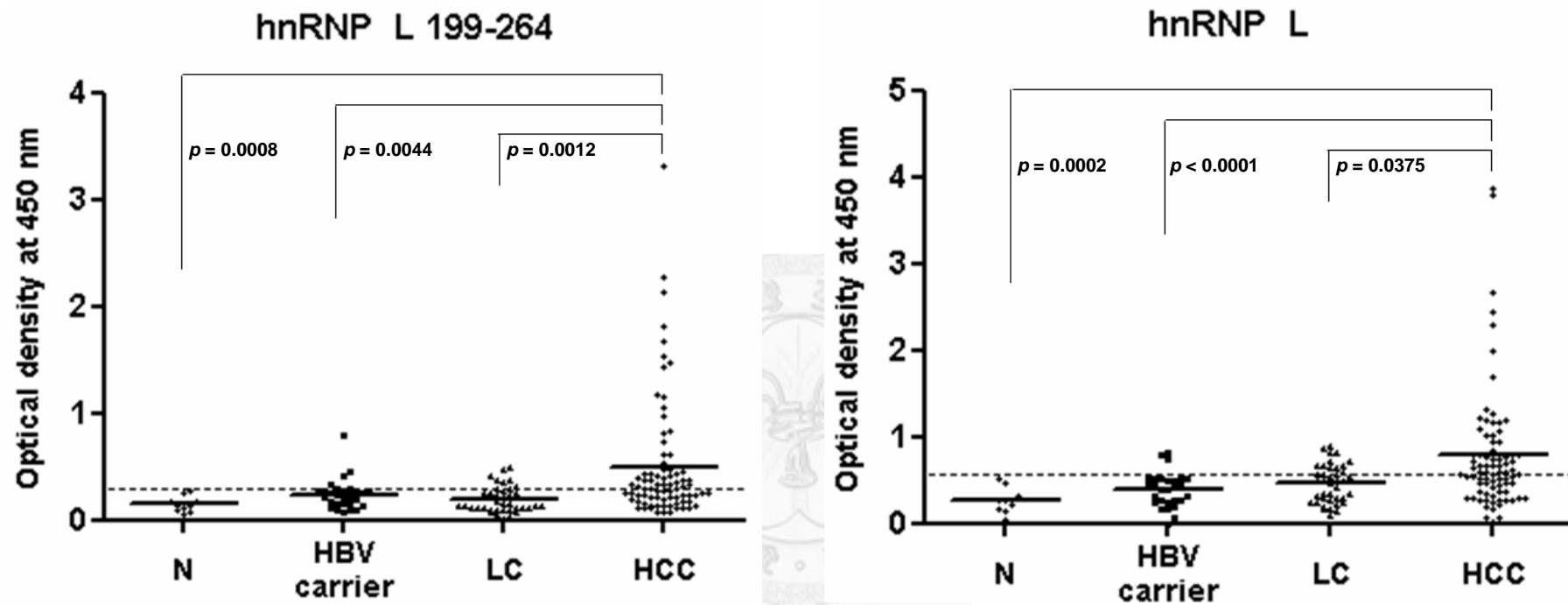


Figure 5. **Anti-hnRNP L autoantibody levels measured by ELISA.** N: normal individuals (n=10). HBV-carrier: HBV-carrier patients (n=28). LC: cirrhosis patients (n=40). HCC: hepatocellular carcinoma (n=80).

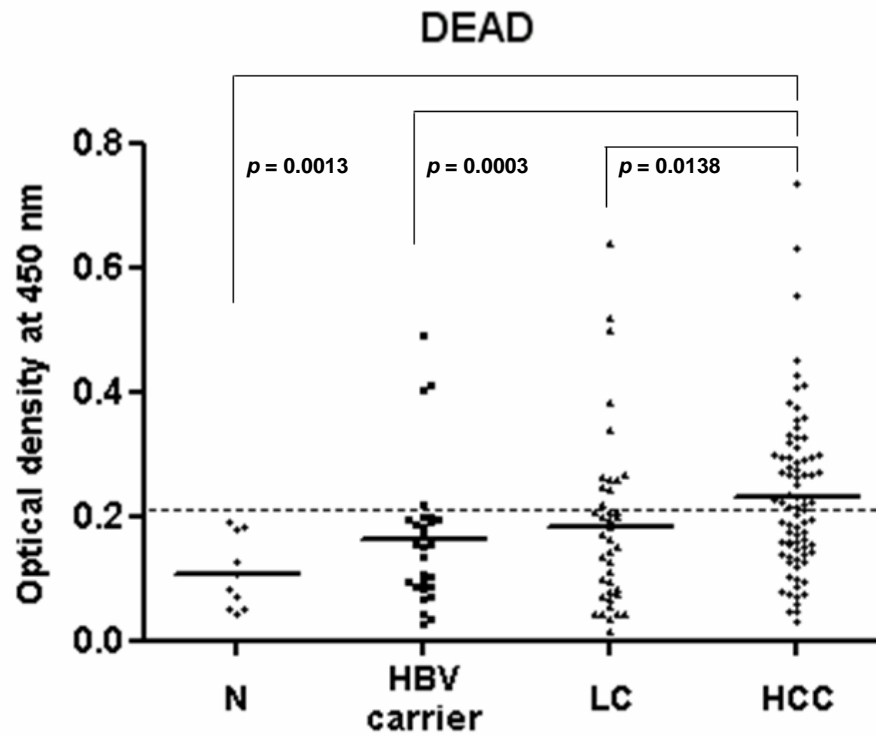


Figure 6. **Anti-DEAD autoantibody levels measured by ELISA.** N: normal individuals (n=10). HBV-carrier: HBV-carrier patients (n=28). LC: cirrhosis patients (n=40). HCC: hepatocellular carcinoma (n=80).



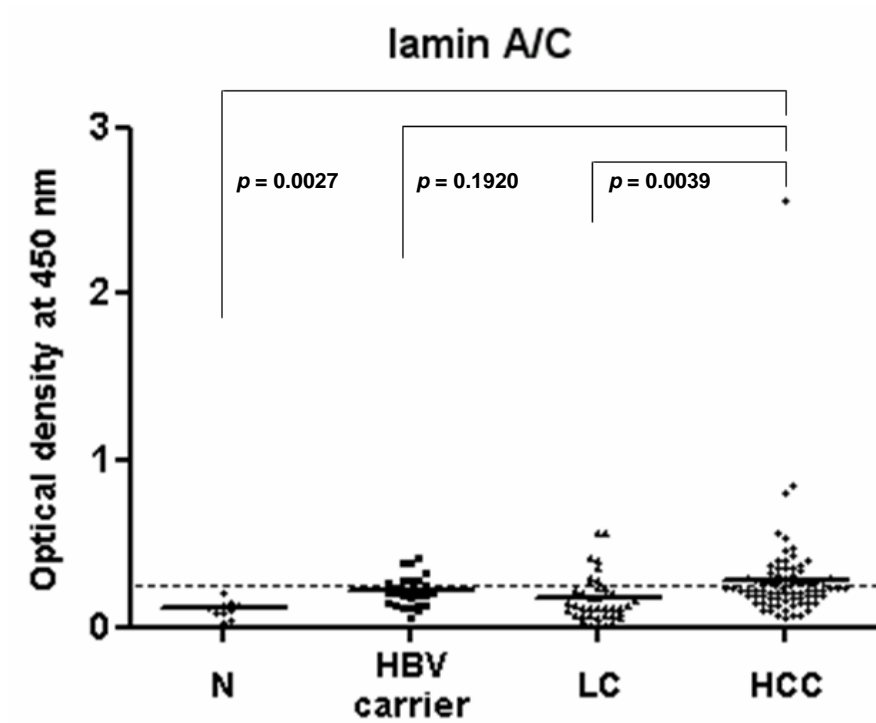


Figure 7. **Anti-lamin A/C autoantibody levels measured by ELISA.** N: normal individuals (n=10). HBV-carrier: HBV-carrier patients (n=28). LC: cirrhosis patients (n=40). HCC: hepatocellular carcinoma (n=80).

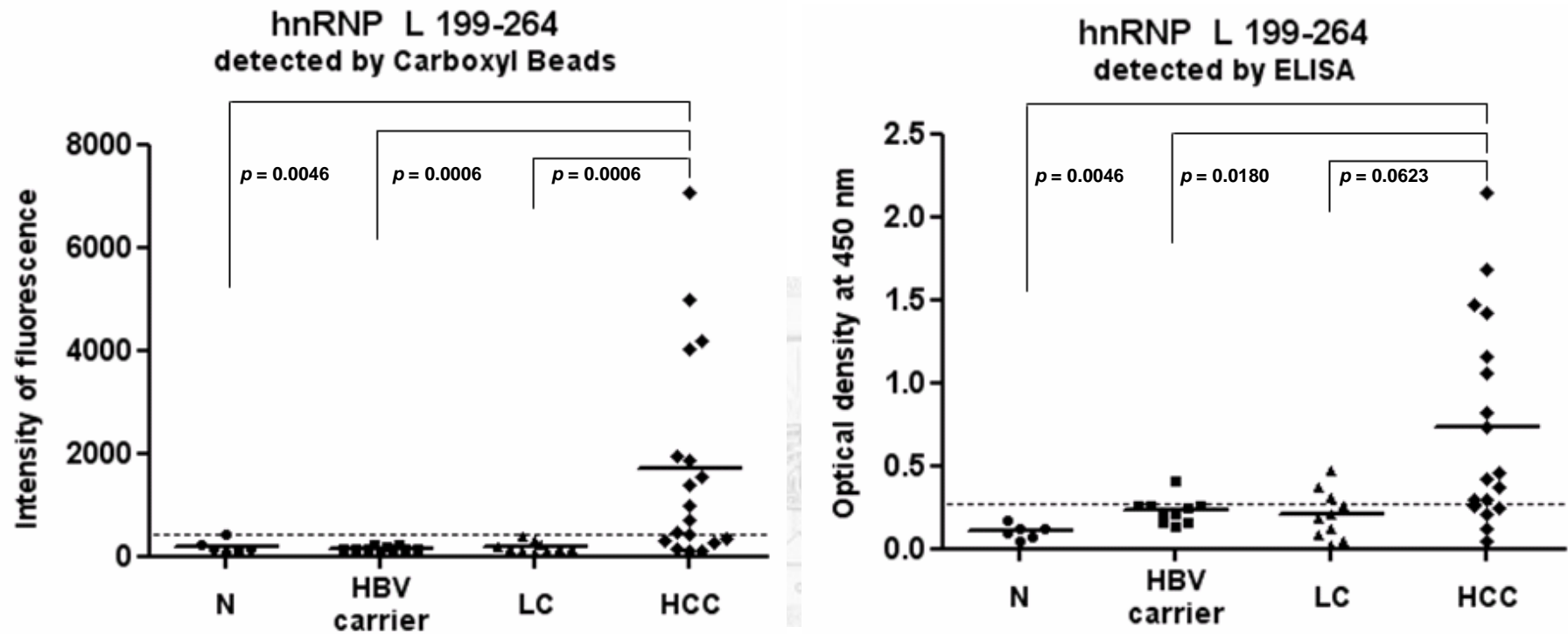


Figure 8. **Contrast between techniques of Carboxyl Beads with ELISA.** N: normal individuals (n=6). HBV-carrier: HBV-carrier patients (n=10). LC: cirrhosis patients (n=10). HCC: hepatocellular carcinoma (n=18).

**Table 1. Frequency of seroreactivity with a single recombinant antigen in patients with hepatocellular diseases or controls and the odds ratio.**

Antigens	Positive no. (%)				OR (95 % CI), <i>p</i> value <sup>a</sup>		
	Normal (n = 20)	HBV-carrier (n = 50)	HBV-LC (n = 20)	HBV-HCC (n = 62)	HBV-HCC vs. Normal	HBV-HCC vs. HBV-carrier	HBV-HCC vs. HBV-LC
hnRNP L	0 (0)	6 (8.7) <sup>α</sup>	11 (14.1) <sup>β</sup>	40 (64.5)	12.8 (4.70-34.9), < 0.0001	11.4 (5.56-23.3), < 0.0001	8.68 (4.35-17.3), < 0.0001
DEAD	0 (0)	12 (24.0)	6 (30.0)	42 (67.7)	14.6 (5.34-39.7), < 0.0001	5.68 (2.70-11.9), < 0.0001	4.65 (1.68-12.8), 0.0029
lamin A/C	0 (0)	5 (10.0)	6 (30.0)	26 (41.9)	6.77 (2.31-19.9), 0.0005	4.86 (2.12-11.1), 0.0002	1.64 (0.59-4.58), 0.3414
hnRNP B1	0 (0)	11 (22.0)	4 (20.0)	27 (43.6)	7.01 (2.42-20.4), 0.0003	2.59 (1.18-5.67), 0.0166	2.69 (0.96-7.56), 0.0590

<sup>a</sup> *p* value was obtained by chi-square test.

<sup>α</sup> Serum sample number in this group is 69.

<sup>β</sup> Serum sample number in this group is 78.

Table 2. Effect of an increased number of recognized antigens on the odds ratio.

Antigens	Positive no. (%)				OR (95 % CI), <i>p</i> value <sup>a</sup>		
	Normal (n = 20)	HBV-carrier (n = 50)	HBV-LC (n = 20)	HBV-HCC (n = 62)	HBV-HCC vs. Normal	HBV-HCC vs. HBV-carrier	HBV-HCC vs. HBV-LC
hnRNP L or DEAD	0 (0)	14 (28.0)	11 (55.0)	53 (85.5)	40.2 (14.1-114.6), < 0.0001	10.7 (5.02-22.8), < 0.0001	5.80 (1.73-19.4), 0.0042
hnRNP L and DEAD	0 (0)	0 (0)	1 (5.0)	29 (46.8)	7.55 (2.65-21.5), 0.0001	11.2 (4.80-26.1), < 0.0001	5.92 (2.09-16.8), 0.0007
hnRNP L and lamin A/C	0 (0)	0 (0)	1 (5.0)	19 (30.6)	5.48 (1.67-18.0), 0.0047	8.64 (3.22-23.2), < 0.0001	3.95 (1.23-12.7), 0.0202
DEAD and lamin A/C	0 (0)	3 (6.0)	1 (5.0)	20 (32.3)	5.63 (1.75-18.1), 0.0035	4.93 (1.97-12.3), 0.0006	4.11 (1.30-12.9), 0.0152
hnRNP L, DEAD and lamin A/C	0 (0)	0 (0)	0 (0)	15 (24.2)	4.95 (1.35-18.1), 0.0150	7.90 (2.66-23.5), 0.0002	4.95 (1.35-18.1), 0.0150
hnRNP L, DEAD and hnRNP B1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	14 (22.6)	4.83 (1.28-18.3), 0.0196	7.74 (2.52-23.7), 0.0003	4.83 (1.28-18.3), 0.0196

<sup>a</sup> *p* value was obtained by chi-square test.