

國立臺灣大學醫學院免疫學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Immunology

College of Medicine

National Taiwan University

Master thesis

探討小鼠在一次和二次登革感染後 T 細胞反應作用

T cells responses in primary and heterotypic secondary DENV

infection

王煜傑

Yu-Chieh Wang

指導教授：伍安怡 博士

Advisor: Betty A. Wu-Hsieh, Ph. D

中華民國一〇一年二月

February, 2012

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

探討小鼠在一次和二次登革感染後 T 細胞反應
作用

T cells responses in primary and heterotypic
secondary DENV infection

本論文係王煜傑（學號 R98449012）在國立臺灣大學醫
學院免疫學研究所完成之碩士學位論文，於民國 101 年 01
月 10 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

任安怡

（簽名）

（指導教授）

鄧希揚

顧家綺

系主任、所長 許秉寧

致謝

“要謝的人太多了，不如就謝天吧”。這句出自高中課文裡的話，我現在終於有所體悟。一本論文從開始到完稿，絕對不可能只靠一人之力就達成。在交出碩士論文前，回頭想想，要感謝的人真的是太多太多，所以在此一併向過程中扶持我的大家說聲感謝。

最要感謝的是我的指導老師伍安怡教授，感謝老師這兩年半教會我許多東西。當初懵懵懂懂從大學畢業進入這個專業領域，老師細心並仔細的介紹實驗背景，開始讓我了解我未來的實驗方向。之後更讓我學習如何統整實驗結果，並做出科學性的分析。最後，在論文寫作上，尤其是最終這段時間，老師非常耐心地和我一起做論文最後的修改，教我如何有效地呈現我在這兩年半內辛苦的成果。第二個要感謝的是玉婷學姐，學姐也是這本論文的大功臣之一。感謝學姐常常和我討論實驗主題和方向，給了我非常多的意見。再來，要感謝實驗室的同仁，你們是我台北生活中每天相處時間最久的人。超好脾氣的瑞敏學姐，我從來沒有看你對學弟妹們發過脾氣，所以說你愛生氣的那個人絕對是沒長眼睛。榮辰學長，感謝你平常的一些意見，希望你早日發期刊。宇翔我還記得值日生工作是你帶我的，常碰到問題就找你問，因為你是個可靠的人。小巫感謝你最後那麼替我擔心畢業的事情，還有平常那麼支持我網路上的梗。俊樺謝謝你常在我倒垃圾時，問需不需要幫忙，雖然我一定說不用，但我很喜歡別人那樣的關心。世青感謝你鼓勵的小紙條，最後那段時間真的很難撐。子軒謝謝你的貼心還有忍受我這個瘋癲的鄰居。修兆謝謝你，兩年好同學希望以後能保持連絡。然後是烏漆麻黑三人組的文裕和水盈，一個是實驗上一起努力的好麻吉，一個是平常無話不聊的好鄰居，有你們兩個讓我的碩士生涯不再苦悶！最後是我的家人和女朋友儷璘，感謝你們在我碩士班後半期心靈上的支持，讓我有辦法繼續走下去。

論文真的不是那麼簡單可以完成，有大家的參與才可能有它的出現。希望你們往後能順心，平安。謝謝各位！

摘要

登革是世界上最為流行的疾病之一。依照其病徵可分為：登革熱(DF)，出血性登革熱(DHF)和登革熱休克(DSS)。出血性登革熱(DHF)目前診斷的依據為血漿滲出(plasma leakage)，血小板過低(thrombocytopenia)和外部流血(bleeding)。感染登革病毒可能引發出血性登革熱(DHF)，而研究顯示出血病例多數發生在登革二次感染的病人身上。目前對於登革二次感染，宿主體內的T細胞反應仍不甚清楚。

本實驗中，我利用實驗室建立的老鼠出血模式，觀察到老鼠感染後T細胞的活化。而且登革二次感染無論是同型或不同型病毒，比起登革一次感染都較多比例的細胞活化並且有較多產生細胞激素的T細胞產出現。老鼠二次感染後，腋窩淋巴結內 $CD4^{+}$ 和 $CD8^{+}$ T細胞會表現 $CD69^{+}$ ， $CD44^{hi}$ 和 $CD62L^{low}$ 。此外腋窩淋巴結內的 $CD4^{+}$ 和 $CD8^{+}$ T細胞也表現了CLA和CCR4，讓T細胞可以準備進入皮膚。實驗中我觀察到這些活化的現象主要出現在二次感染後第1天到第1.5天，而這些T細胞也在感染後第1.5天時，表現皮膚趨化因子CLA和CCR4。

在體外實驗中，我利用anti-CD3抗體刺激來觀察腋窩淋巴結內 $CD4^{+}$ 和 $CD8^{+}$ T細胞表現細胞激素的能力。實驗結果顯示，二次感染老鼠有能力產生TNF- α 的 $CD4^{+}$ 和 $CD8^{+}$ T細胞都顯著高於一次感染老鼠，而二次感染老鼠產生IFN- γ 的 $CD4^{+}$ T細胞雖顯著高於一次感染，但IFN- γ 的 $CD8^{+}$ T細胞卻無顯著差異。

總結這些結果，我觀察到老鼠在皮下注射感染登革病毒後，腋窩淋巴結內T細胞會活化。而T細胞的活化主要發生在登革二次感染後第1天到第1.5天。在二次感染後第1.5天，病灶淋巴結內T細胞會表現皮膚趨化因子。另外，二次感染後老鼠病灶淋巴結內的T細胞比起一次感染有較多能產生TNF- α 和IFN- γ 。這篇論文是首次使用登革出血老鼠模式研究病灶淋巴結T細胞表現皮膚趨化因子，或許這些結果可此解釋為何在皮下感染登革後，皮膚常為出血患處的原因。

Abstract

Dengue is one of the most widely spread infectious diseases in the world. Dengue disease manifests different clinical symptoms which are categorized as: dengue fever (DF), dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS). Dengue hemorrhagic fever is diagnosed as having plasma leakage, thrombocytopenia and hemorrhage manifestations including bleeding from nose and gum, skin hemorrhage and blood in vomits in addition to common DF symptoms. Although hemorrhage can develop in patients with primary DENV infection, greater percentage of patients who develop DHF experience secondary infection. The contribution of T cells to host response to DENV infection in secondary infection is still not well understood.

In this study, utilizing the hemorrhage mouse model our laboratory developed, I investigated T cell activation and cytokine production in mice infected with homotypic as well as heterotypic secondary DENV infections and compared to mice with primary infection. CD4⁺ and CD8⁺ T cell expressions of CD69⁺, CD44^{hi} and CD62L^{low} were analyzed. In addition, CD4⁺ and CD8⁺ T cell expressions of CLA and CCR4, skin homing receptors, were also studied. Here, I found that CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the brachial lymph nodes expressed activation phenotypes at as early as days 1-1.5 after secondary infection and the activated T cells expressed skin homing receptors.

With plate-bound anti-CD3 antibody to restimulate brachial lymph node cells *in vitro*, I analyzed CD4⁺ and CD8⁺ T cell cytokine response. The results showed that there were higher percentages of TNF- α -producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the lymph nodes of mice with secondary infection than that in mice with primary infection. There were higher percentages of IFN- γ -producing CD4⁺ but not CD8⁺ T cells in the lymph nodes of mice with secondary infection than that in mice with primary infection.

In summary, the results together showed that draining lymph node T cells are activated after intradermal inoculation of DENV. T cell activation and expansion occur as early as days 1-1.5 after secondary infection. T cells in the draining lymph nodes also express skin homing receptors after secondary infections and higher percentages of them produced TNF- α and IFN- γ than in mice with primary infection. This is the first study utilizing hemorrhage mouse model to show that T cells in the draining lymph nodes express skin homing receptors, which could possibly explain why skin is the most prevalent site of hemorrhage manifestations after intradermal DENV inoculation.



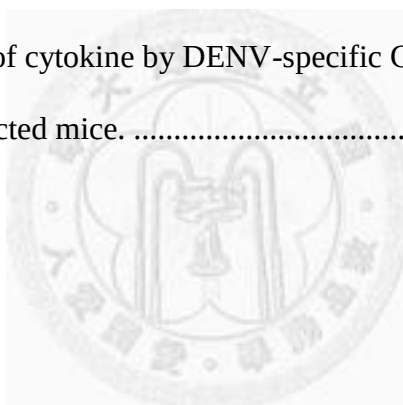
目 錄

口試委員會審定書.....	i
誌謝.....	ii
中文摘要.....	iii
英文摘要.....	iv
第一章 緒論.....	1
(一) 登革病毒與疾病	2
(二) 登革病毒感染的動物模式.....	3
2.1 已發展的動物模式.....	3
2.2 本實驗室發展的動物模式.....	3
(三) 導致登革出血熱/登革休克症候群的相關假說.....	4
3.1 抗體依賴性增強作用.....	4
3.2 T cells 反應與登革感染的關係.....	5
(四) T 細胞的活化與趨化作用	6
4.1 T 細胞的活化	6
4.2 T 細胞表現的皮膚組織趨化分子	7
(五) 實驗動機與目的	8
(六) 研究目標	8
第二章 材料與方法.....	9
(一) 實驗用老鼠	10
(二) 病毒.....	10
2.1 登革病毒.....	10
2.2 C6/36 細胞繼代培養.....	10
2.3 登革病毒的培養.....	10

2.4 登革病毒活性測試.....	11
(三) 老鼠感染登革病毒.....	11
(四) 抗體.....	11
(五) 溶液.....	12
(六) 化學藥劑和實驗器材.....	15
(七) 皮膚組織細胞激素測量-酵素連結免疫吸附分析法.....	17
(八) 淋巴結細胞表面分子螢光染色	18
(九) 胞內細胞激素染色.....	18
(十) 統計方法.....	19
第三章 實驗結果.....	20
(一) 登革病毒二次感染引發老鼠嚴重出血.....	21
(二) 登革病毒二次感後老鼠皮膚患處細胞激素表現量上升.....	22
(三) 登革病毒感染引起老鼠周邊淋巴結內 T 細胞的增加	22
(四) 登革病毒感染引起老鼠周邊淋巴結內 T 細胞表現活化因子	23
(五) 登革病毒二次感染後在周邊淋巴結內的 T 細胞會表現皮膚趨化分子	24
(六) 登革病毒感染後周邊淋巴結內的 T 細胞具有產生細胞激素的能力	24
第四章 討論.....	27
(一) 登革二次感染引起嚴重出血.....	28
(二) 感染後老鼠產生 TNF 和 IFN- γ 與出血的相關性	29
(三) 二次感後 T 細胞活化與出血患處的關聯	29
(四) 活化 T 細胞表現 CLA 在疾病上的研究	30
(五) 結論.....	30
參考文獻.....	32
圖表與說明.....	37

圖表目錄

Figure1. Sequential infections of heterotypic DENV induce hemorrhage in immunocompetent mice	38
Figure 2. IFN- γ and TNF- α levels in hemorrhage skin	40
Figure 3. Increased T cells number in draining lymph node after DENV infection ..	42
Figure 4. Intradermal DENV infection induces draining lymph node T cell to express activation molecule	44
Figure 5. Intradermal DENV infection induces local lymph node T cells to express skin homing receptors and recruit T cells to skin tissue.	51
Figure 6. The frequencies of cytokine by DENV-specific CD4 and CD8 T cell in local lymph node of DENV infected mice.	56



第一章



第一章 緒論

(一) 登革病毒與疾病

登革熱是目前世界上廣為流行的疾病之一。此疾病是由登革病毒(dengue virus)的感染所引起，好發於熱帶及亞熱帶地區(Guzman and Kouri, 2002)。登革病毒主要是藉由病媒蚊的傳播，如埃及斑蚊和白線斑蚊 (Rigau-Perez et al., 1998)。登革病毒為黃熱病毒屬(Flavivirus)，是正鏈單股 RNA 病毒，基因組約 11Kb，病毒膜外具有脂質外套(envelope)。依不同的血清型可將其區分為四型 (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4) (Henchal and Putnak, 1990; Mairuhu et al., 2004)。依照 2009 年世界衛生組織(WHO)定義，感染登革可以分為三個時期。(1) Febrile phase：病人在此時通常會發燒。這個時期會持續 2~7 天，常有面部潮紅(facial flushing)、皮膚紅斑(skin erythema)、泛發全身痠痛(generalized body ache)、肌痛(myalgia)、關節痛(arthralgia)和頭痛(headache)等症狀 (Rigau-Perez et al., 1998)。這個時期所出現的症狀與其他疾病相似，故通常難以從症狀外觀判定感染與否。(2) Critical phase：為退燒時期，通常在發病後第 3~7 天。可由微血管通透增加導致血球容量計(haematocrit)上升當成此時期開始的標誌(Nimmannitya et al., 1969; Srikiatkachorn et al., 2007)。在這段期間，病人會出現血漿滲出(plasma leakage)，此症狀會持續 24~48 小時。體內過量滲出血漿會造成個體休克(shock)。(3) Recovery phase：若病人在 Critical phase 未死亡，24~48 小時後進入此時期。這個時期病人體內會重新吸收滲出的體液，並且開始回復食慾、減輕腸胃症狀和血液流動回復正常。世界衛生組織(WHO)將嚴重的登革定義為具有：(i) 血漿滲出(plasma leakage)導致的休克、體液聚積(fluid accumulation)、呼吸困難(respiratory distress)，(ii) 嚴重的流血(bleeding)，和(iii) 嚴重的器官衰竭(organ impairment)的病人。嚴重的登革症狀主要都出現於退燒的時期 critical phase。到目前為止，對於登革熱病人尚未有好的治療方式出現。所以了解登革出血機制並想出一套治療方式是目前科學界迫切需要完成的任務。

(二) 登革病毒感染的動物模式

2.1 已發展的動物模式

純品系老鼠是目前科學上很重要的工具，除有純品系老鼠可做研究外，目前也發展出許多可用於老鼠的研究材料和基因剔除鼠(knockout mice)，另外，科學研究上的累積也對老鼠的免疫系統有相當程度的了解。

到目前為止許多科學家以老鼠模式研究登革。早期有科學家將人類周邊淋巴細胞(PBL)打入缺乏免疫排斥力的 SCID 老鼠中來作為研究登革病毒的動物模式(Wu et al., 1995)。也有科學家將人類的肝細胞株(HepG2)打入 SCID 老鼠用來研究登革疾病 (An et al., 1999)。另外，IFN- α/β 和 IFN- γ 被認為是與病毒清除有關的細胞激素 (Kurane et al., 1993)，有科學家利用 IFN- α/β 和 IFN- γ receptor 基因缺失的老鼠做為研究材料 (Johnson and Roehrig, 1999)。然而，這些模式老鼠皆為免疫不全的老鼠。現今有許多研究指出，登革出血症狀與宿主的免疫調控有很大的關係，所以免疫缺失老鼠並無法很全面的用來研究登革出血熱/登革休克症之免疫致病機制。

2.2 本實驗室發展的動物模式

為了解登革病毒之免疫致病機制(immunopathogenesis)，我們利用免疫健全的 immunocompetent C57BL/6 老鼠，模擬蚊子叮咬人類的方式以皮下注射感染登革病毒(Chen et al., 2007; Yen et al., 2008)。實驗顯示老鼠感染登革病毒後第三天，可以在注射處的皮膚以及皮下組織發現出血，另外在腹腔，小腸及淋巴結也觀察到出血現象。出血的嚴重程度與所注射的病毒劑量相關。而老鼠的血液中也測到感染後血小板數量顯著的下降(thrombocytopenia)。在出血組織中發現內皮細胞(endothelial cells)會有細胞凋亡(apoptosis)現象，並且能在循環系統內測到內皮細胞 circulating endothelial cells (CECs)，顯示血管內皮細胞在感染後受到損害 (Yen et al., 2008)，並且 macrophage 浸潤到組織並釋出 TNF- α 為主要導致出血的原因

之一 (Chen et al., 2007; Yen et al., 2008)。另外，體外研究也顯示 macrophage 在登革病毒感染後六小時就會開始產生 TNF- α ，而在十二小時測到最大值。另外，實驗顯示在登革病毒和 TNF- α 同時存在下，會誘發上皮細胞產生 iNOS(inducible nitric oxide synthase)及 NO 自由基。這些自由基的產生，被證明與上皮細胞的細胞凋亡相關 (Yen et al., 2008)。另外，此實驗也利用 iNOS 基因剔除鼠證明自由基的產生與感染後老鼠出血的相關性 (Yen et al., 2008)。

本實驗室過去的實驗顯示，被登革病毒二次感染的小鼠 T 細胞去除後，小鼠的出血率會下降。除此之外亦觀察到出血處 T 細胞的浸潤現象，顯示 T 細胞在老鼠二次感染後，引起出血的重要性。在本篇論文中，我將利用此動物模式來探究登革二次感染出血小鼠 T 細胞的變化。

(三) 導致登革出血熱/登革休克症候群的相關假說

3.1 抗體依賴性增強作用 (antibody-dependent enhancement, ADE)

目前在臨床研究上對登革觀察到一些現象：(1)個體在初次感染登革病毒後，對下一次感染同一型病毒(homotypic serotype)產生保護的效力 (Sabin, 1952)。(2)但若是第二次感染為不同型(heterotypic serotype)的病毒，則會產生更嚴重的病徵。在臨床的觀察結果發現，有 90%的登革出血熱病人是由二次感染不同型的病毒(heterotypic serotype)所引起。而且相較於被同一型(homotypic serotype)病毒感染，不同型(heterotypic serotype)的病毒感染有高於 15-80 倍的機率會引起登革出血熱(DHF) (Sangkawibha et al., 1984; Thein et al., 1997; Vaughn et al., 2000)。利用體外試驗科學家發現，細胞被登革病毒感染的程度，會隨登革病毒特異性血清的加入而被改變。當加入低量而不足以中和病毒之特異性血清時，將使細胞更容易受到登革病毒的感染 (Hawkes and Lafferty, 1967)。在恆河猴身上先感染第四型登革病毒或先注射抗病毒的免疫血清一段時間之後，再感染第二型登革病毒，猴子血液中病毒含量較一次感染第二型登革病毒的對照組增加(Halstead, 1979; Halstead

and O'Rourke, 1977)。對於這些實驗結果 Halstead 提出一套假說:ADE (antibody-dependent enhancement)，在初次感染登革病毒後，體內所產生的抗體，在針對第二次接受感染不同型(heterotypic serotype)之病毒，不但不具有保護效力，還因此藉由 Fc receptor 與抗體-病毒複合體(complex)進行作用，導致單核球細胞(monocyte)更容易被登革病毒感染。造成宿主產生嚴重的登革出血熱(DHF)。

3.2 T 細胞反應與登革感染的關係

最早發現病人在感染登革病毒後，會引起體內特異性 T 細胞活化的是 Kurane 和 Bukowski 兩位科學家。在 1989 年 Kurane 的研究中，以登革病毒抗原刺激病人周邊血液單核細胞 (PBMC)引起 CD4 T 細胞的增生並表現 IFN- γ (Kurane et al., 1989)。另外，Bukowski 團隊同年也發現到在感染登革第四型的病人身上分離出的 CD8 毒殺性 T 細胞的毒殺能力可同時被第二型和第四型的病毒抗原所活化 (Bukowski et al., 1989)。1991 年 Kurane 發現登革出血熱(DHF)急性感染病人血清中比起登革熱(DF)病人有更高量的 soluble IL-2 receptor (sIL-2R)、soluble CD4 (sCD4)、soluble CD8 (sCD8)及 IFN- γ (Kurane et al., 1991)，顯示了病人體內的 T 細胞在感染登革病毒後全被活化。

在 1995 年 Zivny 等人利用登革第四型病人的周邊血液單核細胞(PBMC)和登革第四型病毒 NS3 上不同片段的九碼胜肽序列篩選出了毒殺性 T 細胞上面的抗原決定位置(epitope)。同時也發現到這些感染登革第四型病毒的病人可以交互辨識(cross-reactive)第二、三、四型的抗原決定位置 (Zivny et al., 1995)。

在 2003 年，Mongkolsapaya 團隊使用了 NS3 片段上具有專一性的 tetramer 來分析病人體內特異性的 CD8 毒殺性 T 細胞，他們發現這群特異性高的 T 細胞在急性感染期間 (acute phase)會進行大量的細胞凋亡(apoptosis)，另外會有一群特異性不高的 T 細胞則會進行增生(Mongkolsapaya et al., 2003)。這個結果被認為和二次登革病毒感染後產生交互辨識(cross-reactive)T 細胞有關。

(四) T 細胞的活化(activation)與招引作用(recruitment)

4.1 T 細胞的活化

宿主被感染後，體內 T 細胞的活化情形，可以利用 T cell 上某些表面分子來辨認。

CD69 又稱為活化誘導分子 activation inducer molecule (AIM)，是 T 細胞在活化早期表現的一個膜上分子。CD69 的表現與抗原(antigen)或分裂素(mitogen)所引起的 T 細胞增生能力有關 (Biselli et al., 1992)。除了表現於活化的 T cell 外，CD69 也表現在 B 細胞、NK 細胞、單核球、嗜中性和嗜酸性球上 (Ziegler et al., 1994)。

CD44 為一個 85-90 KDa 大小的跨膜糖蛋白，主要表現在淋巴球，皮膚纖維母細胞(fibroblasts)，內皮細胞(endothelial cells)和表皮細胞(epithelial cells)上。此分子的功能包含了淋巴細胞增生(lymphopoiesis)，血管新生(angiogenesis)、傷口癒合(wound healing)、細胞貼附(cell adhesion)和腫瘤轉移(tumor metastasis)。T 細胞被抗原刺激後表現 CD44，會與血管內皮細胞上的透明質酸(hyaluronate)分子結合，讓 T 細胞可以從血液流動的狀態轉而貼附到血管壁上，進而讓 T 細胞進入發炎處。在科學上 CD44^{hi} 常被用來當成 T 細胞活化的標誌 (Haynes et al., 1989; Johnson et al., 2000)。

L-selectin，又稱 CD62L。是一個調控淋巴細胞遷移(migration)和調控淋巴球在淋巴組織與血液之間流動的分子。L-selectin 為 selectin 家族中唯一調控內皮細胞和淋巴球間互動的分子。一旦表現了高量的 L-selectin，T 細胞將會被吸引至二級淋巴組織內，接受抗原的刺激並增生。當細胞接受抗原刺激後，L-selectin 的表現量會下降，以幫助 T 細胞離開淋巴組織進入患處。L-selectin 主要由 B 細胞、未活化的 T 細胞、單核球、嗜中性及嗜酸性球所表現(Grailer et al., 2009; Smalley and Ley, 2005)。

4.2 T 細胞表現的皮膚組織趨化分子

Cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) ，最早被發現表現在皮膚上的 T 細胞表面，為碳水化合物分子(carbohydrate)組成。其配體(ligand)為表現於發炎皮膚上表皮細胞的 E-selectin。此分子是目前最常被用來診斷如皰疹病毒(HSV)感染、牛皮癬(psoriasis)等皮膚相關疾病(Rook and Heald, 1995; Rossiter et al., 1994)。

CCR4 為一個 CC 趨化素受器，與 CCL17 和 CCL22 分子結合，主要由 T 細胞、B 細胞、嗜鹼性球、單核球和 NK 細胞所表現 (Katschke et al., 2001)。目前被認為與 T 細胞進入皮膚組織引起疾病有關 (Morimoto et al., 2005)。

(五) 實驗動機與目的

登革為目前難解的熱帶疾病問題之一，此疾病對於人類生命及生活品質造成很大的威脅，台灣也處於登革的好發地區，所以對於登革致病機制的了解刻不容緩。目前為止，科學家對於登革出血熱的發生原因仍不十分清楚，只在臨床研究觀察到登革出血熱(DHF)多為二次感染病例 (Sangkawibha et al., 1984)。目前對於出血的機制的了解認定可能與細胞激素、抗體依賴性增強反應(ADE)和交叉辨認抗原的 T 細胞有關。過去本實驗室利用老鼠模式觀察到登革病毒感染後，老鼠巨噬細胞所表現的 TNF- α 會與登革病毒共同促使表皮細胞進行細胞凋亡，並引發出血 (Chen et al., 2007; Yen et al., 2008)。在我的實驗中，利用本實驗室建立的登革老鼠模式研究二次感染後 T 細胞活化及產生細胞激素的狀況。希望能從比較感染後淋巴結內 T 細胞的活化狀況和細胞激素的表現來研究登革出血現象中，T 細胞在宿主內的變化。

(六) 研究目標

本論文的研究目標為觀察 C57BL/6 老鼠在被登革病毒一次及二次感染後老鼠的淋巴結內 T 細胞的免疫反應：

1. 觀察老鼠一次及二次感染後出血現象和出血組織中 $\text{TNF-}\alpha$ 及 $\text{IFN-}\gamma$ 表現。
2. 研究老鼠感染後病灶淋巴結內 T 細胞的活化及表現皮膚趨化表面分子。
3. 研究老鼠感染後病灶淋巴結內 T 細胞 $\text{TNF-}\alpha$ 及 $\text{IFN-}\gamma$ 的表現。



第二章

材料與方法



第二章 材料與方法

(一) 實驗用老鼠

使用的老鼠為 4-6 周大 C57BL/6 小鼠，C57BL/6 小鼠購於台大醫學院實驗動物中心。老鼠皆飼養於台大醫學院實驗動物中心感染性動物房。

(二) 病毒

2.1 登革病毒:

實驗使用病毒為登革病毒血清第二型 16681 strain 及第一型病毒 Hawaii strain (病毒活性 $>10^8$ PFU)

2.2 C6/36 細胞繼代培養:

取 C6/36 細胞，以 DMEM w/10% FCS 培養液養在 75T 培養瓶，待細胞生長到高密度時，約 3~4 天分殖到新的培養瓶中，細胞數稀釋比例為 1:3 至 1:6 依情況而定。分殖時，倒掉舊培養液，以 PBS 洗滌細胞，去除 PBS 後加入 1 ml trypsin-EDTA，37°C 靜置五分鐘後，輕拍培養瓶使細胞自動脫落，加入培養液，以吸管上下抽吸數次打散細胞，再以稀釋比例轉移到新的培養瓶中，加入足量培養液，培養於 28°C 含 5% CO₂ 培養箱。

2.3 登革病毒的培養:

取病毒稀釋於 2 ml 的 DMEM w/2% FCS 培養液，利用 MOI=0.01~0.1 的病毒液感染 C6/36 細胞兩小時後，外加 6 ml DMEM w/10% FCS 培養液再將細胞培養於 28°C 含 5% CO₂ 培養箱。約 5~7 天後收取細胞上清液，將細胞殘渣離心去除後，以 27000 (轉/分鐘)離心濃縮(Millipore Centricon MWCO 1000)，再將病毒濃縮液以 0.22 μ m filter 過濾後保存於-80°C 冰箱。

2.4 登革病毒活性測定(溶斑試驗 plaque assay):

先在 24 孔培養盤中將 6×10^4 BHK 細胞培養一夜使之形成單層細胞。以 DMEM w/2% FCS 培養液將病毒作 10 倍序列稀釋後，於 24 孔培養盤中每孔加入 200 μ l 病毒稀釋液。置於 37°C、5% CO₂ 培養箱中兩小時後，每孔再加入 0.5% 洋菜膠至總體積 1 ml 於 37°C、5% CO₂ 培養箱中培養 7 天。7 天後加入 10% formalin 固定 1 小時，然後去除孔內溶液，加數滴 5% crystal violet 染色 5~10 分鐘後，用水洗淨、風乾，即可計算 PFU (plaque forming unit)。

(三) 老鼠感染登革病毒

4-6 周大 C57BL/6 小鼠麻醉後以剃毛機將背上毛去除乾淨，再以鑷子將老鼠皮膚拉起，利用皮下注射方式於老鼠背部注入稀釋後總體積為 400 μ l (4×10^6 或 4×10^7 PFU) 的登革病毒。老鼠於感染後三天進行犧牲，觀察老鼠背部皮膚和皮下出血狀況。

(四) 抗體

Flow cytometry

Format	Specificity (Mouse)	Clone	Isotype	Brand
FITC	CLA	HECA-452	Rat IgM	BD PharMingen
FITC	IFN- γ	XMG 1.2	Rat IgG2a	BD PharMingen
FITC	CD44	IM7	rat IgG2b	eBioscience
FITC	CD62L	MEL-14	rat IgG2a	eBioscience
PE	CD69	H1.2F3	Armenian Hamster	BD

			IgG	PharMingen
PE	TNF- α	MP6-XT22	Rat IgG2a	BD PharMingen
PE Cy5	CD4	L3T4	Rat IgG2b	eBioscience
APC	CD194 (CCR4)	2G12	Hamster IgG	BD PharMingen
APC	CD8	53-6.7	Rat IgG2a	BD PharMingen

Immuno-fluorescence assay

Format	Specificity (Mouse)	Clone	Isotype	Brand
FITC	CLA	HECA-452	Rat IgM	BD PharMingen
PE	CD3	145-2C11	Rat IgG _{2a}	eBioscience

(五) 溶液

Complete RPMI 1640 medium

RPMI 1640	430 ml
Heat-inactivated fetal calf serum	50 ml
Penicillin-streptomycin (100mM)	5 ml
L-glutamine (200mM)	5 ml
Non-essential amino acid (10mM)	5 ml
Sodium pyruvate (100mM)	5 ml

Filter sterilized (0.22 μ m) and stored at 4°C

Complete DMEM medium

DMEM	430 ml
Heat-inactivated fetal calf serum	50 ml
Penicillin-streptomycin (100mM)	5 ml
L-glutamine (200mM)	5 ml
Non-essential amino acid (10mM)	5 ml
Sodium pyruvate (100mM)	5 ml

Filter sterilized (0.22 μ m) and stored at 4°C

2% DMEM medium

DMEM	460 ml
Heat-inactivated fetal calf serum	20 ml
Penicillin-streptomycin (100mM)	5 ml
L-glutamine (200mM)	5 ml
Non-essential amino acid (10mM)	5 ml
Sodium pyruvate (100mM)	5 ml

Filter sterilized (0.22 μ m) and stored at 4°C

PBS

Na ₂ HPO ₄	23 g
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	5.98 g
NaCl	90 g
ddH ₂ O	1 L

pH adjusted to 7.4 and filter sterilized (0.22 μ m)

RIPA Lysis buffer

Leupeptin	1%
Aprotinin	1%
PMSF	1%
Protease inhibitor cocktail	200:1

Intracellular cytokine staining buffer (for Flow cytometry)

1x Dulbecco's PBS buffer	492.5 ml
Heat-inactivated fetal calf serum	5 ml
Sodium azide (20%)	2.5 ml

pH adjusted to 7.4, filter sterilized (0.22 μ m) and stored at 4°C

1% Fixation buffer (for Flow cytometry)

1x Dulbecco's PBS buffer	500 ml
paraformaldehyde	1 %

Store in dark at 4°C

Blocking solution (for IFA)

1x Dulbecco's PBS buffer	100 ml
Heat-inactivated fetal calf serum (5%)	5 ml

Prepared in laminar flow in sterilized condition

Fixation buffer (for IFA)

Acetone	200 ml
methanol	200 ml

ELISA washing buffer

PBS	500 ml
Tween 20	250 μ l

ELISA stop solution

H ₂ SO ₄	1 ml
ddH ₂ O	99 ml

Prepared and operated in chemical hood

ELISA coating buffer

NaHCO ₃	0.1 M
Na ₂ CO ₃	0.1 M

Adjusted pH to 9.5 and autoclaved

ELISA substrate solution

Tetramethylbenzidine	100 μ l
----------------------	-------------

(六) 化學藥劑和實驗器材

Chemicals and reagents	Catalog No.	Brand
10% Formalin		Baso
Agar	213830	Invitrogen
Avertin	T4,840-2	Aldrich
Dulbecco's PBS	02-023-5A	Biological Industries
Fetal calf serum	04-001-1A	Biological Industries

L-glutamine	25030-081	Gibco BRL
Mounting medium	S3023	DAKO
Non-essential amino acid	11140-050	Gibco BRL
Penicillin-streptomycin	15140-122	Gibco BRL
Paraformaldehyde	P-6148	Sigma
RPMI 1640	23400-021	Gibco BRL
TMB substrate	00-4201-56	eBioscience
Tween 20	X251-07	J.T. Baker

Disposable plastics	Brand
5 ml pipet	Costar
10 ml pipet	Costar
25 ml pipet	Costar
6-well culture plate	Corning
24-well culture plate	Corning
96-well culture plate	Corning
25 T Flask	Corning
75 T Flask	Corning
10 cm ² culture dish	Corning
21 G needle	Terumo
23 G needle	Terumo
10cm ² cover slip	信德
FACScan staining tube	Falcon
Syringe filter (0.22 μm)	Millipore
Silanized Slides	DAKO

Equipments	Brand
BH-230 water bath	
Centrifuge	Kubota
CO2 incubator	
FACScanto flow cytometry	Becton Dickinson
Laminar flow hood	Dwyer
SP5 Microscope	Leica

(七) 皮膚組織細胞激素測量-酵素連結免疫吸附分析法(ELISA)

取下感染後老鼠出血組織，秤重後將組織置於 400 μ l RIPA lysis buffer，於冰上研磨組織至泥狀。離心後取上清液以 ELISA 測量。

Coating:

將 capture antibody 以 coating buffer 稀釋 250 倍，取 100 μ l 加於 E.I.A. plate，以保鮮膜包好置於 4°C 冰箱一夜，以 wash buffer (PBS / 0.5% Tween-20) 洗 3 次。

Blocking:

加入 200 μ L blocking buffer 於室溫靜置 1 小時，以 wash buffer 洗 3 次。

Apply sample or standard:

加入稀釋好的上清液和 standard，將 plate 以保鮮膜包好放置於室溫作用一小時；每個檢體均做二重複。之後以 wash buffer 洗 5 次。

Incubate with detection antibody:

加入 100 μ l 二次抗體(稀釋 250 倍)，放置於室溫一小時。之後 wash 5 次。

Add avidin-HRP:

加入 100 μ l avidin-HRP(稀釋 250 倍)，室溫作用三十分鐘。之後以 wash buffer 洗 5 次。

Add substrate and develop:

取 TMB substrate buffer，每 well 加入 100 μ l，避光於室溫作用呈色 5 分鐘。

Stop reaction:

取 2N 硫酸溶液，每 well 加入 50 μ l，以波長 450 nm 判讀吸光值。

(八) 淋巴結細胞表面分子螢光染色

以無菌刀械取出老鼠左右兩臂下腋窩淋巴結(brachial lymph nodes)，將淋巴結置於盛有 1 ml RPMI 的 12 孔培養盤中，輕輕以 5 ml 針筒背面磨出淋巴結細胞，以 1500(轉/分鐘)離心 5 分鐘清洗細胞。取 10^6 淋巴結細胞置於 96 孔 V 型盤，以 4 $^{\circ}$ C，1500 轉離心十分鐘，將培養液倒掉，加入 200 μ l staining buffer 清洗兩次。將標有螢光染劑的抗體加入 100 μ l 於 96 孔盤中。染色過程中避光置於 4 $^{\circ}$ C 作用 30 分鐘。染色完後以 200 μ l staining buffer 清洗，離去沒有黏著的抗體。重複兩次清洗後，加入 200 μ l 之 1% paraformaldehyde 固定。最後將細胞移置 FACScan 小管，以流式細胞儀分析。

(九) 胞內細胞激素染色(ICS, intracellular cytokine staining)

山羊抗小鼠 CD3 抗體 coating:

犧牲小鼠前一天取 96 孔平底盤以無菌 PBS 緩衝液稀釋 anti-CD3 抗體成 1 μ g/ml 濃度，每孔加入 100 μ l，置於 4 $^{\circ}$ C overnight。

anti-CD3 抗體刺激培養及胞內細胞激素染色:

以無菌刀械取出老鼠左右兩臂下腋窩淋巴結(brachial lymph nodes)，將淋巴結置於盛有 1 ml RPMI 的 12 孔培養盤中，輕輕以 5 C.C.針筒背面磨出淋巴結細胞，以 1500(轉/分鐘)離心 5 分鐘清洗細胞。取 10^6 淋巴結細胞加入 coating 有 anti-CD3 抗體之 96 孔培養盤，另外加入 100 μ l 的 RPMI 1640 包含 10% FCS 完整培養液，置 37°C、5% CO₂ 培養箱中培養 6 或 24 小時。在收細胞前 6 小時加入 2 μ M monesin 0.134 μ l 於每個培養孔內。達時間點時，將細胞離心，以染色專用含有 1% FCS 及 0.2% sodium azide 之緩衝液沖洗兩次。細胞經過洗滌後離心，取其細胞在低溫下避光染 T 細胞表面抗原 CD4 及 CD8 分子 30 分鐘。30 分鐘後，以緩衝液洗滌細胞兩次，以移走未黏著之抗體。之後用 4% paraformaldehyde 固定黏上 CD4 與 CD8 的抗體分子。細胞以含有 saponin 緩衝液洗滌兩次，加入 TNF- α 及 IFN- γ 抗體低溫避光染色 30 分鐘。30 分鐘後同樣以含有 saponin 緩衝液洗滌兩次。加入 200 μ l 緩衝液懸浮細胞並移置 FACScan 小管，以流式細胞儀分析。

(十) 統計方法

本實驗所使用的統計方法為 Student's t test，當 $P < 0.05$ ，表示兩組間有顯著差異

第三章

實驗結果



第三章 實驗結果

登革病毒二次感染引發老鼠嚴重出血

在登革疾病的研究中，目前已有許多的團隊利用老鼠作為研究材料並發表結果。本實驗室過去模擬蚊子叮咬人類的情況以皮下(intradermally) 注射病毒至老鼠的方式。實驗結果顯示，在一次感染(4×10^7 PFU)登革第二型 (strain 16681)病毒後三天，會有 33%比例的老鼠會出血 (Chen et al., 2007; Yen et al., 2008)。在本實驗中我利用老鼠模式來研究二次感染後老鼠出血的現象。我使用了兩種血清型的登革病毒 (Hawaii strain as DENV-1 and 16681 strain as DENV-2)，分別在第 0 天注射低劑量(4×10^6 PFU)的登革第一型病毒、第二型病毒或 PBS 至老鼠皮下，30 天後，這些老鼠再接受 4×10^7 PFU 的不同病毒感染。實驗結果顯示，在老鼠經過第二次感染後的第三天，一次感染登革第一型(Hawaii strain)病毒的老鼠會有 21% 的出血比例，而一次感染登革第二型 (strain 16681)的老鼠有 39%的出血比例；另外，登革第二型 (strain 16681)病毒比登革第一型 (Hawaii strain)對老鼠有較高的出血潛力。相較於一次感染 (DENV-1, 21%; DENV-2, 39%)的老鼠組別，實驗的結果顯示二次感染不同型 (heterotypic infection)病毒的老鼠有較高的出血比例 (DENV-2→DENV-1, 50% ; DENV-1→DENV-2, 75%)。這個現象與人類臨床研究結果相吻合。到目前為止人類的臨床病例顯示大部分出現嚴重 DHF/DSS 的病人都是由二次感染不同型的登革熱病毒所引起 (Sangkawibha et al., 1984; Thein et al., 1997; Vaughn et al., 2000)。若是第一次感染引起較輕微出血比例的登革第一型病毒，之後，再給予較嚴重的登革第二型病毒(75%)，這樣的感染方式比起先感染第二型而後再感染第一型病毒(50%)，會有更高的出血比例。另外，有趣的是，我們也發現了如果老鼠兩次都感染同樣是第二型的病毒(20%)，出血比例會比兩次感染不同型病毒(75%)的老鼠低。這些實驗結果暗示著第一次感染後老鼠體內會引發下次對於同一型病毒感染的保護力，但這個保護力對於不同型的病毒似乎無效，甚至有加強出血的可能 (Fig. 1A & 1B)。

接受登革病毒二次感染後，老鼠皮膚患處組織內細胞激素(TNF- α 及 IFN- γ)表現量上升

本實驗室過去的實驗結果發現老鼠在一次感染登革病毒後之第三天，巨噬細胞(macrophage)會浸潤於出血組織中，而這些浸潤的巨噬細胞產生 TNF- α ，且 TNF- α 之產生是老鼠出血的重要因素之一 (Chen et al., 2007)。另外在臨床研究中也發現血液中 TNF- α 及 IFN- γ 的濃度與 DHF/DSS 的病症具有統計意義的正相關性 (Green et al., 1999b; Kontny et al., 1988)。本實驗中我研磨感染三天後老鼠患處的出血組織，並利用酵素連結免疫分析法(ELISA)量測均質液中 TNF- α 及 IFN- γ 濃度 (Fig. 2A & B)。一次感染的組別中，老鼠出血組織裡的 TNF- α 濃度相較於控制組有顯著的差異 (感染第一型病毒 P 值為 0.009，第二型病毒 P 值為 0.002)，而出血組織裡的 IFN- γ (感染第一型病毒與控制組比較後統計上 P 值為 0.019，第二型病毒 P 值為 0.022)，也同樣有顯著的差異。而二次感染的組別除了均顯著高於控制組外，在統計上也顯著地高於只有一次感染登革第二型(PBS $\rightarrow$ DENV2)的組別($P = 0.049$)。顯示造成二次感染出血率更高的因素可能與免疫細胞於皮膚組織釋放更多的 TNF- α 及 IFN- γ 有關。但有趣的是，兩次都感染同樣是登革第二型病毒的組別，雖然老鼠出血率低，但 TNF- α 及 IFN- γ 的表現量與先感染登革第一型病毒再二次感染登革第二型病毒的組別(DENV1 $\rightarrow$ DENV2)比較卻無明顯差異，顯示二次感染中出血現象，無論是因為兩種不同型或同型病毒造成的，都與細胞激素的產生有關。

登革病毒感染引起老鼠病灶淋巴結內 T 細胞的增加

在二次感染後第一天肉眼觀察即可發現老鼠病灶淋巴處的腋窩淋巴結(brachial lymph nodes)有腫脹的現象，細胞計數的結果顯示登革第二型病毒一次感染後，老鼠腋窩淋巴結的 CD8⁺ T 細胞數目會由原本控制組的 5×10^6 增加成感染後的 8×10^6 ，而 CD4⁺ T 細胞數由 11×10^6 增加成 17×10^6 。另外，老鼠二次感染後

(DENV1→DENV2 和 DENV2→DENV2)，淋巴結內的 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 細胞數目更增加到控制組的兩倍以上。這些結果顯示一次和二次感染後，T 細胞均會增生，且第二次感染後 T 細胞的增生較快，並且 T 細胞數量較多 (Fig. 3)。

登革病毒感染後引起周邊淋巴結內 T 細胞表現活化因子

我以免疫螢光染色方式觀察老鼠腋窩淋巴結內的 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 細胞在二次感染後第 1 天到第 2.5 天內 T 細胞活化因子表現的情形。老鼠在感染後第 1 天表現在 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 細胞上的 $CD69^+$ 細胞群無論是兩次感染同型病毒或不同型病毒，都顯著地高於控制組別， $CD4^+$ T 細胞：PBS ($7 \pm 0.4\%$)，DENV1→DENV2 ($18.1 \pm 3.89\%$)，DENV2→DENV2 ($21.2 \pm 7.88\%$)； $CD8^+$ T 細胞：PBS ($6.2 \pm 0.57\%$)，DENV1→DENV2 ($21.7 \pm 5.13\%$)，DENV2→DENV2 ($20 \pm 3.35\%$)，並且 $CD69^+$ T 細胞在老鼠感染後會隨著時間而增加，在第 2.5 天時 $CD69^+$ T 細胞的百分比會達到高點， $CD4^+$ T 細胞：DENV1→DENV2 ($41.8 \pm 1.81\%$)，DENV2→DENV2 ($41.85 \pm 2.65\%$)； $CD8^+$ T 細胞：DENV1→DENV2 ($32.2 \pm 2.91\%$)，DENV2→DENV2 ($34.4 \pm 2.86\%$) (Fig. 4A)。這些結果顯示老鼠經過二次感染後，淋巴結內 T 細胞在第 1 天就會開始活化，並隨著時間持續增加。另外，代表 T 細胞遭遇抗原後所表現的 effector 相關分子 $CD44^{hi}$ (Haynes et al., 1989; Johnson et al., 2000) 在感染後 1 天也有顯著的增多， $CD4^+$ T 細胞：PBS ($13.9 \pm 1.4\%$)，DENV1→DENV2: ($18.8 \pm 1.47\%$)，DENV2→DENV2 ($21.4 \pm 2.57\%$)； $CD8^+$ T 細胞：PBS ($6.3 \pm 1.15\%$)，DENV1→DENV2 ($24.2 \pm 5.72\%$)，DENV2→DENV2 ($23.2 \pm 0.9\%$) (Fig. 4B)。不同於 $CD69^+$ 的是， $CD44^{hi}$ 表現量最高點出現在第 1.5 天， $CD4^+$ T 細胞：DENV1→DENV2 ($26.3 \pm 9.51\%$)，DENV2→DENV2 ($25.4 \pm 8.81\%$)； $CD8^+$ T 細胞：DENV1→DENV2 ($34.7 \pm 6.25\%$)，DENV2→DENV2 ($32.4 \pm 6.46\%$)。另外，調控淋巴球遷移的分子 $CD62L$ (Grailer et al., 2009; Smalley and Ley, 2005)，其 $CD62L^{low}$ 細胞群達到最高點的時間也是出現在感染後第 1.5 天， $CD4^+$ T 細胞：

PBS ($11.5 \pm 2.04\%$), DENV1→DENV2 ($26.6 \pm 5.77\%$), DENV2→DENV2 ($26.2 \pm 8.03\%$); CD8⁺T 細胞: PBS ($6.2 \pm 1.9\%$), DENV1→DENV2 ($31.4 \pm 1\%$), DENV2→DENV2 ($32.04 \pm 9.86\%$) (Fig. 4C)。這些結果顯示二次感染後, T 細胞在第 1 天開始活化表現 CD69, 1.5 天表現 CD44 分子並且使 CD62L 表現量下降讓 T 細胞可以脫離淋巴結而準備進入患處。

登革病毒二次感染後, 在病灶淋巴結內的 T 細胞會表現皮膚趨化分子

為了研究浸潤於皮膚組織的 T 細胞是否有病灶周邊淋巴結的趨勢, 我取下感染後老鼠的腋窩淋巴結, 並利用細胞螢光染色方式檢視 CD4 和 CD8 T 細胞表面上皮膚趨化分子 CLA 和 CCR4 的表現量。實驗結果顯示老鼠經過 DENV-1→DENV-2 或 DENV-2→DENV-2 二次感染後病灶淋巴結內 T 細胞的 CLA 的表現量會在第 1.5 天時上升到最高量, CD4⁺T 細胞: PBS ($4.06 \pm 0.62\%$), DENV1→DENV2 ($8.28 \pm 2.91\%$); DENV2→DENV2 ($6.8 \pm 2.26\%$); CD8⁺T 細胞: PBS ($3.12 \pm 0.73\%$), DENV1→DENV2 ($6.7 \pm 1.88\%$); DENV2→DENV2 ($7.2 \pm 1.22\%$) (Fig.5A)。而代表皮膚趨化受器 (chemokine receptor) 的 CCR4 也和 CLA 有類似的趨勢, CD4⁺T 細胞: PBS ($2.15 \pm 1.26\%$), DENV1→DENV2 ($14.6 \pm 4.24\%$), DENV2→DENV2 ($15.63 \pm 4.96\%$); CD8⁺T 細胞: PBS ($2.65 \pm 1\%$), DENV1→DENV2 ($10.25 \pm 2\%$), DENV2→DENV2 ($13.05 \pm 3.7\%$) (Fig.5B), 由此顯示老鼠淋巴結內的 T 細胞在感染後除了活化外, 也表現皮膚趨化分子準備前往皮膚組織。

這些結果顯示老鼠接受登革二次感染後, 會活化患處周邊淋巴結的 T 細胞, 並使 T 細胞表現皮膚趨化分子 CLA 和 CCR4, 並使它們有能力移動到被感染的皮膚位置。

登革感染後病灶淋巴結內的 T 細胞具有產生細胞激素 (TNF- α 及 IFN- γ) 的能力

Fig. 2 的實驗結果顯示老鼠感染後，出血皮膚組織有高量的 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IFN-}\gamma$ 。並在組織中浸潤的 T 細胞可能是來自周邊淋巴結 (Fig. 5)。接下來我想要了解這些活化並且正準備進入患處的 T 細胞是否表現 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IFN-}\gamma$ 。我取出感染老鼠的腋窩淋巴結的淋巴細胞，以 plate-bound anti-CD3 antibody 分別刺激 10^6 淋巴細胞 6 小時和 24 小時。再以胞內染色法染細胞激素 (intracellular cytokine staining, ICS)，分析 CD4^+ 和 CD8^+ T 細胞會表現 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IFN-}\gamma$ 的百分比。實驗結果顯示，一次感染登革病毒後老鼠體內產生 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IFN-}\gamma$ 的 T 細胞比例高於控制組，但其中具有統計上的顯著差異的只有感染登革第二型和感染登革第一型的 $\text{IFN-}\gamma^+ \text{CD8}^+$ T 細胞， $\text{IFN-}\gamma^+ \text{CD8}^+$ T 細胞：PBS $\rightarrow$ PBS ($0.17 \pm 0.07\%$)，PBS $\rightarrow$ DENV1 ($2.75 \pm 2.46\%$)，PBS $\rightarrow$ DENV1 ($5.79 \pm 5.23\%$)。而老鼠接受二次感染後無論是 DENV-2 $\rightarrow$ DENV-1，DENV-1 $\rightarrow$ DENV-2 或 DENV-2 $\rightarrow$ DENV-2 組別， $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IFN-}\gamma$ 的 T 細胞比例都顯著高於未感染病毒的對照組， $\text{TNF-}\alpha^+ \text{CD8}^+$ T 細胞：PBS $\rightarrow$ PBS ($0.25 \pm 0.08\%$)，DENV-2 $\rightarrow$ DENV-1 ($1.17 \pm 0.41\%$)，DENV-1 $\rightarrow$ DENV-2 ($1.12 \pm 0.56\%$)，DENV-2 $\rightarrow$ DENV-2 ($0.73 \pm 0.41\%$)； $\text{TNF-}\alpha^+ \text{CD4}^+$ T 細胞：PBS $\rightarrow$ PBS ($0.83 \pm 0.12\%$)，DENV-2 $\rightarrow$ DENV-1 ($1.87 \pm 0.9\%$)，DENV-1 $\rightarrow$ DENV-2 ($2.08 \pm 0.9\%$)，DENV-2 $\rightarrow$ DENV-2 ($1.95 \pm 0.86\%$)； $\text{IFN-}\gamma^+ \text{CD8}^+$ T 細胞：PBS $\rightarrow$ PBS ($0.17 \pm 0.07\%$)，DENV-2 $\rightarrow$ DENV-1 ($4.71 \pm 2.13\%$)，DENV-1 $\rightarrow$ DENV-2 ($4.83 \pm 1.57\%$)，DENV-2 $\rightarrow$ DENV-2 ($4 \pm 0.88\%$)； $\text{IFN-}\gamma^+ \text{CD4}^+$ T 細胞：PBS $\rightarrow$ PBS ($0.2 \pm 0.07\%$)，DENV-2 $\rightarrow$ DENV-1 ($0.6 \pm 0.22\%$)，DENV-1 $\rightarrow$ DENV-2 ($0.71 \pm 0.22\%$)，DENV-2 $\rightarrow$ DENV-2 ($0.64 \pm 0.81\%$)。另外，比較一次感染和二次感染組別也發現到二次感染老鼠 T 細胞除了 $\text{IFN-}\gamma^+ \text{CD8}^+$ T 細胞外，其他組別都顯著高於一次感染的 T 細胞， $\text{TNF-}\alpha^+ \text{CD8}^+$ T 細胞：PBS $\rightarrow$ DENV1 ($0.45 \pm 0.21\%$)，DENV-2 $\rightarrow$ DENV-1 ($1.17 \pm 0.41\%$)；PBS $\rightarrow$ DENV2 ($0.57 \pm 0.16\%$)，DENV-2 $\rightarrow$ DENV-2 ($0.73 \pm 0.41\%$)； $\text{TNF-}\alpha^+ \text{CD4}^+$ T 細胞：PBS $\rightarrow$ DENV1 ($1 \pm 0.38\%$)，DENV-2 $\rightarrow$ DENV-1 ($1.87 \pm 0.9\%$)；PBS $\rightarrow$ DENV2 ($1.25 \pm 0.59\%$)，DENV-1 $\rightarrow$ DENV-2 ($2.08 \pm 0.9\%$)； $\text{IFN-}\gamma^+ \text{CD8}^+$ T 細

胞：PBS→DENV1 ($2.75 \pm 2.46\%$)，DENV-2→ DENV-1 ($4.71 \pm 2.13\%$)；PBS→DENV2 ($5.79 \pm 5.23\%$)，DENV-1→ DENV-2 ($4.83 \pm 1.57\%$)；IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 細胞：PBS→DENV1 ($0.26 \pm 0.09\%$)，DENV-2→ DENV-1 ($0.6 \pm 0.22\%$)；PBS→DENV2 ($0.42 \pm 0.17\%$)，DENV-1→ DENV-2 ($0.71 \pm 0.22\%$)。顯示二次感染的老鼠病灶淋巴結內 T 細胞比一次感染的組別有較高的比例產生 TNF- α 和 IFN- γ (Fig. 6A & 6B)。然而，DENV-1→ DENV-2 和 DENV-2→ DENV-2 組別間沒有差異，也表示 TNF- α 和 IFN- γ 的 T 細胞的活化雖然與出血相關，但非充分條件。另外必須提醒的是，由於淋巴細胞取於感染後第一天，尚不知出血比例，故所取的淋巴細胞可能包括出血及不出血的小鼠。



第四章



第四章 討論

登革二次感染引起嚴重出血

登革病毒感染後，病人的症狀為：發燒、頭痛、疲倦、嘔吐，嚴重時會導致登革出血熱和登革休克症(DHF/DSS)甚至造成死亡。目前科學家對於登革出血熱和登革休克症的引發機制還不甚了解。早期利用臨床病例發現有 90%以上的 DHF 病人是被登革病毒二次感染 (Sangkawibha et al., 1984; Thein et al., 1997; Vaughn et al., 2000)。這些結果顯示接受登革病毒二次感染與登革出血熱有很大的關聯。先前本實驗室利用皮下注射登革第二型病毒的方式感染 C57BL/6 老鼠，在感染後第三天發現老鼠有 33%的出血率 (Chen et al., 2007; Yen et al., 2008)。本次實驗中，我利用相同的感染方式來研究老鼠二次感染後的出血症狀，發現老鼠在第二次感染登革病毒前，若已受過不同型病毒感染，出血率會從一次感染的 39%提高到 75% (Fig. 1)。這個結果與人類登革出血熱病人大多為二次感染病例相似。也暗示著目前科學家們認為前次感染不同型病毒所引發的免疫反應對於宿主的第二次感染不但沒有減輕作用，反而造成更大傷害。

在 Fig. 1 的實驗結果中，我們也發現了一次感染登革第二型病毒 strain 16681 所引發的出血率(39%)高於第一型病毒 Hawaii strain (21%)。臨床研究中亦已顯示登革第二型病毒會引起較嚴重的 DHF (Sangkawibha et al., 1984)。另外，我們使用的第二型登革 strain 16681，是從泰國 DHF 病人身上分離而得，這些可能是實驗中第二型病毒 16681 引起較高出血率的因素之一。為了要排除第二型病毒 16681 引起較高出血率的疑問，之後的實驗可使用另一品系的登革第二型病毒 strain PL046 來重複二次感染之出血實驗。若 strain PL046 做二次感染結果與 strain 16681 趨勢類似，則能表示二次感染組別 DENV1→DENV2 出血嚴重的現象並非僅靠 strain 16681 病毒毒力來引起。

感染後老鼠產生 TNF- α 和 INF- γ 與出血的相關性

對於引發登革出血的機制科學界提出了三種可能的機制: (1)免疫細胞在發炎反應進行時所產生的細胞激素對血管通透性的影響; (2)第一次感染後產生中和能力不足的抗體, 在第二次感染時, 幫助病毒對單核球的感染與複製; (3)交叉反應的 T 細胞對組織的破壞。

早在 1999 年就有科學家觀察在病人血液中 TNF- α 的濃度高低與出血嚴重度有正相關性 (Green et al., 1999b)。本實驗室先前在動物實驗中, 老鼠巨噬細胞所表現的 TNF- α 會與登革病毒共同促使表皮細胞進行細胞凋亡, 並引發出血 (Chen et al., 2007; Yen et al., 2008)。在 *in vitro* 實驗中證實了 INF- γ 會促進單核細胞 Fc γ 受體的表現, 藉此加速了病毒感染或活化 T 細胞的毒殺能力 (Juffrie et al., 2001)。在本實驗中, 我觀察到二次感染後, 老鼠患處產生比一次感染更多的 TNF- α 與 INF- γ 。顯示除了 TNF- α , 還有 INF- γ 的表現濃度與出血嚴重度有相關性。目前實驗室已經觀察過 TNF- α 缺失的老鼠出血率比起野生型老鼠出血率較低, 若以同樣的方式觀察 INF- γ 缺失的老鼠感染後出血率的變化, 能幫助了解 INF- γ 在出血機制中是否有角色。另外, 雖然在我的實驗中了解到 TNF- α 與 INF- γ 與出血有相關性, 但對於這兩個細胞激素在老鼠出血機制所誘導出的下游反應還不甚清楚, 這些可能是接下來所必須深入研究的。

二次感染後 T 細胞活化與出血患處的關聯

在實驗中, 我也發現老鼠在二次感染後, 病灶淋巴結內 T 細胞活化增生速度比一次感染比例更高(Fig. 3), 除了增生能力上升之外, 二次感染老鼠的淋巴結 T 細胞也持續表現高量 CD69。CD69 為淋巴細胞早期活化的標誌, 早期就有登革熱的研究證明淋巴細胞上 CD69 的表現量與疾病嚴重程度有關 (Green et al., 1999a)。另外, 我們在感染後 1.5 天也觀察到 T 細胞表現高量 CD44^{hi} 和降低 CD62L^{low} 分子的表現, 表示了感染後 T 細胞被活化。另外, 在感染後第 1.5 天我

們也同時觀察到 T 細胞表現 CLA 和 CCR4。T 細胞上的 CLA 分子會與表皮細胞上 E-selectin 分子結合，藉此吸引 T 細胞進入皮膚組織 (Rossiter et al., 1994)。感染後老鼠 T 細胞表現 CLA 顯示除了準備離開淋巴結外，更準備前往皮膚組織。近期的研究中，CCR8 也被當成是皮膚組織趨化因子，目前被認為與 TH2 細胞的趨化有關 (Islam et al., 2011)。在接下來的實驗也可以觀察出血組織內是否有表現 CCR8 的 T 細胞浸潤其中。

活化 T 細胞表現 CLA 在疾病上的研究

目前為止尚未有科學文獻探討登革病毒感染後宿主淋巴結內 T 細胞上 CLA 分子的表現。CLA (Cutaneous lymphocyte-associated antigen) 為 T 細胞上的表面分子，當 T 細胞表現此分子時，CLA 會與表皮細胞上 E-selectin 分子結合，使 T 細胞可以滯留皮膚組織上。在我的實驗結果中，發現二次感染後第 1.5 天 T 細胞開始表現 CLA，第 2 天以後則又減為初始量，暗示著 T 細胞一旦活化後，即刻進入患處。目前有許多皮膚相關的疾病觀察到 CLA 在患處 T 細胞上表現，如疱疹病毒 (HSV)、牛皮癬 (psoriasis) 或 T 細胞引起的過敏症 (Abernathy-Carver et al., 1995; Koelle et al., 2002; Pitzalis et al., 1996)。科學家認為除了持續表現 CLA 而常駐在皮膚上的 T 細胞，宿主體內的記憶 T 細胞在經由活化後也會被誘導產生 CLA。這些因表現 CLA 而被吸引至皮膚組織的 T 細胞，可能就是導致這些疾病發生的主要原因 (Fuhlbrigge et al., 1997; Koelle et al., 2002)。雖然在實驗中我觀察到出血組織 T 細胞的浸潤，另外在實驗室過去的實驗結果也同時觀察到表現 TNF- α 的 T 細胞出現在出血組織中，然而，在我的實驗當中表現 CLA 的 T 細胞是否為致病性的 T 細胞，可能還需要做進一步的研究才能區分。

結論

我首先利用實驗室的登革老鼠模式研究老鼠在二次感染後出血的情況，發現不同

型登革病毒二次感染的出血率大於一次感染，另外若是兩次感染同一型的登革病毒，則出血率會較二次感染不同型病毒的低(Fig. 1)。在出血率高的二次感染組別，我們發現皮膚的 TNF- α 及 IFN- γ 表現都相較於一次感染高，暗示著二次感染出現較高出血率可能跟患處產生高量的 TNF- α 和 IFN- γ 相關。然而，我們同時看到二次感染同型病毒的組別雖然出血率相對較低，但該組老鼠皮膚出血組織中也有相當高的 TNF- α 和 IFN- γ 表現，說明了無論是二次感染同型或不同型感染，造成組織出血的原因可能與細胞激素有明顯相關(Fig.2)。在老鼠感染後，我們發現周邊淋巴結腫脹並且造成 T 細胞快速活化並具有產生 TNF- α 和 IFN- γ 的能力(Fig. 6)。而這些活化的 T 細胞，我發現它們會表現 CLA 和 CCR4 分子。這現象除了在出血嚴重的感染二次不同型病毒的組別出現，二次感染同型病毒的組別也有同樣的現象。

目前科學家主要是利用感染登革病毒之病人檢體來研究登革熱出血的機制。然而，以人類為研究材料會受到許多實驗上的限制。另外，人與人之間的差異也會影響疾病發病的過程。本研究利用純品系老鼠作為登革病毒感染模式，研究登革病毒二次感染後宿主的 T 細胞免疫反應對出血的影響。實驗結果顯示，老鼠在二次交叉感染後，出現較一次感染出血比例增加的現象。因此，我利用此動物模式來研究宿主出血的免疫機制。我在這個實驗中發現了二次感染後 T 細胞活化與出血有相關性，並觀察到登革病毒感染後引起 T 細胞上活化分子 CD69⁺、CD44^{hi}、CD62L^{low}、與皮膚趨化因子 CLA、CCR4、和細胞激素 TNF- α 與 IFN- γ 的表現。其中 T 細胞活化分子 CD44、CD62L 及皮膚趨化因子 CLA、CCR4 為目前為止在登革疾病的臨床研究上尚未被探討。雖然目前尚未有證據指出表現 CD44^{hi}、CD62L^{low} 或 CLA 的 T 細胞為致病性的 T 細胞，但往後若有更深入的研究，有朝一日科學家或許可以藉由觀察這些分子的表現，當作病人感染後是否會引起出血的觀察點。

參考文獻

參考文獻

- Abernathy-Carver, K.J., H.A. Sampson, L.J. Picker, and D.Y. Leung. 1995. Milk-induced eczema is associated with the expansion of T cells expressing cutaneous lymphocyte antigen. *The Journal of clinical investigation* 95:913-918.
- An, J., J. Kimura-Kuroda, Y. Hirabayashi, and K. Yasui. 1999. Development of a novel mouse model for dengue virus infection. *Virology* 263:70-77.
- Biselli, R., P.M. Matricardi, R. D'Amelio, and A. Fattorossi. 1992. Multiparametric flow cytometric analysis of the kinetics of surface molecule expression after polyclonal activation of human peripheral blood T lymphocytes. *Scandinavian journal of immunology* 35:439-447.
- Bukowski, J.F., I. Kurane, C.J. Lai, M. Bray, B. Falgout, and F.A. Ennis. 1989. Dengue virus-specific cross-reactive CD8⁺ human cytotoxic T lymphocytes. *Journal of virology* 63:5086-5091.
- Chen, H.C., F.M. Hofman, J.T. Kung, Y.D. Lin, and B.A. Wu-Hsieh. 2007. Both virus and tumor necrosis factor alpha are critical for endothelium damage in a mouse model of dengue virus-induced hemorrhage. *Journal of virology* 81:5518-5526.
- Fuhlbrigge, R.C., J.D. Kieffer, D. Armerding, and T.S. Kupper. 1997. Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin-homing T cells. *Nature* 389:978-981.
- Grailer, J.J., M. Kodera, and D.A. Steeber. 2009. L-selectin: role in regulating homeostasis and cutaneous inflammation. *Journal of dermatological science* 56:141-147.
- Green, S., S. Pichyangkul, D.W. Vaughn, S. Kalayanarooj, S. Nimmannitya, A. Nisalak, I. Kurane, A.L. Rothman, and F.A. Ennis. 1999a. Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. *The Journal of infectious diseases* 180:1429-1435.
- Green, S., D.W. Vaughn, S. Kalayanarooj, S. Nimmannitya, S. Suntayakorn, A. Nisalak, R. Lew, B.L. Innis, I. Kurane, A.L. Rothman, and F.A. Ennis. 1999b. Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. *The Journal of infectious diseases* 179:755-762.
- Guzman, M.G., and G. Kouri. 2002. Dengue: an update. *The Lancet infectious diseases* 2:33-42.
- Halstead, S.B. 1979. In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. *The Journal of infectious diseases*

140:527-533.

- Halstead, S.B., and E.J. O'Rourke. 1977. Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes. *Nature* 265:739-741.
- Hawkes, R.A., and K.J. Lafferty. 1967. The enhancement of virus infectivity by antibody. *Virology* 33:250-261.
- Haynes, B.F., M.J. Telen, L.P. Hale, and S.M. Denning. 1989. CD44--a molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunology today* 10:423-428.
- Henchal, E.A., and J.R. Putnak. 1990. The dengue viruses. *Clinical microbiology reviews* 3:376-396.
- Islam, S.A., D.S. Chang, R.A. Colvin, M.H. Byrne, M.L. McCully, B. Moser, S.A. Lira, I.F. Charo, and A.D. Luster. 2011. Mouse CCL8, a CCR8 agonist, promotes atopic dermatitis by recruiting IL-5+ T(H)2 cells. *Nature immunology* 12:167-177.
- Johnson, A.J., and J.T. Roehrig. 1999. New mouse model for dengue virus vaccine testing. *Journal of virology* 73:783-786.
- Johnson, P., A. Maiti, K.L. Brown, and R. Li. 2000. A role for the cell adhesion molecule CD44 and sulfation in leukocyte-endothelial cell adhesion during an inflammatory response? *Biochemical pharmacology* 59:455-465.
- Juffrie, M., G.M. Meer, C.E. Hack, K. Haasnoot, Sutaryo, A.J. Veerman, and L.G. Thijs. 2001. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-6 and its relation to C-reactive protein and secretory phospholipase A2. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 65:70-75.
- Katschke, K.J., Jr., J.B. Rottman, J.H. Ruth, S. Qin, L. Wu, G. LaRosa, P. Ponath, C.C. Park, R.M. Pope, and A.E. Koch. 2001. Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood, synovial fluid, and synovial tissue monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 44:1022-1032.
- Koelle, D.M., Z. Liu, C.M. McClurkan, M.S. Topp, S.R. Riddell, E.G. Pamer, A.S. Johnson, A. Wald, and L. Corey. 2002. Expression of cutaneous lymphocyte-associated antigen by CD8(+) T cells specific for a skin-tropic virus. *The Journal of clinical investigation* 110:537-548.
- Kontny, U., I. Kurane, and F.A. Ennis. 1988. Gamma interferon augments Fc gamma receptor-mediated dengue virus infection of human monocytic cells. *Journal of virology* 62:3928-3933.
- Kurane, I., B.L. Innis, S. Nimmannitya, A. Nisalak, A. Meager, and F.A. Ennis. 1993. High levels of interferon alpha in the sera of children with dengue virus infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 48:222-229.

- Kurane, I., B.L. Innis, S. Nimmannitya, A. Nisalak, A. Meager, J. Janus, and F.A. Ennis. 1991. Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon-gamma in sera of children with dengue. *The Journal of clinical investigation* 88:1473-1480.
- Kurane, I., B.L. Innis, A. Nisalak, C. Hoke, S. Nimmannitya, A. Meager, and F.A. Ennis. 1989. Human T cell responses to dengue virus antigens. Proliferative responses and interferon gamma production. *The Journal of clinical investigation* 83:506-513.
- Mairuhu, A.T., J. Wagenaar, D.P. Brandjes, and E.C. van Gorp. 2004. Dengue: an arthropod-borne disease of global importance. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 23:425-433.
- Mongkolsapaya, J., W. Dejnirattisai, X.N. Xu, S. Vasanawathana, N. Tangthawornchaikul, A. Chairunsri, S. Sawasdivorn, T. Duangchinda, T. Dong, S. Rowland-Jones, P.T. Yenchitsomanus, A. McMichael, P. Malasit, and G. Screaton. 2003. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nature medicine* 9:921-927.
- Morimoto, Y., Y. Bian, P. Gao, Y. Yashiro-Ohtani, X.Y. Zhou, S. Ono, H. Nakahara, M. Kogo, T. Hamaoka, and H. Fujiwara. 2005. Induction of surface CCR4 and its functionality in mouse Th2 cells is regulated differently during Th2 development. *Journal of leukocyte biology* 78:753-761.
- Nimmannitya, S., S.B. Halstead, S.N. Cohen, and M.R. Margiotta. 1969. Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. I. Observations on hospitalized patients with hemorrhagic fever. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 18:954-971.
- Pitzalis, C., A. Cauli, N. Pipitone, C. Smith, J. Barker, A. Marchesoni, G. Yanni, and G.S. Panayi. 1996. Cutaneous lymphocyte antigen-positive T lymphocytes preferentially migrate to the skin but not to the joint in psoriatic arthritis. *Arthritis and rheumatism* 39:137-145.
- Rigau-Perez, J.G., G.G. Clark, D.J. Gubler, P. Reiter, R.J. Sanders, and A.V. Vorndam. 1998. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 352:971-977.
- Rook, A.H., and P. Heald. 1995. The immunopathogenesis of cutaneous T-cell lymphoma. *Hematology/oncology clinics of North America* 9:997-1010.
- Rossiter, H., F. van Reijssen, G.C. Mudde, F. Kalthoff, C.A. Bruijnzeel-Koomen, L.J. Picker, and T.S. Kupper. 1994. Skin disease-related T cells bind to endothelial selectins: expression of cutaneous lymphocyte antigen (CLA) predicts E-selectin but not P-selectin binding. *European journal of immunology*

24:205-210.

- Sabin, A.B. 1952. Research on dengue during World War II. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 1:30-50.
- Sangkawibha, N., S. Rojanasuphot, S. Ahandrik, S. Viriyapongse, S. Jatanasen, V. Salitul, B. Phanthumachinda, and S.B. Halstead. 1984. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *American journal of epidemiology* 120:653-669.
- Smalley, D.M., and K. Ley. 2005. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *Journal of cellular and molecular medicine* 9:255-266.
- Srikiatkachorn, A., A. Krautrachue, W. Ratanaprakarn, L. Wongtapradit, N. Nithipanya, S. Kalayanaroj, A. Nisalak, S.J. Thomas, R.V. Gibbons, M.P. Mammen, Jr., D.H. Libraty, F.A. Ennis, A.L. Rothman, and S. Green. 2007. Natural history of plasma leakage in dengue hemorrhagic fever: a serial ultrasonographic study. *The Pediatric infectious disease journal* 26:283-290; discussion 291-282.
- Thein, S., M.M. Aung, T.N. Shwe, M. Aye, A. Zaw, K. Aye, K.M. Aye, and J. Aaskov. 1997. Risk factors in dengue shock syndrome. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 56:566-572.
- Vaughn, D.W., S. Green, S. Kalayanaroj, B.L. Innis, S. Nimmannitya, S. Suntayakorn, T.P. Endy, B. Raengsakulrach, A.L. Rothman, F.A. Ennis, and A. Nisalak. 2000. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *The Journal of infectious diseases* 181:2-9.
- Wu, S.J., C.G. Hayes, D.R. Dubois, M.G. Windheuser, Y.H. Kang, D.M. Watts, and D.G. Sieckmann. 1995. Evaluation of the severe combined immunodeficient (SCID) mouse as an animal model for dengue viral infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 52:468-476.
- Yen, Y.T., H.C. Chen, Y.D. Lin, C.C. Shieh, and B.A. Wu-Hsieh. 2008. Enhancement by tumor necrosis factor alpha of dengue virus-induced endothelial cell production of reactive nitrogen and oxygen species is key to hemorrhage development. *Journal of virology* 82:12312-12324.
- Ziegler, S.F., F. Ramsdell, and M.R. Alderson. 1994. The activation antigen CD69. *Stem Cells* 12:456-465.
- Zivny, J., I. Kurane, A.M. Leporati, M. Ibe, M. Takiguchi, L.L. Zeng, M.A. Brinton, and F.A. Ennis. 1995. A single nine-amino acid peptide induces virus-specific, CD8+ human cytotoxic T lymphocyte clones of heterogeneous serotype specificities. *The Journal of experimental medicine* 182:853-863.

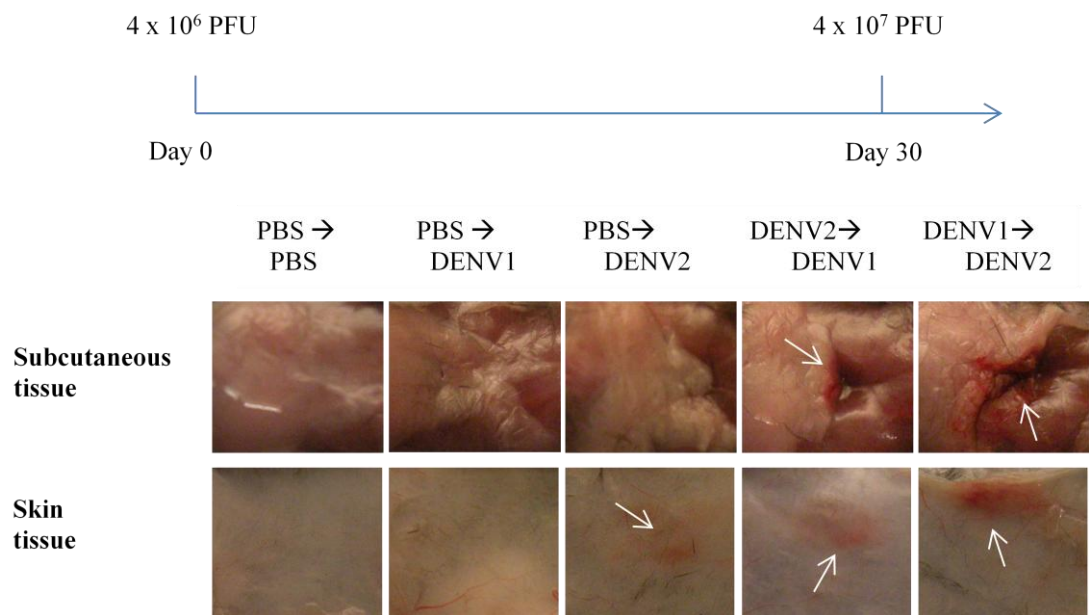
圖表與說明



Figure 1. Sequential infections of heterotypic DENV induce hemorrhage in immunocompetent mice. (A) C57BL/6 mice were inoculated intradermally with PBS or 4×10^6 PFU of DENV at day 0 followed by inoculation of PBS or 4×10^7 PFU of DENV at day 30 at four different sites in the back. Hemorrhage was observed in skin and subcutaneous tissues in mice at day 3 after second inoculation. (B) The percentage of mice develop hemorrhage at day 3 after second inoculation. The denominator indicates the total number of mice included in the group and the numerator the number of mice that developed hemorrhage. Data are from 10 independent experiments with 2~3 mice per experiment.



A



B

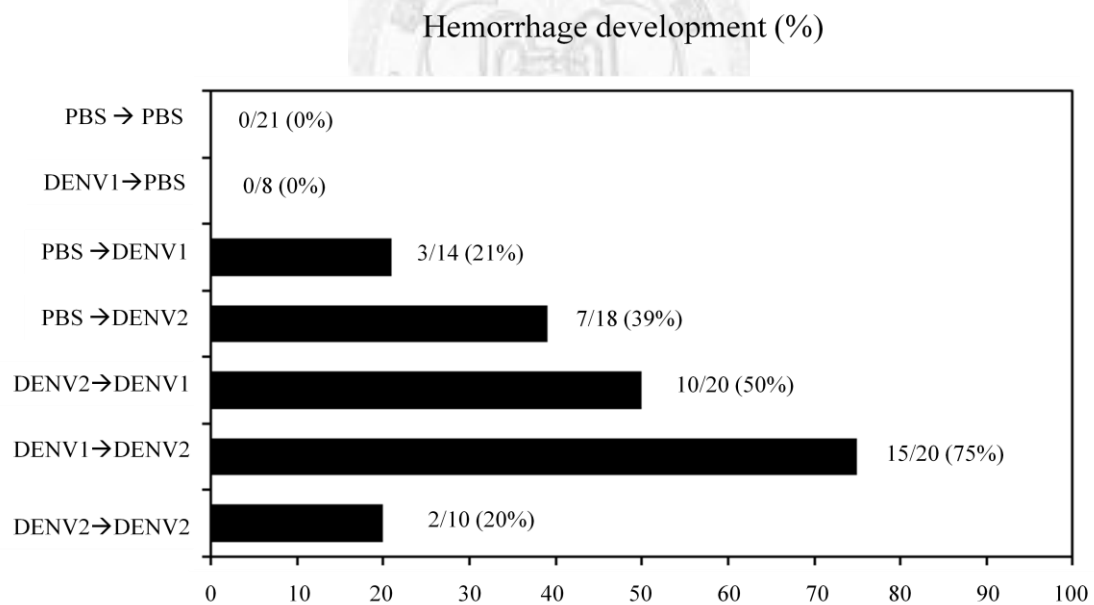
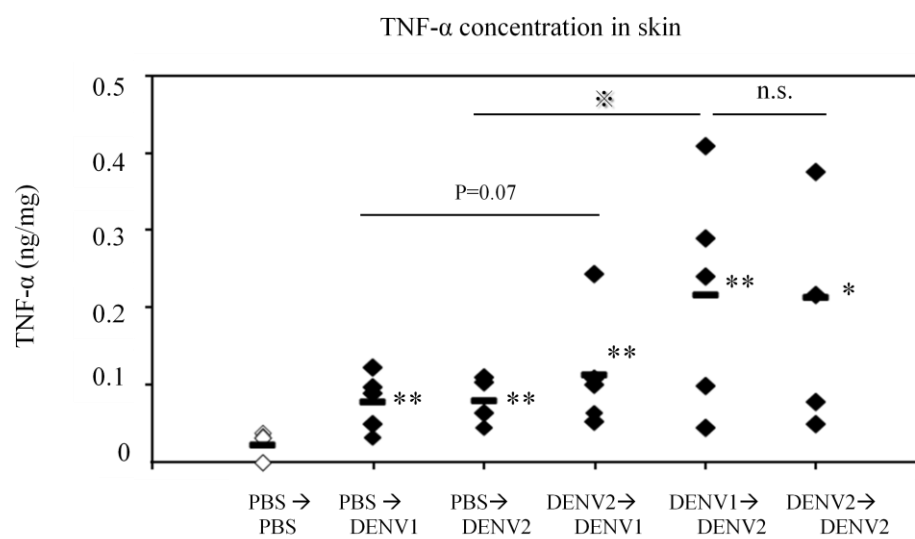


Figure 2. IFN- γ and TNF- α levels in hemorrhage skin.

C57BL/6 mice were inoculated intradermally with PBS or 4×10^6 PFU of DENV at day 0 followed by inoculation of PBS or 4×10^7 PFU of DENV at day 30 at four different sites in the back. Skin was harvested from mice at the hemorrhage site or in the center of the four inoculation sites (PBS) at day 3 after second inoculation. The levels of cytokines were quantified by ELISA. (A) TNF- α levels in hemorrhage skin (ng/mg of skin). (B) IFN- γ levels in hemorrhage skin (ng/mg of skin). Data presented are the mean $\pm$ S.D. values obtained from 4~5 mice. Data from 3 independent experiments are presented. (* $P < 0.05$; ※ $P < 0.05$)



A



B

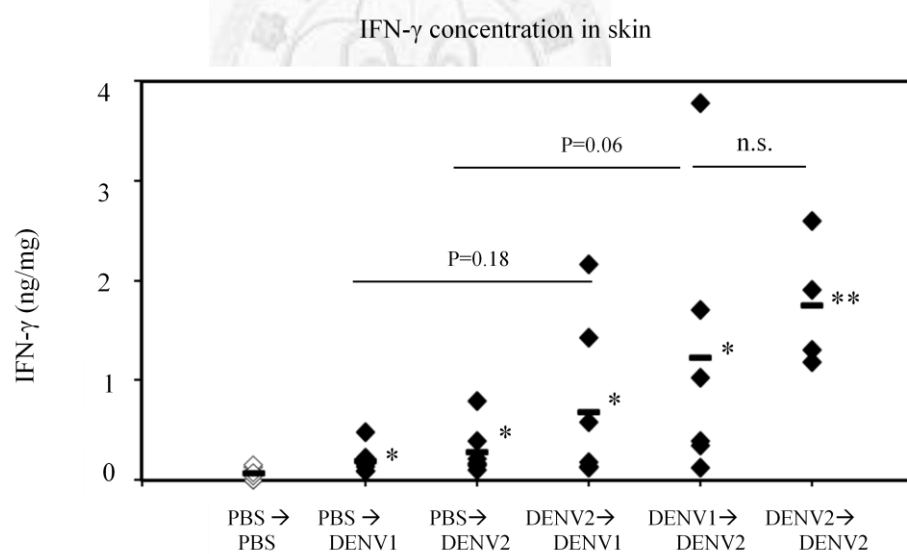
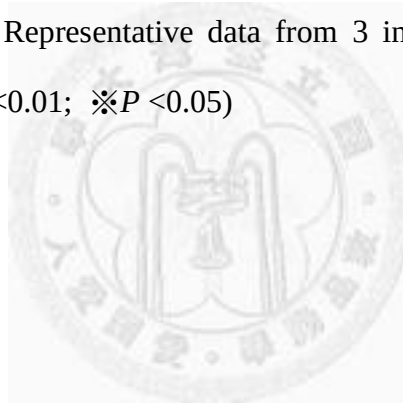
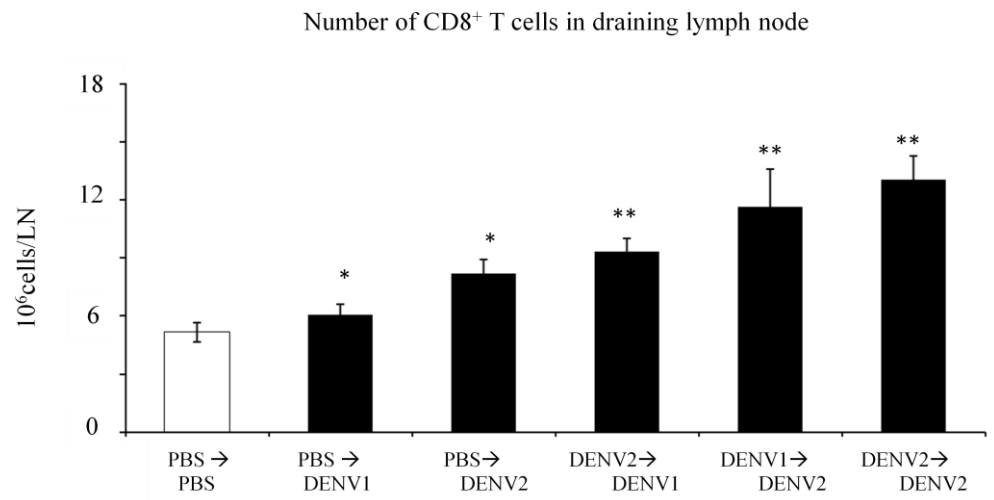


Figure 3. The number of T cells increases in the draining lymph nodes at 1 day after DENV infection. (A) The percentages of CD8 T cells in the brachial lymph nodes were analyzed by flow cytometry at 1 day after second inoculation. Lymph node cells were stained with APC-conjugated anti-CD8 antibody. The number of CD8⁺ cells were counted by multiplying the total number of lymph node cells by the percentage of CD8⁺ T cells. (B) The percentages of CD4 T cells in the brachial lymph nodes were analyzed by flow cytometry at 1 day after second inoculation. Lymph node cells were stained with PE-Cy5-conjugated anti-CD4 antibody. The numbers of CD4⁺ cells were counted by multiplying the total number of lymph node cells by the percentage of CD4⁺ T cells. Data presented are the mean $\pm$ S.D. values obtained from 4~5 mice. Representative data from 3 independent experiments are presented. (* P <0.05, ** P <0.01; ※ P <0.05)



A



B

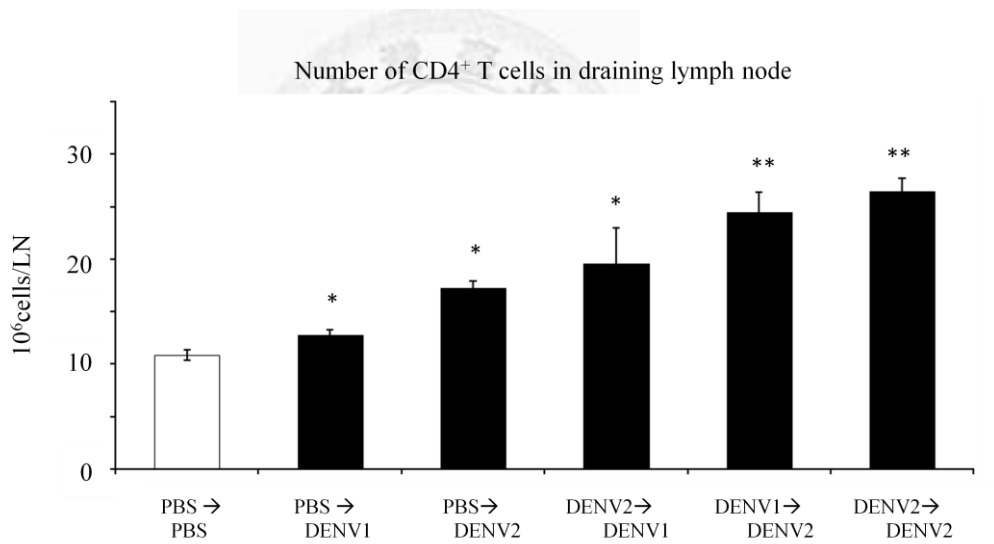
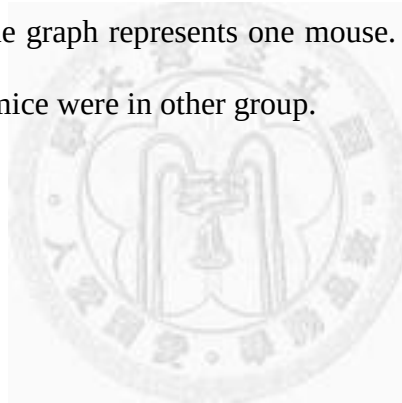
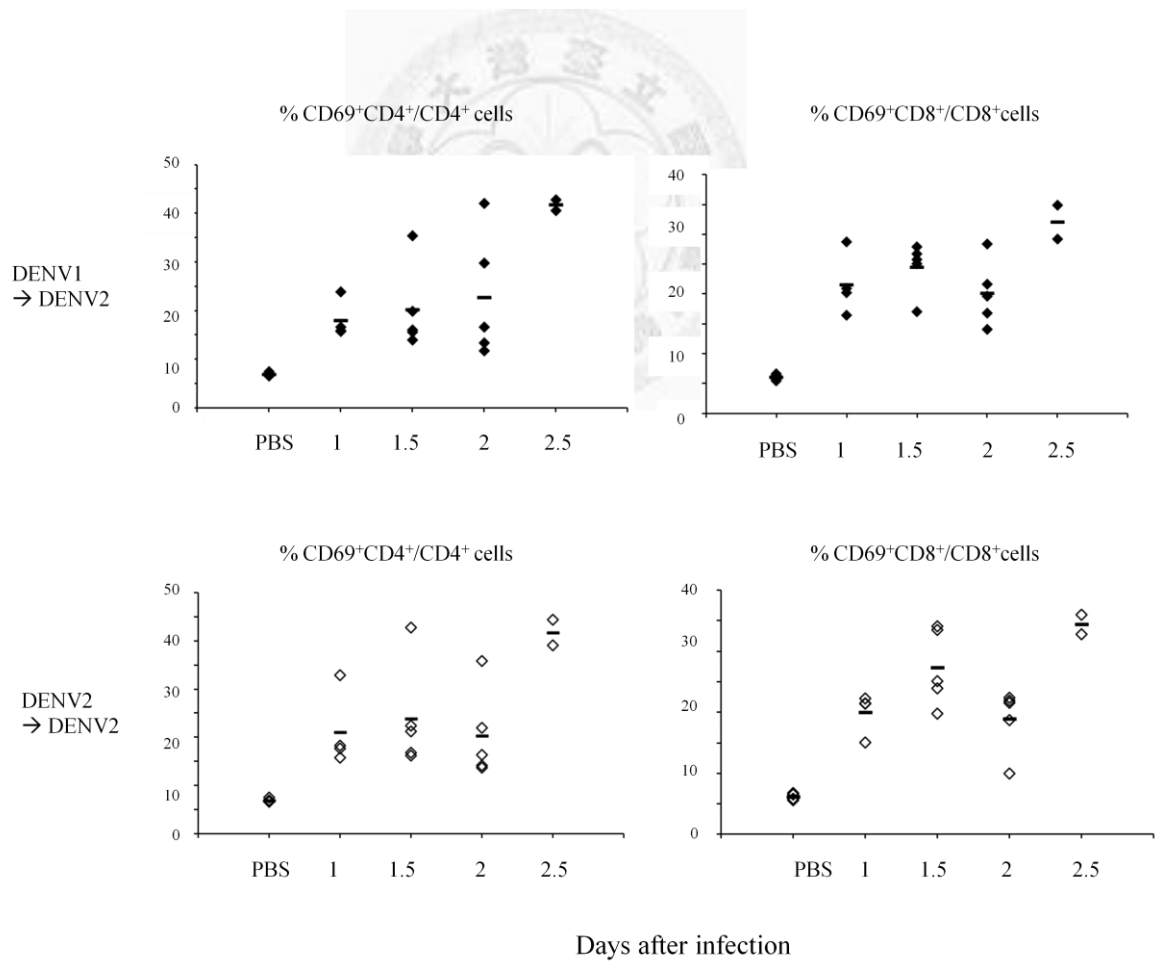
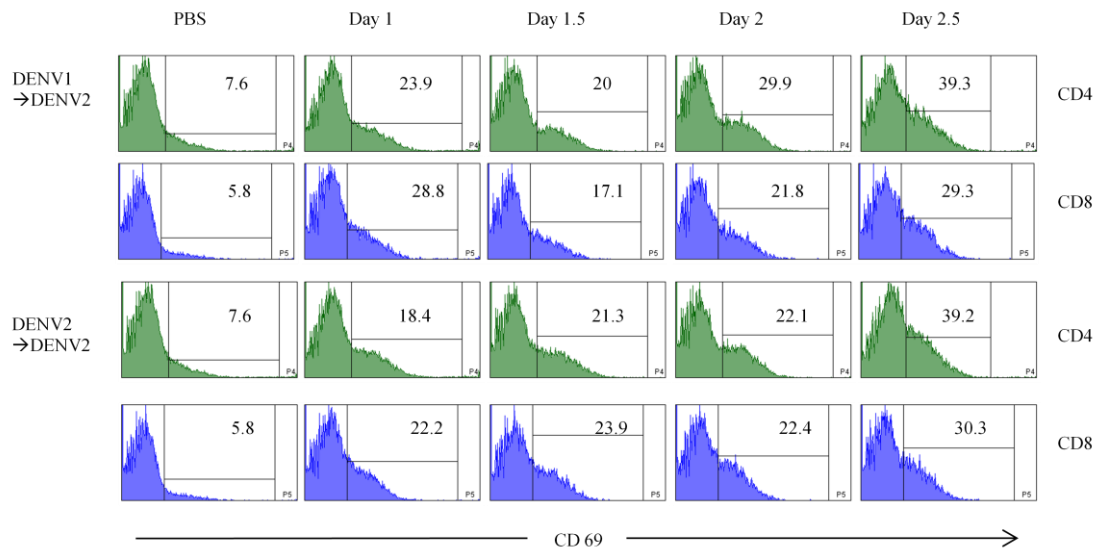
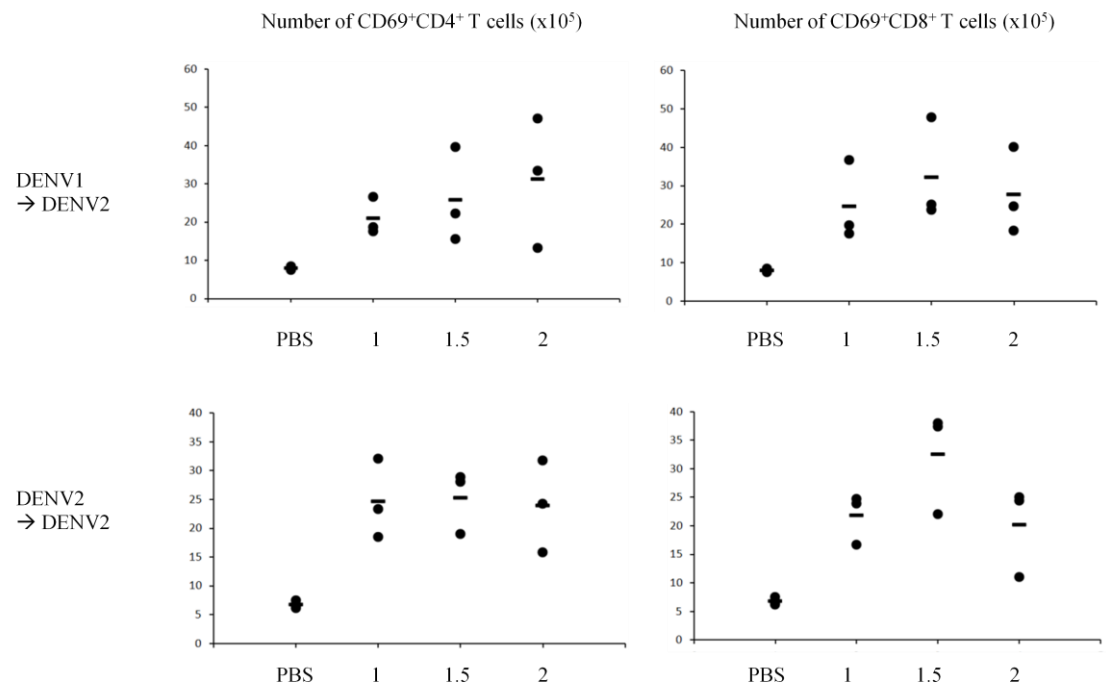


Figure 4. Intradermal DENV infection induces draining lymph node T cell to express activation molecule. Brachial lymph node cells were collected from mice at days 1, 1.5, 2, 2.5 after secondary infection. Cells were stained with PE-Cy5-conjugated anti-CD4 antibody, APC-conjugated anti-CD8 antibody, and FITC-conjugated anti-CD69 antibody (A), FITC-conjugated anti-CD44 antibody (B), or FITC-conjugated anti-CD62L antibody (C). CD4⁺ and CD8⁺ T cells were analyzed for the expression of CD69⁺, CD44^{hi} and CD62L^{Low}. Histograms show the fluorescence intensity of each surface marker on CD4⁺ or CD8⁺ T cells. The number at the upper right corner indicates the percentage of CD4⁺ or CD8⁺ cells expressing each surface marker. The histograms shown are data representative of independent experiment. Each dot in the graph represents one mouse. Two mice were included in the group of day 2.5, 3~5 mice were in other group.

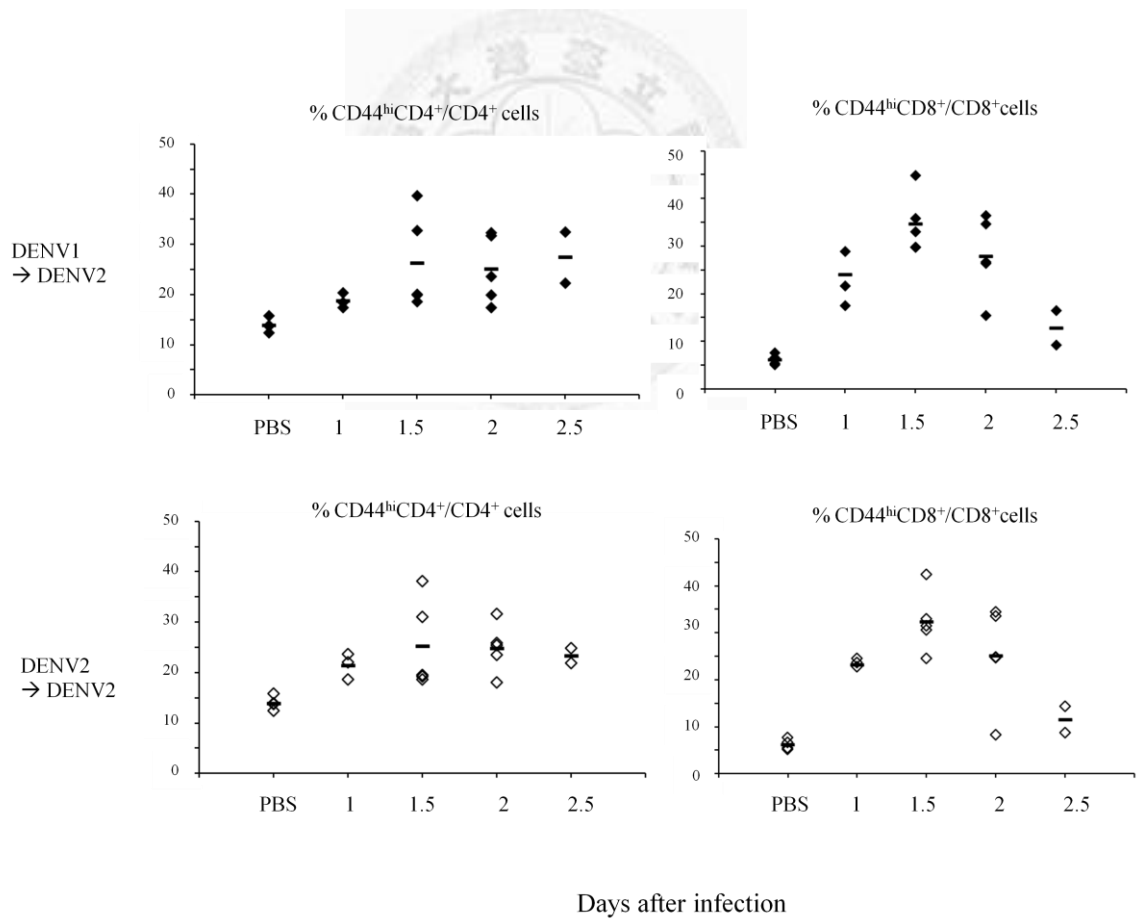
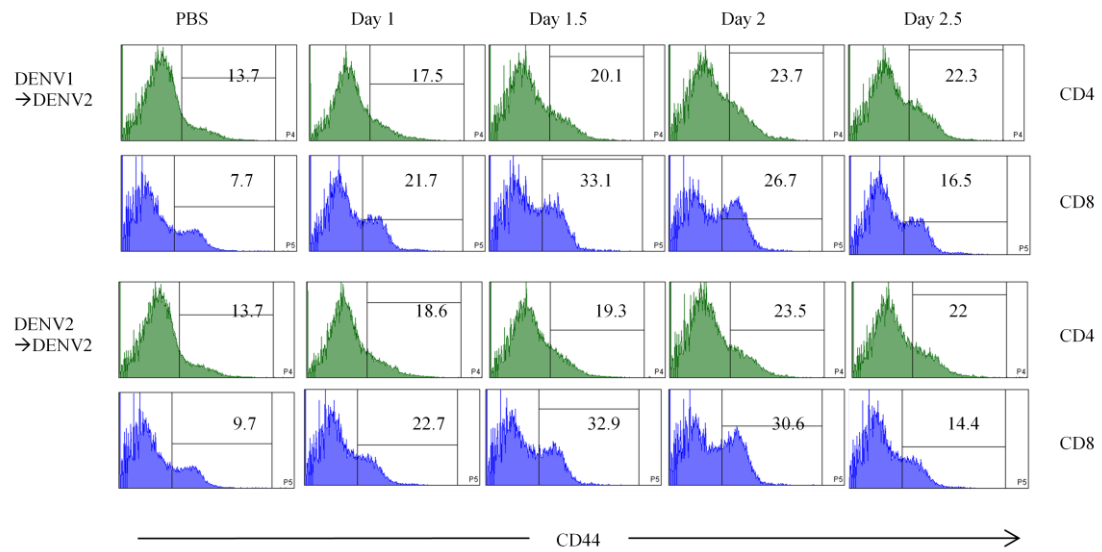


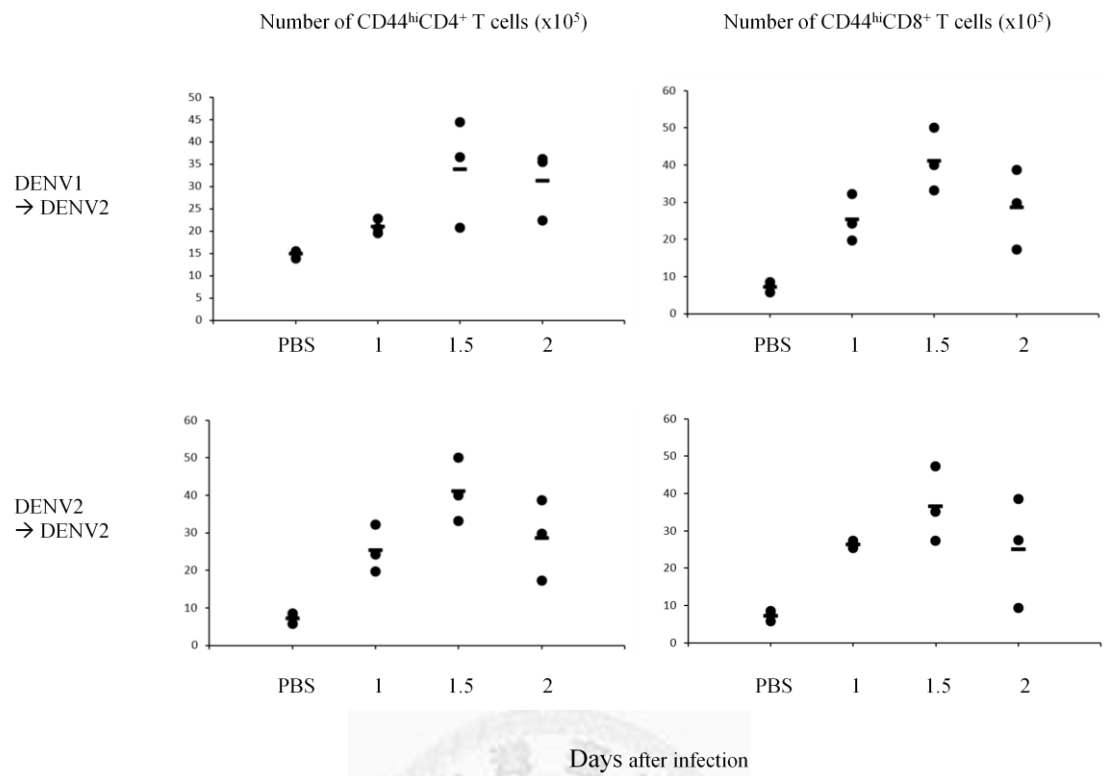
A



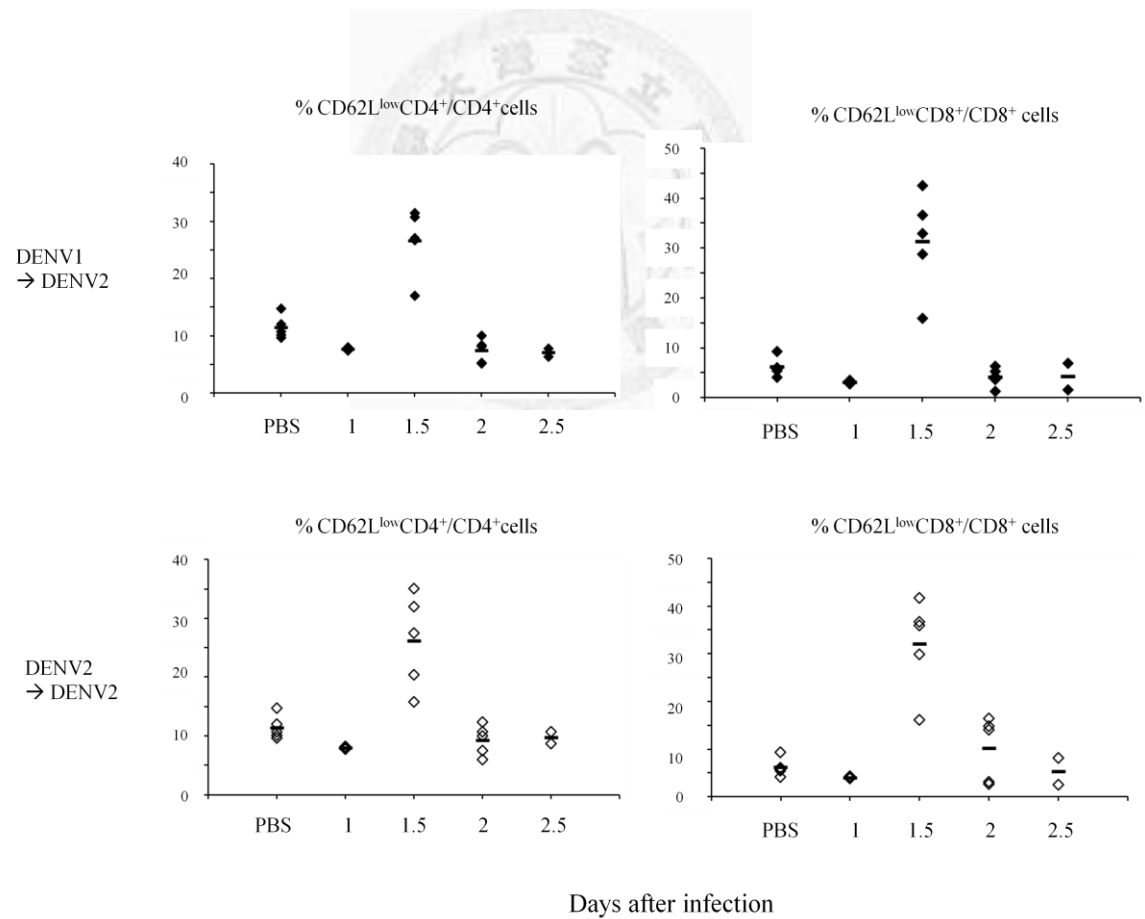
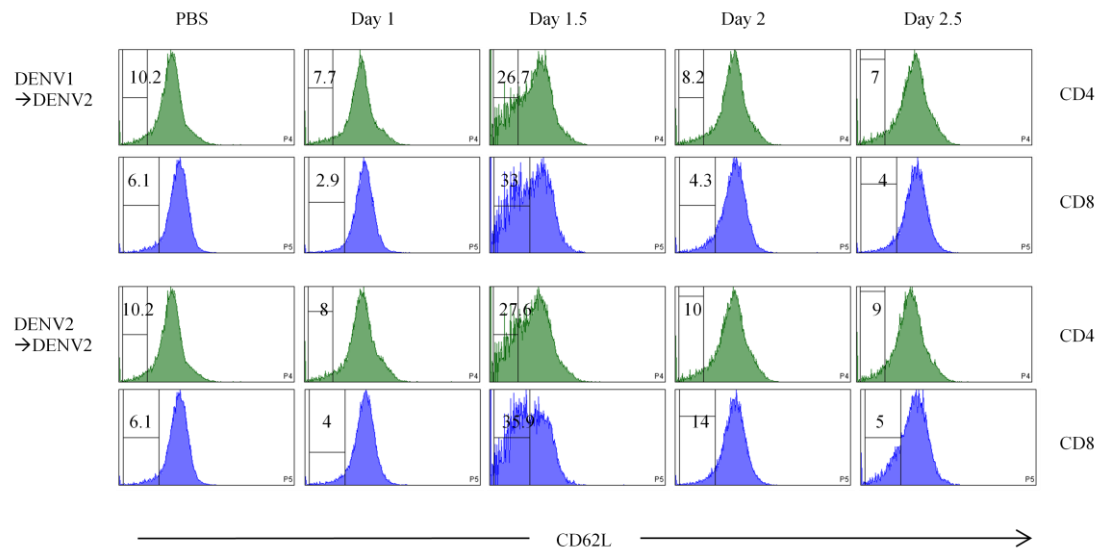


B





C



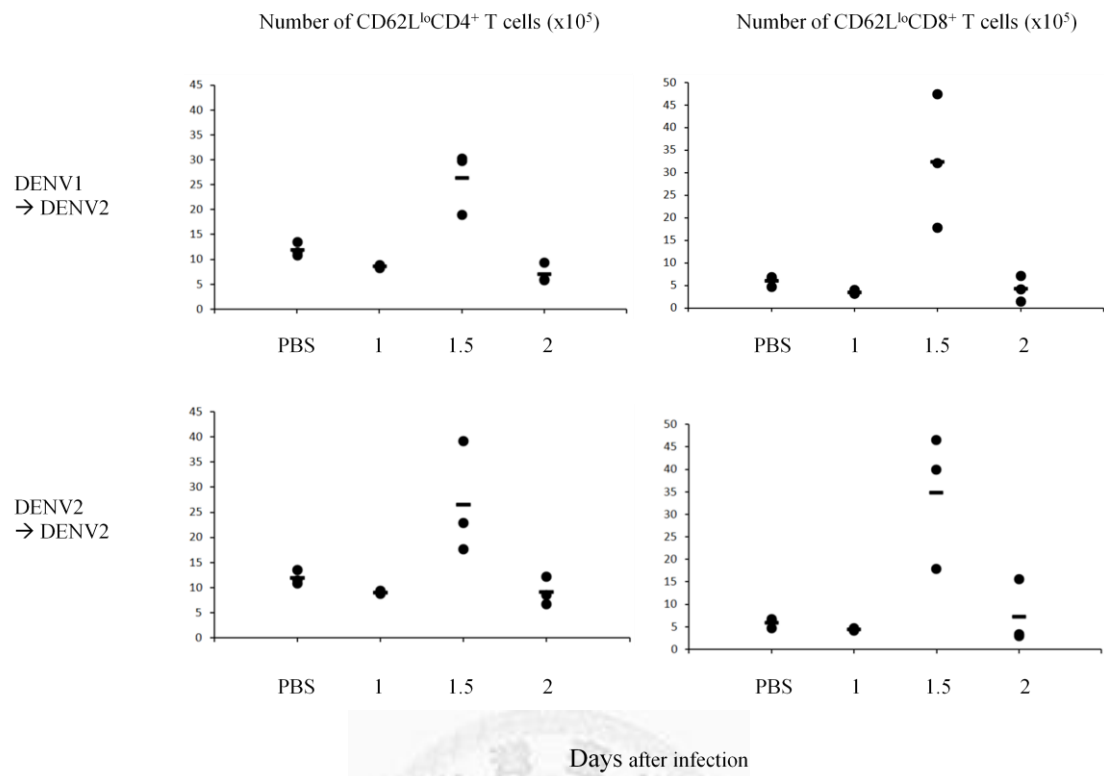
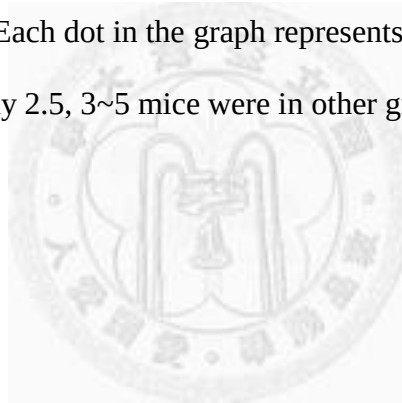
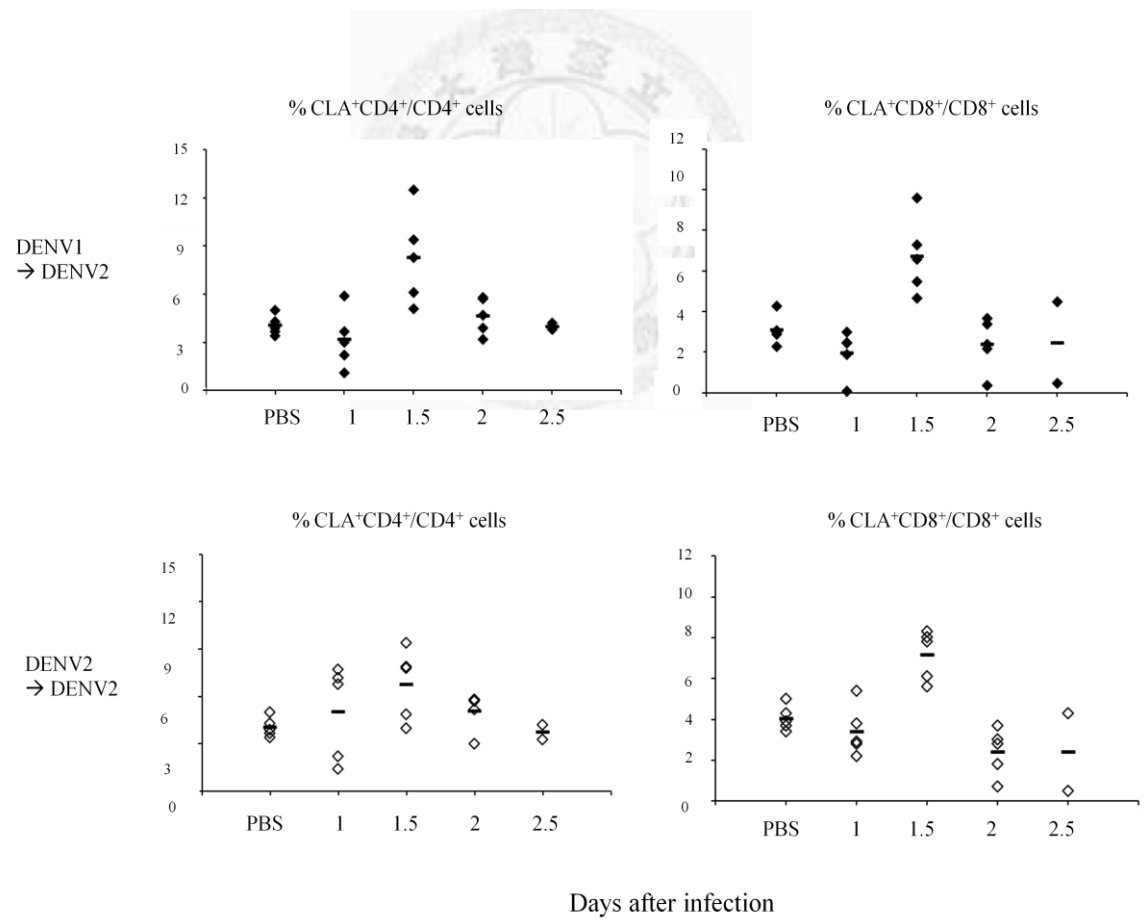
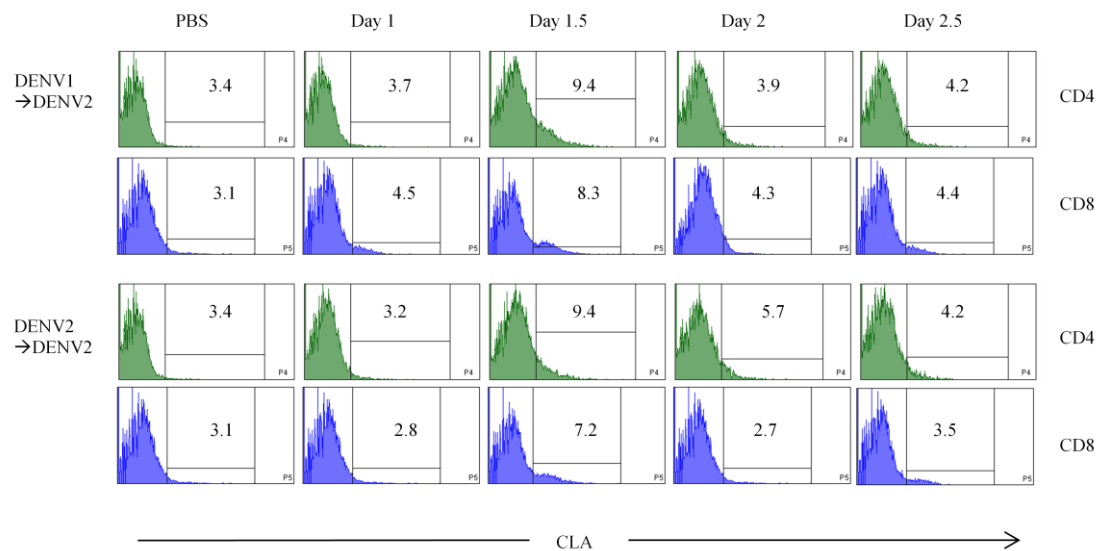
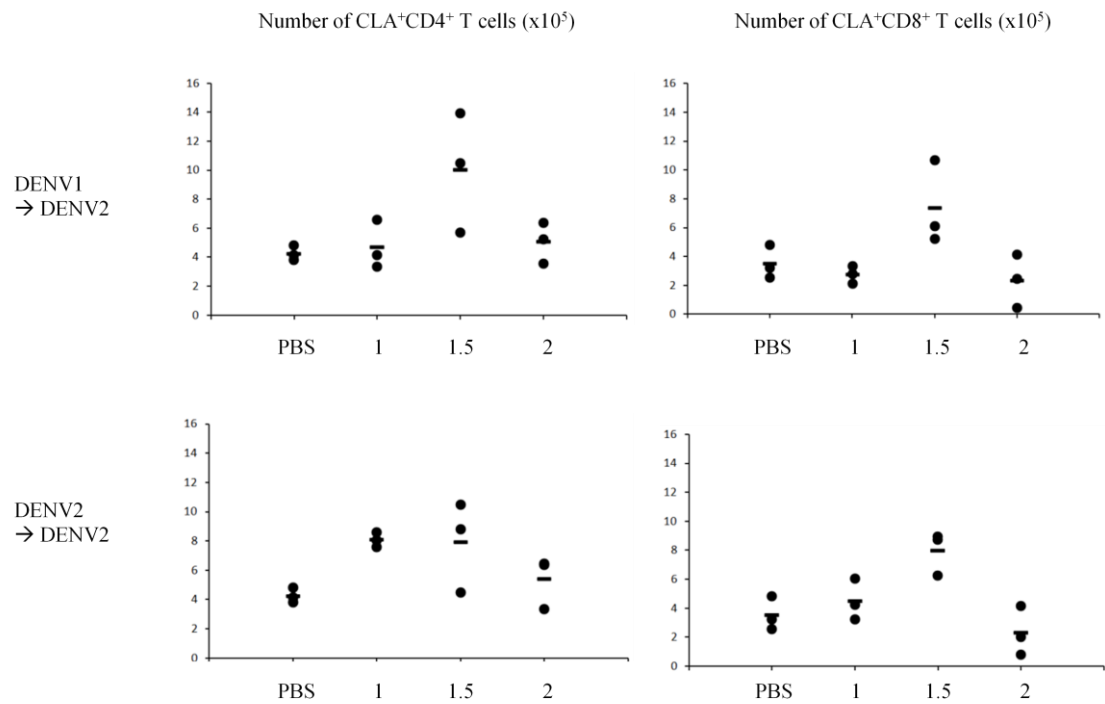


Figure 5. Intradermal DENV infection induces draining lymph node T cells to express skin homing receptors. Brachial lymph node cells were collected at day 1, 1.5, 2, 2.5 after secondary infection. Cells were stained with PE-Cy5-conjugated anti-CD4 antibody, APC-conjugated anti-CD8 antibody, and FITC-conjugated anti-CLA antibody (A), or PE-Cy5-conjugated anti-CD4 antibody, PE-conjugated anti-CD8 antibody, and APC-conjugated anti-CCR4 antibody (B). The percentages of CLA⁺ T cells (A) and CCR4⁺ (B) T cells population are shown. Histograms show the fluorescence intensity of each surface marker on CD4⁺ or CD8⁺ T cell populations. The number at the upper right corner indicates the percentage of CD4⁺ or CD8⁺ cells expressing each surface marker. The histograms shown are data representative of 3 independent experiments. Each dot in the graph represents one mouse. Two mice were included in the group of day 2.5, 3~5 mice were in other group.

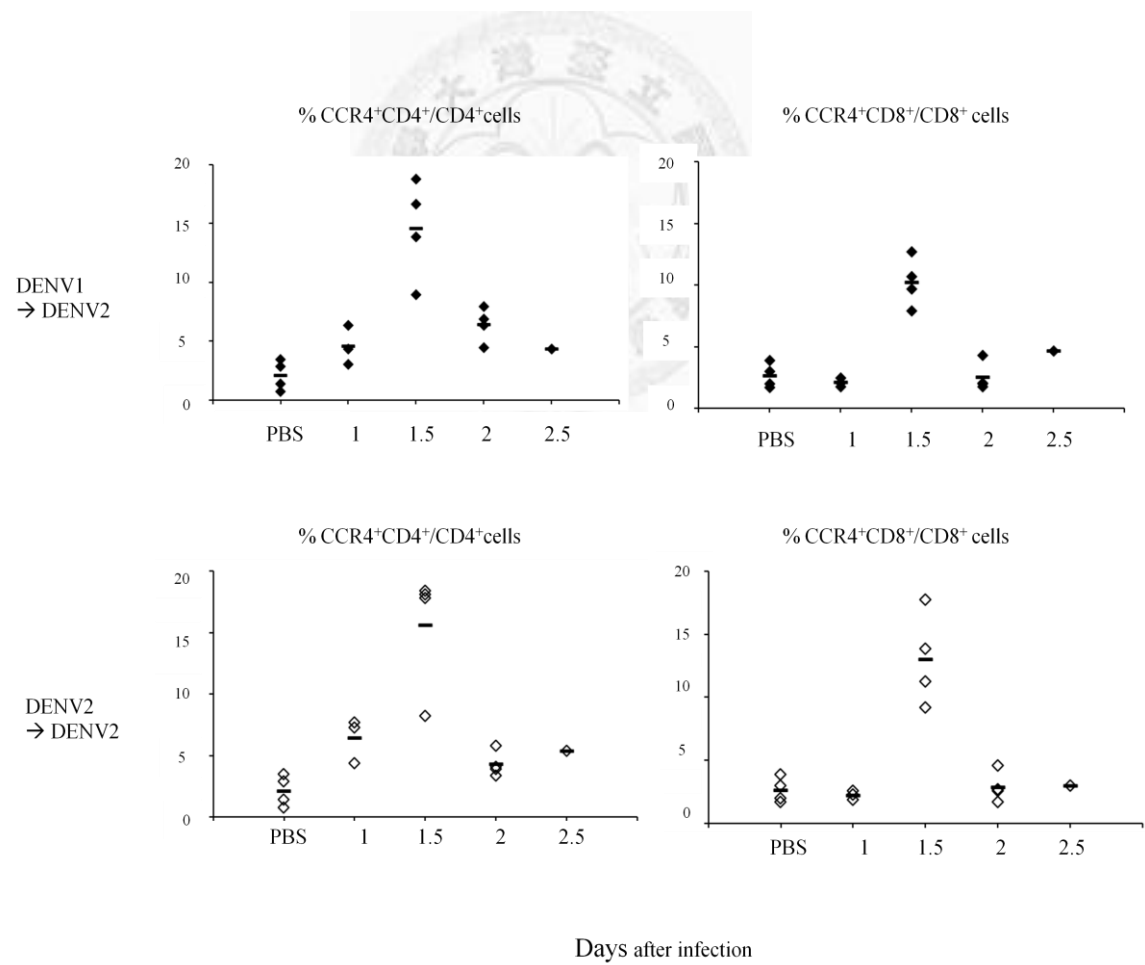
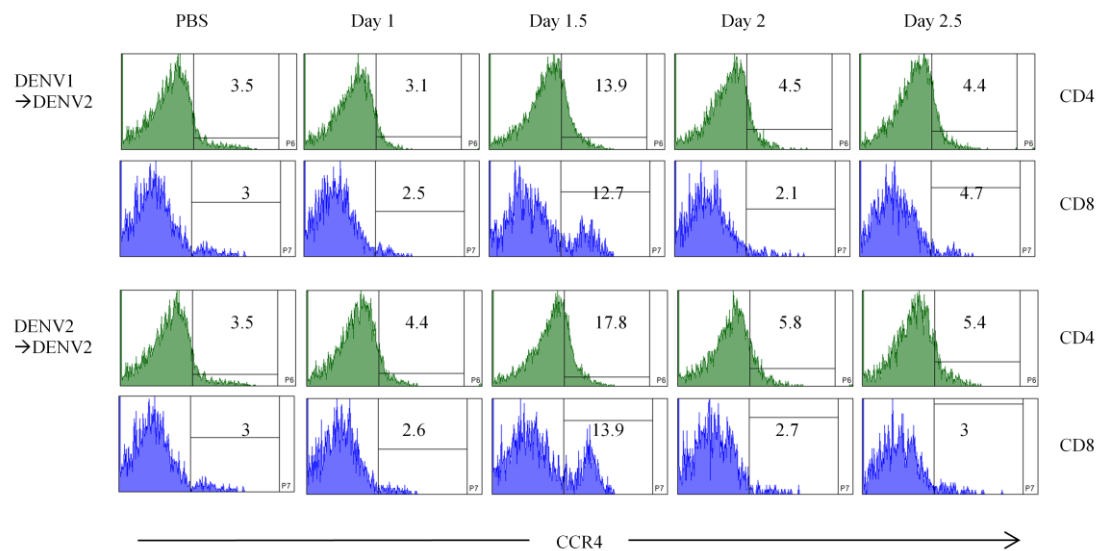


A





B



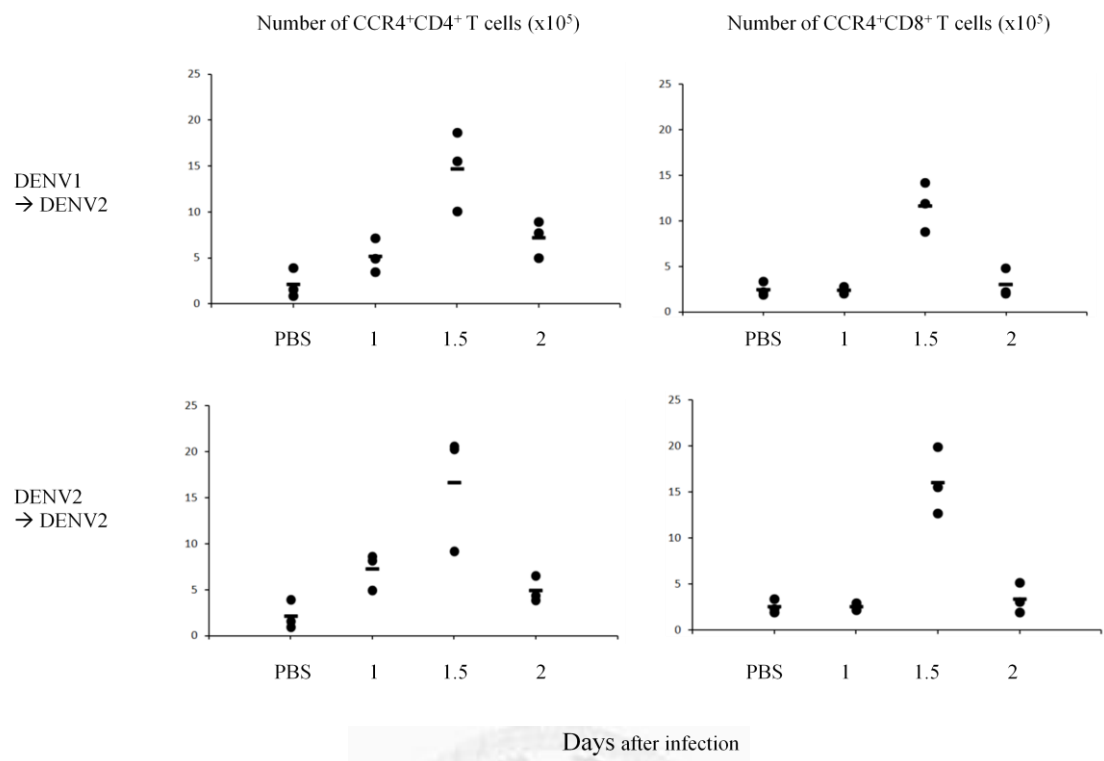
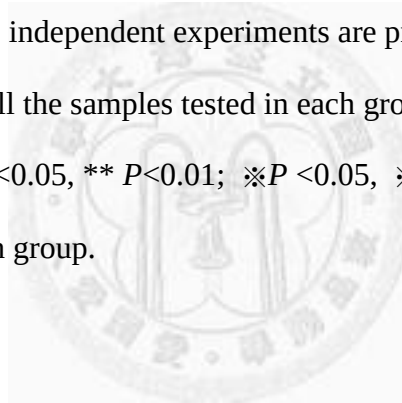
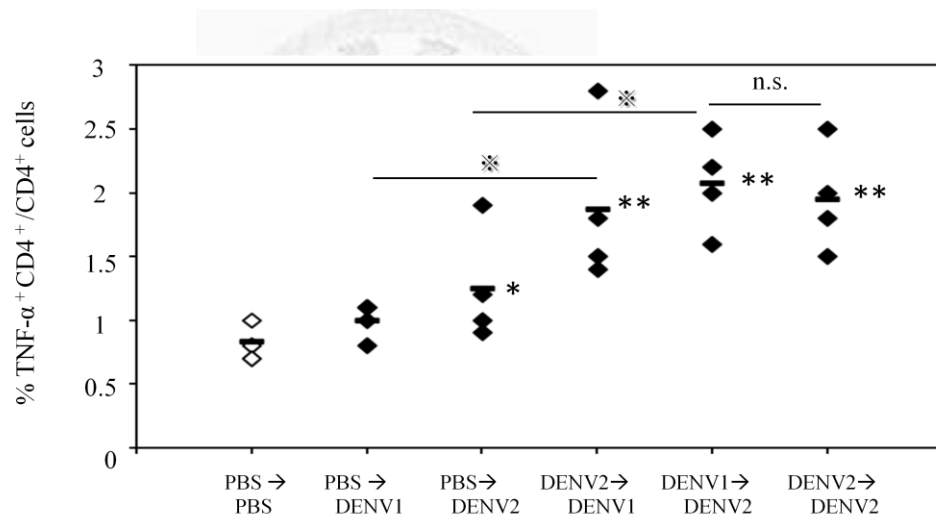
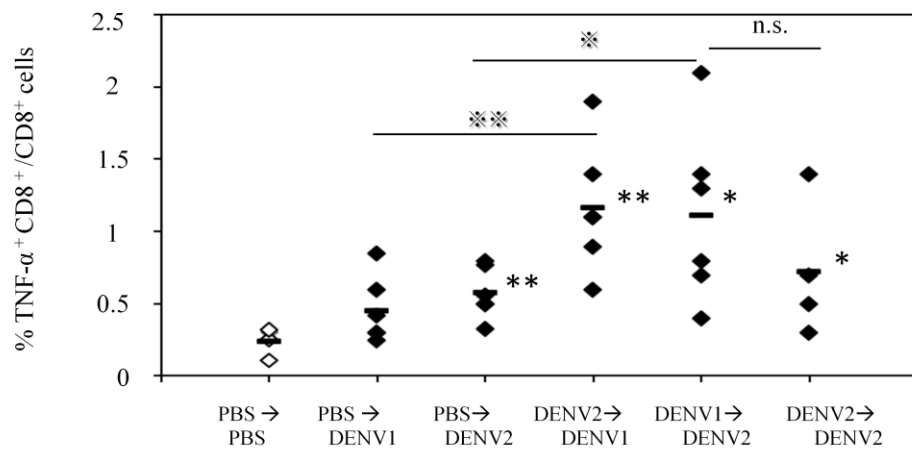


Figure 6. The percentages of cytokine-producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the draining lymph nodes of DENV infected mice. C57BL/6 mice were inoculated intradermally with PBS or 4 x 10⁶ PFU of DENV at day 0 followed by inoculation of PBS or 4 x 10⁷ PFU of DENV at day 30 at four different sites in the back. Brachial lymph nodes were harvested from infected mice at day 1 after second inoculation. One million lymph node cells were stimulated with plate-bound anti-CD3 antibody for 6 h (A) (TNF- α staining) or 24 h (B) (IFN- γ staining). Cells were then stained for surface PE-Cy5-anti-CD4 antibody, APC-anti-CD8 antibody, and intracellular PE-anti-TNF- α antibody (A) or FITC-IFN- γ antibody (B), and analyzed by flow cytometry. The percentage of TNF- α and IFN- γ producing cells are shown. (n = 4~6) Representative data from 3 independent experiments are presented. Short black lines indicate the means of the all the samples tested in each group. Each dot in the graph represents one mouse. (* P <0.05, ** P <0.01; ※ P <0.05, ※※ P <0.01) Four to six mice were included in each group.



(A)



(B)

