

2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 090011

參展科別 醫學與健康科學

作品名稱 探討 TLR7 作用劑對樹突細胞發育及功能的影響

得獎獎項 三等獎

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、TLR7 作用劑、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很多支持，才有今天參與 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。

摘要

樹突細胞在免疫系統中扮演關鍵的角色，不論是活化其他免疫細胞，或是產生細胞素調節免疫系統，都與不同種類的樹突細胞具高度相關。雖然目前已經了解成熟樹突細胞在免疫系統的重要性，但是樹突細胞由前驅幹細胞發育及分化的過程目前仍不清楚，且過程中若遭受刺激，其所造成的影響也有待研究。

本研究採用一種 TLR-7 作用劑 R848 刺激尚未分化的前驅幹細胞，觀察其發育過程及分化後之成熟細胞的影響。結果顯示在低濃度 R848 刺激下，漿狀樹突細胞的分化比例增加且功能增強，傳統型樹突細胞的免疫活性也上升。相反的，高濃度的 R848 則能顯著降低漿狀樹突細胞的比例及干擾素基因表現，傳統型樹突細胞的活性也顯著下降。綜合以上，我們發現不同濃度的 R848 有助於引導不同趨勢的免疫反應。另外，目前實驗結果支持了其作用機制可能為控制轉錄因子的活性，後續將更深入研究此機制。

Abstract

Dendritic cells play a vital role in the immune system, numerous immune responses such as activating T-helper cells or producing cytokines, are related to different subsets of dendritic cells. Although scientists have fully discovered the role of mature dendritic cells in the immune system, the process of dendritic cells differentiation from progenitor cells is still unknown, and whether stimulations during development will affect the activity and the function of mature cells requires further studies.

My research aims at developing the interactions between dendritic cells and a chemical compound R848, which could bind with Toll-like receptor 7, and simulate the infection model of single-strength RNA viruses. Results suggest that when low dose(1.5ng/mL) of R848 is treated during dendritic cell development, the percentages of plasmacytoid dendritic cells(pDCs) will increase, and the expression of interferon-related genes will increase as well. Moreover, by analyzing the expression of pro-inflammatory cytokine genes and anti-inflammatory cytokine genes, we also discover that the activity of conventional dendritic cells(cDCs) will enhance. However, when it comes to high doses of R848 stimulating, it shows an identically opposite tendency. The percentages of pDCs significantly decreased, along with the deactivation of cDCs. Above all, we conclude that different doses of R848 will lead to distinct trends of immune responses. Besides, preliminary result supports my hypothesis that the mechanism is related to the activity of transcription factors, and further studies are now processing.

一、前言

(一)、研究動機

2020 年初，新冠肺炎(COVID-19)的爆發凸顯了免疫系統的重要性，我們相信透過完整的了解免疫系統的運作，勢必能有效的減低病原對人類造成的傷害。而在免疫系統中，樹突細胞扮演著相當關鍵的角色。根據樹突細胞的種類不同，可分別進行抗原呈現、活化 T 細胞、B 細胞等其他種免疫細胞、分泌細胞素等多種功能，協助生物體對抗病原。然而，我們目前仍不清楚樹突細胞自前驅幹細胞開始的完整分化過程，而其調控因子以及與其他種物質的交互作用也有待深入研究。

目前已知樹突細胞上的類鐸受體是影響細胞的重要因子。隨著受體接收到的外來物質不同，將會引發不同的免疫反應及路徑，進而對整體免疫系統產生調控的效果。而多種的類鐸受體對應配體(TLR ligands)已被證明可與不同的類鐸受體接合，並引導下游反應的進行。其中最令我感興趣的是一種人工合成的化合物 R848，其可以模擬單股 RNA 病毒(包括冠狀病毒、流感等)對細胞所造成的刺激，也可引發相同的下游反應，而其完全無毒性的特點也是應用於臨床的最佳潛力。

由於樹突細胞的發育過程對其成熟後的功能及分化種類影響甚大，因此，我們希望深入了解 R848 對於樹突細胞發育過程的影響，並進一步了解其作用機制，期望能在未來將其應用於臨床，針對抵禦未知種類的 RNA 病毒或其他免疫疾病，產生一定的效用。

(二)、研究背景

1. 樹突細胞的種類及功能

目前已知免疫系統有許多可分化成多種細胞類型之能力的幹細胞，可進一步分化成許多種類免疫細胞的前驅幹細胞，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傳統型樹突細胞(conventional dendritic cells, cDC)及漿狀樹突細胞(plasmacytoid dendritic cells, pDC)兩種樹突細胞，其功能差異甚大。傳統型樹突細胞可利用其表面蛋白與 T 細胞進行抗原呈遞，也可執行活化輔助型 T 細胞、B 細胞等功能。而其本身也會分泌特定種類的細胞素調控免疫系統的運作。漿狀樹突細胞的主要功能則是分泌干擾素及其相關下游產物，以避免病原體的入侵及擴散。而樹突細胞表面皆有許多種類的類鐸受體(Toll-like receptor, TLR)，以接收外界訊號。

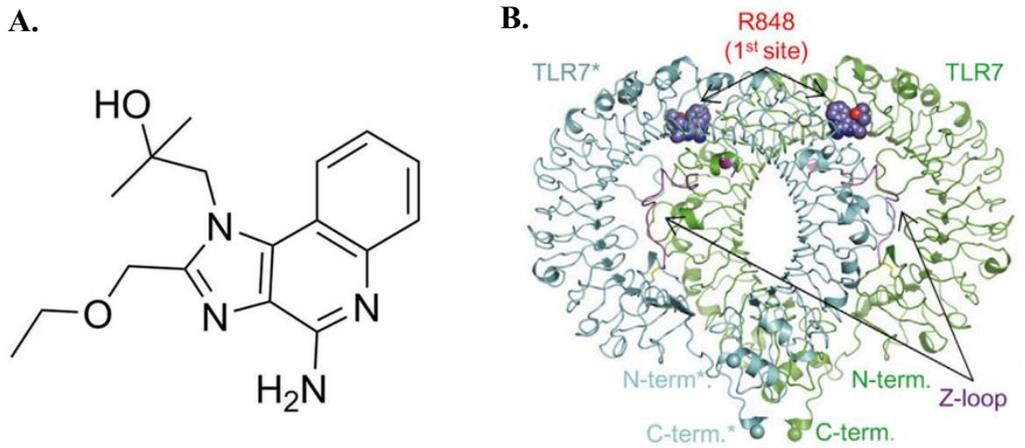
本研究之 cDC 及 pDC 之表面蛋白表現如下：

(1) cDC : CD11c⁺ B220⁻ CD11b⁺

(2) pDC : CD11c⁺ B220⁺ CD11b⁻

2. R848 的功能

R848 是一種人工合成的咪挫奎磷(imidazoquinoline)化合物，化學式為 C₁₇H₂₂N₄O₂，結構式如下圖所示。研究已表明 R848 可與類鐸受體 7 (TLR7) 接合，並藉由相關路徑引發免疫細胞的下游免疫反應。這種現象與單股 RNA 病毒的遺傳物質所引發的免疫反應相似，因此綜合歸納 R848 可模擬單股 RNA 病毒的感染模型。



C.

R848 is an imidazoquinoline and agonist of Toll-like receptors (TLRs) 7 and 8. It mimics the pathogen-associated molecular patterns that activate immune cells through TLR7 and TLR8, and thereby acts as an immune-response modifier. It demonstrates potent anti-tumor and anti-viral properties ($IC_{50} = 4.2 \mu M$; Seganish et al.) which appear to be mediated predominantly through the induction of cytokines, including interferon (IFN)- α and interleukin (IL)-12 due to stimulation of monocytes, macrophages, and dendritic cells (Bernstein et al.; Hattermann et al.; Nian et al.).

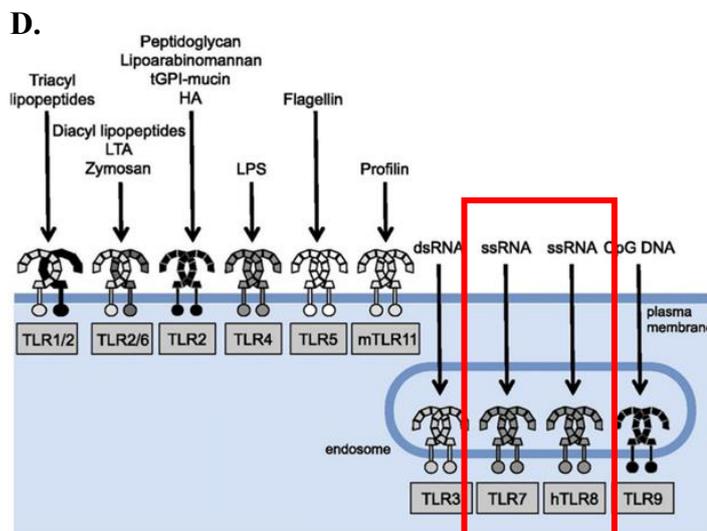


圖 1：關於 R848 的相關佐證資料。(A.)R848 的化學結構式，取自製造商 STEMCELL Technology 的官方網站。(B.)R848 配體與類鐸受體 7 的結合示意圖，圖中的紫色圓形小分子即為 R848，兩旁環狀結構為類鐸受體 7 (TLR7)。本圖取自 Zhikuan Zhang, Umeharu Ohto, Takuma Shibata, ... Structural Analysis Reveals that Toll-like Receptor 7 Is a Dual Receptor for Guanosine and SingleStranded RNA. *Immunity* 45, 737–748. October 18, 2016. ◦

(C.)證明 R848 可模擬與類鐸受體 7/8 互相接合的病原體感染模式。此資料取自 R848 製造商 STEMCELL Technology 的官方網站。(D.) 不同種類的刺激與類鐸受體的對應關係圖。由圖中紅框處可說明 TLR7/TLR8 主要與單股 RNA 遺傳物質對接。此圖摘錄自 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.

3. 轉錄因子在樹突細胞發育過程中的角色

轉錄因子在幹細胞分化為不同種類樹突細胞的過程中相當重要，目前已證實不同種類的樹突細胞需要不同種類的轉錄因子高表現或低表現，進而達到分化的效果。例如 pDC 仰賴 IRF-8、TCF-4 的高表達，cDC 則需要 ID-2 的大量表現，然而 ID-2 又同時會抑制 pDC 的分化。然而，目前我們仍不清楚在有特定刺激的環境下，轉錄因子的表現是否會有所變化。

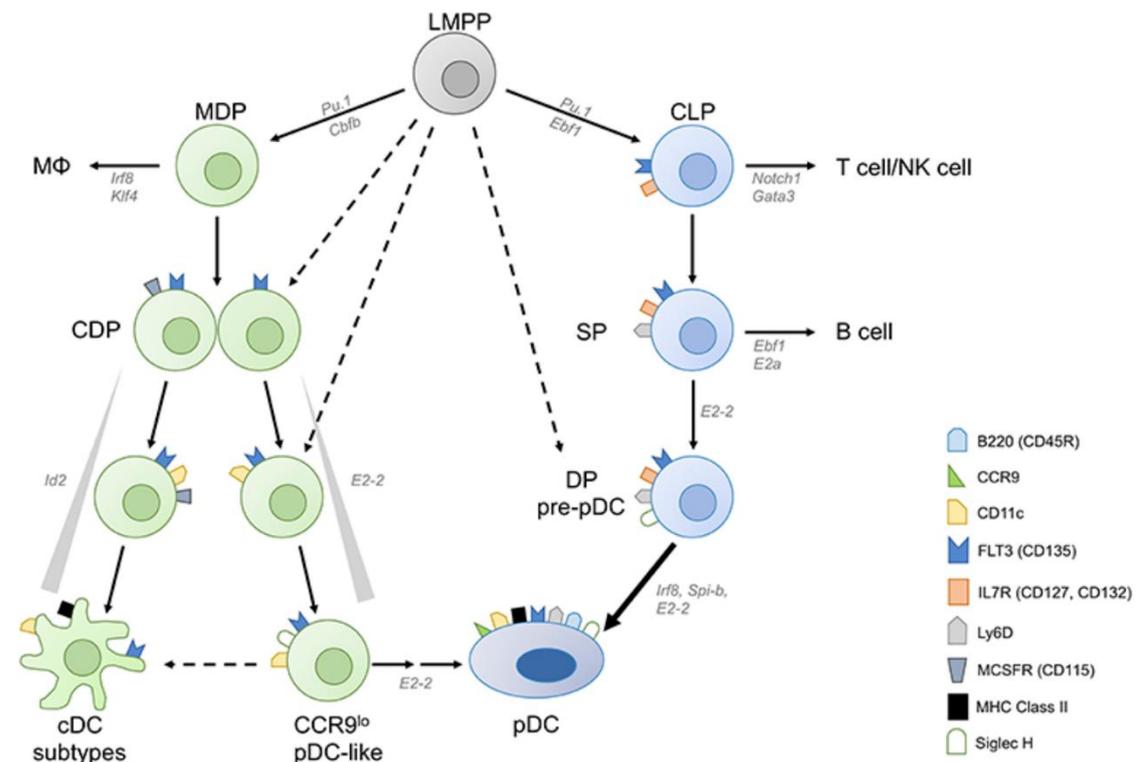


圖 2：關於樹突細胞發育過程中轉錄因子所扮演的角色。本圖取自 Andrea Musumeci, Konstantin Lutz, Elena Winheim and Anne Barbara Krug, What Makes a pDC: Recent Advances in Understanding Plasmacytoid DC Development and Heterogeneity, *Immunol*, 29 May 2019

4. 訓練性免疫與耐受性免疫

目前已知免疫系統可表達 2 種不同類型的免疫反應，分別為訓練性免疫及耐受性免疫。訓練性免疫為當生物體遇到第二次相同或類似的病原時，記憶型免疫細胞可先行快速引發反應，並且提升整體防禦強度，進以應對。然而耐受性免疫為生物體為避免免疫反應過度，而引起自體免疫反應等現象，透過特定路徑抑制免疫反應的表達，故其防禦強度會低於初次遇到抗原時的強度。

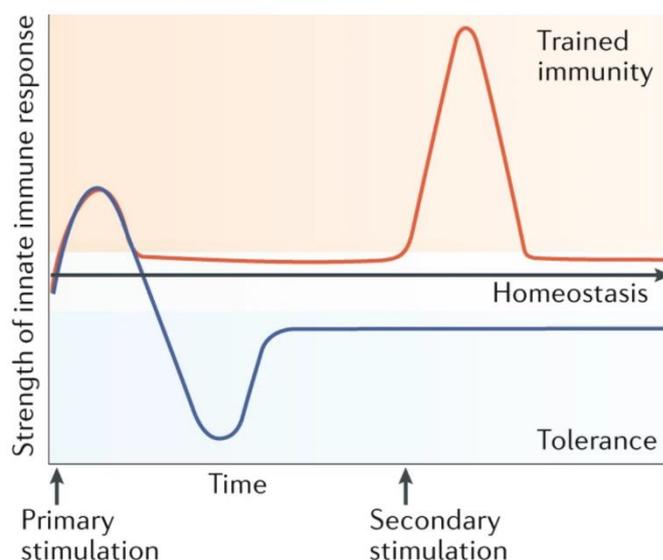


圖 3：耐受性免疫反應及訓練性免疫反應體內反應活性曲線圖。圖片及資料取自 Mihai G. Netea, Jorge Domínguez-Andrés, Luis B. Barreiro, Triantafyllos Chavakis, Maziar Divangahi, Elaine Fuchs, Leo A. B. Joosten, Defining trained immunity and its role in health and disease, *Nature Reviews Immunology*, 04 March 2020.

5. LPS(細菌脂多醣)對免疫系統產生的耐受性反應

圖 4 中的資料顯示 LPS 對免疫系統的耐受性反應。該研究發現，在樹突細胞中給予第一次的 LPS 刺激後，小鼠面臨第二次致死劑量的刺激時，其存活率會有所提升。進一步分析其細胞素表現的變化，發現樹突細胞所產生的促發炎細胞激素(pro-inflammatory cytokines)的表現下降，並且會開啟負回饋通道，減低免疫反應的強度，再配合其他實驗結果，得出 LPS 在一定濃度下將會使樹突細胞表現耐受性反應的特性。

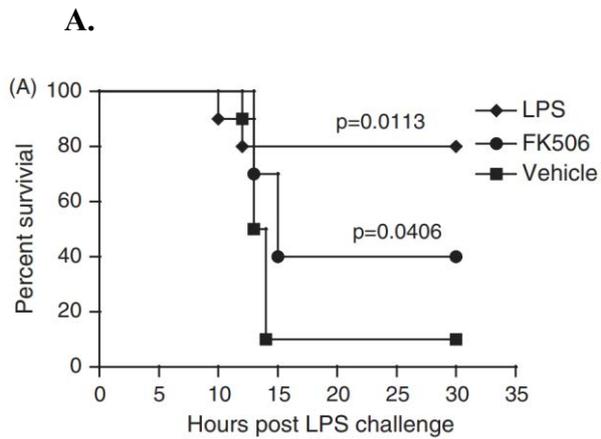


Fig. 4. FK506 protects against LPS-induced toxicity *in vivo*. C57BL/6 mice were injected with FK506 treatment regimen (see Materials and Methods), LPS priming dose (1 mg/kg), or the FK506 vehicle control (Vehicle). (A) After treatment, mice were challenged with a lethal dose (20 mg/kg) of LPS and observed in a blind study. Each experimental group consisted of 10 animals. Results shown are representative of three independent experiments. *P*-values shown on the graph were calculated using the Kaplan–Meier log rank test.

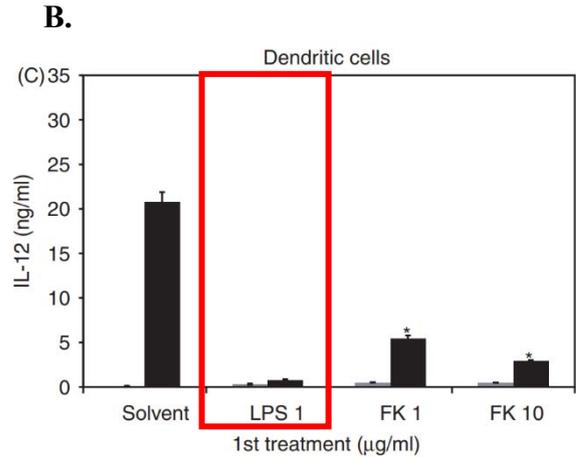


Fig. 2. FK506 induces a form of LPS tolerance in macrophages and dendritic cells *in vitro*. (A) Peritoneal macrophages, (B) RAW264.7 macrophage cell line, and (C) bone marrow-derived dendritic cells were treated for 20 h with an initial dose (first treatment) of LPS or FK506 at the indicated concentrations. Cells were then washed and treated with either medium alone (gray bars) or 2 µg/ml of LPS (black bars). Supernatants were collected and analyzed for TNF- α or IL-12 p40/p70 production by ELISA. Results shown represent the mean \pm SD of three independent experiments. **P* < 0.05 by Student's *t*-test when compared to untreated control.

圖 4：關於 LPS 耐受性的實驗。圖片及資料取自 Charay Jennings, Brenda Kusler, Patricia P. Jones, Calcineurin inactivation leads to decreased responsiveness to LPS in macrophages and dendritic cells and protects against LPS-induced toxicity *in vivo*, *Innate Immunity* 15(2) (2009) 109–120。(A.)小鼠在致死 LPS 劑量下的存活率。部分組別於施打致死劑量前先給予第一次輕量 LPS 刺激。(B.)細胞實驗中針對 LPS 進行 IL-12 在上清液中的濃度測定實驗結果。

(三)、研究目的

本研究之目的希望了解 R848 作用劑對於樹突細胞發育過程的影響，透過在前驅幹細胞時期加入刺激，觀察其發育過程，並分析其分化成不同細胞的比例及活性，以初步了解其影響層面。而後，以 q-PCR 技術進一步分析其下游產物細胞激素的基因表現，並且探討造成這些現象的原因。同步的，也分析轉錄因子在 R848 刺激下的表現變化，進而以上述實驗結果建構 R848 對於樹突細胞的運作模型。

二、研究方法或過程

(一)研究設備與器材

1. 本研究使用的細胞株：

細胞培養的前驅幹細胞 Immortalized HSPC[iHSPC, clone 10]

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

小鼠骨髓幹細胞 Primary cell、Total Bone Marrow

2. 設備

無菌式二氧化碳細胞培養箱

高速離心機

高階分選流式細胞儀

超微量核酸定量檢測儀器

聚合酶連鎖反應儀器

RNA 萃取套組(RNA Microprep)

微量分注器及吸管尖

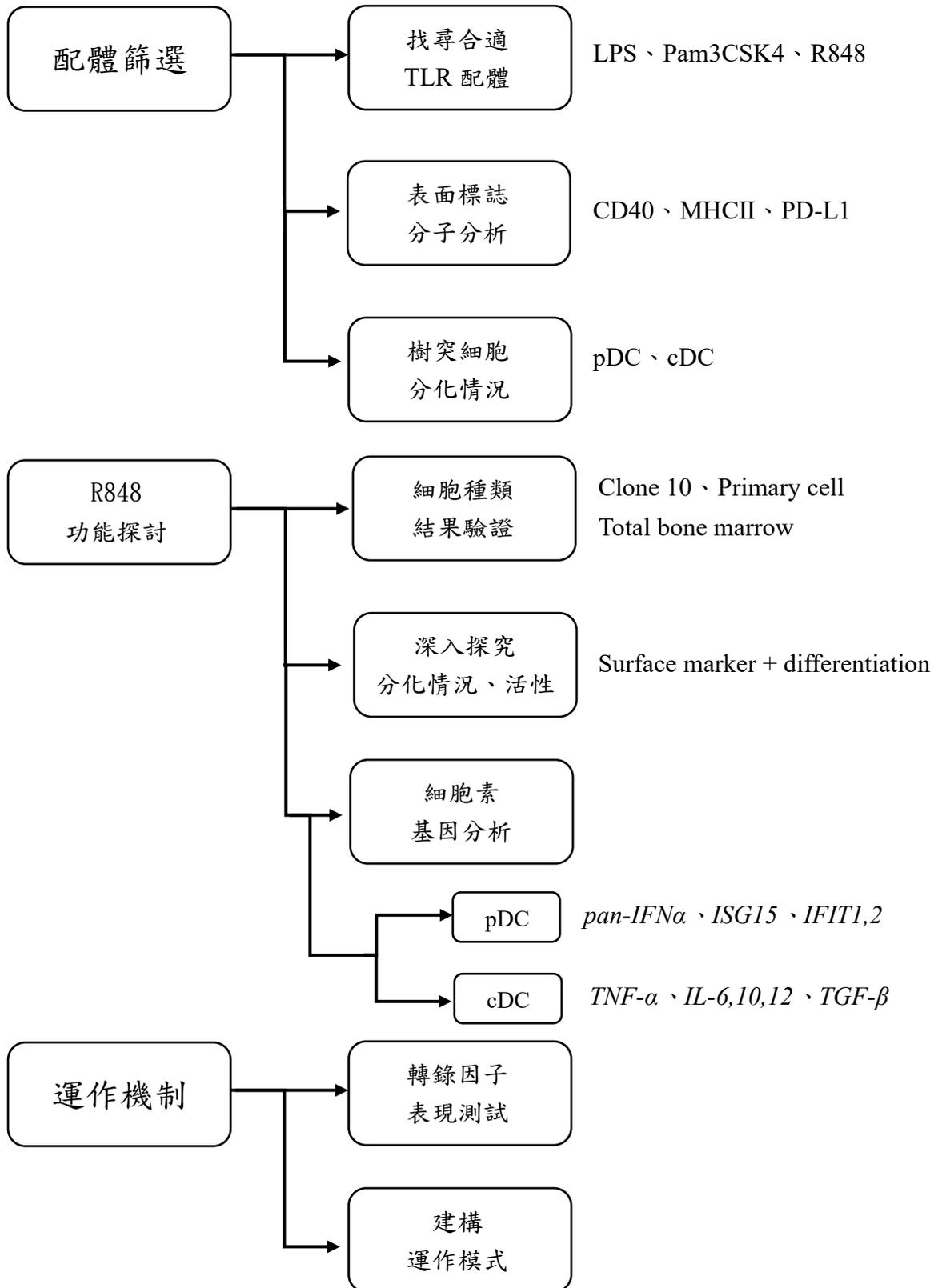
顯微鏡(400X)及細胞計數器

流式細胞儀樣本收集管及細胞濾網

3. 器材、藥品及試劑

RPMI 細胞培養液、磷酸鹽緩衝生理食鹽水、TLR7 agonist (R848)、Flt3 ligand、CpG ligand、staining buffer、RNAase-free water、ACK buffer、PE selection、FC blocker(Anti CD16-32)、台盼藍染劑、抗體(如步驟中所列)、TRIzol、dNTP、Taq for Hot-start、SYBR green、MgCl₂、PCR buffer、70%酒精(消毒用)、100%酒精(RNA 萃取使用)、15cc,50cc 離心管、12 孔盤、96 孔盤、Eppendorf、培養皿 (10cm-dish)

(二)研究架構圖



(三)實驗方法

1. 前驅幹細胞株(Clone 10)的培養及繼代

將原先使用的 10 公分培養皿中含有細胞的溶液轉移至 15 毫升離心管中，並將上述溶液以 500G 25°C 離心 5 分鐘，去除上清液後重新以 1 毫升含胎牛血清的 RPMI 培養液回溶，進行細胞計數後取其中 250ml 置入新的裝有 10 毫升細胞培養液的 10 公分培養皿中，使細胞均勻分散。而後加入雌二醇，阻止細胞分化，即完成細胞繼代。

2. 前驅幹細胞株(Clone 10)細胞取樣

將細胞自培養盤取出後以 700G 離心 5 分鐘，去除上清液並以 10 毫升磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)稀釋後以 700G 離心 5 分鐘，此步驟重複 2 次。而後以 1 毫升 RPMI 培養液將細胞回溶，進行細胞計數後即可依實驗要求配置每份含有固定細胞數的樣本。

3. 小鼠骨髓前驅幹細胞(Primary cell)細胞取樣

妥善將冷凍的小鼠骨髓細胞解凍後，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。將所有細胞(含培養液)以濾網過濾，自濾液中抽取 10 μ L 進行細胞計數，其餘細胞以 300G 離心 5 分鐘並去除上清液。在每 4×10^7 個細胞中，加入 FC blocker(Anti-CD 16-32)及 PE selection 各 50 μ L 並靜待 20 分鐘。而後，加入抗體 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各 0.75 μ L 以及 Biotin anti-mouse CD135 2 μ L，避光靜待 20 分鐘後以 5mL PE selection 回溶，離心並去除上清液後回溶於 100 μ L PE selection，並加入抗體 APC/Cyanine7 streptavidin 2 μ L

後避光等待 20 分鐘。將以抗體染色過後的樣本回溶於 1mL PE selection 並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。將分選出的細胞以 500G 離心 10 分鐘，並在每 2×10^4 個細胞中加入 100 μ L RPMI 培養液以及濃度為 10ng/mL 的 Flt3 ligand 1 μ L，並依照變因加入相應的刺激物後，即完成。

4. 小鼠骨髓細胞(Total bone marrow)細胞取樣

妥善將冷凍的小鼠骨髓細胞解凍後，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。將所有細胞(含培養液)以濾網過濾，自濾液中抽取 10 μ L 進行細胞計數，其餘細胞以 300G 離心 5 分鐘並去除上清液，並在每 2×10^4 個細胞中加入 100 μ L RPMI 培養液以及濃度為 100ng/mL 的 Flt3 ligand 1 μ L，並依照變因加入相應的刺激物後，即完成。

5. 分析不同種類的類鐸受體配體對於樹突細胞發育過程刺激的影響

為去除雌二醇，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，離心後移除上清液，重複上述步驟，加入 1mL RPMI 培養液，計算細胞數目。Clone 10 細胞採用 12 孔盤，每區含有 2×10^5 個細胞以及 1mL 的 RPMI 培養液。上述各樣本加入濃度為 100ng/mL 的 Flt3 ligand，並依據變因組合加入不同的類鐸受體配體及濃度，每份濃度樣本配置 2 份。(本次採用的配體包含 Pam3CSK4、LPS、R848，濃度包含 10000 μ g/mL、100 μ g/mL、1 μ g/mL)將樣本靜置於細胞培養箱中培養 2 天。並於第 3 天時個別將每份細胞轉移至不同的小型離心管(Eppendorf)中，並以 700G 在 4 $^{\circ}$ C 的環境離心 5 分鐘。確認細胞沉澱後，去除上清液並加入 1mL PBS，以 700G 的速度，在 4 $^{\circ}$ C 的環境離心 5 分鐘。重複上述步驟後，將個別每份細胞種回原先的培養盤中，並補充 1mL 的 RPMI 培養液以及濃度為 100ng/mL 的 Flt 3 Ligand. 將樣本於細胞培養箱中靜置一天，並於每份樣本中各加入 1mL 的 RPMI 培養液以及濃度為 100ng/mL 的 Flt 3 Ligand，

再使樣本靜置兩天。於第 6 天時將兩份濃度相同的樣本，其中一份加入濃度為 100ng/mL 的 CpG 配體進行二次刺激，再使樣本靜置一天。於分析前，將每份樣本取出後回溶於 1mL staining buffer，取出 10 μ L 進行細胞計數，而後離心(700G、5 分鐘)，去除上清液後加入 30 μ L 的 FC Blocker(Anti-CD 16-32)以及 70 μ L 的 staining buffer 並等待 15 分鐘。而後離心、去上清液，加入以下抗體並避光等待 15 分鐘。

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

而後，直接加入 APC/Cyanine7 streptavidin 0.2 μ L 並給予 15 分鐘反應時間，後加入 1mL staining buffer 離心並去上清液，回溶於 200 μ L staining buffer 即可以流式細胞儀分析。

6. 分析 R848 配體對於樹突細胞發育過程細胞種類變化及共同刺激分子的影響

為去除雌二醇，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，離心後移除上清液，重複上述步驟，加入 1mL RPMI 培養液，計算細胞數目。依據細胞種類的不同，Clone 10 細胞採用 12 孔盤，每區含有 2×10^5 個細胞以及 1mL 的 RPMI 培養液。Primary cell 採用 96 孔盤，每區含有 2×10^4 個細胞以及 0.1mL 的 RPMI 培養液，Total bone marrow 採用 12 孔盤，每區含有 2×10^5 個細胞以及 1mL 的 RPMI 培養液。上述各樣本加入濃度為 100ng/mL 的 Flt3 ligand，並依據變因組合加入濃度為 100 μ g/mL、25 μ g/mL、

12.5 μ g/mL、6.25 μ g/mL、1.5 μ g/mL 的 R848 (Total bone marrow 因敏感度與其他不同，為達等效濃度效果，所有濃度皆為原先 10 倍計)，每份濃度樣本配置 2 份。將樣本靜置於細胞培養箱中培養 2 天。於第 3 天時個別將每份細胞轉移至不同的小型離心管(Eppendorf)中，並以 700G 在 4°C 的環境離心 5 分鐘。確認細胞沉澱後，去除上清液並加入 1mL PBS，以 700G 的速度，在 4°C 的環境離心 5 分鐘。重複上述步驟後，將個別每份細胞種回原先的培養盤中，並補充 1mL 的 RPMI 培養液以及濃度為 100ng/mL 的 Flt 3 Ligand。將樣本於細胞培養箱中靜置一天，並於每份樣本中各加入 1mL 的 RPMI 培養液以及濃度為 100ng/mL 的 Flt 3 Ligand，再使樣本靜置兩天(Primary cell 為 1 天)。於第 6 天(Primary cell 為第五天)時將兩份濃度相同的樣本，其中一份加入濃度為 100ng/mL 的 CpG 配體進行二次刺激，再使樣本靜置一天。於分析前，將每份樣本取出後回溶於 1mL staining buffer，取出 10 μ L 進行細胞計數，而後離心(700G、5 分鐘)，去除上清液後加入 30 μ L 的 FC Blocker(Anti-CD 16-32)以及 70 μ L 的 staining buffer 並等待 15 分鐘。而後離心、去上清液，加入以下抗體並置於黑暗中等待 15 分鐘。

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

而後，直接加入 APC/Cyanine7 streptavidin 0.2 μ L 並給予 15 分鐘反應時間，後加入 1mL staining buffer 離心並去上清液，回溶於 200 μ L staining buffer 即可上機分析。分析之項目設定為分化後不同種類樹突細胞的比例，以及其表面共同刺激分子蛋白的表現量(CD40、MHCII、PD-L1)。

7. 分析 R848 配體對於樹突細胞細胞素基因的表現調控：樣本準備

將培養好的細胞置入 15mL 的離心管中，離心後移除上清液，而後加入 10mL PBS，離心後移除上清液，重複上述步驟，加入 1mL RPMI 培養液，計算細胞數目。採用 6 孔盤，每區含有 2×10^6 個細胞以及 3mL 的 RPMI 培養液。上述各樣本加入濃度為 100ng/mL 的 Flt3 ligand，並依據變因組合加入濃度為 100 μ g/mL、25 μ g/mL、1.5 μ g/mL 的 R848，每份濃度樣本配置 4 份。將樣本靜置於細胞培養箱中培養 2 天。於第 3 天時個別將每份細胞轉移至不同的小型離心管(Eppendorf)中，並以 700G 在 4°C 的環境離心 5 分鐘。確認細胞沉澱後，去除上清液並加入 1mL PBS，以 700G 的速度，在 4°C 的環境離心 5 分鐘。重複上述步驟後，將個別每份細胞種回原先的培養盤中，並補充 3mL 的 RPMI 培養液以及濃度為 100ng/mL 的 Flt 3 Ligand. 將樣本於細胞培養箱中靜置一天。而後，使用高階流式細胞儀將樣本中已分化之細胞分選為 pDC 及 cDC，並分別分裝。而後將每份變因的 pDC、cDC 細胞個別培養至 96 孔盤，並分別在 1 小時、3 小時、6 小時於其中一個樣本加入濃度為 100ng/mL 的 CpG 刺激。

8. 分析 R848 配體對於樹突細胞細胞素基因的表現調控：RNA 萃取

將上述各樣本加入 750 μ L 的 TRIzol 試劑，與細胞混合均勻後再加入濃度為 98-100%的酒精且混合均勻。吸取其中 750 μ L 溶液，並加入 Direct-zol™ RNA Microprep 套組所附之 IC Column 中，以 14000G 離心 30 秒，吸取下管之液體並丟棄後，將剩餘的 750 μ L 重複上述動作。完成後，將每個樣本加入 400 μ L 的 RNA wash buffer 於 IC Column 上方，並以 14000G 離心 30 秒。而後在 RNAase-free tube 中，為每份樣本配置包含 5 μ l DNase I (6 U/ μ l),以及 35 μ l DNA Digestion Buffer 的溶液，並立刻添加至 IC Column 上方。將處理好的樣本於室溫下靜置 20 分鐘。而後加入 400 μ l Direct-zol™ RNA PreWash 並以 14000G 離心 30 秒。去除下管之廢液後重複加入 400 μ l Direct-zol™ RNA PreWash 並以 14000G 離心 30 秒，去除下管之廢液。接下來，加入 700 μ l RNA Wash Buffer，並以 14000G 離心

1 分鐘，確保所有的 wash buffer 徹底從 IC Column 移除。接著，緩慢的將 IC Column 移至 RNAase-free tube 上方。為徹底萃取 RNA，將每份樣本的 IC Column 直接垂直加入 17 μ L DNase/RNase-Free Water 至 column matrix 上方，並以 14000G 離心 30 秒。重複吸取 RNAase-free tube 中的溶液再次加至 column matrix 上方，並以 14000G 離心 30 秒。

9. 分析 R848 配體對於樹突細胞細胞素基因的表現調控：RNA 反轉錄

為每份樣本準備包含由步驟 8 得到的 RNA 萃取液(先從 17 μ L 中抽取 2 μ L 進行 RNA 含量測定)，以及 5 μ L 的 5x TransAmp Buffer、1 μ L 的 Reverse Transcriptase，將上述三種溶液混合均勻，並在 PCR 機器設定以下運作程式。攝氏 25 度 10 分鐘，42 度 15 分鐘，48 度 15 分鐘，85 度 5 分鐘，以及最後冷卻於 4 度。待 cDNA 反轉錄完成，將產物依照 RNA 測定濃度以 10mM Tris-HCl 回溶，即可保存於-20 度環境，以便進行後續 qPCR 實驗。

10. 分析 R848 配體對於樹突細胞細胞素基因的表現調控：qPCR

將欲測定的樣本自-20 度環境取出退冰後，混合均勻，並自每份樣本中取出 2 μ L 混合成標準品 1 (Standard 1, ST01)，而後依照 4 倍序列稀釋依序製造標準品 2、3、4、5 (ST02-ST05)。為標準化樣品，為每份樣品準備包含以下材料的 qPCR 配方：5.17 μ L 蒸餾水、0.5 μ L 2mM dNTP、0.6 μ L 25mM MgCl₂、1 μ L 10X PCR buffer、0.5 μ L 10uM RpL7 primer(F+R)、0.03 μ L SYBR green、0.2 μ L HS Taq，溶液總體積為 8 μ L。將上述溶液全部混合均勻，並加入 96 孔 qPCR 盤中，而後加入樣本。標準品也按上述步驟配置並進行 qPCR 流程。將儀器設定為 95 度 15 分鐘、60 度 20 分鐘、72 度 20 分鐘、80 度 20 分鐘、72 度 10 分鐘、95 度 1 分鐘、60 度 20 分鐘、以及最後冷卻於 4 度。待流程結束後即可以 RpL7 基因表現為基準標準化並分析結果。若欲分析其他基因表現，將上述步驟的 0.5 μ L 10uM RpL7 primer(F+R) (畫底線部分)更改為欲測定的基因種類引子即可。本研究中採用的基因引子包含：

10uM RpL7 primer(F+R)、10uM pan-IFN α primer(F+R)、10uM IFIT1 primer(F+R)、
10uM IFIT2 primer(F+R)、10uM ISG15 primer(F+R)、10uM TNF- α primer(F+R)、
10uM IL-6 primer(F+R)、10uM IL-10 primer(F+R)、10uM IL12-p40 primer(F+R)。

11. 分析 R848 配體對於樹突細胞分化調控的機制：轉錄因子樣本準備

將培養好的細胞置入 15mL 的離心管中，離心後移除上清液，而後加入 10mL PBS，離心後移除上清液，重複上述步驟，加入 1mL RPMI 培養液，計算細胞數目。採用 12 孔盤，每區含有 5×10^5 個細胞以及 1mL 的 RPMI 培養液。上述各樣本加入濃度為 100ng/mL 的 Flt3 ligand，並依據變因組合準備 2 份細胞，其中一份加入濃度為 100 μ g/mL 的 R848，每份濃度樣本配置 1 份即可。將樣本靜置於細胞培養箱中培養 2 天。於第 3 天時個別將每份細胞轉移至不同的小型離心管 (Eppendorf) 中，並以 700G 在 4°C 的環境離心 5 分鐘。確認細胞沉澱後，去除上清液並加入 750 μ L 的 TRIzol 試劑，而後依照步驟 **8.分析 R848 配體對於樹突細胞細胞素基因的表現調控：RNA 萃取的方式** 以及 **9.分析 R848 配體對於樹突細胞細胞素基因的表現調控：RNA 反轉錄** 的步驟接續進行 RNA 萃取以及反轉錄即可完成樣本製備。

12. 分析 R848 配體對於樹突細胞分化調控的機制：轉錄因子 qPCR 基因分析

依照步驟 **10.分析 R848 配體對於樹突細胞細胞素基因的表現調控：qPCR** 準備各項 qPCR 樣本並上機即可。唯在 qPCR 配方配製階段，將引子改為下列各種引子：10uM RpL7 primer(F+R)、10uM Zeb-2primer(F+R)、10uM BatF3 primer(F+R)

三、研究結果與討論

(一)分析不同種類類鐸受體配體對樹突細胞的影響

LPS :

LPS 對樹突細胞的影響已被研究，Jennings 等人(2009) 在研究 LPS 配體(細菌脂多醣)對免疫細胞的影響時，發現 LPS 配體在特定濃度下，將會使免疫系統產生耐受性反應。(詳見研究報告第 8 頁)

Pam3CSK4 :

Pam3CSK4 是一種 TLR2 配體，由圖 5，我們發現高濃度的 Pam3CSK4(大於 100ng/mL)會使漿狀樹突細胞的比例顯著減少。而在高達 10000ng/mL 的情況下，漿狀樹突細胞大量降低(如圖 5(A))。另外，在傳統型樹突細胞的表面標誌表現上，我們發現高濃度的 Pam3CSK4 刺激也會使得 CD40、PD-L1 等的表現降低，反而 MHCII 的表現並沒有顯著差異(如圖 5B.)。綜上所述，高濃度的刺激會使得樹突細胞對於 Pam3CSK4 會產生耐受性反應。

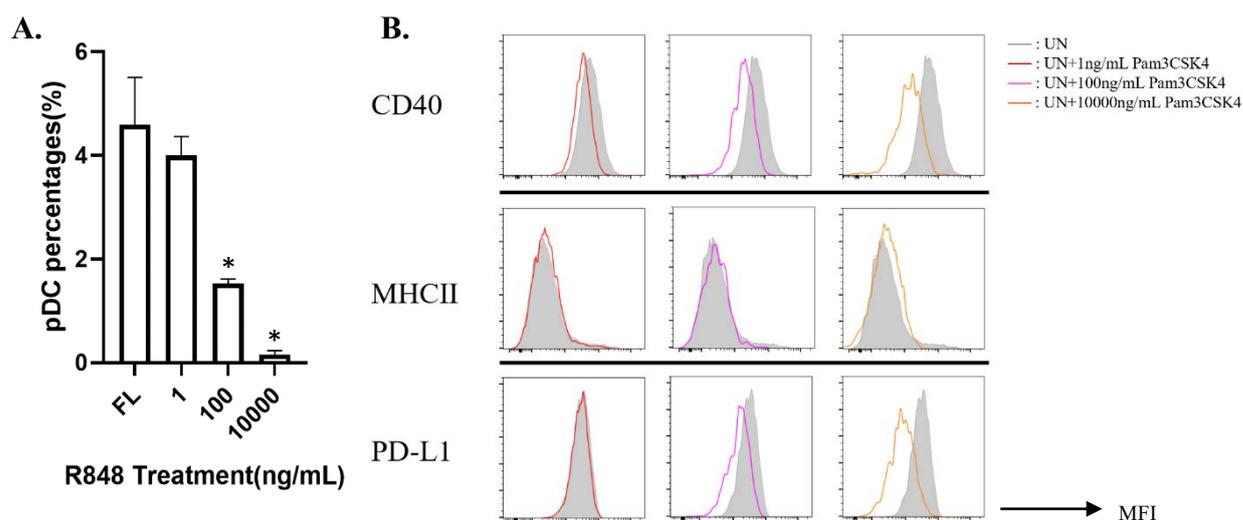


圖 5：樹突細胞在 Pam3CSK4 (TLR2 配體)刺激下的影響。(A.)成熟細胞的漿狀樹突細胞(pDC)比例變化。縱軸為細胞百分比(%),橫軸為 Pam3CSK4 刺激濃度(單位:ng/mL) 各組以 FL(未添加 Pam3CSK4)為對照組、不同濃度處理為實驗組進行比較;「*」表示與對照組相比,數據具顯著差異(0.05>p)(B.)傳統型樹突細胞(cDC)的表面標誌表現變化。組

圖由上至下分別為 CD40、MHCII、PD-L1 的表現量，各組間以粗黑線間隔。鋪色灰底為對照組(未添加 Pam3CSK4)，紅線為 1ng/mL Pam3CSK4 刺激下的表現量，桃紅色為 100ng/mL Pam3CSK4 刺激下的表現量，橘色為 1000ng/mL Pam3CSK4 刺激下的表現量(如右上標示)。各圖中橫軸為偵測之蛋白表現量(單位為 MFI，以右為正)，縱軸為該表現量下的細胞數量。

R848：

R848 對樹突細胞的影響，初步結果已發表於 2021 年北市科展，其後仍持續進行深入研究。為避免內容重複及維持實驗數據的完整性，將深入探討之 R848 對樹突細胞反應共同呈現於下一節 **2.深入分析 R848 刺激對樹突細胞的分化比例及表面標誌分子影響** 中。

(二)深入分析 R848 刺激對樹突細胞的分化比例及表面標誌分子影響

(此部分結果已於 2021 年北市科展發表)

在低濃度的 R848(1.6ng/mL)刺激下，分化為 pDC 的細胞比例相較於對照組顯著提升(如圖 6A.)，可能代表著細胞可產生第一型干擾素(IFN-I)的量漸增。由於第一型干擾素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配體的刺激下，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。關於此部分的内容會在後續進行細胞素基因檢測時做進一步的探討。

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。關

於高濃度下漿狀樹突細胞比例減少的現象，後續會對導致此現象的機制進行深入研究。另外，在高濃度(100 ng/mL)的 R848 刺激下，我們發現傳統型樹突細胞中 CD40 以及 MHCII 的表現量相較於對照組顯著降低，而 PD-L1 卻沒有顯著變化。由於 CD40 以及 MHCII 為促進型共同刺激分子，而 PD-L1 為抑制型刺激分子，藉由數據可知，在高濃度情況下，R848 在發育過程中的刺激會導致傳統型樹突細胞的活性減低，故 R848 在特定濃度下也可引導樹突細胞產生耐受性反應。

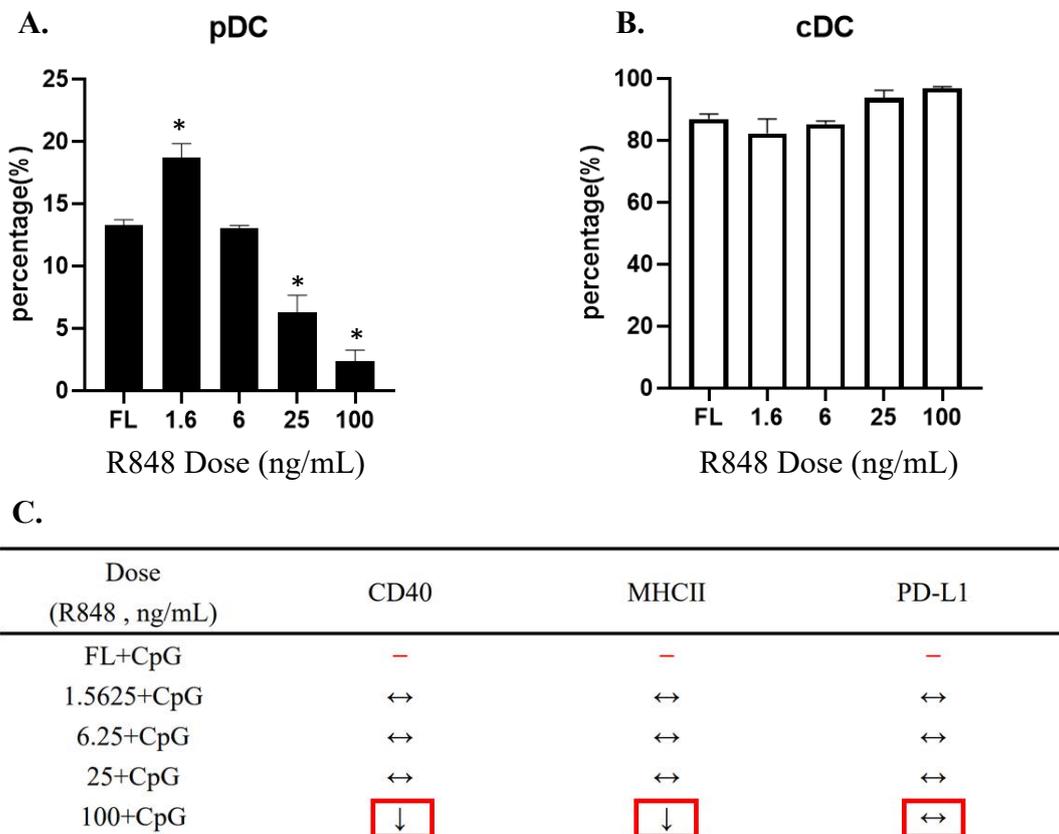


圖 6：樹突細胞在 R848 (TLR7 配體)刺激下的影響。(A.)成熟細胞的漿狀樹突細胞(pDC)比例變化。縱軸為細胞百分比(%), 橫軸為 R848 刺激濃度(單位: ng/mL) 各組以 FL(未添加 R848)為對照組、不同濃度處理為實驗組進行比較;「*」表示與對照組相比, 數據具顯著差異(0.05>p) (B.) 成熟細胞的傳統型樹突細胞(cDC)比例變化。縱軸為細胞百分比(%), 橫軸為 R848 刺激濃度(單位: ng/mL) 各組以 FL(未添加 R848)為對照組、不同濃度處理為實驗組進行比較。(C.) 成熟細胞的傳統型樹突細胞(cDC)表面標誌表現變化表。--代表對照組。「↔」代表與對照組相比, 數據不具有顯著差異。「↓」代表與對照組相比, 數據顯著下降。

(三)R848 刺激對成熟傳統型樹突細胞的 *TNF-α* 基因表現影響

TNF-α 為一種腫瘤壞死因子，其對抑制病毒所引導的細胞變異具有劑量依賴性(即劑量越高，抗病毒能力越強)，前人研究證實其對於 RNA 或 DNA 病毒均具有抑制作用。*TNF-α* 與干擾素的反應機制無關，也不為專一性免疫反應。在病毒學方面，其除了可使細胞產生抗病毒的功能外，也可選擇性的使受病毒感染的細胞凋亡。綜上，*TNF-α* 為一種促炎性細胞因子(pro-inflammatory cytokines)。

本研究發現，在低濃度(1.5ng/mL) R848 刺激下，*TNF-α* 的基因表現有上升趨勢。相反的，在 25ng/mL 開始，基因表現與對照組相比呈下降趨勢，並其表現隨濃度上升而抑制愈顯著。圖(7)的實驗結果充分的顯示這個趨勢，我們也發現了 R848 極有可能會針對促炎性細胞素基因進行調節，進而藉此影響免疫系統的活性。為驗證這項說法，我們接續分析了其他種類的促發炎細胞素基因，並觀察其隨 R848 濃度而產生的變化。

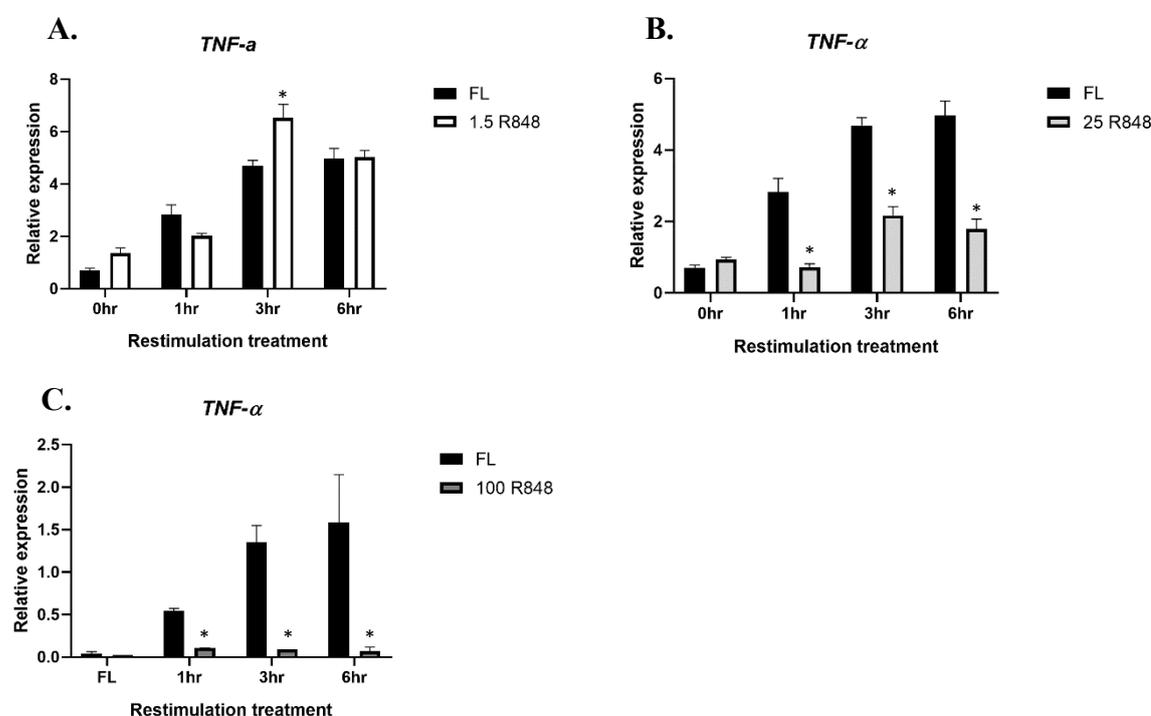


圖 7：成熟傳統型樹突細胞的 *TNF-α* 基因表現量。各組以 RpL7 為標準基因，進行 qPCR 擴增後，將 *TNF-α* 基因對 RpL7 標準化，並計算其相對表現量(Relative expression)。各圖中縱軸為相對表現量（無單位），橫軸為進行二次刺激時間（單位：

小時)。(A.)為發育過程中給予 1.5ng/mL R848 刺激後，成熟的傳統型樹突細胞中 *TNF- α* 基因相對表現量（以白色表示）。(B.)為給予 25ng/mL R848 刺激，以淺灰色表示。(C.)為給予 100ng/mL 刺激，以深灰色表示。對照組以黑色表示。「*」表示與對照組相比，數據具顯著差異(0.05>p)。

(四)R848 刺激對成熟傳統型樹突細胞的 *IL-6* 基因表現影響

IL-6 是一種白細胞介素(又稱介白素)，其功能主要為活化 B 細胞，並參與多種體內免疫反應，包括活化 T 細胞，並促進漿細胞的分化等。不過，由於 *IL-6* 參與多種的發炎反應，因此其也是導致細胞素風暴(Cytokines storm)的主要成員之一。目前也已被證實，*IL-6* 的阻斷劑能有效的治療新冠肺炎患者的重症症狀。

本研究實驗數據顯示，在低濃度(1.5ng/mL) R848 刺激下，*IL-6* 的基因表現與對照組相當。而自 25ng/mL 開始，基因表現與對照組相比呈下降趨勢，並其表現隨濃度上升而愈趨抑制。因此，我們認為 R848 可能具有調節免疫系統，並避免免疫反應過度的功能。後續將透過分析更多種類的細胞素基因來統整並驗證。

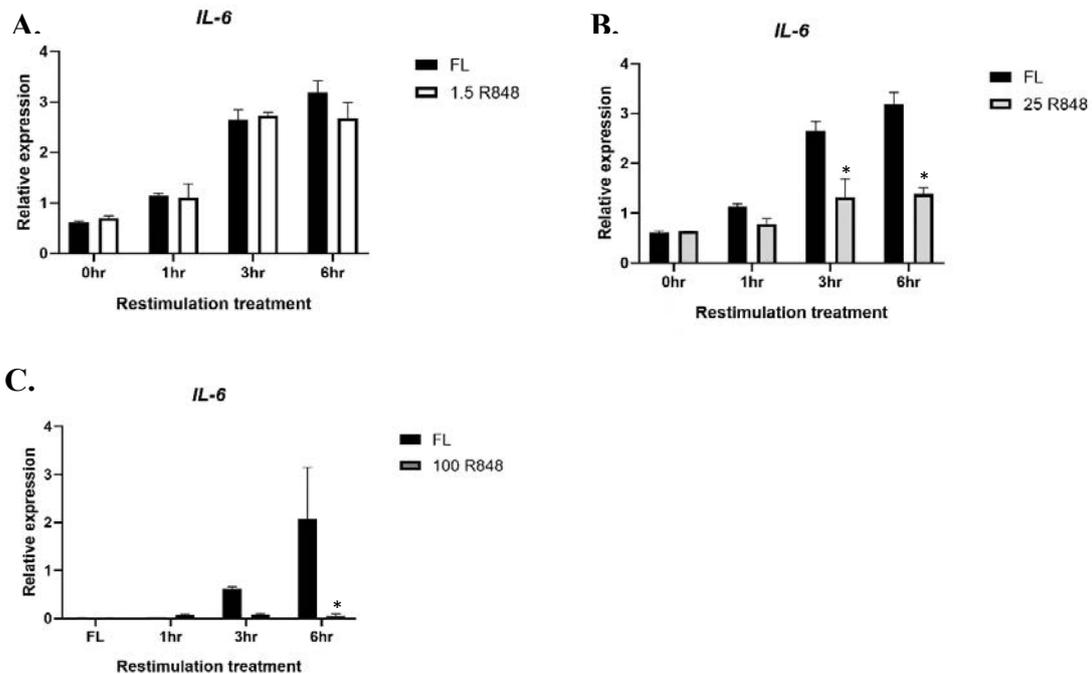


圖 8：成熟傳統型樹突細胞的 *IL-6* 基因表現量。各組以 *RpL7* 為標準基因，進行 qPCR 擴增後，將 *IL-6* 基因對 *RpL7* 標準化，並計算其相對表現量(Relative expression)。各

圖中縱軸為相對表現量（無單位），橫軸為進行二次刺激時間（單位：小時）。(A.)為發育過程中給予 1.5ng/mL R848 刺激後，成熟的傳統型樹突細胞中 *IL-6* 基因相對表現量（以白色表示）。(B.)為給予 25ng/mL R848 刺激，以淺灰色表示。(C.)為給予 100ng/mL 刺激，以深灰色表示。對照組以黑色表示。「*」表示與對照組相比，數據具顯著差異(0.05>p)。

(五)R848 刺激對成熟傳統型樹突細胞的 *IL-10* 基因表現影響

IL-10 是一種抑發炎型細胞素(anti-inflammatory cytokine)，其主要功能包括第一型輔助 T 細胞的去活化、減緩抗原呈現(MHCII)的效率、以及阻斷 NF- κ B 的活動等等。其還可以活化調節型 T 細胞，達到免疫系統的抑制效果。因此，它的定位多半位在免疫系統的調節劑。

本研究實驗數據可發現，在低濃度的刺激下 *IL-10* 大多沒有高度表現，然而若將 R848 濃度提高至 25ng/mL，將可以觀察到 *IL-10* 表現的高水平。圖 9 中的針對 *IL-10* 所觀察到的趨勢與前述 TNF- α 及 *IL-6* 完全相反，這個現象相當有趣。與前兩者不同，*IL-10* 為一種抑發炎細胞素，因此，透過圖 9 的結果我們初步認為 R848 除了會調節促發炎細胞素外，對抑發炎細胞素也具有一定的調控能力。並且對於兩者的調控模式正好相反。為驗證，我們接續追加分析一組促發炎細胞素(*IL-12*)及抑發炎細胞素(TGF- β)，期待透過追加分析的結果取得證實。

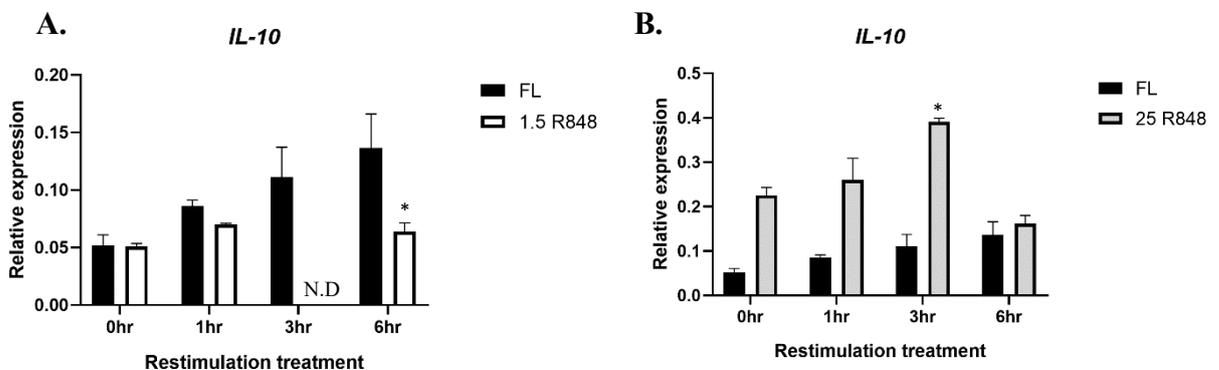


圖 9：成熟傳統型樹突細胞的 *IL-10* 基因表現量。各組以 RpL7 為標準基因，進行 qPCR 擴增後，將 *IL-10* 基因對 RpL7 標準化，並計算其相對表現量(Relative expression)。各圖中縱軸為相對表現量（無單位），橫軸為進行二次刺激時間（單位：小時）。(A.)

為發育過程中給予 1.5ng/mL R848 刺激後，成熟的傳統型樹突細胞中 *IL-10* 基因相對表現量（以白色表示）。(B.)為給予 25ng/mL R848 刺激，以淺灰色表示。對照組以黑色表示。「*」表示與對照組相比，數據具顯著差異(0.05>p)。「N.D.」表示於該樣本中並未測得目標基因(Not Detected)。

(六)R848 刺激對成熟傳統型樹突細胞的 *IL-12* 基因表現影響

IL-12 為一種白細胞介素(又稱介白素)，其功能可擴增自然殺手細胞(NK cell)的活性，並加強 T 細胞的毒殺能力。除此之外，其還可促進干擾素的分泌，以及引導第一型輔助 T 細胞的分化作用。同時，他也可促進腫瘤壞死因子 $TNF-\alpha$ 的生成。因此，藉由交叉比對兩者的結果，並與其他相關的細胞素共同分析，將有助於 R848 運作模式的建立。

本研究數據顯示，於發育過程給予低濃度的 R848 刺激，將會使的 *IL-12* 基因的表現量顯著提高，而若達到 25ng/mL 的刺激，其表現水平在最高峰時則與對照組最高峰無太大差別。在圖 10 中，我們也觀察到了類似於第 23、25 頁的促發炎細胞素的趨勢，因此我們歸納，低濃度的 R848 可提升促發炎細胞素的基因表現，然而高濃度刺激下卻有抑制的現象。針對其可能的生理意義將在(十三)綜合討論中完整說明。

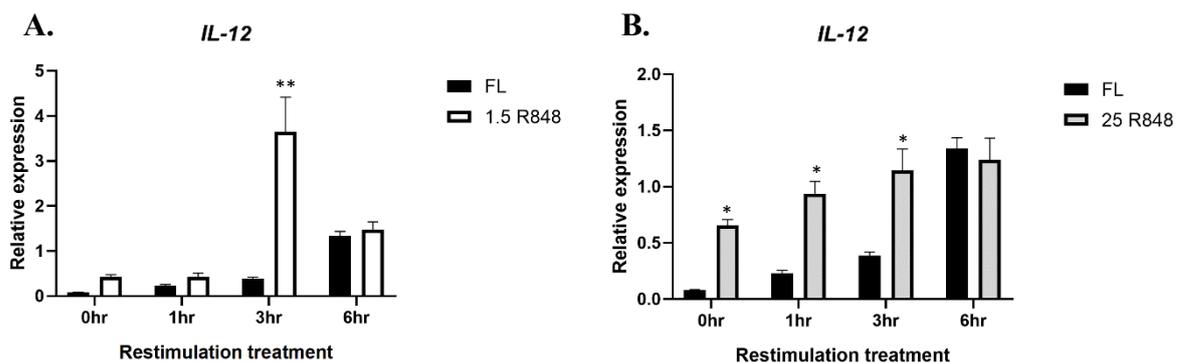


圖 10：成熟傳統型樹突細胞的 *IL-12* 基因表現量。各組以 RpL7 為標準基因，進行 qPCR 擴增後，將 *IL-12* 基因對 RpL7 標準化，並計算其相對表現量(Relative expression)。各圖中縱軸為相對表現量（無單位），橫軸為進行二次刺激時間（單位：小時）。(A.)為發育過程中給予 1.5ng/mL R848 刺激後，成熟的傳統型樹突細胞中 *IL-12* 基因相對表現量（以白色表示）。(B.)為給予 25ng/mL R848 刺激，以淺灰色表示。對照組以黑色表示。「*」表示與對照組相比，數據具顯著差異(0.05>p)。

(七)R848 刺激對成熟傳統型樹突細胞的 *TGF-β* 基因表現影響

TGF-β 為轉化生長因子(Transforming growth factor)，其功能與過敏反應高度相關。目前已知在特定條件下，*TGF-β* 的表達可活化調節型 T 細胞及協助增生，幫助免疫系統的平衡及減少發炎物質。另外也與部分人體器官的耐受性有關。在免疫系統方面，其對於調節第一型與第二型輔助 T 細胞至關重要。總而言之，*TGF-β* 協助免疫系統的調節作用，為抑發炎型的細胞素。本研究發現，低濃度刺激下的樹突細胞，*TGF-β* 相對表現量並不高，然而中高濃度的組別卻可看到其表現水平的提高。在圖 11 中我們觀察到了前述抑發炎細胞素皆會表現的趨勢。因此歸納，在傳統型樹突細胞所表現的細胞素基因中，低濃度的 R848 可抑制抑發炎細胞素基因表現，然而高濃度情況卻可增強其表現。在生理層面，在低濃度與高濃度情況下的變化，分別可促進免疫系統活化以及抑制其活性。而其生理意義將於(十三)綜合討論中與促發炎細胞素互相比對。

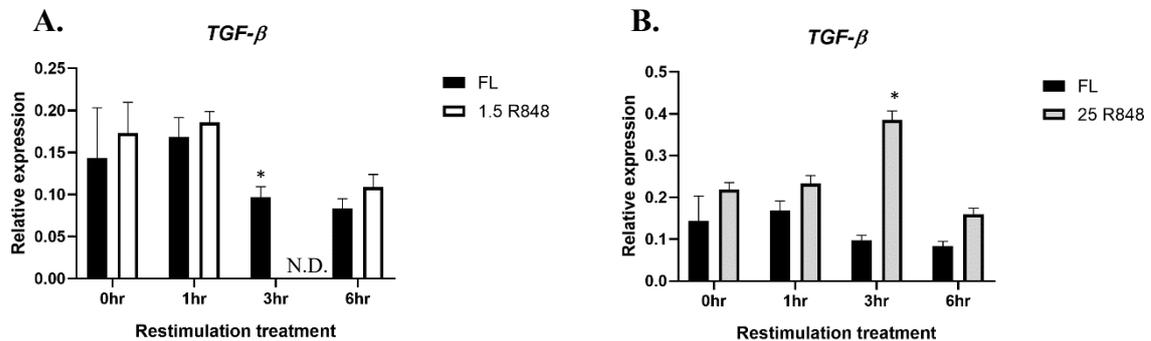


圖 11：成熟傳統型樹突細胞的 *TGF-β* 基因表現量。各組以 RpL7 為標準基因，進行 qPCR 擴增後，將 *TGF-β* 基因對 RpL7 標準化，並計算其相對表現量(Relative expression)。各圖中縱軸為相對表現量（無單位），橫軸為進行二次刺激時間（單位：小時）。(A.) 為發育過程中給予 1.5ng/mL R848 刺激後，成熟的傳統型樹突細胞中 *TGF-β* 基因相對表現量（以白色表示）。(B.) 為給予 25ng/mL R848 刺激，以淺灰色表示。對照組以黑色表示。「*」表示與對照組相比，數據具顯著差異(0.05>p)。「N.D.」表示於該樣本中並未測得目標基因(Not Detected)。

(八)R848 刺激對成熟漿狀樹突細胞的 *pan-IFN α* 基因表現影響

第一型干擾素在免疫系統內是相當重要的角色，其最主要功能為輔助未受感染的細胞不被病毒所感染，因此在多數的病患體內，皆可發現干擾素的作用。另外，干擾素也具有干擾病毒於生物體內複製的功能。目前已知第一型干擾素在樹突細胞內主要由漿狀樹突細胞(pDC)所分泌，因此後續分析干擾素相關基因時我們將 pDC 獨立培養，並測其基因表現，避免數據的誤差。

本研究發現低濃度的刺激處理，其第一型的干擾素基因與對照組相比，維持相當水平。然而中濃度開始，其表現量開始下降，直到 100ng/mL，隨著漿細胞的比例近乎消失，其干擾素基因也幾乎不表現。透過圖 12，我們觀察到了 R848 對第一型干擾素的基因調節，特別是若發育過程中給予高濃度刺激時的反應。對比於前述結果中，在高濃度情況下漿狀樹突細胞的比例會下降，我們認為在比例下降的同時，其功能也顯著降低，顯見高濃度 R848 刺激下降了免疫系統的專一性免疫反應。後續將透過其他干擾素相關基因進一步驗證這項說法。

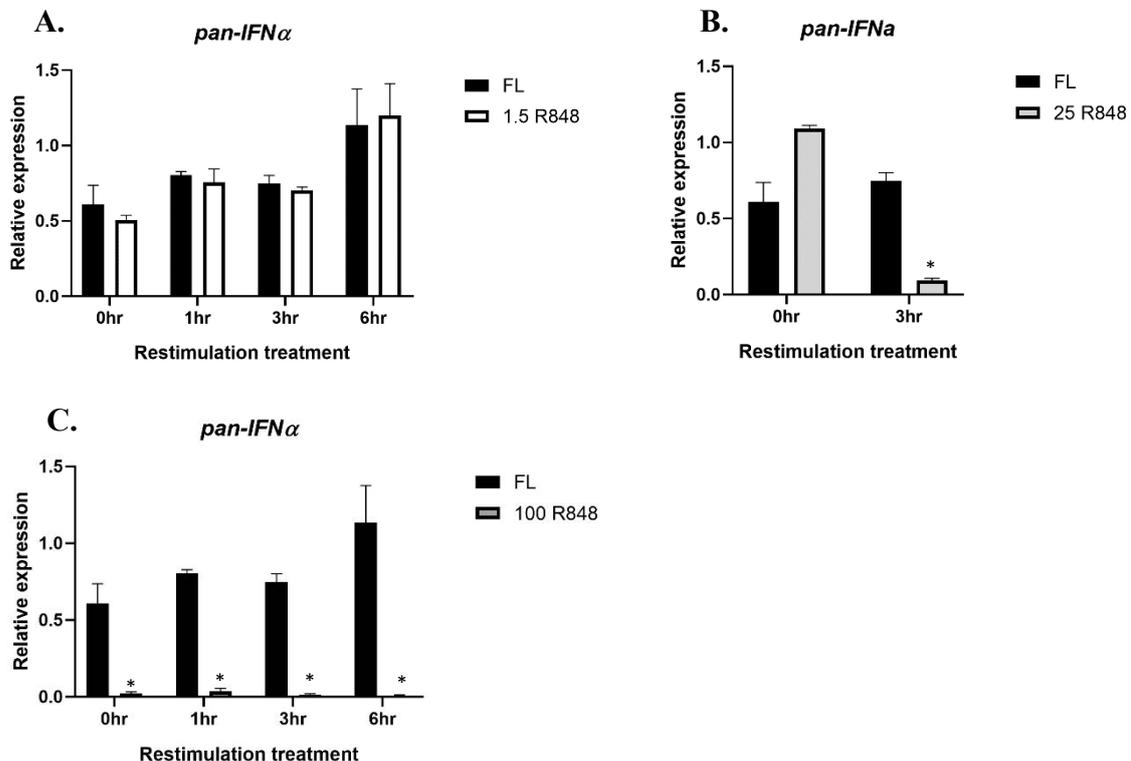


圖 12：成熟漿狀樹突細胞的 *pan-IFN α* 基因表現量。各組以 RpL7 為標準基因，進行 qPCR 擴增後，將 *pan-IFN α* 基因對 RpL7 標準化，並計算其相對表現量(Relative expression)。各圖中縱軸為相對表現量（無單位），橫軸為進行二次刺激時間（單位：小時）。(A.)為發育過程中給予 1.5ng/mL R848 刺激後，成熟的漿狀樹突細胞中基因相對表現量（以白色表示）。(B.)為給予 25ng/mL R848 刺激，以淺灰色表示。(C.)為給予 100ng/mL 刺激，以深灰色表示。對照組以黑色表示。「*」表示與對照組相比，數據具顯著差異(0.05>p)。

(九)R848 刺激對成熟漿狀樹突細胞的 *ISG15* 基因表現影響

ISG15 是一種干擾素下游基因，當第一型干擾素被製造後，*ISG* 相關基因會受到刺激，並且開啟回饋通道，促進更多干擾素的製造。因此，*ISG* 的表達對後續的干擾素總量具有絕對的關係。

本研究發現，在給予低濃度的刺激處理時，*ISG* 基因在特定時間有表現上升的趨勢，中濃度的刺激則與對照組持平，然而，到了高濃度刺激，其基因則幾乎不表現。上述之 *ISG* 基因結果可與 **8.R848 刺激對成熟漿狀樹突細胞的 *pan-IFN α* 基因表現影響** 相互對照。

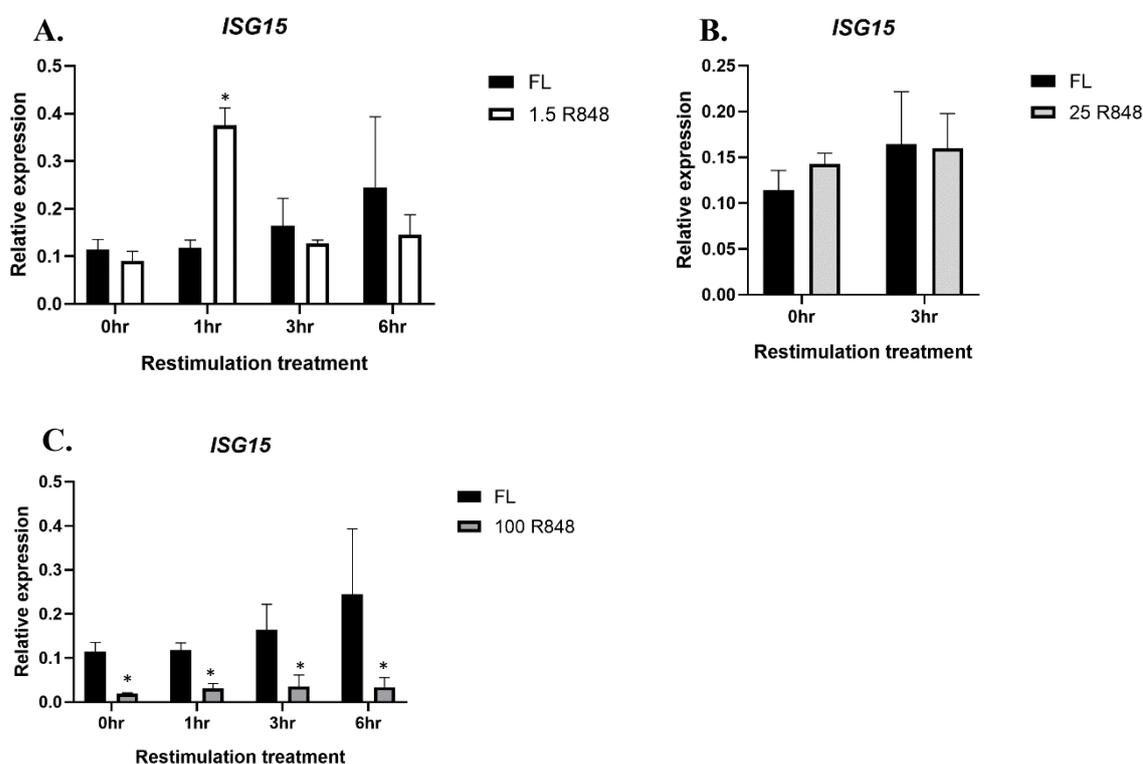


圖 13: 成熟漿狀樹突細胞的 *ISG15* 基因表現量。各組以 RpL7 為標準基因, 進行 qPCR 擴增後, 將 *ISG15* 基因對 RpL7 標準化, 並計算其相對表現量(Relative expression)。各圖中縱軸為相對表現量(無單位), 橫軸為進行二次刺激時間(單位: 小時)。(A.) 為發育過程中給予 1.5ng/mL R848 刺激後, 成熟的漿狀樹突細胞中基因相對表現量(以白色表示)。(B.) 為給予 25ng/mL R848 刺激, 以淺灰色表示。(C.) 為給予 100ng/mL 刺激, 以深灰色表示。對照組以黑色表示。「*」表示與對照組相比, 數據具顯著差異 ($0.05 > p$)。

(十) R848 刺激對成熟漿狀樹突細胞的 *IFN-β* 基因表現影響

IFN-β 也是第一型干擾素的成員之一, 可使生物體產生中和抗體, 對於干擾病毒複製等也具有功效。然而, 在此次實驗中, 不論何種處理, 進行 PCR 時的訊號多為 Primer-dimer 的訊號(如圖 14), 亦即無法測得相關訊號, 故推測 R848 並不會誘導 *IFN-β* 的產生。

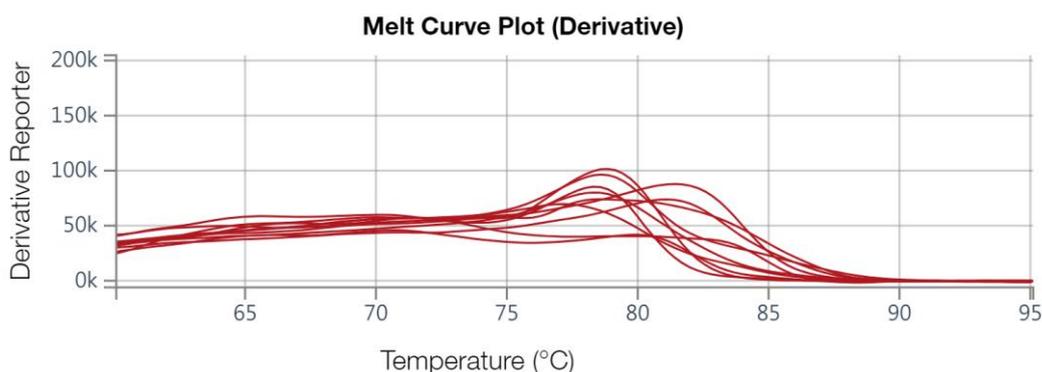


圖 14: 成熟漿狀樹突細胞的 *IFN-β* PCR 熔點曲線圖。各圖中縱軸為螢光引子表現量, 橫軸為測得的熔點變化(單位: 攝氏度)。

(十一) R848 刺激對成熟漿狀樹突細胞的 *IFIT* 家族基因表現影響

IFIT 是一種干擾素下游基因, 包含了 *IFIT-1* 及 *IFIT-2*。其主要功能可透過類鐸受體的路徑, 影響病毒的 mRNA 表現。另外, 也可抑制病毒的複製以及識別外來的 RNA。

本研究顯示在低濃度的情況 IFIT-1 基因表現與對照組持平，而至中濃度稍稍往下，但未到達顯著差異。另外，研究也分析了 IFIT-2 的基因表現，其中數據顯示在低濃度的情況可使 IFIT-2 表現上升，而中濃度(25ng/mL)的組別，表現則與對照組持平。

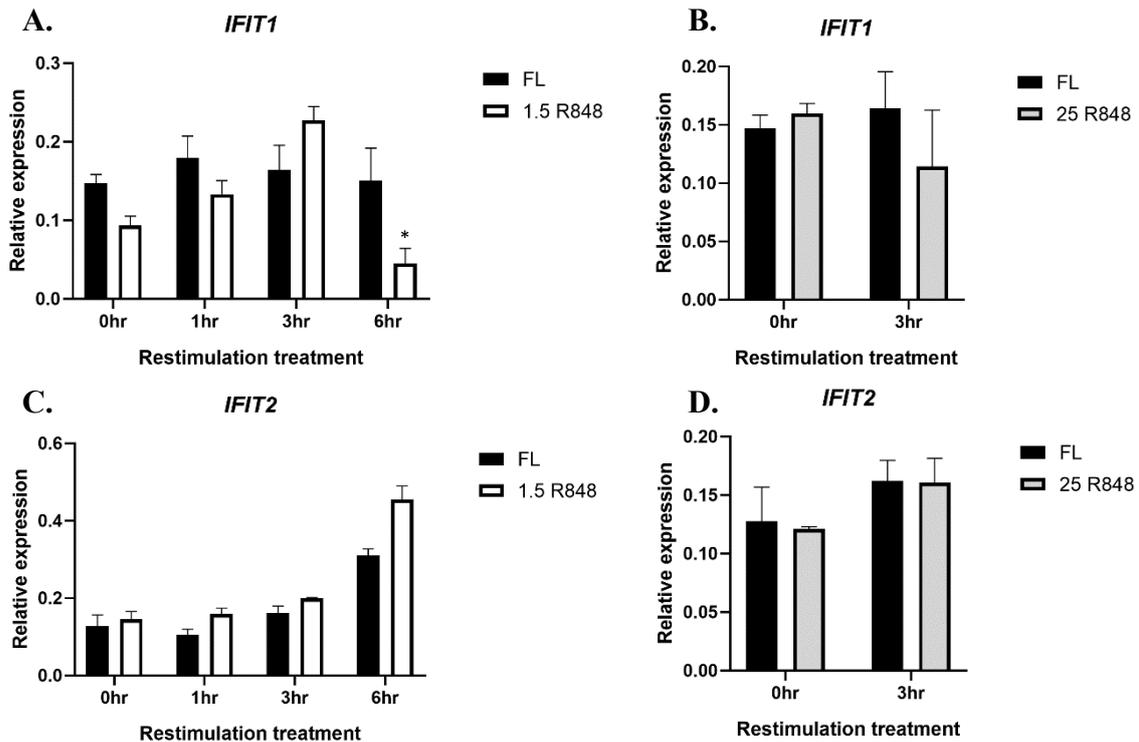


圖 15: 成熟漿狀樹突細胞的 *IFIT-1* 基因表現量。各組以 RpL7 為標準基因，進行 qPCR 擴增後，將 *IFIT-1* 基因對 RpL7 標準化，並計算其相對表現量(Relative expression)。各圖中縱軸為相對表現量(無單位)，橫軸為進行二次刺激時間(單位:小時)。(A.)(C.) 為發育過程中給予 1.5ng/mL R848 刺激後，成熟的漿狀樹突細胞中 *IFIT-1*(A.) *IFIT-2*(C.)及基因相對表現量(以白色表示)。(B.)(D.)為給予 25ng/mL R848 刺激，成熟的漿狀樹突細胞中 *IFIT-1*(B.) *IFIT-2*(D.)及基因相對表現量，以淺灰色表示。對照組以黑色表示。「*」表示與對照組相比，數據具顯著差異(0.05>p)。

(十二)R848 刺激對樹突細胞發育過程中轉錄因子的表現影響(初步結果)

在 R848 刺激下，我們看到了 R848 對樹突細胞分化比例的改變，以及其功能的影響。我們希望深入探究此一機制，已釐清造成這些現象的成因。我們選定可引導漿狀樹突細胞以及傳統樹突細胞分化的轉錄因子進行分析(其基因

名稱如下圖所示)。結果顯示，由於 *RUNX2*、*Zeb2*、*IRF-4*、*IRF-8*、*ID-2* 對於漿狀樹突細胞的分化具有絕對性，其表達活性也與漿狀樹突細胞的比例呈現正相關，不論功能為促進或抑制。而 *BatF3* 則與傳統型樹突細胞的亞群發育有關。研究數據顯示，與對照組相比，在高濃度刺激下的組別，與漿狀樹突細胞發育有關的轉錄因子基因表現量顯著減少，然而 *BatF3* 則沒有顯著差異。此結果與先前對樹突細胞的比例分析吻合，因此我們認為導致上述結果的機制與轉錄因子的表達有關。R848 藉由抑制轉錄因子的表達進而達到調控細胞分化的目的，並且同步影響了成熟細胞的功能。

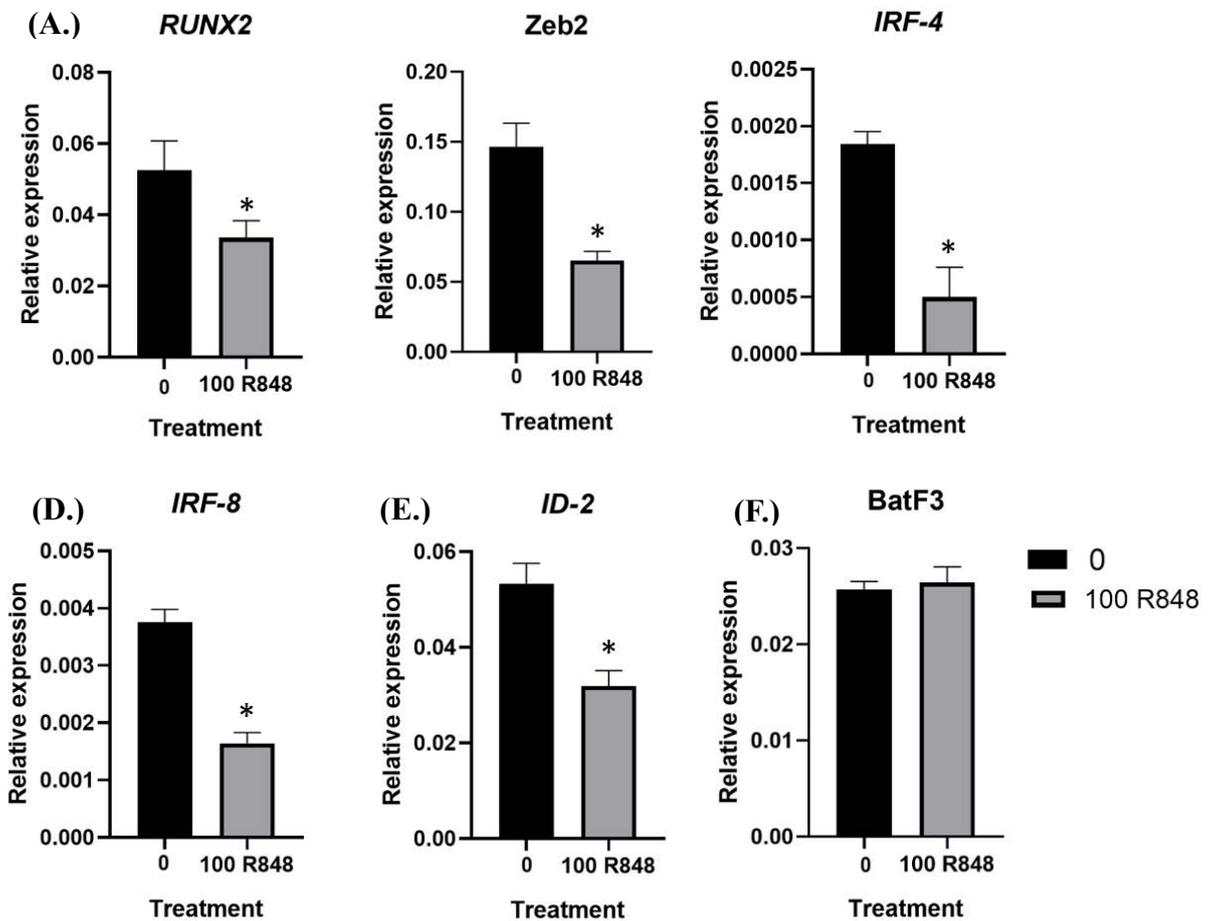


圖 16：分化中未成熟的樹突細胞轉錄因子基因表現量。各組以 *RpL7* 為標準基因，進行 qPCR 擴增後，將 *RUNX2*(A.)、*Zeb2*(B.)、*IRF-4*(C.)、*IRF-8*(D.)、*ID-2*(E.)、*BatF3*(F.) 基因對 *RpL7* 標準化，並計算其相對表現量(Relative expression)。各圖中縱軸為相對表現量（無單位），橫軸為處理組別(FL：對照組，100 R848：R848 100ng/mL 刺激)。對照組以黑色柱狀圖表示。「*」表示與對照組相比，數據具顯著差異(0.05>p)。

(十三)綜合討論

關於各種不同類鐸受體配體的初步實驗或探討(Ligand Screening)時，我們觀察到不管是 TLR-2 配體(Pam3CSK4)、TLR-4 配體(LPS)、TLR-7 配體(R848)，在給予高濃度的刺激時，都會表現出類似於耐受性免疫(Immune Tolerance)的現象，傳統型樹突細胞的共同刺激分子(costimulatory molecules)表現量下降，並且漿狀樹突細胞(pDC)的比例都會顯著下降，且幾乎消失。而其中 R848 相當特別的，在低濃度的情況下我們觀察到，若在前驅幹細胞時期給予低劑量刺激，分化出的樹突細胞中漿狀樹突細胞的比例會有所提升，這個現象引起了我們的注意。恰巧，R848 所主要模擬的對象為單股 RNA 病毒，我們認為其與目前正流行的冠狀病毒、流感等皆有某部分的連結。因此，我們決定深入了解 R848 的相關資訊。同時，我們已知樹突細胞會分泌多種細胞素，而這些物質與免疫系統的能力息息相關。因此，我們針對成熟後樹突細胞的多種細胞素基因表現情況進行測定，一方面希望能再次驗證關於高濃度細胞活性改變的實驗結果，另一方面因為漿狀樹突細胞的一大功能為分泌干擾素，故我們也針對多種干擾素上下游基因進行分析，希望針對低濃度 R848 刺激下漿狀樹突細胞的比例改變，做具體的研究並提出生理意義。

由於不同樹突細胞所分泌的細胞素有所不同，為避免干擾，在進行細胞素基因研究時，我們將傳統型樹突細胞與漿狀樹突細胞分開培養，並分別分析。針對傳統型樹突細胞，我們選擇了兩大類細胞素：促發炎細胞素(pro-inflammatory cytokines)與抑發炎細胞素(anti-inflammatory cytokines)，並各選擇約 2-3 種進行分析。研究發現，若是給予低濃度的刺激，抑發炎細胞素的基因表現大多不顯著，或與對照組持平，甚至某些特定時刻會有無法測得相關基因表現的情形(IL-10、TGF- β)，反觀促發炎細胞素(如 IL-6、IL-12、TNF- α)，表現量皆有顯著上升的趨勢。綜合以上，考量各種細胞素的功能，特別是 TNF- α 可協助抑制 RNA 病毒，與 R848 的模擬功能相同，以及 IL-6、IL-12 等可活化 T 細胞毒殺效果，我們認為低濃度的刺激可以促進傳統型樹突細胞表現出

增強效果(Enhanced ability)，協助免疫系統的專一性免疫反應。將此結果對照於表面標誌分子的結果，於發育過程中給予低濃度的 R848 刺激，表面標誌分子表現並不會下降，與細胞素測量之結果大致吻合。

同步的，低濃度處理下漿狀樹突細胞(pDC)的功能也是我們相當感興趣的重點。由於漿狀樹突細胞主要功能為分泌干擾素，因此我們針對多種干擾素的上、下游基因進行多重分析，以便對照於低濃度刺激下其比例提升的結果。在上游基因我們選擇了 pan-IFN α (第一型干擾素 α 的所有亞群基因)以及 IFN- β (第一型干擾素 β 的基因)。除了 IFN- β 基因大多不表現外，我們發現低濃度處理下的 IFN α 表現大多與對照組持平。而後針對下游，考慮其刺激基因 ISG15 及 IFIT 家族成員，可發現其下游基因表現有上升的現象，特別是 ISG15 特別明顯。由於下游基因會繼續形成一回饋機制，輔助干擾素生成，同時引導部分的干擾素功能，故我們認為在漿狀樹突細胞比例上升的同時，其功能也有所增強。綜合低濃度處理組別的分析，我們發現低濃度的 R848 在前驅幹細胞時期刺激會誘導免疫反應的增強現象，類似於訓練性免疫反應。這樣的生理意義同步對應到的是整體免疫反應的強化，由於細胞素所影響的層面相當廣泛，且扮演著關鍵角色，因此若將來能用於臨床，低濃度的 R848 功能或許可應用於以無毒性的化合物強化自身反應，協助生物體本身干擾素的合成效率，進而協助生物對抗未知外來病原的效果。

高濃度刺激下的細胞活性及比例改變也是我們相當關心的一個重點。在中到高濃度(25-100ng/mL)的傳統型樹突細胞處理組別中，我們發現相當有趣的現象，這些細胞的促發炎細胞素基因(IL-6、IL-12、TNF- α)表現大多顯著下降，少數與對照組持平(IL-12)。然而，抑發炎細胞素(IL-10、TGF- β)卻有顯著上升的現象。為了解這個特別的趨勢所代表的意義，我們深入查詢了一種病毒感染(如新冠肺炎)重症患者體內的現象：細胞素風暴(Cytokines storm)。當患者體內有外來病原時，免疫系統會啟動防禦作用進而對抗病原，然而，若病毒量過多時，很容易導致免疫系統反應過度，進而分泌過多

的細胞激素，導致細胞過度活化。這個情況通常隨之而來的便是各種自體免疫反應的發生，例如近期的新冠肺炎中，重症患者的肺積水等等症狀都是細胞素風暴所導致的結果。目前臨床研究已顯示，若對重症患者施打 IL-6 阻斷劑，可有效的使症狀減輕，這樣的研究也再度凸顯了細胞素風暴所帶來的威脅及嚴重性。透過本研究數據我們發現，高濃度 R848 刺激可使相關促發炎激素的基因表現下降，其中也包含 IL-6 基因的顯著下降。套用至臨床應用，我們認為這種情況下的 R848 有助於減緩因細胞素風暴所帶來的影響。除此之外，我們也發現抑發炎細胞激素的表現上調，由於他與促發炎激素互為拮抗作用，這樣的結果也顯示了另一層的免疫系統活性抑制。就生理意義的層面，這類濃度的 TLR-7 作用劑使免疫系統活性降低，避免自體免疫反應的發生，減輕重症的症狀負擔。若未來有機會應用於醫學，經適當改良後應是對付重症的解藥。

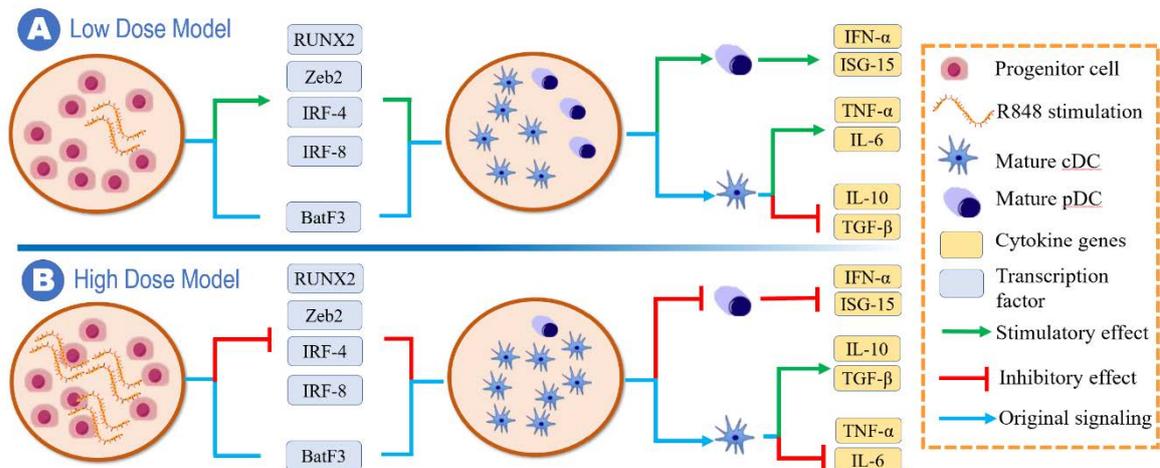
同時，我們也發現在高濃度的刺激處理下，漿狀樹突細胞的干擾素相關基因表現下降皆相當顯著，甚至幾乎不表現。這樣的現象所對應的直接生理意義便是干擾素分泌的減低，以及抗病毒複製能力減弱。對比於原先發現的漿狀樹突細胞會於高濃度刺激下比例顯著減少，這兩項結果相互呼應，皆明顯顯示了高濃度下漿狀樹突細胞功能的喪失。而為深入探究以上現象的成因，我們決定進行深入實驗，探討 R848 的作用機制，是透過何種路徑或機轉達成這樣的效果。

我們將目標鎖定於轉錄因子，先前研究已表明，轉錄因子的表達與樹突細胞分化有所關聯，而某些轉錄因子也同時參與了細胞激素的調控。我們建立了相關的假說，認為 R848 藉由調控特定某些轉錄因子的表達來影響樹突細胞的分化路徑及活性。初步的實驗結果支持這項說法。在初步結果中，我們針對一種對漿狀樹突細胞的分化呈正相關的轉錄因子 *Zeb2*，發現在給予高濃度的 R848 刺激下，其表現量顯著降低，這項結果與樹突細胞的分化比例相符合。相反的，負責傳統型樹突細胞亞群調控的一種轉錄因子 *BatF3* 則沒有明顯的

變化量。當然，我們認為還有其他的轉錄因子也在同步作用，因此，相關實驗正在進行當中。期望能透過揭露 R848 對樹突細胞的作用機制，使臨床醫學多一項嶄新的治療方式。

四、結論

根據實驗結果，我們發現多種的類鐸受體配體都會使免疫系統產生耐受性反應。與類鐸受體 7 接合的作用劑 R848，在濃度範圍 25-100ng/mL 的情況，執行非專一性免疫的漿狀樹突細胞比例顯著減少，而其分泌干擾素的能力透過基因表現量測定，也呈現顯著下降。同時，不論是透過表面共同刺激分子的螢光分析，或是透過分析促發炎細胞素基因及抑發炎細胞素基因，都可推得傳統型樹突細胞活性下降的結果，特別是濃度高達 100ng/mL 的情況相當顯著。而在約 1.5ng/mL 的 R848 刺激下發育，卻可觀察到漿狀樹突細胞比例增加的現象，其干擾素上下游基因也部分呈現上升，部分與對照組持平，顯見其功能並未下降。另，針對傳統型樹突細胞進行分析，也可發現其抑發炎細胞素基因鮮少表現，而促發炎細胞素則有大量表現的效果。此外，透過轉錄因子測定的初步結果發現，與漿狀樹突細胞分化有關的 Zeb2 因子在高濃度下的表現降低。總體而言，低濃度的 R848 刺激增強了免疫系統的反應，而高濃度卻呈現顯著抑制，推測造成上述現象的機制可能與轉錄因子活性調節有所相關。運作模型如下所示：



五、未來展望與應用

本研究目前針對 R848 引導樹突細胞活性的機制正在進行中，也規劃了相關實驗進一步佐證。以下為未來展望、可接續之研究以及相關應用。

(一)、未來展望及實驗規劃

1. 針對更多種可影響樹突細胞分化的轉錄因子進行基因表現測試。
2. 進行傳統型樹突細胞與 T 細胞共同培養實驗，了解傳統型樹突細胞的抗原呈現能力。
3. 了解關於 R848 對於第一型干擾素的正回饋機制及相關受器造成的影響。
4. 觀察 R848 刺激是否會影響 B 細胞的抗體製造及免疫反應。

(二)、創見性及未來可接續之研究

1. 將細胞實驗改為體內生物實驗(in-vivo)，觀察其免疫反應現象與細胞實驗是否相同。
2. 分析 R848 對於各種不同的 RNA 病毒感染時，能提供給生物體的保護力，進以分析其適合使用時機。
3. 將 R848 進行適當改良，或參考其機制，進行臨床醫學研究與應用。

(三)應用

免疫系統的活性與疾病對抗具高度相關，過低的活化有可能導致無法足以對抗病原，然而過高的活化卻加劇了重症的相關症狀。R848 是一種對生物體無毒性的人工合成化合物，我們觀察到在不同的濃度刺激下，可以誘導分化中的樹突細胞產生不同的免疫反應趨勢，有助於在特定情形下引導免疫系統的發展。我們認為此研究主要使用的 R848 有助於未來臨床上的病患治療，不論是在面對未知病原時增強免疫反應，亦或是防止自體免疫、細胞素風暴等症狀，皆是相當有潛力的新興治療方式。

六、參考資料

1. Alam, M. M., Yang, D., Trivett, A., Meyer, T. J. & Oppenheim, J. J. (2018). HMGN1 and R848 Synergistically Activate Dendritic Cells Using Multiple Signaling Pathways. *Immunol.*
2. El-Zayat, S. R., Sibaii, H. & Mannaa, F. A. (2019). Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bulletin of the National Research Centre*, 43:187.
3. Hsiao, Y. L. (2018). Reprogramming of dendritic cell development by inflammation and infection.
4. Ingram, J. R., Dougan, M., Rashidian, M., et al. (2017). PD-L1 is an activation-independent marker of brown adipocytes. *Nature Communications*, 647.
5. Jennings, C., Kusler, B., Jones, P. P. (2009). Calcineurin inactivation leads to decreased responsiveness to LPS in macrophages and dendritic cells and protects against LPS-induced toxicity in vivo. *Innate Immunity*, 15(2), 109–120
6. Liang, S. C. (2003). Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur. J. Immunol.* 33, 2706–2716.
7. 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*.
8. Musumeci, A., Lutz, K., Winheim, E. & Krug, A. B. (2019). What Makes a pDC: Recent Advances in Understanding Plasmacytoid DC Development and Heterogeneity. *Immunol.*
9. Mustafa, N. M., Elfadol, N. S., Murshed, S. W., et al. (2020). Design of multi epitope-based peptide vaccine against E protein of human 2019-nCoV: An

immunoinformatics approach, *medRxiv* and *bioRxiv*.

10. Netea, M. G., Domínguez-Andrés, J., Barreiro, L. B., et al. (2020). Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nature Reviews Immunology*.
11. Noelle, R. J., Roy, M., Shepherd, D. M., Stamenkovic, I., Ledbetter, J. A., & 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*, 89.
12. Noubade, R., Majri-Morrison, S. & Tarbell, K. V. (2019). Beyond cDC1: Emerging Roles of DC Crosstalk in Cancer Immunity. *Immunol*.
13. Nutt, S. L. & Chopin, M. (2020). Transcriptional Networks Driving Dendritic Cell Differentiation and Function. *Immunity*, 52, 942-956
14. 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.
15. Pang, E. S., Macri, C., Patton, T., Bafit, M., & O’Keeffe, M. (2020). Dendritic Cells and Their Roles in Anti-Tumour Immunity. 10.5772/intechopen.91692.
16. Roche, P. A., & Furuta, K. (2015). The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunology*.
17. Satpathy, A., Murphy, K. M., & Wumesh, K. C. (2011). Transcription Factor Networks in Dendritic Cell Development. *Semin Immunol*.
18. Unanue, E. R., Turk, V., & Neefjes, J. (2016). Variations in MHC Class II Antigen Processing and Presentation in Health and Disease. *Annual Review of Immunology*.
19. Vremec, D., O’Keeffe, M., Hochrein, H., et al. (2006). Production of interferons by dendritic cells, plasmacytoid cells, natural killer cells, and interferon-producing killer dendritic cells. *Immunobiology*.
20. Yu, M., Gotley, J., Zhou, C., et al. (2021). Absence of Batf3 reveals a new dimension of cell state heterogeneity within conventional dendritic cells.

iSCIENCE.

21. Zhao, J., Wohlford, L. C., Zhao, J., Fleming, et al. (2012). Treatment with Poly(I·C) Protects Aged Mice from Lethal Respiratory Virus Infections. *Journal of Virology*, 11416 –11424.
22. Zhang, Z., Ohto, U., Shibata, T., et al. (2016). Structural Analysis Reveals that Toll-like Receptor 7 Is a Dual Receptor for Guanosine and SingleStranded RNA. *Immunity*, 45, 737–748.

【評語】 090011

此科展計畫的實驗已初具一個碩班題目的規模，作者呈現數據的方式也相當具水準。雖然題目的新穎性稍嫌不足，但瑕不掩瑜。其他還有一些小地方可以再加強：實驗數據不足以說明部分結論，例如結論說在低濃度的 R848 作用下會刺激促炎性細胞素的表現上升，但是根據圖七、八、十，在低濃度 R848 作用組別中，大部分的促炎性細胞素的基因表現並沒有呈現統計性差異的增加，且唯 3hr 的作用組別較明顯，其他結果並不一致，不足以支撐其結論。另外，作者是如何從眾多相關轉率因子中選擇 Zeb2 及 BatF3 這兩個轉錄因子？其選擇的理由為何？