

國立臺灣大學醫學院微生物學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Microbiology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

C 型肝炎病毒非結構性蛋白質 NS4B 經由細胞 FASTK

對 Fas/FasL 訊息傳遞產生的影響

The Effects of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B

on Fas/FasL Signaling – Through Fas-Activated

Serine/Threonine Kinase (FASTK)

陳彥璋

Yen-Chang Chen

指導教授：張 鑫 博士

Advisor: Shin C. Chang, Ph. D.

中華民國九十七年七月

July 2008

國立臺灣大學醫學院
微生物學研究所

碩士論文

C型肝炎病毒非結構性蛋白質NS5B經由細胞FASTK對Fas/FasL訊息傳遞產生的影響

陳彥璋 撰

97
7

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

論文中文題目

C 型肝炎病毒非結構性蛋白質 NS4B 經由細胞 FASTK
對 Fas/FasL 訊息傳遞產生的影響

論文英文題目

The Effects of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B
on Fas/FasL Signaling – Through Fas-Activated
Serine/Threonine Kinase (FASTK)

本論文係陳彥璋君 (R95445122) 在國立臺灣大學醫學院
微生物學研究所微生物及免疫學組完成之碩士學位論文，於民
國九十七年七月十日承下列考試委員審查通過及口試及格，特
此證明

口試委員：

_____ (簽名)
(指導教授)

系主任、所長 _____ (簽名)

摘要

C 型肝炎病毒 (Hepatitis C virus, HCV) 非結構性蛋白質 NS4B 為一鑲嵌於內質網之疏水性蛋白質，能改變 C 型肝炎病毒感染細胞內質網的構形並形成網狀膜 (membranous web)，而此網狀膜為病毒複製自身基因的位置；目前在病毒複製及細胞毒害方面，NS4B 蛋白質的作用仍不清楚。先前本實驗室研究指出，當在癌化肝細胞 Huh-7 及腎細胞 293 表現 NS4B 蛋白質時，細胞中的 Fas-activated serine/threonine kinase (FASTK) 的 mRNA 量有下降的趨勢。本實驗首先建立一穩定細胞株—HepG2-2-NS4B，此細胞株能經由 doxycycline 誘導表現 NS4B 蛋白質；藉由 real time PCR 觀察，此穩定細胞株經誘導表現 NS4B 蛋白質時，細胞中的 FASTK 的 mRNA 量相較於未誘導表現 NS4B 蛋白質之細胞減少五成。先前已知 FASTK 能調控細胞中 Fas mRNA 的選擇性剪接，使細胞轉譯出具相反生理意義之 Fas isoforms，進而對於 Fas 活化產生不同程度之耐受度。因此在本實驗中，利用 ELISA 檢視細胞製造、分泌至細胞外之 soluble Fas 及細胞中所有 Fas 的量，結果發現誘導表現 NS4B 蛋白質的穩定細胞株和母細胞株相較時，NS4B 穩定細胞株釋放至培養基的 soluble Fas 的量是母細胞株的 2.5 倍、而其釋放至培養基的 soluble Fas 佔所有 Fas 的比例則為母細胞株的 1.4 倍。當利用一能活化 Fas 受器之 anti-Fas 抗體去誘導穩定細胞株進行細胞凋亡，再藉由 trypan blue exclusion assay 去監測細胞存活率則發現，穩定細胞株誘導表現 NS4B 蛋白質時，其細胞存活率為未受誘導之穩定細胞株的 1.7 倍；然而進一步檢視穩定細胞株受到 anti-Fas 抗體刺激後 caspase 3 活化狀況，發現接受 anti-Fas 抗體刺激後 NS4B 穩定細胞株之 caspase 3 活性降低到母細胞株的 41%。推測 soluble Fas 量的上升及 caspase 3 活化程度的降低有直接關聯，而 FASTK mRNA 的下降也許參與其中；然而細胞存活率的上升可能是由於 NS4B 蛋白質藉由影響 FASTK 或其它細胞因子，進而調控細胞凋亡以外的訊息傳遞過程所造成，至於真正造成上述現象之機轉則待進一步實驗去釐清。

關鍵詞：NS4B, FASTK, Fas

Abstract

Nonstructural protein 4B (NS4B) of hepatitis C virus (HCV) is a hydrophobic protein that integrates into endoplasmic reticulum (ER) and causes the formation of membranous web, a hypothetical site for viral replication in the cells. However, the roles of NS4B involved in virus life cycle and pathophysiologic effects remain elusive. Results from our previous studies indicate that NS4B plays a role in the down regulation of the expression of Fas-activated serine/threonine kinase (FASTK) mRNA. In this study, the stable cell line HepG2-2-NS4B that can express NS4B protein upon doxycycline induction was established. The level of FASTK mRNA declined to 51% in the doxycycline-induced, NS4B-expressing HepG2-2-NS4B cells, compared with that of non-induced HepG2-2-NS4B cells. FASTK is a transcriptional regulator that can modulate the alternative splicing of Fas gene and promote the translation of Fas variants with opposite physiological effects. Since the production of soluble Fas isoform may render cells more resistant to Fas-activated apoptosis, it is possible that NS4B protein down-regulates FASTK mRNA expression and affects Fas/FasL signaling pathway. The amount of secreted soluble Fas of HepG2-2-NS4B was 2.5-fold that of the parental HepG2-2 cells; the ratio of secreted soluble Fas to the total amount of Fas produced by HepG2-2-NS4B was 1.4-fold that of the HepG2-2 cells. When cells underwent anti-Fas antibody-induced apoptosis, the cell viability of HepG2-2-NS4B with doxycycline-induction was 1.7-fold that of HepG2-2-NS4B without doxycycline-treatment. Besides, the level of caspase 3 activation of HepG2-2-NS4B was 41 % that of HepG2-2 when caspase 3 activation was examined as another indicator of cells underwent anti-Fas antibody-induced apoptosis. Taken together, the results link the elevation of soluble Fas level to the repression of caspase 3 activity and down-regulation of FASTK mRNA. Signaling pathways other than the FASTK-mediated apoptosis may also contribute to

the increased cell viability regulated by the viral NS4B protein.

Key words: NS4B, FASTK, Fas

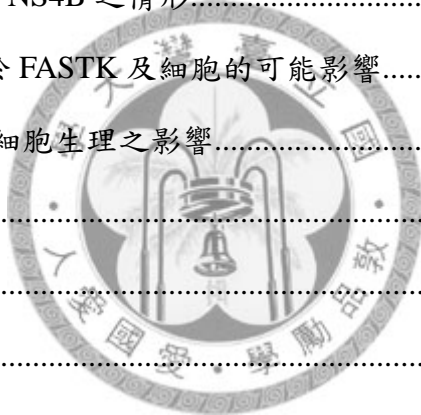


目 錄

口試委員會審定書.....	i
中文摘要.....	ii
英文摘要.....	iii
目錄.....	v
圖表目錄.....	viii
第一章 緒論.....	1
一、C 型肝炎病毒.....	1
1.1 C 型肝炎病毒顆粒及基因體之構造.....	1
1.2 C 型肝炎病毒之複製.....	1
1.3 C 型肝炎相關之肝病變.....	2
二、肝癌.....	3
2.1 肝癌致癌因子.....	3
2.2 肝癌發展之可能機制及其與細胞凋亡的關聯.....	4
2.3 細胞凋亡機制.....	5
三、細胞蛋白質 Fas 受器.....	6
3.1 Fas、FasL 及其訊息傳遞.....	6
3.2 Fas 異構物、基因及 alternative splicing.....	8
四、細胞蛋白質 FASTK.....	9
五、C 型肝炎病毒非構性蛋白 NS4B.....	10
5.1 NS4B 的特性及病毒複製.....	10
5.2 NS4B 對細胞生理之影響.....	12
5.3 NS4B 與細胞蛋白之交互作用.....	13
第二章 研究方向.....	14

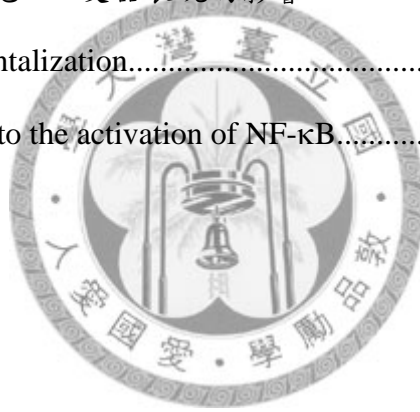
第三章 材料與方法.....	15
一、藥品.....	15
二、酵素.....	16
三、抗體.....	16
四、細胞培養液及轉染試劑.....	16
五、套組試劑.....	17
六、其它.....	17
七、實驗室提供之質體.....	17
7.1 pcDNA-NS4B-V5HisTopo.....	17
7.2 pHyg-TRE-NS4B-V5.....	17
7.3 pTet-On.....	18
7.4 pcDNA-FASTK-V5HisTopo.....	18
八、細胞株及細胞培養.....	18
8.1 HepG2-2 細胞株.....	18
8.2 HepG2-2-NS4B 細胞株.....	18
九、DNA 轉染.....	19
十、細胞全蛋白質之收取.....	19
十一、蛋白質定量.....	20
十二、正十二烷硫酸鈉-聚丙醯胺板膠電泳.....	20
十三、西方墨點法.....	21
十四、萃取 RNA.....	21
十五、反轉錄-聚合酵素鏈反應.....	22
十六、即時定量聚合酵素鏈鎖反應.....	22
十七、Fas 抗體刺激細胞凋亡.....	22
十八、Trypan Blue Exclusion Assay.....	23
十九、Caspase 3 活性測定.....	23

二十、ELISA for sFas.....	24
第四章 結果.....	25
一、HepG2-2-NS4B-V5 穩定細胞株的建立及表現.....	25
二、NS4B 蛋白質對 FASTK 基因表現量的影響.....	25
三、NS4B 對 Fas 活化所導致之細胞凋亡的影響.....	26
3.1 細胞活性.....	26
3.2 Caspase 3 活性.....	27
四、NS4B 蛋白質對 Fas 異構物表現的影響.....	28
第五章 討論.....	30
一、穩定細胞株表現 NS4B 之情形.....	30
二、NS4B 蛋白質對於 FASTK 及細胞的可能影響.....	31
三、NS4B 蛋白質對細胞生理之影響.....	32
第六章 圖表.....	37
第七章 附圖.....	44
第八章 參考文獻.....	46



圖表目錄

表一、即時定量聚合酵素反應使用的引子序列及反應條件.....	37
圖一、穩定細胞株 HepG2-2-NS4B 經 doxycycline 誘導表現 NS4B 蛋白質.....	38
圖二、NS4B 蛋白質抑制 FASTK mRNA 表現量.....	38
圖三、Anti-Fas 抗體(CH11)劑量與 HepG2-2 細胞凋亡之時程.....	39
圖四、NS4B 蛋白質對細胞接受細胞凋亡刺激後之細胞活性的影響.....	40
圖五、Anti-Fas 抗體(CH11)活化 caspase 3 之時程.....	41
圖六、NS4B 蛋白質對細胞接受細胞凋亡刺激後之 caspase 3 活化情形的影響.....	42
圖七、NS4B 蛋白質對細胞 Fas 受器表現的影響.....	43
附圖一、CD95 compartmentalization.....	44
附圖二、Pathways leading to the activation of NF- κ B.....	45



緒論

第一節 C 型肝炎病毒

1.1 C 型肝炎病毒顆粒及基因體之構造

C 型肝炎病毒(HCV) 始發現於 1989 年，為非 A 非 B 型肝炎病毒(non-A, non-B hepatitis virus)、亦即目前所稱之 C 型肝炎的病原體(1)；C 型肝炎病毒屬於黃病毒科(Flaviviridae)科下的 C 型肝炎病毒屬(Hepacivirus)(2)，在電子顯微鏡下可觀察到 C 型肝炎病毒顆粒為一直徑約 50~65nm、具脂質外套膜(envelope)且表面具有棘狀突出物(spike)之圓球體，除去外套膜後可得一直徑約 30~40nm、由病毒蛋白及病毒核酸(基因體)所構成之核(3-7)。C 型肝炎病毒基因體全長約 9600 個核苷酸，結構包含 5'端非轉譯區(non-coding region, NCR)，單一開放閱讀框架(open reading frame, ORF)，以及 3'端非轉譯區。其中 5'和 3'端的非轉譯區之 RNA 序列及二級結構被認為在 C 型肝炎病毒基因體複製過程及轉譯作用上扮演相當重要的角色(8, 9)。

1.2 C 型肝炎病毒之複製

C型肝炎病毒主要感染肝細胞，但也可以在單核球、巨噬細胞及神經組織中觀察到C型肝炎病毒的複製(10-13)；病毒顆粒藉由膜蛋白質(E1, E2)和細胞表面結合因子如scavenger receptor class B type I (SR-BI)、CD81、claudin 1等產生專一性結合(14, 15)，而順利連接到細胞上，再透過受器所調控的內嚥作用(receptor-mediated endocytosis)及膜融合使病毒基因體進入細胞中。單股正向的RNA基因體釋放到宿主細胞質後，會利用宿主細胞之核糖體(ribosome)及病毒核酸5'端之內部核糖體進入位(internal ribosome entry site, IRES)進行轉譯(8)，由開放閱讀區能轉譯出一個約 3000個胺基酸的多蛋白質(polyprotein)前驅物，經由切割修飾，產生至少十個蛋白質產物。其中由宿主細胞蛋白切割酵素(signal peptidase)切割多蛋白前驅物的N端部

份，產生四個結構性蛋白質(structure protein)，包括：核心蛋白質(core protein)、外套膜蛋白質E1及E2(envelope protein)，以及p7 蛋白質；而多蛋白前驅物的C端則由病毒本身所帶的蛋白切割酵素所切割，產生六個非結構性蛋白質(non-structure protein)，包括NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B，之後再由非結構性蛋白質進行病毒複製；另外核心蛋白序列加1的開放閱讀框架可以轉譯出F蛋白質(alternative reading frame protein)(16)。

HCV 複製複合體坐落在細胞內膜狀網(membranous web)構造上，這些膜可能是原本就存在宿主細胞內的，或是由病毒蛋白質所誘導出的新構造(17)。複製基因體時須先以正股 RNA 為模板，經病毒蛋白複製出負股 RNA，再以此負股 RNA 為模板製造出正股 RNA，接著新製造出的正股 RNA 和核蛋白(core)形成 nucleocapsid，然後再包入由細胞膜衍生物及病毒膜蛋白(E1,E2)所構成之病毒殼體，產生病毒顆粒(16)。

因為 C 型肝炎病毒核糖核酸複製酶 NS5B (RNA polymerase)缺乏校正(proof-reading)功能而使得複製出之基因體子代呈現高變異性，導致即使在單一宿主体內之 C 型肝炎病毒顆粒間之基因體核糖核酸序列亦呈現程度不一之差異(quasi-species)(18)。目前根據病毒核酸序列分類，可將其區分為六個的基因型(genotype)，每個基因型之間的序列相似性(sequence homology)小於 70%(19)，而每種基因型又可再細分為不同的基因亞型(subgenotype)，依發現順序以字母 a、b、c 等命名，而流行於台灣的 C 型肝炎病毒則以 1b 為主。

1.3 C 型肝炎相關之肝病變

C 型肝炎病毒感染宿主後，其病毒蛋白質會導致抗體的產生，但因感染初期病毒複製速度快($10^{10}\sim 10^{12}$ viral particles per day)、病毒基因的高突變率、病毒蛋白質的高變異性及病毒蛋白對宿主細胞和免疫系統的影響，使得部分宿主並無法有效地藉由免疫系統來根除 C 型肝炎病毒感染，造成持續之 C 型肝炎病毒慢性感染。

C 型肝炎病毒感染人口有 20% 會發展成急性感染，其餘 80% 則會轉變成慢性感染；其感染早期無明顯症狀，急性感染所引發之症狀亦不如 A 型、B 型肝炎嚴重，不易造成猛爆性肝炎，且多半能自行痊癒；慢性感染人口中 80% 患者只會有輕微病狀，另外 20% 的慢性感染則會發展成肝臟纖維化(fibrosis)、脂肪肝 (steatosis)、冷凝血球症(cryoglobulinemia), 其中約 10%~30% 的慢性肝炎會發展成肝硬化(cirrhosis)，而 2~5% 之肝硬化病人會進一步發展成肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)(20, 21)。

第二節 肝癌 (Hepatocellular Carcinoma, HCC)

2.1 肝癌致癌因子

目前全球每年被診斷罹患肝癌的病患約有五十五萬人，根據研究指出，20% 之肝癌和生活因素如酒精濫用(>50-70g/day)、黃麴毒素(afatoxin)等之食物污染，生理條件如脂肪肝、血色素沉著症(haemochromatosis)、糖尿病、年齡、性別等，以及其它免疫代謝異常如自體免疫肝炎(autoimmune hepatitis)、甲一型抗胰蛋白酶缺乏症(α -1 anti-trypsin deficiency)相關(22)，另外 80% 之肝癌導因則和 B 型肝炎病毒感染、C 型肝炎病毒感染有關，但兩種肝炎病毒造成肝癌的機制並不相同，由 cDNA micro-array 比較兩種病毒陽性之肝癌細胞的基因表現即可發現很大的差異(23)。

肝癌的成因及發展相當複雜、目前尚未完全明瞭其機制，然而在肝癌細胞中經常觀察到 1) 染色體結構異常如 genomic aberrations, loss of heterozygosity；2) epigenetic changes 如去氧核糖核酸甲基化異常；3) 細胞增生複製相關基因如 p53、 β -catenin、AP-1 之突變(mutation)等現象(24)，而病毒感染即可能是造成上述現象之原因(25, 26)。例如 p16/INK4A、SOCS-1、E-cad、APC 等基因之啟動子(promoter) 的去氧核糖核酸甲基化異常即較常發現於 B 型肝炎病毒感染之肝癌細胞(27)；此外，先前發現 β -catenin 的突變在肝癌細胞中發生的機率約佔 20%，Huang 等人更進一步發現 22 位 C 型肝炎病毒感染之病人的肝癌細胞中， β -catenin 突變的檢體有 9

人(40%)，而這 9 位 β -catenin突變及另兩位 β -catenin未突變患者之肝癌細胞中皆可發現 β -catenin聚集在細胞核內的情況(28)。目前C型肝炎病毒蛋白中的核蛋白(Core)、非結構蛋白NS3 及NS5A皆有研究指出其會與細胞蛋白質結合進而影響細胞訊息傳遞、細胞增生及凋亡、氧化壓力、免疫反應等，進而促使細胞癌化(29-32)。

2.2 肝癌發展之可能機制及其與細胞凋亡的關聯

肝癌和其它癌症最大的不同點之一在於約80%的肝癌產生早期都伴隨著慢性肝炎、肝纖維化及隨後而來之肝硬化，而細胞凋亡(apoptosis)在此一連串肝病變過程中扮演重要的角色(33, 34)，例如Canbay等人發現在老鼠中，由死亡受器Fas活化(見第三節)所導致之肝細胞凋亡造成的肝臟傷害較易發展成肝纖維化(35)。

相較於急性肝炎中大量肝細胞於短期間進行細胞凋亡，肝病變早期之慢性肝炎階段是持續而少量之肝細胞凋亡，細胞凋亡會促使發炎分子的產生，進而活化肝細胞並促進其增生；然而在肝病變後期之肝硬化階段，肝細胞增生能力反而下降¹¹，不過相較於慢性肝炎，肝硬化之病人發展成肝癌的機率則大幅提高，對此現象的可能解釋有很多，以下即舉一個可能機制。

當細胞分裂時會使telomere的減短固定長度以確保細胞不會無限制分裂，telomere減到一定長度則會使細胞停止分裂(cell cycle arrest)、不再生長(senescence)並走向細胞凋亡，這就如同由一開始細胞分裂加速之慢性肝炎階段過渡至細胞停止增生之肝硬化階段；當telomere太短以致無法正常作用時，細胞會進行核糖核酸修補，由此可能導致染色質融合(chromosomal fusions)、染色體不穩定(chromosomal instability, CIN)如gene gains and losses、translocations及造成loss of heterozygosity (LOH)等，此時若細胞增生檢測點(cell cycle checkpoints) 相關基因如 p53、Rb、p27、TGF- β /IGF2R及細胞增生死亡控制相關基因如p53、Wnt/ β -catenin、PI3K/Akt因染色體不穩定而突變，即很容易使肝細胞轉型(transform)成癌細胞(22)，此即造成肝硬化發展成肝癌機率大增的可能原因。另外從許多肝癌細胞皆可觀察到其較

能抵抗細胞凋亡訊息的刺激，使其較能抵抗藥物或免疫細胞之毒殺作用，因此細胞凋亡的調控在肝癌發展初期及後期皆扮演重要的角色。

細胞抵抗細胞凋亡刺激的可能機制眾多，一方面可能因為細胞凋亡本身訊息傳遞受阻、一方面則是因存活訊息傳遞被活化進而抑制細胞凋亡(36)，而病毒感染即是造成細胞抵抗細胞凋亡的可能原因之一(33)；例如B型肝炎病毒抗原X (HBxAg) 曾被報導其會活化nuclear factor κ B (NF κ B)或cJun N-terminal kinase (JNK)訊息傳遞、進而抑制Fas受器活化所導致之細胞凋亡(37, 38)，而同時表現C型肝炎病毒蛋白C-E1-E2-NS2之基因轉殖鼠因細胞粒線體cytochrome c 釋出會受阻而較能抵抗Fas受器活化所導致之細胞凋亡(39)，然而亦有研究指出C型肝炎病毒之核心蛋白會使肝癌細胞株更易因Fas受器的活化而走向細胞凋亡。因此，病毒蛋白一方面可能促進細胞凋亡並造成肝臟傷害及急性肝炎，另一方面又可能抑制細胞凋亡而造成慢性感染、並且促進肝癌的發展(34)。

2.3 細胞凋亡機制

控制細胞凋亡的訊息傳遞可大致分為二種：1)粒線體(mitochondria)傳遞、亦稱intrinsic pathway：藉由氧化壓力、內質網壓力、輻射傷害、細胞蛋白質p53活化等，造成粒線體功能異常、膜電位差改變並釋出粒線體中的pro-apoptotic molecules 如cytochrome c、endonuclease G、SMAC/DIABLO (second mitochondria derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI)等，進而活化下游細胞凋亡訊息傳遞；2)死亡受器(death receptor)傳遞、亦稱extrinsic pathway：藉由Fas ligand (FasL)、tumour necrosis factor-alpha (TNF- α)、TNF related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)分別和細胞上的受器Fas、TNFR1、TRAIL-R1/R2結合，活化下游訊息傳遞並且同樣造成粒線體功能異常、粒線體內pro-apoptotic molecules的釋出並引發細胞凋亡；上述兩種訊息傳遞鏈皆會活化同一群蛋白酶(caspases)及核酸內切酶(endonucleases)，最後降解細胞內的組成物、導致細胞死亡(33, 40)。不同的細胞其

主要的細胞凋亡途徑不同，而肝細胞則主要以Fas/FasL訊息傳遞活化來促使肝細胞凋亡(33, 34, 36)，例如當老鼠被以腹腔內(intraperitoneal)注射方式注入anti-Fas單株抗體後，會引起嚴重的肝細胞凋亡、肝炎，並導致老鼠死亡(41)。

第三節 細胞蛋白質 Fas 受器

3.1 Fas、FasL 及其訊息傳遞

Fas (Apo-1、CD95、Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6, TNFRSF6)為一大約 42~52 kDa 的糖化蛋白質，屬於 TNF/NGF superfamily，為 Type I transmembrane protein，表現於許多細胞如肝、心臟、免疫等細胞之表面，而在部分癌細胞如肝癌、乳癌細胞則可發現其表現量異常(42, 43)。Fas 受器主要可分為三個區域，其 C 端位於細胞內，包含死亡區域(death domain, DD)，為傳遞細胞凋亡訊息的區域；中間具有穿膜區域(transmembrane domain)，藉此區域使 Fas 能位於細胞膜上；而 N 端位於細胞外，含 ligand binding domain，由三個 cysteine-rich repeats (CRD)構成，為和 Fas ligand (FasL)結合時的交互作用區域(44)。

Fas ligand (FasL、FASLG、FCD178、TNFSF6)為一大約 40 kDa 的糖化蛋白，屬於 TNF ligand family，為 Type II transmembrane protein，其表現只局限在部分細胞如免疫細胞中的活化 T 細胞(activated T cells)、自然殺手細胞(natural killer cells)、睪丸中之 sertoli cells、眼部之 retina 及 corneal epithelium；部分癌細胞也會表現 FasL(42)，藉由表現 FasL 來活化靠近癌細胞之免疫細胞的 Fas、進而殺死免疫細胞，使得癌細胞能免受免疫細胞的毒殺作用。FasL 亦分為三區域，其 N 端位於細胞內，具一 proline-rich domain；中間具有穿膜區域，使 FasL 固定於細胞膜上；而 C 端位於細胞外，包含一 self-assembly domain，能讓 FasL 自行形成 trimer，其非常尾端則是 receptor binding domain，藉此區域和 Fas 結合(45)。

平常 Fas 會自行形成 trimer，然而此時並不活化下游訊息傳遞，當 FasL 和 Fas trimer 結合(CD95 ligation)，Fas trimer 立即形成 SDS-、mercaptoethanol-stable

microaggregates (CD95^{hi}，以 SDS-PAGE 可得知其分子量大小約 180 kDa)，而此聚合動作使 Fas 受器 C 端之死亡區域 DD 和 Fas-associated death domain (FADD)蛋白質上之死亡區域 DD 結合；平常 FADD 以其 death effector domain (DED)和 pro-caspase-8 之 DED 做結合，當 FADD 和 Fas trimer 上的 DD 結合時，會間接使其上的 pro-caspase-8 互相靠近，這三個蛋白質(Fas、FADD、pro-caspase-8)即構成所謂的 death-inducing signaling complex (DISC)；接著互相靠近的 pro-caspase-8 彼此會切割並活化，在此階段活化之 caspase-8 的量並不足以造成細胞凋亡，但卻可以活化 NFκB 及 MAPK 等訊息傳遞鏈；活化之 caspase-8 會促使更多 CD95^{hi} 聚集在一起，然後經由 Ezrin、actin、clathrin 等協同作用，將 CD95^{hi} 以 CD95-receptosome 的形式運至細胞內，並經由形成更多的 DISC (hiDISC)活化更多的 caspase-8 (此活化現象在 Fas ligation 五至十分鐘內即可觀察到)，而這第二波的 caspase-8 活化會導致細胞凋亡訊息傳遞鏈的活化(見附圖一) (46, 47)。

不同細胞其 Fas 活化過程及涉及的訊息傳遞鏈可能有所不同，當第二波活化之 caspase-8 夠多，則可以直接活化 caspase-3,-6,-7 並促使細胞凋亡，此類細胞在細胞凋亡過程被分類為 type I cells，例如免疫細胞，而 CD95 internalization 的現象主要即發生在 type I cells，在 type II cells 中並沒有 CD95 internalization 的現象。大部分細胞如肝細胞等皆為 type II cells，其經由 Fas/FasL 活化之 caspase-8 很少，必須經過粒線體來放大訊息；caspase-8 會切割 Bid 並釋出 tBid (truncated Bid)，tBid 進而促使粒線體釋出 cytochrome c，而 cytochrome c 會和 Apaf-1 形成 apoptosome 並進一步促使 caspase-9 的活化(48)，caspase-9 再去切割並活化 caspase-3。已知 Bcl-2、Bcl-xL 等細胞蛋白質會抑制 cytochrome c 從粒線體中釋出，type II cells 和 type I cells 的差別之一即在於 type II cells 可經大量表現 Bcl-2、Bcl-xL 來抑制 Fas/FasL 所誘發之細胞凋亡。

活化之 caspase-3 會切割並活化細胞凋亡訊息傳遞鏈之下游蛋白質如 DFF40/CAD (40-kd DNA fragmentation factor/caspase-activated deoxyribonuclease)和 ROCK I (rho-associated kinase I)並導致細胞凋亡之現象如 DNA 斷裂(DNA fragmen-

tation)、細胞皺縮(cell shrinkage)等(49)。

Fas除在細胞凋亡過程扮重要角色，也參與在其它訊息傳遞，如免疫細胞增生分化、發炎反應、NF- κ B活化、JNK活化等過程中(44, 50)。例如以anti-Fas單株抗體去刺激不同的細胞，會促進其分泌IL-8及MCP-1等chemokines的分泌，且不引發caspases的活化或細胞凋亡；而Marusawa等人發現HepG2、Huh7會受anti-Fas單株抗體刺激而活化NF- κ B，抑制NF κ B的活化則使細胞受anti-Fas單株抗體刺激時其細胞凋亡的情況加劇(51)；另外Fas所引起之細胞凋亡通常伴隨著JNK活化，因為Fas所活化之caspase會去切割並活化JNK訊息傳遞鏈上之細胞因子(52)。

3.2 Fas異構物、基因及alternative splicing

除了上述位於細胞膜上並引發細胞凋亡之Fas (接下來稱mFas, membrane Fas)，許多細胞如白血球(53, 54)、心肌細胞(55)、肝細胞(56, 57)等實際上亦會經由pre-mRNA alternative splicing而產生Fas異構物，這些Fas異構物若少了穿膜區域則不會留在細胞膜上，而會被釋放至細胞外而成為soluble Fas (sFas)並具有抗FasL引起之細胞凋亡的作用；因為sFas若其N端仍具有完整之ligand binding domain，則sFas會和mFas一同競爭和FasL做結合，然而因為sFas沒有死亡區域DD或DD在細胞外，所以sFas無法將細胞凋亡訊息傳遞至細胞內。細胞可能藉此來調控細胞凋亡，而在許多肝病變、肝癌之患者血清及肝細胞表面可以觀察到sFas、mFas及FasL量的改變(58-62)，暗示Fas/FasL訊息傳遞的調控在致病過程中可能扮演了重要的角色。

Fas基因位於第十對染色體，由九個exon構成，其中exon 2-5轉譯出ligand binding domain，exon 6則是相對應於穿膜區域，exon 9則相對應於死亡區域DD(63)；其轉錄後得一共2,688個鹼基的mRNA，轉譯所得之Fas受器含335個胺基酸，經過signal peptide的切除、醣化後即為mFas；Fas會經由alternative splicing產生不同的transcript，目前除此含全部exon的transcript，細胞中至少可分離出另外九種transcript(64)，其中之一為略過exon 6之transcript，因為exon 6長度為63

bp，略過並不造成 frameshift，故可轉譯出一不含穿膜區域但其它區域皆正常之 Fas 異構物，此即前面所提到之 sFas 中最常見到之形式。

先前研究指出Fas的alternative splicing會受TIA-1 (T-cell intracellular antigen 1)/TIAR (TIA-1-related)的調控(65)，Izquierdo等人進一步指出TIA-1/TIAR會和FASTK (Fas-activated serine/threonine kinase)協同作用以調節Fas等基因的pre-mRNA的alternative splicing (66)；TIA-1及TIAR皆是RNA結合蛋白質(RRM-type RNA binding protein)，FASTK經由調控TIA-1/TIAR來決定Fas基因exon 6的略過與否，使細胞產生sFas或mFas等具不同生理意義的Fas受器。接下來簡略介紹一下目前對FASTK的了解。

第四節 細胞蛋白質 FASTK

FASTK (Fas-activated serine/threonine kinase)為一持續磷酸化的蛋白質，其serine和threonine residue會接上磷酸根；當Jurkat細胞的Fas受器被活化後，FASTK會迅速去磷酸化、和TIA-1結合，並促使TIA-1磷酸化、活化TIA-1調控之下游基因並引發細胞凋亡現象如DNA斷裂(67, 68)，因此FASTK被認為具有pro-apoptotic之特性；而臨床上亦發現由免疫系統異常引起之類風濕性關節炎(rheumatoid arthritis)患者的滑膜組織細胞中，Fas受器會活化並導致細胞凋亡(69)，而細胞之FASTK mRNA表現量會上升(70)。

雖然Izquierdo等人指出FASTK必須藉由TIA-1/TIAR來間接調控Fas等基因的alternative splicing (66)，然而Simarro等人指出即使缺乏TIA-1，FASTK亦能進到細胞核內調節FGFR2 (fibroblast growth factor receptor-2)之alternative splicing，因此可視FASTK為選擇性剪接調節因子(regulator of alternative splicing) (68)，直接或間接調控細胞凋亡及其它訊息傳遞過程；當以RNAi抑制Fas受器之FASTK表現，細胞的outgrowth會有被促進的現象發生，而當細胞受到LPA (lysophosphatidic acid)刺激時，FASTK的knockdown會抑制LPA刺激所導致之retraction (71)。

FASTK 的 C 端具有一個 lysine- and arginine-rich domain (又稱 mitochondrial tethering domain, MTD), FASTK 藉此區域結合到粒線體外膜上, 同時以其 BH-3 like motif 與 Bcl-xL 結合(72)。當以 RNA interference 的方式抑制 FASTK 表現時, 細胞凋亡的情形會增加, 若是外送 FASTK 進入 HeLa 細胞, 則能增加細胞內抗細胞凋亡分子(cIAP-1, XIAP)的表現並且抑制 Fas 或是 UV 刺激所引起之細胞凋亡反應如 caspase-3 activation, 而在此過量表現 TIA-1 則會中和 FASTK 抗細胞凋亡的功能。因此亦有學者推測 FASTK 能夠影響 TIA-1 並抑制細胞凋亡相關基因表現, 為一 survival protein (73), 其能夠感應粒線體所受到的壓力, 並扮演調控 TIA-1 的角色。

先前本實驗室利用微陣列(microarray)分析 HCV subgenomic replicon 細胞株 (H7-HCVR)之 cDNA, 以及分別轉染 HCV 各個非結構性蛋白質至 Huh7、293 細胞後再以即時定量聚合酵素鏈鎖反應(real-time quantitative PCR)觀察轉染細胞中 mRNA 量的結果顯示, 與其母細胞株 Huh7 或未轉染細胞進行比較時, 表現 HCV 非結構性蛋白質的細胞之 FASTK 的 mRNA 量會有所改變, 特別是單獨表現 HCV NS4B 蛋白質時, FASTK 的 mRNA 量會有下降的趨勢(74), 然而機制為何尚不清楚; NS4B 在病毒感染、複製及致病機轉中所扮演角色尚未被研究清楚, 下面將介紹目前對於 HCV NS4B 的研究及了解。

第五節 C 型肝炎病毒非結構性蛋白質 NS4B

5.1 NS4B 的特性及病毒複製

NS4B 蛋白質為一具疏水性特徵之膜蛋白質, 由 261 個胺基酸所組成、分子量約 27 kDa, 在轉譯過程中會嵌入內質網 (endoplasmic reticulum)(75)。Lundin 等人由疏水性圖譜(hydrophobicity plot)指出 NS4B 至少具有四個穿膜區(transmembrane segments), 無論是單獨表現或和其它非結構性蛋白一起表現, 其 C 端皆位於細胞質內, 而部分 NS4B 的 N 端在未經 NS3 protease 切割之前是存在於細胞質中, 一經 NS3 切割其 N 端會翻轉到 ER lumen 內, 成為有五個 transmembrane segments 的

分子，但是目前尚未在 N 端找到進入 ER lumen 中的 signal peptide，且對在自然狀態下 NS4B 的 N 端是否真的會翻轉到 ER lumen 亦尚無一致看法(76, 77)。NS4B 蛋白質單獨表現會引起細胞內的胞器膜構造產生變化(17)，形成緊密的膜狀網(membranous web)構造，並有許多由膜衍生的小泡構造會緊密附著於膜狀網的周圍，而此網狀膜亦可在 C 型肝炎病毒感染細胞中發現(78)，推測這些構造可能是 HCV 複製複合體(replication complex)於細胞中所座落之位置，而膜狀網構造的產生可能是因 NS4B 的直接作用或經由 NS4B 去結合其它細胞蛋白質並進而造成內質網構造的改變。NS4B 的 N 端前二十九個胺基酸被指為一個 amphipathic helix (AH)，此段序列在不同的 HCV 的分離株中，具有高度的保守性，此 AH 經突變會破壞其特性；將帶此突變的 NS4B 基因轉染至細胞中，則 NS4B 的表現無法使細胞產生膜狀網構造，而其它非結構蛋白質如 NS3、NS4A 也無法座落在一起，而病毒的 RNA 複製現象亦消失，此外 AH 的破壞也會使 NS4B 的 N 端在轉譯後無法由細胞質內轉移到 ER lumen(77, 79)。此外，Yu 等人指出 NS4B 的 C 端之 Cys261 及 Cys267 會接上脂質(palmitoylation)，而此脂化過程對於 HCV 病毒複製是必要的，且會促進 NS4B 的聚合(polymerization)，使 NS4B 更易形成 dimer、trimer、甚至 polymer，不過 NS4B 聚合的決定位置是在其 N 端前七十個胺基酸(80)。

HCV NS4B 蛋白質長久以來都被認為是複製複合體的一部分，藉由 NS4B 將病毒其它非結構性蛋白質集合在一起以進行病毒複製(17, 77, 81)；例如研究證明在真核表現系統中，HCV 的 NS3、NS4A 及 NS4B 之間會有交互作用，且需要在 NS4A 存在下，NS3 及 NS4B 才能進行交互作用；同樣的，NS4B、NS5A 及 NS5B 之間也會有交互作用，並且需要在 NS5A 的存在下，NS4B 及 NS5B 才能進行交互作用(81)。在活體外(in vitro)的實驗中，也證明 NS3、NS4B 及 NS5B 之間互相會有交互作用，而 NS4B 會抑制 NS3-NS5 複製複合體合成 RNA 的活性(82)。

在 subgenomic replicon 細胞培養過程會出現病毒蛋白質的適應性突變、增加病毒複製效率，例如當 replicon 在 NS4B 胺基酸具有突變 (K1846T or V1897L/M/A) 時，複製效率會大幅提升，尤其是 K1846T 的細胞培養適應性突變，可使複製效率

增加三十倍(83, 84)，而此現象可能是因這些突變會直接影響其本身特性、其與細胞蛋白質的交互作用，或是間接透過複製複合體結構改變而造成。

2004年，Einav 等人發現在 NS4B 有一個 nucleotide binding motif (NBM)，其中 1840-GSIGLGK-1846 具有 NBM 中 A motif (1840-GX₄GK-1846) 的保留序列特性；NS4B 和 GTP 結合再將其水解，此動作對於 C 型肝炎病毒複製是重要的，若使其中 A motif 的保守性序列 G1840 突變成 valine、I1842 突變成 asparagine 或是 K1846 突變成 serine 或 arginine，他們在細胞內的表現量和分佈情形均與正常的 NS4B 相同，但是 GTPase 活性下降，與 GTP 的結合也減少，病毒的複製也隨之減少(85)。然而本實驗室的研究發現 NS4B(K1846T) 的突變對於 GTPase 活性沒有影響(86)，推測適應性突變種 NS4B(K1846T) 可能藉由其它機制來回復核苷酸水解能力。

5.2 NS4B 對細胞生理之影響

在細胞培養系統中，HCV NS4B 蛋白質對於細胞生理會有許多影響；例如 NS4B 可活化 NFκB 的啟動子，並可能藉此而影響 NFκB pathway 下游細胞內基因表現(87)，而 NFκB 被指出在許多肝腫瘤個案發展早期皆有活化的情況(88)；在不同來源之 NIH3T3 細胞中，NS4B 單獨或和 Ha-ras 基因共同表現，會造成細胞的轉型，而若將 NS4B 的 nucleotide binding motif 作不同位置之突變，則 NS4B 轉型細胞的能力會受損甚至完全消失(89, 90)。NS4B 亦會抑制細胞的轉譯作用，尤其抑制部分基因如 p21/Waf1、p53、RNaseL 等細胞蛋白質表現(91, 92)，並可能間接影響此類基因之生理功能如細胞生長。另外 NS4B 在不同細胞株中(HeLa、Huh7、HepG2) 可觀察到不同程度之活化 interleukin 8 (IL-8) 啟動子、進而調控 IL-8 的轉錄轉譯過程(93)，而 IL-8 的功能之一是吸引嗜中性淋巴球(leutrophil attractive chemokine)；Takasa 等人則發現 NS4B 的單獨表現會抑制 RIG-1/IFN-stimulated response element (ISRE) 的活化並抑制 type I interferons (IFNs) 的抗病毒作用(94)，此外，Zheng 等人證實 NS4B 會藉 activating transcription factor 6 (ATF6) 及 inositol-requiring enzyme 1

(IRE1)去調控內質網逆境(ER stress)反應中的 unfolded protein response (UPR)(95)。

5.3 NS4B 與細胞蛋白之交互作用

目前已知 NS4B 會和細胞蛋白質 Rab5、cAMP-response-element-binding protein-related protein (CREB-RP，又稱 activating transcription factor 6 β , ATF6 β)產生交互作用(96, 97)；CREB-RP 為一內質網逆境反應相關轉錄因子，NS4B 藉其 N 端和 CREB-RP 結合，推測 NS4B 會透過此蛋白質調控有關內質網逆境的細胞反應，如上述 Zheng 等人觀察到之 UPR(95)。



研究方向

先前研究指出 C 型肝炎病毒之非結構性蛋白質 NS4B 的表現會抑制細胞蛋白質 FASTK 的 mRNA 量，而 FASTK 的生理功能之一是調節 Fas 基因的 mRNA alternative splicing、使細胞產生具不同生理功能之 Fas 受器並改變 Fas 訊息傳遞過程、決定細胞是否走向細胞凋亡，NS4B 可能藉由影響 FASTK 來調控 Fas/FasL 訊息傳遞過程，在細胞凋亡、病毒感染複製、肝病變及肝癌發展中占重要角色。本研究旨在建立一 NS4B 穩定細胞株，以排除轉染效率及過度表現蛋白質等干擾因素，探討 NS4B 的表現是否會影響 FASTK 的表現並進一步改變 Fas 訊息傳遞過程及結果；觀察當 NS4B 蛋白質表現時，FASTK 表現量的升降、不同型式及生理功能的 Fas 受器生成的比例、Fas 受器表現量的升降、對於 anti-Fas 抗體所誘發之細胞凋亡的耐受性、以及細胞凋亡相關分子的活化是否受阻等現象，希望藉這些實驗來了解 NS4B 在病毒複製和致病機制方面所扮演的可能角色。



材料與方法

一、藥品

Acrylamide	United State Biochemical
Ammonium persulfate	Bio-Rad
Ampicillin	United State Biochemical
Bis-acrylamide	Bio-Rad
Boric acid	Merck
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma
Bromophenol blue	Merck
Chloroform	Merck
Deoxycholic acid (DCA)	Sigma
Deoxynucleoside triphosphate (dNTP)	GE Healthcare
Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Sigma
Disodium hydrogen phosphate anhydrous (Na_2HPO_4)	Merck
Ethanol	Merck
Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)	Merck
Formaldehyde	Sigma
Glycine	United State Biochemical
Hydrogen chloride (HCl)	Merck
Isopropanol	Merck
Methanol	Merck
Mineral oil	Sigma
NP-40	Sigma
Peptone	Merck
Phenol	Merck
Potassium chloride (KCl)	Merck
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	Merck
RNasin	Promega
Sodium chloride (NaCl)	Merck
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Merck
TEMED	Bio-Rad
Tris-base	United State Biochemical
Triton X-100	GE Healthcare
TRIzol	Invitrogen

Trypan Blue	GIBCO
Tween 20	Sigma
Yeast extract	Merck

二、酵素

KlenTaqI DNA Polymerase	AB peptide, Inc
Avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (AMV-RT)	Roche
RQ-1 DNase	Promega

三、抗體

HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (sc-2004)	Santa Cruz Biotech
HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (115-035-003)	Jackson
HRP-conjugated rabbit anti-goat IgG (305-035-003)	Jackson
Mouse anti-V5 monoclonal antibody (R990-50)	Invitrogen
Goat anti-FASTK (C20) polyclonal antibody (sc-1820)	Santa Cruz Biotech
Mouse anti-FAS (B10) monoclonal antibody (sc-8009)	Santa Cruz Biotech
Anti-Fas (human, activating), clone CH11 (05-201)	Upstate
Rabbit anti-GAPDH polyclonal antibody (sc-25778)	Santa Cruz Biotech
Rabbit anti-caspase-3 monoclonal antibody	Cell Signaling
Mouse anti- α -tubulin monoclonal antibody (T9026)	Sigma

四、細胞培養液及轉染試劑

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	GIBCO
Doxycycline	Invitrogen
Geneticin (G418)	GIBCO
Hygromycin B	Invitrogen
Lipofetamine 2000	Invitrogen
OPTI-MEM	GIBCO
Penicillin-Streptomycin	GIBCO
Tet System approved FBS	Clontech
TrypLE™ Express	GIBCO

五、套組試劑

Caspase-Glo [®] 3/7 Assay	Promega
ECL [™] western blotting detection reagents	Amersham Bioscience
Plasmid midi kit	Geneaid
Mini-M plasmid DNA extraction	Viogene
Bio-Rad Protein Assay kit	Bio-Rad
Quantikine [®] Human sFas Immunoassay (DFS00)	R&D Systems
Power SYBR [®] Green PCR Master Mix	Applied Biosystems

六、其它

Immobilon [™] -P transfer membrane	Millipore
X-ray film	FUJI
μQuant	BioTek Instruments, Inc.
Orion Microplate Luminometer	Berthold electron systems
ABIPRISM7900	Applied Biosystems

七、實驗室提供之質體

7.1 pcDNA-NS4B-V5HisTopo (寇怡衡學姐提供)

以 pcDNA3.1D/V5His-Topo 為載體，帶有 HCV 非結構性蛋白 NS4B 基因，其質體大小約 6.3 kb，在 HepG2 及 293 等細胞中可表現出分子量約 34 kDa、C 端帶有 V5-His tag 的 NS4B 融合蛋白質。

7.2 pHyg-TRE-NS4B-V5 (張巧伶學姐提供)

將 pcDNA-NS4B-V5-HisTopo 質體利用限制酶 BamHI 及 AgeI 切出帶有 V5-tag 的 NS4B 基因片段並將其黏接至 pHyg-TRE 質體中。pHyg-TRE-NS4B-V5 質體大小約 6.1 kb，在 pTet-On 的同時存在以及 tetracycline 刺激下，可表現出大小約 34 kDa 之 NS4B 蛋白質。

7.3 pTet-On (Clontech)

pTet-On 調控質體大小約 7.4 kb，其上帶有 CMV 啟動子並使啟動子後面之 rTetR (reverse tet repressor)-VP16 調控蛋白質(reverse transcriptional tetracycline-controlled transactivator, rtTA)能持續表現。rtTA 會和 tetracycline 或其衍生物如 doxycycline 結合，此一結會使 rtTA 的構形改變，使 rtTA 能和帶有 TRE (tetracycline responsive element)序列之 DNA 結合並促使 TRE 序列後方之基因進行轉錄及表現。TRE 序列並不存在於真核細胞中，因此 rtTA 不會結合到真核細胞之核酸序列、不會影響細胞自身基因之轉譯過程。

7.4 pcDNA-FASTK-V5HisTopo (張巧伶學姐提供)

以 pcDNA3.1D/V5His-Topo 為載體，帶有細胞 FASTK 基因，其質體大小約 7.4 kb，在 HepG2 及 293 等細胞中可表現出分子量約 64 kDa、C 端帶有 V5-His tag 的 FASTK 融合蛋白質。



八、細胞株和細胞培養

8.1 HepG2-2 細胞株(董馨蓮老師提供)

源於 HepG2 (human hepatoblastoma cells)；將 pTet-On 調控質體(pTet-On regulator plasmid; Clontech)嵌入 HepG2 細胞之染色體而得 HepG2-2 細胞株。當 HepG2-2 受到 doxycycline 刺激時會誘發細胞內啟動子帶有 TRE 之基因的表現。

8.2 HepG2-2-NS4B 細胞株

源於 HepG2-2；將 pHyg-TRE-NS4B-V5 質體以 Lipofetamine 2000 轉染至 HepG2-2 中，然後將轉染細胞持續做繼代培養，並以 100、200、400 $\mu\text{g/ml}$ hygromycin B 篩選細胞，約二個月後得到一抗 hygromycin B 200 $\mu\text{g/ml}$ 之細胞株；在加入

1 $\mu\text{g/ml}$ doxycycline 刺激細胞二十四小時後，收取細胞內容物，經由西方墨點並以 mouse anti-V5 抗體偵測確認 NS4B-V5 的表現。

細胞培養時以含 8% tetracycline-free 胎牛血清(Tet System approved FBS)、1% penicillin-streptomycin、200 $\mu\text{g/ml}$ G418、100 $\mu\text{g/ml}$ hygromycin B 之 DMEM，在 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 下進行繼代培養。

九、DNA 轉染

以 6 公分培養皿為例，將細胞種於 6 公分培養皿中，待隔夜細胞滿度達到一定滿度(HepG2-2, 40~60%; 293, 60~80%) 時，先將 4 μg 質體和 10 μl lipofectamine 2000 分別與適量 OPTI-MEM (~200 μl) 混合，於室溫下靜置 5 分鐘，接著將兩者混合，於室溫下靜置 20 分鐘，然後將此混合的轉染液加入已經以 PBS 清洗過並加入約 2.4 ml OPTI-MEM 的細胞培養皿中，接著放回細胞培養箱中(37 $^\circ\text{C}$ ，5% CO_2)。經過 4-6 小時，將混有轉染液之 OPTI-MEM 換成一般細胞培養液繼續培養 24~48 hr，收取細胞進行分析。

1X Phosphate Buffered Saline (PBS)

137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na_2HPO_4 , 1.47 mM KH_2PO_4 , adjust to a final pH of 7.4

十、細胞全蛋白質之收取

吸除培養液，以 TrypLE 處理 1 min 30 sec (HepG2-2)、3 min (HepG2-2-NS4B)，然後直接加入培養液、連同 Trypsin 將細胞沖離培養皿底部並吸至 1.5 ml eppendorff；接著以 3000 rpm 離心 3min，吸掉上清液，並加入 1 ml PBS，經 vortex 將 cell pellet 弄散，然後再以 3000 rpm 離心 3min，吸除上清液。加入 30~80 μl 的 RIPA lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl pH8.0, 1% DCA, 1% NP-40, 0.1% SDS)並藉 pipetment 進行 homogenization，然後以 6 w 的功率進行超音波震盪，再以 14000 rpm、4 $^\circ\text{C}$ 離心 10 min，收集上清液即為細胞的全蛋白質，儲存於-20 $^\circ\text{C}$ 。

十一、蛋白質定量

採用 Bio-Rad protein assay kit；利用已知濃度的 BSA 溶液(0 $\mu\text{g/ml}$ ~16 $\mu\text{g/ml}$) 對於波長 595 nm 的吸光值所做出標準曲線，再由未知蛋白質濃度之樣本對於波長 595 nm 的吸光值經標準曲線反推回去樣本之蛋白質濃度；若樣本之吸光值超過 16 $\mu\text{g/ml}$ BSA 溶液之吸光值，則將樣本行稀釋後再重新定量。

十二、正十二烷硫酸鈉-聚丙醯胺板膠電泳

先用 70%酒精將玻璃及白板擦拭乾淨，組合成直立膠板裝置後，配製 separating gel solution 注入膠槽後，在上層補水將膠面壓平；等膠凝固後倒掉上層的水，確定膠面乾燥後，配置 stacking gel，膠槽插入齒梳狀模板並將 stacking gel solution 注入其餘空隙，待膠凝之後即完成 SDS-PAGE 製備。

跑膠前先將 SDS-PAGE 置入電泳槽內，倒入適量一倍 running buffer，拔出齒梳狀模板。蛋白質樣品先與 protein dye 混合，放入 100°C 加熱板加熱 5 分鐘，冷卻離心後即可注入齒槽中。先以 80 V 電壓進行 stacking 約半小時，等樣品到達 separating gel 之膠面後，將電壓調到 120 V，直到作為指標的 bromophenol blue 跑至膠底即完成。

Separating gel solution

12~15% polyacrylamide [acrylamide:bisacrylamide=29:1]、0.375 M Tris-HCl (pH 8.8)、0.1 % SDS、0.1% ammonium persulfate (AP)、0.05 % TEMED

Stacking gel solution

4.125 % polyacrylamide [acrylamide:bisacrylamide=29:1]、0.125 M Tris-HCl (pH6.8)、0.1 % SDS、0.1% ammonium persulfate (AP)、0.05 % TEMED

1X Running buffer

0.1% SDS、0.2 M Glycine、25 mM Tris-HCl (pH 8.4)

十三、西方墨點法

先將 Immobilon transfer membrane P 浸在 95 % 乙醇約 10 分鐘然後移至 transfer buffer，接著將電泳完成後的 SDS-PAGE 移至轉漬系統中。在轉漬槽中倒入適量 transfer buffer，在 4 °C 下以 250 mA 電流將膠上的蛋白質轉印到 membrane 上，約三個小時後取出 membrane，將 membrane 浸入 blocking buffer、室溫下反應 1 小時，接著倒掉 blocking buffer，加入初級抗體，在 4°C 隔夜反應。反應完成後，以 washing buffer 清洗三次(5、10、15 分鐘)，加入二級抗體在室溫下反應 1 小時，再以 washing buffer 清洗三次(5、10、15 分鐘)，接著以二次水潤洗 membrane，並將水倒乾。最後加入 ECL 試劑並使其充分覆蓋 membrane，然後以 X-ray film 壓片顯影。

Transfer buffer

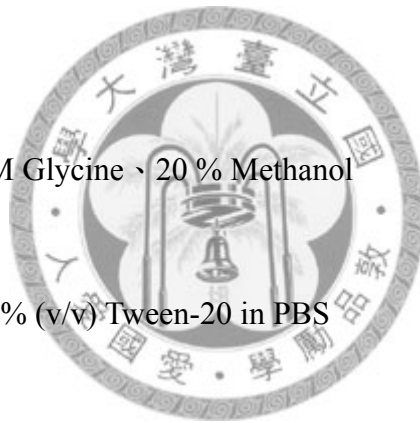
25 mM Tris-HCl、192 mM Glycine、20 % Methanol

Blocking buffer

5 % (w/v) Skim milk、0.1 % (v/v) Tween-20 in PBS

Washing buffer

0.5 % (v/v) Tween-20 in PBS



十四、萃取 RNA

先以 PBS 將細胞沖離培養皿底部並移到 eppendorf tube，以 3000 rpm 離心 3 分鐘，吸去上清液，再加 PBS 以振盪方式使細胞懸浮，然後再以 3000 rpm 離心 3 分鐘，吸去上清液；接著加入 1 ml TRIzol，並以微量吸管將細胞均質化，以 12000 xg、4 °C 離心 10 分鐘，取上清液至新的 eppendorf tube，室溫下靜置反應 5 分鐘，此時可後續萃取步驟或將其儲存於 -80 °C。靜置 5 分鐘後，加入 200 µl chloroform，上下翻轉 eppendorf tube 約十次，室溫下靜置 2 分鐘，再以 12000 xg、4 °C 離心 15 分鐘，取上層透明無色之澄清液至新的 eppendorf tube，然後加入 isopropanol 500

μl ，上下翻轉 eppendorf tube 約十次，室溫靜置 10 分鐘，然後以 $12000 \times g$ 、 4°C 離心十分鐘，去除上清液。接著加入 1 ml 75% 酒精並上下翻轉 eppendorf tube，然後以 $7500 \times g$ 、 4°C 離心 5 分鐘，去除上清液並待管壁殘留液體蒸發。接著加入 20~50 ml 之 ddH₂O 並且 65°C 水浴十分鐘，然後以 OD₂₆₀、OD₂₈₀ 求得其 RNA 濃度，調整濃度到 $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，取 $1 \mu\text{l}$ 跑 1% agarose gel 以確定各樣本稀釋後濃度是否一致、RNA 的品質如何。

十五、反轉錄-聚合酵素鏈反應

取 $2.5 \mu\text{l}$ 之 total RNA ($2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) 加入 $0.4 \mu\text{l}$ 之 RQ-1 DNase (Promega) 及 $0.45 \mu\text{l}$ 10x buffer、 $1.15 \mu\text{l}$ ddH₂O， 37°C 反應 30 分鐘，然後加 $0.5 \mu\text{l}$ stop solution 於 65°C 反應 10 分鐘。接著取 $2.5 \mu\text{l}$ aliquot 進行接下來的反應。

取 $2.5 \mu\text{l}$ aliquot 加 $0.25 \mu\text{l}$ 的 $24 \mu\text{M}$ OligodT 及 ddH₂O $0.45 \mu\text{l}$ ，於 65°C 反應 10 分鐘，然後放在冰上 1 分鐘，接著再加入 $0.25 \mu\text{l}$ 的 10 mM dNTP、 $0.2 \mu\text{l}$ 的 RNasin、 $0.1 \mu\text{l}$ 的 AMV RT、 $1 \mu\text{l}$ 的 5x buffer、 $0.25 \mu\text{l}$ 的 ddH₂O，於 42°C 反應 30 分鐘，即完成反轉錄反應。

十六、即時定量聚合酵素鏈鎖反應

取 100 ng total RNA 所翻得之 cDNA，加入適當濃度之正、反股引子及 $12.5 \mu\text{l}$ 的 Power SYBR[®] Green PCR Master Mix，並補 ddH₂O 使其總體積為 $25 \mu\text{l}$ ，然後以 ABI PRISM 7900 Sequence detection system 進行反應及偵測。各基因引子序列、取量標準及反應條件見表一。

十七、Fas 抗體刺激細胞凋亡

先將細胞養於含 10% 血清之培養基，在進行 anti-Fas 抗體 (CH11) 刺激時，加入等體積、不含血清之培養基並加入 anti-Fas 抗體，使抗體最後濃度為 $200 \text{ ng}/\text{ml}$ 。

十八、Trypan Blue Exclusion Assay

在此利用 trypan blue exclusion assay 來偵測細胞在經過 anti-Fas 抗體刺激後的細胞活性。Trypan blue 為一藍色染劑，活細胞的細胞膜完整，trypan blue 無法穿透細胞膜進到細胞內，然而當細胞死亡時，其細胞膜的完整性會喪失，因此 trypan blue 即可進到細胞內並將細胞染成藍色。

先在 24 well culture plate 中種下 5×10^5 cells/well (每個 well 皆有含 10% 胎牛血清之培養基 300 μ l)，並且加入 doxycycline (1 μ g/ml)，經過二十四小時後，再加入等體積不含血清之培養基並加入 anti-Fas 抗體 (200 ng/ml)，再經過二十四小時後，收取細胞並利用 trypan blue 檢視細胞活性。

收細胞時先吸走培養基，然後加入 100 μ l TrypEL 反應 30 sec ~ 1 min，接著再加入培養基並連同 TrypEL 將細胞以微量吸管沖離 well 底部，然後吸至 eppendorf tube 並以微量吸管吸吐約二十次以打散細胞，接著以 3000 rpm 離心三分鐘，吸掉上清液，再以 200 μ l PBS 用 vortex 的方式使細胞懸浮。

取 5 μ l 細胞懸浮液加 20 μ l PBS 及 25 μ l trypan blue，混勻後靜置 3 分鐘，利用細胞計數器(Hemocytometer)在顯微鏡下數四個底面積 1 mm² 方格中的死細胞和活細胞並計算細胞活性。當數得之細胞數總合不超過 100 顆時，則直接取 5 μ l 細胞懸浮液加 5 μ l trypan blue，混勻靜置 3 分鐘後再重新計數細胞。

十九、Caspase 3 活性測定

在此利用 Caspase-Glo[®] 3/7 Assay 試劑組(Promega)來偵測經 anti-Fas 抗體刺激後細胞內之 caspase 3 活性。

先在 24 well culture plate 中種下 5×10^5 cells/well (每個 well 皆有含 10% 胎牛血清之培養基 300 μ l)，並且加入 doxycycline (1 μ g/ml)，經過二十四小時後，再加入等體積不含血清之培養基並加入 anti-Fas 抗體 (200 ng/ml)，經過八小時後，收取細胞並計算細胞數以進行下一步實驗。

計算出細胞數後，以細胞數最少之樣本計算其 15000 顆細胞需取多少體積之細胞懸浮液，然後以此體積為準(或取其整數)，每個樣本皆取此體積之細胞懸浮液至九十六孔白盤，補 PBS 至 25 μ l，然後加 25 μ l 之 Caspase-Glo[®] 3/7 substrate，避光反應一小時後，以微盤式冷光儀(Orion Microplate Luminometer, Berthold electron systems)及軟體 Simplicity 4.02 去測得冷光值。之後再以所測得之冷光值及各樣本之細胞數計算其 15000 顆細胞的 caspase 3 活性。

二十、ELISA for sFas

在此利用由 R&D systems 購得之 human sFas ELISA (DFS00) 試劑組來進行細胞中及培養過細胞之培養液(conditioned medium)中 Fas 受器的量。

首先在 12 well culture plate 中種下 10^6 cells/well 並使培養基體積為 1 ml，並且加入 doxycycline (1 μ g/ml)；經過 24~26 小時後，先收集上清之培養液(supernatant)，並且收取細胞全蛋白質(lysate)、溶於 50 μ l RIPA buffer；supernatant 以 14000 rpm 離心 10 分鐘後取上層約 2/3 至新的 eppendorf tube；然後取原本體積 1/9 (約 100 μ l) 之離心後的 supernatant 以及 1/27 的 lysate (先取 5 μ l lysate 加 45 μ l 1x Calibrator Diluent RD5L 並混勻，再從中取 18.5 μ l 並加 81.5 μ l 1x RD5L 使其體積為 100 μ l) 去做定量。

所有檢測過程動作皆依據廠商提供之操作說明，以免疫酵素分析儀(μ Quant, BioTek Instruments, Inc.)及 Gen5[™] Microplate Software 去測吸光值，並由 SigmaPlot 10.0 求得回歸曲線；在處理吸光值時，會先分別測量 OD₄₅₀ 及 OD₅₇₀，並以 OD₄₅₀ 減 OD₅₇₀ 取代機器校正波長的動作；Calibrator Diluent RD5L 為試劑組所附之 buffer。

結果

一、HepG2-2-NS4B-V5 穩定細胞株的建立及表現

為了排除轉染效率過低及過度表現蛋白質等干擾因素，並且考慮到 HCV 主要感染細胞為肝細胞，因此首先即是以肝癌穩定細胞株 HepG2-2 建立一可經由誘導來控制 NS4B 蛋白質表現與否之穩定細胞株。

由圖一顯示，經由西方墨點實驗可確定穩定細胞株 HepG2-2-NS4B-V5 在 doxycycline 1 $\mu\text{g/ml}$ 誘導 24 小時後會表現 NS4B 蛋白質，而且誘導時間若增長至 48 小時並不會讓 NS4B 的表現量增加，此外在沒有 doxycycline 的誘導情況下，HepG2-2-NS4B-V5 仍會有微量 NS4B 的表現；因為 NS4B 表現量在 doxycycline 誘導 24、48 小時後觀察並無太大差異，因此往後實驗皆以誘導 24 小時為準。對照組 HepG2-2 則是無論有無 doxycycline 的誘導皆不產生任何 V5-tagged 蛋白質。

二、NS4B 蛋白質對 FASTK 基因表現量的影響

先前本實驗室在 H7-HCVR 中觀察到 FASTK mRNA 有上升的情形，然而在單獨轉染 NS4B 至 Huh7 時卻觀察到 FASTK mRNA 呈現下降的情形(74)，因此接下來先分析 HepG2-2-NS4B 在經誘導表現 NS4B 蛋白質時是否會對 FASTK mRNA 表現量造成任何影響。

首先 HepG2-2 及 HepG2-2-NS4B 以 doxycycline 誘導 24 小時，然後萃取細胞 RNA，經反轉錄反應得到 cDNA，再以即時定量聚合酶反應分析細胞 FASTK mRNA 表現量。結果發現，HepG2-2 中 FASTK mRNA 表現量並不會因 doxycycline 的存在與否而有明顯改變，但 HepG2-2-NS4B-V5 卻會經 doxycycline 誘導表現 NS4B 蛋白質而使其細胞中 FASTK mRNA 表現量下降至沒誘導時的 51%，因此如同先前轉染實驗之結果，當表現 NS4B 蛋白質時，HepG2-2-NS4B-V5 細胞中 FASTK mRNA 表現量會被抑制(圖二)。

三、NS4B 對 Fas 活化所導致之細胞凋亡的影響

根據Li等人的研究指出，當以siRNA抑制HeLa細胞中FASTK蛋白質表現，細胞會出現細胞凋亡現象，如細胞萎縮(cell shrinkage)、caspase 3 活化等現象，且過量表現FASTK蛋白質之HeLa細胞較能夠抵抗Fas受器活化所引起之細胞凋亡(73)；Izquierdo等人則指出FASTK蛋白質會調控細胞受器Fas的alternative splicing、特別是exon 6 的略過與否(66)，而mRNA有沒有exon 6 決定所轉譯出之Fas受器在Fas/FasL訊息傳遞中所扮演的角色(53, 54, 56, 57, 63)；因此FASTK蛋白質在Fas/FasL訊息傳遞及細胞凋亡過程扮演重要角色。

本實驗室先前研究指出在 Huh7、293 細胞株中單獨表現 NS4B 蛋白質會抑制 FASTK 基因之 mRNA 的表現，然而此抑制現象並不會導致如同 Li 等人指出之細胞凋亡現象如 caspase 3 活化(73)，且不會加劇 Fas 受器活化所導致之細胞凋亡(74)。穩定細胞株 HepG2-2-NS4B 中 FASTK 基因之 mRNA 的表現量會因 NS4B 蛋白質的存在而下降，由於 FASTK 蛋白質對於 Fas 基因之 alternative splicing 過程扮演調節的角色，因此假設 NS4B 蛋白質會藉由抑制 FASTK 基因來間接促使細胞產生抗 Fas-mediated 細胞凋亡的 sFas(53, 57)。在實驗時保留 doxycyclin 誘導期間之 culture medium (conditioned medium)然後加入 anti-Fas (CH11)抗體去誘導細胞凋亡，觀察有 NS4B 蛋白質表現之細胞的 conditioned medium 對 anti-Fas 抗體誘導之細胞凋亡的過程及結果是否造成任何影響。

3.1 細胞活性(cell viability)

因為細胞凋亡最終導致細胞死亡，以訊息傳遞鏈越末端訊息越被放大的理論而言，細胞活性或細胞存活率應該是檢視細胞凋亡刺激之結果較直接而易觀察到效果的細胞生理變化之一。又細胞特性如 Fas 受器、抗細胞凋亡細胞因子 Bcl-xL 等表現量的差異等，其會導致各種細胞對於 Fas 受器活化所誘發之細胞凋亡的耐受度及時程出現差異，因此實驗一開始先確認 HepG2-2 細胞株要達到最大細胞凋亡

程度之最低 anti-Fas 抗體(CH11)的濃度為多少、以及 Fas 活化後多久可觀察到明顯之細胞凋亡現象。anti-Fas 抗體(CH11)為 IgM，能藉和 Fas 受器結合而將其聚在一起並使 Fas 受器之死亡區域 DD 活化並傳遞細胞凋亡訊息至細胞內。以 trypan blue exclusion assay 檢視細胞凋亡現象，發現在 anti-Fas 抗體(CH11)濃度 200 ng/ml (圖三 A)刺激 24 小時(圖三 B)後可明顯偵測到 HepG2-2 細胞凋亡現象。

在此採用 200 ng/ml anti-Fas 抗體刺激 24 小時的條件，利用 trypan blue exclusion assay，觀察 doxycyclin 誘導培養 24 小時後之 HepG2-2-NS4B 的 conditioned medium 對 anti-Fas 抗體誘發的細胞凋亡有無影響。結果顯示，穩定細胞株 HepG2-2-NS4B 及其母細胞株 HepG2-2 在未受 anti-Fas 抗體及 doxycycline 刺激時，兩細胞的細胞活性(95% v.s. 100%)沒有明顯差異；在未受 anti-Fas 抗體刺激時，doxycycline 誘導亦不會使兩細胞之細胞活性(102%v.s. 103%)出現差異；當細胞受到 anti-Fas 抗體活化時，HepG2-2 (17%)和 HepG2-2-NS4B (36%)的細胞活性均明顯下降，但 HepG2-2 的細胞活性(19%)不會受 doxycycline 誘導的影響出現明顯差異，而 HepG2-2-NS4B 接受 doxycycline 誘導後的細胞活性(61%)卻明顯高於無 doxycyclin 誘導的 HepG2-2-NS4B 的細胞活性(36%)，因此 NS4B 蛋白質使細胞較能抵抗 Fas 受器活化所引起之細胞凋亡(圖四)。

3.2 Caspase 3 活性

細胞凋亡訊息傳遞由一連串蛋白酶及核苷酸酶等的活化構成，當 Fas 受器活化後，最先活化的是 caspase 8，接著粒線體膜電位能會改變、cytochrome c 釋出，接著 caspase 9 會活化並導致 caspase 3 活化，然後 caspase 3 的活化會活化下游酵素並導致 DNA 斷裂、細胞膜內脂質翻轉等現象，最後導致細胞皺縮、細胞死亡。因此觀察細胞凋亡各種現象必須在不同時間點，而由 HepG2-2 及 HepG2-2-NS4B 接受 anti-Fas 抗體刺激並觀察 caspase 3 活化情形發現，caspase 3 活化約在 anti-Fas 抗體刺激後 6-9 小時最明顯(圖五)，故最後選擇在 anti-Fas 抗體(CH11)刺激 8

小時後觀察細胞內 caspase 3 活化之情形。

在此觀察培養於 doxycycline 誘導 24 小時之 conditioned medium 中的細胞，其在接受 anti-Fas 抗體刺激 8 小時後，細胞內 caspase 3 活性有無改變。結果顯示，在 anti-Fas 抗體刺激 8 小時後，無論是 HepG2-2 或 HepG2-2-NS4B、有無 doxycycline 誘導或 anti-Fas 抗體刺激，其細胞活性並無明顯差異。取等量細胞經由 Caspase-Glo[®] 3/7 Assay 監測細胞中 caspase 3 活性發現，在未受任何刺激時，穩定細胞株 HepG2-2-NS4B 及母細胞株 HepG2-2 之間的 caspase 3 活性並無明顯差異；而當以 doxycycline 誘導時亦不會使細胞各自間 caspase 3 活性出現差異。當以 anti-Fas 抗體刺激 8 小時後，無論有沒有受 doxycycline 誘導，HepG2-2 的 caspase 3 活性皆約上升到原本的 13 倍以上，而 HepG2-2-NS4B 的 caspase 3 活性則皆只上升到原本的 5 倍左右(圖六)；因此在 anti-Fas 抗體刺激時，相較於未受 doxycycline 誘導的細胞，HepG2-2-NS4B 並不會因為表現較多的 NS4B 而讓其 caspase 3 活化程度下降，但是 HepG2-2-NS4B 相較於 HepG2-2 卻明顯抑制 caspase 3 的活化。

四、NS4B 蛋白質對 Fas 異構物表現的影響

因為 NS4B 蛋白質可能藉由抑制 FASTK 之表現來調控 Fas 基因之 alternative splicing，並促使細胞產生具有抗 FasL-ligation-induced 細胞凋亡功能之 soluble Fas (sFas)，因此接下來試圖觀察在 doxycycline 誘導下，culture supernatant 中 sFas 是否會增加，以及 sFas 和 mFas 的表現量比例是否會改變。

種等細胞數之 HepG2-2 及 HepG2-2-NS4B，經過 doxycycline 誘導 24 小時，分別收取細胞全蛋白質(lysate) 及 supernatant，然後以 Quantikine[®] Human sFas Immunoassay 分析細胞之 lysate 及 supernatant 中含有多少的 Fas 受器。結果顯示，doxycycline 誘導並不會對 HepG2-2 或 HepG2-2-NS4B 各自細胞中的 Fas 受器總量及釋放至細胞外的 sFas 受器總量造成影響；然而 HepG2-2 之 sFas 量約佔細胞 Fas 受器總量 10%，而 HepG2-2-NS4B 之 sFas 量約佔其細胞 Fas 受器總量 14%，暗示

HepG2-2-NS4B 傾向於表現 sFas 並釋出至細胞外。另外，以 10^6 細胞數培養在 12 well culture plate 中的 HepG2-2-NS4B 細胞中 Fas 受器總量(2752 pg)約為 HepG2-2 的量(1496 pg)的 1.8 倍，而 HepG2-2-NS4B 釋出至細胞外的 sFas 受器總量(382 pg)約為 HepG2-2 的量(150 pg)的 2.5 倍(圖七)。

上述的差異並非導源於種細胞時細胞數的差異而造成 Fas 受器總量的差異，因為當收取全細胞蛋白質檢視其濃度時，發現經 doxycycline 誘導的 HepG2-2-NS4B 細胞全蛋白質總重(770 μ g)為 HepG2-2(582 μ g)的 1.3 倍，此增加幅度並不足以解釋 HepG2-2-NS4B 的 sFas 的量為 HepG2-2 的量的 2.5 倍，因此雖然以 doxycycline 誘導 NS4B 表現並無法造成更多 sFas 的釋出，但 HepG2-2-NS4B 之 sFas 的量的確較其母細胞株 HepG2-2 高。



討論

一、穩定細胞株表現 NS4B 之情形

在建立穩定細胞株的過程中，只得到一個能抵抗 hygromycin B 篩選的 clone，將此 clone 命名為 HepG2-2-NS4B；由西方墨點實驗檢視 HepG2-2-NS4B 表現 NS4B 蛋白質的情形可發現，即使在沒有 doxycycline 誘導時，HepG2-2-NS4B 仍會表現微量 NS4B 蛋白質，而此微量之 NS4B 蛋白質由本實驗之部分細胞生理實驗結果看來，其對細胞是有影響的。不過當有 doxycycline 誘導時，穩定細胞株中 NS4B 蛋白質的表現量遠多於無 doxycycline 誘導時的表現量。

先前 Lundin 等人以轉染方式在肝癌細胞株 Hep3B 中過量表現 C 端融合螢光蛋白(EGFP)的 NS4B 蛋白質時，觀察到 NS4B 蛋白質分佈在細胞之內質網上(76)；而 Hugle 等人以骨癌細胞株 U-2 OS 建立可藉 tetracycline 的存在來抑制 NS4B 蛋白質表現之穩定細胞株(tet-off system)，並利用 IFA 去檢視，同樣可發現 NS4B 蛋白質位於內質網之上(75)。本研究以轉染方式將 pcDNA-NS4B-V5HisTopo 質體送進 293 細胞表現 NS4B 蛋白質時，由免疫螢光法 IFA (Immuno-Fluorescent Assay)亦可觀察到相似的 NS4B 蛋白質之細胞內分佈特徵如 cytoplasmic foci 及 reticular ER pattern (data not shown)。在建立穩定細胞株 HepG2-2-NS4B 後，嘗試以 IFA 去觀察 NS4B 蛋白質在 HepG2-2-NS4B 內表現分佈之情形及真正能受 doxycycline 誘導表現 NS4B 蛋白質之細胞族群的分佈狀況，並以西方墨點法確認 NS4B 蛋白質表現量(圖一, and data not shown)；結果顯示，在 doxycycline 誘導 24 小時後以西方墨點實驗可觀察到穩定細胞株 NS4B 蛋白質的表現遠多於未經 doxycycline 誘導之細胞的表現，但在以 IFA 觀察時卻無法得到足以區分兩者差異之螢光訊號。在此，NS4B 蛋白質的確有表現，但在細胞內卻無法以 IFA 偵測到，其可能原因之一為 NS4B 蛋白質在內質網上的構造遮蔽住其 C 端的 V5-tag。

NS4B 蛋白質在轉譯的同時會嵌入內質網，而負責切割病毒多蛋白質前驅物

的 NS3-4A 蛋白質位於細胞質，因此理論上剛切割完之 NS4B 蛋白質其 N 端及 C 端皆位於細胞質端；而 NS4B 蛋白質由 261 個胺基酸構成，經由疏水性圖譜及實驗指出其具有四個穿膜區域，而 N 端約有 95 個胺基酸在細胞質、C 端約有 70 個胺基酸在細胞質(77)，因此 N 端可能在蛋白質折疊後遮蔽到 C 端之 V5-tag；此外 NS4B 蛋白質亦可能經由聚合作用而使其 C 端之 V5-tag 被包埋而無法被 anti-V5 抗體偵測到(80)。穩定細胞株之 NS4B 基因來自於 pcDNA-NS4B-V5HisTopo，兩者所轉譯出之 NS4B 蛋白質之胺基酸序列應該完全一樣；雖然 IFA 無法偵測到穩定細胞株表現之 NS4B 蛋白質，但能偵測到轉染進 293 細胞的 pcDNA-NS4B-V5HisTopo 所轉譯出之 NS4B 蛋白質，在此亦提出可能解釋。

真核細胞內蛋白質的合成、折疊主要在內質網中發生，因為細胞 chaperon 等相關幫助蛋白質正確折疊之細胞因子數量有限，所以當大量表現蛋白質時，細胞即可能無足夠之細胞因子幫忙而無法確保新合成蛋白質的正確折疊；因此當以轉染方式將 pcDNA-NS4B-V5HisTopo 質體送進 293 細胞使其過量表現 NS4B 蛋白質，NS4B 蛋白質可能因過度表現而無法正確折疊，使得細胞中 V5-tag 外露並可經由 anti-V5 抗體偵測，甚至 His-tag 也可能造成折疊上的些微差異而使結構不同。若此構造差異確實存在，則折疊不同之 NS4B 蛋白質可能對細胞有不同的生理影響；而同樣是表現 NS4B 蛋白質，因其表現量多寡不同，所觀察到之對細胞生理的影響即可能亦不相同。

二、NS4B 蛋白質對於 FASTK 及細胞的可能影響

經由即時定量聚合酵素鏈鎖反應可發現，穩定細胞株 HepG2-2-NS4B 經 doxycycline 誘導 24 小時表現 NS4B 蛋白質後，其細胞中 FASTK mRNA 表現量有被抑制的情形，呼應先前本實驗室以轉染方式促使 293 及 Huh7 表現 NS4B 蛋白質所觀察到之抑制現象(74)。

NS4B 為一嵌在內質網之疏水性蛋白質，不會進到細胞核內調控 FASTK 基因

之轉錄，因此推測 NS4B 是透過其它細胞轉錄因子抑制 FASTK 基因轉錄、直接或間接促進 FASTK mRNA 降解等方式使其 mRNA 量下降。在本研究中亦嘗試以西方墨點法去觀察 FASTK 蛋白質層次是否會因 NS4B 蛋白質的存在而有任何改變，但因 FASTK 為一 kinase，其在肝細胞中的蛋白質量可能不高，復以初級抗體效果不佳，因此無法由西方墨點法確認 NS4B 蛋白質對 FASTK 蛋白質表現有無影響。

三、NS4B 蛋白質對細胞生理之影響

2007 年，Izquierdo 等人發現 FASTK 能和 TIA-1/TIAR 協同作用並促使 Fas 基因之 exon 6 在 alternative splicing 過程保留、產生含 transmembrane domain 之 Fas mRNA，而當以 RNAi 將 FASTK knockdown 後，細胞會轉而略過 exon 6 並製造 sFas mRNA(66)；而 Simarro 等人更進一步指出 FASTK 會進到細胞核內並且調控 fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) 基因之 alternative splicing(68)，因而在此視 FASTK 為一選擇性剪接調節因子，能調節細胞產生不同之 Fas 異構物並調控 Fas 訊息傳遞過程。

因為 Fas/FasL 訊息傳遞在肝細胞凋亡過程扮演重要角色，因此 HCV 可能影響 Fas 基因表現量或影響其 alternative splicing 使產生不同功能之異構物，並藉此來干擾受 HCV 感染之肝細胞的細胞凋亡過程，使更利於 HCV 複製感染並造成慢性感染；先前研究指出 HCV 慢性感染及 HCV 陽性之肝病變患者之血清經常可偵測到較高濃度之 sFas 受器(62, 98-101)，並有研究指出其細胞內含 exon 6 之 Fas mRNA 較高(56)、細胞表面亦會有較多之 mFas 受器(102)；而除了肝細胞外，活化時的免疫細胞如 peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) 中亦可發現 HCV 的複製(12)，而此兩種細胞皆會表現 mFas 及 sFas(54, 57)，所以血清中增加的 sFas 可能來自於受 HCV 感染之肝細胞或 PBMCs。

Krams 等人指出，人類肝臟細胞及肝癌細胞株 HepG2 能夠經由調控 Fas 基因的 alternative splicing 來產生 sFas 並釋放至培養基，將此培養基當作 conditioned

medium 培養 Jurkat cells，發現能抑制 anti-Fas 抗體所引起之細胞凋亡(57)；因此在發現 NS4B 蛋白質會抑制 HepG2-2-NS4B 中 FASTK mRNA 表現量後，本研究便進一步探討此 FASTK 抑制現象是否間接促使 HepG2-2-NS4B 傾向於轉錄 sFas mRNA、轉譯 sFas 並釋放到細胞外，保護細胞抵抗 anti-Fas 抗體引起之細胞凋亡。

在細胞活性實驗中，HepG2-2-NS4B 受 doxycycline 誘導 24 小時後再以 anti-Fas 抗體刺激，其細胞活性約為未受 doxycycline 誘導之 HepG2-2-NS4B 的細胞活性的 1.7 倍，因此 NS4B 蛋白質的確能使 HepG2-2-NS4B 抵抗 anti-Fas 抗體刺激所引起之細胞凋亡。

雖然 NS4B 蛋白質能抑制細胞凋亡，但當進一步檢視 HepG2-2-NS4B 中 caspase 3 活化情形卻發現，NS4B 蛋白質的存在與否、或者說 NS4B 蛋白質的多寡(因為 HepG2-2-NS4B 在未受 doxycycline 誘導時仍會表現微量 NS4B 蛋白質)並不會造成 caspase 3 活化情形上的任何差異；然而比較 HepG2-2 及 HepG2-2-NS4B 可發現，在 anti-Fas 抗體刺激下，HepG2-2-NS4B 的 caspase 3 活性只有 HepG2-2 的 41%。因為 HepG2-2-NS4B 在不受誘導時也會表現微量 NS4B 蛋白質，也許此微量 NS4B 蛋白質即足以抑制 caspase 3 活化至最大程度，當 NS4B 蛋白質表現量更多時，也無法更加抑制 caspase 3 活性；若是如此，則 NS4B 應該不是直接和 caspase 3 結合干擾其活化，而應是直接或間接促使 caspase 3 降解、透過其它細胞因子抑制 caspase 3 活化，如此才能解釋沒看到 NS4B 蛋白質量的多寡對 caspase 3 活化的影響。

最後本研究利用 ELISA 方法檢視 HepG2-2-NS4B 及 HepG2-2 在接受 doxycycline 誘導後，其 conditioned medium 中 sFas 的量是否有增減；結果發現，是否有 doxycycline 進行誘導並不影響 HepG2-2-NS4B 釋放至 medium 的 sFas 的量，然而比較 sFas 佔所有細胞合成之 Fas 的比率可發現，HepG2-2-NS4B 中 sFas 佔總 Fas 的比例(14%)比 HepG2-2(10%)高。ELISA 所用之 anti-Fas 抗體並無法辨別以 RIPA buffer 收得之 lysate 中的 Fas 是 sFas 或 mFas，因此只能得知 HepG2-2-NS4B 中 Fas 的總表現量(2752)約為 HepG2-2(1496)的 1.84 倍，而 HepG2-2-NS4B 釋出至 medium 中的 sFas 總量(382)為 HepG2-2 的 sFas 量(150)的 2.55 倍。將來或許可以用

其它方法分離細胞膜上之 mFas 及細胞內仍未釋出至細胞外的 sFas，例如 hypotonic lysis buffer 及 freeze/thaw cycles 處理，再分別測其 Fas 異構物的含量。

Krams 等人曾以 RT-PCR 方法研究肝臟初級細胞(primary cells)、肝癌細胞 HepG2 及活化之 PBMCs 中 Fas transcript 的表現情況，結果發現肝臟細胞、活化之 PBMCs 及 HepG2 中 sFas 的 mRNA 量分別約為 mFas 的 $34.6\pm 12.9\%$ 、 $7.4\pm 1.4\%$ 及 7.1% ，而 HepG2 中 sFas 所佔比例小於肝臟細胞主要是因為 HepG2 之 mFas 的 mRNA 量遠高於肝臟細胞(57)，經換算可得 HepG2 中 sFas mRNA 佔 Fas mRNA 總量的 6.6% ，這甚至比本研究在 HepG2-2 蛋白質層次中觀察到之釋出到 medium 中的 sFas 佔 Fas 總量的 10% 略低，推測其可能是 HepG2-2 和 HepG2 自身細胞生理的差異、偵測方法造成的結果差異、或者轉譯過程其它細胞因子調控的結果。

在此推測 HepG2-2-NS4B 細胞 sFas 的增加和 anti-Fas 抗體引起之 caspase 3 活化程度的減低是具直接關聯的；藉由較多之 sFas 和 anti-Fas 抗體結合，使細胞表面之 Fas 只能和較少之 anti-Fas 抗體結合並活化其死亡區域 DD，最後造成 caspase 3 的活化程度較低；然而最後細胞活性之增加，則可能是 NS4B 蛋白質表現量增加後活化了細胞其它訊息傳遞鏈如 NF- κ B pathway，進而增加細胞存活的機率。

關於 HepG2-2-NS4B 及母細胞株 HepG2-2 在沒有 doxycycline 誘導時即可見到兩者間 sFas 及 Fas 總量的差異，亦有可能是因在沒有 doxycycline 誘導下 NS4B 蛋白質已有的微量表現所造成；而另一個造成兩細胞株間 caspase 3 活化程度和 sFas 量差異的原因則是 NS4B 基因嵌入細胞染色體造成細胞其它基因異常。因為當初建立穩定細胞株過程只得到一個 clone (HepG2-2-NS4B)，所以無法藉由觀察其它表現 NS4B 蛋白質之穩定細胞株來排除第二項可能。

Fas 受器除了傳遞死亡訊息引起細胞凋亡外，亦會活化細胞內其它訊息傳遞鏈如 NF- κ B (nuclear factor- κ B) pathway(44)；轉錄因子 NF- κ B/Rel family 於免疫及發炎反應中扮演重要角色，可藉由結合到基因之 promoter 或 enhancer 上之 κ B elements 進而促進或抑制有關細胞凋亡、細胞增生功能等之基因表現，在哺乳類細胞中有五個屬於此 family 之蛋白質，分別為：Rel-A、c-Rel、Rel-B、NF- κ B1 (p105/p50)、

NF- κ B2 (p100/p52)，這些蛋白質可形成 homodimers 或 heterodimers (NF- κ B complex)。目前已知 NF- κ B 活化途徑有三種，分別是 canonical、atypical、non-canonical pathways，以目前最為熟悉的 canonical pathway 之 NF- κ B1/Rel-A (p50/p65) 為例，平常 p50/p65 和 inhibitor of NF- κ B (I κ B α) 結合並且留在細胞質中，當受到 IL-1 及 TNF- α 等刺激後，I κ B kinase (IKK) complex 會活化並促使 I κ B α 磷酸化及降解，釋出 p50/p65 進到細胞核內進而活化、抑制特定基因的轉錄，在此 IKK complex 是由 IKK α 、IKK β 及 NF- κ B essential modifier (NEMO，又稱 IKK γ) 構成。當細胞之 inflammatory receptor CD40 或 lymphotoxin- β receptor 受到活化後，細胞則會經由 non-canonical pathway 活化 NF- κ B2/Rel-B (p100/Rel-B)；平常 p100 及 Rel-B 形成 heterodimer 並存在於細胞質，當受到刺激後，NF- κ B-inducing kinase (NIK) 會活化 IKK complex (IKK α 、IKK β)，而活化之 IKK α 會進一步磷酸化 p100，促使 p100 被切割成 p52，接著 p52/Rel-B 進到細胞核內，並且活化不同於 p50/p65 所活化的另外一群基因(見附圖二)(103)。

在不同生理條件下，p50/p65 活化會促使或抑制抗細胞凋亡細胞因子如 Bcl-xL、xIAP、cFLIP、Fas、FasL 等基因的表現並調控 Fas 受器活化所引發之細胞凋亡，而 Fas 受器活化所傳導之死亡訊息所活化的 caspase 則會反過來降解 NF- κ B pathway 中的細胞因子如 IKK、NIK、p50 等並抑制其存活訊息；當 Fas 受器被活化後，雖然細胞凋亡及 NF- κ B pathway 皆會被活化並且互相抑制，但其活化細胞凋亡訊息之強度大於活化 NF- κ B 訊息之強度，因此細胞會走向死亡，然而當細胞凋亡訊息傳遞鏈被抑制後，NF- κ B 的活化及抗細胞凋亡影響即較明顯(103, 104)。

Marusawa 等人發現，當 HepG2 以低劑量之 anti-Fas 抗體(CH11, 100 ng/ml) 刺激 3 小時，其細胞 NF- κ B 活性增加 1 倍；當以較高劑量之 anti-Fas 抗體(250 ng/ml) 刺激 60 小時，並同時外送 NIK 表現質體時，藉由 trypan blue exclusion assay 去檢視細胞活性，發現 NF- κ B 的活化會使 HepG2 較能抵抗 anti-Fas 抗體刺激所引起的細胞凋亡現象。又若外送 I κ B α 表現質體，並以 anti-Fas 抗體(CH11, 250 ng/ml) 刺激 48 小時，則 DNA fragmentation 會加劇；因此 NF- κ B pathway 中之 NF- κ B1/Rel-A

(p50/p65)及 NF- κ B2/Rel-B (p52/ Rel-B)可能在 Fas 受器活化後會各自活化不同之基因群並調控細胞增生、Fas 受器活化所引發之細胞凋亡(51)。

因為 Fas 受器的活化能夠活化 NF- κ B，Kato 等人亦指出 NS4B 蛋白質會活化 NF- κ B (87)，而 NF- κ B 的活化除了調控細胞凋亡外，亦會參與細胞增生、發炎反應等訊息傳遞，因此在此為本研究所觀察到之現象作一可能解釋：一開始 NS4B 蛋白質的微量表現使細胞產生較多之 sFas，進而造成較少 anti-Fas 抗體能和 mFas 結合，因此 Fas 的活化程度降低、細胞凋亡訊息降低，且微量 NS4B 蛋白質亦可能活化 NF- κ B pathway，並且抑制細胞內細胞凋亡訊息傳遞。當 NS4B 的大量表現後進一步活化 NF- κ B，使細胞之細胞增生能力上升，因此在以 200 ng/ml anti-Fas 抗體刺激 HepG2-2-NS4B 時，NS4B 蛋白質的大量表現除了抑制細胞凋亡訊息外，更促進細胞增生，使得受 doxycycline 誘導的 HepG2-2-NS4B 之細胞存活率上升(圖四)；而在只表現微量 NS4B 蛋白質的 HepG2-2-NS4B 中，雖然細胞凋亡訊息被抑制，但因 NF- κ B 活化強度不足以使細胞抵抗細胞凋亡，且細胞增生能力亦未被誘發，因此最後細胞仍然走向死亡、細胞存活率較低。

綜合本研究及它人研究結果可推測 NS4B 蛋白質在致癌過程扮演重要角色，一方面 NS4B 蛋白質能調控 Fas 受器不同 isoforms 之產生、並抑制 Fas 受器活化所引起之細胞凋亡訊息傳遞，使受 HCV 感染之宿主細胞較能抵抗免疫系統所引發之細胞凋亡、有利於肝癌細胞之 clonal selection；另一方面 NS4B 蛋白質可能藉由影響 Fas 受器等細胞因子來活化 NF- κ B pathway，而 NF- κ B 的活化除了抑制細胞凋亡外，也可能促進細胞增生，並造成肝細胞癌化。

圖表

表一、即時定量聚合酵素反應使用的引子序列及反應條件

A · 引子及其序列

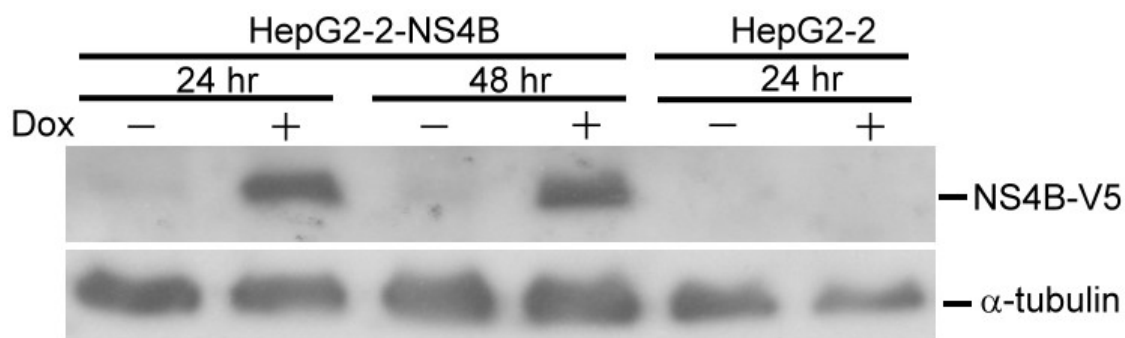
引子名稱		序列
FASTK	Forward	5'-GGCAGCAAGTGCCCATCTT-3'
	Reverse	5'-GGCGCACAGCAGGAAGTC-3'
GAPDH	Forward	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'
	Reverse	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'

B · 即時定量聚合酵素反應時各基因所需的取量標準

	GAPDH	FASTK
2X SYBR GREEN	12.5 μ l	12.5 μ l
Forward primer	40 nmole	100 nmole
Reverse primer	40 nmole	100 nmole
Template	100 ng	100 ng
ddH ₂ O	variable	variable
Total	25 μ l	25 μ l

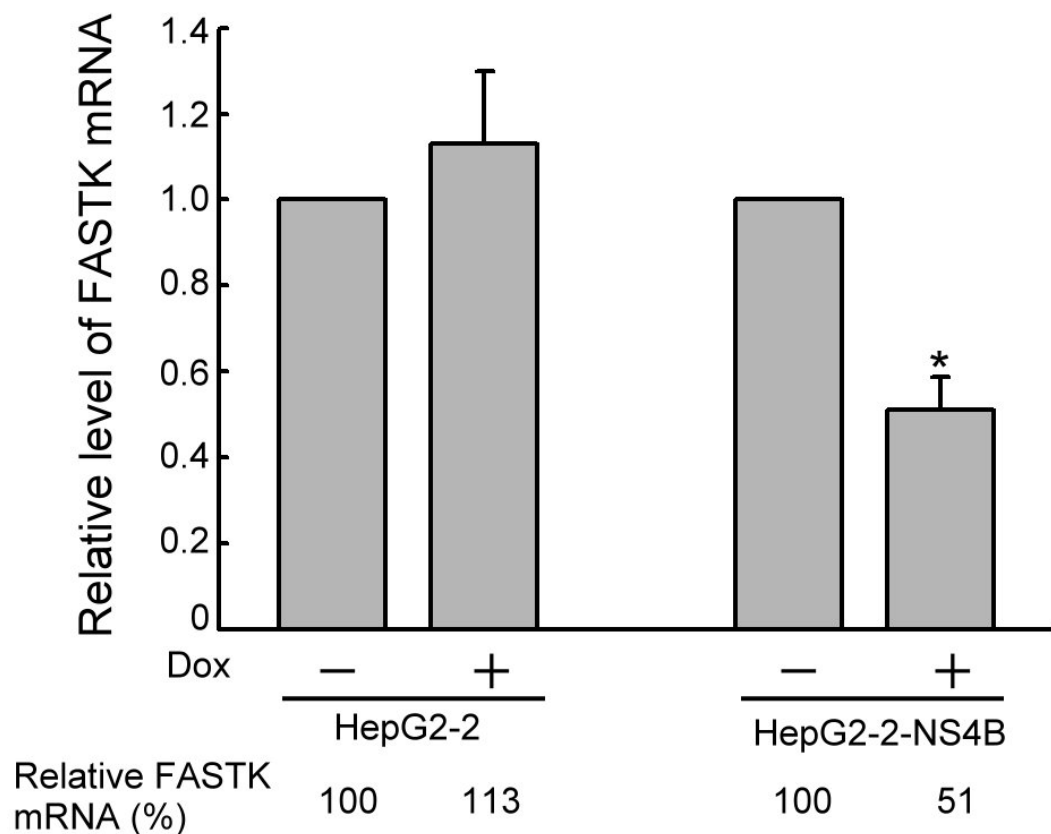
C · 反應程序

	Cycle= 1	Cycles= 40		Cycle= 1	
	Activation	Denature	Anneal/ Extend	Dissociation	
Temp./time	95 °C/ 10'	95 °C/ 15''	60 °C/ 1'	95 °C/ 15''	60→95 °C



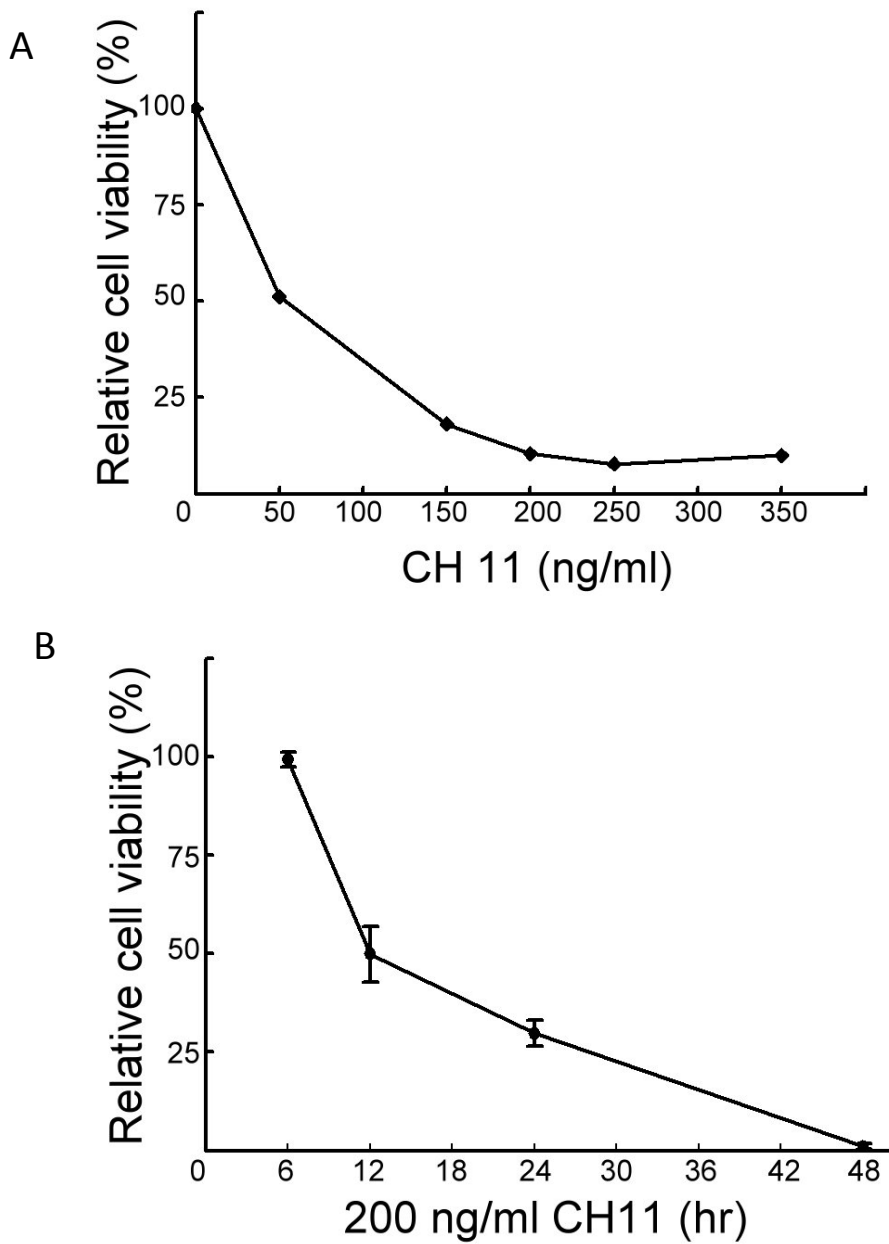
圖一、穩定細胞株 HepG2-2-NS4B 經 doxycycline 誘導表現 NS4B 蛋白質

HepG2-2-NS4B 及其母細胞株 HepG2-2 同時經 doxycycline 誘導 24~48 小時，收取細胞全蛋白質，取 100 μ g 之細胞全蛋白質利用 12% SDS-PAGE 分離其中各種蛋白質，並以西方墨點實驗，初級抗體以 mouse anti-V5 抗體及 mouse anti-tubulin 抗體分別偵測細胞內蛋白質 NS4B-V5 及 α -tubulin 表現情況。



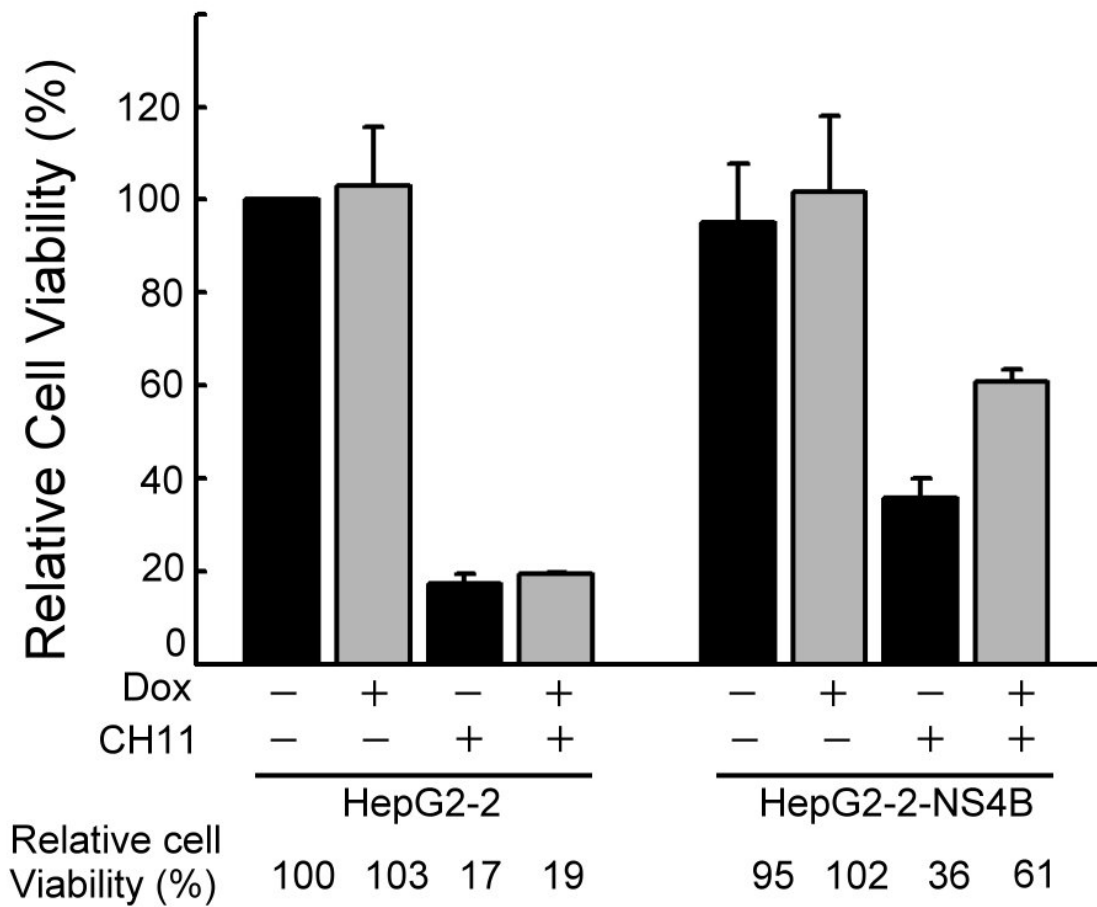
圖二、NS4B 蛋白質抑制 FASTK mRNA 的量

HepG2-2 及 HepG2-2-NS4B 分別經 doxycycline 誘導 24 小時後，萃取細胞全 RNA，經反轉錄酶聚合酵素鏈鎖反應將其轉為 cDNA，再以即時定量聚合酶鏈鎖反應去觀察細胞中 mRNA 變化；internal control 為 GAPDH，分別以未加 doxycycline 之細胞的 FASTK mRNA 為 1 去 normalize 加 doxycycline 之細胞的相對 FASTK mRNA 量；所示結果為各四次獨立實驗結果之平均值，* $p < 0.001$ 。



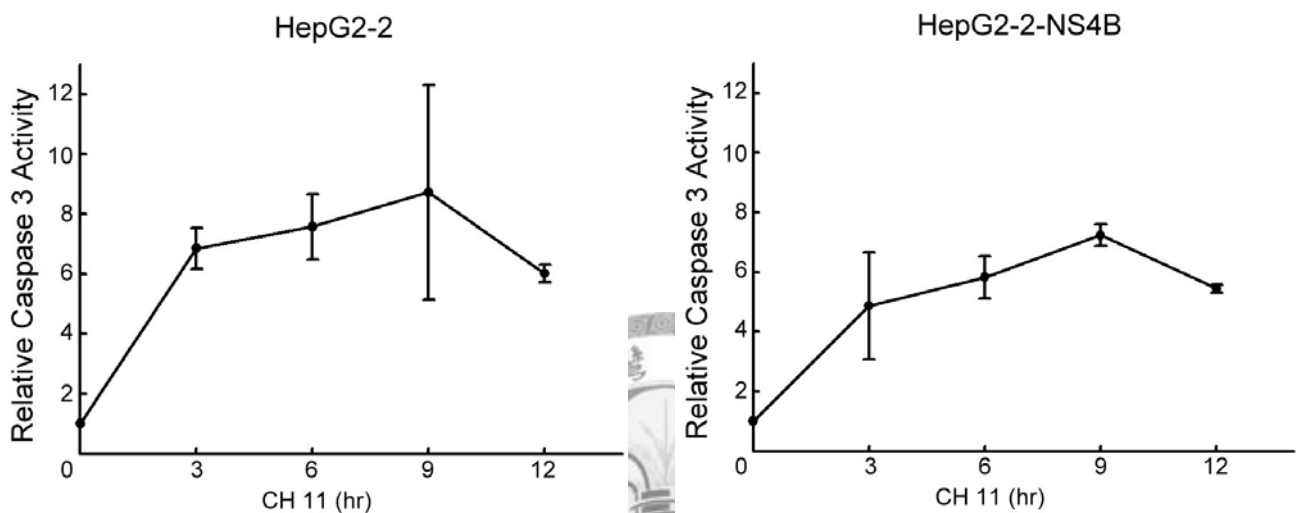
圖三、Anti-Fas 抗體(CH11)劑量與 HepG2-2 細胞凋亡之時程

(A) HepG2-2 以含 5 % tet-free 小牛血清(tet system approved FBS, clontech)之培養液培養 24 小時，然後在保留原培養基情況下，加入等體積並含不同濃度之 CH11，使最後濃度為 0、50、150、200、250、350 ng/ml，在 CH11 刺激 24 小時後，以 trypan blue exclusion assay 分析細胞活性，然後以不加 CH11 之細胞活性為 1 求其它條件之細胞的細胞活性。所示為單一實驗之結果。(B) HepG2-2 以含 5 % tet-free 小牛血清之培養液培養 24 小時，然後在保留原培養基情況下，加入等體積之 CH11 使其最後濃度為 200 ng/ml，然後分別在加入 CH11 後第 6、12、24、48 小時收取細胞並以 trypan blue exclusion assay 分析細胞活性。然後以不加 CH11 之細胞活性為 1 求其它條件之細胞的細胞活性。所示為二次實驗結果之平均。



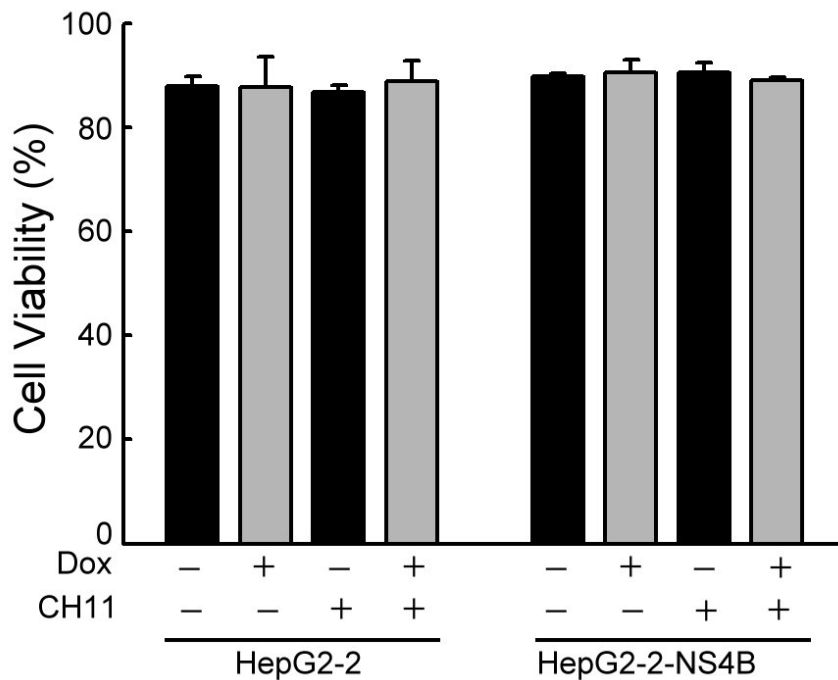
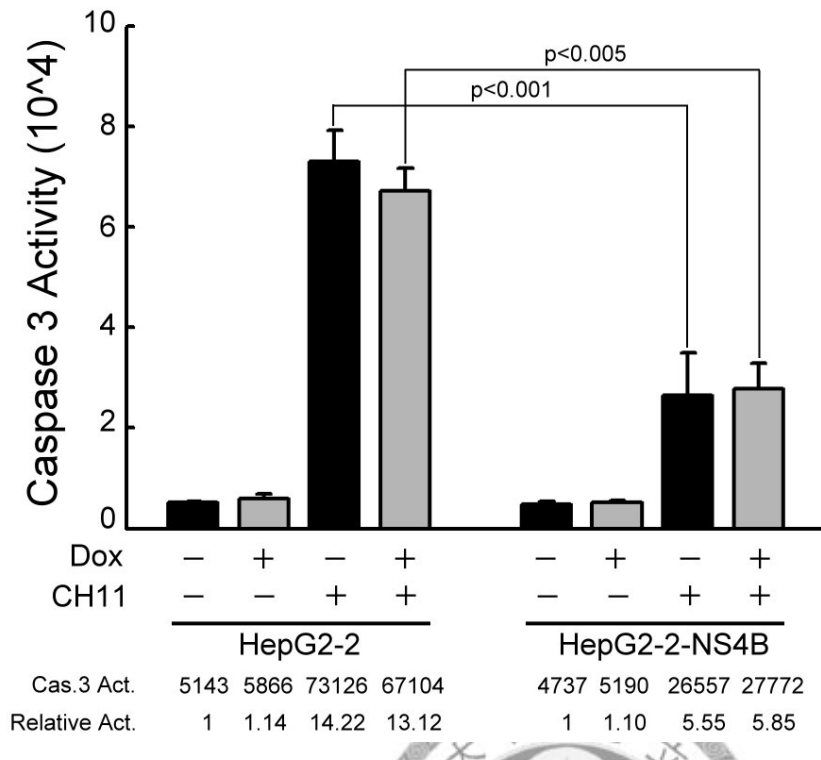
圖四、NS4B 蛋白質對細胞接受細胞凋亡刺激後之細胞活性的影響

HepG2-2 及 HepG2-2-NS4B 先接受 doxycycline 誘導 24 小時，接著再加入 anti-Fas (CH11) 抗體誘導細胞凋亡 24 小時；然後收取細胞並以 trypan blue exclusion assay 去分析各細胞之細胞活性，並且以 HepG2-2 無 doxycycline 誘導、沒 CH11 刺激之細胞活性為 1，去求其它條件之相對細胞活性。所示結果為二次獨立實驗結果之平均值。



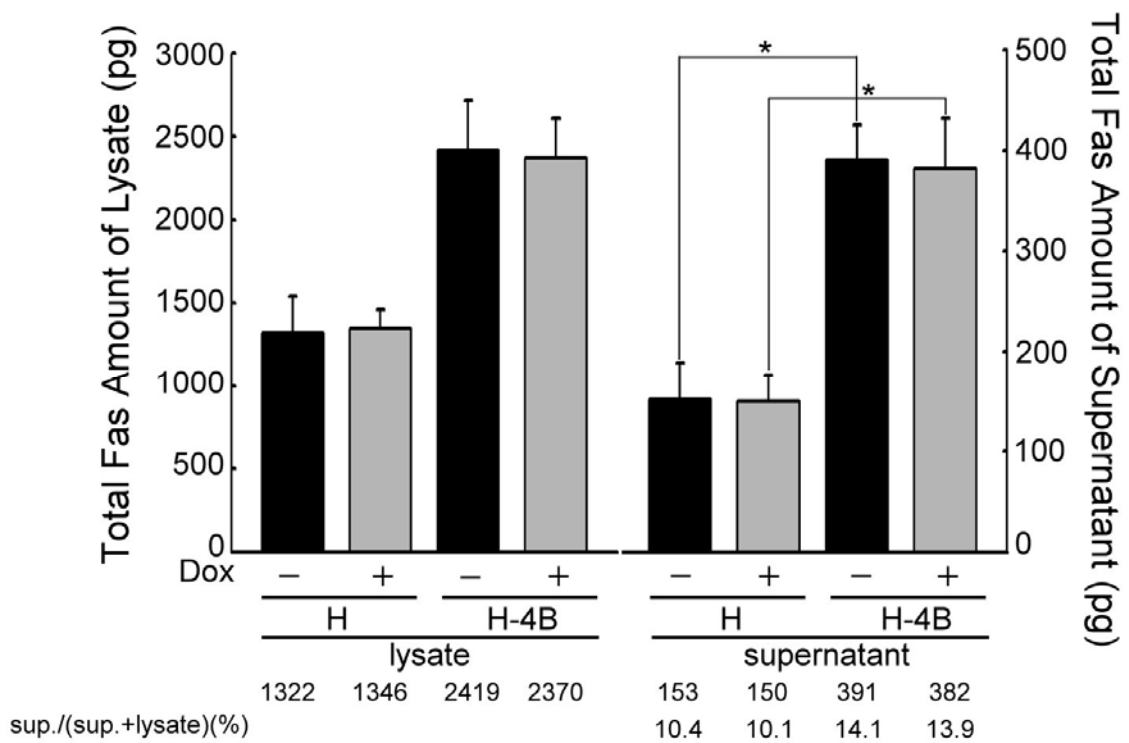
圖五、Anti-Fas 抗體(CH11)活化 caspase 3 之時程

HepG2-2 以含 10 % tet-free 小牛血清之培養基培養 24 小時，然後在保留原培養基情況下，加入等體積、含 CH11 但不含小牛血清之培養基，使 CH11 最後濃度為 200 ng/ml，然後分別在加入 CH11 後第 3、6、9、12 小時收取細胞並以 Caspase-Glo[®] 3/7 Assay 去檢測細胞內 caspase 3/7 之活性，並以不受 CH11 刺激之細胞 caspase 3/7 活性為 1，去求其它時間點 caspase 3/7 活性之相對值。所示為二次實驗結果之平均。



圖六、NS4B 蛋白質對於細胞接受細胞凋亡刺激後在 caspase 3 活化情形及細胞活性的影響

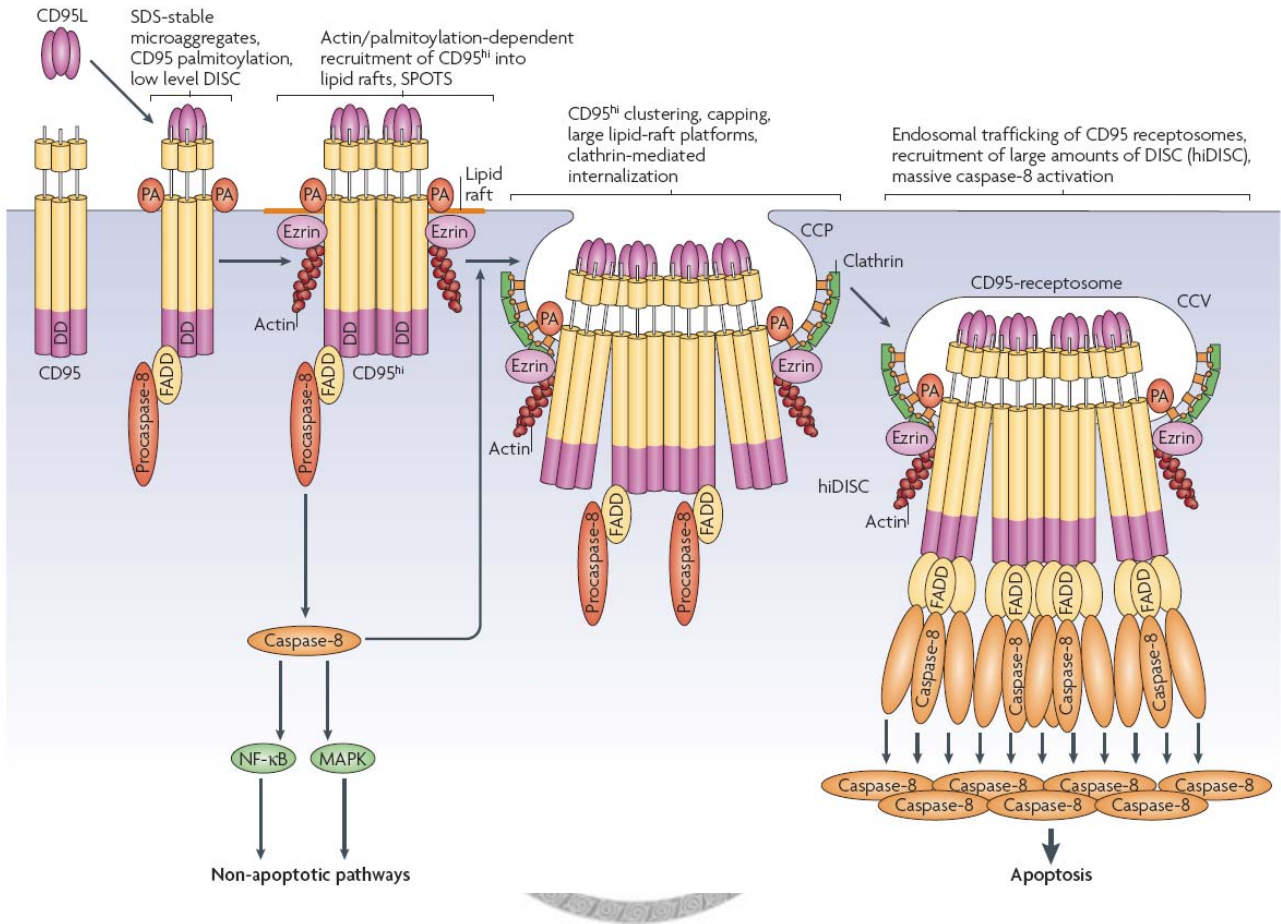
HepG2-2 及 HepG2-2-NS4B 先接受 doxycycline 誘導 24 小時，接著再加入 anti-Fas (CH11) 抗體誘導細胞凋亡 8 小時；計數細胞並算出細胞活性，收取 15000 顆細胞利用 Caspase-Glo[®] 3/7 Assay 去檢測細胞內 caspase 3/7 之活性，由冷光儀求得讀值；所示結果為各三次獨立實驗結果之平均值。



圖七、NS4B 蛋白質對細胞 Fas 受器表現的影響

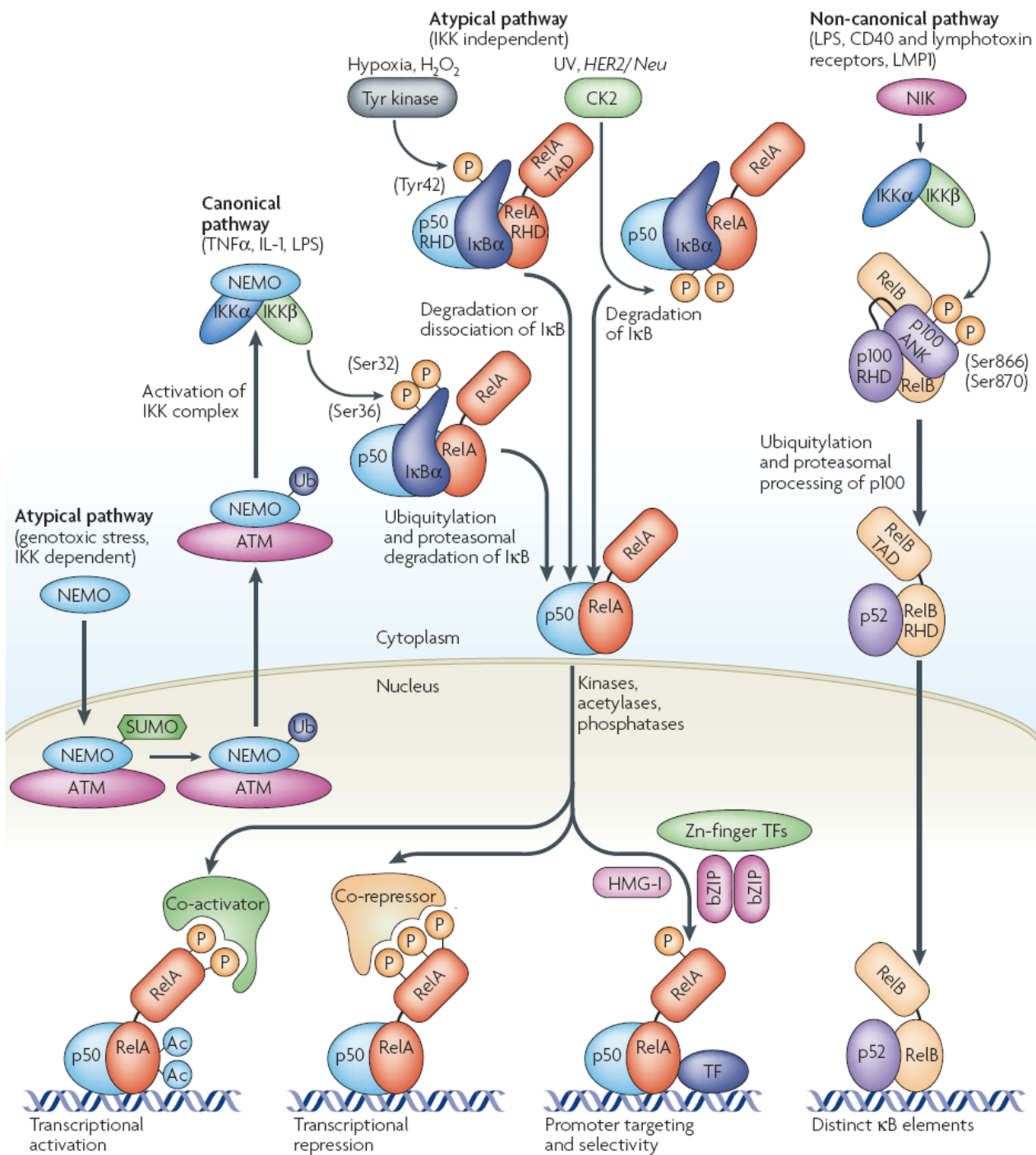
播種 10^6 之 HepG2-2 細胞及 HepG2-2-NS4B 細胞至 12 well culture plate，並且接受 doxycycline 誘導 24 小時，然後分別收取 culture 之 supernatant 及細胞全蛋白質並利 Quantikine[®] Human sFas Immunoassay 去偵測樣本中 Fas 受器的量。所示結果為三次獨立實驗結果之平均；* $p < 0.005$ 。

附圖



附圖一、CD95 compartmentalization (引用自 Schütze, 2008) (47)

CD95和CD95L的結合會促使SDS-stable microaggregates (CD95^{hi})的形成，接著藉由CD95的palmitoylation，以及Ezrin和actin的協調作用，使得CD95^{hi}聚集到lipid raft，此時FADD和pro-caspase-8亦會聚集至CD95的C端並形成SPOTS，活化的caspase-8在此階段能夠活化細胞凋亡以外之訊息傳遞如MAPK及NF-κB。caspase-8活化後會促使CD95^{hi}進一步聚集，並藉由clathrin-dependent、Ezrin-mediated、actin-association的方式將聚集在一起的CD95^{hi}形成CD95 receptosome並運至細胞內，此時大量之FADD和pro-caspase-8會聚集至CD95^{hi}並構成大量之DISK (hiDISK)，造成caspase 8的大量活化並且活化細胞凋亡之下游訊息傳遞鏈。各縮寫全名如下：CD95^{hi}，SDS-stable microaggregates; PA, palmitoylation; FADD, FAS-associated death-domain protein; SPOTS, signalling protein oligomerization transduction structures; MAPK, mitogen-activated protein kinase ; NF-κB, transcription factor nuclear factor-κB; DISC, death-inducing signalling complex; CCP, clathrin-coated pit; CCV, clathrin-coated vesicle.



附圖二、Pathways leading to the activation of NF- κ B(引用自Perkins, 2007) (103)
 解說見討論，各縮寫之全名如下：Ac, acetylation; bZIP, leucinezipper-containing transcription factor; HMG-I, high-mobility-group protein-I; I κ B, inhibitor of κ B; IKK, I κ B kinase; LMP1, latent membrane protein-1; LPS, lipopolysaccharide; NF- κ B, nuclear factor- κ B; RHD, Rel-homology domain ;TAD, transcriptional activation domain; TF, transcription factor; UV, ultraviolet; Zn-finger TF, zinc-finger-containing transcription factor.

參考文獻

1. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, *et al.* An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244(4902):362-4.
2. Thiel HJ, Collett MS, Gould EA, Heinz FX, Houghton M, Meyers G, *et al.* Flaviviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, eds. *Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV*. 2005:979-996.
3. Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, *et al.* Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol* 1994;75 (Pt 7):1755-60.
4. Yu X, Qiao M, Atanasov I, *et al.* Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstructions of hepatitis C virus particles. *Virology* 2007;367(1):126-34.
5. Takahashi K, Kishimoto S, Yoshizawa H, Okamoto H, Yoshikawa A, Mishiro S. p26 protein and 33-nm particle associated with nucleocapsid of hepatitis C virus recovered from the circulation of infected hosts. *Virology* 1992;191(1):431-4.
6. Shimizu YK, Feinstone SM, Kohara M, Purcell RH, Yoshikura H. Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology* 1996;23(2):205-9.
7. Ishida S, Kaito M, Kohara M, *et al.* Hepatitis C virus core particle detected by immunoelectron microscopy and optical rotation technique. *Hepatol Res* 2001;20(3):335-47.
8. Fraser CS, Doudna JA. Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. *Nat Rev Microbiol* 2007;5(1):29-38.
9. Friebe P, Boudet J, Simorre JP, Bartenschlager R. Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *J Virol* 2005;79(1):380-92.
10. Laskus T, Radkowski M, Adair DM, Wilkinson J, Scheck AC, Rakela J. Emerging evidence of hepatitis C virus neuroinvasion. *AIDS* 2005;19 Suppl 3:S140-4.
11. Seifert F, Struffert T, Hildebrandt M, *et al.* In vivo detection of hepatitis C virus (HCV) RNA in the brain in a case of encephalitis: evidence for HCV neuroinvasion. *Eur J Neurol* 2008;15(3):214-8.
12. Muratori L, Gibellini D, Lenzi M, *et al.* Quantification of hepatitis C virus-infected peripheral blood mononuclear cells by in situ reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Blood* 1996;88(7):2768-74.
13. Okuda M, Hino K, Korenaga M, Yamaguchi Y, Katoh Y, Okita K. Differences in hypervariable region 1 quasispecies of hepatitis C virus in human serum, peripheral blood mononuclear cells, and liver. *Hepatology* 1999;29(1):217-22.
14. Dubuisson J, Helle F, Cocquerel L. Early steps of the hepatitis C virus life cycle. *Cell Microbiol* 2008;10(4):821-7.

15. Helle F, Dubuisson J. Hepatitis C virus entry into host cells. *Cell Mol Life Sci* 2008;65(1):100-12.
16. Dubuisson J. Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol* 2007;13(17):2406-15.
17. Egger D, Wolk B, Gosert R, *et al.* Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 2002;76(12):5974-84.
18. Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Biology and genetic heterogeneity of hepatitis C virus. *Clin Exp Rheumatol* 1995;13 Suppl 13:S3-7.
19. Simmonds P, Bukh J, Combet C, *et al.* Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005;42(4):962-73.
20. Hoofnagle JH. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 1997;26(3 Suppl 1):15S-20S.
21. Marcellin P. Hepatitis C: the clinical spectrum of the disease. *J Hepatol* 1999;31 Suppl 1:9-16.
22. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007;132(7):2557-76.
23. Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, *et al.* Comparison of gene expression profiles between hepatitis B virus- and hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma by oligonucleotide microarray data on the basis of a supervised learning method. *Cancer Res* 2002;62(14):3939-44.
24. Wong CM, Ng IO. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2008;28(2):160-74.
25. Tan A, Yeh SH, Liu CJ, Cheung C, Chen PJ. Viral hepatocarcinogenesis: from infection to cancer. *Liver Int* 2008;28(2):175-88.
26. Levrero M. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene* 2006;25(27):3834-47.
27. Su PF, Lee TC, Lin PJ, *et al.* Differential DNA methylation associated with hepatitis B virus infection in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2007;121(6):1257-64.
28. Huang H, Fujii H, Sankila A, *et al.* Beta-catenin mutations are frequent in human hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C virus infection. *Am J Pathol* 1999;155(6):1795-801.
29. Kasprzak A, Adamek A. Role of hepatitis C virus proteins (C, NS3, NS5A) in hepatic oncogenesis. *Hepatol Res* 2008;38(1):1-26.
30. Siavoshian S, Abraham JD, Kieny MP, Schuster C. HCV core, NS3, NS5A and NS5B proteins modulate cell proliferation independently from p53 expression in hepatocarcinoma cell lines. *Arch Virol* 2004;149(2):323-36.
31. Koike K. Pathogenesis of HCV-associated HCC: Dual-pass carcinogenesis through

activation of oxidative stress and intracellular signaling. *Hepatol Res* 2007;37 Suppl 2:S115-20.

32. Farinati F, Cardin R, Bortolami M, *et al.* Hepatitis C virus: from oxygen free radicals to hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat* 2007;14(12):821-9.

33. Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut* 2005;54(7):1024-33.

34. Malhi H, Gores GJ. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology* 2008;134(6):1641-54.

35. Canbay A, Higuchi H, Bronk SF, Taniai M, Sebo TJ, Gores GJ. Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse: a link between apoptosis and fibrosis. *Gastroenterology* 2002;123(4):1323-30.

36. Fabregat I, Roncero C, Fernandez M. Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer. *Liver Int* 2007;27(2):155-62.

37. Pan J, Duan LX, Sun BS, Feitelson MA. Hepatitis B virus X protein protects against anti-Fas-mediated apoptosis in human liver cells by inducing NF-kappa B. *J Gen Virol* 2001;82(Pt 1):171-82.

38. Diao J, Khine AA, Sarangi F, *et al.* X protein of hepatitis B virus inhibits Fas-mediated apoptosis and is associated with up-regulation of the SAPK/JNK pathway. *J Biol Chem* 2001;276(11):8328-40.

39. Machida K, Tsukiyama-Kohara K, Seike E, *et al.* Inhibition of cytochrome c release in Fas-mediated signaling pathway in transgenic mice induced to express hepatitis C viral proteins. *J Biol Chem* 2001;276(15):12140-6.

40. Curtin JF, Cotter TG. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal* 2003;15(11):983-92.

41. Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, *et al.* Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 1993;364(6440):806-9.

42. Sharma K, Wang RX, Zhang LY, *et al.* Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacol Ther* 2000;88(3):333-47.

43. Akazawa Y, Gores GJ. Death receptor-mediated liver injury. *Semin Liver Dis* 2007;27(4):327-38.

44. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Non-apoptotic Fas signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14(1):53-66.

45. Kavurma MM, Khachigian LM. Signaling and transcriptional control of Fas ligand gene expression. *Cell Death Differ* 2003;10(1):36-44.

46. Algeciras-Schimmich A, Shen L, Barnhart BC, Murmann AE, Burkhardt JK, Peter ME. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol* 2002;22(1):207-20.

47. Schutze S, Tchikov V, Schneider-Brachert W. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008.

48. Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(5):405-13.
49. Luthi AU, Martin SJ. The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ* 2007;14(4):641-50.
50. Peter ME, Budd RC, Desbarats J, *et al.* The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell* 2007;129(3):447-50.
51. Marusawa H, Hijikata M, Watashi K, Chiba T, Shimotohno K. Regulation of Fas-mediated apoptosis by NF-kappaB activity in human hepatocyte derived cell lines. *Microbiol Immunol* 2001;45(6):483-9.
52. Deak JC, Cross JV, Lewis M, *et al.* Fas-induced proteolytic activation and intracellular redistribution of the stress-signaling kinase MEKK1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(10):5595-600.
53. Cheng J, Zhou T, Liu C, *et al.* Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994;263(5154):1759-62.
54. Cascino I, Fiucci G, Papoff G, Ruberti G. Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. *J Immunol* 1995;154(6):2706-13.
55. Schumann H, Morawietz H, Hakim K, *et al.* Alternative splicing of the primary Fas transcript generating soluble Fas antagonists is suppressed in the failing human ventricular myocardium. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;239(3):794-8.
56. Ferenbach DA, Haydon GH, Rae F, Malcomson RD, Harrison DJ. Alteration in mRNA levels of Fas splice variants in hepatitis C-infected liver. *J Pathol* 1997;183(3):299-304.
57. Krams SM, Fox CK, Beatty PR, *et al.* Human hepatocytes produce an isoform of FAS that inhibits apoptosis. *Transplantation* 1998;65(5):713-21.
58. Higaki K, Yano H, Kojiro M. Fas antigen expression and its relationship with apoptosis in human hepatocellular carcinoma and noncancerous tissues. *Am J Pathol* 1996;149(2):429-37.
59. Ito Y, Takeda T, Umeshita K, *et al.* Fas antigen expression in hepatocellular carcinoma tissues. *Oncol Rep* 1998;5(1):41-4.
60. Nagao M, Nakajima Y, Hisanaga M, *et al.* The alteration of Fas receptor and ligand system in hepatocellular carcinomas: how do hepatoma cells escape from the host immune surveillance in vivo? *Hepatology* 1999;30(2):413-21.
61. Hirashima N, Matsumoto Y, Ohono T, Kimura Y, Hasegawa I, Ueda R. Hepatic Fas protein expression might be a predictive factor for hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis C undergoing interferon therapy. *J Clin Gastroenterol* 2002;34(3):263-7.
62. Zaki Mel S, Auf FA, Ghawalby NA, Saddal NM. Clinical significance of serum soluble Fas, Fas ligand and fas in intrahepatic lymphocytes in chronic hepatitis C.

Immunol Invest 2008;37(2):163-70.

63. Behrmann I, Walczak H, Krammer PH. Structure of the human APO-1 gene. Eur J Immunol 1994;24(12):3057-62.

64. Ensembl Gene Report for ENSG00000026103, (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?panel_transcript=off;db=core;gene=ENSG00000026103)

65. Forch P, Valcarcel J. Molecular mechanisms of gene expression regulation by the apoptosis-promoting protein TIA-1. Apoptosis 2001;6(6):463-8.

66. Izquierdo JM, Valcarcel J. Fas-activated serine/threonine kinase (FAST K) synergizes with TIA-1/TIAR proteins to regulate Fas alternative splicing. J Biol Chem 2007;282(3):1539-43.

67. Tian Q, Taupin J, Elledge S, Robertson M, Anderson P. Fas-activated serine/threonine kinase (FAST) phosphorylates TIA-1 during Fas-mediated apoptosis. J Exp Med 1995;182(3):865-74.

68. Simarro M, Mauger D, Rhee K, *et al.* Fas-activated serine/threonine phosphoprotein (FAST) is a regulator of alternative splicing. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104(27):11370-5.

69. Kobayashi T, Okamoto K, Kobata T, Hasumuna T, Nishioka K. Apomodulation as a novel therapeutic concept for the regulation of apoptosis in rheumatoid synoviocytes. Curr Opin Rheumatol 1999;11(3):188-93.

70. Neumann E, Kullmann F, Judex M, *et al.* Identification of differentially expressed genes in rheumatoid arthritis by a combination of complementary DNA array and RNA arbitrarily primed-polymerase chain reaction. Arthritis Rheum 2002;46(1):52-63.

71. Loh SH, Francescut L, Lingor P, Bahr M, Nicotera P. Identification of new kinase clusters required for neurite outgrowth and retraction by a loss-of-function RNA interference screen. Cell Death Differ 2008;15(2):283-98.

72. Li W, Kedersha N, Chen S, Gilks N, Lee G, Anderson P. FAST is a BCL-X(L)-associated mitochondrial protein. Biochem Biophys Res Commun 2004;318(1):95-102.

73. Li W, Simarro M, Kedersha N, Anderson P. FAST is a survival protein that senses mitochondrial stress and modulates TIA-1-regulated changes in protein expression. Mol Cell Biol 2004;24(24):10718-32.

74. 張巧伶, 2006年, C型肝炎病毒非結性蛋白 NS4B 對細胞基因 FASTK 與 HRG 表現之調控。國立臺灣大學醫學院微生物學研究所碩士論文。

75. Hugle T, Fehrmann F, Bieck E, *et al.* The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. Virology 2001;284(1):70-81.

76. Lundin M, Monne M, Widell A, Von Heijne G, Persson MA. Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. J Virol 2003;77(9):5428-38.

77. Lundin M, Lindstrom H, Gronwall C, Persson MA. Dual topology of the processed

hepatitis C virus protein NS4B is influenced by the NS5A protein. *J Gen Virol* 2006;87(Pt 11):3263-72.

78. Rouille Y, Helle F, Delgrange D, *et al.* Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *J Virol* 2006;80(6):2832-41.

79. Elazar M, Liu P, Rice CM, Glenn JS. An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication. *J Virol* 2004;78(20):11393-400.

80. Yu GY, Lee KJ, Gao L, Lai MM. Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein. *J Virol* 2006;80(12):6013-23.

81. Gao L, Aizaki H, He JW, Lai MM. Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J Virol* 2004;78(7):3480-8.

82. Piccininni S, Varaklioti A, Nardelli M, Dave B, Raney KD, McCarthy JE. Modulation of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity by the non-structural (NS) 3 helicase and the NS4B membrane protein. *J Biol Chem* 2002;277(47):45670-9.

83. Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999;285(5424):110-3.

84. Lohmann V, Hoffmann S, Herian U, Penin F, Bartenschlager R. Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *J Virol* 2003;77(5):3007-19.

85. Einav S, Elazar M, Danieli T, Glenn JS. A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *J Virol* 2004;78(20):11288-95.

86. 郭逸楨, C型肝炎病毒非結構性蛋白質 4B 之核苷酸水解酶活性, 2005 年, 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。

87. Kato N, Yoshida H, Ono-Nita SK, *et al.* Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32(2):405-12.

88. Arsura M, Cavin LG. Nuclear factor-kappaB and liver carcinogenesis. *Cancer Lett* 2005;229(2):157-69.

89. Park JS, Yang JM, Min MK. Hepatitis C virus nonstructural protein NS4B transforms NIH3T3 cells in cooperation with the Ha-ras oncogene. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;267(2):581-7.

90. Einav S, Sklan EH, Moon HM, *et al.* The nucleotide binding motif of hepatitis C virus NS4B can mediate cellular transformation and tumor formation without Ha-ras co-transfection. *Hepatology* 2008;47(3):827-35.

91. Florese RH, Nagano-Fujii M, Iwanaga Y, Hidajat R, Hotta H. Inhibition of protein

synthesis by the nonstructural proteins NS4A and NS4B of hepatitis C virus. *Virus Res* 2002;90(1-2):119-31.

92. Kato J, Kato N, Yoshida H, Ono-Nita SK, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus NS4A and NS4B proteins suppress translation in vivo. *J Med Virol* 2002;66(2):187-99.

93. Kadoya H, Nagano-Fujii M, Deng L, Nakazono N, Hotta H. Nonstructural proteins 4A and 4B of hepatitis C virus transactivate the interleukin 8 promoter. *Microbiol Immunol* 2005;49(3):265-73.

94. Tasaka M, Sakamoto N, Itakura Y, *et al.* Hepatitis C virus non-structural proteins responsible for suppression of the RIG-I/Cardif-induced interferon response. *J Gen Virol* 2007;88(Pt 12):3323-33.

95. Zheng Y, Gao B, Ye L, *et al.* Hepatitis C virus non-structural protein NS4B can modulate an unfolded protein response. *J Microbiol* 2005;43(6):529-36.

96. Stone M, Jia S, Heo WD, Meyer T, Konan KV. Participation of rab5, an early endosome protein, in hepatitis C virus RNA replication machinery. *J Virol* 2007;81(9):4551-63.

97. Tong WY, Nagano-Fujii M, Hidajat R, Deng L, Takigawa Y, Hotta H. Physical interaction between hepatitis C virus NS4B protein and CREB-RP/ATF6beta. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;299(3):366-72.

98. Iio S, Hayashi N, Mita E, *et al.* Serum levels of soluble Fas antigen in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 1998;29(4):517-23.

99. Seishima M, Takemura M, Saito K, Ando K, Noma A. Increased serum soluble Fas (sFas) concentrations in HCV-positive patients with liver cirrhosis. *J Hepatol* 1997;27(2):424-5.

100. Ozaslan E, Kilicarslan A, Simsek H, Tatar G, Kirazli S. Elevated serum soluble Fas levels in the various stages of hepatitis C virus-induced liver disease. *J Int Med Res* 2003;31(5):384-91.

101. Yao HP, Xia DJ, Zhang LH, Liu KZ. [Serum levels of sFas, sICAM-1, IL-18 in patients with chronic hepatitis C and their clinical significance]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2002;31(1):2-5.

102. El-Bassiouni A, Nosseir M, Zoheiry M, El-Ahwany E, Ghali A, El-Bassiouni N. Immunohistochemical expression of CD95 (Fas), c-myc and epidermal growth factor receptor in hepatitis C virus infection, cirrhotic liver disease and hepatocellular carcinoma. *APMIS* 2006;114(6):420-7.

103. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(1):49-62.

104. Mandal M, Maggirwar SB, Sharma N, Kaufmann SH, Sun SC, Kumar R. Bcl-2 prevents CD95 (Fas/APO-1)-induced degradation of lamin B and poly(ADP-ribose) polymerase and restores the NF-kappaB signaling pathway. *J Biol Chem* 1996;271(48):30354-9.