

摘要

登革熱病毒屬於黃病毒科，主要藉由蚊蟲叮咬人類傳播。感染登革熱病毒可能造成的病症，輕則類似感冒症狀，重則導致出血性或休克性登革熱。先前許多研究提出假說解釋致病的分子機制，但仍無法完整解釋病毒致病的分子機制。於是選擇較易受登革熱病毒感染初級上皮細胞作為研究材料，以微陣列技術分析細胞受登革熱病毒感染後基因表現型態。相較於內皮細胞，上皮細胞明顯有許多調控血管通透性的因子被活化，且調控細胞間隙完整性的蛋白表現量降低。為探討上皮細胞受登革熱病毒感染後對內皮細胞所造成的影響，於是收取感染過上皮細胞的培養液培養內皮細胞，發現內皮細胞中調控細胞通透性的緊密間隙蛋白 occludin 表現量降低。因此推測上皮細胞受登革熱病毒感染後，藉由調控細胞通透性的因子，改變血管內皮細胞的通透性，使病毒較易通過內皮細胞層，進而使在上皮細胞層複製出來的大量病毒進入血液循環系統中，造成嚴重系統性感染。



Abstract

The Dengue virus (DV) belongs to the family of *Flaviviridae*, and is transmitted by mosquitoes. The infections of DV causes a wide spectrum of disease manifestation, ranging from asymptomatic infection to typical dengue fever (DF), and life-threatening situations characterized by dengue hemorrhagic fever (DHF) or dengue shock syndrome (DSS). Although accumulated studies have proposed various projected mechanisms to explain the development of DHF and DSS, the actual molecular mechanism underlying the transmission of DV in a patient from local to systemic infection is still remained unclear. Using cDNA microarray analysis of a primary epithelium, I investigated the global cellular responses over the time course of DV infection. The array data were analyzed in depth with various newly developed analysis tools. Interestingly, we found that many cellular factors involving in regulation of cell permeability were significantly induced, raising a possibility that epithelium might affect the permeability change of the neighboring endothelium. To test this idea, I treated the endothelial cells with conditioned medium of epithelial cells infected with DV. The protein level of tight junction-associated protein, occludin, was found repressed by the factors released into the medium. Together, these results suggest that DV infection of epithelium might affect the permeability of the neighboring endothelium to promote the systemic transmission.

誌 謝

感謝莊志立老師與楊昀良老師在實驗與論文上的指導，在學習的過程中耐心地教導我、鼓勵我，讓我在短短兩年中獲益很多；口試承蒙林宜玲老師及岳嶽老師，給予很好的寶貴意見，使論文得以完善，於此深表感謝；謝謝中研院生醫所王寧老師提供珍貴的細胞，使論文得以順利進行。

感謝莊老師實驗室及楊老師實驗室的學長姐、同學和學弟妹們的關心與照顧，因為你們，使得我的研究生生活更加快樂和充實，最後，感謝家人為我默默付出並給予我鼓勵。



目 錄

中文摘要	i	
英文摘要	ii	
誌謝	iii	
目錄	iv	
表目錄	Vi	
圖目錄	Vii	
附表圖目錄	iX	
壹、	緒論	1
1.1	登革熱病毒簡介	1
1.2	DHF/DSS 的致病機制	1
1.3	利用 cDNA 微陣列技術探討病毒與宿主細胞間的交互作用	3
1.4	研究動機和策略	4
貳、	材料與方法	5
2.1	細胞株與病毒	5
2.2	引子	5
2.3	質體	5
2.4	初級細胞及細胞株培養	6
2.5	登革熱病毒之增殖	6
2.6	噬菌斑試驗測定病毒效價及病毒失活作用	7
2.7	上皮細胞和內皮細胞感染及細胞 RNA 萃取	7
2.8	反轉錄聚合酶連鎖反應	8
2.9	即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應	8
2.10	雙色微陣列實驗及資料標準化	9

2.11	微陣列資料分析.....	10
2.12	條件化培養液培養 ECV304 內皮細胞.....	11
2.13	西方點墨法.....	11
2.14	DNA 轉染.....	12
參、	結果.....	13
3.1	微陣列技術資料分析.....	13
3.2	利用即時定量反轉錄聚合酶鏈鎖反應技術驗證微陣列結果.....	20
3.3	D2V 可在 NPC-TW06 及 ECV304 細胞株中進行感染與複製過程.....	21
3.4	上皮細胞受 D2V 感染後會釋放某些因子影響鄰近的內皮細胞.....	21
3.5	上皮細胞感染 D2V 後對內皮細胞可能造成細胞通透性改變的影響並非由單一 D2V 病毒蛋白所調控.....	22
肆、	討論.....	24
參考文獻	29



表目錄

表一、驗證微陣列資料所使用的引子及探針·····	33
表二、參與在第一型態分群正向調節細胞計畫性死亡功能叢集的基因·····	34
表三、參與在第二型態分群的基因·····	35
表四、參與在第三型態分群的基因·····	36
表五、參與在第四型態分群的基因·····	37
表六、參與在第五型態分群的基因·····	38
表七、參與在第六型態分群的基因·····	39
表八、參與在第七、八、九型態分群脂肪酸代謝功能叢集的基因·····	40
表九、參與在細胞型態組成相關細項功能分群的基因·····	41
表十、探討登革熱病毒感染改變細胞通透性或調控病症嚴重程度的文獻·····	42
表十一、調控細胞通透性相關因子中，參與在調控細胞附著性及免疫反應作用的 基因·····	43
表十二、上皮細胞感染登革熱病毒後，細胞間隙蛋白分群中表現量降低的 基因·····	44

圖目錄

圖 1a. 細胞受D2V感染不同時間點後，顯著增加表現及顯著降低表現的基因 個數.....	45
圖 1b. 顯著差異表現基因在感染不同時間點後基因表現趨勢分群.....	45
圖 2a. 第一功能分群在 GO 分類系統中層階性功能分群及其 P 值.....	46
圖 2b. 參與正向調控細胞計畫性死亡的顯著表現基因在生物途徑上的作用位置.....	46
圖 3a. 第二功能分群在GO分類系統中層階性功能分群及其P值.....	47
圖 3b. 參與急性反應的顯著表現基因在生物途徑上的作用位置.....	47
圖 4. 第三功能分群在GO分類系統中層階性功能分群及其P值.....	48
圖 5. 第四功能分群在GO分類系統中層階性功能分群及其P值.....	49
圖 6. 第五功能分群在GO分類系統中層階性功能分群及其P值.....	50
圖 7. 第六功能分群在GO分類系統中層階性功能分群及其P值.....	51
圖 8. 第八、九、十功能分群在GO分類系統中層階性功能分群及其P值.....	52
圖 9-1. 顯著差異基因在感染不同時間點後所參與的生物途徑.....	53
圖 9-2. 參與在 viral genome replication 功能叢集中顯著表現基因及其表現 模式.....	54
圖 9-3. 參與在 calcium-mediated signaling 功能叢集中顯著表現基因及其表現 模式.....	55
圖 9-4. 參與在 endosome transport 功能叢集中顯著表現基因及其表現模式.....	56
圖 9-5. 參與在 regulation of G-protein coupled receptor proteins 功能叢集中 顯著表現基因及其表現模式.....	57
圖 9-6. 參與在 cellular morphogenesis 功能叢集中顯著表現基因及其表現 模式.....	58
圖 9-7. 參與在 GTPase activity 功能叢集中顯著表現基因及其表現模式.....	59

圖 9-8. 參與在 microtubule-based movement 功能叢集中的顯著表現基因及其表現模式.....	60
圖 9-9. 參與在 symbiotic interaction between host and other organism 功能叢集中顯著表現基因及其表現模式.....	61
圖 10a. 在初級上皮和血管內皮細胞受 D2V 感染後，可能調控細胞通透性改變的顯著差異表現基因.....	62
圖 10b. 11 個共同在初級上皮及血管內皮細胞顯著差異表現的出血致病相關基因.....	62
圖 10c. 在初級上皮細胞中調控細胞通透性改變的顯著差異表現基因 cluster ID 及名稱.....	62
圖 11. 利用 GO 分類系統中 cellular component 分類細項將顯著差異表現基因進行分析後得與 cell junction 相關的基因功能叢集顯著表現.....	63
圖 12. 利用即時定量反轉錄聚合酶鏈鎖反應技術測得基因表現量趨勢與微陣列資料趨勢相符，藉以確立微陣列技術的可信度及再現性.....	64
圖 13a. 利用辨識 D2V NS3 正股的引子進行 PCR，藉以確認 D2V 在感染過程中進入細胞作用.....	65
圖 13b. 利用辨識 D2V NS3 負股的引子進行 PCR，藉以確認 D2V 進入細胞後進行複製過程.....	65
圖 14a. 上皮細胞受 D2V 感染不同時間點後其培養液對內皮細胞 junction protein (occludin) 的響.....	66
圖 14b. 上皮細胞受 D2V 感染不同病毒效價後其培養液對內皮細胞 junction protein (occludin) 的影響.....	66
圖 15a. 可能調控細胞通透性改變的基因 PAI-2 在 D2V 感染或過度表現不同病毒蛋白於上皮細胞後較早期時間點(4/8/12 hr) 的表現趨勢.....	67
圖 15b. 可能調控細胞通透性改變的基因 PAI-2 在 D2V 感染或過度表現不同病毒蛋白於上皮細胞後較早期時間點(4/8/12 hr) 的表現趨勢.....	67

附圖目錄

附圖 1. 登革熱病毒基因體組成結構·····	68
附圖 2. 登革熱病毒複製週期·····	69
附圖 3. 細胞受細菌或病毒入侵所產生免疫反應防禦機制·····	70
附圖 4. Microarray image and scatter plot of microarray data·····	71



壹、緒論

1.1 登革熱病毒簡介

登革熱病毒(Dengue virus; DV)在分類學上屬於黃病毒科(*Flaviviridae*)中的黃病毒屬(*flavivirus*)，是造成全球分布最廣、發病人數最多的節肢動物媒介病毒。傳播方式主要藉由埃及斑蚊(*Aedes aegypti*)及白線斑蚊(*Aedes albopictus*)這兩種病媒蚊叮咬感染而造成病症，由於病媒蚊所活動的區域範圍介於南緯 30 度到北緯 30 度間，全球約 40%的人口暴露在易遭受 DV 感染的環境威脅下，發病的案例極高。DV 結構為一具醣蛋白外膜的正二十面體(icosahedron)，基因體組成為一單股正性 RNA(附圖一)，核酸序列長度為 10.7kb，在 5' 端具有 cap 結構，而 3' 端無 polyA 序列。轉譯後勝肽鍊(polypeptide)可切割成三個結構蛋白(structural proteins)，包括鞘蛋白(C, capsid)、前驅基質蛋白(prM; premembrane)及套膜蛋白(E, envelope)和七個非結構性蛋白(nonstructural proteins)，NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5。病毒顆粒(virion)藉由內胞飲作用(endocytosis)進入宿主細胞後，即開始製造病毒蛋白，完成後便合成新的負股 RNA 及複製正股 RNA。新合成的病毒 RNA 及結構性蛋白進到內質網(endoplasmic reticulum; ER)內腔，包覆成內體囊泡(endosome)，藉胞泌作用(exocytosis)將病毒顆粒釋放到細胞外(附圖二)(Leysen, De Clercq et al. 2000; Kuhn, Zhang et al. 2002)。

DV 依其不同抗原性可區分為四種血清型，分別是 D1V、D2V、D3V 和 D4V，這四種不同血清型具有相似的臨床症狀及區域性分布。病症從輕微類似感冒症狀的登革熱(dengue fever; DF)到對生命具威脅性的出血性/休克性症候群(dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome; DHF/DSS)都可能發生。DHF/DSS 為登革熱病毒致死的主要原因。DHF 主要病徵為微血管通透性(capillary permeability)增加，導致血漿蛋白滲出(plasma leakage)血管外，造成临床上呈現血球濃縮(hemoconcentration)、血小板減少(thrombocytopenia, platelet $<100000/\text{mm}^3$)的現象。當血漿滲出液的量很多時，則會引起低血溶性的休克(hypovolemic shock)，這種休克即為 DSS。

1.2 DHF/DSS 的致病機制

儘管已有眾多學者對 DV 感染所導致病症的嚴重程度進行研究，但對於作用機制仍未全盤了解。目前，有幾種假說，包括病毒的毒力、抗體依賴性增強作用(antibody-dependent enhancement)、免疫增強作用(immune enhancement)、免疫複合體(immune complex)活化補體

(complement)等幾種推論(Raghupathy, Chaturvedi et al. 1998)。首先是病毒的毒力方面，以病毒的複製能力、病毒血症時間長短及血中病毒的量、造成疾病嚴重程度、造成流行的能力來評估，由於不同型(serotype)或同型不同品系(strain)的毒力不同，因此毒力較強的病毒會造成較嚴重的病症(Vaughn, Green et al. 1997)。第二種假說為抗體依賴性增強作用(Halstead 1992)，認為在第一次感染所產生抗體，在第二次受不同型感染時並不能中和病毒，反而使DV透過其抗體的Fc部分與單核球(monocyte)或巨噬細胞(macrophage)的Fc受器(FcR)結合，進而提高病毒進入宿主細胞的機率，使更多的病毒產生，導致DHF/DSS的發生。因此，若懷孕婦女感染登革熱，則會將其抗體經由胎盤傳給胎兒，嬰兒在感染初期抗體的量尚足夠中和病毒，但八個月大的嬰兒，體內來自母體的抗體效價降低不但不能中和病毒，反而增加病毒感染力(Kliks, Nimmanitya et al. 1988)。第三種假說為免疫增強作用，即宿主細胞遭受第二次不同型DV感染會誘發初次感染的免疫力而導致細胞激素(cytokines)大量表現，但失去控制進而造成嚴重病症(Bukowski, Kurane et al. 1989; Gagnon, Ennis et al. 1999)。在細胞激素的研究當中指出，輕微症狀的DF病患身上，其體內所釋放的細胞激素主要由 T_H1 細胞分泌，包括 interferon-gamma($IFN-\gamma$), interleukin-2 (IL-2) and tumor necrosis factor- α (TNF- α)；但在嚴重病徵的DHF/DSS病人體內所表現的細胞激素為 T_H2 所釋放的IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, and IL-13。在 T_H1 與 T_H2 所釋放的細胞激素中，扮演主要調控角色的細胞激素分別為IL-10和 $IFN-\gamma$ (Raghupathy, Chaturvedi et al. 1998)。除此之外，研究也指出初次感染登革熱第一型病毒的單核球會釋放IL-1、TNF- α 、interferon- α ($IFN-\alpha$)，若第二次感染登革熱第二型病毒，則 $IFN-\alpha$ 會大量表現，促進單核吞噬細胞合成及釋放一氧化氮(NO)，而NO可以促進血管擴張。另外，DV也會促進單核球細胞產生血小板活化因子(platelet-activating factor)、thromboxane B2、prostaglandin D2，尤其是二次感染時，血小板活化因子表現量更是顯著(Kim, Hayashi et al. 2003)。其作用為活化血小板，進而影響內皮細胞的功能，導致血小板量降低及血管通透性增大。第四種假說是由Dr. Rosen提出，當二次感染時，免疫複合體會活化補體系統相關因子(eg. C3a和C5a)，這也和病症的嚴重程度有很大的關係(Kuberski, Rosen et al. 1977; Malasit 1987; Srichaikul and Nimmannitya 2000)。最後一種假說為不正常的免疫過度反應假說(aberrant immune responses)，免疫細胞早期活化的標幟CD69表現、CD4/CD8比例下降、細胞

激素過度產生、辨識血小板及抗內皮細胞自體抗體存在，顯示淋巴系統的過度活化反應可能是造成出血性最早的一個主因(Green, Pichyangkul et al. 1999; Liu, Huang et al. 2002)。綜觀以上各種假說，可推知二次感染所造成嚴重性病症的機制很可能與細胞免疫反應有關。然而，DHF/DSS嚴重的病徵在初次感染的情況下亦會發生，且許多病人在受二次感染時，血中病毒的含量較初次感染時的低(Chen and Wang 2002)。所以，在初次DV感染情況下，導致較嚴重病症的機制仍值得探討。

1.3 利用cDNA微陣列技術探討登革熱病毒與宿主細胞間的交互作用

近年來，已有許多研究探討DV感染宿主細胞後，細胞與病毒間複雜相互調控關係。在先前以微陣列技術分析DV感染細胞研究中，血管內皮細胞受D2V感染後，一些作用機制會產生變化，如細胞凋亡、RANTES和IL-8等細胞激素產量增加，此外，NF- κ B訊號傳遞途徑活化、補體系統活化、傷口癒合、調節細胞週期、抗病毒生物途徑及細胞骨架結構等作用也受調控(Warke, Xhaja et al. 2003; Liew and Chow 2006)。基因programmed cell death 8(PCDC8)、receptor-interacting serine-threonine kinase 3(RIPK3)、tumor necrosis factor superfamily member 6(TNFSF6)、TGF-beta receptor-interacting protein(TRIP)、抑制細胞凋亡的human inhibitor of apoptosis (h-IAP1)活化表現；造成染色體濃縮、DNA斷裂的PDCD8/AIF表現降低，抑制cytochrome c調控caspase訊號傳遞途徑的heat shock protein 27(GSP27)，對細胞凋亡或存活扮演重要決定角色。phospholipid scramblase 1(PLSCR1)藉由將phosphatidylserine易位來調控補體系統活化作用。MAD3基因表現在細胞週期中的S-phase，作用為調控細胞有絲分裂anaphase初始化的關卡，使細胞複製過程無法進行。此基因表現可能作用為停止已受感染的細胞複製生長，最後自行凋亡。Actin的組成在細胞感染後有顯著受調控的變化。巨噬細胞為DV主要感染宿主之一，同樣以微陣列基因晶片方式分析，可觀察到感染後短時間內就會釋放免疫反應相關調控因子，如細胞激素(cytokines)、細胞附著(cell adhesion)分子及趨化因子(chemokines)等。這些因子的表現決定DV對細胞迫害的嚴重程度(Moreno-Altamirano, Romano et al. 2004)。利用微陣列技術分析下，可觀察到上述細胞與病毒間相互調控關係及一些與病毒造成病症嚴重程度的因子，另外，從一些臨床病人體內或直接

體外感染內皮細胞的實驗中，仍可發現一些其他會影響病症嚴重程度的因子。如病人血清中一氧化氮含量(Trairatvorakul, Chongsrisawat et al. 2005)、TNF- α (Cardier, Marino et al. 2005)、IL-6、tissue plasminogen activator(Huang, Lei et al. 2003)表現量及細胞中NF- κ B、IL-8表現量(Bosch, Xhaja et al. 2002)多寡等因素。

1.4 研究動機和策略

由於登革熱目前缺乏良好的動物模式(animal model)且檢體取得具高風險性(Avirutnan, Malasit et al. 1998)，故一般實驗以細胞培養(cell culture)方式進行，多以血管內皮細胞(e.g. human umbilical vein endothelial cell; HUVEC)為主要探討模式。然而，在感染登革熱病毒後出現較嚴重病症的病人身上，並無證據顯示其血管內皮細胞遭受感染或破壞，顯示內皮細胞雖是血管通透性增加時受改變的第一線，但這影響可能並非源自DV直接感染複製所造成，因此，受DV感染後血管內皮細胞通透性增加的情況，可能是受其鄰近細胞遭感染後產生反應所導致的影響(Carr, Hocking et al. 2003)。另外，研究指出，在DV感染不同型態細胞過程中，以相同細胞數量進行感染，發現上皮細胞被感染的比例較其他型態細胞高，顯示上皮細胞對DV的接受度高(high susceptibility) (Diamond, Edgil et al. 2000)。

基於上述理由，本論文選取與活體組織相近的初級上皮細胞(primary normal nasopharyngeal cells)進行研究。由於細胞在受感染後，基因的表現不會維持相同的反應，因此，實驗設計著眼於DV感染細胞不同時間點後，觀察其對宿主細胞的影響。又為了探討DV對細胞直接的作用影響，選擇感染較短時間點來作觀察。另外，為了研究細胞受感染後基因層次上的表現，藉由微陣列(microarray)技術，經資料整合分析，從龐大的基因資料庫中有效地挑選出受調控的基因，對基因表現變化作統合性的觀察，並深入探討基因受DV感染後造成的影響，進而推演出對上皮細胞本身或其鄰近細胞(eg. 內皮細胞)可能作用的機轉。本研究發現，上皮細胞受感染後可能會釋放調控血管通透性的因子，改變內皮細胞間隙相關的蛋白表現量降低。推測這樣的現象會使影響通透性的分子或病毒較易通過上皮細胞層進到內皮細胞，進一步改變內皮細胞及組織通透性，局部性導致大量病毒通過血管細胞層，傳播至血液循環系統中，最後造成全身性感染。

貳、材料與方法

2.1 細胞株與病毒

1. NPN001(primary normal nasopharyngeal cells), 人類正常初級鼻咽細胞
2. HUVEC(human umbilical vein endothelial cells), 人類臍靜脈初級內皮細胞
3. NPC-TW06, 人類鼻咽上皮細胞株
4. ECV304, 人類臍靜脈內皮細胞株
5. BHK-21(baby hamster kidney cells), 幼小倉鼠腎臟纖維母細胞
6. D2V, 台灣小琉球分離出之病毒株 PL046

2.2 引子

引子	序列(5'~3')
NS3F	CGGGAGATTGTGGACCTAATGTGTC
NS3R	TGTCCAGAACTCCACGAACGTTTCAG
D2F4522	GCTGGAGTATTGTGGGATGTCCC
D2R5550	CGAACGTTTCAGGGATTTCTCTTTCTT
PAI2-F	AATCTAAATGGGCATGATCC
PAI2-R	CTCACCCCTAAAATAAGCGT
Co14a6F	AGAGGTCAGCACACAT
Co14a6R	GCTTTACTTTGAACCAGGC

2.3 質體

質體名稱	特性	來源
D2NS12388-3477/pCR3.1	pCR3.1 上帶有 D2 NGC strain NS1 sequence 及 flag tag	中研院生醫所林宜玲老師實驗室(constructor:李乾彰)
D2-NS3-pCR3.1	pCR3.1 上帶有 D2 NGC strain NS3 sequence 及 flag tag	中研院生醫所林宜玲老師實驗室(constructor:孫貽菁)
D2 NGC NS5-flag-pCR3.1	pCR3.1 上帶有 D2 NGC strain NS5 sequence 及 flag tag	中研院生醫所林宜玲老師實驗室(constructor:陳奕丞)
pCDNA3-NS2A	pCDNA3 上帶有 D2 NGC strain NS2A sequence 及 HA3/His6 tag	交通大學楊昀良老師實驗室(constructor:楊馥嘉)
pCDNA3-NS2B	pCDNA3 上帶有 D2 NGC strain NS2B	交通大學楊昀良老師實驗室

	sequence 及 HA3/His6 tag	(constructor:楊馥嘉)
pCDNA3-NS4A	pCDNA3 上帶有 D2 NGC strain NS4A sequence 及 HA3/His6 tag	交通大學楊昀良老師實驗室 (constructor:楊馥嘉)
pCDNA3-NS4B	pCDNA3 上帶有 D2 NGC strain NS4B sequence 及 HA3/His6 tag	交通大學楊昀良老師實驗室 (constructor:楊馥嘉)

2.4 初級細胞及細胞株培養(Primary cell and cell lines culture)

初級鼻咽上皮細胞自正常女性鼻腔取出後，放置細胞於事先以膠原蛋白處理過之T75 培養盤 (collagen-coated plate)，培養於不含血清的keratinocyte medium(Gibco)，置於 37°C 的 5% CO₂ 培養箱中培養。當細胞生長近約七至八成滿時，將培養盤取出，抽去培養液，以 5 ml PBS清洗一次，再以 2 ml Trypsin-EDTA溶液打散細胞，取出後置於 15 ml 離心管，加入 8 ml 的培養液中和Trypsin-EDTA的作用，以 1000 rpm(Beckman Allegra™ 6R centrifuge)離心 5 分鐘兩次後，加入 15 ml 培養液並混合均勻後放回 37°C 的 5% CO₂恆溫培養箱中培養。在本論文中所使用的初級上皮細胞代數不超過十代以上。初級內皮血管細胞(primary human umbilical vein endothelial cells;HUVECs)是由王寧博士提供(中研院生物醫學科技研究所)。

由於初級細胞培養不易，因此在本研究中，我們採用鼻咽癌細胞株(NPC-TW06)來模擬病毒感染後細胞反應的狀態。NPC-TW06 為一從台灣鼻咽癌患者體內分離出的細胞株。培養於含 10% fetal calf serum (FCS)及penicillin (100 u/ml)/streptomycin(100 μg/ml)兩種抗生素的DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Gibco)培養液中。用於增殖病毒(virus amplification)的C6/36 cell培養於添加 10% FCS的MEM(Minimum Essential Medium; Gibco)培養液中，培養在 28°C 恆溫培養箱。BHK-21 cell應用於測定病毒效價，培養在 5% FCS的MEM培養液中，置於 37°C、5% CO₂恆溫培養箱中培養。

2.5 登革熱病毒之增殖(Dengue virus amplification)

將D2V PL046病毒株以感染率MOI(multiplicity of infection)=0.1接種於C6/36細胞中，培養於含5% FCS及penicillin/streptomycin的MEM培養液中，細胞置於28°C、5%CO₂的培養箱中培養一小時。病毒經過兩小時吸附作用後，吸去含有D2V的培養液，以PBS清洗細胞三次，再加

入含10% FCS及penicillin/ streptomycin的MEM培養液。細胞於感染後三天、六天、九天收集細胞培養液於15 ml離心管中，以轉速為1000 rpm(Beckman Allegra™ 6R centrifuge)情況下離心5分鐘，收取病毒上清液，將之通過0.22 μ m的filter(Millipore Co., Bedford, MA, USA)使細胞殘渣濾掉，最後分裝到1.5ml的ependoff中，保存於-80°C備用。

2.6 噬菌斑試驗測定病毒效價及病毒失活作用

(Virus titration by plaque assay and inactivation)

將細胞數為 3×10^5 的BHK-21細胞置入6 well細胞培養皿中，在培養箱中培養一夜後，細胞約七八分滿。將病毒以未含血清的培養液(serum-free MEM)作為稀釋液，進行十倍系列稀釋。稀釋完成後，將細胞自培養箱中取出，抽掉培養液，以未含血清的培養液清洗細胞一次後，每個well分別依序加入500 μ l已稀釋過的病毒溶液，前後左右輕晃培養盤使病毒平均分布在well裡。將培養盤放入培養箱中的shaker上慢速搖擺2小時，使病毒對細胞進行吸附作用。待吸附過程結束，每個well加入4 ml含5% FBS之MEM medium的1.1% methyl cellulose後，再放入培養箱中培養五到七天，於倒立式顯微鏡下觀察，確定溶菌斑已形成後，吸除含培養液的methyl cellulose，加入3.7% formaldehyde固定細胞15分鐘後吸去溶液，加入適量的0.5%結晶紫溶液(crystal violet)染色30分鐘後，以清水洗淨。置於室溫風乾後即可計算噬菌斑的數目，除以稀釋的倍數及體積比，即為病毒效價。單位以PFU(plaque forming unit)/ml來表示。病毒失活作用以滅菌燈管的短波UV光照射10分鐘(Anderson et al., 1997)。病毒失活後以噬菌斑試驗確定不具感染力。

2.7 上皮細胞和內皮細胞感染及細胞RNA萃取

(Infection of epithelium and endothelium and total cellular RNA extraction)

生長於培養皿上的NPN001或HUVEC單層細胞先以不含血清的培養液清洗一次，依實驗需要以MOI=2的感染率接種到細胞，於37°C感染一小時後，抽去含病毒的培養液，以PBS清洗細胞三次，再加入細胞培養液繼續培養。NPN001感染後1、2、4、8、12、36小時分別抽取細胞RNA，HUVEC感染後1、2、4小時抽取細胞RNA。細胞總RNA的抽取以RNeasy Mini Kit (QIAGEN Inc.,

Valencia, CA)進行, 抽出後的 RNA 濃度以分光光度計定量。

2.8 反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)

將數目為 1×10^5 的 NPC-TW06 細胞培養在 12 孔培養盤中, 經 24 小時培養後感染 D2V 或轉染表現不同病毒蛋白的質體, 在感染或轉染後不同時間點萃取細胞 RNA。取 $2 \mu\text{g}$ 的 total RNA 加入 oligo(dT) 引子 (Amersham Biosciences), 補 RNase-free ddH₂O (Sigma, Cat no. W4502) 至體積 $10 \mu\text{l}$, 把混合物置於 65°C 作用 5 分鐘。將 RNA/primer 結合後之混合物中加入最後濃度為 0.05 mM 的 dNTP、 0.01 M 的 DTT、 $4 \mu\text{l}$ 的 5X First-Strand Buffer、 $1 \mu\text{l}$ 之 RNaseOUT 及 $1 \mu\text{l}$ SuperScript II Reverse transcriptase (Invitrogen) 並補 RNase-free ddH₂O 至 $20 \mu\text{l}$ 。將混合物置於 42°C 進行反轉錄作用, 一小時反應時間後移至 70°C 下作用 15 分鐘, 使所有反應停止。

PCR 反應取 RT 產物 $2 \mu\text{l}$ 加入 $1 \mu\text{l}$ 之 10 mM 正反向的引子、 $1 \mu\text{l}$ 之 10 mM dNTP、 $2 \mu\text{l}$ 之 10 X Taq buffer、 $0.5 \mu\text{l}$ 之 Taq polymerase 最後加 sterile ddH₂O 至 $20 \mu\text{l}$ 。PCR 反應進行首先在 95°C 作用 5 分鐘, 接著 95°C 作用 1 分鐘, 使雙股 DNA 分離 (denature), 繼而進行引子接合作用 (annealing) 30 秒, 最後 72°C 作用 1 分鐘, 使引子延伸 (elongation), 重複 denature 到 elongation 反應 35 個週期, 最後於 72°C 作用 10 分鐘, 使 DNA 延長完整。PCR 產物以電泳分析 DNA 之大小。

2.9 即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應 (Real-time SYBR Green RT-PCR)

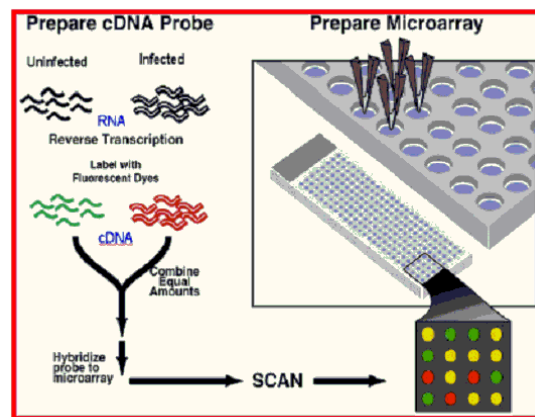
$2 \mu\text{g}$ 細胞總量 RNA 經反轉錄反應後, 利用 Universal ProbeLibrary system 以 LightCycler TaqMan Master kit (Roche Diagnostics) 進行即時定量聚合酶連鎖反應。不同的引子及其相對的探針列於表一。取對照組的 cDNA 作 1:4、1:16、1:64、1:256 系列稀釋, 作為觀察聚合酶連鎖反應效率依據。混合 $2 \mu\text{l}$ 反轉錄後的 cDNA、 $0.2 \mu\text{l}$ 濃度為 $10 \mu\text{M}$ 的正反向引子、 $0.2 \mu\text{l}$ 濃度為 $10 \mu\text{M}$ 的 Universal ProbeLibrary probe、 $4 \mu\text{l}$ 的 5X LightCycler® TaqMan® Master, 最後補水至 $20 \mu\text{l}$ 。一開始反應在 95°C 下作用 10 分鐘, 繼而在 95°C 10 秒、 60°C 30 秒、 72°C 1 秒情況下反應 45 個週期, 並在 72°C 時偵測螢光表現量, 最後在 40°C 下作用 30 秒鐘使反應停止。此實驗中選取一 housekeeping gene 作為 internal control, 在本研究中選定細胞在感染不同時間後, 基因表現量均不受調控的 collagen, type IV, alpha 6 (col4a6) 作為 internal

control。

2.10 雙色微陣列實驗及資料標準化

(cDNA Microarray hybridization and normalization)

微陣列實驗以雙色dye-swap方式進行，流程如下圖：



(<http://www.genome.gov/10000533>)

(一)cDNA microarray chip:

本實驗所使用的cDNA晶片上含46,657個cDNA clones，大約代表26000個人類基因。cDNA probe係自IMAGE(the Integrated Molecular analysis of genomes and Expression; Research Genetics, Huntsville, AL)基因庫中取得。

(二)Preparation of target:

自感染不同時間點後的初級上皮細胞及初級內皮細胞中抽出的RNA，以Agilent 2100 Bioanalyzer分析RNA是否有降解現象，確定RNA無降解現象後，取1 μ g RNA以Microarray Target Synthesis Kit (T7, Roche)進行RNA量放大作用，再以Cyscribe Post-Labeling Kit(Amersham Biosciences)將放大後的1 μ g RNA以oligo(dT)為引子反轉錄成cDNA並標定Cyanine 3-dUTP或Cyanine5-dUTP(Amersham Biosciences)。以感染0小時為對照組，標定Cyanine3-dUTP；感染1、2、4、8、12、36小時後為實驗組，標定Cyanine 5-dUTP。

(三)Prehybridization:

cDNA晶片上的probe在與target進行雜交前，先進行blocking作用(25% formamide、5X SSC、0.1% SDS、1% BSA)，在42°C下作用一小時。

(四)Hybridization:

取等量標定Cyanine3-dUTP和Cyanine 5-dUTP的target與cDNA晶片一起放入Genetac hybridization cassette在42°C下進行雜交反應至隔日。target會雜交固定在晶片上含有互補核酸序列的點。

(五)Posthybridization wash:

以2X SSC、0.1% SDS solution在42°C下震盪清洗5分鐘，再以0.1X SSC、0.1% SDS solution在室溫下震盪清洗10分鐘，在室溫下浸泡於0.1X SSC 1分鐘，以二次水和酒精沖洗過後，使用玻片離心機甩乾水分。

(六)Image scan:

以掃瞄器(Axon GenePix 4000A scanner)數位化圖檔，利用GenePix software將螢光背景值扣除，計算出紅色和綠色螢光比值。

(七)微陣列資料標準化(array data normalization):

在微陣列雙色dye-swap實驗中，利用spike-in ScoreCard (Amersham Biosciences)作為對照，可得Cy5/Cy3相對螢光強度倍數回歸線，如附圖4所示，可得螢光相對倍數為10倍(10X)、3倍(3X)、1/3倍(1/3X)、1/10倍(1/10X)的回歸線，藉由這些回歸線推算出實驗中各cDNA clone螢光強度數值，再進行數值標準化過程。首先以上述回歸線為基準，選出一套constantly expressed genes，利用統計軟體package R以robust scatter-plot smoothing regression(LOWESS)及robust median absolute deviation based scale normalization方式做出標準化曲線，各cDNA clone依此曲線對應出相對表現倍數(Parrish and Spencer 2004)。

2.11 微陣列資料分析(Array data analysis)

(一)顯著表現基因篩選標準

基因表現量經標準化後，將D2V infection/mock infection的ratio > 1.5定為表現量增加的基因(up regulation)，ratio < 0.67的基因設為表現量降低(down regulation)，ratio介於0.67~1.5間的基因視為無顯著差異表現。

(二)統計分析軟體(analysis software)

1. TreeView/Cluster(Eisen, Spellman et al. 1998):

篩選出顯著差異表現的基因後，以 text 形式儲存各基因在感染不同時間點後 Cy5/Cy3 數值，以 TreeView 軟體將表現數值取對數，輸入欲分群的數目，利用 K means 方式分析，最後以 Cluster 軟體呈現依基因型態分群後的表現圖像。

2. GenMAPP/MAPPFinder(Doniger, Salomonis et al. 2003):

此套軟體主要功能為以 P value 計算出顯著差異表現的基因參與在各生物途徑(biological process)中的相關程度，進而找出細胞受感染後，顯著受到調控的生物途徑。以 text 形式儲存各基因表現數據，上傳至 GenMAPP 軟體，設定顯著受調控基因的標準後，以 P value 計算出基因參與在各生物途徑中的顯著性。

2.12 條件化培養液培養 ECV304 內皮細胞

(ECV304 cultured with conditioned medium)

將數量為 5×10^4 的 NPC-TW06 上皮細胞種於 12-well plate 中，經過 16 小時培養，以感染率 MOI=5 感染後不同時間點(4/8/12 hpi)或不同感染率(MOI=2/5/10)感染 4 小時後，收取細胞培養液，此為條件化培養液，保存於 4°C，於一星期內進行培養內皮細胞實驗。將條件化培養液加到 ECV304 細胞培養之前，先用滅菌燈管短波長 UV 照射 30 分鐘，使可能存在條件化培養液中的病毒失活 (Anderson, Wang et al. 1997)，以確保條件化培養液對 ECV304 細胞造成的影響非來自病毒感染所致。條件化培養液與正常培養 ECV304 細胞的 DMEM 培養液以 1:1 的量混合加到 ECV304 細胞中，數量為 1×10^5 的 ECV304 細胞種於 12-well plate 中，經條件化培養液培養 48 小時後，收取細胞蛋白，進行西方點墨法，觀察上皮細胞受感染後，其所釋放的因子對內皮細胞所造成影響。

2.13 西方點墨法(Western blotting)

將培養過經病毒感染的上皮細胞(NPC-TW06)之培養液培養內皮細胞(ECV304)後，吸去培養液，以 PBS 清洗兩次，加入適量的 protein lysis buffer(50 mM Tris, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40)後以 yellow tip 尾端括取細胞，將含有細胞的 protein lysis buffer 吸到 1.5ml eppendoff 中，以 14000 rpm、4°C 狀況下離心 30 分鐘，除去細胞碎片，取上清液，此為待測濃

度蛋白質。利用 BioRad DC protein assay 以 Lowery 方式定量蛋白質濃度，取適量蛋白質檢體，加入 5X sampling buffer(60 mM Tris-HCl, 2% SDS, 25% glycerol, 14.4 mM β -mercaptoethanol, 0.1% bromphenol blue)，於 95°C 加熱 10 分鐘，再以 14000 rpm 轉速離心 3 分鐘。

依 Molecular cloning 上的配方配製 10% 分離膠體(separating gel)，凝固後接著注入 stacking gel 並插上 comb，stacking gel 凝固後，拔去 comb，將做好的膠體裝置於電泳槽中，並加入 1 倍 SDS 電泳溶液，將處理過的蛋白質檢體及 3 μ l pre-stained protein marker(BioRad) 小心注入樣品槽中，以 100 mV 進行電泳反應。電泳完成後，將凝膠於 150 mA、兩小時條件下，將蛋白質自膠體轉漬至硝化纖維膜(Immobilon-P membrane, Cat no. IPVH00010, Millipore)，蛋白纖維膜置於填充緩衝液(blocking buffer; 5% BSA 溶於 PBS)中，在室溫下搖晃 1 小時。之後以 PBS-Tween 20 清洗蛋白纖維膜 4 次，放入專一辨識 occludin 蛋白的一級抗體溶液，4°C 下搖晃至隔天。隔天取出以 PBS-Tween 20 清洗 4 次，加入二級抗體溶液於室溫下作用一小時，PBS-Tween 20 清洗 4 次。以 Western lighting kit(ECL kit, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc.) 呈色，用 X-ray film(Kodak) 壓片。實驗中所使用的專一辨識 occludin 蛋白抗體來自 Zymed Lab. (Cat no. 50698945)。

2.14 DNA 轉染(transfection)

將表現不同病毒蛋白的質體轉染到細胞中的過程是利用 Lipofectamine reagent(Invitrogen) 進行。1 μ g 的 DNA、3 μ l Plus™ Reagent(Cat no. 11514-015, Invitrogen) 補不含血清的 DMEM 至 25 μ l 混合，3 μ l Lipofectamine Reagent 加不含血清的 DMEM 至 25 μ l 混合，分別在室溫下混合 15 分鐘後，將 DNA 混合物與 Lipofectamine 混合物混合於 1.5 ml eppendoff 中後，於室溫下作用 15 分鐘，加入 200 μ l 不含血清的 DMEM，將全部體積為 250 μ l 的混合物加到種於 12-well plate 的細胞中，加入前細胞先以 PBS 清洗兩次。經過五小時作用後，加入 1ml 含 10% FCS 的 DMEM 繼續培養細胞，經不同培養時間後，收取細胞 RNA，進行 RT-PCR 反應。實驗中以轉染表現 GFP 質體(green fluorescent protein) 為轉染效率依據。

參、結果

3.1 微陣列技術資料分析(Microarray profile analysis)

3.1.1 以DAVID website、Cluster、TreeView軟體進行綜觀性微陣資料分析

RNA分別自受感染或感染0小時(mock infection)的細胞內抽出，利用反轉錄的方法將其轉成cDNA，之後將螢光染劑Cy5或Cy3標定在cDNA上，藉由雜交到晶片上的螢光所呈現出紅、綠、黃不同顏色深淺，將之量化後，來判讀基因表現量。表現量原始值利用Terence P. Speed等人研究的方法(Irizarry, Hobbs et al. 2003)經校正(normalize)不同次實驗所產生的誤差後，將表現量於感染0小時(mock infection)差異1.5倍以上的基因定為顯著差異表現(significant expression)。依此條件找出表現量增加(up-regulated)基因共389個(infection/mock infection ratio > 1.5);同樣地，表現量下降的基因(down-regulated)共528個(infection/mock infection ratio < 0.67)。基因在D2V感染1hr、2hr、4hr、8hr、12hr、36hr各時間點後(1/2/4/8/12/36 hpi)，up-regulated和down-regulated的基因個數如圖1a所示。在down-regulated基因中，感染後期(8、12、36 hpi)較多表現顯著差異的基因受病毒進入細胞產生作用而被調控。

在感染後不同時間點的實驗中，以基因表現量差異1.5倍以上做標準，只要任一時間點基因有顯著差異表現者，即挑出以群集分析軟體(Cluster和Tree View)依細胞在DV感染不同時間點後基因表現趨勢進行叢集分群(function group)。依基因在各時間點上表現型態分群後，藉由DAVID website (<http://david.niaid.nih.gov/david/>)以gene ontology(GO)分類系統中生物途徑細項分類方式將基因進行功能及性質上分類後，以樹狀分層層階level 5為標準，找出各表現型態基因所參與的生物途徑。圖1b中，橫軸表每一基因在感染不同時間點後的基因表現量，紅色越深代表基因表現量越高；綠色越深表基因表現量越低。依感染後不同時間點基因的表現型態共分十群，表現量增加的基因概括性可分成兩群，一群為基因在病毒感染後較早時間點就受活化表現(圖1b中group I 和group II)，顯著表現的功能群有正向調節細胞死亡及急性反應；另一群為基因在感染後較晚時間點才顯著表現(圖1b中group III 和group IV)，基因所參與的功能群有細胞內蛋白質運輸及免疫反應。表現量降低的基因同樣可略分兩大群，一群為基因在病毒感染後較早時間點就受抑制(圖1b中group VI)，顯著表現功能群為卟啉代謝(porphyrin metabolism)；另一群為基因在感染後較晚時間點表現量降低(圖1b中group V、group VII、group VIII、group IX、group

X)，基因參與的功能群為細胞週期調節作用及脂肪酸代謝。各分群基因表現模式及所參與的調控作用如下：

第一型態分群(group 1):

基因表達模式為感染初期表現量高(特別是 2 hpi)，之後隨感染後時間點增加而遞減，最後回復到基準表現量(basal level)或低於 mock infection 基因表現量。在此分群中，顯著表現的功能叢集為正向調節細胞計畫性死亡(positive regulation of programmed cell death)，P 值為 0.01208，在 GO 分類系統中功能層階性分群如圖 2a，參與的基因如表二。TNFR 與 TNF 結合後，會引發一連串 caspase 相關訊息傳遞，最後導致細胞凋亡(Gupta et al. 2005)。IGFBP3 和 TIMP3 則受 p53 基因調控而活化表現。(圖 2b)。

第二型態分群(group 2):

基因在感染不同時間點上，呈現的趨勢型態與第一分群類似。但此分群基因表現量在較早感染時間點(8、12、36 hpi)就回復到基準表現量或低於 mock infection 基因表現量。此分群中顯著表現的功能分群有急性反應(acute-phase response)、細胞週期調節作用(regulation of cell cycle)及正向調控訊息傳遞(positive regulation of signal transduction)。這三群功能分群的 P 值分別為 0.00898、0.01499、0.04018。在 GO 分類系統中功能層階性分群如圖 3a，參與在最俱顯著差異表現的急性反應功能群中的基因包含補體系統(complement pathway)中 complement component 1r(C1r)和 complement component 4B(C4a)(圖 3b)以及與傷口癒合相關的基因 fibronectin 1(FN1)。補體系統除了在急性反應情況下被活化，在 DV 感染後造成較嚴重症狀的出血性或休克性反應中亦受調控增加表現(Malasit 1987; Avirutnan, Malasit et al. 1998; Srichaikul and Nimmannitya 2000)。同樣地，FN1 除了參與急性反應作用外，亦在凝血與溶血反應(coagulation/fibrinolysis)系統中扮演重要調控角色，而凝血與溶血系統間的作用平衡及表現強度與 DV 造成症狀的嚴重度有密切相關性(Kabra, Jain et al. 1999; Huang, Liu et al. 2001)，所以 FN1 亦參與在 DV 感染後調控細胞造成通透性改變的相關機制中。參與細胞週期調節作用的基因如表三所示。VEGF 除了在 regulation of cell cycle 中扮演調控角色外，亦調控血管通透性增加、血管新生、內皮細胞生長、促進細胞轉移、抑制細胞凋亡等功能。其

中，血管通透性增加的調控作用可能與 DV 感染造成細胞出血性相關病症的嚴重程度有重要關聯性。參與正向調控訊息傳遞的基因為 CXXC5、MAP3K3、VEGF(表三)。

第三型態分群(group 3):

此型態分群在時間點上的表現模式為一開始基因表現量低於 mock infection 或不受感染影響，直到感染時間點為 8 hpi 時基因達最高表現量，之後，隨感染後時間增加而遞減(12/36 hpi)。雖為遞減趨勢，但在 36 hpi 基因表現量仍高於基準表現量。顯著表現的功能群有細胞內蛋白質運輸(intracellular protein transport)、硫化物合成(sulfur compound biosynthesis)及碳酸和胺基酸代謝(Carboxylic acid and amino acid metabolism)相關途徑。這四群功能分群的 P 值分別為 0.01136、0.01138、0.03731、0.04162。在 GO 分類系統中功能層階性分群如圖 4，參與在細胞內蛋白質運輸、硫化物合成、碳酸代謝作用、胺基酸代謝功能分群的基因列於表四。具蛋白質運輸功能的基因群中，基因 CSE1L 與 KPNA6 的角色主要為運送蛋白質至細胞核內；基因 SSR1 功能為調節蛋白到 ER 上的運輸；基因 SNX1 與外泌作用中囊泡附著到細胞膜(vesicle docking)的過程相關。



第四型態分群(group 4):

基因表現量趨勢一開始為表現量下降或基準表現量，隨著時間表現量漸漸增高，到 36 hpi 達最高基因表現量。此功能分群表現趨勢與第二型態分群表現模式呈相反狀態。顯著表現的功能分群有免疫反應(immune response)、原生質膜組成與生物合成(plasma membrane organization and biogenesis)、外物入侵感受作用(response to pest、pathogen or parasite)。P 值分別為 0.00745、0.01653、0.01991。在 GO 分類系統中層階性分群如圖 5，大部分參與在免疫反應功能群的基因與 IFN 相關。這三群顯著表現的功能群中，基因 OAS1、MX1、PLSCR1 不僅在上皮細胞受感染後表現量顯著差異，在血管內皮細胞受 D2V 感染狀態下亦有差異表現，顯示這三個基因在不同細胞型態中功能演化上的重要性。

第五型態分群(group 5):

基因表現量均低於基準表現量，且表現量隨感染後時間點增加而遞減，在 36 hpi 達最低基因表現量。顯著表現功能群為細胞週期調節作用。P 值為 0.02256。在 GO 分類系統中功能層階性分群如圖 6。

第六型態分群(group 6):

基因表現趨勢為一開始感染基因表現量極低，隨感染後時間點增加表現量遞增，到 8 hpi 之後感染的時間點(含 8/12/36 hpi)基因表現量回復到基準表現量。此型態分群表現趨勢與第五型態分群表現趨勢呈相反狀態。顯著差異表現的功能群集有卟啉代謝(porphyrin metabolism)、負向調控核酸代謝(negative regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism)、轉錄作用及細胞週期調節作用(regulation of transcription/cell cycle)。P 值分別為 0.00972、0.01141、0.03223、0.04687。在 GO 分類系統中層階性分群如圖 7，參與在卟啉代謝、負向調控核酸代謝、轉錄調節作用、細胞週期調節作用的基因分別列於表七。

第七到第十功能分群經 GO 分類系統以樹狀功能分層層階 level 5 為標準進行分類，並無符合條件的功能分群。如將感染後 8、12、36 小時歸為較晚期時間點，表現量降低的基因(group VIII/IX/X)同樣以 GO 分類系統以樹狀功能分層層階 level 5 為標準進行分類，得脂肪酸代謝(fatty acid metabolism)途徑為顯著表現功能叢集，P 值為 0.00746，在 GO 分類系統中層階性分群如圖 8，參與的基因有 PTGS2、FAAH、PLA2G4B。PTGS2 為調控 prostaglandin biosynthesis 生物途徑的因子；FAAH 參與在 fatty acid metabolism 生物途徑中；PLA2G4B 功能為 icosanoid metabolism 生物途徑調控因子。

3.1.2 利用 GenMAPP 及 MAPPFiner2 軟體找出顯著表現生物途徑

GenMAPP 及 MAPPFiner2 為一套可分析基因在不同生物途徑中所扮演的角色之軟體(Doniger, Salomonis et al. 2003)。將各感染不同時間點後顯著差異表現的基因挑出，以 GenMAPP 進行分析，得各感染時間點顯著差異表現基因所參與的生物途徑，其 P 值越小則表越顯著參與，參與顯著性以橘色深淺來表示；橘色越深表 P 值越小，即表此生物途徑顯著受 D2V 感染細胞而被

調控。在圖 9-1 中，橫軸為每一生物途徑在細胞感染不同時間點後受調控的顯著性。將細胞感染 1、2、4 hpi 定為 immediate stage；8、12 hpi 定為 early stage；36 hpi 定為 late stage。在各 stage 有不同生物途徑顯著表現，其中黑色字體表圖 10a 中所使用的分析方法就已觀察到的生物途徑，藍色粗體字表利用 GenMAPP 軟體分析得到但在圖 1b 所使用的 cluster 分析方法中並未觀察到的生物途徑。在 immediate stage 中最顯著表現的生物途徑功能群為 viral genome replication(圖 9-2)及 calcium-mediated signaling(圖 9-3)。圖 9-2、圖 9-3 為利用 GenMAPP 分析軟體所得之結果，每一方格表一個參與在此生物途徑中的基因名稱及其表現狀態，紅色代表表現量增加的基因；綠色代表表現量降低的基因，方格旁邊的數字為基因表現倍數取 log₂ 後的數值。參與在 viral genome replication 生物途徑中表現量增加的基因有 HIV TAT specific factor 1(HTATSF1)及表現量下降的 TNFAIP3 interacting protein 1(TNIP1)和 interleukin 8(IL-8)。HTATSF1 基因藉由調控 RNA polymerase II promoter 活性調節轉錄過程，進而影響病毒基因體複製；TNIP1 的功能為負向調控病毒基因體複製；IL-8 可活化趨化作用(chemotaxis)並參與 G-protein coupled receptor protein signaling pathway，藉以控制病毒基因體複製。另外，在 calcium-mediated signaling 生物途徑中扮演調控角色的基因有表現量增加的 phospholipase C, epsilon 1(PLCE1)及 ring finger and KH domain containing 3(RKHD3)；表現量降低的基因有 bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase(BTK)、Down syndrome candidate region 1-like protein 2(DSCR1L2；Calcipressin-3)、interleukin(IL-8)。PLCE1 為調控細胞存活及生長的重要因子(Song, Satoh et al. 2002)；RKHD3 可調節 protein kinase 活性表現(如 MAPKKK cascade)，並正向調控基因轉錄作用；表現量較低的 BTK 基因會藉由 toll-like receptor 2 (TLR2)和 toll-like receptor 4(TLR4)相關訊息傳遞途徑活化 TNF 和 IL-1b 這兩種促發炎反應的因子表現(Horwood, Page et al. 2006)；在 early stage 中最顯著表現的生物途徑功能群有 endosome transport(圖 9-4)、regulation of G-protein coupled receptor protein signaling pathway(圖 9-5)、cellular morphogenesis(圖 9-6)、regulation of GTPase activity(圖 9-7)。參與在 endosome transport 生物功能途徑中表現量高的基因為調控 endosome 到 lysosome 的 high-mobility group protein 2-like 1(HMG2L1)及調節 endosome 到 Golgi 間反向運送(retrograde transport)的 vacuolar protein sorting 35(VPS35)。表現

量下降的基因有 sequestosome 1 (SQSTM1)、zinc finger, FYVE domain containing 20 (ZFYE20)、調節 endosome 到 lysosome 運送過程的 mannose-6-phosphate receptor(M6PR)及調控 Golgi 到 endosome 的基因 RAB9B, member RAS oncogene family (RAB9B)和 vacuolar protein sorting 13 homolog A (VPS13A)。SQSTM1 為一 ubiquitin chain 可辨識的分子，與 ubiquitin chain 結合後可將其受質運送到 proteasome 中進行分解作用(Seibenhener, Babu et al. 2004)。參與在調控 G-protein coupled receptor protein signaling pathway 的基因中高度表現的有 G protein-coupled receptor kinase interactor 2 (GIT2)、Phospholipase C, epsilon 1 (PLCE1)、regulator of G-protein signaling 5(RGS5)。GIT2 功能為調節細胞 focal adhesion (FA)、細胞延展作用(cell spreading)和細胞移動性(motility)，所以可能在癌細胞轉移(migration)過程中扮演重要調控角色(Frank, Adelstein et al. 2006)；PLCE1 屬於 phospholipase family 一員，可催化 polyphosphoinositides 水解，其水解產物會引發細胞外反應訊息傳遞途徑(cascade of intracellular responses)，對細胞生長、分化及基因表現進行調控作用。表現量降低的基因為 regulator of G-protein signaling 12/14/6(RGS12/14/6)，均為 RGS (regulator of G protein signaling) gene family 一員，RGS12 亦為轉錄作用的抑制者(transcriptional repressor)，可能參與在 tumorigenesis 過程中。參與在 cellular morphogenesis 相關功能及基因列於表九。表現量增加的基因以 ↑ 表示之；表現量降低的基因以 ↓ 表示之。參與在 regulation of GTPase activity 功能群中表現量增加的基因有 ADP-ribosylation factor 4 (ARF4)、eukaryotic translation initiation factor 5 (EIF5)、RAB35, member RAS oncogene family (RAB35)。ARF4 功能為調控 vesicular trafficking 並可活化 phospholipase D(PLD2)，進而促進 AP-1 所調控的轉錄作用表現(Kim, Hayashi et al. 2003)。在 late stage 中最顯著表現的生物途徑功能群有 microtubule-based movement(圖 9-8)和 symbiotic interaction between host and other organism(圖 9-9)。參與在 microtubule-based movement 功能群中表現量增加的基因有 heavy polypeptide 8 (DNAH8)，表現量降低的基因有 dynein, axonemal, heavy polypeptide 9 (DNAH9)、kinesin family member 13A /15/18A(KIF13A/15/18A)、kinesin family member 3A/5B(KIF3A/5B)、tubulin, beta (TUBB)、tubulin, beta 6 (TUBB6)。基因 KIF3A/3B 和 KAP3 結合後對於細胞有絲分裂正常進

行有很重要的調控角色(Haraguchi, Hayashi et al. 2006)；TUBB 在受 Cdk1 磷酸化後可調控有絲分裂過程中 microtubule dynamics (Fourest-Lieuvin, Peris et al. 2006)。參與在 symbiotic interaction between host and other organism 功能群中表現增加的基因為細項分類屬 viral entry into host cell 功能群的 WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2 (WWP2) 及屬 passive viral induction of host immune response 功能群的 interferon regulatory factor 7 (IRF7)。IRF7 可受 interferon(IFN)或病毒感染而活化 interferon beta chain genes 基因表現(Ning, Huye et al. 2005)。表現量降低的基因有細項分類屬 viral entry into host cell 功能群的 itchy homolog E3 ubiquitin protein ligase (ITCH)、屬 pathogenesis 的 endothelin 1 (EDN1)、Huntingtin (Huntington disease) (HD)、TNFAIP3 interacting protein 1 negative regulation of viral genome replication。ITCH 為一與 junction protein-occludin 結合的 E3 ubiquitin-protein ligase，可將 occludin 進行 ubiquitination 作用(Traweger, Fang et al. 2002)；EDN1 具活化發炎反應相關因子 NF-kappaB 進而影響誘導 CD40 表現(Browatzki, Pfeiffer et al. 2005)；HD 基因具有抗細胞凋亡功能(Leavitt, Raamsdonk et al. 2006)。



3.1.3 調控細胞通透性相關基因及生物途徑

概括性了解上皮細胞受 D2V 感染後基因的表現模式及相關功能叢集，其中部分基因亦參與在改變細胞通透性相關機制方面，且大部分顯著表現的時間點都在細胞受感染的初期，於是推測在登革熱感染後患較嚴重病症的病人身上，其內皮細胞通透性增加的原因可能為內皮細胞與上皮細胞一樣都受病毒直接感染所造成，亦或是上皮細胞先受病毒感染影響，進而調控鄰近細胞的基因表現，使改變本身及其他細胞通透性的因子活化。先前研究指出，內皮細胞並非是 DV 直接感染的標的(Carr, Hocking et al. 2003)，且以微陣列技術分析初級內皮細胞受 D2V 感染短時間點後基因表現結果中，並未發現可調控細胞通透性的因子有顯著差異表現。有鑑於此，本計劃之出發點為推測內皮細胞通透性的改變是受其他細胞型態調控所致。由於先前所使用的分類系統並無一功能分群分類屬增加細胞通透性反應相關功能叢集，所以利用 NCBI 彙整前人研究 D2V 感染細胞後或從臨床病人體內發現導致細胞通透性改變進而造成出血反應的文獻，統整參與改變細胞通透性及調控 DV 造成病症嚴重性反應相關基因(表十)，以表現量高於 mock infection

1.5 倍以上為顯著差異表現標準，分別在受 D2V 感染後的初級上皮細胞(NPN001)及初級血管內皮細胞(HUVEC)中挑出可能參與在出血作用的顯著差異表現基因後，以 Cluster 及 TreeView 軟體進行感染時間點上基因表現趨勢分群。從圖 5a. 中知可能與出血反應相關的基因共 111 個，其中 77 個顯著差異表現的基因只在初級上皮細胞表現，佔全部基因比例 69%(圖 10a group I)。只在初級血管內皮細胞顯著差異表現的基因有 23 個，佔全部基因比例 21%(圖 10a group III)。有 11 個基因共同在初級上皮細胞和初級血管內皮細胞差異表現顯著，顯示這 11 個基因在不同型態的細胞受 D2V 感染後調控細胞基因表現的重要性。進一步利用 DAVID website 將 11 個基因以 GO 分類系統進行功能性分群，顯著表現的功能群有調控細胞附著性(cell adhesion)和免疫系統反應(immune response)，P 值分別為 0.0000287 及 0.0010201，參與在調控細胞附著性及免疫反應作用的基因如表十一所示。其中 CX3CL1 和 IL-8 在兩個顯著表現功能群中均扮演調控角色(圖 10b)。77 個在初級上皮細胞顯著差異表現的基因在感染不同時間點的趨勢大致可分為兩群，一群為受 D2V 感染誘導表現量增加(D2V-induced)，一群為受 D2V 感染影響而表現量降低(D2V-suppressed)。D2V-induced 的基因大部分與壓力感受反應(response to stress)有關；D2V-suppressed 的基因主要與調控細胞附著作用(cell adhesion)相關(圖 10c)。另外，如利用 GO 分類系統中 cellular component 細項作功能性分析，以樹狀分層層階 level 5 為標準，得 cell junction 功能叢集顯著差異表現，以 pathway explorer website (<https://pathwayexplorer.genome.tugraz.at/>)分析方式呈現，如圖 11 所示，每一方格中表一基因，一格分為六等分，分別代表基因在感染後 1、2、4、8、12、36 小時的表現量，此表現量以取 log2 表示，紅色越深表基因表現量越高，綠色越深表基因表現量越低。從圖中可知，大多數有顯著表現的基因其表現量相對於受感染 0 小時後基因表現量較低。表現量下降的基因及其所屬功能群列於表十二。

3.2 利用即時定量反轉錄聚合酶鏈鎖反應技術驗證微陣列結果

由於 cDNA 生物晶片上有四萬九千多點，為驗證微陣列技術的可信度及再現性，挑選在有感染與沒感染的情況下基因表現量顯著差異者作為標靶基因，共挑選四個，分別為 plasminogen activator inhibitor 2(PAI-2)、complement component 3a receptor 1(C3aR1)、tissue

metallopeptidase inhibitor 1 (TIMP1)、tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3)(圖 12)。PAI2 為一溶血系統(fibrinolysis)調控因子，C3aR1 屬於補體系統，TNFAIP3 可調控細胞通透性(Bonner and O' Sullivan 1998; Carr, Hocking et al. 2003; Dewi, Takasaki et al. 2004; Fernandez-Mestre, Gendzekhadze et al. 2004)。在 quantitative real-time RT-PCR 技術分析下，PAI-2 在不同時間點上的表現模式除了 1 hpi 時間點外均與 microarray profile 中隨時間點增加而表現量遞減的趨勢是一致的。同樣地，在 microarray profile 上表現趨勢與 PAI2 類似的 C3aR1 結果亦相符合。另外，TIMP1 及 TNFAIP3 除分別在 8 hpi 和 36 hpi 出現與 microarray profile 相反的表現趨勢外，其他感染的時間點表現型態均與 microarray profile 相同。綜觀上述結果，可論定本實驗所應用的微陣列技術做出來的結果是有可信度的。

3.3 D2V 可在 NPC-TW06 及 ECV304 細胞株中進行感染與複製過程

為證實所選取用來模擬初級上皮細胞在無抗體增強作用(antibody enhancement)狀況下受 D2V 感染之情形的細胞株可受感染，遂將自台灣分離出的 D2V strain PL046 感染 NPC-TW06，經過 6、12、24、36 小時不同時間點後(hour postinfection;hpi)收取細胞 RNA，以相同 RNA 量進行反轉錄(reverse transcription)過程，將 RNA 轉成 cDNA，再用辨識 D2V NS3 正股的 primer 進行 PCR。圖 13a DNA 電泳圖中可見大小約為 300bp 的 DNA 片段，自感染後 6 到 36 小時均有表現，且在 12 hpi 達最高表現量，之後，便隨時間增加而遞減。即證明在感染過程中，D2V 確實進入到細胞中，且其基因組成(RNA)可釋放到細胞質中表現。在這實驗中，利用已證實會被 D2V 感染的 BHK-21 細胞株當作 positive control，以經過加熱失活的 D2V (heat-inactivated D2V)當作細胞不受感染的 negative control。另外，除了證明 D2V 會進入 NPC-TW06 細胞中，還設計辨識 D2V NS3 負股的 primer 進行 RT-PCR，以觀察 D2V 進入細胞後是否進行複製過程。在圖 13b 中，大小約為 1kb 的片段在感染 24 hpi 出現，且此片段表現持續到 36 hpi，顯示 D2V 感染 NPC-TW06 細胞後 24 小時即開始進行複製，並且複製過程一直到感染 36 小時後仍持續著。

3.4 上皮細胞受 D2V 感染後會釋放某些因子影響鄰近的內皮細胞

從微陣列資料分析過程中，觀察到可能參與調控出血性反應的基因在初級上皮細胞中較初級

血管內皮細胞中表現顯著差異，因而懷疑血管內皮細胞通透性的改變是否經由上皮細胞感染後釋放因子所產生的影響。為了測試此假設，將 D2V 先感染上皮細胞(NPC-TW06)，感染不同時間點後收取培養液(conditioned medium)，再將此培養液用來培養未受感染的血管內皮細胞(ECV304)，經兩天培養期後，收取細胞蛋白質(protein extraction)，以西方點墨法(Western blotting)分析可能造成出血性反應相關蛋白的表現模式。在先前研究中指出，血管內皮細胞(human dermal microvascular endothelial cell line HMEC-1)受 D2V 感染後與細胞接合點(cell junction)相關的基因 occludin(OCLN)在細胞中組成會改變，進而影響細胞通透性(Talavera, Castillo et al. 2004)。所以，本論文挑選 OCLN 基因做為血管內皮細胞(ECV304)通透性改變的標靶基因。在圖 14a. 中，上皮細胞(NPC-TW06)分別感染具活性(aD2)或以經加熱失活(id2)(Huang, Lei et al. 2003)的病毒 4、8、12 小時後收取培養液，再將此培養液培養內皮細胞(ECV304)，經 48 小時培養後萃取細胞蛋白，觀察細胞中 OCLN 蛋白表現量。圖中結果可知上皮細胞受病毒效價為 moi=5 的 D2V(aD2)感染 4 hpi 的培養液與受失活的 D2V(id2)感染的培養液相比，內皮細胞 OCLN 的蛋白表現量減少，但此減少的現象隨感染時間點增加而回復(8/12 hpi)。另一方面，觀察以不同病毒效價感染上皮細胞的培養液對內皮細胞 OCLN 蛋白的影響。從圖 14b 中可發現越高病毒效價感染上皮細胞的培養液會使內皮細胞 OCLN 表現量更下降。綜合圖 14a 和圖 14b 結果，可觀察到內皮細胞 junction protein-OCLN 的表現量會因上皮細胞感染不同時間點及不同病毒效價而有所影響。

3.5 上皮細胞(NPC-TW06)感染 D2V 後對內皮細胞(ECV304)可能造成通透性改變的影響並

非由單一 D2V 病毒蛋白所調控

從先前微陣列資料分析過程及圖 14 結果可推知，當上皮細胞(NPC-TW06)受 D2V 感染後，可能是由於釋放一些因子進而影響血管內皮細胞或改變細胞特性，使病毒更易通過上皮細胞保護層去感染血管內皮細胞，進而造成內皮細胞出血性相關的反應。為了進一步觀察造成此作用結果是否由某一特定 D2V 病毒蛋白所調控或影響，於是分別將表現 D2V 的 NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5 病毒蛋白的過度表現(overexpression)質體個別送入細胞中，經不同時間後，萃取細胞 RNA，進行 quantitative real-time RT-PCR，觀察可能影響內皮細胞出血性反應基因。

plasminogen activator inhibitor II(PAI-2)為一與血液凝集作用相關的因子，於出血性反應的病患身上可觀察到凝血系統有異常現象(Carlos, Oishi et al. 2005)。在微陣列實驗中，PAI-2 的表現在感染早期就顯著高度表現，且此基因表現螢光值在晶片上的平均強度(average log intensity; A)很強(A>11)，所以選擇此基因作為觀察出血性反應的標的基因。細胞經過度表現病毒蛋白質體不同時間點或直接感染 D2V 後，觀察 PAI-2 表現趨勢是否相似。圖 15a 中可看到上皮細胞不受任何感染或過度表現病毒蛋白情況下(cell only)，PAI-2 基因表現量在不同時間點中無任何改變。上皮細胞感染 D2V 短時間 4、8、12 小時 PAI2 表現隨時間增加而遞減。過度表現病毒單一蛋白後，PAI-2 在時間點上的表現趨勢並不與細胞感染 D2V 相似。另外，觀察較後期(12、24、36、48 小時)細胞受感染或過度表現情況下 PAI-2 表現模式(圖 15b)。D2V 感染狀態下，細胞中 PAI-2 基因已不受調控，表現量與細胞不受任何感染或過度表現蛋白質體情況相同。同樣地，過度表現不同蛋白質體後，PAI-2 基因表現量亦不受影響。顯示上皮細胞受感染後對內皮細胞所造成的影響並非只受單一 D2V 病毒蛋白所調控。



肆、討論

本研究以可同時分析大量基因表現模式的微陣列技術，探討 D2V 感染上皮細胞後基因的表現。分析結果發現上皮細胞受感染後，一些與增加細胞通透性或降低細胞間隙完整性的相關基因表現量明顯受到改變，顯示上皮細胞可能為登革熱病毒感染過程的第一線細胞，上皮細胞感染後可能局部分泌一些促進血管通透性增加的因子改變上皮細胞間隙完整性，進而增進病毒進到內皮細胞層的機會，同時也導致內皮細胞層出現通透性增加情況，使局部性大量病毒容易穿過細胞層進入血液循環系統中，造成嚴重全身性感染。

因缺乏有效疫苗與可用的藥物治療，登革出血熱及休克仍為登革病毒主要致死病因，先前研究發現登革熱病毒造成較嚴重病症中出血性反應的特徵為血管通透性增加，血漿大量滲出。由於臨床病患體內血管內皮細胞並無病毒直接感染或迫害證據情況下，本研究選擇以最易受登革熱病毒感染的上皮細胞(Diamond, Edgil et al. 2000)作為研究模式，探討上皮細胞受感染後對內皮細胞通透性改變的影響。

為了全面性分析 D2V 對上皮細胞直接感染作用後所產生的基因表現，利用高疏通量的微陣列基因晶片技術，描繪出細胞受病毒感染後基因間網絡調控(genetic network)的關係。

微陣列資料結果中以表現量相較於對照組 1.5 倍以上設為顯著差異表現(significant expression)進行分群，可分兩大群：表現量增加基因群與表現量降低基因群。表現量增加基因群再以感染不同時間點的表現趨勢進行分群，可分兩群，一為基因表現量隨感染後時間增加而遞減，另一群為基因表現量隨感染後時間增加而遞增(圖 1b)。在隨感染時間增加表現量遞減的基因群中，顯著表現的功能群(function group)為正向調控細胞計畫性死亡及急性反應調控作用。先前研究指出在有出血性的臨床病人身上或受感染的皮膚上皮細胞和血管內皮細胞中，促發炎反應因子(proinflammatory factors; eg. TNF- α)會明顯表現，活化細胞計畫性死亡機制，避免進入到體內的病毒利用寄主細胞的生理系統進行大量複製(Warke, Khaja et al. 2003; Cardier, Marino et al. 2005; Limon-Flores, Perez-Tapia et al. 2005; Liew and Chow 2006)。在微陣列結果細胞計畫性死亡機制於感染後很短時間內就被活化(圖 1b group I)。可能是因上皮細胞對 D2V 具較高易受性，所以細胞反應較為快速。另外，隨感染時間增加表現量遞增的基

因群中，細胞內蛋白質運輸及免疫反應也顯著受到調控(圖 1b group III/IV)。而與免疫反應相關的基因大都屬於細胞激素(cytokines; eg. interferon)和趨化激素(chemokines)。急性反應屬免疫反應的一部分，利用 clusteranalysis 依細胞感染不同時間點後基因表現趨勢作分群，可觀察到在急性反應功能群中與補體系統相關的基因 C1r 和 C4a 在較早感染時間點就受調控(圖 1b group II, 圖 3)，這些基因的表現量變化可能會影響免疫反應的細胞激素和趨化激素相關基因表現，這種時間上前後調控作用反應與細胞受到外物入侵時的防禦調控機制相符(附圖 3)。

細胞受病毒感染後，除基本的防禦機制-免疫系統活化表現外，其他抗病毒作用的基因亦受調控，如參與在細胞膜組成及生物合成的基因 PLSCR1(圖 5)。PLSCR1 為一細胞膜蛋白，受 interferon 或 growth factor 活化，進行促進細胞結合作用活化(activation of cell binding)、補體系統表現、凝血系統相關蛋白酶(coagulation proteinase)清除血小板作用增強(Warke, Khaja et al. 2003; Wiedmer, Zhao et al. 2004)。參與在細胞內蛋白質運輸功能群的基因中，SSR1 和 VPS33A 表現顯著(圖 4)，可能分別在將要組裝成病毒顆粒相關的蛋白運送到內質網(protein targeting to ER)或包覆病毒顆粒的囊泡附著到細胞膜進行外泌作用(vesicle docking during exocytosis)時扮演重要調控角色，使複製完成的病毒蛋白組裝成完整病毒顆粒後釋放到細胞外，進而再感染其他鄰近細胞。

在表現量下降的基因群中，同樣以感染不同時間點的表現趨勢進行分群，可分六群，將各群所包含的基因以GO分類系統進行分類，挑出符合分類層階level 5的功能群，六群中有兩群含顯著表現功能群。其中一群基因表現趨勢為一開始受感染時基因表現量即低於感染0小時的基因表現量，隨感染後時間點增加表現量遞減(圖1b. group V)。另一群基因表現趨勢與其相反，顯著表現功能群中有porphyrin代謝調控作用(圖1b group VI)。Porphyrin為一可與金屬離子(如：鎂、鐵、鋅、鎳、銅、鈷、銀等金屬)鍵結的化合物，當其與鐵鍵結形成複合物後，便形成具有攜帶氧原子能力的原血紅素(heme)。Heme的代謝主要藉由heme oxygenase-1 (HO-1)催化，產生biliverdin、游離的鐵離子及一氧化碳。HO-1的功能除代謝heme外，在HIV感染情況下，還會誘導免疫及發炎反應作用活化，使細胞藉此來抵禦HIV的入侵(Devadas and Dhawan 2006)。調控porphyrin代謝途徑在初級上皮細胞受D2V感染後顯著表現，表示上皮細胞亦可能經由調控免疫及發炎反應的表現來抵禦病毒的侵害。從圖1b group 中可發現此功能群基因表現量較低，可能

是病毒調控此作用來避免自己遭受細胞防禦機制的迫害。在此基因群中，另一顯著表現的功能群為負向調控核酸代謝作用。D2V基因組成為RNA，為使其能夠在細胞中進行複製與增殖過程，會調控細胞降低代謝核酸作用，然而細胞中參與負向調控核酸代謝作用基因表現量極低，可能為一種反抗病毒調控的防禦機制。在表現量增加的基因及表現量下降的基因中，調節細胞週期功能群均顯著受到影響，顯示病毒感染細胞後，可能主要藉由調控細胞週期進行控制宿主細胞作用。

微陣列資料利用 K means 軟體及 DAVID site 以 GO 分類系統進行功能分群後，可觀察到多數顯著表現的功能叢集為細胞對病毒感染過程產生的防禦機制。另外用 GenMAPP 軟體分析後，除找出利用 K means 軟體及 DAVID site 分析結果相似的功能叢集外，另外觀察到一些與病毒入侵細胞後調控細胞的作用途徑，如病毒基因體複製、病毒進入宿主細胞途徑及病毒所引起的免疫反應機制等功能群。在基因體複製方面，病毒藉由調控可活化轉錄作用的基因 HTATSF1 及降低可抑制病毒複製的 TNIP1 和 IL-8 基因表現量，使病毒基因體可在宿主細胞中進行複製與增殖。另外，藉由抑制 EDN1 表現，使 NF- κ B 相關發炎反應因子無法活化，進而增進病毒進入宿主細胞的機會(Browatzki, Pfeiffer et al. 2005)。所以，利用多種分析方法進行微陣列資料處理工作，可對細胞與病毒間相互作用的反應機制有較全盤性了解。

從圖10結果可知，上皮細胞受感染後，與內皮細胞受感染情況下相比，較多與壓力反應(response to stress)及細胞間隙(cell junction)或細胞附著(cell adhesion)相關的基因受到調控。圖10c及圖11中可知與壓力反應功能群相關的基因多為表現量增加的基因(如cytokine相關基因)，與細胞間隙或細胞附著功能群相關的基因多為表現量降低的基因。細胞間隙相關的蛋白受到調控在一些其他病毒的感染過程中亦有報導。West Nile virus在進行複製時，會誘導Toll-like receptor相關發炎反應活化，促使blood-brain barrier(BBB)通透性改變，讓West Nile virus更易通過這個細胞間隙的特化構造(Wang, Town et al. 2004)。另外，HIV中gp120蛋白會使BBB內皮細胞通透性增加，並降解tight junction相關蛋白，如:ZO-1、ZO-2、occludin，藉由這兩種作用促進HIV及toxic humoral factors通過BBB進到中樞神經系統，造成HIV相關性失智症(HIV-associated dementia)(Kanmogne, Primeaux et al. 2005)。在本研究中，病毒感染上皮細胞後，細胞間隙相關蛋白表現量降低，使局部性的細胞通透性增加，因此病毒及細胞

因受感染而產生的細胞激素更易通過上皮細胞層進到內皮細胞層，內皮細胞受大量病毒感染或受細胞激素刺激後，改變其通透性。另外，值得注意的是基因IL-8在先前D2V感染各式細胞型態(如內皮細胞、單核白血球/巨噬細胞、肥大細胞、嗜中性血球…等)實驗中或臨床病人血漿中表現量極高(Raghupathy, Chaturvedi et al. 1998; Huang, Lei et al. 2000; Juffrie, van Der Meer et al. 2000; Chen and Wang 2002; King, Anderson et al. 2002; Avila-Aguero, Avila-Aguero et al. 2004; Dewi, Takasaki et al. 2004; Moreno-Altamirano, Romano et al. 2004; Talavera, Castillo et al. 2004)。然而，在本論文實驗中IL-8表現量極低。IL-8表現量有如此不同差異，可能是因細胞激素在不同型態細胞中會有不同的表現方式(Bosch, Xhaja et al. 2002; Medin and Rothman 2006)。

為進一步證實受 D2V 感染的上皮細胞會對內皮細胞進行調控作用，本研究選擇培養代數和培養狀況較不受限的細胞株，來模擬上皮細胞對內皮細胞的作用機制。因為此兩種細胞株培養在相同的培養液(DMEM)中，所以乃以 NPC-TW06 和 ECV304 分別為上皮和內皮細胞實驗模式。先前研究結果証實 D2V 可感染 NPC-TW06 和 ECV304 細胞中進行感染複製過程(Liew and Chow 2006)。取受 D2V 感染的 NPC-TW06 細胞之培養液培養 ECV304，觀察 tight junction 中 occludin(OCLN) 蛋白表現情況。OCLN 為一穿膜蛋白(transmembrane protein)，受 protein kinase C (PKC) pathway 產生磷酸化調控其分布，進而對密封細胞間隙功能造成影響(Andreeva, Krause et al. 2001; Feldman, Mullin et al. 2005)。OCLN 在內皮細胞中的分布和組成會因細胞受 D2V 感染而有所影響，使細胞 tight junction 結構改變，進而造成細胞通透性增加(Talavera, Castillo et al. 2004)。在本論文實驗結果中，以培養過受 D2V 感染的上皮細胞培養液去培養內皮細胞，可觀察到內皮細胞中 OCLN 蛋白表現量會減少，顯示上皮細胞受感染後會釋放因子去影響內皮細胞的通透性。出血性過程中血漿滲出反應為快速突發性反應(Avirutnan, Malasit et al. 1998)，而血漿滲出主要原因是血管通透性增加。所以，在本實驗中，OCLN 蛋白表現量減少現象只出現在上皮細胞受感染後四小時，可能是上皮細胞受感染後，對內皮細胞產生的作用為局部短暫性的影響，待病毒釋放到血液循環系統中才開始全面性大量複製並感染其他部位細胞。

觀察到受感染的上皮細胞(NPC-TW06)會對內皮細胞(ECV304)產生調控作用後，進一步想了解

此調控現象是否由某一病毒蛋白所作用，於是將表現不同病毒蛋白質體送入內皮細胞(ECV304)中過度表現，觀察細胞過度表現病毒蛋白後，與出血性反應相關基因 PAI-2 的表現模式是否與細胞直接受 D2V 感染狀態一致。在臨床病人身上可發現在受 D2V 感染初期時，宿主細胞的發炎反應及凝血系統就會被活化(Avila-Aguero, Avila-Aguero et al. 2004)。PAI-2 是一參與在凝血系統(coagulation pathway)相關基因，主要功能為抑制 tissue plasminogen activator(tPA) 和 urokinase 作用，進而使 plasminogen 無法活化成 plasmin，進行溶血功能。在本實驗中並無觀察到任一病毒蛋白過度表現趨勢與細胞直接感染 D2V 表現趨勢一致，可能原因為 PAI-2 主要功能是作用在血管內皮細胞而非上皮細胞，雖然在上皮細胞受感染情況下有顯著差異表現，但其功能在上皮細胞中無法表現，所以不適合用來作為觀察上皮細胞對內皮細胞促進出血性反應的判定標的。且 PAI-2 的表現可能是受其他基因間接調控而影響，並非直接受 D2V 感染所致。

本研究中觀察到上皮細胞受 D2V 感染後，會釋放一些影響細胞通透性的因子及調控本身細胞間隙來影響其鄰近的內皮細胞通透性改變。實驗除觀察 tight junction 中 occludin(OCLN)蛋白表現情況外，可再對其他與調控細胞通透性相關的 junction protein(如:ZO-1、ZO-2)進行表現量上的探討，藉由免疫染色方式呈現這些蛋白受感染不同時間點後在細胞中的分佈狀態(Talavera, Castillo et al. 2004)，抑或分析內皮細胞電阻強度(transendothelial electrical resistance; TEER)(Dewi, Takasaki et al. 2004)，以進一步驗證上皮細胞對內皮細胞的調控確實造成細胞通透性改變。確認上皮細胞調控內皮細胞改變的作用後，可進一步探討是哪些因子造成的影響。

參考文獻

- Anderson, R., S. Wang, et al. (1997). "Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes." *J Virol* **71**(6): 4226-32.
- Andreeva, A. Y., E. Krause, et al. (2001). "Protein kinase C regulates the phosphorylation and cellular localization of occludin." *J Biol Chem* **276**(42): 38480-6.
- Avila-Aguero, M. L., C. R. Avila-Aguero, et al. (2004). "Systemic host inflammatory and coagulation response in the Dengue virus primo-infection." *Cytokine* **27**(6): 173-9.
- Avirutnan, P., P. Malasit, et al. (1998). "Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis." *J Immunol* **161**(11): 6338-46.
- Bonner, S. M. and M. A. O'Sullivan (1998). "Endothelial cell monolayers as a model system to investigate dengue shock syndrome." *J Virol Methods* **71**(2): 159-67.
- Bosch, I., K. Khaja, et al. (2002). "Increased production of interleukin-8 in primary human monocytes and in human epithelial and endothelial cell lines after dengue virus challenge." *J Virol* **76**(11): 5588-97.
- Browatzki, M., C. A. Pfeiffer, et al. (2005). "Endothelin-1 induces CD40 but not IL-6 in human monocytes via the proinflammatory transcription factor NF-kappaB." *Eur J Med Res* **10**(5): 197-201.
- Bukowski, J. F., I. Kurane, et al. (1989). "Dengue virus-specific cross-reactive CD8+ human cytotoxic T lymphocytes." *J Virol* **63**(12): 5086-91.
- Cardier, J. E., E. Marino, et al. (2005). "Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: possible role of TNF-alpha in endothelial cell damage in dengue." *Cytokine* **30**(6): 359-65.
- Carlos, C. C., K. Oishi, et al. (2005). "Comparison of clinical features and hematologic abnormalities between dengue fever and dengue hemorrhagic fever among children in the Philippines." *Am J Trop Med Hyg* **73**(2): 435-40.
- Carr, J. M., H. Hocking, et al. (2003). "Supernatants from dengue virus type-2 infected macrophages induce permeability changes in endothelial cell monolayers." *J Med Virol* **69**(4): 521-8.
- Chen, Y. C. and S. Y. Wang (2002). "Activation of terminally differentiated human monocytes/macrophages by dengue virus: productive infection, hierarchical production of innate cytokines and chemokines, and the synergistic effect of lipopolysaccharide." *J Virol* **76**(19): 9877-87.
- Devadas, K. and S. Dhawan (2006). "Hemin activation ameliorates HIV-1 infection via heme oxygenase-1 induction." *J Immunol* **176**(7): 4252-7.
- Dewi, B. E., T. Takasaki, et al. (2004). "In vitro assessment of human endothelial cell permeability: effects of inflammatory cytokines and dengue virus infection." *J Virol Methods* **121**(2): 171-80.
- Diamond, M. S., D. Edgil, et al. (2000). "Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains." *J Virol* **74**(17): 7814-23.

- Doniger, S. W., N. Salomonis, et al. (2003). "MAPPFinder: using Gene Ontology and GenMAPP to create a global gene-expression profile from microarray data." Genome Biol **4**(1): R7.
- Eisen, M. B., P. T. Spellman, et al. (1998). "Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(25): 14863-8.
- Feldman, G. J., J. M. Mullin, et al. (2005). "Occludin: structure, function and regulation." Adv Drug Deliv Rev **57**(6): 883-917.
- Fernandez-Mestre, M. T., K. Gendzekhadze, et al. (2004). "TNF-alpha-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients." Tissue Antigens **64**(4): 469-72.
- Fourest-Lieuvain, A., L. Peris, et al. (2006). "Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1." Mol Biol Cell **17**(3): 1041-50.
- Frank, S. R., M. R. Adelstein, et al. (2006). "GIT2 represses Crk- and Rac1-regulated cell spreading and Cdc42-mediated focal adhesion turnover." Embo J **25**(9): 1848-59.
- Gagnon, S. J., F. A. Ennis, et al. (1999). "Bystander target cell lysis and cytokine production by dengue virus-specific human CD4(+) cytotoxic T-lymphocyte clones." J Virol **73**(5): 3623-9.
- Green, S., S. Pichyangkul, et al. (1999). "Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever." J Infect Dis **180**(5): 1429-35.
- Halstead, S. B. (1992). "The XXth century dengue pandemic: need for surveillance and research." World Health Stat Q **45**(2-3): 292-8.
- Haraguchi, K., T. Hayashi, et al. (2006). "Role of the kinesin-2 family protein, KIF3, during mitosis." J Biol Chem **281**(7): 4094-9.
- Horwood, N. J., T. H. Page, et al. (2006). "Bruton's tyrosine kinase is required for TLR2 and TLR4-induced TNF, but not IL-6, production." J Immunol **176**(6): 3635-41.
- Huang, Y. H., H. Y. Lei, et al. (2003). "Tissue plasminogen activator induced by dengue virus infection of human endothelial cells." J Med Virol **70**(4): 610-6.
- Huang, Y. H., H. Y. Lei, et al. (2000). "Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production." Am J Trop Med Hyg **63**(1-2): 71-5.
- Huang, Y. H., C. C. Liu, et al. (2001). "Activation of coagulation and fibrinolysis during dengue virus infection." J Med Virol **63**(3): 247-51.
- Irizarry, R. A., B. Hobbs, et al. (2003). "Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data." Biostatistics **4**(2): 249-64.
- Juffrie, M., G. M. van Der Meer, et al. (2000). "Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-8 and its relationship to neutrophil degranulation." Infect Immun **68**(2): 702-7.
- Kabra, S. K., Y. Jain, et al. (1999). "Dengue hemorrhagic fever: clinical manifestations and management." Indian J Pediatr **66**(1): 93-101.
- Kanmogne, G. D., C. Primeaux, et al. (2005). "HIV-1 gp120 proteins alter tight junction protein expression and brain endothelial cell permeability: implications for the pathogenesis of HIV-associated dementia." J Neuropathol Exp Neurol **64**(6): 498-505.

- Kim, S. W., M. Hayashi, et al. (2003). "ADP-ribosylation factor 4 small GTPase mediates epidermal growth factor receptor-dependent phospholipase D2 activation." J Biol Chem **278**(4): 2661-8.
- King, C. A., R. Anderson, et al. (2002). "Dengue virus selectively induces human mast cell chemokine production." J Virol **76**(16): 8408-19.
- Kliks, S. C., S. Nimmanitya, et al. (1988). "Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants." Am J Trop Med Hyg **38**(2): 411-9.
- Kuberski, T., L. Rosen, et al. (1977). "Clinical and laboratory observations on patients with primary and secondary dengue type 1 infections with hemorrhagic manifestations in Fiji." Am J Trop Med Hyg **26**(4): 775-83.
- Kuhn, R. J., W. Zhang, et al. (2002). "Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion." Cell **108**(5): 717-25.
- Leavitt, B. R., J. M. Raamsdonk, et al. (2006). "Wild-type huntingtin protects neurons from excitotoxicity." J Neurochem **96**(4): 1121-9.
- Leyssen, P., E. De Clercq, et al. (2000). "Perspectives for the treatment of infections with Flaviviridae." Clin Microbiol Rev **13**(1): 67-82, table of contents.
- Liew, K. J. and V. T. Chow (2006). "Microarray and real-time RT-PCR analyses of a novel set of differentially expressed human genes in ECV304 endothelial-like cells infected with dengue virus type 2." J Virol Methods **131**(1): 47-57.
- Limon-Flores, A. Y., M. Perez-Tapia, et al. (2005). "Dengue virus inoculation to human skin explants: an effective approach to assess in situ the early infection and the effects on cutaneous dendritic cells." Int J Exp Pathol **86**(5): 323-34.
- Liu, C. C., K. J. Huang, et al. (2002). "Transient CD4/CD8 ratio inversion and aberrant immune activation during dengue virus infection." J Med Virol **68**(2): 241-52.
- Malasit, P. (1987). "Complement and dengue haemorrhagic fever/shock syndrome." Southeast Asian J Trop Med Public Health **18**(3): 316-20.
- Medin, C. L. and A. L. Rothman (2006). "Cell type-specific mechanisms of interleukin-8 induction by dengue virus and differential response to drug treatment." J Infect Dis **193**(8): 1070-7.
- Moreno-Altamirano, M. M., M. Romano, et al. (2004). "Gene expression in human macrophages infected with dengue virus serotype-2." Scand J Immunol **60**(6): 631-8.
- Ning, S., L. E. Huye, et al. (2005). "Regulation of the transcriptional activity of the IRF7 promoter by a pathway independent of interferon signaling." J Biol Chem **280**(13): 12262-70.
- Parrish, R. S. and H. J. Spencer, 3rd (2004). "Effect of normalization on significance testing for oligonucleotide microarrays." J Biopharm Stat **14**(3): 575-89.
- Raghupathy, R., U. C. Chaturvedi, et al. (1998). "Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever." J Med Virol **56**(3): 280-5.
- Seibenhener, M. L., J. R. Babu, et al. (2004). "Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation." Mol Cell Biol **24**(18): 8055-68.
- Song, C., T. Satoh, et al. (2002). "Differential roles of Ras and Rap1 in growth factor-dependent activation of phospholipase C epsilon." Oncogene **21**(53): 8105-13.

- Srichaikul, T. and S. Nimmannitya (2000). "Haematology in dengue and dengue haemorrhagic fever." Baillieres Best Pract Res Clin Haematol **13**(2): 261-76.
- Talavera, D., A. M. Castillo, et al. (2004). "IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers." J Gen Virol **85**(Pt 7): 1801-13.
- Trairatvorakul, P., V. Chongsrisawat, et al. (2005). "Serum nitric oxide in children with dengue infection." Asian Pac J Allergy Immunol **23**(2-3): 115-9.
- Traweger, A., D. Fang, et al. (2002). "The tight junction-specific protein occludin is a functional target of the E3 ubiquitin-protein ligase itch." J Biol Chem **277**(12): 10201-8.
- Vaughn, D. W., S. Green, et al. (1997). "Dengue in the early febrile phase: viremia and antibody responses." J Infect Dis **176**(2): 322-30.
- Wang, T., T. Town, et al. (2004). "Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis." Nat Med **10**(12): 1366-73.
- Warke, R. V., K. Khaja, et al. (2003). "Dengue virus induces novel changes in gene expression of human umbilical vein endothelial cells." J Virol **77**(21): 11822-32.
- Wiedmer, T., J. Zhao, et al. (2004). "Adiposity, dyslipidemia, and insulin resistance in mice with targeted deletion of phospholipid scramblase 3 (PLSCR3)." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(36): 13296-301.



表一. List of primers for microarray profile validation

Gene	Left primer (5'→3')	Right primer (5'→3')	Amplicon size (bp)	No. of probe
PAI-2	catggagcatctcgccac	actgcattggctcccactt	109	1
C3aR1	gccttcagctactgtctcagttt	agaattactgggggctcattc	111	76
TIMP1	gggcttcaccaagacctaca	tgcaggggatggataaacag	71	76
TNFAIP3	tgcacactgtgttcacgag	acgctgtgggactgacttc	76	74
Col4a6	tcttggcatcaatgggattc	cattacagccatccagacca	77	57



表二. 參與在第一型態分群正向調節細胞計畫性死亡功能叢集的基因

Cluster ID	Symbol	Description
Hs.450230	IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3
Hs.268887	STK17A	serine/threonine kinase 17a
Hs.297324	TIMP3	tissue inhibitor of metalloproteinase 3
Hs.521456	TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b



表三. 參與在第二型態分群的基因

Cluster ID	Symbol	Description
<i>Regulation of cell cycle</i>		
Hs.122346	MAD2L1BP	MAD2L1 binding protein
Hs.298654	DUSP6	dual specificity phosphatase 6
Hs.504609	ID1	inhibitor of DNA binding 1
Hs.126256	IL1B	interleukin 1, beta
Hs.502876	RHOB	ras homolog gene family, member B
Hs.73793	VEGF	vascular endothelial growth factor
<i>Positive regulation of signal transduction</i>		
Hs.189119	CXXC5	CXXC finger 5
Hs.29282	MAP3K3	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3
Hs.73793	VEGF	Vascular endothelial growth factor



表四. 參與在第三型態分群的基因

Cluster ID	Symbol	Description
<i>Intracellular protein transport</i>		
Hs.90073	CSE1L	CSE1 chromosome segregation 1-like
Hs.370503	FYB	FYN binding protein
Hs.166924	SEC13L1	SEC13-like 1
Hs.491351	CLTC	Clathrin, heavy polypeptide (Hc)
Hs.470588	KPNA6	Karyopherin alpha 6 (importin alpha 7)
Hs.114033	SSR1	Signal sequence receptor, alpha
Hs.188634	SNX1	Sorting nexin 1
<i>Sulfur compound biosynthesis</i>		
Hs.315562	GCLM	Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit
Hs.512841	HS6ST1	Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1
Hs.118725	SEPHS2	Selenophosphate synthetase 2
<i>Carboxylic acid metabolism</i>		
Hs.113094	CORO2A	Coronin, actin binding protein, 2A
Hs.289347	DHRS3	Dehydrogenase/reductase member 3
Hs.315562	GCLM	Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit
Hs.460929	GOT2	Glutamic-oxaloacetic transaminase 2
Hs.380740	GOT1L1	Glutamic-oxaloacetic transaminase 1-like 1
Hs.497200	PLA2G4A	Phospholipase A2, group IVA
Hs.118725	SEPHS2	Selenophosphate synthetase 2
<i>Amino acid metabolism</i>		
Hs.113094	CORO2A	Coronin, actin binding protein, 2A
Hs.315562	GCLM	Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit
Hs.460929	GOT2	Glutamic-oxaloacetic transaminase 2,
Hs.380740	GOT1L1	Glutamic-oxaloacetic transaminase 1-like 1
Hs.118725	SEPHS2	Selenophosphate synthetase 2

表五. 參與在第四型態分群的基因

Cluster ID	Symbol	Description
<i>Immune response</i>		
Hs.524760	OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1
Hs.413924	CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
Hs.62661	GBP1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible
Hs.458414	IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1
Hs.523847	G1P3	interferon, alpha-inducible protein
Hs.532634	IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27
Hs.20315	IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
Hs.437609	IFIT2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2
Hs.47338	IFIT3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3
Hs.517307	MX1	myxovirus (influenza virus) resistance 1
<i>Plasma membrane organization and biogenesis</i>		
Hs.130759	PLSCR1	phospholipid scramblase 1
Hs.477869	PLSCR4	phospholipid scramblase 4
<i>Response to pest · pathogen or parasite</i>		
Hs.524760	OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1
Hs.523847	G1P3	Interferon, alpha-inducible protein
Hs.532634	IFI27	Interferon, alpha-inducible protein 27

表六. 參與在第五型態分群的基因

Cluster ID	Symbol	Description
Hs.111749	PMS1	PMS1 postmeiotic segregation increased 1
Hs.153546	CDC23	cell division cycle 23
Hs.211602	SMC1L1	SMC1 structural maintenance of chromosomes 1-like 1
Hs.485616	DST	dystonin
Hs.514303	PHB	prohibitin
Hs.523718	SFN	stratifin



表七. 參與在第六型態分群的基因

Cluster ID	Symbol	Description
<i>Porphyrin metabolism</i>		
Hs.465221	FECH	ferrochelatase
Hs.198072	PDE4B	phosphodiesterase 4B
Hs.501376	UROS	uroporphyrinogen III synthase
<i>Negative regulation of nucleobase,nucleoside,nucleotide and nucleic acid metabolism</i>		
Hs.162125	GLIS3	GLIS family zinc finger 3
Hs.155204	ZNF174	zinc finger protein 174
Hs.407694	ZNF350	zinc finger protein 350
Hs.377090	ZHX2	zinc fingers and homeoboxes 2
<i>Regulation of transcription</i>		
Hs.838	CD80	CD80 antigen (CD28 antigen ligand 1, B7-1 antigen)
Hs.522572	RP13-297E16.1	DNA segment on chromosome X and Y
Hs.162125	GLIS3	GLIS family zinc finger 3
Hs.299560	KIAA1862	KIAA1862 protein
Hs.107740	KLF2	Kruppel-like factor 2
Hs.201671	SOX13	SRY (sex determining region Y)-box 13
Hs.479602	APBB2	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 2
Hs.98586	DMRT1	doublesex and mab-3 related transcription factor 1
Hs.102408	EYA4	eyes absent homolog 4
Hs.319171	NFKBIZ	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta
Hs.479396	RBPSUH	recombining binding protein suppressor of hairless
Hs.462983	THRAP4	thyroid hormone receptor associated protein 4
Hs.5638	ZBTB26	zinc finger and BTB domain containing 26
Hs.386162	ZNF100	zinc finger protein 100
Hs.155204	ZNF174	zinc finger protein 174
Hs.25040	ZNF239	zinc finger protein 239
Hs.407694	ZNF350	zinc finger protein 350
Hs.377090	ZHX2	zinc fingers and homeoboxes 2
<i>Regulation of cell cycle</i>		
Hs.445893	KHDRBS1	KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 1
Hs.479602	APBB2	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 2
Hs.298654	DUSP6	dual specificity phosphatase 6
Hs.485616	DST	dystonin
Hs.65029	GAS1	growth arrest-specific 1
Hs.624	IL8	interleukin 8
Hs.78466	PSMD8	proteasome (prosome, macropain) 8

表八. 參與在第七、八、九型態分群脂肪酸代謝功能叢集的基因

Cluster ID	Symbol	Description
Hs.196384	PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2
Hs.528334	FAAH	fatty acid amide hydrolase
Hs.198161	PLA2G4B	phospholipase A2, group IVB



表九.參與在細胞型態組成相關細項功能分群的基因

Functional categories	Symbol	Description	Expression pattern
<i>Filopodium formation</i>	FGD6	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 6	↑
<i>Erythrocyte maturation</i>	EPB42	erythrocyte membrane protein band 4.2	↓
<i>Axonogenesis</i>	APBB2	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 2	↑
	DCC	deleted in colorectal carcinoma	↓
	PARD3	par-3 partitioning defective 3 homolog	↓
	PAX2	paired box gene 2	↓
<i>Negative regulation of axon extension</i>	RTN4	reticulon 4	↑
<i>Axon guidance</i>	SEMA6A	semaphorin 6A	↑
<i>Establishment and/or maintenance of cell polarity</i>	PARD3	par-3 partitioning defective 3 homolog	↓
<i>Maintenance of epithelial cell polarity</i>	ANK1	ankyrin 1, erythrocytic	↑
<i>Regulation of cell shape</i>	CDC42EP3	CDC42 effector protein 3	↓
	EPB42	erythrocyte membrane protein band 4.2	↓
	FGD6	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 6	↑
	PALM2	paralemmin 2	↓
	SPTA1	spectrin, alpha, erythrocytic 1	↓



表十. 探討登革熱病毒感染改變細胞通透性或調控病症嚴重程度的相關文獻

References	Factors/pathway related to cell permeability
Avila-Aguero, Avila-Aguero et al. 2004	IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10 and TNFa,protein C(PC),protein S (PS), d-dimer (DD), fibrinogen (FGN) and activated protein C(APC)
Bethell, Flobbe et al. 1998	IL_6,sICAM-1,TNFR
Bonner and O'Sullivan 1998	Coagulation, thrombolysis, adhesion molecules,IL-1a, TNF-a
Bosch, Xhaja et al. 2002	IL-6,IL-8,NF-kB
Carlos, Oishi et al. 2005	Increased fibrinolysis
Carlos, Oishi et al. 2005	Coagulation abnormalities
Carr, Hocking et al. 2003	TNF-a, IL-1b,IL-6 and IL-8,sVCAM-1
Chaturvedi, Agarwal et al. 2000	Human cytotoxic factor,IL-1b,TNFa,IL-8,hydrogen peroxide,IL-4IL-5,IL-6,IL-10,IL-13,histamine ,heparan sulfate
Chen and Wang 2002	TNFa, IFN-a, IL-1b,IL-8,IL-12MIP-1a,RANTES
Dewi, Takasaki et al. 2004	TNFR,sVCAM,TNFa,IFN-r,IL-2,IL-6,IL-8,IL-10,adhesion molecules
Espina, Valero et al. 2003	IL, TNF, nitric oxide(NO)
Fernandez-Mestre, Gendzekhadze et al. 2004	TNF
Hocke, Temmesfeld-Wollbrueck et al. 2006	Loss of cell-cell adhesion,activation of inflammatory response
Krishnamurti, Peat et al. 2002	E/P-selectin,PGI2,IL-1,TNF-a
Krishnamurti, Wahl et al. 1989	PAI-2
Liew and Chow 2004	TNF-a, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN-r
Mairuhu, Mac Gillavry et al. 2003	Activation of coagulation/fibrinolytic systems
Medin and Rothman 2006	NF-kB,IL-8,AP-1
Srichaikul and Nimmannitya 2000	TNF-a, IL-2, IL-6, IFN-g, PAF, C3a, C5a and histamine
Talavera, Castillo et al. 2004	Actin,occludin,IL-8
Tseng, Lo et al. 2005	VEGF
Van Gorp, Setiati et al. 2002	activation of the coagulation and fibrinolytic systems
Wills, Oragui et al. 2002	PAI-1,plasminogen



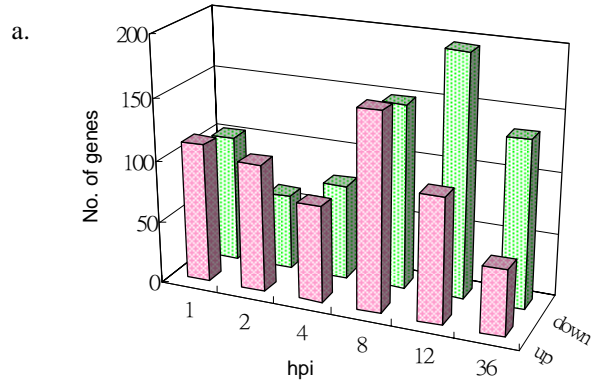
表十一. 調控細胞通透性相關因子中,參與在調控細胞附著性及免疫反應作用的基因

Cluster ID	Symbol	Description
<i>Cell adhesion</i>		
Hs.461086	CDH1	cadherin 1, type 1
Hs.167368	CTNNA2	catenin alpha 2
Hs.531668	CX3CL1	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
Hs.2633	DSG1	desmoglein 1
Hs.624	IL8	interleukin 8
<i>Immune response</i>		
Hs.53155	CFP	properdin P factor
Hs.531668	CX3CL1	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
Hs.62661	GBP1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible
Hs.437609	IFIT2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2
Hs.126256	IL1B	interleukin 1, beta
Hs.624	IL8	interleukin 8
Hs.196384	PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2



表十二. 上皮細胞感染登革熱病毒後,細胞間隙蛋白分群中表現量降低的基因

Unigene ID	Symbol	Description
<i>Cell junction</i>		
Hs.162754	LIM2	lens intrinsic membrane protein 2
<i>Focal adhesion</i>		
Hs.471014	TLN1	talin 1
<i>Hemidesmosome</i>		
Hs.631992	DST	dystonin
<i>Intercellular junction</i>		
Hs.194654	BAI1	brain-specific angiogenesis inhibitor 1
Hs.631992	DST	dystonin
Hs.292549	DLG1	discs, large homolog 1
Hs.412597	DSG2	desmoglein 2
Hs.1925	DSG3	desmoglein 3
Hs.534395	PKP3	plakophilin 3
<i>Connexon complex</i>		
Hs.296310	GJA4	gap junction protein, alpha 4
Hs.591234	GJB2	gap junction protein, beta 2
Hs.522561	GJB3	gap junction protein, beta 3
<i>Tight junction</i>		
Hs.514423	CACNG4	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 4
Hs.251391	CLDN16	claudin 16
Hs.522746	CLDN2	claudin 2
Hs.505337	CLDN5	claudin 5
Hs.513915	CLDN7	claudin 7



b.

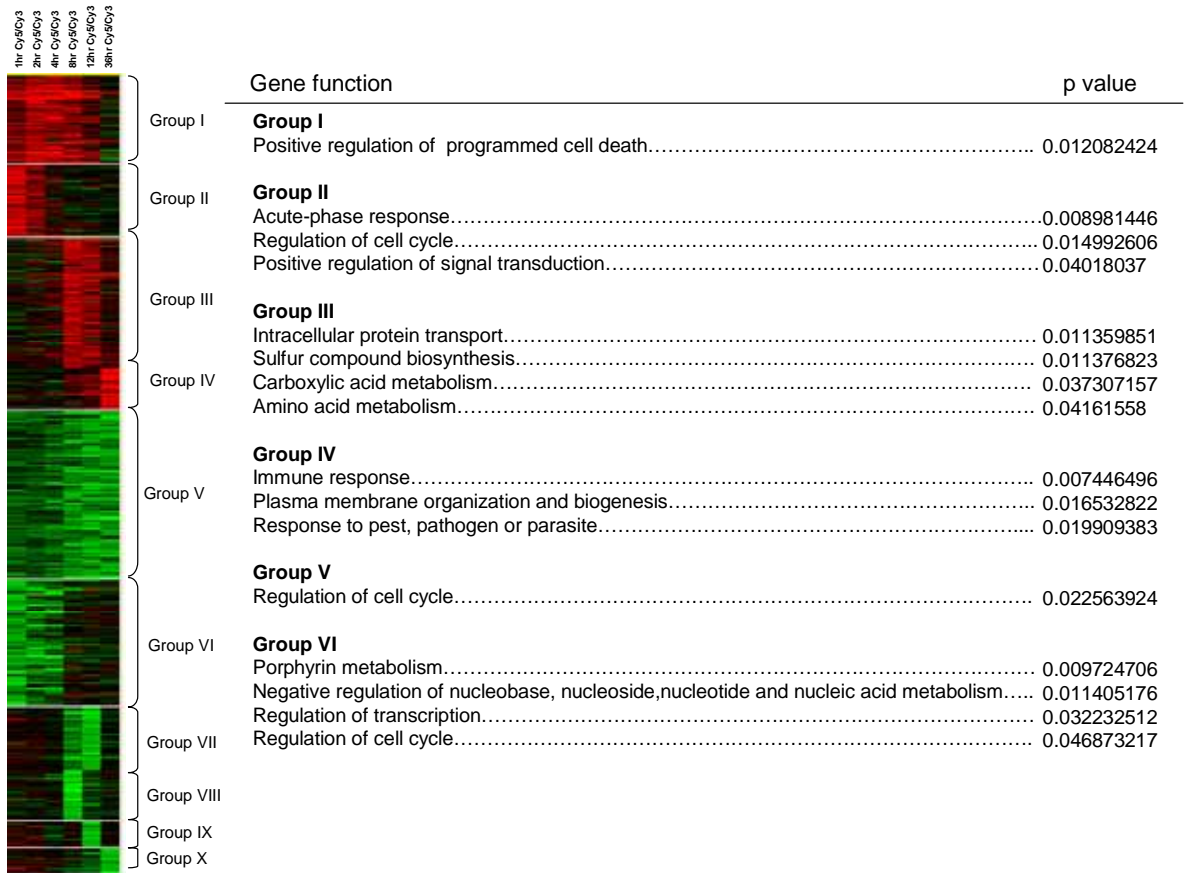
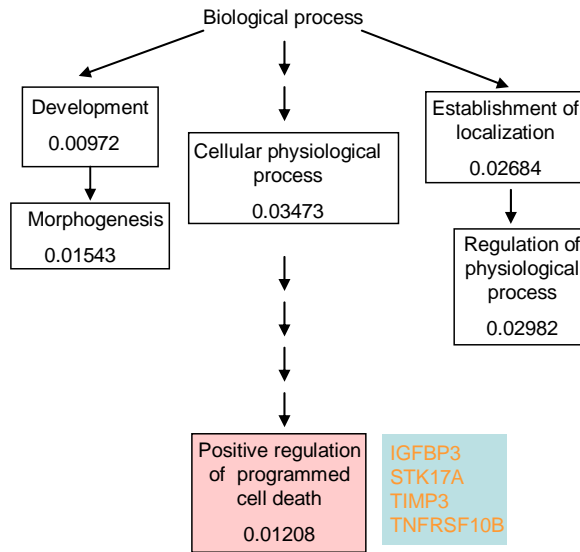


圖 1a. 細胞受D2V感染不同時間點後，高顯著差異表現(up)及低顯著差異表現(down)的基因個數

1b. 顯著差異表現基因在感染不同時間點後基因表現趨勢分群

a.



*P值標示於叢集名稱之下

b.

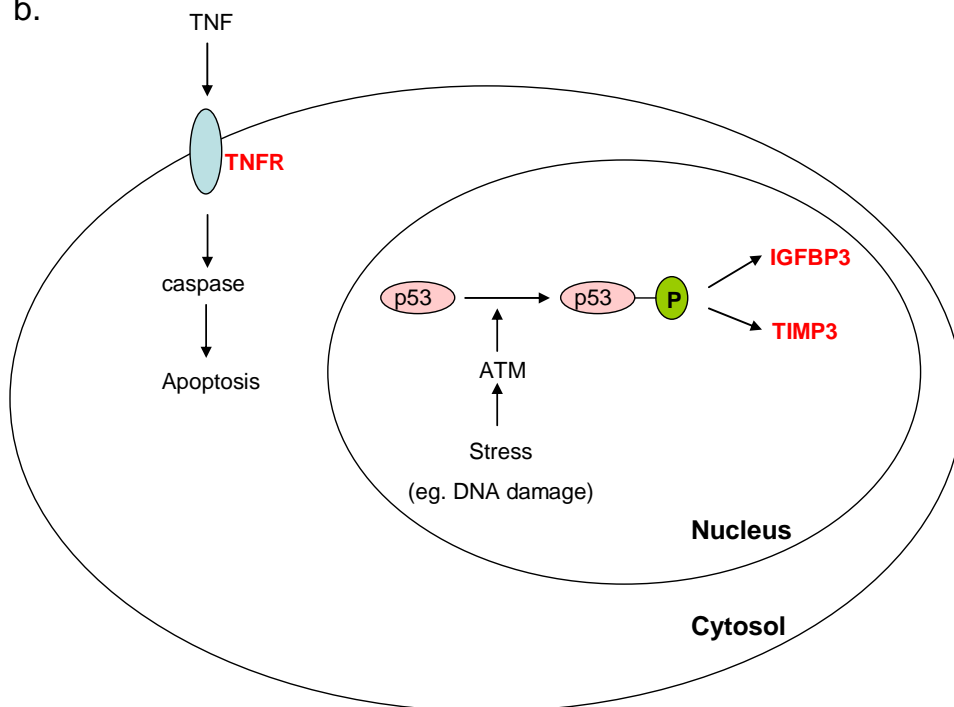
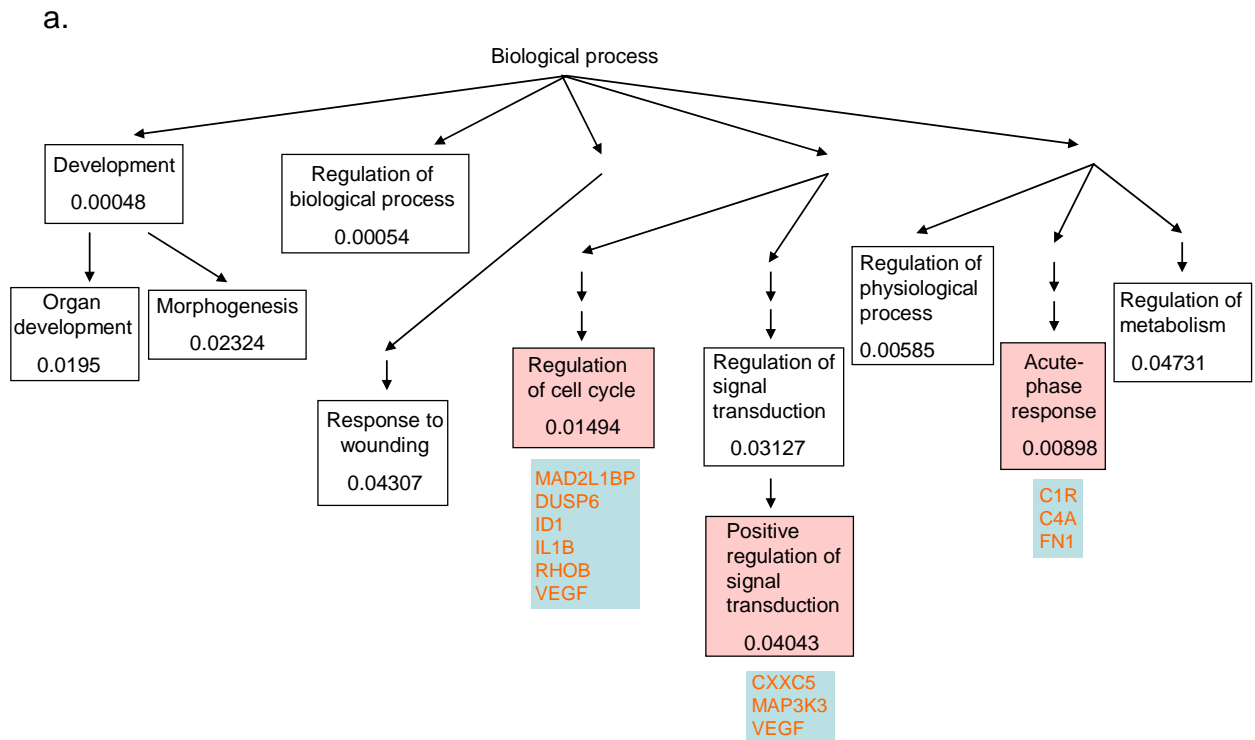


圖 2a. 第一功能分群在 GO 分類系統中層階性功能分群及其 P 值

2b. 參與正向調控細胞計畫性死亡的顯著表現基因在生物途徑上的作用位置



*P值標示於叢集名稱之下

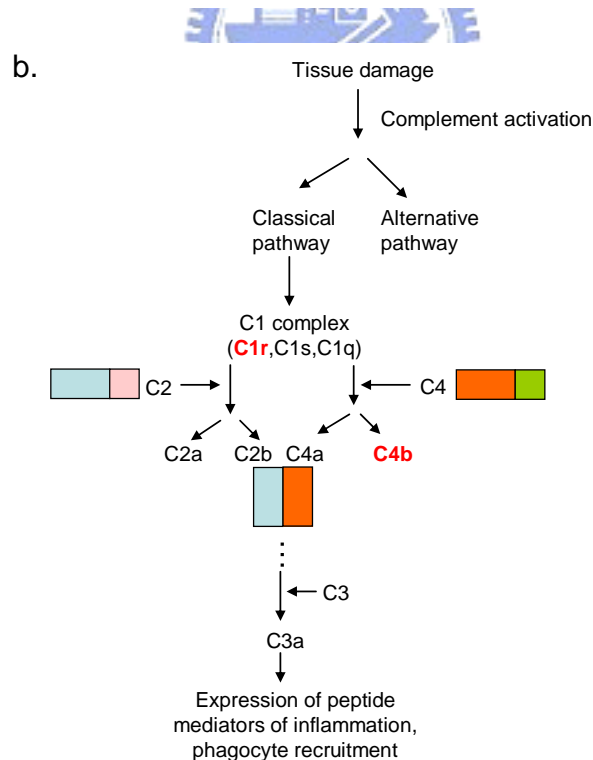


圖 3a. 第二功能分群在GO分類系統中層階性功能分群及其P值

3b. 參與急性反應的顯著表現基因(C1r和C4a)在生物途徑上的作用位置

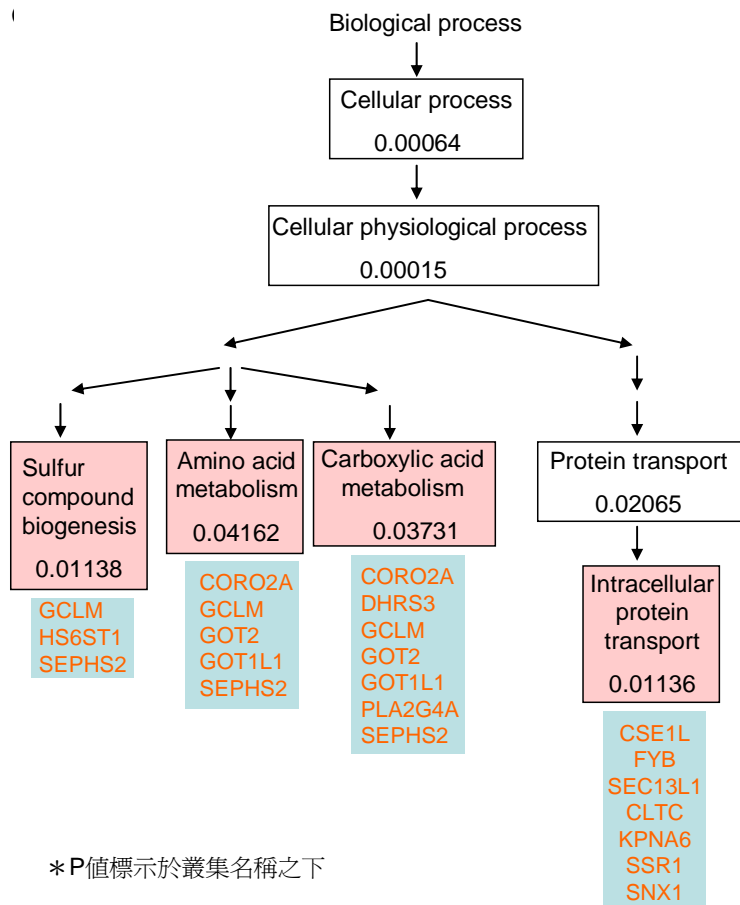
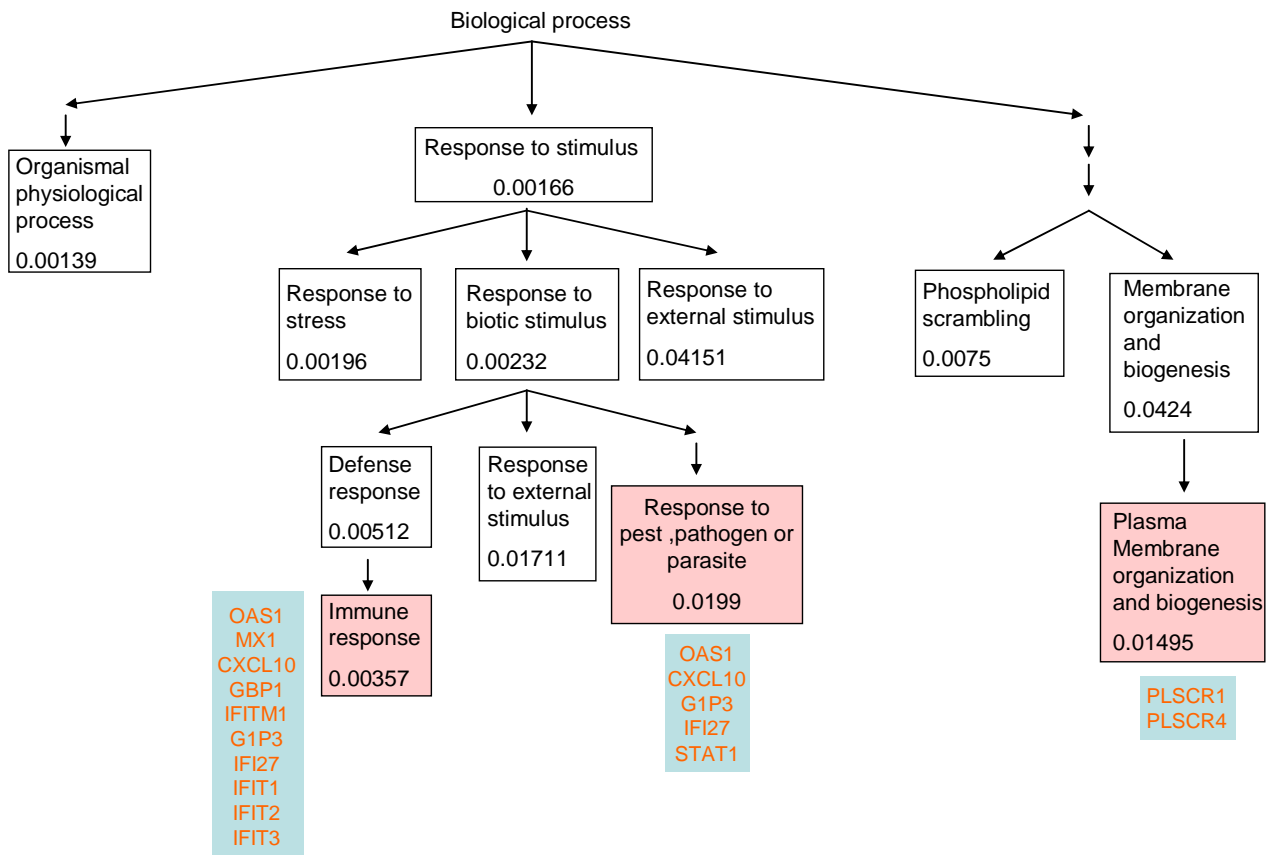


圖 4. 第三功能分群在GO分類系統中層階性功能分群及其P值

Group IV



*P值標示於叢集名稱之下

圖 5. 第四功能分群在GO分類系統中層階性功能分群及其P值

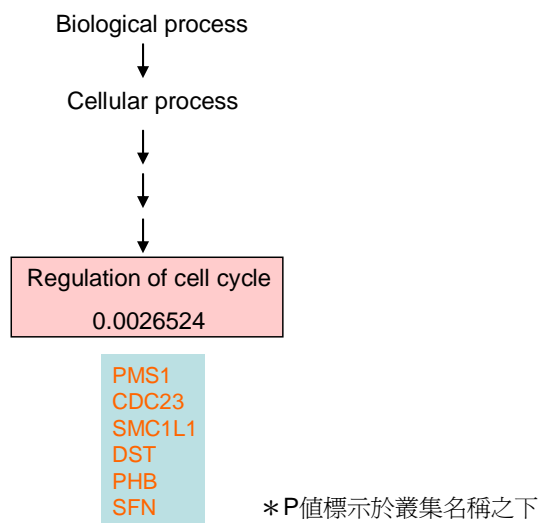


圖 6. 第五功能分群在GO分類系統中層階性功能分群及其P值



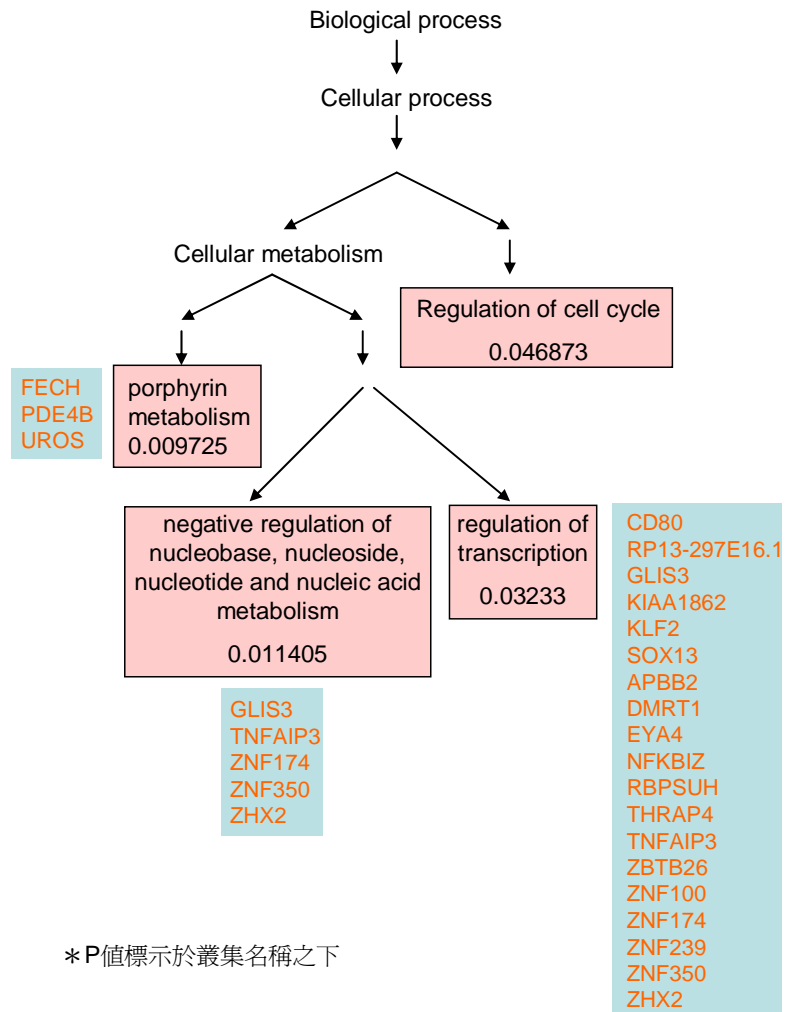
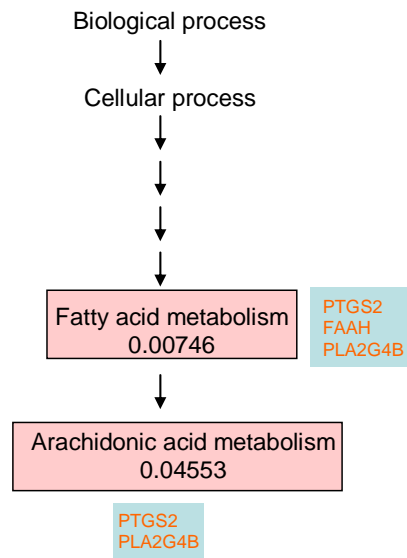


圖 7. 第六功能分群在GO分類系統中層階性功能分群及其P值



*P值標示於叢集名稱之下

圖 8. 第八、九、十功能分群在GO分類系統中層階性功能分群及其P值



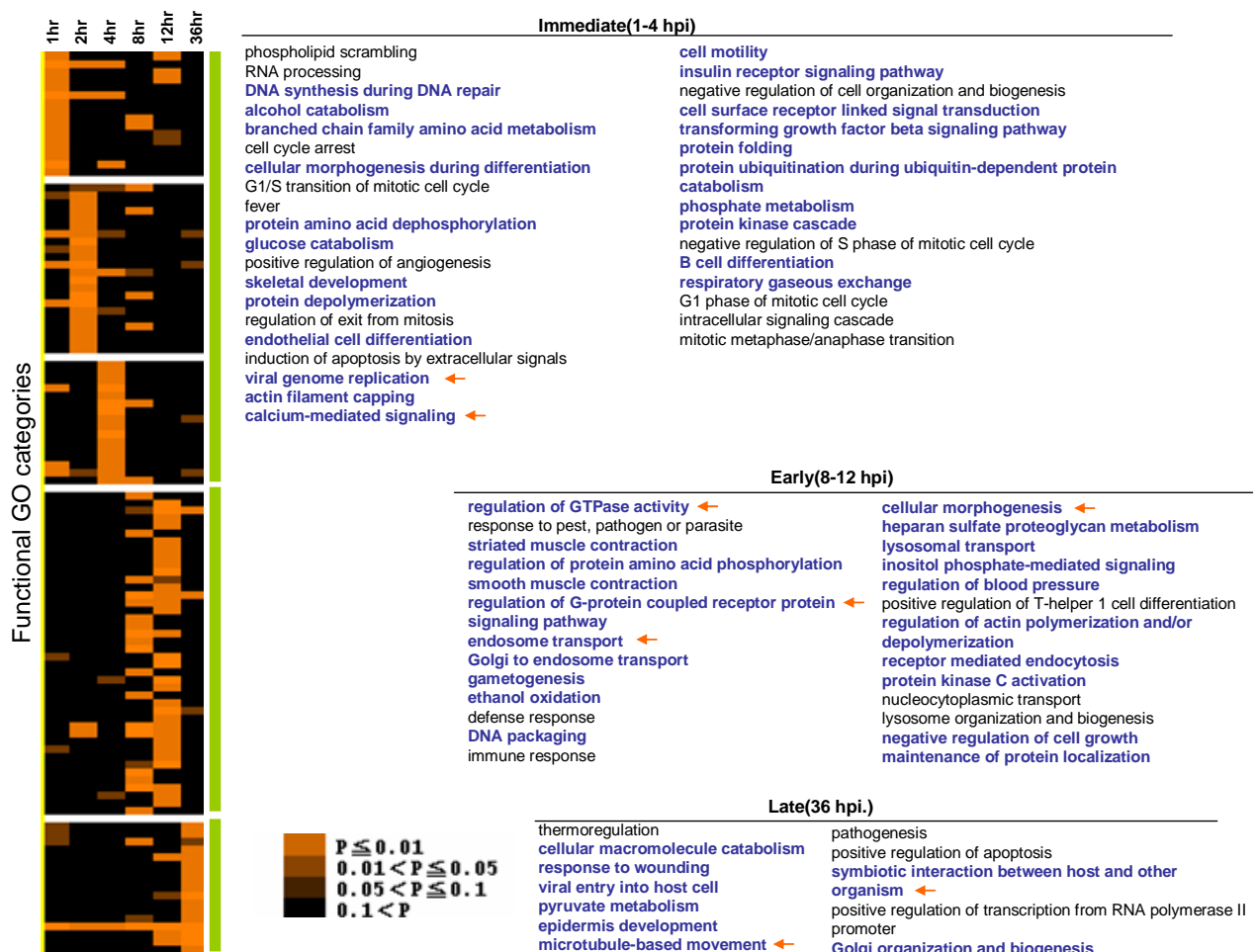


圖 9-1. 顯著差異基因在感染不同時間點後所參與的生物途徑，橘色箭號所指為各時間分群中表現最顯著的功能叢集

viral genome replication

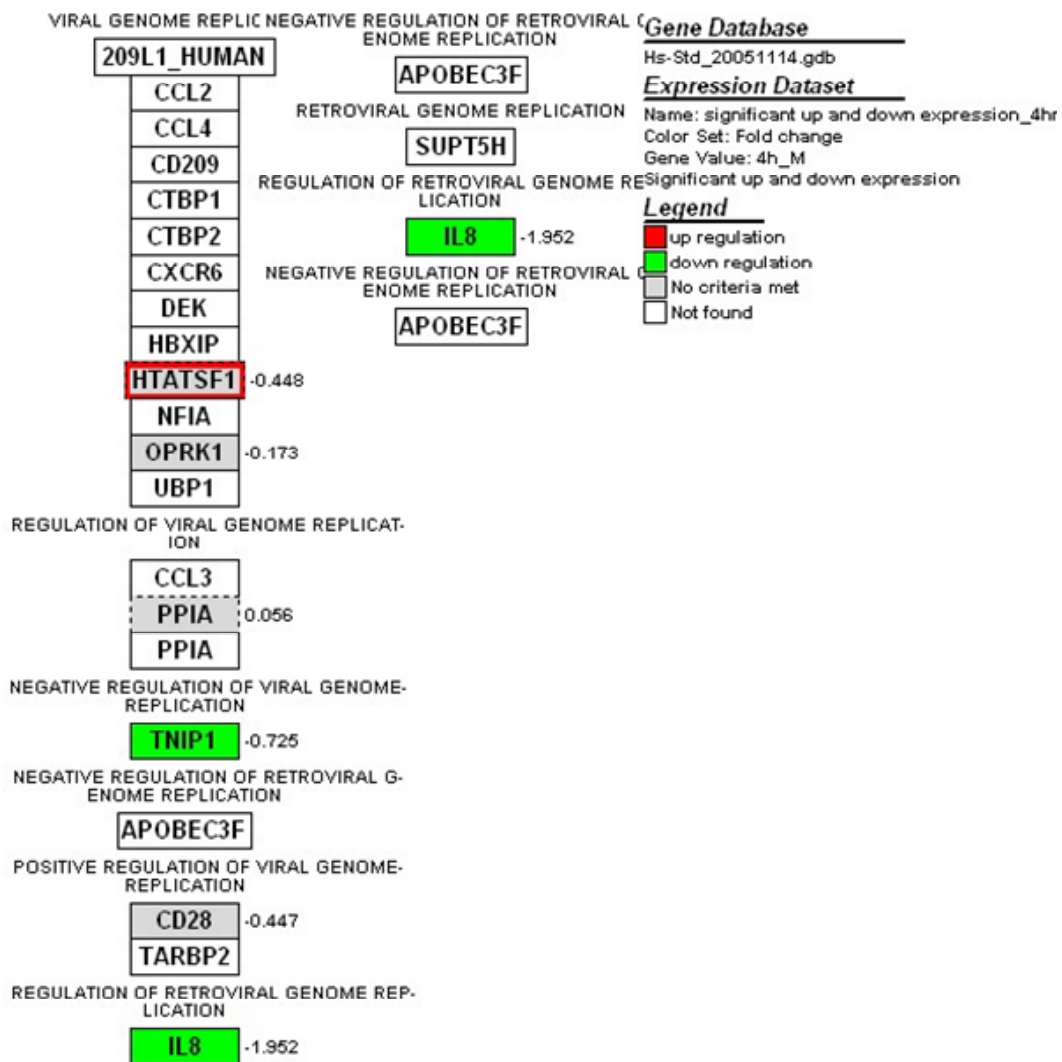


圖 9-2. 參與在 viral genome replication 功能叢集中的顯著表現基因及其表現模式

calcium-mediated signaling

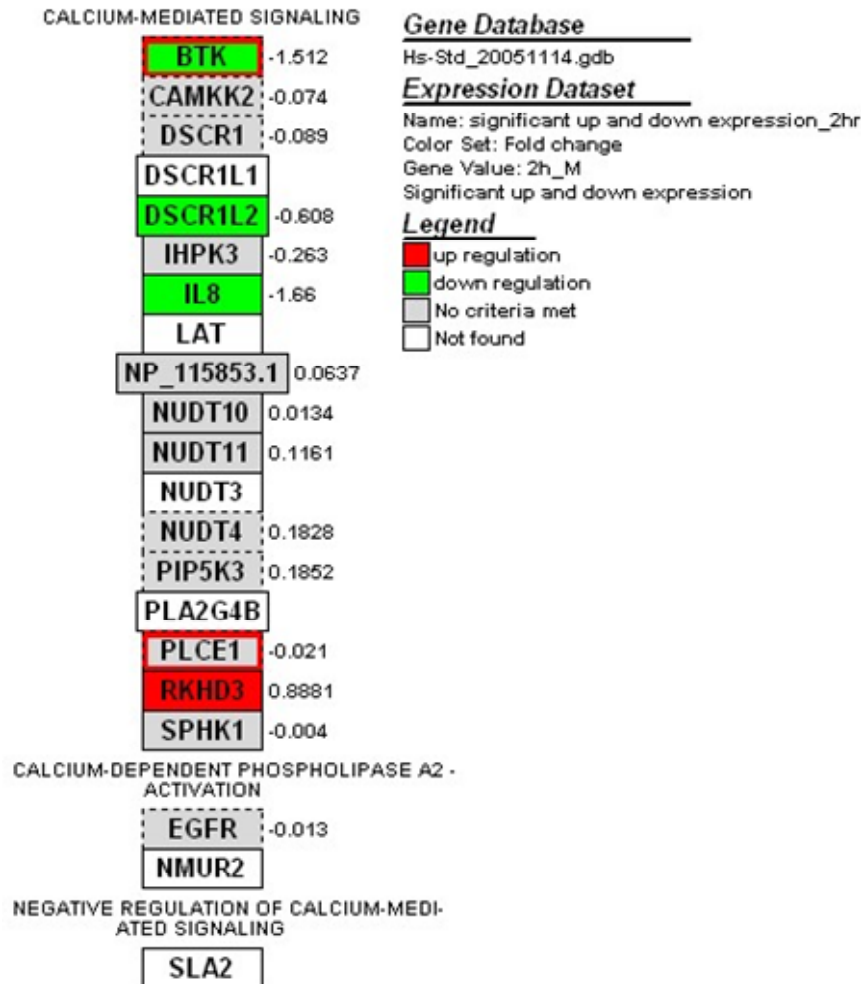


圖 9-3. 參與在 calcium-mediated signaling 功能叢集中的顯著表現基因及其表現模式

endosome transport

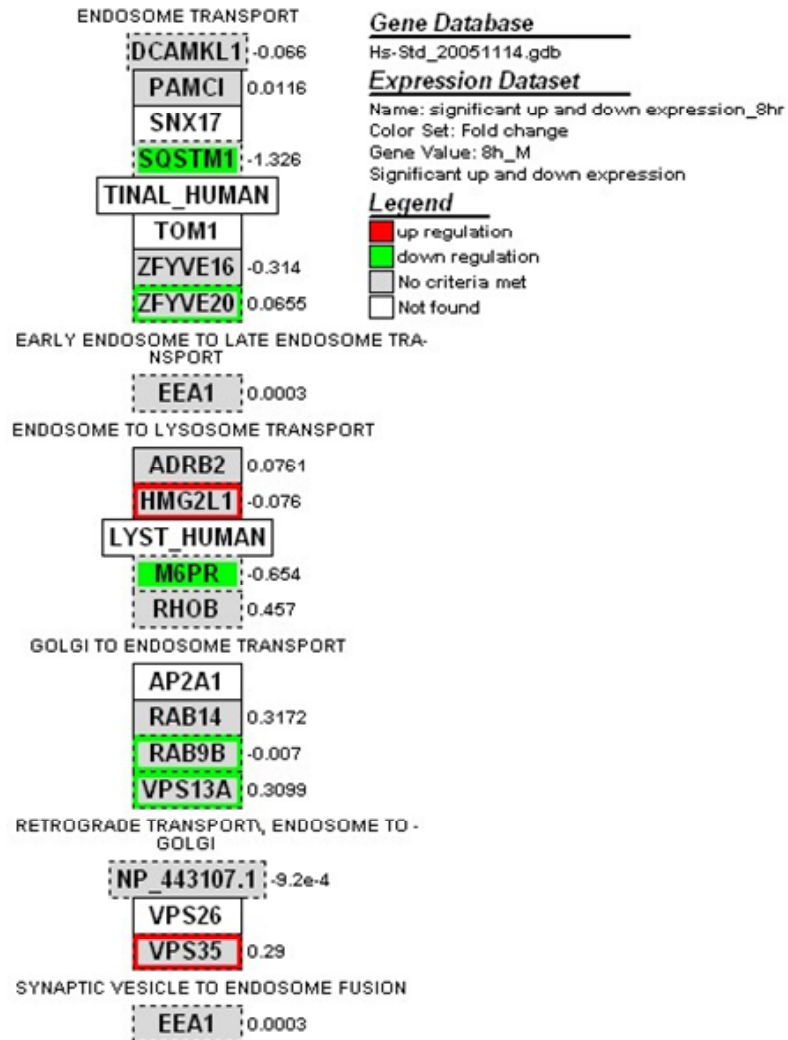


圖 9-4. 參與在 endosome transport 功能叢集中的顯著表現基因及其表現模式

regulation of G-protein coupled receptor proteins

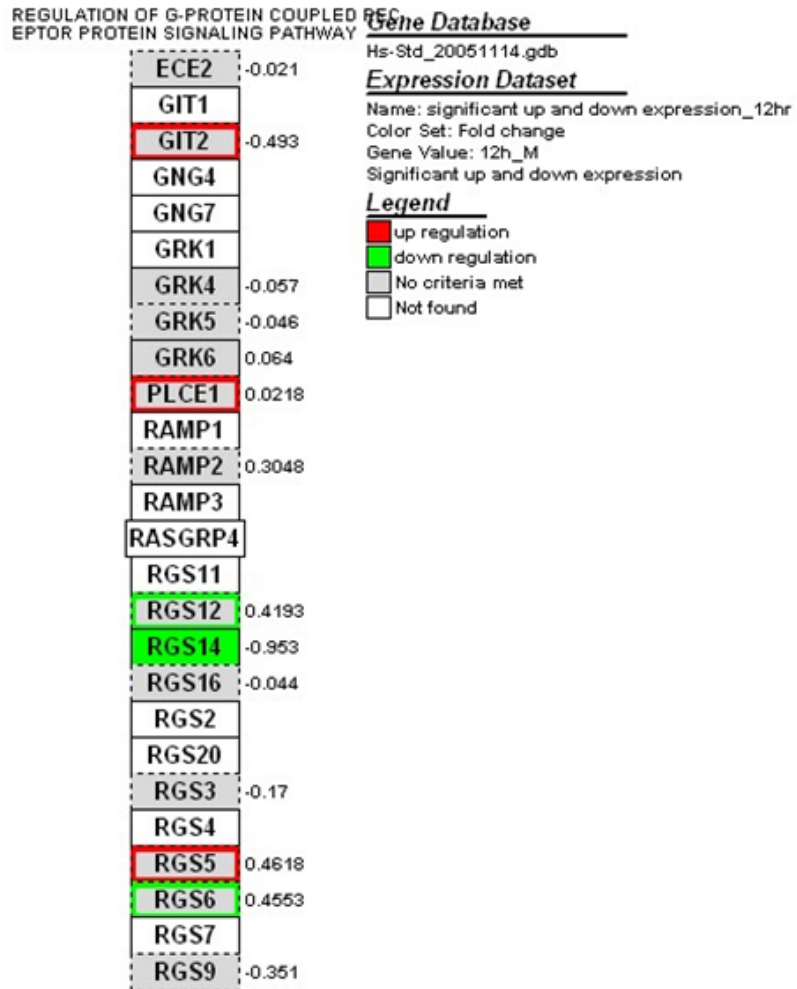


圖 9-5. 參與在 regulation of G-protein coupled receptor proteins 功能叢集中的顯著表現基因及其表現模式

cellular morphogenesis

Author: Adaptation from Gene Ontology
 Maintained by: Gene Ontology
 E-mail: gene_ontology@axelrod.com
 Last modified: 200618
 Right click here for more.

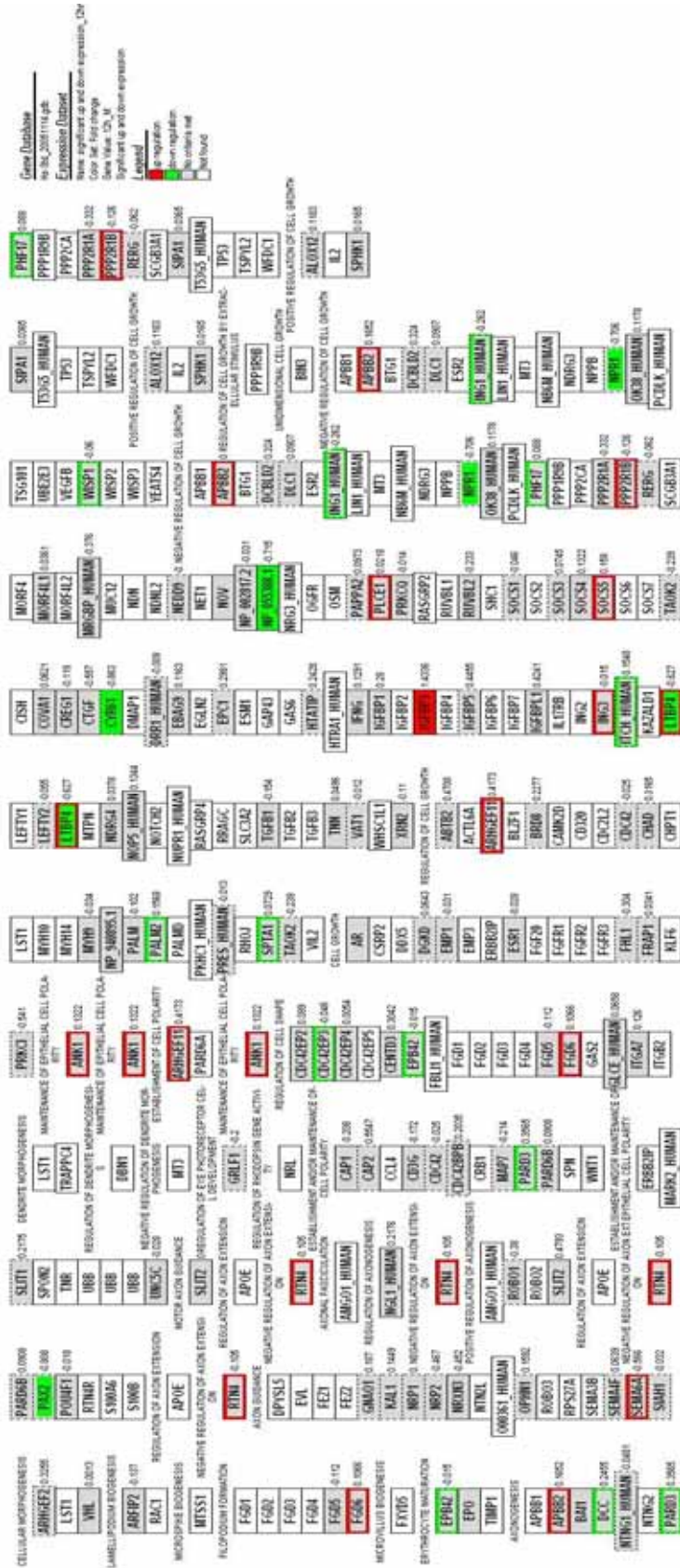


Figure 9-6

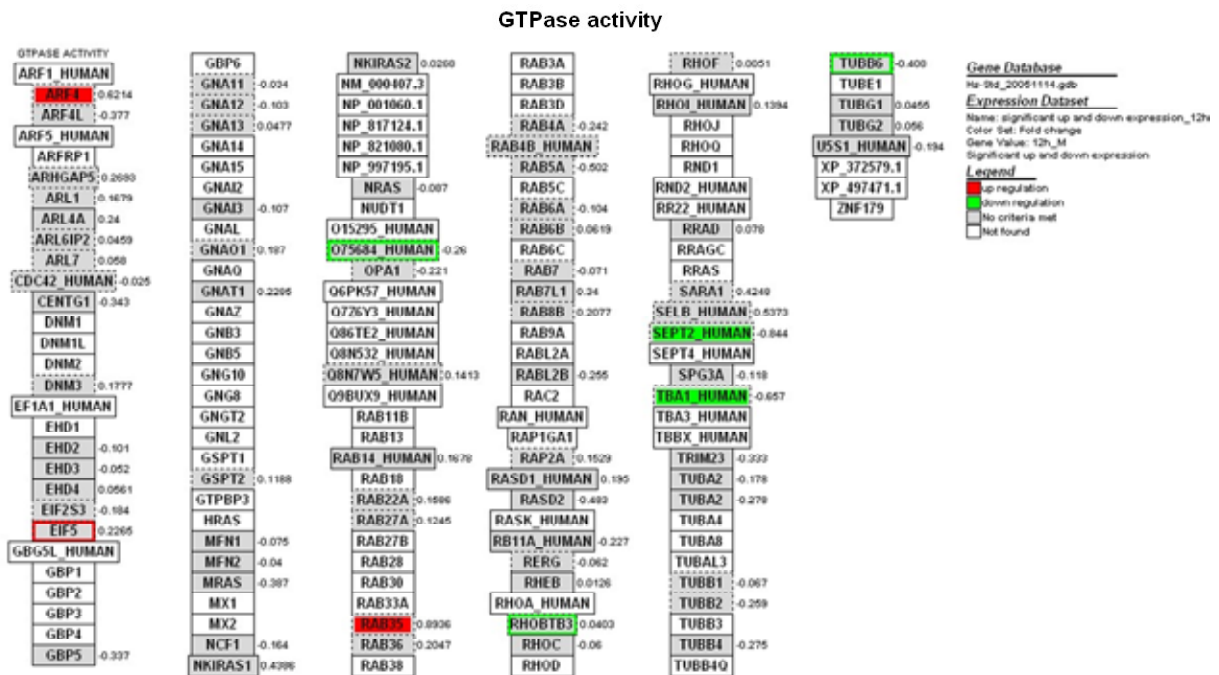


圖 9-7. 參與在 GTPase activity 功能叢集中的顯著表現基因及其表現模式

microtubule-based movement

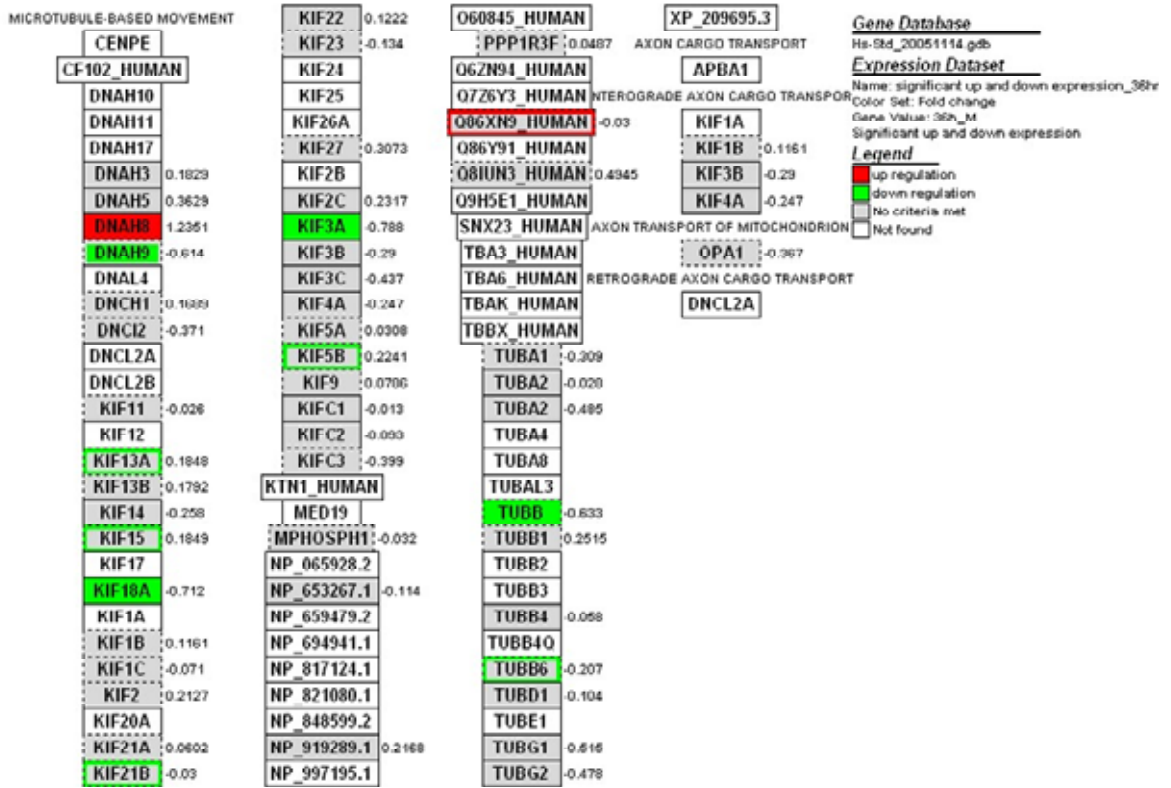


圖 9-8. 參與在 microtubule-based movement 功能叢集中的顯著表現基因及其表現模式

symbiotic interaction between host and other organ

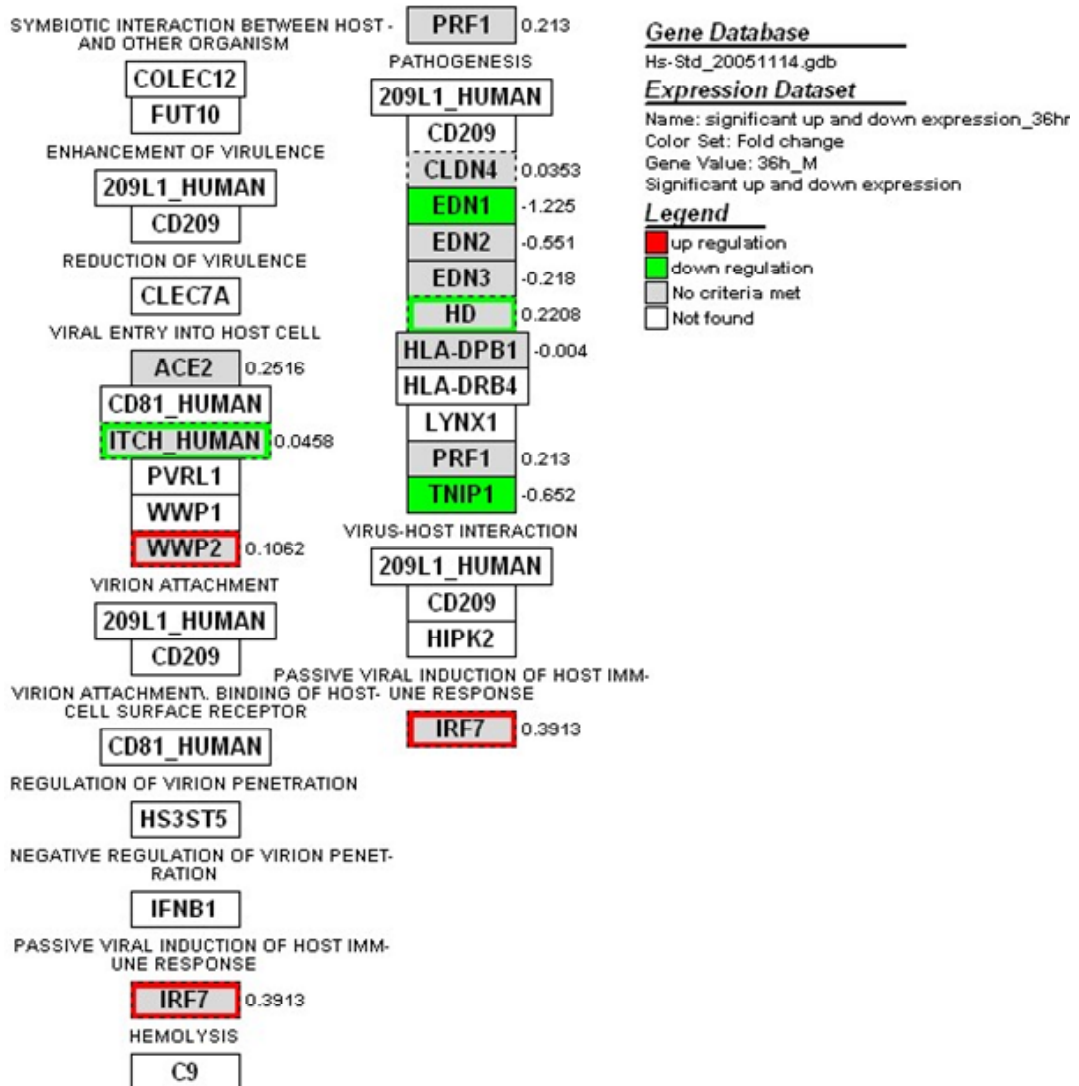
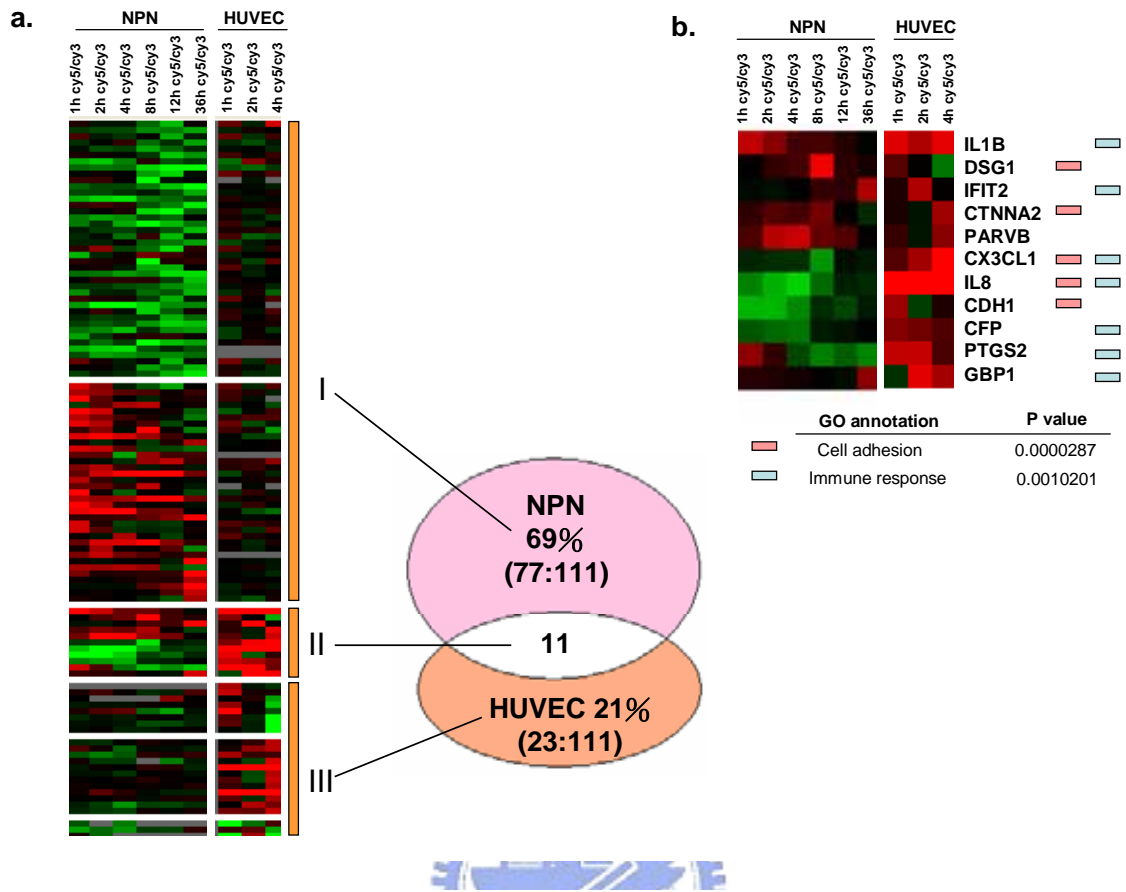


圖 9-9. 參與在 symbiotic interaction between host and other organism 功能叢集中的顯著表現基因及其表現模式



C. Hemorrhagic-related genes differentially regulated in NPN

Unigene ID	Gene symbol
<i>D2V-induced</i>	
Hs.534847	C4A ← Response to stress
Hs.523847	G1P3
Hs.532634	IFI27
Hs.81134	IL1RN
Hs.466871	PLAUR ←
Hs.516807	STK25 ←
Hs.2030	THBD ←
Hs.73793	VEGF
<i>D2V-suppress</i>	
Hs.262150	CD22
Hs.120949	CD36
Hs.42771	CDH19
Hs.148909	CHL1
Hs.134830	COL8A1
Hs.8867	CYR61
Hs.485616	DST ← Integrin-mediated signaling
Hs.41296	FLRT3
Hs.54943	FXC1
Hs.133397	ITGA6 ←
Hs.497636	LAMB3
Hs.136348	POSTN
Hs.164226	THBS1
Hs.169875	THBS3

圖 10a. 在初級上皮和血管內皮細胞受 D2V 感染後，可能參與出血致病機制的顯著差異表現基因

10b. 11 個共同在初級上皮及血管內皮細胞顯著差異表現的出血致病相關基因

10c. 在初級上皮細胞中顯著差異表現的出血致病相關基因 cluster ID 及名稱

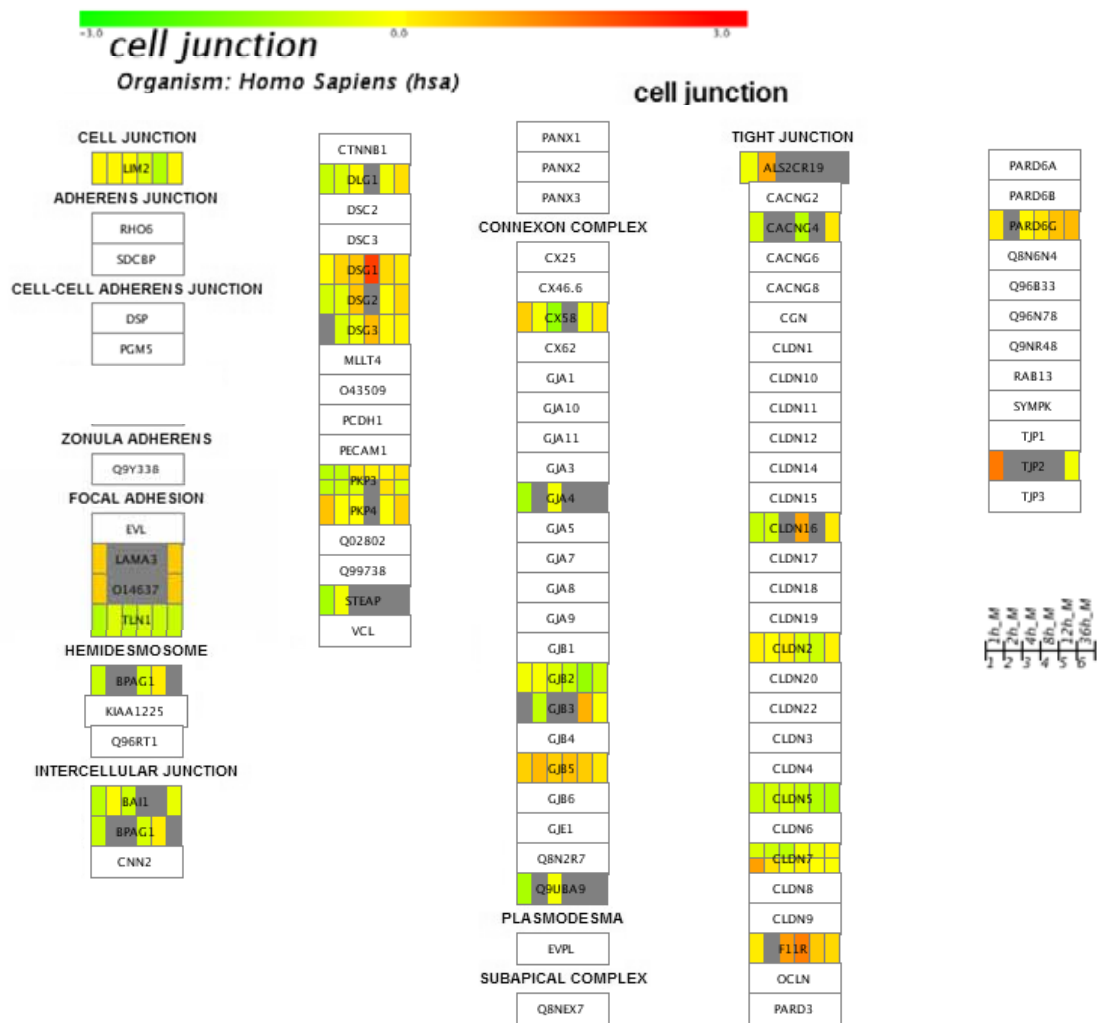


圖 11. 利用 GO 分類系統中 cellular component 分類細項將顯著差異表現基因進行分析後，得與 cell junction 相關的基因功能叢集顯著表現。

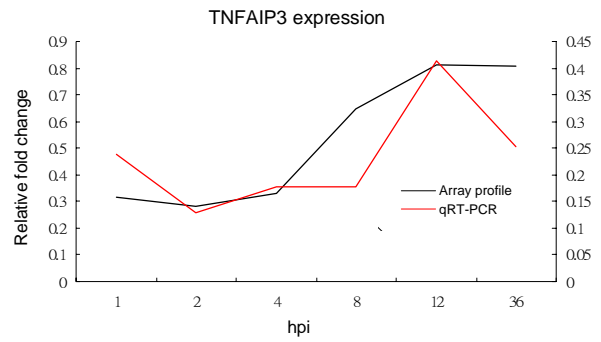
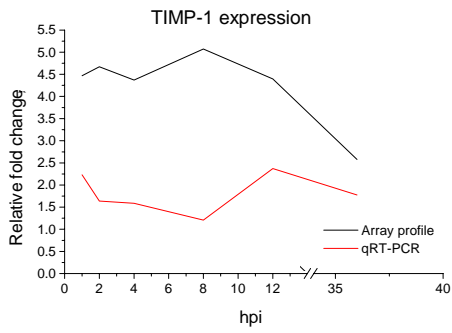
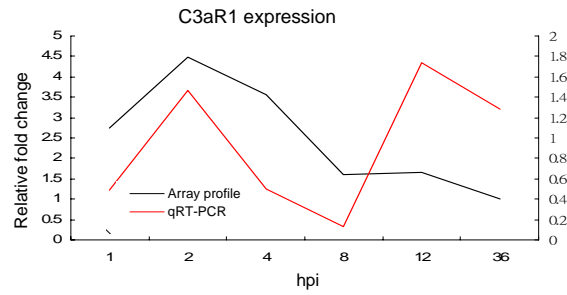
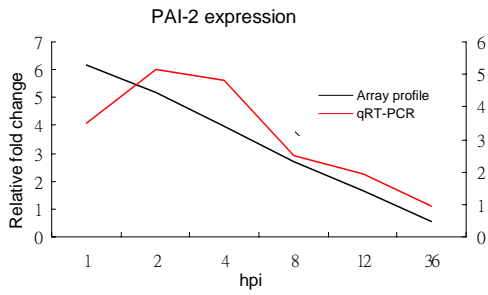


圖 12. 利用 qRT-PCR 技術測得基因表現量趨勢與微陣列技術資料趨勢相符，藉以確立微陣列技術的可信度及再現性

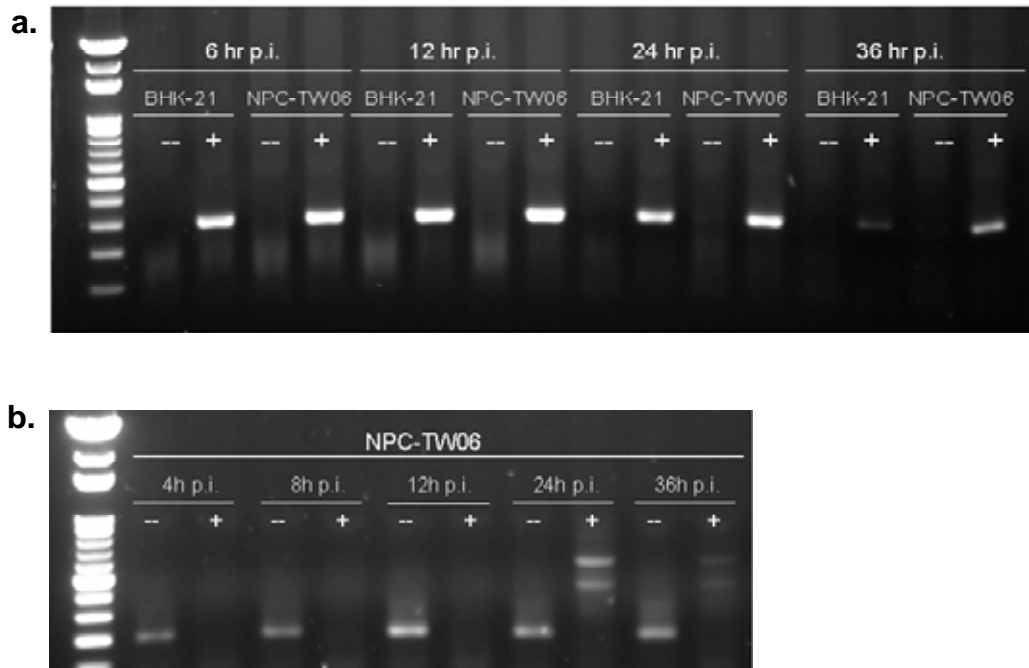
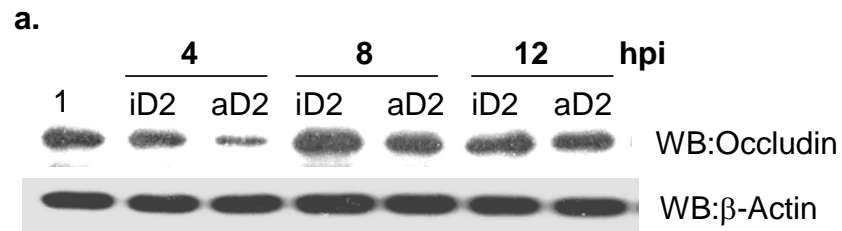


圖 13a. 利用辨識 D2V NS3 正股的 primer 進行 PCR，藉以確認 D2V 在感染過程中進入細胞作用

13b. 利用辨識 D2V NS3 負股的 primer 進行 PCR，藉以確認 D2V 進入細胞後進行複製過程



Lane 1: ECV304 only

iD2: heat-inactivated D2V

aD2: activate D2V , moi=5

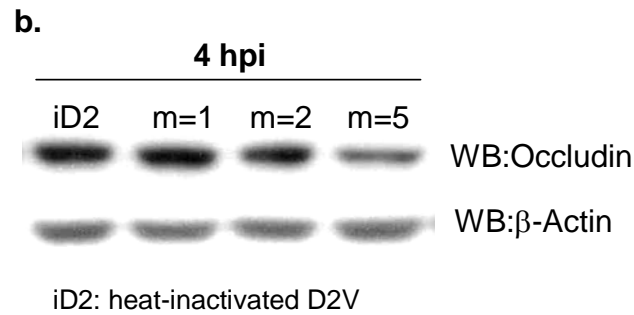


圖 14a. 上皮細胞受 D2V 感染不同時間點後(hpi)其培養液對內皮細胞 junction protein (occludin)的影響

14b. 上皮細胞受 D2V 感染不同病毒效價後其培養液對內皮細胞 junction protein (occludin)的影響

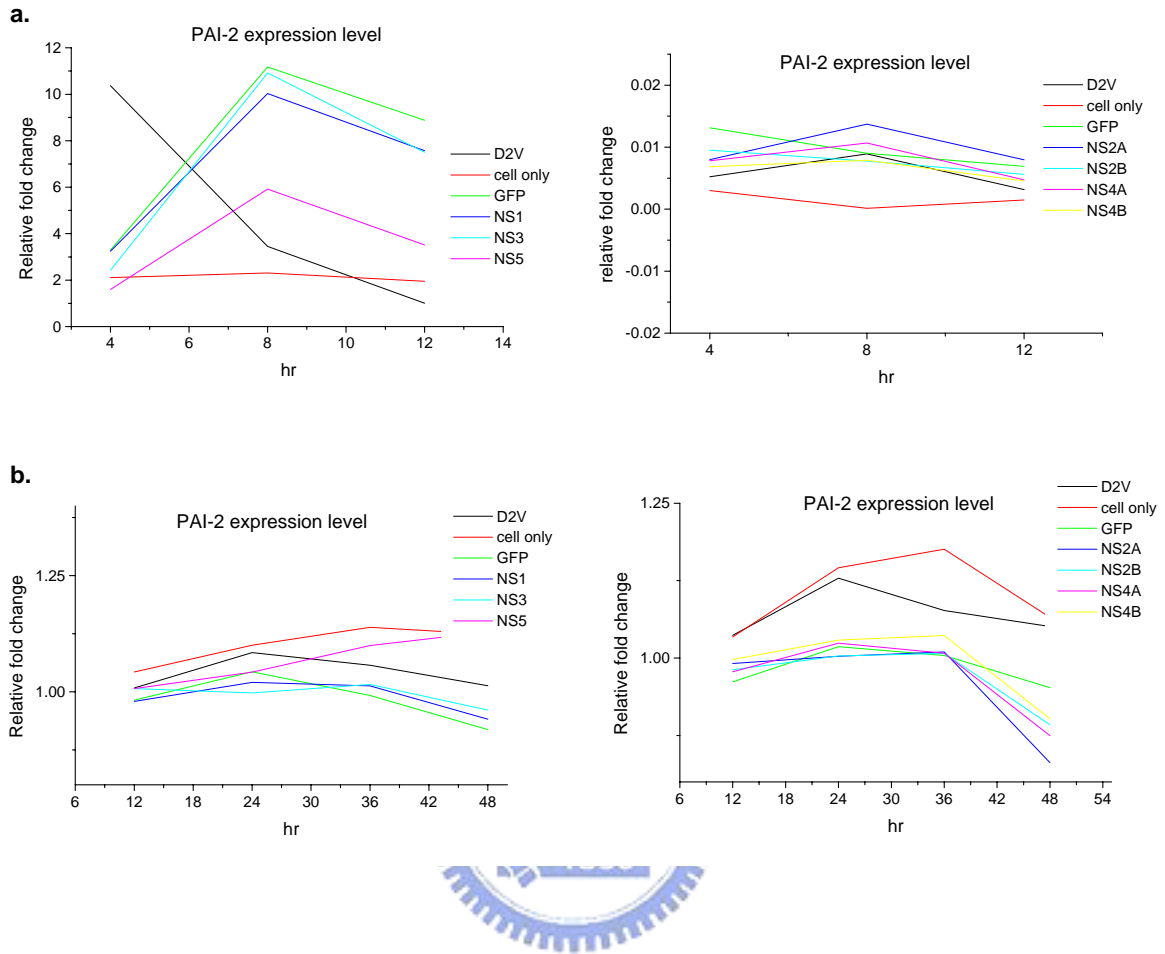
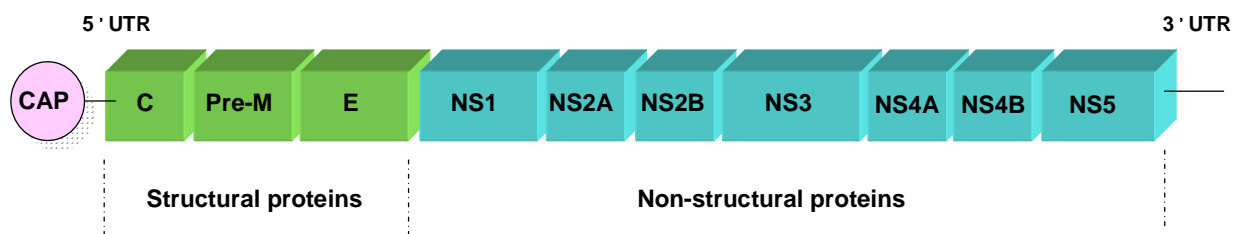


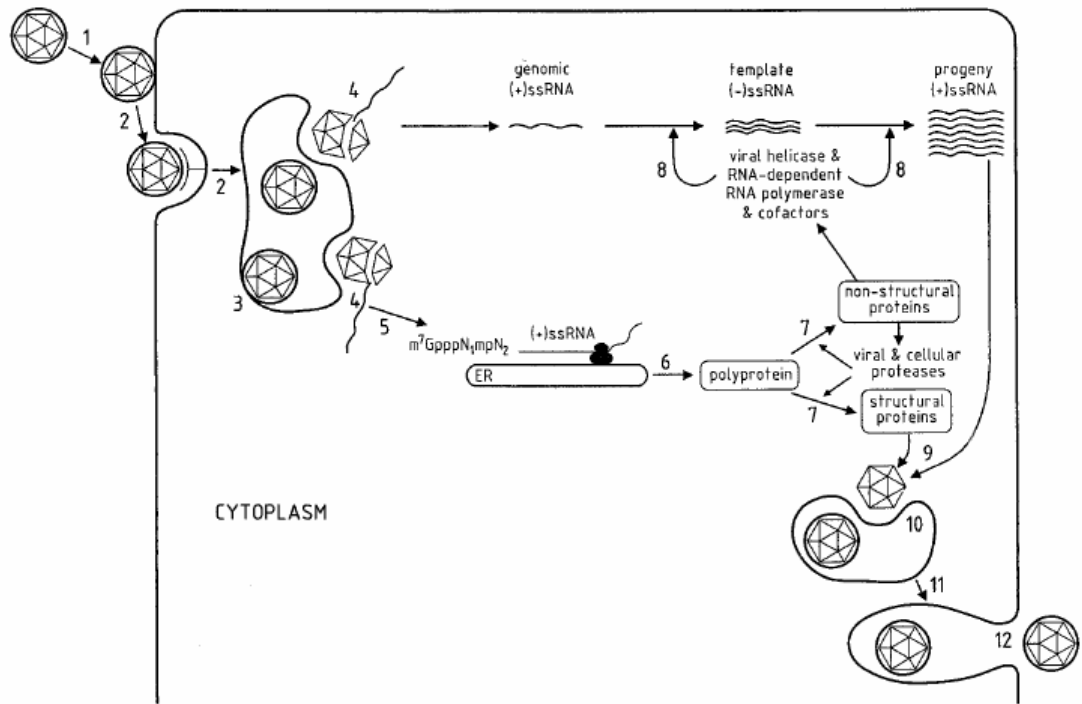
圖 15a. 可能與出血性相關的基因 PAI-2 在上皮細胞在早期時間點上(4/8/12 hr)受 D2V 感染或過度表現不同病毒蛋白情況下的表現趨勢

15b. 可能與出血性相關的基因 PAI-2 在上皮細胞在晚期時間點上(12/24/36/48 hr)受 D2V 感染或過度表現不同病毒蛋白情況下的表現趨勢

附圖一、登革熱病毒基因體組成結構

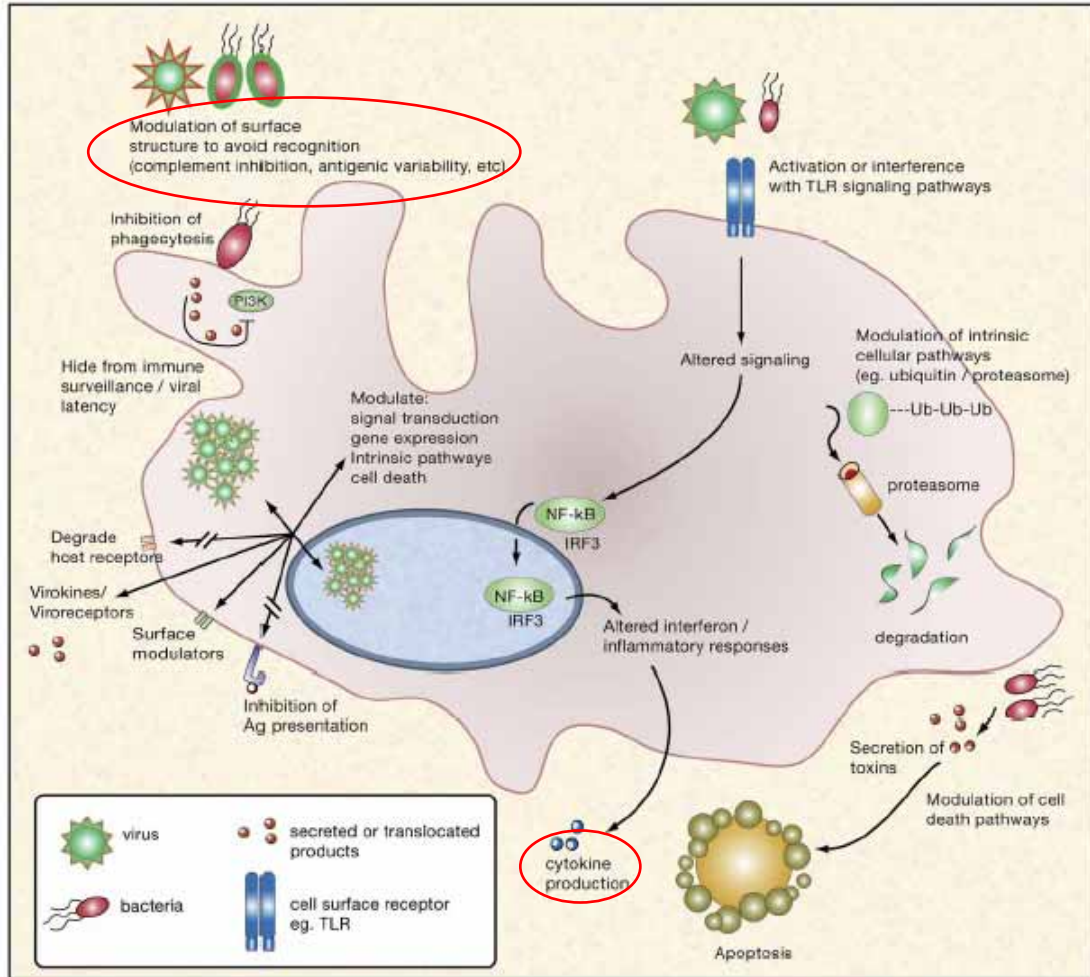


附圖二、登革熱病毒複製週期



1896
 CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, Jan. 2000, p. 67-82 Vol. 13, No. 1

附圖 3. 細胞受細菌或病毒入侵所產生免疫反應防禦機制



Cell 124, 767-782, February 24, 2006

附圖 4. Microarray image and scatter plot of microarray data

