

中國醫藥大學

醫學檢驗生物技術學系碩士班

碩士論文

尋找評估慢性 C 型肝炎經由長效型干擾
素及類核苷酸治療成效之預測因子

Potential biomarkers to predict sustained virological
response of peginterferon plus ribavirin therapy in
patients with chronic hepatitis C

指導教授：鄭如茜

Ju-Chien Cheng

學生姓名：陳郁芬

Yu-Fen Chen

學號：9473007

中華民國九十六年七月

致謝

拿到學位了，第一個要感謝的人就是鄭如茜老師，謝謝老師總是包容我不成熟的態度，在我失去信心的時候，從來就沒放棄過我，永遠站在為學生設想的立場，嚴謹與堅持的態度面對研究中的每個細節，讓我在碩班兩年中得到不少的寶貴經驗。

謝謝曾慶平老師擔任研究進度報告的指導老師及口試委員，謝謝老師在論文格式及內容上的要求及指導，也謝謝老師在百忙中還特地幫我修改論文；謝謝邱全芊老師指導我的研究進度報告口試，謝謝老師提供實驗上的方向及建議，及實驗結果的呈現。

還要謝謝生統中心的吳弘達老師，謝謝老師在短時間內，讓我了解統計的概念，以及如何使用統計軟體來整理實驗結果，也謝謝懿諄與保萱，在當我有問題或困難時，總是適時的提供援助。謝謝千凌學姊在實驗方面的幫忙，提供很多想法來解決我的問題。

當然，最要感謝的是研究室中所有的人，謝謝第一個教我做實驗的長青學長，對我很好的維洲學長和菇學姊，喜歡在晚上做實驗的丞凱學長，從大一就是室友的鳳儀和惠琳，老是在睡覺的建宇。感謝美惠學姊不論是在實驗上或報告及論文中所提供的想法及經驗，也謝謝從大學時期就在同一實驗室的景堂，謝謝羽伶整理的資料，以及花時間跟我討論統計上的問題，謝謝家帆，你的快樂也總感染我的情

緒，嫵如，謝謝你在準備東西的時候，永遠都會想到我，謝謝耀文老是聽我抱怨，幫我做一些雜七雜八的事情，會幫我養細胞的詠薰跟孟弘，以及其他的夥伴俊龍、德欣及騰彥的幫助。還有，也謝謝所有在研究所一起奮鬥的同學。

最後，謝謝我的家人，你們的支持陪我度過這兩年，最後，將論文獻給我的父母。



摘要

C 型肝炎病毒是造成慢性肝炎、肝硬化及肝癌的重要致病因子之一，治療的方式主要是利用干擾素與雷巴威林(ribavirin)的合併治療，因病毒特性與宿主的不同約有 50-80%的治癒成效，治療成效的檢視時間點往往在治療後第 3 個月，由於治療過程會對病人產生極大的副作用，因此期望將檢測的時間點提早在治療後第 1 個月。由於細胞激素及驅化激素是在宿主細胞感染時重要的防禦機制，因此本研究以細胞激素為標的，利用蛋白質晶片，大量篩檢在 C 型肝炎治療前與治療後 1 個月，治療成功及失敗間，細胞激素表現的差異，並以酵素免疫分析法進行確認，結果顯示在 EGF、ENA-78 及 IL-1 α 具有統計上意義。以 ENA-78 進行預測，有 61%的敏感性，92.9%的特異性，91.6%的陽性預測率及 65%的陰性預測率。若合併 ENA-78、EGF 及 IL-1 α 來預測，有 87.5%的敏感性，83.3%的特異性，87.5%的陽性預測率及 83.3%的陰性預測率。因此，多種細胞激素合併進行預測能提高預測的正確性。此外，我們利用二維電泳的方式，分析 Huh7 及帶有 C 型肝炎病毒基因體的 Replicon 細胞之分泌性蛋白質，經由質譜儀分析及蛋白質資料庫的搜尋，會比對出 3 個在兩者間具差異性的蛋白質，分別是參與細胞骨架、蛋白質分解與運輸的相關蛋白。本研究顯示，C 型肝炎病毒感染細胞確實會刺激特殊的細胞因子，這些細胞因子分泌到血液中有機會做為診斷預後的指標，而它們在 C 型肝炎病毒感染的過程中所扮演的機制仍有待進一步研究。

Abstract

Infection of hepatitis C virus leads to chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. Combination of pegylated interferon- α (PEG-IFN- α) and ribavirin is currently standard treatment strategy, and results in a sustained virologic response about 50-80% depending on host and viral characteristics. The third month post-treatment is the checkpoint of efficacy. Due to the severe side effects, we hope to ahead of time after therapy. Cytokines and chemokines play important roles during virus infection. The high-throughput technology, protein array, was applied to screen the cytokines in patient plasma before and after one-month of treatment by pegylated interferon- α and ribavirin. The results from array analysis were then confirmed by ELISA. Three cytokines, EGF, ENA-78, and IL-1 α show statistically significant differences between the two groups. ENA-78 had the prediction of SVR with sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) of 61%, 92.9%, 91.6%, and 65%, respectively. Combination of the three cytokines had higher accuracy of prediction with sensitivity, specificity, PPV, and NPV of 87.5%, 83.3%, 87.5%, and 83.3%, respectively. Taken together, prediction with combination multiple cytokines will elevate higher accuracy of prediction. Besides, two-dimensional electrophoresis was used to analyze secreted protein from Huh7 and HCV subgenomic replicon cells. Three proteins over-expressed in HCV subgenomic replicon cells were identified, which were related to cell skeleton, ubiquitination, and transporter, respectively. Taken together, Infection of HCV indeed stimulate specific cellular factors, and may secret to circular blood as prediction marker for prognosis. The roles of theses cellular factors in HCV infection is worthy to investigate further.

縮寫表

BSA	bovine serum albumin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ENA-78	epithelial neutrophil-activating protein 78
FBS	fetal bovine serum
G418	neomycin
IL-1 α	interleukin-1 alpha
NEAA	non-essential amino acids
NPV	negative predictive value
PCR	polymerase chain reaction
PPV	positive predictive value
RANTES	regulated upon activation, normal T-cell expressed, and presumably secreted
RT	reverse-transcription
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine

目錄

標題	頁碼
致謝	I
中文摘要	III
英文摘要	IV
縮寫表	V
第一章 序論	
1.1 C 型肝炎病毒	5
1.2 C 型肝炎病毒的構造及功能	7
1.3 C 型肝炎的治療	12
1.4 C 型肝炎治療成效的評估	16
1.5 細胞激素與 C 型肝炎病毒感染	20
1.6 研究動機與策略	27
第二章 材料與方法	
2.1 檢體收集及分離	28
2.2 血漿中細胞激素分析	28
2.3 酵素連結免疫吸附試驗(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	30
2.4 預測模型	31
2.5 細胞培養	33

2.6 核酸萃取 (RNA extraction)	34
2.7 反轉錄即時聚合酶連鎖反應 (Reverse-transcription Real-time Polymerase Chain Reaction).....	35
2.8 二維電泳 (2-Dimensional Gel Electrophoresis).....	35
2.9 硝酸銀染色 (Silver stain).....	36

第三章 結果

3.1 利用蛋白質晶片分析病人治療前與治療後一個月細胞激素的 變化	38
3.2 測試酵素連結免疫吸附試驗 (ELISA)之穩定性	39
3.3 以酵素連結免疫吸附試驗 (ELISA)確認細胞激素在 HCV 治療 的變化	40
3.4 使用 SAS 統計軟體建立 ENA-78 及 ENA-78 合併 EGF 及 IL-1 α 預測治療結果模型.....	41
3.5 經由所建立的 ENA-78 預測模型進行 Blind test	43
3.6 以定量聚合酶連鎖反應分析 ENA-78 在肝癌相關細胞中的 mRNA 表現	43
3.7 以定量聚合酶連鎖反應分析 ENA-78 在周邊單核球細胞的 mRNA 表現	44
3.8 利用蛋白質二維電泳方法觀察肝癌相關細胞之分泌性蛋白 質	45

第四章 討論	46
第五章 結論	54
第六章 參考文獻	55



圖表目錄

標題	頁碼
圖 1	70
圖 2	71
圖 3	72
圖 4	73
圖 5	74
圖 6	75
圖 7	76
圖 8	77
圖 9	78
圖 10	79
圖 11	80
附圖一	81
附圖二	81

第一章 序論

1.1 C 型肝炎病毒

美國的 National Institutes of Health (NIH) 在 1970 年發現大部份的輸血性肝炎並非 A 型或 B 型肝炎病毒所造成，基於這個理由，稱為 non-A, non-B hepatitis。在 1987 年 Qui-Lim Choo 和 George Kuo 利用 molecular cloning 方式分離出病毒，並在 1988 年被證實為 NANBH specimens。1989 年 Choo 等人將其研究成果發表在科學雜誌 (Science)，正式命名為 C 型肝炎病毒 (Hepatitis C virus; HCV) (Choo *et al.*, 1989)。HCV 分類上屬於黃熱病毒科 (*Flavivirus*)，具套膜及帶有正股的 RNA，病毒的直徑約為 50 nm，有六種基因型 (重複 30-50% 基因序列)，及超過 50 種副基因型 (重複 10-30% 基因序列) (Bukh *et al.*, 1995)。主要基因型有 1a、1b、2a、2b、3、4、5 及 6。其中，1a 分布的區域在美國及北歐，1b、2a 及 2b 屬於全世界都有分佈，2a 及 2b 大約 10-30% 分布在日本和義大利北部，genotype 3 主要在印度，genotype 4 發生在非洲及中東，genotype 5 發生於南非，genotype 6 多半在香港或東南亞 (Hoofnagle *et al.*, 2002)。台灣主要的基因型為 1b 及 2a，南台灣約有 48-64.3% 的 1b 基因型，35.7-41.4% 的 2a 基因型 (Chen *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1994; Chan *et al.*, 1995; Kao *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 2001)，北台灣存在 58-73% 的 1b 基因型，7.4-26% 的 2a

基因型 (Chen *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1994; Chan *et al.*, 1995; Kao *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1996)。

HCV 感染六月內稱為急性期，大約有 60-70%的病人是沒有任何症狀，部份的人會有食慾低落、疲倦、腹痛、黃疸及類似感冒的症狀。在感染 HCV 1 至 3 星期後可在血液中偵測到 HCV 病毒，3 至 12 星期可偵測到抗體，可利用 alanine aminotransferase (ALT)及 aspartate aminotransferase (AST)來評估肝臟受損情形，約 15-50%病人可在急性期時痊癒，其餘則會發展成慢性 C 型肝炎 (Di Bisceglie *et al.*,2000; Seeff *et al.*, 2002)，慢性肝炎中有 20%會發展成肝硬化，其中每年約 3-6%肝臟代償功能減退，長期 HCV 感染每年約 4%發展成肝癌 (Hepatocellular carcinoma ; HCC) (Di Bisceglie *et al.*, 2000; National Institutes of Health, 2002)。

1.2 C 型肝炎病毒的構造及功能

HCV 基因序列約為 9600 nucleotides，在 5' 及 3' 端有 untranslated region (UTR)，分別約為 341 及 230 核苷酸，包含一個 open reading frame (ORF)，能轉譯出約 3000 個胺基酸的 polyprotein，經由 cotranslation 及 posttranslation 會產生至少 10 個蛋白，包括結構性蛋白 C、E1、E2、p7，及非結構性蛋白 NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B (參考附圖一) (Bartenschlager & Lohann, 2000)。

5'-UTR 在核苷酸序列 40-355 號形成 4 個 highly structured domain，分別為 domain I、II、III、IV。domain I 在核苷酸序列 5-20 號形成 stem-loop，在轉譯時並非必須 (Rijnbrand *et al.*, 1995; Honda *et al.*, 1996)，但在 RNA 複製時卻相當重要 (Boyer *et al.*, 1994)；domain 2-3 上的 internal ribosomal entry site (IRES) 可以直接與宿主的 40S ribosome 及 eIF3 結合 (Pestova *et al.*, 1998)，利用 cap-independent 的方式在內質網上進行轉譯，domain 4 含有 stem-loop 及轉譯起始點 (start codon)。

3'-UTR 包含三個部分，可變區 (variable region)，依據不同基因型，有 27-70 核苷酸長度的差異；尿嘧啶形成的 poly-U 及由 98 個核苷酸序列所組成的 X region，X region 包含三個 stem-loop，屬於序列高

度保留區 (highly conserved region)，在 *in vivo* 的實驗證明複製與 poly-U 及 X region 相關性較高 (Yanagi *et al.*, 1999)。

結構性蛋白經宿主中的胜肽水解酶 (peptidase) 切割成核心蛋白 (core protein) 及套膜蛋白 (envelope protein)。核心蛋白的分子量為 21 kD，含有 RNA binding site、nuclear localization signal (NLS)。能夠組成病毒的 nucleocapsid (Yasui *et al.*, 1998) 以及與宿主的蛋白反應而影響細胞內 transcription、lipid metabolism、apoptosis 及 signaling pathway (Tellinghuisen *et al.*, 2002)。目前研究顯示 core protein 會引起脂肪肝 (steatosis) 及肝癌發生 (Moriya *et al.*, 1998; Hope *et al.*, 2002; Lerat *et al.*, 2002)。ARF/F (alternative reading frame/frameshift) protein 分子量為 17 kD (type 1a) 或 1.5 kD (type 1b)，由於在轉譯 core protein 時核糖體 (ribosome) 移位 (frameshift) 而產生，與病毒的複製有關 (Xu *et al.*, 2001)。

套膜蛋白 (Envelope protein) 包含 E1 (a.a. 192-383) 和 E2 (a.a. 384-746)，兩者皆為第一型的穿膜蛋白，在內質網上進行醣化 (N-linked glycosylation)，C 端具有 transmembrane domain (TMD)，可促使 E1 及 E2 形成兩種形式的二聚體 (heterodimer)，雙硫鍵形成的 misfolded aggregates 及非共價鍵形成的 heterodimer，作為病毒套膜基

本單元。主要功能為與細胞膜上的受體結合，促使與細胞膜融合而感染宿主 (Bartosch *et al.*, 2003)，另一功能則是在病毒完成複製後，扮演組裝病毒顆粒的角色。目前對於 E1 的了解甚少，只知道 E1 上帶有許多厭水性胺基酸，可能的功能為膜融合 (membrane fusion) (Flint *et al.*, 1999)；E2 有兩個高度變異區 (hypervariable region)，HVR1 及 HVR2，皆帶有鹼性胺基酸，少了 HVR1 會降低病毒的感染率 (Forns *et al.*, 2000)，HVR2 對於細胞上的接受器 CD81 或 LDLR (low-density lipoprotein receptor) 有高度親和性，能幫助病毒接觸細胞並感染 (Scarelli *et al.*, 2002; Roccasecca *et al.*, 2003)。

p7 protein 由 63 個胺基酸所組成的 polypeptide，分子量為 7 kD，作為結構蛋白及非結構蛋白的連接，含有兩個 transmembrane domain，可形成六聚體 (hexamers) 行使離子通道的功能 (Griffin *et al.*, 2003; Pavlovic *et al.*, 2003)，幫助病毒顆粒的釋放及成熟 (Carrasco *et al.*, 1995)；此外，p7 可由內質網分泌至細胞質，可能在分泌途徑 (secretory pathway) 中扮演具功能性的角色 (Carrere-Kremer *et al.*, 2002)。

非結構性蛋白經由病毒本身的蛋白酶切割成 NS2-NS5B，NS2 屬於沒有醣化修飾的膜蛋白，分子量為 21 kD，在形成病毒 RNA 複製

的複合體時，目前認為不需要 NS2 的參與 (Lohmann *et al.*, 1999; Blight *et al.*, 2000)。已知 NS2 的功能是能自行催化表現蛋白酶，利用 conformation-dependent 的機制切割 NS2-NS3 間連接 (Reed *et al.*, 2000)，由於蛋白酶的活性會受到金屬離子例如 $ZnCl_2$ 的刺激，或者 EDTA 的抑制，猜測可能為 zinc-dependent metalloproteinase (Hijikata *et al.*, 1993; Grakoui *et al.*, 1993)。

NS3 由 621 個胺基酸所組成，分子量為 70 kD，其中 N 端 189 個胺基酸序列為 serine proteinase domain，NS4A 包含 54 個胺基酸，分子量為 8 kD，可穩定 NS3 結構並活化蛋白酶，切割 4A/4B、4B/5A 及 5A/5B 位置；C 端 442 個胺基酸為 helicase domain，有多種功能，包括 NTPase 活性、與 RNA 結合及解 RNA 螺旋。Serine proteinase domain 能夠抑制 RIG-1 及 TLR3 的訊息傳遞；而 helicase domain 則與細胞中 PKA、PKC、p53、H2B 及 H4 結合，但目前的機制尚未清楚 (Tellinghuisen *et al.*, 2002)。

NS4B 由 251 個胺基酸所組成，分子量為 26 kD，屬於高厭水性膜蛋白，主要的功能為改變膜的形狀，製造出 membrane web，提供病毒複製或轉譯的場所 (Egger *et al.*, 2002; Gosert *et al.*, 2003)。

NS5A 由 147 個胺基酸所組成，屬於磷酸化蛋白，一般磷酸化蛋

白約 56 kD，高度磷酸化蛋白約為 58 kD (Reed *et al.*, 1998)。目前對於 NS5A 在 HCV 複製時之功能仍未清楚，但由 NMR 得知在 N 端 α -helix domain 上具高度保留之極性胺基酸，可能在 HCV 複製時扮演蛋白與蛋白間交互作用 (Ramboarina *et al.*, 2002)。NS5A 上有 interferon sensitivity determining region (Enomoto *et al.*, 1996) 可能會對抗干擾素的治療，另外，在體外試驗證明，NS5A 能夠抑制由雙股 RNA 活化的 protein kinase (Gale *et al.*, 1998)。

NS5B 由 591 個胺基酸所組成，分子量 68 kD，屬於 membrane-associated phosphoprotein，在 C 端的 21 個胺基酸含有 transmembrane domain，屬於 tail-anchored 蛋白，能夠與內質網或高基氏體的細胞膜結合 (Schmidt-Mende *et al.*, 2001)，N 端由 530 個胺基酸組成 catalytic domain，區分成 finger、palm 及 thumb 等 subdomain，在 palm domain 包含酵素活性區 (enzyme active site)，而 finger domain 與 thumb domain 會形成球型分子來固定 RNA (Biswal *et al.*, 2004)。NS5B 的角色為 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)，會與 SNARE-like cellular membrane protein 及 human vesicle-associated membrane protein (VAMP)-associated protein of 33 kDa (hVAP-33) 結合，被這些蛋白帶領到 ER 中進行複製 (Tu *et al.*, 1999)，先複製出一段負股的 RNA，再利用負股的 RNA 製造出正股的 RNA。

1.3 C 型肝炎的治療

1986 年，non-A，non-B hepatitis 開始在臨床上被治療(Hoofnagle *et al.*, 1986)，而在 1988 年，產生了第一個由干擾素治療成功的病人，而目前大部分使用長效型干擾素 (pegylated interferon alpha：Pegasys 或 PEG-Intron)合併 ribavirin 來治療慢性 C 型肝炎，依據基因型的不同，給予 24 週或 48 週的治療，通常基因型 1 治療 48 週，而其它基因型治療 24 週 (National Institutes of Health, 2002)。

HCV 在治療的過程中會出現三種反應，持續性病毒反應 (sustained virological response；SVR)，復發 (end-of-treatment response and relapse)，以及沒有反應 (non-response；NR)。其中 SVR 的定義為在治療結束後，持續六個月不會偵測到血清中的 HCV RNA；而造成復發的原因現在仍未十分清楚，有可能是治療的時間較短，ribavirin 之劑量不適當，或是與肝纖維化程度有關，大約有 1/3 慢性肝炎對於治療沒有反應 (National Institutes of Health, 2002)。

病毒的感染會刺激第一型的干擾素的表現，包括有 interferon (IFN)- α 、 β 、 ω 及 λ ，皆有抗病毒的功能 (Sen, 2001; Bekisz *et al.*, 2004)，但卻很少可以被使用在臨床上 (Robek *et al.*, 2005)，目前僅 IFN- α (α 2a、 α 2b 及 consensus IFN)使用於 HCV 的治療；在生物體外

經由第一型干擾素的刺激，會產生第二型的干擾素 (IFN- γ)，同樣也具有抗病毒的功能 (Frese *et al.*, 2002)，但有趣的是，外加的 IFN- γ 對於人類感染 HCV 病毒的清除卻是無效的 (Soza *et al.*, 2005)。

IFN- α 會刺激 IFN-stimulated genes (ISG) 的表現，在細胞中會建立起非病毒特異性的抗病毒狀態 (Sen *et al.*, 2001; Bekisz *et al.*, 2004)。一般認為，血液中的 IFN- α 會與細胞表面的接受器結合，形成雙聚體 (dimer) 後會活化與接受器相關的激酶，Janus-activated kinase 1 (Jak1) 及 tyrosine kinase 2 (Tyk2) (Gilmour *et al.*, 1995; Gale *et al.*, 2003)，而活化的激酶會磷酸化下游訊息傳遞蛋白，signal transducer and activator of transcription protein 1 及 2 (STAT1 及 STAT2)，使兩者形成雙聚體後進入細胞核中，並與 IFN-regulatory factor 9 (IRF-9) 形成複合體，結合 DNA 上 IFN-stimulated response element，大量表現 ISG，進而影響病毒蛋白的轉譯，像是 protein kinase R (PKR) 會磷酸化細胞中的 eukaryotic initiation factor 2 (eIF2)，抑制病毒蛋白的合成，而 2',5'-oligoadenylate synthetase (OAS) 會活化 ribonuclease-L (RNase-L)，細胞中的雙股 RNA 會被活化的 RNase-L 所分解 (Guo *et al.*, 2005)。

在 Replicon 系統中，因為缺少了 IFN 訊息傳遞的路徑，所以 HCV RNA 的複製對於 ISG 的表現影響不大 (Lanford *et al.*, 2003; Sumpter

et al., 2005)，而外來的 IFN，不論是否活化 HCV 複製，都可以刺激 ISG 的產生並快速降低 HCV RNA (Blight *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2003; Abe *et al.*, 2005)。

在感染 HCV 的人類周邊單核球細胞 (peripheral blood mononuclear cells) 被證實 IFN 的治療會刺激基因的表現 (Ji *et al.*, 2003)。在 liver biopsy 中，利用 microarray 的方式比較治療 PEG-IFN 及 RBV 前後，發現對於藥物治療無效的病人，ISG 會大量的表現，而治療有效的病人則是與正常人相似 (Chen *et al.*, 2005)，這個發現不但證明治療無效的病人會刺激大量 ISG 的表現，也說明病毒或宿主會活化 IFN 的抑制劑，達到抑制內生性或外來的 IFN。

Ribavirin 是鳥嘌呤核苷 (guanosine) 的類似物，合成於 1970 年，主要可以抑制 DNA 及 RNA 病毒的活性，最早用於治療呼吸融合細胞病毒 (Respiratory syncytial virus; RSV) 的感染，1990 年用於 HCV 單獨治療，但發現病毒的數量並未因此而減少，後來發現與干擾素合併治療，不但能減少病毒量，也可以降低復發的機率 (McHutchison *et al.*, 1999)

而在干擾素或長效型干擾素的治療下，病人會產生許多的副作用，包括疲倦、頭痛、肌肉疼痛、噁心、嘔吐、發燒、體重減少、骨

髓抑制及憂鬱症...等。Ribavirin也會有疲倦、皮膚過敏、咳嗽類似感冒症狀或者出現貧血等副作用 (National Institutes of Health, 2003)。



1.4 C 型肝炎治療成效的評估

以往，C 型肝炎治療的成功與否要在治療結束後六個月，利用偵測血漿中病毒 RNA 後才能判斷，但由於 IFN 與 ribavirin 在治療的過程中會產生許多的副作用，所以越來越多人針對治療初期，發展生物性因子 (biomarker)，用以預測將來治療成功的機率，目前，血漿中 HCV RNA 的變化及宿主本身之 SNP 是兩個主要的方向。

1.4.1 以 HCV RNA 的變化評估 C 型肝炎治療成效

2002 年，Kraus 等人在 453 個病人中發現，治療 12 週，即 EVR (early virologic response)，HCV RNA 如果有下降大於 2 個 log 值或偵測不到 HCV RNA，則治療成功的機會約有 65%，反之，治療成功的機會只有 3% (Kraus *et al.*, 2002)。在同一年，Castro 等人在 66 個慢性 C 型肝炎病人的治療中，將 EVR 的時間提前到治療後第 4 週及第 8 週，即 RVR (Rapid virologic response)，在第 4 週下降大於 1 個 log 值、第 8 週下降大於 2 個 log 值及第 12 週下降 3 個 log 值的陽性預測率，PPV (positive predictive value)，分別為 76%、78%及 89%，而陰性預測率，NPV (negative predictive value)，均為 100%，得到在治療後第 12 週 HCV RNA 下降 3 個 log 值是預測治療成功較好的因子 (Castro *et al.*, 2002)。而 2006 年，Yu 等人在 IFN/RBV 高劑量下治療 24 週，觀

察治療第 2 週及第 4 週的病毒量變化，發現在治療後第 2 週，病毒量下降大於 2 個 log 值，在 genotype 2 的病人 PPV 大於 93%，但 NPV 只有 30% 左右；而在治療後第 4 週，病毒量下降大於 2 個 log 值，在 genotype 2 的病人中之 PPV 約有 92%，NPV 達到 100%，在 genotype 1 的病人中之 PPV 也有 49%，NPV 則為 100%，認為在高劑量 IFN/RBV 的治療下，能把病毒量的變化提前至治療後第 4 週 (Yu *et al.*, 2006)。

1.4.2 以 Single nucleotide polymorphism (SNP) 評估 C 型肝炎治療成效

除了病毒的 RNA 能評估治療成效外，在治療的過程中會因病毒感染、干擾素的治療刺激宿主的基因表現，SNP 指基因組內 DNA 中某一特定核苷酸位置上存在轉換(transition)、顛換(transversion)等變化，這樣的變化有可能影響轉譯出蛋白質的穩定度，進而影響抗病毒的結果，以下介紹與 HCV 感染或治療有關的 SNP。

研究顯示 Interferon 的治療 HCV 的病人會產生 myxovirus resistance protein A (MxA) 蛋白，MxA 屬於 interferon-induced protein，其 promoter 區域具有 SNP (G/T, nt-88)，同時治療成功的患者出現高比例的 MxA T positive，同時具高 MxA mRNA 或 MxA 蛋白質的表現量，推測 MxA T positive 在 IFN 治療的時候表現較多的蛋白質 (Hijikata *et al.*, 2000；Suzuki *et al.*, 2004)。

有些基因的 SNP 可用於預測 C 型肝炎病毒的治療，例如

Osteopontin (OPN)。OPN 屬於 extracellular matrix protein，帶有一段 RGD motif，表現在活化的 kupffer cells 和 Stellate cells，作用是使 macrophages 移動到組織破壞的區域 (Kawashima *et al.*, 1999)，可經由免疫作用來對抗 HCV 的感染。2004 年在 OPN 上找到 4 種 SNPs，其中 -443 與其他 SNP 不同，與 HCV 病毒的活性有相關 (Mochida *et al.*, 2004)，在 2005 年，Naito 等人研究 SVR 及 NR 與 OPN 的關係，發現 SVR 在 OPN -155 (G/G) (G/-)、-616 (T/T) (T/G) 及 -1748 (G/G) (G/A) 占 84.6%，而在 -443 (T/T) 占 86.4%，所以，OPN promoter 區域之 SNP 能預測 HCV 治療成效 (Naito *et al.*, 2005)。

在 2006 年，Hwang 等人在 317 位台灣地區慢性 C 型肝炎病人中，研究與 HCV 相關的 SNP，主要有 7 個基因，分為三類來源：第一類基因是經由 IFN- α 刺激而產生，為 adenosine deaminase, RNA-specific (ADAR)、interferon consensus sequence binding protein 1 (ICSBP1) 及 interferon-induced protein 44 (IFI44)；第二類基因產生於宿主免疫反應，分別為 transporter 2 (TAP2) 及 transforming growth factor, β receptor association protein 1 (TGFBRAP1)；第三類基因會促使細胞凋亡或增生，有 caspase 5 (CASP5) 及 fibroblast growth factor 1 (FGF1)。其中，TGFBRAP1 具有高的 PPV (80%)，但在 317 個病人中卻只佔 7.9%，IFI44 在病人中佔有較高的比率 (35.3%)，但 PPV 僅有 75%，將所有

的基因合併病毒基因型來分析，病人的 PPV 由 73.48%上升至 80.21%，NPV 則由 84.62%下降至 68.42% (Hwang *et al.*, 2006)。



1.5 細胞激素與 C 型肝炎病毒感染

細胞激素最重要的角色為活化白血球，使白血球與上皮細胞作用，穿過內皮層，進入組織中執行功能 (Mackay *et al.*, 1996; Adams *et al.*, 1997; Luster *et al.*, 1998)。細胞激素會活化白血球上的 $\beta 1$ 及 $\beta 2$ integrins，使白血球停止轉動並且貼附在血管壁上 (Tanaka *et al.*, 1993; Campbell *et al.*, 1996; Carr *et al.*, 1996)。因為細胞激素的作用，使白血球可穿透過內皮層及細胞外的基質 (extracellular matrix)，直接到達正在發炎的位置 (Baggiolini *et al.*, 1998)，細胞激素與proteoglycan結合，所以能停留在內皮的glycocalyx及細胞外基質，扮演吸引白血球至發炎處的角色 (Tanaka *et al.*, 1993; Tanaka *et al.*, 1998)。

在 HCV 感染過程中，在急性期時，細胞激素與其接受體的作用，將會吸引大量的 T 細胞進入肝小葉中，辨認已感染 HCV 細胞中病毒之抗原，引起免疫反應，達到病毒的清除，假如免疫反應的效果不好或產生 T 細胞的速度下降，病毒便會持續的感染，造成慢性肝炎的發生，在組織不斷的被破壞下，未來會產生肝臟纖維化或者是肝硬化 (Seeff *et al.*, 1997)。現在對於 HCV 如何逃過免疫反應，造成持續性的感染仍未清楚 (Semmo *et al.*, 2007)，當 HCV 感染肝細胞，病毒進行複製時會刺激 IFN- α 及 IFN- β 的表現，並活化下游基因及 IFN- γ ，大

量產生影響病毒複製及轉譯的蛋白 (Meurs *et al.*, 2007)。而當 C 型肝炎病毒轉譯出結構性及非結構性蛋白質像 core 和 NS3 時，也會刺激巨噬細胞 (Kupffer) 產生 IL-10 與 TNF- α (Chang *et al.*, 2007)。同時，NS5A 會刺激具有 anti-interferon 功能的 IL-8 產生，藉由抑制 transducers and activators of transcription 1 (STAT1) 的 serine 與 tyrosine 及 STAT2 的 tyrosine 磷酸化，達到抑制干擾素的產生 (Wertheimer *et al.*, 2007)。接下來，將會介紹各類的細胞激素與 HCV 的關係。

細胞激素可分為四大類，第一類為 chemokine，第二類為 interleukin，第三類為 growth factor，第四類歸類為其他。

第一類的細胞激素為 chemokine，大小約為 8-10 kD，在成熟的蛋白中依據 cysteine 的位置可以分為四類，分別為 C、CC、CXC 及 CX3C，與 HCV 相關的主要有 CXC 家族及 CC 家族。

在 CXC 家族中通常還區分成 N 端是否具有 ELR motif (glutamic acid-leucine-arginine)。interleukin-8 (IL-8) 具有 ELR motif，能夠吸引嗜中性球 (Larsen *et al.*, 1989)。感染 HCV 病人的 IL-8 與正常人並沒有差異，而患有酒精性肝炎的病人 (alcoholic liver disease; ALD) 之 IL-8 則會降低 (Neuman *et al.*, 2001)。不具 ELR motif 的 CXC 家族包括有

interferon-inducible protein (IP-10) 及 monokine induced by IFN- γ (Mig), 主要的功能是吸引淋巴球(Farber *et al.*, 1993; Liao *et al.*, 1995; Taub *et al.*, 1996)。在感染HCV後, IP-10在肝組織中的mRNA及血清中的蛋白均會高於正常人, 但兩者並沒有正相關 (Mihm *et al.*, 2003), 血清中的IP-10在治療24或48週(治療結束時)會下降, 在治療前、治療結束及治療結束後6個月, 治療成功的蛋白量均會小於治療失敗 (Apolinario *et al.*, 2004)。

CC家族的主要功能是吸引T細胞, 包括有macrophage chemotactic protein (MCP-1)、macrophage inflammatory protein (MIP-1 α) 及 RANTES (regulated upon activation, normal T-cell expressed, and presumably secreted)。MCP-1是由單核球或活化的hepatic stellate cells (HSC)細胞分泌, 主要的功能為吸引淋巴球及單核球進入肝臟, 清除組織受損的區域。在感染慢性C型肝炎時會被刺激產生, 感染HCV在肝組織內的MCP-1 mRNA的表現較正常人高 (Leroy *et al.*, 2004), 而在血清蛋白中, 治療前, C型肝炎病人與正常人並無差異, 但在治療16週後, C型肝炎病患的MCP-1會高於正常人, 且治療失敗的病人較為顯著(Panasiuk *et al.*, 2004)。將HCV clone至Huh7及HepG2中, 會促使RANTES及MCP-1的產生 (Soo *et al.*, 2002), 感染HCV病人肝臟中的RANTES mRNA會高於正常人7.2倍 (Nischalke *et al.*, 2004)。

第二類的細胞激素為介白素 (Interleukin)，區分為Th1及Th2兩類，Th1包括interleukin-2 (IL-2)、Tumor necrosis factor α (TNF α)及interferon gamma (IFN γ)，能夠產生毒殺T細胞 (cytotoxic T cell)及活化殺手細胞 (nature killer cell；NK cell)等抗病毒的免疫反應。感染HCV病人與正常人比較，TNF α 在血清中濃度會上升 (335 \pm 10vs.77 \pm 3 pg/ml)，不論使用IFN α 或與Ribavirin合併治療，治療前、治療結束 (48週)及結束後六個月，血清中的TNF α 均會持續下降。但在IFN α 與RBV合併治療中，治療失敗大於治療成功具有統計上的意義 ($p<0.05$) (Neuman *et al.*, 2001)。Th2有IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12及IL-13，能促使抗體的產生，而Th1及Th2彼此會互相拮抗 (Davis *et al.*, 1999；Lechmann *et al.*, 1999)。IL-6在治療前HCV病人會大於正常人，但無法與有酒精性肝炎的病人區分 (Neuman *et al.*, 2001)，不論在治療前或治療後16週，治療失敗均會高於治療成功 (Panasiuk *et al.*, 2004)，而在治療結束 (48週)及結束後六個月，治療失敗會繼續上升，治療成功會繼續下降 (Neuman *et al.*, 2001)。IL-10則是在治療前，治療成功的會高於失敗，而治療後，治療失敗的IL-10會上升，在治療16週後觀察無法區分治療成功或失敗間的差異 (Panasiuk *et al.*, 2004)。IL-12在HCV的濃度會高於正常人，但是無法與酒精性肝炎區分 (Neuman *et al.*, 2001)。

第三類的細胞激素為growth factor，包括有TGF- β 1、VEGF、bFGF、HGF、EGF、TPO及IGF-1，分別介紹如下：transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)，慢性肝炎在肝細胞中TGF- β 1 mRNA表現量會大於正常人 (Castilla *et al.*, 1991；Roulot *et al.*, 1995)，而TGF- β 1在血清中的表現量，患有慢性C型肝炎病人與正常人的表現並無差異 (Zhang *et al.*, 2003)，但在2005年Fisiak等人及2006年Janczewska-kazek等人的結果顯示患有慢性C型肝炎病人表現量高於正常人，並且在治療過程中會逐漸下降，尤其是治療成功的病人(Marek *et al.*, 2005；Janczewska-kazek *et al.*, 2006)，而治療失敗的人在治療前及治療結束後，血清中TGF- β 1的表現沒有差異 (Marek *et al.*, 2005)或者是下降 (Janczewska-kazek *et al.*, 2006)。Vascular endothelial growth factor (VEGF)在正常人與HCV病人並無顯著差異 (Janczewska-kazek *et al.*, 2006)，在治療後，治療成功的病人會上升 (由 112.8 ± 10.2 pg/ml至 315.03 ± 29.3 pg/ml, $p = 0.043$)，治療失敗的病人變化不具意義 (由 172.36 pg/ml至 245.83 pg/ml)。Basic fibroblast growth factor (bFGF) 在正常人與感染HCV病人 (3.3 ± 0.39 pg/ml與 4.35 ± 0.58 pg/ml)並無顯著差異 (Janczewska-kazek *et al.*, 2006)，治療成功的病人會上升 (由 2.51 ± 0.29 pg/ml至 15.79 ± 1.8 pg/ml, $p = 0.04$)，治療失敗的病人變化不具意義 (由 5.94 pg/ml至 4.35 pg/ml)，在治療結束後，治療成功在治療

結束的值遠大於治療失敗 ($p= 0.04$)。Hepatocyte growth factor (HGF) 在HCV病人與正常人並無差異，而治療成功與治療失敗在治療前中後均看不出差異性 (Anatol *et al.*, 2005)。Epidermal growth factor (EGF) 在治療之前，HCV病人的表現量高於正常人，但治療16週後與正常人相似，以治療結束後24週與治療前比較，治療成功的並沒有變化，而治療失敗的則會下降，而治療成功與治療失敗在治療前中後均看不出差異性 (Anatol *et al.*, 2005)。Thrombopoietin (TPO)在治療前，治療成功的與正常人蛋白濃度相似，治療失敗的高於正常人及治療成功者，以治療結束後24週與治療前比較，治療成功的會上升，而治療失敗的則會下降，而治療成功與治療失敗在治療結束後看不出差異性 (Anatol *et al.*, 2005)。Platelet-derived growth factor (PDGF)，感染HCV病人會降低血清中蛋白，而治療前，治療成功的會高於失敗的，以治療結束後24週與治療前比較，治療成功的會下降，而治療失敗的則會下降，而治療成功與治療失敗治療結束後看不出差異性 (Anatol *et al.*, 2005)。大部分血清中insulin-like growth factor-1 (IGF-1)及insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3)來自於肝細胞的合成，而肝臟的疾病會造成IGF-1及IGFBP-3蛋白的減少 (Wu *et al.*, 2004)，相對於正常人，患有慢性C型肝炎血清中的IGF-1及IGFBP-3蛋白的表現量較低 (Elsammak *et al.*, 2006)。

第四類的細胞激素為leptin、matrix metalloproteinases (MMPs)及調控MMP的tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)。Leptin與脂肪代謝有關，會刺激脂肪新生及所需酵素acetyl CoA carboxylase的基因表現，在感染HCV病人的血清中，leptin的濃度會上升 (Piche *et al.*, 2002；Liu *et al.*, 2005)。Eguchi等人認為leptin在血清中濃度小於8 ng/ml對於HCV的治療成功的機率較高 (89.29%)，反之，治療成功的機率僅12.5% (Eguchi *et al.*, 2006)。MMPs具有分解膠原蛋白(collagen)的功能，在細胞中扮演的角色為組織的重建 (tissue remodeling)。Leory等人利用ELISA觀察血清中的MMP-1、2及9，僅有MMP-9在慢性肝炎會低於正常人，MMP-1及MMP-2無法區分慢性肝炎與正常人 (Leory *et al.*, 2004)，HCV病患血清中MMP-1表現量低於正常人 (Fisiak *et al.*, 2005)。TIMP能夠調控MMP功能，Benyon等人在1996年以in situ hybridization的方式發現肝臟星狀細胞 (hepatic stellate cells；HSC)中有TIMP-1及TIMP-2的存在。2001年發現肝硬化的肝臟中TIMP-1及TIMP-2 mRNA的表現量高於正常人 (Lichtinghagen *et al.*, 2001)，HCV患者PBMC中的TIMP-1 mRNA表現量高於正常人 (Zhang *et al.*, 2003)，而以ELISA方式血清中的TIMP-1及TIMP-2，具有慢性C型肝炎血清中的TIMP-1 (Zhang *et al.*, 2003；Leory *et al.*, 2004；Fisiak *et al.*, 2005)及TIMP-2 (Zhang *et al.*, 2003；Leory *et al.*, 2004)高於正常人。

1.6 研究動機與策略

由於在病毒清除過程扮演重要角色，而有關細胞激素在 HCV 治療過程中的機制尚不清楚，因此，我們希望可以經由兩個方面瞭解細胞激素或細胞因子調控 HCV 感染的可能機制，首先，在臨床檢體方面，利用蛋白質晶片的方式，大量篩選在 HCV 治療成功或治療失敗在治療前及治療 1 個月後的細胞激素變化，用 ELISA 的方式來確認蛋白質晶片的結果；其次，在細胞層次上，藉由二維電泳方法，以蛋白質等電點及分子量的不同，區分在肝癌細胞 (Huh7) 及帶有 HCV subgenome 之 replicon 細胞所分泌蛋白質的差異。



第二章 材料與方法

2.1 檢體收集及分離

檢體的來源為中國醫藥大學附設醫院，患有慢性C型肝炎的病人，參與健保長效型的干擾素 (PEG-interferon) 與Ribavirin的合併治療計畫。在病人治療前至治療結束後六個月，以EDTA管收集病人血液的剩餘檢體，經過1500 rpm的離心15分鐘，保存於-80°C。

2.2 血漿中細胞激素分析

2.2.1 細胞激素套組選擇

為了篩選在HCV病人治療前後細胞激素的變化，使用Human Cytokine Array作初步篩選，Human Cytokine Array由 20 X 30 mm nitrocellulose所組成，包含有 11 X 8 個點，其中包括79個與細胞激素相關的抗體，6個positive control抗體，3個negative control抗體，其中有2個為牛血清白蛋白 (bovine serum albumin; BSA)，另1個點為緩衝溶液 (sample buffer)所組成。

2.2.2 選擇病人

在治療結束後六個月偵測血漿中的HCV病毒RNA，若病毒量小

於detection limitation為治療成功，反之則為治療失敗。我們挑選兩組治療成功與治療失敗的病人，觀察兩者在治療前及治療一個月的細胞激素變化。

第一組，治療失敗的病人年紀為58歲，男性，屬於1b病毒基因型，治療前的病毒量為 1.1×10^7 copies/ml，治療3個月、6個月及結束後6個月的病毒量分別為1270、639及9050 copies/ml；治療成功的病人年紀為52歲，男性，屬於1b基因型，治療前的病毒量為 6.2×10^6 copies/ml，治療結束後6個月病毒量小於1000 copies/ml。

第二組，治療失敗的病人年紀為49歲，男性，屬於1b病毒基因型，治療前的病毒量為 7.01×10^5 copies/ml，治療3個月、6個月及結束後6個月的病毒量分別為<86、<86及 3.41×10^5 copies/ml；治療成功的病人年紀為57歲，男性，屬於1b基因型，治療前的病毒量為 6.57×10^5 copies/ml，治療結束後6個月病毒量小於86 copies/ml。

2.2.3 操作步驟

將membrane放置在eight-well tray中，加入2 ml 1X blocking buffer，在室溫下培養30分鐘，血漿則利用blocking buffer稀釋5倍，在blocking結束後加入1 ml稀釋後的血漿，在4°C環境中培養16小時，利用2 ml washing buffer I及II在室溫下分別清洗2及3次，每次時間為5分

鐘，加入biotinylated antibody，繼續在4°C中培養16小時，經過同樣的清洗步驟，加入HRP-conjugated streptavidin，在室溫培養60分鐘，清洗並加入detection buffer，去除多餘的detection buffer後壓片，結束後將membrane保存在-80°C。

2.3 酵素連結免疫吸附試驗 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

2.3.1 ELISA 試劑組選擇

經由蛋白質晶片的結果，決定挑選以下的ELISA試劑來確認晶片的結果，ELISA試劑組分為兩種，第一種來自R&D System，使用的細胞激素為EGF，第二種來自RayBiotech Inc.，有4種細胞激素使用此ELISA kit來確認，分別為ENA-78、IL-1 α 、RANTES、EGF。

2.3.2 操作步驟 (R&D System)

Capture Antibody 以 PBS 配製成 4 μ g/ml 之濃度，每個 well 中各加入 100 μ l，在室溫中放置 12 小時，甩乾後使用 400 μ l wash buffer (PBS + 0.05% Tween 20)清洗三次，加入 300 μ l Reagent Diluent (PBS + 1% BSA)，在室溫中 blocking 1 小時，甩乾後以 400 μ l wash buffer 清洗三次，加入 100 μ l 的 standard 或是檢體，在室溫中培養 2 小時，甩乾後以 400 μ l wash buffer 清洗三次，加入 100 μ l 50 ng/ml 的 detection

antibody，在室溫中培養 2 小時，甩乾後以 400 μl wash buffer 清洗三次，加入 100 μl 稀釋 200 倍的 streptavidin-HRP，在室溫中培養 20 分鐘，甩乾後以 400 μl wash buffer 清洗三次，加入 100 μl 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)，室溫中培養 20 分鐘，加入 50 μl 2N H_2SO_4 ，以 450 nm 測吸光值。

2.3.3 操作步驟 (RayBiotech Inc.)

利用 Assay Diluent A (RayBiotech Inc., United States) 配置 standard 及稀釋檢體，每個 well 中加入 100 μl 的 standard 或是檢體，在室溫中培養 2.5 小時，以 200 μl washing buffer 清洗 4 次，甩乾後加入 100 μl biotinylated antibody，在室溫中培養 1 小時，以 200 μl washing buffer 清洗 4 次，甩乾後加入 100 μl HRP- streptavidin solution，室溫下培養 45 分鐘，以 200 μl washing buffer 清洗 5 次，甩乾後避光操作，加入 100 μl TMB One-Step Substrate Reagent，室溫下 30 分鐘後加入 50 μl stop solution，以 450 nm 測吸光值。

2.4 預測模型

利用統計軟體 SAS 9.1 來進行分析，所有的結果均為雙尾，在 $p < 0.05$ 為統計上具有意義。

將ELISA的結果分為失敗治療前、失敗治療後、成功治療前、成功治療後、失敗治療前/治療後、成功治療前/治療後、失敗治療前一治療後及成功治療前/治療後。

計算出算術平均數及四分位數，由一維散佈圖及Boxplot觀察治療失敗與成功在0M及1M的細胞激素分佈型態，我們的樣本數因未超過30個，因此使用無母數分析 (Wilcoxon rank-sum test)來確認成功與失敗在治療前、治療1個月、治療後與治療前的比率及差值是否具有統計上意義，以配對T檢定及Wilcoxon rank-sum test比較治療成功與治療失敗在治療前後是否具有統計上的意義。

利用logistic regression的方式能清楚的比較出每個變數影響的程度，假設治療失敗為0，治療成功為1，變數為治療前 (0M)、治療後 (1M)、治療後/治療前 (1M/0M) 及治療後-治療前 (1M-0M)，單一變數及多變數同時分析，並畫出diagnostic graphs，觀察曲線形狀來確認是否為合理的預測模型。

利用ROC curve決定擁有最適合的敏感性 (sensitive) 與特異性 (specific) 之預測模型，計算出成功的機率、陽性檢出率 (positive predictive value; PPV)及陰性檢出率 (negative predictive value; NPV)。

2.5 細胞培養

2.5.1 Huh7 (Human hepatoma cell line)

Huh7為來自57歲的日本男性之肝臟細胞，屬於分化良好的肝癌細胞 (Hidekazu *et al.*, 1982)，培養於添加10% 胎牛血清 (FBS) (Hyclone™)的DMEM (Hyclone)，100 Units/ml 青黴素 (Penicillin) 及 100 µg/ml 鏈黴素 (Streptomycin) (GIBCO, USA)中。

2.5.2 Replicon

由 Huh7 細胞轉殖基因型 1b 中與 HCV 複製相關的基因，包括 5'-UTR、3'UTR 及 NS3-NS5B 部分，在 NS5A 基因上有 adaptive mutation，在轉譯出的胺基酸 1179 的位置，由原本的絲胺酸置換成白胺酸，另外，還包括可以分解 Neomycin 的 neo^r 基因方便用於篩選 (Blight *et al.*, 2000) (附圖二)，培養於添加 10% FBS 的 DMEM (Hyclone™)，100 Units/ml Penicillin，100 µg/ml Streptomycin (GIBCO™)及 800 µg/ml G418 (Geneticin®)。

在加藥實驗中，先以 3.5 cm dish 培養 5×10^5 Replicon 細胞，8 小時後以 PBS 清洗細胞兩次，分別加入 DMSO 1 µl/ml 及 PEG-interferon 20 ng/ml，培養 48 小時後收細胞 RNA。

2.5.3 Con1 細胞

Replicon 細胞能夠在細胞中複製，卻無法產生病毒顆粒，Con1 細胞由德國慢性肝炎病人所分離出來，屬於 1b 基因型，增加 3 個 adaptive mutation 來提高複製的效率，分別為 E1202G、T1280T 及 K1846T (Pietschmann *et al.*, 2002)。

Con1 細胞就是利用 Huh7 細胞轉殖一段 Full-length Con1 DNA，培養於添加 10% FBS 的 DMEM，100 Units/ml Penicillin，100 µg/ml Streptomycin、800 µg/ml G418 及 100 µM NEAA (GIBCO™)。

2.5.4 Huh7.5

Replicon 細胞 (NS5A 不具 adaptive mutation) 經由 IFN- α 治療，利用 RT-PCR 的方式確認細胞中沒有 HCV RNA 存在，形成 highly permissive cell line (Blight *et al.*, 2002)。Huh7.5 培養於添加 10% FBS 的 DMEM，100 Units/ml Penicillin，100 µg/ml Streptomycin 及 100 µM NEAA。

2.6 核酸萃取 (RNA extraction)

以 PBS 清洗細胞兩次，加入 0.5 ml REzol™ C&T，靜置 5 分鐘後移至 1.5 ml eppendorf，加入 0.1 ml chloroform，vortex 數次至均質狀，

以 13000 rpm 離心 15 分鐘，取上清液，加入等體積的 isopropanol，放置在 -80°C (30 分鐘以上)，以 13000 rpm 離心 15 分鐘，以 1 ml 70% ethanol 清洗 RNA 兩次，去除 ethanol，以 20 μ l ddH₂O 溶解 RNA。

2.7 反轉錄即時聚合酶連鎖反應 (Reverse-transcription Real-time Polymerase Chain Reaction)

RT-Real-time-PCR 之混合物包含有 100 ng RNA，10 μ l power SYBR Green Master Mix (ABI)，125 nM Forward primer，125 nM Reverse primer，0.625 unit/ μ l Reverse Transcriptase (ABI)，0.00125 unit/ μ l RNase Inhibitor (ABI)，補 ddH₂O 至 20 μ l，以 ABI PRISM 7000 進行反應，反應條件分為 3 個 stages，stage 1 進行 reverse transcription，stage 2 及 3 進行 PCR，stage 1：48°C，30 min；stage 2：95°C，10 min；stage 3：95°C，15 sec，60°C，1 min (40 cycles)。本實驗使用的引子序列如下：ENA-78-F (5'-TTACAGACCACGCAG-3')，ENA-78-R (5'-GCTTCTGGATCAAGACA-3')，HCV-F (5'-TGCGGAACCGGTGAGTACA-3')，HCV-R (5'-CTTAAGGTTTAGGATTCGTGCTCAT-3')， β -actin-F (5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACG-3')， β -actin-R (5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATG-3')

2.8 二維電泳 (2-Dimensional Gel Electrophoresis)

在 10 cm 培養皿中，培養 1×10^6 的 Huh7 或 Replicon，經過 24 小時，以 2 次 5 ml PBS 清洗後，加入含有 0.2% FBS、100 Units/ml Penicillin 及 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin 之 DMEM，在 37°C 及 5% CO_2 培養 72 小時，收集 supernatant，離心 3000 rpm，15 min，取上清液，以 5 kD 蛋白質濃縮管濃縮蛋白，濃縮好的蛋白等比例加入 rehydration buffer (8 M urea、2% CHAPS、1% DTT 及 0.5% Bio-lytes)，打超音波兩次，每次 5 min，中間間隔 5 min，放置在 4°C 6 小時，測蛋白濃度，取 300 μg 的蛋白補 rehydration buffer 至 300 μl ，加入 5 μl bromophenol blue。

將 sample 加入電極板中，加入撕開的 strip (pH 4-7)，避免氣泡的產生，靜置 1 小時，加入 2 ml mineral oil，上機 50 V rehydration 12 小時，在兩端電極放入電極墊 (wick)，設定 run program (S1- 250 V，15 分鐘；S2- 10000 V linear，3 小時；S3- 10000 V，60000 VHrs；S4- 500 V，12 小時)。

取出 strip 並利用 3M paper 除去 mineral oil，經過 equilibration buffer 平衡膠條後以 12% SDS-PAGE 跑膠 15 mA/Gel 2 小時，20 mA/Gel 8 小時。

2.9 硝酸銀染色 (Silver stain)

跑膠結束後，利用 solution A (50% methanol and 25% acetic acid) 固定至少兩個小時，接著，加入 solution B (30% methanol)，搖晃 15 分鐘，以二次水清洗三次，每次 5 分鐘，加入 solution C (0.8 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)，搖晃 2 分鐘，以二次水清洗三次，每次 30 秒，加入含鎘酸銀的 solution D (0.2% AgNO_3)，搖晃 25 分鐘，以二次水清洗兩次，每次 30 秒，加入 solution E (0.28 M Na_2CO_3 , 0.0185% formaldehyde and 0.016 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)使膠呈色，快速的用二次水清洗後，加入 solution F (0.042 M $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)停止反應的進行約 10 分鐘，最後以二次水取代 solution F 保存膠，將結果掃描成 TIF 檔案格式，並使用 ImageMaster™ 2D Platinum Software (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)進行分析。

第三章 結果

3.1 利用蛋白質晶片分析病人治療前後一個月細胞激素的變化

在兩次蛋白質晶片的實驗中，我們分別分成兩個部分來討論，第一部份比較治療成功與治療失敗在治療前細胞激素表現量，第二部份比較治療成功與治療失敗在治療前與治療後 1 個月的變化：

本研究使用的蛋白質晶片具有 79 種細胞激素，在第一組的結果中，治療前，治療成功有 13 個細胞激素的表現量高於治療失敗，分別為 ENA-78、IL-1 α 、MIP-1、RANTES、EGF、IGF-1、Angiogenin、Oncostain M、VEGF、Leptin、IGFBP-1、IGFBP-2 及 TGF- 2；而治療成功有 4 個細胞激素的表現量低於治療失敗，有 GRO、BDNF、IGFBP-3 及 TGF- 3。治療後 1 個月細胞激素與治療前比較，在治療 1 個月後，有 3 個細胞激素在治療成功會下降，且治療失敗不變或上升的有 IL-1 α 、RANTES 及 Oncostain M；治療 1 個月後，治療成功不變，且治療失敗會下降的有 Angiogenin、BDNF、IGFBP-1、IGFBP-2、NAP-2 及 TIMP-2 (圖 1)。

在第二組蛋白質晶片的結果中，治療前，治療成功有 10 個細胞激素的表現量高於治療失敗，分別有 ENA-78、GRO、IL-8、RANTES、EGF、Angiogenin、PDGF-BB、IGFBP-1、IGFBP-2 及 NT-4；而治療

成功有 2 個細胞激素 GRO α 及 IL-1 α 的表現量低於治療失敗。而在治療後 1 個月，治療成功下降，且治療失敗不變或上升的有 MIP-1 δ 、RANTES、EGF、BDNF、NT-4、Osteoprotegerin 及 TIMP-1；治療成功不變，且治療失敗上升的有 IGFBP-2 及 TIMP-2。

比對兩組蛋白質晶片結果後得到：在治療之前，治療成功細胞激素表現量高於失敗的有 ENA-78、RANTES、EGF、Angiogenin、IGFBP-1 及 IGFBP-2；而治療成功細胞激素表現量低於失敗僅有 GRO。治療後 1 個月比上治療前，RANTES 是唯一在兩組結果相同，均為治療成功下降，而失敗不變 (圖 2)。

3.2 測試酵素連結免疫吸附試驗(ELISA)之穩定性

在分析蛋白質晶片的結果後，接下來，我們需要利用酵素連結免疫吸附試驗的方式來確認蛋白質晶片的結果，為了確定酵素連結免疫吸附試驗的方式實驗的穩定性及再線性，在不同的時間點操作 EGF ELISA，先將 EGF standard 配製成 125 pg/ml，再以序列稀釋分別配置出 62.5、31.25、15.63、7.81 及 3.91 pg/ml，以 ELISA 方式操作 15 次，計算其平均值、標準差及變異係數，在這 15 次實驗中，每次操作均為二重複，二重複的變異係數小於 10%，而實驗與實驗間的變異係數也在 10%以下 (圖 3)。

3.3 以酵素連結免疫吸附試驗(ELISA)確認細胞激素在 HCV 治療的變化

在蛋白質晶片的結果中，在治療後比治療前，治療成功 RANTES 的表現量會下降，且治療失敗沒有變化。利用 ELISA 來確認一組病人的蛋白質晶片結果，顯示 ELISA 的結果與蛋白質晶片吻合；但加入更多病人後，經由配對 T-test 統計分析，RANTES 在治療成功與治療失敗治療後的表現量不變 ($p>0.1$) (圖 3)。

EGF 在蛋白質晶片得到的結果為治療前，治療成功的表現量高於失敗，治療後比上治療前，治療成功下降，治療失敗不變。兩組病人經 ELISA 確認後，結果與蛋白質晶片吻合；加入更多病人後，在治療前，在 Wilcoxon 的統計結果中，治療成功與治療失敗沒有統計上意義 ($p=0.3219$)，而比較治療後 1 個月與治療前，治療失敗與成功的 EGF 表現量下降，在配對 T-test ($p=0.008$ 及 0.004) 有統計上的意義 (圖 4)。

ENA-78 在蛋白質晶片的結果為，治療前，治療成功的表現量高於失敗，而治療成功與失敗在治療後表現量均會下降。在兩組病人的 ELISA 與蛋白質晶片得到一致的結果；加入更多病人得到，治療前，在 Wilcoxon 的統計結果中，治療成功與治療失敗沒有統計上意義

($p=0.4825$)，而治療後，經由配對 T-test 得到治療成功與失敗的表現量下降具有統計上意義($p=0.008$ 及 $p=0.004$)，將病人的治療後 1 個月及治療前的 ENA-78 相除，得到治療成功下降的比率會小於治療失敗，兩者下降的比率經由 Wilcoxon test 統計的結果具統計上意義($p=0.014$) (圖 5)。

IL-1 α 在蛋白質晶片中，治療前，治療成功的表現量小於失敗，治療後比治療前，治療成功下降，失敗不變。在 ELISA 的結果顯示，第一組病人結果與蛋白質晶片一致，但第二組病人治療失敗可能因為 IL-1 α 蛋白的表現量低，所以在治療後沒有明顯變化，但 IL-1 α 可能是調控 ENA-78 的上游分子，並且在文獻中顯示 HCV 會刺激肝小葉產生 IL-1 α (Kasprzak *et al.*, 2004)，因此，希望經由加入更多的病人，來確認 IL-1 α 在治療成功與失敗間的差異，治療成功會上升利用 Wilcoxon 統計在治療前不具統計意義($p=0.389$)，治療失敗在治療後下降，配對 T-test 具有意義($p=0.064$) (圖 6)。

3.4 使用 SAS 統計軟體建立 ENA-78 及 ENA-78 合併 EGF 與 IL-1 α

預測治療結果模型

線性迴歸通常是在解釋兩組連續變數的關係，經由解釋變數的值來預測或估計反應變數的值，而我們的反應變數為二元分類，治療成

功與治療失敗，在希望利用解釋變數的值來預測或估計二元反應變數的值，我們使用了羅吉斯迴歸 (logistic regression) 的方式。將單一的解釋變數，例如治療前的數值、治療後 1 個月數值、治療前後相除或相減，或合併兩種及三種解釋變數帶入羅吉斯迴歸中，選擇較有統計意義的迴歸方程式，計算出所有病人的成功機率，利用成功的機率與治療成功及失敗繪出 ROC curve，選擇最靠近 ROC curve 的左上角，即擁有最佳的敏感性及特異性作為 cut-off value。

我們使用單一種細胞激素來建立模型時，唯一看到 $p < 0.1$ 的只有 ENA-78，所預測出的模式為：

$$\ln(p/(1-P)) = 1.5291 + 0.00042 * \text{ENA-78 (1M)} - 2.9611 * \text{ENA-78 (1M/0M)}$$

$$P=0.0724$$

由 ROC curve (圖 7) 得到曲線下積分面積為 0.796，cut-off value 為 0.63，敏感性是治療成功被我們預測為治療成功的比率為 61%，特異性是治療失敗中被我們預測為治療失敗的比率為 92.9%，陽性預測率為成功機率高於 cut-off value 且為治療成功的比率為 91.6%，陰性預測率為成功機率低於 cut-off value 且為治療失敗的比率為 65%。

而將 ENA-78、IL-1 α 及 EGF 同時丟進預測模型，得到的模型為：

$$\ln(p/(1-P)) = 3.2432 + 0.00104 * \text{ENA-78 (1M)} + 7.8938 * \text{ENA-78 (1M/0M)} - 0.00081 * \text{EGF (0M)} - 0.5919 * \text{IL-1}\alpha \text{ (1M/0M)}$$

$$p=0.0089$$

由 ROC curve (圖 8) 得到曲線下積分面積為 0.875，cut-off value 為 0.6，敏感性有 87.5%，特異性是 83.3%，陽性預測率為 87.5%，陰性預測率為 83.3%。

3.5 經由所建立的 ENA-78 預測模型進行 Blind test

以 ELISA 偵測 22 個未知治療結果病人的治療前及治療後 1 個月的血漿中 ENA-78 蛋白表現量，將結果帶入 ENA-78 的預測模型中，計算出成功的機率後，以成功機率 0.63 為 cut-off value，成功機率小於 0.63 判定為失敗，成功機率大於 0.63 判定為成功，經過比對後，PPV 為 50%，而 NPV 為 37.5% (圖 9)。

3.6 以定量聚合酶連鎖反應分析 ENA-78 在肝癌相關細胞中 mRNA 的表現

治療慢性 C 型肝炎後 1 個月，血漿中 ENA-78 的蛋白量會下降，但不清楚在 HCV 的感染下，細胞中 ENA-78 的表現是否也有所改變。因此我們抽取下列細胞的 RNA，包括 Huh7，含有 HCV 全長及複製區域之 Con1 及 Replicon 細胞，以及用干擾素處理至無法偵測出 HCV

RNA 的 Huh7.5 等，藉由反轉錄即時聚合酶連鎖反應的方式，觀察 HCV 及 ENA-78 的 RNA 表現量 (圖 10)。

在未處理的 Replicon 與 Con1 細胞中，ENA-78 mRNA 的表現量高於不具有 HCV 基因的 Huh7 細胞，而 Con1 及 Replicon 細胞經干擾素處理後，HCV RNA 會下降。另外 Con1 的 ENA-78 mRNA 會上升，而 Replicon 在 HCV 有下降的情形，ENA-78 mRNA 沒有變化。

3.7 以定量聚合酶連鎖反應分析 ENA-78 在中周邊單核球細胞 mRNA 的表現

經過治療慢性肝炎病人，血漿中的 ENA-78 表現量降低，而我們利用干擾素處理 Con1 及 Replicon 細胞，卻會得到 ENA-78 mRNA 的表現量上升。目前，血液中有明確的證據顯示，血液周邊單核球細胞 (peripheral blood mononuclear cell; PBMC) 被 HCV 所感染 (Pham *et al.*, 2004)，因此，我們挑選治療成功的病人，抽取在治療前、治療後 1 個月及治療後 6 個月的 PBMC，觀察 ENA-78 mRNA 的表現。除了 33 號病人在治療前後均無改變外，ENA-78 mRNA 在其他病人 PBMC 中的表現為治療後 1 個月會上升，而治療後 6 個月會下降 (圖 10)。

3.8 利用蛋白質二維電泳方法觀察肝癌相關細胞之分泌性蛋白質

經由蛋白質晶片及 ELISA 分析細胞激素在臨床上及肝癌相關細胞中的表現後，本研究想要探討在 HCV 感染細胞之後，是否會促使細胞分泌蛋白，來影響細胞本身或鄰近的細胞產生細胞激素，吸引像是嗜中性球或淋巴球等免疫細胞進行病毒的清除，所以將利用蛋白質二維電泳的方式分析細胞所分泌的蛋白質。

首先，將細胞 Huh7 及 Replicon 培養於含 0.2% FBS 的 DMEM，72 小時後，利用蛋白質濃縮管收集上清液，以 pH 4-7 進行一維電泳，再依蛋白質分子量以二維電泳分離，最後以銀染呈現蛋白點。

比對 Huh7 與 Replicon 細胞的蛋白質表現，挑選僅由 Replicon 細胞所分泌而 Huh7 細胞沒有分泌的 5 個候選蛋白質，以 Image Master™ 2D Platinum, Verision 6.0 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) 分析這 5 個候選蛋白質的 pI 值，且確認不是 HCV 的病毒結構或非結構蛋白質後，將樣本送至長庚大學余兆松老師實驗室以質譜儀分析，並使用英國 Matrix Science 公司所研發的 Mascot 蛋白質資料庫搜尋系統來鑑定比對蛋白質，比對的分數 (score) 至少要超過 60 分，其中有三個蛋白，分別為 myosin (heavy chain 3)、ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 及 transthyretin (homodimer of chain A) (圖 11)。

第四章 討論

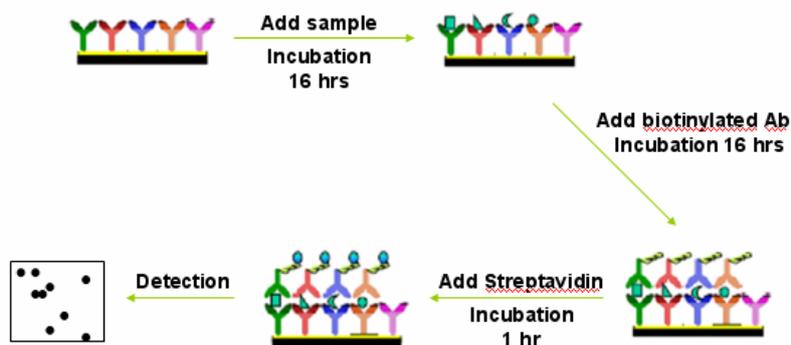
病毒的感染會刺激具備許多功能的細胞激素產生，首先，這些細胞激素能引起免疫反應，在第一時間吸引白血球進入組織中，清除已被感染的細胞。再者，利用訊息傳遞的方式刺激干擾素及相關基因的產生，不但能防止病毒的複製及分解病毒的基因，也能促使鄰近細胞不容易被感染。最後，這些細胞激素能促進細胞的再生，進行破壞組織的修復。

過去的文獻大多研究在HCV治療前及治療12週後細胞激素的變化 (Kraus *et al.*, 2002 ; Castro *et al.*, 2002)。然而，病人在長效型干擾素及Ribavirin的治療下，會產生疲倦、噁心、嘔吐、骨髓抑制、憂鬱症及貧血等副作用 (National Institutes of Health, 2003)。由於希望能提前得知可能治療成功的機會，進而縮短病人感受副作用的時間，因此，在我們的研究中，將時間點設定在治療前與治療後1個月，而非目前用來評估治療成效的時間點---在治療後3個月。

對於細胞激素與HCV間的關係，經常被探討是在感染HCV後與正常人間的比較(Piche *et al.*, 2002 ; Mihm *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2003 ; Liu *et al.*, 2005 ; Elsammak *et al.*, 2006)，或是討論某一類的細胞激素在治療成功與治療失敗間的變化 (Anatol *et al.*, 2005 ; Janczewska-kazek *et al.*, 2006)。因此，我們希望藉由蛋白質晶片的技

術，完整地看到在治療前與治療後1個月所有細胞激素的改變。於是，我們使用蛋白質晶片的技術並考慮不同個體間的差異分析兩組病人的結果，並進一步使用ELISA的技術來確認蛋白質晶片的結果。

蛋白質晶片是先將79種蛋白質的抗體固定在membrane上，與檢體作用一段時間後，加入有結合biotin的79種蛋白質抗體，之後，加入與biotin具有高親合性的streptavidin-HRP。最後再加入呈色劑並利用X光底片感光。使用蛋白質晶片具有以下的優點，第一，蛋白質晶片屬於high-throughput的工具，能夠檢測多種細胞激素的變化，能看到較整體而非片段的概念。第二，所需的檢體量少。第三，減少垃圾量。然而，由於個體間具有生物性差異，因此需要以大量病人的結果當做最後的結論。



在蛋白質晶片的結果，我們分成三個部份來介紹，第一，蛋白質晶片無法偵測到慢性C型肝炎病人血清中應該具有的細胞激素；第二，細胞激素在蛋白質晶片中的結果與過去文獻的結果類似；第三，細胞激素在蛋白質晶片與過去文獻有差異的結果。

在第一部份，我們為了減少背景值，利用稀釋5倍血漿來進行蛋白質晶片的實驗，因此，蛋白質晶片因敏感性不足而無法偵測到在慢性肝炎中會出現的6種細胞激素，包括MIP-3 α 、IL-6、IL-10、TGF- β 1、TPO及HGF。MIP-3 α 在慢性肝炎血清中濃度 39 ± 28.9 pg/ml (Yamauchi *et al.*, 2002)，而蛋白質晶片能偵測的最小濃度為100 pg/ml。IL-6在治療前，治療成功與失敗病人在慢性肝炎血清中濃度分別為 0.16 ± 0.37 及 0.65 ± 0.61 pg/ml (Pansiuk *et al.*, 2004)，而蛋白質晶片能偵測的最小濃度為1 pg/ml。IL-10，在治療前，治療成功與失敗病人在慢性肝炎血清中濃度分別為 0.88 ± 0.78 及 0.45 ± 0.46 pg/ml (Pansiuk *et al.*, 2004)，而蛋白質晶片能偵測的最小濃度為10 pg/ml；TGF- β 1，在治療前，治療成功與失敗病人在慢性肝炎血清中濃度分別為 36.7 ± 1.6 及 34.6 ± 1.4 pg/ml (Marek *et al.*, 2004)，而蛋白質晶片能偵測的最小濃度為200 pg/ml。TPO，在治療前，治療成功與失敗病人在慢性肝炎血清中濃度分別為 48.4 ± 14 及 64.2 ± 17.1 pg/ml (Anatol *et al.*, 2004)，而蛋白質晶片能偵測的最小濃度為100 pg/ml。HGF，在治療前，治療成功與失敗病人在慢性肝炎血清中濃度分別為 873 ± 210 及 919 ± 257 pg/ml (Anatol *et al.*, 2004)，蛋白質晶片能偵測的最小濃度為200 pg/ml，因此在血漿稀釋5倍後無法在蛋白質晶片中呈現。

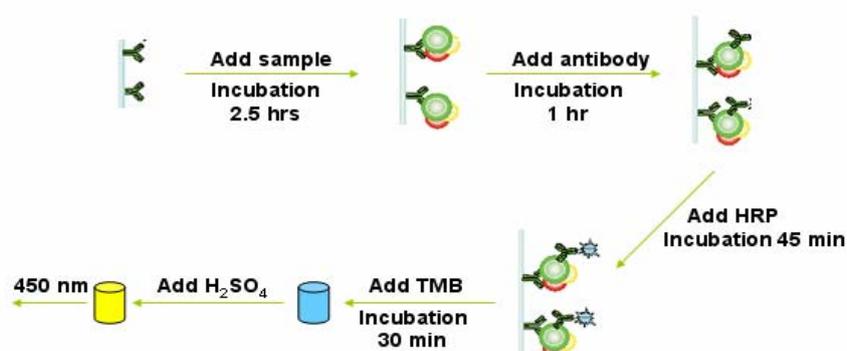
第二部分，蛋白質晶片中的細胞激素與之前文獻類似的有

TIMP-1及PDGF-BB。之前的研究顯示TIMP-1 (Fisiak *et al.*, 2005)及PDGF-BB (Anatol *et al.*, 2005)，分別在治療48週及16週之後會下降，而我們的結果，無論是治療成功或失敗的病人，在治療1個月後血漿中的TIMP-1及PDGF-BB均會下降。

第三部份，細胞激素的結果與過去有差異的有MCP-1、IP-10、EGF及VEGF。過去，MCP-1在血清的蛋白表現量，治療成功與失敗在治療前並沒有差異；經過16星期治療後，MCP-1的蛋白表現量在治療成功不會改變，而治療失敗會上升 (Panasiuk *et al.*, 2004)。而在蛋白質晶片中，在治療前，治療成功與失敗血清中MCP-1的蛋白表現量並沒有差異；而治療4星期後，在治療成功會上升，治療失敗會下降。血漿中IP-10蛋白表現量，過去在治療前或治療結束及治療結束六個月後均可得到治療失敗會大於治療成功 (Apolinario *et al.*, 2004；Diago *et al.*, 2006)；治療結束，治療成功與失敗的IP-10均會下降。在晶片的結果中，治療前，第一組病人沒有變化的，第二組病人在治療成功表現量大於治療失敗；治療後，第一組病人，血漿中IP-10蛋白表現量，在治療前及治療後均會下降，第二組在治療失敗會上升，治療成功會下降。血漿中EGF的表現量，在治療前後，治療成功與治療失敗沒有差異；而治療16星期後，治療成功沒有變化，治療失敗會下降 (Anatol *et al.*, 2005)，我們在兩組蛋白質晶片均可看到在治療前，

治療成功大於治療失敗；治療後1個月，第一組治療成功與失敗在血漿中EGF的表現量均下降，第二組在治療失敗上升，治療成功下降。血漿中的VEGF蛋白在治療前沒有差異；治療成功會在治療後48週上升 (Janczewska-kazek *et al.*, 2006)。蛋白質晶片在兩組的結果並不相同，第一組在治療前，治療成功大於治療失敗；治療後，治療失敗不變，治療成功下降。第一組在治療前，治療成功與治療失敗沒有差異；治療後，治療失敗上升，治療成功不變。

酵素連結免疫吸附試驗 (ELISA)是將要測定的蛋白質固定在96孔盤，在檢體作用後，加入含有biotin的抗體，然後加入streptavidin-HRP之後，利用TMB呈色，以硫酸來中止反應，使用450 nm偵測其吸光值。ELISA最大的優點在於價格比較便宜，操作方式簡單且花費的時間較短，可以因試劑的不同來調整檢體的稀釋倍率，最後是藉由吸光值的變化來分析，分析的方式較蛋白質晶片來的容易。因此，這樣的方式對於臨床上的檢驗占有較大的優勢。



我們以ELISA來確認蛋白質晶片的結果顯示，在蛋白質晶片中，

EGF及ENA-78為治療成功在治療前大於治療失敗，RANTES與IL-1 α 在治療後均為治療失敗不變，成功會下降。用ELISA來確認晶片的兩組病人，在EGF、ENA-78及RANTES都可得到相同的結果，在IL-1 α 的第一組病人也有相同結果，但第二組病人則是在治療失敗沒有改變，而治療成功會上升。推論有可能是因為治療成功的病人血漿中的IL-1 α 蛋白量較少，而出現的誤差。由這樣的結果可以顯示，在ELISA與蛋白質晶片能得到類似的結果。在確認ELISA與晶片的結果吻合之後，我們以相同的方式進行更多病人的篩選後發現，RANTES由原本的治療後失敗不變、成功下降的結果，變成在治療成功與治療失敗的治療前後均無統計上意義。而EGF在治療前治療成功大於失敗也變得沒有意義，即治療失敗與成功在治療後都會下降。ENA-78也喪失在治療前治療成功大於失敗的結果；而多一項在治療後的結論，治療成功下降比率會大於治療失敗。在IL-1 α ，由原先在治療後，治療失敗不變，治療成功下降，最後為治療失敗在治療後下降。每個病人都有生物性上的變異 (biological variation)，無法單純從少數的病人來決定我們的結果是否正確，但蛋白質晶片較昂貴，所以我們使用能得到相同結果的ELISA，並加入較多的病人來排除生物性上的變異。

在預測研究的部份，若以單種細胞激素來做預測，則ENA-78是唯一能得到 p value 小於 0.1 的細胞激素。這樣的預測模式有 61%的

敏感性，92.9%的特異性，91.6%的陽性預測率及 65%的陰性預測率，若是合併 ENA-78、EGF 及 IL-1 α 這 3 種細胞激素來預測，有 87.5%的敏感性，83.3%的特異性，87.5%的陽性預測率及 83.3%的陰性預測率，這樣的結果顯示，如果能同時加入多種因子來進行預測，可得到較高的敏感性及預測正確性。利用單一的 ENA-78 進行預測未知治療結果的 22 位病人，僅得到 50%的陽性預測率及 37.5%的陰性預測率，會有如此的差異有以下的原因。第一，我們預測的模型，雖然 p value 為 0.0724，但未達到統計上顯著意義。第二，用來預測的人數較少，我們的人數為 32 人，雖然我們的敏感性有 61%，但根據貝氏定理 (Joseph *et al.*, 1995) 來計算 95%信賴區，發現敏感性的範圍是在 43.8-78.2%。在未來，如果要進行相同模式的預測，也許我們可以加入更多的病人或提供多種細胞激素及病毒因子來進行預測，以提高我們預測的正確性。

ENA-78屬於CXC家族的驅化激素，在1991年，Walz等人由人類肺泡上皮細胞 (A549)加入IL-1或TNF- α 刺激的培養液中分離。cDNA會轉譯出114個胺基酸，包含一段訊息胺基酸列 (signal peptide)及分泌型蛋白。ENA-78的基因存在第4條染色體長臂上 (4q13-q21) (Chang *et al.*, 1994; Corbett *et al.*, 1994)，在體外試驗證明具有吸引及活化嗜中性球的功能 (Schall *et al.*, 1994)，在人類的血小板中也會表現ENA-78

(Power *et al.*, 1994) , 如果有像 IL-1 或 TNF- α 之 pro-inflammatory cytokines 的刺激, ENA-78 會大量的在內皮細胞、血管的平滑肌細胞、上皮細胞及肺纖維母細胞中表現 (Strieter *et al.*, 1992; Schmourer *et al.*, 1995) , 在多種與嗜中性球相關的發炎情況都會發現 ENA-78 的表現量上升 (Koch *et al.*, 1994; Schmourer *et al.*, 1995; Colletti *et al.*, 1996) 。

而我們在肝癌細胞中, 在含有 HCV 基因的細胞含有較高的 ENA-78 mRNA 的表現, 與利用鼻病毒 (RV16) 感染纖維母細胞後, 使細胞中 ENA-78 mRNA 增加有相同的結果 (Ghildyal *et al.*, 2005) 。利用 PEG-IFN 處理細胞中的 HCV, 當 Replicon 細胞中的 HCV mRNA 是原來的 0.2 倍時, 細胞中的 ENA-78 mRNA 並沒有改變, 而處理 Con1 細胞中至偵測不到 HCV mRNA 時, ENA-78 mRNA 會上升, 結果與利用 VI-28 治療 HIV 病人, 而 PBMC 中的 ENA-78 mRNA 上升相同 (Pan-Hammarstrom *et al.*, 2006) 。

第五章 結論

ELISA 可用來確認蛋白質晶片所篩選出來的結果，但為了排除生物體間的差異，需加入更多的 HCV 患者來確認結果。而利用 ELISA 結果建立的預測模式，合併 3 種細胞激素來建立預測模式，其敏感性及預測正確性會高於以單一細胞激素預測的模式。此外，利用二維電泳分析出 3 個蛋白質在肝癌細胞及帶有 C 型肝炎病毒的肝癌細胞的分泌蛋白中具有差異性，分別是參與細胞骨架、蛋白質分解與運輸的相關蛋白。



第六章 參考文獻

Abe K-i, Ikeda M, Dansako H, et al. cDNA microarray analysis to compare HCV subgenomic replicon cells with their cured cells. *Virus Research* 2005;107:73-81.

Adams D, Lloyd A. Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet* 1997;349:490-5.

Anatol P, Robert F, Danuta P. Effect of interferon alpha2b plus ribavirin treatment on selected growth factors in respect to inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2005;11:1854-8.

Apolinario A, Diago M, Lo Iacono O, et al. Increased circulating and intrahepatic T-cell-specific chemokines in chronic hepatitis C: relationship with the type of virological response to peginterferon plus ribavirin combination therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19:551-62.

Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998;392:565-8.

Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of the hepatitis C virus. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2000;14:241-54.

Bartosch B, Dubuisson J, Cosset F. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 2003;197:633-42.

Bekisz J, Schmeisser H, Hernandez J, et al. Mini Review: Human Interferons Alpha, Beta and Omega Growth Factors 2004;22:243-51.

Blight K, Kolykhalov A, Rice C. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 2000;290:1972-4.

Boyer J, Haenni A. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology* 1994;198:415-26.

Bukh J, Miller R, Purcell R. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 1995;15:41-63.

Campbell J, Qin S, Bacon K, et al. Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells. *J Cell Biol* 1996;134:255-66.

Carr M, Alon R, Springer T. The C-C chemokine MCP-1 differentially modulates the avidity of beta 1 and beta 2 integrins on T lymphocytes. *Immunity* 1996;4:179-87.

Carrasco L. Modification of membrane permeability by animal viruses. *Adv Virus Res* 1995;45:61-112.

Carrère-Kremer S, Montpellier-Pala C, Cocquerel L, et al. Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J Virol* 2002;76:3720-30.

Castilla A, Prieto J, Fausto N. Transforming growth factors beta-1 and alpha in chronic liver disease. *N Engl J Med* 1991;324:933-40.

Castro F, Esteban J, Juarez A, et al. Early detection of nonresponse to

interferon plus ribavirin combination treatment of chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2002;9:202-7.

Chan C, Lee S, Hwang S, et al. Quantitative branched DNA assay and genotyping for hepatitis C virus RNA in Chinese patients with acute and chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 1995;171:443-6.

Chang S, Dolganiuc A, Szabo G. Toll-like receptors 1 and 6 are involved in TLR2-mediated macrophage activation by hepatitis C virus core and NS3 proteins. *J Leukoc Biol* 2007 [Epub ahead of print].

Chen C, Sheu J, Wang J, et al. Genotypes of hepatitis C virus in chronic liver disease in Taiwan. *J Med Virol* 1994;44:234-6.

Chen L, Borozaan I, Feld J, et al. Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. *Gastroenterology* 2005;128:1437-44.

Choo Q, Kuo G, Weiner A, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62.

Davis G, Nelson D, Reyes G. Future options for the management of hepatitis C. *Semin Liver Dis* 1999;19:103-12.

Di Bisceglie A, Bonkovsky H, Chopra S, et al. Iron reduction as an adjuvant to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C who have previously not responded to interferon: a multicenter, prospective, randomized, controlled trial. *Hepatology* 2000;32:135-8.

Egger D, Wölk B, Gosert R, et al. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 2002;76:5974-84.

Eguchi Y, Mizuta T, Yasutake T, et al. High serum leptin is an independent risk factor for nonresponse patients with low viremia to antiviral treatment in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2006;12:556-60.

Elsammak MY, Amin GM, Khalil GM, et al. Possible contribution of serum activin A and IGF-1 in the development of hepatocellular carcinoma in Egyptian patients suffering from combined hepatitis C virus infection and hepatic schistosomiasis. *Clinical Biochemistry* 2006;39:623-9.

Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996;334:77-81.

Farber J. HuMig: a new human member of the chemokine family of cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;192:223-30.

Flint M, Thomas J, Maidens C, et al. Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J Virol* 1999;73:6782-90.

Flisiak R, Jaroszewicz J, Lapinski T, et al. Effect of pegylated interferon alpha 2b plus ribavirin treatment on plasma transforming growth

factor-beta1, metalloproteinase-1, and tissue metalloproteinase inhibitor-1 in patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2005;11:6833-8.

Forns X, Thimme R, Govindarajan S, et al. Hepatitis C virus lacking the hypervariable region 1 of the second envelope protein is infectious and causes acute resolving or persistent infection in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:13318-23.

Frese M, Schwarzle V, Barth K, et al. Interferon-gamma inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs. *Hepatology* 2002;35:694-703.

Gale M. Effector genes of interferon action against hepatitis C virus. *Hepatology* 2003;37:975-8.

Gale M, Blakely C, Kwieciszewski B, et al. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol* 1998;18:5208-18.

Ghildyal R, Dagher H, Donninger H, et al. Rhinovirus infects primary human airway fibroblasts and induces a neutrophil chemokine and a permeability factor. *J Med Virol* 2005;75:608-15.

Gilmour K, Reich N. Signal transduction and activation of gene transcription by interferons. *Gene Expr* 1995;5:1-18.

Grakoui A, McCourt D, Wychowski C, et al. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:10583-7.

Griffin S, Beales L, Clarke D, et al. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* 2003;535:34-8.

Guo J, Bichko V, Seeger C. Effect of alpha interferon on the hepatitis C virus replicon. *J Virol* 2001;75:8516-23.

Guo J, Cheng J, Ji D, et al. Screening and cloning target genes transactivated by hepatitis C virus F protein using suppression subtractive hybridization technique. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2005;13:660-3.

Hijikata M, Mizushima H, Akagi T, et al. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol* 1993;67:4665-75.

Hijikata M, Ohta Y, Mishiro S. Identification of a single nucleotide polymorphism in the MxA gene promoter (G/T at nt -88) correlated with the response of hepatitis C patients to interferon. *Intervirology* 2000;43:124-7.

Honda M, Ping L-H, Rijnbrand RCA, et al. Structural Requirements for Initiation of Translation by Internal Ribosome Entry within Genome-Length Hepatitis C Virus RNA. *Virology* 1996;222:31-42.

Hoofnagle J, Mullen K, Jones D, et al. Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. *N Engl J Med* 1986;315:1575-8.

Hope R, Murphy D, McLauchlan J. The domains required to direct core proteins of hepatitis C virus and GB virus-B to lipid droplets share common features with plant oleosin proteins. *J Biol Chem* 2002;277:4261-70.

Hwang Y, Chen E, Gu Z, et al. Genetic predisposition of responsiveness to therapy for chronic hepatitis C. *Pharmacogenomics* 2006;7:697-709.

Janczewska-Kazek E, Marek B, Kajdaniuk D, et al. Effect of interferon alpha and ribavirin treatment on serum levels of transforming growth factor- β 1, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2006;12:961-5.

Ji X, Cheung R, Cooper S, et al. Interferon regulated gene expression in patients initiating interferon treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;37:610-21.

Joseph L, Gyorkos T, Coupal L. Bayesian estimation of disease prevalence and the parameters of diagnostic tests in the absence of a gold standard. *Am J Epidemiol* 1995;141:263-72.

Kasprzak A, Zabel M, Biczysko W, et al. Expression of Cytokines (TNF- α , IL-1, and IL-2) in Chronic Hepatitis C: Comparative Hybridocytochemical and Immunocytochemical Study in Children and Adult Patients. *J Histochem Cytochem* 2004;52:29-38.

Kawashima R, Mochida S, Matsui A, et al. Expression of osteopontin in

Kupffer cells and hepatic macrophages and Stellate cells in rat liver after carbon tetrachloride intoxication: a possible factor for macrophage migration into hepatic necrotic areas. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;256:527-31.

Kuo G, Choo Q, Alter H, et al. Bradley and M. Houghton, An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-4.

Lanford R, Guerra B, Lee H, et al. Antiviral effect and virus-host interactions in response to alpha interferon, gamma interferon, poly(i)-poly(c), tumor necrosis factor alpha, and ribavirin in hepatitis C virus subgenomic replicons. *J Virol* 2003;77:1092-104.

Lechmann M, Woitas R, Langhans B, et al. Decrease frequency of HCV core-specific peripheral blood mononuclear cells with type I cytokine secretion in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1999;31:971-8.

Lerat H, Honda M, Beard M, et al. Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Gastroenterology* 2002;122:352-65.

Leroy V, Monier F, Bottari S, et al. Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIIINP and hyaluronic acid. *Am J Gastroenterol* 2004;99:271-9.

Liao F, Rabin R, Yannelli J, et al. Human Mig chemokine: biochemical

and functional characterization. *J Exp Med* 1995;182:1301-14.

Lichtinghagen R, Michels D, Haberkorn CI, et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-7, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are closely related to the fibroproliferative process in the liver during chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology* 2001;34:239-47.

Liu Z, Zhang N, Han Q, et al. Serum leptin level in Chinese patients with chronic hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2005;11:3357-62.

Lohmann V, Körner F, Koch J, et al. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999;285:110-3.

Luster A. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998;338:436-45.

Mackay C. Chemokine receptors and T cell chemotaxis. *J Exp Med* 1996; 184:799-802.

Marek B, Kajdaniuk D, Mazurek U, et al. TGF- β 1 mRNA expression in liver biopsy specimens and TGF- β 1 serum levels in patients with chronic hepatitis C before and after antiviral therapy. *J Clin Pharm Ther* 2005;30: 271-7.

McHutchison J, Poynard T. Combination therapy with interferon plus ribavirin for the initial treatment of chronic hepatitis C. *Semin Liver Dis* 1999;19:57-65.

Meurs E, Breiman A. The interferon inducing pathways and the hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 2007;13:2446-54.

Mihm S, Schweyer S, Ramadori G. Expression of the chemokine IP-10 correlates with the accumulation of hepatic IFN- and IL-18 mRNA in chronic hepatitis C but not in hepatitis B. *Journal of Medical Virology* 2003;70:562-70.

Mochida S, Hashimoto M, Matsui A, et al. Genetic polymorphisms in promoter region of osteopontin gene may be a marker reflecting hepatitis activity in chronic hepatitis C patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313:1079-85.

Moriya K, Fujie H, Shintani Y, et al. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 1998;4:1065-7.

Naito M, Matsui A, Inao M, et al. SNPs in the promoter region of the osteopontin gene as a marker predicting the efficacy of interferon-based therapies in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2005;40:381-8.

Neuman MG, Benhamou J-P, Malkiewicz IM, et al. Cytokines as predictors for sustained response and as markers for immunomodulation in patients with chronic hepatitis C. *Clinical Biochemistry* 2001;34:173-82.

Nischalke H, Nattermann J, Fischer H, et al. Semiquantitative analysis of

intrahepatic CC-chemokine mRNAs in chronic hepatitis C. *Mediators Inflamm* 2004;13:357-9.

Panasiuk A, Prokopowicz D, Panasiuk B. Monocyte chemotactic protein-1 and soluble adhesion molecules as possible prognostic markers of the efficacy of antiviral treatment in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2004;10:3639-42.

Pan-Hammarstrom Q, Wen S, Hammarstrom L. Cytokine gene expression profiles in human lymphocytes induced by a formula of traditional Chinese medicine, vigonic VI-28. *J Interferon Cytokine Res* 2006;26:628-36.

Pavlović D, Neville D, Argaud O, et al. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:6104-8.

Pestova T, Shatsky I, Fletcher S, et al. A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev* 1998;12:67-83.

Piche T, Gelsi E, Schneider S, et al. Fatigue is associated with high circulating leptin levels in chronic hepatitis C. *Gut* 2002;51:434-9.

Reed K, Gorbalenya A, Rice C. The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *J Virol* 1998;72:6199-206.

Reed K, Rice C. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;242:55-84.

Rijnbrand R, Abbink T, Haasnoot P, et al. The Influence of AUG codons in the hepatitis C virus 5'-nontranslated region on translation and mapping of the translation initiation window. *Virology* 1996;226:47-56.

Robek M, Boyd B, Chisari F. Lambda interferon inhibits hepatitis B and C virus replication. *J Virol* 2005;79:3851-4.

Roccasecca R, Ansuini H, Vitelli A, et al. Binding of the hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 is strain specific and is modulated by a complex interplay between hypervariable regions 1 and 2. *J Virol* 2003;77:1856-67.

Roulot D, Durand H, Coste T, et al. Quantitative analysis of transforming growth factor β 1 messenger RNA in the liver of patients with chronic hepatitis C: Absence of correlation between high levels and severity of disease. *Hepatology* 1995;21:298-304.

Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 2002;21:5017-25.

Schmidt-Mende J, Bieck E, Hugle T, et al. Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* 2001;276:44052-63.

Seeff L. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:S35-46.

Semmo N, Krashias G, Willberg C, et al. Analysis of the relationship between cytokine secretion and proliferative capacity in hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2007;14:492-502.

Sen G. Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol* 2001;55:255-81.

Soo H, Garzino-Demo A, Hong W, et al. Expression of a full-length hepatitis C virus cDNA up-regulates the expression of CC chemokines MCP-1 and RANTES. *Virology* 2002;303:253-77.

Soza A, Heller T, Ghany M, et al. Pilot study of interferon gamma for chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2005;43:67-71.

Sumpter R, Loo Y, Foy E, et al. Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol* 2005;79:2689-99.

Suzuki F, Arase Y, Suzuki Y, et al. Single nucleotide polymorphism of the MxA gene promoter influences the response to interferon monotherapy in patients with hepatitis C viral infection. *J Viral Hepat* 2004;11:271-6.

Tanaka Y, Adams D, Hubscher S, et al. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 β . *Nature* 1993;361:79-82.

Tanaka Y, Kimata K, Adams D, et al. Modulation of cytokine function by

heparan sulfate proteoglycans: sophisticated models for the regulation of cellular responses to cytokines. *Proc Assoc Am Physicians* 1998;110:118-25.

Taub D, Longo D, Murphy W. Human interferon-inducible protein-10 induces mononuclear cell infiltration in mice and promotes the migration of human T lymphocytes into the peripheral tissues and human peripheral blood lymphocytes-SCID mice. *Blood* 1996;87:1423-31.

Tellinghuisen T, Rice C. Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Curr Opin Microbiol* 2002;5:419-27.

Tu H, Gao L, Shi S, et al. Hepatitis C virus RNA polymerase and NS5A complex with a SNARE-like protein. *Virology* 1999;263:30-41.

Wertheimer A, Polyak S, Leistikow R, et al. Engulfment of apoptotic cells expressing HCV proteins leads to differential chemokine expression and STAT signaling in human dendritic cells. *Hepatology* 2007;45:1422-32.

Wu J, Lee H, Hsiau H, et al. Genotype distribution of hepatitis C virus infection in Taiwan. *J Med Virol* 1994;44:74-9.

Wu Y, Ye J, Zhang S, et al. Clinical significance of serum IGF-I, IGF-II and IGFBP-3 in liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2004;10:2740-3.

Xu Z, Choi J, Yen T, et al. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J* 2001;20:3840-8.

Yanagi M, St Claire M, Emerson S, et al. In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:2291-5.

Yasui K, Wakita T, Tsukiyama-Kohara K, et al. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 1998;72:6048-55.

Yu M, Chuang W, Chen S, et al. Clinical application of the Quantiplex HCV RNA 2.0 and Amplicor HCV Monitor assays for quantifying serum hepatitis C virus RNA. *J Clin Pathol* 1999;52:807-11.

Yu M, Chuang W, Dai C, et al. Different viral kinetics between hepatitis C virus genotype 1 and 2 as on-treatment predictors of response to a 24-week course of high-dose interferon-alpha plus ribavirin combination therapy. *Transl Res* 2006;148:120-7.

Zhang B, Cai W, Weng H, et al. Diagnostic value of platelet derived growth factor-BB, transforming growth factor-beta1, matrix metalloproteinase-1, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in serum and peripheral blood mononuclear cells for hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:2490-6.

Zhu H, Zhao H, Collins C, et al. Gene expression associated with interferon antiviral activity in an HCV replicon cell line. *Hepatology* 2003;37:1180-8.

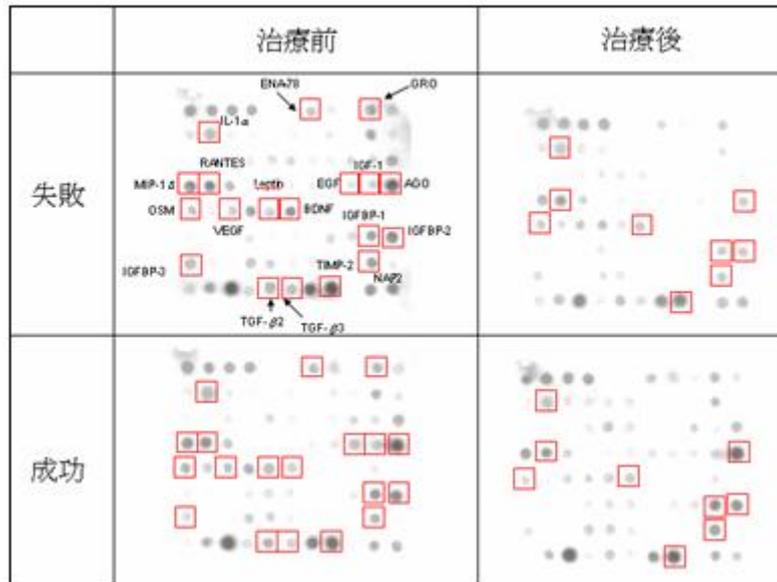


圖 1 以蛋白質晶片分析第一組病人。結果顯示，在治療前，成功大於失敗的有 13 個，分別為 ENA-78、IL-1 α 、MIP-1、RANTES、EGF、IGF-1、Angiogenin、Oncostain M、VEGF、Leptin、IGFBP-1、IGFBP-2 及 TGF- β 2；成功小於失敗的有 4 個，GRO、BDNF、IGFBP-3 及 TGF- β 3。由治療後 1 個月與治療前相比較，治療成功在治療後會下降，而治療失敗在治療後不變或上升的有 IL-1 α 、RANTES 及 Oncostain M；治療成功在治療後不變，而治療失敗在治療後會下降的有 Angiogenin、BDNF、IGFBP-1、IGFBP-2、NAP-2 及 TIMP-2。

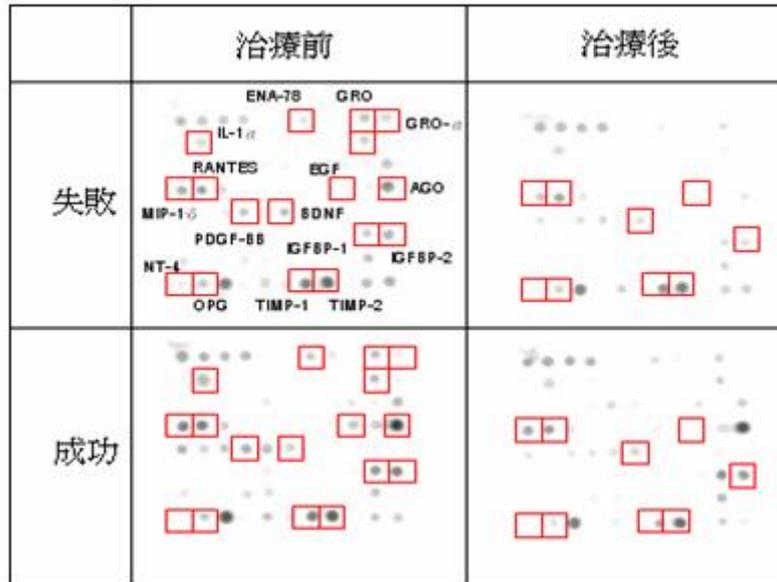


圖 2 以蛋白質晶片分析第二組病人。結果顯示，在治療前，成功大於失敗的有 10 個，分別為 ENA-78、GRO、IL-8、RANTES、EGF、Angiogenin、PDGF-BB、IGFBP-1、IGFBP-2 及 NT-4；成功小於失敗的有 2 個，GRO- α 及 IL-1 α 。而在治療後 1 個月，治療成功下降，而治療失敗不變或上升的有 MIP-1 δ 、RANTES、EGF、BDNF、NT-4、Osteoprotegerin 及 TIMP-1；治療成功不變，而治療失敗在治療後會上升的有 IGFBP-2 及 TIMP-2。

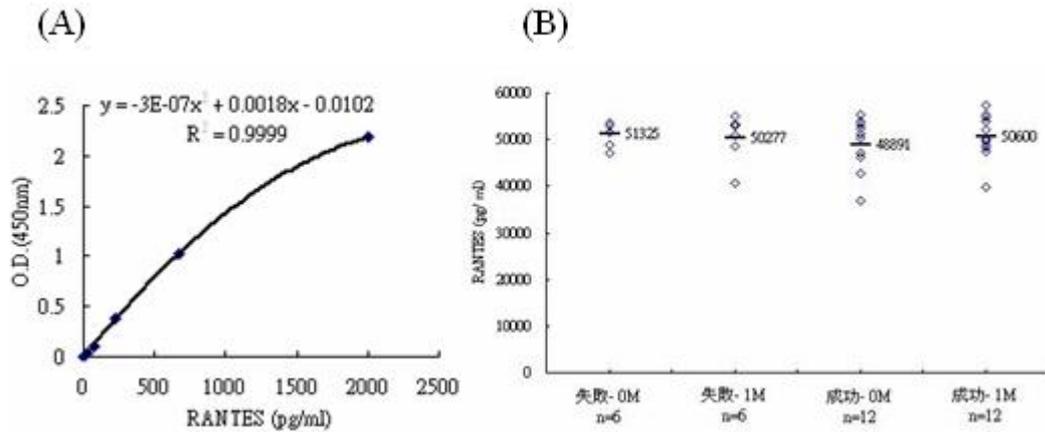


圖 3 以 ELISA 的方式偵測(A) RNATES standard (B) 慢性肝炎病人在治療前及治療後 1 個月血漿中的 RANTES 蛋白表現量。共有 6 個治療失敗及 12 個治療成功的病人，失敗代表治療失敗，成功則為治療成功，0M 代表治療前，1M 為治療後 1 個月。顯示 ELISA 的結果為治療前及治療後比上治療前，治療成功與治療失敗沒有統計上意義。

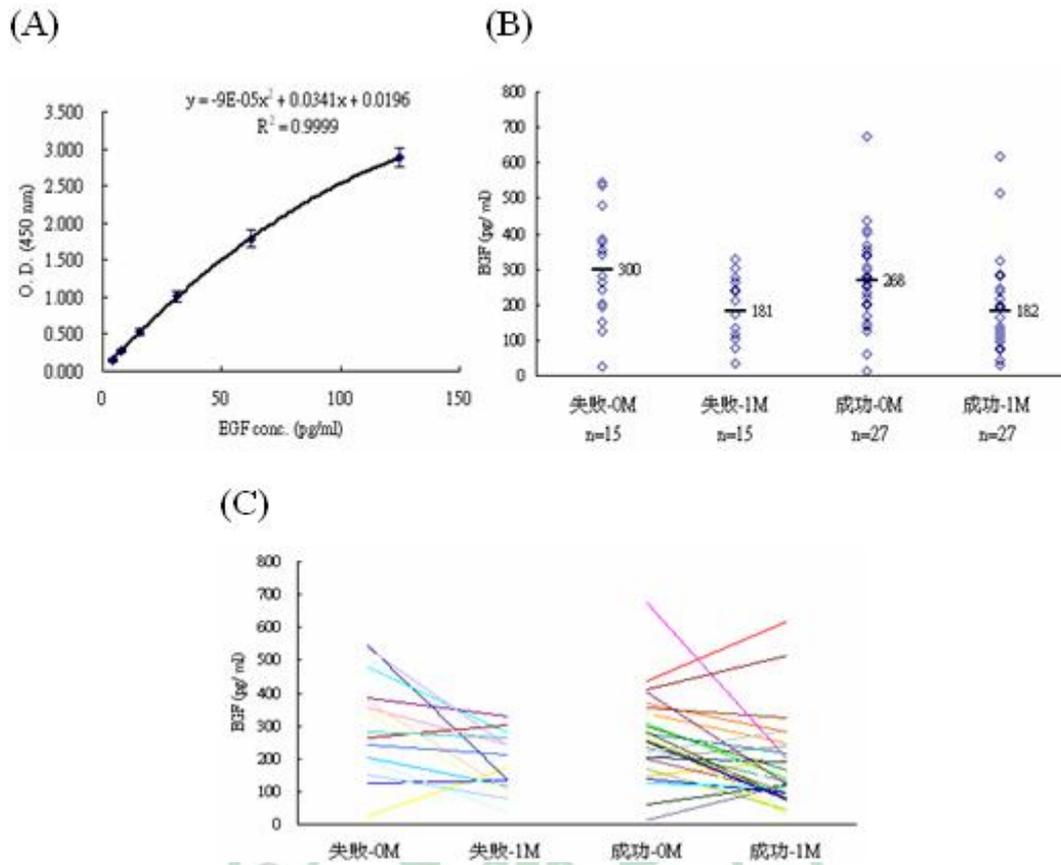


圖 4 以 ELISA 的方式偵測(A) EGF standard，連續操作 15 次，在每次的結果與實驗間的變異係數均在 10%以下。利用(B)一維分佈圖與(C)配對圖呈現在慢性肝炎病人在治療前及治療後 1 個月血漿中 EGF 蛋白的表現量，包含 17 個治療失敗及 27 個治療成功病人的結果。

ELISA 的結果顯示在治療前，治療成功與失敗無統計上意義；而治療失敗與成功在治療 1 個月後均會下降，以配對 T-test 分析具有統計上意義 ($p=0.008$ 及 0.004)。

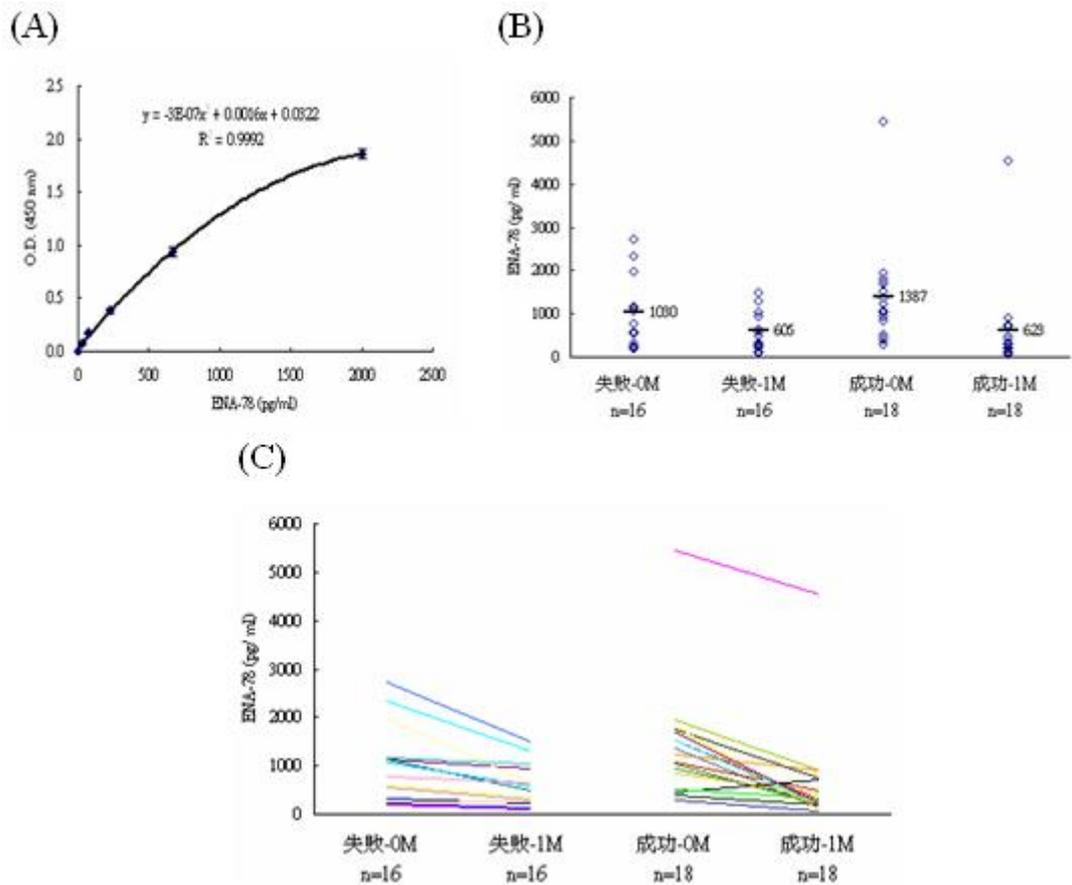


圖 5 以 ELISA 的方式偵測(A) ENA-78 standard，在每次的結果與實驗間的變異係數均在 10%以下。利用(B)一維分佈圖與(C)配對圖呈現在慢性肝炎病人在治療前及治療後 1 個月血漿中 ENA-78 蛋白的表現量，包含 16 個治療失敗及 18 個治療成功病人的結果。ELISA 的結果顯示在治療前，治療成功與失敗無統計上意義；而治療失敗與成功在治療 1 個月後均會下降，以配對 T-test 分析具有統計上意義 ($p=0.003$ 及 $p<0.001$)，而治療成功下降的比值會大於治療失敗，以 Wilcoxon test 分析具統計上意義 ($p=0.014$)。

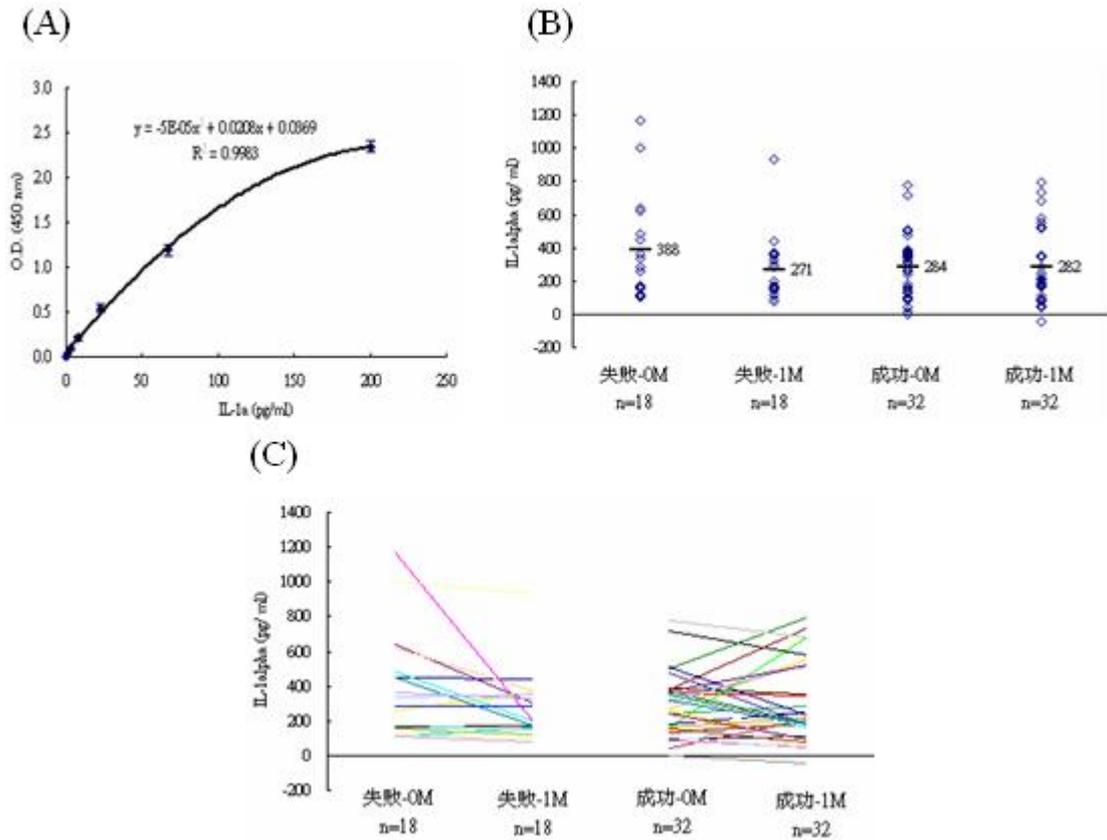


圖 6 以 ELISA 的方式偵測(A) IL-1 α standard, 在每次的結果與實驗間的變異係數均在 15%以下。利用(B)一維分佈圖與(C)配對圖呈現在慢性肝炎病人在治療前及治療後 1 個月血漿中 IL-1 α 蛋白的表現量, 包含 18 個治療失敗及 32 個治療成功病人的結果。ELISA 的結果顯示在治療前, 治療成功與失敗無統計上意義; 而治療失敗在治療 1 個月後會下降, 以配對 T-test 分析具有統計上意義 ($p=0.023$)。

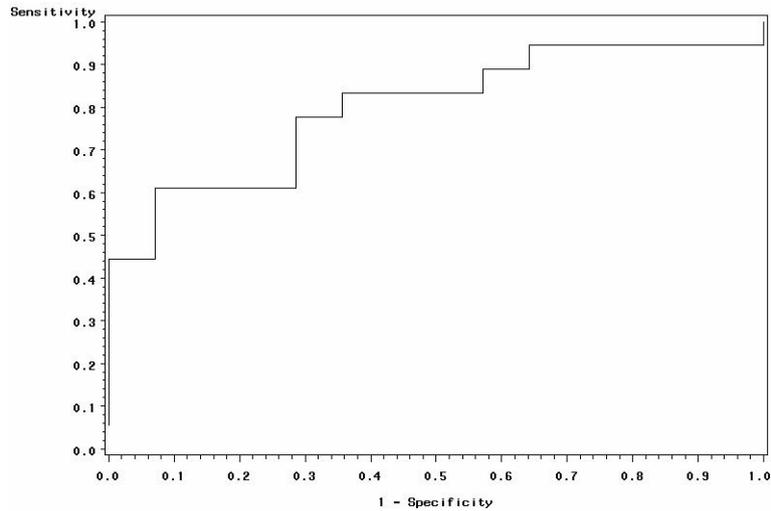


圖 7 由羅吉斯迴歸得到成功機率與 ENA-78 在治療前及治療後 1 個月間的關係，將病人利用 ENA-78 在治療前及治療後 1 個月的值換算成成功機率後，以成功及失敗所對應出的成功機率所繪製的 ROC curve，積分曲線下的面積可得到一數值，稱為 AUC (Area under the ROC curve)，此圖的 AUC 為 0.794。

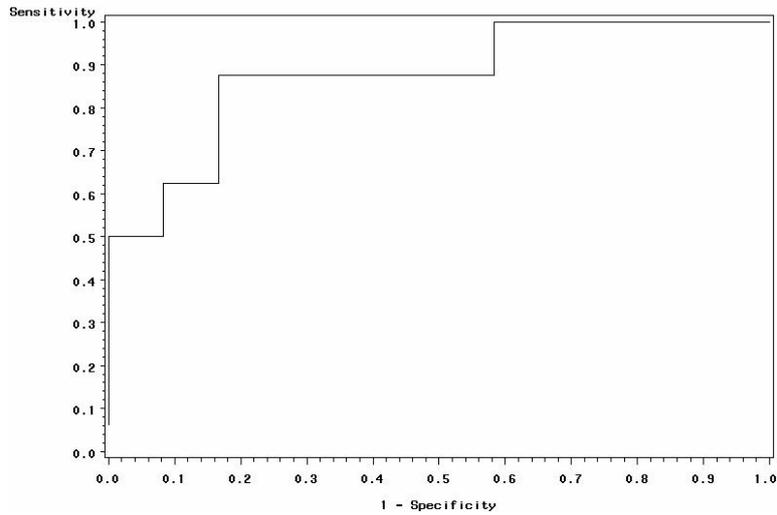


圖 8 由羅吉斯迴歸得到成功機率與 ENA-78 + EGF + IL-1 α 在治療前及治療後 1 個月間的關係，將病人在 3 種細胞激素治療前及治療後 1 個月的值換算成成功機率後，以成功及失敗所對應出的成功機率所繪製的 ROC curve，AUC 為 0.875。



ENA-78	Non-SVR n (%)	SVR n (%)	<i>p value</i>	SEN %	SPE %	PPV %	NPV %	ACC %
Prediction model	n=14	n=18						
P (Y=1)>0.63	1 (7.1)	10 (55.6)	0.0724	61	92.9	91.6	65	75
Blind test	n=9	n=13						
P (Y=1)>0.63	3 (33.3)	3 (23.1)		23.1	66.7	50	37.5	40.9

圖 9 以 ELISA 偵測 22 個未知治療結果病人，在治療前及治療後 1 個月血漿中的 ENA-78 蛋白表現量，將結果帶入 ENA-78 的預測模型中，計算出成功的機率後，以成功機率 0.63 為 cut-off value，成功機率小於 0.63 判定為失敗，成功機率大於 0.63 判定為成功，經過比對後，得到 PPV 為 50%，而 NPV 為 37.5%。



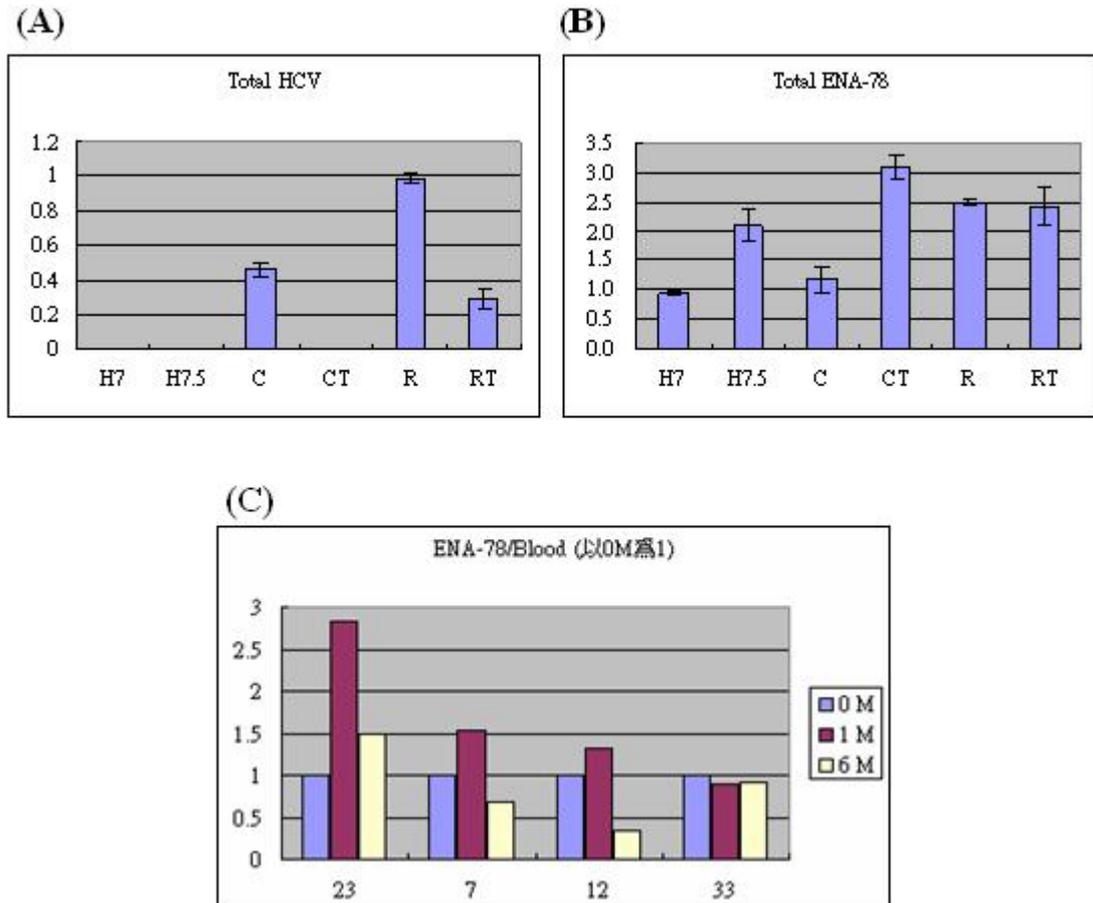


圖 10 利用 Real-time PCR 偵測細胞中(A) HCV (B) ENA-78 的 mRNA 表現量。H7 代表 Huh7，H7.5 為 Huh7.5，C 為 Con1，CT 是 Con1 利用 100 ng/ml PEG-IFN 治療 15 天，R 等於 Replicon，RT 是 Replicon 利用 20 ng/ml PEG-IFN 治療 48 小時。Con1 及 Replicon 在利用干擾素治療後，HCV RNA 表現量均會下降，Con1 在治療後，ENA-78 表現量上升，Replicon 在治療後，ENA-78 表現量沒有改變。(C) 萃取治療成功的病人在治療前，治療後 1 個月及 6 個月之周邊單核球細胞的 mRNA，ENA-78 的表現量在治療的過程會先上升，然後下降。

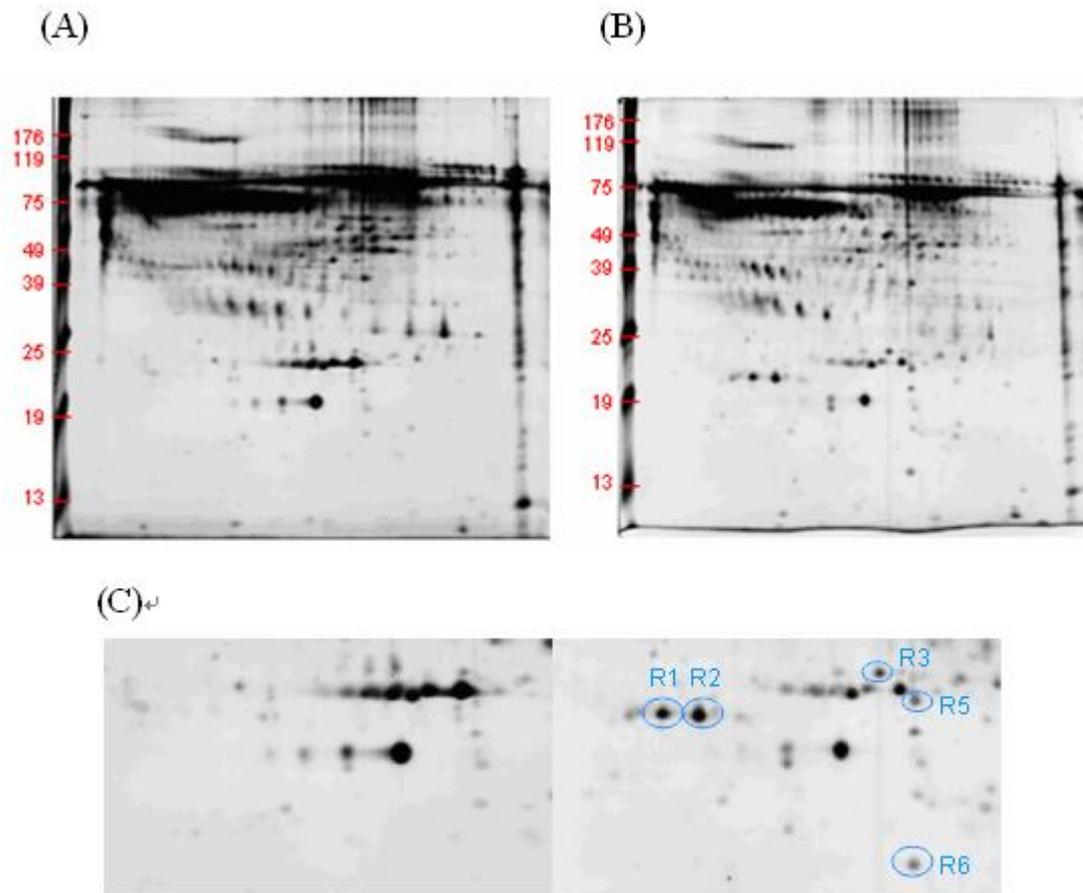
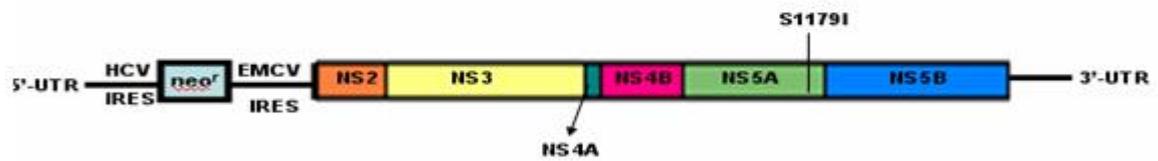


圖 11 以二維電泳比較(A) Huh7 及(B) Replicon 細胞的分泌蛋白表現差異，利用蛋白質的 pI 值及分子量的不同來分離，最後以銀染的方式呈現蛋白點。(C)選取在 Huh7 與 Replicon 表現量不同的分泌蛋白質點，經過 pI 值及分子量的比對，確認非 HCV 的非結構蛋白。



附圖一：HCV結構及polyprotein切割的產物 (Bartenschlager & Loham, 2000)



附圖二：Replicon cell line，改變 NS5A 上的序列，在胺基酸 1179 的位置由絲胺酸 (serine) 置換成白胺酸 (isoleucine)。

