

八十七年度衛生署研究計劃期末報告

分子變異的登革熱病毒核酸和蛋白質分析

**Analysis of viral proteins and nucleic acid sequences
among molecularly divergent dengue 2 viruses**

執行機關：長庚大學醫學院

執行單位：公共衛生暨寄生蟲學科

執行期間：86 年 7 月 1 日至 87 年 6 月 30 日

計劃編號：DOH87-TD-1017

計畫主持人：陳 維 鈞

聯絡電話：(03)3280-3016 轉 5139

傳真號碼：(03)328-3031

目錄

一、中文摘要

二、英文摘要

三、前言

四、材料與方法

五、結果

六、討論

七、謝誌

八、參考文獻

九、圖表及說明

中文摘要

自從 1988 年登革熱重新現身臺灣以來，就一直不曾間斷過，目前已成為本地十分重要的熱帶疾病之一，近年來並已有多起出血性病例的報導，其中尚且包括一名死亡病例。一般都相信出血性登革熱是由於免疫增強作用所引起；然而也有不少證據顯示，病毒毒力因素所導致的可能性並不容忽視。近幾年出現在臺灣的出血性登革熱患者，事實上都沒有先後兩次感染的記錄，因此，就臺灣本土的病例而言，後者其實更應受到重視。本研究即利用實驗室培養的蚊蟲細胞 (C6/36)，連續培養登革二型病毒，探討這些長期感染於蚊蟲細胞的病毒，是否因而改變其核酸結構及其所表現的蛋白質，以模擬自然界中病毒在宿主細胞長期存在，所可能導致的變異現象。我們以往的研究已顯示，長期持續感染於 C6/36 細胞的登革二型病毒，雖都能以免疫螢光抗體試驗測得，有些卻無法利用聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 測其 RNA 之存在，顯示病毒在培養過程中可能改變其部份核酸結構，抗原性卻仍然存在。比較所篩選出來的病毒株間的核酸序列片段，套膜基因確實是容易發生變異的部份。目前的研究結果顯示，較長期持續感染 (第五、十代) 的登革二型病毒，其 RNA 套膜基因片段 (940—1160) 的變化較大，變異的型態主要是以 transition (包括 A↔G 或 U↔C) 為主，但也有 deletion 及 insertion 的情形，這些變異顯然較常發生於 5'-end。此外，蛋白質組成的研究則顯示，在培養過程中，病毒的 NS1 (約 42 Kda) 蛋白質在結構上可能發生變化，從而影響其刺激產生抗體的能力。換言之，當病毒持續感染於細胞中，蛋白質整體的結構也許不受的影響，但其抗原決定位置 (antigenic determinant) 却可能在演化的過程中發生改變，這可能是蟲媒病毒在病媒與宿主間在傳播過程中，藉以形成新基因型病毒的一種方式。

英文摘要

Dengue fever has one of most important health problems in Taiwan since reemergence in 1988. Dengue hemorrhagic fever (DHF) including one fatal case has been reported in past years^{1,2}. It has been thought that DHF may be caused mainly by a mechanism of immune enhancement. However, the factor regarding to the virus virulence should not be ignored since no any sequential infection of dengue viruses in all DHF cases reported from Taiwan has been recorded. In this study, we selected dengue 2 viruses persistently infected in C6/36 cells to examine their variation in both genetic and protein level. We have ever reported that some viruses persistently in C6/36 cells can be detected by using the immunofluorescent antibody test ; but by polymerase chain reaction (PCR). It suggests that the viruses may remain their antigenicity in spite certain part of its RNA sequence has been modified. The variation of nucleic acids has been observed in the segment of E region. Although transition has been frequently occurred in this study; it may occur in either low or high passages of the viruses, both deletion and insertion in the RNA sequence have also been seen in certain position. In fact, all this changes seems to occur on the 5'-end of the RNA sequence more frequently. The analysis of proteins showed that at least one protein, i.e. NS1 may be lost over the passage, suggesting the antibody-inducing ability of NS1 may be deleteriously affected. In other word, the antigenic determinant of the viral protein may be changed even its tertial structure remains intact. Presumably, it is one of strategies of the arboviruses to form a new genotype from the interaction between the virus and hosts including mammal hosts and arthropod vectors.

前言

登革熱是目前東南亞及其它許多的熱帶國家重要的傳染病之一 (Goh et al. 1987; Gubler 1989)。第二次世界大戰以後，臺灣曾在 1981 年發生一次以小琉球為主的大流行，造成當地約 80% 的居民被感染 (吳 1986)。1987-1988 年，南部地區再度爆發歷年來少見的大流行 (Department of Health 1989)。此後，登革熱每年都在臺灣各地造成規模不一的流行。而即使沒有大規模流行，病毒也仍然因不顯性感染而悄悄地傳播 (Chen et al. 1996; Chen et al. 1997)。1998 年，至 8 月下旬，全臺各地也已有約 58 個病例，其中有一個是本土性病例；在這些病例中還包括一例為出血性登革熱 (衛生署資料)，這是個不得不令人注意的警訊。

全世界上已知有 500 多種蟲媒病毒 (Arboviruses 1985, American Society of Tropical Medicine and Hygiene)，登革熱是其中一種必須經由蚊蟲媒介的疾病，其分佈以熱帶國家為主。在病毒學分類上，登革熱病毒屬於黃病毒科 (Flaviviridae) 的黃病毒屬 (*Flavivirus*) (Westaway et al. 1985)。大多數的登革熱病例雖然並不嚴重危及生命，但有部份報導顯示此病毒可能導致中樞神經系統被感染 (Chen et al. 1991)，有些被感染者則呈現出血性或休克性登革熱的病徵 (Halstead 1980; Hsu et al. 1994)。由於登革熱在臺灣的流行並沒有停歇的跡象，儼然成為人民健康的一大威脅，迄 1998 年八月下旬，全臺灣登革熱的確定病例已超過去年同期的一倍，雖出血性登革熱病例在臺灣出現得並不多，但已有因此而死亡者 (Hsu et al. 1994)。事實顯示，病例發生頻率已有漸高的趨勢，這是個十分值得重視的警訊，揆諸其它流行類型近似的國家 (如古巴和斯里蘭卡)，往後的每一次流行出現嚴重病例的機率都將存在 (Kouri et al. 1989; Kuno 1995)。事實也已顯示，1996 年 10 月份在高雄市小港區所出現當年第一個本土病例，即是個出血性登革熱的患者，1998 年的第一例的出血性登革熱也已在八月份出現。

雖然出血性登革熱被認識已有數十年，其形成的原因卻仍不十分清楚。根據流行病學調查及實驗室研究，比較可能的機轉包括免疫增強作用和病毒毒力因素等兩種。由以前者一直以來都受到比較多的重視，然而，也有不少證據顯示，後者的可能性並不容忽視。以近幾年來出現於臺灣的出血性登革熱病例來看，都沒有兩次感染的記錄，因此，就臺灣本土的病例而言，後者其實更應受到重視。

以往的研究已顯示，當昆蟲細胞被蟲媒病毒感染，有些會出現細胞聚集的現象 (Deubel and Digoutte 1981)，但引起細胞病變 (cytopathic effect) 的情形並不常見 (Rehacek 1968, Henchal and Putnak 1990)，這也可以從電子顯微鏡觀察受病毒感染的細胞，並未有被破壞之跡象來證明之 (W. J. Chen; unpublished data)。反之，病毒在感染細胞中卻不可避免受到影響可能產生變異 (Deubel and Digoutte 1981; Newton and Dalgarno 1983)，尤其是許多蟲媒病毒都屬 RNA 病毒，因而引起變異的可能性更大。事實上，一旦病毒持續感染於蚊蟲細胞，就常使細胞衍生出一些前所未見的特質，一般來說，病毒本身的變異很可能就是促成這些性狀改變的重要原因 (Igarashi et al. 1977, Randolph and Hardy 1988a&b)。

蟲媒病毒於昆蟲細胞中持續感染的現象早為人所知悉，但形成的原因迄今未明，不同的病毒在細胞中持續感染的結果也未見一致 (Newton and Dalgarno 1983; Randolph and Hardy 1988a&b)。據報導，病毒確實會在持續感染於培養的細胞後發生突變 (Wechsler et al. 1979)。本實驗室在過去已對持續感染於 C6/36 細胞的登革熱病毒的特性做過一部份的研究 (Chen et al. 1994)。我們發現這些持續感染的病毒，其效價隨培養過程呈週期性增減，而且在不同溫度之下，及在不同寄主細胞中，病毒所表現出來的生長曲線均有所差異。這種現象顯示病毒本身特性的變化，而從免疫螢光抗體反應和病毒效價並非呈絕對平行關係，似乎顯示基因缺失干擾之病毒顆粒 (DI particles) 的形成可能是原因之一，換言之，病毒在 C6/36 細胞中經長期培養後，其遺傳組成很可能會有所改變；亦即對哺乳動物細胞 (如 BHK-21、Vero cells) 的感染力發生變化 (W. J. Chen, unpublished data; Chen et al. 1994)。

當這些病毒的性狀發生，必然有潛藏於分子生物學上的意義，在這個研究中，我們利用實驗室培養的蚊蟲細胞 (C6/36 cells)，連續多代培養登革二型病毒，除觀察其部份性狀，主要也分析了長期存在於蚊蟲細胞病毒核酸變異的情形；並進一步探討病毒的蛋白質表現是否因而受到影響？

材料與方法

持續感染登革病毒之培養：

本研究首先必須建立持續感染的 C6/36 細胞株。其步驟簡述如下：首先將不同 MOI = 1 (multiplicity of infection) 之登革熱病毒接種於 C6/36 細胞，培養於 28 °C 之下，然後，每隔一星期拍下培養瓶中大部份的細胞，連同舊培養基倒出保存，然後再加入新培養基於舊培養瓶，令留存於瓶中的細胞繼續繁殖。每週留下之培養基即為一代 (passage)。

病毒效價之測定：

此檢測方法係參考本實驗室發表的文章中所敘述過的步驟 (Chen et al. 1994)。首先將 BHK-21 cells 種於 24 孔培養盤直至 monolayer 將形成之時，以 100 µl 不同稀釋倍數 ($10^1 \sim 10^6$) 之病毒稀釋液加入已事先抽掉培養基之培養盤的各孔，於 37 °C 下經 1 小時吸附，再於各孔中加入 1 ml 含 0.4% agarose 之新鮮培養基，於 37 °C 下培養 7 天後取出固定並染色，風乾後計算各孔之蝕斑，再依稀釋倍數換算成每毫升所含有之蝕斑形成單位 (PFU/ml)。

RNA 抽取：

本方法係按照 QIAGEN 公司產品的說明書所述，其方法概述如下：

1. 取 140 µl 的病毒懸浮液，置於 1.5 ml 的 microfuge tube 內。
2. 加 560 µl 的 AVL 緩衝液於 microfuge tube 內，振動混合均勻。
3. 於室溫下放置 10 分鐘。
4. 加入 560 µl 的 96-100% 酒精，振動混合均勻。
5. 取 630 µl 混合液，以 QIAamp spin column 過濾於另一支 2ml 的 microfuge tube 內。丟棄率液。
6. 重複上一步驟。
7. 打開 QIAamp spin column，加入 500 µl 的 AW 緩衝液。離心一分鐘。置離心過的 QIAamp spin column 於另一 2 ml 的 microfuge tube 內。
8. 打開 QIAamp spin column，再加入 500 µl 的 AW 緩衝液。於 14,000 rpm (20,000 g) 離心三分鐘。
9. 將 QIAamp spin column 置於另一乾淨的 1.5 ml microfuge tube 內。
10. 打開 QIAamp spin column，將 RNA 以 50 µl 的 Rnase-free water (預熱至 80 °C) 洗出，於 6,000 g (8,000 rpm) 下離心一分鐘。

聚合酶鏈鎖反應：

(1) 引子 (primers) 之選定---

由於 RNA 病毒在演化過程中最易受改變的是其套膜基因 (Rico-Hesssee 1990)。本研究乃參考 Duangchanda et al. (1994) 的所發表的文獻方法選定下列的

引子組 (並由此衍生其它 sense and complementary primer 的組合) (表一)，利用不同位置 PCR 產物探討這段基因變異的位置，並進一步對部份病毒株的核酸定序，評估其變異的內容。

表一、Nt sequences of the D2 primers

Primer codes	Sequence (5' → 3')	Position*
D2-810S	AACCTGGATCTTGAGACATC	829-810
D2-1257C	TAATCCACATCCATTCC	1257-1120
D2-1554C	CCAAGCTTGTCTTCCATCT	1554-1535
D2-1849C	TTCCTGTACACATAGAGTAT	1849-1830
D2-2163C	TGTGCACGTTATCTGTGATGAAGATCC	2163-2143
D2-2500C	TGTGCACGTTATCTGTGATGAAGATCC	2500-2474

S: sense primer; C: complementary primer

* Position of nt in entire genome sequence

(2) RT-PCR 之操作---

這個實驗將參考林孟平 (1994) 檢測登革熱病毒的方法。其步驟簡述如下：

1. 以 5 μl 抽取出來的 RNA 混合 1 μl 的 complementary primer 及 4 μl 的 DEPC-treated water 於一 2 ml 的 microfuge tube 。
2. 於 75 °C 之下 incubate 10 分鐘，取出置於冰上 5 分鐘。
3. 加入 1 μl 的 sense primer 於上述之 microfuge tube 。
4. 將裝有混合物的微離心管置於 PCR machine 中。
5. 加入 14 μl 的 RT/PCR reaction buffer 。
6. 加 30 μl 的 mineral oil 於 microfuge tube 。
7. 隨後進行 35 PCR cycles, 每個 cycle 的反應條件訂為: 94 °C 1 分鐘 → 50 °C 1 分鐘 → 72 °C 2 分鐘。最後讓產物在 72 °C 停留 10 分鐘。
8. PCR 產物可保存 4 °C 或更低的溫度或於 2 % 含 ethidium bromide 的 agarose gel 進行電泳，結果於螢光板上觀察並照相。

* RT-PCR reaction buffer:

DEPC-treated water 9μl

10% PCR buffer 2.5μl

DIG-dNTP(2.5mM) 2μl

DTT (0.5M) 0.125 μl

RNAsin (40μg/μl) 0.25μl

Reverse transcriptase (15 μg/μl) 0.035 μl

Tag (5 μg/μl) 0.035 μl

(3) 核酸定序---

核酸定序係依據 direct sequencing design 進行，其步驟簡述如下：

1. 取 50 μ l 之 PCR 產物，利用一組 MicroSpin S-400 HR Columns (Pharmacia) 將 primer 和 dNTPs 過濾掉。
2. 所得到之濾液以酒精沉澱，然後於 vacuum centrifuge 中乾燥，使用前再將之溶於適量的水中。
3. 定序則以 Cycle Sequencing Kit (Boehringer Mannheim Biochemica) 為之。
4. 首先配製 20 μ l 含下列成份的混合液---
 - 1 pmol (1 μ l) of DIG primer (each complementary PCR primer)
 - 50 fmol (0.4 μ l) of PCR products
 - 2 μ l of reaction buffer
 - steril ddH₂O to 19 μ l
 - 1 μ l (3 units) Taq DNA polymerase
5. 上下搖動混合。
6. 加 2 μ l of the four termination mixture 至每一 labeled reaction vials 。
7. 將上述 reaction mixture 置於 PCR machine ，上鋪一層 mineral oil 。
8. 在機器中，共反應 30 cycles ，其條件設定如下： 96 °C ; 30 sec → 60 °C ; 30 sec → 70 °C ; 1 min 。
9. 每個 vial 加入 2 μ l 的 formamide buffer (to stop the reacton) 。
10. 於 95 °C 加熱 3 分鐘後，置於 GATC CCU1500 Sequencer 進行定序分析。
11. 完成定序之 nitrocellulose membrane 先於 50 °C 的烘箱中乾燥 30 分鐘，再於 UV 下 cross-linking 二分鐘。
12. 呈色反應 (Detection of sequences)
 - (1) 讓 membrane 與 blocking solution 反應 10 分鐘。
 - (2) 將 membrane 放入內含 anti-digoxigenin-alkaline phosphatase conjugate 的瓶中。
 - (3) 將瓶子置於 30 °C 的 hybridization oven 中反應 30 分鐘。
 - (4) 倒掉反應液，以 washing buffer 洗滌。
 - (5) 於瓶中加入含 nitroblue tetrazolium salt (NBT) 和 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (X-phosphate) 的受質，令其呈色。
 - (6) 序列判讀並記錄之。

蛋白質分析：

(1) 凝膠電泳---

本方法係根據 Laemmli (1970) 所敘述之 SDS-polyacryamide electrophoresis。並參考 Churdboonchart et al. (1991) 之結果，採用 12% seperating gel。進行時，將製備好之病毒抗原與等量的 sample buffer 混合，置於沸水中煮 3 分鐘。而標準蛋白質 (SDS-PAGE standards) 則以 1:20 的體積量混合，充填到含 2.5 % stacking gel 之樣品槽中，電泳槽內加上電泳緩衝液，再以固定電壓

120 伏特進行電泳；待指示劑移動至距膠體底端 0.5 公分處，關掉電源。取出膠體，準備轉漬 (blotting)。為了使電泳結果有所比較，每次均將同時跑兩片膠體，其中一片將以 Coomasie Blue 染色；另一片則進行免疫轉漬。

(2) 轉漬---

本技術係參考 Towbin et al. (1979) 之方法，電泳後，首先取出膠體切成條狀，使每一膠體條均含有已經電泳分離過的登革熱病毒蛋白質。將膠體條上之蛋白質轉漬到 $0.1 \mu\text{m}$ 厚且事先已裁剪成和膠體條一樣大小的 nitrocellulose (NC) strips。轉漬後，NC 條上均含有已分開的登革熱病毒蛋白。

(3) 轉漬蛋白質之分析---

轉漬後的 NC 條先以 4 % 牛血清白蛋白做為阻絕劑，以減少背景上可能出現的非特異性反應。將轉漬後的 NC 條和稀釋過的血清混合於 37°C 處理 3 小時或過夜 (稀釋液為 10 mM Tris-hydrochloric acid (pH 7.4) with 0.9 % NaCl (TBS) and BSA (5%))。取出後先以含 0.5 % Tween 20 的 TBS 洗滌，然後和 rabbit-anti human IgG-HRP 反應。經過另一次洗滌之後，置於含有 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) 和 H_2O_2 的溶液中 15 分鐘，取出後以蒸餾水沖洗後，吹乾。呈色反應之記錄係參考 Schupback et al. (1985) 所訂定的標準：0-不呈色—陰性反應；1-呈色但不明顯—微弱陽性反應；2-淡粉紅色—弱陽性反應；3-明顯的粉紅色—陽性反應；4-暗紅色—強陽性反應。

結果

持續感染病毒觀察

結果顯示，長期存在於培養的 C6/36 細胞的登革二型病毒，仍然可以免疫螢光抗體試驗 (immunofluorescence antibody test) 偵測出來 (圖一)。然而，免疫螢光抗體試驗和蝕斑測定 (plaque assay) 所得的病毒效價並非呈絕對平行關係，顯示有些抗原性已變異的病毒會在培養過程中出現，這可能是病毒在細胞中經長期培養後，遺傳組成有所改變所致。因此，這些持續的登革熱病毒，效價常隨培養過程而出現近乎週期性的增減。對於所篩選出來的病毒株間之核酸差異，經過 RNA 抽取，再以不同組合的引子對 (Primer pairs)，透過 PCR 製造出屬於套膜基因不同片段的 cDNA，經比對結果，持續感染的登革病毒，其套膜基因確實是容易病毒發生變異的部份。

核酸結構之變異

本研究以套膜基因為目標，利用多組引子對去偵測病毒 RNA 的變異，結果顯示病毒的此段基因確實會在培養的過程中產生變異。有些病毒在連續培養之後，對於特定的引子對沒有反應，但以免疫螢光抗體卻可偵測到。反之，有些病毒株仍然可以透過這些引子對偵測到 (表一)。我們曾經經比對原型之登革二型病毒 (New Guinea C; NGC) 和一株培養至第三代的病毒，在所分析共有 258 bp 的 RNA 序列，一共有 9 處出現變異，其中絕大多數係 A↔G 或 U↔C 的所謂 transition，包括四處 U→C (1023, 1047, 1137, 1179); 一處 A→G (1022); 一處 G→A (1170)。另外有兩處 G (1169, 1086) 及一處 C (1176) 出現單一核苷酸缺失。

而在本實驗中，我們發現持續感染於 C6/36 細胞的登革二型病毒細胞至第五代時，其變異的型態仍然以 transition (包括 A↔G 或 U↔C)為主，有些在第一代發生變異後即維持至第十代 (966, 1023, 1035, 1047, 1122, 1129, 1132, 1137, 1155)，有些則在變異後又再變回原來的核苷酸 (960, 1039, 1165)。一般而言，從我們所讀出的 E 基因的片段 (940—1160)中，發現 RNA 的序列以接近 5'-end 的部位變異性較大，除了時常出現的 transition 外，有的經第一代即發生 deletion (1148, 1167, 1179)，也有培養至第十代才發生 deletion 的 (1144, 1154)。另外，insertion 也多發生於此端 (1141, 1146) (圖一)。

蛋白質分析

將持續感染於 C6/36 細胞至第五代及第六代的病毒，以 western blot 分析，發現當病毒蛋白質經 SDS-PAGE 電泳後，若同時以一泰籍勞工之登革二型病人血清 (效價 1:2560) 反應，所得蛋白質組成型態並不完全相同。具體來看，結果有分子量為 42 Kda 的蛋白質出現於~~出現於~~第五代的病毒株，但並未出現於第六代的病毒株 (圖二)。以單株抗體檢測，這一段很可能就是 NS1 (Chen WJ, unpublished data)，顯示此蛋白質可能在培養過程中，發生結構上的變化，而這變化已足以影響其抗原性。

討論

一般而言，登革熱並不致對病人構成生命上的威脅，但近年來，出血性登革熱卻在許多熱帶國家逐漸成為一重要的健康問題，至於出血性登革熱的致病機轉，一直以來都是病毒學家深感興趣的課題，然而，時至今日，相關的研究雖然不少，確切的原因卻未明朗。就已知的理論來看，其主要成因可能有二：一是免疫增強作用 (Halstead 1988)；二是病毒毒力因素 (Rosen 1984)。雖然前者一直受到比較多的重視及討論，但也有不少證據顯示後者的可能性並不容忽視。臺灣自 1987 年起雖陸續有多次的登革熱流行，出血性登革熱的病例卻遲至 1994 年才出現 (Department of Health 1988; Hsu et al. 1994)。尤有甚者，近年來在臺灣出現的出血性登革熱患者 (包括 1998 年所出現的一個病例)，都沒有兩次感染的記錄 (Hsu et al. 1994)，顯示其形成因素具有相當程度的複雜性。在自然界，ssRNA 病毒的登革熱病毒本就常見其多變異性 (Holland et al. 1982)。而文獻上已有報導病毒在自然界經過人體及蚊蟲之多次連續傳播，可能造成病毒變異 (Randolph and Hardy 1988a&b)，也可因而篩選出具特殊性質病毒株 (Gubler 1989)。以往的研究經驗顯示當蟲媒病毒培養於脊椎動物細胞時，引起的細胞病變 (cytopathic effect, CPE) 通常十分明顯，甚至常因而破壞細胞。然而，若病毒感染活體昆蟲或培養之昆蟲細胞，雖然有時候會造成細胞聚集的現象 (Deubel and Digoutte 1981)，但引起之細胞病變卻常並不明顯 (Rehacek 1968, Henchal and Putnak 1990)。我們曾經在電子顯微鏡下觀察受高效價 (1×10^7 PFU/ml) 登革熱第四型病毒感染 14 天後之 C6/36 細胞，發現只有部份細胞感染有病毒，而且病毒顯然未具破壞細胞之能力 (W. J. Chen; unpublished data)。

雖然病毒並不引起被感染昆蟲細胞的病變，但長期培養後，能供給病毒繁殖之細胞佔總體細胞數之比例必然大幅下降，產生之病毒量也會顯著降低 (Davey and Dalgarno 1974)。促成這些現象的原因可能不只一端，曾有研究指出，遭受 alphaviruses (如 Sindbis virus 和 Semliki Forest virus) 持續感染的蚊蟲細胞，會釋出具有抗病毒活性的物質，而抑制病毒之形成 (Riedel and Brown 1979, Newton and Dalgarno 1983)，也許是這些物質使細胞免於受大量病毒感染而被破壞的命運。當然，在這理論的背後也有例外情形，例如受 kunjin virus 及黃熱病毒持續感染的蚊蟲細胞中就未被觀察到這類物質 (Deubel and Digoutte 1981)，似乎病毒本身的變化更可能是促成這些現象的原因。綜合相關的報導來看，大部份的蟲媒病毒一旦在細胞內形成持續感染，均可能因而衍生出各種特殊的性狀，包括對寄主動物之毒性、在細胞中形成斑點之大小、對溫度之感受性、寄主範圍以及病毒蛋白質之產量等等 (Stoller and Shenk 1973, Sinarachatanant and Olson 1973, Davey and Dalgarno 1974, Shenk et al. 1974, Igarashi et al. 1977, Randolph and Hardy 1988a&b; Chen et al. 1994)。其中登革熱病毒在這過程中所導致之表現型變化，包括在細胞中形成斑點之大小、對溫度之感受性、寄主範圍以及病毒蛋白質之產量等，本實驗室已有結果發表 (Chen et al. 1994)。

從自然生態的角度來看，蟲媒病毒在蚊蟲細胞中持續感染的現象，與這類病毒在自然界存在的模式其實是十分類似的，尤其是一旦病媒被病毒感染，也都是終身感染，但同樣不會引起明顯的細胞或組織傷害，因此，這個模式可以被充分利用來探討自然界中病毒和病媒的關係 (Ludwig and Icano-Connors 1993)。由於 RNA 病毒在演化過程中具易突變性早已為人所知，其中登革熱病毒在這過程中會導致一些表現型變化，而儘管病毒繁殖情形長期存在，病毒的抗原性病毒卻可能在培養過程中發生變異，而這可能就是病毒的遺傳組成有所改變所致 (Chen et al. 1994)。目前的研究已顯示病毒核酸序列在這樣的過程將發生變異的事實，這些變異直接促成病毒特性的改變。從我們初步的研究結果已顯示，經持續培養的病毒，其核酸序除了 E 基因的部份段落可能會被改變， NS1 的變化更可能導致相關蛋白質表現的異常。這些變異對登革病毒抗原性的影響是值得深入探討的，因為這兩種蛋白的中和抗體產生能力是所有相關蛋白質中最具潛力者 (Gentry et al. 1982)。

病毒在演化過程中，一旦有核苷酸發生變異或缺失，很可能連帶影響所表現出來的蛋白質，以本研究的觀察為例，不同培養代數病毒的 NS1 蛋白在細胞中表現的動態性，就是個明顯的例證。由於有些病毒在連續培養之後，對於特定的引子對沒有反應，卻能以免疫螢光抗體偵測到，顯示也可能病毒的抗原性雖與原來的病毒相似，但其基因改變的情形卻極為明顯。我們曾比較原型登革二型病毒 (New Guinea C; NGC) 和短期持續感染 (第三代) 的登革二型病毒的 RNA 之間的差異，在所定序出來的 258 bp 序列中，一共有 9 處出現變異。在這 9 處變異中，雖然有兩處 G 及一處 C 出現單一核苷酸缺失，顯示 G 與 C 在病毒演化過程中容易被 deleted，但有 6 處係 A↔G 或 U↔C 的所謂 transition，包括四處 U→C、一處 A→G 和一處 G→A，顯示 transition 是登革熱病毒常發生的變異現象。不過，由於這些出現 transition 的位置都發生在各組 triple codon 的最後一個核苷酸，因此短期持續感染的病毒不會改變其基因所轉譯的氨基酸，換言之，這些變異對其抗原性並無影響；而由於仍然存在有核苷酸缺失的現象，使得氨基酸轉譯受到影響的可能性不能排除，這些變異對病毒的抗原性就可能有所影響 (Zanotto et al. 1996)，而由於登革病毒感染細胞時，已知和套膜蛋白上可和細胞接受體相結合的兩段 motifs 有關 (Chen et al. 1997)，因此，這樣的變異若對其感染力產生某種程度的影響也並不令人訝異 (Hasegawa et al. 1992)。

另方面，較長期持續感染 (第五、十代) 的登革二型病毒，其 RNA 的變化顯然也較大，這也反應 RNA 病毒在演化過程易生變異的事實 (Holland et al. 1982, Lanciotti et al. 1997)。在本實驗中，我們發現感染於細胞至第五代的登革二型病毒，其變異的型態仍然以 transition (包括 A↔G 或 U↔C) 為主，有些在第一代發生變異後即維持至第十代，有些則在變異後又反向變回原來的核苷酸。結果也顯示，登革病毒 RNA 的 E 基因片段 (940—1160) 以接近 5'-end 的部位變化較大，除了時常出現的 transition 外，也有 deletion 及 insertion 發生。這可能是蟲媒病毒在病媒與宿主間在傳播過程中，藉由彼此的相互作用，而篩選出變異新基因型

病毒的方式之一 (Chang et al. 1995)，這在本研究就可以印證類似的推論。

以西方墨點法 (western blot) 分析持續感染於 C6/36 細胞至第五代及第六代病毒株，發現兩者的蛋白質組成型態並不完全相同。其中 NS1 (約 42 Kda) 只出現於第五代的病毒株，但未出現於第六代，顯示此蛋白質可能在培養過程中，發生結構上的變化，而這變化已足以影響其刺激產生抗體的能力。由此亦可知，當病毒持續感染於細胞中，蛋白質整體的結構並未受到明顯的影響，但抗原決定位置 (antigenic determining site) 却可能在演化的過程中發生改變，這從長期培養 (如第五代、第十代) 病毒所產生的核酸變異也可以得到進一步的證實。

本實驗室在先前的研究中曾發現，持續感染的病毒顆粒比其它黃病毒小一些 (Henchal and Putnak 1990; Chen et al. unpublished data)，有些一些病毒顆粒的 nucleocapsid 可以被染色，顯然是外殼受損，有可能是發育過程出現瑕疵，或是在離心過程中，其 envelope 受傷害。至於直徑僅及原型一半的小顆粒，據判斷，可能是在培養的過程中核酸變異太大，而改變其應有的形態或大小。核酸序列分析顯示，經連續培養的病毒之套膜基因的 cDNA 片斷有部份缺失，以致演繹出來的氨基酸序列異於原型，這或許就是造成病毒變異的原因之一。從另一方面來看，因為 NS1 也可能發生變異，又因為 NS1 與病毒複製 (包括 assembly 和 release) 有關，這些形態異常的病毒也可能因 NS1 發生變異所致，由此觀之，因核酸變異太大導致病毒顆粒大小出現異常變化的推論，並非全是臆測之詞。至於這些變異和病毒致病力的關係，則是另一個饒富味又具臨床意義的課題。

謝誌

衛生署補助本計劃的經費 (DOH86-TD-1017)，研究期間，承王姮臨、范姜美慧和王聿韻等人協助計劃進行，謹致謝忱。

參考文獻

1. 林孟平。 1983。 東港地區登革熱病毒血清流行病學研究暨登革熱病毒快速
2. 吳盈昌。 1986。 1981 年屏東縣琉球鄉之第二型登革熱流行。中華微免雜誌 19:734-741。
3. Chang, G. J. J., Cropp, B. C., Kinney, R. M., Trent, D. W., and Gubler, D. J. 1995. Nucleotide sequence variation of the envelope protein gene identifies two distinct genotypes of yellow fever virus. *J. Virol.*, 69:5773-5780.
4. Chen, W. J., Chen, S. L., and Fang, A. H. 1994. Phenotypic characteristics of dengue 2 virus persistently infected in a C6/36 clone of *Aedes albopictus* cells. *Intervirology*, 37:25-30.
5. Chen, W. J., Hwang, K. P., and Fang, A. H. 1991. Detection of IgM antibodies from cerebrospinal fluid and sera of dengue fever patients. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth.*, 22:659-663.
6. Chen, W. J., Chen, S. L., Chien, L. J., Chen, C. C., King, C. C., Harn, M. R., Hwang, K. P., and Fang, J. H. 1996. Silent transmission of the dengue virus in southern Taiwan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 55:12-16.
7. Chen, W. J., King, C. C., Chien, L. J., and Fang, A. H. 1997. Changing prevalence of antibody to dengue virus in paired sera in the two years following an epidemic in Taiwan. *Epidemiol. Infect.*, 119:277-279.
8. Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Esko, J. D., Linhardt, R. J., and Marks, R. M. 1997. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nature Med.*, 3:866-871.
9. Churdboonchart, V., Bhamarapratvi, N., Peampramprecha, S., Sirinavin, S. 1991. Antibodies against dengue viral proteins in primary and secondary dengue hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 44:481-493.
10. Deubel, V. and Digoutte, J. P. 1981. Morphogenesis of yellow fever virus in *Aedes aegypti* cultured cells. I. Isolation of different cellular clones and the study of their susceptibility to infection with the virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 30:1060-1070.
11. Davey, M. W. and Dalgarno, L. 1974. Semliki forest virus replication in cultured *Aedes albopictus* cells: studies on the establishment of persistence. *J. Gen. Virol.*, 24:453-463.
12. Davey, M. W., Dennett, D. P., and Dalgarno, L. 1973. The growth of two togaviruses in cultured mosquito and vertebrate cells. *J. Gen. Virol.*, 20:225-232.
13. Dittmar, D., Castro, A., And Haines, H. 1982. Replication of dengue virus in cultured mosquito cells at suboptimal temperature. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 170:68-74.

14. Duangchanda, S., Tanaka, M., Morita, K., Rojanasuphot, S., and Igarashi, A. 1994. Comparative nucleotide and deduced amino acid sequence of the envelope glycoprotein gene among three dengue virus type 2 strains isolated from patients with different disease severities in Maha Sarakham, North Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth., 25:243-252.
15. Gentry, M. K., Henchal, E. A., McCown, J. M., Brandt, W. E. and Dalrymple, J. M. 1982. Identification of distinct antigenic determinants on dengue-2 virus using monoclonal antibodies. Am. J. Trop. Med. Hyg., 31:548-555.
16. Gubler, D. J. 1987. Current research on dengue. In:Harris KF, ed. Current Topics in Vector Research. Vol. 3. Berlin, Germany, springer-Verlag, pp.37-56.
17. Halstead, S. B. 1980. Dengue haemorrhagic fever-- a public health problem and a field for research. Bull. WHO, 58:1-21.
18. Halstead, S. B. 1988. Pathogenesis of dengue:Challenges to molecular biology.
19. Hase, T., Summers, P. L., and Eckels, K. H. 1989. Flavivirus entry into cultured mosquito cells and human peripheral blood monocytes. Arch. Virol., 104:129-143.
20. Hase, T., Summers, P. L., Eckels, K. H., and Baze, W. B. 1987. An electron and immunoelectron microscopic study of dengue-2 virus infection of cultured
21. Hasegawa, H., Yoshida, M., Shiosaka, T., Fujita, S., and Kobayashi, Y. 1992. Mutations in the envelope protein of Japanese encephalitis virus affect entry into cultured cells and virulence in mice. Virology, 191:158-165.
22. Henchal, E. A. and Putnak, A. R. 1990. The dengue viruses. Clin. Microbiol. Rev.,
23. Holland, J., Spindler, K., Horodyski, F., Grabau, E., Nichol, S., and Vandopol, S. 1982. Rapid evolution of RNA genome. Science, 215:1577-1585.
24. Hsu, Y. T., Huang, P. J., Chen, K. H., Su, C. Y., Chuang, C. H., Hung, H. Y., Fang, R. N., and Lu, P. H. 1994. Dengue hemorrhagic fever: a case report. Epidemic Rep., 10:259-260.
25. Igarashi, A., Koo, R., and Stoller, V. 1977. Evolution and properties of *Aedes albopictus* cell cultures persistently infected with Sindbis virus. Virology, 82:69-83.
26. Kuno, G. 1995. Review of the factors modulating dengue transmission. Epidemiol. Rev., 17:321-335.
27. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London), 227:680.
28. Lanciotti, R. S., Gubler, D. J., and Trent, D. W. 1997. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. J. Gen. Virol., 78:2279-2286.
29. Ludwig and Icano-Connors 1993, In Vitro Cell. Dev. Biol., 29A:296-306
30. Morita, K., Maemoto, T., Honda, S., Onishi, K., Murata, M., Tanaka, M., and Igarashi, A. 1994. Rapid detection of virus genome from imported dengue fever

- and dengue hemorrhagic fever patients by direct polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.*, 44:54-58.
31. Newton, S. E. and Dalgarno, L. 1983. Antiviral activity released from *Aedes albopictus* cells persistently infected with Semliki Forest virus. *J. Virol.*, 47:652-655.
32. Randolph, V. B. and Hardy, J. L. 1988a. Establishment and characterization of St. Louis encephalitis virus persistent infection in *Aedes* and *Culex* mosquito cell lines. *J. Gen Virol.*, 69:2189-2198.
33. Randolph, V. B. and Hardy, J. L. 1988b. Phenotypes of St. Louis encephalitis virus mutants produced in persistently infected mosquito cell cultures. *J. Gen. Virol.*, 69:2199-2207.
34. Rehacek, J. 1968. Persistent infection of mosquito cells grown in vitro with Murray Valley encephalitis and Japanese encephalitis viruses. *Acta Virol.*, 12:340-346.
35. Rico-Hessner, R. 1990. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*, 174: 479-493.
36. Riedel, B. and Brown, D. T. 1979. Novel antiviral activity found in the media of Sindbis virus-persistently infected mosquito (*Aedes albopictus*) cell cultures. *J. Virol.*, 29:51-60.
37. Rosen, L. 1984. The global importance and epidemiology of dengue infection and disease. In: Proc. Int'l. Conf. On DHF, Kuala Lumpur, Malaysia, 1983, T. Pang and R. Pahtmanathan, Eds., pp.1-6.
38. Schupback, J., Haller, O., Vogt, M., Luthe, R., Joller, H., Oelz, O., Papovic, M., Sarngadahran, M. G., and Gallo, R. C. 1985. Antibodies to HTLV-III in Swiss patients with AIDS and pre-AIDS in groups at risk for AIDS. *New Eng. J. Med.*, 312:265.
39. Sinarachatanant, P. and Olson, L. C. 1973. Replication of dengue virus type 2 in *Aedes albopictus* cell culture. *J. Virol.*, 12:275-283.
40. Shenk, T. E., Koshelnyk, K. A., and Stoller, V. 1974. Temperature-sensitive virus from *Aedes albopictus* cells chronically infected with Sindbis virus. *J. Virol.*, 13:439-447.
41. Stoller, V. and Shenk, T. E. 1973. Homologous viral interference in *Aedes albopictus* cultures chronically infected with Sindbis virus. *J. Virol.*, 11: 592-595.
42. Tanaka, M. 1993. Rapid identification of flavivirus using the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, 41:311-322.
43. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, 76:4350.

44. Venugopal, K., Reid, H. W., and Gould, E. A. 1994. Tick-borne flavivirus NS1 gene: identification of the conserved peptides and antigenic analysis of recombinant louping ill virus NS1 protein. *Virus Res.*, 31:245-254.
45. Wechsler, S. L., Rustigian, R., Stallcup, K. C., Byers, K. B., Winston, S. H., Fields, B. N. 1979. Measles virus-specified polypeptide synthesis in two persistently infected Hela cell lines. *J. Virol.*, 31:677-684.
46. Westaway, E. G., Briton, M. A., Gaidamovich, S. Y., Hornizek, M. C., Igarashi, A., Kaaainen, L., Lvov, D. K., Proterfield, J. S., Russel, P. K., and Trent, D. W. 1985. Flaviviridae. *Intervirology*, 24:183-192.
47. Zanotto, P. M., Gould, E. A., Gao, G. F., Harvey, P. H., and Holmes, E. C. 1996. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, 93:548-553.

圖表及說明

表一、經連續培養登革二型病毒核酸結構之變異

Primer		virus			
810S	PT*	p3/c12	p3/c1	p20/e12f7	p20/d3a1
1240C	+	-	ND**	?***	?
1535C	+	-	ND	-	-
1830C	+	-	ND	-	-
2143C	+	-	ND	-	-
2474C	+	-	ND	-	-

Primer		virus			
1240S	PT	p3/c12	p3/c1	p20/e12f7	p20/d3a1
1535C	+	-	ND	-	-
1830C	+	-	-	-	-
2143C	+	-	-	?	-
2474C	+	-	-	-	-

Primer		virus			
1535S	PT	p3/c12	p3/c1	p20/e12f7	p20/d3a1
1830C	+	-	-	-	-
2143C	+	-	-	-	-
2474C	+	-	-	-	-

Primer		virus			
1830S	PT	p3/c12	p3/c1	p20/e12f7	p20/d3/a1
2143C	+	-	-	-	-
2474C	+	-	+	-	+

Primer		virus			
2143S	PT	p3/c12	p3/c1	p20/e12f7	p20/d3/a1
2474C	+	+	+	-	?

* PT: prototype den-2 virus (NGC)

** ND: not done

*** Band presented faintly.

937	940	950	960	970	980	990			
Proto	AUGC	GUUGCAUAGG	AAUAUCAAAAU	AGAGACUUUG	UAGAAGGGGU	UUCAGGAGGA			
PC1	AUGC	GUUGCAUAGG	AAUAUCAAAAC	AGAGAUUUUG	UAGAAGGGGU	UUCAGGAGGA			
PC5	AUGC	GUUGCAUAGG	AAUAUCAAAAU	AGAGAUUUUG	UAGAAGGGGU	UUCAGGAGGA			
PC10	AUGC	GUUGCAUAGG	AAUAUCAAAAC	AGAGAUUUUG	UAGAAGGGGU	UUCAGGAGGA			
	1000		1010		1020		1040		
Proto	AGCUGGGUUG	ACAUAGCUU	AGAACAUUGGA	AGUUGUGUGA	CGACGAUGGC				
PC1	AGCUGGGUUG	ACAUAGCUU	AGAACAUUGGA	AGCUGUGUGA	CGACAAUGCC				
PC5	AGCUGGGUUG	ACAUAGCUU	AGAACAUUGGA	AGCUGUGUGA	CGACAAUGGC				
PC10	AGCUGGGUUG	ACAUAGCUU	AGAACAUUGGA	AGCUGUGUGA	CGACAAUGGC				
	1050		1060		1070		1080		1090
Proto	AAAAAAUAAA	CCAACAUUUGG	AUUUUGAACU	GAUAAAACA	GAAGCCAAAC				
PC1	AAAAAAACAA	CCAACAUUUGG	AUUUUGAACU	GAUAAAACA	GAAGCCAAAC				
PC5	AAAAAAACAA	CCAACAUUUGG	AUUUUGAACU	GAUAAAACA	GAAGCCAAAC				
PC10	AAAAAAACAA	CCAACAUUUGG	AUUUUGAACU	GAUAAAACA	GAAGCCAAAC				
	1100		1110		1120		1130		1140
Proto	AACCUGGCCAC	UCUAAGGAAG	UACUGUAUAG	AAGCAAAGCU	GACCAAUACA				
PC1	AACCUGGCCAC	UCUAAGGAAG	UACUGUAUAG	AGGCAAAGUU	AACCAACACA				
PC5	AACCUGGCCAC	UCUAAGGAAG	UACUGUAUAG	AGGCAAAGUU	AACCAACACA				
PC10	AACUUGGCCAC	UCUAAGGACG	UACUGUAUAG	AGGCAAAGUU	AACCAACACA				
	1150		1160		1170		1180		1190
Proto	ACAACAGAAU	CUCGUUGCCC	AACAGAAGGG	GAACCCAGUC	AAAAUGAAGA				
PC1	ACAACAGAU	CUCGCUGUCC	AACACAAGGG	GAACCCAGCC	AAAUGAAGA				
PC5	ACAACAGAAU	CUCGCUGUCC	ACACAGAAGGG						
PC10	GACAACUAGAAU	CUCGUUGUCC							

圖一、prototype dengue 2 virus 與第五及十代登革二型病毒 E 基因的一段 RNA (937-1190) 序列之比較

- transition
- deletion
- insertion
- unchanged

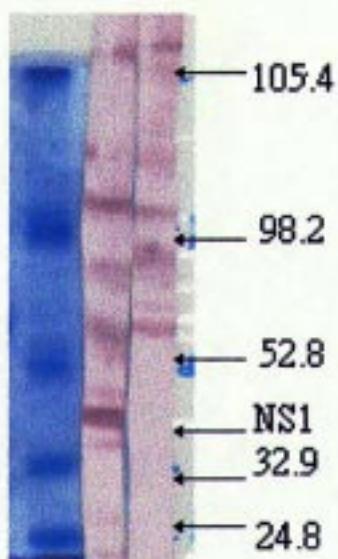
Proto: the dengue 2 virus prior to passage

PC1: passage 1

PC5: passage 5

PC10: passage 10

M PC5 PC6 KDa



圖二、以西方墨點法 (western blot) 分析持續感染於 C6/36 細胞至第五代 (PC5) 及第六代 (PC6) 病毒株，發現 NS1 (約 42 Kda) 只出現於第五代的病毒株，但未出現於第六代，顯示此蛋白質可能在培養過程中，發生結構上的變化，而這變化已足以影響其刺激產生抗體的能力。M: standard marker。