

國立臺灣大學醫學院免疫學研究所

碩士論文

Department of Immunology Collage of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis



探討 IL-15 異構蛋白對 HSV-1 皮膚疱疹與神經侵襲力
作用的動物模式

To Investigate the Effect of an Alternatively Spliced IL-15
Isoform on HSV-1 Zosteriform and Neuroinvasiveness in
a Mouse Model

林宇瑞

Yu-Jei Lin

指導教授：顧家綺 博士

Advisor: Chia-Chi Ku, Ph.D.

中華民國 105 年 7 月

July 2016

誌謝



進到免疫所這個大家庭，不知不覺碩士班兩年的時間已經過去了，在這兩年之中獲得了許多人的幫助，讓我可以完成這份論文，藉由這個機會對各位表達感謝。首先要感謝最重要的人，顧家綺老師，我的指導教授，將我從一個完全沒有任何實驗經驗的學生，一路耐心教導我到現在可以完成一篇碩士論文，而且是令我自己、我的家人驕傲的一份研究成果；除了在學業上，在平日生活與人生經驗上，顧老師都給予我許多的協助與建議，這些話語我都將一輩子珍藏，老師，謝謝您。謝謝我的口試委員，伍安怡老師，在我對研究這條路上感到最迷茫的時候，給了我許多溫暖的鼓勵與支持，非常感謝您，感謝您幫我繼續走下去。謝謝口試委員孔祥智老師，您總是會給我關鍵、最一針見血的評語，雖然一開始有點害怕，但是您每一次的建議都能幫助我更加專注在重要的實驗上，感謝您。謝謝王莉芳醫師，在皮膚病理的專業知識上給予我許多協助，幫助我更加專業的判讀實驗結果，感謝您。

感謝宗霖學長，非常耐心又溫柔的教導我，將我從連微量吸管都不會拿的門外漢帶到可以獨力完成實驗。謝謝簡筠，有妳陪伴的日子非常的快樂，是我最珍貴的戰友。謝謝毅軒，雖然從來沒有跟你說過，其實我很慶幸能跟你在同一個實驗室，聰明又幽默有趣，幫了我很大的忙。謝謝飄飄，幫助我順利通過碩一的Seminar。謝謝琬瑜，在我感到疲憊的時候，給予我許多支持。謝謝克里斯，總是那麼地關心我，溫柔地像爸爸一樣的好學長。謝謝主念，一位非常有禮貌的學弟，謝謝你幫我們準備口試的飲料餐點。謝謝班上所有的同學，你們給了我兩年青春美好的回憶。最後，感謝我的家人，幫你們放到最後，是因為對你們的感謝已經無法用單純用言語述說，謝謝你們。

完成碩士班兩年的學業，並不是結束，而是代表一個新的開始，在此祝福免疫所這個大家庭的每一位，未來都能順心健康、鵬程萬里。

摘要

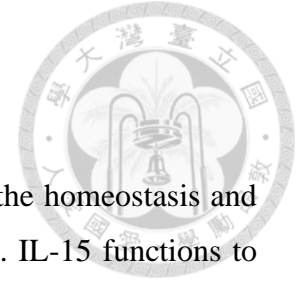


第 15 號細胞激素 (IL-15) 具有維持記憶性 CD8、自然殺手以及自然殺手 T 細胞的發育和細胞數恆定的功能。IL-15 同時也具有驅化免疫細胞、血管新生以及增強發炎激素生成的作用。更多的證據指出組織中表現過量的 IL-15 與多種人類發炎疾病與癌化的相關。正常小鼠體內除了表現 IL-15 之外，也會經轉錄後修飾作用使 Exon 7 部分剔除形成異構體 IL-15。由於表現該異構體 IL-15 的 ENU 突變鼠，發生記憶性 CD8 細胞缺失的結果，因此異構體 IL-15 命名為 DM-IL-15。本實驗室過往的研究結果發現，經過表現 DM-IL-15 DNA 質體的小鼠皮膚，對於引起皮膚發炎的各式刺激例如：機械性刮擦、化學物質刺激或是免疫製劑處理都比未處理組皮膚呈現較不敏感的反應。在我的論文中主要的研究目的為以動物模式探討 DM-IL-15 對於 HSV-1 皮膚疱疹與神經細胞侵襲力的影響。利用主成份分析法比較 179 個與發炎反應相關基因的表現在皮膚表現 DM-IL-15 實驗組和空質體控制組的皮膚受 HSV-1 感染後的實驗結果發現：表現 DM-IL-15 的皮膚受 HSV-1 感染後，促進嗜中性白血球趨移的趨化激素基因 (CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL5) 和促發炎基因 (IL-1 β 、IL-6 及 TNFSF14) 表現量也都低於對照組皮膚，顯示 DM-IL-15 可能藉由調控角質細胞中的 NF- κ B 活化路徑，使宿主發炎反應活性降低的功能；除此之外，DM-IL-15 轉染的皮膚會增加 IL-4、IL-23A 及 LTA 的表現量，顯示 T 細胞活化相關的免疫反應可能受到影響。正常小鼠皮膚受 HSV-1 感染後第 2 天開始形成疱疹傷痂，但於 10 天開始癒合，但是表現過 DM-IL-15 的皮膚經過 HSV-1 後感染後第 14 天依然有嚴重的傷痂，且從 H&E 染色結果可看到嗜中性白血球的浸潤。在 25 天的連續觀察實驗中，與對照組小鼠相比，皮膚表現 DM-IL-15 增加 HSV-1 感染後疱疹傷痂嚴重度和範圍大小，且傷痂出現的時間更早，持續時間更久。降低 HSV-1 接種量後，可看到表現 DM-IL-15 的皮膚中 HSV-1 轉錄因子 (ICP4) 和病毒結構蛋白 (Glycoprotein B) 的 mRNA 表現量高於對照組，顯示 DM-IL-15 可能在 HSV-1 感染前已對皮膚的免疫環境造成影響而提高病毒複製的結果。進一步分析背根神經節中的 HSV-1 病毒活性，表現 DM-IL-15 的皮膚感染 HSV-1 後第七天與第十天，在背根神經節中 ICP4 和 gB 基因表現量同樣都高於對照組。以上結果顯示 DM-IL-15 對於皮膚組織和神經細胞對抗 HSV-1 感

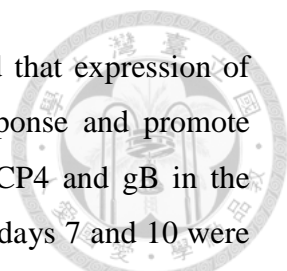
染的能力具有重要的影響，將來進一步釐清 DM-IL-15 主要作用於何種免疫細胞族群與調控因子。



Abstract



Interleukin-15 (IL-15) plays an important role in maintaining the homeostasis and the development of memory CD8 T cells, NK cells and NKT cells. IL-15 functions to increase immune cells infiltration, angiogenesis and pro-inflammatory cytokine production. Clinical researches show that overexpression of IL-15 in tissues is correlated with human inflammatory diseases and carcinogenesis. ENU mutant C57BL/6 mice that predominantly expressed an alternatively spliced IL-15 isoform generated from partial deletion in exon 7 of the IL-15 gene are deficient in memory CD8⁺ T cells. The IL-15 isoform is thus named DM-IL-15. Our previous study demonstrated that ectopic expression of DM-IL-15 in the wild type mouse skin resulted in the modulated proinflammatory response in skin after various types of stimulation by abrasion, chemical compound and immunologic agent. The overall goal of my thesis was to investigate the effects of DM-IL-15 on Herpes simplex virus-1 (HSV-1) zosteriform and neuroinvasiveness in mouse model. Principal component analysis of the transcriptional levels of 179 inflammation related genes demonstrated that they were differentially expressed in wild type C57BL/6 (B6) mouse skin expressed with empty vector (WT/pEV) or a plasmid expressing DM-IL-15 (WT/pDM-IL-15) after HSV-1 infection. Forced expression of DM-IL-15 reduced the gene expression levels of neutrophil chemokines (CXCL1, CXCL2, CXCL3 and CXCL5) and pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 and TNFSF14) in HSV-1 infected skin tissue, suggesting that DM-IL-15 might regulate NF- κ B signaling in skin after HSV-1 infection. DM-IL-15 expressing skin also expressed a higher level of IL-4, IL-23A and LTA than control skin after HSV-1 infection, implicating DM-IL-15 was likely involved in regulating the development of T cell immunity against HSV-1 infection. While HSV-1 skin lesion was evident on day 2 and resolved on day 10 post infection, HSV-1-infected DM-IL-15 expressing mouse skin showed severe lesion until day 14 after HSV-1 infection accompanied with evident neutrophil infiltration by H&E analysis. In a 25-day time course experiment, daily documentation on the development of HSV-1 lesions observed that an earlier onset of new lesion and prolonged skin lesion at the non-inoculated ventral side occurred in DM-IL-15 expressing compared with pEV-treated mouse skin. The higher transcriptional levels of ICP4 gene encoding HSV-1 transcriptional factor and gB gene encoding structural glycoprotein B expressed in DM-IL-15 expressing



mouse skin after infected with low dose of HSV-1 have suggested that expression of DM-IL-15 before HSV-1 inoculation may modulate host cell response and promote viral infection in skin. Moreover, the levels of transcription of ICP4 and gB in the dorsal root ganglion (DRG) isolated from correspondent animals at days 7 and 10 were higher in DM-IL-15 expressed than in control group. These results indicate that DM-IL-15 plays an important role in modulating HSV-1 pathogenesis in skin and the neuron. Cells or mediators that are targeted by DM-IL-15 require further thorough investigations.

目錄



誌謝	I
中文摘要	II
英文摘要	IV
第一章 簡介	1
第一節 DM-IL-15 為 IL-15 的異構體	1
第二節 HSV-1 皮膚帶狀疱疹的動物模式	2
第三節 利用皮膚疱疹動物模式研究 DM-IL-15 對於 HSV-1 神經細胞侵襲性的作用效應	3
第二章 實驗方法與材料	5
第三章 實驗結果	11
第一節 DM-IL-15 調節 HSV-1 病毒感染小鼠皮膚的發炎反應	11
第二節 DM-IL-15 對 HSV-1 在小鼠皮膚形成帶狀疱疹傷疤的影響	14
第三節 DM-IL-15 對小鼠感染 HSV-1 後帶狀疱疹形成過程的長期觀察	16
第四節 皮膚表現 DM-IL-15 對 HSV-1 神經細胞侵襲力的影響	20
第四章 結論與討論	24
第一節 DM-IL-15 對 HSV-1 感染引起的發炎反應相關基因表現的影響	25
第二節 DM-IL-15 對 HSV-1 感染後皮膚形成典型帶狀疱疹傷疤的影響	26
第三節 DM-IL-15 對 HSV-1 感染皮膚後對神經細胞侵襲力的影響	26
第四節 未來應進行的研究	27
第五章 研究文獻	29
第六章 圖	31
圖一：以主成份分析法比較 HSV-1 在表現 DM-IL-15 與正常小鼠皮膚誘發表現發炎反應相關基因群組的離散程度	32
圖二：分析比較 HSV-1 在表現 DM-IL-15 與正常小鼠皮膚對於發炎反應的作用效應	34
圖三：在對照組與實驗組中受 HSV-1 感染後相較於未受刺激皮膚的 CXCR2 與其受體基因增加量	35
圖四：在對照組與實驗組中受 HSV-1 感染後相較於未受刺激皮膚的促發炎反應基因增加量	36
圖五：在對照組與實驗組中受 HSV-1 感染後相較於未受刺激皮膚的 IL-4、IL-23A 與 LTA 基因增加量	37
圖六：皮膚表現 DM-IL-15 對於 HSV-1 後 14 天內傷疤形成大小的作用效應	38
圖七：皮膚表現 DM-IL-15 對於 HSV-1 感染後在皮膚組織中病理變化及噬中性白血球浸潤的影響	39
圖八：皮膚表現 DM-IL-15 對於 HSV-1 在皮膚組織感染性與複製增殖的作用效應	40
圖九：皮膚表現 DM-IL-15 對於 HSV-1 傷疤形成大小的作用效應	41
圖十：對照組與實驗組小鼠皮膚受 HSV-1 感染後第 6 至 9 天的腹背側帶狀疱疹	42

圖十一：對照組與實驗組小鼠皮膚受 HSV-1 感染後第 11 至 21 天的腹背側帶狀疱疹.....	43
圖十二：分析比較表現 DM-IL-15 實驗組與對照組小鼠皮膚經過 HSV-1 感染後疱疹傷痍的嚴重程度.....	45
圖十三：分析皮膚表現 DM-IL-15 對於 HSV-1 感染後在背側形成疱疹傷痍嚴重程度和傷痍範圍的作用效應.....	47
圖十四：分析皮膚表現 DM-IL-15 對於 HSV-1 感染後在腹側形成疱疹傷痍嚴重程度和傷痍範圍的作用效應.....	49
圖十五：比較皮膚表現 DM-IL-15 對於 HSV-1 ICP4 和 GB mRNA 在皮膚表現量的影響.....	51
圖十六：比較皮膚表現 DM-IL-15 對於 HSV-1 ICP4 和 GB mRNA 在皮膚表現量的影響.....	53
圖十七：比較皮膚表現 DM-IL-15 對於 HSV-1 ICP4 和 GB mRNA 在背根神經節表現量的影響.....	54
第七章 表	56
表一：對照組與實驗組受 HSV-1 感染後 mRNA 數量比較結果	56

第一章 簡介



第一節 DM-IL-15 為 IL-15 的異構體

自然環境中的第 15 號細胞激素(Interleukin 15, IL-15)基因結構包含 7 個 intron 和 8 個 exon，可轉譯出由 114 個氨基酸組成的 14 至 15 kD 的蛋白質。IL-15 的 mRNA 廣泛表現於全身各個組織細胞中，包含表皮細胞、神經細胞、巨噬細胞和樹突狀細胞等。完整的 IL-15 蛋白具有其生理意義，包含維持記憶型 CD8⁺ T 細胞、自然殺手 T 細胞和自然殺手細胞的發育與細胞數恆定，對於宿主的先天性與適應性免疫反應具有重要的影響(Waldmann and Tagaya 1999)。臨床研究報告指出，在乾癬和風濕性關節炎等自體免疫病患的發炎組織中檢測到 IL-15 的表現量，與一般健康人相比顯著增加(McInnes and Gracie 2004)。基因轉殖小鼠的研究中指出，過量表現 IL-15 會造成自然殺手細胞與 T 細胞增生過度增生，導致小鼠產生自發性白血病並且導致死亡(Steel, Waldmann et al. 2012)。因此，IL-15 在免疫系統中，對於發炎反應的調節具有相當重要的影響。

在 2006 年發現自然環境中存在 IL-15 的異構體 IL-15 Δ E7，這個異構體在正常小鼠體內表現量最高的地方在小腸表皮層；IL-15 Δ E7 與 IL-15 不同之處在 RNA 剪接的過程中在 exon 7 處有部分剔除，因此 IL-15 Δ E7 的 mRNA 長度比 IL-15 短，並且在生物體外實驗中發現 IL-15 Δ E7 無法像 IL-15 一樣能支持 CTLL-2 細胞的存活與增生，因此當時認為 IL-15 Δ E7 可能在自然環境下具有與 IL-15 拮抗的能力(Tan and Lefrancois 2006)。在 2015 年發表的文章中利用 ENU 突變機制產生的 P191 小鼠能顯著表現更高量 IL-15 Δ E7，並在 P191 小鼠身上發現其記憶型 CD8⁺ T 細胞的數量顯著少於正常小鼠，因為 Deficient memory 的緣故又將 IL-15 Δ E7 稱為 DM-IL-15(Lee, Chang et al. 2015)。

現有研究指出 DM-IL-15 具有調控皮膚角質細胞(Keratinocyte)活化的功能，在免疫功能健全的野生型小鼠皮膚表現 DM-IL-15 質體 DNA，在機械性刮擦刺激、化學性致敏刺激(10% Sodium dodecyl sulfate)和免疫製劑刺激類乾癬(5% Imiquimod cream)症狀，以上三種不同的動物模式中，實驗結果均顯示皮膚角質細胞活化程度下降的情形，包含角質細胞增生能力與表皮層增厚程度降低、細胞

激素與趨化因素表現量下降，以及噬中性白血球浸潤到皮膚組織的數目減少(Lee, Chang et al. 2015)。由此可見，DM-IL-15 可能具有調控週邊皮膚組織發炎反應的功能。




第二節 HSV-1 皮膚帶狀疱疹的動物模式

HSV-1 是一種線狀雙股去氧核糖核酸(double strand linear DNA)病毒，基因序列全長 150 kbp，可轉譯出多達 84 種以上的多肽，屬於相當常見的致病性病毒，全球約有 90% 的人口遭受過 HSV-1 的感染。HSV-1 進入宿主細胞的方式為藉由外套膜上的糖蛋白(glycoprotein)，如 gB 或 gC，與細胞膜上的黏著分子結合，再經由內吞作用進入宿主細胞中，接下來病毒核酸會進到宿主的細胞核中進行複製，最終會導致宿主細胞死亡，造成嚴重的組織損壞(Kollias, Huneke et al. 2015)。HSV-1 將病毒核酸送入宿主細胞核後，會在一開始最早期轉錄受感染細胞蛋白(immediate-early infected cell protein)的 mRNA，包括 ICP0 與 ICP4，兩者皆為 HSV-1 複製過程中 DNA 合成與病毒組裝不可或缺的轉錄因子，接下來感染中期時會轉錄 gB mRNA，轉譯出來的蛋白會組合在病毒外套膜上，做為 HSV-1 病毒離開原本受感染細胞，進一步感染鄰近細胞的重要黏著分子(Derfuss, Seeger et al. 2007)。

從過往動物實驗的結果得知，HSV-1 感染小鼠皮膚後的致病機制如以下順序：

- (1) 在病毒接種部位的皮膚組織中進行複製，增加病毒顆粒數，在這個過程中會造成該處細胞死亡和組織受損形成皮膚潰瘍，通常在感染後第 2 至 3 天便可觀察到皮膚發紅腫脹的現象；
- (2) 藉由週邊組織中細胞與細胞的緊密接觸，HSV-1 從皮膚細胞感染至神經細胞，然後病毒顆粒便會沿著這條感覺神經元的軸突進到與病毒接種處相對應的背根神經節中，並在神經細胞本體中進行病毒複製增殖，一般的情況下，HSV-1 病毒會在感染後 48 小時就可觀察到具有感染活性的病毒顆粒；
- (3) 背根神經節中複製增殖的病毒顆粒，一部份會經由軸突離開，感染同一皮節的皮膚組織，造成他處皮膚組織受損形成，通常會在感染後第 4 至 5 天在非病毒接種處的皮膚出現病毒疱疹，第 5 至 6 天可以觀察到帶狀疱疹的形成(Blyth, Harbour et al. 1984)。



免疫功能健全的小鼠具有抵抗 HSV-1 感染的免疫機制，在 HSV-1 感染後可以引發的免疫反應如下：(1) 宿主細胞表面的類鐸受體(Toll-like receptor, TLR)辨認 HSV-1 後，已知為 TLR3、TLR9 或 TLR2/6，活化下游路徑後促進干擾素(Interferon gamma, IFN γ)、腫瘤壞死因子(Tumor necrosis factor alpha, TNF α)、IL-1 和 IL-6，IFN γ 具有抑制 HSV-1 複製增殖的功能，TNF α 、IL-1 和 IL-6 均具有促進活化發炎反應的功能，以上多種細胞激素可以在皮膚第一道防線即時控制 HSV-1 的感染；(2) 周邊皮膚組織受到 HSV-1 感染後會產生細胞趨化因素，包含 CXCL1、CXCL2、CXCL8、CCL2 等，CCL2 可以趨化單核細胞(Monocyte)浸潤，而 CXCL1/2/8 則可以趨化多形核白血球細胞(Polymorphonuclear leukocyte)浸潤，單核細胞(或巨噬細胞)與多形核白血球會在受感染的皮膚組織中，包圍受 HSV-1 感染的細胞，使病毒顆粒無法感染更多鄰近的健康細胞，防止感染範圍擴大；(3) 適應性免疫中，CD8⁺ T 細胞活化後可以進到受感染的皮膚組織和背根神經節中，藉由降低 HSV-1 病毒顆粒數量，控制皮膚細胞與神經細胞間互相感染，防止二次感染造成皮膚組織受損，形成嚴重的帶狀疱疹傷痍(Watanabe, Adachi et al. 1999, Wakim, Jones et al. 2008, Wuest and Carr 2009)。因此，宿主會藉由活化先天性免疫反應來控制 HSV-1 初期感染範圍，同時也會活化適應性免疫反應降低病毒量，進一步預防二次感染造成的嚴重組織損傷。

第三節 利用皮膚疱疹動物模式研究 DM-IL-15 對於 HSV-1 神經細胞侵襲性的作用效應

皮膚是生物體抵抗外來刺激物入侵的第一道物理防線，皮膚組織中的角質細胞也可以分泌具有調控發炎反應和免疫細胞浸潤的細胞激素與趨化因素，因此皮膚在免疫系統中扮演重要的一員。先前本實驗室的研究已知皮膚表現 DM-IL-15 後，經過機械性、化學性或免疫製劑等不同的刺激下，均可以看到角質細胞較不活化的現象，顯示 DM-IL-15 可能會對週邊組織的先天性免疫反應造成影響。HSV-1 致病機制相當獨特，主要的感染目標是皮膚細胞，同時又會感染神經細胞，從皮膚轉移到背根神經節中；初期感染週邊組織時，會活化宿主的先天性免疫反應作為抗病毒的第一道防線，而先天性免疫反應活化後才能有效的活化適應性免

疫反應，進一步將病毒顆粒清除。因此，為了能更進一步釐清 DM-IL-15 在皮膚的作用，本論文的研究目的為利用皮膚疱疹的動物模式觀察 DM-IL-15 對於 HSV-1 在皮膚形成疱疹予神經細胞侵襲性的作用效應。為了達到本論文研究目的，將以三個實驗目標作為實驗設計的準則：(1) 探討 DM-IL-15 對 HSV-1 皮膚疱疹動物模式中發炎相關基因表現量的影響；(2) 探討 DM-IL-15 對 HSV-1 皮膚疱疹動物模式中帶狀疱疹形成過程的影響；(3) 探討 DM-IL-15 對 HSV-1 皮膚疱疹動物模式中背根神經節裡 HSV-1 相關基因表現量的影響。

第二章 實驗方法與材料

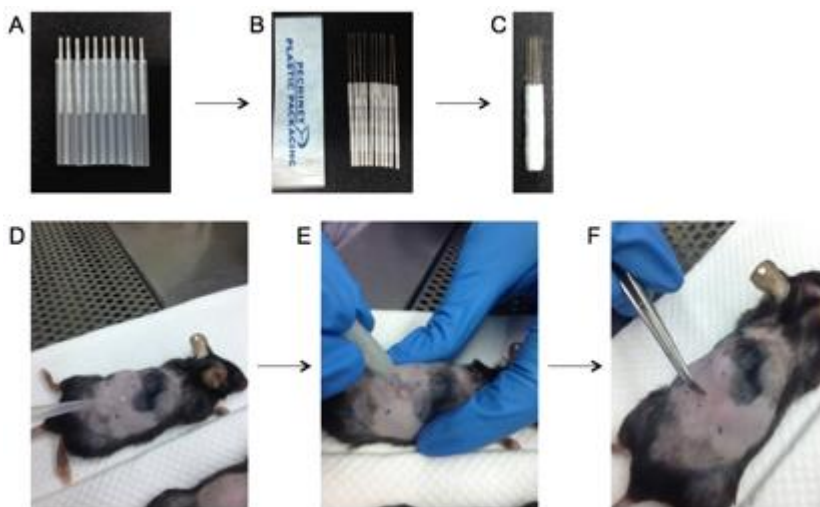


第一節 實驗用小鼠

本實驗使用從國家實驗動物中心購入的野生型 C57BL/6 小鼠（6 至 12 週大），所有的小鼠皆置於台大醫學院實驗動物中心繁殖組或是感染動物房中代養，且使用小鼠的方法步驟皆通過研究動物照顧與使用委員會的許可（動物實驗計畫申請表暨同意書編號:20140536）。

第二節 將質體 DNA 轉染至小鼠皮膚

小鼠先以適當劑量的溴乙醇(Avertin) (20 毫克/克體重)進行腹腔注射麻醉。預先將表現 IL-15 與 IL-15 Δ E7 的質體 DNA，回溶於磷酸鹽緩衝鹽水中，並且調整到 1 mg/ml 的濃度。小鼠麻醉後，以電動刀除毛，並且施予除毛膏徹底清除毛囊後，將背側皮膚標記出 1*1cm² 的區域。將 10 支針灸針用 Paraffin 捆成一束，模擬微針(Microneedle)基因槍的方式將溶於 10 ul ddH₂O 的 10 ug 質體 DNA (Empty vector 或 DM-IL-15)送入小鼠表皮層，經 TaqMan Real-time PCR 檢測後得知經過 3 天後 mRNA 的轉錄量達最高值(Lee, Chang et al. 2015)。因利用針灸針(Acupuncture needle)進行基因轉染(Transfection)，故稱之為 Acufection。



第三節 小鼠皮膚感染 HSV-1



下背側皮膚以 75% 酒精消毒後，以 19 號針與皮膚表面平行，輕微來回刮擦 20 次，在濾紙上滴入 10 ul HSV-1 病毒液(10^4 、 10^5 或 10^6 PFU)，利用過敏源測試貼片 (Finn chamber) 將帶有病毒液的濾紙覆蓋在刮擦處，最後以適當長度的自黏彈性繃帶固定 24 小時。


第四節 小鼠皮膚組織萃取 RNA

小鼠皮膚組織($5 \times 5 \text{ mm}^2$)先以液態氮急速冷凍後敲碎，加入 1 ml Trizol reagent 進行勻漿(Homogenate)，勻漿後的小鼠皮膚組織液加入 0.2 ml 的三氯甲烷(chloroform)，以手搖勻 15-20 秒後，靜置於室溫 5 分鐘。離心 12000 轉，15 min，提取上層液體。利用 RNeasy Mini spin column kit (QIAGEN, Germantown, MD) 手冊中建議的方法純化 RNA，回溶於 30- 50 ul 無核酸酶二次水，以 OD260 測量 RNA 濃度後，分裝保存在-80 度冰箱備用。

第五節 以 nCounter gene expression system 檢測樣本中 mRNA 量

利用 nCounter 基因套組 (共 179 個基因) 檢測 HSV-1 感染後刺激小鼠的發炎反應。純化後的小鼠皮膚 RNA 樣本先通過 OD260 的品質檢測後，再進行雜合反應。這部分的實驗由冷泉港公司提供技術服務。主要的實驗步驟如下:先加入 reporter probe (NanoString Technologies Inc.) 與研究基因的 mRNA 進行雜合，洗去多餘的 reporter probe 後再加入 capture probe (NanoString Technologies Inc.) 與研究基因的 mRNA 進行雜合，最後再洗去多餘的 capture probe 後將雜合完成的樣本滴在鍍有 streptavidin (Optichem, Acceler8 Technology Corporation) 的玻璃片上。最後用光學顯微鏡偵測樣本中的 capture probe 上的螢光 (Geiss, Bumgarner et al. 2008)。獲得的實驗數據即為每個基因在各個樣本內的絕對表現量。該數據先經過 internal control gene 的標準量化後，再作後續的比較分析。

第六節 病毒溶斑定量分析 (Plaque forming assay)



先將 Vero 細胞置入 24 孔盤 (1×10^5 cells/well)，培養 24 小時。之後在貼滿細胞的 well 中放入經過序列稀釋的病毒液體 200 μ l，在細胞培養箱作用兩小時。吸掉病毒液之後在 well 中加入 1ml 1.25% CMC，再放回細胞培養箱中約 48 小時。如果可以在顯微鏡下觀察到 well 中的細胞產生病毒溶斑，即可加入 PFA 固定。以 4% PFA 於室溫下固定在 well 中 10 分鐘與 5 分鐘，移除 PFA 並以 1ml PBS 洗細胞兩次 5 分鐘。再加入 200 μ l PBS (含 0.2% Triton X-100 跟 2% PFA) 到每個 well 中並至於室溫 30 分鐘。移除液體之後再使用 1ml PBS 洗 5 分鐘兩次。加入 200 μ l 200X 稀釋的 anti-HSV-1 抗體於每個 well 中作用 45 分鐘。將一抗移除並以 500 ul PBS 洗兩次。之後再加入結合生物素 (biotin) 次級抗體 (goat anti-mouse IgG) 至每個 well 中作用 45 分鐘。移除二抗並以 500 ul PBS 洗兩次之後再以 500 ul TBS 洗一次。加入 200 ul streptavidin alkaline phosphatase 並靜置反應 40 分鐘。移除 streptavidin alkaline phosphatase 再以 500 ul TBS 洗兩次。加入 200 ul substrate Tris (pH8.2) 靜置 3 分鐘以改變其酸鹼值，以供 fast red substrate 作用。加入 200 ul fast red substrate 後靜置 30 分鐘，直到表現病毒抗原的細胞出現 Fast Red 的紅色訊號，即以水沖洗，風乾後在顯微鏡下紀錄病毒溶斑數。

第七節 蘇木精與伊紅染色(Hematoxylin & Eosin)以及 Ly6G 免疫組織化學染色

將截取下的皮膚組織，先浸泡在福馬林(4% paraformaldehyde)中固定數天後，送至台大醫學院實驗動物中心病理學實驗室進行樣本的石蠟包埋以及 H&E 染色。同時獲得 5 μ m 厚度的皮膚切片，進行免疫組織化學染色分析。免疫組織化學染色實驗的主要步驟如下:石蠟切片先經過 Xylene 脫蠟處理 5 分鐘(連續二次)後，再以 100%，95%，85%，70%，60% 以及 50% 等序列濃度酒精分別處理 5 分鐘，最後放置純水中，使切片組織回復含水量，隨再浸泡在 PBS 中處理五分鐘。將復水後的切片，先以 blocking buffer(Ultra V block)覆蓋表面(50 ul/section)並且於室溫下避光作用 5 分鐘。簡單地以 PBS 清洗後，加入 200 倍稀釋的抗 Ly6G 抗體，在室溫下反應 45 分鐘，再以含有 0.1% Tween-20 的 PBS (TBS)洗五分鐘，共三次，接著加入 Simple Stain MAX PO 在室溫下反應 30 分鐘，再以 TBS 洗五分鐘，共三次。隨後加入 DAB 呈色後(棕色)(Vector Labs)，將玻片浸洗於二次水五分鐘以

中止呈色反應。同時快染 Methyl green 進行核染，提高對組織型態的辨識。最後將染色後的玻片，風乾、封片。



第八節 ICP4 與 gB 即時定量 PCR (qRT-PCR)

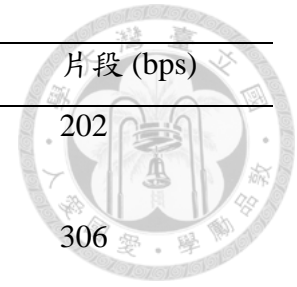
將純化後的總 RNA 樣本(2 µg)先與 1 ul 10mM dNTP (1 ul)和 1 ul Random primer (以水補充總體積到 10 ul)於 65°C 下作用 5 分鐘，再置放到 4°C 2 分鐘。隨後加入 4 ul 5X First strand buffer、2 ul 100 mM DTT、1 ul M-MLV RTase 以及 1 ul RNase 抑制劑 (RNAsin, 0.5si)，將試管放入溫度循環器 (Thermal cycler)，進行反轉錄反應 (37°C, 50 分鐘→70°C, 15 分鐘)。將反轉錄好的 cDNA 保存在-20°C 冰箱中備用。

第一步先放大樣本中 ICP4 與 gB 的基因數量。取出 4 ul 反轉錄好的 cDNA 樣本，加入 2.5 ul 10X PCR reaction buffer, 0.76 ul 50mM MgCl₂, 1 ul 10mM dNTP, 1 ul 10mM 5'-outer primer (ICP4 或 gB), 1 ul 10mM 3'-outer primer (ICP4 或 gB), 0.3 ul Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen)，加入無菌二次水補充體積至 25 ul，最後放入溫度循環器中增加 ICP4 202 bps 基因片段或 gB 306 bps 片段的數量。

PCR 程式

步驟	循環	溫度(°C)	時間(分:秒)	備註
Stage 1	-	95	5:00	
		95	0:15	
		55	0:15	每循環上升 1°C
Stage 2	10	72	0:30	
		95	0:15	
		55	0:15	
Stage 3	30	72	0:30	
		72	7:00	
Stage 4	-	4	無限	

Primer 序列 (Human herpesvirus 1 complete genome, gi: 1944563)



名稱	序列	片段 (bps)
ICP4 5'-outer	CTGCTTGTTCTCCGACGCCAT	202
ICP4 3'-outer	CGGCCGTCCCTGTCCTTTTT	
gB 5'-outer	ACGTACAGCTCCGCGAGC	306
gB 3'-outer	TCTGCACCATGACCAAGTGG	

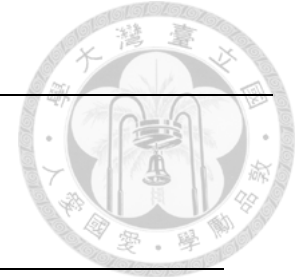
第二步將放大後的 PCR 產物進行 SYBR green 即時定量 PCR。在 96 孔盤中以 2 ul 100 倍稀釋的 PCR 產物進行反應，加入 5 ul 2X SYBR green master mix，0.4 ul 10 mM 5'-inner primer (ICP4 或 gB)，0.4 ul 10 mM 3'-inner primer (ICP4 或 gB)，以無菌二次水補充體積至 10 ul，最後將 96 孔盤以 1000 rpm 離心 1 分鐘，放入即時定量溫度循環器中偵測螢光值，並利用 PikoReal 軟體進行後續分析。

PCR 程式

步驟	循環	溫度(°C)	時間(分:秒)	備註
Stage 1	-	95	5:00	
		95	0:15	
		55	0:15	每循環上升 1°C
Stage 2	10	72	0:30	讀取吸光值
		95	0:15	
		55	0:15	
Stage 3	30	72	0:30	讀取吸光值
Stage 4	-	60	0:30	
		Melting curve		每個循環上升 0.5°C
Stage 5	-	自 60°C 上升至 95°C		讀取吸光值
Stage 6	-	20	0:10	

Primer 序列 (Human herpesvirus 1 complete genome, gi: 1944563)

名稱	序列	片段 (bps)
ICP4 5'-outer	AGGTCACCTACGGACTCTCG	91
ICP4 3'-outer	CTTTTTCCCACCCAAGCAT	
gB 5'-outer	GGGTACTCGGTCAGGTTGGT	99



第九節 實驗材料

名稱	供應商	使用方法
Empty vector 質體 DNA	實驗室製備	10 ug DNA 溶於 10 ul ddH ₂ O 中
DM-IL-15 質體 DNA	實驗室製備	10 ug DNA 溶於 10 ul ddH ₂ O 中
KOS-HSV-1	實驗室製備	10 ⁶ PFU 溶於 10 ul MEM 中

第十節 組織染色抗體與 PCR 酵素

名稱	供應商	產品編號	稀釋倍數
HSV polyclonal antibody	Covance	SIG-3435	1:200
Anti-mouse Ly6G antibody	BioLegend	127601	1:200
Biotinylated anti-rabbit IgG	Vector	BA-1000	1:200
Alkaline phosphatase	R & D system	AR001	1:400
Streptavidin			
Peroxidase-conjugated streptavidin	Jackson Immunoresearch	016-030-084	1:400
Simple Stain Mouse	Nichirei	414341F	直接使用
Max PO (Rat)	Biosciences		
DAB substrate	Vector	SK-4100	直接使用
Platinum Taq DNA Polymerase	Invitrogen	10966-030	-
SensiFAST SYBR Hi-ROX Mix	Bioline	BIO-92005	-
Random primer	Invitrogen	565321	-
MMLV	Invitrogen	28025	-
RNasin	Promega	28119008	-

第三章 實驗結果



第一節 DM-IL-15 調節 HSV-1 病毒感染小鼠皮膚的發炎反應

為了瞭解 DM-IL-15 對於皮膚抗病毒發炎反應的影響，將預先已經表現 DM-IL-15 的小鼠皮膚，經過 HSV-1 感染後，利用 nCounter 基因表達檢測實驗技術分析 179 個與發炎反應相關基因與對照組皮膚表現量的差異。首先，先將獲得的大量數據利用主成份分析法(Principal component analysis, PCA)，將各組樣本的基因表現情形分類分析，初步瞭解是否有顯著的差異程度。主成份分析法可以將大量的獨立數據組分散到不同的維度，經由統計方法計算後重新將各個維度的數據分類，得到新的一組二維的數據呈現圖(Jolliffe 2002)。因此主成份分析法可以用來簡化大量的數據組，例如 nCounter 的結果，從多個變項簡化成兩個變項來看各個實驗組別間基因表現的差異度。實驗數據分析的原理是利用數學計算方法將多個變項(基因)投影至同一個平面中來表示各樣本間的基因表現離散程度，兩個研究樣本之間的距離越大，代表發生變化的基因群組的組成以及表現變化差異度越大，距離越近則代表差異度越小。

圖一(A) 顯示在對照組(WT/pEmpty vector)中小鼠皮膚受到刮擦刺激及 HSV-1 感染後 24 小時可以看到與未受刺激的皮膚間的距離增加，顯示受到 HSV-1 感染後 179 個基因當中有部分基因組別有不同的表現，其中具有差異的基因組別，其表現量可能增加或減少。同樣在實驗組(WT/pDM-IL-15)也可看到小鼠皮膚受到刮擦刺激及 HSV-1 感染後 24 小時與未受刺激的皮膚間的距離增加，顯示兩種刺激方式可引發不同的基因表現。

圖二(B) 可以看到對照組未受刺激皮膚和實驗組未受刺激皮膚相對距離只有 2698，因此只有給予質體 DNA 但沒有再給其他額外的刺激時，兩組間的基因表現模式是相近的。但在加入刮擦刺激與 HSV-1 感染之後，可以在 24 小時看到明顯的差異，對照組和實驗組皮膚受刮擦刺激和 HSV-1 感染 24 小時後，兩組間的相對距離為 10774，比其他時間組別間的距離都還要遠，顯示出 DM-IL-15 具有調控 HSV-1 感染後宿主表現發炎反應基因的可能性。

圖二(C) 將組成二維圖的兩個主成分(PCA1、PCA2)分別獨立出來看對照組與

實驗組間差異程度最大時是在 HSV-1 感染後的哪個時間點。PCA1 對於顯現組間差異的分辨能力為 54.87%，而 PCA2 則有 24%，表示從這兩個主成份的變化可以顯現出 179 個發炎基因在對照組與實驗組間最大的差異程度。從 PCA2 可以明顯看到在 HSV-1 感染後對照組與實驗組兩點間的距離最遠，代表在 24 小時基因表現的種類或程度有最明顯的差異，因此 HSV-1 感染後 24 小時可能是 DM-IL-15 造成最大差異的時間點，後面的分析會著重於 24 小時的變化。

1.1 交叉比對病毒感染後 12 至 48 間持續有比未感染皮膚 2 倍以上 mRNA 數量的基因種類在對照組中多數屬於細胞激素與細胞趨化激素

在對照組中交叉比對找出 HSV-1 感染後 12、24 及 48 小時之間 mRNA 數量比未受刺激皮膚高出 2 倍以上的基因種類，在圖二(A) 可以看到在 12 到 24 小時間有 29 個基因有 2 倍以上上升量，感染後 48 小時只有 21 個基因具有 2 倍以上上升量，代表在早期小鼠皮膚受到 HSV-1 感染後會有 21 個基因會持續有 2 倍以上的增高。但是在實驗組中，HSV-1 感染後 12 到 24 間只有 23 個基因表達量有 2 倍的上升，感染後 48 小時則只有 15 個基因表達量具有 2 倍上升，顯示 DM-IL-15 會使部分 HSV-1 感染後持續表現的基因受到抑制。

為了知道分別在 HSV-1 感染後對照組與實驗組在 12 至 24 小時與 24 至 48 小時上升的基因種類有何差別，進一步再將對照組與實驗組進行交叉比對。從圖二(C) 可以看到在 HSV-1 感染後 12 至 24 小時，只有在對照組才會有 2 倍表現量的基因有 12 個，而在實驗組中才會有 2 倍表現量的基因有 6 個。在圖二(D) 可以看到 HSV-1 感染後 24 至 48 小時，只有在對照組才會有 2 倍表現量的基因有 13 個，而在實驗組才會有 2 倍表現量的基因有 7 個。以上結果顯示，DM-IL-15 可能會藉由抑制部分基因的表現，再引起原來在對照組皮膚中不會表現的基因增加表現量，進而達到調控 HSV-1 感染後宿主的免疫反應的程度。

從原始的 mRNA 數目還是可以看到量有明顯差異，因此分為三大組(見表一)，其中包含對照組表現量高於實驗組、兩組無差別和對照組表現量低於實驗組。HSV-1 感染後 12 至 24 小時，大部分在對照組的基因表現量都高於實驗組，這些基因當中除了 Cfb、Crip 及 Tlr1 以外，其他均為細胞激素和細胞趨化激素，顯示

HSV-1 感染後對照組可能會比實驗組引發更多的免疫細胞浸潤和發炎反應；24 至 48 小時的結果同上。



1.2 DM-IL-15 調節與 CXCR2 結合的相關細胞趨化激素的基因表達

大部分受到 HSV-1 感染後 mRNA 數量會上升的基因上多半都具有 NF- κ B 的結合位，顯示 HSV-1 感染會造成 NF- κ B 路徑的活化，來促進細胞趨化激素和細胞激素基因表現(表一，紅字為受 NF- κ B 調控的基因)。實驗結果發現與其他基因相比，CXCL1、CXCL2、CXCL3 及 CXCL5 的基因表現量特別容易受到 DM-IL-15 的影響(表一)，尤其在 HSV-1 感染後 24 小時出現最大的差異(圖三)，並且這 4 個基因轉錄的蛋白皆為嗜中性白血球上 CXCR2 (IL8RB)的受體，同時也均可由皮膚的角質細胞分泌(Kroeze, Boink et al., 2012)，顯示在皮膚上局部給予 DM-IL-15 後可能使角質細胞的 NF- κ B 路徑活化程度下降，進一步造成細胞趨化激素的產量下降，造成皮膚受到刺激時嗜中性白血球的浸潤程度明顯比為表現 DM-IL-15 的皮膚為低(Lee, Chang et al. 2015)。

1.3 DM-IL-15 調節促進發炎反應的細胞激素基因表現

除了嗜中性白血球的細胞趨化激素會受到 DM-IL-15 調控以外，IL-1 β 、IL-6 和 TNFSF14 的基因表現也顯著受到 DM-IL-15 的影響(圖四)。IL-1 β 和 IL-6 皆為角質細胞受外界刺激後會分泌的細胞激素，用來促進發炎反應，可以活化在皮膚中的樹突狀細胞(Nestle, Di Meglio et al. 2009)，並且這兩個基因同樣仰賴 NF- κ B 路徑促進轉錄 mRNA，與細胞趨化激素的情形一致。TNFSF14 基因轉譯的蛋白為 LIGHT，會與 T 細胞上的 HVEM (Herpesvirus entry mediator)交互作用，進而活化 T 細胞中的 NF- κ B 路徑，使 T 細胞的存活時間增長；反之，HSV-1 表面的醣蛋白 (glycoprotein D, gD)若與 HVEM 結合，則會促進 T 細胞的細胞凋亡(Cai and Freeman 2009)。在實驗組中 TNFSF14 的基因表現量低於對照組，因此 DM-IL-15 可能影響宿主 T 細胞的免疫功能，進而影響皮膚的抗病毒免疫反應(圖三與圖四)。

1.4 DM-IL-15 提高皮膚感染 HSV-1 後 IL-4、IL-23A 與 LTA 基因表現

在實驗組中，HSV-1 感染後大多數的基因表現量與未受刺激的皮膚相比只有些微的上升，但是 IL-4、IL23A 和 LTA 在實驗組卻持續在 12 小時、24 小時和 48 小時均有表現，且高於對照組(圖五)。在 IL-4 較高的環境下會促使宿主偏向 Th2 的反應，且具有抑制巨噬細胞活化的功能(Nestle, Di Meglio et al. 2009)，顯示出 DM-IL-15 可能具有抑制免疫反應的能力。LTA (Lymphotoxin alpha)也會與 HSV-1 的 gD 競爭 T 細胞表面的 HVEM(Cai and Freeman 2009)。在對照組中 HVEM 的受體是 LIGHT 表現量上升，增強 T 細胞存活率；在實驗組中加入了 DM-IL-15 後卻是 LTA 上升，因此可以看到受 HSV-1 感染後，DM-IL-15 可能會引起與一般 IL-15 截然不同的免疫反應，影響後期宿主用以抵抗 HSV-1 感染的適應性免疫反應。

第二節 DM-IL-15 對 HSV-1 在小鼠皮膚形成帶狀疱疹傷痂的影響

為了進一步了解皮膚表現 DM-IL-15 對於 HSV-1 引起的疱疹傷痂形成的病理變化的影響，正常 C57BL/6 小鼠皮膚先施予 DM-IL-15 質體三天後，進行 HSV-1 感染，與給予空質體的對照組小鼠比較疱疹傷痂在連續期間內形成的結果，直到傷痂脫落，總共觀察 14 天。

2.1 皮膚表現 DM-IL-15 會促使 HSV-1 感染後第 7 天開始形成帶狀疱疹外觀且疱疹傷痂持續到第 14 天

實驗結果發現對照組(WT/pEmpty vector)小鼠皮膚受到 HSV-1 感染後第 2 天開始在病毒接種處出現囊泡，直到第 7 天潰瘍處開始有痂皮形成，到第 10 天疱疹傷痂消失，顯示已經痊癒 (圖六，上)。實驗組(WT/pDM-IL-15)小鼠 HSV-1 感染的情況，同樣在第 2 天開始出現在病毒接種處出現囊泡，但是在第 5 天開始疱疹傷痂開始擴大，第 7 天出現典型帶狀疱疹，並且持續有出現新的囊泡在帶狀疱疹以外的區域，第 10 天帶狀疱疹有部分表皮脫落，第 14 天仍可看到疱疹傷痂，尚

未癒合(圖六,下)。同樣受到 HSV-1 感染,對照組的疱疹傷痍範圍侷限在一處,並沒有擴散,並且會逐漸變小直到痊癒,但表現 DM-IL-15 後疱疹傷痍範圍擴大,並且持續到第 14 天仍未修復受 HSV-1 感染而破損的表皮層。



2.2 從組織切片可看到實驗組在 HSV-1 感染後第 7 至 14 天的皮膚厚度和嗜中性白血球的數量均高於對照組

從圖七(A)中 H&E 染色結果可看到對照組小鼠皮膚受到 HSV-1 感染後第 1 天至第 5 天有明顯表皮層增厚的情形;實驗組皮膚則是到 HSV-1 感染後第 2 天才開始出現表皮層增厚,並且角質層也有明顯變厚。將 H&E 結果對照圖七(B)中 Ly6G 免疫組織染色的結果,可以看到對照組在 HSV-1 感染後第 2 天嗜中性白血球已經浸潤到真皮層往 HSV-1 疱疹傷痍處移動,到第 5 天嗜中性白血球的數量更明顯的增加;實驗組在 HSV-1 感染後第 2 天嗜中性白血球仍然聚集在皮下組織處,直到第 5 天才開始明顯大量浸潤到真皮層,顯示在感染初期 DM-IL-15 會延緩嗜中性白血球到達感染處的速度。

從圖七(C) H&E 染色結果可看到對照組小鼠受 HSV-1 感染後第 7 天疱疹傷痍範圍集中於一處,第 10 至 14 天雖然表皮層仍然有增厚的情形,但是已經長出新的完整的表皮層;實驗組小鼠在第 7 天的疱疹傷痍範圍遠大於對照組,並且深及真皮層,表皮層的細胞幾乎全部死亡成為結痂,而到了第 10 至 14 天仍可看到零星散佈在各處的病毒囊泡。對照圖七(D)中對照 Ly6G 免疫組織染色的結果,可以看到在對照組中,HSV-1 感染後第 7 至 14 天已經沒有嗜中性白血球浸潤的情形,但是在實驗組中直到第 14 天仍可在真皮層靠近病毒囊泡處出現很多嗜中性白血球。顯示在感染初期 DM-IL-15 延遲嗜中性白血球到達感染處的速度,可能會影響感染後期皮膚免疫的能力,直到 HSV-1 感染後第 14 天還有發炎的情況。

2.3 DM-IL-15 提高 HSV-1 感染皮膚初始日的複製增殖

從小鼠皮膚外觀(圖六)和組織切片(圖七)的結果都可以看到實驗組受到 HSV-

1 感染後第 7 至 14 天的疱疹傷痍的嚴重程度和範圍大小都比對照組嚴重，因此進一步分析小鼠皮膚中 HSV-1 的病毒量是否有差異。從圖八(A) Plaque assay 的結果顯示 HSV-1 感染後第 2 天對照組測得的病毒量最高，且有一邊的皮膚病毒量高於實驗組 100 倍，但是因為組內誤差值太大所以沒有統計上的差異；而實驗組 HSV-1 感染後第 5 天的病毒量高於第 2 天 10 倍，顯示病毒複製量有隨著時間增加的情形，與對照組會隨時間減少的情形相反。在 HSV-1 感染後第 7 至 14 天，無論是 Plaque assay (A) 或 HSV-1 免疫組織染色 (B) 都無法測得病毒的存在，可能此時病毒量已經低到無法偵測。

第三節 DM-IL-15 對小鼠感染 HSV-1 後帶狀疱疹形成過程的長期觀察

為了進一步確認皮膚表現 DM-IL-15 對於 HSV-1 引起的疱疹傷痍形成的病理變化的影響，這組實驗中只將病毒單邊接種於小鼠右下背側，自感染第一日起每日觀察小鼠背側病毒接種處以及同一皮節的皮膚外觀，紀錄形成第一個病毒疱疹的時間，直到疱疹傷痍完全癒合脫落為止，共 25 天的觀察實驗。

3.1 表現 DM-IL-15 實驗組小鼠受 HSV-1 感染後第 5 天在原病毒接種處以外的腹側皮膚出現新的潰瘍點

從圖九的 A 圖小鼠外觀可以看到，對照組小鼠(WT/pEmpty vector)受 HSV-1 感染後第 3 天在病毒接種處開始出現局部表淺的潰瘍，第 5 天時潰瘍處形成突起的囊泡且周邊皮膚出現紅腫的發炎現象，但是傷痍的範圍大小仍侷限在病毒接種處。實驗組(WT/pDM-IL-15)同樣在受到 HSV-1 感染後第 3 天開始在病毒接種處出現表淺的潰瘍，在第 5 天時出現紅腫的發炎現象。從圖九的 B 圖可以看到 HSV-1 感染後第 5 天，4 隻實驗組小鼠除了在背側之外，都在遠離原本病毒接種處的腹側皮膚出現新的零散的潰瘍點，且腹側的疱疹病毒傷痍外觀與 HSV-1 感染早期第 3 天的背側相似，顯示實驗組小鼠背側與腹側皮膚的感染病程不同。HSV-1 可以在原病毒接種處感染周圍鄰近細胞之外，亦可透過神經元軸突末端入侵到

背根神經節中的神經元本體，並在神經節中沿著同一束神經感染他處皮膚形成二次感染(van Lint, Ayers et al. 2004)，由於實驗組比對照組更早在腹側出現二次感染位置，推測可能 HSV-1 病毒在實驗組小鼠中比對照組更早進到背根神經節或是在神經中有更高的病毒量，因而沿著神經細胞感染同一皮節(Dermatome)的皮膚組織。

3.2 表現 DM-IL-15 實驗組小鼠受 HSV-1 感染第 6 天形成典型帶狀疱疹且第 9 天仍有新的疱疹持續出現

顯示對照組小鼠(WT/pEmpty vector)受 HSV-1 感染後第 6 天開始形成從病毒接種處延伸至腹側的典型帶狀疱疹且有零散的出血點；第 7 天背部及腹部的潰瘍加深並且表皮層脫落，傷痍周邊皮膚亦持續有紅腫發炎的情形；第 8 天背部傷口部分區域開始結痂，腹部的傷口則持續加深且有部分真皮脫落，真皮脫落處有紅腫發炎的現象且有滲液；第 9 天原本背部及腹部的疱疹均有完整的痂皮覆蓋，已沒有出血點，且紅腫發炎的情形相較於前一天有獲得緩解(圖十，A)。然而，實驗組小鼠(WT/pDM-IL-15)受 HSV-1 感染後第 6 天從原本零散的潰瘍點形成典型帶狀疱疹；第 7 天從背側延伸至腹側的帶狀疱疹傷口範圍擴大，伴隨紅腫及滲液等發炎現象，且背側疱疹有部分表皮脫落；第 8 天自背側延伸至腹側的帶狀疱疹出現大範圍真皮脫落，伴有明顯的出血點且可觀察到皮下浮出的微血管；第 9 天帶狀疱疹周邊皮膚紅腫情況持續，並無緩解的趨勢，真皮脫落的部分亦無形成痂皮，並且在帶狀疱疹外的皮膚出現新的潰瘍點(圖十，B)。由以上觀察顯示對照組在 HSV-1 感染後第 6 天疱疹開始明顯擴大，第 9 天開始有結痂修復的情形，但實驗組在第 9 天仍有新的疱疹出現，且沒有結痂修復的情形。

3.3 皮膚表現 DM-IL-15 延長感染 HSV-1 後疱疹傷痍持續的時間

分析比較 HSV-1 感染後第 11-21 天的實驗結果如下：對照組小鼠(WT/pEmpty vector)於 HSV-1 感染後第 11 天已有部分痂皮開始脫落，以及長出新的表皮層；於第 14 天痂皮已經全數脫落，原本帶狀疱疹生成的地方已修復(圖十一，A)。相對地，實驗組小鼠(WT/pDM-IL-15)於 HSV-1 感染後第 11 天仍可看到失去表皮層

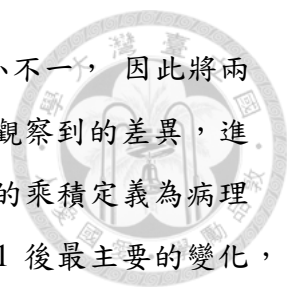
的帶狀疱疹，並有紅腫發炎的情形；第 13 天背部的病毒疱疹開始結痂；第 15 天背部的痂皮脫落，但腹部仍有新的疱疹生成；第 21 天痂皮脫落，原本帶狀疱疹的傷口已經癒合(圖十一，B)。由上觀察顯示對照組在 HSV-1 感染後兩週內傷痂會癒合，但實驗組則超過 20 天，因為新的疱疹會在腹側反覆出現，延長傷口癒合的時間。

3.4 皮膚表現 DM-IL-15 增加感染 HSV-1 後腹背側傷痂的嚴重程度及持續時間

感染 HSV-1 後病毒疱疹的嚴重度可以從傷痂的紅腫與脫皮的程度，將這些病理變化劃分為六個等級，各等級的歸類方式如圖十二(A)。由於 HSV-1 從背側皮膚感染，在局部組織進行複製擴增後或是同時，部分病毒仍可能通過末梢神經軸進入背根神經節，在神經細胞本體內做進一步的增殖後，再沿著神經軸突反方向離開神經細胞進入非直接感染的皮膚區域。因此，在此感染模式下也能在腹側皮膚出現顯著的疱疹傷痂。我們的實驗結果發現小鼠感染 HSV-1 後背側與腹側疱疹出現的時間不同，疱疹傷痂的嚴重程度也有差異，因此以腋中線為界，分別比較背側或腹側疱疹傷痂在對照組與實驗組之間的病理程度的差異。圖十二(B)背側疱疹傷痂嚴重程度的評分結果可以看到，對照組在 HSV-1 感染後第 6 至 10 天嚴重程度明顯上升，於第 11 天開始下降；皮膚表現 DM-IL-15 的實驗組小鼠疱疹傷痂嚴重程度從第 6 天開始上升，但從第 16 天才開始下降，經統計分析結果顯示兩組曲線之間具有顯著差異。圖十二(C)腹側疱疹傷痂嚴重程度的評分結果可以看到，對照組在 HSV-1 感染後第 6 至 10 天嚴重程度明顯上升，於第 11 天開始下降；實驗組提早在第 5 天開始上升，延後至第 16 天才開始下降，經統計分析結果顯示兩組曲線之間具有顯著差異。以上結果顯示，皮膚表現 DM-IL-15 後會增加 HSV-1 疱疹傷痂處於 4 至 6 分較高嚴重度的時間，延緩疱疹傷痂緩解癒合的情形。

3.5 皮膚表現 DM-IL-15 增加 HSV-1 感染後在背側形成疱疹傷痂嚴重程度和傷痂範圍

病理嚴重程度僅能表示一個疱疹傷痂的皮膚受損的深度和紅腫程度，並不包



含傷痂面積的大小，而 HSV-1 感染後會造成皮膚受損面積大小不一，因此將兩個觀察值獨立分開比較不足以表達對照組與實驗組小鼠間實際觀察到的差異，進一步將病理嚴重度評分 (0 ~ 6) 與傷痂範圍大小(mm²)兩個數值的乘積定義為病理指數(Pathology index)，合併兩個觀察值來代表小鼠感染 HSV-1 後最主要的變化，同時將小鼠皮膚傷痂面積與皮膚病理等級一起比較。從圖十三(A) 可以看到對照組感染 HSV-1 後第 6 至 10 天背側病毒接種處疱疹傷痂病理嚴重度顯著上升，但傷痂範圍大小則在受到控制沒有繼續增加，並於第 11 天嚴重程度開始下降，傷痂範圍減少；從圖十三(B) 可以看到實驗組在 HSV-1 感染後第 5 天背側傷痂範圍明顯擴大，且第 6 天嚴重度也跟著加深，第 16 天嚴重度開始下降，傷痂範圍也跟著變小。圖十三(C) 病理指數結果經過統計分析後，可以看到在 20 天內對照組與實驗組間的病理指數變化趨勢具有顯著差異，對照組於第 10 天開始明顯下降，而實驗組則會持續到第 16 後才開始明顯下降，數據化的結果與外觀變化觀察結果一致，皮膚表現 DM-IL-15 後會造成 HSV-1 感染後背側病毒疱疹傷痂的嚴重程度加深且持續的時間較久。

3.6 皮膚表現 DM-IL-15 增加 HSV-1 感染後在腹側形成疱疹傷痂嚴重程度和傷痂範圍

除了背側病毒接種處的皮膚外，也進一步分析腹側二次感染的疱疹傷痂變化，從圖十四(A) 可以看到對照組感染 HSV-1 後第 6 天腹側疱疹傷痂病理嚴重程度顯著上升，同時疱疹傷痂範圍開始增加，於第 11 天開始嚴重程度開始下降，傷痂範圍開始減少；從圖十四(B) 可以看到實驗組在 HSV-1 感染後第 5 天腹側傷痂範圍明顯擴大，且第 6 天嚴重度也跟著加深，到第 16 天嚴重度開始下降，傷痂範圍也跟著變小。從圖十四(C) 的病理指數統計分析可以看到同樣在 HSV-1 感染 20 天內對照組與實驗組間的曲線有顯著差異，統計結果與外觀變化觀察結果一致，皮膚表現 DM-IL-15 會促使 HSV-1 感染後在腹側提早一天出現二次感染位置，並且增加疱疹傷痂的嚴重度和持續時間。

第四節 皮膚表現 DM-IL-15 對 HSV-1 神經細胞侵襲力的影響



已知 HSV-1 感染小鼠後，會從感染處皮膚中的感覺神經進入到背根神經節中，再經由同一束神經感染其他部位的皮膚，造成持續性的感染(Blyth, Harbour et al. 1984)。前一組實驗以 10^6 PFU HSV-1 感染小鼠右下背側皮膚觀察 DM-IL-15 對帶狀疱疹形成的影響，結果顯示皮膚表現 DM-IL-15 會比空質體對照組小鼠提早出現腹側、非病毒接種處的疱疹，並且病毒傷痍持續時間更久，顯示 DM-IL-15 可能促使 HSV-1 更易進入背根神經節。過去的研究指出在病毒量減少的情況下，HSV-1 在原病毒接種處對組織造成的傷害會降低，較傾向從周邊組織侵入神經組織中造成持續性的感染(Metcalf, Hamilton et al. 1979)。因此接下來這組實驗，我們將原來的 10^6 PFU，調整為左下背側接種 10^5 PFU 和右下背側接種 10^4 PFU HSV-1，觀察病毒疱疹傷痍的形成過程，進一步探討皮膚表現 DM-IL-15 後，是否能促進 HSV-1 進入背根神經節造成二次感染。

4.1 皮膚表現 DM-IL-15 造成 10^5 PFU HSV-1 感染後第 10 天出現新的疱疹傷痍且皮膚組織中的 ICP4 mRNA 表現量較低

圖十五(A)的皮膚外觀顯示，皮膚感染 10^5 PFU HSV-1 後，表現空質體的對照組小鼠於第 7 天可看到從背側病毒接種處延伸至腹側形成典型的帶狀疱疹傷痍，部分表皮脫落且伴有紅腫發炎的情形，於第 10 天形成痂皮，原本的疱疹傷痍已經癒合；皮膚表現 DM-IL-15 的實驗組小鼠，於第 7 天背側病毒接種處皮膚的表皮完整並沒有明顯的疱疹傷痍或紅腫發炎的情形，但是腹側則有零散的類似 HSV-1 感染造成的潰瘍點(箭頭標示處)，於第 10 天背側出現典型的 HSV-1 疱疹，不規則的外觀與 10^6 PFU 接種量在腹側出現的二次感染疱疹傷痍相似，且不同於對照組已經癒合，而是有新的病毒疱疹出現。圖十五(B)病毒疱疹傷痍的嚴重程度可以看到，對照組小鼠皮膚在 10^5 PFU HSV-1 感染後第 7 天，背側病毒接種處的疱疹傷痍嚴重程度高達 5 分，腹側的嚴重程度為 4 分，於第 10 天背側已經沒有病毒疱疹，腹側下降為 1 分，腹背側均有癒合的現象；實驗組則不同，於感染後第 7 天背側沒有疱疹傷痍，但第 10 天嚴重程度卻上升為 3，腹側第 7 天為 1 分，第 10 天沒有明顯的疱疹傷痍。圖十五(C)病毒疱疹傷痍的範圍大小可以看到，在

HSV-1 感染後第 7 天，對照組小鼠背側與腹側的疱疹傷痍均大於實驗組，在第 10 天則是實驗組背側疱疹傷痍大於對照組。以上結果顯示，皮膚表現 DM-IL-15 後，降低 HSV-1 接種量至 10^5 PFU 情況下並不會產生自背側環繞至腹側的帶狀疱疹，但仍然會延長疱疹傷痍存在的時間。

進一步收集小鼠皮膚分析皮組織中 HSV-1 病毒量，分析病毒量與疱疹傷痍形成的相關性，利用 HSV-1 感染後宿主細胞後的生命週期中會表現先早期 ICP4 和中期表現 Glycoprotein B (gB) 的特性，進行病毒定量(Derfuss, Segerer et al. 2007)。從圖十五(D)中可看到，對照組小鼠感染 10^5 PFU HSV-1 後第 7 天在背側與腹側的疱疹傷痍組織中均可測得 ICP4 mRNA 表現，第 10 天則基因表現量過低無法偵測；實驗組小鼠只有在 HSV-1 感染後第 7 天的背側病毒接種處皮膚可測得 ICP4 mRNA 表現，且表現量與對照組相近，其餘第 7 天的腹側和第 10 天的腹背側皮膚組織皆表現量過低無法偵測。圖十五(E)為 gB mRNA 表現量檢測結果，對照組小鼠感染 10^5 PFU HSV-1 後第 7 天的背側疱疹傷痍中基因表現量過低無法偵測，第 10 天則是明顯上升，腹側疱疹傷痍只有在第 7 天可以偵測到些微的 gB mRNA，第 10 天則無法偵測；實驗組小鼠感染後第 7 天背側及腹側均有 gB mRNA 表現，且腹側的表現量高於對照組 5 倍以上，第 10 天背側的表現量與對照組相近，腹側則表現量過低無法偵測。從以上結果可知，病毒疱疹傷痍嚴重程度與範圍大小可能與 HSV-1 感染後 ICP4 mRNA 量有關，對照組小鼠於感染後第 7 天腹背側疱疹傷痍嚴重程度和範圍大小均大於實驗組，同樣 ICP4 mRNA 表現量也高於實驗組。並從以上實驗結果得知，皮膚表現 DM-IL-15 後並不會增加受 HSV-1 感染的皮膚組織中 ICP4 與 gB mRNA 表現量。

4.2 皮膚表現 DM-IL-15 造成 10^4 PFU HSV-1 感染後第 10 天仍有新的病毒疱疹傷痍形成

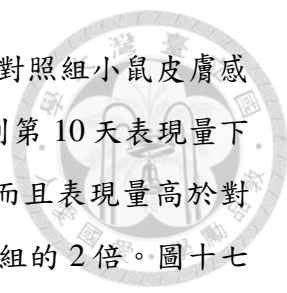
接續上一節的實驗，將 HSV-1 病毒接種量由以往 10^6 PFU 下降 100 倍至 10^4 PFU。圖十六(A)的皮膚外觀顯示，皮膚感染 10^4 PFU HSV-1 後，對照組小鼠皮膚並無病毒疱疹傷痍的形成；皮膚表現 DM-IL-15 的實驗組小鼠，背側病毒接種處皮膚於第 7 天出現表淺的潰瘍點，於第 10 天出現典型的 HSV-1 疱疹，同樣有不規則的外觀與 10^6 PFU 接種量在腹側出現的二次感染疱疹傷痍相似，顯示有新的

病毒疱疹形成，腹側則是沒有病毒疱疹形成。圖十六(B)為病毒疱疹傷痍的嚴重程度計分結果，對照組小鼠皮膚沒有病毒疱疹形成，因此計分結果為零；實驗組小鼠 HSV-1 感染後，背側病毒接種處皮膚於第 7 天疱疹傷痍嚴重程度為 1 分，第 10 天嚴重程度加重為 3 分，腹側沒有疱疹傷痍的形成，因此計分結果為零。圖十六(C)為病毒疱疹傷痍的範圍大小，實驗組小鼠背側病毒接種處在 HSV-1 感染後第 7 天可測量到 3.5 mm² 的疱疹傷痍，在第 10 天擴大為 46.4 mm²。以上結果顯示，皮膚表現 DM-IL-15 後，降低 HSV-1 接種量至 10⁴ PFU 情況下仍會在皮膚表面形成病毒疱疹，並且延長疱疹傷痍存在的時間。

接下來，同樣將對照組與實驗組小鼠經過 10⁴ PFU HSV-1 感染後第 7 天與第 10 天的皮膚組織進行 HSV-1 病毒基因表現量分析。圖十六(D)顯示在第 7 天時對照組皮膚雖然沒有疱疹傷痍形成，但在背側病毒接種處和腹側均可偵測到 ICP4 mRNA 表現，且腹側多於背側；實驗組的情況則是與對照組相反，感染後第 7 天與第 10 天背側皮膚均有病毒疱疹形成，但 ICP4 mRNA 量過低無法偵測。圖十六(E)實驗結果顯示，gB mRNA 表現情形與 ICP4 相似，對照組小鼠 HSV-1 感染後第 7 天的背側與腹側皮膚組織中均有表現 gB mRNA；實驗組小鼠於感染後第 7 天背側與腹側皮膚均為 gB mRNA 表現量過低無法偵測，但第 10 天背側皮膚組織中的 gB mRNA 表現量卻明顯上升，有別於對照組在第 10 天的皮膚組織中表現量過低無法偵測。從以上結果得知，HSV-1 病毒接種量下降至 10⁴ PFU 已經無法在對照組小鼠皮膚造成疱疹傷痍，但實驗組小鼠皮膚則是在第 10 天仍有病毒疱疹存在，且皮膚組織中仍可測得 HSV-1 感染中期表現的 gB mRNA。

4.3 皮膚表現 DM-IL-15 造成 HSV-1 接種處相對應的背根神經節中有較高的 ICP4 和 gB mRNA 表現量

延續前述同一組實驗，相較於對照組小鼠，皮膚表現 DM-IL-15 後，無論是將 HSV-1 接種量下降至 10⁵ PFU 或 10⁴ PFU 均可以在小鼠皮膚看到病毒疱疹傷痍存在時間延長，但是皮膚組織中的 ICP4 和 gB mRNA 表現量卻較低的現象，推測 HSV-1 是否較傾向於不留在皮膚組織中進行複製生長，而是直接沿著神經細胞侵入背根神經節中，因此進一步檢測與 HSV-1 接種處相對應的第 1 至 5 腰椎神經節



中的 ICP4 與 gB mRNA 表現量。圖十七(A)的實驗結果顯示，對照組小鼠皮膚感染 HSV-1 後第 7 天在背根神經節中可以檢測到 ICP4 mRNA，到第 10 天表現量下降一半；實驗組小鼠同樣在第七天可以偵測到 ICP4 mRNA，而且表現量高於對照組 5 倍，到第 10 天同樣也有表現量下降的情形，但仍是對照組的 2 倍。圖十七(B)的實驗結果顯示，對照組小鼠皮膚感染 HSV-1 後第 7 天在背根神經節中 gB mRNA 表現量過低無法偵測，到第 10 天才能檢測到 gB mRNA；實驗組小鼠在第 7 天已有表現 gB mRNA，到 10 天則是明顯增加，且表現量為對照組的 2 倍以上。以上結果證實，皮膚表現 DM-IL-15 並不會增加 HSV-1 在皮膚組織中的病毒數量，而是更傾向於感染神經細胞，在背根神經節中活化程度更高，有大量的 ICP4 mRNA 表現，使 HSV-1 病毒更容易繁殖增加病毒量，進而增加可能具有感染力的 HSV-1 離開神經細胞再次回到皮膚組織中造成二次感染的機會，延緩宿主皮膚上的疱疹傷痍癒合的速度。

第四章 結論與討論



本論文的主要研究目的為探討DM-IL-15對皮膚因應病毒感染的影響。先前本實驗室的研究已知皮膚表現DM-IL-15後，經過機械性、化學性或免疫製劑等不同的刺激之下，均可看到皮膚角質細胞增生、表皮層增厚程度、細胞激素和細胞趨化素表現量及噬中性白血球浸潤數目明顯較正常小鼠降低的情形(Lee, Chang et al. 2015)。

為了能更進一步釐清DM-IL-15對於皮膚抗病毒免疫反應的影響，我們先將表現DM-IL-15的DNA質體轉染到小鼠的皮膚細胞，再利用HSV-1皮膚疱疹的動物模式研究DM-IL-15對於HSV-1在皮膚引起的發炎反應與形成疱疹的作用效應，並起將前述的實驗結果，總結說明如圖十八。在一般情況下，HSV-1感染皮膚角質細胞後進行複製增生(①)，病毒顆粒會沿著感覺神經元進入背根神經節感染神經細胞(②)，在神經細胞中表現病毒基因例如ICP4和gB 而增加病毒複製量(③)，從背根神經節釋出的病毒顆粒可以再感染同一皮節的皮膚組織(④)，造成受損皮膚出現帶狀疱疹傷痕(⑤)。在路徑①中，感染HSV-1後，皮膚角質細胞會因活化而分泌干擾素和細胞趨化激素等促進多核形白血球浸潤而抑制HSV-1感染範圍(Watanabe, Adachi et al. 1999, Wuest and Carr 2009)，同時也會在路徑④有CD8+ T細胞浸潤防止二次感染造成的傷害(van Lint, Ayers et al. 2004)。在我們的實驗中，將DM-IL-15表現在皮膚組織後(⑥)，HSV-1 感染引起的發炎反應相關基因表現例如CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL5、IL-1 β 、IL-6 mRNA和LIGHT等均為下降，但是卻提高IL-4與LTA mRNA表現量上升，伴隨著背根神經節中的ICP4與gB mRNA表現量顯著上升，最後促進疱疹傷痕嚴重程度和範圍大小顯著增加的結果。本研究結果發現，DM-IL-15能透過調節皮膚對HSV-1感染引起的發炎反應，進而促進HSV-1經過背根神經節造成帶狀疱疹。實驗結果也更進一步說明皮膚的免疫反應對於HSV-1對神經細胞的侵襲力扮演重要的角色。



第一節 DM-IL-15 對 HSV-1 感染引起的發炎反應相關基因表現的影響

首先分析小鼠皮膚受HSV-1感染後引發的發炎相關基因的表現量探討可能的機制。在nCounter基因表達檢測的實驗結果可以看到皮膚表達DM-IL-15後，在HSV-1感染後24小時可看到與對照組的基因表現組別具有顯著差異，這當中CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL5、IL-1 β 和IL-6的mRNA表現量相較於對照組在皮膚表現DM-IL-15的實驗組均顯著下降。以上六個基因中均帶有NF- κ B的結合位，可透過NF- κ B路徑的活化促進mRNA轉錄，並且在皮膚組織中都由皮膚角質分泌 (Kroeze, Boink et al. 2012)，顯示DM-IL-15可能會抑制皮膚角質中的NF- κ B活化路徑。CXCL1、CXCL2、CXCL3及CXCL5均可與噬中性白血球表面的CXCR2結合，使血液中的噬中性白血球趨移至病毒感染位置，DM-IL-15可能會在HSV-1感染初期時因為抑制活化皮膚角質中的NF- κ B路徑，降低噬中性白血球細胞趨化激素mRNA的轉錄，因此減少噬中性白血球浸潤。根據研究指出多核形白血球可以HSV-1感染初期阻擋病毒顆粒擴散，在第一線即時控制HSV-1的感染範圍擴大，如果抑制多核形白血球浸潤到皮膚組織，則會造成更嚴重的疱疹傷癩(Watanabe, Adachi et al. 1999)。噬中性白血球是屬於多核形白血球的一種，並在另一個研究指出噬中性白血球缺失小鼠的眼角膜受HSV-1感染後，會有病毒顆粒數增加和感染範圍擴大的現象(Tumpey, Oakes et al. 1995)，但在此研究的實驗中同時有其他免疫細胞如CD8⁺ T細胞數量受到影響，因此HSV-1感染範圍的控制是否確定會受到噬中性白血球浸潤的影響，未來仍有待探討。

除此之外，從nCounter基因表達檢測的實驗結果也可以看到，與對照組相比皮膚表達DM-IL-15的實驗組，在HSV-1感染24小時大部分的與發炎反應相關的mRNA呈現表現量下降，但是IL-4與LTA的mRNA表現量卻是高於對照組，當中IL-4具有抑制巨噬細胞活化的功能，可能會降低清除HSV-1的能力而無法控制病毒感染的情況(Nestle, Di Meglio et al. 2009)；另外，LTA與LIGHT同屬T細胞上疱疹病毒進入調控因子(HVEM)與LT β R的受體，但兩者與受器結合後下游的訊息傳導引起的反應卻不同，LIGHT較傾向於活化T細胞的發炎反應，促進T細胞存活，LTA則傾向於走向細胞凋亡 ((Steinberg, Cheung et al. 2011)，有趣的是在對照組中

是LIGHT的mRNA表現量較高，而皮膚表現DM-IL-15則是LTA的mRNA表現量較高，顯示實驗組小鼠T細胞的活化功能可能受到影響，未來將進一步探討HSV-1感染後，皮膚組織中T細胞的活化和浸潤情形。




第二節 DM-IL-15 對 HSV-1 感染後皮膚形成典型帶狀疱疹傷痍的影響

在一般免疫系統正常的小鼠身上感染HSV-1後第3天會在皮膚表面的病毒接種處出現紅腫的病毒疱疹，第6天於非病毒接種處沿著同一束神經控制的皮節(Dermatome)皮膚組織形成典型帶狀疱疹(Blyth, Harbour et al. 1984)。相關文獻報導指出，HSV-1感染後，病毒接種的皮膚組織測得高量病毒，第5天開始下降；相對應的背根神經節中，第2天開始測得病毒活性，在第3天病毒量達最高，第5天開始下降；非病毒接種處的二次感染部位皮膚組織，第4天的病毒量達最高，第6天開始下降(van Lint, Ayers et al. 2004)。顯示HSV-1感染後病毒會從皮膚進到背根神經節中，並沿著神經感染他處皮膚組織形成帶狀疱疹，在這個過程中CD8⁺ T cell會被活化，藉由降低HSV-1病毒的數目來防止嚴重的二次感染，並且防止HSV-1侵犯至中樞神經(Wakim, Jones et al. 2008)。

在我們的實驗中發現，對照組小鼠背側感染HSV-1後，病毒接種處會有顯著的發炎反應，在第6天出現從背側環繞至腹側的典型帶狀疱疹，在第10天疱疹傷痍會明顯受到控制而開始變小，但是表現DM-IL-15之後，會提早一天於第5天在遠離病毒接種處出現疱疹囊泡，且疱疹傷痍範圍會不受控制持續擴大，直到第20天疱疹傷痍才癒合。顯示皮膚表現DM-IL-15後可能使皮膚組織無法有效活化發炎反應，除了缺乏第一道防線抵擋HSV-1感染，進而降低適應性免疫反應活化，使病毒顆粒更快速且容易入侵背根神經節，經過在神經細胞中複製繁殖後造成皮節皮膚的二次感染。另一方面，發炎反應是否同時影響HSV-1感染神經細胞受體的表現(Kriesel 2002)，尚需其他實驗作進一步的探討。

第三節 DM-IL-15 對 HSV-1 感染皮膚後對神經細胞侵襲力的影響

過去進行小鼠皮膚感染的實驗所使用的標準量是每側10⁶ PFU，目前已知感



染低量的HSV-1較傾向從周邊組織侵入神經組織中造成持續性的感染(Metcalf, Hamilton et al. 1979)。當我們將感染的病毒量下降為 10^5 PFU時，對照組於HSV-1感染後第7天背側病毒接種處疱疹傷痍嚴重度和範圍大小均高於實驗組；下降為 10^4 PFU時，對照組小鼠皮膚並沒有病毒疱疹的形成，只有實驗組小鼠皮膚會出現病毒疱疹傷痍，且感染後第10天傷痍範圍大小開始擴散。進一步分析HSV-1病毒活性發現，在 10^5 PFU感染後第7天，對照組背側與腹側疱疹傷痍中的ICP4 mRNA表現高於實驗組；在 10^4 PFU感染後第7天與第10天，對照組皮膚組織中的ICP4 mRNA表現量同樣高於實驗組。從以上結果顯示，相較於對照組小鼠，皮膚表現DM-IL-15後，無論是將HSV-1接種量下降至 10^5 PFU或 10^4 PFU均可以在小鼠皮膚看到病毒疱疹傷痍存在時間延長，但是皮膚組織中的ICP4和gB mRNA表現量卻較低的現象。背根神經節中檢測ICP4 mRNA表現量的結果可以看到實驗組小鼠無論是在第7天或第10天背根神經節中的ICP4 mRNA表現量均遠大於對照組，證實皮膚表現DM-IL-15並不會增加HSV-1在皮膚組織中的病毒數量，而是更傾向於感染神經細胞，在背根神經節中活化程度更高，有大量的ICP4 mRNA表現，使HSV-1病毒更容易繁殖增加病毒量。另外，從背根神經節中的gB mRNA表現量，顯示仍然有具有活性的HSV-1病毒顆粒從神經細胞中釋出，造成皮膚的二次感染。這項實驗結果也說明在低病毒接種量的情況下，似乎更有利於HSV-1侵入背根神經節，而非留在皮膚組織中進行複製生長。

第四節 未來應進行的研究

雖然DM-IL-15會降低皮膚角質的活化能力，造成初期的發炎反應和嗜中性白血球的浸潤減少，但是卻不會因為降低了皮膚抗病毒的發炎反應而提高病毒的複製程度，反而是促進HSV-1在背根神經節的細胞中表現更高量的ICP4與gB mRNA。另外，從HSV-1在表現DM-IL-15小鼠有較顯著的帶狀疱疹的復發結果來看，DM-IL-15除了調節皮膚角質細胞活化作用之外，極有可能還能進一步調節其他免疫細胞及其產生的細胞激素而影響HSV-1從神經末梢釋出造成皮膚的二次感染。過去的研究指出，HSV-1病毒顆粒最早可於感染免疫健全小鼠皮膚48小時後，在背根神經節中檢測到具有活性的(van Lint, Ayers et al. 2004)。目前正在進行的實驗希望

釐清皮膚表現DM-IL-15是否能有效促進HSV-1在感染初期 (12-24小時內)入侵背根神經節。

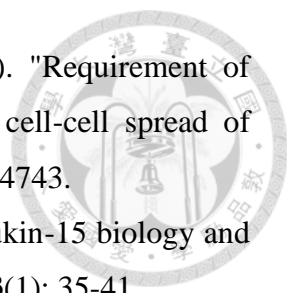
本研究的實驗結果指出，HSV-1感染皮膚所引起的免疫反應可以有效地阻止HSV-1感染神經細胞，同時抑制該病毒從背根神經節處活化造成二次感染。皮膚表現DM-IL-15後透過降低皮膚角質細胞中NF- κ B路徑的活化，進而減少促進發炎反應的細胞激素和細胞趨化激素的表現量雖然是一個顯著的作用效應，但是DM-IL-15是否還能通過抗原的表現與引流到淋巴組織進一步影響免疫細胞活化與生長，進而減少趨移至受HSV-1感染的皮膚組織中免疫細胞數量，例如CD8⁺ T細胞和多形核白血球，是未來需要研究的課題。另外，感覺神經元表面大量表現的Nectin-1已知是HSV-1感染神經細胞的必要分子(Sakisaka, Taniguchi et al. 2001)。透過DM-IL-15所調節的免疫反應是否同時調控感覺神經元Nectin-1的表現以及其與HSV-1的交互作用，需要再做進一步的實驗證實。

我的實驗結果說明表現DM-IL-15後的小鼠出現較嚴重的疱疹傷痍以及帶狀疱疹的復發，提示著會從四個不同的層面造成帶狀疱疹形成，第一是增加HSV-1在皮膚中病毒複製量，造成病毒顆粒擴散至神經細胞中(ⓐ)；第二是HSV-1感染後並沒有在皮膚中先進行複製而是在較早的時間進入背根神經節中(ⓑ)；第三是病毒進入背根神經節的快慢沒有變，但會在神經細胞本體中大量複製繁殖產生具有感染力的病毒顆粒(ⓒ)；第四是背根神經節中的病毒顆粒很容易沿著同一束神經細胞離開，來到週邊組織繼續造成其他部位的感染(ⓓ)。從我們的實驗結果可以排除第一種情況，因為皮膚表現DM-IL-15後，但是目前的實驗並無法將第二至四點分辨清楚，因此未來將先從第二點著手。

第五章 研究文獻



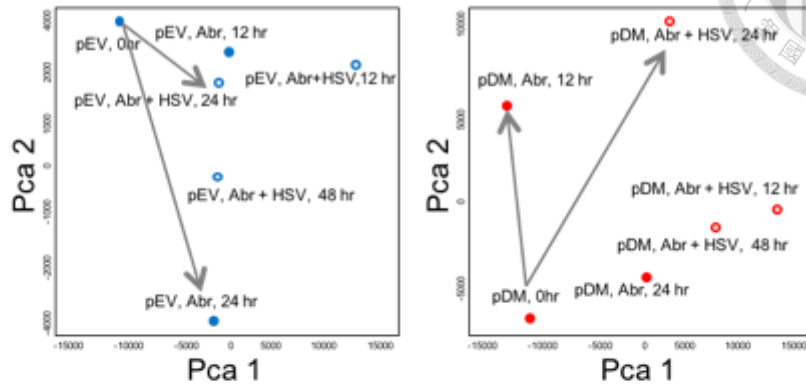
1. Blyth, W. A., D. A. Harbour and T. J. Hill (1984). "Pathogenesis of zosteriform spread of herpes simplex virus in the mouse." J Gen Virol **65** (Pt 9): 1477-1486.
2. Cai, G. and G. J. Freeman (2009). "The CD160, BTLA, LIGHT/HVEM pathway: a bidirectional switch regulating T-cell activation." Immunol Rev **229**(1): 244-258.
3. Derfuss, T., S. Segerer, S. Herberger, I. Sinicina, K. Hufner, K. Ebel, H. G. Knaus, I. Steiner, E. Meinel, K. Dornmair, V. Arbusow, M. Strupp, T. Brandt and D. Theil (2007). "Presence of HSV-1 immediate early genes and clonally expanded T-cells with a memory effector phenotype in human trigeminal ganglia." Brain Pathol **17**(4): 389-398.
4. Jolliffe, I. T. (2002). Principal component analysis. New York, Springer.
5. Kollias, C. M., R. B. Huneke, B. Wigdahl and S. R. Jennings (2015). "Animal models of herpes simplex virus immunity and pathogenesis." J Neurovirol **21**(1): 8-23.
6. Kriesel, J. D. (2002). "The roles of inflammation, STAT transcription factors, and nerve growth factor in viral reactivation and herpes keratitis." DNA Cell Biol **21**(5-6): 475-481.
7. Kroeze, K. L., M. A. Boink, S. C. Sampat-Sardjoepersad, T. Waaijman, R. J. Scheper and S. Gibbs (2012). "Autocrine regulation of re-epithelialization after wounding by chemokine receptors CCR1, CCR10, CXCR1, CXCR2, and CXCR3." J Invest Dermatol **132**(1): 216-225.
8. Lee, T. L., M. L. Chang, Y. J. Lin, M. H. Tsai, Y. H. Chang, C. M. Chuang, Y. Chien, T. Sosinowski, C. H. Wang, Y. Y. Chen, C. K. Lee, J. S. Chen, L. F. Wang, J. T. Kung and C. C. Ku (2015). "An alternatively spliced IL-15 isoform modulates abrasion-induced keratinocyte activation." J Invest Dermatol **135**(5): 1329-1337.
9. McInnes, I. B. and J. A. Gracie (2004). "Interleukin-15: a new cytokine target for the treatment of inflammatory diseases." Curr Opin Pharmacol **4**(4): 392-397.
10. Metcalf, J. F., D. S. Hamilton and R. W. Reichert (1979). "Herpetic-Keratitis in Athymic (Nude) Mice." Infection and Immunity **26**(3): 1164-1171.
11. Nestle, F. O., P. Di Meglio, J. Z. Qin and B. J. Nickoloff (2009). "Skin immune sentinels in health and disease." Nat Rev Immunol **9**(10): 679-691.
12. Sakisaka, T., T. Taniguchi, H. Nakanishi, K. Takahashi, M. Miyahara, W. Ikeda, S.

- 
- Yokoyama, Y. F. Peng, K. Yamanishi and Y. Takai (2001). "Requirement of interaction of nectin-1 alpha/HveC with afadin for efficient cell-cell spread of herpes simplex virus type 1." Journal of Virology **75**(10): 4734-4743.
13. Steel, J. C., T. A. Waldmann and J. C. Morris (2012). "Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer." Trends Pharmacol Sci **33**(1): 35-41.
 14. Steinberg, M. W., T. C. Cheung and C. F. Ware (2011). "The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) in immune regulation." Immunological Reviews **244**: 169-187.
 15. Tan, X. and L. Lefrancois (2006). "Novel IL-15 isoforms generated by alternative splicing are expressed in the intestinal epithelium." Genes Immun **7**(5): 407-416.
 16. Tumpey, T. M., J. E. Oakes and R. N. Lausch (1995). "Neutrophil-Mediated Suppression of Hsv-1 Replication in the Murine Cornea." Investigative Ophthalmology & Visual Science **36**(4): S427-S427.
 17. van Lint, A., M. Ayers, A. G. Brooks, R. M. Coles, W. R. Heath and F. R. Carbone (2004). "Herpes simplex virus-specific CD8+ T cells can clear established lytic infections from skin and nerves and can partially limit the early spread of virus after cutaneous inoculation." J Immunol **172**(1): 392-397.
 18. Wakim, L. M., C. M. Jones, T. Gebhardt, C. M. Preston and F. R. Carbone (2008). "CD8(+) T-cell attenuation of cutaneous herpes simplex virus infection reduces the average viral copy number of the ensuing latent infection." Immunol Cell Biol **86**(8): 666-675.
 19. Waldmann, T. A. and Y. Tagaya (1999). "The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens." Annu Rev Immunol **17**: 19-49.
 20. Watanabe, D., A. Adachi, Y. Tomita, M. Yamamoto, M. Kobayashi and Y. Nishiyama (1999). "The role of polymorphonuclear leukocyte infiltration in herpes simplex virus infection of murine skin." Arch Dermatol Res **291**(1): 28-36.
 21. Wuest, T. R. and D. J. J. Carr (2009). "Uncontrolled herpes simplex virus-1 replication due to type I IFN receptor deficiency results in selective destruction of lymphatic vessels and inhibition of antigen presentation." Cytokine **48**(1-2): 50-50.

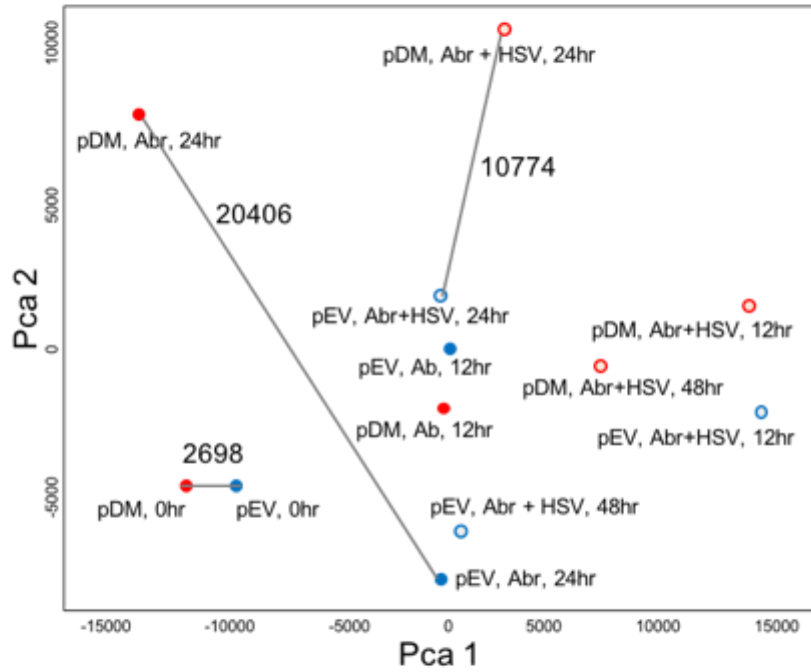
第六章 圖



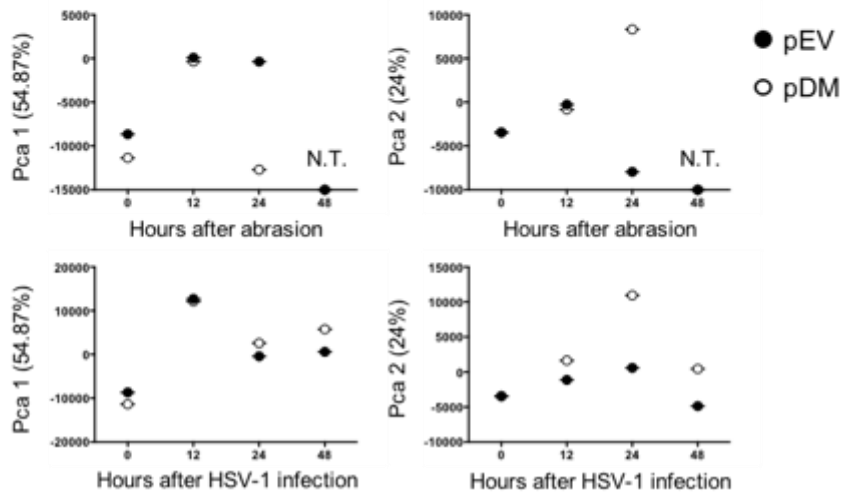
A



B



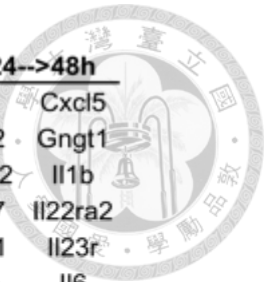
C



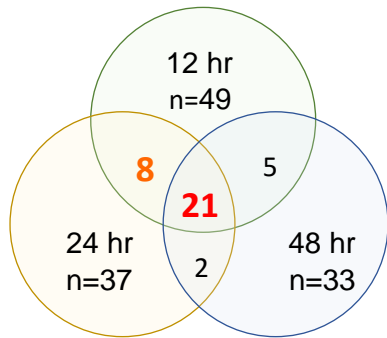
圖一：以主成份分析法比較 HSV-1 在表現 DM-IL-15 與正常小鼠皮膚誘發表現發炎反應相關基因群組的離散程度



正常 C57BL/6 小鼠右側下背部皮膚先在局部 (1 cm x 1 cm) 表現 DM-IL-15 DNA 質體 (WT/pDM-IL-15) 或是表現空質體 (WT/pEmpty vector) 三天後，在該處輕刮角質層 (abrasion, Abr) 後施予 HSV-1 (10^6 PFU) 感染 (Abr + HSV)，並且在感染 12 小時、24 小時與 48 小時取下病毒感染的皮膚組織。從該組織萃取出總 RNA 轉錄 cDNA 後，以 nCounter 基因檢測技術針對 179 個與發炎反應相關基因進行定量分析，再以統計軟體 R 進行基因主成份 (PCA) 分析 HSV-1 感染在實驗組與對照組小鼠皮膚造成發炎基因表現的離散程度。二維分析的結果中 X 軸為第一個主成份 (PCA 1) 對顯現出組間差異的分辨能力為 54.87%，Y 軸為第二個主成份 (PCA 2) 對顯現出組間差異的分辨能力為 24%，各組別的 XY 象限值相距的距離遠近代表相似度大小。(A) 對照組 (左圖) 與實驗組 (右圖) 小鼠皮膚未感染病毒 (Abr) 或是經過 HSV-1 感染 (Abr+HSV) 後 12hr、24hr、48hr 基因主成份的分布結果。(B) 同時比較前述對照組與實驗組小鼠皮膚感染 HSV-1 後不同時間點所有組別的基因主成份彼此之間相似程度。圖中的數字表示相連二組其基因主成份的相距距離，反映彼此之間的相似程度。(C) 對照組與實驗組小鼠皮膚未感染與感染 HSV-1 後 12、24、48 小時，各組的 PCA1 與 PCA2 的分析結果實心圓點(●) 為對照組 (WT/pEmpty vector)，空心圓點(○) 為實驗組 (WT/pDM-IL-15)，每個時間點樣本數為 1 (n=1)。

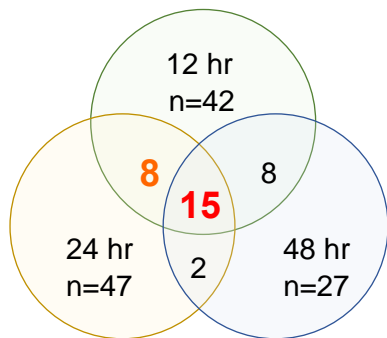


A



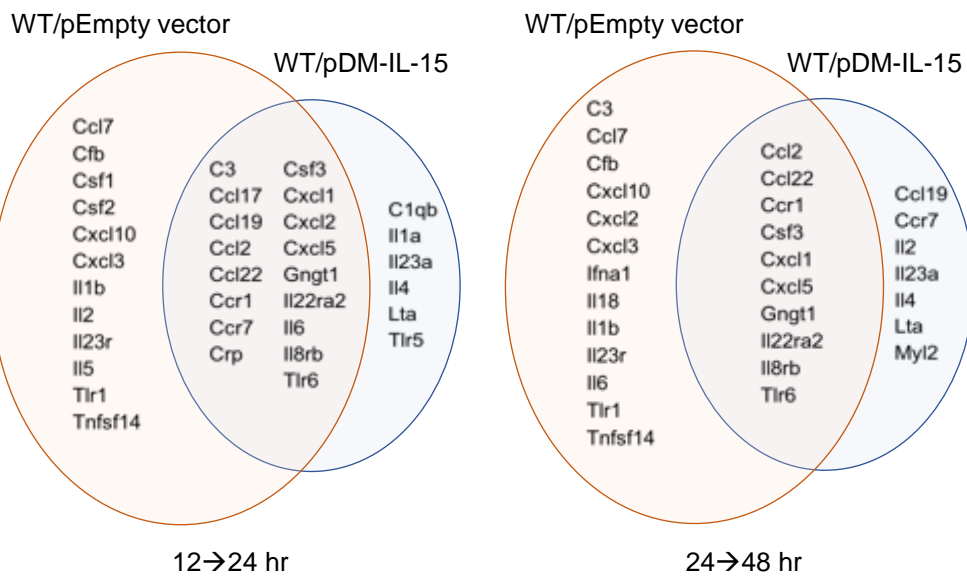
pEV-HSV-12-->24h			pEV-HSV-24-->48h		
Ccl17	C3	Cxcl5	Ifna1	C3	Cxcl5
Ccl19	Ccl2	Gngt1	Il18	Ccl2	Gngt1
Ccr7	Ccl22	Il1b		Ccl22	Il1b
Crp	Ccl7	Il22ra2		Ccl7	Il22ra2
Csf1	Ccr1	Il23r		Ccr1	Il23r
Csf2	Cfb	Il6		Cfb	Il6
Il2	Csf3	Il8rb		Csf3	Il8rb
Il5	Cxcl1	Tlr1		Cxcl1	Tlr1
	Cxcl10	Tlr6		Cxcl10	Tlr6
	Cxcl2	Tnfsf14		Cxcl2	Tnfsf14
	Cxcl3			Cxcl3	

B



pDM-HSV-12-->24h			pDM-HSV-24-->48h		
C1qb	Ccl19	Gngt1	Il2	Ccl19	Gngt1
C3	Ccl2	Il22ra2	Myl2	Ccl2	Il22ra2
Ccl17	Ccl22	Il23a		Ccl22	Il23a
Crp	Ccr1	Il4		Ccr1	Il4
Cxcl2	Ccr7	Il8rb		Ccr7	Il8rb
Il1a	Csf3	Lta		Csf3	Lta
Il6	Cxcl1	Tlr6		Cxcl1	Tlr6
Tlr5	Cxcl5			Cxcl5	

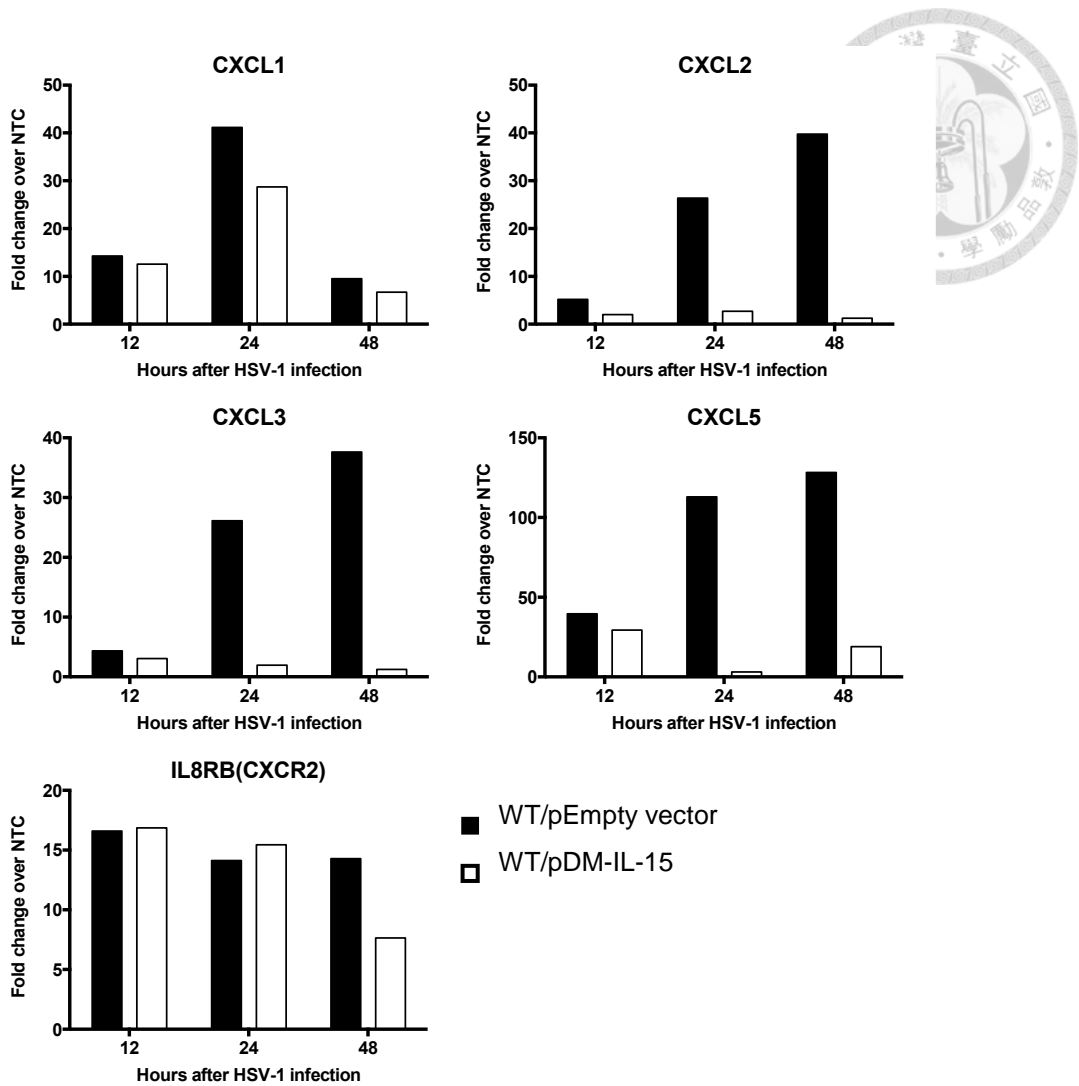
C



圖二：分析比較 HSV-1 在表現 DM-IL-15 與正常小鼠皮膚對於發炎反應的作用效應

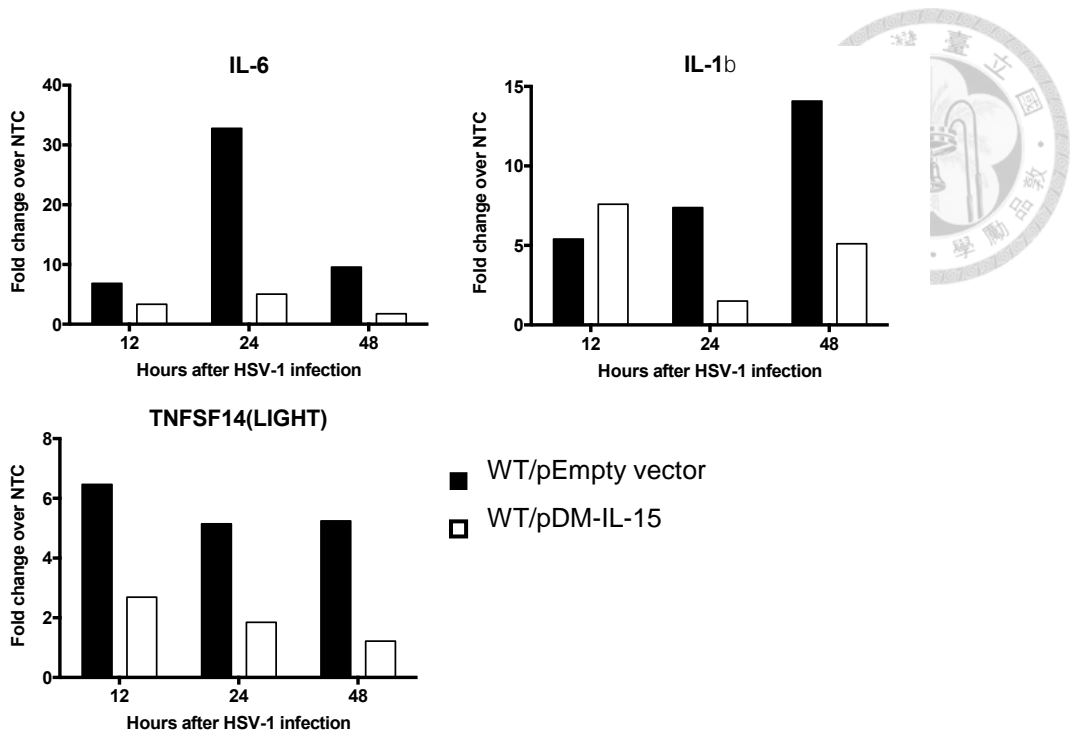


將圖一中經過 nCounter 實驗方法檢測 179 個與發炎反應相關的基因在 HSV-1 感染後的正常(A) 或是表現 DM-IL-15 (B)小鼠皮膚的表現量，交叉比對各組在感染 12、24、48 小時後相對於未受 HSV-1 感染皮膚的對應基因有 2 倍以上增加的基因個數 (n)，圖形交集處表示該群基因同時在兩組中都有 2 倍以上增加的個數。右側表中列出 HSV-1 感染後 12 小時到 24 小時之間(12→24h) 或是 HSV-1 感染後 24 小時到 48 小時之間(24→48h) 具有 2 倍以上增加變化的基因。(C) 經過 HSV-1 感染後 12 小時到 24 小時之間(12→24h)和或是 24 小時到 48 小時之間(24→48h) 在對照組和實驗組間表現量上升的基因別。



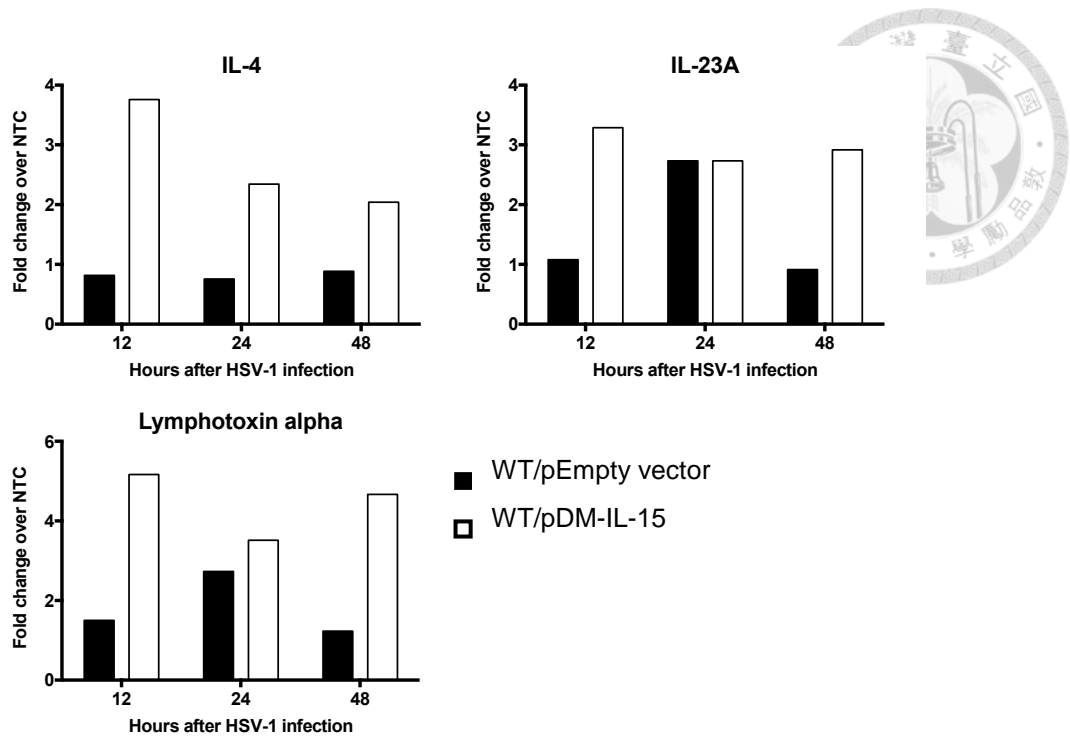
圖三：在對照組與實驗組中受 HSV-1 感染後相較於未受刺激皮膚的 CXCR2 與其受體基因增加量

將圖二中的實驗結果，進一步分析 CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL5 和 IL8RB 等基因相較於未感染對應基因表現的倍數變化在對照組(■)和實驗組(□)小鼠皮膚的差異。每個時間點的樣本數為 1 (n=1)。



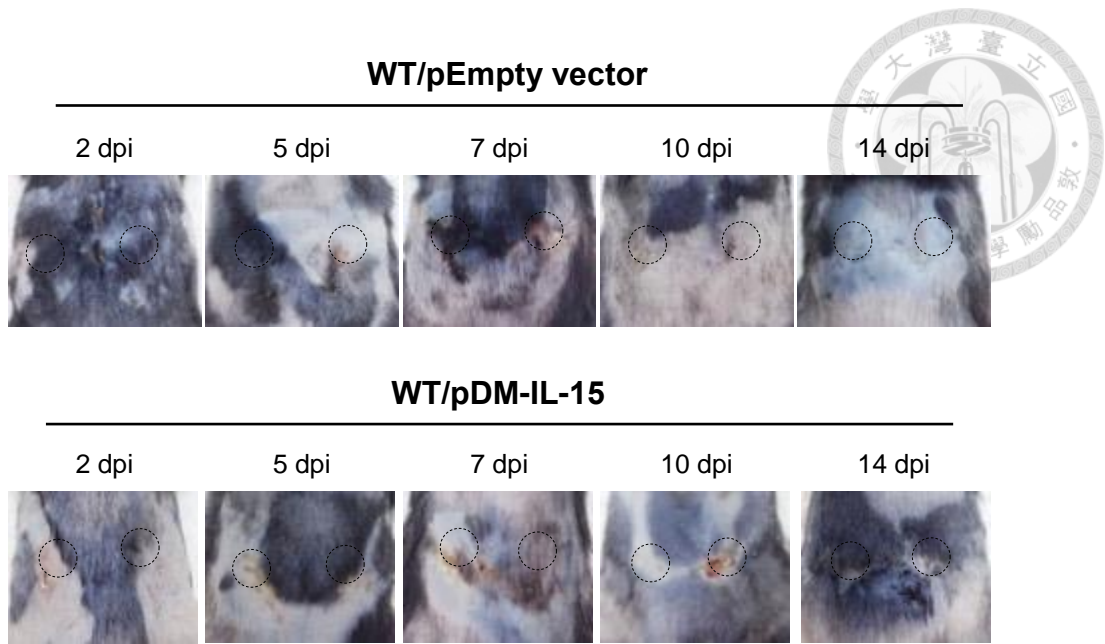
圖四：在對照組與實驗組中受 HSV-1 感染後相較於未受刺激皮膚的促發炎反應基因增加量

將圖二中的實驗結果，進一步分析 IL-1 β 、IL-6 和 TNFSF14 等基因相較於未感染對應基因表現的倍數變化在對照組(■)和實驗組(□)小鼠皮膚的差異。每個時間點的樣本數為 1 (n=1)。



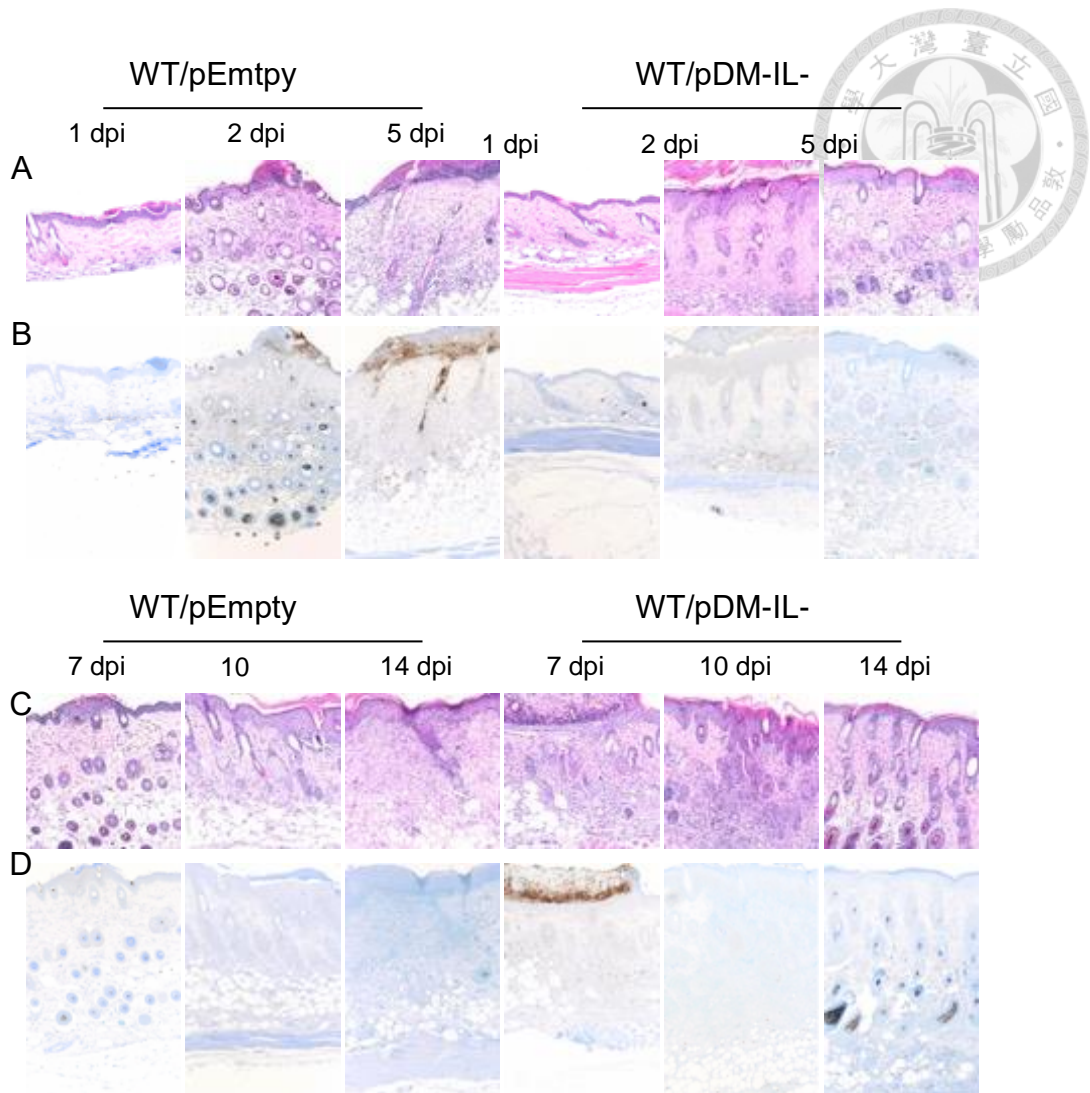
圖五：在對照組與實驗組中受 HSV-1 感染後相較於未受刺激皮膚的 IL-4、IL-23A 與 LTA 基因增加量

將圖二中的實驗結果，進一步分析 IL-4、IL-23A 和 LTA 等基因相較於未感染對應基因表現的倍數變化在對照組(■)和實驗組(□)小鼠皮膚的差異。每個時間點的樣本數為 1 (n=1)。



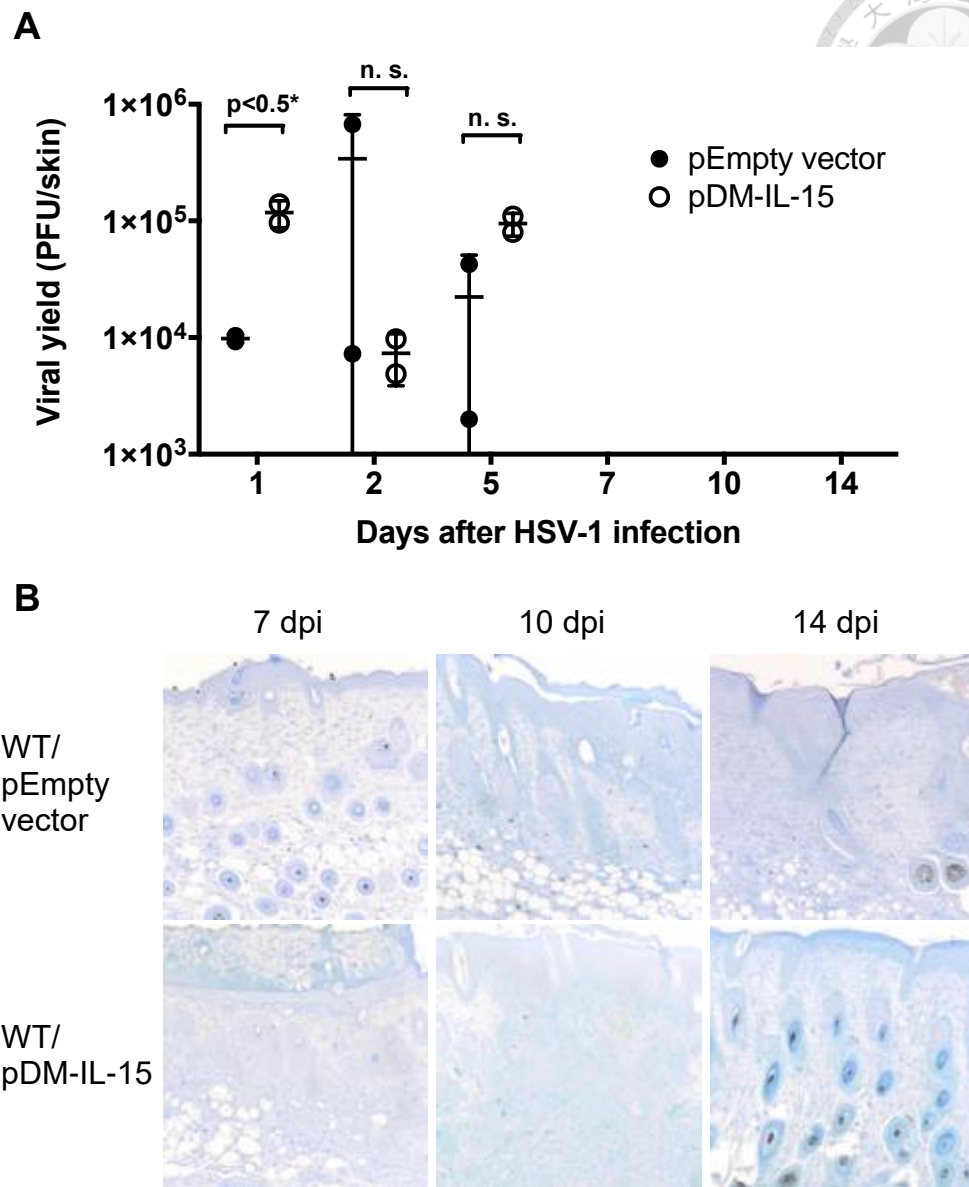
圖六：皮膚表現 DM-IL-15 對於 HSV-1 後 14 天內傷痍形成大小的作用效應

正常 C57BL/6 小鼠右側下背部皮膚先在局部 (1 cm x 1 cm) 表現 DM-IL-15 DNA 質體 (WT/pDM-IL-15) 三天後，在該處施予 HSV-1 (10^6 PFU) 感染。實驗結果與表現空質體 (WT/pEmpty vector) 的對照組小鼠皮膚做比較。小鼠感染 HSV-1 後，以數位攝錄影機每日記錄病毒傷痍形成過程以及大小的變化，一共觀察 14 天。本實驗各組有 2 隻小鼠，圖中所示為其中一隻小鼠進行連續天數觀察的代表性的實驗結果。虛線圈為接種病毒的位置。



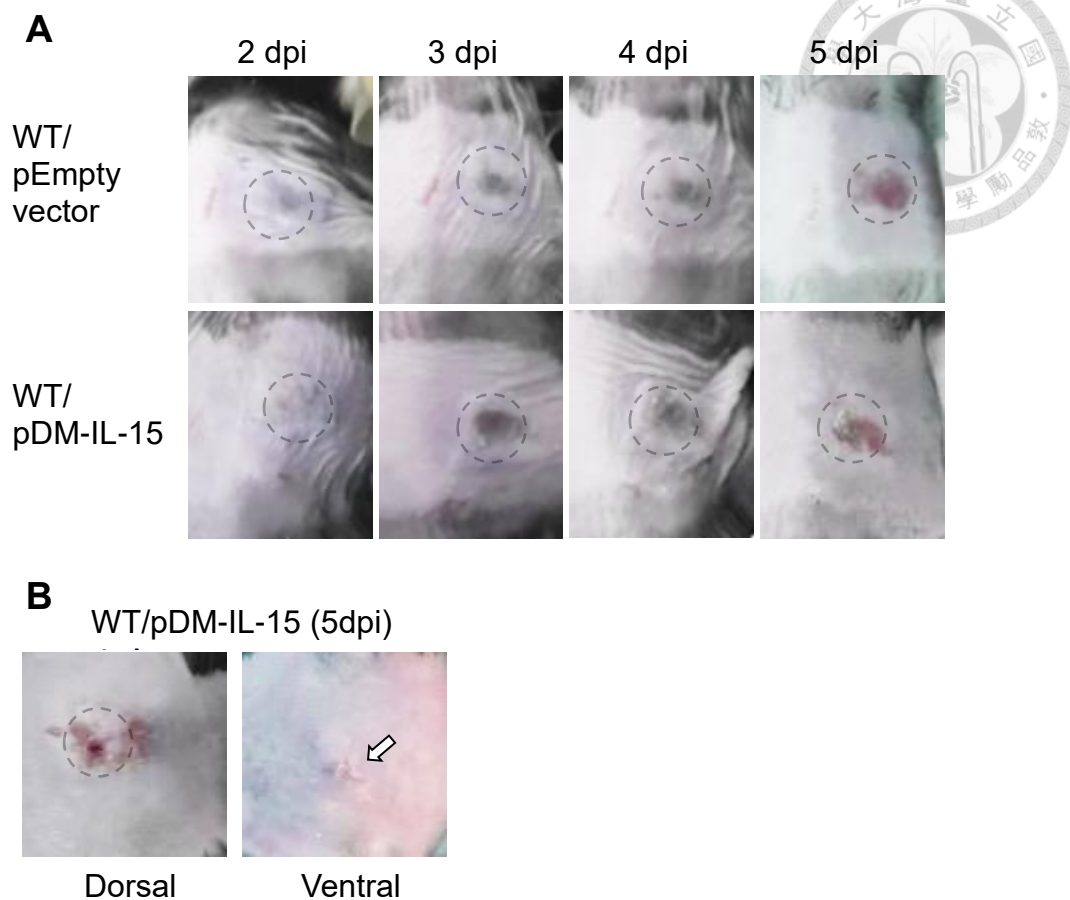
圖七：皮膚表現 DM-IL-15 對於 HSV-1 感染後在皮膚組織中病理變化及嗜中性白血球浸潤的影響

接續圖六實驗，(A、C) HSV-1 感染感染表現空質體的對照組與表現 DM-IL-15 的實驗組小鼠皮膚在 14 天的期間內，病毒接種處皮膚進行石蠟切片的 H&E 染色結果，分析病毒疱疹傷痂大小和表皮層增厚情形。(B、D) 石蠟切片以 Ly6G 抗體進行免疫組織染色的結果，分析皮膚組織中嗜中性白血球浸潤的情形，褐色的點代表有表現 Ly6G 的細胞。每個時間點的樣本數為 2 (n=2)。



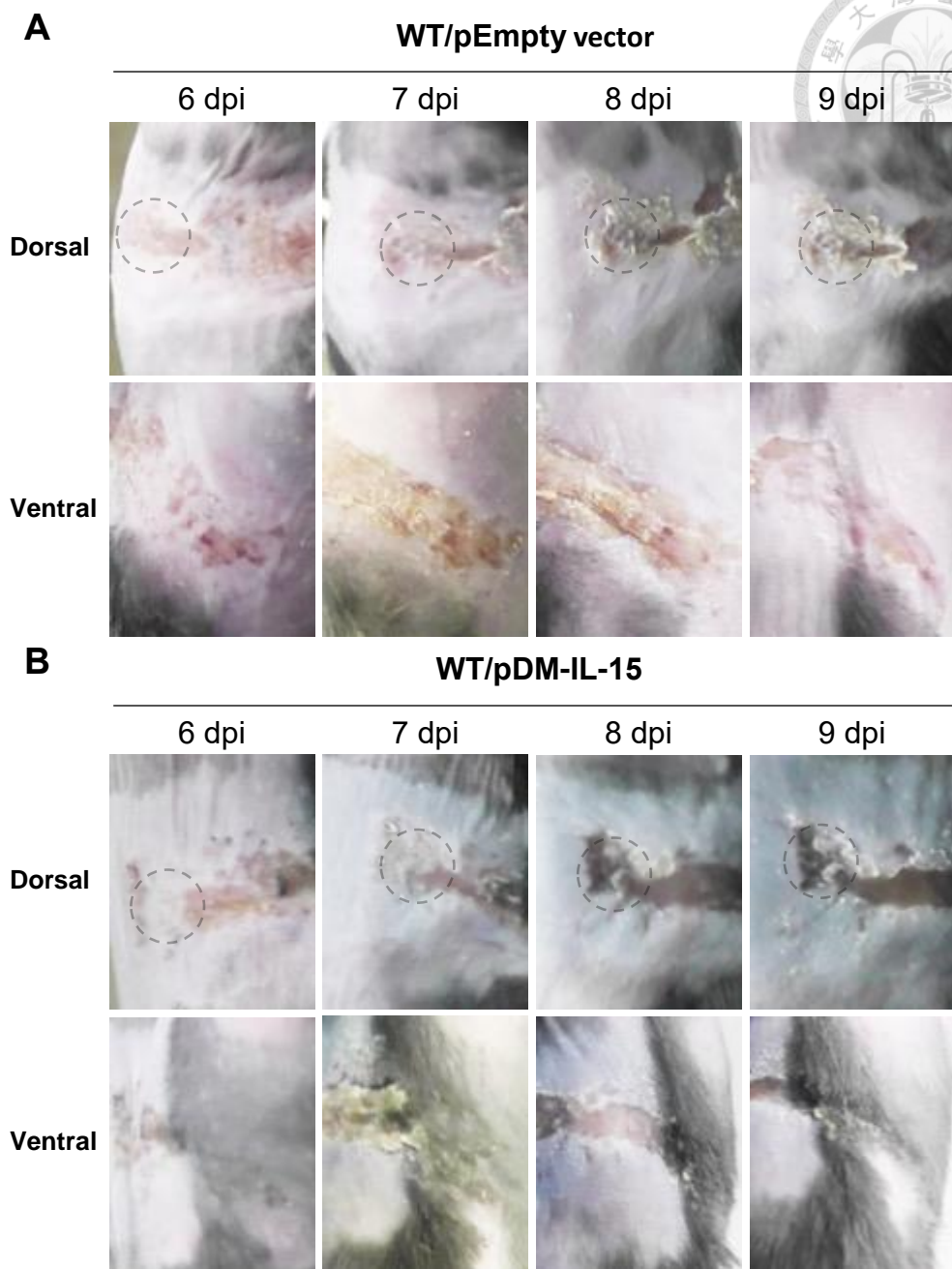
圖八：皮膚表現 DM-IL-15 對於 HSV-1 在皮膚組織感染性與複製增殖的作用效應

接續圖六實驗，(A) HSV-1 感染表現空質體的對照組與表現 DM-IL-15 的實驗組小鼠皮膚在 14 天的期間內，以 Plaque assay 檢測其病毒產量的的結果。(B) HSV-1 感染後第 7、10 和 14 天的石蠟切片皮膚組織以 HSV-1 抗體進行免疫組織染色的結果，並無顯示褐色的病毒感染部位。每個時間點的樣本數為 2 (n=2)。



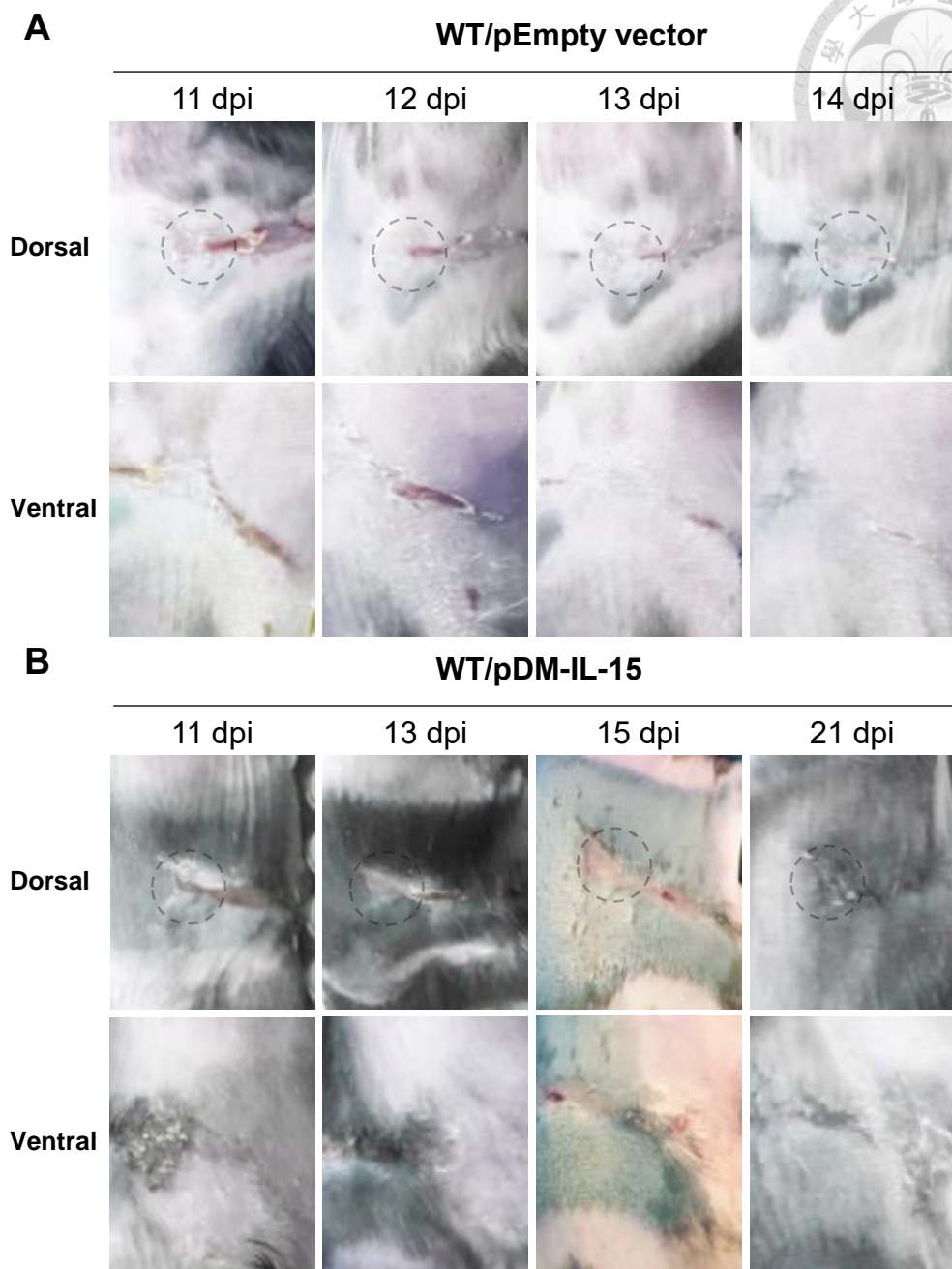
圖九：皮膚表現 DM-IL-15 對於 HSV-1 傷痍形成大小的作用效應

正常 C57BL/6 小鼠右側下背部皮膚先在局部 (1 cm x 1 cm) 表現 DM-IL-15 DNA 質體 (WT/pDM-IL-15) 三天後，在該處施予 HSV-1 (10^6 PFU) 感染。實驗結果與表現空質體 (WT/pEmpty vector) 的對照組小鼠皮膚做比較。小鼠感染 HSV-1 後，以數位攝錄影機每日記錄病毒傷痍形成過程以及大小的變化，直到皮膚外觀沒有出現顯著的傷痍為止，一共觀察 25 天。(A) 實驗組與對照組小鼠感染 HSV-1 後第 2 至 5 天的皮膚外觀，疱疹傷痍出現的時間，以及傷痍的大小變化。(B) 表現 DM-IL-15 實驗組小鼠感染 HSV-1 後第 5 天，在背側及腹側均出現典型的病毒疱疹。本實驗各組有 4 至 5 隻小鼠，圖中所示為其中一隻小鼠進行連續天數觀察的代表性的實驗結果。虛線圈為接種病毒的位置。



圖十：對照組與實驗組小鼠皮膚受 HSV-1 感染後第 6 至 9 天的腹背側帶狀疱疹

如圖九中的實驗方法說明，本圖所示為對照組 (WT/pEmpty vector) (A)與實驗組 (WT/pDM-IL-15) (B)小鼠經過 HSV-1(10^6 PFU) 感染後第 6 至 9 天在同一隻小鼠的背側(Dorsal)與腹側(Ventral)出現帶狀疱疹傷痍的觀察結果。虛線圈為右側下背部施予病毒的位置。對照組與實驗組各組 4 至 5 隻小鼠。



圖十一：對照組與實驗組小鼠皮膚受 HSV-1 感染後第 11 至 21 天的腹背側帶狀疱疹

如圖九中的實驗方法說明，本圖所示為對照組(WT/pEmpty vector) (A)與實驗組(WT/pDM-IL-15) (B)小鼠經過 HSV-1(10^6 PFU)感染後第 11 至 21 天在同一隻小鼠的背側(Dorsal)與腹側(Ventral)出現帶狀疱疹傷痕的觀察結果。虛線圈為右側下背部施予病毒的位置。對照組與實驗組各組 3 至 5 隻小鼠。



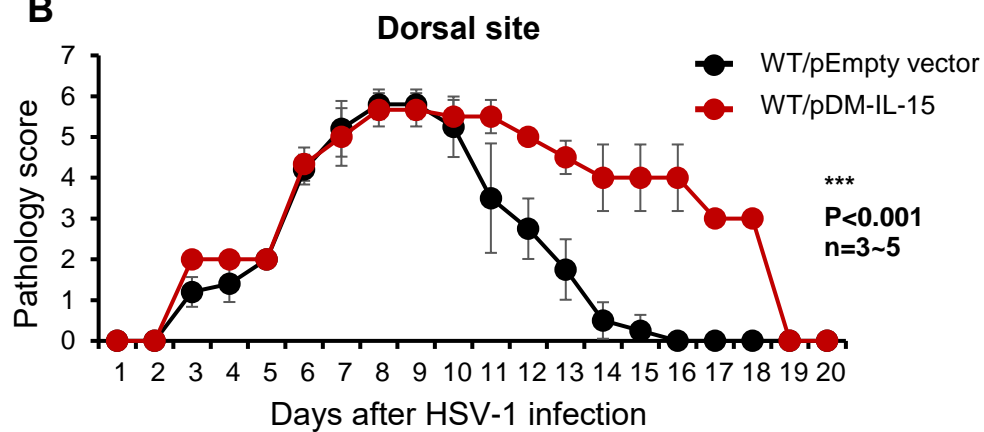
A

Guide of pathology score

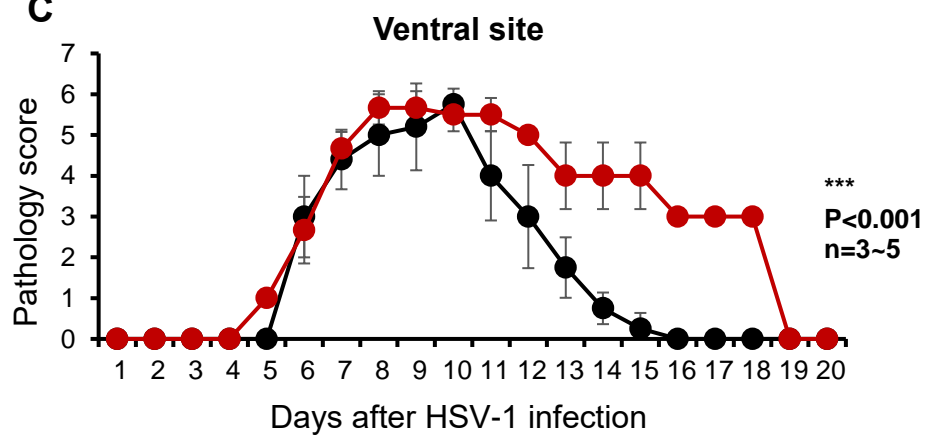
0	1	2	3	4	5	6
No sign of vesicles	Ulcerated local vesicle	Ulcerated local vesicle and erythema	Region of superficial ulceration	Band-like ulceration with scattered vesicles	Severe band-like ulceration and loss of epidermis	Severe band-like ulceration and loss of dermis

○ HSV-1 inoculated site

B



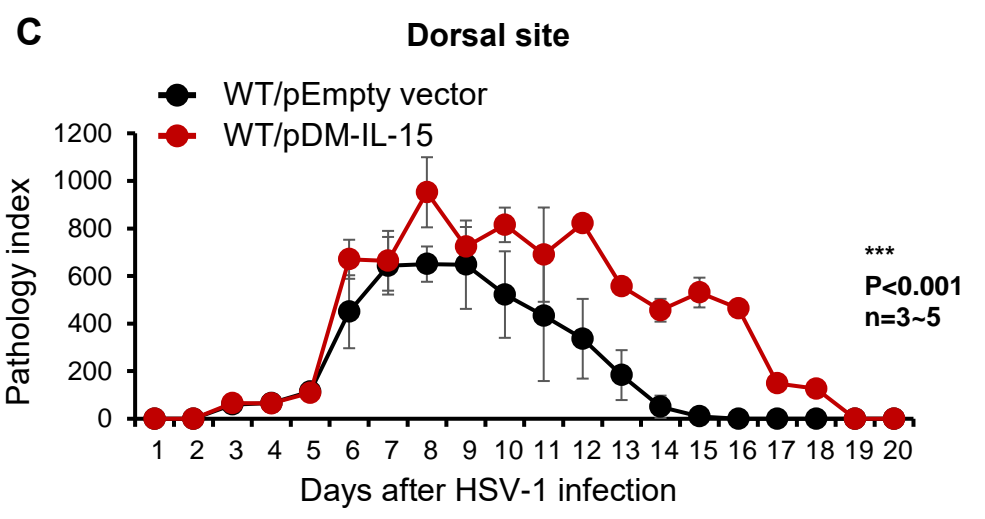
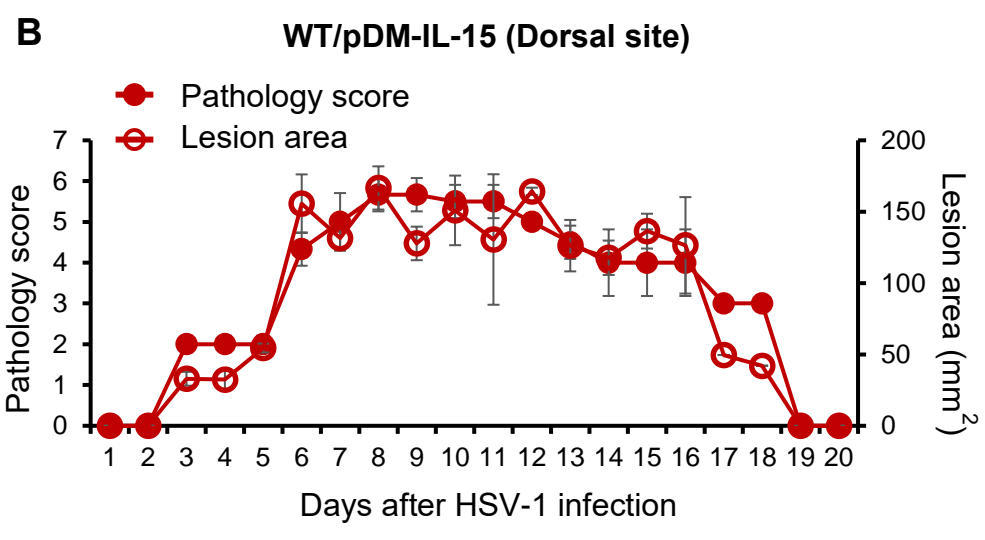
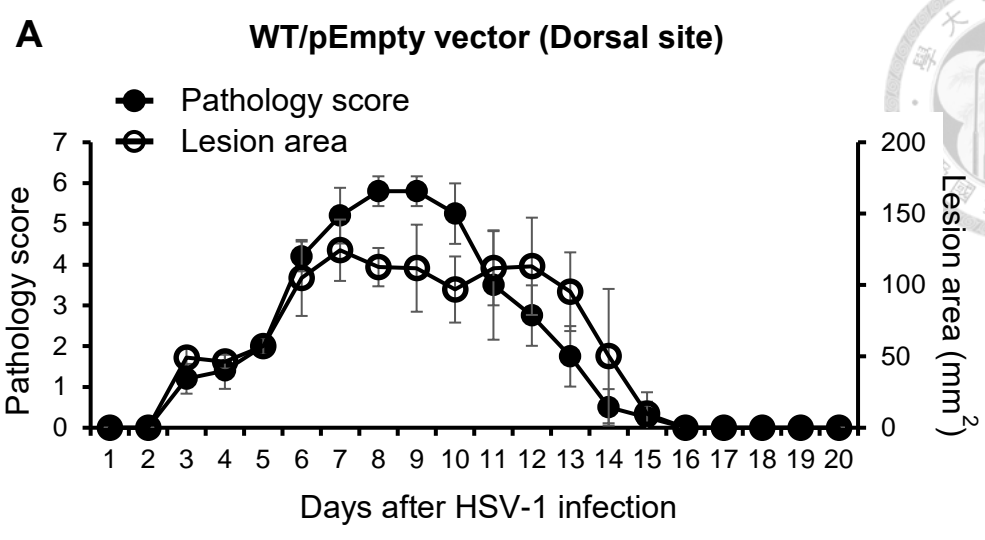
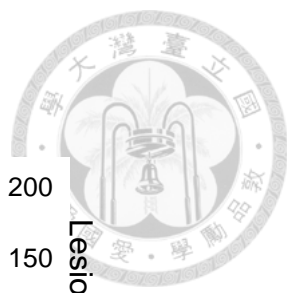
C



圖十二：分析比較表現 DM-IL-15 實驗組與對照組小鼠皮膚經過 HSV-1 感染後疱疹傷痍的嚴重程度



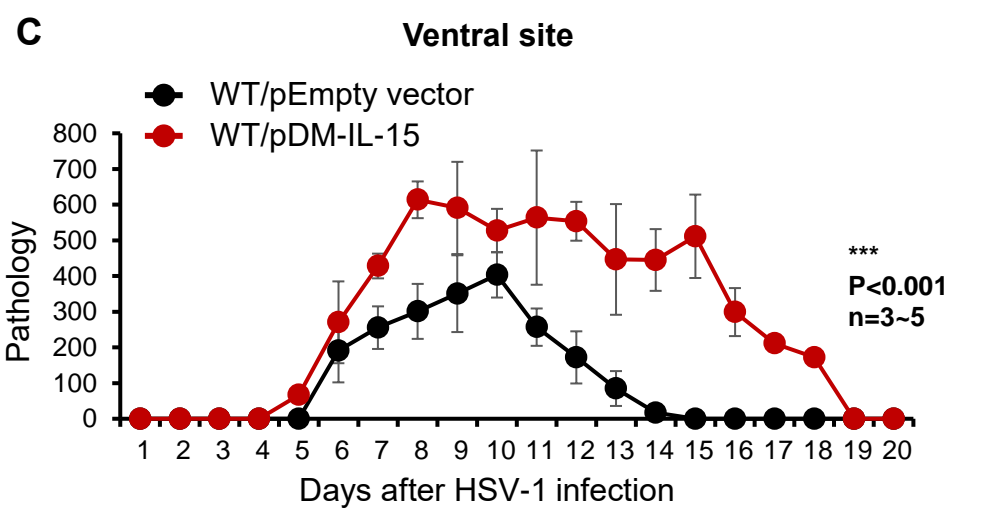
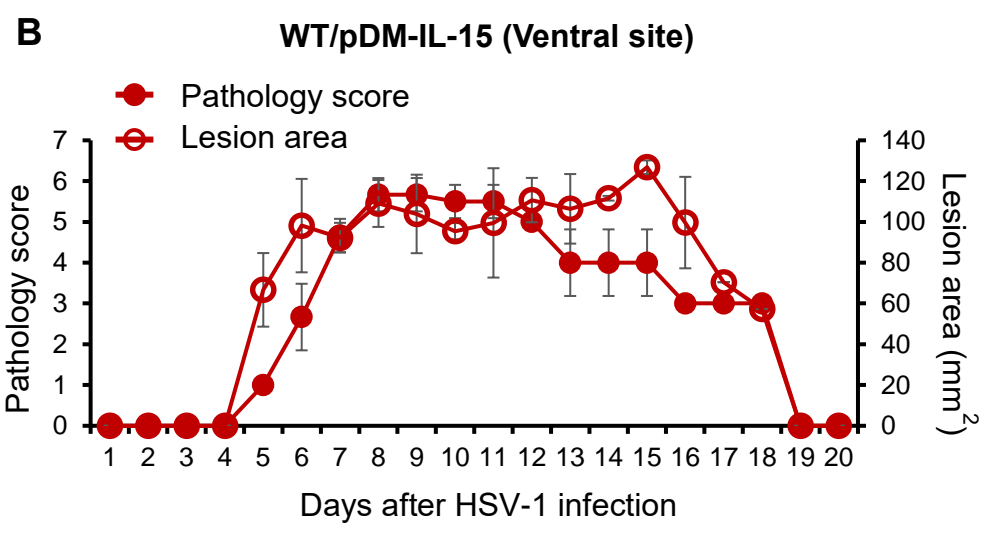
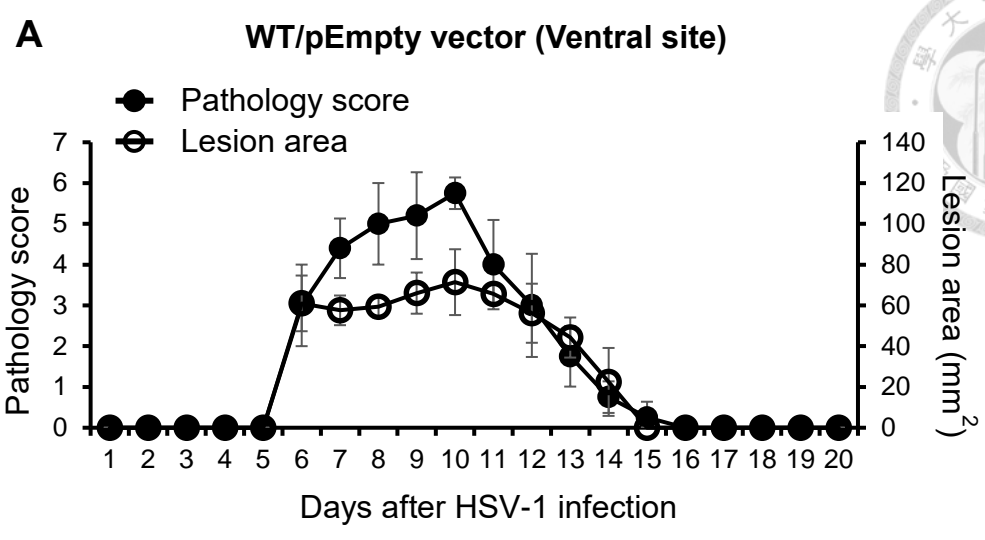
從小鼠皮膚經過 HSV-1 感染後所形成疱疹傷痍的變化進程，可以歸類成六組，分別以 0 至 6 表示以下皮膚外觀傷痍的表徵。(A) 0：沒有疱疹；1：在病毒接種處形成囊泡；2：在病毒接種處的囊泡出現紅腫的現象且範圍擴大；3：從接種病毒處的表淺傷口擴大形成典型帶狀疱疹；4：帶狀疱疹傷口加深且在病毒接種的範圍外出現其他新的囊泡；5：帶狀疱疹傷口潰爛的程度加劇且部分表皮層脫落；6：帶狀疱疹傷口持續加深且部分真皮脫落。對照組(WT/pEmpty vector, ●)和實驗組(WT/pDM-IL-15, ●)小鼠皮膚受 HSV-1(10^6 PFU)感染後連續觀察記錄 20 天疱疹傷痍的結果並且按照 A 圖方法計分。(B, C)以連線圖說明小鼠感染 HSV-1 後 20 天的期間內，在右側下背接種處 (dorsal site) (B)及擴散至腹側 (ventral site) (C)疱疹傷痍的嚴重程度。每個時間點的樣本數為 3~5 ($n=3\sim 5$)。利用統計軟體(SPSS)進行 Two-way ANOVA 檢定各組之間各時間點傷痍平均積分的差異顯著性(***: $p<0.001$)。



圖十三：分析皮膚表現 DM-IL-15 對於 HSV-1 感染後在背側形成疱疹傷痍嚴重程度和傷痍範圍的作用效應



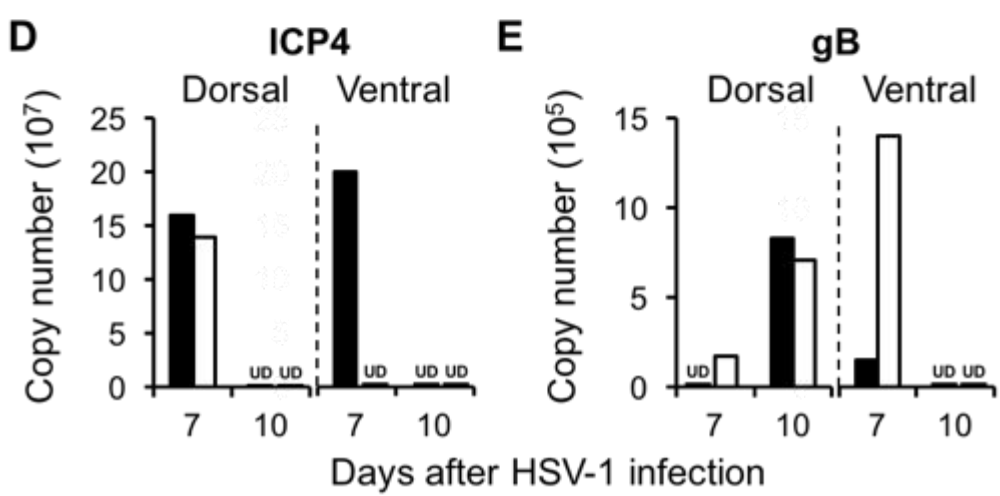
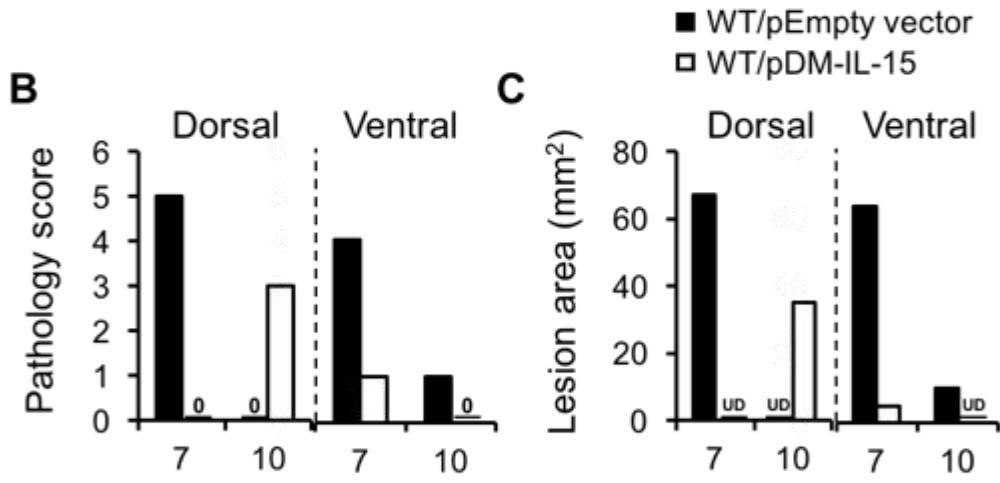
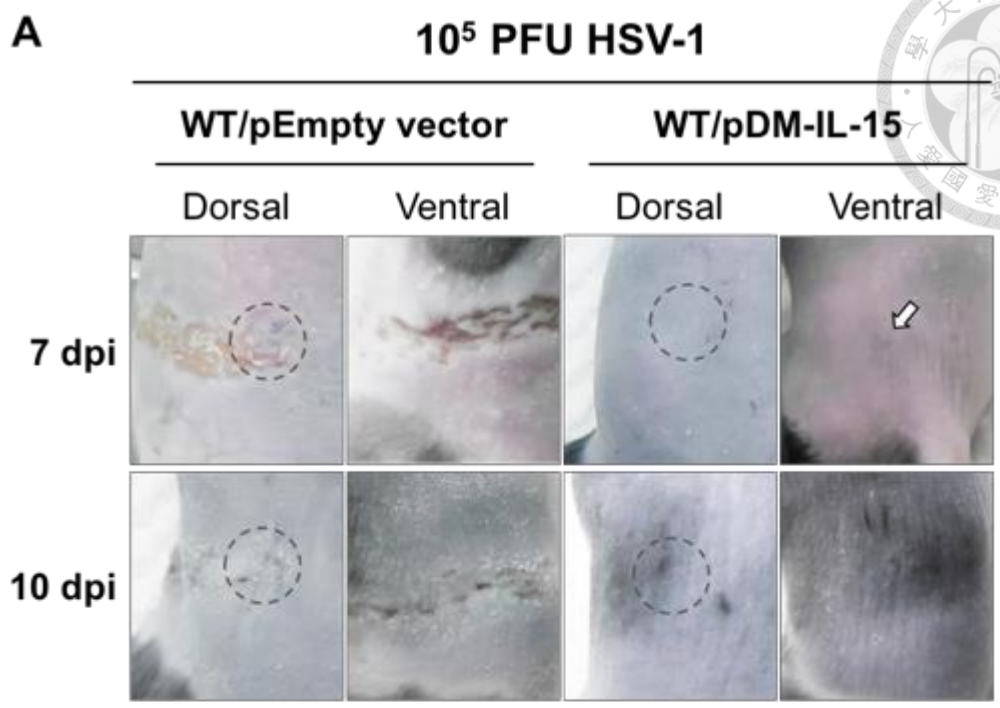
小鼠皮膚經過 HSV-1 感染後所形成疱疹傷痍的變化進程的計分方式如圖十二 A 中的說明，並且利用影像分析軟體(MetaMorph)計算傷痍範圍大小 (mm^2)。對照組 (WT/pEmpty vector) (A)和實驗組(WT/pDM-IL-15) (B)小鼠皮膚經過 HSV-1(10^6 PFU)感染後，其背側形成疱疹傷痍的嚴重度(左 Y 軸；● 對照組，● 實驗組)與傷痍範圍(右 Y 軸；○ 對照組，○ 實驗組)在連續觀察 20 天期間的變化。(C)將背側疱疹病理嚴重程度與傷痍範圍大小的乘積表示為病理指數，綜合比較皮膚表現 DM-IL-15 對於 HSV-1 疱疹傷痍的作用效應。以統計軟體(SPSS)進行 Two-way ANOVA 檢定各組之間各時間點平均病理指數的差異顯著性(***)： $p < 0.001$)。



圖十四：分析皮膚表現 DM-IL-15 對於 HSV-1 感染後在腹側形成疱疹傷痍嚴重程度和傷痍範圍的作用效應

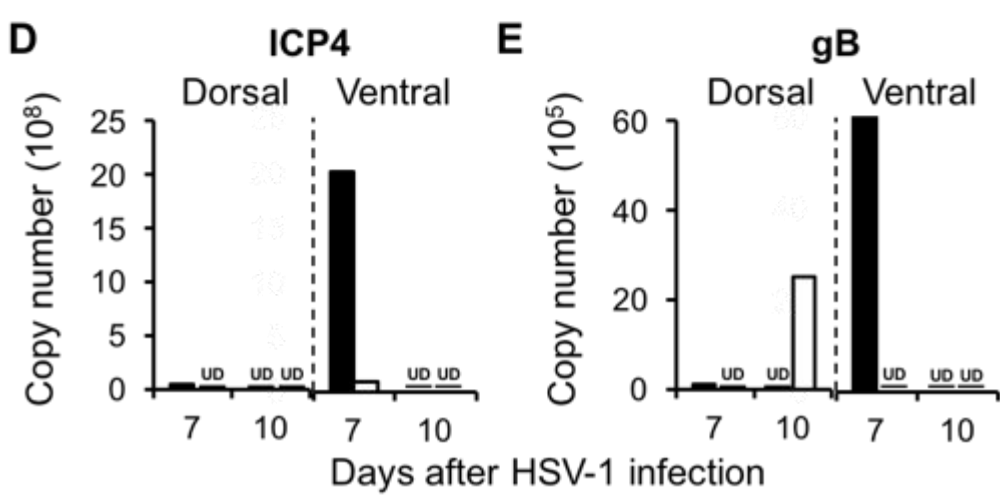
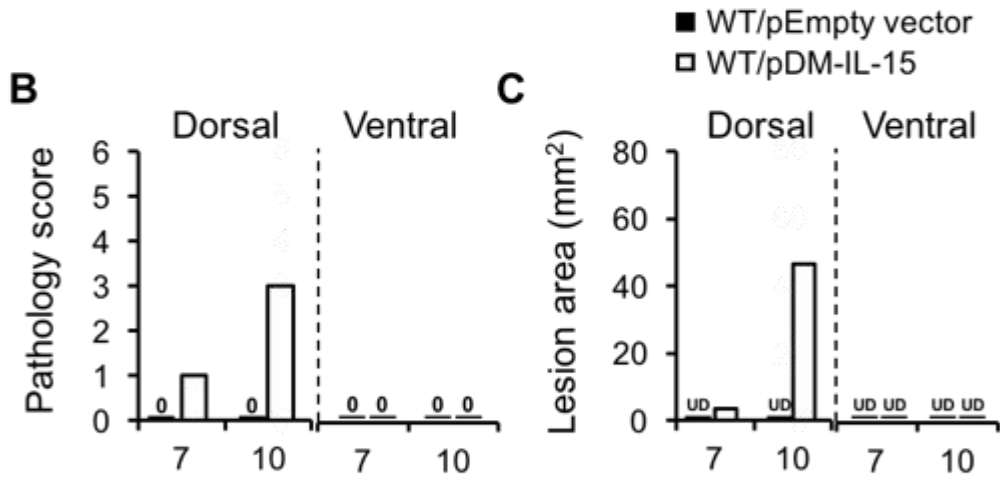
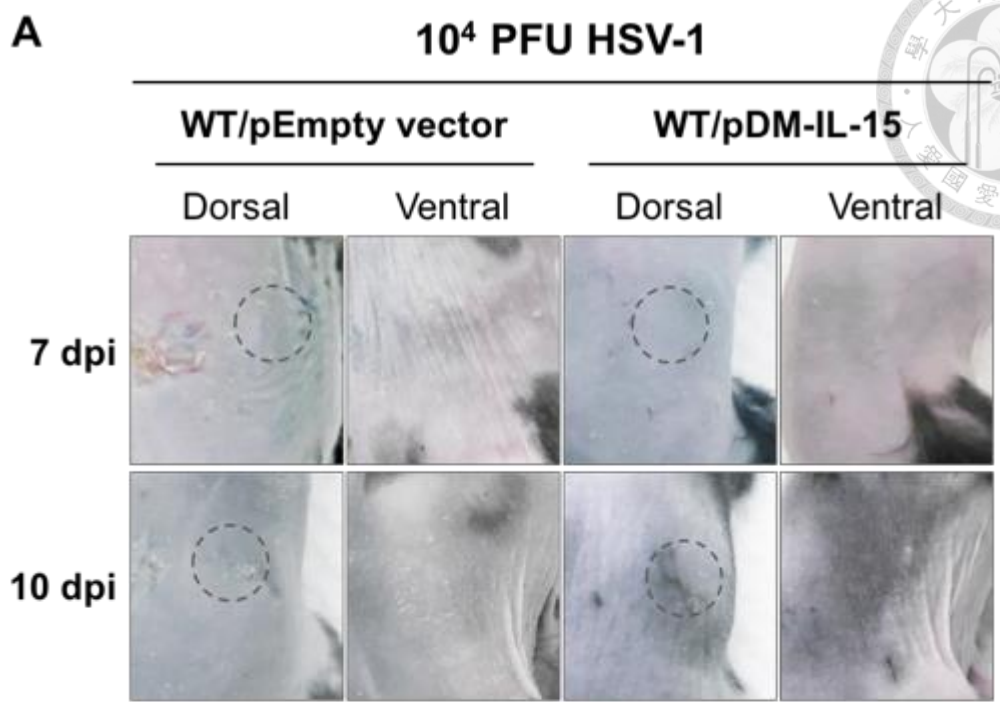


小鼠皮膚經過 HSV-1 感染後所形成疱疹傷痍的變化進程、傷痍範圍大小以及傷痍病理指數的計分方式如圖十三中的說明。對照組(WT/pEmpty vector) (A)和實驗組(WT/pDM-IL-15) (B)小鼠皮膚經過 HSV-1(10^6 PFU)感染後，其腹側形成疱疹傷痍的嚴重度(左 Y 軸；● 對照組，● 實驗組)與傷痍範圍(右 Y 軸；○ 對照組，○ 實驗組)在連續觀察 20 天期間的變化。(C)將腹側疱疹病理嚴重程度與傷痍範圍大小的乘積表示為病理學指數，綜合比較皮膚表現 DM-IL-15 對於 HSV-1 疱疹傷痍的作用效應。以統計軟體(SPSS)進行 Two-way ANOVA 檢定各組之間各時間點平均病理指數的差異顯著性(***： $p < 0.001$)。



圖十五：比較皮膚表現 DM-IL-15 對於 HSV-1 ICP4 和 gB mRNA 在皮膚表現量的影響

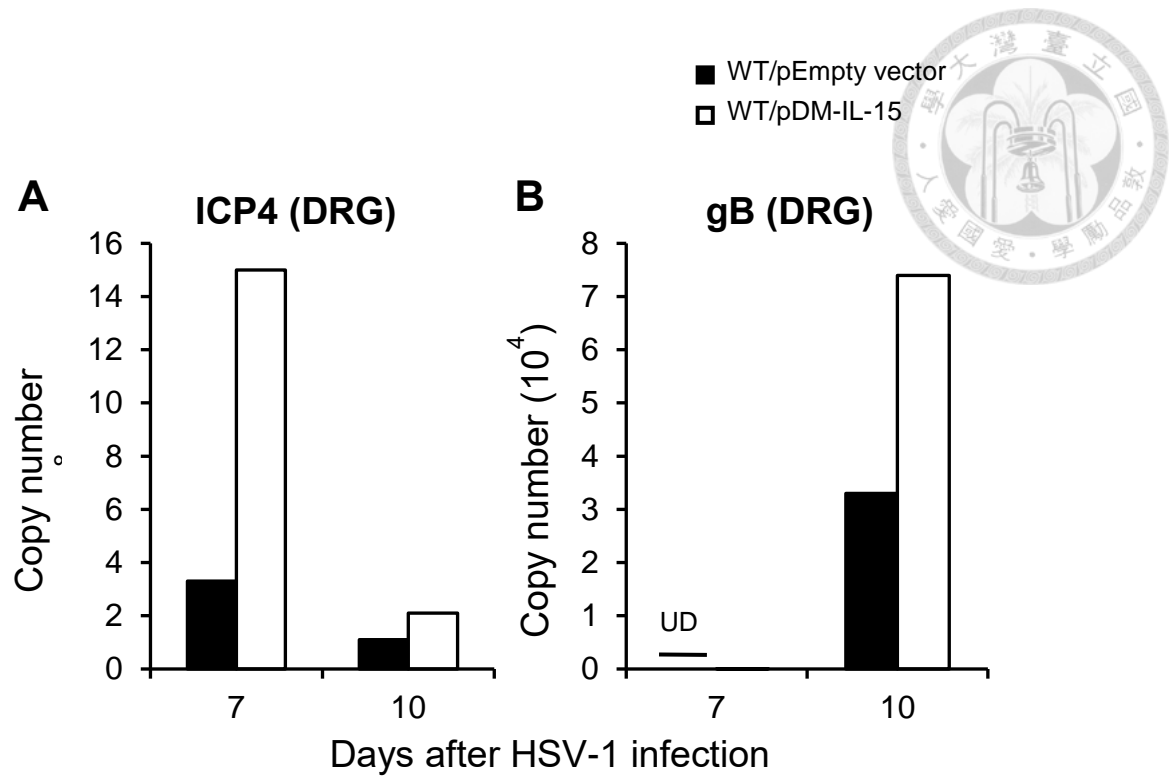
正常 C57BL/6 小鼠兩側下背部皮膚先在局部 (1 cm x 1 cm) 表現 DM-IL-15 DNA 質體 (WT/pDM-IL-15) (實驗組) 或是對照空質體 (對照組) 三天後，分別在左、右兩側分別接種 10^5 PFU 和 10^4 PFU 的 HSV-1。小鼠感染 HSV-1 後，以數位攝影機記錄病毒傷痍形成過程及大小變化，依照圖十二(A)的說明進行嚴重程度計分和利用影像分析軟體(MetaMorph)計算傷痍範圍大小，並分別於感染後第 7 及 10 天收集背側與腹側皮膚組織，抽取 RNA 進行 RT-PCR，再以 RT-qPCR 定量 ICP4 和 gB mRNA 的分子數。圖 A 所示為對照組(左)與實驗組(右)小鼠皮膚感染 HSV-1 後第 7 天(上)與第 10 天(下)疱疹傷痍的觀察結果，虛線圈為左側下背部接種 10^5 PFU 病毒量的位置。圖 B 為疱疹傷痍嚴重程度(0~6 分)，圖 C 為傷痍範圍大小(mm^2)。圖 D 為 ICP4 基因表現量統計結果，圖 E 為 gB 基因統計量結果。■ 為對照組，□ 為實驗組，每組樣本數為 1(n=1)。



圖十六：比較皮膚表現 DM-IL-15 對於 HSV-1 ICP4 和 gB mRNA 在皮膚表現量的影響



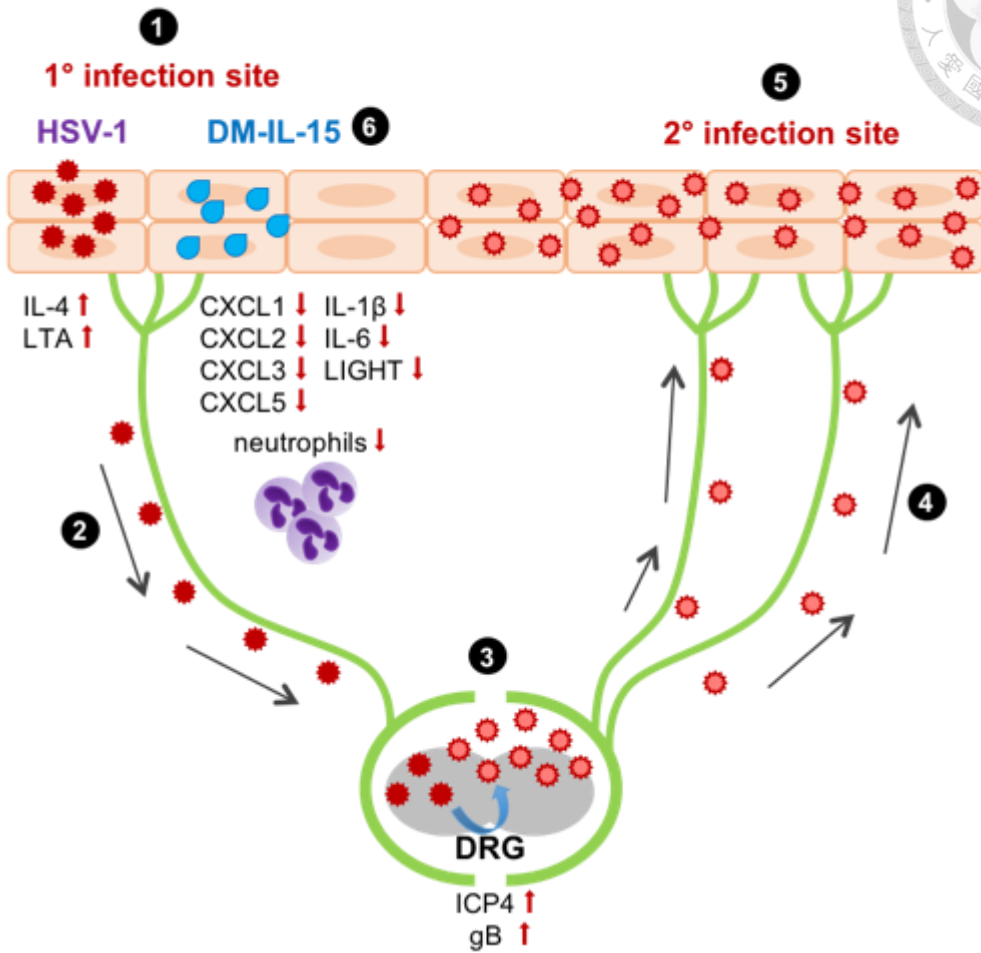
如圖十五中的實驗說明，圖 A 所示為對照組(WT/pEmpty vector)(左)與實驗組(WT/pDM-IL-15)(右)小鼠皮膚感染 HSV-1 後第 7 天(上)與第 10 天(下)疱疹傷痍的觀察結果，虛線圈為左側下背部接種 10^4 PFU 病毒量的位置。圖 B 為疱疹傷痍嚴重程度(0~6 分)，圖 C 為傷痍範圍大小(mm^2)。圖 D 為 ICP4 基因表現量統計結果，圖 E 為 gB 基因統計量結果。■ 為對照組，□ 為實驗組，每組樣本數為 1(n=1)。



圖十七：比較皮膚表現 DM-IL-15 對於 HSV-1 ICP4 和 gB mRNA 在背根神經節表現量的影響

接續圖十五的實驗，正常 C57BL/6 小鼠兩側下背部皮膚先在局部 (1 cm x 1 cm) 表現 DM-IL-15 DNA 質體 (WT/pDM-IL-15) (實驗組) 或是對照空質體 (對照組) 三天後，分別在左、右兩側分別接種 10⁵ PFU 和 10⁴ PFU 的 HSV-1。小鼠感染 HSV-1 後，分別於 HSV-1 感染後第 7 及 10 天，收集與病毒接種處相對應的第 1 至 5 節腰椎背根神經節中的神經本體 RNA 進行 RT-PCR，再以 RT-qPCR 定量 ICP4 和 gB mRNA 的分子數。圖 A 為 ICP4 基因表現量統計結果，圖 B 為 gB 基因統計量結果。■ 為對照組，□ 為實驗組，每組樣本數為 1(n=1)。

The effect of DM-IL-15 on HSV-1 neuroinvasiveness



圖十八：DM-IL-15 在 HSV-1 感染經由皮膚入侵神經的致病機制中扮演的角色

本圖所示①至⑤為 HSV-1 入侵背根神經節後造成二次感染形成帶狀疱疹的路徑，⑥為 DM-IL-15 作用的位置。[orange box] 為皮膚角質細胞，[purple cell] 為噬中性白血球，[red star] 為接種的 HSV-1 病毒顆粒，[red star] 為經過複製繁殖後產生的新的 HSV-1 病毒顆粒。

第七章 表



HSV-1 12-->24hr			HSV-1 24-->48hr		
WT > DM	WT = DM	WT < DM	WT > DM	WT = DM	WT < DM
Ccl19 Cxcl5	C3	Ccr7	Ccl19 Cxcl5	C3	Ccr7
Ccl2 Il1b	C1qb	Csf3	Ccl2 Ifna1	Ccl22	Csf3
Ccl7 Il2	Ccl17	Gngt1	Ccl7 Il1b	Cfb	Il2
Cfb Il22ra2	Ccl22	Il23a	Ccr1 Il23r	Cxcl10	Il23a
Crp Il23r	Ccr1	Il4	Cxcl1 Il6	Gngt1	Il4
Csf2 Il5	Csf1	Lta	Cxcl2 Tlr1	Il18	Lta
Cxcl1 Il6	Cxcl10	Tlr5	Cxcl3 Tnfsf14	Il22ra2	Myl2
Cxcl2 Tlr1	Il1a			Il8rb	
Cxcl3 Tnfsf14	Il8rb			Tlr6	
	Tlr6				

表一：對照組與實驗組受 HSV-1 感染後 mRNA 數量比較結果

將 nCounter 結果以 nSolver 計算 HSV-1 感染皮膚相對於未受刺激皮膚的 mRNA 有 2 倍以上增加的基因，先以時間點分為兩組：第一組為同時在 HSV-1 感染後 12 與 24 小時均有 2 倍以上增加的基因(HSV-1 12→24hr)，共 35 個基因；第二組為同時在 HSV-1 感染後 24 與 48 小時均有 2 倍以上增加的基因(HSV-1 24→48hr)，共 30 個基因。再將上述兩組分別進一步比較對照組與實驗組間 mRNA 的數量，分類為三組：對照組高於實驗組 (WT > DM)、對照組與實驗組相似 (WT = DM)、對照組低於實驗組 (WT < DM)。紅色字為該基因受 NF-κB 調控。