

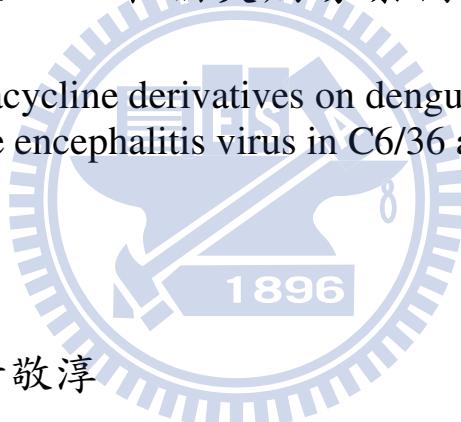
# 國立交通大學

## 生物科技研究所

### 碩士論文

以 C6/36 與 293T 細胞探討四環黴素衍生物對登革熱病  
毒二型及日本腦炎病毒繁衍之影響

The effect of tetracycline derivatives on dengue virus type II and  
Japanese encephalitis virus in C6/36 and 293T



研究 生：黃敬淳

學 號：9728507

指 導 教 授：楊 昶 良 博 士

中華民國一百年七月

以 C6/36 與 293T 細胞探討四環黴素衍生物對登革熱病  
毒二型及日本腦炎病毒繁衍之影響

The effect of tetracycline derivatives on dengue virus type II and  
Japanese encephalitis virus in C6/36 and 293T

研 究 生：黃敬淳

Student : Ching-Chun Huang

指 導 教 授：楊 昀 良

Advisor : Dr. Yun-Liang Yang



in

Biological Science and Technology

July 2011

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國 一百 年 七 月

# 以 C6/36 與 293T 細胞探討四環黴素衍生物對登革熱病毒二型及日本腦炎病毒繁衍之影響

研究生：黃敬淳

指導教授：楊昀良 博士

## 中文摘要

登革熱是目前影響全球健康的重要議題之一，主要分布在熱帶及亞熱帶地區。根據統計已超過 100 個國家曾經爆發過登革熱疫情並且約有二十五億人口受到登革熱病毒的威脅。登革熱病毒屬於黃質病毒科黃質病毒屬。對於登革熱目前並沒有有效且商業化之疫苗，積極開發抗登革熱藥物是當前重要目標之一。

黃質病毒的外膜蛋白對於病毒與宿主細胞結合，進入宿主細胞內都扮演著很重要的角色。之前實驗室已根據登革熱病毒外膜蛋白篩選出一些四環黴素衍生物在幼倉鼠細胞（BHK-21）有抑制登革熱病毒二型空斑產生的效果。在本研究中，我使用蚊子細胞（C6/36）及 人類胚胎腎臟細胞（293T）進行一系列實驗，藉由實驗結果推測四環黴素衍生物對登革熱病毒抑制效果的標的。結果顯示使用不同細胞株不會影響四環黴素衍生物對登革熱病毒的抑制效果。初步推斷四環黴素衍生物之抑制標的應在病毒上。

為了進一步了解四環黴素衍生物抑制的專一性，使用同為黃質病毒的日本腦炎病毒（Japanese encephalitis virus）與藥物一起感染 293T 細胞。結果得到除 Chlortetracycline 之外其他四環黴素衍生物對日本腦炎病毒並沒有顯著抑制的效果，顯示四環藥物衍生物中 Tetracycline、Doxycycline、Rolutetraacycline 的抑制效果具有專一性。

# **The effect of tetracycline derivatives on dengue virus type II and Japanese encephalitis virus in C6/36 and 293T**

Student : Ching-Chun Huang

Advisor : Dr. Yun-Liang Yang

## **Abstract**

Dengue virus, a member of the Flaviviridae family, is now believed to be the most important arthropod-borne disease in the world, especially in tropical and subtropical regions. There were outbreaks reported in more than 100 countries and about 2 billion people lived under the threats. Therefore, control of the dengue viral infections is an urgent issue. However, there is no commercial vaccine or medication available.

Dengue envelop protein (E protein) is responsible for activating “membrane fusion” during the entry of viruses into host cells. Previously research in the laboratory has shown that several tetracycline derivatives have inhibitory effect on the propagation of dengue viruses in mammalian cell BHK21. In this study, I used mosquito cell line C6/36 and human embryonic cell line kidney 293T to perform a series of assay to find out the target of these tetracycline derivatives. All these tetracycline derivatives showed inhibitory effects on dengue virus type 2 in both C6/36 and 293T cell culture, indicating that the inhibitory target might be at virus instead of the host cell.

Furthermore, to understand the specificity of these tetracycline derivatives, Japanese encephalitis virus (JEV), which is also a member of flavivirus was used to infect 293T cell line with or without the present of these four tetracycline derivatives. All these tetracycline derivatives showed no significant inhibitory effects on JEV in 293T cell line except chlortetracycline.

## 致謝

碩班終於走到這一頁了，心裡真是充滿興奮及不捨，這些年來遇到許多幫助我的人，首先最需要感謝的當然是指導教授小楊老師，老師很有邏輯的教導我做研究需要的態度，使我在思考解決問題這方面成長了不少，另外老師課堂及 meeting 上很生活化的舉例說明都會讓我笑個半天，可以在小楊老師實驗室真的很開心。再來一定要感謝的是口試委員梁美智老師及徐維莉老師，美智老師在學校碰到我都會親切的跟我打招呼問候我，維莉老師在兩年後還記得我讓我好感動，謝謝你們抽空來參加我的碩班口試，給我許多建議讓論文更完整。

能夠完成碩士學業也要謝謝實驗室的成員們的陪伴，親切友善的藍敏書學長，對一個剛到陌生環境的新入你真的很重要；謝謝耐心帶我做 western 的淑貞學姐；謝謝原本超 man，上班後超美的高人李淑萍陪我嘻嘻哈哈吵鬧鬧；還有謝謝一起耍白痴哈哈大笑的秀拔，你的笑聲真的超喜感的啦!!謝謝惠菁學姐雖然人在國衛院，回博愛時也會關心問候我；妍寧!!這次沒有打錯你的妍了，你講英文好好聽窩，謝謝你在生活上給我的幫助；感謝佳真老師也是身在國衛院，可是都會關心鼓勵我；一開始以為很兇的桑妮麻麻，其實也是超級可愛跟好笑，謝謝你畢業後也會給我打氣，督促我快快畢業；我最親愛的酷哥，第一次踏進實驗室真的被你的臉嚇個半死，但是相處久了也越來越喜歡你，也發現其實你也是少根經大爺啦，在碩班生涯中非常感謝你一直給我消費，我的高中大學同學都認識你啦，酷哥最棒了!!!小倩倩也是一開始被我歸類為超兇狠學姐，但是現在我都爬到你頭上一直欺負你了，欺負你好好玩，但是但是阿，在我心中深深小小的地方，對小倩其實是非常崇拜的唷!!嘿嘿；最親愛的最親愛的麻麻，首先要謝謝你辛苦帶我做實驗，還有在我心情不好時陪我說話安慰我，心情好時陪我一起開心丟搞，帶我去台中玩，麻麻也最棒了!!!謝謝麻麻當然也要謝謝拔拔，拔拔真的超級無厘頭超好笑，雖然全世界大概只有麻麻跟我欣賞你的笑點啦哈哈；大楊家的咏馨阿姨，面惡心善唱歌超好聽的咏馨阿姨，在你冷酷的外表下，我知道你是最關心朋友的好阿姨，現在對你我也越來越皮了哈

哈，我會學著長大，不會讓你擔心我受騙的!!一起同甘共苦的洪優優跟重哥哥，還記得第一天見到洪優優，我就哭給你看嚇了你一大跳，還麻煩你帶我去光復辦網路，之後這些年也陪我一起起笑當海綿寶派大星二人組，感謝感謝!!謝重哥總是幫忙實驗室細胞室的大小瑣事，儼然是小楊家水電工，還要謝謝你無限供應我的飲用水跟蛋黃派，實驗上有問題跟重哥討論就會感覺超安心的啦!!超高音女王阿錫也是一個熱心搞笑的好朋友，跟你一起唱歌嘶吼真的很爽快，乾蝦乾蝦；常常聽我發瘋的幸璇，你的故事也是我碩班生涯一個非常棒的調劑，故事裡的角色都會讓我非常感興趣，真是太戲劇化了啦!!哈哈；凱薩你的少根經有時候真的讓我很無奈，常常對你兇搞得不愉快，可是之後你看到我都還是笑嘻嘻，讓我很心虛哈哈，謝謝你陪我去NOVA跑來跑去當奧客買硬碟啊；阿白也是常常聽我發瘋的人，感謝你耐心開導我，但是你不要在虐待你的證件了，交給我保管吧!!包你有超乎所值的感覺；阿賢小可愛，跟你也是有風有雨啊，謝謝你常常給我依賴，感覺我們某些個性有點像，希望我們可以一起長大做自己好自在唷!!小善姊姊感謝有你，碩班的最後可以一起共甘苦，互相討論初稿口試的細節，有你在讓我好安心，還有跟你一起分食讓我食量變小一點點羞；小氣寶貝，最後一年有你陪伴真好，你也是個冷面笑匠呢，一開始以為你好文靜，一切都是錯覺哇哈哈哈；春榮電腦神，感謝你重建了網路系統還有架設FTP，讓我們傳檔案超方便，還有每次 meeting 聽你報告都覺得好神奇，果然是電腦神；正咩妍辰，雖然相處的時間不長也很感謝你陪我聊天唷!!還有要感謝阿諾，有時後來陪我吃冰吃飯，一起聊些有的沒的好開心啊科科。其他還有許多在各方面幫助過我，陪伴過我的朋友，讓我碩班這些年過得很快樂很充實，謝謝你們!!!!

最後一部分留給我最親愛的家人，謝謝黃爸爸、黃媽媽跟黃姊姊，你們辛苦了，讓我可以無慮的學習，也都會給我打氣跟鼓勵，有你們的支持讓我讓我更努力學習，超~~級感謝你們的!!

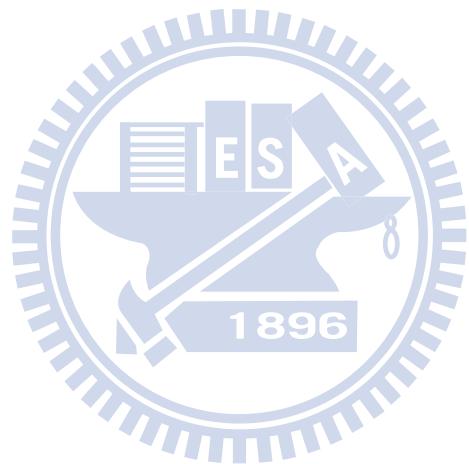
## 目錄

中文摘要 .....	i
英文摘要 .....	ii
致謝 .....	iii
目錄 .....	v
表目錄 .....	ix
圖目錄 .....	x
附表目錄 .....	xii
附圖目錄 .....	xiii
壹、緒論 .....	1
1.1 登革熱疾病概論 .....	1
1.2 登革熱病毒分子生物學背景 .....	2
1.3 登革熱病毒複製史 .....	3
1.4 登革熱病毒外膜蛋白性質 .....	4
1.5 日本腦炎疾病概論 .....	5
1.6 日本腦炎病毒外膜蛋白性質 .....	6
1.7 四環黴素衍生物 ( tetracycline derivatives ) 性質 .....	7
1.8 實驗設計與目的 .....	7
貳、材料與方法 .....	9

2.1 細胞株 .....	9
2.2 病毒 .....	9
2.3 藥品 .....	9
2.4 溶劑、緩衝溶液配方 .....	10
2.5 培養液 .....	11
2.6 儀器設備 .....	11
參、方法 .....	14
3.1 細胞繼代培養 .....	14
3.1.1 BHK-21 細胞繼代培養 .....	14
3.1.2 C6/36 細胞繼代培養 .....	14
3.1.3 293T 細胞繼代培養 .....	15
3.2 病毒增殖 .....	15
3.2.1 登革熱病毒增殖 .....	15
3.2.2 日本腦炎病毒增殖 .....	16
3.3 病毒抑制試驗 .....	16
3.3.1 C6/36 細胞病毒抑制試驗（登革熱病毒） .....	16
3.3.2 293T 細胞病毒抑制試驗（登革熱病毒） .....	17
3.3.3 293T 細胞病毒抑制試驗（日本腦炎病毒） .....	18
3.4 空斑試驗 .....	18

3.4.1 登革熱病毒空斑試驗 .....	18
3.4.2 日本腦炎病毒空斑試驗 .....	19
<b>肆、結果 .....</b>	<b>20</b>
4.1 偵測藥物在 C6/36 細胞中對登革熱病毒二型之影響 .....	20
4.1.1 Tetracycline .....	20
4.1.2 Chlortetracycline .....	20
4.1.3 Doxycycline .....	21
4.1.4 Rolitetracycline.....	22
4.1.5 Kanamycin .....	22
4.2 偵測藥物在 293T 細胞中對登革熱病毒二型之影響.....	23
4.2.1 Tetracycline .....	23
4.2.2 Chlortetracycline .....	24
4.2.3 Doxycycline .....	25
4.2.4 Rolitetracycline.....	25
4.2.5 Kanamycin .....	26
4.3 偵測藥物在 293T 細胞中對日本腦炎病毒之影響.....	27
4.3.1 Tetracycline .....	27
4.3.2 Chlortetracycline .....	27
4.3.3 Doxycycline .....	28
4.3.4 Rolitetracycline.....	29
4.3.5 Kanamycin .....	29
<b>伍、討論 .....</b>	<b>31</b>
5.1 四環黴素衍生物在 C6/36 細胞中對登革熱病毒二型之影響 .....	31

5.2 四環黴素衍生物在 293T 細胞中對登革熱病毒二型之影響 .....	32
5.3 四環黴素衍生物在 293T 細胞中對日本腦炎病毒之影響 .....	33
陸、結論 .....	36
參考文獻 .....	37



## 表目錄

表一 Tetracycline、Chlortetracycline、Doxycycline、Rolutetraacycline 及 Kanamycin 在 C6/36 及 293T 細胞中對登革熱病毒二型之 IC <sub>50</sub> 與在 293T 細胞中 對日本腦炎病毒之 IC <sub>50</sub> 。 .....	39
表二、Tetracycline、Chlortetracycline、Doxycycline、Rolutetraacycline 及 Kanamycin 之結構與他們對 C6/36 及 293T 細胞之傷害濃度。 .....	40
表三、Tetracycline、Chlortetracycline、Doxycycline、Rolutetraacycline 及 Kanamycin 之結構與他們在 BHK-21、C6/36 及 293T 細胞中對登革熱病毒二型之 IC <sub>50</sub> 。 .....	41
表四、登革熱病毒二型與日本腦炎病毒外膜蛋白之疏水性口袋周圍胺基酸之比 較 .....	42



## 圖目錄

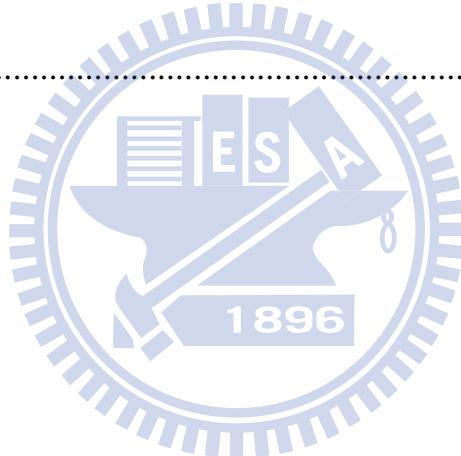
圖一、Tetracycline 在 C6/36 細胞中對於登革熱病毒二型的影響 .....	43
圖二、Tetracycline 對 C6/36 細胞之傷害性 .....	45
圖三、Chlortetracycline 在 C6/36 細胞中對於登革熱病毒二型的影響 .....	46
圖四、Chlortetracycline 對 C6/36 細胞之傷害性.....	48
圖五、Doxycycline 在 C6/36 細胞中對登革熱病毒二型之影響.....	49
圖六、Doxycycline 對 C6/36 細胞之傷害性.....	51
圖七、Rolutetraacycline 在 C6/36 細胞中對登革熱病毒二型之影響.....	52
圖八、Rolutetraacycline 對 C6/36 細胞之傷害性.....	54
圖九、Kanamycin 在 C6/36 細胞中對登革熱病毒二型之影響.....	55
圖十、Kanamycin 對 C6/36 細胞之傷害性.....	57
圖十一、Tetracycline 在 293T 細胞中對於登革熱病毒二型的影響 .....	58
圖十二、Tetracycline 對 293T 細胞之傷害性.....	60
圖十三、Chlortetracycline 在 293T 細胞中對登革熱病毒二型之影響 .....	61
圖十四、Chlortetracycline 對 293T 細胞之傷害性 .....	63
圖十五、Doxycycline 在 293T 細胞中對登革熱病毒二型之影響 .....	64
圖十六、Doxycycline 對 293T 細胞之傷害性 .....	66
圖十七、Rolutetraacycline 在 293T 細胞中對登革熱病毒二型之影響 .....	67
圖十八、Rolutetraacycline 對 293T 細胞之傷害性 .....	69

圖十九、Kanamycin 在 293T 細胞中對登革熱病毒二型之影響 .....	70
圖二十、Kanamycin 對 293T 細胞之傷害性 .....	72
圖二十一、Tetracycline 在 293T 細胞中對於日本腦炎病毒的影響 .....	73
圖二十二、Chlortetracycline 在 293T 細胞中對於日本腦炎病毒的影響 .....	75
圖二十三、Doxycycline 在 293T 細胞中對日本腦炎病毒之影響 .....	77
圖二十四、Rolutetraacycline 在 293T 細胞中對日本腦炎病毒之影響 .....	79
圖二十五、Kanamycin 在 293T 細胞中對日本腦炎病毒之影響 .....	81
圖二十六、Tetracycline、Chlortetracycline、Doxycycline、Rolutetraacycline 及 Kanamycin 之 3D 結構圖 .....	83



## 附表目錄

附表一、Tetracycline、Chlortetracycline、Doxycycline、Rolutetraacycline、Kanamycin、 9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridie hydrochloride hydrate 及 Berberine 之 結構與他們在 BHK-21 細胞中對登革熱病毒二型之 IC <sub>50</sub> .....	84
附表二、Tetracycline、Chlortetracycline、Doxycycline、Rolutetraacycline、 Demeclocycline、Oxytetracycline 及 Minocycline 在 BHK-21 細胞中對登 革熱病毒二型之 IC <sub>50</sub> .....	85
附表三、Tetracycline、Chlortetracycline、Doxycycline、Rolutetraacycline 在人體內 使用之濃度 .....	86



## 附圖目錄

附圖一、登革熱病毒在世界的分布 .....	87
附圖二、2007 年至 2011 年六月台灣登革熱病例數及 2010 年 1 月至 2011 年 6 月登革熱病例發生數.....	87
附圖三、黃質病毒基因體示意圖及病毒、宿主細胞蛋白酵素作用位置 .....	88
附圖四、登革熱病毒在宿主細胞內的複製史 .....	88
附圖五、登革熱病毒外膜蛋白結構示意圖 .....	89
附圖六、日本腦炎外膜蛋白示意圖 .....	89
附圖七 登革熱病毒二型外膜蛋白與日本腦炎外膜蛋白胺基酸序列比較 .....	90
附圖八、登革熱病毒二型外膜蛋白與日本腦炎外膜蛋白比較.....	91



## 壹、緒論

登革熱（Dengue fever, DF）是一種因感染登革熱病毒（Dengue virus, DV）所造成的傳染病。登革熱病毒藉由埃及斑蚊（*Aedes aegypti*）及白線斑蚊（*Aedes albopictus*）叮咬的途徑在人跟人之間傳播。登革熱病毒是經由節肢動物感染的病毒中最重要的一個，主要好發於熱帶及亞熱帶（附圖一），居住在此地區的人口約有 25 億人，占全球人口 40%，超過 100 個國家都有爆發過登革熱（World Health Organization, WHO）。全世界每年感染登革熱約有五千萬到一億的人口，其中登革出血熱（Dengue hemorrhagic fever, DHF）病例有 50 萬件，死亡病例則有 2 萬 2 千件（World Health Organization, WHO）。台灣位於亞熱帶且為海島型國家，氣候溫暖潮濕，非常適合病媒蚊孳生。自 1987 年後，每年都有登革熱的確定病例，其中 2010 年病例集中在八至十二月（附圖二，台灣疾病管制局，Taiwan CDC）。由於目前尚無有效防治登革熱的商業化疫苗及藥物，除了減少病媒蚊的孳生，積極研究預防及治療的方法亦是重要課題之一。

### 1.1 登革熱疾病概論

登革熱根據血清抗原性可分為四個血清型（serotype），分別是 DV1、DV2、DV3 及 DV4。人類被帶有登革熱病毒的病媒蚊叮咬後，登革熱病毒在體內的潛伏期約 3 到 14 天（平均 4 至 7 天）(Gubler, 1998)。感染登革熱的臨

病症狀可能為無症狀 ( asymptomatic )，或依症狀嚴重程度分為登革熱 ( dengue fever, DF )、登革出血熱 ( dengue hemorrhagic fever, DHF ) 及登革休克症候群 ( dengue shock syndrome, DSS )。

DF 又稱典型登革熱 ( classic dengue fever )，症狀為突然的發燒伴隨頭痛、眼窩痛、全身肌肉關節痠痛、噁心嘔吐及紅疹……等。典型登革熱發生出血 ( hemorrhage ) 的情況較不常見，通常具有自限性 ( self-limiting )，於症狀發生後 3 至 7 天會自行痊癒。登革出血熱初期症狀與典型登革熱類似，有急性的發燒期，所以難與典型登革熱做區分。發燒將退的前後一天，因為血管通透性增加造成血漿滲出 ( plasma leakage )，微血管破裂，皮膚開始有瘀血、瘀斑出現。此時若沒有及時給予適當治療，病患血漿滲出過多時會因失血而造成休克，稱為登革休克症候群，死亡率可達 10~15% ( Gubler, 1998, 2002 )。

## 1.2 登革熱病毒分子生物學背景

登革熱病毒為具有外膜 ( envelope ) 的正向單股 RNA 病毒，屬於黃質病毒科 ( Flaviviridea ) 黃質病毒屬 ( Flavivirus )，同屬病毒有：西尼羅病毒 ( West Nile virus )、日本腦炎病毒 ( Japanese encephalitis virus )、黃熱病毒 ( Yellow fever virus )、TBEV ( tick-borne encephalitis virus ) 等其他超過七十種病毒 ( Lindenbach *et al.*, 2007 )。登革熱病毒顆粒直徑約 50 nm，基因體全長約 10.8 kb，只有一個 open reading frame 被 5' 端非轉譯區 ( 5' untranslated region, 5'

UTR) 及 3' 端非轉譯區 (3' untranslated region, 3' UTR) 夾住。進行轉譯時只會合成出一條多肽鏈 (polyprotein)，經由病毒本身的蛋白質酵素 (serine protease) 及宿主細胞內的蛋白質酵素 (protease) (Clyde *et al.*, 2006)，將多肽鏈裂解成十個獨立蛋白，包括三個結構型蛋白 (structural protein)：衣殼蛋白 (capsid protein, C)、前驅膜蛋白 (precursor membrane protein, prM) 及外膜蛋白 (envelope protein, E)；七個非結構型蛋白 (non-structural protein)：NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 及 NS5 (附圖三, Sampath and Padmanabhan, 2009, Lindenbach *et al.*, 2007)。

### 1.3 登革熱病毒複製史



登革熱病毒屬於經由病媒蚊叮咬人類而傳染之黃質病毒，黃質病毒進到人體後的生活史目前最普遍的看法是：病毒透過病毒表面的外膜蛋白跟宿主細胞表面的受體 (receptor) 結合後，經由胞飲作用 (endocytosis) 進到宿主細胞內。在內體小泡 (endosomal vesicle) 中的酸性環境下，病毒及宿主細胞的細胞膜會進行融合 (fusion) 將病毒的 nucleocapsid 釋放到細胞質中，接著去衣殼蛋白的程序使病毒的基因體進到細胞質中，基因體經由轉錄、轉譯的工作，新合成的 RNA 及結構型蛋白進入內質網內腔，先在內質網表面組裝形成不具感染力的未成熟病毒 (Mackenzie and Westaway, 2001)，接著運送到反式高基氏體，藉著宿主細胞的蛋白酶 furin 修飾成為具感染能力的成熟病毒 (Stadler *et al.*,

1997)，經由胞泌作用 (exocytosis) 釋放到胞外 (附圖四,Clyde *et al.*, 2006,, Allison *et al.*, 2001 , Lindenbach *et al.*, 2007)。

#### 1.4 登革熱病毒外膜蛋白性質

外膜蛋白 (envelope protein, E protein) 是成熟黃質病毒顆粒最主要的結構型蛋白 (Heinz and Allison, 2001)。登革熱病毒外膜蛋白由 495 個胺基酸組成，是一穿膜的糖蛋白 (glycoprotein)，關係著病毒與宿主細胞的結合，且對於病毒進入宿主細胞內的過程扮演著很重要的角色 (Allison *et al.*, 2001 , Crill and Roehrig, 2001 )，屬於第二類的融合蛋白 (class II viral fusion protein) ( Heinz and Allison, 2001 )。

近年來，已有學者利用 X-ray 繞射的方法解出黃質病毒中 DV2 及 TBEV ( tick-borne encephalitis virus ) 的 E protein 結晶結構，此結構只包含位於脂雙膜 (lipid bilayer) 外的蛋白質部分 (ectodomain) ( Rey *et al.*, 1995 , Modis *et al.*, 2003 )。根據此結構得知，E protein 在膜外可分為三個區域 (domain) ( 附圖五 , Modis *et al.*, 2004 )，分別是 domain I，包含了第 1-52、133-192 及 275-296 的胺基酸，是 E protein 的中央區域；domain II 包含了第 53-132 及 193-274 的胺基酸，負責與另一個 E protein 形成雙體 (dimer)，且根據黃質病毒外膜蛋白特性在末端有一個 fusion peptide ( 第 98-110 的胺基酸 ) ( Allison *et al.*, 2001 ) 可進行病毒與宿主細胞膜之融合；domain III 包含第

297-394 的胺基酸，被認為是與宿主細胞表面受體結合的區域（Bhardwaj *et al.*, 2001, Crill and Roehrig, 2001），是一個 immunoglobulin-like 區域，病毒中和試驗中常以此區域為抗原。

E protein 在中性酸鹼值的環境以雙體的形式存在於病毒表面，當病毒經胞飲作用進到宿主細胞後，會先被包在內體小泡中，內體小泡中的酸性環境會催化 E protein 的構型改變（Allison *et al.*, 1995, Lescar *et al.*, 2001），雙體結構變成三體結構（trimer）。此構型改變讓 domain II 突出，末端的 fusion peptide 露出促使病毒的外套膜與內體小泡膜進行融合，病毒的 nucleocapsid 進入細胞質中（Modis *et al.*, 2004）。

之前有文獻將登革熱病毒外膜蛋白單獨或與分子 N-octyl- $\beta$ -D-glucoside ( $\beta$ -OG) 進行結晶發現，分子  $\beta$ -OG 會佔據在登革熱病毒外膜蛋白 domain I 跟 domain II 之間的疏水性口袋（hydrophobic pocket）。分子  $\beta$ -OG 的有無會讓登革熱病毒外膜蛋白 domain II 上的 kl loop 結構產生差異（Yang *et al.*, 2007），而這差異會影響登革熱病毒外膜蛋白在低 pH 環境中的構型改變，此疏水性口袋被認為可當作設計抗登革熱病毒藥物之標的（Modis *et al.*, 2003, 2004）。

## 1.5 日本腦炎疾病概論

日本腦炎是由日本腦炎病毒（Japanese Encephalitis Virus, JEV）引起的急性腦

膜炎，每年約有 5 萬個臨床病例，其中約 1 萬名病患最後會死亡，1 萬 5 千名病患在神經及精神上有永久的後遺症（World Health Organization, WHO）。

日本腦炎病毒與登革熱病毒同屬於黃質病毒科 (*Flaviviridea*) 黃質病毒屬 (*Flavivirus*)，在台灣主要的病媒蚊為三斑家蚊 (*Culex tritaeniorhynchus*)。被日本腦炎病毒感染後的症狀大部分為無症狀，少部分輕微病例頭痛、發燒或無菌性腦膜炎等症狀，嚴重者除了頭痛發燒，還有腦膜刺激、昏迷及痙攣等症狀，最後導致精神及神經上後遺症或死亡（台灣疾病管制局，Taiwan CDC <http://www.cdc.gov.tw/>）。

## 1.6 日本腦炎病毒外膜蛋白性質



日本腦炎病毒因為同屬黃質病毒，其外膜蛋白同樣包含三個區域 (domain)，根據 NCBI database 資料三個區域分別為：構成 E protein 中央區域的 domain I，包含了第 1-57、122-222 及 268-298 的胺基酸；含有 fusion peptide 的 domain II 包含了第 58-121 及 223-267 的胺基酸；被認為是與宿主細胞表面受體結合的 domain III 包含第 299-406 的胺基酸（附圖六，National Center for Biotechnology Information，NCBI database）。

與登革熱病毒外膜蛋白比較，在 domain I 與 domain II 之間的區域沒有很高的相似度（附圖七，附圖八）。

## 1.7 四環黴素衍生物 (tetracycline derivatives) 性質

四環黴素衍生物為一類同樣以四環結構為基礎的廣效型 (broad-spectrum) 抗生素。第一個被發現的為 chlortetracycline，於 1947 年被分離出來，之後其他四環黴素衍生物陸續被發現，包括 1950 年的 oxytetracycline，1953 年的 tetracycline，以及半合成的 doxycycline 及 minocycline。四環黴素衍生物藉由與細菌體內 30S 核糖體上的 A-site 結合，使新的胺基酸單體無法加到勝肽鏈上干擾細菌蛋白質合成而達到抑菌的效果，主要用於對抗多種革蘭氏陰性及陽性菌、厭氧菌、立克次氏體及黴漿菌……等等 (Andre, 2005)。本實驗中使用的四環黴素衍生物主要為 tetracycline、chlortetracycline、doxycycline 及 rolitetracycline，其在人體的使用濃度如附表三。

## 1.8 實驗設計與目的

根據實驗室之前與楊進木老師合作，以生物資訊 Virtual screening 的方式針對登革熱病毒的外膜蛋白上疏水性口袋在 Comprehensive Medicinal Chemistry 資料庫進行藥物篩選。篩選得到的前 200 個藥物名單中，包含了兩個四環黴素衍生物 tetracycline 及 rolitetracycline，因為四環黴素衍生物都具有四個環的基本結構，只是在支鏈上做修飾產生其他衍生物，推測四環結構可能為與疏水性口袋結合的條件之一。

實驗室前人（張，2009；杜，2007）研究發現，四種四環黴素衍生物 Tetracycline、Chlortetracycline、Doxycycline、Rolutetraacycline，相較於非四環結構藥物 Kanamycin，在幼倉鼠腎臟纖維母細胞（BHK-21）中對於登革熱病毒二型 PL046 strain 具有抑制空斑（plaque）形成之效果。根據當初篩選藥物的方法，假設這些四環黴素衍生物有機會與登革熱病毒外膜蛋白上的疏水性口袋結合，使外膜蛋白在內體小泡中的低 pH 環境下無法產生構型變化，進而阻止登革熱病毒進入宿主細胞質中。為了進一步確認這些這個假設，根據以下兩個方向進行實驗設計。1) 若藥物與病毒作用，對於不同細胞株應該得到類似的抑制效果。第一步使用不同於哺乳類且為登革熱病毒載體的白線斑蚊細胞（C6/36），第二步使用人類的胚胎腎臟細胞（293T）進行實驗。由於 BHK-21 細胞與 C6/36 及 293T 細胞被登革熱病毒感染之反應不同，BHK-21 會有細胞溶解（cell lyse）的現象，C6/36 及 293T 細胞則不會，若四環黴素衍生物在這些細胞中皆對登革熱病毒有抑制之效果，則可初步排除藥物是針對 BHK-21 細胞有抑制作用。2) 如果藥物是與細胞作用，可能是藉由與細胞內核糖體結合干擾細胞蛋白質合成而達到抑制效果，則對於不同病毒應得到同樣的抑制效果。使用同樣為黃質病毒的日本腦炎病毒來觀察藥物是否藉由干擾蛋白質合成而達到抑制病毒之效果。希望藉由本研究推斷這些四環黴素衍生物作用的標的。

## 貳、材料

### 2.1 細胞株

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

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

293T ( 人類胚胎腎臟細胞 , human embryonic kidney cell )

### 2.2 病毒

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

Japanese encephalitis virus RP9 strain ( gift from Dr. RY. Chang's laboratory ,  
NDHU )



### 2.3 藥品

藥品名稱	製造公司	目錄編號	應用
Chlortetracycline	Sigma	C-4881	病毒抑制試驗
Crystal Violet	Sigma	C-3886	空斑試驗
DMSO	Sigma	D-8418	細胞保存
Doxycycline	Sigma	D-9891	病毒抑制試驗

Fetal Bovine Serum	Biological industries	04-001-1A	細胞培養
Formaldehyde	Riedel-de Haën	33220	固定細胞
Kanamycin	Sigma	K4000	病毒抑制試驗
MEM	GIBCO	41500-034	細胞培養
Methylcellulose	Sigma	M0512	空斑試驗
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma	S-5761	細胞培養
PBS	Biological Industries	11-223-1K	細胞培養
Rolitetracycline	Sigma	R-2253	病毒抑制試驗
Tetracycline	Sigma	T-7660	病毒抑制試驗
TrypLE <sup>TM</sup> Express	GIBCO	12605-010	細胞培養

## 2.4 溶劑、緩衝溶液配方

- 1 % crystal violet solution ( 500 ml )

5 g crystal violet

50 ml 37 % formaldehyde

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

- 3.7 % formaldehyde

100 ml 37 % formaldehyde

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

## 2.5 培養液

- 1X MEM

MEM powder ( GIBCO , 41500-034 )

2.2 g NaHCO<sub>3</sub>

ddH<sub>2</sub>O to 1000 ml

- 2X MEM

MEM powder ( GIBCO , 41500-034 )

2.2 g NaHCO<sub>3</sub>

ddH<sub>2</sub>O to 500 ml

- 10 % FBS / MEM

50 ml fetal bovine serum

450 ml 1X MEM

- 5 % FBS / MEM

25 ml fetal bovine serum

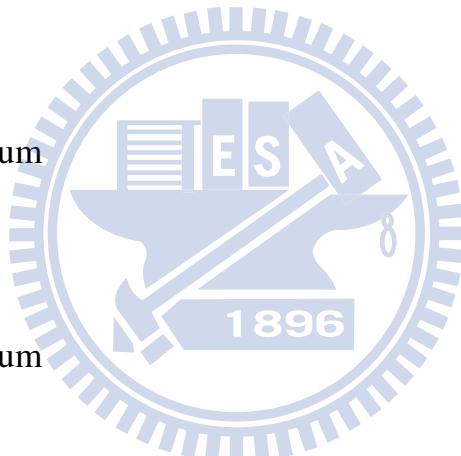
475 ml 1X MEM

- 1.1 % methylcellulose medium

5.5 g methylcellulose

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

250 ml 2X MEM



## 2.6 儀器設備

-20°C 直立冷凍櫃 ( WHITE-WESTINGHOUSE )

開蓋式 -20°C 冷凍櫃 311-407-00 ( CARAVELL )

4°C 三門冰藏櫃 KS-101-MS ( MINI KINGKON )

樣品冷藏櫃 CH-502 ( CHIN HSIN )

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

二氫碳培養箱 5420-0NEW ( NAPCO )

二氫碳培養箱 ( CONTHERM )

低溫培養箱 701 ( WISOOM )

加熱攪拌器 PC-420 ( CORNING )

數字式加熱攪拌器 6795-420D ( CORNING )

水浴槽 B-101 ( FIRSTEK SCIENTIFIC )

血球計數器 ( MARIEMFELD )

研究級倒立項位差螢光顯微鏡 ( NIKON )

桌上型低溫高速離心機 Centrifuge 5804 R ( eppendorf )

微量離心機 UFO2100 ( PANTECH )

電子天秤 PB153-S ( METTLER TOLEDO )

電子天秤 TB-214 ( DENVER INSTRUMENT )

超純水製造機 ( MILLIPORE )

超音波洗淨器 DC200 ( DELTA )

烘箱 DS45 ( DENG YNG )

無菌操作台 VCM-420 ( 造鑫 )

液態氮容器 ( TAYLOR-WHARTON )

數位相機 C-5050Z ( OLYMPUS )



## 參、方法

### 3.1 細胞繼代培養

#### 3.1.1 BHK-21 細胞繼代培養

培養液為含有 5 % FBS ( Fetal Bovine Serum ; Biological Industry , Cat. 04-001-1A) 的 MEM (Minimum Essential Medium; GIBCO , Cat.41500-034) , 培養環境為含有 5 % CO<sub>2</sub> 的 37 °C 恆溫培養箱。繼代培養程序如下：吸除培養液，以 PBS (Phosphate Buffer Saline ; biological industry , Cat. 11-223-1K ) 沖洗一次，加入 1 ml 的 TrypLE™ Express ( GIBCO , Cat. 12605-010 ) 於 37 °C 、 5 % CO<sub>2</sub> 培養箱中反應 5 分鐘，加入約 3 ml 培養液與 TrypLE™ Express 混合後輕沖培養皿底盤使細胞脫落並均勻散佈於培養液中，留下 1 / 10 體積的細胞液，補入 10 ml 培養液混合均勻，置於培養箱繼續培養。

#### 3.1.2 C6/36 細胞繼代培養

培養液使用含有 10 % FBS 的 MEM ，培養於 28 °C , 5 % CO<sub>2</sub> 恆溫箱中。繼代培養程序如下：吸除培養液到約剩 1 ml ，使用細胞刮勺將培養皿底部的細胞刮落，加入 3 ml 培養液沖洗培養皿底盤，將細胞沖散並使其均勻分佈於培養液中。留下約 1 / 3 的細胞液，補入 10 ml 培養液混合均勻，置於

培養箱繼續培養。

### 3.1.3 293T 細胞繼代培養

培養液為含有 10 % FBS 的 MEM，培養環境為含有 5 % CO<sub>2</sub> 的 37°C 恒溫培養箱。繼代培養程序如下：吸除培養液，以 PBS 沖洗一次，加入 1 ml 的 TrypLE<sup>TM</sup> Express，於 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 培養箱中反應 3 分鐘，加入約 3 ml 培養液與 TrypLE<sup>TM</sup> Express 混合後輕沖培養皿底盤使細胞脫落並均勻散佈於培養液中，留下 1/3 體積的細胞液，補入 10 ml 培養液混合均勻，置於培養箱繼續培養。

## 3.2 病毒增殖

### 3.2.1 登革熱病毒增殖

利用白線斑蚊細胞 ( C6/36 ) 增殖登革熱病毒 PL046 strain。將  $1 \times 10^7$  的 C6/36 細胞置於 15 ml 離心管中，以 1500 rpm 離心 5 分鐘 (centrifuge 5804R)，去除上清液，加入適量 10 % FBS / MEM 培養液重新混勻細胞後，加入  $1 \times 10^6$  病毒 ( 病毒液與培養液的總體積為 2 ml )，即 MOI = 0.1，置於 37 °C，5 % CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 2 小時，培養過程中每 20 分鐘搖一次。

將病毒與細胞混合液移入 T75 培養盤中，補入 9 ml 的 10 % FBS / MEM

培養液後，置於 28 °C 培養箱中，於感染後四至十二天收集含有病毒之上清液，以 0.22 μm 孔徑的過濾膜將細胞殘渣過濾掉，最後將過濾後的病毒液分裝到 1.5 ml 的微量離心管中，保存於 -80 °C 冰箱中。

### 3.2.2 日本腦炎病毒增殖

利用白線斑蚊細胞 (C6/36) 增殖日本腦炎病毒 RP9 strain。將  $1 \times 10^7$  的 C6/36 細胞置於 15 ml 離心管中，以 1500 rpm 離心 5 分鐘 (centrifuge 5804R)，去除上清液，加入適量 10 % FBS / MEM 培養液重新混勻細胞後，加入  $1 \times 10^6$  病毒 ( 病毒液與培養液的總體積為 2 ml )，即 MOI = 0.1，置於 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 2 小時，培養過程中每 20 分鐘搖一次。將病毒與細胞混合液移入 T75 培養盤中，補入 9 ml 的 10 % FBS / MEM 培養液後，置於 28 °C 培養箱中，於感染後四至十二天收集含有病毒之上清液，以 0.22 μm 孔徑的過濾膜將細胞殘渣過濾掉，最後將過濾後的病毒液分裝到 1.5 ml 的微量離心管中，保存於 -80 °C 冰箱中。

## 3.3 病毒抑制試驗

### 3.3.1 C6/36 細胞之病毒抑制試驗 ( 登革熱病毒 )

於實驗前一天在六孔培養盤中置入  $2 \times 10^5$  的 C6/36 細胞，隔天使用未含血

清之 MEM 培養液將預測試之藥物序列稀釋到不同濃度及將病毒稀釋到每 450  $\mu\text{l}$  培養液中含有 200 PFU 的病毒，將 450  $\mu\text{l}$  的藥物與 450  $\mu\text{l}$  的病毒混合。以未含血清的 MEM 培養液清洗細胞一次，加入 900  $\mu\text{l}$  的藥物與病毒混合液，前後左右搖晃一下，置入 28 °C，5 % CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 1 小時後，吸除細胞上之藥物與病毒混合液，加入 5 ml 含有 10 % FBS 之 MEM 培養液，置於 28 °C，5 % CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 48 小時後，收取細胞的上清液進行空斑試驗。

### 3.3.2 293T 細胞之病毒抑制試驗（登革熱病毒）

於實驗前一天在六孔培養盤中置入  $2 \times 10^5$  的 293T 細胞，隔天使用未含血清之 MEM 培養液將預測試之藥物序列稀釋到不同濃度及將病毒稀釋到每 450  $\mu\text{l}$  培養液中含有 200 PFU 的病毒，將 450  $\mu\text{l}$  的藥物與 450  $\mu\text{l}$  的病毒混合。以未含血清的 MEM 培養液清洗細胞一次，加入 900  $\mu\text{l}$  的藥物與病毒混合液，前後左右搖晃一下，置入 37 °C，5 % CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 1 小時後，吸除細胞上之藥物與病毒混合液，加入 5 ml 含有 10 % FBS 之 MEM 培養液，置於 37 °C，5 % CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 48 小時後，收取細胞的上清液進行空斑試驗。

### 3.3.3 293T 細胞之病毒抑制試驗（日本腦炎病毒）

實驗前一天在六孔培養盤中置入  $2 \times 10^5$  的 293T 細胞，隔天使用未含血清之 MEM 培養液將預測試之藥物序列稀釋到不同濃度及將病毒稀釋到每 450  $\mu\text{l}$  培養液中含有 200 PFU 的病毒，將 450  $\mu\text{l}$  的藥物與 450  $\mu\text{l}$  的病毒混合。以未含血清的 MEM 培養液清洗細胞一次，加入 900  $\mu\text{l}$  的藥物與病毒混合液，前後左右搖晃一下，置入 37 °C，5 % CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 1 小時後，吸除細胞上之藥物與病毒混合液，加入 5 ml 含有 10 % FBS 之 MEM 培養液，置於 37 °C，5 % CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 24 小時後，收取細胞的上清液進行空斑試驗。

## 3.4 空斑試驗

### 3.4.1 登革熱病毒空斑試驗

實驗前一天先於六孔培養盤中置入  $2 \times 10^5$  的 BHK-21 細胞。病毒以未含血清的 MEM 培養液進行序列稀釋。感染前先以未含血清的 MEM 培養液沖洗細胞一次，並在細胞上加入 500  $\mu\text{l}$  未含血清的 MEM 培養液，加入 400  $\mu\text{l}$  序列稀釋後的病毒液後，置於 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 1 小時候，加入 4 ml 的 1.1 % methyl cellulose medium，置入 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 培養箱中培養約七至八天。取出細胞後，吸除培養液，加入適量 3.7 % 甲醛固定

細胞，室溫靜置 20 分鐘，吸除甲醛後加入適量的 1 % 結晶紫溶液，室溫靜置隔夜後，以流水沖洗培養盤，於室溫風乾後，計數空斑數目。

### 3.4.2 日本腦炎病毒空斑試驗

實驗前一天先於六孔培養盤中置入  $2 \times 10^5$  的 BHK-21 細胞。病毒以未含血清的 MEM 培養液進行序列稀釋。感染前先以未含血清的 MEM 培養液沖洗細胞一次，並在細胞上加入 800  $\mu\text{l}$  未含血清的 MEM 培養液，加入 200  $\mu\text{l}$  序列稀釋後的病毒液後，置於 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 1 小時，培養過程中每 20 分鐘搖一次。1 小時候，加入 4 ml 的 1.1 % methyl cellulose medium，置入 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 培養箱中培養約四至五天。取出細胞後，吸除培養液，加入適量 3.7 % 甲醛固定細胞，室溫靜置 20 分鐘，吸除甲醛後加入適量的 1 % 結晶紫溶液，室溫靜置隔夜，以流水沖洗培養盤，於室溫風乾後，計數空斑數目。

## 肆、結果

### 4.1 偵測藥物在 C6/36 細胞中對登革熱病毒二型之影響

#### 4.1.1 Tetracycline

最終藥物濃度為  $0 \mu\text{M}$ 、 $50 \mu\text{M}$ 、 $150 \mu\text{M}$ 、 $250 \mu\text{M}$ 、 $350 \mu\text{M}$ 。每一個藥物濃度皆有三組重複的實驗結果，每一組之結果又得自於三次重複。將每個藥物濃度培養皿上數得之空斑數換算成病毒效價後，以未加入藥物 ( $0 \mu\text{M}$ ) 所得之病毒效價做為分母，其他藥物濃度所得之病毒效價為分子，相除並乘以百分之百，計算出不同藥物濃度下之病毒效價百分比。每一組之三次重複所得之病毒效價百分比取平均值後得到三組病毒效價之百分比，再將此三組病毒效價百分比取平均值得到在  $50 \mu\text{M}$  時為  $84.95\%$ ， $150 \mu\text{M}$  時為  $13.10\%$ ， $250 \mu\text{M}$  時為  $10.70\%$ ， $350 \mu\text{M}$  時為  $19.34\%$ ，顯示藥物濃度在  $50 \mu\text{M}$  之後，隨著藥物濃度增加，所得之病毒效價有降低的趨勢。 $\text{IC}_{50}$  約為  $98.60 \mu\text{M}$  ( 表一，圖一 )。藥物濃度在  $350 \mu\text{M}$  以下，計數細胞沒有明顯的減少 ( 表二，圖二 )。

#### 4.1.2 Chlortetracycline

最終藥物濃度為  $0 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ 、 $25 \mu\text{M}$ 、 $50 \mu\text{M}$ 。每一個藥物濃度皆有三組

重複的實驗結果，每一組之結果又得自於三次重複。將每個藥物濃度培養皿上數得之空斑數換算成病毒效價後，以未加入藥物（0  $\mu\text{M}$ ）所得之病毒效價做為分母，其他藥物濃度所得之病毒效價為分子，相除並乘以百分之百，計算出不同藥物濃度下之病毒效價百分比。每一組之三次重複所得之病毒效價百分比取平均值後得到三組病毒效價之百分比，再將此三組病毒效價百分比取平均值得到在 10  $\mu\text{M}$  時為 107.78 %，25  $\mu\text{M}$  時為 61.80 %，50  $\mu\text{M}$  時為 15.10 %，顯示藥物濃度在 10  $\mu\text{M}$  之後，隨著藥物濃度增加，所得之病毒效價有降低的趨勢。 $\text{IC}_{50}$  約為 31.31  $\mu\text{M}$ （表一，圖三）。藥物濃度在 51.51  $\mu\text{M}$  以上時細胞死亡率大於 20 %，對細胞有傷害性（表二，圖四）。

#### 4.1.3 Doxycycline



最終藥物濃度為 0  $\mu\text{M}$ 、50  $\mu\text{M}$ 、150  $\mu\text{M}$ 、250  $\mu\text{M}$ 、350  $\mu\text{M}$ 。每一個藥物濃度皆有三組重複的實驗結果，每一組之結果又得自於三次重複。將每個藥物濃度培養皿上數得之空斑數換算成病毒效價後，以未加入藥物（0  $\mu\text{M}$ ）所得之病毒效價做為分母，其他藥物濃度所得之病毒效價為分子，相除並乘以百分之百，計算出不同藥物濃度下之病毒效價百分比。每一組之三次重複所得之病毒效價百分比取平均值後得到三組病毒效價之百分比，再將此三組病毒效價百分比取平均值得到在 50  $\mu\text{M}$  時為 15.14 %，150  $\mu\text{M}$  時為 2.15 %，250  $\mu\text{M}$  時為 0.61 %，350  $\mu\text{M}$  時為 0.07 %，顯示藥物濃度在 50  $\mu\text{M}$  之後，

隨著藥物濃度增加，所得到之病毒效價有降低的趨勢。 $IC_{50}$  約為  $29.48 \mu M$  (表一，圖五)。藥物濃度在  $350 \mu M$  以下，計數細胞沒有明顯的減少 (表二，圖六)。

#### 4.1.4 Rolitetracycline

最終藥物濃度為  $0 \mu M$ 、 $50 \mu M$ 、 $150 \mu M$ 、 $250 \mu M$ 、 $350 \mu M$ 。每一個藥物濃度皆有三組重複的實驗結果，每一組之結果又得自於三次重複。將每個藥物濃度培養皿上數得之空斑數換算成病毒效價後，以未加入藥物 ( $0 \mu M$ ) 所得之病毒效價做為分母，其他藥物濃度所得之病毒效價為分子，相除並乘以百分之百，計算出不同藥物濃度下之病毒效價百分比。每一組之三次重複所得之病毒效價百分比取平均值後得到三組病毒效價之百分比，再將此三組病毒效價百分比取平均值得到在  $50 \mu M$  時為  $88.40\%$ ， $150 \mu M$  時為  $12.99\%$ ， $250 \mu M$  時為  $5.48\%$ ， $350 \mu M$  時為  $0.44\%$ ，顯示藥物濃度在  $50 \mu M$  之後，隨著藥物濃度增加，所得到之病毒效價有降低的趨勢。 $IC_{50}$  約為  $100.93 \mu M$  (表一，圖七)。藥物濃度在  $350 \mu M$  以下，計數細胞沒有明顯的減少 (表二，圖八)。

#### 4.1.5 Kanamycin

最終藥物濃度為  $0 \mu M$ 、 $50 \mu M$ 、 $150 \mu M$ 、 $250 \mu M$ 、 $350 \mu M$ 。每一個藥物濃

度皆有三組重複的實驗結果，每一組之結果又得自於三次重複。將每個藥物濃度培養皿上數得之空斑數換算成病毒效價後，以未加入藥物（ $0 \mu\text{M}$ ）所得之病毒效價做為分母，其他藥物濃度所得之病毒效價為分子，相除並乘以百分之百，計算出不同藥物濃度下之病毒效價百分比。每一組之三次重複所得之病毒效價百分比取平均值後得到三組病毒效價之百分比，再將此三組病毒效價百分比取平均值得到在  $50 \mu\text{M}$  時為  $86.07\%$ ， $150 \mu\text{M}$  時為  $115.07\%$ ， $250 \mu\text{M}$  時為  $127.36\%$ ， $350 \mu\text{M}$  時為  $85.59\%$ 。 $\text{IC}_{50}$  數值無法取得。（表一，圖九）。藥物濃度在  $350 \mu\text{M}$  以下，計數細胞沒有明顯的減少（表二，圖十）。



## 4.2 偵測藥物在 293T 細胞中對登革熱病毒二型之影響

### 4.2.1 Tetracycline

最終藥物濃度為  $0 \mu\text{M}$ 、 $25 \mu\text{M}$ 、 $50 \mu\text{M}$ 、 $100 \mu\text{M}$ 、 $150 \mu\text{M}$ 。每一個藥物濃度皆有三組重複的實驗結果，每一組之結果又得自於三次重複。將每個藥物濃度培養皿上數得之空斑數換算成病毒效價後，以未加入藥物（ $0 \mu\text{M}$ ）所得之病毒效價做為分母，其他藥物濃度所得之病毒效價為分子，相除並乘以百分之百，計算出不同藥物濃度下之病毒效價百分比。每一組之三次重複所得之病毒效價百分比取平均值後得到三組病毒效價之百分比，再將此三組病毒效價百分比取平均值得到在  $25 \mu\text{M}$  時為  $81.91\%$ ， $50 \mu\text{M}$  時為  $64.42\%$ ，

100  $\mu\text{M}$  時為 36.68 %，150  $\mu\text{M}$  時為 36.20 %，顯示藥物濃度在 25  $\mu\text{M}$  之後，隨著藥物濃度增加，所得到之病毒效價有降低的趨勢。IC<sub>50</sub> 約為 63.33  $\mu\text{M}$  ( 表一，圖十一 )。藥物濃度在 177.53  $\mu\text{M}$  以上時細胞死亡率大於 20 %，對細胞有傷害性 ( 表二，圖十二 )。

#### 4.2.2 Chlortetracycline

最終藥物濃度為 0  $\mu\text{M}$ 、5  $\mu\text{M}$ 、15  $\mu\text{M}$ 、25  $\mu\text{M}$ 、50  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$ 。每一個藥物濃度皆有三組重複的實驗結果，每一組之結果又得自於三次重複。將每個藥物濃度培養皿上數得之空斑數換算成病毒效價後，以未加入藥物 (0  $\mu\text{M}$ ) 所得之病毒效價做為分母，其他藥物濃度所得之病毒效價為分子，相除並乘以百分之百，計算出不同藥物濃度下之病毒效價百分比。每一組之三次重複所得之病毒效價百分比取平均值後得到三組病毒效價之百分比，再將此三組病毒效價百分比取平均值得到在 5  $\mu\text{M}$  時為 70.15 %, 15  $\mu\text{M}$  時為 25.70 %, 25  $\mu\text{M}$  時為 5.41 %, 50  $\mu\text{M}$  時為 0.0 %, 100  $\mu\text{M}$  時為 0.0 %，顯示藥物濃度在 5  $\mu\text{M}$  之後，隨著藥物濃度增加，所得到之病毒效價有降低的趨勢。IC<sub>50</sub> 約為 9.54  $\mu\text{M}$  ( 表一，圖十三 )。藥物濃度在 200.20  $\mu\text{M}$  以下，計數細胞沒有明顯的減少 ( 表二，圖十四 )。

#### **4.2.3 Doxycycline**

最終藥物濃度為  $0 \mu\text{M}$ 、 $5 \mu\text{M}$ 、 $15 \mu\text{M}$ 、 $25 \mu\text{M}$ 、 $50 \mu\text{M}$ 、 $100 \mu\text{M}$ 。每一個藥物濃度皆有三組重複的實驗結果，每一組之結果又得自於三次重複。將每個藥物濃度培養皿上數得之空斑數換算成病毒效價後，以未加入藥物 ( $0 \mu\text{M}$ ) 所得之病毒效價做為分母，其他藥物濃度所得之病毒效價為分子，相除並乘以百分之百，計算出不同藥物濃度下之病毒效價百分比。每一組之三次重複所得之病毒效價百分比取平均值後得到三組病毒效價之百分比，再將此三組病毒效價百分比取平均值得到在  $5 \mu\text{M}$  時為  $58.94\%$ ， $15 \mu\text{M}$  時為  $35.83\%$ ， $25 \mu\text{M}$  時為  $17.99\%$ ， $50 \mu\text{M}$  時為  $3.40\%$ ， $100 \mu\text{M}$  時為  $0.56\%$ ，顯示藥物濃度在  $5 \mu\text{M}$  之後，隨著藥物濃度增加，所得到之病毒效價有降低的趨勢。得到  $\text{IC}_{50}$  約為  $8.87 \mu\text{M}$  (表一，圖十五)。藥物濃度在  $216.16 \mu\text{M}$  以下，計數細胞沒有明顯的減少 (表二，圖十六)。

#### **4.2.4 Rolitetracycline**

最終藥物濃度為  $0 \mu\text{M}$ 、 $25 \mu\text{M}$ 、 $50 \mu\text{M}$ 、 $100 \mu\text{M}$ 、 $150 \mu\text{M}$ 。每一個藥物濃度皆有三組重複的實驗結果，每一組之結果又得自於三次重複。將每個藥物濃度培養皿上數得之空斑數換算成病毒效價後，以未加入藥物 ( $0 \mu\text{M}$ ) 所得之病毒效價做為分母，其他藥物濃度所得之病毒效價為分子，相除並乘以百分之百，計算出不同藥物濃度下之病毒效價百分比。每一組之三次重複所

得之病毒效價百分比取平均值後得到三組病毒效價之百分比，再將此三組病毒效價百分比取平均值得到在  $25 \mu\text{M}$  時為 65.16 %,  $50 \mu\text{M}$  時為 40.70 %,  $100 \mu\text{M}$  時為 6.42 %,  $150 \mu\text{M}$  時為 0.88 %, 顯示藥物濃度在  $25 \mu\text{M}$  之後，隨著藥物濃度增加，所得到之病毒效價有降低的趨勢。 $\text{IC}_{50}$  約為  $40.49 \mu\text{M}$  ( 表一，圖十七 )。藥物濃度在  $212.67 \mu\text{M}$  以上時細胞死亡率大於 20 %，對細胞有傷害性 ( 表二，圖十八 )。

#### 4.2.5 Kanamycin

最終藥物濃度為  $0 \mu\text{M}$ 、 $25 \mu\text{M}$ 、 $50 \mu\text{M}$ 、 $100 \mu\text{M}$ 、 $150 \mu\text{M}$ 、 $250 \mu\text{M}$ 、 $350 \mu\text{M}$ 。每一個藥物濃度皆有三組重複的實驗結果，每一組之結果又得自於三次重複。將每個藥物濃度培養皿上數得之空斑數換算成病毒效價後，以未加入藥物 ( $0 \mu\text{M}$ ) 所得之病毒效價做為分母，其他藥物濃度所得之病毒效價為分子，相除並乘以百分之百，計算出不同藥物濃度下之病毒效價百分比。每一組之三次重複所得之病毒效價百分比取平均值後得到三組病毒效價之百分比，再將此三組病毒效價百分比取平均值得到在  $25 \mu\text{M}$  時為 78.00 %,  $50 \mu\text{M}$  時為 89.25 %,  $100 \mu\text{M}$  時為 85.08 %,  $150 \mu\text{M}$  時為 104.58 %,  $250 \mu\text{M}$  時為 81.15 %,  $350 \mu\text{M}$  時為 95.02 %。 $\text{IC}_{50}$  數值無法取得 ( 表一，圖十九 )。藥物濃度在  $350 \mu\text{M}$  以下，計數細胞沒有明顯的減少 ( 表二，圖二十 )。

## 4.3 偵測藥物在 293T 細胞中對日本腦炎病毒之影響

### 4.3.1 Tetracycline

最終藥物濃度為  $0\mu\text{M}$ 、 $25\mu\text{M}$ 、 $50\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$ 、 $150\mu\text{M}$ 。每一個藥物濃度皆有三組重複的實驗結果，每一組之結果又得自於三次重複。將每個藥物濃度培養皿上數得之空斑數換算成病毒效價後，以未加入藥物 ( $0\mu\text{M}$ ) 所得之病毒效價做為分母，其他藥物濃度所得之病毒效價為分子，相除並乘以百分之百，計算出不同藥物濃度下之病毒效價百分比。每一組之三次重複所得之病毒效價百分比取平均值後得到三組病毒效價之百分比，再將此三組病毒效價百分比取平均值得到在  $25\mu\text{M}$  時為  $79.56\%$ ， $50\mu\text{M}$  時為  $82.29\%$ ， $100\mu\text{M}$  時為  $61.92\%$ ， $150\mu\text{M}$  時為  $58.95\%$ ，顯示藥物濃度在  $25\mu\text{M}$  之後，隨著藥物濃度增加，所得到之病毒效價有些微降低的趨勢。 $\text{IC}_{50}$  數值無法取得（表一，圖二十一）。藥物濃度在  $177.53\mu\text{M}$  以上時細胞死亡率大於  $20\%$ ，對細胞有傷害性（表二，圖十二）。

### 4.3.2 Chlortetracycline

最終藥物濃度為  $0\mu\text{M}$ 、 $25\mu\text{M}$ 、 $50\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$ 、 $150\mu\text{M}$ 。每一個藥物濃度皆有三組重複的實驗結果，每一組之結果又得自於三次重複。將每個藥物濃度培養皿上數得之空斑數換算成病毒效價後，以未加入藥物 ( $0\mu\text{M}$ ) 所

得之病毒效價做為分母，其他藥物濃度所得之病毒效價為分子，相除並乘以百分之百，計算出不同藥物濃度下之病毒效價百分比。每一組之三次重複所得之病毒效價百分比取平均值後得到三組病毒效價之百分比，再將此三組病毒效價百分比取平均值得到在  $25 \mu\text{M}$  時為  $34.82\%$ ,  $50 \mu\text{M}$  時為  $12.75\%$  ,  $100 \mu\text{M}$  時為  $8.41\%$ ,  $150 \mu\text{M}$  時為  $2.52\%$ , 顯示藥物濃度在  $25 \mu\text{M}$  之後，隨著藥物濃度增加，所得到之病毒效價有降低的趨勢。 $\text{IC}_{50}$  約為  $22.65 \mu\text{M}$  (表一, 圖二十二)。藥物濃度在  $200.20 \mu\text{M}$  以上時細胞死亡率大於  $20\%$ ，對細胞有傷害性 (表二, 圖十四)。

#### 4.3.3 Doxycycline



最終藥物濃度為  $0 \mu\text{M}$ 、 $25 \mu\text{M}$ 、 $50 \mu\text{M}$ 、 $100 \mu\text{M}$ 、 $150 \mu\text{M}$ ，每一個藥物濃度皆有三組重複的實驗結果，每一組之結果又得自於三次重複。將每個藥物濃度培養皿上數得之空斑數換算成病毒效價後，以未加入藥物 ( $0 \mu\text{M}$ ) 所得之病毒效價做為分母，其他藥物濃度所得之病毒效價為分子，相除並乘以百分之百，計算出不同藥物濃度下之病毒效價百分比。每一組之三次重複所得之病毒效價百分比取平均值後得到三組病毒效價之百分比，再將此三組病毒效價百分比取平均值得到在  $25 \mu\text{M}$  時為  $288.25\%$ ,  $50 \mu\text{M}$  時為  $277.71\%$  ,  $100 \mu\text{M}$  時為  $165.35\%$ ,  $150 \mu\text{M}$  時為  $87.71\%$ , 顯示藥物濃度在  $0 - 25 \mu\text{M}$  間所得到之病毒效價有上升的趨勢， $25 \mu\text{M}$  後病毒效價有下降的趨勢。 $\text{IC}_{50}$

數值無法取得（表一，圖二十三）。藥物濃度在  $216.16 \mu\text{M}$  以上時細胞死亡率大於 20%，對細胞有傷害性（表二，圖十六）。

#### 4.3.4 Rolitetracycline

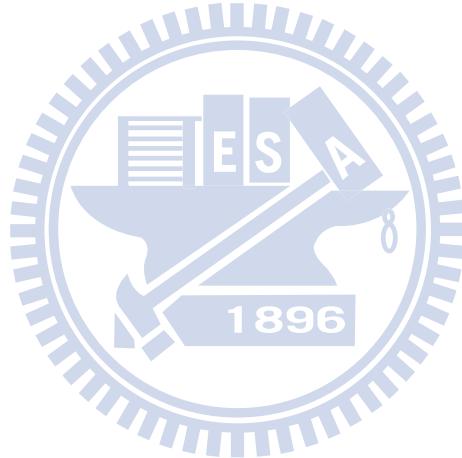
最終藥物濃度為  $0 \mu\text{M}$ 、 $25 \mu\text{M}$ 、 $50 \mu\text{M}$ 、 $100 \mu\text{M}$ 、 $150 \mu\text{M}$ ，每一個藥物濃度皆有三組重複的實驗結果，每一組之結果又得自於三次重複。將每個藥物濃度培養皿上數得之空斑數換算成病毒效價後，以未加入藥物 ( $0 \mu\text{M}$ ) 所得之病毒效價做為分母，其他藥物濃度所得之病毒效價為分子，相除並乘以百分之百，計算出不同藥物濃度下之病毒效價百分比。每一組之三次重複所得之病毒效價百分比取平均值後得到三組病毒效價之百分比，再將此三組病毒效價百分比取平均值得到在  $25 \mu\text{M}$  時為 135.29%， $50 \mu\text{M}$  時為 195.52%， $100 \mu\text{M}$  時為 209.37%， $150 \mu\text{M}$  時為 130.91%，顯示藥物濃度在  $0 - 100 \mu\text{M}$  間所得到之病毒效價有上升的趨勢， $100 \mu\text{M}$  後病毒效價有些微下降的趨勢。 $\text{IC}_{50}$  數值無法取得（表一，圖二十四）。藥物濃度在  $212.67 \mu\text{M}$  以上時細胞死亡率大於 20%，對細胞有傷害性（表二，圖十八）。

#### 4.2.5 Kanamycin

最終藥物濃度為  $0 \mu\text{M}$ 、 $25 \mu\text{M}$ 、 $50 \mu\text{M}$ 、 $100 \mu\text{M}$ 、 $150 \mu\text{M}$ 、 $250 \mu\text{M}$ 、 $350 \mu\text{M}$ ，每一個藥物濃度皆有三組重複的實驗結果，每一組之結果又得自於三次重複。

將每個藥物濃度培養皿上數得之空斑數換算成病毒效價後，以未加入藥物（ $0 \mu\text{M}$ ）所得之病毒效價做為分母，其他藥物濃度所得之病毒效價為分子，相除並乘以百分之百，計算出不同藥物濃度下之病毒效價百分比。每一組之三次重複所得之病毒效價百分比取平均值後得到三組病毒效價之百分比，再將此三組病毒效價百分比取平均值得到在  $25 \mu\text{M}$  時為  $76.56\%$ ， $50 \mu\text{M}$  時為  $110.92\%$ ， $100 \mu\text{M}$  時為  $74.55\%$ ， $150 \mu\text{M}$  時為  $93.43\%$ ， $250 \mu\text{M}$  時為  $125.55\%$ ， $350 \mu\text{M}$  時為  $87.64\%$ 。 $\text{IC}_{50}$  數值無法取得。（表一，圖二十五）。

藥物濃度在  $350 \mu\text{M}$  以下，計數細胞沒有明顯的減少（表二，圖二十）。



## 伍、討論

由本實驗室之前之研究得知四種四環黴素衍生物，Tetracycline、Chlortetracycline、Doxycycline、Rolutetraacycline 在幼倉鼠腎臟纖維母細胞 (BHK-21) 中對於登革熱病毒二型 PL046 strain 具有抑制空斑形成的效果 (附表一，張，2009；附表二，杜，2007)。根據當初篩選這些藥物的方法，推斷這些四環黴素衍生物應該是藉由跟登革熱病毒表面之 E protein 結合，阻止 E protein 的功能，進而達到抑制病毒感染及複製之效果。

本研究中最主要的目的是確認這些藥物是與病毒作用而非與細胞作用，達到抑制病毒的效果。如前所述如果是與病毒作用，則使用不同細胞株應該會得到同樣的效果。本研究中使用白線斑蚊細胞 (C6/36) 與人類胚胎腎臟細胞 (293T) 進行實驗，觀察這些藥物在不同細胞株中對登革熱病毒之影響。

### 5.1 四環黴素衍生物在 C6/36 細胞中對登革熱病毒二型之影響

將四種四環黴素衍生物 Tetracycline、Chlortetracycline、Doxycycline、Rolutetraacycline 分別與登革熱病毒二型混合後，感染白線斑蚊細胞 (C6/36)，48 小時後於細胞上層液中測定登革熱病毒效價，實驗結果顯示病毒效價皆隨著藥物濃度增加而有減少的趨勢 ( $IC_{50}$  分別為  $98.60 \mu M$ 、 $31.31 \mu M$ 、 $29.48 \mu M$ 、 $100.93 \mu M$ ，表一；48-hr  $LC_{20}$  分別為無法取得、 $51.51 \mu M$ 、無法取得、無法取得，表二)，相較之下非四環黴素衍生物 Kanamycin 與登革熱病毒混合感

染 C6/36 細胞，上層液中測定之登革熱病毒效價則沒有明顯變化 ( $IC_{50}$  無法取得，表一；48-hr  $LC_{20}$  無法取得，表二)。

## 5.2 四環黴素衍生物在 293T 細胞中對登革熱病毒二型之影響

將四種四環黴素衍生物 Tetracycline、Chlortetracycline、Doxycycline、Rolutetraacycline 分別與登革熱病毒二型混合後，感染人類胚胎腎臟細胞 (293T)，於細胞上層液中測定登革熱病毒效價，實驗結果顯示病毒效價皆隨著藥物濃度增加而有減少的趨勢 ( $IC_{50}$  分別為  $63.33 \mu M$ 、 $9.54 \mu M$ 、 $8.87 \mu M$ 、 $40.49 \mu M$ ，表一；48-hr  $LC_{20}$  分別為  $177.53 \mu M$ 、 $51.51 \mu M$ 、 $216.16 \mu M$ 、 $212.67 \mu M$ ，表二)，相較之下非四環黴素衍生物 Kanamycin 與登革熱病毒混合感染 293T 細胞，上層液中測定之登革熱病毒效價則沒有明顯變化 ( $IC_{50}$  無法取得，表一；48-hr  $LC_{20}$  無法取得，表二)。

實驗室前人 (張，2009；杜，2007) 將四環黴素藥物衍生物跟登革熱病毒二型一起感染 BHK-21 得到抑制登革熱病毒產生空斑之結果。由於本研究與杜氏所測的藥物不完全相同，在此只與張氏之結果做比較 (表三)。發現這些四環黴素衍生物中 Tetracycline 在 C6/36、293T 細胞中在濃度低於  $150 \mu M$  時可達到抑制 50 % 登革熱病毒效價；Chlortetracycline、Doxycycline 及 Rolutetraacycline 在 BHK-21、C6/36、293T 皆在濃度低於  $150 \mu M$  時就達到抑制 50 % 登革熱病毒效價，而在 293T 細胞中之  $IC_{50}$  又比在 BHK-21 或

C6/36 中來的小，這部分推測其原因為登革熱病毒在不同細胞中之感染、複製、組裝能力皆有所不同所造成的。在這四種四環黴素衍生物中 Chlortetracycline 及 Doxycycline 之抑制效果較強，推測因為這兩個藥物結構上之氫鍵效應使構型產生摺角而更適合與登革熱病毒 E protein 結合，所以相較於 Tetracycline 與之結合能力較強。Rolutetraacycline 因為結構上帶有一個較大側鏈，推測由於這個大的側鏈造成 Rolutetraacycline 與登革熱病毒二型 E protein 結合能力較不佳（圖二十六）。

由於這些四環黴素衍生物不論是在幼倉鼠腎臟纖維母細胞（BHK-21）、白線斑蚊細胞（C6/36）或是人類胚胎腎臟細胞（293T）中對於登革熱病毒二型 PL046 strain 都是有抑制的效果，且 chlortetracycline 及 doxycycline 相較於 tetracycline 及 rolutetraacycline 抑制效果較好這部分在三種細胞株也相同。顯示更換細胞株並不改變這些四環黴素衍生物對登革熱病毒的抑制效果，推論這些藥物並非針對 BHK-21 細胞有抑制作用且有極大的機會應是與病毒本身作用。

由於當初篩選藥物時是針對登革熱病毒進行的，為了瞭解這些藥物的專一性，並更進一步說明藥物與細胞中核糖體結合而達到抑制效果的可能性，本研究使用同樣是黃質病毒的日本腦炎病毒在 293T 細胞中進行相同之實驗。

### 5.3 四環黴素衍生物在 293T 細胞中對日本腦炎病毒之影響

將 Tetracycline、Chlortetracycline、Doxycycline、Rolutetraacycline、Kanamycin 這

五種藥物與日本腦炎病毒混合，感染 293T，於細胞上層液中測定登革熱病毒效價，實驗結果得到日本腦炎病毒效價皆不同。其中 Tetracycline 濃度增加時日本腦炎病毒效價並沒有觀察到明顯減少的趨勢， $IC_{50}$  無法取得；而 Chlortetracycline 濃度增加時日本腦炎病毒效價有觀察到明顯減少的現象 ( $IC_{50} = 22.65 \mu M$ )；Doxycycline 及 Rolitetracycline 則是觀察到隨著藥物濃度增加日本腦炎病毒效價有先上升後下降的情形，但  $IC_{50}$  無法取得；Kanamycin 對日本腦炎病毒效價並沒有明顯的影響， $IC_{50}$  無法取得（表一）。

基於原本篩選藥物時，是針對登革熱病毒二型 (DV2) 外膜蛋白之疏水性口袋。實驗室前人張氏將這四種四環黴素衍生物與不同血清型之登革熱病毒三型 (DV3) 一起感染 BHK-21 細胞觀察空斑的抑制情形，其結果顯示 Tetracycline 在 BHK-21 細胞對於抑制 DV2 與 DV3 並沒有明顯差異；Chlortetracycline、Rolutetracycline 及 Doxycycline 在 BHK-21 細胞中對 DV2 的抑制效果較 DV3 佳。比較 DV2 與 DV3 外膜蛋白之疏水性口袋周圍的胺基酸，有 6 個位置之胺基酸不同 (DV2 之 51、272、274、276、277 及 278 號胺基酸；DV3 之 51、270、272、274、275 及 276 號胺基酸)，推測為四環藥物衍生物對 DV2 抑制效果較佳的原因 ( 張，2009 )。

本研究中將這四種四環黴素衍生物與同為黃質病毒的日本腦炎病毒 (JEV) 一起感染 293T 細胞，收取上層液觀察藥物對 JEV 效價之影響。由於 DV2

與 JEV 外膜蛋白之疏水性口袋周圍的胺基酸只有 7 個胺基酸相同（表四，附圖七），且其 3D 結構中，在 domain I 與 domain II 之間的疏水性口袋沒有很高的相似度（表四，附圖七，附圖八），推測這四種四環黴素衍生物應對 JEV 效價不會有影響。本研究之結果中 Tetracycline 符合預期，在細胞未受傷害之濃度內並沒有觀察到明顯的抑制效果；Doxycycline 與 Rolitetracycline 在低濃度時觀察到 JEV 效價有增加的趨勢，推測其原因為，293T 細胞在這兩種藥物的環境壓力下改變了細胞生理狀況或病毒感染複製的情形；Chlortetracycline 在 293T 細胞中對 JEV 則是有顯著的抑制效果，與預期不相符合，推測 Chlortetracycline 對 JEV 的抑制機制不在疏水性口袋上，可能在 JEV 外膜蛋白的其他地方有相結合的地方，其機制還需要進一步做研究。



## 陸、結論

根據所有的實驗結果，更換細胞株不會影響 Tetracycline、Chlortetracycline、Doxycycline 、Rolutetraacycline 這四種四環黴素衍生物對於登革熱病毒的抑制效果，初步得知其抑制機制應是針對病毒而非細胞。其中 Chlortetracycline 與 Doxycycline 對登革熱病毒二型的抑制效果較佳，原因可能為其結構上的便利。另外，Tetracycline、Doxycycline 及 Rolutetraacycline 對日本腦炎病毒沒有顯著抑制效果，初步推測他們對登革熱病毒之抑制能力是具有專一性的； Chlortetracycline 在 293T 細胞中對日本腦炎病毒也有抑制的效果，其機制應與抑制登革熱病毒之機制不同，但詳細的作用機制還需要更進一步的了解。由於這四環黴素衍生物是已廣為使用的抗細菌藥物，若能深入了解其對登革熱病毒二型的抑制機制及抑制濃度，則非常有潛力成為抗登革熱病毒二型的藥物。

杜育穎. 2007. 以四環素及其衍生物為第二型登革熱病毒之抑制劑. 國立交通大學碩士論文.

張瀞云. 2009. 表現登革熱 2 型病毒 NS2, NS4 基因及探討四環黴素衍生物對登革熱病毒的抑制作用. 國立交通大學碩士論文.

**Allison, S.L., Schalich, J., Stiasny, K., Mandl, C.W., Kunz, C., and Heinz, F.X.** (1995). Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *J Virol* 69, 695-700.

**Allison, S.L., Schalich, J., Stiasny, K., Mandl, C.W., and Heinz, F.X.** (2001). Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E. *J Virol* 75, 4268-4275.

**Andre, M.D.B.** (2005). Antimicrobial Agent: Antibacterials and Antifungals.

**Bhardwaj, S., Holbrook, M., Shope, R.E., Barrett, A.D., and Watowich, S.J.** (2001). Biophysical characterization and vector-specific antagonist activity of domain III of the tick-borne flavivirus envelope protein. *J Virol* 75, 4002-4007.

**Centers for disease control and prevention (CDC, USA).** <<http://www.cdc.gov>>

**Clyde, K., Kyle, J.L., and Harris, E.** (2006). Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol* 80, 11418-11431.

**Crill, W.D., and Roehrig, J.T.** (2001). Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J Virol* 75, 7769-7773.

**Gubler, D.J.** (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 11, 480-496.

**Gubler, D.J.** (2002). Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol* 10, 100-103.

**Heinz, F.X., and Allison, S.L.** (2001). The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. *Curr Opin Microbiol* 4, 450-455.

**Lescar, J., Roussel, A., Wien, M.W., Navaza, J., Fuller, S.D., Wengler, G., and Rey, F.A.** (2001). The Fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. *Cell* 105, 137-148.

**Lindenbach , B.D., Thiel, H.J. Rice, C.M.** 2007. *Flaviviridae*: the viruses and their replication. In Fields Virology, 5<sup>th</sup> edition. D.M. Knipe, and P.M. Howley, eds. ( Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia ), pp. 1101-1152

**Mackenzie, J.M., and Westaway, E.G.** (2001). Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *J Virol* 75, 10787-10799.

**Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., and Harrison, S.C.** (2003). A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6986-6991.

**Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., and Harrison, S.C.** (2004). Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 427, 313-319.

**National Center for Biotechnology Information**, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>>

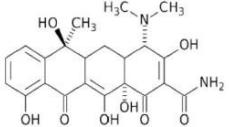
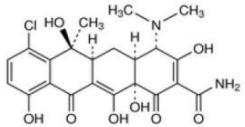
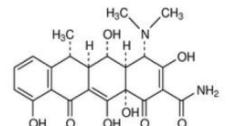
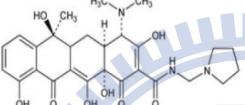
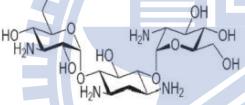
**Rey, F. A., F X Heinz, C. Mandl, C. Kunz, and S. C. Harrison.** (1995). The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375:291-298.

**Sampath, A., and Padmanabhan, R.** (2009). Molecular targets for flavivirus drug discovery. *Antiviral Res* 81, 6-15.

**Stadler, K., Allison, S.L., Schalich, J., and Heinz, F.X.** (1997). Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol* 71, 8475-8481.

**World Health Organization**, WHO <<http://www.who.int/en/>>

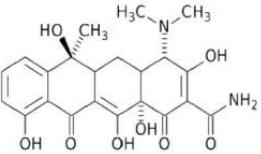
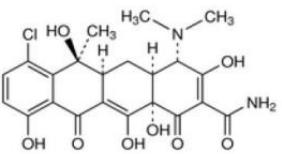
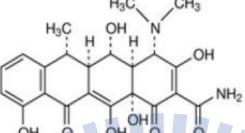
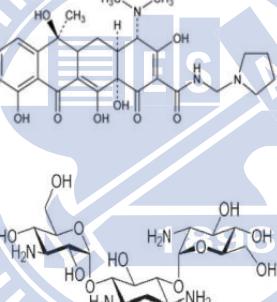
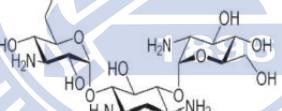
**Yang, J.M., Chen, Y.F., Tu, Y.Y., Yen, K.R., and Yang, Y.L.** (2007). Combinatorial computational approaches to identify tetracycline derivatives as flavivirus inhibitors. *PLoS One* 2, e428.

Name	Drug Structure	IC <sub>50</sub> (μM)		
		C6/36	293T	293T
		DV2	JEV	
Tetracycline		98.60	63.33	NA
Chlortetracycline		31.31	9.54	22.65
Doxycycline		29.48	8.87	NA
Rolitetracycline		100.93	40.49	NA
Kanamycin		NA	NA	NA

1896

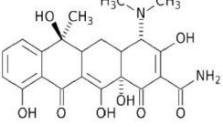
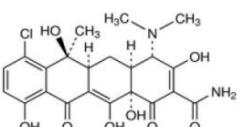
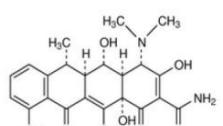
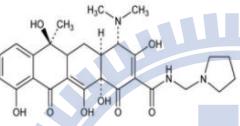
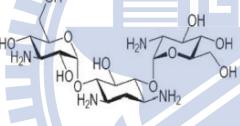
表一 Tetracycline、Chlortetracycline、Doxycycline、Rolutetraacycline 及 Kanamycin 在 C6/36 及 293T 細胞中對登革熱病毒二型之 IC<sub>50</sub> 與在 293T 細胞中對日本腦炎病毒之 IC<sub>50</sub>。

Name：藥物名；IC<sub>50</sub>：抑制 50 % 病毒效價時之藥物濃度；NA：無法取得 (not applicable)；DV2：dengue virus type 2；JEV：Japanese encephalitis virus。

Name	Drug Structure	48-hr LC <sub>20</sub> (μM)	
		C6/36	293T
Tetracycline		NA	177.53
Chlortetracycline		51.51	200.20
Doxycycline		NA	216.16
Rolitetracycline		NA	212.67
Kanamycin		NA	NA

表二 Tetracycline、Chlortetracycline、Doxycycline、Rolutetraacycline 及 Kanamycin 之結構與他們對 C6/36 及 293T 細胞之傷害濃度。

Name：藥物名；48-hr LC<sub>20</sub>：藥物接觸細胞後 48 小時照相計數細胞數，細胞死亡率達到 20 % 時之藥物濃度；NA：無法取得 (not applicable)。

Name	Drug Structure	$IC_{50} (\mu M)$		
		BHK-21 (張瀞云, 2009)*	C6/36	293T
DV2				
Tetracycline		228.95	98.60	63.33
Chlortetracycline		24.59	31.31	9.54
Doxycycline		23.82	29.48	8.87
Rolitetracycline		107.8	100.93	40.49
Kanamycin		NA	NA	NA

表三 Tetracycline、Chlortetracycline、Doxycycline、Rolutetraacycline 及 Kanamycin 之結構與他們在 BHK-21、C6/36 及 293T 細胞中對登革熱病毒二型之  $IC_{50}$ 。

\*此濃度為重新校正計算之結果。

Name：藥物名； $IC_{50}$ ：抑制 50 % 病毒效價時之藥物濃度；NA：無法取得 (not applicable)；DV2：dengue virus type 2。

Residue position DV2	Amino acid		Residue Position JEV	Amino acid Changes (DV2 → JEV)
	DV2	PL046		
48	T	I	48	T → I
49	E	E	49	E → E
50	A	A	50	A → A
51	K	S	51	K → S
52	Q	Q	52	Q → Q
126	E	I	126	E → I
127	G	G	127	G → G
128	K	R	128	K → R
268	T	I	270	T → I
269	E	V	271	E → V
270	I	V	272	I → V
271	Q	E	273	Q → E
272	M	Y	274	M → Y
273	S	S	275	S → S
274	S	S	276	S → S
275	G	S	277	G → S
276	N	V	278	N → V
277	L	K	279	L → K
278	L	L	280	L → L
279	F	T	281	F → T

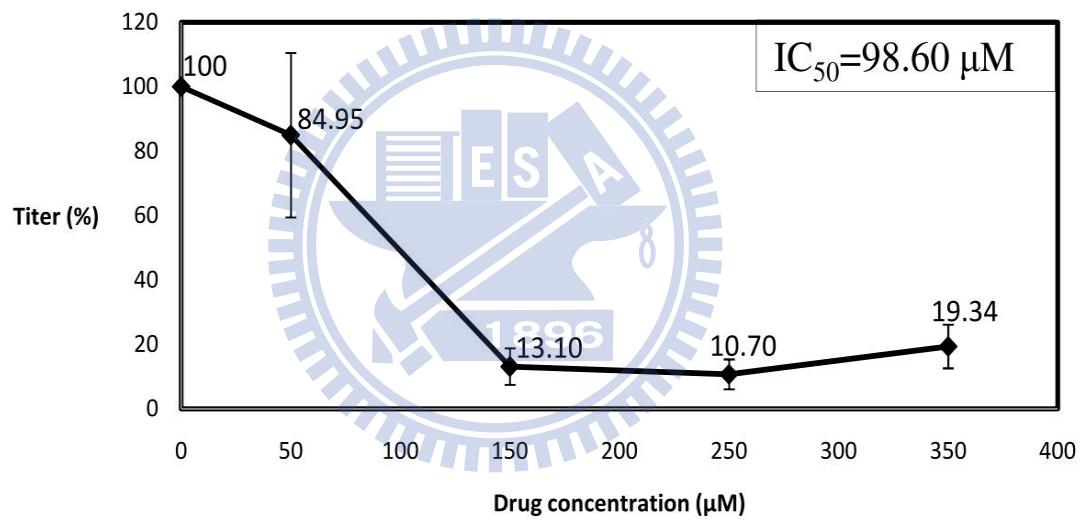
表四 登革熱病毒二型與日本腦炎病毒外膜蛋白之疏水性口袋周圍胺基酸之比較。

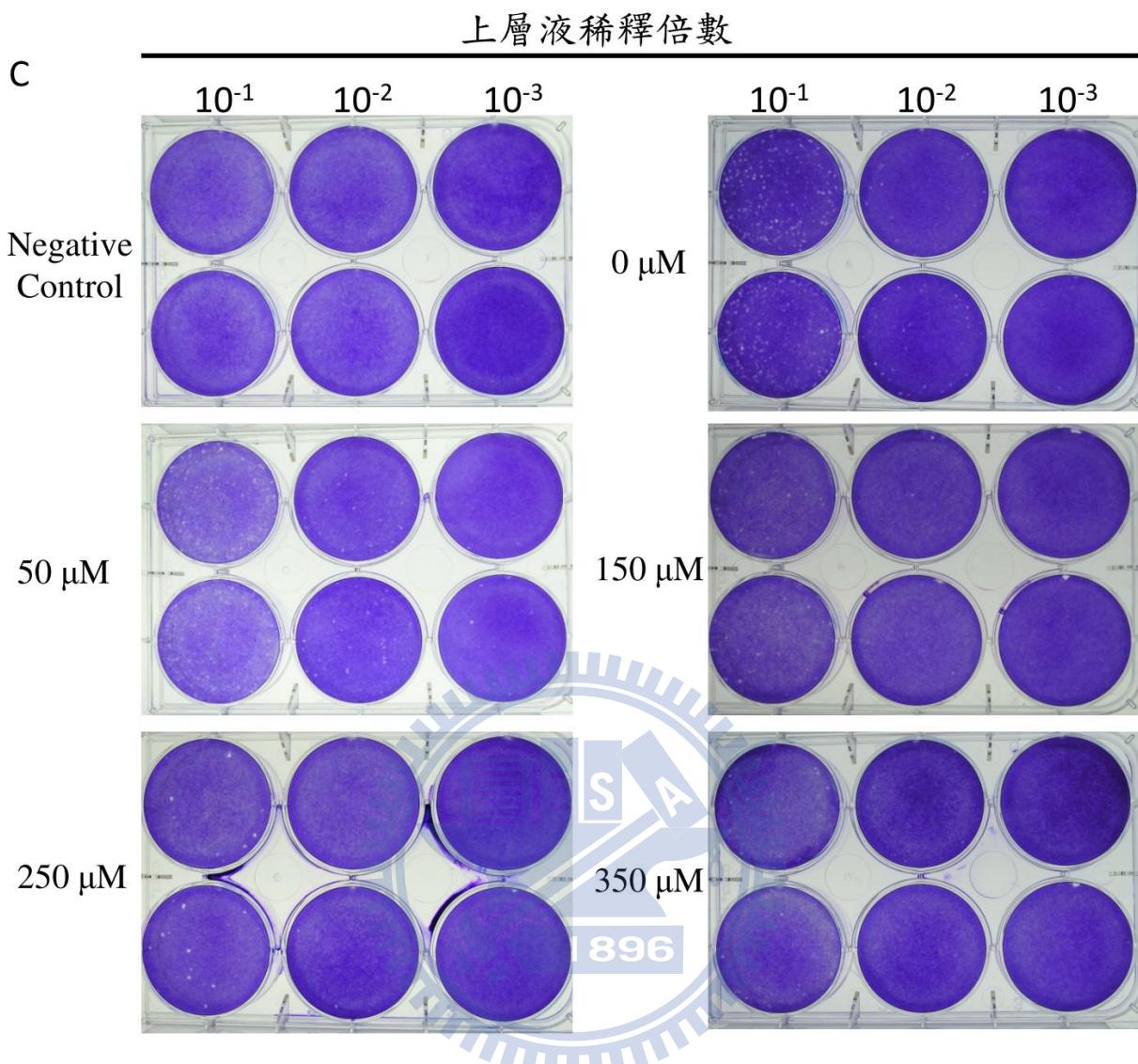
DV2 : dengue virus type 2 ; JEV : Japanese encephalitis virus

A

Tetracycline	titer (%)	titer (%)	titer (%)	mean	sd	mean±sd
0 µM	100	100	100	100	0.0	100±0.0
50 µM	102.26	96.99	55.62	84.95	25.54	84.95±25.54
150 µM	8.27	19.35	11.68	13.10	5.67	13.10±5.67
250 µM	6.43	15.67	10.01	10.70	4.66	10.70±4.66
350 µM	11.82	24.95	21.25	19.34	6.77	19.34±6.77

B



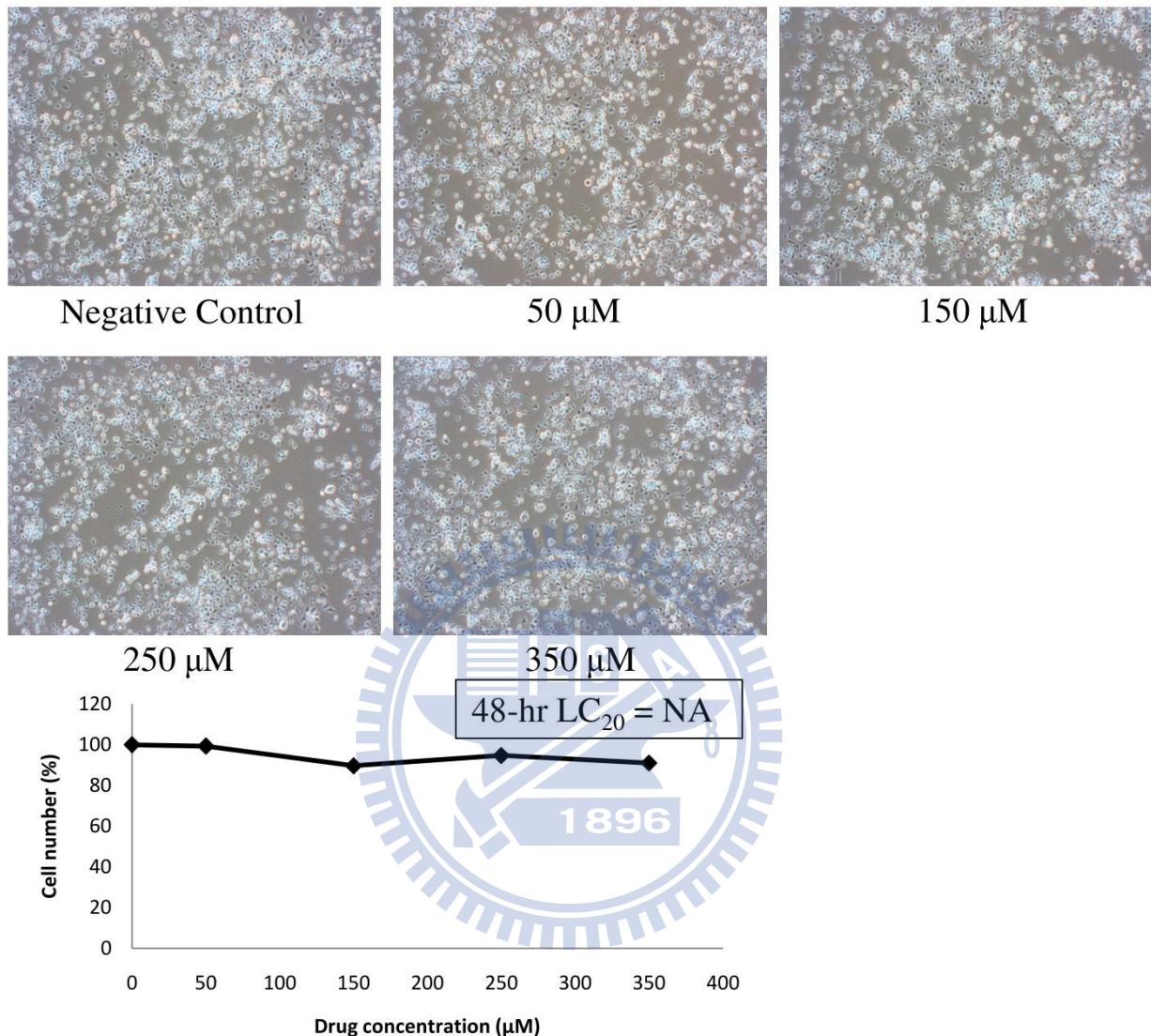


圖一 Tetracycline 在 C6/36 細胞中對於登革熱病毒二型的影響。

(A) 為 Tetracycline 經過病毒抑制試驗及空斑試驗後得到之結果整理。將 tetracycline 各濃度培養皿計數得到的空斑數換算成登革熱病毒之效價，並將未加入 tetracycline (0  $\mu\text{M}$ ) 所得到之效價做為 100 %，計算出加入各濃度 tetracycline 後登革熱病毒效價之相對百分比。

(B) 為相對應之曲線圖。其中橫坐標為藥物濃度，縱座標為效價之百分比，在 C6/36 細胞中 tetracycline 對於登革熱病毒二型之  $\text{IC}_{50}$  為 98.60  $\mu\text{M}$ ，曲線上之數字代表三重複的平均值。

(C) 為具代表性之空斑試驗圖片。negative control 為未加入藥物及病毒之 C6/36 細胞上層液空斑試驗。



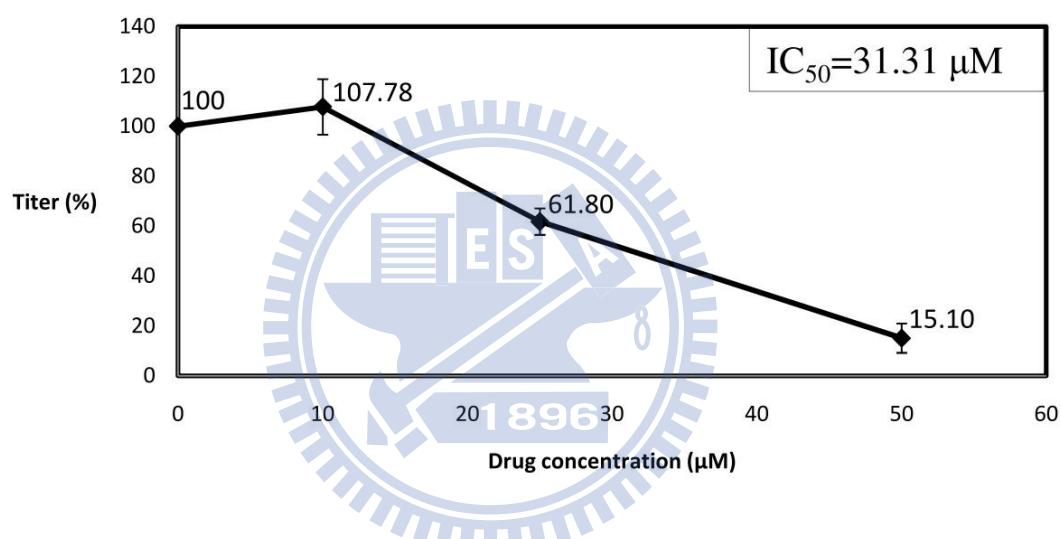
**圖二 Tetracycline 對 C6/36 細胞之傷害性。**

藥物與細胞接觸後 48 小時照相計數細胞數。藥物濃度在 350 μM 以下，沒有發現明顯的細胞減少。本研究在登革熱病毒二型測試之藥物濃度最高為 350 μM。

A

Chlortetracycline titer (%)	titer (%)	titer (%)	mean	sd	mean±sd
0 μM	100	100	100	0.0	100±0.0
10 μM	113.12	115.25	94.97	107.78	11.15
25 μM	63.58	65.97	55.85	61.80	5.29
50 μM	19.64	17.19	8.47	15.10	5.87

B



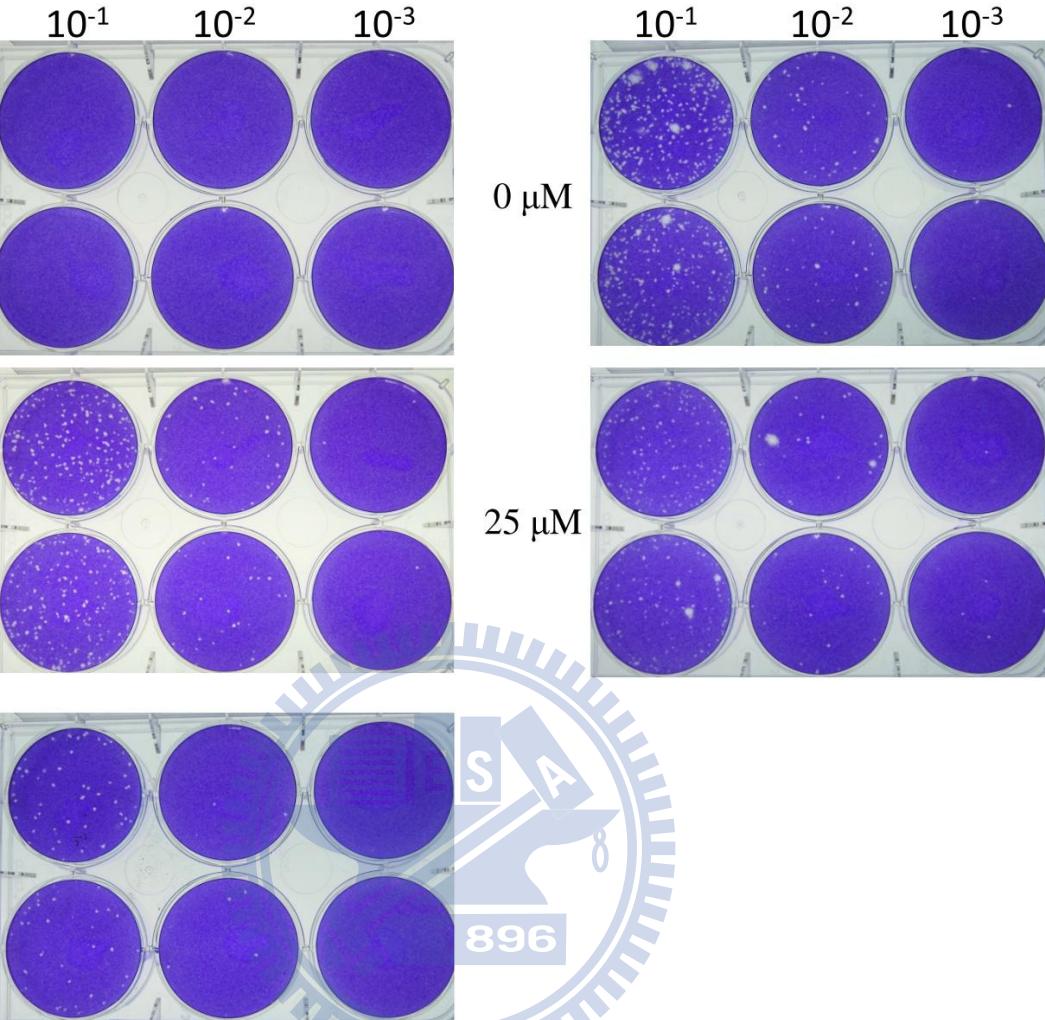
### 上層液稀釋倍數

C

Negative Control

10  $\mu$ M

50  $\mu$ M

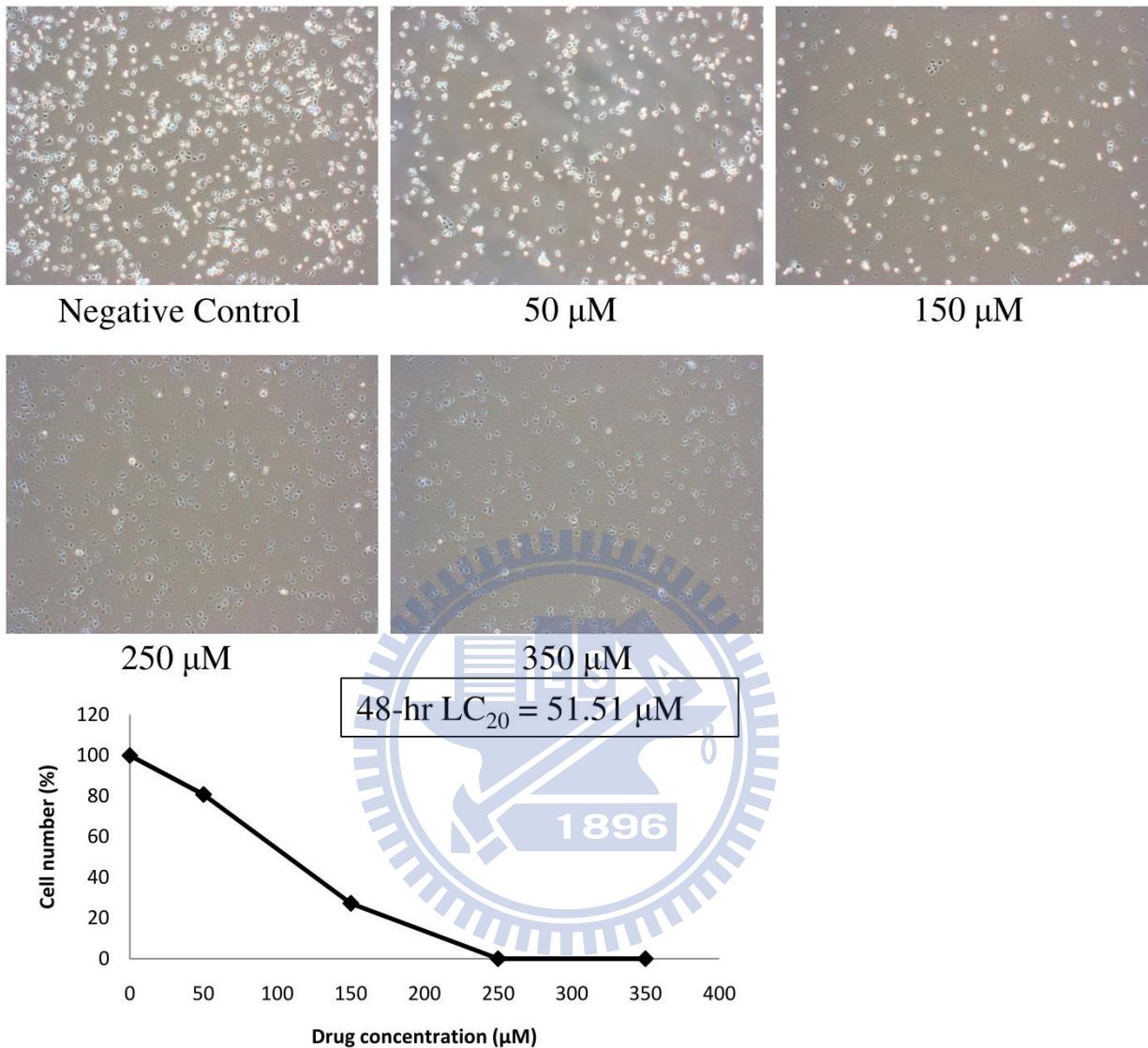


**圖三 Chlortetracycline 在 C6/36 細胞中對於登革熱病毒二型的影響。**

(A) 為 chlortetracycline 經過病毒抑制試驗及空斑試驗後得到之結果整理。將 chlortetracycline 各濃度培養皿計數得到的空斑數換算成登革熱病毒之效價，並將未加入 chlortetracycline (0  $\mu$ M) 所得到之效價做為 100 %，計算出加入各濃度 chlortetracycline 後登革熱病毒效價之相對百分比。

(B) 為相對應之曲線圖。其中橫坐標為藥物濃度，縱座標為效價之百分比，在 C6/36 細胞中 chlortetracycline 對於登革熱病毒二型之 IC<sub>50</sub> 為 31.31  $\mu$ M，曲線上之數字代表三重複的平均值。

(C) 為具代表性之空斑試驗圖片。negative control 為未加入藥物及病毒之 C6/36 細胞上層液空斑試驗。



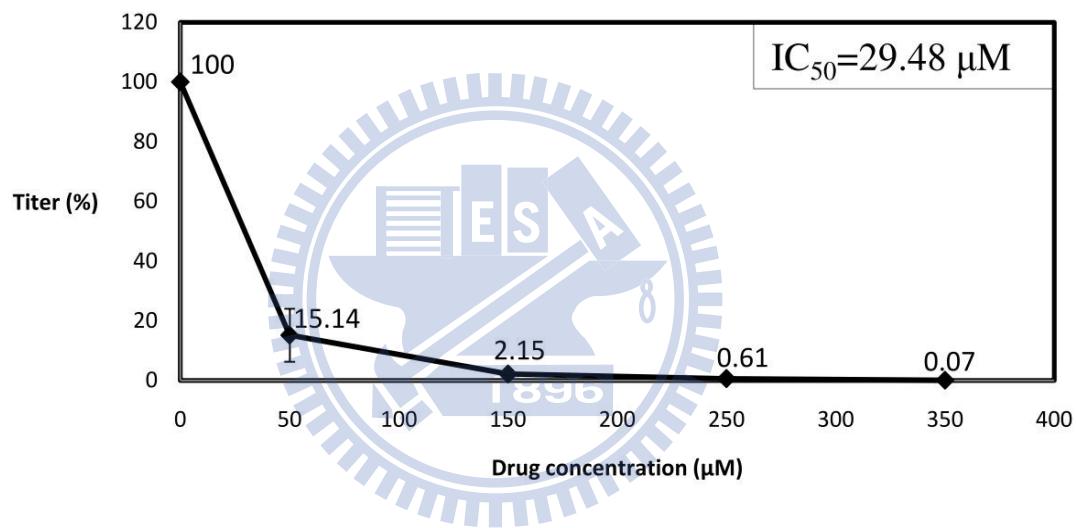
**圖四 Chlortetracycline 對 C6/36 細胞之傷害性。**

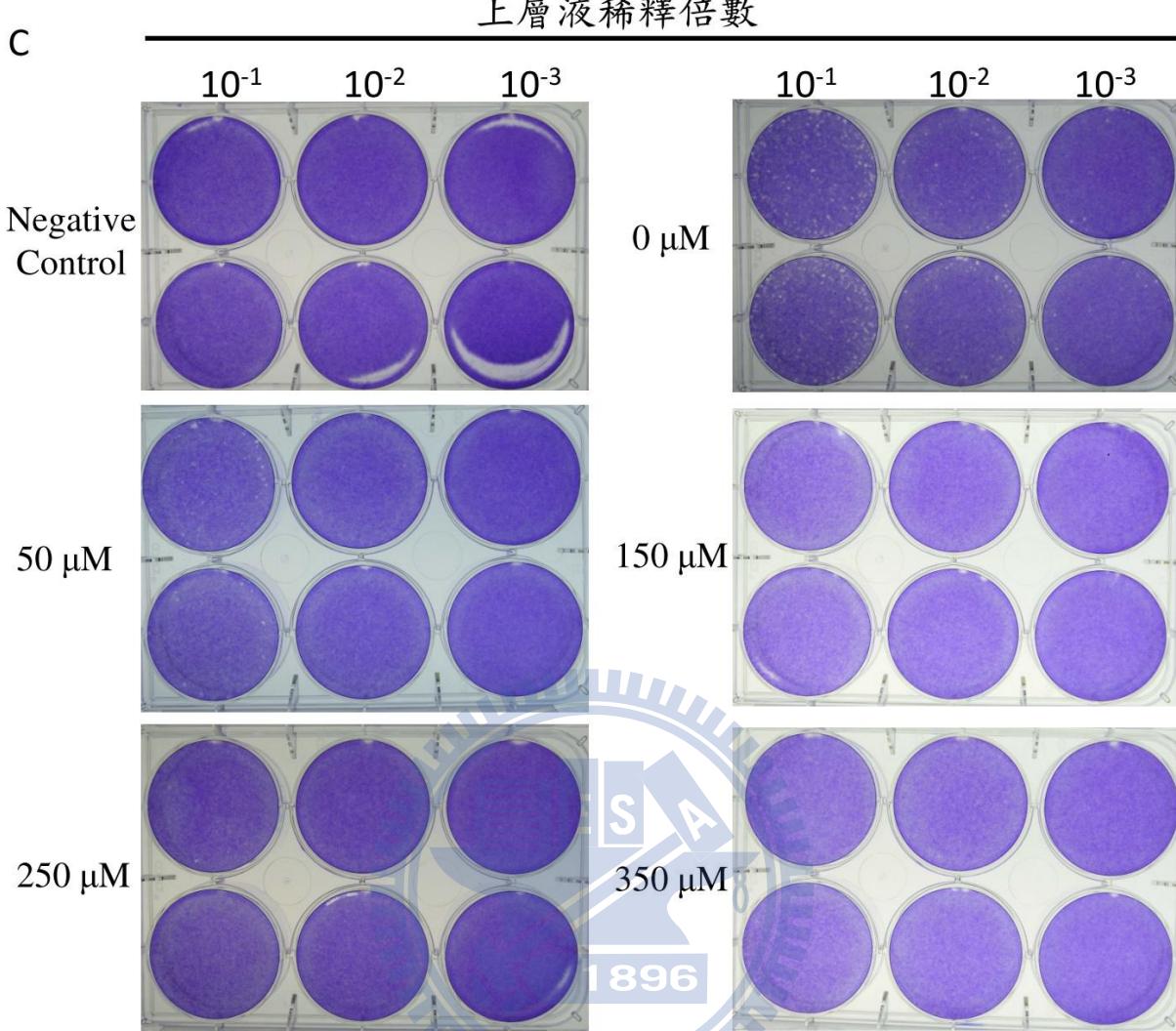
藥物與細胞接觸後 48 小時照相計數細胞數。藥物濃度在  $51.51 \mu\text{M}$  以上時細胞死亡率大於 20 %，對細胞有傷害性。本研究在登革熱病毒二型測試之藥物濃度最高為  $50 \mu\text{M}$ 。

A

Doxycycline	titer (%)	titer (%)	titer (%)	mean	sd	mean±sd
0 $\mu\text{M}$	100	100	100	100	0.0	100±0.0
50 $\mu\text{M}$	25.23	8.38	11.83	15.14	8.90	15.14±8.90
150 $\mu\text{M}$	1.21	3.32	1.93	2.15	1.08	2.15±1.08
250 $\mu\text{M}$	0.61	1.19	0.03	0.61	0.58	0.61±0.58
350 $\mu\text{M}$	0.14	0.08	0.00	0.07	0.07	0.07±0.07

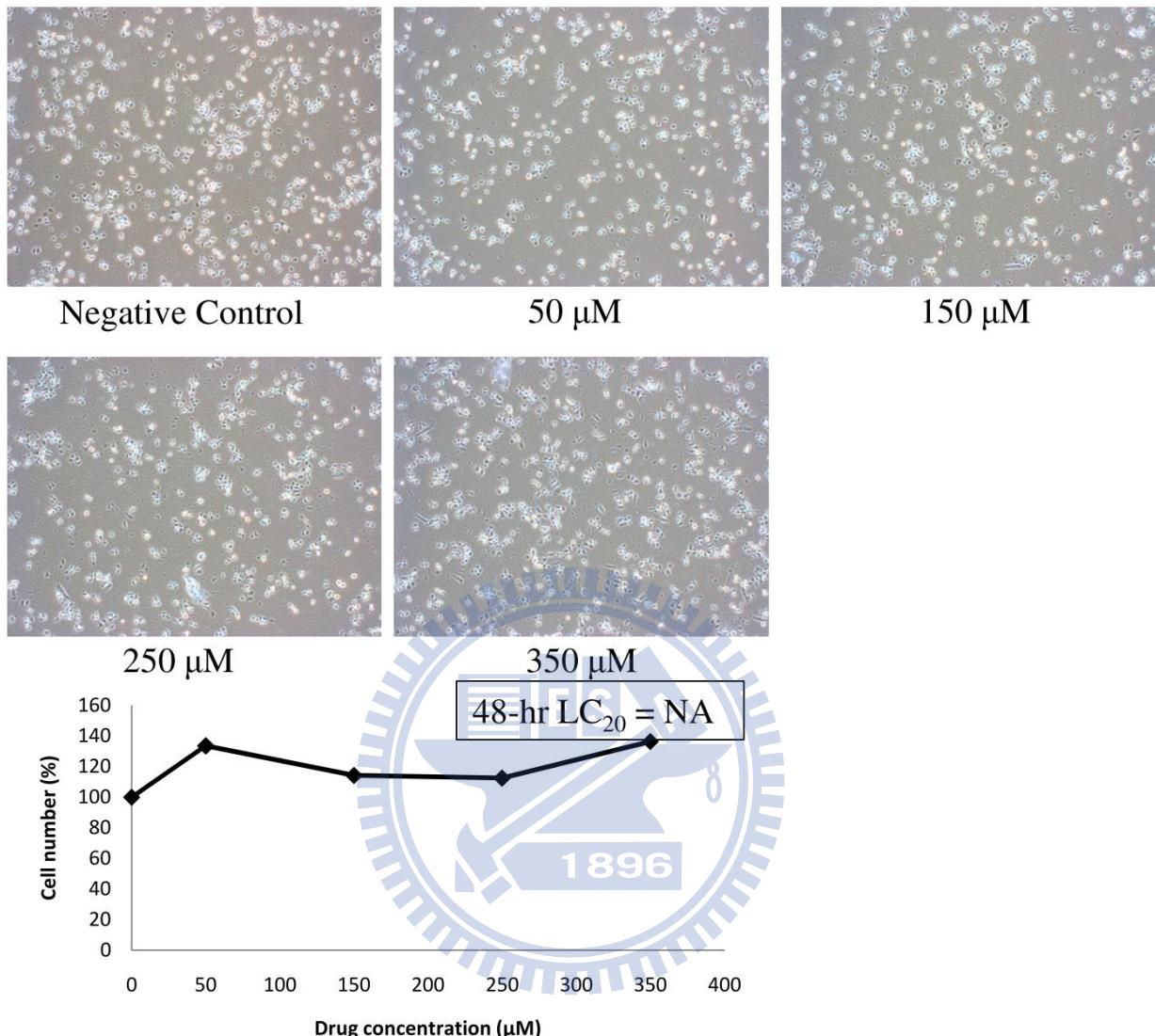
B





圖五 Doxycycline 在 C6/36 細胞中對登革熱病毒二型之影響。

(A) 為 doxycycline 經過病毒抑制試驗及空斑試驗後得到之結果整理。將 doxycycline 各濃度培養皿中計數得到的空斑數換算成登革熱病毒之效價，並將未加入 doxycycline (0  $\mu\text{M}$ ) 所得到之效價當做 100 %，計算出加入各濃度 doxycycline 後登革熱病毒效價之相對百分比。  
 (B) 為相對應之曲線圖。其中橫坐標為藥物濃度，縱座標為效價之百分比，在 C6/36 細胞中 doxycycline 對於登革熱病毒二型之  $\text{IC}_{50}$  為 29.48  $\mu\text{M}$ ，曲線上之數字代表三重複的平均值。  
 (C) 為具代表性之空斑試驗圖片。negative control 為未加入藥物及病毒之 C6/36 細胞上層液空斑試驗。



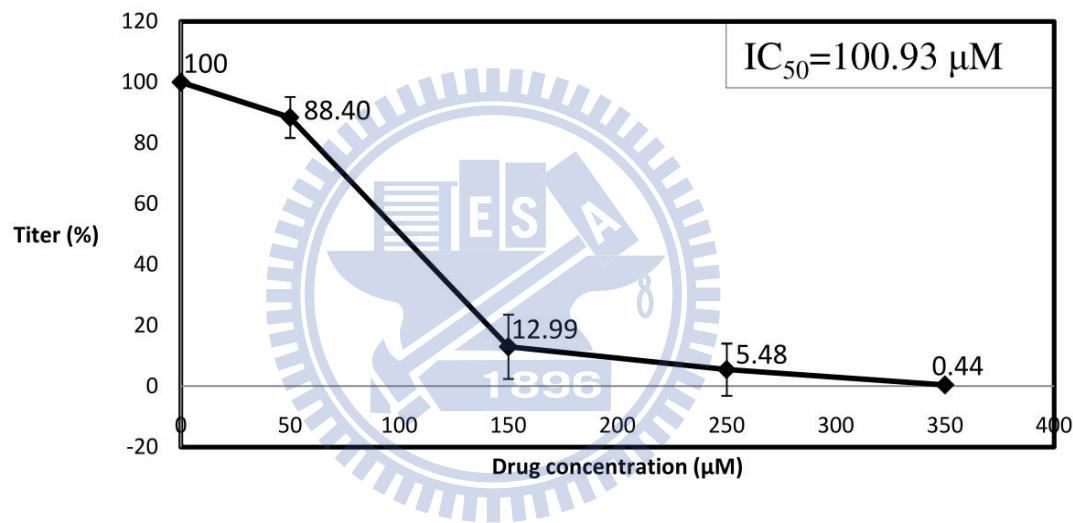
**圖六 Doxycycline 對 C6/36 細胞之傷害性。**

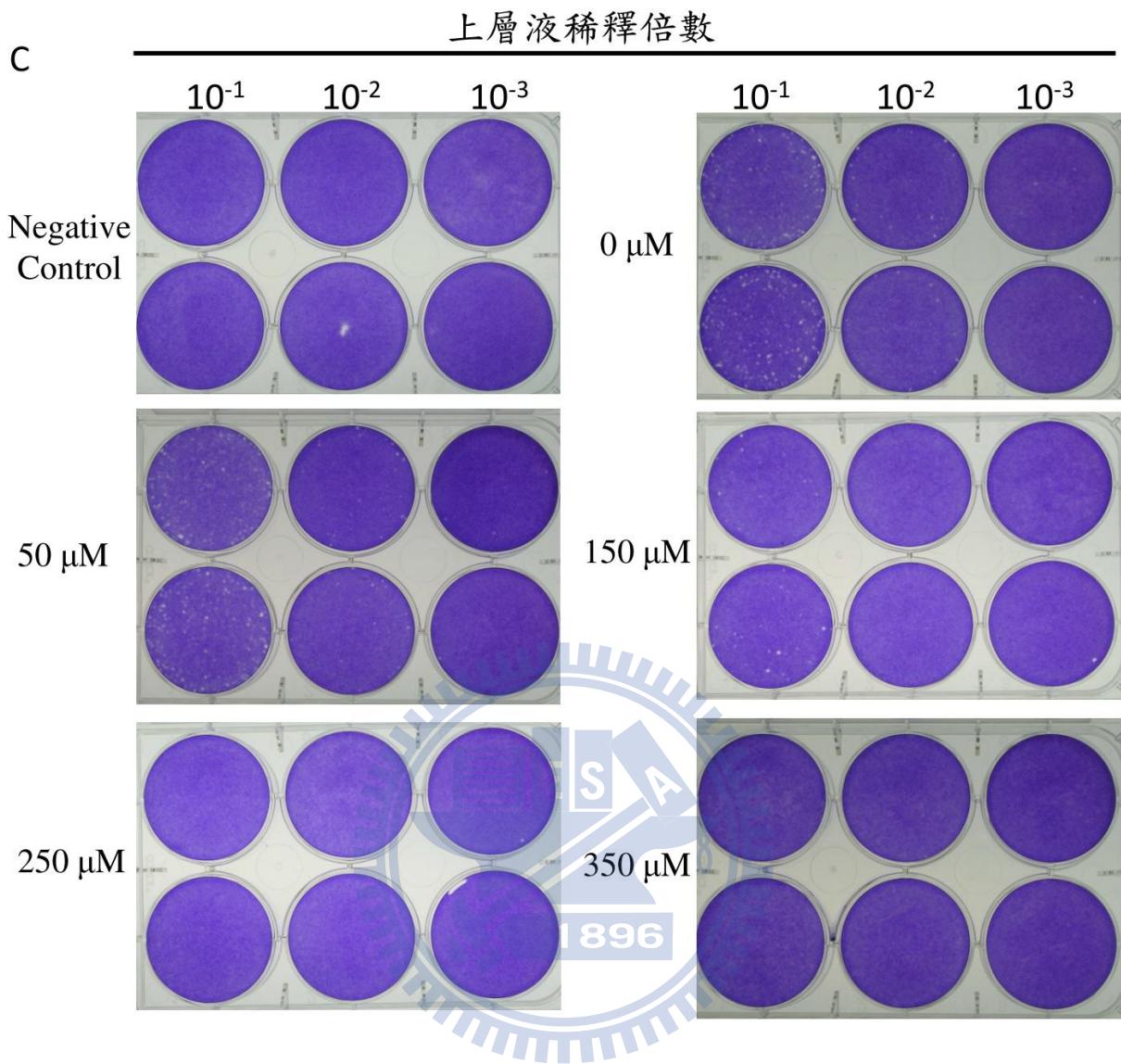
藥物與細胞接觸後 48 小時照相計數細胞數。藥物濃度在 350 μM 以下，沒有發現明顯的細胞減少。本研究在登革熱病毒二型測試之藥物濃度最高為 350 μM。

A

Rolitetracycline	titer (%)	titer (%)	titer (%)	mean	sd	mean±sd
0 $\mu$ M	100	100	100	100	0.0	100±0.0
50 $\mu$ M	84.95	96.17	84.08	88.40	6.74	88.40±6.74
150 $\mu$ M	12.92	23.62	2.44	12.99	10.59	12.99±10.59
250 $\mu$ M	15.39	0.69	0.36	5.48	8.58	5.48±8.58
350 $\mu$ M	1.10	0.14	0.07	0.44	0.57	0.44±0.57

B



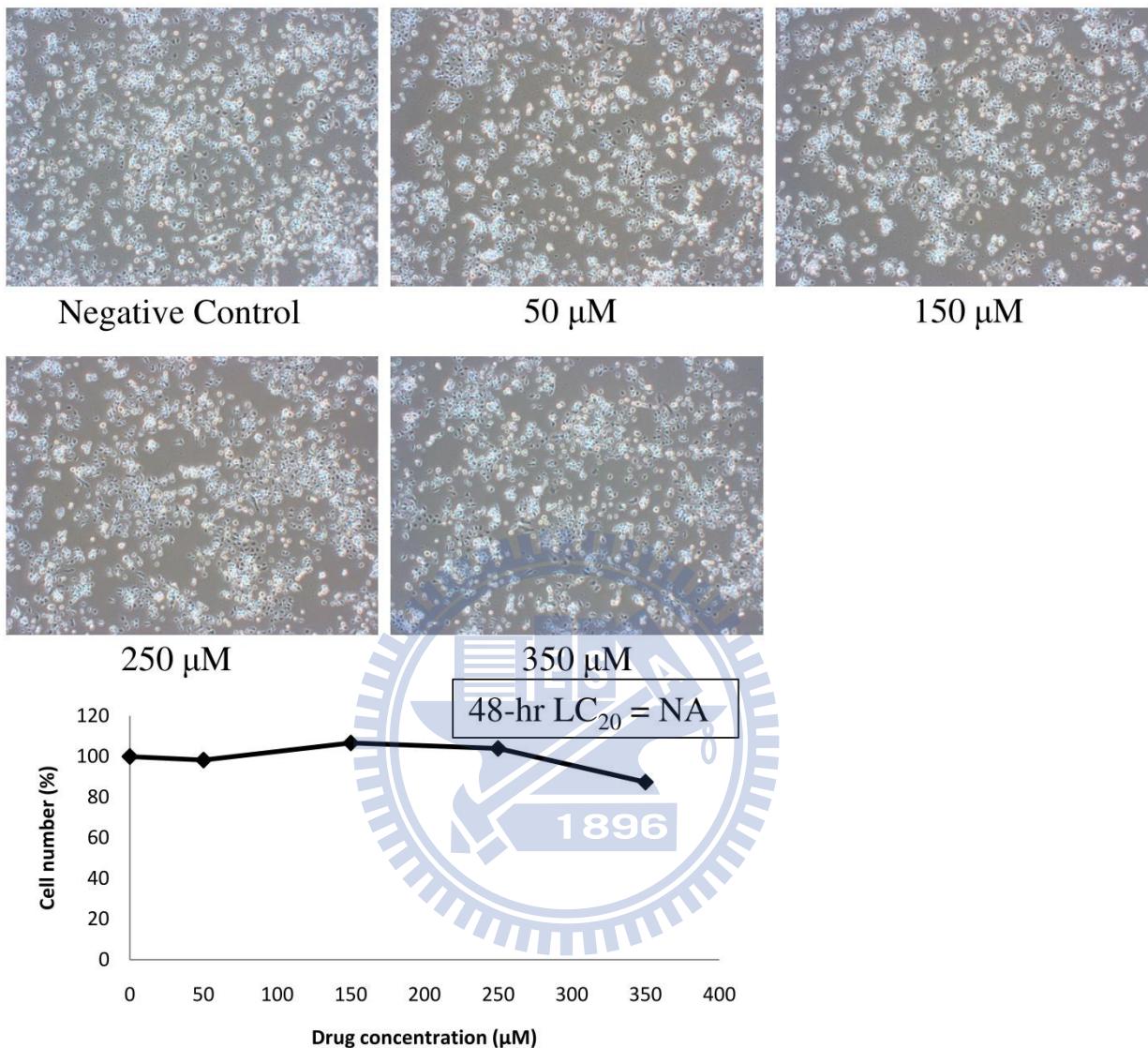


圖七 Rolitetracycline 在 C6/36 細胞中對登革熱病毒二型之影響。

(A) 為 rolitetetracycline 經過病毒抑制試驗及空斑試驗後得到之結果整理。將 rolitetetracycline 各濃度培養皿中計數得到的空斑數換算成登革熱病毒之效價，並將未加入 rolitetetracycline (0  $\mu\text{M}$ ) 所得到之效價當做 100 %，計算出加入各濃度 rolitetetracycline 後登革熱病毒效價之相對百分比。

(B) 為相對應之曲線圖。其中橫坐標為藥物濃度，縱座標為效價之百分比，在 C6/36 細胞中 rolitetetracycline 對於登革熱病毒二型之  $\text{IC}_{50}$  為  $100.93 \mu\text{M}$ ，曲線上之數字代表三重複的平均值。

(C) 為具代表性之空斑試驗圖片。negative control 為未加入藥物及病毒之 C6/36 細胞上層液空斑試驗。



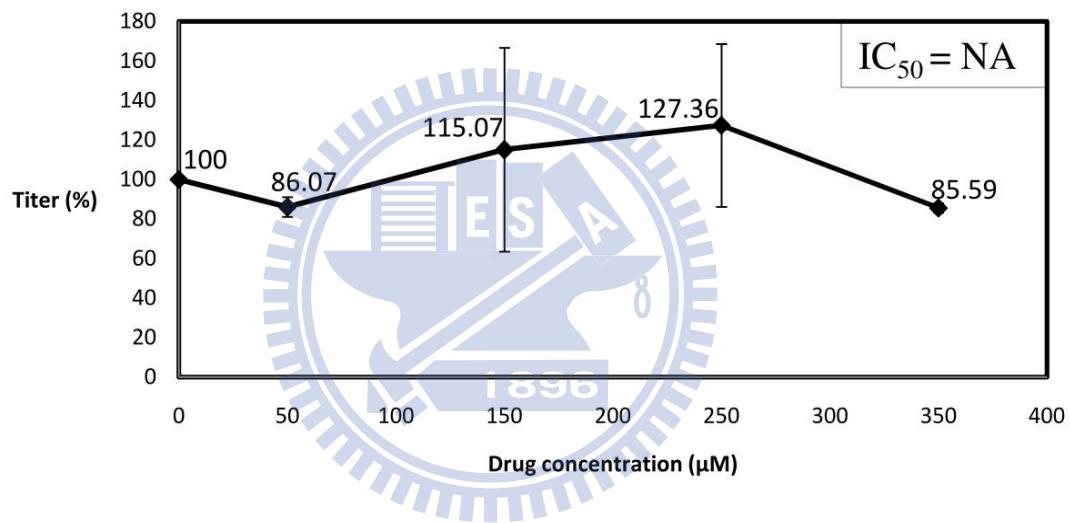
**圖八 Rolitetracycline 對 C6/36 細胞之傷害性。**

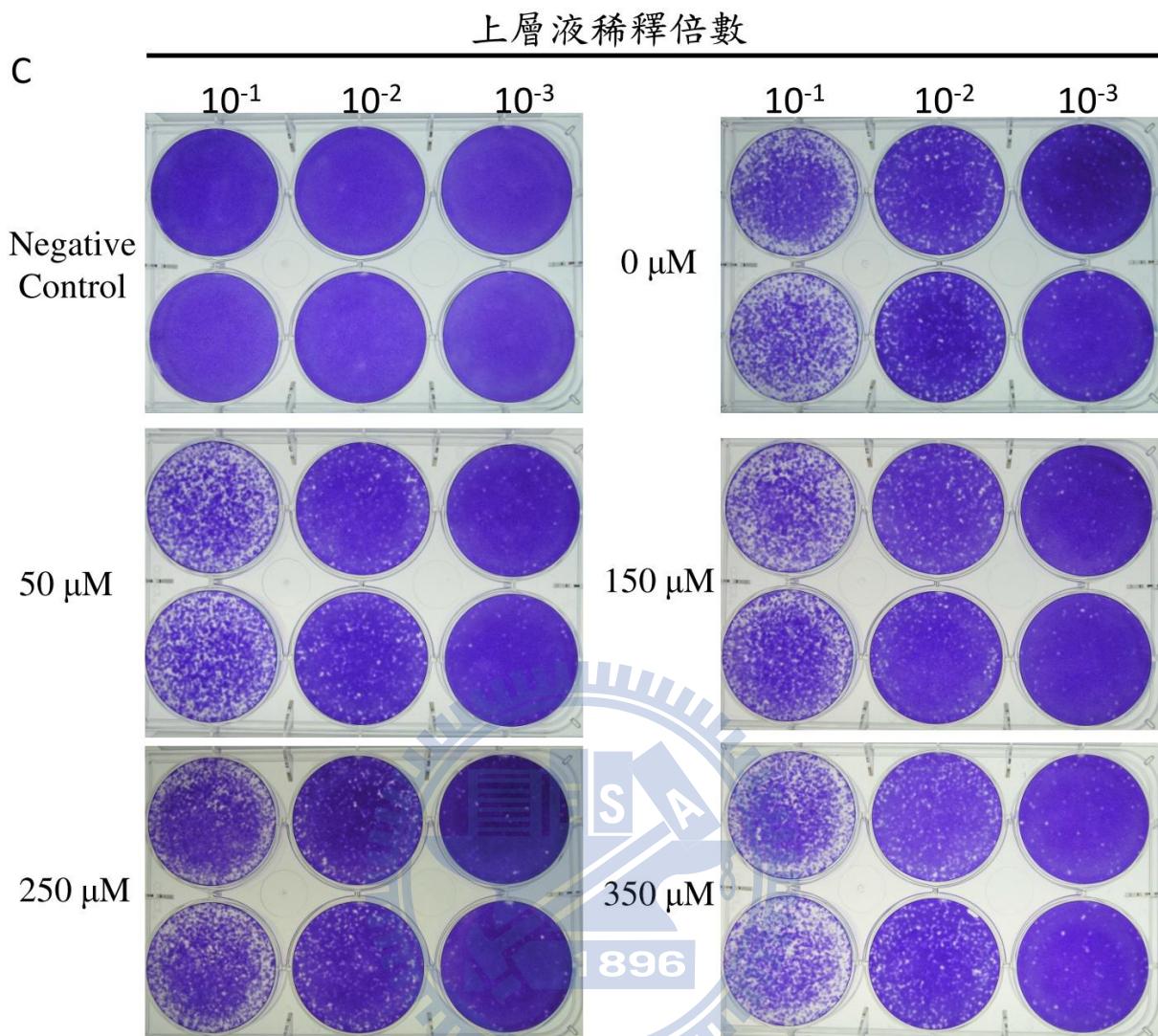
藥物與細胞接觸後 48 小時照相計數細胞數。藥物濃度在 350 μM 以下，沒有發現明顯的細胞減少。本研究在登革熱病毒二型測試之藥物濃度最高為 350 μM。

A

kanamycin	titer (%)	titer (%)	titer (%)	mean	sd	mean±sd
0 $\mu$ M	100	100	100	100	0.0	100±0.0
50 $\mu$ M	85.65	81.32	91.25	86.07	4.98	86.07±4.98
150 $\mu$ M	91.48	79.57	174.18	115.07	51.53	115.07±51.53
250 $\mu$ M	130.74	84.54	166.80	127.36	41.23	127.36±41.23
350 $\mu$ M	87.71	85.99	83.06	85.59	2.36	85.59±2.36

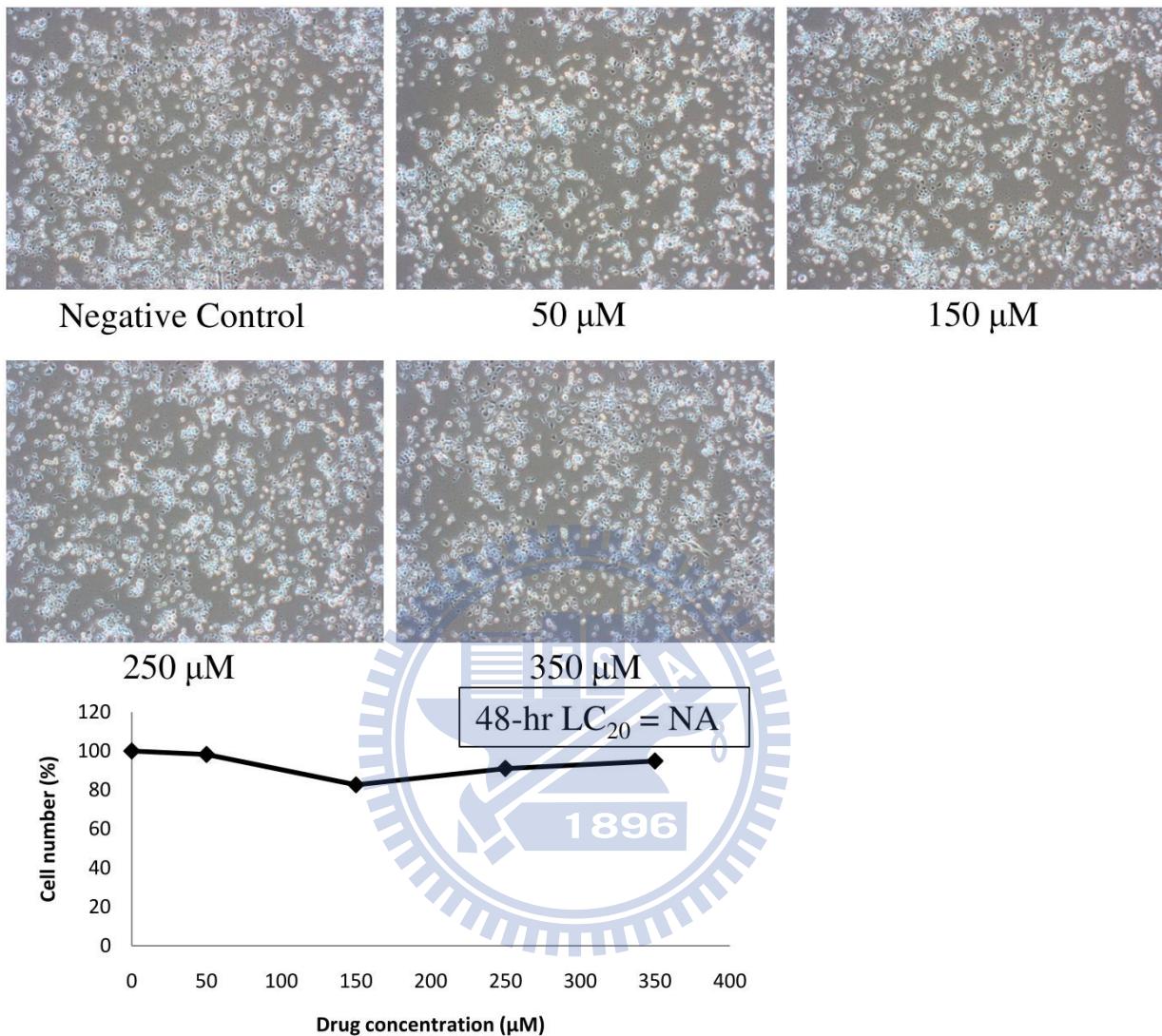
B





圖九 Kanamycin 在 C6/36 細胞中對登革熱病毒二型之影響。

- (A) 為 kanamycin 經過病毒抑制試驗及空斑試驗後得到之結果整理。將 kanamycin 各濃度培養皿中計數得到的空斑數換算成登革熱病毒之效價，並將未加入 kanamycin ( $0 \mu\text{M}$ ) 所得到之效價當做 100 %，計算出加入各濃度 kanamycin 後登革熱病毒效價之相對百分比。
- (B) 為相對應之曲線圖。其中橫坐標為藥物濃度，縱座標為效價之百分比，曲線上之數字代表三重複的平均值。NA 代表無法取得。
- (C) 為具代表性之空斑試驗圖片。negative control 為未加入藥物及病毒之 C6/36 細胞上層液空斑試驗。



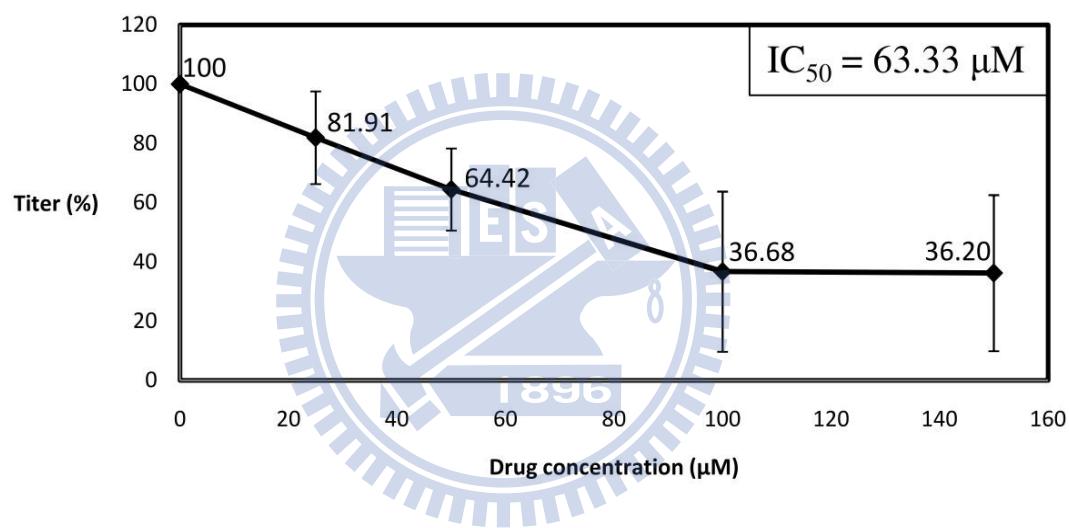
**圖十 Kanamycin 對 C6/36 細胞之傷害性。**

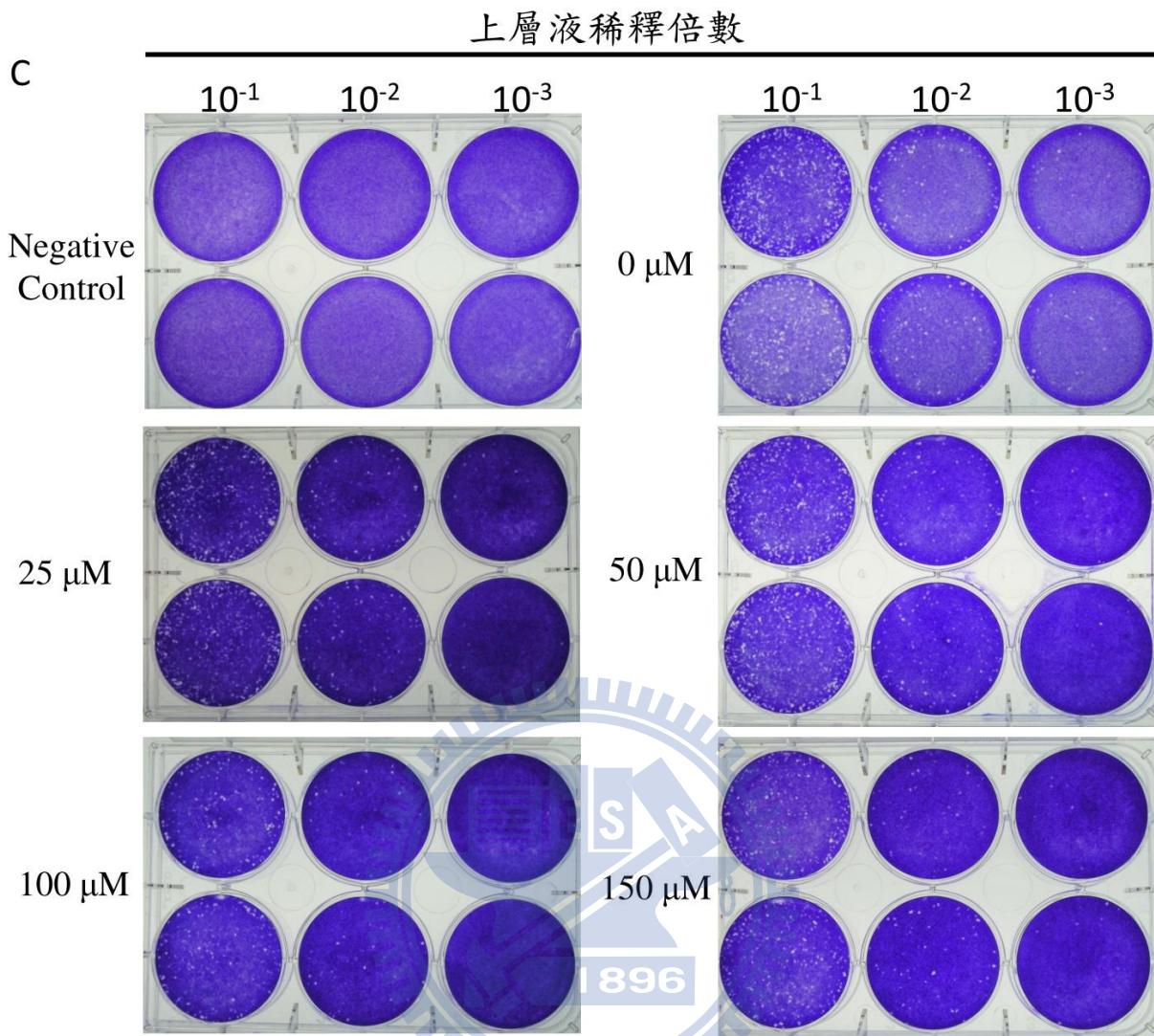
藥物與細胞接觸後 48 小時照相計數細胞數。藥物濃度在 350 μM 以下，沒有發現明顯的細胞減少。本研究在登革熱病毒二型測試之藥物濃度最高為 350 μM。

A

Tetracycline	titer (%)	titer (%)	titer (%)	mean	sd	mean±sd
0 $\mu$ M	100	100	100	100	0.0	100±0.0
25 $\mu$ M	103.72	67.91	74.09	81.91	15.63	81.91±15.63
50 $\mu$ M	82.58	61.72	48.94	64.42	13.87	64.42±13.87
100 $\mu$ M	74.93	17.19	17.90	36.68	27.05	36.68±27.05
150 $\mu$ M	70.22	32.32	6.06	36.20	26.34	36.20±26.34

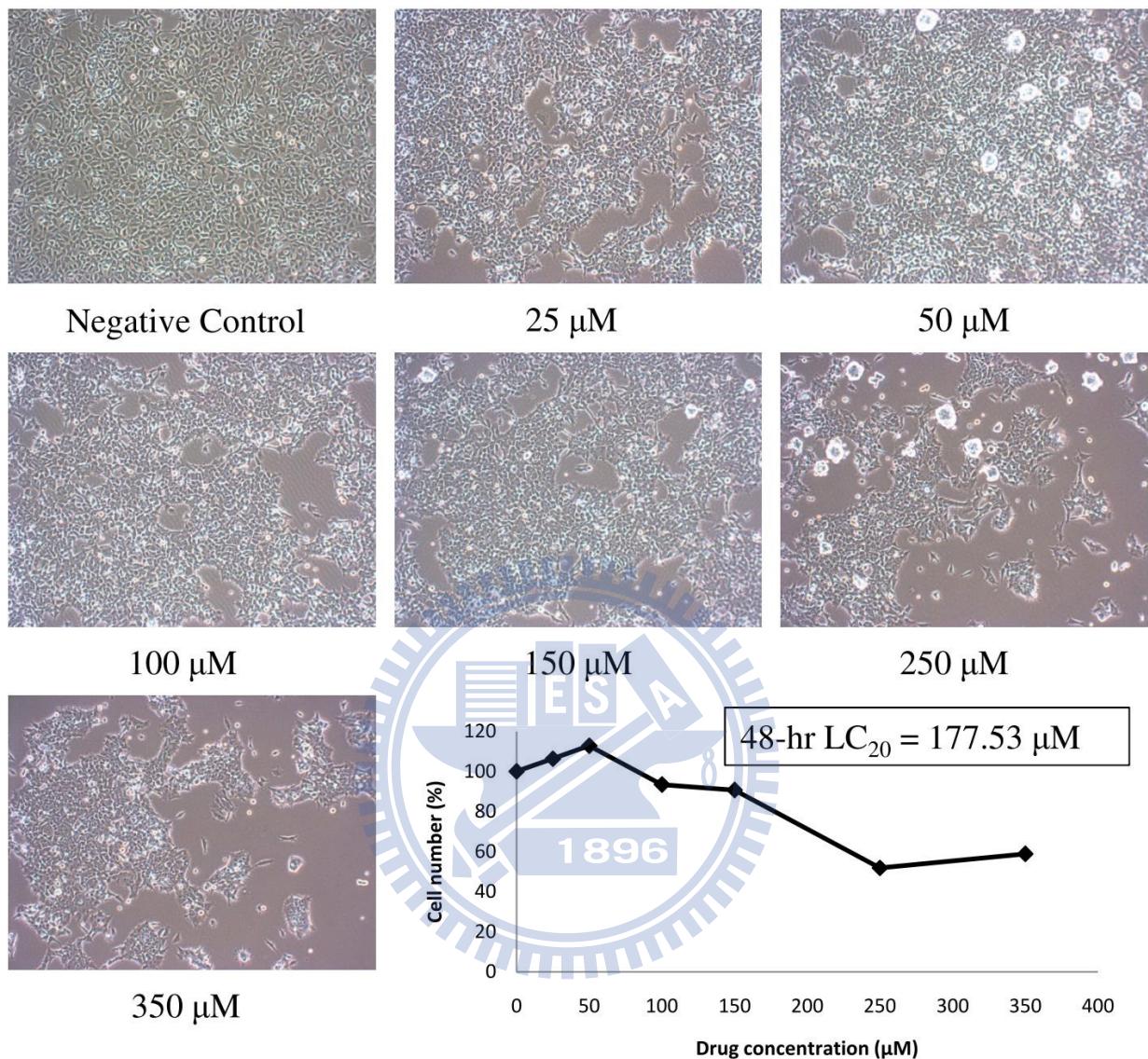
B





圖十一 Tetracycline 在 293T 細胞中對於登革熱病毒二型的影響。

- (A) 為 tetracycline 經過病毒抑制試驗及空斑試驗後得到之結果整理。將 tetracycline 各濃度培養皿計數得到的空斑數換算成登革熱病毒之效價，並將未加入 tetracycline ( $0 \mu\text{M}$ ) 所得到之效價做為 100 %，計算出加入各濃度 tetracycline 後登革熱病毒效價之相對百分比。
- (B) 為相對應之曲線圖。其中橫坐標為藥物濃度，縱座標為效價之百分比，在 293T 細胞中 tetracycline 對於登革熱病毒二型之  $\text{IC}_{50}$  為  $63.33 \mu\text{M}$ ，曲線上之數字代表三重複的平均值。
- (C) 為具代表性之空斑試驗圖片。negative control 為未加入藥物及病毒之 293T 細胞上層液空斑試驗。



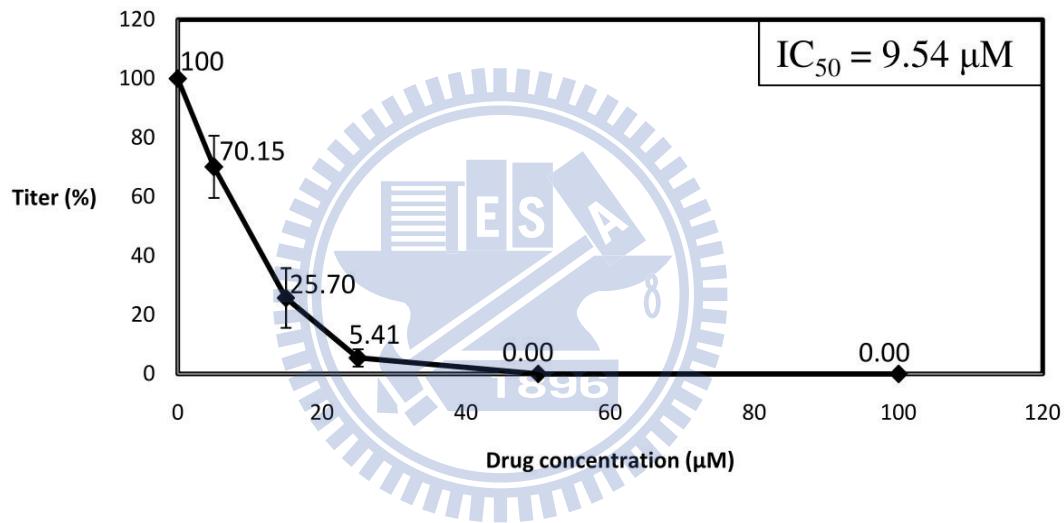
圖十二 Tetracycline 對 293T 細胞之傷害性。

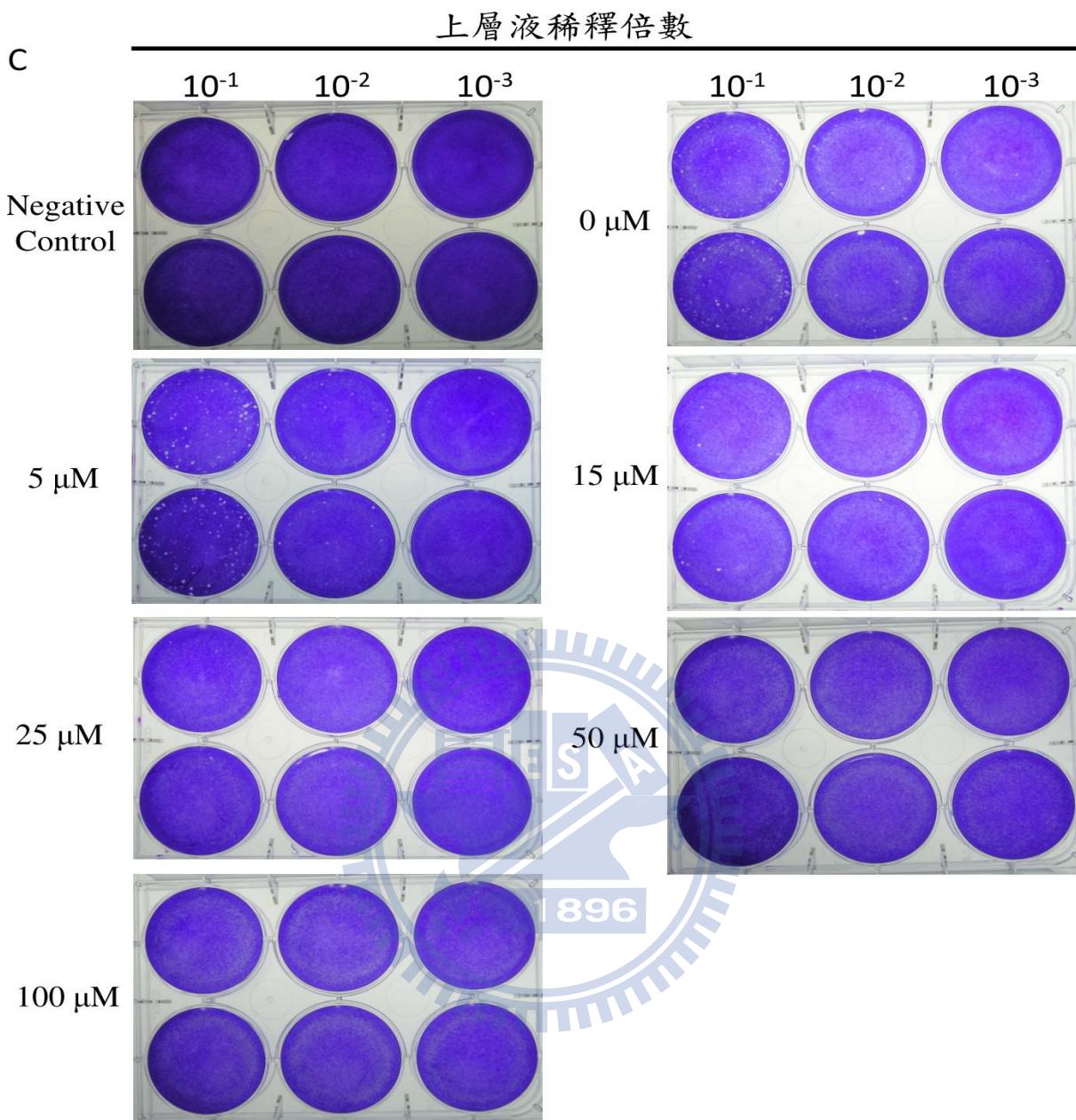
藥物濃度在 177.53  $\mu\text{M}$  以上時細胞死亡率大於 20 %，對細胞有傷害性。本研究在登革熱病  
毒二型及日本腦炎病毒測試之藥物濃度最高皆為 150  $\mu\text{M}$ 。

A

Chlortetracycline titer (%)	titer (%)	titer (%)	mean	sd	mean±sd
0 µM	100	100	100	0.0	100±0.0
5 µM	77.39	77.79	55.26	70.15	10.53
15 µM	22.90	39.26	14.95	25.70	10.12
25 µM	2.82	9.50	3.90	5.41	2.93
50 µM	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
100 µM	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00

B



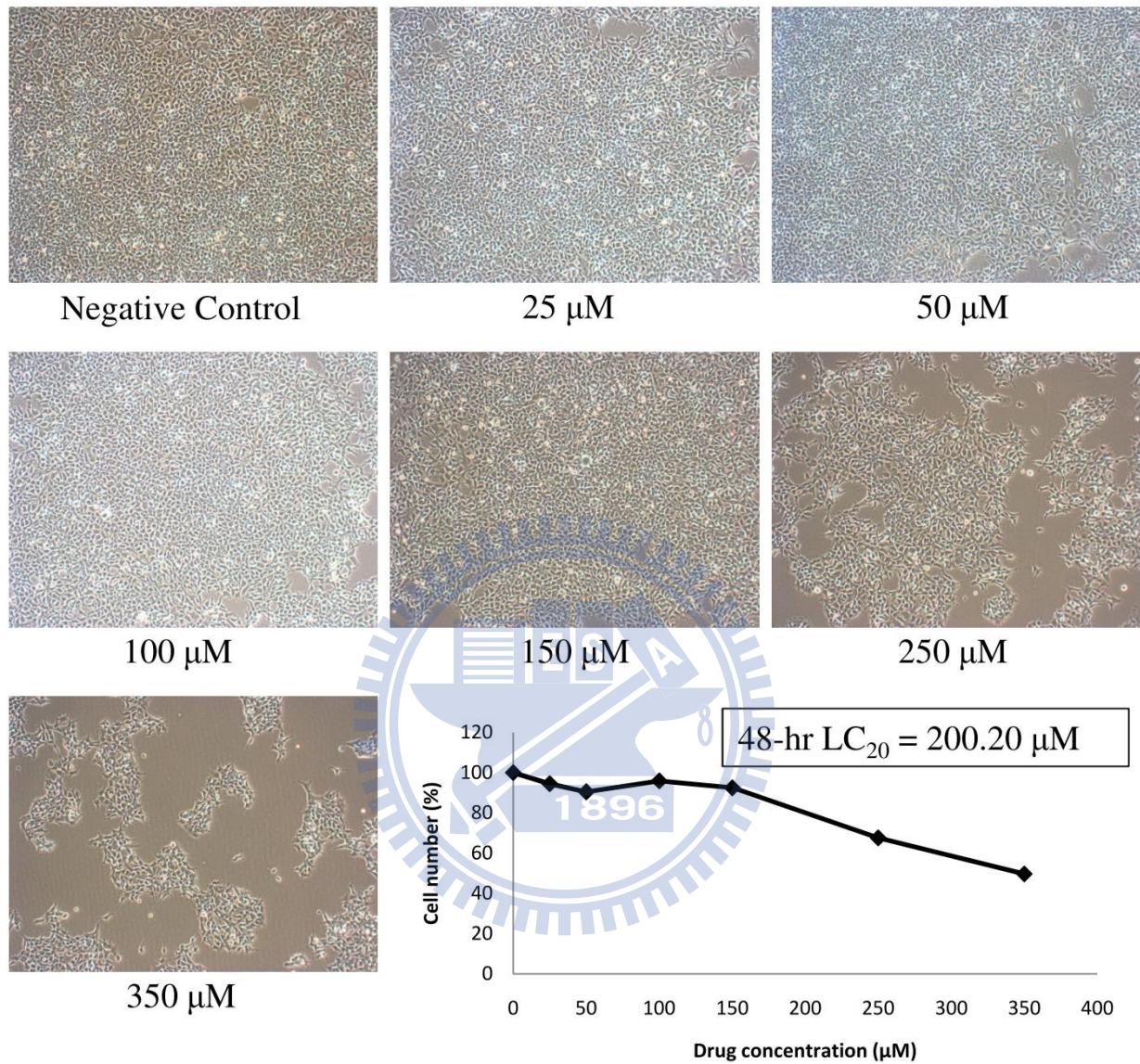


圖十三 Chlortetracycline 在 293T 細胞中對於登革熱病毒二型的影響。

(A) 為 chlortetracycline 經過病毒產量抑制試驗及空斑試驗後得到之結果整理。將 chlortetracycline 各濃度培養皿計數得到的空斑數換算成登革熱病毒之效價，並將未加入 chlortetracycline (0 uM) 所得到之效價做為 100 %，計算出加入各濃度 chlortetracycline 後登革熱病毒效價之相對百分比。

(B) 為相對應之曲線圖。其中橫坐標為藥物濃度，縱座標為效價之百分比，在 293T 細胞中 chlortetracycline 對於登革熱病毒二型之  $IC_{50}$  為  $9.54 \mu M$ ，曲線上之數字代表三重複的平均值。

(C) 為具代表性之空斑試驗圖片。negative control 為未加入藥物及病毒之 293T 細胞上層液空斑試驗。



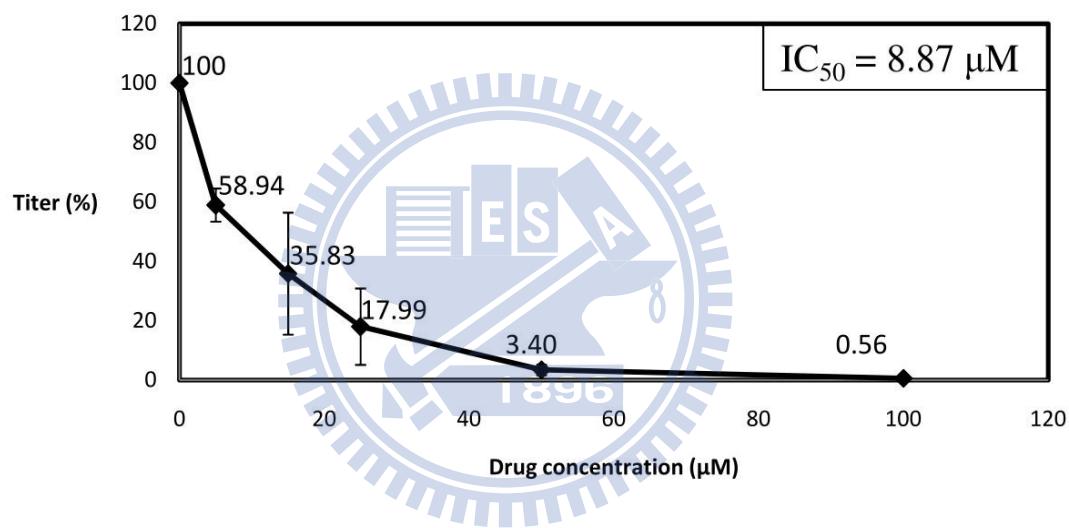
**圖十四 Chlortetracycline 對 293T 細胞之傷害性。**

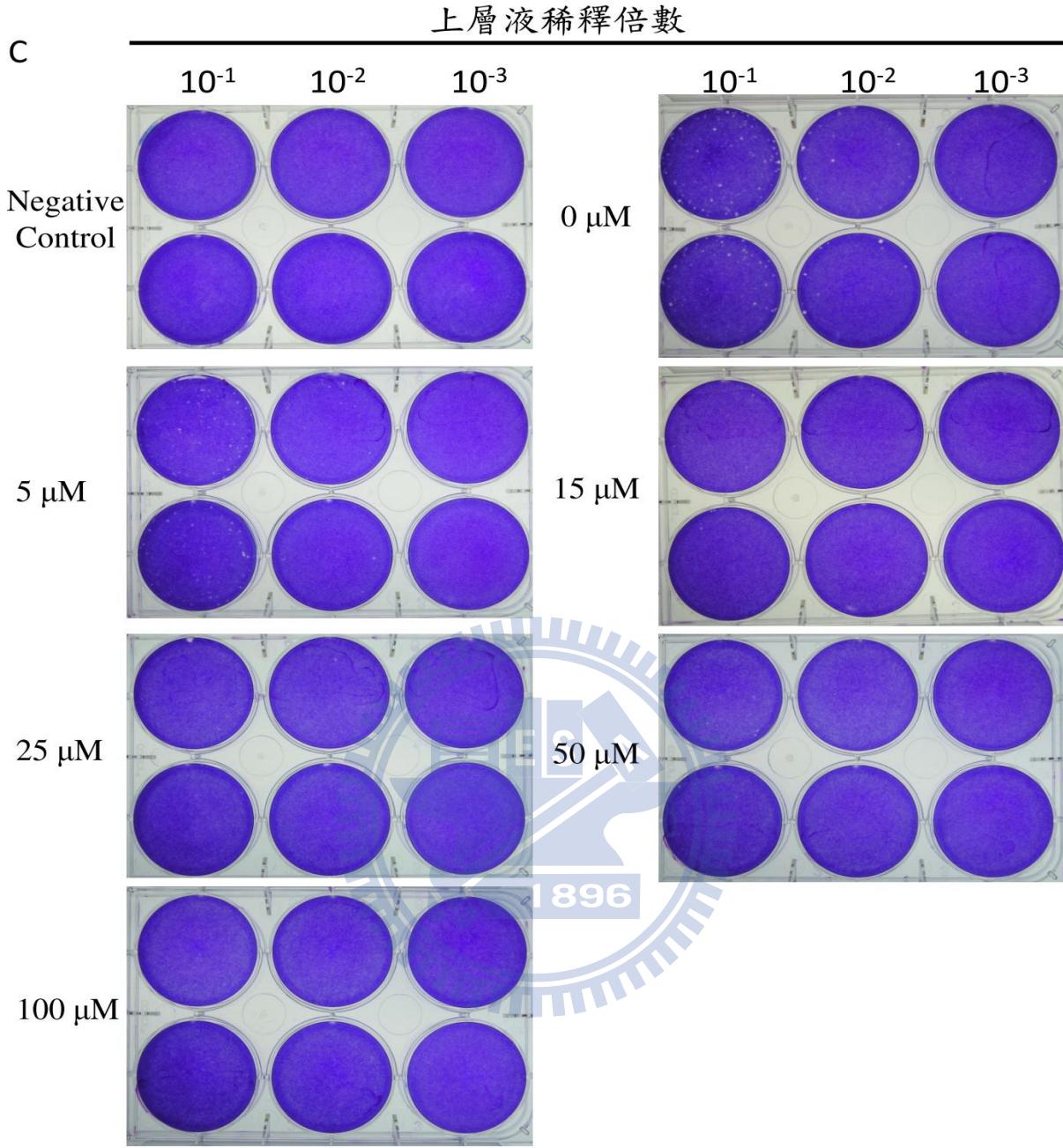
藥物與細胞接觸後 48 小時照相計數細胞數。藥物濃度在 200.20 μM 以下，沒有發現明顯的細胞減少。藥物濃度在 200.20 μM 以上時細胞死亡率大於 20 %，對細胞有傷害性。本研究在登革熱病毒二型及日本腦炎病毒測試之藥物濃度最高分別為 100 μM 及 150 μM。

A

Doxycycline	titer (%)	titer (%)	titer (%)	mean	sd	mean±sd
0 µM	100	100	100	100	0.0	100±0.0
5 µM	52.17	58.81	65.83	58.94	5.58	58.94±5.58
15 µM	8.89	39.85	58.75	35.83	20.55	35.83±20.55
25 µM	8.28	9.53	36.17	17.99	12.86	17.99±12.86
50 µM	3.22	1.30	5.68	3.40	1.79	3.40±1.79
100 µM	1.69	0.00	0.00	0.56	0.80	0.56±0.80

B



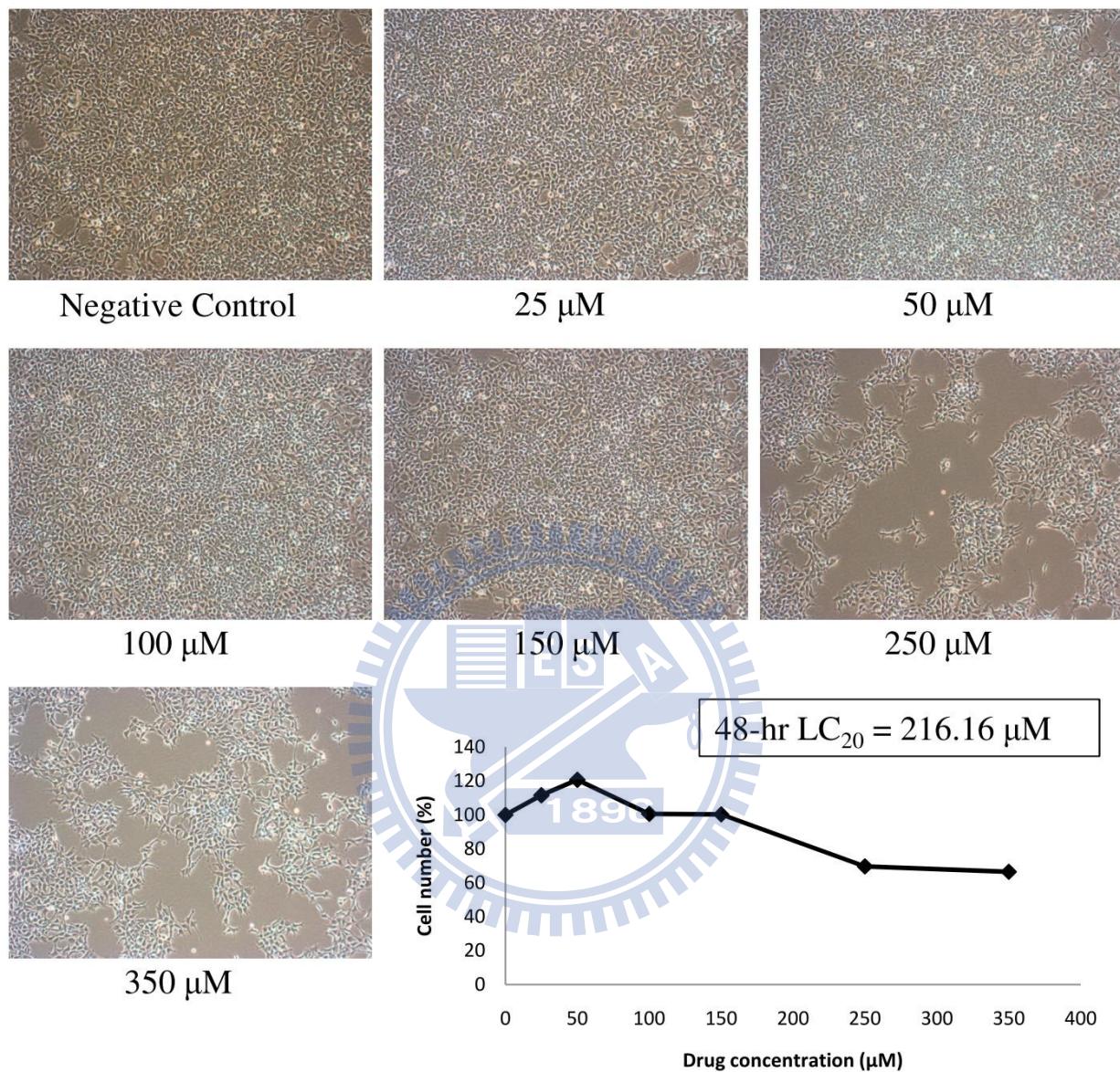


圖十五 Doxycycline 在 293T 細胞中對登革熱病毒二型之影響。

(A) 為 doxycycline 經過病毒產量抑制試驗及空斑試驗後得到之結果整理。將 doxycycline 各濃度培養皿中計數得到的空斑數換算成登革熱病毒之效價，並將未加入 doxycycline (0  $\mu\text{M}$ ) 所得到之效價當做 100 %，計算出加入各濃度 doxycycline 後登革熱病毒效價之相對百分比。

(B) 為相對應之曲線圖。其中橫坐標為藥物濃度，縱座標為效價之百分比，在 293T 細胞中 doxycycline 對於登革熱病毒二型之  $\text{IC}_{50}$  為  $8.87 \mu\text{M}$ ，曲線上之數字代表三重複的平均值。

(C) 為具代表性之空斑試驗圖片。negative control 為未加入藥物及病毒之 293T 細胞上層液空斑試驗。



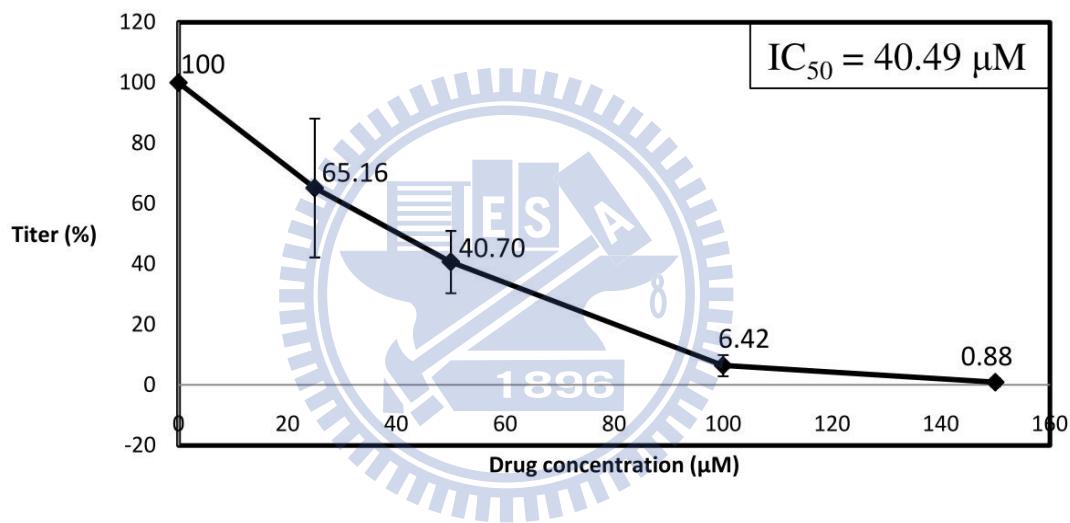
圖十六 Doxycycline 對 293T 細胞之傷害性。

藥物與細胞接觸後 48 小時照相計數細胞數。藥物濃度在  $216.26 \mu\text{M}$  以下，沒有發現明顯的細胞減少。藥物濃度在  $216.16 \mu\text{M}$  以上時細胞死亡率大於 20 %，對細胞有傷害性。本研究在登革熱病毒二型及日本腦炎病毒測試之藥物濃度最高分別為  $100 \mu\text{M}$  及  $150 \mu\text{M}$ 。

A

Rolitetracycline	titer (%)	titer (%)	titer (%)	mean	sd	mean±sd
0 μM	100	100	100	100	0.0	100±0.0
25 μM	40.16	82.07	73.25	65.16	18.04	65.16±18.04
50 μM	30.04	42.96	49.09	40.70	7.94	40.70±7.94
100 μM	6.10	4.02	9.15	6.42	2.11	6.42±2.11
150 μM	1.76	0.74	0.15	0.88	0.67	0.88±0.67

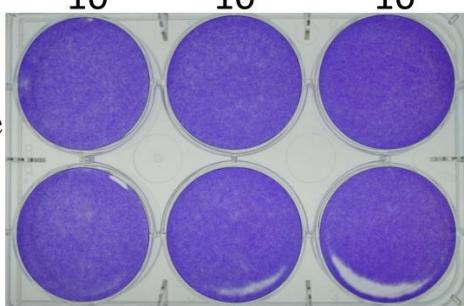
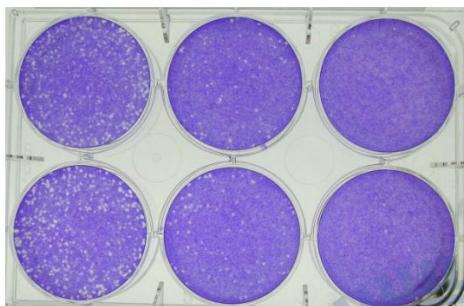
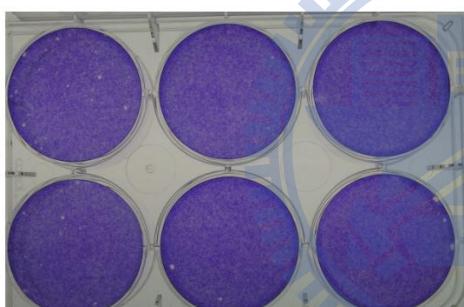
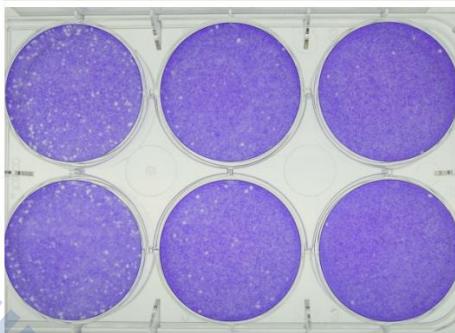
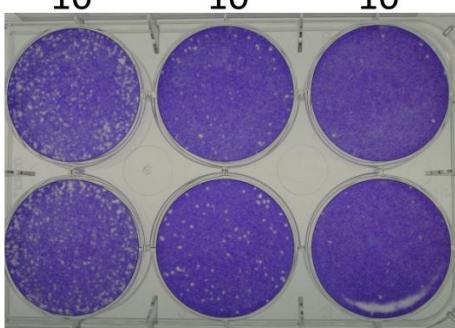
B



C

## 上層液稀釋倍數

Negative Control

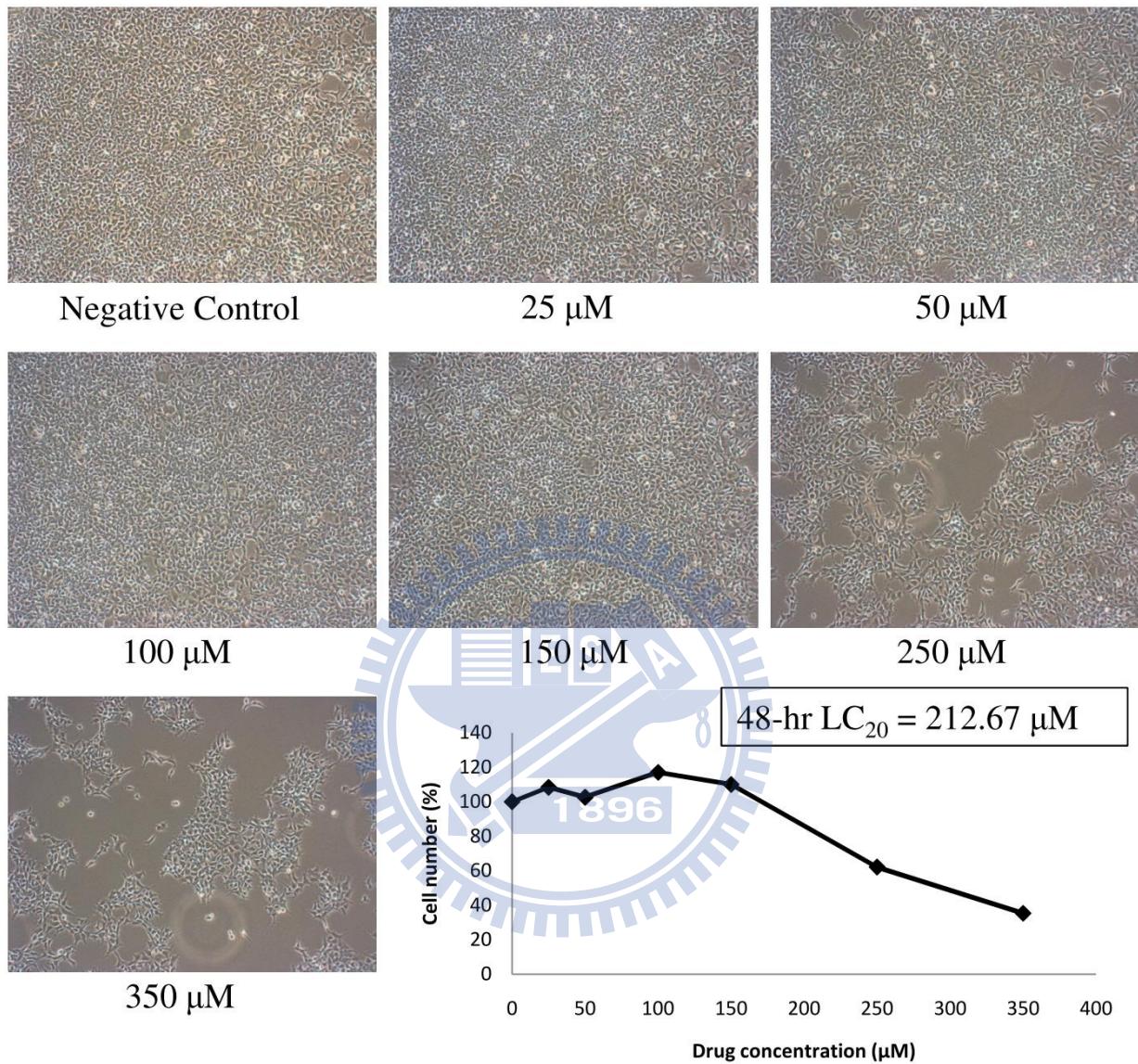
 $10^{-1}$      $10^{-2}$      $10^{-3}$ 0  $\mu\text{M}$ 25  $\mu\text{M}$ 50  $\mu\text{M}$ 100  $\mu\text{M}$ 150  $\mu\text{M}$ 

圖十七 Rolitetracycline 在 293T 細胞中對登革熱病毒二型之影響。

(A) 為 rolitetracycline 經過病毒產量抑制試驗及空斑試驗後得到之結果整理。將 rolitetracycline 各濃度培養皿中計數得到的空斑數換算成登革熱病毒之效價，並將未加入 rolitetracycline (0  $\mu\text{M}$ ) 所得到之效價當做 100 %，計算出加入各濃度 rolitetracycline 後登革熱病毒效價之相對百分比。

(B) 為相對應之曲線圖。其中橫坐標為藥物濃度，縱座標為效價之百分比，在 293T 細胞中 rolitetracycline 對於登革熱病毒二型之  $\text{IC}_{50}$  為 40.49  $\mu\text{M}$ ，曲線上之數字代表三重複的平均值。

(C) 為具代表性之空斑試驗圖片。negative control 為未加入藥物及病毒之 293T 細胞上層液空斑試驗。



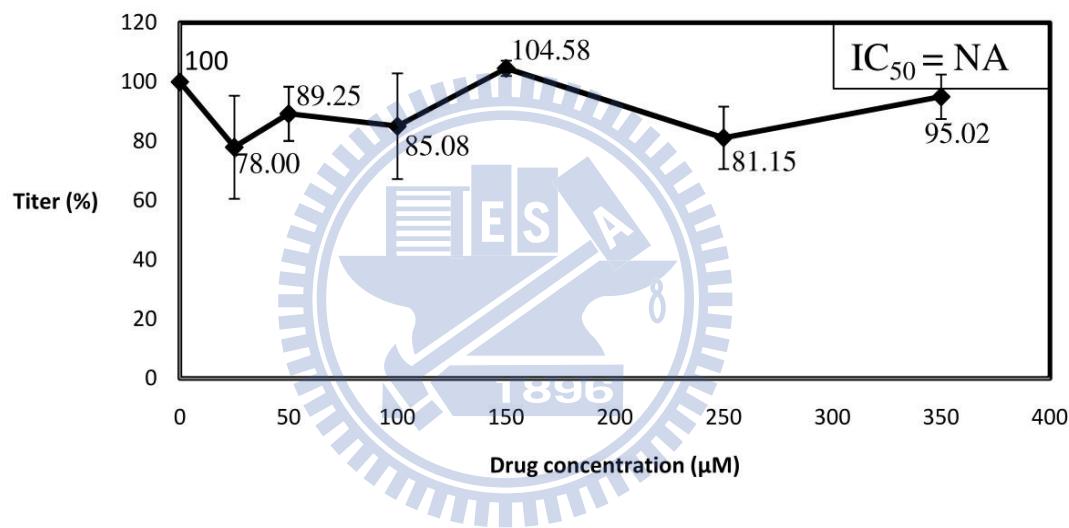
圖十八 Rolitetracycline 對 293T 細胞之傷害性。

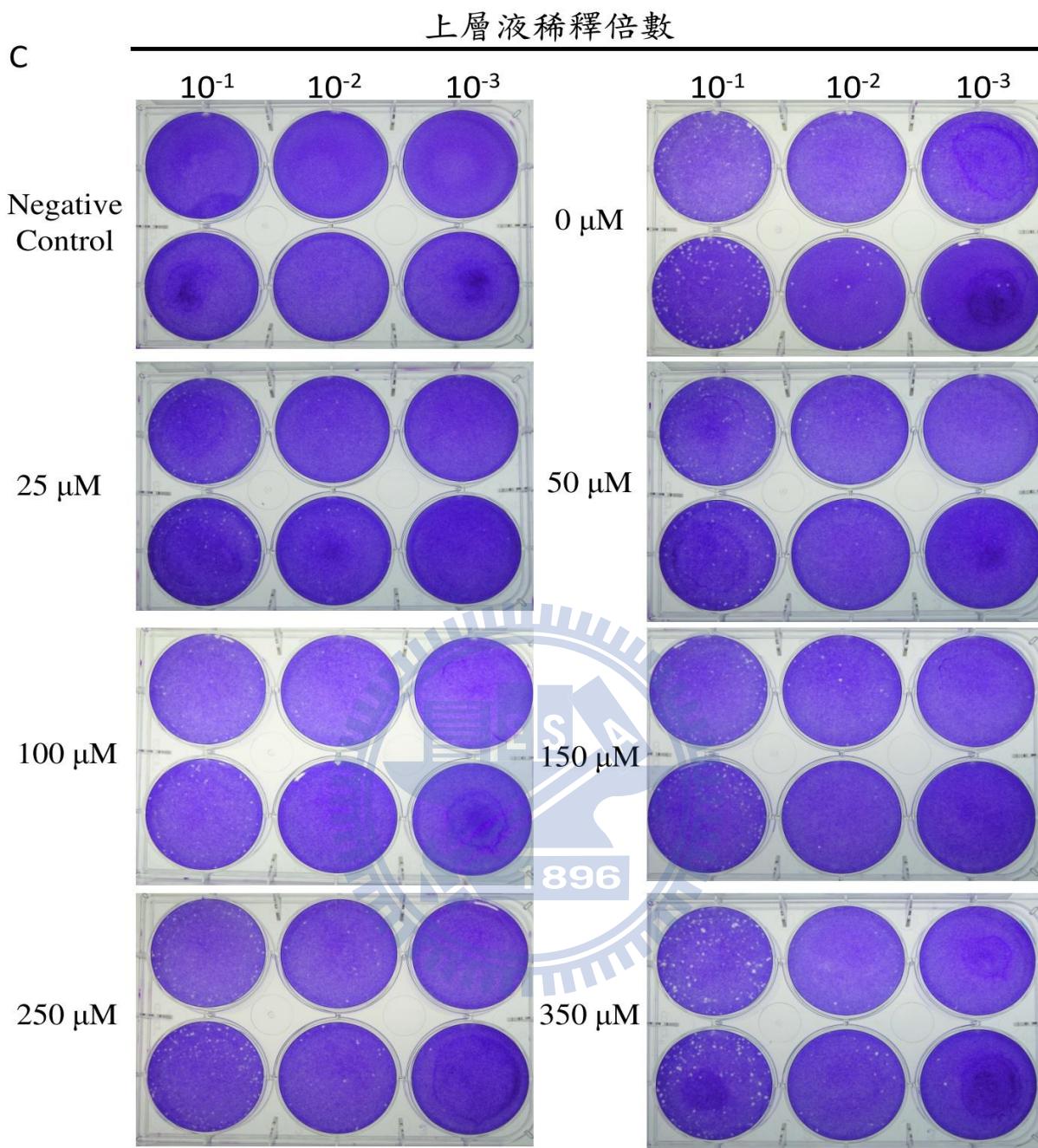
藥物濃度在 212.67 μM 以上時細胞死亡率大於 20 %，對細胞有傷害性。本研究在登革熱病  
毒二型及日本腦炎病毒測試之藥物濃度最高皆為 150 μM。

A

kanamycin	titer (%)	titer (%)	titer (%)	mean	sd	mean±sd
0 $\mu$ M	100	100	100	100	0.0	100±0.0
25 $\mu$ M	88.30	92.19	53.52	78.00	17.38	78.00±17.38
50 $\mu$ M	82.73	102.18	82.84	89.25	9.14	89.25±9.14
100 $\mu$ M	104.25	89.65	61.33	85.08	17.82	85.08±17.82
150 $\mu$ M	100.96	106.77	106.00	104.58	2.58	104.58±2.58
250 $\mu$ M	95.67	76.83	70.94	81.15	10.55	81.15±10.55
350 $\mu$ M	84.37	100.47	100.20	95.02	7.53	95.02±

B

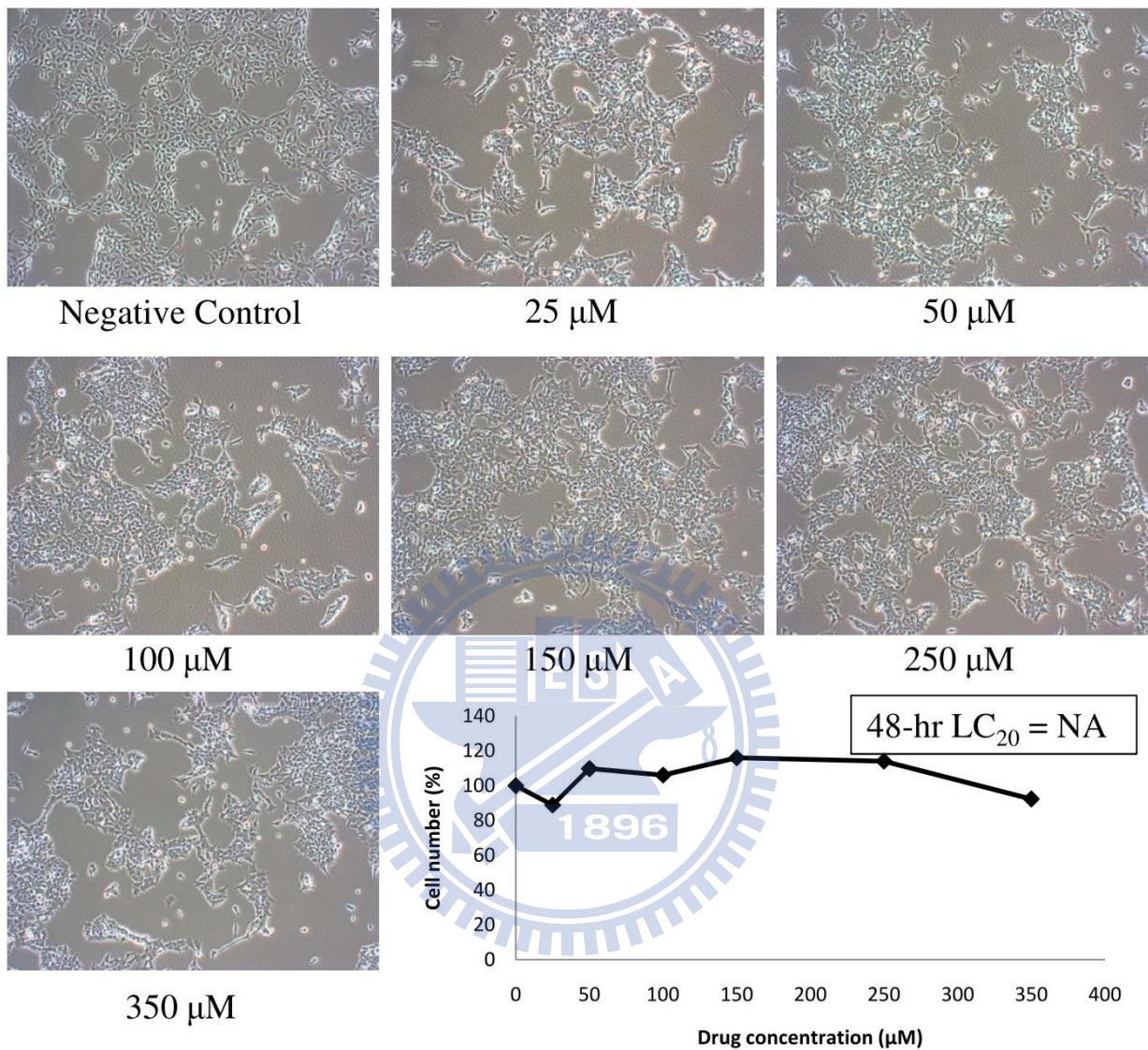




圖十九 Kanamycin 在 293T 細胞中對登革熱病毒二型之影響。

(A) 為 kanamycin 經過病毒產量抑制試驗及空斑試驗後得到之結果整理。將 kanamycin 各濃度培養皿中計數得到的空斑數換算成登革熱病毒之效價，並將未加入 kanamycin (0  $\mu\text{M}$ ) 所得到之效價當做 100 %，計算出加入各濃度 kanamycin 後登革熱病毒效價之相對百分比。(B) 為相對應之曲線圖。其中橫坐標為藥物濃度，縱座標為效價之百分比，曲線上之數字代表三重複的平均值。NA 代表無法取得。

(C) 為具代表性之空斑試驗圖片。negative control 為未加入藥物及病毒之 293T 細胞上層液空斑試驗。



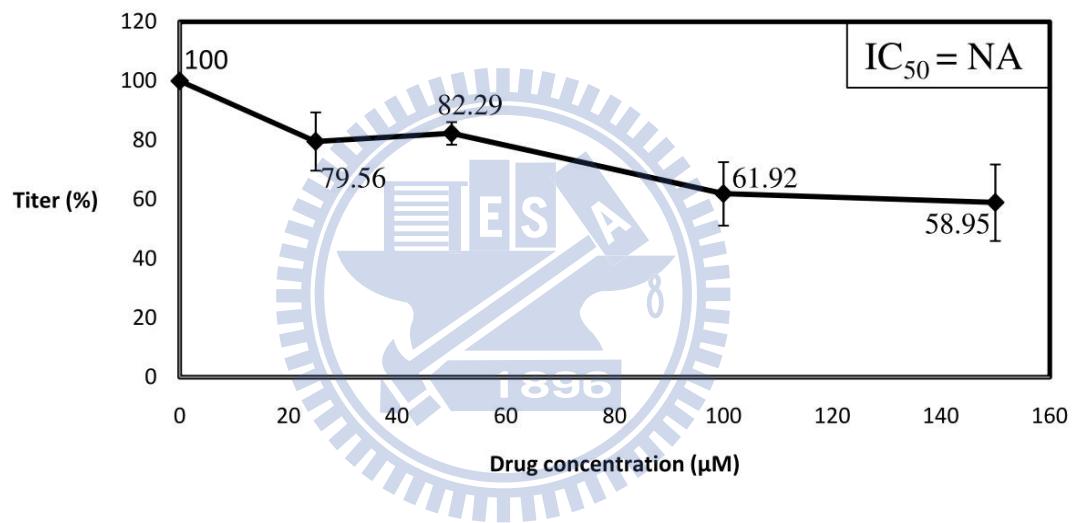
圖二十 Kanamycin 對 293T 細胞之傷害性。

藥物與細胞接觸後 48 小時照相計數細胞數。藥物濃度在 350 μM 以下，沒有發現明顯的細胞減少。本研究在登革熱病毒二型及日本腦炎病毒測試之藥物濃度最高皆為 350 μM。

A

Tetracycline	titer (%)	titer (%)	titer (%)	mean	sd	mean±sd
0 $\mu$ M	100	100	100	100	0.0	100±0.0
25 $\mu$ M	88.09	65.76	84.84	79.56	9.85	79.56±9.85
50 $\mu$ M	82.66	86.78	77.42	82.29	3.83	82.29±3.83
100 $\mu$ M	65.27	73.05	47.44	61.92	10.72	61.92±10.72
150 $\mu$ M	41.61	62.65	72.58	58.95	12.91	58.95±12.91

B



上層液稀釋倍數

C

Negative Control

25  $\mu\text{M}$

100  $\mu\text{M}$

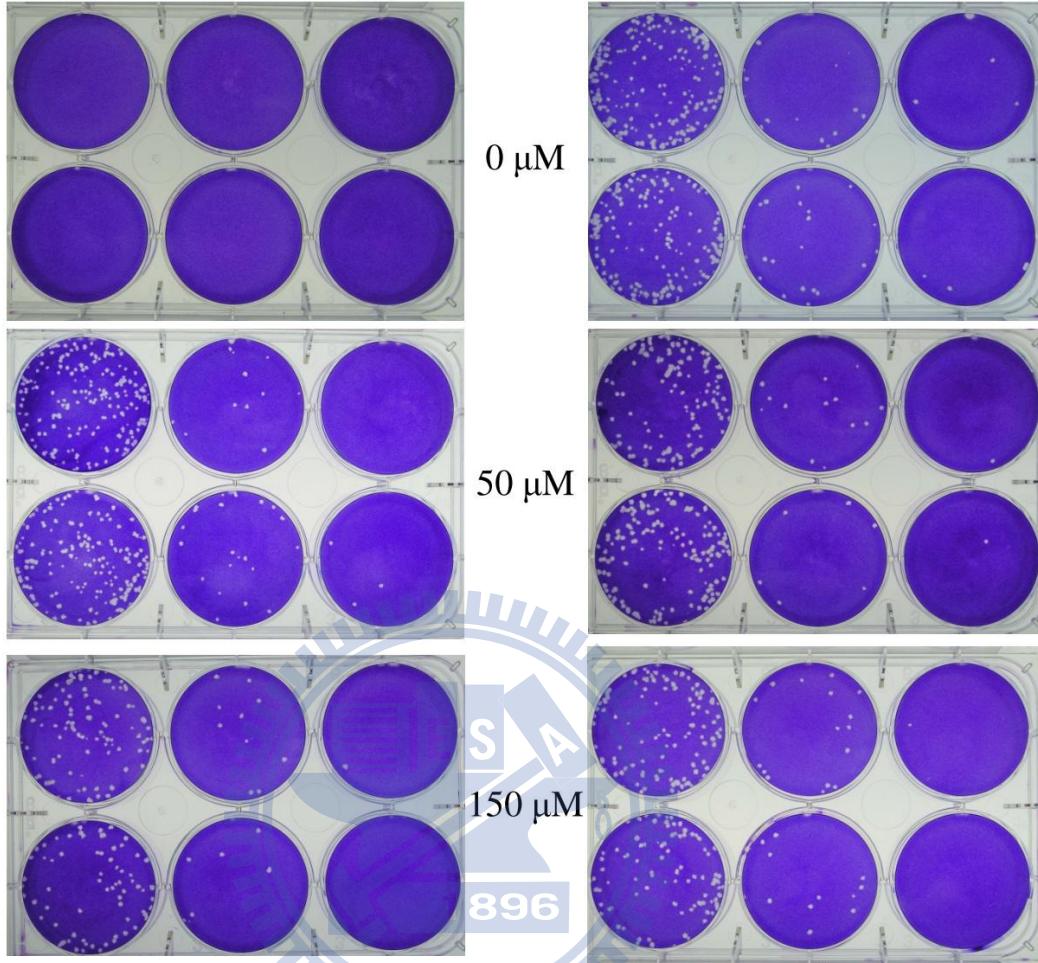
$10^{-1}$      $10^{-2}$      $10^{-3}$

0  $\mu\text{M}$

$10^{-1}$      $10^{-2}$      $10^{-3}$

50  $\mu\text{M}$

150  $\mu\text{M}$



圖二十一 Tetracycline 在 293T 細胞中對於日本腦炎病毒的影響。

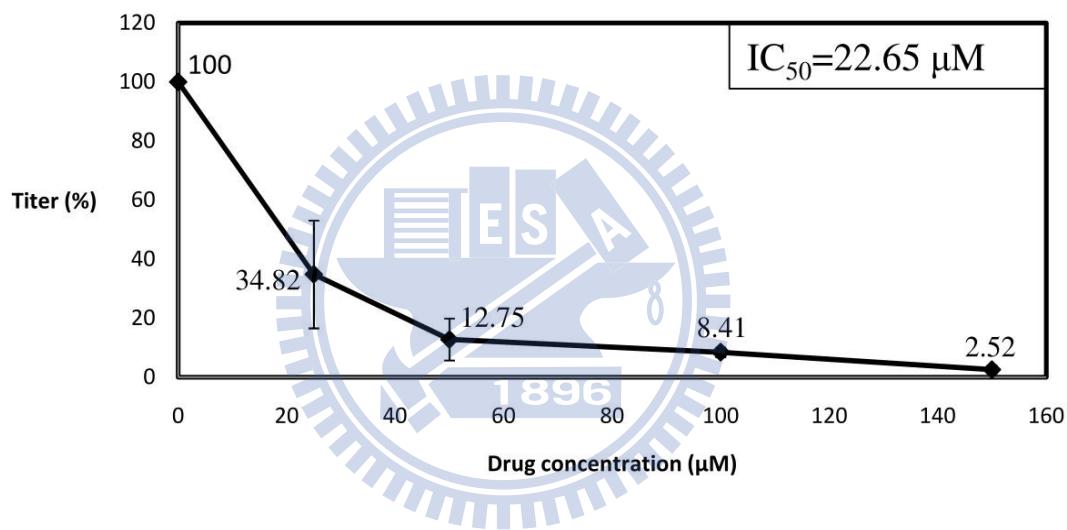
(A) 為 Tetracycline 經過病毒產量抑制試驗及空斑試驗後得到之結果整理。將 tetracycline 各濃度培養皿計數得到的空斑數換算成日本腦炎病毒之效價，並將未加入 tetracycline (0  $\mu\text{M}$ ) 所得到之效價做為 100 %，計算出加入各濃度 tetracycline 後日本腦炎效價之相對百分比。  
 (B) 為相對應之曲線圖。其中橫坐標為藥物濃度，縱座標為效價之百分比，曲線上之數字代表三重複的平均值，NA 代表無法取得。

(C) 為具代表性之空斑試驗圖片。negative control 為未加入藥物及病毒之 293T 細胞上層液空斑試驗。

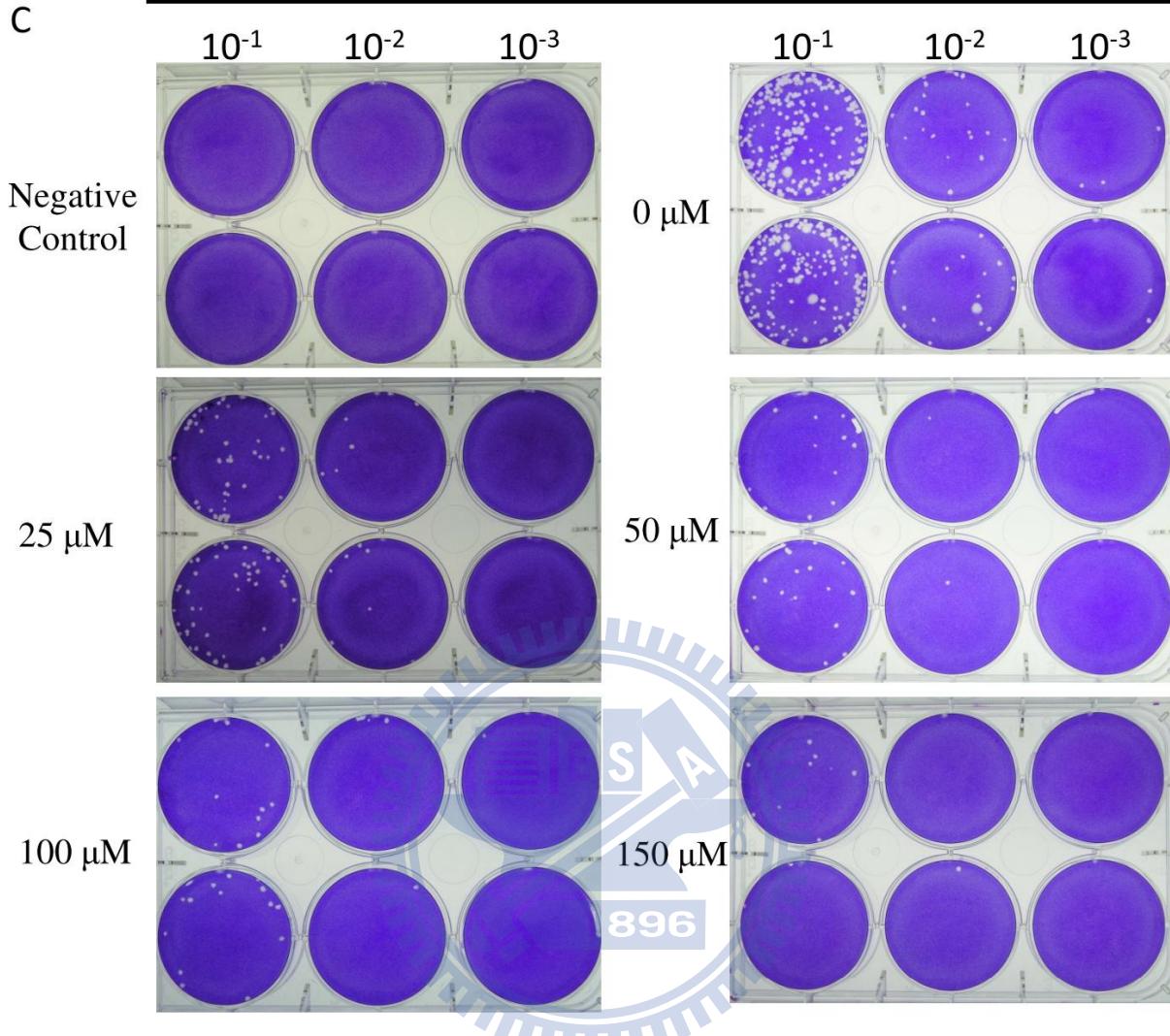
A

Chlortetracycline	titer (%)	titer (%)	titer (%)	mean	sd	mean±sd
0 $\mu$ M	100	100	100	100	0.0	100±0.0
25 $\mu$ M	60.65	22.16	21.65	34.82	18.27	34.82±18.27
50 $\mu$ M	22.74	8.68	6.84	12.75	7.10	12.75±7.10
100 $\mu$ M	9.58	9.48	6.17	8.41	1.59	8.41±1.59
150 $\mu$ M	3.64	3.28	0.64	2.52	1.33	2.52±1.33

B



### 上層液稀釋倍數



圖二十二 Chlortetracycline 在 293T 細胞中對於日本腦炎病毒的影響。

(A) 為 chlortetracycline 經過病毒產量抑制試驗及空斑試驗後得到之結果整理。將 chlortetracycline 各濃度培養皿計數得到的空斑數換算成日本腦炎病毒之效價，並將未加入 chlortetracycline (0  $\mu\text{M}$ ) 所得到之效價做為 100 %，計算出加入各濃度 chlortetracycline 後日本腦炎病毒效價之相對百分比。

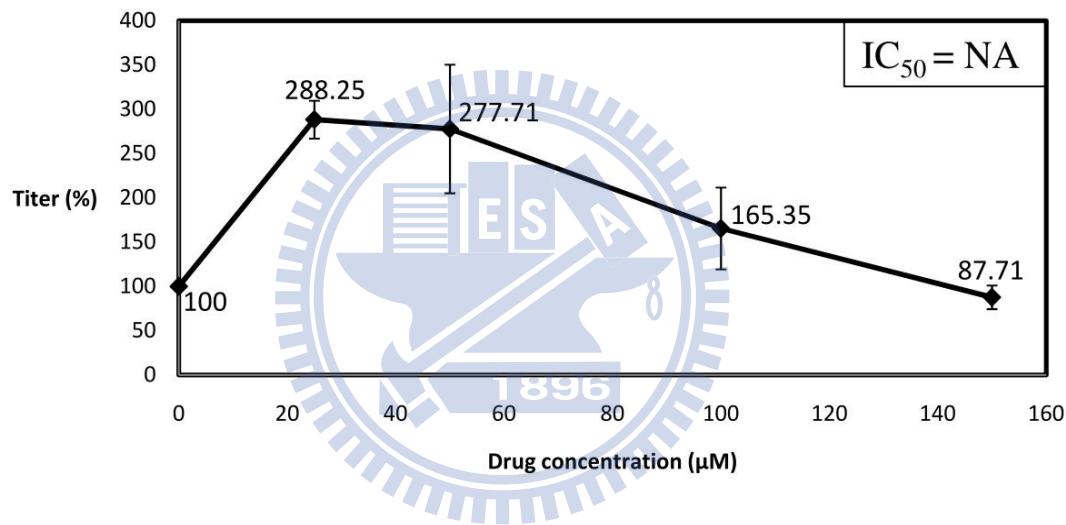
(B) 為相對應之曲線圖。其中橫坐標為藥物濃度，縱座標為效價之百分比，在 293T 細胞中 chlortetracycline 對於日本腦炎病毒之  $IC_{50}$  為  $22.65 \mu\text{M}$ ，曲線上之數字代表三重複的平均值。

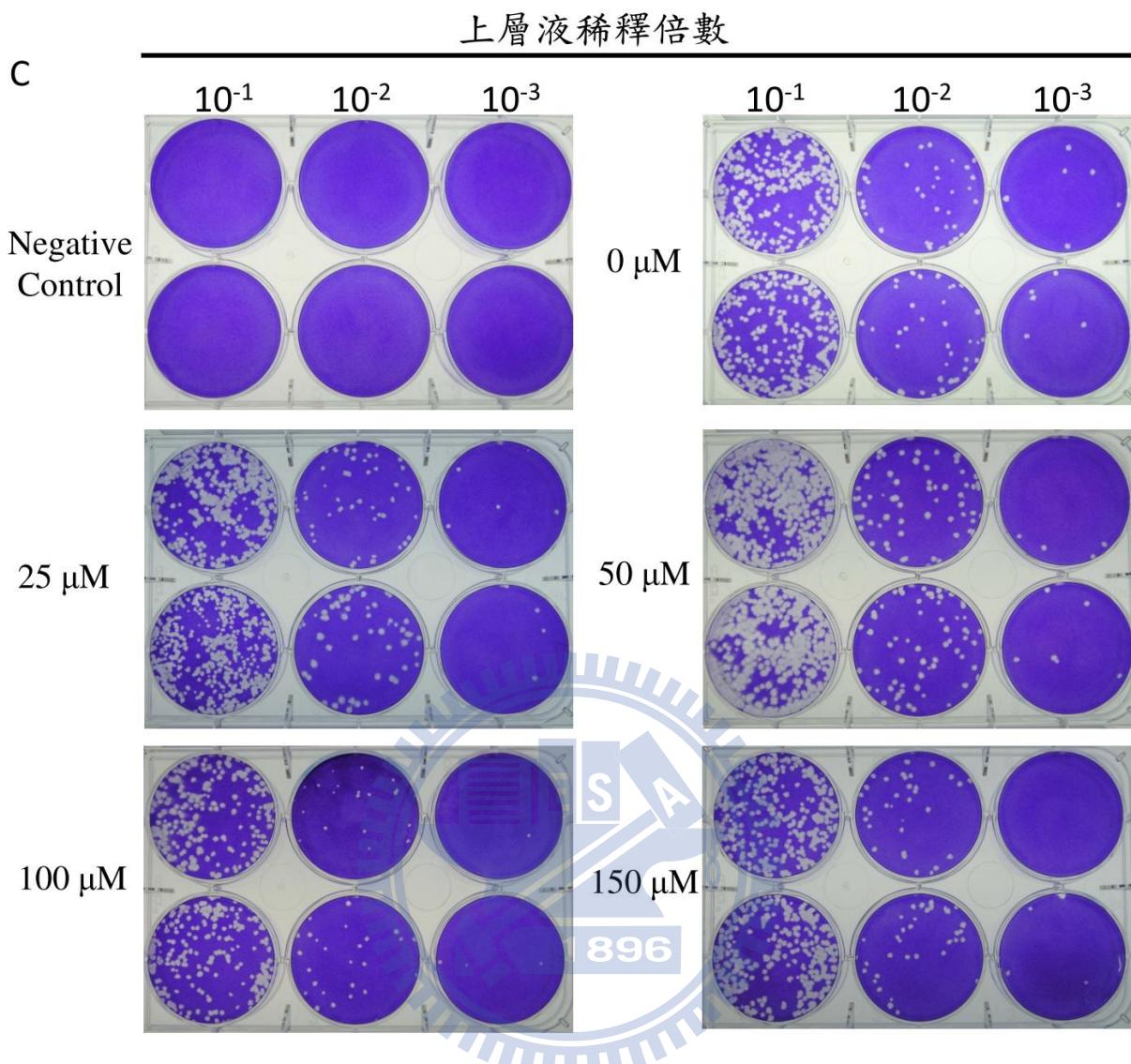
(C) 為具代表性之空斑試驗圖片。negative control 為未加入藥物及病毒之 293T 細胞上層液空斑試驗。

A

Doxycycline	titer (%)	titer (%)	titer (%)	mean	sd	mean±sd
0 $\mu$ M	100	100	100	100	0.0	100±0.0
25 $\mu$ M	261.54	289.35	313.87	288.25	21.38	288.25±21.38
50 $\mu$ M	175.11	330.20	327.82	277.71	72.55	277.71±72.55
100 $\mu$ M	106.95	169.07	220.03	165.35	46.24	165.35±46.24
150 $\mu$ M	75.38	106.28	81.47	87.71	13.36	87.71±13.36

B





圖二十三 Doxycycline 在 293T 細胞中對日本腦炎病毒之影響。

(A) 為 doxycycline 經過病毒產量抑制試驗及空斑試驗後得到之結果整理。將 doxycycline 各濃度培養皿中計數得到的空斑數換算成日本腦炎病毒之效價，並將未加入 doxycycline (0  $\mu$ M) 所得到之效價當做 100 %，計算出加入各濃度 doxycycline 後日本腦炎病毒效價之相對百分比。

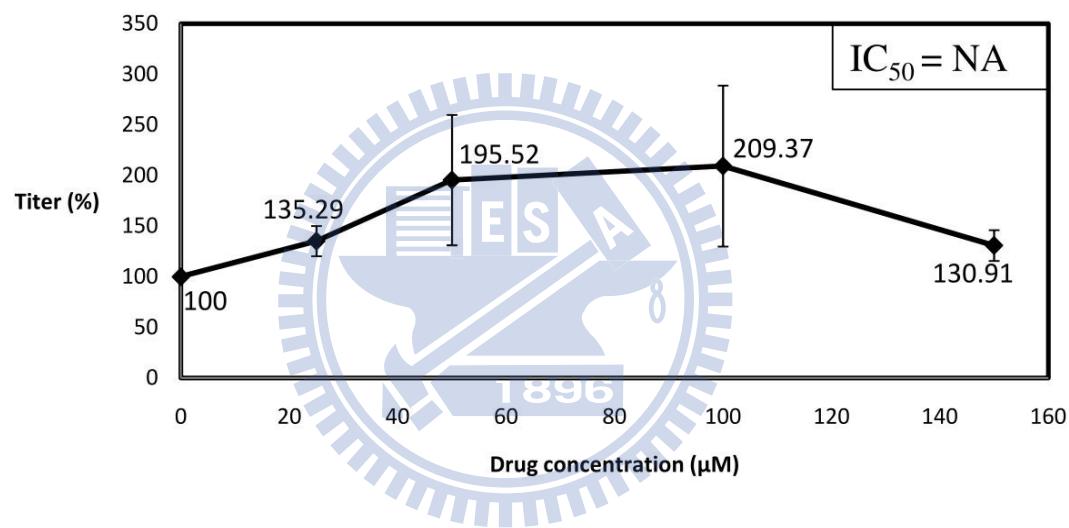
(B) 為相對應之曲線圖。其中橫坐標為藥物濃度，縱座標為效價之百分比，曲線上之數字代表三重複的平均值，NA 代表無法取得。

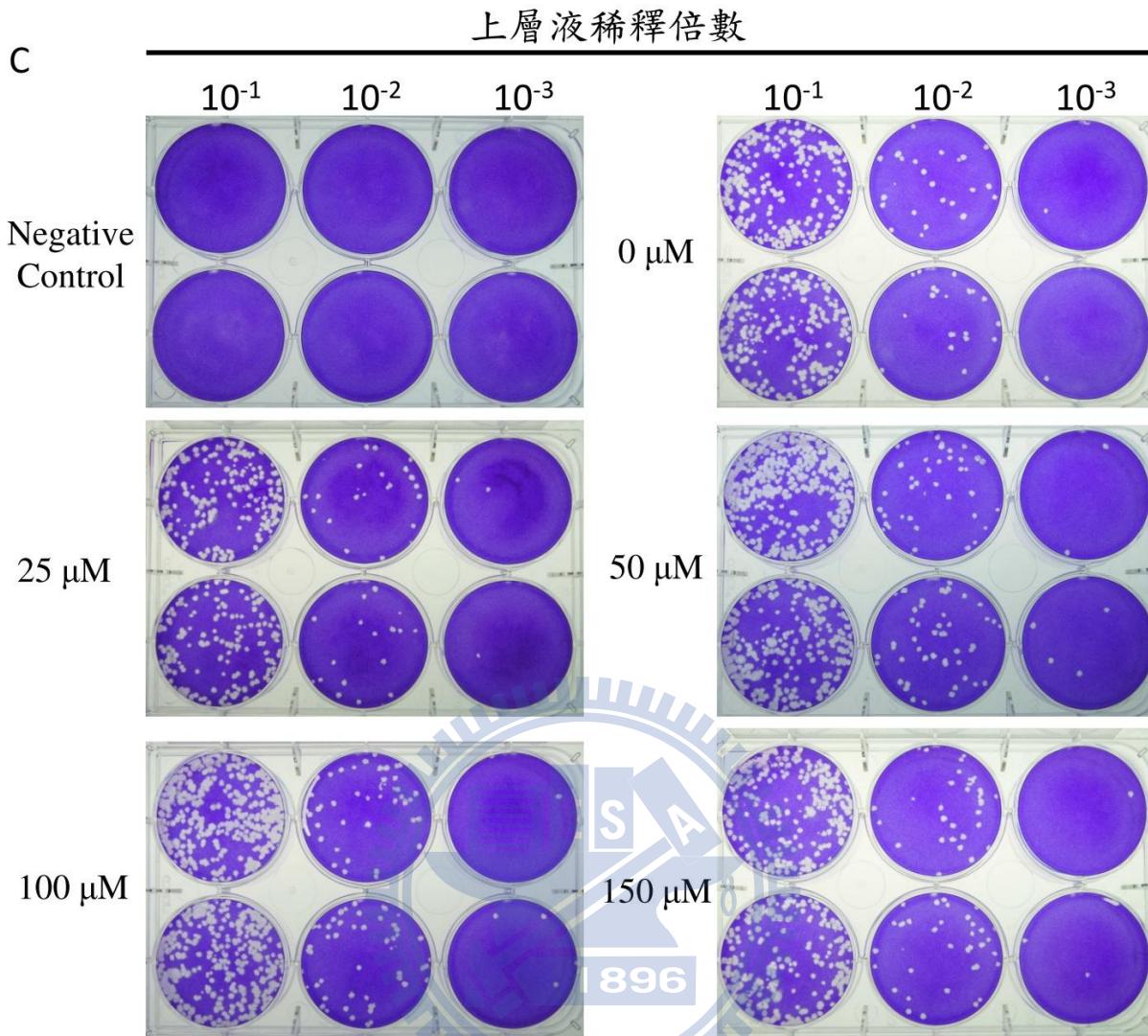
(C) 為具代表性之空斑試驗圖片。negative control 為未加入藥物及病毒之 293T 細胞上層液空斑試驗。

A

Rolitetracycline	titer (%)	titer (%)	titer (%)	mean	sd	mean±sd
0 $\mu$ M	100	100	100	100	0.0	100±0.0
25 $\mu$ M	117.37	153.90	134.59	135.29	14.92	135.29±14.92
50 $\mu$ M	119.72	277.17	189.67	195.52	64.41	195.52±64.41
100 $\mu$ M	126.91	316.82	184.38	209.37	79.52	209.37±79.52
150 $\mu$ M	112.41	149.62	130.71	130.91	15.19	130.91±15.19

B





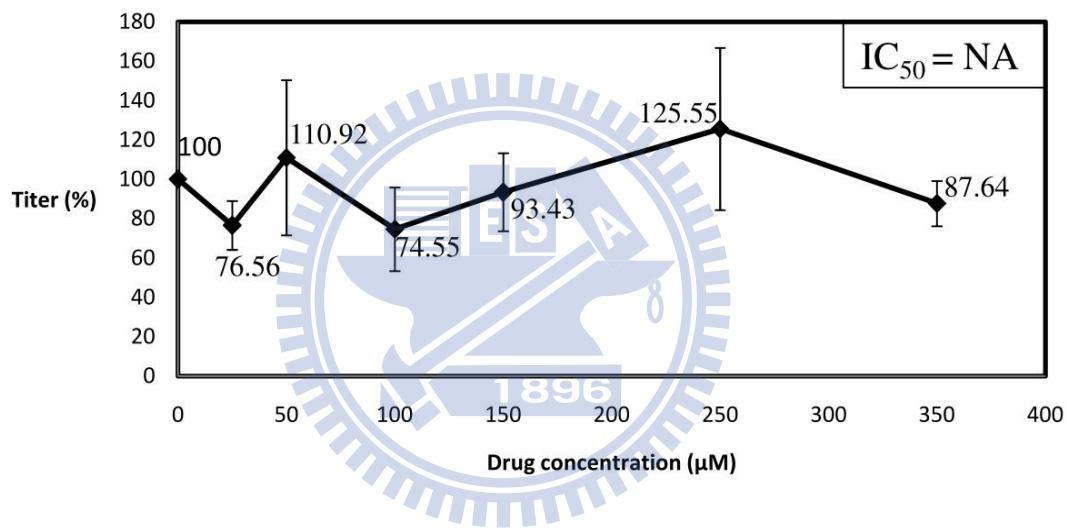
圖二十四 Rolitetracycline 在 293T 細胞中對日本腦炎病毒之影響。

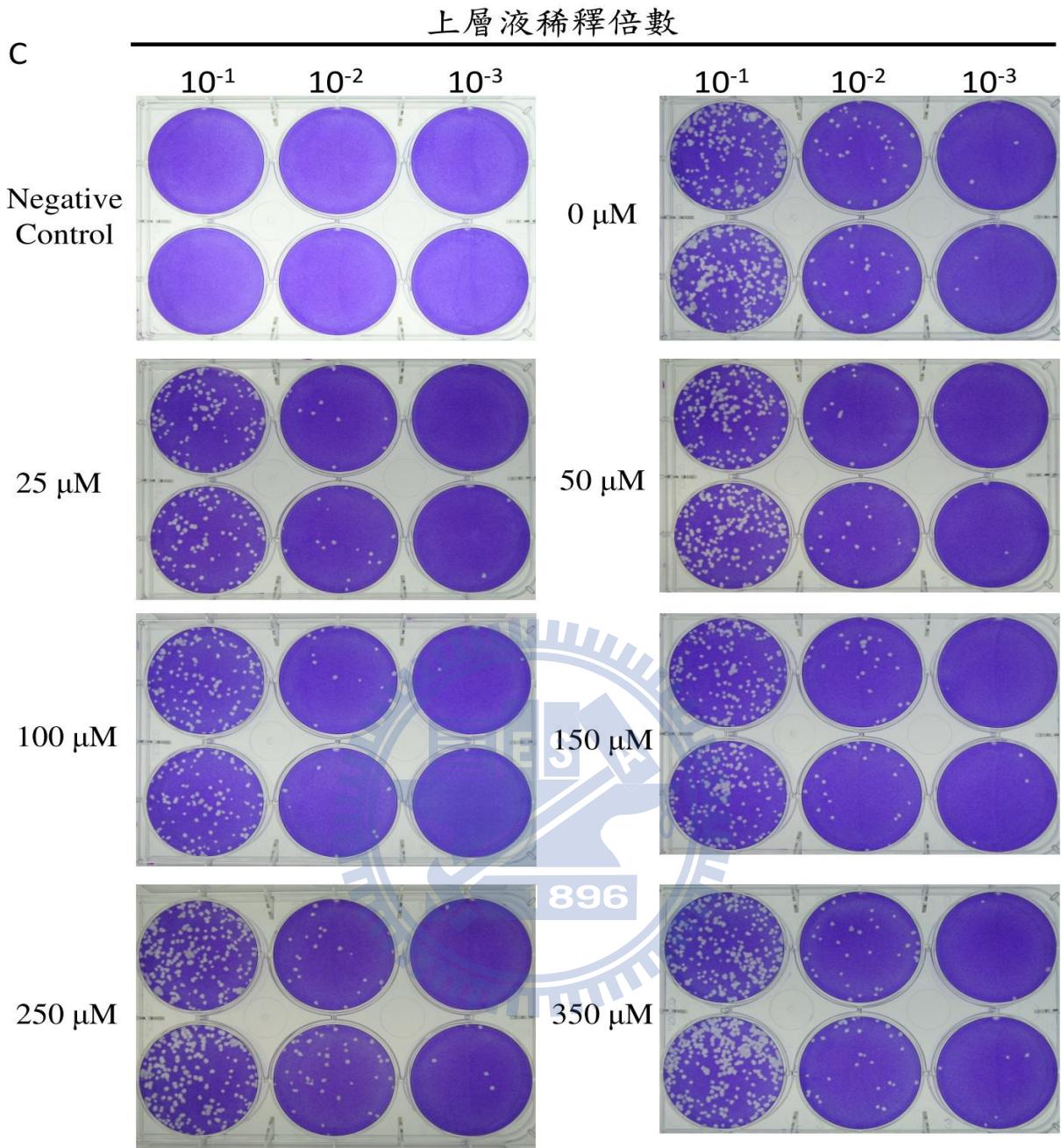
- (A) 為 rolitetetracycline 經過病毒產量抑制試驗及空斑試驗後得到之結果整理。將 rolitetetracycline 各濃度培養皿中計數得到的空斑數換算成日本腦炎病毒之效價，並將未加入 rolitetetracycline ( $0 \mu\text{M}$ ) 所得到之效價當做 100%，計算出加入各濃度 rolitetetracycline 後日本腦炎病毒效價之相對百分比。
- (B) 為相對應之曲線圖。其中橫坐標為藥物濃度，縱座標為效價之百分比，曲線上之數字代表三重複的平均值，NA 代表無法取得。
- (C) 為具代表性之空斑試驗圖片。negative control 為未加入藥物及病毒之 293T 細胞上層液空斑試驗。

A

kanamycin	titer (%)	titer (%)	titer (%)	mean	sd	mean±sd
0 $\mu$ M	100	100	100	100	0.0	100±0.0
25 $\mu$ M	92.39	75.20	62.08	76.56	12.41	76.56±12.41
50 $\mu$ M	102.32	162.94	67.51	110.92	39.43	110.92±39.43
100 $\mu$ M	89.22	89.91	44.53	74.55	21.23	74.55±21.23
150 $\mu$ M	103.13	111.29	65.86	93.43	19.77	93.43±19.77
250 $\mu$ M	106.93	182.64	87.07	125.55	41.18	125.55±41.18
350 $\mu$ M	101.04	72.96	88.93	87.64	11.50	87.64±11.50

B



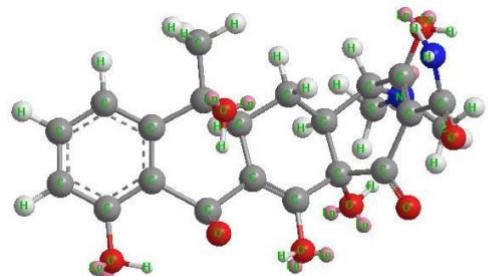


圖二十五 Kanamycin 在 293T 細胞中對日本腦炎病毒之影響。

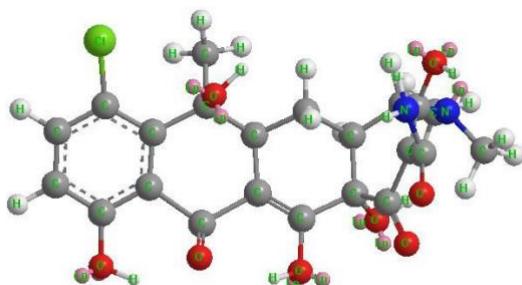
(A) 為 kanamycin 經過病毒產量抑制試驗及空斑試驗後得到之結果整理。將 kanamycin 各濃度培養皿中計數得到的空斑數換算成日本腦炎病毒之效價，並將未加入 kanamycin ( $0 \mu\text{M}$ ) 所得到之效價當做 100%，計算出加入各濃度 kanamycin 後日本腦炎病毒效價之相對百分比。

(B) 為相對應之曲線圖。其中橫坐標為藥物濃度，縱座標為效價之百分比，曲線上之數字代表三重複的平均值。NA 代表無法取得。

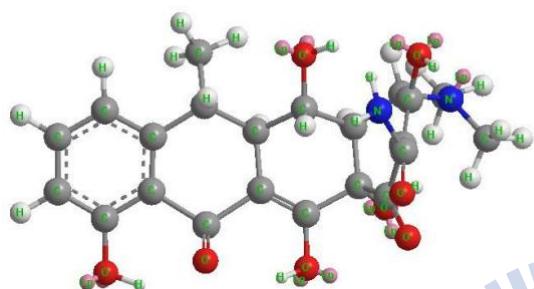
(C) 為具代表性之空斑試驗圖片。negative control 為未加入藥物及病毒之 293T 細胞上層液空斑試驗。



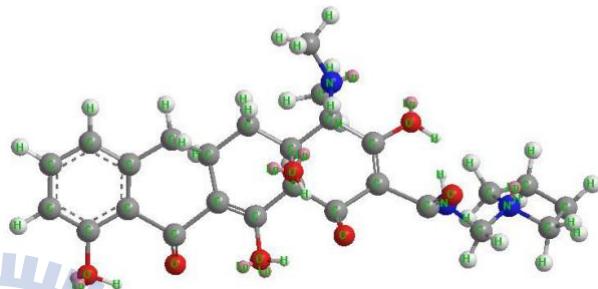
Tetracycline



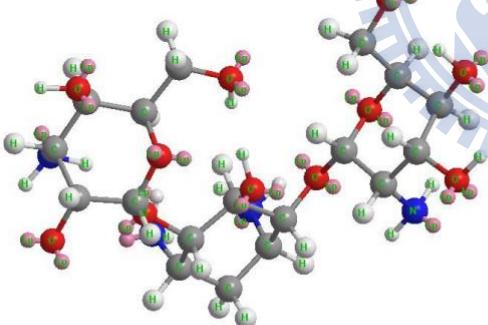
Chlortetraacycline



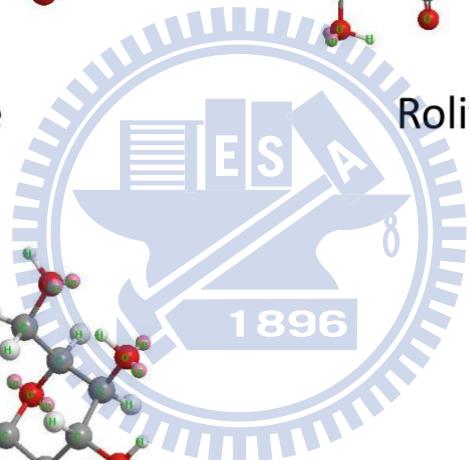
Doxycycline



Rolitetracycline



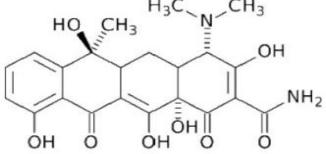
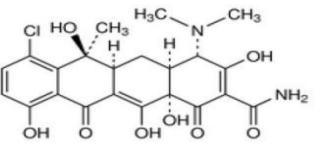
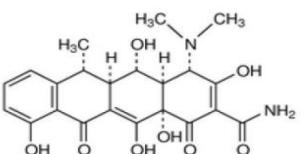
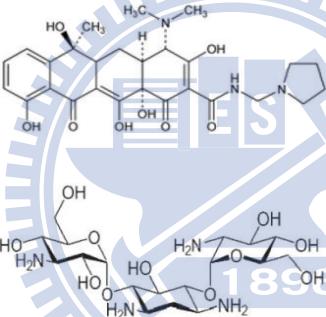
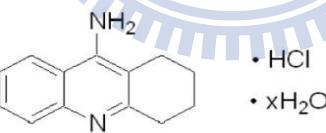
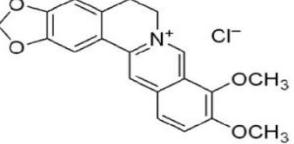
Kanamycin



圖二十六 Tetracycline、Chlortetraacycline、Doxycycline、Rolutetraacycline 及 Kanamycin 之 3D 結構圖。

灰色：碳 (C)；白色：氫 (H)；紅色：氧 (O)；藍色：氮 (N)；綠色：氯 (Cl)；粉紅色：孤對電子 (long pair, Lp)。

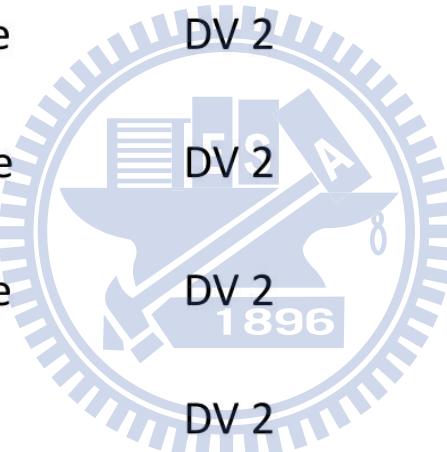
(此圖使用 Chem office 繪製)

Name	Structure	Viral serial type	$IC_{50} (\mu M)^*$
Tetracycline		DV2	228.95
		DV3	166.93
Chlortetracycline		DV2	24.59
		DV3	69.1
Doxycycline		DV2	23.82
		DV3	98.51
Rolutetraacycline		DV2	107.8
		DV3	211.59
Kanamycin		DV2	NA
		DV3	NA
9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridie hydrochloride hydrate		DV2	NA
		DV3	NA
Berberine		DV2	NA
		DV3	NA

附表一 Tetracycline、Chlortetracycline、Doxycycline、Rolutetraacycline、Kanamycin、9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridie hydrochloride hydrate 及 Berberine 之結構與他們在 BHK-21 細胞中對登革熱病毒之  $IC_{50}$ 。\*此濃度為重新校正計算後之結果（張，2009）

Name：藥物名； $IC_{50}$ ：抑制 50 % 病毒效價時之藥物濃度；NA：無法取得（not applicable）；DV2：dengue virus type 2；DV3：dengue virus type 3。

Name	Viral serial type	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )* in BHK-21
Tetracycline	DV 2	NA
Chlortetracycline	DV 2	99.34
Doxycycline	DV 2	27.23
Rolitetracycline	DV 2	33.49
Demeclocycline	DV 2	NA
Oxytetracycline	DV 2 1896	393.99
Minocycline	DV 2	NA

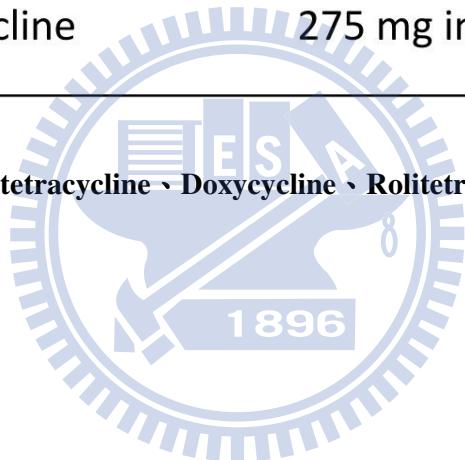


附表二 Tetracycline、Chlortetracycline、Doxycycline、Rolitetracycline、Demeclocycline、Oxytetracycline 及 Minocycline 在 BHK-21 細胞中對登革熱病毒二型之 IC<sub>50</sub>。\*此濃度為重新校正計算後之結果（杜，2007）

Name：藥物名；IC<sub>50</sub>：抑制 50 % 病毒效價時之藥物濃度；NA：無法取得（not applicable）；DV2：dengue virus type 2。

Drug	Dosage
Tetracycline	Intramuscular dose is 250 mg daily
Chlortetracycline	The usual oral dose is 250 mg every 6 hours
Doxycycline	An oral dose is 100 mg twice daily
rolitetracycline	275 mg intravenously daily

附表三 Tetracycline、Chlortetracycline、Doxycycline、Rolutetraacycline 在人體內使用之濃度 (MICROMEDEX )

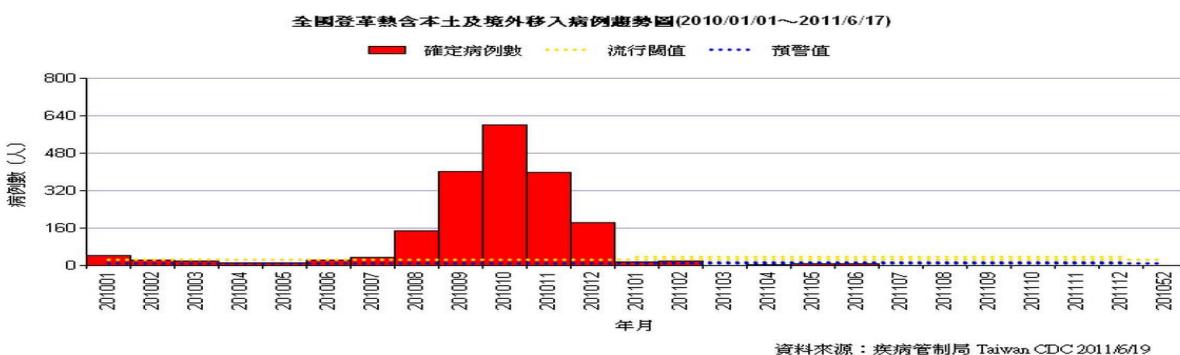
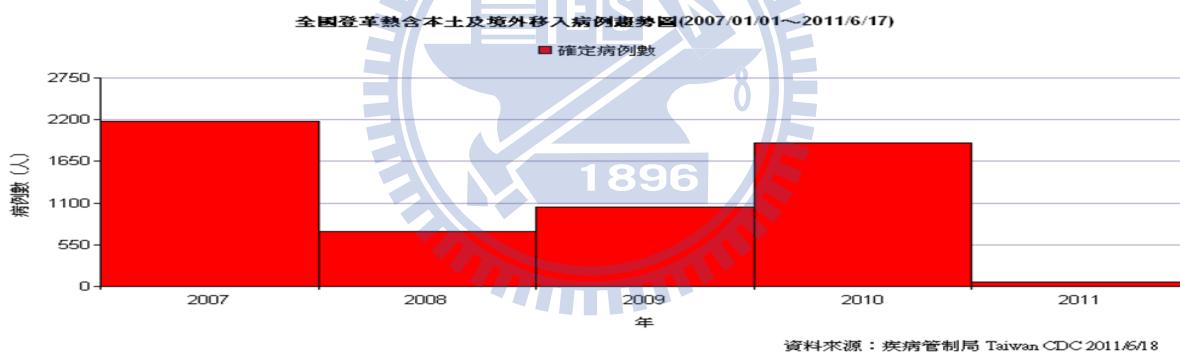




[Visit the CDC Dengue Page](#)

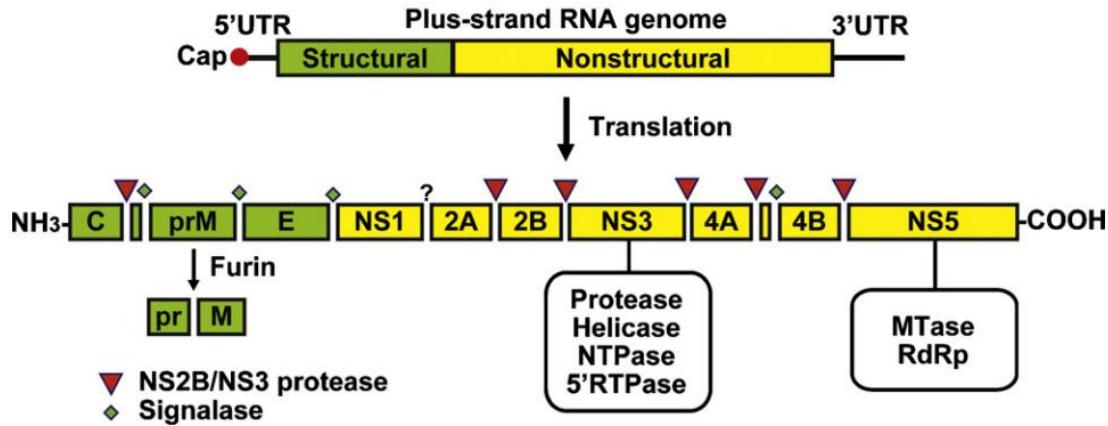


附圖一 登革熱病毒在世界的分布。(美國疾病管制局，CDC, USA)



附圖二 2007 年至 2011 年六月台灣登革熱病例數及 2010 年 1 月至 2011 年 6 月登革熱病例發生數。(台灣疾病管制局, CDC Taiwan, <http://www.cdc.gov.tw/>)

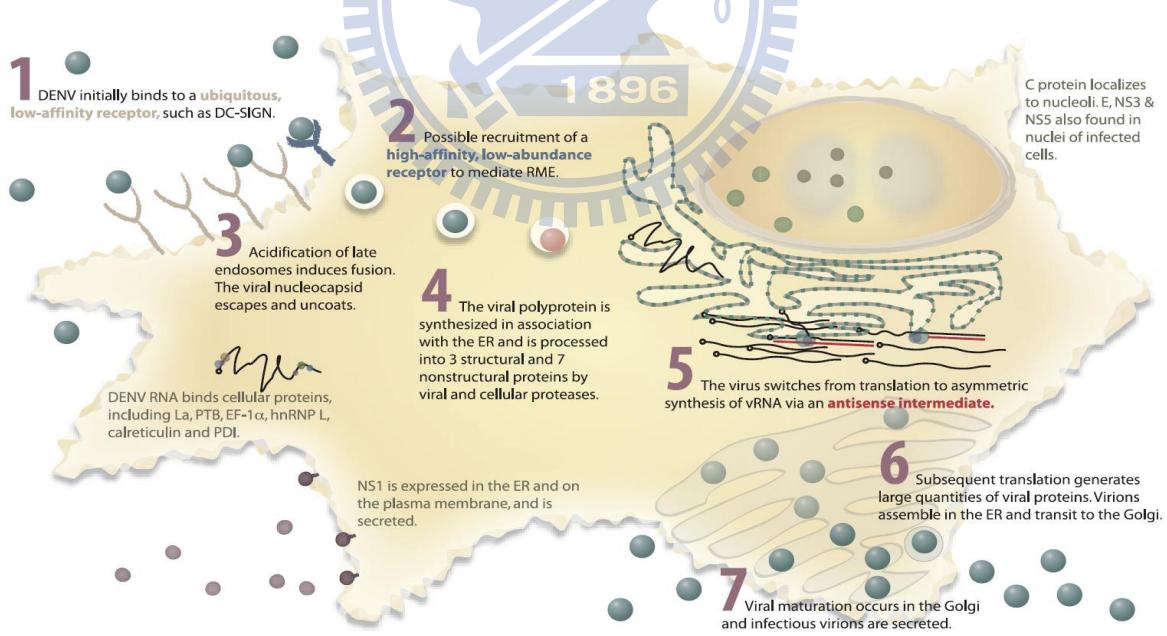
## Flavivirus RNA genome and polyprotein



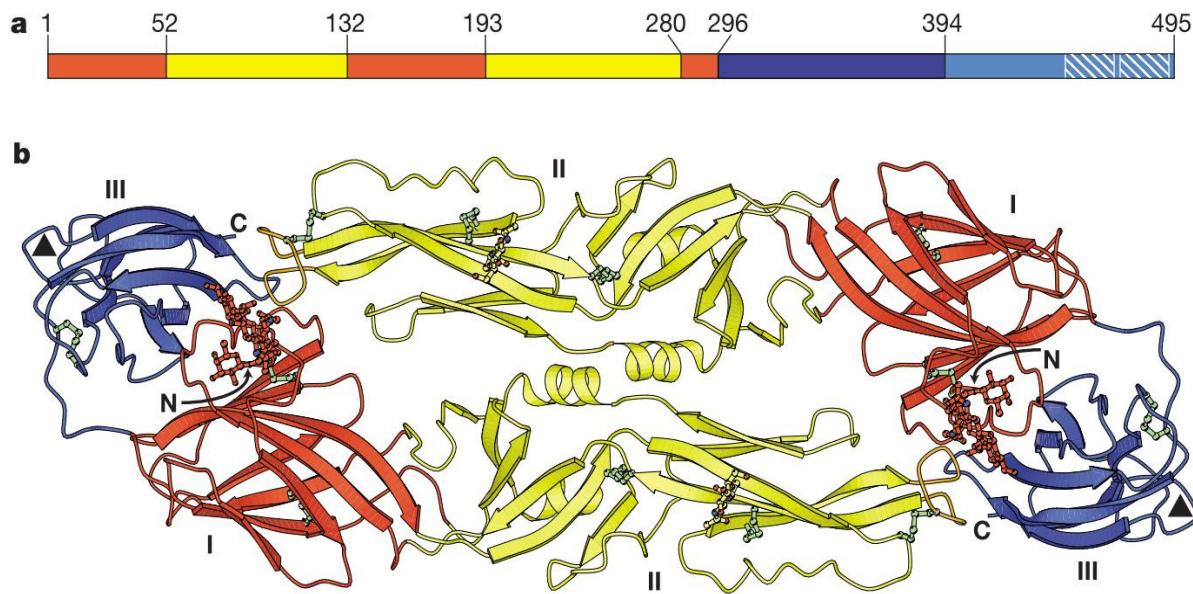
附圖三 黃質病毒基因體示意圖及病毒、宿主細胞蛋白酵素作用位置。

( Sampath *et al.*, 2009 )

登革熱病毒屬於黃質病毒，其基因體為全長約 11 kb 的正向單股 RNA 病毒，只有一個 open reading frame，轉譯出的多肽鏈經由病毒及宿主細胞蛋白酵素作用成十個獨立蛋白：衣殼蛋白 ( capsid protein, C )、前驅膜蛋白 ( precursor membrane protein, prM )、外膜蛋白 ( envelope protein, E )、NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 及 NS5。



附圖四 登革熱病毒在宿主細胞內的複製史。( Clyde *et al.*, 2006 )



附圖五 登革熱病毒外膜蛋白結構示意圖。( Modis et al., 2004 )

其中 domain I : 1-52、133-192、275-296 的胺基酸 ( 紅色 ), domain II : 53-132、193-274 的胺基酸 ( 黃色 ), domain III : 297-394 的胺基酸 ( 藍色 )



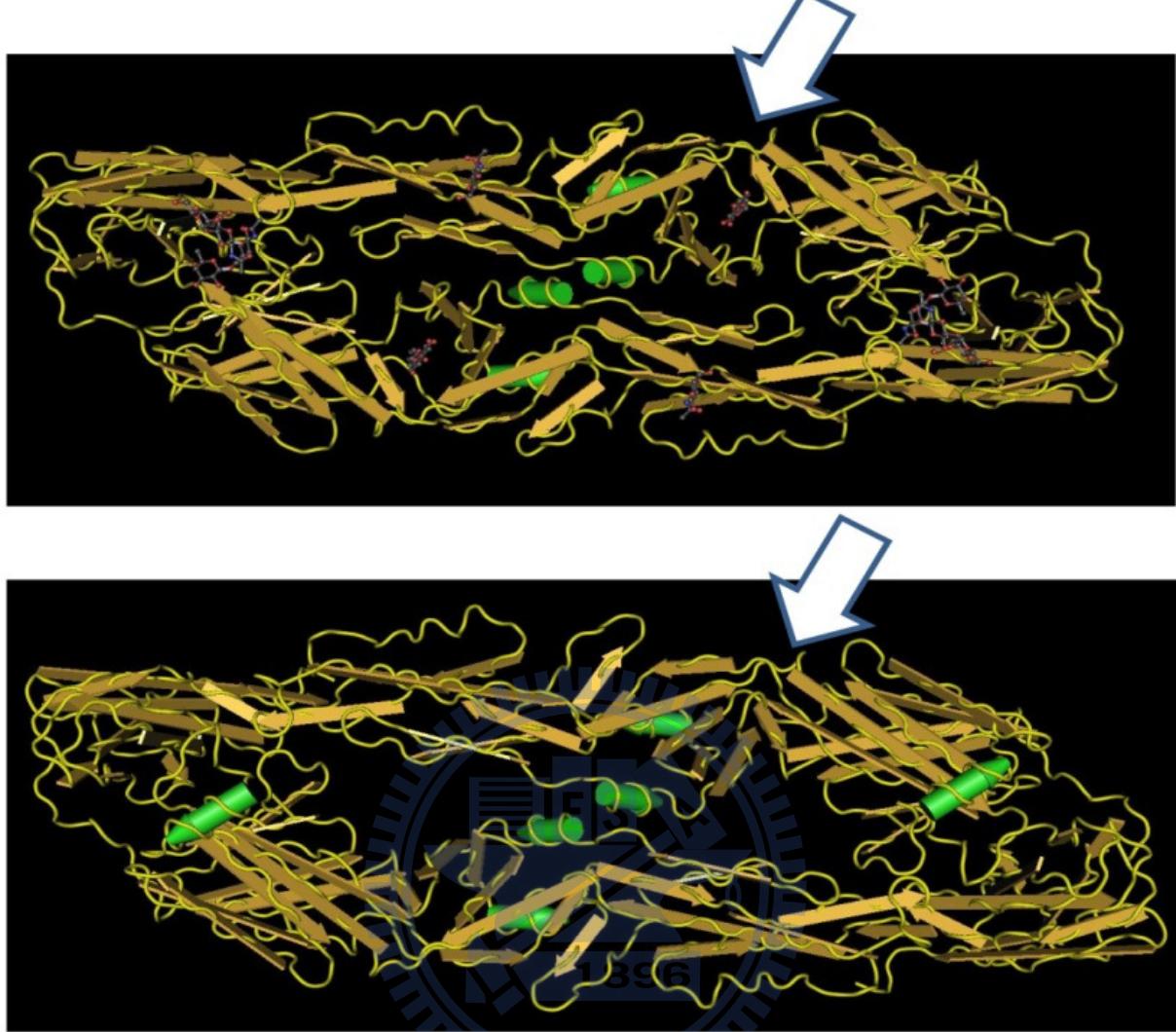
附圖六 日本腦炎外膜蛋白示意圖。( NCBI )

其中 domain I : 1-57、122-222、268-298 的胺基酸 ( 粉紅色 ), domain II : 58-121、223-267 的胺基酸 ( 藍色 ), domain III : 299-406 的胺基酸 ( 褐色 )

Score = 498 bits (1282), Expect = 2e-145, Method: Compositional matrix adjust.  
 Identities = 238/504 (47%), Positives = 326/504 (65%), Gaps = 15/504 (3%)

DV2	PL046	1	MRCIGISNRDFVEGVSGGSWVDIVLEHGSCVTMAKNKPTLDFELIKTEAKQLATLRKYC C+G+ NRDF+EG SG +WVD+VLE SC+T MA +KPTLD +I EA QLA +R YC	60
JEV	RP9	1	FNCLGMGNRDFIEGASGATWVDLVLEGDSCLTIMANDKPTLDVRMINIEASQLAEVRSYC	60
DV2	PL046	61	IEAKLTNTTIESRCPTQGEPSLNEEQDKRFVCKHSMVDRGWGNGCGLFGKGGIVTCAMFT A +T+ +T +RCPT GE + D +VCK DRGWGNGCGLFGKG I TCA F+	120
JEV	RP9	61	YHASVTDISTVARCPTTGEAHNEKRADSSYVCKQGFTDRGWGNGCGLFGKGSIDTCAKFS	120
DV2	PL046	121	CKKNMEGKIVQOPENLEYTIVITPH---SGEEHAVGNDTGKHG---KEIKITPQSSITEA C G+ +QOPEN++Y + I H + E H GN + + G + ITP +	173
JEV	RP9	121	CTSKAIGRTIQOPENIKYEVGIFVHGTTSENH--GNYSAQVGASQAAKFTITPNAPSITL	178
DV2	PL046	174	ELTGYGTVTMECSPTGLDFNEMVLLQMEKAWLVRQWFLDLPLPWLPAGDTQGSNWIQ +L YG VT++C PR+GL+ ++ + K++LVHR+WF DL LPW + T W	233
JEV	RP9	179	KLGDYGEVTLDCPRSLNTEAFYVMTVGSKSFLVHREWFDLALPWTSPSSTA---WRN	235
DV2	PL046	234	KETLVTFKNPHAKKQDVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQMSSGNLLFTGHLKCRLRMDKLQ +E L+ F+ HA KQ VV LGSQEG +H AL GA ++ SS L +GHLKCRL+MDKL	293
JEV	RP9	236	RELLMEFEEAHATKQSVVALGSQEGGLHQALAGAIVVEYSSSVKLTSGHLKCRLKMDKLA	295
DV2	PL046	294	LKGMSYSMCTGKFVVKEIAETQHGTIVVRVQYEGDGSPCKIPF-EIMDLEKRHVGLRI LKG +Y MCT KF K A+T HGT+V+ + Y G PCKIP + L +GRL+	352
JEV	RP9	296	LKGTTYGMCTEKFSAKNPADTGHTVVIELSYSGSDGPCKIPIVSVASLNMDTPVGR LV	355
DV2	PL046	353	TVNPIV--TEKDSPVNIEAEPFGDSYVIIGVEPGQLKLNWFKKGSSIGQMFETTMRGAK TVNP V + +S V +E EPPFGDSY+++G Q+ +W K GS++G+ F TT++GA+	410
JEV	RP9	356	TVNPVFATSSANSKVLVEMEPPFGDSYIIVVGRGDKQINHHWHKAGSTLGKAFSTTLKGAQ	415
DV2	PL046	411	RMAILGDTAWDFGSLGGVFTSIGKALHQVFGAIYGAAFSGVSWTMKILIGVIITWIGMNS R+A LGDTAWDFGS+GGVF SIGKA+HQVFG + F G+SW + L+G ++ W+G+N+	470
JEV	RP9	416	RLAALGDTAWDFGSIGGVFNSIGKAVHQVFGGAFRRTLFGGMSWITQGLMGALLWMGVNA	475
DV2	PL046	471	RSTSLSVSLVLGVVVTLYLGVVQ 494	
JEV	RP9	476	RDRSIALAFLATGGVLVFLATNVH 499	

附圖七 登革熱病毒二型外膜蛋白與日本腦炎外膜蛋白胺基酸序列比較。(NCBI , BLAST)



附圖八 登革熱病毒二型外膜蛋白與日本腦炎外膜蛋白比較。( NCBI )

上圖為登革熱病毒二型外膜蛋白 ( PDB ID : 1OKE , MMDB ID : 24349 ) , 下圖為日本腦炎外膜蛋白 ( PDB ID : 3P54 , MMDB ID : 87213 ) 。箭頭為 domain I 與 domain II 之間的區域。

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure>