

摘要

B 型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染為全球性的嚴重健康問題，每年有一百萬人死於慢性 B 型肝炎引起的肝硬化、肝癌或肝臟衰竭。形成 HBV 慢性感染的原因可能與病毒干擾宿主免疫反應的能力有關，但其真正機轉至今未明。HBV 的 e (HBe) 蛋白為一非結構性蛋白質，與病毒的感染和複製能力無直接關聯，但所有的嗜肝 DNA 病毒(hepadnavirus)都表現 HBe 蛋白，因此 HBe 蛋白可能在 HBV 與宿主間之相互關係中扮演重要的角色。本實驗室過去發現 HBe 蛋白可與人類及小鼠的單核細胞及巨噬細胞結合，並影響細胞激素分泌、趨化作用及過氧化物之產生。巨噬細胞除了執行先天性免疫反應之外，亦具有呈獻抗原 (antigen presentation) 的功能，繼而刺激 T 細胞活化。本實驗室過去亦發現 HBe 蛋白不只和巨噬細胞結合，亦可與人類及小鼠 B 淋巴細胞結合，因此，本研究想探討 HBe 蛋白對淋巴細胞的影響。結果顯示 HBe 蛋白在試管中(*in vitro*)可微幅刺激小鼠脾臟細胞分裂，在以 carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFSE)及 B220 抗體雙重染色的觀察下，HBe 蛋白對 B 淋巴細胞具有促進分裂之作用。至於 HBe 蛋白對 T 淋巴細胞的影響上，不論以純化之 CD8⁺或 CD4⁺ T 細胞進行細胞分裂實驗或以整體 T 細胞藉由雙重染色測定 CD8⁺或 CD4⁺ T 細胞之增生，都發現沒有作用。最後在 T 細胞受體基因轉殖小鼠 OT-1 的 CD8⁺ T 細胞中亦沒有發現 HBe 蛋白會影響抗原引發的特異性 T 細胞增生。本研究之初步結果顯示 HBe 蛋白可能會增加 B 細胞的增生，但對 T 細胞則沒有作用。由於本實驗室過去曾發現 HBe 蛋白可與 B 細胞結合，是否 HBe 蛋白的確在結合 B 淋巴細胞後繼而影響其功能，尚待進一步研究確認。

Abstract

Hepatitis B virus (HBV) infection is a global public health problem. Approximately one million people die from HBV-related liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma every year. In order to persist in the host, HBV may have immunomodulatory abilities to interfere the host immune response. However, the mechanism of chronicity of HBV infection is still unknown. The hepatitis B viral e (HBe) protein is a non-structural protein. It is not present in the virion and not required for infection or replication of HBV. However, the HBe protein is conserved in all members of hepadnaviruses, suggesting that it may play an important role in HBV-host interactions. Our laboratory has previously found that the HBe protein binds to human and mouse monocytes and macrophages. Furthermore, it modulates chemotaxis and the production of peroxides and cytokines. In addition to participating in innate immune functions, macrophages also present antigens to T lymphocytes, leading to T cell activation and proliferation. Our laboratory has also found that the HBe protein could bind to human and mouse B lymphocytes. Therefore, the purpose of this thesis was to investigate the effect of the HBe protein on lymphocytes. I found that HBe could slightly induce mouse splenocyte proliferation *in vitro*. Using double labeling with carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFSE) and B220 antibody, I found that HBe could induce B cell proliferation. By contrast, the HBe protein had no effect on the proliferation of CD3⁺, CD8⁺ or CD4⁺ T cells which were cross-linked by anti-CD3/anti-CD28 antibodies. Finally, the effect of HBe on antigen-specific T cells was studied using CD8⁺ T cells of OT-I TCR-transgenic mice. My preliminary results did not show any effect of HBe on OVA peptide-induced T cell proliferation. Thus, the HBe protein seems to stimulate the proliferation of B cells but not T cells. How the proliferative signal is delivered after the binding of HBe on B cells remains to be investigated.

緒論

B 型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是全球嚴重的健康問題。每年全球約有一百萬人死於 B 型肝炎病毒的急性或慢性感染。目前全球有三億七千萬人為 B 型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)陽性，成為 B 型肝炎病毒的帶原者。B 型肝炎病毒帶原者因長期慢性肝炎，為肝硬化(cirrhosis)與肝細胞癌(hepatocellular carcinoma)的高危險群。B 型肝炎病毒感染成人後僅有百分之五至十的機率成為慢性的帶原者，然而在未經免疫球蛋白與疫苗注射的情況下，慢性帶原母親產下的新生兒中有 90%的機率會演變為慢性感染(Glebe, 2007; Rehermann et al., 2005)。

國人的慢性肝炎、肝硬化及肝癌約有百分之八十由 B 型肝炎病毒感染所造成。臺灣 B 型肝炎病毒表面抗原的預防接種自民國 73 年 7 月起推動，目前 6 歲以下幼兒之 B 型肝炎帶原率已由未實施預防注射前之 10.5%大幅下降至 0.84%。然而目前臺灣仍有二百八十萬至三百三十萬的 B 型肝炎帶原者，他們大多在全面注射疫苗之前即已感染，當此族群預期進入中高齡後，肝硬化或肝癌的高發生率仍預期存在(Centers for Disease Control, R.O.C., 2007)。

B 型肝炎病毒屬於嗜肝 DNA 病毒科(*Hepadnaviridae*)，為一直徑 42 nm 的球體，亦稱為鄧氏顆粒(Dane particle) (圖一)。基因體為部分雙股環狀 (partially double-stranded circular) DNA，包含一股全長 3.2 kb 的負股(negative strand)以及一股較短的正股(positive strand) DNA (圖二)。基因體具有四個重疊的開放編閱架構 (open reading

frame, ORF)：表面蛋白基因(S)、核心蛋白基因(C)、聚合酶基因(P)以及 X 基因(X)。表面蛋白基因可產生三種表面蛋白：大型表面蛋白、中型表面蛋白以及小型表面蛋白，共同構成病毒顆粒的外套。核心蛋白基因(C)產生的核心蛋白構成直徑為 27 nm 的二十面體，包覆基因體及聚合酶於其中。聚合酶基因(P)產生 DNA 聚合酶，為病毒複製所需(Seeger et al., 2000; Yang, 2006)。B 型肝炎病毒另產生兩個非結構性蛋白(non-structural protein)。其一為 X 基因所產生的 X 蛋白，參與調控細胞的轉錄(transcription)、訊號傳遞、細胞週期(cell cycle)、蛋白降解(protein degradation)與細胞凋亡(apoptosis)等多種功能(Tang et al., 2006)。另外 e 蛋白(HBe protein)是由前核心(precore)蛋白基因轉錄，再經修飾而成。前核心蛋白前端帶有疏水性的訊息胜肽(signal peptide)，將其帶往內質網(endoplasmic reticulum, ER)並切除 C 端(C-terminal)後，形成 e 蛋白，再分泌至細胞外(圖三)。目前 e 蛋白的確切功能仍不清楚(Milich et al., 2003)。

B 型肝炎病毒的生命週期(life cycle)如圖四所示，病毒先與肝細胞膜融合(membrane fusion)之後，核心顆粒即可進入細胞。病毒的 DNA 聚合酶先將部分雙股修復為共價鍵封閉環狀的雙股 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA)，再以此為模版，利用宿主細胞內的 RNA 聚合酶轉錄成病毒的各種 mRNA 與前基因體 RNA (pregenomic RNA, pgRNA)，mRNA 可轉譯為病毒蛋白以供複製與組裝，前基因體 RNA 則被包裹至核心蛋白內，經由反轉錄酶(reverse transcriptase)將之反轉錄成病毒的負股 DNA，再以此 DNA 為模版，

複製較短的正股 DNA。病毒核心顆粒與表面蛋白結合之後，形成完整的病毒顆粒釋出細胞。在複製的過程中亦會有非病毒顆粒的表面蛋白與 e 蛋白釋出細胞(Rizzatto et al., 2008; Yang, 2006)。

B 型肝炎病毒有血清型(serotype)及基因型(genotype)兩種分類法。血清型由 B 型肝炎病毒表面抗原判斷，由一個共同的抗原 *a* 及兩個位於第 122 號(*d* 或 *y*)與第 160 號(*w* 或 *r*)胺基酸突變位點配對而成(表一)。之後又根據第 127, 144, 145, 158, 159, 177 及 178 胺基酸突變位點，在其後加上數字等標記細分上述血清型。目前共有 ayw1~4, ayr, adw2~4, adrq-以及 adrq+十種血清型(Kidd-Ljunggren et al., 2002)。然而僅以表面抗原分類仍不足以反映 B 型肝炎病毒的基因體變異程度；1988 年 Oakiokamoto 提出以基因體變異大於百分之八為分類依據，目前已發表 A~H 八種基因型(Okamoto et al., 1988; Arauz-Ruiz et al., 2002)。不論是基因型或是血清型都有地理分佈上的特性(表二)(Kao et al., 2002)。

B 型肝炎病毒感染可分為急性感染或慢性感染。成年人透過血液與體液等媒介的水平傳染(horizontal transmission)有大於百分之九十的機率為無症狀感染(subclinical infection)急性感染。有症狀的急性感染區分為培養期(incubation phase)、急性疾病與臨床症狀期(acute disease clinical symptoms)以及恢復期(Recovery)(圖五 a)。在病毒感染後的兩個月培養期間，會有大量病毒複製，血液中可測得高量的病毒 DNA 與表面抗原(HBsAg)、e 抗原(HBeAg)以及非保護性的核心抗體(anti-HBc antibody)。隨後病毒數量下降，進入急性疾病

與臨床症狀期，此時因 T 細胞活化造成肝臟細胞受損，而使血清中丙氨酸轉氨酶(alanine aminotransferase, ALT)上升。感染四至六個月之後的恢復期中，丙氨酸轉氨酶下降，同時血清反應轉變(seroconversion)，此時血液中可測得表面抗體(anti-HBs antibody)與 e 抗體(anti-HBe antibody)，病人逐漸康復，並且對 B 型肝炎病毒具有免疫力(Chang et al., 2007; Rehermann et al., 2005)。

大多數慢性感染是由初生感染(neonatal infection)所造成。慢性感染的病程可分為免疫耐受期(immune tolerant phase)、免疫活化期(immune active phase)、低度複製期(low replicative phase)與高度複製期(high replicative phase) (圖五 b)。免疫耐受期中，血液含有高量的病毒 DNA 與 e 抗原，然而丙氨酸轉氨酶並不上升，這個時期可以持續十多年。由於目前尚不明白的原因，病毒 DNA 與丙氨酸轉氨酶在血液中的含量開始波動，同時血液中開始測得 e 抗體(anti-HBe antibody)的出現，此時進入免疫活化期，也開始產生肝硬化(liver cirrhosis)的現象。免疫活化期之後進入低度複製期，病毒 DNA 與丙氨酸轉氨酶的含量皆下降，肝臟發炎也逐漸趨緩。有些病患可能終生停留在此時期，另外一些病患因為病毒的前核心蛋白或核心蛋白基因(pre-C/C)突變，或是接受免疫抑制治療(immunosuppressive therapy)等其他原因而使病程進入高度複製期，使病毒大量複製，肝臟嚴重發炎受損。慢性感染患者在任何時期皆無法偵測到表面抗體(anti-HBs antibody) (Rehermann et al., 2005)。

B 型肝炎病毒在宿主體內會啟動先天性免疫反應(innate

immunity)與適應性免疫反應(adaptive immunity)。被病毒感染後的肝細胞可以分泌 γ 干擾素(inferferon γ)、腫瘤壞死因子 α (tumor necrosis factor α)以及 α/β 干擾素(inferferon α/β)，抑制病毒在細胞內複製。該細胞亦可活化自然殺手細胞(nature killer cell, NK cell)及自然殺手 T 細胞(nature killer T cell, NKT cell)，並且活化後續的 B 細胞與 T 細胞反應(Chang et al., 2007)。一般相信 B 型肝炎病毒並不直接造成肝臟細胞的傷害，而宿主的免疫反應反而是細胞損傷的原因。在病毒感染及發炎過程中，肝臟星狀細胞(hepatic stellate cells, HSC)也會被活化，分泌膠原蛋白(collagen)等胞外基質(extracellular matrix)，是造成肝硬化的主要原因。(Winau et al., 2007) 另外，受感染的細胞會將 B 型肝炎病毒抗原胜肽與第一型(class I) 主要組織相容複合體(major histocompatibility complex, MHC)一同呈現在細胞表面。具備 CD8 細胞表面標識(cell marker)的毒殺性 T 細胞(CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte) 可以毒殺呈現病毒胜肽於 MHC class I 中的肝臟細胞(Kao et al., 2002)。慢性 B 型肝炎患者的肝臟長期承受細胞損傷與修補，多次的細胞分裂可能使細胞 DNA 突變率增加(Chisari et al., 2000)；另一方面，B 型肝炎病毒的 X 基因產物具有轉活化(transactivate) 細胞基因的功能，影響與細胞生長相關的基因，也可能影響促使細胞凋亡(apoptosis) 的 p53 功能(Bouchard et al., 2004)。因此慢性 B 型肝炎患者罹患肝癌的機率大為增加。

病毒具有許多能夠逃避與干擾免疫系統的機制，如表三所示(Finlay et al., 2006)。例如人類免疫缺陷病毒(Human

immunodeficiency virus, HIV) 能夠藉由細胞內吞作用 (endocytosis) 降低細胞表面的第一型主要組織相容複合體，藉以抑制抗原呈獻，使 T 細胞無法辨識遭受病毒侵犯的細胞。(Loch et al., 2005) 另外，單純皰疹病毒 (herpes simplex virus, HSV) 可以抑制胜肽與運輸蛋白 (transporter associated with antigen presenting, TAP) 結合，進而降低病毒胜肽被呈獻的機會 (Tomazin et al., 1996) 。與 B 型肝炎病毒同屬 *Hepadnaviridae* 的土撥鼠肝炎病毒 (woodchuck hepatitis virus, WHV) 在慢性感染中，肝細胞與脾臟淋巴細胞的第一型主要組織相容複合體有降低的現象，而且此現象只發生於慢性感染而非急性感染中 (Michalak et al., 2000) 。

病毒不僅能夠干擾宿主抗原呈獻的作用，亦可影響細胞激素 (cytokine) 的功能 (Gooding, 1992) 。例如腺病毒 (adenovirus) 的 E3-14.7K 蛋白能夠抑制腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 受體 (receptor) 進入 (internalize) 細胞，阻止細胞內產生誘導死亡的訊號複合體 (death-inducing signaling complex, DISC) 以避免宿主細胞死亡，讓病毒有機會能夠複製更多子代 (Schneider-Brachert et al., 2006) 。另外，淋巴性脈絡叢腦膜炎病毒 (Lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV) 的慢性感染亦會降低 CD8⁺ T 細胞的第七介白質 (interleukin-7, IL-7) 與第十五介白質 (IL-15) 的受體表現，進而影響 T 細胞的恆定性增生 (homeostatic proliferation)，而且該 CD8⁺ T 細胞在體外 (in vitro) 實驗中亦無法對第七介白質及第十五介白質反應。如將該細胞注射入正常小鼠，亦不能進行恆定性增生

(Shin et al., 2007)。因此有些病毒可能藉由干預細胞激素的訊息傳遞而影響淋巴細胞的功能。

造成 B 型肝炎病毒持續性感染 (persistent infection) 的確切機制目前仍不清楚。然而已有些報導指出 B 型肝炎病毒確實會影響免疫系統。慢性 B 型肝炎患者的 CD4⁺ T 細胞減少；CD8⁺ T 細胞增加，造成 CD4⁺/CD8⁺ T 細胞的族群比例改變，並且與血液中的病毒量(viral load)呈現負相關，但其原因不明(You et al., 2008)。B 型肝炎病毒也可藉由突變逃避免疫系統的辨識；如慢性病患的核心抗原 (HBcAg) 決定位 (epitope) 與急性病患有不同的序列。如將慢性病患核心抗原的胜肽序列加入急性病患的 T 細胞中，可發現其 T 細胞毒殺性明顯下降。如此可能使被感染的寄主細胞得以存活。(Bertoletti et al., 1994)。慢性 B 型肝炎患者的樹突細胞 (dendritic cell) 與 B 型肝炎病毒顆粒 (viral particle) 共同培養後，樹突細胞刺激 T 細胞分裂的能力降低，並且其分泌腫瘤壞死因子 α (TNF- α) 與干擾素 γ (interferon- γ , IFN- γ) 的能力亦下降。樹突細胞為專門抗原呈獻細胞 (professional antigen presenting cell) 在適應性免疫反應的啟動中扮演重要角色，因此 B 型肝炎病毒可能藉此影響適應性免疫反應 (Beckebaum et al., 2003)。在 e 抗原陽性的患者中，其單核細胞 (monocyte) 的第二類鐸受體 (Toll-like receptor 2, TLR2) 表現量較一般常人低。如將 B 型肝炎病毒顆粒與健康者的單核細胞共同培養，其第二類鐸受體的表現量也會下降。因類鐸受體為先天性免疫反應中非常重要的受體，e 抗原對第二類鐸受體的干擾可能使細胞抵抗

病毒的能力減損。(Riordan et al., 2006)。

由上述研究可知，B 型肝炎病毒可能具有免疫調節 (immunomodulation) 的功能，然而透過哪些分子機制進行免疫調節目前並不清楚。B 型肝炎病毒的 e 抗原並非感染與複製所必須的蛋白，然而所有嗜肝 DNA 病毒 (hepadnavirus) 都保留有此蛋白 (Chang et al., 2007)，因此該蛋白可能具有重要的生物功能。根據統計，表面抗原陽性的患者演變為肝癌的風險為一般人的九倍，而 e 抗原陽性患者卻有六十倍之高 (O'Shea, 2007)。在台灣，e 抗原陽性患者的病毒 DNA 含量比 e 抗原陰性者高，同時產生慢性肝炎的年齡亦較早 (Chen et al., 2005)。同樣有研究指出，e 抗原的血清反應轉變 (seroconversion) 較晚或缺乏者，肝炎與肝硬化的病程通常較快 (Lin et al., 2008)。這些在 B 型肝炎患者的發現，似乎指出 e 抗原可能與慢性感染及肝硬化或肝癌的演變有關聯。不過 e 抗原的含量與 B 型肝炎病毒量成正比，因此 e 抗原的確切功能尚無法定論。不過，在土撥鼠與轉殖小鼠中的研究也顯示 e 抗原與慢性感染的關聯。例如土撥鼠肝炎病毒有一個前核心基因突變的亞變種 (pre-core mutated strain)，不會產生 e 蛋白，遭到該變種病毒感染的土撥鼠只有急性感染而不會造成慢性感染 (Cote et al., 2000)。Cheng 等人曾製造出能夠同時對抗核心抗原及 e 抗原的 T 細胞受體 (T cell receptor, TCR) 基因轉殖小鼠。如將此 TCR 基因轉殖小鼠與核心抗原轉殖小鼠交配成雙重基因轉殖鼠 (TCR×HBc double transgenic mice) 時，該小鼠仍會產生對抗核心抗原的抗體以及細胞激素。若將 e 抗原基因再轉

殖到上述小鼠，形成三重基因轉殖鼠(TCR×HBc×HBe triple transgenic mice)時，該小鼠體內對抗核心抗原的抗體明顯降低，同時血清中的第二介白質與干擾素 γ 也較低。因此 e 抗原會干擾抗體與細胞激素的產生。(Chen et al., 2004)。

本實驗室過去發現 B 型肝炎病毒 e 蛋白可與人類單核細胞結合，會增加第六介白質 (IL-6)、第八介白質 (IL-8)、第十介白質 (IL-10)、第二 CC 趨化因子 (CC chemokine ligand2, CCL2)、第四 CC 趨化因子 (CCL4) 以及第八 CXC 趨化因子 (CCL8) 的產生。但同時 e 蛋白也會降低單核細胞的移動能力，因而造成單核細胞的趨化性 (chemotaxis) 下降。e 蛋白亦會降低單核細胞的呼吸遽增 (respiratory burst)，因此推測單核細胞的抗病毒能力可能在 e 蛋白作用後下降 (Lu, 2003)。過去也曾發現 e 蛋白也會與小鼠肝臟與腹腔的巨噬細胞結合，亦會影響第一介白質 (IL-1)、第六介白質 (IL-6)、第十介白質 (IL-10)、第十二介白質 (IL-12)、 γ 干擾素 (interferon γ) 以及第二 CC 趨化因子 (CCL2) 的產生。雖然 B 型肝炎病毒並非小鼠的感染原，然而 e 蛋白對於小鼠的免疫細胞仍然有作用，因此小鼠可作為研究 e 蛋白的動物模式 (Hsu, 2001; Chang, 1999)。

過去的研究已發現 B 型肝炎病毒 e 蛋白可以影響單核細胞及巨噬細胞的一些免疫功能。本篇論文的目的則在於探討 e 蛋白是否會影響淋巴細胞反應。首先，我探討 e 蛋白是否對體外培養的小鼠脾臟細胞有作用，其次，我以洋刀豆血球凝集素 (Concanavalin A, Con A) 或以對抗 CD3 與 CD28 的抗體藉由 cross-linking 誘發 T 細胞增殖反

應為模式，探討 e 蛋白對 T 細胞增殖的影響。最後利用 T 細胞受體轉殖的 OT-I 小鼠為模式，測定 e 蛋白對抗原特異性 (antigen-specific) T 淋巴細胞的作用。實驗結果顯示，e 蛋白對 T 細胞增生沒有明顯的影響，然而卻發現 e 蛋白能微幅增加 B 細胞的增生。

材料與方法

小鼠

C57BL/6 小鼠購自財團法人國家實驗動物中心 (台北, 台灣)。對白蛋白 (ovalbumin, OVA) 第 257 至 264 號氨基酸 (SIINFEKL) 具有專一性的 T 細胞受體基因轉殖小鼠 OT-I (Clarke et al., 2000) 由中央研究院分子生物研究所 (台北, 臺灣) 孔祥智博士贈與。小鼠平均週齡為 6 至 10 週。

B 型肝炎病毒 e 蛋白之製備

表現 B 型肝炎病毒 e 蛋白的質體 (plasmid) pRSET/HBe, 係由本實驗室過去成員製備 (圖六, Chang, 1999)。帶有 Histidine tag (His-tag) 的基因重組 e 蛋白由 pRSET/HBe 在 *E. coli* 中表達, 做法如下述。首先, 利用 high-speed plasmid mini kit (Geneaid, 台北, 臺灣) 將 pRSET/HBe 質體自 DH5 α *E. coli* 分離, 再將含有 10 ng DNA 的 10 μ l 質體與 50 μ l 的 BL21(DE3) *E. coli* 勝任細胞 (competent cell) 混合, 置於冰上 20 分鐘後, 以 42°C 熱處理 1 分 30 秒, 再放在冰上 2 分鐘。加入 200 μ l Luria-Bertani (LB) 培養基 (AthenaES, Baltimore, USA), 均勻混合後, 將 30 μ l 菌液塗在含 270 μ M ampicillin (Sigma, St. Louis, USA) 的 LB agar 培養皿上, 於 37°C 培養箱在 170 rpm 轉速下培養 3 天後, 將單一菌落 (colony) 置於內含 270 μ M ampicillin 的 10 ml LB 培養基中 16 小時。再取其中的 2 ml 飽和菌液培養於內含 270 μ M ampicillin 的 200 ml LB 培養基中, 直到波長 600 nm 吸光讀值 (OD₆₀₀) 為 0.6。接著加入 2 ml 濃度為 100 mM 的 isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG)

(MdBio, Rockville, USA)，使其最終濃度為 1 mM，於 37°C 培養箱在 170 rpm 轉速下培養 3 小時。再於 4°C 下，以 10,000 ×g 離心 30 分鐘，去除上清液。再將沉降細菌顆粒(pellet)加入 18 ml 的分解溶液 (lysis buffer：100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris · HCl, 6 M Guanidine hydrochloride)，置於旋轉架上轉動 1 小時。再於 4°C 下，以 10,000 ×g 離心 30 分鐘，取其上清液加入 2 ml Ni-NTA resin (Qiagen, Hilden, Germany) 的 Ni²⁺管柱中，將管柱置於旋轉架上轉動 1 小時，使 His-tag 蛋白與 Ni-NTA resin 結合。管柱分別經過 8 ml denature wash buffer (100 mM NaH₂PO₄, 10mM Tris · HCl, 8M urea, pH 6.3) 與 8 ml native wash buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0) 沖洗兩次。最後加入 4 ml elution buffer (50mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250mM imidazole, pH 8.0) 洗提出含有 His-tag 的 B 型肝炎病毒 e 蛋白。最後將蛋白溶液注入 Snake Skin™ Pleated Dialysis Tubing (Pierce, Rockford, USA)，密封之後置於 5 L phosphate buffered saline (PBS) 溶液透析 3 次，最後得到溶於 PBS 溶液中的 e 蛋白。

蛋白質膠體電泳 (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)、銀染 (Silver staining) 以及西方墨點轉漬法 (Western blotting)

蛋白質樣本與 5 倍濃度的樣本緩衝液 (sample buffe: 2.5% SDS, 20% glycerol, 125 mM Tris-HCl, 0.01% bromophenol blue, 10% β-mercaptoethanol, pH 6.8) 以 1:4 的比例均勻混合後煮沸 10 分鐘，再以 Gallagher 建立的方法 (Gallagher, 1998) 進行 SDS-10%膠體電

泳。

銀染以 SilverQuest™ Silver Staining Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) 提供的方式，依使用手冊操作。首先以 50 ml fixing solution (40% ethanol, 10% acetic acid) 固定膠體 16 小時，以 30% 酒精清洗之後，浸泡於 50 ml sensitizing solution 10 分鐘，接著以 30% 酒精以及純水清洗，再加入 50 ml staining solution 15 分鐘，使蛋白與銀離子結合，再以純水短暫清洗 30 秒後加入 developing solution 呈色。當顏色達到適當深度時加入 5 ml stopper，終止其反應。

西方墨點轉漬法則在 SDS-PAGE 蛋白質電泳後，利用半乾式轉漬器 (semi-dry transfer plate, MODEL#EBU-4000, C.B.S Scientific Co., Del Mar, CA, USA)，以 70 毫安培電流通電 2 小時，將樣本轉漬至硝化纖維紙 (nitrocellulose paper) 上，再將此硝化纖維紙浸泡於 5% 脫脂奶粉溶液中，在 4°C blocking 16 小時。對抗 B 型肝炎病毒核心抗原 (anti-HBc) 之抗體則以 1% 脫脂奶粉溶液稀釋 1,000 倍，於室溫下與附著了蛋白質的硝化纖維紙反應 1 小時。再以 washing buffer (PBS containing 0.05% Tween 20) 沖洗 3 次，每次 10 分鐘。接著以 1% 脫脂奶粉溶液將結合過氧化酵素 (peroxidase) 的 goat anti-rabbit IgG 抗體稀釋 2,000 倍，作為二次抗體，於室溫下反應 1 小時。再次沖洗 3 次，每次 10 分鐘。最後以 western lighting™ (PerkinElmer Life Science, Inc., Boston, USA) 呈色，即加入 1 ml enhanced luminal reagent 與 oxidizing reagent，在室溫下與硝化纖維紙搖動混合 3 分鐘，再以冷光影像分析系統 (MODEL#LAS-1000, Fujifilm, Tokyo, Japan) 擷取影像。

蛋白質之定量

蛋白質溶液均以 BCATM Protein Assay Reagent Kit (Pierce) 定量。使用方式是將 reagent A (sodium carbonate, sodium bicarbonate, BCATM detection reagent and sodium tartrate in 0.1 N sodium hydroxide)與 reagent B (4% cupric sulfate pentahydrate)以 50:1 的比例混合為 working reagent。在 96 孔盤中分別加入 200 μ l working reagent 及 0.025 μ g/ml 至 2 μ g/ml 的白蛋白，當作標準樣本，待測樣本亦加入 200 μ l working reagent，搖動 30 秒後，於 37°C 下靜置 30 分鐘。最後以 Multiskan Spectrum (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) 讀取 OD_{560 nm} 吸光值，藉由比對標準樣本與待測樣本的數值，即可測量蛋白質之濃度。

內毒素(Endotoxin)之測定及移除

從 *E.coli* 純化的蛋白溶液可能含有內毒素。內毒素之含量係以 Pyrochrome[®] Chromogenic Endotoxin Testing Reagents (Associates of Cape Cod, Inc., East Falmouth, USA) 測定。首先，將 control standard endotoxin (CSE) 及待測蛋白溶液分別與 Limulus Amebocyte Lysate (LAL) reagent water 以 5 倍濃度的間距作連續稀釋混合。將以上稀釋樣本各取 200 μ l 注入 96 孔盤後，加入 50 μ l LAL lysate，在 37°C 下於 Multiskan Spectrum 內反應 70 分鐘，每 20 秒讀取一次 OD_{405nm} 吸光值，最後以待測溶液之 OD_{405nm} 達到 0.03 時的時間與 CSE 比較，藉以估計蛋白溶液中的內毒素含量。

內毒素的移除則利用 EndoTrap[®] blue(Profos AG, Regensburg,

German) 管柱移除。先以 regeneration buffer 和 equilibration buffer (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.1 mM CaCl₂, pH 7.5) 沖洗管柱後，將蛋白溶液加入管柱內，收集自管柱流出的溶液，即可去除內毒素。

小鼠脾臟細胞與脾臟貼附細胞之製備

小鼠以 CO₂ 犧牲後，將脾臟取出，置於已含 5 ml Hanks' balanced salt solution (HBSS) 的直徑 6 公分培養皿。先將脾臟用鑷子撕開，再用玻璃滴管反覆抽吸，使脾臟細胞游離。再將脾臟細胞懸浮液通過一個充填 1.5 公分棉花的玻璃滴管，去除較大的組織碎塊。接著在 4°C 下，將細胞懸浮液以 400 xg 離心 10 分鐘，移除上清液後，加入 10 ml ACK erythrocyte lysis buffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM NaHCO₃, 1 mM EDTA)，將紅血球溶解，再於 4°C 下，以 400 xg 離心 10 分鐘。移除上清液後將細胞懸浮於 10 ml 的 complete Mishell-Dutton 培養基 (Minimum Essential Medium(Invitrogen), 50 mM HEPES, 0.225 % NaHCO₃, 3.9×10⁻⁶ % 2-mercaptoethanol, 1X pen-strep solution(Biological industries), 5% fetal bovine serum)，倒入 10 公分培養皿，在 37°C 的 CO₂ 培養箱中靜置 1 小時，使具有貼附能力的細胞貼附於培養皿的表面。未貼附的細胞可以用吸管取出，稱為脾臟細胞。貼附的細胞可以細胞刮片 (cell scraper) 刮下，稱為脾臟貼附細胞，可作為抗原呈獻細胞 (antigen presenting cells, APCs)。

T 細胞之純化

純化 T 細胞所需 anti- μ 、anti- κ 、anti-CD4 與 anti-CD8 抗體均由中央研究院分子生物研究所 (台北，臺灣) 孔祥智博士贈與。依前述

方式取得的小鼠脾臟細胞懸浮於含有 5% fetal bovine serum (FBS) 的 HBSS 中，均分於兩個預先塗佈 25 μg anti- μ (clone: Bet2) 及 25 μg anti- κ (clone: 187.1) 抗體的 10 公分培養皿中，在室溫下靜置 1 小時，使 B 細胞貼附。以吸管收集未貼附的細胞後，再以 5 ml 含有 5% FBS 的 HBSS 輕微沖刷培養皿上殘留的未貼附細胞。將如此收集的細胞再置於一個預先塗佈 25 μg anti- μ 及 25 μg anti- κ 抗體的 10 公分培養皿中，室溫下靜置 1 小時，使殘餘的 B 細胞貼附。再收集未貼附細胞，並以 5 ml 含有 5% FBS 的 HBSS 輕微沖刷培養皿上殘留的未貼附細胞。這些已去除 B 細胞的脾臟細胞稱為脾臟 T 細胞，約有 80% 為 CD3^+ T 細胞。如欲繼續純化，則再將脾臟 T 細胞加入預先塗佈 4 μg anti- CD8 (clone : 3.155) 抗體的 10 公分培養皿，室溫下靜置 25 分鐘。收集未貼附細胞，以室溫下的 5 ml HBSS 輕微沖刷培養皿，接著以玻璃滴管吸取冰的 HBSS 強力沖刷培養皿上的貼附細胞並收集之，此時可得到純度約 97% 的 CD8^+ T 細胞。而先前收集的未貼附細胞則置入預先塗佈 20 μg anti- CD4 (clone: RL172) 抗體的 10 公分培養皿，室溫下靜置 28 分鐘。移除未貼附細胞，以室溫下的 5 ml HBSS 輕微沖刷培養皿，接著以玻璃滴管吸取冰的 HBSS 強力沖刷培養皿上的貼附細胞並收集，此時可得到純度約 99% 的 CD4^+ T 細胞。

脾臟細胞表面分子之鑑定

不同的脾臟細胞依前述方式取得後，如欲辨識 CD3 、 CD4 、 CD8 (T 細胞標記) 或 B220 (B 細胞標記) 表面分子，則將 2 μl 濃度為 0.5

mg/ml 已標記 fluorescein isothiocyanate (FITC) 或 phycoerythrin (PE) 的 anti-CD3 ϵ 、anti-B220 抗體，或者標記 PE 或 PerCP-Cy5.5 的 anti-CD4、anti-CD8 抗體(BD Bioscience, Franklin Lakes, U.S.A)分別與懸浮於 100 μ l PBS 的 1×10^6 個細胞混合，置於冰上 30 分鐘，再以 2ml PBS 清洗一次後，以流式細胞儀(Flow cytometry, MODEL#CyFlow[®]SL, Partec, Görlitz, Germany)分析標識的細胞族群。欲辨識 MOMA-2 或 F4/80 細胞表面分子，將 10 μ l 濃度為 0.1mg/ml 的 FITC-anti-MOMA-2 或 FITC-anti-F4/80 抗體(AbD Serotec, Kidlington, U.K.) 分別與懸浮於 90 μ l PBS 的 1×10^6 個細胞混合，後續步驟與上述方法相同。

Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFDA, SE; CFSE)標示細胞

將 1×10^7 個欲標示 CFSE 的細胞懸浮於內含 0.5 μ M CFSE (Invitrogen) 的 PBS 中，置於 37 $^{\circ}$ C 下作用 15 分鐘，再於 4 $^{\circ}$ C 下，以 400 \times g 離心 10 分鐘，去除上清液。以 10 ml 含有 5% FBS 的 HBSS 懸浮細胞，再以上述離心條件清洗一次。依實驗設計所需細胞數以適量 complete Mishell-Dutton 培養基懸浮細胞。

細胞分裂試驗

1. 分裂原(mitogen)刺激之細胞分裂試驗

分裂原刺激試驗的細胞來自 C57BL/6 小鼠脾臟，細胞取得方式如前所述。在 24 孔細胞培養盤中每孔加入已標記 CFSE 的 1×10^6 個脾臟細胞，同時加入 2 μ g/ml Con A (Sigma)，刺激 T 細胞分裂。

實驗組則再加入 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ B 型肝炎病毒 e 蛋白，於 37°C、含 5% CO_2 的細胞培養箱中培養 3 天。以流式細胞儀分析 CFSE 螢光衰減程度。

2. CD3/CD28 cross-linking 刺激之細胞分裂試驗

CD3/CD28 cross-linking 試驗在預先塗佈 anti-CD3 抗體及 anti-CD28 抗體(BD Bioscience)的 96 孔 U 型底細胞培養盤中進行。進行實驗前，先在培養盤孔洞中各加入 15 μl 濃度皆為 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 anti-CD3 與 anti-CD28 抗體(BD Bioscience)溶液，於 37°C 靜置 90 分鐘後加入 200 μl PBS，置於 4°C 16 小時後，將溶液移除。再加入 200 μl PBS 置於 4°C，於使用前移除。C57BL/6 小鼠脾臟中之 T 細胞取得方式如上述。先將 2×10^5 個經 0.5 μM CFSE 標示的脾臟 T 細胞、 CD4^+ 或 CD8^+ T 細胞加入盤孔，再加入 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ B 型肝炎病毒 e 蛋白，置於含 5% CO_2 的細胞培養箱中，在 37°C 培養 3 天，再以流式細胞儀分析 CFSE 在細胞內之強弱程度。

3. T 細胞受體基因轉殖小鼠之細胞分裂試驗

本試驗的細胞來自 OT-I 小鼠脾臟的 CD8^+ T 細胞及正常 C57BL/6 小鼠脾臟的抗原呈獻細胞。細胞取得方式如前所述。先將 2.5×10^3 (或 1×10^3) 個 C57BL/6 小鼠抗原呈獻細胞加入平底 96 孔培養盤中，再加入 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 B 型肝炎病毒 e 蛋白。置於含 5% CO_2 的細胞培養箱中，在 37°C 下培養 24 小時後。再加入 5×10^4 (或 2×10^4) 經 0.5 μM CFSE 標示的 CD8^+ T 細胞(T 細胞與抗原呈獻細胞

之比為 20 : 1)及 0.05 µg/ml 的 OVA_{257~264} 胜肽(中央研究院分子生物研究所，孔祥智博士贈與)，培養 3 天後，以流式細胞儀分析 CFSE 在細胞內之強度。

4. 細胞分裂之資料分析

CFSE 標記後的細胞培養三天後，以微量吸管(pepteman)收集，以 400 xg 離心 10 分鐘，去除上清液並將細胞懸浮於 1 ml PBS 後，以流式細胞儀(CyFlow® SL, Partec, Germany)測量細胞螢光強度分佈情形。以每次實驗的 PBS 控制組螢光左邊界開始劃分為分裂細胞的螢光區間，劃分的分裂細胞螢光區間以不超過 5%為原則，如圖十、a。將所得的分裂細胞百分比繪製成柱狀圖，如圖十一，並以兩獨立樣本的無母數檢定-Mann-Whitney test 分析，檢定是否有顯著差異。

結果

E. coli 產生之 B 型肝炎病毒 e 蛋白

為了得到大量的 B 型肝炎病毒 e 蛋白，我將帶有 e 蛋白基因的 pRSET 質體以轉型作用(transformation)送入 *E. coli*。誘使 *E. coli* 表現帶有 His-tag 的 e 蛋白後，以 Ni²⁺管柱純化，再進行 SDS-PAGE 電泳及銀染 (silver stain)。由圖七、a 第 2 行溶菌液的電泳結果可見在 16.5 kDa 附近的蛋白大量表現。自第 3 行的管柱流出液中可見大量表現的蛋白大幅減少，顯然大部分已被 Ni²⁺管柱吸附。自第 5 至第 8 行沖洗液中可見其他不與管柱結合的蛋白被沖洗出來。而在第 4 行沖提液中可見一個分子大小約為 17 kDa 的蛋白。為進一步確認所純化的蛋白含有 HBe/HBeAg 抗原決定位，我以 anti-HBe 抗體進行西方墨點轉漬法(圖七、b)，由圖中僅 17 kDa 位置呈色，證實所純化的蛋白確實具有該抗原決定位。

細菌內毒素含量係以 Pyrochrome®呈色內毒素試劑測定。上述所獲得的 HBe 蛋白溶液中含有 289.5 ng/ml 的內毒素。為了避免內毒素的干擾，我們以 EndoTrap® blue 管柱移除蛋白溶液的內毒素。通過 EndoTrap® blue 管柱後，HBe 蛋白溶液的內毒素大幅降低，含量為 12 ng/ml。

小鼠脾臟細胞族群及 T 細胞純化

由正常 C57BL/6 小鼠脾臟分離出的細胞，懸浮於 PBS 溶液中，分別以 FITC-anti-CD3、FITC-anti-B220、FITC-anti-F4/80 以及

FITC-anti-MOMA-2 抗體標示，再以流式細胞儀分析。脾臟中約含 30 % T 細胞，60% B 細胞與 10% 巨噬細胞(圖八)。如將小鼠脾臟細胞利用 anti- μ 及 anti- κ 去除 B 細胞後，平均可得到純度為 80 % 的 CD3⁺ T 細胞(圖九)。如將已去除 B 細胞的脾臟細胞再以 anti-CD8 或 anti-CD4 抗體分離 CD4⁺ 或 CD8⁺ T 細胞，則分別可得到純度為 99 % 的 CD4⁺ T 細胞及純度為 97 % 的 CD8⁺ T 細胞(圖九)。

B 型肝炎病毒 e 蛋白僅微幅增加正常小鼠脾臟細胞的分裂

將正常小鼠脾臟細胞以 CFSE 標識後，培養於 24 孔培養盤，每個盤孔培養 1×10^6 個細胞，加入最終濃度為 2 $\mu\text{g/ml}$ 的 HBe 蛋白，與加入等體積的 PBS 作為控制組相互對照。控制組有 1.39 % 細胞分裂(圖十、a)，加入 HBe 蛋白則有 3.18 % 細胞分裂(圖十、b)。在另一次類似的實驗中則以不同濃度的 HBe 蛋白測試，而控制組則加入等體積的 PBS。這次實驗中控制組有 1.45 % 細胞分裂(圖十、c)，加入最終濃度為 1, 2 與 4 $\mu\text{g/ml}$ 的 HBe 蛋白的實驗組別則分別有 2.09 % (圖十、d), 2.86 % (圖十、e) 與 4.96 % (圖十、f) 細胞分裂。圖十、a 與 b 均只顯示四重覆中的一次結果，而圖十 c 至 f 均只顯示三重覆中的一次結果。若分別將這兩次實驗加以統計 (圖十一)，第一次實驗的控制組分裂細胞為 $1.4 \pm 0.1\%$ ，2 $\mu\text{g/ml}$ 的 HBe 蛋白實驗組則為 $2.9 \pm 0.5\%$ ($p=0.019$, <0.05)。第二次實驗的控制組分裂細胞亦為 $1.4 \pm 0.1\%$ ，1、2 與 4 $\mu\text{g/ml}$ 的 HBe 蛋白的實驗組別分裂細胞則分別為 $2.1 \pm 0.1\%$ ($p=0.046$, <0.05)、 $2.6 \pm 0.2\%$ ($p=0.05$) 與 $4.4 \pm 0.4\%$ ($p=0.05$)。兩次實驗皆顯示 HBe 蛋白具有微幅增加正常小鼠脾臟細胞的分裂能力。

在 Con A 刺激下，B 型肝炎 e 蛋白對脾臟細胞的分裂沒有明顯作用

2 $\mu\text{g/ml}$ 的 Con A 可刺激 21.67% 的小鼠脾臟細胞分裂(圖十二、a)，於上述條件下再加入最終濃度為 2 $\mu\text{g/ml}$ 的 HBe 蛋白，則有 27.08% 細胞分裂(圖十二、b)。在另一次類似的實驗中則加入不同濃度的 HBe 蛋白測試，而控制組則加入等體積的 PBS。控制組有 27.81% 細胞分裂(圖十二、c)，加入最終濃度為 1, 2 與 4 $\mu\text{g/ml}$ 的 HBe 蛋白後，則分別有 34.12% (圖十二、d), 34.71 % (圖十二、e) 與 37.58% (圖十二、f) 的細胞分裂。圖十二、a 與 b 均只顯示四重覆中的一次結果，而圖十二 c 至 f 均只顯示三重覆中的一次結果。若分別將這兩次實驗加以統計 (圖十三)，第一次實驗的控制組分裂細胞為 $23.5 \pm 7.1\%$ ，2 $\mu\text{g/ml}$ 的 HBe 蛋白實驗組則為 $27.0 \pm 2.5\%$ ($p=0.248$)，雖有微量增幅，但並未達到統計學上的意義。第二次實驗的控制組分裂細胞為 $28.8 \pm 1.6\%$ ，1、2 與 4 $\mu\text{g/ml}$ 的 HBe 蛋白的實驗組別分裂細胞則分別為 $34.2 \pm 0.6\%$ ($p=0.05$)、 $34.7 \pm 1.8\%$ ($p=0.05$) 與 $34.9 \pm 1.9\%$ ($p=0.05$)。兩次實驗僅一次實驗有統計上之差異，且第二次實驗之 p 值均為 0.05，僅達顯著差異的臨界值。因此，HBe 在 Con A 刺激的狀態下對脾臟細胞的分裂沒有明顯作用。

B 型肝炎 e 蛋白增加脾臟分裂細胞中 B 細胞的比例

為了分辨增殖細胞的類別，我利用 CFSE 的降低及螢光抗體標識細胞表面分子的技術來鑑定增殖細胞的類別。我先將 C57BL/6 正常小鼠脾臟細胞以 CFSE 標識後，再加入最終濃度為 2 $\mu\text{g/ml}$ 的 HBe 蛋白，與加入等體積的 PBS 作為控制組相互對照。如以 PE-anti-B220

抗體標示 B 細胞，控制組有 7.63%細胞分裂(圖十四、a)，其中 B 細胞佔 45%，加入 HBe 蛋白後，則有 10.76%細胞分裂(圖十四、b)，其中 B 細胞佔 59%。在 Con A 存在下，有 68.97%細胞分裂(圖十四、c)，其中 B 細胞佔 39%，若再加入最終濃度為 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 HBe 蛋白，則有 52.2%細胞分裂(圖十四、d)，其中 B 細胞佔 53%。圖十四 a 至 d 所示為三次重覆中的的一次結果，若將分裂細胞中的 B 細胞比例平均後(圖十四、e)，在 PBS 控制組的分裂細胞中，B 細胞佔 $48.5 \pm 1.1\%$ ，而在加入 HBe 蛋白的實驗組中，B 細胞比例則增加到 $67.2 \pm 6.4\%$ ($p=0.05$)。在 Con A 存在時，B 細胞佔分裂細胞的 $40.4 \pm 0.9\%$ ，而加入 HBe 蛋白 B 細胞的比例則增為 $50.8 \pm 4.4\%$ ($p=0.05$)。因此，不論在單純的脾臟細胞體外培養中，或是在 Con A 刺激的脾臟細胞試驗中，HBe 蛋白均導致 B 細胞的分裂增加。在此實驗中，因標示 T 細胞的 CD3 抗體效價不足，未能得到可以判讀的結果。

B 型肝炎病毒 e 蛋白不影響 anti-CD3 與 anti-CD28 抗體活化之 T 細胞的增生

為了探討 HBe 是否會影響 T 細胞增生，將純化的 CD3^+ T 細胞以 CFSE 標識後，置於預先塗佈了 anti-CD3 抗體及 anti-CD28 抗體的培養盤中養三天。未塗佈抗體的 PBS 控制組，其增生細胞比例為 1.30% (圖十五、a)；僅塗佈 anti-CD3 及 anti-CD28 抗體的組別，其增生細胞比例為 57.86%(圖十五、b)，若再加入濃度為 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 HBe 蛋白，則增生細胞比例為 56.07%(圖十五、c)。將單一實驗二重覆平均後(圖十八綠色柱狀圖)，PBS 控制組的增生細胞比例為 $1.3 \pm 0\%$ ，僅塗佈

anti-CD3 及 anti-CD28 的抗體組為 $56.4 \pm 2.1\%$ ，而塗佈抗體再加入 HBe 蛋白的組別為 $54.9 \pm 1.7\%$ 。若進一步將 T 細胞純化為 $CD4^+$ 或 $CD8^+$ T 細胞，再將兩種細胞分別培養於上述培養環境。若在同樣有塗佈抗體的情況下，加入最終濃度為 $1 \mu\text{g/ml}$ 的 HBe 蛋白時，可使 $CD4^+$ T 細胞增生比例由 48.72% 變為 45.40% (圖十六、b 及 c)， $CD8^+$ T 細胞增生比例由 34.15% 變為 34.13% (圖十七、b 及 c)。若加入最終濃度為 $2 \mu\text{g/ml}$ 的 HBe 蛋白，則 $CD4^+$ T 細胞增生比例為 36.01% (圖十六、d)， $CD8^+$ T 細胞增生比例為 31.22% (圖十七、d)。圖十五 a 至 c 與圖十六及十七的 b 圖僅代表二重覆中的一次結果，圖十八則顯示圖十五至十七的平均柱狀圖，從結果判斷，HBe 蛋白的影響並不顯著。然而因重覆數不足三次，無法以統計方法得到是否有顯著差異。

為了確定 HBe 蛋白對 $CD4^+$ 或 $CD8^+$ T 細胞是否有影響，我將純化的 $CD3^+$ T 細胞以 CFSE 標識後，同樣培養於預先塗佈了 anti-CD3 抗體及 anti-CD28 抗體的培養盤，加入不同濃度的 HBe 蛋白，共同培養三天後以 PE-anti-CD4 抗體及 PE-anti-CD8 抗體標識分裂細胞。僅塗佈 anti-CD3 及 anti-CD28 抗體時，分裂細胞中有 19.55% 為 $CD4^+$ T 細胞 (圖十九、d)， 41.27% 為 $CD8^+$ T 細胞 (圖十九、h)。在同樣情況下若加入 $1 \mu\text{g/ml}$ 的 HBe 蛋白，則分裂細胞中有 18.46% 為 $CD4^+$ T 細胞 (圖十九、e)、 40.95% 為 $CD8^+$ T 細胞 (圖十九、i)，若加入 $2 \mu\text{g/ml}$ 的 HBe 蛋白，則分裂細胞中有 18.89% 為 $CD4^+$ T 細胞 (圖十九、f)、 38.40% 為 $CD8^+$ T 細胞 (圖十九、j)，若加入 $4 \mu\text{g/ml}$ 的 HBe 蛋白，則分裂細胞中有 23.17% 為 $CD4^+$ T 細胞 (圖十九、g)、 37.30% 為 $CD8^+$ T

細胞(圖十九、k)。圖十九僅顯示四重覆中的一次結果，圖二十則為本次實驗的平均柱狀圖；在有塗佈 anti-CD3 及 anti-CD28 抗體的情況下，分裂細胞中有 $17\pm 2\%$ 為 $CD4^+$ T 細胞，若加入 HBe 蛋白最終濃度為 1、2 或 4 $\mu\text{g/ml}$ ，則分裂細胞中 $CD4^+$ T 細胞分別佔 $18\pm 2\%$ 、 $20\pm 8\%$ 、 $19\pm 4\%$ (圖二十藍色部分)。在 $CD8^+$ T 細胞方面，於塗佈相同抗體的情況下，分裂細胞中有 $34\pm 5\%$ 為 $CD8^+$ T 細胞，若加入 HBe 蛋白最終濃度為 1、2 或 4 $\mu\text{g/ml}$ ，則分裂細胞中的 $CD8^+$ T 細胞分別佔 $38\pm 2\%$ 、 $38\pm 9\%$ 、 $34\pm 4\%$ (圖二十橘色部分)。統計結果顯示，在 anti-CD3 及 anti-CD28 抗體的刺激下，HBe 蛋白確實對 $CD4^+$ 及 $CD8^+$ T 細胞的增生沒有影響。

B 型肝炎病毒 e 蛋白不影響特異性 T 細胞的增生

為了探討 HBe 是否會影響特異性 T 細胞的增生，我利用 T 細胞受體基因轉殖小鼠 OT-I 來研究此問題。為了要探討 HBe 是否會藉由抗原呈獻細胞影響 T 細胞增生，我先從 C57BL/6 正常小鼠取出脾臟貼附細胞與 8 $\mu\text{g/ml}$ 的 HBe 蛋白共同培養 24 小時後，再加入以 CFSE 標識的 OT-I 小鼠 $CD8^+$ T 細胞及 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 的特異性抗原 OVA_{257~264} 胜肽，培養三天後分析 CFSE 螢光強度以得知細胞分裂狀況。在 T 細胞數量為 5×10^4 並含有 5% 抗原呈獻細胞時，PBS 控制組的分裂細胞為 2.04%(圖二十一、a)，若加入 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 的 OVA_{257~264} 則分裂細胞為 56.98%(圖二十一、b)，在 OVA_{257~264} 存在下再加入 8 $\mu\text{g/ml}$ 的 HBe 蛋白，則分裂細胞為 53.54%(圖二十一、c)。若 T 細胞數為 2×10^4 並含有 5% 抗原呈獻細胞時，PBS 控制組的分裂細胞為 2.05%(圖

二十一、d)，僅加入 OVA_{257~264} 的分裂細胞為 46.18%(圖二十一、e)，若再加入 8 µg/ml 的 HBe 蛋白，則分裂細胞為 47.50%(圖二十一、f)。圖二十一中除了 e 圖為單一實驗，其餘皆為二重覆中的一次結果。圖二十二則顯示本實驗的平均柱狀圖。雖二重覆不足以統計方法分析，然而依柱狀圖研判，HBe 蛋白應不影響特異性 T 細胞的增生。

討論

B 型肝炎病毒的 e 蛋白(HBe 蛋白)並非病毒感染與複製時所必須的蛋白，然而所有嗜肝 DNA 病毒(hepadnaviruses)都保留此蛋白，並未因演化的天擇而消失，因此推測 HBe 蛋白可能具有幫助 B 型肝炎病毒具有生存的功能。現今普遍認為該蛋白可能會與宿主的免疫系統交互作用，而且可能影響病毒在宿主體內的持續性(persistent)感染(Milich et al., 2003)。目前臨床上已知大多數的慢性 B 型肝炎是由初生感染所造成。母親若為 B 型肝炎表面抗原陽性而 e 抗原陰性患者，新生兒感染為慢性感染的機率較低；若母親為 e 抗原陽性，則新生兒為慢性感染的機率大幅增加(Milich et al., 2003)。土撥鼠肝炎病毒 e 蛋白亦顯示類似的結果。如將土撥鼠肝炎病毒的基因體改變，產生一個不產生 e 蛋白的前核心基因突變種 (pre-core mutated strain)，遭此突變種病毒感染的土撥鼠形成慢性感染的比例大幅降低(Cote et al., 2000)。

利用不同的實驗動物模式，目前已證實 e 蛋白與免疫調節作用相關。北京鴨 (Peking duck) 遭肝炎病毒慢性感染後，若 e 抗原呈陰性，則對抗核心抗原的抗體會上升。此發現指出 e 蛋白與氨基酸序列相近的核心蛋白對於抗體的產生有相關性 (Zhang et al., 1999)。B 型肝炎病毒 e 抗原轉殖基因小鼠也會抑制核心抗原的血清反應轉變(Chen et al., 2004)。在 1998 年 Milich 等人發現在 e 蛋白基因轉殖小鼠中，有部分對 e 蛋白具有專一性的 T_H 細胞不會被發育過程中的 negative selection 移除，而且可在小鼠體內活化，進而產生

對抗 HBe 的 IgG1 抗體。若將 e 蛋白基因轉殖小鼠與 Fas 缺陷的小鼠交配，其子代因 Fas 的缺陷無法誘發細胞凋亡。這些子代產生對抗 HBe 的抗體不只有 IgG1，還有 IgG2a、IgG2b 和 IgG3。由此實驗推測 e 蛋白可藉由細胞凋亡減少對 e 抗原與核心抗原具專一性的 T_H 細胞數量(Millich et al., 1998)。除了實驗動物，在人類的血液樣本中亦發現 e 抗原陽性病患其第二類鐸受體表現量較一般常人低(Riordan et al., 2006)，代表 e 蛋白影響的層次可能不只在於適應性免疫反應，可能對先天性免疫反應亦有影響。

本實驗室過去發現 HBe 蛋白可與人類血液中的單核細胞結合，並刺激該細胞產生第六介白質與第十介白質等細胞激素、刺激第二 CC 趨化因子及改變過氧化物產生的能力 (Lu, 2003)。HBe 蛋白亦可與小鼠脾臟、腹腔、肝臟中的巨噬細胞結合，同樣會刺激產生第六介白質與第十介白質等細胞激素。第六介白質可引發免疫急性反應，刺激發炎反應的產生；而第十介白質則會抑制前發炎細胞激素(pro-inflammatory cytokine)，如腫瘤壞死因子 α 與干擾素 γ 的產生。這些分泌的介白質可能會影響後續 B 細胞以及 T 細胞的活化反應，但確切的作用及其機轉仍不明瞭。

巨噬細胞除了具有吞噬、殺菌及分泌發炎物質之外，亦可將入侵的抗原「呈獻」(present) 給 T 細胞，引發輔助性(helper) T 細胞(T_H) 活化、毒殺性(cytotoxic) T 細胞(T_C)成熟及抗體產生。因此，我希望能夠進一步探討 HBe 蛋白是否也會改變 T 細胞及 B 細胞免疫反應。本論文的實驗結果顯示，HBe 蛋白能微幅增加 C56BL/6 正常小鼠脾

臟細胞的分裂(圖十一)。根據 CFSE 與細胞表面分子雙重染色的結果，HBe 蛋白確實增加了 B 細胞在分裂細胞當中的比例(圖十四)。本實驗室過去曾發現 HBe 蛋白無法與 T 細胞結合，但是可以和 B 細胞結合(Lu, 2003)，是否 HBe 蛋白可直接作用於 B 細胞而影響其分裂？還是 HBe 重組蛋白中所含有的 12 ng/ml LPS 造成 B 細胞分裂？不論其真相為何，我們觀察到的微幅改變雖然具有統計上意義，然而是否具有生物上的意義仍然需要探討。在本實驗中，因為對抗 CD3 分子的抗體效價不足，使我無法以 CFSE 及 anti-CD3 抗體雙重染色的方式直接探討 HBe 蛋白對脾臟 T 細胞分裂的影響。不過我利用純化的脾臟 T 細胞來回答此問題。在 anti-CD3 及 anti-CD28 抗體活化 T 細胞的實驗中，我發現 HBe 蛋白並未改變 CD3⁺ T 細胞、CD4⁺ T 細胞以及 CD8⁺ T 細胞增生的程度 (圖十八及二十)。文獻中曾有研究指出，慢性 B 型肝炎患者的 CD4⁺/CD8⁺ T 細胞比例會隨著血液中病毒量的增加而減少 (You et al.,2008)。是否 HBe 蛋白在試管中 (*in vitro*) 以及在活體中(*in vivo*)對 T 細胞活化有不同的作用，尚需進一步的研究來證實。

為了探討 HBe 蛋白是否透過與抗原呈獻細胞作用，進而影響抗原刺激的特異性 T 細胞增生，我利用 OT-1 小鼠的 CD8⁺ T 細胞來探討此問題。OT-1 小鼠為一種 T 細胞受體基因轉殖小鼠，該 T 細胞受體係辨識第一型主要組織相容抗原與一段白蛋白胜肽的複合體 (MHC class I/OVA_{257~264})。OT-1 小鼠的大部分 CD8⁺ T 細胞均表現此 T 細胞受體，當 MHC- I/OVA_{257~264} 與其結合後，即提供了 T 細胞活化的第一個訊息 (signal 1)，而 T 細胞活化需的第二個訊息(signal 2)則

由抗原呈獻細胞提供。因此，我先將 HBe 蛋白加入抗原呈獻細胞，作用 24 小時之後，再加上純化的 OT-1 CD8⁺ T 細胞，結果抗原呈獻細胞並沒有因為 HBe 蛋白的作用而影響 CD8⁺ T 細胞的增生(圖二十二)。由於此實驗的結果尚未重覆驗證，是否 HBe 蛋白的濃度不適當？是否 HBe 蛋白與抗原呈獻細胞作用的時間不適當？亦或白蛋白胜肽的濃度與細胞數量需要調整？都須進一步的實驗證實。由本篇論文的結果看來，HBe 蛋白似乎不影響 T 細胞之增生，但會微幅增加 B 細胞的分裂。目前尚無任何關於 HBe 蛋白直接影響 B 細胞的研究報導。然而有文獻研究顯示，慢性 B 型肝炎患者血液中的 CD19⁺ B 細胞與常人相比確實有顯著增加(Khabiri et al., 2001)。HBe 蛋白是否會直接影響 B 細胞的活化現象？或者藉由調控抗原呈獻細胞間接影響 B 細胞的活化？都是很值得研究的題材。

參考文獻

1. Arauz-Ruiz, P., H. Norder, B. H. Robertson, and L. O. Magnius. 2002. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 83:2059.
2. Beckebaum, S., V. R. Cicinnati, X. Zhang, S. Ferencik, A. Frilling, H. Grosse-Wilde, C. E. Broelsch, and G. Gerken. 2003. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response in vitro: mechanisms for viral immune escape. *Immunology* 109:487.
3. Bertoletti, A., A. Costanzo, F. V. Chisari, M. Levrero, M. Artini, A. Sette, A. Penna, T. Giuberti, F. Fiaccadori, and C. Ferrari. 1994. Cytotoxic T lymphocyte response to a wild type hepatitis B virus epitope in patients chronically infected by variant viruses carrying substitutions within the epitope. *J Exp Med* 180:933.
4. Centers for Disease Control, R. O. C. 2007. 中高年齡族群肝炎帶原率偏高，衛署呼籲定期接受肝功能及肝癌檢查。
<http://www.cdc.gov.tw/content.asp?cuitem=1912&mp=1>
5. Chang, J. J., and S. R. Lewin. 2007. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *Immunol Cell Biol* 85:16.
6. Chang, K. Y. 1999. The Effects of HBcAg and HBeAg on the Expression of Cytokine Genes from Murine Macrophages. In *Institute of Microbiology & Immunology School of Life Science*, Vol. Master. National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan.
7. Chen, C. H., C. M. Lee, S. N. Lu, C. S. Changchien, H. L. Eng, C. M. Huang, J. H. Wang, C. H. Hung, and T. H. Hu. 2005. Clinical significance of hepatitis B virus (HBV) genotypes and precore and core promoter mutations affecting HBV e antigen expression in Taiwan. *J Clin Microbiol* 43:6000.
8. Chen, M. T., J. N. Billaud, M. Sallberg, L. G. Guidotti, F. V. Chisari, J. Jones, J. Hughes, and D. R. Milich. 2004. 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.
9. Chisari, F. V. 2000. Rous-Whipple Award Lecture. Viruses, immunity, and

cancer: lessons from hepatitis B. *Am J Pathol* 156:1117.

10. Clarke, S. R., M. Barnden, C. Kurts, F. R. Carbone, J. F. Miller, and W. R. Heath. 2000. Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-I: MHC elements for positive and negative selection. *Immunol Cell Biol* 78:110.
11. Cote, P. J., B. E. Korba, R. H. Miller, J. R. Jacob, B. H. Baldwin, W. E. Hornbuckle, R. H. Purcell, B. C. Tennant, and J. L. Gerin. 2000. Effects of age and viral determinants on chronicity as an outcome of experimental woodchuck hepatitis virus infection. *Hepatology* 31:190.
12. De Boer, R. J., D. Homann, and A. S. Perelson. 2003. Different dynamics of CD4+ and CD8+ T cell responses during and after acute lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol* 171:3928.
13. Finlay, B. B., and G. McFadden. 2006. Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell* 124:767.
14. Foulds, K. E., L. A. Zenewicz, D. J. Shedlock, J. Jiang, A. E. Troy, and H. Shen. 2002. Cutting edge: CD4 and CD8 T cells are intrinsically different in their proliferative responses. *J Immunol* 168:1528.
15. Gallagher, S. R. 1998. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc.
16. Glebe, D. 2007. Recent advances in hepatitis B virus research: a German point of view. *World J Gastroenterol* 13:8.
17. Gooding, L. R. 1992. Virus proteins that counteract host immune defenses. *Cell* 71:5.
18. Hsu, C. L. 2001. The Effects of the Hepatitis B Virus e Antigen on Kupffer cells and Lymphocytes. In *Institute of Microbiology & Immunology School of Life Science*, Vol. Master. National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan.
19. Kao, J. H., and D. S. Chen. 2002. Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Infect Dis* 2:395.
20. Khabiri, A., M. Abolhassani, S. Aslani, H. Darabi, F. Bagheri, and M. H. Alimohammadian. 2001. Compositional changes of PBL population in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Braz J Infect Dis* 5:345.

21. Kidd-Ljunggren, K., Y. Miyakawa, and A. H. Kidd. 2002. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol* 83:1267.
22. Lin, C. L., and J. H. Kao. 2008. Hepatitis B viral factors and clinical outcomes of chronic hepatitis B. *J Biomed Sci* 15:137.
23. Loch, S., and R. Tampe. 2005. Viral evasion of the MHC class I antigen-processing machinery. *Pflugers Arch* 451:409.
24. Lu, Y. C. 2003. 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.
25. Michalak, T. I., P. D. Hodgson, and N. D. Churchill. 2000. Posttranscriptional inhibition of class I major histocompatibility complex presentation on hepatocytes and lymphoid cells in chronic woodchuck hepatitis virus infection. *J Virol* 74:4483.
26. Milich, D., and T. J. Liang. 2003. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology* 38:1075.
27. Milich, D. R., M. K. Chen, J. L. Hughes, and J. E. Jones. 1998. The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence. *J Immunol* 160:2013.
28. Okamoto, H., F. Tsuda, H. Sakugawa, R. I. Sastrosoewignjo, M. Imai, Y. Miyakawa, and M. Mayumi. 1988. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 69 (Pt 10):2575.
29. O'Shea, R. 2007. Chronic hepatitis B virus infection: issues in treatment. *Cleve Clin J Med* 74:557.
30. Rehermann, B., and M. Nascimbeni. 2005. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 5:215.
31. Riordan, S. M., N. Skinner, J. Kurtovic, S. Locarnini, and K. Visvanathan. 2006. Reduced expression of toll-like receptor 2 on peripheral monocytes in patients with chronic hepatitis B. *Clin Vaccine Immunol* 13:972.
32. Rizzetto, M., and A. Ciancio. 2008. Chronic HBV-related liver disease. *Mol*

Aspects Med 29:72.

33. Schneider-Brachert, W., V. Tchikov, O. Merkel, M. Jakob, C. Hallas, M. L. Kruse, P. Groitl, A. Lehn, E. Hildt, J. Held-Feindt, T. Dobner, D. Kabelitz, M. Kronke, and S. Schutze. 2006. Inhibition of TNF receptor 1 internalization by adenovirus 14.7K as a novel immune escape mechanism. *J Clin Invest* 116:2901.
34. Seeger, C., and W. S. Mason. 2000. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:51.
35. Shin, H., and E. J. Wherry. 2007. CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection. *Curr Opin Immunol* 19:408.
36. Tang, H., N. Oishi, S. Kaneko, and S. Murakami. 2006. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein. *Cancer Sci* 97:977.
37. Tomazin, R., A. B. Hill, P. Jugovic, I. York, P. van Endert, H. L. Ploegh, D. W. Andrews, and D. C. Johnson. 1996. Stable binding of the herpes simplex virus ICP47 protein to the peptide binding site of TAP. *Embo J* 15:3256.
38. Winau, F., G. Hegasy, R. Weiskirchen, S. Weber, C. Cassan, P. A. Sieling, R. L. Modlin, R. S. Liblau, A. M. Gressner, and S. H. Kaufmann. 2007. Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. *Immunity* 26:117.
39. You, J., H. Sriplung, A. Geater, V. Chongsuvivatwong, L. Zhuang, H. Y. Chen, L. Yu, B. Z. Tang, and J. H. Huang. 2008. Effect of viral load on T-lymphocyte failure in patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 14:1112.
40. Zhang, Y. Y., and J. Summers. 1999. Enrichment of a precore-minus mutant of duck hepatitis B virus in experimental mixed infections. *J Virol* 73:3616.

表目及圖目

表一、B 型肝炎病毒血清型分類.....	38
表二、B 型肝炎病毒基因與血清型分類和地理分佈的關連.....	39
表三、病毒對抗免疫系統的策略.....	40
圖一、B 型肝炎病毒之結構.....	41
圖二、B 型肝炎病毒之基因體構造與表現之 RNA 及蛋白質.....	42
圖三、B 型肝炎病毒 e 蛋白之產生.....	43
圖四、B 型肝炎病毒的生命週期.....	44
圖五 a、B 型肝炎病毒的急性感染病程.....	45
圖五 b、B 型肝炎病毒的慢性感染病程.....	46
圖六、pRSET/HBe 之構築.....	47
圖七、利用 Ni ²⁺ 管柱純化 His - HBe 蛋白.....	48
圖八、正常 C57BL/6 小鼠脾臟 T 細胞、B 細胞及巨噬細胞之含量.....	49
圖九、經純化後的小鼠 T 細胞純度.....	50
圖十、小鼠脾臟細胞加入 B 型肝炎病毒 e 蛋白後的 CFSE 螢光分佈.....	51
圖十一、B 型肝炎病毒 e 蛋白僅微幅增加 C56BL/6 正常小鼠脾臟細胞的分裂.....	53
圖十二、在 Con A 刺激下，小鼠脾臟細胞加入 B 型肝炎病毒 e 蛋白後的 CFSE 螢光分佈.....	54
圖十三、在 Con A 刺激下，B 型肝炎 e 蛋白對脾臟細胞的分裂沒有明顯作用.....	56
圖十四、B 型肝炎病毒 e 蛋白增加分裂細胞中 B 細胞的比例.....	57
圖十五、以 anti-CD3/CD28 抗體刺激 CD3 ⁺ T 細胞分裂的情況下，B 型肝炎病毒 e 蛋白對 T 細胞的 CFSE 螢光分佈.....	59
圖十六、以 anti-CD3/CD28 抗體刺激 CD3 ⁺ T 細胞分裂的情況下，B 型肝炎病毒 e 蛋白對 CD4 ⁺ T 細胞的 CFSE 螢光分佈.....	60
圖十七、以 anti-CD3/CD28 抗體刺激 CD3 ⁺ T 細胞分裂的情況下，B 型肝炎病毒 e 蛋白對 CD8 ⁺ T 細胞的 CFSE 螢光分佈.....	61
圖十八、B 型肝炎病毒 e 蛋白在以 anti-CD3/CD28 抗體刺激 CD3 ⁺ T 細胞、CD4 ⁺ T 細胞或 CD8 ⁺ T 細胞分裂的情況下，皆不影響 C57BL/6 正常小鼠的細胞分裂.....	62
圖十九、B 型肝炎病毒 e 蛋白在以 anti-CD3/CD28 抗體刺激 CD3 ⁺ T 細胞分裂的情況下，以雙重染色分析增生細胞中的 CD4 ⁺ 與 CD8 ⁺ T 細胞比例.....	63
圖二十、B 型肝炎病毒 e 蛋白在以 anti-CD3/CD28 抗體刺激 CD3 ⁺ T 細胞分裂的情況下，以雙重染色表示 CD4 ⁺ 與 CD8 ⁺ T 細胞的增生情況.....	65
圖二十一、在 HBe 蛋白與抗原呈獻細胞預先培養後，專一抗原刺激 T 細胞受體基因轉殖小鼠的 CD8 ⁺ T 細胞分裂情形.....	66
圖二十二、B 型肝炎病毒 e 蛋白不影響 T 細胞受體基因轉殖鼠 CD8 ⁺ T 細胞的增生.....	68

表一、B 型肝炎病毒血清型分類

Amino acid 122 identity	Amino acid 160 identity	
	Lys	Arg
Lys	<i>dw</i>	<i>dr</i>
Arg	<i>yw</i>	<i>yr</i>

(Adapted from J Gen Virol. **83**:1267-1280, 2002)

表二、B型肝炎病毒基因與血清型分類和地理分佈的關連

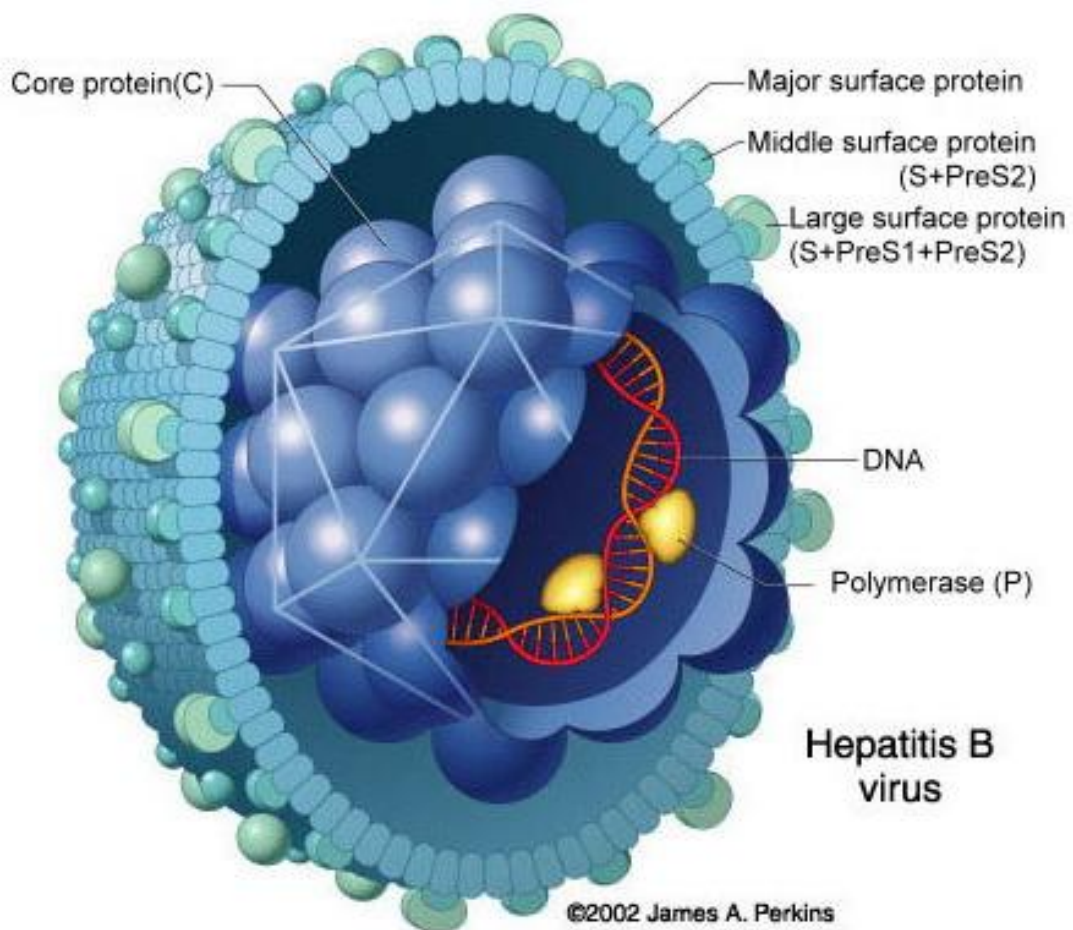
Genotype	serotype	Areas of predominance
A	adw2, ayw1	Northwestern Europe, USA, central Africa
B	adw2, ayw1	Taiwan, Japan, Indonesia, China, Vietnam
C	adw2, adr _q +, adr _q -, ayr	East Asia, Taiwan, Korea, China, Japan, Polynesia, Vietnam
D	ayw2, ayw3	Mediterranean area, India
E	ayw4	West Africa
F	adw4 _q -, adw2, ayw4	Central and South America
G	adw2	France, USA
H	adw3	Central America

Modified from Lancet Infect Dis. 2(7):395-403

表三、病毒對抗免疫系統的策略

Strategy	Viral Examples
(1) Secreted modulators or toxins	- ligand mimics (virokines) - receptor mimics (viroceptors)
(2) Modulators on the pathogen surface	- complement inhibitors - coagulation regulators - immune receptors - adhesion molecules
(3) Hide from immune surveillance	- latency - infect immunoprivileged tissues
(4) Antigenic hypervariability	- express error-prone replicase - escape from antibody recognition - "outrun" T cell recognition
(5) Subvert or kill immune cells/phagocytes	- infect and kill immune cells (DCs, APCs, lymphocytes, macrophage, etc.) - inhibit CTL/NK cell killing pathways - alter immune cell signaling, effector functions, or differentiation - express superantigens
(6) Block acquired immunity	- downregulate MHC-I or -II - block antigen presentation/proteasome - prevent induction of immune response genes
(7) Inhibit complement	- soluble inhibitors of complement cascade - viral Fc receptors
(8) Inhibit cytokines/interferon/chemokines	- inhibit ligand gene expression - ligand/receptor signaling inhibitors - block secondary antiviral gene induction - interfere with effector proteins
(9) Modulate apoptosis/autophagy	- inhibit or accelerate cell death - block death signaling pathways - scavenge free radicals - downregulate death receptors or ligands - inactivate death sensor pathways
(10) Interfere with TLRs	- block or hijack TLR signaling - prevent TLR recognition
(11) Block antimicrobial small molecules	- prevent iNOS induction - inhibit antiviral RNA silencing
(12) Block intrinsic cellular pathways	- inhibit RNA editing - regulate ubiquitin/ISGylation pathways

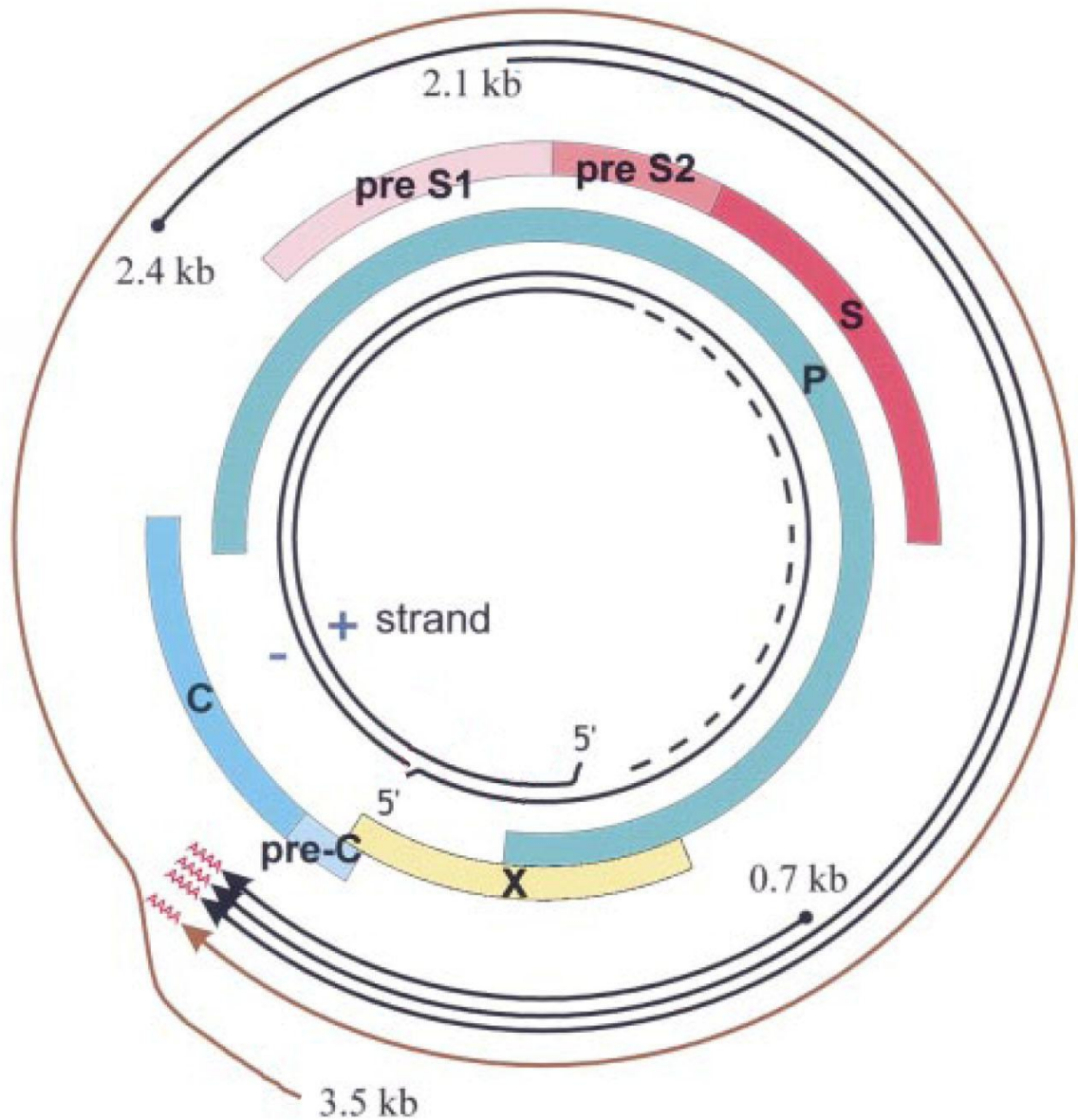
(Modified from Cell **124**: 767-782)



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

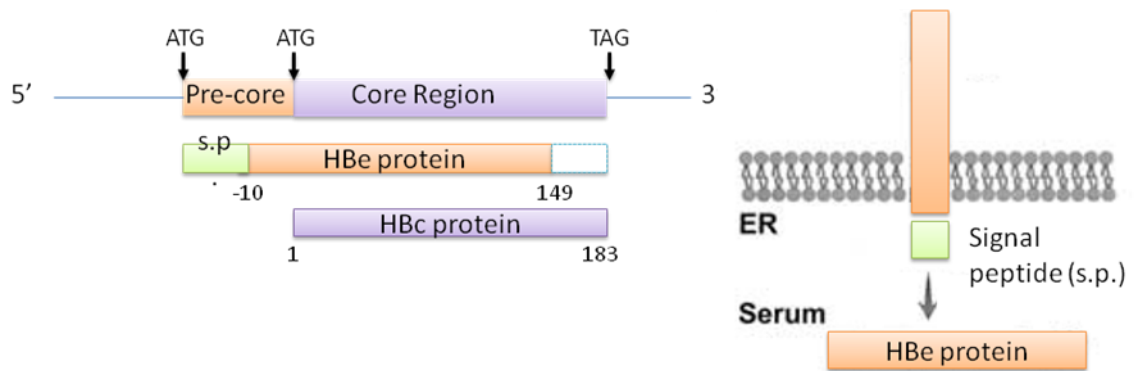
圖一、B 型肝炎病毒之結構

B 型肝炎病毒顆粒由外套(envelope)包覆，包括大型(large)、中型(middle)以及主要(major)三種表面蛋白(surface protein)。表面蛋白內為病毒核心，由核心蛋白(core protein)組成。核心蛋白內為部分雙股環狀 DNA 構成的基因體及 DNA 聚合酶。



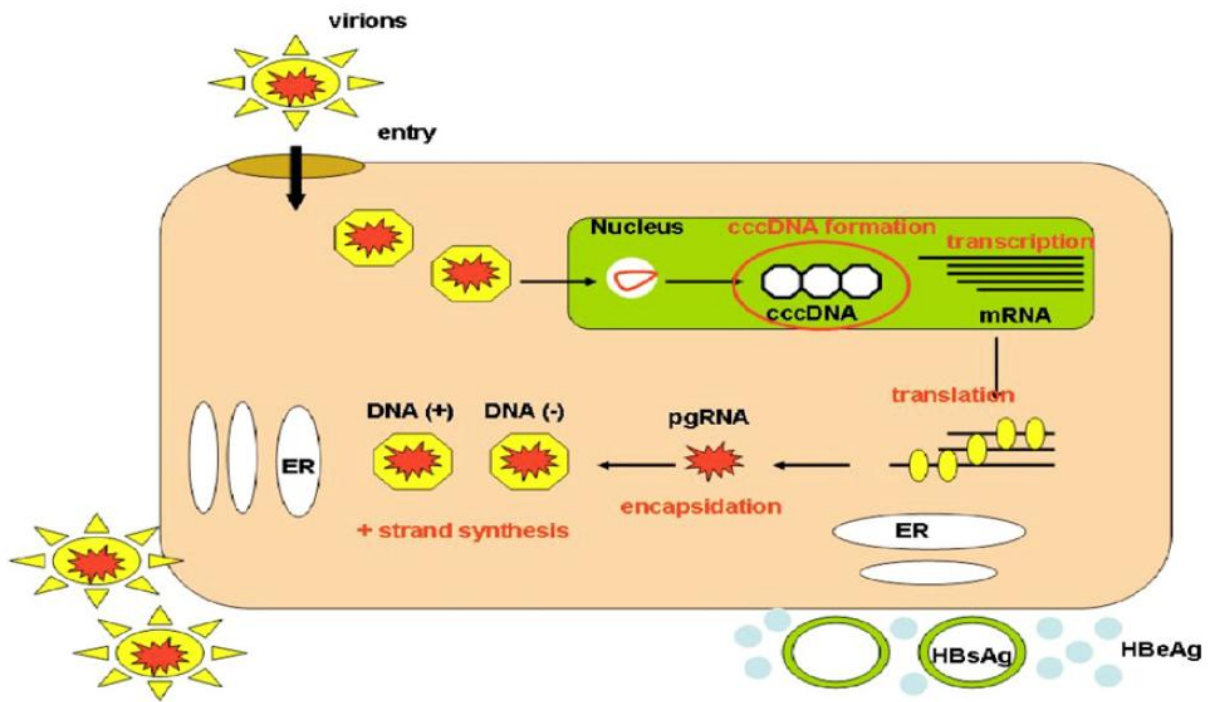
圖二、B 型肝炎病毒之基因體構造與表現之 RNA 及蛋白質

B型肝炎病毒之基因體為部分雙股的環狀DNA，箭頭代表四種主要的RNA；包括 3.5 kb 的前基因體RNA (pregenomic RNA) (棕色)，2.4 kb 及 2.1 kb 的 HBs mRNA 及0.7 kb 的 HBx mRNA (黑色)。填充弧塊代表蛋白質；包括preS1、preS2 及S 表面蛋白(紅色)，DNA 聚合酶 (P) (藍色)，核心蛋白(淡藍色)及X 蛋白 (黃色)。(Modified from J Gen Virol **83**:1267-1280, 2002)



圖三、B型肝炎病毒e蛋白之產生

e蛋白是由前核心蛋白基因轉錄出來的前核心蛋白 (precore protein) 修飾而成。前核心蛋白前端帶有訊息胜肽 (signal peptide, s.p.)，可將其帶至內質網 (endoplasmic reticulum, ER)。最後切除訊息胜肽及 C 端第150至183號的氨基酸，形成e蛋白，分泌至細胞外。(Modified form hepatology **38**: 1075-1086, 2003)

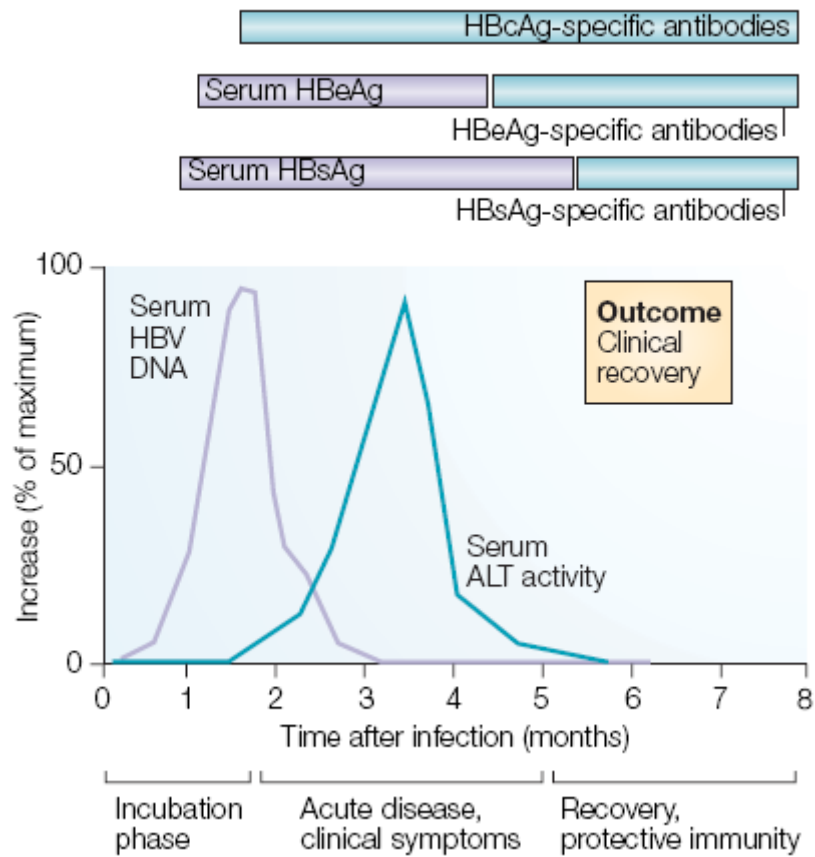


圖四、B型肝炎病毒的生命週期

B型肝炎病毒與肝細胞結合後進入細胞，病毒的DNA聚合酶在細胞核內將部分雙股修復為共價鍵封閉環狀的雙股DNA（covalently closed circular，cccDNA），再以此為模版，利用宿主細胞內的RNA聚合酶，轉錄成病毒的mRNA與前基因體RNA（pregenomic RNA, pgRNA），前者轉譯為病毒蛋白，以供複製與組裝，後者被包裹至核心蛋白內，經反轉錄酶（reverse transcriptase）將之反轉錄成病毒的負股DNA，再以此DNA為模版，複製較短的正股DNA。最後，病毒核心顆粒與表面蛋白結合，形成完整的病毒顆粒，釋出細胞。在複製的過程中，亦有表面蛋白與e蛋白分泌至細胞外。

(Adapted from Mol Aspects Med **29**: 72-84, 2008)

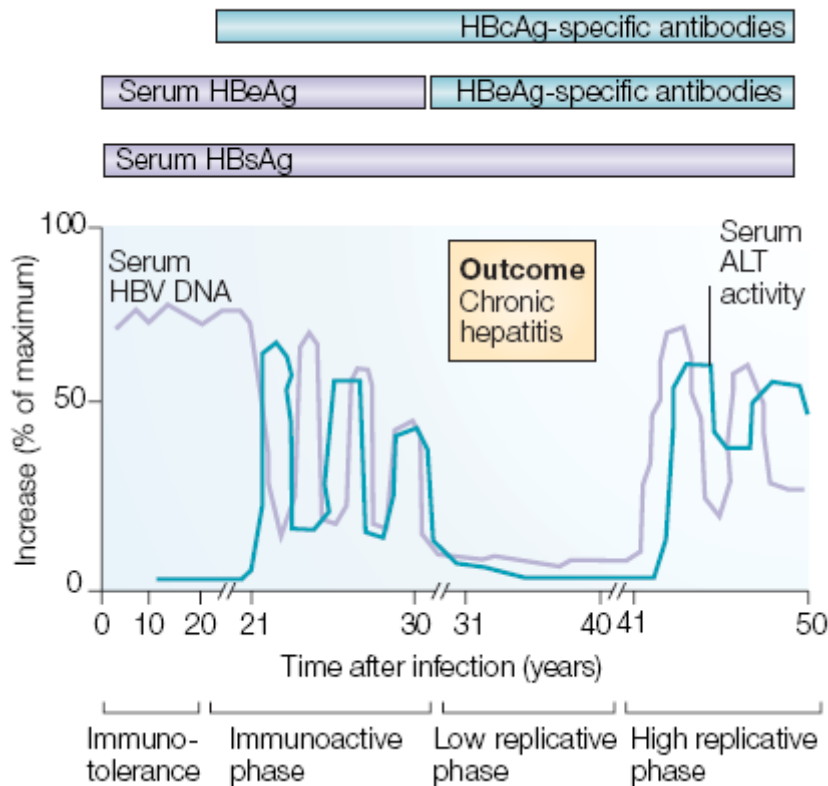
a Hepatitis B (acute)



圖五a、B型肝炎病毒的急性感染病程

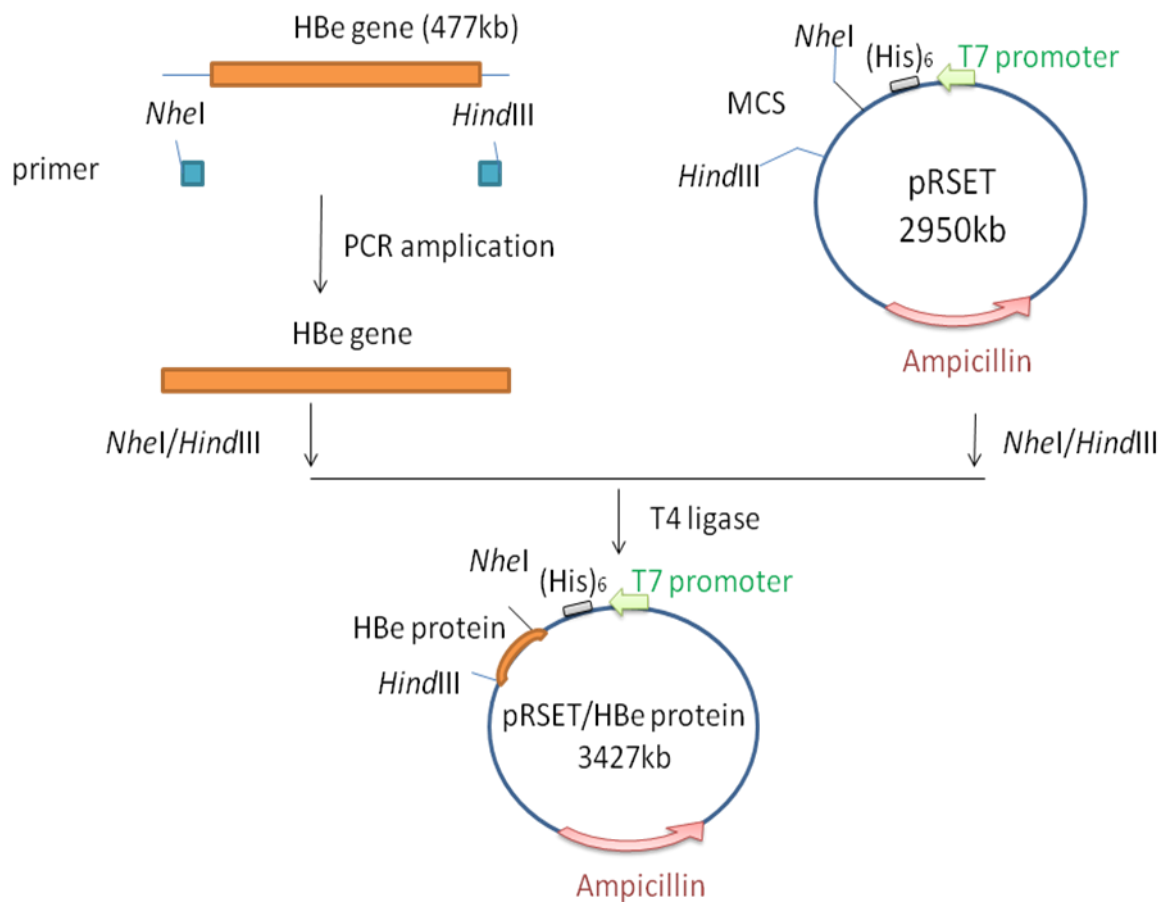
急性感染分為培養期（incubation phase）、急性疾病與臨床症狀期（acute disease clinical symptoms）以及恢復期（Recovery）。在培養期間，血液中可測得高量的病毒DNA與表面抗原、e抗原以及核心抗體。在急性疾病與臨床症狀期時，血液中的丙氨酸轉氨酶（alanine transferase, ALT）先上升，繼而下降。至恢復期時，血液中可測得表面抗體與e抗體，此時病人康復，並且對B型肝炎病毒具有免疫力。(Adapted from Nat Rev Immunol 5: 215-229, 2005)

b Hepatitis B (chronically evolving)



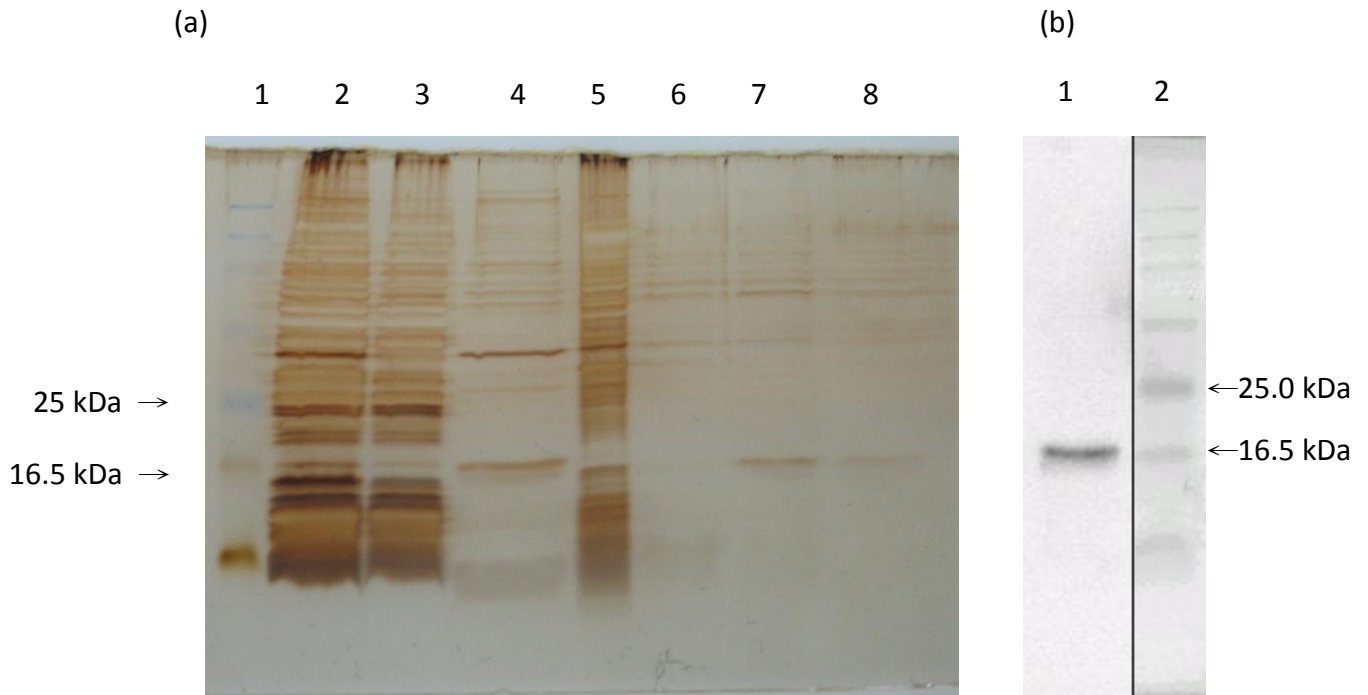
圖五b、B型肝炎病毒的慢性感染病程

慢性感染分為免疫耐受期(immune tolerant phase)、免疫活化期(immune active phase)、低度複製期(low replicative phase)與高度複製期(high replicative phase)。在免疫耐受期間，血液中含有高量的病毒DNA與e抗原，但丙氨酸轉氨酶並不見升高。進入免疫活化期後，病毒DNA的量與丙氨酸轉氨酶濃度上下波動。免疫活化期之後轉變為低度複製期，此時的病毒DNA含量與丙氨酸轉氨酶皆大幅下降，同時血液中可測得e抗體。有些病患會再度進入高度複製期，使病毒大量複製。慢性感染病患的血液在任何時期皆有表面抗原而無法測得表面抗體。(Adapted from Nat Rev Immunol 5: 215-229, 2005)



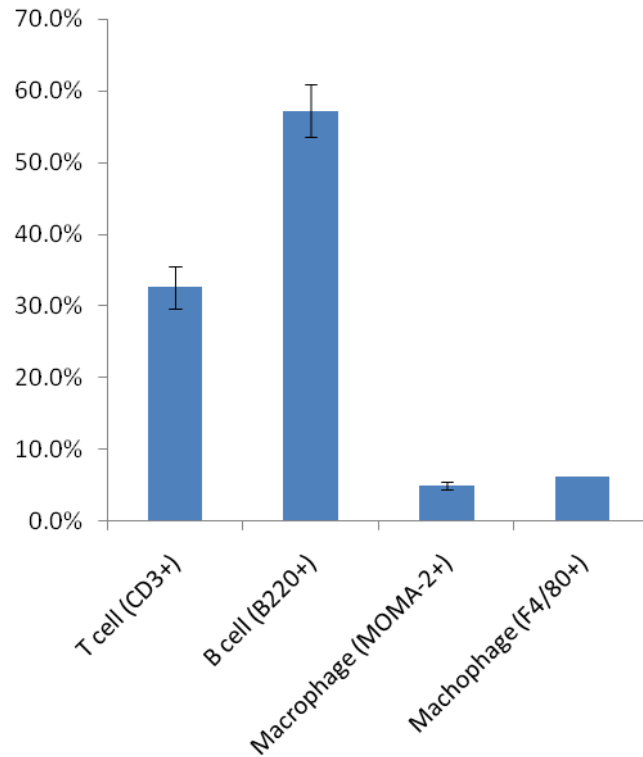
圖六、pRSET/HBe 之構築

以聚合酵素鏈鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)增幅B型肝炎病毒e蛋白基因，在引子中設計*NheI*和*HindIII*兩個限制酶的切位(restriction site)。將PCR產物與pRSET載體(vector)以*NheI*和*HindIII*兩種限制酶處理後，再以T4 DNA連接酶(ligase)接合。pRSET載體的Multiple cloning site(MCS)前的一段序列可使表現的蛋白具有六個組織胺酸(histidine, His)，使蛋白得以進行後續的Ni²⁺管柱純化。pRSET載體本身的T7 promoter及抗Ampicillin序列可供誘導表現及篩選之用。(Modified from Chang, K. Y., Master thesis, 1999)



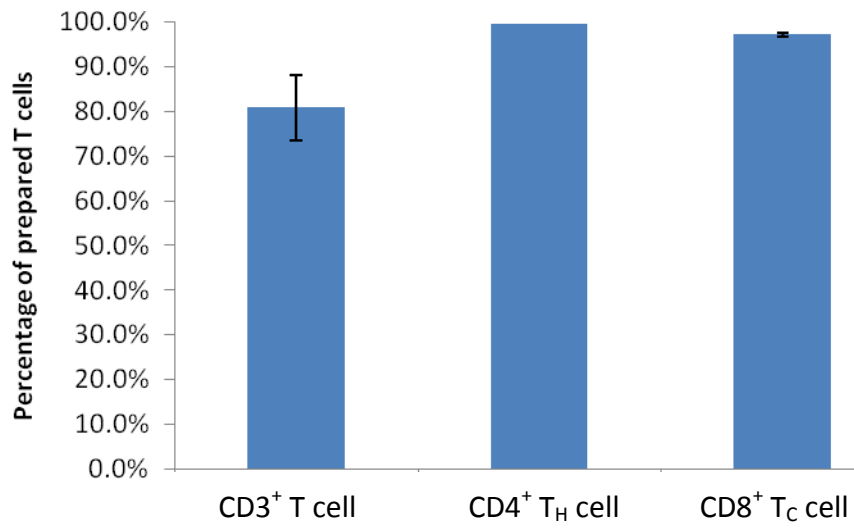
圖七、利用 Ni^{2+} 管柱純化 His - HBe 蛋白

(a) 將帶有 e 蛋白基因的質體以轉型作用送入 *E. coli*，又使其表現帶有 His-tag 的 HBe 蛋白，並以 Ni^{2+} 管柱純化。經 SDS-PAGE 顯示純化過程中各產物的銀染色結果。第 1 行：molecular-size marker，第 2 行：total bacterial cell lysate，第 3 行：effluent，第 5、6 行：denature wash，第 7、8 行：native wash。(b) 第 1 行：純化的蛋白以 anti-HBc 抗體進行西方墨點轉漬法，第二行為 molecular-size markers。



圖八、正常C57BL/6小鼠脾臟 T 細胞、B 細胞及巨噬細胞之含量

將正常 C57BL/6 小鼠脾臟製備成細胞懸浮液，經過 1 小時靜置於培養皿，除去部分貼附細胞後，分別以 FITC-anti-CD3、FITC-anti-B220、FITC-anti-F4/80 及 FITC-anti-MOMA-2 抗體標示，再以流式細胞儀分析。



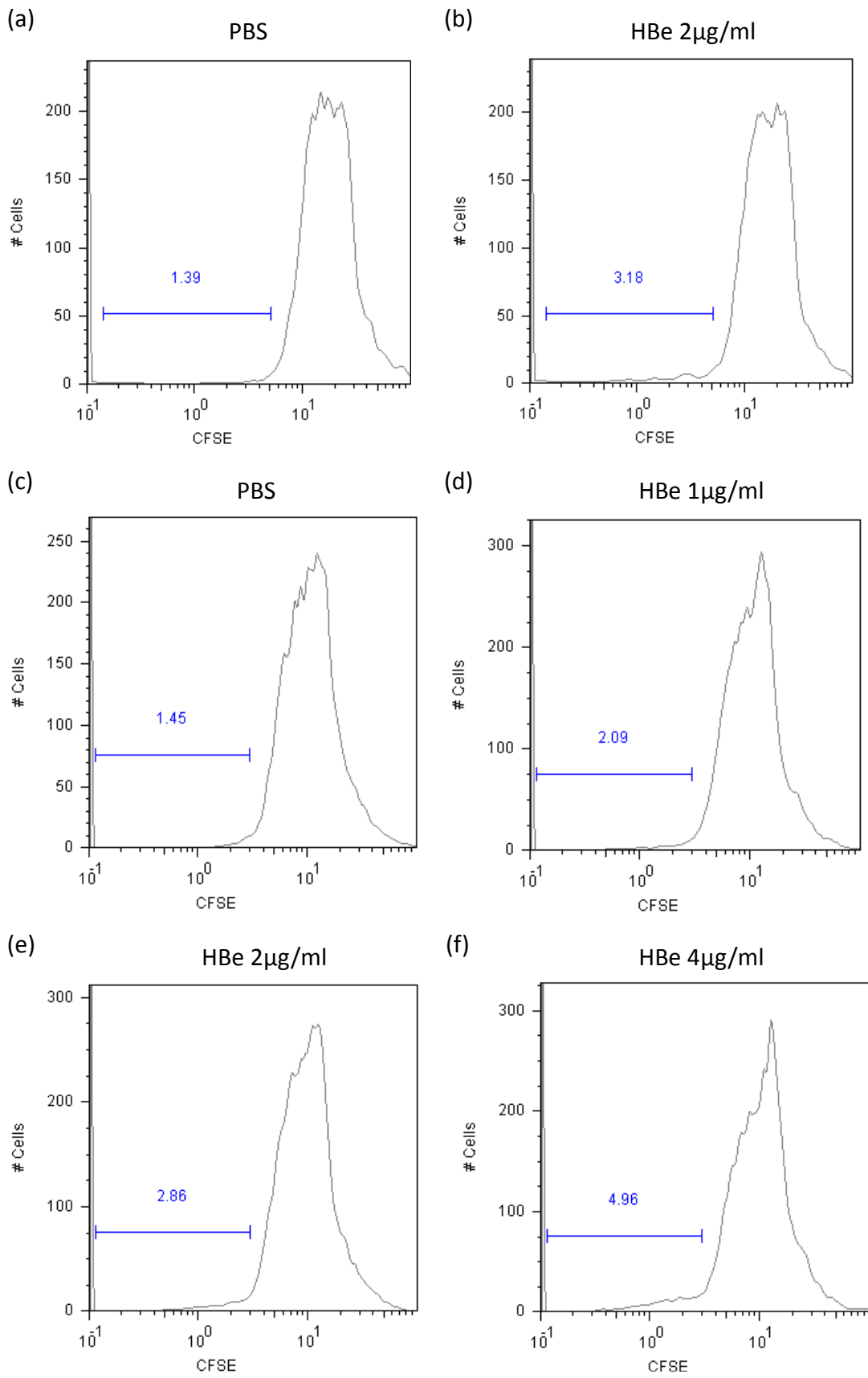
圖九、經純化後的小鼠 T 細胞純度

脾臟細胞懸浮液靜置於預先塗佈25 μg anti- μ 及25 μg anti- κ 抗體的培養皿中，使B細胞黏附其上，收集不附著的脾臟細胞，稱為CD3⁺ T細胞。若繼續將CD3⁺ T細胞再分別與塗有4 μg 的anti-CD8或20 μg 的anti-CD4抗體的培養皿結合，可分別得到CD4⁺ T細胞及CD8⁺ T細胞。此三種細胞分別再以PE-anti-CD3、PE-anti-CD4或PE-anti-CD8抗體測定其純度。

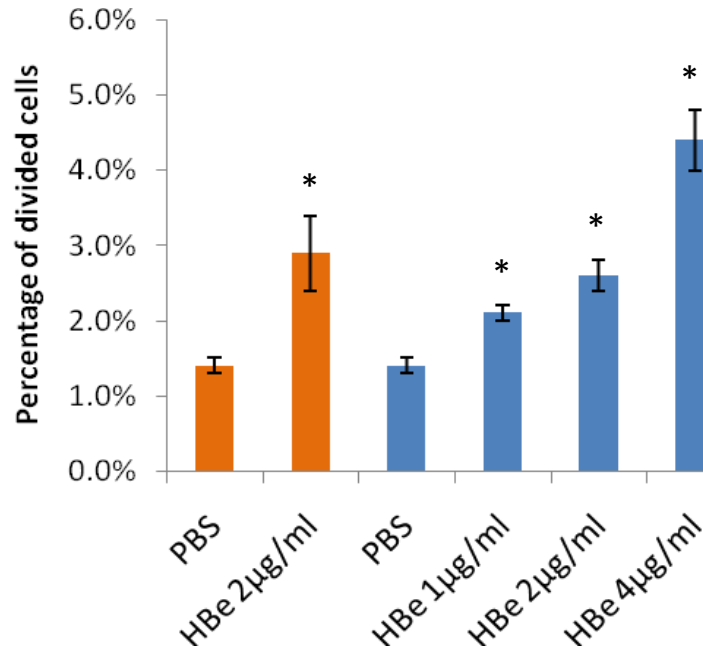
圖十、小鼠脾臟細胞加入 B 型肝炎病毒 e 蛋白後的 CFSE 螢光分佈

以 CFSE 螢光強度分析 C57BL/6 小鼠脾臟細胞加入 HBe 蛋白培養三天後的細胞分裂狀況。(a)(b)為第一次實驗：(a)培養基僅加入與 e 蛋白等體積的 PBS，(b)培養基含有濃度為 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 HBe 蛋白，(c)~(f)為另一次實驗：(c)培養基加入與 e 蛋白等體積的 PBS，(d) 培養基含有濃度為 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 HBe 蛋白，(e) 培養基含有濃度為 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 HBe 蛋白，(f) 培養基含有濃度為 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 HBe 蛋白。圖中藍線涵蓋的區間代表控制組細胞在劃分百分比不超過 5%的則下，以螢光最低點開始所劃分的分裂細胞。(a)與(b)圖為四重覆實驗中的一次結果，(c)~(f)圖為三重覆實驗中的一次結果。

結果圖示於第 52 頁。



圖說於第 51 頁。



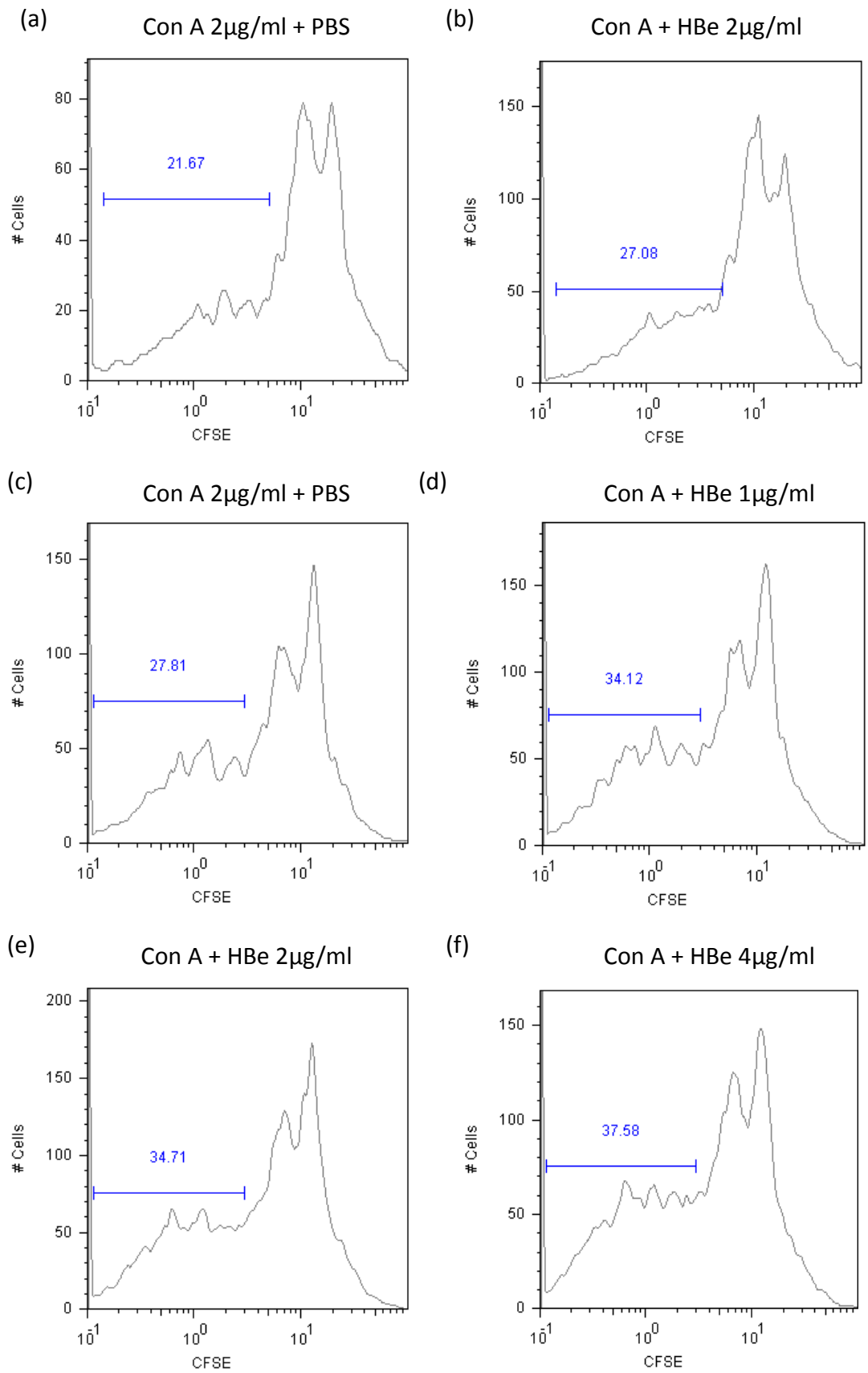
圖十一、B 型肝炎病毒 e 蛋白僅微幅增加 C56BL/6 正常小鼠脾臟細胞的分裂

圖十僅呈現四重覆或三重覆實驗中的一次結果。本圖將重覆實驗結果平均後，繪製成柱狀圖。橘色及藍色柱狀圖分別表示兩次獨立實驗。第一次實驗的 HBe 蛋白濃度為 2 µg/ml ($p=0.019, <0.05$)。第二次實驗的 HBe 蛋白濃度分別為 1 µg/ml ($p=0.046, <0.05$)、2 µg/ml ($p=0.05$)與 4 µg/ml ($p=0.05$)。

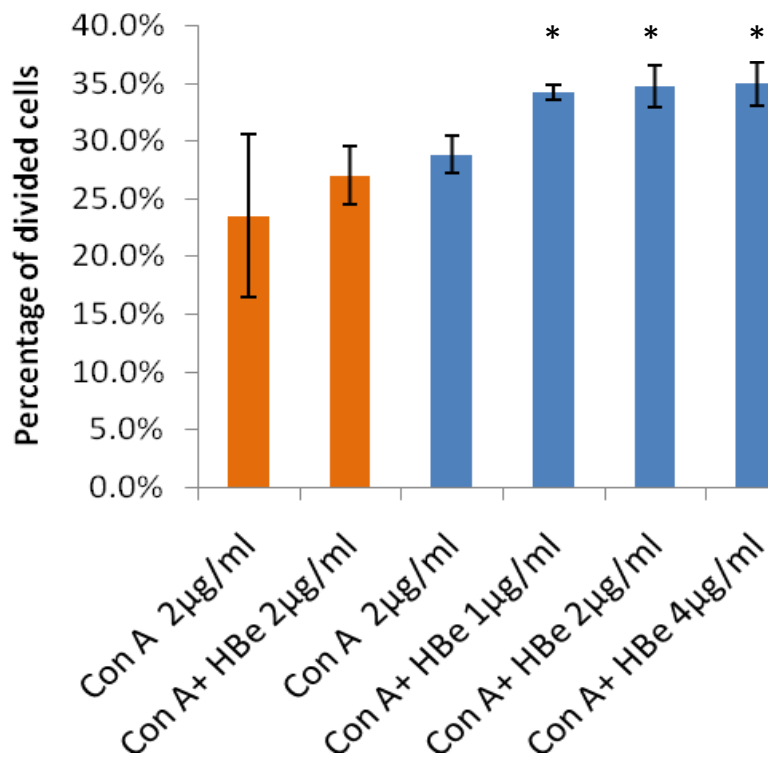
圖十二、在 Con A 刺激下，小鼠脾臟細胞加入 B 型肝炎病毒 e 蛋白後的 CFSE 螢光分佈

以 CFSE 螢光強度分析 C57BL/6 小鼠脾臟細胞與 2 $\mu\text{g/ml}$ 的 Con A 共同培養並加入 HBe 蛋白培養三天後細胞分裂狀況。(a)(b)為第一次實驗：(a)培養基僅加入與 e 蛋白等體積的 PBS，(b)培養基含有濃度為 2 $\mu\text{g/ml}$ 的 HBe 蛋白，(c)~(f)為另一次實驗：(c)培養基加入與 e 蛋白等體積的 PBS，(d) 培養基含有濃度為 1 $\mu\text{g/ml}$ 的 HBe 蛋白，(e) 培養基含有濃度為 2 $\mu\text{g/ml}$ 的 HBe 蛋白，(f) 培養基含有濃度為 4 $\mu\text{g/ml}$ 的 HBe 蛋白。圖中藍線涵蓋的區間代表控制組細胞在劃分百分比不超過 5%的則下，以螢光最低點開始所劃分的分裂細胞。(a)與(b)圖為四重覆實驗中的一次結果，(c)~(f)圖為三重覆實驗中的一次結果。

結果圖示於第 55 頁。



圖說於第 54 頁。



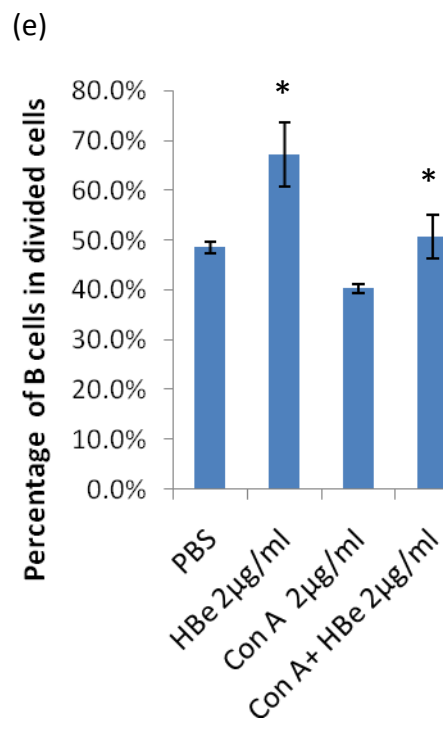
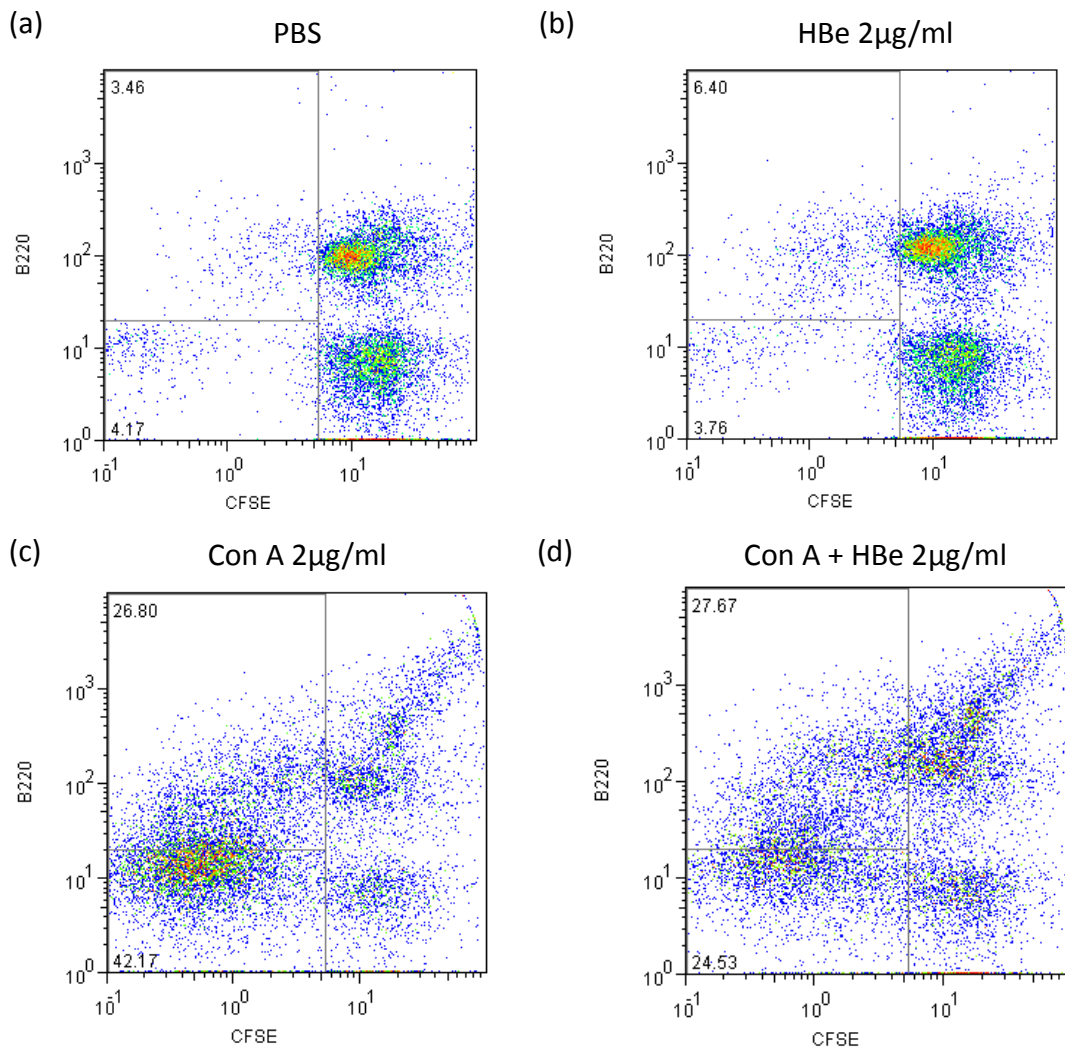
圖十三、在 Con A 刺激下，B 型肝炎 e 蛋白對脾臟細胞的分裂沒有明顯作用

圖十二僅呈現四重覆或三重覆實驗中的一次結果。本圖將重覆實驗結果平均後，繪製成柱狀圖。橘色及藍色柱狀圖分別表示兩次獨立實驗。第一次實驗的 HBe 蛋白濃度為 2 µg/ml (p=0.248)。第二次實驗的 HBe 蛋白濃度分別為 1 µg/ml (p=0.05)、2 µg/ml (p=0.05)與 4 µg/ml (p=0.05)。

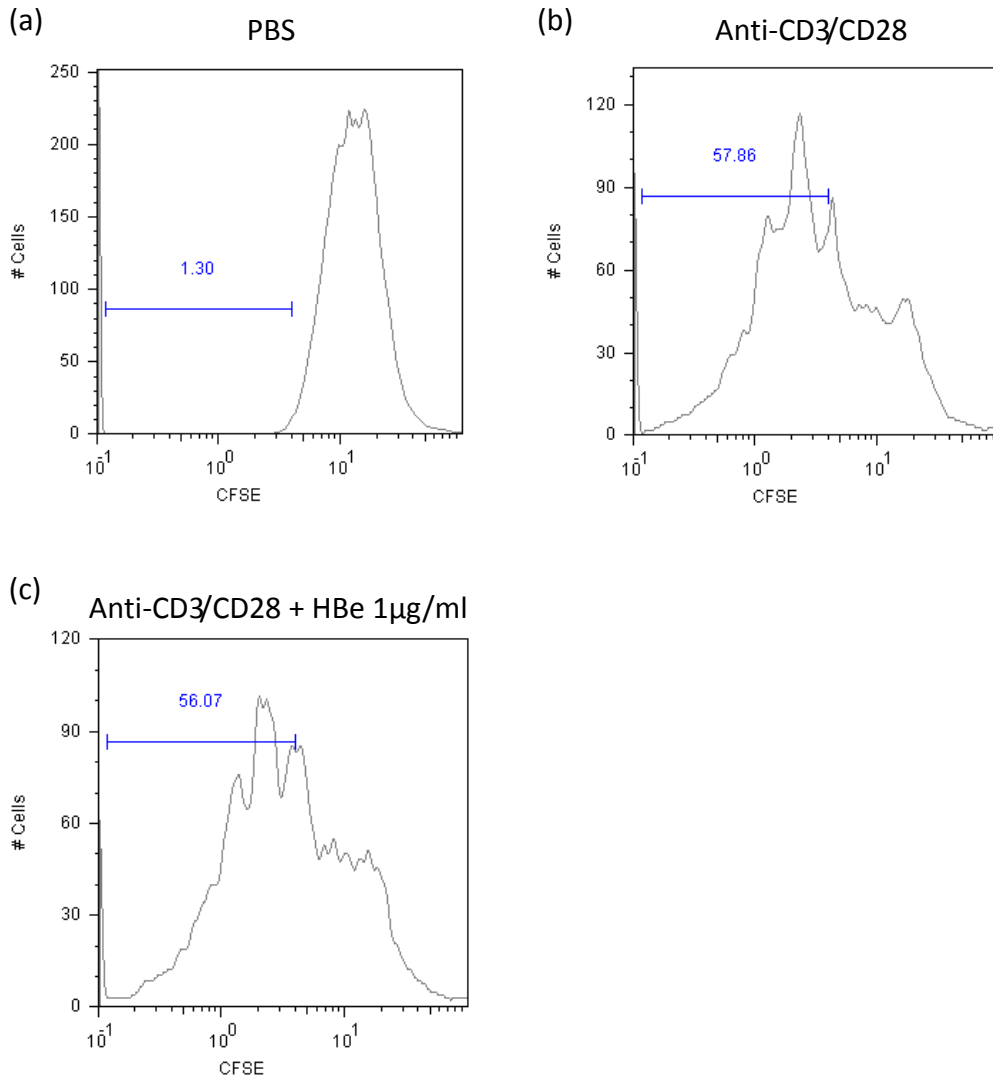
圖十四、B 型肝炎病毒 e 蛋白增加分裂細胞中 B 細胞的比例

以 CFSE 及 PE-anti-B220 抗體雙重標識的技術分析 C57BL/6 小鼠脾臟細胞培養三天增殖細胞中的 B 細胞的比率。第一象限為未增殖的 B 細胞，第二象限為增殖的 B 細胞，第三象限為 B 細胞以外的增殖細胞，第四象限為 B 細胞以外的未增殖細胞，以第二象限細胞百分比除以第二與第三象限細胞百分比的總和計算 B 細胞佔分裂細胞百分比的多寡。(a)培養基僅加入與 e 蛋白等體積的 PBS，(b)培養基含有濃度為 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 HBe 蛋白，(c) 培養基含有濃度為 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 Con A，(d) 培養基含有濃度皆為 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 HBe 蛋白與 Con A，圖(a)至(d)所示為三次重覆中的的一次結果。(e) 將重覆實驗結果平均後，繪製成柱狀圖。分別表示加入 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HBe 蛋白($p=0.05$)，以及在 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Con A 刺激下，加入同樣濃度 HBe 蛋白($p=0.05$)的 B 細胞增生比例。

結果圖示於第 58 頁。

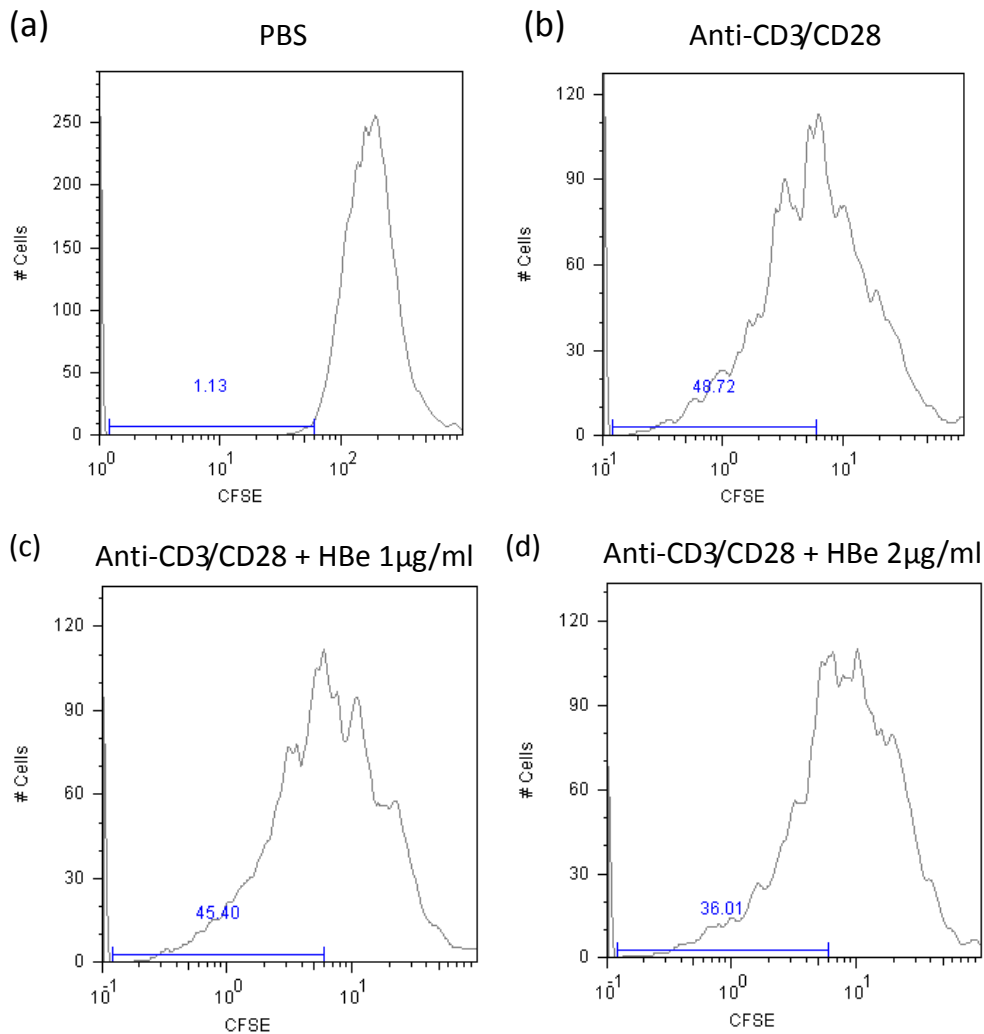


圖說於第 57 頁。



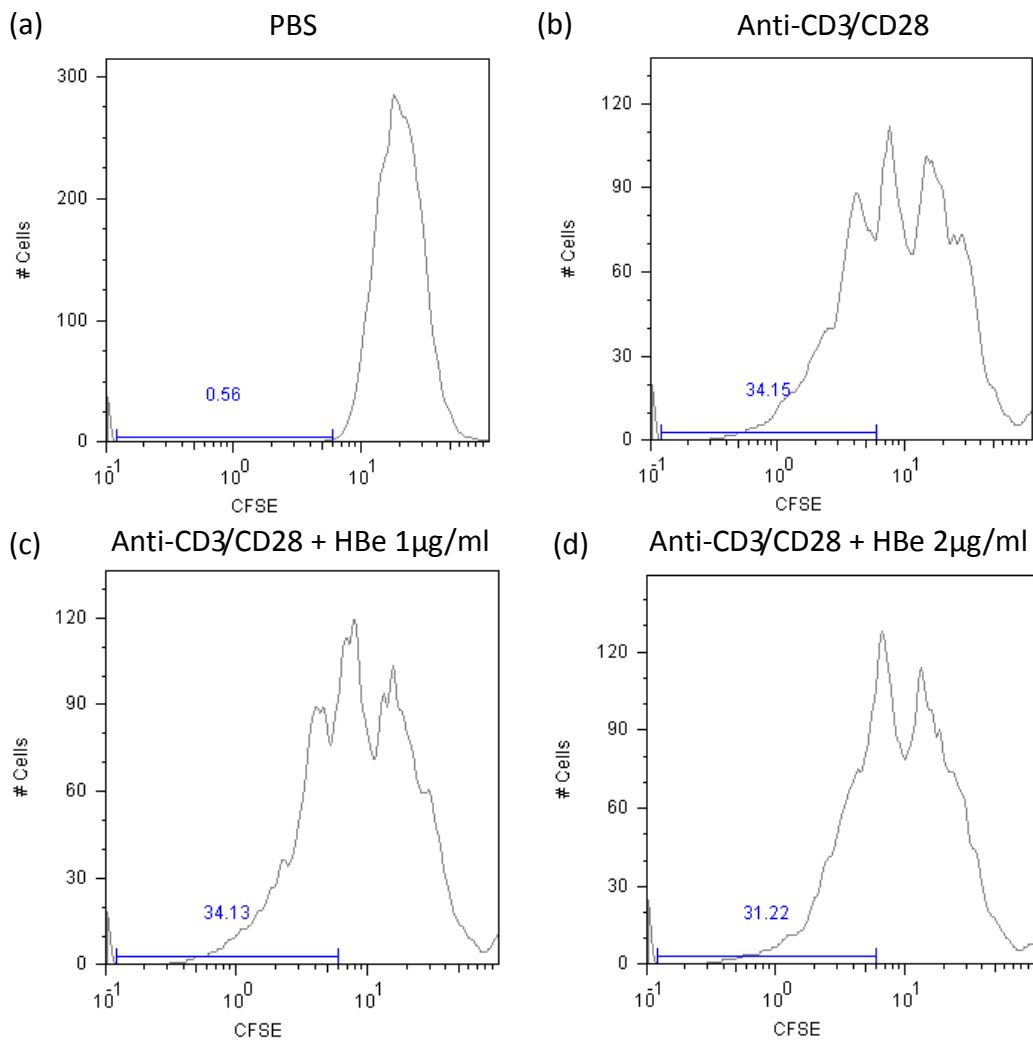
圖十五、以 anti-CD3/CD28 抗體刺激 CD3⁺ T 細胞分裂的情況下，B 型肝炎病毒 e 蛋白對 T 細胞的 CFSE 螢光分佈

以 CFSE 螢光強度分析 C57BL/6 小鼠 CD3⁺ T 細胞在預先塗佈 anti-CD3/CD28 抗體的 96 孔 U 形底培養盤中，加入 1µg/ml 的 HBe 蛋白後培養三天的細胞螢光分佈。(a) CD3⁺ T 細胞在未塗佈 anti-CD3/CD28 培養盤，(b) CD3⁺ T 細胞在塗佈 anti-CD3/CD28 抗體的培養盤，(c) CD3⁺ T 細胞在塗佈 anti-CD3/CD28 抗體的培養盤中，外加 1 µg/ml 的 HBe 蛋白。圖中藍線涵蓋的區間代表控制組細胞在劃分百分比不超過 5% 的則下，以螢光最低點開始所劃分的分裂細胞。本圖為二重覆實驗中的一次結果。



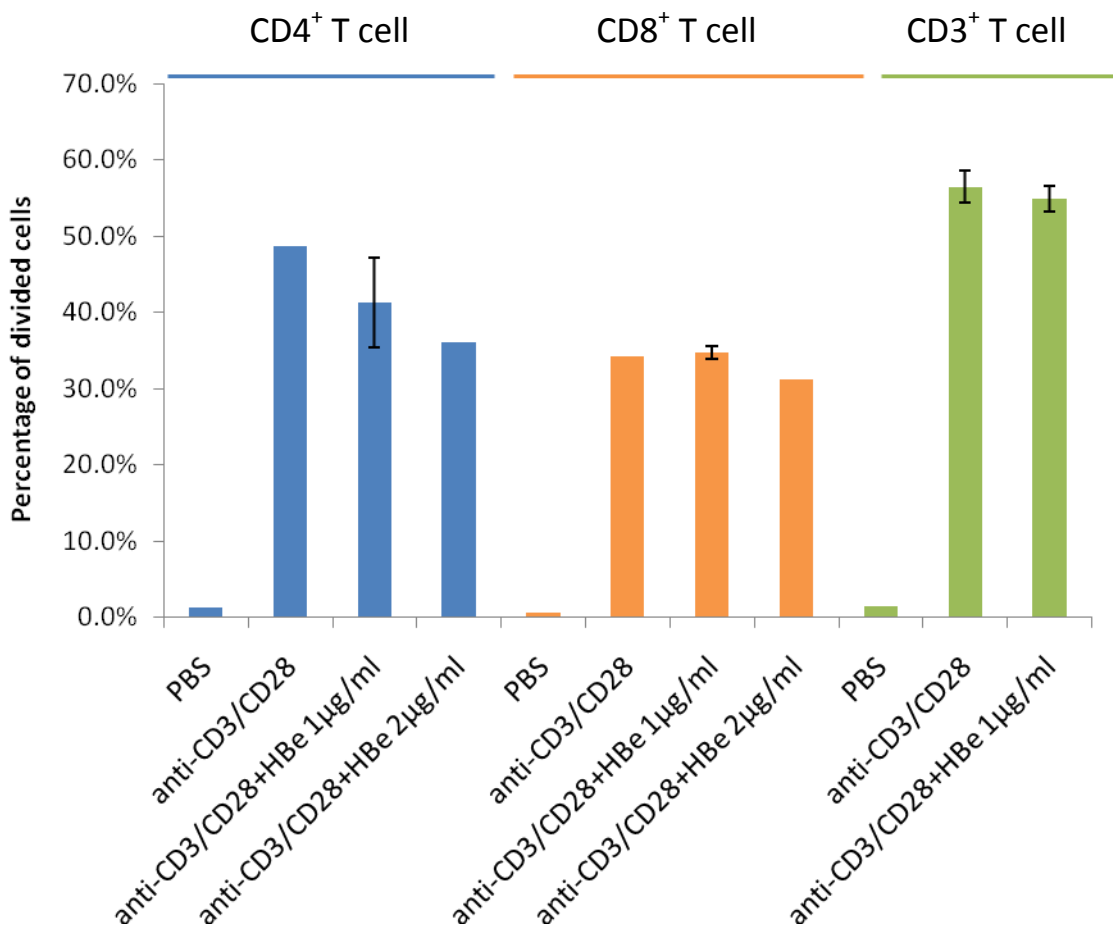
圖十六、以 anti-CD3/CD28 抗體刺激 CD3⁺T 細胞分裂的情況下，B 型肝炎病毒 e 蛋白對 CD4⁺T 細胞的 CFSE 螢光分佈

以 CFSE 螢光強度分析 C57BL/6 小鼠 CD4⁺T 細胞在預先塗佈 anti-CD3/CD28 抗體的 96 孔 U 形底培養盤中，加入 HBe 蛋白後培養三天的細胞螢光分佈。(a) CD4⁺T 細胞在未塗佈 anti-CD3/CD28 培養盤，(b) CD4⁺T 細胞在塗佈 anti-CD3/CD28 抗體的培養盤，(c) CD4⁺T 細胞在塗佈 anti-CD3/CD28 抗體的培養盤中外加 1 μ g/ml 的 HBe 蛋白，(d) CD4⁺T 細胞在塗佈 anti-CD3/CD28 抗體的培養盤中外加 2 μ g/ml 的 HBe 蛋白。圖中藍線涵蓋的區間代表控制組細胞在劃分百分比不超過 5% 的則下，以螢光最低點開始所劃分的分裂細胞。本圖(c) 為二重覆實驗中的一次作結果。



圖十七、以 anti-CD3/CD28 抗體刺激 $CD3^+$ T 細胞分裂的情況下，B 型肝炎病毒 e 蛋白對 $CD8^+$ T 細胞的 CFSE 螢光分佈

以 CFSE 螢光強度分析 C57BL/6 小鼠 $CD8^+$ T 細胞在預先塗佈 anti-CD3/CD28 抗體的 96 孔 U 形底培養盤中，加入 HBe 蛋白後培養三天的細胞螢光分佈。(a) $CD8^+$ T 細胞在未塗佈 anti-CD3/CD28 培養盤，(b) $CD8^+$ T 細胞在塗佈 anti-CD3/CD28 抗體的培養盤，(c) $CD8^+$ T 細胞在塗佈 anti-CD3/CD28 抗體的培養盤中外加 1 μ g/ml 的 HBe 蛋白，(d) $CD8^+$ T 細胞在塗佈 anti-CD3/CD28 抗體的培養盤中外加 2 μ g/ml 的 HBe 蛋白。圖中藍線涵蓋的區間代表控制組細胞在劃分百分比不超過 5% 的則下，以螢光最低點開始所劃分的分裂細胞。本圖(c) 為二重覆實驗中的一次作結果。



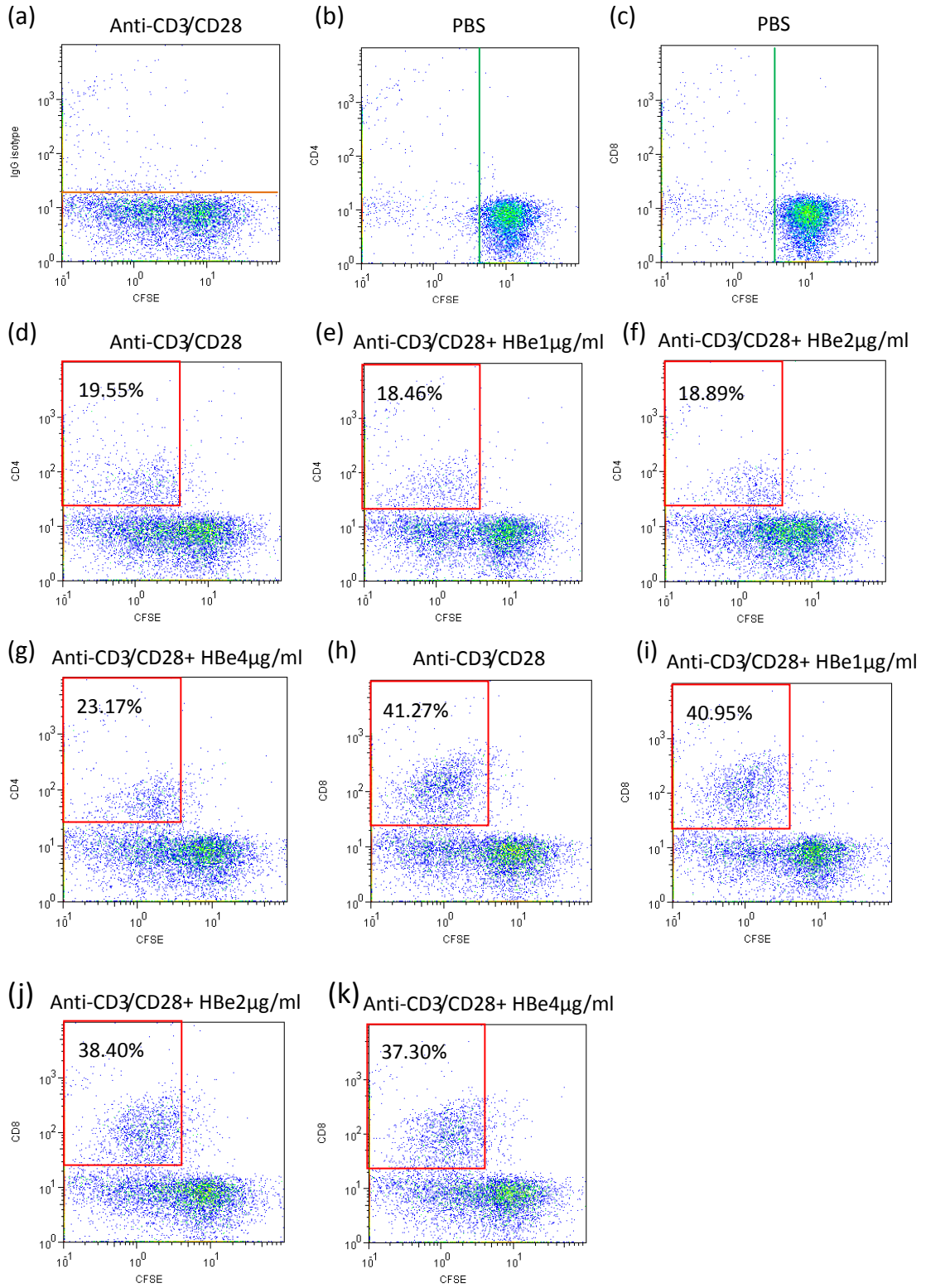
圖十八、B 型肝炎病毒 e 蛋白在以 anti-CD3 及 anti-CD28 抗體刺激 CD3⁺ T 細胞、CD4⁺ T 細胞或 CD8⁺ T 細胞分裂的情況下，皆不影響 C57BL/6 正常小鼠的細胞分裂

圖十六及十七僅呈現重覆實驗中的一次結果。本圖將重覆實驗結果平均後，繪製成柱狀圖。將純化的 C57BL/6 小鼠 CD3⁺ T 細胞、CD4⁺ T 細胞或 CD8⁺ T 細胞經 CFSE 標識後，在預先塗佈 anti-CD3 及 anti-CD28 抗體的培養皿中，外加 HBe 蛋白分析細胞增生比例。柱狀圖顯示 CD3⁺ T 細胞、CD4⁺ T 細胞或 CD8⁺ T 細胞在有 anti-CD3 及 anti-CD28 抗體的刺激下，再加入 1 或 2 µg/ml 的 HBe 蛋白的細胞分裂百分比。

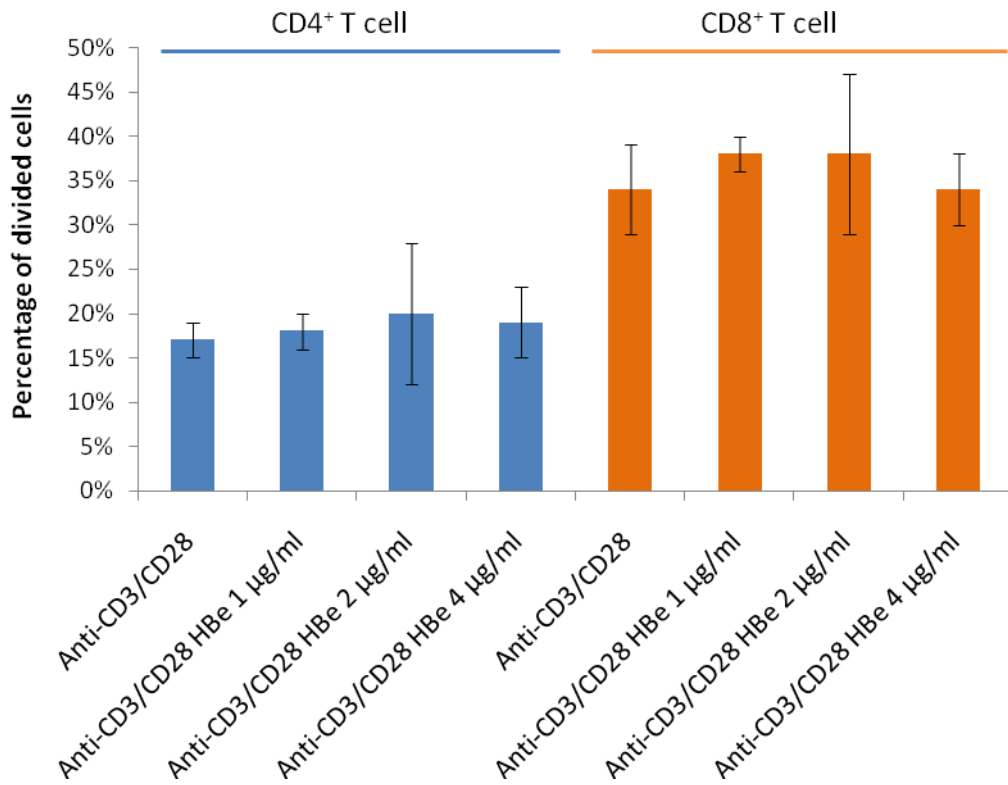
圖十九、B 型肝炎病毒 e 蛋白在以 anti-CD3/CD28 抗體刺激 CD3⁺ T 細胞分裂的情況下，以雙重染色分析增生細胞中的 CD4⁺ 與 CD8⁺ T 細胞比例

以 CFSE 加上 PerCP-Cy5.5-anti-CD4 或 PerCP-Cy5.5-anti-CD8 抗體的雙重染色分析 C57BL/6 小鼠 CD3⁺ T 細胞在預先塗佈 anti-CD3/CD28 抗體的 96 孔 U 形底培養盤中，加入 HBe 蛋白後培養三天的細胞螢光分佈與細胞標識。(a) T 細胞在塗佈 anti-CD3/CD28 抗體的培養盤培養三天後的 CFSE 與染 IgG isotype 抗體的螢光分佈，以此區分細胞標識為陽性的區間(紅線)，(b) T 細胞在未塗佈任何抗體的細胞培養盤培養三天後的 CFSE 與染 CD4 抗體的螢光分佈，以此區分分裂細胞與未分裂細胞區間(綠線)，(c) T 細胞在未塗佈任何抗體的細胞培養盤培養三天後的 CFSE 與染 CD8 抗體的螢光分佈。以此區分分裂細胞與未分裂細胞區間(綠線)，(d) 僅塗佈 anti-CD3 及 anti-CD28 抗體的組別，(e) 在塗佈抗體的情況下加入 1 µg/ml 的 HBe 蛋白的 CD4⁺ T 細胞分裂狀況，(f) 在塗佈抗體的情況下加入 2 µg/ml 的 HBe 蛋白的 CD4⁺ T 細胞分裂狀況，(g) 在塗佈抗體的情況下加入 4 µg/ml 的 HBe 蛋白的 CD4⁺ T 細胞分裂狀況，(h)~(k)實驗設計分別與(d)~(g)相同，僅三天後以 CD8 抗體染色觀察與 CFSE 的雙重螢光分佈。圖中紅色區間代表根據(a)~(c)控制組為基準所劃分的細胞標識分裂細胞。本圖僅表示三重覆實驗當中的一次結果。

結果圖示於第 64 頁。



圖說於第 63 頁。



圖二十、B 型肝炎病毒 e 蛋白在以 anti-CD3/CD28 抗體刺激 CD3⁺ T 細胞分裂的情況下，以雙重染色表示 CD4⁺ 與 CD8⁺ T 細胞的增生情況

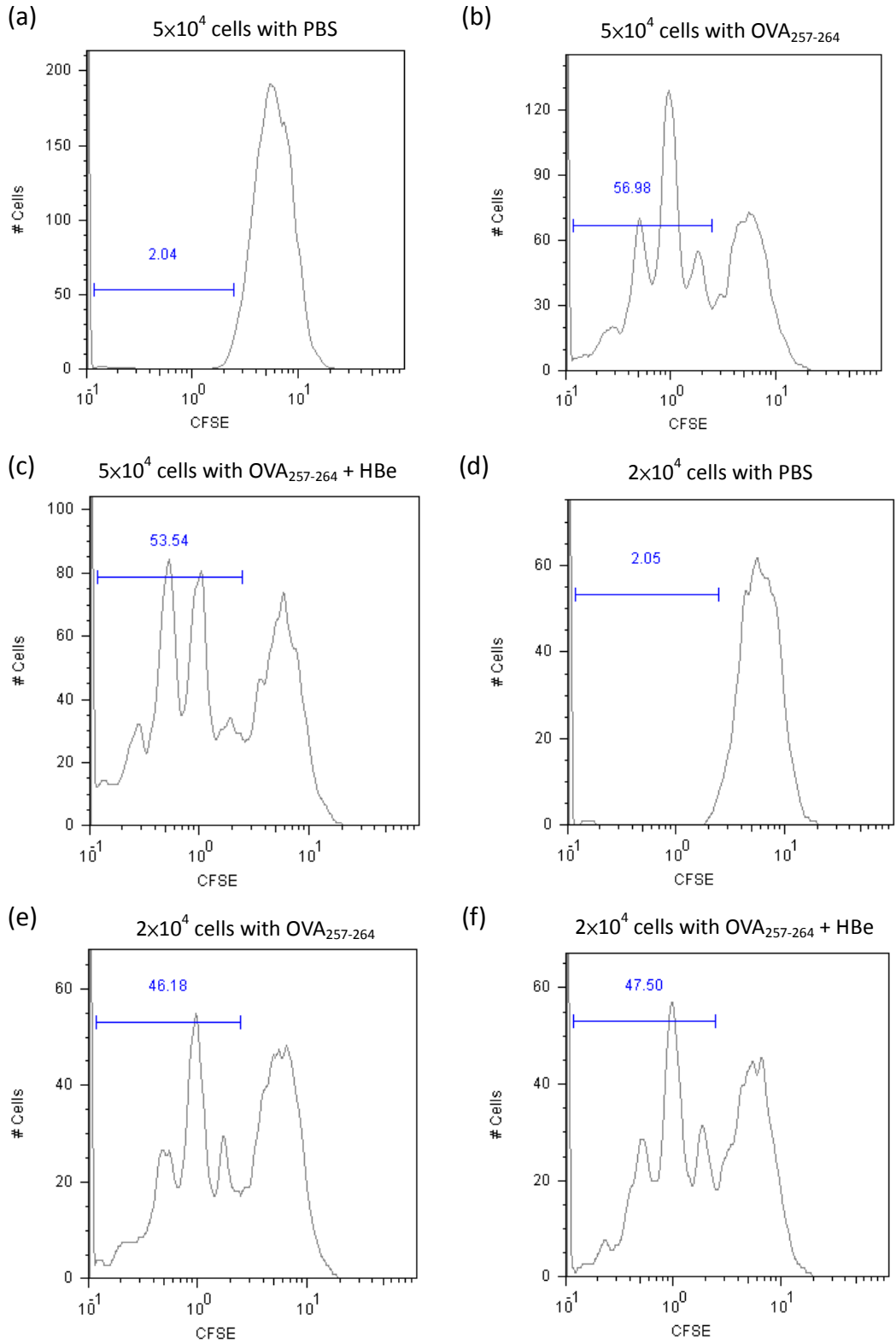
圖十九僅呈現三重覆實驗中的一次結果。本圖將重覆實驗結果平均後，繪製成柱狀圖。將純化的 C57BL/6 小鼠 CD3⁺ T 細胞經 CFSE 標識後，在預先塗佈 anti-CD3 及 anti-CD28 抗體的培養皿中，外加 HBe 蛋白共同培養三天，再以 PerCP-Cy5.5-anti-CD4 或 PerCP-Cy5.5-anti-CD8 抗體分析 CD4⁺ T 細胞及 CD8⁺ T 細胞增生比例。柱狀圖顯示 CD4⁺ T 細胞或 CD8⁺ T 細胞在有 anti-CD3 及 anti-CD28 抗體的刺激下，再加入 1、2 或 4 µg/ml 的 HBe 蛋白的細胞分裂百分比。

圖二十一、在 HBe 蛋白與抗原呈獻細胞預先培養後，專一抗原刺激 T 細胞受體基因轉殖小鼠的 CD8⁺ T 細胞分裂情形

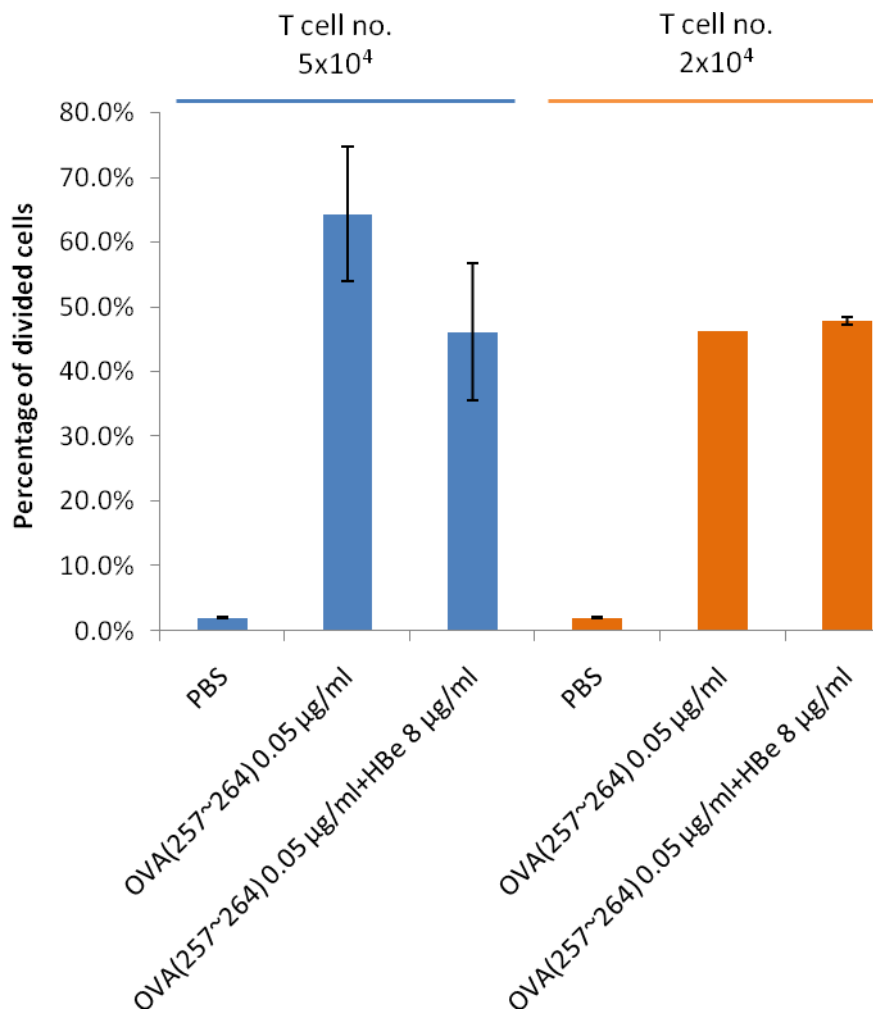
OT-I 小鼠的 CD8⁺ T 細胞在 0.05 µg/ml OVA₂₅₇₋₂₆₄ 胜肽刺激下與預先培養 24 小時的抗原呈獻細胞共培養三天的細胞 CFSE 螢光分佈。(a) 正常小鼠的抗原呈獻細胞先獨自培養 24 小時後，再加入 OT-I 小鼠的 5×10⁴ 個 CD8⁺ T 細胞培養三天，(b) 正常小鼠的抗原呈獻細胞先獨自培養 24 小時後，再加入 5×10⁴ 個 OT-I 小鼠的 CD8⁺ T 細胞，並加入 OVA₂₅₇₋₂₆₄ 胜肽培養三天，(c) 正常小鼠的抗原呈獻細胞先與 8 µg/ml 的 HBe 蛋白培養 24 小時後，再加入 5×10⁴ 個 OT-I 小鼠的 CD8⁺ T 細胞與 OVA₂₅₇₋₂₆₄ 胜肽培養三天，(d)(e)(f) 實驗設計分別與圖(a)(b)(c) 相同，僅 T 細胞個數改變 2×10⁴，並且抗原呈獻細胞等比例減少。除圖(e)為單一重覆實驗，其餘為二重覆實驗當中的一次結果。圖中藍線涵蓋的區間代表控制組細胞在劃分百分比不超過 5% 的則下，以螢光最低點開始所劃分的分裂細胞。

結果圖示於第 67 頁。





圖說於第 66 頁。



圖二十二、B 型肝炎病毒 e 蛋白不影響 T 細胞受體基因轉殖鼠 CD8⁺ T 細胞的增生

圖二十一僅表示三重覆實驗中的一次結果。本圖將重覆實驗結果平均後，繪製成柱狀圖。圖中顯示 5x10⁴(藍色)或 2x10⁴(橘色)個 OT-I 小鼠的 CD8⁺ T 細胞，在加入 0.05 µg/ml OVA₂₅₇₋₂₆ 的情況下與 8 µg/ml HBe 蛋白共培養三天後的 CD8⁺ T 細胞分裂百分比。

個人資料

姓名：李宇翔

英文姓名：Yu-Hsiang Lee

戶籍地：臺灣，彰化

E-mail: lyx@ms60.url.com.tw

學歷：私立東海大學生命科學系學士

私立精誠高級中學

彰化縣立彰化國民中學

彰化縣立南郭國民小學