



國立臺灣大學臨床醫學研究所

博士論文

Graduate Institute of Clinical Medicine

College of Medicine

National Taiwan University

doctoral dissertation

慢性 B 型肝炎患者免疫遺傳、免疫受體與免疫調節之
研究

Studies on Immunogenetics, Immune-Receptors, and
Immunomodulation in Chronic Hepatitis B Patients

黃奕文撰

Yi-Wen Huang

指導教授：高嘉宏所長

Jia-Horng Kao, M.D., PhD

許秉寧教授

Ping-Ning Hsu, M.D, PhD

中華民國一零二年五月

May, 2013

國立臺灣大學博士學位論文
口試委員會審定書

慢性 B 型肝炎患者免疫遺傳、免疫受體與免疫調
節之研究

Studies on Immunogenetics, Immune-Receptors,
and Immunomodulation in Chronic Hepatitis B
Patients

本論文係黃奕文君 (Q94421018) 在國立臺灣大學臨床醫
學研究所完成之博士學位論文，於民國一零二年五月二十八
日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

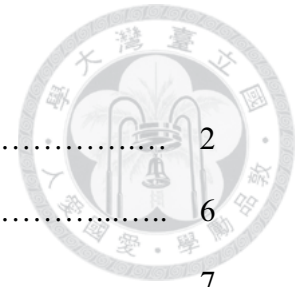
口試委員：

高嘉宏 鄧秉寧 (簽名)
指導教授
陳伊力
劉俊人

系主任、所長

高嘉宏 (簽名)

目 錄



口試委員會審定書.....	2
誌謝.....	6
中文摘要.....	7
英文摘要.....	10
博士論文內容	
緒論	
背景	
第一章 B 型肝炎病毒感染.....	14
1.1 B 型肝炎病毒學.....	15
1.2 急性 B 型肝炎.....	15
1.3 慢性 B 型肝炎.....	16
第二章 慢性 B 型肝炎的免疫遺傳.....	18
2.1 人類白血球抗原.....	18
2.2 人類白血球抗原與 B 型肝炎感染.....	19
2.3 臺灣族群之人類白血球抗原與 B 型肝炎感染及慢性感染的臨床病 程.....	22
第三章 慢性 B 型肝炎的免疫受體.....	22
3.1 維生素 D 免疫受體.....	22
3.2 先天免疫類鐸受體.....	24
第四章 慢性 B 型肝炎的免疫調節.....	26
4.1 病毒與先天免疫.....	26
4.2 宿主與 B 型肝炎病毒之交互作用.....	27
4.3 免疫調節藥物 (干擾素) 治療慢性 B 型肝炎.....	28
研究問題及重要性.....	30

研究創新性.....	31
研究的假說與特定目的.....	33
研究方法與材料.....	34
病患.....	34
實驗檢驗項目.....	37
免疫遺傳因子 HLA-DRB1 對偶基因的訂定、分型及次分型.....	38
維生素 D 免疫受體基因型和單體型的訂定.....	38
週邊血液單核球細胞的先天免疫類鐸受體 (TLR)- 3 表現量的測定.....	39
肝細胞上先天免疫類鐸受體 (TLR)- 3 表現量的測定.....	39
肝細胞上先天免疫類鐸受體 (TLR)-3 免疫組織化學染色.....	40
血清 B 型肝炎病毒核糖核酸 (HBV RNA) 即時 PCR 的測定.....	41
統計分析.....	42
結果	
一、免疫遺傳因子 HLA-DRB1 多形性與男性慢性 B 型肝炎的肝炎嚴重程度 之相關性.....	43
二、維生素 D 免疫受體基因多形性與慢性 B 肝的肝炎急性發作、e 抗原情況 以及肝細胞癌產生之相關性.....	44
三、慢性 B 型肝炎病患週邊血液單核球細胞和肝臟細胞上先天免疫類鐸受體 -3 之表現量，並且其與免疫調節藥物長效型干擾素治療療效的相關性..	45
四、免疫調節藥物 (干擾素) 對於慢性 B 肝病患血清病毒核糖核酸 (HBV RNA) 的抑制效果.....	48
討論	
第一章 免疫遺傳因子 HLA-DRB1 多形性與男性慢性 B 型肝炎的肝炎嚴重 程度之相關性.....	50
第二章 維生素 D 免疫受體基因多形性與慢性 B 肝的肝炎急性發作、e 抗原 情況以及肝細胞癌產生之相關性.....	54

第三章 慢性 B 型肝炎病患週邊血液單核球細胞和肝臟細胞上先天免疫類鐸受體-3 之表現量，並且其與免疫調節藥物長效型干擾素治療療效的相關性.....	60
第四章 免疫調節藥物 (干擾素) 對於慢性 B 肝病患血清病毒核醣核酸 (HBV RNA) 的抑制效果.....	64
展望.....	70
論文英文簡述 (summary)	80
參考文獻.....	91
圖.....	120
表.....	132
附錄.....	145

誌謝

感謝上帝從碩士直升到博士班，給於我這八年寶貴之學習成長的機會。這當中賜給我七個國際及四個國內醫學研究獎狀，支持我繼續往前行而不放棄！實在不是因為我厲害，而是因著祂的恩典與祝福。

感謝爸媽給予我積極進取及自我要求的榜樣、習慣及鼓勵，並且持續性的體諒、支持與代禱。感謝大姨媽的代禱與時常的諒解及關心。感謝神所賜最適合我的愛人季芳，她全方位的愛，常常忍耐及包容我對她與小孩照顧的不足，並且隨時隨地鼓勵、支持、代禱、提醒與照顧讓我可以安心完成學業。感謝大女兒慈恩的體貼與體諒，自動自發不用我操心；二兒子偉恩的細心、體諒與陪伴；小兒子宏恩的懂事與體貼。感謝大哥大嫂在學習上的鼓勵與提醒；二哥二嫂隨時照顧大姨媽，讓我沒有後顧之憂；弟及弟妹隨時協助爸媽的照顧；以及小妹就近照顧爸媽。

感謝高嘉宏所長引領我進入醫學研究領域，提供我材料、資源、研究題目、方法、國內外演講機會、食住娛樂，教導我撰寫、發表及評審論文，用各種方法鼓勵我及包容我的不足，引介國內外學者及至國泰醫院服務。感謝陳定信院士對我第一篇國際論文的鼓勵，提供資源與隨時的指導及啟發。感謝賴明陽教授的鼓勵及所提供的資源與機會。感謝陳培哲院士的隨時鼓勵，啟發性的指導，給予我研究資源及機會。感謝劉俊人教授體貼的鼓勵、時常的指導、協助，成為我的模範。感謝許秉寧教授給予我研究上之提醒與指導，以及論文的審查。感謝簡榮南教授、林俊彥副教授對論文熱心的指導及鼓勵。

感謝楊賢馨教授的提拔，教導我為人處事，包容我的不足，給予我醫療、教學、研究、學會服務、國內及國際各個層面發展的機會，關懷我的生活及家庭。感謝胡瑞庭主任細心的照顧、體諒及支持，給予彈性與空間，不時的提醒，醫療上的指導與支援。感謝林俊麟醫師的照顧、鼓勵及支持。感謝張涵郁醫師體諒與支持及醫療上時常之協助。感謝吳嘉敏醫師醫療工作上的協助。感謝康本初醫師及張睿欣醫師臨床工作之幫忙。


感謝國泰醫院黃清水顧問、林志明院長、黃政華副院長、洪焜隆副院長、李發焜副院長、李豐鯤副院長、內科部及肝臟胃腸科同仁們的支持、協助及鼓勵。感謝林世昌部長的指導並提供實驗室空間及設備。感謝魏淑鈺醫師指導實驗技術及給予支援。感謝梁哲維醫師指導免疫染色。感謝我過去及現在的助理們：游慧玲、李曜任及許成凱碩士在實驗技術及操作，並且行政事務的協助。感謝林志陵主任對我第一篇國際論文的修正。感謝楊宏志、許景盛醫師的鼓勵與指導。感謝高教授實驗室助理陳雯玲、周郁菁小姐實驗操作上的心力；王紫珊小姐及鄭惠如、陳亭之博士生的協助；臺大醫學檢驗暨生物技術學系胡忠怡老師及陳佩蓉小姐的鼓勵及技術指導。

感謝日本 Prof. Kazuaki Chayama, Dr. Shoichi Takahashi, Dr. Masataka Tsuge, Miss Hiromi Abe 之指導與接待及日本消化器病學會提供之出國研究獎學金。感謝行政院國家科學委員會博士生出國研究之經費補助及研究計劃(NSC 99-2314-B-281-002-MY3)和國泰綜合醫院 - 國立台灣大學醫學院附設醫院聯合研究計劃(97-CGN01)的經費支持。

願以上所提的每一位都領受神在耶穌基督裏的恩典與祝福，而身體健康、工作順利、身心靈平安。

Sola Gratia! Soli Deo Gloria!

中文摘要



目前仍然未知那些宿主免疫遺傳及免疫受體因素影響慢性 B 型肝炎急性發作的嚴重度。我們的目的是在於探討免疫遺傳因子 HLA-DRB1 多形性與男性慢性 B 型肝炎之肝炎嚴重程度之間的相關性。在此前瞻性世代研究中，共納入了 204 名在門診已追蹤一年以上的 B 肝帶原者 (131 名男性和 73 名女性)。50 名 ALT < 2X 正常值上限 (第一組、平均追蹤 83.6 個月) 與 154 名 ALT \geq 2X 正常值上限 (第二組、平均跟蹤 81.3 個月) 的帶原者進行比較。HLA-DRB1 的對偶基因採用聚合酶鏈反應-序列特定寡核苷酸探針雜交法，而病毒基因型以熔解曲線分析鑒定。在男性帶原者中發現第一組之 18% 和第二組之 8% 帶有 HLA-DRB1*1101 (調整年齡後 OR 0.23, $p = 0.020$)，女性帶原者是 4% 相較於 9.4% ($p = 0.094$)。男性攜帶 DRB1*1101 者，其 B 肝病毒基因型的分佈在兩組之間是相似的。HLA-DRB1*1101 與臺灣男性慢性 B 肝帶原者的輕度肝炎有關。

對於慢性感染和癌症，維生素 D 可通過維生素 D 受體 (VDR) 發揮免疫調節和抗增殖作用。我們訂定分為 6 個不同組別的 250 名臺灣慢性 B 肝帶原者之三個多形性限制位點的基因型 (*BsmI* (rs1544410)、*ApaI* (rs7975232) 及 *TaqI* (rs731236))。調整年齡和性別後，肝炎急性發作患者的維生素 D 受體 B/b、B/a、B/T、B/a/T 頻率均低於未發生急性發作者 (7% 相較於 20%， $p=0.009$ ；1% 相較於 9%， $p=0.004$ ；3% 相較於 10%， $p=0.007$ ；1% 相較於 9%， $p=0.005$)；相反的，肝炎急性發作患者的 T/t、A/T、A/t、b/A/t 頻率分佈均較高 (8% 相較於 3%， $p=0.003$ ；49% 相較於 34%， $p=0.027$ ；2% 相較於 1%， $P=0.004$ ；0.5% 相較於 0%， $p=0.001$)。此外，HBeAg 陽性患者的 B/b、B/B、T/t、b/A、B/a、B/A、B/T、B/t、A/t、b/A/T、B/a/T、B/A/T、B/A/t、b/A/t 頻率較高。對於併發與未併發肝細胞癌的帶原者，其維生素 D 受體的頻率分佈相似。維生素 D 受體的基因多形性與臺灣 B 型肝炎病毒帶原者的不同臨床表型有關，但與產生肝細胞癌無關。

先天免疫類鐸受體-3 的基因變異與慢性 B 型肝炎有關。我們的目的是探討

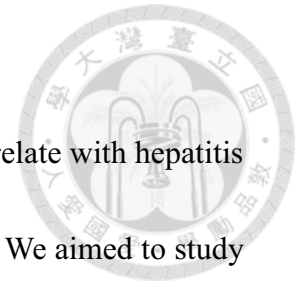
慢性 B 型肝炎患者週邊血液單核球細胞與肝臟細胞的類鐸受體-3 表現量和接受免疫調節藥物長效型干擾素治療時之變化。我們納入 127 例慢性 B 型肝炎患者與 64 例 B 型肝炎表面抗原陰性及 C 型肝炎抗體陰性之控制者。獨立於年齡、性別和 ALT 值之下 (-13.466 ，95% 信賴區間 $-17.202 - -9.730$ ， $p < 0.001$)，相較於對照者，慢性 B 肝病患在週邊血液單核球細胞上有較低的類鐸受體-3 平均熒光強度 (14.61 ± 13.49 相較於 9.70 ± 4.61 ， $p < 0.001$)。慢性 B 肝病患的類鐸受體-3 免疫組織化學染色主要侷限在庫氏細胞，而控制者的染色散佈在庫氏細胞和肝細胞上。病患的肝臟細胞類鐸受體-3 mRNA 表現量也比對照者低 (0.47 ± 0.30 倍相較於 1 倍)。在 12 例接受長效型干擾素治療的病患中，5 例達到持續病毒學反應。使用治療前類鐸受體-3 的平均熒光強度為對照，這 5 例病患之類鐸受體-3 的平均熒光強度在治療後立即回升到平均 1.5 至 1.7 倍。在七例治療無反應或復發病患中，類鐸受體-3 平均熒光強度減少到平均 0.5 至 0.7 倍。在 10 例接受貝樂克治療且具有治療中病毒學反應的患者，在 48 個星期的治療中，類鐸受體-3 平均熒光強度逐漸回升到平均 1.2 倍。慢性 B 型肝炎病患之週邊血液單核球細胞上，在獨立的年齡，性別及 ALT 值之下，以及肝細胞上的類鐸受體-3 的表現量降低。長效型干擾素治療而達到持續病毒反應的患者之類鐸受體-3 表現的回升較貝樂克治療者更為顯著。

在 lamivudine 治療中所檢測到的血清 HBV RNA 是因為 RNA 的複製中間產物未受藥物治療之影響。我們的目的是在於探討慢性 B 型肝炎患者中免疫調節藥物 (干擾素) 對於血清 HBV RNA 的抑制效果。血清檢體中的 HBV DNA 和 RNA 通過 B 肝病毒核酸萃取物的逆轉錄和即時 PCR 而定量之。將對來自以下三組患者之每 2 週到 3 個月的檢體進行分析：10 名男性患者，接受核苷類似物單一治療 44 至 48 週 (5 名用 lamivudine，5 名用 entecavir)；6 名男性患者，接受相繼干擾素和 lamivudine 合併治療；以及 3 名男性患者，接受 lamivudine 單一治療 20 至 24 週。接受治療前，沒有任何患者血清中檢測到 HBV RNA，但在接受治療期間，有 15 名患者血清中檢測出 HBV RNA。在這三組中，治療前 HBV DNA (8.1

± 2.4 相較於 7.7 ± 1.4 相較於 $5.1 \pm 0.3 \log_{10}$ copies/ml, $p = 0.06$)以及治療和追蹤期間 (45.5 ± 2.0 相較於 49.7 ± 5.6 相較於 48.7 ± 6.4 週, $p = 0.32$) 相似。HBV RNA 在所有接受單一治療的患者之治療結束時以及追蹤結束時都可檢測到,但在接受相繼合併治療患者中卻沒有一位被檢測到(100% 相較於 0%, $p < 0.001$)。與 lamivudine 治療而檢測到血清 HBV RNA 相比,免疫調節藥物干擾素治療可通過抑制 HBV RNA 的複製中間產物來降低 HBV DNA 的複製,從而使血清 HBV RNA 消失。

關鍵詞：B 型肝炎；免疫的；人類白血球抗原；維生素 D 受體；類鐸受體 3；核糖核酸；干擾素

英文摘要



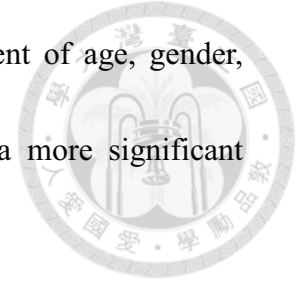
Which host immunogenetic factors and immune receptors correlate with hepatitis severity in chronic hepatitis B (CHB) patients (pts) remain unclear. We aimed to study association of HLA-DRB1 with hepatitis severity in male HBV carriers. 204 HBV carriers (131 men, 73 women) who were followed-up for >1y were enrolled. 50 HBV carriers (group I) with ALT <2x ULN (mean f/u 83.6m) were compared with 154 CHB patients (group II) with ALT \geq 2x ULN (mean f/u 81.3m). HLA-DRB1 alleles were typed by PCR-sequence specific oligonucleotide probe hybridization and HBV genotypes by melting curve analysis. HLA-DRB1*1101 was found in 18% of group I vs. 8% of group II in male (OR 0.23, $p=0.020$, adjusted for age) and 4% vs. 9.4% in female ($p=0.094$). In male harboring DRB1*1101, distribution of HBV genotype was comparable between 2 groups. HLA-DRB1*1101 correlates with less severe hepatitis in Taiwanese male carriers of HBV.

Vitamin D receptor (VDR) has immunomodulatory and antiproliferative effects. We genotyped *BsmI* (rs1544410), *ApaI* (rs7975232), *TaqI* (rs731236) of VDR gene in 250 HBV carriers who were categorized into 6 phenotypes. After adjustment for age and sex, frequencies of VDR B/b, B/a, B/T, B/a/T in pts with hepatitis flare(s) were lower than those without (7%vs.20%, $p=0.009$; 1%vs.9%, $p=0.004$; 3%vs.10%, $p=0.007$; 1%vs.9%, $p=0.005$), in contrast, T/t, A/T, A/t, b/A/t were higher in flare(s)

(8% vs. 3%, $p=0.003$; 49% vs. 34%, $p=0.027$; 2% vs. 1%, $p=0.004$; 0.5% vs. 0%, $p=0.001$). In addition, B/b, B/B, T/t, b/A, B/a, B/A, B/T, B/t, A/t, b/A/T, B/a/T, B/A/T, B/A/t, b/A/t were higher in HBeAg positive pts. Distribution of VDR genotypes was comparable between pts with and without hepatoma. VDR gene polymorphisms are associated with distinct clinical phenotypes but not with hepatoma.

Innate immune receptor toll-like receptor-3 (TLR3) gene variants correlate with CHB. We aimed to investigate TLR3 expression in PBMCs and liver cells of CHB pts and its response to immunomodulation (pegylated-interferon therapy (peg-IFN)). We enrolled 127 CHB pts and 64 HBsAg-negative, anti-HCV negative controls. Compare to controls, pts had a lower TLR3 mean fluorescence intensity (MFI) on PBMCs (14.61 ± 13.49 versus 9.70 ± 4.61 , $p<0.001$), independent of age, gender and ALT (-13.466 , 95% CI $-17.202 - -9.730$, $p<0.001$). Pts had limited TLR3 stains on Kupffer cells, controls had diffuse stains on Kupffer and hepatocytes. Hepatic TLR3 mRNA was lower in pts than controls (0.47 ± 0.30 versus 1 fold). Using pre-treatment TLR3 MFI as referent, among 5 of 12 peg-IFN treated pts with sustained virological response (SVR), TLR3 MFI restored to a mean of 1.5-1.7 folds immediately after therapy. Among 7 non-responders or relapsers, TLR3 MFI reduced to a mean of 0.5-0.7 fold. Among 10 entecavir (ETV)-treated pts with on-treatment virological response, TLR3 MFI gradually restored to a mean of 1.2 folds during 48-week therapy.

CHB pts have reduced TLR3 expressions on PBMCs, independent of age, gender, ALT and on liver cells. Pts with peg-IFN induced SVR have a more significant restoration of TLR3 expression than those under ETV.



Serum HBV RNA is detected during lamivudine therapy as the consequence of unaffected RNA replicative intermediates. We aimed to determine inhibitory effect of immunomodulation (interferon, IFN) on serum HBV RNA in CHB pts. HBV DNA and RNA were quantified by reverse transcription of HBV nucleic acid extract and real-time PCR; every 2 wks to 3m in 10 male treated with nucleoside analogue monotherapy for 44-48wks (5 lamivudine (LMV), 5 ETV), 6 males with sequential IFN and LMV combination, and 3 males with LMV monotherapy for 20-24 wks. HBV RNA was not detectable in all pts before any therapy, but became detectable in 15 during therapy. Among the 3 groups, pretreatment HBV DNA (8.1 ± 2.4 vs. 7.7 ± 1.4 vs. 5.1 ± 0.3 log cp/mL, $p=0.06$), treatment and follow-up durations (45.5 ± 2.0 vs. 49.7 ± 5.6 vs. 48.7 ± 6.4 wks, $p=0.32$) were comparable. HBV RNA was detectable at end of therapy or follow-up in all pts with monotherapy, but none of sequential combination (100% vs. 0%, $p<0.001$). Compared to LMV with detectable serum HBV RNA, immunomodulation of IFN may reduce HBV DNA replication through inhibition of HBV RNA replicative intermediates, resulting in loss of serum HBV RNA.

Keywords: hepatitis B; immune; human leukocyte antigen; vitamin D receptor;
toll-like receptor-3; ribonucleic acid; interferon



緒論

背景



第一章 B 型肝炎病毒感染

B 型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 發現於 1965 年，是全球引起慢性肝炎、肝硬化及肝癌的主因 (Chen 1993; Kao and Chen 2000; Kao and Chen 2002; Lee 1997)，每年約造成一百萬人死亡。根據世界衛生組織的估計，全球帶原者已達 3 億 5 千萬到 4 億人之多，其中 6 千萬人最終可能死於肝癌，而 4 千 5 百萬人最終可能死於肝硬化。慢性 B 型肝炎的盛行率，世界各地有很大的差異。在西方國家，慢性 B 型肝炎的盛行率較低，大部分是成年以後才感染，盛行率為全人口的 0.2% 至 1%，約佔所有慢性肝炎的 5% 至 10%。而在部分高流行區，如亞洲、非洲、南歐及拉丁美洲等地，B 型肝炎帶原者的盛行率高達 2% 至 20%。大多數亞洲 B 型肝炎病毒帶原者在生命早期獲得病毒，如週產期或兒童早期 (Steven et al. 1975)。即使在 B 型肝炎病毒感染率較低的美國，在 2005 年，大約 5400 人患有急性 B 型肝炎病毒感染 (Wasley et al. 2007)，有 120 萬人是慢性 B 型肝炎病毒帶原者 (McQuillan et al. 1989; CDC 1991)。在過去的幾十年裏，由於來自 B 型肝炎病毒流行地區移民的湧入，美國的 B 型肝炎病毒相關之肝臟疾病和肝細胞癌的盛行率增加 (Hann et al. 2007)。據估計，美國每年有 5000 人死於 B 型肝炎的併發症，包括肝硬化和肝細胞癌 (Lin and Kirchner 2004)。臺灣早知是 B 型肝炎高度盛行區，40 歲以上幾乎有 90% 的人感染過 B 型肝炎病毒，且約有 15% 至 20% 的人為帶原者。所幸自從民國 73 年開始施行新生兒 B 型肝炎疫苗注射後，學齡前兒童之帶原率已由疫苗接種前 10%，大幅降低到目前之小於 1%，成果很好。同時兒童肝癌的年發生率亦有顯著下降。但在成年人之中仍有為數不少的 B 型肝炎帶原者，而且肝硬化與慢性肝炎仍為十大死因之第 8 位，肝癌為男女性癌症死因之第 2 位，影響不可謂不大。



1.1 B 型肝炎病毒學

B 型肝炎病毒為去氧核糖核酸 (DNA) 病毒，丹氏顆粒 (Dane particle) 為 42-nm 的球形結構，包括核蛋白 (core) 及外套蛋白 (envelope)。核蛋白內含不完整環狀雙股 DNA，DNA 聚合酶 (polymerase)，核心抗原 (HBcAg) 和 e-抗原 (HBeAg)，外套蛋白則有表面抗原 (HBsAg)。不完整環狀雙股 DNA 有 3,200 個鹼基對 (base pairs)，分成 4 個開放編閱架構 (open reading frames)：即表面基因 (S gene)，核心基因 (C gene)，聚合酶基因 (P gene) 和 X 基因 (X gene)。DNA 聚合酶為 P 基因製造，具有反轉錄 (reverse transcription) 及合成雙股 DNA 功能。核心抗原為 C 基因所製造的蛋白質，人體會產生核心抗體與之對抗，但不具保護功能，核心抗體陽性表示曾經感染過 B 型肝炎病毒。e-抗原亦為 C 基因製造，經過修飾後由肝細胞釋出，e-抗原陽性表示 B 型肝炎病毒在體內大量複製，傳染性極強。人體會產生 e-抗體對抗 e-抗原，e-抗體陽性表示病毒活性降低，傳染性也低。表面抗原為 S、pre-S1 及 pre-S2 基因製造。B 型肝炎表面抗原陽性，表示體內有 B 型肝炎病毒存在，就是 B 型肝炎帶原者。X 基因製造 2 種蛋白質，可當做轉錄活化物 (transcriptional activator)，輔助病毒複製，或許與肝細胞癌之發生有關。

HBV 是通過前基因組 RNA 複製的單一 DNA 病毒。在 HBV 複製過程中有幾個重要步驟：第一、在被感染的肝細胞核內，病毒體內的不對稱 DNA 轉換為共價閉環 DNA (cccDNA)；然後，cccDNA 轉錄為前基因組 RNA。接下來，病毒 DNA 的負鏈通過逆轉錄酶進行合成。最後，與合成的正鏈形成成熟的基因組 DNA (Ganem et al. 1987)。

1.2 急性 B 型肝炎

B 型肝炎的潛伏期約 40 到 180 天 (平均 60 天)，多數沒有症狀，須經驗血才能確定。10-25% 的急性感染有明顯的臨床症狀，如腸胃不適、食慾不振、疲

倦、噁心、嘔吐等，嚴重患者會出現茶色尿甚至黃疸，其病情之輕重須視感染者的年齡、性別、免疫力而定。典型的血清標記變化為表面抗原 (HBsAg)，e-抗原 (HBeAg) 和 HBV DNA 於感染後三到四週內可測得，表示病毒複製旺盛，此時病患尚處於潛伏期間。肝臟生化檢查異常或症狀出現一到二個月後，HBsAg 和 HBV DNA 消失，表面抗體 (anti-HBs) 出現，但其間會有數週不等的"空窗期"。表面抗體長久持續並表示有免疫力。e-抗原多在最高血清轉胺酵素值 (ALT) 後，或表面抗原消失前發生陰轉，而 e-抗體 (anti-HBe) 隨後出現。若 e-抗原持續超過三個月，則有很高的機會轉變成慢性肝炎。表面抗原若存在大於六個月，臨床上稱為慢性 B 型肝炎，只有少數病例雖然多於六個月，但表面抗原最後仍被清除而康復。核心抗體 (anti-HBc) 因核心抗原 (HBcAg) 的免疫性較表面抗原強，常在表面抗原出現後一到二週即轉為陽性。急性 B 型肝炎病毒感染後六個月內，以 IgM 核心抗體 (IgM anti-HBc) 反應為主，六個月後則 IgG 核心抗體取而代之並終身存在。IgM 核心抗體多在十二個月內消失，因之 IgM 核心抗體代表急性 B 型肝炎病毒感染，而 IgG 核心抗體僅表示曾受感染而無法分別急性，慢性或是已經回復且有免疫力。我們發現國人的 IgM 核心抗體在大約一半的慢性 B 型肝炎患者呈陽性反應；因此國人的 IgM 核心抗體的效價區別值應該設定為 2.4 至 2.5 而非試劑原廠所設定的 0.8 至 1.2，以正確的區分急性與慢性 B 型肝炎 (Huang et al. 2006a)。國人 IgM 核心抗體的較高效價區別值的原因是否與國人對於 B 型肝炎病毒有較強的免疫反應仍未知。

此外，我們發現台灣急性 B 型肝炎患者之病毒基因型以 B 及 C 型為主，而且以 B 型居多 (Huang et al. 2008a)。這個病毒基因型的分佈與台灣慢性 B 型肝炎相似。台灣急性 B 型肝炎之病毒基因型 B 型患者的臨床表現與病毒基因型 C 型患者的臨床表現相似 (Huang et al. 2008a)。

1.3 慢性 B 型肝炎

慢性 B 型肝炎的成因是因宿主對 B 型肝炎病毒的免疫機能不佳之故。一般而言毒殺性 T 淋巴球 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 可將被 B 型肝炎病毒感染的肝細胞破壞，而造成肝細胞壞死。但若人體之免疫機能不佳，便無法將 B 型肝炎病毒完全清除，而造成慢性肝炎。e-抗原陽性的母親所生的嬰孩，因免疫系統

尚未發育成熟，有 95% 機會成為 B 型肝炎帶原者。而成人時期感染 B 型肝炎病毒，通常可將病毒完全清除，僅 3% 至 5% 機會成為 B 型肝炎帶原者。

慢性 B 型肝炎的自然病史可以依宿主免疫與病毒之交互作用分為 4 個階段：

(1) 免疫耐受期 (immune tolerance): B 型肝炎病毒在肝細胞中大量複製，血清 e-抗原陽性，HBV DNA 濃度頗高；肝細胞損傷頗輕，血清轉胺酵素值 AST、ALT 值正常；肝組織切片顯示輕微的慢性發炎。(2) 免疫廓清期 (immune clearance): 免疫反應增強，毒殺性 T 淋巴球攻擊被 B 型肝炎病毒感染的肝細胞，常伴有肝炎的急性發作和 e-抗原血清陰轉 (HBeAg seroconversion)，HBV DNA 濃度下降；肝組織切片顯示慢性活動性肝炎或慢性小葉性肝炎。(3) 嵌入或殘存期 (integrated or residual phase): 血清轉胺酵素值 AST、ALT 值正常，e-抗原陰性，e-抗體陽性，HBV DNA 嵌鑲於肝細胞 DNA 內以嵌入形式存在；肝組織切片可顯示輕微變化或不活動性肝炎。(4) 復發期 (reactivation phase): 也稱為 e-抗原陰性慢性 B 型肝炎；e-抗原維持陰性的狀態下，肝炎的急性發作再次發生。當宿主免疫機能受到抑制如帶原者接受化學治療或器官移植時，慢性 B 型肝炎也容易復發 (Huang et al. 2006b；Huang and Chung 2012)。在免疫清除期，肝炎反復急性發作可能會使慢性肝炎加速進展成晚期肝病，而且預後較差 (Huo et al. 2000; Realdi et al. 1994)。一般而言，肝硬化或肝細胞癌的發生，端視免疫廓清期長短和急性發作之嚴重度及次數而定。

嚴重肝病已知的相關風險包括：高血清 B 型肝炎病毒數量 (Iloeje et al. 2006)，高齡或感染時間較長，反復的肝炎急性發作 (Realdi et al. 1994; Huo et al. 2000)，男性，糖尿病 (Huo et al. 2000；Huang et al. 2011)，HBeAg 持續陽性 (Realdi et al. 1994)，B 型肝炎病毒基因型 C 型之感染 (Kao et al. 2000)，C 型肝炎病毒的共同感染 (Liu et al. 2005) 或 D 型肝炎病毒的共同感染 (Tamura et al. 1993)，病毒 pre-S 缺失的突變株 (Chen et al. 2006)，病毒核心啟動子突變株 (Lin et al. 2005)，酒精濫用，肝臟脂肪和宿主免疫狀態的改變，如 HIV 感染或移植後 (Kao 2007)。



第二章 慢性 B 型肝炎的免疫遺傳 (黃與高，民國 97 年)

2.1 人類白血球抗原 (Human Leukocyte Antigen, HLA)

B 型肝炎的病程受病毒及宿主免疫交互作用的影響 (Chisari et al. 1995)。人類白血球抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 是一個重要的宿主基因因子，藉呈現抗原影響 T-淋巴球的免疫調節反應 (Benichou et al. 1990)。已有廣泛的研究顯示人類白血球抗原多形性 (HLA polymorphism) 與疾病易感性或抵抗力相關 (Tiwari and Terasaki 1989)，但是與慢性 B 型肝炎的相關性只有部份被了解。

人類白血球抗原基因區域制定於第六對染色體的短臂之 6p21.3 (Campbell and Trowsdale 1993) 而且擁有多個軌跡 (locus) 把第一、二、三類的人類白血球抗原分子改為密碼。第一類的人類白血球抗原包括三個 alpha 鏈基因，即為 HLA-A、-B 及 -C。第二類的人類白血球抗原主要的分子為 HLA-DP、-DQ 及 -DR。後者區域大約 800kb 長而且包含 alpha 及 beta 基因。Alpha 及 beta 基因被安排為 DRA 及 DRB，DQA 及 DQB，DPA 及 DPB 相配的配對。DRB 基因及偽基因的數目可以依單模式種而不同。DR alpha、DQ alpha 及 DP alpha 蛋白與其 beta-鏈相配對，但有證據顯示交叉配對。

人類白血球抗原分子呈現抗原，包括病毒胜肽 (peptide)，給 T-細胞受體。其結果對於病原菌而言時常是有害的 (Ceppellini et al. 1989)。人類白血球抗原擁有兩個特性使病原菌不易逃脫免疫反應。首先是多元性 (polygeny)，意指其含有數個不同的第一類及第二類人類白血球抗原基因。每個個體擁有一套含有不同胜肽結合特性的人類白血球抗原分子。其次是多形性 (polymorphism)，意指人口中個別基因含有多個變異。

人類白血球抗原第一及第二類分子是人類蛋白中最具多形性者。可占據軌跡 (locus) 的變異基因稱為對偶基因 (allele)。人類白血球抗原對偶基因在一個染色

體的特定組合稱為單模式種 (haplotype)。HLA-DRB 軌跡擁有超過 400 個對偶基因。多形性的餘數 (residue) 排列於胜肽結合溝槽 (peptide-binding groove) 而且直接與胜肽或 T-細胞受體作用 (Bjorkman et al. 1987)。不同的人類白血球抗原對偶基因分子有能力結合不同的胜肽。所有第二類人類白血球抗原基因多形性的軌跡都在第二個編碼順序 (exon)，其將 alpha-beta 異型二聚物 (heterodimer) 之胜肽結合溝槽 (peptide-binding cleft) 的 alpha 螺旋狀牆 (helical wall) 及 beta 褶狀片底部 (pleated sheet floor) 改為密碼。因此第二類軌跡的多形性決定結合溝槽的型狀及呈現給 T 細胞的胜肽。Beta 鏈軌跡是擁有高度多形性的。只有 alpha 鏈軌跡之 DQA1 亦擁有廣泛的多形性。

2.2 人類白血球抗原於 B 型肝炎感染

許多研究提出人類白血球抗原多形性與 B 型肝炎病毒被宿主體內清除或持續感染宿主有關 (Almarri and Batchelor 1994; Forzani et al. 1984; Hohler et al. 1997; Mota et al. 1987; Thio et al. 1999; Thio et al. 2003; Thursz et al. 1995; van Hattum et al. 1987; Wu et al. 2004; Yang et al. 1989)。這些報告大多數顯示 B 型肝炎病毒被宿主體內清除或持續感染與 HLA-DRB1 多形性有關 (Almarri and Batchelor 1994; Forzani et al. 1984; Hohler et al. 1997; Thio et al. 1999; Thio et al. 2003; Thursz et al. 1995; Wu et al. 2004; Yang et al. 1989)，其中包括兩個台灣族群的報告 (Wu et al. 2004; Yang et al. 1989)。

於 1984 年已有報告顯示 44 位義大利 B 型肝炎表面抗原 (HBsAg) 陽性慢性活動性肝炎患者與 526 位年齡、性別、地理來源相配對之健康捐血者相比，前者有較高的 HLA-DR3 頻率 (36.4% vs. 17.1%， $p=0.03$) 及較低的 HLA-DR4 頻率 (0% vs. 18.5%， $p=0.002$)，而 HLA-A, B, C 基因之頻率並無顯著差異 (Forzani et al. 1984)。荷蘭族群的報告提出 37 位慢性活動性肝炎患者與 200 位 HBsAg 及 anti-HBs 陰性健康捐血者相比，前者有較低的 HLA-DQw1 頻率 (37.8% vs. 67.8%， $p=0.043$)，而 HLA-A, B, C, DR 基因之頻率並無顯著差異。此報告使

用標準微量淋巴球毒殺測試 (standard microlymphocytotoxicity tests) 也就是血清學方法 (serological method) 來訂出 HLA 之抗原 (van Hattum et al. 1987)。西亞之卡達 (Qatar) 族群的報告顯示 21 位慢性 B 型肝炎表面抗原陽性患者與 100 位 HBsAg 及 anti-HBs 陰性健康血液捐贈者相比，前者有較低的 HLA-DR2 頻率 (14% vs. 46%， $p < 0.01$) 及較高的 HLA-DR7 頻率 (57% vs. 28%， $p < 0.05$)，而第一類的人類白血球抗原 (HLA class I) 之頻率並無顯著差異。此報告使用標準微量淋巴球毒殺測試來訂出 HLA 之抗原，然後大多數個體的 DR 及 DQ 抗原使用去氧核糖核酸 (DNA) - 限制酵素片段長度多形性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 方法來確認 (Almarri and Batchelor 1994)。

1995 年之後的報告，第二類的人類白血球抗原 (HLA class II，也就是 DR 及 DQ) 都使用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 為基礎的方法訂出。在非洲甘比亞 (Gambia) 族群所做的研究顯出 40 位持續 (persistent) 感染者 (B 型肝炎表面抗原陽性，B 型肝炎核心抗體 IgG (IgG anti-HBc) 陽性及 B 型肝炎核心抗體 IgM (IgM anti-HBc) 陰性患者) 與 195 位短暫 (transient) 感染者 (B 型肝炎表面抗原陰性，B 型肝炎核心抗體 IgG (IgG anti-HBc) 陽性及 B 型肝炎核心抗體 IgM (IgM anti-HBc) 陰性患者) 相比，前者有較低的 HLA-DRB1*1302 頻率 (7.5% vs. 25.6%， $p = 0.012$)，而 HLA-A, B, C 基因之頻率並無顯著差異 (Thursz et al. 1995)。這報告的 B 型肝炎持續感染之定義，沒有包括 B 型肝炎表面抗體 (anti-HBs) 的資料，而且只用單次血清學檢驗結果，而未納入六個月以上之檢驗及臨床資料，是疾病定義及病人分類上的一大缺點。

德國高加索人 (Caucasian，白種人) 中的報告提出 70 位慢性 B 型肝炎患者 (表面抗原陽性，表面抗體陰性，IgG 核心抗體陽性而且經重複檢驗血清丙氨酸轉胺酵素 (ALT) 都上升及 HBV DNA 都陽性) 與 101 位健康對照者相比，前者有較低的 HLA-DRB1*1301 及 *1302 頻率 (5.7% vs. 26.7%， $p = 0.025$)；前者再與 24 位已清除 B 型肝炎病毒 (表面抗體陽性，IgG 核心抗體陽性) 者相比，依然有

較低的 HLA-DRB1*1301 及*1302 頻率 (5.7% vs. 33.3%, $p=0.004$)，而 HLA-A，B，C，DQA1 基因之頻率並無顯著差異 (Hohler et al. 1997)。

在非裔美國人的一項報告顯示出 31 位持續 B 型肝炎病毒感染者 (表面抗原在納入實驗時及至少六個月以後都陽性，表面抗體陰性，IgG 核心抗體陽性) 與 60 位已清除 B 型肝炎病毒 (表面抗原陰性，表面抗體陽性，IgG 核心抗體陽性) 者相比，前者有較高的 HLA-DQA1*0501 頻率 (40% vs. 20%, $p=0.05$) 及 DQB1*0301 頻率 (32% vs. 12%, $p=0.01$)，而 HLA-A，B，DRB1 基因之頻率並無顯著差異。此報告之第一類人類白血球抗原使用聚合酶連鎖反應-序列專一性之引子 (PCR-sequence specific primer, PCR-SSP) 方法訂出。而第二類人類白血球抗原使用單股序列型態多形性 (single-strand conformation polymorphism) 方法分析加上聚合酶連鎖反應 - 序列專一性之引子方法確認 (Thio et al. 1999)。

一項針對美國高加索人的報告顯示 194 位持續 B 型肝炎病毒感染者 (表面抗原在間隔六個月以上的兩次檢驗都陽性) 與 342 位相配對已清除 B 型肝炎病毒 (在間隔六個月以上的兩次檢驗表面抗原都陰性，表面抗體都陽性及 IgG 核心抗體都陽性) 者相比，前者有較低的 HLA-A*0301 頻率 (8.1% vs. 15.7%, $p=0.0005$) 及 DRB1*1302 頻率 (4.9% vs. 2.1%, $p=0.03$)，且有較高的 HLA-B*08 頻率 (12.2% vs. 8.1%, $p=0.03$) 及 B*44 頻率 (19.4% vs. 11.9%, $p=0.001$)。此報告之第一類人類白血球抗原使用聚醯連鎖反應 - 序列特定性寡核酸 (sequence-specific oligonucleotide, SSO) 方法決定之。而第二類人類白血球抗原使用單股序列型態多形性 (single-strand conformation polymorphism) 方法分析加上聚合酶連鎖反應-序列特定性寡核酸方法確認 (Thio et al. 2003)。

以上這些報告所提出與 B 型肝炎病毒感染有關之對偶基因並不一致，其原因包括對偶基因之頻率在不同之族群並不相同。近年的全基因組關聯研究顯示 HLA-DP 的變異與持續的 B 型肝炎感染有關，而且在亞洲國家中不同種族有類似的情形 (Guo et al. 2011; Kamatani et al. 2009)。後續的研究發現 HLA-DQ 的變

異與持續的 B 型肝炎感染也有相關 (Mbarek et al. 2011)。然而，人類白血球抗原多形性與慢性 B 型肝炎不同臨床病程之相關性報告則非常少。

2.3 臺灣族群之人類白血球抗原於 B 型肝炎感染及慢性感染的臨床病程

有兩個台灣族群 B 型肝炎病毒被宿主體內清除或持續感染及慢性活動性肝炎的報告，都顯出與 HLA-DRB1 之相關性。第一個研究顯示 74 位慢性活動性肝炎 (chronic active hepatitis) 患者與 95 位 HBsAg 健康帶原者相比，前者有較高的 HLA-DR3 頻率(37% vs. 10%， $p<0.05$)。此報告使用血清學方法 (serological method) 來訂出 HLA 之抗原，為早期所使用的方法，並無法訂出對偶基因之次分型 (Yang et al. 1989)。另外一個研究提出在台灣的漢人中，98 位慢性表面抗原陽性帶原者 (表面抗原持續陽性六個月以上) 與 324 位已清除 B 型肝炎病毒 (HBsAg 陰性，anti-HBs 陽性) 者相比，前者有較低的 HLA-DRB1*0406 頻率 (0% vs. 4%， $p<0.001$)，而 HLA-A，B 基因之頻率並無顯著差異。此報告之人類白血球抗原以聚 釹 酶連鎖反應 - 序列特定性寡核酸探針雜交 (sequence-specific oligonucleotide probe hybridization，SSOPH) 方法定出 (Wu et al. 2004)。

另一個針對台灣慢性 B 型肝炎病毒感染之兒童的報告指出 HLA-B61 及 HLA-DQB1*0503 可預測較高的 e 抗原血清陰轉之機率 (Wu et al. 2006)。臺灣族群中 HLA-DRB1 的變異是否影響著我們國病慢性 B 型肝炎的疾病嚴重度是亟需回答的問題。

第三章 慢性 B 型肝炎的免疫受體

3.1 維生素 D 免疫受體

維生素 D 作為一種全身激素，不僅參與骨骼代謝，而且在調節宿主免疫反應和癌症發展也有重要的作用 (Haussler et al. 1998)。例如，維生素 D 可抑制淋巴細胞增殖，刺激單核細胞分化，以及防止幾種癌細胞擴散 (Uitterlinden et al.

2004)。維生素 D 的活性形式 1,25 - 二羥維生素 D，通過維生素 D 受體發揮免疫調節作用 (Haussler et al. 1998)，而且，巨噬細胞和 T 淋巴細胞中的維生素 D 受體濃度極高，尤其是 CD8 陽性 T 淋巴細胞 (Veldman et al. 2000)。

維生素 D 存在巨大的個體差異也廣為人知。理解維生素 D 免疫系統個體差異的一種方法是研究在此系統中重要的蛋白質其 DNA 序列變化的影響。例如，在 VDR 基因有害的突變，導致一種罕見的單基因疾病 1,25 - 二羥基抗維生素 D 性佝僂症。VDR 基因序列的少量變異 (多形性) 在人群中更頻繁地出現，但它們還沒有被有系統的分析，而且對 VDR 功能的影響知之甚少。VDR 多形性在複雜性疾病和性狀的相關性值得進一步探討。

在這個大的基因中只有少數多形性已被研究，其中大部分是使用限制性片段長度多形性 (RFLP)，但是其功能作用未知。期待連結到別處真正有功能的多形性 VDR 基因 (或在附近的基因)，然後可以解釋觀察到的關聯。因此，要理解基本關聯的機制，就要分析 VDR 基因的基因組結構，確定哪些基因存在於染色體區域中，分類所有有關的 VDR 多形性，確定整個基因的單套型，確定他們與使用至今的 RFLP 標誌之間的關係，並最終與相關基因型指標進行關聯分析，也包括與疾病指標。

維生素 D 受體基因位於染色體 12q13.1 上，全長超過 100 kb。有關幾種疾病的大量研究報告，維生素 D 受體基因有三個相鄰的多形性限制位點，即 *BsmI* (rs1544410, A - G 鹼基突變，指定為基因型 B/B、B/b、b/b)，*ApaI* (rs7975232, G - T 鹼基突變，指定為基因型 A/A、A/a、a/a) 和 *TaqI* (rs731236, T - C 鹼基突變，指定為基因型 T/T、T/t、t/t) (Uitterlinden et al. 2004)。據報導，t/t 基因型的維生素 D 受體基因變異與 B 型肝炎病毒清除有關，而且維生素 D 的活性形式能夠抑制體外和體內的肝癌細胞增殖 (Bellamy et al. 1999; Pourgholami et al. 2000)。維生素 D 受體基因變異是否會影響慢性 B 型肝炎的臨床表現以及其相關的肝癌之產生是值得探討的議題。

3.2 先天免疫類鐸受體

近年來，我們對先天免疫的理解由於發現模式識別受體 (Pattern recognition receptors, PRRs) 而大為改善。模式識別受體察覺病原體的病原相關分子樣式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)，並觸發免疫反應。PRRs 包括類 NOD 受體 (NLRs)，類 RIG 受體 (RLRs)，類鐸受體 (TLRs) 和最近發現的細胞質 DNA 受體 (Carty and Bowie 2010; Hornung et al. 2009; Janeway 1992; Kawai and Akira 2009; Yanai et al. 2009)。

TLRs 是第一型跨膜受體，其包括胞外層富亮氨酸重複 (Leucine-rich repeat, LRR) 結構區，跨膜區和一個細胞質鐸-介白素-1 受體-抵抗 (Toll-interleukin-1 receptor-resistance, TIR) 結構區。類鐸受體可以大致區分為那些位於細胞表面和那些位於細胞內的核內體室。類鐸受體-3、7、8 及 9 表現在核內體並察覺微生物的核酸 (Kumar et al. 2009)。為了從這些類鐸受體產生訊息傳遞，需要核內體酸化和成熟，導致促發炎細胞激素和第一型干擾素的產生 (Uematsu and Akira 2007)。

類鐸受體的下游訊息傳遞是通過含聯接蛋白 MyD88 (髓樣分化因子 88)，MAL (類似 MyD88 聯接器，也被稱為 TIRAP)，TRIF (含 TIR 結構區聯接蛋白，誘導 IFN-beta，也被稱為 TICAM1) 和 TRAM (TRIF 相關聯接分子，也稱為 TICAM2) 的胞內 TIR 結構區 (O'Neill and Bowie 2007)。這族群的第五個成員，SARM (sterile alpha- and armadillo-motif-containing protein)，已被指出是 TRIF 的抑製劑 (Carty et al. 2006)。類鐸受體與這些 TIR 聯接器接合導致胞內訊息傳遞合成物的活化，這些合成物含有 TRAF 和 IRAK 蛋白，最終導致 NF-kappa B (核因子-kappa B) 和 IRF (干擾素調節因子) 家族轉錄因子的活化。這將觸發促發炎細胞激素和第一型干擾素的產生 (O'Neill and Bowie 2007)。NF-kappa B 在 IL-6 和腫瘤壞死因子 (TNF) 的生產中是必須的，IFN-beta 既需要 NF-kappa B 也需要 IRF3，而產生 IFN-alpha 需要 IRF7 (Takeuchi and Akira 2009)。研究已展示類鐸受體的訊息傳遞機轉：類鐸受體只能從核內體中誘導 IRF3 和 IRF7 的活化，而其

他訊息如活化 MAP 激酶和 NF-kappa B 可以從質膜或核內體觸發 (Barton and Kagan 2009)。

我們可以將類鐸受體的訊息傳遞整理成通過兩個途徑進行：髓樣細胞分化因子 88 (MyD88) 調控的路徑，及鐸-介白素 1 受體 (TIR)-含聯接器之結構區所誘導的 IFN-beta (TRIF)-調控的路徑 (Kawai and Akira 2009; Takeuchi and Akira 2009; Yokota et al. 2010)。前者導致轉錄因子 NF-kappa B 的活化，可活化各種基因促進發炎反應。後者會誘導干擾素，其刺激導致細胞的抗病毒狀態。TLR3 只活化 TRIF 調控的路徑。TLR3 訊息傳遞活化 IRF-3，是 IFN-beta 的一個重要的轉錄因子，其會誘導干擾素之產生。TLR2 只活化 MyD88 調控的路徑。然而，這兩個路徑 TLR4 都可以活化，所以 TLR4 激活劑可活化 NF-kappa B 和誘導 IFN 生產。細胞溶質的模式識別受體，如 RIG-I，MDA5 和 DAI，常活化 IRF3。模式識別受體的表現依細胞類型而有所不同。更重要的是，源自骨髓性幹細胞 (骨髓樣樹突狀細胞 [mDCs]，單核細胞，巨噬細胞，Langerhans 細胞，和嗜中性白血球) 和源自淋巴性幹細胞 (漿細胞樣樹突細胞 [pDCs]，T 細胞和 B 細胞) 者不相同。例如，TLR7 和 TLR9 是很少表現在 mDCs，而 TLR3 和 TLR8 很少表現在 pDCs。而 TLR4 在 pDCs 和 mDCs 的表現量非常低。

早期的證據顯示類鐸受體在察覺病毒上可能是重要的，這些證據是從觀察到一些病毒之編碼蛋白以類鐸受體訊息傳遞為目標。例如，牛痘病毒 (Vaccinia virus, VACV) 的研究發現兩種抑制類鐸受體系統的蛋白質。A46R 與 TIR 聯接器結合使類鐸受體訊息傳遞下調，而 A52R 與 IRAK2 結合可以抑制類鐸受體調控的 NF-kappa B 活化 (Maloney et al. 2005; Stack et al. 2005)。C 型肝炎病毒 (HCV) 是另一種病毒以編碼蛋白抑制類鐸受體調控訊息傳遞，因為它的蛋白酶 NS3/4A 切除 TRIF，而 NS5A 抑制 MyD88 (Abe et al. 2007; Li et al. 2005)。這此及其他病毒對類鐸受體之抑制有助於病毒之毒性 (Bowie and Unterholzner 2008)。類鐸受體家族成員參與對病毒感染產生反應者有 TLR1，TLR2，TLR3，TLR4，TLR6，TLR7，TLR8 和 TLR9 (Takeuchi and Akira 2009)。

類鐸受體-3, 7, 8 和 9 已知能辨認病毒核酸，且人類的類鐸受體-3 與類鐸受體-7, 8 和 9 具有顯著同源性 (Iwasaki and Medzhitov 2004)。類鐸受體-3 分布在細胞膜或核內體上，包含一個可與配位體結合的巨大胞外區所組成 (Matsumoto and Seya 2008; Ranjith-Kumar et al. 2007)。類鐸受體-3 被證明是雙股 RNA 的受體，以及偵測一些 RNA 病毒，也可以偵測在生命週期產生雙股 RNA 之 DNA 病毒 (Yoneyama and Fujita 2010)。帶有類鐸受體-3 基因突變之病患與數種慢性病毒感染有相關聯，包括巨細胞病毒性肝炎和病毒血症 (Nahum et al. 2011)，流感病毒相關性腦病變 (Hidaka et al. 2006)，以及單純皰疹病毒 (HSV) 性腦炎 (Zhang et al. 2007)。兩個單純皰疹病毒腦炎的復發個案暗示了類鐸受體-3 在單純皰疹病毒潛伏的角色 (Bousfiha et al. 2010; Netea and van der Meer 2011)。此外，類鐸受體-3 訊息傳遞可以調控後天免疫反應以抵抗病毒感染 (Schulz et al. 2005)。類鐸受體-3 在慢性 B 型肝炎患者之角色值得進一步釐清。

第四章 慢性 B 型肝炎的免疫調節

4.1 病毒與先天免疫

宿主的免疫系統識別和消除入侵的病原微生物，如病毒，細菌和真菌。在哺乳動物防禦的第一線，是先天免疫系統。對抗病毒感染的早期反應起始於模式識別分子辨認病原相關分子樣式 (PAMPs)，而引發了兩種反應。一種是製造出干擾素 (IFNs) 導致抗病毒狀態，此為先天免疫反應的一部分，第二是樹突狀細胞 (DC) 的成熟化而建立後天免疫。我們的研究焦點在於宿主防禦第一線的先天免疫。

單核細胞、巨噬細胞、T 細胞、B 細胞、pDC 和 mDC 在血管、淋巴管內循環且在間質內巡邏。這些所有的細胞是病毒感染的潛在目標。病毒感染的上皮細胞和纖維細胞產生干擾素，主要是 IFN-beta 和 IFN-lambda，它使周圍未感染的細胞具有抗病毒之狀態。此外，趨化素和細胞激素，如介白素-1 beta (IL-1 beta)，

IL-6, IL-8, 顆粒性單核球-巨噬細胞集落刺激因子 (GM-CSF) 及腫瘤壞死因子-alpha (TNF-alpha) 也會產生。這些分子提供原有的 DCs (固有層樹突細胞和 Langerhans 細胞) 向病毒感染之細胞和死細胞的趨化作用。嗜中性白血球, 單核球, 巨噬細胞, 漿細胞, mDCs 和 pDCs 也從血管移動到受感染的部位。IFN-gamma 誘導蛋白 10 (IP-10), 單核球趨化蛋白 1 (MCP-1), 巨噬細胞發炎蛋白-2 (MIP-2), MIP-3 alpha, MIP-3 beta 對血液的 DCs 移動有很大的幫助。然而, 這些經血液移動的免疫細胞也可能被病毒感染, 然後這些免疫細胞可以調節各種細胞激素和趨化素的產生。

為了確立感染, 病毒需要抑制宿主之一些免疫反應, 例如干擾素誘導的抗病毒活性, 趨化素或細胞激素誘導之免疫細胞的趨化作用, DCs 的成熟和活化, NK 和 NKT 細胞的活化, 成熟的 DCs 之移動至淋巴結, 與在淋巴結的 T 細胞和 B 細胞的分化及活化。當病毒感染免疫細胞, 如 DCs, 受感染細胞的成熟和分化經常被抑制, 細胞激素受體和共刺激分子的表現也被抑制, 而分泌出類似細胞激素和細胞激素受體的分子。此外, 受感染的細胞經常改變他們的細胞激素型態。這些是病毒用來抑制免疫反應的策略, 而且病毒感染也會誘導調整性 T 細胞 (regulatory T cells)。

4.2 宿主與 B 型肝炎病毒之交互作用

為了確立感染宿主, 病毒就必須以各種策略擺脫和/或抑制免疫系統。病毒的一個重要策略是調節 PAMP 誘導的免疫反應。慢性病毒的感染可能使宿主對該病毒的免疫無力 (immune anergy) 與耐受 (immune tolerance)。越來越多的證據顯示 B 型肝炎病毒可以去除第一型干擾素。在慢性 B 型肝炎感染中, 主要製造干擾素 alpha 的漿細胞性樹突細胞有功能性之削弱 (van der Molen et al. 2004)。另外, 慢性 B 型肝炎感染也降低樹突細胞 (dendritic cells) 起動 T 淋巴細胞的功能以及降低細胞激素的產生 (Beckebaum et al. 2002, 2003; Milich et al. 1995; Zheng et al. 2004)。研究也澄清 B 型肝炎病毒會抑制類鐸受體誘導的肝臟抗

病毒活性 (Wu et al. 2009)，而且一項報告指出 B 型肝炎病毒聚合酶可以強效的抑製類鐸受體-3 所調解的干擾素-beta (Yu et al. 2010)。早期的研究也表明 B 型肝炎病毒聚合酶終端蛋白區域的表現會抑制細胞對干擾素-alpha 和干擾素-gamma 以及雙股 RNA 的反應 (Foster et al. 1991)。

在基因轉殖小鼠模型中，配位體結合在類鐸受體-3、類鐸受體-4、類鐸受體-5、類鐸受體-7、類鐸受體-9 上引起干擾素 alpha/beta - 依賴性之方式以抑制 B 型肝炎病毒的複製，但類鐸受體-2 則否 (Isogawa et al. 2005)。研究也證實類鐸受體-3 所刺激之小鼠肝臟非實質細胞 (non-parenchymal cells, NPCs) 將誘導干擾素-beta 和隨後抑制 B 型肝炎病毒之複製 (Wu et al. 2007)，而且慢性 B 型肝炎患者的炎性肝損傷與庫氏細胞的 Fas-L 表現量增加有關 (Tang et al. 2003)。此外，B 型肝炎病毒之持續性感染可能是由於肝臟中缺乏產生抗病毒細胞激素的細胞 (Tang et al. 2003)。一項研究顯示，與 B 型肝炎 e-抗原 (HBeAg) 陰性的患者相比，B 型肝炎 e-抗原陽性在週邊血液單核球細胞 (Peripheral blood mononuclear cells, PBMC)、肝細胞、庫氏細胞的類鐸受體-2 表現量減少，但類鐸受體-4 則否 (Visvanathan et al. 2007)。在體外使用類鐸受體-2 配位體刺激 e-抗原陽性慢性 B 型肝炎患者的週邊血液單核球造成 TNF-alpha 和 IL-6 的顯著抑制。類鐸受體-2 位於細胞膜上，而且它的配位體可能在細菌的脂蛋白中發現。

4.3 免疫調節藥物 (干擾素) 治療慢性 B 型肝炎

目前國際間已核准之慢性 B 型肝炎治療藥物為干擾素 (interferon) 和核苷類似物 (nucleos(t)ide analogues)。這兩類製劑都有抑制病毒的效果，但干擾素還有免疫調節的功能 (Lok and McMahon 2007)。Lamivudine 是第一種經核准可以治療慢性 B 型肝炎的核苷類似物，但是其產生抗藥性病毒株的機率比較高 (Huang et al. 2012a; Lok and McMahon 2007)。核苷類似物對於整合型 (integrated) HBV DNA 或其轉錄物、核糖核酸的複製中間產物沒有抑制的效果 (Doong et al. 1991)。這可能使核苷類似物需要無限期的使用以持續抑制病毒。我們及其他學

者的研究表明在 lamivudine 治療當中，血清中病毒核糖核酸 (HBV RNA) 可以被檢測到。這是因著核糖核酸複製的中間產物未被核苷類似物抑制，以及被中斷的反轉錄反應的結果 (Hatakeyama et al. 2007; Huang et al. 2008b; Zhang et al. 2003)。此外，血清 HBV RNA 還可以早期預測在 lamivudine 治療期間病毒發生的突變 (Hatakeyama et al. 2007)。相反的，干擾素的治療療程固定，而且對於 B 型肝炎表面抗原的血清清除率比核苷類似物要高 (Dienstag 2008)。干擾素的缺點為其副作用，包括血球低下，發燒及憂鬱症 (Huang et al. 2012b)。

之前的研究證明了合併核苷類似物 (lamivudine) 和干擾素的治療比 lamivudine 單一治療的效果好：提高了治療結束後 24 週的 HbeAg 血清轉陰率 (Lau et al. 2005; Sarin et al. 2005)、ALT 正常化和 HBV DNA 檢測不到的機率 (Marcellin et al. 2004; Sarin et al. 2005)。這個發現的機制仍不清楚，是否與核苷類似物單一治療無法抑制核糖核酸複製中間產物有關須進一步研究。

研究問題及重要性



一、目前絕大多數 B 型肝炎病毒感染之免疫遺傳因子及免疫受體多形性研究都探討疾病易感性或抵抗性之相關性。臨床上重要的問題是哪一些宿主因素影響慢性感染 B 型肝炎時之臨床表現型及預後。

→了解影響慢性感染 B 型肝炎臨床表現型及預後之免疫遺傳及免疫受體因子，將有助於訂出有效及符合經濟效益之追蹤及治療政策。

二、早期 (即母嬰傳播) 感染的 B 型肝炎帶原者的自然病史可基於病毒宿主互動分為四個動態階段：免疫耐受期，免疫清除期，嵌入或殘存期和復發期 (Chen 1993)。在免疫清除期，反復肝炎急性發作可能會加速慢性肝炎進展為肝硬化，導致預後不佳。e-抗原的持續陽性也是導致晚期肝病的高風險。慢性 B 型肝炎帶原者肝炎急性發作的頻率和嚴重度以及 e-抗原的陽性或陰性之個體差異性很大。目前仍然未知那些因素影響慢性 B 型肝炎急性發作的頻率和嚴重度及 e-抗原的情況。

→認識哪些宿主免疫遺傳及免疫受體因素決定慢性 B 型肝炎反復性急性發作或 e 抗原狀態將有助於了解患者之臨床病程及預後，進而定出治療之決策。

三、近年來，我們對先天免疫的理解由於發現病原體相關的辨認受體模式而大為改善，包括類鐸受體 (TLR)。類鐸受體-3，7，8 和 9 已知能辨認病毒核酸，且人類的類鐸受體-3 與類鐸受體-7，8 和 9 具有顯著同源性 (Iwasaki and Medzhitov 2004)。類鐸受體-3 基因變異之病患與慢性 B 型肝炎有相關聯，而且其在病毒之潛伏上可能扮演了某種角色。

→探討先天免疫的類鐸受體-3 在慢性 B 型肝炎患者以及經有效治療時之表現量將有助於了解此受體在慢性感染狀態的角色，進而定出可能之輔助治療決策。



四、之前的研究證明了合併核苷類似物和干擾素的治療比核苷類似物單一治療的效果要好。這個發現的機轉可能與免疫調節藥物干擾素擁有有別於核苷類似物的作用所致。已知核苷類似物無法抑制核糖核酸複製中間產物 (HBV RNA replicative intermediates)，而我們在核苷類似物治療當中，可以檢測到血清中病毒核糖核酸 (HBV RNA)。接受合併免疫調節藥物 (干擾素) 和核苷類似物治療的病患，他們血清中 HBV RNA 被抑制的程度仍未知。

→探討免疫調節藥物 (干擾素) 對於B肝病毒血清核糖核酸之抑制情形將有助於了解干擾素對B肝複製過程的影響，進而定出最佳藥物治療組合的模式。

研究創新性

一、人類白血球抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 是一個重要的免疫遺傳及宿主基因因子。早期的報告使用比較粗略的方式訂出人類白血球抗原的對偶基因 (allele)，訂出分型但是並未訂出其次分型，如訂出 HLA-DR3 而非 HLA-DRB1*0301 或*0302 等。HLA-DRB1 是擁有最多對偶基因 (allele) 的人類白血球抗原之一。一些報告顯示急性 B 型肝炎被清除或持續性的感染與 HLA-DRB1 多形性有關。

→免疫遺傳因子 HLA-DRB1 多形性與慢性 B 型肝炎患者肝炎的嚴重程度之相關性仍不清楚。

二、因為一個個體只有兩個人類白血球抗原對偶基因 (allele)，而人類白血球抗原包括 HLA-DRB1 有數十個以上的對偶基因，所以每個個體的 HLA-DRB1 對偶基因會有相當的差異性。要找出那些對偶基因與慢性 B 型肝炎患者肝炎嚴重度之相關性，就必須從較容易肝炎急性發作之族群去探討。男性相較於女性的 B

型肝炎帶原者更為容易產生肝炎急性發作 (Chu et al. 1983)。此外，對於 B 型肝炎表面抗原陽性率的流行病學研究也證實慢性 B 型肝炎病毒感染的患者以男性為主 (Chen et al. 2000)。

→ 男性慢性 B 型肝炎患者肝炎的嚴重程度與免疫遺傳因子 HLA-DRB1 多形性之相關性仍不清楚。

三、 維生素 D 受體 *t/t* 基因變異與 B 型肝炎病毒清除有關，而且維生素 D 的活性形式能夠抑制體外和體內的肝癌細胞增殖 (Bellamy et al. 1999; Pourgholami et al. 2000)。

→ 維生素 D 免疫受體基因多形性與慢性 B 型肝炎病毒帶原者的不同臨床表型包括肝炎急性發作與 e 抗原情況以及 B 肝引起之肝癌的相關性仍不清楚。

四、 人體先天性免疫在慢性 B 型肝炎感染之角色是一個全新的領域。類鐸受體-3 被證明是雙股 RNA 的受體，以及偵測一些 RNA 病毒，也可以偵測在生命週期產生雙股 RNA 之 DNA 病毒 (Yoneyama and Fujita 2010)。

→ 先天免疫類鐸受體-3 在慢性 B 型肝炎之影響仍不清楚。

五、 我們掌握了在核苷類似物治療當中，血清病毒核醣核酸 (HBV RNA) 新且有效之檢測技術。

→ 免疫調節藥物 (干擾素) 對於核苷類似物治療當中所產生的血清病毒核醣核酸之抑制效果及臨床治療療效之影響仍未知。

研究的假說與特定目的



假說一、在男性慢性 B 型肝炎病患中，特定的免疫遺傳因子 HLA-DRB1 多形性可能與 B 型肝炎的嚴重程度有關。

目的一、探討免疫遺傳因子 HLA-DRB1 多形性與男性慢性 B 型肝炎之肝炎嚴重程度之間的相關性。

假說二、維生素 D 免疫受體基因多形性與慢性 B 型肝炎的不同臨床表型以及其發生肝細胞癌情形可能有關。

目的二、探討維生素 D 免疫受體基因多形性與慢性 B 型肝炎的不同臨床表型以及發生肝細胞癌之間的相關性。

假說三、慢性 B 型肝炎病患週邊血液單核球細胞和肝臟細胞上先天免疫類鐸受體-3 表現量可能與慢性病毒感染狀態有關。

目的三、探討慢性 B 型肝炎病患週邊血液單核球細胞和肝臟細胞上先天免疫類鐸受體-3 之表現量，並且其與免疫調節藥物長效型干擾素治療療效的相關性。

假說四、免疫調節藥物（干擾素）可以有效的抑制核苷類似物治療中所囤積及產生的血清病毒核糖核酸（HBV RNA）。

目的四、探討慢性 B 型肝炎患者接受免疫調節藥物（干擾素）對於核苷類似物所產生的血清 HBV RNA 之抑制效果。

研究方法與材料



病患

一、免疫遺傳因子 HLA-DRB1 多形性與男性慢性 B 型肝炎的肝炎嚴重程度之相關性研究

在此前瞻性世代研究中，共納入了 204 名慢性 B 型肝炎帶原者 (131 名男性和 73 名女性)。這些帶原者在台灣大學附設醫院的門診部追蹤一年以上的時間。使用核苷類似物，免疫調節劑，類固醇，化療或具肝毒性的藥物治療的病人；患有 C 型肝炎，D 型肝炎或感染人類免疫缺陷病毒的病人；濫用酒精的病人；帶有自體免疫抗體或代謝性肝病的病人；患有肝硬化或肝癌的病人，和在追蹤之前或之間接受移植手術的病人都被排除在外。

依據慢性 B 型肝炎帶原者其肝炎的嚴重度把符合條件的病人分為兩組。肝炎嚴重度的判定是透過定期檢測血清 ALT 值。本研究使用美國肝病研究學會的臨床指引，依據血清 ALT 值大於或等於兩倍正常值上限的認定為“活動性肝炎”(Lok and McMahon 2007)。第一組納入了 50 名 ALT 小於兩倍正常值上限的慢性 B 型肝炎帶原者 (25 名男性和 25 名女性)，也就是在平均 83.6 個月 (從 12 個月到 382 個月) 的追蹤中，ALT 在重複測量之下小於 80 U/L。第二組納入了 154 名在平均 81.3 個月 (從 12 個月到 231 個月) 的追蹤中，ALT 在重複測量之下大於或等於兩倍正常值上限的慢性 B 型肝炎帶原者 (106 名男性和 48 名女性)。若 ALT 值只有一次大於或等於兩倍正常值上限也會歸到第二組。本研究所納入的所有帶原者為漢族，臺灣最為普遍的種族。血清 ALT 值有上升的帶原者，每 2 至 3 個月檢測 ALT 值。血清 ALT 值正常的帶原者，每 6 至 12 個月檢測一次。血清樣本存放在 -20°C 直到使用為止。每 6 至 12 個月這些帶原者接受腹部超音波檢查是否出現肝硬化或肝癌。本研究獲得所有參與者的知情同意，並且遵守作

者醫院的人體試驗指南。



二、維生素 D 免疫受體基因多形性與慢性 B 型肝炎的肝炎急性發作、e-抗原情況以及肝細胞癌產生之相關性研究

從 1990 年至 1995 年間，台大醫院胃腸肝膽科定期對 250 例慢性 B 型肝炎病毒帶原者 (178 名男性和 72 名女性，年齡在 16 至 70 歲之間) 進行前瞻性世代研究。我們追蹤這些帶原者持續到 2003 年 10 月，這時符合條件的患者開始接受全民健康保險給付的抗病毒治療。慢性 B 型肝炎病毒帶原者是指治療前 B 型肝炎表面抗原帶原至少達 6 個月的患者。這研究排除了使用核苷(酸)類似物、免疫調節劑或皮質類固醇治療的帶原者、C 型肝炎病毒或 D 型肝炎病毒感染、人類免疫缺陷病毒感染、酒精濫用者 (每天超過 50 克)、靜脈注射毒品者、肝毒素暴露者、自體免疫抗體陽性患者、患有已知代謝性肝病的患者、肝臟移植後的患者。表四列出了本研究帶原者的基本特徵。

B 型肝炎病毒帶原者分為 6 個不同的組別 (Kao et al. 2002)。A 組：參加研究時，HBeAg 呈陽性，追蹤期間，無肝炎急性發作或 HBeAg 血清陰轉；B 組：參加研究時，HBeAg 呈陽性，HBeAg 血清陰轉前有肝炎急性發作情形；C 組：參加研究時，HBeAg 呈陽性，有肝炎急性發作，追蹤結束時，無 HBeAg 血清陰轉；D 組：參加研究時，HBeAg 呈陰性，追蹤期間，有肝炎急性發作情形；E 組：參加研究時，HBeAg 呈陰性，追蹤期間，無肝炎急性發作；F 組：參加研究時或追蹤期間，發生肝細胞癌，肝細胞癌診斷依無侵襲性診斷標準或當不符合此標準時，使用肝活檢診斷 (Bruix and Sherman 2005)。肝炎急性發作是指血清 ALT (40 IU/L) 值突然增加，達到正常上限值的 5 倍 (200 IU/L) 以上 (Kao et al. 2001)。對於血清 ALT 升高的參與者，每 3 個月檢測一次血清 ALT 值，對於血清 ALT 值正常的參與者，每 6 個月檢測一次血清 ALT 值。血清檢體在使用前，在 -20°C 的條件下保存。對於所有參與者，每 6 個月檢測一次血清甲型胎兒蛋白值，並進行超音波檢查，以監測肝細胞癌。本研究遵循各筆者所屬機構的人體實驗指

引，而且，每個患者都簽署了知情同意書。

三、慢性 B 型肝炎病患週邊血液單核球細胞和肝臟細胞上先天免疫類鐸受體-3 之表現量，並且其與免疫調節藥物長效型干擾素治療療效的相關性研究

在這項前瞻性世代研究中，我們在國泰綜合醫院醫學中心從 2009 年 6 月至 2012 年 8 月連續納入 127 例慢性 B 型肝炎患者和 64 例 B 型肝炎表面抗原 (HBsAg) 陰性以及 C 型肝炎病毒抗體 (anti-HCV) 陰性的健康受試者作為對照。慢性 B 型肝炎被定義為在納入本研究前，B 型肝炎表面抗原陽性至少 6 個月。患者在一年內接受過核苷酸類似物或 (長效型) 干擾素治療或使用免疫調節劑、類固醇、化療藥物，同時感染 C 型肝炎、D 型肝炎病毒、人類免疫缺乏病毒，有自體免疫抗體、甲狀腺疾病、代謝性肝病、肝硬化、肝癌，經過移植或酗酒都被排除在外。國泰綜合醫院的人體試驗委員會核准了這項研究，每位受試者都已簽署知情同意書。

四、免疫調節藥物 (干擾素) 對於慢性 B 肝病患血清病毒核糖核酸 (HBV RNA) 的抑制效果之研究

我們納入了 19 名慢性 B 型肝炎患者，包括僅接受核苷類似物以及傳統干擾素和 lamivudine 相繼合併治療者。這些患者依據其不同的治療方法分為三組。第一組納入 10 名男性患者(平均年齡 44.2 歲，範圍 30 至 74 歲)，接受 44 至 48 週的核苷類似物單一治療。第二組納入 6 名男性患者(平均年齡 47.3 歲，範圍 39 至 56 歲)。其中 5 名接受 34 至 52 週的 lamivudine 治療，然後改為 24 至 36 週的傳統干擾素治療，其間兩種藥物有 4 至 20 週的重疊。這組中另外的一位患者接受 36 週的傳統干擾素治療，然後改為 32 週的 lamivudine 治療，其間兩種藥有 12 週的重疊。第三組納入 3 名男性患者(平均年齡 51.3 歲，範圍 41 至 64 歲)，接受 20 至 24 週的 lamivudine 治療，停藥後追蹤 22 至 36 週。這些患者的血清檢體採集於其進行治療前和治療中每隔 2 週至 3 個月，直到治療或追蹤結束。這些

檢體在使用前均保存於-80°C的環境下。每一位患者都已被告知並且同意使用其檢體。



實驗檢驗項目

血清抗 C 型肝炎抗體 (anti-HCV) 和抗 D 型肝炎抗體 (anti-HDV) 分別用 Murex anti-HCV 和 Murex anti-delta 試劑盒 (Murex Biotech, Kyalami, South Africa 和 Murex Biotech, Dartford, UK) 檢測。血清 B 型肝炎病毒去氧核糖核酸 (HBV DNA) 定量與 B 型肝炎病毒基因型之鑒定分別用即時 PCR 和熔解曲線分析法進行 (Yeh et al. 2004)。

一、免疫遺傳因子 HLA-DRB1 多形性與男性慢性 B 型肝炎的肝炎嚴重程度之相關性研究

生化檢驗的測量使用常規自動化方法。血清表面抗原 (HBsAg) 和抗體 (anti-HBs) 的測試使用 Enzygnost HBsAg 5.0 和 anti-HBs II (Dade Behring, Marburg, Germany)。

二、維生素 D 免疫受體基因多形性與慢性 B 肝的肝炎急性發作、e-抗原情況以及肝細胞癌產生之相關性研究

血清 HBsAg 和 HBeAg 值分別用 Ausria-II 和 IMx HBe 試劑組 (Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA) 檢測。

三、慢性 B 型肝炎病患週邊血液單核球細胞和肝臟細胞上先天免疫類鐸受體-3 之表現量，並且其與免疫調節藥物長效型干擾素治療療效的相關性研究

血清定量 B 肝表面抗原 (qHBsAg)、B 肝 e-抗原 (HBeAg)、C 肝抗體以 Architect i2000 SR (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) 進行檢測。血清中

B 肝病毒 DNA 以 Abbott m2000 sp (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) 定量檢測。



四、免疫調節藥物 (干擾素) 對於慢性 B 肝病患血清病毒核糖核酸 (HBV RNA) 的抑制效果之研究

血清 B 肝 e-抗原 (HBeAg) 和 B 肝 e-抗體 (anti-HBe) 值是通過 chemiluminescent immunoassay (Architect HBeAg and Architect HBeAb, Abbott Japan, Tokyo, Japan) 所測試出。

免疫遺傳因子 HLA-DRB1 對偶基因的訂定、分型及次分型

從周邊血液單核細胞中使用 QIAamp 試劑組 (Qiagen, Inc. Valencia, CA) 萃取基因中的去氧核糖核酸 (genomic DNA)。如之前的文獻所敘述，通過聚合酶鏈反應-序列特定寡核苷酸探針雜交鑒定 HLA-DRB1 對偶基因 (Scharf et al. 1991)。簡略敘述如下，HLA-DRB1 基因的第二個外顯子 (exon) 由特定的引子組套 (primer set) 放大。使聚合酶鏈反應之產物變性後固定至尼龍膜上。五端生物素化 (5'-biotinylated) 序列特定性寡核苷酸探針組用於檢測多形性外顯子的高變異區域，然後就為每個去氧核糖核酸樣本建立基因型。

維生素 D 免疫受體基因型和單體型的訂定

基因組去氧核糖核酸 (genomic DNA) 從周邊血液白血球中萃取 (Riggs et al. 1995)。使用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 以及以前報告改編的限制性片段長度多形性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 法確定了三個多形性限制位點的基因型 (*BsmI* 位點 [rs1544410] 和 *ApaI* 位點 [rs7975232] 分別位於維生素 D 受體基因的第 7 內含子和第 8 內含子，而 *TaqI* 位點 [rs731236] 位於第 9 外顯子) (Riggs et al. 1995)。簡言之，位於第 7 外顯子的 *BsmI* 多形性正向引子為 5'- CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA

-3'，位於第 7 內含子的 *BsmI* 多形性反向引子為 5'-AACCAGCGGGAAGAGGTCAAGGG -3'。位於第 8 內含子的 *ApaI* 和 *TaqI* 多形性正向引子為 5'-CAGAGCATGGACAGGGAGC -3'，位於第 9 外顯子的 *ApaI* 和 *TaqI* 多形性反向引子為 5'-AGGAGAGGCAGCGGTACTG -3'。*BsmI* 多形性的 PCR 反應條件為：94⁰C 5 分鐘，然後按以下溫度做 35 個循環：94⁰C 30 秒，66⁰C 30 秒，72⁰C 30 秒。在 72⁰C 下延伸 5 分鐘後結束。*ApaI* 和 *TaqI* 多形性的 PCR 反應條件如上所述，但黏合溫度為 68⁰C。*BsmI* 多形性的 PCR 產物長度為 800bp，在 *BsmI* 酶切位點，切斷為兩個限制性片段 600 bps 和 200 bps。*ApaI* 和 *TaqI* 多形性 PCR 產物長度為 480 bps。在各自的酶切限制性位點，*ApaI* 的限制性片段長度為 250 bps 和 230 bps，*TaqI* 的限制性片段長度為 280 bps 和 200 bps。酶切片段用 2% 瓊脂糖凝膠電泳 (agarose gels) 分離，並用溴化乙錠 (ethidium bromide) 染色。

週邊血液單核球細胞的先天免疫類鐸受體 (TLR)-3 表現量的測定

我們抽取對照者納入時和慢性 B 型肝炎患者治療前和治療中的新鮮全血。我們使用 CD14-FITC、TLR3-PE (eBioscience, San Diego, CA, USA) 做細胞表面染色。使用與類鐸受體-3 抗體同型的小鼠 IgG1 為抗體的對照 (eBioscience, San Diego, CA, USA)。在 FACSCalibur 流式細胞儀 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) 上收集總共 50,000 個活細胞。我們選取單核球是依據位於淋巴球後部和 CD14⁺ 細胞的散佈圖 (scatter profile)。我們收集每個檢體依據其散佈圖和 CD14⁺ 細胞所選取的平均熒光強度 (mean fluorescence intensity, MFI) 和其百分比。每個檢體都總共從 50,000 個細胞中讀取 CD14⁺ 單核球。數據分析使用 WinMDI 軟體 (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)。

肝細胞上先天免疫類鐸受體 (TLR)-3 表現量的測定

將慢性 B 型肝炎患者和健康對照者的肝臟切片檢體經過新鮮冷凍或浸入最佳切削溫度化合物 (optimal cutting temperature, OCT) (Ames Company, Elkhart,

IN)，並保持在 -80°C 直到使用時。

RNA 萃取和即時反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)

全部的 RNA (total RNA) 使用 RNeasy 試劑組分離 (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA)。以 1 微克 total RNA 使用 iScript cDNA 合成試劑組 (Bio-Rad, Hercules, CA) 進行反轉錄反應。使用 iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) 在 DNA Engine Opticon 2 (Bio-Rad) 進行即時反轉錄聚合酶連鎖反應。類鐸受體-3 引子如下：正股引子 5'- TTG CCT TGT ATC TAC TTT TGG GG -3'，反股引子 5'- GCG GCT GGT AAT CTT CTG AGT T -3'。GAPDH 引子如下：正股引子 5'- GTC CAC TGG CGT GTT CAC CA -3'，反股引子 5'- GTG GCA GTG ATG GCA TGG AC -3'。擴增混合液 (20 微升) 含有 25 ng 檢體的 RNA (5 微升)，2x Master Mix (10 微升)，5 μM 的正股引子和反股引子 (2 微升)，和 3 微升 ddH₂O (Kapa Biosystems, Inc, Woburn, MA, United States)。聚合酶連鎖反應熱循環參數如下：分別是酵素活化在 1 個循環的 95°C 達 3 分鐘，然後總共 40 個循環的變性和黏合/延伸階段在 95°C 達 10 秒及在 58°C 達 30 秒中進行。每個試驗包括二重複約 25 ng total RNA 的檢體。我們使用 GAPDH mRNA 當內部控制。肝臟組織的類鐸受體-3 mRNA 相對含量是使用 GAPDH mRNA 含量以標準化之，並且以 $-\Delta C_T = -(C_{T(TLR3)} - C_{T(GAPDH)})$ 表示。類鐸受體-3 的 mRNA 數量相較於 GAPDH 的 mRNA 數量之比率計算為 $2^{-\Delta C_T} \times K$ ，其中 K 是一個常數。

肝細胞上先天免疫類鐸受體-3 免疫組織化學染色 (immunohistochemical, IHC stain)

冷凍肝組織的連續切片放置在覆蓋著聚-L-離氨酸 (poly-L-lysine) 載玻片上，並使其乾燥 30 分鐘，然後固定在 100% 丙酮中 15 分鐘。組織切片以磷酸鹽緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗滌三次各 5 分鐘，之後浸入含有 2% 過氧化氫 (H_2O_2) 的甲醇中 25 分鐘以去活化內源性過氧化酶 (endogenous peroxidase)，並用 1% 牛血清白蛋白阻隔。阻隔後以稀釋 1:50 之類鐸受體-3 抗

體 (ab13915) (Abcam, Cambridge, MA, USA) 在室溫培養兩小時，然後用 PBS 洗滌，之後與 NovoLink Polymer (Leica Biosystems, Newcastle, United Kingdom) 作用 30 分鐘，再用可以顯示抗體位置的 DAB 作用液培養 (Leica Biosystems, Newcastle, United Kingdom)，且組織再以 Mayer's haematoxylin 對染。以同源型抗體當作陰性染色對照。

血清 B 型肝炎病毒核糖核酸 (HBV RNA) 即時 PCR 的測定

B 型肝炎病毒核酸的萃取和逆轉錄步驟以及定量依據之前的報告進行 (Hatakeyama et al. 2007)。使用 SMI TEST EX-R&D 試劑組 (Genome Science Laboratories, Tokyo, Japan) 從 100ul 血清中萃取核酸，然後溶解於 18ul 的無核糖核酸酶的水中。再將萃取物分成兩份相同的容量，分別稱為溶液 I 和 II。將溶液 I 與等量的水混合後，訂出去氧核糖核酸 (DNA) 的濃度。溶液 II 使用隨機引子 (random primer) (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) 和 M-MLV 逆轉錄酶 (ReverTra Ace, TOYOBO Co., Osaka, Japan) 進行逆轉錄步驟，然後訂出 DNA 加上 cDNA 的濃度。逆轉錄的步驟如下：加入 25pM 的隨機引子，將檢體加熱到 65°C 維持 5 分鐘；然後把檢體放置於冰中 5 分鐘；加入 5 × 逆轉錄緩衝劑 (4ul)，10mM 的 dNTP (2ul)，0.1M 的二硫蘇糖醇 (dithiothreitol) (2ul)，8 個單位的核糖核酸酶抑制劑和 100 個單位的 M-MLV 逆轉錄酶；在 30°C 和 42°C 下分別培養檢體 10 分鐘和 60 分鐘；最後在 99°C 下 5 分鐘使其失去活性。

HBV DNA 和 cDNA 的定量依據之前的報告進行 (Hatakeyama et al. 2007)。按照製造商的說明，將 1ul 的溶液 I 和溶液 II 以即時 PCR 使用 ABI Prism 7300 序列檢測系統 (Sequence Detection System) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 分別放大。放大是在 25ul 反應混合液中進行的，混合液內含有 SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)，200nM 正向引子 (5'-TTTGGGGCATGGACATTGAC-3'，核苷酸 1893-1912)，200nM 反向引子 (5'-TTTGGGGCATGGACATTGAC-3'，核苷酸 2029-2049)，和 1ul 的溶液 I 或溶

液 II。即時 PCR 中的步驟如下：在 50°C 下培養 2 分鐘，然後在 95°C 下 10 分鐘使之變性及 PCR 循環包含 40 次兩步循環在 95°C 下 15 秒和 60°C 下 60 秒進行。此試驗的檢測下限範圍是 10^3 copies/ml。HBV RNA 的濃度可以通過溶液 II 減去溶液 I 的濃度而得出（也就是由即時 PCR 逆轉錄反應過後的 B 型肝炎病毒核酸減去由即時 PCR 訂定的 HBV DNA）。

統計分析

帶原者的基本特徵，包括年齡、性別、追蹤時間、e-抗原、e-抗體、基因型、ALT 和病毒去氧核糖核酸濃度在研究組之間進行比較。連續變項以平均值 \pm 標準差表示，並以 Student *t*-test 檢定兩組間之比較，且以 Kruskal-Wallis test 將三組進行比較。類別變項表示為比例頻率，使用 Pearson's 卡方檢定；當表格中有一個或以上的單格出現預期頻率 < 5 時，使用 Yates 校正法或 Fisher's exact test 來比較。所有檢定都是雙尾，*p* 值小於 0.05 被認定為統計學上具意義。病毒去氧核糖核酸濃度在分析前先予對數化 (log-transformed)。

組別之間的 HLA-DRB1 對偶基因頻率使用邏輯回歸分析，包括檢測兩組整體差異的整體檢定 (global test) 和檢測相對勝算 (relative odds) 的特定檢定 (specific test)，而且使用“常見類型” (common types) 作為參考型別 (reference category)。

組別之間的維生素 D 受體基因型和單體型頻率經驗 *p* 值用 10,000 置換計算 (permutations)，四捨五入到小數點後第三位。置換分析用於處理多次檢驗 (multiple testing) 的問題。使用 SAS 9.2 版 (SAS Institute, Inc, Cary, NC) 軟體以推斷單模式種。另外以 SAS 的線性回歸分析週邊血液單核球細胞類鐸受體-3 表現量的預測因子。

結果



一、免疫遺傳因子 HLA-DRB1 多形性與男性慢性 B 型肝炎的肝炎嚴重程度之相關性

204 名 B 肝病毒帶原者的基本特徵如表一所示。ALT \geq 80U/L 的患者 (平均 42 歲, 從 22 歲到 75 歲) 明顯比 ALT $<$ 80U/L (平均 46 歲, 從 20 歲到 79 歲) 年輕 ($p=0.042$), 且多數為男性 (106 vs. 25, $p=0.016$)。在追蹤時間和病毒因素 (e-抗原, e-抗體, 病毒基因型, 病毒數量) 上兩組並沒有顯著差異。男性和女性 B 肝病毒帶原者的個別 HLA-DRB1 對偶基因頻率分佈分別如表二和表三所示。佔最多的對偶基因 (即 HLA-DRB1*09) 作為參考型 (reference category)。小於 5% 的對偶基因頻率合併為“其他”型別。調整年齡後, ALT $<$ 80 U/L 的男性帶原者之 HLA-DRB1*1101 頻率明顯高於那些 ALT \geq 80U/L 者 (18.0% vs. 8.0%, OR 0.23, $p=0.020$)。此外, ALT $<$ 80U/L 的男性帶原者之 HLA-DRB1*14 明顯比那些 ALT \geq 80U/L 者 (16.0% vs. 8.0%, OR 0.23, $p=0.025$) 更為頻繁。HLA-DRB1*14 的進一步次分型揭示了顯著較頻繁是屬於“其他”型別, 這一型是合併所有對偶基因頻率低於 5% 者, 而不是頻率最高的 DRB1*1401 對偶基因子型 (8.0% vs. 4.7%, $p=0.111$)。在不同 ALT 值的女性 B 肝病毒帶原者中沒有發現 HLA-DRB1 對偶基因頻率的明顯差別。雖然在多次測試校正後男性帶原者之間對偶基因頻率的差異不在明顯, 依照 ALT 值高低還是有一個潛在的增加趨勢。因預估的風險沒有差異, 進一步的分析使用所有其他的對偶基因作為參考型, 經性別調整後, 顯示支持 HLA-DRB1*1101 和 ALT $<$ 80U/L 之間有關連 (圖一)。這樣, 在做年齡調整後, 在 ALT $<$ 80U/L 與 ALT \geq 80U/L 的 B 肝病毒帶原者的比較中, 男性的 HLA-DRB1*1101 對偶基因與所有其他對偶基因比較的勝算比 (odds ratio) 為 0.39 (95% CI 0.16 – 0.95)。

DRB1*1101 的 B 肝病毒男性帶原者中, ALT \geq 80U/L 的 B 肝患者, 其病毒

基因型分佈為 67% B 型，20% C 型，0% B 及 C 型與 0% 非 B 或 C 型，而 ALT < 80U/L 者分別為 67%，22%，11% 及 0% (p=0.41)。



二、維生素 D 免疫受體基因多形性與慢性 B 肝的肝炎急性發作、e-抗原情況以及肝細胞癌產生之相關性

HBeAg 陽性帶原者 (A 組, B 組和 C 組) 明顯比 HBeAg 陰性帶原者 (D 組和 E 組) 年輕 (41.9 ± 11.3 歲相較於 51.7 ± 12.6 歲, $p < 0.001$)。肝炎急性發作的 B 型肝炎病毒帶原者 (B 組, C 組和 D 組) 明顯比未發生肝炎急性發作的 B 型肝炎病毒帶原者 (A 組和 E 組) 年輕 (41.5 ± 9.8 歲相較於 51.0 ± 13.5 歲, $p < 0.001$)。未併發肝細胞癌的 B 型肝炎病毒帶原者 (A 組, B 組, C 組, D 組和 E 組) 明顯比併發肝細胞癌的 B 型肝炎病毒帶原者 (F 組) 年輕 (46.2 ± 12.9 歲相較於 62.7 ± 17.9 歲, $p < 0.001$)。六組之間的性別比、HBV DNA 值和 B 型肝炎病毒基因型頻率分佈未呈現顯著性差異。

表五列出了未發生肝炎急性發作 (A 組和 E 組) 和發生肝炎急性發作 (B 組, C 組和 D 組) 的 B 型肝炎病毒帶原者之間的維生素 D 受體基因型和單體型頻率分佈。調整年齡和性別後, 兩組之間的 *BsmI* 位點和 *TaqI* 位點的基因型頻率呈現顯著性差異 (分別為 $p = 0.011$ 和 $p = 0.012$)。肝炎急性發作帶原者的維生素 D 受體基因 *BsmI* B/b 的頻率明顯低於未發生肝炎急性發作的帶原者 (7.2% 相較於 19.8%, $p = 0.009$)。肝炎急性發作帶原者的維生素 D 受體基因 *TaqI* T/t 的頻率明顯高於未發生肝炎急性發作的帶原者 (7.5% 相較於 2.5%, $p = 0.0029$)。兩組之間的 *BsmI*-*ApaI*、*BsmI*-*TaqI*、*ApaI*-*TaqI* 和 *BsmI*-*ApaI*-*TaqI* 單體型頻率呈現顯著性差異 (分別為 $p = 0.010$, $p = 0.004$, $p = 0.013$ 和 $p = 0.009$)。肝炎急性發作帶原者的 A/T、A/t 和 b/A/t 單體型頻率明顯高於未發生肝炎急性發作的帶原者 (分別為 48% 相較於 34%, $p = 0.027$; 2% 相較於 1%, $p = 0.004$ 和 0.5% 相較於 0%, $p = 0.001$)。相反的, 肝炎急性發作帶原者的 B/a、B/T 和 B/a/T 單體型頻率明顯低於未發生肝炎急性發作的帶原者 (分別為 1% 相較於 9%, $p = 0.004$;

3% 相較於 10%， $p = 0.007$ 和 1% 相較於 9%， $p = 0.005$)。三種維生素 D 受體基因型未檢測出連鎖不平衡，如圖二所示，其中 D' 值偏低。

表六列出了 HBeAg 陽性 (A 組, B 組和 C 組) 和 HBeAg 陰性 (D 組和 E 組) 的 B 型肝炎病毒帶原者之間的維生素 D 受體基因型和單體型頻率分佈。調整年齡和性別後，兩組之間的 *BsmI* 位點和 *TaqI* 位點的基因型頻率呈現顯著性差異 (分別為 $p = 0.004$ 和 $p = 0.002$)。HBeAg 陽性帶原者的維生素 D 受體基因 *BsmI* B/b 和 B/B 的頻率明顯高於 HBeAg 陰性帶原者 (分別為 19% 相較於 9%， $p = 0.015$ 和 2% 相較於 1%， $p < 0.001$)。HBeAg 陽性帶原者的維生素 D 受體基因 *TaqI* T/t 的頻率明顯高於 HBeAg 陰性帶原者 (7% 相較於 2%， $p = 0.002$)。兩組之間的維生素 D 受體 *BsmI*-*ApaI*、*BsmI*-*TaqI*、*ApaI*-*TaqI* 和 *BsmI*-*ApaI*-*TaqI* 單體型頻率呈現顯著性差異 (分別為 $p = 0.004$, $p = 0.002$, $p = 0.021$ 和 $p = 0.004$)。HBeAg 陽性帶原者的 b/A、B/a、B/A、B/T、B/t、A/t、b/A/T、B/a/T、B/A/T、B/A/t 和 b/A/t 單體型頻率明顯高於 HBeAg 陰性帶原者 (分別為 45% 相較於 34%， $p = 0.039$ ；7% 相較於 4%， $p = 0.006$ ；4% 相較於 1%， $p < 0.001$ ；9% 相較於 5%， $p = 0.009$ ；1.8% 相較於 0.5%， $p < 0.001$ ；2.2% 相較於 0.5%， $p < 0.001$ ；44% 相較於 34%， $p = 0.043$ ；7% 相較於 4%， $p = 0.004$ ；2% 相較於 1%， $p = 0.007$ ；1.8% 相較於 0.5%， $p < 0.001$ 和 0.4% 相較於 0%， $p < 0.001$)。

對於併發與未併發肝細胞癌的帶原者，其維生素 D 受體 *BsmI*、*ApaI* 和 *TaqI* 基因型和單體型頻率未呈現顯著性差異。

三、慢性 B 型肝炎病患週邊血液單核球細胞和肝臟細胞上先天免疫類鐸受體-3 之表現量，並且其與免疫調節藥物長效型干擾素治療療效的相關性

慢性 B 型肝炎患者週邊血液單核球細胞和肝細胞的類鐸受體-3 表現量

所納入的 127 例慢性 B 型肝炎患者和 64 例非 B 型非 C 型肝炎的健康對照者之基礎特徵如表七。慢性 B 型肝炎患者相較於對照者有較多男性及較高的 ALT

值。慢性 B 型肝炎患者週邊血液單核球細胞的類鐸受體-3 平均熒光強度 (MFI) 表現量顯著低於對照者 (9.70 ± 4.61 相較於 14.61 ± 13.49 , $p < 0.001$) (圖三左)。類鐸受體-3 平均熒光強度於病毒基因型 B 與 C 型之間相似 (9.0 ± 3.7 與 10.2 ± 4.7 , $p = 0.259$)。線性回歸分析週邊血液單核球細胞類鐸受體-3 表現量的平均熒光強度和表現量的百分比的預測因子如表八和表九所示。與對照者相比，在獨立於年齡、性別和血清 ALT 值之外，慢性 B 型肝炎患者週邊血液單核球細胞的類鐸受體-3 平均熒光強度表現量較低 ($p < 0.001$) (表八 a)。然而，在慢性 B 型肝炎患者中之年齡、性別、血清 ALT、B 肝 e-抗原狀態、B 肝表面抗原定量或血清 B 肝病毒 DNA 含量無法預測在週邊血液單核球細胞的類鐸受體-3 平均熒光強度表現量 ($p = 0.511$) (表八 b)。在週邊血液單核球細胞的類鐸受體-3 表現量百分比顯示一致的結果 (表九)。

慢性 B 型肝炎患者肝細胞上類鐸受體-3 之免疫組織化學染色為局限性於庫氏細胞 (Kupffer cells) 上 (圖四 c 和四 d 顯示一位代表性患者之肝組織染色)，相較於健康對照者較廣泛的分布在庫氏細胞和肝細胞上 (圖四 b 顯示一位代表性對照者之肝組織染色)。我們藉由小鼠免疫球蛋白 G (IgG) 同源型為對照染色以驗證免疫組織化學染色的特定性 (圖四 a)。此外，55 例慢性 B 型肝炎患者的肝臟類鐸受體-3 mRNA 表現量也比 3 例對照者的表現量低 (0.47 ± 0.30 倍相較於 1 倍) (圖三右)。

在長效型干擾素或貝樂克治療中的慢性 B 型肝炎患者週邊血液單核球細胞類鐸受體-3 表現量

本研究中共有 22 例 B 肝患者根據 AASLD 指南接受抗病毒藥物治療 (Lok et al. 2007)。在這些患者中，12 例 (男/女 10/2，年齡 41 ± 9.7 歲，B 肝病毒 DNA 對數 6.1 ± 1.4 IU / mL，42% B 肝 e-抗原陽性，100% 病毒基因型 B 型) 以長效型干擾素治療。如果血清 B 肝病毒 DNA 或 B 肝表面抗原定量在第 12 週時沒有下降，第 24 週就停止長效型干擾素治療。其中 5 例患者達到持續病毒學反應

(sustained virological response, SVR), 持續病毒學反應定義為治療後 6 個月血清 B 肝病毒 DNA < 2000 IU / mL (圖六)。在圖五中可以看出以治療前的類鐸受體-3 平均熒光強度作為參照, 在治療第 48 週類鐸受-3 平均熒光強度的倍數變化。在獲得持續病毒學反應的患者中, 類鐸受體-3 平均熒光強度在治療後立即上升到平均 1.5 至 1.7 倍, 並且在治療第 12 週, 85% 患者的類鐸受體-3 平均熒光強度至少增加 45%。此外, 其中 60% 患者在治療第 24 和 48 週時, 類鐸受體-3 平均熒光強度持續升高 (圖六)。在 7 例無治療反應或復發的患者, 類鐸受體-3 平均熒光強度治療後立即降低平均 0.5 至 0.7 倍 (圖五), 並且 7 位都在治療第 12 或 24 週時, 類鐸受體-3 平均熒光強度降低超過 30% (圖七)。與病毒復發前之類鐸受體-3 平均熒光強度相比, 四位復發者的類鐸受體-3 平均熒光強度都短暫性的上升至 1.1 至 1.8 倍, 其中兩位患者的類鐸受體-3 平均熒光強度後續下降 0.6 至 0.7 倍; 另外兩位病毒復發後接受貝樂克治療的患者未納入這個分析, 因為貝樂克治療會改變類鐸受體-3 平均熒光強度。

對於長效型干擾素治療後達到病毒持續反應的病患, 治療結束後六個月類鐸受體-3 表現量的平均變化倍數為 1.74 ± 0.99 。這個平均變化倍數與開始治療的 12 週者相似。所以類鐸受體-3 表現量在干擾素治療後達到病毒持續反應患者之治療中與治療後六個月的平均變化倍數在 1.5 至 1.7 之間浮動。

七位未達到病毒持續反應的病患中, 三位接受貝樂克治療者因著貝樂克治療會改變類鐸受體-3 表現量而未納入這個分析。而其他四位病患在治療後六個月的平均變化倍數為 0.69 ± 0.33 , 這比治療結束時的 0.74 ± 0.24 稍低。所以類鐸受體-3 表現量在干擾素治療後未達到病毒持續反應患者之治療中與治療後六個月的平均變化倍數在 0.5 至 0.7 之間浮動。因著多位未達到病毒持續反應之患者在長效型干擾素治療後改為貝樂克, 所以我們沒有把治療後六個月的資料放入圖五。

本研究中共有 10 例以貝樂克治療 (男/女 10/0, 年齡 48 ± 14 歲, B 肝病毒 DNA 對數 5.3 ± 2.0 IU / mL, 30% B 肝 e-抗原陽性, 80% 病毒基因型 B 型)。所有患者在治療第 24 或 48 週時都檢測不到 B 肝病毒 DNA。使用治療前類鐸受體

-3 平均熒光強度作為參照，在 48 週的治療中類鐸受體-3 平均熒光強度逐漸上升平均 1.2 倍 (圖五)。在第 24 週和 48 週治療後，分別觀察到 60% 和 80% 患者的類鐸受體-3 平均熒光強度都至少增加 5% (圖八)。治療至 120 週時，類鐸受體-3 平均熒光強度進一步上升至平均 1.5 倍 (圖九)。類鐸受體-3 表現量與各個患者治療前及治療中，接受干擾素或貝樂克治療者之病毒量都無相關性。

四、免疫調節藥物 (干擾素) 對於慢性 B 肝病患血清病毒核糖核酸 (HBV RNA) 的抑制效果

以核苷類似物和/或傳統干擾素治療的慢性 B 型肝炎患者的基本特徵如表十所示。這三個組別中在年齡、性別比例、ALT 值、HBeAg 狀態或 HBV DNA 值上無差異。

核苷類似物治療後的血清 HBV RNA 值

在核苷類似物治療前、中和治療或追蹤結束時血清 HBV RNA 的可檢測性和濃度如表十一所示。在核苷類似物治療開始前，血清 HBV RNA 在所有患者中都檢測不到；但在治療後，在 15 個患者 (79%) 上可檢測到。14 個接受 lamivudine 治療的患者中，血清 HBV RNA 在 10 個患者 (71%) 上可檢測到。相反的，在 5 個接受 entecavir 治療的患者中，血清 HBV RNA 在所有患者 (100%) 中都可檢測到。在接受 lamivudine 治療的患者中，血清 HBV RNA 的最高值範圍從 4.2 到 7.0 \log_{10} copies/ml，而在接受 entecavir 治療的患者中，範圍從 7.2 到 9.6 \log_{10} copies/ml。

接受各式治療的患者中血清 HBV RNA 值的連續變化

在接受核苷類似物單一治療後可以測得血清 HBV RNA 的患者中，直到治療結束時 HBV RNA 仍存在 (第一組；表十一)。相似的，在短期的 lamivudine 治療後，血清 HBV RNA 仍然是可以檢測得到 (第三組；表十一)。相反的，接受

了 lamivudine 和干擾素相繼合併治療的患者，在治療結束時血清 HBV RNA 就檢測不到了（第二組；表十一）。第一組、第二組和第三組患者中可測得 HBV RNA 者的血清 HBV RNA 連續變化分別如圖十、圖十一 和圖十二所示。在接受核苷類似物治療的前面 2 至 4 週，血清 HBV RNA 在 13 名患者 (87%) 中可檢測到並且在 11 名 (73%) 中達到最高值。

討論



第一章 免疫遺傳因子 HLA-DRB1 多形性與男性慢性 B 型肝炎的肝炎嚴重程度之相關性

B 型肝炎感染後導致廣泛的臨床表現及結果。在嬰幼兒時期獲得 B 型肝炎感染的個體中約 95% 進展成持續性感染，而成人時期獲得感染者只有 3% 至 5% 成為帶原者。部份持續性的 B 型肝炎感染將發展成慢性 B 型肝炎，以反覆性的 ALT 值上升來表現。哪一些宿主因素影響慢性 B 型肝炎患者反覆性 ALT 值上升仍不明。

人類白血球抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 位置的基因多形性讓 HLA 分子可以呈現廣泛之抗原種類，並且使 HLA 分子的抗原結合及呈現之特性多樣化 (Martin and Carrington 2005)。干擾素治療調升 HLA-DR, CD80 及 ICAM-I 分子在樹突細胞的表現，進而強化免疫反應 (Yu et al. 2006)。HLA-DR 位置似乎是影響干擾素治療反應之明顯的免疫遺傳因子 (Singh et al. 2007)。

毒殺 CD8+ T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 藉由 T 細胞受體 (TCR) 與被病毒感染的細胞交互作用，是透過 CD4+ T 細胞的幫忙 (Schoenberger et al. 1998) 及辨識在 HLA 分子表面所呈現病毒之胜肽 (Elahi and Horton 2012)。這種交互作用結果會殺死被病毒感染的細胞，透過兩個主要途徑：非依賴顆粒的途徑涉及 Fas/FasL 交互作用 (Poonia et al. 2009) 或負載溶解顆粒的穿孔素與顆粒酶 B (Granzyme B, GzmB) (Migueles et al. 2008)。CD8+ T 細胞在各種慢性病毒感染中發揮重要的作用。在少數受到控制之感染者 (Saez-Cirion et al. 2007) 和疾病長期穩定之患者 (Betts et al. 2006 ; Horton et al. 2006) 上已證實有增強之毒殺 CD8+ T 細胞的功能。第二型 HLA 分子將抗原呈現給 CD4+ T 細胞被認為是對於 B 型肝炎病毒感染重要的宿主免疫反應 (Penna et al. 1997)。這個 T 細胞免疫反應在慢

性 B 型肝炎感染的病患有顯著的被減弱的現象 (Vermehren et al. 2012)。

病毒特异性 CD8⁺ T 細胞在 HLA 限定性和 T 細胞受體的親和力方面有所不同。許多愛滋病長期穩定患者具有愛滋病毒特异性而且被 HLA-B27 或 HLA-B57 (保護性對偶基因) 限定的毒殺 CD8⁺ T 細胞，可以在慢性感染過程中繼續增殖。而大多數具有愛滋病毒特异性而且被不具保護性 HLA 對偶基因限定的毒殺 CD8⁺ T 細胞失去它們增殖能力 (Horton et al. 2006)。在慢性病毒感染時 T 細胞免疫反應有效性取決於幾個因素，如目標抗原負載、T 細胞受體親和力和結構、T 細胞的分化狀態，以及毒殺 CD8⁺ T 細胞的活化/功能型態 (Genesca 2011)。作用性 CTL 的有效性也受外部力量控制，尤其是專門扮演此角色之加強調節的細胞，如調節性 T 細胞 (Tregs)。

大型日本 B 型肝炎病毒帶原者相較於對照者的全基因組關聯性研究 (Genome Wide Association Study) 顯示持續性 B 型肝炎病毒感染與 HLA-DP 基因位置，包括 HLA-DPA1 及 HLA-DPB1 之十一個單核苷酸多形性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 有顯著的相關性 (Kamatani et al. 2009)。兩個在 HLA-DP 位置 (在 HLA-DPA1 的 rs3077 及 HLA-DPB1 的 rs9277535) 最顯著的單核苷酸多形性之相關性於數個大型的日本、中國及泰國人中被證實 (An et al. 2011; Guo et al. 2011; Kamatani et al. 2009; Li et al. 2011; Wang et al. 2011)。HLA-DPB1 的 rs9277535 也與國人慢性 B 型肝炎病患的病毒表面抗原自然清除有相關 (Cheng et al. 2013)。明顯的，在 HLA-DPA1 rs3077 及 HLA-DPB1 rs9277535 的 A alleles 顯著的與降低獲得 B 型肝炎感染之風險有關聯。雖然如此，報告指出 HLA-DPA1 及 HLA-DPB1 位置上的變異無法區分 B 肝帶原者是否為非活動健康帶原者或 ALT 反覆升高的慢性 B 肝患者 (Vermehren et al. 2012)。另外，B 型肝炎病毒感染相關的肝硬化或肝癌也與 HLA-DPA1 rs3077 無顯著相關性 (An et al. 2011; Li et al. 2011)。因此，HLA-DP 位置的 SNP 與慢性 B 肝患者之臨床表現，如肝炎嚴重度無相關聯。

我們這項前瞻性世代研究顯示 HLA-DRB1*1101 與臺灣男性 B 肝病毒帶原

者的輕度肝炎有關。這一型對偶基因不同於病毒持續感染或病毒清除的對偶基因 (HLA DRB1*0403, *1302 和 *0901, 作者未發表的資料), 它表明了 B 肝病毒感染的各種臨床表現的 HLA 對偶基因的不同角色。以往的研究顯示 HLA-DRB1*1101 與自限性 C 肝病毒感染和慢性 C 肝的輕度肝炎有相關 (Cramp et al. 1998; Thursz et al. 1999)。鑒於所有的證據, HLA-DRB1*1101 可與 B 肝和 C 肝病毒感染的宿主免疫保護重度肝炎相關聯。在 400 名正常漢族人中發現 35 名 (8.8%) 帶有 HLA-DRB1*1101 (作者未發表的資料), 此項研究發現 204 名 B 肝病毒帶原者中有 37 名 (18.1%) 帶有 HLA-DRB1*1101 ($p=0.001$), 這表明攜帶 HLA-DRB1*1101 的個人更易於發生持續性 B 肝病毒感染, 而這些持續性 B 肝感染者的男性多是長期疾病穩定之患者。

就如我們所假設的, HLA-DRB1*1101 與輕度肝炎的相關性只在男性 B 肝病毒帶原者中發現。這個對偶基因的頻率也在女性帶原者兩組病患中分析, 但是未發現明顯的差異 (表三)。此結果可能是因為 ALT ≥ 80 U/L 組中的男性占大多數, 這與以往的報告相符。男性 B 肝病毒帶原者的輕度肝炎有較高的 HLA-DRB1*1101 對偶基因頻率強調了性別對肝炎免疫遺傳的可能影響。然而, 我們還需要進一步的研究以探討這一重要而有趣的議題。

以往的研究顯示在 B 肝病毒流行地區, 通常是在生產過程或兒童的早年獲得 B 肝病毒感染, 而且無論男或女, 在這時期獲得的感染都是持續性的慢性感染 (Stevens et al. 1975)。然而, 一個長期追蹤的研究針對一群納入研究時男女比相同的 B 肝病毒表面抗原帶原者顯示經過超過兩萬人年的追蹤後, 男性 B 肝病毒帶原者的肝炎急性發作的機率明顯較高 (Chu and Liaw 2007a)。此外, 朱等人也指出在臺灣和女性帶原者相比, 男性 B 肝病毒帶原者的 ALT 大於兩倍正常值上限的機會較高, 並且 ALT 小於兩倍正常值上限的機會較低 (Chu and Liaw 2007b)。他們還發現和女性帶原者相比, 男性帶原者有較高的 ALT 值和較高的機率產生肝炎急性發作 (Chu et al. 2004)。這些證據證實了從男女比 1.0 的低 ALT 帶原者轉變到以男性為主的高 ALT 帶原者。

在這些慢性 B 肝病毒帶原者中，那些血清 ALT 值大於正常值上限兩倍者的平均年紀較輕。這一發現可能是因為與 ALT 小於正常值上限兩倍者相比，前者的 e 抗原陽性比例 (38% vs. 29%) 較高有關，這表明後者大多數帶原者是在病毒低複製階段。報告也指出在低複製階段的帶原者通常年紀較大，e 抗原為陰性以及 ALT 值正常 (Chu 2000)。

曾經有報告指出 HLA-DRB1*1101/1104 與對慢性 B 肝有抵抗力有關連 (Jiang et al. 2003)。然而，在這個以往的研究中，急性和慢性 B 肝的診斷標準沒有被明確的定義。此外，它僅包含少數的患者而且單獨的 DRB1*1101 對偶基因與慢性 B 肝無顯著之關連。另一項研究對高加索人顯示對表面抗原疫苗有反應的人其帶 DRB1*11 的頻率增加 (Hohler et al. 1998)。這項研究缺乏對於 DRB1 的次分型而限制了其對偶基因的特異性。不同對偶基因的次分型與不同的臨床表型常常相關，所以對偶基因的次分型在關連性研究中是重要的。此外，在不同種族中特定的對偶基因與不同的臨床表型相關性也不同。

在本研究中納入了兩組相對等病毒因素的 B 肝帶原者以研究宿主因素的關連，也就是特定的 HLA-DRB1 對偶基因與肝炎嚴重度的關連。這些帶原者連續性的納入本研究，因此這些帶原者的 HLA 對偶基因頻率可以與一般人口相比。此外，這些帶原者都沒有接受任何抗病毒藥物或免疫調節治療，因為臺灣全民健康保險的 B 肝治療給付在本研究納入受試者之後才開始。因此，所納入的 B 肝帶原者的臨床表型可以代表慢性 B 肝病人的自然病程。

在這項研究中，肝炎的嚴重度是以重複測量血清 ALT 值而訂定。雖然標準的評估單一病人肝臟發炎的嚴重度及纖維化的分期以肝切片為主，但是切片的價值在大型的免疫遺傳世代研究中，特別是需要與一般人口相比的 HLA 對偶基因頻率，因著高成本及潛在風險而仍然有爭議。即使每個帶原者都進行肝切片，也不能代表肝炎嚴重度的動態變化；此外，取樣誤差的可能性依然存在。近年，報告指出血清 ALT 值上升的慢性肝炎患者比那些 ALT 值正常的患者有著更為嚴重的肝組織變化 (Shiffman et al. 2000)。因此，血清 ALT 值本身可以作為一個肝炎

嚴重度的代理標記，此 ALT 值提供了重複測量的可能性。

在擁有 HLA-DRB1*1101 的男性帶原者中，ALT 小於 80U/L 及大於或等於 80U/L 兩組中 B 肝病毒基因型之分佈相似。因此，擁有 DRB1*1101 的男性 B 肝帶原者中，對於肝臟發炎的嚴重度，B 肝病毒基因型的角色極小。

HLA 調解之免疫反應所產生不同的疾病表現及免疫缺陷，以及 HLA 基因與病毒感染相關性研究報告的不一致性的因素包括：(1) 抗原結合親和力之變化，(2) 無效率的抗原呈現，(3) 無效率的抗原-MHC 及 T 細胞受體之間的互動，(4) 缺乏特定性 T 細胞，(5) 細胞激素的不足，以及 (6) 補體活化的不足。

因著 (1) HLA 基因的高度多形性，(2) 基因相互作用之多樣性，以及 (3) 免疫反應的複雜性，目前無法將任何一個對偶基因或基因位置加上標籤作為某一疾病或疾病預後的潛在候選基因。雖然如此，臨床的證據明顯的展示這些相關性。所以，對於病毒性肝炎感染的反應是免疫遺傳相關的，而且受多個候選基因之獨立或相關聯性作用之影響 (包括 HLA 及非 HLA 基因)。HLA 基因可能直接牽涉或相關聯於疾病易感性、保護性及治療反應的基因標記。

總之，在臺灣漢族中，男性 B 肝帶原者擁有 HLA-DRB1*1101 對偶基因與輕度肝臟發炎相關連。這個第二型 HLA 對偶基因 (allele) 可能在接觸到病原體的過程中被挑選出來，在 B 型肝炎病毒感染時提供生存優勢，卻以長期穩定為疾病之臨床表現。B 肝病毒基因型在擁有 DRB1*1101 的男性帶原者中的臨床病程影響不大。

第二章 維生素 D 免疫受體基因多形性與慢性 B 肝的肝炎急性發作、e 抗原情況以及肝細胞癌產生之相關性

Baker 等人在 1988 年選殖人類維生素 D 受體的 cDNA 後 (Baker et al. 1988)，花了近 10 年，人類 VDR 的基因組主要結構才清楚被了解，就如 Miyamoto 等人的描述 (Miyamoto et al. 1997)。近年人類基因組計劃讓基因組序列可以容易的從

資料庫中找到。然而，這些資料庫仍然是不完整的，並且針對特定的基因，必須再確定其完整基因組結構。VDR 基因在第 12 對染色體的圖譜位置首先在 Labuda 等人 (Labuda et al. 1992) 以連鎖圖譜被闡明，後來 Taymans 等人 (Taymans et al. 1999) 以更精確的螢光原位雜交 (FISH) 和輻射雜種定位。然而，這些研究定位 VDR 基因的位置是非常籠統的，解析度大於 100 kb，這不足以了解 VDR 多形性在疾病的角色。

了解這個區域確切的基因內容和距離，主要是來自基因關聯的研究。由於大多來源不明的多形性已被使用，所觀察到之相關性的解釋之一為不是 VDR 基因本身解釋其相關性，而是附近的另一個基因。因此，知道哪些基因也出現在該區域是重要的，它們與 VDR 基因之距離，以及這些其他基因如何可以解釋其相關性。

Uitterlinden 等人擴充 VDR 基因的圖譜 (Uitterlinden et al. 2004)，建立一個高解析度位於染色體 12q13 區域的 VDR 基因圖譜。這些研究者應用徹底之分析所有可用的基因組序列資料庫，使用脈衝式膠體電泳以確定 VDR 基因的順序和其鄰近基因之確切位置。他們分析位於染色體 12q13.1 的 VDR 基因組架構，顯示 VDR 基因本身是相當大的 (剛好超過 100 kb)，而且有一個廣泛的啟動子區域，能夠生成多種組織特定性的轉錄產物。在沒有證據證明 VDR 基因區域的其他基因所扮演之角色下，VDR 基因是明顯的候選基因以解釋所發現的相關性。下一個步驟是確定在相關區域中的基因多形性，並且訂出它們彼此在遺傳方面和功能方面如何交互作用。

我們的這研究是首次探討維生素 D 受體基因多形性與 B 型肝炎病毒帶原者的不同臨床表型和發生肝細胞癌之間相關性的前瞻性世代研究。我們訂定 *ApaI* (Faraco et al. 1989), *BsmI* (Morrison et al. 1992), *TaqI* (Morrison et al. 1994) 在 VDR 基因的 3' 末端所發現的限制性片段長度多型性 (RFLPs)。尋找基因多形性的一個簡單的方法是在一些不同個體中訂出 VDR 序列相同部位之鹼基配對序列。由於年齡和性別是影響慢性 B 型肝炎病毒感染者的臨床表型和預後的兩個重要因素

(Chu 2000; Chu and Liaw 2007a; Chu and Liaw 2007b; Chu et al. 2004)，因此，本研究的所有分析均在調整年齡和性別後評估具體的維生素 D 受體基因型和單體型的獨立風險。因此，本研究結果有力地證實了維生素 D 受體基因型和單體型多形性與臺灣 B 型肝炎病毒帶原者的不同臨床表型和發生肝細胞癌之間的相關性。

在本研究中，慢性 B 型肝炎病毒感染的活動性依據反復測量血清麩丙酮酸轉胺酶 (ALT) 值來測定。雖然肝活檢 (切片) 是公認的評估肝病患者肝炎活性和肝纖維化的黃金標準，但其在大规模免疫遺傳世代研究中的價值仍存在爭議，因為成本高，而且存在潛在的風險。此外，在特定時間點進行的單一肝活檢無法代表肝炎嚴重度的動態變化，而且不能排除抽樣誤差的可能性。因此，通過反復測量血清 ALT 值來監測肝炎活性的動態變化相當合理，而且也很實用。此外，Shiffman et al. 2000 已指出，與血清 ALT 值正常的慢性肝炎患者相比，血清 ALT 值升高的慢性肝炎患者更易發生比較嚴重的肝組織變化。因此，一系列血清 ALT 值可作為監測大型世代研究慢性 B 型肝炎病毒帶原者肝炎活性的有效替代指標。

在撰寫本文時，英文文獻只報導了兩項涉及維生素 D 受體 *Apal* 和 *TaqI* 多形性與 B 型肝炎病毒相關性的研究 (Bellamy et al. 1999; Suneetha et al. 2006)。一項早期研究表明，維生素 D 受體 *t/t* 基因型與預防慢性 B 型肝炎病毒感染有關 (Bellamy et al. 1999)。本研究證實，慢性 B 型肝炎病毒帶原者中不存在 *t/t* 基因型。另一項後期研究表明，維生素 D 受體基因 *Apal* 和 *TaqI* 多形性與 B 型肝炎病毒感染的易感性無關 (Suneetha et al. 2006)。然而，研究人員發現，*Apal* 基因型 *a/a* 與嚴重的肝臟疾病和病毒 DNA 量較高有關 (Suneetha et al. 2006)。因為 *a/a* 基因型是 *Apal* 位點“最常見的基因型”，因此，本研究以此基因型為參考型別。對於有肝炎急性發作與無肝炎急性發作的帶原者，其 *Apal* 位點的總體基因型頻率 (總體基因型檢測) 相當 ($p = 0.082$ ，表五)。雖然 Suneetha et al. 之研究選用與帶原者年齡和性別相配的對照者，但是帶原者的肝病嚴重程度和 B 型肝炎病毒 DNA 量的比較未依年齡和性別進行調整，這可能會影響他們的主要結果。此外，研究族群不同，以往的研究納入血清 ALT 值超過正常上限值 1.5 倍的患者，我們的研究

納入血清 ALT 值正常以及超過正常上限值 5 倍的患者。再者，以往的研究結果只是基於單一次的肝組織切片和一次 B 型肝炎病毒 DNA 定量結果，以監測肝臟發炎以及血中病毒 DNA 量，未進行配對切片或反復檢測 B 型肝炎病毒 DNA。另外兩個由同一組研究人員進行的研究（中文文獻，有英文摘要）顯示，維生素 D 受體基因 *TaqI* 基因型與 B 型肝炎病毒帶原者之間無顯著的相關性 (Li et al. 2006a; Li et al. 2006b)；這些結論不一致的可能原因為臨床表型的界定不清楚和回顧性的研究設計，而且，未對研究中的帶原者進行定期的監測。

在本研究中，維生素 D 受體基因型 B/b、單體型 B/a、B/T 和 B/a/T 與預防肝炎急性發作有關。這些研究結果意味著，B 型肝炎病毒帶原者擁有這些基因型或單體型時患有的肝臟疾病較不嚴重，因此不太需要治療。此外，基因型 T/t、單體型 A/T、A/t 和 b/A/t 與肝炎急性發作有關，因此可以預測 B 型肝炎病毒帶原者的不良臨床預後 (Huo et al. 2000; Realdi et al. 1994)。這些研究結果表明，擁有這些基因型或單體型的帶原者應接受密切追蹤，直到確定積極治療的時間點，以便改善長期預後。現行的標準指引是每隔 3 至 6 個月監測一次 B 型肝炎病毒帶原者的血清 ALT 值 (Lok et al. 2007)；擁有這些基因型或單體型的帶原者應接受每隔 1 至 2 個月監測一次血清 ALT 值。

本研究還發現，維生素 D 受體基因多形性與 HBeAg 陽性有關連。HBeAg 是 B 型肝炎病毒複製活性的血清學標誌，並且 HBeAg 陽性的血清陰轉常為亞洲 B 型肝炎病毒帶原者較好預後的指標 (Chu 2000)。這一發現意味著，維生素 D 受體基因與 B 型肝炎病毒的複製活性有關聯，因此擁有與 HBeAg 陽性相關基因型 B/b、B/B、T/t 或單體型 b/A、B/a、B/A、B/T、B/t、A/t、b/A/T、B/a/T、B/A/T、B/A/t 和 b/A/t 的 B 型肝炎病毒帶原者也應該接受密切追蹤直到確定最佳的治療時機。

本研究把維生素 D 受體基因多形性與臺灣慢性 B 型肝炎病毒帶原者的臨床病程連接起來。這些結果支持一種假設，即候選基因至少在一定程度上影響疾病進展，也將是改善慢性 B 型肝炎處治的一個關鍵因素。因此，未來需對這些基

因多形性進行進一步的功能性研究，以闡明其分子機制。正如維生素 D 受體基因多形性與其他疾病之間的相關性研究所述 (Valdivielso and Fernandez 2006)，對於不同種族，維生素 D 受體基因多形性對 B 型肝炎病毒感染過程的影響也可能不同。所謂候選基因的方法，在複雜性狀的遺傳分析上，可以利用連鎖分析對基因組進行搜索 (Risch and Merikangas 1996)。我們的資料並沒有顯示這些維生素 D 受體基因型之間的連鎖不平衡，這意味著，單體型關聯的意義在於對偶基因的相互作用 (allelic interaction)，而不是連鎖不平衡的單體型。

維生素 D 受體基因多形性可能與 B 型肝炎病毒感染的易感性相關，也就是說，擁有 B 型肝炎病毒複製 (HBeAg 陽性) 相關的基因型或單體型之帶原者，容易感染 B 型肝炎病毒。這些包括基因型 B/b、B/B、T/t 或單體型 b/A、B/a、B/A、B/T、B/t、A/t、b/A/T、B/a/T、, B/A/T、B/A/t 或 b/A/t。擁有這些基因型或單體型的個體很容易透過病毒複製感染 B 型肝炎病毒。擁有基因型 B/b、單體型 B/a、B/T 和 B/a/T 的個體由於對抗 B 型肝炎病毒的免疫反應不太活躍，可以從較少發生肝炎急性發作看出，特別容易感染和複製 B 型肝炎病毒。此外，雖然擁有基因型 T/t、單體型 A/t 和 b/A/t 的帶原者發生肝炎急性發作較為頻繁，但是他們的免疫反應可能太弱，難以抑制 B 型肝炎病毒複製，致使 HBeAg 持續呈陽性狀態。

追蹤率低和有限的病例數量是本研究的主要缺點。我們使用置換檢定 (permutation test) 克服了樣本數量小的限制 (Potter 2005)。置換檢定是一種無母數統計方法，透過模擬對受試者重新採樣而獲得經驗 p 值。該檢定用於控制因樣本數量有限而產生的多重檢定的第 1 型誤差。如果虛無假設下的疾病標記可以依現有的模式互換，當母群體分佈未知或樣本數量相對較小時，所產生的檢定結果將得到確切的顯著值。

本研究未發現維生素 D 受體基因 *BsmI*、*ApaI* 和 *TaqI* 多形性與肝細胞癌風險有關聯，這表明，維生素 D 受體基因多形性對肝細胞癌形成的影響極小。然而，據報導，維生素 D 的活性形式預防肝細胞癌增殖的作用與細胞內維生素 D 受體

值有關聯 (Pourgholami and Morris 2004)。維生素 D 類似物 Seocalcitol 已被用於治療無法手術的肝細胞癌患者 (Dalhoff et al. 2003)。然而，並沒有進一步的對照研究被報告。因此，未來還需要進行進一步研究，以闡明維生素 D 和維生素 D 受體在肝細胞癌的發展和控制的角色。

在大多數分組中，男性多於女性。然而，由於維生素 D 受體多形性是體染色體多形性，因此，不同性別的 *BsmI* - *ApaI*、*BsmI* - *TaqI*、*ApaI* - *TaqI* 和 *BsmI* - *ApaI* - *TaqI* 單體型未呈現顯著性差異 (分別為 $p = 0.094$ ， $p = 0.319$ ， $p = 0.713$ ， $p = 0.302$ ，資料未顯示)，這表明性別不影響維生素 D 受體的單體型頻率分佈。然而，這些結果不能排除一種可能性，即維生素 D 受體單體型與性別染色體基因、性別相關或性別特定性因素之間的相互作用。雖然統計意義不顯著，但性別是影響 B 型肝炎病毒帶原者肝臟疾病進展的一個重要因素，因此，我們的分析納入了這一因素。

VDR 基因多形性在人種和種族之間已知有相當大的差異性 (Zmuda et al. 2000)。*BsmI* 少數對偶基因 (minor allele) "B" 在白種人 42%、亞洲人 7%、非洲人 36%，*ApaI* 少數對偶基因 "A" 在白種人 44%、亞洲人 74%、非洲人 31%，而 *TaqI* 少數對偶基因 "T" 在白種人 43%、亞洲人 8%、非洲人 31% (Uitterlinden et al. 2004)。另外，*Bsm-Apa-Taq* 單模式種 (haplotype) baT 在白種人 43%、亞洲人 75%、非洲人 26%，haplotype BA_T 在白種人 39%、亞洲人 7%、非洲人 16%，而 haplotype bAT 在白種人 11%、亞洲人 17%、非洲人 59% (Uitterlinden et al. 2004)。為什麼可以看到這樣的差異呢？在一般情況下，所有多形性從突變的發生開始，可能是由於 DNA 損傷的情況造成，然後頻率會在群體中增加，並成為真正的多形性。因此，在種族之間對偶基因頻率的差異，最有可能是演化過程和群體遺傳習性的結果。

維生素 D 受體 (VDR) 影響先天和後天免疫。在人類巨噬細胞，維生素 D 受體和 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 維生素 D 活性型態，被類鐸受體 (TLRs) 啟動以調解抗微生物反應，造成抗微生物肽 cathelicidin 的誘發並殺死細胞內的結核桿菌 (Liu et al.

2006)。維生素 D 受體和 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 在後天免疫的作用是比較具爭議的。生物體外研究表明， $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 幫助單核球與巨噬細胞的趨化作用和嗜菌作用，但降低 MHC 第二型的表現、T 細胞刺激性能力和合成 Th1 的細胞素 IL-2 與 IFN-gamma，誘發 CD4^+ T 淋巴球分化成 Th2 表型 (Hayes et al. 2003; Van Etten and Mathieu 2005)。相反的，生物體內研究表明有功能的維生素 D 受體在 Th1 細胞生長是必須的。雖然有跡象表明高濃度 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 配位體結合的維生素 D 受體的轉錄活性可能幫助強化 Th2 細胞調解反應的發展 (Hayes et al. 2003)。維生素 D 受體位於 12q12-14 含有超過 25 種已知的多形性，雖然根據所觀察到的全基因組 SNPs 的頻率，預計會有超過 100 種 (Uitterlinden et al. 2004)。削弱維生素 D 受體功能的突變，例如發生在遺傳性維生素 D 抗性佝僂病 (Hereditary vitamin D resistant rickets, HVDRR)，與頻繁和嚴重的感染有關聯 (Hayes et al. 2003)。另一方面，細微的多形性在具有足夠的 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 存在下會影響免疫反應的特性 (Hayes et al. 2003)。

在本研究中，HBeAg 陽性的 B 型肝炎病毒帶原者明顯比 HBeAg 陰性者年輕，肝炎急性發作患者比未發生肝炎急性發作的患者年輕。這些結果與以往亞洲慢性 B 型肝炎病毒感染患者自然病史的研究結果一致 (Chu 2000)。總之，本研究結果有力地證實，維生素 D 受體基因型和單體型多形性與臺灣 B 型肝炎病毒帶原者的肝炎急性發作和 HBeAg 陽性有關聯。

第三章 慢性 B 型肝炎病患週邊血液單核球細胞和肝臟細胞上先天免疫類鐸受體-3 之表現量，並且其與免疫調節藥物長效型干擾素治療療效的研究

細胞內多樣性的感測器可以透過辨認病原體成分而偵測病毒。這些成分通常被稱為病原相關分子樣式 (PAMP)，因為它們不同於宿主細胞之分子 (Roy and Mocarski 2007)。有許多種類的受體可以辨認 PAMP：類鐸受體 (TLR)；結合核苷酸，寡聚化類結構域受體 (nucleotide binding, oligomerization domain-like

receptors); C 型類凝集素受體; 細胞質雙股的 RNA (dsRNA) 和 DNA (dsDNA) 的受體。這些受體的功能作為感測器來引起細胞內反應路徑，進一步形成警報系統，可透過誘發細胞死亡、調升參與免疫防禦的基因或刺激細胞激素 (干擾素 [IFN]-alpha、-beta，腫瘤壞死因子 [TNF]-alpha，介白質 [IL] -6、IL-12) 的產生來幫助控制或清除病原體。這些細胞激素可能接著誘發高效率的後天免疫。

宿主對抗 B 型肝炎病毒的反應同時涉及先天和後天免疫系統。當後天免疫在清除 B 型肝炎病毒感染普遍被認為扮演關鍵性角色的同時，實驗的限制阻礙了對先天免疫系統所扮演角色的正確理解。目前缺少 B 肝病毒感染一致性和可重複性的模型。正因為如此，B 肝病毒透過不同類型的模式識別受體活化細胞內抗病毒機制的的能力還沒有被直接的研究。

在這項研究中，我們證實了與健康對照者相比，獨立於年齡、性別和血清 ALT 值之因素，慢性 B 型肝炎患者的週邊血液單核球細胞有較低的類鐸受體-3 表現量。同時，我們也一致性發現，慢性 B 型肝炎患者肝細胞的類鐸受體-3 免疫組織化學染色只表現在庫氏細胞上，並且患者肝細胞的類鐸受體-3 mRNA 數量比對照者低。此外，大多數長效型干擾素或貝樂克治療而有持續病毒抑制反應者，其週邊血液單核球細胞類鐸受體-3 表現量有回升現象，這進一步證實我們的發現。總括來說，慢性 B 型肝炎感染降低類鐸受體-3 之表現量，以及有效治療使得類鐸受體-3 表現量回升的資料支持 B 型肝炎病毒調節先天性免疫的假說，進而設立及維持 B 型肝炎病毒感染之慢性狀態。

上述假說的構成是因為越來越多的研究證實 B 型肝炎病毒造成類鐸受 -2、-4 和 -9 功能性之表現量下降 (Chen et al. 2008; Visvanathan et al. 2007; Woltman et al. 2011; Xie et al. 2009; Xu et al. 2009)。最近的報告顯示兒童慢性 B 型肝炎在類鐸受體-3 配位體刺激後其干擾素-alpha 的產量減少 (Heiberg et al. 2012)。另外之研究展示了 B 型肝炎病毒會抑制類鐸受體誘導的肝臟抗病毒活性 (Wu et al. 2009)，而且一項研究澄清 B 型肝炎病毒聚合酶可以強效的抑制類鐸受體-3 所調解的干擾素-beta (Yu et al. 2010)。早期的研究也表明 B 型肝炎病毒聚合酶終端蛋

白區域的表現會抑制細胞對干擾素-alpha 和干擾素-gamma 以及雙股 RNA 的反應 (Foster et al. 1991)。

文獻回顧顯示類鐸受體-3 可能在 B 型肝炎病毒感染之反應上扮演重要的角色。B 型肝炎病毒可能發展出對抗類鐸受體-3 相關的機轉及途徑以建立及支撐持續性的感染。我們的資料支持 B 肝病毒感染及受感染之細胞在類鐸受體-3 免疫監視的調降上之角色。樹突細胞使用類鐸受體-3 以檢測病毒 dsRNA，而且類鐸受體-3 之訊息傳遞強化樹突細胞之交叉呈現給毒殺 T 細胞，在受病毒感染之細胞上交叉吸引毒殺 T 細胞之作用 (Schulz et al. 2005)。所以，類鐸受體-3 可能發展以交叉吸引毒殺 T 細胞作用於 B 型肝炎病毒。

慢性 B 型肝炎患者的肝細胞之類鐸受體-3 免疫組織化學染色顯示零散且局限在庫氏細胞中。已知在肝臟的非實質細胞 (NPCs)，包括庫氏細胞和肝竇內皮細胞，都是先天免疫系統的主要作用細胞。以往的研究顯示類鐸受體-3 所刺激之小鼠 NPCs 將誘導干擾素-beta 和隨後抑制 B 型肝炎病毒之複製 (Wu et al. 2007)，而且慢性 B 型肝炎患者的炎性肝損傷與庫氏細胞的 Fas-L 表現量增加有關 (Tang et al. 2003)。此外，B 型肝炎病毒之持續性感染可能是由於肝臟中缺乏產生抗病毒細胞激素的細胞 (Tang et al. 2003)。所以，肝臟上類鐸受體-3 的低表現量及局限在庫氏細胞的表現情況是因著 B 型肝炎病毒慢性感染狀態所導致的現象。

不是所有正常對照者之肝細胞上類鐸受體-3 免疫組織化學染色都呈現陽性反應 (圖四 b)。這現象與在人類蛋白網站上所公告的情況相似 (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000164342/normal/liver>)，可能的原因為細胞週期依賴性類鐸受體-3 表現量的調節。

研究報告展示 B 型肝炎病毒與類鐸受體-3 的交互作用。類鐸受體-3 的配位體是雙股 RNA，而 B 型肝炎病毒具有部分雙股 DNA 基因組及藉由前基因組 RNA 複製 (Liang 2009; Huang et al. 2009)。類鐸受體-3 之訊息傳遞可以被病毒雙股 RNA 及人工合成的雙股 RNA 類似物 poly (I:C) 活化，而前者活化之效果較後者

弱 (Lai et al. 2011)。Lai et al. 發現病毒雙股 RNA 結合的 B 肝病毒外鞘蛋白 H-cp183 (Porterfield et al. 2010)，其包含一個帶正電荷的多精氨酸區，可以強效的增進藉由 poly (I:C) 或病毒雙股 RNA 誘導之類鐸受體-3 訊息傳遞 (Lai et al. 2011)。另外，截短的 B 型肝炎病毒外鞘蛋白 H-cp149 與雙股 RNA 結合力相對較差，因此類鐸受體-3 之活化效率較低 (Lai et al. 2011)。另外，B 型肝炎病毒聚合酶在 B 肝病毒感染中參與類鐸受體-3 操縱干擾素 beta 之誘導。B 肝病毒聚合酶抑制類鐸受體-3 調解之抗病毒免疫 (Yu et al. 2010)。所以，B 型肝炎病毒外鞘蛋白或 B 肝病毒聚合酶可能有潛力調節類鐸受體-3 之功能或穩定性。

兩項研究未能展示類鐸受體-3 在慢性 B 型肝炎患者和對照者之間表現量的顯著差異 (Chen et al. 2008; Wang et al. 2010)。在我們的研究中，慢性 B 型肝炎患者週邊血液單核球細胞，獨立於年齡、性別及 ALT 值，和在肝細胞上的類鐸受體-3 表現量降低。相反的，Chen et al. 顯示了在慢性 B 型肝炎患者和健康捐血者，其類鐸受體-3 mRNA 有類似的表現量 (Chen et al. 2008)，而且 Wang et al. 發表了在慢性 B 型肝炎患者和對照者之間，其週邊血液單核球細胞之類鐸受體-3 mRNA 表現量與西方墨點法分析結果不一致 (Wang et al. 2010)。這個有爭論的研究結果可以以樣本數不足來解釋。此外，因為年齡、性別、血清 ALT 值、e 抗原狀態、血清 B 肝病毒 DNA 和血清 B 型肝炎表面抗原數量可以影響類鐸受體-3 的表現量，這些變項應該加於調整或分層，就如在我們研究中所做的。

我們的結果與最近一份報告有一致性之發現，這份報告指出在慢性 B 型肝炎患者或 B 肝病毒相關的慢性肝衰竭急性惡化 (ACLF) 患者中，類鐸受體-3 和干擾素 beta 在單核球分化的樹突細胞中表現量降低 (Li et al. 2009)。持續病毒感染和樹突細胞之間的交互作用也已被報告 (Lambotin et al. 2010)。另外，恢復類鐸受體-3 活化的髓樣樹突細胞可以改善慢性 B 型肝炎患者之自然殺手細胞功能 (Tjwa et al. 2012)。綜合這些證據，持續的 B 肝病毒感染可能與先天免疫系統進行交互作用，從而抑制宿主的免疫反應。

在我們的研究中，對於長效型干擾素治療有持續病毒抑制反應的慢性 B 型

肝炎患者，他們類鐸受體-3 之表現量相較於接受貝樂克治療者有更迅速和顯著的回升。此現象可能是因著干擾素具有免疫調節的特性所引起。接受貝樂克治療而 B 肝病毒 DNA 檢測不到的患者中，類鐸受體-3 的表現量逐漸回升，這表明類鐸受體-3 表現量之回升是在病毒被抑制後。

對長效型干擾素無反應或復發的患者，類鐸受體-3 的平均熒光強度在開始治療後迅速降低。已知慢性 B 型肝炎患者之髓樣樹突細胞功能受損，進而導致自然殺手細胞之功能也受損。研究證明慢性 B 型肝炎患者之類鐸受體-3 與干擾素活化的自然殺手細胞及髓樣樹突細胞之間的功能性交互作用被削弱了 (Tjwa et al. 2012)。此外，報告指出類鐸受體-3 的表現量與自然殺手細胞的活化有相關性 (Chew et al. 2012)。干擾素治療無反應或復發的患者無法活化及回復自然殺手細胞及髓樣樹突細胞的功能，這可能迅速的降低類鐸受體-3 的表現量。

總結來說，慢性 B 型肝炎患者週邊血液單核球細胞上，在獨立於年齡、性別及血清 ALT 值，以及肝細胞上的類鐸受體-3 表現量下降。對於長效型干擾素治療具有持續病毒抑制反應的患者，其類鐸受體-3 表現量的回升，相較於貝樂克，更為有效。在慢性 B 型肝炎的治療上，還需要進一步的研究於探索類鐸受體-3 刺激的潛在價值。

第四章 免疫調節藥物 (干擾素) 對於慢性 B 肝病患血清病毒核糖核酸 (HBV RNA) 的抑制效果

在 entecavir 和 lamivudine 治療的早期 (六個月內)，血清中會產生大量的 B 肝病毒 RNA (Hatakeyama et al. 2007)。因為 entecavir 和 lamivudine 只作用在反轉錄步驟，cccDNA 轉錄的階段不會被這些藥物影響。B 肝病毒 RNA 雖然緩慢降低，卻是持續的存在反映出 cccDNA 仍然存在肝臟內，而且病毒複製之機制仍然活躍的運作中。這與之前報導是一致的，顯示肝臟內 cccDNA (Sung et al. 2005; Yuen et al. 2005) 和反應肝內 cccDNA 的血清 cccDNA (Wong et al. 2004; Yuen et al.

2005)，可以預測 lamivudine 的效果及停止治療時病毒是否復發的標記。大量的 B 肝病毒 RNA 是否來自於肝細胞中大量的 cccDNA 模板或從活躍的轉錄（或兩者），實際上是未知的。


血清 HBV RNA 在慢性 B 型肝炎患者的特殊存在於之前的研究中已經透過核糖核酸酶的作用而被確定了 (Hatakeyama et al. 2007)。透過逆轉錄反應後的即時 PCR 所檢測的 HBV DNA，核糖核酸酶作用將其降低至原檢測值的 1% (Hatakeyama et al. 2007)。在我們的研究中，可檢測的血清 HBV RNA 在核苷類似物治療期間持續存在，其中包括 lamivudine 和 entecavir 的治療（第一組），但在相繼合併 lamivudine 和干擾素的治療（第二組）下得到了抑制。即便患者數量較少，兩組之間的差異仍十分明顯，顯示了干擾素對 HBV RNA 重要的抑制效果。血清 HBV RNA 值的下降不僅僅是 lamivudine 停用的結果，因為在第三組患者短期 lamivudine 治療停止後，血清 HBV RNA 仍可檢測到。在先接受 lamivudine 治療然後轉為傳統干擾素治療和先接受傳統干擾素治療然後轉為 lamivudine 治療的患者中都出現了血清 HBV RNA 的抑制。在後一類患者中，血清 HBV RNA 的抑制可能是因為干擾素的延後療效。

幾個之前的研究證明了合併 lamivudine 和干擾素的治療比 lamivudine 單一治療的效果要好。在本研究中，干擾素對接受 lamivudine 治療的患者血清 HBV RNA 的抑制效果也許可以解釋為什麼這些患者比接受 lamivudine 單一治療者有更高的持續治療反應率。

此研究的缺點就是第二組和第三組的患者人數太少。但由於這是一個對於接受各種治療方法血清 HBV RNA 差異性效果的初步研究，以及第二組和第三組患者接受的不是當前的標準治療方法，我們不打算再增加接受此治療方法的患者數量。但是，與我們的研究一致的是，我們未發表有關三位從一開始就同時接受長效型干擾素 (pegylated interferon) 合併 lamivudine 治療的患者也可以抑制血清 HBV RNA 值。在這三位患者中，血清 HBV RNA 值在同時合併治療的 12 至 24 週開始升高，而在治療的 48 至 72 週就檢測不到 (Huang et al., 未發表的資料)。

在接受核苷類似物治療的患者中血清 HBV RNA 的可偵測性可以從 B 型肝炎病毒-轉移感染的 HepG2.2.15 細胞株獲得體外資料來解釋。一項研究顯示經過 lamivudine 和其他核苷類似物治療後，在細胞溶解物中 B 型肝炎病毒特定的 RNA 沒有減少 (Doong et al. 1991)。我們未發表的資料也顯示，核苷類似物治療第 4 天起至所有細胞都死亡的第 17 天，上清液持續性可以檢測到 HBV RNA (Huang et al., 未發表的資料)。Lamivudine 和其他核苷類似物沒有影響到完整的 (integrated) HBV DNA，HBV RNA 被認為是從 integrated HBV DNA 轉錄而來 (Doong et al. 1991)。需要進一步研究以評估長期核苷類似物治療對於血清 HBV RNA 的效果。

干擾素- α 對於血清 HBV RNA 的抑制作用可以透過之前在基因轉殖鼠上的研究得到支持。通過注射單一劑量干擾素- α/β 誘導物聚肌苷酸-聚胞苷酸 (polyinosinic-polycytidylic acid; poly I:C 為類鐸受體-3 配位體)，肝內 B 型肝炎病毒複製的中間產物被清除了 (McClary et al. 2000)。據假設，干擾素的機轉包含 B 型肝炎病毒生命週期中轉錄後的步驟，所以肝內 B 型肝炎病毒複製的中間產物被清除，而穩定狀態的 HBV RNA 內容未受影響 (McClary et al. 2000)。同一組研究人員進一步證明，干擾素- α/β 的抑制效果是在內含前基因組 RNA 的外鞘體階段，作用於促進其降解或阻止其聚合 (Wieland et al. 2000)。干擾素可以直接抑制 B 型肝炎病毒合成或透過細胞免疫反應作用於 B 型肝炎病毒感染的肝細胞 (Thomas et al. 2003)。以干擾素- β 和干擾素- γ 抑制 B 型肝炎病毒在基因轉殖鼠的不死之肝細胞株上確認了非細胞毒性抑制的路徑 (Pasquetto et al. 2002)。這種抑制可透過 2',5'-低聚糖腺嘌呤合成酶 (oligoadenyl synthetase) / RNase L 路徑進行作用 (Lengyel 1981)。干擾素可誘導此多酶路徑，該路徑包括 2',5'-低聚糖腺嘌呤合成酶、內切核糖核酸酶 (endoribonuclease) RNase L 和 2',5'-低聚糖腺嘌呤磷酸二酯酶 (oligoadenyl phosphodiesterase)。這些酶中，RNase L 理論上可通過一個 RNA 中間步驟抑制所有病毒的複製 (Thomas et al. 2003)。而且，此核糖核酸酶 (ribonuclease) 的啟動被視為干擾素抑制病毒複製的主要動力 (Lengyel 1981)。



在目前的研究中，我們對血清 HBV DNA 和 RNA 進行頻繁的檢測，在某些情況中達到每兩週一次，以確定在單一治療或合併治療中血清 HBV DNA 和 RNA 的連續變化。我們的資料顯示，接受 entecavir 治療的血清 HBV RNA 最高值明顯高於接受 lamivudine 者 (8.6 ± 1.0 相較於 5.6 ± 1.0 ; $p < 0.001$)。相同的，接受 entecavir 治療患者的血清 HBV RNA 的可檢測性趨向於高過接受 lamivudine 者 (100% 相較於 71%; $p = 0.48$)。這些發現說明，血清 HBV RNA 值可反映核苷類似物的抗病毒效力 (Huang et al. 2009)。但還需要進一步的研究以闡明這有意思也是重要的議題。

雖然有一項研究表示 HBV RNA 在接受 lamivudine 治療前的 24 名患者的血清檢體中可以檢測到 (Rokuhara et al. 2006)，但此檢測率並未詳細說明。其蔗糖濃度梯度分級研究 (sucrose density gradient fractionation studies) 的結果表明在開始治療時，以含有 HBV DNA 的病毒粒子為主，而在治療後第 1 及第 2 個月，含有 HBV RNA 的病毒粒子變得較顯著。他們也同樣表明，在沒有治療的情形下，含有 HBV RNA 的病毒粒子僅占總 B 型肝炎病毒粒子的 1%。但是，這些特殊的粒子在 lamivudine 的治療中變為主要的部分 (Zhang et al. 2003)。他們因此總結出，在未使用 lamivudine 治療的患者中，HBV RNA 粒子的存在似乎佔 B 型肝炎所有病毒粒子的 $< 1\%$ (Gerelsaikhan et al. 1996)。相反的，我們的研究中，治療前檢測不到的 HBV RNA 與之前的報告相同，表明血清 HBV RNA 值在核苷類似物開始給藥後迅速上升 (Hatakeyama et al. 2007)。而且 B 型肝炎病毒-轉移感染的 HepG2.2.15 細胞株的體外資料 (Huang et al., 未發表的資料) 支持我們的發現，表明在接受核苷類似物治療前，HBV RNA 在上清液中沒有被檢測出，而在給藥後可以檢測得到。此外，研究發現在 lamivudine 治療期間，血清 HBV DNA 值比 HBV RNA 值下降更為明顯 (Rokuhara et al. 2006)，這也肯定了我們的發現。

在第三組患者接受短期 lamivudine 治療中斷後，血清 HBV RNA 仍然是可以檢測得到。這個發現顯示，雖然新含有 HBV RNA 病毒粒子者在 lamivudine 停用後不再產生，但是在 lamivudine 治療期間含有 HBV RNA 的病毒粒子並沒有迅速

的被分解。上述之研究也表明，在 lamivudine 治療期間，血清 HBV DNA 比 RNA 下降更明顯 (Rokuhara et al. 2006)，也肯定了我們的發現，顯示核苷類似物對於血清含有 HBV RNA 病毒粒子之抑制效果不佳。不過，還是需要進一步的研究以證明含有 HBV RNA 之病毒粒子在血清中將存在多長的時間。

Lamivudine 和傳統干擾素的相繼合併治療後，血清 HBV DNA 值降低，但直到治療結束時仍然可以在所有患者中檢測得到。相反的，血清 HBV RNA 受到抑制，並在治療結束時檢測不到了。血清 HBV DNA 的持續存在是由於核苷類似物治療的終止，因此，缺少了藥物持續抑制的效果。轉換成干擾素治療使血清 HBV RNA 得到抑制，但干擾素對 HBV DNA 的抑制效果不如核苷類似物有效 (Dienstag 2008)。雖然沒有細胞內 RNA 和 DNA 北方和南方雜交的資料，我們和其他人的研究都肯定了檢測到血清 HBV RNA 的可能性。

慢性 B 型肝炎患者接受核苷類似物治療中，B 肝病毒數量以轉錄調解擴增與雜交保護分析法 (Transcription-mediated amplification and hybridization protection assay, TMA-HPA) 檢測和以 Amplicor B 型肝炎病毒監視測定 (HBV Monitor test)，所測得的結果不一致，是因為 TMA-HPA 使用 T7 RNA 聚合酶進行 RNA 轉錄及擴增轉錄產物 (Kamisango et al. 1999)，因此同時檢測 B 肝病毒 DNA 與 B 肝病毒 RNA 兩者。藉由實時反轉錄聚合酶連鎖反應所偵測到的 B 肝病毒核酸相似於藉由 TMA-HPA 所偵測的 (Hatakeyama et al. 2007)。所以，兩個方法之間的測量差異可能是由於存在大量的 B 肝病毒 RNA。存在大量的 B 肝病毒 RNA 可能象徵這些患者的病毒轉錄和病毒顆粒之形成仍然活躍。

接受 lamivudine 治療的患者血清中存在 B 肝病毒 RNA 曾被報告過 (Zhang et al. 2003)。在之前的研究中，作者主要分析他們假定會從完整基因組被轉錄出的截短 (truncated) B 肝病毒 RNA (Su et al. 2001; Zhang et al. 2003)。他們展示在 lamivudine 療程中，B 肝病毒 DNA 和被截短的 B 肝病毒 RNA 之間的巨大差異，而 RNA 並不會降低。我們也藉由實時聚合酶連鎖反應和實時反轉錄聚合酶連鎖反應偵測到 B 肝病毒 DNA 和 B 肝病毒核酸。由此兩種方法測定的值顯示出少於

一個對數的差異；此觀察表明血清中截短的 B 肝病毒 RNA 在我們研究中影響極小。

總而言之，干擾素可以抑制 lamivudine 治療時所偵測到的血清 HBV RNA。血清 HBV RNA 的持續存在是因為 HBV RNA 複製中間產物未受抑制的結果，這可能導致核苷類似物的治療必須長久或無限期。相反的，干擾素對 HBV RNA 複製中間產物的抑制可以加強核苷類似物抑制 B 型肝炎病毒複製之效果。

展望



第一章 免疫遺傳因子 HLA-DRB1 多形性與男性慢性 B 型肝炎的肝炎嚴重程度之相關性

目前幾乎所有人類白血球抗原多形性之報告，包括全基因組關聯性研究 (Genome Wide Association Study, GWAS)，都指出其與急性期 B 型肝炎病毒之清除或持續感染之相關性。臨床上重要的問題是哪些慢性 B 型肝炎病患有比較頻繁的肝炎，並且比較容易進展到肝硬化及肝癌，因而需要比較密切的追蹤，評估治療的時機。GWAS 所發現的單核苷酸多形性 (SNPs) 與慢性 B 肝之肝炎嚴重度並無顯著的相關 (Vermehren et al. 2012)。所以，GWAS 所得的結果無法運用在臨床上以預估慢性 B 肝病患的追蹤頻率或預測患者治療的起始時間及治療需求。我們的研究確認人類白血球抗原-DRB1 多形性與慢性 B 肝之肝炎嚴重度有相關。了解影響慢性 B 型肝炎臨床表現及預後之免疫遺傳因子，將有助於訂出臨床上實用、有效及符合經濟效益之追蹤及治療政策。

HLA-DRB1*11 及 DQB1*0301 對 C 肝病毒感染有保護性，而且與慢性 B 型肝炎感染也有相關。這兩個對偶基因對 B 型及 C 型肝炎病毒感染的不同影響可能是因為病毒特定性抗原呈現的變異，進而引起免疫反應的差異。研究 HLA-DRB1*11 清除 C 型肝炎病毒相關的分子機轉將對此對偶基因有更深入地了解。發覺 HLA-DRB1*11 限定之 CD8⁺細胞的 C 型肝炎病毒抗原表位 (epitope) 將可以找出或設計 B 型肝炎病毒相似的特定性抗原表位。研究免疫顯性的抗原表位可以找出 HLA 限定的特定性呈現，進而發展 HLA 特定性疫苗及以胜肽為基礎的免疫治療。

最近報告指出條件式配位體 (conditional ligands)，可以大量產出第一型 HLA 資料庫 (libraries)，此 HLA 資料庫呈現經過修飾的胜肽 (Chang et al. 2013)。要

監測細胞免疫反應需要解開它們的異質性 (heterogeneity)，這是各種診斷和治療應用的基礎。條件式配位體是結合 MHC 為基礎的多聚體陣列 (MHC-based multimer arrays) 之使用與抗原特异性 T 細胞經過大量產出之流式細胞儀分析，因為它們允許透過胜肽交換方法快速合成獨特的 MHC 分子。更改特异性之 HLA 四聚體 (tetramers) 可以偵測抗原特異之 CD8+ T 細胞對於 B 型肝炎病毒之反應。大多數的抗原特定的 T 細胞反應，相較於現行的抗原決定部位預測法，更容易的被無偏見之發現方法偵測出。此技術是否可以運用在第二型人類白血球抗原上還需進一步研究。

人類白血球抗原會影響到宿主對病毒感染後之疾病表現。病毒在感染人體之後也會對宿主免疫反應產生影響，甚至對宿主免疫遺傳因子產生效果。就如報告指出幾乎所有的病毒感染都引發第一型干擾素的生產，透過細胞內蛋白調解其抗病毒活性，並且抑制轉譯及調節人類白血球抗原 (Stark et al. 1998)。因此，宿主免疫遺傳與病毒感染有著相互作用的影響，這也造成不同種族與地區對於各種病毒感染有不同的易感性和抵抗性。

宿主與病毒之交互作用所產生的慢性病毒性感染，依賴細胞性免疫反應，後者受宿主 HLA 類型和 HLA 限定的病毒突變脫逃之調節。有關 CD8 抗原表位 (epitope) 或自然毒殺細胞在不同種族中個體慢性感染的參與，及其 HLA 關聯性還需更多研究。HLA 與疾病預後的關聯性資料提供了設計宿主特异性治療策略無限的希望。慢性 B 型肝炎之 HLA 型態可能影響整體的 T 細胞反應及其反應的階層 (Singh et al. 2007)。未來 HLA 之研究方向包括協作性的分析幾個宿主免疫調節基因如 T 細胞功能之變異。

第二章 維生素 D 免疫受體基因多形性與慢性 B 肝的肝炎急性發作、e 抗原情況以及肝細胞癌產生之相關性

由於蛋白質序列的變異可能會導致截然不同的功能及效果，例如配位體的親和力或結合到 DNA 上的變化。因此，似乎多形性變異及群體變異比較容易存在於調控表現量的基因區域，如 5 端啟動子區和 3 端 UTR 區。一旦我們知道哪些基因多形性存在於某個候選基因區域，接著重要的事情就是要了解它們是如何相互關聯。這個了解包括在遺傳的觀念上以及在生物功能的觀念上。在遺傳的觀念上，我們需要藉由研究多個多形性之間的關連而知道哪些對偶基因相互連結。在生物功能的觀念上，我們必須確定整個候選基因上，某些對偶基因組合如何強化或減弱基因功能的特定效果。

我們可以假設比較“舊”的多形性顯示出不同種族之間少數的變異，而比較“新”的多形性可能展示大量的變異。為了解釋基因多形性與疾病臨床表現之相關性，我們可以假設個人功能性的多形性應該在不同種族中擁有相同的功能性效果，因為維生素 D 的免疫生理角色在種族間沒有很大的差異。雖然如此，因著此基因頻率在種族之間的差異，個人之基因多形性將大略解釋群體之變異。這也是解釋生態學研究上的基礎，進行橫越種族對偶基因頻率與疾病或臨床表現在種族族群之間不同發生率之關聯性研究。對於非功能性或不知名的基因多形性，情況就不同，因為這時我們依靠多形性中發現的連鎖不平衡來解釋它與疾病的關聯。

Bsm-Apa-Taq 單模式種 (haplotype) 這些標記單模式種 (marker haplotypes) 之頻率在種族之間非常不同。標記單模式種意指含有非功能性之多形性是其位置真正功能性對偶基因 (allele) 的標記。更重要的是，與個別單模式種相關聯的特定對偶基因很可能非常不同。例如，某單模式種被發現與亞洲人以及非洲人相關聯，這可能是因為與一個完全不同的功能性對偶基因之連鎖 (linkage) 關係。另外一個例子，如果一個標記單模式種 (marker haplotype) 之關聯是在亞洲人被發現而沒有在白種人中發現，這個解釋是因為標記與功能性對偶基因之間的連鎖不平衡在種族之間是不同的。這進一步強調必須建構不同種族之橫跨維生素 D 受體的單模式種圖譜 (haplotype map)。

已知維生素 D 受體基因的 3' 端 UTR 參與基因表現的調節，特別是透過 mRNA 穩定性的調節。Morrison 等人證實兩個 3' 端 UTR 變異之區別性螢光素活性 (differential luciferase activity) 相連於兩個最常見的 haplotypes，就是 “baT” 及 “BAat” (Morrison et al. 1994)。Durrin 等人展示 UTR 中的特定部位，稱為去穩定部份 (destabilizing elements)，參與決定維生素 D 受體-mRNA 之穩定度 (Durrin et al. 1999)。雖然如此，他們沒有發現那一個與 UTR 連結的 “baT” 或 “BAat” haplotype，而無法依 mRNA 之穩定度區分 (Durrin et al. 1999)。因著已知 3' 端 UTR 展示特定細胞型態 (cell-type-specific) 對於 mRNA 穩定度之影響，因此有必要顯示 UTR 上序列變異之功能性。雖然假設 mRNA 穩定度的差異可能構成 allelic 差異的基礎，還需進一步研究其他的解釋。

種族對偶基因變異之結果並未完全清楚。其中的因素包括種族之間差異相當大的環境因素如飲食。另外，種族之間的基因背景也相當不同。這基因背景包括基因組之其他部份及其所含的基因變異。維生素 D 受體基因多形性彼此之間有交互作用，而且與其他部位基因之基因變異也會交互作用。所以，在不同種族中定義出維生素 D 受體基因多形性之單模式種構造是重要的。這會展示出哪一個維生素 D 受體 allele 在特定的 haplotypes 中同時出現，以及他們在不同種族中的頻率如何。進一步，我們可以透過種族之間環境因素差異的資料一起了解基因環境相關的交互作用。

我們可以進一步分析多個生物反應參數，包括體外細胞生物及分子生物研究，體內生物化學參數的測定以及對維生素 D 治療的反應。另外，基因多形性的功能可以在不同層面測定，包括在 mRNA、蛋白及細胞層面等。最理想的情況，基因多形性在所有這些層面中顯示出與 allele 效果相同方向的結論，這樣就可以在分子層面的機轉與族群層面的流行病學中發現連結。

評估維生素 D 受體多形性之功能是富挑戰及高標準的。我們需要找出維生素 D 受體基因之分析與維生素 D 作用之分子機轉及細胞特定性知識的協同作用。對於維生素 D 受體基因多形性之分子及功能性結果的認識，並且完全了解

它之意義及潛在臨床運用是非常重要的。

維生素 D 免疫受體基因多形性可以影響基因之轉錄，進而改變合成維生素 D 的能力，這將影響疾病的易感性或抵抗性 (Bornman et al. 2004; Liu et al. 2006)。類鐸受體活化人類巨噬細胞可以調升維生素 D 受體及維生素 D-1-羥化酶基因的表現量，進而誘導抗微生物肽 cathelicidin 及細胞內結核菌之毒殺 (Liu et al. 2006)。類鐸受體與維生素 D 受體在慢性 B 型肝炎病毒感染之交互影響有待進一步研究。

第三章 慢性 B 型肝炎病患週邊血液單核球細胞和肝臟細胞上先天免疫類鐸受體-3 之表現量，並且其與免疫調節藥物長效型干擾素治療療效的研究

我們的研究顯示慢性 B 型肝炎病毒感染透過還未明之機轉抑制類鐸受體-3 在單核球及肝細胞上的表現量，並且使用藥物成功的抑制病毒後，類鐸受體-3 的表現量回升。此外，類鐸受體-3 和干擾素 beta 在慢性 B 型肝炎或相關的慢性肝衰竭急性惡化 (ACLF) 患者中之單核球分化的樹突細胞中表現量也降低 (Li et al. 2009)，類鐸受體-3 之基因變異也與慢性 B 型肝炎病毒感染及相關的慢性肝衰竭急性惡化有關 (Al-Qahtani et al. 2012; Rong et al. 2012)。因此，慢性 B 型肝炎感染可能透過影響類鐸受體-3 的受體量及基因之變異而達到持續感染狀態，甚至因著病患之免疫長期無法清除病毒而導致肝衰竭。研究也顯示恢復類鐸受體-3 活化的髓樣樹突細胞可以改善患者之自然殺手細胞功能 (Tjwa et al. 2012)。我們研究的貢獻在於發現慢性 B 型肝炎病毒感染抑制類鐸受體-3 在單核球及肝細胞上的表現量，並且確認免疫調節治療 (干擾素) 對於恢復類鐸受體-3 表現量之功效，優於核苷類似物。提升類鐸受體-3 表現量之藥物將有潛力改善慢性 B 型肝炎之治療療效及降低後續的併發症。

Ampligen，人造模擬類鐸受體-3 的激活劑 poly(I : C)，在 HIV 治療上已被探索 (Gowen et al. 2007)。臨床前研究顯示，poly(I : C) 另一種衍生物，poly ICLC

(Polyinosinic – Polycytidylic Acid stabilized with Polylysine and Carboxymethylcellulose)產生對一系列病毒的保護性免疫，包括流感，RSV 和 SARS (Wong et al. 2009)。PIKA (穩定的 poly(I:C) 衍生物)，另一個類鐸受體-3 激活劑，在流感大流行時已被提議作為一種可能的治療，因其有效抑制流感病毒之複製及具有強力輔助治療的效果 (Lau et al. 2009)。類鐸受體-3 和類鐸受體-9 激活劑對 HSV-2 顯示出有效的抗病毒反應 (Gill et al. 2006)。有趣的是，另一團隊表明，這種影響是依賴第三型干擾素的分泌，就像第一型干擾素之抗病毒活性 (Ank et al. 2008)。類鐸受體-3 的激活劑可能可以抑制 B 肝患者病毒之複製或具抗病毒效果，成為慢性 B 型肝炎之輔助治療。

病毒自然感染過程中，多個模式識別受體可能會與特定的病毒接合發生反應，在類鐸受體的情況也似乎是如此。一項研究中強調這些不同類鐸受體之間協同作用的重要性以提供抗病毒免疫反應(Sorensen et al. 2008)。他們發現，基因剔除小鼠在對抗 HSV-2 之免疫反應需要類鐸受體-2 和類鐸受體-9 共同作用。在類鐸受體-2/-9 雙基因剔除小鼠，全身性感染後誘導出的細胞激素被顯著影響，而單基因剔除小鼠只有部分受到影響。有趣的是，類鐸受體-2/-9 雙基因剔除小鼠在大腦中的病毒載量比單基因剔除或是對照組的小鼠增多。HSV 感染的樹突細胞也顯示了類似的發現 (Sato et al. 2006)。這種協同作用的另外一個例子發生在 MCMV 感染，顯示出類鐸受體-7 和類鐸受體-9 調控對此病毒漿細胞樣樹突細胞的反應，並且是第一次研究顯示，類鐸受體-7 可以對病毒 DNA 作出反應 (Zucchini et al. 2008)。在其他病毒感染的例子也很顯然的顯示類鐸受體與其他 PRRs 的協同作用以提供抗病毒之免疫反應。改良後之牛痘病毒安卡拉株 (Modified Vaccinia Ankara, MVA) 是目前正在開發防治 HIV/AIDS 的疫苗載體，並且先天免疫偵測這種病毒是以類鐸受體-2/-6、黑色素瘤分化相關基因-5 (MDA-5) 和 NALP3 發炎體之調控 (Delaloye et al. 2009)。我們研究的貢獻在於顯示類鐸受體-3 是慢性 B 型肝炎感染的模式識別受體之一，未來需要後續基礎及臨床之研究以確認其他模式識別受體在慢性 B 型肝炎之角色。

動物的 B 型肝炎病毒在感染之最初期，病毒並沒有到達肝臟，而是留在其他器官。土撥鼠之 B 肝病毒的縱向分析顯示感染最初的位置不在肝臟，而是在骨髓 (Coffin and Michalak 1999)。但是，比起人類的 B 肝病毒，土撥鼠 B 肝病毒的淋巴取向是比較顯著、廣泛及更有病理學上的重要性 (Coffin and Michalak 1999; Lew and Michalak 2001)。鴨子之 B 肝病毒最初在肝臟內皮細胞上可能被隱藏，以逃脫免疫的辨認 (Breiner et al. 2001)。動物之 B 肝病毒感染的證據支持最初感染之位置在肝以外的器官，這是一個很有趣的觀念，感染的位置影響著辨認此病毒的先天免疫細胞及其受體。在人類的 B 肝病毒感染還需進一步的研究來證實。

長效型干擾素治療時宿主對於治療療效所產生之反應，除了我們發現的先天免疫類鐸受體-3 表現量的變化以外，還可以從宿主所產生的一些免疫活性相關指標來預測治療的效果。如最近的報告指出治療前的干擾素-gamma 誘導蛋白-10 (interferon-gamma inducible protein-10) 可以預測療效 (Sonneveld et al. 2013)。我們研究的貢獻在於確認干擾素治療成功有效恢復類鐸受體-3 之表現量，而且是在治療開始時就立即有區別性的變化。隨著個案數之累積，可以使用類鐸受體-3 之表現量於預測干擾素之治療療效。

對於在不同病毒感染之後類鐸受體所調控的免疫反應之理解，已有很大的進展。然而，並非所有類鐸受體的訊息傳遞過程都被定義，這過程所需要之蛋白質的一些細節，以及它們是如何被調節的還需要更多的被揭露。病毒 - 類鐸受體交互作用之結果是複雜的，並且是依照特定的類鐸受體和病毒以及宿主之物種而定。就如，類鐸受體-3 在人類角質化細胞，提供牛痘病毒 (Vaccinia Virus, VACV) 感染時的保護性免疫 (Howell et al. 2006)。現在也發現至少對於一些病毒感染的免疫反應需要許多模式識別受體的參與。所有這些訊息如何在自然感染時被綜合是未知的。就類鐸受體訊息傳遞來說，在小鼠和人類的重要區別已被觀察到，因此，類鐸受體的治療將需要更完整的理解人類系統 (Bowie and Unterholzner 2008)。由於類鐸受體可以調控病毒感染後有害的免疫反應，應進一步研究揭示

控制類鐸受體訊息傳遞路徑之藥物標的，以期改善不同病毒感染的預後。某些藥物可能是根據已知的病毒對類鐸受體訊息傳遞之抑制反應。相反的，許多有潛力的類鐸受體激活劑，據報導有抗病毒活性，是有理由樂觀的認為這樣的策略可以被採用在病毒感染的治療或是可能作為疫苗之佐劑。

第四章 免疫調節藥物 (干擾素) 對於慢性 B 肝病患血清病毒核糖核酸 (HBV RNA) 的抑制效果

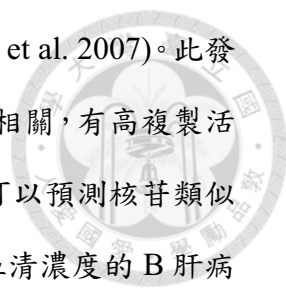
干擾素系統是先天免疫中不可缺乏的部份，它透過誘導對抗病毒生命週期之許多功能性蛋白及活化後天免疫而發揮立即的抗病毒反應 (Yu et al. 2010)。第一型的干擾素可以被類鐸受體或類 RIG-I 解旋酶 (RIG-I-like helicases) 調解之訊息傳遞路徑誘發。上游之路徑因著以下兩個不同的訊息而產生區別性：TRIF 對於類鐸受體-3 誘發的干擾素反應是必要的，而 IPS-1 在 RIG-I 誘發的干擾素反應是需要的。這個路徑在 TBK1 / IKK epsilon 會合，其可以磷酸化干擾素控制因子-3 (IRF3) 及 IRF7。後兩者是引起第一型干擾素重要的轉錄因子 (Takeuchi and Akira 2009)。

B 型肝炎病毒的複製可以有效的被 alpha 及 beta 干擾素限制 (McClary et al. 2000; Wieland et al. 2000)。B 型肝炎病毒可能已發展出脫離宿主最初的抗病毒機制，這是由類鐸受體或其他模式識別受體活化的。慢性 B 型肝炎病毒感染的情況下，雖然 B 型肝炎病毒在核殼體內顆粒複製，但是其 RNA 複製中間產物無法有效的活化第一型干擾素基因。在一部份的患者中，為了有效的控制或清除病毒，必須依賴從體外給予的干擾素。

失敗的清除 B 型肝炎及其他病毒感染導致 T 細胞功能逐漸喪失。慢性病毒感染中病毒特异性 T 細胞反應之衰減，稱之為 '衰竭' (exhaustion)。這種衰竭首先喪失增殖和分泌 IL-2 能力，之後喪失腫瘤壞死因子之生產，最終喪失干擾素之生產 (Shin and Wherry 2007)。雖然已知此衰竭發生之事實，但是尚不清楚誘

導這種功能障礙的機制。在這些細胞中，一些抑制性受體似乎制定性的被調升。細胞程序性死亡-1 (Programmed cell death-1, PD-1) 是一個特性清楚的抑制性受體，在各種活化的免疫細胞中表現，包括在 T 細胞中，而且 PD-1 與其配位體細胞程序性死亡配位體-1 或-2 (Programmed cell death ligand-1, PD-L1 或 Programmed cell death ligand-2, PD-L2) 之間的交互作用抑制了 T 細胞的功能 (Barber et al. 2006)。B 型肝炎及其他病毒感染時，CD8+ T 細胞持續性表現 PD-1 (Rouse and Sehrawat 2010)。毒殺 T 細胞相關蛋白 4 (CTL-associated protein 4, CTLA-4) 是另一個協同抑制的受體，在 B 型肝炎及其他病毒感染時與 PD-1 配合作用促使 T 細胞衰竭 (exhaustion) (Kaufmann et al. 2007; Neumann-Haefelin et al. 2006; Schurich et al. 2011)。在活化的 CD4+ T 細胞，CTLA-4 表現被調升，並與 CD80/CD86 結合，並且透過減少 IL-2 的生產和制止細胞週期進展來抑制 T 細胞的活化 (Kaufmann et al. 2007)。小鼠的研究證明，在病毒特异性 CD8+ T 細胞上，一些抑制性受體制定性的被調升，如 2B4、LAG-3 和 CD160 (Blackburn et al. 2009)。顯然地，細胞衰竭的越嚴重，它們表現越多的抑制分子。這些數據表明，阻斷多個抑制分子可能比單一阻斷 PD-1 路徑更有效地恢復毒殺 T 細胞反應。所以，除了體外給予干擾素治療外，阻斷多個抑制分子是未來有潛力的免疫治療。但是必須小心的運用此種新的免疫療法，以避免不幸的自體免疫併發症。

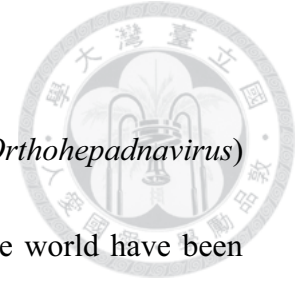
B 肝病毒感染人類肝細胞後，HBV 基因組被輸送到細胞核中，並且病毒一部分的基因組會嵌合到人類的染色體上。因此，完全根除 B 肝病毒是困難的。干擾素不會干擾 B 肝病毒之反轉錄反應，而是抑制 B 肝病毒在肝細胞中轉錄。我們的研究發現 B 肝病毒顆粒包含 B 肝病毒 RNA 顆粒，在核苷類似物治療下會從肝細胞被釋放出來，並且在血清中偵測到。在 B 肝病毒複製的過程中，在細胞質內，RNA 的前基因組被包覆到 B 肝病毒核心顆粒中，並且在核心顆粒中，所有的 RNA 前基因組反轉錄成正股的 DNA 基因組。然而，在核苷類似物治療中，核苷類似物因著強烈的干擾反轉錄酶，造成 B 肝病毒 RNA 顆粒過度累積在肝細胞內，而在沒有反轉錄的情況下就被釋放出來。之前的研究發現 B 肝病毒



RNA 顆粒的存在與發展成抗藥性病毒有顯著相關 (Hatakeyama et al. 2007)。此發現顯示 B 肝病毒 RNA 顆粒的存在可能與 B 肝病毒複製活性有相關，有高複製活性的病毒生產大量的 B 肝病毒 RNA。臨床上，B 肝病毒 RNA 可以預測核苷類似物治療停止後病毒復發的情形 (Tsuge et al. 2013)。另外，低血清濃度的 B 肝病毒 RNA 也可以預測核苷類似物治療時病毒早期被抑制的反應 (Huang et al. 2012c)。B 肝病毒 RNA 的臨床意義還需更多的研究來發現。

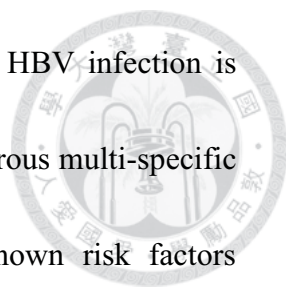
與單獨核苷類似物相比，干擾素合併核苷類似物有更好的治療療效 (Lau et al. 2005; Marcellin et al. 2004; Sarin et al. 2005)，這可能與核苷類似物有效抑制病毒反轉錄過程，而囤積及分泌至血清的 HBV RNA 被干擾素抑制有關。核苷類似物合併長效型干擾素治療有潛力成為未來治療慢性 B 型肝炎的模式。

論文英文簡述 (Summary)



Hepatitis B virus (HBV, Family *Hepadnaviridae*, Genus *Orthohepadnavirus*) infection is a global health problem. About 2 billion people in the world have been infected by HBV, and 400 million of them are chronic carriers of the virus (Kao and Chen 2002). Even in the United States where HBV infection is not endemic, an estimated 1.25 million individuals are carriers of HBV (McQuillan et al. 1989). HBV infection causes a wide spectrum of clinical manifestations, ranging from acute or fulminant hepatitis to various forms of chronic liver diseases, including inactive carrier states, chronic hepatitis, cirrhosis, and even hepatocellular carcinomas (Kao and Chen 2002; Chen 1993).

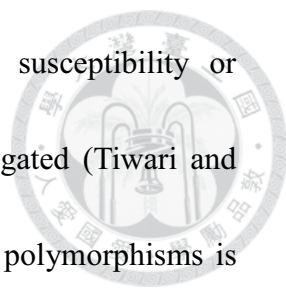
The natural history of carriers of HBV who are infected early in life (i.e. perinatal transmission) can be divided into four dynamic phases based on the virus-host interaction: immune tolerance phase, immune clearance phase, integration or low replication phase, and reactivation phase (Chen 1993). During the immune clearance phase, repeated hepatitis may accelerate the progression of chronic hepatitis to cirrhosis resulting in poor prognosis. HBV reactivation may also occur when the patients receiving chemotherapy or organ transplantation (Huang et al. 2006b; Huang and Chung 2012). Furthermore, the frequency and severity of hepatitis activity differ greatly among individual carriers of HBV.



It is generally believed that the liver injury associated with HBV infection is predominantly mediated through immune mechanisms such as vigorous multi-specific T cell responses (Kao and Chen 2002; Chisari 1997). The known risk factors associated with more severe liver diseases include: high serum HBV DNA level (Iloeje et al. 2006), older age or longer duration of infection, repeated hepatitis flares (Huo et al. 2000; Realdi et al. 1994), male gender, diabetes (Huo et al. 2000), persistence of HBeAg (Realdi et al. 1994), HBV genotype C infection (Kao et al. 2000), co-infection with hepatitis C (Liu et al. 2005) or delta virus (Tamura et al. 1993), pre-S deletion mutants (Chen et al. 2006), basal core promoter mutants (Lin et al. 2005), alcohol abuse, liver fat, and altered host's immune status, such as HIV infection or post transplantation (Kao 2007). *Which host immunogenetic factors and immune receptors correlate with hepatitis severity and HBeAg status in chronic hepatitis B (CHB) patients remain largely unclear.*

I. Immunogenetics in chronic hepatitis B (CHB): The association of HLA-DRB1 polymorphisms with hepatitis activity of male CHB patients

An important host factor which may correlate with severity of hepatitis is the human leukocyte antigen (HLA). HLA is a crucial host genetic factor that regulates immune responses by presenting antigens including viral peptides to T lymphocytes

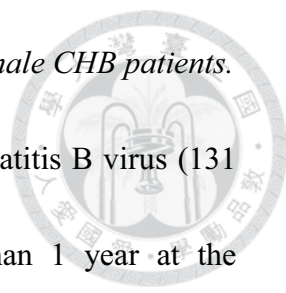


(Ceppellini et al. 1989). Although the association of disease susceptibility or resistance with HLA polymorphisms has been extensively investigated (Tiwari and Terasaki 1989), the association between HBV infection and HLA polymorphisms is only partially clarified. For example, specific HLA alleles are associated with clearance or persistence of HBV after acute infection (Forzani et al. 1984; Almarri and Batchelor 1994; Thursz et al. 1995; Hohler et al. 1997; Thio et al. 1999; Thio et al. 2003, Yang et al. 1989; Wu et al. 2004), such association has been linked to HLA-DRB1 polymorphisms, in both Western (Forzani et al. 1984; Almarri and Batchelor 1994; Thursz et al. 1995; Hohler et al. 1997; Thio et al. 1999; Thio et al. 2003) and Taiwanese populations (Yang et al. 1989; Wu et al. 2004).

Male gender is another apparent host factor associated with severity of hepatitis in perinatally transmitted carriers of HBV. A study reported that abnormal alanine aminotransferase (ALT) levels are much more frequent in male carriers of HBV than female carriers (Chu et al. 1983). In addition, an epidemiological study focusing on HBsAg seroprevalence also confirmed that subjects with chronic HBV infection are predominantly males (Chen et al. 2000).

Much less data are available on the association between HLA-DRB1 polymorphisms with severity of hepatitis in CHB patients, especially male subjects who have more severe hepatitis. The hypothesis of this study was that specific

HLA-DRB1 allele might be associated with severity of hepatitis in male CHB patients.

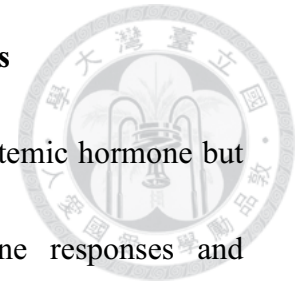


In this prospective cohort study, a total of 204 carriers of hepatitis B virus (131 men and 73 women) who have been followed-up for more than 1 year at the outpatient clinic of a university hospital were collected consecutively. Fifty carriers of hepatitis B virus (group I) with alanine aminotransferase < 2x upper limit of normal (mean follow-up 83.6 months) were compared with 154 chronic hepatitis B patients (group II) with alanine aminotransferase \geq 2x upper limit of normal (mean follow-up 81.3 months). Alleles of HLA - DRB1 were typed by polymerase chain reaction - sequence specific oligonucleotide probe hybridization and genotypes of hepatitis B virus by melting curve analysis. HLA - DRB1*1101 was found in 18% of group I versus 8% of group II in male carriers (OR 0.23, $p=0.020$, after adjustment for age) and 4% versus 9.4% in female carriers ($p=0.094$). In male carriers harboring DRB1*1101, the distribution of hepatitis B viral genotype was comparable between the two groups.

In conclusion, in Taiwanese Han ethnic group, HLA-DRB1*1101 correlates with less severe hepatitis in male carriers of HBV. Genotype of HBV has little impact on the clinical course of carriers of HBV harbouring DRB1*1101.

II. Immune receptor in CHB: The association of vitamin D receptor gene

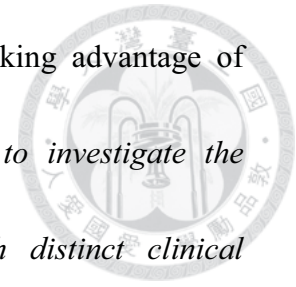
polymorphisms with distinct clinical phenotype of CHB patients



Vitamin D is involved in the metabolism of skeleton as a systemic hormone but also plays important roles in the regulation of host immune responses and development of cancer (Haussler et al. 1998). For example, vitamin D inhibits lymphocyte proliferation, stimulates monocyte differentiation, and exhibits anti-proliferation activities in several types of cancer cells (Uitterlinden et al. 2004). The active form of vitamin D, 1,25-dihydroxyvitamin D, exerts immunomodulatory effects via the vitamin D receptor (VDR) (Haussler et al. 1998), and high concentration of VDR is detected in the macrophages and T lymphocytes, especially CD8-positive lymphocytes (Veldman et al. 2000).

The VDR locus is located at chromosome 12q13.1 with a size of over 100 kb. Three adjacent restriction polymorphic sites in the VDR gene, the *BsmI* (rs1544410, A to G base change, designate as genotype B/B, B/b, b/b), *ApaI* (rs7975232, G to T base change, designate as genotype A/A, A/a, a/a), and *TaqI* (rs731236, T to C base change, designate as genotype T/T, T/t, t/t), have been reported and extensively studied in several diseases (Uitterlinden et al. 2004). Although VDR gene variant of genotype t/t was reported to be associated with HBV clearance and active form of vitamin D was shown to inhibit HCC cell proliferation in vitro and in vivo (Bellamy et al. 1999; Pourgholami et al. 2000), *the association of VDR gene polymorphisms with distinct*

clinical phenotypes of CHB patients remain largely unclear. Taking advantage of rampant HBV infection in Taiwan, the aim of this study is to investigate the association of vitamin D receptor gene polymorphisms with distinct clinical phenotypes of Taiwanese CHB patients as well as the risk of HCC development.



We genotyped *BsmI* (rs1544410), *ApaI* (rs7975232), and *TaqI* (rs731236) polymorphisms of VDR gene in 250 Taiwanese chronic HBV carriers, who were categorized into 6 phenotypes. After adjustment for age and sex, the frequencies of VDR B/b, B/a, B/T, B/a/T in patients with hepatitis flare(s) were lower than those without (7% vs. 20%, $p=0.01$; 1% vs. 9%, $p=0.007$; 3% vs. 10%, $p=0.01$; 1% vs. 9%, $p=0.007$; respectively), in contrast, b/A A/T, b/A/T were higher in flare(s) (47% vs. 33%, $p=0.04$; 49% vs. 34%, $p=0.005$; 46% vs. 33%, $p=0.046$; respectively). In addition, B/b, T/t, b/A, B/a, B/A, B/T, B/t, A/T, A/t, b/A/T, B/a/T, B/A/t were higher in patients positive for HBeAg. The distribution of VDR genotypes was comparable between patients with and without hepatoma.

In summary, these findings convincingly demonstrated the association of VDR genotype and haplotype polymorphisms with hepatitis flares and HBeAg positivity in Taiwanese HBV carriers.

III. Innate immune receptor in CHB: TLR3 expressions in PBMCs and liver cells

of CHB patients with its response to immunomodulation (interferon therapy)

In recent years, our understanding of innate immunity is much improved due to the discovery of pathogen-associated pattern recognition receptors, including the toll-like receptors (TLR). In transgenic mice models, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR9 but not TLR2 ligands binding inhibit HBV replication in an α/β interferon-dependent manner (Isogawa et al. 2005). In comparison with hepatitis B e-antigen (HBeAg) -negative patients, HBeAg-positive had a reduced expression of TLR2, but not TLR4, on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), hepatocytes, and Kupffer cells (Visvanathan et al. 2007).

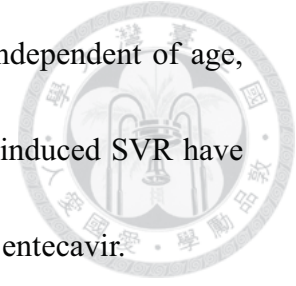
TLR3, 7, 8, and 9 are known to recognize nucleic acids of viruses, and human TLR3 has a significant homology with TLR7, 8, and 9 (Iwasaki and Medzhitov 2004). TLR3 is comprised of a huge ligand-binding ecto-domain, which localizes on plasma membrane or endosome (Ranjith-Kumar et al. 2007). Patients with mutations in TLR3 gene are associated with chronic cytomegalovirus disease including hepatitis and viremia (Nahum et al. 2011), influenza-associated encephalopathy (Hidaka et al. 2006), as well as herpes simplex virus (HSV) encephalitis (Zhang et al. 2007). Recurrences in two HSV encephalitis patients suggested the role of TLR3 in HSV latency (Bousfiha et al. 2010; Netea and van der Meer 2011). *Variants in TLR3 gene have been correlated with CHB and/or HBV-related acute or chronic liver failure*

(Al-Qahtani et al. 2012; Rong et al. 2012). Furthermore, TLR3 signaling may mediate adaptive immunity against viral infections (Schulz et al. 2005). In this study, we aimed to investigate the expression of TLR3 on PBMCs and liver cells of CHB patients and its response to immunomodulation (pegylated-interferon therapy).

We consecutively enrolled 127 CHB patients and 64 HBsAg-negative, anti-hepatitis C virus negative healthy individuals as controls. We compared the TLR3 expressions on fresh PBMCs and liver cells from patients and controls, before and during pegylated-interferon or nucleoside analogues therapy.

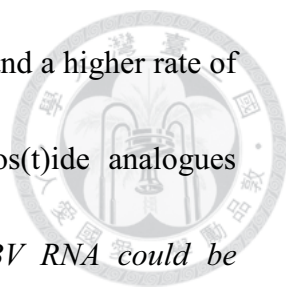
Compare to controls, patients had a lower TLR3 mean fluorescence intensity (MFI) on PBMCs (14.61 ± 13.49 versus 9.70 ± 4.61 , $p < 0.001$), independent of age, gender and ALT (-13.466 , 95% CI $-17.202 - -9.730$, $p < 0.001$). Patients had limited TLR3 stains on Kupffer cells, controls had diffuse stains on Kupffer and hepatocytes. Hepatic TLR3 mRNA was lower in patients than controls (0.47 ± 0.30 versus 1 fold). Using pre-treatment TLR3 MFI as referent, among five of 12 pegylated-interferon treated patients with sustained virological response (SVR), TLR3 MFI restored to a mean of 1.5 to 1.7 folds immediately after treatment. Among seven non-responders or relapsers, TLR3 MFI reduced to a mean of 0.5 to 0.7 fold. Among ten entecavir-treated patients with on-treatment virological response, TLR3 MFI gradually restored to a mean of 1.2 folds during 48-week therapy.

CHB patients have reduced TLR3 expressions on PBMCs, independent of age, gender, ALT and on liver cells. Patients with pegylated-interferon induced SVR have a more significant restoration of TLR3 expression than those under entecavir.



IV. Effect of immunomodulation (interferon therapy) on serum HBV RNA (HBV replicative intermediates)

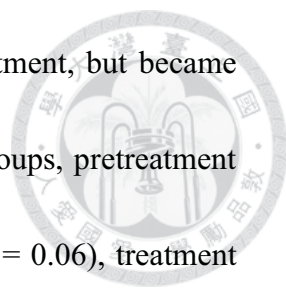
HBV is a unique DNA virus which replicates via pregenomic RNA. The steps in HBV replication include: 1. In the nucleus of infected hepatocytes, the asymmetric DNA in virions converts to covalently closed circular DNA (cccDNA); 2. cccDNA was transcribed to pregenomic RNA; 3. synthesis of minus strand of viral DNA by reverse transcriptase; 4. synthesis of plus strand to mature genomic DNA (Ganem et al. 1987). Both interferon and nucleos(t)ide analogues have been approved for the treatment of chronic hepatitis B (CHB). All of these agents have viral suppression effects, while interferon has additional immune modulatory properties (Lok and McMahon 2007). Lamivudine is the first approved nucleoside analogue, however, the development of resistant mutants are high (Huang et al. 2012a; Lok and McMahon 2007). Furthermore, it does not affect the integrated HBV DNAs and their transcripts, the RNA replicative intermediates (Doong et al. 1991). Thus, lamivudine as well as other nucleos(t)ide analogues need indefinite duration of therapy for continued viral



suppression. In contrast, interferon has a finite duration of therapy and a higher rate of hepatitis B surface antigen (HBsAg) seroclearance than nucleos(t)ide analogues (Dienstag 2008). Our study and others showed that *serum HBV RNA could be detected during lamivudine therapy as the consequence of unaffected RNA replicative intermediates* as well as interrupted reverse transcription (Hatakeyama et al. 2007; Huang et al. 2008b; Zhang et al. 2003).

Previous clinical trials indicated that *simultaneous combination therapy of interferon- α plus lamivudine leads to greater on-treatment viral suppression and higher sustained response rates than lamivudine monotherapy* (Dienstag 2008). However, the detectability and patterns of serum HBV RNA in patients receiving sequential combination therapy of interferon and lamivudine compared to those with lamivudine monotherapy remain largely unknown. *We thus explored the inhibitory effect of immunomodulation (interferon) on serum HBV RNA (HBV replicative intermediates) in CHB patients.*

HBV DNA and RNA were quantified by reverse transcription of HBV nucleic acid extract and real-time PCR every 2 weeks to 3 months in 10 male patients treated with nucleoside analogue monotherapy for 44 to 48 weeks (5 with lamivudine and 5 with entecavir), 6 males with sequential interferon and lamivudine combination therapy, and 3 males with lamivudine monotherapy for 20 to 24 weeks.



HBV RNA was not detectable in all patients before any treatment, but became detectable in 15 during antiviral treatments. Among these three groups, pretreatment HBV DNA (8.1 ± 2.4 vs. 7.7 ± 1.4 vs. 5.1 ± 0.3 log copies/mL, $p = 0.06$), treatment and follow-up durations (45.5 ± 2.0 vs. 49.7 ± 5.6 vs. 48.7 ± 6.4 weeks, $p = 0.32$) were comparable. HBV RNA was detectable at the end of treatment or follow-up in all patients with monotherapy, but none in those with sequential combination therapy (100% vs. 0%, $p < 0.001$).

In conclusion, compared to lamivudine therapy with detectable serum HBV RNA in patients with chronic HBV infection, interferon treatment (immunomodulation) may reduce HBV DNA replication through the inhibition of HBV RNA replicative intermediates, resulting in the loss of serum HBV RNA.

參考文獻



黃奕文、高嘉宏。人類白血球抗原多形性與 B 型肝炎病毒感染臨床病程之相關性。當代醫學中華民國九十七年五月十五日第三十五卷第五期第 344-350 頁。

Abe T, Kaname Y, Hamamoto I, *et al.* Hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates the toll-like receptor-MyD88-dependent signalling pathway in macrophage cell lines. *J Virol* 2007;81:8953-8966.

Almarri A, Batchelor JR. HLA and hepatitis B infection. *Lancet* 1994;344:1194-1195.

Al-Qahtani A, Al-Ahdal M, Abdo A, *et al.* Toll-like receptor 3 polymorphism and its association with hepatitis B virus infection in Saudi Arabian patients. *J Med Virol* 2012;84:1353-1359.

An P, Winkler C, Guan L, *et al.* A common HLA-DPA1 variant is a major determinant of hepatitis B virus clearance in Han Chinese. *J Infect Dis* 2011;203:943-947.

Ank N, Iversen MB, Bartholdy C, *et al.* An important role for type III interferon (IFN-lambda/IL-28) in TLR-induced antiviral activity. *J Immunol* 2008;180:2474-2485.

Baker AR, McDonnell DP, Hughes M, *et al.* Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1988;85:3294-3298.

Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T

cells during chronic viral infection. *Nature* 2006;439:682-687.



Barrett JC, Fry B, Maller J, *et al.* Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005;21:263-265.

Barton GM, Kagan JC. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol* 2009;9:535-542.

Beckebaum S, Cicinnati VR, Dworacki G, *et al.* Reduction in the circulating pDC1/pDC2 ratio and impaired function of ex vivo-generated DC1 in chronic hepatitis B infection. *Clin Immunol* 2002;104:138-150.

Beckebaum S, Cicinnati VR, Zhang X, *et al.* 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* 2003;109:487-95.

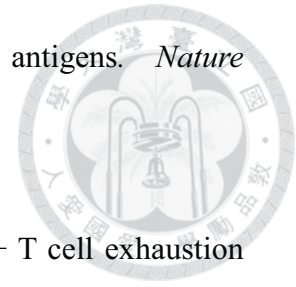
Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, *et al.* Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene. *J Infect Dis* 1999;179:721-724.

Benichou G, Takizawa PA, Ho PT, *et al.* Immunogenicity and tolerogenicity of self-major histocompatibility complex peptides. *J Exp Med* 1990;172:1341-1346.

Betts MR, Nason MC, West SM, *et al.* HIV non-progressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8⁺ T cells. *Blood* 2006;107:4781-4789.

Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, *et al.* The foreign antigen binding site and T

cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 1987;329:512-518.



Blackburn SD, Shin H, Haining WN, *et al.* Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol* 2009;10:29-37.

Bornman L, Campbell SJ, Fielding K, *et al.* Vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in West Africa: a case-control and family study. *J Infect Dis* 2004;190:1631-1641.

Bousfiha A, Picard C, Boisson-Dupuis S, *et al.* Primary immunodeficiencies of protective immunity to primary infections. *Clin Immunol* 2010;135:204-209.

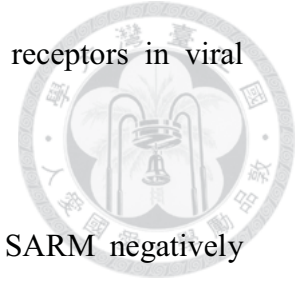
Bowie AG, Unterholzner L. Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2008;8:911-922.

Breiner KM, Schaller H, Knolle PA. Endothelial cell-mediated uptake of a hepatitis B virus: a new concept of liver targeting of hepatotropic microorganisms. *Hepatology* 2001;34:803-808.

Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005;42:1208-1236.

Campbell RD, Trowsdale J. Map of the human MHC. *Immunol Today* 1993;14:349-352.

Carty M, Bowie AG. Recent insights into the role of Toll-like receptors in viral infection. *Clin Exp Immunol* 2010;161:397-406.



Carty M, Goodbody R, Schroder M, *et al.* The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signalling. *Nat Immunol* 2006;7:1074-1081.

CDC. Hepatitis B virus: a comprehensive strategy for limiting transmission in the United States through universal childhood vaccination. Recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee (ACIP). *MMWR* 1991;40:RR-13:1-25.

Cepellini R, Frumento G, Ferrara GB, *et al.* Binding of labeled influenza matrix peptide to HLA DR in living B lymphoid cells. *Nature* 1989;339:392-394.

Chang CX, Tan AT, Or MY, *et al.* Conditional ligands for Asian HLA variants facilitate the definition of CD8(+) T-cell responses in acute and chronic viral diseases. *Eur J Immunol* 2013;43:1109-1120.

Chen BF, Liu CJ, Jow GM, *et al.* High prevalence and mapping of pre-S deletion in hepatitis B virus carriers with progressive liver diseases. *Gastroenterology* 2006;130:1153-1168.

Chen CJ, Wang LY, Yu MW. Epidemiology of hepatitis B virus infection in the Asia-Pacific region. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(Suppl):E3-E6.

Chen DS. From hepatitis to hepatoma: lessons from type B viral hepatitis. *Science* 1993;262:369-370.



Chen Z, Cheng Y, Xu Y, *et al.* Expression profiles and function of Toll-like receptors 2 and 4 in peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B patients. *Clin Immunol* 2008;128:400-408.

Cheng HR, Liu CJ, Tseng TC, *et al.* Host genetic factors affecting spontaneous HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B patients. *PLoS One* 2013;8:e53008.

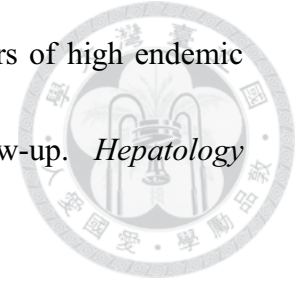
Chew V, Tow C, Huang C, *et al.* Toll-like receptor 3 expressing tumor parenchyma and infiltrating natural killer cells in hepatocellular carcinoma patients. *J Natl Cancer Inst* 2012;104:1796-1807.

Chisari FV. Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J Clin Invest* 1997;99:1472-1477.

Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995;13:29-60.

Chu CM. Natural history of chronic hepatitis B virus infection in adults with emphasis on the occurrence of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(Suppl):E25-30.

Chu CM, Hung SJ, Lin J, *et al.* Natural history of hepatitis B e antigen to antibody seroconversion in patients with normal serum aminotransferase levels. *Am J Med* 2004;116:829-834.



Chu CM, Liaw YF. HBsAg seroclearance in asymptomatic carriers of high endemic areas: Appreciably high rates during a long-term follow-up. *Hepatology* 2007a;45:1187-1192.

Chu CM, Liaw YF. Predictive factors for reactivation of hepatitis B following hepatitis B e antigen seroconversion in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2007b;133:1458-1465.

Chu CM, Liaw YF, Sheen IS, *et al.* Sex difference in chronic hepatitis B virus infection: an appraisal based on the status of hepatitis B e antigen and antibody. *Hepatology* 1983;3:947-950.

Coffin CS, Michalak TI. Persistence of infectious hepadnavirus in the offspring of woodchuck mothers recovered from viral hepatitis. *J Clin Invest* 1999;104:203-212.

Cramp ME, Carucci P, Underhill J, *et al.* Association between HLA class II genotype and spontaneous clearance of hepatitis C viraemia. *J Hepatol* 1998;29:207-213.

Dalhoff K, Dancey J, Astrup L, *et al.* A phase II study of the vitamin D analogue Seocalcitol in patients with inoperable hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2003;89:252-257.

Delaloye J, Roger T, Steiner-Tardivel QG, *et al.* Innate immune sensing of modified vaccinia virus Ankara (MVA) is mediated by TLR2-TLR6, MDA-5 and the

NALP3 inflammasome. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000480.

Dienstag JL. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 2008;359:1486-1500.

Doong SL, Tsai CH, Schinazi RF, *et al.* Inhibition of the replication of hepatitis B virus in vitro by 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine and related analogues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:8495-8499.

Durrin LK, Haile RW, Ingles SA, *et al.* Vitamin D receptor 3'-untranslated region polymorphisms: lack of effect on mRNA stability. *Biochem Biophys Acta* 1999;1453:311-320.

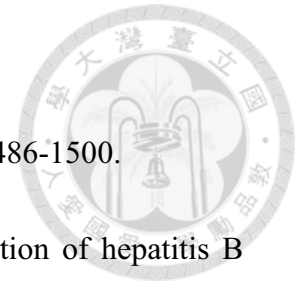
Elahi S, Horton H. Association of HLA-alleles with the immune regulation of chronic viral infections. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44:1361-1365.

Forzani B, Actis GC, Verme G, *et al.* HLA-DR antigens in HBsAg-positive chronic active liver disease with and without associated delta infection. *Hepatology* 1984;4:1107-1110.

Foster GR, Ackrill AM, Goldin RD, *et al.* Expression of the terminal protein region of hepatitis B virus inhibits cellular responses to interferons alpha and gamma and double-stranded RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2888-2892.

Ganem D, Varmus HE. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Ann Rev Biochem* 1987;56:651-693.

Genesca M. Characterization of an effective CTL response against HIV and SIV



infections. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:103924.



Gerelsaikhan T, Tavis JE, Bruss V. Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis. *J Virol* 1996;70:4269-4274.

Gill N, Deacon PM, Lichty B, *et al.* Induction of innate immunity against herpes simplex virus type 2 infection via local delivery of Toll-like receptor ligands correlates with beta interferon production. *J Virol* 2006;80:9943-9950.

Gowen BB, Wong MH, Jung KH, *et al.* TLR3 is essential for the induction of protective immunity against Punta Toro Virus infection by the double-stranded RNA (dsRNA), poly(I:C12U), but not Poly(I:C): differential recognition of synthetic dsRNA molecules. *J Immunol* 2007;178:5200-5208.

Guo X, Zhang Y, Li J, *et al.* Strong influence of human leukocyte antigen (HLA)-DP gene variants on development of persistent chronic hepatitis B virus carriers in the Han Chinese population. *Hepatology* 2011;53:422-428.

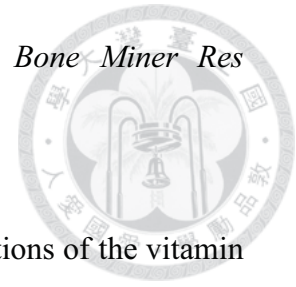
Hann HW, Hann RS, Maddrey WC. Hepatitis B virus infection in 6,130 unvaccinated Korean-Americans surveyed between 1988 and 1990. *Am J Gastroenterol* 2007;102:767-772.

Hatakeyama T, Noguchi C, Hiraga N, *et al.* Serum HBV RNA is a predictor of early emergence of the YMDD mutant in patients treated with lamivudine. *Hepatology* 2007;45:1179-1186.

Hattum JV, Schreuder GT, Schalm SW. HLA antigens in patients with various courses after hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1987;7:11-14.

Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, *et al.* The nuclear vitamin D receptor:

biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res* 1998;13:325-349.



Hayes CE, Nashold FE, Spach KM, *et al.* The immunological functions of the vitamin D endocrine system. *Cell Mol Biol* 2003;49:277-300.

Heiberg IL, Winther TN, Paludan SR, *et al.* Pattern recognition receptor responses in children with chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Virol* 2012;54:229-234.

Hidaka F, Matsuo S, Muta T, *et al.* A missense mutation of the Toll-like receptor 3 gene in a patient with influenza-associated encephalopathy. *Clin Immunol* 2006;119:188-194.

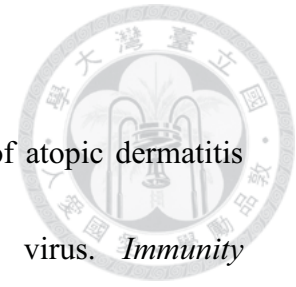
Hohler T, Gerken G, Notghi A, *et al.* HLA-DRB1*1301 and *1302 protect against chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1997;26:503-507.

Hohler T, Meyer CU, Notghi A, *et al.* The influence of major histocompatibility complex class II genes and T-cell V β repertoire on response to immunization with HBsAg. *Hum Immunol* 1998;59:212-218.

Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M *et al.* AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 2009;458:514-18.

Horton H, Frank I, Baydo R, *et al.* Preservation of T cell proliferation restricted by protective HLA alleles is critical for immune control of HIV-1 infection. *J*

Immunol 2006;177:7406-7415.



Howell MD, Gallo RL, Boguniewicz M, *et al.* Cytokine milieu of atopic dermatitis skin subverts the innate immune response to vaccinia virus. *Immunity* 2006;24:341-348.

Huang YW, Chayama K, Tsuge M, *et al.* Serum HBV RNA level reflects the potency of nucleos(t)ide analogue. *Hepatol Int* 2009;3:110. (Abstract)

Huang YW, Chung RT. Management of hepatitis B reactivation in patients receiving cancer chemotherapy. *Therap Adv Gastroenterol* 2012;5:359-370.

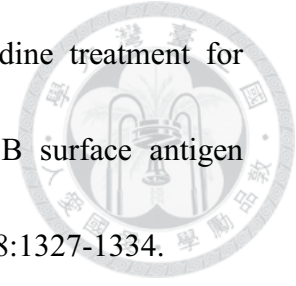
Huang YW, Hu JT, Chang HY, *et al.* Predictors of response in adefovir combination to lamivudine for lamivudine resistant HBeAg positive and negative chronic hepatitis B. *Hepatol Int* 2012a;6:134-135. (Abstract)

Huang YW, Hu JT, Hu FC, *et al.* Biphasic pattern of depression and its predictors during pegylated interferon-based therapy in chronic hepatitis B and C patients. *Antivir Ther* 2012b Oct 17. doi: 10.3851/IMP2441 (In press).

Huang YW, Lin CL, Chen PJ, *et al.* Higher cut-off index value of immunoglobulin M antibody to hepatitis B core antigen in Taiwanese patients with hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 2006a;21:859-862.

Huang YW, Lin CL, Chen PJ, *et al.* Hepatitis B viral genotype in Taiwanese patients with acute hepatitis B. *Hepato-Gastroenterology* 2008a;55:633-635.

Huang YW, Liu CJ, Lai MY, *et al.* Discontinuation of lamivudine treatment for hepatitis flare after kidney or heart transplant in hepatitis B surface antigen positive patients: a retrospective case series. *Clin Ther* 2006b;28:1327-1334.



Huang YW, Takahashi S, Tsuge M, *et al.* Presence of serum HBV RNA predicts initial virological response in nucleoside analogue treated chronic hepatitis B patients. *Hepatology* 2012c;56:422A (Abstract).

Huang YW, Tsuge M, Takahashi S, *et al.* Interferon inhibits HBV RNA detected during lamivudine therapy. *J Hepatol* 2008b;48:S244. (Abstract)

Huang YW, Wang TC, Hu JT, *et al.* Increased risk of cirrhosis in chronic hepatitis B patients who develop diabetes: A population-based study. *Hepatology* 2011;54:446A. (Abstract)

Huo T, Wu JC, Hwang SJ, *et al.* Factors predictive of liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis B: a multivariate analysis in a longitudinal study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:687-693.

Iloeje UH, Yang HI, Su J, *et al.* Risk Evaluation of Viral Load Elevation and Associated Liver Disease/Cancer-In HBV (the REVEAL-HBV) Study Group. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology* 2006;130:678-686.

Isogawa M, Robek MD, Furuichi Y, *et al.* Toll-like receptor signaling inhibits

hepatitis B virus replication in vivo. *J Virol* 2005;79:7269-72.

Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses.

Nat Immunol 2004;5:987-995.

Janeway CA, Jr. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* 1992;13:11-16.

Jiang YG, Wang YM, Liu TH, *et al.* Association between HLA class II gene and susceptibility or resistance to chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2003;9:2221-2225.

Kamatani Y, Wattanapokayakit S, Ochi H, *et al.* A genome-wide association study identifies variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B in Asians. *Nat Genet* 2009;41:591-5.

Kamisango K, Kamogawa C, Sumi M, *et al.* Quantitative detection of hepatitis B virus by transcription-mediated amplification and hybridization protection assay. *J Clin Microbiol* 1999;37:310-314.

Kao JH. Role of viral factors in the natural course and therapy of chronic hepatitis B. *Hepatol Int* 2007;1:415-430.

Kao JH, Chen DS. Overview of hepatitis B and C viruses. In: Goedert JJ, ed. *Infectious Causes of Cancer: Targets for Intervention. Totowa: Humana Press Inc.* 2000;313-330.

Kao JH, Chen DS. Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Infect Dis*



2002;2:395–403.

Kao JH, Chen PJ, Lai MY, *et al.* Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000;118:554-559.

Kao JH, Chen PJ, Lai MY, *et al.* Acute exacerbations of chronic hepatitis B are rarely associated with superinfection of hepatitis B virus. *Hepatology* 2001;34:817-823.

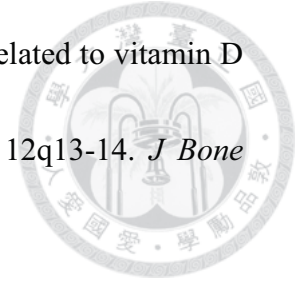
Kao JH, Chen PJ, Lai MY, *et al.* Genotypes and clinical phenotypes of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Microbiol* 2002;40:1207-1209.

Kaufmann DE, Kavanagh DG, Pereyra F, *et al.* Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4⁺ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat Immunol* 2007;8:1246-1254.

Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* 2009;21:317-337.

Kock J, Theilmann L, Galle P, *et al.* Hepatitis B virus nucleic acids associated with human peripheral blood mononuclear cells do not originate from replicating virus. *Hepatology* 1996;23:405-413.

Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;388:621-625.



Labuda M, Fujiwara TM, Ross MV, *et al.* Two hereditary defects related to vitamin D metabolism map to the same region of human chromosome 12q13-14. *J Bone Miner Res* 1992;7:1447-1453.

Lai Y, Yi G, Chen A, *et al.* Viral double-strand RNA-binding proteins can enhance innate immune signaling by Toll-like receptor 3. *PLoS One* 2011;6:e25837.

Lambotin M, Raghuraman S, Stoll-Keller F, *et al.* A look behind closed doors: interaction of persistent viruses with dendritic cells. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:350-360.

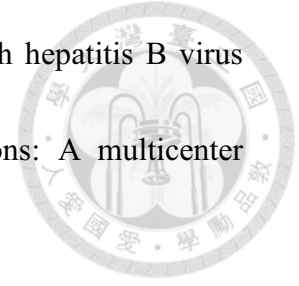
Lau GK, Piratvisuth T, Luo KX, *et al.* Peginterferon alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2005;352:2682-2695.

Lau YF, Tang LH, Ooi EE. A TLR3 ligand that exhibits potent inhibition of influenza virus replication and has strong adjuvant activity has the potential for dual applications in an influenza pandemic. *Vaccine* 2009;27:1354-1364.

Lee W. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997;337:1733-1745.

Lengyel P. Mechanisms of interferon action: the 2'5' A synthetase-RNase L pathway. In *Interferon 3*. Edited by I Gresser. New York: Academic Press 1981;pp. 77-99.

Lew YY, Michalak TI. In vitro and in vivo infectivity and pathogenicity of the lymphoid cell-derived woodchuck hepatitis virus. *J Virol* 2001;75:1770-1782.



Li J, Yang D, He Y, *et al.* Associations of HLA-DP variants with hepatitis B virus infection in Southern and Northern Han Chinese populations: A multicenter case-control study. *PLoS One* 2011;6:e24221.

Li JH, Chen DM, Li Z, *et al.* Study on association between vitamin D receptor gene polymorphisms and the outcomes of HBV infection. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2006a;23:402-405.

Li JH, Li HQ, Li Z, *et al.* Association of TaqI T/C and FokI C/T polymorphisms of vitamin D receptor gene with outcome of hepatitis B virus infection. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2006b;86:1952-1956.

Li K, Foy E, Ferreon JC, *et al.* Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:2992-2997.

Li N, Li Q, Qian Z, *et al.* Impaired TLR3/IFN-beta signaling in monocyte-derived dendritic cells from patients with acute-on-chronic hepatitis B liver failure: relevance to the severity of liver damage. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;390:630-635.

Liang TJ. Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology* 2009;49:S13-21.

Lin CL, Liao LY, Wang CS, *et al.* Basal core-promoter mutant of hepatitis B virus and progression of liver disease in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B.

Liver Int 2005;25:564-570.

Lin KW, Kirchner JT. Hepatitis B. *Am Fam Physician* 2004;69:75-82.

Liu CJ, Liou JM, Chen DS, *et al.* Natural course and treatment of dual hepatitis B virus and hepatitis C virus infections. *J Formos Med Assoc* 2005;104:783-791.

Liu PT, Stenger S, Li H, *et al.* Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006;311:1770-1773.

Lok ASF, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007;45:507-539.

Maloney G, Schroder M, Bowie AG. Vaccinia virus protein A52R activates p38 mitogen-activated protein kinase and potentiates lipopolysaccharide-induced interleukin-10. *J Biol Chem* 2005;280:30838-30844.

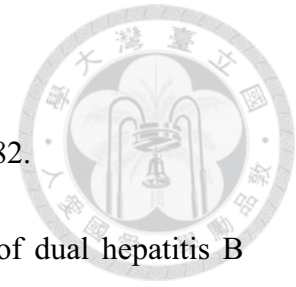
Marcellin P, Lau GK, Bonino F, *et al.* Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2004;351:1206-1217.

Martin MP, Carrington M. Immunogenetics of viral infections. *Curr Opin Immunol* 2005;17:510-516.

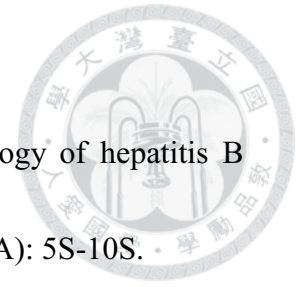
Matsumoto M, Seya T. TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:805-812.

Mbarek H, Ochi H, Urabe Y, *et al.* A genome-wide association study of chronic hepatitis B identified novel risk locus in a Japanese population. *Hum Mol Genet* 2011;20:3884-92.

McClary H, Koch R, Chisari FV, *et al.* Relative sensitivity of hepatitis B virus and other hepatotropic viruses to the antiviral effects of cytokines. *J Virol*



2000;74:2255-2264.



McQuillan GM, Townsend TR, Fields HA, *et al.* Seroepidemiology of hepatitis B virus infection in the United States. *Am J Med* 1989;87(suppl 3A): 5S-10S.

Migueles SA, Osborne CM, Royce C, *et al.* Lytic granule loading of CD8⁺ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity* 2008;29:1009-1021.

Milich DR, Wolf SF, Hughes JL, *et al.* Interleukin 12 suppresses autoantibody production by reversing helper T-cell phenotype in hepatitis B e antigen transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:6874-51.

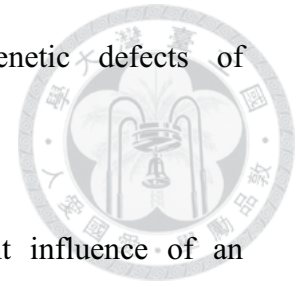
Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, *et al.* Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Mol Endocrinol* 1997;11:1165-1179.

Morrison NA, Qi JC, Tokita A, *et al.* Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994;367:284-287.

Mota AH, Fainboim H, Terg R, *et al.* Association of chronic active hepatitis and HLA B35 in patients with hepatitis B virus. *Tissue Antigens* 1987;30:238-240.

Nahum A, Dadi H, Bates A, *et al.* The L412F variant of Toll-like receptor 3 (TLR3) is associated with cutaneous candidiasis, increased susceptibility to cytomegalovirus, and autoimmunity. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:528-531.

Netea MG, van der Meer JW. Immunodeficiency and genetic defects of pattern-recognition receptors. *N Engl J Med* 2011;364:60-70.



Neumann-Haefelin C, McKiernan S, Ward S, *et al.* Dominant influence of an HLA-B27 restricted CD8+ T cell response in mediating HCV clearance and evolution. *Hepatology* 2006;43:563-572.

O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2007;7:353-364.

Pasquetto V, Wieland SF, Uprichard SL, *et al.* Cytokine-sensitive replication of hepatitis B virus in immortalized mouse hepatocyte cultures. *J Virol* 2002;76:5646-5653.

Penna A, Del Prete G, Cavalli A, *et al.* Predominant T-helper 1 cytokine profile of hepatitis B virus nucleocapsid-specific T cells in acute self-limited hepatitis B. *Hepatology* 1997;25:1022-1027.

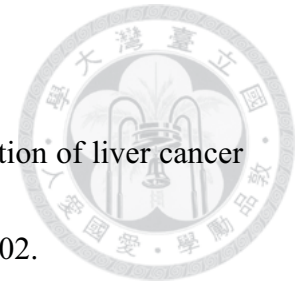
Poonia B, Pauza CD, Salvato MS. Role of the Fas/FasL pathway in HIV or SIV disease. *Retrovirology* 2009;6:91.

Porterfield JZ, Dhasan MS, Loeb DD, *et al.* Full-length hepatitis B virus core protein packages viral and heterologous RNA with similarly high levels of cooperativity. *J Virol* 2010;84:7174-7184.

Potter DM. A permutation test for inference in logistic regression with small- and

moderate-sized data sets. *Stat Med* 2005;24:693-708.

Pourgholami MH, Akhter J, Ku Y, *et al.* In vitro and in vivo inhibition of liver cancer cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Cancer Lett* 2000;151:97-102.



Pourgholami MH, Morris DL. 1,25-dihydroxyvitamin D3 in lipiodol for the treatment of hepatocellular carcinoma: cellular, animal and clinical studies. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;89-90:513-518.

Ranjith-Kumar CT, Miller W, Xiong J, *et al.* Biochemical and functional analyses of the human Toll-like receptor 3 ectodomain. *J Biol Chem* 2007;282:7668-7678.

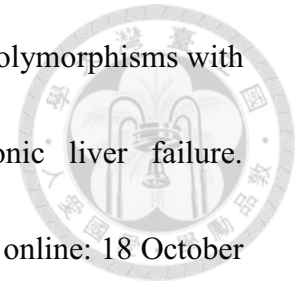
Realdi G, Fattovich G, Hadziyannis S, *et al.* Survival and prognostic factors in 366 patients with compensated cirrhosis type B: a multicenter study. *J Hepatol* 1994;21:656-666.

Riggs BL, Nguyen TV, Melton III LJ, *et al.* The contribution of vitamin D receptor gene alleles to the determination of bone mineral density in normal and osteoporotic woman. *J Bone Miner Res* 1995;10:991-996.

Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996;273:1516-1517.

Rokuhara A, Matsumoto A, Tanaka E, *et al.* Hepatitis B virus RNA is measurable in serum and can be a new marker for monitoring lamivudine therapy. *J Gastroenterol* 2006;41:785-790.

Rong Y, Song H, You S, *et al.* Association of Toll-like receptor 3 polymorphisms with chronic hepatitis B and hepatitis B-related acute-on-chronic liver failure. *Inflammation* 2012;doi:10.1007/s10753-012-9560-4. Published online: 18 October 2012.



Rouse BT, Sehrawat S. Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome? *Nat Rev Immunol* 2010;10:514-526.

Roy CR, Mocarski ES. Pathogen subversion of cell-intrinsic innate immunity. *Nat Immunol* 2007;8:1179-1187.

Saez-Cirion A, Lacabaratz C, Lambotte O, *et al.* HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection *ex vivo* and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:6776-6781.

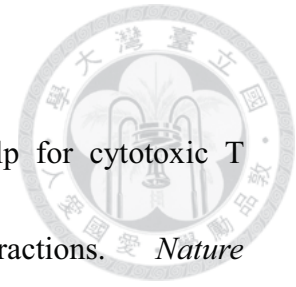
Sarin SK, Kumar M, Kumar R, *et al.* Higher efficacy of sequential therapy with interferon-alpha and lamivudine combination compared to lamivudine monotherapy in HBeAg positive chronic hepatitis B patients. *Am J Gastroenterol* 2005;100:2463-2471.

Sato A, Linehan MM, Iwasaki A. Dual recognition of herpes simplex viruses by TLR2 and TLR9 in dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:17343-17348.

Scharf JS, Griffith RL, Erlich HA. Rapid typing of DNA sequence polymorphism at the HLA-DRB1 locus using the polymerase chain reaction and nonradioactive

oligonucleotide probes. *Human Immunol* 1991;30:190-201.

Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, *et al.* T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 1998;393:480-483.



Schulz O, Diebold SS, Chen M, *et al.* Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* 2005;433:887-892.

Schurich A, Khanna P, Lopes AR, *et al.* Role of the coinhibitory receptor cytotoxic T lymphocyte antigen-4 on apoptosis-prone CD8T cells in persistent hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2011;53:1494-1503.

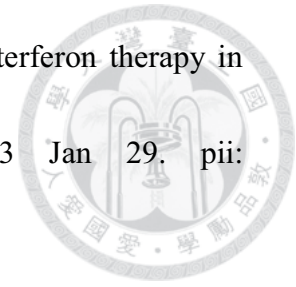
Shiffman ML, Stewart CA, Hofmann CM, *et al.* Chronic infection with hepatitis C virus in patients with elevated or persistently normal serum alanine aminotransferase levels: comparison of hepatic histology and response to interferon therapy. *J Infect Dis* 2000;182:1595-1601.

Shin H, Wherry EJ. CD8T cell dysfunction during chronic viral infection. *Curr Opin Immunol* 2007;19:408-415.

Singh R, Kaul R, Kaul A, *et al.* A comparative review of HLA associations with hepatitis B and C viral infections across global populations. *World J Gastroenterol* 2007;13:1770-1787.

Sonneveld MJ, Arends P, Boonstra A, *et al.* Serum levels of

interferon-gamma-inducible protein 10 and response to peginterferon therapy in HBeAg-positive chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2013 Jan 29. pii: S0168-8278(13)0076-7. doi: 10.1016/j.hep.2013.01.029.



Sorensen LN, Reinert LS, Malmgaard L, *et al.* TLR2 and TLR9 synergistically control herpes simplex virus infection in the brain. *J Immunol* 2008;181:8604-8612.

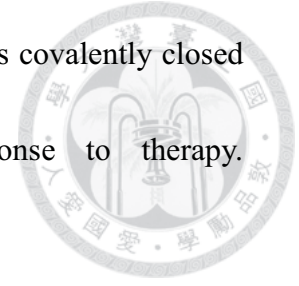
Stack J, Haga IR, Schroder M, *et al.* Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence. *J Exp Med* 2005;201:1007-1018.

Stark GR, Kerr IM, Williams BR, *et al.* How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 1998;67:227-264.

Stevens CE, Beasley RP, Tsui J, *et al.* Vertical transmission of hepatitis B antigen in Taiwan. *N Engl J Med* 1975;292:771-774.

Su Q, Wang SF, Chang TE, *et al.* Circulating hepatitis B virus nucleic acids in chronic infection: representation of differently polyadenylated viral transcripts during progression to nonreplicative stages. *Clin Cancer Res* 2001;7:2005-2015.

Suneetha PV, Sarin SK, Goyal A, *et al.* Association between vitamin D receptor, CCR5, TNF- α and TNF- β gene polymorphisms and HBV infection and severity of liver disease. *J Hepatol* 2006;44:856-863.



Sung JJ, Wong ML, Bowden S, *et al.* Intrahepatic hepatitis B virus covalently closed circular DNA can be a predictor of sustained response to therapy.

Gastroenterology 2005;128:1890-1897.

Takeuchi O, Akira S. Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev* 2009;227:75-86.

Tamura I, Kurimura O, Koda T, *et al.* Risk of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma in subjects with hepatitis B and delta virus infection: a study from Kure, Japan. *J Gastroenterol Hepatol* 1993;8:433-436.

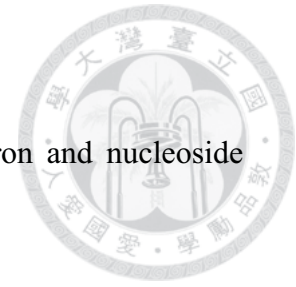
Tang TJ, Kwekkeboom J, Laman JD, *et al.* The role of intrahepatic immune effector cells in inflammatory liver injury and viral control during chronic hepatitis B infection. *J Viral Hepat* 2003;10:159-167.

Taymans SE, Pack S, Pak E, *et al.* The human vitamin D receptor gene (VDR) is localized to region 12cen-q12 by fluorescent in situ hybridization and radiation hybrid mapping: genetic and physical VDR map. *J Bone Miner Res* 1999;14:1163-1166.

Thio CL, Carrington M, Marti D, *et al.* Class II HLA alleles and hepatitis B virus persistence in African Americans. *J Infect Dis* 1999;179:1004-1006.

Thio CL, Thomas DL, Karacki P, *et al.* Comprehensive analysis of class I and class II HLA antigens and chronic hepatitis B virus infection. *J Virol*

2003;77:12083-12087.



Thomas H, Foster G, Platis D. Mechanisms of action of interferon and nucleoside analogues. *J Hepatol* 2003;39:S93-98.

Thursz M, Yallop R, Goldin R, *et al.* Influence of MHC class II genotype on outcome of infection with hepatitis C virus. The HENCORE group. Hepatitis C European Network for Cooperative Research. *Lancet* 1999;354:2119-2124.

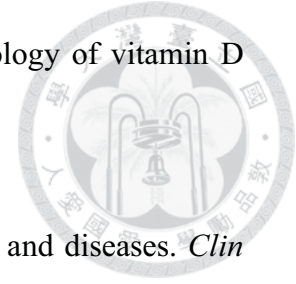
Thursz MR, Kwiatkowski D, Allsopp CEM, *et al.* Association between an MHC class II allele and clearance of hepatitis B virus in the Gambia. *N Engl J Med* 1995;332:1065-1069.

Tiwari JL, Terasaki PI. HLA and disease associations. Heidelberg, *Germany: Springer-Verlag* 1989;31-169.

Tjwa ET, van Oord GW, Biesta PJ, *et al.* Restoration of TLR3-activated myeloid dendritic cell activity leads to improved natural killer cell function in chronic hepatitis B virus infection. *J Virol* 2012;86:4102-4109.

Tsuge M, Murakami E, Imamura M, *et al.* Serum HBV RNA and HBeAg are useful markers for the safe discontinuation of nucleotide analogue treatments in chronic hepatitis B patients. *J Gastroenterol* 2013 Feb 9 [Epub ahead of print].

Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors and Type I interferons. *J Biol Chem* 2007;282:15319-15323.



Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JBJ, *et al.* Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 2004;338:143-156.

Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta* 2006;371:1-12.

van der Molen RG, Sprengers D, Binda RS, *et al.* Functional impairment of myeloid and plasmacytoid dendritic cells of patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2004;40:738-46.

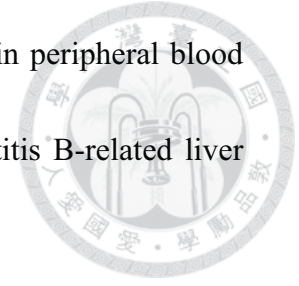
van Etten E, Mathieu C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃: basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;97:93-101.

van Hattum J, Schreuder GM, Schalm SW. HLA antigens in patients with various courses after hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1987;7:11-14.

Veldman CM, Cantorna MT, DeLuca HF. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in the immune system. *Arch Biochem Biophys* 2000;374:334-338.

Vermehren J, Lotsch J, Susser S, *et al.* A common HLA-DPA1 variant is associated with hepatitis B virus infection but fails to distinguish active from inactive Caucasian carriers. *PLoS One* 2012;7:e32605.

Visvanathan K, Skinner NA, Thompson AJV, *et al.* Regulation of Toll-like receptor-2 expression in chronic hepatitis B by the precore protein. *Hepatology* 2007;45:102-10.



Wang K, Liu H, He Y, *et al.* Correlation of TLR1-10 expression in peripheral blood mononuclear cells with chronic hepatitis B and chronic hepatitis B-related liver failure. *Hum Immunol* 2010;71:950-956.

Wang L, Wu XP, Zhang W, *et al.* Evaluation of genetic susceptibility loci for chronic hepatitis B in Chinese: two independent case-control studies. *PLoS One* 2011;6:e17608.

Wasley A, Miller JT, Finelli L. CDC. Surveillance for acute viral hepatitis—United States, 2005. *MMWR. Surveillance Summaries*. 2007;56:1-24.

Wieland SF, Guidotti LG, Chisari FV. Intrahepatic induction of alpha/beta interferon eliminates viral RNA-containing capsids in hepatitis B virus transgenic mice. *J Virol* 2000;74:4165-4173.

Woltman AM, Op den Brouw ML, Biesta PJ, *et al.* Hepatitis B virus lacks immune activating capacity, but actively inhibits plasmacytoid dendritic cell function. *PLoS One* 2011;6:e15324.

Wong DK, Yuen MF, Yuan H, *et al.* Quantification of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B patients. *Hepatology* 2004;40:727-737.

Wong JP, Christopher ME, Viswanathan S, *et al.* Antiviral role of toll-like receptor-3 agonists against seasonal and avian influenza viruses. *Curr Pharm Des*

2009;15:1269-1274.



Wu J, Lu M, Meng Z, *et al.* Toll-like receptor-mediated control of HBV replication by nonparenchymal liver cells in mice. *Hepatology* 2007;46:1769-1778.

Wu J, Meng Z, Jiang M, *et al.* Hepatitis B virus suppresses Toll-like receptor-mediated innate immune responses in murine parenchymal and nonparenchymal liver cells. *Hepatology* 2009;49:1132-1140.

Wu JF, Chen CH, Hsieh RP, *et al.* HLA typing associated with hepatitis B e antigen seroconversion in children with chronic hepatitis B virus infection: a long-term prospective sibling cohort study in Taiwan. *J Pediatr* 2006;148:647-651.

Wu YF, Wang LY, Lee TD, *et al.* HLA phenotypes and outcomes of hepatitis B virus infection in Taiwan. *J Med Virol* 2004;72:17-25.

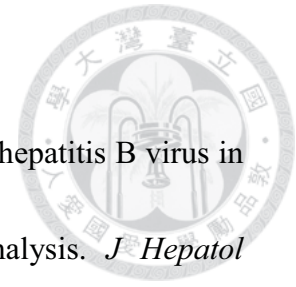
Xie Q, Shen HC, Jia NN, *et al.* Patients with chronic hepatitis B infection display deficiency of plasmacytoid dendritic cells with reduced expression of TLR9. *Microbes Infect* 2009;11:515-523.

Xu Y, Hu Y, Shi B, *et al.* HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN-alpha production in plasmacytoid dendritic cells. *Mol Immunol* 2009;46:2640-2646.

Yanai H, Savitsky D, Tamura T, *et al.* Regulation of the cytosolic DNA-sensing system in innate immunity: a current view. *Curr Opin Immunol* 2009;21:17-22.

Yang PM, Sung JL, Chen DS. HLA-A,B,C and DR antigens in chronic hepatitis B

viral infection. *Hepato-Gastroenterology* 1989;36:363-366.



Yeh SH, Tsai CY, Kao JH, *et al.* Quantification and genotyping of hepatitis B virus in a single reaction by real-time PCR and melting curve analysis. *J Hepatol* 2004;41:659-666.

Yokota S, Okabayashi T, Fujii N. The battle between virus and host: modulation of Toll-like receptor signaling pathways by virus infection. *Mediators Inflamm* 2010;2010:184328.

Yoneyama M, Fujita T. Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. *Rev Med Virol* 2010;20:4-22.

Yu S, Chen J, Wu M, *et al.* Hepatitis B virus polymerase inhibits RIG-I- and Toll-like receptor 3-mediated beta interferon induction in human hepatocytes through interference with interferon regulatory factor 3 activation and dampening of the interaction between TBK1/IKKepsilon and DDX3. *J Gen Virol* 2010;91:2080-2090.

Yu YS, Tang ZH, Han JC, *et al.* Expression of ICAM-I, HLA-DR, and CD80 on peripheral circulating CD1 alpha DCs induced in vivo by IFN-alpha in patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2006;12:1447-1451.

Yuen MF, Wong DK, Sum SS, *et al.* Effect of lamivudine therapy on the serum covalently closed-circular (ccc) DNA of chronic hepatitis B infection. *Am J*

Gastroenterol 2005;100:1099-1103.

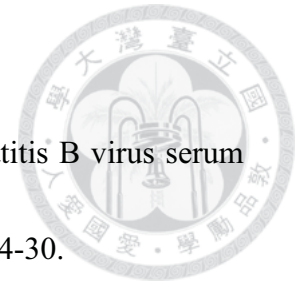
Zhang W, Hacker HJ, Tokus M, *et al.* Patterns of circulating hepatitis B virus serum nucleic acids during lamivudine therapy. *J Med Virol* 2003;71:24-30.

Zhang SY, Jouanguy E, Ugolini S, *et al.* TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science* 2007;317:1522-1527.

Zheng BJ, Zhou J, Qu D, *et al.* Selective functional deficit in dendritic cell – T cell interaction is a crucial mechanism in chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat* 2004;11:217-24.

Zmuda JM, Cauley JA, Ferrell RE. Molecular epidemiology of vitamin D receptor gene variants. *Epidemiol Rev* 2000;22:203-217.

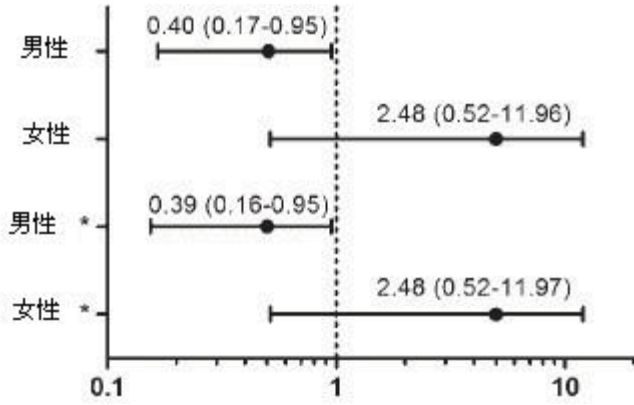
Zucchini N, Bessou G, Traub S, *et al.* Cutting edge: overlapping functions of TLR7 and TLR9 for innate defense against a herpes-virus infection. *J Immunol* 2008;180:5799-5803.



圖



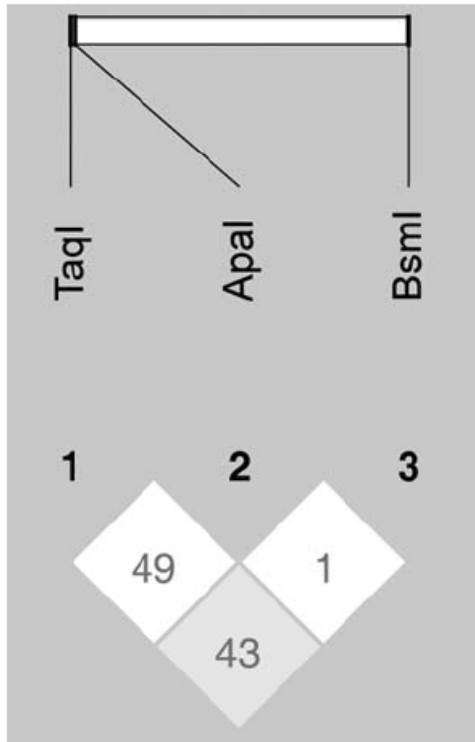
圖一、與所有剩餘的對偶基因相比之下 HLA-DRB1*1101 對偶基因的勝算比



說明：

*經性別和年齡調整後，HLA-DRB1*1101 對偶基因相較於所有剩餘的對偶基因，在 ALT 小於 80U/L 與 ALT 大於或等於 80U/L 兩組中 B 肝帶原者的勝算比。

圖二、維生素 D 受體基因型在 *BsmI*、*ApaI* 和 *TaqI* 位點的連鎖不平衡 (linkage disequilibrium) 模式



說明：

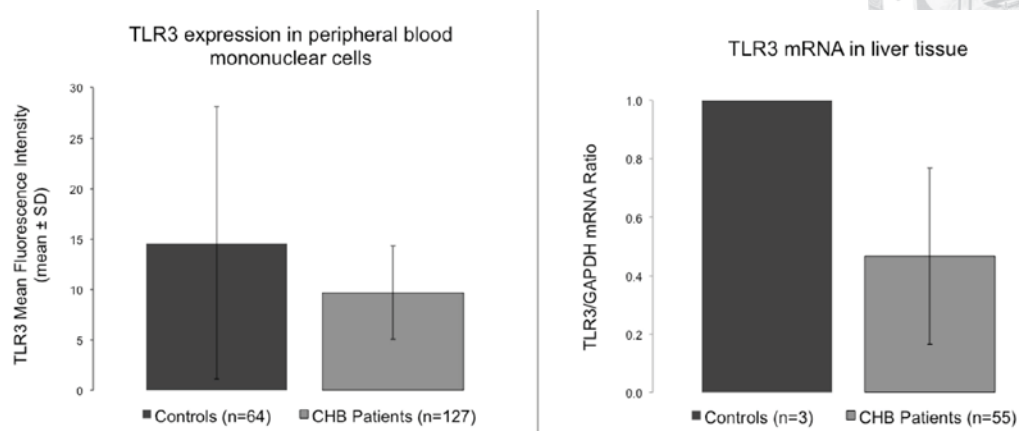
用 D' 值測量的連鎖不平衡使用 Haploview 4.0 進行評估 (Barrett et al. 2005)。

D' 值範圍在 -1 到 1 之間， D' 值 > 0.8 的配對標記視為連鎖不平衡。

方框內對應的數字為 D' 值 $\times 100$ 。

三種維生素 D 受體基因型未檢測到連鎖不平衡，因為其 D' 值偏低。

圖三、健康對照者和慢性 B 型肝炎 (CHB) 患者中，類鐸受體 - 3 (TLR3) 在週邊血液單核球細胞 (PBMC) 和肝細胞的表現量。

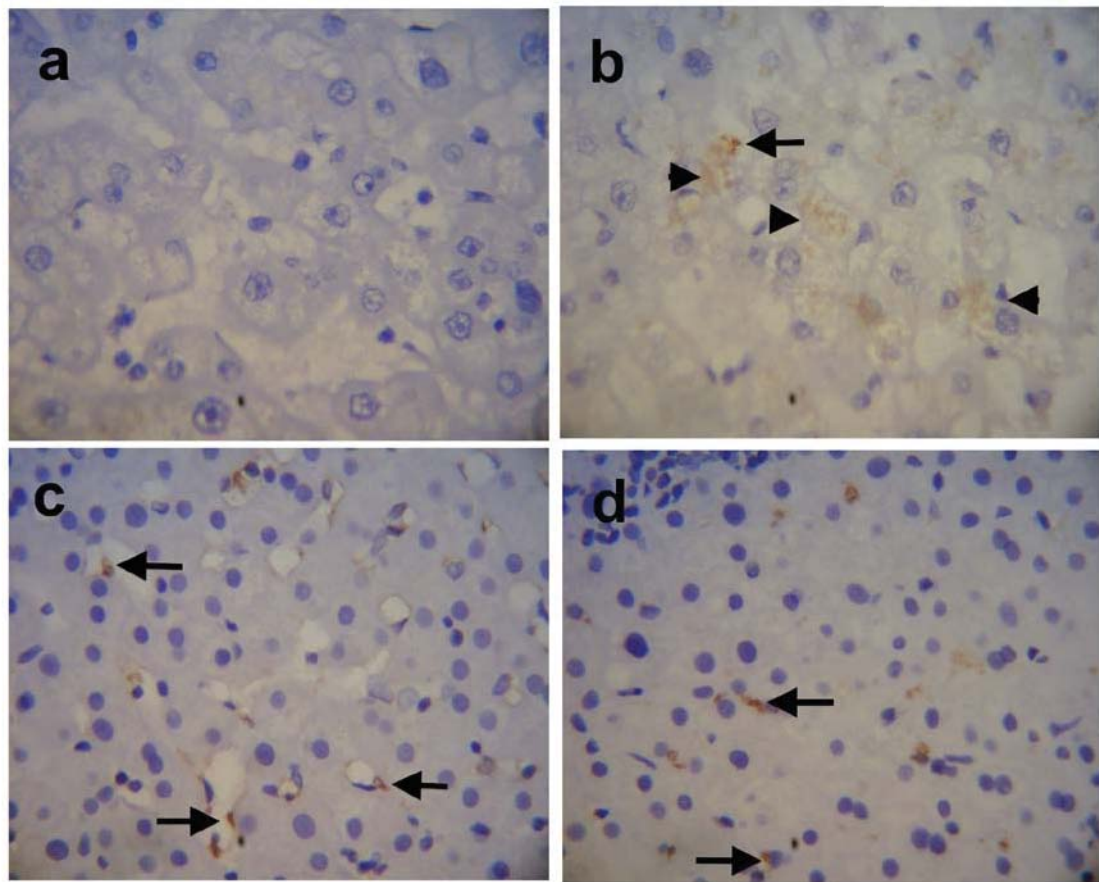


說明：

左：在健康對照者 (n = 64) 和慢性 B 型肝炎患者 (n = 127) 中，週邊血液單核球細胞類鐸受體 3 表現量的平均熒光強度 (14.61 ± 13.49 與 9.70 ± 4.61 , $p < 0.001$)

右：健康對照組 (n = 3) 和慢性 B 型肝炎患者 (n = 55) 的肝細胞類鐸受體 3 mRNA 的含量 (相對定量：1 倍比 0.47 ± 0.30 倍)。

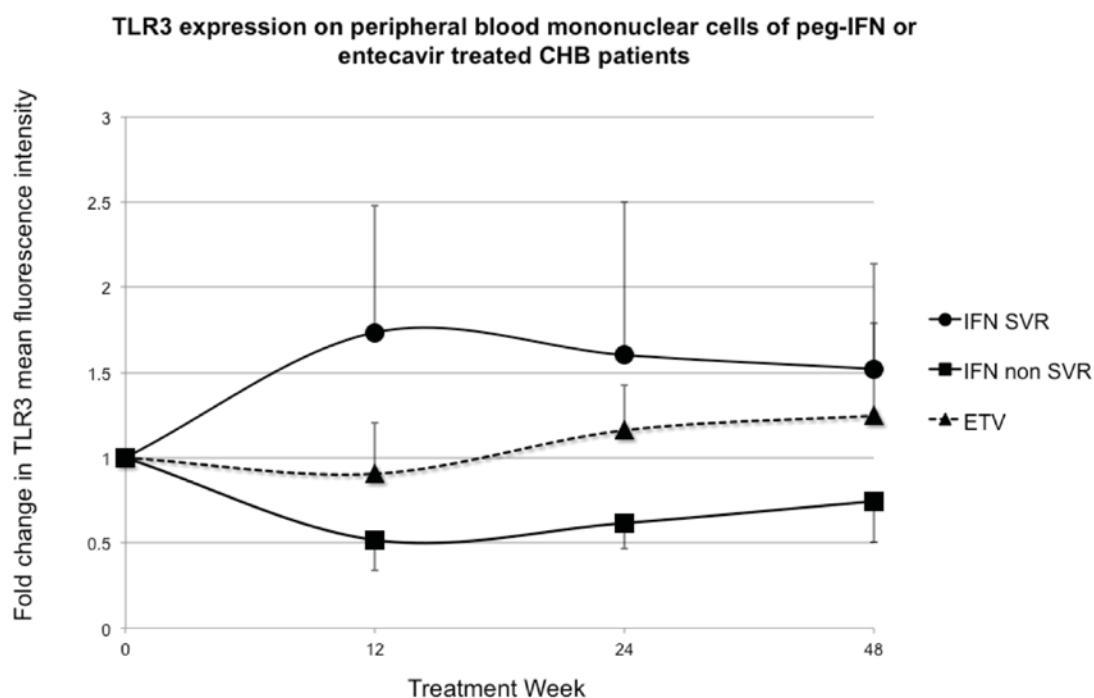
圖四、健康對照者和慢性 B 型肝炎代表之患者的肝細胞類鐸受體 3 (TLR3) 免疫組織化學染色。



說明：

a：小鼠免疫球蛋白 G (IgG) 染色作為負向對照組；b：對照者的類鐸受體 3 染色 (棕色) 顯示散佈性在庫氏細胞 (箭) 和肝細胞 (箭頭)；c 和 d：一位慢性 B 型肝炎患者的類鐸受體 3 染色 (棕色) 顯示局限性的僅在庫氏細胞 (箭)。

圖五、以長效型干擾素或貝樂克治療 48 週的慢性 B 型肝炎患者，週邊血液單核球細胞中類鐸受體 3 表現量的倍數變化



說明：

12 例患者以長效型干擾素治療：5 例患者達到持續病毒學反應 (SVR)，定義為在治療後 6 個月血清 HBV DNA 含量 < 2000 IU / mL，及 7 例治療無反應者或復發患者。

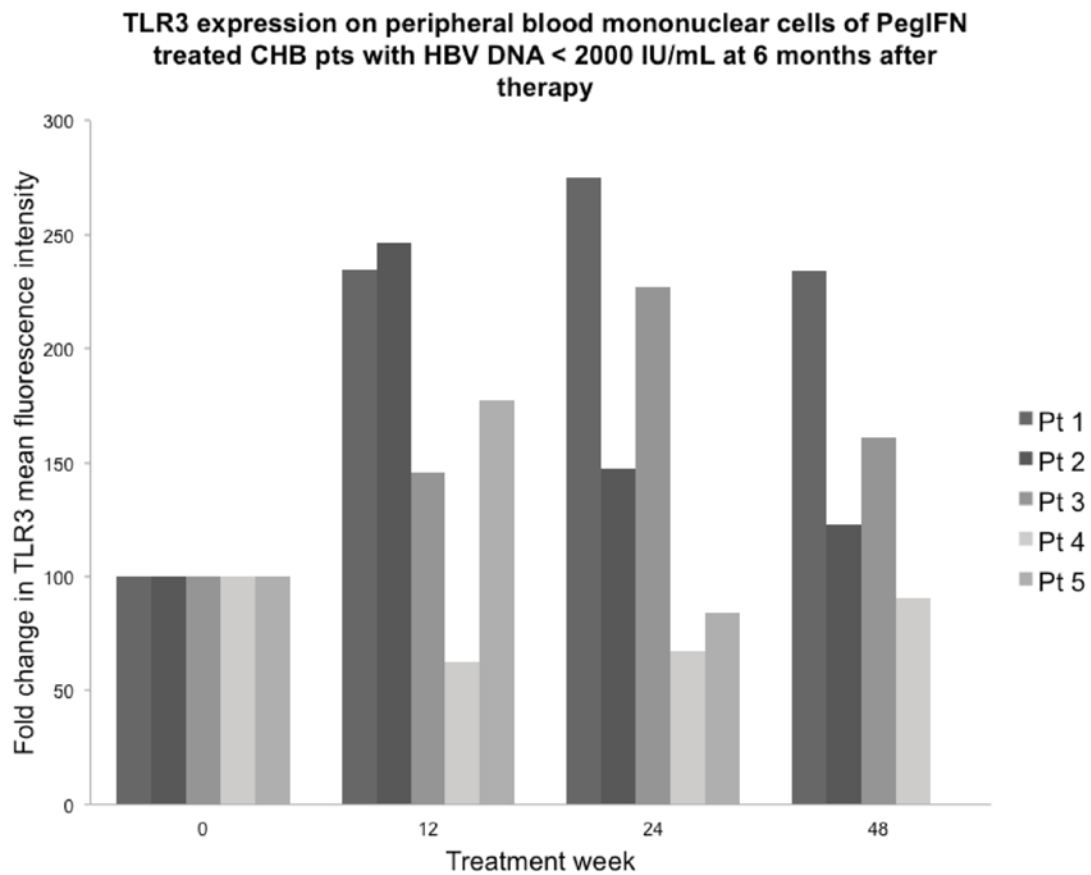
以治療前類鐸受體 3 平均熒光強度當作參考值，在圖中可看出在 48 週治療時類鐸受體 3 平均熒光強度的倍數變化。

具有持續病毒學反應的患者中，類鐸受體 3 的平均熒光強度在治療後立即恢復至平均 1.5 到 1.7 倍。

七例無治療反應或復發患者中，類鐸受體 3 的平均熒光強度在治療後立即減少平均 0.5 到 0.7 倍。

十例患者以貝樂克治療。其中，在 48 週治療時類鐸受體 3 平均熒光強度逐漸恢復到平均 1.2 倍。

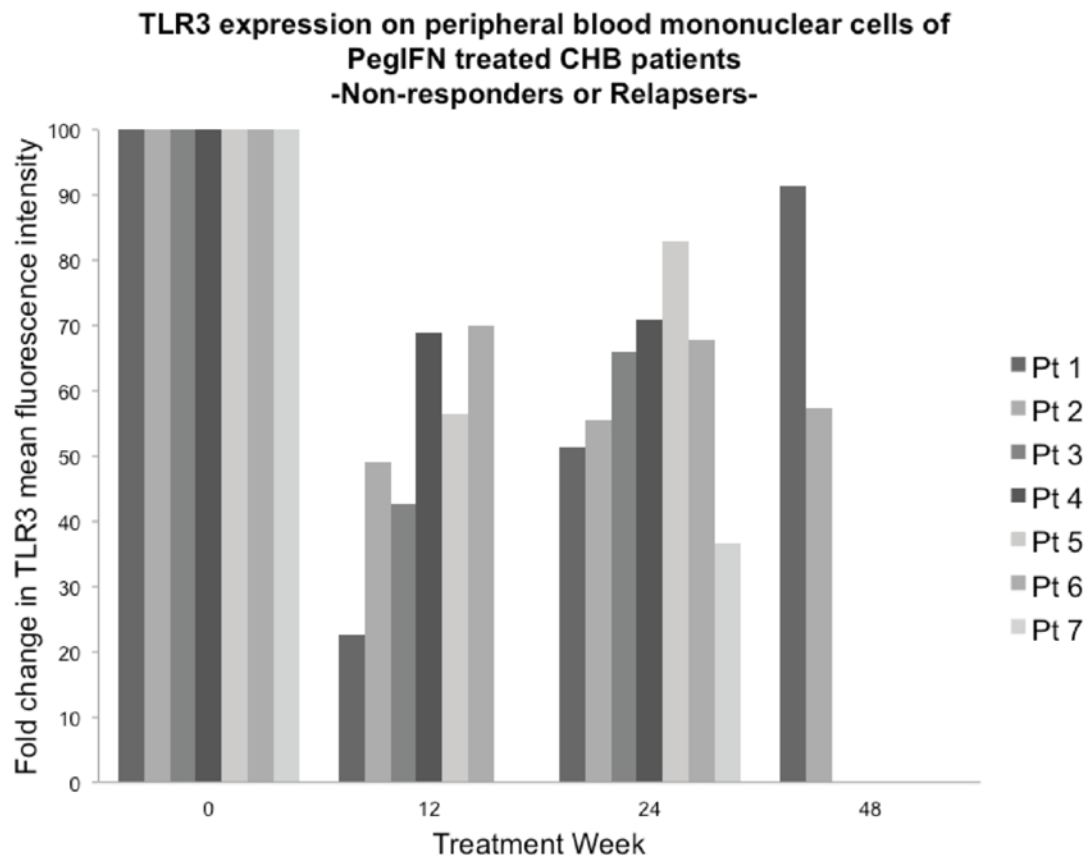
圖六、在長效型干擾素治療後 6 個月，血清 HBV DNA 含量 < 2000 IU / mL 的慢性 B 型肝炎患者其週邊血液單核球細胞類鐸受體 3 表現量的倍數變化。



說明：

總體而言，在第 12 週的治療時，有 80% (4/5) 的患者類鐸受體 3 平均熒光強度增加了 45% 以上，其中 60% (3/5) 的患者在治療第 24 週和 48 週，類鐸受體 3 平均熒光強度持續增加。

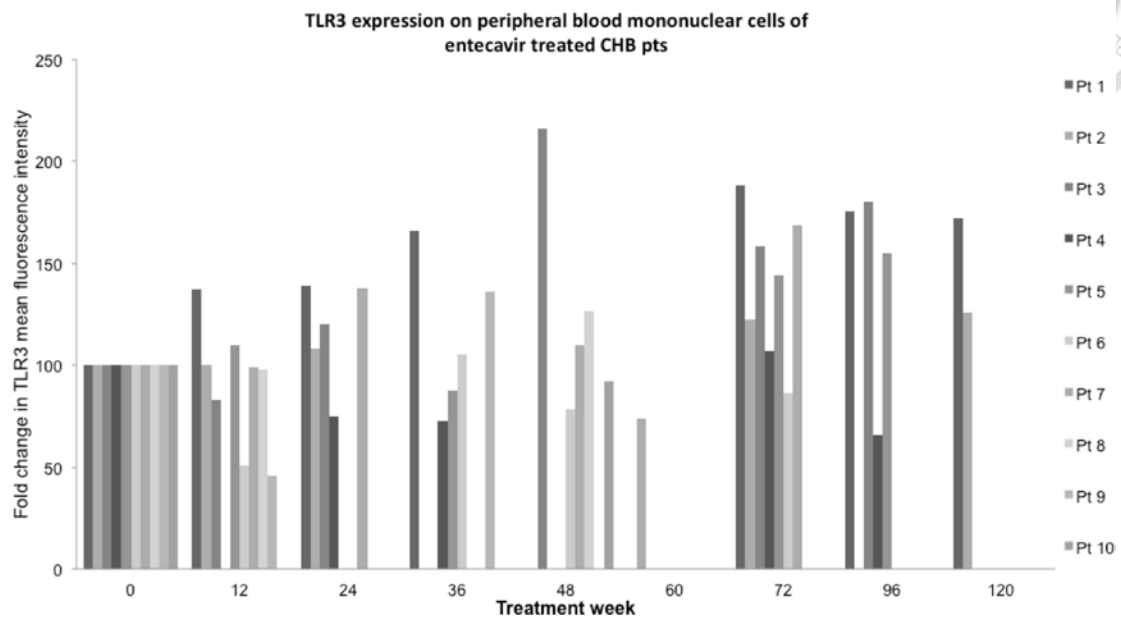
圖七、在長效型干擾素治療後，無治療反應或復發的慢性 B 型肝炎患者其週邊血液單核球細胞類鐸受體 3 表現量的倍數變化。



說明：

所有 (7/7) 的患者經歷了 12 或 24 週的治療，類鐸受體 3 平均熒光強度有超過 30% 的下降。

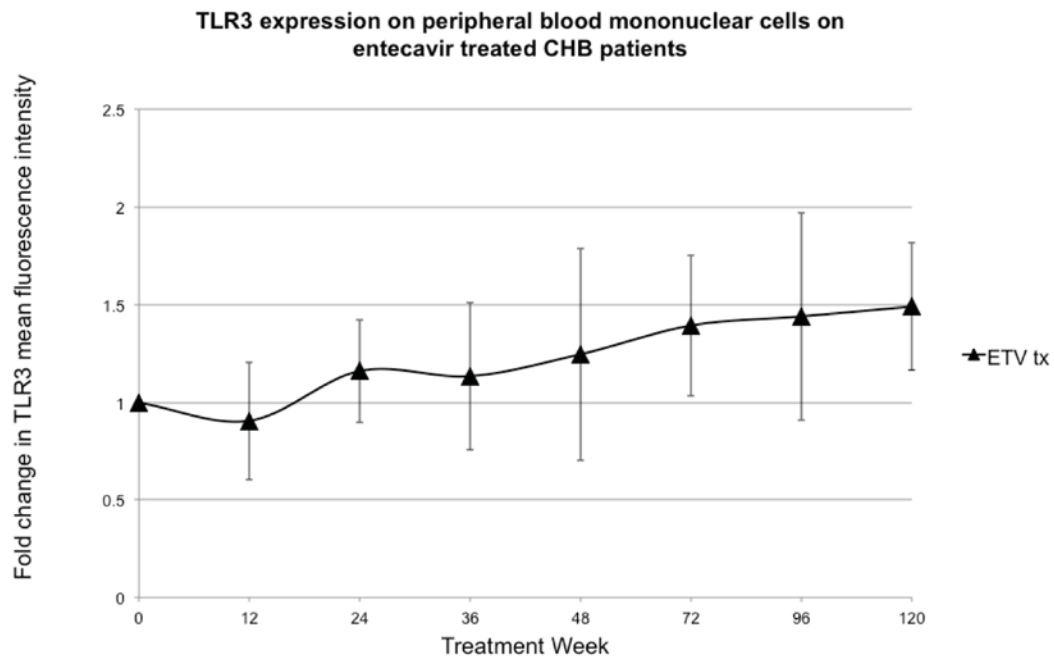
圖八、在貝樂克治療後，慢性 B 型肝炎患者其週邊血液單核球細胞類鐸受體 3 表現量的倍數變化。



說明：

在第 24 週和 48 週治療時，分別觀察到 60% (6/10) 和 80% (8/10) 患者的類鐸受體 3 平均熒光強度都至少增加 5%。

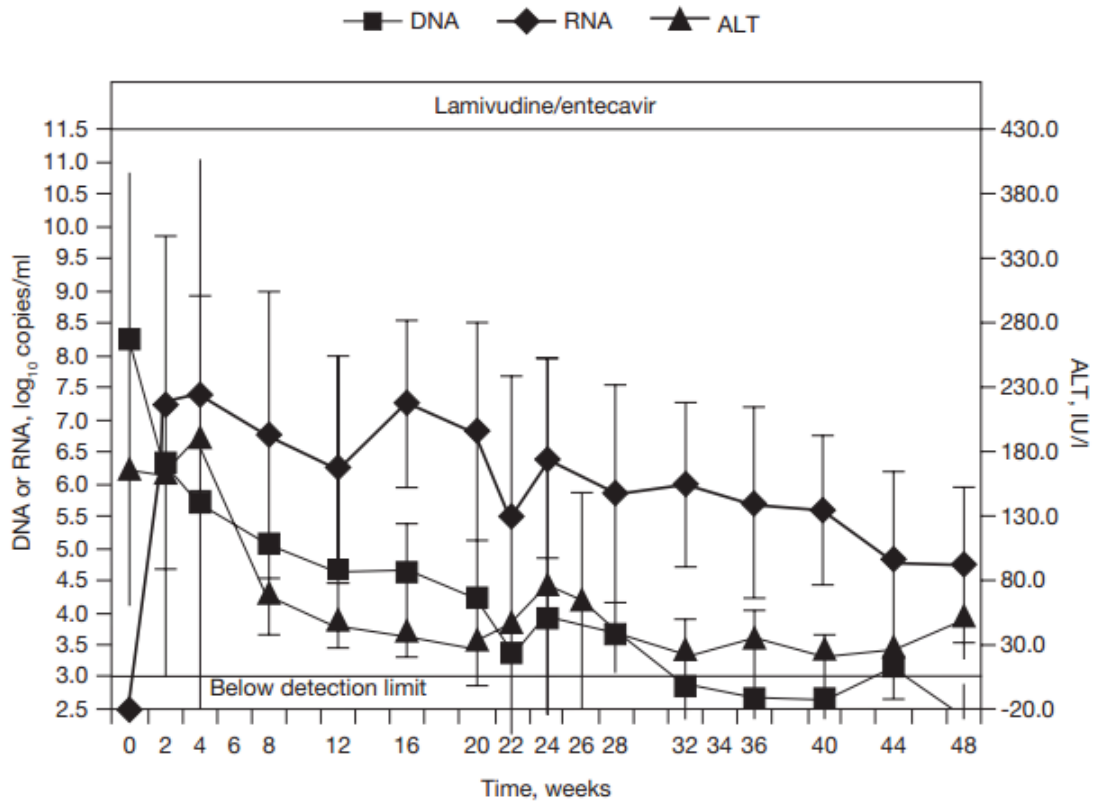
圖九、在貝樂克治療後，慢性 B 型肝炎患者其週邊血液單核球細胞類鐸受體 3 表現量的倍數變化。



說明：

在 10 例患者中，以治療前類鐸受體 3 平均熒光強度當作參考值，類鐸受體 3 平均熒光強度逐漸恢復至平均 1.2 到 1.5 倍。

圖十、接受 44 至 48 週 lamivudine 或 entecavir 單一治療的患者中可以檢測到 HBV RNA 者的血清 HBV RNA、DNA 和 ALT 值的連續變化 (第一組)

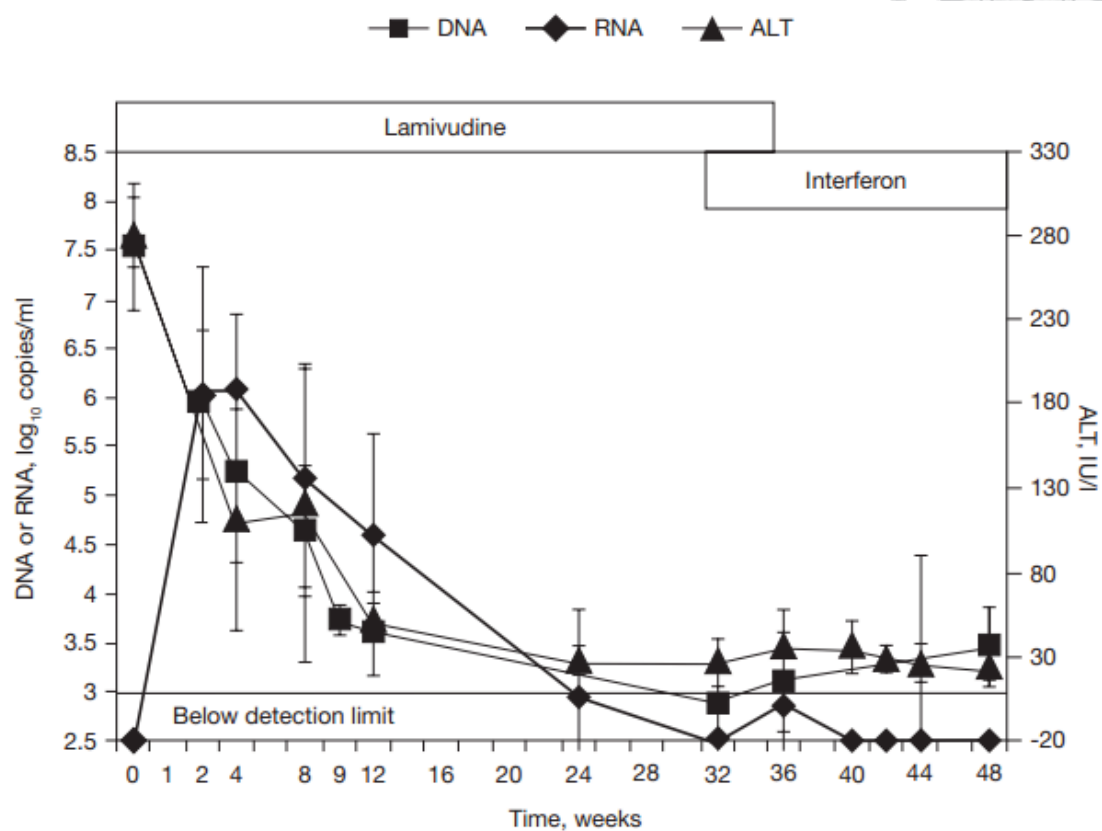


說明：

直到治療結束時血清 HBV RNA 仍可檢測到

ALT，丙氨酸轉氨酶；below detection limit，低於檢測下限；time, weeks，時間，週

圖十一、接受相繼合併 lamivudine 和干擾素治療患者的血清 HBV RNA、DNA 和 ALT 值的連續變化(第二組)



說明：

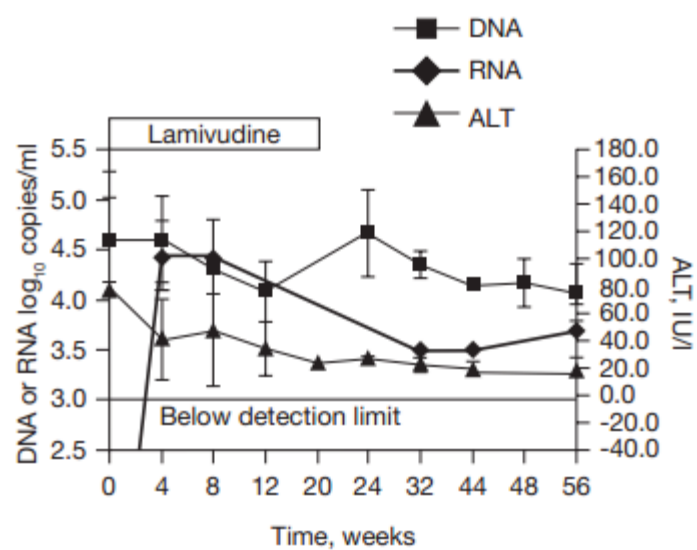
患者先接受 34 至 52 週的 lamivudine 治療，然後轉為 24 至 26 週的傳統干擾素治療，其間兩種藥有 4 至 20 週的重疊。

治療結束時檢測不到血清 HBV RNA。

ALT，丙氨酸轉氨酶；interferon，干擾素；below detection limit，低於檢測下限；

Time, weeks，時間，週

圖十二、接受 20-24 週短期 lamivudine 治療患者的血清 HBV RNA、DNA 和 ALT 值的連續變化(第三組)



說明：

在第 44 至 56 週追蹤結束時血清 HBV RNA 仍可檢測的到。

ALT，丙氨酸轉氨酶；below detection limit，低於檢測下限；time, weeks，時間，週。

表

表一、204 名 B 肝病毒帶原者的基本特徵



變數	N	第一組		第二組		P 值
		ALT < 80U/L	N	ALT ≥ 80U/L	N	
年齡 (歲)	50	45.9 ± 12.6	154	42.1 ± 10.9		0.042
性別	50		154			0.016
男性		25 (50.0)		106 (68.8)		
女性		25 (50.0)		48 (31.2)		
追蹤時間 (年)	50	83.6 ± 57.6	154	81.3 ± 51.9		0.800
e 抗原	41		128			0.296
陽性		12 (29.3)		49 (38.3)		
陰性		29 (70.7)		79 (61.7)		
e 抗體	41		128			0.846
陽性		26 (63.4)		79 (61.7)		
陰性		15 (36.6)		49 (38.3)		
病毒基因型	50		151			0.319
B		31 (62.0)		106 (70.2)		
C		16 (32.0)		42 (27.8)		
B 及 C		2 (4.0)				1 (0.7)
非 B 或 C		1 (2.0)		2 (1.3)		
HBV DNA	42	5.53 ± 1.95	120	5.44 ± 1.95		0.812

說明：

報告的資料以平均值 ± 標準差或數量 (%) 表示。ALT，丙氨酸轉氨酶；病毒去氧核糖核酸濃度在分析前先予對數化 (log-transformed)。

表二、131 名男性 B 肝病毒帶原者的每個 HLA-DRB1 對偶基因頻率分佈

DRB1	第一組	第二組				
對偶基因	ALT<80U/L	ALT≥80U/L	OR(95% CI)	P 值	OR(95% CI) ^b	P 值 ^b
03	3 (6.0)	11 (5.2)	0.42 (0.09–2.02)	0.276	0.48 (0.09–2.44)	0.376
04	7 (14.0)	23 (10.9)	0.37 (0.11–1.31)	0.124	0.42 (0.12–1.53)	0.188
08	4 (8.0)	24 (11.32)	0.68 (0.17–2.78)	0.593	0.86 (0.20–3.70)	0.835
09	5 (10.0)	44 (20.8)	1.00 (Reference)	0.450 ^a	1.00 (Reference)	0.228 ^a
11	9 (18.0)	21 (9.9)	0.27 (0.08–0.89)	0.032	0.27 (0.08–0.94)	0.039
1101	9 (18.0)	17 (8.0)	0.21 (0.06–0.73)	0.014	0.23 (0.06–0.79)	0.020
Others	0 (0.0)	4 (1.9)	—	—	—	—
12	9 (19.0)	34 (16.0)	0.43 (0.13–1.40)	0.161	0.45 (0.14–1.48)	0.188
14	8 (16.0)	17 (8.0)	0.24 (0.07–0.84)	0.026	0.23 (0.06–0.83)	0.025
1401	4 (8.0)	10 (4.7)	0.28 (0.06–1.25)	0.096	0.29 (0.06–1.33)	0.111
Others	4 (8.0)	7 (3.3)	0.19 (0.04–0.93)	0.040	0.18 (0.04–0.87)	0.033
DR2	3 (6.0)	27 (12.7)	1.02 (0.23–4.63)	0.977	1.26 (0.26–6.03)	0.770
Others ^c	2 (4.0)	11 (5.2)	0.63 (0.11–3.66)	0.602	0.76 (0.12–4.88)	0.775

說明：

^a 整體基因檢定 (genotype-global test)

^b 年齡調整

^c 頻率低於 5%的合併為“其他 (Others)”型別

表三、73 名女性 B 肝病毒帶原者的每個 HLA-DRB1 對偶基因頻率分佈

DRB1	第一組	第二組				
對偶基因	ALT<80U/L	ALT≥80U/L	OR(95% CI)	P 值	OR(95% CI) ^b	P 值 ^b
03	7 (14.0)	12 (12.5)	1.60 (0.49–5.22)	0.436	1.64 (0.50–5.44)	0.412
04	4 (8.0)	12 (12.5)	2.80 (0.73–10.76)	0.134	2.77 (0.72–10.66)	0.138
08	2 (4.0)	9 (9.4)	4.20 (0.77–22.91)	0.097	4.29 (0.78–23.49)	0.093
09	14 (28.0)	15 (15.6)	1.00 (Reference)	0.590 ^a	1.00 (Reference)	0.575 ^a
11	2 (4.0)	9 (9.4)	4.20 (0.77–22.91)	0.097	4.29 (0.78–23.50)	0.094
1101	2 (4.0)	9 (9.4)	4.20 (0.77–22.91)	0.097	4.29 (0.78–23.50)	0.094
Others	0 (0.0)	0 (0.0)	—	—	—	—
12	8 (16.0)	16 (16.7)	1.87 (0.61–5.71)	0.274	1.94 (0.62–6.02)	0.254
14	2 (4.0)	7 (7.3)	3.27 (0.58–18.46)	0.180	3.54 (0.60–21.05)	0.164
1401	1 (2.0)	4 (4.2)	3.73 (0.37–37.58)	0.264	4.00 (0.39–41.38)	0.245
Others	1 (2.0)	3 (3.1)	2.80 (0.26–30.18)	0.396	3.08 (0.27–34.88)	0.364
DR2	9 (18.0)	13 (13.5)	1.35 (0.44–4.13)	0.601	1.35 (0.44–4.13)	0.603
Others ^c	2 (4.0)	3 (3.1)	1.40 (0.20–9.66)	0.733	1.45 (0.21–10.11)	0.707

說明：

^a 整體基因檢定 (genotype-global test)

^b 年齡調整

^c 頻率低於 5%的合併為“其他 (Others)”型別

表四、250 名慢性 B 型肝炎病毒帶原者的基本特徵



特徵	組						p 值 ^a
	A 組(n = 36)	B 組(n = 37)	C 組(n = 40)	D 組(n = 22)	E 組(n = 90)	F 組(n = 25)	
年齡(歲)	46.3±14.8	40.2±8.3	39.5±8.8	47.1±11.9	52.8±12.6	62.7±17.9	0.001
	參考 ^b	0.003	0.001	0.761	<0.001	<0.001	
		參考 ^b	0.575	0.001	<0.001	<0.001	
			參考 ^b	<0.001	<0.001	<0.001	
				參考 ^b	0.006	<0.001	
					參考 ^b	<0.001	
性別							0.146
男	25(69.4)	28(75.7)	29(72.5)	13(59.1)	60(66.7)	23(92.0)	
女	11(30.6)	9(33.3)	11(27.5)	9(40.9)	30(33.3)	2(8.0)	
	參考 ^b	0.460	0.722	0.315	0.766	0.003	
		參考 ^b	0.715	0.066	0.179	0.029	
			參考 ^b	0.160	0.388	0.007	
				參考 ^b	0.379	<0.001	
					參考 ^b	<0.001	
HBV DNA (log cp/ml)	12.9±4.7	11.7±4.5	11.4±4.5	10.1±2.8	10.4±3.3	11.1±3.7	0.235
	參考 ^b	0.210	0.079	0.007	0.001	0.095	
		參考 ^b	0.665	0.198	0.070	0.611	
			參考 ^b	0.317	0.153	0.868	
				參考 ^b	0.772	0.344	
					參考 ^b	0.323	
HBV 基因型							0.137
B 型	19(54.3)	25(75.8)	21(56.8)	10(50.0)	51(69.9)	12(54.6)	
C 型	16(45.7)	8(24.2)	15(40.5)	9(45.0)	17(23.3)	7(31.8)	
B 型及 C 型	0(0.0)	0(0.0)	1(2.7)	1(5.0)	3(4.1)	1(4.5)	
非 B 或 C 型	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(2.7)	2(9.1)	
	參考 ^b	0.012	0.546	0.227	0.002	0.008	
		參考 ^b	0.021	0.007	0.242	0.006	
			參考 ^b	0.635	0.037	0.050	
				參考 ^b	0.038	0.252	
					參考 ^b	0.110	

說明：HBV：B 型肝炎病毒；DNA：去氧核糖核酸。報告的資料為平均值 ± 標準差或計數 (%)。^a 用 Analysis of variance (ANOVA) 分析或 χ^2 檢定評估各組間的差異性。^b 用 T 檢定或 χ^2 檢定 / Fisher's exact 檢定進行配對比較。

表五、無肝炎急性發作 (A 組和 E 組) 和有肝炎急性發作 (B 組、C 組和 D 組) 的 B 型肝炎病毒帶原者之間的維生素 D 受體基因型和單體型頻率分佈

基因型/單體型	無肝炎急性發作(%)	有肝炎急性發作(%)	勝算比(95% CI)	經驗 p-值	勝算比(95% CI) ^a	經驗 p-值 ^a
<i>BsmI</i>	A+E 組(n=121)	B+C+D 組(n=97)		0.093 ^b		0.011 ^b
b / b	95(78.5)	89(91.8)	參考		參考	
B / b	24(19.8)	7(7.2)	0.31(0.13-0.76)	0.018	0.29(0.11-0.74)	0.009
B / B	2(1.7)	1(1.0)	0.53(0.05-5.99)	0.404	1.34(0.06-32.27)	0.666
<i>ApaI</i>	(n=120)	(n=93)		0.037 ^b		0.082 ^b
a / a	68(56.7)	39(41.9)	參考		參考	
A / a	20(16.7)	16(17.2)	1.43(0.66-3.09)	0.357	1.33(0.57-3.08)	0.504
A / A	32(26.7)	38(40.9)	2.18(1.18-4.03)	0.009	2.09(1.07-4.08)	0.021
<i>TaqI</i>	(n=120)	(n=93)		0.102 ^b		0.012 ^b
T / t	117(97.5)	86(92.5)	參考		參考	
t / t	3(2.5)	7(7.5)	3.17(0.80-12.63)	0.036	4.62(0.83-24.45)	0.0029
T / T	0(0.0)	0(0.0)	—	—	—	—
<i>BsmI-ApaI</i>				0.004 ^b		0.010 ^b
b / a	142(55.91)	96(48.48)	參考		參考	
b / A	84(33.07)	93(46.97)	1.64(1.11-2.43)	0.050	1.54(1.01-2.36)	0.114
B / a	23(9.06)	2(1.01)	0.13(0.03-0.56)	0.004	0.13(0.03-0.57)	0.004
B / A	5(1.97)	7(3.54)	2.07(0.64-6.72)	0.298	3.26(0.77-13.82)	0.165
<i>BsmI-TaqI</i>				0.004 ^b		0.004 ^b
b / T	225(88.58)	185(93.43)	參考		參考	
B / T	26(10.24)	6(3.03)	0.28(0.09-0.72)	0.004	0.28(0.11-0.74)	0.007
B / t	2(0.79)	3(1.52)	1.82(0.21-22.03)	0.491	3.41(0.36-32.14)	0.166
b / t	1(0.39)	4(2.02)	4.85(0.47-240.62)	0.089	4.34(0.43-43.73)	0.112
<i>ApaI-TaqI</i>				0.010 ^b		0.013 ^b
a / T	164(64.57)	95(47.98)	參考		參考	
A / T	87(34.25)	96(48.48)	1.90(1.27-2.85)	0.010	1.81(1.19-2.73)	0.027
A / t	2(0.79)	4(2.02)	3.44(0.48-38.65)	0.069	7.37(0.97-55.85)	0.004
a / t	1(0.39)	3(1.52)	5.15(0.41-99.99)	0.005	3.13(0.30-33.13)	0.183
<i>BsmI-ApaI-TaqI</i>				0.004 ^b		0.009 ^b
b / a / T	141(55.51)	93(46.97)	參考		參考	
b / A / T	84(33.07)	92(46.46)	1.66(1.10-2.51)	0.042	1.54(1.01-2.36)	0.117
B / a / T	23(9.06)	2(1.01)	0.13(0.02-0.56)	0.13	0.13(0.03-0.59)	0.005
B / A / T	3(1.18)	4(2.02)	2.02(0.33-14.07)	0.314	2.86(0.45-18.07)	0.235
B / A / t	2(0.79)	3(1.52)	2.27(0.26-27.62)	0.312	4.14(0.44-39.13)	0.106
b / a / t	1(0.39)	3(1.52)	4.52(0.36-99.99)	0.020	2.71(0.26-28.63)	0.252
b / A / t	0(0.00)	1(0.51)	1.50(0.04-99.99)	0.022	99.99(0.01-99.99)	0.001

說明：

CI，信賴區間。

各基因型或單體型“最常見”的類型作為參考型別，因此可比較各基因型或單體型的勝算比。

^a 調整年齡和性別。

^b 總體基因型檢定。



表六、HBeAg 陰性 (D 組和 E 組) 與 HBeAg 陽性 (A 組, B 組和 C 組) 的 B 型肝炎病毒帶原者之間的維生素 D 受體基因型和單體型的頻率分佈

基因型/單體型	HBeAg 陰性(%)	HBeAg 陽性(%)	勝算比(95%CI)	經驗 p-值	勝算比(95%CI) ^a	經驗 p-值 ^a
<i>BsmI</i>	D+E 組(n=107)	A+B+C 組(n=111)		0.194 ^b		0.004 ^b
b / b	96(89.7)	88(79.3)	參考		參考	
B / b	10(9.4)	21(18.9)	2.29(1.02-5.13)	0.043	2.84(1.18-6.85)	0.015
B / B	1(0.9)	2(1.8)	2.18(0.19-24.48)	0.174	13.88(0.77-99.99)	<0.001
<i>Apal</i>	(n=104)	(n=109)		0.063 ^b		0.134 ^b
a / a	60(57.7)	46(42.2)	參考		參考	
A / a	16(15.4)	20(18.4)	1.63(0.71-3.76)	0.207	1.58(0.68-3.66)	0.295
A / A	28(26.9)	43(39.4)	2.00(1.04-3.87)	0.016	1.89(0.97-3.67)	0.051
<i>TaqI</i>	(n=104)	(n=109)		0.034 ^b		0.002 ^b
T / T	102(98.0)	101(92.7)	參考		參考	
T / t	2(2.0)	8(7.3)	4.02(0.78-39.73)	0.034	6.88(1.04-45.31)	0.002
t / t	0(0.0)	0(0.0)	—	—	—	—
<i>BsmI–Apal</i>				0.006 ^b		0.004 ^b
b / a	137(61.2)	101(44.3)	參考		參考	
b / A	75(33.5)	102(44.7)	1.84(1.24-2.74)	0.020	1.75(1.14-2.69)	0.039
B / a	9(4.0)	16(7.0)	2.41(1.02-5.68)	0.036	3.06(1.22-7.64)	0.006
B / A	3(1.3)	9(4.0)	4.07(1.07-15.41)	0.064	10.45(2.02-54.10)	<0.001
<i>BsmI–TaqI</i>				0.021 ^b		0.002 ^b
b / T	211(94.20)	199(87.28)	參考		參考	
B / T	11(4.91)	21(9.21)	2.02(0.90-4.77)	0.053	2.82(1.22-6.49)	0.009
B / t	1(0.45)	4(1.75)	4.23(0.41-209.84)	0.084	14.60(1.08-99.99)	<0.001
b / t	1(0.45)	4(1.75)	4.23(0.41-209.84)	0.098	3.68(0.36-37.14)	0.277
<i>Apal–TaqI</i>				0.016 ^b		0.021 ^b
a / T	145(64.73)	114(50.00)	參考		參考	
A / T	77(34.38)	106(46.49)	1.75(1.17-2.62)	0.023	1.62(1.07-2.46)	0.071
A / t	1(0.45)	5(2.19)	6.32(0.69-99.99)	0.005	19.30(1.66-99.99)	<0.001
a / t	1(0.45)	3(1.32)	3.80(0.30-99.99)	0.021	2.17(0.21-22.72)	0.470
<i>BsmI–Apal–TaqI</i>				0.005 ^b		0.004 ^b
b / a / T	136(60.71)	98(42.98)	參考		參考	
b / A / T	75(33.48)	101(44.30)	1.87(1.23-2.83)	0.017	1.75(1.14-2.69)	0.043
B / a / T	9(4.02)	16(7.02)	2.46(0.98-6.59)	0.027	3.12(1.24-7.80)	0.004
B / A / T	2(0.89)	5(2.19)	3.45(0.55-36.95)	0.104	7.33(0.95-56.50)	0.007
B / A / t	1(0.45)	4(1.75)	5.52(0.54-99.99)	0.002	18.56(1.36-99.99)	<0.001
b / a / t	1(0.45)	3(1.32)	4.14(0.33-99.99)	0.011	2.40(0.23-25.40)	0.444
b / A / t	0(0.00)	1(0.44)	1.37(0.04-99.99)	0.003	99.99(0.01-99.99)	<0.001

說明：

CI，信賴區間。

各基因型或單體型“最常見”的類型作為參考型別。經驗 p 值用 10000 置換計算 (permutations)，四捨五入到小數點後第三位。

^a 調整年齡和性別。

^b 總體基因型檢定。



表七、127 名慢性 B 型肝炎 (CHB) 患者和 64 名健康對照組的基本資料

	慢性 B 型肝炎患者	健康對照組	<i>p</i> 值
N	127	64	
男性	91 (72%)	33 (52%)	0.006*
年齡	42.3 ± 11.2	43.9 ± 10.4	0.321^
ALT	138.9 ± 377.9	38.0 ± 34.7	0.036^
HBeAg 陽性	44 (35%)	NA	
(n) log ₁₀ qHBsAg	(109) 3.1 ± 1.1	NA	
(n) log ₁₀ HBV DNA	(115) 5.3 ± 2.0	NA	
(n)HBV 基因型(B/C/B+C/U)	(107) 75/19/1/12	NA	

說明：

值表示為平均值 ± 標準差或數字(百分比)。

(n) 可用的數目；U：未檢測出。

* Pearson's chi-square，^ Student's t-test。

ALT：麩丙酮酸轉胺酶，NA：不適用。

qHBsAg：B 型肝炎表面抗原定量值。

表八、線性回歸分析預測週邊血液單核球細胞類鐸受體 3 表現量的平均熒光強度



表八 a、慢性 B 型肝炎 (CHB) 患者和對照者*

項目	值	95%信賴區間	p 值
常數	16.258	9.947 – 22.569	<0.001
慢性 B 型肝炎患者比健康對照者	-13.466	-17.202 – -9.730	<0.001
年齡	-0.022	-0.155 – 0.111	0.751
性別	0.542	-2.598 – 3.682	0.736
ALT	-0.024	-0.091 – 0.043	0.478

說明：

*p 值 < 0.001

表八 b、慢性 B 肝患者**

項目	值	95%信賴區間	p 值
常數	6.236	1.397 – 11.075	0.013
log ₁₀ qHBsAg	0.253	-0.756 – 1.262	0.625
年齡	0.013	-0.065 – 0.091	0.745
性別	-0.201	-1.908 – 1.506	0.818
ALT	0.001	-0.001 – 0.003	0.261
HBeAg	-1.377	-3.500 – 0.746	0.207
log ₁₀ HBV DNA	0.376	-0.163 – 0.915	0.175

說明：

**p 值 0.511

ALT：麩丙酮酸轉胺酶。

qHBsAg：B 型肝炎表面抗原定量值。

表九、線性回歸分析預測週邊血液單核球細胞類鐸受體 3 表現量的百分比



表九 a、慢性 B 型肝炎 (CHB) 患者和對照者*

項目	值	95%信賴區間	p 值
常數	11.457	4.458 – 18.456	0.002
慢性 B 型肝炎患者比健康對照者	-5.063	-9.438 – -0.688	0.025
年齡	-0.056	-0.191 – 0.079	0.419
性別	2.817	-0.488 – 6.122	0.097
ALT	0.039	-0.032 – 0.110	0.287

說明：

*p 值 0.002

表九 b、慢性 B 肝患者**

項目	值	95%信賴區間	p 值
常數	-0.401	-2.584 – 1.782	0.720
log ₁₀ qHBsAg	0.190	-0.269 – 0.649	0.418
年齡	0.011	-0.024 – 0.046	0.531
性別	0.348	-0.514 – 1.210	0.432
ALT	0.00003	0.00003 – 0.00003	0.954
HBeAg	-0.913	-1.885 – 0.059	0.070
log ₁₀ HBV DNA	0.176	-0.089 – 0.441	0.197

說明：

**p 值 0.164

ALT：麩丙酮酸轉胺酶。

qHBsAg：B 型肝炎表面抗原定量值。

表十、接受核苷類似物和/或傳統干擾素治療的慢性 B 肝患者的基本特徵

特徵	組別			p 值
	一 ^a	二 ^b	三 ^c	
病患 (3TC/ETV), n	10 (5/5)	6	3	-
平均年齡, 年 ± 標準差	44.2 ±13.7	47.3 ±6.5	51.3 ±11.7	0.31 ^d
性別 (男/女), n	10/0	6/0	3/0	1.0 ^e
平均 ALT, U/L ± 標準差	164.4 ±105.5	180.3 ±121.2	154 ±142	0.88 ^d
HBeAg, % (+/-)	70 (7/3)	17 (1/5)	66.7 (2/1)	0.13 ^e
平均 HBVDNA, log ₁₀ cp/ml ± 標準差	8.1 ±2.4	7.7 ±1.4	5.1 ±0.3	0.06 ^d

說明：

^a 第一組，44 至 48 週的 lamivudine(3TC)或 entecavir(ETV)單一治療。

^b 第二組，34 至 52 週的 3TC 和 24 至 36 週的傳統干擾素相繼合併治療；期間有 4 至 20 週的時間兩種藥重疊使用。

^c 第三組，20 至 24 週的 3TC 治療，之後追蹤了 22 至 36 週。

^d Kruskal-Wallis test

^e Fisher's exact test

ALT, 丙氨酸轉氨酶；HBeAg, B 肝 e 抗原；cp, copies

表十一、接受核苷類似物和/或傳統干擾素治療的慢性 B 肝患者的血清 HBV RNA

特徵	組別			p 值
	一 ^a	二 ^b	三 ^c	
患者 (3TC/ETV), n	10 (5/5)	6	3	-
治療前可檢測性, %	0	0	0	1.0 ^e
治療後可檢測性, n (%)	8/2 (80.0)	5/1 (83.0)	2/1 (66.7)	1.0 ^e
平均最高值, log ₁₀ cp/ml ± 標準差	7.4 ± 1.9	6.1 ± 0.9	4.6 ± 0.1	0.08 ^d
平均期間 (治療加追蹤), 週 ± 標準差	45.5 ± 2.0	49.7 ± 5.6	48.7 ± 6.4	0.32 ^d
治療及追蹤結束時的可檢測性, n (%)	8/0 (100)	0/5 (0)	2/0 (100)	<0.001 ^e

說明：

^a 第一組，44 至 48 週的 lamivudine(3TC)或 entecavir(ETV)單一治療。

^b 第二組，34 至 52 週的 3TC 和 24 至 36 週的傳統干擾素相繼合併治療；期間有 4 至 20 週的時間兩種藥重疊使用。

^c 第三組，20 至 24 週的 3TC 治療，之後追蹤了 22 至 36 週。

^d Kruskal-Wallis test

^e Fisher's exact test；cp，copies

附錄

1. Yi-Wen Huang, Chung-Yi Hu, Chi-Lin Chen, Ya-Tang Liao, Chun-Jen Liu, Ming-Yang Lai, Pei-Jer Chen, Sien-Sing Yang, Jui-Ting Hu, Ding-Shinn Chen, Jia-Horng Kao. Human leukocyte antigen-DRB1*1101 correlates with less severe hepatitis in Taiwanese male carriers of hepatitis B virus. *Journal of Medical Virology* 2009;81:588-593.
2. Yi-Wen Huang, Ya-Tang Liao, Wendy Chen, Chi-Lin Chen, Jui-Ting Hu, Chun-Jen Liu, Ming-Yang Lai, Pei-Jer Chen, Ding-Shinn Chen, Sien-Sing Yang, Jia-Horng Kao. Vitamin D receptor gene polymorphisms and distinct clinical phenotypes of hepatitis B carriers in Taiwan. *Genes and Immunity* 2010;11:87-93.
3. Yi-Wen Huang, Shih-Chang Lin, Shu-Chen Wei, Jui-Ting Hu, Han-Yu Chang, Shih-Hung Huang, Ding-Shinn Chen, Pei-Jer Chen, Ping-Ning Hsu, Sien-Sing Yang, Jia-Horng Kao. Reduced Toll-like receptor-3 expression in chronic hepatitis B patients and its restoration by interferon therapy. *Antiviral Therapy* 2013 Jun 6. doi: 10.3851/IMP2630.
4. Yi-Wen Huang, Kazuaki Chayama, Masataka Tsuge, Shoichi Takahashi, Tsuyoshi Hatakeyama, Hiromi Abe, Jui-Ting Hu, Chun-Jen Liu, Ming-Yang Lai, Ding-Shinn Chen, Sien-Sing Yang, Jia-Horng Kao. Differential effects of interferon and lamivudine on serum HBV RNA inhibition in patients with chronic hepatitis B. *Antiviral Therapy* 2010;15:177-184.