

# 東海大學生命科學系碩士論文

B 型肝炎病毒 e 蛋白對 B 淋巴細胞之影響

The Effect of Hepatitis B Virus e Protein on B Lymphocytes

研究生：李柏鈞

Po-chun Li

指導教授：胡承波 博士

Dr. Cheng-po Hu

中華民國一〇〇年七月八日

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 李柏鈞 君所撰寫之論文

(中文)

B型肝炎病毒 e 蛋白對 B 淋巴細胞之影響

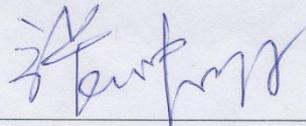
(英文)

The effect of hepatitis B virus e protein on B lymphocytes

經本委員會審定通過，特此證明。

學位考試委員會

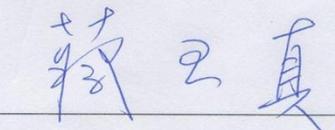
召集人



(簽名)

委員





中華民國 100 年 7 月 8 日

## 誌謝

首先感謝胡承波老師於我大學後半段及碩士班期間對我的指導，使我能學習許多對於科學與實驗應抱持的態度及看法，實獲益良多。

第二要感謝中央研究院分子生物研究所孔祥智老師提供純化細胞實驗所需之抗體，使實驗材料不虞匱乏。第三要感謝免疫學實驗室成員心慈、宇翔、光佑、岳峰、祐萱、辛霽在實驗上與日常生活上對我的照顧，特別感謝岳峰在科學討論上與我切磋琢磨，激盪出許多有趣的想法。再來要感謝生科系的老師及同儕們在我課業與研究上的幫助及建議。最後謝謝我的父母親在生活上的支持，使我能完成碩士班的學業。

## 目錄

1. 中文摘要	1
2. 英文摘要	2
3. 前言	3
4. 材料與方法	11
5. 結果	19
6. 討論	25
7. 參考文獻	31
8. 表目與圖目	37
9. 附表	39
10. 附圖	41
11. 個人資料	70

## 摘要

B 型肝炎病毒 (Hepatitis B virus, HBV) 會造成人類急性或慢性肝炎。此病毒的 e 蛋白 (HBe) 是一個非結構性蛋白，也不參與病毒複製與感染的機制。若將 e 蛋白有缺失的土撥鼠肝炎病毒感染新生土撥鼠時，病毒造成慢性感染的比例較低，若將鴨肝炎病毒 e 蛋白基因突變，則受感染的鴨隻會產生較高量的抗病毒核心抗體，這些結果都顯示 HBe 可能具有調節宿主免疫系統的功能。本實驗室過去發現 HBe 蛋白可以結合上人類及小鼠單核細胞與 B 淋巴細胞表面，且經 HBe 處理過的人類單核細胞其產生過氧化物的能力下降，移動能力降低，且會釋放多種細胞激素與趨化因子。我的研究主要針對 HBe 對於小鼠 B 淋巴細胞的影響。實驗結果發現，HBe 會誘使 resting B 淋巴細胞之 CD19、CD21、CD69、CD80、CD86、MHC I、MHC II 與 sIgM 的表現量升高，且使細胞變大，由於這些指標都與 B 淋巴細胞的活化相關，因此推測 HBe 可能會影響 B 淋巴細胞的功能。為了探討被抗原活化的 B 淋巴細胞是否會受到 HBe 的影響，本研究利用 anti-IgM 與 anti-CD40 來交聯 (crosslink) B 淋巴細胞表面受體，進而引發 B 淋巴細胞活化。在 anti-IgM 與 anti-CD40 的作用下，B 淋巴細胞之表面分子，如 CD19、CD69、CD86、MHC I 與 MHC II 分子均明顯上升，如果將 B 淋巴細胞與 anti-IgM、anti-CD40 與 HBe 共同培養時，CD19、CD69、CD86、MHC I 的表現量因 HBe 之作用更為增高，唯獨 anti-IgM 與 anti-CD40 誘導之 MHC II 上升會受到 HBe 之抑制。此抑制作用是具有特異性的，因為 HBe 不會抑制 LPS 誘導之 MHC II 增加。本論文之結果可能為一重要的發現，因為在 HBV 感染時，若對抗 HBV 的特異性 B 細胞無法適量表現 MHC II 分子，B 細胞可能無法完全活化與分化來產生中和 HBV 的抗體，進而降低宿主對抗 HBV 的能力。

## **Abstract**

Hepatitis B virus (HBV) infects human liver cells and may cause acute or chronic infection. Up to the present, the reason why HBV causes chronic infection is largely unknown. Hepatitis B virus e protein (HBe) is a nonstructural protein which is neither required for viral replication nor for viral infection. However, the woodchuck hepatitis B virus with the e deletion could not cause chronic infection in newborn woodchucks; and the ducks infected with duck hepatitis B virus with the e mutation produced an increased amount of anti-core antibodies. These findings suggest that HBe may exert an immunomodulatory function in the host. Previously, our laboratory found that HBe could bind human and mouse monocytes and B lymphocytes. HBe was shown to suppress the respiratory burst of monocytes and to modulate the secretion of cytokines/chemokines from monocytes. My thesis' focus is on the effect of HBe on mouse B lymphocytes. I found that HBe could induce the expression of activation molecules on resting B lymphocytes, such as CD19, CD21, CD69, CD80, CD86, MHC I, MHC II and sIgM, and the cell size were increased. Since these molecules are crucial for B cell activation, HBe may affect some functions of B cells. To understand whether HBe could affect the antigen-stimulated B cells, I used anti-IgM plus anti-CD40 antibodies to crosslink B cell receptors for activation. Under the stimulation of anti-IgM plus anti-CD40, CD19, CD69, CD86, MHC I and MHC II molecules were upregulated as expected. When HBe was added into the culture, the anti-IgM- plus anti-CD40-induced expression of CD19, CD69, CD86 and MHC I were further increased on B cells. On the contrary, the induction of MHC II molecules was downregulated in the presence of the HBe protein. This HBe-inhibited MHC II expression is specific for anti-IgM- plus anti-CD40-activated B cells because HBe does not suppress the expression of MHC II on LPS-activated B cells. During HBV infection, a suppressive effect of HBe on the induction of MHC II on activated B cells may result in the incomplete activation and/or differentiation of HBV-specific B cells and downregulation of anti-HBV neutralizing antibodies. This study may shed light on the understanding of the immune tolerance during HBV infection.

## 前言

B 型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 為嗜肝性病毒 (hepadnavirus) 的成員之一，其成員包含有土撥鼠嗜肝性病毒、鴨嗜肝性病毒、地松鼠嗜肝性病毒及 B 型肝炎病毒。B 型肝炎病毒對人類能造成急性 (acute) 亦或是慢性 (chronic) 感染，病毒主要透過被感染者含有病毒的血液及體液在人類中傳染，主要途徑有：新生兒圍產期 (perinatal) 感染、與感染者共用針頭、輸血及性行為 (Rehermann, 2005)。經統計，全世界有二十億人曾經受過 B 型肝炎病毒感染，且仍有三億五千萬人正遭受慢性 B 型肝炎病毒感染，每年全球更有六十萬人因急性或慢性 B 型肝炎病毒造成的併發症死亡 (World Health Organization, 2008)。台灣位於 B 型肝炎病毒感染的高盛行率地區 (圖一)，經衛生署統計台灣的成年人當中有百分之十五至二十的人為慢性 B 型肝炎帶原者，但在實施新生兒施打 B 型肝炎疫苗後，年輕族群感染慢性 B 型肝炎人數的大大降低。經臨床統計，B 型肝炎病毒慢性感染的病患將來有較高機率會罹患肝硬化亦或是肝癌 (表一) (Rehermann, 2005)。這些都顯示 B 型肝炎病毒感染是一個重要的全球公共衛生問題。

B 型肝炎病毒基因體為部分雙股的環狀 DNA，全長約 3.2 kb，該基因體具有四個相互重疊的開放讀碼區 (open reading frame)，可產

生三種表面蛋白 (surface protein)：大型、中型、主要表面蛋白，聚合酶 (polymerase)，核心蛋白 (core protein)，及兩個非結構蛋白，x 蛋白及 e 蛋白 (圖二)，B 型肝炎病毒顆粒結構為球型，直徑約為 42 nm，由核心蛋白組成的二十面體，其外被包覆著由表面蛋白組成的套膜，其內則包覆病毒本身攜帶的聚合酶及基因體 (圖三) (Liang, 2009)。

B 型肝炎病毒感染時，首先與細胞上一個未知的受體結合，引發細胞進行胞吞作用 (endocytosis)，接著病毒釋放核心顆粒，DNA 聚合酶將病毒本身的部分雙股環狀 DNA 填補成為共價封閉之雙股環狀 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA)，再利用此 DNA 為模板，產生 mRNA 及 pregenomic RNA，其中 pregenomic RNA 與聚合酶會被核心蛋白包裹成病毒顆粒，顆粒內聚合酶以 pregenomic RNA 為模板反轉錄形成病毒的負股 DNA，再成為部分雙股環狀 DNA，接著病毒顆粒會被表面蛋白包裹成完整的病毒顆粒，釋出細胞外 (圖四) (Rehermann, 2005)。

B 型肝炎病毒的慢性感染主要有三個時期：免疫耐受期 (Immunotolerance)、免疫活化期 (Immunoactive)、低度複製期 (Low replication) (圖五) (Rehermann, 2005)，在免疫耐受期，病患血液中可以偵測到大量的 HBV DNA 與 HBe 蛋白，然而病患血液中的 ALT (alanine aminotransferase) 的含量為正常，顯示病患的免疫系統並未正

常地活化來清除受病毒感染的肝細胞，此耐受期因人而異時間可以持續數十年，接著目前尚未清楚了解之原因，病患會進入免疫活化期，此時免疫系統活化，受病毒感染的肝細胞受到免疫系統攻擊，血液中 ALT 含量升高，HBV DNA 含量降低與 ALT 含量呈現波動，最後進入低度複製期，血液中僅能偵測到少量 HBV DNA，ALT 含量趨向正常，能偵測到 HBe 之抗體，但是 HBV 慢性感染之病患血液中始終無法偵測到 anti-HBs 這種保護性抗體，然而在急性感染的病患則可以偵測到 anti-HBs 抗體。目前對於慢性感染病患，免疫耐受期無法偵測到 anti-HBs 抗體的原因仍然不清楚。

B 型肝炎病毒何以形成慢性感染的確切原因目前依然不明，但其中一個主要原因可能是病毒干擾宿主的免疫系統，使得清除體內病毒的能力受到影響。而這種病原體干擾宿主免疫系統進而讓本身能在宿主体內存活的機制已有許多發現，如目前已知數種病毒藉由降低宿主細胞的主要組織相容性複合體 (major histocompatibility complex, MHC) 表現量來逃避宿主免疫系統辨識，像是人類免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 的 Tat 蛋白藉由與宿主競爭 CIITA (class II transactivator)，干擾其與細胞內 cyclin T1 結合，影響細胞 MHC II 的轉錄作用 (Kanazawa, 2000)，水痘帶狀皰狀病毒 (Varicella-zoster virus) 藉著下降細胞的 STAT1 與 JAK2 蛋白表現量來

抑制由  $\gamma$  干擾素 (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 誘導之 CIITA 的表現 (Abendroth,2000)，人類細胞巨大病毒 (Human cytomegalovirus, HCMV)藉由抑制細胞 STAT1 磷酸化 (Le Roy,1999) 及促進 JAK1 蛋白降解 (Miller, 1998) 來抑制經由  $\gamma$  干擾素誘導之 CIITA 的上升，結核桿菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 藉由表現一種 19kDa 大小之脂蛋白來抑制由  $\gamma$  干擾素誘導之 IRF1 (interferon-regulatory factor 1) 與 CIITA 的表現量 (Pai, 2003)，另外也有病毒藉由影響宿主細胞的抗原呈獻來逃避免疫系統的辨認，如腺病毒的 E3-19K 蛋白藉由與宿主細胞 TAP (transporter associated with antigen processing) 結合，抑制 tapasin 與 TAP 形成複合體，影響抗原的呈獻 (Bennett, 1999)，鼠疱疹病毒 68 型 (Murine gammaherpesvirus-68, MHV-68) 會產生一種 E3 連接酶 mK3，能專一性地使 MHC class I 接上泛蛋白 (ubiquitin)，讓 MHC class I 蛋白降解，因而干擾細胞之抗原呈獻 (Boname, 2001)，如 EB 病毒 (Epstein-barr virus) 的 EBNA1 蛋白，本身蛋白質序列有重複的甘胺酸 (glycine) 與丙胺酸 (alanine) 胺基酸序列使其可以不被細胞內的蛋白酶體分解，讓細胞無法呈獻該病毒抗原 (Levitskaya, 1995)。有的病毒干擾宿主細胞的表面受體傳遞訊息，使細胞無法啟動抗病毒機制。也有病毒產生促使感染細胞產生細胞激素干擾免疫反

應的作用，如鼠疱疹病毒 68 型的 M2 蛋白會促使 B 淋巴細胞分泌第十介白質影響 B 細胞免疫反應 (Siegel, 2008)。

B 型肝炎 e 蛋白 (HBe) 在病毒感染宿主時的表達，目前在臨床上是作為一個 HBV 正處於複製時期的指標，但對於它的生物功能並不清楚。HBe 與 HBc 共用同一個開放讀碼區，但起始碼 (start codon) 位置不同 (圖六)，HBe 蛋白為一種分泌性蛋白，前身為 pre-core 蛋白，pre-core 因含有訊息蛋白 (signal peptide)，蛋白在轉譯後會被帶往內質網 (endoplasmic reticulum, ER) 經修飾及切除 signal peptide 後才是完整的 e 蛋白，接著被釋出胞外 (Milich, 2003)。在所有的嗜肝性病毒都有保留此 e 蛋白基因的同源序列，但 e 蛋白並不參與嗜肝性病毒的複製機制與感染機制 (Chen, 1992)，若從生物演化的角度上看來，e 蛋白可能對於嗜肝性病毒具有某種重要的功能，而沒有在病毒演化中被捨棄。在前人的研究中發現，當土撥鼠嗜肝性病毒無法產生 e 蛋白時，病毒感染土撥鼠後造成慢性感染的比例會下降 (Cote, 2000)，以及在鴨嗜肝性病毒中 e 蛋白基因突變會造成病毒感染鴨子後的抗核心蛋白抗體生成量增加 (Zhang, 1999)，顯示 e 蛋白可能具有干擾免疫系統的功能。

本實驗室過去發現 HBe 會結合人類及小鼠的單核細胞、巨噬細胞及 B 淋巴細胞，而 T 淋巴細胞則否 (Chen, 2000)，顯示 HBe 或許藉

由結合這些細胞而影響其免疫功能。過去研究發現 HBe 與人類單核球細胞作用後會促使細胞分泌第六介白質 (IL-6)、第十介白質 (IL-10)，第二趨化因子 (CCL2)、第四趨化因子 (CCL4)，並會抑制單核細胞產生過氧化物的能力 (Lu, 2003)，抑制細胞的移動。對於 T 淋巴細胞，雖然 HBe 不會結合上細胞表面，但是會藉由影響抗原呈獻細胞 (antigen presenting cell, APC) 來影響抗原特異性 T 細胞的活化 (Ho, 2010)。由於 HBe 具有結合人類及小鼠 B 淋巴細胞的能力，顯示 HBe 可能會影響 B 淋巴細胞功能。

B 淋巴細胞在免疫系統中的功能為分泌抗體，當身體存有外來抗原時，該抗原會結合到具抗原特異性的 B 細胞受體 (B cell receptor, BCR)，受體由細胞膜上的免疫球蛋白 (surface immunoglobulin, sIg) 所組成，抗原結合受體促使該複合體於細胞膜上聚集，並引發細胞內的訊息傳遞，引發與 B 淋巴細胞分化有關的活化分子表現量上升，如 CD19、CD80、CD86、MHC II。在功能上，CD80、CD86 會與 T 淋巴細胞上的 CD28 結合，傳遞活化訊息給 T 細胞 (Chen, 2004)，MHC class II 用來呈獻抗原胜肽、CD19 與 B 細胞上 CD21、CD81 結合形成 B 細胞共同受體 (B cell coreceptor)，該共同受體可幫助 B 細胞受體與抗原結合並傳遞活化訊號 (Tsubata,1999)。此 B 淋巴細胞藉由 MHC class II 將抗原胜肽呈獻給抗原特異性 T 淋巴細胞，接著 T

淋巴細胞藉由 CD40L 與 B 淋巴細胞上的 CD40 結合，刺激 B 淋巴細胞活化，活化後的 B 淋巴細胞進一步分化成漿細胞 (plasma cell) 產生抗體，而部分細胞則形成記憶細胞儲存於骨髓內。此外小鼠 B 淋巴細胞有一類模式辨認受體 (pattern recognition receptors, PRR) 可辨認微生物上特有的分子結構，例如類鐸受體第四型 (Toll-like receptor 4, TLR4) 可辨認細菌內毒素，藉此引發細胞活化，對抗微生物感染。由於受到 B 型肝炎病毒慢性感染的病患，體內無法偵測到抗 HBs (anti-HBs) 的保護性抗體，所以 e 蛋白或許有可能藉由與 B 淋巴細胞結合來影響 B 細胞的功能。

我的實驗係利用 C57BL/6 小鼠的脾臟 B 淋巴細胞為實驗對象，我將 B 淋巴細胞分成兩類去探討 HBe 的作用，一類是未活化的 B 細胞，也就是未受抗原活化的 B 淋巴細胞，另一類是受抗原活化的 B 淋巴細胞，實驗設計上，由於 B 細胞受體具有多樣性，具某一類抗原特異性的 B 淋巴細胞數量不多，故我利用 anti-IgM 抗體處理 B 細胞，模擬抗原交聯 B 細胞受體與處理 anti-CD40 抗體模擬 T 細胞給予 B 細胞的活化訊號，來使實驗的 B 淋巴細胞活化。首先，對於未活化的 B 淋巴細胞，與 HBe 進行共同培養，藉由流式細胞儀測量 B 淋巴細胞表面分子 (B cell surface molecules) 的表現量，發現 HBe 對於未活化的 B 淋巴細胞 (Resting B cell) 會促使其表面分子表現量上升，

如 CD19、CD21、CD69、CD80、CD86、MHC I、MHC II 與 sIgM，且會促使細胞變大，顯示 HBe 蛋白可以調節 B 淋巴細胞的表面分子表現。但是對於受到 anti-IgM、anti-CD40 活化的 B 淋巴細胞（模擬受抗原結合活化之 B 淋巴細胞），HBe 會使 B 淋巴細胞的 MHC class II 表現量下降。由於 MHC class II 分子參與在 B 淋巴細胞跟 T 淋巴細胞作用進而促使 B 淋巴細胞活化之機制有關，顯示 HBe 可能藉由下降抗原特異性的 B 淋巴細胞 MHC class II 表現量，影響 B 細胞呈現抗原，使 B 淋巴細胞無法正常活化與分化來產生中和病毒之抗體，藉此干擾宿主免疫系統。

## 材料與方法

### 小鼠

實驗使用 C57BL/6JNarl 品系之公小鼠 (國家實驗動物中心, 台北), 小鼠平均週齡為 6 至 14 週。

### 蛋白質膠體電泳

將蛋白質樣本與兩倍濃度之 Sample buffer ( 2.5% SDS, 20% glycerol, 125mM Tris-HCl, 0.01% bromophenol blue, 10%  $\beta$ -mercaptoethanol, pH 6.8) 以體積比 1:1 混合, 於 95°C 水中加熱 10 分鐘, 之後參考 Gallagher 建立的膠體電泳法( Gallagher, 1998)進行 SDS-10% 膠體之電泳。

### 銀染

蛋白質膠體電泳後之膠體以銀染試劑 (Silver staining kit, Invitrogen, USA) 呈色。膠體以 100 毫升 fix solution ( 40% ethanol, 10% acetic acid) 於室溫下固定 16 小時, 接著以 100 毫升之 30% 酒精浸泡 10 分鐘, 再用 100 毫升之 sensitize solution 浸泡 10 分鐘, 以 100 毫升之 30% 酒精浸泡 10 分鐘, 接著用 100 毫升去離子水浸泡 10 分鐘, 再以 100 毫升 staining solution 染色 15 分鐘, 用 100 毫升去離子水浸泡 30 秒, 接著用 100 毫升 development solution 呈色, 呈色完成後加

入 10 毫升 stopping solution 浸泡 10 分鐘，之後用相機拍攝膠體。

### **Coomassie blue 染色**

蛋白質膠體電泳後膠體以 Coomassie Blue 染色法呈色。膠體以 fix solution (50% methanol, 10% acetic acid) 於室溫固定 2 小時後，置於 coomassie blue staining solution (0.1% Coomassie Blue, 50% methanol, 10% acetic acid) 染色 30 分鐘，置於 destaining solution (40% methanol, 10% acetic acid) 做退染，之後用相機拍攝膠體。

### **西方點墨法**

蛋白質膠體電泳完，膠體用半乾式轉漬法以 70 毫安培電泳 2 小時，將膠體上之蛋白質轉漬於 PVDF (polyvinylidene fluoride) 膜上，之後將 PVDF 膜置於含有 5% 脫脂牛奶之 PBS 溶液中，於 4°C 下浸泡 16 小時，之後以含有 e 抗原抗體 (rabbit) 之 1% 脫脂牛奶 (1:1000) 於室溫下作用半小時，接著使用 washing buffer (PBS with 0.05% Tween 20) 清洗 3 次，每次 10 分鐘，接著以 anti-rabbit IgG (goat)-HRP 之 1% 脫脂牛奶 (1:2000) 於室溫下作用 1 小時，之後使用 washing buffer 清洗 3 次，每次 10 分鐘，最後以 Western light (Perkinelmer Life Science, USA) 呈色試劑呈色，將 PVDF 膜浸泡於 Luminal reagent 與 Oxidizing reagent(1:1) 的混合溶液中 1 分鐘，之後以訊號冷光分析儀拍攝膜上訊號分布。

## 流式細胞儀

細胞表面分子之表現量使用流式細胞儀 (Cyflow, Partec, Germany) 進行測量。將待測細胞懸浮於 100 微升之 4°C PBS 中，以螢光抗體進行染色，B220-PE、CD19-FITC、CD21-FITC、CD80-FITC、CD86-FITC、F4/80-PE、CD3-PE、MHC class I-FITC、MHC class II-FITC、CD69-PE (BD Pharmigen)、CD81-biotin、streptavidin-FITC、IgM-FITC、IgD-PE、CD19-FITC、CD21-FITC (eBioscience)，染色時間為 30 分鐘，之後加入 2 毫升之 PBS 清洗，以 400g 離心 5 分鐘，丟棄上清液，懸浮細胞塊於 4°C 之 1 毫升 PBS 中，之後以流式細胞儀測量細胞所帶有的螢光強度，以 medium fluorescent intensity 進行量化，最後用流式細胞儀數據分析軟體進行結果分析。

## 蛋白質之定量法

B 型肝炎病毒 e 蛋白之定量是利用蛋白定量試劑 (BCA protein assay kit, PIERCE, USA) 進行定量，配置好序列稀釋之標準品，接著將 reagent A (sodium carbonate, sodium bicarbonate, sodium tartrate, 0.1N sodium hydroxide) 與 reagent B (4% cupric sulfate pentahydrate) 以體積比 50:1 方式混合配置成 working reagent，待測樣品和標準品與 working reagent 以體積比 1:8 方式混合，於 60°C 下作用 30 分鐘，之

後用分光光度計測量波長 570 nm 之吸光值，用序列稀釋標準品之吸光值與其對應濃度繪製標準曲線，待測樣品之吸光值可與標準曲線進行換算，則可得到樣品蛋白質濃度。

### **提取 pRSET-HBe 質體**

利用純化質體試劑 (High-speed plasmid mini kit, Geneaid, USA) ，進行 pRSET-HBe 質體的純化。將含有 pRSET-HBe 的大腸桿菌 DH5 $\alpha$  菌株培養於含有 Ampicillin (100  $\mu$ g/ml, Sigma) 之 10 毫升液態 LB 培養基於 50 毫升離心管中，在培養箱中以 180 轉/分，於 37 $^{\circ}$ C 下培養 16 小時，之後將吸取 1.5 毫升之菌液於 1.5 毫升微離心管，以 15000g 離心 1 分鐘，之後加入 200 微升之 PD1 buffer，劇烈震盪，再加入 200 微升之 PD2 buffer，翻轉 10 次後，靜置 2 分鐘，加入 300 微升 PD3 buffer，翻轉 10 次後，以 15000g 離心 2 分鐘，將上清液吸取置試劑所提供之收集管，以 15000g 離心 30 秒，加入 400 微升 W1 buffer，以 15000g 離心 30 秒，加入 600 微升 Wash buffer，以 15000g 離心 30 秒，之後去掉管內液體，以 15000g 離心 3 分鐘，最後加入 50 微升 elution buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.5) 靜置 10 分鐘，以 15000g 離心 30 秒，收集含 plasmid 之溶液於 1.5 毫升微離心管。

## 內毒素之測定

樣本內毒素的測定是用蠟血試劑 (LAL assay kit, 昶安, 台北) 進行測量，首先利用內毒素標準品配置序列濃度稀釋標準品，之後將蠟血萃取物混合液與序列稀釋未知樣本與序列濃度稀釋標準品混合，分別置於九十六微孔盤中，使用 Thermo multiscan spectrophotometer 測量 OD<sub>405</sub> 之吸光值，與標準曲線換算可得到樣本內毒素濃度。

## 純化 B 型肝炎病毒 e 蛋白

利用氯化鈣轉型法將 pRSET-HBe 質體置入大腸桿菌 BL21 細菌中，將菌液塗抹在含有 Ampicillin (100 µg/ml, Sigma, USA) 之固態 LB 培養基上，在培養箱中以 37°C 度下培養 16 小時，之後挑選形成菌落之菌株，做為往後用來表達 B 型肝炎病毒 e 蛋白之菌株。將得到的 pRSET-HBe 之表達菌株，培養在含有 Ampicillin (100 µg/ml) 之 10 毫升液態 LB 培養基於 50 毫升離心管中，在培養箱中以 180 轉/分，於 37°C 下培養 16 小時，之後吸取 4 毫升之菌液到含有 Ampicillin (100 µg/ml) 之 200 毫升液態 LB 培養基於 1000 毫升震盪三角錐形瓶中，在培養箱中以 160 轉/分，於 37°C 下培養，當培養到菌液 OD<sub>600</sub> 吸光值為 0.6 時，加入 IPTG (isopropyl β-D-thiogalactoside, Sigma) 使其 IPTG 終濃度為 1mM，之後培養箱中以 160 轉/分，於 37°C 下培養 3 小時，將 200 毫升菌液置入 250 毫升高速離心管，以 8000g 於 4°C 下

離心 30 分鐘，得到含有 B 型肝炎病毒 e 蛋白之菌塊。將得到含有 B 型肝炎病毒 e 蛋白之菌塊，用 lysis buffer (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 6 M GuHCl, pH 8.0) 將菌塊溶解，每 200 毫升菌液所得之菌塊加入 18 毫升 lysis buffer，於室溫下震盪溶解 (100 轉/分) 1 小時，之後將溶液吸取到 30 毫升高速離心管，以 10000g 於 4°C 下離心 30 分鐘，取得上清液，於上清液加入 imidazole (終濃度 20mM, MERCK, Germany)，將 6 毫升上清液與 2 毫升鎳微珠瓊脂 (Qiagen, Germany) 於管柱中進行混合，用旋轉台在室溫以 25 轉/分混合 1 小時，之後將管柱架於台上，讓溶液濾出，加入 8 毫升 wash buffer 1 (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 8 M Urea, pH 6.3) 進行沖洗 2 次，再加入 8 毫升 wash buffer 2 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0) 進行沖洗 2 次，之後以 4 毫升 elution buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0) 將 B 型肝炎病毒 e 蛋白沖洗出來，將蛋白溶液置於透析模 (7k m/w, Thermo, USA) 中，在 4°C 下以體積比 1:1000 與 PBS 進行透析，得到溶於 PBS 的 B 型肝炎病毒 e 蛋白溶液。

### **去除 B 型肝炎病毒 e 蛋白溶液中的內毒素**

利用可移除溶液中內毒素之管柱 (EndoTrap red, Profos AG, Germany) 去除 B 型肝炎病毒 e 蛋白溶液中的內毒素。首先管柱以 3

毫升 regeneration buffer 沖洗 2 次，再以 equilibration buffer 沖洗 2 次，之後將 B 型肝炎病毒 e 蛋白溶液通過管柱，可將溶液內毒素移除。

### 純化小鼠脾臟 B 淋巴細胞

C57BL/6JNarl 公小鼠以二氧化碳犧牲後取出小鼠脾臟，置於含有 5 毫升 MD (Mishell-Dutton) 培養基 (minimum essential medium 1 package (Invitrogen)、50 mM HEPES、15.8mM NaHCO<sub>3</sub>、 $5.58 \times 10^{-2}$   $\mu$ M 2-mercaptoethanol、1X pen-strep (Biological Industries)、5% fetal bovine serum) 之 6 公分細胞培養皿中，於無菌操作台內用鑷子將脾臟撕碎並以玻璃滴管沖出組織內細胞，接著將含有細胞之培養基通過含有填充棉花之玻璃滴管去除不要的組織碎片，接著再加入 5 毫升 MD 培養基重複沖洗培養皿，收集所得總體積 10 毫升含有細胞之 MD 培養基置於 15 毫升離心管以 400xg，離心 5 分鐘，丟棄上清液，下層細胞塊打散後加入 10 毫升 ACK buffer (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10mM NaHCO<sub>3</sub>, 1mM EDTA)，接著以 400xg，離心 5 分鐘，丟棄上清液，下層細胞塊打散後加入 10 毫升 MD 培養基，將所得 10 毫升含有細胞之 MD 培養基置於 10 公分細胞培養皿，於培養箱內 (37°C，5% CO<sub>2</sub>) 培養 1 小時，之後取培養皿上層非貼附性細胞，將含有細胞的培養基以 400xg，離心 5 分鐘，丟棄上清液，下層細胞塊打散後加入 5 毫升 MD 培養基，將培養基置於預先塗抹 anti-CD8 抗體之 10 公分細胞培養皿，於培養

箱內 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 培養 30 分鐘，之後取培養皿上層非貼附性細胞，將含有細胞的培養基以 400xg，離心 5 分鐘，丟棄上清液，下層細胞塊打散後加入 5 毫升 MD 培養基，將培養基置於預先塗抹 anti-CD4 抗體之 10 公分細胞培養皿，於培養箱內 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 培養 30 分鐘，之後取培養皿上層非貼附性細胞，此為實驗所需要的小鼠脾臟 B 淋巴細胞族群，細胞純度以流式細胞儀偵測 B 細胞表面分子(B220) 判別，平均 B 細胞純度為 95%。

#### **體外活化小鼠脾臟 B 淋巴細胞**

將小鼠脾臟 B 淋巴細胞以  $1 \times 10^5$  個細胞，培養於 96 平底微孔盤中，總體積為 150 微升，活化 B 淋巴細胞組別含有 anti-mouse IgM (Jackson ImmunoResearch, USA), anti-mouse CD40 (eBioscience, USA), 5 $\mu$ g/ml、10 $\mu$ g/ml，培養於培養箱內 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 24 與 48 小時，之後以流式細胞儀測量活化後 B 淋巴細胞表面分子。

## 結果

### B 型肝炎病毒 e 蛋白 (HBe) 的製備

實驗所需之 HBe 蛋白來自實驗室前人製備好之 pRSET-HBe 質體 (圖七)，經大腸桿菌表達後，經由鎳微珠瓊脂管柱來純化 e 蛋白而得 (圖八)。由於使用大腸桿菌當作表達蛋白之系統，蛋白樣本含有內毒素 (Lipopolysaccharides, LPS)，而本實驗小鼠 B 淋巴細胞上具有內毒素受體一類鐸受體第四型 (Toll-like receptor 4, TLR4)，若樣本含有內毒素則會在實驗中干擾小鼠 B 淋巴細胞本身的功能，故利用可結合內毒素的管柱將內毒素移除，移除內毒素後以蠶血試劑測量內毒素含量，發現移除了約 99.9% 的內毒素，此為最後實驗所需之 HBe 蛋白 (圖九)。

### 小鼠 B 淋巴細胞的製備

為了得到高純度的 B 淋巴細胞，將小鼠脾臟細胞，經 anti-CD4 與 anti-CD8 的培養皿把 T 淋巴細胞族群移除後，得到 B 淋巴細胞族群，並以流式細胞儀鑑定 B 淋巴細胞純度 (圖十)，平均 B 細胞純度為 95%。

### HBe 蛋白會刺激小鼠 B 淋巴細胞表面分子表現量上升

為了了解 HBe 蛋白對小鼠 B 淋巴細胞的作用，我將小鼠 B 淋巴

細胞與 PBS 控制組或三種不同濃度的 HBe 蛋白 (0.5, 1, 1.5 $\mu$ g/ml) 共同培養 48 小時，之後以流式細胞儀測量 B 淋巴細胞的表面分子表現量 (CD69、CD80、CD86、MHC I、MHC II) 及 B 細胞共同受體表現量 (CD19、CD21、CD81)。結果顯示，HBe 蛋白具有刺激 B 淋巴細胞表面分子表現量上升的能力 (圖十一、圖十三)。隨著 HBe 濃度提高，CD80 (圖十二 a)、CD86 (圖十二 b)、MHC I (圖十二 c)、MHC II (圖十二 d)、CD19 (圖十四 a)、CD21 (圖十四 b)、CD69 (圖十四 c) 表現量與 PBS 控制組相比皆有顯著性的上升。然而，因 HBe 蛋白樣本內含有微量的內毒素，為了排除表面分子表現量上升是由 HBe 蛋白樣本內毒素所導致，實驗均同時有內毒素控制組 (圖十五、圖十六)，將 B 淋巴細胞與 0.6 ng/ml 的內毒素進行培養，此 0.6 ng/ml 的內毒素為 HBe 蛋白處理的最高濃度組 (1.5 $\mu$ g/ml) 所含有的內毒素，接著一樣去測量 B 淋巴細胞的表面分子表現量：CD69 (圖十六 b)、CD80 (圖十五 a)、CD86 (圖十五 b)、MHC I (圖十五 c)、MHC II (圖十五 d)、B 細胞共同受體表現量：CD19 (圖十六 a)、CD21 (圖十六 c)、CD81 (圖十六 d)。結果顯示以 0.6 ng/ml 內毒素處理之 B 淋巴細胞組別，其表面分子的表現量沒有比處理 1.5 $\mu$ g/ml HBe 蛋白來的高，顯示因處理 HBe 蛋白所導致的表面分子表現量上升與 HBe 蛋白樣本所含的 LPS 沒有直接關係。

## **HBe 蛋白會刺激小鼠 B 淋巴細胞變大**

實驗結果顯示 HBe 會刺激 B 淋巴細胞表面分子表現量上升，為了解 B 淋巴細胞是否處於類似活化時的狀態，所以我量測另一個 B 淋巴細胞活化時的指標：細胞大小的改變。將純化後的 B 淋巴細胞處理 HBe 蛋白 (0.5, 1, 1.5 $\mu$ g/ml) 48 小時後，以流式細胞儀測量細胞大小 (圖十七)，隨著處理 HBe 蛋白的濃度提高，B 淋巴細胞的大小也跟著變大 (表二)，顯示 HBe 有刺激 B 淋巴細胞變大的能力。

## **HBe 蛋白會刺激小鼠 B 淋巴細胞表面 IgM 增多**

B 細胞活化時的另一個指標，細胞表面免疫球蛋白 M (IgM) 與 D (IgD) 的表現量改變，B 淋巴細胞活化時 IgM 表現量上升，IgD 表現量則下降。由於想進一步確認 HBe 是否會影響 IgM 與 IgD 的表現量，我將純化後的 B 淋巴細胞處理 PBS、內毒素 (0.6 ng/ml) 或 HBe 蛋白 (1 $\mu$ g/ml) 24 及 48 小時後，以流式細胞儀測量細胞表面 IgM 與 IgD 表現量 (圖十八)，結果顯示 B 淋巴細胞以 HBe 蛋白處理 24 及 48 小時後，IgM 表現量會隨時間上升 (圖十九 a)，IgD 則否，且 IgD 並沒有因為處理 HBe 後而表現量減少 (圖十九 b)，而內毒素處理的組別並沒有差異。顯示 HBe 所造成的 IgM、IgD 改變與 HBe 蛋白樣本所含的內毒素無直接關係。

## B 型肝炎病毒 e 蛋白會抑制活化後的 B 淋巴細胞 MHC II 表現量上升

由於上述的實驗是關於 HBe 對休止期的 B 淋巴細胞 (Resting B cell) 的作用，我們想了解 HBe 蛋白對於受抗原活化之 B 淋巴細胞的作用，但受限於 B 細胞受體的多樣性，在正常小鼠內受抗原活化的抗原特異性 B 細胞族群數量相當少，不易量測，故我利用體外活化 B 淋巴細胞方法，以抗體交聯 B 細胞受體與以抗體結合 B 細胞上的 CD40，將抗 B 細胞受體(anti-IgM)及抗 CD40 (anti-CD40)的抗體拿來處理 B 淋巴細胞，模擬 B 細胞活化時所需要的訊號，使大部分的 B 細胞活化。利用此方法，將兩種  $\alpha$ -IgM,  $\alpha$ -CD40 抗體濃度 (5 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml) 活化的 B 淋巴細胞同時加入 PBS 或 HBe 蛋白 (1 $\mu$ g/ml) 處理 48 小時後，測量 B 細胞 CD19、CD69、CD86、MHC I、MHC II 的表現量 (圖二十)。結果顯示，活化的 B 淋巴細胞在處理 HBe 蛋白後，CD19 (圖二十一 d)、CD69 (圖二十一 a)、CD86 (圖二十一 b)與 MHC I (圖二十一 e)表現量有顯著性的上升，但 MHC II 是顯著性的下降 (圖二十一 c)，由於前面的實驗以 HBe 蛋白處理休止期 B 細胞 (Resting B cell) 會使 CD19、CD69、CD86、MHC I 與 MHC II 表現量上升，但對於活化的 B 淋巴細胞 (activating B cell)，HBe 蛋白卻是使 MHC II 表現量下降，顯示此抑制 MHC II 表現量上升的作用是專一性的針對在活化的 B 細胞上。

而為了了解此作用是否與 B 細胞活化程度有關，我將三種  $\alpha$ -IgM,  $\alpha$ -CD40 抗體濃度 (0.5 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml, 1.5 $\mu$ g/ml) 活化的 B 淋巴細胞同時加入 PBS 或 HBe 蛋白(1 $\mu$ g/ml) 處理 24、48、72 小時後，觀察細胞表面 MHC II 表現量(圖二十二)。結果顯示，三種  $\alpha$ -IgM,  $\alpha$ -CD40 抗體濃度處理下的 B 淋巴細胞，在受到 HBe 蛋白處理 72 小時後，MHC II 的表現量與 PBS 相比，均是顯著性的被抑制(圖二十三 c)。但與 24、48 小時相比，此抑制作用在  $\alpha$ -IgM,  $\alpha$ -CD40 抗體濃度 (0.5 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml)則沒有作用，顯示此作用與受到  $\alpha$ -IgM,  $\alpha$ -CD40 抗體處理的時間有關。

為了排除此抑制 MHC II 作用是受到 HBe 蛋白樣本所含內毒素而導致，我將 B 淋巴細胞以三種  $\alpha$ -IgM,  $\alpha$ -CD40 抗體濃度：2.5  $\mu$ g/ml、5  $\mu$ g/ml、10  $\mu$ g/ml 處理 B 淋巴細胞使其活化，同時處理 PBS 或五種內毒素濃度 (1 ng, 10 ng, 100 ng, 1000 ng, 10000 ng/ml) 48 小時後，觀察 MHC II 表現量 (圖二十四)。結果顯示，當活化後的 B 淋巴細胞處理 1ng/ml 內毒素 48 小時後，MHC II 表現量與 PBS 相比，沒有發現有顯著性的抑制作用(圖二十四 a,b,c)，此濃度高於 HBe 處理組所含的 LPS 濃度 (0.6 ng/ml)，而抑制作用要到 10 ng/ml 內毒素處理才有顯著性差異，顯示此 HBe 蛋白抑制 MHC II 表現量的作用與 HBe 蛋白樣本內所含的內毒素無直接關係。

為了了解此抑制作用是否專一性的作用在受抗原活化的 B 淋巴細胞 (本實驗以抗體交連 B 細胞受體模擬抗原結合)，我以五個不同的內毒素濃度活化 B 淋巴細胞 (1 ng, 10 ng, 100 ng, 1000 ng, 10000 ng/ml)，同時處理 PBS 或 HBe (1  $\mu$ g/ml) 48 小時後，測量 MHC II 表現量是否會受到 HBe 處理而下降。結果顯示，B 淋巴細胞在不同的內毒素濃度活化下並處理 PBS 或 HBe (1 $\mu$ g/ml) 48 小時後，MHC II 表現量並沒有受到抑制 (圖二十五)，顯示此 HBe 抑制 MHC II 表現量的作用是專一性的作用在受到  $\alpha$ -IgM,  $\alpha$ -CD40 抗體處理而活化的 B 淋巴細胞。

## 討論

B 型肝炎病毒 e 蛋白確切功能仍然不明，目前臨床上是將 e 蛋白的表達與病毒正在複製具有關聯性，但目前已知 HBe 蛋白與病毒的複製與感染機制無關 (Chen, 1992)，然而所有的嗜肝性病毒皆有保留相似於 e 蛋白基因的同源序列，顯示此蛋白對於嗜肝性病毒可能具有某種重要的功能，此外土撥鼠嗜肝性病毒若無法產生 e 蛋白，則病毒造成慢性感染的比例就會下降 (Cote, 2000)，而鴨嗜肝性病毒若 e 蛋白基因突變則受感染之鴨產生抗病毒核心抗體的生成量會上升 (Zhang, 1999)，皆顯示 e 蛋白可能具有調節宿主免疫系統的功能。由於過去在實驗室研究中，發現 HBe 可以結合到單核球細胞、巨噬細胞與 B 淋巴細胞表面 (Chen, 2000)，且單核球細胞受到 HBe 蛋白處理後，其產生過氧化物能力及移動能力受到抑制，且會產生許多種免疫相關細胞激素與趨化因子，顯示結合上免疫細胞的 e 蛋白會影響該免疫細胞的功能。且先前實驗室研究也發現 e 蛋白會藉由影響抗原呈獻細胞來影響 T 細胞的活化 (Ho, 2010)。

由於過去本實驗室證明 HBe 可以結合上 B 淋巴細胞表面，且 B 細胞的功能為產生抗體，在臨床上受到 B 型肝炎病毒慢性感染的病患無法偵測到抗 HBs 的抗體，顯示 B 細胞功能有可能受到 HBe 影響，故我的實驗中針對 B 細胞進行探討。我將實驗的對象 B 細胞分類成

兩種狀態，一類是未受到抗原活化的 B 淋巴細胞 (休止期 B 細胞)，另一類是受到抗原活化的 B 淋巴細胞。實驗結果發現處理 HBe 蛋白會使未活化的 B 淋巴細胞表面分子 CD19、CD21、CD69、CD80、CD86、MHC I、MHC II 上升 (圖十一、圖十三)、細胞變大 (表二)，IgM 表現量上升 (圖十九)，顯示 HBe 蛋白結合上 B 淋巴細胞具有對細胞傳遞訊息的能力，且實驗結果與蛋白樣本所含內毒素無直接關連 (圖十五、圖十六)。由於 B 細胞表面分子與往後 B 淋巴細胞要進行分化有關，如 CD19、CD80、CD86、MHC II。CD80、CD86 在 B 淋巴細胞活化過程中會與 T 淋巴細胞的 CD28 進行結合，給與 T 細胞活化訊號幫助細胞活化 (Chen, 2004)，CD19 可與 CD21、CD81 形成 B 細胞共同受體，此共同受體可幫助 B 細胞受體與抗原的結合 (Tsubata, 1999)，MHC II 可呈獻病毒抗原給 T 細胞辨認，幫助 B 淋巴細胞活化 (Vyas, 2008)，推測影響 B 淋巴細胞活化分子表現量有可能會影響該宿主的免疫功能，然而 HBe 蛋白使表面分子上升的真正功能並不清楚。且 e 蛋白在 B 淋巴細胞上的受體目前仍然未知，故 e 蛋白是藉由哪一個訊息傳遞而影響未活化 B 淋巴細胞，仍需要進一步研究。

HBe 蛋白對於受抗原活化的 B 淋巴細胞之影響的實驗，受限於 B 細胞受體具多樣性的特性，小鼠體內具某抗原特異性的細胞數量並不多，測量不易，故我利用體外活化 B 淋巴細胞的方法來活化 B 淋巴

細胞，藉由處理 B 淋巴細胞 anti-IgM 抗體來交聯 B 細胞受體，模擬 B 細胞受體被抗原結合而使受體之間於細胞膜上聚集，使細胞傳遞活化訊息，並使用 anti-CD40 抗體結合上 B 淋巴細胞表面上的 CD40，來模擬 B 淋巴細胞活化過程中，抗原特異性 T 細胞 CD40 ligand 與 B 淋巴細胞表面的 CD40 結合的過程，藉這兩個活化訊息，來模擬 B 淋巴細胞受到抗原活化，藉此探討 HBe 對於受抗原活化之 B 淋巴細胞有何影響。實驗結果顯示，處理 HBe 蛋白後，活化的 B 淋巴細胞表面分子表現量如 CD19、CD69、CD86、MHC I 具有顯著性的增加，跟先前以 HBe 蛋白處理未活化之 B 淋巴細胞的結果相同，推測可能 HBe 蛋白使表面分子上升的機制在未活化與活化的 B 淋巴細胞中相同。然而在 MHC 表現量上，活化後的 B 淋巴細胞處理 HBe 蛋白會使 MHC II 表現量下降，但 MHC I 表現量上升，顯示 HBe 蛋白會抑制活化的 B 淋巴細胞 MHC II 表現量上升，而且實驗結果與 HBe 蛋白樣本內所含的內毒素無直接關聯。此外以內毒素活化 B 淋巴細胞，並以 HBe 處理後並沒有發現 MHC II 表現量受到抑制，顯示此抑制 MHC II 表現量上升的作用是專一性的作用在受抗原活化的 B 淋巴細胞上，但機制目前不清楚。

B 淋巴細胞活化過程中，MHC II 的表現具有重要的功能。B 淋巴細胞的活化需要兩個活化訊息傳遞 (McHeyzer-Williams, 2005)，首先

當 B 淋巴細胞上的 B 細胞受體受到抗原結合，會給予 B 淋巴細胞第一個活化訊號，接著 B 細胞會將抗原經由胞吞作用送入細胞內 (Vascotto, 2007)，分解成小段的胜肽鏈，之後利用 MHC II 分子將胜肽鏈表現在細胞膜上，此時具抗原特異性的 T 淋巴細胞會藉由 T 細胞受體 (T cell receptor, TCR) 辨識 B 細胞上具有抗原胜肽鏈的 MHC II，促使 T 細胞 CD40 ligand (CD40L) 表現量增加，接著 T 細胞的 CD40L 與 B 細胞的 CD40 結合，給與 B 細胞另一個活化訊號，使 B 細胞可以進入到完全活化階段，移動到生長中心 (germinal centers)，進入細胞週期，並開始進行細胞的分化，最後產生漿細胞產生抗體，與產生記憶細胞儲存於體內，故 MHC II 的表現對於 B 淋巴細胞的活化步驟上扮演很重要的角色。

MHC II 的表現量主要由一類轉錄促進因子 CIITA (class II transactivator) 所調控 (Reith, 2005)，而 CIITA 本身的轉錄也受到調控 (LeibundGut-Landmann, 2004)，由於我的實驗當中 HBe 蛋白並不會抑制由內毒素刺激所導致的 B 細胞 MHC II 上升，而是要在受抗原活化的 B 細胞才有抑制 MHC II 的作用，推測 HBe 蛋白作用的機制是在 B 細胞需受抗原活化後才會啟動的 MHC II 表現量上升機制上。有研究顯示 B 淋巴細胞受到內毒素刺激所導致的 MHC II mRNA 表現量上升並不是透過上升 CIITA 的表現 (Pai, 2002)，也有研究顯示 B

淋巴細胞受到第四介白質刺激所導致的 B 細胞 MHC II 表現量上升並不是藉由上升 MHC II mRNA 或是 CIITA mRNA 的表現量 (Casals, 2007), 顯示細胞調控 MHC II 表現量非單一機制在作用, 故未來可以藉由測量 MHC II 與 CIITA 的 mRNA 與蛋白表現量, 探討 HBe 蛋白下降抗原活化後 B 細胞 MHC II 表現量的機制為何。

根據我的實驗結果, 我推測, 當 B 型肝炎病毒感染宿主時, 病毒製造並釋放 e 蛋白與 B 淋巴細胞表面結合, 接著, e 蛋白對於沒有受到病毒抗原活化的未活化 B 淋巴細胞 (resting B cell), 會誘導其表面分子表現量改變, 刺激細胞變大, 推測 e 蛋白結合上 B 淋巴細胞表面後, 可能藉由引發細胞訊息傳遞鏈的活化亦或是抑制來改變 B 淋巴細胞表面分子表現量, 進而影響該類 B 細胞的功能, 另外, 由於過去實驗室曾發現 e 蛋白會刺激單核細胞與巨噬細胞分泌細胞激素, 不排除 e 蛋白能夠刺激未活化的 B 淋巴細胞分泌細胞激素, 干擾宿主免疫系統對抗病毒感染。另一方面, e 蛋白藉由抑制由病毒抗原活化的 B 淋巴細胞表面 MHC II 表現量上升, 干擾該活化 B 淋巴細胞往後的分化, 使該 B 淋巴細胞無法正常活化與分化來產生抗病毒之抗體, 若以 B 型肝炎病毒表面蛋白 (HBs) 為例, 當 B 淋巴細胞受體受到 HBs 結合後引發 B 淋巴細胞活化, 此時 HBe 會抑制活化的 B 淋巴細胞 MHC II 上升, 使該 B 淋巴細胞往後活化與分化的能力受到影響,

無法正常活化至產生抗病毒表面蛋白之抗體，臨床上由於受 B 型肝炎病毒慢性感染的病患體內始終無法偵測到抗病毒表面蛋白之抗體，顯示宿主本身產生抗病毒表面蛋白抗體的能力的確可能受到病毒干擾。故推論，B 型肝炎病毒感染宿主時可能藉由 e 蛋白來影響未活化的 B 淋巴細胞與受病毒抗原活化的 B 淋巴細胞之功能，使宿主免疫系統無法有效的清除 B 型肝炎病毒，逃避宿主的免疫反應。

## 參考文獻

1. Abendroth, A., Slobedman, B., Lee, E., Mellins, E., Wallace, M., and Arvin, A.M. (2000). Modulation of major histocompatibility class II protein expression by varicella-zoster virus. *J Virol* 74, 1900-1907.
2. Bennett, E.M., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., and Brodsky, F.M. (1999). Cutting edge: adenovirus E19 has two mechanisms for affecting class I MHC expression. *J Immunol* 162, 5049-5052.
3. Blutt, S.E., Crawford, S.E., Warfield, K.L., Lewis, D.E., Estes, M.K., and Conner, M.E. (2004). The VP7 outer capsid protein of rotavirus induces polyclonal B-cell activation. *J Virol* 78, 6974-6981.
4. Boname, J.M., and Stevenson, P.G. (2001). MHC class I ubiquitination by a viral PHD/LAP finger protein. *Immunity* 15, 627-636.
5. Casals, C., Barrachina, M., Serra, M., Lloberas, J., and Celada, A. (2007). Lipopolysaccharide up-regulates MHC class II expression on dendritic cells through an AP-1 enhancer without affecting the levels of CIITA. *J Immunol* 178, 6307-6315.
6. Chen, M., Sallberg, M., Hughes, J., Jones, J., Guidotti, L.G., Chisari, F.V., Billaud, J.N., and Milich, D.R. (2005). Immune tolerance split between hepatitis B virus precore and core proteins. *J Virol* 79, 3016-3027.
7. Chen, Y.C., Chu, C.M., and Liaw, Y.F. (2010). Age-specific prognosis following spontaneous hepatitis B e antigen seroconversion in chronic hepatitis B. *Hepatology* 51, 435-444.
8. Chen, H.S., Kew, M.C., Hornbuckle, W.E., Tennant, B.C., Cote, P.J., Gerin, J.L., Purcell, R.H., and Miller, R.H. (1992). The precore gene of the woodchuck hepatitis virus genome is not essential for viral replication in the natural host. *J Virol* 66, 5682-5684.

9. Chen, L. (2004). Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol* 4, 336-347.
10. Chen, A.J. (2000). The effects of the hepatitis B virus e antigen on macrophages and lymphocytes. Institute of Microbiology & Immunology, School of Life Science, Vol. Master. National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan.
11. Cherukuri, A., Shoham, T., Sohn, H.W., Levy, S., Brooks, S., Carter, R., and Pierce, S.K. (2004). The tetraspanin CD81 is necessary for partitioning of coligated CD19/CD21-B cell antigen receptor complexes into signaling-active lipid rafts. *J Immunol* 172, 370-380.
12. Cote, P.J., Korba, B.E., Miller, R.H., Jacob, J.R., Baldwin, B.H., Hornbuckle, W.E., Purcell, R.H., Tennant, B.C., and Gerin, J.L. (2000). Effects of age and viral determinants on chronicity as an outcome of experimental woodchuck hepatitis virus infection. *Hepatology* 31, 190-200.
13. Centers for Disease Control and Prevention. (2008). *Travelers' Health; Yellow Book, USA*.
14. Dorner, T., and Radbruch, A. (2007). Antibodies and B cell memory in viral immunity. *Immunity* 27, 384-392.
15. Harding, C.V., and Boom, W.H. (2010). Regulation of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*: a role for Toll-like receptors. *Nat Rev Microbiol* 8, 296-307.
16. Harwood, N.E., and Batista, F.D. (2010). Early events in B cell activation. *Annu Rev Immunol* 28, 185-210.
17. Hayashi, E.A., Akira, S., and Nobrega, A. (2005). Role of TLR in B cell development: signaling through TLR4 promotes B cell maturation and is inhibited by TLR2. *J Immunol* 174, 6639-6647.

18. Ho, Y.F. (2010) Immunomodulatory effects of the hepatitis B virus e protein on T lymphocytes. Department of Life Science, Vol. Master. Tunghai university, Taichung, Taiwan.
19. Kanazawa, S., Okamoto, T., and Peterlin, B.M. (2000). Tat competes with CIITA for the binding to P-TEFb and blocks the expression of MHC class II genes in HIV infection. *Immunity* 12, 61-70.
20. Kassel, R., Cruise, M.W., Iezzoni, J.C., Taylor, N.A., Pruett, T.L., and Hahn, Y.S. (2009). Chronically inflamed livers up-regulate expression of inhibitory B7 family members. *Hepatology* 50, 1625-1637.
21. Kurosaki, T., Shinohara, H., and Baba, Y. (2010). B cell signaling and fate decision. *Annu Rev Immunol* 28, 21-55.
22. LeibundGut-Landmann, S., Waldburger, J.M., Krawczyk, M., Otten, L.A., Suter, T., Fontana, A., Acha-Orbea, H., and Reith, W. (2004). Mini-review: Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes. *Eur J Immunol* 34, 1513-1525.
23. Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P.M., Klein, G., Kurilla, M.G., and Masucci, M.G. (1995). Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* 375, 685-688.
24. Levy, S., Todd, S.C., and Maecker, H.T. (1998). CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu Rev Immunol* 16, 89-109.
25. Liang, T.J. (2009). Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology* 49, S13-21.
26. Lu, Y. C. (2003). The immunomodulatory effects of hepatitis B virus e antigen (HBeAg) on human monocytes. Institute of Microbiology & Immunology, School of Life Science, Vol. Master. National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan.

27. Marzio, R., Jirillo, E., Ransijn, A., Mael, J., and Corradin, S.B. (1997). Expression and function of the early activation antigen CD69 in murine macrophages. *J Leukoc Biol* 62, 349-355.
28. McHeyzer-Williams, L.J., and McHeyzer-Williams, M.G. (2005). Antigen-specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol* 23, 487-513.
29. Milich, D., and Liang, T.J. (2003). Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology* 38, 1075-1086.
30. Miller, D.M., Rahill, B.M., Boss, J.M., Lairmore, M.D., Durbin, J.E., Waldman, J.W., and Sedmak, D.D. (1998). Human cytomegalovirus inhibits major histocompatibility complex class II expression by disruption of the Jak/Stat pathway. *J Exp Med* 187, 675-683.
31. Pai, R.K., Askew, D., Boom, W.H., and Harding, C.V. (2002). Regulation of class II MHC expression in APCs: roles of types I, III, and IV class II transactivator. *J Immunol* 169, 1326-1333.
32. Pai, R.K., Convery, M., Hamilton, T.A., Boom, W.H., and Harding, C.V. (2003). Inhibition of IFN-gamma-induced class II transactivator expression by a 19-kDa lipoprotein from *Mycobacterium tuberculosis*: a potential mechanism for immune evasion. *J Immunol* 171, 175-184.
33. Parker, D.C. (1993). T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* 11, 331-360.
34. Pennini, M.E., Liu, Y., Yang, J., Croniger, C.M., Boom, W.H., and Harding, C.V. (2007). CCAAT/enhancer-binding protein beta and delta binding to CIITA promoters is associated with the inhibition of CIITA expression in response to *Mycobacterium tuberculosis* 19-kDa lipoprotein. *J Immunol* 179, 6910-6918.

35. Purtha, W.E., Chachu, K.A., Virgin, H.W.t., and Diamond, M.S. (2008). Early B-cell activation after West Nile virus infection requires alpha/beta interferon but not antigen receptor signaling. *J Virol* 82, 10964-10974.
36. Rehermann, B., and Nascimbeni, M. (2005). Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 5, 215-229.
37. Reith, W., LeibundGut-Landmann, S., and Waldburger, J.M. (2005). Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nat Rev Immunol* 5, 793-806.
38. Rizzetto, M., and Ciancio, A. (2008). Chronic HBV-related liver disease. *Mol Aspects Med* 29, 72-84.
39. Siegel, A.M., Herskowitz, J.H., and Speck, S.H. (2008). The MHV68 M2 protein drives IL-10 dependent B cell proliferation and differentiation. *PLoS Pathog* 4, e1000039.
40. Swanson-Mungerson, M., Bultema, R., and Longnecker, R. (2006). Epstein-Barr virus LMP2A enhances B-cell responses in vivo and in vitro. *J Virol* 80, 6764-6770.
41. Tsubata, T. (1999). Co-receptors on B lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 11, 249-255.
42. Vascotto, F., Lankar, D., Faure-Andre, G., Vargas, P., Diaz, J., Le Roux, D., Yuseff, M.I., Sibarita, J.B., Boes, M., Raposo, G., et al. (2007). The actin-based motor protein myosin II regulates MHC class II trafficking and BCR-driven antigen presentation. *J Cell Biol* 176, 1007-1019.
43. Vascotto, F., Le Roux, D., Lankar, D., Faure-Andre, G., Vargas, P., Guermonprez, P., and Lennon-Dumenil, A.M. (2007). Antigen presentation by B lymphocytes: how receptor signaling directs membrane trafficking. *Curr Opin Immunol* 19, 93-98.

44. Vidakovics, M.L., Jendholm, J., Morgelin, M., Mansson, A., Larsson, C., Cardell, L.O., and Riesbeck, K. (2010). B cell activation by outer membrane vesicles--a novel virulence mechanism. *PLoS Pathog* 6, e1000724.
45. Yuan, D. (1984). Regulation of IgM and IgD synthesis in B lymphocytes. II. Translational and post-translational events. *J Immunol* 132, 1566-1570.
46. Vyas, J.M., Van der Veen, A.G., and Ploegh, H.L. (2008). The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol* 8, 607-618.
47. World Health Organization. (2008). Hepatitis B. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>
48. Zhang, Y.Y., and Summers, J. (1999). Enrichment of a precore-minus mutant of duck hepatitis B virus in experimental mixed infections. *J Virol* 73, 3616-3622.

## 表目

表一、B 型肝炎病毒感染的臨床特徵 (第 39 頁)

表二、B 淋巴細胞以不同濃度 HBe 蛋白處理 48 小時後之細胞大小 (第 40 頁)

## 圖目

圖一、全球各國人口受到 B 型肝炎病毒感染的百分比分布圖 (第 41 頁)

圖二、B 型肝炎病毒基因體結構圖 (第 42 頁)

圖三、B 型肝炎病毒顆粒結構圖 (第 43 頁)

圖四、B 型肝炎病毒生活史 (第 44 頁)

圖五、B 型肝炎病毒慢性感染示意圖 (第 45 頁)

圖六、HBe 的產生 (第 46 頁)

圖七、pRSET-HBe 質體之組成 (第 47 頁)

圖八、純化 HBe 蛋白質過程中各處理之濾出液樣本鑑定 (第 48 頁)

圖九、實驗用蛋白樣本銀染及西方點墨法 (第 49 頁)

圖十、純化後的小鼠 B 淋巴脾臟細胞所占總細胞族群比例 (第 50 頁)

圖十一、B 淋巴細胞處理不同濃度之 HBe 蛋白 48 小時後，CD80、CD86、MHC I、MHC II 之表現量 (第 51 頁)

圖十二、B 淋巴細胞處理不同濃度之 HBe 蛋白 48 小時後，CD80、CD86、MHC I、MHC II 之表現量柱狀圖 (第 52 頁)

圖十三、B 淋巴細胞處理不同濃度之 HBe 蛋白 48 小時後，CD19、CD69、CD21、CD81 之表現量 (第 53 頁)

圖十四、B 淋巴細胞處理不同濃度之 HBe 蛋白 48 小時後，CD19、CD69、CD21、CD81 之表現量柱狀圖 (第 54 頁)

圖十五、B 淋巴細胞處理不同濃度之內毒素 48 小時後，CD80、CD86、MHC I、MHC II 之表現量柱狀圖 (第 55 頁)

圖十六、B 淋巴細胞處理不同濃度之內毒素 48 小時後，CD19、CD69、CD21、CD81 之表現量柱狀圖 (第 56 頁)

圖十七、B 淋巴細胞以不同濃度 HBe 蛋白處理 48 小時後之細胞大小 (第 57 頁)

圖十八、B 淋巴細胞以 HBe 蛋白或內毒素處理 48 小時後，細胞表面 IgM 與 IgD 之表現量 (第 58 頁)

圖十九、B 淋巴細胞以 HBe 蛋白或內毒素處理 48 小時後，細胞表面 IgM 與 IgD 之表現量柱狀圖 (第 59 頁)

圖二十、B 淋巴細胞活化後，以 HBe 蛋白處理 48 小時後，CD19、CD69、CD86、MHC I、MHC II 之表現量 (第 60 頁)

圖二十一、B 淋巴細胞活化後，以 HBe 蛋白處理 48 小時後之 CD19、CD69、CD86、MHC I、MHC II 之表現量柱狀圖 (第 62 頁)

圖二十二、B 淋巴細胞活化後以 HBe 蛋白處理 24、48、72 小時後之 MHC II 表

現量 (第 64 頁)

圖二十三、B 淋巴細胞活化後以 HBe 蛋白處理 24、48、72 小時之 MHC II 表現量柱狀圖 (第 66 頁)

圖二十四、B 淋巴細胞活化後以 HBe 蛋白處理 24、48、72 小時後，於 72 小時 MHC II 表現量皆下降 (第 68 頁)

圖二十五、被不同濃度內毒素活化之 B 淋巴細胞，處理 PBS 或 HBe 蛋白 48 小時後，MHC II 表現量柱狀圖 (第 69 頁)

表一：B 型肝炎病毒感染的臨床特徵

<b>Feature</b>	<b>Hepatitis B infection</b>
<i>Public-health impact</i>	
In the world	350 million people infected
<i>Clinical course of infection</i>	
Vertical transmission, outcome	Most common from mother to neonate, 90% of people have chronically evolving hepatitis
Horizontal transmission, outcome	Intravenous drug, parenteral, sexual, 90% of people recover
Disease progression	Liver cirrhosis, hepatocellular carcinoma
Preventive vaccination	Yes

(Modified from Rehermann, 2005)

表二：B 淋巴細胞以不同濃度 HBe 蛋白處理 48 小時後之細胞大小

	Treatment			
	PBS	0.5 $\mu$ g/ml HBe	1 $\mu$ g/ml HBe	1.5 $\mu$ g/ml HBe
mean of forward scatter#	1.8 $\pm$ 0.2	2.2 $\pm$ 0.1*	2.3 $\pm$ 0.5*	2.8 $\pm$ 0.2*

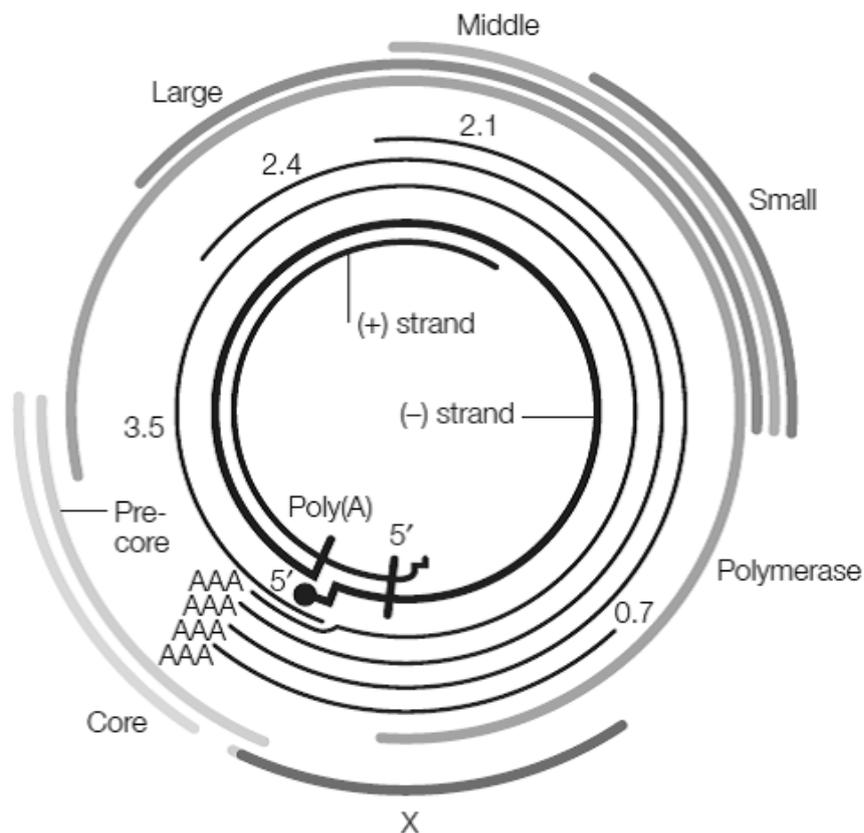
#, mean $\pm$  standard deviation

\*, p<0.05



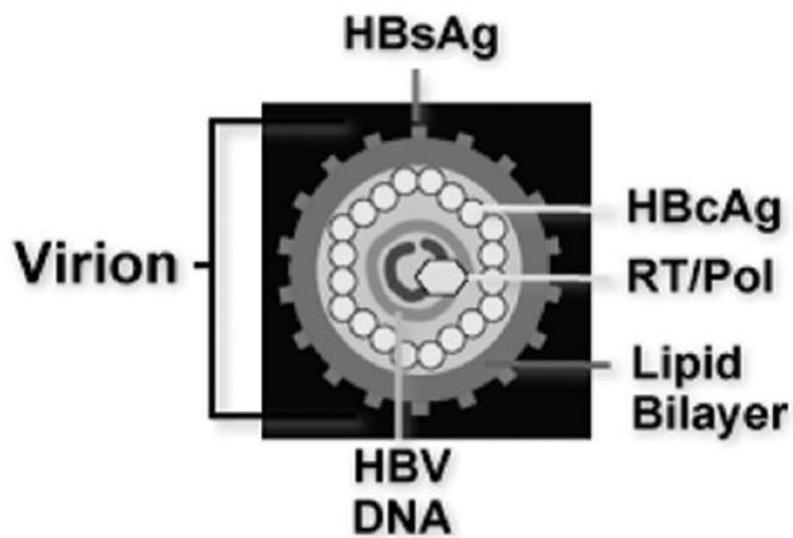
圖一：全球各國人口受到 B 型肝炎病毒感染的百分比分布圖

以國家為單位依受感染人數占該國人數百分比劃分成三等級，淡灰（輕度：小於 2%）、灰（中度：2%~7%）、深灰（重度：大於 8%），台灣為 B 型肝炎高度盛行率的國家。(CDC. Travelers' Health; Yellow Book, 2008)



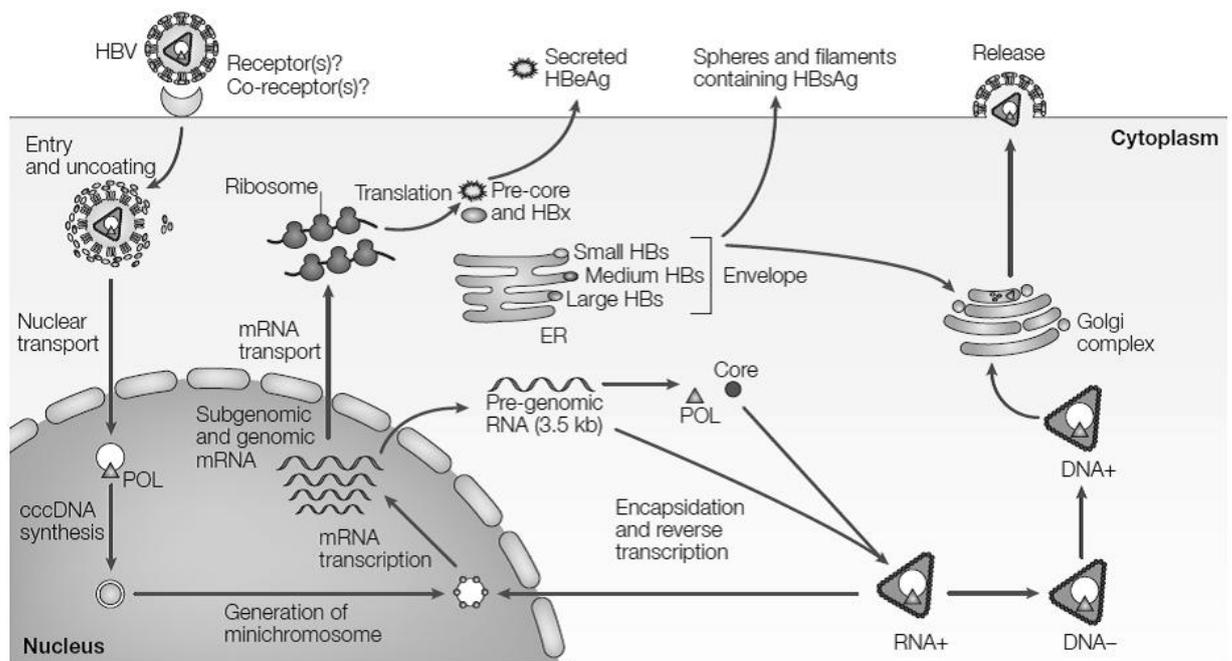
圖二：B 型肝炎病毒基因體結構圖

B 型肝炎病毒基因體結構圖的最內圈為病毒的部分雙股環狀 DNA，外圈為四個開放讀碼區所轉錄出的四條 mRNA，最外圈則是病毒產生的蛋白質，分別有大、中、小型表面蛋白 (small, middle, large surface protein)，聚合酶 (polymerase)，核心蛋白(core protein)，X 蛋白及 pre-core 蛋白。(Rehermann, 2005)



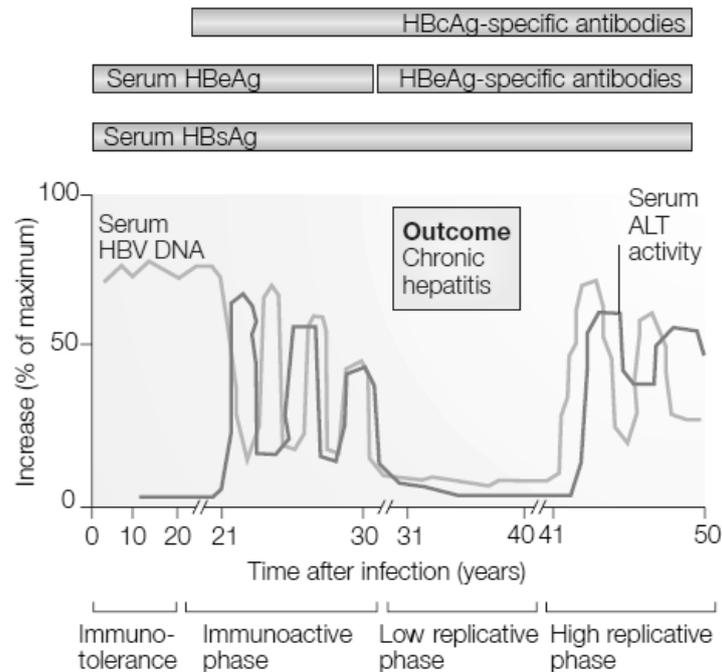
圖三：B 型肝炎病毒顆粒結構圖

B 型肝炎病毒顆粒 (Virion) 最外層為三種表面蛋白 (HBsAg) 所組成的套膜，其內含有由核心蛋白 (HBcAg) 所組成之 20 面體，裡面含有病毒本身攜帶之聚合酶 (RT/Pol) 以及 DNA。(Liang, 2009)



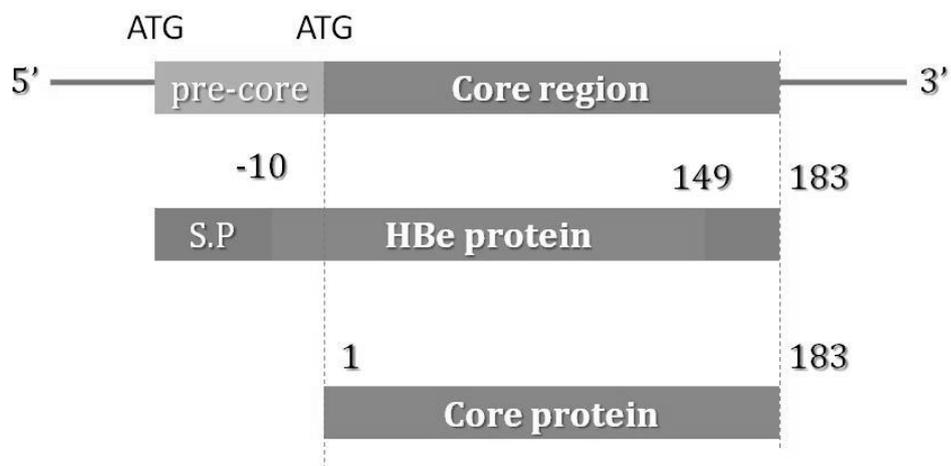
圖四：B 型肝炎病毒生活史

B 型肝炎病毒經由未知的細胞受體進入細胞並釋放病毒顆粒，病毒之聚合酶將本身之部分雙股環狀 DNA 形成為封閉環狀 DNA (cccDNA) 並以此為模板轉錄出所需之 mRNA 以及 pregenomic RNA，接著病毒合成所需之蛋白質，核心蛋白將 pregenomic RNA 與聚合酶包裹起來，在核心顆粒內聚合酶將 pregenomic RNA 反轉錄成單股環狀 DNA，最後修補成為部分雙股環狀 DNA，接著表面蛋白將核心顆粒包裹起來釋出細胞外。(Rehermann, 2005)



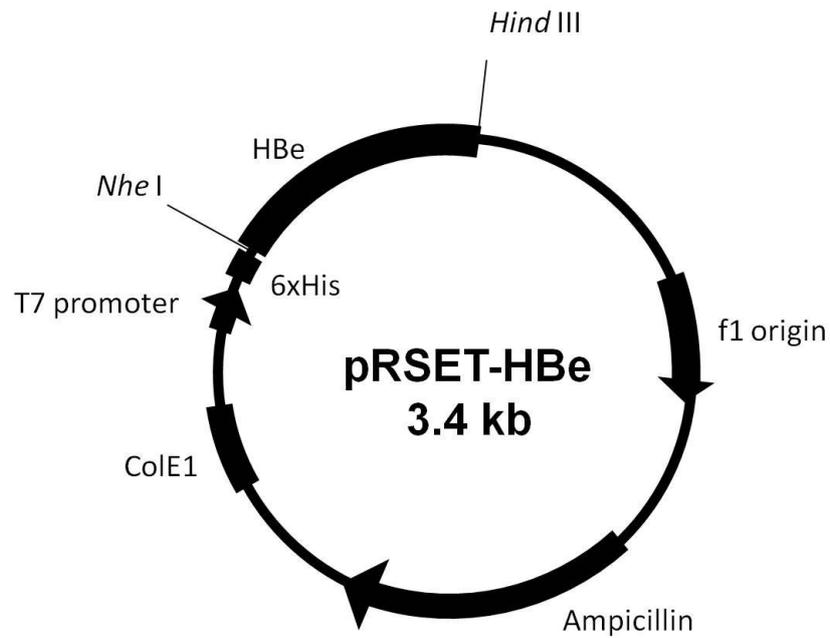
**圖五：B 型肝炎病毒慢性感染示意圖**

B 型肝炎病毒的慢性感染進程可分為免疫耐受期(Immunotolerance)、免疫活化期 (Immunoactive)、低度複製期 (Low replication)，在免疫耐受期，大量的 HBV DNA 與 HBe 蛋白存在病患血液中，血液中的 ALT 含量為正常，接著病患進入免疫活化期，此時免疫系統活化，肝細胞受免疫系統攻擊血液 ALT 含量升高，HBV DNA 含量降低與 ALT 含量呈現波動，最後進入低度複製期，血液中僅能偵測到少量 HBV DNA，ALT 含量趨向正常。(Rehermann, 2005)



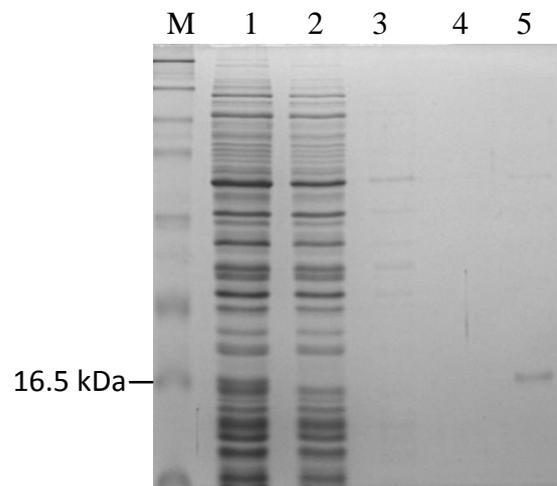
**圖六：HBe 的產生**

從第一個起始密碼子轉譯出的 pre-core 含有訊息胜肽鏈 (signal peptide, SP)，蛋白在轉譯後會被帶往內質網經蛋白質修飾及切除 signal peptide (灰色區域)及尾端部分胜肽鏈後才是完整的 HBe 蛋白，接著被釋出細胞外。(modified from Milich, 2003)



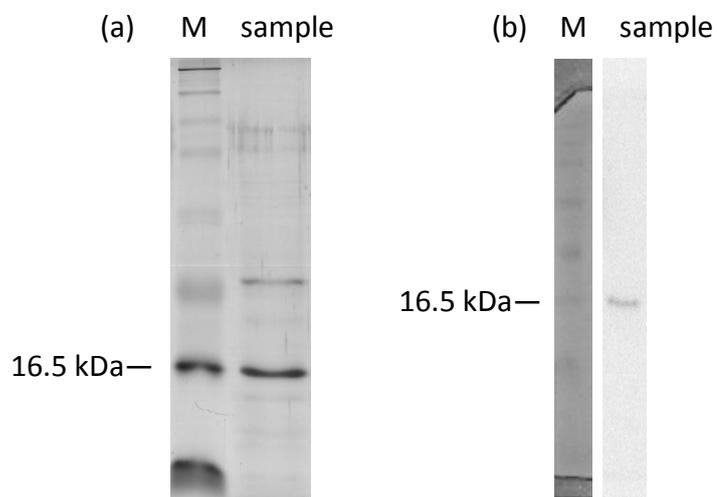
**圖七： pRSET-HBe 質體之組成**

質體為實驗室前人所建構，使用 HBe 序列 (ayw) 含有 477bp，序列兩端之限制內切酶切位為 *Nhe* I 與 *Hind* III，HBe 蛋白之基因序列前端接有可一併轉譯出六個組氨酸之 DNA 序列。



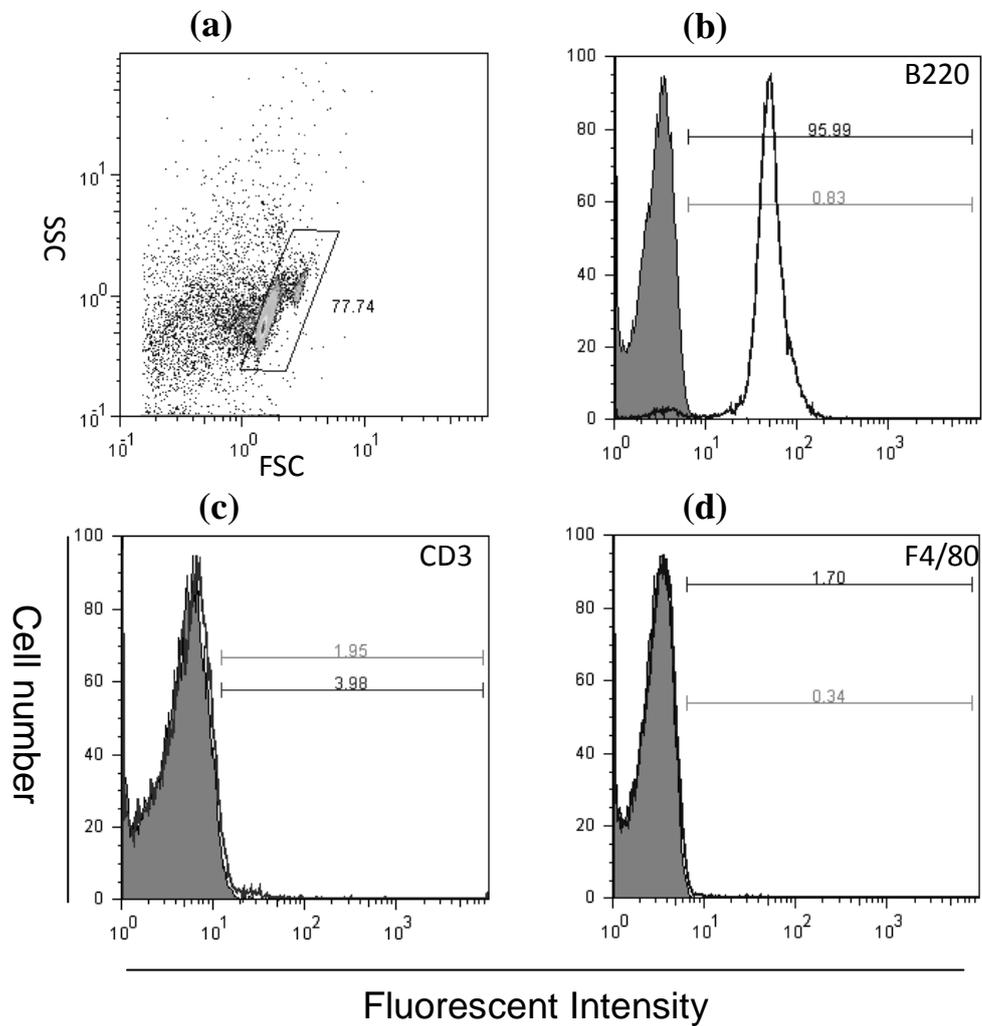
圖八：純化 HBe 蛋白質過程中各過程之濾出液樣本鑑定

.HBe 蛋白純化過程中之樣本以 SDS 蛋白質電泳後，經 coomassie blue 染色後結果，M. marker、1. 菌塊以 lysis buffer 處理後之蛋白產物、2. lysate 結合鎳微珠瓊脂後之濾出液、3. 管柱以 wash buffer1 通過後之濾出液、4. 管柱以 wash buffer 2 通過後之濾出液、5. 管柱以 Elution buffer 通過後之濾出液。



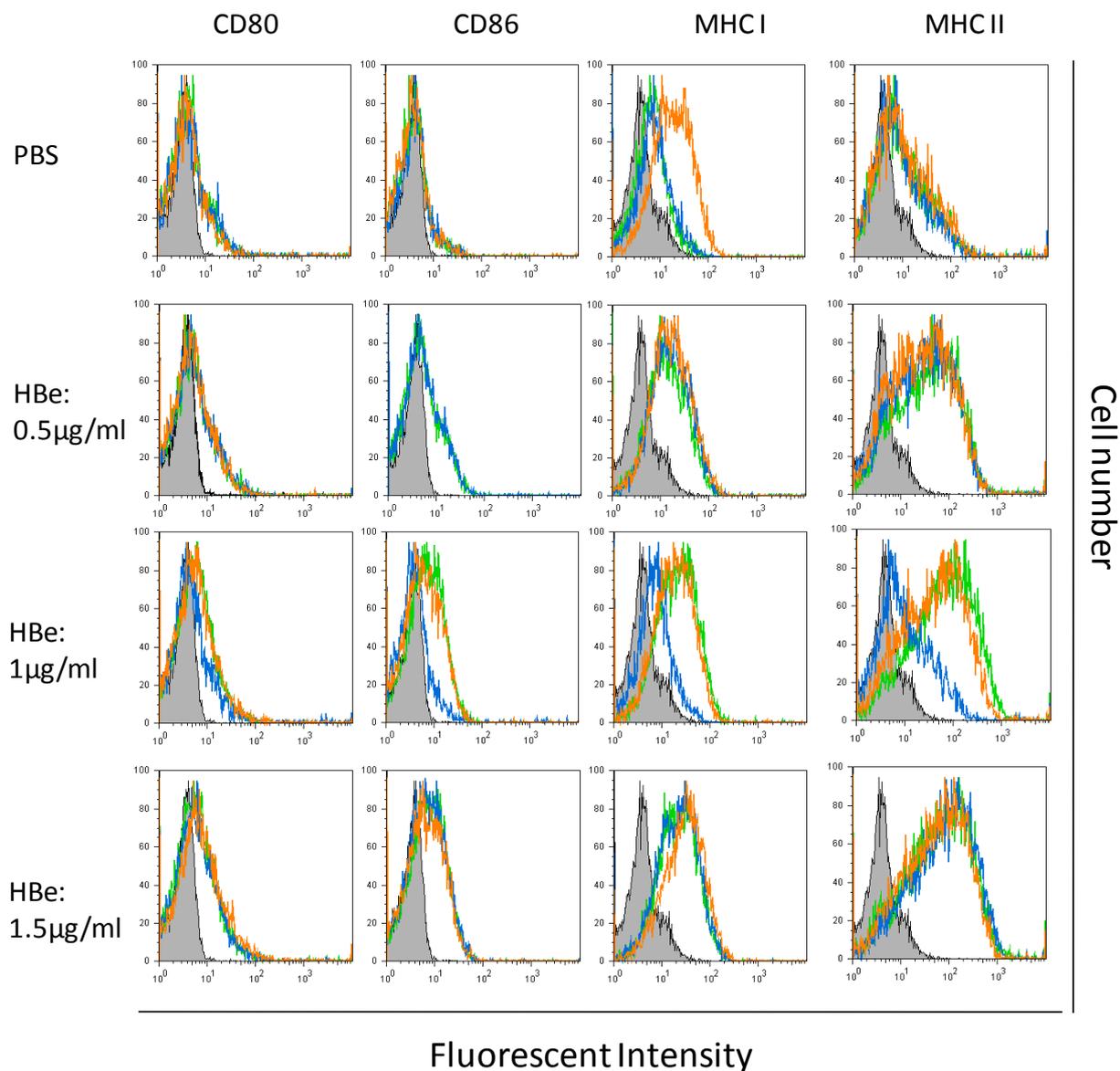
**圖九：實驗用 HBe 蛋白樣本銀染及西方點墨法**

圖九(a)實驗用 HBe 蛋白溶液以 SDS 蛋白質電泳，經銀染後結果，圖九(b)為實驗用 HBe 蛋白溶液以 SDS 蛋白質電泳，經西方點墨法後結果。箭頭處皆為蛋白質標準品 16.5 kDa 位置，HBe 蛋白分子量大小為 16.9 kDa，M: marker。



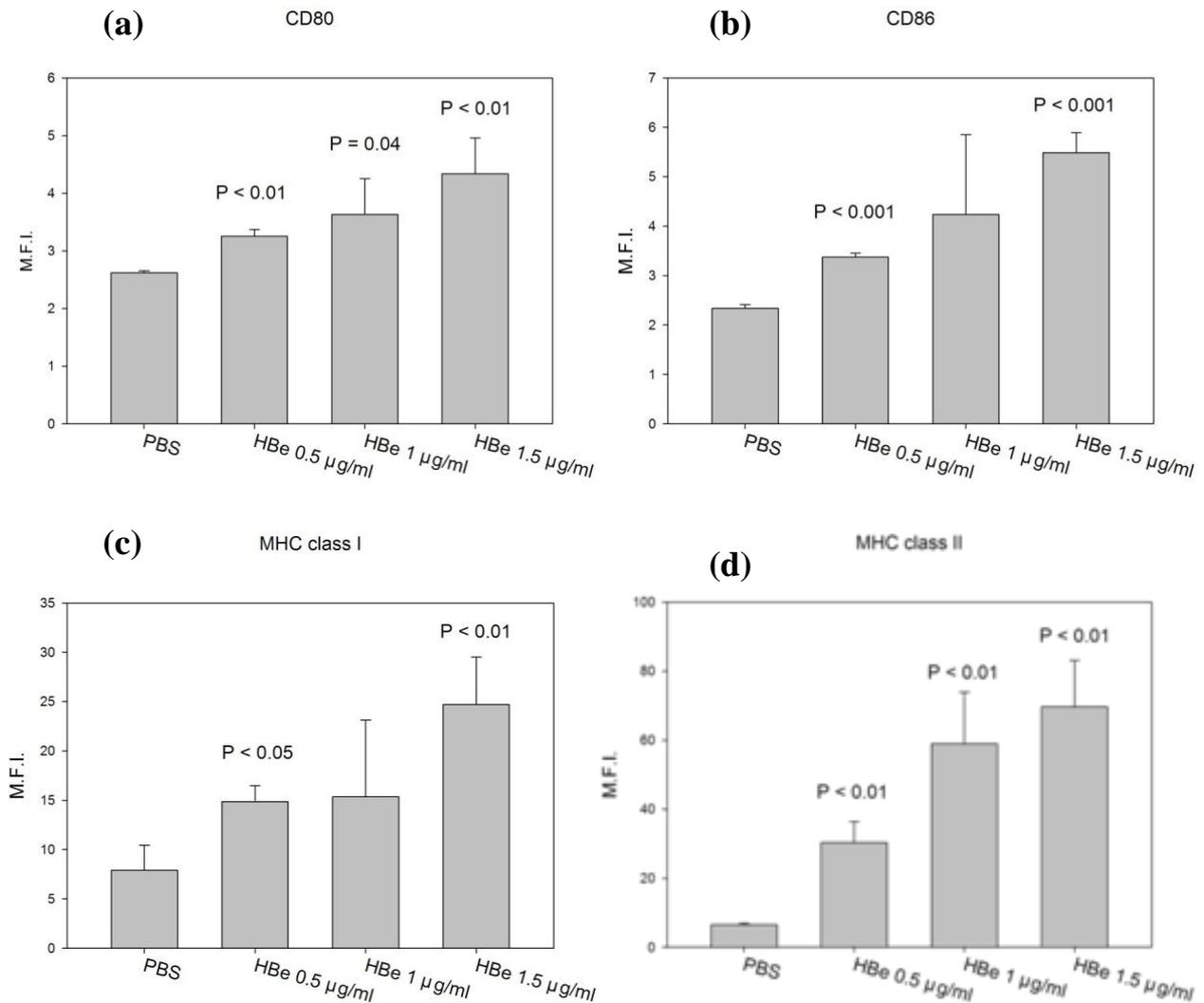
圖十：純化後的小鼠 B 淋巴脾臟細胞所占總細胞族群比例

將小鼠的脾臟細胞取出後，透過純化 B 淋巴細胞的方法把 B 細胞以外的細胞移除，最後的細胞族群以流式細胞儀分析 B 淋巴細胞所占總細胞族群之比例。a. 細胞族群的大小及顆粒性、b. B 淋巴細胞 (B220<sup>+</sup>) 占總細胞數的 96%、c. T 細胞 (CD3<sup>+</sup>) 占總細胞數小於 2%、d. 巨噬細胞 (F4/80<sup>+</sup>) 占總細胞數小於 1%。



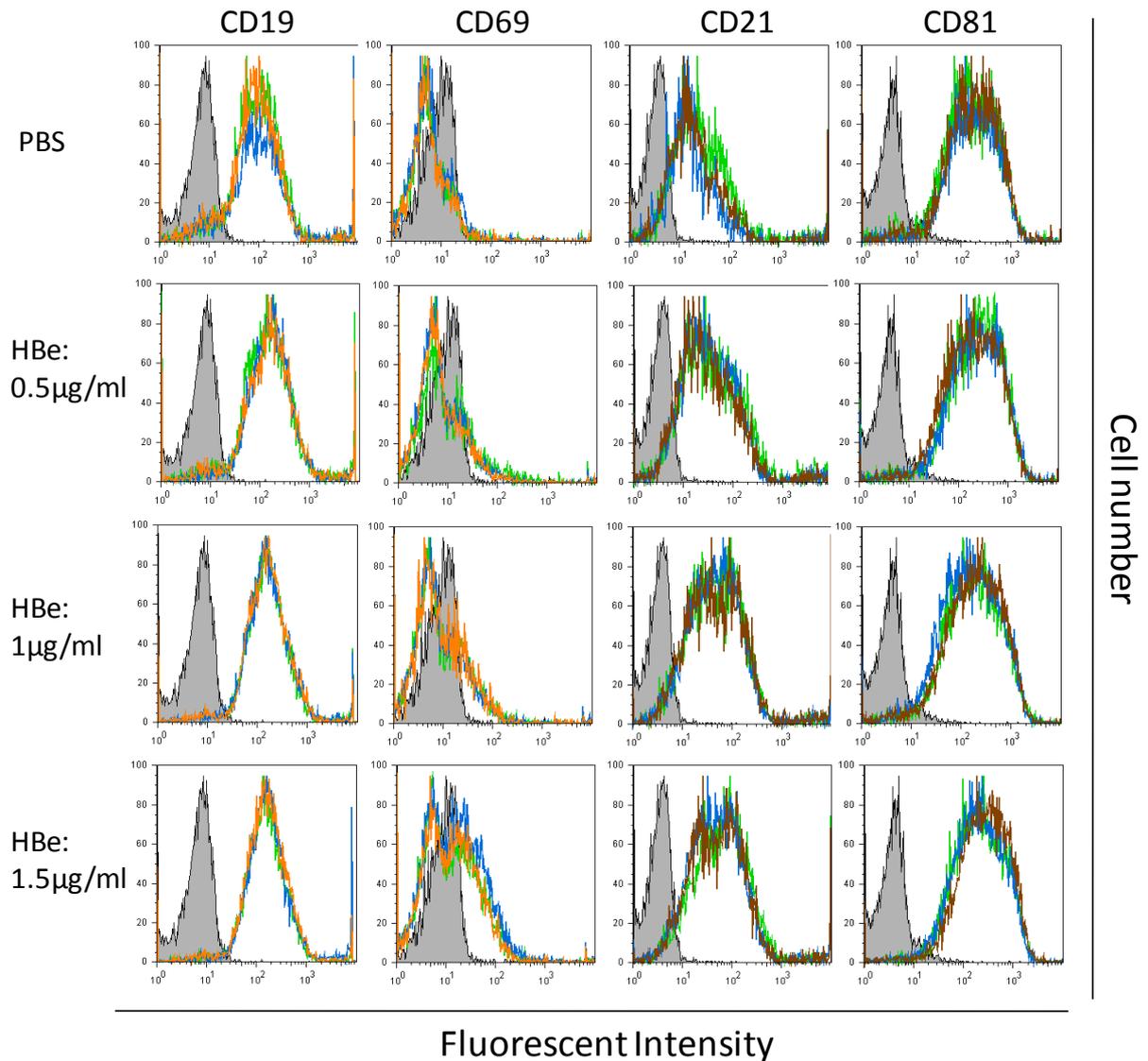
圖十一：B 淋巴細胞處理不同濃度之 HBe 蛋白 48 小時後，CD80、CD86、MHC I、MHC II 之表現量

將 B 淋巴細胞與 PBS 及 HBe 蛋白 (0.5, 1, 1.5µg/ml) 共同培養 48 小時後，收集細胞以流式細胞儀測定細胞之 CD80、CD86、MHC I、MHC II 表現量，黑色實線為背景螢光控制組，彩色實線為實驗組三重複螢光強度，Y 軸為細胞數目，X 軸為螢光強度。



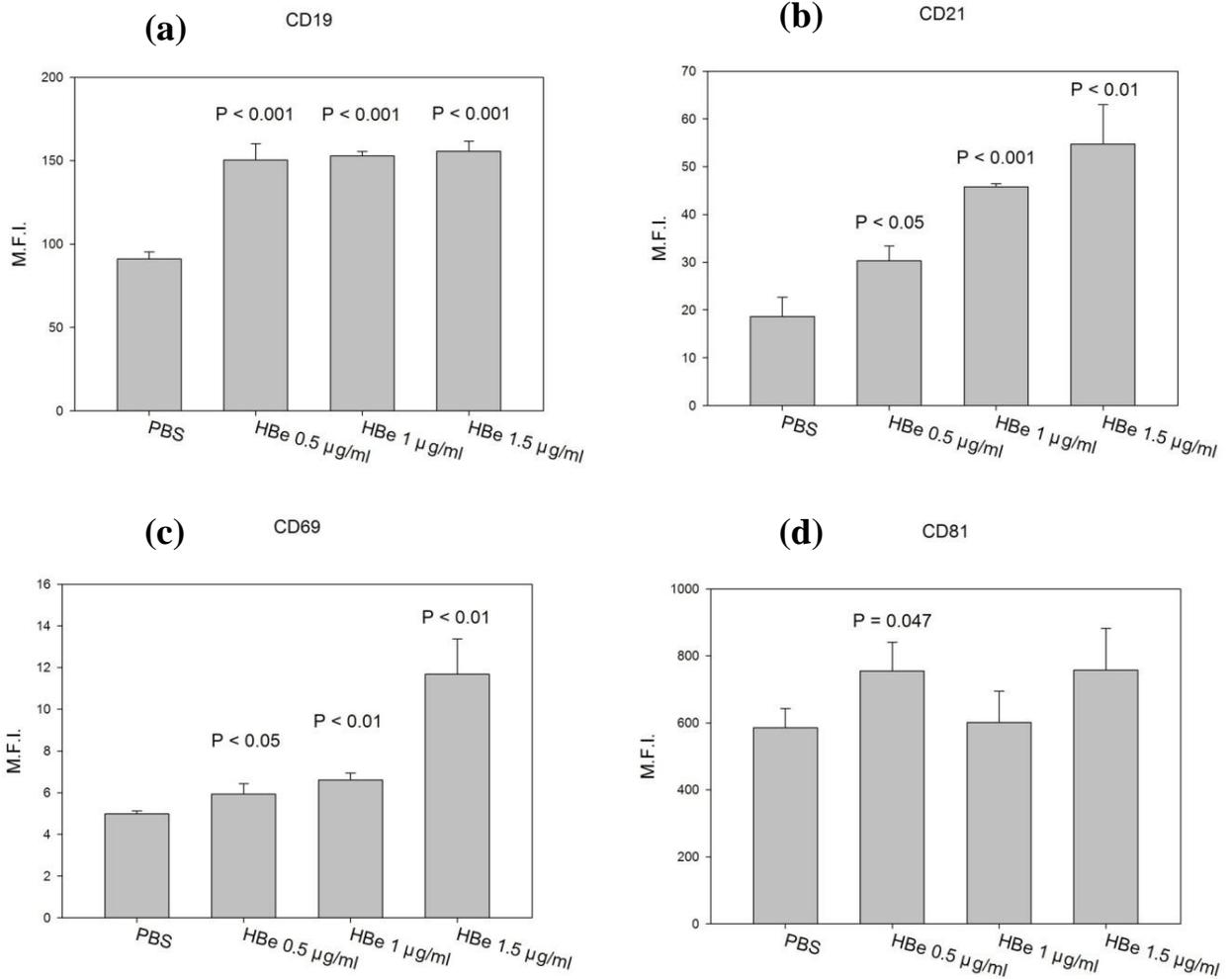
**圖十二：B 淋巴細胞處理不同濃度之 HBe 蛋白 48 小時後，CD80、CD86、MHC I、MHC II 之表現量上升**

將 B 淋巴細胞與 PBS 及 HBe 蛋白 (0.5, 1, 1.5µg/ml) 共同培養 48 小時後，收集細胞以流式細胞儀測定細胞之 CD80、CD86、MHC I、MHC II 表現量，並將實驗組的三重複以 median fluorescent intensity (MFI) 平均後繪製成柱狀圖，(a)為 CD80 表現量，(b)為 CD86 表現量，(c)為 MHC I 表現量，(d)為 MHC II 表現量。



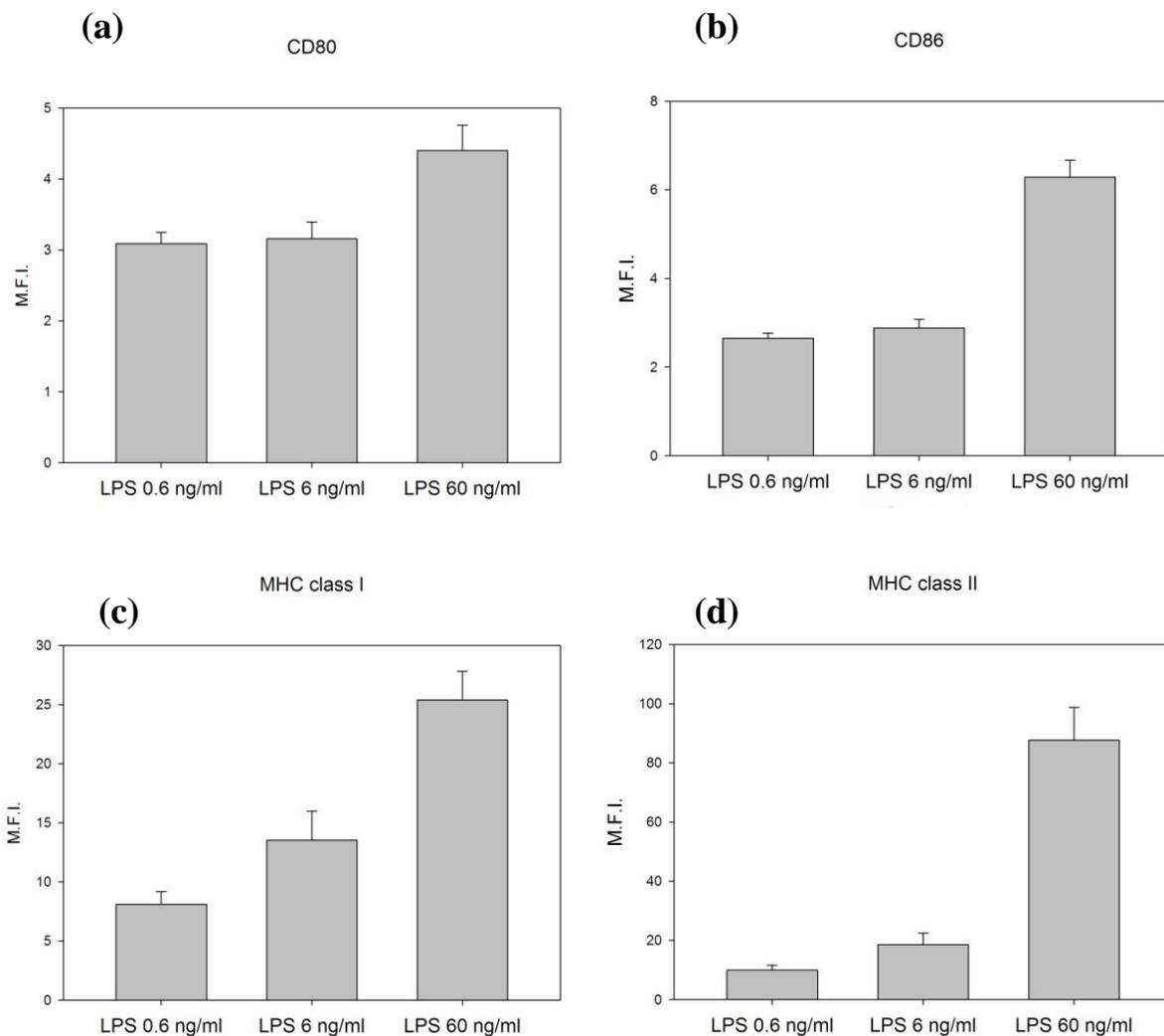
圖十三：B 淋巴細胞處理不同濃度之 HBe 蛋白 48 小時後，CD19、CD69、CD21、CD81 之表現量

將 B 淋巴細胞與 PBS 及 HBe 蛋白 (0.5, 1, 1.5 μg/ml) 共同培養 48 小時後，收集細胞以流式細胞儀測定細胞之 CD19、CD69、CD21、CD81 表現量，黑色實線為背景螢光控制組，彩色實線為實驗組三重複螢光分佈，Y 軸為細胞數目，X 軸為螢光強度。



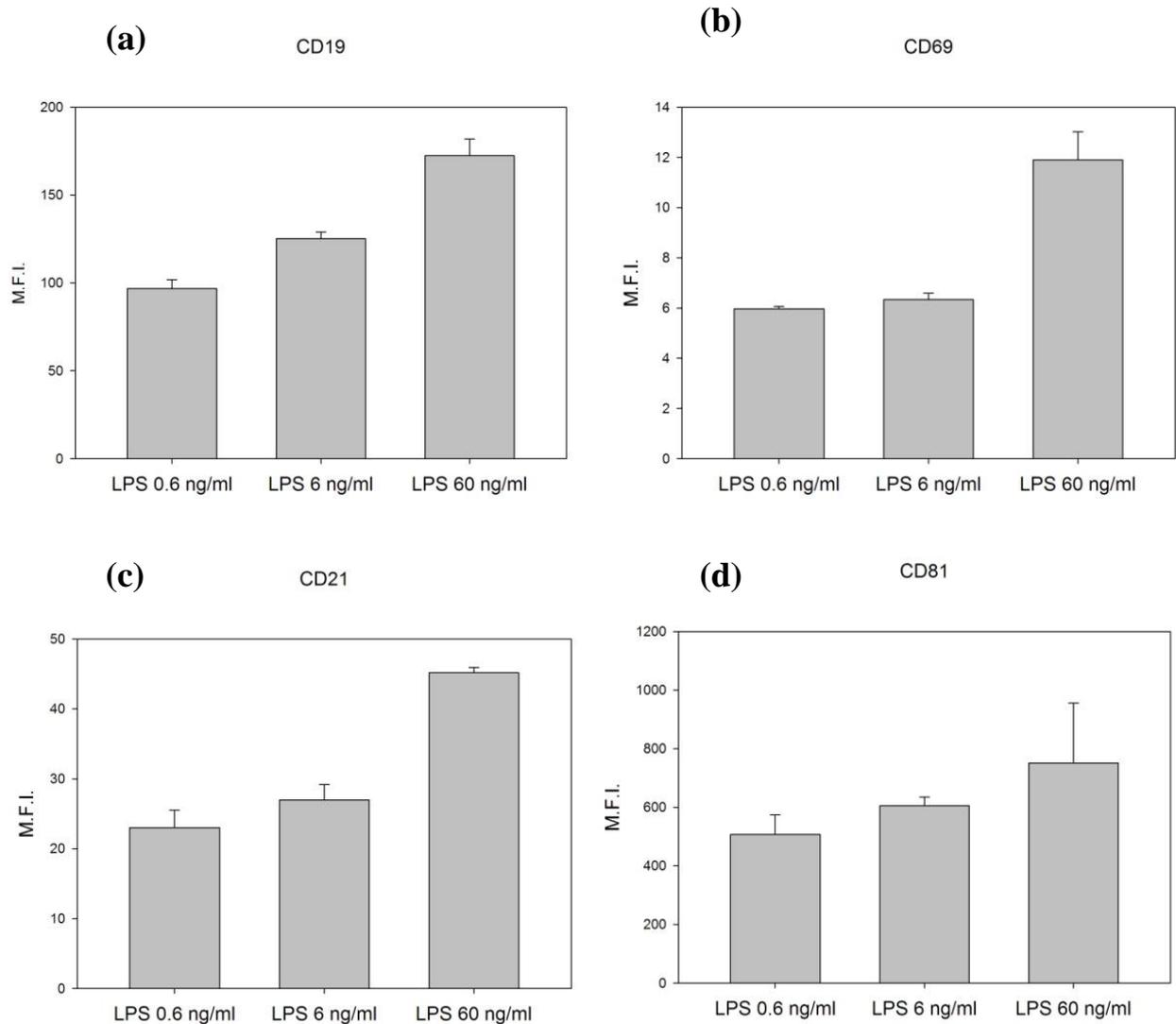
**圖十四：B 淋巴細胞處理不同濃度之 HBe 蛋白 48 小時後，CD19、CD69、CD21 表現量上升**

將 B 淋巴細胞與 PBS 及 HBe 蛋白 (0.5, 1, 1.5µg/ml) 共同培養 48 小時後，收集細胞以流式細胞儀測定細胞之 CD19、CD69、CD21、CD81 表現量，並將實驗組三重複數以 median fluorescent intensity (MFI) 平均後繪製成柱狀圖，(a)為 CD19 表現量，(b)為 CD69 表現量，(c)為 CD21 表現量，(d)為 CD81 表現量。



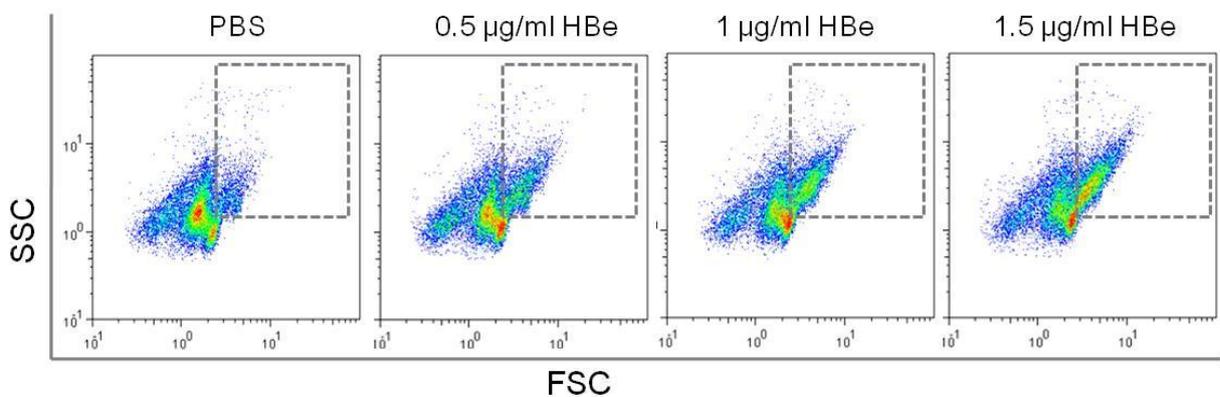
**圖十五：B 淋巴細胞處理不同濃度之內毒素 48 小時後，CD80、CD86、MHC I、MHC II 之表現量柱狀圖**

將 B 淋巴細胞與內毒素 (0.6, 6, 60 ng/ml) 共同培養 48 小時後，收集細胞以流式細胞儀測定細胞之 CD80、CD86、MHC I、MHC II 表現量，並將實驗組三重複以 median fluorescent intensity (MFI) 平均後繪製成柱狀圖，(a)為 CD80 表現量，(b)為 CD86 表現量，(c)為 MHC I 表現量，(d)為 MHC II 表現量。



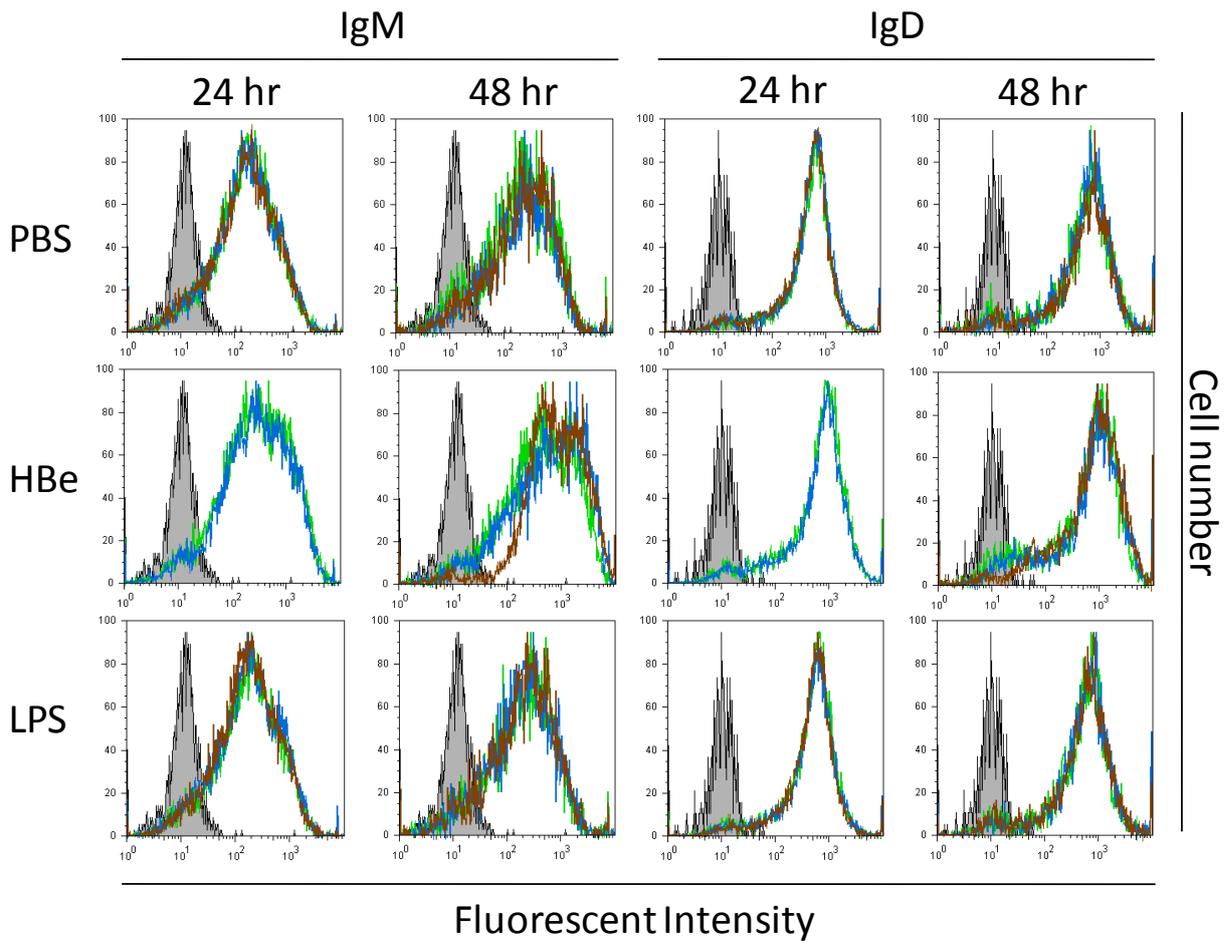
**圖十六：B 淋巴細胞處理不同濃度之內毒素 48 小時後，CD19、CD69、CD21、CD81 之表現量柱狀圖**

將 B 淋巴細胞與內毒素 (0.6, 6, 60 ng/ml) 共同培養 48 小時後，收集細胞以流式細胞儀測定細胞之 CD19、CD69、CD21、CD81 表現量，並將實驗三重複數以 median fluorescent intensity (MFI) 平均後繪製成柱狀圖，(a)為 CD19 表現量，(b)為 CD69 表現量，(c)為 CD21 表現量，(d)為 CD81 表現量。



圖十七：B 淋巴細胞以不同濃度之 HBe 蛋白處理 48 小時後，細胞變大

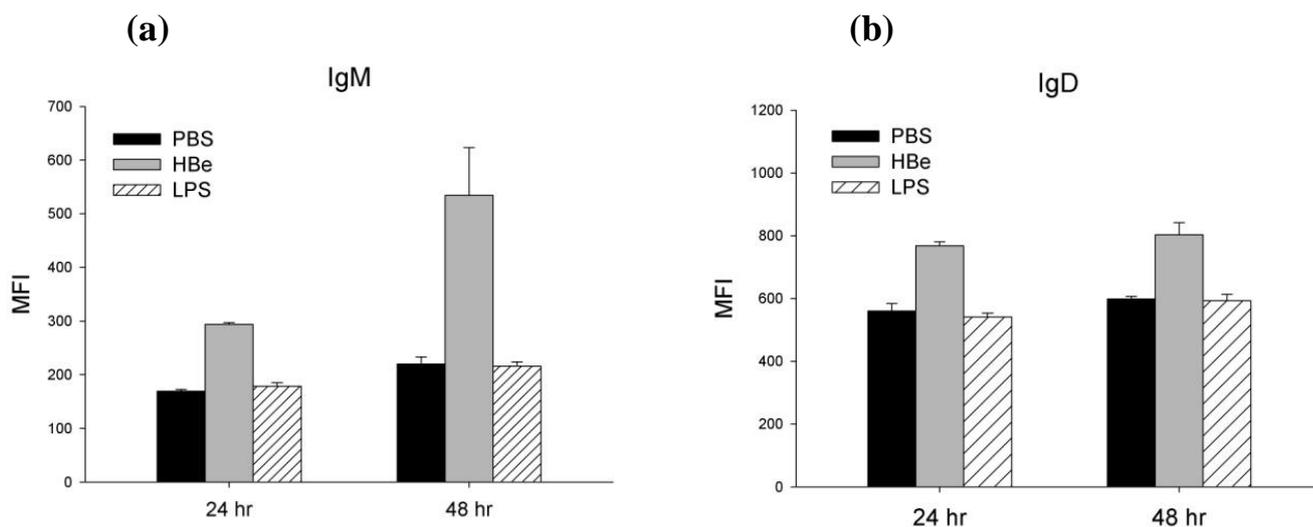
將 B 淋巴細胞與 HBe 蛋白 (0.5, 1, 1.5µg/ml) 共同培養 48 小時後，收集細胞以流式細胞儀測定細胞大小，Forward scatter (FSC) 為細胞大小指標，Side scatter (SSC) 為細胞顆粒性指標。



圖十八：B 淋巴細胞以 HBe 蛋白或內毒素處理 48 小時後，細胞表面

### IgM 與 IgD 之表現量

將 B 淋巴細胞以 PBS、HBe (1 $\mu$ g/ml) 或 LPS (0.6ng/ml) 處理 24 及 48 小時，收集細胞以流式細胞儀測定細胞表面之 IgM 與 IgD 表現量，黑色實線為背景螢光控制組，彩色實線為實驗組三重複，Y 軸為細胞數目，X 軸為螢光強度。

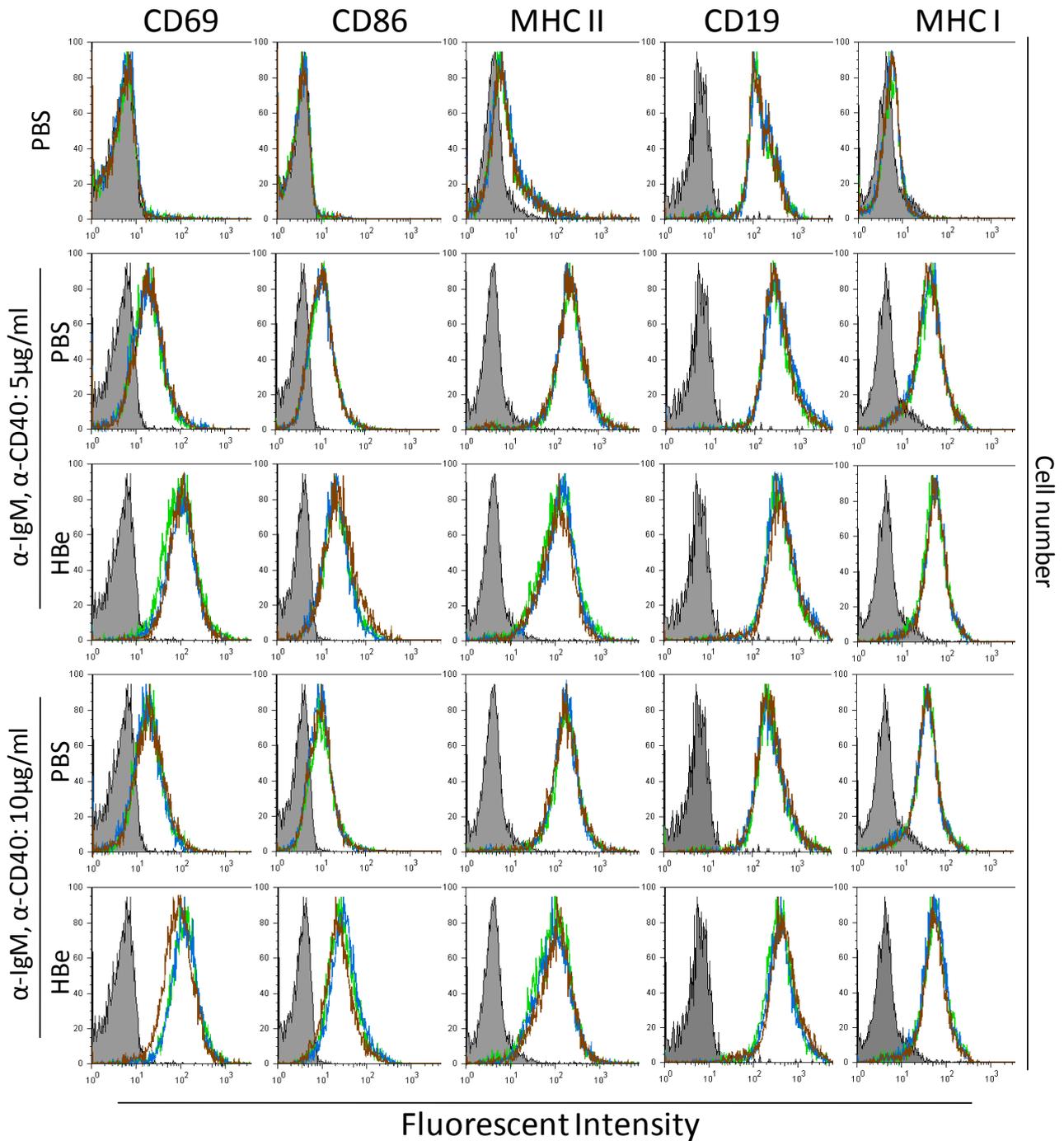


圖十九：B 淋巴細胞以 HBe 蛋白或內毒素處理 24 及 48 小時後，細胞表面 IgM 表現量隨時間上升

將 B 淋巴細胞以 PBS、HBe (1 $\mu$ g/ml) 或 LPS (0.6ng/ml) 處理 24 及 48 小時，收集細胞以流式細胞儀測定細胞表面之 IgM 與 IgD 表現量，並以 median fluorescent intensity (MFI) 平均後繪製成柱狀圖，(a)為 IgM 表現量，(b)為 IgD 表現量。

**圖二十：B 淋巴細胞活化後，以 HBe 蛋白處理 48 小時後，CD19、  
CD69、CD86、MHC I、MHC II 之表現量**

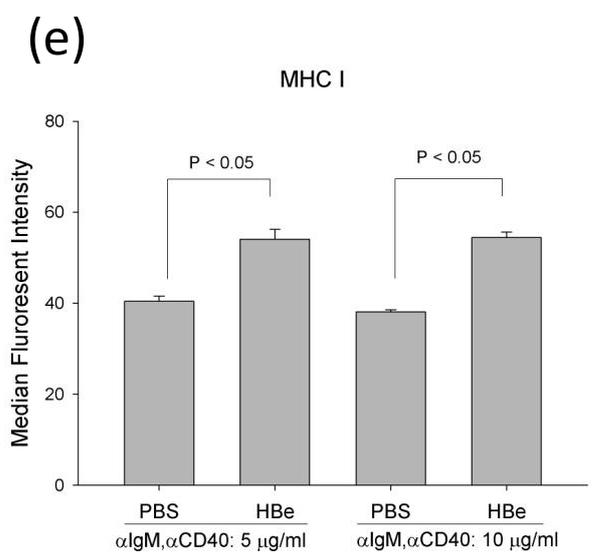
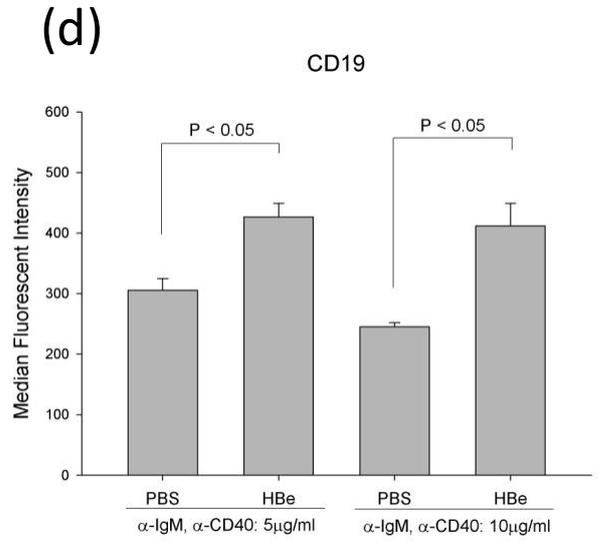
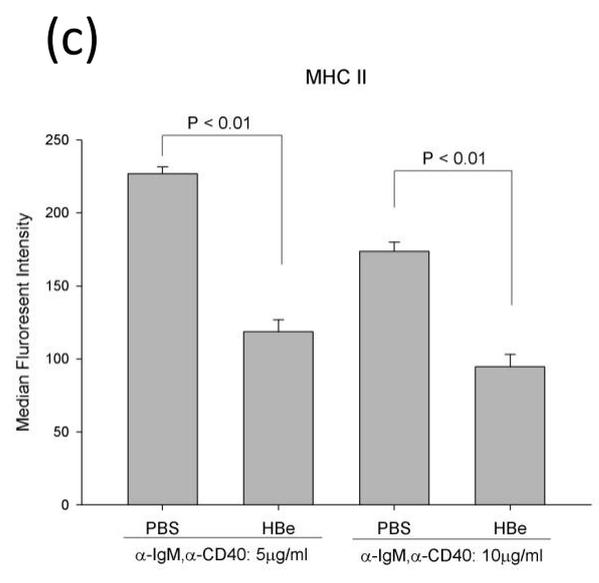
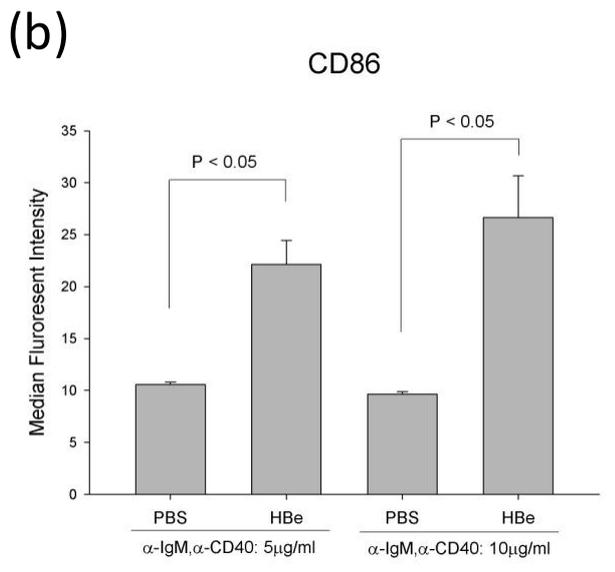
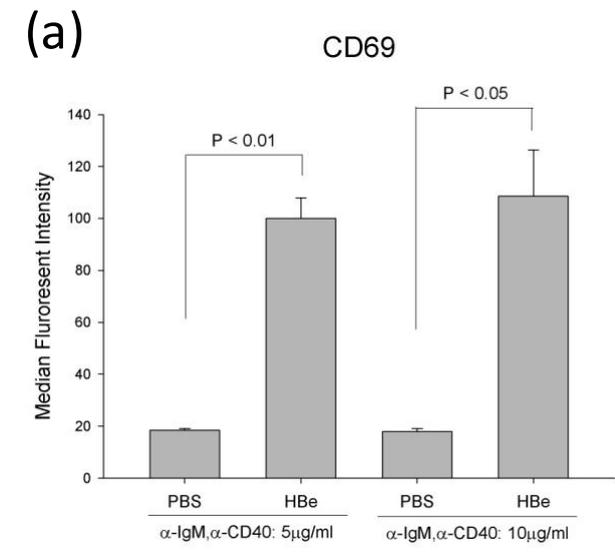
將 B 淋巴細胞以兩種  $\alpha$ -IgM,  $\alpha$ -CD40 抗體濃度 (5 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml) 刺激細胞活化，並分別加入 PBS 或 HBe (1 $\mu$ g/ml) 蛋白培養 48 小時後，收集細胞以流式細胞儀測定細胞 CD19、CD69、CD86、MHC I、MHC II 的表現量，黑色實線為背景螢光控制組，彩色實線為實驗組三重複，Y 軸為細胞數目，X 軸為螢光強度。



圖二十：B 淋巴細胞活化後，以 HBe 蛋白處理 48 小時後之 CD19、CD69、CD86、MHC I、MHC II 之表現量 (圖說於前頁)

**圖二十一：B 淋巴細胞活化後，以 HBe 蛋白處理 48 小時後之 CD19、CD69、CD86、MHC I 表現量上升，但 MHC II 表現量下降**

將 B 淋巴細胞以兩種  $\alpha$ -IgM,  $\alpha$ -CD40 抗體濃度 (5 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml) 刺激細胞活化，並分別加入 PBS 或 HBe 蛋白 (1 $\mu$ g/ml) 培養 48 小時後，收集細胞以流式細胞儀測定細胞 CD19、CD69、CD86、MHC I、MHC II 的表現量，將實驗組三重複數以 median fluorescent intensity (MFI) 平均後繪製成柱狀圖，(a)為 CD69 表現量，(b)為 CD86 表現量，(c)為 MHC II 表現量，(d)為 CD19 表現量，(e)為 MHC I 表現量。

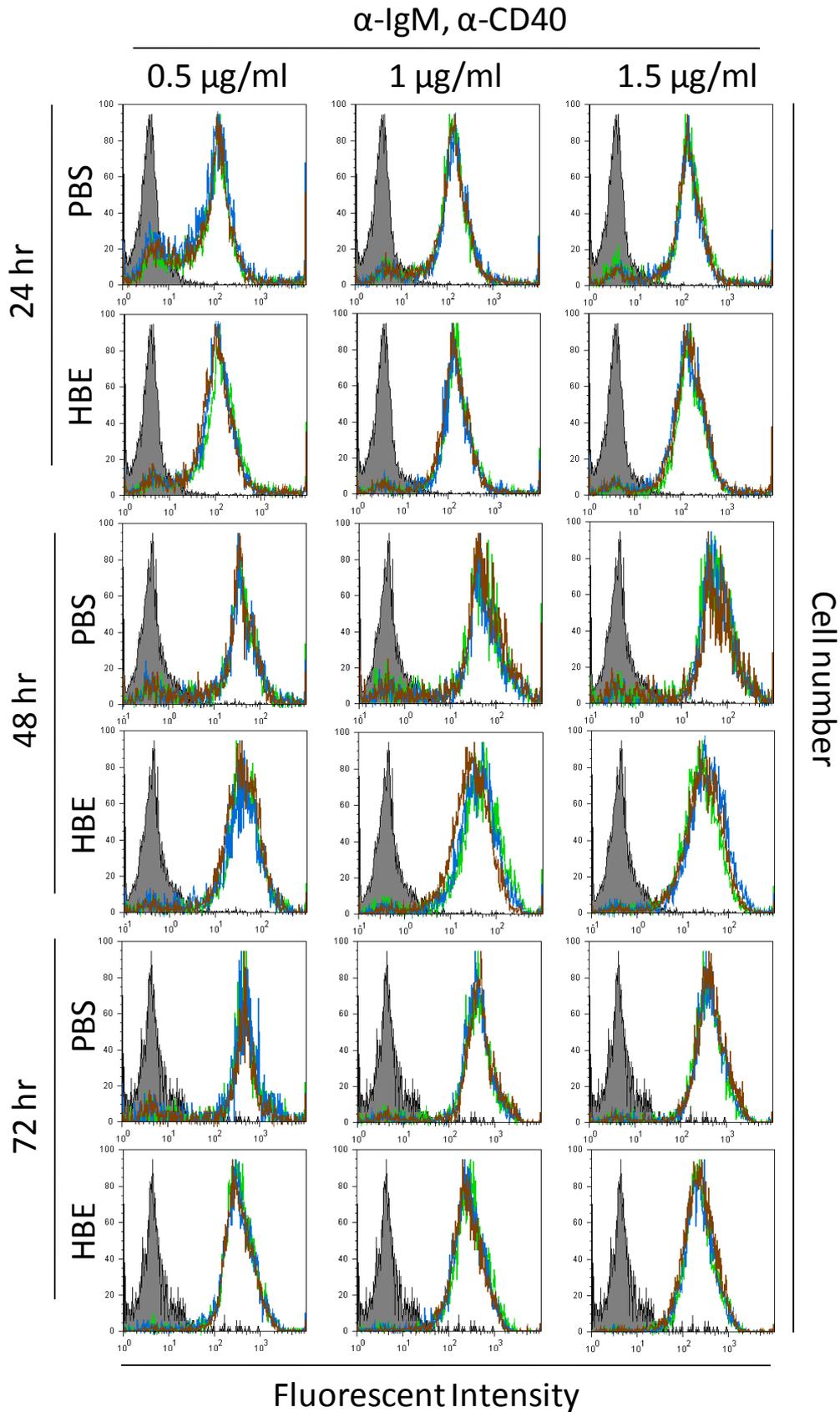


圖二十一: B 淋巴細胞活化後, 以 HBe 蛋白處理 48 小時後之 CD19、CD69、CD86、MHC I 表現量上升, 但 MHC II 表現量下降 (圖說於前頁)

圖二十二：B 淋巴細胞活化後以 HBe 蛋白處理 24、48、72 小時後之

### MHC II 表現量

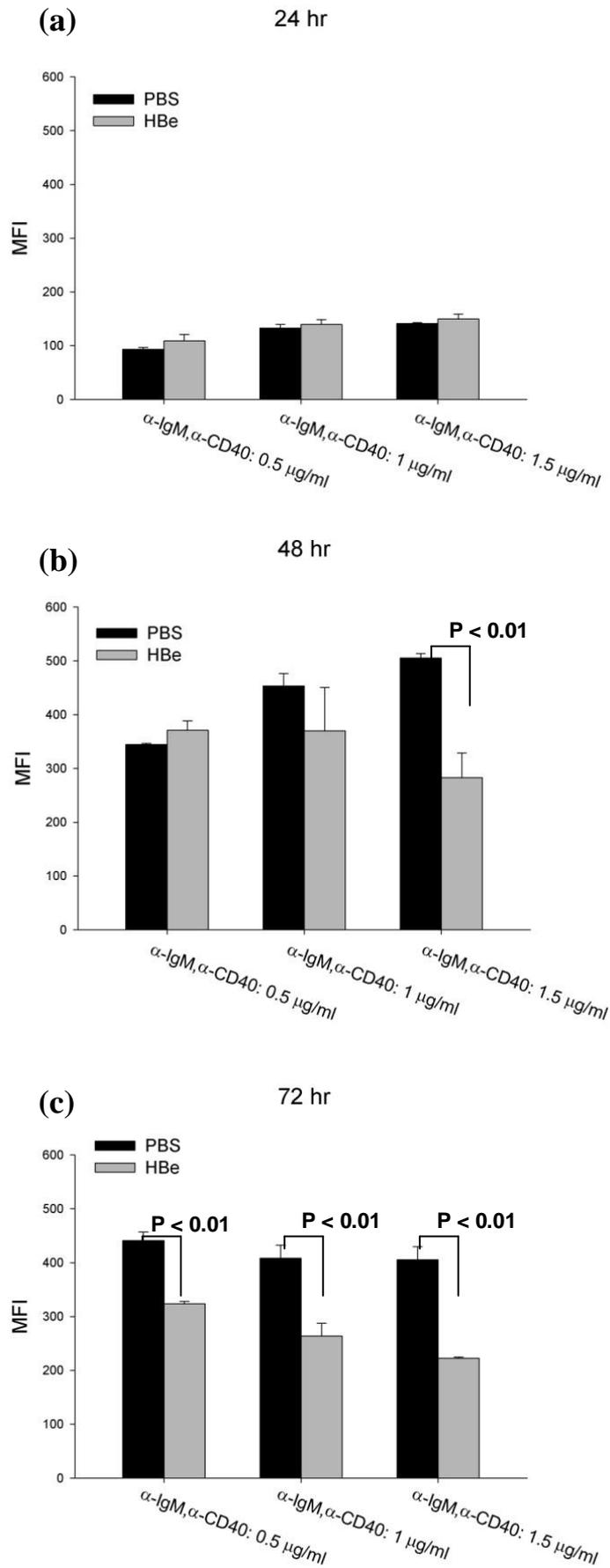
將 B 淋巴細胞以三種  $\alpha$ -IgM,  $\alpha$ -CD40 抗體濃度 (0.5 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml, 1.5 $\mu$ g/ml) 刺激細胞活化，並分別加入 PBS 或 HBe 蛋白 (1 $\mu$ g/ml) 培養 24、48、72 小時後，收集細胞以流式細胞儀測定細胞 MHC II 的表現量，黑色實線為背景螢光控制組，彩色實線為實驗組三重複，Y 軸為細胞數目，X 軸為螢光強度。



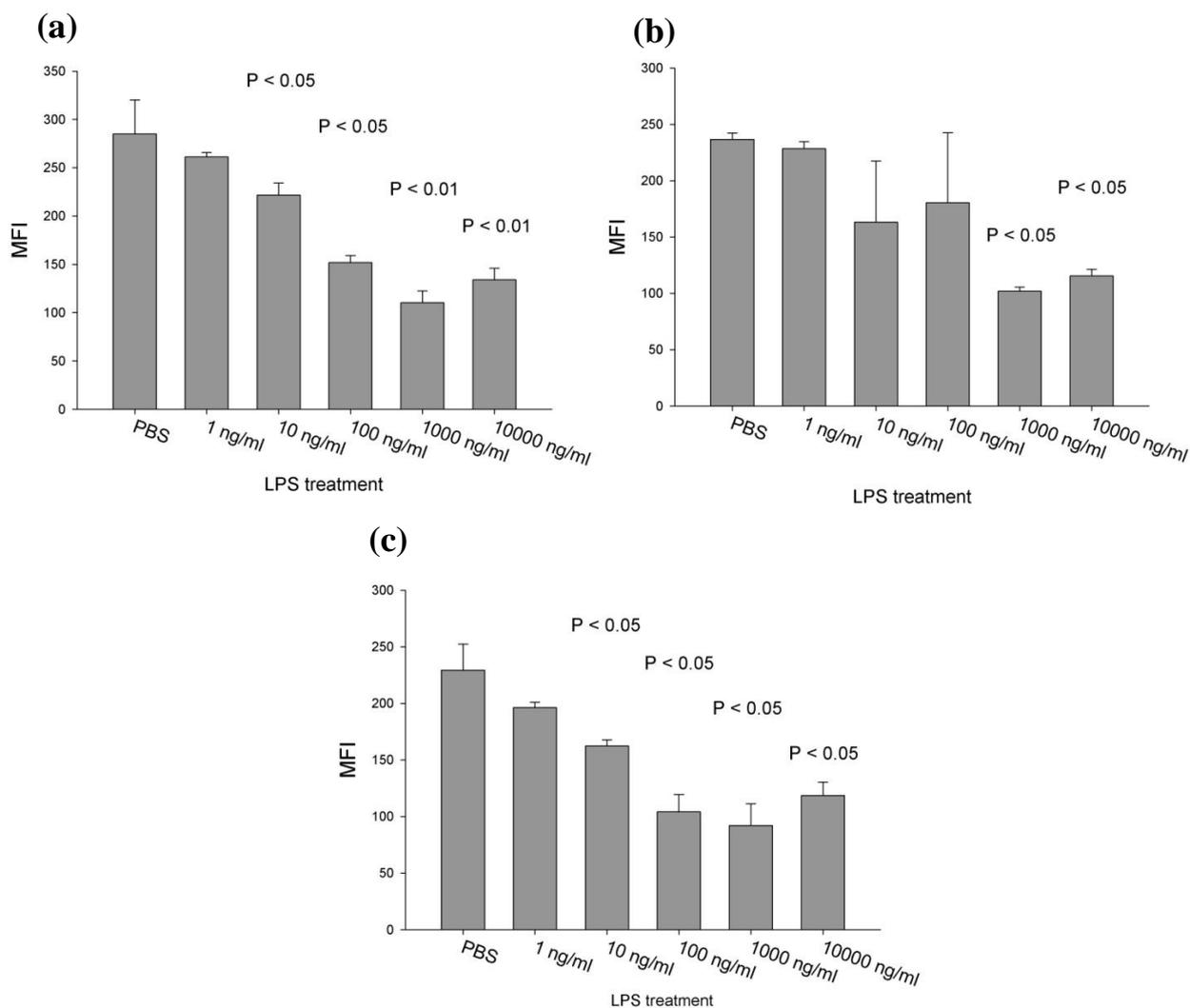
圖二十二：B 淋巴細胞活化後以 HBe 蛋白處理 24、48、72 小時後之 MHC II 表現量 (圖說於前頁)

**圖二十三：B 淋巴細胞活化後以 HBe 蛋白處理 24、48、72 小時後，  
MHC II 表現量皆下降**

將 B 淋巴細胞以三種  $\alpha$ -IgM,  $\alpha$ -CD40 抗體濃度 (0.5 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml, 1.5 $\mu$ g/ml) 刺激細胞活化，並分別加入 PBS 或 HBe 蛋白 (1 $\mu$ g/ml) 培養 24、48、72 小時後，以流式細胞儀測定細胞 MHC II 的表現量，將實驗組三重複數以 median fluorescent intensity (MFI) 平均後繪製成柱狀圖，(a)為處理 24 小時，(b)為 48 小時，(c)為 72 小時。

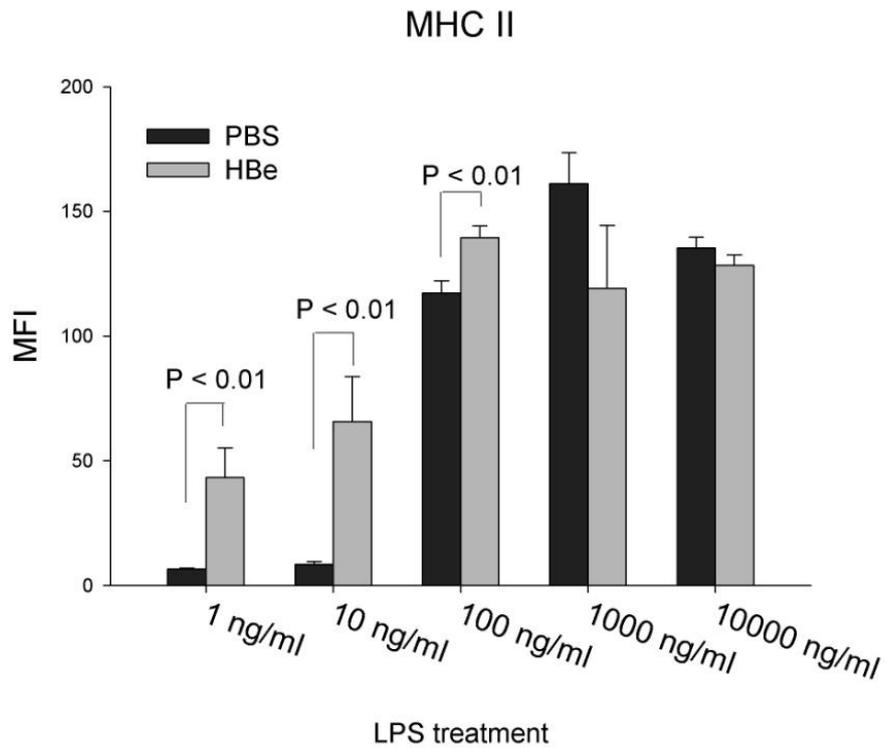


圖二十三：B 淋巴細胞活化後以 HBe 蛋白處理 24、48、72 小時後，於 72 小時 MHC II 表現量皆下降（圖說於前頁）



圖二十四：活化後的 B 淋巴細胞加入不同濃度的內毒素處理 48 小時後，MHC II 的表現量柱狀圖

將 B 淋巴細胞以三種  $\alpha$ -IgM,  $\alpha$ -CD40 抗體濃度 (2.5 $\mu$ g/ml, 5 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml) 刺激細胞活化，之後以 PBS 或五種內毒素濃度 (1ng, 10ng, 100ng, 1000ng, 10000 ng/ml) 處理 48 小時後，收集細胞以流式細胞儀測定細胞 MHC II 的表現量，將實驗組三重複數以 median fluorescent intensity (MFI) 平均後繪製成柱狀圖，(a)為處理 2.5 $\mu$ g/ml 抗體濃度，(b)為 5 $\mu$ g/ml 抗體濃度，(c)為 10 $\mu$ g/ml 抗體濃度。



圖二十五：被不同濃度內毒素活化之 B 淋巴細胞，處理 PBS 或 HBe 蛋白 48 小時後，MHC II 表現量柱狀圖

將 B 淋巴細胞以五種內毒素濃度 (1ng, 10ng, 100ng, 1000ng, 10000 ng/ml) 刺激細胞活化，並處理 PBS 或 HBe (1 $\mu$ g/ml) 48 小時後，以流式細胞儀分析細胞 MHC II 表現量，並將實驗組三重複以 (median fluorescent intensity, MFI) 量化後平均繪製成柱狀圖。