

B型肝炎及癌症研究

洪瑞祥整理/賴明德校稿/生化所
成大B型肝炎研究團隊

HBV (Hepatitis B Virus) 是一種DNA病毒，分子大小約為3.2 kb 屬於Hepadnavirus的一員。全世界超過20億的人口曾遭受HBV的感染，其中約有350萬人成為B型肝炎帶原者。B型肝炎帶原者在發生肝硬化、肝癌的比例明顯高出正常人150至200倍之多。HBV具有外套蛋白DNA為部分雙股型，由兩股之5'端重疊而成，互補形成環狀。HBV主要具有四個Open reading frame (ORF) 分別調控不同基因生成相對應的蛋白質，包括由三個膜蛋白 (Large, middle, small envelope proteins) 所組成的外套蛋白 (envelope)、核心蛋白 (core protein)、X蛋白、以及P蛋白 (polymerase)。其中外套蛋白是由三種B型肝炎表面抗原 (Hepatitis B surface antigen, HBsAg) 組成；核心蛋白是由核心抗原 (core antigen, HBcAg) 及e抗原 (HBeAg) 所組成；X蛋白由體外實驗顯示與transcriptional transactivation 有關；P蛋白是與病毒複製相關的蛋白。

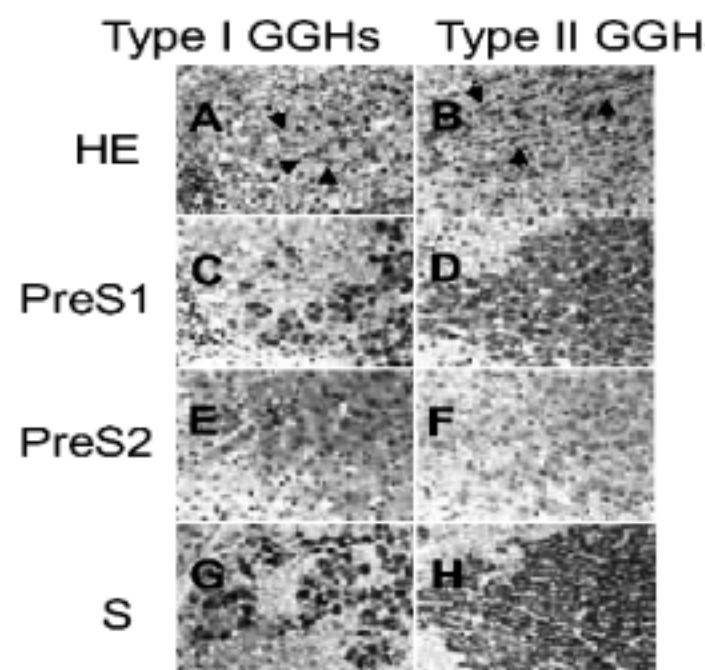
到目前為止，關於B型肝炎病毒的感染如何長期潛伏於宿主中而導致肝細胞的嚴重損害最終形成肝癌，其中的分子機制目前並不明瞭。有研究指出肝細胞表面會藉由表現病毒所產

生的表面抗原與MHC (major histocompatibility complex) 轉錄出的多?類作用，而引發毒殺性T細胞的免疫反應。早期有部分的研究人員認為HBV可能會藉由本身的雙股DNA直接利用反轉錄酵素 (Reverse Transcriptase) 的作用而嵌入宿主的DNA genome中，藉由cis-activation的作用進而破壞某些特定的腫瘤抑制基因如p53或活化某些特定的致癌基因如c-myc, Ras等。但在近幾年的研究中發現，病毒的嵌入 (integration) 並非侷限在某一特定的區域。因此有另一派研究人員認為是病毒本身在感染宿主之後會藉由本身所轉錄出的蛋白質，例如HBx、PreS2 activators (LHB及MHB¹) 經由蛋白質間trans-activation的機制作為活化者，啟動一些與肝細胞生長相關的轉錄因子的表現，或透過與宿主蛋白質間的交互作用而導致肝癌。但是在近年轉殖鼠的研究中發現，肝細胞的損害是部份由於堆積過多的HBsAg於內質網中，肝細胞表型呈現“round glass”的型態。

另一方面，蘇益仁醫師研究發現在臨床上由慢性感染且帶有HBsAg的患者取得肝臟組織進行病理切片染色的結果顯示HBsAg的分布可分為數種

類型，但是肝癌細胞的HBsAg皆是以一種特別的“邊緣形式”(marginal type)出現，這種情形經常見於感染晚期肝硬化或肝癌的年長患者檢體中。也就是說在早期受到B型肝炎病毒感染的細胞中，其HBsAg是以類包涵體或均勻分布於細胞質。在晚期時，血清中偵測不到病毒及HBeAg，此時某部分肝癌細胞的HBsAg卻有大量累積在細胞膜下方的現象，而且這種細胞所形成的結節有群聚的特性。因此推測B型肝炎表面抗原在肝癌的進程中扮演某種特殊的角色。

圖一



當以PCR方法分析這些帶有HBsAg的患者取得肝臟組織發現，HBsAg DNA序列在這些組織都有突

變的情形，而HBsAg PreS2D (2-55) 占了大約30%。同時蘇益仁醫師實驗室把這HBsAg PreS2D質體送入肝細胞株中表現也發現有“邊緣形式”(marginal type)出現。而這些HBsAg PreS2D的表現也會大量累積在內質網，造成內質網壓力(ER stress)。

因此蘇益仁醫師對HBsAg PreS2D病毒蛋白相當感興趣，進一步的想要去探討HBsAg PreS2D對細胞的影響及在肝癌的進程中是否扮演某種特殊的角色。所以蘇益仁醫師邀集了黎煥耀、賴明德、張文榮、黃溫雅等老師的實驗室一同加入探討HBsAg PreS2D的分子機制，以不同研究領域來探討HBsAg PreS2D病毒蛋白和肝癌之間的關係。

1. 在蘇益仁醫師實驗室研究方面，目前研究主要以轉殖鼠的模式來探HBsAg PreS2D對肝細胞的影響。當HBsAg PreS2D表現在老鼠的肝臟組織時，肝臟組織外觀顏色明顯的變紅及轉黃，進一步把肝組織切片分析可發現在有一些表現HBsAg PreS2D的肝細胞的細胞核內染色體有增加的現象。之前的研究也發現在一些腫瘤研究上也有發現染色體不穩定的現象。在這HBsAg PreS2D造成的染色體不穩定是否和

肝腫瘤形成有直接的相關性需更進一步的研究。

2. 在黎煥耀老師實驗室研究方面，目前研究主要以hydrodynamics-based in vivo transfection的方式來探討誘導型一氧化氮合成酶(iNOS)在老鼠急性B型肝炎病毒感染模式所扮演的角色。在過去的研究發現在慢性B型肝炎感染，誘導型一氧化氮合成酶的表現跟疾病的進展有相關性。但誘導型一氧化氮合成酶在急性B型肝炎病毒感染所扮演的角色則還沒被探討。黎煥耀老師實驗室研究發現誘導型一氧化氮合成酶的表現不僅可影響B型肝炎病毒的清除並且可對B型肝炎病毒抗原所引起的白血球浸潤有所調節。

3. 在賴明德老師實驗室研究方面，目前主要有兩個方向
 - a. 以蛋白質交互作用的方法尋找會跟HBsAg PreS2D結合的蛋白，目前發現HBsAg PreS2D可和甘醇素(glucosidase)結合進而增加glucosidase的活性。文獻中也曾有研究證實HPV (Human papillomavirus type 16)可藉由病毒所產生的E7蛋白質與 α -glucosidase結合，並調控其酵素活性而導致癌

症。

- b. 探討HBsAg PreS2D和環氧化酶-2(cyclooxygenase-2)之間的關係。過去的研究以發現在很多腫瘤有環氧化酶-2大量表現，而大量表現環氧化酶-2可促進腫瘤生成。實驗結果發現HBsAg PreS2D可造成細胞內質網壓力(ER stress)進而誘導環氧化酶-2的大量表現。
4. 在張文榮老師實驗室研究方面，主要利用RNAi的方式來抑制HBsAg的表現。實驗結果發現，無論在細胞或老鼠動物實驗RNAi-3可明顯完全的抑制HBsAg的表現。根據這個結果，希望未來能應用於臨床上，進而達到治療的目的。
5. 在黃溫雅老師實驗室研究方面，主要在探討氧化造成的DNA的受損(oxidative DNA damage)和HBsAg PreS2D之間的關係。以comet方法來分析發現HBsAg PreS 1D和HBsAg PreS2D可造成DNA受損，以HBsAg PreS2D更為明顯。當加入FPG(DNA glycosylase/lyase)時，DNA受損更為明顯。目前結果顯示，這些突變的HBsAg易造成細胞DNA受損，進而造成染色體不穩定(chromosome instability)。