

## **Abstract**

This study was aimed to generate a mammalian stable cell line harboring subgenomic dengue virus replicon containing green fluorescent gene (DENV/GFP) and the development of cell-based model for anti-DENV compounds screening. Deleted E gene encoded for envelope protein of DENV-2 was replaced with fragments of GFP derived from pAcGFP followed by a FMDV2 derived cleavage site. IRES and neomycin resistance genes were immediately placed up-stream to NS1 gene to enhance the viral translation and the clone selection after propagation of the recombinant plasmid in mammalian cell line (BHK-21 cells). The stably cell line expressing the brightest GFP expression was selected and examined for effectiveness in anti-viral drug screening assay with the potential anti-viral compounds chemically isolated from the local plants in parallel with the known broad spectrum antiviral agents. Analysis of GFP and viral proteins and RNA expression from flow cytometry, Western blotting and RT-PCR showed the well correlated inhibitory results of the testing compounds. The obtained data were validated by conventional plaque titration reduction assay. The results suggest that this newly developed cell line is efficient to be using as a cell-based model for primary screening of anti-DENV drugs. Further searching for anti-dengue viral compounds was performed by using this cell-based model assay with 75 samples from available plant extracts (crude-, pure-, and modified- compounds). Positive anti-dengue virus compounds could be identified within a few days. This established cell-based model should have benefits for primary screening of natural compounds, such as plant extracts, and synthetic inhibitors, for potential dengue inhibitors. The performance of mass screening is also possible, providing a low cost and rapid screening assay. This method will facilitate new drug discovery against DENV.

**Key word:** Dengue virus-2, Green fluorescent protein, Anti-dengue virus compounds

## บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการที่จะสร้างเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดพิเศษที่มีการติดเชื้อไวรัสเด็งกีและมีการแสดงออกของโปรตีนจากไวรัสติดอยู่กับโปรตีนจากสารเรืองแสงสีเขียวที่เรียกว่าฟลูออเรสเซน (GFP) แบบถาวร เพื่อใช้เป็น Cell-based model สำหรับการค้นหาสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่สามารถจะนำไปพัฒนาเป็นยาสำหรับต้านเชื้อไวรัสเด็งกีได้ โดยสารเรืองแสงจะเป็นตัวช่วยในการวิเคราะห์ผลได้เร็วขึ้นเมื่อทำการทดสอบสารสกัดกับเซลล์เพาะเลี้ยงในห้องทดลอง ในการทดลองนี้ได้ใช้วิธีการทางพันธุวิศวกรรมหรือการตัดต่อยีน โดยได้นำยีนของสารเรืองแสงสีเขียว (GFP) ใส่เข้าไปแทนที่ยีนบางส่วนของไวรัสเด็งกีไทป์ 2 แล้วทำการปรับแต่งเพิ่มยีนอื่นๆที่จำเป็นในการเพิ่มประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนจากไวรัสเด็งกี และโปรตีนจาก GFP รวมทั้งเติม neomycin resistance gene เพื่อให้มีความเหมาะสมและเพื่อความสะดวกในการคัดเลือกเซลล์เมื่อทำเป็น stable cell line ที่พร้อมใช้งานได้ ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการสร้าง subgenomic GFP/DEN-2 replicon และได้นำ replicon เข้าสู่เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม(BHK-21 cell) ซึ่งสามารถมีการแสดงออกของยีนทั้งสองได้อย่างมีประสิทธิภาพตามที่ต้องการ จัดว่าเป็นครั้งแรกที่ได้มีการสร้างเซลล์ชนิดนี้ได้สำเร็จ ต่อมาได้นำเซลล์ ดังกล่าวนี้นำไปทดสอบกับยาที่มีฤทธิ์ต้านไวรัสทั่วไป ได้แก่ ribivarin และ mycophenolic acid พบว่าสามารถประเมินฤทธิ์ต้านไวรัสของยาได้จากการตรวจวัดระดับแสงสีเขียวของโปรตีน GFP ที่ลดลงอย่างชัดเจนสังเกตเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งมีระดับสัมพันธ์กับการลดจำนวน RNA และโปรตีนของไวรัส ดังนั้นจึงคาดว่าเซลล์ที่สร้างได้นี้ จะสามารถนำไปใช้เป็น model ในการค้นหาสารสกัดจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านไวรัสเด็งกีได้ ในการทดลองต่อมาผู้วิจัยได้นำเซลล์ดังกล่าวไปใช้ทดสอบกับสารสกัดหยาดและสารสกัดบริสุทธิ์จากพืชจำนวน 75 ตัวอย่าง รวมทั้งสารดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีอีกจำนวนหนึ่ง พบว่าการทดสอบโดยวิธีการใช้เซลล์นี้ช่วยให้การค้นหาสารที่มีฤทธิ์ต้านไวรัสเด็งกีในเบื้องต้นได้รวดเร็วขึ้น จึงเป็นการย่นระยะเวลาและเพิ่มโอกาสในการค้นหาสารสกัดที่จะนำไปพัฒนาเป็นยาได้เร็วขึ้น ซึ่งในการทดลองนี้ได้ค้นพบสารสกัดที่ดีหลายตัว อย่างไรก็ตามการบอกถึงกลไกการออกฤทธิ์การยับยั้งไวรัสในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับ viral assembly process ยังบอกได้ไม่ละเอียด เพราะไวรัสที่ลดจำนวน จะส่งผลให้ระดับโปรตีนทั้ง GFPและโปรตีนจากไวรัสลดลงด้วย การทดสอบในรายละเอียดถึงระดับกลไกการออกฤทธิ์ยังคงต้องดำเนินการต่อไป

**คำหลัก:** ไวรัสเด็งกี แสงสีเขียวฟลูออเรสเซน สมุนไพรต้านเชื้อไวรัสเด็งกี