

國立臺灣大學醫學院微生物學所微生物及免疫學組

碩士論文

Graduate Institute of Microbiology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis



探討白細胞介素 IL-32 於 EB 病毒感染 B 細胞中
之調控機制及細胞功能

The regulatory and biological functions of IL-32 gene in
EBV-infected cells

賴坤詣

Kun-Yi Lai

指導教授：蔡錦華 博士

Advisor: Ching-Hwa Tsai, Ph.D.

中華民國 103 年 7 月

July, 2014


致謝

一轉眼兩年的碩士生活就這樣過去了，過程中經歷的許多喜怒哀樂，真的很開心能與實驗室的大家以及微生物所的同學師長們一起度過，在各位的分享、學習以及指導下，覺得自己比剛進入微生物所前進步了不少，自己也漸漸能夠維持獨立思考並解決問題。這本論文由非常多人的支持以及指導才得以完成，雖然過程失敗了不少實驗，也迷途過許多次，但是很謝謝有你們大家的幫助。

謝謝蔡老師這兩年來的指導，雖然有時候，應該說常常，我會惹老師生氣，但是老師最後還是很有耐心的向我解釋，在實驗方面也能給予相當多的建議，同時也給予我十分充足的思考空間不斷的嘗試錯誤，也謝謝美如老師在每一次的 Group Meeting 給予實驗結果相當多的肯定與建議，謝謝長庚大學的素珍老師能參加我的 Committee，並給予相當多且十分有用的建議，謝謝董老師在這兩年的所有指導，包括所上 seminar 的報告、committee 進度報告、Defense 報告以及好多好多數不清的幫助，真的很謝謝老師們。謝謝實驗室的君翰學長，雖然一開始進實驗室我滿不知所措的，但是學長仍然很有耐心且很細心的指導，也點提出很有建設性的問題及幫忙標上星號，謝謝雅菁學姐在實驗上給予的眾多幫助，雖然我標底片的方式常常讓學姐非常頭大，謝謝雅琪學姐在科學實驗上所提供的建議及 Reagent，謝謝英勻學姐的植樹人，謝謝劉怡、羅敏、維筑及宇馨學姐在我一開始進實驗室的細心指導，謝謝同桌的佩頤，讓各種 Reagent 和 Tips 都會自動填滿，在實驗之餘也能夠跟你打幾場架，謝謝哞子同伴，雖然常被你排擠、被嗆被打被罵，但是你仍然像是女生，謝謝小昱真的幫助以及辛苦妳照顧哞子了，也謝謝宜芳在 PCR 技術上給的建議，謝謝學弟彥儒在實驗上給予相當多參考的網址，實驗的問題也時常幫我紀錄在手機裡，謝謝楷敏在英文方面給的建議，以及說說彥儒笑話所帶來的歡樂，謝謝實驗室重霈學長、洲維學長、美慈學姐、伶詩學姐給予的幫助，最後謝謝我的家人們，爸爸、媽媽和姐姐在背後給予的後盾和陪伴，謝謝俐旻在這兩年的陪伴，雖然這兩年比較忙碌比較少理你。謝謝大家這兩年的幫助以及指導。

摘要

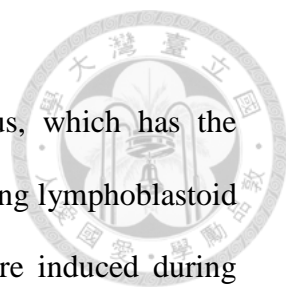
EB 病毒是一具有致癌能力的人類疱疹病毒，能夠感染人類初代 B 細胞 (primary B cell)，並使其不朽化成淋巴芽母細胞株 (lymphoblastoid cell line, LCL)。過去許多研究證實，轉形成 LCL 後細胞中會有許多細胞激素及細胞介素被誘導表現，而這些細胞激素主要被認為和 LCL 細胞增生及不朽化有關。本實驗室先前在 cDNA 微陣列結果中發現，其中一個細胞激素，白細胞介素 32 (interleukin 32, IL-32) 在 EB 病毒感染後的 B 細胞有明顯增加的現象。IL-32 在近年來被報導的功能為促發炎細胞激素的一員，能在不同的細胞內誘發各種細胞激素及細胞介素的產生，甚至具有影響細胞生長的能力。本研究目的是為了瞭解 IL-32 於 EB 病毒感染 B 細胞中之調控機制及細胞功能。實驗研究發現，隨著 EB 病毒感染 B 細胞的天數增加，IL-32 的表現量也有隨之上升的現象。另外在四位健康捐血者的 B 細胞以 EB 病毒感染後不朽化成的 LCL 中也能看到 IL-32 皆有大量表現，顯示 EB 病毒具有活化 IL-32 表現的能力且此一現象是存在所有 EB 病毒感染後的 LCL 中。以免疫螢光染色法及細胞核質分離法發現在 LCL 內的 IL-32 主要位在細胞質而非細胞核。進一步發現 EB 病毒的潛伏膜蛋白 1 (Latent membrane protein 1, LMP1) 及溶裂期極早期基因 Rta 對誘發 IL-32 的 mRNA 及蛋白質表現是重要的，另外，隨著表現越多的 LMP1 能以正相關的現象誘導越多 IL-32 表現，且在 IL-32 大量表現的 LCL 中，以 shRNA 抑制 LMP1 的表現後也可以看到 IL-32 表現有隨之下降的現象，以上結果顯示 LMP1 具有活化 IL-32 表現的能力。在 LMP1 分子調控機制上，我們發現 LMP1 能透過 C 端活化區域 CTAR1 以及 CTAR2 活化 IL-32 表現。以螢光酵素報導基因分析發現 IL-32 基因的啟動子上 -8 至 +2 的核苷酸鹼基對之 NF- κ B 結合位對於基因表現是重要的，進一步我們利用染色質免疫沉澱法，發現 NF- κ B p65 能夠結合在 IL-32 啟動子上，在 LMP1 表現的 Akata 細胞中，另外在 LCL 及 LMP1 表現的 Akata 細胞中以 shRNA 使 p65 基因受抑制後也可以看到 IL-32 表現有下降的現象，顯示 LMP1 活化 IL-32 是透過 NF κ B 訊息傳遞路徑。在細胞功能研究



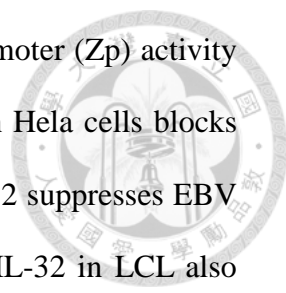
部分，我們在 LCL 中以 shRNA 抑制 IL-32 表現後，觀察到 EB 病毒溶裂期基因的表現量皆有上升的現象，顯示 LCL 內 EB 病毒進入溶裂期，接著進一步發現溶裂期極早期基因 Zta 的啟動子(Zp)的活性，在經過 Zta、TSA 藥物刺激及蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)的大量表現後會有增加的現象，重要的是這些 Zp 活化的現象會受到 IL-32 的抑制，顯示 IL-32 可能藉由抑制 Zp 的方式進而抑制 EB 病毒進入溶裂期，另外以共軛焦顯微鏡可以觀察到 IL-32 具有抑制 PKC 進入細胞核的現象，暗示 IL-32 確實能夠抑制 PKC 所造成的活化現象。除此之外，在 LCL 中以 shRNA 抑制 IL-32 表現後也觀察到 IL-6 有活化的現象，但 IL-10 及 TNF α 則沒有太大的影響，顯示 IL-32 具有影響細胞激素表現的能力。同樣在 LCL 中以 shRNA 抑制 IL-32 表現後則發現 IL-32 不會影響細胞增生。以上對生理功能的研究顯示，IL-32 可能主要功能為抑制 LCL 中的 EB 病毒進入溶裂期及 IL-6 的表現。由於 IL-6 對 LCL 的生長及不朽化是重要的，且進入溶裂期有助於 EB 病毒的擴散及形成 EB 病毒相關之惡性腫瘤，幫助 EB 病毒形成適合存在的環境，IL-32 可能扮演宿主抑制 EB 病毒入侵的角色。

關鍵字: EB 病毒、LMP1、細胞激素、白細胞介素-32

Abstract



Epstein-Barr virus (EBV) is a human oncogenic herpesvirus, which has the potential to immortalize primary B cells into unlimitedly proliferating lymphoblastoid cell lines (LCLs). Previous study shows that several cytokines are induced during immortalization and these cytokines are required for cell proliferation and B cell immortalization. Our previous cDNA microarray results show that interleukin 32 (IL-32), a newly discovered proinflammatory cytokine, is upregulated after EBV infection. Recent studies show that IL-32 is a proinflammatory cytokine which can induce other cytokines and effect cell proliferation. So, we wonder what is the role of IL-32 in EBV-infected cells. The expression of IL-32 is up-regulated during EBV infection. B cells purified from four different donors are infected by EBV for 28 days (defined as LCL), and also, IL-32 is up-regulated in these LCLs. The cellular localization of IL-32 is mainly in the cytoplasm of LCLs. Furthermore, the EBV latent membrane protein 1 (LMP1) and Rta are responsible for inducing IL-32 expression in both mRNA and protein levels. LMP1 also induces IL-32 expression in a dose-dependent manner. Knockdown of endogenous LMP1 in LCLs with shRNA approach suppresses the IL-32 expression. These data suggest that LMP1 is critical for induction of IL-32 expression. We also demonstrated that the carboxy-terminal activating region (CTAR) 1 and CTAR2 of LMP1 are required to induce IL-32. The NF- κ B site located at the -8 to +2 nucleotide locus of IL-32 promoter is crucial for activating IL-32 in the reporter assays. Moreover, using ChIP assay, we demonstrate that NF- κ B p65 binds to IL-32 promoter region in LMP1-expressing Akata cells. Knockdown of p65 with shRNA suppresses IL-32 expression. These data show that NF- κ B p65 is critical for IL-32 expression. In biological function study, knockdown of IL-32 in LCL induces EBV lytic protein expression. Moreover, the promoter activity of immediately early gene Zta is induced via the expressing of Zta, treating

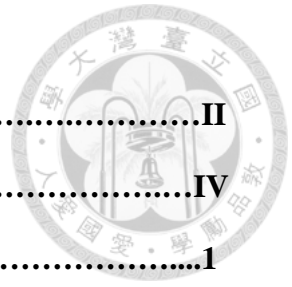


TSA, and PKC stimulation. However, these activations on Zta promoter (Zp) activity are suppressed by IL-32 expression. Also, overexpressing IL-32 in Hela cells blocks the translocation of PKC into nuclear. These data indicate that IL-32 suppresses EBV lytic cycle by suppressing Zp activity. Furthermore, depletion of IL-32 in LCL also induces the expression of IL-6 instead of IL-10 or TNF α . This result shows that IL-32 can affect particular cytokine production in LCL, which may be different from other cell types. However, depletion of IL-32 dose not have impact on cell proliferation. Overall, IL-32 inhibits the lytic cycle of EBV and partial IL-6 expression. IL-6 is critical for the proliferation and immortalization of LCL. EBV lytic cycle progression is important for EBV evation and formation of EBV-associated malignancies. These concepts indicate that IL-32 might play a role in EBV life cycle.

Key words: EBV, LMP1, cytokine, IL-32

目錄

中文摘要.....	II
英文摘要.....	IV
第一章 序論.....	1
第二章 實驗材料與方法.....	12
第三章 實驗結果.....	31
第四章 討論.....	42
第五章 圖表.....	48
第六章 參考文獻.....	85



第一章 序論



一、EB 病毒 (Epstein-Barr Virus, EBV)

1.1 EB 病毒發現史

EB 最早於 1958 年由英國外科醫生 Denis Burkitt 在非洲小孩身上發現一種惡性淋巴瘤，並且提出此淋巴瘤可能為病毒所引發的假說，因此將此惡性腫瘤命名為 Burkitt's lymphoma (Burkitt and O'Connor, 1961)。而後於 1964 年，英國的病理學家 Michael Anthony Epstein 及 Yvonne Barr 等人從腫瘤檢體中成功培養出淋巴瘤細胞株，並以電子顯微鏡發現到細胞株具有類似疱疹病毒的顆粒 (Epstein et al., 1964)。隨後 Henle 等人進一步利用血清學抗體反應等實驗方法，發現此 Burkitt's 淋巴瘤中的病毒和其他已知的疱疹並不同 (Henle and Henle, 1966)，說明 Burkitt's 淋巴瘤中含有一種新的疱疹病毒，將其命名為 EB 病毒，Epstein-Barr Virus。

1.2 EB 病毒的分類、組成結構及基因體

EB 病毒分類屬於疱疹病毒科 (herpesviridae) 中 γ 疱疹病毒亞科 (γ -herpesvirinae) 的一員，也被稱為人類第四型疱疹病毒 (human herpesvirus 4, HHV-4) (Fields et al., 2007)。

EB 病毒顆粒最外層結構是來自宿主細胞的套膜 (outer envelope)，套膜上則嵌有病毒產生的醣蛋白 (glycoproteins)，位於病毒蛋白質外殼以及套膜中間的間質為蛋白質被膜 (tegument proteins)(Dolyniuk et al., 1976)，病毒的蛋白質核外殼 (nucleocapsid) 是由 162 個次蛋白質衣 (capsomers) 所形成的二十面體結構。

蛋白質核外殼內包裹 EB 病毒全長約 172 kb 的雙股線性 DNA 基因體，基因體的兩端為約 0.5 kb 的末端重複序列 (terminal repeats, TRs)，內部含有約 3 kb 的重複序列 (internal repeats, IRs) 及可轉譯出超過 85 個基因產物的獨特序列 (unique sequence, US) (Dambaugh and Kieff, 1982; Given et al., 1979)。1980 年為了對基因研究的通用性，Dambaugh 等人以 *Bam*HI 限制酶切割 B95.8 病毒株的基因體，並完成此病毒株的限制酶圖譜，以 *Bam*HI 限制酶切割後 DNA 片段長短以英

文字母順序排列 (A 至 Z) (Dambaugh et al., 1980), 並根據基因的轉錄方向及其位在的開放譯讀架 (open reading frames, ORF) 將 EV 病毒的基因命名 (Baer et al., 1984)。



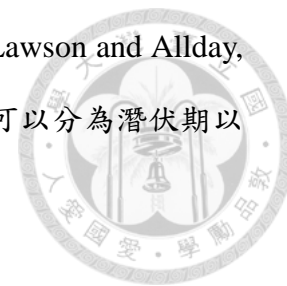
1.3 EB 病毒及其相關疾病

EB 病毒主要傳染途徑是藉由唾液傳染, 目前已知世界上將近 90 % 的成年人都曾受到 EB 病毒的感染, 雖然多數人被感染並無明顯的臨床病徵, 但會終生帶原。和 EB 病毒相關之人類疾病包含感染性單核球增多症 (infectious mononucleosis, IM)、移植後淋巴組織增生症 (post-transplant lymphoproliferative disease, PTLN)、愛滋病相關的口腔髮狀白斑症 (oral hairy leukoplakia, OHL)、柏金氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma, BL)及霍杰金氏症(Hodgkin disease, HD)(Geser et al., 1982; Greenspan and Greenspan, 1989; Henle and Henle, 1966; Hjalgrim and Engels, 2008; Mueller et al., 1989; Nalesnik, 1998; Niederman et al., 1968; Niedobitek et al., 1989; Purtilo, 1987), 除了淋巴性疾病之外, EB 病毒也被認為和鼻咽癌 (Nasopharyngeal carcinoma, NPC)有高度相關性 (Wolf et al., 1975), 另外近年研究指出在胃腺癌 (gastric adenocarcinoma)和乳癌 (breast cancer)病人檢體中曾經檢驗出 EB 病毒的基因體, 是可能引發胃癌的感染性病原之一。其和乳癌之關係則尚待進一步探查 (Fukayama et al., 1994; Labrecque et al., 1995; Shibata and Weiss, 1992)。

1.4 EB 病毒生活史

EB 病毒具有感染宿主 B 細胞的能力, 以病毒表面的醣蛋白 gp350/220 與 B 細胞表面之 CD21 受體 (CD21 receptor) 結合 (Hutt-Fletcher et al., 1983; Micklem et al., 1985; Yefenof et al., 1976), 另外再以病毒外套膜上的 gp42 扮演輔助受體 (co-receptor) 和宿主的 MHC class II 結合後進入 B 細胞 (Nemerow et al., 1987)。在人體中根據 Thorley-Lawson 等人的理論, EB 病毒藉可由唾液感染上皮細胞後

進入扁桃體，即可感染休眠期 B 細胞 (resting B cell)(Thorley-Lawson and Allday, 2008; Thorley-Lawson and Gross, 2004)。EB 病毒感染 B 細胞後可以分為潛伏期以及溶裂期兩種生活週期。



EB 病毒之潛伏期 (Latent stage)

EB 病毒在潛伏期主要表現十一種病毒基因，六種分布於宿主細胞核內的核蛋白 (EBV nuclear antigen proteins, EBNA) 、三種位在宿主細胞膜上的膜蛋白 (Latent membrane proteins, LMP1, LMP2A, LMP2B) 以及病毒所轉錄之核醣核酸 (RNA) (EBV-encoded RNAs, EBERs 及 BamHI A right-ward transcripts, BARTs)。依照不同 EB 病毒基因表現的模式，將潛伏期分為四型 (Thorley-Lawson and Gross, 2004)。

(1) 潛伏期第零型 (Latency 0) :

主要表現 EBERs 及 BARTs，亦有研究發現可能會表現 EBNA1 及 LMP2 之 mRNA，常見於健康的 EB 病毒帶原者之休眠期記憶性 B 細胞 (quiescent memory B cells)。

(2) 潛伏期第一型 (Latency I) :

主要表現 EBERs、BARTs 及 EBNA1，EB 病毒相關之柏金氏淋巴瘤屬於此型。

(2) 潛伏期第二型 (Latency II) :

主要表現 EBERs、BARTs 及 EBNA1、LMP1、LMP2，EB 病毒相關之鼻咽癌及霍杰金氏症屬於此型。

(3) 潛伏期第三型 (Latency III) :

所有潛伏期病毒基因均會表現，淋巴球增多症 (Lymphoproliferative disease)、移植後淋巴增生疾病 PTLN、感染性單核球增多症細胞及活體外感染 B 細胞使之不朽化成的淋巴母芽細胞株 (lymphoblastoid cell line, LCL) 中之 EB 病毒屬於此型。

EB 病毒之溶裂期 (Lytic stage)

在潛伏期的 EB 病毒可能因為環境的壓力，自發性的進入溶裂期。亦可能於培養基中加入化學藥劑佛波酯 (phorbol esters, TPA)、Sodium butyrate、抗免疫球蛋白抗體 (anti-immunoglobulin antibody, IgG) 或轉染 EB 病毒轉錄活化因子 Zta 或 Rta 均能使 EB 病毒再活化而進入溶裂期 (Countryman and Miller, 1985; Hardwick et al., 1988; Luka et al., 1979; zur Hausen et al., 1978)。溶裂期表現之基因依表現時序可分為三類。第一類為極早期基因 (immediately early gene)：EB 病毒進入溶裂期最先表現的基因為 BZLF1 及 BRLF1，其基因產物分別為 Zta 及 Rta 是重要的轉活化因子 (transactivator)，可與 EB 病毒基因上的 ZRE (Zta response element) 或 RRE (Rta response element) 結合，單獨或協同活化更多溶裂期基因表現 (Chevallier-Greco et al., 1986; Countryman and Miller, 1985; Fixman et al., 1992)。第二類為早期基因 (early gene)：早期基因所表現的蛋白質大多參與病毒 DNA 複製有關，包含病毒 DNA 聚合酶 BALF5、具有 DNA 螺旋酶 (helicase) 功能的 BBLF4、聚合酶輔助因子 BMRF1、穩定單股 DNA 結構之 DNA 結合蛋白 BALF2 及具有引子酶 (primase) 功能的 BSLF1 等 (Fixman et al., 1992; Goodman et al., 1978; Kallin et al., 1985; Zeng et al., 1997)。第三類為晚期基因 (late gene)：EB 病毒溶裂期晚期基因所表現的蛋白大多是構成病毒套膜及核膜，參與在 EB 病毒顆粒包裹 (package) 有關，如病毒套膜抗原 (viral capsid antigens, VCA) 及套膜醣蛋白 (membrane antigens, MA) (Hummel and Kieff, 1982; Tsurumi et al., 2005; Vroman et al., 1985)。

EB 病毒進入溶裂期後，依照上述時序表現不同溶裂期基因，從大量複製病毒 DNA 開始至結構蛋白的產生，經過運送、組裝、修飾以及包裹產生新的 EB 病毒顆粒，並以胞外分泌作用 (exocytosis) 或是細胞溶裂 (cell lysis) 的方式離開宿主細胞，進行下一個生命週期。

1.5 EB 病毒體外不朽化 B 細胞之特性



EB病毒在體外 (in vitro) 能將B細胞轉型 (transformation) 為具有不斷增生能力的淋巴芽母細胞株 LCL，此一體外轉型的模式是於1973年Miller等人以周邊血液單核球細胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 加入B95.8 EB病毒，感染其中的休眠期B細胞 (resting B-lymphocyte) 建立而成的 (Miller and Lipman, 1973)。LCL相較於未受EB病毒感染的休眠B細胞型態上具有明顯的變化，如表面有不規則的突起 (protrusion)、細胞明顯較大及體外靜置培養下會有聚集球狀 (clump topology) 的現象 (Fields et al., 2007)，除了型態上的變化，LCL也表現許多B細胞的活化標誌，如CD23、CD40、CD44及細胞附著分子ICAM-1和LFA-1等 (Calender et al., 1987; Davies et al., 2010; Halder et al., 2009; Peng and Lundgren, 1992)。潛伏在LCL中的EB病毒表現的是EB病毒潛伏期第三型基因，其會使細胞具有不朽化及不斷增生的能力，近年來的研究發現EB病毒具有抑制細胞凋亡的能力，例如LMP2A可利用PI3K的訊息傳遞路徑活化抑制凋亡 (anti-apoptosis) 的蛋白質Bcl-xL (Portis and Longnecker, 2004)，另外許多潛伏期基因，如EBNA1、EBNA2、EBNA3A、EBNA3C和LMP1也指出對EB病毒不朽化B細胞是重要的 (Cahir McFarland et al., 1999; Cohen et al., 1989; Hammerschmidt and Sugden, 1989; Lee et al., 1999; Mannick et al., 1995; Tomkinson et al., 1993; Wang et al., 1985)

1.6 EB 病毒感染後誘發之細胞激素 (cytokine)

過去研究已指出許多 EB 病毒蛋白能活化不同的細胞激素，這些細胞激素大多被認為對 B 細胞的不朽化及增生是重要的。例如 EB 病毒潛伏膜蛋白 (LMP1) 能透過活化下游 NF κ B 訊息傳遞路徑及 AP-1 轉錄因子，進一步活化 IL-1 β 、IL-6、IL-8 及 IL-10 (Eliopoulos et al., 1999; Huang et al., 2010; Nakagomi et al., 1994) 等細胞激素的表現，EBNA2 可與轉錄因子 RBP-J κ 結合 (Hsieh and Hayward, 1995)，進一步促進 IFN- α/β 的產生 (Kanda et al., 1999)，其他能與 DNA 結合的 EB 病毒蛋白如 Zta 及 Rta，過去也被報導能增加 IL-6、IL-8 和 IL-10 (Jones et al., 2007; Mahot et al., 2003) 的表現，顯示當 EB 病毒進入溶裂期能誘發更多的細胞激素，另外本實驗室過去研究指出 Zta 可以直接結合在 IL-13 基因的啟動子 AP-1 結合

位，進一步誘導 IL-13 的表現 (Tsai et al., 2009)，研究中也指出 IL-13 對 B 細胞的增生是重要的，顯示 EB 病毒利用其蛋白能調控宿主細胞之細胞激素的表現，進而影響宿主細胞的增生。



1.7 EB 病毒潛伏膜蛋白(latent membrane protein 1, LMP1)之生理功能

EB 病毒之 LMP1 蛋白，結構可分為位於細胞質內的 N 端區域、六段由疏水性胺基酸所組成的穿膜區域 (transmembrane domain) 及一長片段位於宿主細胞質內的 C 端區域 (C-terminal domain) 等三個部分。N 端區域位在宿主細胞質內，功能為幫助 LMP1 導向及穩定嵌至宿主細胞膜上，由疏水性胺基酸所組成的六個穿膜區域，結構上能幫助 LMP1 嵌在宿主細胞膜上，C 端區域主要包含三個活化區域 (C-terminal activating region)，縮寫分別為 CTAR1、CTAR2 及 CTAR3，主要功能為活化下游訊息傳遞路徑及誘發轉錄因子的活化，如 MAPK 訊息傳遞路徑或 NF κ B 訊息傳遞路徑。藉此 LMP1 能經由活化不同的訊息傳導路徑，接著調控下游基因之表現，進而調控細胞各種生理功能 (Dawson et al., 2012; Huen et al., 1995; Li and Chang, 2003; Young and Rickinson, 2004)(圖一)。

LMP1 的構造和 CD40 類似，所以活化的下游訊息傳遞路徑也類似 (Kilger et al., 1998)，CD40 為一腫瘤壞死因子受體 (tumor necrosis factor receptor, TNFR) 的其中一員，下游以腫瘤壞死因子受體相關因子 (TNFR associated factors, TRAFs) 傳遞細胞訊號，LMP1 則可直接利用 TRAF1、TRAF2、TRAF3 及 TRAF6，以及腫瘤壞死因子受體相關致死區域蛋白 (TNFR associated death domain protein, TRADD) 活化下游訊息傳遞路徑 (Devergne et al., 1998)。有別於 CD40 受體，LMP1 不需要任何受質 (ligand) 即可自發性的活化下游相似的訊息傳遞路徑 (Mosialos et al., 1995)，CTAR1 及 CTAR2 下游可活化 p38、JNK 及 ERK 三條 MAPK 訊息傳遞路徑，也能活化 AP-1 及 ATFs 等轉錄因子 (Eliopoulos and Young, 1998; Kieser et al., 1997)，另外 CTAR1 也可活化 PI3K/Akt 的訊息傳遞路徑 (Dawson et al., 2003)，CTAR3 則是可能與 Janus kinase 3 (JAK3) 結合進一步活化 signal

transducer and activator of transcription 1 (STAT-1)的訊息傳遞 (Gires et al., 1999), 推測可能與發炎相關之細胞激素產生有關。LMP1 對 B 細胞轉型是重要的, 但是已知刪除 CTAR3 對於 EB 病毒生長及 B 細胞轉型沒有影響(Dirmeier et al., 2003; Izumi et al., 1999), 所以目前對於 CTAR3 的研究及其功能仍不十分清楚。

從 LMP1 訊息傳遞路徑可以觀察到, NF κ B 訊息傳遞路徑及 AP-1 轉錄因子能被 LMP1 所活化及利用(圖一), 其中 NF κ B 訊息傳遞路徑對於細胞激素的表現是非常重要的, 目前已知 LMP1 能透過 NF κ B 訊息傳遞路徑活化 IL-1 β 、IL-6、IL-8 及 IL-10 的表現 (Eliopoulos et al., 1999; Huang et al., 2010; Mosialos, 2001; Nakagomi et al., 1994), 在 LCL 中, IL-6 能利用自分泌性 (autocrine) 的生長因子來促進 LCL 的增生 (Scala et al., 1990; Tanner and Tosato, 1992), 顯示 LMP1 所活化的細胞激素中, 含有對 LCL 細胞增生相當重要的角色。

二、白細胞介素 32 (Interleukin 32, IL-32)

2.1 IL-32 的發現

在 1992 年, Dahl 等人將自然殺手細胞 (natural killer cell, NK cell) 加入 IL-2 細胞激素刺激後, 以北方墨點法分析其 mRNA, 發現誘導出一新的 mRNA 片段, 接著利用互補 DNA (complementary DNA, cDNA)的定序 (sequencing) 解開其 cDNA 圖譜以及推測出蛋白質序列。由於是在 NK 細胞上所發現的新基因, 因此命名為 NK4 (Dahl et al., 1992), 但其生物功能未明。到了 2005 年, Kim 等人利用 NK4 的重組蛋白給予 THP-1 單核球細胞株刺激, 發現 NK4 能誘導 THP-1 細胞株產生 TNF α 及 IL-8 的表現, 推測 NK4 具有細胞激素的基本功能, 因此將 NK4 正式歸類在白細胞介素中, 命名為 IL-32 (Kim et al., 2005)。

2.2 IL-32 的蛋白質結構特性

IL-32 的基因位在人類第 16 號染色體上, 其基因含有 8 個外顯子 (exon) 片段, 分別命名為 E1~E8, 可利用不同外顯子片段做變異性剪接 (alternative

splicing)，轉錄出不同剪接變異體 (splice variant)，分別為 IL-32 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 及 ζ (圖二)，而目前對於這六種變異體之間的功能差異仍不清楚，目前只知道不同種類的細胞能表現出不同的變異體，IL-32 γ 為最早被報導的變異體，當時由於是在NK細胞上所發現，名稱暫為NK4 (Dahl et al., 1992)，IL-32 β 則在活化後的 T 細胞中能觀察到有大量被誘導的現象 (Goda et al., 2006)，IL-32 α 則在肝癌細胞 (hepatocellular carcinoma) 中觀察到有大量表現 (Kang et al., 2012)。

從最早 1992 年對 IL-32 蛋白質序列定序的結果和 2005 年 Kim 等人對其序列的預測研究發現，IL-32 因為和其他細胞激素不具有相同或重複的蛋白質序列及區域 (domain) 因此不屬於任何已知的細胞激素家族 (cytokine family) 成員，目前推測 IL-32 蛋白質序列上具有 3 個十四烷酸結合位 (myristoylation site)、1 個醣基結合位 (N-glycosylation site) 以及在 C 端上含有 Arg-Gly-Asp (RGD) 的序列，稱做 RGD 區域 (RGD domain) (Dahl et al., 1992; Kim et al., 2005)，不同的細胞可能利用 IL-32 蛋白質序列上不同的修飾位做轉譯後修飾 (post-translational modification)，所以在西方墨點法偵測 IL-32 表現時，可能因為偵測到不同的變異體及 IL-32 本身轉譯後的修飾，造成 IL-32 分子量大小的不一。

RGD 區域主要存在於和細胞貼附相關蛋白質中，目前針對 IL-32 及 RGD 區域的研究發現，IL-32 可能藉由 RGD 區域和整合素 (integrin) 結合，接著活化整合素下游的黏著激酶 (focal adhesion kinase, FAK)，黏著激酶接著活化細胞貼附相關蛋白的表現，因此 IL-32 的 RGD 區域目前推測可能與整合素下游訊息傳遞以及細胞貼附有關 (Heinhuis et al., 2012)。

有別於其他細胞激素，IL-32 在蛋白質序列上並未發現具有分泌訊號序列 (signal sequence)，也沒有任何的穿膜區域 (transmembrane domain)(Kim et al., 2005)。另外至今為止的研究也未發現有關 IL-32 的受體。直到 2007 年 Shioya 等人發現，IL-32 雖然能存在於細胞外，但是其含量是遠低於細胞內的，推測存在於細胞外的 IL-32 可能也只是細胞凋亡後細胞內的 IL-32 釋放出來的結果 (Netea

et al., 2006; Shioya et al., 2007)，因此目前的研究假說偏向 IL-32 是位在細胞內並執行其功能。



2.3 IL-32 的誘導及活化

IL-32 最早在被 IL-2 所刺激的 NK 細胞中發現能被誘導 (Dahl et al., 1992)，近年來的研究發現，在周邊血液單核球細胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 中以 LPS (lipopolysaccharide) 刺激並活化 TLR4 (toll-like receptor 4) 下游訊息傳遞路徑，發現 IL-32 可被誘導出來 (Netea et al., 2006)。在血管的內皮細胞中以 IL-1 β 、IFN γ 或 LPS 刺激後能活化下游 NF κ B 及 MAPK 的訊息傳遞路徑，進而活化 IL-32 的表現 (Nold-Petry et al., 2009)。在胰腺癌細胞株中以 IL-1 β 、IFN γ 或 TNF α 刺激後能活化 PI3K-Akt 的訊息傳遞路徑，進一步活化轉錄因子 NF κ B 及 AP-1 使 IL-32 的表現量上升 (Nishida et al., 2009)。在小腸表皮細胞株中加入 NF κ B 訊息傳遞路徑的抑制物後，發現 IL-32 的表現量有下降的現象，顯示 IL-32 可能透過 NF κ B 訊息傳遞路徑被誘導出來。

許多病毒也被報導能誘導 IL-32 的表現，流感病毒 (influenza virus) 及人類乳突狀病毒 (human papillomavirus, HPV) 分別感染人類肺臟上皮細胞株 A549 和子宮頸癌細胞株後能利用環氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 誘導 IL-32 的表現 (Lee et al., 2011; Li et al., 2008)。流感病毒也能利用 I κ B 酶 (I κ B kinase, IKK) 活化 NF κ B 訊息傳遞路徑以及轉錄因子 CREB (cAMP response element binding protein)，進一步誘導 IL-32 產生，還能利用表觀遺傳 (epigenetic) DNA 去甲基化 (demethylation) 的方式，使 IL-32 啟動子上去甲基化而被活化 (Li et al., 2010)。B 型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 能利用其病毒蛋白 X (HBx) 活化 NF κ B 訊息傳遞路徑以誘導 IL-32 的表現 (Pan et al., 2011)，另外人類免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 感染後的 PBMCs、HEK293T 及病人檢體中也可以發現 IL-32 有大量表現的情況 (Nold et al., 2008a; Rasool et al., 2008)。

2.4 IL-32 的生理功能

目前認為 IL-32 的生理功能為一促發炎激素 (pro-inflammatory cytokine)，能夠誘導下游更多細胞激素的產生，以利發炎反應的進行。2005 年 Kim 等人以 IL-32 α/β 重組蛋白成功誘導 THP-1 單核球細胞株中 TNF α 及 IL-1 β 的表現，且發現 IL-32 α/β 具有誘導 NF κ B 及 p38 MAPK 訊號傳遞路徑的能力 (Kim et al., 2005)。在人類免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 感染的周邊血液單核球細胞中，以 siRNA 抑制內生性 IL-32 的表現可以觀察到 IL-1 β 、IL-6、IFN γ 及 TNF α 的表現量受到抑制 (Nold et al., 2008b)。以 siRNA 抑制人類內皮細胞 HUVEC 中的內生性 IL-32，也能觀察到 IL-1 β 、IL-6 及 IL-8 的表現有降低的現象 (Nold-Petry et al., 2009)，類似的研究也發現，同樣以 siRNA 抑制 HUVEC 中內生性 IL-32 後，接著以 LPS 或 TPA 刺激，觀察到 TNF α 、IL-6 及 IL-8 的表現受到抑制 (Hong et al., 2010)。以上研究結果皆顯示 IL-32 可能對誘導細胞激素產生扮演重要的角色，所以在 2010 年 Kobayashi 等人提出 IL-32 在血管內皮細胞中發炎反應的假說，推測 TNF α 或 IL-1 β 能透過 NF κ B 訊息傳遞路徑活化 IL-32 的表現，IL-32 表現後能活化更多的細胞激素，如 TNF α 或 IL-1 β ，進而吸引白血球聚集至發炎位置而促進發炎反應的進行，並且整個發炎反應路徑以正向回饋 (positive feedback) 的方式持續活化 (Kobayashi et al., 2010)(圖三)。

除了誘導細胞激素產生的功能外，也有研究指出 IL-32 可能和細胞增生有關，在 2009 年 Nishida 利用胰腺癌細胞株，以 shRNA 抑制內生性 IL-32 的表現後觀察到 IL-32 具有影響胰腺癌細胞株生長的能力，進一步也探察到 IL-32 能活化 Bcl-2 及 Bcl-xL 等存活蛋白 (survival protein) 的表現，顯示 IL-32 可能透過活化存活蛋白的表現，進而影響細胞生長 (Nishida et al., 2009)。

另外也有研究指出，IL-32 具有抗腫瘤 (anti-tumor) 及抗病毒 (anti-virus) 的能力。以皮下注射方式使 B16 黑色素瘤細胞株 (B16 melanoma cells) 生長在 IL-32 表現的基因轉殖鼠 (transgenic mice) 身上，觀察到 IL-32 具有抑制腫瘤細胞中 NF κ B 及 STAT3 訊息傳遞路徑的能力進而抑制腫瘤本身生長的能力 (Oh et

al., 2011; Yun et al., 2013)。另外在 HIV 感染的周邊血液單核球細胞中，以 siRNA 抑制內生性 IL-32 的表現後發現，IL-32 具有抑制 HIV 核心蛋白 (core protein) p24 的能力，以達到抗病毒的功能 (Nold et al., 2008b; Rasool et al., 2008)。在流感病毒感染的人類肺臟上皮細胞株 A549 中可以發現 IL-32 除了能被 iNOS 誘導表現，也能經由負回饋的方式抑制 iNOS 的表現 (Li et al., 2009)。

最近期關於 IL-32 的研究發現，IL-32 不同變異體之間有互相結合的作用，IL-32 之間的結合對活化下游基因表現也是重要的，目前知道 IL-32 δ 能透過與 IL-32 β 之間的結合，抑制 IL-32 β 所活化的 IL-10 (Kang et al., 2013b)。另外對細胞生理功能非常重要的蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)，也被報導能與 IL-32 β 結合並活化 PKC 下游的轉錄因子 C/EBP α ，進而活化 IL-10 的表現 (Kang et al., 2013b)。

2.5 研究目的

過去研究指出 IL-32 具有抑制病毒複製及病毒顆粒產生的能力，也有研究發現 IL-32 能夠抑制腫瘤的生長，但是也有文獻指出相反的結果，認為 IL-32 具有增加腫瘤生長、幫助宿主躲避免疫細胞攻擊及造成腫瘤轉移的功能，故目前 IL-32 對腫瘤影響的研究仍不清楚。本實驗室先前利用 cDNA 微陣列分析在 EB 病毒轉形 B 細胞變成 LCL 的過程中發現，隨著 EB 病毒感染的時間增加 IL-32 的表現也有上升的趨勢，因此想進一步了解 EB 病毒利用宿主細胞的 IL-32 是否和 B 細胞之不朽化及轉型有關，及 IL-32 是否影響 EB 病毒的生長週期感到好奇。此研究主要探討：(1) IL-32 在 EB 病毒轉形後的 LCL 是如何被調控，以及 (2) 誘導之 IL-32 對 EB 病毒生長週期、宿主細胞中其他細胞激素及細胞生長的影響。

第二章 實驗材料與方法



一、實驗材料

1.1 藥品

2-mercaptoethanol, 2-ME (Sigma)

2-propanol (J.T. Baker)

Acetic acid (J.T. Baker)

Agarose (Invitrogen)

Ammonium acetate, NH₄OAc (Merck)

Ammonium persulfate, APS (Sigma)

Ampicillin (Sigma)

Bisacrylamide (Usb)

Bovine serum albumin, BSA (Roche)

Bromophenol blue (Sigma)

Chloroform (Merck)

Diethyl pyrocarbonate, DEPC (Sigma)

Dimethyl sulfoxide, DMSO (Merck)

Dipotassium phosphate, K₂HPO₄ (Merck)

Disodium phosphate, Na₂HPO₄ (Merck)

Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM (Hyclone)

Ethanol (Burnett)

Ethidium bromide, EtBr (Sigma)

Ethylene diamine tetra-acetic acid, EDTA (J.T. Baker)

Fast green (Sigma)

Fat-free skim milk (安佳)

Fetal bovine serum, FBS (Hyclone)

Glycerol (J.T. Baker)

Glycine (Bio Basic)

Glycogen (Roche)

Hydrochloric acid, HCl (J.T. Baker)

Kanamycin (Sigma)

L-glutamine (Sigma)

Methanol (J.T. Baker)

Opti-MEM® (Invitrogen)

Penicillin:streptomycin solution (Gemini)

Peptone (Usb)

Phenol (和光)

Potassium chloride, KCl (J.T. Baker)

Potassium dihydrogen phosphate, KH_2PO_4 (Merck)

Proteinase K (Roche)

Puromycin (Sigma)

RNase A (Sigma)

Roswell Park Memorial Institute medium, RPMI (Hyclone)

Sodium acetate, NaOAc (Merck)

Sodium azide (Sigma)

Sodium chloride, NaCl (J.T. Baker)

Sodium deoxycholate (Sigma)

Sodium dodecyl sulfate, SDS (Merck)

Sodium fluoride, NaF (Merck)

Sodium hydroxide, NaOH (J.T. Baker)

Sodium metabisulfite, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (Sigma-Aldrich)

Sodium orthovanadate, Na_3VO_4 (Sigma)

N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, TEMED (Sigma)



Tris (Bio Basic)
Triton X-100 (Merck)
TRIzol® reagen (Invitrogen)
Trypan blue (Sigma)
Trypsin (Biological Industries)
Tween20 (J.T. Baker)
Yeast extract (BD)



1.2 套組試劑

AlamarBlue® (AbD Serotec)
Bio-Rad protein assay (Bio-Rad)
Bright-Glo® Luciferase Substrate (Promega)
Calf intestinal alkaline phosphatase, CIP (New England Biolabs)
Deoxyribonucleotide triphosphate, dNTP (Protech)
DETACHaBEAD® CD19 (Invitrogen)
Dithiothreitol, DTT (Promega)
Dual-Glo® Luciferase Substrate (Promega)
Dynabeads® CD19 Pan B (Invitrogen)
Ficoll-Paque (GE Healthcare)
Gel/PCR DNA fragments extraction kit (Geneaid)
High-speed plasmid mini kit (Geneaid)
Immobilon-P Transfer Membranes, PVDF (Millipore)
KAPA HiFi DNA polymerase (Kapa Biosystems)
Klenow fragment (New England Biolabs)
Lipofectamine 2000 (Invitrogen)
M-MLV Reverse transcriptase (Promega)

Non-liposome transfection reagent II, NTR II (T-pro)
Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes)
QIAGEN Plasmid maxi kit (Qiagen)
ProZyme DNA polymerase (Protech)
Random primers (Bionovas)
Rnasin RNase inhibitor (Promega)
T4 DNA ligase (New England Biolabs)
Western Lightning enhanced chemiluminescence, ECL (Perkin Elmer)



1.3 質體

pSG5

由 SV40 啟動子表現，並具有 ampicillin 抗藥基因。

pSG5-LMP1

由 SV40 啟動子表現 LMP1，並具有 ampicillin 抗藥基因。(由英國伯明罕大學 Dr. Alan B. Rickinson 惠贈)

pSG5-Zta

由 SV40 啟動子表現 Zta，並具有 ampicillin 抗藥基因。(由本實驗室 吳韶文學姐惠贈)

pSG5-Rta

由 SV40 啟動子表現 Rta，並具有 ampicillin 抗藥基因。(由本實驗室 吳韶文學姐惠贈)

pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP

pCDH 為慢病毒表現載體，目標基因由 CMV 啟動子表現，另外帶有以 EF1 啟動子表現之 copGFP 和 ampicillin 抗藥基因。

pCDH-IL32 β

pCDH 為慢病毒表現載體，以 CMV 啟動子表現 IL-32 β ，另外帶有以 EF1 啟動子

表現之 copGFP 和 ampicillin 抗藥基因。(由本實驗室 劉怡學姐惠贈)

pSIN-MCS

由慢病毒表現基因之載體，帶有 SFFV 啟動子(spleen focus forming virus promoter)，並具有 ampicillin 抗藥基因。(由陽明大學 王學偉老師惠贈)

pSIN-LMP1

建構於 pSIN 載體上，可表現 LMP1 之慢病毒質體。(由本實驗室 蔡淑君學姊惠贈)

pMD2.G

帶有 CMV 啟動子以表現 VSV 套膜醣蛋白，並具有 ampicillin 抗藥基因，為包裹慢病毒必須之質體。(由陽明大學 王學偉老師惠贈)

p8.91

帶有 CMV 啟動子以表現 HIV-1 gag、pol、tat、rev，並具有 ampicillin 抗藥基因，為包裹慢病毒必須之質體。(由陽明大學 王學偉老師惠贈)

pMD.G

帶有 CMV 啟動子以表現 VSV 套膜醣蛋白，為包裹慢病毒必須之質體。質體購於中研院 RNAi core 核心設施。

pCMV”R8.91

帶有 CMV 啟動子以表現 HIV-1 Gag、Pol、Tat、Rev，為包裹慢病毒必須之質體。質體購於中研院 RNAi core 核心設施。

pCMV.Tag2B

帶有 CMV 啟動子及 flag 標籤，並具有 neomycin 及 kanamycin 抗藥基因。

pCMV.Tag2B-p65

帶有 CMV 啟動子及表現帶有 flag 標籤的 p65 (RelA) 基因，並具有 neomycin 及 kanamycin 抗藥基因。

pCMV.Tag2B-IL32

帶有 CMV 啟動子及表現帶有 flag 標籤的 IL-32 β 基因，並具有 neomycin 及

kanamycin 抗藥基因。

pEGFP-C1

利用 CMV 啟動子表現綠色螢光蛋白(green fluorescent protein)之質體，具有 neomycin/kanamycin 抗藥基因。

pEGFP-N1

利用 CMV 啟動子表現綠色螢光蛋白(green fluorescent protein)之質體，具有 neomycin/kanamycin 抗藥基因。(由中興大學 陳鴻震老師惠贈)

pEGFP-WT-PKC δ

利用 CMV 啟動子表現綠色螢光蛋白(green fluorescent protein)之質體及 WT-PKC δ ，具有 neomycin/kanamycin 抗藥基因。(由本實驗室 李恆煥學長惠贈)

pEGFP-CF-PKC δ

利用 CMV 啟動子表現綠色螢光蛋白(green fluorescent protein)之質體及 CF-PKC δ ，具有 neomycin/kanamycin 抗藥基因。(由本實驗室 李恆煥學長惠贈)

pEGFP-DN-PKC δ

利用 CMV 啟動子表現綠色螢光蛋白(green fluorescent protein)之質體及 DN-PKC δ ，具有 neomycin/kanamycin 抗藥基因。(由本實驗室 李恆煥學長惠贈)

pGL2-Basic

帶有表現 Luciferase 報導基因載體，帶有 ampicillin 抗藥基因。

pGL2-WT Zp

以 BZLF1 基因啟動子接入 pGL2-basic 載體中，並表現 Luciferase 報導基因。帶有 ampicillin 抗藥基因。(由本實驗室 李恆煥學長惠贈)

pGL2-Rp

以 BRLF1 基因啟動子接入 pGL2-basic 載體中，並表現 Luciferase 報導基因。帶有 ampicillin 抗藥基因。(由本實驗室 許翠瑛老師惠贈)

pLKO.1-shLuciferase

表現抑制 luciferase mRNA 之 shRNA 慢病毒質體，目標序列為



5'-CCTAAGGTTAAGTCGCCCT。購於中研院 RNAi core。

pLKO-shLMP1

為表現專一抑制 LMP1 mRNA 之 shRNA 質體，目標序列為

5'-GCTCTTATTGCTCTCTAT-3'。(由本實驗室 蔡淑君學姐構築)



pLKO-shIL-32

為表現專一抑制 human IL-32 mRNA 之 shRNA 質體。

clone3 的目標序列為 5'-GCAGGCCCTCTGGAAACAGTT-3'

clone5 的目標序列為 5'-GCAGGCCCTCTGGAAACAGTT-3'

(自中研院 RNAi core 購買)

pLKO-shRelA

為表現專一抑制 human RelA (p65) mRNA 之 shRNA 質體。

clone1 的目標序列為 5'-CCCTGAGCACCATCAACTATG-3'

clone4 的目標序列為 5'-CACCATCAACTATGATGAGTT-3'

1.4 引子

(表一)

1.5 抗體

(表二)

二、實驗方法

2.1 質體構築 (Plasmid construct)

設計含有適當限制酶切位之引子 (見表一) 以製備帶有特殊限制酶切位之目標基因片段。以 300 ng 之質體為模板分別加入 0.2 μ M 引子、0.2 mM dNTPs、1X HF buffer、及 2 unit phusion DNA polymerase，並以 ddH₂O 將體積補至 100 μ l 並以 25 μ l 分為四管進行聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)。反應完

利用 Gel/PCR DNA fragments extraction kit 進行 PCR 產物純化，並以適當限制酶在 37 °C 切割至隔天。再利用 Agarose 膠體電泳作用分離目標基因，從膠體上切下目標基因片段之 DNA 後，再以 Gel/PCR DNA fragments extraction kit 純化出目標基因片段，以 50 µl ddH₂O 回溶 DNA 並儲存於-20°C。欲切割之載體以適當限制酶在 37 °C 切割至隔天，隔天加入 2 µl CIP 於 37°C 作用 1 小時後，同樣以 Agarose 膠體電泳作用分離切割片段，並利用 Gel/PCR DNA fragments extraction kit 進行純化，以 50 µl ddH₂O 回溶 DNA 並儲存於-20°C。

目標載體與目標基因片段以質量 1:6 之比例，取總量 300 ng 混合均勻，加入 1 unit T4 DNA ligase 和 1X T4 ligation buffer 並補 ddH₂O 至體積為 50 µl，置於 16°C 水浴槽進行 DNA 接合作用 (ligation) 24 小時完成質體構築。接合後之產物須利用轉型作用作進一步篩選。

2.2 細菌轉型 (Transformation)

將 100 ng 質體 DNA 加入含有 100 µl 勝任細胞 (competent cell) 之 1.5 ml 微量離心管，充分混合後置於冰上 15 分鐘，再置於 42 °C 水浴槽 60 秒，立即再置於冰上 15 分鐘，加入 1 ml LB 培養液並充分混合後置於 37 °C 培養箱一小時，離心 13200 rpm 一分鐘，去除上清液留下 100 µl 菌液，以微量吸管混合重新懸浮菌液並加入在含有適量抗生素之 LB 固態培養基中，以塗菌用之玻璃珠將菌液均勻塗抹在培養基上，置於 37 °C 培養箱 16 小時。

2.3 抽取大量質體 DNA (Maxi-preparation of plasmid)

採用 Geneaid Plasmid Maxi Kit

選取目標質體之菌株，接種於含有適量濃度抗生素之 3 ml 培養液內，於 37 °C 培養箱以 170 rpm 震盪 8 小時。取 1 ml 培養完之菌液並種於含有適量濃度抗生素之 200 ml LB 培養液，在 37 °C 震盪 16 小時。分裝菌液至 250 ml Beckman 離心瓶中，將菌液以 14000 rpm (Beckman JA-14)，4 °C 離心 5 分鐘，去除上清液後加入 10 ml P1 溶液並以滴管打散細菌沉澱，接著加入 10 ml P2 溶液上下翻

轉 20 次 (勿 vortex)，靜置室溫 5 分鐘後，再加入 10 ml P3 溶液上下翻轉 20 次，並置於冰上 20 分鐘。離心 20000 rpm (Beckman JA14)、4 °C 離心 15 分鐘，將上清液倒入新的 50 ml Beckman 離心管重複以 20000 rpm (Beckman JA25)，4 °C 離心 30 分鐘，同時以 10 ml QBT 溶液洗滌過濾管柱。離心後將上清液倒入管柱中，過濾完後以 30 ml QC 溶液清洗管柱兩次，接著以 15 ml QF 溶液回溶質體至含有 10.5 ml 2-propanol 新的 50 ml Beckman 離心管，上下翻轉混合後以轉速 20000 rpm (Beckman JA25.5)、4 °C 離心 30 分鐘，離心後將離心管倒扣再旋開離心蓋倒出 2-propanol 上清液，倒扣在室溫風乾 15 分鐘，並以 1 ml 滅菌 ddH₂O 回溶 DNA pellet，並分裝各 500 µl 至 2 個 1.5 ml 微量離心管，每管加入 1 ml 100% Ethanol 與 20 µl 3M Sodium acetate (NaOAc) 於 -80°C 作用 24 小時析出 DNA，以轉速 13200 rpm 4°C 離心 30 分鐘，去除上清液後各加入 1 ml 75% Ethanol 使 DNA pellet 重新懸浮並使之無菌，以 13200 rpm，4 °C 離心 15 分鐘，去除上清液後風乾，以 150 µl ddH₂O 回溶並儲存於 -20°C。

2.4 分離 CD19⁺ B 細胞及建立 LCL 細胞株 (CD19⁺ B cell purification and LCL establishment)

2.4.1 分離周邊血液單核球細胞 (PBMCs)

由捐血中心取得之健康捐血者的白血球濃厚液 (White blood cells concentrate) 取 45 ml 倒入 50 ml 離心管中，以 1000 rpm (Beckman GS6R)，25 °C 離心 5 分鐘，去除上層油脂及血漿後移至含有 100 ml FBS-free RPMI 的 75T 培養瓶，同時以 30 ml FBS-free RPMI 清洗殘留於離心管內的白血球濃厚液回收至同一培養瓶，混合後各取 30 ml 至含有 15 ml Ficoll-paque 之 50 ml 離心管 (離心管傾斜，緩慢加入以避免破壞 Ficoll-paque 與白血球濃厚液分層之界線)。以 2400 rpm (Beckman GS6R)，20 °C 離心 30 分鐘。去除上層血漿，將中間白色單核球細胞層移至新的 50 ml 離心管，加入 FBS-free RPMI 補滿至 50 ml 進行清洗，以 2000 rpm (Beckman GS6R)，20 °C 離心 15 分鐘，去除上清液，重複此一步驟兩次，分別逐步降低離

心轉速、溫度及時間為 1800 rpm、20°C、12 分鐘和 1500 rpm、4°C、5 分鐘，完成三次離心後合成一管。以事先預冷之 10 ml purify buffer (2 mM EDTA, 0.1% BSA in PBS) 回溶細胞，計數細胞並將濃度調整為 5×10^7 /ml，即完成周邊血液單核球細胞分離，接著進行 B 細胞純化。

取適量 CD19⁺ Dynabeads (Invitrogen, Carlsbad, CA) 至 15 ml 離心管，加入等體積 purify buffer 清洗磁珠並置換成原來磁珠濃度後，接著取 25 μ l 磁珠與 5×10^7 PBMCs 於 4°C 轉盤 (DISHUNG) 轉速 12 rpm 作用 20 分鐘後，以 0.5 ml purify buffer 清洗磁珠四次，取適量含 10 % FBS 之 RPMI 培養液回溶磁珠。此時 CD19⁺ B 細胞會吸附於磁珠上，以每 1×10^7 B 細胞，加入 10 μ l DETACHaBEAD 的比例，將磁珠在室溫下以轉盤 (DISHUNG) 轉速 12 rpm 作用 60 分鐘釋放 B 細胞，以適量含 10 % FBS 之 RPMI 培養液回溶磁珠四次，收取上清液至新的 15 ml 離心管，即完成 CD19⁺ B 細胞之純化。

2.4.2 EB 病毒感染與 B 細胞轉型成 LCL 細胞株

將純化後之 B 細胞以含 10 % FBS 之 RPMI 培養液將濃度調整為 1×10^6 /ml 並加入 1 ml 於 12 孔盤中，加入 40 μ l B95.8 EB 病毒液進行轉型作用，感染後 28 天得到細胞株即可為 LCL 細胞株。

2.5 細胞培養 (Cell culture)

2.5.1 細胞種類及細胞培養液

- (1) LCL 細胞株由 EB 病毒感染 CD19⁺ B 細胞而來
- (2) Akata 細胞為柏金氏淋巴瘤建立之細胞株
- (3) Human Embryonic Kidney (HEK) 293T 細胞為 293 細胞表現 SV40 之 large T 抗原轉形而來的細胞株，被廣泛用於轉染質體的接受細胞

RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 培養液 (Hyclone, South Logan, UT)

和 DMEM (Dulbecco modified Eagle medium ; Hyclone, South Logan, UT) 培養液中，皆內含 10% 胎牛血清 (fetal calf serum , FCS ; Hyclone, South Logan, UT)、1 mM L-Glutamine (Merck, Germany)、100 U/mL penicillin (Gemini Bio-Products, West Sacramento, CA) 和 100 μ g/mL streptomycin (Gemini Bio-Products, West Sacramento, CA)。

2.5.2 培養方法

所有細胞株皆培養於 37 °C 和含 5 % CO₂ 之培養箱內，每次繼代前須將細胞培養液置於 37 °C 水浴槽預先溫熱。

1. 懸浮細胞

淋巴細胞為懸浮性細胞，當細胞生長達到八至九分滿時，吸取細胞培養液至 15 ml 離心管，以 750 rpm，室溫離心 5 分鐘，去除上清液，再以適量培養液稀釋後繼續培養。

2. 單層附著細胞

當細胞生長達到八至九分滿時，先吸取並丟棄原有的細胞培養液，先以 1x PBS-EDTA 沖洗細胞一次，再加入適量的 1% 胰蛋白酶 (trypsin) 進行胰蛋白水解作用，靜置 37 °C 培養箱 5 分鐘後，再以細胞培養液中和胰蛋白酶並回溶細胞置於 15 ml 離心管，以 750 rpm，室溫離心 5 分鐘後去除上清液，再以適量培養液稀釋後繼續培養。

2.6 細胞轉染 (Transient transfection)

進行細胞轉染前，將培養中的細胞以胰蛋白酶單離化後，計數細胞將 1 ml 含適量數量之細胞分配至 6 孔盤或 12 孔盤，混合均勻後置於 37 °C 培養箱 24 小時。

Lipofectamine™ 2000

利用細胞計數器計數細胞並稀釋至 1×10^5 /ml 細胞，取 1 ml 至 12 孔盤中，隔天轉染前一小時將原培養液置換為 1 ml FBS-free DMEM。欲轉染之質體與 Lipofectamine™ 2000 以 $1 \mu\text{g} : 1.5 \mu\text{l}$ 之比例分別與適量 Opti-MEM 培養液混勻後於室溫靜置 5 分鐘，再將二者混合，於室溫靜置 20 分鐘。之後吸除原有培養液，均勻滴入質體 Opti-MEM 混合液，於 37°C 培養箱作用 4-6 小時，再將質體混合液置換為新的含 10 % FBS 之 DMEM 繼續置於 37°C 培養箱 72 小時。

NTR II

利用細胞計數器計數細胞後並稀釋至 1×10^5 /ml 細胞，取 1 ml 至 12 孔盤中隔天進行轉染，將目標質體與適量 Opti-MEM 混合，以質體與 NTR II 為 $1 \mu\text{g} : 2 \mu\text{l}$ 之比例混勻後於室溫靜置 20 分鐘。均勻滴入質體 Opti-MEM 混合液後置於 37°C 培養箱轉染 72 小時。

2.7 慢病毒製備 (Lenti-virus preparation)

放置 8 至 9 成滿的 HEK 293T 細胞於 10 公分培養皿或 75T 培養瓶中，隔天以 lipofectamine-2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 進行轉染，轉染前一小時將培養液置換成 9 ml FCS-free DMEM 培養液。包裹帶有表現質體的慢病毒，取 $6 \mu\text{g}$ p8.91 質體、 $3 \mu\text{g}$ pMD2.G 質體和 $9 \mu\text{g}$ 構築於 pSIN 或 pCDH 載體之質體至 4 ml OPTI-MEM 中進行轉染。包裹的慢病毒為 mRNA 降解的 shRNA 質體，將 $8.1 \mu\text{g}$ pCMVdeltaR8.91 質體、 $0.9 \mu\text{g}$ pMD.G 質體和 $9 \mu\text{g}$ 構築於 pLKO.1-puro 載體之 shRNA 質體轉染至細胞中。轉染步驟同實驗方法 2.7。轉染 16 小時後，更換含 1% BSA 之 complete DMEM 培養液 11 ml，於轉染後 48 及 72 小時收取培養液並以 $0.22 \mu\text{m}$ 過濾膜過濾，分裝並儲存於 -80°C 。

2.8 慢病毒感染 (Lenti-virus infection)

慢病毒液主要用轉導目標質體於懸浮細胞中。利用細胞計數器將適量細胞置於 6 孔或 12 孔盤中，依實驗設定均勻加入所需之病毒感染劑量 (Multiplicity of

infection, MOI)，加入慢病毒液後以 2250 rpm (BECKMAN GS6R)，室溫離心 30 分鐘，再置於 37 °C 培養箱中培養。



2.9 西方墨點法 (Western Blot)

2.9.1 蛋白質樣本萃取

吸取細胞至 1.5 ml 微量離心管，並以 13200 rpm 轉速，4 °C 離心 1 分鐘，先去除上清液後加入 1 ml 1x PBS 清洗並沖散細胞，再以 13200 rpm 轉速，4 °C 離心 1 分鐘，去除上清液後以適量 RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl, 1% IGEPAL or NP40, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate, 1X protease inhibitor cocktail (Roche, Indianapolis, IN), 50 mM NaF, 8 mM Na₃VO₄)回溶細胞。

RIPA buffer 回溶後所得之細胞蛋白質萃取樣本，先利用超音波以間隔 2 秒、震盪 2 秒的方式進行震盪 (UP400A Sonicor)，重複 10 個循環後，再將蛋白質萃取樣本於以 13200 rpm 轉速，4°C 離心 30 分鐘，收取上清液至新的 1.5 ml 離心管，並儲存蛋白質樣本於-80°C。

2.9.1 蛋白樣本配製

取 10 µg 蛋白質至 0.6 µl 微量離心管，加入 4X Sample loading dye (內含 2-Me, 17 µl/ml)，以 RIPA buffer (4 °C)調整體積至 12 µl 後，於 95 °C 加熱 10 分鐘始蛋白質變性得到蛋白質樣本。

2.9.2 西方墨點法

先將製作膠體之玻璃模組架起，配置分離層為 10 % 的十二烷基磺酸鈉-聚丙烯醯胺膠體電泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)，將膠體固定於電泳槽中，並加入 running buffer (3 mg/ml Tris, 18.8 mg/ml glycine, 1 mg/ml SDS, pH=8.3)，再將上一步驟預先配置的蛋白質樣本注入，

先以 80 伏特電壓進行電泳，直到蛋白質樣本聚集於上下層膠體界面時，改為 150 伏特繼續進行電泳。待樣本之蛋白質分離至適當距離後，先以甲醇(Methanol)活化 PVDF 轉漬膜，再將膠體從電泳槽拆下，小心將活化後之 PVDF 轉漬膜覆蓋上，再與濾紙、海棉墊片以夾層之方式置入卡夾中，將卡夾放置於電泳轉漬器中，加入適量 transfer buffer (3 mg/ml Tris, 18.8 mg/ml glycine, 20% methanol, pH=8.3)，以 300 mA 進行電流進行轉漬作用 (electrotransfer) 90 分鐘。轉漬完成後以 Fast Green 將完成的轉漬膜進行 30 秒染色，以 ddH₂O 潤洗後將轉漬膜置於 5% blocking buffer (5% skin-milk in 0.01 M Tris pH=7.4, 9 mg/ml NaCl, 0.2% Tween-20) 中，在室溫中以 50 rpm 轉速之震盪器作用 1 小時。加入專一性抗體 (配置於 0.2% sodium azide in 0.5% blocking buffer) 放置於 4°C 作用隔夜。隔天以 washing buffer (0.01 M Tris pH=7.4, 9 mg/ml NaCl, 0.2% Tween-20) 清洗 3 次，每次 5 分鐘，再加入配置於 5 % blocking buffer 中帶有 horseradish peroxidase (HRP) 的次級抗體於室溫作用 1 小時後，以 washing buffer 清洗 4 次，每次 10 分鐘，接著利用 Western Lighting™ chemiluminescence reagent plus 進行冷光反應，以 X 光片 (Fuji, Shizuoka, Japan)偵測蛋白質表現量。西方墨點法所使用之抗體資訊列於實驗材料 1.4。

2.10 螢光酵素報導分析 (Luciferase reporter assay)

貼附性細胞 HEK293T 利用細胞計數器計數後，取 1 ml 含 1×10^5 顆細胞至 12 孔盤中，並置於 37 °C 培養箱培養。隔天將需要轉導之質體與 NTR II 以 1 µg : 2 µl 的比例加入在 60 µl 的 Opti-MEM 溶液中，在室溫中靜置 15 分鐘後進行轉染，再將轉染中細胞置於 37 °C 培養箱培養 72 小時。每組樣本進行二重複實驗。

72 小時後，將細胞收取至 1.5 ml 離心管，以 4°C 的 1x PBS 清洗後，再以 100 µl FBS-free RPMI 重新懸浮並打散細胞，取 50 µl 至白色不透明之 96 孔盤，各加入 50 µl Bright-Glo® Luciferase Substrate 混合均勻後，以微盤式閃爍冷光分析儀 (PerkinElmer TopCount)測定冷光讀值，並以酵素免疫微量計數器 (Molecular

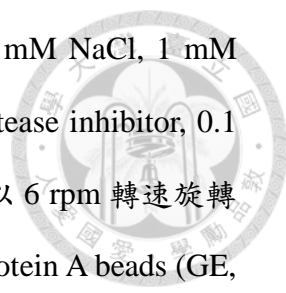
Devices SpectraMax M5)以波長 485 nm – 538 nm 之波長測定 GFP 讀值。剩餘約 50 μ l 細胞萃取蛋白質，以西方墨點法進行分析。



2.11 免疫染色質沉澱法(Chromatin immunoprecipitation)

將帶有 pSIN 載體和 pSIN-LMP1 以慢病毒感染方式轉染至 Akata 細胞，轉導 EB 病毒 LMP1 到 Akata 細胞，6 天後收取細胞。先取約 5 ml 少部分的細胞以 RIPA buffer 萃取蛋白質，之後進行西方墨點法分析，剩餘的細胞以 1% 甲醛 (formaldehyde) 室溫下反應 15 分鐘使蛋白質及 DNA 交叉結合 (cross-link)，再以 0.125M Glycine 室溫作用 15 分鐘中和甲醛所作用的交叉結合反應。將細胞以 1500 rpm (Tsiangtai RS-50 centrifuge)轉速，室溫離心 5 分鐘將細胞收取至 50 ml 離心管 (細胞容積大於 50 ml 則需離心數次)，以 50 ml 預冷之 PBS 清洗 4 次，以 1000 rpm 轉速，室溫離心 5 分鐘，去除上清液後以 5 ml cell lysis buffer (5 mM HEPES pH=8, 85 mM KCl, 0.5% IGEPAL, fresh prepared with 1 mM DTT, 1X protease inhibitor, 0.1 mM PMSF) 回溶細胞並從 50 ml 離心管移至 15 ml 離心管，於 4°C 以 6 rpm 旋轉 (DISHUNG) 作用 30 分鐘後，以 1500 rpm (Tsiangtai RS-50 centrifuge) 轉速，室溫離心 5 分鐘，去除大部分上清液留剩下 1 ml 之上清液，再移至 1.5 ml 微量離心管，以 13200 rpm 轉速，4°C 離心 10 min 後將上清液吸乾，剩下的細胞核以 600 μ l nuclei lysis buffer (50 mM Tris pH=8, 10 mM EDTA, 1% SDS, fresh prepared with 1 mM DTT, 1X protease inhibitor, 0.1 mM PMSF, 0.1 M NaF, 1 mM Na₃VO₄) 回溶，置於冰上作用 30 分鐘後保存於-80°C。接著以超音波 (Ultrasonic professor up 400A, Sonicor) 震盪將 DNA 打碎，震盪條件為： On 5 秒、Off 10 秒、強度 3-4、output = 40 %，共作用 48 回。震盪完後以 13200 rpm 轉速，4 °C 離心 10 分鐘後收取上清液，並以 1 % Agarose 膠體注入 1 μ l 之細胞核樣本測得 DNA 片段約 500-1000 鹼基對的小片段，另外取 1 μ l 進行蛋白質定量。

取 400 μ g 蛋白質分別加入 1 μ g 抗 NF- κ B p65 抗體及陰性對照組 rabbit IgG，另外取 10 分之 1 的蛋白質 40 μ g 做為 ChIP 的總輸入量 (input)，先存放於-80°C。



欲進行 IP 的組別以 IP dilution buffer (16.7 mM Tris pH=8, 167 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, fresh prepared with 1 mM DTT, 1X protease inhibitor, 0.1 mM PMSF, 0.1 M NaF, 1 mM Na₃VO₄) 將總體積補至 800 μ l，以 6 rpm 轉速旋轉 (DISHUNG)，4°C 作用至隔天。隔天加入 150 μ l 20% slurry protein A beads (GE, Sweden)，以 6 rpm 轉速，4°C 旋轉 2 小時，再以 8000 rpm 轉速，4 °C 離心 20 秒，去除上清液後收取磁珠。磁珠依序以 1 ml RIPA wash A buffer (50 mM Tris pH=8, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% IGEPAL, 0.1% SDS, 1% deoxycholic acid) 清洗 2 次、RIPA wash B buffer (50 mM Tris pH=8, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% IGEPAL, 0.1% SDS, 1% deoxycholic acid) 清洗 2 次、LiCl wash buffer (50 mM Tris pH=8, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 300 mM LiCl, 1% IGEPAL, 0.1% SDS, 1% deoxycholic acid) 清洗 2 次、TE buffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris pH=8) 清洗 3 次。清洗時需注意不可直接將各溶液直接沖洗磁珠，每次沖洗後以 6 rpm 轉速於 4°C 旋轉 5 分鐘後再以 13200 rpm 轉速，4 °C 離心 20 秒後去除上清液。

清洗完磁珠並去除上清液後，接著加入 150 μ l elution buffer (fresh prepared with 50 mM NaHCO₃, 1% SDS) 於 37°C 水浴槽作用 1 小時使抗體與磁珠分開，重複此步驟 2 次後可收集到 300 μ l 的產物。另外取出 input 同樣以 elution buffer 以體積補至 300 μ l，各組別每管加入 10 μ g RNase 及 300 mM NaCl，於 67°C 水浴槽作用隔夜，將 DNA-蛋白質複合物的交叉結合消除 (de-crosslink)。隔天各組別每管加入 1X PK buffer (50 mM Tris pH=7.5, 25 mM EDTA, 1.25% SDS) 及 450 μ g proteinase K，於 37°C 水浴槽作用 2 小時使與 DNA 結合之蛋白質降解 (degrade)。

加入等體積之 phenol/ chloroform/ IAA 350 μ l 後劇烈搖晃，室溫靜置 2 分鐘使水層及有機層分層，再以 13200 rpm 轉速，4 °C 離心 15 分鐘，吸取 300-350 μ l 水層後加入 2 倍體積之 100% 酒精、1/10 體積之 3M NaOAc 及 20 μ g Glycogen，於 -80 °C 作用至隔夜沉澱 DNA，再以 13200 rpm 轉速，4 °C 離心 15 分鐘、去除上清液後以 1 ml 75 % 酒精清洗 DNA 沉澱物，因 pellet 通常很細小，要小心避

免吸掉，再以 13200 rpm, 4 °C 離心 10 分鐘後，將得到的 DNA 風乾，以 20 μ l ddH₂O 回溶 DNA pellet。

得到的 DNA 以聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 進行放大反應。取 0.33% input 或 3 μ l ChIP DNA，加入 0.2 μ M 正向及反向引子、0.4 mM dNTPs、1X PCR Gold Buffer、2.5 mM MgCl₂、1.25 units AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA)，以 ddH₂O 將體積補至 25 μ l 進行 PCR (Biometra T3 thermocycler)。

論文中使用之 pIL-32 PCR 反應條件為：(1) 95 °C 5 min' (2) 95 °C 30 sec' (3) 60 °C 30 sec' (4) 72 °C 30 sec (第 2 到第 4 步進行 34 循環)' (5) 72 °C 5 min' (6) 4°C。pGAPDH PCR 反應條件為：(1) 95°C 5 min' (2) 95°C 30 sec' (3) 55°C 30 sec' (4) 72°C 30 sec (第 2 到第 4 步進行 31 循環)' (5) 72°C 5 min' (6) 4°C。

2.13 細胞質&細胞核分離法(Cytosolic and nuclear fractionation)

依實驗所需收取適量細胞至 15 ml 或 50 ml 離心管 (因細胞培養液容積不同而定)，1000 rpm 轉速，室溫離心 15 分鐘收取細胞，去除上清液後，再以 1x PBS 清洗細胞並移至 1.5 ml 離心管，取 1/3 數量的細胞以 RIPA 溶液回溶做為 input 正控制組，2/3 數量的細胞留做細胞核質分離，各組以 13200 rpm，4°C 離心 1 分鐘並去除上清液得到細胞樣本。細胞核質分離的細胞樣本，以使用前加入 1x protease inhibitor 之 Buffer A (10 mM HEPES pH=7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 % IGEPAL) 共 200 μ l (依細胞數量而定) 沖散細胞，並置於冰上 30 分鐘，再以 13200 rpm 轉速，4°C 離心 10 分鐘，收集上清液至新的 1.5 ml 離心管，此上清液為細胞質樣本，離心後之沉澱物以 Buffer A 打散清洗 3 次，每次清洗後以 13200 rpm 轉速，4°C 離心 5 分鐘並去除上清液，再以 200 μ l 之 Buffer B (20 mM HEPES pH=7.9, 0.4 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol) 回溶細胞核沉澱物，並以超音波震盪將細胞核沉澱物打散，樣本置於冰上 30 分鐘後，得到細胞核樣本。之後利

用西方墨點法偵測各核質樣本的分離產物。



2.15 活細胞增生測量 (Alamar blue assay)

以細胞計數器計數細胞後，稀釋細胞濃度至 1×10^5 /ml 並取 100 μ l 細胞至透明 96 孔組織培養盤中，每組樣本重複置入三格進行三重複實驗，再將細胞置於 37 °C 培養箱培養。各組別之細胞分別於第 0、24、48、72 及 96 小時各加入 10 μ l AlamarBlue[®]，置回 37 °C 培養箱培養 4 小時後以可見光分光光譜儀 (Beckman Coulter DU 730, 位在第一共同研究室, 14 樓) 測定樣本於波長 570 nm 與波長 600 nm 之吸光值，並套用公式算出各組別氧化還原程度

2.16 RNA 純化 RNA extraction

將細胞培養液去除後，以 1x PBS 清洗細胞並將樣本收集至 1.5 ml 離心管，再以 1 ml TRIzol 溶液將細胞打散 (此步驟後可將 TRIzol 回溶之樣本保存在 -80 °C 數月)，再加入 200 μ l 氯仿 (chloroform; Merck) 並劇烈搖晃 30 秒，室溫靜置 2 分鐘後以 13200 rpm 轉速，4 °C 離心 15 分鐘，離心後會分為上下兩層，上層為透明含 RNA 之水層，下層為紅色含 DNA 及細胞蛋白質之有機層。小心吸取上層溶液，約可吸取到 400-450 μ l 的水層樣本，並移至新的 1.5 ml 微量離心管，並加入等體積的異丙醇 (isopropanol; J.T. Baker)，混合均勻後置於室溫 20 分鐘沉澱 RNA，再以 13200 rpm 轉速，4 °C 離心 20 分鐘，可見白色果凍狀的 RNA 沉澱，倒去上清液後加入 1 ml 75% 酒精 (以 DEPC 水稀釋) 清洗沉澱物，再以 13200 rpm 轉速，4 °C 離心 20 分鐘，小心吸乾上清液後，於室溫倒扣風乾 10-15 分鐘，不可將 RNA 沉澱物風乾至 pellet 變成透明，太乾的 RNA pellet 以 DEPC 水難以回溶，風乾後加入 20 μ l DEPC 水，於 60 °C 作用 10 分鐘以幫助 RNA 回溶，得到的 RNA 樣本保存於 -80 °C 冰箱，也可直接進行反轉錄作用。

2.17 反轉錄作用 Reverse transcription

取 2.5 μg RNA，加入 1 μl random primer (One-Star, Taiwan) 後以 DEPC 水將體積調整為 10 μl ，並於 95°C 作用 90 秒將 RNA 的二級結構打開，馬上置於冰上 1 分鐘，再置於室溫 10 分鐘以利引子和 RNA 結合，加入各反轉錄作用所需之溶液，10 mM DTT (Promega, Madison, WI)、1X M-MLV RT buffer、0.125 mM dNTPs (Protech, Taiwan)、及 200 units M-MLV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI) 後，調整總體積為 25 μl ，並於 42°C 作用 90 分鐘及 70°C 10 分鐘，得到的 cDNA 產物，以 ddH₂O 將 cDNA 樣本稀釋 10 倍並保存於 -20°C 冰箱。

2.18 聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

取適量的 cDNA 樣本作為模版置於 0.2 μl PCR 反應管，並加入 0.2 μM 正向及反向引子、0.375 mM dNTPs、1X reaction buffer、及 1.4 units prozyme (Protech, Taiwan)，以滅菌之 ddH₂O 將體積補至 10 μl 進行聚合酶鏈鎖反應 (Biometra T3 thermocycler)。產物視片段大小以含有 EtBr 之 1-2% agarose 進行電泳，再利用紫外光照射顯像 (BioDoc-It 220 Imaging system；UVP, Upland, 位在第一共同研究室, 14 樓)。PCR 使用之引子序列及其使用條件請見表一。

IL-32 反應條件如下：(1) 95°C 5 min' (2) 95°C 30 sec' (3) 65°C 25 sec' (4) 72°C 30 sec (第 2 到第 4 步進行 26 或 28 循環)' (5) 72°C 10 min。

第三章 實驗結果

一、 IL-32 在 EB 病毒感染後之 B 細胞的表現情形

EB 病毒感染 B 細胞，可利用其病毒 RNA 或蛋白調控宿主細胞的訊號傳遞路徑及轉錄因子，進而影響 EB 病毒基因及宿主本身基因的表現，最後造成 B 細胞的增生、活化及不朽化等現象，形成 LCL。本實驗室蔡淑君博士先前利用 cDNA 微陣列分析 (附錄一)，比較初代 B 細胞經 EB 病毒感染 0、3、7 及 28 天這些不同時間點中 B 細胞內各基因的變化，EB 病毒感染 28 天後即定義此 B 細胞為不朽化的 LCL，發現其中一種細胞激素，白細胞介素-32 (interleukin-32, IL-32) 的表現量有隨著 EB 病毒感染的時間增加而增加。

為了進一步驗證 cDNA 微陣列分析的結果，本實驗室自捐血中心取得一位健康捐血者之白血球濃厚液，以 CD19⁺ 磁珠純化出 B 細胞後再以 B95.8 strain EB 病毒感染，收取感染 0、1、2、3、7、14、21 及 28 天之 B 細胞的 RNA 及蛋白質樣本進行分析，發現 IL-32 不論是在 RNA 或蛋白質的表現皆在感染後第 7 天才有些微的上升，直到感染兩周 (14 天) 後 IL-32 的 RNA 及蛋白質表現才有非常顯著的提升，直至感染 28 天後 B 細胞不朽化成 LCL，IL-32 的表現量相較於初代 B 細胞在 RNA 層面上表現量大約上升 100 倍，以西方墨點法偵測蛋白質的表現量方面也有明顯的上升，另外隨著感染天數的增加，各 EB 病毒蛋白的表現量，例如 EBNA 及 LMP1 也有隨時間增加而上升，顯示 EB 病毒有成功感染 B 細胞，而 IL-32 在 RNA 及蛋白質的表現皆依感染天數而逐步上升的趨勢 (圖四)。為了更進一步釐清 EB 病毒感染後 IL-32 上升的現象非個體之 B 細胞的差異所引起，本實驗室再從捐血中心取得四位健康捐血者之白血球濃厚液，同樣以 CD19⁺ 磁珠純化出個別之 B 細胞後再以 B95.8 strain EB 病毒感染 28 天，收取四株不同捐血者之 LCL 的蛋白質樣本，經西方墨點法分析後發現，IL-32 皆在 4 株 LCL 中有大量表現的現象，為了證實 EB 病毒感染是否成功，除了偵測目標基因 IL-32 之外，也偵測 EB 病毒蛋白 EBNA1 及 LMP1 的表現 (圖五)。

由於先前研究顯示 IL-32 通常是位在細胞質內，極少位在細胞外，本實驗室

劉怡學姐以免疫螢光染色法偵測 IL-32 蛋白質在 LCL 中的分布情形，先將 LCL 細胞株置於 12 孔載玻片上，經過風乾、固定及穿孔後將 IL-32 抗體與之作用，另以 PBS 做為陰性控制組，以螢光顯微鏡觀察後發現，相較於控制組別大部分的 IL-32 蛋白質皆表現在 LCL 的細胞質中 (附錄二)。接著進一步利用細胞核質分離法，將兩株 LCL 的細胞核以及細胞質分離並收集各核質蛋白質樣本，以西方墨點法偵測 IL-32、PARP 及 α -tubulin 的表現，發現表現的 IL-32 主要位在細胞質中。PARP 為偵測細胞核樣本內控制組， α -tubulin 則為細胞質樣本內控制組 (圖六)。

二、EB 病毒 LMP1 能活化 IL-32 的 mRNA 及蛋白質的表現

從圖四及圖五可以觀察到 IL-32 表現量在 EB 病毒感染後之 B 細胞會有明顯的上升，進一步為了釐清 EB 病毒感染 B 細胞活化 IL-32 的表現是透過病毒的何種蛋白，本實驗室周雅菁博士，在柏金氏淋巴瘤細胞株 Akata 中以電穿孔的方式送入 EBNA1、LMP1、LMP2A、Zta 或 Rta 等表現質體，轉導各 EB 病毒基因至 Akata 細胞，3 天後收取細胞蛋白質以及 RNA 進行分析，而本實驗室劉怡學姐利用 RT-qPCR 偵測 IL-32 mRNA 的表現，以西方墨點法偵測 IL-32 及各 EB 病毒蛋白的表現情形，發現只有在表現 LMP1 的情況下才能明顯的誘導 IL-32 的表現，其餘的 EB 病毒蛋白表現時，相較於載體控制組 IL-32 的表現則沒有明顯的上升，為了確認各 EB 病毒在轉導各表現質體後在 Akata 細胞確實能表現，以西方墨點法同時確認各 EB 病毒確實能在 Akata 中表現，且各基因表現量 0 並無明顯差異 (附錄三)。

目前已知 EB 病毒除了感染 B 細胞之外，也能感染人類上皮細胞，為了釐清在上皮細胞中 EB 病毒是透過何種蛋白調控 IL-32 的表現，首先在人類腎臟上皮細胞株 HEK 293T 及人類鼻咽癌細胞株 TW01 中，分別以 Lipofectamine 2000 試劑轉染 EBNA1、EBNA2、LMP1、LMP2A、Rta 或 Zta 的表現質體，轉導各 EB 病毒基因至上皮細胞株，2 天後收取細胞之 RNA 及蛋白質進行實驗分析，利用

RT-qPCR 偵測 IL-32 mRNA 的表現，以西方墨點法偵測 IL-32 及各 EB 病毒蛋白的表現情形。發現相較於載體控制組別，當表現 EB 病毒溶裂極早期轉錄活化因子 Rta 及潛伏膜蛋白 LMP1 在 HEK 293T 及 TW01 細胞時可誘發 IL-32 mRNA 及蛋白質的表現，Rta 誘發 IL-32 mRNA 表現的倍數相對於載體控制組，在 HEK293T 及 TW01 中分別可誘發約 180 倍及 8 倍的表現，而 LMP1 則可分別誘發約 65 倍及 4 倍的 RNA 表現量，為了確認各 EB 病毒在轉染各表現質體在 HEK293T 及 TW01 細胞確實能表現，以西方墨點法同時確認各 EB 病毒能在 HEK293T 及 TW01 中表現，且各基因表現時沒有明顯影響其他 EB 病毒基因的表現 (附錄四)。

由上述先前的實驗結果得知，不論是在上皮細胞或是柏金氏淋巴瘤細胞株，EB 病毒 LMP1 表現時確實能增加 IL-32 之 RNA 及蛋白質的表現，為了進一步釐清 LMP1 活化 IL-32 的過程，接著將包裹 pSIN 或 pSIN-LMP1 質體的慢病毒以 MOI = 0.0625、0.125、0.25、0.5 感染 Akata 細胞，使細胞表現不同量之 LMP1，5 天後收取蛋白質，以西方墨點法偵測 IL-32、LMP1 及 β -actin 蛋白質的表現，發現 IL-32 的蛋白質表現有隨著 LMP1 慢病毒感染的 MOI 上升而增加，顯示 LMP1 確實能活化 IL-32 的表現 (圖七)，同樣也發現在 EB 病毒存在之 LCL 細胞株中，將包裹 pLKO-shLuc 或 pLKO-shLMP1 質體的慢病毒感染兩株 LCL，轉導 shLMP1 RNA 至 LCL 中以抑制 EB 病毒 LMP1 基因的表現，5 天後收取細胞蛋白質，以西方墨點法分析發現，送入 shLMP1 RNA 可以成功抑制 EB 病毒 LMP1 基因的表現，同時也可以觀察到 IL-32 蛋白質的表現量也有隨著 LMP1 表現下降而受到抑制，以上結果顯示，EB 病毒感染 B 細胞後，能利用 LMP1 活化 IL-32 基因的表現 (圖八)。

另外先前研究已知，LMP1 的構造和所活化的下游訊息傳遞路徑和 CD40 類似，進一步利用純化後之初代 B 細胞，在培養液中加入 EB 病毒、 α CD40+IL4、LPS 或 Poly I:C 這些刺激物後，觀察是否有其他刺激物能活化 IL-32 的表現。分別收取 1、2 及 3 天之細胞 RNA 樣本，以 RT-qPCR 分析後發現，在 anti-CD40

的刺激活化 CD40 的訊息傳遞路徑後能增加 IL-32 蛋白質的表現，其餘的刺激物在 qPCR 的結果中則沒有太大的變化(圖九 A)，另外為了進一步驗證 CD40 所誘導的訊息傳遞路徑可以活化 IL-32 的表現，同樣在 Akata 細胞中以 α CD40+IL4 的刺激物誘導 CD40 的訊息傳遞路徑，發現刺激後 48 小時及 72 小時後在 Akata 細胞能誘導 IL-32 的表現，72 小時的刺激甚至能誘導更多的 IL-32 (圖九 B)。由於 LMP1 的構造和所活化的下游訊息傳遞路徑和 CD40 類似，以上實驗結果也提示 LMP1 具有活化 IL-32 表現的潛能。

三、NF κ B 訊息傳遞路徑參予對 LMP1 活化 IL-32 的表現是重要的

目前已知 LMP1 的構造和腫瘤壞死因子受體家族 (tumor necrosis factor receptor, TNFR) 的 CD40 類似，所活化的下游訊息傳遞路徑也因而類似，LMP1 可透過其 C 端上的 CTAR1 及 CTAR2 活化區域，與 TRAFs 及 TRADD 等蛋白結合，進一步活化下游訊息傳遞路徑，如 PI3K/Akt、MAPK/p38、JNK 及 NF κ B 等訊息傳遞路徑，最後活化許多轉錄因子及宿主基因。

為了釐清 LMP1 的哪些活化區域對活化 IL-32 的表現是重要的，本研究利用慢病毒感染方式將包裹 pSIN、pSIN-LMP1、pSIN-LMP1dCTAR1、pSIN-LMP1dCTAR2 及 pSIN-LMP1dCTAR1/2 質體的慢病毒感染 Akata 細胞，5 天後收取蛋白質，以西方墨點法偵測 IL-32、LMP1 及其各刪除片段之蛋白質表現，先確認各組 LMP1 野生型及其刪除型的蛋白質表現量皆接近一致，實驗結果發現 LMP1 在刪除 CTAR1 或 CTAR2 時皆會抑制 IL-32 的表現，進一步發現 CTAR1 和 CTAR2 同時刪除時對 IL-32 的抑制情況最為明顯，顯示 LMP1 的 CTAR1 及 CTAR2 活化區域對 IL-32 的表現是重要的，而 LMP1 所活化的 NF κ B 訊息傳遞路徑，是目前已知對細胞激素的產生扮演重要角色，且 LMP1 的 CTAR1 及 CTAR2 活化區域皆可活化 NF κ B 訊息傳遞路徑，在西方墨點法的結果也顯示刪除 LMP1 的 CTAR1、CTAR2 或 CTAR1/2 後皆能明顯抑制 p-I κ B 的表現 (圖十)，顯示 NF κ B 的訊息傳遞路徑是受抑制的。

為了釐清 NFκB 訊息傳遞路徑對 IL-32 的表現是重要的，本研究進一步利用包裹 pSIN 或 pSIN-LMP1 質體的慢病毒感染 Akata 細胞轉導 EB 病毒基因 LMP1，5 天後加入 IκB 抑制劑 Bay11-7082、MEK 抑制劑 U0126 及 JNK 抑制劑 Sp600125，2 天後收取蛋白質，並以西方墨點法偵測 IL-32 及 LMP1 下游訊息傳遞路徑的變化，結果顯示，加入 IκB 抑制劑能夠抑制 NFκB 訊息傳遞路徑，且 IL-32 也有同時被抑制的現象，顯示 LMP1 活化 IL-32 可能透過 NFκB 訊息傳遞路徑 (圖十一 A)，另外加入 MEK 抑制劑則對 LMP1 活化的 IL-32 沒有抑制的現象 (圖十一 B)，而加入 JNK 抑制劑後則對 LMP1 活化的 IL-32 只有些微且不明顯的抑制 (圖十一 C)，綜合以上結果顯示，LMP1 可能透過 NFκB 訊息傳遞路徑活化 IL-32 的表現，但 JNK 訊息傳遞路徑可能也會影響 IL-32 的表現。

四、 LMP1 能活化 p65 轉錄因子使之結合在 IL-32 啟動子上進而活化 IL-32 的表現

為了更深入探討 LMP1 透過 NFκB 訊息傳遞路徑活化 IL-32 的機制，本研究以 PROMO (<http://algggen.lsi.upc.es/>) 軟體預測 IL-32 啟動子序列 -548 至 +495 之間可能相關的轉錄因子，其中含有 1 個 c-Jun、1 個 c-Fos、1 個 CREB、2 個 NFκB、1 個 Sp1 及 1 個 AP-1 轉錄因子結合位(圖十二 A)，本實驗室劉怡學姐先前構築多個 IL-32 啟動子區域刪除片段質體，以及 CRE、NFκB 結合位以及 Sp1 結合位突變之 IL-32 啟動子序列 (CRE 序列由 TGACGTCA 置換成 GACTGTCA；NFκB 結合位由 GGGAGTTTCC 置換成 GGGAGTTAGA；Sp1 結合位由 GCTCCGCCCA 置換成 GCTATTAATA)，本研究利用這些構築好的質體做為啟動子報導質體，以 pSG5-LMP1 為表現質體，pEGFP-C1 做為內控制組質體，在 HEK293T 細胞以 NTRII 試劑轉導各項質體進行螢光酵素報導基因分析，實驗結果發現，LMP1 能活化全長的 IL-32 啟動子達約 300 倍之多，刪除 IL-32 啟動子片段至 -117 的位置去除 c-Jun 及 c-Fos 的結合位則不影響 IL-32 啟動子的活化，但是當刪除 IL-32 啟動子片段至 -21 位置去除 CRE 結合位後，LMP1 活化 IL-32 啟動子的倍數抑制至

剩下約 50 倍，且將 NF κ B 結合位突變後，LMP1 活化 IL-32 啟動子的倍數也受到抑制 (圖十二 B)，顯示 LMP1 可能透過啟動子-117 至+11 片段上的 CRE 及 NF κ B 結合位活化 IL-32 的表現。

另外在先前研究也觀察到 Rta 具有活化上皮細胞內 IL-32 的表現，因此想進一步觀察 Rta 是如何活化 IL-32 啟動子的活性，同樣利用先前提到之構築好的質體做為啟動子報導質體，以 pSG5-Rta 為表現質體，pEGFP-C1 做為內控制組質體，在 HEK293T 細胞以 NTRII 試劑轉導各項質體進行螢光酵素報導基因分析，實驗結果發現，Rta 具有活化全長 IL-32 啟動子達 30 倍之多的能力，刪除 IL-32 啟動子片段至-117 的位置去除 c-Jun 及 c-Fos 的結合位後，Rta 仍具有活化 IL-32 啟動子達 20 倍的能力，受抑制的情形不顯著，刪除片段至-21 位置去除 CRE 序列以及刪除片段至+267 位置則仍不影響 Rta 活化 IL-32 啟動子的現象，顯示 Rta 不會利用 CRE 序列以及 NF κ B 結合位活化 IL-32 啟動子，直到刪除片段至+339 位置去除 Sp1 結合位後 IL-32 啟動子的活性才抑制至約 9 倍，但是突變的 Sp1 結合位卻不影響 Rta 活化 IL-32 啟動子，且突變 CRE 序列也有相同的現象，由於刪除片段至+339 位置同時也去除了前面許多轉錄因子的結合位，因此推測 Rta 活化 IL-32 啟動子可能不只透過一種轉錄因子的幫助，所以接著將 CRE 序列以及 Sp1 序列同時突變時，Rta 活化 IL-32 啟動子的現象則受到抑制 (圖十三)，結果顯示 CRE 序列及 Sp1 結合位對 Rta 活化 IL-32 啟動子是重要的。

在先前研究(圖十二)中已知道 LMP1 可能透過 NF κ B 轉錄因子活化 IL-32 啟動子，為了更進一步釐清 NF κ B 是否結合在 IL-32 啟動子上，本研究以包裹 pSIN 或 pSIN-LMP1 質體的慢病毒感染 Akata 細胞後，收取細胞樣本進行免疫染色質沉澱法分析，由於 NF κ B 轉錄因子的一員 p65 是活化典型 NF κ B 訊息傳遞路徑所必需的，所以想了解 p65 是否會結合在 IL-32 啟動子上，結果顯示，在利用 p65 專一抗體進行免疫沉澱後以 PCR 進行片段放大，觀察到在 LMP1 表現的 Akata 細胞中(圖十四 B)，p65 能夠結合在 IL-32 啟動子-85 至+98 的 NF κ B 結合位(圖十四 A)。

為了更深入了解 p65 是否對 IL-32 啟動子的活化是重要的，本研究利用 p65 的表現質體 (pSIN-p65 及 pCDNA3-HA-p65) 以慢病毒感染及 NTRII 試劑轉染的方式，分別在 Akata 細胞以及 HEK293T 細胞大量表現轉錄因子 p65，並收取細胞蛋白質並以西方墨點法分析 IL-32 的表現，結果顯示不管在 Akata 細胞或 HEK293T 細胞中皆可看見 IL-32 有被誘導表現 (圖十五)，另外進一步確認 LMP1 活化 p65 對 IL-32 的表現是重要的，同時以包裹 pSIN 或 pSIN-LMP1 及 shLuc、shRelA-1 或 shRelA-4 質體之慢病毒感染 Akata 細胞後，收取細胞蛋白質進行西方墨點法分析，實驗結果顯示 LMP1 能活化 IL-32，但是在抑制 p65 的表現後 IL-32 的表現也隨之受到抑制 (圖十六)，顯示 LMP1 是藉由活化轉錄因子 p65 因而活化 IL-32 的表現。為了釐清此現象和 EB 病毒存在的細胞株是否具有相同趨勢，利用 EB 病毒感染不朽化後的 LCL 細胞株，以包裹 shLuc、shRelA-1 或 shRelA-4 質體之慢病毒感染兩株 LCL 後，5 天收取細胞蛋白質樣本並以西方墨點法分析 IL-32 的表現，結果顯示和前面實驗結果相符，在抑制 p65 的表現時 IL-32 也同時受到抑制 (圖十七)，另外在 LCL 內抑制 p65 表現時則不影響 LMP1 的表現量，顯示 IL-32 表現下降並非因為各組之間 LMP1 表現量有所差異。

五、 IL-32 具有抑制 EB 病毒溶裂期的能力

本研究想進一步釐清表現之 IL-32 對細胞的生理功能為何。過去研究顯示 IL-32 具有抑制病毒顆粒產生的能力以利宿主細胞的存活，為了探討 IL-32 是否具有抑制病毒顆粒的產生，本研究以包裹 shLuc、shIL32-3 及 shIL32-5 質體之慢病毒感染三株 LCL，5 天後收取細胞蛋白質樣本並以西方墨點法偵測 IL-32 以及各 EB 病毒溶裂期基因的表現，已瞭解 LCL 內的 EB 病毒是否進入溶裂期進而產生更多的病毒顆粒，西方墨點法的結果顯示，抑制 IL-32 的表現後可以觀察到各溶裂期基因的表現量皆有上升的現象，其中包括極早期基因 Zta (圖十八)，顯示 LCL 內的 EB 病毒進入溶裂期，所以推測在 LCL 細胞株中，IL-32 的表現具有抑制 EB 病毒進入溶裂期的功能。

病毒進入溶裂期第一個需要表現的基因是溶裂期極早期基因 Zta，為了更進一步研究 IL-32 是如何抑制 EB 病毒進入溶裂期，本研究想釐清 IL-32 是否具有抑制溶裂期極早期基因 Zta 的表現進而影響 EB 病毒進入溶裂期。利用 Zta 基因啟動子 Zp 的報導質體 (圖十九 A)，pSG5-Zta 和 pCDH-IL32 為表現質體，以 NTRII 試劑轉染各質體至 HEK293T 細胞後，探察 IL-32 是否具有抑制 Zta 啟動子的能力，螢光酵素報導分析的結果顯示，Zta 具有活化 Zp 活性達 5 倍的能力，但是在表現 IL-32 後 Zta 活化 Zp 的現象則受到抑制，轉染 IL-32 表現質體 0.1 μg 的組別沒有抑制 Zp 的現象，轉染 0.2 μg 和 0.4 μg 的組別分別能抑制 Zp 活性至 3.5 倍及 2.5 倍 (圖十九 B)，隨著 IL-32 的表現量增多，其抑制 Zp 的現象也有隨之變的顯著，顯示 IL-32 具有抑制 Zp 活性的能力。另外，溶裂期極早期基因除了 Zta 之外還有 Rta，為了釐清 IL-32 是否具有抑制極早期基因表現進而影響 EB 病毒進入溶裂期的能力，本研究同樣利用 Rta 基因啟動子 Rp 的報導質體，pSG5-Rta 和 pCDH-IL32 為表現質體，以 NTRII 試劑轉染各質體至 HEK293T 細胞後，探察 IL-32 是否具有抑制 Rta 啟動子的能力，螢光酵素報導分析的結果顯示，Rta 具有活化 Rp 達 7.5 倍的能力，但是和 Zp 趨勢相同的是，在表現 IL-32 後 Rta 活化 Rp 的現象也受到抑制，轉染 IL-32 表現質體 0.1 μg 的組別沒有抑制 Rp 的現象，轉染 0.2 μg 和 0.4 μg 的組別分別能抑制 Rp 活性至 5 倍及 3 倍 (圖二十)，隨著 IL-32 的表現量增多，其抑制 Rp 的現象也有隨之變的顯著，顯示 IL-32 同樣具有抑制 Rp 活性的能力。以上結果指出，IL-32 抑制 EB 病毒溶裂期，可能是透過抑制極早期基因 Zta 及 Rta 的啟動子。

研究指出 HDAC2 能結合在 Zp 上進而抑制 Zp 的活性，而加入 Trichostatin A (TSA) 具有抑制 HDAC2 活性使 Zp 能重新受轉錄因子的調控，進而啟動 Zp 的表現，本研究想進一步釐清 IL-32 是否具有抑制 TSA 所活化之 Zp 的活性，以 NTRII 試劑同時轉染 pSG5 或 pSG5-Zta 及 pCDH 或 pCDH-IL32 表現質體，以及報導質體 pGL2-Zp，隔天加入 DMSO 或 TSA (125 μM)，轉導 2 天後收取細胞進行螢光酵素報導基因分析，實驗結果顯示 Zta 具有活化 Zp 活性達約 8 倍的能力，而 IL-32

則可以抑制活化的現象至約 4 倍，在加入 TSA 的組別中，Zta 活化 Zp 的活性增加至 25 倍，且在表現 IL-32 後也能抑制由 TSA 及 Zta 所活化之 Zp 的活性至 15 倍 (圖二十一)，顯示 TSA 及 Zta 所活化之 Zp 仍會受到 IL-32 的抑制。

本實驗室蔡佩芳學姐過去研究發現蛋白質激酶 C δ (protein kinase C- δ , PKC δ) 能夠透過活化 Zp 之 ZID 片段進而活化 Zp 的活性，本研究想更進一步釐清 IL-32 是否具有抑制由 PKC δ 所活化之 Zp 的活性，以 NTRII 試劑同時轉導 pEGFP-N1、pEGFP-WT-PKC δ 、pEGFP-CF-PKC δ 或 pEGFP-DN-PKC δ 及 pCDH 或 pCDH-IL32 表現質體和 pGL2-Zp 報導質體，轉染 3 天後收取細胞進行螢光酵素報導基因分析，實驗結果顯示 WT-PKC δ 及 CF-PKC δ 具有活化 Zp 分別達約 13 倍及 32 倍的能力，且在有表現 IL-32 基因的組別中，WT-PKC δ 及 CF-PKC δ 所活化之 Zp 的活性也有分別下降至 5 倍及 15 倍，pEGFP 和 DN-PKC δ 的組別分別為控制組及負控制組，對 Zp 活性沒有影響 (圖二十二)。另外以 NTRII 試劑同時轉導 pEGFP-N1、pEGFP-WT-PKC δ 、pEGFP-CF-PKC δ 或 pEGFP-DN-PKC δ 及 Tag2B 或 Tag2B-IL32 表現質體，3 天後收取細胞進行免疫螢光染色後，以共軛焦顯微鏡觀察 IL-32 影響 PKC δ 在細胞內核質分布的情形，結果顯示 IL-32 具有抑制 WT-PKC δ 及 CF-PKC δ 進入細胞核的能力 (圖二十三)。

六、IL-32 具有抑制 IL-6 表現的能力

過去許多研究接證實 IL-32 具有活化其他細胞激素的能力，如 TNF α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 及 IL-10，而這些細胞激素也能夠被 LMP1 所誘發，因而推論和 IL-32 有正相關，這些細胞激素在 LCL 內也有表現，對 LCL 的細胞生理功能也有影響，本研究進一步以包裹 shLuc、shIL32-3 及 shIL32-5 載體的慢病毒感染三株 LCL 以抑制 LCL 內的 IL-32，5 天後收取細胞 RNA，以 RT-qPCR 分析 TNF α 、IL-6 及 IL-10 mRNA 的表現量變化。RT-qPCR 分析結果顯示，抑制 LCL 中 IL-32 表現能誘導 IL-6 的表現，與控制組 shLuc 比較約增加 15 至 35 倍 (圖二十四)，顯示 IL-32 具有影響細胞激素表現的能力，而相較於 IL-6，IL-10 及 TNF α 在抑制

IL-32 表現的組別，和控制組 shLuc 比較則是沒有太大的差異(圖二十五)。



七、 IL-32 無法影響細胞中 NFκB 訊息傳遞路徑

過去研究指出，IL-32 具有活化 NFκB 訊息傳遞路徑的能力，進而活化更多的細胞激素，以利發炎反應幫助宿主清除病原菌，所以本研究進一步想釐清 IL-32 是否具有活化細胞 NFκB 訊息傳遞路徑的能力，以 NTRII 試劑轉染 pLKO-shLuc、pLKO-shIL32-3 或 pLKO-shIL32-5 載體及 NFκB downstream element-Luc 報導質體至 HEK293T 細胞及以包裹 pSIN 或 pSIN-LMP1 表現質體之慢病毒感染 HEK293T 細胞後，使細胞表現 EB 病毒 LMP1 以及抑制所活化之 IL-32 的表現，以螢光酵素報導分析實驗，觀察 IL-32 是否會影響 LMP1 所活化之 NFκB 訊息傳遞路徑，實驗結果顯示，LMP1 具有活化 NFκB 訊息傳遞路徑的活性達 4 倍之多，但是在抑制 IL-32 基因的組別則沒有探察到 NFκB 訊息傳遞有受到抑制或是誘導的影響 (圖二十六 A)，另外進一步以西方墨點法偵測 NFκB 訊息傳遞路徑中 p-IκB 的表現也沒有明顯的變化 (圖二十六 B)，為了進一步確認 IL-32 無法影響細胞內 NFκB 訊息傳遞路徑，本研究以包裹 pSIN 或 pSIN-LMP1 表現質體及 pLKO-shLuc、pLKO-shIL32-3 或 pLKO-shIL32-5 質體之慢病毒感染 Akata 細胞，5 天後收取細胞蛋白質樣本，以西方墨點法分析 NFκB 訊息傳遞路徑是否在抑制 IL-32 表現時有任何影響，實驗結果顯示，在 Akata 細胞中表現 EB 病毒 LMP1 能活化 IL-32 的表現，且 NFκB 訊息傳遞路徑也有受到活化的現象，但是抑制 IL-32 的組別中，p-IκB 的表現量沒有明顯的變化(圖二十七 A)，顯示 NFκB 訊息傳遞路徑並未受到影響。進一步以包裹 pCDH 或 pCDH-IL32 質體之慢病毒感染 Akata 細胞，5 天後收取細胞蛋白質並以西方墨點法分析 NFκB 訊息傳遞路徑是否受影響，實驗結果顯示，在 IL-32 表現量不同的 Akata 細胞中，p-IκB 的表現量相較於對照組別沒有明顯的變化 (圖二十七 B)，顯示 NFκB 訊息傳遞路徑並未受到影響，綜合以上結果顯示，IL-32 不參與在 LMP1 所活化的 NFκB 訊息傳遞路徑中，甚至單獨表現 IL-32 基因也不會影響 NFκB 訊息傳遞路徑，但是前面研

究已知 NF κ B 訊息傳遞路徑能夠活化 IL-32 的表現，顯示此活化現象為單方向且並無回饋作用。



八、 IL-32 不影響 LCL 之細胞生長

過去研究指出，IL-32 具有促進細胞增生的能力，推測可能的原因是 IL-32 具有活化細胞激素的能力，細胞激素如 IL-1 β 過去報導具有增加細胞增生的功能，另外在本研究也指出，IL-32 具有影響 IL-6 表現的能力，而 IL-6 在過去的研究也已經知道對 LCL 的增生及 B 細胞不朽化是重要的，為了進一步釐清 IL-32 對 LCL 細胞生長的影響，本研究以包裹 pLKO-shLuc、pLKO-shIL32-3 及 pLKO-shIL32-5 質體之慢病毒感染兩株 LCL，5 天後收集細胞並置於透明 96 孔盤中，以 Alamar Blur 試劑偵測 0 小時以及 96 小時之細胞氧化還原的程度，以推測 LCL 活細胞增生的現象，實驗結果顯示，抑制 IL-32 之組別細胞氧化還原的程度和對照組比較並無明顯的差異(圖二十八)，進一步將細胞培養於只含 1% FBS 之 RPMI 細胞培養液中，使細胞在營養成分缺乏的情況下生長速度變慢，以更深入釐清 IL-32 是否具有影響細胞增生的功能，但結果分析發現，甚至使細胞處於飢餓狀態，IL-32 仍不影響細胞的增生(圖二十八)。

第四章 討論

4.1 IL-32 在 EB 病毒感染後的細胞內的表現情形

先前研究中，Carter 等人利用 cDNA 微陣列分析偵測 1B4 LCL、柏金氏淋巴瘤細胞株 BL41 及潛伏期第三期的 BL41 細胞株，以 RT-PCR 分析發現能夠被 EB 病毒所誘導的基因為 IL-32 (Carter et al., 2002)，此研究數據支持本實驗室 cDNA 微陣列初步分析的結果。本研究進一步證實 IL-32mRNA 以及蛋白質的表現量在 EB 病毒感染後不同時間點的 B 細胞皆有上升的現象，另外從四位不同捐血者身上純化之 B 細胞轉型成的 LCL 內同樣也發現 IL-32 的表現量有上升的現象，顯示 EB 病毒感染後之 LCL 會造成 IL-32 表現量上升是一普遍而非單一的現象，實驗結果發現雖然 IL-32 的 mRNA 表現量上升只有 100 倍而非與 cDNA 微陣列分析的 350 倍結果相符，但整體而言上升的趨勢是相符合的，倍數結果有差異推論是因為受 EB 病毒感染之 B 細胞來源個體差異及實驗方法敏感度不同所至。

LCL 中大量表現的 IL-32 以細胞核質分離法探察 IL-32 分布位置，發現主要是位在細胞質，Netea 等人的研究結果和本研究結果類似，以螢光顯微鏡同樣發現大量表現的 IL-32 主要位在巨噬細胞的細胞質中，故推測活化後的 IL-32 需要表現在細胞質中才具有其生物功能(Netea et al., 2008)，另外目前對 IL-32 位在細胞質何處的研究推測，IL-32 可能位在溶酶體 (lysosome 或是 ER 膜 (Endoplasmic reticulum, ER)上(Hasegawa et al., 2011)，但這方面的研究仍為不足。

4.2 EB 病毒調控 IL-32 的機制

在此研究我們先針對 IL-32 在淋巴球之調控情形進行研究，因此在 Akata 細胞表現不同量的 LMP1 發現 IL-32 的表現量有隨著 LMP1 表現量增加而上升，故推測 LMP1 可能和 IL-32 的活化有關。先前的研究顯示流感病毒能透過活化 NF κ B 訊息傳遞路徑進而活化人類腎臟上皮細胞中 IL-32 的表現 (Li et al., 2008)，另外 HBV 也能利用病毒蛋白 HBx 活化 NF κ B 訊息傳遞路徑進而活化 IL-32 啟動子 (Pan et al., 2011)。本研究發現 EB 病毒的 LMP1 需透過 CTAR1 及 CTAR2 才能活

化 NF κ B 的訊息傳遞路徑，再活化轉錄因子 p65 進而促進 IL-32 的表現，研究中外送表現 NF κ B 轉錄因子 p65 的質體在 HEK 293T 及 Akata 細胞，發現能夠活化 IL-32 的表現，雖然細胞中 NF κ B 訊息傳遞路徑並未活化，但是細胞核及細胞質之間 NF κ B 轉錄因子可能有固定的比例，過高濃度的 NF κ B 轉錄因子可能因此移動至細胞核中，進而能夠調控與 NF κ B 轉錄因子相關之基因。本研究以及過去的研究皆指向不論是 EB 病毒、HBV 或是流感病毒，感染的是 B 細胞、上皮細胞或是 PBMC 皆需藉由 NF κ B 轉錄因子及透過 CRE 結合位才能活化 IL-32 的表現。

另外本研究在上皮細胞中也發現 Rta 也能夠活化 IL-32 的表現，過去研究指出 Rta 具有透過 Sp1/Sp3 結合位活化 Rta 啟動子，及使 EB 病毒進入溶裂期的能力(Ragoczy and Miller, 2001; Zalani et al., 1992)，另外也可以與 CBP (CRE-binding protein)結合作用(Swenson et al., 2001)，在本研究中也發現 CRE 及 Sp1/Sp3 結合位對 Rta 活化 IL-32 的表現是重要的，但有趣的是，CRE 及 Sp1/Sp3 結合位必須同時失去轉錄因子結合的功能後才會失去對 IL-32 活化的能力，由於 CBP 的數量有很多，且會結合在 IL-32 的啟動子上的蛋白可能透過直接結合或是間接結合於結合在 IL-32 啟動子的蛋白等方式進而調控 IL-32 啟動子的活性，故本研究推測，CRE 及 Sp1/Sp3 結合位上可能結合了其他的轉錄因子及活化因子，形成一個活化體進而活化 IL-32 啟動子。綜合以表現上研究顯示，LMP1 能透過 NF κ B 轉錄因子活化 IL-32 的表現，Rta 能透過 Sp1/Sp3 結合位活化 IL-32 的表現，但是 CRE 對兩者活化 IL-32 皆是重要的。

4.3 IL-32 在 EB 病毒感染之細胞中的生理功能

過去許多研究發現 IL-32 具有抑制病毒顆粒產生的能力，分別能抑制流感病毒的複製 (Li et al., 2009)以及 HIV 的複製 (Nold et al., 2008b)，這兩篇研究顯示，IL-32 具有活化細胞激素產生的能力，進而使細胞具有抵抗外來病毒的能力，例如 Nold 等人研究發現 IL-32 具有活化 IL-1 β 的能力，進而促進發炎反應並抑制 HIV 病毒的複製，而本研究則顯示，IL-32 具有抑制 LCL 中 EB 病毒溶裂期的能

力，進而抑制 EB 病毒顆粒產生。

由於 EB 病毒進入溶裂期需要活化溶裂期極早期基因 Zta 以及 Rta，本研究顯示 IL-32 能抑制 LCL 中 EB 病毒的溶裂期，其中一個原因可能是 IL-32 具有抑制 Zta 活化 Zp 活性的現象，且此抑制現象也有隨著 IL-32 表現量增加而抑制得更加明顯，推測可能是因為 Zta 能夠結合在 Zp 上的 ZIIIA 及 ZIIIB 上進而活化 Zp (Yin et al., 2004)，IL-32 位在細胞質中可能具有抑制 Zta 進入細胞核活化 Zp 的能力。

另外本實驗室過去研究已知 TSA，其為一組蛋白脫乙酰酶(histone deacetylase, HDAC)的抑制劑，具有活化 Zp 的能力，機制為 TSA 能使結合在 Zp 的 ZID 區域上之 HDAC 離開，進而使 PKC δ 能夠活化 Zp 的 ZID 區域，最後活化 Zp 的表現 (Tsai et al., 2011)，而本研究發現 IL-32 具有抑制 TSA 及 PKC δ 活化 Zp 的現象，顯示 IL-32 抑制 Zp 活性也能透過 Zp 的 ZID 區域，推論 IL-32 除了抑制 Zta 活化 Zp 的 ZIIIA 及 ZIIIB 區域外，同時也能抑制 PKC δ 活化 ZID 區域。本研究已知 IL-32 是表現在細胞質中，而 Zta 及 PKC δ 需要進入細胞核才能調控基因的表現，所以推測 IL-32 需要具有抑制其進入細胞核的現象才能達到抑制其活化的情形。目前有研究指出 IL-32 具有和 PKC δ 結合的能力，且結合後具有活化 PKC δ 下游訊息傳遞的功能 (Kang et al., 2013a)，在本研究想進一步釐清，IL-32 與 PKC δ 結合是否能抑制 PKC δ 所造成 Zp 活化的現象，推測可能的抑制方式為，IL-32 與 PKC δ 結合，因 IL-32 無法進入細胞核而使活化後的 PKC δ 同樣無法進入細胞核中，進而無法活化 PKC δ 下游基因的表現。本研究也發現在大量表現 IL-32 的 Hela 細胞中，PKC δ 在細胞核及細胞質的分佈確實有受到影響，位在細胞核中的 PKC δ 有減少的現象。目前對於活化之 PKC 與 IL-32 的關係仍沒有研究報導，故本研究除了從共軛焦顯微鏡觀察外，仍需要更多的實驗才能證明此現象。

過去研究指出 NF κ B 訊息傳遞路徑對疱疹病毒的潛伏期是重要的 (Brown et al., 2003)，隨著 NF κ B 轉錄因子的表現量增加，疱疹病毒的溶裂期基因啟動子的活性有受到抑制的現象。由研究結果推測，EB 病毒透過 LMP1 活化 NF κ B 訊息傳遞路徑而具有抑制 EB 病毒進入溶裂期的能力，其機制可能是透過活化 IL-32

後，抑制 PKC δ 的活性及溶裂期基因啟動子的活性，最後使 EB 病毒能夠維持在潛伏期。過去研究已知疱疹病毒具有抑制宿主細胞 MHC 的表現以及抑制細胞凋亡的能力 (Carpenter et al., 2007; Divito et al., 2006)，進而使病毒能夠躲藏在宿主細胞內，進入潛伏期而不被免疫系統發現，EB 病毒也和多數的疱疹病毒一樣，感染宿主細胞後主要處於潛伏期的狀態，躲藏在宿主體內，IL-32 則具有抑制 EB 病毒溶裂期基因表現的能力，所以對 EB 病毒來說，具有幫助其維持潛伏期並避免免疫系統的能力。

IL-32 在血管內皮細胞株或 PBMC 中具有活化 TNF α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 及 IL-10 的能力 (Hong et al., 2010; Nold-Petry et al., 2009)，且在 THP-1 單核球細胞株中 IL-32 能被 TNF α 及 IL-1 β 活化 (Heinhuis et al., 2011; Kobayashi et al., 2010)，顯示 IL-32 具有活化其他細胞激素的能力，也能夠被其它細胞激素所活化，推測此一現象能放大發炎反應以及更促進細胞激素產生的能力。但是本研究在 LCL 中發現，TNF α 及 IL-10 的 mRNA 表現量在抑制 IL-32 後沒有太大的變化，且 IL-32 不影響對細胞激素相當重要的 NF κ B 訊息傳遞路徑的能力，所以在 EB 病毒存在的細胞中，IL-32 對細胞激素的影響非常小。但是本實驗研究得知 IL-32 具有抑制 EB 病毒溶裂期的能力，且 EB 病毒溶裂期基因在過去也被報導對細胞激素的產生是重要的，例如除了 LMP1 以外，Zta 也具有活化 IL-6 表現的能力 (Jones et al., 2007)，此研究結果和本研究相符，在 LCL 中抑制 IL-32 能使 EB 病毒進入溶裂期，且進入溶裂期後 IL-6 也有大量上升的現象，故推測 IL-6 在抑制 IL-32 後表現量上升是由於 EB 病毒進入溶裂期所至，於 EB 病毒感染的 B 細胞中，IL-32 可能對細胞激素沒有直接且重要的影響，但是對 EB 病毒進入溶裂期是重要的。

過去許多研究顯示，IL-32 存在許多癌細胞中 (Kim et al., 2008; Nishida et al., 2009)，且具有抑制細胞凋亡的能力 (Kang et al., 2012)，增進癌細胞的存活，但是本研究的結果顯示 IL-32 並不會影響細胞生長，推測可能原因為，IL-32 不會影響許多和細胞生長有關的細胞激素，過去的研究皆指向 IL-32 具有活化細胞激素的能力，細胞激素因而影響細胞生長，但本研究的 LCL 細胞株本身即可透過

LMP1 活化許多細胞激素，所以 IL-32 在本實驗研究的模式中所佔的影響較小，因而無法觀察到細胞生長是否受影響。



4.4 與 IL-32 有交互作用之蛋白質

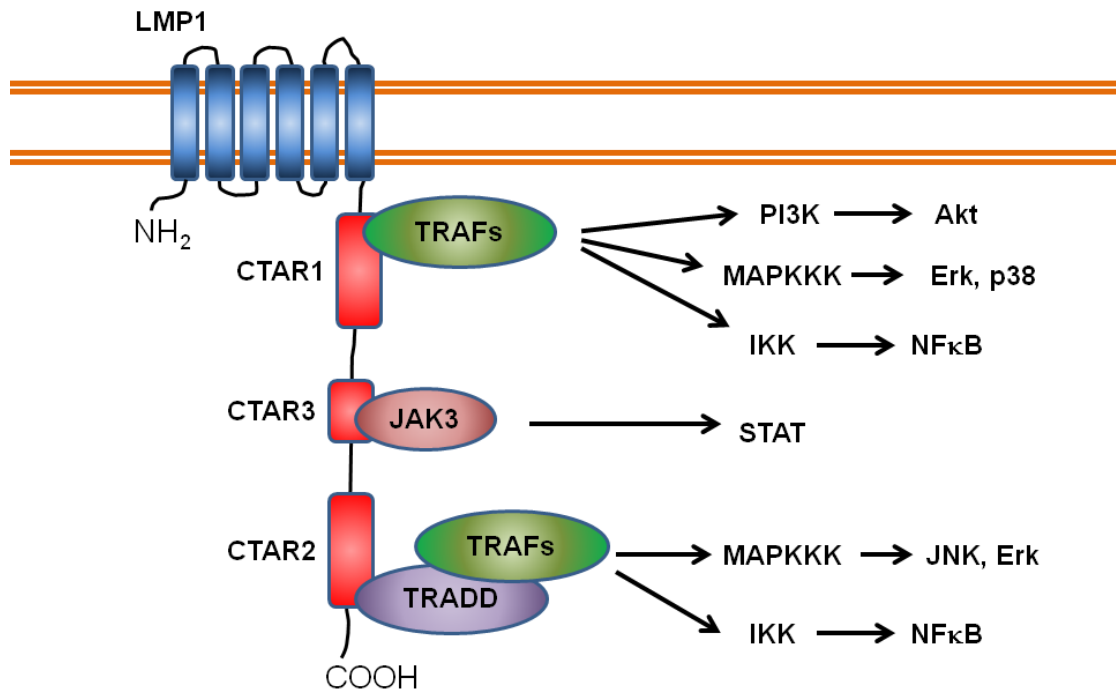
目前本研究以酵母菌雙雜合篩選法 (yeast two hybrid)，以表現 IL-32 和 Gal4 DNA 結合區域形成的重組蛋白為 bait，B 細胞的基因庫與 Gal4 轉錄活化因子的活化區域形成重組蛋白為 prey，轉型至酵母菌中，經過重複篩選確認 bait 以及 prey 的交互作用具有再現性後，整合先前實驗室劉怡學姐發現兩個基因以及本研究發現的三個基因，整合以下可能與 IL-32 有交互作用之蛋白質。

1. RMND1 : Required for Meiotic Nuclear Division 1 homolog (yeast)
2. PAICS : Phosphoribosylaminoimidazole Carboxylase,
Phosphoribosylaminoimidazole Succinocarboxamide Synthetase
3. NCL : nucleolin
4. LBR : lamin B receptor
5. TIMM44 : translocase of inner mitochondrial membrane 44 homolog (yeast)

其中 RMND1、PAICS 及 TIMM44 位在細胞質中，RMND1 及 TIMM44 過去則更細部的被認為在細胞質中的粒腺體，NCL 位在細胞核中，LBR 位在細胞核膜上，本研究先前已知 IL-32 主要位在細胞質中，所以推測 RMND1、PAICS 及 TIMM44 較可能與 IL-32 有交互作用。目前對 RMND1 的研究尚不明確，只知道和粒線體的穩定以及生成有關，PAICS 主要的功能為合成嘌呤核酸 (purine)，對於生長速度快的細胞，如癌細胞是重要的，TIMM44 主要是幫助粒線體和細胞質之間物質的交換，已有研究指出抑制 TIMM44 會造成人類胸線瘤的產生 (Bonora et al., 2006; Garcia-Diaz et al., 2012; Zalkin and Dixon, 1992)。所以 IL-32 可能透過結合 PAICS，達到抑制合成嘌呤核酸的現象，由於 LCL 等生長速度快的細胞需要更多的核苷酸才能進行染色體複製及細胞分裂，推測宿主細胞藉由 IL-32 結合 PAICS 來抵抗 EB 病毒的侵蝕，另外 RMND1 及 TIMM44 和粒線體的穩定及維持

其正常功能扮演重要角色，而過去已知粒線體可能對癌細胞的生長是重要的 (Wallace, 2012)，推測 LCL 可能活化 IL-32 並結合 RMND1，以達到穩定粒線體的功能。

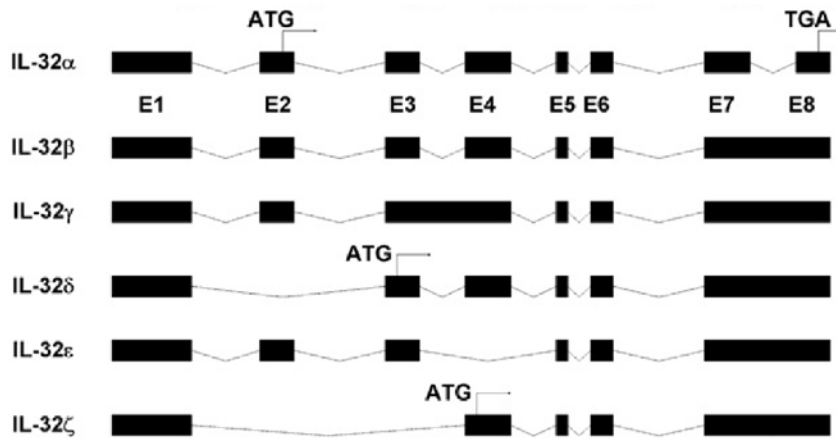




圖一、LMP1 之結構及其下游訊息傳遞路徑

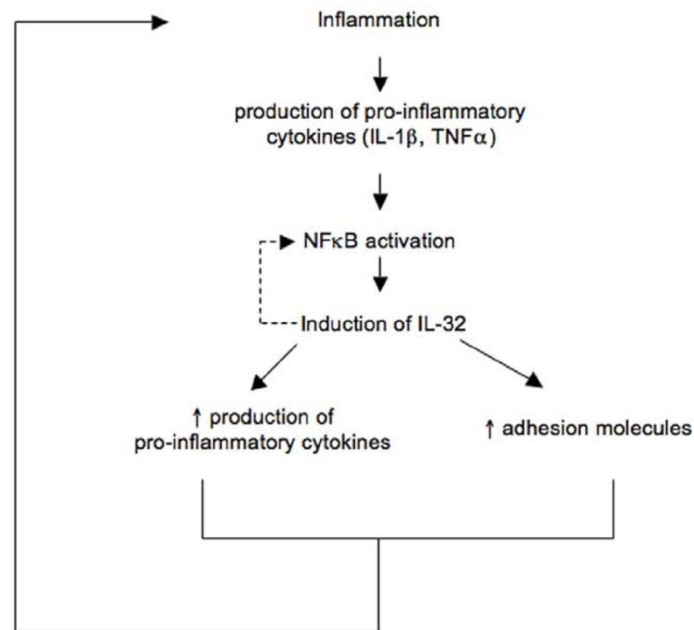
LMP1 蛋白質結構包含位於細胞質內的 N 端區域、6 段疏水性胺基酸所組成的穿膜區域及一長片段位於細胞質內的 C 端區域 (C-terminal domain)。C 端區域主要包含三個活化區域(C-terminal activating region)，縮寫分別為 CTAR1、CTAR2 及 CTAR3，主要功能為活化下游訊息傳遞路徑及誘發轉錄因子的活化。CTAR1 可活化 PI3K/Akt 訊息傳導路徑及 MAPK/p38 訊息傳導路徑，CTAR2 能活化 JNK 訊息傳導路徑，其中 CTAR1 及 CTAR2 皆可活化 NFκB 訊息傳遞路徑及 MAPK/Erk 訊息傳遞路徑，CTAR3 可透過 JAK3 活化轉錄因子 STAT。LMP1 活化不同的訊息傳導路徑，接著調控下游基因之表現，進而調控各種細胞生理功能

圖片修改自(Capello and Gaidano, 2009; Young and Rickinson, 2004)。



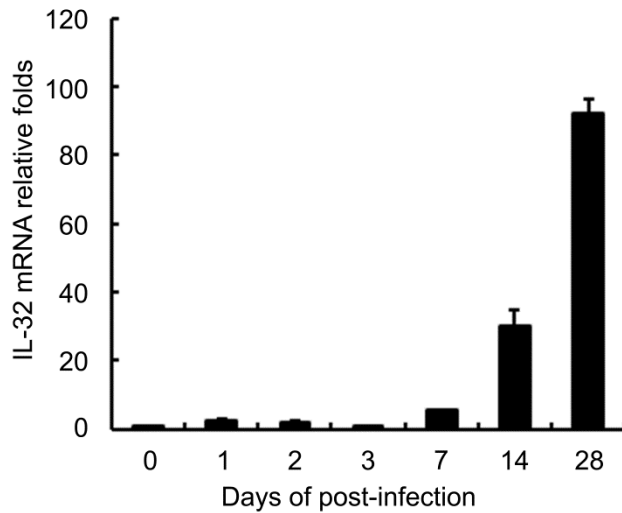
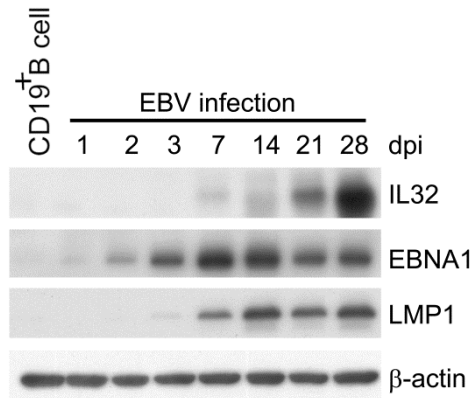
圖二、IL-32 之六種剪接變異體

IL-32 基因位於人類第 16 號染色體 p arm 13.3 位置，由 IL-32 之 DNA 所轉錄出的前 mRNA (pre-mRNA) 含有 8 個外顯子 (exon) 片段，命名為 E1~E8，可做變異性剪接 (alternative splicing) 利用不同外顯子片段轉錄出不同剪接變異體 (splice variant)，分別為 IL-32 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 及 ζ 。圖中 ATG 為轉譯起始位，TGA 為位在 E8 外顯子片段上的轉譯停止位。(Shoda et al., 2007)



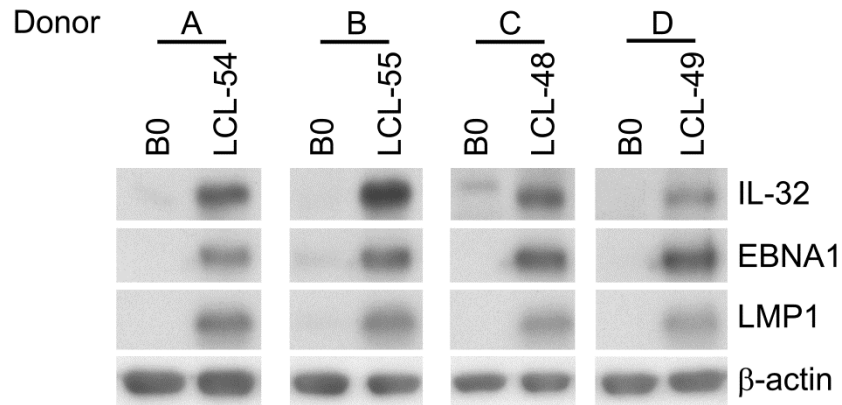
圖三、IL-32 在發炎反應的正向回饋作用

發炎相關的細胞激素，如 $\text{TNF}\alpha$ ，能誘發 IL-32 表現，推測可能的機制為活化發炎反應的 NF κ B 訊息傳導路徑。接著 IL-32 可能再透過 NF- κ B 的訊息傳遞路徑活化更多細胞激素的產生，或是誘發許多和細胞黏附有關的因子，使白血球等免疫細胞能聚集在發炎的血管內皮，進而造成發炎反應的增強，並使整個訊息傳遞路徑形成正向回饋。(Kobayashi et al., 2010)

A**B**

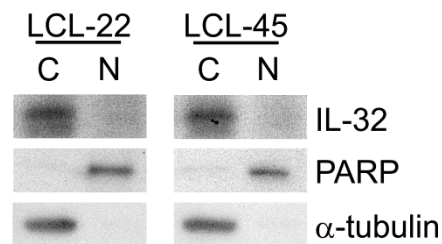
圖四、探查 IL-32 mRNA 及蛋白質在 EB 病毒感染 CD19⁺ B 細胞各不同時間點時的表現情形

自捐血中心取得白血球濃厚液以 CD19⁺ 磁珠純化出 B 細胞。取 1 ml 含 1×10^6 細胞置於 12 孔盤中，取 40 μ l B95.8 strain EB 病毒感染後收取 1、2、3、7、14、21、28 天之細胞，並收取各天數之 RNA 及蛋白質，(A) 以 RT-qPCR 分析 IL-32 mRNA 表現變化，以 β -actin 數據為內控制組，並將 primary B0 所得之相對訊號設為 1 作基準進行量化，得到 IL-32 RNA 表現讀值的相對倍數。(B) 以西方墨點法分析細胞內 IL-32 表現情況，同時偵測 p-I κ B 表現探查 NF κ B 細胞訊號的變化，偵測 EBNA1、LMP1、EA-D、Zta 及 Rta 用以探測各 EB 病毒蛋白的變化。西方墨點法由 β -actin 為內控制組。



圖五、以西方墨點法探查 EB 病毒轉型 CD19⁺ B 細胞後 28 天 IL-32 表現情況

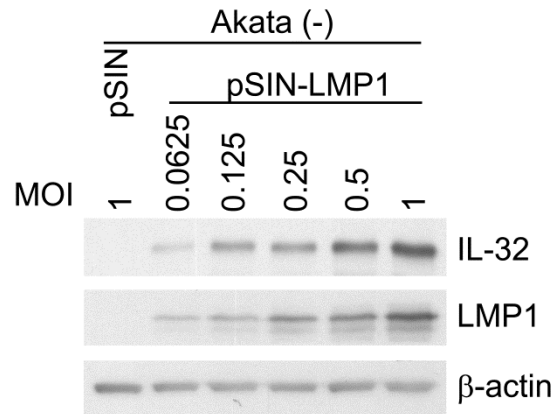
自捐血中心取得四位健康捐血者之白血球濃厚液以 CD19⁺ 磁珠純化出 B 細胞，四位捐血者分別以 A、B、C 及 D 代表之，轉型成的 LCL 依序為 LCL-54、LCL-55、LCL-48 及 LCL-49。純化出之 B 細胞取 1 ml 含 1×10^6 細胞置於 12 孔盤中，取 40 μ l B95.8 strain EB 病毒感染 28 天形成 LCL 後收取蛋白質，以西方墨點法偵測 IL-32、EBNA1、LMP1 及 β -actin 的表現情形， β -actin 為內控制組。



圖六、以西方墨點法探察 IL-32 在 LCL 中細胞核質分佈的情形

從兩株 LCL 中 (LCL-22 及 LCL-45) 收取 1×10^7 顆細胞，以細胞核質分離萃取出細胞核及細胞質的樣本，以西方墨點法偵測 PARP、 α -tubulin 及 IL-32 的表現。

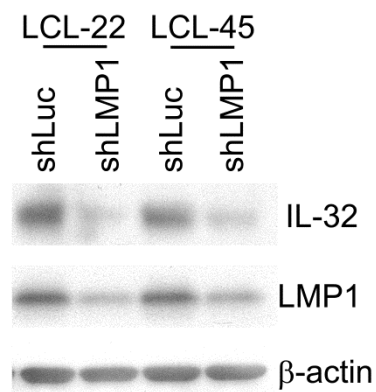
PARP 為細胞核樣本的內控制組， α -tubulin 為細胞質樣本的內控制組。



圖七、以西方墨點法探查 EB 病毒潛伏膜蛋白 LMP1 在不同表現量下對 IL-32 的影響

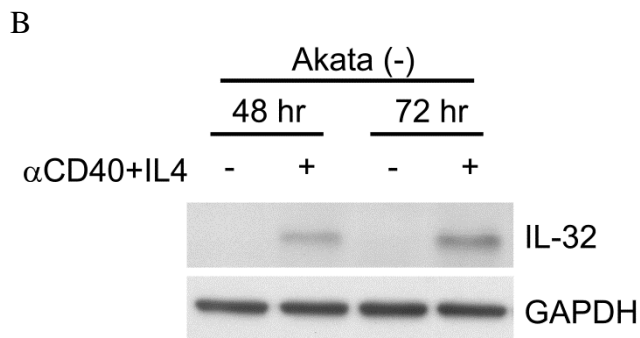
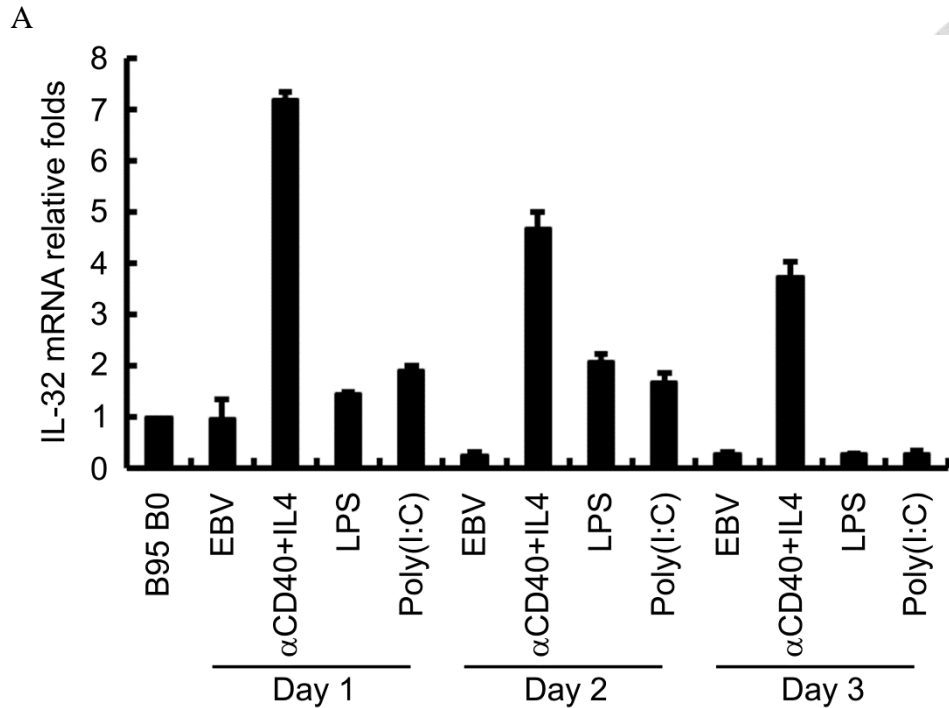
取 1 ml 含 1×10^6 顆 Akata 細胞置於六孔盤中，將包裹 pSIN 或 pSIN-LMP1 質體的慢病毒以 MOI = 0.0625、0.125、0.25、0.5 感染 Akata 細胞，轉導 EB 病毒基因 LMP1，5 天後收取蛋白質，以西方墨點法偵測 IL-32、LMP1 及 β -actin 的表現。

β -actin 為內控制組。



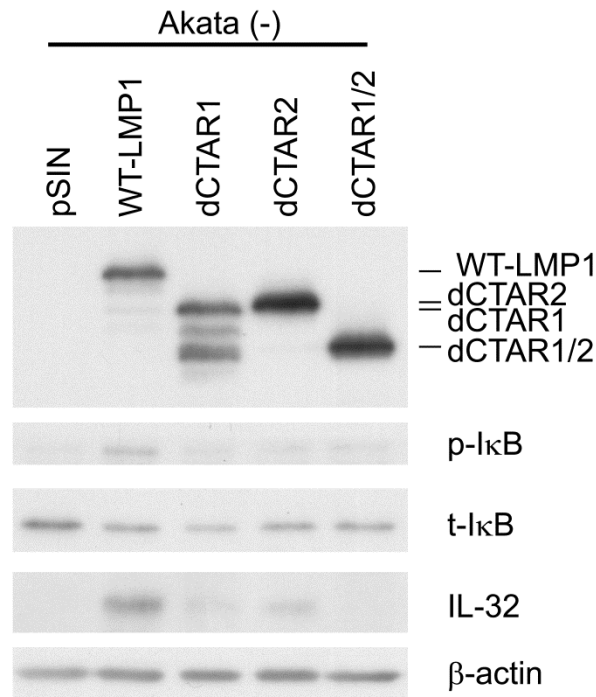
圖八、以西方墨點法探察 IL-32 在轉導 EB 病毒潛伏膜蛋白 LMP1 shRNA 的 LCL 中表現情況

從 LCL-22 及 LCL-45 中取 1 ml 含 1×10^6 顆細胞置於六孔盤中，將包裹 pLKO-shLuc 或 pLKO-shLMP1 質體的慢病毒以 MOI=4 的數量感染 LCL-22 及 LCL-45，轉導 EB 病毒 LMP1 shRNA，5 天後收取蛋白質，以西方墨點法偵測 IL-32、LMP1 及 β -actin 的表現。 β -actin 為內控制組。



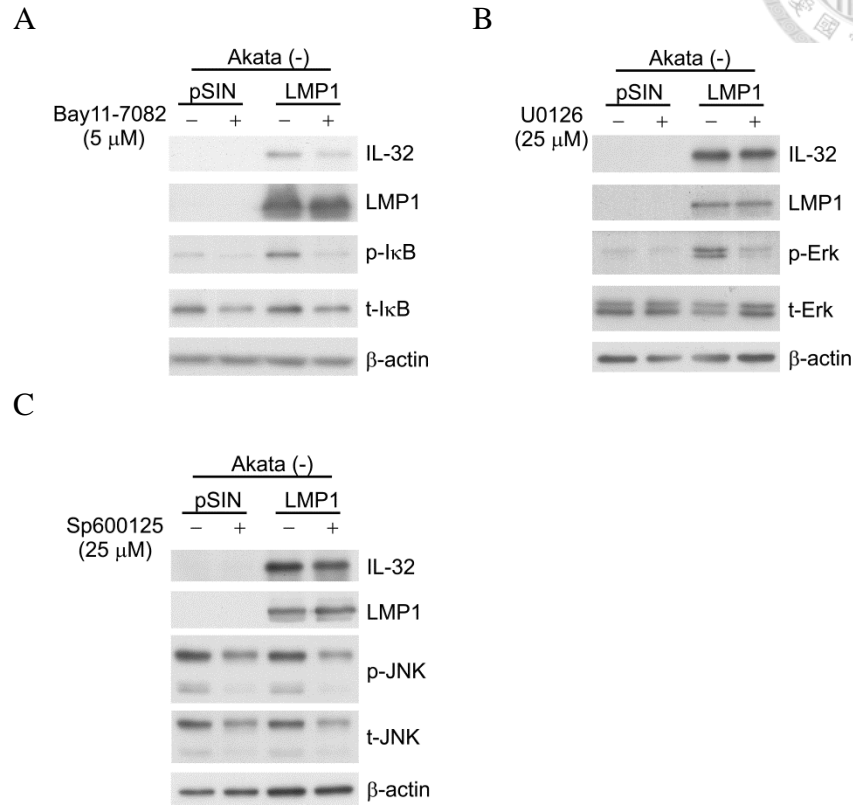
圖九、以 RT-qPCR 探查 IL-32 RNA 在 CD19⁺ B 細胞以不同的活化物刺激後的表現情況

(A)自捐血中心取得白血球濃厚液以 CD19⁺ 磁珠純化出 B 細胞,取 1 ml 含 1×10^6 細胞置於 12 孔盤中,加入不同活化物 (B95.8 strain EB 病毒: 40 μ l; α CD40 : 1 μ g/ml ; IL4 : 10 ng/ml ; LPS : 200 ng/ml ; Poly I:C : 20 μ g/ml) 並收取 1、2 及 3 天的細胞 RNA。qPCR 以 β -actin 數據為內控制組,並將 primary B0 所得之相對訊號設為 1 作基準進行量化,得到 IL-32 RNA 表現讀值的相對倍數。(B)取 1 ml 含 1×10^6 顆 Akata 細胞置於六孔盤中,並加入 α CD40 (1 μ g/ml)及 IL4 (10 ng/ml) 刺激物,未加刺激物的組別補等體積之 PBS 視為負控制組,在刺激物作用後 48 小時及 72 小時收取細胞蛋白質樣本,以西方墨點法偵測 IL-32 及 GAPDH 的表現,GAPDH 為正控制組。



圖十、以西方墨點法探查 LMP1 活化 IL-32 的主要蛋白區域

取 1 ml 含 1×10^6 顆 Akata 細胞置於六孔盤中，將包裹 pSIN、pSIN-LMP1、pSIN-LMP1dCTAR1、pSIN-LMP1dCTAR2 及 pSIN-LMP1dCTAR1/2 質體的慢病毒以 MOI=2 的數量感染 Akata 細胞，轉導 EB 病毒基因 LMP1 野生型、刪除 CTAR1、刪除 CTAR2 及刪除 CTAR1/2 到 Akata 細胞，5 天後收取蛋白質。以西方墨點法偵測 IL-32、LMP1、LMP1-dCTAR1、LMP1-dCTAR2、LMP1-dCTAR1/2、p-IκB、t-IκB 及 β-actin 的表現。β-actin 為內控制組。(西方墨點法蛋白質樣本由本實驗室周雅菁學姐提供)

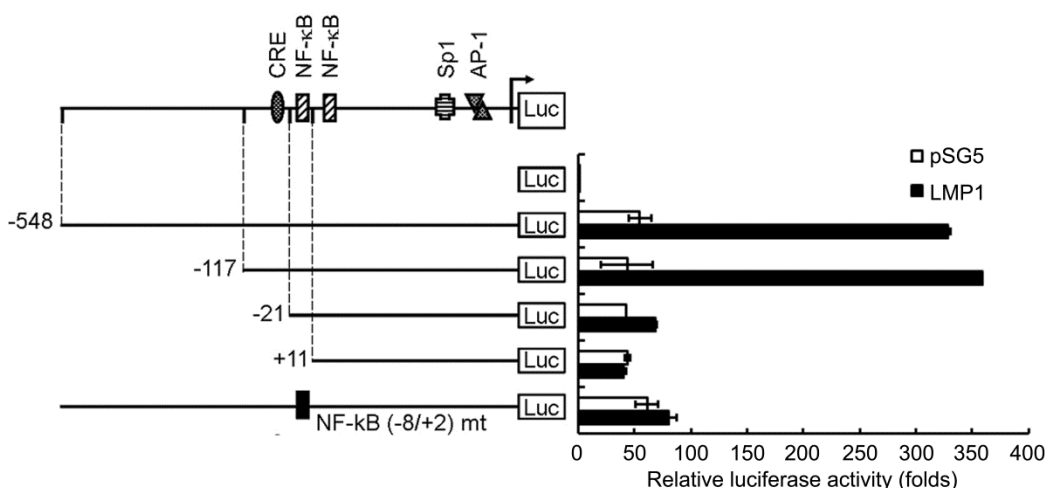
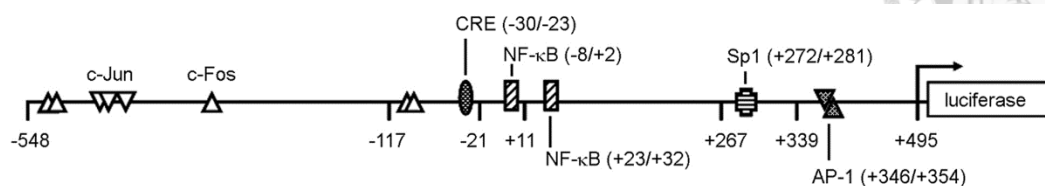


圖十一、以抑制劑探查 LMP1 活化 IL-32 的細胞訊號傳導路徑

取 1 ml 含 1×10^6 顆 Akata 細胞置於六孔盤中，將包裹 pSIN 或 pSIN-LMP1 質體的慢病毒以 MOI=1 的數量感染 Akata 細胞，轉導 EB 病毒基因 LMP1，5 天後加入(A) I κ B 抑制劑 Bay11-7082 (5 μ M)、(B) MEK 抑制劑 U0126 (25 μ M)及(C) JNK 抑制劑 Sp600125 (25 μ M)，2 天後收取蛋白質，以西方墨點法偵測 IL-32、LMP1、p-JNK、t-JNK、p-Erk、t-Erk、p-I κ B、t-I κ B 及 β -actin 的表現。 β -actin 為內控制組。

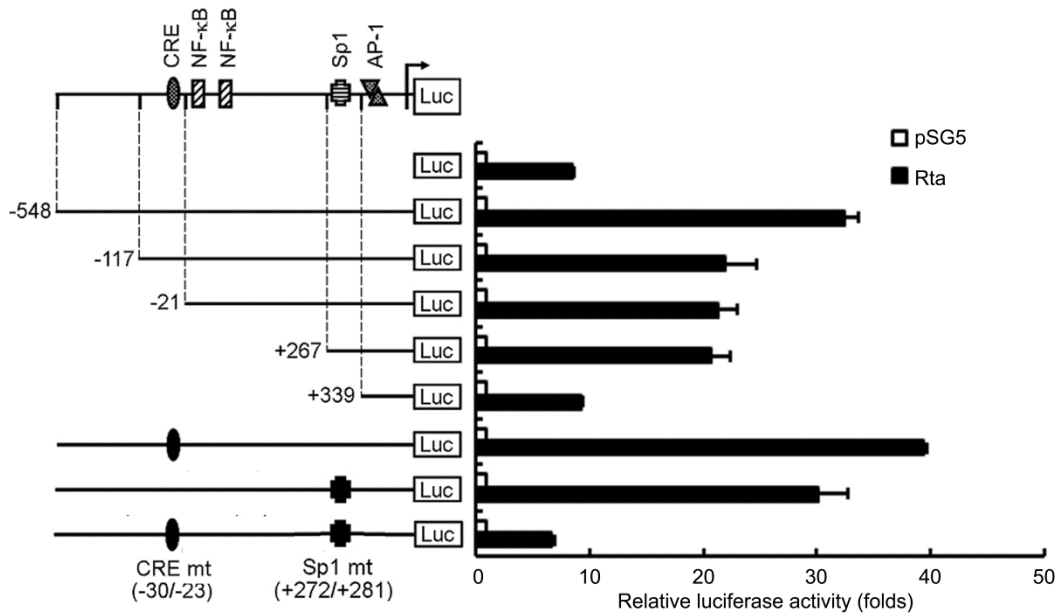


A



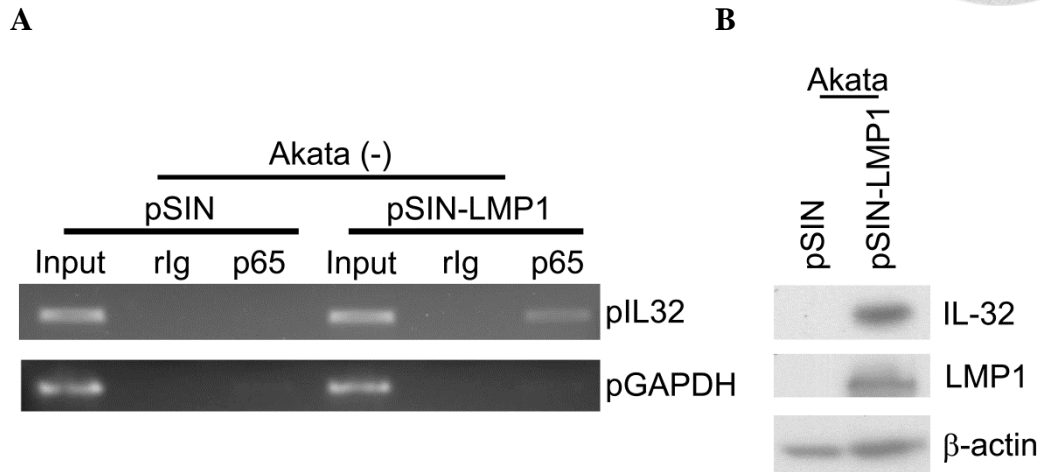
圖十二、以螢光酵素報導分析法探查 LMP1 對 IL-32 啟動子活化的影響

(A) IL-32 啟動子報導基因示意圖，以 PROMO (<http://algggen.lsi.upc.es/>) 軟體預測 IL-32 啟動子序列-548 至+495 之間可能相關的轉錄因子，其中包括 c-Jun、c-Fos、CREB、NFκB、Sp1 及 AP-1 轉錄因子的結合位。(B)取 1 ml 含 1×10^5 顆 HEK 293T 細胞置於 12 孔盤中，以 T-Pro NTRII 同時轉染 0.25 μg pSG5 或 pSG5-LMP1 質體、0.5 μg 報導質體，轉導 EB 病毒基因 LMP1，包括 IL-32 啟動子及其不同刪除片段、突變的 NF-κB 結合位及 0.05 μg pEGFP-C1 做為內控制組，以三重複進行實驗並比對誤差，轉染 3 天後收取細胞進行螢光酵素報導基因分析。各組冷光讀值以 GFP 讀值較正後，以 pGL2-basic 組別為 1 作為基準得到螢光酵素活性的相對倍數。



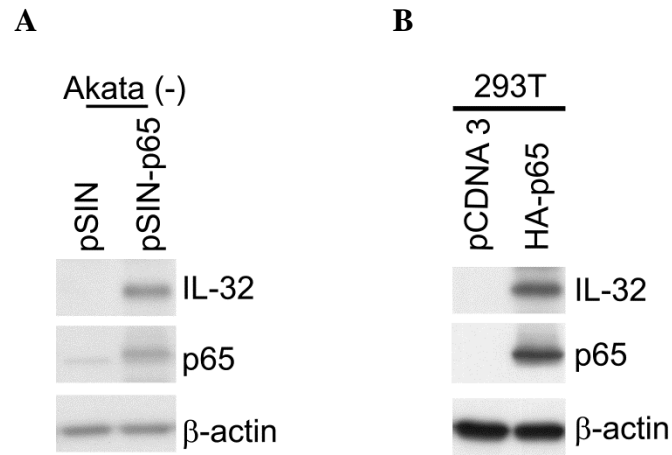
圖十三、以螢光酵素報導分析法探查 Rta 對 IL-32 啟動子活化的影響

取 1 ml 含 1×10^5 顆 HEK 293T 細胞置於 12 孔盤中，以 T-Pro NTRII 同時轉染 0.25 μg pSG5 或 pSG5-Rta 質體、0.5 μg 報導質體，轉導 EB 病毒基因 Rta，包括 IL-32 啟動子及其不同刪除片段、突變的 NF- κ B 結合位和 CRE 結合位及 0.05 μg pEGFP-C1 做為內控制組，以三重複進行實驗並比對誤差，轉染 3 天後收取細胞進行螢光酵素報導基因分析。各組冷光讀值以 GFP 讀值較正後，以 pGL2-basic 組別為 1 作為基準得到螢光酵素活性的相對倍數。



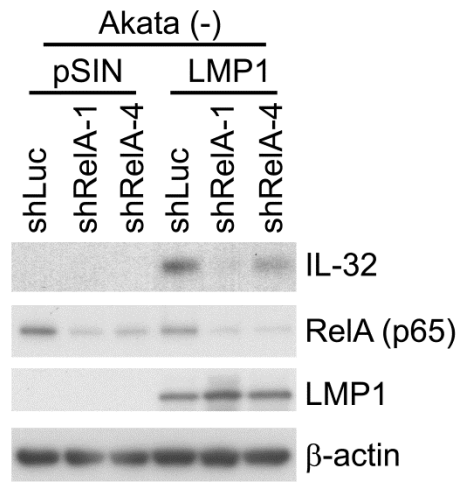
圖十四、以染色質免疫沉澱法分析 p65 轉錄因子結合在 IL-32 啟動子之情形

取 10 ml 含 5×10^6 顆 Akata 細胞置於 25T Flask 中，將包裹 pSIN 或 pSIN-LMP1 質體的慢病毒以 MOI=1 的數量感染 Akata 細胞，轉導 EB 病毒基因 LMP1，5 天後收取蛋白質並以超音波震盪打破細胞核及震斷 DNA，接著收取細胞核萃取樣本。(A) 取 100 μ g 細胞核萃取樣本以 1 μ g NF- κ B p65 抗體或 1 μ g rabbit IgG (rlg) 進行免疫沉澱，之後以 Chloroform 萃取 DNA，再以 PCR 偵測 IL-32 啟動子基因片段 -85/+98 和對照組 GAPDH 啟動子片段 -93/+64。實驗中取 0.1% 核萃取樣本為正控制組 (input control)。(B) 以西方墨點法偵測 LMP1 和 IL-32 的表現。 β -actin 為內控制組。



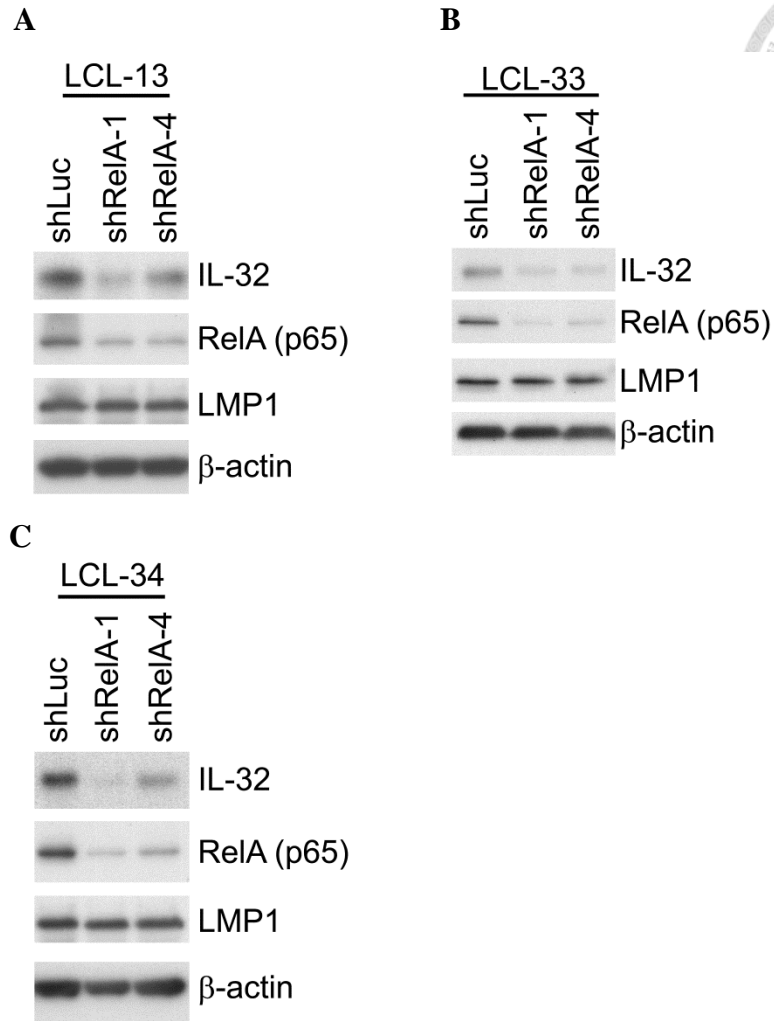
圖十五、以西方墨點法探察外送 NF- κ B p65 對 IL-32 表現之影響

(A) 取 1 ml 含 1×10^6 顆 Akata 細胞置於六孔盤中，將包裹 pSIN 或 pSIN-p65 質體的慢病毒以 MOI=1 的數量感染 Akata 細胞，轉染轉錄因子 p65，5 天後收取蛋白質，(B) 取 1 ml 含 2×10^5 顆 HEK 293T 細胞置於六孔盤中，將 0.5 μ g 的 pCDNA 3 或 pCDNA 3-HA-p65 質體以 T-Pro NTRII 進行轉染，轉導轉錄因子 p65，3 天後收取蛋白質。以西方墨點法分析 p65、IL-32 及 β -actin 的表現。 β -actin 為內控制組



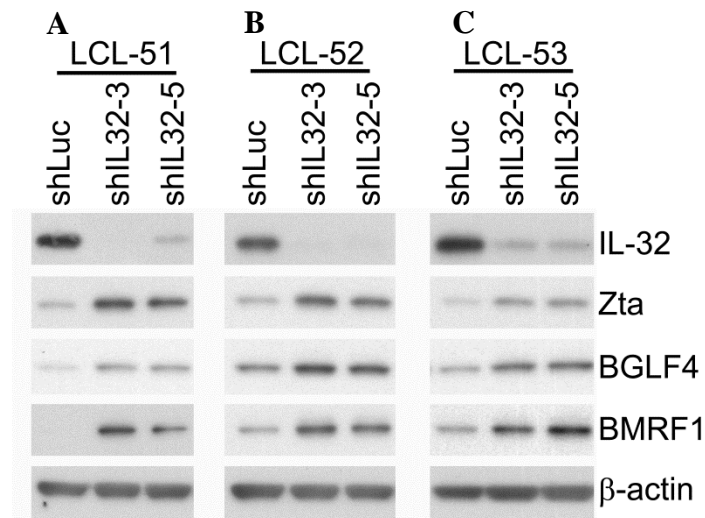
圖十六、以西方墨點法探察轉導 p65 shRNA 對 LMP1 誘導之 IL-32 的影響

取 1 ml 含 1×10^6 顆 Akata 細胞置於六孔盤中，同時感染包裹 pLKO-shLuc 或 pLKO-shRelA 質體的慢病毒(MOI=4)及包裹 pSIN 或 pSIN-LMP1 質體慢病毒感染 (MOI=1) Akata 細胞，轉染 EB 病毒基因 LMP1 及轉錄因子 p65 shRNA，5 天後收取蛋白質，以西方墨點法偵測 IL-32、LMP1、RelA (p65) 及 β -actin 的表現。 β -actin 為內控制組。



圖十七、以西方墨點法探察 IL-32 在抑制轉錄因子 p65 的 LCL 中表現影響

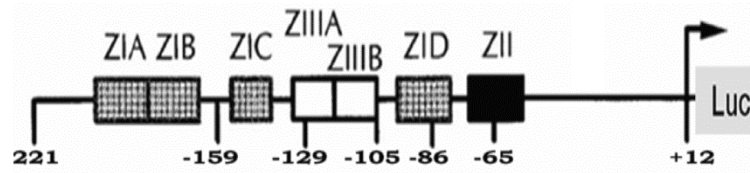
從三株 LCL (A) LCL-13 (B) LCL-33 (C) LCL-34 取 1 ml 含 1×10^6 顆細胞置於六孔盤中，將包裹 pLKO-shLuc 或 pLKO-shRelA 質體的慢病毒以 $MOI = 4$ 的數量感染 LCL-13、LCL-33 及 LCL-34，轉導轉錄因子 p65 shRNA，5 天後收取蛋白質，以西方墨點法偵測 IL-32、LMP1、RelA (p65) 及 β -actin 的表現。 β -actin 為內控制組。



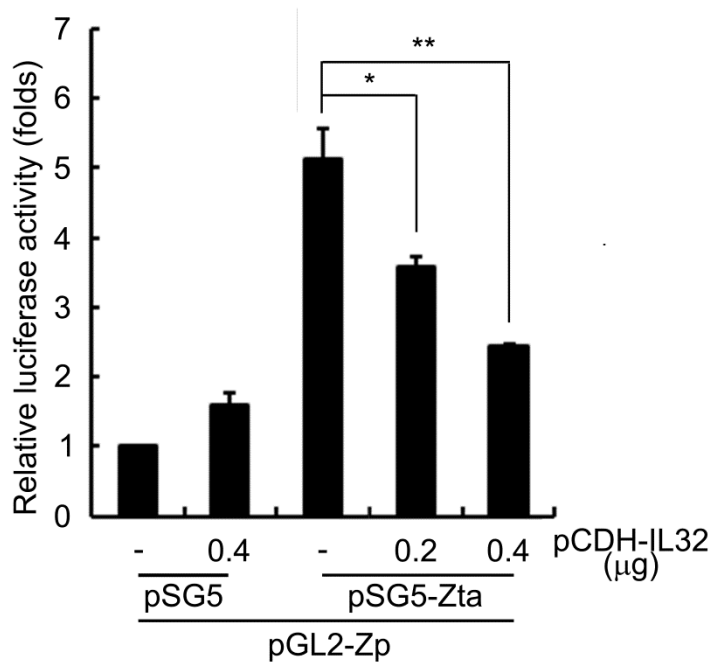
圖十八、探察抑制 IL-32 對 LCL 中 EB 病毒溶裂期基因表現之影響

從三株不同 LCL(A) LCL-51 (B) LCL-52 (C) LCL-53 取 1 ml 含 1×10^6 顆細胞置於六孔盤中，將包裹 pLKO-shLuc 或 pLKO-shIL32 質體的慢病毒以 MOI=4 的數量感染 LCL-51、LCL-52 及 LCL-53，轉染 IL-32 shRNA，5 天後收取蛋白質，以西方墨點法偵測 IL-32、Zta、BGLF4、BMRF1 及 β -actin 的表現。 β -actin 為內控制組。

A



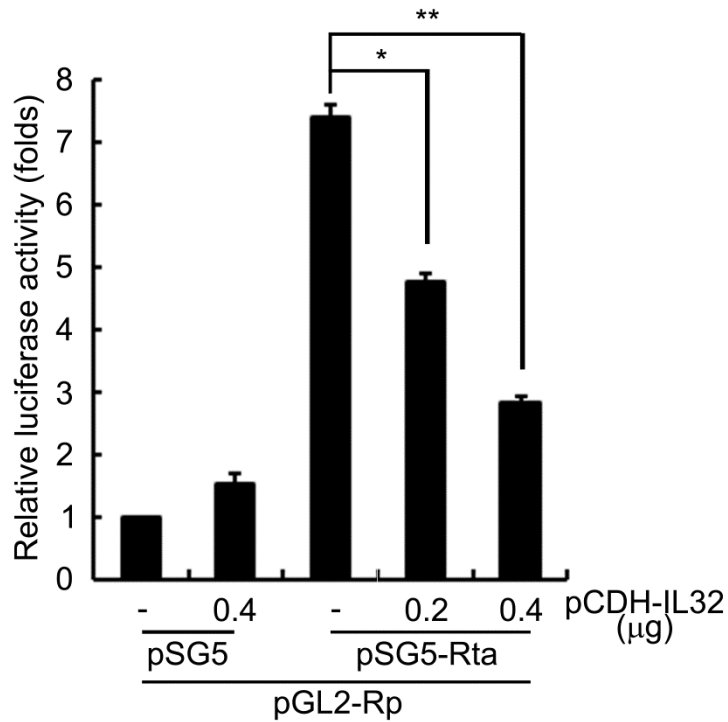
B



圖十九、以螢光酵素報導基因分析 IL-32 抑制 Zta 啟動子的情況

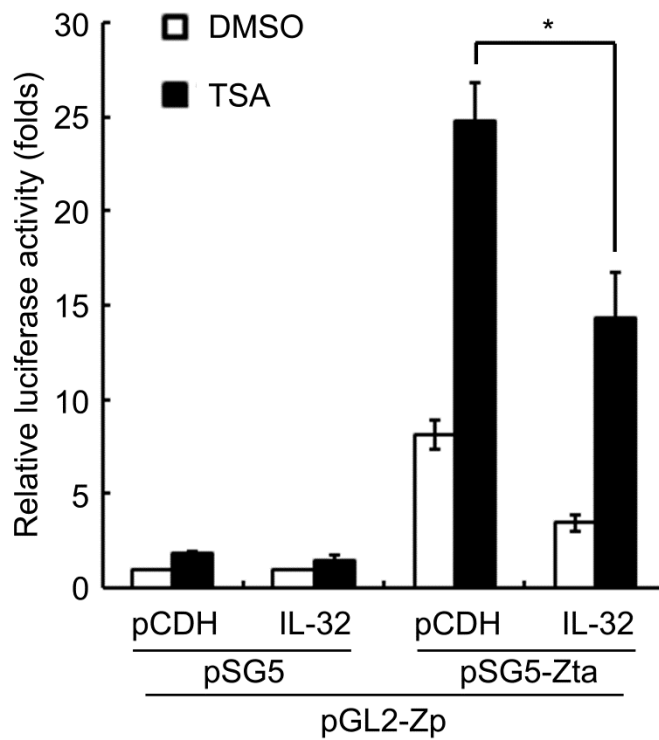
(A)Zta 啟動子片段示意圖，轉錄因子 Sp1/Sp3 及 MEF2D 可結合在 ZID 上，C/EBP 可結合在 ZII 及 ZIIIB 上，ATFs 及 CREB 可結合在 ZII 上，而 Zta 能結合在 ZIIIA 及 ZIIIB 上。Zta 啟動子片段示意圖來自本實驗室蔡佩芳學姐碩士論文圖七

(B)取 1 ml 含 1×10^5 顆 HEK 293T 細胞置於 12 孔盤中，以 T-Pro NTRII 同時轉染 0.25 μg 的 pSG5 或 pSG5-Zta 及 0.4 μg pCDH 或 0.1、0.2、0.4 μg 不同數量的 pCDH-IL32 (不足 0.4 μg 組別補 pCDH 至 0.4 μg) 和 0.5 μg 報導質體 pGL2-basic 或 pGL2-Zp，轉染 3 天後收取細胞進行螢光酵素報導基因分析。各組冷光讀值以 GFP 讀值較正後，以 pSG5-pCDH 組別為 1 作為基準得到螢光酵素活性的相對倍數。



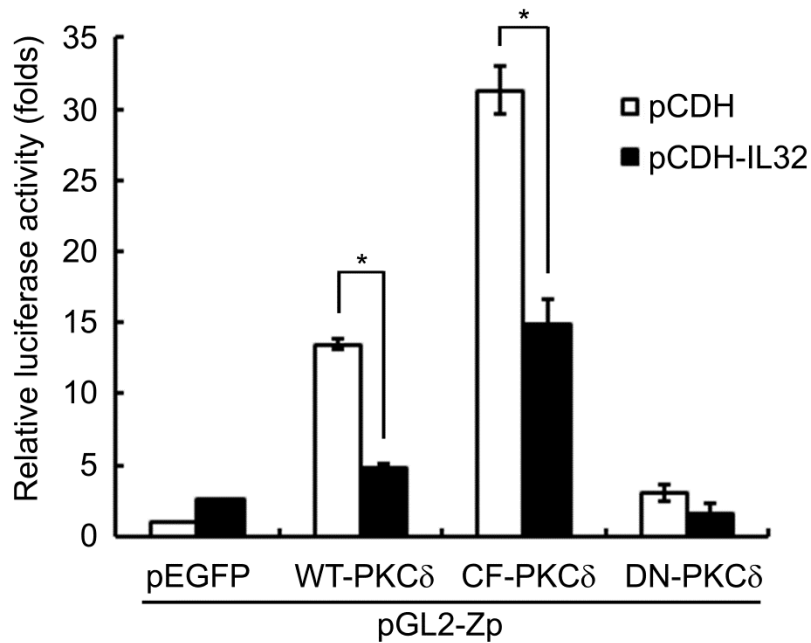
圖二十、以螢光酵素報導基因分析 IL-32 抑制 Rta 啟動子的情況

取 1 ml 含 1×10^5 顆 HEK 293T 細胞置於 12 孔盤中，以 T-Pro NTRII 同時轉染 0.25 μg 的 pSG5 或 pSG5-Rta 及 0.4 μg pCDH 或 0.1、0.2、0.4 μg 不同數量的 pCDH-IL32 (不足 0.4 μg 組別補 pCDH 至 0.4 μg) 和 0.5 μg 報導質體 pGL2-basic 或 pGL2-Rp，轉導 3 天後收取細胞進行螢光酵素報導基因分析。各組冷光讀值以 GFP 讀值較正後，以 pSG5-pCDH 組別為 1 作為基準得到螢光酵素活性的相對倍數。



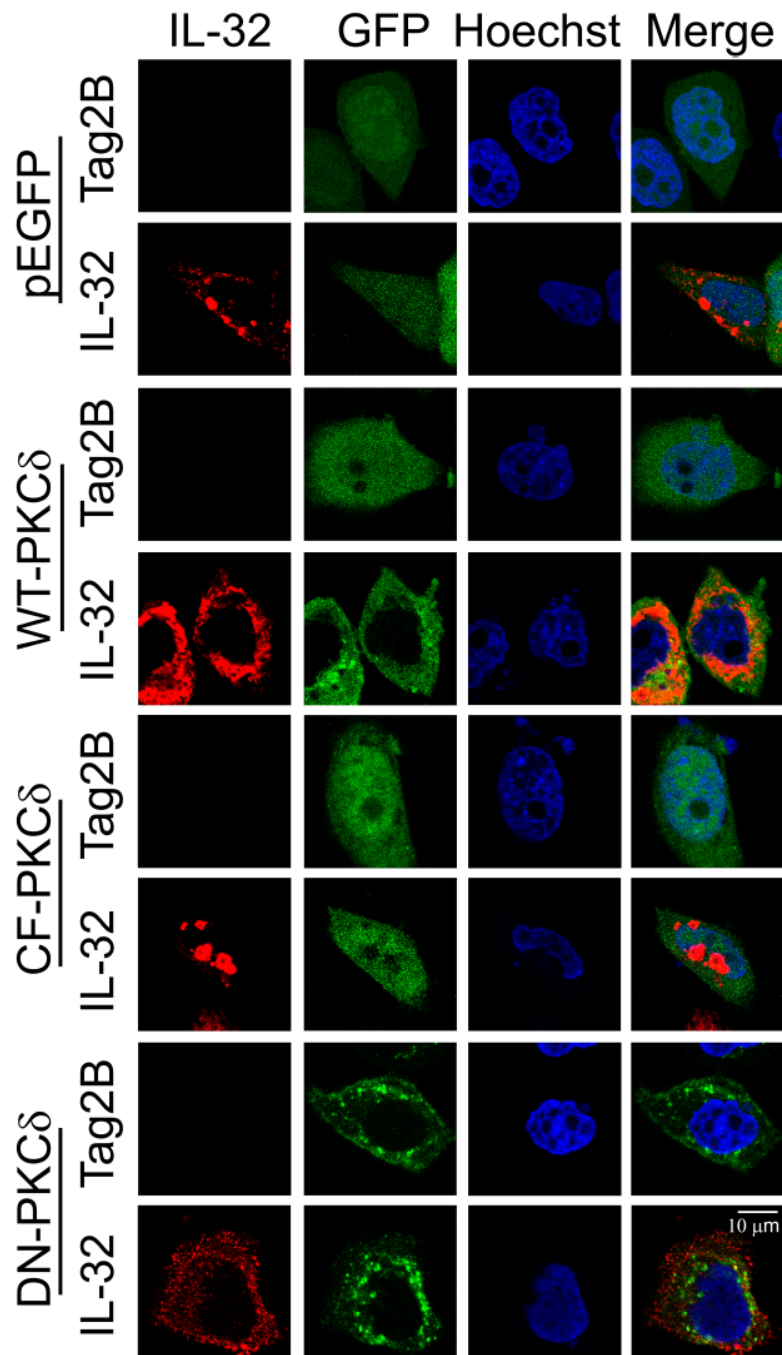
圖二十一、探察加入 Zp 活化物後 IL-32 抑制 Zp 的情況

取 1 ml 含 1×10^5 顆 HEK 293T 細胞置於 12 孔盤中，以 T-Pro NTRII 同時轉染 0.25 μg pSG5 或 pSG5-Zta 及 0.4 μg pCDH 或 pCDH-IL32 和 0.5 μg 報導質體 pGL2-Zp，隔天加入 DMSO 或 TSA (125 μM)，轉導 2 天後收取細胞進行螢光酵素報導基因分析。各組冷光讀值以 GFP 讀值較正後，以 pSG5-pCDH 組別為 1 作為基準得到螢光酵素活性的相對倍數。



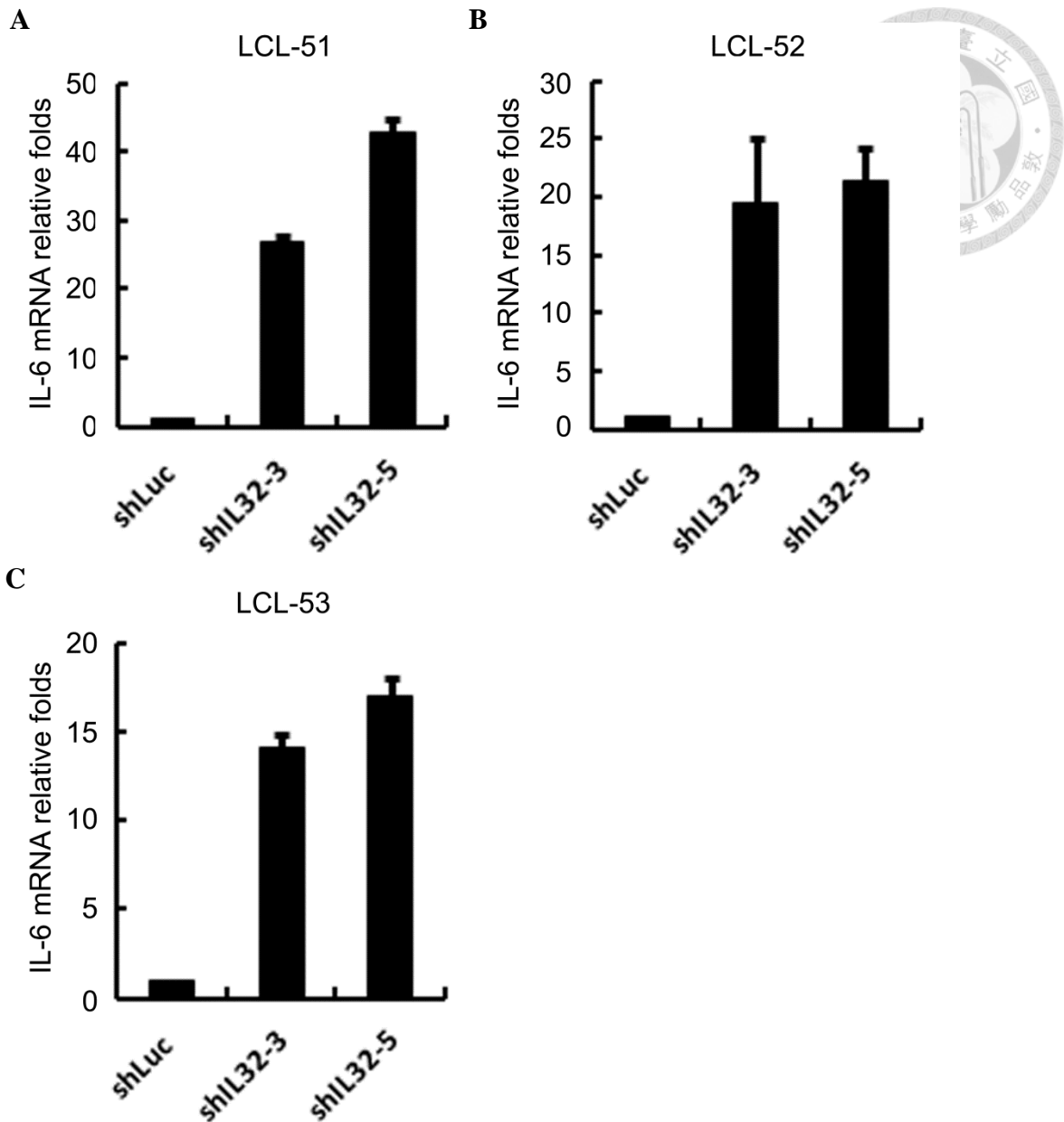
圖二十二、探察 PKC δ 活化 Zp 活性是否受 IL-32 所抑制

取 1 ml 含 1×10^5 顆 HEK 293T 細胞置於 12 孔盤中，以 T-Pro NTRII 同時轉導 0.25 μg 的 pEGFP-N1、pEGFP-WT-PKC δ 、pEGFP-CF-PKC δ 或 pEGFP-DN-PKC δ 及 0.4 μg pCDH 或 pCDH-IL32 和 0.5 μg 報導質體 pGL2-Zp，轉染 3 天後收取細胞進行螢光酵素報導基因分析。各組冷光讀值以 GFP 讀值較正後，以 pGL2-basic 組別為 1 作為基準得到螢光酵素活性的相對倍數。



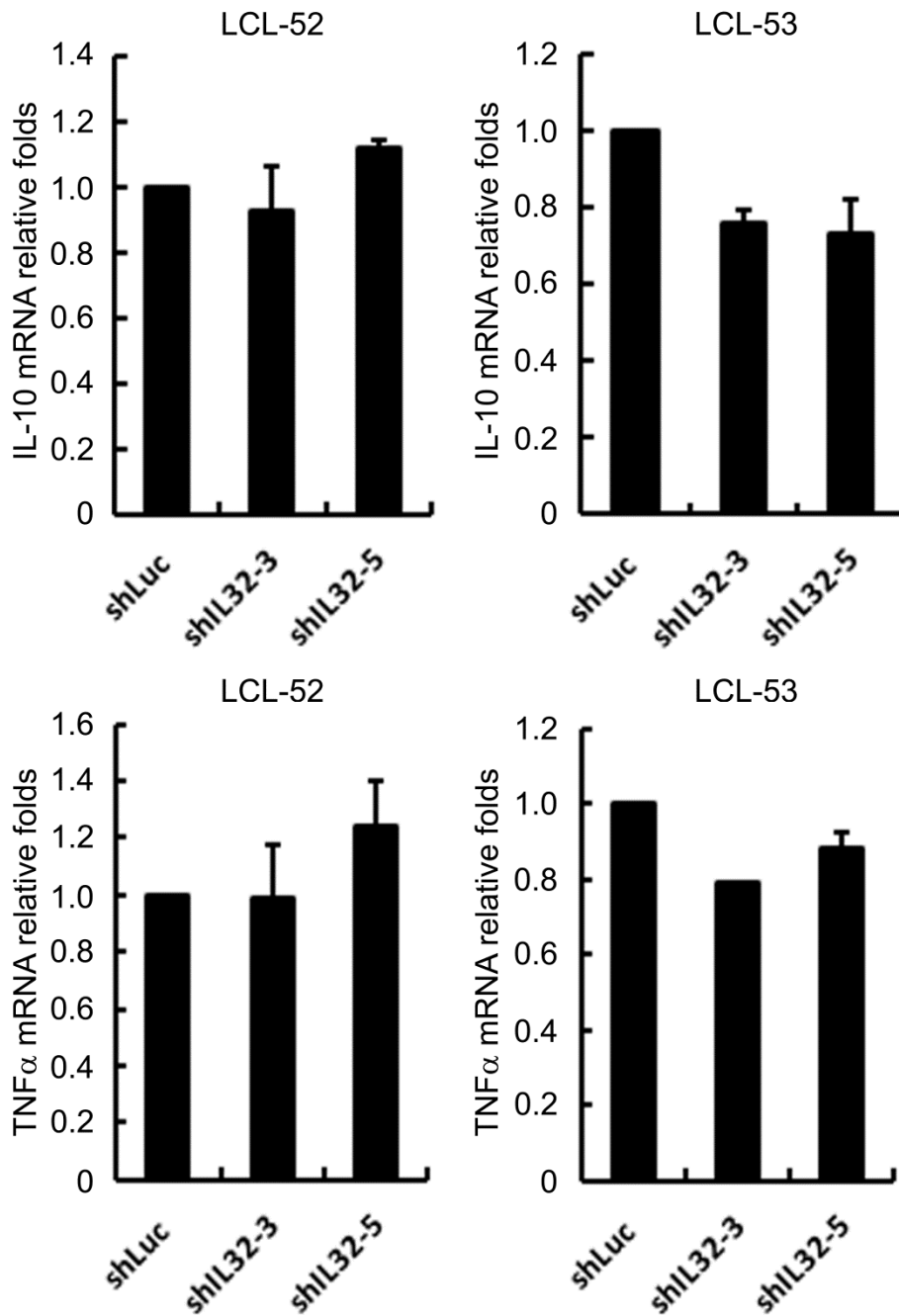
圖二十三、以免疫螢光染色探查 IL-32 影響 PKCδ 在細胞中分布的情形

取 1 ml 含 1×10^5 顆 HeLa 細胞置於 6 孔盤中，以 T-Pro NTRII 同時轉導 1 μ g 的 pEGFP-N1、pEGFP-WT-PKC δ 、pEGFP-CF-PKC δ 或 pEGFP-DN-PKC δ 及 1 μ g Tag2B 或 Tag2B-IL32，轉染 3 天後收取細胞進行免疫螢光染色分析。共軛焦顯微鏡以 63x 油鏡觀察，IL-32 以紅色 Rhodamine 染色，PKC δ 及其各個刪除片段本身則帶有綠色 GFP，細胞核以藍色 Hoechst 進行染色，Merge 為將紅、綠及藍色重疊後之結果。圖中最右下角的白線標示 10 μ m 長度。



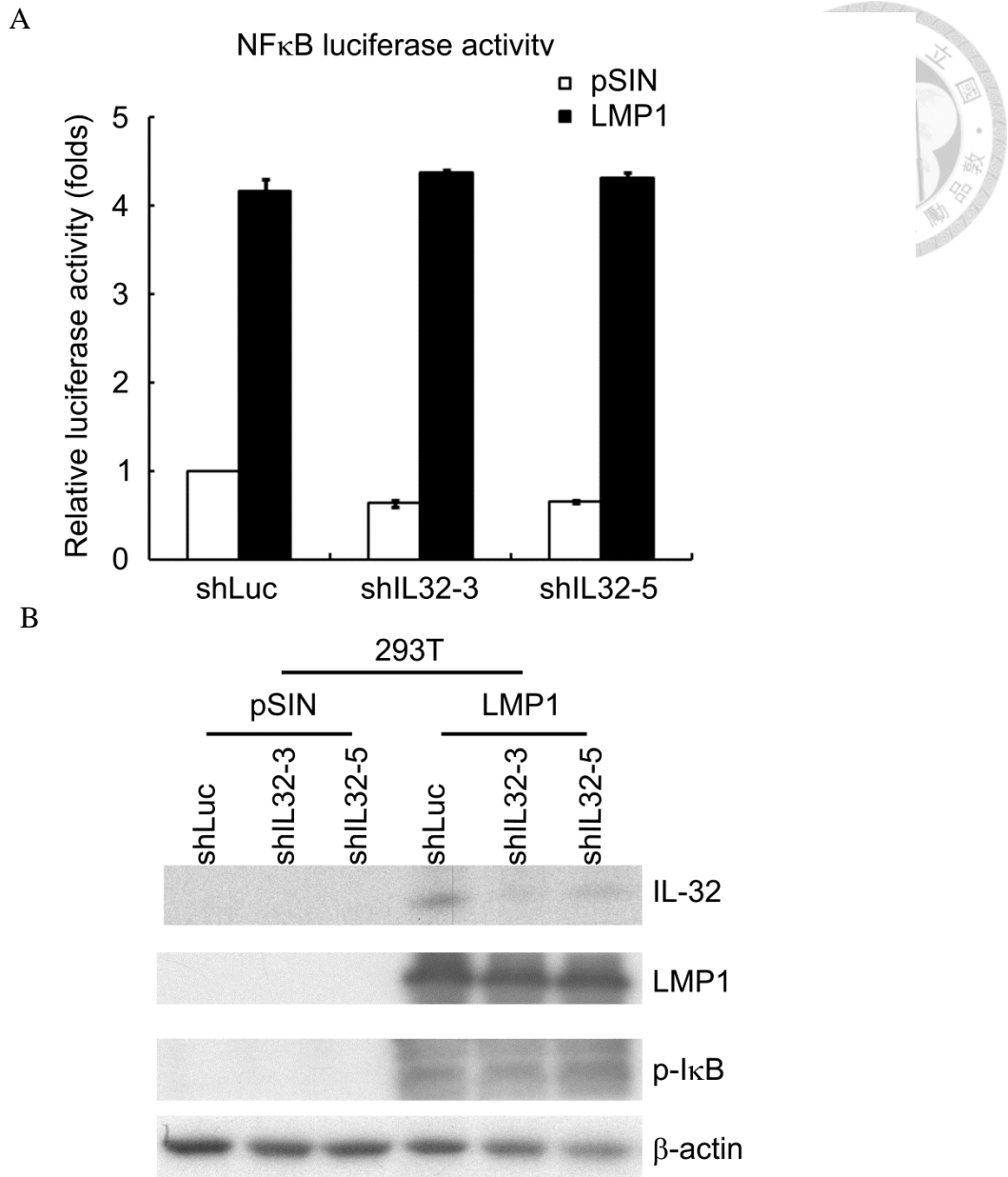
圖二十四、探察抑制 IL-32 對於 LCL 中細胞激素 IL-6 表現的影響

從三株不同 LCL 中(A) LCL-51 (B) LCL-52 (C) LCL-53 取 1 ml 含 1×10^6 顆細胞置於六孔盤中，將包裹 pLKO-shLuc 或 pLKO-shIL32 質體的慢病毒以 MOI=4 的數量感染 LCL-51、LCL-52 及 LCL-53，轉導 IL-32 shRNA，5 天後收取 RNA，以 RT-qPCR 偵測 IL-6 及 GAPDH 的 RNA 表現。qPCR 以 GAPDH 數據為內控制組，並將 shLuc 組所得之相對訊號設為 1 作基準進行量化，得到各組 IL-6 RNA 表現讀值的相對倍數。



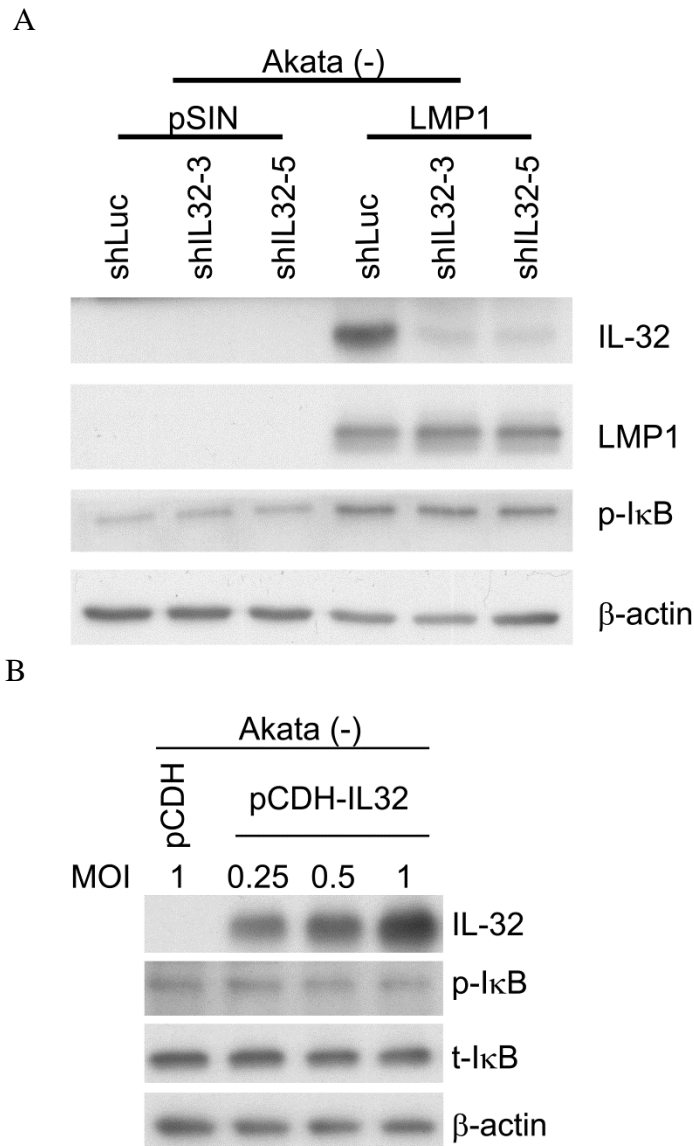
圖二十五、探察抑制 IL-32 對於 LCL 中細胞激素 IL-10 及 TNF α 表現的影響

從兩株不同 LCL 中(A) LCL-52 (B) LCL-53 取 1 ml 含 1×10^6 顆細胞置於六孔盤中，將包裹 pLKO-shLuc 或 pLKO-shIL32 質體的慢病毒以 MOI=4 的數量感染 LCL-52 及 LCL-53，轉導 IL-32 shRNA，5 天後收取 RNA，以 RT-qPCR 偵測 IL-8、IL-10 及 GAPDH 的 RNA 表現。qPCR 以 GAPDH 數據為內控制組，並將 shLuc 組所得之相對訊號設為 1 作基準進行量化，得到各組 IL-10 及 TNF α 之 RNA 表現讀值的相對倍數。



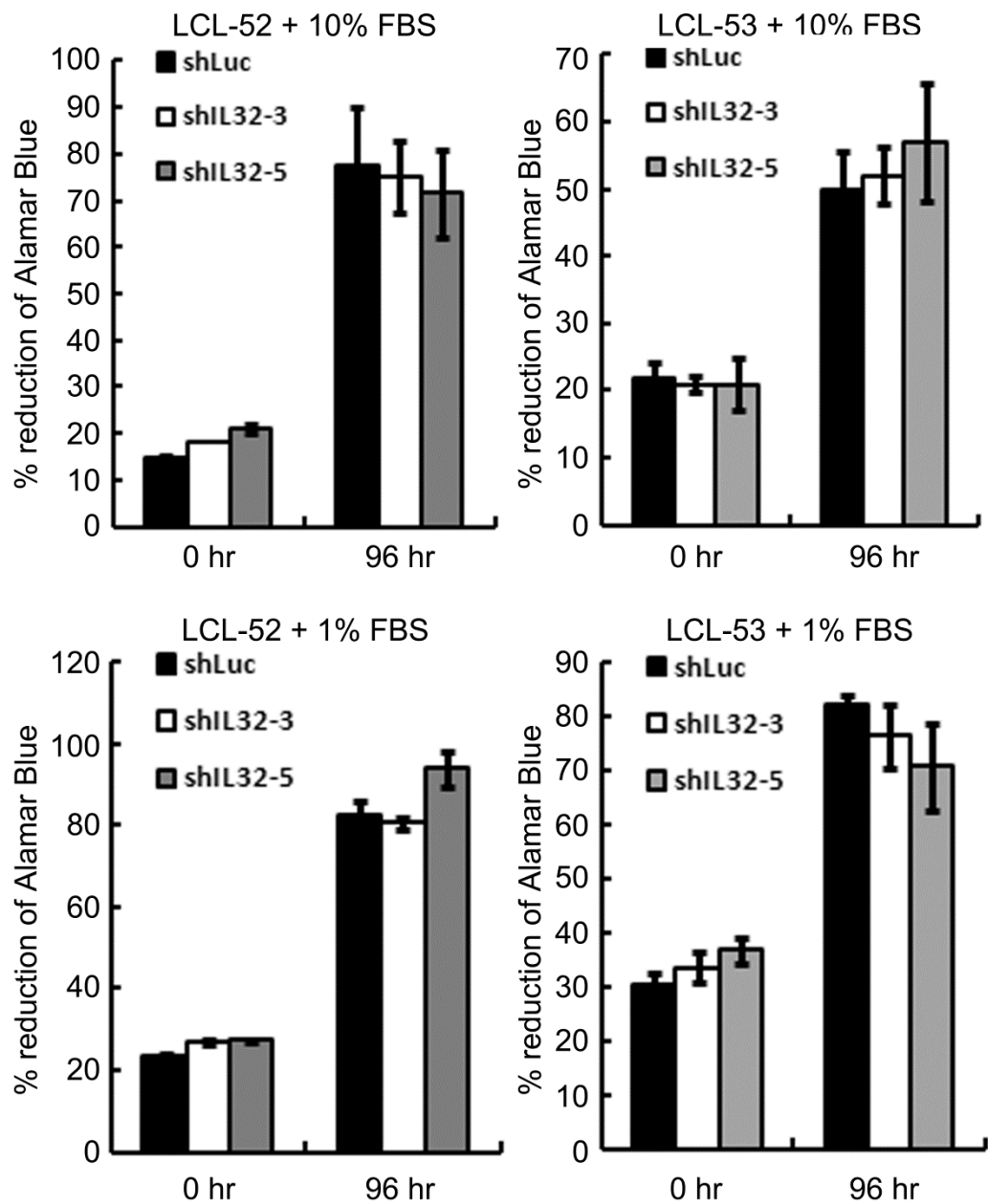
圖二十六、以西方墨點法探察抑制 IL-32 後對 LMP1 誘導之 NFκB 訊息傳遞路徑的影響

(A) 取 1 ml 含 1×10^5 顆 HEK 293T 細胞置於 12 孔盤中，以 NTRII 轉染 0.25 μg pLKO-shLuc 或 pLKO-shIL32 和 0.5 μg 報導質體 NFκB downstream element-Luc，並同時將包裹 pSIN 或 pSIN-LMP1 質體的慢病毒以 MOI=1 的數量感染，3 天後收取細胞進行螢光酵素報導基因分析及西方墨點法。各組冷光讀值以 GFP 讀值較正後，以 pLKO-shLuc 組別為 1 作為基準得到螢光酵素活性的相對倍數。(B) 以西方墨點法偵測 IL-32、p-IκB、LMP1 及 β-actin 的表現。β-actin 為內控制組。



圖二十七、以西方墨點法探察 IL-32 影響細胞 NFκB 訊息傳遞路徑的情形

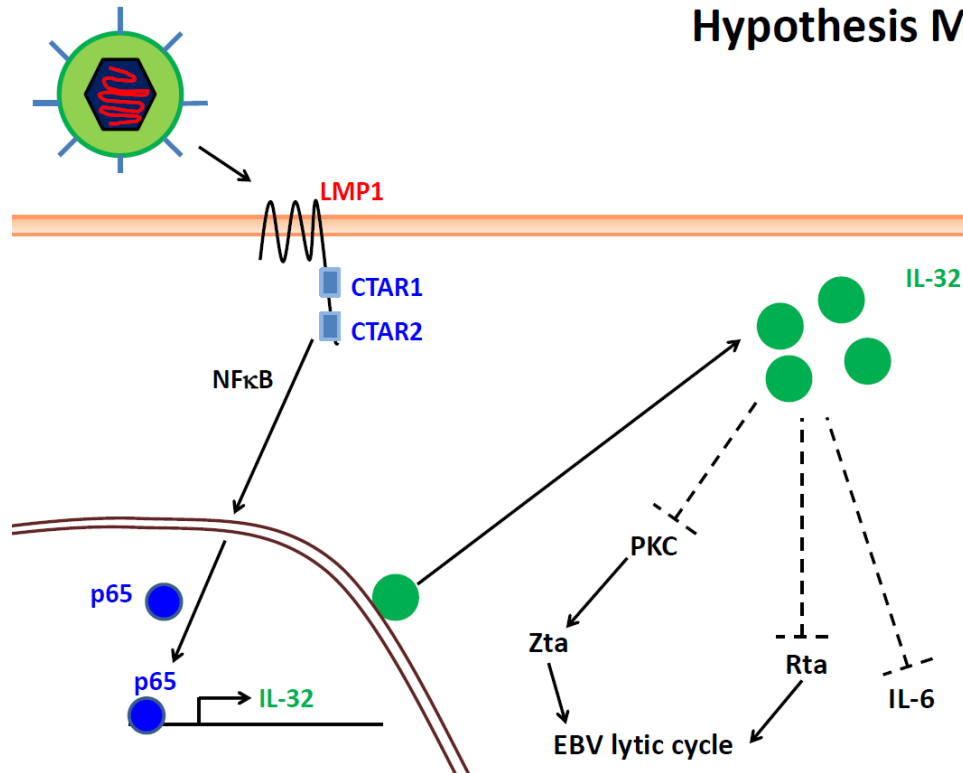
(A) 取 1 ml 含 1×10^6 顆 Akata 細胞置於六孔盤中，同時感染包裹 pLKO-shLuc 或 pLKO-shIL32 質體的慢病毒(MOI=4)及包裹 pSIN 或 pSIN-LMP1 質體慢病毒感染 (MOI=1) Akata 細胞，轉導 EB 病毒基因 LMP1，5 天後收取蛋白質，(B) 取 1 ml 含 1×10^6 顆 Akata 細胞置於六孔盤中，將包裹 pCDH (MOI=1) 或 pCDH-IL32 (MOI=0.1、0.2、0.4) 質體的慢病毒感染 Akata 細胞，轉導 IL-32 基因，5 天後收取蛋白質。以西方墨點法偵測 IL-32、LMP1、p-IκB、t-IκB 及 β-actin 的表現。β-actin 為內控制組。



圖二十八、以 Alamar blue 試驗探察 IL-32 對 LCL 的生長之影響

從 LCL-52 及 LCL-53 中取 1 ml 含 1×10^6 顆細胞置於六孔盤中，將包裹 pLKO-shLuc 或 pLKO-shIL32 質體的慢病毒以 MOI=4 的數量感染，5 天後收取細胞並回溶 1×10^4 細胞於 100 μ l 的 (A) 10% FBS 細胞培植液或 (B) 1% FBS 細胞培植液，濃度為 1×10^5 /ml，再重新放置於 96 孔盤中。Alamar blue 試驗於培養 0 及 96 小時加入 10 μ l Alamar blue 染劑，置於 37°C 培養箱 2 小時後偵測 OD570 和 OD600 讀值，並計算各組細胞氧化還原之程度。

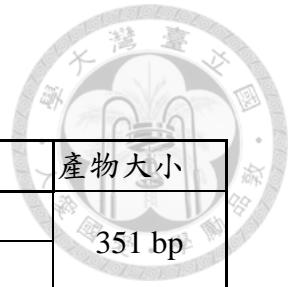
Hypothesis Model



圖二十九、假說

在 B 細胞中，EB 病毒可以利用 LMP1 的 CTAR1 及 CTAR2 兩段區域活化下游 NFκB 訊息傳遞路徑，使 p65 轉錄因子結合在 IL-32 啟動子上的 NFκB 結合位，誘發 IL-32 的表現。表現後的 IL-32 雖然無法活化細胞訊息傳遞路徑，也無法對細胞的增生有影響，但是能透過抑制 PKC 進而抑制 Zta 的表現，也可以抑制 Rta 的表現，使 EB 病毒無法進入溶裂期。

表一、實驗中所使用之引子及探針列表



PCR 所使用之引子			
目標基因	引子方向	引子序列 5'→3'	產物大小
IL-6	Forward	AAAGAGGCACTGGCAGAAAA	351 bp
	Reverse	AAAGCTGCGCAGAATGAGAT	
使用條件	94°C 5min→(94°C 30sec→55°C 30sec→72°C 1min)×34 cycle→72°C 7min→4°C pause		
IL-8	Forward	GTGCAGTTTTGCCAAGGAGT	357 bp
	Reverse	TTGTATTGCATCTGGCAACC	
使用條件	94°C 5min→(94°C 30sec→55°C 30sec→72°C 1min)×34 cycle→72°C 7min→4°C pause		
IL-10	Forward	TTACCTGGAGGAGGTGATGC	351 bp
	Reverse	TGGGGGTTGAGGTATCAGAG	
使用條件	94°C 5min→(94°C 30sec→55°C 30sec→72°C 1min)×36 cycle→72°C 7min→4°C pause		
TNF α	Forward	AGCCCATGTTGTAGCAAACC	360 bp
	Reverse	CTGAGTCGGTCACCCTTCTC	
使用條件	94°C 5min→(94°C 30sec→60°C 30sec→72°C 1min)×28 cycle→72°C 7min→4°C pause		

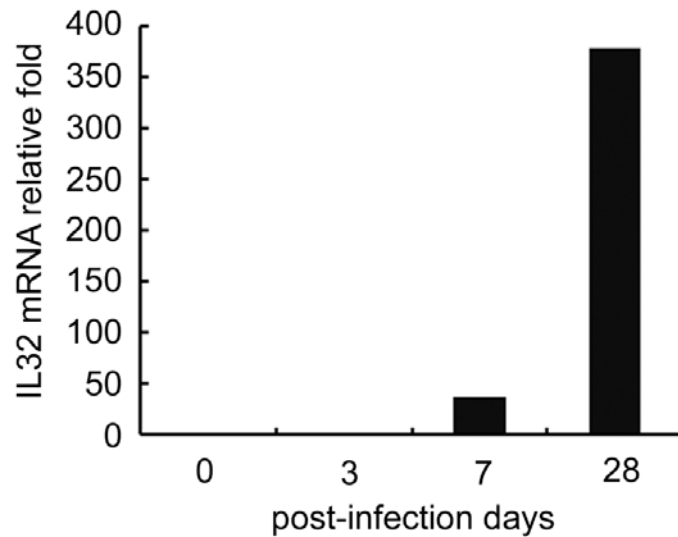
Q-PCR 所使用之引子		
目標基因	引子方向	引子序列 5'→3'
IL-32	Forward	TCAAAGAGGGCTACCTGGAG
	Reverse	TTTCAAGTAGAGGAGTGAGCTCTG
Probe #	Roche University Probe Library, Probe #68	
GAPDH	Forward	GAGTCCACTGGCGTCTTCAC
	Reverse	GTTACACCCATGACGAACA
Probe #	Roche University Probe Library, Probe #45	
IL-6	Forward	GATGAGTACAAAAGTCCTGATCCA
	Reverse	CTGCAGCCACTGGTTCTGT
Probe #	Roche University Probe Library, Probe #40	
TNF α	Forward	CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT
	Reverse	GCCAGAGGGCTGATTAGAGA
Probe #	Roche University Probe Library, Probe #40	
IL-8	Applied Biosystems Taqman MGB Probe No. 4327042	
IL-10	Applied Biosystems Taqman MGB Probe No. 4327043	

構築質體所使用之引子		
引子名稱	引子序列 5'→3'	構築之質體
BamHI- p65-F	CGCGGATCCGCGATGGACGAACTGTTCCCCT (底線為 BamHI 切位)	Tag2B-p65
XhoI- p65-R	CCCTCGAGGGTTAGGAGCTGATCTGACTCA (底線為 XhoI 切位)	
MluI- Tag2B-F	CGACGCGTCGGCCACCATGGATTACAAG (底線為 MluI 切位)	pSIN-p65
NotI- Tag2B-R	AAGGAAAAAAGCGGCCGCACACTTACCTGGTACCTT (底線為 NotI 切位)	
EcoRI- IL32-F	CCGGAATTCGGTGCTTCCCGAAGGTCCTC (底線為 EcoRI 切位)	Tag2B-IL32
XhoI- IL32-R	CCGCTCGAGCGGTCATTTTGAGGATTGGGG (底線為 XhoI 切位)	

表二、實驗中使用之抗體列表

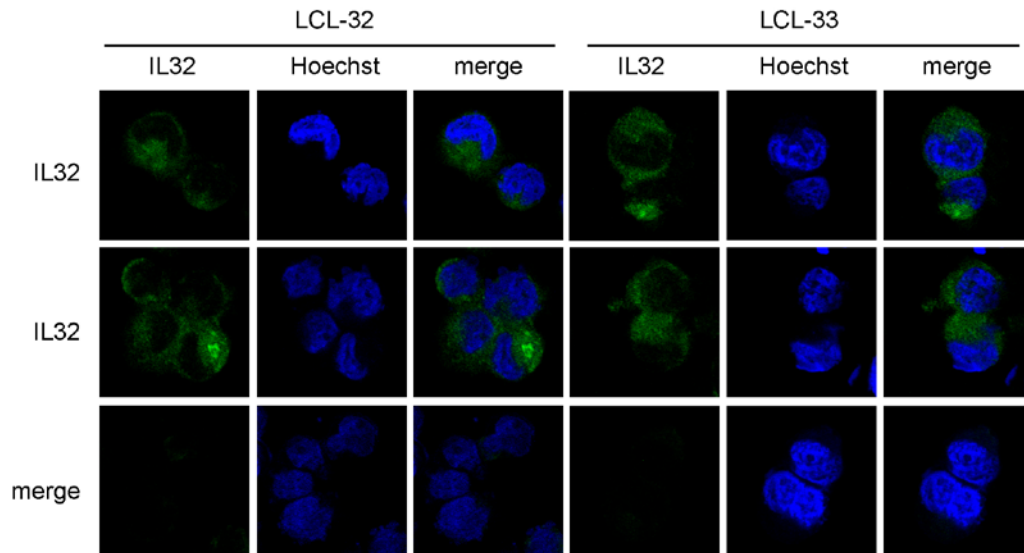
偵測蛋白	抗體名稱	來源動物	使用比例	廠牌/註
a-tubulin	Anti-alpha tubulin antibody	Mouse	WB (1:10000)	
b-actin	Anti-beta actin antibody	Mouse	WB (1:8000)	AC-15 Sigma
EBV EA-D	Anti-EA-D antibody (88)	Mouse	WB (1:20)	Clone 88
EBV EBNA1	Anti-EBNA1 antibody	Human	WB (1:50)	
EBV LMP1	Anti-LMP1 antibody (S12)	Mouse	WB (1:200)	(S12)
EBV Rta	Anti-Rta antibody (467)	Mouse	WB (1:25)	Clone 467
EBV Rta	Anti-Rta antibody (Argene)	Mouse	WB (1:500)	Clone 8C12 (Argene)
EBV Zta	Anti-Zta antibody (1B4)	Mouse	WB (1:50)	Clone 1B4
Flag	Anti-Flag antibody (M2)	Mouse	WB (1:5000) IP (1 µg / 500 µg sample)	M2 Sigma
GFP	Anti-GFP antibody	Mouse	WB (1:1000) IP (1 µg / 500 µg sample)	GeneTex
IL-32 $\alpha\beta\rho$ δ	Anti-IL32 antibody	Mouse	WB (1:200) IFA (1:10)	Biolegend (KU32-52)

RelA (p65)	Anti-p65 antibody	Rabbit	WB (1:1000) ChIP (1 μ g)	Santa Cruz
GAPDH	Anti-GAPDH antibody	Mouse	WB (1:10000)	Biodesign
p-Akt	Anti-p-Akt antibody	Rabbit	WB (1:500)	Cell Signaling
p-Erk	Anti-p-Erk antibody	Mouse	WB (1:250)	Cell Signaling
p-I κ B	Anti-p-I κ B antibody	Mouse	WB (1:500)	Cell Signaling
p-JNK	Anti-p-JNK antibody	Rabbit	WB (1:500)	Cell Signaling
Akt	Anti-Akt antibody	Rabbit	WB (1:200)	Santa Cruz
Erk	Anti-Erk antibody	Rabbit	WB (1:500)	Santa Cruz
I κ B	Anti-I κ B antibody	Rabbit	WB (1:500)	Santa Cruz
JNK	Anti-JNK antibody	Mouse	WB (1:200)	Santa Cruz



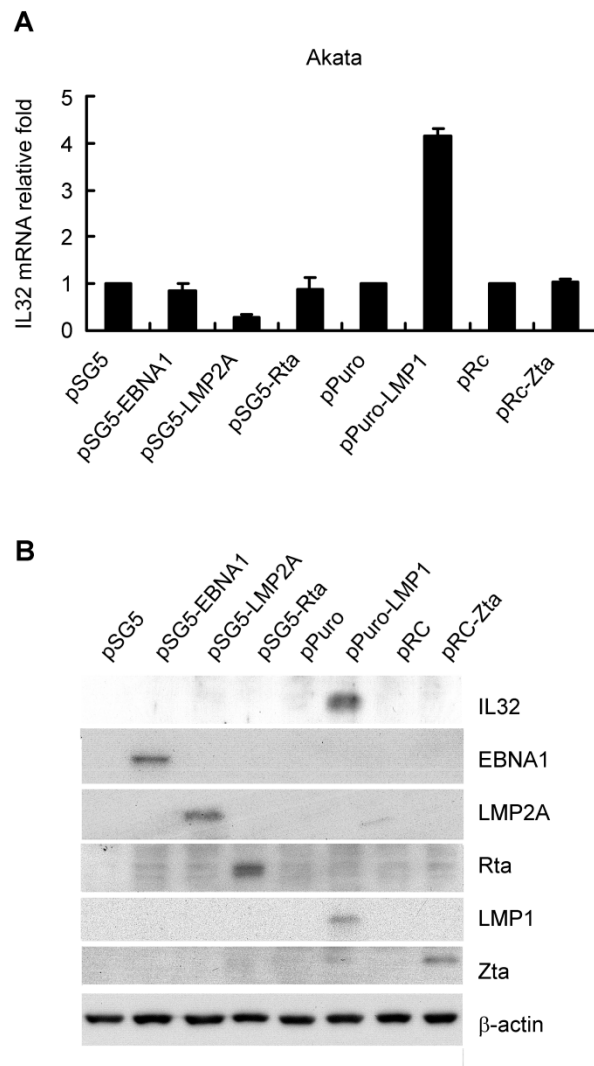
附錄一、以 cDNA 微陣列分析 IL-32 在 EB 病毒感染後不同時間的表現量

自捐血中心取得 5 位健康捐血者之白血球濃厚液以 CD19⁺ 磁珠純化出 B 細胞後，將 5 位健康捐血者之 B 細胞混合為一並感染 B95.8 strain EB 病毒，收集感染 0、3、7 及 28 天後之細胞並萃取出 RNA，經反轉錄作用後得到各組 cDNA 樣本，進一步利用 cDNA 微陣列分析比較初代 B 細胞和各組 EB 病毒感染後的 B 細胞之 IL-32 基因表現差異。微陣列分析由本實驗室蔡淑君博士完成，此圖由本實驗室周雅菁博士繪製。



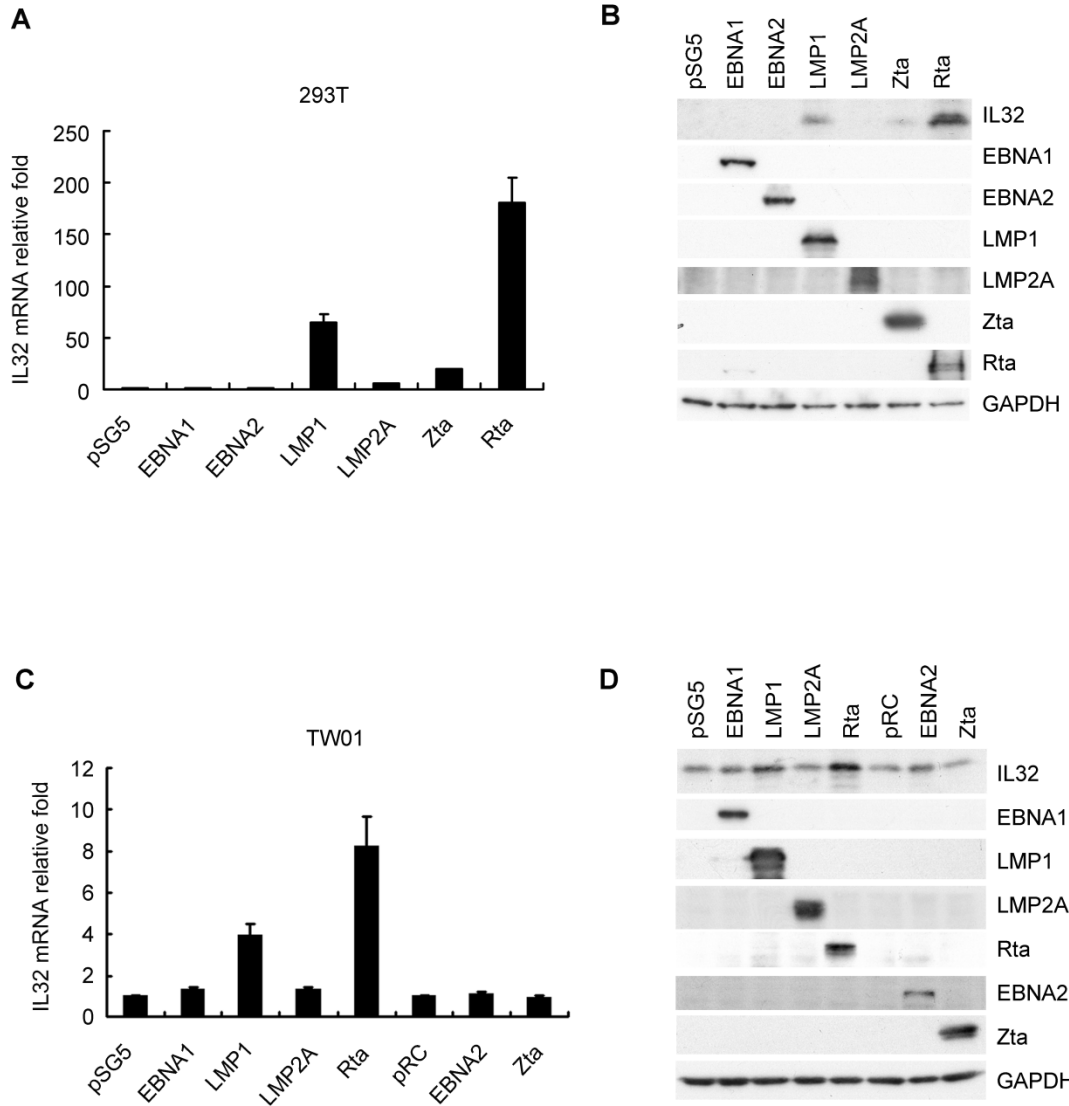
附錄二、探察 IL-32 在 LCL 細胞株的表現情形

LCL 細胞經過固定、穿孔處理後以免疫螢光分析法偵測 IL-32 及 DNA 在細胞核及細胞質的分布情形。IL-32 以帶有 fluorescein isothiocyanate (FITC) (綠色) 的二級抗體偵測，細胞核以 Hoechst 33258(藍色)染色。染色的細胞以螢光顯微鏡進行觀察。merge 為將 IL-32 及細胞核染色後的圖檔合併之結果。實驗結果由本實驗室劉怡學姐完成，詳見劉怡學姐碩士論文圖九



附錄三、EB 病毒 LMP1 可誘導 Akata 細胞中 IL-32 的 mRNA 及蛋白質表現

在 Akata 細胞以電穿孔的方式轉導 EBNA1、LMP1、LMP2A、Zta 或 Rta 的表現質體，3 天後收取細胞 RNA 及蛋白質。(A) IL-32 mRNA 的表現量以 RT-Q-PCR 偵測，以 GAPDH 為內控制組，並以控制組質體讀值設定為 1 為基準進行量化，得到 IL-32 的表現相對倍數。(B) 以西方墨點法偵測 IL-32、EBNA1、LMP2A、Rta、LMP1、Zta 及 β -actin 的表現量， β -actin 做為內控制組。此實驗由本實驗室劉怡學姐完成，詳見劉怡學姐論文圖十一



附錄四、EB 病毒 LMP1 及 Rta 可誘發 IL-32 表現

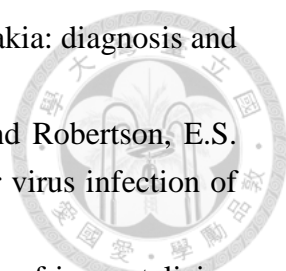
(A-B) 於 12 孔盤中放置 3×10^5 顆 HEK 293T 細胞，以 Lipofectamine-2000 試劑轉染送入 $1 \mu\text{g}$ EB 病毒基因表現質體，包括 EBNA1、EBNA2、LMP1、LMP2A、Zta 和 Rta，(C-D) 於 6 孔盤中放置 3×10^5 顆 TW01 細胞，以 Lipofectamine-2000 試劑轉染送入 $2 \mu\text{g}$ EB 病毒基因表現質體，包括 EBNA1、EBNA2、LMP1、LMP2A、Zta 和 Rta，進行實驗。2 天後收取細胞 RNA 及蛋白質，以西方墨點法偵測 EBNA1、EBNA2、LMP1、LMP2A、Rta、Zta、IL-32 及 GAPDH 的表現量 (B、D)，再利用 RT-qPCR 偵測 IL-32 mRNA 的表現量 (A、C)。qPCR 各讀值以 GAPDH 為內控制組，並以控制組質體的讀值設為 1 為基準進行量化得到 IL-32 的表現相對倍數。此實驗由本實驗室劉怡學姐完成，詳見劉怡學姐論文圖十

參考資料

1. Baer, R., Bankier, A.T., Biggin, M.D., Deininger, P.L., Farrell, P.J., Gibson, T.J., Hatfull, G., Hudson, G.S., Satchwell, S.C., Seguin, C., *et al.* (1984). DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* *310*, 207-211.
2. Bonora, E., Evangelisti, C., Bonichon, F., Tallini, G., and Romeo, G. (2006). Novel germline variants identified in the inner mitochondrial membrane transporter TIMM44 and their role in predisposition to oncocytic thyroid carcinomas. *Br J Cancer* *95*, 1529-1536.
3. Brown, H.J., Song, M.J., Deng, H., Wu, T.T., Cheng, G., and Sun, R. (2003). NF- κ B Inhibits Gammaherpesvirus Lytic Replication. *Journal of Virology* *77*, 8532-8540.
4. Burkitt, D., and O'Connor, G.T. (1961). Malignant lymphoma in African children. I. A clinical syndrome. *Cancer* *14*, 258-269.
5. Cahir McFarland, E.D., Izumi, K.M., and Mosialos, G. (1999). Epstein-barr virus transformation: involvement of latent membrane protein 1-mediated activation of NF-kappaB. *Oncogene* *18*, 6959-6964.
6. Calender, A., Billaud, M., Aubry, J.P., Banchereau, J., Vuillaume, M., and Lenoir, G.M. (1987). Epstein-Barr virus (EBV) induces expression of B-cell activation markers on in vitro infection of EBV-negative B-lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *84*, 8060-8064.
7. Capello, D., and Gaidano, G. (2009). Post-transplant lymphoproliferative disorders: role of viral infection, genetic lesions and antigen stimulation in the pathogenesis of the disease. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases* *1*, e2009018.
8. Carpenter, D., Hsiang, C., Brown, D.J., Jin, L., Osorio, N., BenMohamed, L., Jones, C., and Wechsler, S.L. (2007). Stable cell lines expressing high levels of the herpes simplex virus type 1 LAT are refractory to caspase 3 activation and DNA laddering following cold shock induced apoptosis. *Virology* *369*, 12-18.
9. Carter, K.L., Cahir-McFarland, E., and Kieff, E. (2002). Epstein-barr virus-induced changes in B-lymphocyte gene expression. *J Virol* *76*, 10427-10436.
10. Chevallier-Greco, A., Manet, E., Chavier, P., Mosnier, C., Daillie, J., and Sergeant, A. (1986). Both Epstein-Barr virus (EBV)-encoded trans-acting factors, EB1 and EB2, are required to activate transcription from an EBV early promoter. *Embo j* *5*, 3243-3249.
11. Cohen, J.I., Wang, F., Mannick, J., and Kieff, E. (1989). Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proc Natl*

- Acad Sci U S A 86, 9558-9562.
12. Countryman, J., and Miller, G. (1985). Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4085-4089.
 13. Dahl, C.A., Schall, R.P., He, H.L., and Cairns, J.S. (1992). Identification of a novel gene expressed in activated natural killer cells and T cells. *J Immunol* 148, 597-603.
 14. Dambaugh, T., Beisel, C., Hummel, M., King, W., Fennewald, S., Cheung, A., Heller, M., Raab-Traub, N., and Kieff, E. (1980). Epstein-Barr virus (B95-8) DNA VII: molecular cloning and detailed mapping. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 2999-3003.
 15. Dambaugh, T.R., and Kieff, E. (1982). Identification and nucleotide sequences of two similar tandem direct repeats in Epstein-Barr virus DNA. *J Virol* 44, 823-833.
 16. Davies, M.L., Xu, S., Lyons-Weiler, J., Rosendorff, A., Webber, S.A., Wasil, L.R., Metes, D., and Rowe, D.T. (2010). Cellular factors associated with latency and spontaneous Epstein-Barr virus reactivation in B-lymphoblastoid cell lines. *Virology* 400, 53-67.
 17. Dawson, C.W., Port, R.J., and Young, L.S. (2012). The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Semin Cancer Biol* 22, 144-153.
 18. Dawson, C.W., Tramountanis, G., Eliopoulos, A.G., and Young, L.S. (2003). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodeling. *J Biol Chem* 278, 3694-3704.
 19. Devergne, O., Cahir McFarland, E.D., Mosialos, G., Izumi, K.M., Ware, C.F., and Kieff, E. (1998). Role of the TRAF binding site and NF-kappaB activation in Epstein-Barr virus latent membrane protein 1-induced cell gene expression. *J Virol* 72, 7900-7908.
 20. Dirmeier, U., Neuhierl, B., Kilger, E., Reisbach, G., Sandberg, M.L., and Hammerschmidt, W. (2003). Latent membrane protein 1 is critical for efficient growth transformation of human B cells by Epstein-Barr virus. *Cancer Res* 63, 2982-2989.
 21. Divito, S., Cherpes, T.L., and Hendricks, R.L. (2006). A triple entente: virus, neurons, and CD8+ T cells maintain HSV-1 latency. *Immunologic research* 36, 119-126.
 22. Dolyniuk, M., Pritchett, R., and Kieff, E. (1976). Proteins of Epstein-Barr virus. I. Analysis of the polypeptides of purified enveloped Epstein-Barr virus. *J Virol* 17,

- 935-949.
23. Eliopoulos, A.G., Gallagher, N.J., Blake, S.M., Dawson, C.W., and Young, L.S. (1999). Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J Biol Chem* 274, 16085-16096.
 24. Eliopoulos, A.G., and Young, L.S. (1998). Activation of the cJun N-terminal kinase (JNK) pathway by the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1). *Oncogene* 16, 1731-1742.
 25. Epstein, M.A., Achong, B.G., and Barr, Y.M. (1964). Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* 1, 702-703.
 26. Fields, B.N., Knipe, D.M., and Howley, P.M. (2007). *Fields' virology*, 5th edn (Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins).
 27. Fixman, E.D., Hayward, G.S., and Hayward, S.D. (1992). trans-acting requirements for replication of Epstein-Barr virus ori-Lyt. *J Virol* 66, 5030-5039.
 28. Fukayama, M., Hayashi, Y., Iwasaki, Y., Chong, J., Ooba, T., Takizawa, T., Koike, M., Mizutani, S., Miyaki, M., and Hirai, K. (1994). Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma and Epstein-Barr virus infection of the stomach. *Lab Invest* 71, 73-81.
 29. Garcia-Diaz, B., Barros, M.H., Sanna-Cherchi, S., Emmanuele, V., Akman, H.O., Ferreira-Barros, C.C., Horvath, R., Tadesse, S., El Gharaby, N., DiMauro, S., *et al.* (2012). Infantile encephalomyopathy and defective mitochondrial translation are due to a homozygous RMND1 mutation. *Am J Hum Genet* 91, 729-736.
 30. Geser, A., de The, G., Lenoir, G., Day, N.E., and Williams, E.H. (1982). Final case reporting from the Ugandan prospective study of the relationship between EBV and Burkitt's lymphoma. *Int J Cancer* 29, 397-400.
 31. Gires, O., Kohlhuber, F., Kilger, E., Baumann, M., Kieser, A., Kaiser, C., Zeidler, R., Scheffer, B., Ueffing, M., and Hammerschmidt, W. (1999). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *EMBO J* 18, 3064-3073.
 32. Given, D., Yee, D., Griem, K., and Kieff, E. (1979). DNA of Epstein-Barr virus. V. Direct repeats of the ends of Epstein-Barr virus DNA. *J Virol* 30, 852-862.
 33. Goda, C., Kanaji, T., Kanaji, S., Tanaka, G., Arima, K., Ohno, S., and Izuhara, K. (2006). Involvement of IL-32 in activation-induced cell death in T cells. *Int Immunol* 18, 233-240.
 34. Goodman, S.R., Prezyna, C., and Clough, W. (1978). Identification and partial purification of two EBV-associated DNA polymerases. *IARC scientific publications*, 395-405.

- 
35. Greenspan, J.S., and Greenspan, D. (1989). Oral hairy leukoplakia: diagnosis and management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 67, 396-403.
36. Halder, S., Murakami, M., Verma, S.C., Kumar, P., Yi, F., and Robertson, E.S. (2009). Early events associated with infection of Epstein-Barr virus infection of primary B-cells. *PLoS One* 4, e7214.
37. Hammerschmidt, W., and Sugden, B. (1989). Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature* 340, 393-397.
38. Hardwick, J.M., Lieberman, P.M., and Hayward, S.D. (1988). A new Epstein-Barr virus transactivator, R, induces expression of a cytoplasmic early antigen. *J Virol* 62, 2274-2284.
39. Hasegawa, H., Thomas, H.J., Schooley, K., and Born, T.L. (2011). Native IL-32 is released from intestinal epithelial cells via a non-classical secretory pathway as a membrane-associated protein. *Cytokine* 53, 74-83.
40. Heinhuis, B., Koenders, M.I., van den Berg, W.B., Netea, M.G., Dinarello, C.A., and Joosten, L.A. (2012). Interleukin 32 (IL-32) contains a typical alpha-helix bundle structure that resembles focal adhesion targeting region of focal adhesion kinase-1. *J Biol Chem* 287, 5733-5743.
41. Heinhuis, B., Koenders, M.I., van Riel, P.L., van de Loo, F.A., Dinarello, C.A., Netea, M.G., van den Berg, W.B., and Joosten, L.A. (2011). Tumour necrosis factor alpha-driven IL-32 expression in rheumatoid arthritis synovial tissue amplifies an inflammatory cascade. *Ann Rheum Dis* 70, 660-667.
42. Henle, G., and Henle, W. (1966). Studies on cell lines derived from Burkitt's lymphoma. *Trans N Y Acad Sci* 29, 71-79.
43. Hjalgrim, H., and Engels, E.A. (2008). Infectious aetiology of Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiological evidence. *J Intern Med* 264, 537-548.
44. Hong, J., Bae, S., Kang, Y., Yoon, D., Bai, X., Chan, E.D., Azam, T., Dinarello, C.A., Lee, S., Her, E., *et al.* (2010). Suppressing IL-32 in monocytes impairs the induction of the proinflammatory cytokines TNFalpha and IL-1beta. *Cytokine* 49, 171-176.
45. Hsieh, J.J., and Hayward, S.D. (1995). Masking of the CBF1/RBPJ kappa transcriptional repression domain by Epstein-Barr virus EBNA2. *Science* 268, 560-563.
46. Huang, Y.T., Liu, M.Y., Tsai, C.H., and Yeh, T.H. (2010). Upregulation of interleukin-1 by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 and its possible role in nasopharyngeal carcinoma cell growth. *Head Neck* 32, 869-876.
47. Huen, D.S., Henderson, S.A., Croom-Carter, D., and Rowe, M. (1995). The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of

- NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. *Oncogene* 10, 549-560.
48. Hummel, M., and Kieff, E. (1982). Mapping of polypeptides encoded by the Epstein-Barr virus genome in productive infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 5698-5702.
 49. Hutt-Fletcher, L.M., Fowler, E., Lambris, J.D., Feighny, R.J., Simmons, J.G., and Ross, G.D. (1983). Studies of the Epstein Barr virus receptor found on Raji cells. II. A comparison of lymphocyte binding sites for Epstein Barr virus and C3d. *J Immunol* 130, 1309-1312.
 50. Izumi, K.M., Cahir McFarland, E.D., Riley, E.A., Rizzo, D., Chen, Y., and Kieff, E. (1999). The residues between the two transformation effector sites of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 are not critical for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* 73, 9908-9916.
 51. Jones, R.J., Seaman, W.T., Feng, W.H., Barlow, E., Dickerson, S., Delecluse, H.J., and Kenney, S.C. (2007). Roles of lytic viral infection and IL-6 in early versus late passage lymphoblastoid cell lines and EBV-associated lymphoproliferative disease. *Int J Cancer* 121, 1274-1281.
 52. Kallin, B., Sternas, L., Saemundssen, A.K., Luka, J., Jornvall, H., Eriksson, B., Tao, P.Z., Nilsson, M.T., and Klein, G. (1985). Purification of Epstein-Barr virus DNA polymerase from P3HR-1 cells. *J Virol* 54, 561-568.
 53. Kanda, K., Kempkes, B., Bornkamm, G.W., von Gabain, A., and Decker, T. (1999). The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2), a protein required for B lymphocyte immortalization, induces the synthesis of type I interferon in Burkitt's lymphoma cell lines. *Biol Chem* 380, 213-221.
 54. Kang, J.W., Park, Y.S., Kim, M.S., Lee, D.H., Bak, Y., Ham, S.Y., Park, S.H., Hong, J.T., and Yoon, D.Y. (2013a). Interleukin (IL)-32beta-mediated CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBPalpha) phosphorylation by protein kinase Cdelta (PKCdelta) abrogates the inhibitory effect of C/EBPalpha on IL-10 production. *J Biol Chem* 288, 23650-23658.
 55. Kang, J.W., Park, Y.S., Lee, D.H., Kim, M.S., Bak, Y., Park, S.H., Ham, S.Y., Yang, Y., Hong, J.T., and Yoon, D.Y. (2013b). Interleukin-32delta interacts with IL-32beta and inhibits IL-32beta-mediated IL-10 production. *FEBS Lett*.
 56. Kang, Y.H., Park, M.Y., Yoon, D.Y., Han, S.R., Lee, C.I., Ji, N.Y., Myung, P.K., Lee, H.G., Kim, J.W., Yeom, Y.I., *et al.* (2012). Dysregulation of overexpressed IL-32alpha in hepatocellular carcinoma suppresses cell growth and induces apoptosis through inactivation of NF-kappaB and Bcl-2. *Cancer Lett* 318, 226-233.
 57. Kieser, A., Kilger, E., Gires, O., Ueffing, M., Kolch, W., and Hammerschmidt, W.

- (1997). Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 triggers AP-1 activity via the c-Jun N-terminal kinase cascade. *EMBO J* 16, 6478-6485.
58. Kilger, E., Kieser, A., Baumann, M., and Hammerschmidt, W. (1998). Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *EMBO J* 17, 1700-1709.
59. Kim, K.H., Shim, J.H., Seo, E.H., Cho, M.C., Kang, J.W., Kim, S.H., Yu, D.Y., Song, E.Y., Lee, H.G., Sohn, J.H., *et al.* (2008). Interleukin-32 monoclonal antibodies for immunohistochemistry, Western blotting, and ELISA. *J Immunol Methods* 333, 38-50.
60. Kim, S.H., Han, S.Y., Azam, T., Yoon, D.Y., and Dinarello, C.A. (2005). Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNF α . *Immunity* 22, 131-142.
61. Kobayashi, H., Huang, J., Ye, F., Shyr, Y., Blackwell, T.S., and Lin, P.C. (2010). Interleukin-32 β propagates vascular inflammation and exacerbates sepsis in a mouse model. *PLoS One* 5, e9458.
62. Labrecque, L.G., Barnes, D.M., Fentiman, I.S., and Griffin, B.E. (1995). Epstein-Barr virus in epithelial cell tumors: a breast cancer study. *Cancer Res* 55, 39-45.
63. Lee, M.A., Diamond, M.E., and Yates, J.L. (1999). Genetic evidence that EBNA-1 is needed for efficient, stable latent infection by Epstein-Barr virus. *J Virol* 73, 2974-2982.
64. Lee, S., Kim, J.H., Kim, H., Kang, J.W., Kim, S.H., Yang, Y., Kim, J., Park, J., Park, S., Hong, J., *et al.* (2011). Activation of the interleukin-32 pro-inflammatory pathway in response to human papillomavirus infection and over-expression of interleukin-32 controls the expression of the human papillomavirus oncogene. *Immunology* 132, 410-420.
65. Li, H.P., and Chang, Y.S. (2003). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1: structure and functions. *J Biomed Sci* 10, 490-504.
66. Li, W., Liu, Y., Mukhtar, M.M., Gong, R., Pan, Y., Rasool, S.T., Gao, Y., Kang, L., Hao, Q., Peng, G., *et al.* (2008). Activation of interleukin-32 pro-inflammatory pathway in response to influenza A virus infection. *PLoS One* 3, e1985.
67. Li, W., Sun, W., Liu, L., Yang, F., Li, Y., Chen, Y., Fang, J., Zhang, W., Wu, J., and Zhu, Y. (2010). IL-32: a host proinflammatory factor against influenza viral replication is upregulated by aberrant epigenetic modifications during influenza A virus infection. *J Immunol* 185, 5056-5065.
68. Li, W., Yang, F., Liu, Y., Gong, R., Liu, L., Feng, Y., Hu, P., Sun, W., Hao, Q., Kang, L., *et al.* (2009). Negative feedback regulation of IL-32 production by

- iNOS activation in response to dsRNA or influenza virus infection. *Eur J Immunol* 39, 1019-1024.
69. Luka, J., Kallin, B., and Klein, G. (1979). Induction of the Epstein-Barr virus (EBV) cycle in latently infected cells by n-butyrate. *Virology* 94, 228-231.
70. Mahot, S., Sergeant, A., Drouet, E., and Gruffat, H. (2003). A novel function for the Epstein-Barr virus transcription factor EB1/Zta: induction of transcription of the hIL-10 gene. *J Gen Virol* 84, 965-974.
71. Mannick, J.B., Tong, X., Hemnes, A., and Kieff, E. (1995). The Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein associates with hsp72/hsc73. *J Virol* 69, 8169-8172.
72. Micklem, K., Sim, E., and Sim, R.B. (1985). The generation of active fragments of complement receptor type 2 by trypsin digestion. *FEBS Letters* 189, 195-201.
73. Miller, G., and Lipman, M. (1973). Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 190-194.
74. Mosialos, G. (2001). Cytokine signaling and Epstein-Barr virus-mediated cell transformation. *Cytokine Growth Factor Rev* 12, 259-270.
75. Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C., and Kieff, E. (1995). The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* 80, 389-399.
76. Mueller, N., Evans, A., Harris, N.L., Comstock, G.W., Jellum, E., Magnus, K., Orentreich, N., Polk, B.F., and Vogelmann, J. (1989). Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus. Altered antibody pattern before diagnosis. *N Engl J Med* 320, 689-695.
77. Nakagomi, H., Dolcetti, R., Bejarano, M.T., Pisa, P., Kiessling, R., and Masucci, M.G. (1994). The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) induces interleukin-10 production in Burkitt lymphoma lines. *Int J Cancer* 57, 240-244.
78. Nalesnik, M.A. (1998). Clinical and pathological features of post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD). *Springer Semin Immunopathol* 20, 325-342.
79. Nemerow, G.R., Mold, C., Schwend, V.K., Tollefson, V., and Cooper, N.R. (1987). Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J Virol* 61, 1416-1420.
80. Netea, M.G., Azam, T., Lewis, E.C., Joosten, L.A., Wang, M., Langenberg, D., Meng, X., Chan, E.D., Yoon, D.Y., Ottenhoff, T., *et al.* (2006). Mycobacterium tuberculosis induces interleukin-32 production through a caspase-1/IL-18/interferon-gamma-dependent mechanism. *PLoS Med* 3, e277.
81. Netea, M.G., Lewis, E.C., Azam, T., Joosten, L.A., Jaekal, J., Bae, S.Y.,

- Dinarello, C.A., and Kim, S.H. (2008). Interleukin-32 induces the differentiation of monocytes into macrophage-like cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 3515-3520.
82. Niederman, J.C., McCollum, R.W., Henle, G., and Henle, W. (1968). Infectious mononucleosis. Clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *JAMA : the journal of the American Medical Association* *203*, 205-209.
83. Niedobitek, G., Hamilton-Dutoit, S., Herbst, H., Finn, T., Vetner, M., Pallesen, G., and Stein, H. (1989). Identification of Epstein-Barr virus-infected cells in tonsils of acute infectious mononucleosis by in situ hybridization. *Human pathology* *20*, 796-799.
84. Nishida, A., Andoh, A., Inatomi, O., and Fujiyama, Y. (2009). Interleukin-32 expression in the pancreas. *J Biol Chem* *284*, 17868-17876.
85. Nold-Petry, C.A., Nold, M.F., Zepp, J.A., Kim, S.H., Voelkel, N.F., and Dinarello, C.A. (2009). IL-32-dependent effects of IL-1beta on endothelial cell functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 3883-3888.
86. Nold, M.F., Nold-Petry, C.A., Pott, G.B., Zepp, J.A., Saavedra, M.T., Kim, S.H., and Dinarello, C.A. (2008a). Endogenous IL-32 Controls Cytokine and HIV-1 Production. *The Journal of Immunology* *181*, 557-565.
87. Nold, M.F., Nold-Petry, C.A., Pott, G.B., Zepp, J.A., Saavedra, M.T., Kim, S.H., and Dinarello, C.A. (2008b). Endogenous IL-32 controls cytokine and HIV-1 production. *J Immunol* *181*, 557-565.
88. Oh, J.H., Cho, M.C., Kim, J.H., Lee, S.Y., Kim, H.J., Park, E.S., Ban, J.O., Kang, J.W., Lee, D.H., Shim, J.H., *et al.* (2011). IL-32gamma inhibits cancer cell growth through inactivation of NF-kappaB and STAT3 signals. *Oncogene* *30*, 3345-3359.
89. Pan, X., Cao, H., Lu, J., Shu, X., Xiong, X., Hong, X., Xu, Q., Zhu, H., Li, G., and Shen, G. (2011). Interleukin-32 expression induced by hepatitis B virus protein X is mediated through activation of NF-kappaB. *Mol Immunol* *48*, 1573-1577.
90. Peng, M., and Lundgren, E. (1992). Transient expression of the Epstein-Barr virus LMP1 gene in human primary B cells induces cellular activation and DNA synthesis. *Oncogene* *7*, 1775-1782.
91. Portis, T., and Longnecker, R. (2004). Epstein-Barr virus (EBV) LMP2A mediates B-lymphocyte survival through constitutive activation of the Ras/PI3K/Akt pathway. *Oncogene* *23*, 8619-8628.
92. Purtilo, D.T. (1987). Epstein-Barr virus: the spectrum of its manifestations in human beings. *South Med J* *80*, 943-947.
93. Ragoczy, T., and Miller, G. (2001). Autostimulation of the Epstein-Barr virus

- BRLF1 promoter is mediated through consensus Sp1 and Sp3 binding sites. *J Virol* 75, 5240-5251.
94. Rasool, S.T., Tang, H., Wu, J., Li, W., Mukhtar, M.M., Zhang, J., Mu, Y., Xing, H.X., Wu, J., and Zhu, Y. (2008). Increased level of IL-32 during human immunodeficiency virus infection suppresses HIV replication. *Immunol Lett* 117, 161-167.
95. Scala, G., Quinto, I., Ruocco, M.R., Arcucci, A., Mallardo, M., Caretto, P., Forni, G., and Venuta, S. (1990). Expression of an exogenous interleukin 6 gene in human Epstein Barr virus B cells confers growth advantage and in vivo tumorigenicity. *J Exp Med* 172, 61-68.
96. Shibata, D., and Weiss, L.M. (1992). Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. *Am J Pathol* 140, 769-774.
97. Shioya, M., Nishida, A., Yagi, Y., Ogawa, A., Tsujikawa, T., Kim-Mitsuyama, S., Takayanagi, A., Shimizu, N., Fujiyama, Y., and Andoh, A. (2007). Epithelial overexpression of interleukin-32alpha in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 149, 480-486.
98. Shoda, H., Fujio, K., and Yamamoto, K. (2007). Rheumatoid arthritis and interleukin-32. *Cell Mol Life Sci* 64, 2671-2679.
99. Swenson, J.J., Holley-Guthrie, E., and Kenney, S.C. (2001). Epstein-Barr virus immediate-early protein BRLF1 interacts with CBP, promoting enhanced BRLF1 transactivation. *J Virol* 75, 6228-6234.
100. Tanner, J.E., and Tosato, G. (1992). Regulation of B-cell growth and immunoglobulin gene transcription by interleukin-6. *Blood* 79, 452-459.
101. Thorley-Lawson, D.A., and Allday, M.J. (2008). The curious case of the tumour virus: 50 years of Burkitt's lymphoma. *Nat Rev Microbiol* 6, 913-924.
102. Thorley-Lawson, D.A., and Gross, A. (2004). Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med* 350, 1328-1337.
103. Tomkinson, B., Robertson, E., and Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* 67, 2014-2025.
104. Tsai, P.F., Lin, S.J., Weng, P.L., Tsai, S.C., Lin, J.H., Chou, Y.C., and Tsai, C.H. (2011). Interplay between PKCdelta and Sp1 on histone deacetylase inhibitor-mediated Epstein-Barr virus reactivation. *J Virol* 85, 2373-2385.
105. Tsai, S.C., Lin, S.J., Chen, P.W., Luo, W.Y., Yeh, T.H., Wang, H.W., Chen, C.J., and Tsai, C.H. (2009). EBV Zta protein induces the expression of interleukin-13, promoting the proliferation of EBV-infected B cells and lymphoblastoid cell lines. *Blood* 114, 109-118.
106. Tsurumi, T., Fujita, M., and Kudoh, A. (2005). Latent and lytic Epstein-Barr

- virus replication strategies. *Rev Med Virol* 15, 3-15.
107. Vroman, B., Luka, J., Rodriguez, M., and Pearson, G.R. (1985). Characterization of a major protein with a molecular weight of 160,000 associated with the viral capsid of Epstein-Barr virus. *J Virol* 53, 107-113.
108. Wallace, D.C. (2012). Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer* 12, 685-698.
109. Wang, D., Liebowitz, D., and Kieff, E. (1985). An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* 43, 831-840.
110. Wolf, H., Werner, J., and zur Hausen, H. (1975). EBV DNA in nonlymphoid cells of nasopharyngeal carcinomas and in a malignant lymphoma obtained after inoculation of EBV into cottontop marmosets. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 39 Pt 2, 791-796.
111. Yefenof, E., Klein, G., Jondal, M., and Oldstone, M.B. (1976). Surface markers on human B and T-lymphocytes. IX. Two-color immunofluorescence studies on the association between ebv receptors and complement receptors on the surface of lymphoid cell lines. *Int J Cancer* 17, 693-700.
112. Yin, Q., Jupiter, K., and Flemington, E.K. (2004). The Epstein-Barr virus transactivator Zta binds to its own promoter and is required for full promoter activity during anti-Ig and TGF-beta1 mediated reactivation. *Virology* 327, 134-143.
113. Young, L.S., and Rickinson, A.B. (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 4, 757-768.
114. Yun, H.M., Oh, J.H., Shim, J.H., Ban, J.O., Park, K.R., Kim, J.H., Lee, D.H., Kang, J.W., Park, Y.H., Yu, D., *et al.* (2013). Antitumor activity of IL-32beta through the activation of lymphocytes, and the inactivation of NF-kappaB and STAT3 signals. *Cell death & disease* 4, e640.
115. Zalani, S., Holley-Guthrie, E.A., Gutsch, D.E., and Kenney, S.C. (1992). The Epstein-Barr virus immediate-early promoter BRLF1 can be activated by the cellular Sp1 transcription factor. *J Virol* 66, 7282-7292.
116. Zalkin, H., and Dixon, J.E. (1992). De novo purine nucleotide biosynthesis. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 42, 259-287.
117. Zeng, Y., Middeldorp, J., Madjar, J.J., and Ooka, T. (1997). A major DNA binding protein encoded by BALF2 open reading frame of Epstein-Barr virus (EBV) forms a complex with other EBV DNA-binding proteins: DNAase, EA-D, and DNA polymerase. *Virology* 239, 285-295.
118. zur Hausen, H., O'Neill, F.J., Freese, U.K., and Hecker, E. (1978). Persisting oncogenic herpesvirus induced by the tumour promoter TPA. *Nature* 272,

373-375.

