

中國醫藥大學
醫學檢驗生物技術學系碩士班
碩士學位論文

TRAIL 促進 A 型流感病毒感染細胞之
細胞凋亡研究

TRAIL Enhances Apoptosis of
Influenza A Virus Infected Cells

指導教授：林振文 博士
Cheng-Wen Lin

學生姓名：顧心元
Shin-Yuan Gu

中華民國九十八年七月

致 謝

有時候真的會有點兒害怕提筆寫這段致謝詞，因為兩年來所有甘甜蜜辣的情緒，會隨著鍵盤的敲打而一一浮現在心中，時間的輪軸似乎會再重新轉動一圈又一圈。在這段研究所的時光中，生活是緊湊、匆忙、凌亂及無法形容的感受。但是在一團迷霧中，又要時時刻刻保持清醒，才能找出一條妳將要走的路，於是乎生活就一直在尋著線索，努力找尋出口的所在，希望有撥雲見日的一天。

幸好有時人生改變一點點，就會變得很不一樣！指導教授林振文老師身俱躍動感的人格特質，身教猶如言教，深深影響我的研究之路。徐維莉和黃智生老師總是細心的閱讀論文，彌補我容易粗心大意的錯誤以及不吝惜經驗的傳承與論文的指正，讓論文的撰寫能逐漸完整清晰。在此再次衷心感激三位老師的完美組合與耐心指導。

還有謝謝曾經教導過的所上老師，和共同打拼的同學與朋友，因為有你們，才能醞釀一股研究氛圍，使我逐漸沉浸與深入生命科學的領域。隨著碩士班生涯的結束，雖然又走入另一團迷霧當中，但這次卻甘之如飴，不再害怕。當然，絕對不能忘記最了解、最支持我的家人和女朋友，在我喪失動力之時，隨時都能給予我心靈上的滋潤與無窮盡的鼓勵，讓我的步履逐漸放達，靜靜完成藝術創作的旅途。想要感謝的人真的太多太多，就只有感謝上天了！

Abstract

Tumor necrosis factor-related apoptosis factor-inducing ligand (TRAIL) is a member of TNF family, promoting apoptosis through the binding interaction with the receptors TRAIL-R1/DR4 and TRAIL-R2/DR5. TRAIL selectively induces apoptosis of cancer cells but not normal cells. Influenza A viruses (IAV) belong to the orthomyxovirus family, being segmented, single stranded, negative sense RNA viruses. IAV causes acute respiratory tract infection in human, resulting in apoptosis of human lung epithelial cells. TRAIL enhances apoptosis of avian IAV-infected cells, but not un-infected cells. In addition, TRAIL inhibits the replication of dengue virus and HIV-1 by apoptosis-independent manners. In this study, we intend to investigate the roles of TRAIL in enhancing apoptosis of IAV-infected cells and blocking the IAV replication. Initially, IAV infection induced a higher expression of TRAIL mRNA and a significant increase of apoptosis in human epithelial lung A549 cells than human promonocyte HL-CZ cells. In addition, TRAIL treatment induced a higher apoptosis rate in IAV-infected cells, being associated with the generation of reactive oxygen species (ROS) and the decrease of mitochondria membrane potential (MMP). TRAIL also up-regulated the expression of caspases 3, 8 and 9, and TRAIL receptor DR5. Furthermore, the combination of TRAIL and cyclosporine A showed synergistic effect on apoptosis of IAV-infected cells and the inhibition of IAV replication. The results demonstrated that the expression of TRAIL and TRAIL receptor DR5 was associated with the apoptosis enhancement of IAV-infected cells by TRAIL. In addition, the results indicated that the combination of TRAIL and cyclosporine A had synergically inhibited the replication of IAV in an apoptosis-dependent manner. The study provides informatics on novel therapeutic approaches against IAV infection.

摘要

TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis factor-inducing ligand) 隸屬 TNF 家族中的成員之一，藉由穿膜蛋白上的受器 TRAIL-R1/DR4 和 TRAIL-R2/DR5 啟動細胞凋亡反應。TRAIL 具有選擇性的誘導癌細胞凋亡，且不會對正常細胞造成細胞毒性，是其最為人所知的特性。A 型流感病毒 (IAV) 屬於正黏液病毒，一種高傳染性單股負性 RNA 病毒，通常會引起人類急性呼吸道的感染。由於細胞免疫機制作用的關係，當病毒感染時會誘導肺部上皮細胞凋亡。近年來，TRAIL 蛋白被發現具有選擇性加速誘導禽流感病毒感染細胞走向細胞凋亡，卻不影響未感染細胞。TRAIL 蛋白也被證實以非細胞凋亡路徑去抑制登革熱病愛毒及人類免疫缺陷病毒的複製。本論文我們試圖去探討 TRAIL 對人類 A 型流感病毒感染細胞之凋亡分子機制，以及其對 A 型流感病毒複製的影響。首先我們觀察到 A 型流感病毒感染時，人類肺表皮細胞 A549 比人類單核球細胞 HLCZ 之 TRAIL mRNA 表現量及細胞凋亡明顯增加。此外 A 型流感病毒感染亦會引起細胞內粒線體膜電位下降與活性氧化物的產生。再者，我們利用 Propidium Iodide 及 Annexin V 特異性染劑分析，人類重組蛋白 TRAIL 會促進 A 型流感病毒感染細胞凋亡的比例提高，促使 A 型流感病毒感染細胞之活性氧化物產生增加及粒線體膜電位下降。此外。

人類重組蛋白 TRAIL 會刺激 A 型流感病毒感染細胞，TRAIL 接受器 DR5、凋亡路徑蛋白 Caspase 3、8、9 基因及蛋白的表現量增加，以及抑制 A 型流感病毒的複製生長。最後，環孢靈素(Cyclosporine A) 與人類重組蛋白 TRAIL 同時作用下，引起的高度選擇性細胞凋亡反應及抑制 A 型流感病毒複製成效更加，因此我們推論 Cyclosporine A 與 TRAIL 具有協同作用的效果。本實驗結果發現 TRAIL 與 TRAIL 接受器 DR5 表現與 TRAIL 促使 A 型流感病毒感染細胞凋亡及抑制 A 型流感病毒的複製作用相關。本實驗結果也證實環孢靈素 (Cyclosporine A) 與 TRAIL 共同作用時產生具有高度選擇性抑制 A 型流感病毒的協同效果。本論文提供在 A 型流感病毒感染治療上一個新的觀念。

目錄

致 謝.....	I
Abstract.....	II
摘要.....	III
目錄.....	1
表圖目錄.....	6
第一章、緒論	8
1.1 TRAIL.....	8
1.1.1 TRAIL 接受器	8
1.1.2 TRAIL 引發的訊息傳遞路徑.....	9
1.2 A 型流行性感 冒病毒.....	10
1.2.1 A 型流感病毒之組成結構與基因.....	11
1.2.2 A 型流感病毒之複製機制.....	11
1.3 細胞凋 亡(apoptosis)之研究.....	12
1.3.1 細胞壞死與細胞凋 亡.....	12
1.3.2 細胞凋 亡之意義.....	13
1.3.3 細胞凋 亡的過程與訊息傳遞路徑	14
1.3.4 Caspase 與細胞凋 亡.....	15
1.3.5 粒線體膜電位(MMP)與細胞凋 亡關係.....	17
1.3.6 內質網壓力(ER stress)與細胞凋 亡之關係.....	18

1.4 病毒感染與細胞凋亡之研究.....	19
1.5 環孢靈素(Cyclosporin A).....	21
1.6 研究動機.....	22
1.7 研究目的.....	24
1.8 實驗設計流程圖.....	25
第二章、材料與方法.....	27
2.1 實驗材料.....	27
2.1.1 rhTRAIL (Recombinant Human TRAIL/Apo2L).....	27
2.1.2 環孢靈素 (Cyclosporin A).....	27
2.1.3 病毒株 (Virus).....	27
2.1.4 細胞株 (Cell line).....	27
2.1.5 即時定量聚合酶連鎖反應引子 (RT-PCR Primer).....	27
2.1.6 抗體 (Anti-body).....	28
2.1.7. 呈色劑.....	29
2.2 實驗方法.....	30
2.2.1 冷凍細胞活化.....	30
2.2.2 細胞冷凍保存.....	30
2.2.3 細胞培養.....	31
2.2.4 病毒的增幅放大.....	32
2.2.5 病毒蝕斑(plaque assay).....	32

2.2.6 細胞週期分析.....	33
2.2.7 Annexin V-FITC & PI 染色.....	34
2.2.8 活性氧化物測定(ROS).....	35
2.2.9 粒線體膜電位測定(MMP).....	36
2.2.10 細胞 RNA 抽取(extraction of cell total RNA)	37
2.2.12 逆轉錄酶-聚合酶連鎖反應(RT-PCR).....	39
2.2.13 即時定量聚合酶連鎖反應(Real-time PCR).....	40
2.2.14 蛋白質之電泳分析 (SDS-PAGE)	40
2.2.15 西方墨點法 (Western blot).....	41
第三章、結果	43
3.1 TRAIL 誘導 A 型流感病毒感染之 A549 及 HL-CZ 細胞凋亡	43
3.1.1 rhTRAIL 蛋白對 A 型流感病毒感染之 A549 細胞及 HL-CZ 細胞型態上的影響.....	43
3.1.2 利用流式細胞儀分析，rhTRAIL 蛋白對 A 型流感病毒 感染之.....	44
3.1.3 利用 Annexin V-FITC 特異性染色檢測，rhTRAIL 蛋白 對 A 型流感病毒感染之 A549 細胞及 HL-CZ 細胞凋亡分析	45
3.2 TRAIL 促使 A 型流感病毒感染 A549 細胞之細胞凋亡分子機制..	46
3.2.1 rhTRAIL 蛋白對 A 型流感病毒感染之 A549 及 HL-CZ	

細胞活性氧化物(ROS)產之影響.....	46
3.2.2 rhTRAIL 蛋白對 A 型流感病毒感染之 A549 及 HL-CZ 細胞粒線體膜電位(MMP)之影響.....	47
3.2.3 利用即時定量聚合酶連鎖反應分析 rhTRAIL 蛋白對 A 型流感病毒感染的 A549 細胞之凋亡機制基因表現的影響 .	47
3.2.4 rhTRAIL 蛋白對 A 型流感病毒感染的 A549 細胞之凋亡 蛋白表現的影響.....	48
3.3 TRAIL 引發 A 型流感病毒感染 A549 細胞凋亡反應，對 A 型流感 病毒複製的影響.....	48
3.3.1 利用即時定量聚合酶連鎖反應觀察，rhTRAIL 蛋白的 作用對 A 型流感病毒複製的影響(細胞外病毒顆粒)。	49
3.3.3 利用即時定量聚合酶連鎖反應及西方墨點法觀察， rhTRAIL 蛋白對於 A 型流感病毒蛋白在細胞內複製的影響 (細胞內病毒顆粒)。	50
3.4 環孢靈素(Cyclosporine A)與 TRAIL 作用，對 A 型流感病毒感染 之 A549 細胞凋亡反應及 A 型流感病毒複製的影響。	51
3.4.1 利用流式細胞儀分析，Cyclosporin A 及 rhTRAIL 的作 用下，對 A 型流感病毒感染之 A549 細胞週期 Sub-G1 影響	51
3.4.2 利用 Annexin V-FITC 特異性染色檢測，rhTRAIL 蛋白	

與 Cyclosporin A 作用，對 A 型流感病毒感染之 A549 細胞凋 亡分析.....	51
3.4.3 利用即時定量聚合酶連鎖反應觀察，rhTRAIL 蛋白與 Cyclosporin 的作用對 A 型流感病毒複製的影響(細胞外病毒 顆粒).....	52
第四章、討論	54
4.1 rhTRAIL 對不同細胞株感受性的差異及誘導凋亡程度的不同	54
4.2 rhTRAIL 蛋白的作用，使 A 型流感病毒感染細胞 mRNA DR5、 Caspase 3、Caspase 8、Caspase 9 現量上升.....	55
4.3 rhTRAIL 蛋白的作用對 A 型流感病毒複製的影響	56
4.4 A 型流感病毒感染時 TRAIL 在免疫反應及致病機轉上的腳色..	57
4.5 以環孢靈素(Cyclosporin A)及 TARAIL 蛋白共同作用，作為 A 型 流感病毒新治療法	58
第五章、結論	60
參考文獻.....	61

表圖目錄

圖 1. IAV 及 rhTRAIL(rhT)作用下 A549 細胞型態改變	66
圖 2. IAV 及 rhTRAIL(rhT)作用下 A549 細胞之細胞週期分析	67
圖 3. A549 細胞各週期比例分析統計.....	68
圖 4. IAV 及 rhTRAIL(rhT)作用下 A549 細胞之 Annexin V 凋亡細胞特異性染色	69
圖 5. A549 凋亡細胞比例分析.....	70
圖 6. IAV 及 rhTRAIL(rhT)作用下 HL-CZ 細胞型態改變.....	71
圖 7. IAV 及 rhTRAIL(rhT)作用下 HL-CZ 細胞之細胞週期分析。	72
圖 8. HL-CZ 細胞各週期比例分析統計.....	73
圖 9. IAV 及 rhTRAIL(rhT)作用下 HL-CZ 細胞之 Annexin V 凋亡細胞特異性染色	74
圖 10. HL-CZ 凋亡細胞比例分析.....	75
圖 11. A549 及 HL-CZ 細胞之活性氧化物(ROS)分析	76
圖 12. A549 及 HL-CZ 細胞之粒線體膜電位(MMP)分析	77
圖 13. A549 及 HL-CZ 細胞之 TRAIL 及 TRAIL 接受器 DR4 及 DR5 基因表現分析	78
圖 14. rhTRAIL(rhT)及 IAV 引發 A549 細胞凋亡路徑基因表現	79
圖 15. rhTRAIL(rhT)及 IAV 引發 A549 細胞凋亡訊息路徑基因表現。	

.....	80
圖 16. 分析 rhTRAIL 及 IAV 引發 A549 凋亡路徑蛋白 Caspase 3、8、9 的表現.....	81
圖 17. Real time PCR 分析 rhTRAIL(rhT)對 IAV 複製的影響.....	82
圖 18. Plaque assay 分析 rhTRAIL(rhT)對 IAV 複製的影響.....	83
圖 19. 即時定量聚合酶連鎖反應及西方墨點法分析 rhTRAIL(rhT)對 IAV 蛋白複製的影響.....	84
圖 20. Cyclosporin A 及 rhTRAIL(rhT)的共同作用下，IAV 感染之 A549 細胞週期分析.....	85
圖 21. Cyclosporin A 及 rhTRAIL(rhT)的共同作用下，IAV 感染之 A549 細胞 Annexin V 特異性染色分析.....	86
圖 22. Cyclosporin A 及 rhTRAIL(rhT)的共同作用下，對於 IAV 複製上的影響.....	87
表一、Western blot.....	88
表二、Protein concentration detection.....	89

第一章、緒論

1.1 TRAIL

TNF- α related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)屬於腫瘤壞死因子 (Tumor necrosis factor)家族成員，而其家族成員包括 Fas ligand (FasL 或 CD95L)、TNF- α (Griffith and Lynch 1998)^[1]、TNF- α related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/apo-2(Wiley, Schooley et al. 1995; Pitti, Marsters et al. 1996)^[2,3]及 apo-3 ligand (apo-3L) (Marsters, Sheridan et al. 1998)^[4]等會與其相對應的凋亡受器結合，經由受器下游 death domain 的活化，進而誘發 caspase cascades 的活化以導致細胞凋亡產生。在所有死亡配體(death ligand)中，目前又以 TRAIL 最受矚目，原因在於其可誘發癌細胞進行細胞凋亡，卻又對正常細胞不具有細胞毒殺的效果(Lawrence, Shahrokh et al. 2001)^[5]，近來被認為在對抗癌症治療上，最具潛力的抗腫瘤免疫療法分子(Smyth, Takeda et al. 2003; Wang and El-Deiry 2003)^[6,7]。然而有些癌細胞對 TRAIL 具有抵抗性，醫學上會對於具有抗性的癌細胞會配合一些化療藥物一併使用，除了可以達到一定的療效，更可以降低化療藥物的使用(Mitsiades, Treon et al. 2001)^[8]。

1.1.1 TRAIL 接受器

目前已知五種 TRAIL 受器，如 TRAIL-R1/DR4、TRAIL-R2/DR5、TRAIL-R3/DcR1、TRAIL-R4/DcR2 與 osteoprotegerin (OPG) (Kruyt

2008)^[9]。只有當 TRAIL 結合到 DR4 或 DR5 才能啟動細胞凋亡，而 DcR1、DcR2 與 OPG 僅扮演誘餌受器(decoy receptor)，並不會誘發細胞凋亡(LeBlanc and Ashkenazi 2003)^[10]，原因在於 DcR1、DcR2 與 OPG 受器不具有 death domain 或者所具有的 death domain 並無功能。

1.1.2 TRAIL 引發的訊息傳遞路徑

當 TRAIL 與 DR4 或 DR5 結合後，細胞質內的 adaptor protein FADD 會被先吸引與 DR4 或 DR5 結合，透過死亡受器 death domain 與 FADD 的 death domain 交互作用，pro-caspase 8 隨即亦會透過其序列上的 DED (death effector domain)與 FADD 蛋白序列上 DED 交互作用至被募集到 FADD，形成所謂的 DISC (death-inducing signaling complexe)。接著 DISC 內 pro-caspase 8 會自行修飾並活化，啟動下游細胞凋亡訊息(LeBlanc and Ashkenazi 2003)^[10]。

近來研究發現 TRAIL 所誘發的細胞凋亡，除了須要粒線體的參與，也依賴 Bax 蛋白的參與(Danial and Korsmeyer 2004; Jin and El-Deiry 2005)^[11, 12]。活化的 caspase 8 可以切割 Bid 產生截短的 tBid (truncated Bid)，tBid 可以至粒線體，並聯合 Bax 或 Bak 鑲嵌在粒線體外膜，造成粒線體膜電位(mitochondria transmembrane potential, $\Delta\Psi$)的損失，同時 cytochrome c 與 Smac/DIABLO 等促使細胞凋亡相關因子，由粒線體的 intermembrane space 釋出。Cytochrome c 聯合 Apaf-1、

dATP、pro-caspase 9 形成 apoptosome，使 pro-caspase 9 自行修飾活化並同時活化下游 pro-caspase 3。同時釋出的 Smac/DIABLO 會結合至 XIAP，並解除 XIAP 對 caspase 3、9 的活化抑制作用(Ekert, Silke et al. 2001; Deng, Lin et al. 2002)^[13, 14]，此外過量表現 Smac/DIABLO 會促進細胞對 TRAIL 所誘發的細胞凋亡，更強調 Smac/DIABLO 在 TRAIL 所誘發的細胞凋亡的確扮演重要角色。

1.2 A 型流行性感冒病毒

流行性感冒病毒（流感病毒）幾乎每年都會在世界各地造成流行性疾​​病，在 1918 年所發生的流行性感冒曾經造成全球大約五千萬人的死亡，因此研究流感病毒的詳細機制是刻不容緩的。流感病毒分為 A、B、C 三型，屬於正黏液病毒科(Orthomyxoviridae)；其中 A 型流感病毒可感染哺乳類，如人、豬、貂、馬、海獅、鯨魚，而在鳥類可感染雞、火雞及水禽類如鴨、鵝等。B 及 C 型流感病毒則主要感染人類；但大多數病例是由 A 型流行性感冒病毒(Influenza A virus)所引起的，而依照其表面抗原——血清凝集素(hemagglutinin, HA)與神經胺酸酶(neuraminidase, NA)——可將 A 型流感病毒分為許多亞型，目前發現的亞型 HA 有 16 種，而 NA 則有 9 種；其中主要能感染人類的亞型是 H1、H2、H3 和 N1、N2，但也有少數亞型如 H5N1、H7N2、H7N3、H7N7 或 H9N2 能夠感染人類，不

同亞型的流感病毒可感染禽鳥類或哺乳類等不同的物種(Hilleman 2002)^[15]。

1.2.1 A 型流感病毒之組成結構與基因

A 型流感病毒為一具有單股負向 RNA 的病毒，於電子顯微鏡下呈球狀結構，其直徑大約是 120 nm。在病毒表面約有 80% 為 HA 表面抗原，另外 20% 則由 NA 與 matrix protein (M) 構成。病毒體內包含八段基因；目前已知這八段基因至少能轉譯出 11 種病毒蛋白質(Shinya 2008)^[16]：包括位在病毒表面的兩種醣蛋白，即 HA 與 NA；作為離子通道的 M2 以及構成病毒體的 M1 蛋白質；而具有 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase) 功能的 PB2、PB1、PA (合稱 3P protein) 則會協同流感病毒的 RNA 與核蛋白 (nucleoprotein, NP) 構成核糖核蛋白 (ribonucleoprotein, RNP) 結構；此外尚有 NS1、NS2、PB1-F2 各具不同功能的病毒蛋白質存在於流感病毒之中(Horimoto and Kawaoka 2005)^[17]。

1.2.2 A 型流感病毒之複製機制

A 型流感病毒會利用 HA 表面抗原吸附到宿主細胞膜，經由 receptor-mediated endocytosis 進入宿主細胞質，再藉由 M2 的幫助將自身的 RNA 基因片段以及病毒的聚合酶蛋白質釋放到宿主細

胞；隨即病毒基因會進入宿主細胞的細胞核中，同時流感病毒的聚合酶(3P protein)與 NP 也會聚集到病毒 RNA (vRNA) 末端；在形成 RNP 的結構後，3P protein 即可開始將負向的 vRNA 轉錄成正向的 mRNA，而新合成的 mRNA 便可利用宿主細胞的轉錄機制，轉譯出構成流感病毒所需的各種蛋白質。在經過一段時間或是經由某種機制，3P protein 才會轉為將負向的 vRNA 轉錄成與 vRNA 互補的正向 RNA (cRNA)，此種 cRNA 即是作為複製 vRNA 的模板，因此病毒才得以產生大量的 vRNA。當產生足量的 vRNA 與病毒蛋白後，新合成的 vRNA 與病毒蛋白質便會組裝成新的流感病毒，而藉由 NA 協助以出芽 (budding) 的方式離開宿主細胞(Josset, Frobert et al. 2008)^[18]。

1.3 細胞凋亡(apoptosis)之研究

1.3.1 細胞壞死與細胞凋亡

細胞死亡之方式約略可分為二大類：細胞壞死 (necrosis) 及細胞凋亡 (apoptosis)。細胞壞死常見於一些急性的物理性或化學性的傷害，進而造成細胞質與胞器之間的滲透壓不平衡，並導致細胞膜膨脹破裂、細胞核和胞器瓦解、染色質被隨機切成不規則的碎片、細胞內物質釋出，會誘導血液內淋巴球清除此類細胞碎片，因而引發一連串的細胞發炎反應，最後導致整個區域的細胞壞死。

“細胞凋亡”，是於 1972 年由 Kerr 等人根據觀察實驗所提出並將其定義(Kerr, Wyllie et al. 1972)^[19]。目前已知細胞凋亡為一種單一細胞受到刺激後，主動經由多種細胞內組成 (cellular organosms) 來進行的系統性自戕反應 (systematic self-destruction)。其特徵包括：細胞萎縮、染色質濃縮 (chromatin condensation)、染色質在核中呈現邊緣化現象，細胞內的 DNA 被核酸內切酶以 180~200 bp 為單位切成小片段並可在 DNA 電泳膠上形成 DNA 規則片段化的階梯狀 (DNA ladder)，以及凋亡小體 (apoptotic body) 的產生(Brown, Sun et al. 1993; Samali, Gorman et al. 1996)^[20, 21]。當凋亡小體產生後，此細胞即被鄰近細胞吞噬而較不引起發炎反應(Vaux and Strasser 1996; Kroemer, Dallaporta et al. 1998)^[22, 23]。

1.3.2 細胞凋亡之意義

細胞凋亡與細胞壞死最明顯的差異是不會造成組織的發炎反應。因此細胞凋亡才可以在生物中扮演調控生理機能這樣的角色。(1) 個體發育時的可塑性 (developmental plasticity) 及挑選最適細胞 (the fittest cells)：發育學的一個通則是在某個組織形成時，一開始往往製造數量過多的細胞，繼而再依據某種需求準則來選擇最後留存的功能細胞。(2) 細胞凋亡是塑造個體及器官形態的機制：例如人類發育時尾椎消失、腸胃消化道的行成、到昆蟲的蛻變(metamorphosis)

等等的一切形態的形成。(3) 原狀恆定(homeostasis)：個體要保持著細胞數必須經由細胞增殖與細胞凋亡二大動力來平衡。最明顯的例子可見於血液系統，血液細胞的細胞增殖與細胞凋亡可依其所需要的生長因子與介白質存在與否來決定；此時生長因子與介白質(interleukin)就是扮演著存活因子的角色。(4) 殺死危險性細胞：細胞凋亡在保護生物個體的安全上，是一項極為重要的防護鎖。例如當生物個體中某些細胞遭受環境傷害或病毒感染時而啟動凋亡程式(Elmore 2007)^[24]。

1.3.3 細胞凋亡的過程與訊息傳遞路徑

雖然細胞凋亡的現象早就在 1972 年就被提出，但是其分子內的調控機制卻直到近年來才漸漸被了解。細胞凋亡主要過程可以分為三個階段(Igney and Krammer 2002)^[25]：第一階段為起始階段(Initiation)，在此階段細胞受到刺激後開始啟動死亡起始訊號；第二階段為作用階段(Effector)，在此階段中包含許多蛋白及核酸內切的活化(Kumar and Harvey 1995)^[26]，其酵素與受質之間的作用造成細胞外觀變化及 DNA 的碎裂；第三階段為降解階段(Degradation)，此時細胞已形成凋亡小體，並被鄰近細胞經由吞噬作用而清除。而在細胞凋亡之訊息傳遞方面，目前主要分為內源性(intrinsic) 和外源性(extrinsic)兩大路徑：前者為細胞內產生壓力(stress)或受到傷害，促使粒腺體釋出 cytochrome c(Green and Reed 1998)^[27]，導致 Apaf-1、

Caspase-9 與 Caspase-3 的活化，此為內生性細胞凋亡路徑之一，另外粒線體也會釋放 endo-G、AIF，並且這兩者會進入到細胞核中使 DNA 斷裂分解；至於後者則為死亡受體（death receptor）與受質的結合，如 Fas ligand，且活化 Caspase-8 與 Caspase-3 (Ashkenazi and Dixit 1998)^[28]。而具有天門冬胺酸胺(aspartate)專一性的胱胺酸蛋白酶（Cysteine proteases, Caspases）均參與此兩大路徑(Thornberry and Lazebnik 1998)^[29]。

1.3.4 Caspase 與細胞凋亡

對於細胞凋亡的了解最早是來自於對線蟲（Caenorhabditis elegant）控制其細胞死亡 ced 基因方面之研究。Ced-3 和 ced-4 是促進細胞凋亡的基因（pro-apoptotic genes），而 ced-9 則為抑制細胞凋亡的基因（anti-apoptotic genes）。這些蛋白酶皆為半胱胺酸蛋白酶，可在專一性的天冬胺酸位置切割其受質，故稱之為 caspase（cysteinyl aspartase）。

依執行功能可將 caspase 分為三類(Thornberry and Lazebnik 1998)^[29]：

(a) Inflammatory caspases: caspase 1、4、5、11、13、14

(b) Effector caspases: caspase 3、6、7

(c) Initiator caspases: caspase 2、8、9、10、12

在細胞中 Caspase 通常以不活化前驅物(zymogen)存，當細胞表面接

受器接收到凋亡訊息(如 TNF- α)或者受到刺激，促使粒線體釋出 cytochrome c 後將會活化 initiator caspase，接著活化 effector caspase 啟動凋亡機制。Caspase-3 是 effector caspase 的一員，當其活化後會使數種蛋白受質失去活性，例如：PARP 被 caspase-3 切割後即喪失 DNA 修補功能(Tewari, Quan et al. 1995)^[30]；Lamin A 為核膜蛋白，一旦被 caspase-3 分解則 DNA 易受損害，有利凋亡進行；ICAD(inhibitor of caspase activated deoxyribonuclease)是 CAD(caspase activated deoxyribonuclease)的抑制蛋白，當被 caspase-3 作用後即無法抑制 CAD，而 CAD 則會活化下游之 effector caspase(Chowdhury, Tharakan et al. 2008)^[31]。

另外有關細胞凋亡的發生大致上可分為內源性(intrinsic)和外源性(extrinsic)兩種路徑。在外源性凋亡路徑方面，當 Fas Ligand 或 TNF 與細胞膜上的受器（即 Fas receptor 及 TNFR-1）結合時，會將 pro-caspase-8 活化為 caspase-8，接下來即為 caspase-3 及-6 依序被活化(Earnshaw, Martins et al. 1999)^[32]；在內源性凋亡路徑方面，細胞內由不同因子引發的死亡訊息可促使粒線體的通透性發生改變而使 cytochrome c 由粒線體中釋放到細胞質(Liu and Vakharia 2006)^[33]，cytochrome c 再與 ATP 共同結合到 Apaf-1，使得 Apaf-1 的結構改變，讓 Apaf-1 的 CARD (caspase-recruitment domain) 能與

pro-caspase-9 上的 CARD 結合，將 pro-caspase-9 活化為 caspase-9，進而活化下游的 caspase-3、-7(Li, Nijhawan et al. 1997; Hu, Benedict et al. 1999; Saleh, Srinivasula et al. 1999)^[34-36]。因此在細胞凋亡發生時，Caspase-3、8、9 都會明顯的被活化。

1.3.5 粒線體膜電位(MMP)與細胞凋亡關係

在二十億年前，細胞以及細菌的祖先處於共生狀態，一起面對生存的壓力。此後細菌演化成粒線體，而細胞則開始了多細胞的演化之路。有許多證據指出，當初細菌進入細胞內時，不僅將產生能量的能力帶入細胞，提供細胞生長、活動、分化之能量；另一方面也將目前認為是細胞凋亡的基因帶入細胞內，例如與 Bcl-2 家族相似的基因 CED-9 (C. elegans)，這些 Bcl-2 家族的結構與功能都與一些細菌毒素相似(如 diphtheria toxin 和 colicins)，並且 Bcl-2 家族許多蛋白都會結合在粒線體的膜上，並且能在粒線體膜上形成許多孔洞(如 BAX)，這些孔洞的形成會造成粒線體間質釋放出 cytochrome c 和 apoptosis-inducing factor (AIF)去活化 caspases 而引起一連串細胞凋亡的現象發生(Green and Reed 1998; Liu and Vakharia 2006)^[27, 33]。

而調控這些粒線體內容物的釋放，一般認為與粒線體上的粒線體過渡性通透孔(mitochondrial permeability transition pore：MPTP)有關，它包含了兩大部分：

一是在粒線體內膜與 adenine nucleotide translocator (ANT) 相關之蛋白質；另一是在外膜的蛋白質（包括了 porin, voltage-dependent anion channel, VDAC）。打開此一通道會造成粒線體內膜兩側陽離子電位 (H^+ gradient) 消失、粒線體膜電位下降、粒線體基質(matrix)滲透壓增高，造成粒線體漲大，外膜漲破之後 cytochrome c 和 caspase-inducing factors (AIF) 釋放到細胞質中造成細胞凋亡 (Green and Reed 1998)^[27]。在研究粒線體過度性通透孔過程中發現，許多抑制粒線體過度性通透孔打開的化合物可以抑制細胞凋亡的發生，這些研究更證明了粒線體膜電位的改變對於細胞凋亡之重要性。因為，粒線體膜電位喪失不但是細胞凋亡的一個重要指標，更是調控此一機轉之非常重要的關鍵，抑制膜電位喪失通常可以進一步抑制下游凋亡路徑。

1.3.6 內質網壓力(ER stress)與細胞凋亡之關係

內質網(ER)是細胞內主要蛋白質合成、折疊、儲存鈣離子及鈣離子訊息傳導的主要場所，醣蛋白的醣基修飾 (glycosylation) 也是在此進行。當合成的蛋白質未折疊(unfolded)、錯誤折疊(misfolded)在內質網裡堆積，或是蛋白質醣基化的過程被抑制，氧化壓力 (oxidative stress) 產生，都會破壞了內質網的正常功能，造成所謂的內質網壓力 (Gething and Sambrook 1992; Pahl and Baeuerle 1995)^[37, 38]。然而，細胞感受到內質網壓力後，會促使某些伴護蛋白(chaperons)的表現提

高，幫助新合成的蛋白質摺疊成可以正確的構型，例如：葡萄糖調蛋白 78 (glucose regulated protein 78, GRP78) 在內質網壓力下會被大量表現出來以調節細胞生理(Momoi 2004)^[39]，因此許多實驗都以 GRP78 表現是否提高當作指標，來偵測是否有內質網壓力的產生。而近年的研究中發現，內質網壓力造成的凋亡也與粒線體之調控有關(Egger, Madden et al. 2007)^[40]。在研究中發現，當內質網受到壓力後，會調控下游蛋白酶體 (proteasome) 活性，而且此類蛋白酶體會針對抗凋亡 Bcl-2 家族蛋白作降解，使這些抗凋亡蛋白無法繼續抑制促凋亡蛋白如 Bax、Bak 之活性，最後影響粒線體膜電位，造成細胞凋亡。

此外，若是內質網壓力持續累積也會造成細胞走向凋亡。Caspase 12 就是內質網壓力所誘導的細胞凋亡中特定活化的 Caspase，會進一步活化下游細胞質中的 Caspase，但目前機制尚未清楚(Urano, Wang et al. 2000)^[41]。事實上，病毒感染宿主細胞有時也會產生內質網壓力，進而引發細胞凋亡，例如：腺病毒的 E3/19k 蛋白(Pahl, Wang et al. 1996)^[42]、流行性感冒病毒的 Hemagglutinin (HA) (Braakman, Hoover-Litty et al. 1991)^[43]、HBV truncated middle HB surface antigen(Meyer, Caselmann et al. 1992)^[44]等蛋白都被發現在細胞中大量表現，會在內質網中堆積而導致內質網壓力而造成凋亡。

1.4 病毒感染與細胞凋亡之研究

根據目前的研究，高等脊椎動物在受到病毒感染之後，會有兩種防護機制，而二者皆是以細胞凋亡方式來消除已經被病毒感染之細胞。其中一種機制為免疫反應，當病毒與組織相容性抗原複合 (histocompatibility complex, MHC) 結合，隨之被表現在細胞膜上之後，細胞毒型 T 細胞 (Cytotoxic T cell) 辨識到這樣的抗原後，此辨識動作將會啟動細胞凋亡訊號，使受病毒感染的細胞走向凋亡 (Oldstone, 1997)。另一種機制則為細胞自衛性 (cell autonomous) 行為，當受感染細胞感受到因病毒蛋白而引起之非計畫性 (unscheduled) 細胞凋亡。目的主要藉此種自殺行為以移去受感染之細胞 (Harrington, Bennett et al. 1994; Eick and Hermeking 1996)^[45, 46] 達到防衛之目的。當在細胞凋亡的發生過程中，有些反應會不利於病毒的複製，例如細胞發生凋亡時，細胞的核酸內切酶被活化，並攻擊複製中的病毒 DNA，以達到早期即抑制病毒複製的目的。但當細胞在受到病毒感染後早期即死亡並且被免疫細胞吞噬，如此就能減少病毒在細胞中複製後釋放到鄰近細胞的機會，故許多病毒為對抗上述問題，因而演變出各種抑制或延緩細胞凋亡的蛋白，讓病毒有足夠的時間可以大量複製並組裝完整的病毒顆粒，例如 IPNV 的 VP5 (Hong and Wu 2002)^[47]；adenovirus 的 E1B；Baculovirus 的 p35 及 IAV 的 NS1，都是目前已知會抑制細胞凋亡的病毒蛋白 (Roulston, Marcellus et al. 1999)^[48]。在

感染的後期，大量複製的病毒常會引發宿主細胞的凋亡，以利於病毒顆粒的釋出並且可以逃過宿主免疫反應及酵素的攻擊，而可再度感染鄰近細胞。目前已知有許

多病毒的個別基因表現皆會誘發細胞凋亡，如 adenovirus 的 E1A；CAV Apoptin；IAV 的 NS1 和 SV40 的 large T antigen(Roulston, Marcellus et al. 1999)^[48]。因此，病毒在不同的時間利用不同的機制抑制或促進細胞凋亡，控制宿主細胞的死亡與否，使得病毒能在最佳的環境下複製及釋出，直到再度感染。

1.5 環孢靈素(Cyclosporin A)

環孢靈素(cyclosporin A)為含有 11 個胺基酸之環型多肽類 (polypeptide)。它是一種很強有效的免疫抑制劑，可以延長各種同種異體移植之存活，例如皮膚、心臟、腎臟、胰臟、骨髓等(Starzl, Koep et al. 1980)^[49]。Cyclosporin A 主要抑制 T 細胞促成性反應之發生，包括同種異體免疫，延遲性皮膚過敏，Freund 氏佐藥關節炎，移植物反宿主疾病及 T 細胞依賴性抗體之產生。它也可抑制淋巴激素 (Lymphokine)之產生及釋放，包括 interleukin 2 或 T 細胞生長因子 (TCGF)。Cyclosporin A 對淋巴球有選擇性及可逆性的作用。不像細胞抑制劑，它不抑制造血，而且對吞噬細胞的功能沒有影響。目前有

研究指出，Cyclosporin A 及其衍生物能透過抑制 Cyclophilin 的活性去影響 Hepatitis C virus RNA 的複製(Watashi, Hijikata et al. 2003)^[50]，目前已經有效應用到 C 型肝炎患者的身上。

1.6 研究動機

Apoptosis 一種可由型態鑑定及生化反應上去定義的細胞死亡模式(Kerr, Wyllie et al. 1972)^[19]，在許多疾病的發生扮演重要的角色，包括病毒的感染(Razvi and Welsh 1995)^[51]，然而 Apoptosis 被認為是宿主細胞抵抗病毒入侵的一種防禦機制，原因在於許多病毒會產生抗凋亡的蛋白，以避免這項細胞反應。

當 A 型流感病毒感染人類上呼吸系統細胞時，會引發先天性及後天性的免疫反應，避免感染細胞的病毒散佈蔓延，感染其他細胞。其中以 Type I interferone signaling pathway (IFN- α/β)，為最為熟知的流感病毒感染引發之免疫機制，其下游基因的啟動 (如 PKR、OAS、Mx、ISG15, 54, 56)，促使被感染的細胞細胞週期停滯、活化 RNase L 分解細胞及病毒 RNAs、辨認病毒 nucleocapside-like structure 抑制其進入細胞核內、抑制病毒複製、病毒蛋白的轉譯，甚至啟動細胞凋亡機制，因此許多研究相信 Type I interferone 的觸發，是 A 型流感病毒感染造成細胞凋亡的主因(Balachandran, Roberts et al. 2000)^[52]。

研究指出，除了 Interferone pathway 免疫機制外，免疫細胞 CD 8⁺

T cell 利用 Fas- FasL 及 perforin-granzyme B 凋亡路徑，來毒殺 A 型流感病毒感染之細胞，近來更發現 CD8⁺ T cell 亦利用 TRAIL-TRAIL receptor 的結合引發感染細胞導向凋亡路徑。TRAIL 是 TNF 家族成員中誘發細胞凋亡的 ligand 之一，當與其受體結合後，其受體細胞內 domain 的部分透過 Fas-associated death domain 形成三聚體的受體，進而活化凋亡路徑下游蛋白 Caspase 的活性。以往 TRAIL 蛋白在癌症的治療上，具有很好的功效，原因在於它可以選擇性的誘導癌細胞凋亡，卻又不影響正常細胞的運作。近來被發掘在病毒感染之細胞亦有相同特異性功能，實驗顯示 TRAIL 會選擇性凋亡受感染之細胞，受感染的人類肺腺癌細胞對 TRAIL 的敏感性會高於未受到感染之細胞，細胞凋亡的程度會大於未受感染之細胞(Brincks, Kucaba et al. 2008)^[53]。

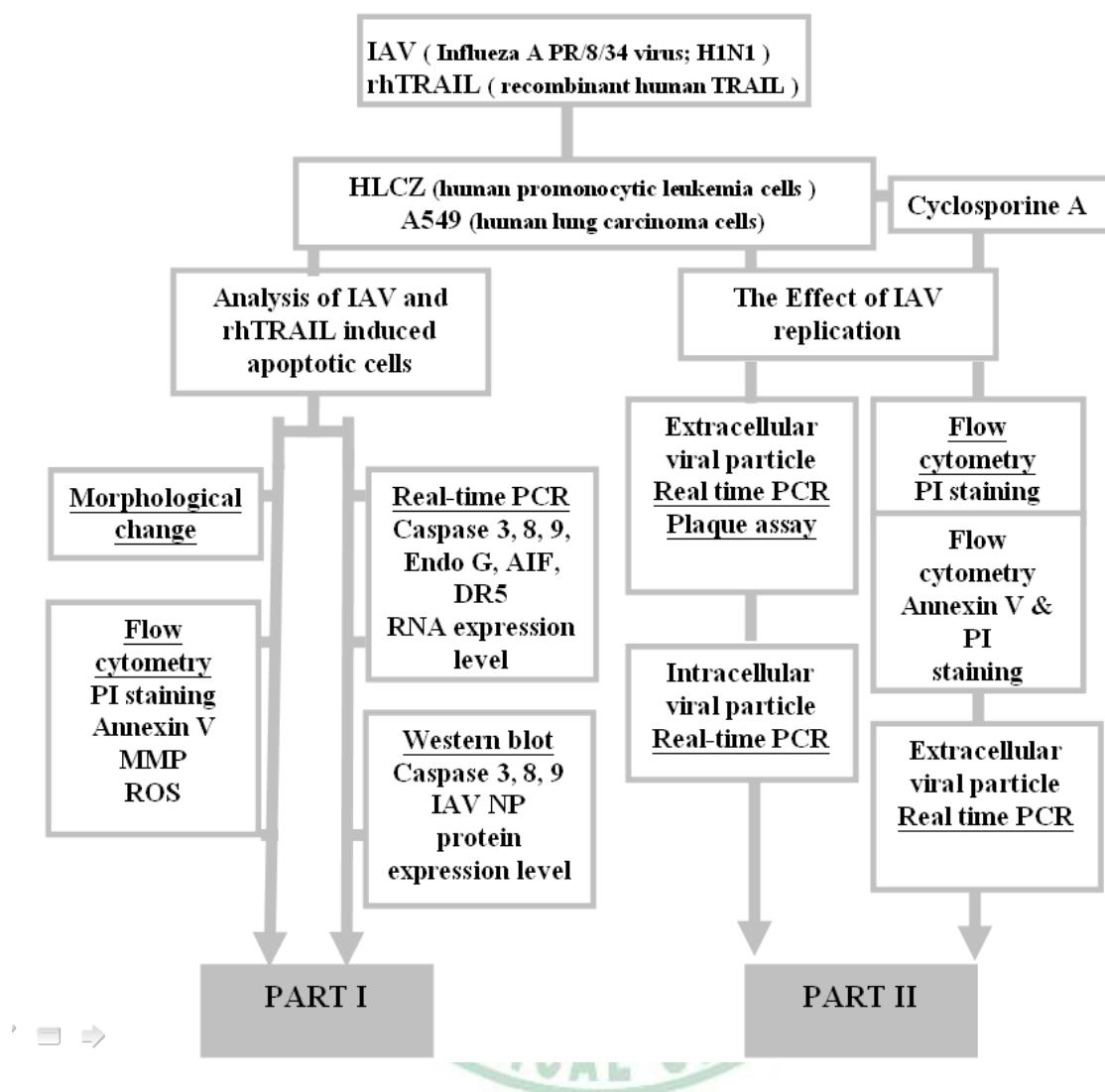
另有文獻指出，凋亡蛋白 Caspase 3 的活化有利於流感病毒的複製 (Wurzer, Planz et al. 2003)^[54]，當細胞受到 A 型流感病毒感染時，會引發感染細胞凋亡反應，而其反應途徑為凋亡路徑中的外在路徑：FADD/Caspase 8 signaling pathway(Balachandran, Roberts et al. 2000)^[52]，已具有活性的 Caspase 8 會再活化其下游凋亡蛋白 Caspase 3，執行凋亡反應如 PARP 的切割 (喪失其修補 DNA 的功能)。經活化 Caspase 3 會幫助 virus RNP complex 的運輸，由細胞核到細胞質以合成病毒之蛋白。

然而有趣的是 TRAIL 蛋白誘導凋亡反應亦屬於外在路徑 FADD /Caspase 8 signaling pathway，是否會影響 A 型流感病毒的複製。此外，TRAIL 蛋白可以選擇性的促使 A 型流感病毒感染細胞，加速細胞凋亡反應分子機制亦尚未明確發現，本實驗以此作為探討項目。

1.7 研究目的

- ❖ 了解 TRAIL 蛋白促使 A 型流感病毒感染細胞，選擇性加速細胞凋亡反應分子機制與凋亡途徑。
- ❖ 了解 TRAIL 蛋白引發細胞凋亡反應，對於 A 型流感病毒的複製之影響。
- ❖ Cyclosporin A 與 TRAIL 蛋白，對於 A 型流感病毒治療上的新方法。

1.8 實驗設計流程圖



實驗設計一

TRAIL 誘導 A 型流感病毒感染之 A549 及 HL-CZ 細胞產生細胞凋亡

- ❖ 策略：1. 顯微鏡觀察及照相(感染 24 及 48 小時細胞凋亡型態)。
2. Propidium Iodide(PI)染色，流式細胞儀分析細胞週期。
3. Propidium Iodide(PI)及 Annexin V 凋亡細胞特異性染色。

TRAIL 促使 A 型流感病毒感染 A549 細胞之細胞凋亡分子機制

- ❖ 策略：1. DCFH-DA 染色，活性氧化物(ROS)分析。
- 2. DioC6 染色，粒線體膜電位(MMP)分析。
- 3. 即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應，細胞凋亡蛋白及 TRAIL 接受器基因表現量分析。
- 4. 西方墨點法，細胞凋亡蛋白及流感病毒蛋白表現量分析。

實驗設計二

TRAIL 引發 A 型流感病毒感染 A549 細胞凋亡反應，對 A 型流感病毒複製的影響

- ❖ 策略：1. 即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應及病毒蝕斑實驗，測量細胞外病毒顆粒的釋放。
- 2. 即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應，觀察細胞內病毒蛋白複製的情形

環孢靈素(Cyclosporine A)與 TRAIL 作用，對 A 型流感病毒感染之 A549 細胞凋亡反應及 A 型流感病毒複製的影響。

- ❖ 策略：1. Propidium Iodide(PI)染色，流式細胞儀分析細胞週期。
- 2. Propidium Iodide(PI)及 Annexin V 凋亡細胞特異性染色
- 3. 即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應及病毒蝕斑實驗，測量細胞外病毒顆粒的釋放。

第二章、材料與方法

2.1 實驗材料

2.1.1 rhTRAIL (Recombinant Human TRAIL/Apo2L)

(TNF-related apoptosis-inducing Ligand, TNFSF 10, Apo2 Ligand, TL2)

PEPROTECH INC.購買，以磷酸鹽溶液 PBS (phosphate buffer saline)

稀釋濃度為 100 ng/ul，-20°C 保存。

2.1.2 環孢靈素 (Cyclosporin A)

Sigma 購買，溶於 DMSO 中濃度為 500 ug/m，-20°C 保存。

2.1.3 病毒株 (Virus)

A 型流感病毒 Influenza A virus (IAV) A/PuertoRico/8/34 (PR8; H1N1)

株，由中興大學獸醫學公共衛生研究所徐維莉教授提供。

2.1.4 細胞株 (Cell line)

人類單核球白血病細胞 HL-CZ (human promonocytic leukemia cells)

人類肺腺癌細胞 A549 (human lung carcinoma cell)

狗腎細胞 MDCK (Madine Darby canine kidney)

2.1.5 即時定量聚合酶連鎖反應引子 (RT-PCR Primer)

Primer name	Primer sequence
Homo caspase 3-F	CAGTGGAGGCCGACTTCTTG

Primer name	Primer sequence
Homo caspase 3-R	TGGCACAAAGCGACTGGAT
Homo caspase 8-F	GGATGGCCACTGTGAATAACTG
Homo caspase 8-R	TCGAGGACATCGCTCTCTCA
Homo caspase 9-F	TGTCCTACTCTACTTTCCCAGGTTTT
Homo caspase 9-R	GTGAGCCCACTGCTCAAAGAT
Homo AIF-F	GGGAGGACTACGGCAAAGGT
Homo AIF-R	CTTCCTTGCTATTGGCATTCTG
Homo EndoG-F	GTACCAGGTCATCGGCAAGAA
Homo EndoG-F	CGTAGGTGCGGAGCTCAATT
TRAIL-F	GCTCTGGGCCGCAAAAT
TRAIL-R	TGCAAGTTGCTCAGGAATGAA
DR4(TRAIL-R1)-F	CAGAACGTCCTGGAGCCTGTAAC
DR4(TRAIL-R1)-R	ATGTCCATTGCCTGATTCTTTGTG
DR5(TRAIL-R2)-F	ATCACCCAACAAGACCTAGC
DR5(TRAIL-R2)-R	TTCTGAGATATGGTGTCCAGG
Influenza A virus NP-F	GATTGGTGGAATTGGACGAT
Influenza A virus NP-R	AGAGCACCATTCTCTCTATT
Influenza A virus M-F	AAGACCAATCCTGTCACCTCTGA
Influenza A virus M-R	CAAAGCGTCTACGCTGCAGTCC
GAPDH-F	CCACCCATGGCAAATTCC
GAPDH-R	TGGGATTTCCATTGATGACAAG

2.1.6 抗體 (Anti-body)

Anti-body	Company
Caspase 3 (Mouse)	Calbiochem
Caspase 8 (Mouse)	Cell signaling technology
Caspase 9 (Mouse)	Upstate
Influenza A virus Nucleoprotein (NP) (Mouse)	Chemicon
β -actin (Mouse)	Sigma
Peroxidase-conjugated Goat Anti-Mouse IgG	Abcam

2.1.7. 呈色劑

Name	Company
Chemiluminescent HRP substrate	Millipore

2.2 實驗方法

2.2.1 冷凍細胞活化

冷凍細胞之活化原則為快速解凍，以避免冰晶重新結晶而對細胞造成傷害，導致細胞之死亡。細胞活化後，約需數日，或繼代一至二代，其細胞生長或特性表現才會恢復正常（例如產生單株抗體或是其他蛋白質）。自液氮或乾冰容器中取出冷凍管，檢查蓋子是否旋緊，由於熱脹冷縮過程，此時蓋子易鬆掉。取出冷凍管，立即放入 37°C 水槽中快速解凍，輕搖冷凍管使其在 3 分鐘內全部融化，以 70% 酒精擦拭保存管外部，移入無菌操作台內。取出解凍之細胞懸浮液，緩緩加入有培養基之培養容器內（稀釋比例為 1:10，混合均勻，放入 CO₂ 培養箱培養。在解凍培養後隔日更換培養基。

2.2.2 細胞冷凍保存

欲冷凍保存之細胞應在生長良好（log-phase）且存活率高之狀態下，約為 80%-90% 緻密度。注意冷凍保護劑之品質。DMSO 應為試劑級等級，無菌且無色（以 0.22 micron FGLP Teflon 過濾或是直接購買無菌產品），以 5~10 ml 小體積分裝，4°C 避光保存，勿作多次解凍。冷凍保存之細胞濃度： $5\sim 10\times 10^6$ cells/ml。冷凍保護劑濃度為 10% DMSO。冷凍前一日前更換半量或全量培養基，觀察細胞生長情形。配製冷凍保存溶液（使用前配製）：將 DMSO 加入新鮮培養基

中，最後濃度為 5%，混合均勻，置於室溫下待用。取少量細胞懸浮液（約 0.1 ml）計數細胞濃度及凍前存活率。離心，去除上清液，加入適量冷凍保存溶液，使細胞濃度為 $1-5 \times 10^6$ cells/ml，混合均勻，分裝於已標示完全之冷凍保存管中，1 ml/vial。冷凍保存方法：冷凍管置於 4°C 10 分鐘、-20°C 30 分鐘、-80°C 16-18 小時（或隔夜），最後以液態氮槽長期儲存。

2.2.3 細胞培養

實驗所使用的細胞株

2.2.3.1 人類單核球白血病細胞 HL-CZ (human promonocytic leukemia cells)

培養條件：RPMI-1640 (Rosewell Park Memorial Institute, HyClone) 10 % FBS (fetal bovine serum)、Penicillin -Streptomycin solution (HyClone)，250 ug/ml Amphotericin (Sigma)，置於 5% CO₂、37°C 恆溫培養箱。

2.2.3.2 人類肺腺癌細胞 A549 (human lung carcinoma cell)

培養條件：DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) 10% FBS (fetal bovine serum)、Penicillin-Streptomycin solution (HyClone)，250 ug/ml Amphotericin (Sigma)，置於 5% CO₂、37°C 恆溫培養箱

2.2.3.3 狗腎細胞 MDCK (Madine Darby canine kidney)

培養條件：DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium)

10% FBS (fetal bovine serum)、Penicillin-Streptomycin solution

(HyClone)，250 ug/ml Amphotericin (Sigma)，置於 5% CO₂、37°C 恆溫培養箱。

2.2.4 病毒的增幅放大

流行性感冒病毒 (IAV) 利用貼附細胞 MDCK 當作病毒的宿主細胞。當 MDCK 細胞長到單層八九分滿時，將培養液置換為不含胎牛血清、2 %trypsin 的 DMEM，加入 IAV 使其感染 MDCK 細胞，34°C 恆溫培養箱培養。病毒感染 2-3 天後觀察細胞是否有細胞病理形態 (Cytopathoc effect, CPE) 產生，待細胞 CPE 達 80% 以上，收集含病毒之培養液，離心 3000rpm; 10 分鐘以去除細胞碎屑，上清液以每管 0.5 ml 分裝，並儲存於-80°C 並以病毒蝕斑測其病毒價數。

2.2.5 病毒蝕斑(plaque assay)

A 型流感病毒(IAV PR8 strain)利用貼腹細胞 MDCK 當作病毒的宿主細胞。當 MDCK 細胞再 6-well plate 長到單層八九分滿時，將培養液置換為不含胎牛血清、2 %trypsin 的 DMEM，加入序列稀釋病毒液 IAV 200 ul (兩重複)，34°C、5% 恆溫培養箱培養，每 15 分鐘

清搖 6-well plate 使病毒液散布均於。作用一小時後加入覆蓋液(3% 洋菜膠 agarose 以 1:9 的比例混合不含胎牛血清、2 %trypsin 的 DMEM)每格 2 ml, 34°C、5% 恆溫培養箱培養, 72 小時後加入奈酚藍黑染色劑染色 12 小時, 以水柱沖掉覆蓋液並晾乾, 依稀釋倍數計數病毒效價以 pfu/ml (plaque forming unit/ml)表示。

2.2.6 細胞週期分析

病毒感染細胞一流式細胞儀 (Flow Cytometry Assay)

實驗步驟: 準備 A549 & HL-CZ 細胞 1×10^6 個/well, 將培養基置換為不含胎牛血清、0.5% trypsin 的 DMEM, 後加入 2 ul 20 ng/ml、1ul 200 ng/ul rhTRAIL (recombinant human TRAIL)以及感染 IAV (MOI= 1), 分別作用 24, 48 小時後, 將細胞以 trypsin 打下 (A549) 及磷酸鹽溶液 PBS (Phosphate buffer saline) 清洗離心 (1200rpm, 3 分鐘) 2 次, 去除多餘的 PBS。加入 2-3ml 70%酒精進行細胞固定, 放置在-20°C 冰箱存放。將細胞取出離心 1200rpm, 3 分鐘, 之後去除上清液, 再加入 1X PBS 將殘留的酒精洗淨, 再離心 1200rpm, 3 分鐘, 去除多餘上清液, 加入 propidium iodide (PI) 染劑 (25 μ l PI (1mg/ml), 0.5 μ l RNase (10mg/ml) 於 500 μ l PBS 中)視細胞數多寡而定。移至 Falcon 管, 37°C 避光靜置 30 分鐘後, 使用流式細胞儀測定結果。

原理: Propidium iodide (PI); 是一種螢光染劑, 可專一性的鍵結核酸

而廣泛應用於流式細胞儀的技術中，正常情況下的細胞細胞膜為持完整，使 PI 無法穿透細胞之細胞膜，故可以併入其他實驗 (如：可與 FITC 標記的 Annexin V、抗體) 共同偵測，凋亡細胞或細胞內特定蛋白的含量) 或其他染劑共同使用，評估細胞存活狀態。將細胞以酒精打洞固定後，PI 進入細胞內可與核酸鍵結，利用流式細胞儀 (Flow cytometry FACS) 偵測產生的螢光強弱，則可以反映細胞內 DNA 倍體的含量。

2.2.7 Annexin V-FITC & PI 染色

本實驗使用 Annexin V-FITC apoptosis detection kit I (BD)

實驗步驟：準備 A549 & HL-CZ 細胞 1×10^6 個/well，將培養基置換為不含胎牛血清、0.5% trypsin 的 DMEM，後加入 2 ul 20 ng/ml、1ul 200 ng/ul rhTRAIL (recombinant human TRAIL) 以及感染 IAV (MOI=1)，分別作用 24, 48 小時後，將細胞以 trypsin 打下 (A549) 及磷酸鹽溶液 PBS (Phosphate buffer saline) 清洗 (離心 1200rpm，5 分鐘) 2 次。去除多餘的 PBS，再用 1× Binding Buffer 緩衝液製成 1×10^6 cell/ml 的懸浮液。各取樣 100 ul 細胞懸浮液於 Falcon 式管中。加入適量體積的 Annexin V 與核酸染料：螢光標記 Annexin V-FITC 5 ul、PI 核酸染料 5ul。輕搖混勻，室溫下避光靜置作用 15 分鐘。各個試管中分別加入 1× Binding Buffer 緩衝液 400 ul。於一個小時

內，使用流式細胞儀測定結果。

原理：細胞凋亡早期細胞膜會發生改變，Phosphotidyl Serine (PS) 磷脂從細胞膜內轉移到細胞膜外，Annexin V 是一種 Ca^{++} 依賴的磷脂結合蛋白，具有 PS 專一結合的特性，可做為探針來檢測暴露再細胞膜表面的 PS。然而 PS 轉移到細胞膜外不是凋亡所獨特的，也可能發生在壞死的細胞上。

早期凋亡細胞對所有用於細胞活性鑑定的染料 (如 PI) 有抗染性，壞死細胞則不能。細胞膜損傷的細胞，其 DNA 可與 PI 結合而產生紅色螢光；而細胞膜保持完好的細胞則不會有紅色螢光產生。因此早期細胞凋亡細胞，並不會與 PI 作用，所以沒有紅色螢光序號產生；正常細胞與此相似。

2.2.8 活性氧化物測定(ROS)

實驗步驟：準備 A549 細胞 1×10^6 個/well，將培養基置換為不含胎牛血清、0.5% trypsin 的 DMEM，感染 IAV (PR8) MOI= 1 作用 24 小時後，每間隔 30 分鐘加入 1ul 200 ng/ul rhTRAIL (recombinant human TRAIL)，2 小時後，將各個時間點細胞以 trypsin 打下及磷酸鹽溶液 PBS (Phosphate buffer saline) 清洗 (離心 1200rpm，5 分鐘) 2 次。去除多餘的 PBS，加入 DCFH-DA 染劑 (1 μ l DCFH-DA (10 μ M) 於 500 μ l PBS 中) 視細胞數多寡而定。移至 Falcon 管，37 $^{\circ}$ C 避光反應

30 分鐘後，使用流式細胞儀測定結果。

原理：免疫細胞進行需氧性滅菌過程中，會在細胞內啟動一連串的氧化還原反應，而產生一些氧化代謝物 (Oxidative Metabolites)，如 H_2O_2 、 O_2^- 自由基。可藉由 DCFH-DA 染劑，滲透細胞膜特異性的追蹤評估 ROS 的生成量。DCFH-DA 會被細胞內的乙醯酯酶 (acetylcholinestases) 去乙醯化 (deacetylated) 成非螢光性的 DCFH，然而 DCFH 會在細胞內被 H_2O_2 氧化成具螢光性質的 DCF，並聚集在粒線體中，因此散發出的螢光則可反映出細胞內 H_2O_2 的含量

2.2.9 粒線體膜電位測定(MMP)

實驗步驟：準備 A549 細胞 1×10^6 個/well，將培養基置換為不含胎牛血清、0.5% trypsin 的 DMEM，後分別加入 2 ul 20 ng/ul、4 ul 20 ng/ul、6 ul 20ng/ul、1ul 200 ng/ul rhTRAIL (recombinant human TRAIL) 以及感染 IAV (PR8) MOI= 1，分別作用 24 小時後，將細胞以 trypsin 打下及磷酸鹽溶液 PBS (Phosphate buffer saline) 清洗離心 (1200rpm, 3 分鐘) 2 次，去除多餘的 PBS。加入 DioC6 染劑 (10 μ l DioC6 (400 μ M) 於 500 μ l PBS 中) 視細胞數多寡而定。移至 FACS 管，37 $^{\circ}$ C 避光反應 30 分鐘後，使用流式細胞儀測定結果。

原理：DioC6 (3,3'-Dihexyloxacarbocyanine iodide)，為綠色螢光 (green fluorescent) 之陽離子親脂性染劑 (cationic dye)；又稱為細胞膜電位探

針。可穿透細胞膜、專一性的結合並累積在細胞粒線體中，DioC6 在細胞內外的分佈可反應出細胞膜內外的電位差，藉由其螢光強度的改變就可顯示細胞膜電位改變的情形。在不需固定細胞或其他處理的情況下可以即時、快速的偵測活細胞內粒線體膜電位。粒線體功能不良 (mitochondria dysfunction) 通常伴隨在早期細胞凋亡時，因此細胞膜電位的改變也因此當作早期其凋亡偵測上的指標。

2.2.10 細胞 RNA 抽取(extraction of cell total RNA)

細胞 RNA 萃取實驗使用 PureLink™ Micro-to-Mini Kit Total RNA Purification System (Invitrogen)。

先準備 A549 細胞 1×10^6 個/well，將培養基置換為不含胎牛血清、0.5% trypsin 的 DMEM，後加入 1ul 200ng/ul rhTRAIL (recombinant human TRAIL) 以及感染 IAV (PR8) MOI=1，分別作用 0, 24, 48 小時後，將細胞以 trypsin 打下及磷酸鹽溶液 PBS (Phosphate buffer saline) 清洗三次，換為 1.5 ml 微量離心管，離心 2000 g；5 分鐘，去除上清液。各加入 0.3 ml 含 1% 2-Mercaptoethanol 的 RNA Lysis buffer (2-Mercaptoethanol : RNA Lysis solution = 1 : 100)，用空針 syring 數次後，離心 2600 g；5 分鐘取上清液，加入新的 1.5 ml 微量離心管中。加入與上清等體積的 70% ethanol 混合均勻，加入 spin cartridge 中 (spin cartridge 已經去 RNase 處理，拿取要在 flow 中進行)，離心

12000 g；2 分鐘去下層液。加入 Wash Buffer I 0.7 ml 離心 12000 g；2 分鐘去下層液 (重複兩次)，Wash Buffer II 0.5 ml 12000 g；2 分鐘去下層液 (重複兩次)。最後再離心 12000 g；2 分鐘，去除殘留的 Wash Buffer II。將 colum 換至新的微量離心管，加入 RNase-free Water 30 ul，靜置 5 分鐘後，離心 12000 g；2 分鐘。萃取出來的 RNA 先轉 cDNA，剩餘的 RNA 放置 -80°C 冰箱保存。

2.2.11 病毒 RNA 抽取(extraction of virus RNA)

病毒 RNA 萃取實驗使用 QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) 先準備 A549 & HL-CZ 細胞 1×10^6 個/well，將培養基置換為不含胎牛血清、0.5% trypsin 的 DMEM，後加入 1ul 200ng/ul rhTRAIL (recombinant human TRAIL) 以及感染 IAV (PR8) MOI= 1，分別作用 0, 24, 48, 72 小時後，各別收取病毒液保存 -80°C 冰箱保存。解凍保存於 -80°C 冰箱各個時間點 IAV (PR8) 病毒液，取 140 ul 病毒液加入含有 1% carrier RNA 的 AVL 560 ul，震盪 15 秒鐘；靜置室溫(15-25°C) 下 10 分鐘。加入 (96-100%) 酒精，震盪 15 秒鐘；靜置室溫(15-25°C) 下 15 分鐘。加入 spin cartridge 中 (spin cartridge 已經去 RNase 處理，拿取要在 flow 中進行)，離心 6000 g (8000 rpm)；3 分鐘去下層液。加入 AW1 solution 500 ul 離心 6000 g (8000 rpm)；3 分鐘去下層液，AW2 solution 500 ul 離心 6000 g (8000 rpm)；3 分鐘去下層液。

最後在離心 6000 g (8000 rpm)；3 分鐘，去除殘留的 AW2 solution。

將 colum 換至新的微量離心管，加入 AVE buffer 60 ul，靜置 5 分鐘

後，離心 6000 g (8000 rpm)；2 分鐘。萃取出來的 RNA 先轉 cDNA，

剩餘的 RNA 放置 -80°C 冰箱保存。

2.2.12 逆轉錄酶-聚合酶連鎖反應(RT-PCR)

逆轉錄酶-聚合酶連鎖反應(RT-PCR)實驗使用 Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen)

2.2.12.1 Virus RNA

解凍保存於 -80°C 冰箱的 IAV RNA，測量 OD₂₆₀ 值以定量 RNA，將

IAV RNA 的含量調整至 5ug，加入 RNase free water 將體基調整至 11

ul。在 PCR 反應器上，以 55°C 加熱 15 分鐘。加入 10mM dNTP 混

合液 1 ul 與 5mM IAV forward primer 1 ul，後放置 65 °C 作用 10 分

鐘。插入冰上，依序加入 5 倍的第一股反應緩衝液 (20mM Tris-HCl

ph= 7.5, 0.1mM EDTA, 0.01%(V/V)NP-40, 50%(V/V)glycerol 100mM

MgCl₂) 4 ul, 0.1 mM Dithiothreitol (DTT) 2 ul，放置 42 °C 中平衡溫度。

2 分鐘後加入 1 ul 的逆轉錄酶 **SS III RT** 200 U/ul，42 °C 中反應 80

分鐘進行第一股互補 DNA(cDNA)合成。

2.2.12.2 Cell total RNA

解凍保存於 -80°C 冰箱的細胞 RNA，測量 OD₂₆₀ 值以定量 RNA，將

細胞 RNA 的含量調整至 5ug，加入 RNase free water 將體基調整至 11

ul。在 PCR 反應器上，以 55°C 加熱 10 分鐘。加入 10mM dNTP 1 ul 與 Oligo dT primer (0.5 ug/ul) 1 ul，後放置 65 °C 作用 15 分鐘。插入冰上，依序加入 5 倍的第一股反應緩衝液 (20mM Tris-HCl ph= 7.5，0.1mM EDTA，0.01%(V/V)NP-40，50%(V/V)glycerol 100mM MgCl₂) 4 ul，0.1 mM Dithiothreitol (DTT) 2 ul，放置 42 °C 中平衡溫度。2 分鐘後加入 1 ul 的逆轉錄酵素 **SS III RT** 200 U/ul，42 °C 中反應 80 分鐘進行第一股互補 DNA (cDNA) 合成。

2.2.13 即時定量聚合酶連鎖反應(Real-time PCR)

即時定量聚合酶連鎖反應(realtime PCR)實驗使用 Smart Quant Green Master Mix with dUTP & ROX kit。

在 0.2 ml 微量離心管 (Optical tubes) 中加入 2 ul IAV 或 cell cDNA 作為反應模板 (template)，依序加 SQGM 12.5 ul，ddH₂O 8.5 ul，5mM forward & reverse primer 各 1 ul，總體積 25 ul，至於 ABI 7000 的反應槽中。先 50°C 作用 2 分鐘，以 95°C 作用 10 分鐘，在每個週期，95 °C；15 秒、55 °C；1 分鐘，40 個反應週期並偵測螢光數值。最後再加以計算 Ct 值，與複製倍數。

2.2.14 蛋白質之電泳分析 (SDS-PAGE)

本實驗所使用的電泳裝置為 Bio-Rad 蛋白質電泳槽。

待鑄膠裝置組合後，先加入分離膠體溶液 (separating gel)，再加入酒精將上層膠壓平，待凝固後倒掉酒精並擦拭乾後加入集膠溶液

(stacking gel)，插上齒膜，膠體凝固後置於電泳槽中，注入電泳緩衝液 (running buffer)。取蛋白質樣本溶液加入等量的 sample loading dye，混勻後在 110 °C 加熱五分鐘後，迅速置於冰上。於電泳槽注入樣本 10 ug，並注入控制組 10 μ l 為對照，先以 80V 30 分鐘進行電泳，待藍色染劑跑到分離膠體時，將電壓調整為 110V 50 分鐘繼續電泳，直到藍色染劑跑到膠體底部。

2.2.15 西方墨點法 (Western blot)

Bio-Rad 半乾式的電泳轉漬槽

待 SDS-PAGE 後，切除集膠體 (stacking gel) 部份，膠片浸在轉漬緩衝液 (Transfer buffer) 中。取轉印紙 NC paper (硝化纖維紙 nitrocellulose paper) 切成膠片大小 (6 cm \times 9 cm) 浸在轉漬緩衝液，先鋪上浸濕的濾紙 (extra thick Blot paper)，後鋪上濕潤的轉印紙，疊上膠片，再鋪上浸濕的濾紙 (extra thick Blot paper)。以 400 mA 轉印 30 分鐘。之後，進行 Blocking 將轉印紙放入 1x TBST 含 5% 脫脂牛奶，室溫搖盪一小時。倒掉牛奶，加入一抗 (1 : 1000 稀釋)，置於室溫搖擺一至二小時或放置 4°C 隔夜。一抗回收重覆使用，轉印紙以 1 x TBST 清洗七分鐘三次。再加入二抗 anti-Mouse or anti-Rabbit HRP (1 : 2000 稀

釋)，置於室溫搖擺一小時。回收二抗，轉印紙以 1 x TBST 清洗七分鐘三次。加入顯色劑 (chemiluminescent HRP substrate, Millipore)，反應壓片呈色。晾乾後保存。

Bio-Rad 溼式的電泳轉漬槽

待 SDS-PAGE 後，切除集膠體 (stacking gel) 部份，膠片浸在含有 20 % 甲醇轉漬緩衝液 (Transfer buffer) 中。取轉印紙 NC paper (硝化纖維紙 nitrocellulose paper) 切成膠片大小 (6 cm×9 cm) 浸在轉漬緩衝液，先鋪上浸濕的濾紙，後鋪上濕潤的轉印紙，疊上膠片，再鋪上浸濕的濾紙。以 400 mA、90 伏特，轉印 60 分鐘。之後，進行 Blocking 將轉印紙放入 1x TBST 含 5% 脫脂牛奶，室溫搖盪一小時。倒掉牛奶，加入一抗 (1:1000 稀釋)，置於室溫搖擺一至二小時或放置 4°C 隔夜。一抗回收重覆使用，轉印紙以 1 x TBST 清洗七分鐘三次。再加入二抗 anti-Mouse or anti-Rabbit HRP (1:2000 稀釋)，置於室溫搖擺一小時。回收二抗，轉印紙以 1 x TBST 清洗七分鐘三次。加入顯色劑 (chemiluminescent HRP substrate, Millipore)，反應壓片呈色。晾乾後保存。

第三章、結果

3.1 TRAIL 誘導 A 型流感病毒感染之 A549 及 HL-CZ 細胞凋亡

3.1.1 rhTRAIL 蛋白對 A 型流感病毒感染之 A549 細胞及 HL-CZ 細胞型態上的影響

經感染及未感染 A 型流感病毒之 A549 及 HL-CZ 細胞，分別予以不同濃度 (20 ng/ml、100 ng/ml) 之人類重組 TRAIL 蛋白處理，作用 24 及 48 小時後，以倒立式像位差顯微鏡觀察型態上的變化。(圖 1) A 型流感病毒及 rhTRAIL 均會誘發 A549 細胞凋亡型態，當我們單獨給予細胞 rhTRAIL 或只感染 A 型流感病毒時，當病毒或蛋白作用的 24 小時後，我們可以觀察到少數、輕微凋亡的細胞型態產生 (細胞變圓、皺縮)。經 48 小時後，多數細胞皺縮，甚至有凋亡小體、漂浮的細胞殘骸產生。然而同時給予 rhTRAIL 及感染 A 型流感的細胞，作用 24 小時便可以觀察到細胞凋亡的型態產生，隨著予以的 rhTRAIL 濃度的增加，凋亡的現象會更明顯。作用 48 小時後，細胞明顯皺縮、空泡化，凋亡小體出現頻率增加，多數細胞已成漂浮的死細胞、細胞破裂的殘骸碎片。根據細胞型態上的觀察，(圖 6) HL-CZ 細胞對 rhTRAIL 誘發的凋亡現象並不敏感，剛我們僅給予 HL-CZ 細胞 rhTRAIL 時，隨著濃度的增加、作用時間的拉長，予以蛋白的細胞和

作為控制組的 Mock 細胞並無太大的差異。同樣的，當我們給予 HL-CZ 細胞 rhTRAIL 及感染 A 型流感，作用 24 小時便可以觀察到細胞凋亡的型態產生，隨著予以的 rhTRAIL 濃度的增加，凋亡的現象會更明顯。作用 48 小時後，細胞明顯皺縮、空泡化，凋亡小體出現頻率增加，多數細胞已成漂浮的死細胞、細胞破裂的殘骸碎片。綜合以上的結果，rhTRAIL 會加速促使 A 型流感病毒感染的細胞形成凋亡的形態。

3.1.2 利用流式細胞儀分析，rhTRAIL 蛋白對 A 型流感病毒感染之 A549 細胞及 HL-CZ 細胞細胞周期之影響，誘導凋亡的程度

分別給予經感染及未感染 A 型流感病毒之 A549 及 HL-CZ 細胞不同濃度(20 ng/ml、100 ng/ml)的 rhTRAIL 於 24、48 小時後，觀察 A549 及 HL-CZ 細胞週期知變化、週期分佈的情形。細胞週期分佈的情形，細胞週期所佔每一個時期比例以百分比顯示。

結果顯示，(圖 2、圖 3) 當 A 型流感病毒感染 A549 細胞 48 小時後，均會造成細胞週期的 G2 期比例下降，S 期的細胞分佈比例上升，形成細胞停滯在 S 期 (S phase arrest)。當予以不同濃度 rhTRAIL 48 小時後，在 A549 細胞此現象有更加明顯的趨勢，rhTRAIL 促使 A 型流感病毒感染之 A549 細胞 G2 phase 下降比例增加，而細胞停滯在 S 期比例上升。(圖 7、圖 8)然而在 HL-CZ 細胞，其 S 期停滯的變化之差

異則較為緩和，rhTRAIL 促使 A 型流感病毒感染之 HL-CZ 細胞 G2 phase 下降比例增加，而細胞停滯在 S 期 (S phase arrest) 分佈上升。而 Sub G1 期分佈的情形：隨著予以 rhTRAIL 蛋白的濃度增加、作用的時間拉長，Sub G1 期的細胞分佈的比例亦有逐波而上的趨勢，當我們給予正常細胞或 A 型流感病毒感染細胞不同濃度 rhTRAIL 蛋白，(圖 3) 可發現予以重組蛋白 TRAIL 濃度較高的細胞，其 Sub G1 比例大於濃度較低者；經 A 型流感病毒感染者會大於正常細胞。然而 rhTRAIL 造成此差異的現象，由結果可發現，其中(圖 8) HL-CZ 細胞又相較於 A549 細胞的變化緩和。由以上的結果顯示，rhTRAIL 會促使 A 型流感病毒感染的細胞週期停滯在 S 期 (S phase arrest)，促使凋亡細胞 (sub G1) 比例的增加。

3.1.3 利用 Annexin V-FITC 特異性染色檢測，rhTRAIL 蛋白 對 A 型流感病毒感染之 A549 細胞及 HL-CZ 細胞凋亡分析

分別給予經感染及未感染 A 型流感病毒之 A549 及 HL-CZ 細胞不同濃度(20 ng/ml、100 ng/ml)的 rhTRAIL 於 24、48 小時後，以 AnnexinV 特異性染色，觀察 A549 及 HL-CZ 細胞其正常細胞、凋亡細胞、壞死細胞分佈的情形。細胞分佈的情形，細胞分佈所佔每一個象限比例以百分比顯示。結果顯示，(圖 4)受感染的 A549 細胞，隨著予以 rhTRAIL 蛋白的濃度增加、作用的時間拉長，第二 (壞死細胞或

凋亡晚期細胞) 及第四項限 (凋亡細胞) 的細胞分佈的比例有上升的趨勢，當我們給予正常或 A 型流感病毒感染細胞不同濃度 rhTRAIL 蛋白，(由圖 5)可發現予以 rhTRAIL 濃度較高的細胞，其凋亡細胞的比例大於濃度較低者；經 A 型流感病毒感染者會大於正常細胞，呼應細胞週期 Sub G1 的結果。然而(圖 9、圖 10) HL-CZ 細胞相較於 A549 細胞，受到 rhTRAIL 的影響較為緩和。以上結果呼應細胞週期 Sub G1 的結果，rhTRAIL 會促使 A 型流感病毒感染的細胞凋亡比例的增加。

3.2 TRAIL 促使 A 型流感病毒感染 A549 細胞之細胞凋亡分子機制

3.2.1 rhTRAIL 蛋白對 A 型流感病毒感染之 A549 及 HL-CZ 細胞活性氧化物(ROS)產之影響

為了比較，rhTRAIL 對 A 型流感病毒感染之 A549 細胞加速誘導細胞凋亡，是否和 ROS 產生有關。將感染 A 型流感病毒之 A549 及 HL-CZ 細胞，依不同時間點 (0 min、30 mins、60 mins、90 mins、120 mins) 分別給予 rhTRAIL 100 ng/ml，經 DCF-DA 特異性染色，觀察 ROS 生成的情形。(圖 11) 實驗結果，隨作用的時間增加，A 型流感病毒感染之 A549 ROS 有上升的趨勢，在第 90 分鐘達到最高峰，隨之而逐漸下降。結果顯示，rhTRAIL 加速引發 A 型流感感染之細胞凋亡訊息的啟動路徑，和 ROS 的產生有關。

3.2.2 rhTRAIL 蛋白對 A 型流感病毒感染之 A549 及 HL-CZ 細胞粒線體膜電位(MMP)之影響

分別給予感染 A 型流感病毒之 A549 及 HL-CZ 細胞不同濃度(0 ng/ml、20 ng/ml、40 ng/ml、60 ng/ml、100 ng/ml)的 rhTRAIL，作用 24 小時後，經 DiOC6 特異性染色，觀察膜電位變化的情形。若粒線體膜電位降低，則 DiOC6 染劑結合較少，由此來檢測 A 型流感病毒感染之 A549 細胞粒線體膜電位是否會因 rhTRAIL 的作用後產生變化，進而加速誘導細胞凋亡作用的發生。(圖 12) 結果顯示，當給以 A 型病毒感染之 A549 細胞不同濃度 rhTRAIL 蛋白，作用 24 小時後，可發現隨濃度增加，A 型病毒感染之 A549 細胞粒線體膜電位逐漸下降。結果顯示，rhTRAIL 會加速引發 A 型流感感染之細胞凋亡訊息的啟動，導致膜電位的下降。

3.2.3 利用即時定量聚合酶連鎖反應分析 rhTRAIL 蛋白對 A 型流感病毒感染之 A549 細胞之凋亡機制基因表現的影響

為了觀察，rhTRAIL 是否會影響 A 型流感病毒凋亡機制相關基因的表現。A 型流感病毒感染之 A549 細胞，給予 100 ng/ml rhTRAIL，分別作用 24 及 48 小時後，抽取細胞 total RNA，以 Real-time PCR 觀察凋亡相關基因表現的影響。(圖 14)為 ΔCt 值 = 目標值(target) - Ct GAPDH；(圖 15)為 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = 2^{-(\Delta\text{Ct}_{24\text{h}, 48\text{h}} - \text{Ct}_{0\text{h}})}$ ，24 及 48 小時測量數值

扣除 0 小時測量數值。實驗結果，經病毒感染之細胞在 rhTRAIL 作用 48 小時後，相較於僅有病毒感染之細胞，可發現凋亡相關的基因 AIF、caspase 3、caspase 8、caspase 9、Endo G，基因表現，mRNA 的表現量上升。結果顯示，rhTRAIL 促進 A 型流感病毒感染之 A549 細胞凋亡路徑基因的表現，選擇性加速被感染之細胞走向凋亡的途徑。

3.2.4 rhTRAIL 蛋白對 A 型流感病毒感染的 A549 細胞之凋亡蛋白表現的影響

觀察 rhTRAIL 是否會影響 A 型流感病毒凋亡機制相關蛋白的表現。A 型流感病毒感染之 A549 細胞，給予 100 ng/ml rhTRAIL，分別作用 24 及 48 小時後以 trypsin 使細胞懸浮後，以 1200 rpm 離心 3 分鐘，將沉澱的細胞加入 lysis buffer，再以西方墨點法檢測蛋白的表現。(圖 16)實驗結果，經 A 型流感病毒感染之細胞在 rhTRAIL 作用 48 小時後，可發現凋亡相關的蛋白 caspase 3、caspase 8、caspase 9 表現量上升。結果顯示呼應即時定量聚合酶連鎖反應的結果，rhTRAIL 促進 A 型流感病毒感染之 A549 細胞凋亡路徑蛋白表現，選擇性加速被感染之細胞走向凋亡的途徑。

3.3 TRAIL 引發 A 型流感病毒感染 A549 細胞凋亡反應，對 A 型流感病毒複製的影響

3.3.1 利用即時定量聚合酶連鎖反應觀察，rhTRAIL 蛋白的作用對 A 型流感病毒複製的影響(細胞外病毒顆粒)

rhTRAIL 引發 A 型流感病毒感染之細胞，加速走向細胞凋亡機制，是否會對於 A 型流感病毒的複製造成影響。A 型流感病毒感染之 A549 細胞，給予 100 ng/ml rhTRAIL，分別收集 24、48、72 小時後細胞培養液，抽取病毒 RNA，以 Real-time PCR 測量 A 型流感病毒 Matrix (M) 蛋白核糖核酸(RNA)的表現量。(圖 17)實驗結果，A549 細胞的確可以幫助 A 型流感病毒的複製，隨著時間點的增加 12、24、48 小時，A 型流感病毒 Matrix mRNA Ct 值逐漸下降，表示 Matrix mRNA 表現量上升，病毒顆粒增加。而當給以 A 型流感病毒感染之 A549 細胞 TRAIL 蛋白，其中 12 至 24 小時數據顯示，TRAIL 蛋白加速 A 型流感病毒的複製，48 小時後，可發現 Matrix mRNA Ct 值上升，Matrix mRNA 表現量下降，病毒複製被抑制。rhTRAIL，加速 A 型流感感染之細胞走向凋亡途徑，且抑制 A 型流感病毒在宿主細胞內複製。

3.3.2 利用病毒蝕斑觀察，rhTRAIL 蛋白的作用對 A 型流感病毒複製的影響(細胞外病毒顆粒)

rhTRAIL 引發 A 型流感病毒感染之細胞，加速走向細胞凋亡機制，是否會對於 A 型流感病毒的複製造成影響。A 型流感病毒感染

之 A549 細胞，給予 100 ng/ml TRAIL，分別收集 0、12、24、48 小時後細胞培養液，序列稀釋後感染 MDCK 細胞，48 小時後計數產生的病毒蝕斑，依序列稀釋倍數計算病毒效價。(圖 18)結果顯示，A 型流感病毒經由 12 至 24 小時的潛伏期後，在 24 至 48 小時釋放至細胞外。而當我們病毒感染同時給以 TRAIL 蛋白作用，可觀察到病毒顆粒的釋放由原本的 24 至 48 小時，提早到 12 至 24 小時，其釋放病毒顆粒的幅度隨著給予 TRAIL 蛋白濃度的提高而增加。然而，24 至 48 小時抑制病毒複製的能力，亦隨著給予 TRAIL 蛋白濃度的提高而增加。

3.3.3 利用即時定量聚合酶連鎖反應及西方墨點法觀察，rhTRAIL 蛋白對於 A 型流感病毒蛋白在細胞內複製的影響(細胞內病毒顆粒)

rhTRAIL 引發 A 型流感病毒感染之細胞，加速走向細胞凋亡機制，是否對於細胞內 A 型流感病毒蛋白的複製造成影響。A 型流感病毒感染之 A549 細胞，給予 100 ng/ml rhTRAIL，分別收集 24、48 小時後的細胞，抽取細胞內 total RNA 及蛋白，以 Real-time PCR 及 Western blot 測量 A 型 Nucleoprotein (NP) 蛋白及核糖核酸(RNA)的表現量。(圖 19)結果顯示病毒感染細胞後，病毒蛋白 NP mRNA 在細胞內表現隨時間 24、48 小時增加。然而，當我們病毒感染同時給予 TRAIL 蛋白作用，可觀察到病毒蛋白 NP mRNA，在 24 小時表現量

高於僅有病毒感染之細胞，但是 48 小時的表現量卻低於僅有病毒感染之細胞。TRAIL 的作用前期，可幫助細胞內病毒蛋白基因的表現，由於促使受病毒感染細胞凋亡，使細胞內病毒蛋白的表現受阻。

3.4 環孢靈素(Cyclosporine A)與 TRAIL 作用，對 A 型流感病毒感染之 A549 細胞凋亡反應及 A 型流感病毒複製的影響。

3.4.1 利用流式細胞儀分析，Cyclosporin A 及 rhTRAIL 的作用下，對 A 型流感病毒感染之 A549 細胞週期 Sub-G1 影響

將 A549 細胞培養至 6 well 中，於培養液中分別加入 IAV PR8 (m.o.i=0.2) 、100 ng/ml rhTRAIL(rhT)、Cyclosporin A(Cs A) 5uM，八組不同組合: (1) Mock(2) Cs A(3) rhT(4) Cs A+rhT(5) IAV(6) IAV+Cs A(7) IAV+rhT(8) IAV+Cs A+rhT，48 小時之後將細胞收下，經由 PI 染色處理後利用流式細胞儀分析細胞週期。(圖 20)Sub-G1 細胞分佈百分比，正常 A549 細胞：0.4%；Cs A 作用細胞：1.4%；rhT 作用的細胞：0.4%；rhT 及 Cs A：3.2%；IAV 感染的細胞：4.6%；IAV 及 Cs A：2.8%；IAV 及 rhT：8%；IAV、rhT、Cs A 三者作用細胞：16.4%。結果間接證明 Cyclosporin A 與 TRAIL 的作用下，更加速了受 A 型流感病毒感染之細胞，走向細胞凋亡途徑。

3.4.2 利用 Annexin V-FITC 特異性染色檢測，rhTRAIL 蛋白與

Cyclosporin A 作用，對 A 型流感病毒感染之 A549 細胞凋亡分析

將 A549 細胞培養至 6 well 中，於培養液中分別加入 IAV PR8 (m.o.i=0.2)、100 ng/ml rhTRAIL(rhT)、Cyclosporin A(Cs A) 5uM，八組不同組合: (1) Mock(2) Cs A(3) rhT(4) Cs A+rhT(5) IAV(6) IAV+Cs A(7) IAV+rhT(8) IAV+Cs A+rhT，48 小時之後將細胞收下，經由 Annexin V 及 PI 雙染色處理後利用流式細胞儀分析凋亡細胞的比例。(圖 21) 凋亡細胞分佈 Q4 百分比，正常 A549 細胞：2.7%；Cs A 作用細胞：2.2%；rhT 作用的細胞：1.8%；rhT 及 Cs A：10.8；IAV 感染的細胞：3.7%；IAV 及 Cs A：3.6%；IAV 及 rhT：8.8%；IAV、rhT、Cs A 三者作用細胞：24.6%。結果直接證明 Cyclosporin A 與 TRAIL 的作用下，更加速了受 A 型流感病毒感染之細胞，走向細胞凋亡途徑。

3.4.3 利用即時定量聚合酶連鎖反應觀察，rhTRAIL 蛋白與

Cyclosporin 的作用對 A 型流感病毒複製的影響(細胞外病毒顆粒)

將 A549 細胞培養至 6 well 中，於培養液中分別加入 IAV PR8 (m.o.i=0.2)、100 ng/ml rhTRAIL(rhT)、Cyclosporin A(Cs A) 5uM，八組不同組合: (1) Mock(2) Cs A(3) rhT(4) Cs A+rhT(5) IAV(6) IAV+Cs A(7) IAV+rhT(8) IAV+Cs A+rhT，12、24 及 48 小時後，收集各個時間點的細胞培養基，將上清液之病毒 RNA 抽出並轉 cDNA 後，利用 Real

time PCR 測量各個時間點 Ct 值(圖 22A)，觀察細胞外病毒顆粒的釋放，了解 IAV 複製的情形。(圖 22B)在 24 小時的結果顯示，當 Cyclosporin A 單獨與 A 型流感病毒感染之細胞作用，本身就可以抑制 A 型流感病毒的複製。若同時給予 A 型流感病毒感染細胞 TRAIL 蛋白及 Cyclosporin A，在 24 小時被 Cyclosporin A 抑制的病毒則有回升的趨勢，但是仍然低於 TRAIL 所促進病毒複製的病毒價數。48 小時結果，被 Cyclosporin A 抑制的病毒價數回升，同時給予 A 型流感病毒感染細胞 TRAIL 蛋白及 Cyclosporin A，病毒價數仍然低於 TRAIL 所促進病毒複製的病毒價數。



第四章、討論

A 型流感病毒的感染，引發宿主細胞免疫機制的啟動，一些免疫細胞如 Macrophage、plasmacytoid dendritic cell (pDC)、CD 8⁺ 及 CD 4⁺ T cell 會產生 TRAIL 蛋白，迫使遭受感染的細胞走向程序性的死亡途徑 (Apoptosis)，抑制病毒的複製生長，避免病情的擴散。本研究討論主要探討 TRAIL 蛋白使 A 型流感病毒感染細胞加速凋亡反應機制，以及 TRAIL 蛋白對 A 型流感病毒複製的影響情形。

4.1 rhTRAIL 對不同細胞株感受性的差異及誘導凋亡程度的不同

為了觀察 rhTRAIL 對 A 型流感病毒感染之細胞所引起的細胞凋亡，本實驗我們利用人類肺癌細胞 A549 及前單核球細胞 HL-CZ，將實驗後細胞以 PI 及 Annexin V 染色，利用流式細胞儀測量測量結果。發現，rhTRAIL 皆可促進 A 型流感病毒感染之 A549 及 HL-CZ 細胞凋亡，但是引起凋亡的程度有所差異。試圖比較 A549 及 HL-CZ 兩個不同細胞株，細胞週期 Sub-G1 的變化(圖 3、8)以及早期凋亡指標 Annexin V 細胞的百分比(圖 5、10)，可發現當 A 型流感病毒感染時，TRAIL 對於 A549 細胞的敏感性會大於 HL-CZ 細胞；易引起細胞凋亡反應。有文獻指出，人類器官組織中以肺臟、脾臟及前列腺，可以偵測到富含 TRAIL 蛋白的表現(Wiley, Schooley et al. 1995)^[2]，並且可

經由干擾素(interferon)的刺激下所誘發。TRAIL 可經由 autocrine (自我接收自我所分泌的激素)及 paracrine (接收由別的細胞所分泌之激素)的方式與接受器結合，引發細胞凋亡程式(Nagao, Nakajima et al. 1999)^[55]。另外，我們利用即時定量聚合酶連鎖反應，發現正常情況下 A549 細胞中 TRAIL 及 TRAIL 接受器 DR4、DR5 基因表現會比 HL-CZ 細胞來的活躍。接著我們以不同效價 A 型流感病毒，分別感染 A549 細胞及 HL-CZ 細胞，以西方墨點法分析細胞內 TRAIL 蛋白的表現量，可發現在 A549 細胞中 TRAIL 蛋白的表現量會大於 HL-CZ。以上種種的原因，可能是促使受病毒感染之 A549 細胞，對於 TRAIL 蛋白感受性大於受病毒感染之 HL-CZ 細胞。因此，我們利用 A549 細胞來探討往後的實驗。

4.2 rhTRAIL 蛋白的作用，使 A 型流感病毒感染細胞 mRNA DR5、Caspase 3、Caspase 8、Caspase 9 現量上升

之前所提到的，A 型流感病毒的感染，會誘導宿主細胞啟動免疫機制，使受感染之細胞走向凋亡途徑，其中 A 型流感所引發的凋亡途徑為 FADD/Caspase 8 signaling pathway。然而 A 型流感病毒以 MOI = 1 感染 A549 細胞，觀察期 48 小時凋亡相關蛋白 mRNA 的表現量，流感病毒尚未啟動免疫反應的凋亡機制。當我們給與病毒感染之細胞 TRAIL 蛋白 48 小時後，可以看到凋亡相關蛋白的 mRNA 表現量上

升，其中以 Caspase 3、Caspase 8 最為顯著(圖 15)，說明了 rhTRAIL 的作用，加速 A 型流感病毒感染之細胞走向凋亡途徑。A 型流感病毒感染之細胞，在 TRAIL 蛋白作用下亦會刺激，TRAIL receptor 1 (TRAIL-R1；DR4)及 TRAIL receptor 2 (TRAIL-R2；DR5) 的表現量上升(圖 13)。DR4 及 DR5 都屬於 TRAIL receptor 中的 Death receptor，DcR1、DcR2 屬於 decoy receptor，彼此屬於互相競爭抑制。當病毒感染及 TRAIL 蛋白的刺激下，Death receptor 表現量上升，使病毒感染細胞訊號加速走向凋亡途徑。

4.3 rhTRAIL 蛋白的作用對 A 型流感病毒複製的影響

rhTRAIL 的作用，促使 A 型流感病毒感染細胞加速走向細胞凋亡機制，抑制病毒的複製。然而在 TRAIL 蛋白對 A 型流感病毒複製影響的實驗中，反應初期 12、24 小時即時定量聚合酶連鎖反應及病毒蝕斑的結果，加入 TRAIL 蛋白反而是助益病毒的複製。先前文獻曾指出，凋亡蛋白 Caspase 3 的活化有利於流感病毒的複製(Wurzer, Planz et al. 2003)^[54]，當細胞受到 A 型流感感染時，會引發感染細胞凋亡反應，而其反應途徑為凋亡路徑中的外在路徑：FADD/Caspase 8 signaling pathway(Balachandran, Roberts et al. 2000)^[52]，已具有活性的 Caspase 8 會再活化其下游凋亡蛋白 Caspase 3。經活化 Caspase 3 會幫助 virus RNP complexe 的運輸，由細胞核到細胞質以合成病毒之蛋

白，有趣的是 TRAIL 蛋白誘導得凋亡反應亦屬於外在路徑 FADD/Caspase 8 signaling pathway，同樣會活化 Caspase 3 的活性。當作用持續至 48 小時，由先前細胞週期 Sub-G1 以及 Annexin V 染色結果推論，絕大部分的細胞可能都已走向凋亡的途徑，使病毒無宿主細胞賴以生存，因此抑制了 A 型流感病毒的複製。此外我們可由細胞內病毒核蛋白(NP) mRNA 及蛋白表現量的變化，得到相同的結果。

4.4 A 型流感病毒感染時 TRAIL 在免疫反應及致病機轉上的腳色

當病毒感染時，細胞會啟動免疫機制抵制病毒的入侵，其中最為人所探討的是第一型及第二型干擾素(Type I and type II interferon)，而干擾素的產生會誘發訊息傳遞下游的抗病毒蛋白表現，如 OAS、ISG15、PKR、TRAIL 等等。有許多文獻指出 TRAIL 蛋白，可經由大量 TRAIL 或 TRAIL 接受器 DR4、DR5 的表現，促使那些受病毒感染的細胞對 TRAIL 敏感性增加，企圖將病毒感染的細胞導向凋亡途徑，達到清除病毒的效果，如 HIV、CMV、HBV、HCV、RSV、EBV 等病毒，我們稱之為凋亡反應依賴型抗病毒機制 (Apoptosis-dependent mechanism)。然而當 A 型流感病毒感染，此時 TRAIL 所引發的凋亡反應，在抗病毒機制上卻出現不同發現。有文獻指出，當我們投以抗 TRAIL 單株抗體(Anti-TRAIL MAb)於 A 型流感病毒感染之老鼠，發現老鼠肺部病毒清除(virus clearance)的機制有

延滯的現象，間接性的說 TRAIL 在病毒感染的免疫機制中扮演重要的腳色(Ishikawa, Nakazawa et al. 2005)^[56]。又有文獻指出，A 型流感病毒會促進 NFkB 表現來誘導 TRAIL 及 Fas/FasL 蛋白的產生，並且藉由 TRAIL 蛋白所引發的凋亡機制清除感染的細胞，來抑制 A 型流感病毒的散佈，然而 A 型流感病毒反而卻利用這項機制來幫助其病毒的增殖(Wurzer, Planz et al. 2003)^[54]。因此我們很難去明確定義說，TRAIL 在抵抗病毒的免疫機制中扮演的腳色，究竟是助益的一方；抑或是有害的一方。

4.5 以環孢靈素(Cyclosporin A)及 TARAIL 蛋白共同作用，作為 A 型流感病毒新治療法

Cyclosporin A 為含有 11 個胺基酸之環型多肽類(cyclic peptide)。於早期被當作是有效的免疫抑制劑，可以延長動物之皮膚、心臟、腎臟、胰臟、骨髓、小腸及肺臟等同種異體移植之存活。而 Cyclophilin A 會與免疫抑制藥物 Cyclosporin A 形成複合物並結合至鈣調磷酸酶(calcineurin)而抑制鈣調磷酸酶之活性(Liu, Farmer et al. 1991)^[57]，進而阻斷 T 細胞活化，達到免疫抑制的目的。而近來研究發現，Cyclosporin A 結合至 Cyclophilins 上會抑制其 PPIase 之活性，更有文獻指出，Cyclosporin A 因能夠抑制 Cyclophilins 的活性，而能影響 HIV-1(Ptak, Gallay et al. 2008)^[58]以及 HCV 在宿主細胞內的複製，並且已應用至

HCV 的患者身上而得到療效 (Flisiak, Horban et al. 2008)^[59]。

在抗病毒治療臨床上，已經有人利用干擾素(Interferon α 2b)合併 Cyclosporin A(Cs A)使用，對於慢性 C 型肝炎的患者。可以有效的控病人體內 C 型肝炎病毒的效價，同時病毒感染造成的轉氨酶 (transaminase)異常，也回復到正常值範圍。本研究中我們使用 Cyclosporin A，觀察其對 A 型流感病毒的影響。利用 PI 及 Annexin V-PI 染色(圖 20、21)，發現在 TRAIL 及 Cyclosporin A 同時作用的情況下，更加速了 A 型流感病毒感染的細胞凋亡反應的啟動，相較於 TRAIL 單獨作用的情況下，我們推論 Cyclosporine A 與 TRAIL 具有協同作用的效果。另外，我們利用即時定量聚合酶連鎖反應(圖 23)，觀察其對病毒複製的影響，發現在 Cyclosporin A 單獨使用時，本身可以抑制病毒的複製，但效果僅止於作用初期(24 小時)，效果不彰。若 Cyclosporin A 與 TRAIL 合併使用，由 24 及 48 小時的實驗結果，發現 Cyclosporin A 對於 TRAIL 促進 A 型流感病毒增殖的現象具有抑制的作用。因此，何以上的論點及討論 4.4，我們期望 Cyclosporin A 與 TRAIL 合併使用的方法，對 A 型流感病毒的感染，可以提供一個新的治療方法。

第五章、結論

本篇研究首先確認當 A 型流感病毒感染時，受感染的細胞會對於 TRAIL 配體(Ligand)敏感性增加，加速啟動細胞凋亡反應、凋亡型態的產生。接著利用流式細胞儀、即時定量聚合酶連鎖反應及西方墨點法，得知 TRAIL 促進受 A 型流感病毒感染細胞凋亡反應分子機制，TRAIL 接受器 DR5、凋亡路徑蛋白 Caspase 3、8、9 基因及蛋白的表現量增加。實驗二的部份，利用即時定量聚合酶連鎖反應及病毒蝕斑的方法，發現不論是細胞外或細胞內，TRAIL 的作用對於 A 型流感病毒感染細胞具有抑制病毒複製生長的功能。最後，利用流式細胞儀及即時定量聚合酶連鎖反應，發現環孢靈素(Cyclosporine A)與人類重組蛋白 TRAIL 同時作用下，引起的高度選擇性細胞凋亡反應及抑制 A 型流感病毒複製成效更加，因此我們推論 Cyclosporine A 與 TRAIL 具有協同作用的效果，期望提供在 A 型流感病毒感染治療上一個新的思維。

參考文獻

1. Griffith, T.S. and D.H. Lynch, *TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms*. *Curr Opin Immunol*, 1998. **10**(5): p. 559-63.
2. Wiley, S.R., et al., *Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis*. *Immunity*, 1995. **3**(6): p. 673-82.
3. Pitti, R.M., et al., *Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(22): p. 12687-90.
4. Marsters, S.A., et al., *Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3*. *Curr Biol*, 1998. **8**(9): p. 525-8.
5. Lawrence, D., et al., *Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions*. *Nat Med*, 2001. **7**(4): p. 383-5.
6. Smyth, M.J., et al., *Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy*. *Immunity*, 2003. **18**(1): p. 1-6.
7. Wang, S. and W.S. El-Deiry, *TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors*. *Oncogene*, 2003. **22**(53): p. 8628-33.
8. Mitsiades, C.S., et al., *TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications*. *Blood*, 2001. **98**(3): p. 795-804.
9. Kruyt, F.A., *TRAIL and cancer therapy*. *Cancer Lett*, 2008. **263**(1): p. 14-25.
10. LeBlanc, H.N. and A. Ashkenazi, *Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors*. *Cell Death Differ*, 2003. **10**(1): p. 66-75.
11. Danial, N.N. and S.J. Korsmeyer, *Cell death: critical control points*. *Cell*, 2004. **116**(2): p. 205-19.
12. Jin, Z. and W.S. El-Deiry, *Overview of cell death signaling pathways*. *Cancer Biol Ther*, 2005. **4**(2): p. 139-63.
13. Deng, Y., Y. Lin, and X. Wu, *TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO*. *Genes Dev*, 2002. **16**(1): p. 33-45.
14. Ekert, P.G., et al., *DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed caspase 9*. *J Cell Biol*, 2001. **152**(3): p. 483-90.
15. Hilleman, M.R., *Realities and enigmas of human viral influenza:*

- pathogenesis, epidemiology and control. Vaccine, 2002. 20(25-26): p. 3068-87.*
16. Shinya, K., *Host adaptation mechanisms of Influenza A viruses.* Uirusu, 2008. **58**(1): p. 69-72.
 17. Horimoto, T. and Y. Kawaoka, *Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents.* Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(8): p. 591-600.
 18. Josset, L., E. Frobert, and M. Rosa-Calatrava, *Influenza A replication and host nuclear compartments: many changes and many questions.* J Clin Virol, 2008. **43**(4): p. 381-90.
 19. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.* Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
 20. Brown, D.G., X.M. Sun, and G.M. Cohen, *Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation.* J Biol Chem, 1993. **268**(5): p. 3037-9.
 21. Samali, A., A.M. Gorman, and T.G. Cotter, *Apoptosis -- the story so far.* Experientia, 1996. **52**(10-11): p. 933-41.
 22. Kroemer, G., B. Dallaporta, and M. Resche-Rigon, *The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis.* Annu Rev Physiol, 1998. **60**: p. 619-42.
 23. Vaux, D.L. and A. Strasser, *The molecular biology of apoptosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(6): p. 2239-44.
 24. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death.* Toxicol Pathol, 2007. **35**(4): p. 495-516.
 25. Igney, F.H. and P.H. Krammer, *Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(4): p. 277-88.
 26. Kumar, S. and N.L. Harvey, *Role of multiple cellular proteases in the execution of programmed cell death.* FEBS Lett, 1995. **375**(3): p. 169-73.
 27. Green, D.R. and J.C. Reed, *Mitochondria and apoptosis.* Science, 1998. **281**(5381): p. 1309-12.
 28. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, *Death receptors: signaling and modulation.* Science, 1998. **281**(5381): p. 1305-8.
 29. Thornberry, N.A. and Y. Lazebnik, *Caspases: enemies within.* Science, 1998. **281**(5381): p. 1312-6.
 30. Tewari, M., et al., *Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of*

- CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase.* Cell, 1995. **81**(5): p. 801-9.
31. Chowdhury, I., B. Tharakan, and G.K. Bhat, *Caspases - an update.* Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2008. **151**(1): p. 10-27.
 32. Earnshaw, W.C., L.M. Martins, and S.H. Kaufmann, *Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis.* Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 383-424.
 33. Liu, M. and V.N. Vakharia, *Nonstructural protein of infectious bursal disease virus inhibits apoptosis at the early stage of virus infection.* J Virol, 2006. **80**(7): p. 3369-77.
 34. Hu, Y., et al., *Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis.* EMBO J, 1999. **18**(13): p. 3586-95.
 35. Li, P., et al., *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade.* Cell, 1997. **91**(4): p. 479-89.
 36. Saleh, A., et al., *Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation.* J Biol Chem, 1999. **274**(25): p. 17941-5.
 37. Gething, M.J. and J. Sambrook, *Protein folding in the cell.* Nature, 1992. **355**(6355): p. 33-45.
 38. Pahl, H.L. and P.A. Baeuerle, *A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappa B.* EMBO J, 1995. **14**(11): p. 2580-8.
 39. Momoi, T., *Caspases involved in ER stress-mediated cell death.* J Chem Neuroanat, 2004. **28**(1-2): p. 101-5.
 40. Egger, L., et al., *Endoplasmic reticulum stress-induced cell death mediated by the proteasome.* Cell Death Differ, 2007. **14**(6): p. 1172-80.
 41. Urano, F., et al., *Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1.* Science, 2000. **287**(5453): p. 664-6.
 42. Pahl, M.V., et al., *Effects of low density lipoprotein on cytosolic [Ca⁺⁺] in cultured rat mesangial cells.* J Investig Med, 1996. **44**(9): p. 556-60.

43. Braakman, I., et al., *Folding of influenza hemagglutinin in the endoplasmic reticulum*. J Cell Biol, 1991. **114**(3): p. 401-11.
44. Meyer, M., et al., *Hepatitis B virus transactivator MHBst: activation of NF-kappa B, selective inhibition by antioxidants and integral membrane localization*. EMBO J, 1992. **11**(8): p. 2991-3001.
45. Harrington, E.A., et al., *c-Myc-induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines*. EMBO J, 1994. **13**(14): p. 3286-95.
46. Eick, D. and H. Hermeking, *Viruses as pacemakers in the evolution of defence mechanisms against cancer*. Trends Genet, 1996. **12**(1): p. 4-6.
47. Hong, J.R. and J.L. Wu, *Induction of apoptotic death in cells via Bad gene expression by infectious pancreatic necrosis virus infection*. Cell Death Differ, 2002. **9**(2): p. 113-24.
48. Roulston, A., R.C. Marcellus, and P.E. Branton, *Viruses and apoptosis*. Annu Rev Microbiol, 1999. **53**: p. 577-628.
49. Starzl, T.E., et al., *Excisional treatment of cavernous hemangioma of the liver*. Ann Surg, 1980. **192**(1): p. 25-7.
50. Watashi, K., et al., *Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes*. Hepatology, 2003. **38**(5): p. 1282-8.
51. Razvi, E.S. and R.M. Welsh, *Apoptosis in viral infections*. Adv Virus Res, 1995. **45**: p. 1-60.
52. Balachandran, S., et al., *Alpha/beta interferons potentiate virus-induced apoptosis through activation of the FADD/Caspase-8 death signaling pathway*. J Virol, 2000. **74**(3): p. 1513-23.
53. Brincks, E.L., et al., *Influenza-induced expression of functional tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand on human peripheral blood mononuclear cells*. Hum Immunol, 2008. **69**(10): p. 634-46.
54. Wurzer, W.J., et al., *Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation*. EMBO J, 2003. **22**(11): p. 2717-28.
55. Nagao, M., et al., *The alteration of Fas receptor and ligand system in hepatocellular carcinomas: how do hepatoma cells escape from the host immune surveillance in vivo?* Hepatology, 1999. **30**(2): p. 413-21.
56. Ishikawa, E., et al., *Role of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune response to influenza virus*

- infection in mice. J Virol, 2005. 79(12): p. 7658-63.*
57. Liu, J., et al., *Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. Cell, 1991. 66(4): p. 807-15.*
58. Ptak, R.G., et al., *Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human cells by Debio-025, a novel cyclophilin binding agent. Antimicrob Agents Chemother, 2008. 52(4): p. 1302-17.*
59. Flisiak, R., et al., *The cyclophilin inhibitor Debio-025 shows potent anti-hepatitis C effect in patients coinfecting with hepatitis C and human immunodeficiency virus. Hepatology, 2008. 47(3): p. 817-26.*



圖

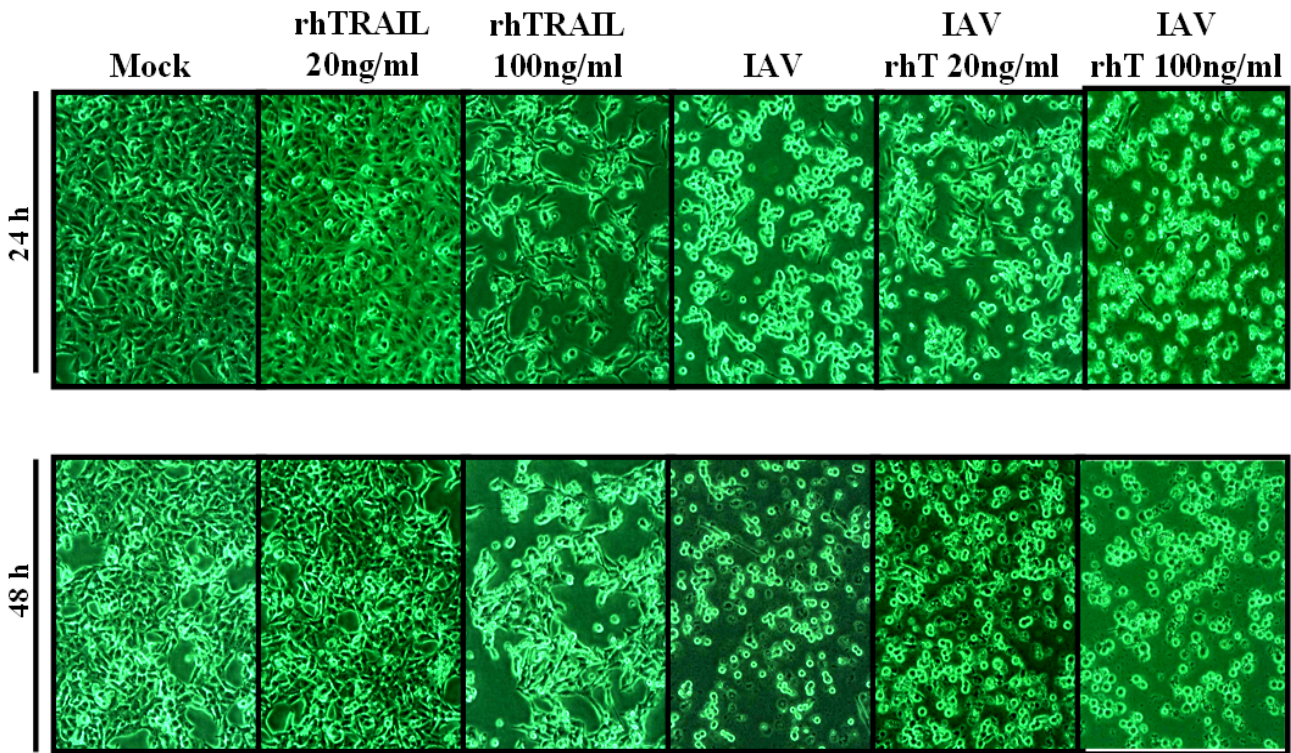


圖 1. IAV 及 rhTRAIL(rhT)作用下 A549 細胞型態改變

A549 細胞感染 IAV(PR8; H1N1), MOI = 1 及 rhTRAIL(rhT) 濃度 20 ng/ml, 100 ng/ml 作用下，24 及 48 小時後，細胞凋亡形態由顯微鏡觀察及照相。

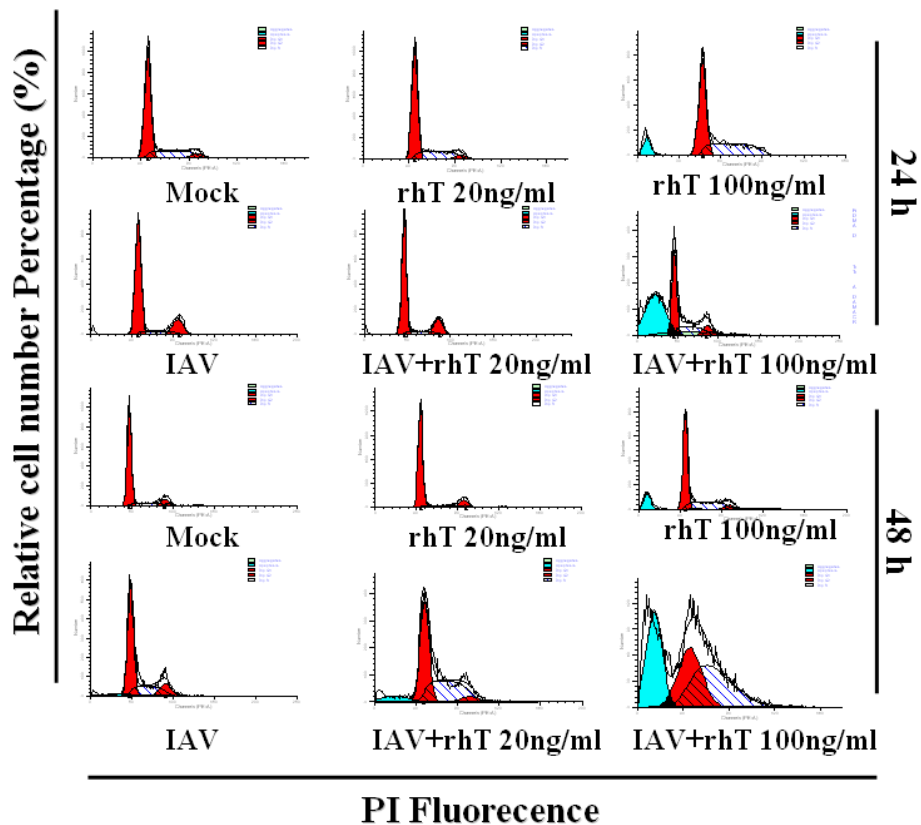


圖 2. IAV 及 rhTRAIL(rhT)作用下 A549 細胞之細胞週期分析

將 A549 細胞培養至 6 well 中，於培養液中分別加入 IAV PR8 (m.o.i=1)、20 ng/ml 及 100 ng/ml rhTRAIL(rhT)，六組不同組合: (1) Mock(2) 20 ng/ml rhT(3) 100 ng/ml rhT(4) IAV(5) IAV+20 ng/ml rhT(6) IAV+100 ng/ml rhT，24 及 48 小時之後將細胞收下，經由 PI 染色處理後利用流式細胞儀分析細胞週期。數據由 Modfit 軟體分析。

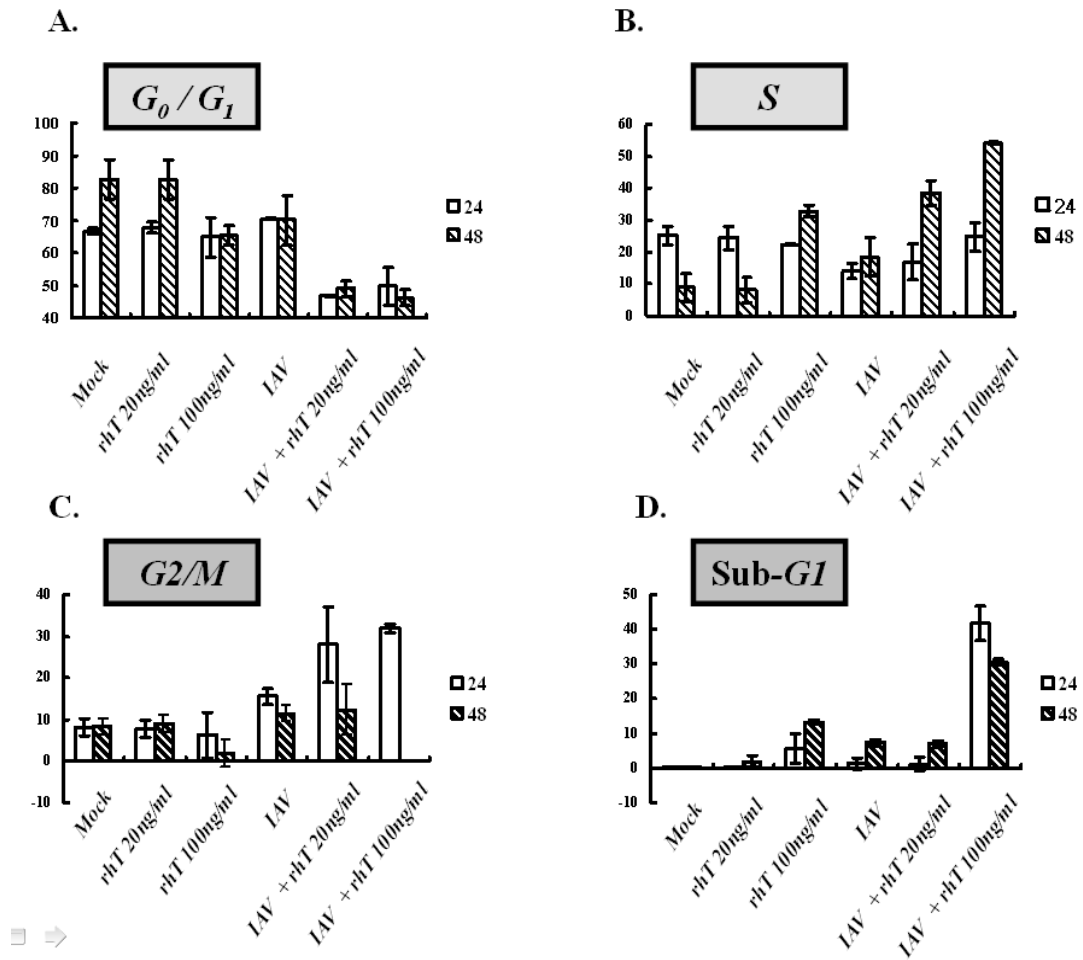


圖 3. A549 細胞各週期比例分析統計

將(圖 2)經由 Modfit 軟體比對分析, G_0/G_1 (圖 3A), S (圖 3B), G_2/M (圖 3C), $Sub-G_1$ (圖 3D)各細胞週期比例數據以柱狀圖統計表示。

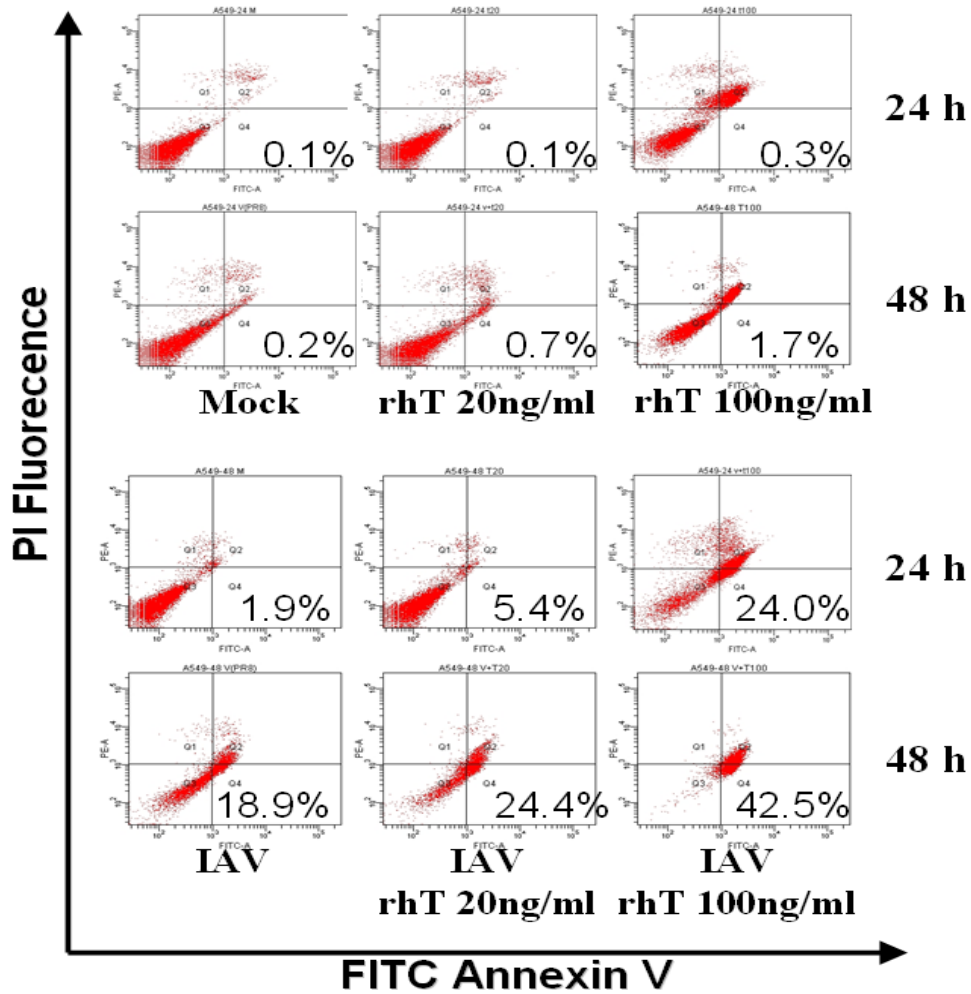


圖 4. IAV 及 rhTRAIL(rhT)作用下 A549 細胞之 Annexin V 凋亡細胞特異性染色

將 A549 細胞培養至 6 well 中，於培養液中分別加入 IAV PR8 (m.o.i=1)、20 ng/ml 及 100 ng/ml rhTRAIL(rhT)，六組不同組合: (1) Mock(2) 20 ng/ml rhT(3) 100 ng/ml rhT(4) IAV(5) IAV+20 ng/ml rhT(6) IAV+100 ng/ml rhT，24 及 48 小時之後將細胞收下，經由 Annexin V 及 PI 雙染色處理後利用流式細胞儀分析凋亡細胞的比例，第四象限 (Q4)分佈細胞屬於凋亡細胞。

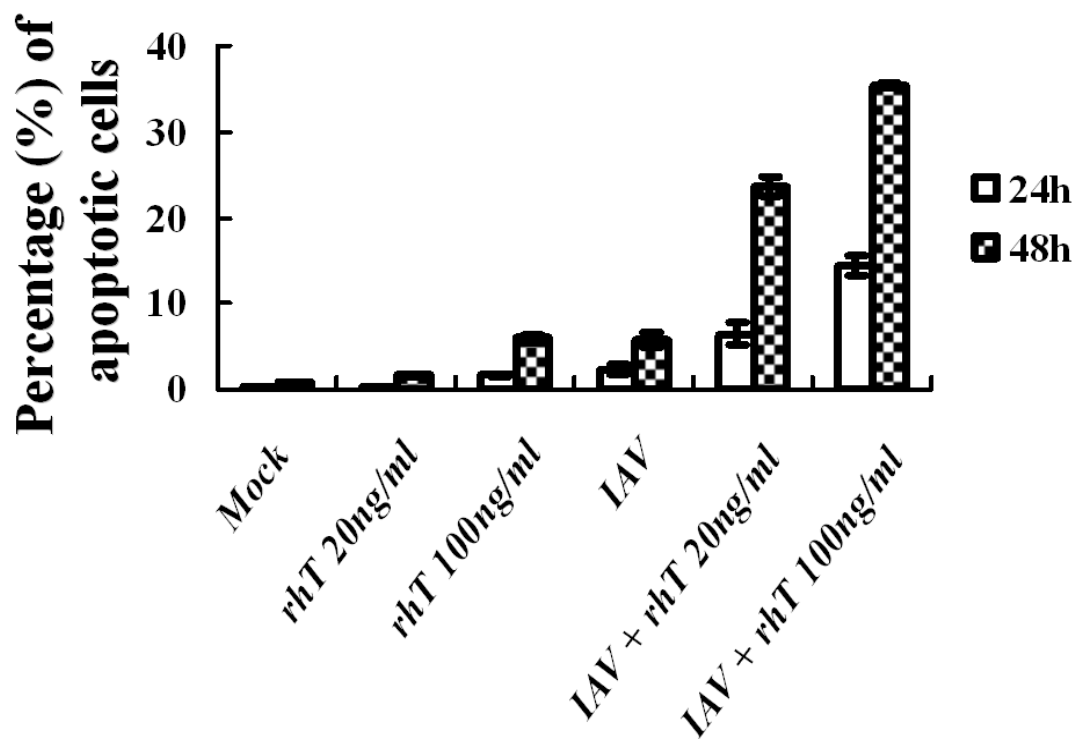


圖 5. A549 凋亡細胞比例分析

將(圖 4)第四象限(Q4)，屬於細胞凋亡比例之細胞數據，以柱狀圖統計表示。

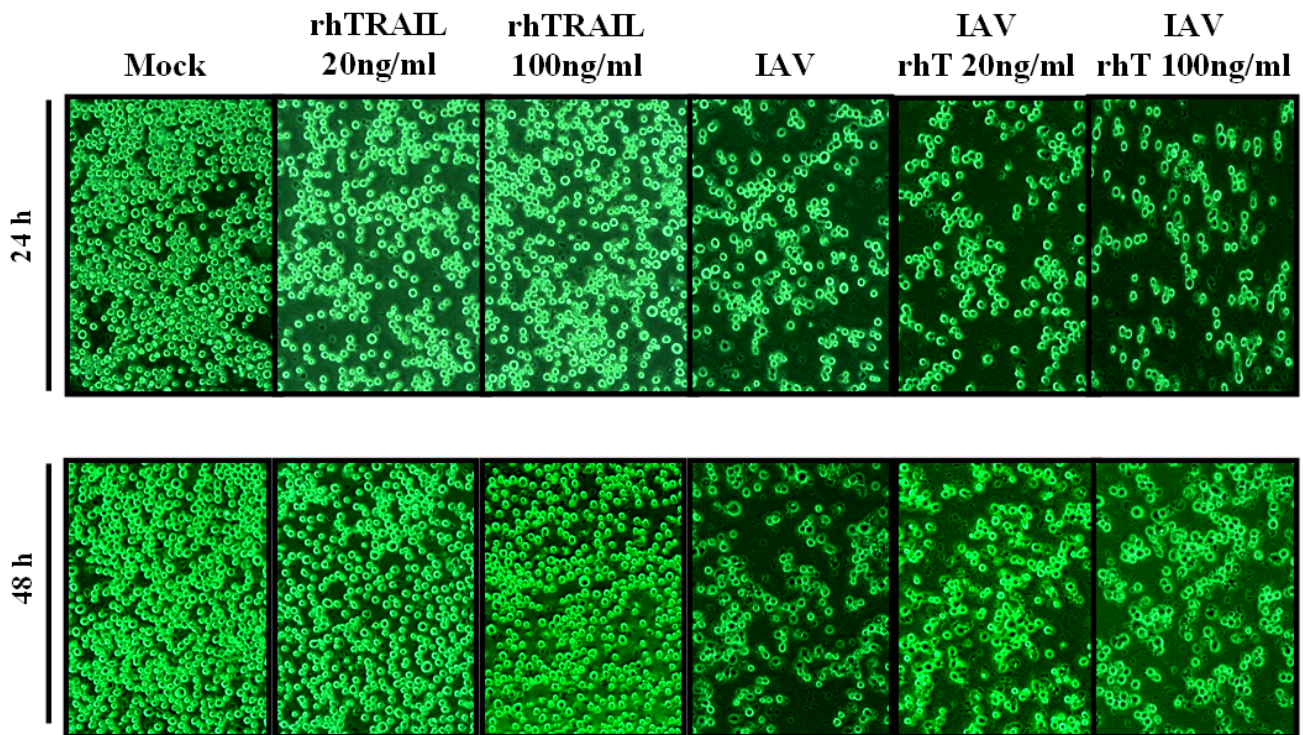


圖 6. IAV 及 rhTRAIL(rhT)作用下 HL-CZ 細胞型態改變

HL-CZ 細胞感染 IAV(PR8;H1N1), MOI = 1 及 rhTRAIL(rhT) 濃度

20ng/ml, 100ng/ml 作用下，24 及 48 小時後，細胞凋亡形態由顯微鏡

觀察及照相。

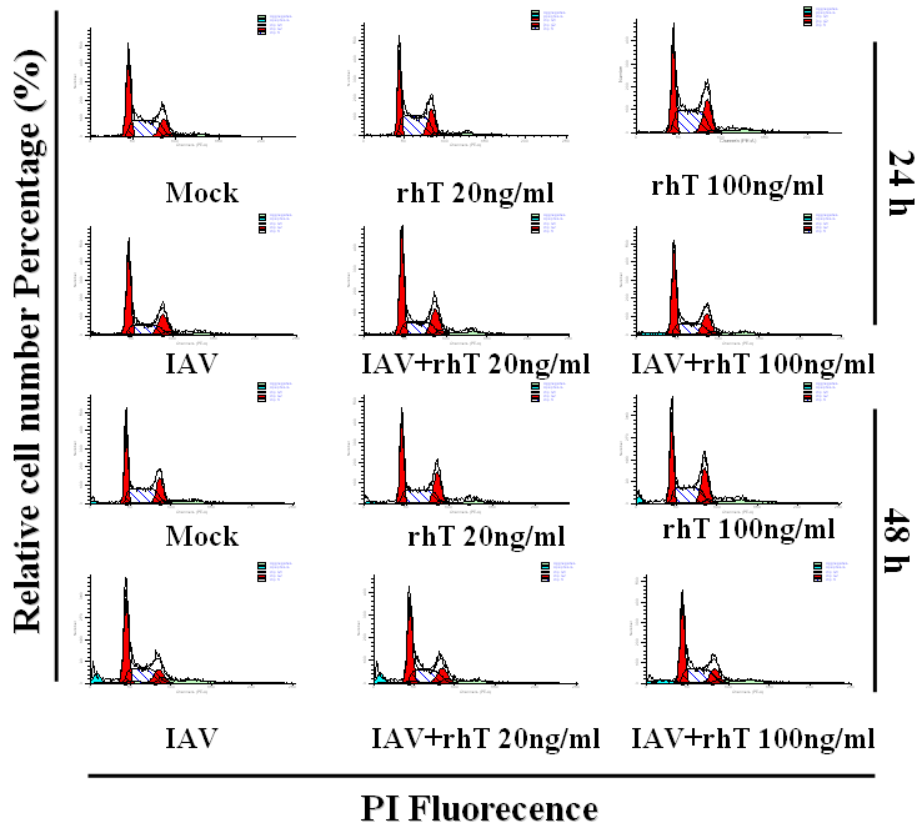


圖 7. IAV 及 rhTRAIL(rhT)作用下 HL-CZ 細胞之細胞週期分析

將 HL-CZ 細胞培養至 6 well 中，於培養液中分別加入 IAV PR8 (m.o.i=1)、20 ng/ml 及 100 ng/ml rhTRAIL(rhT)，六組不同組合: (1) Mock(2) 20 ng/ml rhT(3) 100 ng/ml rhT(4) IAV(5) IAV+20 ng/ml rhT(6) IAV+100 ng/ml rhT，24 及 48 小時之後將細胞收下，經由 PI 染色處理後利用流式細胞儀分析細胞週期。數據由 Modfit 軟體分析。

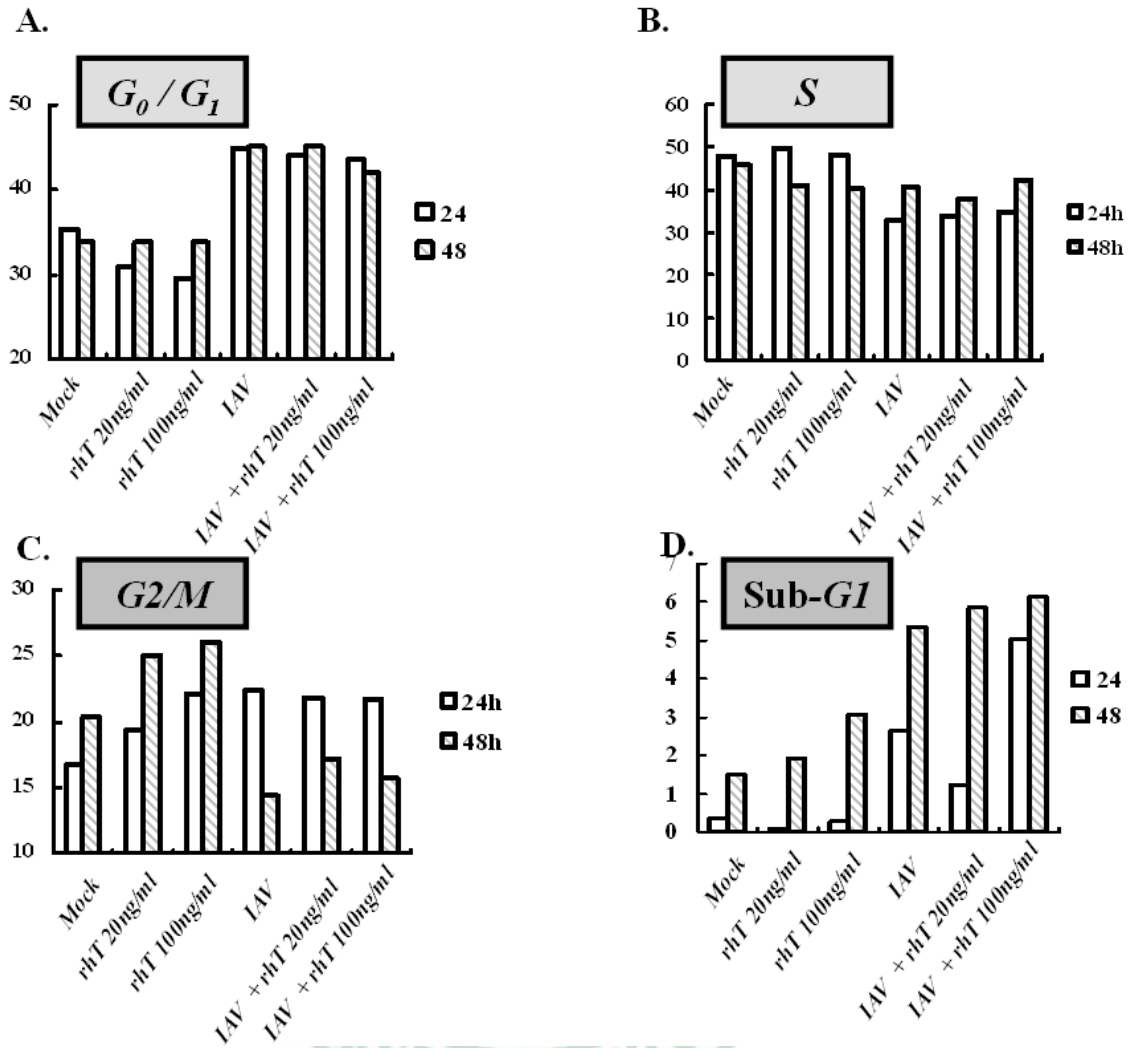


圖 8. HL-CZ 細胞各週期比例分析統計

將(圖 2)經由 Modfit 軟體比對分析， G_0/G_1 (圖 3A), S (圖 3B), G_2/M (圖 3C), Sub- G_1 (圖 3D)各細胞週期比例數據以柱狀圖統計表示。

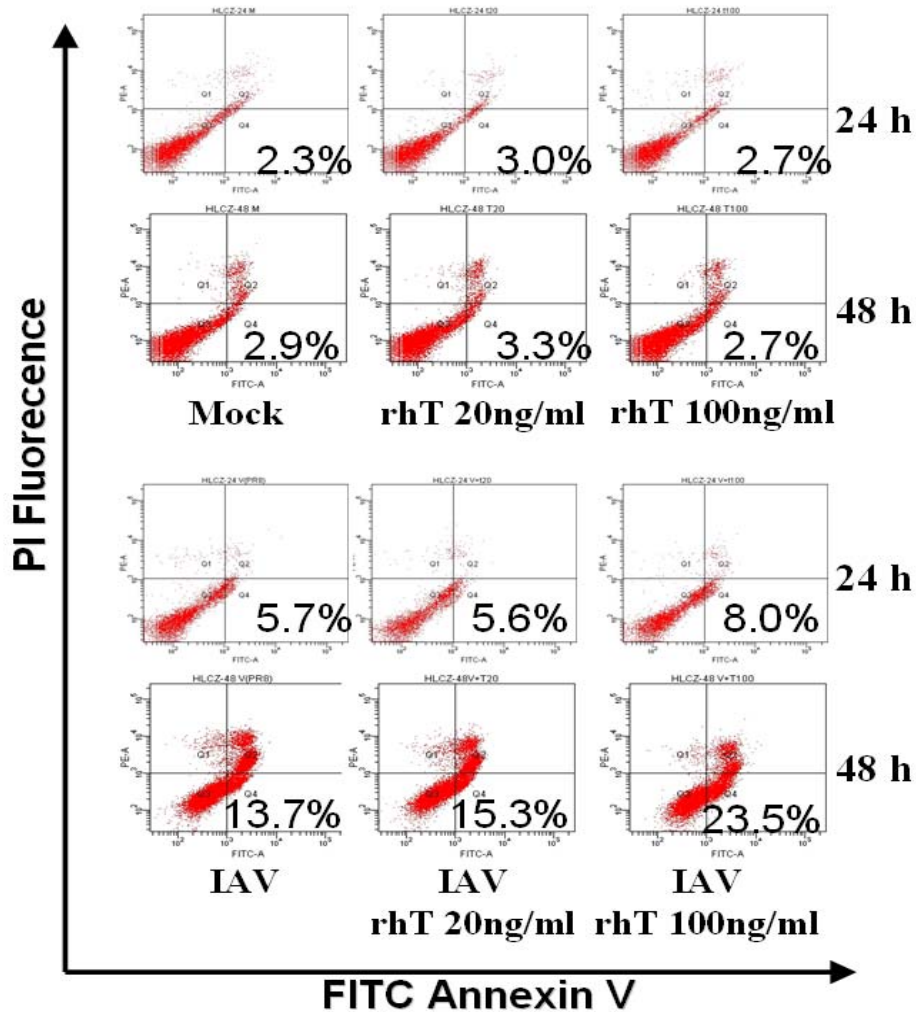


圖 9. IAV 及 rhTRAIL(rhT)作用下 HL-CZ 細胞之 Annexin V 凋亡細胞特異性染色

將 HL-CZ 細胞培養至 6 well 中，於培養液中分別加入 IAV PR8 (m.o.i=1)、20 ng/ml 及 100 ng/ml rhTRAIL(rhT)，六組不同組合: (1) Mock(2) 20 ng/ml rhT(3) 100 ng/ml rhT(4) IAV(5) IAV+20 ng/ml rhT(6) IAV+100 ng/ml rhT，24 及 48 小時之後將細胞收下，經由 Annexin V 及 PI 雙染色處理後利用流式細胞儀分析凋亡細胞的比例，第四象限(Q4)分佈細胞屬於凋亡細胞。

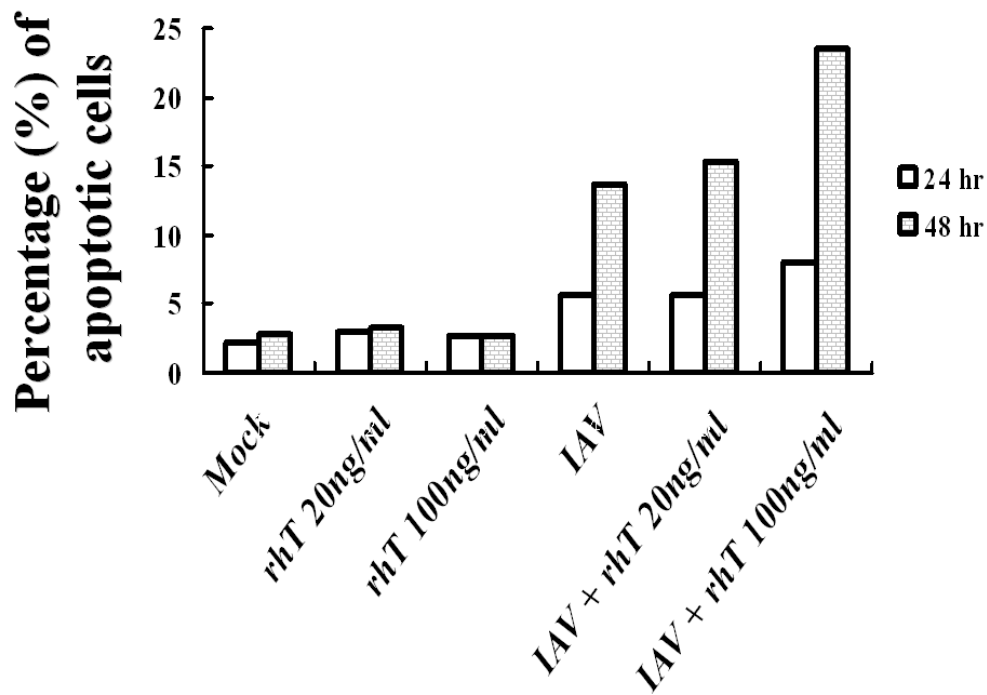
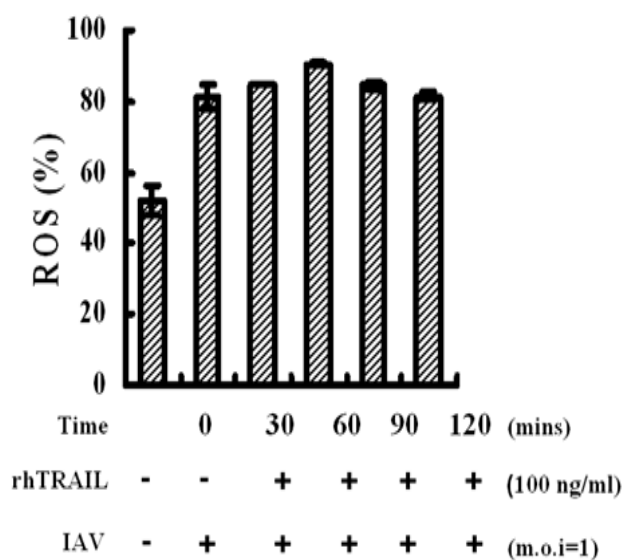


圖 10. HL-CZ 凋亡細胞比例分析

將(圖 9)第四象限(Q4)，屬於細胞凋亡比例之細胞數據，以柱狀圖統計表示。

A549



HL-CZ

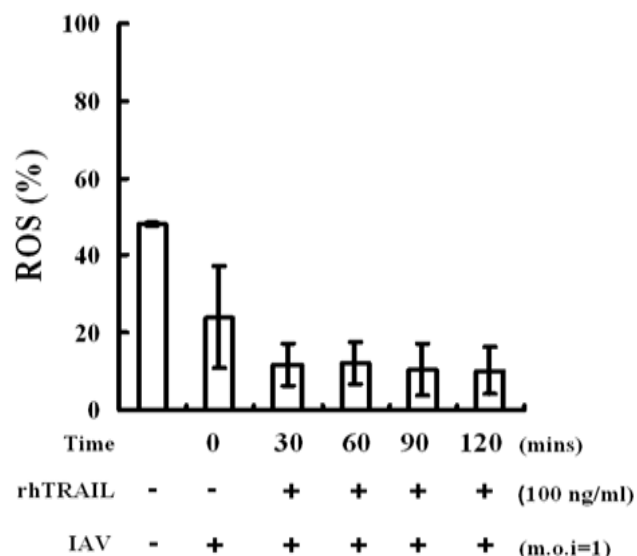


圖 11. A549 及 HL-CZ 細胞之活性氧化物(ROS)分析

利用流式細胞儀測量，rhTRAIL(rhT) 100 ng/ml，以不同分析前的時間點，0, 30, 60, 90, 120 分鐘加入，與 IAV 感染之 A549 及 HL-CZ 細胞作用，與染劑 DCFH-DA 作用 30 分鐘後，活性氧化物產生變化的細胞比例分析。

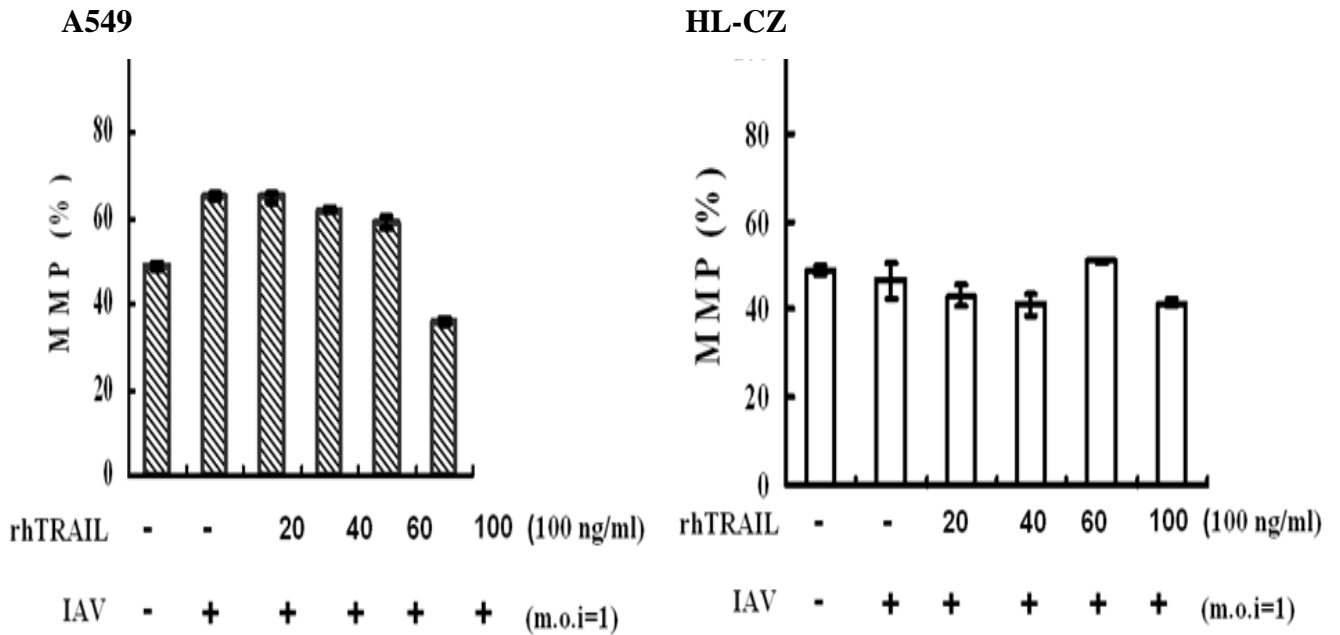
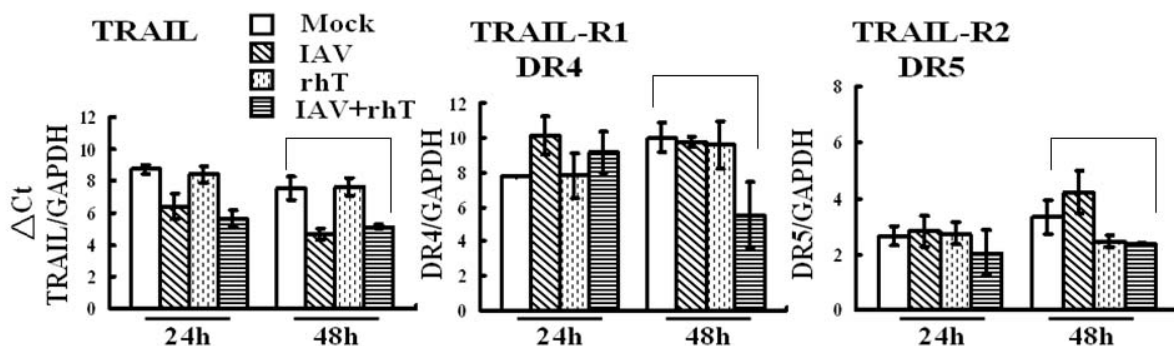


圖 12. A549 及 HL-CZ 細胞之粒線體膜電位(MMP)分析

利用流式細胞儀測量，rhTRAIL(rhT)分別以不同濃度，0, 20, 40, 60, 100 ng/ml 加入，與 IAV 感染之 A549 細胞作用，24 小時後與染劑 DioC6 作用 30 分鐘後，粒線體膜電產生變化的細胞比例分析。

A549



HL-CZ

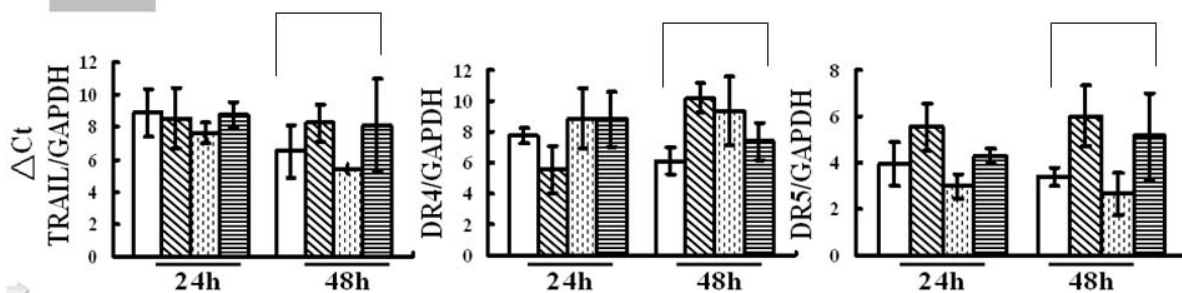


圖 13. A549 及 HL-CZ 細胞之 TRAIL 及 TRAIL 接受器 DR4 及 DR5

基因表現分析

(圖 13)為 ΔCt 值($Ct_{target} - Ct_{GAPDH}$)，並將其統計值以柱狀圖統計表示，(圖 13A) A549 TRAIL、(圖 13B) A549 DR4、(圖 13C) A549 DR5、(圖 13D) HL-CZ TRAIL、(圖 13E) HL-CZ DR4、(圖 13F) HL-CZ DR5。

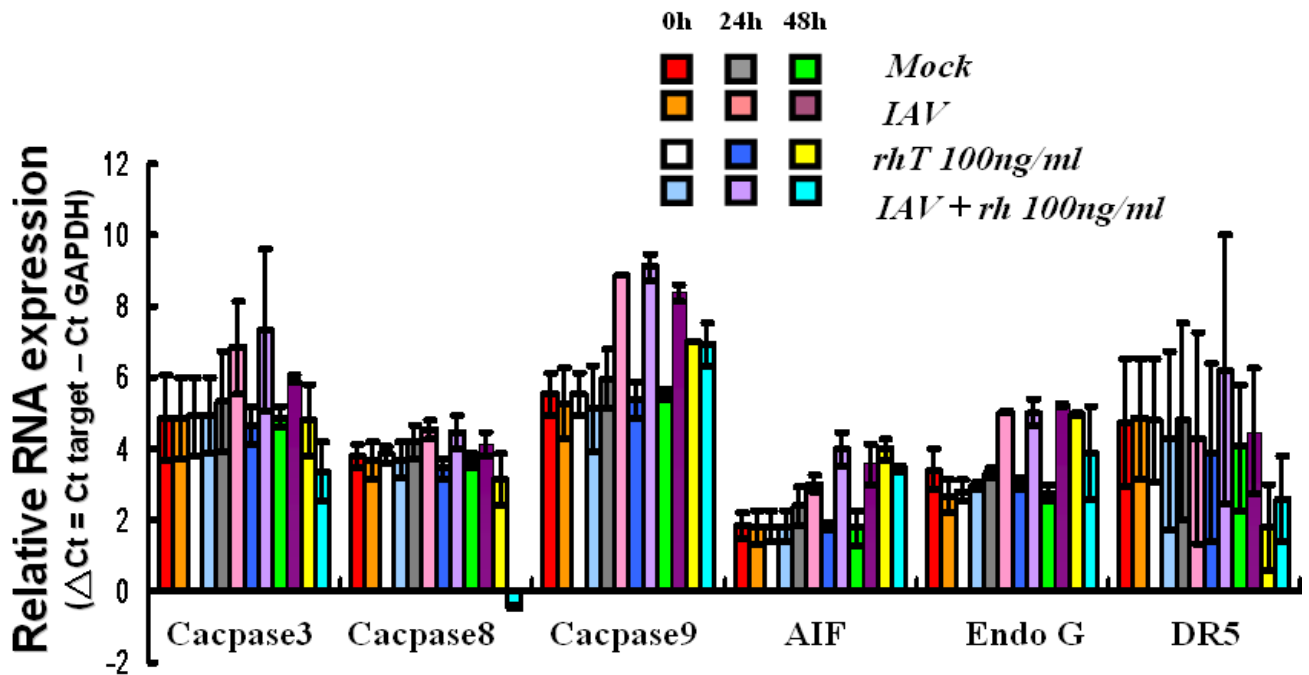


圖 14. rhTRAIL(rhT)及 IAV 引發 A549 細胞凋亡路徑基因表現

IAV (PR8; H1N1), MOI = 1 及 rhTRAIL(rhT)濃度 100 ng/ml 作用下，
 24 及 48 小時後，利用 Real-time PCR 測量凋亡蛋白 caspase 3, 8, 9、
 Endo G、AIF 及 TRAIL receptor DR5 基因的表現。(圖 13)為 $-\Delta Ct$ 值
 (Ct target - Ct GAPDH)。

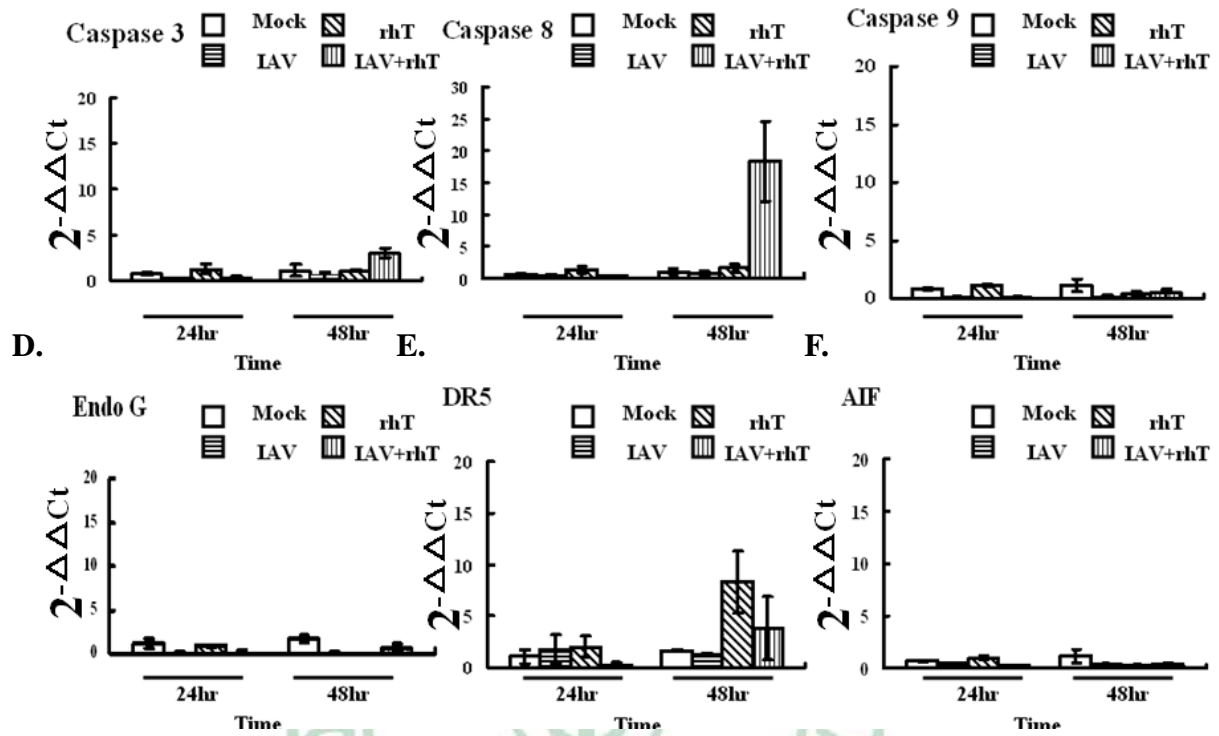


圖 15. rhTRAIL(rhT)及 IAV 引發 A549 細胞凋亡訊息路徑基因表現

(圖 15)為 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值 (Ct 24h、48h – Ct 0h)，並將其統計值以柱狀圖統計表示，(圖 15A) Caspase 3、(圖 15B) Caspase 8、(圖 15C) Caspase 9、(圖 15D) Endo G、(圖 15E) AIF、(圖 15F) DR5。

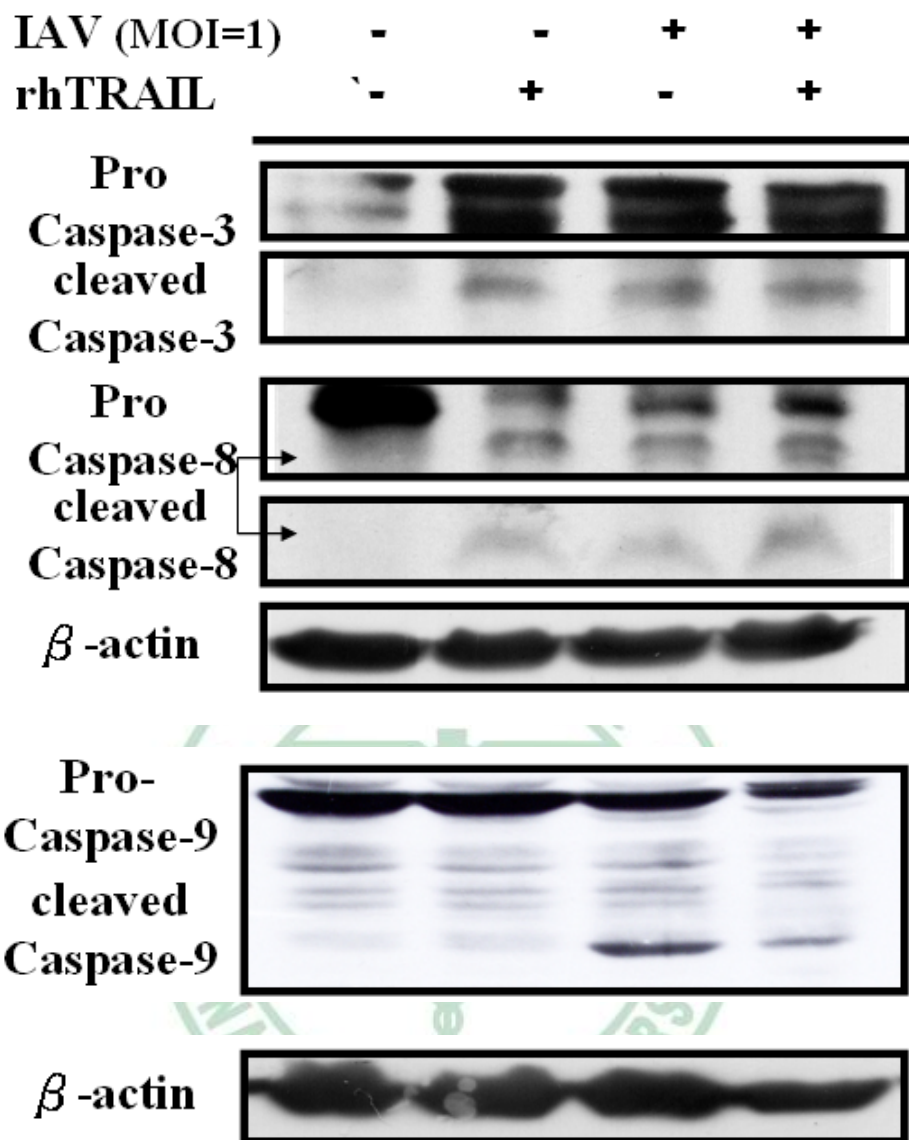


圖 16. 分析 rhTRAIL 及 IAV 引發 A549 凋亡路徑蛋白 Caspase 3、8、9 的表現

IAV (PR8; H1N1), MOI = 1 及 rhTRAIL 濃度 20 ng/ml, 100 ng/ml 作用下，48 小時後，利用西方墨點法分析凋亡蛋白 caspase 3、8、9 的表現量。

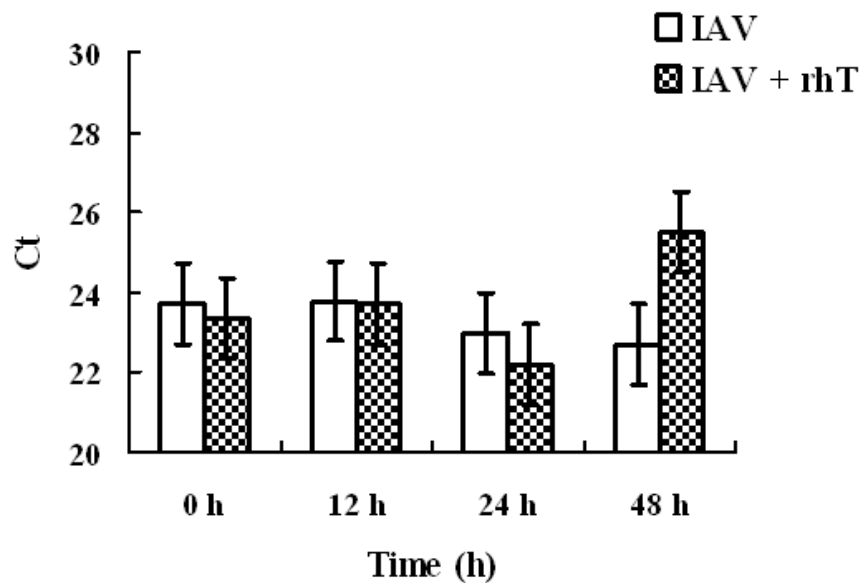


圖 17. Real time PCR 分析 rhTRAIL(rhT)對 IAV 複製的影響

IAV (PR8; H1N1), MOI = 1 及 rhTRAIL(rhT)濃度 100 ng/ml 作用下，12、24 及 48 小時後，收集各個時間點的細胞培養基，將上清液之病毒 RNA 抽出並轉 cDNA 後，利用 Real time PCR 測量各個時間點 Ct 值，觀察細胞外病毒顆粒的釋放，了解 IAV 複製的情形。

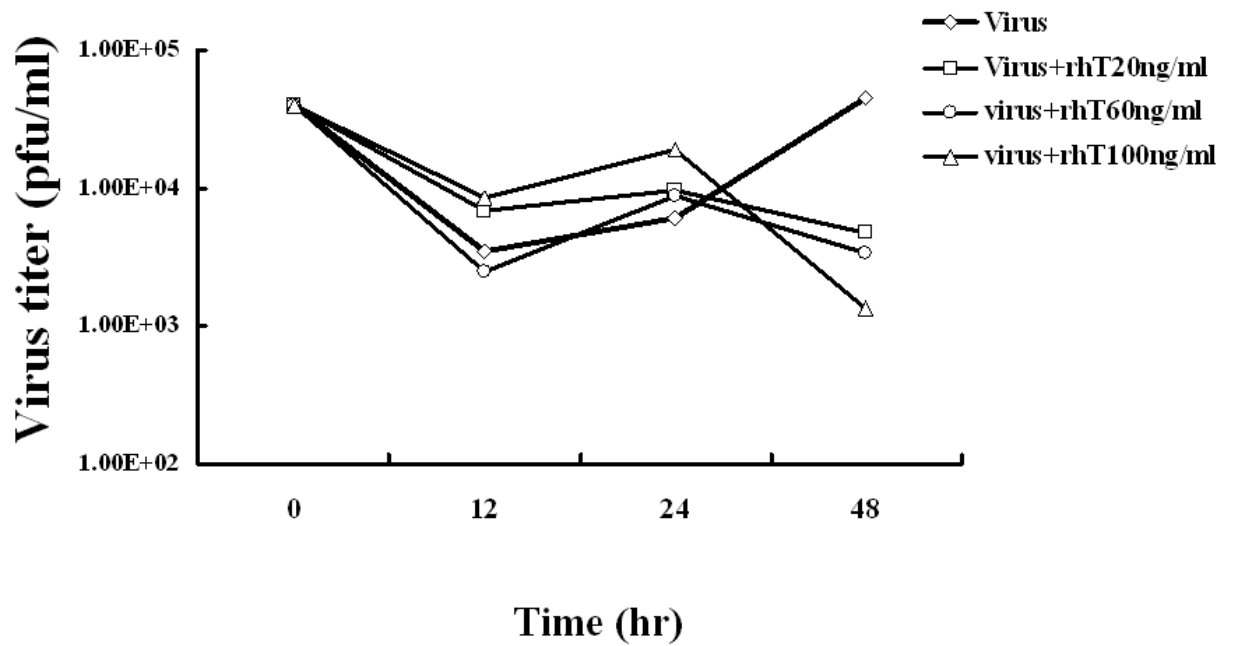


圖 18. Plaque assay 分析 rhTRAIL(rhT)對 IAV 複製的影響

IAV (PR8; H1N1), MOI = 1 及 rhTRAIL(rhT)濃度 0, 20, 60, 100 ng/ml 作用下，0, 12, 24 及 48 小時後，收集各個時間點的培養基，利用病毒蝕斑試驗，在各個時間點不同濃度下，觀察細胞外具有感染能力病毒顆粒的釋放，了解 IAV 複製的情形。

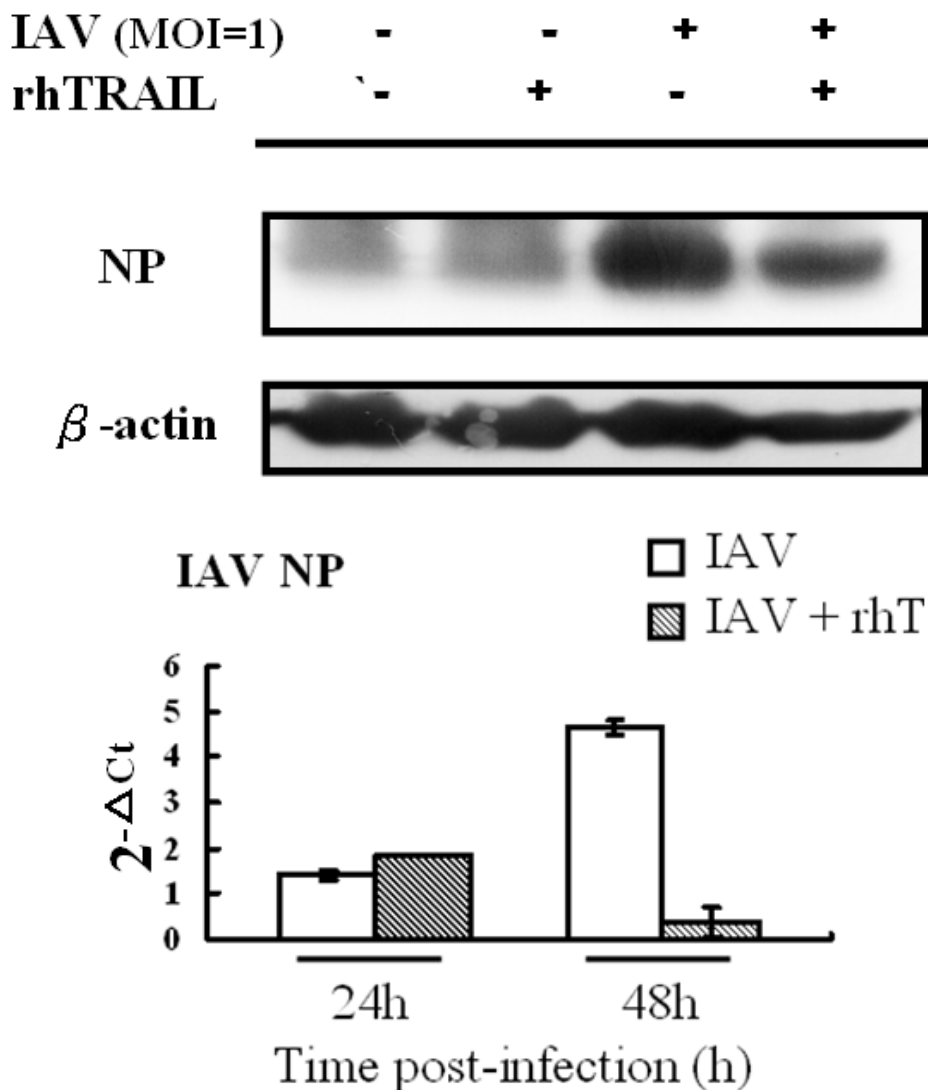


圖 19. 即時定量聚合酶連鎖反應及西方墨點法分析 rhTRAIL(rhT)對 IAV 蛋白複製的影響

IAV (PR8; H1N1), MOI = 1 及 rhTRAIL(rhT)濃度 100 ng/ml 作用下，24、48 小時後，收集各個時間點的細胞，將上細胞之 RNA 抽出並轉 cDNA 後，利用 Real time PCR 測量各個時間點 $-\Delta Ct$ 值(Ct target – Ct GAPDH)，觀察細胞內 IAV 蛋白 M、NP 複製的情形。

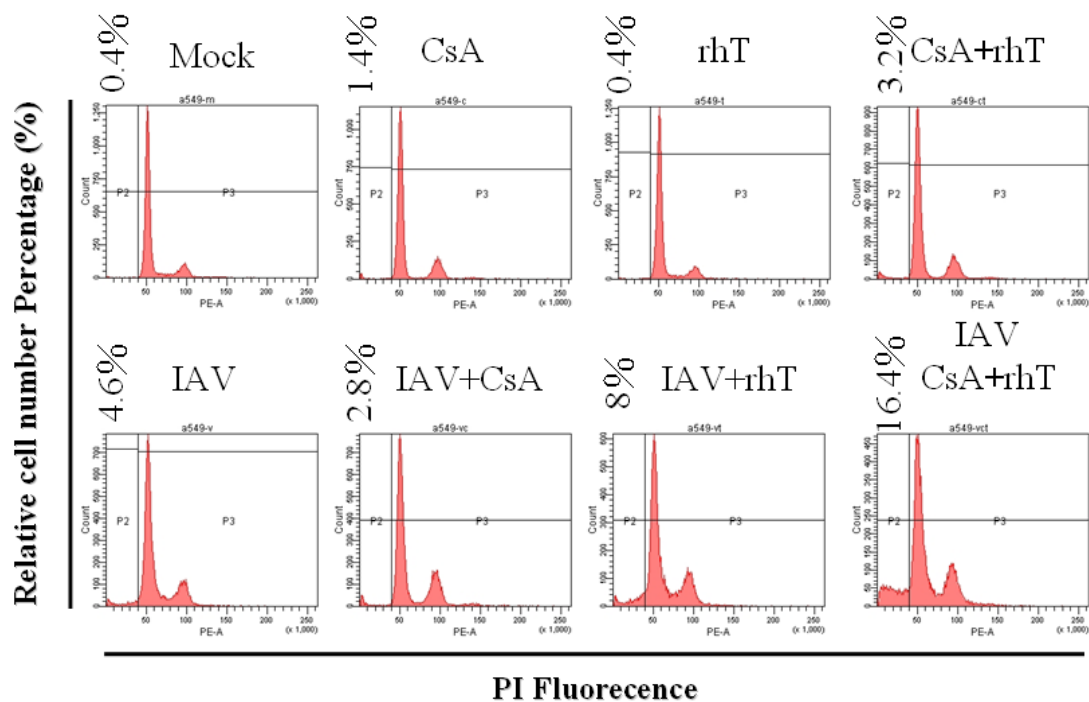


圖 20. Cyclosporin A 及 rhTRAIL(rhT)的共同作用下，IAV 感染之 A549 細胞週期分析

將 A549 細胞培養至 6 well 中，於培養液中分別加入 IAV PR8 (m.o.i=0.2)、100 ng/ml rhTRAIL(rhT)、Cyclosporin A(Cs A) 5uM，八組不同組合：(1) Mock(2) Cs A(3) rhT(4) Cs A+rhT(5) IAV(6) IAV+Cs A(7) IAV+rhT(8) IAV+Cs A+rhT，48 小時之後將細胞收下，經由 PI 染色處理後利用流式細胞儀分析細胞週期。

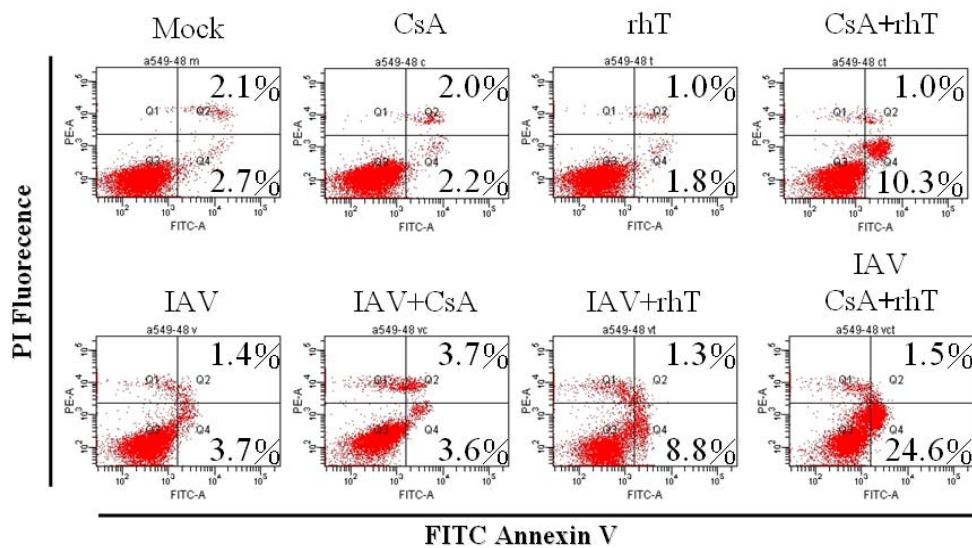


圖 21. Cyclosporin A 及 rhTRAIL(rhT)的共同作用下，IAV 感染之 A549 細胞 Annexin V 特異性染色分析

將 A549 細胞培養至 6 well 中，於培養液中分別加入 IAV PR8 (m.o.i=0.2)、100 ng/ml rhTRAIL(rhT)、Cyclosporin A(Cs A) 5uM，八組不同組合：(1) Mock(2) Cs A(3) rhT(4) Cs A+rhT(5) IAV(6) IAV+Cs A(7) IAV+rhT(8) IAV+Cs A+rhT，48 小時之後將細胞收下，經由 Annexin V 及 PI 雙染色處理後利用流式細胞儀分析凋亡細胞的比例，第四象限(Q4)分佈細胞屬於凋亡細胞。

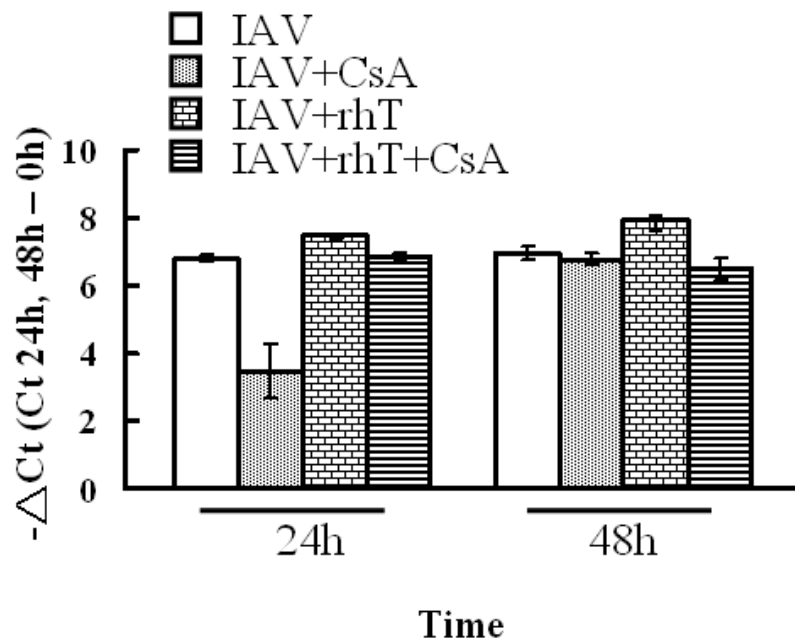


圖 22. Cyclosporin A 及 rhTRAIL(rhT)的共同作用下，對於 IAV 複製上的影響

將 A549 細胞培養至 6 well 中，於培養液中分別加入 IAV PR8 (m.o.i=0.2)、100 ng/ml rhTRAIL(rhT)、Cyclosporin A(Cs A) 5uM，八組不同組合: (1) Mock(2) Cs A(3) rhT(4) Cs A+rhT(5) IAV(6) IAV+Cs A(7) IAV+rhT(8) IAV+Cs A+rhT，12、24 及 48 小時後，收集各個時間點的細胞培養基，將上清液之病毒 RNA 抽出並轉 cDNA 後，利用 Real time PCR 測量各個時間點 Ct 值，觀察細胞外病毒顆粒的釋放，了解 IAV 複製的情形。(圖 22) $-\Delta Ct$ 值 (Ct 0 小時 - Ct 24 及 48 小時)。

表

表一、Western blot

1.5M Tris-base (pH8.8)	45.4g tris-base add ddH ₂ O 250ml pH=8.8
0.5M Tris-HCl (pH6.8)	7.88g tris-HCl, dd ddH ₂ O 100ml, pH=6.8
10% SDS	10g SDS sodium dodecyl sulfate ,add ddH ₂ O to 100ml
APS 10%	ammonium persulfate 1g/10ml ddH ₂ O
Stacking gel(4%)	ddH ₂ O 1.35ml ,30%Acy/Bis 0.27ml,0.5M Tris-HCl (pH6.8)0.55ml, APS10% 22.5 μ l,10% SDS 22.5 μ l,TEMED 3.5 μ l
separating gel (10%)	ddH ₂ O 4.8ml ,30 % Acy/Bis 4.2ml,1.5M Tris-base (pH8.8)3.0ml, APS 10% 120 μ l,10% SDS 120 μ l,TEMED 6.5 μ l
2x sample loading buffer	glyceol 2.5 ml , 2-mercaptoethanol 100 μ l, 10% SDS 2 ml, 0.5 M Tris-HCl 1.25 ml, pH6.8, 0.5% (W/V)bromophenyl blue 0.2ml, ddH ₂ O 3.55 ml , glycerol 2.5ml
running 或 separation buffer	10X : 30g tris-base,144g glycine,10% SDS100ml add ddH ₂ O to 1L 1X :25mM tris-base,250mM glycine,0.1%SDS
Coommassie brilliant blue 染色液	40%methanol ,10% acetic acid, 0.1% Coommassie brilliant bluer-250
Destain solution	40%methanol ,10% acetic acid
Transfer buffer	8.72g tris-base,4.4g glycine, add ddH ₂ O to 1.5L, pH 8.4,add methanol 300ml,10% SDS 5.6ml store at 4°C .
10x TBS (Tris buffer saline)	200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 M NaCl
1x TBST (wash solution)	1 X TBS cotaining 0.1% Tween-20
5% skim milk	2.5g skim milk/50ml TBST

表二、Protein concentration detection

Protein Standard	bovine serum albumin (1 $\mu\text{g}/\text{ul}$)
Protein assay dye	Bio-RAD Protein assay dye reagent concentrate, 450 ml

