

中華民國第四十六屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 生物(生命科學)科

佳作

040714

口蹄疫病毒鞘蛋白 VP1 在細胞造成之訊息傳遞及其影響

學校名稱： 臺北市立第一女子高級中學

作者： 高二 曾思宜	指導老師： 胡苓芝
---------------	--------------

關 鍵 詞：Integrin、Gytokine、Akt

作品名稱：口蹄疫病毒鞘蛋白 VP1 在細胞造成之訊息傳遞及其影響

壹、摘要：

經前人實驗研究已知在大腸桿菌內表現的口蹄疫病毒（FMDV）鞘蛋白 VP1，能在老鼠及人類的癌細胞內引起細胞凋亡（apoptosis），並且活化老鼠的巨噬細胞。

本實驗利用 RNA 干擾（RNA interference）技術成功抑制人類乳癌細胞 T-47D 膜上插入蛋白 integrin $\beta 1$ 的基因表現，經由細胞活性的測試，發現不表現 integrin $\beta 1$ 的細胞在經 VP1 處理過後，存活率會提高；綜合前人研究，推知 VP1 在 T-47D 內的訊息傳導路徑，可能是先藉由與細胞膜表面的 integrin 結合，接著抑制下游蛋白 Akt 的活性，最後啟動細胞凋亡的機制。而在老鼠巨噬細胞 RAW264.7 中，VP1 會使 pAkt 的表現量增加，故推測 VP1 在 RAW264.7 中造成的細胞凋亡，可能不是經由抑制 Akt 的路徑。

另由反轉錄聚合酶連鎖反應（RT-PCR）偵測 VP1 與巨噬細胞中細胞激素（cytokine）釋放的實驗發現，VP1 可在老鼠巨噬細胞 J744A 和 RAW264.7 中引發 interleukin- 1α 、interleukin- 1β 、interleukin-6 以及 interleukin-12 等介白素的釋放，具有免疫方面的生理意義。

貳、研究動機

口蹄疫病毒 (Foot-and-Mouth Disease Virus ; FMDV) 屬於小 RNA 病毒科 (Picornaviridae) 口瘡病毒屬 (Aphthovirus)，是偶蹄類動物高度傳染性疾病 (口蹄疫) 的病原。其中心遺傳物質由單股正鏈 RNA 構成，約有 8000 個鹼基，可直接作為 mRNA 轉譯成蛋白質^(2,3)。FMDV 外型為正二十面體 (附圖一)，由稱作 P1 的三角狀蛋白質單元構成，P1 又由 VP1、VP2、VP3、VP4 四個蛋白質組成 (附圖二)，其中 VP1 具有抗原性，可使宿主體內產生抗體。而 VP1 上的一段胺基酸序列 Arg-Gly-Asp (RGD) 部位可與細胞表面的膜蛋白進行結合，加速病毒進入宿主細胞。

經由過去的實驗發現⁽⁷⁾，轉殖於大腸桿菌表現並經由純化技術得到的重組 VP1，可以在倉鼠腎細胞 BHK-21、人類胸腺癌細胞 MCF-7 和攝護腺癌細胞 PC-3 與 22Rv1 引起 DNA 的聚集與碎裂的現象，進而導致細胞凋亡 (計畫性細胞死亡，apoptosis)，具有抗癌效果 (附圖三、四)。但若加入如抗體或纖網蛋白 (fibronectin) 等可與 VP1 競爭插入 integrin 蛋白的物質，或者直接在細胞內表現 VP1，皆不會造成細胞凋亡的現象，所以可推知 VP1 是由與細胞膜表面 integrin 結合的方式進行其訊息傳導，目前猜測其路徑為 Akt/GSK-3 β /caspase pathway。此外，VP1 尚可以在老鼠巨噬細胞 J744A 內造成活化反應 (附圖五)，使其釋放出細胞激素 (cytokine)。

本實驗主要以 VP1 與細胞膜結合的機制、與下游蛋白 Akt 的交互作用、活化巨噬細胞產生的 cytokine 及其生理意義為研究內容。

參、研究目的

- 一、找出 VP1 與細胞膜結合的機制。
- 二、研究 VP1 對細胞凋亡之相關蛋白 Akt (protein kinase B ; PKB) 活性的調控。
- 三、探討 VP1 對巨噬細胞活化的影響及其生理意義。

肆、研究設備及器材

一、儀器

高速離心機 (MX-307, TOMY)
光電二極體分光光度計 (S2100, Biowave)
真空濃縮機
可梯度聚合酶鏈鎖反應器 (Thermo Hybaid)
DNA 電泳槽 (ADVANCE)
DNA 照相分析儀 (IP-008-SD, VIO GENE)
SDS-PAGE 鑄膠器 (SE245, Hoefer)
蛋白質電泳槽 (Pharmacia Biotech)
半乾式西方墨點法轉印器 (BIO-RAD)
震盪器 VORTEX-GENE 2
ELISA 光譜儀

二、材料

(一) 生物材料

rVP1 from *E. coli*

T-47D cell (人類乳癌細胞)

RAW264.7 cell (老鼠巨噬細胞)

J744A cell (老鼠巨噬細胞)

pAkt-DA 載體

pAkt-wt 載體

(二) 藥品

RPMI 1640 培養基

MEM 培養基

DMEM 培養基

抗凍劑 DMSO

L-glutamine

Sodium bicarbonate

Glucose

HEPES

Sodium pyruvate

Fetal bovine serum

Bovine insulin

TRIzol reagent

Chloroform

Isopropyl alcohol

DEPC-water

Ethanol

Nuclease free H₂O

Reaction mix

Enhancer mix

Enzyme mix

Agarose

TAE buffer

DNA loading dye

Gen-KB DNA ladder LC

InstantSTAINTM Ethidium Bromide (EtBr)

Opti-MEMI

Lipofectamine 2000

30% acrylamide mix

1.0M Tris (pH6.8 and 8.8)

10% sodium dodecyl sulfate (SDS)

10% ammonium persulfate

TEMED

SDS-PAGE running buffer

SDS sample buffer

Protein Inhibitor

Dithiothreitol (DTT)

Prestained protein ladder

Transfer membrane

Methanol

Western transfer buffer

Blocking buffer

Skin milk

Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS)

Dulbecco's phosphate-buffered saline-tween (PBST)

3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)

3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-dihydroxybenzotetrazolium bromide; Thiazolyl blue (MTT)

Color development solution

(三) 引子 (primer)

hIntegrin $\beta 1$ primer 5'端—GTT ACA CGG CTG CTG GTG TT

3'端—CTA CTG CTG ACT TAG GGA TC

mIntegrin $\beta 1$ primer 5'端—GGT CAG ATC TGC AAT GGC CG

3'端—CCA CGC CTG CTA CAA TTG GG

mIL-1 α primer 5'端—AAA ATC TCA GAT TCA CAA CTG TTC GT

3'端—CTG GAA TTA AAC CCA CTG AGG TAG G

mIL-1 β primer 5'端—CTC CAT GAG CTT TGT ACA AGG

3'端—AGC CCA TAC TTT AGG AAG ACA

mIL-6 primer 5'端—GTT CTC TGG GAA ATC GTG GA

3'端—TGT ACT CCA GGT AGC TAT GG

mIL-12 p40 primer 5'端—CTC ACC TGT GAC ACG CCT GA

3'端—CAG GAC ACT GAA TAC TTC TC

mIL-18 primer 5'端—ACT GTA CAA CCG CAG TAA TAC GG

3'端—AGT GAA CAT TAC AGA TTT ATC CC

mIFN- γ primer 5'端—TGA ACG CTA CAC CAT GCA TCT TGG

3'端—CGA CTC CTT TTC CGC TTC CTG AG

(四) siRNA for hIntegrin $\beta 1$

siRNA 1—AUA AUG UUC CUA CUG CUG ACU UAG G

CCU AAG UCA GCA GUA GGA ACA UUA U

siRNA 2—UAC ACU UAC AGA CAC CAC ACU CGC A

UGC GAG UGU GGU GUC UGU AAG UGU A

siRNA 3—UUU AAU GUA AAU GUC UGU GGC UCC C

GGG AGC CAC AGA CAU UUA CAU UAAA

(五) 抗體

Rabbit anti-integrin β 1

Goat anti-integrin β 1

Anti-rabbit IgG

Anti-mouse IgG

Anti-goat IgG

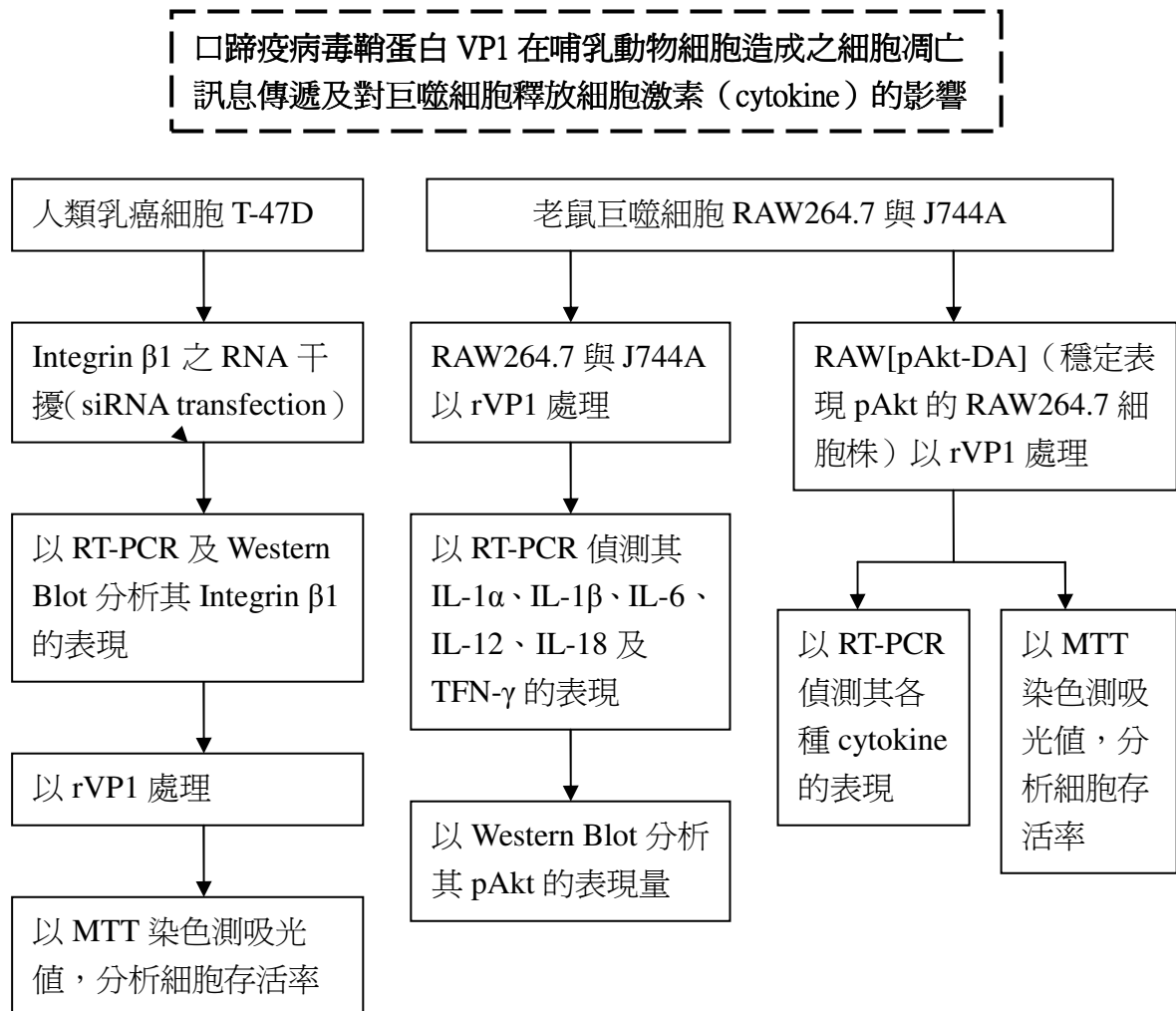
Rabbit anti-pAkt

Rabbit anti-Akt

Mouse anti-actin

伍、研究過程或方法

一、實驗流程圖



二、實驗方法

(一) rVP1 的處理

- 1.將已培養細胞的培養基置於無菌操作台，吸去培養液，用 PBS 清洗細胞，再用 MEM 清洗一到二次。

- 2.加入含所需濃度 rVP1 的 MEM，放置於於 37°C、5% CO₂ 之培養箱內。
- 3.處理完成後移除培養液，用 PBS 清洗細胞後儲存於-80°C。

(二) siRNA Transfection

- 1.將 20 nM siRNA 溶液 20 µl 與 250 µl Opti-MEMI 均勻混合，室溫下放置 5 分鐘。
- 2.同時將 5 µl Lipofectamine 2000 與 250 µl Opti-MEMI 均勻混合，室溫下放置 5 分鐘。
- 3.將 1、2 步驟的溶液均勻混合，室溫下放置 20 分鐘。
- 4.將第 3 步驟的混合液體加入細胞培養基內，再加入 2000 µl Opti-MEMI，於 37°C、5% CO₂ 環境下培養 24-96 小時。

(三) RNA 的萃取

- 1.每 10 平方公分的細胞加 1 ml TRIzol，室溫下放置 5 分鐘。
- 2.取出細胞溶液裝入 tube，加入 0.2 ml chloroform，劇烈搖晃 15 秒，靜置 3 分鐘。
- 3.離心 12000 xg，15 分鐘，4°C。
- 4.取上清液裝入新 tube，加入 0.5 ml isopropyl alcohol 均勻混合，室溫下放置 10 分鐘。
- 5.離心 12000 xg，10 分鐘，4°C。
- 6.移去上清液，加入 1 ml 75% EtOH 於 RNA 沉澱物中。
- 7.離心 7500 xg，5 分鐘，4°C。
- 8.移去上清液，乾燥沉澱物，再用 20-50 µl DEPC-water 溶解。
- 9.用光電二極體分光光度計定量，儲存於-80°C。

(四) 蛋白質的萃取

- 1.每 10 平方公分的細胞加 1 ml TRIzol，室溫下放置 5 分鐘。
- 2.取出細胞溶液裝入 tube，加入 0.2 ml chloroform，劇烈搖晃 15 秒，靜置 3 分鐘。
- 3.離心 12000 xg，15 分鐘，4°C。
- 4.倒掉上清液，加入 0.3 ml 100% ethanol 於下層有機層，室溫下放置 3 分鐘。
- 5.離心 2000 xg，10 分鐘，4°C。
- 6.取上清液裝入新 tube，加入 1.5 ml isopropyl alcohol 均勻混合，室溫下放置 10 分鐘。
- 7.離心 12000 xg，10 分鐘，4°C。
- 8.移去上清液，乾燥沉澱物，加入 2 ml ethanol 溶解之，室溫下放置 20 分鐘。
- 9.離心 7500 xg，5 分鐘，4°C。
- 10.真空乾燥沉澱物 10 分鐘，儲存於-20°C。

(五) 反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction; RT-PCR)

1. 溶液配置

材料	每管份量
nuclease free H ₂ O	26 µl

reaction mix	10 μ l
enhancer mix	10 μ l
primer 5'端及 3'端	各 1 μ l
RNA 溶液	0.5-1 μ g/ μ l
enzyme mix	1 μ l

2.RT-PCR 機器反應：

Reverse Transcription：cDNA 的合成..... 50°C，30 分鐘

RTase inactivation：反轉錄酶的去活性..... 94°C，2 分鐘

Denaturation：將雙股 DNA 分開成兩條單股 DNA..... 94°C，30 秒

Annealing：Primer 的結合..... 55°C，30 秒

Extension：Primer 延伸..... 72°C，1 分鐘
循環 30 次

Extension..... 72°C，7 分鐘
Store at 4°C

（六）DNA 電泳

1.2% Agarose gel 的製作：將 150 ml TAE 加入 3 g agarose，搖勻後微波 1-1.5 分鐘至其完全溶解，注入模中，插 comb，靜置 15 分鐘。

2.取出做好的膠放入電泳槽，加入 TAE 為 buffer。

3.將 DNA 溶液與 dye 以 5：1 比例注入膠中，放入 Gen-KB DNA ladder LC，以 135 V 跑 25 分鐘。

4.EtBr 貼片 5 分鐘。

5.以 DNA 照相分析儀觀測並拍照。

（七）蛋白質電泳

1.SDS-PAGE 的製作：

（1）上膠配置

藥品	份量
ddH ₂ O	9.9 ml
30% acrylamide mix	8.3 ml
1.0M Tris (pH 8.8)	0.25 ml
10% sodium dodecyl sulfate (SDS)	0.01 ml
10% ammonium persulfate	0.04 ml
TEMED	0.004 ml

混合後，注入模中靜置 30 分鐘。

（2）下膠配置

藥品	份量
ddH ₂ O	2.7 ml
30% acrylamide mix	0.67 ml

1.0M Tris (pH 6.8)	0.5 ml
10% sodium dodecyl sulfate (SDS)	0.04 ml
10% ammonium persulfate	0.04 ml
TEMED	0.004 ml

混合後，注入下膠上，插 comb，靜置 5 分鐘。

- 2.蛋白質溶液以 SDS sample buffer 稀釋 2 倍後加入 Protein Inhibitor 及 DTT，放入沸水煮 5 分鐘再冰凍 1 分鐘。
- 3.注入 SDS-PAGE，加 Prestained protein ladder (marker)，140 V 跑 1.5 小時。

(八) 西方墨點法 (Western Blotting)

- 1.先進行 SDS-PAGE 電泳。
- 2.Transferring (將蛋白質轉移到 transfer membrane 上): Transfer membrane 先以 methanol 活化，與 SDS-PAGE 一起放入 Semi-dry transfer cell 中，25 V、200 mA，1.5 小時。
- 3.Blocking: Membrane 放入 5 ml、5% skin milk in PBS 中，室溫下搖晃 30 分鐘。
- 4.用 PBS 洗 10 分鐘。
- 5.以正確比例加入 first antibody 與 5% skin milk in PBST，與 membrane 一起放入塑膠膜套中，搖晃，4°C，16 小時。
- 6.用 PBST 洗 10 分鐘，3 次。
- 7.以正確比例加入 second antibody 與 5% skin milk in PBST，與 membrane 一起放入塑膠膜套中，室溫下搖晃 2 小時。
- 8.用 PBST 洗 10 分鐘，3 次。
- 9.加入 TMB 呈色。

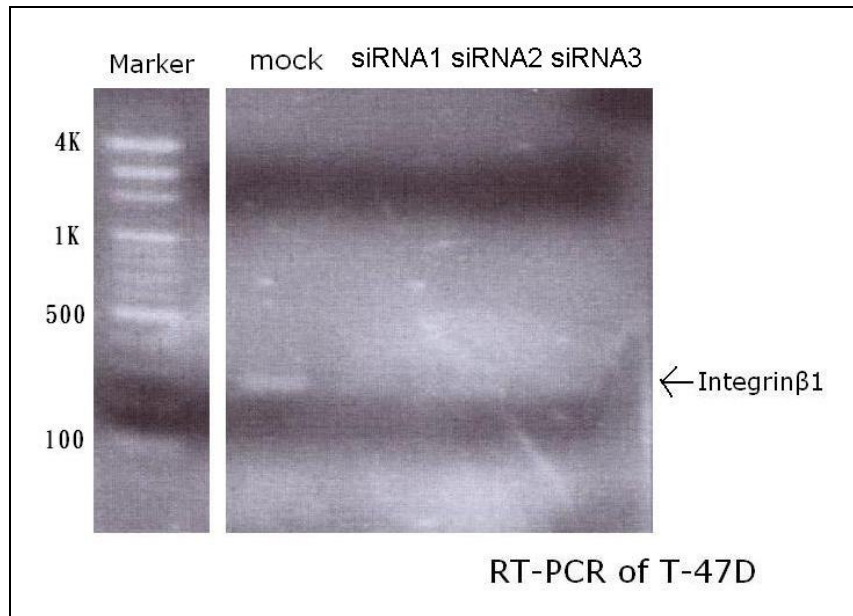
(九) 細胞活性測試 (MTT Assay)

- 1.用 pH 值 7.4 的 PBS 清洗細胞。
- 2.加入 0.1 ml 0 % serum DMEM。
- 3.加入 50 mg/vial 的 MTT 及 10 μ l 的 PBS，均勻混合，37°C 放 4 小時。
- 4.把細胞溶液移到新培養基裡，加入 0.1 ml 的 color development solution，均勻混合後把溶液移回原處。
- 5.放置觀察 1 小時，把溶液 (此時呈現紫色) 移到 ELISA 光譜儀下，以波長 570 nm 測量其吸光值並紀錄之，吸光值越高即代表細胞存活量越大。

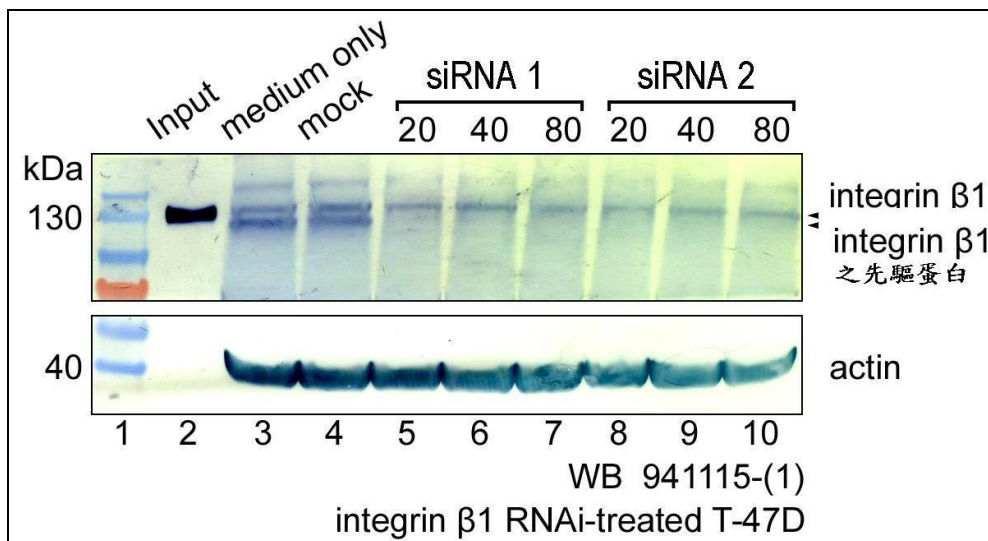
陸、研究結果

一、利用 RNA interference 技術可以抑制 T-47D 細胞表現 integrin β 1

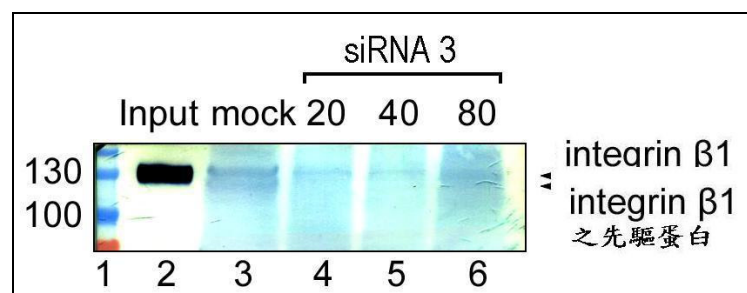
將不同濃度 (20 nM、40 nM、80 nM) 的三種 siRNA 序列送入 T-47D 細胞 2 天後，萃取 RNA 進行 RT-PCR，從電泳圖中可看出 integrin β 1 的 mRNA 表現已消失 (圖一)；而萃取其蛋白質做 Western Blotting，也可以看出 integrin β 1 之先驅物已經成功地停止表現了 (圖二、圖三)，顯示三種 siRNA 皆有效抑制 integrin β 1 表現。



圖一：利用 RNA interference 技術抑制 T-47D 細胞產生 integrin β 1 的 mRNA
 （註 1：mock 為未經任何處理的原細胞。）



圖二：利用 siRNAi 1 及 siRNAi 2 抑制 T-47D 細胞表現 integrin β 1 的先驅蛋白質



圖三：利用 siRNAi 3 抑制 T-47D 細胞表現 integrin β 1 的先驅蛋白質

二、經 RNAi 處理的 T-47D 細胞在加入 VP1 之後的有較高的存活率

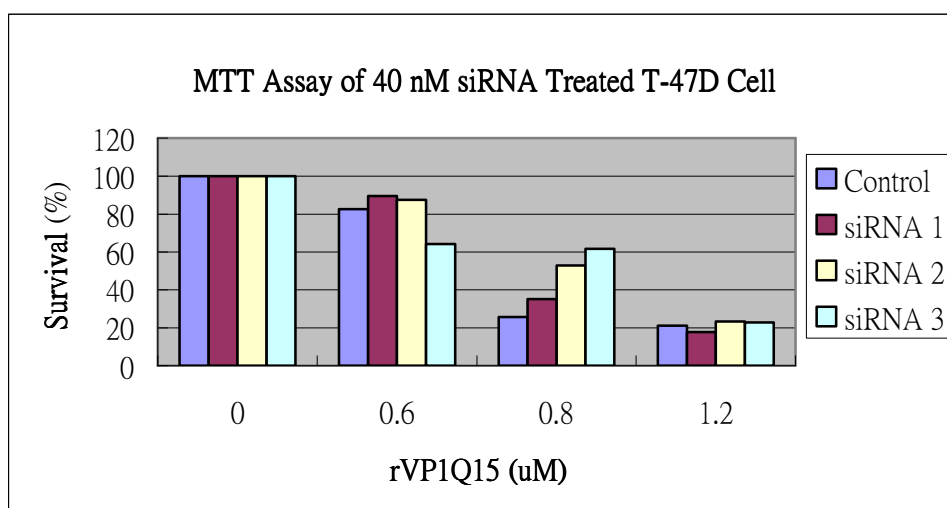
將經由 siRNA 處理 2 天(不表現 integrin $\beta 1$)的 T-47D 細胞再以不同濃度 VP1 處理，以 MTT 實驗測試其細胞的活性，可發現當 VP1 濃度在 0.6 μM 及 0.8 μM 時，加入 siRNA 的細胞其吸光數值較大(表一、表二)，代表沒有表現 integrin $\beta 1$ 的細胞存活率較一般細胞為高(圖四、圖五)。

表一：經 RNAi 處理的 T-47D 細胞在加入 VP1 之後進行細胞活性測試(MTT)的結果

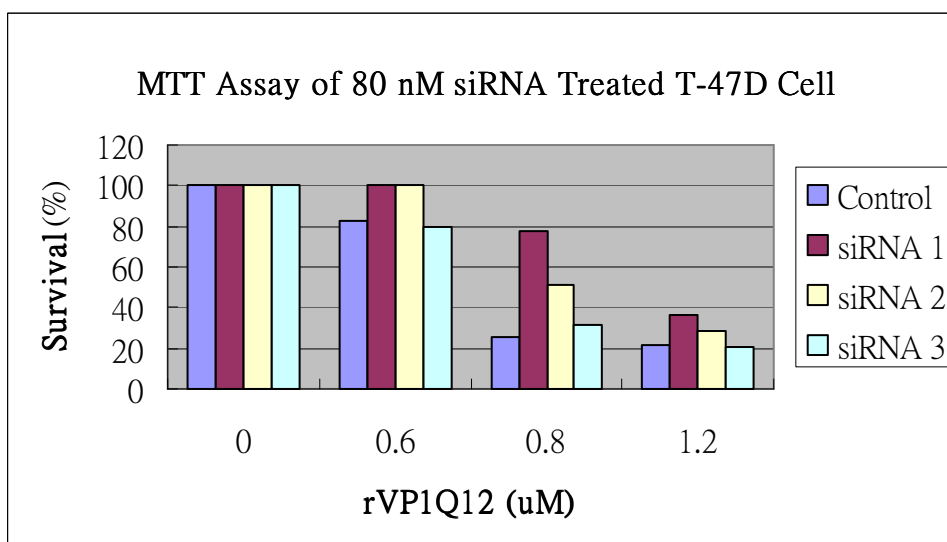
MTT Assay of T-47D cell (1)			
rVP1Q15 (uM)	0	0.8	1.2
10% FBS	1.15	0.274	0.178
control 1	1.249	0.265	0.2
control 2	1.31	0.396	0.342
RNAi 1 20 nM	1.269	0.271	0.084
RNAi 1 40 nM	1.305	0.459	0.231
RNAi 1 80 nM	0.918	0.712	0.333
RNAi 2 20 nM	1.255	0.15	0.085
RNAi 2 40 nM	1.189	0.623	0.28
RNAi 2 80 nM	0.898	0.455	0.254
RNAi 3 20 nM	1.241	0.557	0.333
RNAi 3 40 nM	1.038	0.639	0.237
RNAi 3 80 nM	1.247	0.39	0.261

表二：經 RNAi 處理的 T-47D 細胞在加入 VP1 之後進行細胞活性測試(MTT)的結果

MTT Assay of T-47D cell (2)			
rVP1Q15 (uM)	0	0.6	0.8
10% FBS	1.739	1.381	0.999
control 1	2.023	1.672	1.197
opti-MEM	2.107	1.496	0.855
RNAi 1 20 nM	2.281	2.302	1.278
RNAi 1 40 nM	2.318	2.074	1.251
RNAi 1 80 nM	1.875	2.542	0.643
RNAi 2 20 nM	2.021	1.786	1.312
RNAi 2 40 nM	2.245	1.964	1.325
RNAi 2 80 nM	1.877	2.59	0.208
RNAi 3 20 nM	1.726	1.598	1.112
RNAi 3 40 nM	1.959	1.255	0.812
RNAi 3 80 nM	1.969	1.565	0.997



圖四：經由 40 nM siRNA 處理後的 T-47D 細胞在加入 VP1 之後的存活率



圖五：經由 80 nM siRNA 處理後的 T-47D 細胞在加入 VP1 之後的存活率

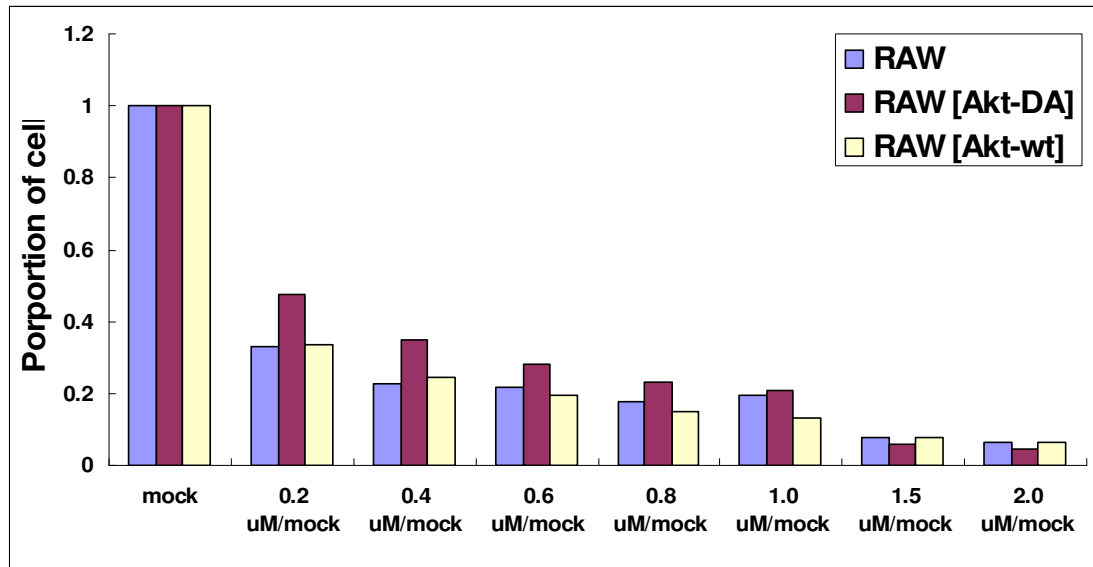
三、穩定表現有活性 Akt 蛋白質 (pAkt) 的 RAW264.7 細胞，在 VP1 處理後有較高的存活率

將 pAkt-DA、pAkt-wt 送入 RAW264.7 細胞內 (pAkt-DA 為可產生持續有活性的 Akt 之載體；而 pAkt-wt 為可產生正常 Akt 的載體)，並篩選出穩定表現 pAkt-DA 與 pAkt-wt 的細胞株，在加入 VP1 六小時後，進行 MTT 實驗測試細胞活性，結果顯示出在 0.2-1 μ M 時 RAW[pAkt-DA] 的吸光數值較大 (表三)，代表 RAW[pAkt-DA] 的存活率，比一般細胞以及 RAW[pAkt-wt] 為高 (圖六)。

表三：穩定表現有活性 Akt 蛋白質的 RAW264.7 細胞進行細胞活性測試 (MTT) 的結果

MTT Assay of RAW264.7 cell									
rVP1Q15 (uM)	mock	mock	mock	Akt-DA	Akt-DA	Akt-DA	Akt-wt	Akt-wt	Akt-wt
0	0.755	0.909	0.841	1.456	1.247	1.357	1.079	1.096	1.169
0.2	0.274	0.298	0.261	0.673	0.646	0.61	0.381	0.542	0.474

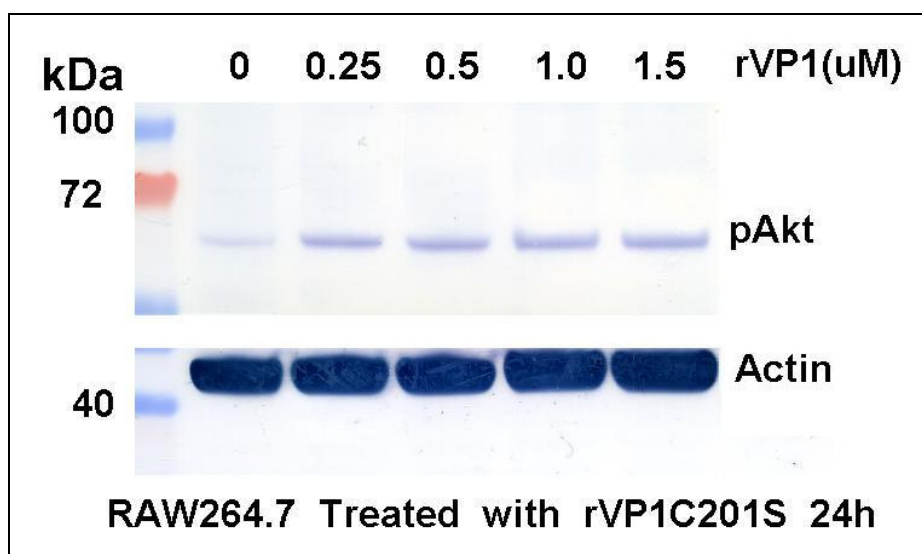
0.4	0.183	0.184	0.197	0.452	0.473	0.486	0.308	0.336	0.233
0.6	0.179	0.173	0.192	0.365	0.383	0.39	0.242	0.2	0.215
0.8	0.131	0.142	0.168	0.269	0.331	0.333	0.159	0.165	0.169
1	0.159	0.172	0.157	0.288	0.293	0.272	0.177	0.179	0.168
1.5	0.066	0.064	0.067	0.086	0.08	0.08	0.104	0.082	0.073
2	0.054	0.053	0.053	0.061	0.06	0.061	0.057	0.057	0.056



圖六：穩定表現有活性 Akt 蛋白質的 RAW264.7 細胞，在 VP1 處理後有較高的存活率

四、加入 VP1 的 RAW264.7 其 pAkt 的表現量會增加

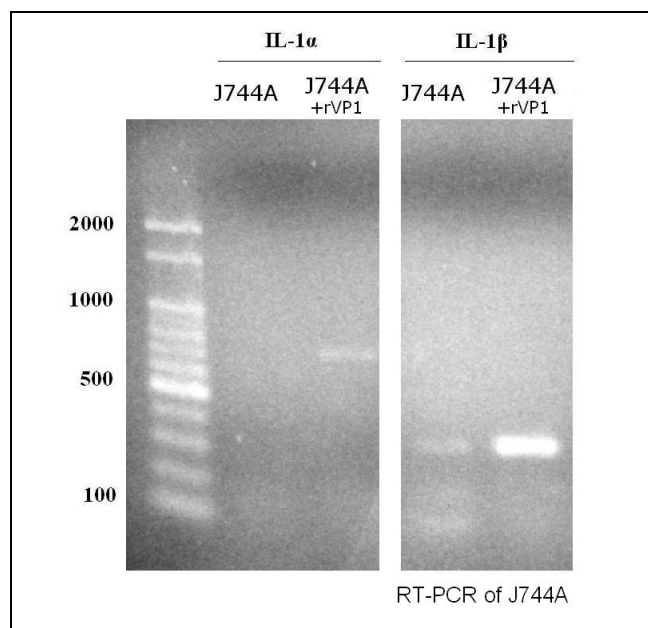
將 RAW264.7 以不同濃度 VP1 處理 24 小時，萃取蛋白質，以 Western Blotting 分析其 pAkt，可發現加入 VP1 之後細胞的 pAkt 表現量較原細胞為多（圖七）。



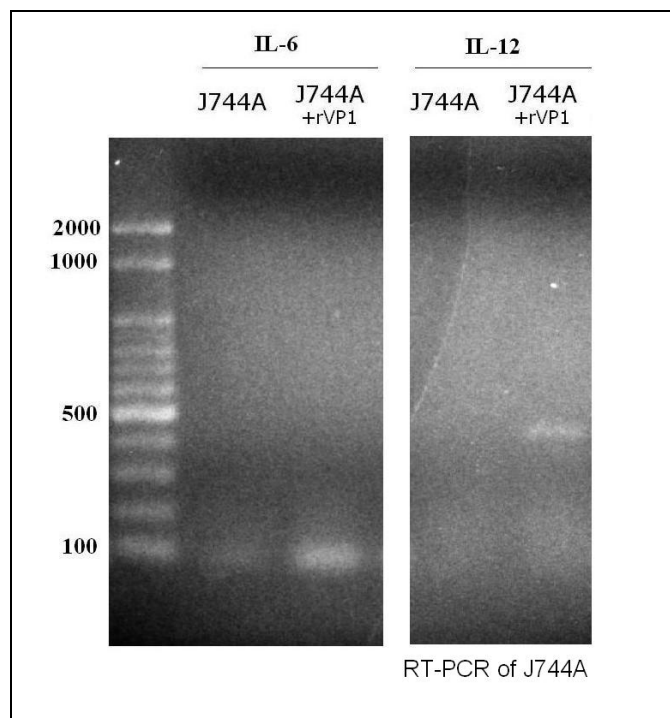
圖七：加入 VP1 的 RAW264.7，其 pAkt 表現量增加

五、VP1 可在老鼠巨噬細胞中引發細胞激素 (cytokine) 的釋放

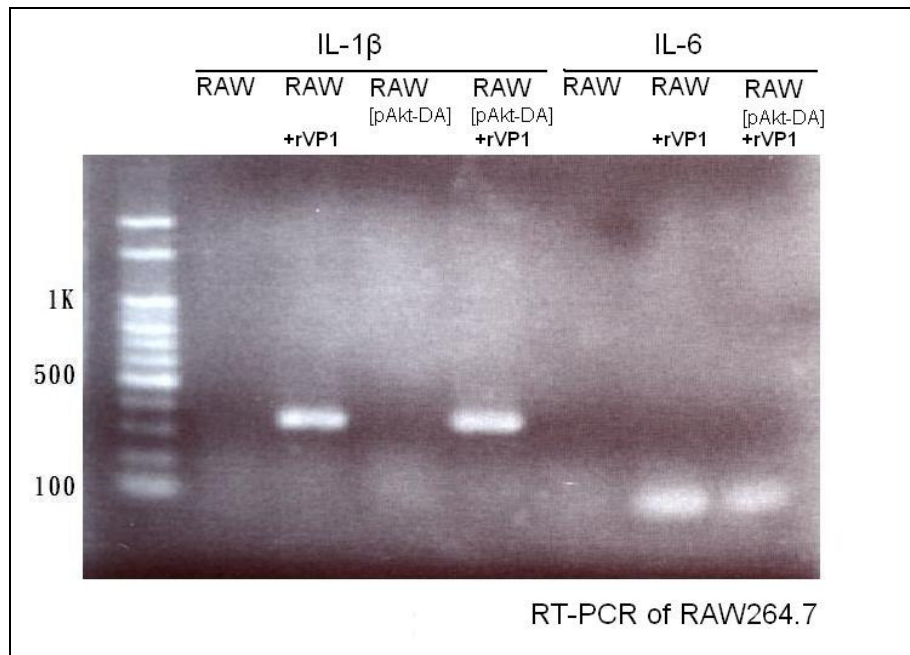
將 J744A 與 RAW264.7 以 1 μ M VP1 處理 8 小時過後，萃取 RNA 做 RT-PCR，測試其不同種類 cytokine 的表現量；測試對象有 interleukin-1 α 、interleukin-1 β 、interleukin-6、interleukin-12、interleukin-18 及 interferon- γ 。從電泳結果中可看到，在加入 VP1 到細胞後，會刺激 J744A 釋放 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6 與 IL-12 (圖八、圖九)，也可促使 RAW264.7 產生 IL-1 β 以及 IL-6 (圖十)，而 IFN- γ 則無任何表現 (圖十一)，IL-18 在原來細胞及處理後的細胞內表現量相當 (圖十二)。



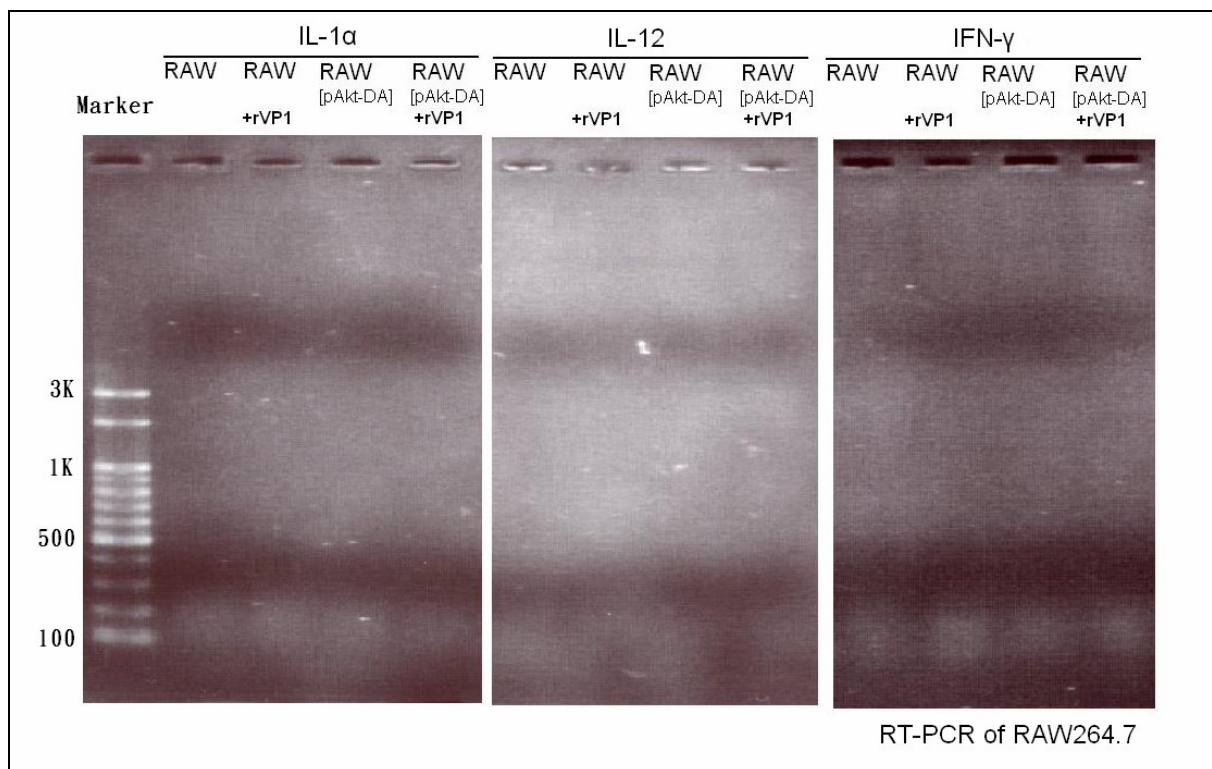
圖八：VP1 可刺激 J744A 細胞釋放 IL-1 α 與 IL-1 β



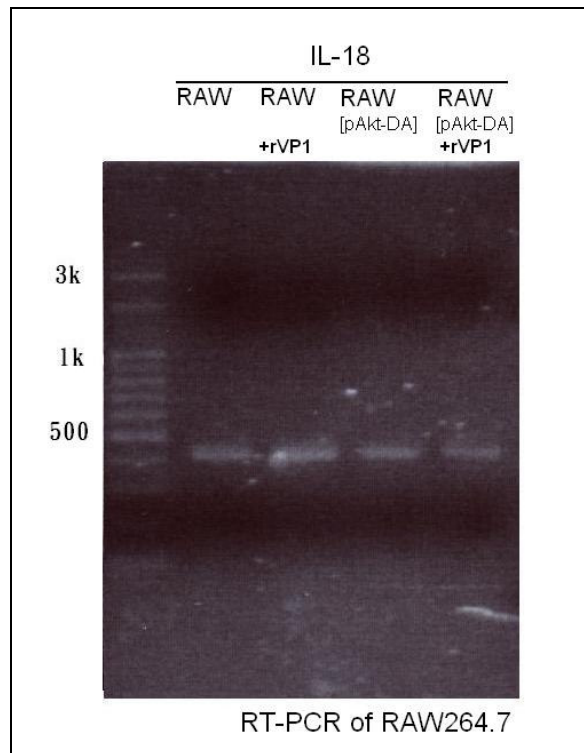
圖九：VP1 可刺激 J744A 細胞釋放 IL-6 與 IL-12



圖十：VP1 可刺激 RAW264.7 細胞產生 IL-1 β 與 IL-6，且此現象與 pAkt 的表現無關



圖十一：VP1 在 RAW246.7 細胞內對 IL-1 α 、IL-12 和 IFN- γ 無影響，且與 pAkt 的表現無關



圖十二：VP1 在 RAW246.7 細胞內對 IL-18 的釋放量無明顯影響，且與 pAkt 的表現無關

六、Akt 活性對 cytokine 的調控

在 RAW264.7 細胞中大量表現有活性的 Akt (pAkt)，然後再加入 VP1，由電泳結果顯示 pAkt 不會影響到 cytokine 的釋放（圖十-圖十二）。

柒、討論

一、RNA interference 的膜蛋白選擇

原先實驗室的資料顯示 VP1 可能是以與細胞膜蛋白 integrin 結合的方式來進行其訊息傳遞，integrin 為膜上一系列的插入蛋白^(4,10)，由 α (14 種) 和 β (8 種) 兩個次單位組成，約有 20 種組合方式。因為口蹄疫病毒 (FMDV) 主要是藉由與 $\alpha 1\beta 1$ 、 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 1$ 及 $\alpha v\beta 3$ 的結合來感染宿主細胞，故選擇 $\beta 1$ 為 RNA 干擾的對象，抑止宿主細胞中 integrin $\beta 1$ 的表現，來探討 VP1 是否藉 integrin 進行訊息傳遞。

二、RNA interference of Integrin $\beta 1$

RNA interference (RNAi) 為近年來熱門的實驗技術⁽¹⁾，能夠停止細胞特定基因的表現，其方法是將一小段目標基因的雙股 RNA 序列 (short interference RNA; siRNA) 送入細胞內，細胞的酵素系統即會阻斷該基因的轉譯作用；原理為當雙股 RNA 在細胞中形成時，會碰上一種叫 Dicer 的酵素，經由化學水解作用被切成約 22 個核苷酸長度的微小 RNA，之後雙股的微小 RNA 解開，與某個蛋白質結合成「RNA 引發消音複體 (RISC)」，當碰到目標 mRNA，就會產生互補現象而與 RISC 黏合，此時 Dicer 會再將目標 mRNA 切斷，阻止蛋白質轉譯作用的進行（附圖六）。

在 RNAi 的實驗中，因為 siRNA 的對 T-47D 處理只進行 2 天，所以從 Western Blot 的結果上看來 T-47D 細胞膜上的 integrin $\beta 1$ 雖未完全消失，但是 integrin $\beta 1$ 的先驅物(位於 integrin $\beta 1$ 的 band 下方)已經不表現，顯示 RNAi 實驗確實抑止了 integrin $\beta 1$ 的表現。

三、Integrin $\beta 1$ 為 VP1 的受器

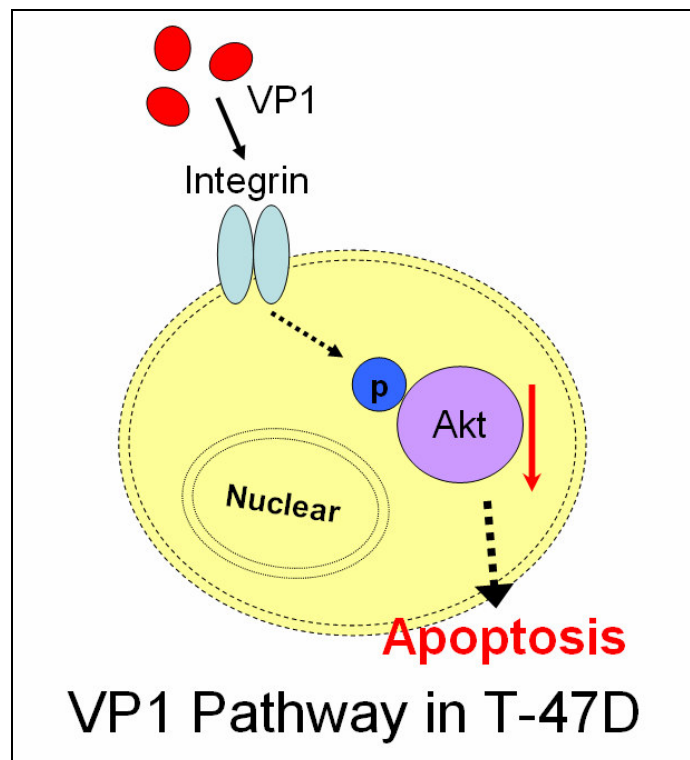
經由 RNAi 停止表現 integrin $\beta 1$ 的 T-47D 細胞在加入 VP1 之後，其存活率較處理 VP1 的一般細胞為高，可見缺乏 integrin $\beta 1$ 會使 VP1 造成細胞凋亡 (apoptosis) 的路徑受到影響，由此可知 integrin $\beta 1$ 確實為 VP1 與細胞膜結合的受器；但是從細胞凋亡僅降低而無完全消失的現象看來，VP1 可能還有其他種類的受器，將再進一步以實驗探討之。

四、VP1 在 T-47D 細胞中的訊息傳遞路徑

由 RNA 干擾實驗得知 integrin $\beta 1$ 為 VP1 的受器，而另有研究發現，在 T-47D 中 VP1 可抑制 Akt 的磷酸化和活化，進而導致 apoptosis (附圖七)。

文獻中提到 Akt (protein kinase B; PKB) 為一種絲胺酸/色胺酸蛋白激酶^(5,6)，是 apoptosis 的一個調節因子，當細胞接受外來刺激後，經過一連串複雜的訊息傳遞，刺激 PI3K 產生 PIP3，它會激發 PIP3 依賴型激酶(PDK)，使 Akt 磷酸化與活化，活化的 Akt (pAkt) 接著調控 Bad 與 Bcl-xl 的活性，阻止粒線體釋放細胞色素 C (Cytochrome C; CytC) 與抑制創蛋白酶 (Caspase) 來拮抗 apoptosis⁽¹¹⁾ (附圖八)。

由此可推知 VP1 在 T-47D 細胞中的訊息傳遞路徑，是先與細胞膜上 integrin $\beta 1$ 結合，然後抑制 Akt 蛋白質的活性，最後引發 apoptosis (圖十三)。



圖十三：VP1 在癌細胞中的訊息傳遞示意圖

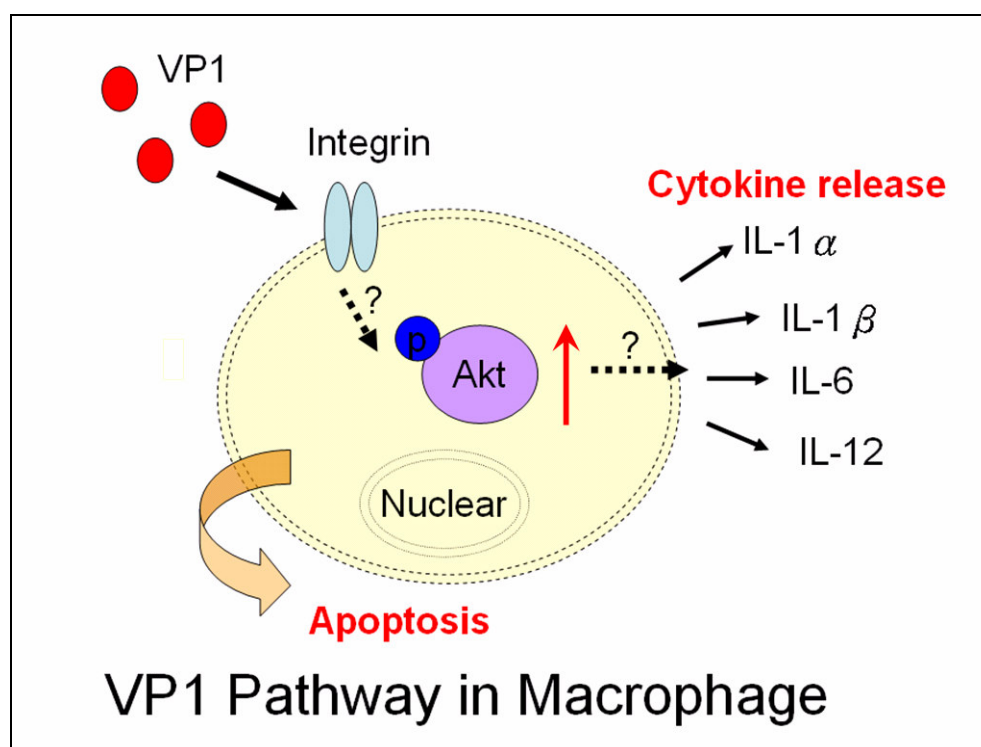
五、在 RAW264.7 細胞中 VP1 對 Akt 的影響

RAW264.7 加入 VP1 後 pAkt 的表現量會增加，代表 VP1 在 RAW264.7 中造成的細胞凋亡，可能不是經由抑制 Akt 的路徑，而另有其他機制；而在細胞內大量表現 pAkt 會提高加入 VP1 之後的存活率，可能因為 pAkt 本身就會拮抗 apoptosis，與 VP1 無直接關聯；所以 VP1 造成 RAW264.7 細胞凋亡的機制與 T-47D 有所差異，而此差異可能由於這兩中細胞之來源、種類及功能不同所造成。

六、VP1 可活化巨噬細胞細胞使其釋放出多種 cytokine

實驗顯示 VP1 會刺激 J744A 釋放出 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-12，也可使 RAW264.7 細胞產生 IL-1 β 和 IL-6 等數種介白素（圖十四）。

細胞激素（cytokine）為細胞間傳遞訊息的多種蛋白質，其中介白素（interleukin；IL）為免疫細胞釋放的細胞激素，可調節免疫相關的反應。從文獻中得知^(9,12)，IL-1 由活化的巨噬細胞產生，可以促使 T-cell 增生、引起周邊組織發炎反應、急性蛋白質的合成與體溫的增加（發燒）；IL-6 可以促使 B-cell 分化及增生而產生免疫球蛋白、使肝臟合成急性蛋白質、刺激破骨細胞的活性及增加體溫；IL-12 由 p40 與 p35 兩個次單元組成，主要功能為刺激干擾素 γ （interferon- γ ；IFN- γ ）的基因表現、促進輔助性 T-cell 的分化來活化細胞免疫反應，為免疫反應中重要的調節因子，更有研究指出 IL-12 可運用於治療病毒感染、自體免疫疾病，甚至是癌症；所以低劑量的 VP1 具有研發成促進免疫反應的藥物或佐劑之潛力。



圖十四：VP1 在巨噬細胞內的訊息傳遞示意圖

捌、結論

由實驗結果可知在人類乳癌細胞 T-47D 中，VP1 能與細胞膜表面的 integrin $\beta 1$ 結合，然後抑制 Akt 蛋白質的活性，最後導致細胞凋亡。在細胞以 RNA 干擾技術處理使 integrin $\beta 1$ 停止表現之後，細胞凋亡的現象即會減少。而在老鼠巨噬細胞 RAW264.7 中，VP1 會使 pAkt 的表現量增加，故推測 VP1 在 RAW264.7 中造成的細胞凋亡，可能不是經由抑制 Akt 的路徑。

另外 VP1 可以活化 RAW264.7 及 J744A 細胞，使其釋放出 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6 與 IL-12 等多種 cytokine，而這些 cytokine 在非特異性及特異性免疫反應中皆為重要的調節者。

綜合以上所述，VP1 能造成癌細胞的死亡，具有很好的抗癌效果，並有研發成為有關免疫反應的藥物或佐劑的實用性。

玖、參考資料及其他

一、參考資料

- (一) 劉志弘、David P. Bartel (2003)。RNAi—神祕的基因糾察隊。科學人，2003.09，48-56。
- (二) 張信之 (1999)。病毒世界—現代分子病毒學大綱 (第一版)。臺北市：藝軒圖書出版社。
- (三) 楊繼江 (2001)。病毒學概論 (第一版)。臺北市：藝軒圖書出版社。
- (四) Charles French-Constant and Holly Colognato (2004)。Integrins: Versatile Integrators of Extracellular Signals. *TRENDS in Cell Biology* 2004(14)678-686 December.
- (五) Honglin Zhou, Xin-Ming Li, Judy Meinkoth, and Randall N. Pittman (2001)。Akt Regulates Cell Survival and Apoptosis at a Postmitochondrial Level. *Arthritis Rheum.* 2001 (7)1555-67 July.
- (六) Igor Vivanco and Charles L. Sawyers (2002)。The Phosphatidylinositol 3-kinase-Akt Pathway in Human Cancer. *NATURE REVIEWS CANCER* 2002(2)489-501 July.
- (七) Jei-Ming Peng, Shu-Mei Liang, and Chi-Ming Liang (2004)。VP1 of Foot-and-Mouth Disease Virus Induces Apoptosis via the Akt Signaling Pathway. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 2004(279)52168-52174 December.
- (八) Warren G. King, Mark D. Mattaliano, Tung O. Chan, Philip N. Tsichlis and Joan S. Brugge (1997)。Phosphatidylinositol 3-Kinase is Required for Integrin-Stimulated Akt and Raf-1/Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Activation. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* 1997(17)4406-4418 August.
- (九) 張明德。臨床免疫的應用。 <http://www.tsgh.ndmctsgh.edu.tw/ria/cimmunology.htm>
- (十) 張新侯。Integrin。 <http://www.hhchang.tcu.edu.tw/index.html>
- (十一) Robert A. Weinberg。癌症的成因。
http://66.102.7.104/search?q=cache:gNuc6bBfidAJ:www.3cmall.com/healthy/cancer03.htm+AKt&hl=zh-TW&lr=lang_zh-TW
- (十二) William Bowers. Cell Interactions in Specific Immune Response.
<http://pathmicro.med.sc.edu/2003-immpdf/Lecture%2013.pdf>

(十三) Virus World. <http://rhino.bocklabs.wisc.edu/cgi-bin/virusworld/virustable.pl>

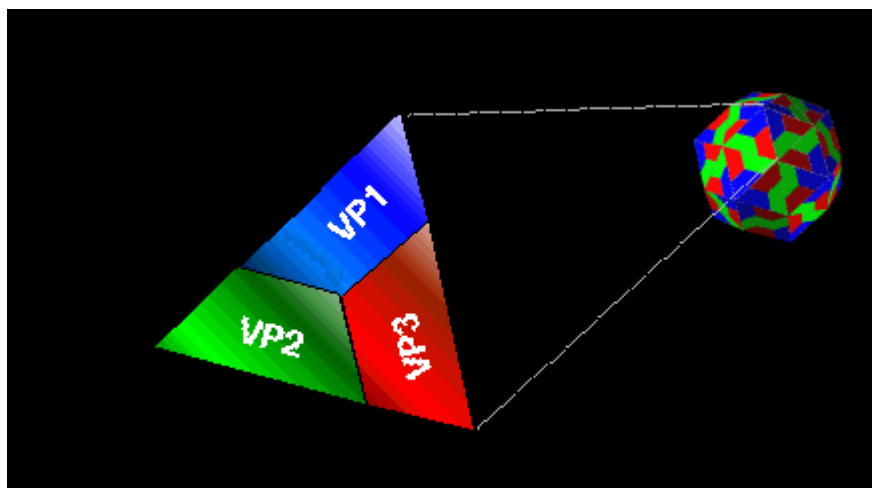
二、附錄

(一) 口蹄疫病毒電腦模擬圖及其鞘蛋白結構圖



附圖一：口蹄疫病毒（FMDV）電腦模擬外型圖

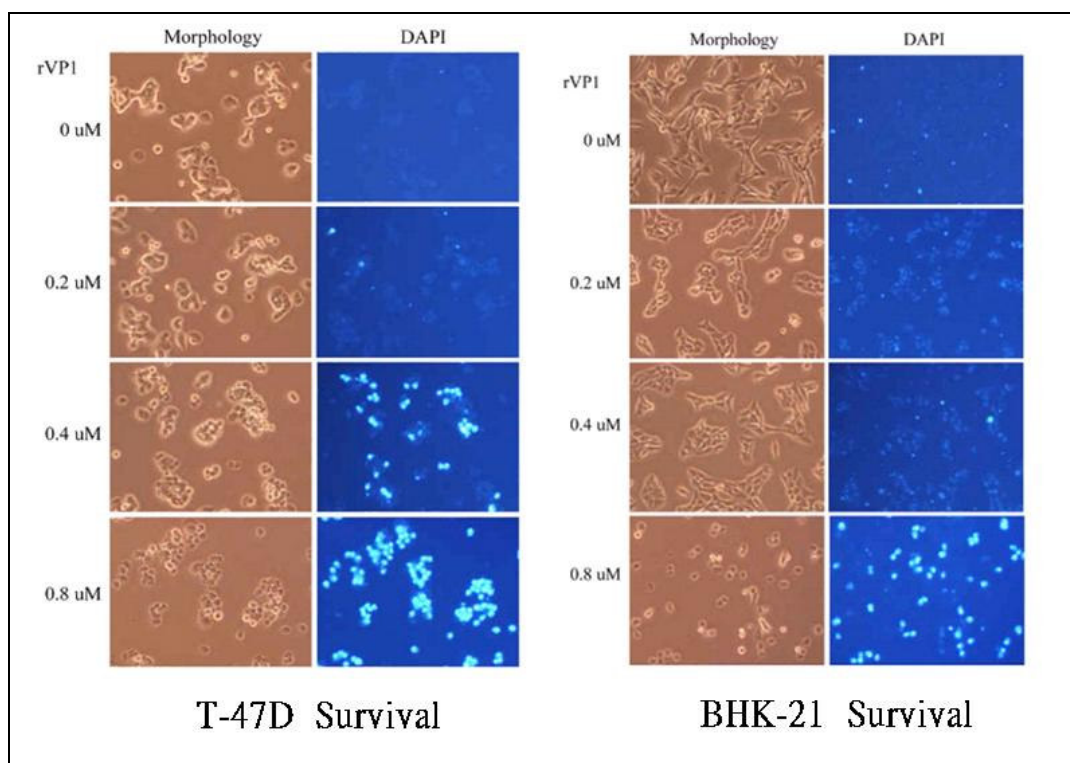
(<http://faculty.uca.edu/~benw/biol1400/pictures>)



附圖二：FMDV 鞘蛋白之結構組成圖示⁽¹³⁾

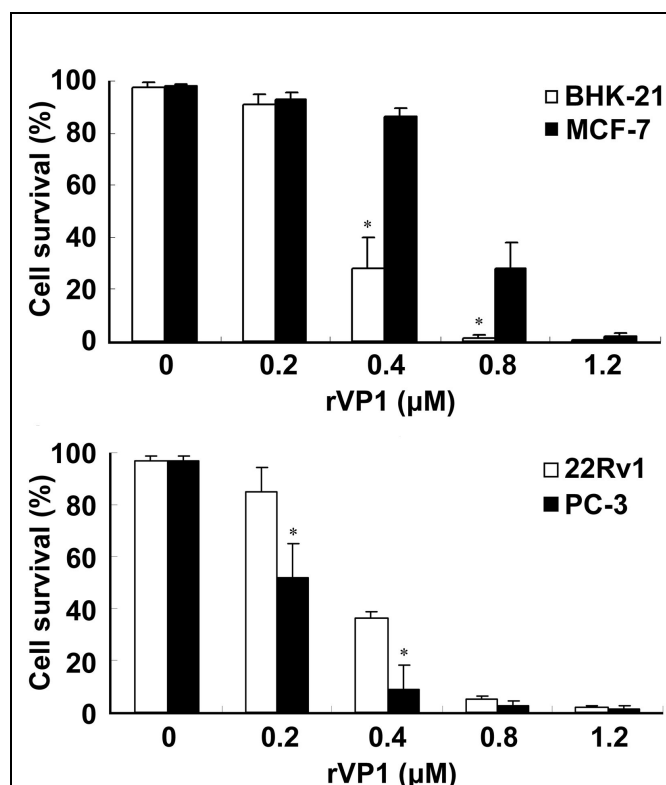
(註：圖中並未表現出 VP4。)

(二) VP1 在細胞中造成的細胞凋亡現象



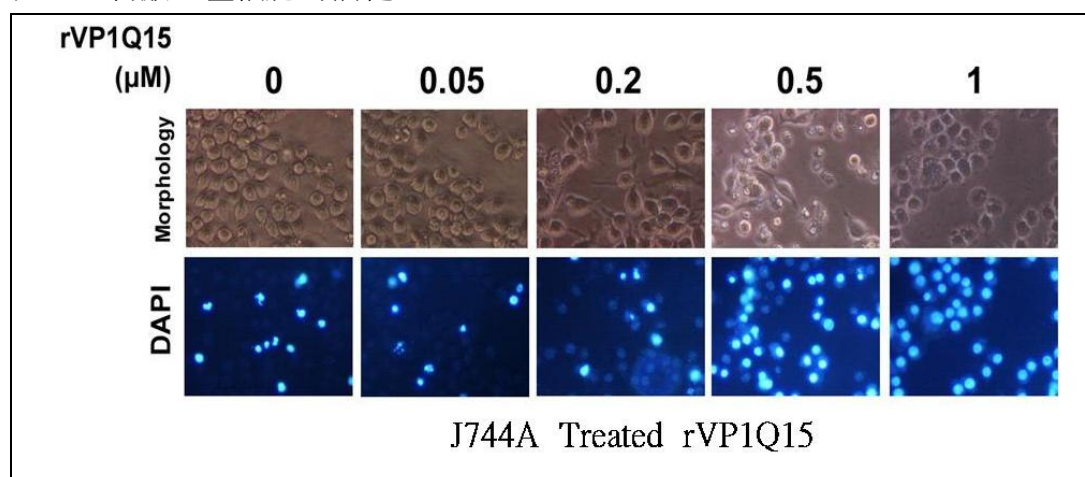
附圖三：VP1 在 T-47D 及 BHK-21 中造成細胞型態改變 (unpublished)

(註：在 T-47D 及 BHK-21 細胞中加入不同濃度的 VP1，在顯微鏡下觀察，可發現隨著濃度的增加細胞外型有逐漸皺縮的現象，核內的染色質 DNA 亦有凝聚現象，此為細胞凋亡的表象。)



附圖四：VP1 在不同細胞中造成細胞存活率降低之示意圖⁽⁷⁾

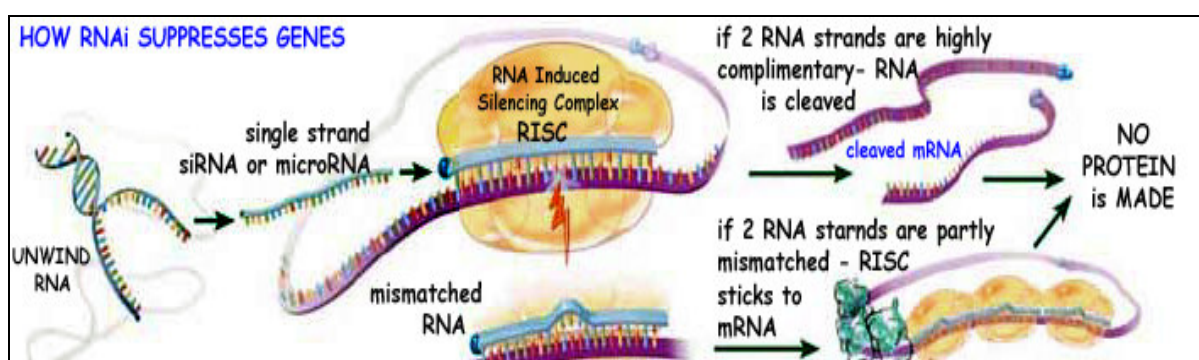
(三) VP1 刺激巨噬細胞的活化



附圖五：VP1 在老鼠巨噬細胞 J744A 中造成的活化現象 (unpublished)

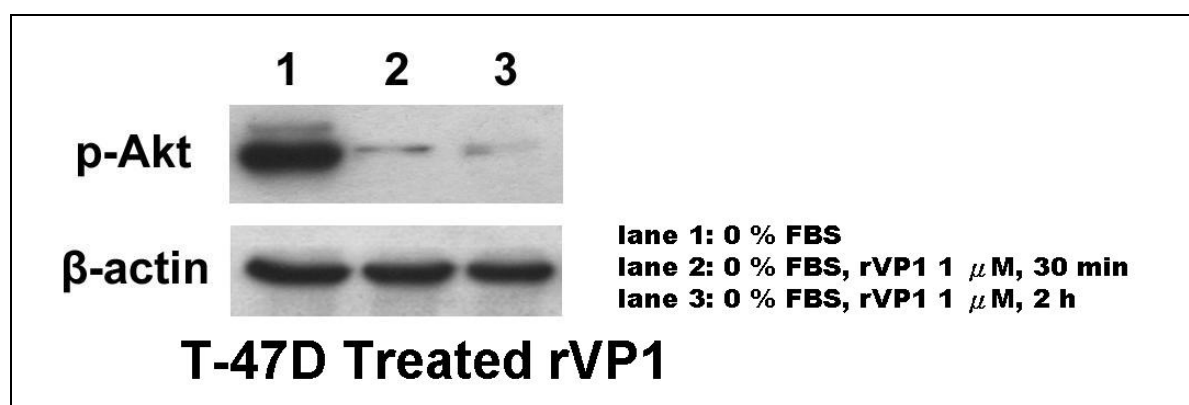
(註：從顯微鏡下可看出在 VP1 濃度為 0.05 μM 及 0.2 μM 時，巨噬細胞外型變大且伸出明顯的偽足，此為細胞被活化的現象。)

(四) RNA interference 原理示意圖



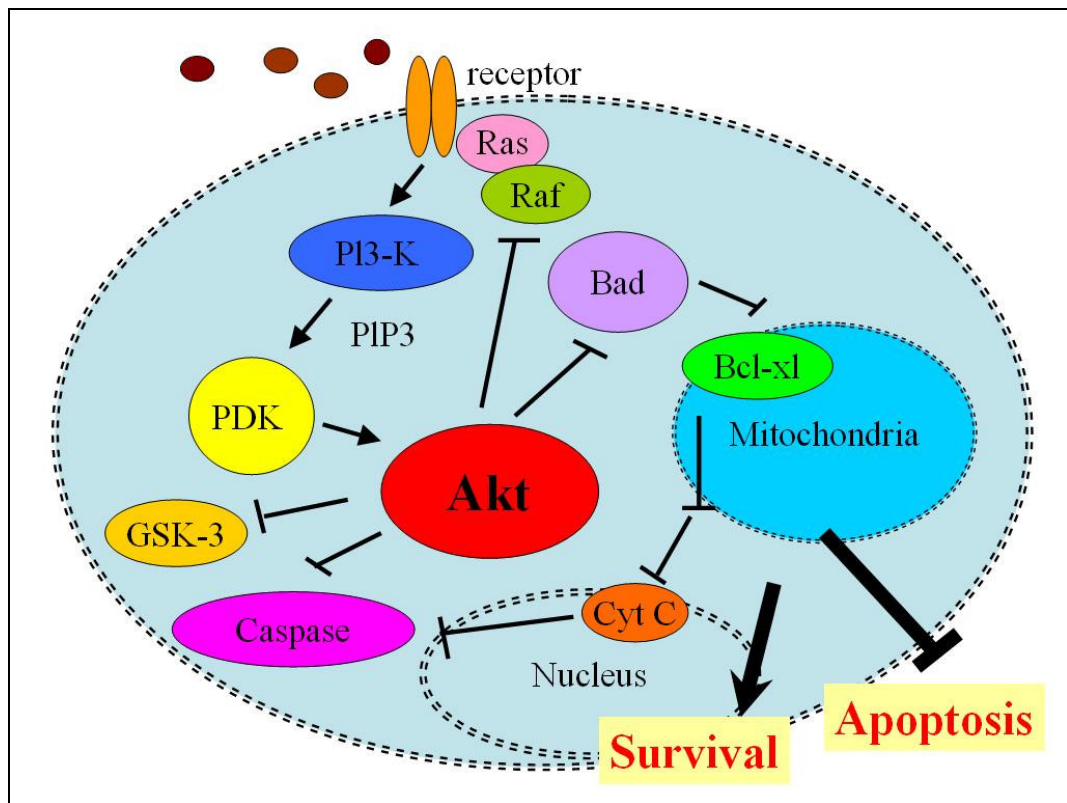
附圖六：siRNA 引發 gene silence 的原理圖⁽¹⁾

(五) VP1 對 T-47D 細胞的影響



附圖七：在 T-47D 細胞中 VP1 對 pAkt 的影響 (unpublished)

(六) Akt 已知之訊息傳遞路徑



附圖八：Akt 藉由與其他蛋白質的互動來拮抗細胞凋亡

評語

040714 口蹄疫病毒鞘蛋白 VPI 在細胞造成之訊息傳遞及其
影響

1. 能利用細胞實驗探討 VPI 的初步作用機制及交互作用蛋白。
2. 應集中探討 VPI 對特定型態細胞之作用，並深入瞭解其訊號傳遞機制，謹慎分析實驗結果。
3. 建議加入生物資訊分析方法。