

國立臺灣體育學院  
National Taiwan College of Physical  
Education  
體育研究所碩士學位論文

藉由單核球細胞免疫反應抑制人類B型  
肝炎病毒表面抗原作用探討老年人之自  
行車運動對免疫力提升效果之研究  
MIDDLE-AGED SUBJECTS WITH HABITUAL  
LOW-SPEED CYCLING EXERCISE HAVE  
GREATER MONONUCLEAR CELL  
RESPONSIVENESS AGAINST HUMAN  
HEPATITIS B VIRUS SURFACE ANTIGEN



研究生：陳捷撰  
指導教授：陳裕鏞 教授

中華民國 99 年 12 月

## 謝誌

首先，我要感謝我的爸爸和媽媽，謝謝我的家人給予求學過程的支持與鼓勵。在求學的一路上您們全力地支持我，讓我順利完成最後的學業。在台灣體育學院這幾年來從一般全職碩班學生到休學當兵並取得工作，短短幾年進而轉成在職身份的學生，無形中增添的許多困難與壓力但仍然一一克服。

首先我要感謝指導教授陳裕鏞老師，謝謝陳老師指導我這幾年的研究學習，老師的博學多聞更讓我在文章閱讀及研究方向中都有了相當的廣大的見解與進步，更同時增添了許多知識。同時在論文上給予我許多的建議與指導，在論文上的審閱跟糾正上更是仔細與審慎。您從中鼓勵我去解決問題，讓研究的精神深植我心。

感謝其他身旁朋友，謝謝俊傑、柏言，謝謝你們陪我度過研究所的難忘歲月。謝謝我的女友，麗容。在我最迷惘絕望的時候，讓可以突破接踵而來的考驗並勇敢面對，讓我打消放棄的念頭，亦耐心傾聽。謝謝妳！謝謝大家、謝謝，感恩！

陳捷 謹致

論文名稱：藉由單核球細胞免疫反應抑制人類 B 型肝炎病毒表面抗原作用探討老年人之自行車運動對免疫力提升效果之研究

總頁數：52 頁

院校所組別：國立臺灣體育學院體育研究所

畢業時間及提要別：九十九學年度第一學期碩士提要

研究生：陳捷

指導教授：陳裕鏞

## 摘 要

研究背景在研究具習慣性自行車運動的老年人(HCE, Habitual cycling exercise)藉由每日清晨低強度的運動，經實驗控制，與對照組(SC, Sedentary control)相比之下，而表現出較高抗 B 型肝炎病毒的免疫活性。其方法利用植物血凝集素(PHA, Phytohemagglutin)刺激後表現之人類週邊血單核球細胞加入可表現 B 型肝炎病毒的 Hep-3B 細胞培養基下，觀察免疫抑制情形。

結果發現為經由實驗設計與控制後的受試者表現情形，在自行車運動計劃過程中觀察到  $VO_2 \max$  最高峰可達到 43.54%，HR max 可達到 60.12%。因此認為 HCE 對於老年人是屬於一種有氧之中低強度運動。在此過程中所表現出之細胞激素(Cytokine)像是  $IFN-\gamma$ ， $TNF-\alpha$  和  $IFN-\alpha$ ，在培養基的表現情形，具有運動習慣之 HCE 組較優於 SC 組。而在相同濃度的 PHA 刺激之下，觀察兩者對於抑制 B 型肝炎病毒的表現，其中 HCE 為 64.7%，而 SC 為 81.5%。然而下降的抑制率在細胞激素中和試驗下，可以推測其關鍵的證據是由於細胞激素的作用而造成 HCE-MNC-CM 對於 HBS Ag 表現抑制情

形。

結論為透過數據顯示出具自行車運動習慣的老年人與正常無運動習慣的老年人相比下，觀察經由 PHA 刺激 B 型肝炎病毒表面抗原表現過程中之單核球細胞免疫反應情形，HCE 組較優於 SC 組。

關鍵字：自行車運動、免疫抑制、B 型肝炎病毒、低強度運動、  
B 型肝炎病毒表面抗原

Chen, Jay.(2010). Middle-aged subjects with habitual low-speed cycling exercise have greater mononuclear cell responsiveness against.  
Unpublished master thesis, National Taiwan College of Physical Education, Taichung.

### **Abstract**

**Background:** Whether elderly with habitual cycling exercise (HCE), at lower intensity in the morning, have higher immunity against hepatitis B virus than sedentary controls (SC) was a health care issue for elderly. **Methods:** The conditioned media were prepared by stimulating the isolated human peripheral blood mononuclear cells with phytohemagglutinin (PHA) for assessment of the inhibitory effects on hepatitis B surface antigen (HBsAg) expression in human hepatoma Hep3B cells. **Results:** By the detected %  $VO_2$  peak at about 43.54 % and % HRmax at about 60.12% during cycling exercise program in present study, we can considered HCE as an aerobic and low to moderate exercise for elderly. The concentrations of secreted cytokines such as IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IFN- $\alpha$  were greater in the MNC-CM from the HCE group than those from the SC group. The inhibitory rates of HCE group' MNC-CM against the HBsAg expression were greater than that of SC group. In the same stimulating concentration of PHA (at 10  $\mu$ g/ml), the relative HBsAg expression in HCE group' MNC-CM was 64.7 % versus 81.5 % of SC group. The decline of inhibitory rates

in cytokine neutralization experiments suggest that the crucial roles played by these cytokines for inhibitory effect of HCE-MNC-CM against HbsAg expression.

**Conclusion:**The results reveal that the immune response of MNC, which are stimulated with PHA to suppress HBsAg expression in elderly with habitual cycling exercise at lower speed, is greater than that in sedentary controls.

Key words: Cycling exercise; Immunodulatory; HBV;  
Low intensity; HBs Ag

## 目 錄

中文摘要	I
英文摘要	II
表目錄	VII
圖目錄	VIII
第一章 緒論	
第一節 研究動機與目的	1
第二節 研究問題與假設	2
第三節 研究限制	3
第四節 重要名詞解釋	4
第二章 文獻探討	
第一節 老化與運動	6
第二節 運動型式與免疫細胞調控之現象	7
第三節 免疫表現與抗病毒作用之關係	12
第三章 研究方法	
第一節 研究架構	16
第二節 研究實施程序	16
第三節 研究方法	19
第四章 結果	
第一節 受試者身體質量指數測量與VO <sub>2</sub> peak測定	25
第二節 HCE與SC受試群經PHA-MNC-CM模式刺激週 邊血液細胞對於Hep3B細胞株於HBs Ag表現 程度之比較	29
第三節 細胞激素對於Hep3B細胞株產生之HBs抗原的 影響	31

第五章 結論	33
第六章 討論	36
參考文獻	37
附錄一 受試者身體檢查表	50

## 表 目 錄

表 4-1: 受試者身體質量指數測量與 VO <sub>2</sub> peak 測定·····	26
表 4-2: 習慣性自行車運動前後血中乳酸濃度與能量消耗之 比較·····	28
表 4-3: 經 PHA 刺激單核球細胞條件培養基與細胞激素抗體 中和作用後對於 B 型肝炎病毒表面抗原的影響···	30
表 4-4: 經 PHA 刺激單核球細胞條件培養基分泌出之細胞激 素表現情形·····	32

## 圖 目 錄

圖 3-1: 研究實施程序·····	17
--------------------	----

# 第一章 緒論

本章共分為四節，包含研究動機與目的、研究問題與假設、研究限制、重要名詞解釋等，茲分述如下：

## 第一節 研究動機與目的

### 壹、研究動機

隨著社會的變遷，石油缺乏所帶來之能源危機以及環境保護的議題趨使，使得自行車運動不但具有休閒及交通運輸的用途，更對身體保健的提升，有著相當程度的影響。在自行車有氧的運動過程中，運動強度由輕度至中度的漸進變化，更可以作為老年人的健康照護方式，同時避免其足部與膝關節的損傷。

在過去的文獻上可以發現，每週3小時的自行車運動與無運動之受試者相較之下可以降低約40%的死亡率(Andersen, 2000)。在芬蘭，老年人平均具有15-29分鐘的走路或騎駛自行車之習慣，研究觀察到心血管疾病所造成之死亡率有明顯的降低(Barengo, 2004)。每星期約60分鐘的規律性中強度運動持續12個月，會增強唾液中的黏膜免疫球蛋白IgA之濃度與分泌之速率(Akimoto, 2003)。從目前研究結果，顯示運動的強度與免疫功能是有關的(Nieman, 1994)。部份研究文獻則提及老年人運動會影響細胞內免疫功能的作用(Shephard, 1995 & Flynn, 1999 & Mazzero, 1994 & Houston, 1997)。舉例而言，具有運動習慣的老年人與無運動習慣的老年人相較之下在冷凍切片檢查中可以發現具有運動習慣的老年人其組織細胞內會表現出較多的T細胞(Shinkai, 1995)。進一步的研究更發現老年女性在介入16週的耐力運動訓練相較於無運動訓練之下

會表現出較佳的NK cell活性(Crist, 1989)。而動物實驗中，老鼠在中強度運動之下會表現出對HSV-1有較佳的抵抗力(Davis, 2003)。

細胞激素在受刺激作用下，可表現出對病毒的免疫抵抗作用。IFN- $\gamma$ 會經由人類週邊血液單核球細胞(Human peripheral blood mononuclear cells, PBMNC)所分泌出，此分泌的IFN- $\gamma$ 對HBV的表現具有抑制作用(Suri, 2001)。TNF- $\alpha$ 可經由細胞對於抗HBV病毒的機轉作用所活化。造成其機轉最主要的影響來自於TNF- $\alpha$ 表現量的增加(Hsu, 1999)。透過中強度運動的過程，血液中可以表現出TNF- $\alpha$ 的生成(Moldoveanu, 2000)。

因此研究論文設計透過規律化的有氧自行車運動的老年人受測者，評估其週邊單核細胞，所增進之免疫活性對於經由PHA植物血凝集素刺激Hep-3B細胞抗病毒的表現。評估具有習慣性自行車運動的老年人相較於無習慣性運動的控制組，其對於抵抗HBV表現的免疫反應之差異，本實驗利用分離之人類週邊單核球細胞，並體外培養其細胞再藉由PHA刺激免疫反應等體外試驗觀察因人類週邊單核血細胞分泌的細胞激素對於抗病毒的效應。

## 第二節 研究問題與假設

### 壹、研究問題

依據研究動機及研究目的，本研究將探討下列問題：

- 一、具自行車運動習慣之老年人，其週邊單核球血細胞於體外實驗對於B型肝炎病毒抑制之表現？
- 二、於無運動習慣之老年人，其週邊單核球血細胞於體外實

驗對於 B 型肝炎病毒抑制之表現？

## 貳、研究假設

依據研究動機及研究目的，本研究將驗證下列假設：

假設一：運動習慣（自行車運動）有無，其週邊單核球細胞在抑制 HBV 作用上是有顯著的差異。

假設二：因運動習慣所分泌之細胞激素對於 HBV 抑制上是有顯著差異。

## 第三節 研究限制

### 壹、研究方法的限制

本研究以細胞培養之體外試驗為主，由於受試者為非 HBV 帶原者，則以病毒細胞株培養作為模擬感染病毒之受試者，故體外實驗無法與人體實際研究結果相互比較差異是本研究方法限制之一。

### 貳、取樣的限制

本研究取樣以老年人為範圍，以自願參與研究方式為主，無法涵蓋全面性，取樣誤差為本研究限制之二。

### 參、研究推論的限制

本研究以特定病毒細胞株培養(Hep3B)模擬人體免疫表現方式為研究範圍，對於不同種類之病毒細胞培養於免疫表現之推論有其限制，為本研究限制之三。

## 第四節 重要名詞解釋

### 壹、老人

臺灣於1980年通過的老人福利法第二條規定「本法所稱老人，係指年滿65歲以上之人，因而本研究敘述之老人，是將65歲以上者定義之。

### 貳、B型肝炎病毒(HBV, Hepatitis B virus)

B型肝炎病毒(Hepatitis B virus)簡稱為B肝病毒(HBV)。屬DNA病毒，分類為肝炎DNA病毒科(hepadnavividae)。為42nm大之雙股去氧核糖核酸(Double strand-DNA)病毒；由27nm大小之核心所組成(HbcAg & HbeAg)，外層為脂蛋白外套，此外套包含B型肝炎表面抗原(HBsAg)。表面抗原(HBsAg)：為B型肝炎病毒之外套蛋白分子，存在於肝細胞或血清內表現時，則表示為感染B型肝炎。核心抗原(HBcAg)為B型肝炎病毒核心中的蛋白抗原，存在於病毒複製活躍的肝細胞中。e抗原(HBeAg)亦存在於病毒核心中，通常出現在表面抗原高的病人血清中，它的存在表示病毒仍進行活躍的複製，此時血清B型肝炎病毒的傳染力強。

### 參、植物血球凝集素(Phytohaemagglutini、PHA)

植物血凝素(Phytohaemagglutinin)是一種有絲分裂原，主要用於激活免疫細胞。淋巴細胞為干擾素(Interferon)誘導劑，不但可以刺激組織產生間白素-2(IL-2)和干擾素以及促進身體形成非特異性抗體。

#### 肆、細胞激素 (Cytokine)

細胞激素為分子量在 8~25kD 大小的醣蛋白，其分子具多樣性，能傳遞訊息予淋巴球、吞噬細胞與身體其他細胞。它們是由 Th 細胞受到刺激時而釋放出來，活化 B 細胞，除了作用至免疫細胞，其他細胞如內皮細胞，神經細胞，腦部都會受到影響，細胞激素作用方式可以是自我調控方式 (autocrine)，影響到其他週遭細胞的方式 (paracrine)，不同細胞激素之間可以利用加成作用 (synergy)，連續作用 (sequential) 或拮抗作用 (antagonism) 等不同的方式彼此作用。

常見之細胞激素種類有幾種，如：干擾素 (Interferons, IFNs)、間白素 (Interleukins, ILs)、株落刺激因子 (Colony stimulating factors, CSFs)、腫瘤壞死因子 (Tumor necrosis factors, TNF- $\alpha$ 、 $\beta$ ) 與轉化生增殖子- $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 等細胞作用因子 (Ivan Roitt, Jonathan Brostoff, David Male, 1999)。

## 第二章 文獻探討

本節旨在瞭解老年人經由自行車運動後所產生的免疫作用與理論對 B 型肝炎病毒表面抗原的影響，其中相關的研  
究，以下分述之。

### 第一節、老化與運動

台灣人口老化速度冠於全球，老人已占總人口 10.63%(內政部, 2010)，世界各國之中如芬蘭、日本和台灣均是人口快速老化的國家，國內老人醫療支出不但已占去家庭醫療總支出的 20%，亦耗費 3 成以上的醫療資源，不僅顯示台灣老人身心健康與生命品質情況普遍不佳，亦突顯出國內健保經費大多花費在疾病治療部分，應多增加於「保健、疾病預防」之比例。幫助老人做適當的運動，使老人更健康，進而減少醫療上的經費支出。老化和遺傳因子、生活環境及心理狀況等有關，也和生理機能的代謝過程有關。透過運動可以增加全身血液循環，讓身體組織保持活性及增加細胞修復功能(細胞修復功能隨著年紀增大，會變較差)，增強肌力、耐力、柔軟度及心肺功能，協調平衡能力，讓身體處在高效率的生理狀態。同時，運動有降低血糖、降低休息時的血壓、降低血脂肪的三低作用，很適合老人。而且，運動可以使身心舒暢、增加青春活力，使人保有積極樂觀的心理，如此更可延緩老化。

牟鍾福(2010)於我國老人運動政策報告書中調查指出 65 歲以上老人參與程度最高的休閒運動，前五項依序為：散步、健行、郊遊/旅遊、爬山、伸展運動。55~64 歲年輕老人參

與程度最高的休閒運動，前五項依序為：散步、健行、郊遊/旅遊、爬山、自行車。最喜歡參與的休閒運動依序為：散步、健行、爬山、自行車、慢跑、郊遊/旅遊、養身運動、伸展運動、游泳及舞蹈運動。間接反應出老年人參與之休閒運動皆趨向於低強度至中強度運動類型。因而老年人運動計劃定訂則需考量為輕、中強度運動為佳。

文獻建議其運動型態可包含健身房用腳踏車，運動強度則由輕度運動強度開始，並僅需中等運動強度對老年人就能促進健康等建議事項(Chih-Chin Hsu & Alice May-Kuen Wong, 2003)，因而本研究計劃定訂則選擇具自行車運動習慣之老年人為測驗模式。

## 第二節、運動型式與免疫細胞調控之現象

由運動所表現出的免疫現象已日趨重要，其中包含運動過程中對於骨質或軟組織所產生的損傷反應進而由身體免疫系統下表現的徵兆與現象。其中細胞內表現的免疫作用，則稱為細胞性免疫，由發炎反應所造成的免疫刺激，促使細胞分泌多種不同型式的細胞型式，最常見的是身體組織由血液中釋出白血球(White Blood Cell或Blood Mononuclear cells)再經由活化白血球釋出細胞激素。本段主在解釋因運動所表現出免疫細胞調控之現象。

舉例而言，如馬拉松運動，其特性則包含有高強度、長時間等特性，因此對於身體系統造成的壓力，更是值得注意。其中內分泌系統與免疫系統因壓力所產生的變化，對免疫反應產生的影響。研究表示競技性馬拉松運動是具有極大的壓

力，同時對身體生理系統造成顯著性的影響，在過程中會出現脫水、體重降低、腸胃問題、體溫過高與肌肉損傷等問題(Peter, Elena et al., 2003)。

Fournier(1997)和 O'Connor(1995)研究指出耗竭性與耐力的運動因素可能影響細胞藉由體液性的免疫反應而影響神經內分泌系統。神經內分泌系統活化則因馬拉松運動的特性所形成之壓力反應則會下視丘-腦下垂體-腎上腺軸(Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis,HPA)的活化。

Peter (2003)研究以 7 位選手參與馬拉松競賽活動，結果顯示賽後血液中會產生顯著性的白血球分佈情形改變，並影響免疫系統與內分泌系統的平衡。研究指出當運動時因身體所產生的壓力會使得腎上腺素分泌加速，並觀察到週邊血液之腎上腺素濃度上升，使得因含有  $\beta$ -腎上腺素受體之細胞，如 Lymphocyte(淋巴細胞)、T-cell(T 細胞)和 Neutrophils(嗜中性球)由脾臟、肝臟等器官中釋出而進入週邊血液循環，而生長激素分泌增加使得嗜中性球的數量亦跟著增加(Perdersen, 1997)。而 Rabin (1996)與 Perdersen(1997)指出皮質類固醇影響血管中內皮細胞附著分子的改變，同時使得淋巴球細胞、單核球細胞、嗜酸性白血球、嗜中性白血球與自然殺手細胞出現減少情形。

當運動強度增強時，淋巴細胞的濃度於運動期間為顯著性的增加，運動過後顯著性的下降(含 CD8+毒殺型 T 細胞、CD4+輔助型 T 細胞、CD19+B 細胞等)。當運動壓力所形成之免疫反應，包含了免疫細胞類型與數目的改變、細胞激素的調節(Venkatraman & Pendergast, 1998)。邱亦涵等人(2003)指出長時間運動對免疫系統有重大的影響。在急性運動後，

初級免疫細胞，如自然殺手細胞 (nature killer cell, NK cell)、單核球 (monocyte)與嗜中性球 (neutrophil)，不論在數量或功能上均有所變化。

文獻指出，耗竭性運動(strenuous exercise) 導致身體產生發炎反應，發炎反應則表現出如同組織受傷或感染形成的急性期反應 (acute phase response) 兩者現象有許多相類似之處 (Camus et al., 1994)。

Davidson, Robertson 與 Maughan 等人(1987)以 113 位選手參加馬拉松賽，完成比賽平均時間為 240.5 分鐘為跑完步時週邊血液之平均顆粒白血球濃度增加接近 200%。Garbriel 等人，以 9 位受試者以 100 公里之超級馬拉松的方式跑完全程，平均完成時間為 487 分鐘，週邊血液之嗜中性白血球平均增加 310%。Maria R.(2002)以 8 位受試者參與 1999 年巴勒莫馬拉松賽，平均完成時間為 207 分鐘，嗜中性白血球濃度上升至 150%。Galun 等人(1987)，認為運動所產生的血球變化主要受內分泌荷爾蒙的影響，其中包括皮質醇與兒茶酚胺。

由於運動壓力所形成的刺激而使得細胞激素增加而使得身體各器官中的白血球釋出而造成循環血液中的濃度升高。但由於荷爾蒙刺激源消失後而使得兒茶酚胺類之腎上腺素、正腎上腺素因壓力下降後，濃度減少，因此白血球的濃度亦跟著減少(McCarthy, 1988)。

Rainwater(1995)於 2.5 小時之 treadmill 跑步運動之研究，運動後淋巴細胞經由 Con-A 刺激，以形成增殖現象

然而運動過量，或從事長時間且高強度運動後。血液中免疫系胞會出現下降，進而影響免疫系統的表現。Peters(1997)與 Nieman(1990)以流行病學調查發現當耐力型運動競賽後兩

星期內，上呼吸道感染 (upper respiratory tract infections; URTI) 機率會上升。Nieman, Johansen, Lee 與 Arabatzis (1990) 以 1987 年洛杉磯馬拉松競賽前後所產生的感染情形作一分析，結果表示完成馬拉松賽選手於賽後一星期內上呼吸道感染情形有 12.9%。

Mars 等人 (1998) 發現耐力運動性的選手當運動至衰竭情形，便會開始出現細胞凋亡 (apoptosis)，比率有明顯增加的趨勢。徐台閣、徐廣明、蘇文和、張永政 (2001) 以 TUNEL (terminal-deoxynucleotidyl-transferase-mediate dUTP biotin nick end labeling stain) 當馬拉松賽後，以螢光顯微鏡觀察經由綠色螢光所染色之淋巴細胞，而由 apoptosis 所增加之比率於賽後 30 分鐘比率增加至 23%。研究結果表示馬拉松賽會造成淋巴細胞自發性死亡，而使得淋巴細胞數減少。

文獻整理進一步發現運動對於自然殺手細胞的作用，自然殺手細胞 (Natural Killer cell) 簡稱 NK cell，屬於淋巴細胞的一種，可直接殺死癌細胞與感染病毒的細胞，可以同時進行專一與非專一的免疫機制，目前已知最多的 NK cells 標記為 CD56、CD16，而 CD16 功能為參與 NK cells 的活化，其中 NK cells 的活化可以經由細胞激素 (IL-2、IL-12、Interferon- $\alpha$  與 Interferon- $\beta$ ) 刺激所產生，受到刺激與活化的 NK 細胞可以釋出 Interferon- $\gamma$  與 GM-CSF 等細胞激素。

當運動特性開始表現長時間，且強度增強時，如馬拉松運動。在運動過後一小時內自然殺手細胞出現大量的減少與毒殺活性降低。身體內形成之巨大壓力進而影響 NK cells 的活化情形，主要因 NK cells 受到細胞激素 (Interleukin-2、Interleukin-12) 與荷爾蒙刺激等因素的作用。

Yamada (2002)以 12 位男性選手(winter-sport)於 treadmill 上進行最大運動能力試驗(Maximal exercise test)直至衰退，而運動後與運動前相較之下，G-CSF、IL-6 顯著上升約 210%。

Shinkai(1993)以三項鐵人運動經由運動 2~3 小時，其血液中單核球濃度出現增加。血液中呈現單核球活化與增多，大多情形出現於衰竭性運動中。而影響單核球細胞活化的影響因素則包括了細胞激素，內分泌系統。因衰竭性運動過後會早成發炎現象，故因此造成嗜中性球與單核球趨向受傷區域，白血球同時會分泌出 IL-1、IL-6 與 TNF- $\alpha$  等。同樣的情形在 Ostrowki(1999)以 10 位男性選手參與哥本哈根馬拉松賽，平均完成時間為 3 小時 27 分，血液中單核球與嗜中性球活性與分泌於血液中時間增加，細胞激素 IL-1 $\beta$ 、IL-6 與 TNF $\alpha$  等均於馬拉松賽後升高，促使單核球與嗜中性球活性與分泌於血液中時間增加。

運動後所形成免疫系統與細胞的現象，會因運動強度、時間長短因素，而有所差異。形成耗竭性運動的過程中，造成身體內組織的傷害與強烈發炎反應。當運動強度提高時，在運動期間會造成血液中細胞大量分泌並形成訊息使得細胞激素釋出，而使得淋巴細胞數出現降低，並出現發炎前與抗發炎激素的分泌等。另外，針對老人運動的時間也應避免過長。因長時間運動過後會使得免疫力出現下降的問題，是需要注意，因運動後所造成之上呼吸道感染現象，使身體組織，感染疾病機率大為提高而使得身體健康受影響。由上述文獻探討藉此了解與發現運動與免疫細胞作用之關係，進而形成一推論於本實驗中觀察老人藉由運動所表現出之免疫反應。

### 第三節、免疫表現與抗病毒作用之關係

免疫反應初期探討來自於病原體的感染。病原體(pathogen)包括細菌(bacterium)、病毒(virus)、真菌(fungi)以及寄生蟲(parasite)等。當身體出現感染時，免疫作用則會低下。當免疫反應作用時會釋出許多吞噬細胞(phagocyte)如循環血液中的嗜中性球(neutrophil)、單核球(monocyte)以及週邊組織中的巨噬細胞(macrophage)。促使巨噬細胞活化以對抗外來病原，而降低其對體內之傷害。一般來說，對抗免疫反應的表現為藉由內毒素(endotoxin)刺激巨噬細胞時，其產物有：(1)高反應性含氧分子(reactive oxygen species, ROS)：如一氧化氮(nitric oxide, NO)。(2)脂質衍生物：白三烯素(leukotrienes)、前列腺素(prostaglandins)及血栓凝集素(thromboxan)。(3)蛋白質：通常是 Interleukin (如 IL-1、IL-6、IL-8)、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ ，其中 IL-1、IL-6 及 TNF- $\alpha$  為促發炎細胞激素(pro-inflammatory cytokines)，並在急性發炎反應中扮演重要角色。

常見細胞激素之作用如下：

- 一、IL-1(介白質-1):由許多不同的細胞，包括單核球、巨噬細胞及寡樹突細胞所分泌，以IL-1 $\alpha$ 及IL-1 $\beta$ 兩種形式存在，IL-1 主在誘導急性期蛋白質之產生、刺激T及B細胞的活化等。
- 二、IL-6(介白質-6):屬多功能之細胞激素，為巨噬細胞、T細胞、纖維母細胞及內皮細胞等分泌形成，為刺激T細胞的活化及刺激B細胞產生抗體等(Chia-Wen Liang, Yi-Chung Lai and Yan-Hwa Chu, 2004)。

三、TNF- $\alpha$  (腫瘤壞死因子- $\alpha$ ):從單核球及巨噬細胞中所產生出來，其功能可以誘導單核白血球及巨噬細胞分化、活化巨噬細胞、刺激補體及凝血系統。在脂多醣體 (lipopolysaccharide, LPS) 誘導的發炎反應中，誘導 IL-1、IL-6 及 IL-8 的產生，誘導感染區域血管促進黏附分子聚集，使內皮細胞產生血小板活化因子，以催化血液凝結，防止病原菌擴散(Peter P, 2000)。

四、IFN(干擾素): 干擾素具有抗病毒及免疫調節的作用(Rico MA, 2001)。透過複雜的作用機制，干擾素降低肝細胞支援病毒複製的能力，產生有助於清除感染的宿主蛋白質，並且強化毒殺型 T 細胞及自然殺手細胞對於病毒抗原的攻擊能力，以達到清除病毒的能力(Harari A. Et al., 2006 ; Savoldo B. Et al., 2006 ; Meier UC. et al., 2005)。

干擾素可分為  $\alpha$ -、 $\beta$ -及  $\gamma$ -三種形式，干擾素  $\alpha$  是由白血球纖維母細胞或活化的 B 淋巴球所分泌的一種蛋白質；干擾素  $\beta$  是由纖維母細胞合成，兩者都是由感染病毒的細胞產生。而干擾素  $\gamma$  是由 T 淋巴球及自然殺手細胞所產生，可活化巨噬細胞(Kota RS. et al., 2006 & Fujiwara N. et al.,2006)

免疫系統經由訊息交換與傳遞是可以互相調控的。而調控各個訊息環節的免疫因子在受到刺激時，便會啟動免疫防禦機制。以現代研究中影響起始的正向作用因素多為運動與藥物等刺激模式。

運動就是影響免疫系統的一個例子(Gabriel & Kindermann, 1997; Nieman, 1997; Shinkai, Konishi, &

Shephard, 1997)。上述文獻曾探討提過，白血球的生物活性包括淋巴細胞的增殖測試、自然殺手細胞的毒殺能力以及黏膜組織抗體 IgA 都將因為劇烈運動後而有所降低，而 IL-1、IL-6 以及 TNF- $\alpha$  在血液中的濃度則會上升 (Pedersen et al., 2000)。但其免疫表現，如免疫細胞數改變、細胞激素濃度增減皆發生於人體，並無詳細探討其作用機制。

因而可利用細胞或動物實驗的模式研究其相關機轉。影響免疫因素對於人類腫瘤細胞關係，目前皆為探討增殖或抑制現象，文獻指出運動對於 NK cell 的調節作用，經過身體訓練模式 (Physical exercise training, PET) 後其實驗組血液中 NK cell 表現出的毒殺腫瘤細胞 (Cytotoxic) 的能力有顯著上升 (Crist, Mackinnon, Thompson, Atterbom & Egan, 1989)。利用結合碳水化合物 (Carbohydrate) 與運動可以發現降低 HSV-1 的感染 (E. Angela Murphy, J. Mark Davis & Martin D. Carmichael, 2009)。部份動物實驗觀察到，老鼠運動到疲勞後，其組織內巨噬細胞對於 HSV-1 抗病毒作用則會下降。細胞激素中 IFN 的生成目前是已知抗病毒最重要的防禦機制，ISG15 為其抗病毒之蛋白質，並可藉由 IFN 的分泌進而抵抗 Influenza、herpes 與 Sindbis viruses 的感染 (Deborah J. et al., 2007)。細胞激素對於抗病毒作用的情形，除了於 HIV 的感染的患者中發現，亦可以在 EBV 急性感染期中觀察到 IFN- $\gamma$  IL-10, TNF- $\alpha$  與 IL-6 的表現 (Cecilia. et al., 1996)。

然而，部份研究以動物實驗模式將基因轉殖鼠注射 IL-12 與 IL-18 可以觀察到 HBV 複製情形明顯被抑制 (Cavanaugh et al., 1997 ; kimura et al., 2002)。另有細胞試驗之模式進行細胞激素活化後對 HBV 作用之探討，具運動習慣的中年受試者

與正常作息之控制組從事太極拳運動(中強度運動)，可以觀察到具運動習慣的控制組所採集之 PBMNC 經由 PHA 刺激分泌的細胞激素可以抑制 HBV 的抗表現情形 (Chen Y.Y, et al., 2008)。

根據上述所探討的免疫表現與作用之關係，了解免疫反應可以經由運動的刺激而生成，並經由細胞激素的分泌表現而形成抗病毒的初級免疫作用。綜合上述三段文獻探討在於了解運動行為會影響免疫系統的作用，影響的因素在於運動種類、時間、強度等。再透過老人醫學的觀點，藉由運動提升免疫力進而降低外來病原的感染作為選定研究主題的方向。

## 第三章 研究方法

本章根據研究動機及目的，輔以相關文獻探討的結果，作為研究的架構依據。本研究以體外為主要之研究方法，首先針對受試對象以問卷調查所得到之結果進行統計分析，將分析之結果陳列出，之後再結和文獻探討之方式，將研究結果與相關文獻進行探討，以探究研究架構所含的研究問題；茲就本研究方法分為研究架構、研究實施程序及進度管制、研究對象、研究工具及資料處理等項，依序分節敘述

### 第一節 研究架構

本研究主要目的在探討台灣老年人經運動習慣的持續經血液細胞與混合 B 型肝炎病毒株培養透過分泌之細胞激素觀察對於 HBV 抗原抑制表現情形。

### 第二節 研究實施程序

本研究之進行其程序分為：一、收集分析文獻；二、決定研究主題；三、實驗方法擬定；四、實驗資料收集；五、電腦資料處理；六、撰寫論文報告。如圖 3-1 所示：

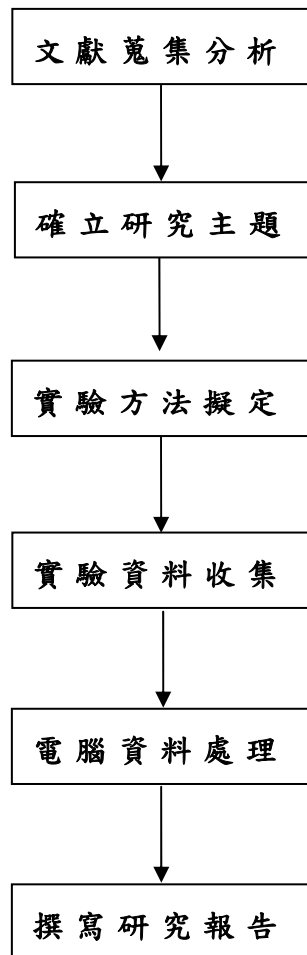


圖 3-1 研究實施程序

#### 一、收集分析文獻

利用中華民國期刊論文索引系統、中文期刊電子服務 (CEPS)、Pub-med、ProQuest、Highwire、Cochrane 等系統，針對國內外相關文獻資料進行廣泛蒐集及評讀並經分析、整理與實驗室接續性研究，以形成研究主題。

#### 二、決定研究主題

經廣泛蒐集及研讀相關文獻後，對老人醫學、運動免疫、B 型肝炎病及體外試驗等相關研究條件並加上實驗室內系

統化接續性之研究方向，而確立此研究主題。

### 三、實驗方法擬定

發展問卷作為研究工具以符合研究需要。在發展工具過程中主要分成兩個步驟，其一：以研究主題，對相關人員進行調查，了解研究主題實務層面的現況，其二：結合文獻理論，作為編製工具的基礎。依研究之需要，結合理論分析資料，編製研究工具。

### 五、電腦資料處理

基本背景資料問卷回收後，檢視背景資料數據並予以分類後，輸入電腦建檔處理，並登錄問卷施測結果，再進行資料分析，並以統計考驗研究假設，以了解研究結果。

### 六、撰寫論文報告

將研究結果撰寫論文，提出研究結論與建議，已完成研究論文。

### 第三節 研究方法

#### 壹、研究樣本

本次實驗共收集29位老年男性參與本次研究，其中有關身體質量組成由中國文化大學所提供檢測，15位男性受試者為具有清晨自行車運動習慣，其頻率每日為2小時，每週至少2次，其運動歷程至少2年以上，因此定義為具自行車運動習慣實驗組(HCE group, Habitual cycling exercise)。另外14位男性在本次研究之前並不具有任何與身體活動有關之習慣，因此定義為靜態控制組(SC group, Sedentary group)。

所有的收試者皆接受臨床身體檢查，受試者本身無肌肉損傷、肺炎、心血管及手術治療等病史。在研究期間需進行血液檢體採集與分析，受試者背景需注意不得為HBV帶原者或HBs Ag為陽性。

在血液檢體採集之前，HCE group需接受HCE計劃2個月。此計劃為一星期二次，從清晨5點至8點進行自行車運動，過程中行車速度需等同於32% VO<sub>2</sub>peak。另一組受試者在研究期間禁止從事任何身體活動。

所有的受試者於自行車運動前30分鐘，營養控制上，可食用肉品與3片白吐司、1顆蛋、240C.C的牛奶。研究開始前4週及研究期間，限制受試者攝取任何加入咖啡因的飲料、喝酒、服藥、抽煙與維生素飲用等行為。

每位受試者需接受相同的運動強度試驗，其中包括心跳率計數使用(使用Polar pacer heart rate)，使用過程為HCE計劃中，為由運動到筋疲力竭再回復至安靜休息的狀態。

血液檢體採集，從實驗前48小時，其中包含受試者食用肉類之前與靜止休息狀態等，採集時間點在早上8點至9點。

所有的受試者(HCE和SC組)，受試者平均年齡為  $66 \pm 5.6$  years (區間在59至69 years)，受試者平均身高為  $164.2 \pm 8.3$  cm，受試者平均體重為  $62.1 \pm 9.5$  kg，以上兩群(HCE和SC組)所測得之所有的基本背景變項並無顯著差異。

#### 貳、受試者心肺適能測定

每一位受試者分別進行兩種初步之測驗，第一種試驗為測量  $VO_2\text{peak}$  和氧氣之消耗，第二種測量其進行 HCE 運動速度達到 32%  $VO_2\text{peak}$ 。 $VO_2\text{peak}$  和氧氣之消耗使用 respiratory system 做為監測(為 respiratory system, Q-plus IW/Corival 400, Seattle, WA, USA)，受試者使用電子自行車 ergometer 進行漸增運動模擬(Lode Excalibur, Quinton Instruments, Seattle, WA, USA)，本次最大需氧運動試驗從研究期間前一個月便開始完整進行記錄。記錄過程為受試者熱身之後，開始進行負荷式的運動，一開始為2分鐘75W，開始增加負荷，每階段負荷為2分鐘75W直到疲勞為止。

#### 參、肝癌細胞株培養

研究過程使用 Hep3B/C16(Hep3B cell line)細胞株，此細胞株為人類肝細胞癌細胞株，其細胞株內之染色體嵌入 HBV 基因，此細胞株能穩定表現 HBs Ag，產生 HBV 複製(Knowles, 1980; Twist, 1981)。

本次研究中，一開始將 Hep-3B 細胞培養於 30%MNC-CM(人類單核細胞條件培養基)中，30%MNC-CM 內有新鮮 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DEMM)。將 Hep3B，置於 37℃，5%CO<sub>2</sub> 的培養箱中培養。

Hep3B細胞株培養於DMEM中，其DMEM生長細胞密度為 $1 \times 10^6$  cells/ml，培養液含有10%胎牛血清(FBS, fetal bovine serum)，100 mg/l Streptomycin，1000 $\mu$ M/l L-glutamine和 $1 \times 10^5$  I.U./l penicillin等成分，培養於濕度固定，37 $^{\circ}$ C，5%CO<sub>2</sub>培養箱中。培養過程所需之成分不會直接影響HBs抗原的表現及經10 $\mu$ g/ml之PHA刺激之MNC-CM培養的Hep3B細胞存活情形。

研究過程中使用tetrazolium dye染色，以MTT試驗檢測細胞存活率(Mosmann, 1983)。以PBS清洗細胞表層，PBS中含有10 $\mu$ g/ml的PHA，清洗過後再更換新的MNC-CM培養液，細胞存活率以MTT試驗分析。

研究結果在計算經HCE運動後所抽取的MNC-CM處理之Hep3B比較未經運動所抽取的MNC-CM處理之Hep3B細胞存活率之差異。

#### 肆、人類單核球細胞條件培養液之製備(Preparation of Human Peripheral Blood Mononuclear)

PHA為一種自然T細胞的分裂原，其主要作用啟動免疫刺激作用。同樣的刺激作用亦可藉由藥物所誘發(Chen, 2004 & Chen, 1997)。人類週邊血液單核球細胞(PBMNC)是從人類血液所分離的。於此研究中透過10 $\mu$ g/ml之PHA所刺激，藉由此免疫反應形成一作用模式。研究中以藉由運動產生免疫調控的模式作為實驗基礎(Chiang, 2000 ; Lio, 2006)。

MNC取自於人類週邊血細胞，經淋巴細胞分離液(Ficoll-Hypaque solution, 1.077 g/mL; Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)處理並經密度離心400G, 30min(Chiang, 2000)。MNC使用PBS(Phosphate-buffered saline)清洗細胞3次

之後再加入 RPMI-1640 培養基 (Gibco/BRL, Grand Island), 培養基成分含有 10% heat-inactivated autoserum (熱純化自體血清), 然後將 RPMI-1640 Medium 培養於培養皿中。

MNC 培養於 10% heat-inactivated fetal calf autoserum (熱純化胎牛自體血清, Hyclone, Logan, UTT) 以  $1 \times 10^6$  cells/ml/well 的細胞密度種植並加入 1,000  $\mu$ mole/l L-glutamine (Gibco/BRL)、100 mg/l Streptomycin (Gibco/BRL)、50 mg/l penicillin (Gibco/BRL) 和 RPMI-1640 medium (含有 10  $\mu$ g/ml 之 PHA, Sigma-Aldrich), 於 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 恆溫培養箱中培養 24 小時後使用 0.45  $\mu$ m membrane 移去 MNC 細胞, 移除後之培養基稱為 Conditioned media, 再將此冷凍於 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中 (Wang, 1997)。

使用 PHA-MNC-CM 模組, 其中經由 PHA 培養及刺激 24 小時後, 觀察 HBs 抗原在 Hep-3B 細胞株之表現情形。收集 SC 和 HCE 受試群的 MNC-CM 以測定分泌的細胞激素。從 MNC-CM 中收集與抗病毒及抗腫瘤免疫表現等相關的細胞激素, 如 IFN- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ )、TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor) 及 Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ )。

#### 伍、細胞激素之分析與測定 (Assay for cytokine)

研究中受測族群, HCE-PHA-MNC-CM 先孵育於含有多種不同細胞激素中和抗體中, 包含 anti-IFN- $\gamma$  (30.0  $\mu$ g/mL)、anti-TNF- $\alpha$  (2.4  $\mu$ g/mL)、anti-IFN- $\alpha$  (1.0  $\mu$ g/mL) 與 anti-interleukin (IL)-1 $\beta$  antibodies (5.1  $\mu$ g/mL), 孵育在 37 $^{\circ}$ C, 90 分鐘。將此混合有中和抗體及週邊血細胞之混合液取出, 加在 Hep3B 細胞株上, 再添加細胞激素的專一性抗體孵育 48 小

時，分析細胞激素濃度使用ELISA Kits套組，其中包括IFN- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  (R&D Systems, minneapolis, MN, USA)。分析波長為450nm，分析由PHA-MNC-CM所分泌出之Cytokine，方法沿用Wang(1997)。結果將與標準曲線相比較之下，所得此4種細胞激素之相關係數(correlation coefficients)為0.998-0.999。

#### 陸、B型肝炎病毒表面抗原之分析(Assay for Relative HBs Ag)

HBV帶原或感染者其HBs Ag在血清中可以反應出近期HBV感染程度與表現形成肝硬化與肝細胞癌的機率。而HBs Ag也成為一種檢視HBV病毒活動力的指標(Czaja, 1979 & Chisari, 1997 & Lee, 1997 & Yang, 2002)。Hep3B細胞株培養在DMEM混合10%胎牛血清蛋白增殖24小時後，使其生長密度為 $1 \times 10^6$  cells/ml，之後再轉移到無血清之DMEM或不含30%MNC-CM  $1 \times 10^6$  cells/ml培養48小時，然後再使用ELISA套組試劑去測得培養液(細胞分離液)所分泌之HBs Ag。在實驗中所應用之PHA劑量在過去研究中並不會干擾ELISA對於HBs Ag的濃度。結果為ELISA(Enzyme-linked)所測得之OD值。

HBs Ag表現情形則使用MTT去處理HCE並比較SC組經PHA刺激後細胞培養基所測得之細胞表現情形。

#### 柒、統計處理與分析 (Statistical Analysis)

研究結果表示以平均值 $\pm$ SEM，結果以Student's t test比較測試族群間之組成差異，信賴區間為5% ( $p < 0.05$ )作為顯著性

評估。

## 第四章 結果

### 第一節、受試者身體質量指數測量與VO<sub>2</sub>peak測定

HCE受試群平均年齡為67.6±5.4歲(範圍, 49~78歲)、平均體重為59.4±9.2公斤, 平均為身高162.5公分±10.1公分。體脂肪比率為28.5±7.3%。

SC受試群平均年齡為66.3±5.8歲(範圍, 51~76歲)、平均體重62.4±9.1公斤、平均身高162.9公分±8.2公分。體脂肪比率為30.3±6.4%。

兩群受試者並無身體質量測量上之差異( $p > 0.05$ )。HCE受試群之VO<sub>2</sub>peak為25.6 ± 7.1ml/kg · min<sup>-1</sup>與SC群類似(24.2 ± 6.71ml/kg · min<sup>-1</sup>) , 詳如表4-1。

表 4-1、受試者身體質量指數測量與 VO<sub>2</sub>peak 測定

	HCE(n=15)	SC(n=14)
Age(years)	67.6±5.4	66.3±5.8
Height(cm)	162.5±10.1	162.9±8.2
Weight(kg)	59.4±9.2	62.4±9.1
Body Fat(%)	28.5±7.3	30.3±6.4
VO <sub>2</sub> peak(ml/[kg x min])	25.6±7.1	24.2±6.7

\*Data are expressed as mean±standard error of the mean.

HCE=habitual cycling exercise; SC=sedentary control; VO<sub>2</sub> peak=peak oxygen uptake.

Respiratory exchange ratios 在 HCE 計劃受測前與受測後並無明顯改變。血清中的乳酸濃度變化情形由 1.68 增加至 1.98 mmol/L，統計學上並無顯著差異。HCE 在運動強度出現小幅度的變化，如  $VO_2\text{peak}$  由  $21.26\% \pm 12.73\%$  至  $45.52\% \pm 13.28\%$ ，最大心跳率 (Maximal heart rate) 由  $49.87 \pm 6.82\%$  變化至  $68.58\% \pm 6.71\%$ 。

基礎代謝當量 (metabolic equivalents) 於運動前後數值由  $1.3 \pm 1.1$  至  $4.3 \pm 1.3$ ，並無明顯差異，詳如表 4-2。

表 4-2、習慣性自行車運動前後血中乳酸濃度與能量消耗之比較

	Before HCE	During HCE
Blood lactate (mmol/L)	1.98 ± 0.39	1.68 ± 0.46
%HRmax (%)	49.87 ± 6.82	68.58 ± 6.71
% VO <sub>2</sub> peak (%)	21.26 ± 12.73	45.52 ± 13.28
MET	1.3 ± 1.1	4.3 ± 1.3
RER	0.76 ± 0.08	0.75 ± 0.08

\*Data are expressed as mean ± standard error of the mean.

%HRmax= percent of maximal heart rate achieved during incremental exhaustive exercise; % VO<sub>2</sub>peak=percent of peak oxygen uptake; MET = metabolic equivalent; RER = respiratory exchange ratio

## 第二節、HCE與SC受試群經PHA-MNC-CM模式 刺激週邊血液細胞對於Hep3B細胞株於HBs Ag 表現程度之比較

兩群受試模組經PHA刺激之後，HCE-PHA-MNC-CM出現較優於SC-PHA-MNC-CM的抗原抑制表現情形，其中較為明顯的部份為HCE-PHA-MNC-CM刺激之Hep3B細胞株中的HBs Ag其表現情形為64.7%，而SC-PHA-MNC-CM刺激之Hep3B細胞株中的HBs Ag表現為81.5%，如表4-3。

其HCE-PHA-MNC-CM所表現出之B型肝炎病毒表面抗原抑制率較高。然而SC受試群經PHA-MNC-CM刺激之Hep3B細胞株中的HBs Ag並無明顯抑制情形。細胞株培養過程中，兩群細胞模組所使用之PHA的濃度皆為10ug/ml，以確保Hep3B細胞株不會有明顯死亡情形。

表 4-3、經 PHA 刺激單核球細胞條件培養基與細胞激素抗體中和作用後對於 B 型肝炎病毒表面抗原的影響

	Relative HBsAg MTT cell expression (%)	MTT cell Viability assay (%)
Untreated control	100	100
SC-PHA-MNC-CM	81.5 ± 13.7	99.1 ± 12.4
HCE-PHA-MNC-CM <sup>†</sup>	64.7 ± 12.8	97.5 ± 13.3
+ anti-IL-1 $\beta$ antibodies <sup>‡</sup>	67.3 ± 12.5	97.2 ± 11.8
+ anti-IFN- $\gamma$ antibodies <sup>§</sup>	82.5 ± 11.7	99.1 ± 11.4
+ anti-IFN- $\alpha$ antibodies <sup>  </sup>	78.7 ± 13.8	97.3 ± 12.8
+ anti-TNF- $\alpha$ antibodies <sup>¶</sup>	79.3 ± 13.2	99.1 ± 13.5
+anti-TNF- $\alpha$ <sup>¶</sup> +anti-IFN- $\alpha$ <sup>  </sup> + anti-IFN- $\gamma$ antibodies <sup>§</sup>	87.1±11.4	98.2±11.3

\*Tripllicated data from separate experiments are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean; <sup>†</sup>aliquots were preincubated, with or without cytokine-neutralizing antibodies, at 37°C for 90 minutes before addition to Hep3B cell culture; <sup>‡</sup>5.1  $\mu$ g/mL; <sup>§</sup>30.0  $\mu$ g/mL; <sup>||</sup>1.0 $\mu$ g/mL; <sup>¶</sup>2.4  $\mu$ g/mL.

MTT = (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide); SC = sedentary control; HCE = habitual cycling exercise; IL-1 $\beta$  = interleukin 1 $\beta$ ; IFN- $\gamma$  = interferon gamma; IFN- $\alpha$ = interferon alpha; TNF- $\alpha$ = tumor necrosis factor- $\alpha$ .

### 第三節、細胞激素對於Hep3B細胞株 產生之HBs抗原的影響

經PHA刺激分泌後形成的細胞激素，如IL-1 $\beta$ ，TNF- $\alpha$ ，IFN- $\gamma$ 和IFN- $\alpha$ 在HCE受試群所測得之濃度，分別為876 $\pm$ 211 pg/mL，1293 $\pm$ 289 pg/mL，712 $\pm$ 125 pg/mL及1057 $\pm$ 229 pg/mL。

而SC受試群為312 $\pm$ 134pg/mL，621 $\pm$ 251 pg/mL，387 $\pm$ 98 pg/mL及363 $\pm$ 158 pg/mL/，兩者相比下，HCE受試群出現較明顯增加與表現情形，如表4-4。

為了解及澄清Hep3B細胞株中HBs Ag表現受分泌之細胞激素抑制之情形，因而利用多種細胞激素中和抗體，例如：anti-IL-1 $\beta$ 、anti-TNF- $\alpha$ 、anti-IFN- $\gamma$ 和anti-IFN- $\alpha$ 抗體，再混合Hep3B細胞株培養前加入HCE-PHA-MNC-CM培養基內。

加了anti-IL-1 $\beta$  antibody於HCE-PHA-MNC-CM內，再混合培養至Hep3B細胞株，產生之HBs Ag被抑制而下降為67.3% $\pm$ 12.5%。再與無添加細胞激素中和抗體之HCE-PHA-MNC-CM中所測得之抑制表現情形(64.7% $\pm$ 12.8%)，兩者相比較之下，其前者出現些微增加而統計學上觀察具顯著差異。

同樣的情形觀察到加入anti-IFN- $\alpha$  antibody於HCE-PHA-MNC-CM內，接著混合培養至Hep3B細胞株，表現之HBs Ag則上升至78.7% $\pm$ 13.8%。加了anti-IFN- $\alpha$  antibody則HBs Ag抑制表現上升至82.5 $\pm$ 11.7%；添加anti-TNF- $\alpha$  antibody則增加了79.3 $\pm$ 13.2%。最後結合三種細胞激素(anti-IFN- $\alpha$ 、anti-IFN- $\gamma$ 、anti-TNF- $\alpha$  -antibody)可以得到最佳抑制HBs Ag表現，其抑制率可達到87.1 $\pm$ 11.4%。

表 4-4、經 PHA 刺激單核球細胞條件培養基分泌出之細胞激素  
表現情形

	SC-PHA-MNC-CM	HCE-PHA-MNC-CM
IL-1 $\beta$ (pg/mL)	312 $\pm$ 134	876 $\pm$ 211
IFN- $\alpha$ (pg/mL)	363 $\pm$ 158	1,057 $\pm$ 229
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	621 $\pm$ 251	1,293 $\pm$ 289
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	387 $\pm$ 98	712 $\pm$ 125

\*Tripllicated data from separate experiments are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. SC = sedentary control; HCE = habitual cycling exercise; IL-1 $\beta$  = interleukin 1 $\beta$ ; IFN- $\alpha$  = interferon alpha; TNF- $\alpha$  = tumor necrosis factor  $\alpha$ ; IFN- $\gamma$  = interferon gamma.

## 第五章 結論

本研究分析HBs Ag在體外試驗模組下免疫抑制調節表現情形，其過程能顯著的表現免疫調節抑制作用，而在老年人受測族群中，HCE組較SC組有較佳的免疫抑制表現。從基礎受試者背景變項控制中，觀察受試群身體質量指數等相關資料。其兩群受試者(HCE和SC群)是無顯著差異的。

然而透過實驗觀察到HCE受試群在VO<sub>2 peak</sub>表現上較優於SC組，利用最大心跳率(%)的控制以及在HCE運動計劃過程中，所測得之值為68.5%，藉此定義本運動訓練計畫強度為中強度運動。

另一個可以解釋此運動訓練計畫為中強度運動的數值為VO<sub>2 peak</sub>(%)其測得之值為45.52%，基礎代謝當量為4.3，再從運動過程中血液乳酸(Lactate)減少的變化，可以定義HCE計劃為一種有氧、中低強度運動。

經由分泌所表現出之細胞激素，主要研究為IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ ，其主要為控制HCE-PHA-CM免疫抑制作用，因而中強度運動訓練可能可以增強抗病毒的免疫反應，因此本研究中的中強度之自行運動是有可能出現此種表現作用。中強度運動訓練在在文獻中(Lowder, 2005)，觀察到能減少流感病毒(Influenza virus)的活性。

HCE-PHA-MNC-CM組與SC組相較之下表現出較多IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ ，指出受試者經中強度自行車運動後會表現出表現出較多的單核球細胞。

HCE-PHA-MNC-CM經anti-IFN- $\alpha$ 、anti-IFN- $\gamma$ 、anti-TNF- $\alpha$  -antibody中和試驗之後會有部份喪失抑制HBs Ag的表現。研究過程中，在HCE-MNC-CM受試群血液細胞經培

養處理，發現在抗體中和試驗後可以觀察到一些溶於培養基 (CM) 的免疫因子，如 IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  等細胞激素，藉由生成之細胞激素可以繼續表現出 HBs Ag 的抑制活性。

值得注意的是實驗過程中人類單核血球細胞 (MNC) 及肝癌細胞株 (Hep3B) 對於細胞激素作用後會表現出細胞抑制而非毒殺細胞。在此研究之前，仍有相關文獻指出，具運動習慣的老年跑者和無運動習慣組經中強度運動後，血液中之細胞經 PHA 刺激後依循體外試驗模式可以發現具運動習慣老年跑者會出現較多的 IFN- $\gamma$  (Shinkai, 1995)。

細胞激素 IFN- $\gamma$  的作用，對於 B 型肝炎抗原陽性之病人 (B 肝帶原者) 體內之 HBs Ag 表現形成抑制，目前已被臨床使用 (Bonino, 1986 & Mahrle, 1990)。在本研究中，經 anti-IFN- $\gamma$ -antibody 中和試驗之後，可以明顯觀察到 HBs Ag 表現被抑制。在 HCE-MNC-CM 所測得之細胞激素 IFN- $\gamma$  濃度出現上升之情形，而成為一種強而有力之證據，同時提供重要免疫抑制結果。

類似的研究結果，同樣的可以在 PBMNC 培養基中測得分泌之細胞激素 IFN- $\gamma$ ，其增加的細胞激素會和細胞質體中的 HBV DNA 片段呈負相關 (Schultz, 1999 & Sheron, 1991)。

TNF- $\alpha$  目前是已知影響免疫系統啟動初始因子。例如，當 TNF- $\alpha$  分泌於培養基中，則會使得 HBV DNA 複製表現受影響，而不會使用肝細胞發生病變 (Biermer, 2003)。當 TNF- $\alpha$  加入 Hep3B 細胞株混合培養時，可以觀察到 HBV 複製減少 (Romero, 1996)。而在研究文獻中，注意到 TNF- $\alpha$  分泌較多時，HBs Ag 表現情形則較低，在我們研究中加入 anti-TNF- $\alpha$  抗體中和後同樣可獲得相同的結果。

IFN- $\alpha$ ，目前已知是用於臨床病患治療上，其作用是抑制病毒複製，當使用IFN- $\alpha$ 用於治療HBe Ag-Positive(HBe Ag，B型肝炎病毒核抗原)的病人時，可以觀察到其血清中HBe Ag的量由40%減低至25%(Perrillo, 1990 & Van, 2004)。同樣於體外試驗中觀察IFN- $\alpha$ 的作用，當IFN- $\alpha$ 分泌量增加時，便會啟動免疫調控抗病毒機轉，例如利用IFN- $\alpha$ 在MNCs中以中和試驗，透過特異性結合，可以減少單純疱疹病毒(HSV)之表現與影響(Leibson, 1986)。

因此推論細胞激素生成量和HBs Ag的抑制表現是有相關的。Hep3B細胞為B型肝炎病毒依附宿主而形成之細胞株。然而在HCE-PHA-MNC-CM混合培養中，無法被殺死，因而假設實驗控制所造成之免疫調控作用使HBV DNA無法於細胞中進行病毒複製，進而被抑制表現，而非進行細胞毒殺作用。以上IFN- $\alpha$ 與TNF- $\alpha$ 二者皆由毒殺型T細胞所分泌，對HBV有特異性，能夠影響HBV基因表現與DNA複製，不再使細胞發生病變。

研究中，混合培養anti-TNF- $\alpha$ 、anti-IFN- $\gamma$ 、anti-IFN- $\alpha$ 抗體，在HCE-PHA-MNC-CM受試群中，大多數表現為減毒作用，降低HBs Ag生成，形成抵抗病毒的結果。

因此TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$ 與本研究中，藉由HCE計劃所獲得之抗病毒免疫調控機制為重要之結果。

## 第六章、討論

本研究透過體外細胞培養試驗過程中以抗病毒免疫細胞模組作為研究，經由HCE計劃之受試群與SC計劃受試群相比之下，其HCE計劃受試群呈現出較佳的免疫調節反應，以抑制Hep3B細胞株上HBs Ag的表現。其實驗過程中，可以觀察到老年人經HCE運動計劃後，體內週邊單核球血液細胞，分泌出較多的細胞激素，如IFN- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$ 和TNF- $\alpha$ ，而形成免疫調節反應，進而抑制Hep3B細胞株上B型肝炎病毒表面抗原的表現。

## 參考文獻

### 中文部份

內政部統計處 (2010)。九十九年第四週內政統計通報。

取自 <http://sowf.moi.gov.tw/stat/week/list.htm>

牟鍾福(2010)。我國老人運動政策之研究報告書。行政院體育委員會委由之專案報告。

邱亦涵、黃國欽、徐廣明、徐台閣。(2003)。42 公里馬拉松賽跑對初級細胞性免疫的抑制與恢復狀況之探討。北體學報，11，17-27。

徐台閣、徐廣明、蘇文和、張永政(2001)。馬拉松賽對淋巴細胞自發性死亡以及脂質過氧化的影響。北體學報，9，195-205。

### 英文部份

Andersen, L. B., Schnohr, P., Schroll, M., et al.(2000).

All-cause mortality associated with physical activity during leisure time, work, sports, and cycling to work. *Arch Intern Med*, 160, 1621-1628.

Akimoto, T., Kumai, Y., Akama, T., et al.(2003). Effects of 12 months of exercise training on salivary secretory IgA levels in elderly subjects. *Br. J. Sports Med*, Feb, 37, 76-79.

Barengo, N. C., Hu, G., Lakka, T. A., et al.(2004). Low physical activity as a predictor for total and cardiovascular disease mortality in middleaged men and women in Finland. *Eur Heart J*, 25, 2204-2211.

- Biermer, M., Puro, R., Schneider, R. J.(2003). Tumor necrosis factor alpha inhibition of hepatitis B virus replication involves disruption of capsid integrity through activation of NF-kappaB. *J Virol*, 77, 4033-4042.
- Bonino, F., Rosina, F., Rizzetto, M., et al.(1986). Chronic hepatitis in HBsAg carriers with serum HBV-DNA and anti-HBe. *Gastroenterology*, 90, 1268-1273.
- Camus, G., Deby-Dupont, G., Duchateau, J., Deby, C., Pincemail J, Lamy M. (1994). Are similar inflammatory factors involved in strenuous exercise and sepsis? *Intens Care Med*, 20, 602-610.
- Cavanaugh, V. J., Guidotti, L. G., Chisari, F. V.(1997). Interleukin-12 inhibits hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol*, 71(4), 3236-3243.
- Cecilia, G., Kira, R. G., Mauro, V., James, F. D., Marybeth, D., Michael, S. S., George, M. S., Thomas, C. Q., Oren, J. C., Craig, C. W., Giuseppe, P. & Anthony, S. F.(1996). Kinetics of cytokine expression during primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 4386-4391
- Liang, C. W., Lai, C. Y., Chu, Y. H.(2004). A Study of the effects of nine chinese herbs on proinflammatory cytokines production in two cell culture models. *J Chin Med*, 15(4), 293-304.
- Hsu, C. C., Wong, A. M-K.(2003). Principles of Exercise Prescription for the Elderly. *Formosan J Med*, 7, 3.
- Chen, Y. J., Shiao, M. S., Lee, S. S., Wang, S. Y.(1997). Effect

- of Cordyceps Sinensis on the proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells. *Life Science*, 60, 2349-2359.
- Chen, Y. Y., Chang, H. M.(2004). Antiproliferative and Differentiating Effects of polysaccharide Fraction from Fu-Ling (Poria cocos) on Human Leukemic U937 and HL-60 Cells source. *Food Chem. Toxicol.*, 42, 759-769.
- Chen, Y. Y., Chiang, J., Chen, Y. J., Chen, K. T., Yang R. S. and Lin, J.G.(2008). Cycling and Tai Chi Chuan exercises exert greater immunomodulatory effect on surface antigen expression of human hepatitis B virus. *Chin Med J*,121(21), 2172-2179.
- Chiang, J., Huang, Y. W., Chen, M. L., et al.(2000). Comparison of anti-leukemic immunity against U937 cells in endurance athletes versus sedentary controls. *Int J Sports Med*, 21, 602-607.
- Chisari, F. V.(1997). Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J Clin Invest*, 99, 1472-1477.
- Crist, D. M., Mackinnon, L. T., Thompson, R.F., et al.(1989). Physical exercise increases natural cellular mediated tumor cytotoxicity in elderly women. *Gerontology*, 35, 66-71.
- Czaja, A. J.(1979). Serologic markers of hepatitis A and B in acute and chronic liver disease. *Mayo Clin Proc*, 54, 721-732.

- Davis, J. M., Murphy, E. A., Brown, A. S., et al.(2003).Effects of moderate exercise and oat-glucan on innate immune function and susceptibility to respiratory infection. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 286, 366-372.
- Davidson, R. J., Robertson, J. D., & Maughan, R., J. (1987). Effect of ultramarathon training and racing on hematologic parameters and serum ferritin levels in well-trained athletes. *International Journal of Sports Medicine*, 8, 19-25.
- Deborah J. L., Caroline, L., Natalia, F. S., Nadia V, G., Andrew L., Thorsten, W.,Anna, O., Beth, L., Robert, E. S., Adolfo, Garcı́a-Sastre, David, A. Leib, Andrew Pekosz,Klaus-Peter Knobeloch, Ivan, H. & Herbert Whiting Virgin IV.(2007). IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(4) , 1371-1376.
- Murphy E. A., Davis J. M., Carmichael M. D., Mayer E. P., Ghaffar A.(2009). Benefits of oat beta-glucan and sucrose feedings on infection and macrophage antiviral resistance following exercise stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 297(4) ,1188-1194.
- Flynn, M.G., Fahlman, M., Braun, W.A., et al.(1999). Effects of resistance training on selected indexes of immune function in elderly women. *J Appl Physiol*, 86,

1905-1913.

- Fournier, P. E., Stalder, J., Mermilod, B., & Chantraine, A. (1997). Effects of a 110 kilometers ultra-marathon race on plasma hormone levels. *Int J Sports Med.*, 18, 252-256.
- Fujiwara, N., Kobayashi, K. (2006). Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 4, 281-286.
- Gabriel, G., A, Brechtel, L., Urhausen, A., Muller, H. J., Schwarz, L., & Kindermann, W. (1994). Leukozyten subpopulation vor und nach einem 100-km Ultramarathonlauf (leukocyte subpopulations before and after a 100-km ultramarathon run). In Liesen, L., Weiss, M., & Baum, M. (eds). *Regulation und Reparatur Mechanismen*. Koin: Duetscher Arzte Verlag, 380-382.
- Gabriel, H., & Kindermann, W. (1997). The acute immune response to exercise: what does it mean? *International Journal of Sports Medicine*, 18(1), 28-45.
- Galun, E., Burstein, R., Assia, E., Tur-Kaspa, I., Rosen-blum, J., & Epstein, Y. (1987). Changes of white blood cell count during prolonged exercise. *International Journal of Sports Medicine*, 8, 253-255.
- Harari A, Dutoit V, Cellerai C, Bart PA, Du Pasquier RA, Pantaleo G. (2006) Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections.

*Immunol Rev* , 211, 236-254.

- Houston, M. S., Silverstein, M. D., Suman, V. J.(1997). Risk factors for 30-day mortality in elderly patients with lower respiratory tract infection. *Arch Intern Med*, 157, 2190-2195.
- Hsu, H. Y., Chang, M. H., Ni, Y. H, et al.(1999). Cytokine release of peripheral blood mononuclear cells in children with chronic hepatitis B virus infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 29, 540-545.
- Ivan, R., Jonathan, B., David, M.(1999). *Immunology* (5th ed.) Mosby International Ltd.
- J. M. Davis, M. L. Kohut, L. H. Colbert, D. A. Jackson, A. Ghaffar, and E. P. Mayer. (1997). Exercise, alveolar macrophage function, and susceptibility to respiratory infection. *J Appl Physiol*, 83, 1461-1466.
- Knowles, B. B., Howe, C. C., Aden, D. P.(1980). Human hepatocellular carcinomacell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science*, 209, 497-501.
- Kimura, K., Kakimi, K., Wieland, S., Guidotti, L.G., Chisari, F. V.(2002). Interleukin-18 inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. *J Virol*. 76(21), 10702-10707.
- Kota, R. S., Rutledge, J. C., Gohil, K., Kumar, A., Enelow, R. I., Ramana CV.(2006). Regulation of geneexpression in RAW 264.7 macrophage cell line by interferon-gamma.

- Biochem Biophys Res Commun*, 342, 1137-1146.
- Lee, W. M.(1997). Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med*, 337, 1733-1745.
- Leibson, P. J., Laszlo, M. H., Hayward, A. R.(1986). Inhibition of herpes simplex virus type 1 replication in fibroblast cultures by human blood mononuclear cells. *J Virol*, 57, 976-982.
- Liao, H. F., Chiang, L. M., Yen, C. C., Chen, Y. Y., Zhuang, R. R., Lai, L. Y., Chiang, J., Chen, Y. J.(2006). Effect of a periodized exercise training and active recovery program on antitumor activity and development of dendritic cells. *J sporis med phys fitness*, 46, 307-314.
- Lowder, T., Padgett, D. A., Woods, J. A.(2005). Moderate exercise protects mice from death due to influenza virus. *Brain Behav Immun*, 19, 377-380.
- Maria, R. B., Giuseppe, M., Alessandra, S., Maria, P., Lucia, C., Anna, B., Pietro, A., Franco, M., Mirella, P., Giuseppe, I., Maria, G., A., Maurizio, V., Ignazio, M., Ugo, T., & James C. H.(2002). Circulating hematopoietic progenitor cells in runners. *Journal Apply physiology*, 93, 1691-1697.
- Mars, M., Govender, S., Weston, A., Naicker, V., & Chuturgoon, A (1998). High intensity exercise: A cause of lymphocyte apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 249, 366-370.
- Mahrle, G., Schulze, H. J.(1990). Recombinant

- interferon-gamma (rIFN-gamma) in dermatology.  
*J Invest Dermatol*, 95, 132-137.
- Mazzeo, R. S.(1994). The influence of exercise and aging on immune function. *Med Sci Sports Exerc*, 26, 586–592.
- McCarthy, D. A.,and Dale, M. M. (1988). The leucocytosis of exercise a review and model. *Sports Medicine*,6, 333-363.
- Meier, U. C., Owen, R. E., Taylor, E. et al.(2005). Shared alterations in NK cell frequency,phenotype, and function in chronic human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections. *J Virol* , 79, 12365-12374.
- Moldoveanu, A. I., Shephard, R. J., Shek, P. N.(2000). Exercise elevates plasma levels but not gene expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha in blood mononuclear cells. *J Appl Physiol.*, 89, 1499-1504.
- Mosmann, T.(1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 69, 55-63.
- Nieman, D. C., Nehlsen-Cannarella, S. L., & Markoff, P. A. (1990). The effects of moderate exercise training on natural killer cells and acute upper respiratory tract infections. *Int J Sports Med.*, 11, 467-473.
- Nieman, D. C., Johansen, L. M., Lee, J. W., & Arabatzis, K. (1990). Infectious episodes in runner before and after the Los Angeles Marathon. *The Journal of Sport Medicine and Physical Fitness*, 30, 316-328

- Nieman, D. C. (1994). Exercise, upper respiratory tract infection, and the immune system. *Med Sci Sports Exerc*, 26, 128-139.
- Nieman, D. C. (1997). Exercise immunology: practical applications. *International Journal of Sports Medicine*, 18(1), 91-100.
- O'conner, A. M., Johnston, C. F., & Bruchanan, K. D. (1995). Circulating gastrointestinal hormone changes in marathon running . *Int J Sports Med.*, 16, 283-287.
- Ostrowski, K., Rohde, T., Asp, S., Schjerling, P., & Pedersen, B. K. (1999). Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *Journal of Physiology*, 515(1), 287-291.
- Pedersen, B. K. (1997). *Exercise Immunology*. Heideberg:Springr.
- Pedersen, B. K., Bruunsgaard, H., Ostrowski, K., Krabbe, K., Hansen, H., Krzywkowski, K., Toft, A., Sondergaard, S. R., Petersen, E. W., Ibfelt, T., & Schjerling, P. (2000). Cytokines in aging and exercise. *International Journal of Sports Medicine*, 21(1), 4-9.
- Perrillo, R. P., Schiff, E. R., Davis, G. L. (1990). A randomized, controlled trial of interferon alfa-2b alone and after prednisone withdrawal for the treatment of chronic hepatitis B: the hepatitis interventional therapy group. *N Engl J Med*, 323, 295-301.
- Peter, P. The immune system. Garland Publishing,

- London, .201-219, 2000.
- Peter, N. U., Elena, P. G., & Jim, S. G. (2003). Immune and Neuroendocrine alterations in marathon runners. *The Journal of Applied Research*, 3(4), 483-494.
- Peters, E. M. (1997). Exercise, immunology and upper respiratory tract infections. *Int J Sports Med.*, 18(1), 66-77.
- Rabins, B. S., Moyna, M. N., Kusnecov, A., Zhou, D., & Shurin, M. R. (1996). Neuroendocrine effects of immunity. In: *Exercise and immune function*. edited by L.Hoffman-Goetz. Boca Raton,FL:CRC.
- Rainwater, M. K., Nieman, D. C., Simandle, S., Henson, D. A., Warren, B. J., Davis, J. M., & Nehlsen-Cannarella, S. L.(1995). Lymphocyte proliferative response to 2.5h running. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 27,S(67)(abstract).
- Rico, M. A., Quiroga, J. A., Subirá, D., Castañón, S., Esteban J. M., Pardo, M., Carreño, V.(2001). Hepatitis B virus-specific T-cell proliferation and cytokine secretion in chronic hepatitis B e antibody-positive patients treated with ribavirin and interferon alpha. *Hepatology*, 33, 295-300.
- Romero, R., Lavine, J. E.(1996). Cytokine inhibition of the hepatitis B virus core promoter. *Hepatology*, 23, 17-23
- Savoldo, B., Goss, J. A., Hammer, M. M., Zhang, L., Lopez, T., Gee, A. P., Lin, Y. F., Quiros-Tejeira, R. E., Reinke, P.,

- Schubert, S., Gottschalk, S., Finegold, M. J., Brenner, M. K., Rooney, C. M., Heslop, H. E.(2006). Treatment of solid organ transplant recipients with autologous Epstein Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL). *Blood*, *108*(9). 2942-2949.
- Schultz, U., Chisari, F. V.(1999).Recombinant duck interferon gamma inhibits duck hepatitis B virus replication in primary hepatocytes. *J Virol*, *73*, 3162-3168.
- Shephard, R. J., Shek, P. N.(1995). Exercise, aging and immune function. *Int J Sports Med*, *16*, 1-6.
- Sheron, N., Lau, J., Daniels, H., Goka, J., Eddleston, A., Alexander, G. J., et al.(1991). Increased production of tumour necrosis factor alpha in chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol*, *12*, 241-245.
- Shinkai, S., Kurokawa, Y., Hino, S., Hirose, M., Torri, J.,Watanabe, S., et al. (1993). Triathlon competition induced a transient immunosuppressive change in the peripheral blood of athletes. *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, *33*, 70-78.
- Shinkai, S., Kohno, H., Kimura, K., et al.(1995). Physical activity and immune senescence in men. *Med Sci Sports Exerc*, *27*, 1516-1526.
- Shinkai, S., Konishi, M., & Shephard, R. J. (1997). Aging, exercise, training, and the immune system. *Exercise Immunology Review*, *3*, 68-95.
- Suri, D., Schilling, R., Lopes, A. R., et al.(2001).

- Non-cytolytic inhibition of hepatitis B virus replication in human hepatocytes. *J Hepatol*, 35, 790-797.
- Twist, E. M., Clark, H. F., Aden, D. P., Knowles, B. B., Plotkin, S. A.(1981). Integration pattern of hepatitis B virus DNA sequences in human hepatoma celllines. *J Virol*, 37, 239–241.
- Vankatraman, J. T., Pedergast, D. (1998). Effects of the level of dietary fat intake and endurance exercise on plasma cytokines in runners. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 30(8), 1198-1204.
- Van Zonneveld, M., Honkoop, P., Hansen, B. E.(2004) Long-term followup of alpha-interferon treatment of patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*, 39, 804-810.
- Wang, S. Y., Hsu, M. L., Hsu, H. C., Tzeng, C. H., Lee, S. S., Shiao, M. S., Ho, C. K.(1997). The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages T lymphocytes. *Int J Cancer*, 70, 699-705.
- Yamada, M., Suzuki, K., Kudo, S., Totsuka, M., Nakaji, S. Sugawara, K.(2002). Raised plasma G-CSF and IL-6 after exercise may play a role in neutrophil mobilization into the circulation. *Journal Apply Physiol*, 92, 1789-1794.
- Yang, H. I., Lu, S. N., Liaw, Y. F., You, S. L., Sun, C. A., Wang L, Y., Hsiao, C. K., Chen, P. J., Chen, D. S., Chen C,

J.(2002). Taiwan community-based cancer screening project group Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 347, 168-174.

## 附錄一 受試者身體檢查表

姓名：		出生日：	年 月 日
性別： <input type="checkbox"/> 男 <input type="checkbox"/> 女	手機		身分證 字號
住址：			

以下體格檢查表由健檢單位填寫

檢查項目	檢查日期： 年 月 日			檢查
過去病史				人員
身高：	公分	體重：	公斤	血壓： / mmHg
脈搏：	次/分			
眼	<input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 異常	<input type="checkbox"/> 辨色力異常		
	視 力	裸視：左眼 _____ 右眼 _____ 矯正視力：左眼 _____ 右眼 _____ <input type="checkbox"/> 其他		
耳 鼻 喉	<input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 異常	聽力異常： <input type="checkbox"/> 左 <input type="checkbox"/> 右		
	<input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 異常	<input type="checkbox"/> 疑似中耳炎，如耳膜破損 <input type="checkbox"/> 耳道畸形 <input type="checkbox"/> 扁桃腺腫大 <input type="checkbox"/> 耵聍栓塞 <input type="checkbox"/> 其他 _____		
頭 頸	<input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 異常	<input type="checkbox"/> 斜頸 <input type="checkbox"/> 甲狀腺腫 <input type="checkbox"/> 淋巴腺腫大 <input type="checkbox"/> 異常腫塊 <input type="checkbox"/> 其他 _____		
胸 部	<input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 異常	<input type="checkbox"/> 胸廓異常 <input type="checkbox"/> 心雜音 <input type="checkbox"/> 心律不整 <input type="checkbox"/> 呼吸聲異常		

	異常	<input type="checkbox"/> 其他 _____																																																																					
腹部	<input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 異常	<input type="checkbox"/> 肝脾腫大 <input type="checkbox"/> 疝氣 <input type="checkbox"/> 其他 _____																																																																					
脊柱 四肢	<input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 異常	<input type="checkbox"/> 脊柱側彎 <input type="checkbox"/> 青蛙肢 <input type="checkbox"/> 肢體畸形 <input type="checkbox"/> 其他 _____																																																																					
皮膚	<input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 異常	<input type="checkbox"/> 癬 <input type="checkbox"/> 疣 <input type="checkbox"/> 紫斑 <input type="checkbox"/> 疥瘡 <input type="checkbox"/> 濕疹 <input type="checkbox"/> 異位性皮膚炎 <input type="checkbox"/> 其他 _____																																																																					
口腔	<input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 異常	<input type="checkbox"/> 口腔衛生不良 <input type="checkbox"/> 齒列咬合不正 <input type="checkbox"/> 其他 _____																																																																					
牙齒位置圖 檢查代碼 C-齶齒 X-缺牙 △-已矯正 ψ-阻生牙 Sp.-贅生牙																																																																							
右 上 右 下	<table border="1"> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>18</td><td>17</td><td>16</td><td>15</td><td>14</td><td>13</td><td>12</td><td>11</td><td>21</td><td>22</td><td>23</td><td>24</td><td>25</td><td>26</td><td>27</td><td>28</td><td></td></tr> <tr><td>48</td><td>47</td><td>46</td><td>45</td><td>44</td><td>43</td><td>42</td><td>41</td><td>31</td><td>32</td><td>33</td><td>34</td><td>35</td><td>36</td><td>37</td><td>38</td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </table>																		18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28		48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38																			左 上 左 下	
18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28																																																								
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38																																																								
實驗室檢查項目		檢查結果	實驗室檢查項目	檢查結果																																																																			
血液 常規 檢查	血色素 (Hb)		血脂肪 檢查	總膽固醇 Cholesterol																																																																			
	白血球 (WBC)		血清 免疫學	B 型肝炎表面抗原 (HbsAg)																																																																			
	紅血球 (RBC)			B 型肝炎表面抗體 (Anti-HBs)																																																																			
	血小板 (PLT)		尿液檢查	尿蛋白 (Protein)																																																																			
	平均血球容積 (MCV)			尿糖 (Sugar)																																																																			
肝功 能檢	麩胺酸草醋酸轉氨酶 (GOT)			潛血 (Occult Blood)																																																																			

查	麩胺酸丙酮酸轉氨酶 (GPT)			酸鹼值 (PH)	
腎功能檢查	肌酸酐 (Creatinine)		其他		
	尿酸 (Uric Acid)				
胸部 X光 檢查	<input type="checkbox"/> 無異狀 <input type="checkbox"/> 疑似肺結核病徵 <input type="checkbox"/> 肺結核鈣化 <input type="checkbox"/> 胸廓異常 <input type="checkbox"/> 肋膜腔積水 <input type="checkbox"/> 脊柱側彎 <input type="checkbox"/> 心臟肥大 <input type="checkbox"/> 支氣管擴張 <input type="checkbox"/> 其他 _____				複查日期及備註：
建議及總評	<input type="checkbox"/> 無異常 <input type="checkbox"/> 有異狀，需接受 _____ 科醫師診治 總評：				檢查醫師
研究單位		檢查單位		檢查醫療機構	