

2012 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

編號：090010

作品名稱

探討第三號誘餌受體對 NOD 小鼠糖尿病預防與 T 細胞分化影響之研究

得獎獎項

大會獎：四等獎

作者姓名：李岱霖

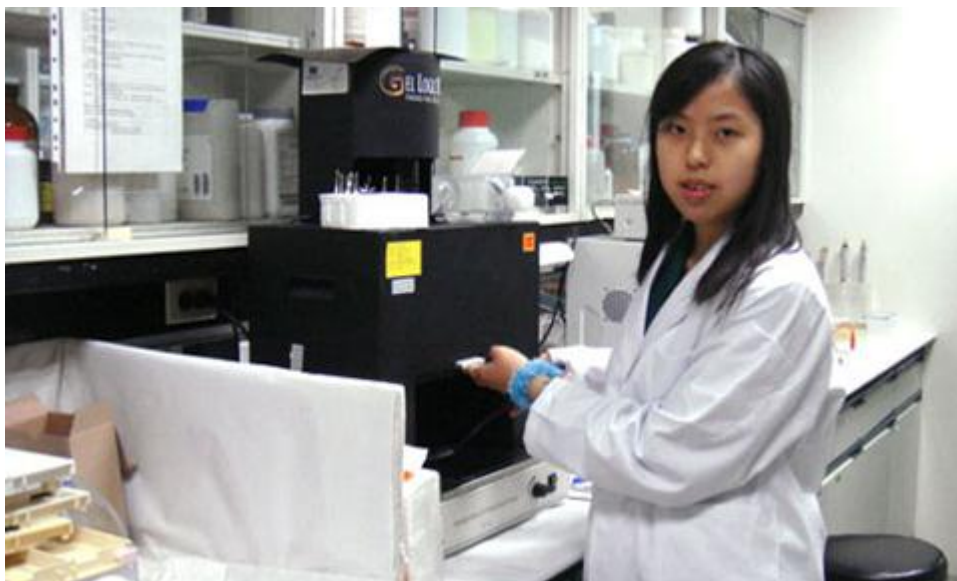
就讀學校：臺北市立第一女子高級中學

指導教師：司徒惠康、吳雅嵐

關鍵字：DcR3、

None-obese Diabetic Mice (NOD mice)、
regulatory T cell (Treg cell)

作者簡介



我是李岱霖，小時候因喜愛美術而進入台北市民族國小及金華國中美術實驗班就讀，曾得過台灣全國學生美術比賽優等的佳績。後來因受到一位自然科老師的啟發，而愛上自然界各種奧妙之處，於是潛心靜修自然科學的各方知識並幸運地進入北一女中數理資優班就讀。也因為小時候經常參加動手實作的營隊，時而扛著木材上山蓋房子，時而學習設計電路打造專屬機器人。這些種種加上對於自然科學好奇心的逐漸萌芽，我很高興能有機會參加本屆的台灣國際科展，並與各方好手互相交流、互相砥礪！

探討第三號誘餌受體對 NOD 小鼠糖尿病預防與 T 細胞分化影響之研究

摘要

DcR3 是腫瘤壞死因子 6B 的成員 (Tumor necrosis factor receptor superfamily)，又稱為 TR6 或 M68。DcR3 會藉由與 Fas Ligand, LIGHT 或 TL1A 等細胞表面配位結合，阻擋 T 細胞的死亡訊息傳輸，保護該細胞免於細胞凋亡；另外，DcR3 也會與抗原呈現細胞的硫化肝素糖蛋白結合，誘導未分化之 T 細胞發育成能減少自體免疫疾病發生的 Th2 細胞，顯示 DcR3 有充分作為自體免疫疾病預防之藥物的可能性。因此我藉本實驗探討 DcR3 對 T 細胞分化與發育造成的影響與造成此一現象的原因。

根據實驗結果，我們發現 DcR3 不僅有上述之功能，更能增加調節型 T 細胞 (Treg) 這種抑制免疫反應的特殊 T 細胞表現量，若能藉由 Treg 調控免疫系統活力，將可改善一般免疫抑制劑治療造成病人免疫力下降之缺點。因此我藉由 NOD 小鼠，實際檢測 DcR3 在活體中對抗自體免疫疾病發生的能力，並以 DcR3 與 T 細胞之交互作用實驗，探討現象的成因。根據實驗結果，在 Somatic gene therapy 和 Protein therapy 的實驗中，皆可看出疾病延遲發生的現象。而在 DcR3 對 T 細胞存活率的影響方面，可看出 DcR3 並不會造成 T 細胞之異常死亡。故我們推測 DcR3 可藉由增加 Treg 表現量減緩或降低 NOD 小鼠糖尿病的發病。

因此我們認為 DcR3 非常有潛力作為未來自體免疫疾病預防或移植手術後用以抗排斥之藥物。

To Investigate the Effects of DcR3 on the Development of NOD Mice Diabetes and the Differentiation of Treg cells

Abstract

Decoy receptor 3 (DcR3) is a new identified soluble receptor of TNF receptor family. It typically binds to three kinds of ligand, FasL, LIGHT and TL1A, blocking down the T cell signaling pathway of cell death. In other research, DcR3 binds to heparan-sulfated proteoglycan molecules presented in the plasma membranes of antigen presenting cells, and transduce signals to modulate dendritic cells (DCs) differentiation, leading to skew the T cell response toward the Th2 phenotype, which suppress the effect of Th1 on developing autoimmune diseases.

In this experiment, we found out that DcR3 can not only prevent autoimmune diseases via those two ways mentioned above, but enhance the expression of Treg cells. Treg cells' population increases significantly when CD⁴⁺ T cells are treated with DcR3. When NOD mice are treated with DcR3 protein or somatic gene, there shows evident prolongation of diabetes development. We also analyze the effect of DcR3 on T cells' survival and found no apparent difference between the experimental and baseline groups. We believe that the phenomenon is caused by the increase in Treg cells' population instead of T cells' death.

We suggest that DcR3 is a promising molecule to prevent autoimmune diseases. It could prolong or even decrease the development of diabetes in NOD mice without harming the mice's immune system.

壹、前言

一、研究動機

免疫系統的影響廣泛，舉凡移植器官的壽命長短，癌細胞的移除等皆與免疫系統有著重大關聯，但是免疫系統複雜的影響路徑至今仍無一統的解釋。目前雖有許多方式皆能降低免疫系統之作用（抗排斥藥環孢靈即是一例），但往往會使病患免疫力大幅降低，增加其他疾病之感染機會，但若知道如何利用自然的免疫抑制細胞，或許將有助於降低自體免疫疾病發生率與延長移植器官壽命並減少副作用的產生。已有文獻指出第三號誘餌受體（Decoy Receptor 3;DcR3）能影響 T 細胞之分化，但究竟會造成哪些影響？DcR3 是否有潛力成為自體免疫疾病的預防藥物？這便是我想探討的問題。

二、研究目的

研究 DcR3 是否能減少 NOD 小鼠的發病率，以基因轉殖技術及蛋白質治療等方式，探討 DcR3 對自體免疫疾病預防之效果。並以細胞株培養研究其可能的影響途徑。

三、文獻探討

DcR3 是腫瘤壞死因子 6B 的成員（Tumor necrosis factor receptor superfamily），又稱為 TR6 或 M68。不同於此家族的其他成員，DcR3 是一種可溶性的蛋白質，並且會在形成後被釋出細胞。以往認為人體中的 DcR3 會藉由與 Fas Ligand、LIGHT 或 TL1A 等細胞表面配位結合，阻擋 T 細胞的死亡訊息傳輸，故可保護該細胞免於細胞凋亡。另外，DcR3 也會與抗原呈現細胞結合，誘導未分化之 T 細胞發育成能降低自體免疫疾病發生的 Th2 細胞，而抑制主要造成自體免疫疾病的 Th1 細胞表現量。

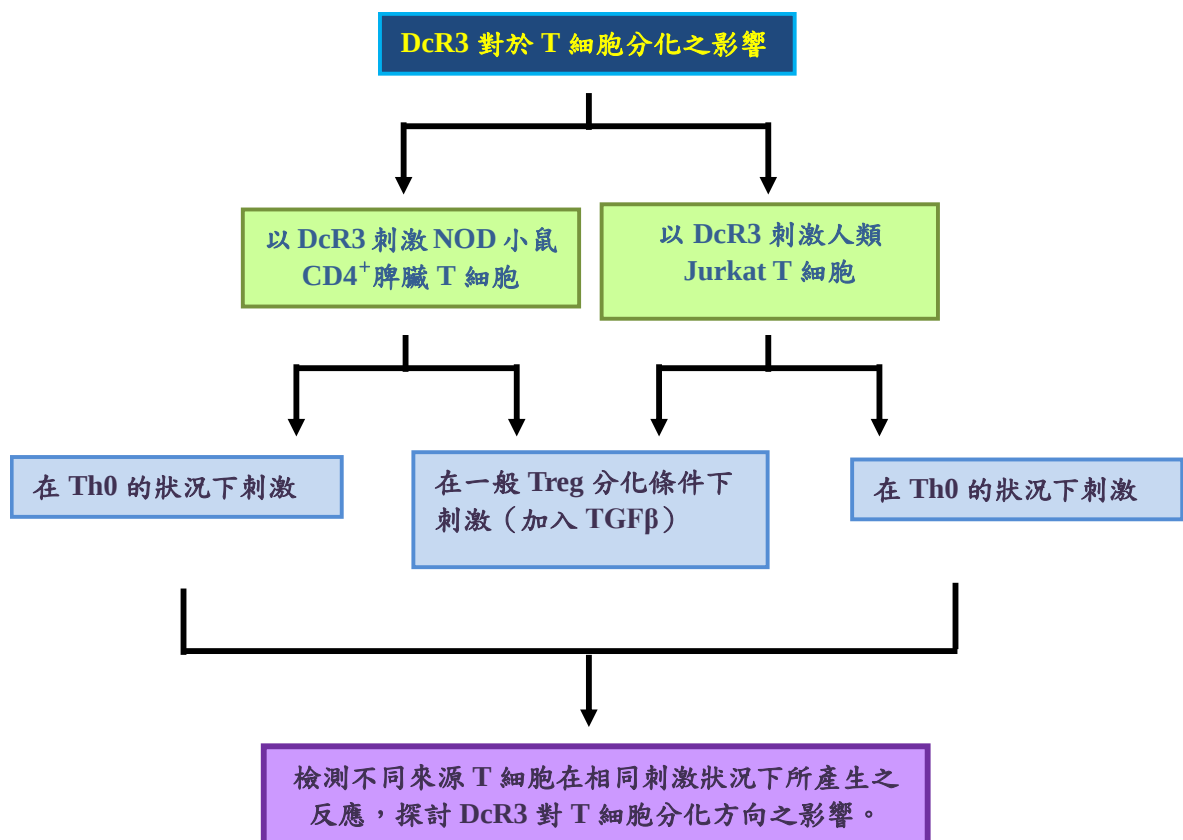
貳、 研究方法或過程

一、 設備或器材

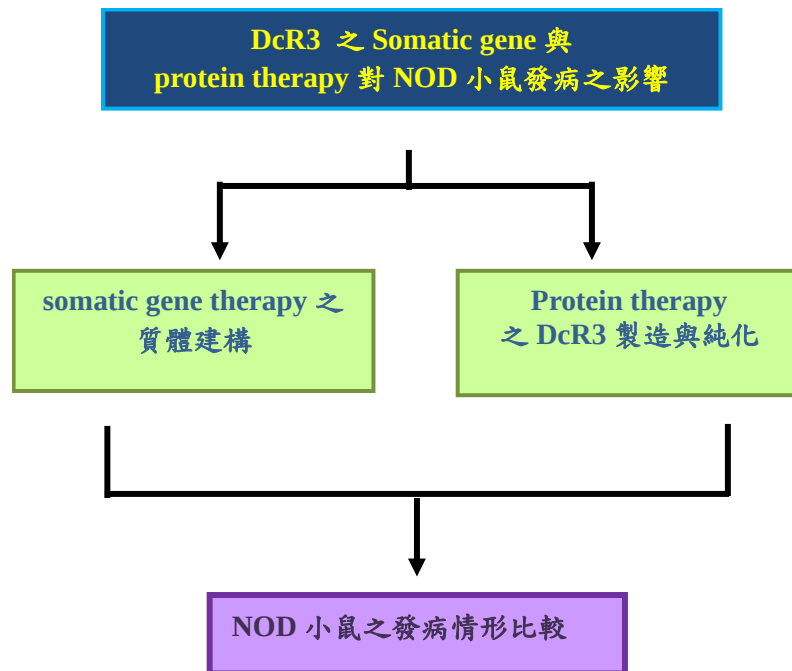
1. 細胞培養盤 (24 well)
2. 牛血清
3. 細胞培養箱
4. 離心機
5. 細胞培養基 (DMEM)
6. RNeasy Mini Kit
7. 西方墨點法設備 (semi-dry)
8. 微量滴管
9. Q-PCR 設備
10. 基因轉殖植體

二、研究架構

1. DcR3 對於 T 細胞分化之影響分析流程



2. 小鼠治療實驗架構



三、製造 DcR3 蛋白質

1. yT & A-DcR3.Fc 表現載體之構築

利用包含 Sac I 限制酶切點的引子將表現載體上的 DcR3.Fc 基因合成出來，再接到 yT & A 載體上（如附錄圖 1 所示），則在 DcR3.Fc 的兩端會產生 Hind III 及 Bgl II 限制酶切點，成為 yT & A-DR3Fc 表現載體。

2. 大量製備 DcR3.Fc 蛋白

以來自 *Spodoptera frugiperda* 的 Sf-21 昆蟲幼蟲細胞株以 $1-2 \times 10^6$ cells/well 的濃度懸浮於 spinner flask 中，再以 M.O.I=10 的 DcR3.Fc recombinant baculovirus 感染昆蟲細胞約 5-6 天後，待出現細胞病變效應，即可以 4000 rpm 離心 10 分鐘（4℃），收集上清液置於 4℃ 冰箱備用。

四、純化 DcR3 蛋白質

將 Sf-21 昆蟲細胞之上清液與 Protein A Bead 混合，並置於 4℃ 冷房中隔夜使其結合。將在中性環境中以 column 過濾混合液中的 Protein A Bead，再以 pH=7.4

的 Tris-HCl 洗去雜質。以酸性 (pH=3) buffer 使 DcR3.Fc 與 Protein A Bead，並以 pH=9.0 的 Tris-Base 中和酸性蛋白質萃取液。加入 PBS 以 4000rpm, 30 分鐘離心三次濃縮蛋白質 (見附錄圖 2)。

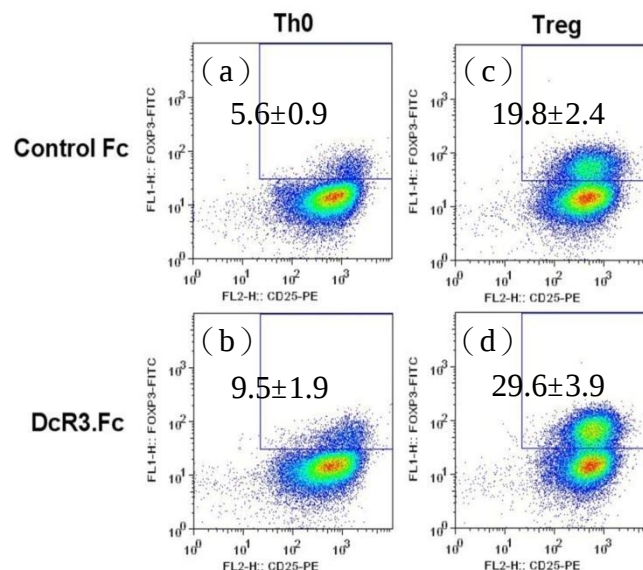
五、測定 DcR3 濃度

利用 DC protein assay 試劑組作蛋白質定量測定。以已知濃度之 BSA 為標準溶液，取 10 λ 蛋白質與 100 λ A 試劑和 900 λ B 試劑均勻混合後避光作用 20 分鐘，以 655 nm 波長光線照射後，測量其吸光值，並據以推知樣本蛋白質濃度。

六、前置實驗

1. 分析 DcR3 對 NOD 小鼠 CD4⁺脾臟細胞分化之影響

犧牲 NOD 小鼠後，取出其脾臟細胞製成單一細胞懸浮液，並以自動磁珠分選 (auto-MACS) 機器，分離出 2 $\times$ 10⁶ cells/管之 NOD 小鼠 CD4⁺脾臟細胞六管備用。將細胞分為四組培養，分別是只加入 DcR3 或 TGF β ，兩者皆無或兩者皆有。培養三天後，以流式細胞儀分析細胞，發現只以 DcR3 培養之細胞 (b) 較兩者皆無的組別 (a) 有更多的 Treg 細胞，而兩者皆有的組別 (d) 中，Treg 細胞之含量是兩者皆無的 5.3 倍、僅加入 TGF β 組別 (c) 之 1.5 倍左右。此結果顯現 DcR3 能調節 T 細胞之分化，並增加 Treg 細胞之表現量。



2. 分析 DcR3 對 Jurkat T 細胞分化之影響

去除冷凍劑後，在 20 ml flask 中加入以 10 ml 培養基回溶並打散細胞。於 37℃，5% CO₂ 的恆溫細胞培養箱中培養 3 代後，將細胞分為兩組，其中每組加入 2×10^5 個細胞，並分別加入或不加入 DcR3。培養三天後以流式細胞儀分析 Treg 表現量。其中加入 DcR3 之組別，其 Treg 細胞表現量約為未加入組別之 3.3 倍，由此實驗與前一實驗可證實 DcR3 能增加 Treg 細胞之表現。

七、DcR3 plasmid 建構

1. pcDNA3.1A(-)-DcR3 plasmid 建構（見附錄圖 3）

pcDNA3.1 A-myc-his (5.5kb) 載體和 pINSI-DcR3 表現載體 (0.9kb) 分別以 Eco RI 限制酶同時作用於 37℃ 水浴槽中 2 小時。分別將切下之 DNA 片段以 6× loading dye 混合均勻在含有 0.5× TAE 緩衝溶液的電泳槽中以 1.2% 洋菜膠和 100V 進行電泳。以 10μg/ml EtBr 染色，在紫外燈箱下將兩 DNA 片段自洋菜膠上切割下來，置入 1.5ml 離心管中以 Gel-MTM Gel Extraction System 純化。將 pcDNA3.1 A-myc-his 以 dephosphatase 進行 CIP 處理移除 5' 端磷酸根，避免其自行黏接。將 pcDNA3.1 A-myc-his 和 pINSI-DcR3 以 1:6 比例置入 1μl T4 DNA ligase 和 2μl 10× T4 DNA ligase bufer 中以電泳確認其黏接情形，再以熱休克 (heat shock) 方式送入轉型勝任細胞。

2. pcDNA3.1A(+)-DcR3.Fc plasmid 建構（見附錄圖 4）

pcDNA3.1 A-myc-his (5.5kb) 載體和 pBPAK9-DcR3.Fc (1.6kb) 分別以 Bam HI 和 Not I 於 37℃ 下處理 1-2 小時，將切下之 DNA 片段進行電泳並分離、純化。pcDNA3.1 A-myc-his 不需進行 CIP 處理和 pBPAK9-DcR3.Fc 以 1:6 比例置入 1μl T4 DNA ligase 和 2μl 10× T4 DNA ligase bufer 中以電泳確認黏接情形，再以熱休克方式送入轉型勝任細胞。

3. DcR3 與 DcR3.Fc 質體表現分析

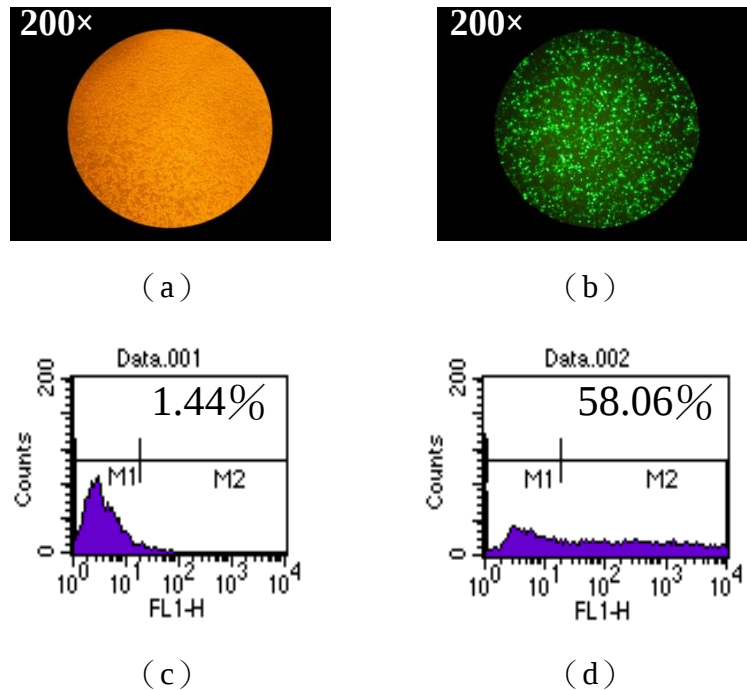


圖 (a)、(b)、(c)、(d) 表示 DcR3.Fc 質體轉染後蛋白質在細胞內之表現效率。其中 (a)、(c) 為對照組，(b)、(d) 則為轉染了 DcR3.Fc 質體與 pEGFP 基因之細胞，其中約 58% 的細胞有 EGFP 綠色螢光基因 (FL1) 的表現。

八、小鼠血糖之測定

於第 10 週開始每週以尾部採血方式檢測小鼠血糖值。小鼠之正常血糖值在 50-135 mg/dl 之間若血糖高於 500mg/dl 且連續 3 天以上，則判定為糖尿病鼠（以第一次超過 500mg/dl 為發病時間）。

九、NOD 小鼠之 Somatic gene therapy

1. i.m. (Intramuscular) 肌肉注射實驗

小鼠肌肉較小，因此左手食指、中指夾住腳進行腿前肌內側肌肉注射。將小鼠分為四組，於不同時間點進行注射，一週一劑，共施打四劑，探討局部 transfection 對 NOD 小鼠發病之影響，施打劑量與組別如下：

組別	首次注射時間	注射劑量	組數
Control 組	4 weeks	200 μ l PBS/mouse, 1 time/week for 4 weeks	n=16
實驗組 1	5 weeks	100 μ g DNA/mouse, 1 time/week for 4 weeks	n=10
實驗組 2	8 weeks	100 μ g DNA/mouse, 1 time/week for 4 weeks	n=8
實驗組 3	12 weeks	100 μ g DNA/mouse, 1 time/week for 4 weeks	n=5

*NOD 小鼠之發病率會因性別而不同，其中母鼠約有 8 成發病率，而公鼠僅 2 成，因此本實驗皆使用母鼠進行測試。另外 NOD 小鼠約於 12 weeks 時產生 peri-insulinitis，因此在此之前，約 4-5 weeks 時進行 treatment 一般能獲得較好的效果。因此在此實驗中分別於不同階段給予 treatment 來探討 somatic gene therapy 的效果。

2. i.v. (Intravenous) 靜脈注射實驗

將藥劑施打於小鼠眼窩下之靜脈叢，引起全身性細胞的 transfection，將小鼠分為三組，並探討 NOD 小鼠之發病率。分組如下：

組別	首次注射時間	注射劑量	組數
Control 組	4 weeks	200 μ l PBS/mouse, 1 time/week for 4 weeks	n=16
實驗組 1	4 weeks	DcR3.Fc plasmid:100 μ g DNA + 100 μ g liposome/mouse, 1 time/week for 4 weeks	n=9
實驗組 2	4 weeks	DcR3 plasmid:100 μ g DNA + 100 μ g liposome/mouse, 1 time/week for 4 weeks	n=10

十、NOD 小鼠之 DcR3 protein therapy

1. i.p. (Intraperitoneal) 腹腔注射實驗

以右手固定小鼠尾巴後，再用左手壓住鼠身並捉起皮層將小鼠翻轉平放，於

其腹腔中線偏左處平行尾巴的方向下針，完成腹腔注射。因腹腔注射代謝較慢，故 protein therapy 多採腹腔注射進行。將小鼠分為兩組，探討 DcR3 protein 對 NOD 小鼠發病之影響。其分組如下：

組別	首次注射時間	注射劑量	組數
Control 組	4 weeks	200 μ l PBS/mouse, 1 time/week for 8 weeks	n = 16
實驗組	4 weeks	DcR3.Fc: 100 μ g/mouse, 1 time/week for 8 weeks	n = 7

十一、 DcR3 對 T 細胞存活率之影響

為確保 DcR3 不會造成 T 細胞數量之減少，造成免疫系統功能下降，我進行了以下實驗，以探討 DcR3 作為免疫抑制藥物之可行性。

1. 以 Jurkat T 細胞分析

將 Jurkat T 細胞分為 4 組，其中 control 組單純以培養基培養，其他三組皆加入佛波酯（PMA）和離子霉素（Ionomycin）（PMA 和 Ionomycin 可刺激 T 細胞活化與細胞激素之分泌，故常用於小鼠 T 細胞型態之研究），其中兩組再分別加入 hIgG（10 μ g/ml）或 DcR3.Fc（10 μ g/ml）。於培養箱中培養一天後，以 PI 染色，經流式細胞儀分析細胞存活率。

2. 以 CD4⁺T 細胞分析

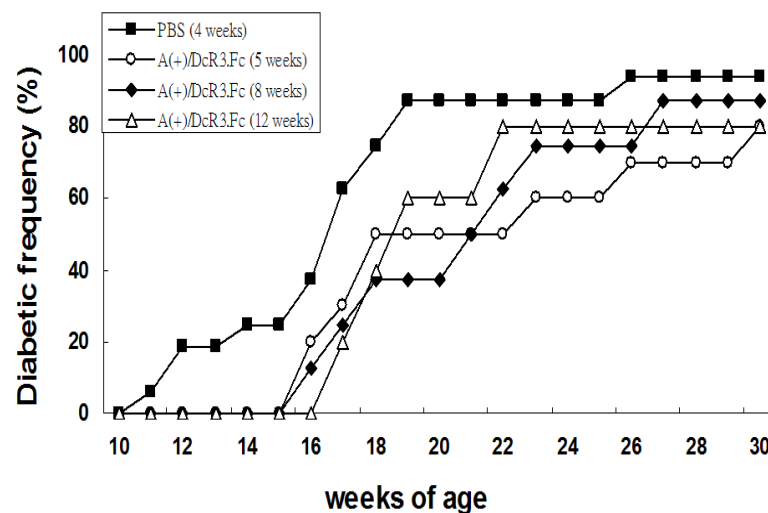
將 primary CD4⁺T 細胞分為 4 組，其中 control 組單純以培養基培養，其他三組皆加入 immobilized anti-CD3 進行兩次刺激，其中兩組再分別加入 hIgG（10 μ g/ml）或 DcR3.Fc（10 μ g/ml）。於培養箱中培養一天後，以 PI 染色，經流式細胞儀分析 DcR3.Fc 對細胞存活率之影響。

參、 研究結果與討論

一、 DcR3 Somatic gene therapy

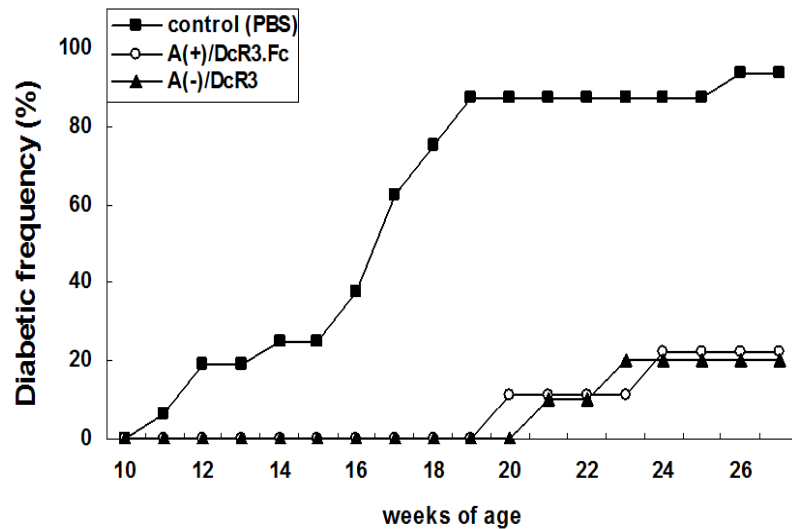
1. i.m.實驗

由此實驗數據可知 DcR3.Fc 之質體肌肉注射能減緩 NOD 小鼠 diabetes onset，但不明顯。於 12 週開始施打的組別雖然初期發病率較低，但最後仍以 5 週齡開始治療之組別發病率最低。顯示這種治療方式可能有一定之時效性，但越早施打越能降低小鼠胰島炎之發展、減少發病。



2. i.v.實驗

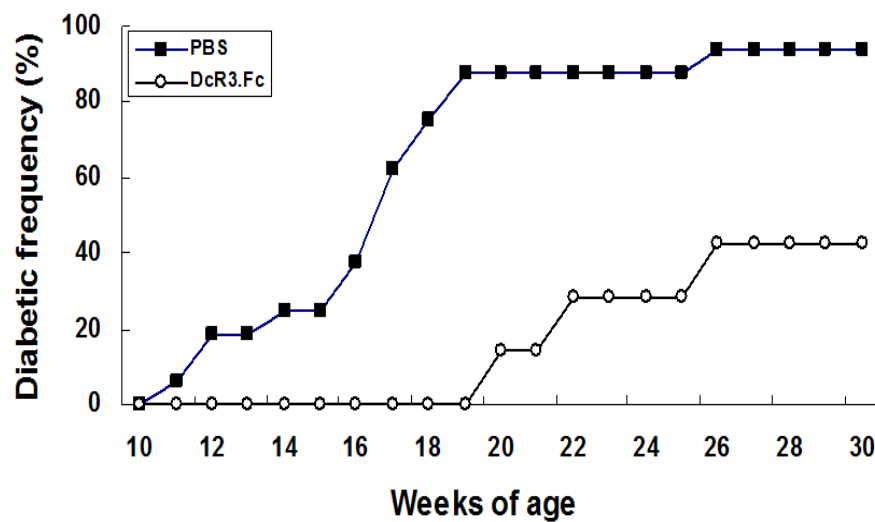
在本實驗中除確認 Fc.蛋白對 DcR3 的影響，也改以靜脈注射方式進行全身性的 gene transfection，並提前首次注射時間於 4 週齡時，以改善前一組實驗。結果顯示兩實驗組小鼠的發病皆明顯延緩並下降，且兩者趨勢相似。可見 DcR3 確有預防自體免疫疾病發生之潛力。



二、DcR3 Protein therapy

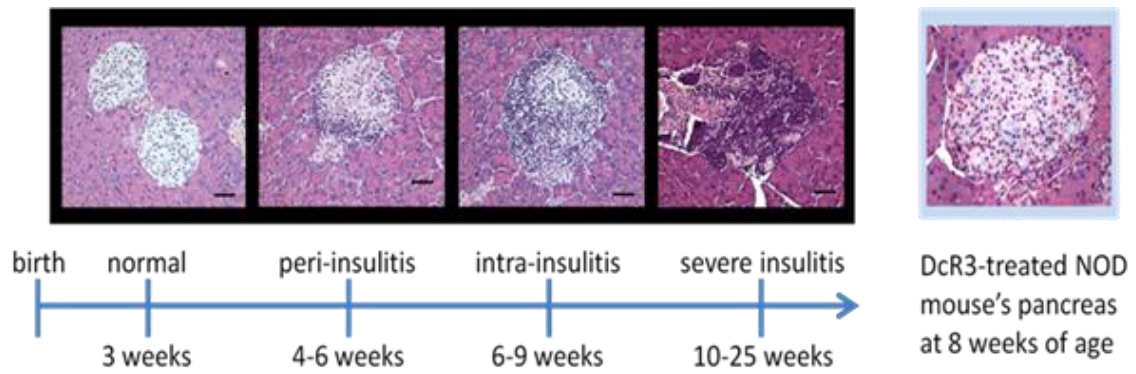
1. 發病率

此圖顯示 DcR3 蛋白質注射，對於 NOD 小鼠 diabetes 之發生亦有顯著延緩與抑制的效果，再度證實 DcR3 能預防自體免疫疾病的發生。



2. 組織切片

由此組織切片可看出小鼠之胰臟在停止治療時仍未出現胰島炎現象。相較於正常 NOD 小鼠之發病進程第八週時內部胰島炎的現象，可證實 DcR3.Fc 蛋白能有效延緩糖尿病的發生。

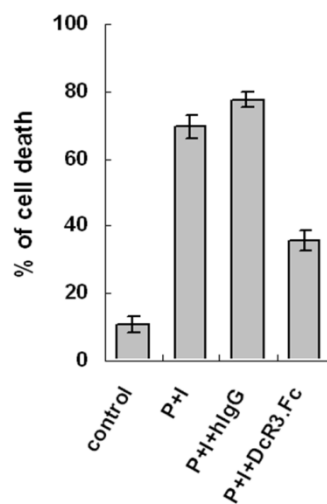


三、DcR3 對 T 細胞存活率之影響

我們已證實 DcR3 能抑制自體免疫疾病的發生，但此效果是因為 T reg 細胞增加，還是因為 T 細胞減少所造成並不確定，因此我針對 DcR3 對 T 細胞存活率之影響作一探討。

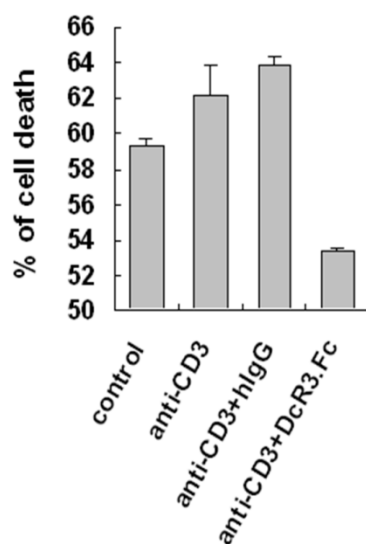
1. 以 Jurkat T 細胞分析

在此實驗中，以 PMA 和 Ionomycin 會刺激活化 Jurkat T 細胞並引發 T 細胞 ACID，而 DcR3.Fc 則可抑制此一情形之發生，降低 Jurkat T 細胞之死亡率。



2. 以 CD4⁺T 細胞分析

在此實驗中，anti-CD3 會刺激 T 細胞活化，造成其死亡率的上升。根據實驗結果分析可知，DcR3.Fc 可降低 T 細胞 ACID 之發生，降低 CD4⁺T 細胞的死亡率。



3. 小結

根據這兩個實驗，我們可以證實加入 DcR3.Fc 並不會造成 T 細胞之死亡，NOD 小鼠發病率的降低與延緩，應是由 Treg 細胞的增加所主導。這也證實 DcR3 並不會造成免疫力的顯著下降，卻可避免自體免疫攻擊的發生，因此極有作為免疫抑制藥物的潛力。

肆、 結論

將本實驗與已知的文獻做一探討，可知 DcR3 可能藉由以下方式降低自體免疫疾病的發生或延緩發病進程：

1. DcR3 可與 FasL、LIGHT、TL1A 等 ligand 競爭受體配位，並阻斷 T 細胞死亡訊息的傳送。
2. DcR3 可與 dendritic cells 結合，影響其表面分子的表現，並進一步影響 T 細胞的分化。在此情形下，DcR3 可增加 Th2 之表現量，並減少 Th1 之表現。因自體免疫疾病是由 Th1 細胞攻擊主導，故 DcR3 可抑制自體免疫疾病的發生。
3. DcR3 可增加 Treg 細胞 population，對 T 細胞攻擊產生專一的抑制效果。因 Treg 細胞分泌的細胞激素較不會造成其他疾病，使 DcR3 預防自體免疫疾病的假設更具有實用價值。
4. DcR3 的 somatic gene therapy 和 protein therapy，皆可有效降低 NOD 小鼠糖尿病的發病率或延緩發病進程，顯示出注射 DcR3 質體或蛋白皆有抑制免疫攻擊的效果，這為器官移植排斥現象的預防提供一個新方向。
5. 由 T 細胞死亡率的實驗中，證實 DcR3 並不會造成整體免疫力的下降，是其優於現行抗排斥藥物之處，也確保往後應用的可行性。

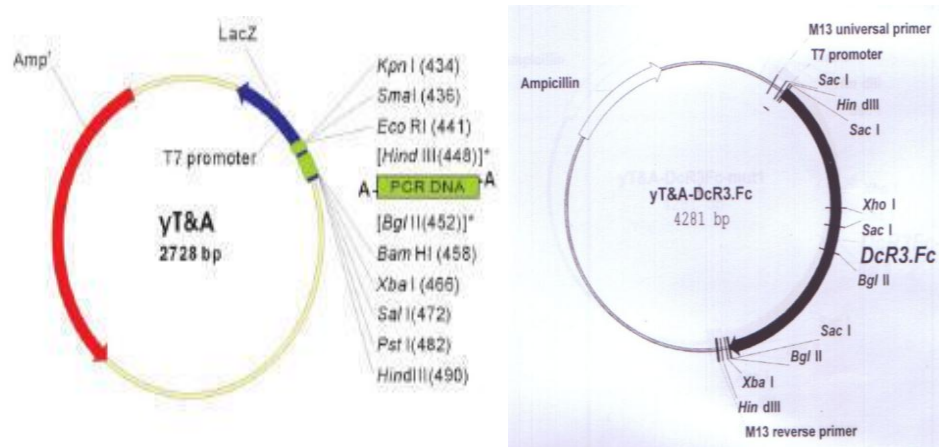
伍、 未來展望

目前已證實 DcR3 在活體中的效果，與其對 T 細胞之影響。未來可進一步探討更明確的作用機制，以利於評估 DcR3 治療的可行性。另外也希望繼續研究 DcR3 somatic gene therapy 或 protein therapy 中，最有效的注射量，以評估其實用性。

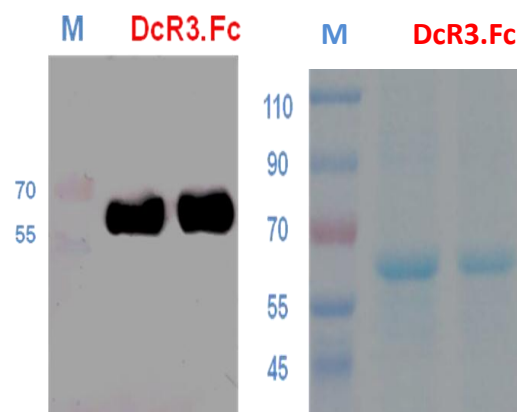
陸、 參考文獻

- (一) 王燕玲。民 92。第三號誘餌受體對非肥胖型糖尿病小鼠之免疫保護力及其機制之探討。國防醫學院。微生物及免疫學研究所。
- (二) Yukiko Tone, Keiji Furuuchi, Yoshitsugu Kojima, Mark L Tykocinski, Mark I Greene & Masahide Tone. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. Nature Immunology. 2008. vol.9. 194-202。
- (三) Hsiang-Hsuan Sung, Jyuhn-Huarng Juang, Yu-Chun Lin, Chien-Hung Kuo, Jung-Tung Hung, An Chen, Der-Ming Chang, Sun-Yran Chang, Shie-Liang Hsieh, and Huey-Kang Sytwu. 2004. Transgenic Expression of Decoy Receptor 3 Protects Islets from Spontaneous and Chemical-induced Autoimmune Destruction in Nonobese Diabetic Mice. The Journal of Experimental Medicine. 1143-1157。

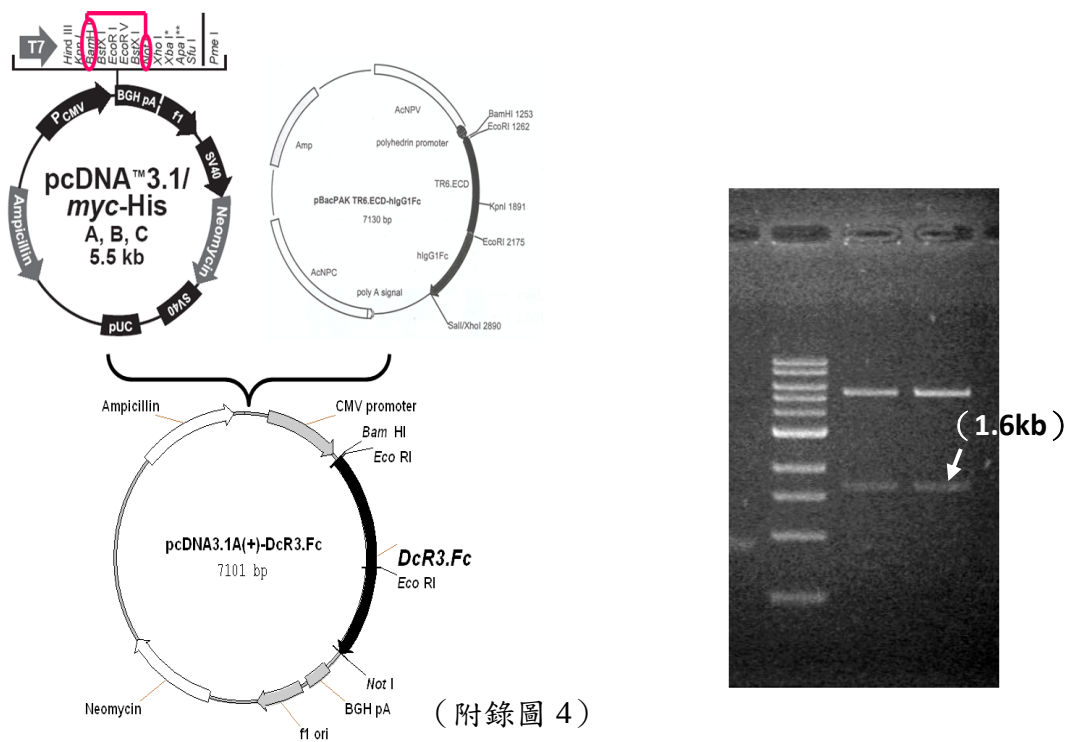
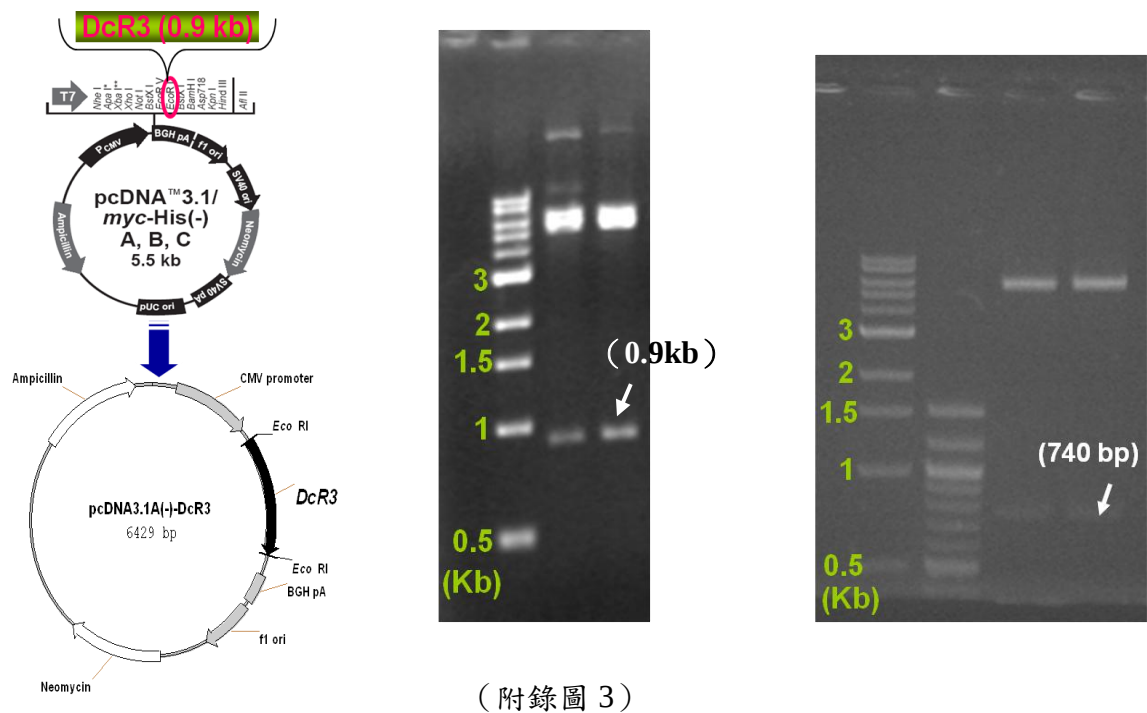
柒、 附錄



(附錄圖 1) 此為實驗中所使用之 yT&A 載體體。



(附錄圖 2) 純化之蛋白質分別以 Western Blot 與 SDS-PAGE 檢測，皆可找到 DcR3Fc 這個 61kDa 的蛋白質。



評語

DcR3，可增加調節型 T 細胞(T_{reg})，並不會造成 T 細胞異常死亡，現實 DcR3 能延緩自體免疫疾病發生及誘導未分化之 T 細胞發育成能減少自體免疫疾病發生的 Th2 細胞。