

國立交通大學

分子醫學與生物工程研究所

碩士論文

登革熱病毒於神經細胞內感染與複製能力之研究

Investigation of dengue virus infection in primary  
neurons of embryonic mouse hippocampal regions and  
human neuroblastoma IMR-32

研究生：余幸璇

指導教授：楊昀良博士

黃兆祺博士

中華民國一百年二月

登革熱病毒於神經細胞內感染與複製能力之研究

Investigation of dengue virus infection in primary neurons of embryonic mouse  
hippocampal regions and human neuroblastoma IMR-32

研究生：余幸璇

Student：Hsing-Hsuan Yu

指導教授：楊昀良博士

Advisor：Dr. Yun-Liang Yang

黃兆祺博士

Dr. Eric Hwang

國立交通大學

分子醫學與生物工程研究所

碩士論文

A Thesis

Submitted to Institute of Molecular Medicine and Bioengineering

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master

in

Molecular Medicine and Bioengineering

February 2011

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國一百年二月

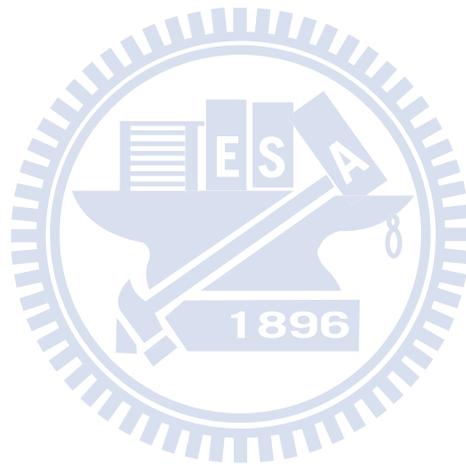
## 摘要

登革熱病毒 (Dengue virus, DV) 及日本腦炎病毒 (Japanese Encephalitis Virus, JEV) 皆屬於蚊蟲叮咬傳播的黃質病毒家族，具有相似的基因組態。感染日本腦炎病毒，於臨床上可能出現腦炎或腦膜炎等症狀。目前病理學的研究方面指出，日本腦炎病毒感染會傷害大腦或中樞神經系統，實際上致病的機制尚待進一步研究。登革熱病毒的患者於臨床上除了發熱外，可能出現出血與休克等症狀，依嚴重程度區分為登革熱 (Dengue fever, DF)，登革出血熱 (Dengue hemorrhage fever, DHF) 與登革休克熱 (Dengue shock syndrome, DSS) 等。這兩種病毒引起的臨床上的病徵，尤其是導致神經病變的機率差異很大。相對於日本腦炎而言，登革熱很少造成人類神經方面的感染。這兩種病毒的致病機制、體內感染途徑、造成神經毒性的關鍵都還不清楚，仍需進一步研究。

本實驗使用免疫螢光染色的影像技術，配合影像分析軟體，觀察日本腦炎病毒與登革熱病毒在包括幼倉鼠腎臟纖維母細胞 BHK-21、白線斑蚊細胞 C6 / 36、小鼠初代神經細胞中，病毒感染與複製的情形。又因為登革熱病毒感染後主要的癥狀出現於人類，故本實驗亦針對人類神經瘤細胞 IMR-32 測試日本腦炎病毒以及登革熱病毒的感染力。

本研究中發現小鼠初代神經細胞以及人類神經瘤細胞不只能被日本腦炎病毒感染，也能被登革熱病毒感染。並且，在幼倉鼠腎臟纖維母細胞

BHK-21 以及蚊子細胞 C6 / 36 中，這兩種病毒皆能複製且趨勢相似。根據實驗結果，登革熱病毒在臨床上導致腦炎的機率很低並不是因為登革熱病毒無法感染神經細胞，或無法在神經細胞內複製所導致。



## **Abstract**

Both Dengue viruses (DV) and Japanese encephalitis virus (JEV) are mosquito-borne flaviviruses. They share the same genomic organization and both are positive-sense, single-stranded RNAs. However, the symptoms of their infection are very different. JEV causes severe, even lethal encephalitis in humans. Pathological studies of JEV have shown that developing neurons are the major target of JEV. The DV complex consists of four serotypes (DV1-DV4). They may cause dengue fever (DF), dengue hemorrhagic fever (DHF), or dengue shock syndrome (DSS).

Interestingly, most flaviviruses but DV cause neurotropism. Possibilities are that DV has difficulty to enter or propagate in neurons. Hence, I employed imaging technique to determine if DV2 and JEV can infect neurons by investigating the accumulation kinetics of viral replication in mouse primary neurons and mosquito cells. Since dengue symptoms are limited to human, I also analyzed the viral infectivity of DV2 and JEV in human neuroblastoma IMR-32.

The results showed that both human and mouse neurons could be infected not only by JEV but also by DV2. And, the accumulation kinetics for DV and JEV were similar in the mouse primary neurons and mosquito cells. Hence, DV rarely causing neurotropism is not due to inability of infectivity and/or replication in neuron cells.

## 誌謝

眼看著學位在眼前，這一路有太多太多的人要感謝！謝謝小楊老師，在我的學習過程中總是給我建議與鼓勵，有時甚至比我自己更對我有信心，讓我能夠勇往直前。謝謝黃老師的教導，總在我低潮時給我鼓舞，激勵我向前。能跟著您們學習，我真的覺得自己很幸運，謝謝您們！感謝口試委員台灣大學的閔明源老師以及陽明大學的兵岳忻老師，謝謝您們的不吝指導，與您們討論讓我獲益良多，使本論文能更完整，也看到自己更多進步的空間與努力的方向。

謝謝葉大哥的照顧；謝謝秀哥、酷哥、毛麻麻，在實驗技巧上給我許多指導；謝謝小倩、淑萍、阿姨在撰寫論文的過程中給予我建議；謝謝細胞室一姊阿大和病毒一哥蟲神，提供我實驗的材料與靈感；謝謝WB一姊優比，總為實驗室帶來歡笑；謝謝熱心的凱薩提供我病毒；謝謝阿賢、阿白、小善，給了我的實驗室生活許多調劑；謝謝開朗的小氣、電腦大神春榮、勤奮的妍辰，與你們討論實驗總讓我很開心。謝謝逸禪和小珊學姊使我熟悉免疫螢光染色的技術；謝謝里長伯朝彥、踏實的小光、萬能的雯馨，你們除了提供細胞、材料，總在我遇到困難時不吝伸出援手，這段時間真是麻煩你們了，謝謝！謝謝夾破玻片的好兄弟永安，真是不好意思讓你提前體驗了一下趕進度的生活。謝謝你們大家在寫作論文過程中給我的幫助與鼓勵！感謝大學同窗好友奕薇、假酷和以樂在我初來乍到新竹時給予我的

諸多幫助，也謝謝室友佳凌、綉吟學姊、詠湟學長、宗寬學長在日常生活上對我的照顧與關懷。

特別感謝國立東華大學生科系張瑞宜老師，在我的專題生涯中為我的實驗技術與求學態度奠定了基礎，讓我在往後的研究生涯中深感受用無窮。謝謝張老師實驗室提供的病毒與抗體，謝謝學長姐們一直以來的協助，讓我可以完成這個研究。

最後，我要感謝求學過程中一路走來始終沒有停止過支持我的家人。你們在我當初上榜時的雀躍與欣喜一直以來都是我努力的動力，謝謝你們的陪伴與鼓勵！我愛你們，我做到了。

寫了這麼多都是說不完數不盡的感謝，真的謝謝大家！謝謝你們，有你們的扶持、陪伴、鼓勵，我是最幸運且幸福的人。

## 目錄

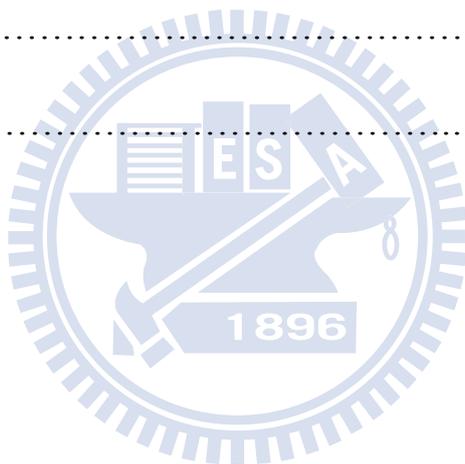
中文摘要.....	i
英文摘要.....	iii
誌謝.....	iv
目錄.....	vi
圖目錄.....	xi
附表目錄.....	xiii
附圖目錄.....	xiv
壹、緒論.....	1
1.1 日本腦炎與登革熱疾病概述.....	1
1.2 日本腦炎與登革熱臨床病徵.....	3
1.3 日本腦炎病毒與登革熱病毒基因組態.....	4
1.4 文獻探討.....	4
1.4.1 日本腦炎病毒研究.....	4
1.4.2 登革熱病毒研究.....	7
1.5 免疫螢光染色技術介紹.....	10
1.6 軟體介紹.....	11
1.7 實驗目的與設計.....	11
貳、材料.....	14

2.1 實驗動物.....	14
2.2 細胞株.....	14
2.3 病毒.....	14
2.4 藥品試劑.....	15
2.5 溶劑、緩衝溶液及培養基.....	17
2.6 儀器設備.....	18
參、方法.....	20
3.1 細胞繼代培養.....	20
3.1.1 BHK-21 細胞繼代培養.....	20
3.1.2 白線斑蚊細胞 C6 / 36 細胞繼代培養.....	20
3.1.3 IMR-32 細胞繼代培養.....	21
3.1.4 IMR-32 細胞分化測試.....	21
3.2 小鼠初代神經細胞培養.....	22
3.3 病毒增殖.....	23
3.3.1 日本腦炎病毒增殖.....	23
3.3.2 登革熱病毒增殖.....	24
3.4 空斑試驗.....	24
3.4.1 日本腦炎病毒空斑測試.....	24
3.4.2 登革熱病毒空斑測試.....	25

3.5 細胞感染.....	26
3.5.1 小鼠初代神經細胞感染.....	26
3.5.2 幼倉鼠腎臟纖維母細胞感染.....	26
3.5.3 白線斑蚊細胞 C6 / 36 感染.....	27
3.5.4 IMR-32 細胞感染.....	27
3.5.5 分化後 IMR-32 細胞感染.....	28
3.6 細胞固定.....	28
3.7 細胞染色.....	29
3.7.1 小鼠初代神經細胞免疫螢光染色.....	29
3.7.2 幼倉鼠腎臟纖維母細胞 BHK-21 免疫螢光染色.....	30
3.7.3 C6/36 免疫螢光染色.....	31
3.7.4 IMR-32 細胞免疫螢光染色.....	32
3.8 軟體分析.....	33
肆、結果.....	35
4.1 小鼠初代神經細胞感染.....	35
4.1.1 日本腦炎感染神經細胞.....	35
4.1.2 登革熱病毒感染神經細胞.....	36
4.1.3 神經細胞型態變化.....	36
4.2 登革熱及日本腦炎病毒感染幼倉鼠腎臟纖維母細胞.....	37

4.3	以登革熱及日本腦炎病毒感染 C6 / 36 細胞.....	38
4.4	登革熱與日本腦炎病毒在神經初代培養細胞中增幅趨勢.....	38
4.5	人類神經瘤細胞 IMR-32 感染.....	39
4.5.1	日本腦炎病毒感染人類神經瘤細胞 IMR-32.....	39
4.5.2	登革熱病毒感染人類神經瘤細胞 IMR-32.....	40
4.6	人類神經瘤細胞 IMR-32 分化條件測試.....	40
4.7	病毒感染分化後 IMR-32.....	41
4.7.1	日本腦炎病毒感染分化後 IMR-32.....	41
4.7.2	登革熱病毒感染分化後 IMR-32.....	41
伍、	討論.....	43
5.1	登革熱與日本腦炎病毒對小鼠初代神經細胞感染力分析.....	43
5.1.1	登革熱與日本腦炎病毒感染小鼠初代神經細胞.....	43
5.1.2	神經細胞型態.....	43
5.2	登革熱與日本腦炎病毒對幼倉鼠腎臟纖維母細胞 BHK-21 感染力 分析.....	44
5.2.1	登革熱與日本腦炎病毒感染幼倉鼠腎臟纖維母細胞 BHK- 21.....	44
5.2.2	登革熱與日本腦炎病毒在幼倉鼠腎臟纖維母細胞 BHK-21 中複製情形.....	45
5.3	登革熱與日本腦炎病毒對白線斑蚊細胞 C6 / 36 感染力分析....	46

5.4 登革熱與日本腦炎病毒在白線斑蚊細胞 C6 / 36 中複製情形...	47
5.5 登革熱病毒與日本腦炎病毒在小鼠初代神經細胞中複製情形....	48
5.6 登革熱病毒與日本腦炎病毒對人類神經瘤細胞 IMR-32 感染力分 析.....	49
5.7 IMR-32 分化情形探討.....	50
5.8 登革熱與日本腦炎病毒對分化後人類神經瘤細胞 IMR-32 感染力分 析.....	52
陸、結論.....	55
柒、參考文獻.....	57



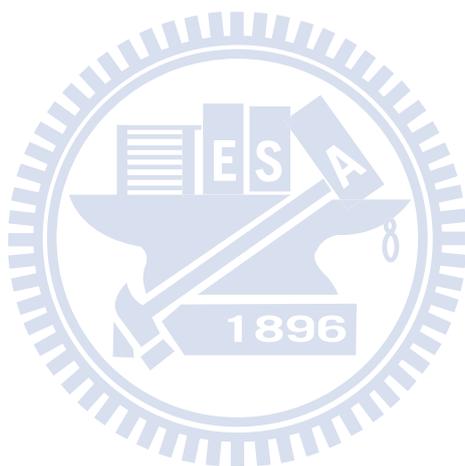
## 圖目錄

圖一 免疫螢光染色--登革熱病毒與日本腦炎病毒感染小鼠初代神經細胞 .....	62
圖二 免疫螢光染色—初代神經細胞被病毒感染後一至四天型態變化.....	63
圖三 圖二白色框線處局部放大.....	64
圖四 免疫螢光染色 -- 以 anti-JEV prM / E antibody 偵測病毒蛋白表現.....	65
圖五 免疫螢光染色--以 anti-prM / E antibody 偵測病毒蛋白表現....	66
圖六 免疫螢光染色—幼倉鼠腎臟纖維母細胞 BHK-21 中病毒複製趨勢...67	
圖七 免疫螢光染色--登革熱與日本腦炎病毒感染白線斑蚊細胞 C6 / 36 .....	70
圖八 圖七的白色框線處局部放大.....	71
圖九 免疫螢光染色--白線斑蚊細胞 C6 / 36 中病毒複製趨勢.....	72
圖十 免疫螢光染色--白線斑蚊細胞 C6 / 36 中病毒複製趨勢.....	75
圖十一 免疫螢光染色—神經初代培養細胞中病毒複製趨勢.....	77
圖十二 免疫螢光染色—登革熱病毒與日本腦炎病毒感染 IMR-32.....	80
圖十三 免疫螢光染色—未感染病毒之 IMR-32.....	81
圖十四 IMR-32 細胞以 RA 處理後之型態變化.....	82

圖十五 免疫螢光染色—登革熱與日本腦炎病毒感染以 RA 處理過之

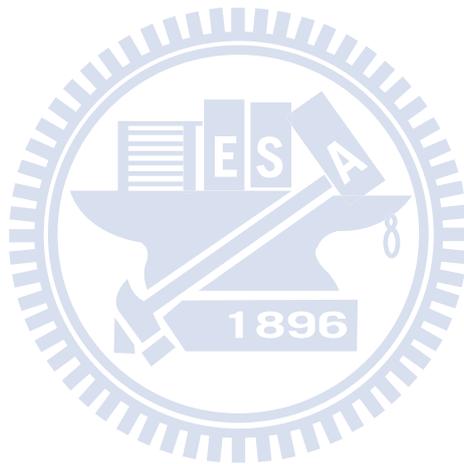
IMR-32.....84

圖十六 圖十五的白色框線處局部放大.....85



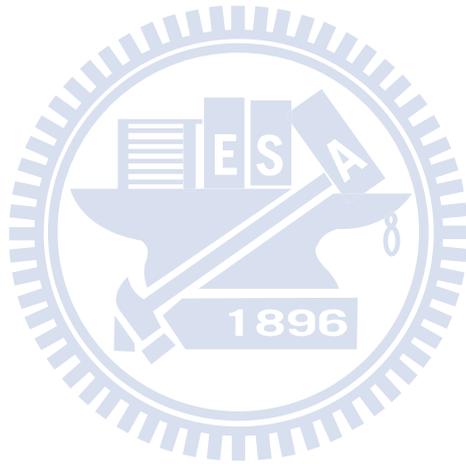
## 附表目錄

附表一 行政院衛生署疾管局統計 1998-2007 年日本腦炎通報病例 數及確定病例數.....	86
附表二 行政院衛生署疾管局統計 2007-2010 年日本腦炎通報確定 病例數.....	86
附表三 行政院衛生署疾管局統計 2007-2010 年登革熱通報確定病 例數.....	87



## 附圖目錄

附圖一 免疫螢光染色示意圖.....	88
附圖二 病毒螢光強度分析流程示意圖.....	89



## 壹、緒論

### 1.1 日本腦炎與登革熱疾病概述

根據我國衛生署發布，日本腦炎與登革熱分列第二、第三類傳染病。日本腦炎於 1924 年、1948 年在日本爆發大流行，1931 年台灣開始出現病例記載。從 1998 年到 2007 年，台灣每年的通報病例數平均有 336 例，確診的病例數平均為 27 例(見附表 1)，2007 年到 2010 年，平均確定病例為 26.25 例(見附表二)。日本腦炎在全球的分佈上，北起西伯利亞、日本、台灣、菲律賓、馬來西亞、印尼、斯里蘭卡和澳洲北部等，每年約有三至五萬病例。豬隻在臺灣為日本腦炎病毒可能的增幅宿主，每年的豬抗體陽性率超過一半之後的二至三週，病例數亦達高峰。此病主要發生於九歲以下的兒童，自 1968 年開始施打疫苗起，臺灣的日本腦炎疫情控制良好。但在 1998 年後發現此疾病感染年齡層漸移至 20 歲以上。

登革熱俗稱斷骨熱、天狗熱，發生於熱帶、亞熱帶等有斑蚊生存的地方，包括亞洲、非洲、中南美洲與大洋洲。但 1980 年代後漸有向全球擴展的趨勢，且已在其中某些地方成為地方性的傳染病，如斯里蘭卡、印度、孟加拉、緬甸、泰國和寮國等。一般認為，病媒蚊之間的傳播為登革熱的傳染途徑，但在馬來西亞西部與西非，也有報導另一種病媒蚊與猴子之間

的傳染(森林傳播循環)。於 1953 年菲律賓出現登革出血熱的病例(Hammon *et al.*, 1960; Mairuhu *et al.*, 2004), 病例數從 1950 年代每年平均 908 人, 在 1990 年到 1998 年每年增加到二十餘萬人(Ligon, 2005)。臺灣在日治時期與後期曾爆發過三次全島大流行, 分別在 1912 年(民國 4 年)、1931 年(民國 20 年)和 1942 年(民國 31 年)。近年隨著戰爭、交通運輸發達與溫室效應等影響, 登革熱病毒感染的地區正逐漸擴大。2007 年到 2010 年在臺灣的確定病例數平均為 1459.75 例, 從 2008 年後每年都有增加的趨勢(見附表三)。

由於此兩種疾病皆由蚊蟲叮咬傳播, 因此在台灣本地流行的高峰期為梅雨、颱風盛行季節。日本腦炎於 1956 年已發展出不具病毒活性的疫苗, 目前預防的方式主要為施打疫苗以及清除居家周遭可能的積水環境。登革熱病毒則因有抗原增強反應(Antibody-dependent enhancement; ADE)(Kliks *et al.*, 1989)的現象, 使疫苗研究倍受影響。所謂 ADE 就是若曾經被一種血清型的登革熱病毒感染, 再被另一種血清型登革熱病毒感染後, 可能因引起的是補體型免疫反應, 巨噬細胞的活躍導致體液滲漏或出血、溶血的症狀嚴重可能會引發循環衰竭及休克等。因此, 目前尚未研發出有效的疫苗。預防上仍多採取環境控制、抑止病媒蚊孳生的方式, 包括清除積水環境、避免蚊蟲叮咬等。在臨床治療上, 處理這兩種疾病仍以採取支持療法居多。

## 1.2 日本腦炎與登革熱臨床病徵

日本腦炎是一經由埃及斑蚊及白線斑蚊傳播的傳染病。大部分病人無明顯症狀，然而部分病患血液病毒含量很高，會發展為腦炎或無菌性腦膜炎，隨著病程進展可能出現嗜睡、高燒、噁心、劇烈頭痛、腹痛等症狀，更嚴重可能出現譫妄、囁語、頸部僵硬、抽搐痙攣、昏迷等，一部份患者可能出現顱神經麻痺、肌肉無力、震顫等。死亡率大概在 5% 至 60%，此外在存活的病患可能留下永久性的後遺症（行政院衛生署疾病管制局，疾管局，2010）。部分兒童於幾個月後仍能觀察到腦波異常，運動及智能的退化、協調的障礙等需要數月至數年來恢復。

登革熱是一急性傳染症，經由埃及斑蚊叮咬而傳播。病人被帶有登革熱病毒的病媒蚊叮咬而受感染，在發病前一天與發病後五天，血液中可檢驗出病毒活性稱為病毒血症期（疾管局，2010）。依血清抗原呈現分為四種血清型，為一可能導致發熱的疾病。登革熱典型的登革熱症狀為發燒、肌肉疼痛、頭痛及出疹。較嚴重的症狀可能會因血小板減少而出現溶血、體液滲漏、凝血等現象，稱為登革出血熱（DHF），更嚴重進一步導致循環衰竭引起休克，即為登革休克熱（DSS）。依臺灣行政院衛生署疾病管制局 2010 年的統計，臺灣歷年來感染登革出血熱的死亡率高達 9.5%（疾管局，2010）。

### 1.3 日本腦炎病毒與登革熱病毒基因組態

日本腦炎病毒與登革熱病毒皆屬於黃質病毒科，黃質病毒屬。皆為正股、單股的 RNA 病毒，全長約為 10.8 kb，僅具一開放式讀架。複製時，先轉譯出一聚合蛋白，再由病毒與宿主的蛋白酶切割成三個結構蛋白 C，prM，E 與七個非結構蛋白 NS1，NS2A，NS2B，NS3，NS4A，NS4B，NS5。目前已知與宿主細胞受器辨識結合的為表面蛋白 E protein 的結構，prM protein 在病毒顆粒包裝的時候會切割出成熟的 M protein，幫助 E protein 在病毒顆粒表面結構更為穩定。NS3 是一個具有蛋白酶活性的病毒蛋白，NS5 則具有核糖核酸聚合酶 RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) 以及核酸解旋酶 (helicase) 的活性，也是黃質病毒 superfamily 分類的依據 (Lindenbach *et al.*, 2007)。

### 1.4 文獻探討

#### 1.4.1 日本腦炎病毒研究

依照其臨床症狀推測，日本腦炎病毒 (Japanese Encephalitis Virus, JEV) 會感染神經細胞，造成中樞神經系統傷害。在老鼠方面，已證實日本腦炎病毒對其神經細胞、神經瘤細胞 Neuron 2a (N2a) 等皆會造成感染

(Kimura-Kuroda *et al.*, 1992; Mathenge *et al.*, 2004)。在人類細胞中，日本腦炎病毒也能感染單核白血球細胞、神經瘤細胞 (Yang *et al.*, 2004)。

在主要感染的對象上，1992 年 Kimura-Kuroda *et al.* 研究認為發育中的神經細胞是日本腦炎病毒主要感染的目標，日本腦炎病毒與這些細胞結合，推測是產生神經病變的原因。作者認為神經細胞表面在神經細胞發育時期具有特殊的受器，能和日本腦炎病毒表面蛋白產生專一性而結合。於 2002 年也有文獻發表，指出老鼠大腦中，神經細胞發育的程度影響其對日本腦炎病毒的感受性。日本腦炎病毒接觸神經或與神經細胞結合，即可能導致神經病變與傷害 (Yasui K., 2002)。

關於病毒蛋白在致病機制的功能探討方面，Mathernge 等人將日本腦炎病毒中的兩個結構蛋白 prM、E 置換為登革熱病毒四型的 prM、E，來研究新的嵌合體 (chimera) 對老鼠神經細胞株 N2a 的感染力。日本腦炎病毒與新構築出的 chimera 都能在蚊子細胞 C6/36 中複製，然而只有野生型的日本腦炎病毒在 N2a 細胞中能有效的複製，結構蛋白置換為登革熱四型病毒的 chimera 則缺乏複製能力。至於 chimera 與登革熱四型病毒，在腹腔內注射的動物實驗中，同樣缺乏侵入神經細胞的能力，但進行顱內注射時，這兩種病毒仍具有神經毒性。根據以上結果，作者認為 prM、E 這兩個病毒結構蛋白是決定日本腦炎能否侵入神經細胞的關鍵 (Mathernge *et al.*, 2004)。

在病毒感染的過程中，感染中樞神經系統前，需突破一由內皮細胞形成緊密連接（tight junction）的結構，稱為血腦屏障（Blood-brain barrier，BBB）。2006 年，透過研究感染日本腦炎病毒死亡的病例，認為病毒的複製可能位於血管內皮細胞，隨著病毒複製造成內皮細胞損傷，進一步解釋日本腦炎病毒是如何穿過血腦屏障（German *et al.*，2006.）。之後也有研究指出，日本腦炎病毒感染後，可能破壞 tight junction 的結構並滲透過 BBB。靜脈內注射日本腦炎病毒，會提高老鼠大腦 BBB 的通透性，但老鼠小腦 BBB 的通透性並沒有此一現象。這個結果指出，隨著病毒感染，BBB 的通透性可能因此產生改變，使病毒顆粒能穿越大鼠的 BBB。目前認為中樞神經系統中最先被感染的部份是大腦週邊的單核白血球細胞，理論上，當大腦受病毒感染後，小腦也會隨之被感染，而開始出現行為不協調的現象（Liu *et al.*，2008）。

在探討日本腦炎病毒感染後，感染部位是否改變，以及病程如何進展的研究的方面，利用大鼠來做為實驗動物，觀察在其中樞神經系統中，於不同時間點感染日本腦炎病毒所造成病變的區域，並針對腦皮層、丘腦（視神經床）、紋狀體及中腦來探討，在不同區域隨著感染後天數增加，累積的病毒量也有所不同。但整體而言，病毒抗原累積最大量是在感染大鼠後第六天（Kumar *et al.*，2009）。

日本腦炎病毒感染未成熟的神經原細胞或神經幹細胞，隨著病毒感染

細胞繼續發育，可能會形成能產生免疫反應的細胞，表現先天與後天免疫反應。文獻指出，這些發育中的神經原細胞或神經幹細胞，可能會因此有不同的功能，像是在中樞神經系統中表現出抗原 (Das *et al.*, 2009)。2010年 Gupta 等人則有研究結果指出，中樞神經系統中的不同免疫細胞可能會分泌趨化因子 (chemokines) 來抵抗日本腦炎病毒引發的腦炎。在老鼠的神經瘤細胞中發現，被日本腦炎病毒感染後，有八十種 mRNA (messenger ribonucleotide nucleic acid) 的表現量有明顯的改變。作者認為這些基因的表現量與細胞凋亡 (apoptosis) 與抗病毒反應有關。在這些基因中，有部分基因與早期的發炎反應及抗發炎反應有關。作者認為日本腦炎病毒感染後，可能會導致初期發炎反應的 chemokines 表現，並可能吸引單核白血球至病毒感染的位置。之所以造成神經病變，即可能是因 chemokines 的表現 (Gupta *et al.*, 2010)。

#### 1.4.2 登革熱病毒研究

由於登革熱病毒 (Dengue Virus, DV) 感染的臨床症狀並未明顯顯示對中樞神經系統有危害，因此雖然早在 1964 年即有文獻報導，觀察到登革熱病毒感染老鼠神經；而 1973 年也有研究指出脊髓內注射約  $4 \times 10^4$  Plaque Formation Unit (PFU) / 隻病毒的幼鼠 (出生一至兩天)，於感染後

三天在腦部神經的核周圍能觀察到病毒蛋白產生 (Sriurairatna *et al.*, 1973), 但並未引起學界的注意。

1996 年以登革熱一型病毒感染老鼠神經瘤細胞株 Neuro 2a 做為研究對象, 發現未完全成熟的病毒蛋白在細胞中內質網的累積會導致細胞走向 apoptotic pathway (Desprès *et al.*, 1996), 此現象發生的部位是在腦部皮層及海馬迴。研究證實中樞神經系統病毒感染後出現的 apoptosis 確實是直接由病毒感染導致 (Desprès *et al.*, 1997)。

雖然已有上述文獻報導登革熱病毒對幼鼠神經的感染情況, 以及宿主可能產生的免疫反應, 但是登革熱病毒致病機制目前尚未被完全了解。在活體外的細胞實驗中, 包括上皮細胞、內皮細胞及纖維母細胞等初代細胞皆能有效的複製登革熱病毒, 也能進行病毒放大、抗原呈現測試以及抗病毒研究。登革熱病毒經病媒蚊叮咬進入體內後, 感染的目標細胞可能為單核球細胞、巨噬細胞等, 並可能進入淋巴結、肝、脾等器官內大量地複製 (Bente *et al.*, 2006)。但是目前為止, 病毒在血液中的含量與症狀的嚴重程度的關聯還不清楚。目前為數不少的研究方向集中在被感染後病人 (或細胞) 的細胞因子 (cytokine) 表現 (免疫反應) (Yu *et al.*, 2010; Ip *et al.*, 2010), 以及病毒複製對 cytokine 分泌量及內皮細胞通透性的影響 (German *et al.*, 2006.)。

經由感染各種動物包括雞、水鳥、羊、狗、豬、兔子、大鼠、老鼠與

倉鼠發現，即使給予高病毒劑量，這些動物也不會出現登革熱的病徵。在多種品系的猴子中也發現，儘管能被登革熱病毒感染，但仍未有明顯的病徵。至於常用的實驗動物--老鼠，被登革熱病毒感染後，病毒複製的產量少，也沒有登革熱病徵出現。為了克服這一點，在實驗設計上常會給予很高的病毒劑量（ $10^8$  PFU）、選用特定的病毒株或者以靜脈、顱內注射等方式來感染。但這些注射感染的方式都不是自然的感染途徑，每隻病媒蚊叮咬後至多也只注入  $10^4$ - $2.5 \times 10^5$  PFU 的病毒量(Bente *et al.*, 2006)。因此這些老鼠被登革熱病毒感染後的現象並未能確實反應出實際感染的情況，也因此我們並不能確切的模擬出病毒在人體內的致病機制，成為研究上的障礙。

近年來登革熱病毒可能造成神經病變的情形開始受到關注，但是致病的機制仍不明確。有研究團隊認為，病毒在病人體內的複製效率與宿主天生免疫系統調控達成的平衡，在病毒感染的初期影響了病人可能表現出來的病徵。在老鼠的中樞神經系統中，發現登革熱病毒感染後，有一百五十一種老鼠基因的表現會增強，這些基因可能與登革熱病毒導致神經病變有關，也可能是提供保護使宿主免於被感染。經過分析，其中部分基因認為與干擾素（interferon）訊息傳遞與抗原表現有關（Bordignon *et al.*, 2008）。

另外，Kinoshita 等人試圖連結登革熱病毒可能造成的細胞病變與其致病機制。同一個病人體內分離出的病毒可以感染 C6/36 細胞與 K562（人類造血細胞），並在這兩種細胞中表現出不同的感染力。作者分別將在不同

細胞內表現的病毒命名為 VNHCM18-C / 02 (能感染 C6 / 36) 以及 VNHCM18-K / 02 (能感染 K562)。進一步分析發現 VNHCM18-C / 02 以及 VNHCM18-K / 02 序列中有三個胺基酸不同，其中一個位於病毒結構蛋白 E protein 上的第六十二個位置 (E-62)。經由這個現象，作者認為同一個病人體內分離出之病毒，其序列不同也可能導致細胞病變的情況不同 (Kinoshita *et al.*, 2009.)。

### 1.5 免疫螢光染色技術介紹

這個技術應用的基本原理為抗原抗體反應 (附圖一)。實驗上首先利用一級抗體辨識細胞或組織切片中的抗原，再利用二級抗體辨識一級抗體。二級抗體的尾端可能接上的螢光發光基團，在一定波長的光激發下，即放出特定波長的光而可被偵測。既然稱之為螢光，則利用螢光顯微鏡即可以肉眼觀察。其優點在於，免疫螢光染色可直接觀察細胞中的抗原呈現狀況，具高靈敏度與高效率，是一個很有發展潛力的篩選平台；並且以螢光呈色便於觀察。這個技術的限制為必須將細胞固定與穿孔，因此只能觀察死細胞。另外一個可能產生而對觀察造成影響的問題為，螢光的呈色強度可能會隨著曝光而衰減。在螢光的發光基團上改採用 Alexa Fluors 或者 Dylight Fluors，能使抗體呈色更穩定 (Berlier *et al.*, 2003; Sarkar *et al.*, 2010)。

配合現在越來越多功能的影像處理分析軟體，免疫螢光染色技術可應用的範圍也更廣。

## 1.6 軟體介紹

本研究中大量使用 Image J 這個影像軟體。Image J 為免費授權軟體，下載即能使用。可開啟包括 TIFF、png、jpeg、BMP、DICOM、FITS 等圖檔。除基本編輯功能外，換算每一格畫素代表的實際長度，能夠利用 Image J 為照片加上比例尺。Image J 能將多張圖片組合為一疊 (stacks) 或者將一疊分為多張，有利於快速編輯或運算。亦能將不同時間點得到的照片做多線程處理 (multithread)，使分散的時間點照片能串連成影片。Image J 能夠計算指定範圍內的畫素值，將肉眼觀察強度數據化。本研究上會使用到的功能包括設定閾值 (threshold) 將圖片二元化、範圍選擇、照片畫素計算等，將螢光強度轉為畫素數量可將肉眼能感覺到的強度數據化 (見附圖二)。另外亦可將不同波長得到的影像，依照該波長的顏色套用，來得到彩色的影像，有助於判別該抗原在細胞中表現的位置。

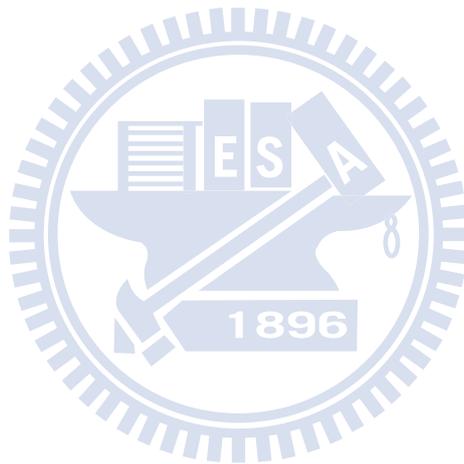
## 1.7 實驗目的與設計

綜合以上文獻回顧，關於登革熱病毒的致病機制尚有待進一步的研

究；從臨床症狀上觀察，雖然近年陸續有些病例報導因為感染登革熱而導致中樞神經系統病變，但整體而言，比起日本腦炎病毒，其導致腦炎 / 腦膜炎的機率還是很低。這兩種病毒皆屬於黃質病毒科、黃質病毒屬，且基因體結構相似，所造成的臨床症狀卻不同，其中最顯著的差異即為造成神經病變的機率。除了日本腦炎病毒對神經細胞的感染與造成的病變外，雖然也有登革熱病毒感染幼鼠神經的相關報導，然而施予的病毒量、感染途徑等，都無法模擬正常感染途徑，對於病毒致病機制的研究能提供的線索也有限。日本腦炎病毒與登革熱病毒雖然在對神經的致病機制上近年來分別有研究成果陸續發表，但目前卻尚未有文獻針對兩者感染的情況做比較，並針對其中的差異性進一步探討，因此我試圖從此做為研究神經病變致病機制的切入點。

本研究中使用的日本腦炎病毒為 JEV RP9 strain (Chang's Lab collection, National Dong Hwa University)，登革熱二型病毒則為 DV2 PL046 strain 為一臺灣本土株。以低感染複數 (multiplicity of infection, MOI) 感染，並以免疫螢光染色法此一影像技術來觀察病毒在小鼠初代神經細胞、幼倉鼠腎臟纖維母細胞、蚊子細胞以及人類神經瘤細胞中感染與複製的情形。影像技術的引進為這方面的研究提供直觀的結果及不同於傳統方式的分析與技術平台。本研究欲探討登革熱病毒對神經細胞的感染力以及病毒在神經細胞內複製情形，並與日本腦炎病毒做比較。由於登革熱的病徵主

要是在人類身上被觀察到，因此本研究亦使用人類神經瘤細胞來進行實驗，期望能為登革熱病毒對神經細胞的致病機制提供線索。



## 貳、材料

### 2.1 實驗動物

使用購自行政院國科會實驗動物繁殖及研究中心的雌性 C57BL / 6J 小鼠，受孕 16 天。

### 2.2 細胞株

BHK-21 (幼倉鼠腎臟纖維母細胞, baby hamster kidney cell)

C6 / 36 (白線斑蚊細胞, *Aedes albopictus* cell)

mHN (小鼠初代神經細胞, mouse hippocampal neuron, primary culture)

IMR-32 (人類神經瘤母細胞, human neuroblastoma)

### 2.3 病毒

Dengue virus type 2 PL046 strain (Taiwan Local Strain, lab collection)

Japanese encephalitis virus RP9 strain (Dr. R.Y. Chang's laboratory collection,

NDHU)

## 2.4 藥品試劑

藥品名稱	廠商	目錄編號	應用
Anti-NS1 antibody	Abcam	DN2	細胞染色
Anti-prM / E antibody	非商品		細胞染色
Alexa 568 goat-anti-rabbit antibody	Invitrogen	A-11011	細胞染色
Alexa 568 goat-anti-mouse antibody	Invitrogen	A-11004	細胞染色
B27 supplement	Invitrogen	17504	神經細胞培養
BSA fraction V	Invitrogen	11018041	細胞培養、染色
Crystal violet	Sigma	A3294	空斑測試
DAPI	Invitrogen	D3571	細胞染色
DMSO	Sigma	D4540	細胞保存
DNase I	Sigma	DN25	切斷 DNA
Dylight 488 goat-anti-mouse antibody	Jackson	115-485-003	細胞染色
Dylight 488 goat-anti-rabbit antibody	Jackson	111-485-003	細胞染色

Fetal Bovine Serum	Biological industries	04-001-1A	細胞培養
Formaldehyde	Riedel-de Haën	33220	固定細胞
Fluor mount	Sigma	F4680	玻片固定
HEPES	Invitrogen	15630	組織等張溶液
HBSS	Invitrogen	14185	組織等張溶液
MEM	GIBCO	41500-034	細胞培養
Methylcellulose	Sigam	M0512	空斑測試
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma	S-5761	細胞培養
NaOH	Riedel-de Haën	30620	緩衝液配製
Neurobasal medium	Invitrogen	21103	神經細胞培養
PBS	Biological Industries	11-223-1K	細胞培養
Penicillin / streptomycin	Invitrogen	15140	抗生素
Retinoic acid	Sigma	R2625	誘導分化
Sodium Pyruvate	GIBCO	11360-070	細胞培養
Triton X-100	J.T.Backer	X198-07	細胞穿孔
TrypLE™ Express	GIBCO	12605-010	細胞培養

TUJI	Covence.	MMS-435P	細胞染色
Tween-20	Sigma	P1379	細胞染色

## 2.5 溶劑、緩衝溶液及培養基

- 0.25% Triton X-100 / PBS

50  $\mu$ l Tiron X-100, 19.95 ml PBS

- 1% crystal violet solution (500 ml)

5 g crystal violet

50 ml 37% formaldehyde

450 ml H<sub>2</sub>O

- 2% BSA/PBS

0.4 g BSA in 20 ml PBS

- 3.7% Formaldehyde

37% Formaldehyde diluted with ddH<sub>2</sub>O

- 10% BSA

2 g BSA in 20 ml PBS

- DNase I solution

100 mg DNase I in 1 ml ddH<sub>2</sub>O

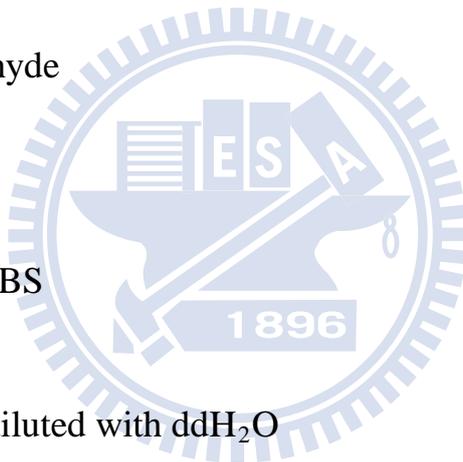
- Neuron maintenance medium

50 ml Neurobasal medium

125  $\mu$ l 200 mM L-glutamine solution

1 ml 50 X B27 supplement

- IMR-32 growth medium



90% MEM (Eagle) with Earle's BSS

2 mM L-glutamine , 1.0 mM sodium pyruvate

0.1 mM non-essential amino acids

2.2 g / L sodium bicarbonate

10% Fetal Bovine Serum

● Immonofluorescence staining's wash buffer (50 ml)

0.05% tween-20 25  $\mu$ l

0.5% BSA 2.5 ml

1 X PBS 47.5 ml

● HBSS

5 ml 1 M HEPES

5 ml Penicillin / streptomycin

50 ml 10 X HBSS

440 ml ddH<sub>2</sub>O



## 2.6 儀器設備

震盪器 VORTEX-GENIE2 G560 (SCIENTIFIC INDUSTRICS)

加熱攪拌器 S101 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

酸鹼值檢測計  $\Phi$ 360 (BECKMAN)

電子天平 PB153-S (METTLER TOLEDO)

電子防潮箱 DX106 (台灣防潮科技)

往復式恆溫水槽 B206-T1 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

恆溫式震盪培養箱 B206 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

桌上型高速離心機 5100 (KUBOTA CORPORATION)

4°C 三門冰藏櫃 KS-101-MS (MINI KINGKON)

-20°C 直立冷凍櫃 (WHITE-WESTINGHOUSE)

-80°C 超低溫冷凍櫃 925/926 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

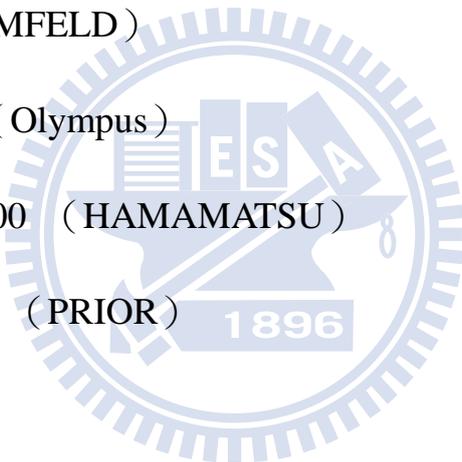
無菌操作台 VCM-420 (造鑫)

血球計數器 (MARIEMFELD)

倒立式顯微鏡 1X71 (Olympus)

顯微鏡搭載相機 C10600 (HAMAMATSU)

載物臺控制 OptiscanII (PRIOR)



## 參、方法

### 3.1 細胞繼代培養

#### 3.1.1 BHK-21 細胞繼代培養

培養液為含有 5% Fetal Bovine Serum (FBS; Biological industries, Cat. 04-001-1A) 的 Minimum Essential Medium (MEM; GIBCO, Cat.41500-034), 培養環境為含有 5% CO<sub>2</sub> 的 37°C 恆溫培養箱。繼代培養程序如下：吸除培養液後，以 Phosphate Buffer Saline (PBS; Biological industries, Cat. 11-223-1K) 沖洗兩次，加入 1 ml 的 TrypLE™ Express (GIBCO, Cat. 12605-010) 於 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中反應 5 分鐘，加入約 3 ml 培養液與 TrypLE™ Express 混合後沖洗培養皿底盤使細胞脫落及均勻散佈於培養液中，留下 1 / 10 體積的細胞液，補入 10 ml 培養液混合均勻，置於培養箱繼續培養。

#### 3.1.2 白線斑蚊細胞 C6 / 36 細胞繼代培養

培養液為含有 10% FBS 的 MEM，培養於 28 °C，5% CO<sub>2</sub> 恆溫箱中。繼代培養流程如下：留下 1 ml 培養液以利用細胞刮勺將細胞從培養皿底盤

刮起，加入約 3 ml 培養液沖洗培養皿底盤後，即將細胞沖散使其均勻分布於培養液中。留下約 1 / 3 的細胞液，再加入 10 ml 培養液混合均勻，置於培養箱繼續培養。

### 3.1.3 IMR-32 細胞繼代培養

IMR-32 (食品工業發展研究所生資中心, BCRC 60014) 初得到時是細胞凍管型式，解凍後隔天置換培養基去除抗凍劑 Dimethyl Sulfoxide (DMSO; Sigma, Cat. D4540)。培養環境為 37 °C、5% CO<sub>2</sub>，使用 MEM 作為培養基，內含 Earle's BSS、2 mM L-glutamine、0.1 mM non-essential amino acids，外加 2.2 g / L sodium bicarbonate (Sigma, Cat. S-5761)、一百倍稀釋的 100 mM sodium pyruvate (GIBCO, Cat. 11360-070) (最終濃度為 1.0 mM) 以及 10% FBS。當細胞長至八到九成滿後即可進行繼代培養：去除部分的舊培養基，以剩下約 4 ml 的培養基沖洗培養盤並將細胞打散，留下約 1 / 4 的細胞液，補入 9 ml 的培養液後置於培養箱繼續培養。培養時盡量維持細胞數在  $4 \times 10^4$  至  $4 \times 10^5 / \text{cm}^2$  之間。

### 3.1.4 IMR-32 細胞分化測試

去除部分老舊培養液後以剩餘培養液將 IMR-32 沖散，將細胞液移至

15 ml離心管中，以 1500 rpm (rounds per minute) 離心 5 分鐘。去除上清液後以含有 10  $\mu$ M Retinoic Acid (RA; Signa, Cat. R2625) 的培養液回溶沉澱的細胞至均勻，計數細胞，以每格  $10^6$ 個細胞分別將細胞液置入 6 孔培養盤中 (MARIEMFELD)，以含 10  $\mu$ M RA 的培養液培養，觀察以 RA 處理後 24、48、72 小時細胞型態的變化。

### 3.2 小鼠初代神經細胞培養

選用的老鼠品系為 C57D / J6 (B6)。於實驗前準備解剖剪刀、平夾、彎夾、鑷子以及以 PLL (poly-L-lysine) 處理過的玻片 (置於 24 孔培養皿中)。先將取得的母鼠於懷孕週期的最後一天犧牲，取胚胎置於放在冰上的 petri dish，仔細將胚胎表面的膜剝除後將小鼠放在內有 HBSS (Invitrogen, Cat. 14185) 的 petri dish 中。以平夾於頸部固定小鼠，以彎夾的尖端從小鼠鼻尖處開始挑破小鼠的第一層表皮，第二次一樣從鼻尖處開始，小心的破壞腦殼，在這個步驟中彎夾尖端要注意盡量與小鼠的表面型態保持平行，在不傷害鼠腦的狀態下進行。之後將彎夾的兩端置於小鼠兩眼的位置，平均的往內施力再往上夾，即可取出胚胎鼠腦，將鼠腦放進一置於冰上內有少許 HBSS 的 petri dish 中。將內有鼠腦的 petri dish 移至 laminar flow 中，放在解剖顯微鏡下，仔細的以小剪刀與鑷子剝離腦

膜後，先移除延腦與腦幹的部份，再將兩個腦半球分開，將其中呈現 C 型的海馬迴分離出來。將分離出的海馬迴放進 37 °C 預熱的 trypsin 中，置於 37 °C 水浴槽 30 分鐘後，以 37 °C 預熱的 HBSS 沖洗三次，每次三分鐘，最後一次用含有 DNase I (Sigma, Cat. DN25) 的 HBSS 沖洗。將細胞沖散後計數，以每格六萬個細胞的密度將細胞移入 24 孔培養盤中，置於 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中。待細胞貼附後，置換為含有 Penicillin / Streptomycin (Invitrogen, Cat. 15149) 以及 Neurobasal medium (Invitrogen, Cat. 21103) 的 Neuronal maintenance medium 並將玻片翻轉使細胞朝下，置於 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養。

### 3.3 病毒增殖

#### 3.3.1 日本腦炎病毒增殖

利用幼倉鼠腎臟纖維母細胞增殖日本腦炎病毒 RP9 strain。前一天先於培養皿中置入  $1 \times 10^7$  的 BHK-2 1 細胞，以含 5% FBS 的培養液，在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 12 小時。感染前先去除了培養液，以 PBS 沖洗兩次，再加入  $1 \times 10^6$  病毒，即 MOI (multiplicity of infection) = 0.1，於 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 1 小時，培養過程中每 15 分鐘搖一次培養皿。一小時後棄置病毒液，再加入含 5% FBS 細胞培養液 10 ml 培養於 37

°C，5% CO<sub>2</sub> 培養箱三天。之後收集病毒上清液，以 0.22 μm 孔徑的過濾膜進行過濾，最後將過濾後的病毒液分裝到 1.5 ml 的微量離心管中，保存於 -80 °C 冰箱中。

### 3.3.2 登革熱病毒增殖

利用白線斑蚊細胞增殖登革病毒 PL046 strain。將  $1 \times 10^7$  的 C6 / 36 細胞置入 15 ml 離心管中，以 1500 rpm 慢速離心 5 分鐘 (KUBOTA 5100)，去除上清液，加入適量 10% FBS / MEM 培養液重新混勻細胞後，加入  $1 \times 10^6$  病毒 (病毒液與培養液的總體積為 2 ml)，即 MOI = 0.1，於 37 °C，5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 1 小時，培養過程中每 20 分鐘搖一次。將病毒與細胞混合液移入 T75 培養盤中，再補入 9 ml 的 10% FBS / MEM 培養液，培養於 28 °C 培養箱中，於感染後五至七天收集病毒上清液，以 0.22 μm 孔徑的過濾膜進行過濾，最後將過濾後的病毒液分裝到 1.5 ml 的微量離心管中，保存於 -80 °C 冰箱中。

## 3.4 空斑試驗

### 3.4.1 日本腦炎病毒空斑測試

於實驗前一天先於六孔培養盤中置入  $3 \times 10^5$  的 BHK-21 細胞，隔天細胞會長至約佔底面積八成滿。病毒解凍後，以未含血清的 MEM 培養液進行序列稀釋，再將  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  三管病毒液以未含血清的 MEM 培養液稀釋五倍（最終病毒液體積 1 ml）。感染前先以未含血清的 MEM 培養液沖洗細胞兩次，再將 1 ml 病毒液加入，置於  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培養箱中培養 1 小時，培養過程中每 15 分鐘搖一次。加入 4 ml 的 1.1% methyl cellulose medium (Sigma, Cat. M0512)，置於  $37^\circ\text{C}$ ，5%  $\text{CO}_2$  培養箱中培養約三至五天。取出細胞後，吸除培養液，加入適量 3.7% formaldehyde (Riedel-de Haën, Cat. 33220) 固定細胞，室溫靜置 15 分鐘，吸除甲醛後加入 2 ml 的 1% 結晶紫溶液 (Sigma, Cat. A3294)，於室溫靜置隔夜，再以流水沖洗培養盤，於室溫風乾後，計數空斑數目。

#### 3.4.2 登革熱病毒空斑測試

於實驗前一天先於六孔培養盤中置入  $3 \times 10^5$  的 BHK-21 細胞，隔天細胞會長至約佔底面積八成滿。病毒解凍後，以未含血清的 MEM 培養液進行序列稀釋，再將  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  三管病毒液以未含血清的 MEM 培養液稀釋兩倍（最終病毒液體積 900  $\mu\text{l}$ ）。感染前先以未含血清的 MEM 培養液沖洗細胞兩次，再將 900  $\mu\text{l}$  病毒液加入，置於  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培養箱

中培養 1 小時，培養過程中每 20 分鐘搖一次。加入 4 ml 的 1.1% methyl cellulose medium，置入 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養約七至八天。取出細胞後，吸除培養液，加入適量 3.7% 甲醛固定細胞，室溫靜置 15 分鐘，吸除甲醛後加入 2 ml 的 1% 結晶紫溶液，於室溫靜置隔夜，再以流水沖洗培養盤，於室溫風乾後，計數空斑數目。

### 3.5 細胞感染

#### 3.5.1 小鼠初代神經細胞感染

於胚胎鼠腦內取得細胞時，將細胞平均置入 24 孔盤培養皿，每一孔內細胞數為  $3 \times 10^4$ ，細胞貼附於盤底的圓形蓋玻片上。感染時直接於原本的培養液中加入  $3 \times 10^3$  病毒，即 MOI=0.1，每隔 15 分鐘輕拍培養盤使病毒液散佈均勻，於 37 °C，5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 1 小時。之後將含有病毒液的細胞培養液置換為一般的細胞培養液，繼續於 37 °C，5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養一至四天。

#### 3.5.2 幼倉鼠腎臟纖維母細胞感染

實驗前一天先將  $3 \times 10^5$  / well 細胞移至六孔培養盤於 37 °C、5% CO<sub>2</sub>

培養箱中培養一個晚上。感染時先移除原有培養液後，以不含血清的培養液潤濕幼倉鼠腎臟纖維母細胞 BHK-21。於每一 well 中，加入  $3 \times 10^4$  PFU 病毒液（即  $MOI = 0.1$ ）於無血清培養液中（總體積為 1 ml）。之後放入培養盤中，置於  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$  的培養箱中，每 20 分鐘上下左右搖晃培養盤，使病毒均勻散佈於培養盤中。一小時後將病毒液去除，加入原本含  $5\%$  FBS 的培養液，繼續在  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$  培養箱中培養。

### 3.5.3 白線斑蚊細胞 C6/36 感染

實驗前一天先將  $10^5$  / well 細胞移至二十四孔培養盤，於  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$  培養箱中培養一個晚上。感染時先移除原有培養液後，以不含血清的培養液潤濕 C6/36 細胞後，將  $3 \times 10^4$  PFU 病毒液（即  $MOI=0.1$ ）加入無血清培養液中（總體積為  $500\ \mu\text{l}$ ）後，放入培養盤中。將上述培養盤置於  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$  培養箱中，每 20 分鐘上下左右搖晃培養盤，使病毒均勻散佈於培養盤中。一小時後將病毒液去除，加入原本含  $10\%$  FBS 的培養液繼續在  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$  培養箱中培養。

### 3.5.4 IMR-32 細胞感染

實驗前一天先將  $10^6$  / well 細胞移至六孔培養盤中，於  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$

培養箱中培養一個晚上。感染時先移除原有培養液，再以不含血清的培養液潤濕 IMR-32 細胞。將  $10^5$  PFU 病毒液（即  $\text{MOI} = 0.1$ ）加入無血清培養液中（總體積為 1 ml）後放入培養盤中。將上述培養盤置於  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培養箱，每 20 分鐘上下左右搖晃培養盤，使病毒均勻散佈於培養盤中。一小時後將病毒液去除，加入原本含 10% FBS 的培養液繼續在  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培養箱中培養。

### 3.5.5 分化後 IMR-32 細胞感染

實驗前三天先將  $10^6$  / well 細胞移至六孔培養盤中於  $37\text{ }^\circ\text{C}$ ，5%  $\text{CO}_2$  培養箱中，並以含有  $10\text{ }\mu\text{M}$  RA 的培養液培養。待 72 小時後再進行病毒感染，方法同 3.5.4.

### 3.6 細胞固定

先於另一個 24 孔盤培養皿中置入現配的 3.7% formaldehyde 300  $\mu\text{l}$ ，再以鑷子將附有細胞的蓋玻片移入，於  $37\text{ }^\circ\text{C}$ ，5%  $\text{CO}_2$  培養箱靜置約 15 分鐘。吸除 formaldehyde 後，以 PBS 沖洗三次，最後加入 300  $\mu\text{l}$  的 PBS，置放在  $4\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱內保存。於觀察病毒複製情況的實驗中，分多個時間點固定細胞，至最後一個時間點細胞固定好，再一起進行免疫螢光染

色。

### 3.7 細胞染色

#### 3.7.1 小鼠初代神經細胞免疫螢光染色

移除內有含細胞之蓋玻片的培養皿中原有的 PBS，加入 0.25% Triton X-100 (T. J. Backer, Cat. X198-07)，於 37 °C 培養箱中反應 5 分鐘。吸除 Triton X-100，以 PBS 沖洗三次，將培養皿底部的有細胞的蓋玻片移至 parafilm 上，於每個玻片加入 10% BSA 80  $\mu$ l (Bovine Serum Albumin; Invitrogen, Cat. 11018041)，於 37 °C 培養箱中反應一小時。吸除 10% BSA 後以 PBS 沖洗一次，加入適當稀釋倍數的一級抗體。所用的一級抗體稀釋如下：anti-NS1 antibody (Abcam, Cat. DN2) 是以 1:20 的比例稀釋於 2% BSA / PBS 中；anti-prM / E antibody (Dr. Chang's laboratory collection) 則以 1:1000 比例稀釋於 2% BSA / PBS 中；TUJ1 (anti- $\beta$ -tubulin III; Covence, Cat. MMS-435P) 是以 1:2000 比例稀釋於 2% BSA / PBS 中。每一個玻片加入 80  $\mu$ l 的一級抗體，於 37 °C 培養箱中反應一小時。吸除一級抗體後，以含有 0.05% tween-20 (Sigma, Cat. P1379) 及 0.5% BSA 的 PBS 沖洗三次，再加入二級抗體。所用二級抗體如下：以 1:1000 的比例稀釋於 2% BSA / PBS 中的 Alexa 568 goat-anti-rabbit antibody (Invitrogen,

Cat. A-11011) ;以 1 : 1000 的比例稀釋於 2% BSA / PBS 中的 DyLight 488 goat-anti-mouse antibody (Jackson , Cat. 115-485-003) ; 以 1 : 500 的比例稀釋於 2% BSA / PBS 中的 DAPI (Invitrogen , Cat. D3571) 。每一個玻片加入 80  $\mu$ l 的二級抗體，於 37  $^{\circ}$ C 培養箱中反應一小時。吸除二級抗體後，以含有 0.05% tween-20 及 0.5% BSA 的 PBS 沖洗三次後，先將玻片移入內有 300  $\mu$ l PBS 溶液的培養皿中觀察染色情形，再以 Fluoro mount (Sigma , Cat. F4680) 進行封片以利觀察。

### 3.7.2 幼倉鼠腎臟纖維母細胞 BHK-21 免疫螢光染色

移除內有含細胞之蓋玻片的培養皿中原有的 PBS，加入 0.25% Triton X-100，於 37  $^{\circ}$ C 培養箱中反應 5 分鐘。吸除 Triton X-100，以 PBS 沖洗三次，將培養皿底部的有細胞的蓋玻片移至 parafilm 上，於每個玻片加入 10% BSA 80  $\mu$ l，於 37  $^{\circ}$ C 培養箱中反應一小時。吸除 10% BSA 後以 PBS 沖洗一次，加入一級抗體。所用一級抗體如下：以 1 : 20 的比例稀釋於 2% BSA / PBS 中的 anti-NS1 antibody ; 以 1 : 1000 比例稀釋於 2% BSA / PBS 中的 anti-prM / E antibody (Dr. Chang's laboratory collection) 。每一個玻片加入 80  $\mu$ l 一級抗體，於 37  $^{\circ}$ C 培養箱中反應一小時。吸除一級抗體後，以含有 0.05% tween-20 及 0.5% BSA 的 PBS 沖洗三次，再加入二級

抗體。所用二級抗體如下：以 1 : 1000 的比例稀釋於 2% BSA / PBS 中的 Dylight 488 goat-anti-rabbit antibody (Jacksons , Cat. 115-485-003) ;以 1 : 500 的比例稀釋於 2% BSA / PBS 中的 DAPI。每一個玻片加入 80  $\mu$ l 二級抗體，於 37  $^{\circ}$ C 培養箱中反應一小時。吸除二級抗體後，以含有 0.05% tween-20 及 0.5% BSA 的 PBS 沖洗三次後，先將玻片移入內有 300  $\mu$ l PBS 溶液的培養皿中觀察染色情形，再以 Fluoro mount 進行封片以利觀察。

### 3.7.3 C6 / 36 免疫螢光染色

移除內有含細胞之蓋玻片的培養皿中原有的 PBS，加入 0.25% Triton X-100，於 37  $^{\circ}$ C 培養箱中反應 5 分鐘。吸除 Triton X-100，以 PBS 沖洗三次，將培養皿底部的有細胞的蓋玻片移至 parafilm 上，於每個玻片加入 10% BSA 80  $\mu$ l，於 37  $^{\circ}$ C 培養箱中反應一小時。吸除 10% BSA 後以 PBS 沖洗一次，加入一級抗體。所用一級抗體如下：以 1 : 20 的比例稀釋於 2% BSA / PBS 中的 anti-NS1 antibody ;以 1 : 1000 比例稀釋於 2% BSA / PBS 中的 anti-prM / E antibody。每一個玻片加入 80  $\mu$ l 一級抗體，於 37  $^{\circ}$ C 培養箱中反應一小時。吸除一級抗體後，以含有 0.05% tween-20 及 0.5% BSA 的 PBS 沖洗三次，再加入二級抗體。所用二級抗體如下：以 1 :

1000 的比例稀釋於 2% BSA / PBS 中的 Dylight 488 goat-anti-mouse / rabbit antibody (Jacksons, Cat. 115-485-003); 以 1:500 的比例稀釋於 2% BSA / PBS 中的 DAPI。每一個玻片加入二級抗體 80  $\mu$ l, 於 37  $^{\circ}$ C 培養箱中反應一小時。吸除二級抗體後, 以含有 0.05% tween-20 及 0.5% BSA 的 PBS 沖洗三次後, 先將玻片移入內有 300  $\mu$ l PBS 溶液的培養皿中觀察染色情形, 再以 Fluoro mount 進行封片以利觀察。

#### 3.7.4 IMR-32 細胞免疫螢光染色

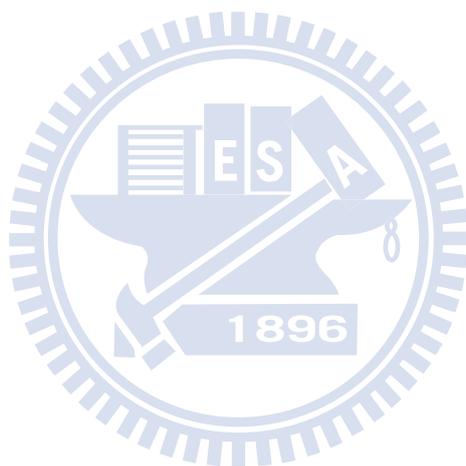
移除內有含細胞之蓋玻片的培養皿中原有的 PBS, 加入 0.25% Triton X-100, 於 37  $^{\circ}$ C 培養箱中反應 5 分鐘。吸除 Triton X-100, 以 PBS 沖洗三次, 將培養皿底部的有細胞的蓋玻片移至 parafilm 上, 於每個玻片加入 10% BSA 80  $\mu$ l, 於 37  $^{\circ}$ C 培養箱中反應一小時。吸除 10% BSA 後以 PBS 沖洗一次, 加入一級抗體。使用一級抗體如下: 以 1:20 的比例稀釋於 2% BSA / PBS 中的 anti-NS1 antibody; 以 1:1000 比例稀釋於 2% BSA / PBS 中的 anti-prM / E antibody。每一個玻片加入一級抗體 80  $\mu$ l, 於 37  $^{\circ}$ C 培養箱中反應一小時。吸除一級抗體後, 以含有 0.05% tween-20 及 0.5% BSA 的 PBS 沖洗三次, 再加入二級抗體。使用的二級抗體如下: 以 1:1000 的比例稀釋於 2% BSA / PBS 中的 Dylight 488 goat-anti-mouse /

rabbit antibody；以 1：500 的比例稀釋於 2% BSA / PBS 中的 DAPI。每一個玻片加入二級抗體 80  $\mu$ l，於 37  $^{\circ}$ C 培養箱中反應一小時。吸除二級抗體後，以含有 0.05% tween-20 及 0.5% BSA 的 PBS 沖洗三次後，先將玻片移入內有 300  $\mu$ l PBS 溶液的培養皿中觀察染色情形，再以 Fluoro mount 進行封片以利觀察。

### 3.8 軟體分析

染色結果以倒立式顯微鏡觀察 (Olympus 1X71) 以及 Metamorph 和 ImageJ 兩種軟體進行定性與定量分析。影像擷取皆使用 Metamorph 軟體預覽及拍照，定性分析以 20 倍物鏡拍攝，曝光時間以畫素不過飽和、畫面不過度曝光為原則，在此條件下可拍攝訊號最清晰照片 (HAMAMATSU C10600)。定量分析則分別以 10 倍或 20 倍物鏡拍攝十至二十張照片，固定每張照片的曝光時間，曝光時間取決於照片中該訊號最強的時間點，此訊號以不會過度曝光為基準點進行拍攝。取得細胞骨架、病毒蛋白與細胞核三種不同波長的影像後，以 ImageJ 軟體進行後續的分析處理。病毒蛋白累積的定量方式為：針對細胞骨架的影像選擇一閾值，將神經細胞的區域選取，再將此範圍套用至病毒蛋白的影像上，進一步分析這張照片中所有畫素的強弱，累加計算 (附圖二)。此方式可分析在神經細胞內的所

有病毒蛋白表現量。將分析計算所得的數字輸入 Excel 後，先計算出單一時間點的每張照片中畫素強度總和，再平均可得到這個時間點的數據（我們將之視為該時間點的病毒蛋白表現量），而將單一時間點的每張照片中畫素強度進行標準差運算可得到該時間點的 error bar 範圍。將兩病毒的圖片分析數據化後製表，即可看出病毒蛋白於細胞被病毒感染後一至四天累積的趨勢。



## 肆、結果

### 4.1 小鼠初代神經細胞感染

#### 4.1.1 日本腦炎感染神經細胞

以免疫螢光染色法針對被感染神經細胞做染色，可發現小鼠初代神經細胞確實能被日本腦炎病毒感染（圖一）。病毒感染後第一至第四天，神經突（neurite）仍繼續延長（圖二，E-H）。然而因病毒感染可發現，感染後第三到第四天，神經突開始出現不連續（fragmentation）的現象（圖三，g-h 箭頭處）。且以針對日本腦炎病毒之抗體 Anti-prM/E antibody 進行染色，再以相對應二級抗體 Alexa 568 goat-anti-rabbit antibody 辨識，於顯微鏡下以肉眼觀察確實能看到紅光，代表有日本腦炎病毒感染的細胞中確實可觀察到病毒蛋白的產生（圖一，H），於未感染組的細胞中，紅光強度低於肉眼可辨識，無法偵測到目標，可視為沒有病毒蛋白產生。紅光表現的區域可視為是病毒蛋白在細胞中表現的位置，主要分布於核周圍的區域，少數表現在神經突中（圖一，F）。另外，當初感染的條件是以  $MOI = 0.1$  來感染，相當一隻病毒感染十個細胞的比例，但在感染後第二天的細胞中可發現，發紅光的細胞比例約占整體的五至八成。

#### 4.1.2 登革熱病毒感染神經細胞

同樣以免疫螢光染色法來觀察，可發現小鼠初代神經細胞亦能被登革熱病毒感染（圖一），且病毒感染後一至四天神經發育也不受影響，神經突（neurite）仍會繼續延長（圖二, A-D），感染後第三至四天神經突一樣有不連續（fragmentation）現象（圖三, c-d 箭頭處）。用針對登革熱病毒 NS1 蛋白之抗體 Anti-NS1 antibody 染色，未感染細胞中紅光強度低於肉眼可辨識的程度，也明顯較有病毒感染的細胞為低，可視為沒有病毒蛋白產生。但在有病毒感染的細胞中，可觀察到明顯的病毒蛋白產生。紅光表現的區域可視為是病毒蛋白在細胞中表現的位置，與被日本腦炎病毒感染的細胞一樣，被登革熱病毒感染的細胞，其病毒蛋白的表現亦主要分布於核周圍的區域，少數則表現在神經突中（圖一，B）。實驗時一樣以 MOI=0.1 來感染，相當一隻病毒感染十個細胞的比例，在感染後第二天的細胞中可發現，發紅光的細胞比例約占整體的五至八成。

#### 4.1.3 神經細胞型態變化

於感染後一至四天固定細胞並觀察，神經突於感染後第三天出現斷裂不連續的現象（圖二，圖三，C 和 G 箭頭處）。比較病毒感染後第一天的神經突長度，雖仍可觀察到神經突持續延長，然而細胞病變的現象隨著病毒

蛋白的表現量增加而顯著。神經突斷裂的現象並未在未感染（mock）組的細胞中被觀察到（圖二，I-L）。此現象於病毒感染後第三天最為明顯，此時間點亦為病毒蛋白表現量達最大值（圖十一）。

#### 4.2 登革熱及日本腦炎病毒感染幼倉鼠腎臟纖維母細胞

幼倉鼠腎臟纖維母細胞（BHK-21）是一株已確定能被登革熱與日本腦炎這兩種病毒感染的細胞株，在實驗室中因其可被上述兩種病毒感染後細胞會裂解，常被用來偵測病毒感染力價。DV 及 JEV 這兩種病毒感染 BHK-21 後，以針對日本腦炎病毒的 Anti-prM / E antibody 偵測用免疫螢光染色法來觀察。發現不只日本腦炎病毒，登革熱病毒感染的組別中亦能看到病毒蛋白的產生，並且病毒蛋白表現的位置相似（圖五）。在未感染組中則未觀察到病毒蛋白的表現與抗體呈色，故認為此一 Anti-prM / E antibody 於此兩種病毒中有 cross-reaction 的現象，且針對病毒蛋白 prM / E glycoprotein 具有專一性（圖四）。本實驗數據為一次最具代表性的實驗結果，分析一片蓋玻片擷取十張十倍物鏡所攝得照片上細胞中病毒蛋白表現的情形。此外實驗結果指出，在幼倉鼠腎臟纖維母細胞中，登革熱病毒與日本腦炎病毒的增幅總量趨勢一致（圖六）。

#### 4.3 以登革熱及日本腦炎病毒感染 C6 / 36 細胞

日本腦炎病毒與登革熱病毒皆為一蚊蟲叮咬傳播的疾病。在實驗室中，白線斑蚊細胞 C6 / 36 常用來放大病毒。我們以登革熱與日本腦炎病毒感染 C6 / 36 細胞，之後以免疫螢光染色法進行觀察，可發現兩種病毒皆可感染 C6 / 36 細胞（圖七，圖八）。本實驗數據為一次最具代表性的實驗結果，分析一片蓋玻片擷取十張二十倍物鏡所攝得照片上細胞中病毒蛋白表現的情形。在 C6 / 36 細胞中，不管是使用 Image J 內建設定選取閾值（Li *et al.*, 1993 ; Li *et al.*, 1998）或使用細胞核訊號閾值做範圍選取，分析日本腦炎病毒與登革熱病毒複製的總量趨勢相似。雖於感染後第 48 小時，病毒蛋白表現量稍有降低的情形，但從感染後 24 到 60 小時病毒複製的情形整體而言是增加的（圖九，圖十）。

#### 4.4 登革熱與日本腦炎病毒在神經初代培養細胞中增幅趨勢

為釐清臨床症狀的差異性是否為病毒於神經細胞內的增幅能力差異所造成，於是進一步觀察兩種不同病毒於小鼠初代神經細胞中複製與增幅的情形。本實驗以 Anti-prM / E antibody 進行偵測，並觀察病毒蛋白在感染後一至四天累積的情況。實驗時一樣以  $MOI = 0.1$  感染，並於感染後一至四天固定細胞進行免疫螢光染色。本實驗數據為一次最具代表性的實驗結

果，分析一片蓋玻片擷取二十張二十倍物鏡所攝得照片上細胞中病毒蛋白表現的情形。分析呈色結果可發現，感染後一至兩天病毒量增加，兩種病毒的複製皆於感染後第三天達到最大量（訊號分析得到最強的畫素累積強度），感染後第四天下降（圖十一 B，C）。兩種病毒在神經細胞中的增幅趨勢相似，照片分析結果與肉眼觀察相符合（圖十一 A）。

#### 4.5 人類神經瘤細胞 IMR-32 感染

##### 4.5.1 日本腦炎病毒感染人類神經瘤細胞 IMR-32

日本腦炎病毒以  $MOI = 0.1$  感染 IMR-32 後 36 小時，固定細胞並以免疫螢光染色法來觀察，用針對日本腦炎病毒設計之抗體 Anti-prM / E antibody 及相對應二級抗體 Dylight 488 goat-anti-rabbit antibody 染色（呈現綠色螢光），另外以 DAPI 標定細胞核位置。實驗結果觀察到，於未感染細胞中綠色螢光強度低於肉眼可辨識，也明顯較有病毒感染的細胞低，可視為沒有病毒蛋白產生（圖十三）。但在有病毒感染的細胞中，可觀察到明顯的綠光訊號，證實 IMR-32 中有病毒蛋白存在，IMR-32 能被日本腦炎病毒感染。綠光表現的區域可視為是病毒蛋白在細胞中表現的位置，主要分布於核周圍的區域（圖十二）。

#### 4.5.2 登革熱病毒感染人類神經瘤細胞 IMR-32

登革熱病毒以  $MOI = 0.1$  感染 IMR-32 後三天，固定細胞並以免疫螢光染色法來觀察，用針對登革熱病毒設計之抗體 Anti-NS1 antibody 及相對應二級抗體 Dylight 488 goat-anti-mouse antibody 染色（呈現綠色螢光），另外以 DAPI 標定細胞核位置。實驗結果觀察到，於未感染細胞中綠光強度低於肉眼可辨識，也明顯較有病毒感染的細胞低，可視為沒有病毒蛋白產生（圖十二）。但在有病毒感染的細胞中，可觀察到明顯的綠光訊號，證實 IMR-32 中有病毒蛋白存在，IMR-32 確實能被登革熱病毒感染。綠光表現的區域可視為是病毒蛋白在細胞中表現的位置，與被日本腦炎病毒感染的細胞一樣，被登革熱病毒感染的細胞，其病毒蛋白的表現亦主要分布於核周圍的區域（圖十二）。

#### 4.6 人類神經瘤細胞 IMR-32 分化條件測試

以 Retinoic Acid 做為分化的誘導劑。根據過往文獻指出，於人類神經瘤細胞 IMR-32 中外加 RA 可以誘使 IMR-32 分化為神經細胞，但尚未有明確的抗體可辨識分化前後的 IMR-32，僅能以型態上的不同來區分 IMR-32 是否分化。以 RA 處理後的 24 小時細胞型態與未以 RA 處理無明顯差異，48 小時後似乎有些許神經突生長的情形，可看到細胞密度明顯

較未以 RA 處理的細胞少。與文獻結果相比，使用一樣的 RA 濃度（同為 10  $\mu$ M）（Poongodi *et al.*, 2002），本研究的細胞分化進展較慢、比例較低。72 小時後可觀察到少部分神經突生長，部分神經突尖端可看到有冠狀生長的情況（growth cone），細胞密度依然明顯較無 RA 處理的組別少（圖十四）。

#### 4.7 病毒感染分化後 IMR-32

##### 4.7.1 日本腦炎病毒感染分化後 IMR-32

以 RA 處理過 72 小時的 IMR-32 型態上與未以 RA 處理過的組別並沒有太顯著的不同（圖十四，B），在實驗上也沒有顯著的蛋白表現改變可做為是否分化的判別。日本腦炎病毒確實能感染以 RA 處理過的 IMR-32 細胞（圖十五），但在以 RA 處理過的組別中，可發現受病毒感染的細胞似乎較未以 RA 處理的 IMR-32 少（圖十二，圖十五）。未感染的細胞中則未能觀察到螢光（病毒蛋白）表現。

##### 4.7.2 登革熱病毒感染分化後 IMR-32

在登革熱病毒感染的組別中，以 RA 處理過的 IMR-32 細胞確實會被

感染 (圖十二); 在登革熱病毒感染的實驗組別中, 是否以 RA 處理過細胞並沒有造成病毒感染後蛋白表現量的明顯差異 (圖十二, 圖十五)。感染的細胞中則未能觀察到螢光 (病毒蛋白) 表現。



## 伍、討論

### 5.1 登革熱與日本腦炎病毒對小鼠初代神經細胞感染力分析

#### 5.1.1 登革熱與日本腦炎病毒感染小鼠初代神經細胞

本研究證實登革熱與日本腦炎病毒皆能感染小鼠初代神經細胞，從免疫螢光染色的結果來看，兩種病毒的病毒蛋白分佈的位置皆位在細胞核周圍的區域（圖一）；跟已知病毒的結構蛋白 prM / E glycolprotein 在細胞中分佈於內質網所在的資料相符合。在內質網的蛋白質通常正經歷蛋白修飾、成熟以產生功能性的過程。prM protein 在病毒顆粒成熟後會切割成 M protein，主要功能是幫助 E protein 在病毒顆粒表面的結構穩定，E protein 主要是做為病毒外殼上與宿主細胞辨識的蛋白（Chang, 1997.）。根據實驗結果，認為病毒確實感染細胞，將病毒本身的遺傳物質 RNA 送入細胞，經過複製表現出病毒蛋白，才能被相對應的抗體辨識與結合。

#### 5.1.2 神經細胞型態

被感染的小鼠初代神經細胞於感染後一至四天，神經突仍繼續延長，但是隨著病毒蛋白表現量的增加，神經突開始產生不連續現象（圖二）。本

次實驗結果顯示，登革熱病毒造成的神經突斷裂現象較日本腦炎感染的神經細胞嚴重，我認為這可能是因實際感染的病毒量不同所導致。病毒被放大後，以空斑測試來計算產生的病毒量，單位為 PFU / ml。然除了此測試本來就可能存在操作誤差，幼倉鼠腎臟纖維母細胞被日本腦炎病毒感染後細胞裂解所產生的空斑，與被登革熱病毒感染後產生的空斑清晰程度不同，計數上有一定的困難，因此無法非常準確的控制感染神經細胞時，加入的登革熱病毒與日本腦炎病毒量完全相等。再者因神經細胞數少，感染時病毒量若有不同，其差異性可能會更顯著。但數次實驗後可發現，整體就神經細胞被感染後產生的細胞型態變化而言，看不出日本腦炎病毒與登革熱病毒感染的差異。

## 5.2 登革熱與日本腦炎病毒對幼倉鼠腎臟纖維母細胞 BHK-21 感染力分析

### 5.2.1 登革熱與日本腦炎病毒感染幼倉鼠腎臟纖維母細胞 BHK-21

我們已知登革熱病毒與日本腦炎病毒皆可感染幼倉鼠腎臟纖維母細胞 BHK-21，並且因其被病毒感染後會產生裂解現象的特性，在實驗室中常用來計數病毒感染力價。根據實驗結果，可看到這兩種病毒感染 BHK-21 後，病毒蛋白表現的位置皆在核的周圍（圖五）。根據實驗結果，能確定 anti-JEV prM / E 抗體不但對病毒的結構蛋白 prM / E glycolprotein 具有

辨識專一性，並且在日本腦炎病毒與登革熱病毒間還具有 cross-reaction 的特性，可同時辨識日本腦炎病毒以及登革熱病毒的病毒蛋白（圖四）。抗體可辨識兩種病毒蛋白的特性，有利於之後的病毒增幅分析實驗。為辨別日本腦炎病毒與登革熱病毒複製的情況，故我們使用針對同一種病毒蛋白的抗體來進行實驗。

#### 5.2.2 登革熱與日本腦炎病毒在幼倉鼠腎臟纖維母細胞 BHK-21 中複製情形

由病毒蛋白於不同時間點訊號強度的結果可見，日本腦炎病毒與登革熱病毒的複製趨勢相似：病毒的複製趨勢於感染後 36 小時達到最高，48 小時開始下降（圖六）。病毒複製趨勢的結果除了分析免疫螢光染色實驗結果，將每張照片的病毒蛋白訊號 / 像素強度數據化外，也必須和肉眼觀察的結果相符合（圖六 A）。我們得到的病毒複製趨勢，根據宿主細胞種類不同，時間點也不同，然而大致的病毒複製趨勢都是先增加，於達到最大量後降低。考慮到宿主細胞可提供的資源，以及神經細胞型態在感染後發生改變，神經突產生斷裂的情況，若觀察到的病毒蛋白表現量達到一個最大值後會產生病毒蛋白表現量下降的情況是合理的。神經突斷裂的產生，隨著病毒表現量的增加而增加。至於為何會產生神經突不連續的情

形，根據已發表文獻，在老鼠體內登革熱病毒感染可能會導致中樞神經系統的神經細胞 apoptosis (Desprès *et al.*, 1998)。以日本腦炎病毒感染老鼠神經瘤細胞，也可能導致 chemokines 的產生，使細胞有 apoptosis 或者抗病毒的反應 (Gupta *et al.*, 2010)。分析病毒複製趨勢時使用的一級抗體為 anti-JEV prM / E (collection of Dr. Chang's lab)，此抗體能同時辨識兩種病毒的結構蛋白，但不會與寄主細胞成分作用 (圖四)。若選擇兩種分別辨識不同的病毒蛋白的一級抗體來偵測登革熱以及日本腦炎病毒複製的趨勢，可能會有若趨勢不同是因為不同抗體與抗原之反應不同及不同蛋白產生的 kinetics 不同所致，故選用同樣辨識結構蛋白的一級抗體來進行實驗。分析兩病毒複製趨勢，代表日本腦炎病毒複製的曲線較代表登革熱病毒複製的曲線來得高，據推測是因使用的一級抗體是具有 cross-reaction 特性的 anti-JEV prM / E，因其當初製作抗體的給予的抗原為日本腦炎病毒，故此一級抗體雖仍能與登革熱病毒蛋白結合，但是在抗原抗體結合的親和性相對較弱。

### 5.3 登革熱與日本腦炎病毒對白線斑蚊細胞 C6 / 36 感染力分析

白線斑蚊細胞 C6 / 36 在實驗室中常用來做登革熱病毒及日本腦炎病毒的增幅。因蚊子為這兩種病毒的傳播媒介 (Kinoshita *et al.*, 2009)，因比

在感染這兩種病毒的時候，細胞並不產生裂解的現象。也因為這個特性，實驗室用 C6 / 36 細胞進行病毒的增幅，可在感染後三至四天開始，以一定時間為一個間隔收取細胞培養上清液（具病毒活性，即病毒液），至從上清液中測到的病毒感染力降低為止。在 C6 / 36 中，可觀察到病毒蛋白的表現，並且其病毒蛋白表現位置皆在核周（圖八），與細胞內質網位置一致。與 BHK-21 細胞比較，雖然兩者被病毒感染後，有是否裂解的細胞病變現象差異存在，但是病毒蛋白在這兩種細胞中，表現的位置並沒有差異，因此進一步觀察兩種病毒在 C6 / 36 細胞中複製情形。

#### 5.4 登革熱與日本腦炎病毒在白線斑蚊細胞 C6 / 36 中複製情形

由病毒蛋白呈色的強度，與呈色強度數據化的結果可見，日本腦炎病毒與登革熱病毒的複製趨勢相似。與 BHK-21 細胞不同之處在於，在病毒感染後 48 小時，可觀察到病毒蛋白表現量較感染後 36 小時少，但在感染後 60 小時繼續上升，且直到感染後 60 小時，整體病毒蛋白表現量都呈現增加的趨勢。C6 / 36 細胞在病毒感染時並不會產生裂解，認為這是病毒表現量在感染後 60 小時都還沒降低的主要原因。觀察日本腦炎病毒與登革熱病毒在 BHK-21 與 C6 / 36 細胞中比較複製的情形，沒有顯著的差異存在（圖六，圖九）。在病毒於 C6 / 36 細胞內複製趨勢分析上，使用

Image J 內建閾值設定選用 Li 直接分析病毒蛋白訊號，與自行選取細胞核訊號閾值做範圍選取再套至病毒蛋白照片上分析訊號強度的結果一致。之所以選用 Li 的方式來設定閾值並規劃欲分析範圍，是因為照片上病毒蛋白訊號的位置，會隨感染後時間增加，從細胞核周漸往細胞質擴散。原本考慮若只以細胞核訊號閾值來選擇分析範圍可能會損失部分病毒蛋白訊號，但直接手動選取病毒蛋白範圍的閾值來選擇分析範圍有失客觀，因此選擇軟體內建的運算方式來選取閾值。然而比較兩種不同設定閾值以選取範圍的分析方式結果一致，因此認為之前在 BHK-21 細胞中使用細胞核訊號來選擇範圍分析病毒複製趨勢是沒有問題的（圖九，圖十）。

## 5.5 登革熱病毒與日本腦炎病毒在小鼠初代神經細胞中複製情形

因病毒蛋白表現位置，原本考慮使用 DAPI 訊號—細胞核染色區域做為分析細胞中病毒蛋白表現量的範圍遮罩，但實際操作後發現，在感染第二天後，病毒蛋白訊號較強的範圍在細胞核周，以 DAPI 做遮罩來定量看不出病毒蛋白表現量隨著病毒複製可能產生的差異性，也不符合人眼觀察病毒訊號強弱的結果。因神經細胞具有較長的神經突，並且神經突中也分佈有內質網，雖然較神經細胞體中的內質網來得少，但隨著感染後天數的增加，神經突內也開始出現病毒蛋白表現。因此在小鼠初代神經細胞中，採用

TUJ1 訊號—神經細胞整體範圍做遮罩。換言之即為分析神經細胞中畫素數量的多寡，來做為病毒蛋白表現量判斷的依據（附圖二）。根據實驗結果，日本腦炎病毒與登革熱病毒的複製趨勢相似：病毒的複製趨勢於感染後第三天達到最高，第四天開始下降（圖十一）。兩種病毒在神經細胞中複製的趨勢與在 BHK-21 中複製的趨勢一致，這兩種細胞在病毒感染後，也都表現出會產生裂解的現象，因此病毒蛋白表現量下降，可能是由於宿主細胞可提供的資源被消耗，或者宿主細胞已開始走向凋亡所導致。考慮到日本腦炎與登革熱等疾病症狀是在人體觀察到，之後進一步使用人類神經瘤細胞來進行實驗。

## 5.6 登革熱病毒與日本腦炎病毒對人類神經瘤細胞 IMR-32 感染力分析

登革熱病毒與日本腦炎病毒皆能感染分化前的人類神經瘤細胞 IMR-32，且兩種病毒蛋白在細胞中表現的位置，與 BHK-21 和 C6/36 細胞一致，皆處於核周，與內質網分佈的區域一致（圖十二）。為了模擬人類神經細胞，我將 IMR-32 以維他命 A 酸（Retinoic Acid, RA, 做為分化誘導劑）處理，使 IMR-32 從神經瘤細胞株分化成神經細胞，進一步觀察病毒對分化後 IMR-32 造成的影響。

## 5.7 IMR-32 分化情形探討

目前沒有研究報告證實 IMR-32 這株細胞，在以誘導物促使其產生分化前後，會表現出可做為判斷是否分化的依據的蛋白，因此相較於別的神經瘤細胞株，此細胞判斷是否分化的根據即為型態分析。從實驗結果可看出，IMR-32 細胞分化前後最顯著的差異性出現在細胞密度上。一般認為當細胞開始分化後，其細胞分裂複製的速度會開始降低甚至停止 (Slack F. J., 2010)。從型態上來觀察，以 RA 處理過的細胞有較大比例出現軸突伸長、頂端出現冠狀型態的現象。從二十倍物鏡拍攝得到的照片也顯示，經過 RA 處理的細胞，整體型態較細長，也有較多的細胞產生神經突 (圖十四)。不過，整體而言無法單憑型態差異的觀察即能判斷細胞是否分化。可能的原因如下：

一、 原始的細胞已開始出現分化初期的型態變化：

因 IMR-32 需要的培養環境、血清品質都較嚴格，培養時若環境、培養基內容物、細胞密度等各種條件與原本培養的條件出現差異，都可能會造成細胞開始產生分化的情形。

二、 原始的細胞型態干擾判斷結果：

相較於他人的研究結果，我認為本研究以 RA 處理過後細胞的型態變化不大。該研究中提供的資料顯示，控制組中未以 RA 處理的 IMR-32 細胞呈

現偏圓形淚珠狀 (Poongodi *et al.*, 2002), 然 IMR-32 細胞株當初從人體分離培養時, 作者提到此細胞株具兩種不同型態, 一為上述圓形淚珠狀 (neuroblastoma), 另一為纖維母細胞 (fibroblastoma) 的型態, 在顯微鏡下觀察細胞兩端偏尖呈梭狀。單獨分離 neuroblastoma 型態的細胞來培養, 細胞的存活比例低, 無法在人體外培養超過九代, 但若兩種型態的細胞一起培養則沒有這個問題; 且此細胞株雖呈現兩種不同的型態, 但兩種型態的細胞都表現同樣的特徵、現象 (Tumilowicz *et al.*, 1970)。故也可能是本實驗中培養的人類神經瘤細胞株 IMR-32, 其原始未分化的細胞中就已存在較大比例的 fibroblastoma 型態細胞, 因此以 RA 處理三天後無法觀察到明顯的神經突伸長。

### 三、 缺乏明確的辨識標誌：

由於目前缺乏 IMR-32 分化的蛋白標記, 因此本實驗中無法確切的證實細胞是否分化。目前已知的分化誘導劑, 除了本研究使用的維他命 A 酸外, 尚有外加與神經發育有關的蛋白, 與轉染和神經發育有關的基因。本實驗選用維他命 A 酸, 除了已有文獻報導其確實能使 IMR-32 細胞產生分化外 (McCright *et al.*, 1996; Poongodi *et al.*, 2002), 有便於操作、不必使用微脂體進行轉染 (微脂體對神經細胞具有相當程度的細胞毒性)、不需考慮轉染效率造成分化效率的影響等優點。整體而言, 即使以分化誘導劑處理, 仍然會存在一部份細胞未分化, 目前沒有一種已知的誘導劑能使細胞整體

完全產生分化狀況。

針對第三點，未來可考慮以 phalloidin-Alexa488 對 F-actin 進行染色。神經突的 growth cone 通常有大量的 F-actin 表現，或許可協助辨別 IMR-32 細胞是否分化 (Forscher *et al.*, 1992)。

## 5.8 登革熱與日本腦炎病毒對分化後人類神經瘤細胞 IMR-32 感染力分析

以 RA 處理的細胞在未被病毒感染前生長的狀況，與未以 RA 處理的細胞比較，型態上看起來較不健康。推測是因 RA 需溶解於乙醇中，而乙醇不利於細胞的生長。雖細胞培養時以 RA 處理後，加至培養盤中乙醇可能的含量已非常低，但是可能 IMR-32 細胞對乙醇的敏感度很高。另一可能是細胞以 RA 處理後 72 小時才以病毒感染，可能培養液中的養分與資源被細胞消耗，因此細胞型態上較分盤隔天立刻感染病毒的未以 RA 處理的組別來得較不健康。或者 IMR-32 細胞以 RA 處理後，進行分化而減緩增生，導致整體細胞密度較低 (Slack F. J., 2010)。

在實驗中觀察到日本腦炎病毒感染的組別中，受感染的細胞數較少，但無法確定是因為原本的細胞密度較低或者細胞對病毒感受性變低導致。有文獻指出，日本腦炎病毒感染的主要目標是尚在發育中的細胞 (Kimura-Kuroda *et al.*, 1992)。這一點確實反應在其導致的臨床病徵上：日本腦炎有

很高的比例會侵犯九歲以下的孩童；至於登革熱病毒，在本實驗中沒有出現顯著的影響，於臨床上也沒有觀察到像日本腦炎一樣容易感染幼齡孩童的情形。IMR-32 細胞是否分化，有可能會導致細胞表面受器的改變，而造成病毒感染力改變或出現差異。但在目前初步的實驗結果中，並沒有明顯觀察到此現象。

於文獻回顧中，我們曾提到日本腦炎病毒結構蛋白 prM / E protein 可能是日本腦炎病毒對神經致病機制的關鍵 (Mathernge *et al.*, 2004)，但是在本研究實驗結果中，證實登革熱病毒亦能感染神經細胞，且不需太高的 MOI 即能觀察到細胞被病毒感染的現象。因此認為除了病毒結構蛋白，在神經致病機制上有更多的因素在調控，包括：日本腦炎病毒與登革熱病毒在血管內皮細胞中感染與增幅的能力，是否是突破血腦屏障的關鍵 (German *et al.*, 2006；Liu *et al.*, 2008)、病毒感染時神經細胞發育的階段對病毒的感受性如何 (Kimura-Kuroda *et al.*, 1992；Yasui K., 2002)，以及這些發育中的神經細胞是否可能會具備免疫的功能 (Das *et al.*, 2009)、宿主本身被感染後產生的免疫反應等 (Ip *et al.*, 2010；Gupta *et al.*, 2010)，都可能參與神經產生病變的過程。本論文欲探討的主題，始於日本腦炎病毒與登革熱病毒臨床症狀上導致腦炎的機率的差異，而近年來的文獻因為生物微陣列晶片技術的發展，開始分析被病毒感染的細胞與未感染病毒的細胞之間，是否有表現量產生明顯差異的基因 (Bordignon *et al.*, 2008)，指出了日

本腦炎病毒與登革熱病毒感染後病徵的產生，亦可能是宿主免疫反應與病毒在宿主體內複製達到平衡的結果（Bordignon et al.，2008；Gupta *et al.*，2010）。

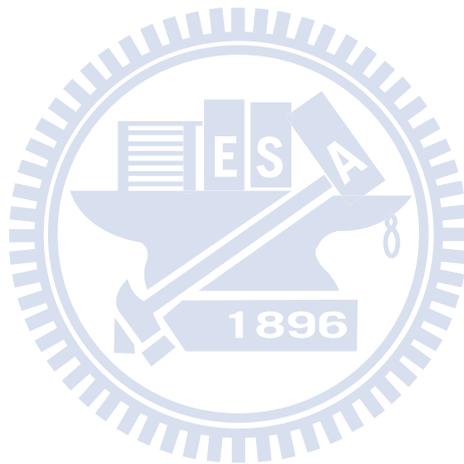


## 陸、結論

本研究使用了 BHK-21、C6/36、小鼠初代神經細胞進行一連串實驗，證實了日本腦炎病毒與登革熱病毒在這些細胞中，都具有感染能力；因此我進一步觀察這兩種病毒在上述三種細胞中複製情形的比較。除了細胞本身被病毒感染後是否裂解可能會造成病毒複製情形的改變外，在同一種細胞中，這兩種病毒複製的趨勢大致上還是相同的。考量到登革熱病毒感染後主要是在人體上出現症狀，所以接著我在 IMR-32 細胞中進行了病毒感染力測試，結果證實 JEV 和 DV2 皆可以感染 IMR-32 細胞。實驗進行到此，我認為可以排除 JEV 與 DV2 致病的機制只與對神經細胞的感染力有關，因此並未進一步觀察這兩種病毒在 IMR-32 細胞中複製的趨勢。根據實驗結果，認為關於日本腦炎病毒與登革熱病毒致病機制的探討，或許可能在細胞層級之上。本研究排除了登革熱病毒對神經細胞的感染力或在神經細胞中的複製能力有限的可能性，同時統整過往研究日本腦炎病毒或登革熱病毒對神經細胞是否具有感染能力、在細胞內能否複製的結果，將兩病毒在不同物種的幾種細胞中感染的能力與複製的情形做一個完整的比較。

在探討日本腦炎病毒與登革熱病毒在致病的機致時，除了考慮對神經細胞的感染力外，進一步應思考兩種病毒在人體內最初可能感染的宿主——血管中的內皮細胞，是否可能有感染或複製能力的不同及其可能造成的影

響；以及宿主在被病毒感染後，是否可能產生不同的免疫反應來調控病毒該何去何從，進一步影響臨床病徵。我認為接下來研究的方向，除了著重於在整個中樞神經系統上，兩種病毒是否有不同的感染區域外，也應思考兩種病毒在不同種類細胞內的感染、複製能力是否有差異性，以及宿主被病毒感染後相應而生的免疫反應，甚至是病毒的基因序列改變，皆可能造成是否感染神經細胞的影響，都有待更進一步的研究。



## 柒、參考文獻

行政院衛生署疾病管制局(2001)：行政院衛生署疾病管制局傳染病防治工作手冊。取自：<http://www.cdc.gov.tw/ct.asp?xItem=6484&ctNode=1733&mp=1>

行政院衛生署疾病管制局(2010)：行政院衛生署疾病管制局認識疾病網站。取自：[http://www.cdc.gov.tw/sp.asp?xdurl=disease/disease\\_content.asp&id=770&mp=1&ctnode=1498](http://www.cdc.gov.tw/sp.asp?xdurl=disease/disease_content.asp&id=770&mp=1&ctnode=1498)

行政院衛生署疾病管制局(2010)：疾管局最新消息。取自：<http://www.cdc.gov.tw/ct.asp?xItem=30758&ctNode=220&mp=1>

胡旻秀（2009）.登革熱二型病毒 PL046 感染性質體之建構。交通大學碩士論文。

An, J., Kimura-Kuroda, J., Hirabayashi, Y., Yasui, K., (1999). "Development of a novel mouse model for dengue virus infection." Virology Journal **263**: 70-77.

An, J., Zhou, D-S, Kawasaki, K., Yasui, K. (2003). "The pathogenesis of spinal cord involvement in dengue virus infection." Virchows Archives **442**: 472-481.

Bente, D.A., Rico-Hesse, R., (2006). "Models of dengue virus infection." Drug Discovery Today: Disease Models **3**: 97-107.

Berlier, J.E., Rothe, A., Buller, G., Bradford, J., Gray, D.R., Filanoski, B.J., Telford, W.G., Yue, S., Liu, J., Cheung, C-Y, Chang, W., Hirsch, J.D., Beechem, J.M., Haugland, R.P., Haugland, R.P., (2003). "Quantitative comparison of long-wavelength Alexa Fluor dyes to Cy dyes: fluorescence of the dyes and their bioconjugates." The Journal of Histochemistry & Cytochemistry **51**: 1699-1712.

Bordignon, J., Probst, C.M., Mosimann, A.L., Pavoni, D.P., Stella, V., Buck, G.A., Satproedprai, N., Fawcett, P., Zanata, S.M., de Noronha, L., Krieger, M.A., Duarte Dos Santos, C.N., (2008). "Expression profile of interferon stimulated genes in central nervous system of mice infected with dengue virus type-1." Virology **377**:319-29.

Chang, G-J, (1997). Molecular biology of dengue viruses. Gubler, D.J., Kuno, G., CAB INTERNATIONAL.

Das, S., Basu, A., (2008). "Japanese encephalitis virus infects neural progenitor cells and decreases their proliferation." Journal of Neurochemistry **106**: 1624-1636.

Das, S., Ghosh, D., Basu, A., (2009). " Japanese encephalitis virus induce immuno-competency in neural stem/progenitor cells." PLoS ONE **4**: e8134.

Desprès, P., Flamand, M., Ceccaldi, P-E, Deubel, V., (1996). "Human isolates of dengue type 1 virus induce apoptosis in mouse neuroblastoma cells." Journal of Virology **70**: 4090-4096.

Desprès, P., Frenkiel, M-P, Ceccaldi, P-E, Santos, C.D.D., Deubel, V., (1998). "Apoptosis in the mouse central nervous system in response to infection with mouse-neurovirulent dengue viruses." Journal of Virology **72**: 823-829.

Diagana, M., Preux, P-M, Dumas, M., (2007). "Japanese encephalitis revisited." Journal of the Neurological Sciences **262**: 165-170.

Forscher, P., Lin, C.H., Thompson, C., (1992). "Novel form of growth cone motility involving site-directed actin filament assembly." Nature **357**: 515-518.

Gupta, N., Santhosh, S.R., Babu, J.P., Parida, M.M., Rao, P.V.L., (2010). "Chemokine profiling of Japanese encephalitis virus-infected mouse neuroblastoma cells by microarray and real-time RT-PCR: Implication in neuropathogenesis." Viral Research **147**: 107-112.

German , A.C., Myint , K.S.A., Mai, N.T.H., Pomeroy, I., Phu, N.H., Tzartos, J., Winter, P., Collett, J., Farrar, J., Barrett, A., Kipar, A., Esiri, M.M., Solomon, T., (2006). "A preliminary neuropathological study of Japanese encephalitis in humans and a mouse model" Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **100**: 1135-1145.

Hammon W.M., Rudnik, A., Sather, G.E., (1960). "Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand." Science **15**: 1102-1103

Ip, P-P., Liao, F., (2010). "Recruitment CXCL10-mediated leukocyte and is independent of in mice is potentiated by CXCL10 resistance to dengue virus infection." The Journal of Immunology **184**: 5705-5715.

Jan, J-T., Chen, B-H, Ma, S-H, Liu, C-I, Tsai, H-P, Wu, H-C, Jiang, S-Y, Yang, K-D, Shaio, M-F, (2000). "Potential dengue virus-triggered apoptotic pathway in human neuroblastoma cells: arachidonic acid, superoxide anion, and NF-kB are sequentially involved." Journal of Virology **74**: 8680-8691.

Kimura-Kuroda, J., Ichikawa, M., Ogata, A., Nagashima, K., Yasui, K., (1992). "Specific Tropism of Japanese Encephalitis Virus for Developing Neurons in Primary Rat Brain Culture." Archives of Virology **130**: 477-484.

Kinoshita, H., Mathenge, E.G.M., Hung, N.T., Huong, V.T.Q., Kumatori, A., Yu, F., Parquet, M. del C., Inoue, S., Matias, R.R., Natividad, F.F., Morita, K., Hasebe, F., (2009). "Isolation and characterization of two phenotypically distinct dengue type-2 virus isolates from the same dengue hemorrhagic fever patient." Japanese Journal Of Infectious Diseases **62**: 343-350.

Kliks, S., Nisalak, A, Brandt, W.E., Wahl, L, Burke, D.S., (1989). "Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human-monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic-fever." American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **40**: 444-451.

Kumar, S., Kalita, J., Saxena, V., Khan, M.Y., Khanna, V.K., Sharma, S., Dhole, T.N., Misra, U.K., (2009). "Some observations on the tropism of Japanese encephalitis virus in rat brain." Brain Research: 135-141.

Li, CH & Tam, PKS (1998), "An Iterative Algorithm for Minimum Cross Entropy Thresholding", Pattern Recognition Letters **18**: 771-776.

Ligon, B.L., (2005). "Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: a review of the history, transmission, treatment, and prevention." Semin Pediatr Infect Dis, **16**:60-65.

Lindenbach, B.D., Thiel, H.J. and Rice, C.M. (2007). Flaviviridae: The viruses and their replication. Fields Virology. (5<sup>th</sup> ed), Phildelphia.

Liu, T-H., Liang, L-C, Wang, C-C, Liu, H-C, Chen, W-J, (2008). "The blood-brain barrier in the cerebrum is the initial site for the Japanese encephalitis virus entering the central nervous system." Journal of NeuroVirology **14**: 514-521.

Low, J.G., Ooi, EE, Tolfvenstam, T., Leo, Y.S., Hibberd, M.L., Ng, L-C, Lai, Y-L, Yap, G. SL, Li, C. SC, Vasudevan, S. G., Ong, A., (2006). Early Dengue Infection and Outcome Study (EDEN) – Study Design and Preliminary Findings. The Annals, Academy of Medicine Singapore. **35**: 783-789.

Mairuhu, A.T., Wagenaar, J., Brandjes, D.P., van Gorp, E.C., (2004). “Dengue: an arthropod-borne disease of global importance.” European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, **23**: 425-433.

Mathenge, E.G.M., Parquet, M.D.C., Funakoshi, Y., Houhara, S., Wong, P.F., Ichinose, A., Hasebe, F., Inoue, S., Morita, K., (2004). "Fusion PCR Generated Japanese Encephalitis Virus/Dengue 4 Virus Chimera Exhibits Lack of Neuroinvasiveness, Attenuated Neurovirulence, and A Dual-flavi Immune Response in Mice." Journal of General Virology **85**: 2503-2513.

Maximova, O.A., Ward, J.M., Asher, D.M., St. Claire, M., Finneyfrock, B.W., Speicher, J.M., Murphy, B.R., Pletnev, A.G., (2008). "Comparative neuropathogenesis and neurovirulence of attenuated flaviviruses in nonhuman primates." Journal of Virology **82**: 5255-5268.

McCright , B., Rivers, Ann M., Audlin, S., Virshup, David M., (1996). “The B56 family of protein phosphatase 2A (PP2A) regulatory subunits encodes differentiation-induced phosphoproteins that target PP2A to both nucleus and cytoplasm” Journal of Biological Chemistry **271**: 22081-22089.

Poongodi, G.L., Nimmagadda S., Gopinath, S.C.B., Chang, T., Inoue, S. Inoue, Y. (2002). "Dynamic Change of Neural Cell Adhesion Molecule Polysialylation on Human Neuroblastoma (IMR-32) and Rat Pheochromocytoma (PC-12) Cells during Growth and Differentiation." The Journal of Biological Chemistry **277**: 28200-28211.

Rico-Hesse, R. (2007). Dengue virus evolution and virulence models. Department of Virology and Immunology Hughes, J.M., Wilson, M.E., NIH Public Access. **44**: 1462-1466.

Slack, F.J., (2010) “Stem cells big roles for small RNAs.” Nature **463**:616-616

Sarkar, P., Sridharan, S., Luchowski, R., Desai, S., Dworecki , B., Nlend, M., Gryczynski, Z., Gryczynski, I., (2010). “Photophysical properties of a new DyLight 594 dye.” Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **98**:35–39.

Sriurairatna, S., Bhamarapavati, N., Phalavadhtana O., (1973). "Dengue virus infection of mice: morphology and morphogenesis of dengue type-2 virus in suckling mouse neurones." Infection and Immunity **8**: 1017-1028.

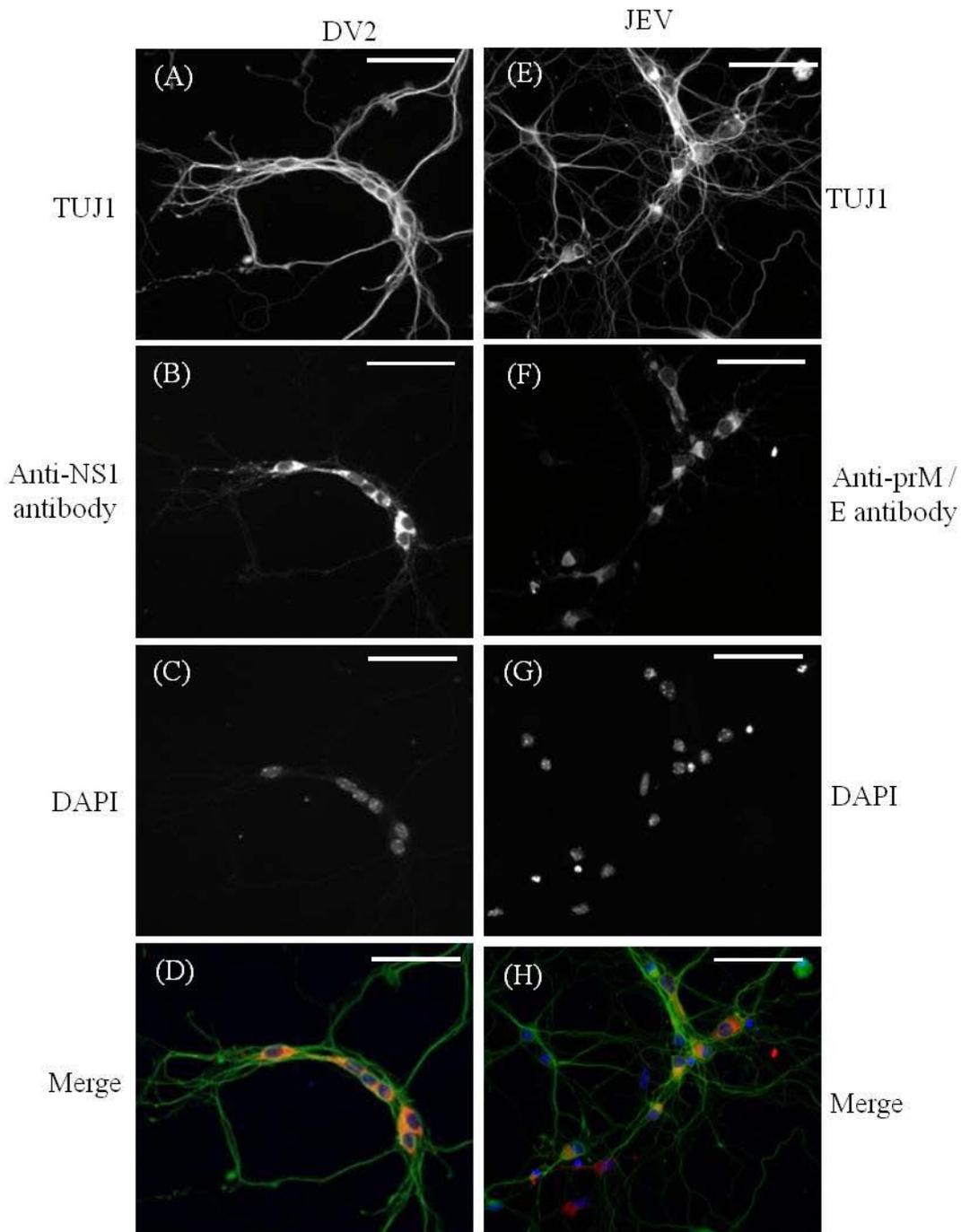
Tumilowicz, J.J., Nichols, W.W., Cholon, J.J., Greene, A.E., (1970). "Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma." Cancer Research **30**: 2110-2118.

Yang, K.D., Yeh, W-T, Chen, R-F, Chuon, H-L, Tsai, H-P, Yao, C-H, Shaio, M-F, (2004). "A model to study neurotropism and persistency of Japanese encephalitis virus infection in human neuroblastoma cells and leukocytes." Journal of General Virology **85**: 635-642.

Yasui, K., (2002). "Neuropathogenesis of Japanese encephalitis virus." Journal of NeuroVirology **2**: 112-114.

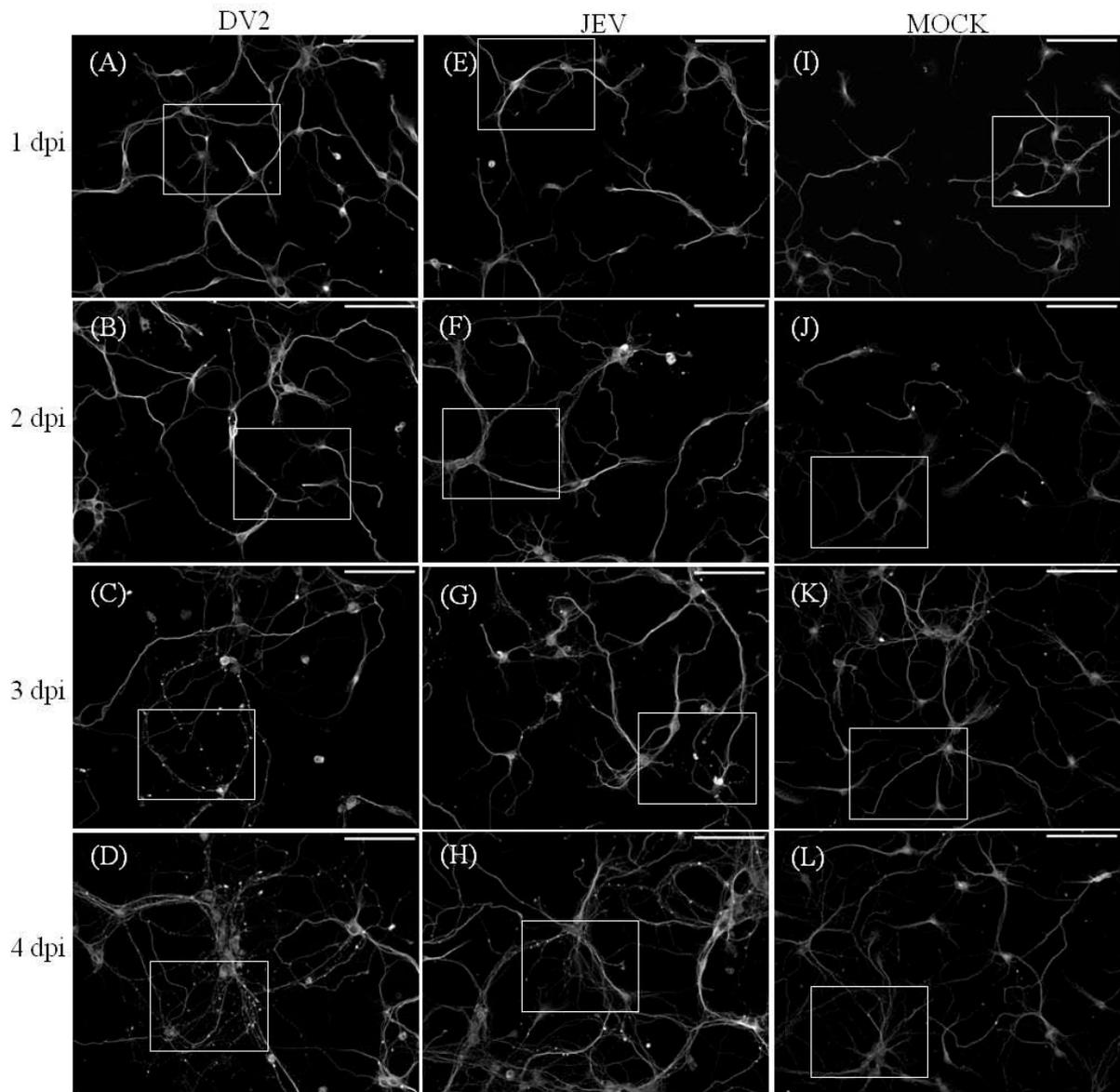
Yauch, L.E., Shresta, S. (2008). "Mouse models of dengue virus infection and disease." Antiviral Research **80**: 87-93

Yu, C-Y., Chiang, R-L., Chang, T-H., Liao, C-L., Lin, Y-L. (2010). "The Interferon Stimulator Mitochondrial Antiviral Signaling Protein Facilitates Cell Death by Disrupting the Mitochondrial Membrane Potential and by Activating Caspases." Journal of Virology **84**: 2421-2431.



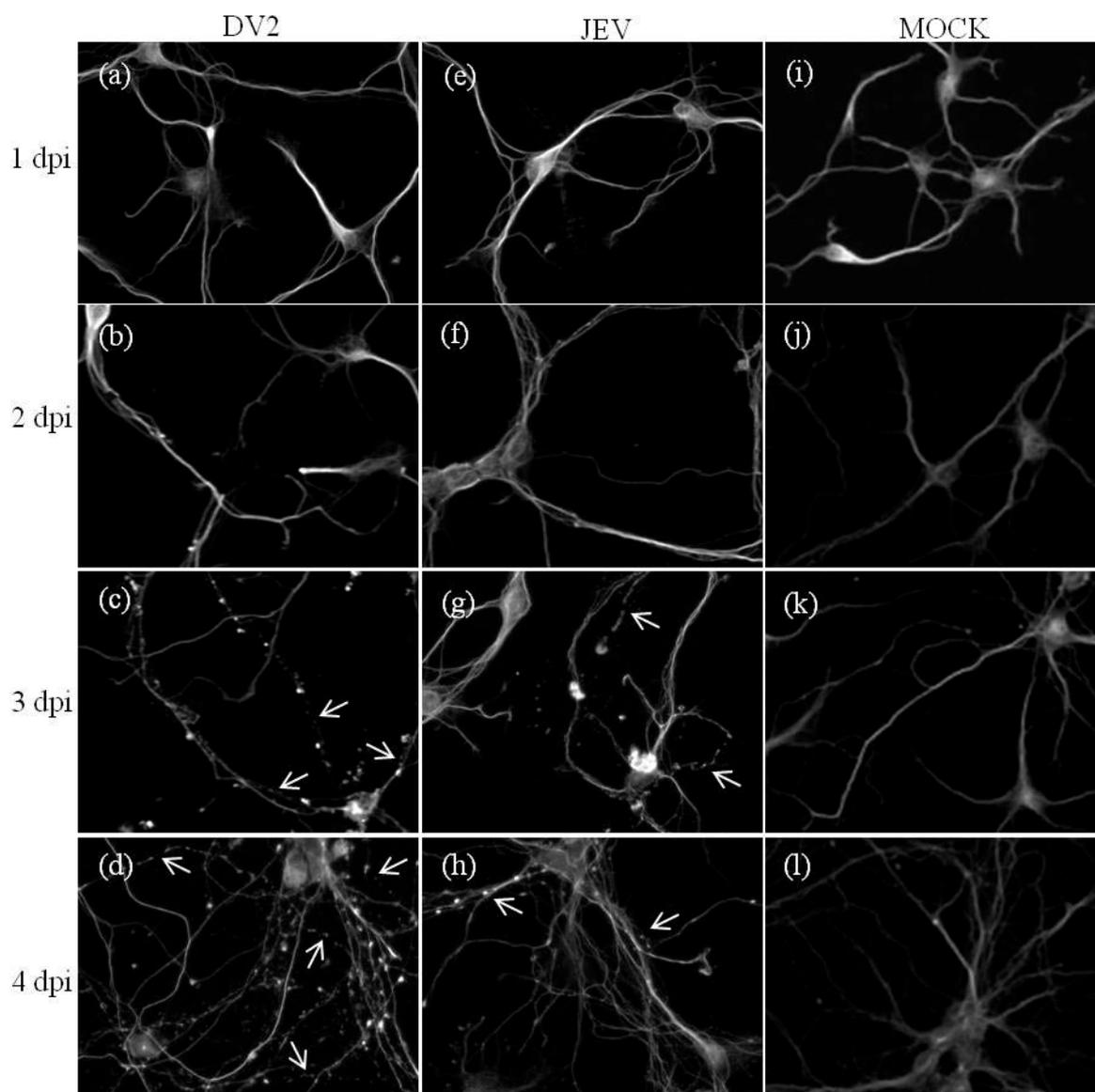
**圖一 免疫螢光染色--登革熱病毒與日本腦炎病毒感染小鼠初代神經細胞**

(A) - (D) 以登革熱感染小鼠初代神經細胞；(E) - (H) 以日本腦炎病毒感染小鼠初代神經細胞。(A)，(E) 以 Neuron-specific antibody TUJ1 antibody (anti- $\beta$ III tubulin) 偵測神經細胞。(B)，(F) 偵測病毒蛋白分佈位置。(C)，(G) DAPI，細胞核。(D)，(H) 將三種不同訊號結合在一起並套色。綠色：TUJ1；紅色：病毒蛋白；藍色：細胞核。比例尺標示 31.5  $\mu$ m。



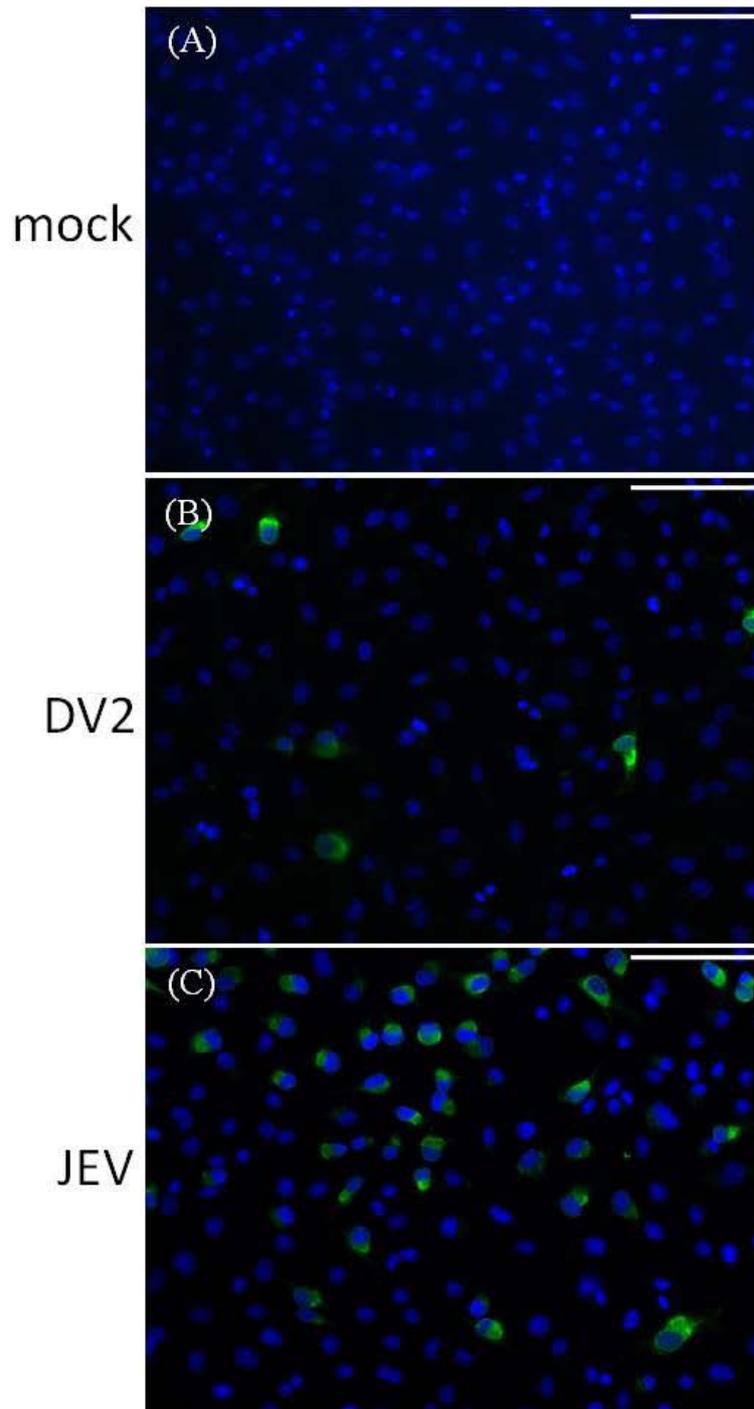
**圖二 免疫螢光染色—初代神經細胞被病毒感染後一至四天型態變化**

(A) - (D) 登革熱病毒感染的組別；(E), (H) 日本腦炎病毒感染組；(I) - (L) 未感染對照組。(A), (E) 病毒感染後第一天；(B), (F) 病毒感染後第二天；(C), (G) 病毒感染後第三天；(D), (H) 病毒感染後第四天神經細胞型態的變化。比例尺標示 50  $\mu\text{m}$ 。



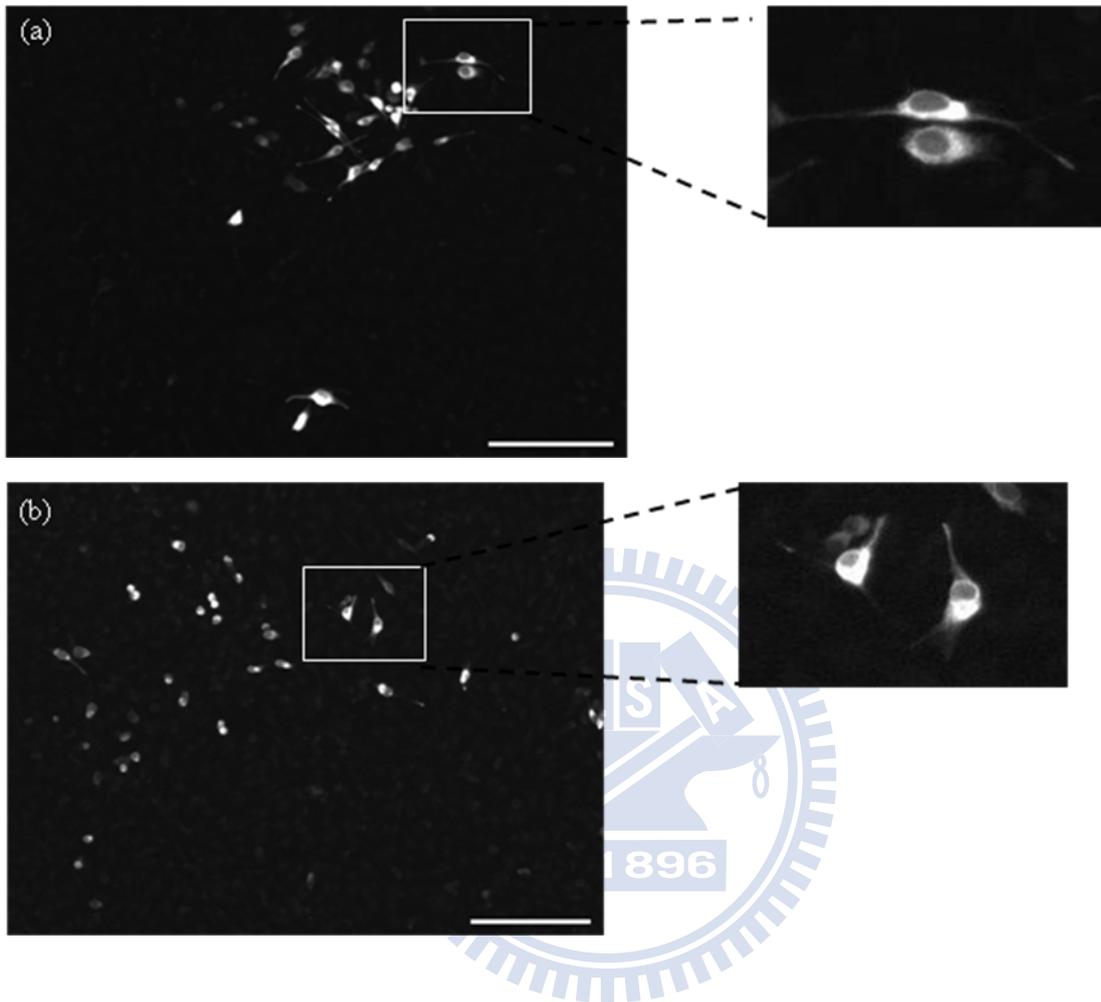
圖三 圖二白色框線處局部放大

(a) - (l) 分別為圖二 (A) - (L) 的白色框線處局部放大。箭頭指向神經突不連續型態發生處。



**圖四 免疫螢光染色 -- 以 anti-JEV prM / E antibody 偵測病毒蛋白表現**

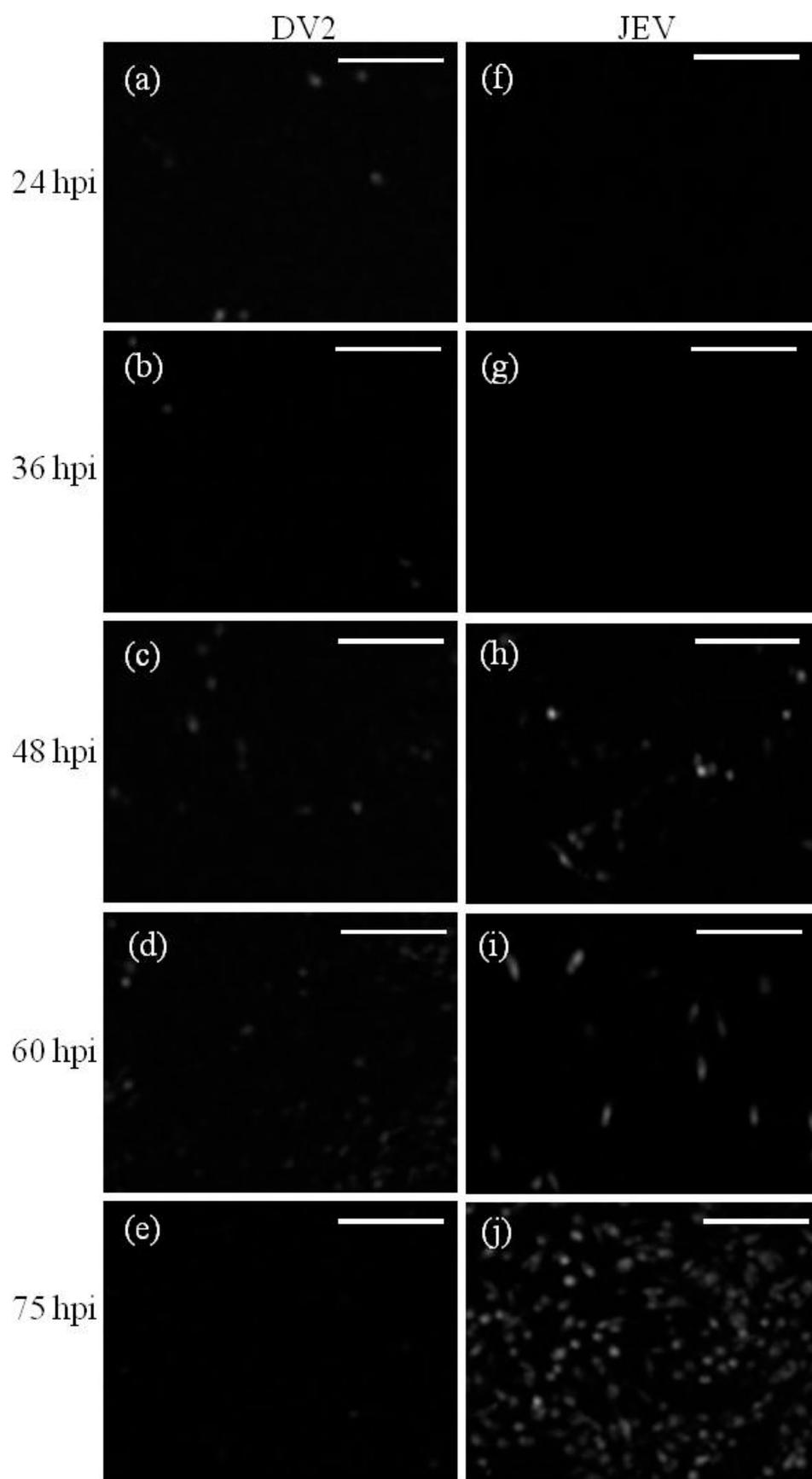
(A) 未感染之 BHK-21 細胞，沒有觀察到 anti-prM / E antibody 及相對應二級抗體產生的綠色螢光；(B) 以登革熱病毒感染的 BHK-21 細胞，以 anti-prM / E antibody 偵測病毒蛋白表現可觀察到綠色螢光；(C) 以日本腦炎病毒感染 BHK21，以 anti-prM / E antibody 偵測病毒蛋白表現可觀察到綠色螢光。藍色訊號為 DAPI，標示細胞核。比例尺標示 50  $\mu$ m。



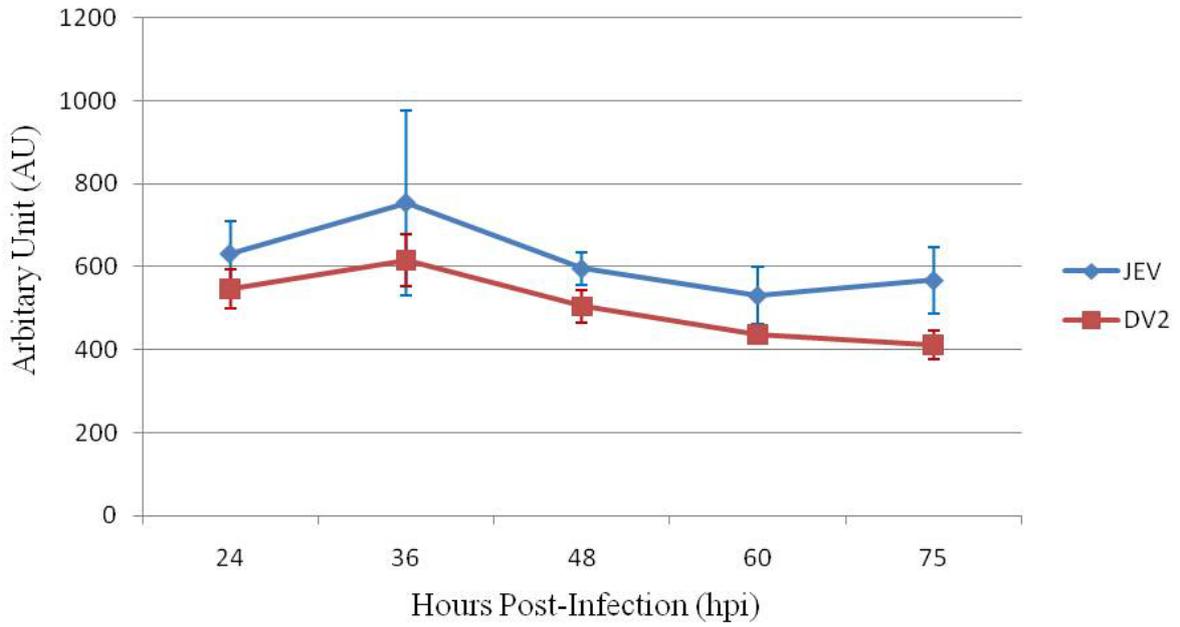
**圖五 免疫螢光染色--以 anti-prM / E antibody 偵測病毒蛋白表現**

(A) 以日本腦炎病毒感染 BHK-21，以 anti-prM / E antibody 偵測病毒蛋白表現。(B) 以登革熱病毒感染 BHK-21，以 anti-prM / E antibody 偵測病毒蛋白表現。比例尺標示 100  $\mu\text{m}$ 。

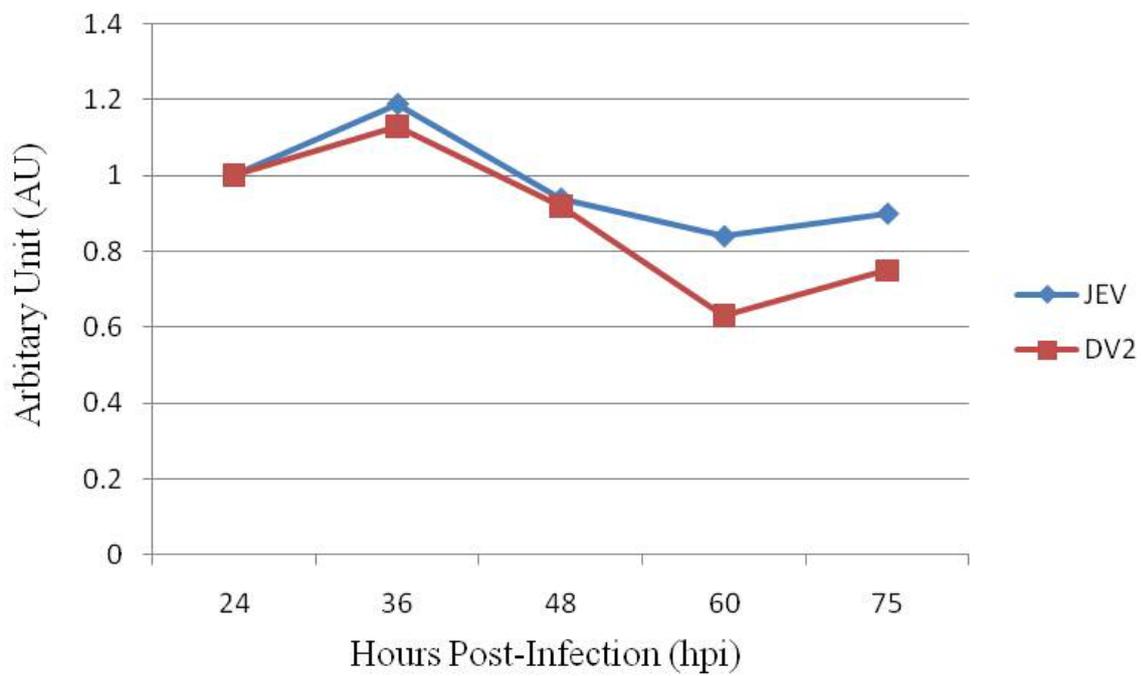
(A)



(B)



(C)



(D)

	JEV	DV2
24 hpi	631.558±77.412	547.118±47.562
36 hpi	753.989±222.975	616.118±62.798
48 hpi	595.463±40.160	504.429±39.488
60 hpi	530.939±69.891	436.190±19.267
75 hpi	567.055±79.321	410.585±34.767

**圖六 免疫螢光染色—幼倉鼠腎臟纖維母細胞 BHK-21 中病毒複製趨勢**

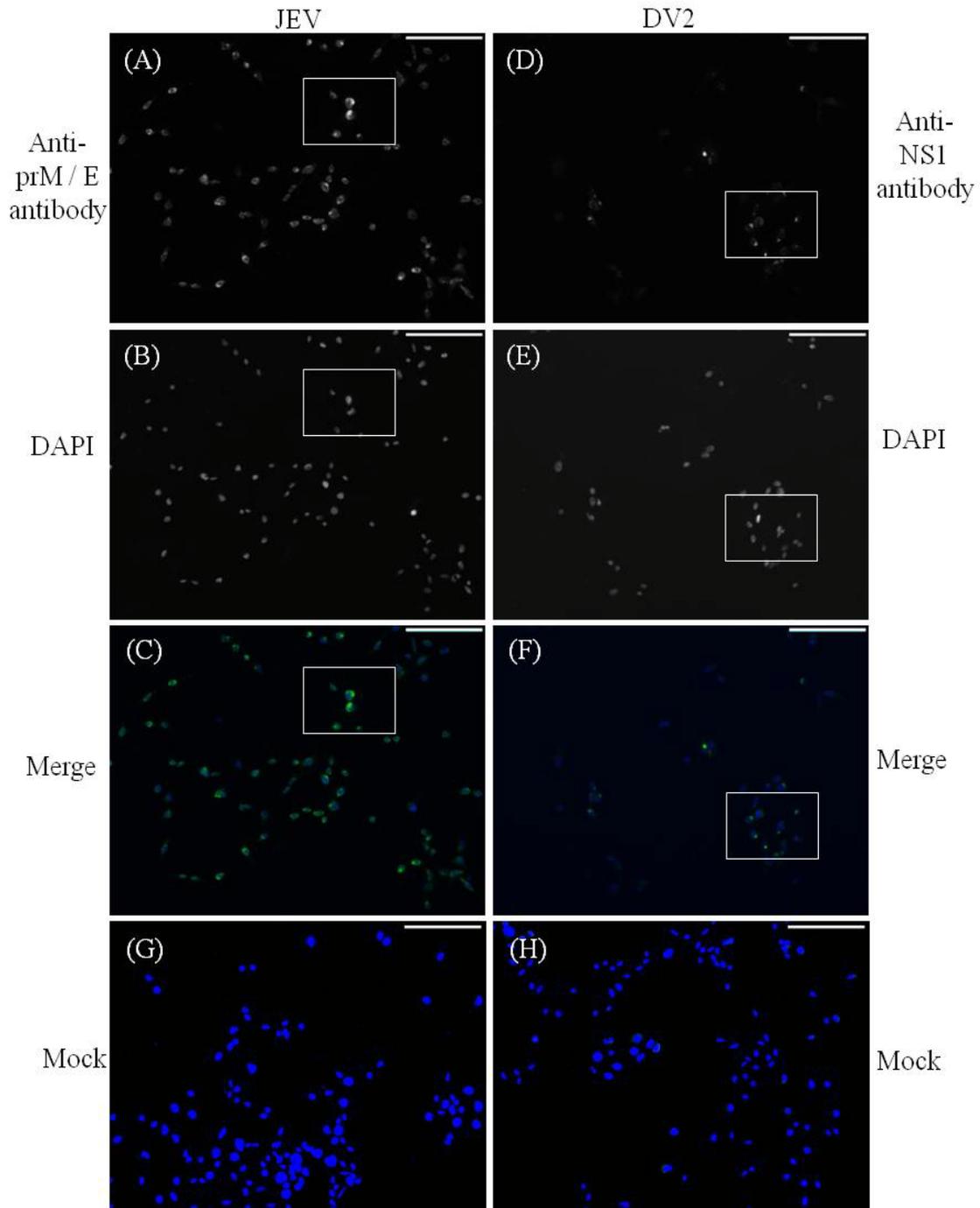
以軟體定量病毒蛋白強度隨時間之改變。

(A) 於感染後 24、36、48、60、75 個小時，病毒蛋白表現強度：(a) - (e) 登革熱病毒感染的組別；(f) - (j) 日本腦炎病毒感染組。(a)，(f) 感染後 24 小時；(b)，(g) 感染後 36 小時；(c)，(h) 感染後 48 小時；(d)，(i) 感染後 60 小時；(e)，(j) 感染後 75 小時。比例尺標示 25  $\mu\text{m}$ 。

(B) 根據表四做折線圖，error bar 為標準差。

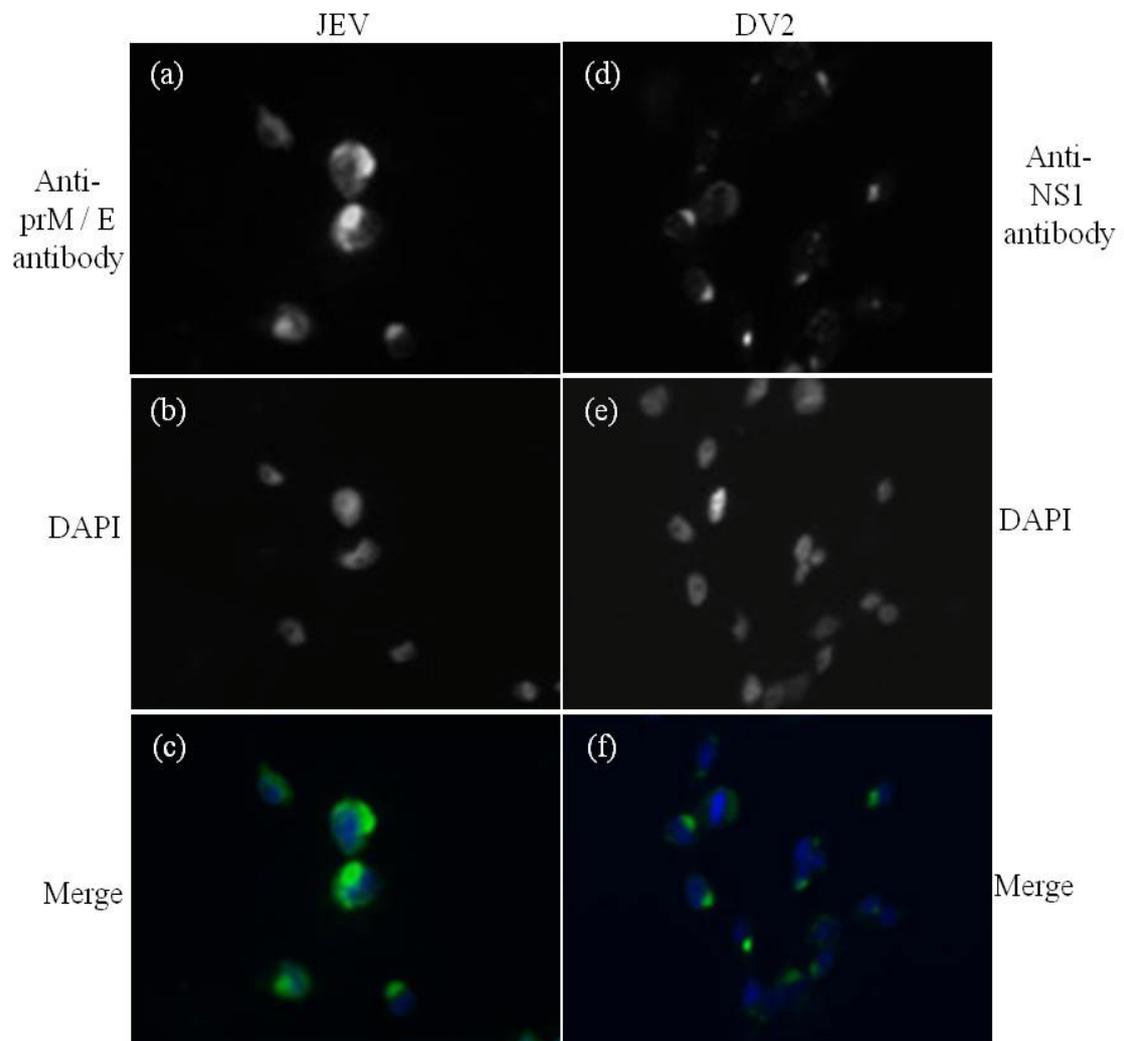
(C) 根據圖六 (A) 將兩組數據除以 24 hpi 標準化。

(D) 根據圖六 (A) 的病毒蛋白呈色強度以軟體計數照片中總畫素 signal intensity 數據化。



**圖七 免疫螢光染色--登革熱與日本腦炎病毒感染白線斑蚊細胞 C6 / 36**

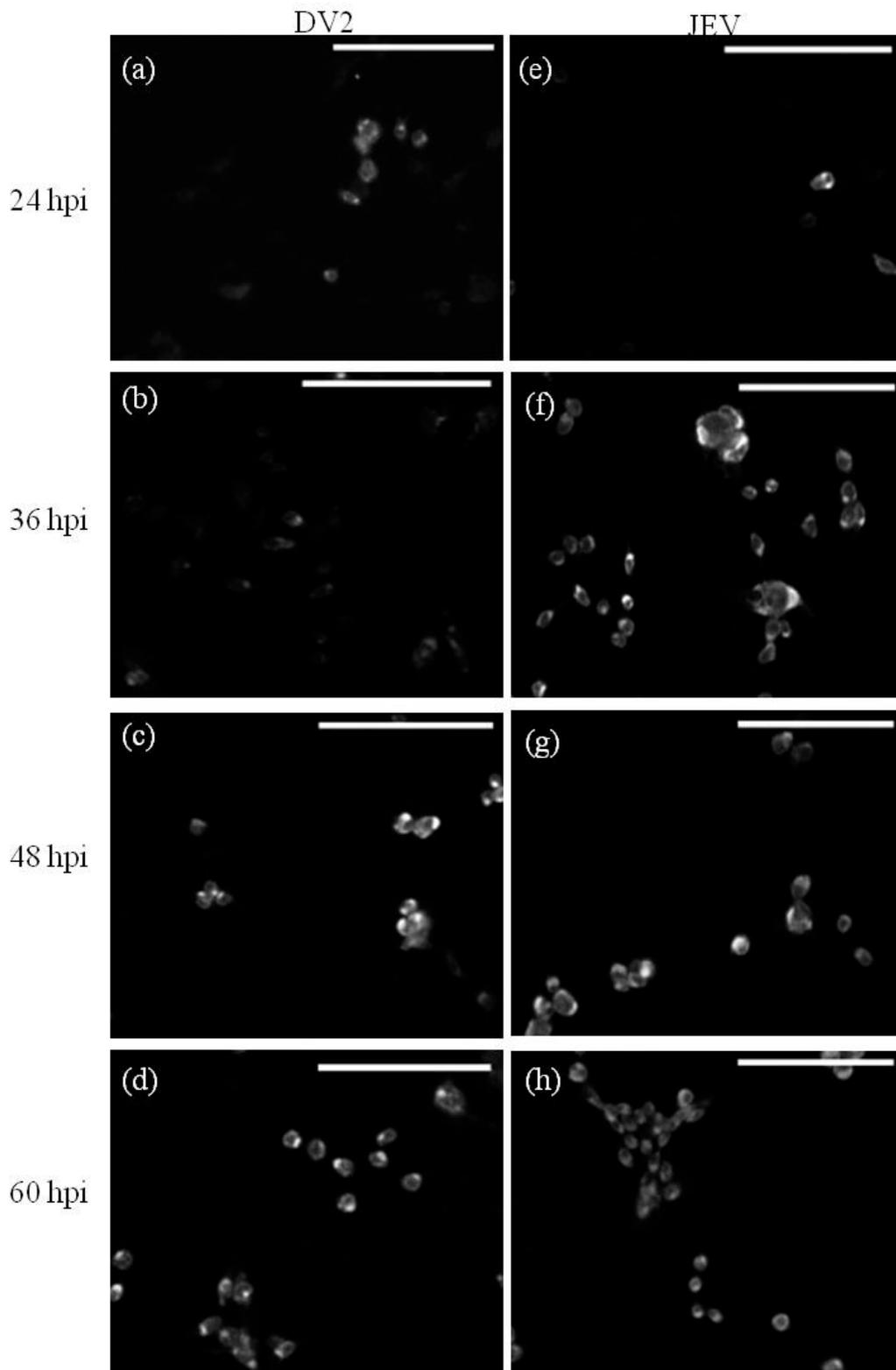
(A) - (C) 日本腦炎病毒感染的組別；(D) - (F) 登革熱病毒感染組。(A)，(D) 偵測病毒蛋白分佈位置：一級抗體分別為 anti-prM / E；anti- NS1；二級抗體為 Dylight 488 goat-anti-rabbit / mouse。(B)，(E) DAPI，細胞核。(C)，(F) 將兩個不同訊號結合在一起並套色。(G)，(H) 未感染病毒之 C6 / 36 細胞。綠色：病毒蛋白 anti-prM / E antibody、anti-NS1 antibody；藍色：細胞核。比例尺標示 50 μm。



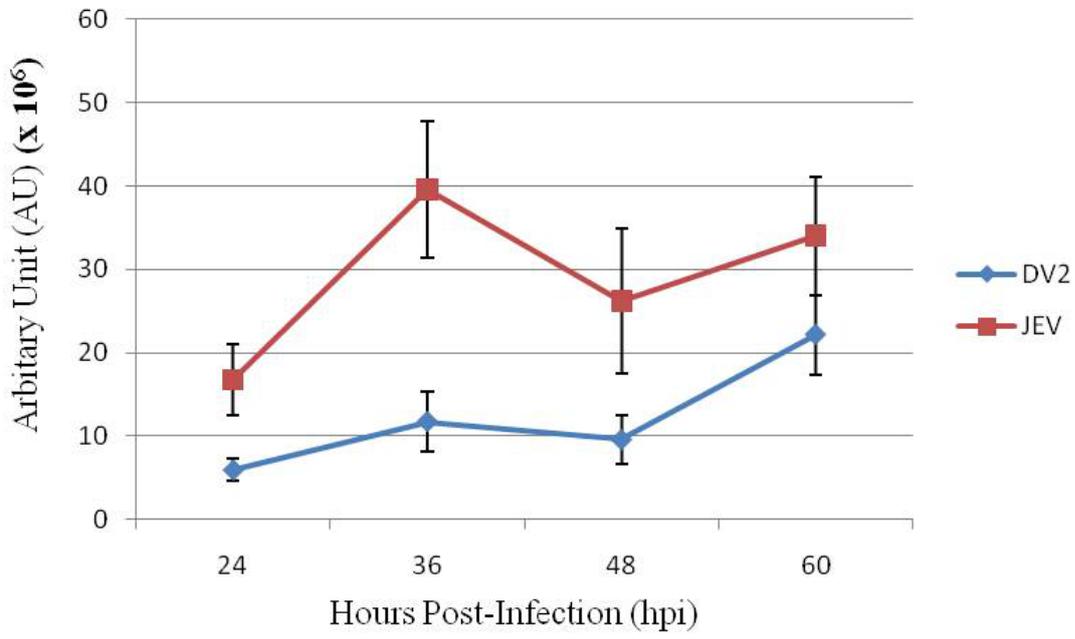
圖八 圖七的白色框線處局部放大

(a) - (f) 分別為圖七 (A) - (F) 的白色框線處局部放大。

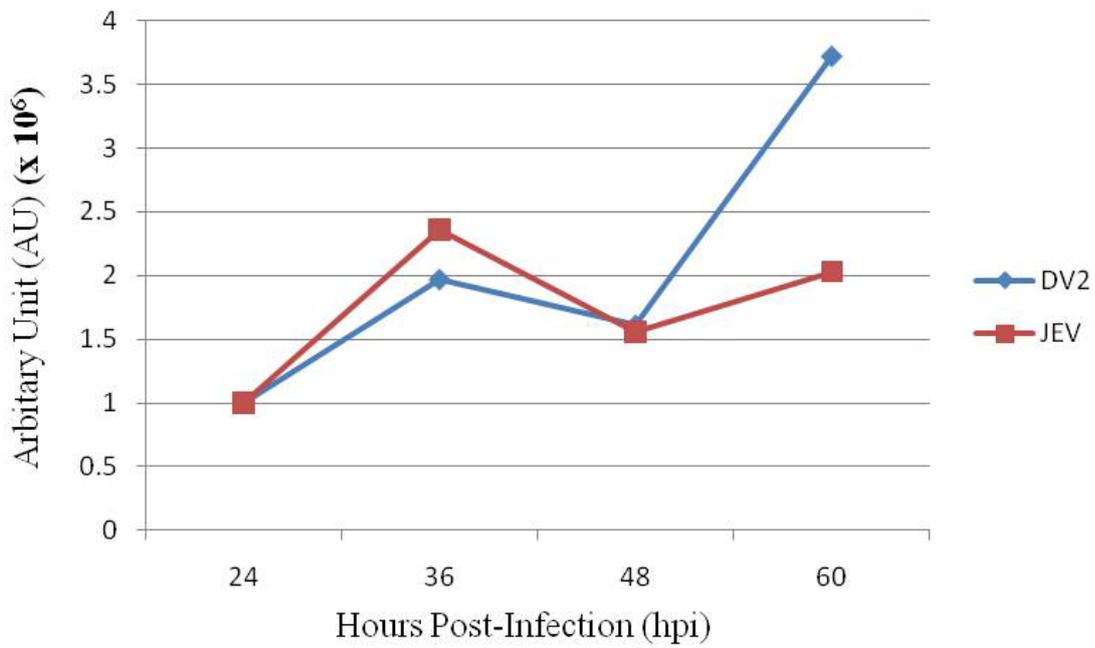
(A)



(B)



(C)



(D)

	DV2	JEV
24 hpi	5946943±1346522	16760970±4324666
36 hpi	11736634±3608113	39584029±8186995
48 hpi	9591399±2877093	26212103±8666520
60 hpi	22163277±4742421	43020333±7120301

**圖九 免疫螢光染色--白線斑蚊細胞 C6/36 中病毒複製趨勢**

以軟體定量病毒蛋白強度隨時間之改變，選擇軟體內建設定來選取閾值。

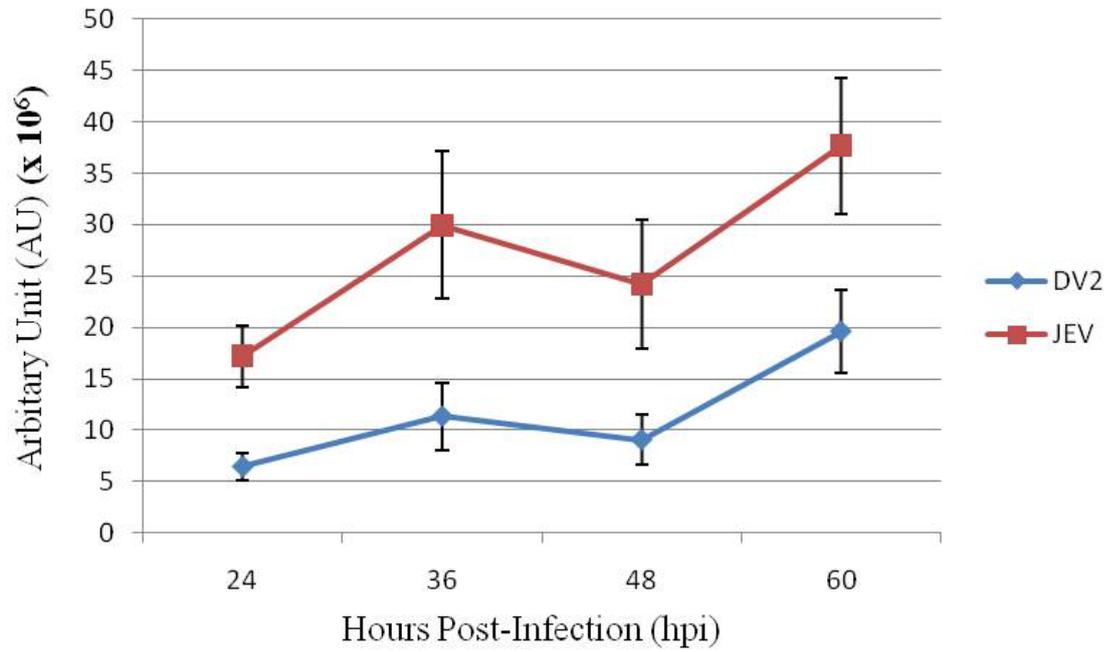
(A) 於感染後 24、36、48、60 個小時，病毒蛋白表現強度：(a) - (d) 登革熱病毒感染組別；(e) - (h) 日本腦炎病毒感染組。(a)，(e) 感染後 24 小時；(b)，(f) 感染後 36 小時；(c)，(g) 感染後 48 小時；(d)，(h) 感染後 60 小時。比例尺標示 50  $\mu\text{m}$ 。

(B) 根據表五做折線圖，error bar 為標準差。

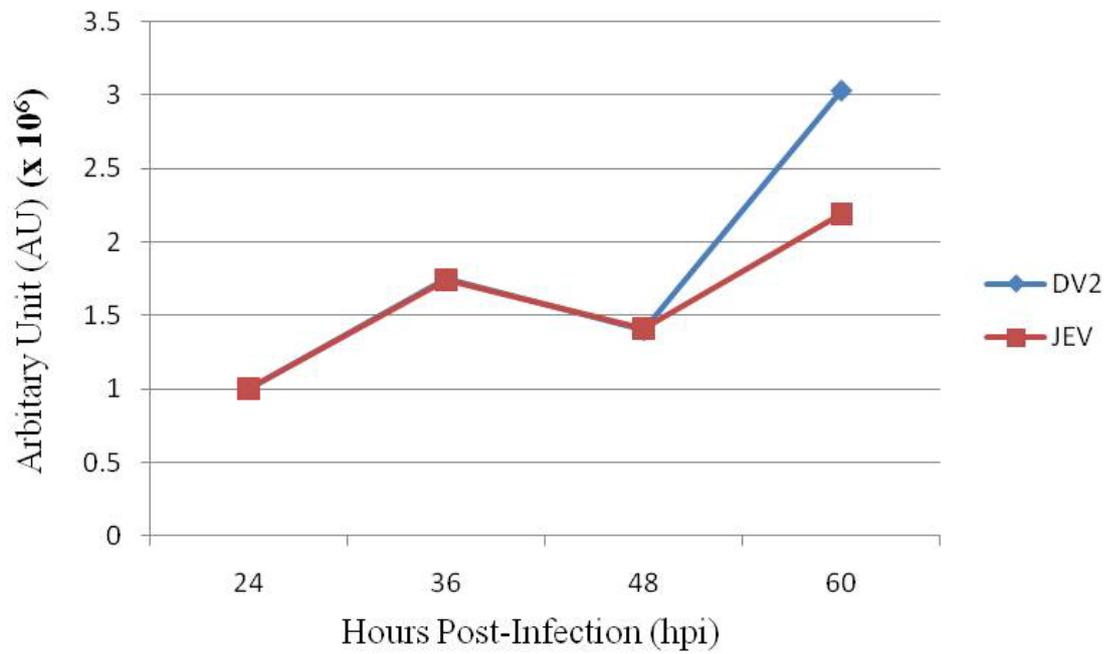
(C) 根據圖九 (B) 將兩組數據除以最小數值標準化。

(D) 根據圖九 (A) 的病毒蛋白呈色強度以軟體計數照片中總畫素數據化。

(A)



(B)



(C)

	DV2	JEV
24 hpi	6473451±1337395	17208887±2979540
36 hpi	11345520±3290506	29927797±7162312
48 hpi	9085500±2495830	24212864±6308480
60 hpi	19600401±3991273	37680437±6633391

**圖十 免疫螢光染色--白線斑蚊細胞 C6 / 36 中病毒複製趨勢**

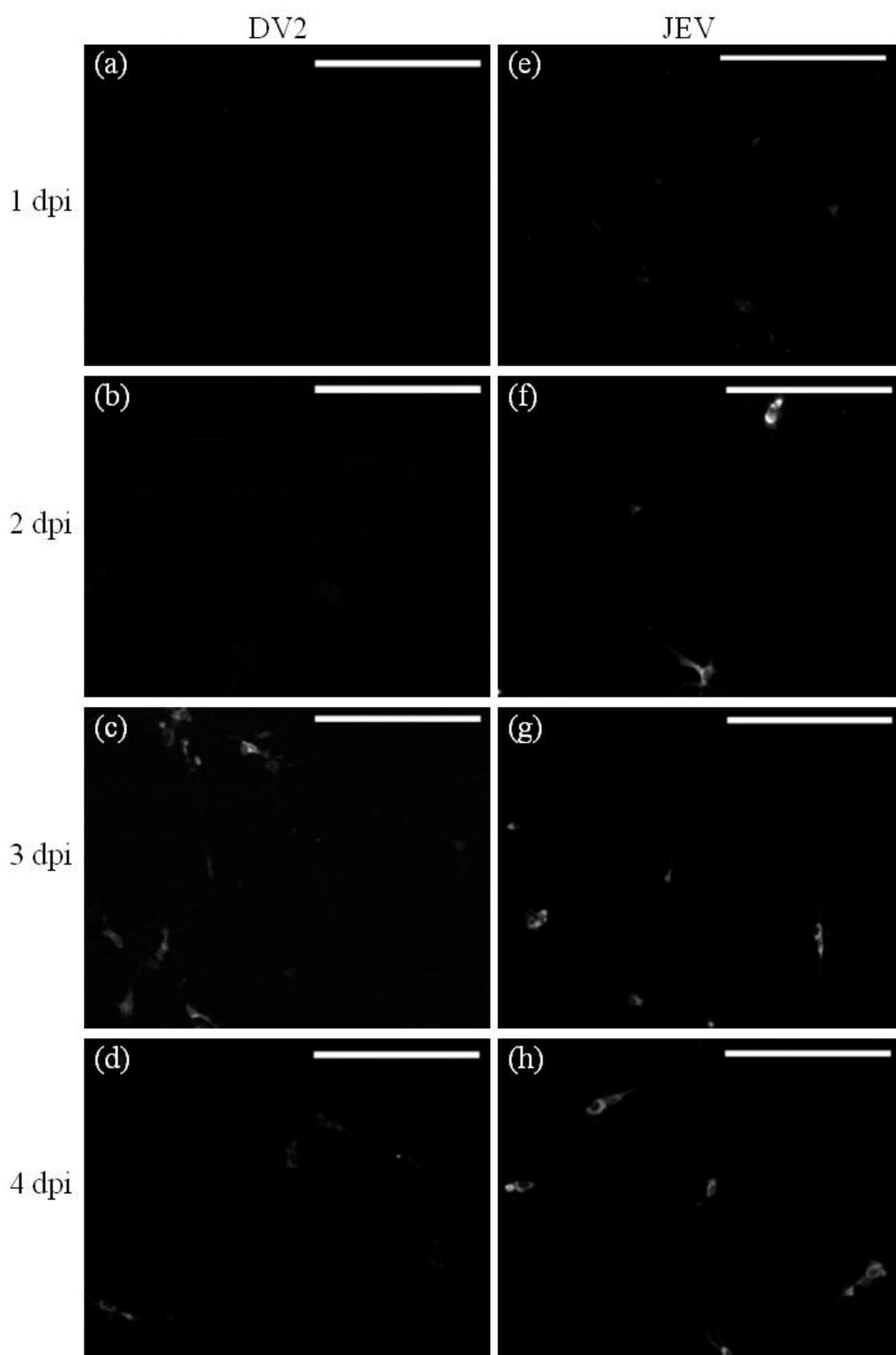
以軟體定量病毒蛋白強度隨時間之改變，選擇細胞核訊號做定量範圍規範。

(A) 根據圖九 (A) 分析不同時間點病毒蛋白表現量做折線圖，error bar 為標準差。

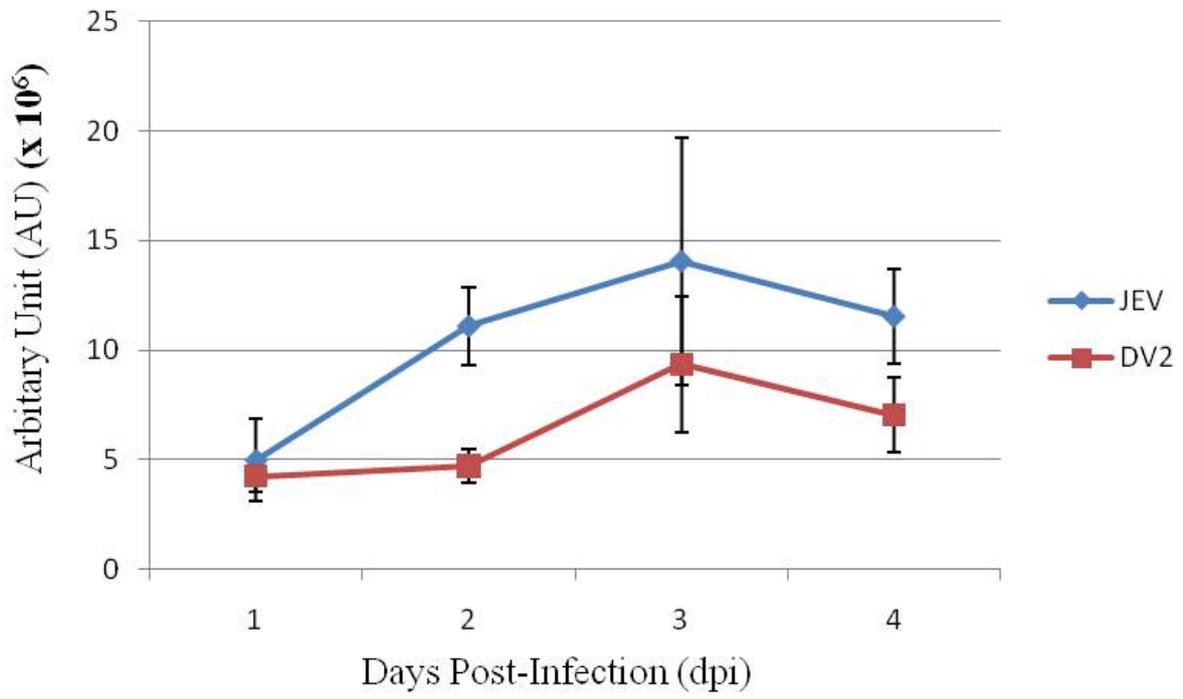
(B) 將兩組數據除以第一時間點數值以標準化。

(C) 根據圖九 (A) 的病毒蛋白呈色強度以軟體計數照片中總畫素數據化。

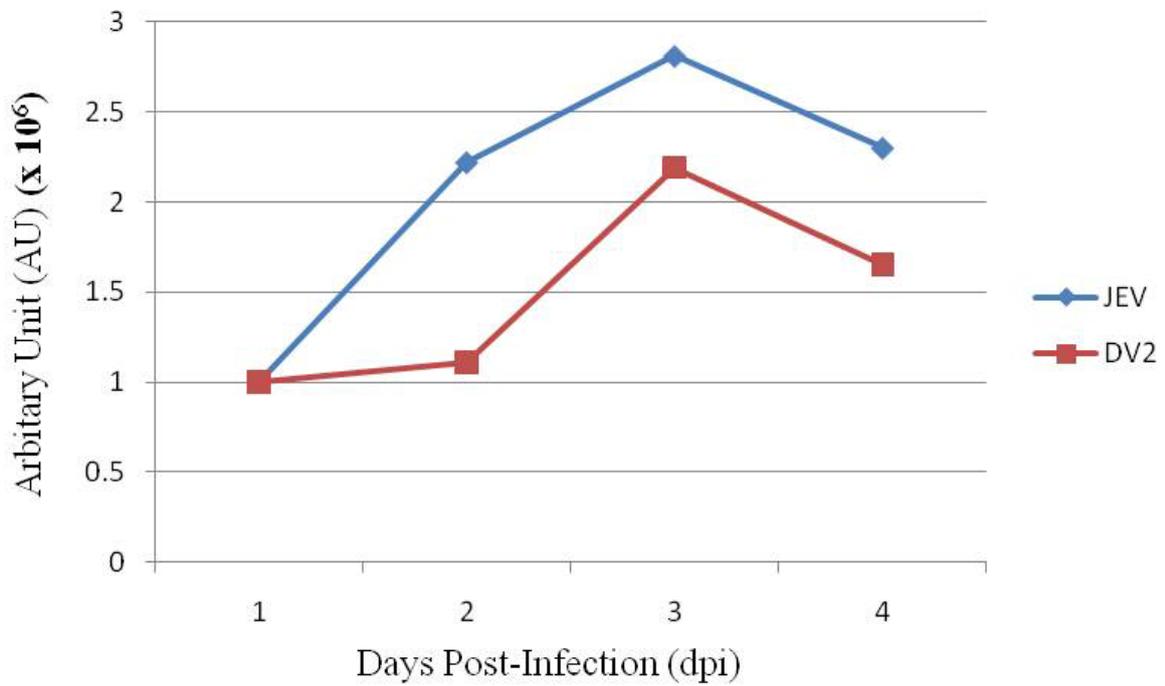
(A)



(B)



(C)



(D)

	JEV	DV2
1 dpi	5002482±1868730	4258968±718012
2 dpi	11100675±1765804	4717698±740298
3 dpi	14050230±5631120	9345338±3095699
4 dpi	11539519±2152074	7046070±1701368

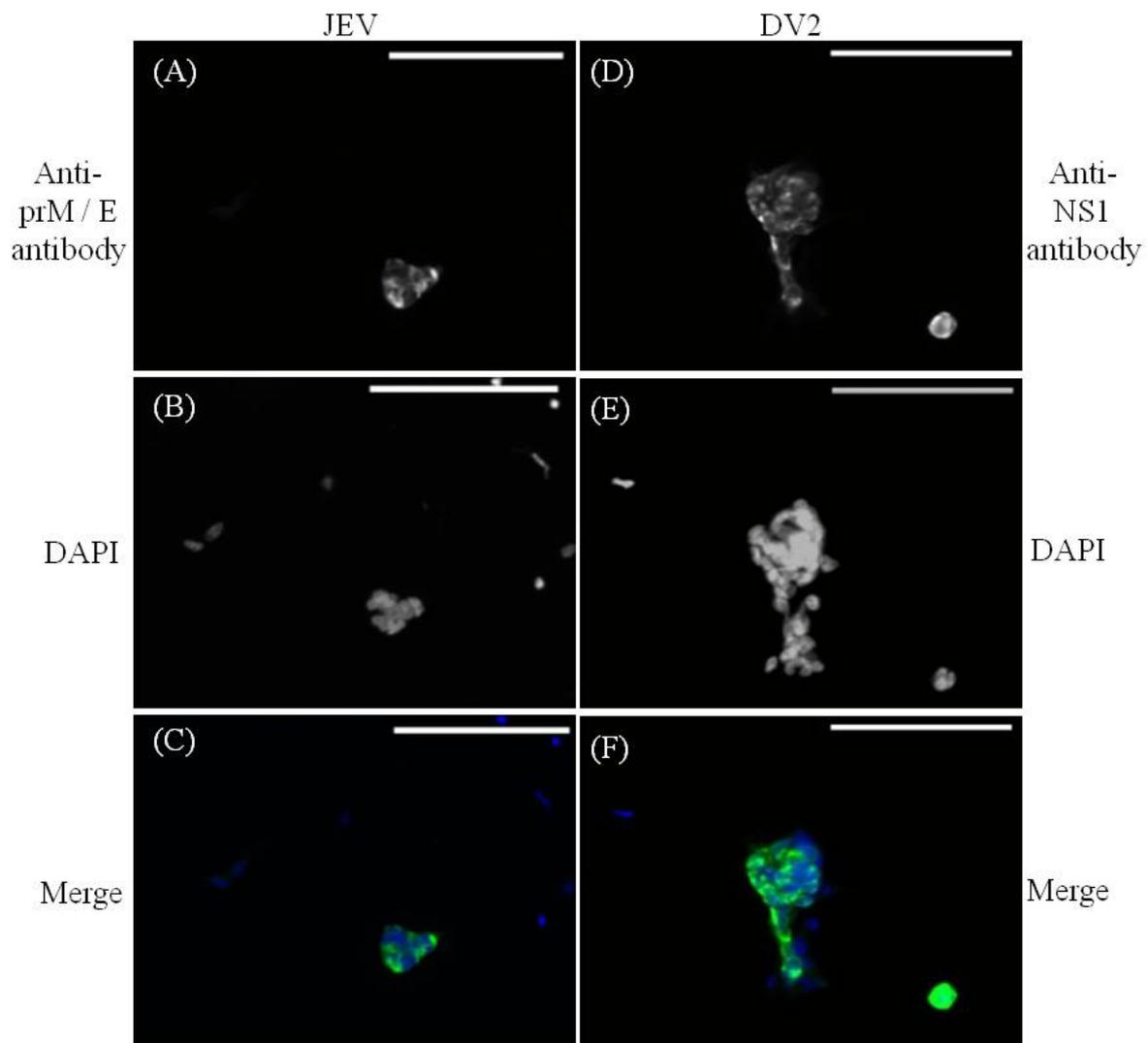
#### 圖十一 免疫螢光染色—神經初代培養細胞中病毒複製趨勢

以軟體定量病毒蛋白強度隨時間之改變。(A) (a) - (d) 登革熱病毒感染的組別；(e) - (h) 日本腦炎病毒感染組。(a)，(e) 病毒感染後第一天；(b)，(f) 病毒感染後第二天；(c)，(g) 病毒感染後第三天；(d)，(h) 病毒感染後第四天病毒蛋白表現強度與分佈。比例尺標示 50  $\mu\text{m}$ 。

(B) 根據圖十一 (A) 分析不同時間點病毒蛋白表現量做折線圖，error bar 為標準差。

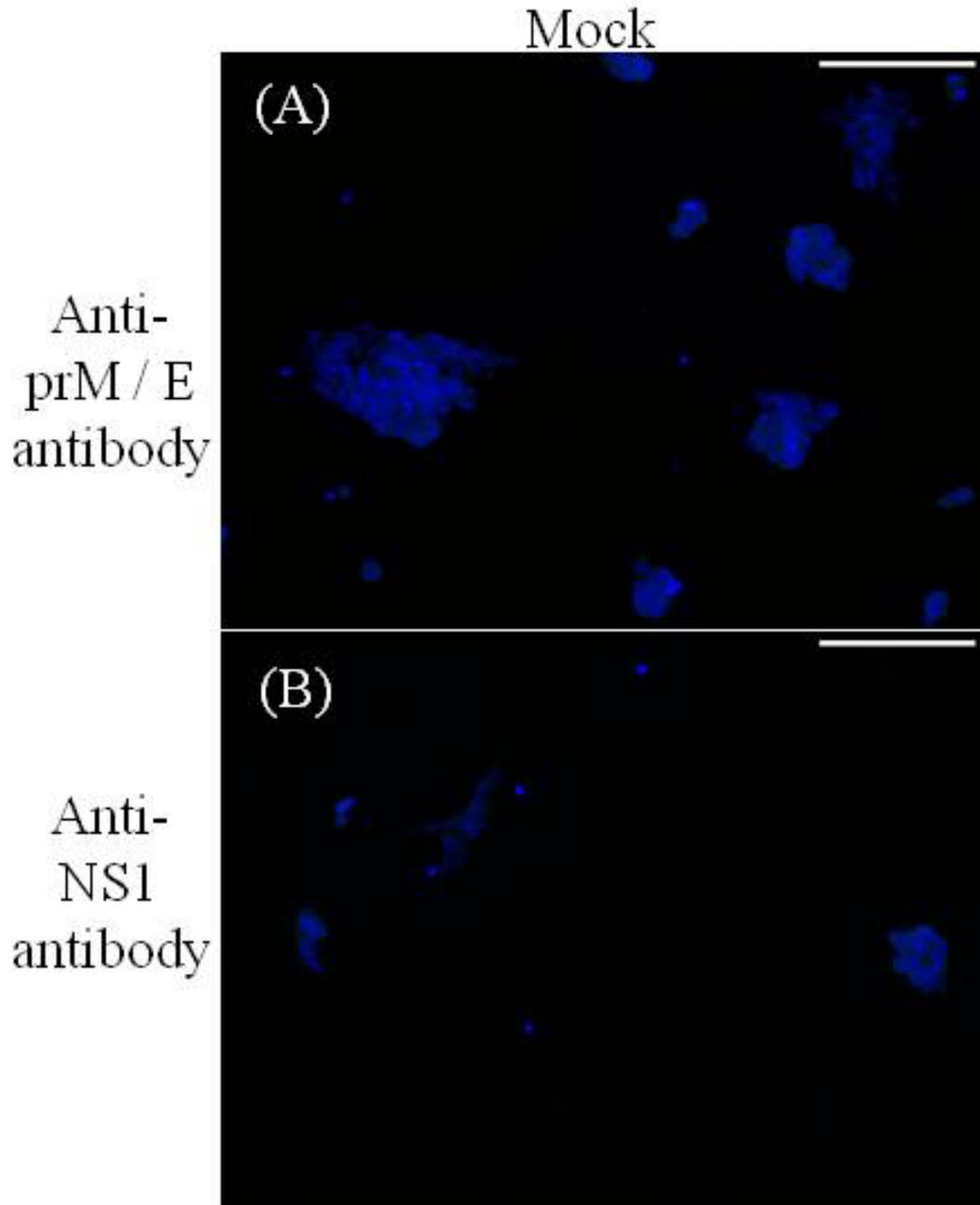
(C) 根據圖十 (B) 將兩組數據除以最小數值標準化。

(D) 根據圖十 (A) 的病毒蛋白呈色強度以軟體計數照片中總畫素數據化。



圖十二 免疫螢光染色—登革熱病毒與日本腦炎病毒感染 IMR-32

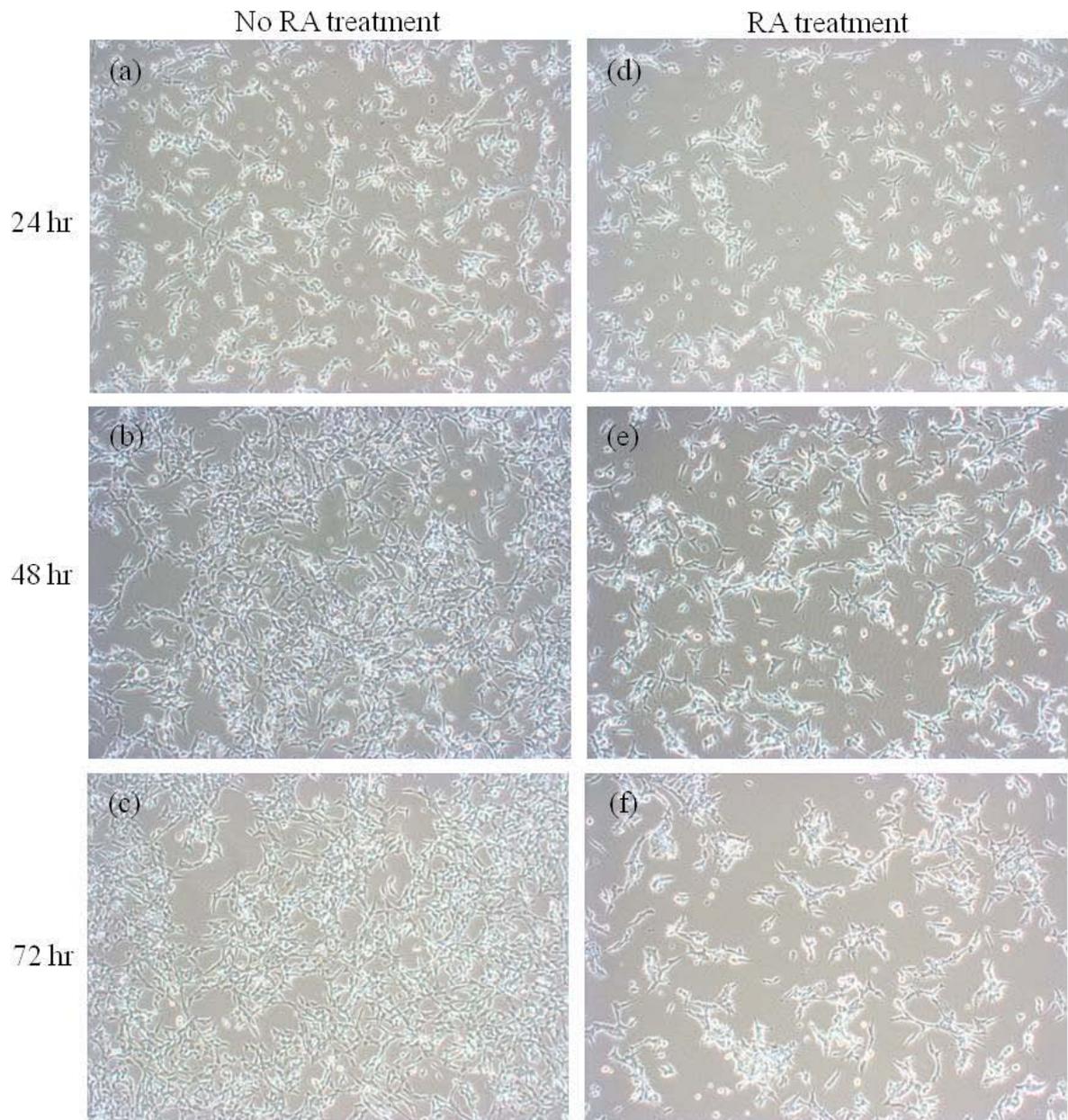
(A) - (C) 日本腦炎病毒感染的組別；(D) - (F) 登革熱病毒感染組。(A)，(D) 偵測病毒蛋白分佈位置：一級抗體分別為 anti-prM / E；anti-NS1；二級抗體為 Dylight 488 goat-anti-rabbit / mouse。(B)，(E) DAPI，細胞核。(C)，(F) 將兩個不同訊號結合在一起並套色。綠色：病毒蛋白 anti-prM / E antibody、anti-NS1 antibody；藍色：細胞核。比例尺標示 25  $\mu$ m。



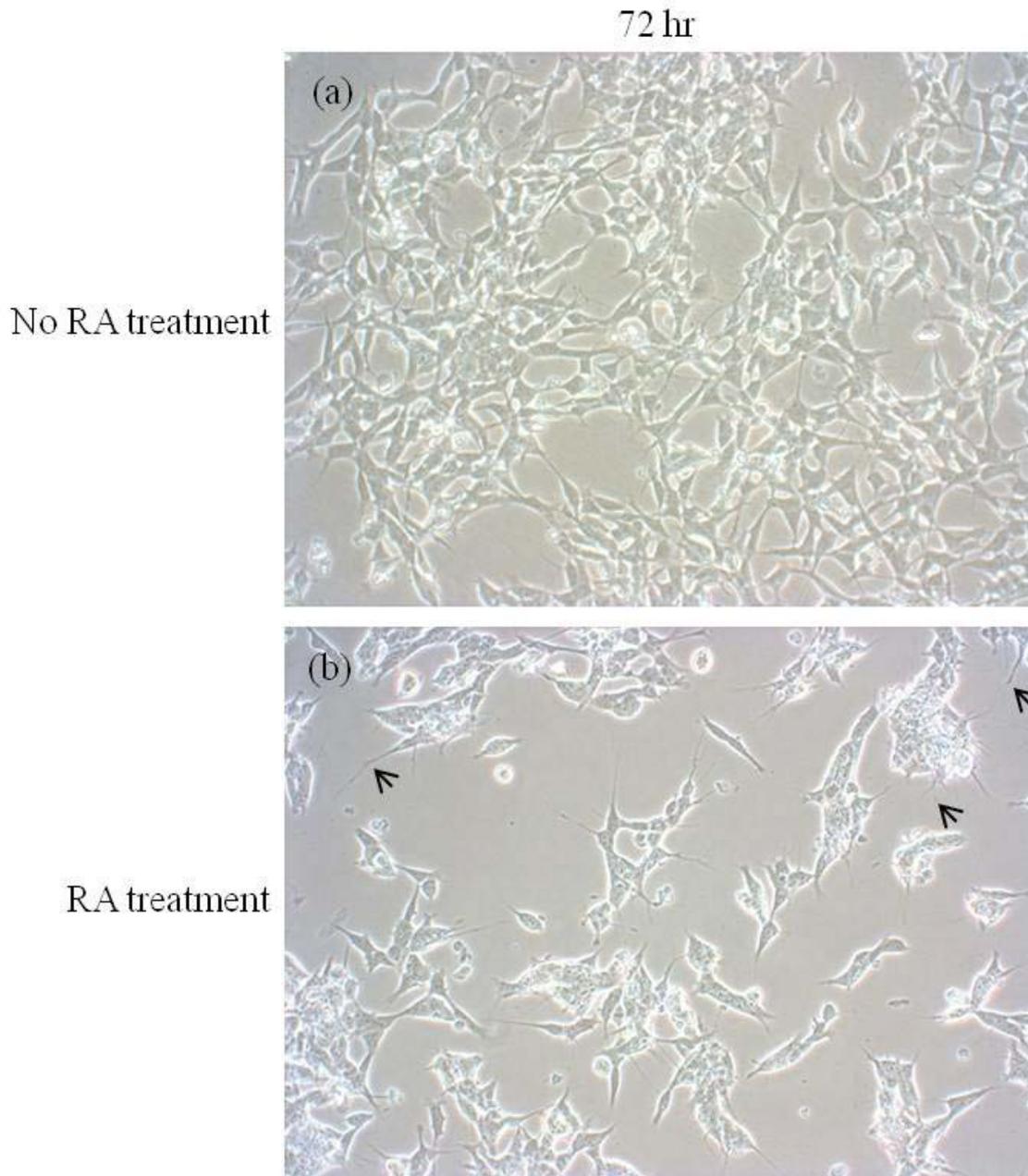
**圖十三 免疫螢光染色—未感染病毒之 IMR-32**

(A) 未感染之 IMR-32 細胞：一級抗體為 anti-prM / E，二級抗體為 Dylight 488 goat-anti-rabbit；(B) 未感染之 IMR-32 細胞：一級抗體為 anti-NS1 antibody，二級抗體為 Dylight 488 goat-anti-mouse。藍色：DAPI 訊號，細胞核。比例尺標示 50  $\mu\text{m}$ 。

(A)

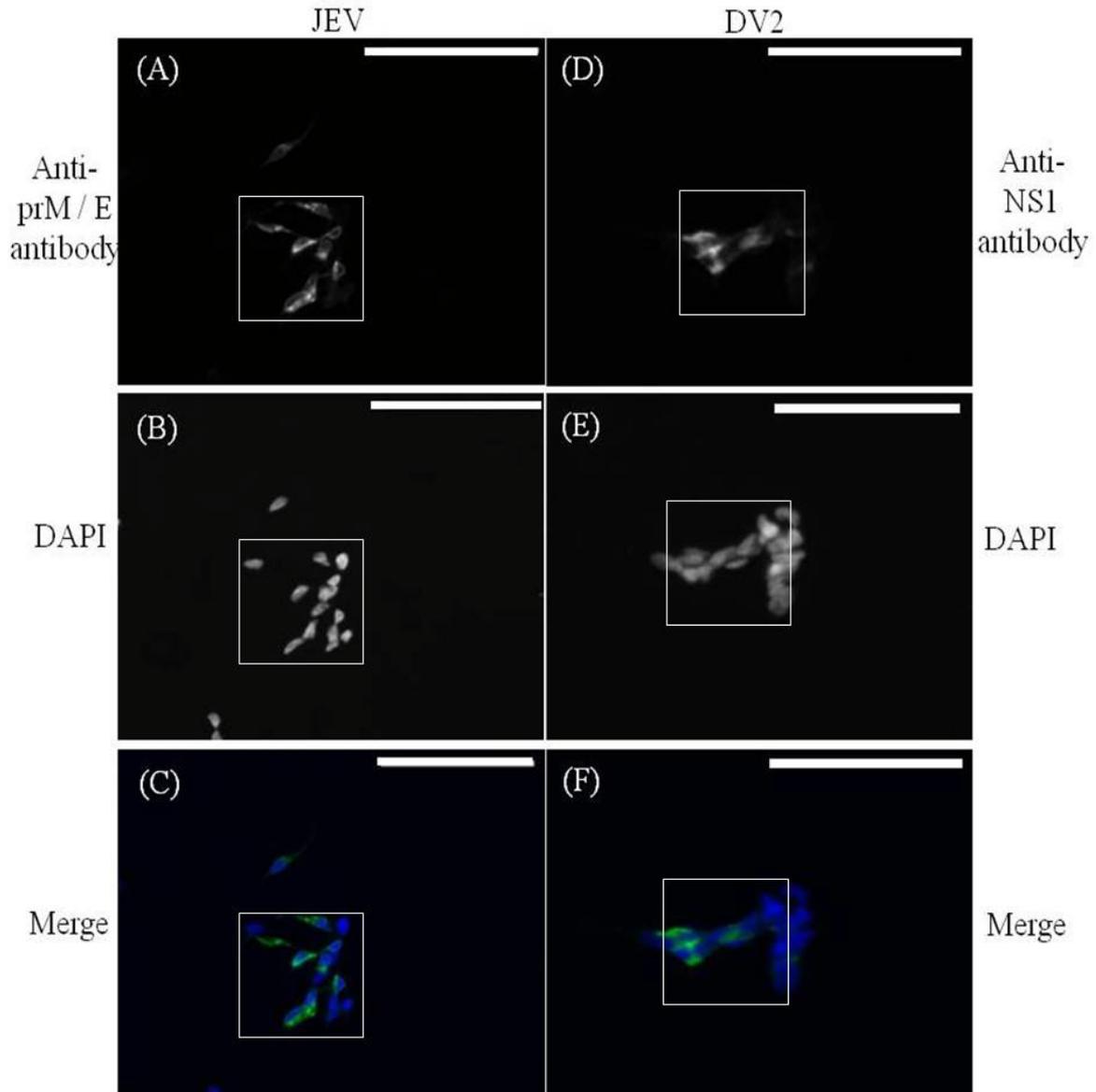


(B)



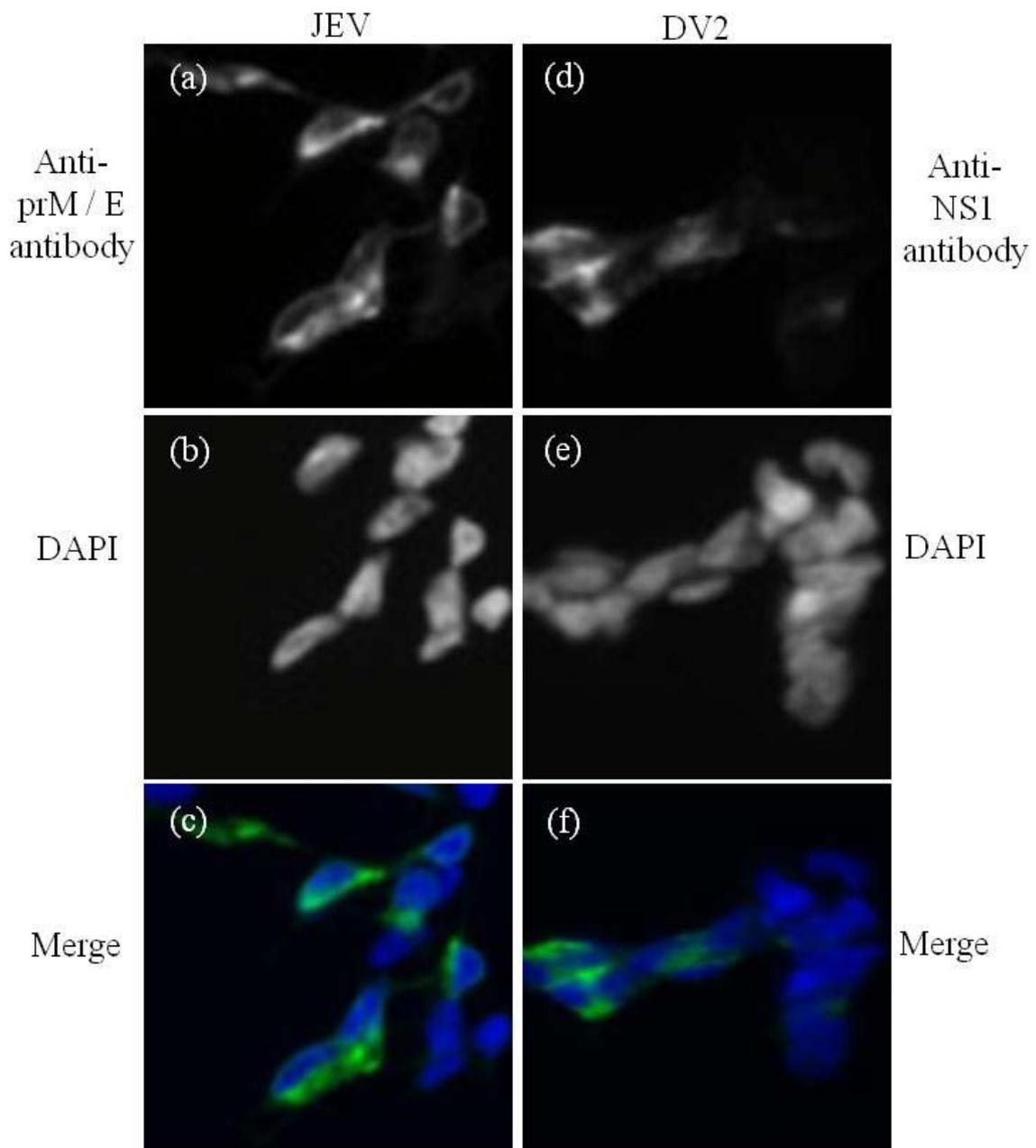
**圖十四 IMR-32 細胞以 RA 處理後之型態變化**

(A) 以十倍物鏡拍攝，(a) - (c) 為未以 RA 處理的控制組，(d) - (f) 為以 10  $\mu$ M RA 處理的 IMR-32 細胞。(a)，(d) 為處理後 24 小時；(b)，(e) 為處理後 48 小時；(c)，(f) 為處理後 72 小時。(B) 以二十倍物鏡拍攝，(a) 為未以 RA 處理的細胞，72 小時；(b) 以 10  $\mu$ M RA 處理的細胞，72 小時。



**圖十五 免疫螢光染色—登革熱與日本腦炎病毒感染以 RA 處理過之 IMR-32**

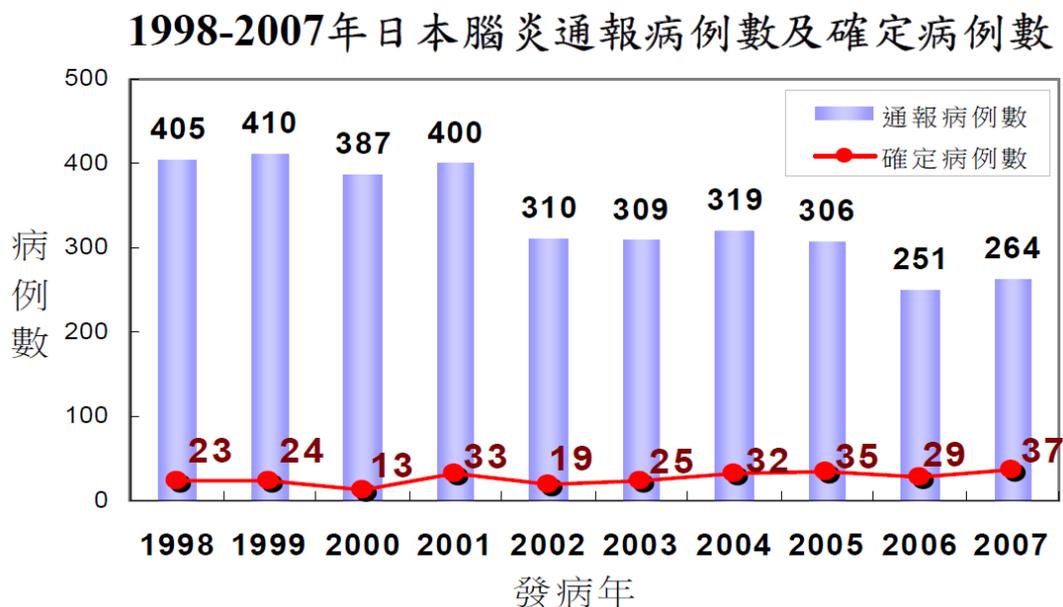
(A) - (C) 日本腦炎病毒感染的組別；(D) - (F) 登革熱病毒感染組。(A)，(D) 偵測病毒蛋白分佈位置：一級抗體分別為 anti-prM / E；anti-NS1；二級抗體為 Dylight 488 goat-anti-rabbit / mouse。(B)，(E) DAPI，細胞核。(C)，(F) 將兩個不同訊號結合在一起並套色。綠色：病毒蛋白 anti-prM / E antibody、anti-NS1 antibody；藍色：細胞核。比例尺標示 50  $\mu$ m。



圖十六 圖十五的白色框線處局部放大

(a) - (f) 分別為圖十五 (A) - (F) 的白色框線處局部放大。

附表一 行政院衛生署疾管局統計 1998-2007 年日本腦炎通報病例數及確定病例數



附表二 行政院衛生署疾管局統計 2007-2010 年日本腦炎通報確定病例數



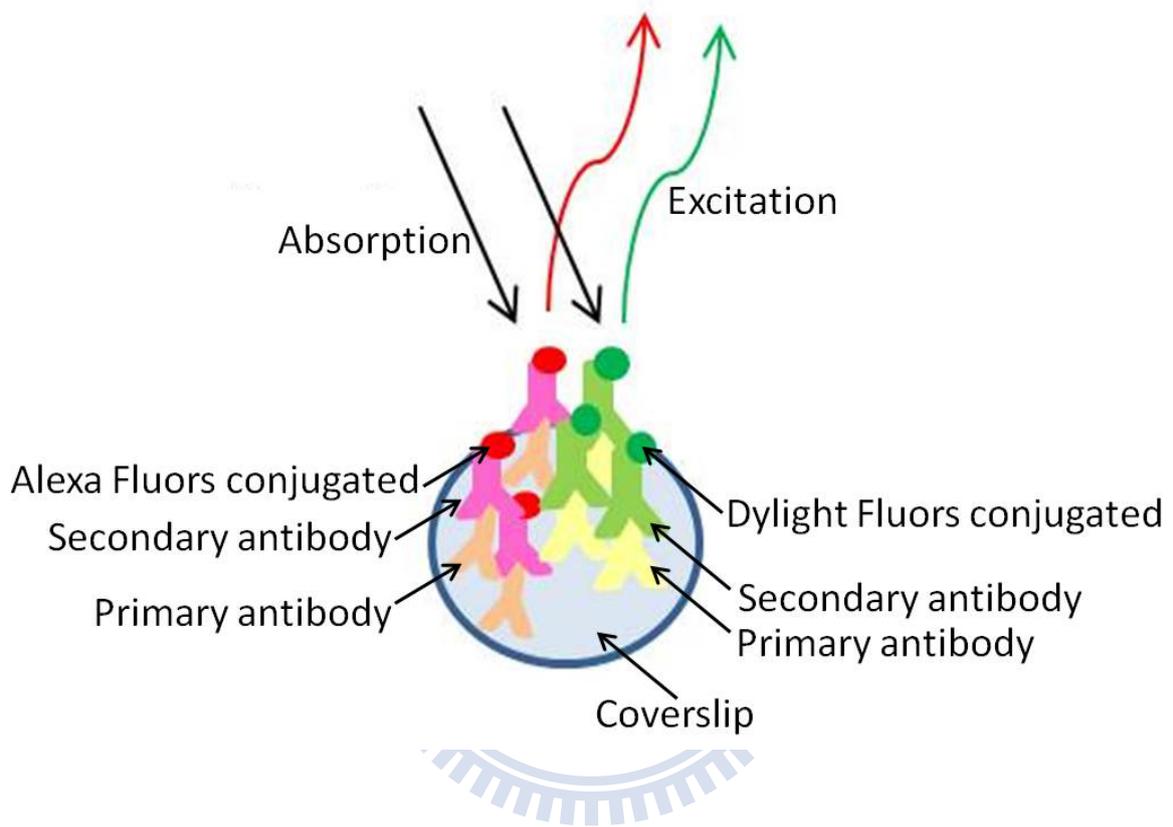
資料來源：疾病管制局 Taiwan CDC 2011/1/11

附表三 行政院衛生署疾管局統計 2007-2010 年登革熱通報確定病例數



資料來源：疾病管制局 Taiwan CDC 2011/1/11





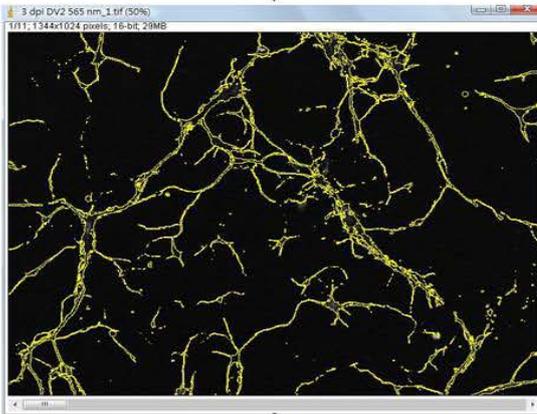
附圖一 免疫螢光染色示意圖



Set threshold of TUJ1 pictures



Create selection and restore selection on picture of viral signal



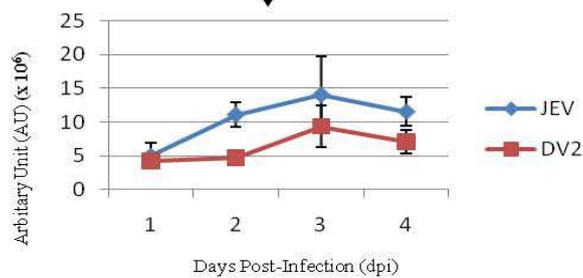
Analyze and measurement

File	Edit	Font	Area	Mean	Min	Max	IntDen
1			76340	130.547	113	414	9965920

File	Edit	Font	Area	Mean	Min	Max	IntDen
1			76340	130.547	113	414	9965920
2			73674	127.639	112	525	9403667
3			61301	128.140	112	503	7855092.000
4			51161	132.252	112	2761	6766147
5			58771	126.924	113	249	7459455



Statistics and make the chart



附圖二 病毒螢光強度分析流程示意圖