

台灣二〇〇二年國際科學展覽會

科 別：醫學與健康科學

作品名稱：免疫治療新契機 —— 從一個自體免疫疾病的動物
模式，探討樹突狀細胞的培養與分析

得獎獎項：醫學與健康科學科佳作

學 校：國立臺南女子高級中學

作 者：邱鈺涵 林珮璇

作者簡介



去年，我參加了國防醫學院所舉辦的醫學營。研習的過程中對我最大影響就是讓我對當代生物醫學的發展產生了強烈的興趣，所以我決定跟隨帶領我進入免疫學大門的司徒惠康老師做實驗。在實驗中，我發現到有一個細胞扮演了舉足輕重的角色，因為它主導了這場體內免疫衝突的發展是往激烈的方向走還是向平和的方向去。因此，我非常想把這個關鍵的細胞培養出來。至於我是如何做的呢？就請看我的實驗！

邱鈺涵

作者簡介



在一個因緣際會之下，我認識了司徒惠康教授，並且也和鈺涵一起展開了這次的實驗。由於免疫學是一種挺新、也挺熱門的一門學問，在做這個實驗之前，我們必須先涉獵這方面的許多資料，以及參考許多免疫學的書以及研究報告，這對我來講是一個新的考驗，幸而在教授、學長姊、及老師的各方面支持與指導下，讓我在實驗過程中能更順利的進行。

林珮璇

免疫治療的新契機 ——

從一個自體免疫疾病的動物模式，探討樹突狀細胞的培養與分析

中文摘要：

胰島素依賴型糖尿病（insulin-dependent diabetes mellitus；IDDM）是一種胰島素無法正常分泌的自體免疫疾病；而 NOD 老鼠（non-obese diabetic mouse，NOD）的病徵與其非常相似。藉由觀察 NOD 老鼠發病前後外觀行為及胰島組織切片的差異，我們認為胰島素依賴型糖尿病的致病機轉是因為 T 細胞攻擊胰島組織中製造胰島素的 β 細胞，使胰島素分泌不足而引起糖尿病；而樹突狀細胞（dendritic cell，DC）是調控淋巴細胞反應的重要調節細胞，未來可望利用樹突狀細胞進行胰島素依賴型糖尿病的免疫調控治療。本實驗即是利用 IL-4、GM-CSF 使 NOD 老鼠的骨髓幹細胞分化樹突狀細胞，並藉由控制 NOD 老鼠的年紀與的樹突狀細胞培養天數，希望取得較多的樹突狀細胞，以利未來免疫治療之用。

Abstract

Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is a spontaneously occurring autoimmune disease in which cellular immune components mediate destruction of the insulin-producing β cells of the pancreas. It begins with an asymptomatic stage during the β cells are gradually destroyed. These patients have to depend on injecting insulin to lower their blood glucose, facing the danger of being infected. So we want to research into the cause of IDDM by model animal — NOD mouse (non-obese diabetic mouse). We observe the differences of exterior behavior and sections of pancreas organization between NOD mice and normal ones. It has been shown that the immunopathological mechanism of IDDM is T cells destroy β cells of genetically predisposed individuals and result in insufficiency of insulin-producing. Dendritic cells (DC), having great Ag-presenting ability, are related to IDDM. We cultivate bone marrow stem cells of 5-week-old, 8-week-old, and 21-week-old NOD mice treated with IL-4, GM-CSF and make them differentiate into dendritic cells. The result shows that using 8-week-old NOD mice to cultivate will get the largest amount of dendritic cells. We also compare the percentage of differentiated DCs for 6 days' culture with 9 days', and we find that 9 days' is better. Dendritic cells are the effect Antigen-presenting cells which can be used for immunotherapy of IDDM, though, its complicated mechanism still needs further researching and developing. We hope in the future IDDM patients could get rid of the suffering of injecting insulin in their whole life.

壹、前言

一、研究動機：

糖尿病是常見的文明病，它是因為胰島素分泌出現問題而導致血糖無法利用，造成尿液中出現葡萄糖。它分為兩種：第一型為胰島素依賴型糖尿病（insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM），通常發生於幼兒或年輕人身上，它的致病機轉主要由於 T 淋巴細胞選擇性地破壞胰島組織中具有生產胰島素能力的 β 細胞，最後導致體內缺乏胰島素；第二型為非胰島素依賴型糖尿病，多發生於中年以後，主要是由於肥胖及遺傳因子的影響。而我們要探討的是胰島素依賴型糖尿病，又稱幼年型糖尿病，在台灣約有 6000 ~ 8000 人之譜。這型病患因為體內長久缺乏胰島素，以致於血糖居高不下，但是實際上這些血液中的葡萄糖卻不能成為能源以提供體內細胞代謝所需。因此，他們必須每隔一段時間測量血糖，並且隨身攜帶胰島素，終其一生都得依靠注射胰島素來降低血糖，以維繫生命。又因為胰島素會被胃酸破壞分解，所以無法口服，必須注射在腹部、大腿、及手臂的皮膚下；長期注射的結果，不僅使胰島素依賴型糖尿病的病人肌肉纖維化，而且受感染的危險性也勢必會增加。更必須承擔若未按時注射所引起的種種併發症，或是注射過量造成的低血糖休克危機。對病人的生活品質和社會成本都造成很大的傷害。

二、研究目的：

本實驗目的是利用細胞激素使自體免疫糖尿病老鼠的骨髓幹細胞分化成樹突狀細胞，並找出最適合的培養條件。事實上，樹突狀細胞（dendritic cell, DC）本身就是一種抗原呈現細胞（antigen-presenting cell; APC），而胰島素依賴型糖尿病的致病機轉與樹突狀細胞的失序呈現高相關性，也就是所謂的自體免疫疾病（autoimmune disease）。根據研究指出，在老鼠的骨髓培養液中加入 GM-CSF（顆粒球、單核球單株刺激因子）、IL-4（白血球間質素-4）兩種細胞激素可以促使老鼠的骨髓幹細胞分化為樹突狀細胞。並且我們利用流式細胞儀測試分析不同培養天數和實驗老鼠的年紀下所培養出來的樹突狀細胞之純度有多少。未來可利用特殊的免疫反應來調控樹突狀細胞，合理地控制胰島素依賴型糖尿病，使胰島素依賴型糖尿病的病患能夠遠離長期注射胰島素的痛苦。

貳、研究方法與過程

一、材料：

1. 器材：

NOD 老鼠	24-well plate	光學顯微鏡
剪刀	微量滴管	流式細胞儀
鑷子	培養盤	無菌操作檯
25G 針頭	H&E	計數器
HBSS	福馬林	培養箱
ACK lysis buffer	石蠟	離心機、離心管
70%酒精	冰塊	數位相機

2. 培養 DC 的試劑：

- ① culture medium; RPMI-5FCS, 含 50μ M2-MB 及 L-Glutamine ,APS, Heps
- ② culture medium A : 500 U/ml rmGM-CSF and 1000 U/ml rmIL-4 in culture medium
- ③ culture medium B : 500 U/ml rmGM-CSF and 3000 U/ml rmIL-4 in culture medium
- ④ mAB : anti-IA^d AB
anti-B220 AB
anti-Thy1.2 AB
anti-CD4 AB
anti-CD8 AB
- ⑤ rabbit complement (cedarlane)。將 complement 溶在 1 ml ice-cold ddB20，分裝 100ml per eppendorf，保存在 -20°C。

二、實驗計畫與過程：

要研究胰島素依賴型糖尿病的致病機制與治療方法，首先要建立一種最接近人類胰島素依賴型糖尿病的理想動物模式。根據研究資料，日本鹽野義製藥公司 (Shinogi) 在七〇年代發現一種病徵近似於人類胰島素依賴型糖尿病的老鼠，命名為 NOD 老鼠 (non-obese diabetic mouse)。牠的病狀特徵為頻尿、多飲、高血糖、毛色為乳白色。我們想藉由研究 NOD 老鼠來了解 IDDM 的免疫致病機轉。我們的計畫是：

1. 觀察 NOD 老鼠，並比較牠發病前後外顯行為的差別。【實驗一】
2. 進一步做 NOD 老鼠的胰島組織切片，比較牠發病前後胰島組織的變化。【實驗二】
3. 加入 IL-4、GM-CSF 於老鼠的骨髓幹細胞使其分化成樹突狀細胞，利用流式細胞儀分析樹突狀細胞培養的培養結果。【實驗三】

三、樹突狀細胞的基本培養步驟及方法

1. 小鼠犧牲後，將其外皮撕開至腳跟處，利用剪刀將大腿及小腿的肌肉剔除乾淨，將關節間的韌帶剪斷。
2. 將取出的大腿骨 (femur, 股骨) 和小腿骨 (tibia, 脛骨) 浸泡在 70% 酒精中，之後移至 HBSS 中浸泡約一分鐘後，再移至另一盤 HBSS 中。
3. 將骨頭的兩端剪開，用裝有 culture medium 的針筒 (25G 針頭) 反覆沖洗，直至骨頭內的骨髓完全沖出。
4. 將沖出的細胞懸浮液靜置約十分鐘，將不含其他組織的細胞懸浮液移至新的試管，離心 1500 轉、5 分鐘，再去除上清液。
5. 以 2ml 的 ACK lysis buffer (用來去除紅血球) 作用約 1 分鐘，之後外加 5ml HBSS，離心 1500 轉、5 分鐘，再去除上清液。
6. 以 10 ml HBSS 沖洗 2 次，離心 1500 轉、5 分鐘，再去除上清液。計算細胞數，用細胞培養液將細胞濃度調至 1×10^6 /ml，使用 24-well plate 來培養細胞。(每個 well 中有 10^6 個細胞)
7. day2 清液吸取再加入新的 medium。
8. day4 同 6 以輕微吹吸使細胞懸浮液再移至新的 plate (GM-CSF 1000U/ml, IL-4

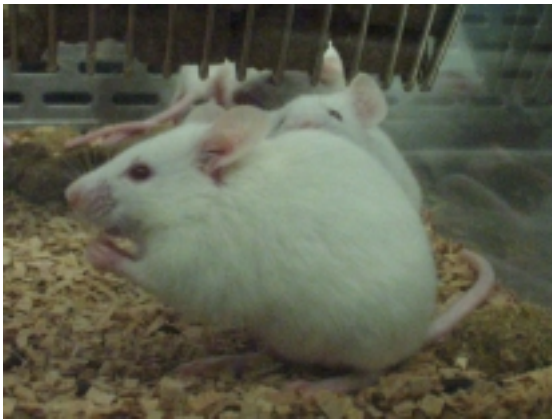
3000U/ ml)。

9. day6, day8 同 day4。

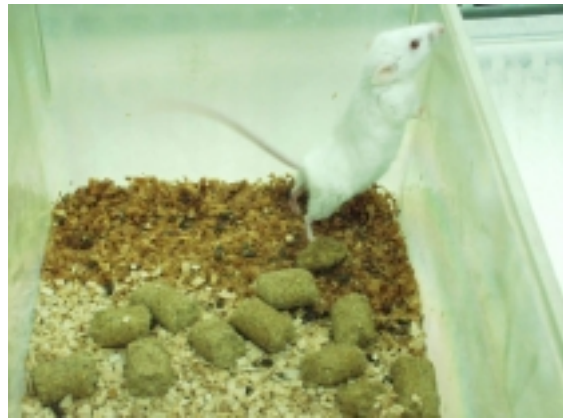
參、結果與討論

一、【實驗一】NOD 老鼠發病前後外顯行為的比較：

NOD 老鼠剛出生時的生理表現沒有任何異常現象，毛色為乳白色。但待四週後，NOD 老鼠的病徵慢慢顯現。首先，開始發病的 NOD 老鼠食量明顯增多，根據觀察，一隻六週大尚未發病的 NOD 老鼠每天的飲水量平均約為 6.7ml，16 週大發病的 NOD 老鼠則多達 24ml；而以攝食量而言，六週大未發病的 NOD 老鼠為每日 5.0mgs，16 週大發病的 NOD 老鼠則為 15.0~20.0mgs；另外 NOD 老鼠開始發病時，還出現了頻尿症狀，排尿次數較正常老鼠多出許多，(參考照片二：飼料箱底部的木屑明顯潮濕)。第二，發病的 NOD 老鼠的背部明顯拱起(參考照片三)，實則因其逐漸消瘦使得脊椎骨突出造成；不僅如此，牠的毛色偏黃，鼠毛參差不順(參考照片四)。甚而，發病的 NOD 老鼠會有肛門出血、母鼠吃掉哺乳中幼鼠或哺育困難等現象發生。最後，NOD 老鼠會因併發症致死。另外我們發現發病者以雌性為主，雌雄之比例大約為 9：1。



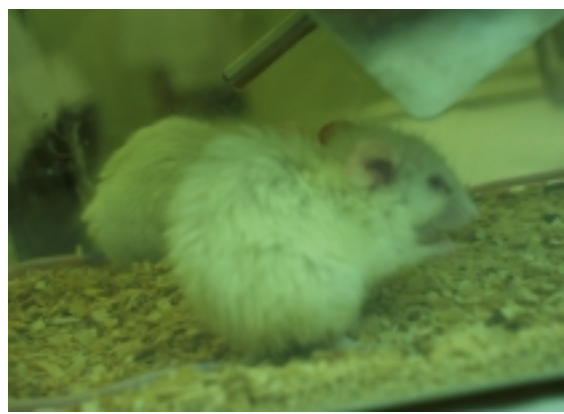
照片一：6 週大 (♀)
尚未發病的 NOD 老鼠



照片二：12 週大 (♀)
NOD 老鼠培養箱底部木屑明顯潮濕



照片三：14 週大 (♀)
NOD 老鼠拱背，有喝尿行為



照片四：16 週大 (♀)
NOD 老鼠鼠毛稀疏、參差不順

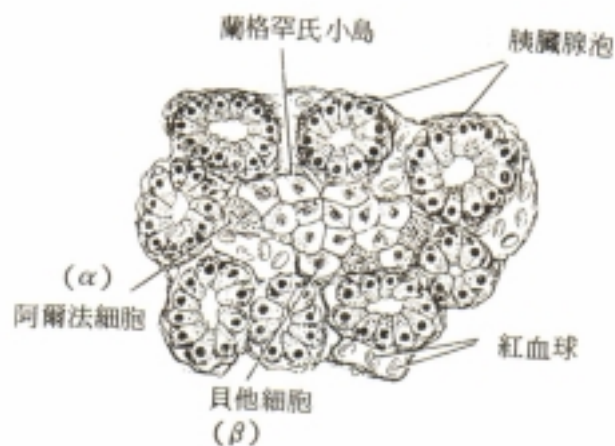
	未發病的 NOD 老鼠 (6 週大)	發病的 NOD 老鼠 (16 週大)
食量 (mg/day)	5.0	15.0 ~ 20.0
飲水量 (ml/day)	6.7	22.0 ~ 25.0
毛 色	乳白色	偏黃，色澤淡
外 型	鼠毛豐滿、滑順	背部明顯拱起
尿失情形	一週換一次墊料	兩天換一次墊料
尿 味	淡淡的尿騷味	甜甜的尿臭味

二、【實驗二】NOD 老鼠胰臟組織病理切片：

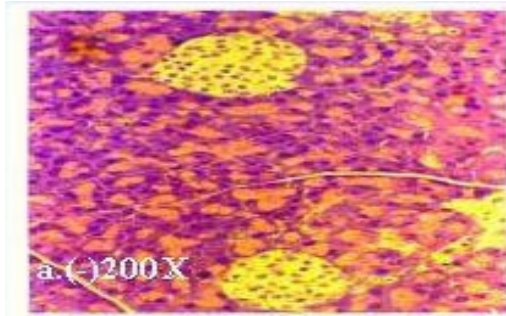
經由觀察發現：NOD 老鼠和糖尿病患者的病徵皆是「三多」—吃多、喝多、尿多，並且有明顯消瘦的現象，所以我們想利用組織切片的方式，比較 NOD 老鼠發病過程中的胰島組織有何明顯變化。

做法：將胰島組織取出，用 10% 中性福馬林固定胰臟，以石蠟包埋，做成病理切片。用 H&E (Hematoxylin and eosin) 染色後在光學顯微鏡下觀察。
Hematoxylin 用來染細胞核，Eosin 用來染細胞質。

1. 正常胰島組織簡圖

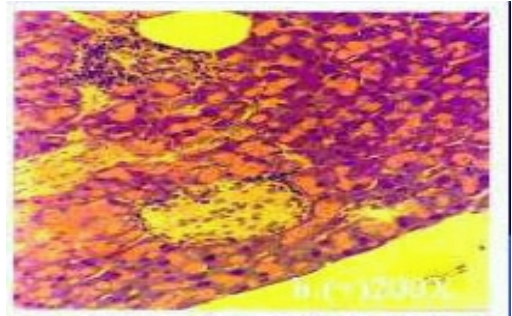


2. 不同年紀的胰島組織切片



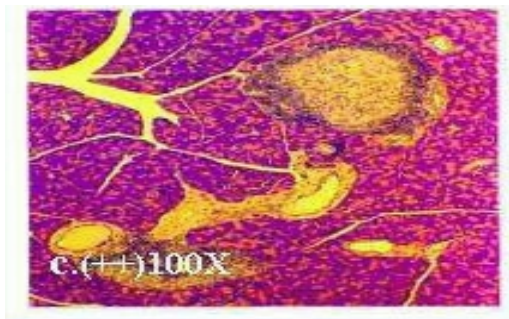
a. 4 週大

正常無淋巴球浸潤的胰島（200 倍）



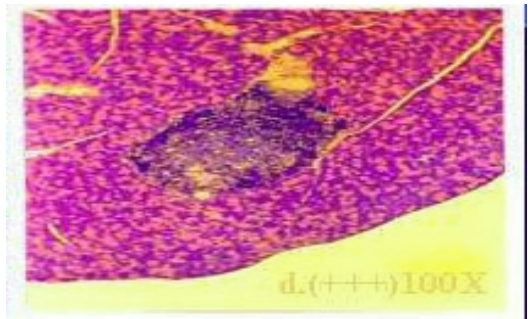
b. 6 週大

胰島的周邊區域被淋巴球浸潤，稱為周邊胰島炎（200 倍）



c. 8 週大

淋巴球往胰島中心移動（100 倍）



d. 12 週大

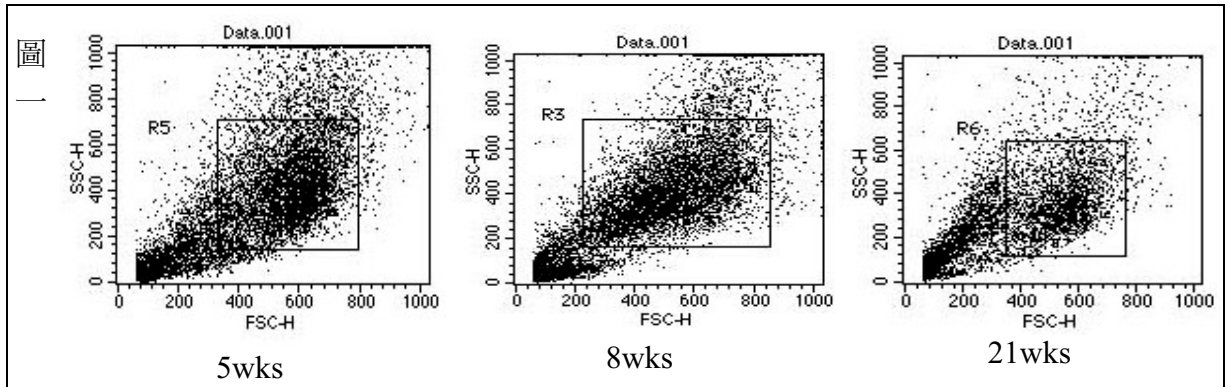
整個胰島都被淋巴球所浸潤，且胰島細胞和組織結構遭受破壞（100 倍）

三、【實驗三】樹突狀細胞的培養：

由以上的動物模式，我們認為：胰島素依賴型糖尿病最主要是因為胰島組織中分泌胰島素的細胞受到傷害所造成的結果。它的免疫致病機轉是因為體內的 T 淋巴細胞會選擇性地破壞胰島組織中蘭氏小島內製造胰島素的 β cell，因而導致胰島素分泌量不足。免疫系統在正常各體內不應該攻擊自身的組織或細胞，而自體免疫疾病就是由於免疫系統的調節失序所導致；其中胰島素依賴型糖尿病即是 T 細胞主動攻擊體內的蘭氏小島所引發的自體免疫疾病。抗原呈現細胞是調控淋巴細胞反應的重要調節細胞，它會引導外來或組織抗原呈現給淋巴細胞進而引起免疫反應。樹突狀細胞本身就是一種抗原呈現細胞，它具有很強的抗原呈現能力，因此我們用它來做胰島素依賴型糖尿病之免疫調控治療。我們分別選擇年紀 5 週、8 週、21 週大的 NOD 老鼠，從牠們的股骨以及脛骨中萃取出骨髓幹細胞，在培養液中加入 GM-CSF（顆粒球、單核球單株刺激因子）、IL-4（白血球間質素-4）兩種細胞激素，使老鼠的骨髓幹細胞分化為樹突狀細胞，並觀察其在第 6 天與第 9 天的培養結果，我們發現，取 8 週大老鼠的骨髓幹細胞培養 9 天，分化成 DC 的純度最高。

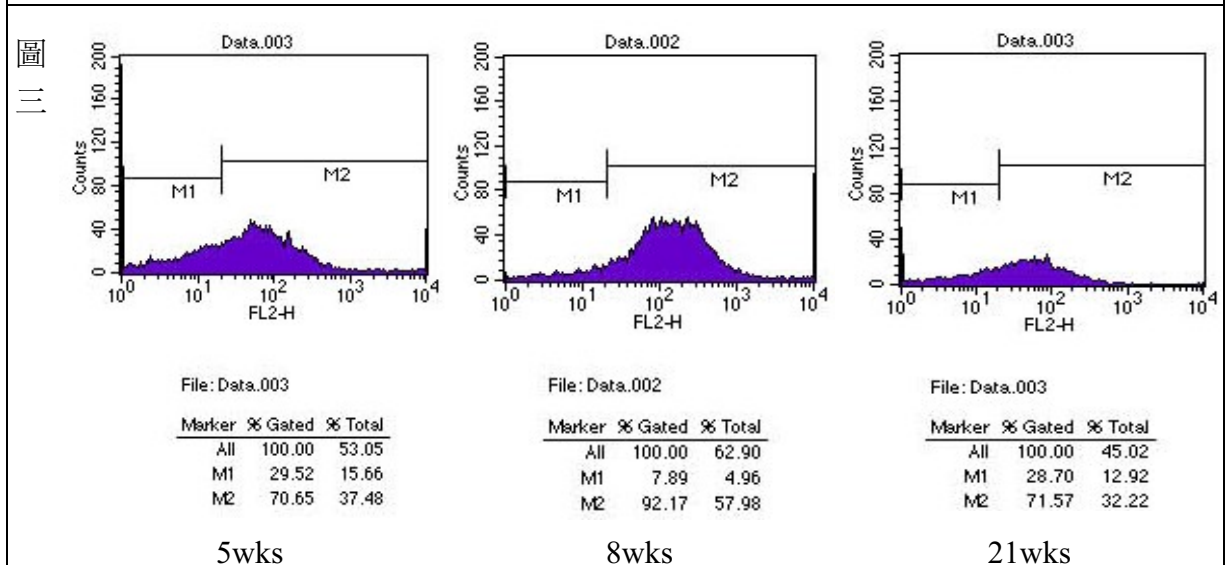
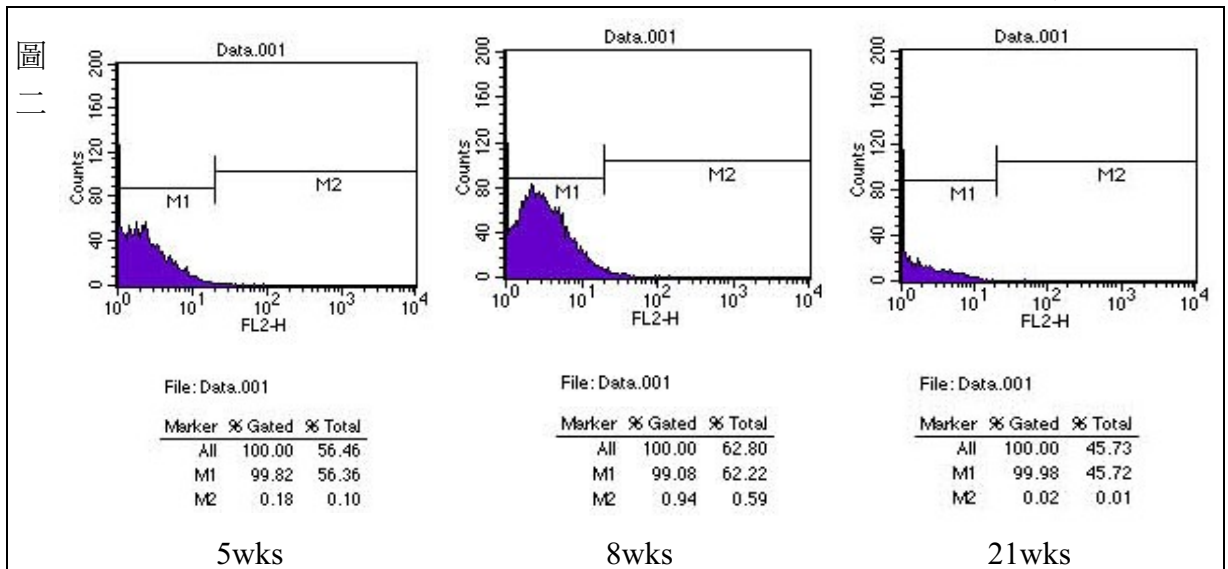
不同操縱變因下所培養出來的樹突狀細胞 (DC)

1. 用流式細胞儀分析 5 週、8 週、21 週大 NOD 老鼠的 DC 分化情形

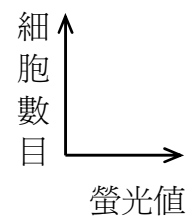


我們取 5 週、8 週、21 週大 NOD 老鼠的骨髓幹細胞，加入 IL-4 (白血球間質素)、GM-CSF (顆粒球、單核球單株刺激因子)，培養 9 天，將培養結果利用流式細胞儀分析其細胞大小與顆粒性，並從中取一群數目最密集的細胞進行測試分析。

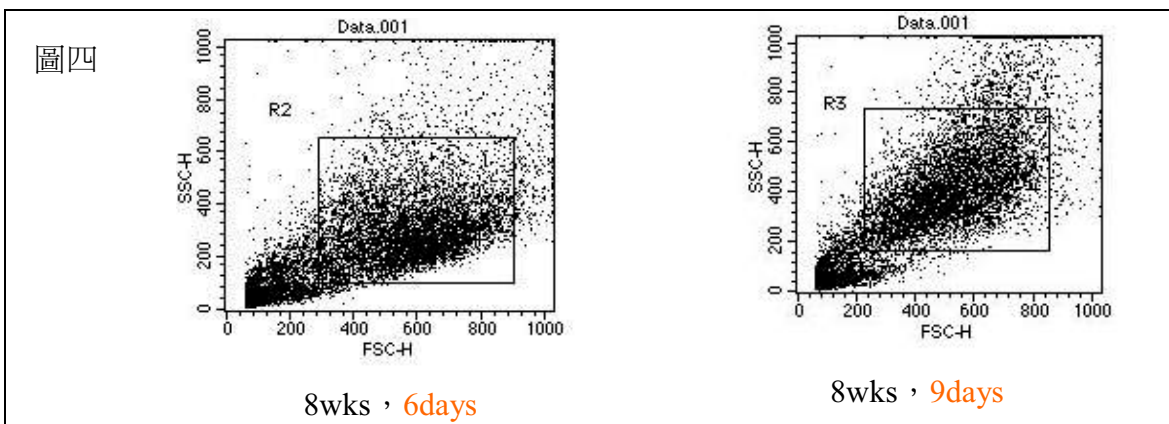
細胞顆粒性 ↑
細胞大小 →



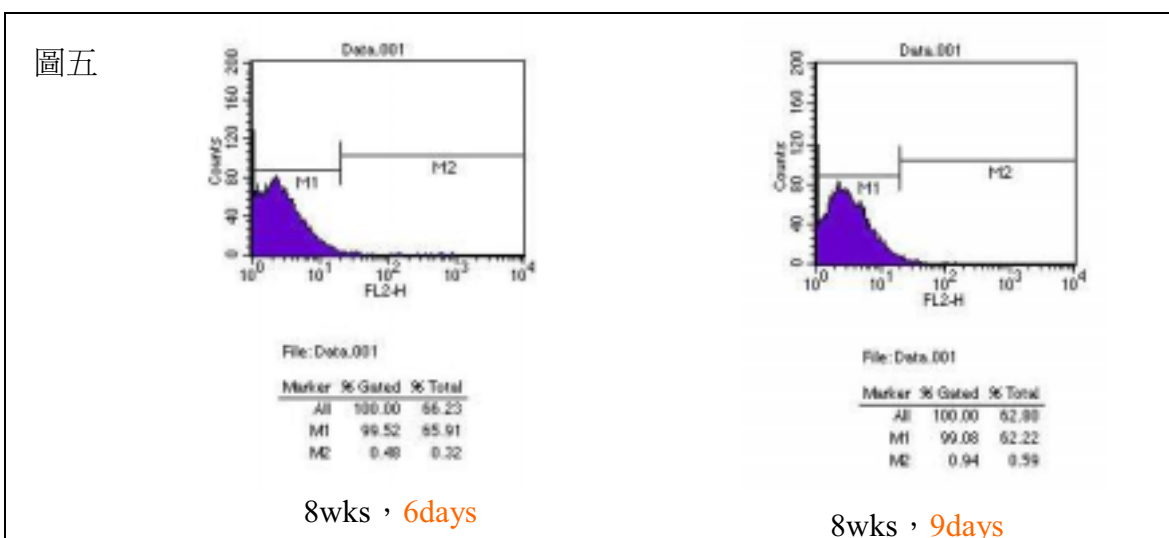
因為 cd-11c 能表現在 DC 上，所以我們利用特殊尾巴會發出螢光的抗體抓 cd-11c，再以流式細胞儀偵測螢光值及 DC 的細胞數；M1 表背景值範圍，M2 範圍內的細胞即是我們欲求的 DC。圖二是不加抗體的對照組，DC 絕大部分落到 M1 內；圖三則是加入抗體後所偵測到的結果，其細胞大部分落入 M2 內。由圖二、圖三可知，分化成 DC 的比例：5 週為 70.47%，8 週為 91.23%，21 週為 71.55%。由此可知，取 8 週大的 NOD 老鼠的骨髓幹細胞，其分化出來的 DC 純度最高。



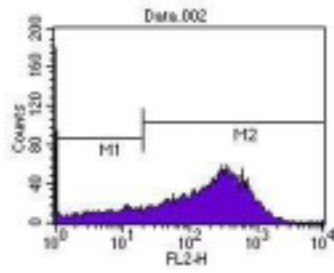
2. 用流式細胞儀分析 DC 培養 6 天和 9 天之情形



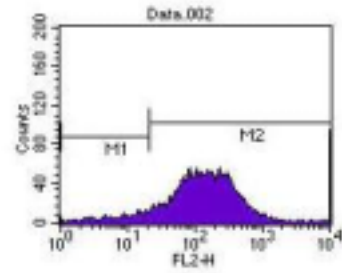
取 8 週大 NOD 老鼠的骨髓幹細胞，加入 IL-4、GM-CSF，分別培養 6 和 9 天，再用流式細胞儀分析細胞大小與顆粒性，從中取出一群數目最密集的細胞測試分析。



圖六



8wks , 6days



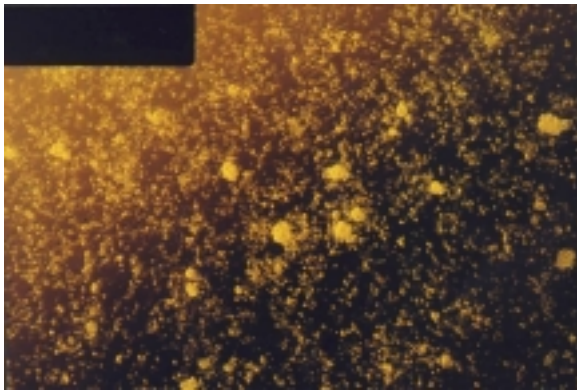
8wks , 9days

圖五為不加抗體的對照組，DC 絕大部分落到 M1 內；圖六則是加入抗體後所偵測到的結果，其細胞大部分落入 M2 內。由圖五、圖六可知，分化成 DC 的比例：6 天為 81.41%，9 天為 91.23%。

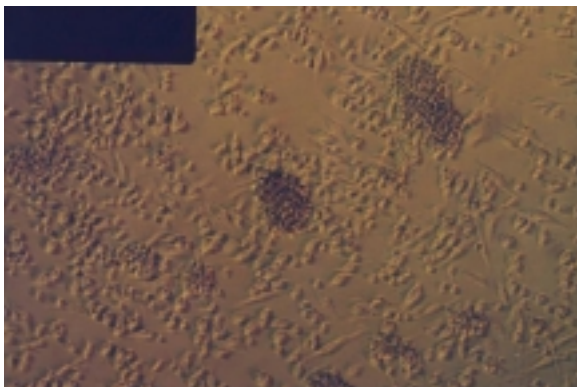
綜合圖一～圖六，取 8 週大的 NOD 老鼠的骨髓幹細胞培養 9 天，其分化出來的 DC 純度最高。

3. 倒立顯微鏡下樹突狀細胞的觀察：

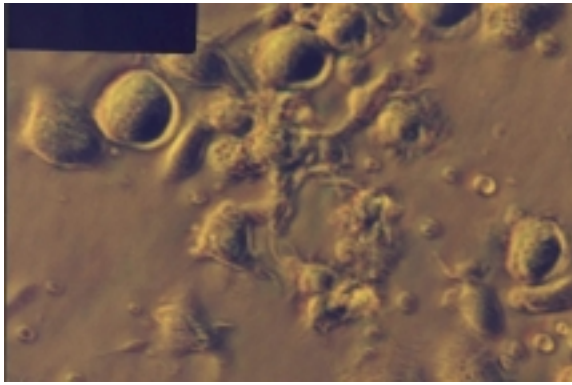
從照片中可看見聚集成一團，並有樹枝狀分岔的細胞就是樹突狀細胞



照片四：DC，40 倍



照片五：DC，100 倍



照片六： DC，400 倍

肆、結論與應用：

由 NOD 老鼠的胰島組織病理切片可以看出，正常胰島組織並不會受免疫細胞攻擊而發病。一開始，牠的胰島周邊區域遭受淋巴球浸潤，漸漸地，淋巴球往胰島中心移動，最後整個胰島都被淋巴球所浸潤破壞而喪失胰島應有的功能，並且由於過去學者的研究顯示，浸潤在胰島組織周邊的淋巴球，大多是屬於 T 淋巴細胞。因此，我們認為：胰島素依賴型糖尿病的免疫致病機轉，是因為體內的 T 淋巴細胞會選擇性地破壞胰島組織中蘭氏小島內製造胰島素的 β cell，因而導致胰島素分泌量不足，進而引發糖尿病的產生。淋巴細胞的活化，需要抗原呈現細胞的刺激，因此，在糖尿病老鼠組織病理切片觀察所見的淋巴細胞不正常攻擊自體細胞的現象未來可望藉由調控抗原呈現細胞進而控制淋巴細胞的反應，達到免疫治療的效果。而樹突狀細胞本身就是一種抗原呈現細胞，它具有很強的抗原呈現能力，因此我們選擇用它來做胰島素依賴型糖尿病之免疫調控治療。事實上，樹突狀細胞免疫治療是近幾年來最熱門的研究題材之一，但是它還有很多功能與機制尚未研發，因此，我們必需先進行樹突狀細胞的培養，以取得較多的樹突狀細胞。儘管我們已知它的基本培養原理，但培養的過程中仍常出現失敗的例子，加上一次培養費用所費不貲，因此我們希望試驗 NOD 老鼠的年紀與培養天數以取得較高純度的 DC。所以，我們選擇 5 週大、8 週大及 21 週大的 NOD 老鼠，從牠的股骨以及脛骨中萃取出骨髓幹細胞，在培養液中加入 GM-CSF（顆粒球、單核球單株刺激因子）、IL-4（白血球間質素-4）兩種細胞激素，促使老鼠的骨髓幹細胞分化為樹突狀細胞，並觀察其在第 6 天及第 9 天的培養結果，我們發現：利用 8 週大的老鼠取其骨髓幹細胞並培養 9 天，分化成的樹突狀細胞的比例最高。至於如何利用特殊的細胞激素誘使 DC 走向體液免疫反應，使細胞免受攻擊，仍有待進一步的探討與實驗。

伍、致謝：

首先非常感謝國防醫學院司徒惠康教授實驗室提供我們這次科展各項實驗器材與實驗的場地。這段期間以來，本研究獲得教授、學姊、學長，以及老師們的指導，使得我們這項實驗得以完成，謹致上無限的謝忱！在實驗期間，我們曾遭遇許多的挫折及困難，幸而有司徒教授、吳淑芬學姊、林佑俊學長、江紀明學長的悉心指導及幫忙，除了提供我們在免疫學方面更進一步的資料及知識外，更解答了我們不少實驗中的所遇到的疑難雜症，以及提昇我們一些實驗上的技巧，讓我們在這次的實驗過程中，能夠進行得更順利。還有，我們最好的朋

友叔吟，是我們實驗最大幕後功臣，謝謝她從頭到尾參與並協助我們的實驗以及海報編排。另外，非常感謝我們的生物老師侯明全老師、林靜吟老師在我們閱讀免疫學資料時，幫我們釐清了許多問題；知識的不斷累積，是使得我們這次實驗完成的關鍵之一。一個研究的完成，需要許多人的支持、協助及教導，由衷的感謝一路上陪我們一起走過來的人！

陸、參考文獻

國防醫學院司徒惠康教授指導

- 一、林明泉編著，臨床血清免疫學，第二版，台北出版，藝軒圖書出版社，第一章，P.4~18，免疫系統與免疫細胞
- 二、Neil A Campbell, et al.，生物學，艾迪生維斯理朗文、偉明圖書有限公司合作出版，第 39 章，P.877~907，個體防禦系統
- 三、Bach, J-F., et al. 2001. Tolerance to islet autoantigens in type 1 diabetes. *Annu. Rev. Immunol.* Chp.19: 131-161.
- 四、Banchereau, J., et al. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* Chp.18: 767-811.
- 五、Delovitch, T. et al. The nonobese diabetes mouse as a model of autoimmune diabetes; immune dysregulation gets the NOD. *Immunity* 7: 727-738.
- 六、Fox, J.G., et al. *Laboratory animal medicine*. 1984. Academic press. Chp.2.
- 七、Tisch, R., et al. 1996. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 85, 291-297.

評 語

經由 NOD 鼠之成長時段，作者成功地分離大量的樹突狀細胞（DCs）。此項成功的技術使得日後研討免疫治療（至少針對糖尿病言）可建立有效的動物模式。

二作者均是台南地區學生，惟大部份實驗在台北（國防）進行，實驗進度較不能掌握，宜在就讀地區另行擇聘指導教授。