

2021 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 090024

參展科別 醫學與健康科學

作品名稱 探討病毒配體與樹突細胞間的交互作用

就讀學校 臺北市立建國高級中學

指導教師 李建國、劉翠華

作者姓名 洪偉哲

關鍵詞 樹突細胞、配體、發育調控

作者簡介



我是洪偉哲，目前就讀建國中學科學班。科學研究一直以來都是我相當憧憬的一個領域，或許研究的過程有許多風雨交加、窒礙難行的時刻，但正是因為有了這樣的歷練，成功的果實才會更加甜美。

非常非常感謝實驗室教授、學姊，以及我的專題指導老師的協助，在我遇到困難的時候給我相當多的支持，才讓我有今天參與 TISF 的機會。這次的比賽使我獲益良多，很高興能認識一起往目標前進的每一個你，這段時光將會是我高中生涯裡最珍貴且難忘的回憶。

一、摘要

中文摘要

由於新冠肺炎的影響，引發了世界的一陣恐慌，也促使我對於免疫系統及病毒之間的交互作用有了更濃厚的興趣。而在疾病的肆虐之下，疫苗儼然成為對抗病原體的重要武器。試想我們若能找到某些化合物，在未找到特定疾病的疫苗之前，能藉由化合物刺激增強人體免疫能力，進而達到對抗病毒的功效，或許會是未來萬用疫苗的首選。

目前已知一種配體 R848 在 RNA 病毒界具有一定的代表性，在動物實驗中對冠狀病毒的感染也有一定的功效，因此我希望進一步探究此配體在免疫系統中的作用。本研究以細胞株及小鼠骨髓細胞為材料，以 R848、CpG 等 2 種不同的配體刺激，發現 R848 濃度會影響細胞的分化種類及活性，而經過 CpG 再刺激的細胞將會被活化。且若於發育過程受到持續高濃度 R848 刺激，將會使細胞活性下降，進而避免自體免疫反應的發生。透過此研究，可初步了解 R848 影響免疫系統的途徑。

英文摘要 (Abstract)

In recent months, the outbreak of COVID-19 caused a serious problem to the whole world, as a result, it inspires my interests about the interaction between virus and immune system. Under the devastation of the disease, vaccines has surely become a useful weapon in order to help us fight against the pathogen. Try to imagine that we had found a specific kind of chemical compound, which gives our body enough strength to resist the attack of pathogens which we still have no medicine to cure, this kind of substances will have a high possibility to become a “versatile vaccine”.

We have already known that a ligand called “R848” can be representative of RNA virus, and it turned out to be useful repelling coronavirus, such as SARS or COVID-19, in animal experiments. We are wondering how this ligand affect the immune system. In my research, I use immortalized cells and primary cells as my experimental materials, treats different dose of R848. And the restimulation by CpG ligand will also be another kind of variation. Flow cytometric analysis showed that dose of ligand surely affect the differentiation of dendritic cells. Mature dendritic cells will be activated with restimulations. Moreover, with high concentration of R848 stimulating, the ability of dendritic cells against pathogen was significantly decreased. This was thought to avoid autoimmunity from happening. Besides, the way R848 effect the immune system could be proposed throughout this research.

二、前言

(一)、研究動機

2020 年初，新冠肺炎(COVID-19)肆虐全球，除了造成近 10 年來最劇烈的一次全球大恐慌外，也對許多人的健康造成威脅。然而回溯以往，於 2003 年流行的 SARS(severe acute respiratory syndrome)也是由冠狀病毒所引起，因此，透過完整的了解冠狀病毒對於人體免疫系統的影響，勢必能有效的減低病毒對人類造成的傷害。於是，我開始於網路上查詢各種資料，發現一篇於 2012 年發表的研究論文指出，若在小鼠體內先行注射由 R848 配體及其他藥品所製成的疫苗，可有效保護小鼠免於 MA15(mouse-adapted SARS)的攻擊，且經過注射後，其存活率提高了 8-9 成(如圖 1)，這項研究顯著的描述出了疫苗對於免疫系統的重要性。

於是進一步搜索資料後發現，目前已研發出多種配體可以模擬病毒入侵的過程，並且其本身不帶有任何致病力，除了可在 P1 實驗室進行操作外，研究人員也可以在安全的環境下進行實驗。而目前最廣為人知的配體即為上述研究中所使用的 R848，其可以模擬單股 RNA 病毒(包括冠狀病毒、流感等多種常見的病毒)對細胞所造成的刺激。然而，目前我們對於病毒與免疫系統之間的交互作用仍沒有明確的瞭解，也因此無法於第一時間立即研發出藥物或疫苗進行防疫。因此，我希望從這種配體著手，了解其與免疫系統的相關性。

由於 R848 配體所對應的受體為 TLR-7(Toll-like receptor 7)，這種受體在免疫細胞中的樹突細胞相當常見，於是我選定了樹突細胞，作為此次實驗的材料以及分析的主要對象。

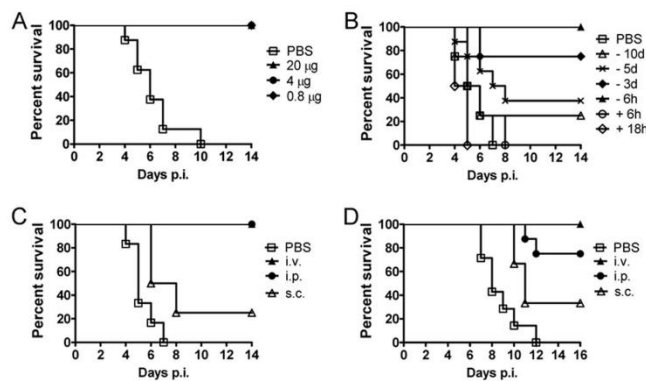


圖 1:由 Poly-IC 製成之疫苗對於小鼠存活率之研究圖,摘錄自 Jincun Zhao, Christine Wohlford-Lenane, Jingxian Zhao, Erica Fleming, Thomas E. Lane, Paul B. McCray, Jr., and Stanley Perlmana, Intranasal. (2012). Treatment with Poly(I-C) Protects Aged Mice from Lethal Respiratory Virus Infections. *Journal of Virology*, 11416–11424.

(二)、研究背景

目前已知免疫系統有許多可分化成多種細胞系之能力的幹細胞(hematopoietic stem cell,HSC)，可進一步分化成許多種類免疫細胞的前驅幹細胞(progenitor cell)，例如 CLP、CMP、CDP 等不同的免疫細胞。而上述三種細胞皆可分化為 cDC(傳統樹突細胞 (conventional DC))及 pDC(漿狀樹突細胞(plasmacytoid DC))兩種樹突細胞，其功能差異甚大，如下所示：

1. cDC 細胞作用為將抗原呈現給 T 細胞，使得 T 細胞能辨認病原
2. pDC 細胞功能為分泌第一型干擾素，干擾病毒的合成及增殖

已知在一般情況下，分化完成之 cDC 與 pDC 的比例大約為一定值(視細胞情況、生長環境而有所不同)。然而經過初步的定性實驗發現，透過某些刺激，會使得此分化途徑在發育過程中受到影響，導致兩種細胞的分化比例重新調整，此外，分化出的細胞之活性也不盡相同。查詢資料後發現，當樹突細胞面臨不同的刺激時，會藉由不同的類鐸受體接受刺激訊號，並產生相對應的免疫反應(其對應方式如圖 2 所列)。我們認為生物體是透過這樣的途徑來調節免疫系統，進一步使得生物體產生足夠且適合的抗體對抗病原。換言之，若我們能清楚了解此途徑對於免疫系統的影響，或許可藉由操控分化途徑，而使得人體可對抗某些相當棘手的病毒。因此，我將針對分化後的細胞，透過流式細胞儀分析細胞種類、細胞活性，量化數據後並進行分析，並推測其生理意義。

本研究之 cDC 即 pDC 之相關定義如下：

- (1) cDC : CD11c⁺ B220⁻ CD11b⁺
- (2) pDC : CD11c⁺ B220⁺ CD11b⁻

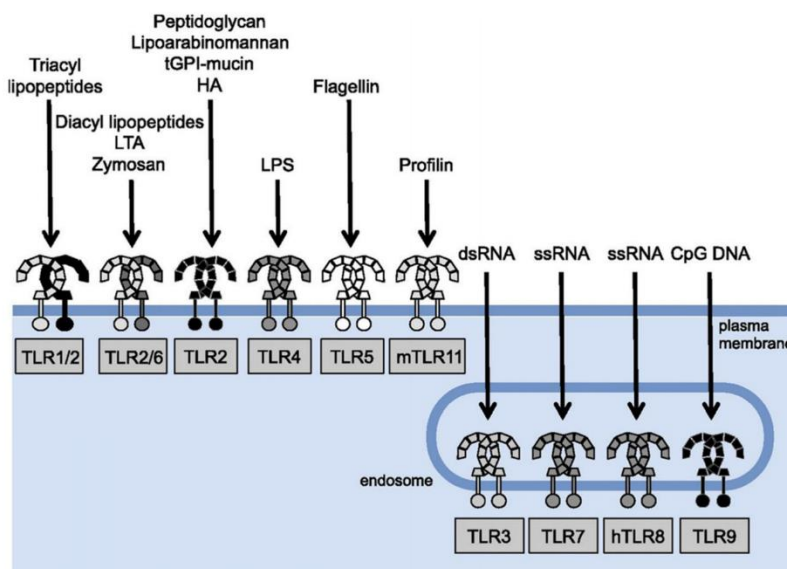


圖 2:不同種類的刺激與類鐸受體的對應關係圖，摘錄 Salwa Refat El-Zayat , Hiba Sibaii and Fathia A. Mannaa. (2019) .Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. Bulletin of the National Research Centre ,43:187.

(三)、研究目的

由於在先前文獻探討中發現，R848 配體對於小鼠冠狀病毒的感染具有相當可觀的預防能力，因此在本研究中，我將針對經過不同濃度 R848 刺激後的細胞，進行種類、活性及數量的分析，藉由這些數據推測免疫系統與配體間的運作機制及原理，以及其在生理上的意義，並且進一步驗證我的想法。

研究目的如下：

- 1.配體對於前驅幹細胞分化成樹突細胞路徑的調控
- 2.不同濃度的配體刺激對細胞發育過程的影響
- 3.不同濃度的配體刺激對於成熟細胞的活性影響及相關蛋白表現量的多寡
- 4.細胞活性及分化比例對生物體的生理意義及影響
- 5.配體刺激與樹突細胞發育過程的機制探討
- 6.Cell-line 實驗與 Primary-cell 的實驗之結果差異性

三、研究方法及過程

(一)實驗器材及設備

1. 細胞株：

Immortalized HSPC[iHSPC, clone 10]

ERHBD-HOXB8(hormone binding domain of the estrogen receptor-HOXB8)

2. 藥品及試劑：

RPMI 細胞培養液 (RPMI medium), 雌二醇 (estradiol), 磷酸鹽緩衝生理食鹽水 (PBS), TLR7 ligand (R848), Flt3 ligand, CpG ligand, staining buffer, FC blocker(Anti CD16-32), 臺盼藍染劑 (trypan blue), ddH₂O, 所需抗體如表 1

表 1:所需之抗體名稱

Biotin anti-mouse CD11c
APC/Cyanine7 streptavidin
Brilliant Violet 421 anti-mouse/human B220
FITC anti-mouse/human CD11b
APC anti-mouse CD24
PE/Cyanine 7 anti-mouse CD172α(SIRPα)
Per CP/Cyanine 5.5 anti-mouse CD40
Brilliant violet 510 anti-mouse I-A/I-E(MHCII)
PE anti-mouse CD274(B7-H1,PD-L1)
PE anti-mouse CD3 ε
PE anti-mouse CD19
PE anti-mouse CD8a

PE anti-mouse/human CD45R/B220
PE anti-mouse Ly-6G/Ly-6C(Gr1)
PE anti-mouse NK1.1
PE anti-mouse TER119/Erythroid Cells
PE anti-mouse/human CD11b
PE anti-mouse MHCII
Biotin anti-mouse CD135

3. 實驗器材

微量分注器、微量吸管尖、細胞計數器、70%酒精(消毒用)、15cc,50cc 離心管、12 孔盤、96 孔盤、Eppendorf、培養皿 (10cm-dish)、VORTEX、離心機、細胞培養箱、流式細胞儀、無菌操作台、顯微鏡。

(二)實驗方法與過程

1.Cell-line 細胞株實驗

1-1 培養細胞及繼代

- (1) 使用微量分注器不斷吸取及排放溶液，使細胞分散。將培養皿中含有細胞的溶液轉移至 15 毫升離心管中。
- (2) 將上述溶液以 500g 25°C 離心 5 分鐘，去除上清液後重新以 1 毫升營養液回溶。
- (3) 取其中 250ml 置入新的裝有 10 毫升細胞培養液的培養皿中，並且前後左右搖晃，使的細胞均勻分散。

※此時即完成細胞繼代※

1-2 以配體刺激細胞株

STEP1: cell seeding(DAY 0)

首先，為了將細胞引導至開始分化的時機，需要將培養中的細胞進行處理，才能使得細胞開始分化。其原理主要是將抑制細胞分化的化學物質：雌二醇(estradiol)移除，如此細胞就會開始進入分化過程。移除 estradiol 的步驟如下：

- (1) 取出細胞置入 15mL 的離心管中，離心後移除上清液，而後加入 10mL PBS 溶液
- (2) 離心後移除上清液，再度加入 10mL PBS
- (3) 最後一次離心後，加入 1mL 細胞培養液 (medium)—取其中 10μL 進行細胞計數

STEP1-1:細胞計數

- (1) 將取出的 10μL 細胞與 10μL 台盼藍染劑混和均勻(亦即 2 倍稀釋)，並從混合液中取出 10μL 注入細胞計數器中
- (2) 由於細胞數較少，故計數九宮格中所有格子內的細胞，並計算每 1 毫升所含活細胞數。接著，將細胞移至 12 孔盤中，並依照變因的不同加入不同劑量的配體。

(本次所採用的變因組合如表 2 所列:(總體積 1mL, 2×10^5 cells/well))

表 2:所有變因之 R848 濃度(ng/mL)與 CpG 處理對照表

Treatment	0	1.5625	6.25	25	100
FL	Control 1	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Experiment 4
+CpG	Control 2	Experiment 5	Experiment 6	Experiment 7	Experiment 8

STEP1-2:配製混合液

每個 well 需包含的材料及分量如表 3 所示:

表 3:培養盤中每個 well 所需之內容物

品名	數量
移除 estradiol 之細胞	2×10^5 (個)
RPMI medium	1mL
Flt3 ligand(100ng/mL)	1 μ L

配製步驟如下:

- (1) 取 17mL RPMI medium 加入先前含有所有細胞的 15mL 離心管，而後吸取 17 μ L Flt3 ligand 注入。
- (2) 藉由不斷 180°翻轉離心管使得所有溶液均勻混和。
- (3) 每次吸取 1mL 的混和液依序注入每個 well 當中。
- (4) 依表格內容加入對應濃度的 R848 即完成。

STEP 2: Wash away(DAY 2)

在此時期，細胞大多已分化完畢並成熟，為了避免於實驗中所加入的 R848 影響到成熟健康的細胞，影響實驗數據結果，因此須將溶液中及可能附著於細胞上的 R848 移除，步驟如下:

- (1) 準備 16 個 Eppendorf，稍微沖洗每個 well 的底部後，依序將每個 well 內的溶液轉移至相對應的 Eppendorf 中，並以 700G 的速度，在 4°C 的環境離心 5 分鐘。
- (2) 確認細胞沉澱後，去除上清液並加入 1mL PBS(不須刻意打散沉澱)，以 700G 的速度，在 4°C 的環境離心 5 分鐘。
- (3) 重複步驟(2)
- (4) 配置混合液:每個 well 須包含表 4 之成分:

表 4:混合液配置成分表

試劑名稱	濃度	劑量
RPMI medium	x	1mL
Flt 3 Ligand	100ng/mL	1 μ L

- (5) 去除上清液後，於每個樣品中加入步驟(4)配製的混合液即完成。

STEP 3: Add fresh medium(DAY 3)

由於細胞的生長及發育皆需要養分，因此需於第三天時補充細胞培養液，進已將細胞維持在最佳狀態，每個 well 所需補充的量及配方如 STEP1-2:配製混合液所示。

STEP 4: Restimulation (DAY 5)

我們想要了解，在經過各種變因處理後的細胞再度面臨外來物質時所產生的變化，因此選在分析的前 24 小時針對特定組別給予適當劑量的 CpG 配體。而其中，不選用 R848 作為刺激的原因是，細胞已在 R848 的環境下發育，再度使用相同的配體將會使數據失準。步驟如下：在分配到參與 restimulation(well 2、5、6、7、8)的 well 當中個別加入濃度為 100ng/mL 的 CpG Ligand 1 μ L。

STEP 5: Analysis (DAY 6)

分析之前置作業步驟如下：

- (1) 準備 3 個 eppendorf，將每個 well 中的 2cc 溶液分兩次 1cc 分別轉移至 2 個不同的 eppendorf，而後使用 1cc PBS 沖洗培養盤之底部後，將其裝入另一個 eppendorf 中。
- (2) 去除上清液後進行以下步驟：
在 TUBE 1 中加入 1mL staining buffer 並混合均勻，將所有液體吸出並移至 TUBE 2 並混和均勻，並將所有液體吸出後移至 TUBE 3，混和均勻直到細胞沉澱皆消失即完成。
- (3) 自 TUBE 3 中取出 10 μ L 進行細胞計數，而後將此管進行離心(700G、5 分鐘)，去除上清液後加入表 5 溶液並等待 15 分鐘：

表 5:TUBE 3 溶液配置表

品名	體積
FC blocker(Anti-CD 16-32)	30 μ L
Staining buffer	70 μ L

- (4) 離心、去上清液後，加入 Primary 抗體並避光等待 15 分鐘。

抗體配置如表 6 所示：

表 6:一抗抗體劑量配置表

抗體名稱	劑量 (per 10 ⁶ cells in 100 μ L)
Biotin anti-mouse CD11c	0.4 μ L
Brilliant Violet 421 anti-mouse/human B220	0.2 μ L
FITC anti-mouse/human CD11b	0.2 μ L
APC anti-mouse CD24	0.2 μ L
PE/Cyanine 7 anti-mouse CD172 α (SIRP α)	0.2 μ L
Per CP/Cyanine 5.5 anti-mouse CD40	0.2 μ L
Brilliant violet 510 anti-mouse I-A/I-E(MHCII)	0.2 μ L
PE anti-mouse CD274(B7-H1,PD-L1)	0.2 μ L

- (5) 加入 1mL staining buffer 後離心並去上清液，而後回溶於 100 μ L staining Buffer，加入二抗並等待 15 分鐘。二抗之抗體如表 7 所示:

表 7:二抗抗體劑量配置表

抗體名稱	劑量 (per 10 ⁶ cells in 100 μ L)
APC/Cyanine7 streptavidin	0.2 μ L

以流式細胞儀進行分析

將細胞回溶於 200 μ L staining buffer 即可進行上機。

※備註:本次實驗上機並非分析所有細胞，而是自樣本中隨機抽取 20000 個細胞進行分析。

2.Primary Cell 小鼠細胞實驗

STEP1: cell seeding(DAY 0)

- (1) 將細胞離心，而後以 1mL 的 ACK buffer 作用 1 分鐘使紅血球破裂，於 1 分鐘後加入 10mL RPMI 培養液中和滲透度。
- (2) 將所有細胞(含培養液)過濾網，自濾液中抽取 10 μ L 進行細胞計數，其餘細胞以 300G 離心 5 分鐘
- (3) 離心後移除上清液，依比例加入混合液(配方如表 8 所示)後靜待 20 分鐘

表 8:混合液配方(每4 \times 10⁷個細胞)

品名	體積
FC blocker(Anti-CD 16-32)	50 μ L
PE selection	50 μ L

- (4) 而後進行抗體染色，將表 9 抗體依比例混合後加入細胞中並等待 20 分鐘

表 9:一抗抗體劑量配置表(每4 \times 10⁷個細胞)

抗體名稱	劑量
PE anti-mouse CD3 ϵ	0.75 μ L
PE anti-mouse CD19	0.75 μ L
PE anti-mouse CD8a	0.75 μ L
PE anti-mouse/human CD45R/B220	0.75 μ L
PE anti-mouse Ly-6G/Ly-6C(Gr1)	0.75 μ L
PE anti-mouse NK1.1	0.75 μ L
PE anti-mouse TER119/Erythroid Cells	0.75 μ L
PE anti-mouse/human CD11b	0.75 μ L
PE anti-mouse MHCII	0.75 μ L
Biotin anti-mouse CD135	2 μ L

- (5) 等待後加入 5mL PE selection，並離心且去除上清液後，回溶於 100 μ L PE selection(每 4×10^7 個細胞)，而後加入 2 抗(如表 10 所示)，等待 20 分鐘後重複上述動作。

表 10:二抗抗體劑量配置表(每 4×10^7 個細胞)

抗體名稱	劑量
APC/Cyanine7 streptavidin	2 μ L

- (6) 回溶於 1mL PE selection 後，將細胞轉移至流式細胞儀管(flow tube)，並以高階流式細胞儀分選出前驅幹細胞。

- (7) 將分選出的細胞以 500G 離心 10 分鐘，並取出其中 2×10^5 個前驅幹細胞，加入混合液中(配方如表 11 所示)

表 11:每 2×10^4 個細胞所需之內容物

品名	數量
前驅幹細胞	2×10^4 個
RPMI medium	0.1mL
Flt3 ligand(10ng/mL)	1 μ L

- (8) 依照表 12 的變因設計分別加入對應濃度的 R848 即完成。

表 12:所有變因之 R848 濃度與 CPG 處理對照表

Treatment	0	1.5625	6.25	25	100
FL	Control 1	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Experiment 4
+CPG	Control 2	Experiment 5	Experiment 6	Experiment 7	Experiment 8

STEP 2: Wash away(DAY 2)

- (1) 將細胞以 300G 離心 5 分鐘。
- (2) 輕輕吸出 70 μ L 上清液，並補充 180 μ L RPMI 培養液後以 300G 離心 5 分鐘
- (3) 輕輕吸出 180 μ L 上清液，並補充 180 μ L RPMI 培養液後以 300G 離心 5 分鐘，吸出 180 μ L 上清液後加入表 13 所列之混合液 70 μ L 至每個 well。

表 13:混合液配置成分表(每個 well)

試劑名稱	濃度	劑量
RPMI medium	x	70 μ L
Flt 3 Ligand	10ng/mL	1 μ L

STEP 3: Add fresh medium(DAY 3)

依表 14 的配方補充細胞培養液。

表 14:混合液配置成分表(每個 well)

試劑名稱	濃度	劑量
RPMI medium	x	100 μ L
Flt 3 Ligand	10ng/mL	1 μ L

STEP 4: Restimulation (DAY 6)

在相對應的變因組合當中個別加入濃度為 10ng/mL 的 CpG Ligand 1 μ L。

STEP 5: Analysis (DAY 7)

分析之前置作業步驟如下:

- (1) 將細胞以 300G 離心 5 分鐘，從中取出 180 μ L 上清液，並加入 80 μ L 混合液(如表 15 所示)，將細胞均勻打散。

表 15:混合液配方

品名	體積
FC blocker(Anti-CD 16-32)	10 μ L
Staining buffer	70 μ L

- (2) 等待 15 分鐘後加入表 6 所示之抗體，唯每支抗體劑量改為 0.05 μ L/well。
- (3) 等待 15 分鐘後，即可上機分析。

四、研究結果與討論

(一)iHSPC 細胞株實驗結果

以 iHSPC 細胞株進行實驗，予以不同濃度的 R848 刺激，並以 CpG 再刺激後進行分析。所有實驗分析圖為流式細胞儀輸出數據後，以 FLOW-JO 軟體進行繪圖，統計圖表依照數據進行 T-TEST 運算後，以 PRISM 繪圖並標示顯著差異。

1. 樹突細胞的分析

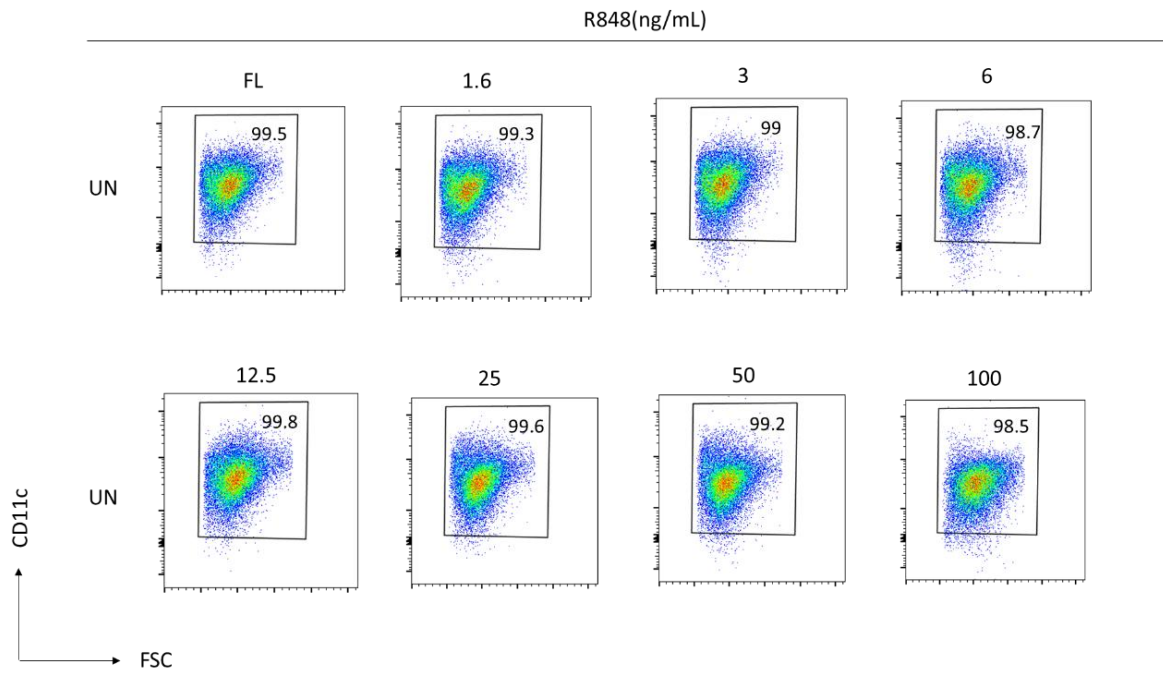


圖 3:未經 CpG 處理的變因組別中樹突細胞的分化比例

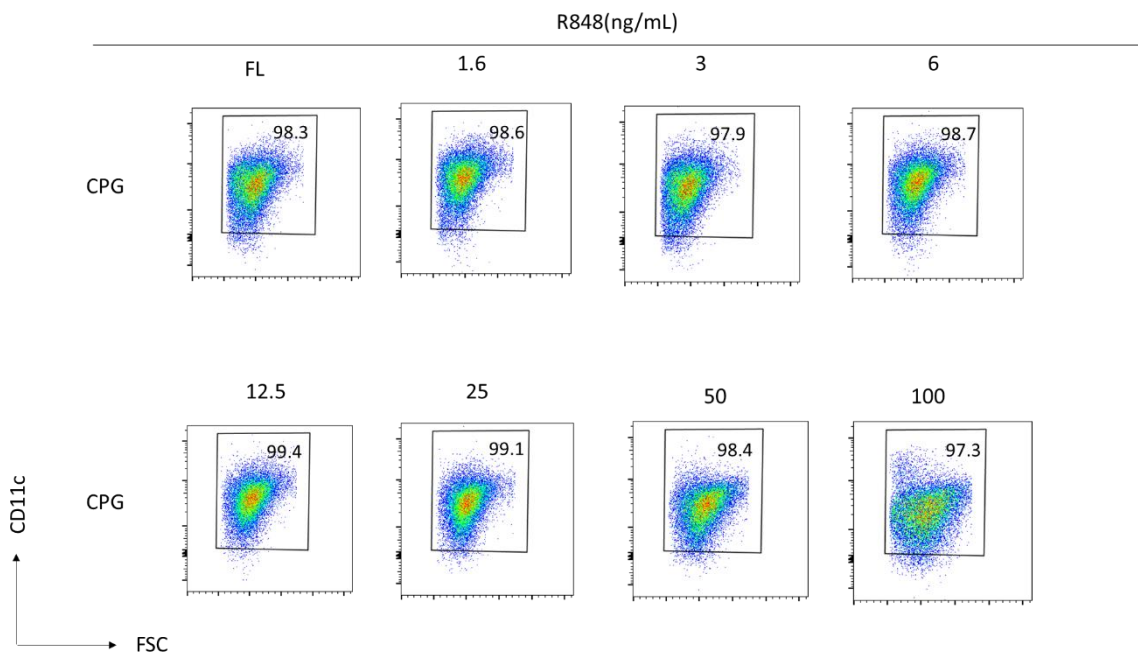


圖 4:經 CpG 處理的變因組別中樹突細胞的分化比例

圖 3、4 的縱軸代表 CD11c 的表現量。由於在免疫系統中，樹突細胞的 CD11c 表現量通常都較顯著，因此可作為分辨細胞群體為樹突細胞與否的依據。圖中方框內的細胞群即為樹突細胞，方框內的數字代表樹突細胞佔全部細胞的百分比。圖形上方之(FL、1.6、3.....)分別代表 R848 之濃度，其中 FL 標記表示此樣本只經 Flt3 Ligand 之處理，為對照組。最左邊之「UN」(未經 CpG 刺激)圖(四)、「CpG」圖(五)分別代表是否經後繼處理。

由圖 3、圖 4 分析可知:

- (1) 由數字顯示，分化完成之細胞，樹突細胞的佔比都達到 95%以上，與預期相符，表示後續的數據具有參考價值。
- (2) 藉圖 3、圖 4 相互對照可發現，不論有無 CpG，樹突細胞佔整體細胞的量大約相同(相差在 2%以內)，因此推測配體調控的層面並不在樹突細胞的分化量，而是在更細微的層面。

2. 傳統型樹突細胞(cDC)與漿狀樹突細胞(pDC)的分化

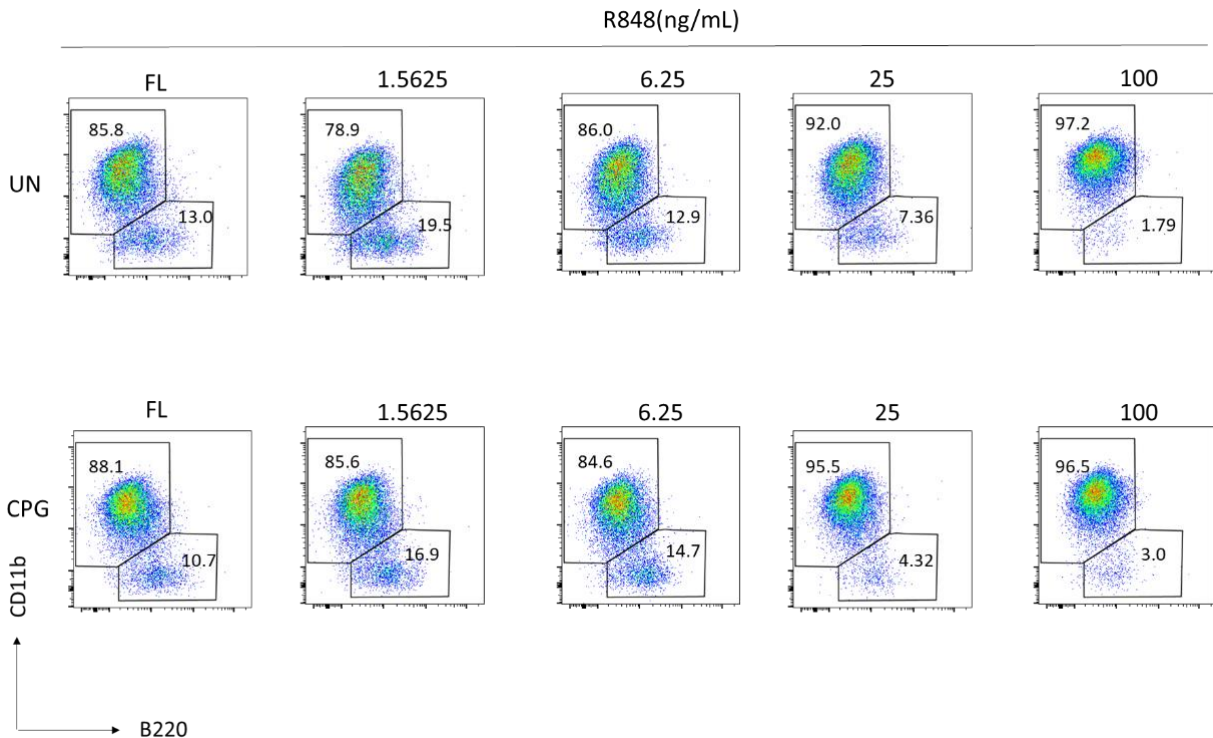


圖 5: 發育過程經不同濃度配體刺激對樹突細胞分化為 cDC 及 pDC 的比例分析圖，左上角之框線內為 cDC，而右下角框線內為 pDC。

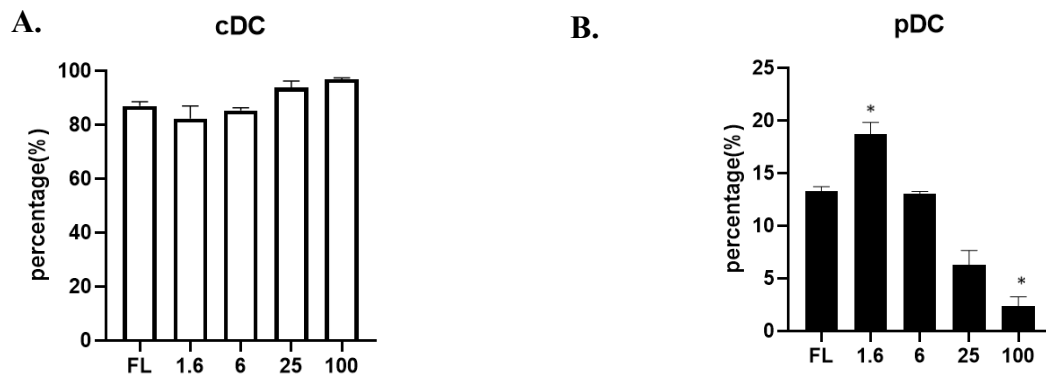


圖 6：不同濃度 R848 刺激對 cDC(A.)及 pDC(B.)分化比例的影響。橫軸表示 R848 濃度(單位：ng/mL)，各組以 FL 為對照組進行比較；「*」表示與對照組相比，數據具顯著差異(0.05>p>0.01)，縱軸表示該細胞佔全部細胞之百分比。

由圖 5 分析：

- (1) 在低濃度的 R848(1.6ng/mL)刺激下，分化為 pDC 的比例相較於對照組來說提昇了大約 50%的幅度，統計學上經過 T-TEST 的運算後，也證明具有顯著提升效果(如圖 6 所示)，可能代表著細胞可產生第一型干擾素的量漸增。由於第一型干擾素(IFN-I)和受體結合後會以一連串的訊息傳遞促進病毒基因組的降解、抑制病毒生成，進而達到抗病毒的效果，因此推測在相對低濃度的配體刺激底下，免疫系統是以增加干擾素的形式來對抗病原。我們推測其生理意義為，直接由 pDC 分泌干擾素降解病毒為先天性免疫反應，其作用時機較為快速且不具有專一性，因此可在較需耗費時間的後天性免疫反應出現前先行對抗病原，也可耗費較少的能量。
- (2) 在中高濃度的 R848 刺激下，pDC 的量大都比對照組要少，特別是在最高濃度(100ng/mL)下，其降低的比例與對照組相比具有顯著差異。推測此結果與專一性免疫有相當大的關係。由於單一類型的病毒量提高，干擾素可能已經無法負荷，因此需待生物體啟動專一性免疫反應後，才能有效抵禦。也因此，cDC 所佔之比例提高，也可使較多 T 細胞進行專一性免疫反應，以更有利的方式對抗入侵的病原體。也因此，在中高濃度的刺激下，我們推測免疫系統最主要並不是靠 pDC 進行調節，而是另有其他機制的的作用。
- (3) 於圖 5 擷取部分圖樣，並於細胞密集處標示上一條紅色水平線(如下圖 7 所示)

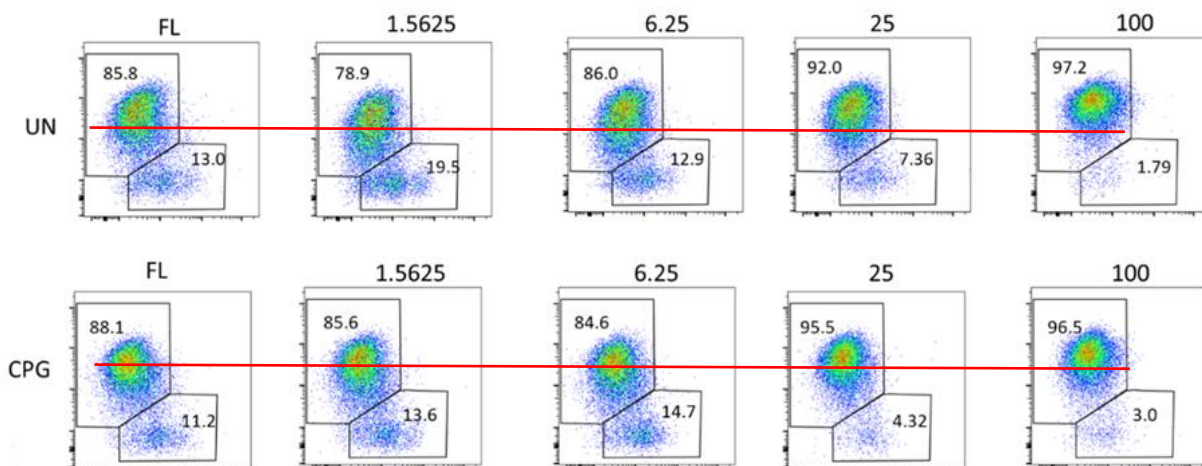


圖 7:圖 5 針對 CD11b 表現量的分析

可以發現，在高濃度的條件下，cDC 在 CD11b 的表現量有逐漸上升的趨勢，而此情況配合的是 pDC 量的下降。雖然我們目前仍不清楚 CD11b 表現量的上升對於細胞或生物體的生理意義，但我們推測此現象應是逐漸取代原本由 pDC 所執行的免疫反應功能。

3. cDC1 與 cDC2 的分化

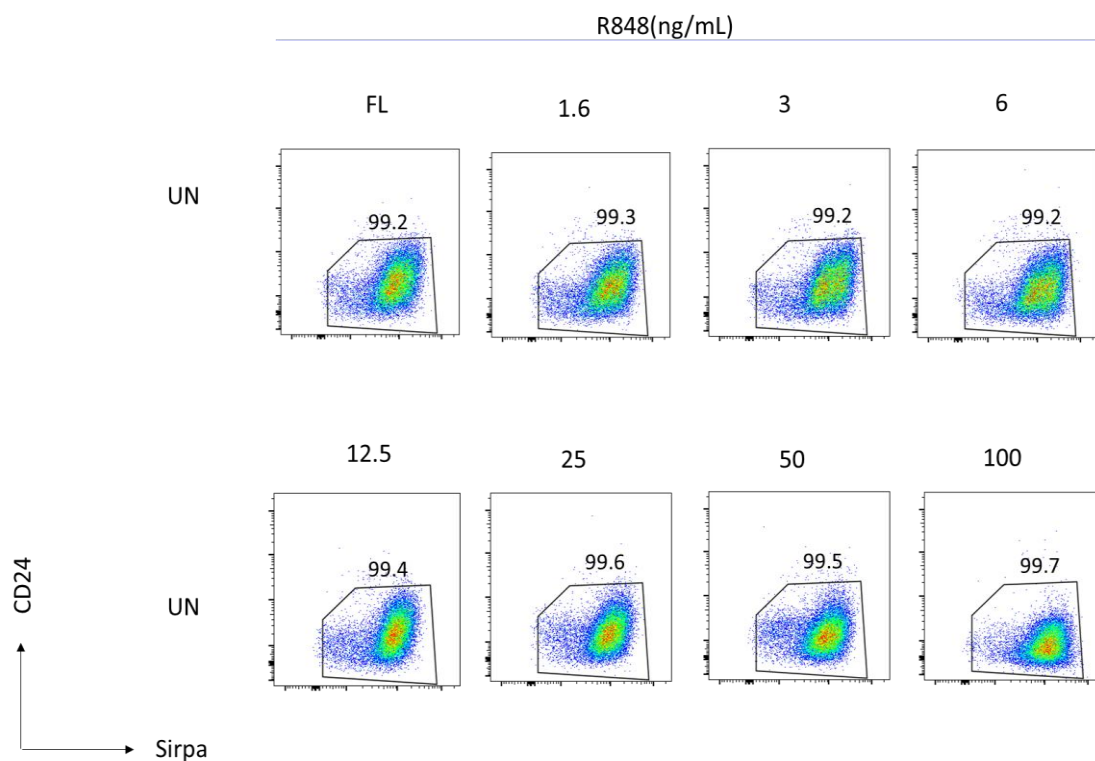


圖 8: 未經 CpG 處理的變因組別中 cDC1 與 cDC2 的比例

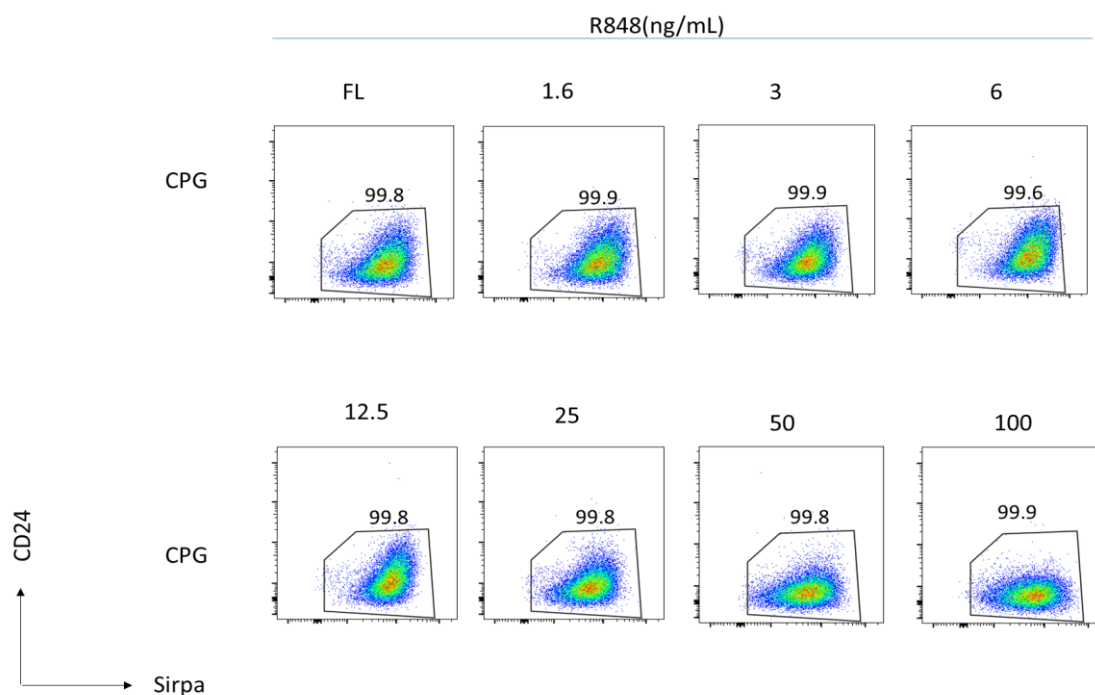


圖 9: 經 CpG 處理的變因組別中 cDC1 與 cDC2 的比例

備註: cDC1 之定義為 $CD11c^+ B220^- CD11b^+ CD24^+ sirp\alpha^-$

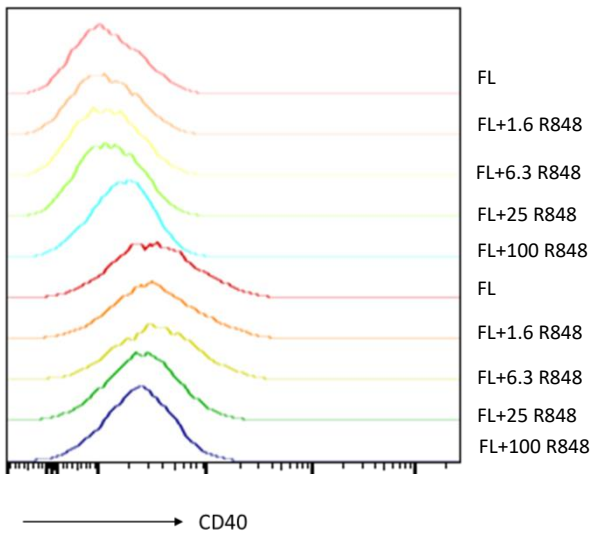
cDC2 之定義為 $CD11c^+ B220^- CD11b^+ CD24^- sirp\alpha^+$

圖表分析:

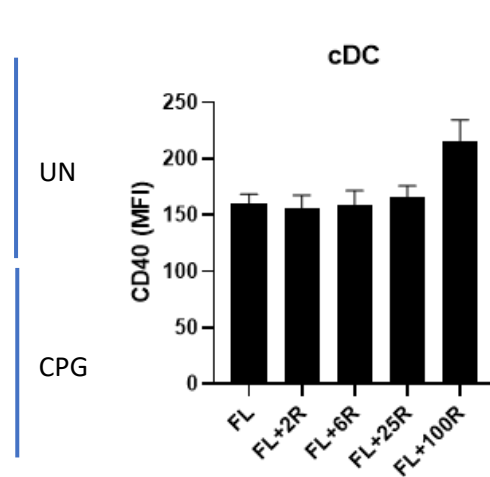
- (1) 在細胞株實驗中，因為 Clone 10 細胞的特性，所有的分化出的傳統型樹突細胞皆屬於 cDC2。
- (2) cDC2 的功能主要為將抗原透過 MHCII 分子呈遞給 $CD4^+$ T 細胞，而 cDC1 則主要透過 MHC I 誘導 $CD8^+$ 細胞獲得胞毒性 T 細胞的功能，指導 CTL 對細胞內病原及腫瘤做出反應，及交叉表現(cross presentation)。隨著兩者的活性及比例不同，生物體內的免疫系統可能被引導至執行不同的反應。

4. cDC 細胞對 CD40 活性的分析

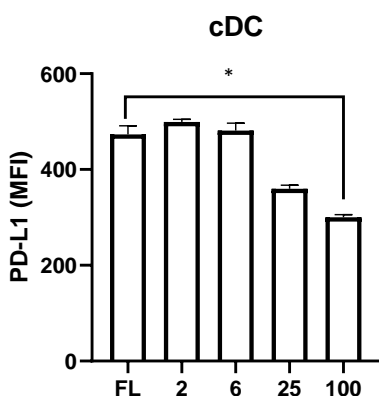
A.



B.



C.



D.

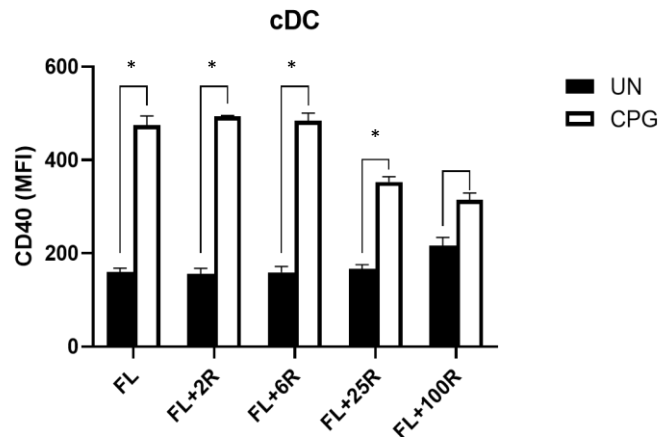


圖 10 : cDC 的 CD40 表現量。(A)所有組別針對 CD40 蛋白的表現量，橫軸表 CD40 表現量，峰值高低代表位於該表現量的細胞數多寡。圖後數字代表 R848 刺激濃度，單位：ng/mL。(B)未經 CpG 刺激的 cDC 活性比較 (CD40)，橫軸表不同濃度 R848 刺激(單位：ng/mL)，縱軸表(CD40 表現量(MFI)。以 FL 為對照組進行比較。(C)在 CPG 刺激下，於發育過程給予不同濃度 R848 刺激，CD40 的表現量變化。橫軸表不同濃度 R848 刺激(單

位：ng/mL)，縱軸表 CD40 表現量(MFI)。以 FL 為對照組進行比較。(D)CpG 刺激對 CD40 的表現量影響，橫軸表不同濃度 R848 刺激(單位：ng/mL)，縱軸表 CD40 表現量(MFI)。各組以同濃度 R848 刺激下，UN 為對照組、CpG 為實驗組進行比較。「*」表示與對照組相比，數據具顯著差異(0.05>p>0.01)。

1. CD40 是一種在抗原呈現細胞(APC)表面的蛋白質，其在免疫系統中扮演相當重要的角色。例如：當抗原呈現細胞在 MHC II 蛋白上呈現抗原時，輔助 T 細胞(helper T cell)可藉由與 APC 表面的 CD40 交互作用而產生適當的細胞激素，加強身體的免疫反應。再者，CD40 可輔助 B 細胞的成熟並發揮其功能，以及加速 B 細胞產生抗體。而在新型冠狀病毒的案例中，患者體內的 CD4⁺T 細胞與健康人類相比明顯下降，而測量患者體內的 CD4⁺T 數量也成了檢測患者體內 RNA 病毒殘餘量的方法之一，因此推測 CD40 與 RNA 病毒具有一定程度的關聯，故我們將分析所有樣品中細胞 CD40 的活性並推測其關連。
2. 由於 CD40 屬於抗原呈現的一環，其功能與 cDC 較有直接關係，雖少數 pDC 也會執行抗原呈現功能，但其主要還是以干擾素為主，故在此不分析 pDC 對 CD40 的活性。

由圖 10 可知：

- (1) 在未添加 CpG 的組別中，藉由 T TEST 進行統計分析，發現不論添加的 R848 濃度為何，CD40 的表現量與對照組皆沒有明顯差異(如圖 10B.所示)，為了解原因，我們深入探討了樹突細胞進行免疫反應的機制(如圖 11 所示)。樹突細胞在進行抗原呈遞時，除以 MHCII 進行抗原的呈現外，另外需要其他蛋白的訊號傳遞，方能活化 T 細胞的所有功能。因此，根據實驗結果推論，樹突細胞並非隨時皆處於活化階段，可能需要其他配體(如:CpG)給予刺激，方能活化其他蛋白的訊號傳遞。

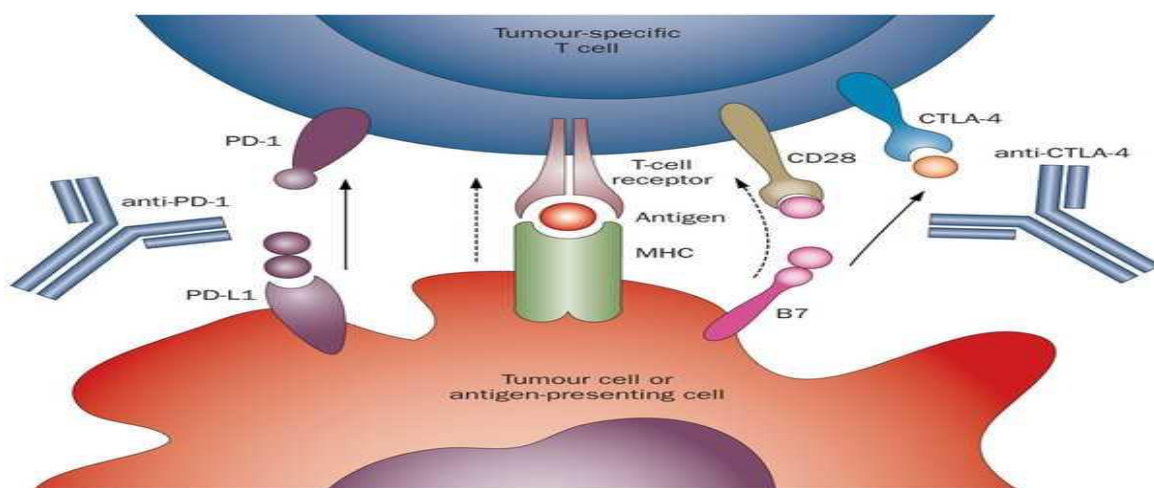


圖 11：樹突細胞進行抗原呈現時的機制示意圖，摘錄自 <https://www.creative-biolabs.com/vaccine/costimulatory-molecules-development.htm>

- (2) 在添加 CpG 的組別，由統計數據顯示，在低濃度 R848 的刺激下，其表現量與對照組存在顯著差異(p<0.05)，此代表在低濃度 R848 的刺激環境下發育的樹突細胞在成熟後具有較大的活性。而相反的，高濃度的 R848 處理使得 CD40 的表現量有下降的趨勢，其中又以 100ng/mL 的濃度具有顯著差異。(如圖 10C.所示)推測這項結果與自體免疫反應有關。若 CD40 的表現量太高，將有可能造成免疫力過強，終至生物體無法自行控制。為驗證這項假說，我將分析有關抑制免疫反應的蛋白(PD-L1)表現量。

5. cDC 細胞對 MHCII活性的分析

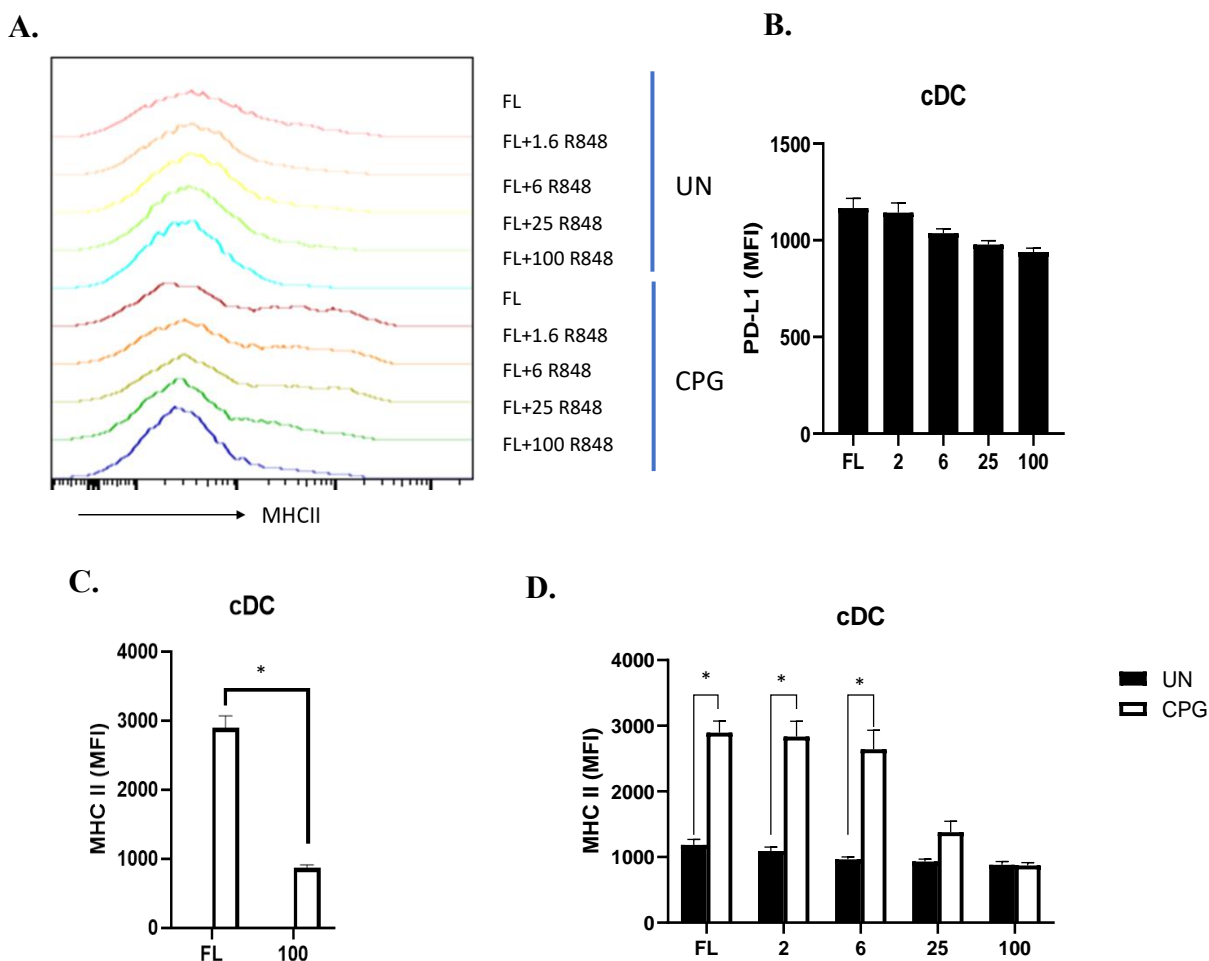


圖 12：cDC 的 MHCII 表現量。(A) 所有組別針對 MHCII 蛋白的表現量，橫軸表 MHCII 表現量，峰值高低代表位於該表現量的細胞數多寡。圖後數字代表 R848 刺激濃度，單位：ng/ml。(B) 未經 CPG 刺激的 cDC 活性比較(MHCII)，橫軸表不同濃度 R848 刺激(單位：ng/ml)，縱軸表 MHCII 表現量(MFI)。以 FL 為對照組進行比較。(C) 在 CpG 刺激下，於發育過程給予不同濃度 R848 刺激，MHCII 的表現量變化。橫軸表不同濃度 R848 刺激(單位：ng/ml)，縱軸表 MHCII 表現量(MFI)。以 FL 為對照組，100 為實驗組進行比較。(D) CpG 刺激對 MHCII 的表現量影響，橫軸表不同濃度 R848 刺激(單位：ng/ml)，縱軸表 MHCII 表現量(MFI)。各組以同濃度 R848 刺激下，UN 為對照組、CpG 為實驗組進行比較。「*」表示與對照組相比，數據具顯著差異(0.05>p>0.01)。

MHC II 是一種主要組織相容性複合體，其主要存在於抗原呈現細胞的表面，而因為此分子對細胞外病原體的防禦行為相當重要(此次實驗所採用的配體即為細胞外病原體)，若細胞的 MHC II 表現量過少，將使得 T 細胞無法順利辨識病原。而若 MHC II 的表現量增加，連帶將幫助 T 細胞的活性增加。因此，分析樣品細胞表面的 MHC II 表現量便成為相當重要的工作。再者，一篇刊登於 bioRxiv 的文獻顯示大約 10 種的 MHC 相關蛋白具有成為新型冠狀病毒候選疫苗的潛力，因此我們選定此蛋白進行表現量的測定及分析。

由圖 12 可知：

- (1) 在 cDC 的分析圖中，未經 CpG 處理的組別 MHCII 的表現量隨濃度的變化趨勢並不明顯(如圖 12B. 所示)，然而在經過 CpG 的處理後，低濃度的組別，其表現量相較於對照組有顯著提升(如圖 12D. 所示)。

(2) 在高濃度的 R848 刺激，並經過 CpG 處理的組別，其表現量與低濃度相比，具顯著下降的趨勢，代表樹突細胞在抗原呈遞的功能減弱(如圖 12C.所示)。導致此情況的主因我們推測與自體免疫的調節機制有所關連，將透過接續之 PD-L1 進行驗證與分析。

6. cDC 細胞對 PD-L1 活性的分析

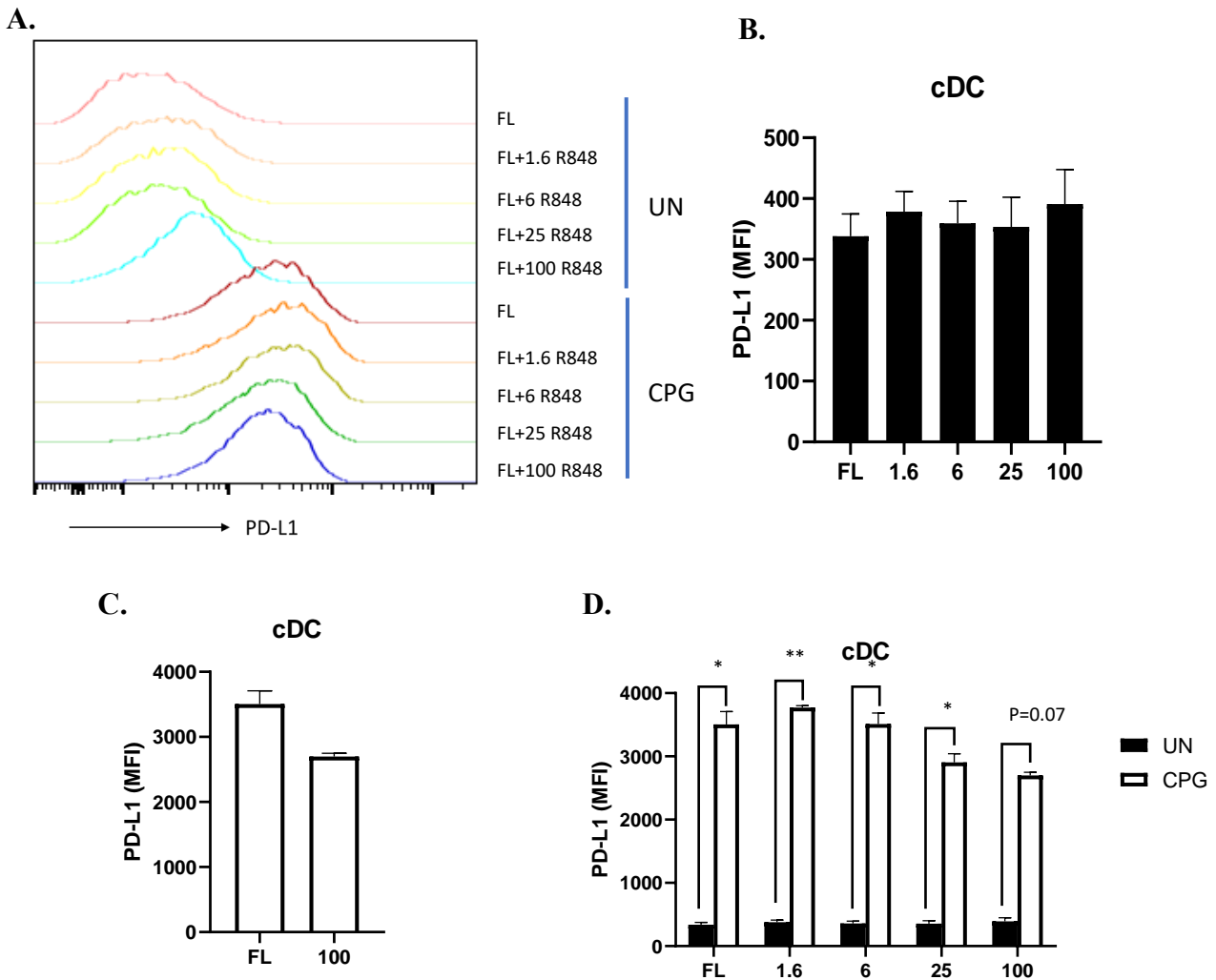


圖 13：cDC 的 PD-L1 表現量。(A)所有組別針對 PD-L1 蛋白的表現量，橫軸表 PD-L1 表現量，峰值高低代表位於該表現量的細胞數多寡。圖後數字代表 R848 刺激濃度，單位：ng/mL。(B)未經 CpG 刺激的 cDC 活性比較(PD-L1)，橫軸表不同濃度 R848 刺激(單位：ng/mL)，縱軸表 PD-L1 表現量(MFI)。以 FL 為對照組進行比較。(C)在 CpG 刺激下，於發育過程給予不同濃度 R848 刺激，PD-L1 的表現量變化。橫軸表不同濃度 R848 刺激(單位：ng/mL)，縱軸表 PD-L1 表現量(MFI)。以 FL 為對照組，100 為實驗組進行比較。(D)CpG 刺激對 PD-L1 的表現量影響，橫軸表不同濃度 R848 刺激(單位：ng/mL)，縱軸表 PD-L1 表現量(MFI)。各組以同濃度 R848 刺激下，UN 為對照組、CpG 為實驗組進行比較；「*」表示與對照組相比，數據具顯著差異(0.05>p>0.01)；「**」表示與對照組相比，數據具非常顯著差異(0.01>p>0.001)。

PD-L1 是一種程序性死亡配體(Programmed death ligand)，James P.Allison 教授在 2018 年因發現 PD-L1 與腫瘤及癌症的種種關係而獲得諾貝爾獎。然而，此標記除了可以治療癌症外，他在免疫系統為一種抑制型的訊號，隨著 PD-L1 的表現量提高，免疫系統的活性將會隨之下降，而由於先前的數據分析中，高濃度的配體刺激往往會造成促進型蛋白的表現量下降，因此決定分析 PD-L1 的表現，進已判定是否是因為免疫系統自身的調控機制造成此種現象，抑或是有其他可能性。

由圖 13 可知:

- (1) 將「UN」組別與「CpG」組別相互對照，可發現有經 CpG 後繼處理的組別，其 PD-L1 的表現量皆比未經處理的組別要高，且具顯著差異(如圖 13D.所示)，而未經 CpG 處理之組別，其大抵並無太大差異(如圖 13B.所示，唯 100ng/mL 的濃度與未加 R848 比較，p 值約為 0.08)由於 PD-L1 為抑制型訊號，因此推測病原體的入侵的確會啟動生理層面的自我防禦機制，避免因免疫反應太過強烈而造成自體免疫疾病。
- (2) 雖然 PD-L1 在高濃度 R848 且經 CpG 處理的組別下有微微下降，但經過 T-TEST 的分析後顯示並無與對照組有太大差異(如圖 13C.所示)，反觀 CD40 及 MHCII，其下降皆具顯著差異。故由此可推論，PD-L1 確實參與調節免疫系統的活性，且其可有效抑制高濃度時的免疫能力。

(二)Primary cell 驗證實驗

以小鼠骨髓細胞進行實驗，予以不同濃度的 R848 刺激，並以 CpG 再刺激後進行分析。所有實驗分析圖為流式細胞儀輸出數據後，以 FLOW-JO 軟體進行繪圖，統計圖表依照數據進行 T-TEST 運算後，以 PRISM 繪圖並標示顯著差異。

1. 傳統型樹突細胞(cDC)與漿狀樹突細胞(pDC)的分化

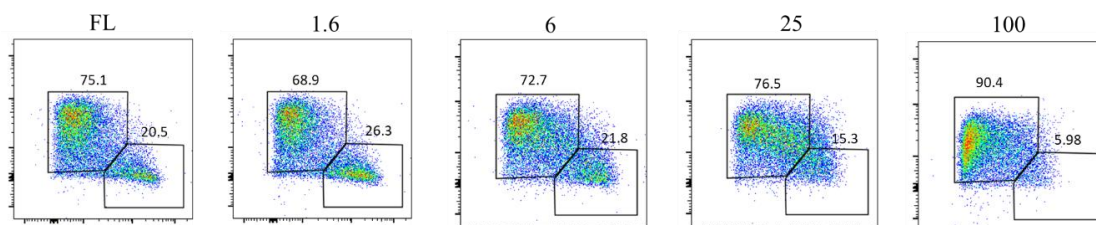


圖 14: 發育過程經不同濃度配體刺激對樹突細胞分化為 cDC 及 pDC 的比例分析圖，左上角之框線內為 cDC，而右下角框線內為 pDC，框線上方數字代表框線內細胞佔所有細胞之百分比(%)，每張圖上之數字代表不同處理之 R848 濃度(ng/mL)

由 Cell-line 實驗(圖 5)及 Primary cell(圖 14)綜合比較：

小鼠細胞實驗中，pDC 比例依然於低濃度時上升，高濃度時下降，符合細胞實驗時之趨勢，故推測細胞實驗所得之此部分結論適用於生物體。

2. cDC1 與 cDC2 的分化

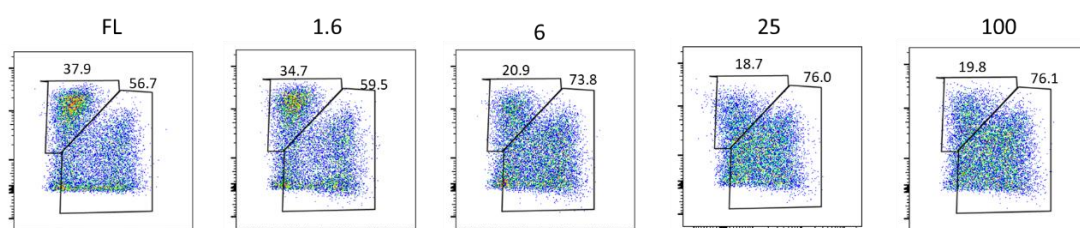


圖 15: 小鼠細胞實驗中 cDC1 與 cDC2 的比例，橫軸表示 sirpα 表現量，縱軸表示 CD24 表現量左上角框線內屬於 cDC1，右下角框線內屬於 cDC2。框線上方數字代表框線內細胞佔所有細胞之百分比(%)，每張圖上之數字代表不同處理之 R848 濃度(ng/mL)。

由 Cell-line(圖 8)及 Primary cell(圖 15)綜合比較：

- (1) 在細胞株實驗中，因為 Clone 10 細胞的特性，所有的傳統型樹突細胞皆屬於 cDC2，然而在小鼠細胞實驗中(如圖 15 所示)，則可進一步分化為 cDC1 及 cDC2。
- (2) cDC2 的功能主要為將抗原透過 MHCII 分子呈遞給 CD4⁺T 細胞，而 cDC1 則主要透過 MHC I 誘導 CD8⁺ 細胞獲得胞毒性 T 細胞的功能，指導 CTL 對細胞內病原及腫瘤做出反應，及交叉表現(cross presentation)。隨著兩者的活性及比例不同，生物體內的免疫系統可能被引導至執行不同的反應。

(3) 由圖 15 分析，在低濃度及無刺激的組別，圖上可看出明顯的分群，而中高濃度的刺激則會使的分界愈趨不明顯。再者，高濃度的刺激下，cDC1 的占比有減少的趨勢，而加入 CPG 後的組別減少又更為明顯。推測因為 cDC1 主要功能為對抗細胞內病原，然此次實驗所用配體皆屬於細胞外病原，因此 cDC1 的量會隨著配體濃度增加而減少，且減少至一定量後即不繼續減少，避免影響生物體之恆定。

3. cDC1、cDC2 細胞對 CD40 活性的分析

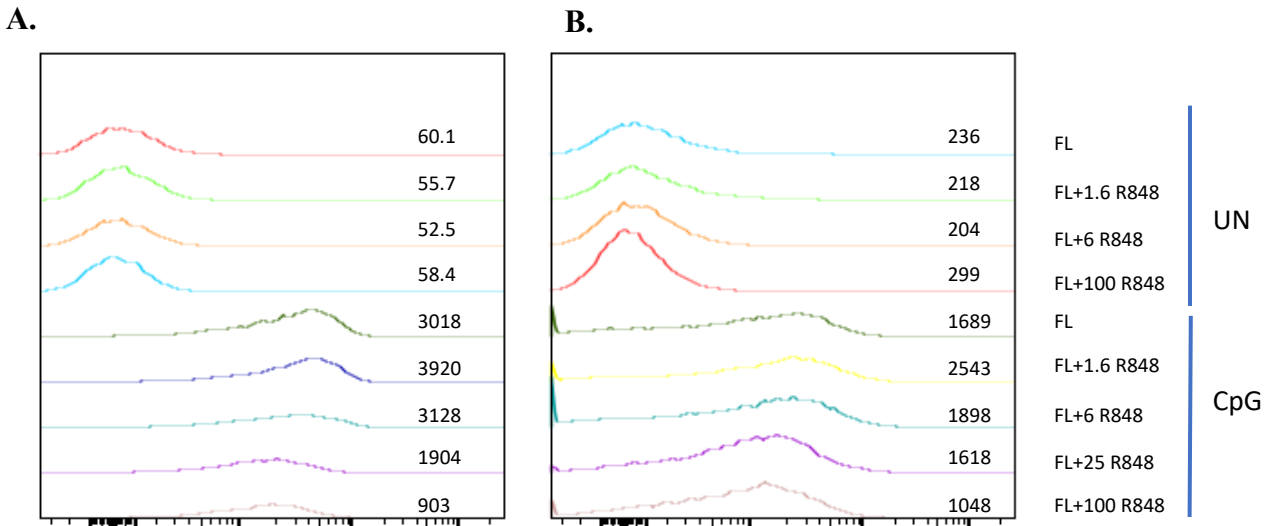


圖 16 : cDC1(A.)、cDC2(B.)針對 CD40 蛋白的表現量，橫軸表 CD40 表現量，峰值高低代表位於該表現量的細胞數多寡。圖後數字代表測定之 MFI 值，圖末之標示為變因，R848 濃度單位 :ng/mL。

由 Cell-line(圖 10)及 Primary cell(圖 16)綜合比較：

小鼠細胞實驗中，不論是 cDC1 或 cDC2，在未添加 CpG 的組別，其表現量皆無太大變化，而在有給予 CpG 刺激之組別，除表現量皆較未添加之組別高之外，其變化趨勢遵循高濃度刺激時表現量下降，與細胞實驗所推出的結論約一致，故推測細胞實驗所得之此部分結論適用於小鼠生物體。

4. cDC1、cDC2 細胞對 MHCII活性的分析

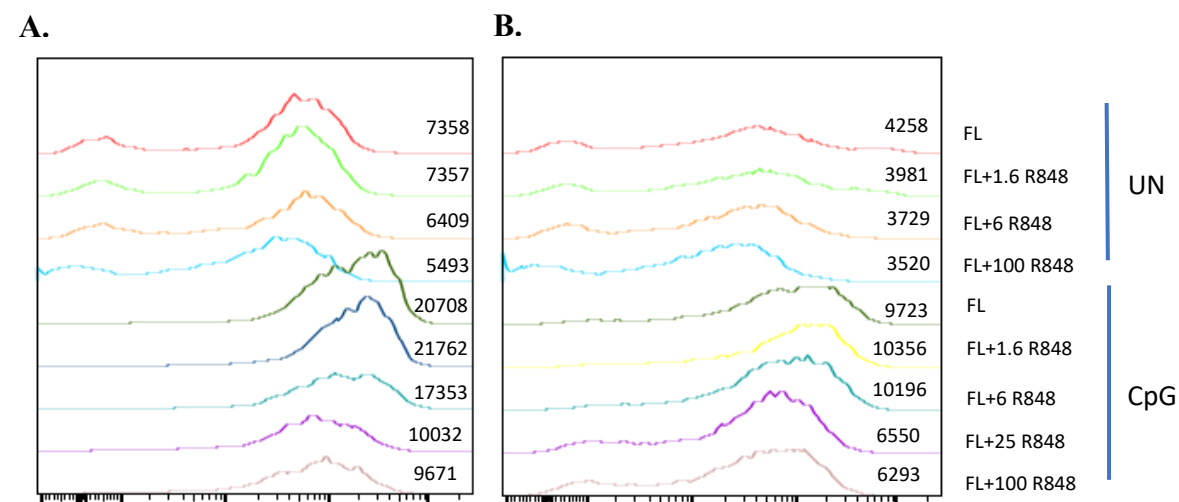


圖 17 : cDC1(A.)、cDC2(B.)針對 MHCII蛋白的表現量，橫軸表 MHCII表現量，峰值高低代表位於該表現量的細胞數多寡。圖後數字代表測定之 MFI 值，圖末之標示為變因，R848 濃度單位 :ng/mL。

由 Cell-line(圖 12)及 Primary cell(圖 17)綜合比較：

小鼠細胞實驗中，不論是 cDC1 或 cDC2，在未添加 CpG 的組別，其表現量皆無太大變化，而在有給予 CpG 刺激之組別，除表現量皆較未添加之組別高之外，其變化趨勢遵循高濃度刺激時表現量下降，與細胞實驗所推出的結論約一致，故推測細胞實驗所得之此部分結論適用於小鼠生物體。

5. cDC1、cDC2 細胞對 PD-L1 活性的分析

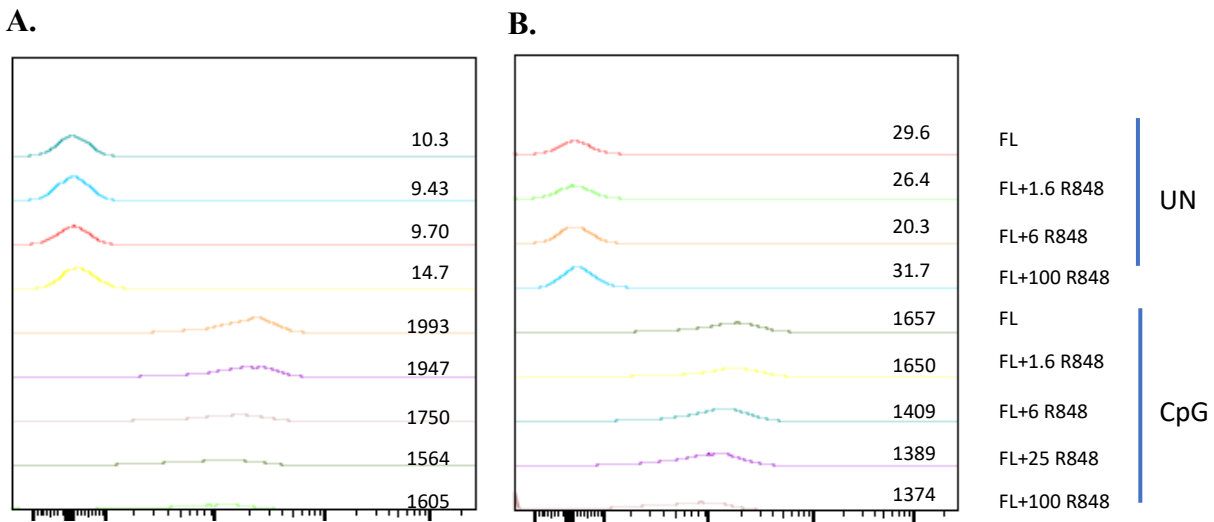


圖 18：cDC1(A.)、cDC2(B.)針對 PD-L1 蛋白的表現量，橫軸表 PD-L1 表現量，峰值高低代表位於該表現量的細胞數多寡。圖後數字代表測定之 MFI 值，圖末之標示為變因，R848 濃度單位：ng/mL。

由 Cell-line(圖 14)及 Primary cell(圖 18)綜合比較：

小鼠細胞實驗中，不論是 cDC1 或 cDC2，在未添加 CpG 的組別，其表現量皆無太大變化，而在有給予 CpG 刺激之組別，除表現量皆較未添加之組別高之外，其在發育過程給予高濃度刺激時，表現量較無顯著差異，與細胞實驗所推出的結論大約一致，故推測細胞實驗所得之此部分結論也適用於小鼠生物體。

(三) 綜合比較

1. pDC 的分化比例比較表(如表 16)

不論有無 CpG 刺激，前驅幹細胞在低濃度 R848 的持續刺激下，會分化出較多的 pDC，反之，在高濃度的情況，則會減少 pDC 的比例，這是 R848 調控樹突細胞發育的其中一項重要環節，這個現象同時也會導致生物體的免疫反應朝不同方向發展。

表 16：不同 R848 濃度刺激及有無 CpG 處理對 pDC 比例的影響。

Dose(R848 , ng/mL)	FL	CpG
FL	—	—
1.5625	★	★
6.25	—	—
25	—	—
100	▼	▼

「—」表示與對照組相比，數據無顯著差異($p>0.05$); 「★」表示與對照組相比，數據顯著上升($0.05>p>0.01$); 「▼」表示與對照組相比，數據顯著下降($0.05>p>0.01$)。紅色及綠色分別代表兩組之對照組。

2. CD40、MHCII、PD-L1 在有無 CpG 刺激下的表現量變化(如表 17-19)

在沒有 CpG 進行再刺激的情況下，分化出的傳統型樹突細胞，其 CD40、MHCII、PD-L1 的表現量大約一致。然而在經過 CpG 刺激後，低中濃度的組別，其表現量與對照組存在顯著差異，此現象也代表樹突細胞就算於發育過程持續遭受刺激，成熟後仍然需要特定的條件才會被活化。

表 17：不同 R848 濃度刺激及有無 CpG 處理對 CD40 表現量的影響。

Dose(R848 , ng/mL)	FL	CpG
FL	—	★
1.5625	—	★
6.25	—	★
25	—	★
100	—	—

「—」表示與對照組相比，數據無顯著差異($p>0.05$); 「★」表示與對照組相比，數據顯著上升($0.05>p>0.01$); 紅色代表對照組，比較方式為取相同 R848 濃度刺激的組別，將未經 CpG 處理之組別與經 CpG 處理之組別相互對照，並利用 T-TEST 統計運算所得之結果。

表 18：不同 R848 濃度刺激及有無 CpG 處理對 MHC II 表現量的影響

Dose(R848 , ng/mL)	FL	CpG
FL	—	★
1.5625	—	★
6.25	—	★
25	—	—
100	—	—

「—」表示與對照組相比，數據無顯著差異($p>0.05$); 「★」表示與對照組相比，數據顯著上升($0.05>p>0.01$); 紅色代表對照組，比較方式為取相同 R848 濃度刺激的組別，將未經 CpG 處理之組別與經 CpG 處理之組別相互對照，並利用 T-TEST 統計運算所得之結果。

表 19：不同 R848 濃度刺激及有無 CpG 處理對 PD-L1 表現量的影響。

Dose(R848 , ng/mL)	FL	CpG
FL	—	★
1.5625	—	★★
6.25	—	★
25	—	★
100	—	—

「—」表示與對照組相比，數據無顯著差異($p>0.05$); 「★」表示與對照組相比，數據顯著上升($0.05>p>0.01$); 「★★」表示與對照組相比，數據非常顯著上升($0.01>p>0.001$)。紅色代表對照組，比較方式為取相同 R848 濃度刺激的組別，將未經 CpG 處理之組別與經 CpG 處理之組別相互對照，並利用 T-TEST 統計運算所得之結果。

2. CpG 刺激下 CD40、MHCII、PD-L1 隨不同濃度 R848 刺激的表現量變化

在皆有接受 CpG 刺激的情況下，面對高濃度 R848 於發育過程持續給予刺激，將會使傳統型樹突細胞的 CD40、MHCII 兩種促進型蛋白的表現量下降。然而，抑制型蛋白 PD-L1 的表現量卻沒有受到影響。

表 20：在皆有 CpG 刺激的情況下，於發育時給予不同濃度 R848 刺激對 CD40、MHCII、PD-L1 表現量的影響。

Dose (R848 , ng/mL)	CD40	MHCII	PD-L1
FL+CpG	—	—	—
1.5625+CpG	—	—	—
6.25+CpG	—	—	—
25+CpG	—	—	—
100+CpG	▼	▼	—

「—」表示與對照組相比，數據無顯著差異($p>0.05$); 「▼」表示與對照組相比，數據顯著下降($0.05>p>0.01$)。紅色代表對照組，比較方式為取不同濃度刺激下的表現量，以未經過 R848 刺激為對照組，相互對照，並利用 T-TEST 統計運算所得之結果。

五、結論

1. R848 配體影響樹突細胞發育的層面包括細胞的分化比例及活性。
2. 樹突細胞並非隨時皆具有活性，需配體與受體接合後方能活化。
3. 低劑量(約 1.5ng/mL)的配體刺激使漿狀樹突細胞比例上升，高劑量的配體刺激(約 100ng/mL)則相反。
4. 在發育過程給予持續刺激，並於成熟後活化其功能，發現低劑量的刺激下，細胞具有較高的活性，反之，高劑量的刺激下，細胞活性減弱。
5. 自體免疫也同時參與樹突細胞的發育調控，並適時給予負回饋。
6. 利用小鼠細胞重複實驗，其趨勢與 Cell-line 實驗大致相符，推測此反應也可同步於生物體內發生。
7. R848 與樹突細胞間的交互作用(示意圖)

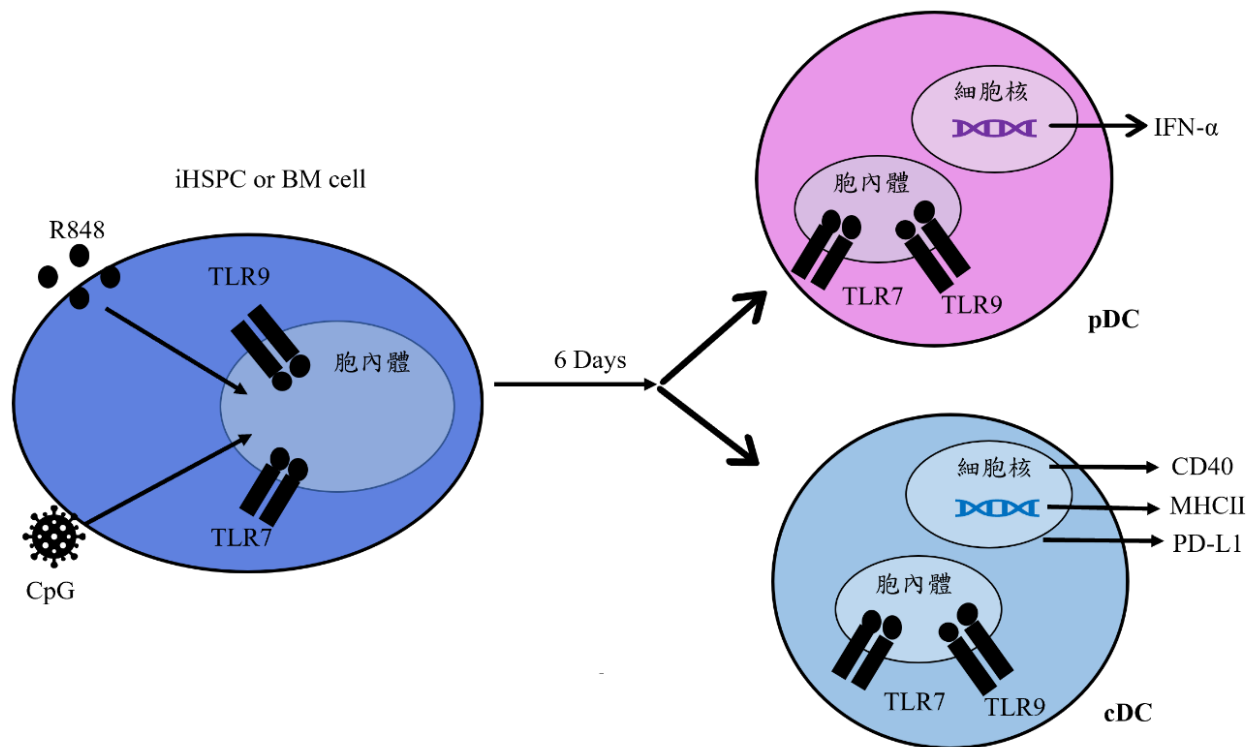


圖 19：R848 與樹突細胞間的交互作用示意圖

六、總結與未來應用性

在本研究，我們發現 R848 配體會影響免疫系統中樹突細胞的分化以及活性，例如，在低濃度的配體刺激下，pDC 的比例較對照組來說有上升的趨勢，然而中高濃度的情況，pDC 的分化量卻是下降。因此推測配體影響免疫系統的途徑之一是藉由誘導前驅幹細胞株分化成具不同功能的細胞，以此調節不同的免疫反應。我們也得知分化出的細胞，其活性與濃度並不成正相關，而是在某一最適濃度時，其活性具有最大值，而後活性隨濃度增加而遞減。因此，若日後我們成功將 R848 配體製成疫苗，將可利用此特性，配置配體的最適濃度，使得

人體具有最高的免疫力。

再者，我們也分析了細胞表面的 CD40 蛋白表現量，這類的蛋白也被利用在檢驗新冠病毒等嚴重傳染性疾病時，測量體內病毒殘餘量的依據。在文獻探討時我們發現，感染新冠病毒的患者，體內 CD4⁺細胞數量有明顯的下降趨勢，然而透過低濃度 R848 及 CPG 的協同刺激，我們成功在特定濃度下，使細胞群的 CD40 表現量增加，如此理論上應可促進 CD4⁺細胞的增長及干擾素的分泌。因此若我們進一步了解其應用機制，或許可藉由特定配體的刺激來對應患者體內輔助 T 細胞減少的情形，並使病情好轉。

第三，不論是在 CD40、MHCII 或是 PD-L1 的表現量，有經過 CpG 處理的組別，其表現都會較無處理組別更為明顯。綜合目前已知的資訊，我們推測樹突細胞並非在任何時刻皆為活化狀態，其機制應為接受不同刺激後，通過相對應的受體經歷化學反應，進而活化 cDC 及相關 T 細胞的功能。

而針對促進型蛋白(CD40、MHCII)在高濃度配體的刺激下，表現量會降低的反應，透過分析 PD-L1 的訊號可以得到驗證，表現量的降低應是細胞透過自身調節的途徑，為避免產生自體免疫疾病，所產生的自我防衛機制。因為在 PD-L1 的數據分析圖中可發現，越高濃度的刺激，PD-L1 的訊號(抑制型訊號)並沒有如促進型訊號般顯著下降，反倒與對照組無顯著差異。也因此我們推測其作用機制為，當生物體於發育過程中受到過度刺激，將會啟動 PD-L1 的抑制行為，進而使得分化出的細胞活性減弱，避免攻擊自身細胞，形成自體免疫反應，然而此機制卻有可能使的生物體防禦產生破口，例如在新冠肺炎患者的體內病毒量過高時，即有可能因此而影響其正常免疫系統的活性，使得防禦機制更難進行，若能針對此現象有更進一步的了解，或許能藉由調控 PD-L1 的表現，適度的增強免疫系統活性。

綜上所述，R848 影響免疫系統的機制包含改變細胞分化的比例，以及調控細胞表面蛋白的表現量，且其改變量具有一定的規律。因此，若我們能適度的改良 R848 配體，使其對人體有益，其應用價值將會相當廣泛，包括其可能可成為能對抗多種不同病原的疫苗，或是應用於刺激患者體內特定細胞的活性，進而利用增強的免疫力對付目前尚無藥物治療的病毒。更甚，由於 R848 可代表單股 RNA 病毒，也因此，R848 在此研究中對細胞造成的影響，極有可能也在真正感染冠狀病毒的患者體內同步發生。若我們能利用 R848 無毒性的特點將其發展為冠狀病毒的疫苗，或許能對現正肆虐全球的疫情帶來一線曙光。

七、未來研究規劃

(一)未來計畫之進度:

1. 將 T 細胞與樹突細胞共同培養(co-culture)，觀察 T 細胞的活性變化。
2. 測定不同變因下 pDC 的干擾素分泌量，進而了解低濃度刺激下 pDC 比例增加的原因。
3. 使用不同的配體(如:CpG、LPS)進行刺激，觀察其結果與 R848 是否有落差，並了解其原因。
4. 給予不同時間，同劑量的 R848 刺激(3hrs、6hrs、12hrs.....)，觀察刺激時間與細胞分化及活性間的關係。
5. 進一步深入了解 R848 與免疫系統間的作用機制(mechanism)，如此可對於實驗現象有更進一步的了解，並且在了解反應機制後，應用性將更深更廣。

(二)未來可接續之研究

1. 使用小鼠進行動物實驗，並採用注射方式注入配體，觀察其細胞之分布狀況及活性，如此可更貼近配體真正於生物體內的情況。
2. 進一步探究 R848 與新冠病毒(COVID-19)的關聯性，並研究其機制。
3. 將 R848 進行改良或與其他藥物搭配使用，並研究其作為人類疫苗之潛力。

八、參考文獻

1. David Vremec, Meredith O'Keeffe, Hubertus Hochrein, Martina Fuchsberger, Irina Caminschi, Mireille Lahoud, Ken Shortman. (2006). Production of interferons by dendritic cells, plasmacytoid cells, natural killer cells, and interferon-producing killer dendritic cells. *Immunobiology*.
2. Ee Shan Pang, Christophe Macri, Timothy Patton, Mariam Bafit and Meredith O'Keeffe. Dendritic Cells and Their Roles in Anti-Tumour Immunity. 10.5772/intechopen.91692.
3. Jessica R. Ingram, Michael Dougan, Mohammad Rashidian, Marko Knoll, Edmund J. Keliher, Sarah Garrett, Scott Garforth, Olga S. Blomberg, Camilo Espinosa, Atul Bhan, Steven C. Almo, Ralph Weissleder, Harvey Lodish, Stephanie K. Dougan & Hidde L. Ploegh(2017). PD-L1 is an activation-independent marker of brown adipocytes, *Nature Communications*, Article number: 647
4. Jincun Zhao, Christine Wohlford-Lenane, Jingxian Zhao, Erica Fleming, Thomas E. Lane, Paul B. McCray, Jr., and Stanley Perlman, bIntranasal. (2012) .Treatment with Poly(I·C) Protects Aged Mice from Lethal Respiratory Virus Infections. *Journal of Virology*, 11416 – 11424.
5. Liang, S. C. et al. (2003). Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur. J. Immunol.* 33, 2706–2716.
6. Marzi, A., Gramberg, T., Simmons, G., Möller, P., Rennekamp, A. J., Krumbiegel, M., & Steinkasserer, A. (2004). DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Journal of virology*.
7. Md Masud Alam, De Yang, Anna Trivett, Thomas J. Meyer and Joost J. Oppenheim. (2018). HMGN1 and R848 Synergistically Activate Dendritic Cells Using Multiple Signaling Pathways. *Immunol.*
8. Mustafa, Nafisa M. Elfadol, Naseem S. Murshed, Shaza W. Shantier, Abdelrafie M. Makhawi.(2020) Design of multi epitope-based peptide vaccine against E protein of human 2019-nCoV: An immunoinformatics approach, medRxiv and bioRxiv.
9. Noelle RJ, Roy M, Shepherd DM, Stamenkovic I, Ledbetter JA, Aruffo A (1992). "A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89.
10. Okazaki, T., Chikuma, S., Iwai, Y., Fagarasan, S., & Honjo, T. (2013). A rheostat for immune

responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nature Immunology*, 14(12), 1212-1218.

11. Rajkumar Noubade, Sonia Majri-Morrison and Kristin V. Tarbell. (2019). Beyond cDC1: Emerging Roles of DC Crosstalk in Cancer Immunity. *Immunol.*
12. Roche PA, Furuta K. (2015). "The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation". *Nature Reviews. Immunology.*
13. Salwa Refat El-Zayat , Hiba Sibaii and Fathia A. Mannaa. (2019) .Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bulletin of the National Research Centre* ,43:187.
14. Stephen L. Nutt and Michael. (2020). Transcriptional Networks Driving Dendritic Cell Differentiation and Function. *Immunity*,52.
15. Unanue, Emil R., Turk, Vito, Neefjes, Jacques (2016). Variations in MHC Class II Antigen Processing and Presentation in Health and Disease. *Annual Review of Immunology.*
16. Wen Lijun, Liu Haiyan, Laboratory of cellular and molecular tumor immunology , Medical College, Soochow University, Suzhou 215123,China.
17. Yu-Ling Hsiao (2018). Reprogramming of dendritic cell development by inflammation and infection.

【評語】 090024

此研究發現 R848 配體的濃度會影響免疫系統中樹突細胞的分化比例及其活性，並調控了免疫細胞表面的蛋白表現量，進而影響免疫系統。報告整理的很清楚明瞭，實驗之間的連接可以再詳細說明，加強連貫性。背景知識的介紹可以再清楚一點。