

# 東海大學生命科學系碩士論文

B 型肝炎病毒 e 蛋白對 T 淋巴細胞的免疫調節功能

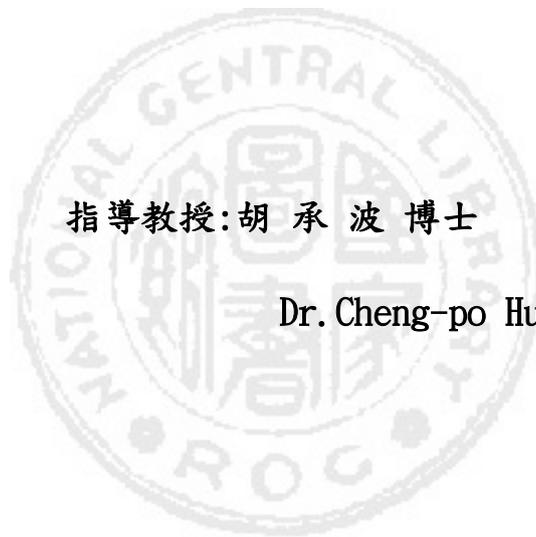
**Immunomodulatory Effects of the Hepatitis B Virus  
e Protein on T Lymphocytes**

研究生:何岳峰

Yueh-feng Ho

指導教授:胡承波 博士

Dr. Cheng-po Hu



東海大學生命科學系  
碩士論文學位考試審定書

生命科學系碩士班研究生 何岳峰 君所撰寫之論文

(中文)

B 型肝炎病毒 e 蛋白對 T 淋巴細胞的免疫調節功能

(英文)

Immunomodulatory Effects of the Hepatitis B Virus e Protein on T Lymphocytes

經本委員會審定通過，特此證明。

學位考試委員會

召集人

范聖興

(簽名)

委員

張中明

胡承波

中華民國 99 年 7 月 14 日

## 誌謝

感謝胡承波老師讓我有機會學如何以正確的方法做研究，在這過程中胡老師總是不厭其煩提醒我如何以正確的態度以及方法來做研究。除了課業上以外，胡老師也教導我許多關於做人做事的正確態度。另外特別感謝中央研究院分子生物研究所的孔祥智老師提供我們純化細胞所需的抗體以及基因轉殖小鼠。感謝孔老師實驗室的陳芬苓學姊回覆我實驗上的問題。最後感謝宇翔學長幫助建立實驗系統，還要感謝光佑、心慈、祐萱以及柏鈞能夠跟我討論實驗的問題以及分享有趣的科學新知，同時營造實驗室和諧輕鬆的氣氛。

# 目錄

中文摘要-----	1
英文摘要-----	3
緒論-----	4
材料與方法-----	12
結果-----	22
討論-----	31
參考文獻-----	37
圖目-----	42
附圖-----	44
個人資料-----	71

## 摘要

全球大約有 3.5 億的人口為 B 型肝炎病毒 (hepatitis B virus, 簡稱 HBV) 的慢性帶原者，每年約有一百萬人死於 HBV 慢性感染導致的肝癌及肝硬化。HBV 能在人體中持續性感染，推測它可能具有干擾人體免疫系統的能力，但目前機制未明。在臨床上，血液中 HBV e 蛋白 (HBe) 陽性代表病毒正在大量複製。然而 HBe 既不是 HBV 病毒的結構蛋白，亦非病毒感染及複製之必要，但所有的 DNA 肝病毒 (hepadnaviruses) 卻都表現 HBe 且具有高度保留性，因此推測 HBe 的功能可能與對抗宿主的反應有關。本實驗室過去發現 HBe 能夠與人類的單核細胞結合並抑制趨化作用、降低過氧化物產生及影響細胞激素分泌。此外，HBe 也能夠調節小鼠巨噬細胞及抗原呈現細胞 (antigen-presenting cells, 簡稱 APC) 的細胞激素分泌，顯示 HBe 可以干擾先天性的免疫功能。本論文則繼續探討 HBe 是否會因影響 APC 的功能而改變 T 細胞功能。我利用正常小鼠及 OT- I T 細胞受體 (T cell receptor) 轉殖小鼠的實驗模式及 carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) 細胞標示法，發現 HBe 不會促使正常的脾臟 T 及 B 淋巴細胞分裂，卻可以經由 HBe 對 APC 的作用進而增加抗原特異性 (antigen-specific) T 細胞的增生。此外，為了探討 T 細胞的增生是否由分泌性因子導致，我將 HBe 與 APC 共培養的條件培養液加入 OT-I

T細胞的系統中，結果發現並不改變 T 細胞的增生，因此 T 細胞的增生可能不是單獨由分泌性因子造成。最後，我在 APC 不存在的實驗條件下，以 anti-CD3 及 anti-CD28 抗體交聯 (crosslink) T 細胞受體及共激 (co-stimulatory) 分子使 T 細胞活化，再測試 HBe 是否仍對 T 細胞增殖有作用。結果顯示 HBe 不會影響 anti-CD3 及 anti-CD28 抗體交聯引發的 T 細胞增生。因此，HBe 必須經由 APC 的作用才能改變 T 細胞的增殖現象。總言之，HBe 經由對 APC 的作用進而促進 T 細胞增殖為本研究首次發現，而 T 細胞增生後如何影響病毒感染則有待後續的研究方得釐清。

## Abstract

More than 350 million people are chronic hepatitis B virus (HBV) carriers in the world. About one million people die from HBV-related hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis each year. Infection with HBV often results in chronic and persistent infection, but the mechanism is still unknown. One of the HBV proteins, the HBe protein, is neither a structural protein of the virus nor required for viral replication and infection. Sequence analyses demonstrate a conservation of the HBe gene among hepadnaviruses. Hence HBe may function as an “anti-host” molecule for maintaining HBV persistence. Our laboratory previously found that HBe could bind human monocytes, suppress chemotaxis, and decrease the production of superoxides and cytokines. In mouse cells, HBe also modulated the production of cytokines from macrophages and antigen-presenting cells (APC). Therefore, HBe is able to interfere with the innate immune reactions. In this thesis, I have studied whether HBe affected the function of T lymphocytes due to the modulation of functions of APC. Using carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)-labeled lymphocytes from normal or OT-I T cell receptor (TCR) transgenic mice, I found that HBe had no effect on the proliferation of normal lymphocytes, but enhanced the proliferation of antigen-specific T cells. Furthermore, to study whether the enhancing effect of HBe was due to soluble mediators, I added the conditional medium of APC which had been incubated with HBe for 24 hours into the antigen-stimulated OT-I T cell culture. No enhancement of T-cell proliferation was observed. This result suggested that soluble mediators alone were not able to promote antigen-specific T cell proliferation. To confirm that the enhancing effect of HBe was indeed through the action of APC, I further found that HBe had no effect on the proliferation of T cells which were activated by crosslinking of TCR/CD3 and CD28 co-stimulatory molecules with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. Thus, HBe did not directly affect the proliferation of T cells. In conclusion, the HBe protein seems to indirectly enhance antigen-specific T-cell proliferation through a modulated function of APC. How the enhanced T-cell proliferation affects the outcome of HBV infection is not clear and needs future investigation.

## 緒論

全球目前受到 B 型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染的人口約有三億五千萬，其中每年約有一百萬人因急性或慢性 B 型肝炎病毒感染而死亡。目前台灣地區成年人的 HBV 帶原率為 15%~20%，自民國 73 年全面實施兒童 HBV 表面抗原疫苗接種後，目前兒童帶原率約 0.8%。成年人感染 HBV 後約 90%為急性感染，通常伴隨著類似一般感冒的症狀，如全身無力、食慾不振及噁心，時間約一到兩週後能自然痊癒。但約 3%的患者會產生黃疸，其中一部分的人甚至形成猛爆性肝炎而死亡。成年人僅約 5%會發展成慢性帶原者，若在出生時感染 HBV 者則有 90%會發展為慢性 B 型肝炎帶原者。慢性感染患者無明顯的臨床症狀或僅容易產生倦怠和疲累，但他們為肝硬化(cirrhosis)與肝細胞癌(hepatocellular carcinoma)的高危險群 (Centers for Disease Control, R. O. C., 2007; Lok, A. S., and McMahon, B. J., 2007; McMahon, B. J., 2009)。

B 型肝炎病毒屬於嗜肝 DNA 病毒科 (*Hepadnaviridae*)，為直徑為 42 nm 的球體(圖一)，亦稱鄧氏顆粒(Dane particle)，其生活週期如圖二所示，病毒顆粒與肝細胞進行細胞膜融合(membrane fusion)後，核心顆粒便進入細胞中。病毒的 DNA 聚合酶隨後將病毒基因體修補為共價封閉環型 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA)，

再以此為模板，並利用宿主細胞中的 RNA 聚合酶轉錄(transcribe)出前基因體 RNA (pregenomic RNA, pgRNA)及各種 mRNA，前基因體 RNA 被包裹至核心蛋白中，由反轉錄酶(reverse transcriptase)反轉錄出病毒的負股(negative strand) DNA，再以此負股 DNA 為模板複製出正股(positive strand)較短的 DNA。而各種不同的 mRNA 可轉譯出各種病毒所需組裝與複製的蛋白。包含病毒基因體的核心顆粒與表面蛋白結合，形成完整的病毒顆粒並釋出肝細胞外。(Guidotti, L.G., and Chisari, F.V., 2006)。

病毒基因體 (圖三) 為部分雙股環狀 (partially double-stranded circular) DNA，具有長 3.2 kb 的負股及較短的正股 DNA。其中含有四個重疊的開放編碼架構(open reading frame)：表面蛋白基因(S)、核心蛋白基因 (C)、聚合酶基因 (P)與 X 基因 (X)。表面蛋白基因產生三種表面蛋白：大型、中型及主要型表面蛋白，共同構成病毒顆粒的外套蛋白。核心蛋白基因產生核心蛋白，並將病毒基因體及聚合酶包裝於其中。e 蛋白(圖四)是由前核蛋白 (precore) 基因轉錄而來，前端帶有一訊息胜肽 (signal peptide)，隨後送至內質網 (endoplasmic reticulum, ER)進行 C 端切除蛋白修飾後，釋放出肝細胞，然而目前對於 e 蛋白的確切功能並不清楚。聚合酶基因可產生聚合酶，具有反轉錄的功能，並與負股 DNA 5' 端以共價鍵的方

式連結，為病毒複製所需 (Liang, T. J., 2009)。最後 X 基因會產生多功能的 X 蛋白，與細胞訊息傳遞、轉錄調控，DNA 修復及抑制蛋白質降解(degradation)有關，但 X 蛋白在病毒的生活週期中所扮演的角色並不清楚 (Bouchard, M. J., and Schneider, R. J., 2004; Hu, Z et al, 2006)。此外最近研究亦顯示 HBV 可產生十餘種接合(spliced)。有些接合 RNA 可轉譯出蛋白質，在 HBV 患者的肝臟及血清中也偵測到這類蛋白質及其抗體產生，但它們的功能尚不清楚 (Su, T. S. et al, 1989; Soussan, P. et al, 2000)。

HBV 感染時，宿主會啟動先天性免疫反應 (innate immunity) 及後天性免疫反應(adaptive immunity)。當肝細胞受感染時，肝細胞能分泌干擾素  $\alpha / \beta$  (interferon- $\alpha / \beta$ , IFN- $\alpha / \beta$ )，抑制病毒蛋白合成，並且吸引及活化肝臟中的巨噬細胞(Kuffer cell)及樹突細胞(dendritic cell)，且產生第十八介白質(interleukin- 18, IL-18)、活化自然殺手細胞、分泌干擾素  $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 並直接抑制病毒的複製 (Chang, J. J., and Lewin, S. R., 2007)。巨噬細胞及樹突細胞可產生各種細胞激素；如腫瘤壞死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 與第十二介白質(interleukin-12, IL-12) 也可將病毒抗原呈獻給 T 細胞，是先天性免疫反應及後天性免疫反應兩者間的橋梁，TNF- $\alpha$  及 IL-12 可使毒殺性 T 細胞 (cytotoxic T cell, T<sub>c</sub>)

或輔助性 T 細胞(helper T cell,  $T_H$ ) 成熟。毒殺性 T 細胞可將病毒感染細胞殺死，而輔助性 T 細胞則幫助 B 細胞成熟，並分化為漿細胞(plasma cell)產生對抗病毒抗體 (Jung, M. C., and Pape, G. R., 2002)。

病毒要成功感染宿主並能夠造成慢性感染通常具備干擾宿主免疫系統的策略。例如單純疱疹病毒 (Herpes Simplex Virus, HSV) 的 ICP47 蛋白能夠阻礙抗原胜肽(antigenic peptide)通過 TAP (transporter associated with antigen processing) 進入內質網 (endoplasmic reticulum, ER) (Tomazin, R. et al, 1996)。腺病毒 (adenovirus) 產生的 E3-19K 蛋白能與第一型主要組織相容複合體 (major histocompatibility class I) 結合，並抑制其離開內質網，因此無法輸送至細胞表面 (Liu, H. et al, 2007)。卡波西氏肉瘤疱疹病毒 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV) 藉 kK3 (KSHV K3) 蛋白辨識第一型主要組織相容複合體及利用 kK5 (KSHV K5) 蛋白使其被胞吞 (endocytosis) 而降解 (Duncan, L. M. et al, 2006)。病毒除了干擾宿主的抗原呈獻作用之外，亦可調節細胞激素 (cytokine) 的分泌，如卡波西氏肉瘤疱疹病毒在潛伏期時會表現潛伏期相關核蛋白 1 (latency-associated nuclear antigen-1, LANA-1)，可與干擾素  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) 的主要轉錄因子 IRF3 (interferon regulatory factor-3)

競爭，使細胞無法產生干擾素 $\beta$  (Cloutier, N., and Flamand, L., 2010)。第一型單純疱疹病毒(herpes simplex virus-1)亦可利用VP16降低小鼠腹腔中的巨噬細胞表現腫瘤會死因子- $\alpha$ 、第六介白質(interleukin- 6, IL-6)及第十二介白質 (Mogensen, T. H., 2004)。C型肝炎病毒(hepatitis C virus)不僅能干擾樹突細胞的成熟，且能促進具有免疫抑制功能的第十介白質(interleukin- 10, IL-10)之分泌(Saito, K., 2008)。人類巨大性細胞病毒(Human Cytomegalovirus)在潛伏期時能產生與人類第十介白質相似的病毒性第十介白質(cmv IL-10)，使宿主在病毒潛伏性感染時不易活化免疫系統(Jenkins, C. et al, 2008)。

當成年人受到HBV感染時，大部分的人都能完全清除病毒，然而少部分成年人及新生兒都會發展成慢性感染 (Shi, Y. H., and Shi, C. H., 2009)。HBV如何造成慢性感染的機制並不清楚，但有文獻指出，在慢性B型肝炎患者的樹突細胞上，第二型主要組織相容複合體、CD40、B7及第十二介白質的表現量皆下降(Tavakoli, S. et al, 2004; Zheng, B. J. et al, 2004)，亦無法正常使T細胞增生並且活化毒殺性T細胞與分泌細胞激素。慢性B型肝炎患者中也發現病毒特異性毒殺性T細胞PD-1蛋白表現量較急性或健康者高(Boni, C. et al, 2007; Zhang, Z. et al, 2009)。當PD-1 (pro-programmed death-1)與PD-L1 (programmed

death-ligand 1)或PD-L2蛋白結合能夠抑制T細胞的增生、細胞激素分泌及執行細胞毒殺的功能(Riley, J. L., 2009)。此外慢性B型肝炎患者的輔助性T細胞亦不能正常表現CD40L以活化抗原呈獻細胞(antigen presenting cells, APCs)，而且第十介白質的分泌量增高(Barboza, L. et al, 2009)。在土撥鼠肝炎病毒(woodchuck hepatitis virus, WHV)的慢性感染時，觀察到肝細胞與脾臟淋巴細胞的第一型主要組織相容複合體相對較急性感染時有下降的趨勢(Wang, J., and Michalak, T. I., 2006)。HBV的e蛋白對於病毒本身的複製及感染宿主細胞並必要，然而在所有的嗜肝DNA病毒(hepadnavirus)均保留e蛋白(Chang, J. J., and Lewin, S. R., 2007)，所以推測e蛋白可能具有重要的生物功能。根據臨床統計，e抗原陽性患者發展為肝癌的風險為正常人的六十倍，且肝炎受過治療後再次復發的風險也較高(O' Shea, R., 2007; Sun, H. C. et al, 2007)。此外，若較晚或是缺乏e抗原的血清反應轉變(seroconversion)患者，隨後發展為肝炎或肝硬化的速度也較快。在慢性B型肝炎e抗原陽性的患者中亦發現單核細胞(monocyte)與肝臟巨噬細胞(Kuffer cell)的第二類鐸受體(Toll-like receptor 2, TLR2)比e抗原陰性患者表現量較低，而且對抗病毒的先天性免疫反應(Visvanathan, K. et al, 2007)也較差。由這些結果看來，e蛋白可能與B型肝炎病毒慢性感染及隨後發展成肝癌的機率似

乎有所關聯。雖然e蛋白在人類B型肝炎病毒慢性感染中所扮演的角色並無確切的定論，然而e蛋白缺失的土撥鼠肝炎病毒不會造成慢性感染只會造成急性感染的結果中指出e蛋白可能與慢性感染卻有關聯 (Cote, P. J. et al., 2000)。在小鼠的研究模式中一種T細胞受體(T cell receptor)與HBV核心抗原(HBc)的雙重基因轉殖小鼠(TCR×HBc double transgenic mice)具有產生對抗核心抗原的細胞激素與抗體。如進一步將e抗原再轉殖入該小鼠形成三重基因轉殖鼠(TCR×HBc×HBe triple transgenic mice)時，該小鼠血清中的第二介白質(IL-2)與干擾素 $\gamma$ 表現量均明顯下降，此外對抗核心抗原的抗體也同時降低。顯示e蛋白具有干擾細胞激素與抗體產生的作用(Chen, M. T. et al, 2004)。

本實驗室過去曾發現 HBV e 蛋白能與人類單核細胞結合，並使第六介白質、第十介白質、第二趨化因子(CC chemokine ligand 2, CCL2)及第四趨化因子 (CC chemokine ligand 4, CCL4)表現量增加 (Lu, 1999)，且 e 蛋白可以降低單核細胞的移動能力，使其趨化性(chemotaxis)下降。雖然 HBV 並非小鼠的病原(pathogen)，但在過去的研究結中顯示，e 蛋白能與小鼠腹腔、肝臟以及脾臟中的巨噬細胞結合，且能增加第六介白質、第十介白質、單核細胞趨化蛋白 1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)及干擾素 $\gamma$ 的表現量。由於 e 蛋白能

影響小鼠免疫細胞的作用，因此我們可利用小鼠做為研究 e 蛋白免疫調節功能的模式動物(Hsu, 2001;chang, 1999)。

巨噬細胞具有吞噬、調控發炎反應、分泌細胞激素及產生殺菌的過氧化物等功能。此外巨噬細胞能將病原體在蛋白酶體中切割成胜肽並呈獻給 T 細胞，活化輔助性 T 細胞及毒殺性 T 細胞。過去研究中，已知 e 蛋白能影響巨噬細胞的免疫功能，本論文則是探討是否 HBV e 蛋白能調控 T 淋巴細胞的反應。首先我以 e 蛋白與小鼠脾臟細胞進行體外培養，觀察脾臟淋巴細胞的增殖情形。另外利用 T 細胞受體轉殖基因 OT-I 小鼠，探討是否 HBe 蛋白能透過影響抗原呈獻細胞之功能再影響抗原特異性(antigen-specific) T 細胞的增生。結果顯示 HBV e 蛋白不影響正常小鼠脾臟細胞中的 B 細胞或是 T 細胞的分裂，但在 T 細胞受體轉殖基因 OT-I 小鼠中，e 蛋白能增加 OVA 引發 CD8<sup>+</sup>T 細胞的增生。

## 材料與方法

### B 型肝炎病毒 e 蛋白之製備

本實驗室過去成員已製備帶有 histidine tag(his-tag) B 型肝炎病毒 e 蛋白(HBe)的質體(plasmid) pRSET/HBe(圖五)利用 *E. coli* 大量表達,過程如下。首先將 pRSET/HBe 質體利用 high-speed plasmid mini kit (Geneaid, 台北, 台灣) 從 DH5  $\alpha$  *E. coli* 分離, 再將 10 ng 質體 DNA 10  $\mu$ l 與 BL21 (DE3) *E. coli* 勝任細胞 (competent cell) 均勻混合, 置於冰上 20 分鐘後, 於 42°C 下處理 1 分 30 秒, 最後靜置冰上 2 分鐘。加入 200  $\mu$ l Luria-Bertani (LB) 培養基 (AthenaES, Baltimore, USA) 混合均勻, 取 10  $\mu$ l 菌液塗抹至含 100  $\mu$ g/ml ampicillin (Sigma, St. Louis, USA) LB agar 培養皿上並置於 37°C 下培養 16~18 小時。沾取單一菌落(colony)於含 100  $\mu$ g/ml ampicillin LB 培養基中 37°C 下 178 rpm 培養 16 小時。取其中 2 ml 菌液加入 200 ml LB 培養基中, 培養至波長 600 nm 吸光值 ( $OD_{600}$ ) 為 0.6~0.8。加入 2 ml 100 mM IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiobalactoside) (MdBio, Rockville, USA) 最終濃度 1 mM, 於 37°C 下 178 rpm 培養 3 小時。4°C 下, 10,000  $\times$ g 離心 30 分鐘去除上清液。取 18 ml lysis buffer (100 mM  $NaH_2PO_4$ , 6M guanidine hydrochloride) 與細菌團塊 (pellet) 混合均勻, 於旋轉輪上, 室溫下轉動 1 小時後, 於 4°C 下, 10,000  $\times$ g

離心 30 分鐘，取上清液 6 ml 加入 2 ml Ni-NTA resin (Qiagen, Hilden, Germany) Ni<sup>2+</sup>管柱中，再置於旋轉輪上室溫下，轉動 1 小時，讓 Ni-NTA resin 與帶有 his-tag 蛋白進行結合。加入 8 ml denature wash buffer (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8M urea, pH 6.3) 沖洗兩次，再加入 8 ml native wash buffer (57.5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole)沖洗 2 次，最後加入 4 ml elution buffer (57.5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole) 沖提出 his-tag HBe 蛋白。隨後將蛋白溶液加入 SnakeSkin® Pleated Dialysis Tubing (Thermo, Rockford, USA)透析膜中，置於 5 L PBS(phosphate buffered saline)溶液中，4°C 下透析 3 次，最後得到溶於 PBS 溶液的 HBe 蛋白。

### 蛋白質之定量

HBe 蛋白利用 BCA™ Protein Assay Reagent kit (Pierce)定量。將 reagent A (sodium carbonate, sodium bicarbonate, BCA™ detection reagent & sodium tartrate in 0.1 N sodium hydroxide) 與 reagent B (4% cupric sulfate pentahydrate)以 50:1 比例均勻混合成 working reagent，再各別加入 200  $\mu$ l 與 0.025~2  $\mu$ g/ml 白蛋白於平底 96 孔盤，作為標準樣本，並取待測樣本 10  $\mu$ l 加入 200  $\mu$ l working reagent 中，搖晃 30 秒後，置於 37°C 下，30 分鐘。

利用 Multiskan Spectrum (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) 以波長 570 nm ( $OD_{570}$ ) 偵測吸光值。最後對照標準樣本與待測樣本的吸光值換算待測樣本蛋白質濃度。

蛋白質膠體電泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electro-phoresis, SDS-PAGE)、銀染 (silver staining) 與西方點墨轉漬法 (Western blotting)

**蛋白質膠體電泳**-取 40  $\mu$ l 蛋白質樣本與 10  $\mu$ l 5 倍濃度 sample buffer (2.5% SDS, 20% glycerol 125 mM Tris-HCl, 0.01% bromophenol blue, 10%  $\beta$ -mercaptoethanol, pH 6.8) 均勻混合於沸水中加熱 10 分鐘, 參考 Gallagher 所建立的方法 (Gallagher, 1998) 進行 SDS-10% 膠體電泳。

**銀染**-依照 SilverQuest™ Silver staining kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) 使用手冊操作。先將膠體以 50 ml fixing solution (40% ethanol, 10% acetic acid) 固定 16 小時。以 30% 酒精清洗 10 分鐘, 置於 50 ml sensitizing solution 10 分鐘, 再以 30% 酒精及去離子水各清洗 10 分鐘, 並加入 50 ml staining solution 浸泡 15 分鐘, 使銀離子與蛋白結合。最後以去離子水清洗 30 秒後加入 developing solution 呈色, 顏色達到適當深度後加入 5 ml stopper

solution 終止呈色。

**西方點墨轉漬法**-在蛋白質膠體電泳後，以半乾式轉漬器(semi-dry transfer plate, MODEL#EUB-4000, C. B. S. Scientific Co., Del Mar, CA, USA) 設定 70 毫安培通電 2 小時，使樣本轉漬硝化纖維紙(nitro-cellulose paper)上，隨後浸泡在 5%脫脂奶粉液中，4°C 下，浸泡 16~18 小時。將對抗 HBe 抗原(anti-HBe)抗體以 1%脫脂奶粉液稀釋 1000 倍，室溫下與轉漬後的硝化纖維紙反應 1 小時後，再利用 washing buffer (PBS containing 0.05% Tween 20)每次 10 分鐘沖洗 3 次。將結合過氧化酵素 (peroxidase) 的 goat anti- rabbit IgG 抗體以 1%脫脂奶粉液稀釋 2000 倍當二次抗體，室溫下反應 1 小時後，利用 washing buffer 每次 10 分鐘沖洗 3 次。利用 western light™ (Perkinelmer Life science, Inc., Boston USA)呈色，在室溫下加入 1 ml enhanced luminal reagent 及 oxidizing reagent 與硝化纖維紙混合 3 分鐘，最後以冷光影像分析系統 (MODEL#LAS-1000, Fujifilm, Tokyo, Japan) 分析影像。

### **細菌脂多醣(lipopolysaccharide, LPS)移除與測定**

**細菌脂多醣**-由 *E. coli* 純化後的 HBe 蛋白溶液中含有細菌脂多醣，即內毒素 (endotoxin)利用 EndoTrap® blue (Hyglos GmbH,

Regensburg, German) 移除。以 regeneration buffer 及 equilibration buffer (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0.1 CaCl<sub>2</sub>, pH 7.5) 沖洗管柱後，將 HBe 蛋白溶液加入管柱內並收集從管柱流出的 HBe 蛋白溶液，即去除細菌脂多醣。

**細菌脂多醣含量測定**-利用 Pyrochrome® Chromogenic Endotoxin Testing Reagents (Associates of Cape Cod, Inc., East Falmouth, USA) 測定細菌脂多醣含量。將待測樣本與 control standard endotoxin (CSE) 各別與 limulus amoebocyte lysate (LAL) 以 5 倍濃度為間距做序列稀釋均勻混合，並將上述各稀釋樣本取 200  $\mu$ l 加入 96 孔盤中，再加入 50  $\mu$ l LAL lysate，置於 multiskin Spectrum 中，37°C 下反應 70 分鐘，每 20 秒偵測 OD<sub>405</sub> 吸光值，當待測樣本吸光值到達 0.03 時之時間與 CSE 比較，估計待測樣本中細菌脂多醣含量。

## 小鼠

C57BL/6JNar 小鼠購自財團法人國家實驗動物中心(台南，台灣)。針對白蛋白(ovalbumin, OVA) 第 257~264 號氨基酸(SIINFEKL)具專一性的 T 細胞受體轉基因轉殖小鼠 OT-I 來自中央研究院分子生物研究所(台北，台灣)孔祥智博士贈與。小鼠平均週齡 8~14 週。

### 小鼠脾臟細胞與脾臟貼附細胞之製備

將小鼠以 5% CO<sub>2</sub> 犧牲後，將脾臟取出並置於含 5 ml complete Mishell-Dutton 培養基 (MD medium: minimum essential medium (Invitrogen), 50 mM Hepes, 15.8 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5.58×10<sup>-5</sup> mM 2-mercaptoethanol, 1X pen-strep solution (Biological industries), 5% fetal bovine serum) 的 6 公分培養皿。將脾臟以鑷子撕碎後，以玻璃滴管反覆抽吸沖洗出組織中的脾臟細胞，再加入 5ml MD 培養基並將細胞懸浮液加入以填充 1.5 公分棉花的玻璃滴管使大塊的組織碎片去除。隨後將細胞懸浮液在 25°C 下，400 ×g 離心 5 分鐘後去除上清液。加入 10 ml ACK erythrocyte lysis buffer (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1mM EDTA) 將紅血球溶解，在 25°C 下，400 ×g 離心 5 分鐘後去除上清液，以 10 ml MD 培養基使細胞懸浮，加入 10 公分培養皿中並置於 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培養箱中 1 小時。吸取收集未貼附的細胞稱為脾臟細胞。另外以 10 ml HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution without Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, HBSS: 136.9 mM NaCl, 53.7 mM KCl, 0.4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.6 mM glucose, 0.001% phenol red) 緩衝液沖洗培養皿 3 次後，加入 Cell Dissociation Buffer Enzyme-Free Hanks' -based (Invitrogen) 1.5 ml 置於 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培養箱中 5 分鐘。輕微側向拍打培養皿並加入 10 ml MD 培養基並輕微沖洗培養

皿後，收集到離心管中在 25°C 下，400 ×g 離心 5 分鐘，得到的貼附細胞稱為脾臟貼附細胞，作為抗原呈獻細胞。

### OT-I 小鼠之 CD8<sup>+</sup> T 細胞純化

純化細胞之抗體 anti- $\mu$  (clone:Bet2), anti- $\kappa$  (clone:187.1), anti-CD4 (clone:RL172), anti-CD8(clone:3.155)皆由中央研究院分子生物研究所(台北，台灣)孔祥智博士所贈與。如同製備小鼠脾臟細胞方法取得小鼠脾臟細胞懸浮於 10 ml MD 培養基中，平均加入預先塗上一層含 25  $\mu$ g anti- $\mu$  及 anti- $\kappa$  抗體的 10 公分培養皿中，於 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培養箱中 1 小時，30 分鐘時輕微搖晃培養皿，使 B 細胞貼附於培養皿上。收集未貼附的細胞並加入 5 ml MD 培養基沖洗剩餘未貼附的細胞以 400 ×g，25°C 下離心 5 分鐘後，以 5 ml MD 培養基懸浮細胞再加入另一預先塗上一層含 25  $\mu$ g anti- $\mu$  及 anti- $\kappa$  抗體的 10 公分培養皿中，於 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培養箱中 1 小時，30 分鐘時輕微搖晃培養皿，使殘餘的 B 細胞貼附。收集未貼附的細胞並加入 5 ml MD 培養基沖洗剩餘未貼附的細胞，此以去除 B 細胞的脾臟細胞稱為脾臟 T 細胞。脾臟 T 細胞可加入預先塗上一層含 10  $\mu$ g anti-CD4 抗體的 10 公分培養皿中，於 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培養箱中 28 分鐘並收集未貼附的細胞並加入 5 ml MD 培養基沖洗剩餘未貼附的細胞以 400 ×g，

25°C 下離心 5 分鐘後，以 5 ml MD 培養基懸浮細胞加入預先塗上一層含 2  $\mu$ g anti-CD8 抗體的 10 公分培養皿中，於 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培養箱中 25 分鐘。去除未貼附的細胞加入 5 ml MD 培養基輕微沖洗培養皿後，以玻璃滴管吸取冰的 5 ml MD 培養基強力沖洗 3 次貼附的細胞並收集，得到的 CD8<sup>+</sup> T 細胞純度約 97%。

### Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester

#### (CFDA, SE;CFSE)細胞標示

將  $1 \times 10^7$  細胞懸浮於含 0.5  $\mu$ M CFSE (Invitrogen) 的 PBS 溶液中，於 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培養箱中作用 15 分鐘，隨後加入 10 ml MD 培養基，以 400  $\times$ g，25°C 下離心 5 分鐘後去除上清液，依實驗所需以適量 MD 培養基懸浮細胞。

#### 脾臟細胞表面分子之鑑定

依照上述不同方式取得脾臟細胞，利用已標記 phycoerythrin (PE) 或 fluorescein isothiocyanate (FITC): PE-anti-CD3 complex, FITC-anti-CD3  $\epsilon$ , PE-anti-CD4, PE-anti-CD8 (T 細胞標誌), PE-anti-B220, FITC-anti - B220 (B 細胞標誌) 抗體 (BD Bioscience Pharmingen™) 或 FITC-anti-F4/80 (巨噬細胞標誌) 抗體 (AbD Serotec,

Kidlington, U. K.) 辨識各種細胞族群。將  $2\ \mu\text{l}$  濃度  $0.5\ \text{mg/ml}$  抗體與已  $100\ \mu\text{l}$  PBS 懸浮之細胞溶液均勻混合置於冰上 30 分鐘後，加入  $2\ \text{ml}$  PBS 清洗一次。最後藉由流式細胞儀(Flow cytometry, MODEL#CyFlow®SL, Partec, Görlitz, Germany) 分析各細胞族群比例。

### 脾臟細胞分裂試驗

將自 C57BL/6JNar 小鼠以方式如上述的取得脾臟細胞，控制組於 24 孔細胞培養盤中，每孔僅加入  $1\times 10^6$  顆脾臟細胞或與  $2\ \mu\text{g/ml}$  淋巴球細胞分裂原(mitogen)洋刀豆血球凝集素(Concanavalin A, Con A)(Sigma)，刺激脾臟細胞分裂。實驗組則加入  $2$  或  $4\ \mu\text{g/ml}$  HBe 蛋白於  $37^\circ\text{C}$   $5\%$   $\text{CO}_2$  培養箱中培養 3 天，藉由流式細胞儀分析 CFSE 螢光衰弱程度。

### T 細胞受體基因轉殖小鼠之 $\text{CD8}^+$ T 細胞分裂試驗

抗原呈獻細胞如上述方式自 C57BL/6JNar 或 OT-I 小鼠取得，於 96 孔盤每孔加入  $2.5\times 10^3$  顆細胞與  $4\ \mu\text{g/ml}$  HBe 蛋白或與其等量的細菌脂多醣 於  $37^\circ\text{C}$   $5\%$   $\text{CO}_2$  培養箱中培養 24 小時。加入  $5\times 10^4$  顆以  $0.5\ \mu\text{M}$  CFSE 標定的 OT-I  $\text{CD8}^+$  T 細胞及依照實驗設計所需的 OVA<sub>257-264</sub> 胜肽(中央研究院分子生物研究所(台北，台灣) 孔祥智博士所贈與)，

培養 3 天後，以流式細胞儀分析 CFSE 螢光衰弱程度。在進行以條件培養基(conditional medium, CM)實驗則收集抗原呈獻細胞與 HBe 蛋白培養過 24 小時的上清液，再與抗原呈獻細胞及已  $0.5 \mu\text{M}$  CFSE 標定的 OT-I  $\text{CD8}^+$  T 細胞及 OVA<sub>257-264</sub> 胜肽於  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培養箱中培養 3 天後，以流式細胞儀分析 CFSE 螢光衰弱程度。

### CD3/CD28 cross-linking 刺激脾臟 T 細胞分裂試驗

預先在 96 孔盤中每孔  $30 \mu\text{l}$  塗上一層依照實驗設計所需的濃度的 anti-CD3e 及 anti-CD28 的抗體(BD Bioscience Pharmingen™)，於  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培養箱靜置 90 分鐘後，加入  $200 \mu\text{l}$  PBS 溶液置於  $4^\circ\text{C}$  下，16~18 小時。將 PBS 溶液移除，再加入  $200 \mu\text{l}$  PBS 溶液清洗一次。脾臟 T 細胞由上述方式自 C57BL/6JNar 小鼠取得，以  $0.5 \mu\text{M}$  CFSE 標定後，每孔加入  $2 \times 10^5$  顆脾臟 T 細胞與  $4 \mu\text{g/ml}$  HBe 蛋白，於  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培養箱中培養 3 天後，以流式細胞儀分析 CFSE 螢光衰弱程度。

### 細胞分裂之數據分析

以每次實驗的 PBS 控制組螢光數值中位數(median) $1/2$  為界線往左邊畫分為細胞分裂的螢光區間並將分裂細胞百分比繪製成柱狀圖，並利用 Student' s t-test 分析結果是否有顯著差異。

## 結果

### 以 *E. coli* 所表現的 HBe 蛋白之純化與移除細菌脂多醣

首先將帶有 HBe 蛋白基因的 pRSET 質體利用轉形方式(transformation)送入 *E. coli*，並誘導其表現 his-tag HBe 蛋白，再藉由 Ni<sup>2+</sup>管柱純化出 HBe 蛋白並利用 SDS-PAGE 電泳以及銀染來檢視蛋白純化的結果。圖六、a 第 2 行約 16.5 kDa 位置顯示蛋白大量表現，而第 3 行的管柱流出液可觀察到蛋白大量減少，表示大部份蛋白已被 Ni<sup>2+</sup>管柱吸附。第 5 至第 8 行的沖提液中可觀察到未吸附的蛋白被沖提出，最後在第 4 行的沖提液中可見一大小約 17 kDa 的蛋白分子。進一步利用純化的蛋白具有 HBeAg 抗原決定位，以 anti-HBe 抗體進行西方點墨轉漬法(圖六、b)僅在約 17 kDa 位置訊號產生，確定純化出的蛋白具 HBeAg 抗原決定位。

*E. coli* 為革蘭式陰性菌，脂多醣(lipopolysarcchride, LPS)為細胞壁上成分之一。細菌脂多醣會與巨噬細胞、樹突細胞及 B 細胞等表面第四類鐸受體(Toll-like receptor 4, TLR4)結合，使細胞分泌與發炎反性相關的細胞激素如第一介白質  $\alpha$ 、第六介白質及腫瘤壞死因子- $\alpha$  干擾實驗結果(Kawai, T. & Akira, S., 2006)。為了降低 HBe 蛋白溶液中的細菌脂多醣，以 EndoTrap bule<sup>®</sup>管柱去除細菌脂多醣並以 Pyrochrome<sup>®</sup>內毒素呈色試劑測定細菌脂多醣含量。上述取得蛋白

溶液中含有 289.5 ng/ml 的細菌脂多醣，經去除細菌脂多醣後的蛋白溶液細菌脂多醣含量降低為 9.6 ng/ml。

### 小鼠脾臟細胞各種細胞族群

自 C57BL/6JNar 小鼠脾臟取得脾臟細胞，以 FITC-anti-CD3 $\epsilon$ 、FITC-anti-B220 及 FITC-anti-F4/80 抗體標示後，以流式細胞儀分析各細胞族群比例。小鼠脾臟中 T 細胞約佔 45%、B 細胞約佔 40%、巨噬細胞約佔 7%(圖七)

### HBe 蛋白不影響小鼠脾臟細胞中 B 與 T 細胞分裂

將已標定 CFSE (Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester) 小鼠脾臟細胞於 24 孔盤中，每孔  $1 \times 10^6$  顆細胞與最終濃度 2 及 4  $\mu\text{g/ml}$  的 HBe 蛋白，控制組則加入 PBS 或 2  $\mu\text{g/ml}$  淋巴細胞分裂原(mitogen) Con A(Concanavalin A)培養 3 天後，再以 PE-anti-B220 或 PE-anti-CD4、PE-anti-CD8 抗體標示藉此分析 B 細胞與 T 細胞族群的分裂程度。在一次實驗中，經 PBS(圖八、a)或 Con A(圖八、b)處理的控制組分別為 8%及 75%的 B 細胞分裂。而加入 2 及 4  $\mu\text{g/ml}$  的 HBe 蛋白處理的組別為 4%及 3% B 細胞分裂。經 PBS(圖九、a)或 Con A(圖九、b)處理的控制組分別為 7%及 84%的 T 細胞分裂。而加入 2 及

4  $\mu\text{g/ml}$  的 HBe 蛋白處理的組別為 5%(圖九、c)及 5% (圖九、d) T 細胞分裂。圖十為為綜合圖八及圖九平均結果之柱狀圖。2 及 4  $\mu\text{g/ml}$  的 HBe 的實驗組 B 細胞分裂分別為  $4.0 \pm 1.0\%$  及  $3.7 \pm 0.6\%$ ，T 細胞分裂分別為  $5.3 \pm 1.5\%$  及  $5.0 \pm 0.6\%$ 。實驗結果顯示 2 及 4  $\mu\text{g/ml}$  HBe 蛋白不影響小鼠脾臟細胞中的 B 細胞與 T 細胞分裂比例。

### 由 OT-I 小鼠脾臟純化之 CD8<sup>+</sup> T 細胞純度

先以塗抹 25  $\mu\text{g}$  anti- $\mu$  與 25  $\mu\text{g}$  anti- $\kappa$  抗體的培養皿移除 OT-I 小鼠脾臟細胞中的 B 細胞，再以 10  $\mu\text{g}$  anti-CD4 抗體培養皿移除 CD4<sup>+</sup> T 細胞。最後利用 2  $\mu\text{g}$  之 anti-CD8 抗體分離出 CD8<sup>+</sup> T 細胞。圖十一為純化 CD8<sup>+</sup> T 細胞的結果，CD8<sup>+</sup> T 細胞的比例約 97% 而 CD4<sup>+</sup> T 細胞的比例約 1%。

### HBe 蛋白促進抗原特異性 T 細胞分裂比例增加

為了觀察 HBe 蛋白會影響抗原特異性 T 細胞的分裂比例，藉由 T 細胞受體轉殖基因小鼠 OT-I 與抗原呈獻細胞及 OVA 胜肽的系統測試。先由 OT-I 小鼠的脾臟中取得貼附性細胞作為抗原呈獻細胞與 4  $\mu\text{g/ml}$  HBe 蛋白培養 24 小時後，加入已標記 CFSE OT-I 小鼠的 CD8<sup>+</sup> T 細胞以及 0.05、0.10 及 0.15  $\text{ng/ml}$  的特異性抗原 OVA 胜肽，培養 3

天後與 PE-anti-CD8 抗體標示並分析 CFSE 螢光分佈了解 CD8<sup>+</sup> T 細胞分裂的程度。在 PBS 控制組中細胞分裂的比例為 3% (圖十二、a)，加入 0.05、0.10 及 0.15 ng/ml 特異性抗原 OVA 胜肽細胞分裂的比例為 34%(圖十二、b)、68%(圖十二、c)及 91%(圖十二、d)，而在各種濃度特異性抗原 OVA 胜肽存在下，加入 4 μg/ml HBe 蛋白細胞分裂的比例分別為 4%(圖十二、e)、62%(圖十二、f)、80%(圖十二、g)及 94%(圖十二、h)。在先前製備 HBe 蛋白已去除掉大部分的細菌脂多醣，但實驗中加入處理的 HBe 蛋白含少量的細菌脂多醣，最終濃度 0.89 ng/ml，在另外兩組的控制組分別加入最終濃度為 1 ng/ml 及 10 ng/ml 的細菌脂多醣與抗原呈獻細胞培養 24 小時並加入各種濃度的特異性抗原 OVA 胜肽及已標示 CFSE 的 CD8<sup>+</sup> T 細胞培養 3 天。在 1 ng/ml 的細菌脂多醣組別中，依照各種濃度的特異性抗原 OVA 胜肽細胞分裂的比例分別為 3%(圖十二、i)、34%(圖十二、j)、77%(圖十二、k)及 94%(圖十二、l)。在 10 ng/ml 的細菌脂多醣組別中，則分別為 3%(圖十二、o)、36%(圖十二、p)、77%(圖十二、q)及 92%(圖十二、r)。圖十二為一次實驗中四重覆的一次結果。圖十三、a 為圖十二結果的平均柱狀圖，圖十三、b 為另一次實驗結果的平均柱狀圖。兩次實驗結果顯示，HBe 蛋白與 OT-I 小鼠的抗原細胞培養 24 小時，在不同的特異性抗原 OVA 胜肽的存在下可觀察到 CD8<sup>+</sup> T 細胞分裂的比例明顯增加。

此外，在 1 ng/ml 及 10 ng/ml 的細菌脂多醣兩組控制組對照於 PBS 的組別細胞的分裂比例無明顯增加( $P > 0.05$ )，顯示 HBe 蛋白溶液中存在的細菌脂多醣在此實驗系統中並不干擾實驗結果。

為了節省 OT-I 小鼠的使用，利用 C57BL/6JNar 小鼠脾臟所取得抗原呈獻細胞進行實驗。實驗條件如上述，抗原呈獻細胞與  $4 \mu\text{g/ml}$  HBe 蛋白培養 24 小時後，加入已標記 CFSE OT-I 小鼠的  $\text{CD8}^+$  T 細胞以及不同濃度的特異性抗原 OVA 胜肽培養 3 天並分析細胞的分裂比例。在 PBS 控制組中細胞分裂的比例為 3%(圖十四、a)。僅加入 0.05、0.10 及 0.15 ng/ml 特異性抗原 OVA 胜肽細胞分裂的比例為 19%(圖十四、b)、66%(圖十四、c)及 86%(圖十四、d)。在加入  $4 \mu\text{g/ml}$  HBe 蛋白的組別中  $\text{CD8}^+$  T 細胞分裂的比例分別為 3%(圖十四、e)、35%(圖十四、f)、82%(圖十四、g)及 90%(圖十四、h)。在 1 ng/ml 的細菌脂多醣處理下，不同濃度特異性抗原 OVA 胜肽條件下，分裂比例為 2%(圖十四、i)、22%(圖十四、j)、69%(圖十四、k)及 87%(圖十四、l)。在 10 ng/ml 的細菌脂多醣的組別中，細胞分裂比例為 3% (圖十四、i)、21%(圖十四、j)、72%(圖十四、k)及 86%(圖十四、l)。圖十四為一次實驗中四重覆的一次結果。圖十五、a 圖為圖十四結果的平均柱狀圖。圖十五、a、b、c 圖為另外三次實驗結果的平均柱狀圖。

四次實驗結果顯示，HBe 蛋白與 C57BL/6JNar 小鼠的抗原細胞培養 24 小時後，在不同的特異性抗原 OVA 胜肽的存在下可觀察到 CD8<sup>+</sup>T 細胞分裂的比例顯著增加與利用 OT-I 小鼠的抗原細胞進行實驗的結果相似( $P < 0.05$ )。在 1 ng/ml 及 10 ng/ml 的細菌脂多醣兩組控制組相對於 PBS 的組別細胞的分裂比例亦無差異( $P > 0.05$ )，顯示 HBe 蛋白溶液中少量的細菌脂多醣在此實驗系統中不影響實驗結果。

在上述以 C57BL/6JNar 或 OT-I 小鼠的抗原呈獻細胞與 HBe 蛋白培養 24 小時後，再加入特異性抗原 OVA 胜肽與 CD8<sup>+</sup>T 細胞共同培養皆能夠使細胞分裂比例增加。為了探討在不同時間點抗原呈獻細胞與 HBe 蛋白培養後也具有使 CD8<sup>+</sup>T 細胞比例增加的現象，我將 HBe 蛋白、抗原呈獻細胞特異性抗原 OVA 胜肽與 CD8<sup>+</sup>T 細胞同時加入培養 3 天後，觀察 CD8<sup>+</sup>T 細胞分裂的比例。在 PBS 控制組中細胞分裂的比例為 4%(圖十六、a) 而加入 0.05、0.10 及 0.15 ng/ml 特異性抗原 OVA 胜肽細胞分裂的比例為 33%(圖十六、b)、80%(圖十六、c)及 92%(圖十六、d)。以 4  $\mu$ g/ml HBe 蛋白處理的組別中細胞分裂的比例分別為 5%(圖十六、e)、36%(圖十六、f)、95%(圖十六、g)及 96%(圖十六、h)。在 100 ng/ml 的細菌脂多醣控制組中，不同濃度各特異性抗原 OVA 胜肽條件下細胞分裂比例為 5%(圖十六、i)、34%(圖十六、j)、88%(圖十六、k)及 95%(圖十六、l)。圖十六為一次實驗四重覆中的

一次結果，而圖十七、a 為圖十六的平均柱狀圖，圖十七、b 為另一次實驗結果。僅在圖十七、a 中特異性抗原 OVA 胜肽 0.10 ng/ml 控制組的標準差較大雖然統計上有差異 ( $P < 0.05$ )，但需要進行多次實驗以證實此現象。兩次實驗結果顯示同時將 HBe 蛋白、抗原呈獻細胞、特異性抗原 OVA 胜肽與 CD8<sup>+</sup>T 細胞一起培養 3 天對於細胞分裂的比例結果則無差異 ( $P > 0.05$ )。

### 抗原呈獻細胞與 HBe 蛋白培養 24 小時後的條件培養基加入特異性抗原 OVA 胜肽、抗原呈獻細胞及 CD8<sup>+</sup>T 細胞培養後不影響 CD8<sup>+</sup>T 細胞分裂比例

上述的結果中使 CD8<sup>+</sup>T 細胞比例增加，需要將抗原呈獻細胞與 HBe 蛋白先培養 24 小時。為了探討 HBe 蛋白與抗原呈獻細胞培養 24 小時的這段時間內，透過影響抗原呈獻細胞分泌調控因子而增加 CD8<sup>+</sup>T 細胞比例增加，我收集與 HBe 蛋白處理 24 小時抗原呈獻細胞的條件培養基(conditional medium)加入新鮮分離的抗原呈現細胞、CD8<sup>+</sup>T 細胞及特異性抗原 OVA 胜肽培養 3 天後觀察細胞分裂的比例。控制組中細胞分裂的比例為 2%(圖十八、a)。當加入不同濃度的特異性抗原 OVA 胜肽細胞分裂比例依序為 45%(圖十八、b)80%(圖十八、c)91%(圖十八、d)96%(圖十八、e)。然而再加入經過 HBe 蛋白處理過的條件培養

基培養的 CD8<sup>+</sup>T 細胞分裂比例在不同濃度特異性抗原 OVA 胜肽下依序為 52%(圖十八、g)82%(圖十八、h)93%(圖十八、i)96%(圖十八、j)。圖十八、a~j 為一次實驗四重覆中的一次結果，圖十八、k 為平均結果柱狀圖。此次實驗結果加入經過 HBe 蛋白處理過的條件培養基對照於控制組在不同濃度的特異性抗原 OVA 胜肽下 CD8<sup>+</sup>T 細胞分裂比例無差異( $P > 0.05$ )。

#### HBe 蛋白不影響以 anti-CD3/CD28 抗體活化之 CD3<sup>+</sup>T 細胞的分裂

為了探討 HBe 蛋白是否透過影響抗原呈獻細胞間接造成 T 細胞分裂比例增加的必要性。將純度約 85%(圖十九、a)CD3<sup>+</sup>T 細胞加入預先塗上一層 anti-CD3 及 anti-CD28 抗體及 HBe 蛋白培養 3 天，觀察在無抗原呈獻細胞條件下 T 細胞分裂的比例。在未含抗體的 PBS 控制組，T 細胞分裂比例為 4%(圖十九、b)；僅含 10  $\mu$ g/ml 的 anti-CD28 抗體與 anti-CD28 抗體加入 4  $\mu$ g/ml HBe 蛋白處理組別中，T 細胞分裂比例分別為 3%(圖十九、c)與 3%(圖十九、d)。在僅含有不同濃度的 anti-CD3 抗體的情況下細胞分裂比例為 3%(圖二十、a)、4%(圖二十、b)、5%(圖二十、c)、10%(圖二十、d)及 13%(圖二十、e)。當加入 HBe 蛋白處理後 anti-CD3 抗體濃度增加細胞分裂比例為 3%(圖二十、f)、5%(圖二十、g)、6%(圖二十、h)、14%(圖二十、i) 與 14%(圖二十、

j)。在固定  $10 \mu\text{g/ml}$  的 anti-CD28 抗體同時含有不同濃度 anti-CD3 抗體的條件下，細胞分裂比例為 5%(圖二十、k)、13%(圖二十、l)、37%(圖二十、o)、45%(圖二十、p)及 41%(圖二十、q)。當加入 HBe 蛋白時，細胞分裂比例分別為 11%(圖二十、r)、18%(圖二十、s)、33%(圖二十、t)、46% (圖二十、u)及 39% (圖二十、v)。圖二十為一次實驗中，三重覆的一次結果。圖二十一、a 為圖二十結果的平均柱狀圖，顯示此次實驗 HBe 蛋白對於以 anti-CD3 或 anti-CD3/28 抗體刺激  $\text{CD3}^+\text{T}$  細胞的分裂並不影響。在另兩次實驗結果的平均柱狀圖圖二十一、b 中 anti-CD3 抗體濃度在  $0.0625(P < 0.05)$ 、 $0.125(P < 0.01)$ 、 $0.250(P < 0.01)$ 、 $0.500(P < 0.01)$ 及圖二十一、c 中 anti-CD3 抗體濃度在  $1.000(P < 0.01)$ 的條件下，HBe 蛋白會促進  $\text{CD3}^+\text{T}$  細胞的分裂比例增加。從實驗結果觀察 anti-CD3/28 抗體刺激的條件下，HBe 蛋白不影響  $\text{CD3}^+\text{T}$  細胞的分裂比例( $P > 0.05$ )。然而僅在兩次實驗中觀察到(圖二十一、b 及二十一、c)在單獨以 anti-CD3 抗體刺激時，HBe 蛋白能促進  $\text{CD3}^+\text{T}$  細胞分裂比例增加，需要進一步進行多次實驗以確實實驗結果。

## 討論

目前在臨床上對於偵測 B 型肝炎病毒 e 蛋白(HBe 蛋白)顯示 B 型肝炎病毒正在進行複製，但在功能上瞭解並不清楚。B 型肝炎病毒 e 蛋白對於病毒的複製及感染並非所需，然而卻在所有的嗜肝炎病毒中卻都保留 e 蛋白。推測 HBe 蛋白可能有干擾宿主免疫系統的作用進而幫助病毒能夠生存。當母親為 B 型肝炎病毒 e 抗原陽性的帶原者，新生兒為 B 型肝炎病毒慢性感染機率大幅增加。在以土撥鼠肝炎病毒研究中，當修飾病毒的基因產生不具表現 e 蛋白的肝炎病毒則土撥鼠造成慢性感染的機率則大幅降低。

本實驗室過去研究發現 HBe 蛋白能夠與小鼠腹腔、肝臟及脾臟中的巨噬細胞結合且能夠刺激第六介白質、第十介白質、單核球趨化蛋白 1 及干擾素  $\gamma$  表現量上升。巨噬細胞具有吞噬、分泌調控發炎反應及其他白血球的細胞激素及產生殺菌的過氧化物等功能。此外巨噬細胞能夠將病原體在溶酶體(lysosome)中切割成小片的的抗原胜肽並呈獻給 T 細胞，促使輔助性 T 細胞(helper T cell,  $T_H$ )及毒殺性 T 細胞(cytotoxic T cell,  $T_c$ )的活化。根據過去實驗室發現的結果中，我希望探討是否 HBe 蛋能透過影響抗原呈獻細胞而間接影響 T 細胞的免疫反應。根據圖十的結果中，經過 HBe 蛋白處理過的小鼠脾臟細胞並以 B 細胞及 T 細胞的標誌與 CFSE 進行雙重染分析顯示 B 細胞與

T 細胞分裂比例並未改變。可能 HBe 蛋白的作用並不如同分裂原 (mitogen) 對於淋巴球細胞能夠產生全面性的反應。另外在 T 細胞的發育過程中，因 DNA 重組而產生許多具有不同 T 細胞受體的 T 細胞，若是 HBe 蛋白有作用，可能僅少數的 T 細胞會分裂，所以藉由正常脾臟的 T 細胞進行實驗可能無法觀察到明顯 T 細胞分裂的現象。OT-I 小鼠為 T 細胞受體轉基因小鼠，此小鼠體內大部份為單一種 T 細胞受體的 CD8<sup>+</sup>T 細胞能辨識第一型主要組織相容抗原與一段特異性白蛋白胜肽的複合體 (MHC class I/OVA<sub>257-264</sub>)，此時給許 CD8<sup>+</sup>T 細胞活化的第一個訊號 (signal 1) 而我加入小鼠脾臟貼附細胞作為抗原呈現細胞給與第二個活化的訊號 (signal 2)。藉由此系統一方面能夠較明顯觀察到 T 細胞分裂的現象，另一方面能夠探討 HBe 蛋白是否透過影響抗原呈獻細胞而間接影響特異性 T 分裂。首先我將 OT-I 抗原呈獻細胞預先與 HBe 蛋白培養 24 小時，再加入不同濃度特異性抗原 OVA 胜肽與 OT-I CD8<sup>+</sup>T 細胞結果，在 HBe 蛋白處理後觀察到 CD8<sup>+</sup>T 細胞分裂比例確實增加 (圖十三)。另外為了節省 OT-I 小鼠的使用，此小鼠為 C57BL/6 品系，所以我選用遺傳背景相似的品系 C57BL/6JNar 小鼠。實驗條件如同上述將 C57BL/6JNar 小鼠的抗原呈獻細胞與 HBe 蛋白培養 24 小時後，加入特異性抗原 OVA 胜肽與 OT-I CD8<sup>+</sup>T 細胞，而在經過 HBe 蛋白處理的組別也觀察到 CD8<sup>+</sup>T 細胞分裂比例確實增加 (圖十

五)。HBe 蛋白可能透過影響抗原呈獻細胞而間接影響 T 細胞的增生。當這些抗原呈獻細胞活化的情形下會釋放許多細胞激素如第二介白質、第十五介白質(interleukin-15)或腫瘤壞死因子- $\alpha$  等細胞激素促使 T 細胞增生。在過去的研究觀察到慢性 C 型肝炎患者中，樹突細胞因 C 型肝炎病毒的影響，造成第十二介白質及腫瘤壞死因子- $\alpha$  分泌降低，而間接影響到 T 細胞分泌第 2 介白質、干擾素- $\gamma$ 、腫瘤壞死因子- $\alpha$  以及降低細胞毒殺能力(Chen, L., 2007)。此外 T 細胞活化需要抗原呈獻細胞所提供第 2 個訊號如 B7.1、B7.2 及 ICOS 等共同刺激分子 (costimulatory molecule) (Carreno, B. M., and Collins, M., 2002)，當經過 HBe 蛋白處理過的抗原呈獻細胞可能透過細胞激素或是改變共同刺激分子進一步使 CD8<sup>+</sup>T 細胞分裂比例增加。另外在慢性 B 型肝炎患者也觀察到樹突細胞表面的 B7-H1 分子表現量增加。B7-H7 會與 T 細胞 PD-1 分子結合，抑制 T 細胞的活化(Rodrigue-Gervais, I.G., 2010)。為了探討在不同時間點與 HBe 蛋白培養的抗原呈獻細胞是否也會造成 CD8<sup>+</sup>T 細胞分裂比例增加，結果(圖十七)顯示在統計上僅在 0.1 ng/ml 的特異性抗原 OVA 胜肽的組別顯著差異但在生物上是否有意義則需再增加實驗的次數以確定結果。然而未預先與 HBe 蛋白處理 24 小時的抗原呈獻細胞無法使 CD8<sup>+</sup>T 細胞分裂比例增加，可能由於同時具備 T 細胞活化的兩個訊號，使 T 細胞內訊息

傳遞(signal transduction)快速的進行 ( Huse, M. et al, 2007 ) , 使 HBe 蛋白作用在抗原呈獻細胞上的時間不足, 所以無法觀察到 CD8<sup>+</sup>T 細胞分裂比例增加。在以 E. coli 製備 HBe 蛋白時, 含有約 0.89 ng/ml 細菌脂多醣, 另外以 100 ng/ml 細菌脂多醣處理的組別中顯示 HBe 蛋白中的細菌脂多醣含量不影響實驗結果。相似的 1 ng/ml 及 10 ng/ml 處理(圖十三、十五)的結果中, HBe 蛋白中細菌脂多醣的含量並不影響 OT-I CD8<sup>+</sup>T 細胞分裂比例, 若欲進行 HBe 蛋白對釋放細胞激素或探討 HBe 蛋白對於抗原呈獻細胞活化則需要進一步降低細菌脂多醣的含量。

另外利用 CD3/CD28 cross- linking 以人為的方式在無抗原呈獻細胞下給予活化 CD3<sup>+</sup>T 細胞的訊號並加入 HBe 蛋白觀察 CD3<sup>+</sup>T 細胞分裂比例的情形, 藉此探討 HBe 蛋白是否透過影響抗原呈獻細胞, 間接使 T 細胞分裂比例增加。在圖十九的結果中, 給予 T 細胞活化所需 anti-CD3 抗體(signal 1)及 anti-CD28 抗體(signal 2)的條件下, HBe 蛋白不能影響 CD3<sup>+</sup>T 細胞分裂的比例, 顯示 HBe 蛋白需透過抗原呈獻細胞的重要性。然而在兩次結果中(圖二十一、b 及 c)觀察到當單獨給予 anti-CD3 抗體刺激時, HBe 蛋白能夠 CD3<sup>+</sup>T 細胞分裂的比例增加, 顯示可能 HBe 蛋白能作用在 CD3<sup>+</sup>T 細胞上, 如同 B7 共同刺激分子給予 T 細胞所需的 signal 2, 但初步純化的 CD3<sup>+</sup>T 細胞的純度約

85%(圖十九、a)不能夠完全排除 HBe 蛋白對於其餘非 CD3<sup>+</sup>T 細胞的作用，使在僅有 anti-CD3 抗體刺激的條件下，造成 CD3<sup>+</sup>T 細胞分裂比例增加。若要完全排除其餘非 CD3<sup>+</sup>T 細胞的影響，則需進一步以純度更高的 T 細胞來進行實驗，除了更確切證實 HBe 蛋白是作用在抗原呈獻細胞而影響 T 細胞的分裂比例，也能夠證實 HBe 蛋白的作用是否如共同刺激分子，在僅有 anti-CD3 抗體刺激的條件下，造成 CD3<sup>+</sup>T 細胞分裂比例增加。

為了進一步證實 HBe 蛋白作用在抗原呈獻細胞上，使其能夠分泌某些調節因子如細胞激素，所以我收集 HBe 蛋白及抗原呈獻細胞培養 24 小時後，的條件培養液加入新鮮分離的抗原呈獻細胞及 CD8<sup>+</sup>T 細胞並與不同濃度的特異性抗原 OVA 胜肽培養 3 天。在圖十八結果中顯示實驗組與對照組無顯著差異。在 CD8<sup>+</sup>T 細胞與 HBe 蛋白預先處理 24 小時的抗原呈獻細胞培養時，能夠持續的分泌調節因子能夠觀察到 CD8<sup>+</sup>T 細胞分裂比例增加。可能因素(1)影響 CD8<sup>+</sup>T 細胞分裂不是透過分泌性的調節因子(2)影響 CD8<sup>+</sup>T 細胞的分裂除了分泌性調節因子外，還需要抗原呈獻細胞上的表面分子，例如 B7 共同刺激分子兩者的作用才足以促使 CD8<sup>+</sup>T 細胞分裂比例增加(3)經過預先與 HBe 蛋白處理的抗原呈獻細胞能夠持續釋放分泌性的調節因子，使 CD8<sup>+</sup>T 細胞分裂比例增加，但僅收集 24 小時的條件培養基中分泌性的調節因子的濃

度不足以影響 CD8<sup>+</sup>T 細胞分裂的比例。未來可利用接上 anti-HBe 抗體的蛋白 A 瓊脂糖凝膠珠 (protein A-sepharose beads) 以免疫吸附 (immunoabsorption) 的方式將蛋白溶液中 HBe 蛋白去除，以證實經過 HBe 蛋白處理過的抗原呈獻細胞能使 CD8<sup>+</sup>T 細胞分裂比例增加的現象。雖然 HBe 能夠作用在抗原呈獻細胞使 CD8<sup>+</sup>T 細胞分裂比例增加，宿主對於 HBV 的清除需藉由 CD8<sup>+</sup>T 細胞，未來可針對 CD8<sup>+</sup>T 細胞功能上如毒殺細胞或釋放干擾素- $\gamma$  等探討增生的 CD8<sup>+</sup>T 細胞是否能正常的分化以及執行正常的功能。總結以上的實驗結果顯示 HBe 能夠影響抗原呈獻細胞進而造成 T 細胞分裂比例增加，而 HBe 蛋白是透過何種機制影響 T 細胞的增生以及增生的 T 細胞如何影響病毒的感染則需有待後續的研究釐清。

## 參考文獻

1. Barboza, L. et al. Altered T cell costimulation during chronic hepatitis B infection. *Cell Immunol* 257, 61-68 (2009).
2. Boni, C. et al. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J Virol* 81, 4215-4225 (2007).
3. Bouchard, M.J. & Schneider, R.J. The enigmatic X gene of hepatitis B virus. *J Virol* 78, 12725-12734 (2004).
4. Carreno, B.M. & Collins, M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol* 20, 29-53 (2002).
5. Chang, J.J. & Lewin, S.R. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *Immunol Cell Biol* 85, 16-23 (2007).
6. Centers for disease Control, R.O.C., 2007 <http://www.cdc.gov.tw>
7. Chan, K.Y. The Effects of HBcAg and HBeAg on the Expression of cytokine genes from murine macrophage. In institute of microbiology & immunology school of life science, Vol. Master. National Yang-ming University, Taipei, Taiwan. (1999)
8. Chen, L. et al. B7-H1 up-regulation on myeloid dendritic cells significantly suppresses T cell immune function in patients with chronic hepatitis B. *J Immunol* **178**, 6634-6641 (2007).
9. Chen, M.T. et al. A function of the hepatitis B virus precore protein is to regulate the immune response to the core antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14913-14918 (2004).
10. Cloutier, N. & Flamand, L. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen inhibits interferon (IFN) beta

expression by competing with IFN regulatory factor-3 for binding to IFN $\beta$  promoter. *J Biol Chem* 285, 7208-7221.

11. Cote, P.J. et al. Effects of age and viral determinants on chronicity as an outcome of experimental woodchuck hepatitis virus infection. *Hepatology* 31, 190-200 (2000).
12. Duncan, L.M. et al. Lysine-63-linked ubiquitination is required for endolysosomal degradation of class I molecules. *EMBO J* 25, 1635-1645 (2006).
13. Gallagher, S.R. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc. (1998)
14. Guidotti, L.G. & Chisari, F.V. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol* 1, 23-61 (2006).
15. Hu, Z., Zhang, Z., Kim, J.W., Huang, Y. & Liang, T.J. Altered proteolysis and global gene expression in hepatitis B virus X transgenic mouse liver. *J Virol* 80, 1405-1413 (2006).
16. Huse, M. et al. Spatial and temporal dynamics of T cell receptor signaling with a photoactivatable agonist. *Immunity* 27, 76-88 (2007).
17. Hsu, C.L. The Effects of the Hepatitis B virus e Antigen on Kuffer Cells and Lymphocyte. In institute of macrobiology & immunology school of life science, Vol. Master. National Yang-ming University, Taipei, Taiwan. (2001)
18. Jenkins, C. et al. Immunomodulatory properties of a viral homolog of human interleukin-10 expressed by human cytomegalovirus during the latent phase of infection. *J Virol* 82, 3736-3750 (2008).
19. Jung, M.C. & Pape, G.R. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis* 2, 43-50 (2002).
20. Kawai, T. & Akira, S. TLR signaling. *Cell Death Differ* 13, 816-825 (2006)

21. Liang, T.J. Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology* 49, S13-21 (2009).
22. Liu, H., Fu, J. & Bouvier, M. Allele- and locus-specific recognition of class I MHC molecules by the immunomodulatory E3-19K protein from adenovirus. *J Immunol* 178, 4567-4575 (2007).
23. Lok, A.S. & McMahon, B.J. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 45, 507-539 (2007).
24. Lu, Y.C. The immunomodulatory Effects of Hepatitis B virus e Antigen (HBeAg) on Human Monocytes. In institute of microbiology & immunology school of life science, Vol. Master. National Yang-ming University, Taipei, Taiwan. (1999)
25. McMahon, B.J. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 49, S45-55 (2009).
26. Mogensen, T.H., Melchjorsen, J., Malmgaard, L., Casola, A. & Paludan, S.R. Suppression of proinflammatory cytokine expression by herpes simplex virus type 1. *J Virol* 78, 5883-5890 (2004).
27. O'Shea, R. Chronic hepatitis B virus infection: issues in treatment. *Cleve Clin J Med* 74, 557-560 (2007).
28. Rehermann, B. & Nascimbeni, M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 5, 215-229 (2005).
29. Riley, J.L. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol Rev* 229, 114-125 (2009).
30. Rodrigue-Gervais, I.G. et al. Dendritic cell inhibition is connected to exhaustion of CD8+ T cell polyfunctionality during chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 184, 3134-3144. (2010)

31. Saito, K. et al. Hepatitis C virus inhibits cell surface expression of HLA-DR, prevents dendritic cell maturation, and induces interleukin-10 production. *J Virol* 82, 3320-3328 (2008).
32. Shi, Y.H. & Shi, C.H. Molecular characteristics and stages of chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 15, 3099-3105 (2009).
33. Soussan, P. et al. In vivo expression of a new hepatitis B virus protein encoded by a spliced RNA. *J Clin Invest* 105, 55-60 (2000).
34. Su, T.S. et al. Hepatitis B virus transcript produced by RNA splicing. *J Virol* 63, 4011-4018 (1989).
35. Sun, H.C. et al. Positive serum hepatitis B e antigen is associated with higher risk of early recurrence and poorer survival in patients after curative resection of hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 47, 684-690 (2007).
36. Tavakoli, S. et al. Phenotype and function of monocyte derived dendritic cells in chronic hepatitis B virus infection. *J Gen Virol* 85, 2829-2836 (2004).
37. Tomazin, R. et al. Stable binding of the herpes simplex virus ICP47 protein to the peptide binding site of TAP. *EMBO J* 15, 3256-3266 (1996).
38. Visvanathan, K. et al. Regulation of Toll-like receptor-2 expression in chronic hepatitis B by the precore protein. *Hepatology* 45, 102-110 (2007).
39. Wang, J. & Michalak, T.I. Inhibition by woodchuck hepatitis virus of class I major histocompatibility complex presentation on hepatocytes is mediated by virus envelope pre-S2 protein and can be reversed by treatment with gamma interferon. *J Virol* 80, 8541-8553 (2006).
40. Zhang, Z. et al. Dynamic decrease in PD-1 expression correlates with HBV-specific memory CD8 T-cell development in acute self-limited hepatitis B patients. *J Hepatol* 50, 1163-1173 (2009).

41. Zheng, B.J. et al. Selective functional deficit in dendritic cell--T cell interaction is a crucial mechanism in chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat* 11, 217-224 (2004).

## 圖目

圖一、B 型肝炎病毒顆粒之結果-----	44
圖二、B 型肝炎病毒之生活史-----	45
圖三、B 型肝炎病毒基因體結構與其表現之 RNA 及蛋白質-----	46
圖四、B 型肝炎病毒 e 蛋白之表現-----	47
圖五、pRSET/HBe 質體之建構-----	48
圖六、6x his-HBe 蛋白之 Ni <sup>2+</sup> 管柱純化-----	49
圖七、C57BL/6JNar 小鼠脾臟各細胞族群比例-----	50
圖八、HBe 蛋白處理小鼠脾臟 B 細胞後之 CFSE 螢光長方圖-----	51
圖九、HBe 蛋白處理小鼠脾臟 T 細胞後之 CFSE 螢光長方圖-----	52
圖十、HBe 蛋白不影響正常小鼠脾臟細胞中 B 與 T 細胞分裂-----	53
圖十一、純化後 OT-I 小鼠脾臟 CD8 <sup>+</sup> T 細胞之純度-----	54
圖十二、OT-I 小鼠抗原呈獻細胞預先與 HBe 蛋白培養後，不同濃度 的 OVA 胜肽刺激 OT-I CD8 <sup>+</sup> T 細胞分裂比例-----	55
圖十三、OT-I 小鼠抗原呈獻細胞預先與 HBe 蛋白培養後，以不 同濃度的特異性抗原 OVA 胜肽刺激 OT-I CD8 <sup>+</sup> T 細胞分裂比 例平均結果之柱狀圖-----	57
圖十四、C57BL/6JNar 小鼠抗原呈獻細胞預先與 HBe 蛋白培養後， 以不同濃度的特異性抗原 OVA 胜肽刺激 OT-I CD8 <sup>+</sup> T 細胞分	

裂比例-----58

圖十五、C57BL/6JNar 小鼠抗原呈獻細胞預先與 HBe 蛋白培養後，  
以不同濃度的特異性抗原 OVA 胜肽刺激 OT-I CD8<sup>+</sup>T 細胞分  
裂比例平均結果之柱狀圖-----60

圖十六、同時加入 C57BL/6JNar 小鼠抗原呈獻細胞、HBe 蛋白、不同  
濃度的特異性抗原 OVA 胜肽及 OT-I CD8<sup>+</sup>T 細胞培養後，  
觀察 CD8<sup>+</sup>T 細胞分裂比例-----62

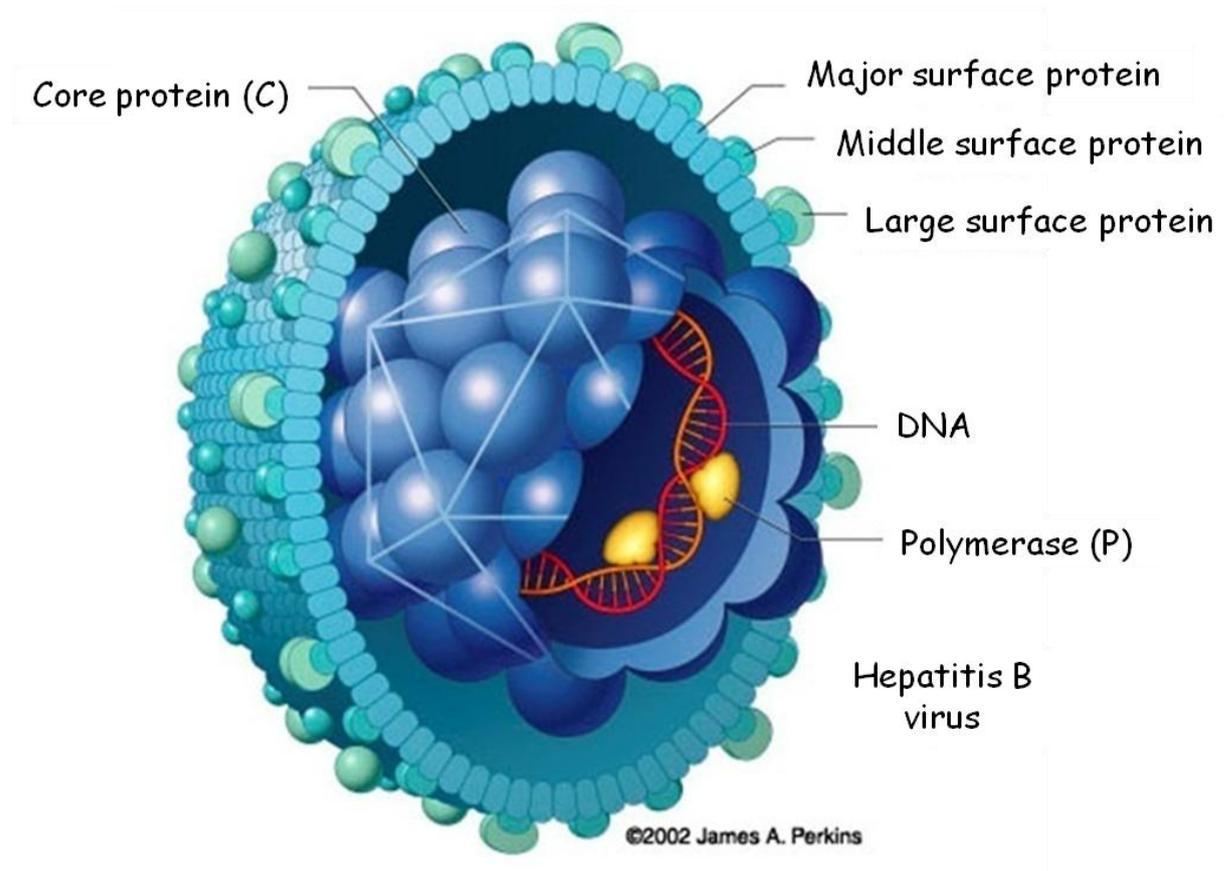
圖十七、C57BL/6JNar 小鼠抗原呈獻細胞與 HBe 蛋白同時培養後，  
以不同濃度的特異性抗原 OVA 胜肽刺激 OT-I CD8<sup>+</sup>T 細胞分  
裂比例平均結果之柱狀圖-----63

圖十八、C57BL/6JNar 小鼠抗原呈獻細胞預先與 HBe 蛋白培養的條件  
培養基加入不同濃度的特異性抗原 OVA 胜肽與抗原呈獻細  
胞刺激 OT-I CD8<sup>+</sup>T 細胞分裂比例及平均結果之柱狀圖--64

圖十九、不含抗體與 anti-CD28 抗體處理下，HBe 蛋白對於 CD3<sup>+</sup>T 細  
胞分裂比例及 CD3<sup>+</sup>T 細胞之純度-----66

圖二十、HBe 蛋白在以 anti-CD3 抗體或 anti-CD3/CD28 抗體刺激  
CD3<sup>+</sup>T 細胞分裂比例-----67

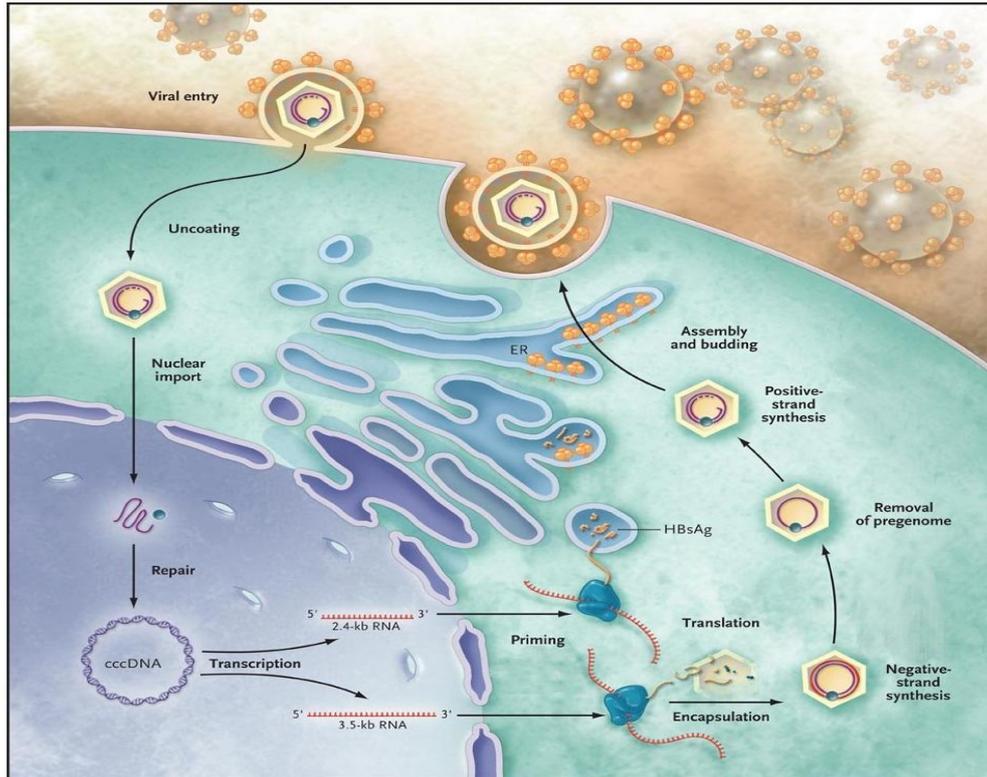
圖二十一、HBe 蛋白在以 anti-CD3 抗體或 anti-CD3/CD28 抗體刺激  
CD3<sup>+</sup>T 細胞分裂比例結果平均之柱狀-----69



### 圖一、B 型肝炎病毒顆粒之結構

在病毒最外層由表面蛋白(surface protein)構成病毒的外套(envelope)。外套蛋白的內部為包含病毒基因體的核心蛋白(core protein)所構成。病毒基因體為部分雙股 DNA，其上帶有 DNA 聚合酶(polymerase)。

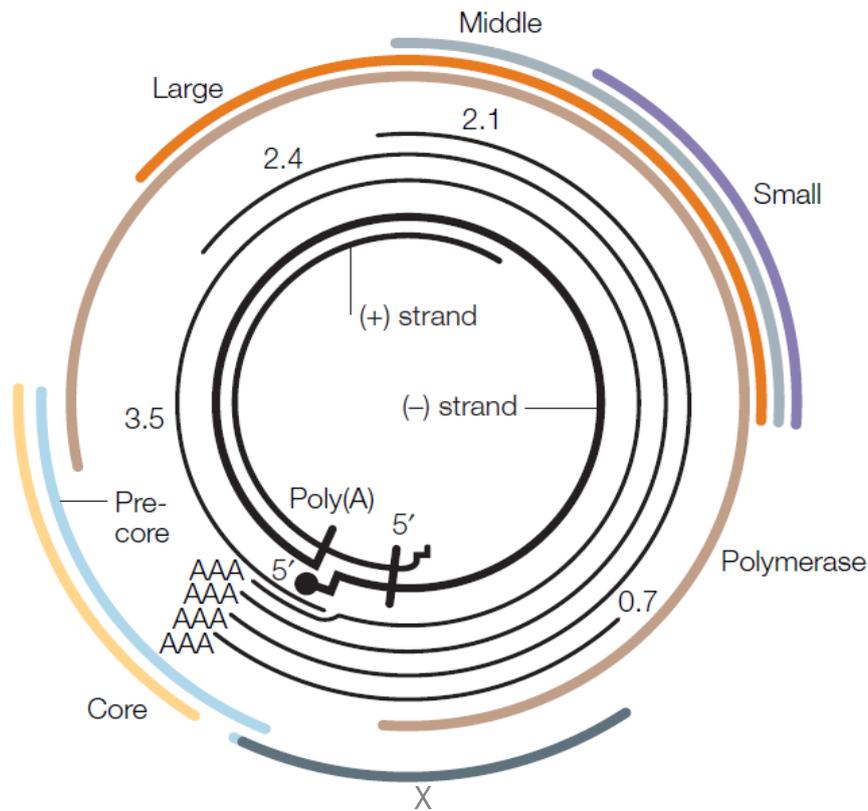
(modified from <http://people.rit.edu/japfaa/HBV.jpg>)



圖二、B 型肝炎病毒之生活史

當 B 型肝炎病毒進入肝臟細胞後，其 DNA 聚合酶在細胞核中將部分雙股 DNA 的基因體修補為共價封閉環狀的雙股 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA)，以此為模板並透過宿主細胞的 RNA 聚合酶轉錄出病毒的 mRNA 並轉譯出各種組裝及複製的蛋白產物。此外轉錄出的前基因體 RNA (pregenomic RNA, pgRNA) 隨後被包覆在核心蛋白中，藉由反轉錄酶 (reverse transcriptase) 反轉錄成基因體的負股 DNA 隨後以其為模板再複製出較短的正股 DNA。最後表面蛋白與病毒核心顆粒結合形成完整的病毒顆粒釋出肝細胞外。

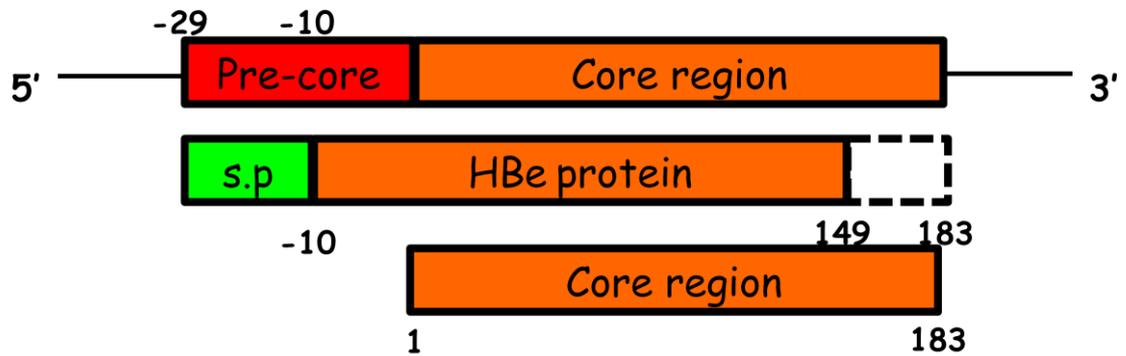
(modified from N Engl J Med 359:1486-1500, 2008)



圖三、B型肝炎病毒基因體結構與其表現之RNA及蛋白質

B型肝炎病毒具有部分雙股DNA的基因體(粗體黑色)其中黑色線條表示主要的四種RNA；前基因體RNA(pregenomic RNA)大小為3.5 kb，可轉譯出核心蛋白(膚色)、前核心蛋白(淺藍色)及病毒DNA聚合酶(酒紅色)，2.4 kb的RNA產生large S蛋白(橘色)及2.1 kb的RNA可產生middle S(淡紫色)、small S(紫色)三種S表面蛋白，0.7 kb的RNA產生X蛋白(藍色)。

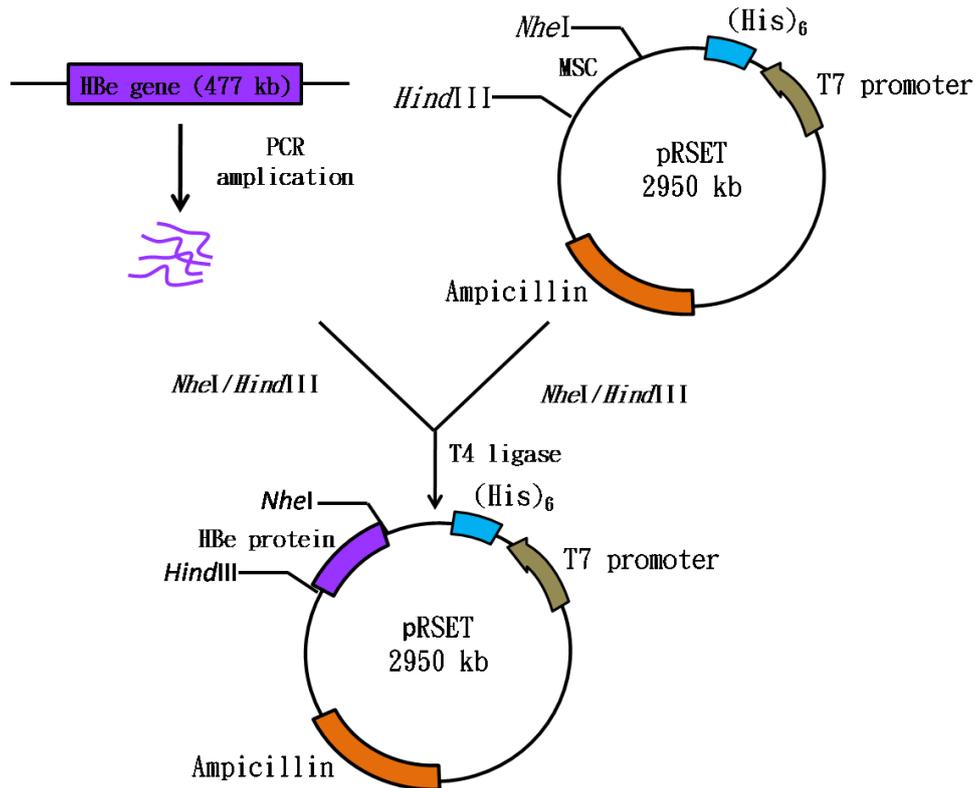
(Adapted from Nat Rev Immunol 5:215-229, 2005)



圖四、B 型肝炎病毒 e 蛋白之表現

由-29 號位置的起始密碼子(start codon)可轉譯出前核心蛋白 (pre-core pretein)，其前端帶有訊息胜肽(signal peptide, s. p.)，可送往內質網(endoplasmic reticulum, ER)。經過修飾切除訊息胜肽與 C 段 150 至 183 號氨基酸後，形成 e 蛋白並釋放到細胞外。

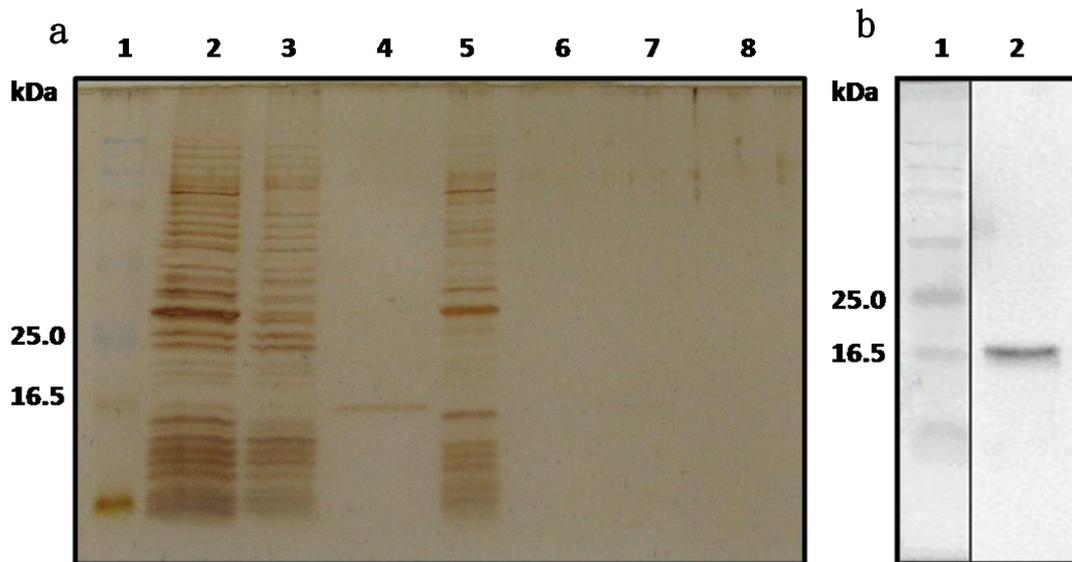
(Modified from J Biol Chem **268**:1332-1337, 1993)



圖五、pRSET/HBe 質體之建構

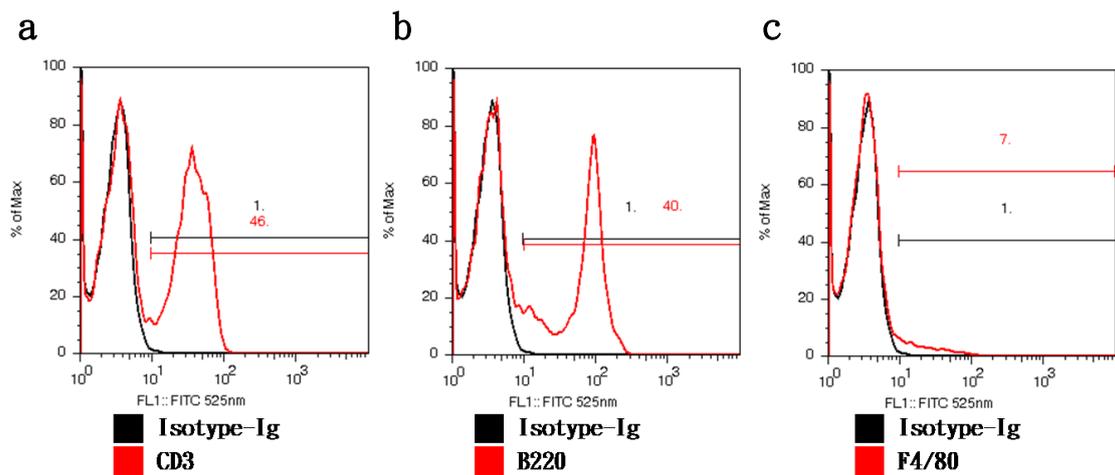
在引子 (primer) 中設計 *NheI* 及 *HindIII* 兩種限制內切酶切點 (restriction site)，並以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 增幅 B 型肝炎病毒 e 蛋白基因。以 *NheI* 及 *HindIII* 兩種限制酶與 PCR 產物及 pRSET 載體(vector)處理後，利用 T4 連接酶(ligase)將兩者接合。pRSET 載體具有 T7 啟動子(promoter)與抗青黴素(Ampicillin)抗生素序列提供表現蛋白及篩選功能。此外，在多重選殖位(multiple cloning site, MCS)一段序列可使 e 蛋白上帶有 6 個組織胺酸(histidine, His)，方便進一步 Ni<sup>2+</sup>管柱純化蛋白。

(Modified from Chang, K. Y., Master thesis, 1999)



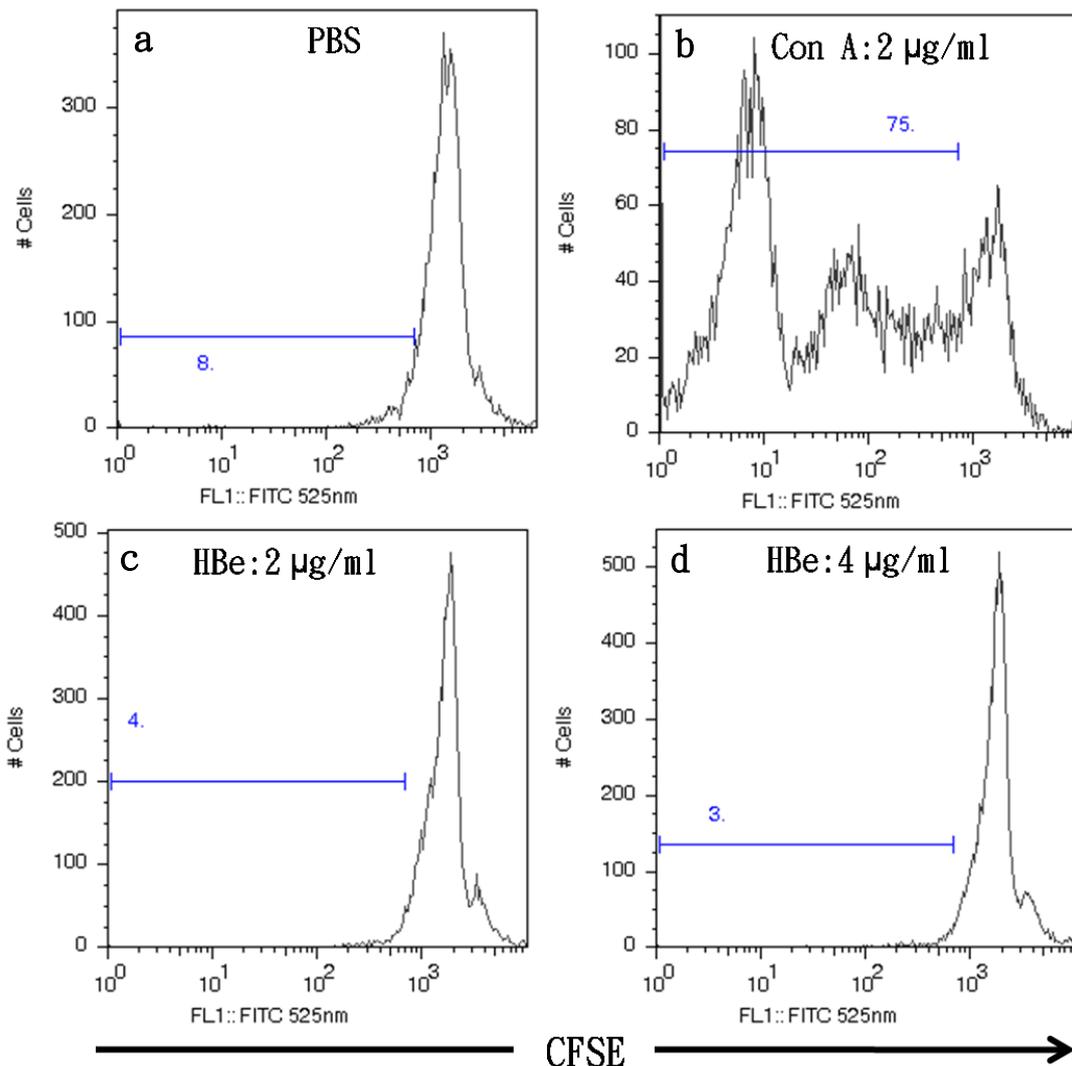
圖六、6x his-HBe 蛋白之  $\text{Ni}^{2+}$  管柱純化

a: 以轉型作用將帶有 HBe 蛋白基因的質體送入 *E. coli* 中表現具有 his-tag 的 HBe 蛋白並透過  $\text{Ni}^{2+}$  管柱純化，在以 SDS-PAGE 及銀染檢視純化過程。第 1 行: molecular-size marker；第 2 行: 細菌細胞溶解液 (bacteria cell lysate)；第 3 行: 管柱流出液 (effluent)；第 4 行: 純化後 HBe 蛋白溶液；第 5 及第 6 行: denature wash；第 7 及第 8 行: native wash。b: 第 1 行: molecular-size marker；第 2 行: 純化的 HBe 蛋白以 anti-HBe 抗體進行西方點末轉漬法。



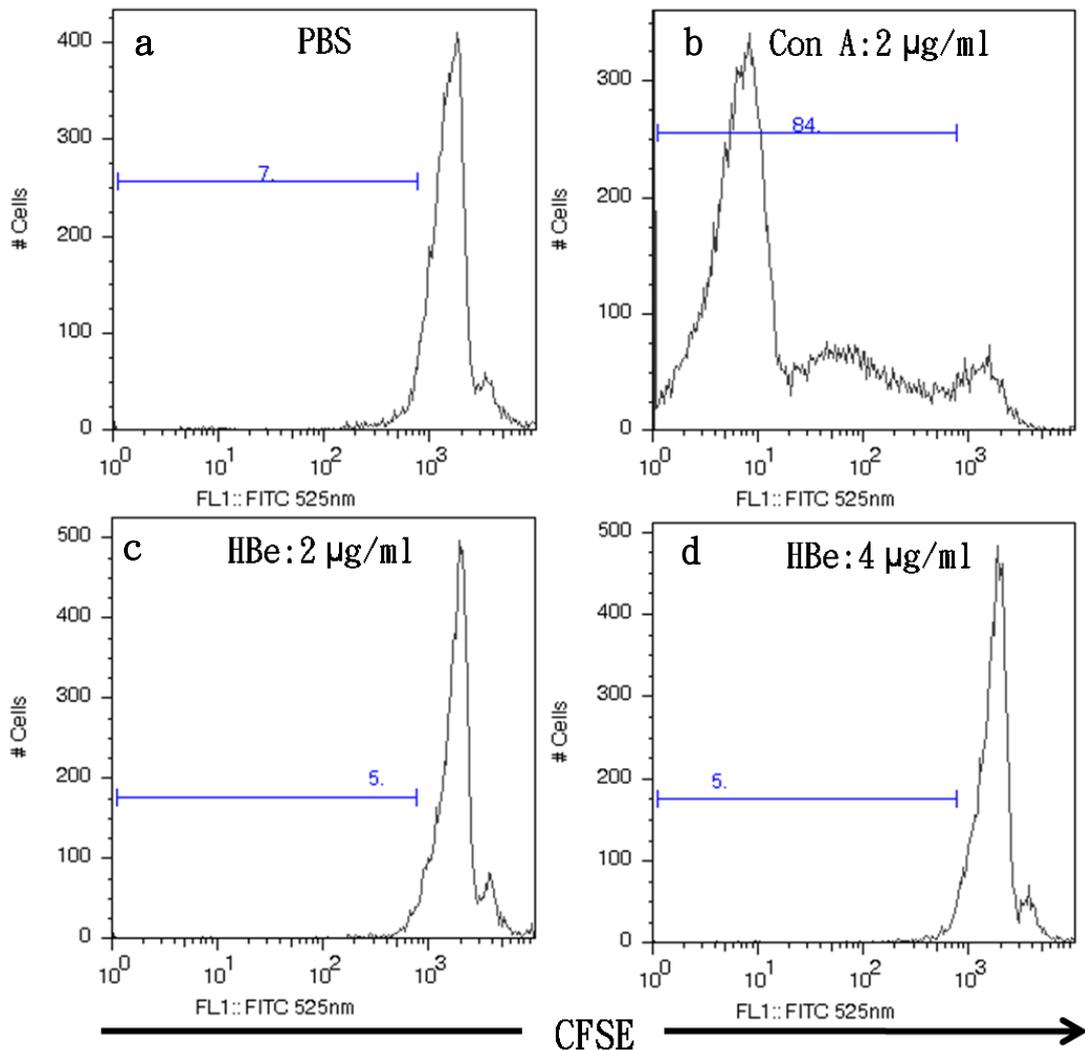
圖七、C57BL/6JNar 小鼠脾臟各細胞族群比例

取得 C57BL/6JNar 小鼠脾臟細胞懸浮液後靜置於培養皿後 1 小時，去除貼附細胞，再以 FITC-anti-CD3(T 細胞標誌)、FITC-anti-B220(B 細胞標誌)、FITC- anti-F4/80(巨噬細胞標誌)抗體標示，藉流式細胞儀分析各細胞族群比例。



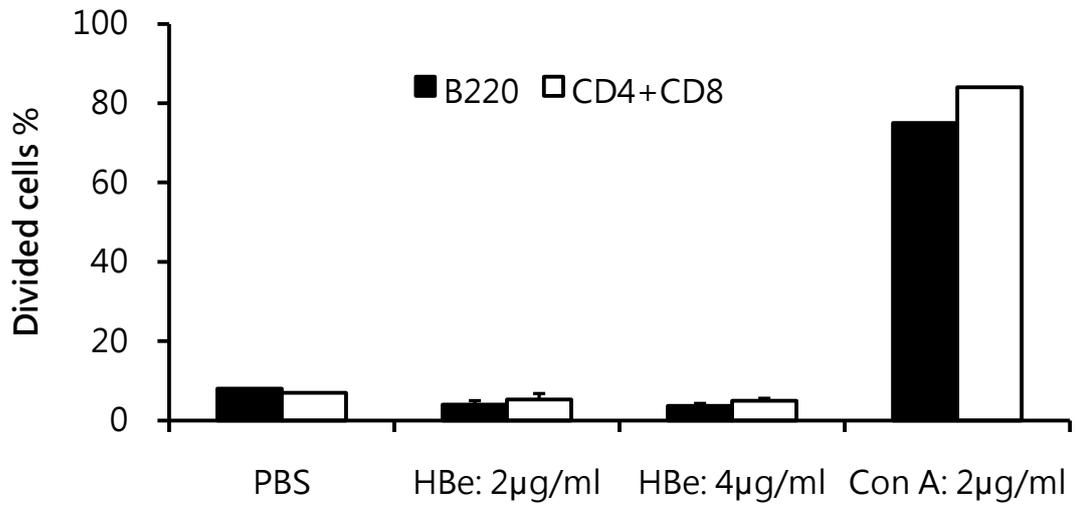
圖八、HBe 蛋白處理小鼠脾臟 B 細胞後之 CFSE 螢光長方圖

將  $2\ \mu\text{g/ml}$  或  $4\ \mu\text{g/ml}$  的 HBe 蛋白與已標示 CFSE (Carboxy fluorescein diacetate, succinimidyl ester) 之小鼠脾臟細胞培養 3 天，標示 PE-anti-B220 抗體後，分析 B 細胞之分裂程度。a: PBS，b:  $2\ \mu\text{g/ml}$  Con A (Concanavalin A)，c:  $2\ \mu\text{g/ml}$  HBe 蛋白，d:  $4\ \mu\text{g/ml}$  HBe 蛋白。a, b 為此次實驗的單一結果，c, d 為此次實驗三重覆的一次結果。



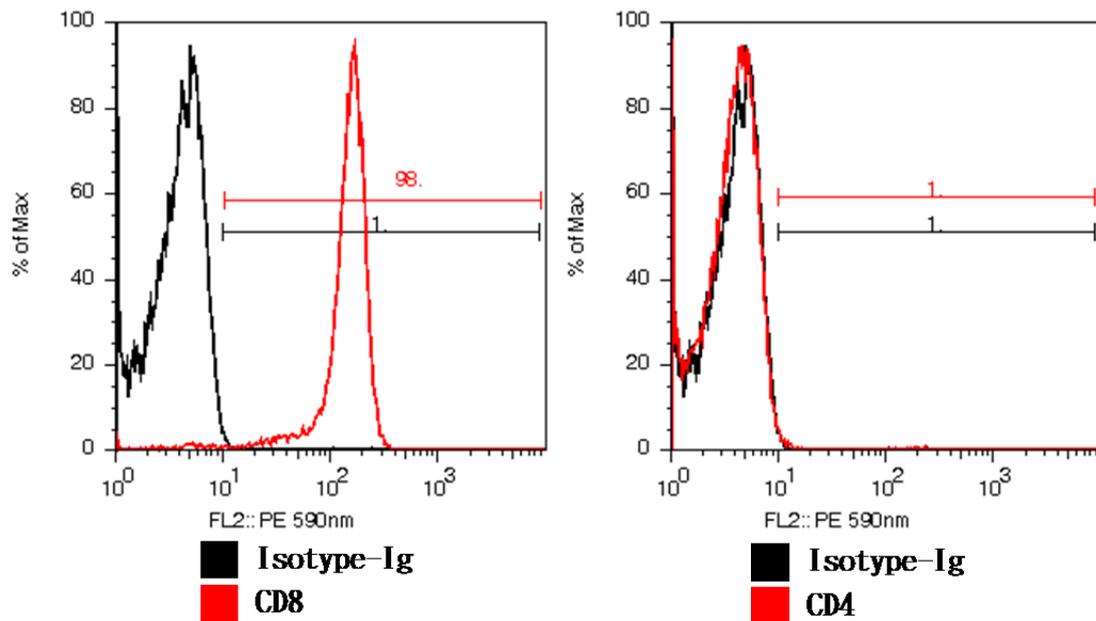
圖九、HBe 蛋白處理小鼠脾臟 T 細胞後之 CFSE 螢光長方圖

將  $2\ \mu\text{g/ml}$  或  $4\ \mu\text{g/ml}$  的 HBe 蛋白與已標示 CFSE 之小鼠脾臟細胞培養 3 天，標示 PE-anti-B220 抗體後，分析 B 細胞之分裂程度。a: PBS，b:  $2\ \mu\text{g/ml}$  Con A，c:  $2\ \mu\text{g/ml}$  HBe 蛋白，d:  $4\ \mu\text{g/ml}$  HBe 蛋白。a, b 為此次實驗的單一結果，c, d 為此次實驗三重覆的一次結果。



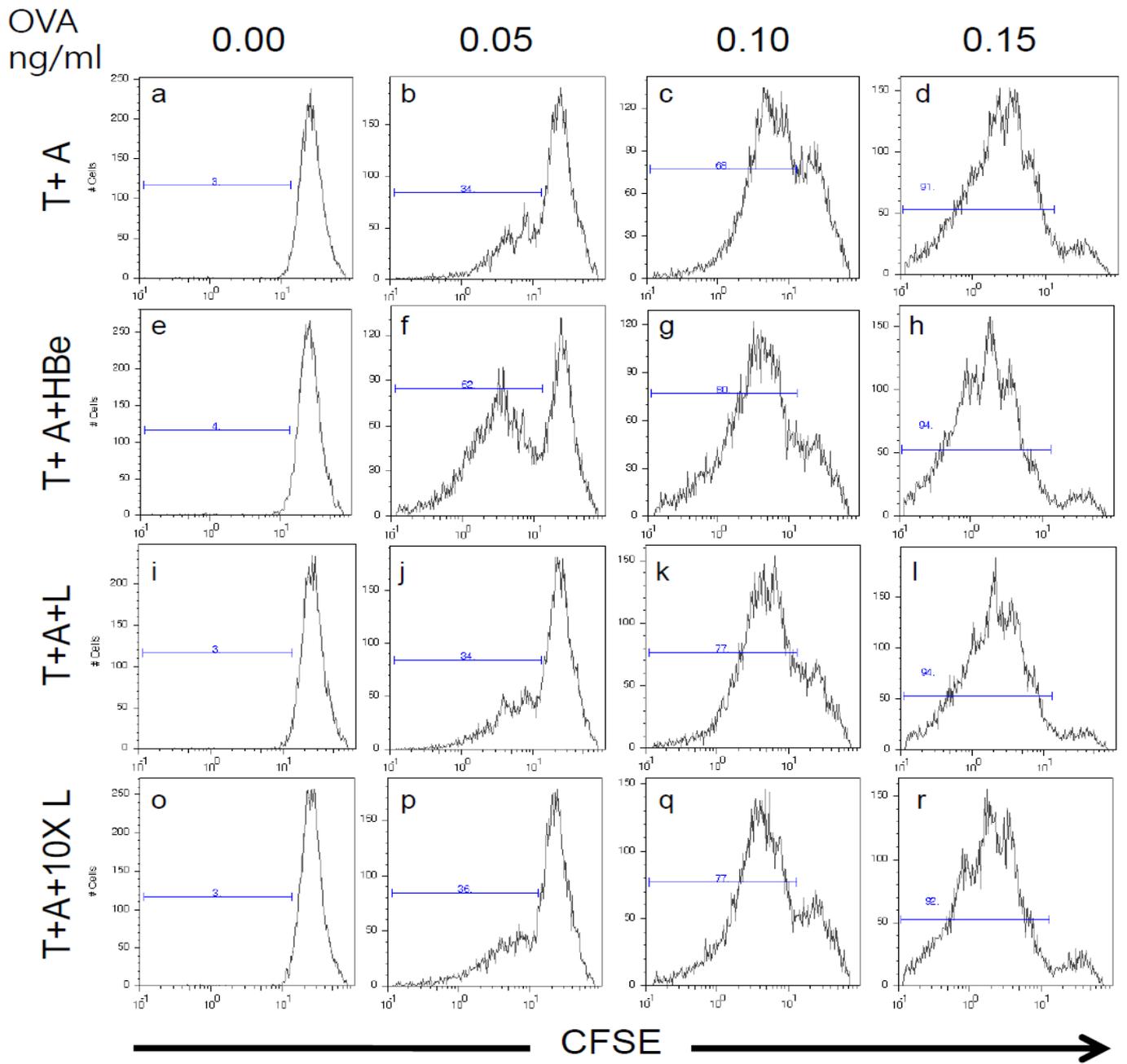
圖十、HBe 蛋白不影響正常小鼠脾臟細胞中 B 與 T 細胞分裂

本圖為綜合圖八及圖九平均結果之柱狀圖。黑色表示 B 細胞分裂情形；白色表示 T 細胞分裂情形。



圖十一、純化後 OT-I 小鼠脾臟 CD8<sup>+</sup> T 細胞之純度

由 OT-I 小鼠取得的脾臟細胞懸浮液藉由 anti- $\mu$  與 anti- $\kappa$  抗體  
 移除 B 細胞及 anti-CD4 抗體移除 CD4<sup>+</sup>T 細胞，再以 anti-CD8 抗  
 體純化出 CD8<sup>+</sup>T 細胞。最後利用 PE-anti-CD8 及 PE-anti-CD4 抗  
 體分析 CD8<sup>+</sup>T 細胞比例。



圖說於 56

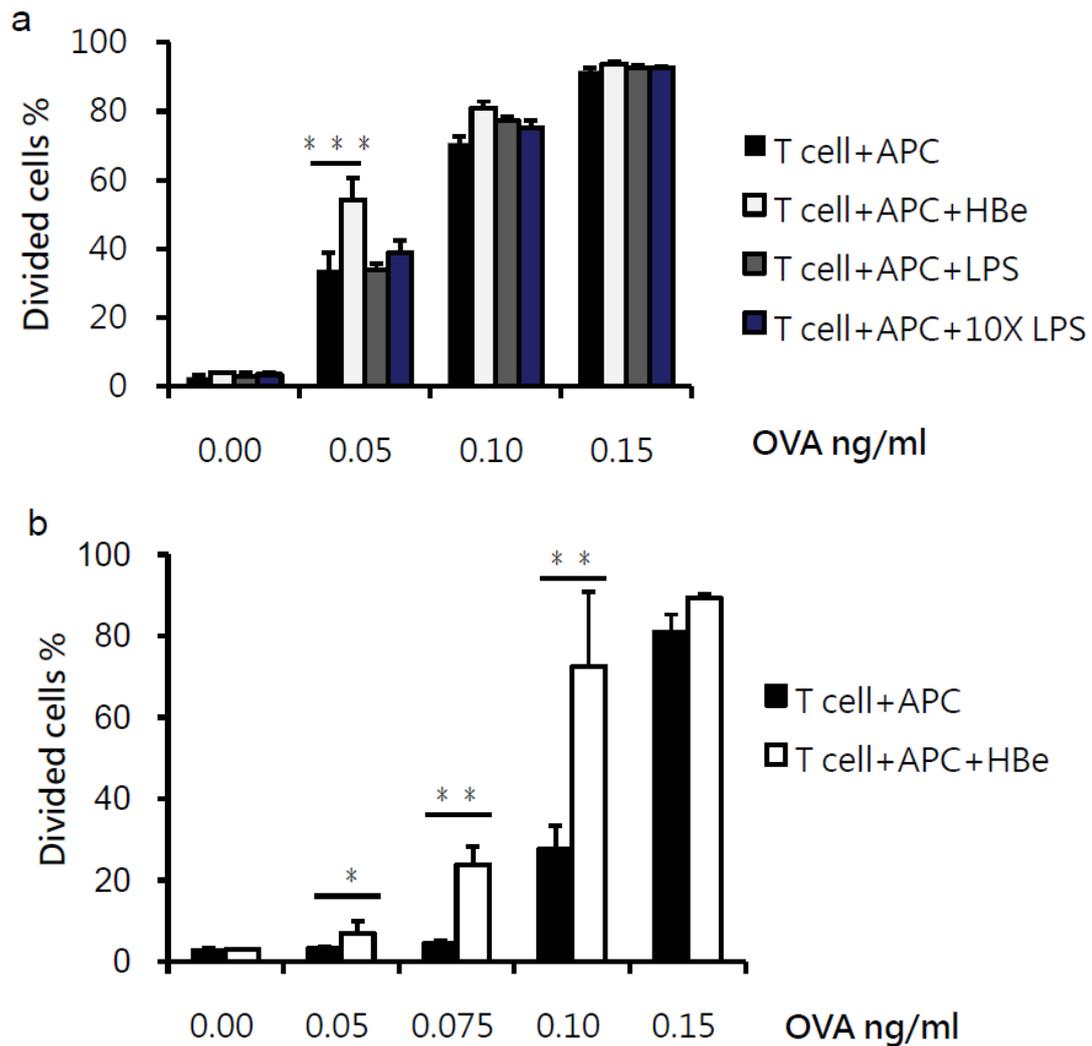
圖十二、OT-I 小鼠抗原呈獻細胞預先與 HBe 蛋白培養後，不同濃度的 OVA 胜肽刺激 OT-I CD8<sup>+</sup> T 細胞分裂比例

將 OT-I 小鼠抗原呈獻細胞與 HBe 蛋白培養 24 小時，再加入 CD8<sup>+</sup>T 細胞及 OVA 胜肽培養 3 天。a~d:PBS，e~h: 4  $\mu$ g/ml HBe 蛋白，i~l: 與 HBe 蛋白中等量 LPS，o~r:10 倍 LPS。此圖為一次實驗中，四重複的一次結果。

A- 抗原呈獻細胞；T-CD8<sup>+</sup>T 細胞；L-細菌脂多醣(LPS):1 ng/ml；

10xL:10 ng/ml

結果圖於 55 頁



圖十三、OT-I 小鼠抗原呈獻細胞預先與 HBe 蛋白培養後，以不

同濃度的特異性抗原 OVA 胜肽刺激 OT-I CD8<sup>+</sup> T 細胞分裂比

例平均結果之柱狀圖

a 圖為圖十二平均結果之柱狀圖在 OVA 胜肽 0.05 ng/ml ( $P < 0.001$ )

顯著大於 PBS 控制組，b 圖為另一次實驗在 OVA 胜肽 0.05 ng/ml

( $P < 0.05$ )、0.075 ng/ml ( $P < 0.01$ )及 0.10 ng/ml ( $P < 0.01$ )均顯著

大於 PBS 控制組。

OVA  
ng/ml

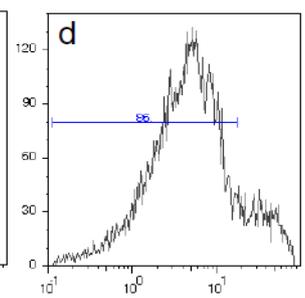
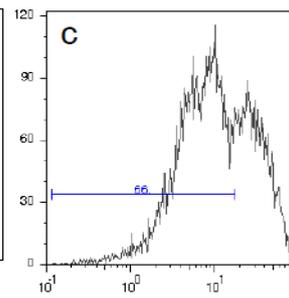
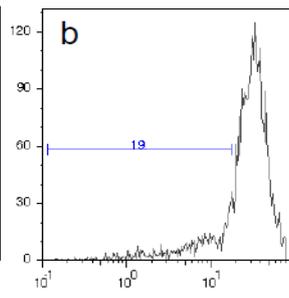
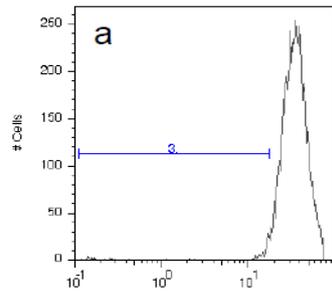
0.00

0.05

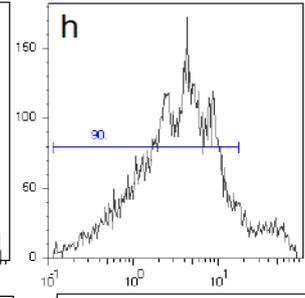
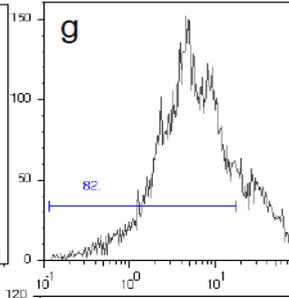
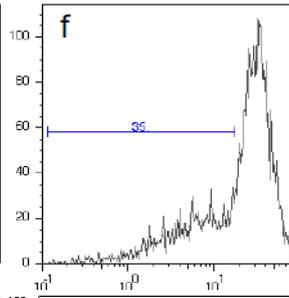
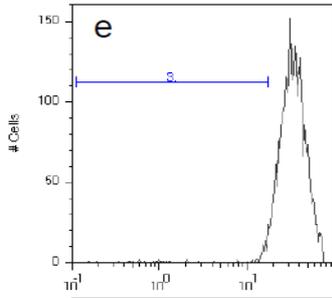
0.10

0.15

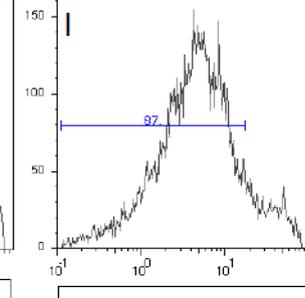
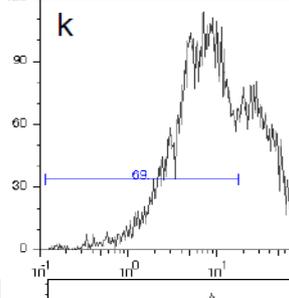
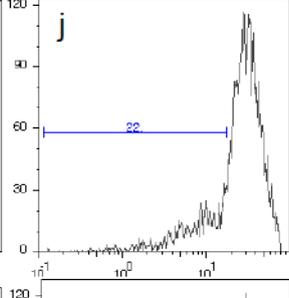
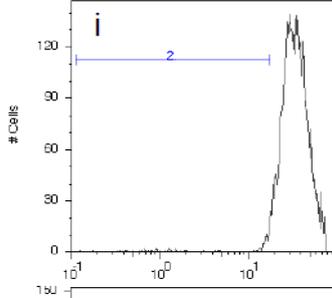
T+A



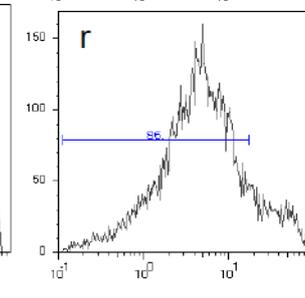
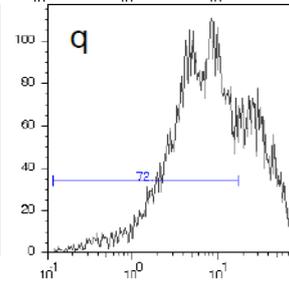
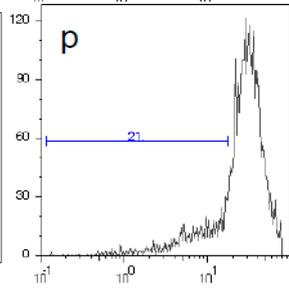
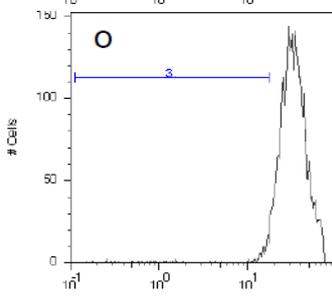
T+A+HBe



T+A+L



T+A+10X L



CFSE



圖說於 59 頁

圖十四、C57BL/6JNar 小鼠抗原呈獻細胞預先與 HBe 蛋白培養後，

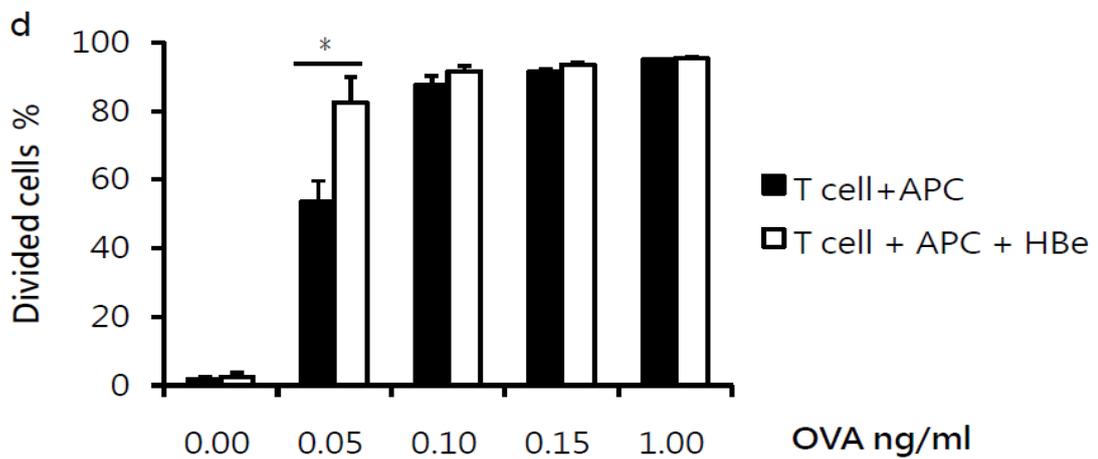
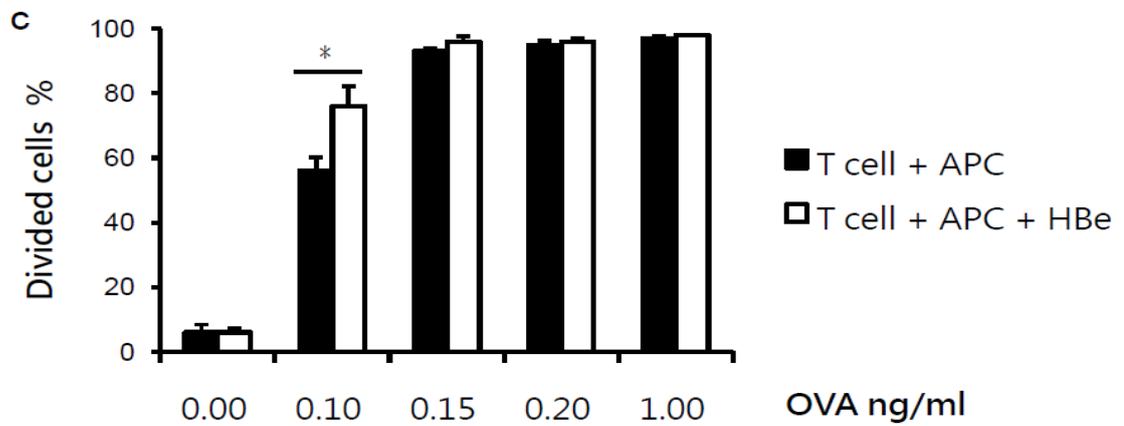
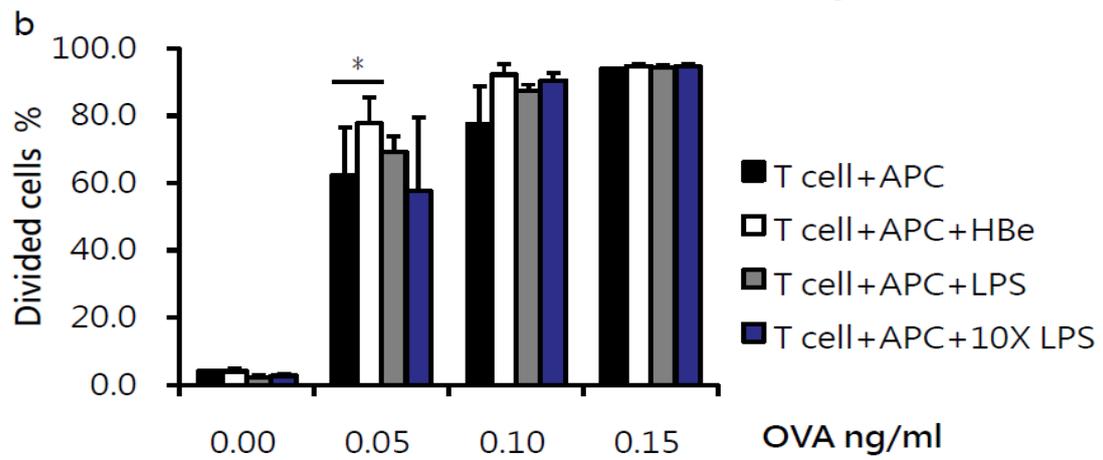
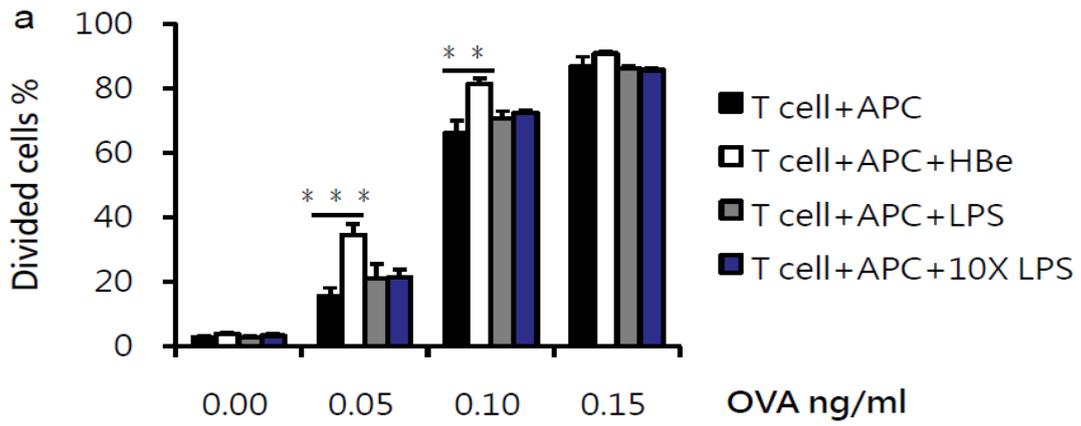
以不同濃度的特異性抗原 OVA 胜肽刺激 OT-I CD8<sup>+</sup> T 細胞分  
裂比例

將 C57BL/6JNar 小鼠抗原呈獻細胞與 HBe 蛋白培養 24 小時，再加入  
CD8<sup>+</sup>T 細胞及 OVA 胜肽培養 3 天。a~d:PBS，e~h: 4  $\mu$ g/ml HBe 蛋白，  
i~l:與 HBe 蛋白中等量 LPS，o~r:10 倍 LPS。此圖為一次實驗中，  
四重複的一次結果。

A- 抗原呈獻細胞；T-CD8<sup>+</sup>T 細胞；L-細菌脂多醣(LPS):1 ng/ml；

10xL:10 ng/ml

結果圖於 58 頁



圖說於 61 頁

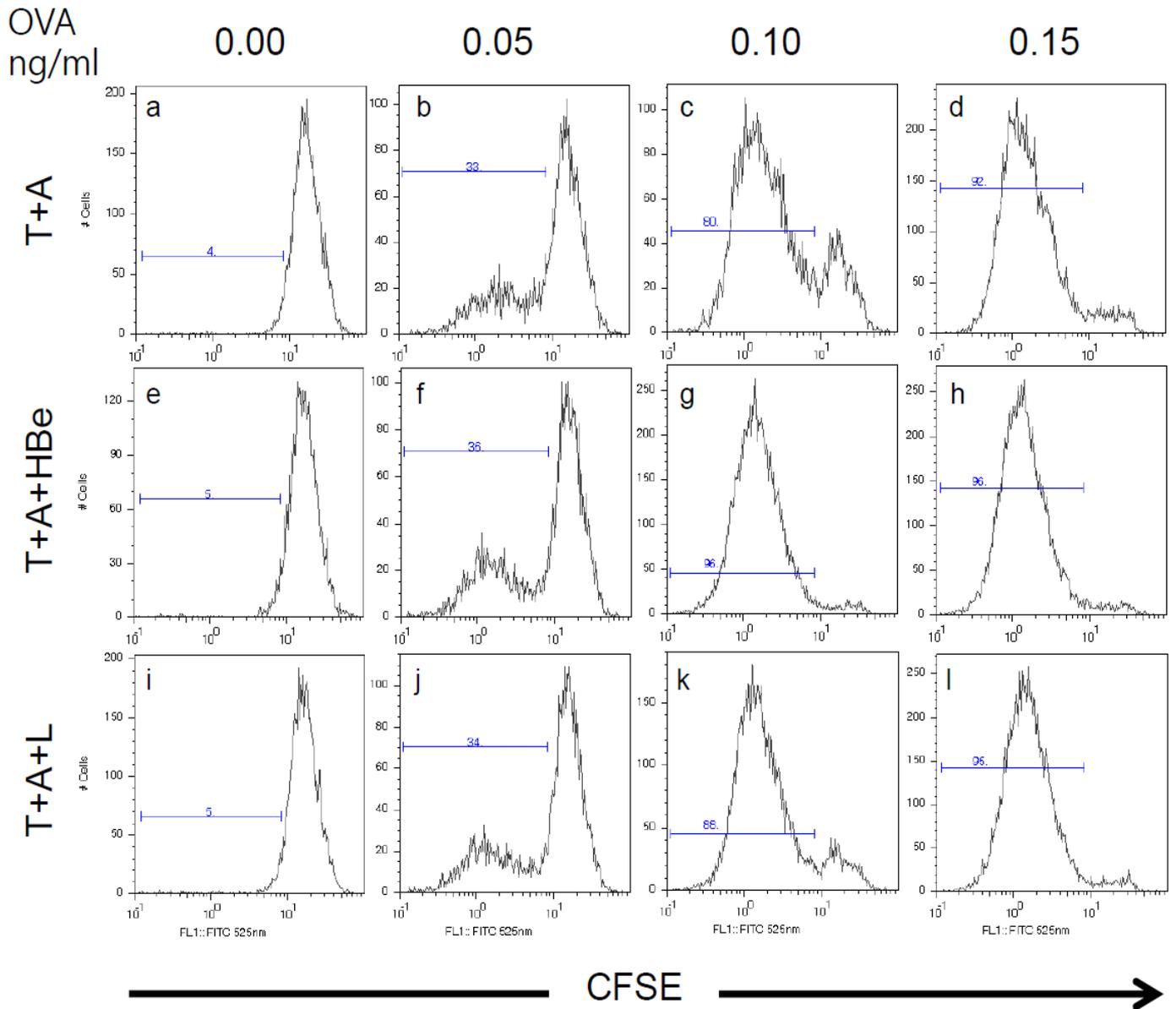
圖十五、C57BL/6JNar 小鼠抗原呈獻細胞預先與 HBe 蛋白培養後，

以不同濃度的特異性抗原 OVA 胜肽刺激 OT-I CD8<sup>+</sup>T 細胞分

裂比例平均結果之柱狀圖

a 圖為圖十四結果之平均柱狀圖在 OVA 胜肽 0.05 ng/ml ( $P < 0.001$ ) 及 0.10 ng/ml ( $P < 0.01$ ) 顯著大於 PBS 控制組，b~d 圖為另三次實驗平均結果之柱狀圖。b: OVA 胜肽 0.05 ng/ml ( $P < 0.05$ )，c: OVA 胜肽 0.10 ng/ml ( $P < 0.05$ )，d: OVA 胜肽 0.05 ng/ml ( $P < 0.05$ ) 均顯著大於 PBS 控制組。

結果圖於 60 頁



圖十六、同時加入 C57BL/6JNar 小鼠抗原呈獻細胞、HBe 蛋白、不同

濃度的特異性抗原 OVA 胜肽及 OT-I CD8<sup>+</sup> T 細胞培養後，

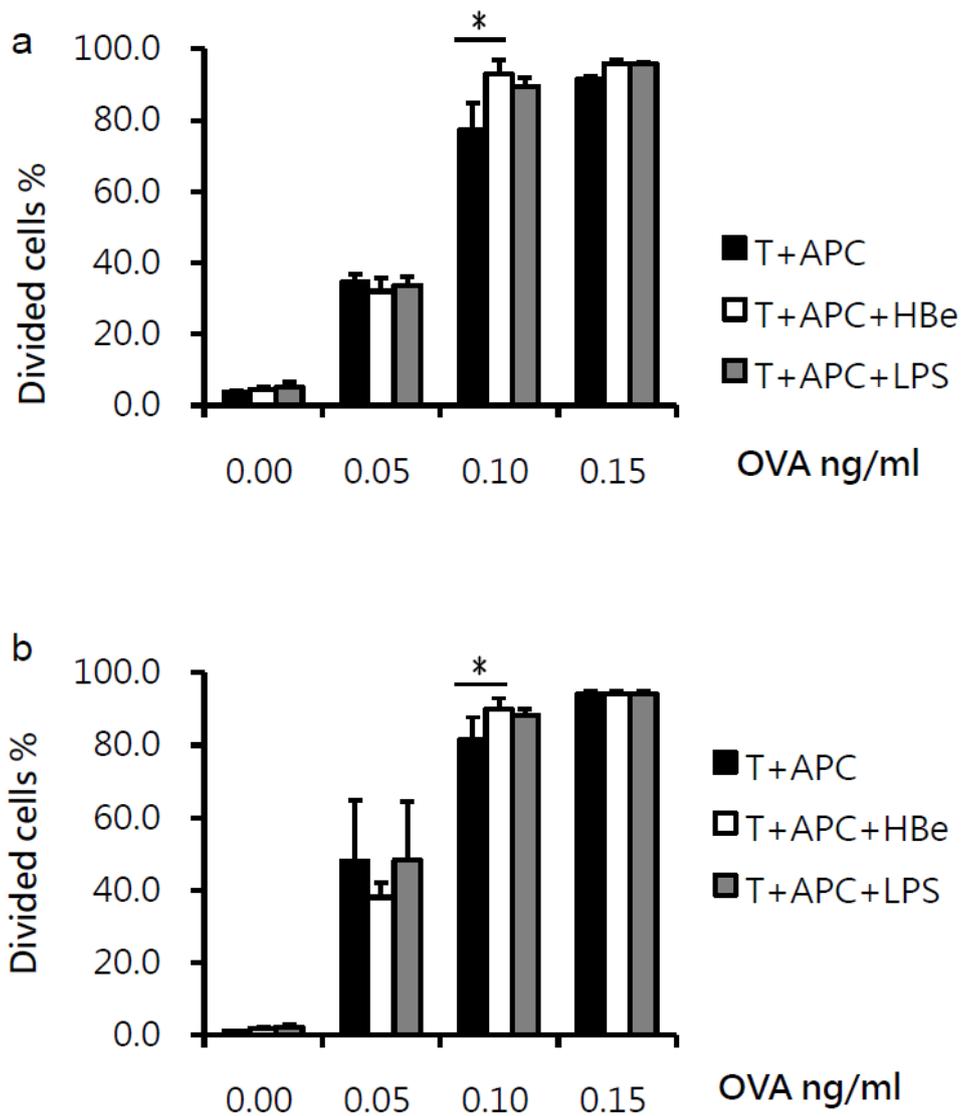
觀察 CD8<sup>+</sup> T 細胞分裂比例

同時加入 C57BL/6JNar 小鼠抗原呈獻細胞、HBe 蛋白、CD8<sup>+</sup>T 細胞及

OVA 胜肽培養 3 天。a~d: PBS，e~h: 4 μg/ml HBe 蛋白，i~l: 100 倍

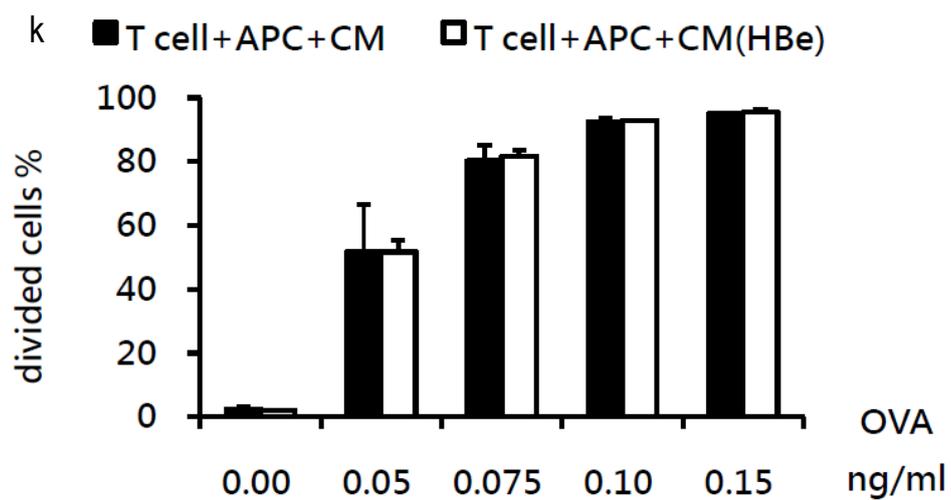
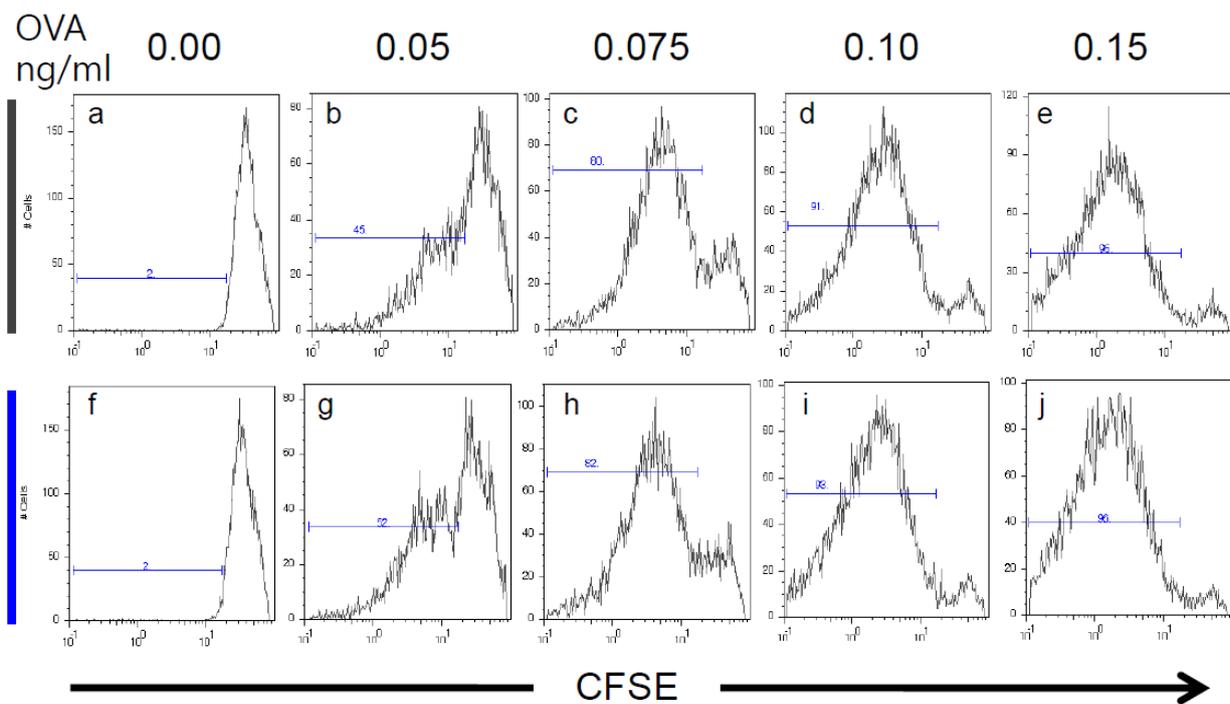
LPS。此圖為一次實驗中，四重複的一次結果。

A-抗原呈獻細胞；T-CD8<sup>+</sup>T 細胞；L-細菌脂多醣(LPS):100 ng/ml



圖十七、C57BL/6JNar 小鼠抗原呈獻細胞與 HBe 蛋白同時培養後，以不同濃度的特異性抗原 OVA 胜肽刺激 OT-I CD8<sup>+</sup> T 細胞分裂比例平均結果之柱狀圖

a 圖為圖十五結果之平均柱狀圖在 OVA 胜肽 0.05 ng/ml ( $P < 0.001$ ) 顯著大於 PBS 控制組，b 圖為另一次實驗平均結果之柱狀圖。b: OVA 胜肽 0.10ng/ml ( $P < 0.05$ ) 顯著大於 PBS 控制組。



圖說於 65 頁

圖十八、C57BL/6JNar 小鼠抗原呈獻細胞預先與 HBe 蛋白培養的條件  
培養基加入不同濃度的特異性抗原 OVA 胜肽與抗原呈獻細胞  
刺激 OT-I CD8<sup>+</sup> T 細胞分裂比例及平均結果之柱狀圖

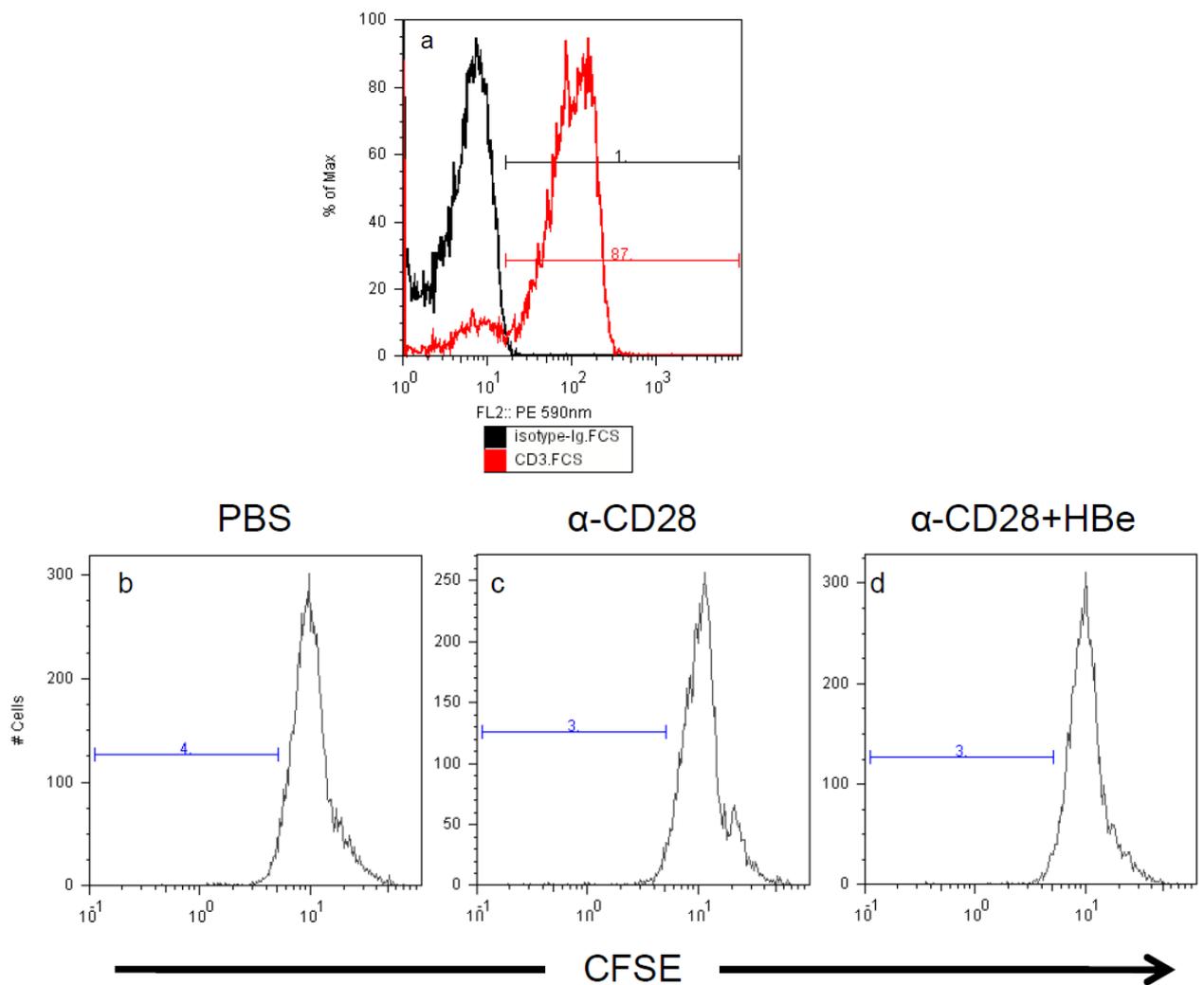
將 C57BL/6JNar 小鼠抗原呈獻細胞與 HBe 蛋白培養 24 小時的條件培養基、CD8<sup>+</sup>T 細胞、新鮮分離的抗原呈獻細胞及 OVA 胜肽培養 3 天。

a 圖為四重複的一次結果，灰色:PBS，藍色: 4  $\mu$ g/ml HBe 蛋白，

k 圖為此次實驗結果平均柱狀圖。

APC-抗原呈獻細胞；T cell-CD8<sup>+</sup>T 細胞；CM-Conditional medium

結果圖於 64 頁

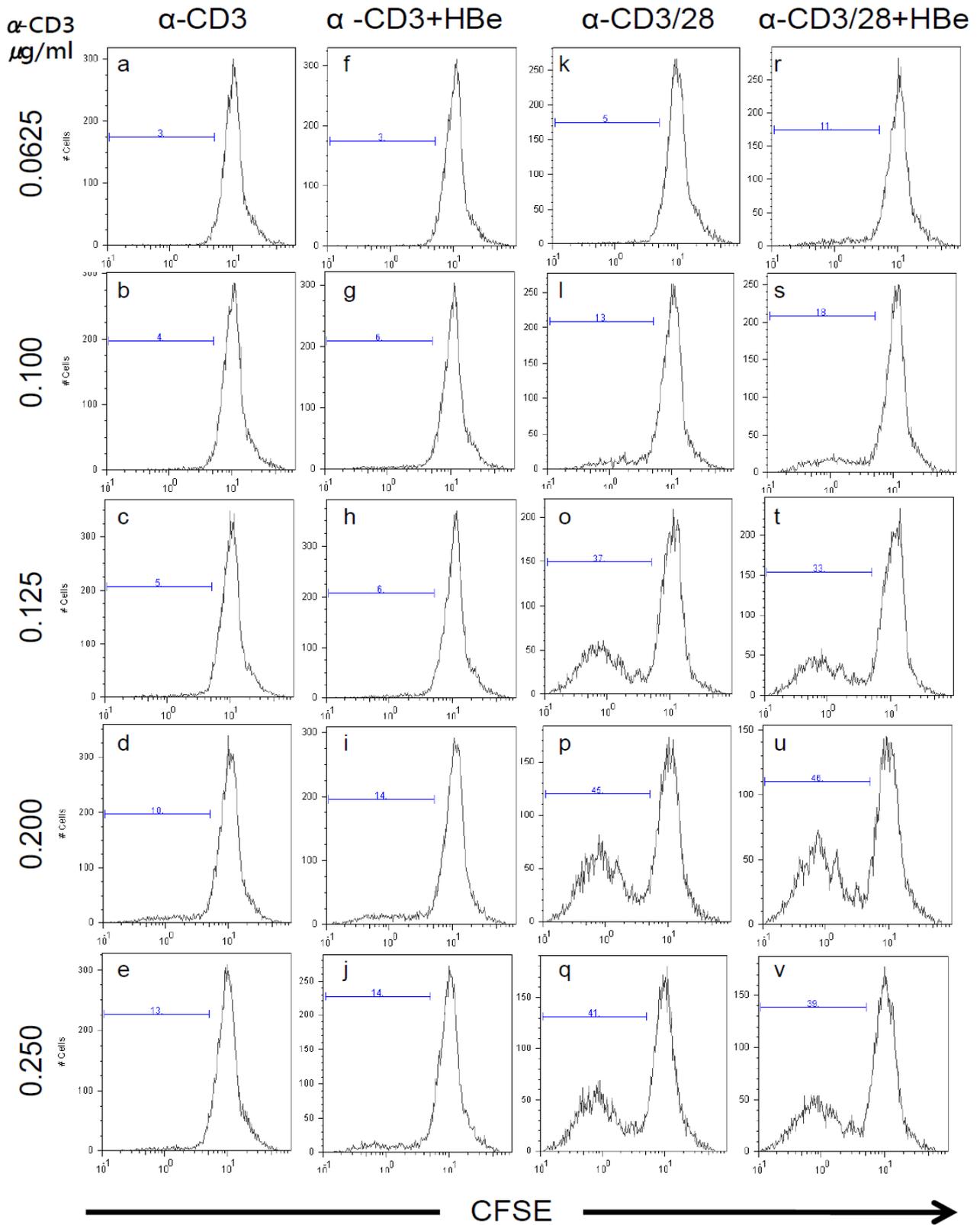


圖十九、不含抗體與 anti-CD28 抗體處理下，HBe 蛋白對於 CD3<sup>+</sup>T 細

### 胞分裂比例及 CD3<sup>+</sup>T 細胞之純度

a 圖為 C57BL/6J Nar 小鼠取得的脾臟細胞懸浮液藉由 anti- $\mu$  與 anti- $\kappa$  抗體移除 B 細胞，純化出 CD3<sup>+</sup>T 細胞。最後以 PE-anti-CD3 complex 及分析 CD3<sup>+</sup>T 細胞比例。將 CD3<sup>+</sup>T 細胞加入預先塗有一層 10  $\mu$ g/ml 的 anti-CD28 抗體 U 型底 96 孔盤中並加入 4  $\mu$ g/ml 的 HBe 蛋白培養 3 天之 CD3<sup>+</sup>T 細胞分裂比例。b: PBS。c: anti-CD28 抗體，d: HBe 蛋白。

本圖為一次實驗三重覆的一次結果。



圖說於 68 頁

## 圖二十、HBe 蛋白在以 anti-CD3 抗體或 anti-CD3/CD28 抗體刺激 CD3<sup>+</sup>T

### 細胞分裂比例

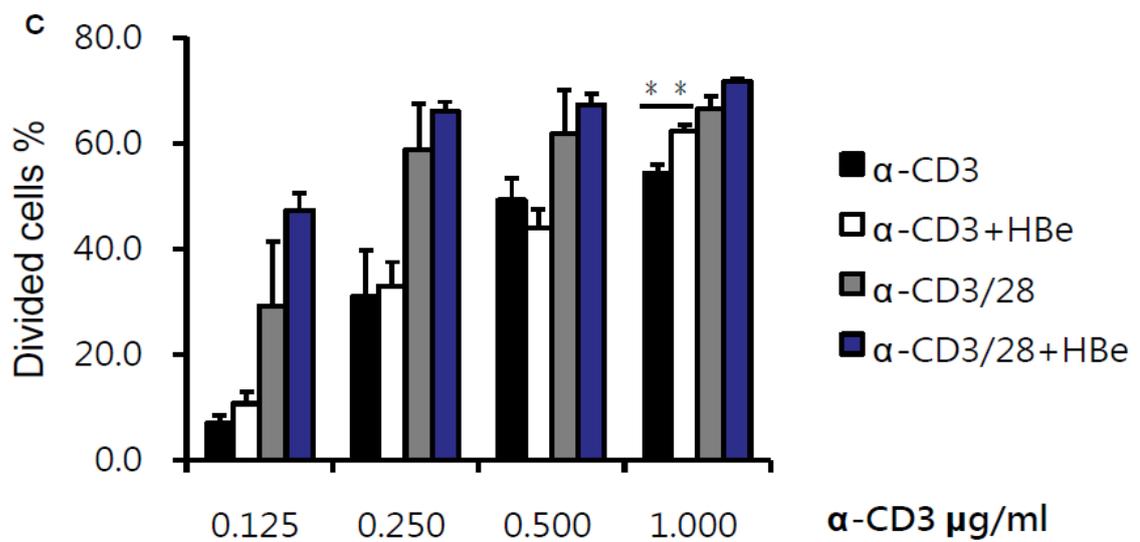
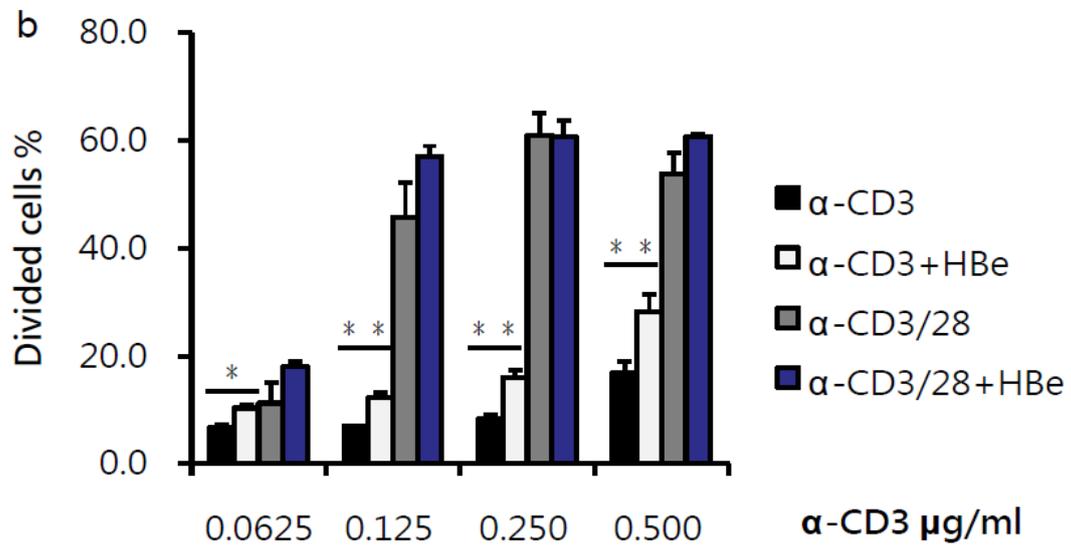
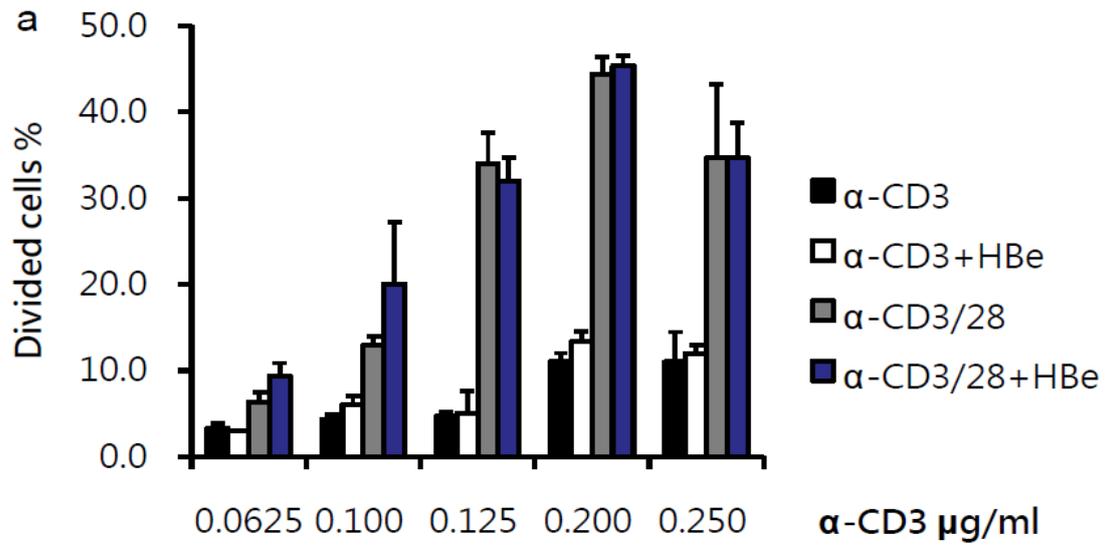
將 CD3<sup>+</sup>T 細胞加入預先塗有一層 anti-CD3 或 anti-CD3/28 抗體 U 型底 96 孔盤中與 4  $\mu$ g/ml 的 HBe 蛋白培養 3 天之 CD3<sup>+</sup>T 細胞分裂比例。

所有組別 anti-CD28 抗體為 10  $\mu$ g/ml。a~e: anti-CD3 抗體+PBS, f~j:

anti-CD3 抗體+ HBe, k~q: anti-CD3/28 抗體+PBS, r~v: anti-CD3/28

抗體+ HBe, 本圖為一次實驗三重覆的一次結果。

結果圖於 67 頁



圖說於 70 頁

圖二十一、HBe 蛋白在以 anti-CD3 抗體或 anti-CD3/CD28 抗體刺激

CD3<sup>+</sup>T 細胞分裂比例結果平均之柱狀圖

圖 a 為圖二十結果的平均柱狀圖，圖 b 中 anti-CD3 濃度 0.0625

( $P < 0.05$ )、0.125( $P < 0.01$ )、0.250( $P < 0.01$ )、0.500( $P < 0.01$ )，

圖 c 中在 1.000( $P < 0.01$ )處理下，顯著大於 PBS 控制組。

結果圖於 69 頁



## 個人資料

姓名：何岳峰

英文姓名：Yueh-feng Ho

戶籍地：台灣，嘉義

E-mail: oafrock@gmail.com, oafrock@hotmail.com

學歷：私立東海大學生命科學系學士

國立嘉義高級中學

嘉義市立蘭潭國民中學