



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ:

การศึกษาความสามารถในการติดเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรทัยป์ 2 สายพันธุ์ 16681 และสายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในบริเวณส่วนปลาย 5' ในเซลล์ที่มีและไม่มีที่รับแอนติบอดี

โดย

นางสาวสุพิชา คุ่มเกตุ และคณะ

กรกฎาคม 2552

สัญญาเลขที่ MRG5080143

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาความสามารถในการติดเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรทัยป์ 2 สายพันธุ์ 16681 และสายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในบริเวณส่วนปลาย 5' ในเซลล์ที่มีและไม่มีการรับแอนติบอดี

ผู้วิจัย

นางสาวสุพีชา คุ่มเกตุ

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

เลขที่สัญญา MRG5080143

โครงการ: การศึกษาความสามารถในการติดเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรทัยป์ 2 สายพันธุ์ 16681 และสายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในบริเวณส่วนปลาย 5' ในเซลล์ที่มีและไม่มีที่รับแอนติบอดี

บทคัดย่อ

ไวรัสเดงกี ซีโรทัยป์ 2 ที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์แบบแทนที่บริเวณ 5' NCR 3 สายพันธุ์ ได้แก่ D2/IC69, D2/IC60 และ D2/IC5758 มีประสิทธิภาพในการติดเชื้อและเพิ่มจำนวนในเซลล์ Vero ได้ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ปกติ 16681 (wild type) แต่ขนาดของ plaque จากเซลล์ Vero ที่ติดเชื้อ D2/IC5758 มีขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์ 16681 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงอาจกล่าวได้ว่าการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์แบบแทนที่ ลำดับที่ 57 และ 58 บริเวณ 5' NCR อาจมีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนและความรุนแรงของไวรัส ไวรัสเดงกีสายพันธุ์ปกติสามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์ HepG2 ซึ่งไม่มีที่รับแอนติบอดีได้โดยไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ Matrix metalloproteinase (MMP) -2 และ MMP-9 หลังการตรวจวิเคราะห์ในระดับ mRNA โดย RT-PCR และโปรตีนที่สร้างออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ โดย gelatin zymography นอกจากนี้ไวรัสที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ส่วน 5' NCR ให้ผลคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ปกติ ในทางตรงข้าม เซลล์ U937 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีที่รับแอนติบอดี หลังการติดเชื้อไวรัสเดงกี จะมีการแสดงออกของ MMP-2 และ MMP-9 ลดลง โดยการเจาะอย่างยิงระดับเอนไซม์ MMP-9 ในน้ำเลี้ยงเซลล์มีปริมาณลดลงหลายเท่า การทดลองนี้แสดงให้เห็นผลการตอบสนองของเซลล์ที่แตกต่างกัน หลังการติดเชื้อไวรัสเดงกี

คำสำคัญ : ไวรัสเดงกี, 5'NCR, MMP

ABSTRACT

Reproduction rates of three mutants containing one or two nucleotide substitution (D2/IC69, D2/IC60 and D2/IC5758) were investigated in comparison to wild-type DENV 16681 in Vero cells. The amounts of the infectious virion released in supernatants of Vero cell culture were monitored throughout a 4-day period of infection. Similar patterns of viral reproduction were reported amongst three strains of the mutant and did not differ to that of a wild-type cohort. However, by plaque forming assay, we could detect larger plaques generated from a D2/IC5758 virus compared to those from a wild type strain. In addition, effect of DENV infection on the expression of Matrix metalloproteinase (MMP) -2 and MMP-9 was also examined in HepG2 and U937 cells. The expressions of MMP-2 and 9 in HepG2 cells infected wild type DENV 16681 were comparable with those of non-infected cells. Mutation in 5'NCR also caused no apparent difference in both MMP-2 and MMP-9 expression in this cell type. In contrast, following DENV infection, U937 cells down regulated their MMP-2 and MMP-9 expressions. Zymographic analysis demonstrating gelatinolytic activities of MMP-2 and -9 showed that, in comparison with uninfected control cells, infected U937 cells reduced their secretion of MMP-2 and -9. Results of significantly decreased MMP-9 production were confirmed by quantitative ELISA. Manipulation of MMP-9 expression has believed to involve with the function of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1). We were able to detect the expression of TIMP-1 mRNA in U937 cells; however, levels of expression were similar in both dengue virus-infected and control cells. These results suggested that DENV elicited different responses in MMP production in different cell types

Keywords: dengue, 5'NCR, MMP

หน้าสรุปโครงการ (Executive summary)

รหัสโครงการ MRG5080143

ชื่อโครงการ การศึกษาความสามารถในการติดเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรทัยป์ 2 สายพันธุ์ 16681 และสายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในบริเวณส่วนปลาย 5' ในเซลล์ที่มีและไม่มีที่รับแอนติบอดี

ชื่อนักวิจัย นางสาวสุพิชา คุ่มเกตุ

สถานที่ทำงาน ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400
โทรศัพท์ 02 201 5477 โทรสาร 02 354 7161 e-mail scskk@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ 2 ปี ระหว่าง 2 กรกฎาคม 2550 – 1 กรกฎาคม 2552

การศึกษายาทบาทของส่วน 5' Noncoding region ในไวรัสเดงกี ซีโรทัยป์ 2 ว่ามีผลต่อการติดเชื้อและเพิ่มจำนวนในเซลล์ที่มีและไม่มีที่รับแอนติบอดี นอกจากนี้ตรวจสอบการตอบสนองของเซลล์ทั้ง 2 ประเภทในการผลิตเอนไซม์เมทริกเมทาโลโปรตีนเนส (Matrix metalloproteinase) หลังการติดเชื้อไวรัสเดงกี

วัตถุประสงค์โครงการ

1. ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการติดเชื้อ (infectivity) ไวรัสแดงกี่ ซีโรทัยป์ 2 สายพันธุ์ 16681 และสายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในบริเวณส่วนปลาย 5' ในเซลล์ที่มีและไม่มีที่รับแอนติบอดี
2. ศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์เมตริกเมทาโลโปรตีนเนส (Matrix metalloproteinases; MMPs) ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสแดงกี่ ซีโรทัยป์ 2 สายพันธุ์ 16681 และสายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในบริเวณส่วนปลาย 5' ในเซลล์ที่มีและไม่มีที่รับแอนติบอดี

ระเบียบวิธีวิจัย

1. จัดหาไวรัสแดงกี่ ซีโรทัยป์ 2 สายพันธุ์ 16681 wild-type และเลือกไวรัสที่มีนิวคลีโอไทด์ ส่วน 5' NCR เปลี่ยนแปลงไป (mutant) อีก 3 สายพันธุ์ ได้แก่

ไวรัสที่มีนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 69 เปลี่ยนจาก A เป็น T เรียกว่า D2/IC-69

ไวรัสที่มีนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 60 เปลี่ยนจาก A เป็น G เรียกว่า D2/IC-60

ไวรัสที่มีนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 57 และ 58 เปลี่ยนจาก C และ G เป็น T และ C เรียกว่า D2/IC5758

เนื่องจากมีผลการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของไวรัส ในเซลล์ LLC-MK₂ และ neurovirulence จากห้องปฏิบัติการวิจัยของ รศ. วิจิตรา เลิศกมลกาญจน์ (Sirigulpanit et. al., 2007) พบว่า ไวรัส mutant สายพันธุ์ D2/IC-69 มีขนาด plaque ใกล้เคียง สายพันธุ์ปกติ แต่ ทำให้อัตราการตายในหนูต่ำกว่าสายพันธุ์ปกติ ไวรัส mutant สายพันธุ์ D2/IC-60 มีขนาด plaque เล็กกว่า สายพันธุ์ปกติ แต่ ทำให้อัตราการตายในหนูใกล้เคียงสายพันธุ์ปกติ

ไวรัส mutant สายพันธุ์ D2/IC-5758 มีขนาด plaque ใหญ่กว่า สายพันธุ์ปกติ และ ทำให้อัตราการตายในหนูสูงกว่าสายพันธุ์ปกติ

2. จัดหาเซลล์ที่ต้องการศึกษาได้แก่

เซลล์ที่มีที่รับแอนติบอดี (FcR⁺ cells) ได้แก่ เซลล์โมโนไซต์ (human monocyte cell line ;U937)

เลี้ยงเซลล์ด้วย RPMI ที่มี 115 mM HEPES, 10% FBS เพนนิซิลิน 100 หน่วย/มล. และสเตรปโตมัยซิน 100 ไมโครกรัม/มล. เซลล์ที่ไม่มีที่รับแอนติบอดีที่เป็น (FcR⁻ cells) ได้แก่ เซลล์ Vero และ human hepatocellular carcinoma (HepG2) เลี้ยงเซลล์ด้วย Modified Eagle's Medium (MEM) ที่มี 115 mM HEPES, 10% FBS เพนนิซิลิน 100 หน่วย/มล. และสเตรปโตมัยซิน 100 ไมโครกรัม/มล.

3. การไทเทรตหาปริมาณไวรัสโดยวิธี Plaque forming assay ในเซลล์ Vero ดังขั้นตอน ต่อไปนี้

- นำเซลล์ Vero เลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 มล. ด้วย MEM ที่มี 115 mM HEPES, 10% FBS เพนนิซิลิน 100 หน่วย/มล. และสเตอโรโตมัยซิน 100 ไมโครกรัม/มล. ที่ 37°C, 5% CO₂
- นำเซลล์มาเลี้ยงต่อในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม (6-well plate) ด้วยการ trypsinization (ใช้ 0.25% trypsin PBS-EDTA) โดยนับเซลล์ให้มีความหนาแน่น 1.5×10^5 เซลล์/มล. เติมนลงในจานเลี้ยงเซลล์หลุมละ 4 มล. (เป็นจำนวน 6×10^5 เซลล์/หลุม)
- ทำการเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนเซลล์มีปริมาณ 90-95% confluent ที่ 37°C 5% CO₂
- จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ออกและทำการล้างผิวเซลล์ด้วย PBS และเท PBS ออกจากหลุม
- นำไวรัสที่เก็บจากตู้เย็น -80°C มาทำ dilution 10 เท่าใน MEM ที่มี 2% FBS, เพนนิซิลิน 100 หน่วย/มล. และสเตอโรโตมัยซิน 100 ไมโครกรัม/มล. และเติมไวรัสแต่ละ dilution ลงในแต่ละหลุมของเซลล์ Vero ปริมาตร 200 ไมโครลิตร
- นำจานเลี้ยงเซลล์ที่มีไวรัสอยู่ไปใส่ตู้เลี้ยงเซลล์ 37°C 5% CO₂ เพื่อให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์เป็นเวลา 90 นาที โดยทำการพลิกกลับจานเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 30 นาที
- เมื่อครบเวลาเติม Methyl cellulose ปริมาตร 4 มล. ลงในแต่ละหลุม (ใช้ 1% Methyl cellulose ละลายใน MEM ที่มี 2% FBS, เพนนิซิลิน 100 หน่วย/มล. และสเตอโรโตมัยซิน 100 ไมโครกรัม/มล. และนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อที่ 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 10 วัน
- เมื่อครบ 10 วัน เติม fixative ได้แก่ 4% formaldehyde ใน PBS ลงในแต่ละหลุมจำนวน 4 มล. ตั้งที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง
- เมื่อครบเวลาเทสารละลายในจานเลี้ยงเซลล์ออกและล้างเซลล์ด้วยน้ำประปา
- เติมสารละลาย Methylene blue 2 มล. ลงในแต่ละหลุม แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 30 นาที
- ล้าง Methylene blue ออกด้วยน้ำประปา
- คว่ำให้จานเลี้ยงเซลล์แห้ง
- อ่านผลโดยการนับจำนวน plaque ที่พบในแต่ละ dilution ของไวรัส
คำนวณหาปริมาณไวรัส (titer) หน่วย plaque forming unit (PFU) /มล. = (จำนวน plaque ในหลุม x dilution factor) x 5

4. การเปรียบเทียบการติดเชื้อในเซลล์ที่ไม่มีที่รับแอนติบอดี (FcR^- cells) ได้แก่ เซลล์ Vero ของไวรัสสายพันธุ์ 16681 wild-type และ mutant ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ D2/IC69, D2/IC60 และ D2/IC5758

- นำเซลล์มาเลี้ยงในจานหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม โดยแต่ละหลุมมีเซลล์จำนวน 1.5×10^5 เซลล์ และเลี้ยงไว้ก่อนการติดเชื้อไวรัส 24 ชั่วโมง ที่ 37°C , 5% CO_2
- ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก
- เติมไวรัสแดงกี ซีโรทัยป์ 2 สายพันธุ์ 16681 ปริมาตรไม่เกิน 200 ไมโครลิตรใน MEM ที่มี 2% FBS, เพนนิซิลิน 100 หน่วย/มล. และสเตربتอมัยซิน 100 ไมโครกรัม/มล.
- นำเข้าตู้เลี้ยงเซลล์ 37°C , 5% CO_2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้ไวรัสเข้าเซลล์ทำการplikงานเลี้ยงเซลล์ไปมาทุกๆ 30 นาที
- ดูดไวรัสที่เหลือออกและล้างผิวเซลล์ด้วย MEM อีก 5-6 ครั้ง
- เติมอาหารเลี้ยงเซลล์และทำการเลี้ยงต่อที่ 37°C , 5% CO_2 เป็นเวลา 7 วัน
- ในแต่ละวันทำการดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ (supernatant) ออกปั่นเหวี่ยง 500xg เก็บส่วน supernatant ที่ -80°C
- ทำการตรวจหาไวรัสที่ถูกปล่อยอยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์ ด้วย วิธี plaque forming assay ด้วยเซลล์ Vero และเปรียบเทียบขนาดความกว้างของ plaque ที่เกิดขึ้น

5. ทำการติดเชื้อเซลล์ที่มีที่รับแอนติบอดี (FcR^+) ได้แก่ myelomonocytic (U937) โดยอาศัยแอนติบอดี

- นำเซลล์ U937 จำนวน 7×10^5 เซลล์ resuspend ใน RPMI ที่มี 10% FBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร
- นำซีรัมที่เจือจางให้มีความเข้มข้นต่ำกว่า PRNT_{50} (ในที่นี้ใช้ 1 : 2,500) ผสมกับไวรัสแดงกี ซีโรทัยป์ 2 สายพันธุ์ 16681 จำนวน 7×10^5 PFU ($\text{MOI} = 1$) ในปริมาตรที่เท่ากัน incubate ที่ 37°C ใน water bath เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยทำการเขย่าทุกๆ 15 นาที
- เมื่อครบเวลาเติม mixture ไวรัสและซีรัมลงในเซลล์ U937 ปล่อยให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์ที่ 37°C เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ทำการเขย่าทุกๆ 30 นาที แล้วนำใส่จานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม
- เติม RPMI ที่มี 10% FBS เพนนิซิลิน 100 หน่วย/มล. และสเตربتอมัยซิน 100 ไมโครลิตร/มล. จนมีปริมาตรหลุมละ 500 ไมโครลิตร
- ทำการเลี้ยงเซลล์ U937 ต่อไปตามเวลาที่กำหนดในตู้เลี้ยงเซลล์ที่ 37°C , 5% CO_2

6. ทำการติดเชื้อเซลล์ที่ไม่มีที่รับแอนติบอดี (FcR⁻) ได้แก่ human hepatocellular carcinoma (Hep G2)

- นำเซลล์ Hep G2 มาเลี้ยงในจานหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม โดยแต่ละหลุมมีจำนวน 7×10^5 เซลล์
- ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์และล้างเซลล์ด้วย PBS
- เติมไวรัสแดงกีปริมาณ 200 ไมโครลิตร โดยมีค่า $\text{MOI} = 1$
- นำเข้าตู้เลี้ยงเซลล์ 37°C , $5\%\text{CO}_2$ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง เพื่อให้ไวรัสเข้าเซลล์ทำการplikงานเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 30 นาที
- เติมอาหารเลี้ยงเซลล์จนมีปริมาณ 500 ไมโครลิตร ทำการเลี้ยงเซลล์ต่อในตู้เลี้ยงเซลล์ที่ 37°C , $5\%\text{CO}_2$

7. การสกัด RNA และตรวจหาปริมาณ RNA ของไวรัสและMMPs ด้วย Reverse Transcription – Polymerase Chain reaction (RT-PCR)

- ทำการสกัด RNA จากเซลล์ U937 และ Hep G2 โดยใช้ Illustra RNAspin Mini RNA Isolation kit (GE Healthcare, UK) และตรวจวัดปริมาณ RNA ที่สกัดได้ด้วย Biophotometer
ทำ RT-PCR ด้วย Illustra Ready – To – Go RT – PCR Bead (GE Healthcare, UK) PCR primers ที่ใช้ได้แก่ i) ไวรัสแดงกี forward, 5'-AAG GTG AGA TGA AGC TGT AGT CTC -3' ; reverse , 5'-CAT TCC ATT TTC TGG CGT TCT ii) human glyceraldehydes – 3 – phosphate dehydrogenase (GAPDH) forward, 5'-GAA GAA GGT CGG AGTC-3'; reverse, 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'; iii) Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) forward, 5'-GAA GAT GCT GCT GTT CAG CG-3'; reverse, 5'-ACT TGG TCC ACC TGGTTCAA-3' , iv) MMP-2 forward, 5'- GTG TTC TTT GCA GGG AAT GAA T -3'; reverse, 5'-ACG ACG GCA TCC AGG TTA TC -3' และ v)Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1) forward, 5'-GGT ACC ATG GCC CCC TTT GAG CCC CT-3 ; reverse primer: 5'-AAG CTT TCA CAA GCA ATG AGT GCC ACT CTG-3'
- PCR amplification สำหรับไวรัสแดงกี, GAPDH ใช้ 40 รอบที่อุณหภูมิ 94°C 3 นาที, 64.9°C (ไวรัสแดงกี), 57.8°C (GAPDH) 1.5 นาที, 72°C 2 นาที สำหรับ MMP-9 ใช้ 40 รอบ ที่อุณหภูมิ 95°C 20 วินาที, 53°C 20 วินาที, 72°C 20 วินาที และสำหรับ MMP-2 ใช้ 40 รอบ ที่อุณหภูมิ 95°C 1 นาที, 55.5°C 1.5 นาที, 72°C 1.5 นาที
- ทำการ run gel โดยใช้ 2% agarose ที่มี ethidium bromide

8. การวิเคราะห์เปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 จากเซลล์ HepG2 และ U937 จากการติดเชื้อไวรัสเดงกีด้วยวิธี gelatin zymography

- นำน้ำเลี้ยงเซลล์ HepG2 และ U937 ที่เก็บได้ในแต่ละเวลามาสมกับ non-reducing sample buffer และ load ลงใน 10% polyacrylamide gel ที่มี 2.65 mg/ml gelatin แล้ว run electrophoresis ที่ 30 mA เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- จากนั้นทำแผ่นเจลมาแช่ใน SDS removal buffer (2.5% Triton X-100, 50 mM Tris, 5 mM CaCl_2 , 1 μM ZnCl_2) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- หลังจากล้างแผ่นเจลด้วยน้ำแล้วนำมาแช่ใน enzyme activating buffer (50 mM Tris, 5 mM CaCl_2 , 1 μM ZnCl_2) ที่ 37°C, 12-18 ชั่วโมง
- ทำการย้อมแผ่นเจลด้วย 0.25% Coomassie Blue R-250 ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที
- ล้างโดยการแช่เจลใน Destaining buffer ตรวจหา band ของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9

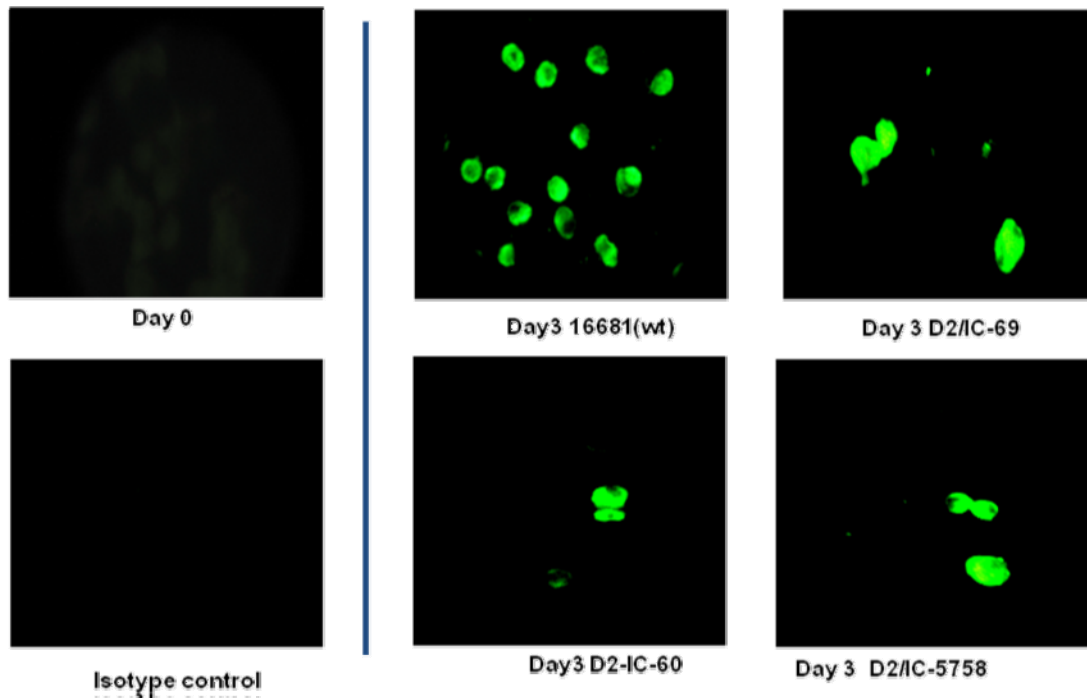
9. ทำการวัดระดับ MMP-9 ในน้ำเลี้ยงเซลล์ U937 โดยวิธี sandwich ELISA ใช้ Human MMP-9 ELISA kit (Bender MedSystems, Austria)

ผลการวิจัย

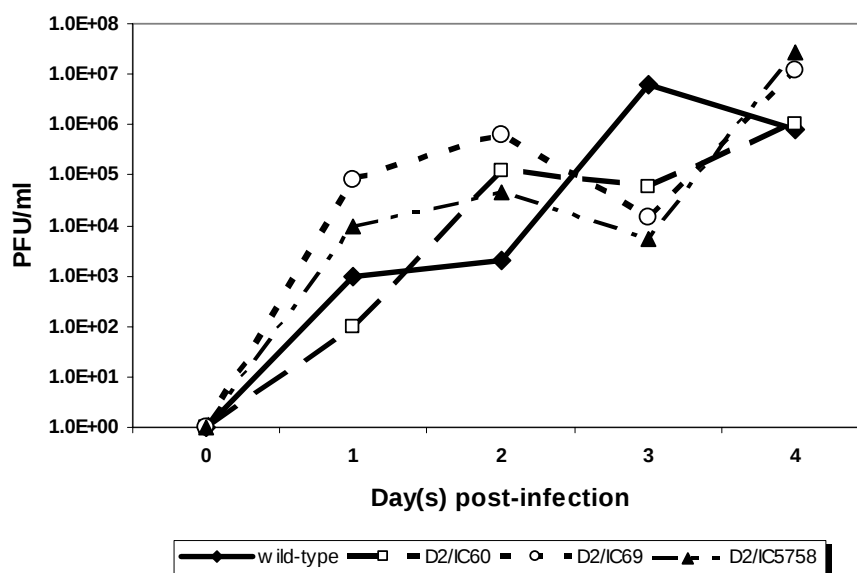
1. ผลการทดลองหาปริมาณไวรัส (titer) สายพันธุ์ wild-type และ mutant ได้แก่ D2/IC-69, D2/IC60 และ D2/IC5758 โดยวิธี plaque forming assay ด้วย เซลล์ Vero ดังตาราง

สายพันธุ์	lot	titer
D216681(WT)	30/7/2004 LLC3-4	7×10^6 PFU/ml
D2/IC-69	2/8/2004 LLC1-2	3.6×10^6 PFU/ml
D2/IC-60	2/8/2004 LLC1-2	5×10^6 PFU/ml
D2/IC-5758	27/9/2004	6×10^5 PFU/ml

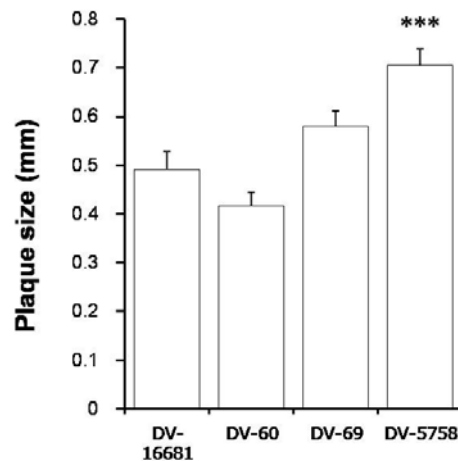
2. การตรวจการติดเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรทัยป์ 2 สายพันธุ์ 16681 และ mutant ได้แก่ D2/IC-69, D2/IC60 และ D2/IC5758 ในเซลล์ Vero ในวันที่ 3 หลังการติดเชื้อ ด้วยวิธี Immunofluorescence assay โดยอาศัย mouse anti-DEN2-E protein antibody clone 3H5 และ goat anti-mouse immunoglobulin ติดฉลาก FITC เปรียบเทียบกับวันแรกที่ยังไม่พบการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าว ภายในเซลล์



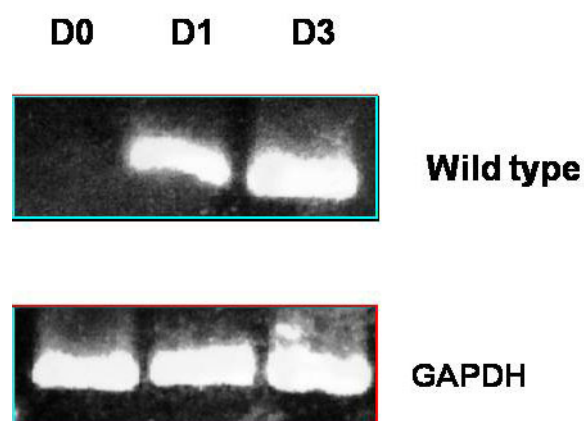
3. ผลการเปรียบเทียบการติดเชื้อ ไวรัสสายพันธุ์ 16681 wild-type และ mutant ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ D2/IC69, D2/IC60 และ D2/IC5758 (MOI เท่ากับ 1) ในเซลล์ Vero โดยวิธี Plaque forming assay ในช่วงระยะเวลา 4 วัน ดังกราฟ



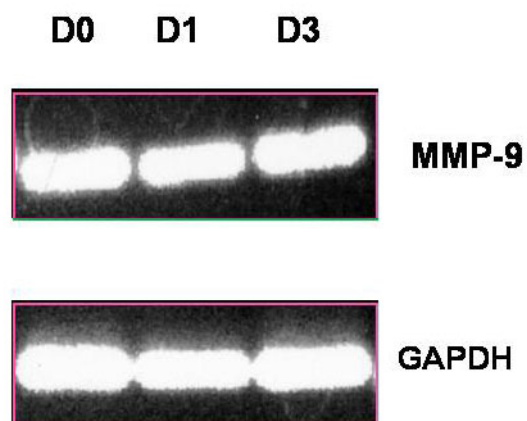
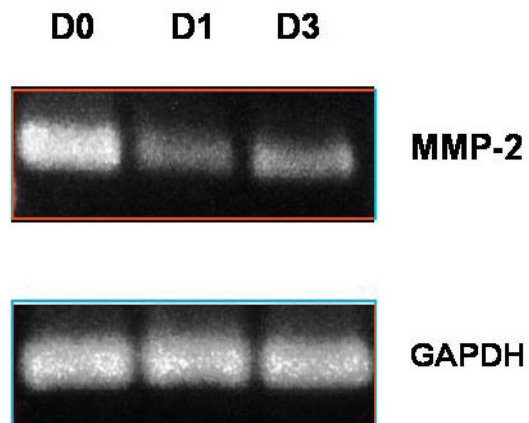
4. แสดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง plaque ที่เกิดขึ้น จากไวรัสสายพันธุ์ 16681 wild-type และ mutant ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ D2/IC69, D2/IC60 และ D2/IC5758 ในเซลล์ Vero โดยวิธี Plaque forming assay โดยขนาด Plaque ของ D2/IC5758 มีขนาดใหญ่กว่า wild-type อย่างมีนัยสำคัญ (***, $P<0.001$)



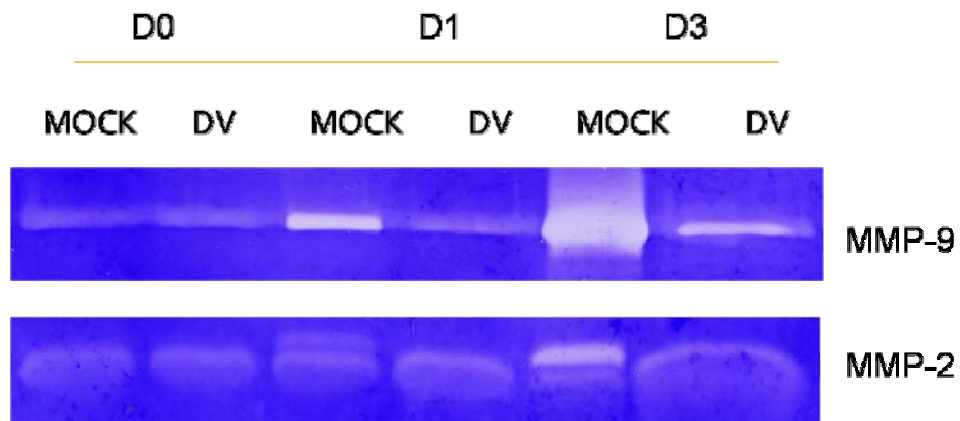
5. ผล RT-PCR แสดง mRNA ของไวรัสเดงกี สายพันธุ์ 16681 wild-type ในเซลล์ U937 หลังการติดเชื้อโดยอาศัยแอนติบอดี ในวันที่ 0, 1 และ 3



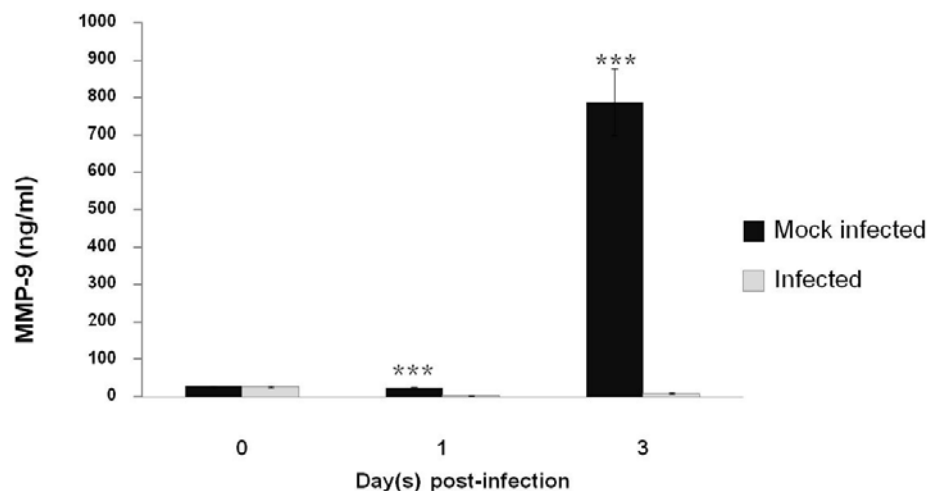
6. ผล RT-PCR แสดง mRNA ของ MMP-2, MMP-9 ในเซลล์ U937 หลังการติดเชื้อไวรัสแดงกีสายพันธุ์ 16681 wild-type โดยอาศัยแอนติบอดี ในวันที่ 0, 1 และ 3



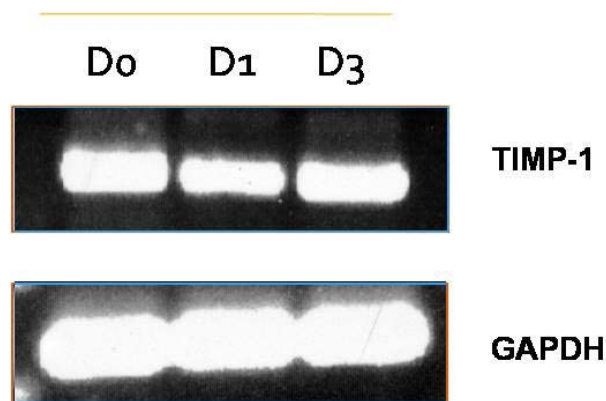
7. การวิเคราะห์ระดับเอนไซม์ MMP-2 (72 kDa) และ MMP-9 (92 kDa) ด้วยวิธี gelatin zymography ในน้ำเลี้ยงเซลล์ U937 ที่เก็บหลังการติดเชื้อไวรัสเดงกีสายพันธุ์ 16681 wild-type ในวันที่ 0, 1 และ 3 แสดงแถบสีของ gelatin ที่ย่อยจากเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด



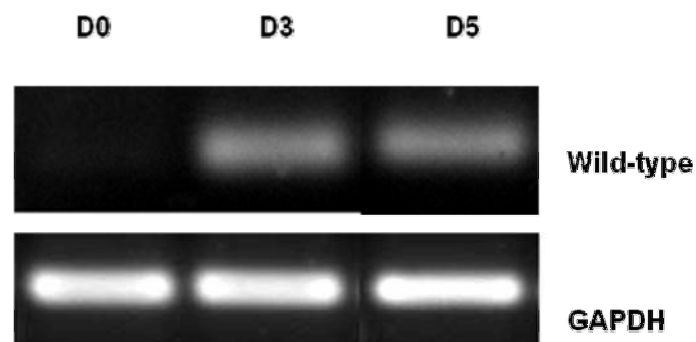
8. การตรวจวัดระดับเอนไซม์ MMP-9 ในน้ำเลี้ยงเซลล์ U937 ที่เก็บหลังการติดเชื้อไวรัสเดงกีสายพันธุ์ 16681 wild-type ในวันที่ 0, 1 และ 3 โดยวิธี sandwich ELISA



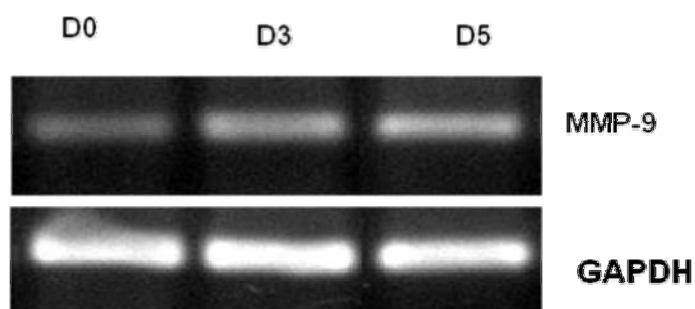
9. ผล RT-PCR แสดง mRNA ของ TIMP-1 ในเซลล์ U937 หลังการติดเชื้อไวรัสเดงกีสายพันธุ์ 16681 wild-type โดยอาศัยแอนติบอดี ในวันที่ 0, 1 และ 3



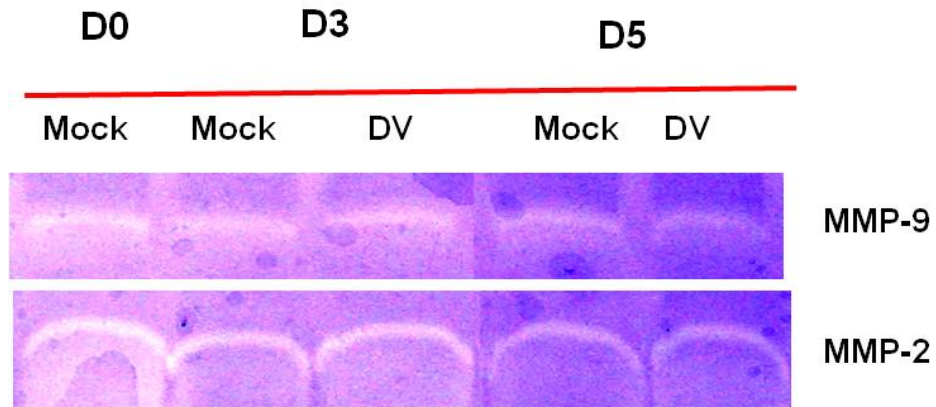
10. ผล RT-PCR แสดง mRNA ของไวรัสเดงกี สายพันธุ์ 16681 wild-type ในเซลล์ HepG2 หลังการติดเชื้อ 0, 3 และ 5 วัน



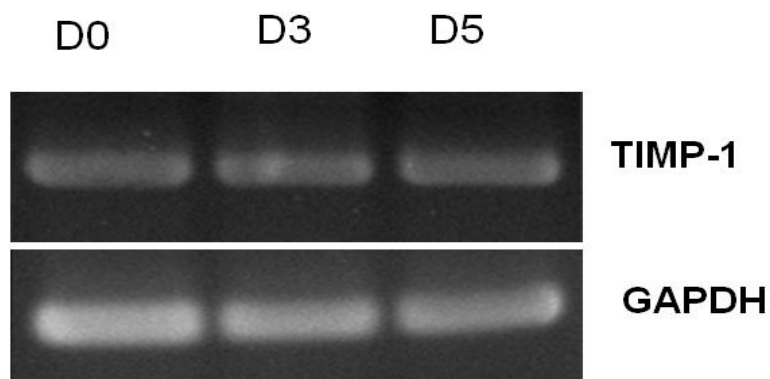
11. ผล RT-PCR แสดง mRNA ของ MMP-9 ในเซลล์ HepG2 หลังการติดเชื้อไวรัสเดงกีสายพันธุ์ 16681 wild-type โดยอาศัยแอนติบอดี ในวันที่ 0, 3 และ 5



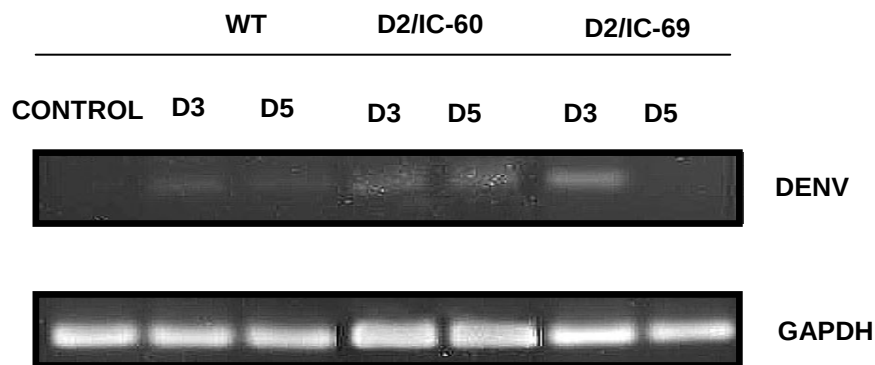
12. การวิเคราะห์ระดับเอนไซม์ MMP-2 (72 kDa) และ MMP-9 (92 kDa) ด้วยวิธี gelatin zymography ในน้ำเลี้ยงเซลล์ HepG2 ที่เก็บหลังการติดเชื้อไวรัสแดงกีสายพันธุ์ 16681 wild-type ในวันที่ 0, 3 และ 5



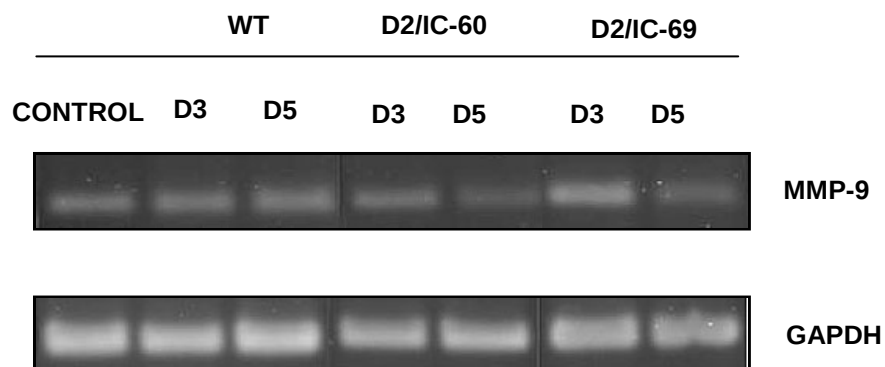
13. ผล RT-PCR แสดง mRNA ของ TIMP-1 ในเซลล์ HepG2 หลังการติดเชื้อไวรัสแดงกีสายพันธุ์ 16681 wild-type โดยอาศัยแอนติบอดี ในวันที่ 0, 3 และ 5



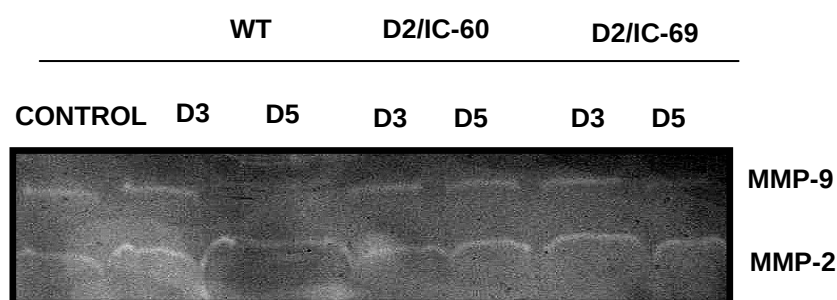
14. ผล RT-PCR แสดง mRNA ของไวรัสเดงกี สายพันธุ์ 16681 wild-type และ mutant 2 สายพันธุ์ ได้แก่ D2/IC69, D2/IC60 ในเซลล์ HepG2 หลังการติดเชื้อ 0, 3 และ 5 วัน



15. ผล RT-PCR แสดง mRNA ของ MMP-9 ในเซลล์ HepG2 หลังการติดเชื้อไวรัสเดงกีสายพันธุ์ 16681 wild-type และ mutant 2 สายพันธุ์ ได้แก่ D2/IC69, D2/IC60 โดยอาศัยแอนติบอดี ในวันที่ 0, 3 และ 5



16. การวิเคราะห์ระดับเอนไซม์ MMP-2 (72 kDa) และ MMP-9 (92 kDa) ด้วยวิธี gelatin zymography ในน้ำเลี้ยงเซลล์ HepG2 ที่เก็บหลังการติดเชื้อไวรัสเดงกีสายพันธุ์ 16681 wild-type และ mutant 2 สายพันธุ์ ได้แก่ D2/IC69, D2/IC60 ในวันที่ 0, 3 และ 5



สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ไวรัส mutant ที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ บริเวณ 5' NCR ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ D2/IC69, D2/IC60 และ D2/IC5758 สามารถเข้าและเพิ่มจำนวนในเซลล์ Vero ได้ไม่แตกต่างจากสายพันธุ์ 16681 wild type
2. การเปรียบเทียบขนาดของ plaque (วัดเส้นผ่าศูนย์กลาง plaque) ที่เกิดขึ้นจากเซลล์ Vero ที่ถูกติดเชื้อด้วย mutant D2/IC5758 ใหญ่กว่า ขนาดของ plaque ที่เกิดจากการติดเชื้อ wild type แต่ mutant D2/IC60 ให้ขนาด plaque ที่มีแนวโน้มเล็กกว่า ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับลักษณะของ plaque ที่รายงานจากเซลล์ LLC-MK2 ของ Sirigulpanit et al., 2007 เป็นการยืนยันว่าการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์แบบแทนที่บริเวณ 5' NCR มีผลต่อการเพิ่มจำนวนไวรัส in vitro การศึกษาเพิ่มเติมต่อไปว่าไวรัส mutant กลุ่มนี้จะมีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนและกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลองเปรียบเทียบกับ wild type จะทำให้ได้ประโยชน์ต่อการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคในอนาคต
3. การติดเชื้อไวรัสเดงกี สายพันธุ์ 16681 wild type ในเซลล์ U937 ซึ่งเป็นเซลล์ในกลุ่ม FcR^+ แบบอาศัยแอนติบอดี พบว่า ไวรัสสามารถเข้าและเพิ่มจำนวนในเซลล์ชนิดนี้ได้
4. ผู้วิจัยทำการศึกษาเพิ่มเติมว่าการติดเชื้อเดงกี ในเซลล์ U937 จะมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการผลิตเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ซึ่งมีรายงานว่า เป็นปัจจัยส่งเสริมการเกิดพยาธิสภาพของ dengue haemorrhagic fever (DHF) (Lupertlop et al., 2006) พบว่าหลังการติดเชื้อไวรัสเดงกี 3 วัน เซลล์ U937 มีระดับ mRNA ของ MMP-2 ลดลง

5. ผลของ gelatin zymography แสดงให้เห็นว่าปริมาณ เอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ที่ผลิตได้ในน้ำเลี้ยงเซลล์ U937 ลดลงจากเซลล์ที่ไม่ได้รับไวรัส ซึ่งผลจาก ELISA ยืนยันว่ามีปริมาณ MMP-9 ลดลงอย่างมาก
6. การลดลงของ MMP-9 อาจเกิดจากการเพิ่มขึ้นของ TIMP-1 ดังเคยมีรายงานในการติดเชื้อของ human cytomegalovirus ในเซลล์โมโนไซต์ (Straat et al., 2009) การทดลองนี้จึงศึกษาการแสดงออกของ TIMP-1 แต่ผลแสดงให้เห็นว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลง TIMP-1 ในระดับ mRNA
7. ไวรัสทั้งสายพันธุ์ปกติ 16681 wild type และ mutant สามารถเข้าและเพิ่มจำนวนในเซลล์ HepG2 ซึ่งเป็นเซลล์ในกลุ่ม FcR⁺ ได้
8. การตอบสนองของเซลล์ HepG2 ในการผลิต MMP-9 ไม่ชัดเจน เห็นได้จากระดับ mRNA และโปรตีนที่ใกล้เคียงกันระหว่างเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัสและเซลล์ควบคุม นอกจากนี้การแสดงออกของ TIMP-1 ก็มีระดับใกล้เคียงกันด้วย
9. ผู้วิจัยกำลังศึกษาซ้ำเพื่อยืนยันผลในเซลล์ทั้ง 2 ชนิดและทำการเพิ่มเติม dose ของไวรัสจากเดิม เพื่อเปรียบเทียบผล

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

คาดว่าจะจากผลการทดลองที่ได้จะรวบรวมเขียน manuscript และส่งตีพิมพ์ในวารสารวิชาการได้ราวปลายปี 2552

เอกสารอ้างอิง

Luplertlop N, Missé D, Bray D, Deleuze V, Gonzalez JP, Leardkamolkarn V, Yssel H, Veas F. Dengue-virus-infected dendritic cells trigger vascular leakage through metalloproteinase overproduction *EMBO Rep.* 2006 ;7(11):1176-81.

Sirigulpanit W, Kinney RM, Leardkamolkarn V. Substitution or deletion mutations between nt 54 and 70 in the 5' non-coding region of dengue type 2 virus produce variable effects on virus viability *J Gen Virol.* 2007;88:1748-52.

Strååt K, de Klark R, Gredmark-Russ S, Eriksson P, Söderberg-Nauclér C. Infection with human cytomegalovirus alters the MMP-9/TIMP-1 balance in human macrophages. *J Virol.* 2009 ;83(2):830-5.