

# 中國醫藥大學

醫學檢驗生物技術學系碩士班

碩士論文

研究日本腦炎病毒蛋白誘導細胞凋亡機制

**Study on apoptosis induced by Japanese  
encephalitis virus proteins**

指導教授：林振文 博士  
**Cheng-Wen Lin**

學生姓名：許素連  
**Su-Lian Shiu**

學生學號：9473008

中華民國九十六年七月

## 致謝

終於，我完成了學業。期待已久的研究結果也劃下了一個完美的句點。首先感謝我的指導老師林振文老師讓我從一個不懂得做實驗的小毛頭到能夠在時間上做充分的掌握，安排自己的實驗。這項學習也讓我提升了對自己在實驗上的肯定。同時也感謝老師在這兩年對我的教導與照顧讓我心無旁騖的專心做研究，對於老師的鞭策，感激在心裡。老師辛苦您了。感謝系上楊翠青老師與口試委員黃素華老師在論文上提供許多寶貴意見，也讓學生了解到自己的盲點，進而有機會加以改進。同時也感謝系上所有的老師以及儲姐給予我的教導與鼓勵。感謝冠勳學長、傑文學長、小羊學姊、尚恩學長、美秀學姐在實驗上教導；同梯的美少女、佳芳、明璋、明宏、冠傑在實驗上互相提供寶貴的意見；實驗室所有學弟妹：姿穎、俊瑋、育存、佳文、弘達、培紋、韋華、玉如、應雅、凱弘、平日的幫忙。C.W. Lin 小組一同搞笑、相互扶持，共同出遊的快樂回憶。我的好朋友佳鳳、小邱、苑霖、緯芳、帥氣的孟輝、帆妤、佳琪、怡婷、惠菁、美齡、珮姍、珥卿、嘉嘉，總是不斷給我加油打氣，謝謝你們。

我最重要的家人爸爸、媽媽、姐姐、姑姑、小傑、昱岑謝謝你們一路支持、無私奉獻讓我得以完成學業。還有我的老公炳峯對我無微不至的照顧和兒子詠竣一路陪我完成學業，謝謝你們。這份喜悅是屬大家的。

## 中文摘要

日本腦炎病毒 (Japanese encephalitis virus, 簡稱 JEV) 是一種藉由蚊子傳染的黃質屬病毒主要會入侵神經系統，引起急性腦膜炎並使腦、腦膜和脊髓受損。本篇研究目的在於探討日本腦炎病毒與誘導 HL-CZ 及 TE671 細胞凋亡 (apoptosis) 現象的關係以及特定病毒蛋白是否也能引發細胞走向細胞凋亡的途徑，及其分子機制為何。首先，利用 propidium iodide 染劑染色發現，HL-CZ 及 TE-671 細胞在 MOI 為 1 的日本腦炎病毒感染 48 小時後，細胞明顯有細胞凋亡的現象。隨後利用質體 DNA 重組選殖以及細胞轉染技術，建立個別獨立表現日本腦炎病毒蛋白 E、NS1、NS2B、NS3-180、NS2BNS3-180、NS4A 及 NS4B 的細胞株。再利用 PI 染劑、Annexin V 染色、Fluorimetric assay kit，確認病毒蛋白 NS2B、NS3-180、NS2BNS3-180 表現細胞會產生細胞凋亡。進一步藉由西方墨點法發現，表現病毒非結構蛋白 NS2B、NS3-180 及 NS2BNS3-180 的 HL-CZ 細胞株，caspase 3、8 蛋白被活化；而細胞表現病毒蛋白 NS2BNS3-180 有活化 caspase 3、8、9 蛋白的現象產生。表現病毒結構蛋白 E 以及非結構蛋白 NS3-180、NS2BNS3-180 的 TE-671 細胞株，caspase3、9 有被活化的現象。最後利用 DioC6 染劑染色，表現病毒蛋白 E 的 HL-CZ 細胞株有粒線體膜電位下降的趨勢；藉由 FLUO3/AM 染劑測得細胞表現 NS2B3-180 促使細胞內鈣離子釋放；利用 DCFH-DA 染劑

得知表現 NS2B 的 TE-671 細胞株有活性氧化物的產生；而當細胞表現病毒蛋白 NS2B3-180 時，發現活性氧化物生成和粒線體膜電位下降。此研究成果將有助於更加了解日本腦炎病毒誘導細胞凋亡的分子傳遞路徑。



## Abstract

Japanese encephalitis virus (JEV), a mosquito-borne flavivirus, causes severe neurological diseases with a high fatality rate. In this study, the goal of this study is to characterize JEV-induced apoptosis, to identify the dominant viral protein involved in apoptosis, and to investigate the molecular pathways of JEV protein-induced apoptosis. Flow cytometric analysis revealed apoptosis of HL-CZ and TE-671 cells infected with JEV at a MOI of 1 after 2-day infection. Propidium iodide staining, Annexin-V staining and fluorimetric assay of caspase-3 indicated that JEV proteins E, NS2B, NS3, and NS2b-NS3 protease induced apoptosis of HL-CZ and TE-671 cells, respectively. Western blotting showed that single expression of NS2B, NS3-180, and NS2BNS3 protease activated caspases 3 and 8 in HL-CZ cell. Active form of caspases 3 and 9 were detected in JEV E, NS3-180, and NS2BNS3 protease -expressing TE-671 cells, while active form of caspase 9 was only found in NS2b-NS3 protease-expression HL-CZ cell. In addition, the increase of ROS was measured in NS2B-, and NS2b-NS3 protease –expressing TE-671 cells. The decrease of MMP was measured in E –expressing HL-CZ cells and NS2b-NS3 protease-expression TE-671 cells. The increase of  $Ca^{2+}$  was measured in NS2b-NS3 protease –expressing HL-CZ cells. This study provides more information on the mechanism of the JEV induced apoptosis.

# 目 錄

致謝 .....	i
中文摘要 .....	ii
英文摘要.....	iv
目錄 .....	v
表目錄.....	viii
圖目錄 .....	x
第一章 緒論	
第一節 研究背景與研究動機 .....	1
第二節 研究假設 .....	2
第三節 研究目的 .....	2
第四節 研究標的 .....	2
第二章 文獻查證	
第一節 流行病學 .....	3
第二節 日本腦炎病毒、蛋白與功能介紹 .....	4
第三節 細胞凋 (Apoptosis) .....	6
第四節 Annexin V 染色 .....	10
第五節 活性氧化物與細胞凋亡相關性 .....	10
第六節 粒線體膜電位與細胞凋亡相關性 .....	11



第七節	鈣離子與細胞凋亡相關性 .....	11
第八節	研究架構 .....	12
<b>第三章 研究方法</b>		
第一節	研究設計 .....	14
第二節	研究材料 .....	15
第三節	實驗方法 .....	18
<b>第四章 研究結果 .....</b>		
<b>第一節 以 MOI 為 0.1 及 1 的條件下日本腦炎病毒感染 HLCZ 細胞及 TE671 細胞之細胞週期分析.....31</b>		
<b>第二節 日本腦炎病毒蛋白 NS2B、NS3-180、NS2BNS3-180 的質體構築.....31</b>		
<b>第三節 蛋白表現 HL-CZ 及 TE-671 細胞之免疫螢光染色.....32</b>		
<b>第四節 流式細胞儀分析日本腦炎病毒蛋白誘導 HL-CZ 及 TE-67 細胞凋亡程度 .....</b>		
<b>33</b>		
<b>第五節 Annexin V 檢測細胞凋亡之早期反應..... 34</b>		
<b>第六節 分析日本腦炎病毒蛋白表現誘導 Caspase 3 活性分析...34</b>		
<b>第七節 利用西方墨點法分析病毒蛋白對 HLCZ 細胞及 TE671 細胞之細胞凋亡相關 caspase 3、8、9 蛋白活性 .....</b>		
<b>35</b>		
<b>第八節 探討日本腦炎病毒蛋白引發細胞凋亡之分子機制.....35</b>		

第九節	病毒蛋白表現 TE-671 細胞之免疫螢光染色 .....	36
<b>第五章 討論</b>		
第一節	結果討論 .....	37
第二節	研究限制 .....	42
<b>第六章 結論與建議</b>		
第一節	結論 .....	43
第二節	建議 .....	44
參考文獻	.....	45
表	.....	53
圖	.....	60
附錄一	.....	82
附錄二	.....	84
附錄三	.....	86





# 表 目 錄

表一 MOI 為 0.1 時日本腦炎病毒感染 HL-CZ 細胞之細胞週期分析 .....	53
表二 MOI 為 0.1 時日本腦炎病毒感染 TE-671 細胞之細胞週期分析...	53
表三 MOI 為 1 時日本腦炎病毒感染 HL-CZ 細胞之細胞週期分析.....	54
表四 MOI 為 1 日本腦炎病毒感染 TE-671 細胞之細胞週期分析.....	54
表五 病毒蛋白表現 HL-CZ 之細胞週期分析 .....	55
表六 病毒蛋白表現 TE-671 之細胞週期分析 .....	55
表七 日本腦炎病毒蛋白表現 HL-CZ 細胞誘導 Caspase 3 蛋白產生比例 .....	56
表八日本腦炎病毒蛋白表現 TE-671 細胞誘導 Caspase 3 蛋白產生的比例 .....	56
表九 利用流式細胞儀測 JEV 蛋白在 HL-CZ 細胞表現後測活性氧化物的 產生與否 .....	57
表十 利用流式細胞儀測 JEV 蛋白在 TE-671 細胞表現後測活性氧化物的 產生與否 .....	57
表十一 利用流式細胞儀測 JEV 蛋白在 HL-CZ 細胞表現後測細胞鈣離子 的變化 .....	58

表十二 利用流式細胞儀測 JEV 蛋白在 TE-671 細胞表現後測細胞鈣離子的變化 .....58

表十三 利用流式細胞儀測 JEV 蛋白在 HL-CZ 細胞表現測膜電位的變化 .....59

表十四 利用流式細胞儀測 JEV 蛋白在 TE-671 細胞表現後測膜電位的變化 .....59



# 圖 目 錄

圖一 日本腦炎病毒在 MOI 為 0.1 及 1 的條件下感染 HL-CZ 及 TE-671 細胞，在 24-96 小時誘導細胞凋亡程度 .....	60
圖二 NS2B、NS3-180、NS2BNS3-180PCR 電泳圖 .....	61
圖三 基因轉殖電泳分析圖 .....	62
圖四 E 蛋白表現 HL-CZ 細胞之免疫螢光染色 .....	63
圖五 NS1、pNS2B 蛋白表現 HL-CZ 細胞之免疫螢光染色 .....	64
圖六 NS3-180、NS2BNS3-180 蛋白表現 HL-CZ 細胞之免疫螢光染色 .....	65
圖七 NS4A、NS4B 蛋白表現 HL-CZ 細胞之免疫螢光染色.....	66
圖八 E 蛋白表現 TE-671 細胞之免疫螢光染色 .....	67
圖九 NS1、NS2B 蛋白表現 TE-671 細胞之免疫螢光染色.....	68
圖十 NS3-180、NS2BNS3-180 蛋白表現 TE-671 細胞之免疫螢光染色 .....	69
圖十一 NS4A、NS4B 蛋白表現 TE-671 細胞之免疫螢光染色.....	70
圖十二 E、NS2B、NS3-180、NS2BNS3-180 蛋白表現 TE-671 細胞之免疫螢光染色 .....	71
圖十三 日本腦炎病毒蛋白對 HL-CZ 細胞與 TE671 細胞誘導細胞凋亡程度 .....	72

圖十四 Annexin V 染色 .....	73
圖十五 Caspase 3 活性分析 .....	74
圖十六 西方墨點法分析病毒蛋白對 HL-CZ 細胞之細胞凋亡相關 caspase 3、8、9 蛋白活性 .....	75
圖十七 西方墨點法分析病毒蛋白對 TE-671 細胞之細胞凋亡相關 caspase 3、8、9 蛋白活性 .....	76
圖十八 JEV 蛋白在 HL-CZ 及 TE-671 細胞表現後氧化物的產生比例 .....	77
圖十九 JEV 蛋白在 HL-CZ 及 TE-671 細胞表現後膜電位下降比例 .....	78
圖二十 JEV 蛋白在 HL-CZ 及 TE-671 細胞表現後鈣離子的產生比例 .....	79
圖二十一 病毒蛋白表現 TE-671 細胞之免疫螢光染色.....	80
圖二十二 病毒蛋白表現 TE-671 細胞之免疫螢光染色.....	81

# 第一章、緒論

## 第一節 研究背景

### 日本腦炎介紹

日本腦炎是一種藉蚊子傳染的病毒性疾病。1924 年在日本爆發大流行，1935 年，病毒首先由病人腦部的病理組織被分離出來，並且命名為日本腦炎 B 型病毒( Japanese B encephalitis virus)，現今則稱為日本腦炎病毒(Japanese encephalitis virus，簡稱 JEV)，是屬於黃病毒科(Flaviviridae)的病毒成員之一。1956 年發展出不活性的疫苗。<sup>(3)</sup>

### 研究動機

本實驗研究的病毒蛋白就 NS2b-NS3 蛋白酶除了有蛋白酶作用，在登革熱病毒 (dengue viruses 簡稱 DEN) 研究還被發現與細胞凋亡有關<sup>(4)</sup>，同時病毒 E Protein 也被報導誘導細胞凋亡<sup>(5)</sup>。此外，在西尼羅河病毒研究更證實 NS3-180 蛋白酶能獨自引發細胞凋亡 (apoptosis)<sup>(6)</sup>。在日本腦炎病毒感染細胞時，細胞所呈現的細胞病變 (CPE) 也有觀察到細胞凋亡<sup>(10)</sup>。但以日本腦炎病毒引發的細胞凋亡機制途徑並不了解，因此想深入去瞭解日本腦炎病毒引發的細胞凋亡機制。

## 第二節 研究假設

文獻指出西尼羅河病毒(West Nile virus 簡稱 WNV) 研究病毒 NS3-180 蛋白酶能獨自引發細胞凋亡，而不需要病毒蛋白 NS2B 作輔助因子<sup>(10)</sup>。於是設立研究假設說，認為同屬於黃質病毒屬(Flavivirus) 日本腦炎病毒的 NS3-180 蛋白酶應該可以獨自誘導細胞凋亡。而經由分子技術的方法，我們得以檢測其誘導細胞凋亡機制，進而發現 NS2B、NS3-180 蛋白酶、NS2b-NS3-180 蛋白酶在病毒感染細胞誘導細胞凋亡上所扮演的角色及其重要性。

## 第三節 研究目的

研究日本腦炎病毒是否能誘導 HL-CZ(人類單核球細胞)、TE-671(人類腦胚胎瘤細胞) 產生細胞凋亡現象並且證明病毒蛋白是否也能獨自引發細胞凋亡，其分子機制為何。

## 第四節 研究標的

- 1 日本腦炎病毒誘導 HL-CZ 及 TE-671 細胞產生細胞凋亡？
- 2 何種病毒蛋白是否能獨自引發細胞凋亡？
- 3 引發細胞凋亡分子機制為何？



## 第二章、文獻查證

### 第一節 流行病學

日本腦炎是一種經由蚊子傳播的病毒性人畜共通傳染病，病毒活動蹤跡遍及西太平洋地區，北起西伯利亞，南達澳洲北部地區，西至印度。台灣位處流行範圍內，每年一到春末夏初，就能偵測到日本腦炎病毒的活動。根據 1960 年代進行的日本腦炎生態調查，確認了三斑家蚊、白頭家蚊及環蚊家蚊等是台灣地區重要的日本腦炎病媒蚊，豬則是能讓病毒在體內大量繁殖，擔任自然界中「增幅動物」的角色。因此，在台灣地區的日本腦炎病毒，主要是藉由蚊子→豬→蚊子這樣的循環在自然界中立基，綿延子代；而人類對日本腦炎病毒來說，是一個沒有作用的終宿主，因為在人體內複製的病毒量並不足以有效的感染蚊子，所以沒有辦法將病毒再傳播給其他個體<sup>(7)</sup>。

日本腦炎病毒的毒性由老鼠動物實驗中病毒的神經侵襲力（neuroinvasiveness）及神經毒力（neurovirulence）所組成。神經侵襲力是指病毒在宿主週邊組織之繁殖複製引起病毒血症之後，侵襲宿主中樞神經系統的能力。神經毒力則是病毒引起宿主中樞神經系統細胞病變與引發腦炎的能力。

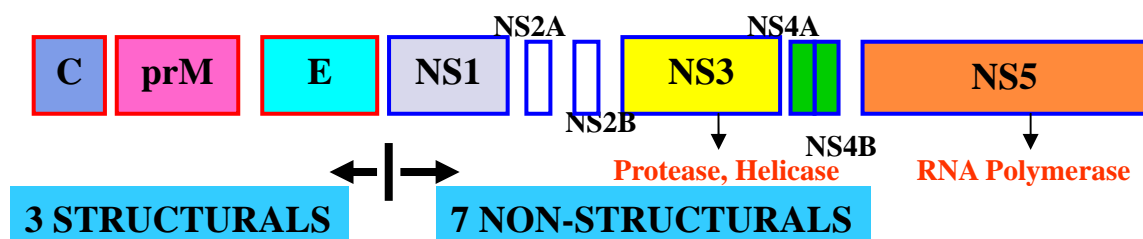
日本腦炎病毒引起的典型病程共分為四期包括前驅期、急性期（病毒血期）、亞急性期（侵犯中樞神經系統）、恢復期。



潛伏期平均為5-15天，被感染者99%無症狀，不發病就產生抗體。抵抗力弱的患者會有發燒、頭痛、嘔吐、頸部僵硬等無菌性腦膜炎表徵(80%)，嚴重的則有嗜睡、不自主顫抖(27%)、胡言亂語、昏迷(40%)、無意識或性格異常等腦炎症狀，嚴重者會死亡。發病後許多痊癒者會有永久性神經損壞<sup>(8)</sup>。

## 第二節 日本腦炎病毒介紹

日本腦炎病毒是一種藉由蚊子傳染的黃質屬病毒。為單股正性的 RNA 病毒。基因組成大小約為 11 個 kb，其中包含有 5' 及 3' 兩端的非轉譯區(Untranslation Region 簡稱 UTR)，而開放性區域(open reading frames 簡稱 ORF) 經過轉譯形成聚胜肽鏈(polypeptide)，經過細胞的胜肽水解酶切割後，聚胜肽鏈依序從基因體 5' 端可生成三個結構蛋白分別為核心蛋白 (capsid protein 簡稱 C)、前膜蛋白 (membrane protein 簡稱 prM) 以及套膜蛋白 (envelope protein 簡稱 E)，及 3' 端七個非結構蛋白 NS1、NS2a、NS2b、NS3、NS4a、NS4b，and NS5<sup>(1)(2)(9)</sup>。



## 日本腦炎病毒蛋白與功能

結構蛋白：核心蛋白、前膜蛋白、套膜蛋白分子量大小依序為 12kDa、8kDa、53kDa<sup>(17)</sup>。三個結構蛋白主要負責組合成病毒顆粒(virion)<sup>(10)</sup>。

核心蛋白組成了病毒的外殼而包覆著病毒的核酸。前膜蛋白與套膜蛋白皆為醣蛋白，兩者以 heterodimer 的形式呈現在病毒的外殼上，以穩定套膜蛋白的摺套膜蛋白<sup>(15)</sup>。套膜蛋白是日本腦炎病毒表面最主要的抗原蛋白<sup>(16)(17)</sup>，另外也有文獻報導套膜蛋白可以誘導細胞凋亡<sup>(18)</sup>。

非結構蛋白 NS1 是一種醣蛋白，出現在細胞表面、細胞質中。文獻指出與病毒早期複製作用有關<sup>(27)(29)</sup>。非結構蛋白 NS3 分子量大小大約 70 kDa，為一個多功能性蛋白。在病毒蛋白的切割跟加工過程以及病毒 RNA 的合成佔有一個重要的地位<sup>(28)</sup>。同時具有一些酵素活性的功能，包含蛋白質裂解酶(protease)、nucleoside triphosphatase (NTPase)、解螺旋酶 (helicase)，以及 RNA triphosphatase<sup>(13)(14)</sup>。NS3 蛋白的 N 端 NS3-180 a.a 與 NS2B，在內質網區域結合成一個具有蛋白酵素功能的 trypsin-like serine protease，可將日本腦炎病毒多胜肽 (polypeptide) 正確的切割。切割 NS2A/NS2B、NS2B/NS3、NS3/NS4A 和 NS4B/NS5 的連接<sup>(9)(23)</sup>。NS3 蛋白的 replicase 活性被推測說是在 nucleoside triphosphatase 及解螺旋酶的區域與 NS5 形成 NS3-NS5-RNA complex<sup>(10)</sup>。日本腦炎病毒非結構性蛋白 NS2BNS3 除了有蛋白酶作用功能，

在登革熱病毒研究還被發現與細胞凋亡有關<sup>(7)</sup>。另外在西尼羅河病毒觀察到 NS2b 使 NS3 蛋白酶結構穩定和催化作用的構行為何<sup>(25)</sup>。此外在西尼羅河病毒有另外一項研究證實 NS3-180 能獨自引發細胞凋亡<sup>(11)</sup>。在最近研究文獻也發現 NS3 具有的蛋白酶功能，能切割兩個部分，其中之一切斷 NS2BNS3 蛋白酶的連接；另一個切割 C 端 459 位置胺基酸為 Arg 和 460 位置胺基酸為 Gly 的連接<sup>(24)</sup>。在另一個登革熱病毒研究文獻中又發現當 NS4B 與 NS3 產生交互作用會降低 NS3 解螺旋酶的效能；進而影響病毒複製的速度<sup>(26)</sup>。在日本腦炎病毒感染細胞時，細胞所呈現的細胞病變（CPE）也有觀察到細胞凋亡，但以日本腦炎病毒引發的細胞凋亡機制途徑尚未很瞭解。日本腦炎的非結構蛋白 NS4A 分子量約 14kDa，可以抑制干擾素反應的訊息傳遞路徑，且在先前的研究已證實登革熱病毒的 NS2A、NS4A 與 NS4B<sup>(19)(20)</sup>，以及西尼羅河病毒的 NS4B 蛋白可以抑制第一型干擾素的訊息傳遞<sup>(21)</sup>。非結構蛋白 NS4B 分子量約 27kDa 有文獻指出 NS4B 可能和宿主 ER 反應有關、改變基因的表現，和複製效能。<sup>(22)</sup>

### 第三節 細胞凋亡（apoptosis）

細胞凋亡又稱為細胞計畫性死亡，在真核細胞的生長與細胞分化中排除大量與不需要的細胞的方式，為一種細胞自我毀滅的過程。細胞凋

亡幾乎存在所有組織細胞中，當細胞老化受損，失去功能時，多數細胞會經由自殺行為來清除這些無用的細胞，以維持體內環境穩定。這種死亡方式有別於一般的細胞壞死（necrosis）。細胞凋亡的死亡在早期是經由活化去氧核糖核酸內切酶造成 DNA 斷裂、細胞膜皺縮、染色質變濃，但其胞器仍是完整。到了晚期，細胞膜會皺縮成不規則狀而後形成凋亡小體（apoptotic bodies），但細胞膜仍是完整的。最後由單核球或巨噬細胞吞噬處理。因此不會使周圍的細胞受到影響，而且不發生發炎反應。同時也會活化凋亡蛋白酶（caspase）的產生。而細胞壞死，會造成細胞內胞器脹大，細胞膜破裂，因而釋出發炎因子並且涉及周圍細胞和組織，有壞死現象的出現<sup>(30)</sup>。

#### 細胞凋亡與凋亡蛋白酶的關連性

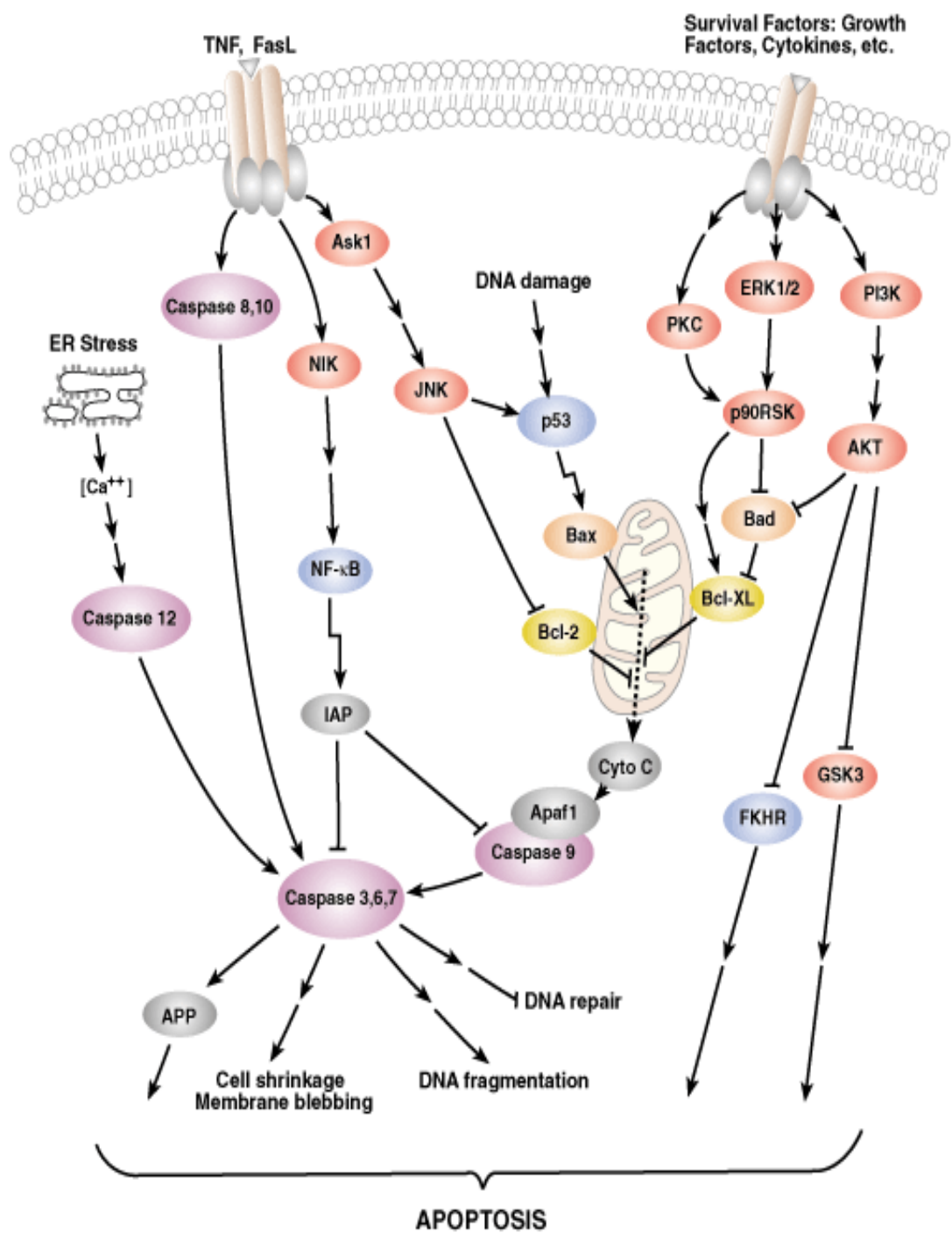
在細胞凋亡啟動的時候，凋亡蛋白酶會活化細胞凋亡路徑，亦是所謂瀑布式效應。故利用本身的蛋白酶活性去切割下游的 caspase 並活化 caspase。Caspase 有兩種，其中一種包括起始的 caspase，有 caspase2、8、9、10，另一種則為 effector 的 caspase，有 caspase3、6、7，當 caspase 活化時，有作用的 caspase 會將細胞蛋白裂解掉，最後導致細胞凋亡<sup>(31)</sup>  
(32)(33)。

## 細胞凋亡的兩個路徑

外在路徑：由死亡訊息與細胞表面接受器結合放出細胞凋亡訊號後開啟。當開啟細胞凋亡之後活化起始者如 caspase-8 和反應者如 caspase-3 蛋白水解酵素。

內在路徑：主要是指粒線體，其會釋出 cytochrome c，是一種電子傳遞鏈的關鍵蛋白，經由粒線體細胞凋亡信號，會活化 Apaf-1，進而活化起始者 caspase，如 caspase 9。隨後活化反應者 caspase-3 而促進細胞凋亡。另外內在路徑主要是粒線體的標的直接活化，或是間接經由外在途徑 caspase-8 分解未活化的蛋白 BID。當活化 BID 後，BID 會轉移到粒線體並刺激 cytochrome c 的釋放進而活化 caspase 9，隨後活化反應者 caspase-3 而促進細胞凋亡。而 Bcl-2 為一種抗細胞凋亡的蛋白，位於 caspase 9 上游抑制 caspase 的活化，在粒線體上扮演防止 cytochrome c 釋放的角色；。在此 mitochondria-mediated apoptosis 不活化 Bcl-2 家族<sup>(34)</sup>。





細胞凋亡路徑示意圖

#### 第四節 Annexin V 染色

細胞凋亡早期改變發生在細胞膜表面，這些細胞膜表面的改變之一是磷脂（Phosphatidyl Serine 簡稱 PS）從細胞膜內轉移到細胞膜外。PS 是一種帶負電荷的磷脂，正常生理情況它主要存在於細胞膜的內面。在細胞發生凋亡時，細胞膜上的這種磷脂分佈的不對稱性被破壞，而使 PS 暴露在細胞膜外。Annexin V 具有易與磷脂類結合的特性，對 PS 有高度的親和性，因此該蛋白可作為一敏感的探針來檢測暴露在細胞膜表面的 PS。

#### 第五節 活性氧化物與細胞凋亡相關性

活性氧化物（Reactive Oxygen Species 簡稱 ROS）為氧的化學反應之衍生物，它包括自由基（free radicals）像是超氧離子、氫氧自由基，過氧化氫。它們的高化學反應會使的 DNA、蛋白質、碳水化合物和脂質遭受破壞。細胞則利用抗氧化防禦系統去對抗活性氧化物，經由直接或是間接去對抗氧化性傷害。當活性氧化物去克服這些防禦系統，結果產生氧化壓力（oxidative stress）。氧化壓力包含病理引起的疾病如 AIDS、帕金森氏症（Parkinson's disease）、阿茲海默症（Alzheimer's disease）和一些退化性神經性疾病。氧化壓力主要的來源為活性氧化物，故調節活性氧化物對於調控氧化壓力扮演著重要角色，亦可以使用技術去調控細胞凋亡有關的氧化壓力。活性氧化物會調節多種細胞死亡<sup>(35-42)</sup>。



## 第六節 粒線體膜電位與細胞凋亡相關性

在凋亡研究的早期，從形態學觀察上粒線體沒有明顯的變化。隨著凋亡機制的深入研究，在細胞凋亡過程中粒線體跨膜電位（Mitochondria membrane potential 簡稱 MMP）會改變，主要是由於粒線體內膜發生動態的通透性轉變，這是因為生成了由粒線體各部分的蛋白質與細胞質中蛋白質聯合組成的通透性轉變孔道（mitochondria permeability transition pore 簡稱 PTpore），PT 孔道位於粒線體內膜與外膜接觸位點。PT 孔道主要功能調控粒線體內容物的釋放，包括了兩大部分：一個是粒線體內膜與 adenine nucleotide translocator（ANT）相關之蛋白質；另一個為外膜蛋白質（porin、voltage-dependent anion channel，VDAC）。當粒線體基質的 ATP/ADP 通道打開時，藉由粒線體氧化磷酸化產生 ATP。當 ATP/ADP 通道打開時，粒線體內膜兩側氫離子梯度消失、粒線體膜電位下降，使粒線体外膜漲破，而 caspase-inducing factors cytochrome c 和 AIF 釋放到細胞質液中造成細胞凋亡。故粒線體膜電位下降在細胞凋亡中為一重要指標（42-43）。

## 第七節 鈣離子測定與細胞凋亡相關性

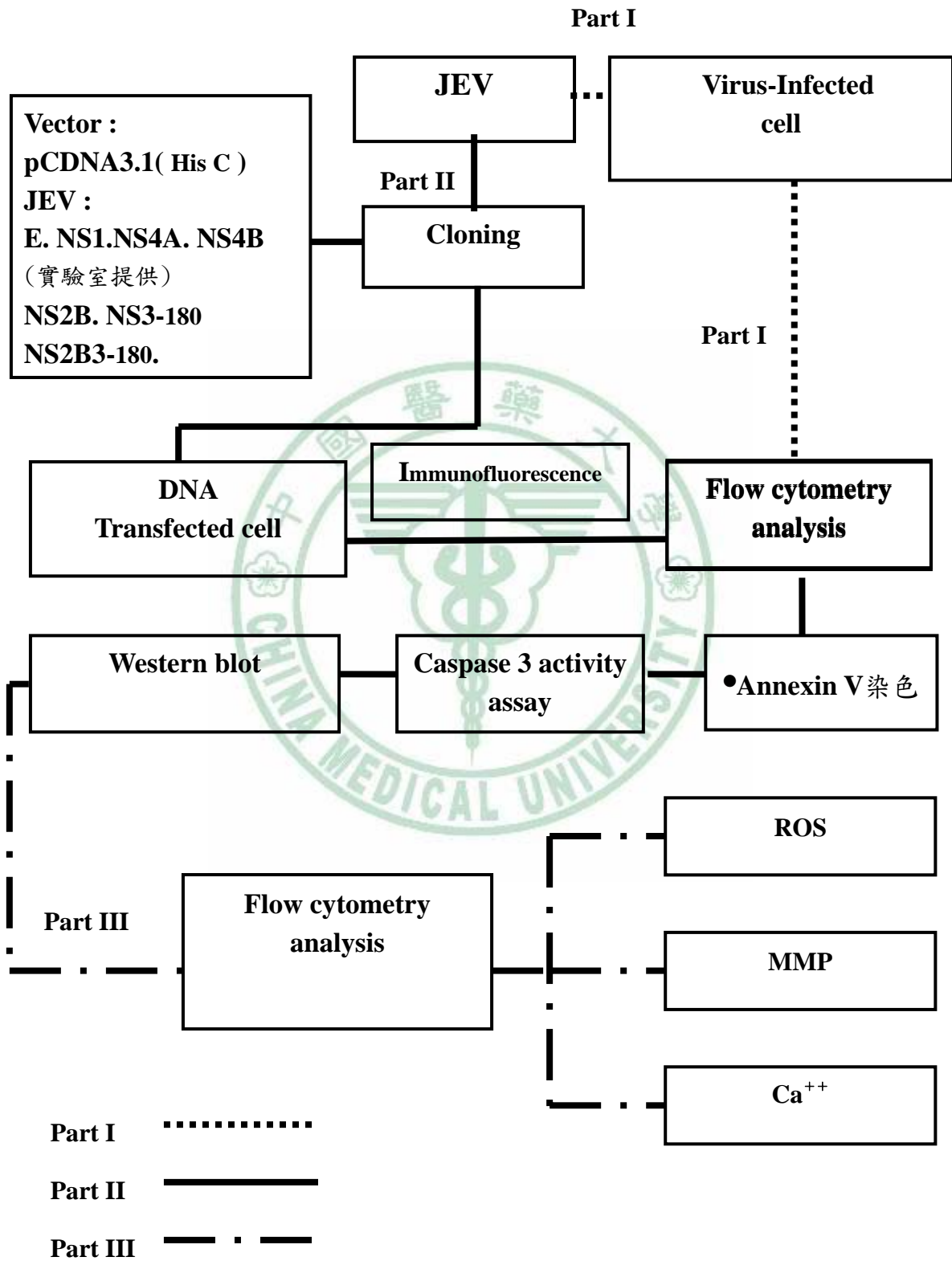
對於多數的生理狀況而言，細胞內鈣離子（Calcium）信號扮演著一個重要角色，經由調節鈣離子依賴型酵素像是磷脂酶、蛋白酶，核酸酶

導致細胞受傷和細胞凋亡。粒線體沿著內質網的路徑對調節細胞內鈣離子的含量扮演著關鍵角色。粒線體為鈣離子運送機制主要位點，經由粒線體而釋出鈣離子進入內膜。當細胞鈣離子過量時，細胞內液的鈣離子會佔據著粒線體，此時會誘發細胞膜孔道打開，會產生粒線體膜電位改變。粒線體會釋出 cytochrome c，隨後活化 caspase，但抑制細胞死亡。Bcl-2 家族蛋白在調控細胞凋亡上扮演著重要角色。這些蛋白會出現在調控細胞內鈣離子上。當 Bcl-2 蛋白在細胞內表現減少就會調控鈣離子上升而誘導細胞凋亡<sup>(43)</sup>。

## 第八節 研究架構

首先，利用流式細胞儀研究日本腦炎病毒誘導 HL-CZ 及 TE-671 細胞產生細胞凋亡現象。隨後，我們利用分子選殖技術，建立日本腦炎病毒蛋白 E、NS1、NS2B、NS3-180、NS2B-NS3-180、NS4A 及 NS4B 個別表現細胞株，並以免疫螢光染色來確認病毒蛋白表現。再利用流式細胞儀觀察病毒蛋白表現細胞是否也能獨自引發細胞凋亡。進一步，若病毒蛋白表現能獨自引發細胞凋亡，藉由偵測早期細胞凋亡的 Annexin V 染色與 Caspase-3 活性分析來更加確認細胞凋亡的產生。接著由西方墨點法探討病毒蛋白引發細胞凋亡的路徑。最後由流式細胞儀觀察病毒蛋白表現可能引起活性氧化物產生、細胞粒線體膜電位的改變及細胞鈣離子釋引發細胞凋亡之分子機制。

流程圖：



# 第三章、研究方法

## 第一節 研究設計

### 1 研究標的 I 之設計

目的：日本腦炎病毒誘導 HL-CZ 及 TE-671 細胞產生細胞凋亡？

方法：將日本腦炎病毒感染 TE-671 及 HL-CZ 細胞。條件為 (1) MOI 為 0.1，病毒數為  $1 \times 10^4$  pfu/ml 細胞數為  $1 \times 10^5$  個 cell / T30 flask  
(2) MOI 為 1，病毒數為  $4 \times 10^4$  pfu/ml 細胞數為  $4 \times 10^4$  個 cell / T30 flask，分別培養 24、48、72 與 96 小時。依不同時間點收下細胞，加入 2-3ml 70% 酒精，進行細胞固定。放置在  $-20^\circ\text{C}$  冰箱存放。第二天，加入 propidium iodide (PI) 染劑， $37^\circ\text{C}$  避光反應 30 分鐘後，再以流式細胞儀進行分析。

### 2 研究標的 II 之設計

目的：何種病毒蛋白是否能獨自引發細胞凋亡？

方法：1 利用分子選殖技術，建立日本腦炎病毒蛋白 E、NS1、NS2B、NS3-180、NS2BNS3-180、NS4A 及 NS4B 個別表現細胞株。  
2 將病毒蛋白各別 cDNA 轉染於  $2 \times 10^5$  cell/well 中，使病毒蛋白表現在 TE-671 及 HL-CZ 細胞。48 小時將細胞收下，加入 2-3ml 70% 酒精，進行細胞固定。放置在  $-20^\circ\text{C}$  冰箱存放。第二天，加

入 propidium iodide (PI) 染劑，37°C 避光反應 30 分鐘後，再以流式細胞儀進行分析。

3 進一步，若病毒蛋白表現能獨自引發細胞凋亡藉 Caspase-3 活性分析、Annexin V 染色確認病毒蛋白造成細胞凋亡。再由西方墨點法得知病毒蛋白造成細胞凋亡的傳遞路徑。

### 3 研究標的 III 之設計

目的：病毒蛋白表現細胞引發細胞凋亡分子機制為何？

方法：利用流式細胞儀分析病毒蛋白表現細胞可能促使活性氧化物增加、粒線體膜電改變、鈣離子濃度上升引發細胞凋亡之分子機制。

## 第二節 研究材料

1 病毒株：日本腦炎病毒 (*Japanese encephalitis virus*, JEV)

放大條件：利用日本腦炎病毒感染 BHK-21 細胞至 CPE 現象出現(約兩天)，離心收取上清液，冰至-80 冰箱。

2 細胞株 (cell line)：

**HL-CZ**：人類單核球細胞 (*Human promonocytic leukemia cell*) 購於 BCRC NO.60043。

培養條件：含 10 % 的 FBS (*fetal bovine serum*) 的 RPMI -1640 培養



液，置於 5%CO<sub>2</sub>、37°C 恆溫培養箱。

**TE-671:**人類腦胚胎瘤細胞 (Human Caucasian medulloblastoma) ，

感謝本校 楊文光教授提供。

培養條件:含有 2 mM L-glutamine、1.5 g/L sodium bicarbonate、0.1 mM non-essential amino acids、1.0 mM sodium pyruvate 、5 %的 FBS (fetal bovine serum) 的 Minimum essential medium (MEM)培養液，置於 5 %CO<sub>2</sub>、37°C 恆溫培養箱。

### 3 大腸桿菌菌株 ( *Escherichia coli* )

Top10 : 基因型為 F- , *mcrA* ,  $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$  ,  $\phi 80lacZ$  ,  $\Delta M1$  ,  $\Delta lacX74$  , *recA1* , *araD139* , *galU* , *galK* ,  $\Delta(ara-leu)7697$  , *rpsL* (Str<sup>R</sup>) , *endA1* , *nupG* , 用於質體轉形 (transformation)、質體製備。

### 4 質體 (Vector)

1pcDNA3.1/His C 含有 5.5kb 個鹼基配對，可在哺乳動物細胞 (mammalian cells) 中，經 human cytomegalovirus immediate-early (CMV) promoter 表現蛋白質，N'端帶 Anti-Xpress epitope tag、His-tag。

2pEGFP-N1 含有 4.7 個鹼基配對，可在哺乳動物細胞中，經 CMV promoter 表現 Enhanced green fluorescent protein (EGFP) 蛋白質，在顯

微鏡下產生綠色螢光。

5 引子(primer)

F: NS2bNS3-180-pcDNA3.1 (*Bam*HI)

ACCGGATCCGGGTGGCCAGCTACTGAG

R:myc-NS2bNS3-180-pcDNA3.1 (*Eco*RI)

TGCAGAATTCCAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCG

GTATAAGCTTCTGGGACTGG

F- NS3-180- pCDNA3.1-c (*Bam*HI)

ACCCGGATCCGGAGGCGTGTGTTTGGGACACG

R:myc-NS3-180-pcDNA3.1 (*Eco*RI)

TGCAGAATTCCAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCG

GTATAAGCTTCTGGGACTGG

F: NS2B-pcDNA3.1 (*Bam*HI)

ACCGGATCCGGGTGGCCAGCTACTGAG

R- NS2B- pcDNA3.1-c (*Eco*RI)

TGCAGAATTCTCTTTTTGTTGTCTTTAGAGT

6 抗體(Antibody)

Mouse Anti-His tag antibody (Novagen™)

Anti-mouse IgG (goat), AP labeled antibody(PerKlin-Elmer™)

Anti-Rabbit IgG AP-linked(Cell Signaling)

Rhoamone anti mouse IGg Ab (PerKlin-Elmer™)



Anti- $\beta$ -actin antibody (SIGMA)

Anti-caspase3 antibody(IMGENEX)

Anti-caspase8 antibody(upstate)

Anti-caspase9 antibody(MDBio,inc)

## 7 實驗試劑及緩衝液

試劑與緩衝液於附錄一

## 8 儀器、器材

實驗所用儀器、器材於附錄二

## 第三節 實驗方法

### 1 細胞培養

#### (1) 懸浮細胞培養

將 HL-CZ 培養於含有 10% 的 FBS (fetal bovine serum) 的 RPMI -1640 培養液中，置於 5%CO<sub>2</sub>、37°C 恆溫培養箱。當細胞生長在培養盤 70% 至 80% 時，利用培養盤裡原有的培養液將細胞沖離培養盤底部，吸起所有舊培養液，放置在 15ml 離心管，離心 1200rpm 5 分鐘，去除上清液，以 1xPBS (phosphate buffer saline) 清洗細胞後，離心去除上清液，再加入 3-4ml 培養液輕輕打散細胞，保留 1ml 並補培養液至 10ml 放回培養箱作繼代培養。當細胞數過多時，可以做細胞冷凍。

## (2) 貼細胞培養

將 TE-671 培養於含有 2 mM L-glutamine、1.5 g/L sodium bicarbonate、0.1 mM non-essential amino acids、1.0 mM sodium pyruvate、10 %的 FBS (fetal bovine serum) 的 Minimum essential medium (MEM) 培養液中，置於 5%CO<sub>2</sub>、37°C 恆溫培養箱。當細胞生長在培養盤 70% 至 80% 時，吸起舊的培養液，以 1xPBS 清洗細胞後，加入 1ml 的 trypsin 於培養箱作用 2 分鐘，再以 3-4ml 培養液中和 trypsin 後，輕輕打散細胞，保留 1ml 並補培養液至 10ml 放回培養箱作繼代培養。當細胞數過多時，可以做細胞冷凍將其冷凍在液態氮中。

## 2 細胞週期測定 (1)

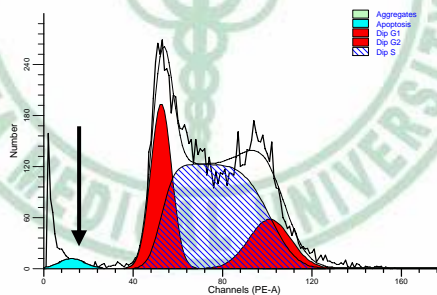
病毒感染細胞—流式細胞儀 (Flow Cytometry Assay)

將細胞培養在 T30 內，MOI 為 0.1：細胞數為  $1 \times 10^5$  個 cell / T30 flask，並於每個 T30 加入  $1 \times 10^4$  pfu/ml 日本腦炎病毒液；MOI 為 1：細胞數為  $4 \times 10^4$  個 cell / T30 flask，並於每個 T30 加入  $4 \times 10^4$  pfu/ml 日本腦炎病毒液分別培養 24、48、72 與 96 小時。依不同時間點收下細胞，以 trypsin 將細胞打下 (懸浮細胞則否) 放入試管中，離心 1200rpm，5 分鐘去除上清液，再以 1X PBS 清洗兩次，離心

1200rpm，5 分鐘，之後去除上清液。一滴滴加入 2-3ml 70%酒精，進行細胞固定。放置在-20°C 冰箱存放。第二天，將 sample 取出離心 1200rpm，5 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，5 分鐘，去除上清液，加入 cell cycle 的 propidium iodide (PI) 染劑【25µl PI( 1mg/ml )，0.5µl RNase( 10mg/ml ) 於 500µl PBS 中】視細胞數多寡而定。移至 FACS 管，37°C 避光反應 30 分鐘後，再以流式細胞儀進行分析。

流式細胞儀判讀方式：

藉由流式細胞儀分析可以觀察細胞週期的變化（附錄三）



縱軸：代表細胞數目

橫軸；代表吸收螢光量

箭頭指示方向：為細胞凋亡的部分

波峰一：代表細胞在 G1 期的情形與細胞量

斜線部份：代表細胞在 S 期的情形與細胞量

波峰二：代表細胞在 G2 期的情形與細胞量

### 3 質體純化 ( plasmid purification )

取含有質體的單一菌落，以 3ml LB 在 37°C 培養箱培養至 log phase 後取出，離心 12,000rpm 3 分鐘，倒掉上清液，用 Gene-Spin™ Miniprep Purification Kit 來純化質體。1) 以 solution I 溶液 200μl resuspend pellet，2) solution II 溶液 200μl 上下倒置數次 3) solution III 溶液 200μl 上下輕搖數次，離心 12,000rpm 15 分鐘。4) 將 spin column 插入一收集管 ( collection tube ) 中，並將離心後的上清液移至 spin column 中，離心 12,000rpm 1 分鐘，去除上清液。5) 加入 700μl Washing solution，離心 12,000rpm 1 分鐘，去除上清液，再離心 12,000rpm 3 分鐘，去除上清液。6) 再將收集管以 1.5ml 微量離心管置換，加入 20μl ddH<sub>2</sub>O 放置 2 分鐘，4°C 離心 12,000rpm 5 分鐘。7) 回收質體放置在 -20 冰箱備用。

### 4 聚合酵素連鎖反應 ( polymerase chain reaction , PCR )

在 0.5ml 微量離心管中，取病毒反轉錄的 cDNA 5 μl 做為模版 ( template )，依序加入 ddH<sub>2</sub>O 79μl，10X Optipol buffer 10 μl，dNTP (10mM) 1 μl，Primer F 與 Primer R (10mM) 各 2 μl，最後加 Optipol Taq polymerase 1 μl，總體積為 100 μl。混合均勻後加入約 20 μl 的礦物油在置於聚合酵素連鎖反應器 ( thermohybrid ) 的反應槽中。

反應條件：

1. 94°C 作用五分鐘
2. 94°C 作用 1 分鐘的 DNA 變性反應
3. 52°C 作用一分鐘三十秒的鏈合反應
4. 72°C 作用一分鐘的 DNA 合成反應，進行 40 個反應週期。
- 5 之後以 72°C 作用十五分鐘將 DNA 片段補齊。
- 6 最後設定 4°C 保存。

將 PCR DNA 產物跑 2% 瓊脂凝膠 (2% agarose gel) 進行電泳分析。確定 PCR 產物片段大小正確，以 Spin PCR Clean-Up system 試劑套組 (Viogene) 將 DNA 純化。

#### 5 限制酵素的處理

PCR 得到的產物，以 Spin PCR Clean-Up system 試劑套將 DNA 純化後，以 30  $\mu$ l 的 ddH<sub>2</sub>O 將 DNA 溶出，加入 10X reaction buffer 10 $\mu$ l 及切位的限制酵素依照最佳比例配製，使總體積為 100  $\mu$ l，以 37°C 作用三小時。相對應的質體載體亦以同樣的方式進行限制酵素的水解，來構築實驗的表現載體。

#### 6 質體的構築

10X ligation buffer 1 $\mu$ l、ligase 1 $\mu$ l、質體載體 1 $\mu$ l，加上欲接合的



Target DNA 7 $\mu$ l，16 $^{\circ}$ C 作用一個晚上。

#### 7 大腸桿菌之轉型 (transformation)

將構築好的質體 10 $\mu$ l 加到 200 $\mu$ l 適應性細胞 (Top10) 中，混合後放在冰上作用三十分鐘。再放置在 42 $^{\circ}$ C 水浴槽反應 90 秒後，迅速放置冰上三分鐘，之後在 flow 中加入 800 $\mu$ l 不含抗生素的 LB 培養液。在 37 $^{\circ}$ C 培養箱培養一小時後，離心 5000rpm 5 分鐘去除上清液，均勻塗在含抗生素的 LB 培養基

#### 8 DNA 轉染 (DNA transfection)

細胞的轉染是利用 Arrest In(AI) Transfection Kit 試劑。

將  $2 \times 10^5$  cell/well 轉染於 6-well plate 中培養至隔夜 (懸浮細胞則否)。將 3 $\mu$ g/well 的 DNA 以 50 $\mu$ l/well 不含胎牛血清的培養液稀釋。再加入 15 $\mu$ l 的 AI (Transfection Kit Reagents) 混合均勻靜置於室溫十五分鐘，使得 AI/DNA complexes 形成。再將要轉染的細胞移去舊的培養液，利用 PBS 將細胞清洗一次。最後將反映 15 分鐘的 AI/DNA complexes 加入，並加入 1ml 不含胎牛血清的培養液，於 37.0 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 下培養 3 到 5 小時，再更換 2ml 含胎牛血清的培養液，繼續培養 72 小時。

## 9 免疫染色 (1)

將  $2 \times 10^5$  cell/well 轉染於 6-well plate，於 48 小時吸去培養液，用 PBS 洗滌兩次去除殘留的培養液，以福馬林固定，再加入 10% methanol 乾燥，利用 PBS 洗滌兩次，去除上清液。加入 anti-His 抗體反應一小時，再以 PBS 洗滌三次去除抗原抗體非專一性結合，再加入 Rhoamone anti mouse IGg Ab (1:1000) 避光反應一小時，於避光條件下利用 PBS 清洗後，利用螢光顯微鏡觀察。

## 10 免疫染色 (2)

將  $2 \times 10^5$  cell/well 轉染於含有玻片的 6-well plate，於 48 小時吸去培養液，用 PBS 洗滌兩次去除殘留的培養液，以福馬林固定，再加入 10% methanol 乾燥用，利用 PBS 洗滌兩次，去除上清液。加入 anti-JEV (1:400) 抗體反應一小時，再以 PBS 洗滌三次去除抗原抗體非專一性結合，再加入 FITC anti mouse IGg Ab (1:1000) 避光反應一小時，於避光條件下利用 PBS 清洗後，利用共扼焦顯微鏡 (confocal) 觀察。



## 11 細胞週期測定 (2)

### 病毒 DNA 轉染細胞—流式細胞儀

將  $2 \times 10^5$  cell/well 轉染於 6-well plate，於 48 小時後吸去培養液，用 PBS 洗滌兩次去除殘留的培養液，以 trypsin 打下細胞（懸浮細胞則否）放到試管中，離心 1200rpm，5 分鐘，之後去除上清液，再以 1X PBS 清洗兩次，離心 1200rpm，5 分鐘，去除上清液。一滴滴加入 2-3ml 70% 酒精，進行細胞固定。放置在  $-20^\circ\text{C}$  冰箱存放。第二天，將 sample 取出離心 1200rpm，5 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，5 分鐘，去除上清液，加入染劑【25 $\mu\text{l}$  PI (1mg/ml)，0.5 $\mu\text{l}$  RNase (10mg/ml) 於 500 $\mu\text{l}$  PBS 中】視細胞數多寡而定。移至 FACS 管， $37^\circ\text{C}$  避光反應 30 分鐘後，再以流式細胞儀進行分析。

## 12 Annexin V 染色

將  $2 \times 10^5$  cell/well 細胞轉染於有蓋玻片放置的 6-well plate 中，48 小時後吸去培養液，用 1xPBS 洗滌兩次去除殘留的培養液。再用 Annexin V -BindingBuffer Resuspend 細胞，吸去殘留液。加入 Annexin V conjugateSubstube 10 $\mu\text{l}$  /1ml Annexin V -Binding Buffer，室溫避光反應 15 分鐘。將蓋玻片固定於載玻片上，封邊，利用顯微鏡觀察。

### 13 caspase3 活性分析 (caspase3 activity assay)

使用 Fluorimetric assay kit。

將細胞分盤到 6 well plate 中培養十八到二十四小時，進行轉染後培養 48 小時將細胞收起，以冰的 1X PBS 清洗，離心 1200rpm，5 分鐘之後去除上清液。加入 100 $\mu$ l extraction buffer 溶解細胞後，冰上反應 10 分鐘，4 $^{\circ}$ C 離心 1200rpm，5 分鐘之後先收取上清液 50 $\mu$ l。再將 assay buffer 50 $\mu$ l、細胞上清液 50 $\mu$ l，及 caspase3 substrate conjugate solution 10 $\mu$ l，混合加入 black microtiter plate 中。避光放置培養箱 37.0 $^{\circ}$ C 培養 2 小時，再使用 cytoFluor 測其活性。

### 14 蛋白質之電泳分析 (SDS-PAGE)

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  $^{\circ}$ C 加熱五分鐘後，迅速置於冰上。於電泳槽注入樣本 10  $\mu$ l，並注入控制組 10  $\mu$ 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。

## 15 西方墨點法

實驗所使用的電泳裝置為 Bio-Rad 半乾式的電泳轉漬槽。

SDS-PAGE 後，切除集膠體部份，膠片浸在轉漬緩衝液 (Transfer buffer) 中。取轉印紙 (硝化纖維紙 nitrocellulose paper) 切成膠片大小浸在轉漬緩衝液，先鋪上三張濕潤的 3M 濾紙，後鋪上濕潤的轉印紙，疊上已濕潤的膠片，再鋪上三張濕潤的 3M 濾紙。以 200 mA 轉印 100 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 (1:1000 稀釋)，置於室溫搖擺一至二小時。回收二抗，轉印紙以 1 x TBST 清洗七分鐘三次。加入 NBT/TCIP 顯色劑，反應至呈色。加入二次水以終止反應，晾乾後保存。

## 16 活性氧化物測定

將  $2 \times 10^5$  cell/well 轉染於 6-well plate，於 48 小時後吸去培養液，用 1xPBS 洗滌兩次去除殘留的培養液，以 trypsin 打下細胞 (懸浮細胞則否)，放入試管中離心 1200rpm，5 分鐘，之後去除上清

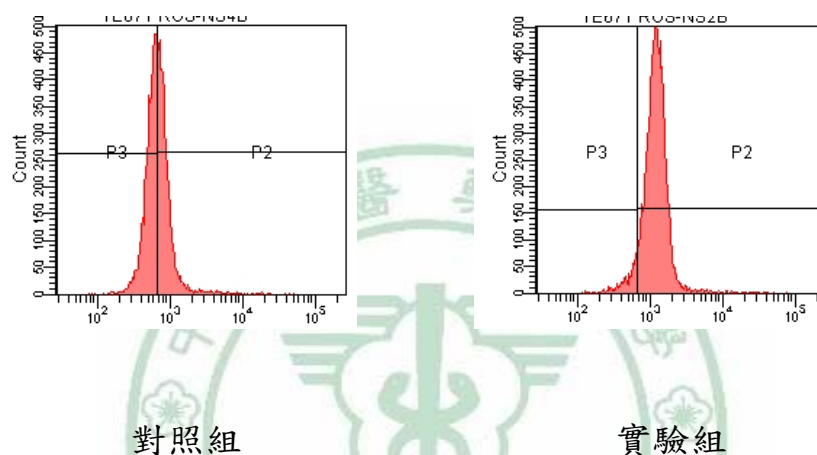
液，再以 1X PBS 清洗兩次，離心 1200rpm，5 分鐘，去除上清液。

加入 DCFH-DA 染劑【1 $\mu$ l DCFH-DA (10 $\mu$ M) 於 500 $\mu$ 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，

再以流式細胞儀進行分析。

利用流式細胞儀測 ROS 判讀方式：



縱軸：代表細胞數

橫軸：代表吸收螢光量

利用縱軸黑線將上圖波峰平均分半為 P2 與 P3。當細胞有氧化物

產生，雷射會激發螢光使螢光量增加波峰由中間往右移（P2 部分增加）

## 17 鈣離子測定

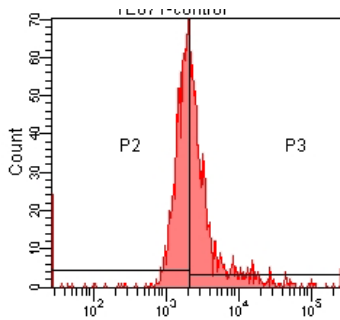
將  $2 \times 10^5$  cell/well 轉染於 6-well plate，48 小時後吸去培養液，用 1xPBS 洗滌兩次去除殘留的培養液，以 trypsin 打下細胞（懸浮細胞則否）放入試管中離心 1200rpm，5 分鐘，之後去除上清液，再以 1X PBS 清洗兩次，離心 1200rpm，5 分鐘，去除上清液。加入 FLUO3/AM 染劑 0.3-1ml ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) 視細胞數多寡而定。37°C 培養箱避光反應 30 分鐘，離心 1200rpm，5 分鐘去除上清液，再以 1x PBS 清洗兩次，離心 1200rpm，5 分鐘，去除上清液。加入 500 $\mu\text{l}$  PBS，並移至 FACS 管，再以流式細胞儀進行分析。

（判讀方式與 ROS 相同）

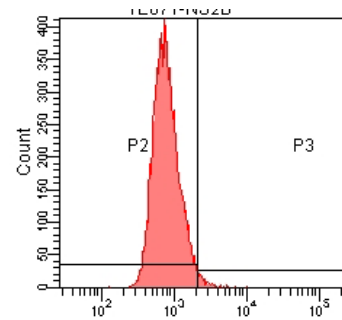
## 18 粒線體膜電位測定

將  $2 \times 10^5$  cell/well 轉染於 6-well plate，於 48 小時後吸去培養液，用 1xPBS 洗滌兩次去除殘留的培養液，以 trypsin 打下細胞（懸浮細胞則否）放入試管中離心 1200rpm，5 分鐘，之後去除上清液，再以 1X PBS 清洗兩次，離心 1200rpm，5 分鐘，去除上清液。加入 DioC6 染劑【10 $\mu\text{l}$  DioC6 ( $400 \mu\text{M}$ ) 於 500 $\mu\text{l}$  PBS 中】視細胞數多寡而定。移至 FACS 管，37°C 避光反應 30 分鐘後，再以流式細胞儀進行分析。

利用流式細胞儀測膜電位改變之判讀方式：



對照組



實驗組

縱軸：代表細胞數

橫軸：代表吸收螢光量

利用縱軸黑線將上圖波峰平均分半為 P2 與 P3。當細胞膜電位下降，雷射所激發螢光少波峰由中間往左移（P2 部分增加）。



## 第四章、研究結果

### 第一節 以 MOI 為 0.1 及 1 的條件下日本腦炎病毒感染 HLCZ 細胞及 TE671 細胞之細胞週期分析

利用流式細胞儀分析日本腦炎病毒感染 HL-CZ 及 TE-671 細胞分別在 MOI 為 0.1 與 1 的條件感染 24、48、72、96 小時，發現隨著時間增加細胞凋亡程度也隨之上升。HL-CZ 細胞在 MOI 為 0.1 條件經由病毒感染後 72 能看見明顯細胞凋亡；而當感染病毒條件提升至 MOI 為 1 時發現在 48 小時就有細胞凋亡，時間上提前 24 小時就看到細胞凋亡的情形。另外，在 TE-671 細胞部份則發現隨著 MOI 為 0.1 提升至 MOI 為 1 時在 48 小時細胞凋亡比例明顯上升，因此在 TE-671 細胞 MOI 為 1 時病毒才明顯引起細胞凋亡（圖一）。

### 第二節 日本腦炎病毒蛋白 NS2B、NS3-180、NS2BNS3-180 的質體構築

將病毒的 cDNA 進行 PCR 增幅，PCR 產物經過純化後，跑 2% 瓊脂確認 NS2B 的片段大小為 393bp（圖二 A）、NS3-180 的片段大小為 540bp（圖二 B），NS2BNS3-180 的片段大小為 933bp（圖二 C）。接著再利用 *Bam*H I、*Eco*R I 限制內切酶處理接到相同切位的 pcDNA 載體上經轉型到勝任細胞上，再利用基因轉殖電泳分析進行質體選殖。將帶有 NS2B（圖

三 A)、NS3-180 (圖三 B)、NS2B-NS3-180 (圖三 C) 的載體 pcDNA (5514bp), 進行序列片段確認。

### 第三節 蛋白表現 HL-CZ 及 TE-671 細胞之免疫螢光染色

HL-CZ 細胞分別進行 (pcDNA/His C, pE, pNS1, pNS2B, pNS3-180, pNS2BNS3-180, pNS4A 及 pNS4B): pEGFP 以 9 比 1 的比例進行轉染, 利用螢光顯微鏡觀察, 綠色螢光為 EGFP 蛋白 (圖四一七 B、F), 紅色螢光利用 anti: His (Rhodamine) 表現出來的 E、NS1、NS2B、NS3-180、NS2B-NS3-180、NS4A 及 NS4B 蛋白 (圖四一七 C、G), merge 後可以看到兩種基因在細胞都有表現, 而呈現黃色螢光 (圖四一七 D、H)。

同時, 在 TE-671 細胞也分別進行 ((pcDNA/His C, pE, pNS1, pNS2B, pNS3-180, pNS2BNS3-180, pNS4A 及 pNS4B): pEGFP 以 9 比 1 的比例進行共同轉染, 利用螢光顯微鏡觀察, 綠色螢光為 EGFP 蛋白 (圖八一十一 A、D), 紅色螢光利用 anti: His (Rhodamine) 所表現出來的 E、NS1、NS2B、NS3-180、NS2B-NS3-180、NS4A 及 NS4B 蛋白 (圖八一十一 B、E), merge 後可以看到兩種基因在細胞都有表現, 而呈現黃色螢光 (圖八一十一 C、F)。

另外, 又分別將 pE、pNS1、pNS2B、pNB3-180、pNS2B3-180 轉染在 TE-671 細胞, 培養兩天後以螢光顯微鏡觀察。利用一抗 anti: JEV,

二抗 anti : mouse Co-AP 確認病毒蛋白 E、NS2B、NB3-180、NS2B3-180 在 TE-671 細胞表現。自然視野下觀察到 E、NS2B、NB3-180、NS2B3-180 蛋白表現在 TE671 細胞 (圖十二 B、C、D、E)。綠色螢光為利用 anti : JEV (FITC) 所表現出來的 E、NS1、NS2B、NB3-180、NS2B3-180 蛋白，確認病毒蛋白在細胞有表現 (圖十二 G、H、I、J)。

#### 第四節 流式細胞儀分析日本腦炎病毒蛋白誘導 HL-CZ 及 TE-671 細胞凋 亡程度

利用流式細胞儀分析日本腦炎病毒基因分別轉染於 HL-CZ 及 TE-671 細胞在不同蛋白存在表現後，HL-CZ 細胞誘導細胞凋亡比例 E (8.7%)、NS1 (7.3%)、NS2B (15.3%)、NS3-180 (21.1%)、NS2B-NS3-180 (29%)、NS4A (5.9%) 及 NS4B (1.0%) (圖十三)。TE-671 細胞誘導細胞凋亡比例分別為 E (0.1%)、NS1 (0.1%)、NS2B (0.6%)、NS3-180 (7.2%)、NS2B-NS3-180 (18.2%)、NS4A (0.23%) 及 NS4B (0.03%) (圖十三)。結果發現在 HL-CZ 細胞病毒蛋白 NS2B、NS3-180、NS2BNS3-180 表現，細胞會產生較明顯細胞凋亡；同時在 TE-671 細胞，病毒蛋白 NS3-180、NS2BNS3-180 表現，細胞也產生明顯細胞凋亡。

## 第五節 Annexin V 檢測細胞凋亡之早期反應

在 TE-671 細胞當病毒蛋白有表現促使細胞凋亡發 Phosphotidyl Serine 磷脂從細胞膜內轉移到細胞膜外，與 Annexin V 染劑結合在螢光顯微鏡下為紅色螢光。因此，病毒蛋白 NS3-180，NS2BNS3-180 表現在 TE-671 細胞在螢光顯微鏡下則看到多數紅色螢光，E、NS2B 則有部分紅色螢光出現，顯示出 E，NS2B，NS3-180，NS2BNS3-180 皆能引起細胞凋亡，其中以 NS2BNS3-180 表現在細胞引起明顯細胞凋亡（圖十四）。

## 第六節 分析日本腦炎病毒蛋白表現誘導 Caspase 3 活性分析

日本腦炎病毒表現對 HL-CZ 細胞（A）、TE-671 細胞（B）作用 48 小時後，細胞溶解與 Caspase 3 substrate、Assay buffer 作用 2 小時，再利用 cytofluor 測其活性。比較誘導 Caspase 3 蛋白產生的比例。當 Caspase 3 活性被活化就能初步判定細胞會產生細胞凋亡。結果發現在 HL-CZ 細胞，病毒蛋白 E，NS3-180，NS2BNS3-180 表現，細胞會活化明顯 Caspase 3 蛋白產生，其活化 Caspase 3 蛋白活性的比例依序增加（圖十五）。TE-671 細胞，病毒蛋白 NS2B，NS3-180，NS2BNS3-180 表現，細胞也會活化 Caspase 3 蛋白產生，其活化 Caspase 3 蛋白活性的比例依序增加（圖十五）。

## 第七節 利用西方墨點法分析病毒蛋白對 HLCZ 細胞及 TE671 細胞之 細胞凋亡相關 caspase 3、8、9 蛋白活性

分別於 HL-CZ 細胞轉染 pE、pNS2B、pNS3-180、pNS2BNS3-180，經蛋白表現後，觀察 caspase 3、8、9 蛋白表現量。利用一抗 anti-caspase 3、8、9，二抗 anti-mouse co-AP 確認 caspase 3、8、9 蛋白活性，並以  $\beta$ -actin 當作 internal control。發現在 HL-CZ 細胞當病毒蛋白 NS2B 及 NS3-180 表現會活化 caspase 3、8 蛋白；而病毒蛋白 NS2BNS3-180 表現會活化 caspase 3、8、9 蛋白產生。(圖十六)。

另外在 TE-671 細胞轉染 pE、pNS2B、pNS3-180、pNS2BNS3-180，經蛋白表現後，觀察 caspase 3、8、9 蛋白表現量，分別利用一抗 anti-caspase 3、8、9，二抗 anti-mouse co-AP 確認 caspase 3、8、9 蛋白活性，並以  $\beta$ -actin 當作 internal control。發現在 TE-671 細胞當病毒蛋白 E、NS3-180、NS2BNS3-180 有表現會活化 caspase 3、9 蛋白。(圖十七)。

## 第八節 探討日本腦炎病毒蛋白引發細胞凋亡之分子機制。

利用流式細胞儀分析活性氧化物。在 TE-671 細胞病毒蛋白 NS2B、NS2BNS3-180 表現時產生活性氧化物(圖十八)。另外當病毒蛋白 NS2BNS3-180，在 HL-CZ 細胞表現時有鈣離子濃度上升的趨勢(圖十九)。利用流式細胞儀分析粒線體膜電位的變化。病毒蛋白 E Protein，



NS2BNS3-180 在 HL-CZ 細胞表現時有膜電位下降的情形產生(圖二十)。

### 第九節 病毒蛋白表現 TE-671 細胞之免疫螢光染色

分別將 pE、pNS2B、pNB3-180、pNS2BNS3-180：pDsRed-Mito 以 9 比 1 的比例在 TE-671 細胞進行共同轉染，兩天後以共軛焦分光光譜顯微鏡觀察。綠色螢光為 anti: His (FITC) 所表現出來的 E、NS2B、NB3-180、NS2BNS3-180 蛋白 (D、G、J、M)。紅色螢光為 E、NS2B、NB3-180、NS2BNS3-180 表現 pDsRed-Mito 的情形 (B、E、H、K、N)，merge 後呈現出黃色螢光 (C、F、I、L、O) 代表病毒基因在細胞都有表現 (圖二十)。

另外，又分別將 pE、pNS2B、pNB3-180、pNS2BNS3-180：pDsRed-Mito 以 9 比 1 的比例在 TE-671 細胞進行共同轉染，兩天後以共軛焦分光光譜顯微鏡觀察。綠色螢光為 anti: Cytochrome c (FITC) 所表現出來的 E、NS2B、NB3-180、NS2BNS3-180 蛋白 (D、G、J、M)。紅色螢光為 E、NS2B、NB3-180、NS2BNS3-180 表現 pDsRed-Mito 的情形 (B、E、H、K、N)。當病毒基因在細胞有表現且誘導細胞凋亡產生走粒線體路徑就能促使 Cytochrome c 從粒線體釋放出來，由 (圖二十一 C、F、I、L、O) 看出 merge 後並沒有完全呈現黃色螢光，代表 E、NS2B、NB3-180、NS2BNS3-180 基因表現會促使 Cytochrome c 從粒線體釋放出來，證明能引起細胞凋亡。



# 第五章、討論

## 第一節 結果討論

日本腦炎病毒引起的典型病程共分為四期包括前驅期、急性期（病毒血期）、亞急性期（侵犯中樞神經系統）、恢復期。因此本實驗利用 HL-CZ（人類單核球細胞）細胞株可以觀察病毒血期的情形，另一株 TE-671 則可以觀察日本腦炎病毒在感染細胞後進入亞急性期侵犯中樞神經系統的情形與變化。

NS2BNS3-180 具有蛋白酶的功能，主要是由日本腦炎病毒非結構性 NS2B、NS3-180 蛋白所構成，而 NS2B 是一個協助 NS3-180 功能的角色。文獻指出西尼羅河病毒研究 NS3-180 能獨自引發細胞凋亡，而不需要 NS2B 協助<sup>(6)</sup>。故在同屬於黃質病毒屬的日本腦炎病毒裡試圖探討 NS2B、NS3-180 兩者之間對於誘導細胞凋亡的關係。本篇主要探討目的如下：1 日本腦炎病毒誘導神經細胞是否會產生 HL-CZ 細胞及 TE-671 細胞凋亡現象？2 病毒蛋白是否能獨自引發細胞凋亡？3 利用活性氧化物、細胞粒線體膜電位的改變，細胞鈣離子釋放，探討病毒蛋白 E、NS2B、NS3-180、NS2B-NS3-180 引發細胞凋亡之分子機制。

流式細胞儀是一台可以偵測細胞週期、細胞凋亡的機器，非常靈敏，利用流式細胞儀的分選原理，以一萬顆細胞做針測，不會有細胞數不同的情形。利用流式細胞儀分析日本腦炎病毒感染 HL-CZ 細胞在 MOI

為 0.1 的條件感染 72 小時可造成 HL-CZ 細胞凋亡，細胞凋亡比例 13.8 %，而相同的條件下感染 TE-671 細胞，在 72 小時誘導細胞凋亡比例只有 0.7%，明顯的看出 HL-CZ 對日本腦炎病毒有較高的感受性使細胞產生自殺性反應也就是產生細胞凋亡，這是在 MOI 為 0.1 的條件產生的情形。另外，當 MOI 為 1 時 48 小時就明顯可以看到 HL-CZ 細胞與 TE-671 細胞產生細胞凋亡，這項結果與 MOI 為 0.1 相作比較，發現在 HL-CZ 細胞 MOI 為 1 時病毒感染引起細胞凋亡時間由 72 小時提早至 48 小時，時間提前 24 小時；而在 TE-671 細胞 MOI 為 1 時就有明顯細胞凋亡，因此，病毒在感染 TE-671 細胞需要有足夠的病毒才能誘導細胞明顯細胞凋亡。在這項實驗統計結果觀察到隨病毒感染細胞時間增加誘導細胞凋亡的比例也隨之增加形成一個線性趨勢。但在 HL-CZ 細胞卻發現在 96 小時 MOI 為 0.1 誘導細胞凋亡比例比 MOI 為 1 還要高，推測可能與細胞本身代數替換速率有關，在 37°C、5%CO<sub>2</sub> 培養 HL-CZ 細胞平均 48 小時就必須更換一次培養液與 TE-671 細胞相比快了 24-48 小時。所以有可能在培養 96 小時產生一些代謝上的變化。理論上 MOI 為 0.1 細胞數比 MOI 為 1 多，感染 96 小時有較多細胞產生細胞凋亡。

當得知日本腦炎病毒 48 小時可使 HL-CZ 及 TE-671 細胞產生明顯細胞凋亡接下來我們就去探討病毒蛋白是否能獨自引發細胞凋亡？本實驗研究的病毒蛋白 NS2b-NS3-180 蛋白酶除了有蛋白酶作用，在登革熱病毒

研究還被發現與細胞凋亡有關<sup>(4)</sup>；文獻也指出西尼羅河病毒研究 NS3-180 能獨自引發細胞凋亡<sup>(6)</sup>。因此實驗中利用分子選殖技術將得到的各別病毒表現細胞株以流式細胞儀觀察病毒蛋白 NS3-180、NS2B-NS3-180 表現 HL-CZ 及 TE-671 細胞同樣會產生細胞凋亡，其中又以 NS2B-NS3-180 在兩株細胞內誘導更明顯細胞凋亡，這項結果也顯示 NS3-180 需要 NS2B 這個輔助因子來提升誘導細胞凋亡程度。

此外，在本實驗 HL-CZ 細胞也分析出 E、NS2B 在 HL-CZ 細胞也有部分誘導細胞凋亡的現象。這項結果在過去登革熱的研究也有發現 E 基因在細胞裡表現會誘導細胞凋亡<sup>(18)</sup>。NS2B 在 HL-CZ 細胞能誘導細胞凋亡，在過去的文獻並沒有被報導出來，這是本論文研究發現到的新現象。

進一步，藉由 Annexin V 染色、Caspase-3 活性分析確認病毒蛋白 E、NS2B、NS3-180、NS2B-NS3-180 確實造成 HL-CZ 及 TE-671 細胞有不同程度的細胞凋亡，以 NS2B-NS3-180，NS3-180，E，NS2B 誘導細胞凋亡比例依序遞減。綜合以上結果發現病毒蛋白在這兩株細胞裡表現所誘發的細胞凋亡程度 HL-CZ 細胞的數據皆比 TE-671 細胞敏感，猜測可能是因為細胞本身複製速率不同，一般來說人類單核球細胞（HL-CZ）原本細胞複製速率就比神經細胞（TE-671）來的快，所以導致 HL-CZ 細胞產生細胞凋亡比率高於 TE-671 細胞的原因。

細胞凋亡的機制，主要是藉由細胞凋亡基因和蛋白的調節表現去調

控凋亡的機制，包括多種的瀑布式的反應，結果導致細胞的裂解和產生凋亡小體。而造成這種自殺機制的主要角色為 caspase 家族蛋白，故我們要去偵測 caspase 蛋白。由 Caspase3 與 Caspase8、9 西方墨點法等試驗確認病毒蛋白 NS2B、NS3-180、NS2BNS3-180 在 HL-CZ 當病毒蛋白 NS2B、NS3-180、NS2BNS3-180 有表現會活化 caspase 3 蛋白；同時當病毒蛋白 E、NS2B、NS3-180、NS2BNS3-180 表現會活化 caspase 8 蛋白，但病毒蛋白 E 表現卻未活化 caspase 3 蛋白，可能是因為沒有作量化的原因導致表現病毒 E 基因的 HL-CZ 細胞在西方墨點法做 caspase 3 蛋白表現時沒有看見 caspase 3 蛋白表現。另外 NS2BNS3-180 有表現也會活化 caspase 9 蛋白。所以在 HL-CZ 細胞病毒蛋白表現會藉由 Caspase3 與 Caspase8 路徑來誘導細胞凋亡。在 TE-671 細胞當病毒蛋白 E、NS3-180、NS2BNS3-180 有表現則會活化 caspase 3、caspase 9 蛋白來誘導細胞凋亡。藉由西方墨點法驗證 E、NS2B、NS3-180、NS2BNS3-180 能誘導細胞凋亡同時在不同細胞表現會誘導不同路徑的細胞凋亡，可能的原因是因為不同細胞株所以本身就會有不同表現，但最終都會藉由活化 Caspase3 蛋白引起細胞凋亡。

利用 DioC6 染劑染色，表現病毒蛋白 E 的 HLCZ 細胞株有粒線體膜電位下降的趨勢；藉由 FLUO3/AM 染劑測得細胞表現 NS2B3-180 促使細胞內鈣離子釋放；利用 DCFH-DA 染劑得知表現 NS2B 的 TE671 細胞株



有活性氧化物的產生；而當細胞表現病毒蛋白 NS2B3-180 時，發現活性氧化物生成和粒線體膜電位下降而誘導細胞凋亡。

綜合以上結果發現 NS2BNS3-180 表現在兩株細胞內都能顯著的引起細胞凋亡與文獻結果相符合，同時在西方墨點法也發現日本腦炎病毒蛋白 NS3-180 也能獨自引發細胞凋亡與西尼羅河病毒研究 NS3-180 能獨自引發細胞凋亡，而不需要 NS2B 協助結果一致。但由流式細胞儀分析病毒蛋白誘導細胞凋亡比例得知在兩株細胞內 NS3-180 誘導細胞凋亡比例皆比 NS2BNS3-180 顯示 NS3-180 若能得到 NS2B 協助皆提升細胞凋亡比例。最後，在流式細胞儀分析結果也發現 NS2B 能誘導細胞凋亡產生這項結果也在本研究方法 Caspase 3 活性分析、Annexin V、西方墨點法得到應證。NS2B 可能藉由活性氧化物誘導細胞凋亡，推測 NS2B 在細胞表現產生一些過氧化物進到粒線體，經由粒線體內清除系統去除過多過氧化物，當粒線體無法清除過多過氧化物可能就促使粒線體 PT 孔道開啟釋出 AIF、cytochrome c 到細胞質液中造成細胞凋亡。NS2B 能誘導細胞凋亡在過去文獻並沒有報導，為本論文研究的新發現。

## 第二節 研究限制

由於這些日本腦炎病毒蛋白表現有些會誘導細胞凋亡，因此在 DNA 轉染於細胞要不斷的轉染才能看到病毒蛋白的表現。所以在實驗上結果的一致性有著很大的考驗，必須一再確認結果才足以可信，因此在時間與金錢上都是很大的損傷。





## 第六章、結論與建議

### 第一節 結論

日本腦炎病毒在 MOI 為 1 的條件下，感染 48 小時造成 HL-CZ 及 TE-671 細胞產生細胞凋亡。而個別病毒蛋白 E、NS2B、NS3-180、NS2NS3-180 表現細胞會導致細胞凋亡。其個別病毒蛋白引發細胞凋亡分子機制在 HL-CZ 細胞 NS2B，NS3-180，NS2BNS3-180 藉由外在路徑死亡訊息與細胞表面接受器結合放出細胞凋亡訊號後開啟。當開啟細胞凋亡之後活化起始者 caspase-8 和反應者 caspase-3 蛋白水解酵素而促進細胞凋亡。當病毒蛋白 NS2BNS3-180 表現時利用鈣離子釋放而誘導細胞凋亡。在 TE-671 細胞的表現 E，NS2B，NS3-180，NS2BNS3-180 藉由引發內在路徑粒線體的標的間接經由外在途徑 caspase-8 分解未活化的蛋白轉移到粒線體並刺激 cytochrome c 的釋放進而活化 caspase 9，隨後活化反應者 caspase-3 而促進細胞凋亡。

在 TE-671 細胞當病毒蛋白 NS2B3-180 表現時利用活性氧化物或是鈣離子的產生促使膜電位的改變來誘導細胞凋亡引發內在路徑粒線體，釋出 cytochrome c，進而活化起始者 caspase 9，隨後活化反應者 caspase-3 而促進細胞凋亡。

另外，在本篇論文研究我們另外發現 NS2B 表現時利用活性氧化物的產生來誘導細胞凋亡。E Protein 也藉由引發內在路徑粒線體，釋出

cytochrome c，進而活化起始者 caspase 9，隨後活化反應者 caspase-3 而促進細胞凋亡。由以上結果發現在不同細胞引發細胞凋亡的分子機制不同，對此我們有了更深一步了解，未來我們可以更加詳究藉由不同細胞探討不同時期病程其病毒作用機制為何，將有助對治療重要性。

## 第二節 建議

對於本篇的實驗，在未來，我們可以利用西方墨點法做一些本篇沒使用到的調控細胞凋亡的其他抗體，更進一步探究調控細胞凋亡因子。而後也可以做抗體的抑制劑，去看他抑制抗體的現象。例如加入caspase 3抑制劑Ac-DEVD-CHO，去看它抑制caspase 3的現象。對於病毒蛋白誘導細胞凋亡更進一步確認。

## 參考文獻

1. 塗炳峯 (2006) . 人類疱疹病毒第八型Kaposin蛋白與神經細胞因子Septin4之交互作用. 【碩士論文】. 亞洲大學. 生物科技與生物資訊學所.
- 1 鄭傑文 (2006) . 日本腦炎病毒非結構蛋白 NS4A 與 NS4B 阻撓第一型干擾素訊息傳遞及其與細胞因子之交互作用.【碩士論文】. 中國醫藥大學. 醫學研究所.
- 2.Cheng-Wen Lin,Kuan-HsunLin,Ping-Chiang Lyu.Wei-June Chend.Japanese encephalitis virus NS2B-NS3 protease binding to phage-displayed human brain proteins with the domain of trypsin inhibitor and basic region leucine zipper. *Virus Research* **116** 106–113 (2006).
- 3.Niyomrattanakit,P., Winoyanu wattikun,P., Chanprapaph,S.,Angsuthanasomb at, C., Panyim,S.,and Katzenmeier, G. Identification of residues in the dengue virus type 2 NS2B cofactor that are critical for NS3 protease activation. *J Virol* **78**(24), 13708-16.
- 4.Norazizah Shafee and Sazaly AbuBakar.Dengue virus type 2 NS3 protease and NS2BNS3 protease precursor induce apoptosis.*Journal of General Virology*. **84**, 2191–2195 (2003).
- 5.Chen SO, Chang TJ, Stone G, Chen CH, Liu JJ Programmed cell death induced by Japanese encephalitis virus YL vaccine strain or its recombinant

envelope protein in varied cultured cells. *Intervirology*. **49**(6),346-51 (2006).

6.Mathura P. Ramanathan, Jerome A. Chambers, Panyupa Pankhong, Michael Chattergoon , Watcharee Attatippaholkun , Kesen Dang , Neelima Shah , David B.Weiner.Host cell killing by the West Nile Virus NS2B–NS3 proteolytic complex: NS3 alone is sufficient to recruit caspase-8-based apoptotic pathway. *Virology*. **345** ,56 – 72 (2006).

7.Dong-Kun Yang<sup>1</sup>, Chang-Hee Kweon<sup>1</sup>, Byoung-Han Kim<sup>1</sup>, In-Jin Hwang<sup>1</sup>, Mun-Il Kang<sup>1</sup>, Byung-Jae Sol<sup>1</sup>, Kyoung-Oh Cho<sup>2</sup>. *J. Vet. Sci.***8**(2), 197–199(2007).

8.McMinn,P.C.The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses.*J.Gen.Virol.***78**,2711-2722 (1997) .

9.Chun-Tang Chiou, Chih-Chi Andrew Hu , Pi-Hsin Chen, Ching-Len Liao, Yi-Ling Lin and Jaang-Jiun Wang .Association of Japanese encephalitis virus NS3 protein with microtubules and tumour susceptibility gene 101 (TSG101) protein. *J.Ge.nVirol* **84**, 2795-2805 (2003).

10.Lindenbach,B.D,andRice,C.M..Flaviridae : the virus and their replication. InFields Virology.**4** ,991-1041.

11.Grigori G. Prikhod'ko,Elena A. Prikhod'ko,Alexander G. Pletnev,and Jeffrey I. Cohen.Langat Flavivirus Protease NS3 Binds Caspase-8 andInduces Apoptosis. *Journal Of Biological Chemistry OF Virology*, June, p. 5701–5710

( 2002 ) .

12.Claudia Nunes Duarte dos Santos, Marie-Pascale Frenkiel,Marie-Pierre Courageot,Carlos Fernando S. Rocha,Marie-Christine Vazeille-Falcoz, Michelle W. Wien,§ Felix A. Rey, Vincent Deubel, and Philippe DespreÁs Claudia Nunes Duarte dos Santos,Marie-Pascale Frenkiel,Marie-Pierre Courageot,Carlos Fernando S. Rocha,Marie-Christine Vazeille-Falcoz, Michelle W. Wien, Felix A. Rey, Vincent Deubel,and Philippe DespreÁs *Virology* **274**, 292±308 (2000).

13.Lin CW, Huang HD, Shiu SY, Chen WJ, Tsai MH, Huang SH, Wan L, Lin YJ. Functional determinants of NS2B for activation of Japanese encephalitis virus NS3 protease.*Virus Res.***127**(1),88-94 ( 2007 ) .

14.Takegami T, Sakamuro D, Furukawa T. Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS3 has RNA binding and ATPase activities. *Virus Genes.* **9**(2),105-12 ( 1995 ) .

15.Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R., and Rice, C. M. Flavivirus: Genome organization, expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**, 649±688 (1990)..

16.Fuquan Zhang<sup>1,2,3</sup>, Wenyu Ma<sup>2</sup>, Li Zhang<sup>1</sup>, Marlen Aasa-Chapman<sup>1</sup> and Hongyi Zhang\*<sup>1,4</sup>Expression of particulate-form of Japanese encephalitis virus envelope protein in a stably transfected *Drosophila* cell line*Virology*



*Journal*, **4**:17 (2007).

17. Kuen-Phon Wu, Chih-Wei Wu, Ya-Ping Tsao, Ting-Wei Kuo, Yuan-Chao Lou, Cheng-Wen Lin, Suh-Chin Wu, and Jya-Wei Cheng. Structural Basis of a Flavivirus Recognized by Its Neutralizing Antibody. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. **278**, No. 46, pp. 46007–46013, (2003)

18. Claudia Nunes Duarte dos Santos, Marie-Pascale Frenkiel, Marie-Pierre Courageot, Carlos Fernando S. Rocha, Marie-Christine Vazeille-Falcoz, Michelle W. Wien, Felix A. Rey, Vincent Deubel, and Philippe Despre<sup>Á</sup>s, 1 Determinants in the Envelope E Protein and Viral RNA Helicase NS3 That Influence the Induction of Apoptosis in Response to Infection with Dengue Type 1 *Virus Virol* **274**, 292±308 (2000).

19. Jones, M., Davidson, A., Hibbert, L., Gruenwald, P., Schlaak, J., Ball, S., Foster, G. R., and Jacobs, M. Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. *J Virol* **79**(9), 5414-20(2005).

20. Munoz-Jordan, J. L., Sanchez-Burgos, G. G., Laurent-Rolle, M., and Garcia-Sastre, A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(24), 14333-8(2003).

21. Munoz-Jordan, J. L., Laurent-Rolle, M., Ashour, J., Martinez-Sobrido, L., Ashok, M., Lipkin, W. I., and Garcia-Sastre, A. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J Virol* **79**(13),



8004-13 (2005).

22. Welsch C, Albrecht M, Maydt J, Herrmann E, Welker MW, Sarrazin C, Scheidig A, Lengauer T, Zeuzem S. Structural and functional comparison of the non-structural protein 4B in flaviviridae. *J Mol Graph Model*. 2007 Apr 4; [Epub ahead of print] [Links](#)

23. Chambers, T. J., R. C. Weir, A. Grakoui, D. W. McCourt, J. F. Bazan, R. J. Fletterick, and C. Rice. 1990. Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:8898–8902.

24. Bera AK, Kuhn RJ, Smith JL Functional characterization of cis and trans activity of the Flavivirus NS2B-NS3 protease. *J Biol Chem*. **282**(17),12883-92 (2007) .

25. Zhou H, Singh NJ, Kim KS Homology modeling and molecular dynamics study of West Nile virus NS3 protease: a molecular basis for the catalytic activity increased by the NS2B cofactor. *Proteins*. **65**(3),692-701 (2006) .

26. Umareddy I, Chao A, Sampath A, Gu F, Vasudevan SG Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J Gen Virol*. **87**(Pt 9),2605-14 (2006) .

27.Satchidanandam V, Uchil PD, Kumar P. Organization of flaviviral replicase proteins in virus-induced membranes: a role for NS1' in Japanese encephalitis virus RNA synthesis. *Novartis Found Symp.***277**,136-45 discussion 145-8, 251-3 (2006) .

28.Uchil PD, Kumar AV, Satchidanandam V. Nuclear localization of flavivirus RNA synthesis in infected cells. *J Virol.* **80**(11),5451-64 (2006) .

29.Xueqin Liu, Shengbo Cao<sup>1</sup>, Rui Zhou, Gaoyuan Xu, Shaobo Xiao, Ying Yang, Minxuan Sun, Yaoming Liand Huanchun Chen. Inhibition of Japanese encephalitis virus NS1 protein expression in cell by small interfering RNAs. *Virus Genes.* **33**, 69-75 (2006) .

30Hengartner,M.O.The biochemistry of apoptosis.*Nature.***407**,770-776(2000)

31 Yaginuma H, Sato N, Homma S, Oppenheim RW. Roles of caspases in the programmed cell death of motoneurons in vivo. *Arch Histol Cytol.* **64**(5),461-74 (2001) .

32. Ciara Twomey, J.V. McCarthy .Pathways of apoptosis and importance in development. *J. Cell. Mol. Med.* **9**, pp. 345-359 (2005) .

33.SCHMITT Estelle<sup>1</sup>, PAQUET Claudie<sup>1</sup>, BEAUCHEMIN Myriam<sup>1</sup>, BERTRAND Richard,.DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis *J Zhejiang Univ Sci*

B. **8**(6),377-97 (2007) .

34. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zúñiga-Pflücker JC, Kroemer G, Penninger JM. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. **410**(6828):549-54 (2001) .

35. Bernard MIGNOTTE and Jean-Luc VAYSSIERE. Mitochondria and apoptosis. *Eur. J. Biochem.* 252, 1215 (1998).

36. Hua-qing LIU<sup>2</sup>, Xing-zu ZHU<sup>2,3</sup>, En-qi WENG<sup>4</sup> Intracellular dopamine oxidation mediates rotenone-induced apoptosis in PC12 cells<sup>1</sup>. *Acta Pharmacologica Sinica* **26** (1),17–26 (2005) .

37. Hui-Lu Lin A Jai-Sing Yang A Jen-Hung Yang A Seng-Sheen Fan A Wen-Cheng Chang A Yu-Ching Li A Jing-Gung Chun. The Role of Ca<sup>2+</sup> on the DADS-induced Apoptosis in Mouse–Rat Hybrid Retina Ganglion Cells (N18). *Neurochem Res* **31**,383–393 (2006).

38. James F. Curtin <sup>1</sup>, Maryanne Donovan <sup>1</sup>, Thomas G. Cotter\*. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *Journal of Immunological Methods* **265** 49– 72 (2002).

39. Haitao Wang , Xiangliang Yang , Zhihong Zhange, Huibi Xub. Both calcium and ROS as common signals mediate Na SeO -induced apoptosis in SW480 human colonic carcinoma cells. *Journal of Inorganic Biochemistry* **97**

221–230(2003).

40. Yaginuma H, Sato N, Homma S, Oppenheim RW. Roles of caspases in the programmed cell death of motoneurons in vivo. *Arch Histol Cytol.* **64**(5),461-74(2001)..

41. Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. p53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by Bcl-2. *EMBO J.* 18(21), 6027-36(1999).

42. Jianping Ye, Suwei Wang, Stephen S. Leonard, Yi Sun, Leon Butterworth, Jim Antonini, Min Ding, Yongyut Rojanasakul, Val Vallyathan, Vincent Castranova, and Xianglin Shi. Role of Reactive Oxygen Species and p53 in Chromium(VI)-induced Apoptosis. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. **274**, No. 49, pp. 34974–34980, (1999).

43. Yoko Arai, Takashi Kondo, Kiyoshi Tanabe, Qing-Li Zhao, Fu-Jun Li, Ryohei Ogawa, Min Li, and Minoru Kasuya. Enhancement of Hyperthermia-induced Apoptosis by Local Anesthetics on Human Histiocytic Lymphoma U937 Cells. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. **277**, No. 21, pp. 18986–18993, (2002).

# 表

表一 MOI 為 0.1 時日本腦炎病毒感染 HL-CZ 細胞之細胞週期分析

MOI = 0.1	0	24	48	72	96
1	0	0	1.71	17.47	52.76
2	0.38	0.59	1.13	12.55	38.47
3	2.32	2.5	1.72	11.46	39
AVERAGF	0.9	1.03	1.52	13.82667	43.41
STDEV	1.244347	1.30679	0.337787	3.201942	8.101673

表二 MOI 為 0.1 時日本腦炎病毒感染 TE-671 細胞之細胞週期分析

MOI = 0.1	0	24	48	72	96
1	0	0	0	0.87	0.54
2	0	0.34	0.57	0.31	1.54
3	0	1.35	1.44	1.12	1.63
AVERAGF	0	0.563333	0.67	0.766667	1.236667
STDEV	0	0.702163	0.72519	0.414769	0.605007



表三 MOI 為 1 時日本腦炎病毒感染 HL-CZ 細胞之細胞週期分析

MOI = 1	0	24	48	72	96
1	1.12	1.38	5.14	21.34	25
2	0.8	1.6	11.79	12.29	29.54
AVERAGE	0.96	1.49	8.465	16.815	27.27
STDEV	0.226274	0.155563	4.70226	6.399316	3.210265

表四 MOI 為 1 時日本腦炎病毒感染 TE-671 細胞之細胞週期分析

MOI = 1	0	24	48	72	96
1	0.17	0.27	0.31	3.76	4.46
2	0.33	1.03	6.52	9.41	8.96
AVERAGE	0.25	0.65	3.415	6.585	6.71
STDEV	0.113137	0.537401	4.391133	3.995153	3.181981

表五 病毒蛋白表現 HL-CZ 之細胞週期分析

Apoptosis%	pcDNA3.1	pE	pNS1	pNS2B	pNS3-180	pNS2BNS3-180	pNS4A	pNS4B
1	4	7.64	7.13	18	25.92	31.23	7	0
2	2.1	10.77	7.63	12	18	27.07	9.77	2.18
AVERAGE	3.05	9.205	7.38	15	21.96	29.15	8.385	1.09
STDEV	1.343503	2.213244	0.353553	4.242641	5.600286	2.941564	1.958686	1.541493

表六 病毒蛋白表現 TE-671 之細胞週期分析

Apoptosis%	pcDNA3.1	pE	pNS1	pNS2B	pNS3-180	pNS2B3-180	pNS4A	pNS4B
1	0.01	0.26	0.12	0.15	7.78	15.26	0.06	0
2	0	0.07	0.07	1.13	6.71	21.33	0.4	0.07
AVERAGE	0.005	0.165	0.095	0.64	7.245	18.295	0.23	0.035
STDEV	0.007071	0.13435	0.035355	0.692965	0.756604	4.292138	0.240416	0.049497

表七 日本腦炎病毒蛋白表現HL-CZ細胞誘導 Caspase 3 蛋白產生的比例

Caspase 3	pcDNA3.1	pE	pNS1	pNS2B	pNS3-180	pNS2B3-180	pNS4A	pNS4B
1	48.8	75.8	60	70	153	173	42	45
2	21.1	68	53	59	113	110	48	60
AVERAGEF	34.95	71.9	56.5	64.5	133	141.5	45	52.5
STDEV	19.58686	5.515433	4.949747	7.778175	28.28427	44.54773	4.242641	10.6066

表八日本腦炎病毒蛋白表現TE-671細胞誘導 Caspase 3 蛋白產生的比例

Caspase 3	pcDNA3.1	pE	pNS1	pNS2B	pNS3-180	pNS2B3-180	pNS4A	pNS4B
1	56	73	59	85	121	136	80	76
2	24	39	50	74	89	76	49	48
AVERAGEF	40	56	54.5	79.5	105	106	64.5	62
STDEV	22.62742	24.04163	6.363961	7.778175	22.62742	42.42641	21.92031	19.79899

表九 利用流式細胞儀測 JEV 蛋白在 HL-CZ 細胞表現後測活性氧化物的產生與否。

	pcDNA3.1	pE	pNS2B	pNS3-180	pNS2BNS3-180	pNS4B
1	50	47.2	50.7	52	44	29
2	49.4	48.2	46.6	44.2	41.6	41.1
3	48.5	45	47.2	42.8	42.7	37.8
AVERAGE	5	4.74645	5.146011	4.809689	4.615108	4.204988
STDEV	0.150997	0.327414	0.442869	0.99143	0.240278	1.250973

表十 利用流式細胞儀測 JEV 蛋白在 TE-671 細胞表現後測活性氧化物的產生與否。

	pcDNA3.1	pE	pNS2B	pNS3-180	pNS2BNS3-180	pNS4B
1	50	24.6	93.6	23.1	90	50
2	53	17.7	93.3	22	91	40
AVERAGE	5	2.053398	22.0922	1.206528	20.06652	2.486188
STDEV	2.12132	4.879037	0.212132	0.777817	0.707107	7.071068

表十一 利用流式細胞儀測 JEV 蛋白在 HL-CZ 細胞表現後測細胞鈣離子的變化。

	pcDNA3.1	pE	pNS2B	pNS3-180	pNS2BNS3-180	pNS4B
1	49	53	57	43	59	40
2	50	52	46	47	64	32
AVERAGE	5	5.30303	4.904762	4.368932	6.833333	2.926829
STDEV	0.141421	0.141421	1.555635	0.565685	0.707107	1.131371

表十二 利用流式細胞儀測 JEV 蛋白在 TE-671 細胞表現後測細胞鈣離子的變化。

	pcDNA3.1	pE	pNS2B	pNS3-180	pNS2BNS3-180	pNS4B
1	49	12.3	1.8	1.8	19.6	1
2	50	12.7	1.7	3.6	10.5	1.5
AVERAGE	5	1.262626	0.176768	0.272727	1.520202	0.126263
STDEV	0.141421	0.056569	0.014142	0.254558	1.286934	0.070711



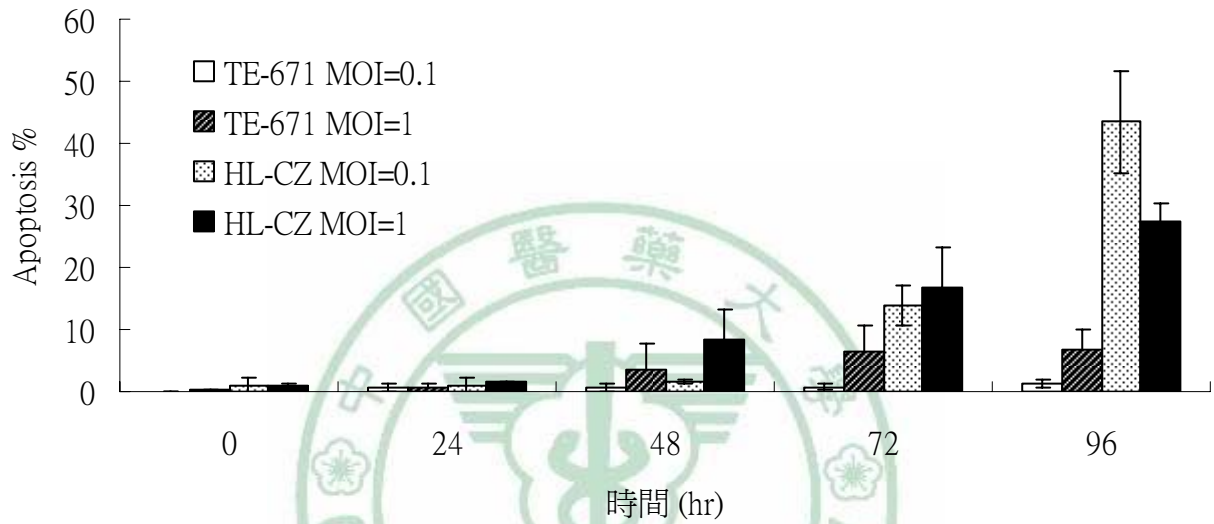
表十三 利用流式細胞儀測 JEV 蛋白在 HL-CZ 細胞表現後測膜電位的變化

°	pcDNA3.1	pE	pNS2B	pNS3-180	pNS2BNS3-180	pNS4B
1	49	68	44.5	50	52	45
2	50	65	46.8	54	53	42
AVERAGE	5	6.717172	4.611111	5.252525	5.30303	4.393939
STDEV	0.141421	0.424264	0.325269	0.565685	0.141421	0.424264

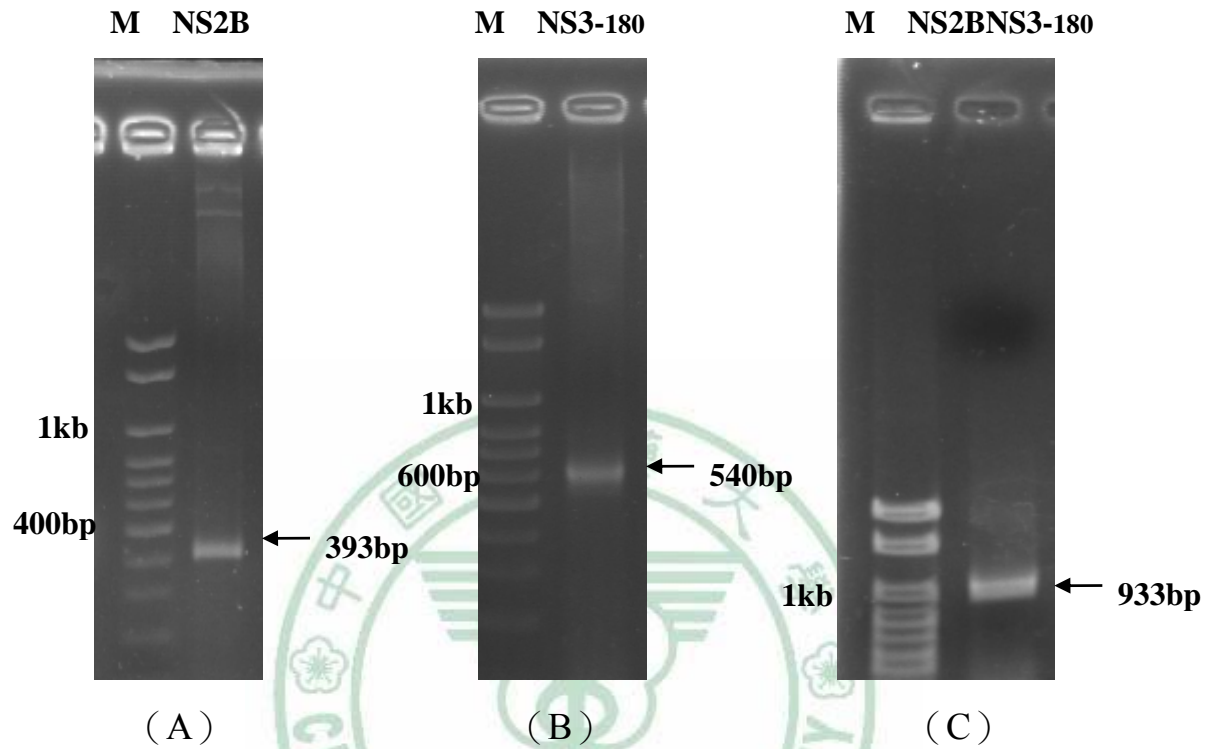
表十四 利用流式細胞儀測 JEV 蛋白在 TE-671 細胞表現後測膜電位的變化。

	pcDNA3.1	pE	pNS2B	pNS3-180	pNS2BNS3-180	pNS4B
1	52	42.3	54.2	58	83	45
2	46	41.7	60.6	53	68	31
AVERAGE	5	4.285714	5.857143	5.663265	7.704082	3.877551
STDEV	0.848528	0.084853	0.905097	0.707107	2.12132	1.979899

# 圖



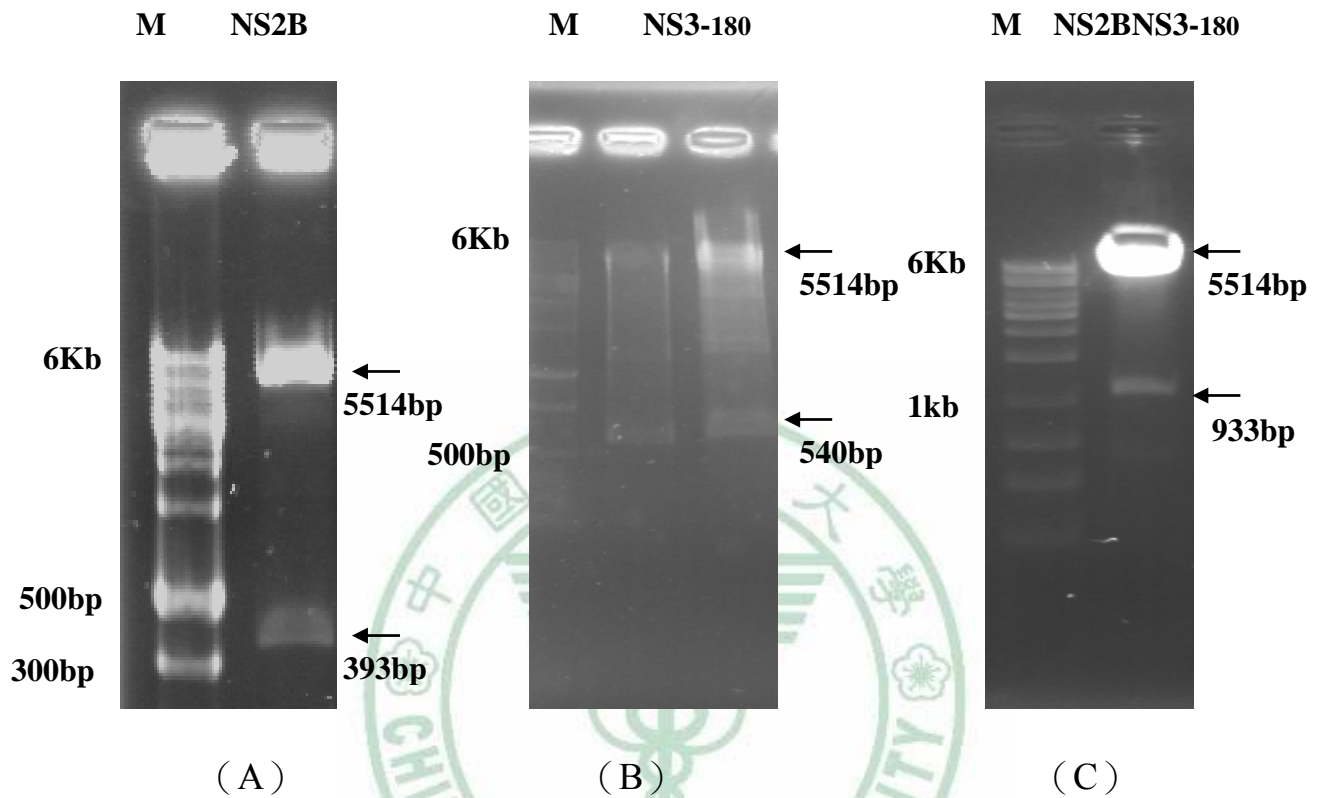
圖一 分析日本腦炎病毒分別在 MOI 為 0.1 及 1 的條件下感染 HL-CZ 及 TE-671 細胞，在 24-96 小時誘導細胞凋亡程度。



圖二 NS2B (A)、NS3-180 (B)、NS2BNS3-180 (C) PCR 電泳圖

將 PCR DNA 產物跑 2%瓊脂凝膠 (2% agarose gel) 進行電泳分析，確定

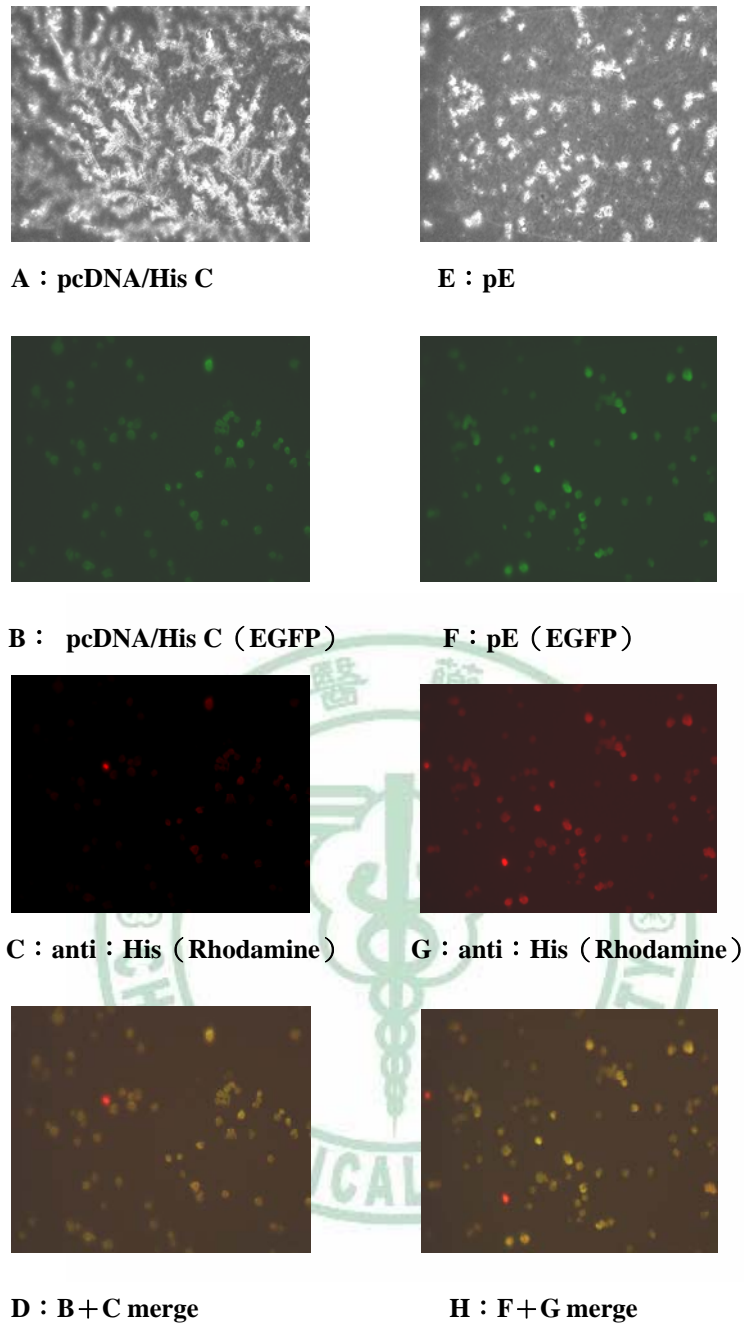
PCR 產物片段大小正確。



圖三 基因轉殖電泳分析

分別利用 *Bam*H I、*Eco*R I 限制內切酶處理接到相同切位的 pcDNA 載體上經轉型到勝任細胞上，再利用基因轉殖電泳分析進行質體選殖。

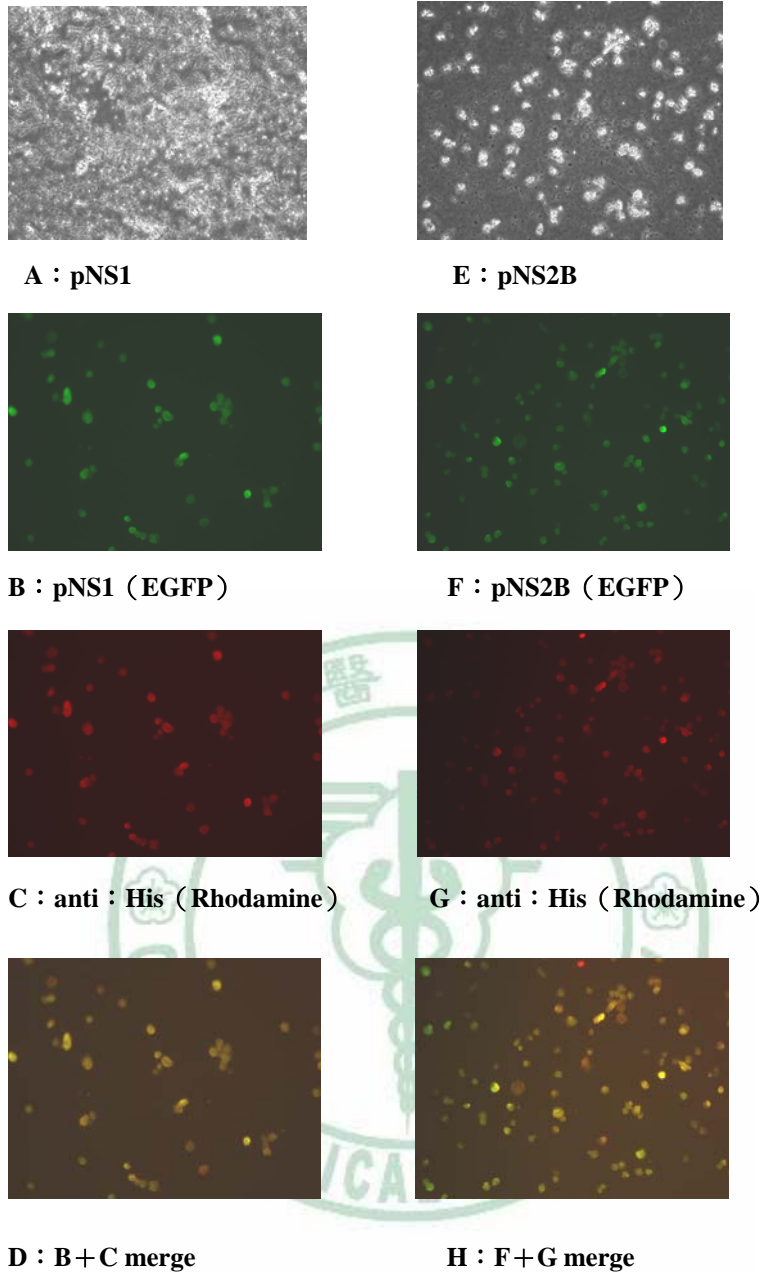
NS2B/pcDNA3.1 (A)、NS3-180/pcDNA3.1 (B)、NS2BNS3-180/pcDNA3.1 (C)



圖四 E 蛋白表現 HL-CZ 細胞之免疫螢光染色

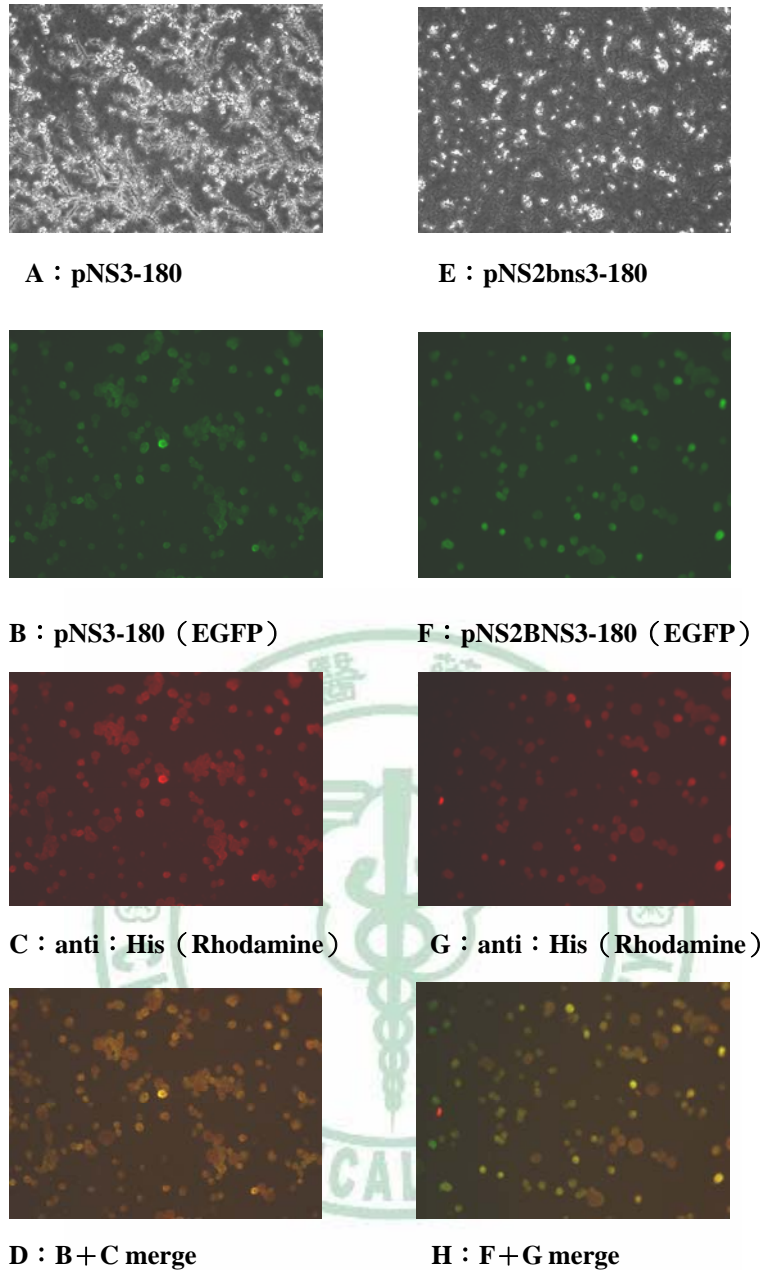
在 HL-CZ 細胞分別進行 (pcDNA/His C , pE) : pEGFP 以 9 比 1 的比例進行轉染，培養兩天後以螢光顯微鏡觀察。綠色螢光為 EGFP 蛋白(圖 B、F)，紅色螢光利用 anti : His (Rhodamine) 表現出來的 E 蛋白 (圖 G)，merge 後呈現黃色螢光 (圖 D、H)。





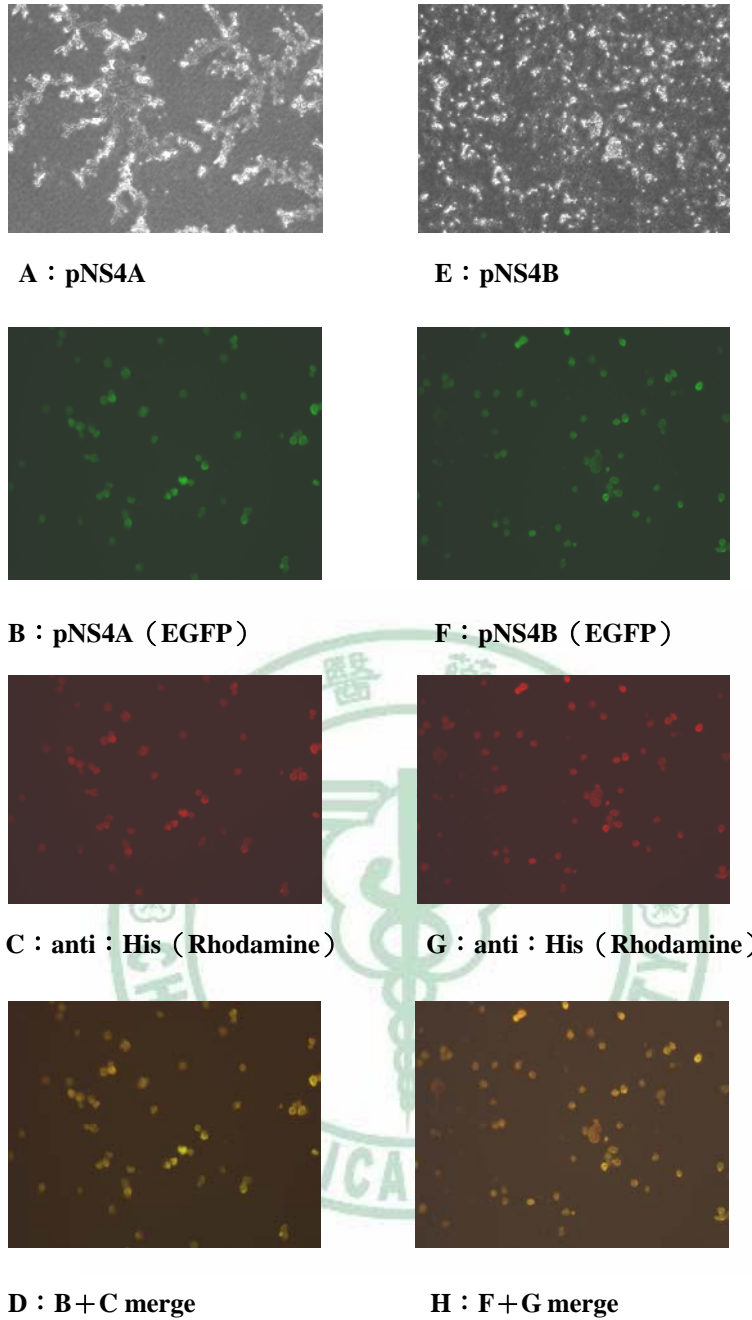
圖五 NS1、pNS2B 蛋白表現 HL-CZ 細胞之免疫螢光染色

在 HL-CZ 細胞分別進行 (pNS1, pNS2B) : pEGFP 以 9 比 1 的比例進行轉染，培養兩天後以螢光顯微鏡觀察。綠色螢光為 EGFP 蛋白 (圖 B、F)，紅色螢光利用 anti : His (Rhodamine) 表現出來的 NS1、pNS2B 蛋白 (圖 C、G)，merge 後呈現黃色螢光 (圖 D、H)。



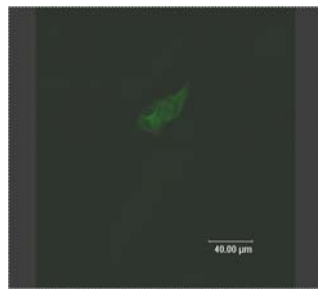
圖六 NS3-180、NS2BNS3-180 蛋白表現 HL-CZ 細胞之免疫螢光染色

在 HL-CZ 細胞分別進行 pNS3-180，pNS2BNS3-180 與 pEGFP 以 9 比 1 的比例進行轉染，培養兩天後以螢光顯微鏡觀察。綠色螢光為 EGFP 蛋白(圖 B、F)，紅色螢光利用 anti : His (Rhodamine) 表現出來的 NS3-180、NS2BNS3-180 蛋白 (圖 C、G)，merge 後 (圖 D、H)。

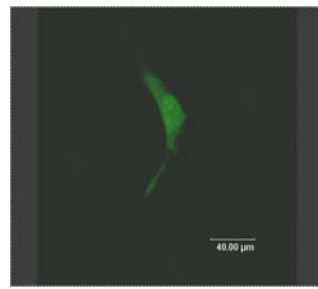


圖七 NS4A、NS4B 蛋白表現 HL-CZ 細胞之免疫螢光染色

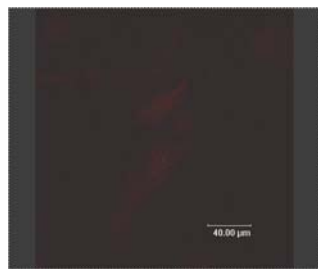
在 HL-CZ 細胞分別進行 (pNS4A, pNS4B) : pEGFP 以 9 比 1 的比例進行轉染，培養兩天後以螢光顯微鏡觀察。綠色螢光為 EGFP 蛋白 (圖 B、F)，紅色螢光利用 anti : His (Rhodamine) 表現出來的 NS4A、NS4B 蛋白 (圖 C、G)，merge 呈現黃色螢光 (圖 D、H)。



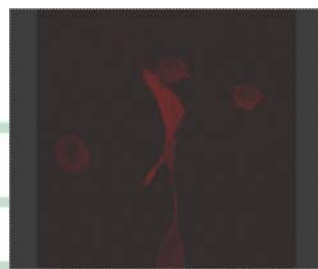
**A : pcDNA/His C (EGFP)**



**D : pE (EGFP)**



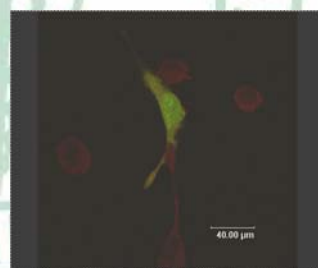
**B : anti : His (Rhodamine)**



**E : anti : His (Rhodamine)**



**C : A+B merge**



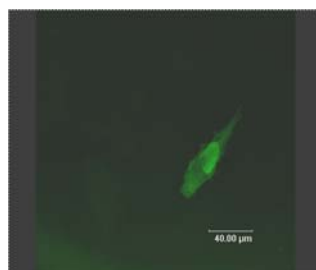
**F : D+E merge**

圖八 E 蛋白表現 TE-671 細胞之免疫螢光染色

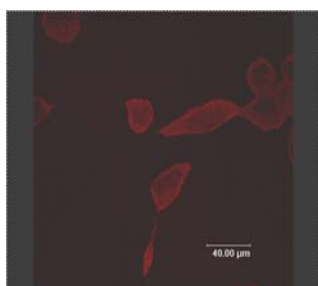
在 TE-671 細胞分別進行 (pcDNA/His C, pE) : pEGFP 以 9 比 1 的比例進行共同轉染，培養兩天後以螢光顯微鏡觀察。綠色螢光為 EGFP 蛋白 (圖 A、D)，紅色螢光利用 anti : His (Rhodamine) 所表現出來的 E 蛋白 (圖 E)，merge 後呈現出黃色螢光 (圖 C、F)。



**A : pNS1 (EGFP)**



**D : pNS2B (EGFP)**



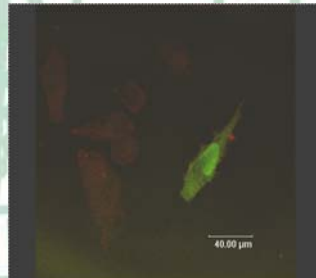
**B : anti : His (Rhodamine)**



**E : anti : His (Rhodamine)**



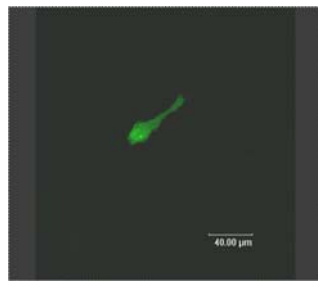
**C : A+B merge**



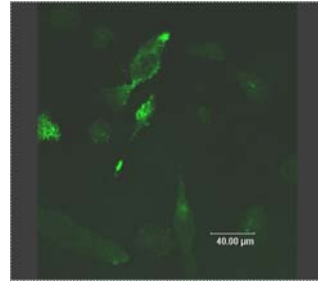
**F : D+E merge**

圖九 NS1、NS2B 蛋白表現 TE-671 細胞之免疫螢光染色

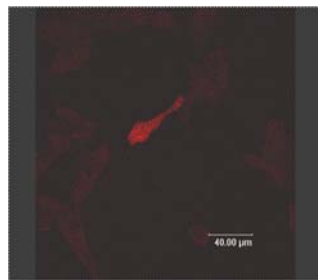
在 TE-671 細胞分別進行 (pNS1, pNS2B) : pEGFP 以 9 比 1 的比例進行共同轉染，培養兩天後以螢光顯微鏡觀察。綠色螢光為 EGFP 蛋白 (圖 A、D)，紅色螢光利用 anti : His (Rhodamine) 所表現出來的 NS1、pNS2B 蛋白 (圖 B、E)，merge 後呈現出黃色螢光 (圖 C、F)。



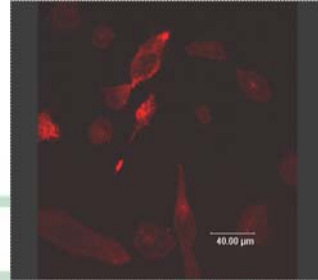
A : pNS3-180 (EGFP)



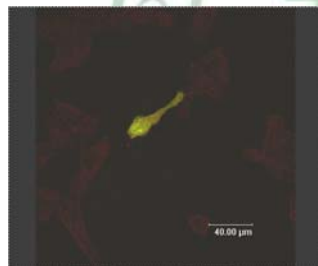
D : pNS2BNS3-180 (EGFP)



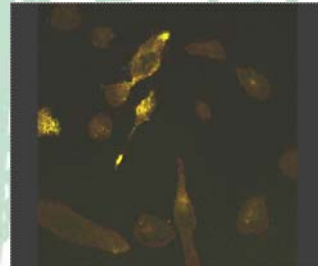
B : anti : His (Rhodamine)



E : anti : His (Rhodamine)



C : A+B merge

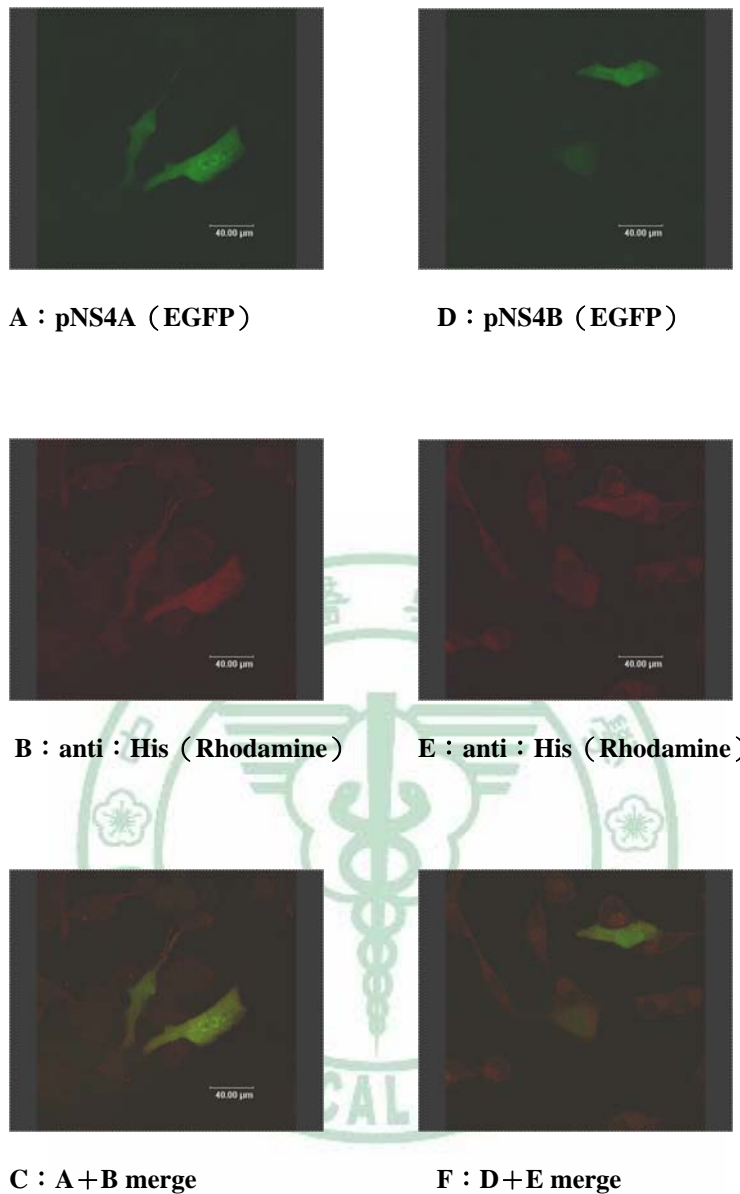


F : D+E merge

圖十 NS3-180、NS2BNS3-180 蛋白表現 TE-671 細胞之免疫螢光染色

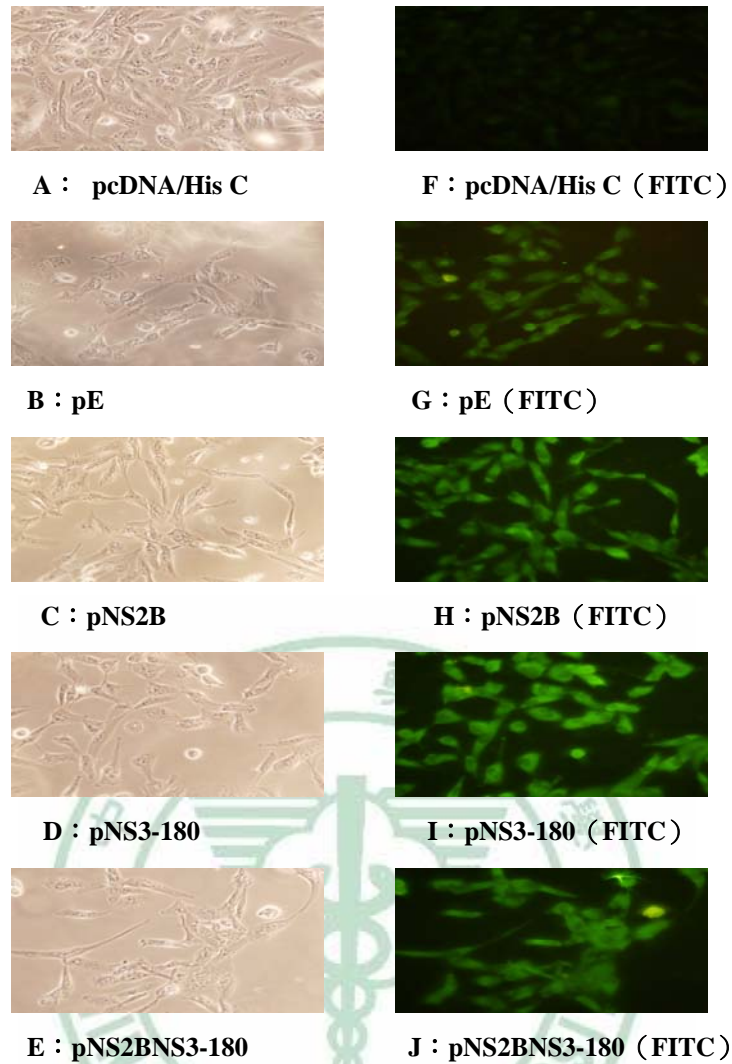
在 TE-671 細胞分別進行 pNS3-180, pNS2BNS3-180 : pEGFP 以 9 比 1 的比例進行共同轉染，培養兩天後以螢光顯微鏡觀察。綠色螢光為 EGFP 蛋白 (圖 A、D)，紅色螢光利用 anti : His (Rhodamine) 所表現出來的 NS3-180、NS2BNS3-180 蛋白 (圖 B、E)，merge 後呈現出黃色螢光 (圖 C、F)。





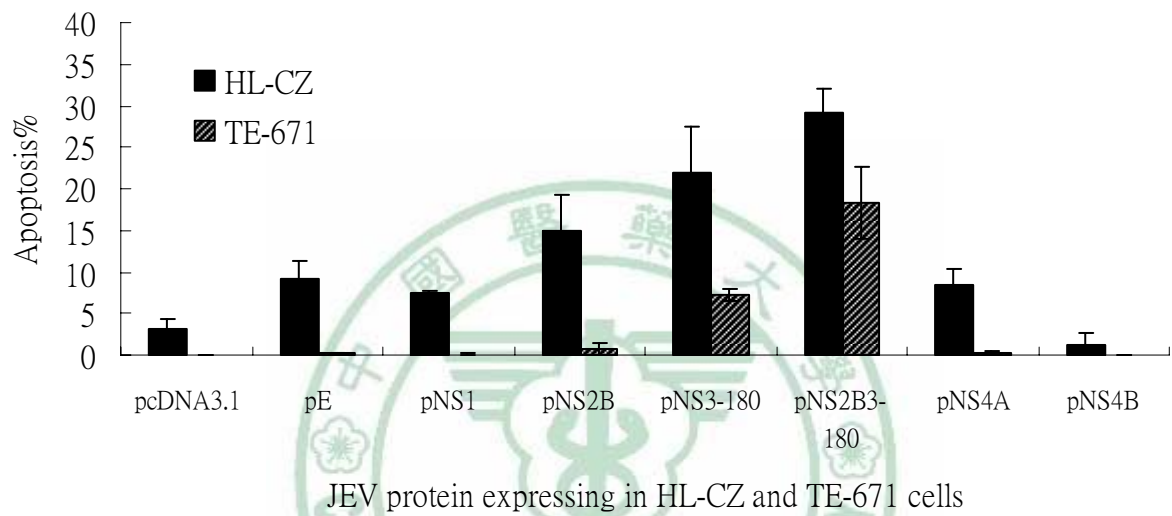
圖十一 NS4A、NS4B 蛋白表現 TE-671 細胞之免疫螢光染色

在 TE-671 細胞分別進行 (pNS4A, pNS4B) : pEGFP 以 9 比 1 的比例進行共同轉染，培養兩天後以螢光顯微鏡觀察。綠色螢光為 EGFP 蛋白 (圖 A、D)，紅色螢光利用 anti : His (Rhodamine) 所表現出來的 NS4A、NS4B 蛋白 (圖 B、E)，merge 後呈現出黃色螢光 (圖 C、F)。

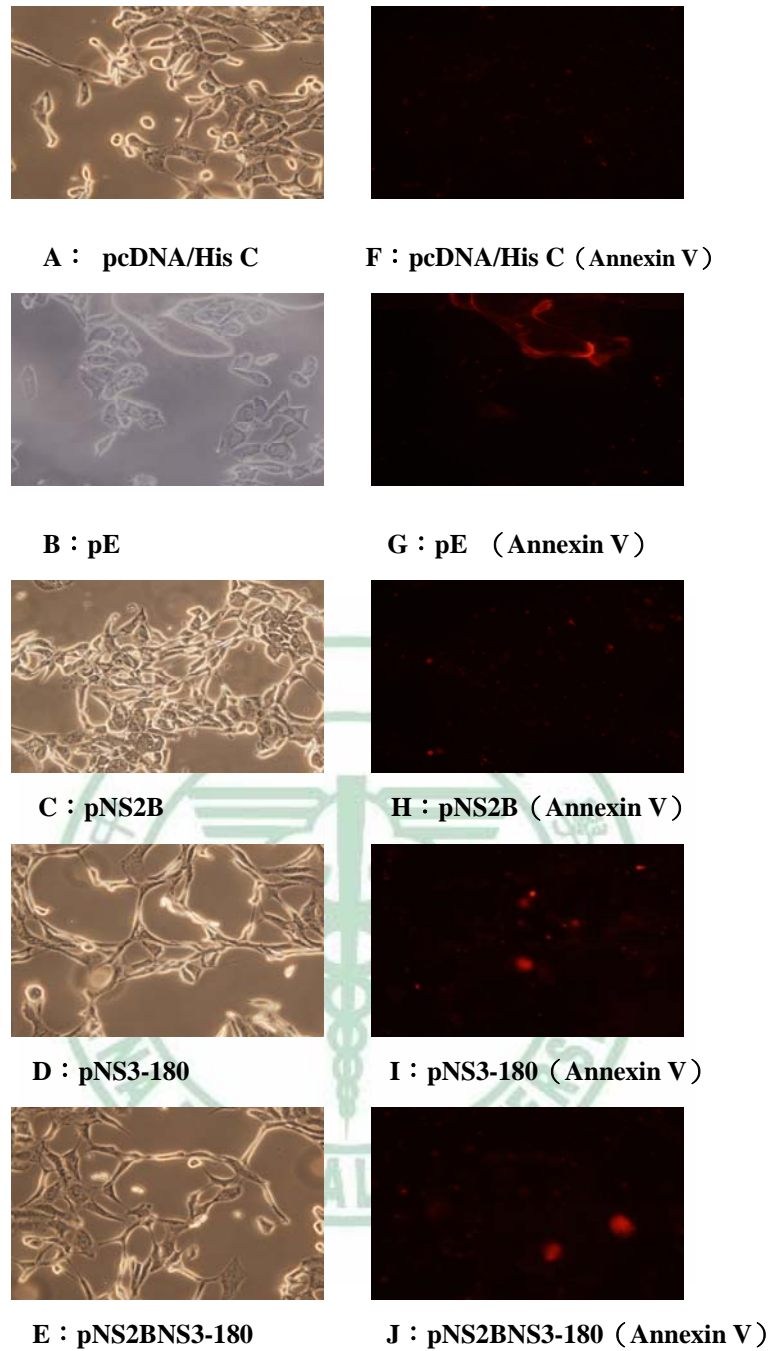


圖十二 E、NS2B、NB3-180、NS2BNS3-180 蛋白表現 TE-671 細胞之免疫螢光染色

分別將 pE、pNS2B、pNB3-180、pNS2BNS3-180 轉染在 TE-671 細胞，培養兩天後以螢光顯微鏡觀察。自然視野下觀察到 E、NS2B、NB3-180、NS2BNS3-180 蛋白表現在 TE671 細胞（圖 B、C、D、E）。綠色螢光為利用 anti:JEV (FITC) 所表現出來的 E、NS2B、NB3-180、NS2BNS3-180 蛋白（圖 G、H、I、J）。

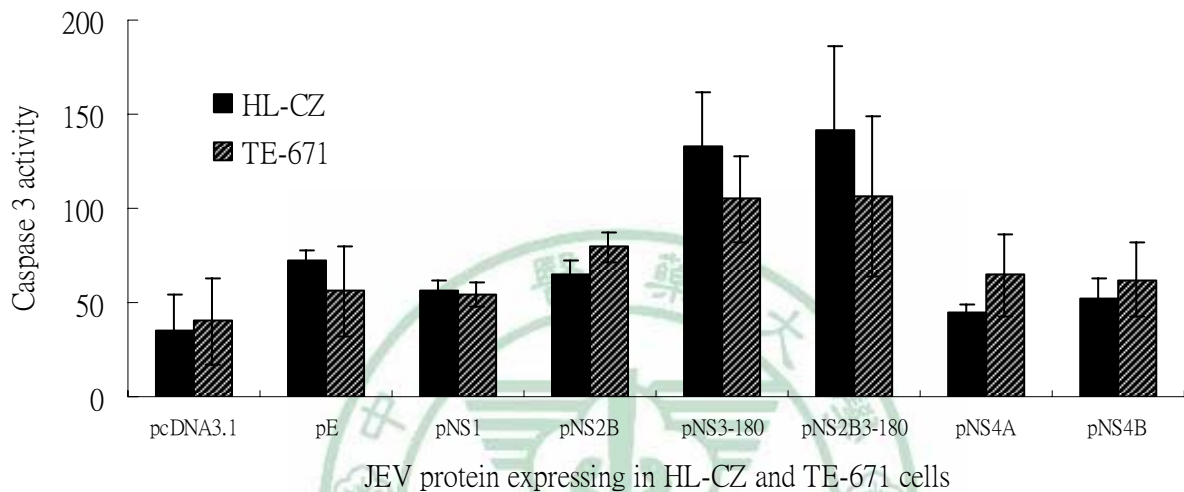


圖十三 日本腦炎病毒蛋白分別對 HL-CZ 細胞與 TE671 細胞誘導細胞凋亡程度。



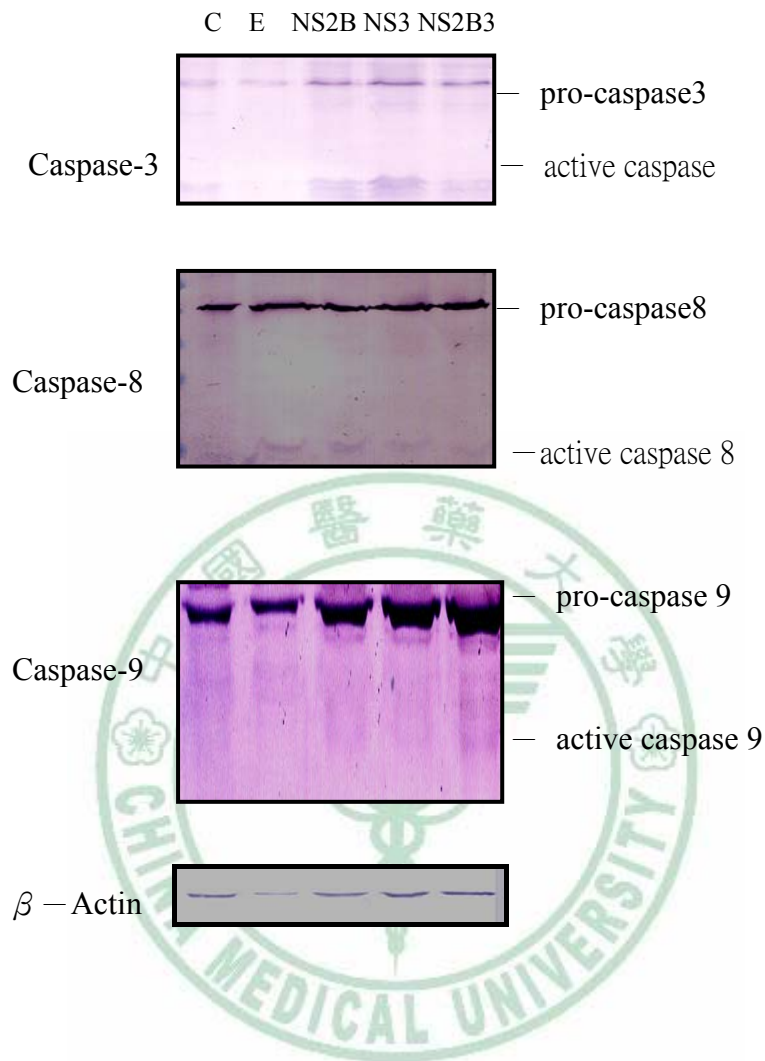
圖十四 Annexin V 染色

TE-671 細胞轉染 pcDNA3.1、pE、pNS2B、pNS3-180、pNS2BNS3-180，經蛋白表現後，與 Annexin V 染劑作用 15 分鐘後，於螢光顯微鏡下觀察到紅色螢光，為初期細胞凋亡的表現。



圖十五 Caspase 3 活性分析

日本腦炎病毒蛋白表現分別對 HL-CZ 細胞及 TE671 細胞作用兩天後，細胞溶解與 Caspase 3 substrate、Assay buffer 作用 2 小時，再利用 cytofluor 測其活性。比較誘導 Caspase 3 蛋白產生的比例。當 Caspase 3 活性被活化就能初步判定細胞會產生細胞凋亡。



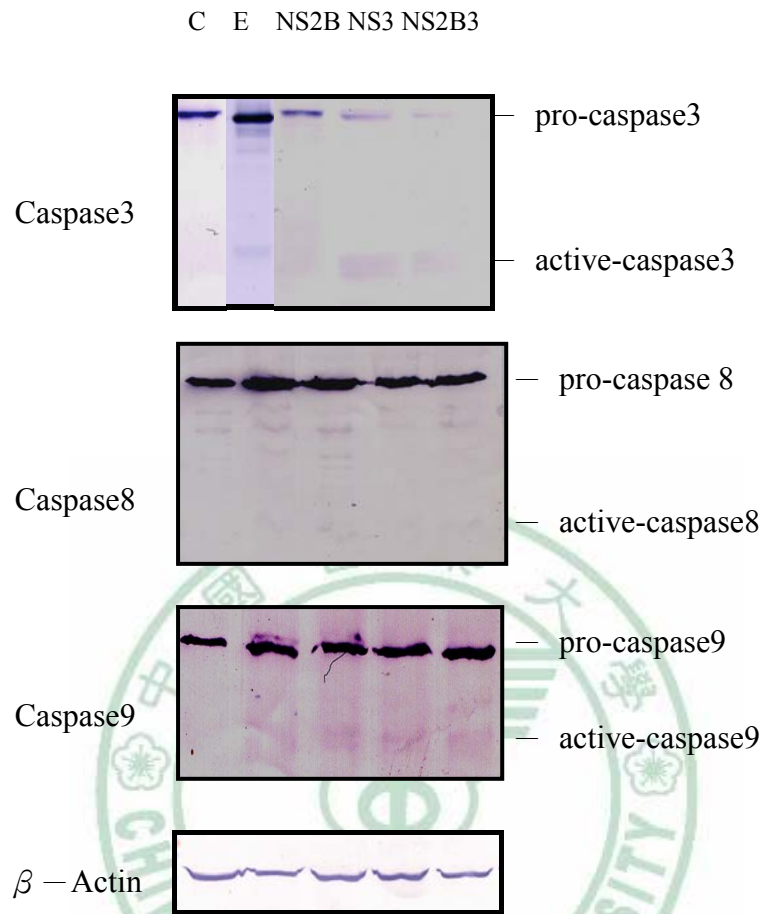
圖十六 利用西方墨點法分析病毒蛋白對 HL-CZ 細胞之細胞凋亡相關

caspase 3、8、9 蛋白活性。

分別利用一抗 anti-caspase 3、8、9，二抗 anti-mouse co-AP 確認 caspase

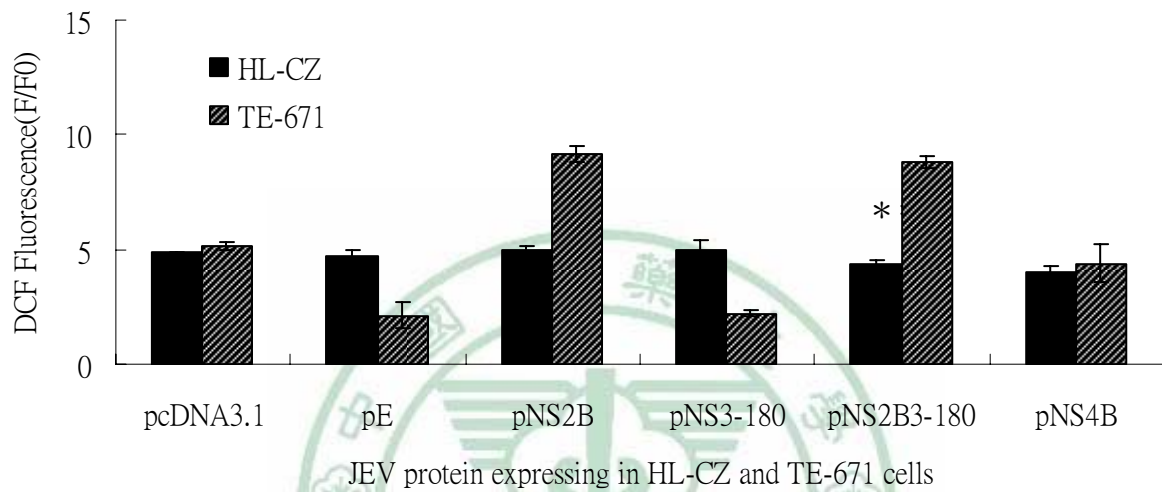
3、8、9 蛋白活性，並以  $\beta$ -actin 當作 internal control。



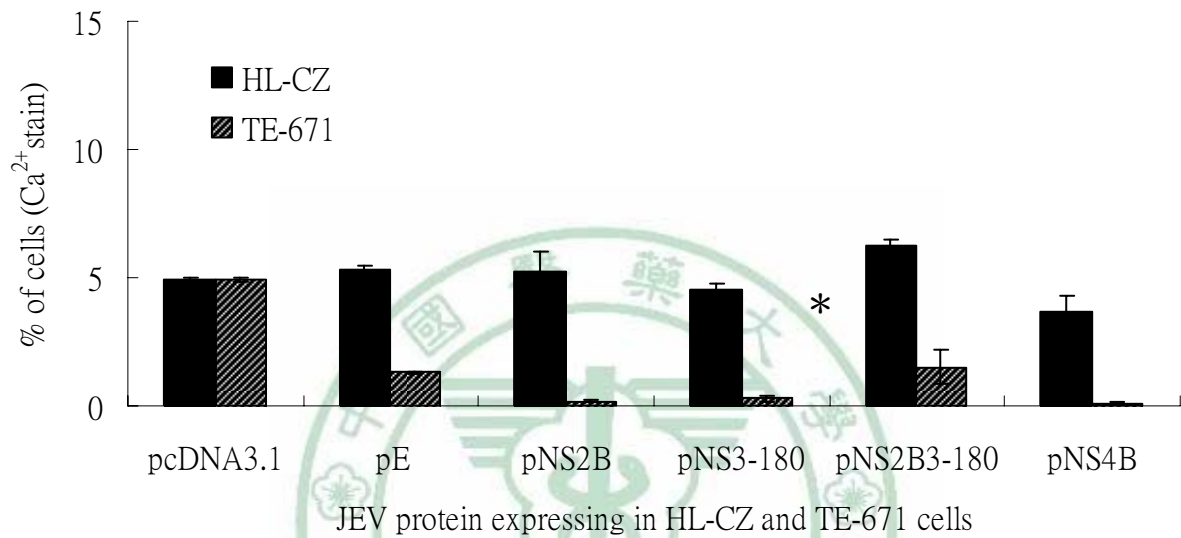


圖十七 利用西方墨點法分析病毒蛋白對 TE-671 細胞之細胞凋亡相關 caspase 3、8、9 蛋白活性。

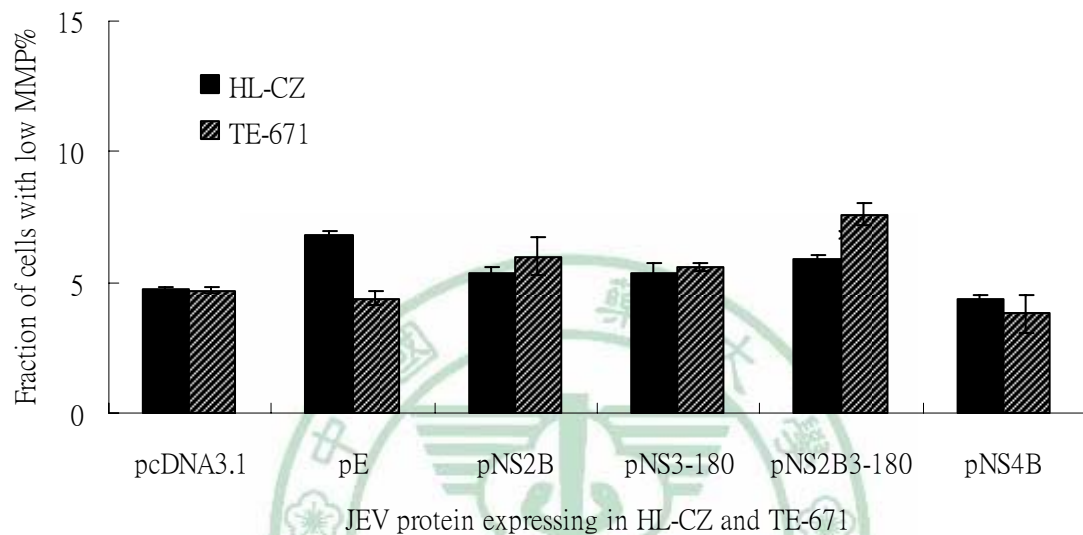
分別利用一抗 anti-caspase 3、8、9，二抗 anti-mouse co-AP 確認 caspase 3、8、9 蛋白活性，並以  $\beta$ -actin 當作 internal control。



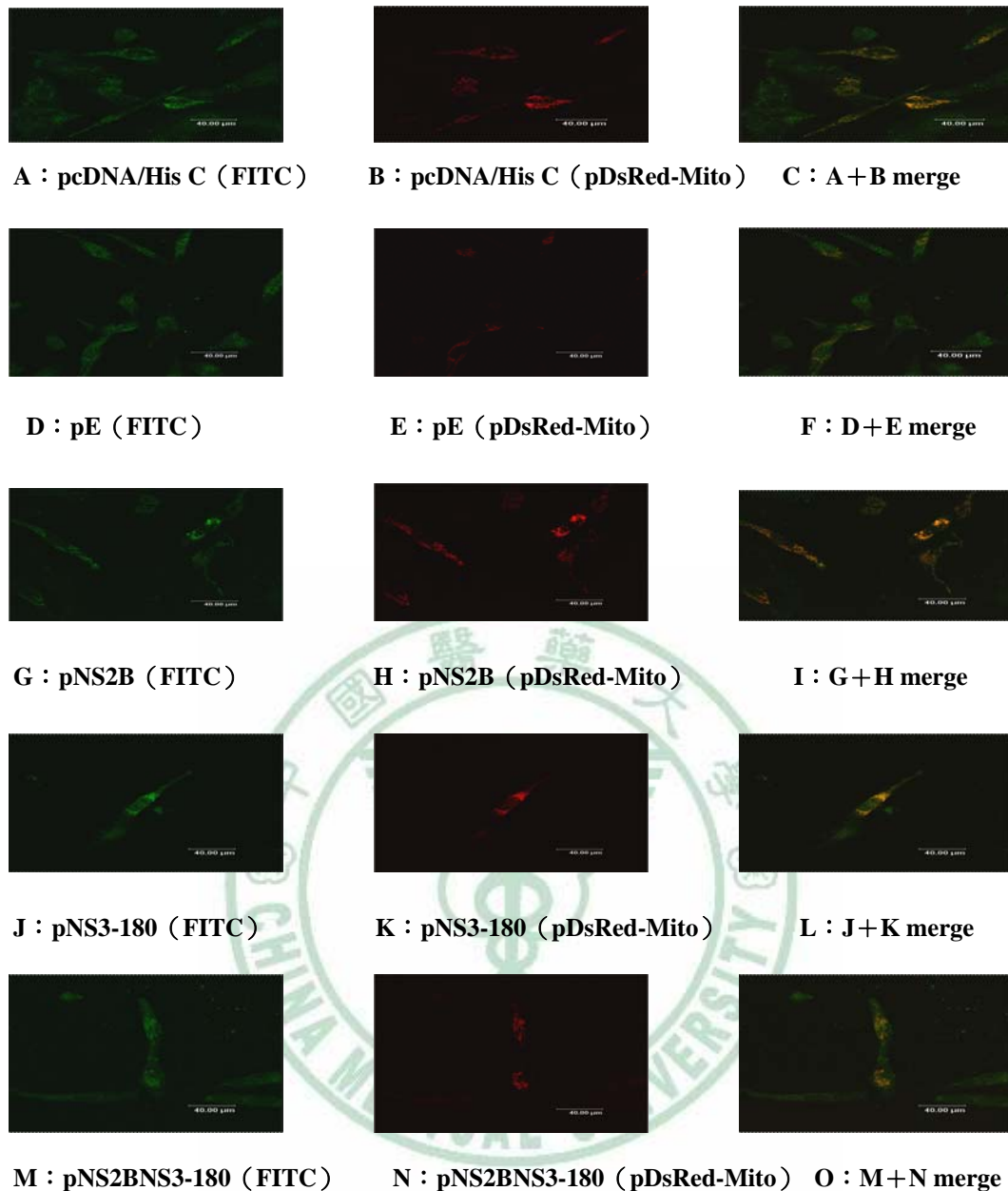
圖十八 利用流式細胞儀測 JEV 蛋白在 HL-CZ 及 TE-671 細胞表現後測  
 活性氧化物的產生與否。利用數據表示：當 ROS 的%小於 Control 代表  
 無自由基產生。(\* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.01$ )



圖十九 利用流式細胞儀測 JEV 蛋白在 HL-CZ 及 TE-671 細胞表現後測鈣離子的變化。利用數據表示：當鈣離子%小於 Control 代表鈣離子沒有釋出。(\* $P < 0.05$ )

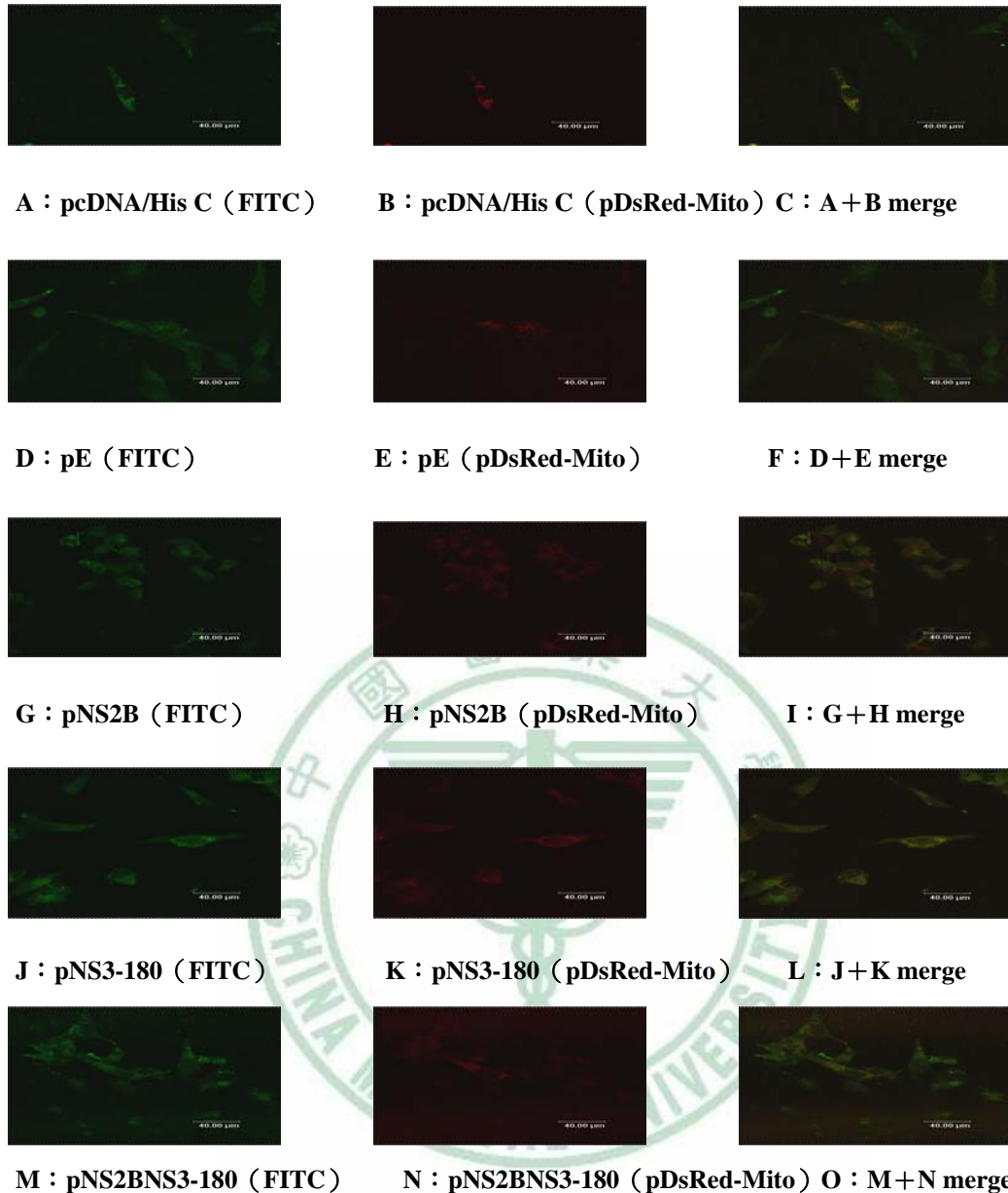


圖二十 利用流式細胞儀測JEV 蛋白在 HL-CZ 及 TE-671 細胞表現後測膜電位的變化。利用數據表示：當 MMP% 小於 Control 代表膜電位沒有改變。( \*\* , \* P < 0.05 )



圖二十一 病毒蛋白表現 TE-671 細胞之免疫螢光染色

將 pE、pNS2B、pNB3-180、pNS2BNS3-180 : pDsRed-Mito 以 9 比 1 的比例在 TE-671 細胞進行共同轉染。綠色螢光為 anti : His (FITC) 所表現出來的 E、NS2B、NB3-180、NS2BNS3-180 蛋白 (D、G、J、M)。紅色螢光為 E、NS2B、NB3-180、NS2BNS3-180 表現 pDsRed-Mito 的情形 (B、E、H、K、N)，merge 後呈現出黃色螢光 (C、F、I、L、O)。



圖二十二 病毒蛋白表現 TE-671 細胞之免疫螢光染色

將 pE、pNS2B、pNB3-180、pNS2BNS3-180 : pDsRed-Mito 以 9 比 1 的比例在 TE-671 細胞進行共同轉染。綠色螢光為 anti : Cytochrome c (FITC) 所表現出來的 E、NS2B、NB3-180、NS2BNS3-180 蛋白 (D、G、J、M)。紅色螢光為 E、NS2B、NB3-180、NS2BNS3-180 表現 pDsRed-Mito 的情形 (B、E、H、K、N)，merge 後呈現出黃色螢光 (圖 C、F、I、L、O)。



# 附錄一

## 1. DNA 電泳 (DNA electrophoresis)

- (1) TAE buffer : 40 mM Tris.Acetate, 2 mM EDTA,pH=8.5
- (2) EtBr : 0.5 /ml 溴化乙苯啡啶 ethidium bromide ( intercalation agent)
- (3) DNA 染劑 : 0.25%(w/v) bromophenol blue,0.25%(w/v)xylene cyaol FF,30%(v/v)glycerol in ddH<sub>2</sub>O

## 2. 蛋白質之電泳分析與西方轉漬分析

- (1) 1.5M Tris-base (pH8.8) : 5.4g tris-base add ddH<sub>2</sub>O 250ml pH=8.8
- (2) 0.5M Tris-HCl (pH6.8) : 7.88gtris-HCl,dd ddH<sub>2</sub>O 100ml,pH=6.8
- (3) 10% SDS : 10g SDS sodium dodecyl sulfate ,add ddH<sub>2</sub>O 100ml
- (4) 10% APS : ammonium persulfate 1g/10ml ddH<sub>2</sub>O
- (5) 4% Stacking gel : ddH<sub>2</sub>O 1.35ml,30%Acy/Bis 0.27ml,0.5M Tris-HCl (pH6.8)0.55ml, APS10% 22.5 $\mu$ l,10% SDS 22.5 $\mu$ l,TEMED 3.5 $\mu$ l
- (6) 12% separating gel : ddH<sub>2</sub>O 4ml ,30 % Acy/Bis 4.8ml,1.5M Tris-base (pH8.8)3.0ml, APS 10% 120 $\mu$ l,10% SDS 120 $\mu$ l,TEMED 6.5 $\mu$ l
- (7) 2X sample loading buffer : glyceol 2.5 ml , 2-mercaptoethanol 100 $\mu$ l, 10% SDS 2 ml, 0.5 M Tris-HCl 1.25 ml, pH6.8, 0.5% (W/V)bromophenyl blue 0.2ml, ddH<sub>2</sub>O 3.55 ml , glycerol 2.5ml
- (8) 10X running buffer : 30g tris-base,144g glycine,10% SDS100ml add distilled water to 1L

(9) Transfer buffer : 8.72g tris-base, 4.4g glycine, add ddH<sub>2</sub>O to 1.5L, pH

8.4, add methanol 300ml, 10% SDS 5.6ml store at 4°C

(10) 10x TBS (Tris buffer saline) : 200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 M NaCl

(11) 1x TBST : 1x TBS contain 0.1% Tween-20

(12) 5% skim milk : 2.5g skim milk/50ml TBST

### 3. 細胞週期測定：流式細胞儀

(1) propidium iodide (PI) 染劑 1mg/ml (Sigma)

(2) RNase A 10µg/ml (Sigma)

### 4. 活性氧化物測定：流式細胞儀 (BD Biosciences, FACS101)

(1) DCFH-DA 染劑 10µM (Sigma)

### 5. 粒線體膜電位測定：流式細胞儀

(1) DioC6 染劑 400µM (Calbiochem)

### 6. 鈣離子測定：流式細胞儀

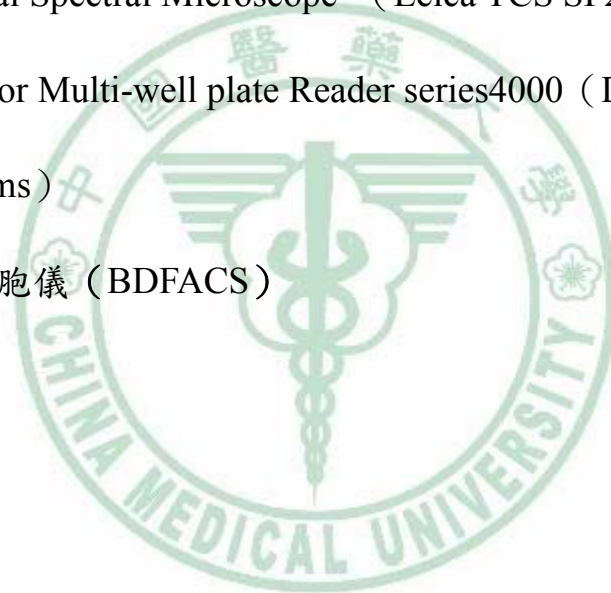
(1) FLUO3/AM 染劑 1ml (5µg/ml) (Calbiochem)

## 附錄二

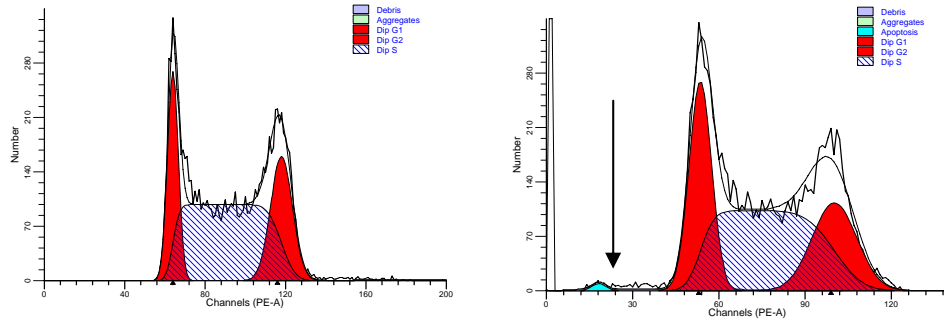
### 儀器、器材

- (1) 4°C 冰箱 (DEL-625)
- (2) -20°C 冰箱 (Caravell)
- (3) -80°C 低溫冷凍機 (Revco)
- (4) 恆溫水浴槽 (TKS)
- (5) PCR Express (Thermo Hybaid)
- (6) PCR System 480 (PERKIN ELMER)
- (7) Mini gel migration trough (Cosmobio)
- (8) BioDoc-It System (UVP)
- (9) 無菌操作箱 VCM-620
- (10) 二氧化碳培養箱 (Forma Scientific)
- (11) 迴轉式震盪培養箱 (Forma Scientific)
- (12) 高速冷凍離心機 (Hitachi CR21FC)
- (13) 離心機 (Beckman Avanti J-25)
- (14) 乾式低溫恆溫槽 (Scinic EC-301)
- (15) 乾浴槽 (Firstek Scientific B101)
- (16) Orbital Skaker (TKS OS701)
- (17) Vortex-2 genie (Scientific Industries)

- (18) 紫外光可見光光譜儀 (Beckman DU-650)
- (19) Bio-Rad 蛋白質電泳槽
- (20) Bio-Rad 半乾式的電泳轉漬槽
- (21) 秤重器 (MonoBloc)
- (22) Stirrer/Hatplate (Corning)
- (23) Microprocessor PH meter (SUNTEX)
- (24) Confocal Spectral Microscope (Leica TCS SP2)
- (25) cytoFluor Multi-well plate Reader series4000 (DerSeptive Biosystems)
- (26) 流式細胞儀 (BDFACS)

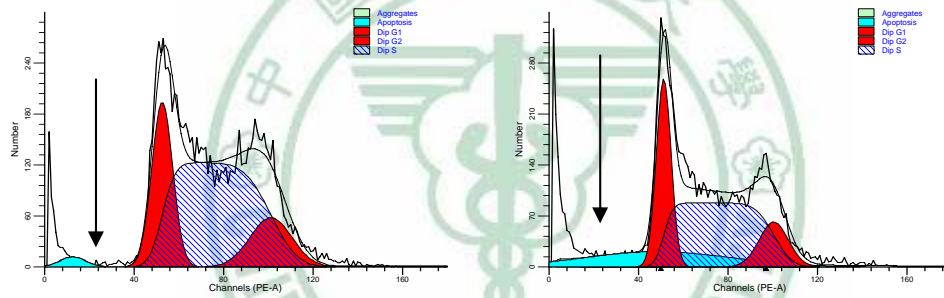


# 附錄三



**A : Control**

**B : 24hr**

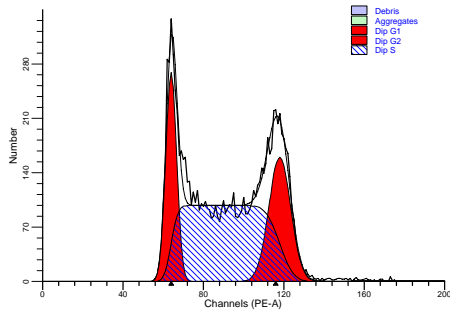


**C : 48hr**

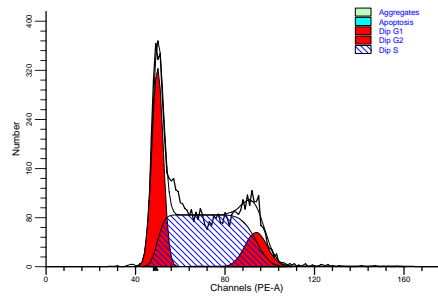
**D : 72hr**

附錄三—— MOI 為 0.1 時日本腦炎病毒感染 HL-CZ 細胞之細胞週期分析

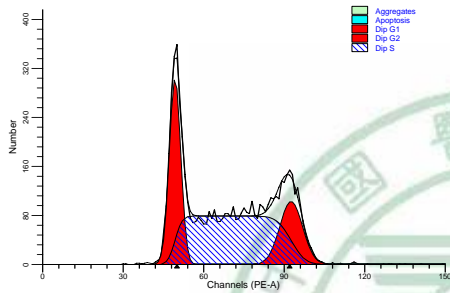
利用流式細胞儀評估 MOI 為 0.1 的條件下 HL-CZ 經由感染日本腦炎病毒 24-96 小時所造成的細胞凋亡程度 (↓ 指示)。數據由 Modfit 軟體分析。



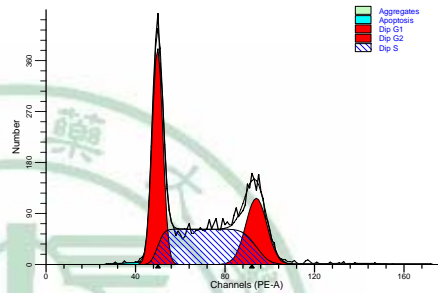
**A : Control**



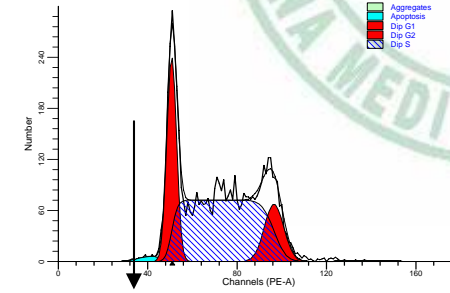
**B : 24hr**



**C : 48hr**



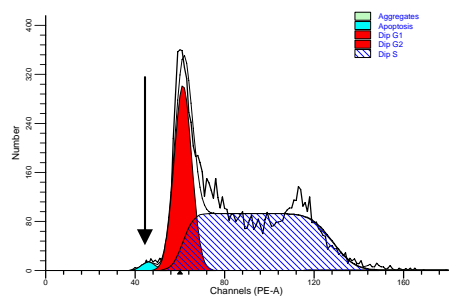
**D : 72hr**



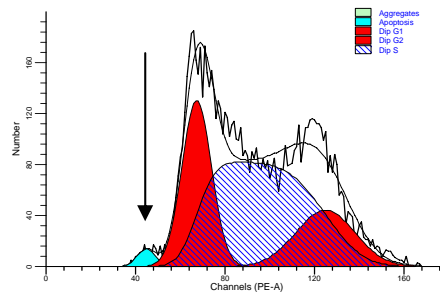
**E : 96hr**

附錄三一二 MOI 為 0.1 時日本腦炎病毒感染 TE-671 細胞之細胞週期分析 利用流式細胞儀評估 MOI 為 0.1 的條件下 TE-671 經由感染日本腦炎病毒 24-96 小時造成的細胞凋亡程度(↓ 指示)。數據由 Modfit 軟體分析。

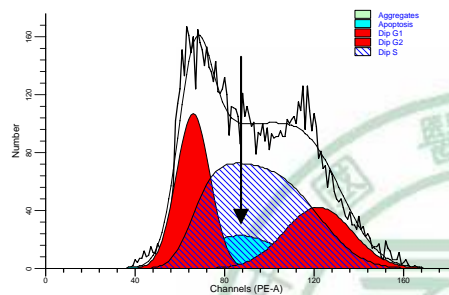




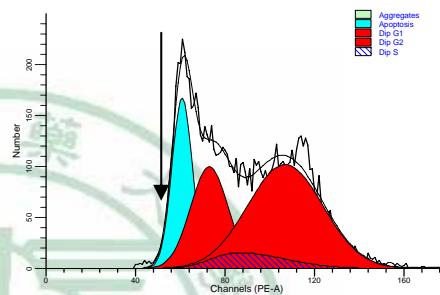
**A : Control**



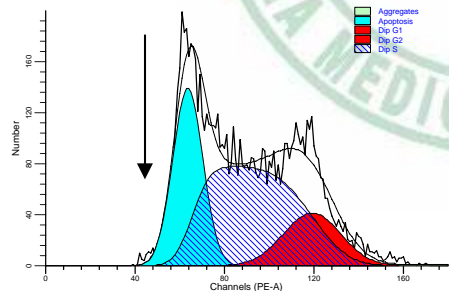
**B : 24hr**



**C : 48hr**

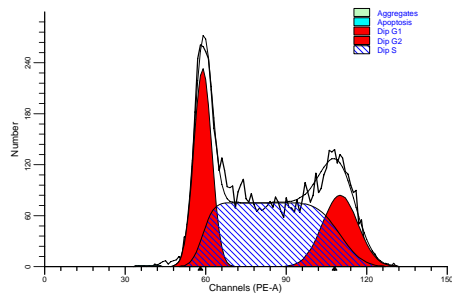


**D : 72hr**

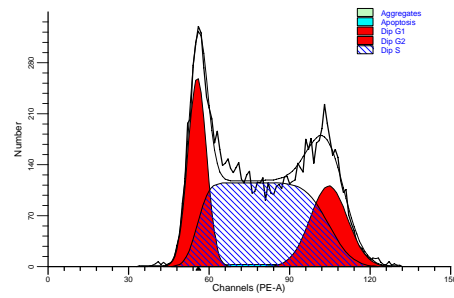


**E : 96hr**

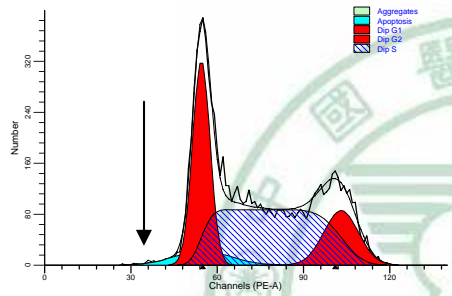
附錄三一三 MOI 為 1 時日本腦炎病毒感染 HL-CZ 細胞之細胞週期分析  
 利用流式細胞儀評估 MOI 為 1 的條件下 HL-CZ 經由感染日本腦炎病毒  
 24-96 小時所造成的細胞凋亡程度 (↓ 指示)。數據由 Modfit 軟體分析。



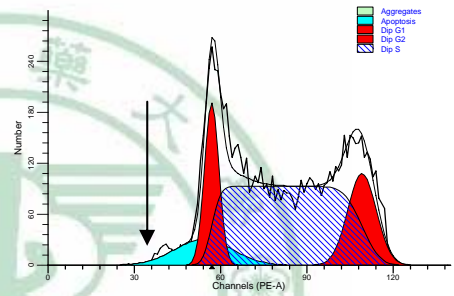
**A : Control**



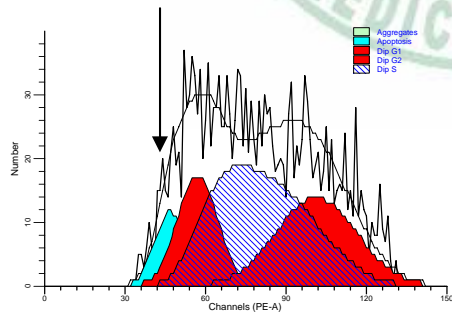
**B : 24hr**



**C : 48hr**

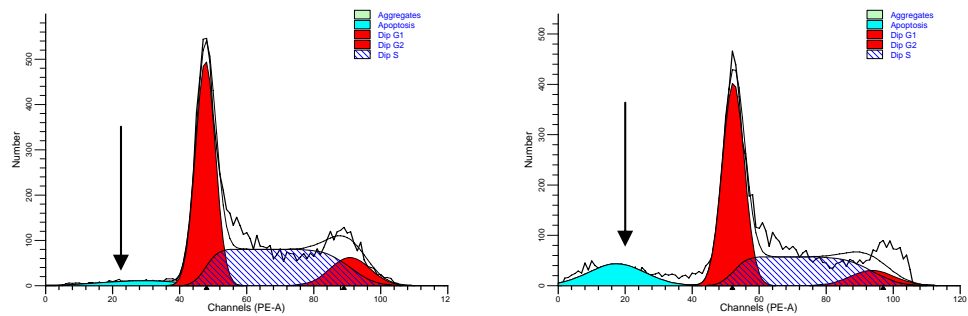


**D : 72hr**



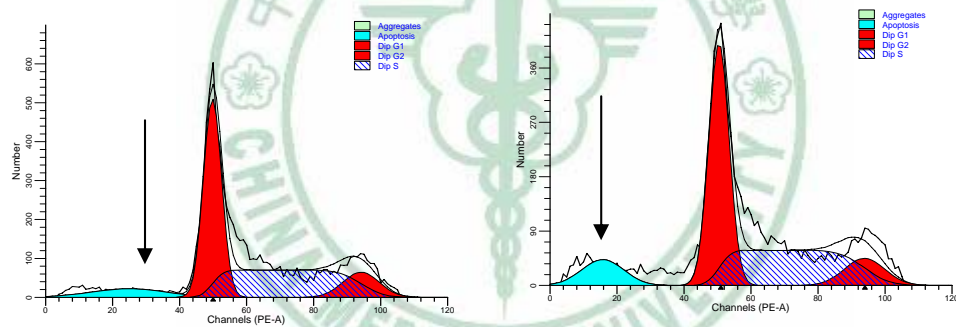
**E : 96hr**

附錄三—四 MOI 為 1 時日本腦炎病毒感染 TE-671 細胞之細胞週期分析  
 利用流式細胞儀評估 MOI 為 1 的條件下 TE-671 經由感染日本腦炎 病毒  
 24-96 小時所造成的細胞凋亡程度 (↓ 指示)。數據由 Modfit 軟體分析。



**A : pcDNA3.1**

**B : pE**

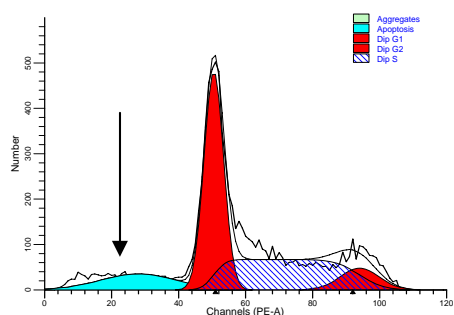


**C : pNS1**

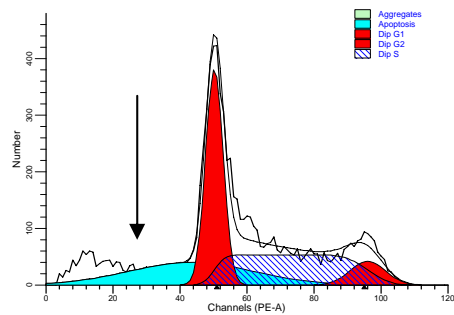
**D : pNS2B**

附錄三一五 NS1、E 與 NS2B 蛋白表現 HL-CZ 之細胞週期分析

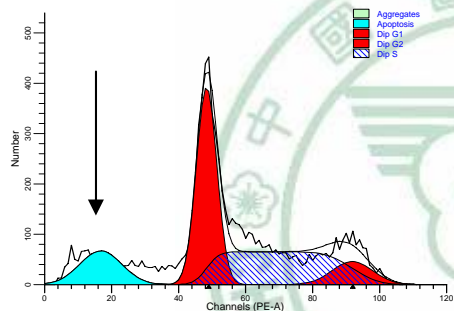
利用流式細胞儀評估在 HL-CZ 細胞內經由日本腦炎病毒蛋白表現後所造成的細胞凋亡比例 ( ↓ 指示)。數據結果由 Modfit 軟體分析。



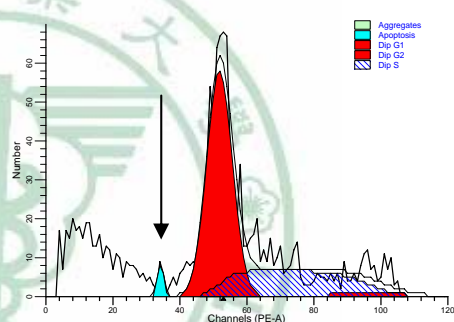
**E : pNS3-180**



**F : pNS2BNS3-180**



**G : pNS4A**

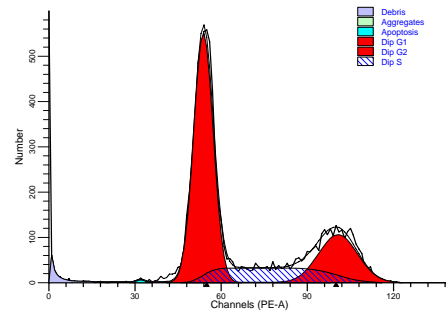
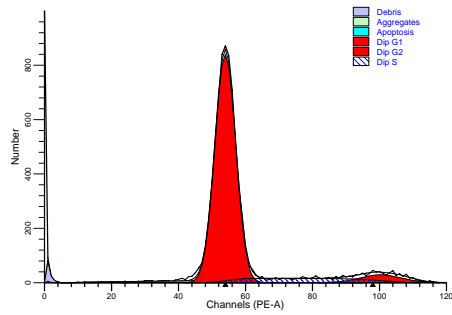


**H : pNS4B**

附錄三一六 NS3-180、NS2BNS3-18、NS4A 與 NS4B 蛋白表現 HL-CZ 細

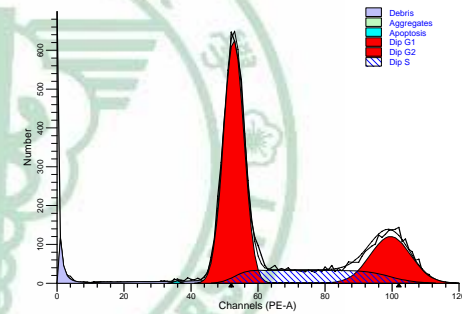
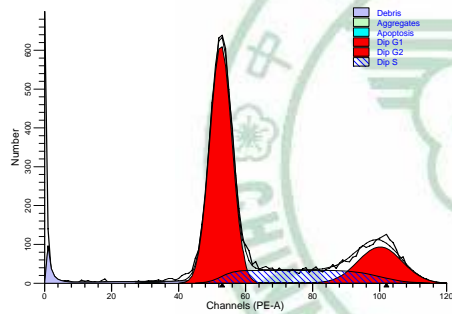
胞之細胞週期分析

利用流式細胞儀評估在 HL-CZ 細胞內經由日本腦炎病毒蛋白表現後 所造成的細胞凋亡比例 (↓ 指示)。數據結果由 Modfit 軟體分析。



**A : pcDNA3.1**

**B : pE**



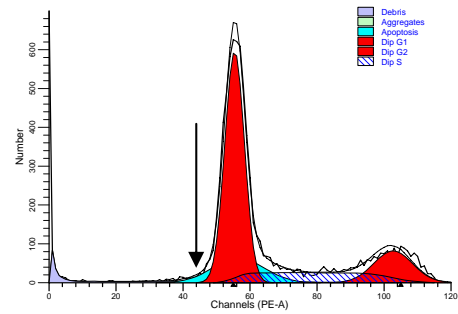
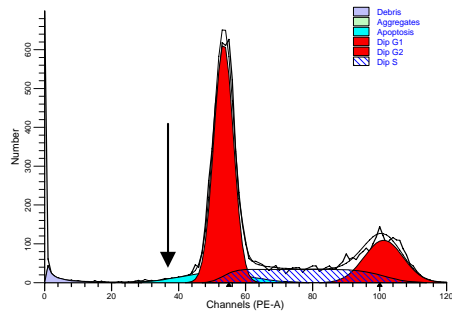
**C : pNS1**

**D : pNS2B**

附錄三一七 NS1、E 與 NS2B 蛋白表現 TE-671 之細胞週期分析

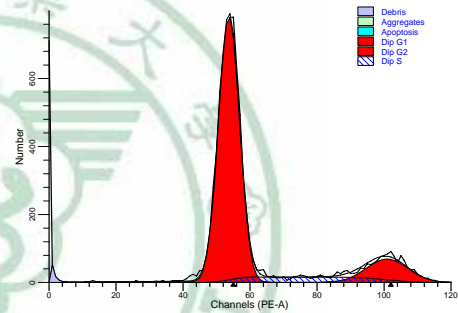
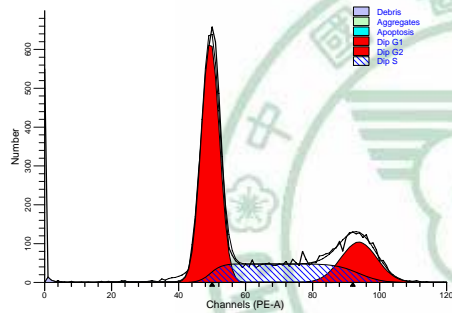
利用流式細胞儀評估在 TE-671 細胞內經由日本腦炎病毒蛋白表現後所造成

的細胞凋亡比例 ( ↓ 指示)。數據結果由 Modfit 軟體分析。



**E : pNS3-180**

**F : pNS2BNS3-180**



**G : pNS4A**

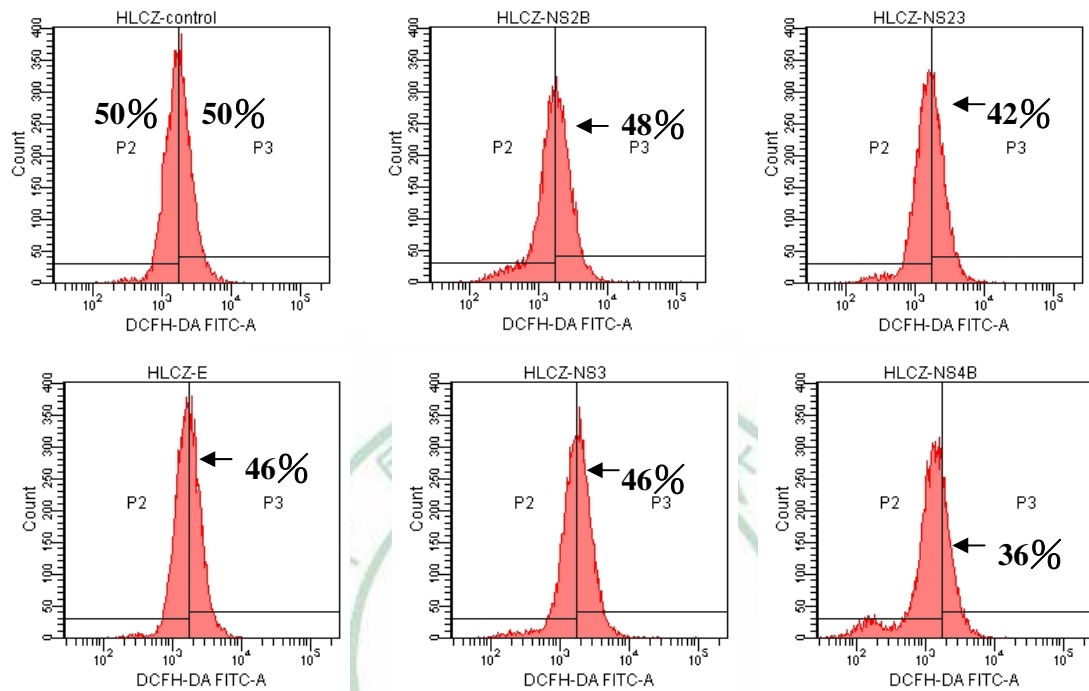
**H : pNS4B**

附錄三一八 NS3-180、NS2BNS3-18、NS4A 與 NS4B 蛋白表現 TE-671

### 細胞之細胞週期分析

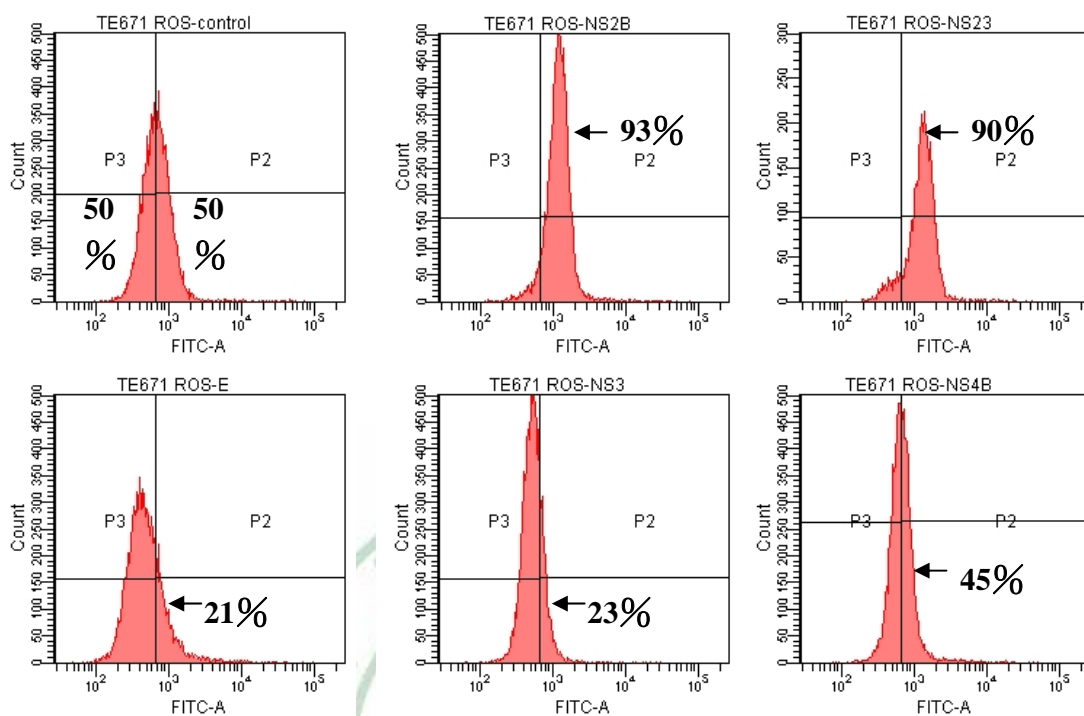
利用流式細胞儀評估在 TE-671 細胞內經由日本腦炎病毒蛋白表現後所造成的細胞凋亡比例 ( ↓ 指示)。數據結果由 Modfit 軟體分析。





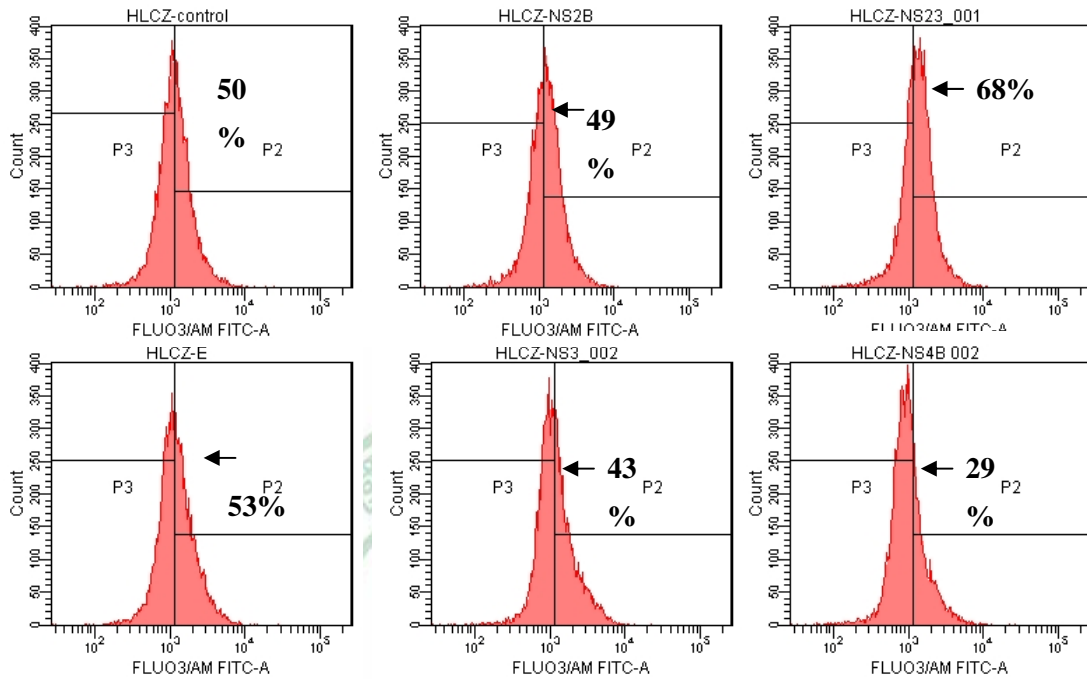
附錄三一九 利用流式細胞儀測 JEV 蛋白在 HL-CZ 細胞表現後測活性氧化物的產生與否。

將  $2 \times 10^5$  cell/well 轉染於 6-well plate，於 48 小時後吸去培養液，細胞經過清洗步驟後，細胞加入 DCFH-DA 染劑，移至 FACS 管， $37^\circ\text{C}$  避光反應 30 分鐘後，再以流式細胞儀進行分析。



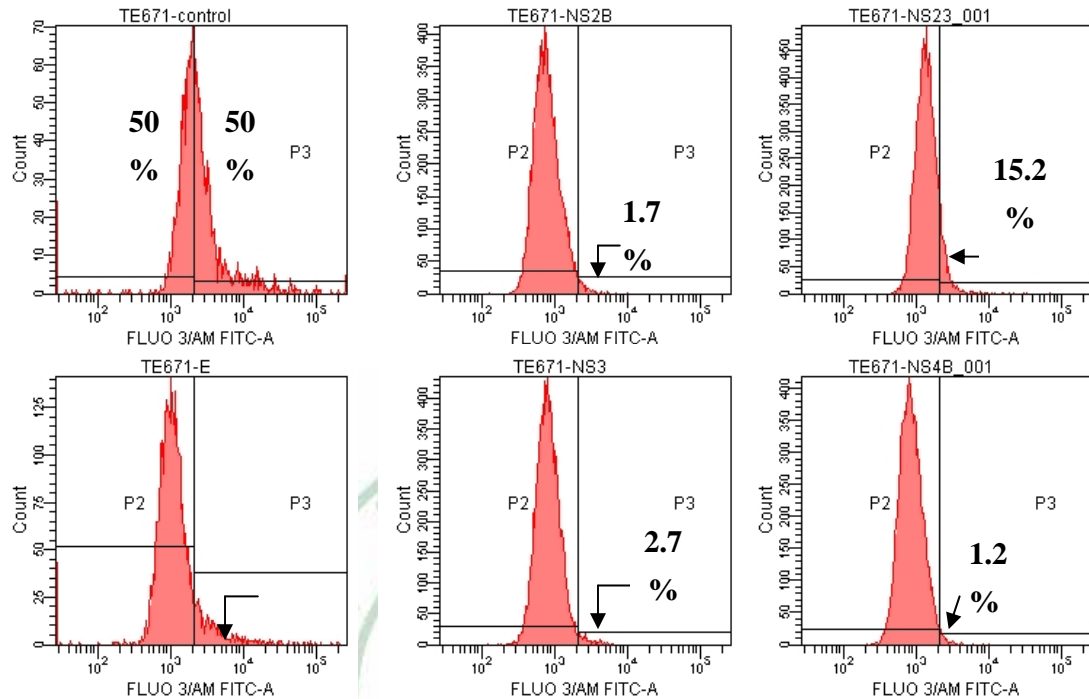
附錄三—十 利用流式細胞儀測JEV蛋白在TE-671細胞表現後測活性氧化物的產生與否。

將  $2 \times 10^5$  cell/well 轉染於 6-well plate，於 48 小時後吸去培養液，細胞經過清洗步驟後，細胞加入 DCFH-DA 染劑，移至 FACS 管， $37^\circ\text{C}$  避光反應 30 分鐘後，再以流式細胞儀進行分析。



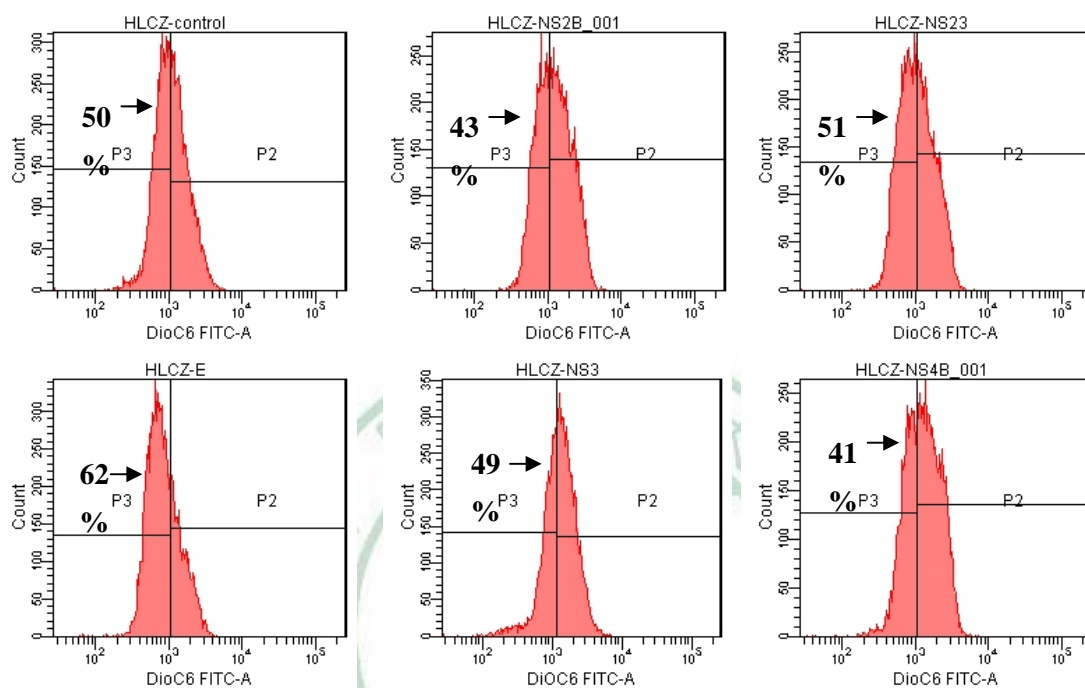
附錄三—十一 利用流式細胞儀測 JEV 蛋白在 HL-CZ 細胞表現後測細胞鈣離子的變化。

$2 \times 10^5$  cell/well 轉染於 6-well，48 小時後吸去培養液，加入 FLUO3/AM 染劑， $37^\circ\text{C}$  培養箱避光反應 30 分鐘，離心去除上清液，加入 PBS，並移至 FACS 管，再以流式細胞儀進行分析。



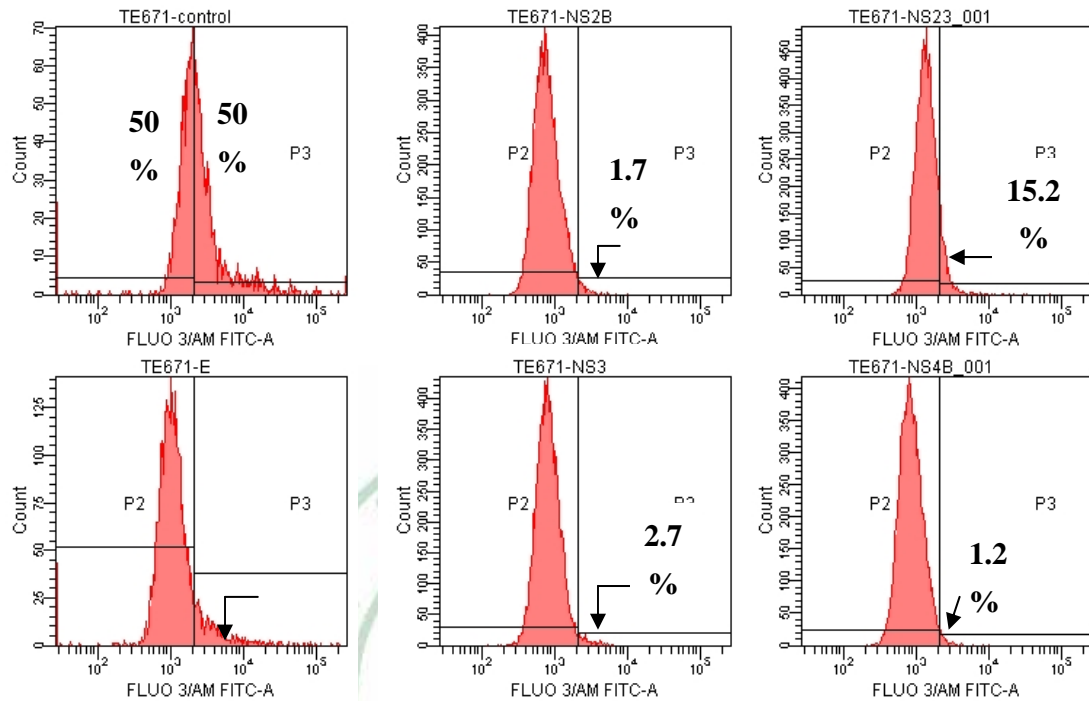
附錄三—十二 利用流式細胞儀測 JEV 蛋白在 TE-671 細胞表現後測細胞鈣離子的變化。

將  $2 \times 10^5$  cell/well 轉染於 6-well，48 小時後吸去培養液，加入 FLUO3/AM 染劑， $37^\circ\text{C}$  培養箱避光反應 30 分鐘，離心去除上清液，加入 PBS，並移至 FACS 管，再以流式細胞儀進行分析。



附錄三一十三 利用流式細胞儀測 JEV 蛋白在 HL-CZ 細胞表現後測膜電位的化。

將  $2 \times 10^5$  cell/well 轉染於 6-well plate，於 48 小時後吸去培養液，細胞經過洗滌後加入 DioC6 染劑，移至 FACS 管， $37^\circ\text{C}$  避光反應 30 分鐘後，再以流式細胞儀進行分析。



附錄三一十四 利用流式細胞儀測JEV蛋白在TE-671細胞表現後測膜電位的變化。

將  $2 \times 10^5$  cell/well 轉染於 6-well plate，於 48 小時後吸去培養液，細胞經過洗滌後加入 DioC6 染劑，移至 FACS 管， $37^\circ\text{C}$  避光反應 30 分鐘後，再以流式細胞儀進行分析。