

國立臺灣大學醫學院醫學檢驗暨生物技術學系研究所

碩士論文

Department of Clinical Laboratory Sciences and Medical Biotechnology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

利用小鼠模式研究 Hepsin 與 B 型肝炎病毒量的相關性

Study of association of Hepsin with hepatitis B virus levels

in mouse models

陳光彥

Kuang-Yen Chen

指導教授：林淑華 博士

Advisor: Shu-Wha Lin, Ph.D.

中華民國 103 年 7 月

July, 2014

國立臺灣大學碩士學位論文 口試委員會審定書

論文題目

利用小鼠模式研究 Hepsin 與 B 型肝炎病毒量的相關性

Study of association of Hepsin with hepatitis B virus levels
in mouse models

本論文係陳光彥君（R01424027）在國立臺灣大學醫學
檢驗暨生物技術學系研究所完成之碩士學位論文，於民國
103 年 07 月 25 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

林俊華

（簽名）

（指導教授）

楊雅倩

游益興

吳慧琳

系主任

鄧麗珍

（簽名）

誌謝

回顧兩年的碩士班生活，味道是酸甜苦辣，一路上需要感謝的人很多。首先要先感謝論文指導教授林淑華老師及各位口試委員，吳慧琳老師、游益興老師與楊雅倩老師，對於本論文提供許多建議與指導，尤其要特別感謝林淑華老師在實驗上的訓練與指正，以及老師教導我做事情的態度，使我獲益良多，另外也感謝吳慧琳老師對於 B 型肝炎病毒相關知識及實驗的指點。

感謝當初林淑華老師願意當我的指導教授，讓我有機會進到 R510 這個大家庭裡學習，因此我有了一大群的學長姐、學弟妹當靠山，能無後顧之憂的專心完成我的實驗研究。最感謝的是玉真學姊這兩年來的教導，不僅僅只在實驗技術方面的教導，更多的是教導我實驗設計的邏輯性和如何解決實驗問題，同時也協助我完成碩班生涯大小專題討論和進度報告，還要容忍我時常犯錯、問一堆問題和聽我冗言贅詞，實在是大慈善家。說學姊是我第二個老師一點也不為過；感謝軍宇學長對我的教導，交會我許多實驗技巧與協助我解決問題；感謝建宇學長、嘉倫學長、明憲學長對於我實驗上的教導與生活上的關心；謝謝冠瑛學妹、夢倪學妹、嘉璐學妹在實驗方面的協助；感謝實驗室秋雯學姊、淑筑學姊、萌嵐學姊、至淳、瑤絮學妹、之易學弟及士鋒學弟在我有困難的時候伸出援手幫助我；也感謝核心實驗室的勝凱學長、子珊學姊、莉萍學姊、鳳翌學姊、伯約學長、峰麟學長、聖堯學長、政儒學長、瑋柔學姊、俊賢、威年及芊慧，謝謝大家解決我實驗上的問題或是對我的照顧；感謝肝炎中心吳慧琳老師實驗室雪莉學姊、泳璉學長、慧珠學姊在實驗上的教導與耗材的提供；謝謝台大動物中心 9F、10F 工作人員，幫忙我照顧老鼠及處理實驗檢體；也感謝實驗室研究 Hepsin 的前人們辛苦建立的研究基礎和實驗材料；也十分謝謝因實驗而被我犧牲的小鼠，感謝你們的奉獻。

最後感謝我的親人們、爸爸、媽媽、姊姊、巧玟、大學同學們以及關心我的人，在我求學的過程中給予全力的支持、鼓勵和開導，讓我能順利的完成學業。在此，將本論文獻給大家，期許對於你們能有些許的貢獻。

中文摘要

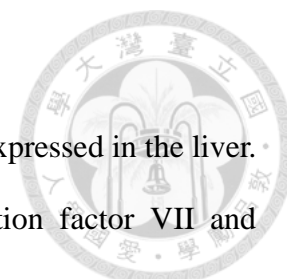


Hepsin 為第二型穿膜絲胺酸蛋白酶，主要表現於肝臟。試管實驗已證實 Hepsin 可活化人類第七凝血因子及肝細胞生長因子前驅物等受質，故推測 Hepsin 可能參與血液凝固與肝細胞生長。先前文獻利用共免疫沉澱實驗發現，Hepsin 與 B 型肝炎病毒 (hepatitis B virus; HBV) 的轉錄活化因子 HBx 有交互作用，由於 HBx 被認為可促進 HBV 的複製，且當含 HBV 基因體的肝癌細胞株 HepG2.2.15 共轉染 Hepsin 與 HBx 時，細胞培養液中 HBeAg (hepatitis B early antigen，可作為病毒複製指標) 的含量上升，因此 Hepsin 被推測能促進病毒複製。本篇論文欲利用基因剔除小鼠模式探討 Hepsin 對 HBV 複製的影響；為確認 Hepsin 相關功能區與 HBV 病毒複製關係，也建立了攜帶 Hepsin cDNA 的腺相關病毒 (adeno-associated virus, AAV) 及肝臟大量表現人類 Hepsin 的基因轉殖小鼠 (Tg-hHPN) 等動物模式。由於小鼠肝細胞無法自然感染 HBV，本論文首先以尾靜脈高壓注射法 (hydrodynamic injection) 將 HBV 質體 DNA 注射入同窩野生型 (wild-type littermate, WT) 小鼠與 HPN 基因剔除 (hepsin knockout, HPN KO) 小鼠，使小鼠肝細胞製造 HBV 後，比較兩組小鼠間血清及肝臟中 HBV 病毒量。確認尾靜脈高壓注射法於肝細胞轉染效率一致的作法，是以抗 HBcAg (hepatitis B core antigen) 免疫螢光染色完成，證明 WT 及 HPN KO 小鼠的肝切片中表現 HBcAg 陽性肝細胞數目相近。後續分析顯示，雖然兩組小鼠血清中 HBsAg (hepatitis B surface antigen) 與 HBeAg 無差異，但 Q-PCR 定量發現 HPN KO 小鼠血清 HBV DNA 約少 WT 小鼠 2 倍，且兩組小鼠的肝細胞 HBV DNA 量相當；因此推測 Hepsin 對於肝細胞內 HBV 複製影響有限，而可能與病毒由肝細胞釋放有關。此外利用 AAV 感染的方式於 HPN KO 小鼠肝臟表現野生型及各功能區突變後，初步顯示表現野生型 Hepsin 的 HPN KO 小鼠，血清中 HBV DNA 量較高。為了免於 AAV 感染系統下的 Hepsin 表現量差異過大，另外利用原核顯微注射技術建立了表現 Hepsin 野生型及各功能區突變型共 3 種品系的 Tg-hHPN 小鼠，其中 2 品系的種源小鼠

(founder)已確認在肝臟大量表現 Hepsin，目前正進行子代配種及子代 Hepsin 表現量分析，未來將建立穩定傳系且表現量高的 Tg-hHPN 小鼠，用於後續研究。

關鍵字:Hepsin 基因剔除小鼠、尾靜脈高壓注射法、B 型肝炎病毒、腺相關病毒、
基因轉殖小鼠

Abstract



Hepsin is a type II transmembrane serine protease predominantly expressed in the liver. In vitro study showed that hepsin can activate human coagulation factor VII and hepatocyte growth factor precursor. This may imply that hepsin is involved in liver development and coagulation. A literature showed hepsin interacted with the trans-activator factor HBx of hepatitis B virus in co-immunoprecipitation assay. HBx was considered to promote HBV (hepatitis B virus) replication, and the expression of HBeAg (hepatitis B early antigen, an indicator of HBV replication) was increased in HBV-genome positive hepatoma cell line, HepG2.2.1.5, when Hepsin and HBx were co-expressed in the cells. Therefore, hepsin was indicated to stimulate HBV replication. This thesis tried to investigate the role of Hepsin in HBV replication using hepsin-deficient mice (HPN KO mice). Moreover, we established an adeno-associated virus (AAV) delivery system and the transgenic mouse models which expressed human Hepsin (Tg-hHPN) in the liver to validate the importance of Hepsin in HBV replication. Since HBV can not directly infect mouse hepatocyte, we used hydrodynamic injection to deliver HBV plasmid DNA into WT and HPN KO mice for establishing HBV replication in mice hepatocytes. Both strains of mice showed nearly equivalent amount of HBcAg (hepatitis B core antigen) expressing cells as detected by immunohistochemistry, suggesting that the efficiency of hydrodynamic injection was similar between WT and HPN KO mice. Subsequent analysis revealed that serum HBsAg (hepatitis B surface antigen) and HBeAg levels had no significant differences, but the serum HBV DNA levels in HPN KO mice were 2 times lower than those in WT mice. However, the hepatic HBV DNA levels were similar in WT and HPN KO mice. This observation suggested that Hepsin is associated with HBV secretion or assembly. Furthermore, the preliminary data showed that expression of wild-type hepsin in HPN

KO mice using AAV-delivery system seems to enhance the serum HBV DNA levels. Besides, we established three different lines of Tg-hHPN mice, including wild-type and the functional domain mutant Hepsin transgenic mice. So far, two of these transgenic lines had the founder mice with the expression of Hepsin in liver for offspring breeding. We will screen and establish the stable and high-level expression of human HPN Tg-hHPN mice for further studies.

Key words: Hepsin Knockout mice, Hydrodynamic injection, Hepatitis B virus,
Adeno-associated virus, transgenic mice

目錄



論文口試委員審定書.....	i
誌謝.....	ii
中文摘要.....	iii
英文摘要.....	v
圖目錄.....	viii
表目錄.....	ix
緒論.....	1
材料方法.....	8
實驗結果.....	17
討論.....	22
參考文獻.....	27
附錄.....	59

圖目錄



圖一、B 型肝炎病毒質體 DNA，pHBV1.3 B6 示意圖及 B 型肝炎病毒質體 DNA 尾靜脈高壓注射法實驗時程圖。.....	32
圖二、HPN 基因剔除小鼠與 WT 小鼠尾靜脈高壓注射 pHBV1.3B6 質體 DNA 後，肝臟中 HBcAg 表現情況。.....	33
圖三、HPN 基因剔除小鼠與 WT 小鼠尾靜脈高壓注射 pHBV1.3B6 質體 DNA 7 天後，血清中 HBsAg 與 HBeAg 比較圖。.....	34
圖四、HPN 基因剔除小鼠與 WT 小鼠尾靜脈高壓注射 pHBV1.3B6 質體 DNA 7 天後，血清中 HBV DNA 與肝臟中 HBV DNA 比較圖。.....	35
圖五、尾靜脈高壓注射 pHBV1.3B6 質體 DNA 7 天後，血清中 HBV DNA 量 與肝臟中 HBV DNA 量比較。.....	36
圖六、腺相關病毒所攜帶質體 pssAAV-hHPN 結構示意圖。.....	37
圖七、免疫組織染色法分析腺相關病毒載體 pssAAV human Hepsin 表現 人類 Hepsin 蛋白質。.....	38
圖八、HPN 基因剔除小鼠感染 AAV 病毒載體 2 周後肝臟中 Hepsin RNA 定 量結果。.....	39
圖九、西方墨點法與免疫組織染色法偵測 AAV-hHPN 感染後肝臟 Hepsin 表現量。.....	40
圖十、以各組 AAV-hHPN 感染後的 HPN 基因剔除小鼠進行尾靜脈高壓注 射 pHBV1.3B6 質體 DNA 7 天後，血清及肝臟中病毒量分析。.....	42
圖十一、以各組 AAV-hHPN 感染後的 HPN 基因剔除小鼠進行尾靜脈高壓 注射 pHBV1.3B6 質體 DNA 7 天後，血清中 HBV DNA 量與肝臟中 HBV DNA 量比較。.....	43
圖十二、基因轉殖鼠質體 pBS-hHPN 結構示意圖。.....	44
圖十三、以 PCR 確認基因轉殖鼠 genomic DNA 含基因轉殖片段。.....	46

圖十四、基因轉殖小鼠繁殖族譜。.....	47
圖十五、以西方墨點法及組織免疫染色證明基因轉殖小鼠 Tg-hHPN ^{SRCR} 肝 臟表現人類 Hepsin 蛋白。.....	50
圖十六、以西方墨點法及組織免疫染色證明基因轉殖小鼠 Tg-hHPN ^{RS} 肝臟 表現人類 Hepsin 蛋白。.....	52
圖十七、基因轉殖鼠南方墨點法分析結果。.....	54
圖十八、以西方墨點法分析基因轉殖小鼠各組織中人類 Hepsin 蛋白質表 現情況。.....	55

表目錄

表一實驗用引子表.....	57
表二實驗中使用的一級抗體及二級抗體資訊.....	58

緒論

Hepsin 的組織分佈與蛋白結構

Hepsin 為第二型穿膜絲胺酸蛋白酶，當初是以絲胺酸蛋白酶高度保留區反轉譯序列設計為探針，從人類肝臟互補基因庫中篩選而得到，因在肝臟中大量表現，所以命名為 Hepsin (Leytus et al., 1988)。以北方墨點法得知 Hepsin 除了在肝臟細胞大量表現，也少量表現在腎臟、胰臟、前列腺、胸線、甲狀腺 (Tsuji et al., 1991)。人類 Hepsin 基因位於第 19 號染色體短臂 11-13.2 區域 (Kurachi et al., 1994)，其互補基因長約 1.8 kb，轉譯出 417 個胺基酸組成約 51 kDa 絲胺酸蛋白酶，N 端第 1~17 個胺基酸位於細胞膜內、第 18~44 個胺基酸為細胞膜穿膜區域，第 45~417 個胺基酸為細胞膜外端部分。Hepsin 細胞膜外端區經由 Arg162-Ile163 切割水解活化後，形成 C 端催化區 (catalytic region) 絲胺酸蛋白酶及 N 端非催化區 (non-catalytic region) SRCR (Scavenger Receptor Cysteine-Rich) 區域 (附錄一)，兩個區域連結主要是由絲胺酸蛋白酶區域裡的 Cys277 和 SRCR 區域的 Cys153 以雙硫鍵及其他非共價鍵連結。由 Somoza 在 2003 年解出的 Hepsin 3D 結構圖，並藉由電子雲分佈圖得知絲胺酸蛋白酶區域 (serine protease domain) 中，由 His203、Asp257、Ser353 組成酵素活化中心 (Catalytic triad)，傾向切割受質為 P1 (Arg、Lys)、P2 (Thr、Leu、Asn)、P3 (Gln、Lys)、P4 (Pro、Lys) (Herter et al., 2005)；非催化區 (non-catalytic region) 具有 SRCR 區域 (scavenger receptor cysteine rich domain)，已被證實與 Mac-2 Binding Protein (M2BP) 有高度相似性 (Somoza et al., 2003)，目前功能仍然未知。人類 Hepsin 在序列比對上與大鼠、小鼠相似性達 88.7% (Farley et al., 1993)，主要差異為小鼠 Hepsin 多一亞型，為 N 端胺基酸序列多出 20 個胺基酸，可能是 mRNA 經由選擇性剪接 (Alternative splicing) 所形成，不過其亞型生理意義仍未知 (Kawamura et al., 1999)。

Hepsin 受質與功能

絲胺酸蛋白酶在人體中扮演重要角色，負責協調體內各種生理功能，如消化、免疫反應、血液凝固與纖溶和生殖功等 (Hedstrom, 2002)。目前已被證實 Hepsin 在體外試管實驗 (*In vitro*) 的受質包括：人類前肝細胞生長因子 (pro-hepatocyte growth factor)、第七凝血因子 (Factor VII)、第十二凝血因子 (Factor XII)、第九凝血因子 (Factor IX)、蛋白裂解酶 (matrilysin) 與血纖維蛋白溶酶原前驅物 (Plasminogen activator) (Ustach et al., 2010 ; Ustach et al., 2010)，因此推測可能跟血液凝固或肝細胞生長與分化相關 (Schmidt et al., 1995)。而 Hepatocyte growth factor activator inhibitor-1B 與 Hepatocyte growth factor activator inhibitor-2 則可抑制 Hepsin 活性 (Kirchhofer et al., 2005; Shia et al., 2005)。

Hepsin 生理意義與病理意義

Wu Q et al 與本實驗室分別製造出 Hepsin 基因剔除(Hepsin knockout mice ; HPN KO)小鼠，此小鼠發育生長正常且可繁殖出子代，其血液凝固與肝功能皆正常，肝臟再生能力也與野生型小鼠 (wild-type mice) 無差異 (Wu et al., 1998 ; Yu et al., 2000)，唯血清中鹼性磷酸酶約為野生型小鼠兩倍之多，不過此生理意義仍然不明。另有報告顯示 HPN 基因剔除小鼠的耳蝸發育異常，造成聽力不良。推測可能與胚胎發育時甲狀腺不足有關 (Guipponi et al., 2007)。本實驗室已用 HPN 基因剔除小鼠證實 Hepsin 能藉由轉化 pro -HGF (pro -hepatocyte growth factor 為後，降低肝細胞間隙連接 (Gap junction)蛋白表現及功能 而調節肝細胞體積及肝臟結構 (Hsu et al., 2012)。綜合上論，Hepsin 在生物體內所扮演的生理角色目前仍未完全了解，有待更進一步的研究。不少文獻皆指出 Hepsin 與前列腺癌、卵巢癌及子宮內膜癌細胞生長及轉移有關 (Dorn et al., 2014 ; Klezovitch et al., 2004 ; Nakamura et al., 2006 ; Tang et al., 2014)，不過在肝癌研究仍未明。本團隊先前研究發現在肝細胞癌組織中 Hepsin 表現減少，而低表現 Hepsin 病人存活時間較高表現 Hepsin 病人短，推測 Hepsin 表現可以抑制肝細胞癌的細胞增生與細

胞群落形成 (Chen et al., 2006)。先前 Zhang 團隊從慢性病毒感染病人體內分離出 B 型肝炎病毒 (Hepatitis B virus)，利用病毒 HBx 與人類互補基因庫序列進行酵母菌雙雜合 (Yeast two hybrid)，找到 Hepsin 胜肽 (Hepsin peptide) 片段。接著用免疫共沉澱法 (Co-Immunoprecipitation) 證明兩蛋白有相互作用，同時用 HepG2 肝癌細胞株同時共轉染 Hepsin 胜肽片段質體 DNA 與 HBx 質體 DNA 來證明 Hepsin 胜肽片段與 HBx 蛋白在細胞質內有共位現象 (colocalize)。用肝癌細胞株 (HepG2.2.15; 細胞可自行製造出具有感染力 HBV) 共轉染 Hepsin 胜肽片段質體 DNA 與 HBx 質體 DNA 時，會增加 HBV 複製力指標 HBe 抗原蛋白 (HBeAg)，推測兩者蛋白間的作用可增加 HBV 的病毒複製量 (Zhang et al., 2005)。此外，另有團隊證明利用 Cytotrap two-hybrid system 技術，在人類肝細胞互補基因資料庫中，尋找可能與 E 型肝炎病毒 (Hepatitis E virus; HEV) pORF3 有結合作用的蛋白，並用免疫共沉澱法證明 Hepsin 與 pORF3 有特異性的結合作用 (Wang et al., 2014)，不過兩蛋白的結合對於 HEV 的影響還有待探討。

B 型肝炎病毒 (Hepatitis B virus ;HBV)

病毒性肝炎

肝炎可分為酒精性肝炎、非酒精性肝炎、藥物性肝炎及病毒性肝炎。而病毒性肝炎是由一些病毒引致肝臟發炎的傳染病，而目前已知有 A 型肝炎病毒、B 型肝炎病毒 (Hepatitis B virus ; HBV)、C 型肝炎病毒、D 型肝炎病毒及 E 型肝炎病毒。A 型、E 型肝炎病毒傳染路徑為糞口傳染，B 型肝炎病毒與 C 型肝炎病毒傳染路徑為病毒血液的接觸感染，而 D 型肝炎病毒，無法直接感染肝細胞，它會與 B 型肝炎病毒一起傳染，加重其肝炎嚴重性。

B 型肝炎病毒與 B 型肝炎

HBV 為 DNA 病毒，屬於 Hepadnaviridae 科。HBV 感染會造成急性或慢性 B 型肝炎。急性 B 型肝炎可能會出現食慾不振、疲倦、噁心、嘔吐、上腹部

不適或腹脹等症狀。約有 1% 患者會發生猛爆性肝炎;而慢性 B 型肝炎屬於全球重大公衛議題，超過 3.5 億人口有慢性 B 型肝炎。慢性 B 型肝炎在末期約有 25% 機率會轉變為肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)，根據世界衛生組織統計結果，全世界每年有超過七十八萬人因為感染而罹患肝癌死亡。慢性 B 型肝炎大部分沒有症狀，少部份人有輕微右上腹脹痛或厭食。台灣曾是 B 型肝炎流行區，根據統計結果得知高達 70~90% 的成人曾被 HBV 感染過，而目前國人 B 型肝炎帶原率約為 15% (Centers for Disease Control, ROC Taiwan)。HBV 可經由輸血、性接觸及共用注射針頭進行水平傳染，而絕大部分感染路徑為帶原母親的垂直傳染。隨著全面推行 B 型肝炎疫苗注射後，國人及新生兒感染 B 型肝炎情況明顯下降。不過全台目前約四百萬人為帶原者，而慢性肝病與肝硬化仍是 102 年國人十大死因之一，所以對於 HBV 的了解、治療及預防，仍為重要的議題之一。尤其是對於治療 B 型肝炎病毒的藥物開發，傳統的干擾素可藉由抑制病毒及促進免疫系統這兩方面來抑制 HBV 的活性，使病毒活性變低，肝臟發炎的狀況獲得改善，但因無法清除 HBV 的共價閉合環狀 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA)，導致無法完全清除肝細胞內 HBV。因此持續開發治療 B 型肝炎藥物仍為重要醫療方向 (Lucifora et al., 2014)。

B 型肝炎病毒基因與蛋白結構

具有感染力的 HBV 顆粒約為 42 nm，由外套膜(envelope)及核心顆粒(nucleocapsid)組成。核心顆粒是由核心蛋白 (core protein)及部分雙股環狀的病毒 DNA 組成 (Birnbaum and Nassal, 1990)。HBV 基因體大小約為 3200 核苷酸，包含四個啟動子 (core promoter、pre-S1 promoter、pre-S2/S promoter 及 X promoter)，可分別轉錄出四條 RNA：3.5 kb pre-genomic RNA、2.4 kb large S RNA、2.1 kb middle S/small S RNA 及 0.7 kb X RNA；二組增強子 (Enhancer，ENI 及 ENII) 可增強四個啟動子的活性 (Nassal, 1999)。而 RNA 序列上包含了四個開放閱讀框 (open reading frame)，分別轉譯出 DNA 聚合酶 (DNA polymerase)、核心抗原

(HBcAg)、HBe抗原 (HBeAg)、表面抗原 (HBsAg)和X蛋白 (HBx)。核心抗原可以組成病毒的殼核心顆粒蛋白 (Capsid)，為直徑27 nm的二十面體，包裹 pre-genomic RNA及DNA聚合酶。HBe抗原 (HBeAg)是由前核心 (precore)蛋白基因轉錄，再經轉譯及修飾而成。前核心蛋白前端帶有疏水性的訊息胜肽 (signal peptide)，將其帶往內質網並切除訊息胜肽及C端 (C-terminal)，形成HBe抗原，再分泌至細胞外。DNA 聚合酶，是病毒複製所需蛋白 (C and WS, 2000)，其包含了反轉錄酶 (reverse transcriptase)與核糖核酸分解酶 (RNase H)活性。表面抗原可分為三種表面蛋白：大型表面蛋白、中型表面蛋白以及小型表面蛋白，共同構成病毒顆粒的外套，也形成棒狀或球狀不含HBV DNA的病毒顆粒，可能的功能為吸附宿主產生對抗病毒的抗體，以利病毒不被宿主免疫反應清除。X蛋白是一個轉錄活化因子 (transcriptional transactivator)，調控細胞的轉錄 (transcription)、訊號傳遞、細胞週期、蛋白降解與細胞凋亡等多種功能 (Tang et al., 2006)。一般被認為HBx可以提高HBV的複製能力，使HBV病毒量上升 (McClain et al., 2007)，而HBx基因轉殖鼠被發現約12個月大之後，小鼠肝臟會有肝細胞癌的病理現象產生，因此HBx也被認為會促進肝細胞癌的生成 (Kim et al., 1991)。

B型肝炎病毒生活史

HBV 進到宿主體內後，會先與宿主肝細胞膜上的受體結合，目前已證實 HBV 可經由 Sodium taurocholate (NTCP)進入肝細胞 (Yan et al., 2012)，不過 NTCP 可能屬於共受體 (Taylor, 2013)。進入肝細胞內的 HBV 會先在細胞質內脫去套膜 (envelope)，接著進到細胞核釋出 HBV DNA，藉由 DNA 修補將原本不完整雙股 DNA 轉為完整共價閉合環狀 DNA (cccDNA)，接著以 cccDNA 當為模板，開始進行轉錄合成出正股的 RNA，分為 3.5 kb、2.5 kb、2.1 kb 及 0.7 kb RNA，這些 RNA 會被運送到細胞質，再由轉譯作用製造出病毒複製所需要的蛋白，為 DNA 聚合酶、HBcAg、HBeAg、HBsAg、HBx，而 3.5 kb RNA 為 pre-genomic RNA，其 5'端有特殊結構 ε 可被 DNA 聚合酶辨認結合，再一起被 HBcAg 包裹成核心

顆粒 (core particle)，此外 DNA 聚合酶也將 pre-genomic RNA 作為模板進行反轉錄，先做出一完整的負股 DNA，再做出部份正股 DNA，而此含部分不完整的雙股 DNA 的核心顆粒可到宿主細胞內質網，由 HBsAg 包裹出外套膜進行病毒組裝、並隨著細胞分泌的途徑釋出病毒顆粒；含部分不完整的雙股 DNA 的核心顆粒也可再進入細胞核，進行第二輪的複製，增加核內 cccDNA 量，重複病毒生活史。

HBV 小鼠模式

有鑑於小鼠基因特性與人類相近，且為近親繁殖品系可減少實驗個體間的差異，同時小鼠體型小，飼養環境和條件較易建立等優點，小鼠實驗已被廣泛的運用在各領域的研究中。不過 HBV 無法感染小鼠肝細胞，因此無法藉由自然感染 HBV 來建立小鼠 HBV 小鼠模式，必須靠基因工程達成此目的 (Dandri et al., 2006; Chayama et al., 2011)。大致可把目前 HBV 小鼠模式分為兩類；(1) HBV 複製模式(HBV-replication model)，有 HBV 基因轉殖鼠、腺病毒攜帶 HBV 質體 DNA 感染小鼠及尾靜脈高壓注射 HBV 質體 DNA。HBV 基因轉殖鼠可被用來研究 HBV 複製的機制，不過因為 HBV 基因轉殖鼠對於病毒所產生的抗原有免疫耐受性，所以不會發展成肝病，且因 HBV 基因轉殖鼠為 HBV 嵌入小鼠染色體中，因此肝細胞內無 HBV 轉錄模板 cccDNA，若要拿來當測試清除 HBV 藥物的動物模式則不適合。腺病毒攜帶 HBV 質體 DNA 或尾靜脈高壓注射 HBV 質體 DNA 小鼠模式的特點為可用來研究 HBV 病毒與免疫系統調控機制，且尾靜脈注射法在注射 HBV 質體 DNA 隔天就有病毒顆粒的產生，第 7 天可高達約 10^7 HBV DNA/mL blood 達到高峰，但之後 HBV 病毒量即隨時間往下降，因此其缺點為 HBV 無法長期在細胞內表現。(2) 人類肝細胞嵌合小鼠 (human-mouse chimera models)，是把人類肝細胞移植到免疫缺陷 (severe combined immunodeficiency, SCID mice) 老鼠或是免疫缺陷 uPA (Urokinase-type plasminogen activator/SCID) 基因轉殖鼠肝臟中，其原理皆為使人類肝細胞取代原本老鼠肝細胞，並在肝臟中

生長並能複製，最後再以 HBV 直接感染人類肝細胞嵌合小鼠肝臟，建立起 HBV 小鼠模式。此人類肝細胞嵌合小鼠缺點為花費貴，且因為免疫缺陷老鼠，所以無法探討免疫相關問題。



研究目的

先前文獻指出 Hepsin 與 HBx 蛋白在細胞內有共位現象及相互作用，且用 HBV 基因體肝癌細胞株 HepG2.2.15 共轉染 Hepsin 胜肽片段質體 DNA 與 HBx 質體 DNA 時，會增加 HBV 複製力指標 HBe 抗原蛋白，進而推測兩者蛋白間的作用可增加 HBV 的病毒複製量。本篇論文利用在活體內，探討 Hepsin 在 HBV 複製過程中的重要性與其可能扮演的角色。實驗設計以 HPN 基因剔除小鼠與 WT 小鼠，在尾靜脈高壓注射法的 HBV 小鼠模式下來探討。同時以腺相關病毒及基因轉殖鼠建立肝臟大量表現野生型與突變型人類 Hepsin 小鼠動物模型，探討 Hepsin 功能區可能參與其中。

材料與方法

動物

本論文使用的HPN基因剔除小鼠已發表 (Yu *et al.*, 2000) , 與C57BL/6J回交 (backcross) 超過8代以上。實驗中所使用的對照組小鼠為與HPN基因剔除小鼠同窩的野生型小鼠(wild-type ; WT littermate)。小鼠飼養在台灣大學實驗動物中心無特殊病原菌之動物房。所有動物照護、試驗設計及操作流程皆遵守臺灣大學動物管理委員會規範。

尾靜脈高壓法

先將小鼠秤重，小鼠以 175 瓦特燈炮照射 5 分鐘，以保定器固定小鼠，只露出小鼠尾巴。找尋小鼠尾靜脈，用 75%酒精擦拭尾巴消毒後，以 27 號針頭及 3mL 針筒將含 100 μ g DNA 之 PBS 緩衝液從尾靜脈打入小鼠體內，注射時間為 5~8 秒，再以 70%酒精棉片止血 10~30 秒。注射緩衝溶液體積為 0.1 mL/g-小鼠體重。

石蠟切片製備及免疫組織染色

小鼠斷頸犧牲後將肝臟組織取出，經PBS緩衝液處理後。取小鼠肝臟左葉放入10%福馬林固定過夜。第二天經乙醇及二甲苯逐步脫水，以液態石臘包埋，經低溫凝固後製成檢體組織蠟塊。石蠟切片厚度為5 μ m的薄片，貼至表面含有silicon的玻片上，置於65 $^{\circ}$ C烘箱30分鐘後，以二甲苯脫蠟三次，每次5分鐘後，再進行水合，水合過程為100%乙醇兩次、95%乙醇兩次、70%乙醇一次，50%乙醇一次，每次5分鐘，最後浸泡於ddH₂O 5分鐘。水合後以TBS (150mM NaCl ,20mM Tris-Cl pH7.5)浸泡5分鐘，再換ddH₂O浸泡10分鐘，放入以滾燙的10mM Citrate buffer中加熱20分鐘進行抗原復原 (Antigen retrieval) 步驟。加熱20分鐘後室溫冷卻，再以TBS浸潤5分鐘。以圈畫筆圈畫切片周圍，滴上30% H₂O₂室溫10分鐘達到去除內生性過氧化酶效果，PBS緩衝液浸潤兩次，每次5分鐘。以抗體阻斷染色劑 Rodent Block M (Biocare medical, concord, CA, USA) 於室溫作用2小時。甩掉抗體阻斷染色劑後，加上一級抗體 (稀釋液為 5%BSA/PBS) 4 $^{\circ}$ C反應約

14~16小時。以PBST (PBS/0.2% Triton X-100) 清洗6次，每次5分鐘。接著以Super Sensitive™ Polymer-HRP IHC Detection System 套組 (BioGenex, San Roman, CA, USA) 中的Super enhancer滴上切片，室溫20分鐘，再PBS浸潤2次。加入套組中polymer-HRP 室溫30分鐘，以PBST清洗6次，每次5分鐘。最後用套組中的DAB呈色，紀錄顯微鏡視野中最佳呈色時間。以ddH₂O洗去DAB結束反應，以Mayer's Hematoxylin (Sigma-ALDRICH, St. Louis, MO, USA)進行細胞核對比染色，ddH₂O洗去染劑後加入10mM Tris-Cl pH8.8溶液5分鐘。最後浸入50%乙醇一次、70%乙醇一次、95%乙醇兩次、100%乙醇兩次、二甲苯脫蠟兩次，每次5分鐘進行脫水。以封片膠Entellan® (Merck,Darmstadt,Germany)及蓋玻片進行封片。

冷凍切片製備及免疫螢光染色

免疫螢光染色切片製備為取小鼠中葉以4 % paraformaldehyde室溫固定15分鐘，先用PBS緩衝液洗去固定液，再利用4.5%、9%、12%、18%、24%的sucrose/PBS溶液於4℃逐步脫水。於4.5%、9%、12%溶液中脫水反應一個小時後，於18%溶液中脫水反應至組織沉澱，24%溶液中脫水過夜。隔日取出，檢體以抗凍劑Tissue-Tek® O.C.T.compound (Sakura Finetek,Torrance,CA,USA) 包埋製成冷凍組織塊，保存於-80℃。進行冷凍切片，切片厚度為8 μm，貼至表面覆蓋有silicon的玻片上，放入37℃烘箱15分鐘，以PBS浸潤兩次，每次5分鐘，以圈畫筆圈畫切片周圍，滴上抗體阻斷染色劑 Rodent Block M (Biocare medical, concord, CA, USA)於室溫作用2小時，甩掉抗體阻斷染色劑後，加上一級抗體 (稀釋液為5%BSA/PBS) 4℃反應約14~16小時。以PBST (PBS/0.2% Triton X-100)清洗6次，每次5分鐘。滴上二級抗體Cys-3 conjugated anti-rabbit IgG (Jackson Immuno Research,West Grove, PA, USA) 室溫避光一小時，以PBST (PBS/0.2% Triton X-100)清洗6次，每次5分鐘。以1mg/mL DAPI (Sigma-ALDRICH, St. Louis, MO, USA)染色10分鐘。以PBS浸潤三次，每次5分鐘。最後用水溶性封片膠 (Dako Fluorescence Mounting Medium, Glostrup,Dako)進行封片。

眼角採血

小鼠麻醉後，繃緊欲採血眼球處附近皮膚，以玻璃毛細管，插入眼窩後方的微血管叢，毛細管與地面呈水平，藉由虹吸管原理引出血液。血液經由毛細管流至 1.5mL 離心管後，離心 4500xg 15 分鐘分離出血清。

血清 HBV 表面抗原 HBsAg 、HBeAg 測定

小鼠以眼角採血採檢，將 40 μ L 小鼠血清以 PBS 緩衝液稀釋十倍，以亞培 AXSYM 全自動血清分析儀測得血液中 HBsAg 單位為 Signal To Noise (S/N)與 HBeAg 單位為 Signal To Cutoff (S/CO)。

萃取血清中 HBV DNA

小鼠以眼角採血採檢，取 25 μ L 血清混合 74 μ L Suspension buffer (10mM Tris-Cl pH 7.5, 8mM CaCl₂, 6M MgCl₂) 與 30 Units micrococcal nuclease 置於 37°C 反應 30 分鐘，接著利用 QIAGEN DNA Blood mini kit (Cat No.51106)，進行病毒 DNA 抽取，最後以 100 μ L elution buffer 回溶 DNA。

萃取肝臟中 HBV DNA

小鼠斷頸犧牲取下肝臟組織，洗去血水後拭乾。取約 0.1 g 肝臟，加 1 mL lysis buffer (10mM Tris-Cl pH 7.5, 1mM EDTA, 50mM NaCl, 0.25% NP-40 及 8% Sucrose) 以 QIAGEN TissueLyserII 將組織均質，靜置 37°C 20 分鐘後，以最高轉速離心 10 分鐘，取上清液加入 8 μ L 1M CaCl₂、6 μ L 1M MgCl₂、30 Units micrococcal nuclease 與 3 Units DNaseI，於 37°C 反應 1 小時後，加入 300 μ L 26% PEG 震盪均勻，放入 4°C 冰箱 1 小時或是放隔夜。離心 8000 rpm 10 分鐘，去除上清液，加入 100 μ L Suspension buffer 打散沉澱物後，加 30 Units micrococcal nuclease 與 3 Units DNaseI 37°C 反應 1 小時，加 300 μ L SDS-Lysis buffer (25 mM Tris-Cl pH 7.5, 10 mM EDTA, 1 % SDS)後，加 10 μ L Proteinase K (20 mg/mL)，55°C 反應 14~16 小時。加 430 μ L Phenol/chloroform，混勻後最高轉速離心 10 分鐘。取上清液約 400 μ L 加入 800 μ L 100%酒精與 40 μ L 3M NaOAc，混合均勻，放入 -80°C 靜置 1 小

時或是隔夜。4°C 離心最高轉速 10 分鐘，去除上清液，加入 1 mL 70% 酒精，4°C 離心最高轉速 10 分鐘，去除上清液，待酒精揮發後，加入 15 μ l TE buffer 保存 DNA。

即時聚合酶鏈鎖反應定量 HBV DNA

取萃取血清 HBV DNA 或肝臟 HBV DNA 以 Roche Lightcycler[®] 即時聚合酶鏈鎖反應儀進行定量。取檢體 5 μ l 加入 8 mM CaCl₂ 0.8 μ l、10 μ M HBV (+)1181 0.5 μ l、HBV (-)2016 0.5 μ l、Roche Lightcycler SYBR green 1 μ l，補水至總體積為 10 μ l 進行聚合酶鏈鎖反應。反應條件為：(1) 95°C 10 分 (2) 95°C 10 秒、60°C 5 秒、72°C 20 秒 重複此三個步驟 45 次 (3) 65°C 15 秒 (4) 40°C 30 秒。利用已知濃度 pHBV1.3 B6 質體 DNA 推算 copies，並當作標準值。單位為 Copies/mL。

HBcAg 免疫螢光染色計數

將小鼠犧牲，取出肝臟組織經由固定、脫水、包埋處理後，以 8 μ m 厚度進行冷凍切片，每隔 0 μ m 收取一片肝臟切片，共收集 6 片。組織切片經由免疫螢光染色後，以螢光顯微鏡進行拍照計數。每片切片拍攝 5 張 200 倍視野，在利用 Image J (National Institute of Health, MD, USA) 計數 HBcAg 陽性細胞數。每隻小鼠肝臟總共計數 20 個 200 倍視野圖，計數結果相加後除以總視野數。

腺相關病毒 (adeno-associated virus, AAV) 質體構築

人類 Hepsin 野生型 (hHPN^{WT}) 與突變型 (hHPN^{RS}) 全長 cDNA 已於之前發表 (Chen et al., 2006, 突變型 hHPN^{RS} cDNA 主要為 Hepsin 被活化時的切點 Arg¹⁶² 突變成 Ala，絲胺酸蛋白酶活性區 Ser³⁵³ 突變為 Tyr，藉以無法表現活化即被活化的全長 Hepsin 蛋白；突變型 hHPN^{SRCR} cDNA 主要為 Hepsin SRCR 區域突變，將 SRCR 區域結構破壞，將 Cys⁹⁰、Cys¹¹⁹、Cys¹⁴⁰ 進行點突變，藉以表現失去 SRCR 區域構形的全長 Hepsin 蛋白。依實驗室前人所製備完成的 pCMV hHPN^{WT}、pCMV hHPN^{RS}、pCMV hHPN^{SRCR} 質體，利用序列上帶有特定限制酶切位序列的引子 5' HPN MluI、3' HPN SalI，進行聚合酶連鎖反應得到人類 Hepsin cDNA 片段，再

經由純化及限制酶酵素切割後 (hHPN^{WT} cDNA、hHPN^{RS} cDNA 為 *MLuI* 與 *SaII* ； hHPN^{SRCR} cDNA 為 *MluI* 與 *EcoRV*)，接合於切過相同限制酶的載體 pAAV-SMS (含 L-ITR、R-ITR、ApoE-HCR、human $\alpha 1$ Antitrypsin、Factor IX intron I、3' UTR Polyadenylation Signal)，最後完成質體 DNA，交由台大第一共研確認核酸序列無誤後，命名為 pssAAV-hHPN^{WT}、pssAAV-hHPN^{RS}、pssAAV-hHPN^{SRCR}。取 600 μ g DNA 交給中研院陶秘華老師實驗室，進行 AAV 製作與純化。

質體 DNA 轉型 (transformation)

取 20 μ l 質體 DNA (DNA 濃度依實驗需求調整)與 200 μ l 勝任細胞 DH5 α 溫和混和，置於冰上 30 分鐘後，放入 42°C 水浴槽作用 90 秒，再置於冰上 2 分鐘，加入 800 μ l (為 DH5 α 體積 4 倍量) SOC 培養基 (2% BactoTM Tryptone BD、0.5% BactoTM-yeast extract、0.05% Sodium chloride、10 mM MgCl₂、20 mM Glucose) 放入 37°C 搖晃反應 1 小時後，取十分之一即十分之九分別塗到含抗生素的 LB 培養基，靜置於 37°C 反應約 14~16 小時，待菌落形成。

即時聚合酶鏈鎖反應定量 AAV DNA

將 AAV-hHPN 用 QIAGEN DNA Blood mini 套組(Cat No.51106)，進行 DNA 抽取。以 ABI 7500 即時聚合酶鏈鎖反應儀 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA)進行定量。取未知濃度 AAV DNA 5 μ l 加入 2X KAPA SYBR fast q-PCR Master Mix 10 μ l、10 μ M hAAT (F) 0.4 μ l、10 μ M hAAT (R) 0.4 μ l、50x ROX low 0.4 μ l，補水至總體積為 25 μ l 去進行聚合酶鏈鎖反應。反應條件為：(1) 50 °C 2 分(2) 95°C 10 分(3) 95°C 30 秒、60°C 60 秒、78°C 25 秒，重複此三個步驟 30 次。利用已知濃度 pssAAV-hHPN 質體 DNA 推算 copies，並當作標準值。單位為 Copies/mL。

AAV 尾靜脈注射

將已分裝保存於-80°C 的 AAV 取出解凍，以 1X 無菌 PBS 稀釋 AAV，本次實驗施打劑量為 10¹¹ copies/200 μ l PBS/小鼠。小鼠先照光加熱 5 分鐘，接著以保

定器固定，找尋小鼠尾靜脈，用 70%酒精棉片擦拭消毒，以胰島素針筒(BD, Cat. 328820)吸取稀釋後 AAV 進行施打，從小鼠尾靜脈注射至體內，再以 70%酒精棉片止血 10~30 秒。



小鼠肝臟蛋白萃取

將小鼠斷頸犧牲，快速取下肝臟，經 PBS 緩衝溶液清洗多餘的血水後秤重。約取 0.1g 肝臟，加入 500 μ l 蛋白萃取液 NP-40 lysis buffer (50mM Tris-Cl pH7.5, 150mM NaCl, 1mM CaCl₂, 2mM EDTA pH8.0, 1%NP-40 及 10% Glycine，使用前加 1mM PMSF, 1mM DTT, 1% Protease inhibitor Cocktails (Sigma, MO, USA))，以 QIAGEN TissueLyserII 將組織打碎，確認組織萃取液呈現均質狀。以 4°C 離心機最高轉速離心 20 分鐘。取上清液至另一新的 1.5mL 離心管，放入 -80°C 冰箱冷凍 1 小時。回融後以 4°C 離心機最高轉速離心 20 分鐘，收集上清液，即為蛋白萃取液，分裝後放入 -80°C 冰箱保存。取 10 μ l 蛋白萃取液，以滅菌水做 20 倍及 100 倍稀釋，用 BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) 進行蛋白定量(標準液為胎牛血清蛋白)。以 96 孔微量盤盛裝，取 10 μ l 蛋白萃取液加到 200 μ l Working reagent (50 part reagent A+1 part reagent B)，混合均勻後放置 37°C 培養箱搖晃 30 分鐘。取出 96 孔微量盤放置於室溫 5 分鐘後，以 96 孔微量盤判讀儀 (Model 340, Molecular Device, CA, USA) 測波長 562nm 得知吸光值。在利用 BSA 標準品吸光值比較，推算出蛋白濃度

西方墨點法

取總蛋白 100 μ g 加入 3x Cracking buffer 與滅菌水調整體積，混勻後煮沸 10 分鐘，置於冰上 5 分鐘。以 SDS-PAGE (5% stacking gel ;10% separating gel)，電壓 130 伏特將蛋白展開。準備裁切完大小的 PVDF 膜 (PerkinElmer Cat NO. NEF1002001PK)，先泡入甲醇 15 秒，再浸泡二次水 2 分鐘。與已跑膠展開後的 SDS-PAGE，依照順序由下往上為 6 張 3M paper、PVDF 膜、1 張 3M paper、SDS-PAGE 及 5 張 3M paper，泡入 Transfer buffer (10% Tris-Glycin Methanol) 15

分鐘。將 PVDF 與 SDS-PAGE 中間那張 3M paper 抽出並對齊，接著利用 TE77 semi-dry transfer (GE Healthcare, Piscataway, NY, USA)，以一片 60mA 電流 1.5 小時進行蛋白轉印。將轉印完成的 PVDF 膜放入 TBST/5% Milk (150mM NaCl, 20mM Tris-Cl pH7, 1% Tween 20, 5% 安佳脫脂牛奶) 室溫搖晃 1 小時，進行非特异性特抗原阻斷。將 PVDF 膜放入一級抗體中（以 TBST/5% Milk 進行稀釋，稀釋倍率視抗體而定）4°C 12~16 小時。將 PVDF 膜取出，用 TBST (150mM NaCl, 20mM Tris-Cl pH7, 1% Tween 20) 清洗 6 次，每次 5 分鐘。加入二級抗體（以 TBST/5% Milk 進行 1:10000 稀釋）室溫搖晃 2 小時後，再以 TBST 清洗 6 次，每次 5 分鐘。以冷光呈色劑套組 (Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate ; Millipore, MA, USA) 呈色，以 X 光片感光顯影。

小鼠肝臟 RNA 萃取

小鼠斷頸犧牲後，快速取出肝臟，取約 0.1g 肝臟（約米粒大小），加入 1mL Trizol (Invitrogen, Cat. No. 15596-018)。以 QIAGEN TissueLyserII 將組織打碎，確認組織與萃取液呈現均質狀。移到另一新 1.5mL 離心管加入氯仿劇烈搖晃後置於冰上 30 分鐘，以最高轉速 4°C 離心 20 分鐘，取上清液加入鹽類與異丙醇沉澱 RNA。最高轉速 4°C 離心 20 分鐘，去除上清液。加入 600μl 70%酒精（稀釋於 0.1% DEPC 水），最高轉速 4°C 離心 10 分鐘，去除上清液，於室溫風乾 RNA 約 10 分鐘。回溶於 50μl 0.1% DEPC 水。取萃取完之 RNA 以 0.1% DEPC 水進行 10 倍稀釋，以 Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, DE 19810 US) 進行定量(OD260/OD280 比值約 1.8~2.1)。同時也以 RNA 電泳確認 RNA 品質。

反轉錄反應

取 5μg 的 RNA 先加入 5 Unit DNase (RQ1 RNase-Free DNase, Promega, Madison WI, USA)，在 37°C 作用 30 分鐘後，再加入 RQ1 DNase Stop Solution 65°C 加熱 10 分鐘以中止反應，接著取 2.5μg RNA 加入 50mM 去氧胸腺嘧啶引子 Oligo(dT)₂₀ 2.5μl 及 10mM dNTP 2.5μl，於 65°C 加熱 5 分鐘再放置冰上冷卻至少

1 分鐘，加入 2.5 μ l 0.1M DTT、5X 反應緩衝液及 50Units 反轉錄酶 (SuperScript[®] III, Invitrogen Corporation, California, USA) 進行反應，反應條件為 50 $^{\circ}$ C 作用 1 小時，70 $^{\circ}$ C 15 分鐘。

即時聚合酶鏈鎖反應定量 Hepsin cDNA

取 0.125 μ g 反轉錄的 cDNA，加入 2X KAPA SYBR fast q-PCR Master Mix 10 μ l、10 μ M Human HPN 9U 0.4 μ l 10 μ M Human HPN 10D 0.4 μ l、50x ROX low 補水至總體積為 25 μ l 去進行聚合酶鏈鎖反應。反應條件為: (1) 95 $^{\circ}$ C 2 分 (2) 95 $^{\circ}$ C 30 秒、95 $^{\circ}$ C 2 分、95 $^{\circ}$ C 25 秒 重複此三個步驟 35 次 (3) 72 $^{\circ}$ C 7 分。利用以知濃度 pCMV-hHPN 質體 DNA 推算 copies，並當作標準值。單位為: Copies/0.125 μ g RNA。

基因轉殖鼠質體構築

依實驗室前人所製備完成的 pCMV hHPN^{WT}、pCMV hHPN^{RS}、pCMV hHPN^{SRCR} 質體，利用上頭帶有設計過限制酶切位序列的引子 5' HPN MluI、3'HPN SalI 進行聚合酶連鎖反應得到人類 Hepsin cDNA 片段，在經由純化與限制酶切割後 (hHPN^{WT} cDNA、hHPN^{RS} cDNA 為 MluI 與 SalI; hHPN^{SRCR} cDNA 為 MluI 與 EcoRV)，把同樣也經由相同限制酶切割的載體 pBS-SMS (含 ApoE-HCR、human α 1 Antitrypsin、Factor IX intron I、3' UTR Polyadenylation Signal 序列)，一起進行切點接合。最後完成質體，交由台大第一共研做核酸序列定序確認無誤，命名為 pBS-hHPN^{WT}、pBS-hHPN^{RS}、pBS-hHPN^{SRCR}。

基因轉殖片段製備

將質體 pBS-hHPN^{WT}、pBS-hHPN^{RS}、pBS-hHPN^{SRCR} 利用 QIAGEN EndoFree Plasmid Mega Kit (去除大腸桿菌的 LPS) 抽取大量質體 DNA，接著取約 300 μ g 質體 DNA 進行限制酶切割 SpeI 切割，利用跑膠分離出 4.2 kb 基因轉殖片段，經由純化後，回溶約 300 μ l 滅菌水。再用兩次苯酚與兩次氯仿去除變性蛋白，進行酒精沉澱，最後回溶滅菌水，調整濃度為 2 μ g/ μ l。

顯微注射

將 Hepsin 質體 DNA 線性化後將 DNA 轉殖片段交由台大動物中心或是國研院實驗動物中心進行 C57BL/6 單細胞核受精卵，顯微注射。出生後的基因轉殖鼠分別命名為 Tg-hHPN^{WT}、Tg-hHPN^{RS}、Tg-hHPN^{SRCR}。

基因轉殖鼠基因型分析

由小鼠腳趾或尾巴萃取小鼠 genomic DNA，利用 Direct PCR® (Viagen Biotech Cat101-T)，取約 250~400ng DNA 進行聚合酶鏈鎖反應，引子為 5' pBS-CF 及 3'Hep 2D。聚合酶鏈鎖反應條件為：(1) 95°C 2 分鐘 (2) 95°C 30 秒、65°C 30 秒、72°C 30 秒，重複此三個步驟 30 次 (3) 72°C 7 分鐘 (4) 16 °C。

數據分析與統計

數據以 Student's t test (two-tailed) 分析。血清中 HBV DNA 與肝臟中 HBV DNA 相關係數統計方法為 Spearman's correlation，P<0.05 定義為有顯著差異。

南方墨點法

萃取小鼠腳趾或尾巴 genomic DNA，以酚/氯仿進行蛋白變性，最後將 DNA 以酒精沉澱，回溶於 50 µl Low TE 緩衝液 (10 mM Tris pH8.0、0.1 mM EDTA)，取約 800 µg DNA 以限制酶酵素 *EcoRV* 切割，37°C 反應 12 小時，以 0.7% 洋菜膠電泳分離 DNA 片段，待電泳結束後，以二次水清洗膠體 3 次，吸除二次水後加入 0.25N HCl 室溫輕微震盪 15 分鐘，再以二次水清洗膠體 3 次，吸除二次水後加入變性溶液 (1.5 M NaCl、0.5 M NaOH) 室溫輕微震盪 30 分鐘，以二次水清洗膠體 3 次，吸除二次水後加入中和溶液 (1 M Tris pH8.0，1.5 M NaCl，4.2% HCl) 室溫輕微震盪 30 分鐘，以二次水清洗膠體 3 次，利用虹吸原理將 DNA 片段轉印到 Nylon membrane 上，完成後將 membrane 進行 UV cross link (100 µJ/cm²)，再進行 pre-hybridization，42°C 烘箱旋轉混勻作用隔夜，製備 α-³²P dCTP 基因轉殖探針，將探針加入已 pre-hybridization 完的 membrane 上，42°C 烘箱旋轉混勻作用隔夜，以 2X SSC, 0.1% SDS 溶液清洗 membrane，去除非專一性結合的同位素，最後以 X 光片感光，至適當時間後沖洗 X 光片。

實驗結果



尾靜脈高壓注射 HBV 小鼠模式下，HPN 基因剔除小鼠血清中 HBV DNA 量較 WT 小鼠低

在尾靜脈高壓注射 pHBV1.3 B6 質體 DNA 後第七天，利用組織免疫染色及免疫螢光染色比較 WT 小鼠與 HPN 基因剔除小鼠肝細胞表現 HBcAg 情形 (圖二)。結果得知，WT 小鼠與 HPN 基因剔除小鼠肝細胞皆表現 HBcAg。證明兩組小鼠皆可利用尾靜脈高壓注射法建立 HBV 小鼠模式。計數肝切片中免疫螢光染色 HBcAg 陽性肝細胞數量，發現兩組小鼠 HBcAg 陽性肝細胞數量上沒有差異，代表利用尾靜脈高壓注射法使 pHBV1.3 B6 質體 DNA 進到 WT 小鼠肝細胞與 HPN 基因剔除小鼠肝細胞的效率一致，藉由效率的一致，因此可選用尾靜脈高壓注射法建立 HBV 小鼠模式，比較 WT 小鼠與 HPN 基因剔除小鼠肝臟或血清中 HBV 數量是否有差異。在尾靜脈高壓注射法注射 HBV 質體 DNA 第 7 天後，分析 WT 小鼠與 HPN 基因剔除小鼠血清中 HBsAg 與 HBeAg (圖三)，兩者皆無顯著差異。為比較小鼠血清中 HBV 病毒量，我們進行血清 HBV DNA 定量。實驗先以 micrococcal nuclease 切除血清中因尾靜脈高壓法殘留的 pHBV1.3B6 質體 DNA，接著萃取出 HBV DNA (HBV 病毒顆粒有套膜保護，不會被 micrococcal nuclease 切除)，利用 Q-PCR 進行 HBV DNA 定量 (圖四 A)。由實驗結果得知 WT 小鼠血清中 HBV DNA 約為 9.2×10^7 copies/mL，HPN 基因剔除小鼠血清中 HBV DNA 約 5.4×10^7 copies/mL，不過 p 值 ($p=0.06$) 沒有達到顯著差異。我們也比較了兩組小鼠肝臟中 HBV DNA 量，實驗先以 micrococcal nuclease 切除肝臟中尾靜脈高壓法殘留的 pHBV1.3B6 質體 DNA 後，再由肝細胞內萃取出 HBV DNA，利用 Q-PCR 進行 HBV DNA 定量 (圖四 B)。實驗結果顯示，WT 小鼠與 HPN 基因剔除小鼠肝臟中 HBV DNA copies 沒有差異 ($p=0.23$)。由上述實驗結果得知 HPN 基因剔除小鼠血清中 HBV DNA 量約低於 WT 小鼠兩倍，而肝臟中 HBV DNA 沒有差異。藉由圖表以 Y 軸為小鼠血清 HBV DNA，X 軸為小鼠肝臟中 HBV DNA，

記錄每隻小鼠數值 (圖五)。用各組小鼠數值分佈情形劃出趨勢線，再以 Spearman correlation test 計算各趨勢線 X、Y 關係係數，代表 WT 小鼠的趨勢線關係係數 (R 值) 為 0.6625 ($p < 0.001$)，意思為 WT 小鼠肝臟中 HBV DNA 越多，則血清 HBV DNA 也越多，呈現正相關。而代表 HPN 基因剔除小鼠的趨勢線關係係數為 0.17335 ($p = 0.4404$)，p 值沒有顯著差異的意思為 X、Y 軸間相互關係不成立，即為 HPN 基因剔除小鼠肝臟中 HBV DNA 越多，血清 HBV DNA 不一樣越多，兩條趨勢線統計上有顯著差異 ($p = 0.0394$)。由圖得知，兩組小鼠在肝臟 HBV DNA 相同程度下，HPN 基因剔除小鼠血清中 HBV DNA 量較 WT 小鼠值低。

以腺相關病毒(AAV)建立大量表現人類 Hepsin 小鼠動物 模式

上述結果得知 HPN 基因剔除小鼠血清中 HBV DNA 量較低，我們推測若是 HPN 基因剔除小鼠大量表現 Hepsin 時，其血清中 HBV DNA 量應會上升。同時為推測 Hepsin 哪一個功能區可能參與作用，計劃使用 AAV 系統於 HPN 基因剔除小鼠肝臟表現野生型與突變型人類 Hepsin，AAV 質體構築簡圖示意於圖六。利用先前實驗室已製備完成的野生型 (hHPN^{WT}) 及突變型 (hHPN^{RS}、hHPN^{SRCR}) cDNA 進行後續實驗。人類 Hepsin 野生型 (hHPN^{WT}) 與突變型 (hHPN^{RS}) 全長 cDNA 已於之前發表 (Chen et al., 2006，突變型 hHPN^{RS} cDNA 主要為 Hepsin 被活化時的切點 Arg¹⁶² 突變成 Ala，絲胺酸蛋白酶活性區 Ser³⁵³ 突變為 Tyr，藉以無法表現活化即被活化的全長 Hepsin 蛋白；突變型 hHPN^{SRCR} cDNA 主要為 Hepsin SRCR 區域結構改變，利用限制酶酵素接合於腺相關病毒載體，經核酸定序確認序列無誤後，依人類 Hepsin cDNA 片段的野生型或突變型將質體 DNA 命名為 pssAAV-hHPN^{WT}、pssAAV-hHPN^{RS}、pssAAV-hHPN^{SRCR}。為確定建構好質體 DNA 可以表現出 Hepsin 蛋白質，取質體 DNA 用尾靜脈高壓注射法送入 HPN 基因剔除小鼠體內，再以組織免疫染色證明小鼠肝細胞有人類 Hepsin 蛋白表現 (圖七)。並委由中研院陶秘華老師實驗室進行 AAV 製備。為確認攜帶人類 Hepsin 的 AAV

是否可使小鼠肝臟表現 Hepsin，我們將 10^{11} copies/mouse 劑量以尾靜脈注射的方式感染 8 周齡 HPN 基因剔除小鼠 (圖八 A)，感染兩周後，分析小鼠肝臟中 Hepsin RNA (圖八 B)，證明以 AAV-hHPN^{WT}、AAV-hHPN^{RS}、AAV-hHPN^{SRCR} 感染小鼠後，肝臟可轉錄出人類 Hepsin RNA，且 RNA copies 數量皆比野生型小鼠內源性 Hepsin 高。以西方墨點法分析 AAV-hHPN 感染 2 周後小鼠肝臟的 Hepsin 蛋白 (圖九 A)，證明利用腺相關病毒 AAV-hHPN 感染小鼠後，可以做為表現人類 Hepsin 的小鼠模式，實驗同時也以組織免疫染色驗證 (圖九 B)。為比較野生型 Hepsin 與突變型 Hepsin 的表現與 HBV 複製的關係，我們以 10^{11} copies/mouse AAV-empty、AAV-hHPN^{WT}、AAV-hHPN^{RS}、AAV-hHPN^{SRCR} 感染 6 周齡 HPN 基因剔除小鼠，2 周後再用尾靜脈高壓注射 HBV 質體 DNA，比較第 7 天小鼠血清與肝臟中 HBV DNA。由結果得知各組間血清中 HBV DNA 沒有差異，而表現野生型 Hepsin (hHPN^{WT}) 與突變型 Hepsin (hHPN^{RS}) 肝臟中 HBV DNA 較實驗對照組 (AAV-empty) 低 (圖十)。以 Y 軸為小鼠血清 HBV DNA，X 軸為小鼠肝臟中 HBV DNA，記錄每隻小鼠數值，劃出各組小鼠趨勢線，以 Spearman correlation test 計算各趨勢線 X、Y 關係係數及統計分析。結果得知，各組趨勢線彼此沒有顯著差異 (圖十一)。

以基因轉殖技術建立表現人類 Hepsin 小鼠動物模式

有鑑於用 AAV 表現人類 Hepsin 系統在小鼠間個體差異頗大，我們另以基因轉殖技術建立表現人類 Hepsin 小鼠動物模式，預期可用此動物模式探討 Hepsin 相關功能區與 HBV 病毒複製關係。構築基因轉殖質體 DNA 序列包括啟動子為專一表現在肝臟的人類 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶啟動子、脂蛋白原 A 加強子增強 DNA 轉錄效果、第九凝血因子內插子 I 可增強 RNA 轉譯效果 (圖十二 A)。確認核酸定序結果正確後，使用去除內毒素的萃取 DNA 質體套組 (Qiagen endotoxin-free) 抽大量質體 DNA，避免細菌內毒素影響質體 DNA 注射到小鼠原核胚時，造成死

亡。將所抽取大量質體 DNA 以限制酶酵素 *SpeI* 切割出質體片端 (圖十二 B) 後，經由苯酚/氯仿去除蛋白，再用酒精沉澱 DNA 後，得到欲基因轉殖片段為 4.2 kb。委由台大實驗動物中心及國研院動物中心以胚顯微注射植入基因轉殖片段到受精卵後，植入代理孕母小鼠子宮內。所生的仔鼠先利用 PCR 做轉殖鼠基因型初步鑑定，我們選用的引子為 pBS-CF 與 Hep2D，分別位於第九凝血因子內插子 I 與人類 Hepsin cDNA 上，故可用以鑑定基因轉殖片段，PCR 產物約 500 bp 左右 (圖十三)。基因轉殖小鼠依基因轉殖片段上作出的人類 Hepsin 蛋白質分別命名為：Tg-hHPN^{WT}、Tg-hHPN^{RS}、Tg-hHPN^{SRCR}。轉殖小鼠育種策略是以由動物中心移交之 PCR 轉殖鼠基因型陽性小鼠為 G0 founder，與野生型小鼠配種後生出的子代，以 PCR 轉殖鼠基因型陽性小鼠為 G1 子代。將 G1 子代分為公、母鼠，犧牲母鼠取下肝臟組織，以西方墨點法與組織免疫染色證明 G1 子代小鼠肝臟有表現人類 Hepsin 蛋白，藉此回推 G0 founder 小鼠肝臟也有表現人類 Hepsin 蛋白，同時取 G1 子代公鼠與野生型母鼠配種得到 G2 子代公、母鼠後，以 G2 子代母鼠肝臟西方墨點法分析人類 Hepsin 蛋白結果及 G1 子代公鼠 DNA 南方墨點法 (分析基因轉殖片段嵌入小鼠單一染色體或多對染色體) 結果評估，挑選出最高量及穩定表現人類 Hepsin 蛋白的小鼠，用以建立繁殖後代的 Tg-hHPN 品系。

Tg-hHPN^{SRCR} 與 Tg-hHPN^{RS} 品系族譜如圖十四，Tg-hHPN^{SRCR} 有 5 公 7 母 G0 Funder；Tg-hHPN^{RS} 有 4 公 2 母 G0 Funder，以西方墨點法及組織免疫染色分析 Tg-hHPN^{SRCR} 品系 G1 及 G2 子代小鼠肝臟中人類 Hepsin 蛋白表現量及蛋白分佈位置 (圖十五)，西方墨點法及組織免疫染色分析 Tg-hHPN^{RS} 品系 G1 子代小鼠肝臟中人類 Hepsin 蛋白表現量及蛋白分佈位置 (圖十六)。接著以 Tg-hHPN^{RS} G1 子代小鼠 DNA 南方墨點法結果分析基因轉殖片段為 5 端及 3 端互接，而非 5 端及 5 端方式互接 (圖十七 A、B)，同時分析基因轉殖片段在 Tg-hHPN^{RS} No 33.182、No 33.183 為嵌入小鼠多對染色體，而 Tg-hHPN^{RS} No 39.154、No 39.156、No 39.157 為嵌入小鼠單一染色體 (圖十七 B)。本次基因轉殖片段啟動子為肝臟特異性表現

的人類 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶，欲了解 Tg-hHPN 小鼠人類 Hepsin 蛋白是否只在肝臟特異性表現，取 Tg-hHPN^{SRCR} G1 子代 PCR(+) No.08.92、No.08.93 與對照組 PCR(-) No. 08.96 小鼠各主要器官，包含肝臟、小腸、腎臟、脾臟、肺臟、睪丸、大腦、大腸、心臟、前列腺及胸腺，以西方墨點法分析人類 Hepsin 蛋白表現量，結果得知確實只有肝臟特異性表現人類 Hepsin 蛋白。

討論

HPN 基因剔除小鼠與 WT 小鼠肝臟及血清中 HBV 病毒量

過去文獻發表指出，Hepsin 胜肽片段與 HBx 蛋白質有交互作用，且在肝癌細胞株 HepG2.2.15 共轉染 Hepsin 與 HBx 時，細胞培養液中 B 型肝炎 e 抗原 (HBeAg; 可作為病毒複製指標) 的含量上升，因此 Hepsin 被推測能促進病毒複製。為了探討此現象是否也在活體內發生，因此選用合適的 HBV 小鼠模式進行實驗。我們推測在此模式下，HPN 基因剔除小鼠體內 HBV 病毒量會比 WT 小鼠低。

由於小鼠肝細胞缺乏 HBV 受體，無法感染 HBV，因此我們利用尾靜脈高壓法將 HBV 質體 DNA 打入小鼠體內，讓小鼠肝細胞可以短暫產生 HBV，且在肝臟中複製 (Yang et al., 2002)。而本次實驗所使用的 HBV 質體 DNA 為 pHBV1.3B6 (Chen et al., 2012)，雖然報告顯示用尾靜脈高壓法打入此 HBV 質體 DNA，無法在基因型背景為 C57BL/6 小鼠建立長期表現 HBV 的動物模式，但因為本實驗欲回答 Hepsin 與 HBV 複製問題，不用建立長期表現 HBV 的動物模式，且由結果證明，尾靜脈高壓法使 HBV 質體 DNA 進入 WT 小鼠肝細胞與 HPN 基因剔除小鼠肝細胞效率一致。故選用尾靜脈高壓注射 HBV 質體 DNA 來進行本論文的研究。由實驗結果得知，HPN 基因剔除小鼠血清中 HBV DNA 量約少 WT 小鼠 2 倍，但 HPN 基因剔除小鼠血清中 HBsAg、HBeAg 數值與肝臟中 HBV DNA 量與 WT 小鼠數值相比沒差異，不過當以 Y 軸為小鼠血清中 HBV DNA，X 軸為小鼠肝臟中 HBV DNA (圖五)，以 Spearman correlation test 計算各趨勢線 X、Y 關係係數，兩條趨勢線統計上有顯著差異 ($p=0.0394$)，得知兩組小鼠在肝臟 HBV DNA 相同程度下，HPN 基因剔除小鼠血清中 HBV DNA 量較 WT 小鼠值低，推測是否 Hepsin 會影響到 HBV 在肝細胞內的病毒組裝與釋放。

我們推測在此 HBV 小鼠模式下，Hepsin 對於 HBV 病毒複製的影響有限，可能與 HBV 在肝細胞內病毒組裝與釋放較相關，不過還需要更進一步的實驗來驗證。HPN 基因剔除小鼠與 WT 小鼠血清中 HBV DNA 約呈現 2 倍差距，由於

小鼠肝細胞沒有 HBV 受體，所以小鼠肝細胞釋放到血液中的完整 HBV 病毒顆粒並無法再重複感染小鼠其他肝細胞，推測若是人類宿主肝細胞有 HBV 受體可反覆感染 HBV 的條件下，Hepsin 蛋白表現量高低對於血清中病毒量的差距可能會更有意義。已知血液中 HBV 病毒數量與肝細胞癌發生機率有正相關性 (Yu et al., 2005 ; Chen et al., 2006)。因此 Hepsin 在 HBV 複製中參與的角色是否更重要，則有待再進行探討證明，也必須在更進一步的研究與探討。

本論文想利用 HPN 基因剔除小鼠大量表現 Hepsin 時，其血清中 HBV DNA 量應會上升，同時可推測 Hepsin 哪一個功能區可能參與作用。首先試以共同尾靜脈高壓注射 Hepsin 質體 DNA 與 HBV 質體 DNA，藉以在 HBV 小鼠模式下大量表現 Hepsin，不過初步結果顯示，與小鼠尾靜脈高壓注射 HBV 質體 DNA 相比，兩質體 DNA 共同尾靜脈高壓注射會減低小鼠肝臟及血清中 HBV DNA 量，雖然可藉由調整注射時 Hepsin 質體 DNA 與 HBV 質體 DNA 比例，找出最不影響肝臟及血清 HBV DNA 的 Hepsin DNA 量，不過此時小鼠肝細胞 Hepsin 蛋白的表現量並不符合我們預期，且尾靜脈高壓法有其缺點，例如：對肝細胞造成傷害 (小鼠的肝指數生化數值如：AST、ALT 比正常值上升百倍到千倍)；無法長期表現蛋白 (高壓注射 24 小時為蛋白表現高峰，隨後蛋白表現量隨時間下降 (Liu et al., 1999))。而用 AAV 感染則可以克服以上兩項缺點，因此改以 AAV 建立大量表現 Hepsin 的動物模式。

利用 AAV 建立大量表現人類 Hepsin 小鼠模式

利用腺相關病毒建立大量表現人類 Hepsin 小鼠模式。欲建立野生型人類 Hepsin (hHPN^{WT})，絲胺酸蛋白酶區域突變人類 Hepsin (hHPN^{RS})，為 Hepsin 被活化時的切點 Arg¹⁶² 突變成 Ala，絲胺酸蛋白酶活性區 Ser³⁵³ 突變為 Tyr，藉以無法表現活化即被活化的全長 Hepsin 蛋白，SRCR 區域突變 Hepsin (hHPN^{SRCR}) 為 Hepsin SRCR 區域結構改變。

本次實驗所使用 AAV 其套膜血清型為 2/8，約可感染 80%~90% 細胞 (Daya and Berns, 2008; Samulski, 1993)，主要對肝臟有較高的感染力 (Nakai et al., 2005)，而實驗所使用 AAV 攜帶的質體 DNA 啟動子為人類 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶，主要表現在肝臟，藉此讓小鼠感染 AAV 後能肝臟專一性表現人類 Hepsin。同時 AAV 攜帶的質體 DNA 序列還有加強子脂蛋白原 A 增強 DNA 轉錄效果、第九凝血因子內插子 I 可增強 RNA 轉譯效果。由實驗結果得知，小鼠經尾靜脈注射感染 AAV 10^{11} copies 2 周後，肝臟表現人類 Hepsin RNA 約高於 C57BL/6 小鼠內源性 Hepsin 2~5 倍 (圖八 B)。而肝臟組織免疫染色與西方墨點法皆證明 AAV-hHPN 感染小鼠後，肝臟能表現人類 Hepsin 蛋白。不過若以組織免疫染色比較，可發現利用感染 AAV 系統於 HPN 基因剔除小鼠肝臟表現人類 Hepsin 蛋白的表現量明顯低於用尾靜脈高壓注射相同質體 DNA；取注射後 24 小時肝臟切片分析。推測原因是尾靜脈高壓法為單一細胞短時間大量表現人類 Hepsin (高壓注射完 24 小時為蛋白表現量高峰)，因此從免疫組織染色結果可以觀察到肝細胞有較深染情況；相對於 AAV-hHPN 免疫組織染色結果，也許受限於免疫組織染色的人類 Hepsin 抗體靈敏度，組織免疫染色結果無法很明顯的觀察人類 Hepsin 訊號。由西方墨點法 (圖九 A) 得知，同為肝臟萃取總蛋白 100 μ g，尾靜脈高壓法模式下小鼠肝臟人類 Hepsin 蛋白表現量與 AAV 感染小鼠表現人類 Hepsin 蛋白量並沒有那麼明顯的差距，表示利用 AAV 系統還是可以使小鼠肝臟做出一定量人類 Hepsin 蛋白，因此選擇利用 AAV 建立大量表現人類 Hepsin 小鼠模式，不過由西方墨點法結果也觀察到，相同條件的 AAV-hHPN 感染不同小鼠情況下，小鼠個體間肝臟中人類 Hepsin 蛋白表現量有差異。

探討表現人類 Hepsin 小鼠在 HBV 小鼠模式下，是否可看到小鼠血清或肝臟中 HBV DNA 上升。實驗以 6 周齡 HPN 基因剔除小鼠尾靜脈注射 AAV，2 周後進行尾靜脈高壓注射 pHBV1.3B6 質體 DNA，第 7 天後採集小鼠血液與肝臟組織，進行 HBV DNA 定量。初步實驗結果顯示表現野生型人類 Hepsin 的基因剔除鼠

與對照組 (AAV-empty)及突變型(hHPN^{RS}、hHPN^{SRCR})人類 Hepsin 血清中 HBV DNA 沒有差異，但表現野生型 Hepsin (hHPN^{WT})與突變型 Hepsin (hHPN^{RS}) 肝臟中 HBV DNA 較實驗對照組 (AAV-empty)低 (圖十)，劃出各組小鼠趨勢線 (圖十一)，雖然各組趨勢線彼此沒有顯著差異，但可看到的趨勢為與實驗對照組 (AAV-empty)相比，表現野生型 Hepsin (hHPN^{WT})與突變型 Hepsin (hHPN^{RS})HPN 基因剔除小鼠肝臟中 HBV DNA 量越高，似乎血清中 HBV DNA 量也隨著越高，不過仍需再多重複幾次實驗以確認實驗結果。

以基因轉殖技術建立表現人類 Hepsin 小鼠動物模式

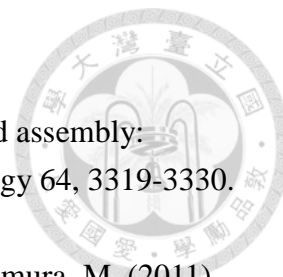
已知 AAV 感染系統下小鼠肝臟中 Hepsin 表現量差異大，因此我們建立了表現野生型人類 Hepsin (Tg-hHPN^{WT})、絲胺酸蛋白酶區域突變人類 Hepsin (Tg-hHPN^{RS})與 SRCR 區域突變 Hepsin (Tg-hHPN^{SRCR})三種不同的人類 Hepsin 基因轉殖鼠，此基因轉殖鼠肝臟需大量且穩定表現人類 Hepsin 蛋白，我們會利用西方墨點法分析各基因轉殖小鼠蛋白表現量高低、肝臟組織免疫染色觀察蛋白在細胞內的分佈位置及南方墨點法分析基因轉殖片段插入小鼠單一染色體或是多對染色體中，藉由分析結果篩選並建立穩定及表現量高的 Tg-hHPN 小鼠。目前各 Tg-hHPN 各品系中，Tg-hHPN^{SRCR} 與 Tg-hHPN^{RS} 品系已有確認肝臟大量表現 Hepsin 的種源小鼠(founder)，Tg-hHPN^{WT} 目前進度為已得到轉殖片段 PCR(+) Founder 小鼠，目前正與野生型小鼠配種，子代尚未出生。Tg-hHPN^{SRCR} 目前以配種到 G2 子代，其 G1 子代人類 Hepsin 蛋白表現量在個體間有差異，推測基因轉殖片段為插入小鼠不同染色體中，會進行南方墨點法確認結果，最後篩出表現量高且穩定的 G2 子代小鼠，用此小鼠繁殖下一代。Tg-hHPN^{RS} 目前配種到 G1 子代，已用西方墨點法證明小鼠肝臟有表現人類 Hepsin，且也以南方墨點法分析得知基因轉殖片段插入染色體的結果，之後用 G2 子代確認肝臟中人類 Hepsin 有高且穩定表現量。由文獻得知，人類 α 1-抗胰蛋白酶的基因轉殖鼠其蛋

白專一大量表現在肝臟，少部分在小腸及大腸有表現 (Kelsey et al., 1987)，而本論文以人類 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶為啟動子的基因轉殖鼠，只有在肝臟專一性表現 Hepsin，在小腸、大腸或是其他主要器官則沒有看到 Hepsin 蛋白表現。待未來 3 品系 Tg-hHPN 小鼠接建立完整，則可用來探討 Hepsin 與 HBV 複製關係，可用尾靜脈高壓法注射 HBV 質體 DNA，偵測小鼠血清中及肝臟中 HBV DNA 量，比較及分析 Hepsin 功能區是否有參與作用。

未來實驗規劃

探討 Hepsin 與 HBx 之間的作用機制與機轉，及其病理上的意義。由實驗結果推測，Hepsin 可能與 HBV 在肝細胞內組裝或釋放有關，不過必須更進一步的證明與找出相關機制。利用大量表現人類 Hepsin 動物模型探討在 HBV 小鼠模式下，觀察是否會有更嚴重的病理意義，並且可以探討為 Hepsin 哪個功能區參與反應。

參考文獻



Birnbaum, F., and Nassal, M. (1990). Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: primary structure requirements in the core protein. *Journal of virology* 64, 3319-3330.

Chayama, K., Hayes, C.N., Hiraga, N., Abe, H., Tsuge, M., and Imamura, M. (2011). Animal model for study of human hepatitis viruses. *Journal of gastroenterology and hepatology* 26, 13-18.

Chen, C.H., Su, K.Y., Tao, M.H., Lin, S.W., Su, Y.H., Tsai, Y.C., Cheng, K.C., Jeng, Y.M., and Sheu, J.C. (2006a). Decreased expressions of hepsin in human hepatocellular carcinomas. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 26, 774-780.

Chen, C.J., Yang, H.I., Su, J., Jen, C.L., You, S.L., Lu, S.N., Huang, G.T., Iloeje, U.H., and Group, R.-H.S. (2006b). Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 295, 65-73.

Chen, S.H., Wu, H.L., Kao, J.H., and Hwang, L.H. (2012). Persistent hepatitis B viral replication in a FVB/N mouse model: impact of host and viral factors. *PloS one* 7, e36984.

Cho, A., Haruyama, N., and Kulkarni, A.B. (2009). Generation of transgenic mice. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S Bonifacino [et al]* Chapter 19, Unit 19 11.

Daya, S., and Berns, K.I. (2008). Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clinical microbiology reviews* 21, 583-593.

Dandri, M., Lutgehetmann, M., Volz, T., and Petersen, J. (2006). Small animal model systems for studying hepatitis B virus replication and pathogenesis. *Seminars in liver disease* 26, 181-191.

Dorn, J., Beaufort, N., Schmitt, M., Diamandis, E.P., Goettig, P., and Magdolen, V. (2014). Function and clinical relevance of kallikrein-related peptidases and other serine proteases in gynecological cancers. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 51, 63-84.

Farley, D., Reymond, F., and Nick, H. (1993). Cloning and sequence analysis of rat hepsin, a cell surface serine proteinase. *Biochimica et biophysica acta* 1173, 350-352.

Guipponi, M., Tan, J., Cannon, P.Z., Donley, L., Crewther, P., Clarke, M., Wu, Q., Shepherd, R.K., and Scott, H.S. (2007). Mice deficient for the type II transmembrane serine protease, TMPRSS1/hepsin, exhibit profound hearing loss. *The American journal of pathology* 171, 608-616.

Hedstrom, L. (2002). Serine protease mechanism and specificity. *Chemical reviews* 102, 4501-4524.

Herter, S., Piper, D.E., Aaron, W., Gabriele, T., Cutler, G., Cao, P., Bhatt, A.S., Choe, Y., Craik, C.S., Walker, N., et al. (2005). Hepatocyte growth factor is a preferred in vitro substrate for human hepsin, a membrane-anchored serine protease implicated in prostate and ovarian cancers. *The Biochemical journal* 390, 125-136.

Hsu, Y.C., Huang, H.P., Yu, I.S., Su, K.Y., Lin, S.R., Lin, W.C., Wu, H.L., Shi, G.Y., Tao, M.H., Kao, C.H., et al. (2012). Serine protease hepsin regulates hepatocyte size and hemodynamic retention of tumor cells by hepatocyte growth factor signaling in mice. *Hepatology* 56, 1913-1923.

Huang, L.R., Wu, H.L., Chen, P.J., and Chen, D.S. (2006). An immunocompetent mouse model for the tolerance of human chronic hepatitis B virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 17862-17867.

Kawamura, S., Kurachi, S., Deyashiki, Y., and Kurachi, K. (1999). Complete nucleotide sequence, origin of isoform and functional characterization of the mouse hepsin gene. *European journal of biochemistry / FEBS* 262, 755-764.

Kelsey, G.D., Povey, S., Bygrave, A.E., and Lovell-Badge, R.H. (1987). Species- and tissue-specific expression of human alpha 1-antitrypsin in transgenic mice. *Genes & development* 1, 161-171.

Kim, C.M., Koike, K., Saito, I., Miyamura, T., and Jay, G. (1991). HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 351, 317-320.

Kirchhofer, D., Peek, M., Lipari, M.T., Billeci, K., Fan, B., and Moran, P. (2005).

Hepsin activates pro-hepatocyte growth factor and is inhibited by hepatocyte growth factor activator inhibitor-1B (HAI-1B) and HAI-2. FEBS letters 579, 1945-1950.

Klezovitch, O., Chevillet, J., Mirosevich, J., Roberts, R.L., Matusik, R.J., and Vasioukhin, V. (2004). Hepsin promotes prostate cancer progression and metastasis. Cancer cell 6, 185-195.

Leytus, S.P., Loeb, K.R., Hagen, F.S., Kurachi, K., and Davie, E.W. (1988). A novel trypsin-like serine protease (hepsin) with a putative transmembrane domain expressed by human liver and hepatoma cells. Biochemistry 27, 1067-1074.

Liu, F., Song, Y., and Liu, D. (1999). Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. Gene therapy 6, 1258-1266.

Lucifora, J., Xia, Y., Reisinger, F., Zhang, K., Stadler, D., Cheng, X., Sprinzl, M.F., Koppensteiner, H., Makowska, Z., Volz, T., et al. (2014). Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. Science 343, 1221-1228.

McClain, S.L., Clippinger, A.J., Lizzano, R., and Bouchard, M.J. (2007). Hepatitis B virus replication is associated with an HBx-dependent mitochondrion-regulated increase in cytosolic calcium levels. Journal of virology 81, 12061-12065.

Nakai, H., Fuess, S., Storm, T.A., Muramatsu, S., Nara, Y., and Kay, M.A. (2005). Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice. Journal of virology 79, 214-224.

Nakamura, K., Nasu, Y., Hongo, A., Matsuo, T., Kodama, J., Ebara, S., Nagai, A., Abrzua, F., Kumon, H., and Hiramatsu, Y. (2006). Hepsin shows inhibitory effects through apoptotic pathway on ovarian cancer cell lines. International journal of oncology 28, 393-398.

Nakamura, K., Takamoto, N., Abarzua, F., Hongo, A., Kodama, J., Nasu, Y., Kumon, H., and Hiramatsu, Y. (2008). Hepsin inhibits the cell growth of endometrial cancer. International journal of molecular medicine 22, 389-397.

Nassal, M. (1999). Hepatitis B virus replication: novel roles for virus-host interactions. Intervirology 42, 100-116.

Samulski, R.J. (1993). Adeno-associated virus: integration at a specific chromosomal locus. *Current opinion in genetics & development* 3, 74-80.

Schmidt, C., Bladt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschesche, W., Sharpe, M., Gherardi, E., and Birchmeier, C. (1995). Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 373, 699-702

Seeger, C., and Mason, W.S. (2000). Hepatitis B virus biology. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 64, 51-68.

Shia, S., Stamos, J., Kirchhofer, D., Fan, B., Wu, J., Corpuz, R.T., Santell, L., Lazarus, R.A., and Eigenbrot, C. (2005). Conformational lability in serine protease active sites: structures of hepatocyte growth factor activator (HGFA) alone and with the inhibitory domain from HGFA inhibitor-1B. *Journal of molecular biology* 346, 1335-1349.

Somoza, J.R., Ho, J.D., Luong, C., Ghate, M., Sprengeler, P.A., Mortara, K., Shrader, W.D., Sperandio, D., Chan, H., McGrath, M.E., et al. (2003). The structure of the extracellular region of human hepsin reveals a serine protease domain and a novel scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) domain. *Structure* 11, 1123-1131.

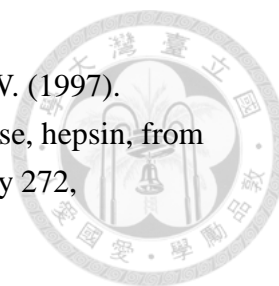
Tang, H., Oishi, N., Kaneko, S., and Murakami, S. (2006). Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein. *Cancer science* 97, 977-983.

Tang, X., Mahajan, S.S., Nguyen, L.T., Beliveau, F., Leduc, R., Simon, J.A., and Vasioukhin, V. (2014). Targeted inhibition of cell-surface serine protease Hepsin blocks prostate cancer bone metastasis. *Oncotarget* 5, 1352-1362.

Taylor, J.M. (2013). Virus entry mediated by hepatitis B virus envelope proteins. *World journal of gastroenterology* : WJG 19, 6730-6734.

Tsuji, A., Torres-Rosado, A., Arai, T., Le Beau, M.M., Lemons, R.S., Chou, S.H., and Kurachi, K. (1991). Hepsin, a cell membrane-associated protease. Characterization, tissue distribution, and gene localization. *The Journal of biological chemistry* 266, 16948-16953.

Ustach, C.V., Huang, W., Conley-LaComb, M.K., Lin, C.Y., Che, M., Abrams, J., and Kim, H.R. (2010). A novel signaling axis of matriptase/PDGF-D/ss-PDGFR in human prostate cancer. *Cancer research* 70, 9631-9640.



Vu, T.K., Liu, R.W., Haaksma, C.J., Tomasek, J.J., and Howard, E.W. (1997). Identification and cloning of the membrane-associated serine protease, hepsin, from mouse preimplantation embryos. *The Journal of biological chemistry* 272, 31315-31320.

Wang, C., Guo, L., Yu, D., Hua, X., Yang, Z., Yuan, C., and Cui, L. (2014). HEV-ORF3 Encoding Phosphoprotein Interacts With Hepsin. *Hepatitis monthly* 14, e13902.

Wu, Q., Yu, D., Post, J., Halks-Miller, M., Sadler, J.E., and Morser, J. (1998). Generation and characterization of mice deficient in hepsin, a hepatic transmembrane serine protease. *The Journal of clinical investigation* 101, 321-326.

Yan, H., Zhong, G., Xu, G., He, W., Jing, Z., Gao, Z., Huang, Y., Qi, Y., Peng, B., Wang, H., et al. (2012). Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife* 1, e00049.

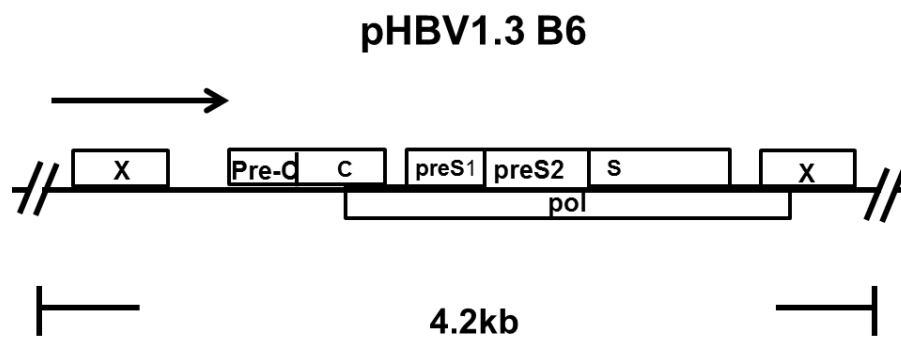
Yang, P.L., Althage, A., Chung, J., and Chisari, F.V. (2002). Hydrodynamic injection of viral DNA: a mouse model of acute hepatitis B virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 13825-13830.

Yu, I.S., Chen, H.J., Lee, Y.S., Huang, P.H., Lin, S.R., Tsai, T.W., and Lin, S.W. (2000). Mice deficient in hepsin, a serine protease, exhibit normal embryogenesis and unchanged hepatocyte regeneration ability. *Thrombosis and haemostasis* 84, 865-870.

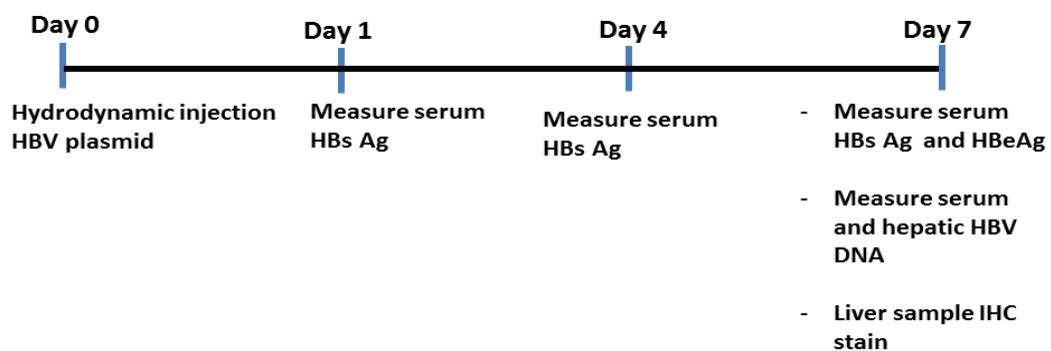
Yu, M.W., Yeh, S.H., Chen, P.J., Liaw, Y.F., Lin, C.L., Liu, C.J., Shih, W.L., Kao, J.H., Chen, D.S., and Chen, C.J. (2005). Hepatitis B virus genotype and DNA level and hepatocellular carcinoma: a prospective study in men. *Journal of the National Cancer Institute* 97, 265-272.

Zhang, J.L., Zhao, W.G., Wu, K.L., Wang, K., Zhang, X., Gu, C.F., Li, Y., Zhu, Y., and Wu, J.G. (2005). Human hepatitis B virus X protein promotes cell proliferation and inhibits cell apoptosis through interacting with a serine protease Hepsin. *Archives of*

(A)



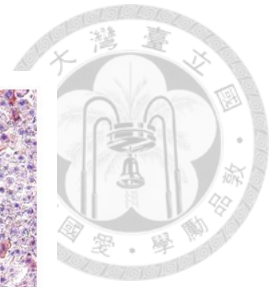
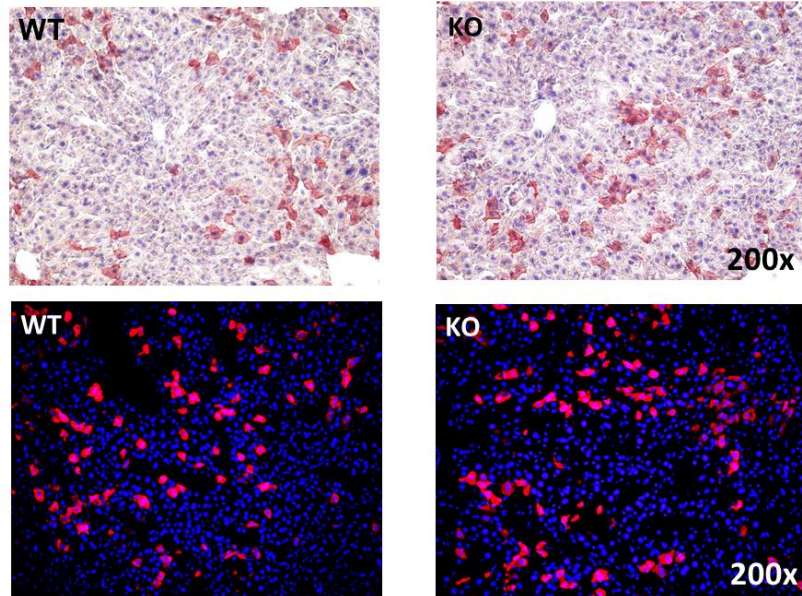
(B)



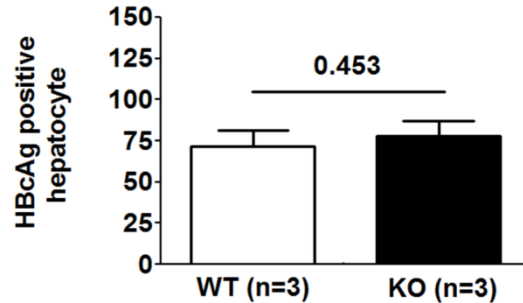
圖一、B 型肝炎病毒質體 DNA，pHBV1.3 B6 示意圖及 B 型肝炎病毒質體 DNA 尾靜脈高壓注射法實驗時程圖。

(A) pHBV1.3 B6 質體中 HBV 序列為 4.2kb，為 1.3 倍長度。由台大肝炎中心吳慧琳老師實驗室提供。(B)以尾靜脈高壓注射質體 DNA 設定為第 0 天，DNA 量為每隻小鼠 10 μ g，接著分別在第 1 天、第 4 天、第 7 天眼窩採血測量血清中 HBsAg 及 HBeAg。第 7 天犧牲小鼠，採集肝臟組織，並區分左、中、右葉肝臟分開收集，以 -80°C 保存，待後續進行病毒 DNA 量測定及免疫組織染色。

(A)

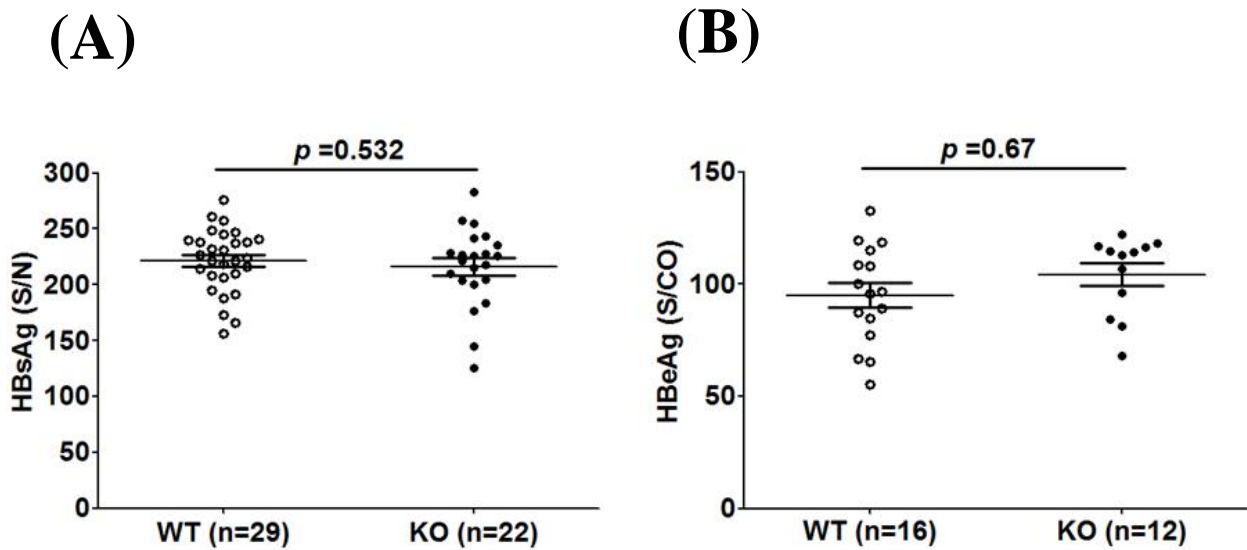


(B)



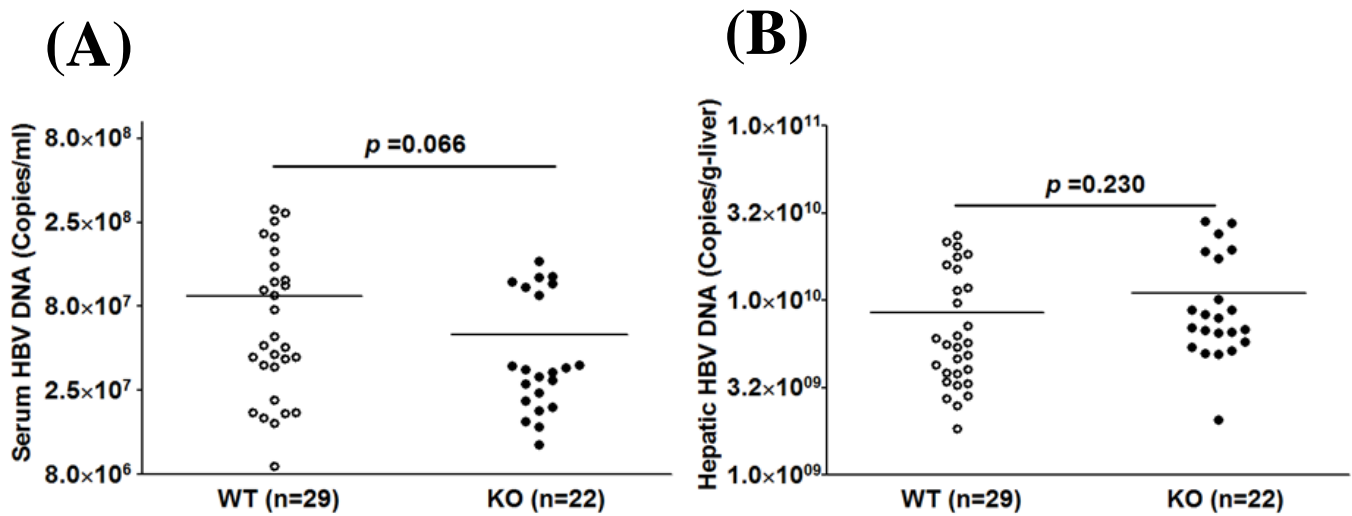
圖二、HPN 基因剔除小鼠與 WT 小鼠尾靜脈高壓注射 pHBV1.3B6 質體 DNA 後，肝臟中 HBcAg 表現情況。

(A)免疫組織染色圖與免疫螢光染色圖，一級抗體為抗 HBcAg (Dako Rabbit polyclonal, 1:500 稀釋)，圖中深染及紅色螢光訊號為 HBcAg 表現細胞。(B)為(A)之定量結果，以螢光顯微鏡在 200 倍視野下計數加總 20 個不同視野後平均 HBcAg 陽性肝細胞數，比較野生型小鼠(n=3) 與 HPN 基因剔除小鼠(n=3)計數結果。



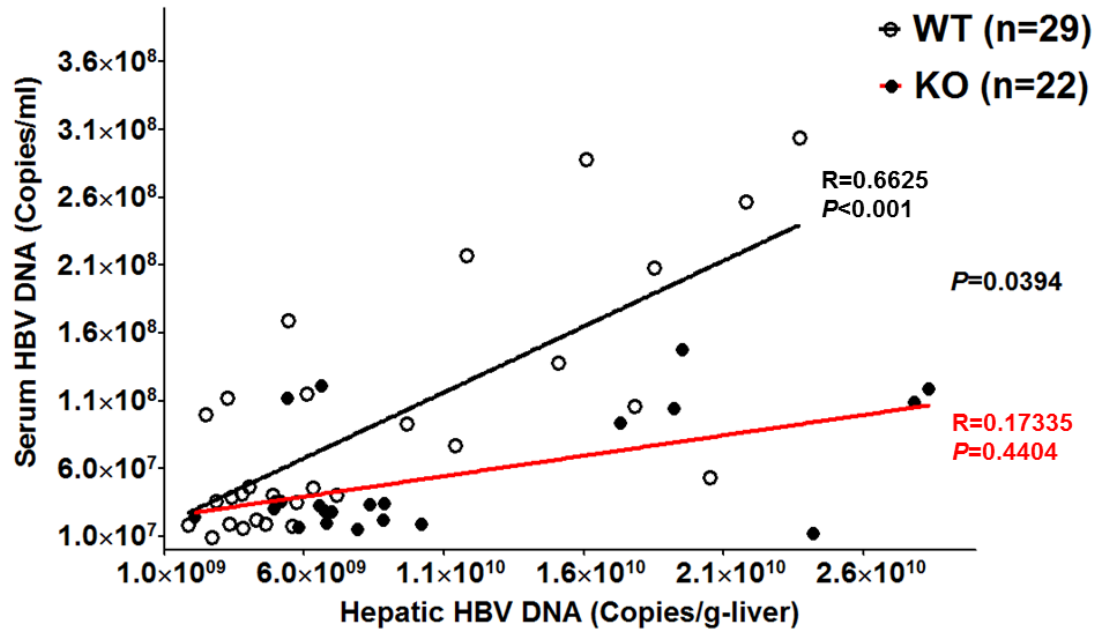
圖三、HPN 基因剔除小鼠與 WT 小鼠尾靜脈高壓注射 pHBV1.3B6 質體 DNA 7 天後，血清中 HBsAg 與 HBeAg 比較圖。

(A) HBsAg 的測量是以亞培 AXSYM 全自動血清分析儀以免疫偵測，S/N：Signal To Noise。(B)血清中 HBeAg 測量是以亞培 AXSYM 全自動血清分析儀以免疫偵測，S/CO：Signal To Cutoff Ratio。



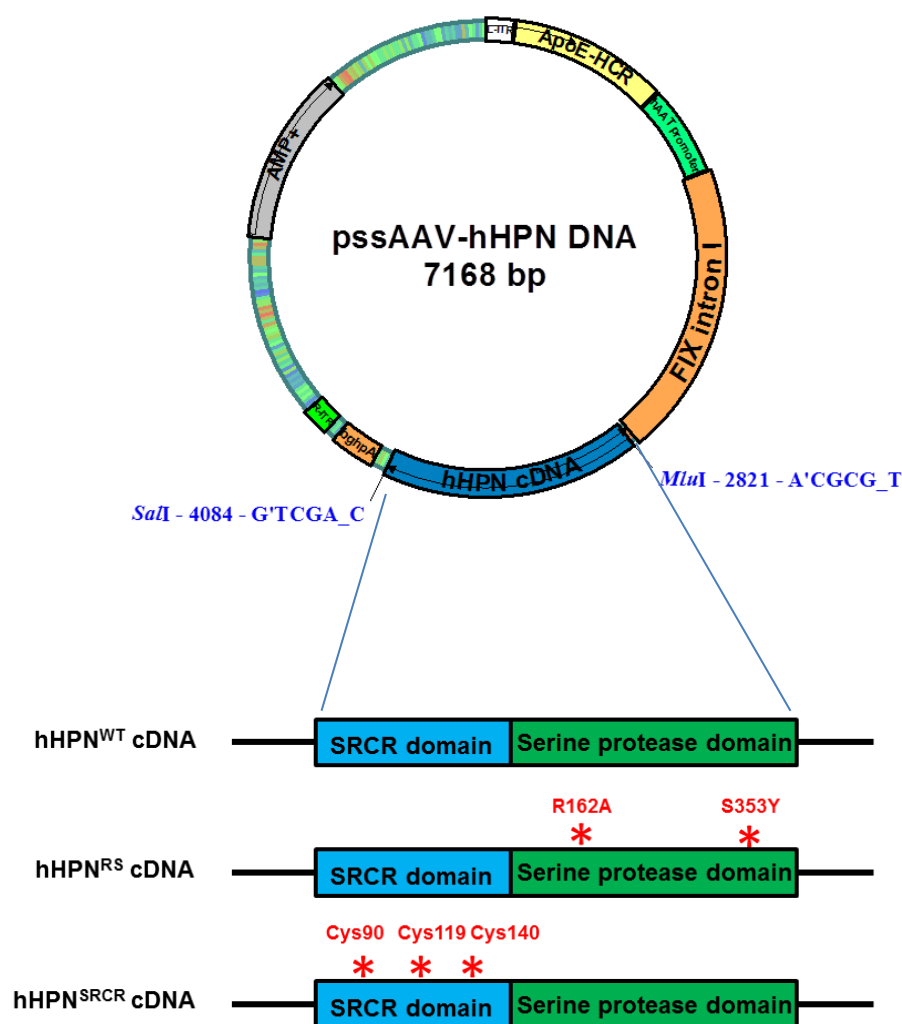
圖四、HPN 基因剔除小鼠與 WT 小鼠尾靜脈高壓注射 pHBV1.3B6 質體 DNA7 天後，血清中 HBV DNA 與肝臟中 HBV DNA 比較圖。

(A)血清中 HBV DNA 量，血清先以 micrococcal nuclease 清除 HBV 相關質體 DNA 後再萃取套膜內 HBV DNA，利用 Q-PCR 進行病毒定量。(B)肝臟中 HBV DNA 量，將肝臟檢體秤重後磨碎以 lysis buffer 溶液回溶，接著以 micrococcal nuclease 清除 HBV 相關質體 DNA，再萃取套膜內 HBV DNA，利用 Q-PCR 進行病毒定量。



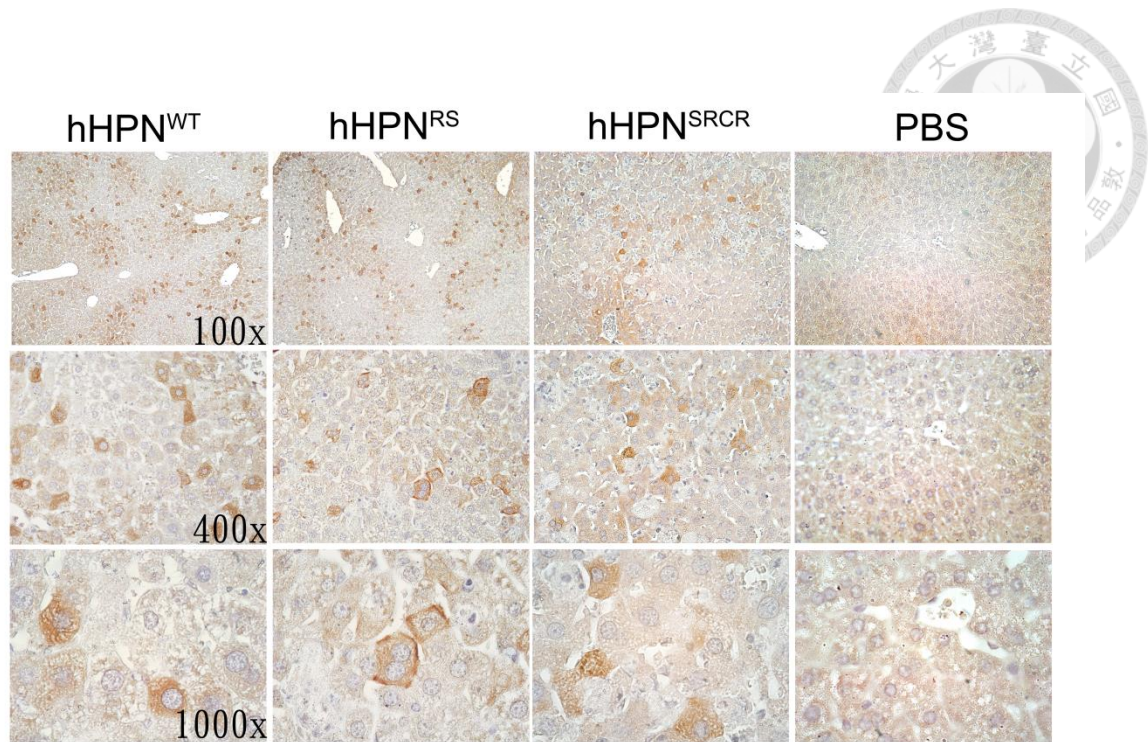
圖五、尾靜脈高壓注射 pHBV1.3B6 質體 DNA 7 天後，血清中 HBV DNA 量與肝臟中 HBV DNA 量比較。

點代表 1 隻小鼠。橫坐標為小鼠肝臟中 HBV DNA 數量，縱座標為小鼠血清中 HBV DNA 數量。黑色線條為 WT 小鼠血清比肝臟 HBV DNA 趨勢線，紅色線條為 HPN 基因剔除小鼠血清比肝臟 HBV DNA 趨勢線，R 值為 Spearman's correlation 統計結果，為 X 軸與 Y 軸相關係數。



圖六、腺相關病毒所攜帶質體 pssAAV-hHPN 結構示意圖。

pssAAV-hHPN 質體結構包括 L-ITR、R-ITR (Inverted Terminal Repeat)、脂蛋白原 A 加強子 (ApoE-HCR)、人類 α 1-抗胰蛋白酶啟動子 (hAAT Promoter)、第九凝血因內插子 I (FIX intron I)、小牛生長因子賀爾蒙 Poly A (Bovine Growth Hormone Polyadenylation Signal ; bghpA)，質體以 *Mlu* I 與 *Sal* I 切和野生型(hHPN^{WT})與點圖變型(hHPN^{RS}、hHPN^{SRCR})人類 Hepsin cDNA。



圖七、免疫組織染色法分析腺相關病毒載體 pssAAV human Hepsin 表現人類 Hepsin 蛋白質。

將 pssAAV human Hepsin 質體 DNA 以尾靜脈高壓法注射至 HPN 基因剔除小鼠，24 小時後取小鼠肝臟進行組織免疫染色，證明該載體能於小鼠肝臟表現人類 Hepsin 蛋白，呈色為棕色反應。實驗所使用抗體為抗人類 Hepsin 抗體（Cayman Chemical Rabbit polyclonal, 1:200 稀釋）。

(A)

AAV-hHPN
 10^{11} vg/mouse



8 week-old

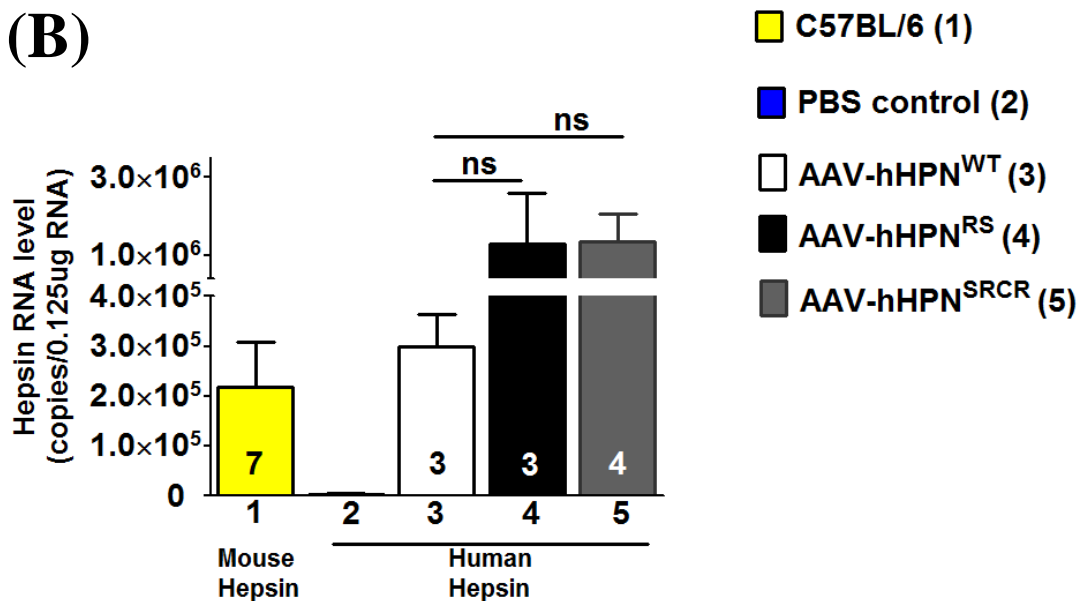
Sacrifice

Day 0

Day 14



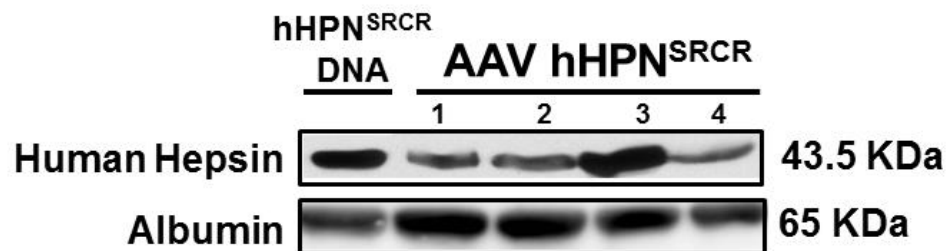
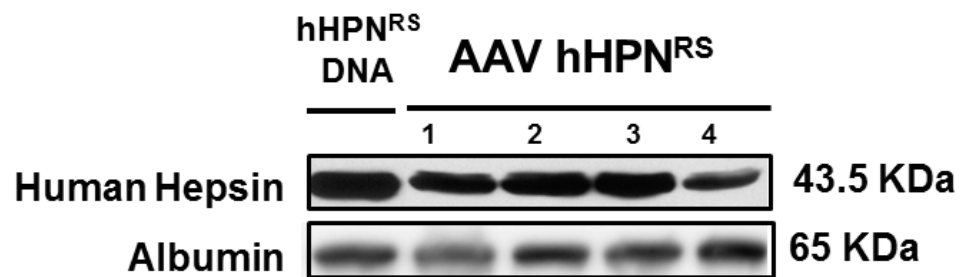
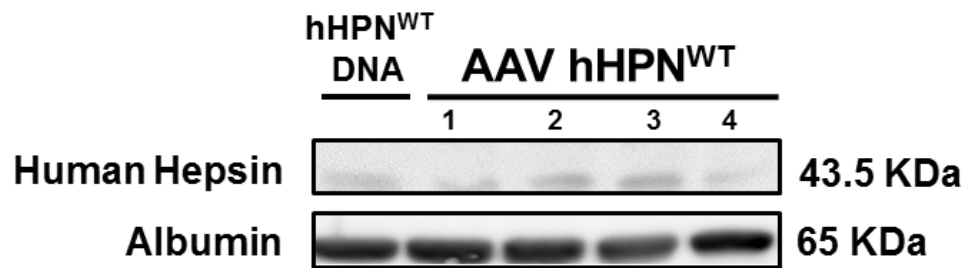
(B)



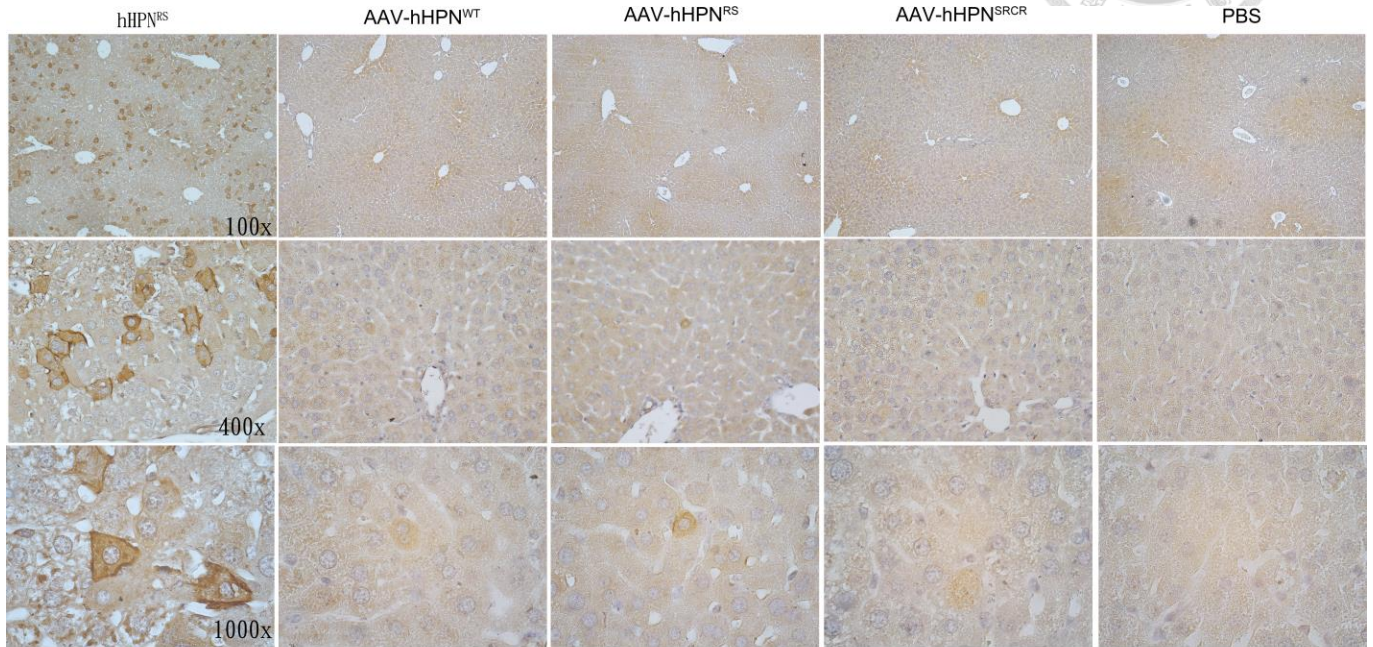
圖八、HPN 基因剔除小鼠感染 AAV 病毒載體 2 周後肝臟中 Hepsin RNA 定量結果。

(A)實驗設計流程示意圖。取 8 周齡 HPN 基因剔除公鼠，從尾靜脈注射 PBS control 及 AAV-hHPN^{WT}、AAV-hHPN^{RS}、AAV-hHPN^{SRCR} 病毒量 10^{11} 以感染小鼠肝細胞，2 周後犧牲小鼠，收取肝臟組織進行後續實驗分析。(B)利用 Q-PCR 檢測感染各組 AAV 的 HPN 基因剔除公鼠與 C57BL/6 公鼠肝臟 Hepsin RNA 表現量。ns 為統計上無顯著差異。

(A)



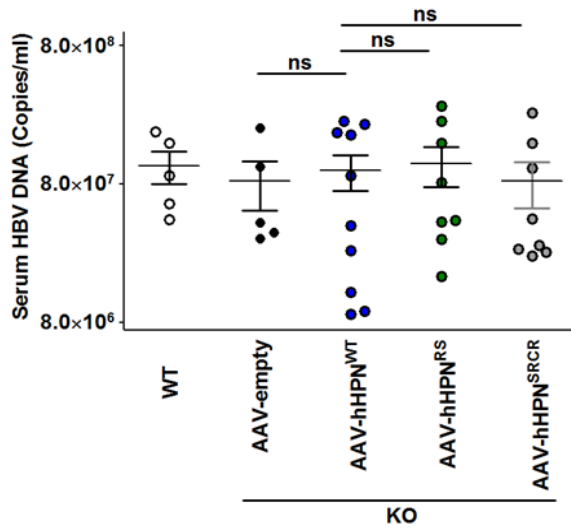
(B)



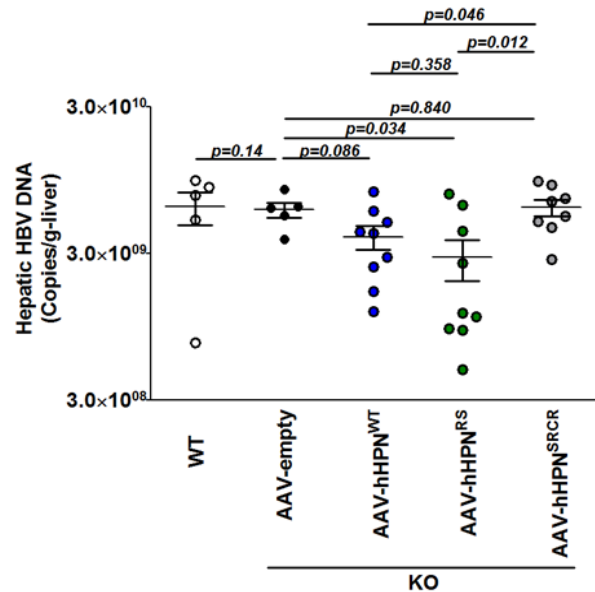
圖九、西方墨點法與免疫組織染色法偵測 AAV-hHPN 感染後肝臟 Hepsin 表現量。

(A) HPN 基因剔除小鼠注射 AAV-hHPN 感染 2 周後，以西方墨點法偵測肝臟中 hHPN^{WT}、hHPN^{RS}、hHPN^{SRCR} 蛋白表現量，hHPN DNA 為小鼠尾靜脈高壓注射 AAV 攜帶的質體 DNA 肝臟萃取液。每個 well 加入肝臟萃取液總蛋白量為 100 µg 以蛋白電泳展開。本次實驗所使用抗體為兔子抗人類 hepsin 蛋白質抗體 (Abcam ab31148, 1:1000 稀釋)。綿羊抗老鼠白蛋白抗體 (US Biological, 1:40000 稀釋)。每一組 AAV-hHPN 施打 4 隻小鼠。(B)免疫組織染色法檢測 AAV 病毒載體感染 HPN 基因剔除小鼠的肝臟組織 Hepsin 的表現。實驗所使用抗體為抗人類 Hepsin 抗體(Cayman Chemical Rabbit polyclonal, 1:200 稀釋)。

(A)

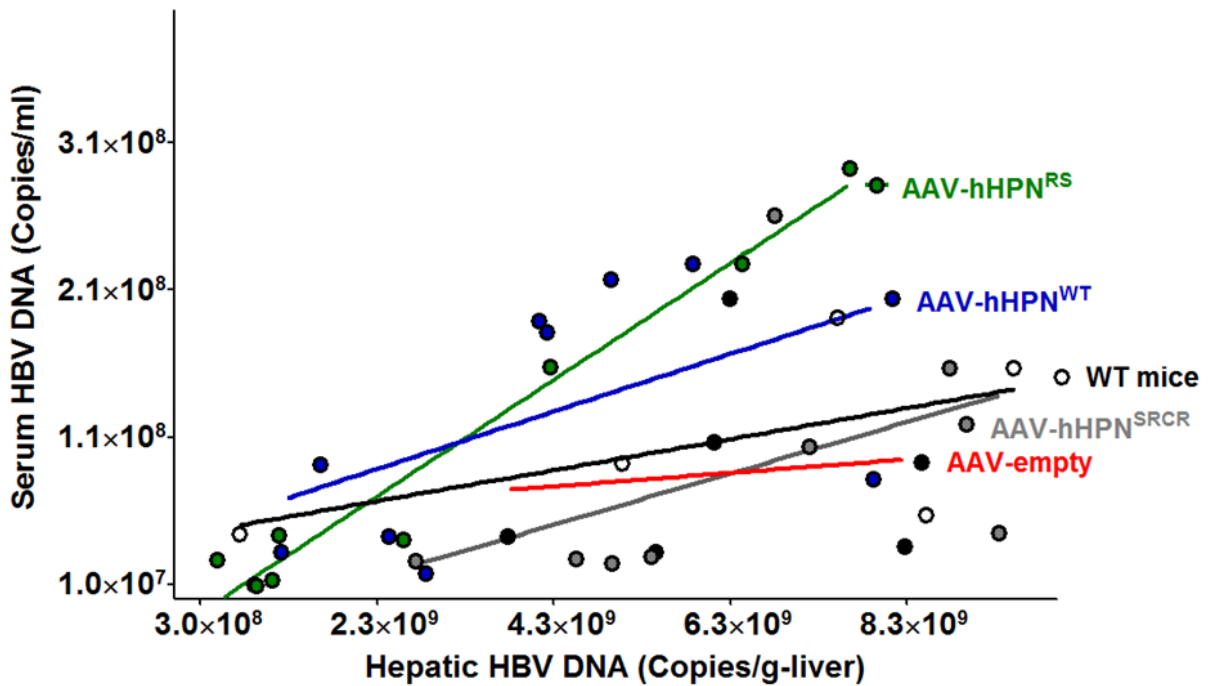


(B)



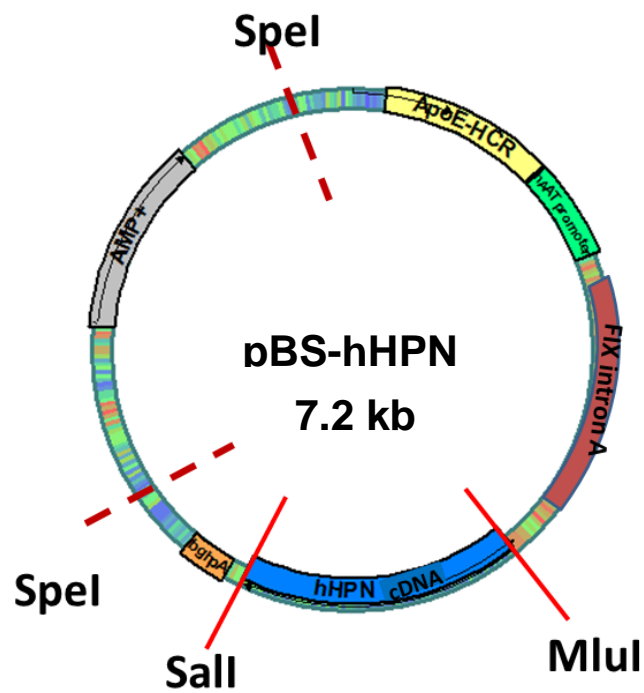
圖十、以各組 AAV-hHPN 感染後的 HPN 基因剔除小鼠進行尾靜脈高壓注射 pHBV1.3B6 質體 DNA 7 天後，血清及肝臟中病毒量分析。

AAV-hHPN 感染的 HPN 基因剔除小鼠 (AAV-empty $n=5$, AAV-hHPN^{WT} $n=9$, AAV-hHPN^{RS} $n=9$, AAV-hHPN^{SRCR} $n=8$) 以尾靜脈高壓注射 pHBV1.3B6 質體七天後，(A)血清中 HBV DNA 量，血清先以 micrococcal nuclease 清除 HBV 相關質體 DNA 後再萃取套膜內 HBV DNA，利用 Q-PCR 進行病毒定量。(B)肝臟中 HBV DNA 量，將肝臟檢體秤重後磨碎以 lysis buffer 溶液回溶，接著以 micrococcal nuclease 清除 HBV 相關質體 DNA，再萃取套膜內 HBV DNA，利用 Q-PCR 進行病毒定量。ns 為統計上無顯著差異。

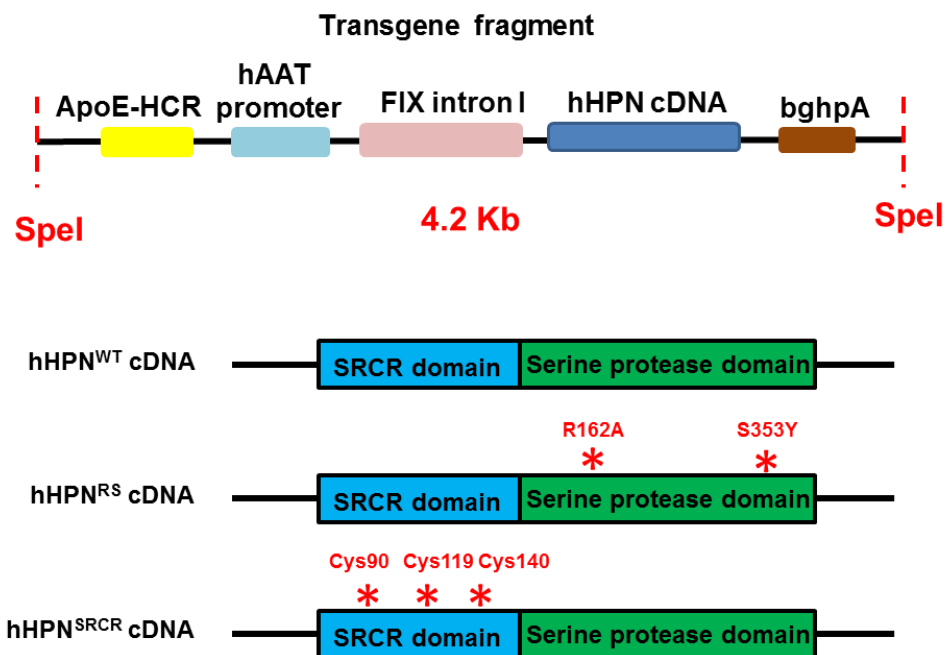


圖十一、以各組 AAV-hHPN 感染後的 HPN 基因剔除小鼠進行尾靜脈高壓注射 pHBV1.3B6 質體 DNA 7 天後，血清中 HBV DNA 量與肝臟中 HBV DNA 量比較。尾靜脈高壓注射 pHBV1.3B6 質體 DNA 7 天後，點代表 1 隻小鼠。橫坐標為小鼠肝臟中 HBV DNA 數量，縱座標為小鼠血清中 HBV DNA 數量。黑色線條為 WT 小鼠血清比肝臟 HBV DNA 趨勢線，紅色線條為 HPN 基因剔除小鼠血清比肝臟 HBV DNA 趨勢線，藍色線條為 HPN 基因剔除小鼠感染 AAV-hHPN^{WT} 血清比肝臟 HBV DNA 趨勢線，綠色線條為 HPN 基因剔除小鼠感染 AAV-hHPN^{RS} 血清比肝臟 HBV DNA 趨勢線，灰色線條為 HPN 基因剔除小鼠感染 AAV-hHPN^{SRCR} 血清比肝臟 HBV DNA 趨勢線。

(A)

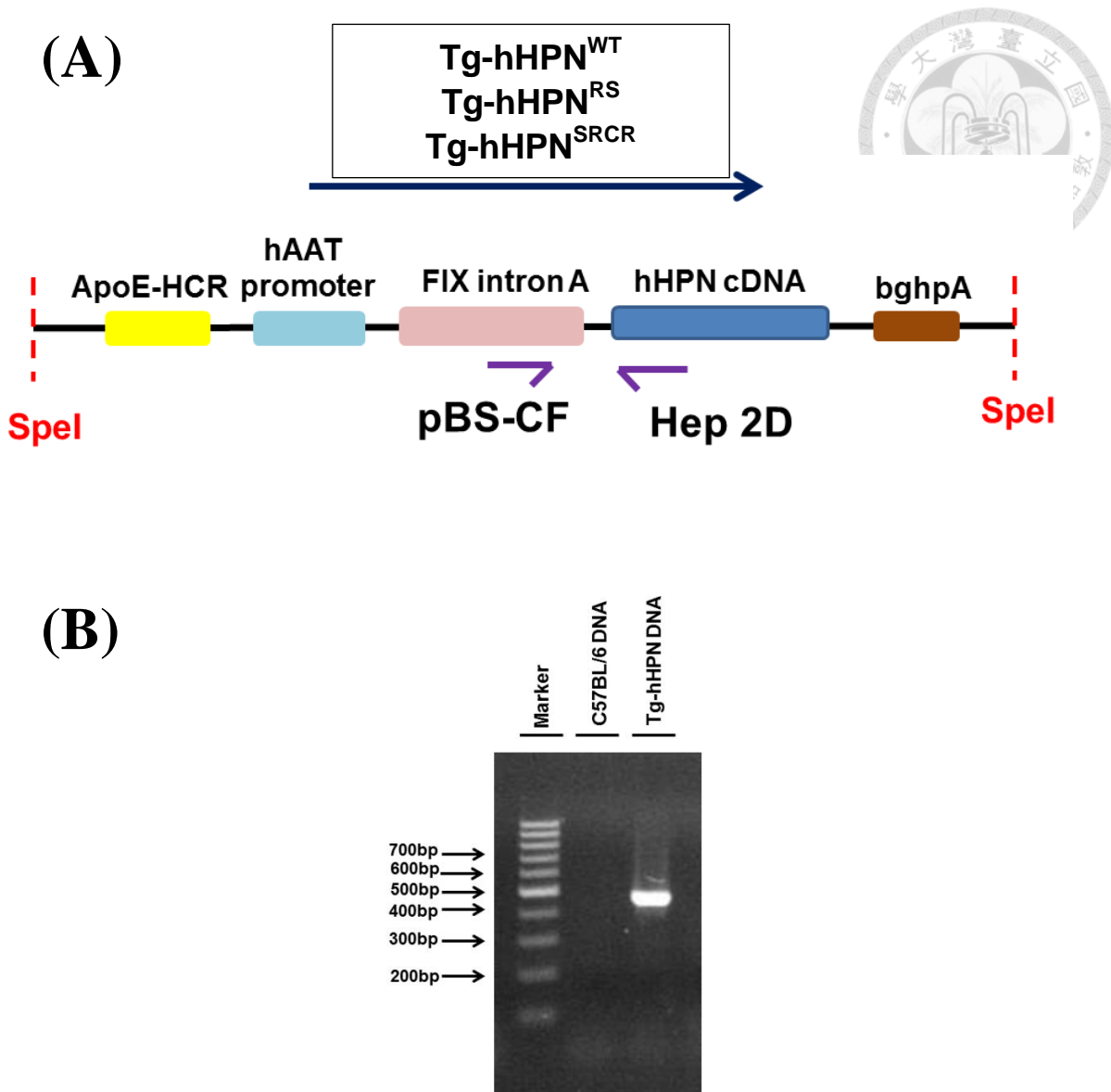


(B)



圖十二、基因轉殖鼠質體 pBS-hHPN 結構示意圖。

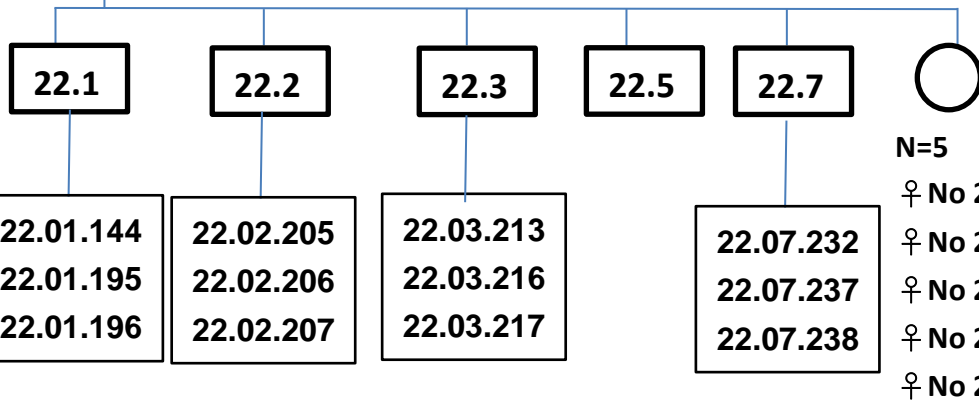
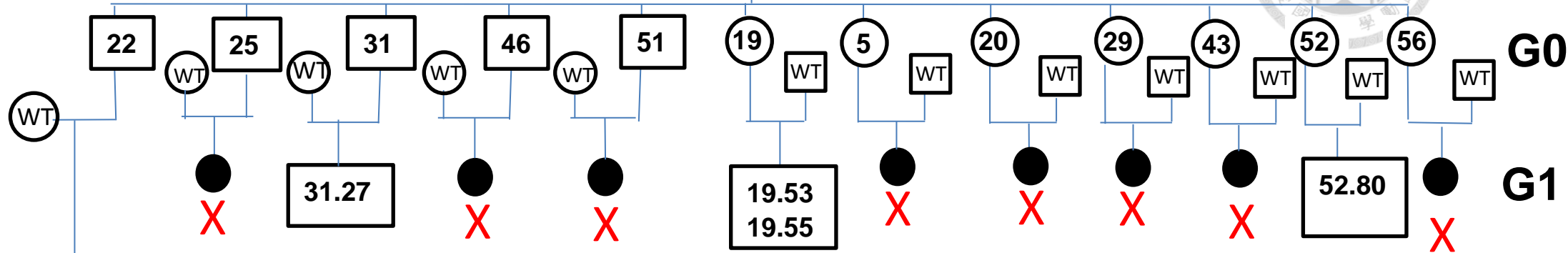
(A) pBS-SMS 載體 (得自於 Carol H Miao 教授華盛頓大學) 質體結構包含脂蛋白原 A 加強子 (ApoE-HCR)、人類 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶啟動子 (hAAT Promoter)、第九凝血因內插子 I (FIX intron I)、小牛生長因子賀爾蒙 Poly A (Bovine Growth Hormone Polyadenylation Signal ; bghpA)，用限制酶酵素 *MLu* I 與 *Sal* I 切割置換人類 Hepsin 野生型(hHPN^{WT})與點圖變型(hHPN^{RS}、hHPN^{SRCR})。(B)以 *Spe*I 限制酶酵素切割圖(A)中的 pBS-hHPN 質體 DNA 架構，再進行分離和純化，取得基因轉殖片段 (Transgenic fragment)。將此基因轉殖片段交由台大動物中心及國研院實驗動物中心產製基因轉殖鼠。



圖十三、以 PCR 確認基因轉殖鼠 genomic DNA 含基因轉殖片段。

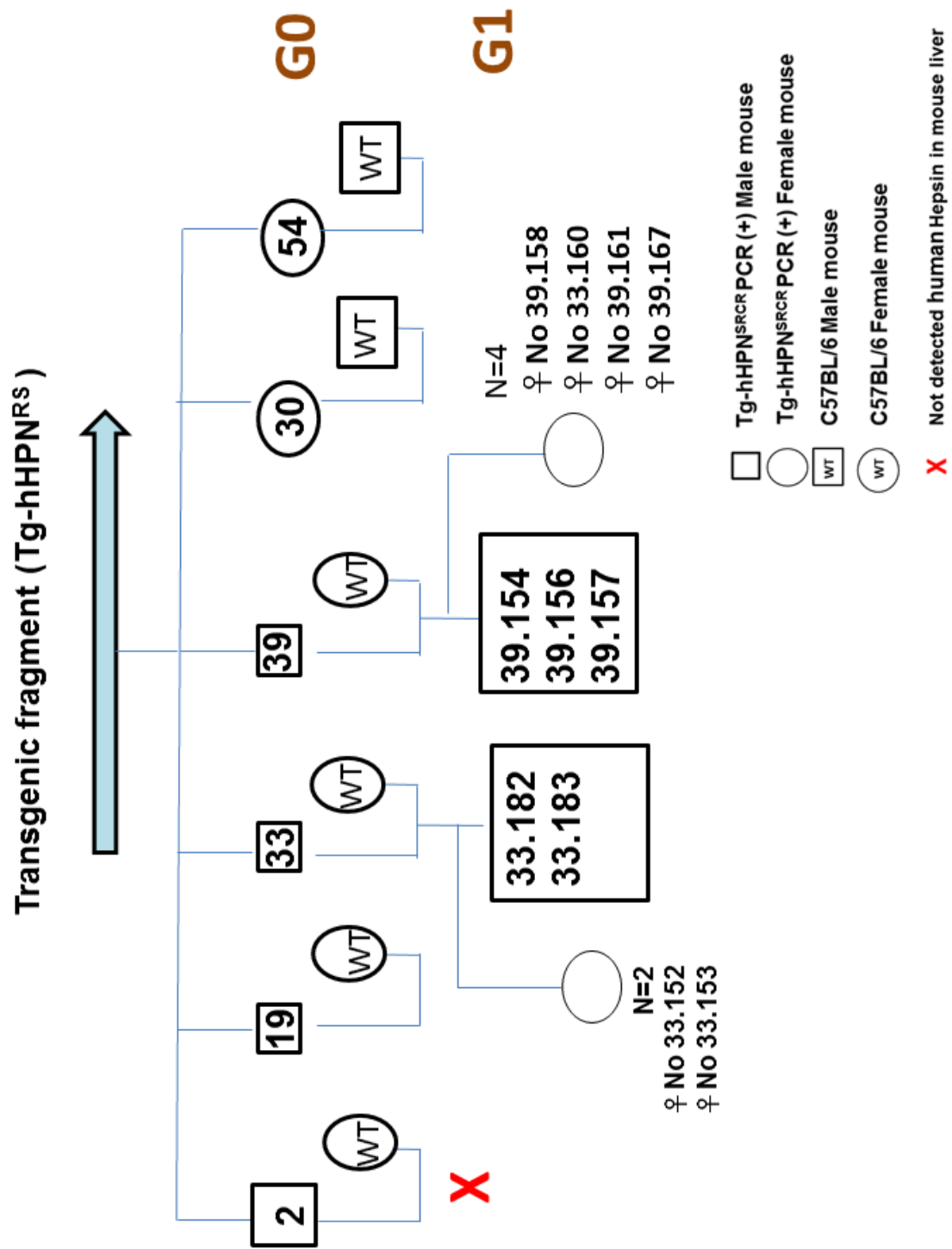
(A)為基因轉殖片段及確認基因型所使用 PCR 引子。如圖所示，箭頭代表 5 端至 3 端方向，5 端引子為位於 FIX intron I 的 pBS-CF；3 端引子為位於 hHPN Cdna 上的 Hep 2D，引子序列如(表一)。PCR 產物為 500 bp。(B)PCR 產物電泳分析圖，依計算 PCR 產物約為 500 bp，圖中依序所示為野生型小鼠 genomic DNA 及具基因轉殖片段之 Tg-hHPN DNA。結果如預期，只有 Tg-hHPN DNA 具 PCR 產物。

Transgenic fragment (Tg-hHPN^{SRCR})



- Tg-hHPN^{SRCR} PCR (+) Male mouse
- Tg-hHPN^{SRCR} PCR (+) Female mouse
- C57BL/6 Male mouse
- C57BL/6 Female mouse
- Not detected human Hepsin in mouse liver

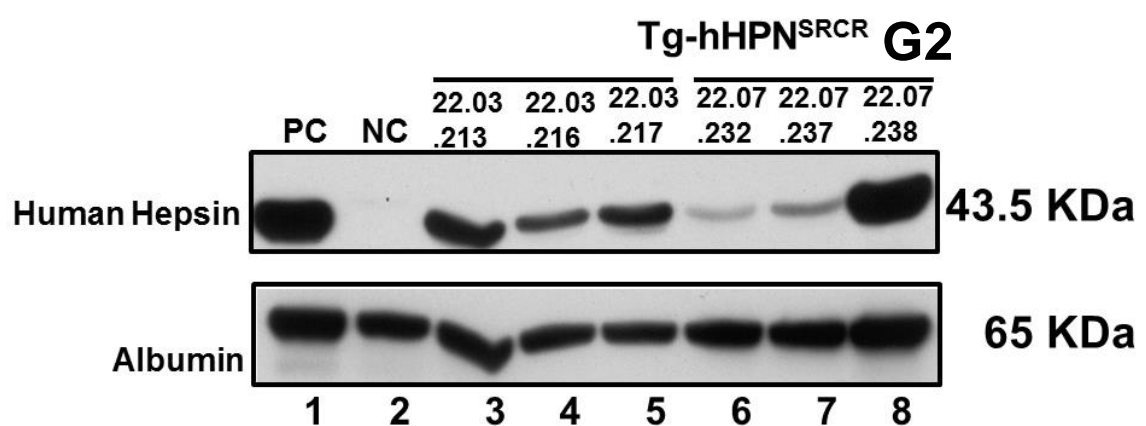
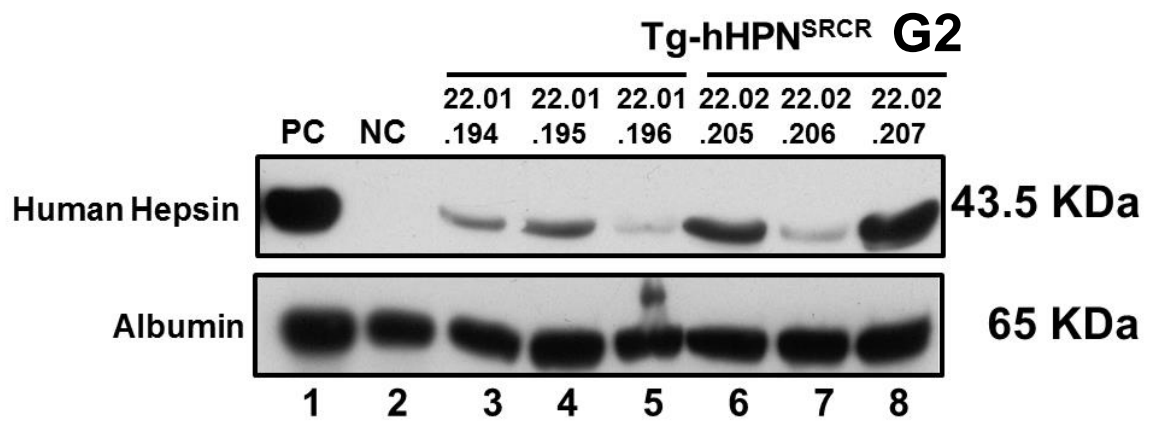
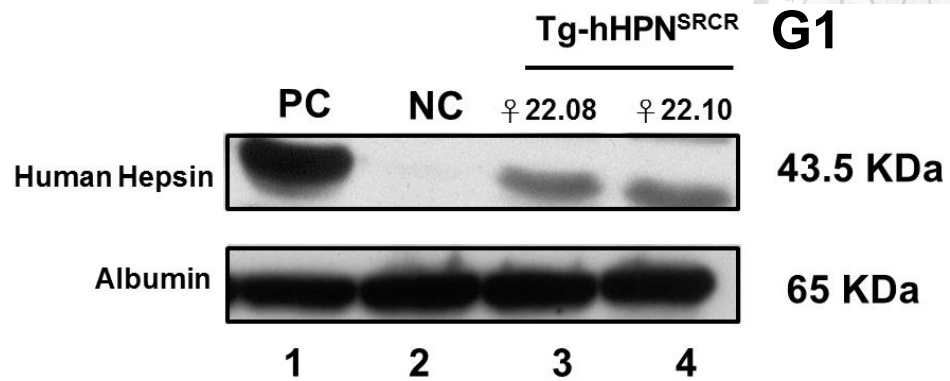
B



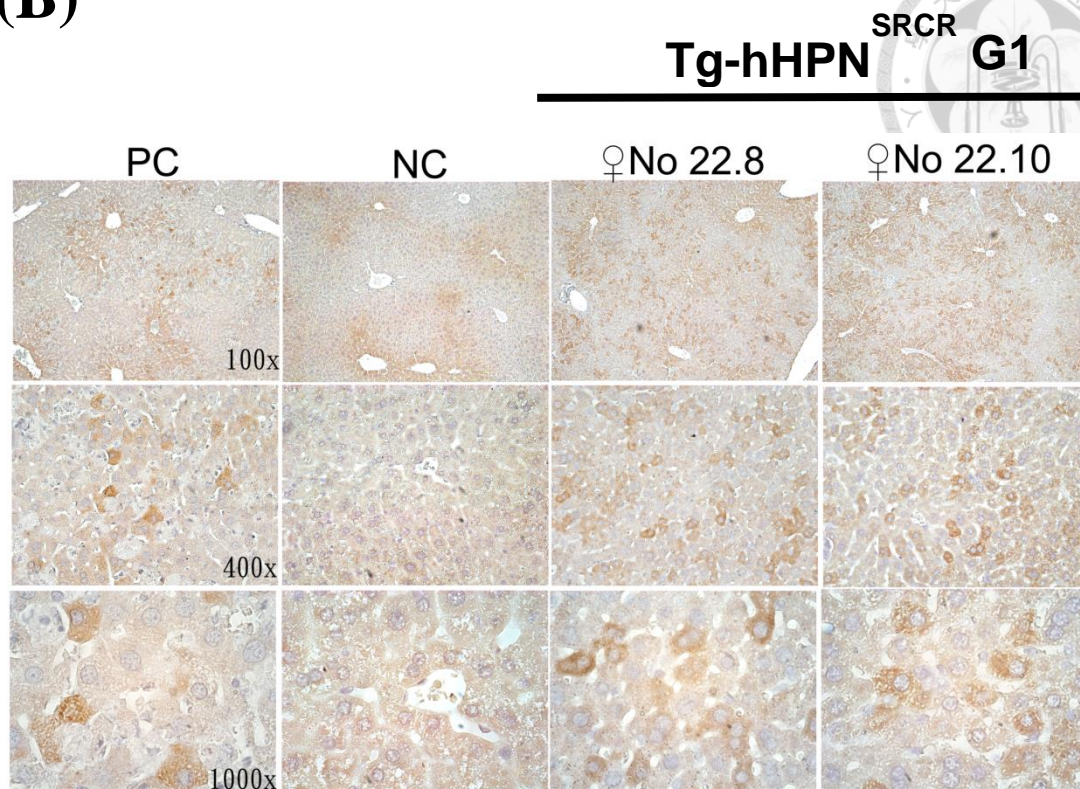
圖十四、基因轉殖小鼠繁殖族譜。

(A) Tg-hHPN^{SRCR} 基因轉殖小鼠品系。以 Tg-hHPN^{SRCR} 片段進行小鼠胚胎原核注射產製基因轉殖小鼠後，共取得 5 公 7 母 PCR 陽性(具基因轉殖片段)的種源小鼠 (G0 Founder)。 (B) 以 Tg-hHPN^{RS} 片段進行小鼠胚胎原核注射產製 HPN 基因轉殖小鼠，並以 PCR 鑑定為 hHPN^{RS} 陽性，共取得 4 公 2 母 PCR 陽性(具基因轉殖片段)的種源小鼠(G0 Founder)。每隻 G0 Founder 皆與野生型小鼠進行配種，新生母仔鼠(G1)犧牲取出肝臟，利用西方墨點法分析是否有表現人類 Hepsin 加以回推其 G0 是否肝臟也會表現人類 Hepsin。若 G1 母仔鼠肝臟有表現人類 Hepsin，則等其同一胎公仔鼠約 6~8 周大，再與野生型母鼠配種得到 G2 子代。紅色 X 為未偵測到小鼠肝臟表現人類 Hepsin 蛋白。

(A)



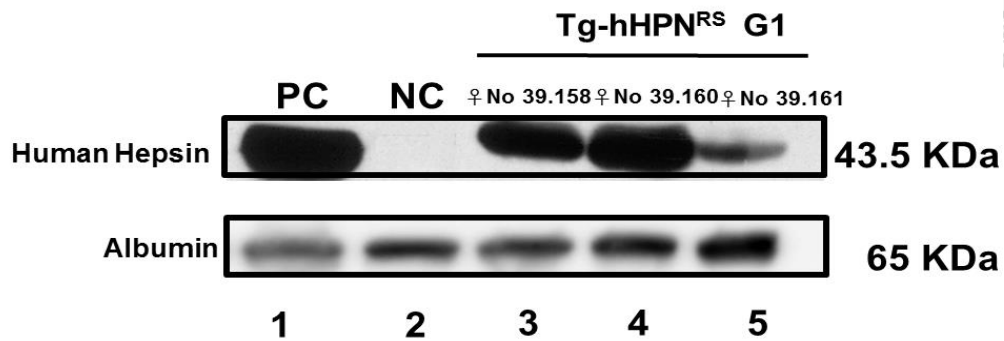
(B)



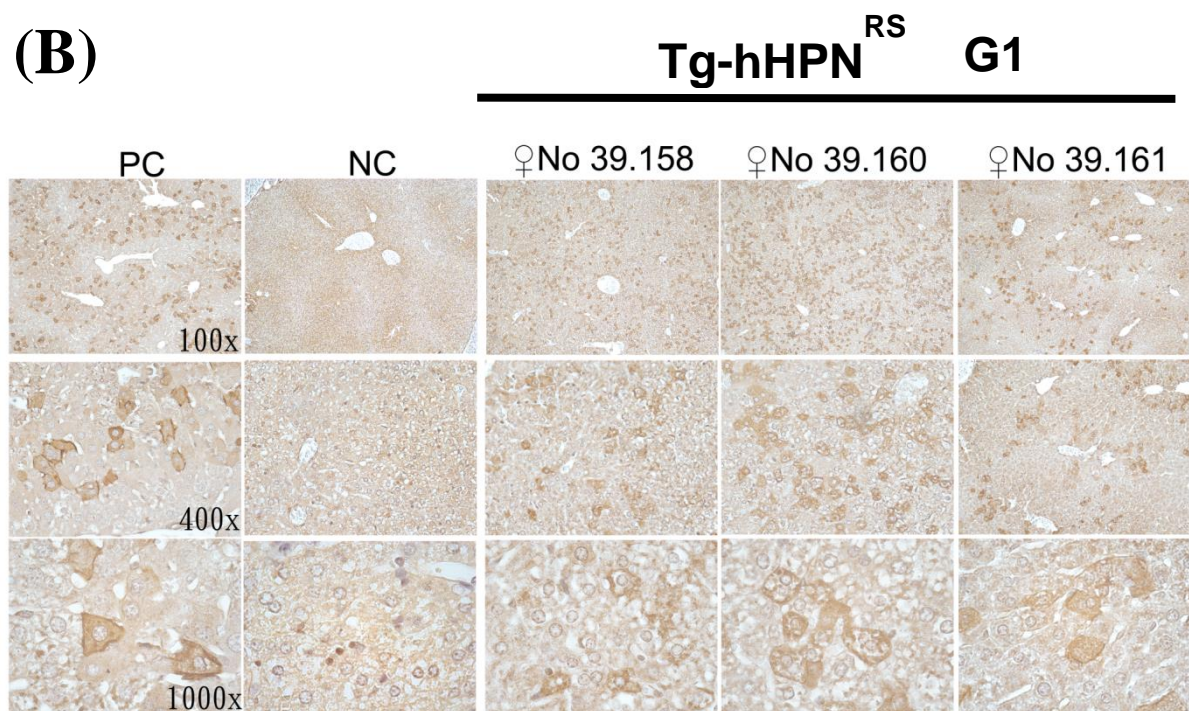
圖十五、以西方墨點法及組織免疫染色證明基因轉殖小鼠 Tg-hHPN^{SRCR} 肝臟表現人類 Hepsin 蛋白。

2~3 週齡基因轉殖小鼠 Tg-hHPN^{SRCR} G1 No 22.8、No 22.10，及 Tg-hHPN^{SRCR} G2 子代肝臟進行西方墨點法分析與組織免疫染色。(A) 西方墨點法實驗結果與(B) 組織免疫染色結果顯示，Tg-hHPN^{SRCR} G1 No 22.8、No 22.10 與 Tg-hHPN^{SRCR} G2 子代肝臟有表現人類 hepsin 蛋白。西方墨點法使用抗體為兔子抗人類 hepsin 蛋白質抗體 (Abcam ab31148, 1:1000 稀釋)。綿羊抗老鼠白蛋白抗體 (US biological, 1:40000 稀釋)。組織免疫染色所使用抗體為抗人類 Hepsin 抗體 (Cayman Chemical Rabbit polyclonal, 1:200 稀釋)。PC：為 Hydor-hHPN^{RS} DNA liver lysate；NC：為 Tg-hHPN^{RS} PCR(-)。

(A)



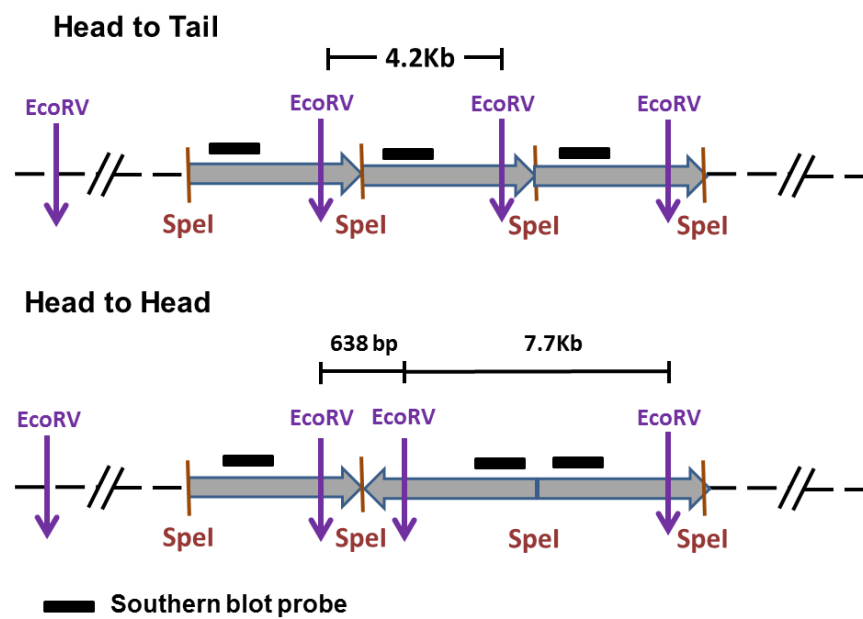
(B)



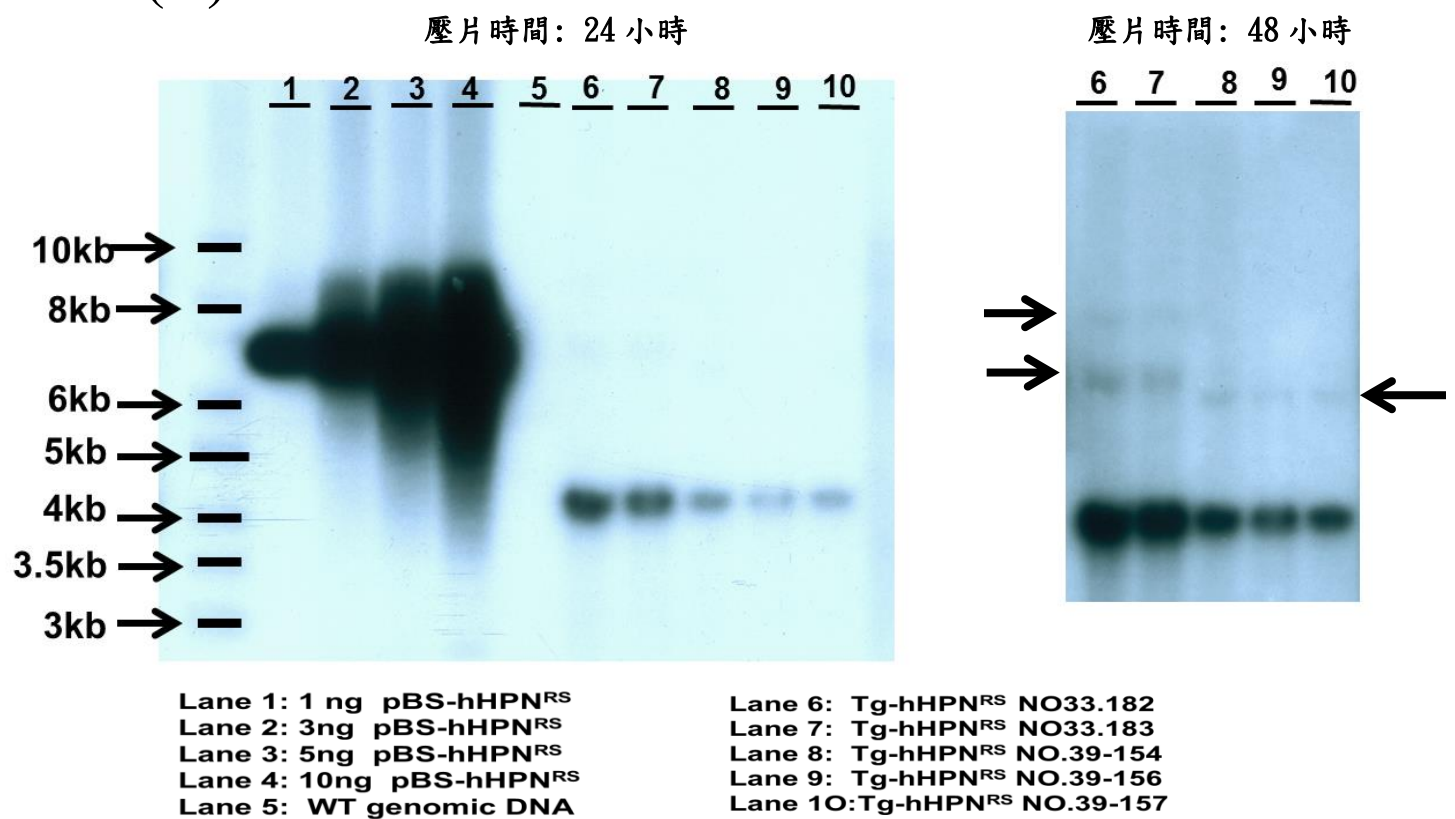
圖十六、以西方墨點法及組織免疫染色證明基因轉殖小鼠 Tg-hHPN^{RS} 肝臟表現人類 Hepsin 蛋白。

2~3 週齡基因轉殖小鼠 Tg-hHPN^{RS} No 39.158、39.160、39.161 及 Tg- hHPN^{RS} PCR(-) 肝臟進行西方墨點法分析與組織免疫染色。(A) 西方墨點法實驗結果與(B)組織免疫染色結果顯示，No 39.158、39.160、39.161 之基因轉殖小鼠肝臟有表現人類 hepsin 蛋白。西方墨點法使用抗體為兔子抗人類 hepsin 蛋白質抗體 (Abcam ab31148,1:1000 稀釋)。綿羊抗老鼠白蛋白抗體 (US biological,1:40000 稀釋)。組織免疫染色所使用抗體為抗人類 Hepsin 抗體 (Cayman Chemical Rabbit polyclonal, 1:200 稀釋)。PC：為 Hydor-hHPN^{RS} DNA liver lysate；NC：為 Tg-hHPN^{RS} PCR(-)。

(A)

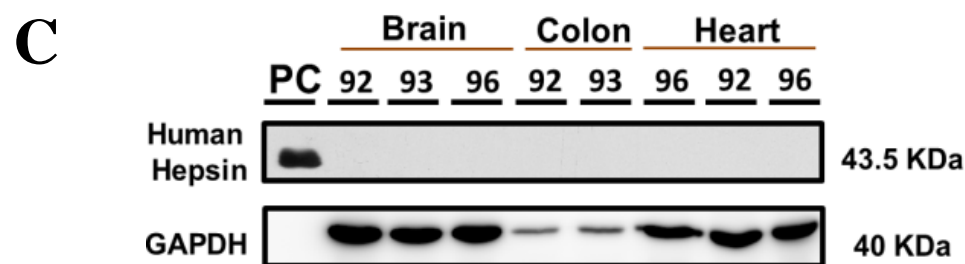
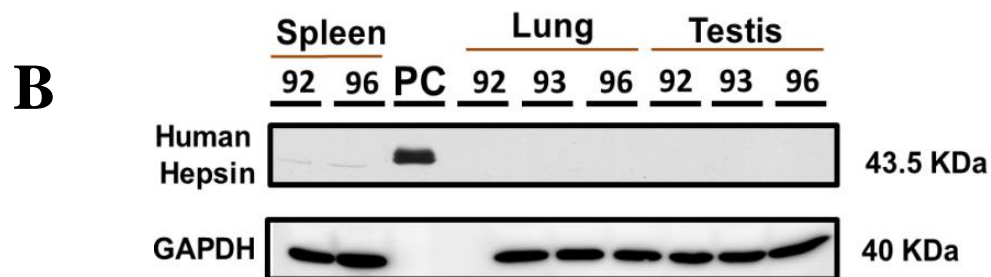
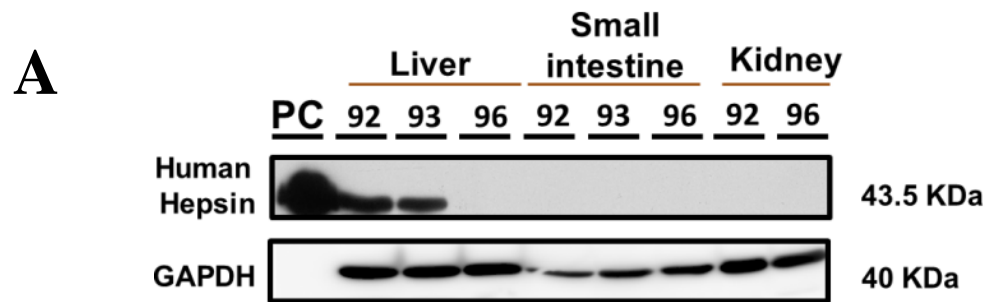


(B)



圖十七、基因轉殖鼠南方墨點法分析結果。

(A)為模擬多套 (multiple copies)基因轉殖片段嵌入單一染色體示意圖。圖中灰色箭頭表示為基因轉殖片段，*SpeI* 為原核注射時，用以切出基因轉殖片段的限制酶切位。黑色粗線為南方墨點法設計的探針。*EcoRV* 為基因轉殖片段上有單一切位的限制酶酵素，可用以判定嵌入染色體後的相對位子，由基因轉殖小鼠腳趾或尾巴萃取出來的 genomic DNA 會先以 *EcoRV* 切割，再進行南方墨點法。基因轉殖片段嵌入方式可分為頭尾互接或頭頭互接。如上圖所示，若是基因轉殖片段為頭尾互接，探針所辨識的片段大小為 4.2 kb；若為下圖所示，為頭頭互接，探針所標定的片段則為 7.7 kb。(B)壓片時間 24 小時 lane1~4 是 pBS-hHPN 質體 DNA 本身為 7.2 kb，可被 *EcoRV* 在序列上切一刀，以 7.2 kb 呈現。而 lane6~10 為基因轉殖小鼠 genomic DNA，結果得知 5 隻小鼠基因轉殖片段都是以頭尾相接型態鑲嵌在小鼠染色體中。壓片時間 48 小時圖中可看到 Lane6、7 為嵌入小鼠多對染色體(探針辨識到兩不同大小片段，黑色箭頭處)，而 Lane8、9、10 為嵌入小鼠單一染色體。



圖十八、以西方墨點法分析基因轉殖小鼠各組織中人類 Hepsin 蛋白質表現情形。

取基因轉殖公鼠 Tg-hHPN^{SRCR} (子代六週齡 No.92、93) 及公鼠 Tg- hHPN^{SRCR} PCR(-) (子代六週齡 No.96) 進行分析。各組織蛋白萃取液取總蛋白 100 µg 以蛋白電泳展開。本次實驗所使用抗體為兔子抗人類 hepsin 抗體 (Abcam ab31148, 1:1000 稀釋) 及老鼠抗 GAPDH 抗體 (Abcam ,ab9482 1:10000 稀釋)。



表一、實驗用引子表

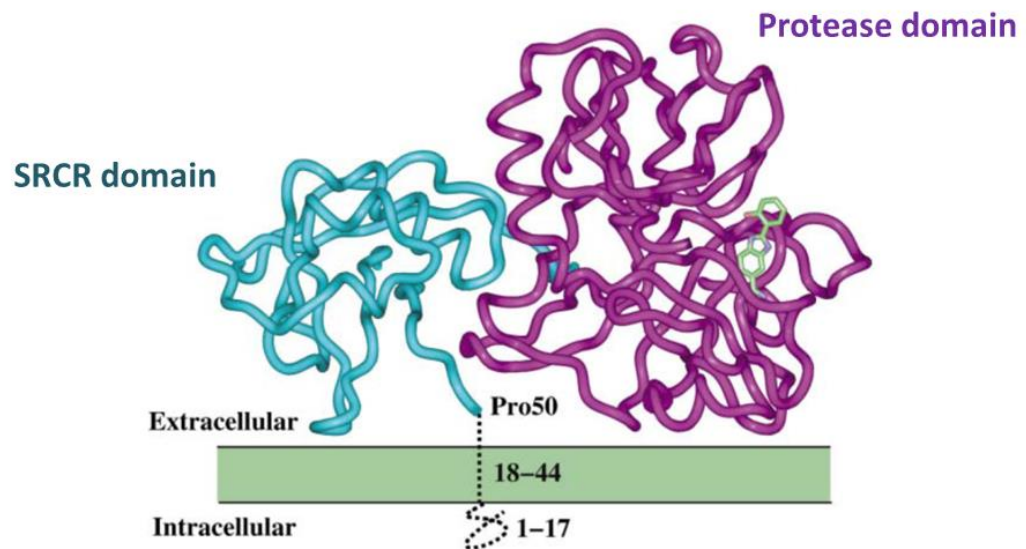
Primer name	Sequence (5' to 3')
hAAT P1630 (F)	CTC ATC TCA CCA CAA CCT TCC
hAAT P1631 (R)	CAA CAT GGA GAA ACC CGT CT
HBV (+)1181	CGA TAC AGA GCT GAG GCG GT
HBV (-)2016	ACC ATG CAA CTT TTT CAC CTC TGC CTA ATC ATC
Hep 2D	GGC TAC CCT GGC GTT GA GC
Human HPN 9U	AAG ATG TTC TGT GCT GGC TAC
Human HPN 10D	CCG AGA GAT GCT GTC CTC ACA
5' HPN MLuI	TAA CGC GTG CTA TGG CGC AGA AGG AGG GT
Mouse HPN 1340U	ATC AAG GTG GCG GCT ATG
Mouse HPN 1474D	CTG GCT TCG GAG TGA GTC
pBS-CF	ATC TCC ATG TGT ATA CAG TAC TGT G
3'HPN SalI	ATA GTC GAC TCA GAG CTG GGT CAC CAT
3'-hHPN EcoRV	ATA ATA GAT ATC TCA GAG CTG GGT CAC CAT



表二、實驗中使用的一級抗體及二級抗體資訊

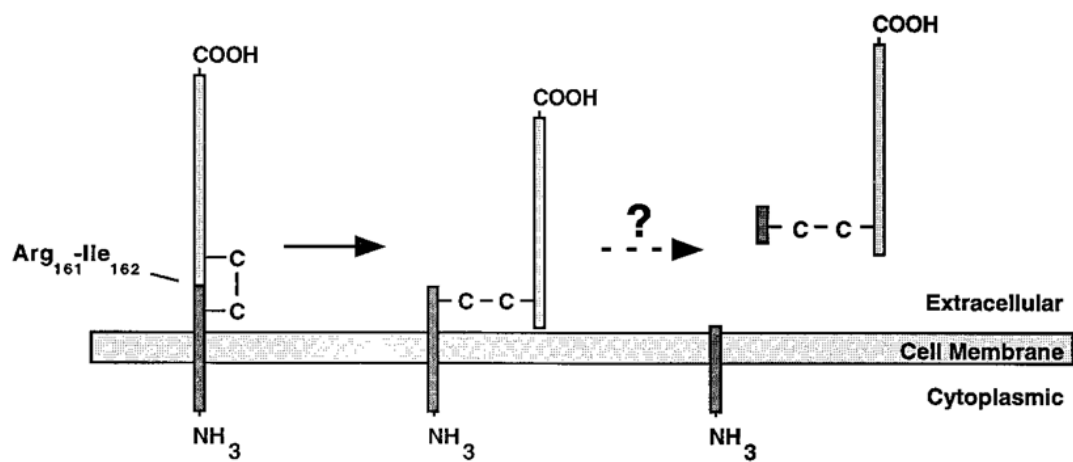
一級抗體	廠商	Catalog	濃度 (mg/mL)	Species	用途	稀釋倍數
Human Hepsin	Cayman	100022	未提供	Rabbit	IHC	1:200
HBcAg	Dako	B0586	未提供	Rabbit	IHC, IFA	1:500
Albumin	US Biological	A1274-90	未提供	Sheep	western blot	1:40000
Human Hepsin	Abcam	Ab31148	1	Rabbit	western blot	1:1000
GAPDH	Abcam	Ab9484	1	Mouse	western blot	1:20000

二級抗體	廠商	Catalog	濃度 (mg/mL)	稀釋倍數
Goat anti-Mouse IgG conjugated HRP	Millipore	AP124P	1	1:10000
Goat anti-Rabbit IgG conjugated HRP	Millipore	AP132P	1	1:10000
Rabbit anti-Sheep IgG conjugated HRP	Santa cruz	Sc-2770	0.4	1:20000
Goat anti-Rabbit IgG conjugated Cy3	Jackson	111-165-14 4	1.5	1:500
Goat anti-Rabbit IgG conjugated Alexa488	Jackson	111-545-14 4	1.5	1:500



Structure, Vol. 11, 1123–1131, September, 2003

Hepsin 結構圖，為一個 N 端朝膜內的穿膜蛋白。由絲氨酸蛋白酶及 SRCR 區域所組成。



Hepsin 活化示意圖，Zymogen 的 Hepsin 一刀在 $\text{Arg}^{161}\text{-Ile}^{162}$ 。?代表為未知酵素將在膜上的 Hepsin 切一刀，成為 soluble form Hepsin (Vu TK et al., 1997)