

計畫編號：DOH88-TD-1007

行政院衛生署八十八年度科技研究發展計畫

鼻咽癌病人對 EB 病毒溶裂期蛋白的免疫反應 (I)

研 究 報 告

執行機構：臺大醫學院細菌學科

計畫主持人：蔡錦華

執行期間：87 年 7 月 1 日至 88 年 6 月 30 日

目錄:

摘要

中文摘要	2
------	--------

英文摘要	3
------	--------

本文

前言	4
----	--------

材料與方法	9
-------	--------

結果	12
----	---------

討論	14
----	---------

結論與建議	16
-------	---------

參考文獻	17
------	---------

圖、表	23
-----	---------

中文摘要:

鼻咽癌(Nasopharyngeal carcinoma)的產生及發展與 EB 病毒(Epstein-Barr virus)的存在有密切相關，過去的研究顯示 EB 病毒蛋白具有致癌能力，此外，鼻咽癌病人對於 EB 病毒的免疫反應及 EB 病毒是否利用免疫反應促進鼻咽癌的形成也值得探討。本計劃第一部份主要偵測鼻咽癌病人對於 EB 病毒溶裂期蛋白的體液性免疫反應。利用免疫螢光法偵測 32 位正常人(NB)及 70 位鼻咽癌患者(NPC)血清中抗 EB 病毒 viral capsid antigen(VCA)及 early antigen(EA)抗體效價的分佈情形。經由分組統計分析的結果顯示，鼻咽癌患者抗 EB 病毒 VCA 及 EA 抗體有明顯偏高的分佈。此外，為了進一步偵測血清中抗其他 EB 病毒溶裂期蛋白抗體，我們成功地將病毒的另三種溶裂期蛋白 BMRF 1 基因產物(EA-D), DNase 及 thymidine kinase(TK)三種蛋白藉由基因重組的 baculovirus 表現於 SF9 細胞中，再以免疫螢光法偵測鼻咽癌患者對上述三種特定蛋白的抗體價位。同時，以正常人作為實驗對照組。結果顯示，鼻咽癌患者中分別有 94%，90% 及 80% 具有抗 EA-D，DNase 及 TK 的 IgG 抗體，反之，只有 25%，19% 及 9% 的正常人可偵測到低價位的 IgG 抗體。更有意義的是，正常人均無法測得抗 EA-D，DNase 及 TK 的 IgA 抗體，反之，仍有 69%，49% 及 39% 的鼻咽癌患者血清中可偵測到高效價的 IgA 抗體。由整體分佈而言，鼻咽癌患者對 EB 病毒三種溶裂期蛋白抗體效價(包括 IgG 及 IgA)與正常人均有顯著差異($p < 0.05$)。此 EB 病毒三種溶裂期蛋白抗體效價(包括 IgG 及 IgA)越高，此患者為鼻咽癌末期的機會越高。更值得注意的是抗體效價高低與鼻咽癌腫瘤大小及是否遠距轉移有顯著差異，尤其抗 DNase IgG 抗體效價高低與腫瘤轉移至淋巴腺的程度呈現高度正相關。另一方面，在此計劃中，我們亦嘗試利用已經過純化的 EA-D 和 DNase 蛋白作為抗原，以單核細胞增生實驗，探查鼻咽癌病人和正常人對此二蛋白的細胞性免疫反應。將 32 位正常人與 54 位鼻咽癌患者的周邊血液單核細胞與純化的 EA-D 抗原(300 ng/ml) 或 DNase 抗原(200 ng/ml)共同培養六天，並於加入 ^3H -thymidine 16 小時後，以 β -射線計數器測 cpm 值。所得的細胞增生刺激比值為:(給與 EA-D 抗原之平均 cpm 值)/(只給與 medium 的平均 cpm 值)。結果顯示，鼻咽癌病人和正常人的單核細胞在 EA-D 或 DNase 抗原的存在下，均無明顯的細胞增生現象，但其中只有二位末期鼻咽癌患者的單核細胞對此二抗原有明顯的單核細胞增生;同時，他們也都為鼻咽癌末期患者且具有極高的抗 EA-D 及 DNase 的抗體。

關鍵詞: 鼻咽癌; 鼻咽癌病毒; 溶裂期; 免疫反應

英文摘要:

Role of three Epstein-Barr virus (EBV) lytic proteins, DNase, thymidine kinase (TK) and BMRF-1 gene products (52/50 kD diffused early antigen, EA-D complex) in humoral and cellular immunity and of EBV-infected healthy donors and nasopharyngeal carcinoma (NPC) individuals has been elucidated. Experimental designs for humoral immunity test were using baculovirus-expression system as target cells for immunofluorescence assay and for cellular immunity examination were performed by ^3H -thymidine incorporation cell proliferation assay. 70 NPC individuals and 32 control individuals were examined in this study. According to data of immunofluorescence analysis, it was indicated that the antibody titers to all three EBV lytic antigens were higher in NPC patients than those in control individuals, especially for IgA type. The elevated IgA antibodies for those three antigens were detectable in NPC individuals but in none of controls, while the exhibition of IgA antibodies were correlated with their IgA against EBV-encoded virus capsid antigen and total early antigen. The most interesting finding was that antibody titers to these EBV lytic proteins were significantly associated with tumor progression of clinical nasal lymph node metastases. However, results of cell proliferation assay suggested that peripheral blood cells of NPC patients could not be prominently stimulated by both purified DNase and EA-D complex, except few NPC individuals who usually had high anti-EA-D complex and anti-DNase antibodies.

Epstein-Barr virus is associated with the formation and progression of Nasopharyngeal carcinoma (NPC). It has shown that EBV encoded proteins had the ability of carcinogenesis. Furthermore, the immune response to EBV in NPC patients and the mechanism of immune response-enhancing progression of NPC are worth to identify.

Key words: nasopharyngeal carcinoma, Epstein-Barr virus, lytic cycle, immune response

本文：

(1) 前言：

隨著各類抗生素的發現和改造，細菌類的感染性疾病已能較有效的防治，因此病毒在人類疾病中所扮演的角色也愈來愈受到重視。EB 病毒即是其中一個和人類疾病很有關係的病毒。除了是單核球增多症的病源外(1)，EB 病毒同時也和多種疾病關係密切，例如：免疫缺陷病人的 B 淋巴腫瘤、X-染色體有關的淋巴增生症候群、慢性倦怠症候群、以及兩種人類惡性腫瘤：Burkitt 氏淋巴瘤及鼻咽癌(2-6)。近年來，更進一步得知，EB 病毒亦存在於 T 淋巴瘤、Hodgkin's 氏疾病、Sjogren's Syndrome 及胃癌的檢體細胞中(7-10)，顯示 EB 病毒在臨床醫學上扮演愈來愈重要的角色。後者主要是指因病毒感染（如 AIDS 病人）、服用壓抑免疫機能藥劑（如器官移植者）或先天遺傳（如 X-染色體有關的淋巴增生症候群患者）的 B 淋巴腫瘤。

EB 病毒在基礎病毒學上亦有其十分特殊的地位，因為它具有許多特異的生物活性。根據以前的實驗結果顯示，EB 病毒主要能感染兩種人類細胞：表皮細胞 (epithelial cells) 和 B 淋巴球 (B lymphocytes) (11-12)。目前又知 T 淋巴球亦可能為其宿主(13)。顯示，EB 病毒有其特異性宿主範圍。而在細胞內，EB 病毒 DNA 可以二種型式存在：episomal form (游離型) 或 integrated form (嵌入型) (14-15)；其生活史亦有二種：潛伏期或溶裂期。在一般體外 B 淋巴球的培養系統中，大多數的 EB 病毒是以潛伏期存在，此時，只有九種蛋白會有表現，此類蛋白稱為潛伏性蛋白(latent proteins)。其中包括六種核蛋白 (EBV-associated nuclear antigens, EBNA, EBNA1-6)，三種潛伏性膜蛋白 (latent membrane proteins, LMP-1, LMP-2A & LMP-2B)，以及二種尚不明功能的小 RNA(16)。

這些潛伏性蛋白的主要功能是和 EB 病毒的另一主要特性 - 在體外系統使 B 淋巴球轉形(transform)，有相當的關係。目前所知，當 EB 病毒在潛伏期時，EBNA-1 蛋白的生物功能可能和維持病毒 DNA 形成 episomal form，參與潛伏期病毒 DNA 的複製及調控蛋白本身在細胞內的含量有關(17-18)。EBNA-2~EBNA-6 和 LMP-1 則在 EB 病毒的轉形功能中扮演重要角色(19-22)。實驗顯示，EBNA-2 可能經由和一細胞因子 CBF1(C-promoter binding factor 1)結合而轉活化(transactivate)或調控其他病毒或細胞基因的表現(23-24, 60)。另外，EBNA-2 和 EBNA-5 亦被証明有促使細胞由 G0 時期進入 G1 時期的能力(25)。而 EBNA-5 蛋白亦被証實有和 Rb

及 P53 抑癌蛋白結合的能力(26)。以上的實驗證據均顯示，EBNA-2 和 EBNA-5 可能經由上述的傳導途徑，促使細胞轉形。EBNA-3 和 EBNA-6 蛋白亦被證明是 EB 病毒轉形 B 淋巴球的過程中所不可或缺的分分子(27-28)，因為若將此二基因去除，則 EB 病毒的轉形能力大為減低。LMP-1 更是在轉形的過程中扮演舉足輕重的角色(29)。它也是目前 EB 病毒潛伏性蛋白中，唯一被証實獨自即可使 Rat-1 細胞轉形的蛋白分子(30)。LMP-1 能轉活化 bcl-2 致癌基因的表現，而 bcl-2 蛋白有防止細胞死亡的作用。所以 LMP-1 活化 bcl-2 的作用，可能和其轉形能力有密切關係(31)。而鼻咽癌組織中，100%的檢體組織可表現 EBNA-1，亦有 65%的標本能測到 LMP-1 蛋白。更重要的是，LMP-1 蛋白亦曾被証明具有抑止上皮細胞分化的能力(29)。種種證據均顯示，EB 病毒在鼻咽癌的形成過程中可能有某種程度的參與作用。而 LMP2A 和 LMP2B 亦是常表現在鼻咽癌組織和 LCL 細胞的膜蛋白。近年來的研究顯示，此二潛伏膜蛋白可抑制 EB 病毒的再活化(61)。目前所知，此抑制作用可能是透過此二膜蛋白負面性的調控 B 淋巴球中的一些 Protein-tyrosine kinases，例如：Lyn，Syk 等(62)。可能有更多更重要的訊息傳導(signal transduction)牽涉其內，目前尚不十分清楚。

在體外系統中，EB 病毒能使 B 淋巴球轉形，而在這種細胞培養環境中，EB 病毒主要是以潛伏型式存在於細胞內。但若將細胞培養於下列情況，則可促使病毒由潛伏期轉入溶裂期：(1)低溫或饑餓狀態(32)。(2)UV 照射或熱刺激狀態(33)。(3)化學物質活化狀態。若在培養基中加入一些激發因子，例如：sodium butyrate，TPA，halogenated pyrimidines 及 anti-immunoglobulin 等化學刺激物(34-37)，則大多數 EB 病毒可轉入溶裂期。但是對於這些化學物質為何能活化 EB 病毒，原因則尚不清楚。目前僅知，TPA 可能經由刺激細胞內 protein kinase C 的作用而間接活化病毒(38)。

另一可能導致 EB 病毒活化進入溶裂期的因素是，EB 病毒本身會發生基因重新組合(rearrangement)。Miller 實驗室以前即發現在 P3HR-1 細胞株內，因有 W-Z 基因的重新組合，導致 ZEBRA（亦即 Zta 蛋白）蛋白不斷的合成而促使 EB 病毒進入溶裂期，因而源源不斷的產生病毒顆粒(39)。而在 oral hairy leukoplakia 的表皮細胞中，可偵測到 Zta 蛋白的表現，而其他 EB 病毒亦被証實是有發生基因重組的現象(40)。這些結果顯示，經由基因重組也是促使 EB 病毒活化的主因之一。

除了以上所提的各種因素外，細胞因子也是 EB 病毒是否能進入溶裂期的一個重要關鍵。由最早的體外實驗得知，同樣的病毒感染不同形式的 B 淋巴球，則有的可進入溶裂期，有的僅能停留在潛伏期(63)。進一步，由 SCID 老鼠實驗証明，B 淋巴球的分化程度關係著 EB 病毒能否行使溶裂期複製，因溶裂期 EB 病毒常被發現存在高度分化的 B 淋巴球內(64-65)。以上報告均顯示，細胞因子亦是決定 EB 病毒溶裂期的一個主要因素。

當 EB 病毒在有激發因子 (activation factor) 存在或基因重組時，病毒可由潛伏期轉入溶裂期。此時，80 種以上的 EB 病毒特異性蛋白可被製造生產，此類蛋白稱為溶裂期蛋白 (lytic proteins)。此類蛋白又可分為三大類 (一) 立即早期蛋白 (immediately early antigens)，此種蛋白在 EB 病毒一進入溶裂期時即製造產生，Zta、Rta 等蛋白即屬此類，這一類蛋白常具有轉活化其他溶裂蛋白的能力(41-42)。(二) 早期蛋白(early antigens)，所謂早期蛋白是指這一類蛋白的合成是在病毒 DNA 複製之前，所以通常是屬於複製病毒 DNA 時所需的酵素。例如：DNA polymerase，DNase，及 thymidine kinase 等均屬此類(43-45)。(三) 後期蛋白 (late antigens)，這一族群蛋白的產生是在病毒 DNA 複製之後。這類蛋白通常是屬於病毒的結構支架，例如：病毒外殼抗原(viral capsid antigen, VCA)，以及膜蛋白(membrane antigen, MA)(46-47)等。

許多臨床的資料顯示，EB 病毒的活化可能和 EB 病毒的致病性有關。從流行病學及血清學觀點來看，在開發中的國家，大多數的人在兒童時期已感染過 EB 病毒，所以血清反應均呈現陽性反應，但一般抗體價位(titer)都不高。然而，在 EB 病毒相關的兩種腫瘤— Burkitt 氏淋巴瘤及鼻咽癌患者體內，大多含有非常高價位的抗溶裂期蛋白，如：抗 DNA polymerase、DNase、thymidine kinase 及 VCA 的抗體。而在恢復期的病人，其血清中抗 EB 病毒的抗體則可逐漸降至與常人無異(48-49)。另外，在鼻咽癌的切片組織中，亦被証實存在有溶裂期基因的產物。這些調查結果顯示，EB 病毒可能在病人發病之前或發病時期已由潛伏期轉入溶裂期。這暗示著 EB 病毒的活化機轉可能和鼻咽癌的發生或發展形成有極密切的關連。

另外，在 EB 病毒相關的其它疾病：oral hairy leukoplakia 及 thymic carcinoma 的病理切片中均可測到有 Zta 蛋白的表現(50-51)。此一蛋白為 Dr. Miller 實驗室所發現的一分子量約 38kD 的 EB 病毒立即早期蛋白，此蛋白具有轉活化多種 EB 病毒早期蛋白因而促使 EB 病毒進入溶裂期的能力(52-54)。所以，此一蛋白的表現被視為 EB 病毒進入溶裂期的表徵。因此一般認為在 oral hairy leukoplakia 細胞中的 EB 病毒是進入溶裂期狀態。

溶裂期蛋白本身的致癌能力也在逐漸研究了解中。Zta 蛋白被證實可以控制細胞週期，使細胞停處於 G0/G1 時期 (72)。最近，另一早期溶裂期蛋白 Mta 的研究中發現，此溶裂期蛋白亦可轉形 Rat-1 或 NIH 3T3 細胞 (55)。而其轉形功能，主要經由 c-myc 途徑傳遞完成。另一 EB 病毒溶裂期蛋白 BHRF-1，其氨基酸序列和 bcl-2 蛋白有很高的相似性。此溶裂期蛋白不但被證實有防止細胞計劃性死亡 (programmed cell death) 的能力，也被發現能抑制抗癌藥物誘導的細胞死亡。因此，BHRF-1 蛋白被認為在病毒的癌化過程和抗藥能力可能扮演重要的角色(56-57)。更重要

的是，最近在將感染過 EB 病毒正常人的 B 淋巴球打入 SCID 老鼠的模式中，明顯的發現具有能表現溶裂期產物的 B 淋巴球是較為惡性的。而在體外培養系統時僅具潛伏期病毒的細胞在注射入老鼠體內，其 EB 病毒也常轉為能進入溶裂期病毒的型式(64-65)。另外，臨床上常見的 LPD

(Lymphoproliferative Disease, 淋巴增生症)，不論是先天的(例如：X-linked lymphoproliferative disease, X-染色體有關的淋巴增生症候群)或後天的(B lymphoma 在 AIDS 病人或是在器官移植病人)因素造成，其與 EB 病毒密切的關係，以及發展的情形，和上述的 SCID 老鼠模式，十分相似(66)。

除了 EB 病毒產物蛋白本身的致癌能力外，病毒產物對免疫細胞方面的影響也是 EB 病毒致病力的一個很重要的因素。EB 病毒本身的宿主細胞——B 淋巴球，就是體液性免疫反應的重要角色。更重要的是，EB 病毒會引起許多種細胞激素(cytokine)調控上的變化。由許多體外細胞株感染實驗證明，LMP-1 會促使 IL-10 的表現激增(73)，Zta 蛋白會提升 TGF- β 的反應活性(74)。而在另一嗜中性白血球(neutrophil)的實驗中，發現其被 EB 病毒感染後，會促使血球內的 IL-1 和 IL-1Ra (IL-1 receptor antagonist) 的產量大為增加(75)。一般推測 IL-1Ra 的大幅增加可能有利於 EB 病毒躲避體內免疫細胞的攻擊(75)。總之，EB 病毒藉由直接或間接的方法、主動或被動的形式，逃避免疫系統的偵察，使得病毒能安全地在體內繁殖生存。

申請人曾對 EB 病毒的溶裂期蛋白及活化機制做過深入的研究及探討，所以在此計畫中，我們藉由以前的經驗及基礎，希望能深入地探討比較鼻咽癌病人對 EB 病毒溶裂期蛋白的免疫反應。第一部份主要是偵察對三種溶裂期蛋白，包括：EA-D，DNase，及 TK 等的體液性免疫反應。雖然上述的實驗在鼻咽癌的病人中亦曾有過報告(76)。但從未有實驗將其做一橫向系統的比較。而因為各個檢測系統及實驗材料的異同，很難比較出究竟何種蛋白才是人體中較強的抗原。所以在此計畫，嘗試將上述五種溶裂期蛋白均表現於 baculovirus 的系統中，並以免疫螢光法偵察鼻咽癌或正常人對這些蛋白的抗體價位，希望能比較出抗體價位、抗體形式及抗體和鼻咽癌臨床分類或分期的關係。另一方面，在此計畫中，我們亦嘗試利用已經過純化的 EA-D 和 DNase 蛋白作為抗原，以 ^3H -incorporation 實驗探查鼻咽癌病人和正常人對此二蛋白的細胞性免疫反應。細胞性免疫反應是病毒感染中很重要的免疫反應。而由於技術及取材的困難，直到目前才較有突破法展。經過數年的努力，本實驗室已可迅速的純化出純度很高的 DNase 蛋白(77)。所以此實驗計畫可以初步的同時探討鼻咽癌病人對 EB 病毒溶裂期蛋白的細胞性反應是否異於常人，及此反應和病情發展是否相關連。我們深信這些實驗結果可以提供人們對於溶裂期的發生在鼻咽癌的形成，發展診斷及治療過程中所扮演的角色，有一初步的瞭解。我們深信此實驗計畫將能增進人們對鼻咽癌病人的 EB 病毒蛋白之免疫反應有

更進一步的瞭解。也希望此種瞭解能有利於鼻咽癌的早期診斷、治療，甚至在日後發展疫苗時能有所幫助。

(2) 材料與方法:

(1) 血清及單核細胞的製備:

將已加抗凝劑(heparin)的 70 個鼻咽癌病人(由台大醫院耳鼻喉科沈宗憲醫師提供)及 32 個正常人的血液 25 ml, 收集至 50 ml 離心管, 25 °C 下, 以 2000 rpm 離心 15 分鐘, 分離血清(plasma)及血球(blood cells)。將離心管上層的血清分裝至 2 ml 小管, 凍於 -70°C 備用; 而血球部分, 則加入 12 ml 已回溫的 10%FCS RPMI 1640, 血球細胞與 medium 混合均勻後, 緩緩加至 12 ml Ficoll-hypaque 上方, 經 1500 rpm 離心 30 分鐘後, 吸出上層單核細胞層, 並留意不要吸到最下層的紅血球。然後, 此單核細胞加入等體積的 10%FCS RPMI 1640, 離心去除有毒的 Ficoll-hypaque, 而後將單核細胞懸浮於 10 ml 的 10%FCS RPMI 1640 +1% human AB 型血清 +1% 2-ME(mecaptoethanol)中, 並計算細胞數目。

(2) 細胞培養:

實驗用的細胞均培養於 37°C 含 5% CO₂ 的溫箱中, 並使用含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培養液。SF9 細胞則培養在含有 10%FBS 的 TC-100 培養基, 27°C 的溫箱中。

(3) 化學反應活化試驗:

將欲作化學處理的細胞離心沈澱, 計算細胞數, 再將細胞調成 5×10^5 cells/ml 的濃度, 而後加入 TPA 40 μ g/ml 或 sodium butyrate (SB) 3mM, 或二者一起, 於細胞培養液內。經過 48 小時培養, 收取細胞, 並用 PBS 沖洗兩次, 再將細胞作免疫螢光試驗。

(4) 免疫螢光試驗法抗原的準備:

a. VCA 及 EA 抗原的製備

P3HR-1 細胞及 Raji 細胞培養於 10% FCS RPMI 1640 再加入 TPA 及 SB 以誘導病毒溶裂期蛋白的產生。三天後, 將細胞離心, 並以 PBS 洗滌三次, 而後將適當量的細胞滴於免疫螢光專用的玻片上。待細胞已乾燥, 並附著於玻片上, 及以 acetone 作用 15 分鐘, 以固定細胞。製備好的玻片保存於 -20°C 冰箱中。以上細胞作為 VCA (P3HR-1) 及 EA (Raji) 的抗原材料。另以未含有 EB 病毒的 BJAB 細胞作為對照。

b. EA-D 蛋白抗原的製備

將帶有 EA-D (相當於 B95-8 病毒株核甘酸序列 79819 至 81110)的

DNA 片段構築於 baculovirus transfer vector pVL1393 質體。此質體再與原生株 (wild-type) 的 baculovirus 基因體共同轉染 SF9 細胞。經過六天在 27°C 培養後，收取培養液中的基因重組病毒，其應含有 BMRF-1 DNA 片段。再以 10 倍連續稀釋定期病毒價位，此價位主要是用抗 EA-D 的單株抗體以免疫螢光法測定。再以適量的病毒感染 SF9 細胞，經二天的感染後，收集細胞以 PBS 洗滌三次，依上述方法，製備免疫螢光玻片。另外，也以感染原生株 baculovirus 的 SF9 細胞作為對照。

c. DNase 蛋白抗原的製備

實驗步驟均同上述。只是 DNA 片段取代為含有 DNase 基因 (相當於 B95-8 病毒株核甘酸序列 120746 至 122410) 的 DNA。

d. TK 蛋白抗原的製備

實驗步驟均同上述。只是 DNA 片段取代為含有 TK 基因 (相當於 B95-8 病毒株核甘酸序列 142740 至 144861) 的 DNA。

(5) 以西方式點漬法探查各種溶裂期蛋白表現：

收取經 baculovirus 感染的 2×10^6 cells，以 PBS 沖洗。再加入 $50 \mu\text{l}$ 的 lysis buffer (3.3% SDS, 1.67M urea, 及 $0.34 \mu\text{M}$ 2-mercaptoethanol)，將細胞沉澱物溶解。並以冷熱互換法(freeze-thaw)確定細胞完全溶解。再以超音波振盪器振盪 30 秒鐘(強度 4)。然後將標本和 sample buffer (0.1M dithiothreitol, 2% SDS, 15% glycerol, 0.08M Tris-HCl pH6.8 及 0.015% bromophenol blue) 均勻混合。再根據修改過的 Towbin 等人的方法，將蛋白質轉移到 hybond 膜上。將膜經過 1 小時與 2% 牛奶作用後，與各種溶裂期蛋白的單株抗體 (實驗室已備有) 於 4°C 作用。隔夜後，經二次清洗去除多餘或非特異性的物質，再加入 1:2500 稀釋標記有 horseradich peroxidase 的 Goat-anti-mouse IgG 抗體，室溫下作用 2 小時。於暗室中加入顯影劑(ECL kit, Amersham)並呈像于 X 光片上。

(6) 免疫螢光分析試驗 (immunofluorescence assay)：

利用上述所製備好的各種細胞，分別偵測 32 個正常人，70 個鼻咽癌患者，血清中抗 EB 病毒 VCA, EA, EA-D, DNase 及 TK 的效價。方法如下：將血清經 56°C, 30 分鐘去活化後並給予 PBS 以 1:20 開始做兩倍連續稀釋，同時將保存於 -20°C 的玻片取出回溫，而後分別於玻片中的每個 well 置入 15ul 於上述已稀釋好的血清，且以抗 VCA、EA、EA-D、DNase 或 TK 的單株抗體作為對照。已加入血清的玻片，置於 37°C 溼室中。反應 30 分鐘後，玻片以 PBS 清洗三次，然後再給予有螢光鍵結的抗人類 IgG 或 IgA 的抗體，置於 37°C 溼室中反應 30 分鐘。而再經二次 PBS 洗去多餘抗體，以 0.01% Evan's blue 在染缸中負染 1

分鐘。最後以二次水清洗玻片，室溫去除水分，加入封片油封片，並由螢光顯微鏡觀察各細胞呈現的螢光，判定血清中各抗體的效價。

(7) 單核球增生活性試驗之抗原的準備：

- a. EA-D 蛋白:由生計中心惠贈。
- b. DNase 蛋白：利用實驗室已有的 pDNase15b 質體表現 DNase 蛋白 (Lin, 1995)。再經過 Ni-column 純化，目前已可獲得純度及產量均極佳的 DNase 蛋白。

(8) 單核細胞增生活性試驗 (mononuclear cells proliferation assay)：

將方法(1)中所得的單核細胞，加入 10%FCS RPMI 1640 +1% human AB 型血清+1% 2-ME，調整細胞濃度為 1×10^6 cells/well，同時也將純化的 EA-D 及 DNase 蛋白以上述 medium 稀釋為 600 ng/ml 及 400 ng/ml，於 96-well plate 中每個 well 分別加入 100 μ l 細胞及 100 μ l 抗原做四重複，同時以加入 PHA 2 μ g/ml 作為正對照，另以 medium 作為負對照。於 37°C, 5% CO₂ 的培養箱中培養。於第 5 天，加入由 medium 稀釋過的 ³H-thymidine (0.5 μ Ci/ml)，再經過 16 小時的培養後，利用細胞收集器收集，並以 β -射線計數器測 cpm 值。所得的 cpm 值以下列公式計算比例值 (Proliferation Index): (給予 EA-D 或 DNase 的平均 cpm 值) / (只給予 medium 的平均 cpm 值)

(3)結果:

為了探討鼻咽癌病人體內對 EB 病毒的免疫反應，首先收集 70 位未治療的鼻咽癌患者(NPC)及 32 位正常人(NB)血清，利用免疫螢光法偵測血清中抗 EB 病毒 VCA 抗體與抗 EA 抗體效價的分佈情形。P3HR1 及 Raji 細胞經 TPA 與 SB 藥物誘導產生 EB 病毒溶裂期蛋白，而後以此細胞塗抹標本作為 EB 病毒 VCA 及 EA 的抗原來源。正常人及鼻咽癌患者血清以 PBS 做兩倍系列稀釋後，以間接免疫螢光法探查(1)抗 VCA IgG，(2)抗 VCA IgA，(3) 抗 EA IgG，(4)抗 EA IgA 效價。圖一縱軸所示為陽性人數佔測試總人數的百分比，橫軸為抗體的價位數。經由分組統計分析的結果顯示，鼻咽癌患者抗 EB 病毒 VCA 及 EA 抗體有明顯偏高的分佈。在 VCA IgG 方面，鼻咽癌患者抗體效價高於 1280 倍者佔了 91%；且在 EA IgG 方面，91% 的正常人抗體效價在 0 至 160 之間，但鼻咽癌患者有 92% 抗體效價是大於 160，在統計上與正常人有顯著差異($p<0.05$)。更特別的是，正常人均無法測得抗 VCA 及 EA 的 IgA 抗體，然而分別有 87% 及 80% 的鼻咽癌患者血清中具有此二種抗原的 IgA 抗體。

為了進一步偵測鼻咽癌患者血清中是否具有 EB 病毒其他的溶裂期蛋白抗體，因而須建立基因重組的 baculovirus 感染 SF9 昆蟲細胞以表現 EB 病毒溶裂期蛋白抗原。建立基因重組的 baculovirus 系統之前，首先構築帶有 EB 病毒 EA-D，DNase 及 TK 基因質體(圖二)，並分別與野生型 baculovirus 基因體於 SF9 細胞內進行共同轉染(co-transfection)與基因重組，進而產生帶有 EA-D, DNase 或 TK 基因的 baculovirus。圖三是以帶有 EA-D，DNase 或 TK 基因的重組 baculovirus 感染 SF9 細胞兩天後，將細胞溶解，並利用抗 EA-D，抗 DNase 或抗 TK 單株抗體做西方式點漬法(Western Blotting)分析蛋白表現(+)，以確認重組的 baculovirus 感染的 SF9 細胞表現特定的 EA-D，DNase 及 TK 蛋白。另外，以未感染 baculovirus(-)或感染野生型 baculovirus(wt)的 SF9 細胞作為對照。結果顯示，基因重組的 baculovirus 在 SF9 細胞內確實能大量表現 52/50kD EA-D, 52kD DNase 或 67kD TK 蛋白。圖四是將這些被感染細胞分別利用抗 EA-D，抗 DNase，或抗 TK 單株抗體以間接免疫螢光法做免疫螢光分析(+)，同時以未感染 baculovirus 的 SF9 細胞作為對照(-)。結果再次確認此病毒能在 SF9 細胞表現 EA-D，DNase 或 TK 抗原。

利用已成功建立的 SF9 細胞表現 EA-D，DNase 及 TK 作為抗原來源，並將 70 位鼻咽癌患者(NPC)及 32 位正常人(NB)血清作系列稀釋，以間接免疫螢光法測定對此三種抗原的抗體效價。圖五縱軸所示為陽性人數佔測試總人數的百分比，橫軸為抗體的價位數。結果顯示，鼻咽癌患者中分別有 94%，90% 及 80% 具有抗 EA-D，DNase 及 TK 的 IgG 抗體，反之，只有 25%，19% 及 9% 的正常人可偵測到極低價位的 IgG 抗體。此外，正常人血清中均無法偵測到抗 EA-

D, DNase 及 TK 的 IgA 抗體；反之，仍有 69%，49% 及 39% 的鼻咽癌患者血清中可偵測到高效價的 IgA 抗體。由整體分佈而言，鼻咽癌患者對此 EB 病毒三種溶裂期蛋白抗體效價(包括 IgG 及 IgA)與正常人均有顯著差異($p < 0.05$)。此外為了更進一步了解所測得的三種蛋白與 VCA 及 EA 抗體效價高低是否呈現正相關，因此藉由線性迴歸法分析五者的相關性。表一顯示此五種抗體效價大多呈現高度正相關 ($p < 0.01$)，且有趣的是當測得的 EA-D IgA 抗體效價較高時 EA-D IgA 抗體效價也偏高 ($R^2 = 81.14$)。其次相關性較高的還包括: DNase IgA 與 EA IgA ($R^2 = 54.60$)，TK IgA 與 VCA IgA ($R^2 = 49.36$)，及 DNase IgA 與 VCA IgA ($R^2 = 45.75$)。相反地，VCA IgG 與此 EB 病毒三種溶裂期蛋白抗體效價(包括 IgG 及 IgA)較不相關 ($R^2 = 2.73 - 25.1$)。

依據鼻咽部腫瘤大小(T)，轉移至頸部淋巴腺的程度(N)，及是否有遠距轉移(M)，鼻咽癌可分為 I 至 IV 四期 (Stage)。進一步利用分組統計法分析與各抗體效價是否與鼻咽癌臨床分期有相關。分析結果顯示 EB 病毒五種溶裂期蛋白抗體效價(包括 IgG 及 IgA)越高，此患者為鼻咽癌末期的機會越高。抗體效價高低與鼻咽癌腫瘤大小(T) 及是否遠距轉移(M) 雖無顯著相關，但值得注意的是抗此五類抗體(包括 IgG 和 IgA)效價高低與腫瘤轉移至頸部淋巴腺的程度呈現高度正相關(圖六)。

另一方面，在鼻咽癌患者對 EB 病毒的免疫反應中除了偵測抗體的存在之外，鼻咽癌患者對 EB 病毒蛋白的細胞性免疫反應也值得深入探討。在此計劃中，我們亦嘗試利用已經過純化的 EA-D 和 DNase 蛋白作為抗原，以單核細胞增生實驗，探查鼻咽癌病人和正常人對此二蛋白的細胞性免疫反應。利用大腸菌系統分別表現 EA-D 及 DNase 蛋白，其中 DNase 再經過 Ni-column 純化。所得已純化的蛋白經由 SDS-PAGE 確認分子大小及濃度後，即做為單核球細胞增生活性試驗之抗原(圖七)。將 32 位正常人與 54 位鼻咽癌患者的周邊血液單核細胞與純化的 EA-D 抗原(300 ng/ml)共同培養四天，並於加入 ^3H -thymidine 16 小時後，以 β -射線計數器測 cpm 值。所得的細胞增生刺激比值為:(給與 EA-D 抗原之平均 cpm 值)/(只給與 medium 的平均 cpm 值)。圖八結果顯示，大部份的鼻咽癌患者及正常人均無法偵測得明顯的細胞增生現象，但有二位鼻咽癌患者可測得對 EA-D 有明顯的細胞性免疫反應;更特別的是，這二位患者均屬於癌症後期(NPC stage IV)且均有很高的抗 EA-D 抗體效價。相同的，以單核細胞增生活性試驗偵測正常人及鼻咽癌患者對 DNase 抗原的細胞性免疫反應 (圖九)。將正常人與鼻咽癌患者的周邊血液單核細胞經 DNase 抗原(200 ng/ml)刺激後，測定細胞增生的刺激比值圖八結果顯示，在 DNase 抗原刺激下，無論鼻咽癌患者或正常人的單核細胞均無明顯的細胞增生現象。然而，其中有二位癌症後期的患者具有較高的細胞增生反應，並與之前的 EA-D 刺激的結果相吻合;同時，此二位患者亦具有極高的抗 DNase 抗體。

(4)討論:

利用 baculovirus 表現系統並利用免疫螢光法偵測 70 位 NPC 患者及 32 位對照血清中抗 EA-D complex, DNase 及 TK 抗體效價。結果顯示，鼻咽癌患者的對於此三種 EB 病毒溶裂期蛋白的抗體效價明顯較正常人高，其中以 EA-D 的效果最佳。雖 IgG 的敏感度較高，但無論正常人或非鼻咽癌的耳鼻喉科患者均無法測得 IgA 抗體，因而利用偵測 IgA 的有無有助於鼻咽癌的診斷。雖先前已有學者利用其它的蛋白質表現系統或偵察方式測定鼻咽癌患者對 EA-D, DNase 及 TK 抗體，但此一結果更加印証利用 baculovirus 表現系統作為診斷工具的可行性 (78-80)。除此之外，我們也同時比較傳統血清學法：此三種溶裂期蛋白抗體高低均與抗 EB 病毒 VCA 及 EA 的抗體效價有明顯正相關，尤其是 IgA 型抗體。更有趣的是，鼻咽癌細胞轉移至頸部的患者抗體明顯增高，且隨著頸部腫瘤增大及侵犯部位的擴展，對於五類 EB 溶裂期蛋白抗體力價更顯著上升。因此藉由對 EB 病毒溶裂期蛋白抗體的偵測有助於鼻咽癌的診斷，並可利用抗體效價高低作為判別轉移至頸部腫瘤大小的參考。

EB 病毒的 DNase 及 TK 均屬於 restricted early antigen，當病毒進入溶裂期時產生的早期蛋白主要分佈於細胞核內；而 EA-D 為 defused early antigen 的成員之一，其功能可能為 EBV DNA polymerase accessory protein 並參與病毒 DNA 的複製 (81)。雖然在目前因實驗技術限制，鼻咽癌組織中仍不易偵測到 EB 病毒溶裂期蛋白，但由鼻咽癌患者體內具高價抗體顯示病毒在患者體內大量活化的可能性。且由偵測血清中病毒基因量的結果，亦再次証實上述推斷 (82)。

1986 年 Hsu 等人發現鼻咽癌病人無論在 CD4⁺T 細胞或 CD8⁺T 細胞數均有明顯下降的趨勢，且在 PHA 刺激下，T 細胞的活性也較正常人為低 (83-84)。近年更證實鼻咽癌患者血清中有 soluble IL-2 receptor (sIL-2R) 的增加，因此推測 T 細胞活性的減少，可能是因鼻咽癌病人體內過多的 sIL-2R 競爭掉 IL-2 (85)。由我們的結果亦顯示，雖除了二位癌症末期的病患以外，大部份鼻咽癌患者，對於 EA-D 及 DNase 蛋白並無明顯提高的細胞性免疫反應。過去的研究也發現鼻咽癌患者雖有抗 gp350 抗體，但此抗體效價與其體內的 antibody-dependent cellular cytotoxic effect 並無顯著相關 (86)。因此在鼻咽癌患者體內為何只產生大量抗 EB 病毒抗體，但卻無法誘導產生具有毒殺性的細胞性免疫反應值得探討。至於已帶有 EB 病毒的健康者如何利用免疫反應清除活化的病毒，也值得進一步的分析。

由病理組織切片可觀察到：在鼻咽癌細胞周圍浸潤許多活化的淋巴球。因此，在鼻咽癌患者血清中特定的 IgA 效價升高的現象，顯示癌細胞本身或其與這些淋巴球交互作用產生的細胞間素(cytokines)也可能扮演極重要的角色 (87)。由 B 細胞培養及起動子實驗已証實β型轉型生長因子(transforming growth factor, TGF-β)，IL-5，及 IL-6 等 cytokines 能促進 IgA 的抗體轉換(class switch)。而更有趣的是 EB 病毒本身產生的基因產物也會誘導這些 cytokines 的產生：如 Zta 能活化 TGF-β₁ 及 TGF-β₂ 且 LMP-1 亦能促進 IL-6 的分泌 (88-89)。此外在鼻咽癌細胞周圍浸潤許多活化的淋巴球在於協助 B 細胞 class switch 為 IgA 時所扮演的角色，也值得探討。

(5)結論與建議:

相較於傳統利用大腸桿菌表現蛋白系統，基因重組的 baculovirus 系統的優點是(1)此分析系統能表現較類似真核細胞的蛋白質，可提高抗原與抗體結合的機會，(2)人類血清對 SF9 細胞較不會產生非專一性結合，故可減低判別的困難度。本實驗室已可利用基因重組的 baculovirus，成功地建立分別能表現 EA-D，DNase 及 TK 特定蛋白的 SF9 細胞作為偵測抗體效價的抗原。由免疫螢光實驗結果顯示:偵測 EB 病毒溶裂期蛋白 VCA，EA，EA-D，DNase 及 TK 的抗體效價高低有助於診斷鼻咽癌，尤其是 IgA 型抗體的存在更是鼻咽癌所特有，其中又以抗 VCA 的抗體的敏感度最佳，但抗 EA，EA-D，DNase 及 TK 的抗體較具特異性。同時此五種抗體的存在具相關性，暗示著鼻咽癌病患體內有大量進入溶裂期的 EB 病毒的存在。由比較本實驗利用同一系統偵測之三種溶裂期蛋白的平均抗體效價後，結果以 EA-D 抗體平均效價最高，其次為 DNase，TK 最低，顯示在鼻咽癌病人體內 EA-D 蛋白的表現量可能較 DNase 及 TK 多，另一個原因為可能 EA-D 的抗原性最強，能刺激產生較多的抗體。本實驗中還進一步發現:轉移至頸部的鼻咽癌腫瘤大小與 EB 病毒溶裂期蛋白抗體高低(包括 IgG 及 IgA，尤其是 IgG)呈現明顯正相關。因此在臨床診斷上，除了直接觀測之外，現在還可間接以抗體高低作為判別轉移的頸部腫瘤大小的參考。

在鼻咽癌病患體內雖可明顯偵測到病毒抗體，卻無法偵測到細胞性免疫反應，暗示不健全的細胞性免疫反應可能無法清除 EB 病毒，因此可測得大量複製的 EB 病毒。造成對 EB 病毒有不健全的細胞性免疫反應，可能導因於宿主本身免疫力有所缺陷之外，也可能因病毒本身產生的蛋白不易刺激細胞性免疫反應所致。例如:現已知 Epstein-Barr nuclear antigen (EBNA-1) 蛋白上的 Gly-Ala repeat 序列的存在，能避免 antigen processing 及 presentation 至 MHC class I，因而無法在 EB 病毒感染者身上測得能辨認 EBNA-1 的 cytotoxic T 細胞；至於 EA-D 及 DNase 是否也有此一特性則待進一步探查。

鼻咽癌與 EB 病毒有密相關，除了抗體的存在之外，同時也可在癌細胞內發現 EB 病毒基因體及潛伏期蛋白，包括 EBNA-1 及 LMP-1；至於溶裂期蛋白是否存在於癌細胞內且表現量如何，仍待進一步的證實。鼻咽癌病人體內已可偵測到高效價的 EA-D，DNase 及 TK 抗體，已知 EA-D 能與 EB 病毒 DNA polymerase 結合，並可能參與病毒複製。因此鼻咽癌組織內是否可偵測到這三種抗原，且其扮演的角色也值得研究。

(6)參考文獻:

- 1 Henle, G., Henle, W. and Diehl, V. (1968) Relation of Burkitt's tumor -associated herpes-type virus to infectious mononucleosis., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 59:94-101.
2. Rochford, R., and Mosier, D.E. (1994) Immunobiology of Epstein-Barr virus-associated lymphomas. *Clin. Immuno. & Immunopatho.*, 71:256-259.
3. Purtilo, D. T., Sakamoto, K., Barnabei, V., Seley, J., Bechtold, T., Rogers, G., Yetz, G., and Harada, S. (1982) Epstein-Barr virus-induced diseases in boys with the X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP), *Am. J. Med.* 73: 49-56.
4. Jones, J. F., Williams, M., Schooley, R. T., Robinson, C., and Glaser R. (1988) Antibodies to Epstein-Barr virus-specific DNase and DNA polymerase in the Chronic fatigue syndrome., *Arch. Int. Med.*, 148:1957-1960.
5. Epstein, M.A., and Achong, B. G. (1986) Specific immunofluorescence test for the herpes-type EB virus of Burkitt's lymphoblasts, authenticated by electron microscopy. *J. Int. Cancer. Inst.*, 40:593-607.
6. Henle, W., Ho, J.H.C., Henle, G., Chau, J.C.W. and Kwan, H.C. (1977) Nasopharyngeal carcinoma: Significance changes in Epstein-Barr virus-related antibody patterns following therapy. *Int. J. Cancer* 20:663-673.
7. Loke, S. L., Ho, F., Srivastava, G., Fu, K., H., Leung, B., and Liang, R. (1992) Clonal Epstein-Barr virus genome in T-cell rich lymphomas of B or Probable B lineage. *Am. J. Pathol.*, 140:981-989.
8. Deacon, E. M., Pallesen, G., Niedobitek, G., Crocker, J., Brooks, L. Rickinson, A. B., and Young, L.S. (1993) Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: Transcriptional analysis of virus latency in the malignant cells. *J. Exp. Med.*, 177:339-349.
9. Jones, D. T., Monrov, D., Ji, Z., Atherton, S. S., and Pflugfelder, S. C. (1994) Sjogren's syndrome: cytokine and Epstein-Barr viral gene expression within the conjunctival epithelium. *Inves. Ophthalm.*, 35:3493-3504.
10. Imai, S., Koizumi, S., Sugiura, M., Tokunaga, M., Uemura, Y., Yamamoto, N., Tanaka, S., Sato, E., and Osato, T. (1994) Gastric carcinoma: Monoclonal epithelial malignant cells expressing Epstein-Barr virus latent infection protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91:9131-9135.
11. Sixbey, J.W, Vesterinen, E.H. Nedrud, J.G, Raab-Traub, N., Walton, L.A., and Pagano, J.S. (1983) Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected in vitro. *Nature* 306:480-483.
12. Tanner, J., Weis, J., Fearon, D., Wang, Y., and Kieff, E. (1987) Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte CD21 receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell* 40: 203-213.
13. Watry, D., Hedrick, J. A., Siervo, S., Rhodes, G., Lamberti, J. J., Lambris, and Tsoukas, C. D. (1991) Infection of human thymocytes by Epstein-Barr virus. *J. Exp. Med.*, 173:971-980.
14. Lindahl, T., Adams, A., Bjursell, G., Bornkamm, G. W., Kaschka-Dierich, C., and John, U. (1976) Covalently closed circular duplex DNA of Epstein-Barr virus in a human lymphoid cell line. *J. Mol. Biol.* 102:511-530.
15. King, W., Thomas-Powell, A.L., Raab-Traub, N., Hawke, M. and Kieff, E. (1980) Epstein-Barr virus RNA. V. Viral RNA in a restringently infected, growth transformed cell. *J. Virol.*, 36:506-518
16. Toczyski, D. P., Matera, A. G., Ward, D. C., and Steitz, J. A. (1994) The Epstein-Barr virus (EBV) small RNA EBEB1 binds and relocalize ribosomal protein L22 in EBV-infected human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3463-3467.

17. Kieff, E., Dambaugh, T., Heller, M., King, W., Cheung, A., van Santen, V., Hummel, M., Beisel, C., Fennewald, S., Hennessy, H., and Heiniman, T. (1982) The biology and chemistry of Epstein-Barr virus. *J. Infect. Dis.* 146: 506-517.
18. Rawlins, D. R., Milman, G., Hayward, S. D., and Hayward, G. S. (1985) Sequence specific DNA binding of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA-1) to clustered sites in the plasmid maintenance region. *Cell* 42:859-868.
19. Skare, J., Farley, J., Strominger, J. L., Fresen, K. O., Cho, M. S., and zur Hausen, H. (1985) Transformation by Epstein-Barr virus requires DNA sequences in the region of Bam H I fragments Y and H. *J. Virol.* 45:286-297.
20. Wang, F., Kikutani, A., Tsang, S.F., Kishimoto, T., and Kieff, E. (1991) Epstein-Barr virus nuclear protein 2 transactivates a cis-acting CD23 DNA element. *J. Virol.* 65: 4101-4109.
21. Baichwal, V., and Sugden, B. (1988) Transformation of Balb 3T3 cells by the BNLF-1 gene of Epstein-Barr virus. *Oncogene*, 2:461-467.
22. Wang, F., Tsang, S-F., Kurilla, M. G., Cohen, J. I., and Kieff, E. (1990) Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivates latent membrane protein LMP1. *J. Virol.*, 64:3407-3416.
23. Henkel, T., Ling, P.D., Hayward, S.D., and Peterson, M. G. (1994) Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal -binding protein Jk. *Science.*, 265:92-95.
24. Ling, P. D., Hsieh, J. J-D., Ruf, I. K., Rawlins, D. R., and Haywards, D. (1994) EBNA-2 upregulation of Epstein-Barr virus latency promoters and the cellular CD23 promoter utilizes a common targeting intermediate, CBF1. 68:5375-5383.
25. Sinclair, A., Palmero, I., Peters, G., and Farrel, P. (1994) EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G₀ to G₁ transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *EMBO.*, 13:3321-3328.
26. Szekely, L., Selivanova, G., Magnusson, K. P., Klein, G., and Wiman, K. G. (1993) EBNA-5, an Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 5455 -5459.
27. 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.
28. Tomkinson, B., and Kieff, E. (1992) Use of second-site homologous recombination to demonstrate that Epstein-Barr virus nuclear protein 3B is not important for lymphocyte infection or growth transformation in vitro. *J. Virol.*, 66:2893-2903.
29. Dawson, C. W., Rickinson, B., and Young, L. S. (1990). Epstein-Barr virus latent membrane protein inhibits human epithelial cell differentiation. *Nature* 344: 777-780.
30. Wang, D., Liebowitz, D., and Kieff, E. (1985) An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* 43: 831-840.
31. Rowe, M., Peng-Pilon, M., Huen, D. S., Hardy, R., Croom-Carter, D., Lundgren, E., and Rickinson, A. B. (1994) Upregulation of bcl-2 by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP1: a B-cell-specific response that is delayed relative to NF-kB activation and to induction of cell surface markers. *J. Virol.*, 68:5602-5612.
32. Magrath, I., Pizzo, P., Novkova, L., and Levine, A. (1980). Enhancement of Epstein-Barr virus replication in producer cell lines by a combination of low temperature and corticosteroid. *Virology* 97: 477-481.
33. Field, B., Knipe, D., Chanock, R., Hirsch, M., Melnick, J., and Monath, T. (1990) *Virology*. vol.2. New York :Raven pp. 1889-1958

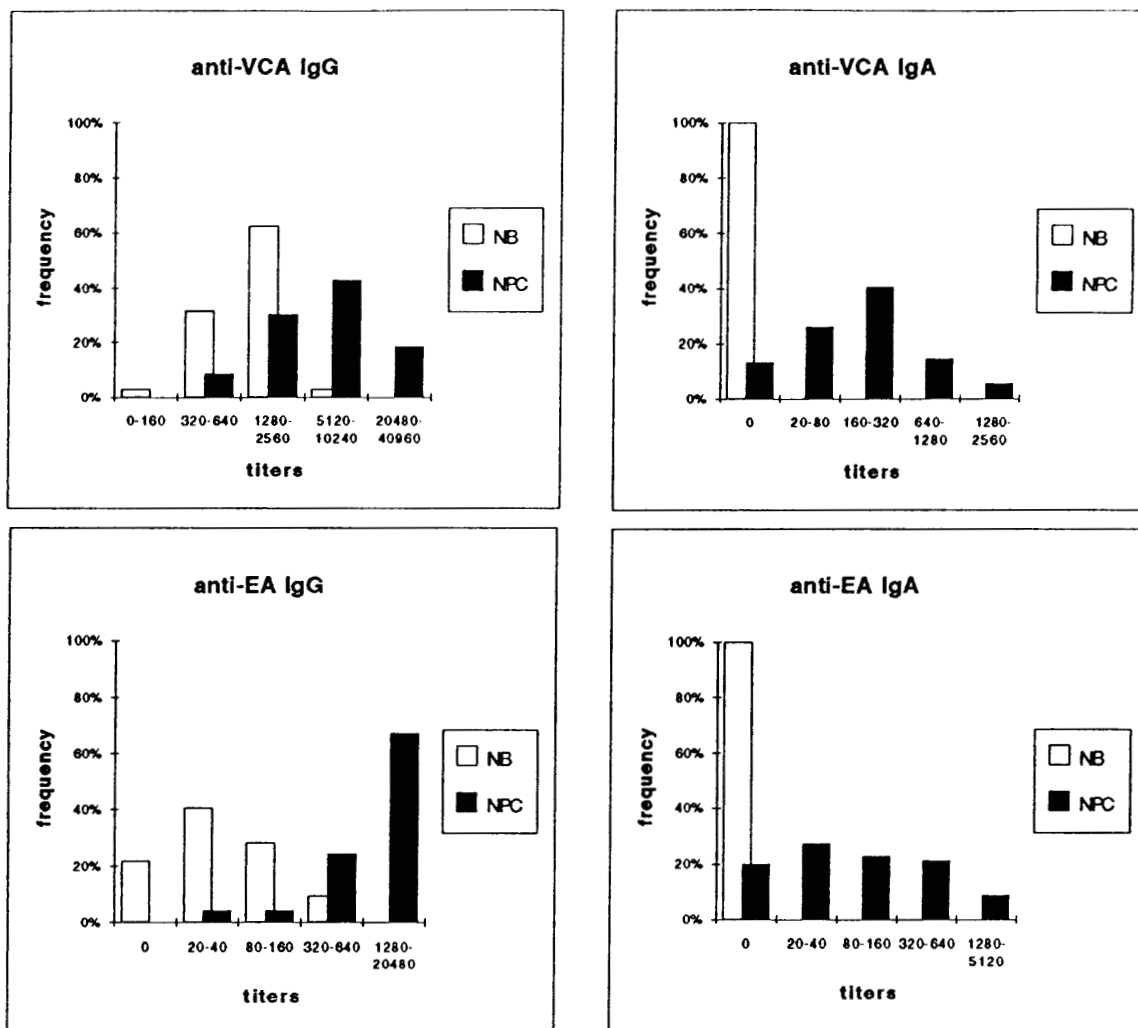
34. zur Hausen, H., O'Neill, F.J., Freese, U.K., and Hecher, E. (1978) Persisting oncogenic herpesvirus induced by tumor promoter TPA. *Nature* 272: 373-375.
35. Luka, J., Kallin, B., and Klein, G. (1979) Induction of the Epstein-Barr virus cycle in the latently infected cells by N-butyrate. *Virology* 94: 228-231.
36. Gerber, P. (1972) Activation of Epstein-Barr virus by 5-bromo-2'-deoxyuride in "virus-free" human cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 83-85.
37. Tovey, M. G., Lenoir, G., and Gegon-Louis, J. (1978) Activation of latent Epstein-Barr virus by antibody to human IgM. *Nature* 276:270-272.
41. Flemington, E.K., Borras, A.M., Lytel, J.P., and Speck, S.H. (1992) Characterization of the Epstein-Barr virus BZLF1 activation domain. *J. Virol.* 64:1227-1232.
42. Bogendain, C., Allger, P., Schwarzmann, F., Marshall, M., Wolf, H., and Ting, W. (1994) Different activation of Epstein-Barr virus immediate-early and early genes in Burkitt's lymphoma cell and lymphoblastoid cell lines. *J. Virol.* 68:1200-1203.
43. Tsurumi, T., Daikoku, T., Kurachi, R., and Nishiyama, Y. (1993) Functional interaction between Epstein-Barr virus DNA polymerase catalytic subunit and its accessory subunit in vitro. *J. Virol.*, 67:7648-7653.
44. Lin, S-F., Lin, S-H., Hsu, T-Y., Liu, M-Y., Chen, J-Y., and Yang, C-S. (1994) Functional analysis of the amino terminus of Epstein-barr virus deoxyribonuclease. *Virology.*, 199:223-227.
45. Liu, M-Y., Pai, C-Y., Shieh, S-H., Hsu, T-Y., Chen, J-Y., and Yang, C-S. (1992) Cloning and expression of a cDNA encoding the Epstein-Barr virus thymidine kinase gene. *J. Virol. Meth.*, 40:107-118.
46. Vroman, B., Luke, J., Rodriguez, M., and Pearson, G. R. (1984) 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.
47. Nemerow, G., Mold, G., Schwend, V. K., Tollefson, V., and Cooper, N. (1987) Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus to the EBV/C3d receptor of B cell: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J. Virol.* 61:1416-1420.
48. Tan, R.S., Li, J.S., Grill, S.P., Nutter, L., and Cheng, Y.C. (1986) Demonstration of Epstein-Barr virus-specific DNA polymerase in chemically induced Raji cells and its antibody in serum from patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 46:5024-5028.
49. Liu, M. Y., Chou, W. H., Nutter, L., Hsu, M. M. and Chen, J. Y. (1989) Antibody against Epstein-Barr virus DNA polymerase activity in sera of patients with nasopharyngeal carcinoma. *J. Med. Virol.* 28:101-105
50. Niedobitek, G., Young, L. S., Lau, R., Brooks, L., Greenspan, D., Greenspan, J. S., and Rickinson, A. B. (1991) Epstein-Barr virus infection in oral hairy leukoplakia: virus replication in the absence of a detectable latent phase *J. Gen. Virol.* 72:3035-3046
51. Patton, D. F., Ribeiro, R. C., Jenkins, J. J., and Sixbey, J. W. (1994) Thymic carcinoma with a defective Epstein-Barr virus encoding the BZLF1 trans-activator. *J. Inf. Dis.* 170:7-12.
52. Hayashi, K. (1992) Effect of protein kinase C inhibitors with different action on EB virus replication. *Intervirology* 33: 217-224.

53. Miller, G. (1990) The switch between latency and replication of Epstein-Barr virus. *J. Infect. Dis.* 161:833-844.
54. Daibata M., Speck S.H., Mulder C., and Sairenji T. (1994) Regulation of the BZLF1 promoter of Epstein-Barr virus by second messengers in anti-immunoglobulin-treated B cells. *Viol.* 198:446-454
55. Korman J.L., Korman C.J., and Miller G. (1992) Mark variation in the size of genomic plasmids among members of a family of related Epstein-Barr virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7772-7776
56. Tarodi, B., Subramanian, T., and Chinnadura, G. (1994) Epstein-Barr virus BHRF1 protects against cell death induced by DNA-damaging agents and heterologous viral infection. *Virology*, 201: 404-407.
57. Henderson, S., Huen, D., Rowe, M., Dawson, C., Johnson, G., and Rickinson, A. (1993) Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:8479-8483.
58. Bloss T.A., and Sugden B. (1994) Optimal lengths for DNAs encapsidation by Epstein-Barr virus. *J. Virol.*, 68:8217-8222
59. Corbo, L., Roux, F. Le., and Sergeant A. (1994) The EBV early gene EB2 transforms rodent cells through a signalling pathway involving c-MYC. *Oncogene*, 9:3299-3304.
60. Hsieh, J. J.-D., and Hayward, S. D. (1995) Masking of the CBF1/RBPJ κ transcriptional repression domain by Epstein-Barr virus EBNA2. *Science*, 268:560-563.
61. Miller, C. L., Lee, J. H., Kieff, E., and Longnecker, R. (1994). An integral membrane protein (LMP2) blocks reactivation of Epstein-Barr virus from latency following surface immunoglobulin cross-linking. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 91, 772-776.
62. Miller, C. L., Burkhardt, A. L., Lee, J. H., Stealey, B., Longnecker, R., Bolen, J. B., and Kieff, E. (1995) Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases. *Immunity* 2:155-166.
63. Miller, G. (1990) Epstein-Barr virus: biology, pathogenesis and medical aspects, p1921-1958. In B. N. Fields, D. M. Knipe, R. M. Chanock, J. L., Melnick, M. S. Hirsch, T. P. Monath, and B. Roizman (ed.), *Virology*, Raven Press, Ltd., New York.
64. Rowe, M., Young, L., Crocker, S. H., Stokes, S., Henderson, S., and Rickinson, A. B. Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoproliferative disease in the SCID mouse model: implication for the pathogenesis of EBV-positive lymphomas in man. *J. Exp. Med.*, 173:147-158.
65. Rochford, R., and Mosier, D. E. (1995) Differential Epstein-Barr virus gene expression in B-cell subsets recovered from lymphomas in SCID mice after transplantation of human peripheral blood lymphocytes. *J. Virol.*, 69:150-155.
66. Rochford, R., and Mosier, D. E. (1994) Immunobiology of Epstein-Barr virus-associated lymphomas. *Clin. Immun. & Immunopathol.*, 71:256-259.
67. Gardella, T., Medveczky, P., Sairenji, T., and Melder, C. (1984) Detection of circular and linear herpesvirus DNA molecules in mammalian cell by gel electrophoresis. *J. Virol.*, 50:248-254.
68. Silins, S. L., Argat, V. P., and Sculley, T. B. (1992) Isolation of Epstein-Barr virus genomes using pulse-field gel electrophoresis. *Nucleic Acid Res.*, 20:2901-2902.
69. Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., and Mitchell, J. B. (1987) Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.*, 47:936-942.

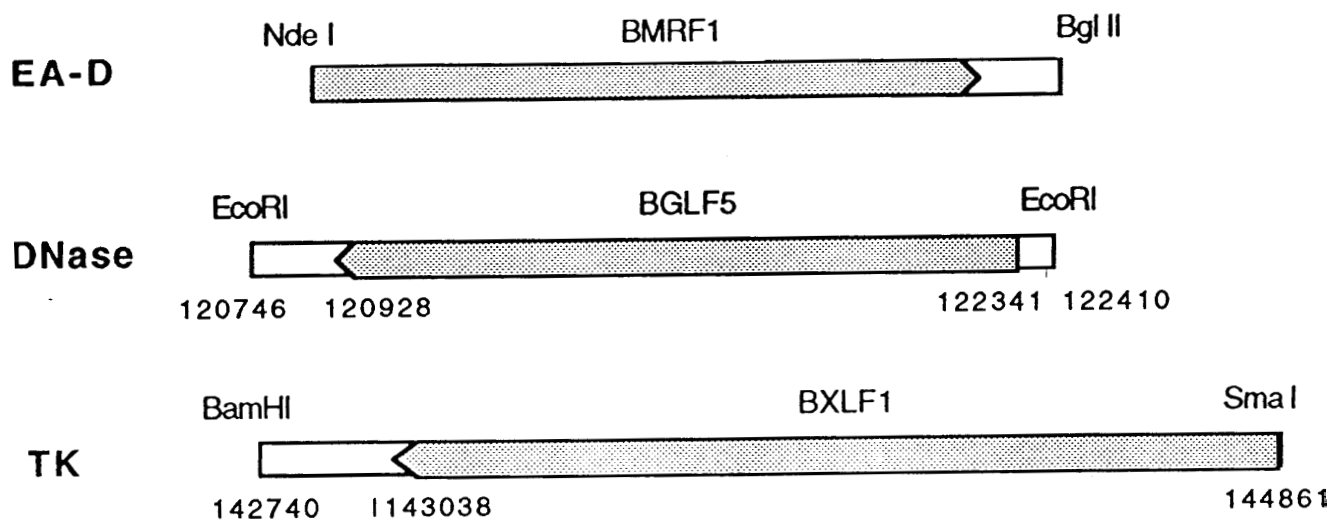
70. Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. L., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R. H., and Boyd, M. R. (1988) Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.*, 48:589-601.
71. Dyne, M. G. J., and Musgrave, E. A. (1978). Immunofluorescence quantification of ribonucleotide reductase M1 subunit and correlation with DNA content by flowcytometry. *Cytometry*, 8:504-517.
72. Cayrol, C., and Flemington, E. K. (1996). The Epstein-Barr virus bZIP transcription factor Zta causes G₀/G₁ cell cycle arrest through induction of cyclin-dependent kinase inhibitors. *EMBO*, 15:2748-2759.
73. Nakagomi, H., Dolcetti, R., Bejarano, M. T., Pisa, P., Kiessling, R., and Masucci, M. G. (1994). The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP-1) induces interleukin-10 production in Burkitt lymphoma lines. *Int. J. Cancer*, 57:240-244.
74. Cayrol, C., and Flemington, E. K. (1995). Identification of cellular target genes of the Epstein-Barr virus transactivator Zta: activation of transforming growth factor β (TGF- β 1 and TGF- β 2).
75. Roberge, C. J., Poubelle, P. E., Beaulieu, A. D., Heitz, D., and Gosselin, J. (1996). The IL-1 and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) response of human neutrophils to EBV stimulation. *J. Immunol.*, 156:4884-4891.
76. Knanna, R., Burrows, S. W., and Moss, D. J. (1995) Immune regulation in Epstein-Barr virus-associated diseases. *Micro. Rev.*, 59:387-405.
77. Lin, S-F., Lin, S-H., Hsu, T-Y., Liu, M-Y., Chen, J-Y., and Yang, C-S. (1994) Functional analysis of the amino terminus of Epstein-Barr virus deoxyribonuclease. *Virology*, 199:223-227.
78. Littler, E., Newman, W. and Arrand, J.R.. (1990) Immunological response of nasopharyngeal carcinoma patients to the Epstein-Barr-virus-coded thymidine kinase expressed in *Escherichia coli*. *Int. J. Cancer* 45: 1028-1032.
79. Baylis, S. A., Purifoy, D. J. M., and Litter, E. (1991) High-expression of Epstein-Barr virus alkaline deoxyribonuclease using a recombinant baculovirus: application to the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *Virol.* 181: 390-394.
80. Nadala, E. C. B., Tan, T. M. C., Wong, H. M., and Ting, R. C. Y. (1996) ELISA for the detection of serum and saliva IgA against the BMRFI gene product of Epstein-Barr virus. *J. Med. Virol.* 50: 93-96.
81. Tsurumi, T., Diakoku, T., Kurachi, R., and Nishiyama, Y. (1993) Functional interaction between Epstein-Barr virus DNA polymerase catalytic subunit and its accessory subunit in vitro. *J. Virol.* 67: 7648-7653.
82. Lo, Y. M., Chan, Y. S., Lo, K. W., Leung, S. F., Zhang, J., Chan, T. C., Lee, C. K., Hjelm, N. M., Johnson, P. J., and Huang, D. P. (1999) Quantitative analysis of cell free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 59: 1188-1191.
83. Chan, S.H., Chew, T.S., Goh, E.H., Simons, M.J. and Shanmugaratnam, K. (1976) Impaired general cell-mediated immune functions in vivo and in vitro in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer* 18: 139-144.
84. Hsu, M.M. and Lin, B.L. (1986) Characterization of T cell subsets using monoclonal antibodies in nasopharyngeal carcinoma patients. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 95: 298-301.

85. Hsu, M.M., Ko, J.Y. and Chang, Y. L. (1991) Elevated levels of soluble interleukin 2 receptor and tumor necrosis factor in nasopharyngeal carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 117: 1257-1259.
86. Khyatti, M., Stefanescu, I., Blagdon, M., and Menezes, J. (1994) Epstein-Barr virus gp350-specific antibody titers and antibody-dependent cellular cytotoxic effector function in different groups of patients: a study using cloned gp350-expressing transfected human T cell target. *J. Infect. Dis.* 170: 1439-1447.
87. Huang, Y. T., Sheen, T. S., Chen, C. L., Lu, J., Chang, Y., Chen, J. Y. and Tsai, C. H. (1999) Profile of cytokine expression in nasopharyngeal carcinomas: a distinct expression of interleukin 1 in tumor and CD4⁺ T cells. *Cancer Res.* 59:1599-1605.
88. Cayrol, C., and Flemington, E. K. (1995) Identification of cellular target genes of the Epstein-Barr virus transactivator Zta: activation of transforming growth factor β h3 (TGF- β h3) and TGF- β 1. *J. Virol.* 69: 4206-4212.
89. Elioponlos, A. G., Stack, M., Dawson, C. W., Kaye, K. M., Hodgkin, L., Sihota, S., Rowe, M., and Young, L. S. (1997) Epstein-Barr virus-encoded LMP1 and CD40 mediate IL-6 production in epithelial cell via an NF- κ B pathway involving TNF receptor-associated factors. *Oncogene* 14: 2899-2916.

(7)圖及表:



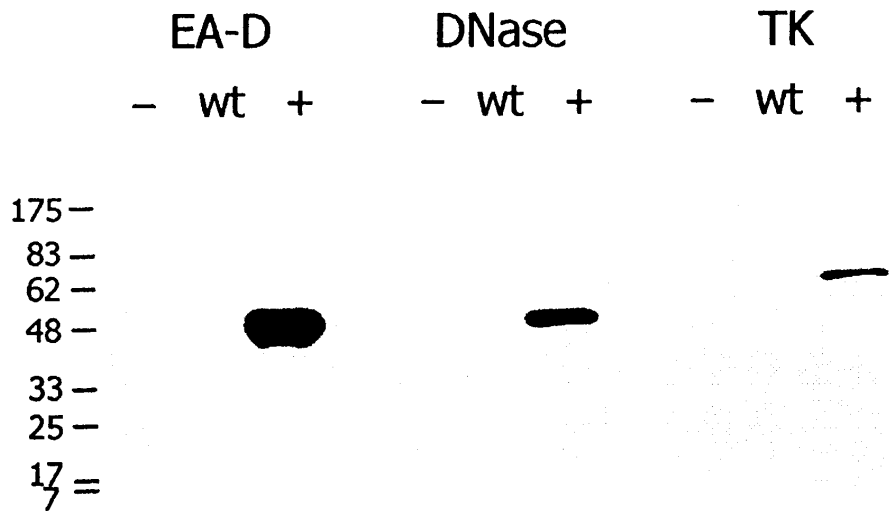
圖一 利用免疫螢光法(Immunofluorescence assay)偵測 32 位正常人(NB)及 70 位鼻咽癌患者(NPC)血清中抗 EB 病毒 VCA 抗體與抗 EA 抗體效價的分佈情形 P3HR1 及 Raji 細胞經 TPA 與 SB 藥物誘導產生 EB 病毒溶裂期蛋白，而後以此細胞塗抹標本作為 EB 病毒 VCA 及 EA 的抗原來源。正常人及鼻咽癌患者血清以 PBS 做兩倍系列稀釋後，以間接免疫螢光法探查抗 VCA IgG,抗 VCA IgA, 抗 EA IgG,及抗 EA IgA 效價。圖中縱軸所示為陽性人數佔測試總人數的百分比，橫軸為抗體的價位數。



圖二 構築帶有 EB 病毒 EA-D，DNase 及 TK 基因質體

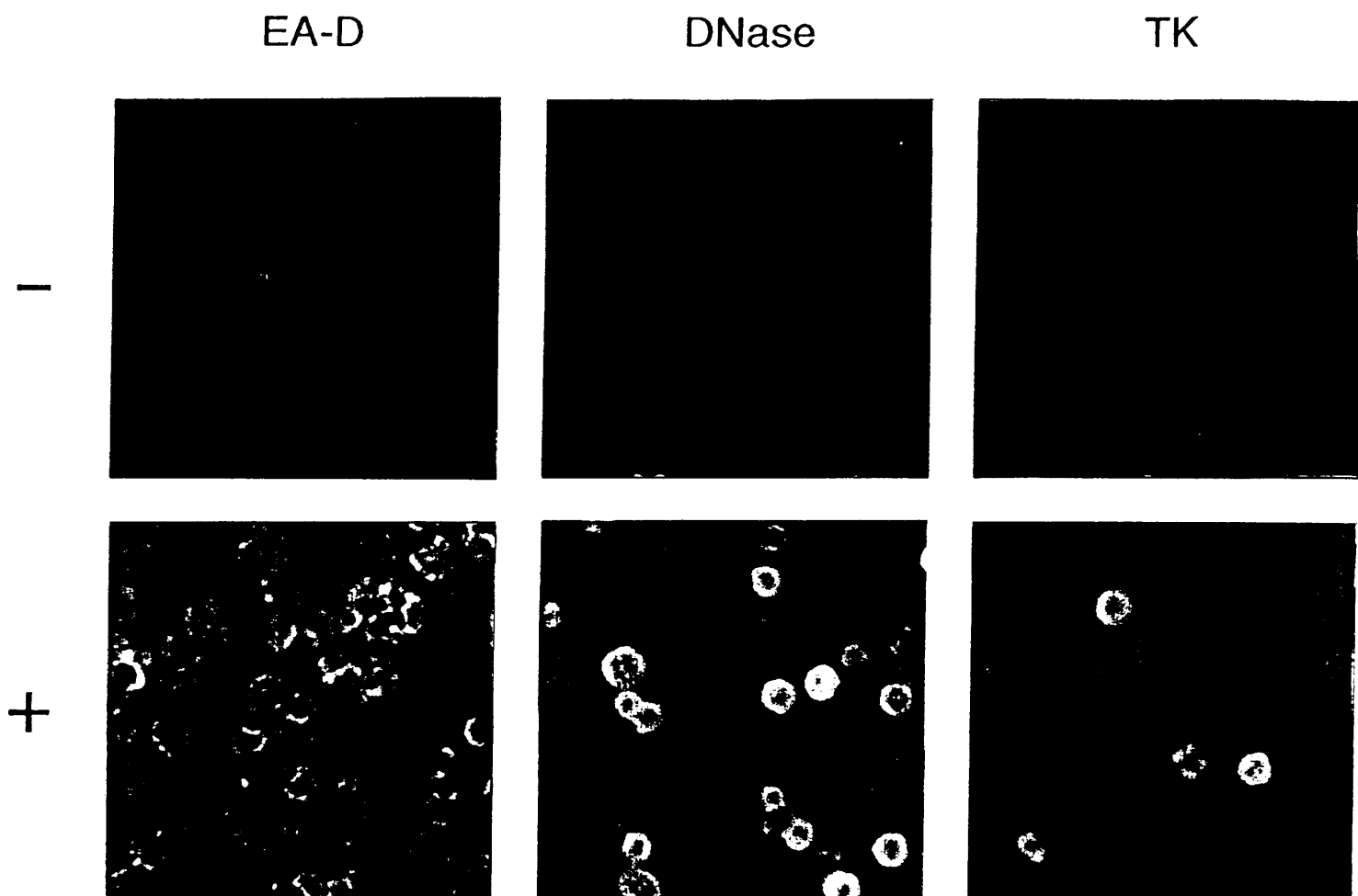
將 EB 病毒 EA-D，DNase 及 TK 基因分別嵌入 baculovirus 系統轉植質體

pVL1393。白色線條顯示嵌入基因的長度及限制酵素的種類，灰色線條顯示基因在 EB 病毒基因體的位置圖及蛋白轉譯方向。



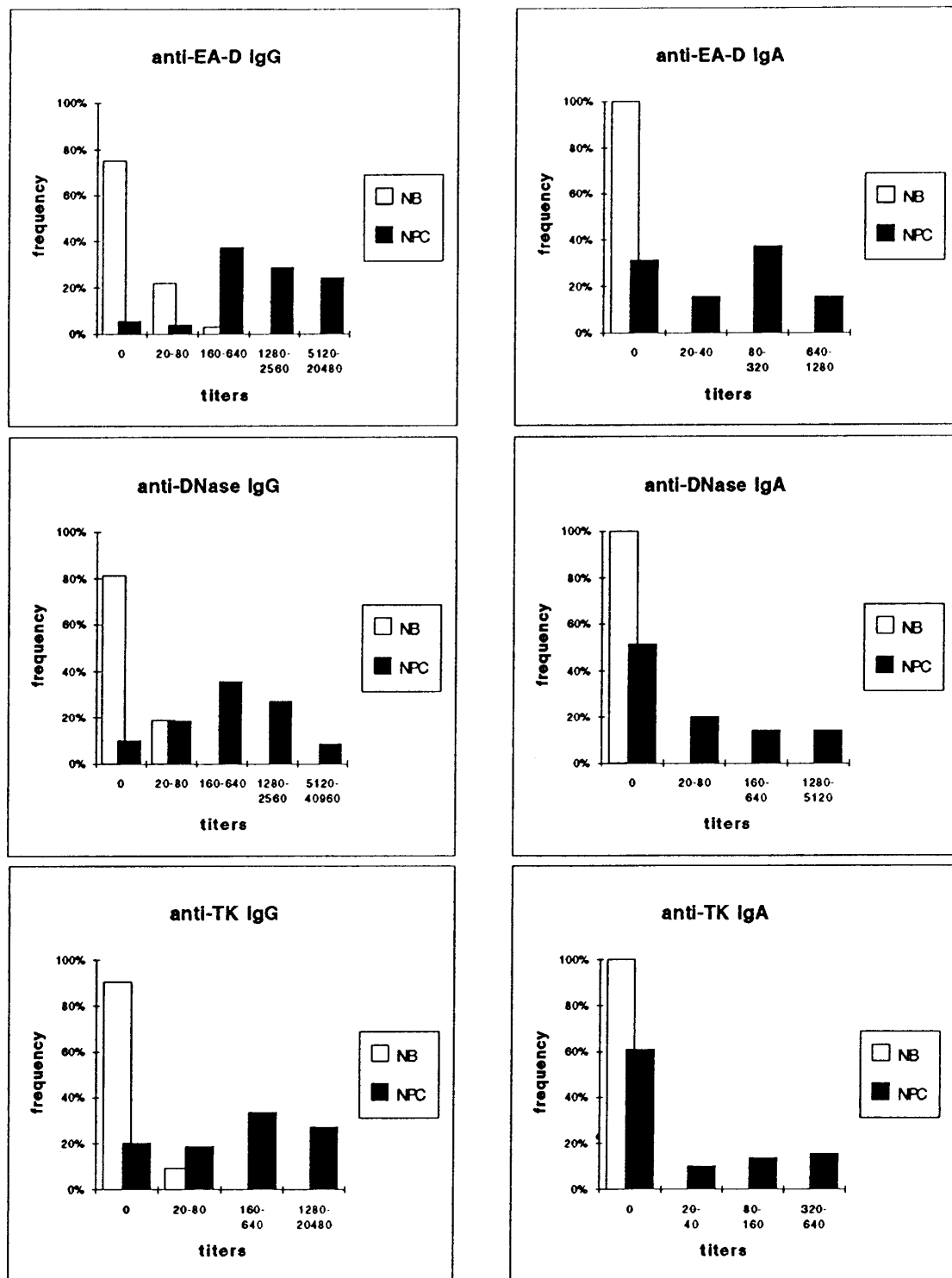
圖三 建立基因重組的 baculovirus 並以 Western Blotting 偵查重組的 baculovirus 感染的 SF9 細胞分別表現 52/50kD EA-D, 52kD DNase 或 67kD TK 蛋白

利用共同轉染方式(co-transfection) 建立 EB 病毒 EA-D, DNase 及 TK 基因重組的 baculovirus，並利用抗 EA-D 單株抗體，抗 DNase 多株抗體或抗 TK 單株抗體做 Western Blotting 分析蛋白表現(+)。另外，以未感染 baculovirus(-)或感染野生型 baculovirus(wt)的 SF9 細胞作為對照。



圖四 利用間接免疫螢光法確認此病毒在 SF9 細胞表現 EA-D, DNase 及 TK 抗原

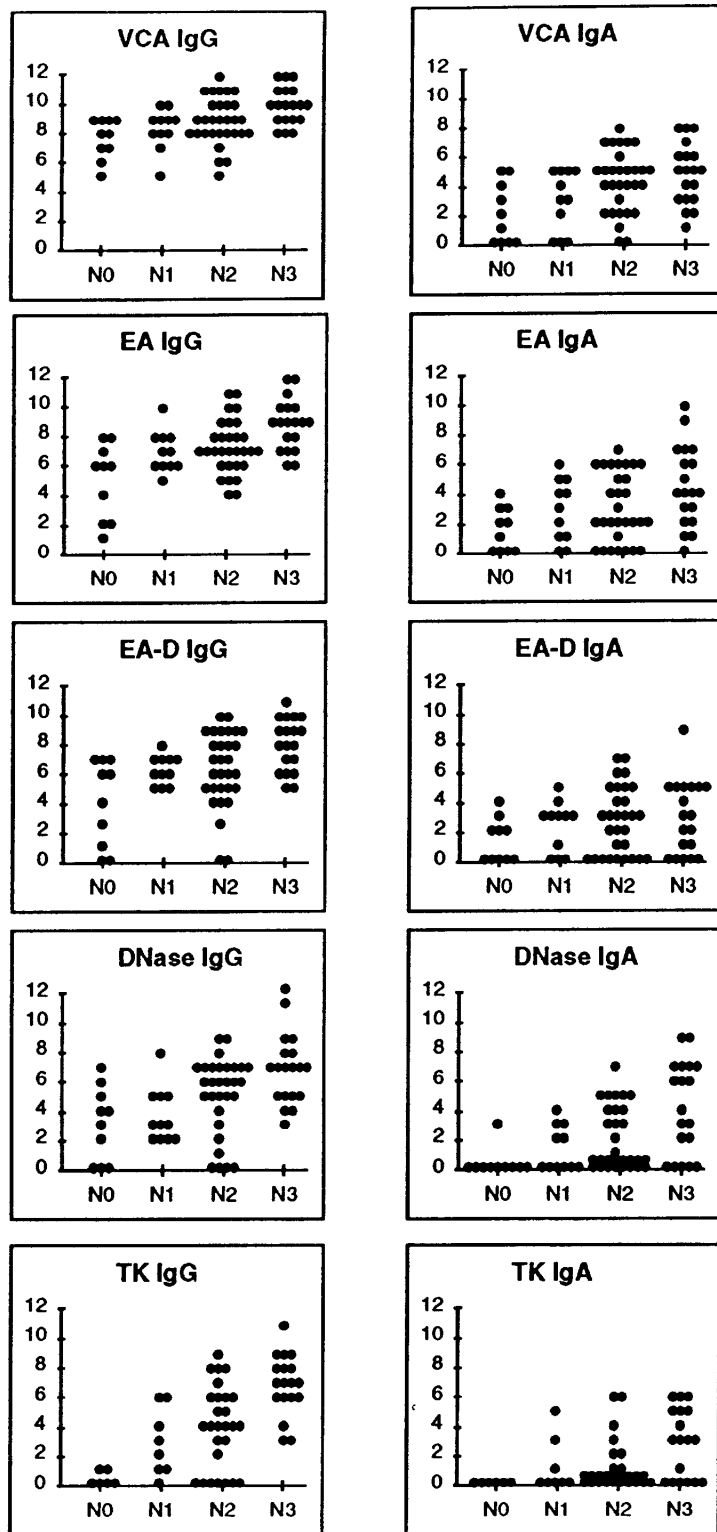
將帶有 EA-D, DNase 或 TK 基因的重組 baculovirus 感染 SF9 細胞兩天後，將細胞溶解，並建立能表現 EB 病毒蛋白的 SF9 細胞作為偵測抗體效價的抗原。將這些細胞分別利用抗 EA-D 單株抗體，抗 DNase 多株抗體或抗 TK 單株抗體做免疫螢光分析(+)，同時，以未感染 baculovirus 的 SF9 細胞作為對照(-)。



圖五 以間接免疫螢光法測定鼻咽癌患者(NPC)及正常人(NB)對 EA-D complex, DNase 及 TK 抗原的抗體價位

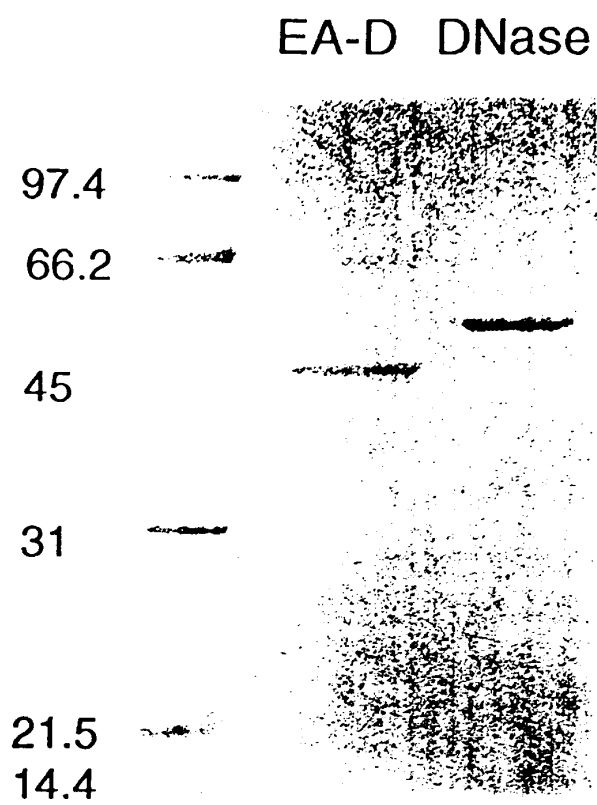
利用已成功建立的 SF9 細胞表現 EA-D, DNase 及 TK 作為抗原來源，並將待測血清作系列稀釋，以間接免疫螢光法測定對此三種抗原的抗體效價。圖中縱軸所示為陽性人數佔測試總人數的百分比，橫軸為抗體的價位數。

Antibody titers (log2)



圖六 EB 病毒溶裂期蛋白抗體效價高低與鼻咽癌轉移至頸部淋巴腺的大小(N)的相關性

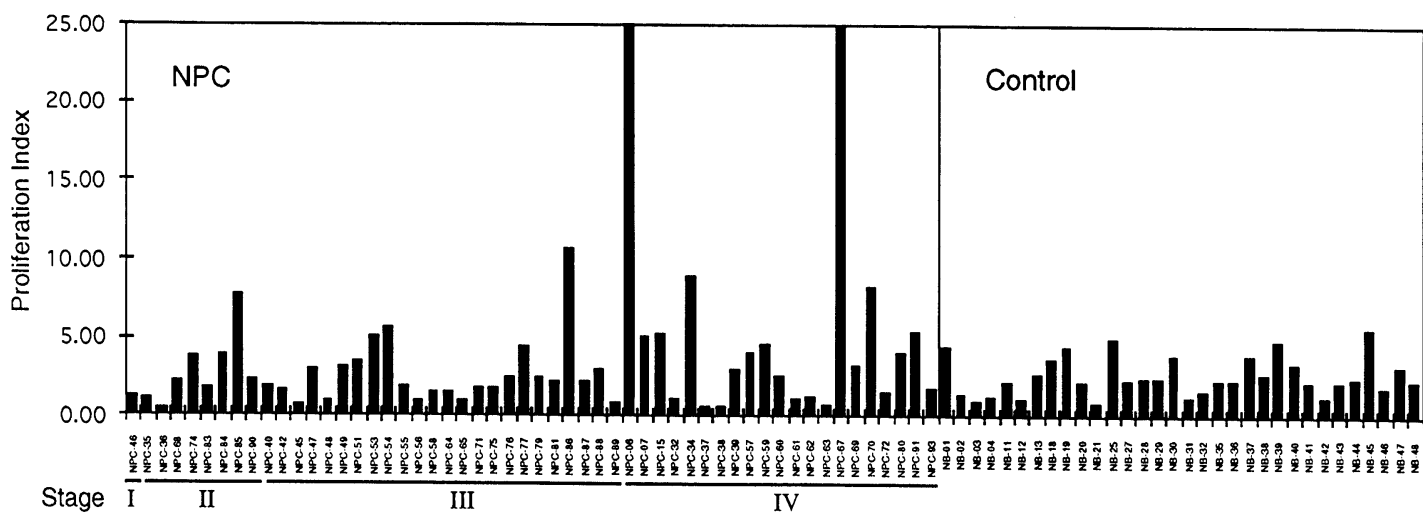
縱軸為鼻咽癌患者對五種抗原 IgG 效價，橫軸為其頸部轉移腫瘤大小的分期。依據鼻咽癌轉移至頸部淋巴腺的程度分為: N1: 轉移的腫瘤位於頸部上方且小於 3 公分; N2: 位於頸部中央大小為 3 至 6 公分的腫瘤; N3: 腫瘤已轉移至頸部下方鎖骨之上且大於 6 公分; N0: 為無轉移。



圖七 EA-D 及 DNase 抗原的表現及純化

利用大腸菌系統分別表現 EA-D 及 DNase 蛋白，其中 DNase 再經過 Ni-column 純化。所得已純化的蛋白經由 SDS-PAGE 確認後，即做為單核球細胞增生活性試驗之抗原。

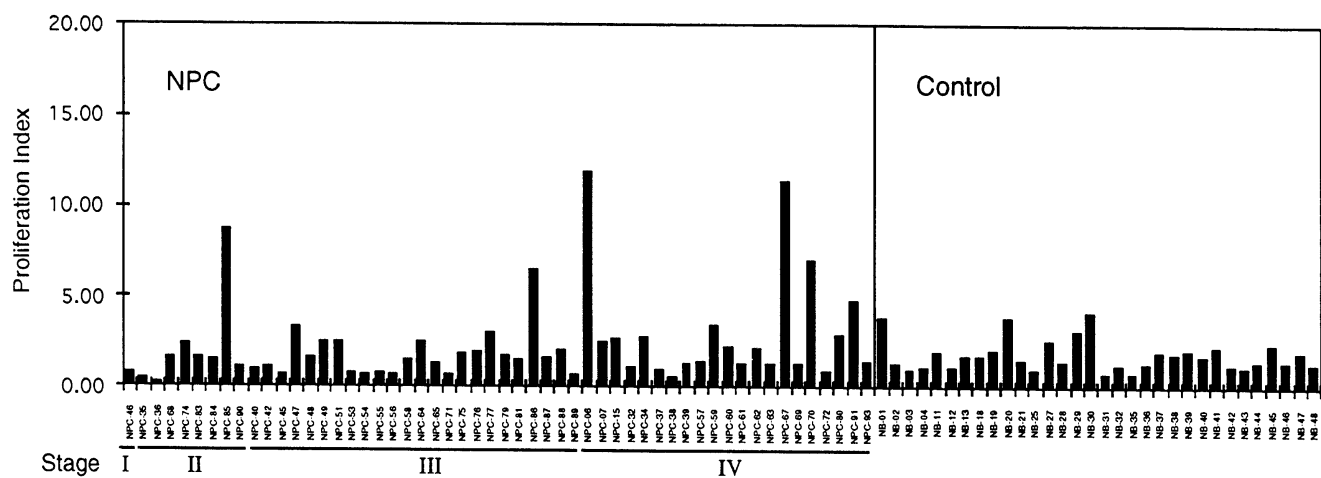
A



圖八 以單核細胞增生活性試驗偵測正常人及鼻咽癌患者對 EA-D 抗原的細胞性免疫反應

將 32 位正常人與 38 位鼻咽癌患者的周邊血液單核細胞與純化的 EA-D 抗原(300 ng/ml)共同培養六天，並於加入 ^3H -thymidine 16 小時後，以 β -射線計數器測 cpm 值。所得的細胞增生刺激比值為:(給與 EA-D 抗原之平均 cpm 值)/(只給與 medium 的平均 cpm 值)。

B



圖九 以單核細胞增生活性試驗偵測正常人及鼻咽癌患者對 DNase 抗原的細胞性免疫反應

將 32 位正常人與 38 位鼻咽癌患者的周邊血液單核細胞經 DNase 抗原(200 ng/ml)刺激後，測定細胞增生的刺激比值(計算法見圖六)。

表一：藉由線性迴歸法分析三種蛋白與 VCA 及 EA 抗體效價高低的相關性

	EA-D		DNase		TK	
	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA
VCAIgG	25.10 (0.0001)*	2.73 (0.1720)	12.59 (0.0026)	4.54 (0.0767)	8.17 (0.0281)	5.36 (0.0778)
IgA	31.50 (0.0001)	34.76 (0.0001)	35.75 (0.0001)	45.75 (0.0001)	32.05 (0.0001)	49.36 (0.0004)
EA IgG	42.70 (0.0001)	39.40 (0.0001)	31.83 (0.0001)	44.19 (0.0001)	33.39 (0.0001)	21.63 (0.0002)
IgA	20.90 (0.0001)	81.14 (0.0001)	11.60 (0.0036)	54.60 (0.0001)	11.24 (0.0094)	33.17 (0.0001)

* multicollinearity linear regression model: R-square (p-value of F-test)