

國立臺灣大學醫學院醫學檢驗暨生物技術學系

碩士論文

Department of Clinical Laboratory Sciences and Medical Biotechnology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

Annexin II 蛋白質在第一型單純疱疹病毒

產生過程中所扮演之角色

The Role of Annexin II in

Human Herpes Simplex Virus Type 1 Production

趙昱凱

Yu-Kai Chao

指導教授：張淑媛 博士

Advisor: Sui-Yuan Chang, Sc.D.

中華民國99年7月

July, 2010

國立臺灣大學醫學院醫學檢驗暨生物技術學系

碩士論文

Department of Clinical Laboratory Sciences and Medical Biotechnology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

Annexin II 蛋白質在第一型單純疱疹病毒

產生過程中所扮演之角色

The Role of Annexin II in

Human Herpes Simplex Virus Type 1 Production

趙昱凱

Yu-Kai Chao

指導教授：張淑媛 博士

Advisor: Sui-Yuan Chang, Sc.D.

中華民國99年7月

July, 2010

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

Annexin II 蛋白質在第一型單純疱疹病毒產生過程中所
扮演之角色

The Role of Annexin II in
Human Herpes Simplex Virus Type 1 Production

本論文係趙昱凱君 (R97424016) 在國立臺灣大學醫學檢驗暨生
物技術學研究所完成之碩士學位論文，於民國九十九年七月三十日承
下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

張淑媛 (簽名)

(指導教授)

高金良

李君男

系主任

鄧麗珍 (簽名)

致謝

時間飛逝，一轉眼，兩年的碩士生涯就在七月三十號口試結束後畫下了句點。回想這些日子以來，從剛進實驗室凡事都要請教學長姐的菜鳥，到可以親手做完一系列的實驗，我發覺自己學習到不少珍貴的知識，也累積了許多寶貴的經驗；這都要感謝張淑媛老師的指導與教誨。淑媛老師總是耐心又細心地培養我獨立思考以及解決問題的能力，指導我如何將實驗的結果完整且有條有理地呈現出來，並且提供完善的實驗設備與資源，幫助我完成各項研究。也要感謝李君男老師及高全良老師於百忙之中抽空來參加碩士班口試，針對我的研究內容提供很多寶貴的建議及指導。

在這兩年的碩士班生活中，我也認識了許多的好朋友及同甘共苦的夥伴。首先是R424的大家，淑芳學姐總是能為實驗室帶來歡笑以及好消息；實驗室一哥小索學長及一姐必涵學姐，凡是實驗上所遇到的問題都可以和他們討論；阿信學長、廷祺學長、景煜學長及老堯學長，在我剛進實驗室的那段時間非常照顧我，讓我能更快適應實驗室的生活；雨恬學姐和衣茜學姐則是提供我許多碩士班修課及報告要注意的許多事情，使我能順利修完各門課程；同是碩二的小涂還有宜芳，在帶學生實驗以及準備畢業口試的路上有你們一起努力，讓我不會覺得孤單；還有苔伶學妹及助理學長姐們，謝謝你們這兩年幫助。另外也要感謝在台大男二舍陪伴我的室友們，希傑、康康學長、子傑學長、HENDA學長和小咪，你們讓寢室充滿了溫馨及歡樂。R97的碩士班同學，雖然平時大家都各自忙著實驗，不過只要是在路上碰到面，都會互相的打氣鼓勵，很珍惜和大家相處的這段日子。

最後，要謝謝在碩士班生涯中陪伴我的家人們及小不點，在實驗室的這段生活中，受到你們無比的照顧及呵護，當我在實驗上遇到挫折的時候，你們總是傾聽我的煩惱，並且支持著我，使我能一再的面對挫折，能夠順利從碩士班畢業，你們是我背後最大的助力，推動我向前邁進，接下來的路，我期許能不辜負你們的期望，朝自己的目標努力走下去。

總目錄

圖目錄.....	v
表目錄.....	vii
中文摘要.....	viii
英文摘要.....	ix
第一章 緒論.....	1
1.1. 第一型人類單純疱疹病毒.....	1
1.1.1. 人類單純疱疹病毒之結構及基因組成.....	1
1.1.2. 人類單純疱疹病毒之感染途徑.....	2
1.2. Annexin II 蛋白質.....	4
1.2.1. Annexin II 蛋白質之結構(圖一).....	4
1.2.2. Annexin II 蛋白質之功能.....	4
1.3. Annexin II 蛋白質與病毒之關聯.....	6
1.3.1. Annexin II 蛋白質與流感病毒之關聯.....	6
1.3.2. Annexin II 蛋白質與人類免疫不全病毒第一型(Human immunodeficiency virus , HIV-1)之關聯.....	6
1.3.3. Annexin II 蛋白質在 C 型肝炎病毒(Hepatitis C virus , HCV)產生過程中所扮演之角色.....	6
1.3.4. Annexin II 蛋白質與 Human herpes simplex virus type 1 之關聯.....	7
1.4. 研究動機及目的.....	7

1.4.1.	研究動機.....	7
1.4.2.	實驗目的.....	7
第二章 實驗材料與實驗方法.....		9
2.1.	實驗材料.....	9
2.1.1.	細胞株.....	9
2.1.2.	病毒株.....	9
2.1.3.	培養基與試劑.....	9
2.1.4.	質體.....	10
2.1.5.	抗體.....	10
2.1.6.	商業實驗試劑套組.....	11
2.1.7.	核酸引子 (表一).....	11
2.2.	實驗方法.....	12
2.2.1.	病毒與細胞培養.....	12
2.2.2.	病毒生長時程實驗.....	13
2.2.3.	病毒力價測定試驗.....	13
2.2.4.	total RNA 萃取及 DNase 處理.....	14
2.2.5.	反轉錄反應(Reverse transcription).....	14
2.2.6.	即時相對定量 PCR (Quantitative Real-time PCR).....	15
2.2.7.	蛋白質濃度定量.....	15
2.2.8.	西方墨點法(Western blotting).....	15
2.2.9.	濕式轉染法.....	16

2.2.10.	細胞轉染(Transfection).....	17
2.2.11.	少量質體 DNA 萃取.....	17
2.2.12.	大量質體 DNA 萃取.....	17
2.2.13.	病毒穿膜試驗 (Entry assay).....	18
2.2.14.	病毒核酸萃取.....	19
2.2.15.	染色體核酸萃取(Genomic DNA extraction).....	19
2.2.16.	流式細胞計數.....	20
2.2.17.	免疫螢光染色.....	20
2.2.18.	實驗數據分析及統計.....	20
第三章 實驗結果.....		21
3.1.	siRNA 對 Annexin II 之降解效果測試.....	21
3.1.1.	siRNA - Annexin II 在 293T 細胞中對 Annexin II mRNA 所造成之降解效果.....	21
3.1.2.	siRNA - Annexin II 在 Vero 細胞中對 Annexin II mRNA 所造成之降解效果.....	21
3.2.	siRNA 降解 Vero 細胞中 Annexin II 對 HSV-1 病毒的影響.....	21
3.2.1.	Annexin II 降解對 Vero 細胞上清液中 HSV-1 病毒價數所產生的影響.....	21
3.2.2.	單純疱疹病毒對於 Annexin II 降解之 Vero 細胞與正常 Vero 細胞之感染比率	22
3.2.3.	Annexin II 降解對於 HSV-1 病毒侵入 Vero 細胞之效率所造成之影響.....	23
3.2.4.	Vero 細胞中 Annexin II 降解對 HSV-1 病毒複製過程所造成之影響.....	23
3.2.5.	Vero 細胞中 Annexin II 降解對 HSV-1 病毒釋放效率所造成之影響.....	24
3.2.6.	HSV-1 病毒蛋白 VP22 在 Annexin II 降解之 Vero 細胞及正常細胞中之分布比較	25

3.3.	siRNA 降解 A549 細胞中 Annexin II 表現量對 HSV-1 病毒之影響.....	26
3.4.	過度表現 Annexin II 對 HSV-1 病毒的影響.....	26
3.4.1.	pRK5-Anx2 質體 DNA 之製備.....	27
3.4.2.	pRK5-Anx2 質體 DNA 過度表現 Annexin II 基因之實驗.....	27
3.4.3.	在 293T 細胞中過度表現 Annexin II 蛋白對 HSV-1 病毒產生所造成之影響	27
第四章	討論.....	29
第五章	參考文獻.....	34
圖表	41
附表	66

圖目錄

圖 一 Annexin II 蛋白之結構及功能區域.....	41
圖 二 293T 細胞在轉染不同濃度之 Annexin II siRNA 後細胞中 Annexin II mRNA 下降之情況.....	42
圖 三 Vero 細胞在轉染不同濃度之 Annexin II siRNA 後細胞中 Annexin II mRNA 下降之情況.....	43
圖 四 Vero 細胞在轉染不同濃度之 Annexin II siRNA 並感染 HSV-1 後細胞中 Annexin II mRNA 之表現狀況.....	44
圖 五 Vero 細胞在轉染不同濃度之 Annexin II siRNA 並感染 HSV-1 後細胞中 Annexin II 蛋白之表現量.....	45
圖 六 Vero 細胞在轉染不同濃度之 Annexin II siRNA 並感染 HSV-1 後細胞上清液中之病毒價數.....	46
圖 七 單純疱疹病毒對於 Annexin II 降解之 Vero 細胞與正常 Vero 細胞之感染率.....	47
圖 八 單純疱疹病毒侵入 Annexin II 降解之 Vero 細胞與正常 Vero 細胞之效率.....	48
圖 九 單純疱疹病毒在 Annexin II 降解細胞及正常細胞中之生長狀況.....	49
圖 十 HSV-1 病毒蛋白 VP16 在 Annexin II 降解之 Vero 細胞與正常 Vero 細胞中之表現情況.....	50
圖 十一 Annexin II 降解之 Vero 細胞及正常 Vero 細胞在感染 HSV-1 後上清液中病毒價數之比較.....	51
圖 十二 Annexin II 降解之 Vero 細胞及正常 Vero 細胞在感染 HSV-1 後細胞中病毒價數之比較.....	52
圖 十三 HSV-1 病毒從 Annexin II 降解之 Vero 細胞及正常 Vero 細胞中釋	

放之比例	53
圖 十四 HSV-1 病毒蛋白 VP22 在 Annexin II 降解之 Vero 細胞及正常細胞中之分布比較	54
圖 十五 Vero 細胞在不同 Annexin II 含量下感染 HSV-1 後 VP22 GFP 表現位置之分析	55
圖 十六 Annexin II 降解之 A549 細胞及正常 A549 細胞在感染 HSV-1 後上清液中病毒價數之比較	56
圖 十七 Annexin II 降解之 A549 細胞及正常 A549 細胞在感染 HSV-1 後細胞中病毒價數之比較	57
圖 十八 HSV-1 病毒從 Annexin II 降解之 A549 細胞及正常 A549 細胞中釋放之效率	58
圖 十九 HSV-1 病毒蛋白 VP16 在 Annexin II 降解之 A549 細胞與正常 A549 細胞中之表現情況	59
圖 二十 pRK5-Anx2 質體 DNA 示意圖	60
圖 二十一 pRK5-Anx2 質體表現 Annexin II 蛋白之測試	61
圖 二十二 過度表現 Annexin II 基因之 293T 細胞與正常 293T 細胞在感染單純疱疹病毒後細胞上清液中之病毒價數	62
圖 二十三 過度表現 Annexin II 基因之 293T 細胞與正常 293T 細胞在感染單純疱疹病毒後細胞中之病毒價數	63
圖 二十四 HSV-1 病毒從過度表現 Annexin II 基因之 293T 細胞及正常 293T 細胞中釋放之效率	64
圖 二十五 HSV-1 病毒蛋白 VP16 在過度表現 Annexin II 基因之 293T 細胞及正常 293T 細胞中之表現情況	65

表目錄

表 一. 聚合酶鏈鎖反應使用之引子序列 66



中文摘要

第一型人類單純疱疹病毒(Human herpes simplex virus type-1, HSV-1)在感染細胞的過程中需要胞吞、胞吐作用及許多細胞蛋白的參與。Annexin II 蛋白質是 Annexin 蛋白質家族中的一員，主要功能與多種細胞行為有關，如細胞間質的交互作用及參與胞吞和胞吐作用等。根據先前的文獻，Annexin II 會被包入 HSV-1 之初期病毒顆粒中，並且在細胞外之 HSV-1 病毒顆粒中也發現 Annexin II 的存在。因此本篇研究想探討宿主細胞中的 Annexin II 在 HSV-1 病毒產生過程中所扮演的角色。首先，我們利用 siRNA - Annexin II 降低 VERO 細胞株(非洲綠猴腎臟上皮細胞)中 Annexin II mRNA 的表現量，再感染 HSV-1 病毒，結果發現上清液中之 HSV-1 病毒活性效價也相對降低。進一步實驗證明，此現象並非由於細胞中 Annexin II 降解影響病毒侵入細胞所致；此外，HSV-1 之後期病毒蛋白質表現量在 Annexin II 降解細胞中並無明顯改變，因此可以確認 Annexin II 表現量的下降並不會影響 HSV 病毒的複製過程。最後，經由分析受感染細胞上清液中病毒活性效價與細胞中病毒活性效價，發現細胞中 Annexin II 降解只會影響細胞上清液中病毒活性效價，而細胞內之病毒活性效價則沒有明顯改變；以此計算病毒之釋放效率顯示，HSV-1 病毒從 Annexin II 降解之 Vero 細胞中釋放比例較正常 Vero 細胞低 (12.5% v.s. 26%, $P < 0.01$)。利用共軛焦顯微鏡觀察，在 Annexin II 降解之 Vero 細胞中，大部分病毒皆聚集在細胞核膜周圍；而在正常細胞，病毒則是散布在細胞質中。由以上實驗結果得知，細胞中 Annexin II 降解會導致單純疱疹病毒聚集在細胞核膜周圍，造成病毒從細胞中釋放的效率降低，其詳細的作用機制則須進一步的實驗來釐清。

關鍵字：人類單純疱疹病毒第一型、Annexin II、病毒釋放

英文摘要

The replication of human herpes simplex virus type-1 (HSV-1) involves a variety of cellular proteins and processes, such as endocytosis and exocytosis. Annexin II, a member of Annexin family, is involved in diverse cellular processes such as endocytosis, exocytosis, and cell matrix interactions. Recent studies indicated that Annexin II is incorporated into the primary HSV-1 virions in the perinuclear space and in the extracellular virus particles. In this study, we would like to define the role of Annexin II in HSV-1 virus production. First, siRNA was utilized to down-regulate Annexin II mRNA in Vero cell before HSV-1 infection. A significant reduction of supernatant virus titer in the Annexin II down-regulated cells was observed. Since the viral entry, HSV-1 late protein expression, and the intracellular virus titer were not disturbed in the Annexin II down-regulated cells, the reduction of Annexin II may directly influence the virus release. Using confocal microscopy, we observed that most HSV-1 particles localized at the perinuclear space in the Annexin II down-regulated Vero cells, while the distribution of HSV-1 particles in the untreated Vero cells was mainly in the cytoplasm. In summary, Annexin II plays a role in HSV virion release and reduction of Annexin II results in accumulation of virus particles at the perinuclear localization. Further analysis is required to elucidate the mechanism in which Annexin II is involved in HSV-1 release.

Key words : Herpes simplex virus type-1 ; HSV-1 ; Annexin II ; Virus egress

第一章 緒論

1.1. 第一型人類單純疱疹病毒

1.1.1. 人類單純疱疹病毒之結構及基因組成

人類單純疱疹病毒第一型(Human herpes simplex virus type 1 ,HHV-1)是疱疹病毒科(*Herpesviridae*)中的成員之一，一個完整的單純疱疹病毒顆粒包含四個重要的組成元素：一個含有病毒遺傳物質的核心(core)；包含著核心的二十面體外鞘蛋白(capsid)；圍繞著外鞘蛋白的不定型區域稱做被膜(tegument) (83)以及病毒最外層之脂雙層又稱為套膜(envelope)。

進一步分析這四個重要組成分子，核心(core)中包含著雙股的病毒DNA，其中小部份的DNA成環狀(72)，其餘大部分則為線狀(83)，核心中不含有高度鹼性之蛋白，能避免中和病毒DNA之負電性，以利病毒DNA能夠正常的摺疊於外鞘蛋白中(23)。病毒外鞘則由五種保守的蛋白所構成，分別為pUL19(主要之外鞘蛋白，構成所有的殼微粒)，pUL18，pUL38，pUL35及pUL6此五種蛋白。而被膜部分則是由至少20種病毒蛋白所組成，其中最重要的蛋白分別為病毒顆粒轉活化蛋白(virion transactivator protein，VP16)，宿主關閉蛋白(virion host shut-off protein，VHS)，VP22(已被證明能在細胞間散佈)(16)及VP1-2(在HSV-1侵入細胞的過程中扮演重要角色)(4)，其餘被膜蛋白還包含UL14，UL17，VP11/12(UL46)，VP13/14(UL47)，US9，US10及US11。膜套的部分主要由脂雙層所構成，其上鑲嵌了約11種病毒之醣蛋白(glycoprotein)，分別為gB(VP7和VP8.5)，gC(VP8)，gD(VP17和VP18)，gE(VP12.3和VP12.6)，gG(US4)，gH(UL22)，gI(US7)，gL(UL1)和gM(UL11)。

1.1.2. 人類單純疱疹病毒之感染途徑

1.1.2.1. 病毒之入侵(virus entry)

在單純疱疹病毒感染細胞的過程中，病毒首先會藉由病毒套膜上的醣類蛋白(glycoprotein) gC及gB與細胞膜上glycosaminoglycans (GAG)進行結合(33, 66) (81)。接著gD會與細胞膜上的三種受器進行交互作用，這三種受器分別為nectin，疱疹病毒進入調控因子(herpes virus entry mediator, HVEM)及 3-O-sulfated heparin sulfate (3-OS HS) (10) (20) (53, 67, 78)。gD與細胞膜上受器的交互作用造成gD的構形改變，促使gD與gH和gL作用形成一複合體(74)；gB再與此gH/gL複合體作用，而幫助病毒套膜和細胞膜的融合(7) (71)，產生一侵入孔(entry pore)，使病毒顆粒進入細胞(71)。病毒的外鞘藉由細胞內微管(microtubule)的移動，運送到細胞核孔(70)。之後，病毒的基因組會被送入宿主細胞核中進行DNA的複製及轉錄(54)。

1.1.2.2. 病毒基因之複製(virus replication cycle)

在單純疱疹病毒複製的過程中，約有超過 80 種病毒蛋白以階段性的方式表現(35)，病毒 DNA 的轉錄發生在細胞核，病毒蛋白則在細胞質中進行合成，宿主細胞中的 RNA 聚合酶 II (RNA polymerase II)在此過程中扮演著重要的角色(13) (2)。當病毒感染細胞後，病毒基因之複製最開始是由病毒顆粒中的 VP16 轉活化子(transactivator)啟動整個過程，約 2-4 小時，病毒的迅早期基因(Immediate Early gene；IE or α gene) 就會開始表現，這些基因包括 ICP0，ICP4，ICP22，ICP27，ICP47 及 Us1.5。迅早期基因的產物主要為轉活化子，具有與 DNA 結合的能力，可以進一步調控細胞基因及病毒早期基因 (Early or β gene) 的表現；病毒感染後 4-8 小時，早期基因的表現會到達高峰，早期基因的產物多半是與病毒 DNA 複製及核酸代謝相關之蛋白質，這些蛋白質會促進病毒 DNA 的複製以及刺激晚期蛋白的表現。最後表現的是晚期基因 (Late or γ gene)，這些基因受到早期基因的調控，而其主要產物是構成病毒顆粒的結構性蛋白(38) (11, 12, 36, 68)。

1.1.2.3. 病毒之組裝及釋放(virus assembly and egress)

當病毒外鞘蛋白形成後，會藉由和 pUL19 及 pUL6 作用而與病毒基因組在細胞核中進行組裝(34) (69, 77)，當組裝完成後，病毒外鞘蛋白會進一步藉由肌動蛋白(Actin)的幫忙而移動至內核膜(inner nuclear membrane)與之結合(18)，病毒基因組會得到初期套膜(primary envelope)，為了使外鞘蛋白與內核膜能接觸的更好，核膜(nuclear lamina)必須變得更軟或是些微的溶解，這個步驟需要病毒蛋白 pUL31 和 pUL34 的參與(62)，當此兩種蛋白其中之一沒有表現時，病毒從核中釋放的效率會顯著的降低，但此兩種蛋白在成熟病毒當中並不存在，因此可以證明初期病毒顆粒和成熟病毒顆粒存在著結構上的差異。

接著初期病毒顆粒藉由初期套膜與外核膜(outer nuclear membrane)進行融合而將病毒基因組送進細胞質當中，然而外鞘蛋白從細胞核進入細胞質之機制至今尚未被明確的證明，針對此過程科學家們有兩種說法，除了前述外鞘蛋白先與內核膜結合再由外核膜釋放的過程；另一種假設則是外鞘蛋白會直接經由細胞核上擴張的核孔進一步進到細胞質中(43, 79)，但此說法的根據只建立在電子顯微鏡的觀察上，並無細胞生化或基因層面的實驗結果輔佐(52)，因此確切的過程尚待實驗證明。當病毒外鞘由細胞核進入到細胞質之後，包覆有病毒基因組的病毒外鞘會在反式高爾基氏網(trans-Golgi network)上獲得二級套膜(secondary envelope) (51)，此步驟有許多的病毒醣蛋白(glycoprotein)及被膜蛋白(tegument)參與(75)，其中最重要的兩種蛋白為 glycoprotein M 及 pUL11。Glycoprotein M 是成熟病毒套膜上之蛋白，可以於反式高爾基氏網上幫助保留或回收病毒套膜上之醣蛋白(15)；pUL11 則會幫忙指引被膜蛋白移動至反式高爾基氏網上(5, 44)。由這些被膜蛋白及醣蛋白與病毒外鞘蛋白的互動，成熟之病毒顆粒即可被組裝完成(50)，接著病毒顆粒可藉由細胞內的囊泡(vesicle)運送到細胞膜，囊泡和細胞膜進一步融合後即可將病毒顆粒釋放到胞外(49)。

1.2. Annexin II 蛋白質

1.2.1. Annexin II 蛋白質之結構(圖一)

Annexin II 的結構是由 2 個主要結構 (structural domains) 所組成，包括中央核心部份(19) (由 4 個重複的胜肽鏈組成包含有 5 個鈣離子結合位置的右旋超螺旋結構) 以及一段 N-terminal 的尾端(21)。Annexin II 蛋白的氨基端(amino-terminal) 含有 p11 子單元的結合位以及 pp60^{SRC} 和蛋白激酶 C (protein kinase C) 的磷酸化點 (phosphorylation site)。而 Annexin II 蛋白的羧基端則包含了磷脂質(phospholipid)、纖維性肌動蛋白(F-actin) 以及肝素(heparin) 的結合位(76)。Annexin II 分子量為 36 kDa，在一般的情況下也會以四聚體(tetrameters) 的型態存在，分子量為 98 kDa (76)。

1.2.2. Annexin II 蛋白質之功能

Annexin II 在細胞中具有多種生理功能，依其分布的位置不同或細胞種類不同而有所差異(28)。當 Annexin II 在細胞內表現時，會參與胞吞作用(endocytosis) 或是胞吐作用(exocytosis)(46)，也會調控細胞活化以及細胞增殖的反應(9)。當 Annexin II 分布在細胞表面時，則是以細胞膜蛋白(peripheral membrane protein) 的形式存在，在功能上可能是扮演細胞受器(receptor) 的角色，某些病毒如人類巨細胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV) 可以藉由與 Annexin II 進行結合而進一步黏著到細胞上(80)。此外，在內皮細胞中也有觀察到自體抗體會與細胞表面的 Annexin II 結合並促使細胞內的訊息傳遞(82)。

1.2.2.1. Annexin II 與細胞膜結構

Annexin II 是屬於結合在細胞膜上與鈣離子濃度相關的細胞膜結合蛋白(14)，橫跨細胞膜內外，具有鈣離子傳遞通道的特性。文獻中指出，Annexin II 會與細胞膜上之磷脂醯肌醇 4,5 二磷酸 (phospholipid phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate,

PtdIns(4,5)P₂結合(21, 31, 61)，而 Annexin II 和細胞膜的鍵結會受到鈣離子濃度、氫離子濃度，酸鹼環境以及膽固醇存在的影響(41)。另外，Annexin II 也被指出是絲狀肌動蛋白尾部的成員之一(47) (48)，會和肌動蛋白結合(32)，在細胞膜之肌動蛋白聚集處幫助組織似脂筏(Lipid rafts-like)的細胞膜結構(60)。

1.2.2.2. Annexin II 與胞吞作用

文獻中指出許多 Annexin 蛋白如 Annexin A1，Annexin A2 及 Annexin A6 皆會在核內體(endosome)中出現，而 Annexin A1 及 Annexin A2 之 N 端更帶有獨特的序列能與核內體進行交互作用(17, 29, 37, 65)。而利用 siRNA 進行 Annexin II 蛋白的降解會導致細胞中溶小體(lysosome)所媒介的運送作用受到抑制，而此現象可能是因為細胞中之多泡溶酶體(multivesicular endosome)不適當的從早期核內體(early endosome)分離所導致(46)。因此，細胞胞吞作用中之多泡溶酶體(multivesicular endosome)要能正常的運作，除了需要 HRS(hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate)及 ESCRT(endosomal sorting complex required for transport)的幫助外，還需要 Annexin II 蛋白促使其能更有效的從早期核內體脫離。

1.2.2.3. Annexin II 與胞吐作用

許多研究都指出，Annexin II 會參與鈣離子所調控之胞吐作用(1)，而此過程需要藉由蛋白激酶 C (protein kinase C)對 Annexin II 蛋白 N 端 S25 位置的磷酸化來啟動(8, 64)。但也有文獻提出異議，指出在 Annexin II 顯性抑制(dominant negative)的神經內分泌細胞株 PC12 中，細胞之胞吐作用並沒有受到影響(26)。而最近的文獻則證明，利用 siRNA 降解 Annexin II 及利用競爭型胜肽抑制 Annexin II-S100A10 的複合物，皆不會影響鈣離子所調控之細胞胞吐作用(39, 40)。

1.3. Annexin II 蛋白質與病毒之關聯

1.3.1. Annexin II 蛋白質與流感病毒之關聯

文獻中指出，A/WSN/33 strain (H1N1) 的 NA(neuraminidase) 可與 plasminogen (PLG) 結合，而 PLG 活化所產生的 plasmin 因具有似胰蛋白酶的酵素活性，可切割 A/WSN/33 strain (H1N1) 的 HA，進而造成老鼠全身性的感染(24)(25)。其他文獻更證明 plasminogen 可藉由與包裹至病毒顆粒內的一種宿主蛋白 Annexin II 進行結合，特異性地增進其他 IAV 病毒株的複製速率。因此，包裹至病毒顆粒內的 Annexin II 不僅使得病毒在感染初期即可活化 PLG，也使得病毒能夠在呼吸道以外之器官複製，散播而引起嚴重的併發症(42)。

1.3.2. Annexin II 蛋白質與人類免疫不全病毒第一型(Human immunodeficiency virus, HIV-1)之關聯

之前科學家將目標放在尋找巨噬細胞中影響 HIV-1 病毒組裝及釋放的宿主專一蛋白，其中之一為 Annexin 2 (Anx 2) 蛋白(63)。文獻中指出，在 293T 細胞模式中，Anx 2 蛋白會與 HIV-1 Gag 蛋白在細胞膜中含有磷脂醯肌醇 4,5 二磷酸 (phospholipid phosphatidylinositol (4,5) biphosphate, PtdIns(4,5)P₂) 的脂筏 (*Lipid rafts*) 上進行交互作用，幫助病毒的組裝。此外，Anx 2 也會促進 HIV-1 Gag 蛋白的成熟，而增加感染性 HIV-1 病毒的產生(30)。

1.3.3. Annexin II 蛋白質在 C 型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)產生過程中所扮演之角色

文獻中指出當細胞中 Annexin II 蛋白遭到降解，會進一步造成細胞內及細胞外之 HCV 病毒價數降低(3)，但並不影響病毒 RNA 之複製。另外，此文獻中也發現 HCV 中之非結構性蛋白 5A(non-structural protein 5A)會召集(recruit) Annexin II 蛋白進一步幫助 HCV 病毒顆粒的生成，因此證明 Annexin II 蛋白對於 HCV 病毒的產

生具有重要性(3)。

1.3.4. Annexin II 蛋白質與 Human herpes simplex virus type 1 之關聯

文獻中提到 HSV-1 在細胞中移動至釋放的過程中，必須要有具功能性的多囊泡體(Multivesicular bodies)參與(6) (56)；而 Annexin II 也被報導在多囊泡體的形成中扮演著相當重要的角色(27) (17)。此外，在近幾年的文獻當中也指出無論在細胞外之 HSV-1 病毒顆粒或是細胞內之 HSV-1 初期病毒顆粒(primary virion)中，皆有發現 Annexin II 蛋白的存在(45) (55)，因此可以假設 Annexin II 蛋白在 HSV-1 的產生過程中扮演著相當程度的角色。

1.4. 研究動機及目的

1.4.1. 研究動機

由於先前之文獻中有提到 Annexin II 蛋白會被包裹進入宿主細胞核周邊(perinuclear)之初級病毒顆粒當中，並在宿主細胞外之病毒顆粒當中也發現含有 Annexin II 蛋白的存在。另一方面，Annexin II 會參與細胞中多囊泡體(Multivesicular bodies)的生成，而多囊泡體在 HSV 於細胞中移動至釋放的過程中扮演著重要的角色。由於 HSV-1 病毒的釋放過程與病毒和宿主細胞膜間的交互作用有相當程度的關聯，因此本篇研究想要探討宿主細胞中 Annexin II 蛋白在 HSV-1 病毒產生過程中所扮演的角色。

1.4.2. 實驗目的

1.4.2.1. 證明 Annexin II 蛋白量之改變確實會影響單純疱疹病毒之產生

實驗中我們將利用 siRNA 針對細胞中 Annexin II mRNA 進行降解，進一步降低 Annexin II 蛋白質的表現量，接著感染 HSV-1 病毒，之後定量細胞上清液中病毒價數及細胞中病毒價數，以及利用西方墨點法進行實驗觀察 HSV-1 病毒蛋白表

現量，觀察病毒價數及病毒蛋白表現量是否會受到 Annexin II 降解而造成影響。

1.4.2.2. 探討 Annexin II 蛋白如何與單純疱疹病毒進行交互作用進一步造成病毒生長情況之改變

在確認 HSV-1 病毒價數會因為 Annexin II 的降解而改變後，接著要進一步探討 Annexin II 蛋白是如何影響 HSV-1 病毒的生成，我們將進行實驗觀察 Annexin II 蛋白是否會與幫助 HSV-1 釋放相關的病毒蛋白產生交互作用進一步幫助 HSV-1 病毒的產生，藉由上述之實驗，我們將可以探討 Annexin II 在 HSV-1 在病毒釋放過程中所扮演的角色為何，幫助對抗 HSV-1 病毒之研究。



第二章 實驗材料與實驗方法

2.1. 實驗材料

2.1.1. 細胞株

- 非洲綠猴細胞(Vero) (ATCC, CCL-81)
- 人類非小細胞肺癌細胞(A549) (ATCC, CCL-185)
- 人類胚胎腎臟纖維母細胞(HEK 293T) (ATCC, CRL-11268)
- 人類攝護腺癌細胞(LNCaP)(新竹食科所, 60088)

2.1.2. 病毒株

人類單純疱疹病毒第一型 F strain (ATCC, VR-1493)

人類單純疱疹病毒第一型攜帶 VP22 GFP 融合蛋白 (from Dr. Canton)

2.1.3. 培養基與試劑

DMEM (Gibco , 12800-017)

Fetal bovine serum(FBS) (Hyclone, SH3007003)

Antibiotic-Antimycotic (Gibco , 15240)

Sodium hydrogen bicarbonate (NaHCO_3) (Wako , 198-01315)

Trypsin—EDTA (Gibco , 25200)

Phosphate buffered saline (PBS)

配方：氯化鈉 (NaCl , Mallinckrodt)、氯化鉀 (KCl , Merck)、磷酸氫二鈉 (Na_2HPO_4 , Amresco)、磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4 , Amresco) TPCK-trypsin (Sigma, T3053)

Methyl Cellulose (Sigma, M0262)

Formalin (Wako, 062-03861)

Crystal violet (Acros, 229641000)

LipofectamineTM 2000 (Invitrogen , 11668-1019)

Praformaldehyde (Sigma-aldrich , 158127)

Albumin , Bovine Serum (BIONOVAS , 8A0724)

Triton X-100 (Sigma-aldrich, 234729)

DAPI (Sigma-aldrich, D9542)

Methanol (J.T. Baker, 9070)

Ethanol (J.T. Baker, 9400)

Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, D8418)

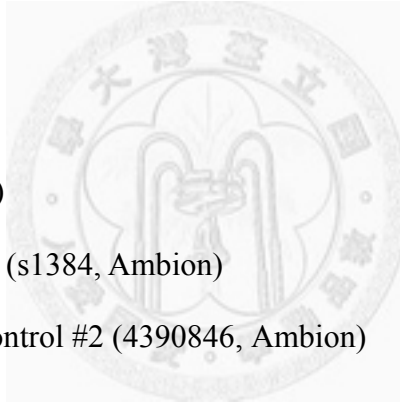
Bradford assay Reagent (BioRad, 500-0006)

2.1.4. 質體

pRK5-Anx 2 (圖十四)

pSilencer - Annexin II (s1384, Ambion)

pSilence - Negative control #2 (4390846, Ambion)



2.1.5. 抗體

一級抗體

Mouse HSV- ICP4 antibody (Virusys, H1A021-100)

Mouse HSV-VP16 antibody (Santa Cruz, SC-7545)

Mouse Annexin II antibody (BD, 610068)

Goat actin antibody (Santa Cruz, SC-1616)

二級抗體

Rabbit anti-mouse HRP conjugate antibody (Zymed, 81-6520)

Donkey anti-goat HRP conjugate antibody (Santa Cruz, SC-2020)

Goat anti-mouse Cy3 conjugate antibody (Jackson Immuno Research,
115-165-105)

2.1.6. 商業實驗試劑套組

小量 DNA 萃取商業套組(Mini *Plus*TM Plasmid DNA Extraction System, Viogene GF2001)

大量 DNA 萃取商業套組(Maxi *Plus*TM Ultrapure Plasmid Extraction System, Viogene GMV2001)

RNA 萃取商業套組(Total RNA Extraction Miniprep System, Viogene GR1001)

基因染色體 DNA 純化商業套組(Blood & Tissue Genomic DNA Extraction System, Viogene GG2001)

病毒RNA萃取商業套組 (QIAamp® Viral RNA Mini Kit) (Qiagen ,52906)

Power SYBR® Green PCR Master Mix (ABI , 67-68-5)

Western LightningTM Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer, MEL105)

2.1.7. 核酸引子 (表一)

Annexin II-F primer

Annexin II-R primer

F-Annexin II qPCR primer

R-Annexin II qPCR primer

Anx2-BamHI-F

Anx2-XbaI-R

Anx2-sequence

Actin-S primer

Actin-AS primer

qHSV-gpB-F primer

qHSV-gpB-R primer

ICP4-1 primer

ICP4-3 primer

2.2. 實驗方法

2.2.1. 病毒與細胞培養

2.2.1.1. 細胞培養

實驗中所使用到之細胞株有非洲綠猴細胞(Vero)、人類胚胎腎臟纖維母細胞(HEK 293T)、人類攝護腺癌細胞(LNCaP)及人類非小細胞肺癌細胞(A549)，Vero及HEK293T細胞使用含10% FBS之DMEM培養基進行培養，LNCaP及A549細胞則是利用含10% FBS之RPMI1640培養基進行培養，細胞培養在75T細胞培養盤中，置於37°C含5%二氧化碳之培養箱中培養。細胞繼代培養之步驟為吸去細胞培養盤中之上清液，利用10mL之PBS清洗細胞，加入2mL之0.05% Trypsin—EDTA溶液，於37°C、5%二氧化碳培養箱中靜置數分鐘，待細胞經Trypsin—EDTA作用而飄起後，加入等量之生長培養基中止Trypsin之作用。將細胞懸浮液取出，離心1,500 rpm 5分鐘，去除上清液後以新鮮生長培養基將細胞重新懸浮。之後將適當體積之細胞懸浮液分裝於細胞培養盤中，補充生長培養基至10mL，繼續培養於37°C含5%二氧化碳之培養箱中。

2.2.1.2. 病毒培養

本實驗中所使用之病毒株為人類單純疱疹病毒第一型 F strain，病毒的培養方法為，將病毒液配製成 M.O.I=0.05 後感染 Vero 細胞，48 小時觀察細胞是否有細胞病變(Cytopathic effect, CPE)產生，若已產生 CPE 則將細胞冷凍解凍三次，1500rpm 離心 5 分鐘去除細胞碎片後收集病毒上清液。所收集之病毒液可利用 Vero

細胞進行溶菌斑試驗定量病毒價數。

2.2.1.3. 病毒感染細胞

將細胞置於 24 孔盤中，將定量的病毒稀釋成 0.2mL 的體積接種細胞，37°C 下吸附 1 小時，1 小時後移去上清液並以 PBS 潤洗三次，之後補入 0.5mL 維持培養液(E2-DMEM)於細胞株中。

2.2.2. 病毒生長時程實驗

在 24 孔盤中放入 5×10^4 細胞，待細胞到達穩定的狀態時，移除培養液，以 M.O.I=0.3 的單純疱疹病毒以 0.2mL 的體積接種細胞，37°C 下吸附 1 小時，1 小時後移去上清液並以 PBS 潤洗三次，之後補入 0.5mL 維持培養液(E2-DMEM)。在病毒感染細胞後特定時間點分別收集上清液和細胞。細胞部分是加入 Trypsin—EDTA 溶液，置於 37°C、5%二氧化碳培養箱數分鐘。待細胞經 Trypsin—EDTA 作用而掉下來後，加入等量之 DMEM 生長培養液以中止 Trypsin 之活性，將細胞懸浮液冷凍解凍三次，離心收集上清液，之後依適當濃度進行病毒溶斑試驗定出病毒價數。

2.2.3. 病毒力價測定試驗

在 24 孔盤中放入 1×10^5 Vero 細胞，於 37°C 含 5%二氧化碳之培養箱培養一天。隔天移除孔中培養液，將待定量的病毒以不同稀釋倍數加入孔中，每孔所含液體體積為 0.2 mL，於 37°C 下吸附 1 小時，1 小時中每 15 分鐘搖動培養盤一次，1 小時後移去上清液，每孔以 0.5mL PBS 清洗三次後加入 1mL 甲基纖維素覆蓋液 (overlapping medium, 配方為:2% Methyl Cellulose 和 2x E4 DMEM 一比一混合)，37°C 培養三天。三天後每孔加入 1mL 的 10% formalin，室溫下固定 1 小時後移去孔內液體，以 1% Crystal violet 染色 15 分鐘後以清水沖洗，待乾燥後計數溶菌斑

形成的個數，計算公式為每孔中之溶菌斑數 $\times 1/\text{每孔中所加入之待測病毒液體積} \times 1/\text{稀釋倍數}$ ，單位為 PFU/mL。

2.2.4. total RNA 萃取及 DNase 處理

實驗所需之細胞先以 0.05% Trypsin 處理 5 分鐘，使之從細胞培養盤底脫離，再以含 FBS 之細胞培養液將細胞打散，細胞懸浮液以 9,000 rpm 離心 1 分鐘，以 PBS 清洗，再以 9,000 rpm 離心 1 分鐘去除上清液後收集細胞。所收集之細胞利用 RNA 萃取商業套組進行萃取，流程如下：每管樣品加入 350 μ L RX buffer (內含 3.5 μ M β -ME)，再使用 20 號針頭(20-G syringe)進行均質化(homogenize)，接著加入等量 (350 μ L)之 70%酒精震盪混勻，將上述混合液置於 Total RNA Mini Column 管柱中，離心 13000rpm 30~60 秒，加入 0.5mL WF buffer 離心 13000rpm 30~60 秒，之後再加入 0.7mL WS buffer 離心 13000rpm 30~60 秒，再以 13000 rpm 離心 3 分鐘將殘留的 WS buffer 揮發，將管柱置於新的 1.5mL 微量離心管上，加入 30~50 μ L 不含 RNase 之二次水(RNase-free ddH₂O) 靜置一分鐘後以 13000 rpm 離心 1~2 分鐘，即得萃取出之 RNA，為確保所萃取之樣本中不會含有 DNA 干擾後續實驗之進行，所萃取出之 RNA 會接著進行 DNase 處理，RNA 則可保存於-80 $^{\circ}$ C 冰箱。

DNase 處理過程如下，取待處理之 RNA 21 μ L，加入 10X RQ buffer 2.5 μ L 及 RQ DNase 1.5 μ L；37 $^{\circ}$ C 處理 30 分鐘後再加入 2.5 μ L 10X RQ stop solution，65 $^{\circ}$ C 處理 10 分鐘即可保存於-70 $^{\circ}$ C 冰箱。

2.2.5. 反轉錄反應(Reverse transcription)

DNase 處理過後之 RNA 先進行濃度測量，所使用之儀器為 NanoDrop 2000 (Thermo SCIENTIFIC)，測量完後取總濃度 1 μ g 之 RNA 再補水至總體積 12 μ L，加入 1 μ L 之 oligo dT 當作引子，70 $^{\circ}$ C 處理 5 分鐘後置於冰上 5 分鐘，使 oligo dT 與 RNA 進行黏合(annealing)，之後再加入 5X MMLV RT buffer 5 μ L、RNAsin 1 μ L、

MMLV 1 μ L 及 2.5mM dNTP 5 μ L ; 42 $^{\circ}$ C 處理 1 小時後再 70 $^{\circ}$ C 作用 15 分鐘即可得反轉錄後之互補 DNA(cDNA)，並可保存於-20 $^{\circ}$ C 冰箱。

2.2.6. 即時相對定量 PCR (Quantitative Real-time PCR)

每一支樣品分別以 Annexin II qPCR primer 和 Actin 兩種引子進行聚合酶鏈鎖反應，每一支樣品皆做二重複反應。Annexin II 代表樣品中 Annexin II 蛋白之表現量，Actin 當作細胞數量的控制組，將樣品中 Annexin II 的量除以 Actin 的量即為細胞中所含有 Annexin II 的量。反應試劑體積與濃度如下：DNA 2 μ L、Primer mix (5 μ M) 1.2 μ L、2X SYBR master mix 10 μ L 及 ddH₂O 6.8 μ L 共 20 μ L。反應條件為 50 $^{\circ}$ C 2 分鐘、95 $^{\circ}$ C 10 分鐘、(95 $^{\circ}$ C 15 秒、60 $^{\circ}$ C 1 分鐘) 以上兩步驟重複 40 個循環，最後保存於 4 $^{\circ}$ C。所使用之機器為 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System。

2.2.7. 蛋白質濃度定量

以 BSA 當作標準曲線之樣本，作六種濃度之序列稀釋 125 μ g/mL、250 μ g/mL、500 μ g/mL、1000 μ g/mL、2000 μ g/mL、2500 μ g/mL。取事先做好 5 倍稀釋之 Bradford dye 990 μ l，加入上述稀釋之 BSA solution 10 λ 。最後 BSA 濃度為 1.25 μ g/mL、2.50 μ g/mL、5.00 μ g/mL、10.00 μ g/mL、20.00 μ g/mL、25.00 μ g/mL。將所要偵測吸光值之樣品用水稀釋 10 倍，再取 10 倍稀釋之樣品 10 μ L 加入 990 μ L 稀釋 5 倍之 Bradford dye，避光反應 10 分鐘。在波長 595nm 下測吸光值，並畫出標準曲線。待測樣品濃度為所計算濃度的 1000 倍。

2.2.8. 西方墨點法(Western blotting)

先以 0.05% Trypsin 處理培養盤中之細胞 5 分鐘，再以含 FBS 之細胞培養液將細胞打散，細胞懸浮液以 9,000 rpm 離心 1 分鐘，以 PBS 清洗，再以 9,000 rpm 離

心 1 分鐘去除上清液後收集細胞。將所收集之細胞以適當體積的 lysis buffer 打散後，於 4°C 以 13,000 rpm 離心 5 分鐘後收取含細胞中蛋白質之上清液。

將所收集之上清液以 Bradford assay 定量蛋白質濃度，取出 25µg 的蛋白量(total protein)，與 4% loading dye 混合後，95°C 加熱 5 分鐘後再置於冰桶約 5 分鐘，4°C 13,000 rpm 離心 1 分鐘，將樣品置入 10%SDS-PAGE 中進行電泳，再利用濕式轉染法(Wet transfer)的方式將 PAGE 上之蛋白轉染到 PVDF membrane 上，利用 5% 脫脂牛奶做為阻隔緩衝液(blocking buffer)阻隔掉 PVDF membrane 上不含蛋白質區域與抗體結合的能力，接著依序將 PVDF membrane 與一級抗體在 37°C 共同培養 90 分鐘，之後以 PBS 潤洗 PVDF membrane 四次，再加入二級抗體，於 37°C 下培養 90 分鐘，PBS 潤洗 PVDF membrane 四次，再利用 Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus 套組中之 Enhanced Luminol Reagent 及 Oxidizing Reagent 一比一混合後加至 PVDF membrane 上，進行冷光反應呈色顯像。

2.2.9. 濕式轉染法

在進行轉染前先將 PVDF membrane 用甲醇浸泡至半透明狀，再用清水清洗約 1 分鐘，之後準備一個容器，依序放上海棉 1 塊（儘量擠出海棉內的空氣）、transfer paper 2 張、PVDF membrane 1 張、transfer paper 2 張及海棉 1 塊，加入適量 transfer buffer 後浸泡約 15 分鐘。打開轉染卡匣（黑面為負極，白面為正極），白面朝下，依序放上已被 transfer buffer 浸濕之海棉 1 塊、圖畫紙 2 張、PVDF membrane 1 張、PAGE gel、圖畫紙 2 張及海棉 1 塊，略為擠壓使多餘的 transfer buffer 排出後，關上轉染卡匣。將卡匣放入濕式轉染裝置中（黑面朝黑面，白面朝紅面；用力壓下），後方的容器裝滿冰塊，以避免在轉染中所產生的高溫影響後續結果；將轉染裝置倒滿 transfer buffer，並選擇適當攪拌子投入後，置於攪拌台上，設定電壓 100V，電流 400mA，時間 60 分鐘即可進行轉染，於轉染時每 20 分鐘補充容器中之冰塊。

2.2.10. 細胞轉染(Transfection)

細胞轉染實驗前一天先將 5×10^4 個細胞/well 之 Vero 細胞放置在二十四孔盤中培養，18 小時後，將質體和 lipofectamine 2000 以 1:2 的比例（例：1 μ g 質體:2 μ L lipofectamine 2000）分別加到兩管含 100 μ L E0-DMEM 之 1.5mL 微量離心管中，5 分鐘後邊震盪邊將質體混合液加入 lipofetamine 2000 混合液中，於室溫中靜置 30 分鐘後加入二十四孔盤中進行轉染實驗。轉染後 4 小時將細胞培養液換成 E10-DMEM，待 48 小時後可將細胞收下進行 RNA 萃取或是西方墨點法實驗，或進一步進行病毒感染實驗。

2.2.11. 小量質體 DNA 萃取

將菌液 1.5 ml 置於微量離心管中，離心 13000rpm 30 秒去除上清液，加入 200 μ L 4 $^{\circ}$ C 之 PD1 buffer，用 vortex 或 pipetting 使細菌細胞重新懸浮；再加 200 μ L PD2 buffer，上下反轉微量離心管使液體混合均勻後靜置 2 分鐘；加入 300 μ L PD3 buffer 並上下反轉微量離心管使液體混合均勻；離心 13000 rpm 5 分鐘，並同時將已標示之 Mini-MTM Column 放置在 Collection tube 上，取離心後的上清液加到 column 中，離心 13000 rpm 1 分鐘，倒掉液體；加 0.5 ml 之 WF Buffer，離心 13000 rpm 1 分鐘，倒掉液體；加 0.7 ml WS Buffer，離心 13000 rpm 1 分鐘，倒掉液體；空離心 13000 rpm 3 分鐘以去掉多餘的 WS buffer；將 column 放在新的 1.5 ml 微量離心管上，加 50 μ L 滅菌後的二次水在 column 中膜的中央，放置 1 分鐘；離心 13000 rpm 2 分鐘，質體 DNA 將會被萃取出來，可將樣品保存在 4 $^{\circ}$ C 或 -20 $^{\circ}$ C 冰箱。

2.2.12. 大量質體 DNA 萃取

挑選一顆欲進行大量質體 DNA 萃取之細菌菌落培養於 3 mL 之 LB 培養液中，37 $^{\circ}$ C 培養 16~18 小時，取 1.5 mL 菌液進行小量質體 DNA 萃取，確認所挑選之菌落所攜帶之質體 DNA 確實為我們所需要的，確定之後將剩餘之 1.5 mL 菌液倒入

含 500 mL LB 培養液之錐形瓶中進行培養，37°C 培養約 12 小時；12 小時後將菌液於 4°C 下 3000 rpm 離心 30 分鐘，將上清液去除，並用 10 mL 之 4°C VP1 buffer 重新懸浮菌體；接著加入 10 mL VP2 buffer，利用旋轉的方式小心的使 buffer 與菌液混合，於室溫中靜置 5 分鐘；再加入 10 mL 以冰塊冷藏過之 VP3 buffer，利用旋轉的方式小心的使 buffer 與菌液混合至白色沉澱物出現，將混合物置於冰上 30 分鐘後於 4°C 下 3000 rpm 離心 30 分鐘，於離心的同時，用 5mL 之 99%酒精通洗 Maxi-V500™ 管柱，再用 10mL 之 VPN buffer 潤洗管柱，丟棄管柱中所流出之液體；待菌液離心完之後，小心將白色沉澱物以外之上清液置於 Maxi-V500™ 中使之流過，將管柱中流出之液體丟棄；接著用 20mL VPN buffer 清洗管柱兩次，將管柱中流出之液體丟棄；加入 10mL VPE buffer 於管柱中並用 50mL 離心管收取管柱中流出含 DNA 之液體，再加入 7.5mL 之室溫異丙醇與之混合並於 4°C 下 3000 rpm 離心 30 分鐘使 DNA 沉澱；離心 30 分鐘後小心去除上清液並留下呈白色之 DNA 沉澱物；用 1mL 之 70%酒精小心清洗 DNA 沉澱物，去除掉酒精後室溫風乾 DNA 沉澱物，待沉澱物成透明塊狀時，加入 200 μ L 之 TE buffer 於 4°C 靜置 18 小時以溶解 DNA 沉澱物；於隔日可收取已溶解之質體 DNA，利用 NANO DROP 測完濃度後，保存於 -80°C 冰箱。

2.2.13. 病毒穿膜試驗 (Entry assay)

在病毒感染前 1 小時先將細胞培養盤置於 4°C，1 小時後吸去上清液，每孔加入 M.O.I=0.3 的單純疱疹病毒以 0.2mL 的體積感染細胞，於 4°C 下培養 60 分鐘，此時病毒只會吸附在細胞表面，而無法穿透細胞膜。之後吸去病毒液，每孔以 0.5 mL 冰冷的 PBS 潤洗三次後，加入 0.2mL E2-DMEM 培養基在 37°C 下培養 30 分鐘，此時病毒可以進入細胞中。之後再以 pH3 的磷酸緩衝溶液(PBS)處理細胞 1 分鐘，將沒有進入到細胞內的病毒去活化。以 PBS 潤洗三次後，加入 Trypsin—EDTA 溶液，置於 37°C、5%二氧化碳培養箱數分鐘。待細胞經 Trypsin 作用而掉落下來後，

加入等量之 DMEM 生長培養液以中止 Trypsin 之活性，10,000 rpm 離心後 1 分鐘後收集細胞。之後用病毒 DNA 萃取方法萃取細胞內的病毒核酸，再以即時定量聚合酶鏈鎖反應(real-time PCR)定量細胞內的病毒核酸，所偵測之目標基因為 ICP4 及 Glycoprotein B。

2.2.14. 病毒核酸萃取

以病毒 RNA 萃取商業套組進行萃取，其流程如下：140 μ L 病毒懸浮液加入 560 μ L 含 carrier RNA 的 AVL 溶液。震盪 15 秒後在室溫靜置 10 分鐘，以 8,000 rpm 短暫離心 10 秒，加入 560 μ L 99%酒精震盪 15 秒，離心 10 秒後將檢體加入 QIAamp spin column，8,000 rpm 離心 1 分鐘。以 500 μ L AW1 溶液通過管柱，8,000rpm 離心 1 分鐘。500 μ L AW2 溶液通過 column，以 14,000 rpm 離心 3 分鐘清洗，再以 14,000 rpm 離心 1 分鐘將殘留的 AW2 揮發。將管柱置於新的 1.5mL 微量離心管上，加入 40 μ L AVE buffer，靜置一分鐘後以 8,000 rpm 離心 1 分鐘，即得萃取出的 RNA，保存於-80 $^{\circ}$ C 冰箱。

2.2.15. 染色體核酸萃取(Genomic DNA extraction)

以 DNA 萃取商業套組進行萃取，其流程如下：200 μ L PBS 打散細胞後，加入 20 μ L proteinase K 和 200 μ L EX 溶液，震盪 20 秒。放入 60 $^{\circ}$ C 水浴 20 分鐘，過程中每 5 分鐘震盪一次，之後將樣品移到 70 $^{\circ}$ C 水浴 10 分鐘，將 proteinase K 去活化。在樣品中加入 210 μ L 99%酒精，混合均勻後將樣品小心地加到 mini column 中，8,000 rpm 離心 2 分鐘，倒掉下層液體。管柱以 0.5mL WS 溶液 8,000 rpm 離心 2 分鐘清洗兩次，再以 13,000 rpm 離心 2 分鐘去除殘留的酒精。最後將管柱置於新的 1.5mL 微量離心管上，加入 40 μ L 70 $^{\circ}$ C 二次水，靜置 2 分鐘後以 13,000 rpm 離心 2 分鐘，即得萃取出的 DNA，保存於-20 $^{\circ}$ C 冰箱。

2.2.16. 流式細胞計數

將所要偵測綠色螢光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)之細胞懸浮液離心 1000rpm 10 分鐘，除去上清液後用 PBS 清洗細胞一次，再離心 1000rpm 10 分鐘，用 3mL PBS 重新懸浮細胞(pipet 至少 20 次)，取 500 μ L 細胞懸浮液加上 500 μ L PBS 放入康氏管後即可上機，所使用之流式細胞儀為 Beckman Coulter Epics XL，計數條件選取 EGFP detection protocol，每次收取 10000 顆細胞並進行數據分析。

2.2.17. 免疫螢光染色

欲染色之細胞先以丙酮與甲醇一比一混合液(aceton:methanol=1:1)在室溫下固定 3 分鐘，PBS 潤洗兩次，再以阻隔緩衝液(3% Bovine Serum Albumin)作用 30 分鐘，去除非特異性結合以避免干擾染色結果。接著再以 0.2% Triton X-100 作用 10 分鐘於細胞膜上打洞以利抗體進入細胞中，10 分鐘後以 PBS 潤洗細胞兩次。細胞與一級抗體在 37 $^{\circ}$ C 共同培養 90 分鐘，之後以 PBS 潤洗細胞四次，再加入二級抗體，在 37 $^{\circ}$ C 下避光培養 90 分鐘，PBS 潤洗細胞四次後，加入 DAPI 螢光染劑(1 μ g/mL)在室溫下避光染色 20 分鐘，最後以二次水潤洗細胞五次，封片後用 Olympus X-71 倒立螢光顯微鏡及正立共軛焦顯微鏡 (ZEISS, LSM 510 META Confocal Microscope)進行觀察。

2.2.18. 實驗數據分析及統計

本論文中主要使用 Excel 軟體(Microsoft Office 2007, Microsoft Taiwan Corp.)進行相關資料之整理及計算，並以 t 檢定(t-test)雙尾檢定及卡方測定(Chi Square test)的方式來探討不同分析對象之間是否有統計上的差異，若 p 值(p value)小於 0.05 則認定兩者有統計上的顯著差異。西方點墨法及 RT-PCR 電泳圖則利用 Image J 軟體(<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)進行量化分析。

第三章 實驗結果

3.1. siRNA 對 Annexin II 之降解效果測試

3.1.1. siRNA - Annexin II 在 293T 細胞中對 Annexin II mRNA 所造成之降解效果

實驗中我們選用 293T 細胞進行測試，在轉染不同濃度(50pmol、20pmol)之 Annexin II siRNA 及 Negative control siRNA 進入細胞後，48 小時收取細胞進行 RNA 萃取並進行 RT-PCR 及 Real time Q-PCR，由結果顯示，所挑選之 siRNA 確實能夠有效的降低細胞中之 Annexin II mRNA，隨著 Annexin II siRNA 濃度的提高，細胞中 Annexin II mRNA 的表現量下降越明顯(P50 v.s. C ; $P < 0.001$) (圖二)。

3.1.2. siRNA - Annexin II 在 Vero 細胞中對 Annexin II mRNA 所造成之降解效果

由於後續實驗將選用適合 HSV-1 感染之 Vero 細胞進行實驗，因此我們也想確認 siRNA - Annexin II 在 Vero 細胞中對 Annexin II mRNA 降解之效率，實驗中將 Vero 細胞轉染不同濃度(100pmol、50pmol、20pmol)之 Annexin II siRNA、Negative control siRNA 及 lipofectamine 2000 進入細胞後，48 小時收取細胞進行 RNA 萃取並進行 Real time Q-PCR 及 RT-PCR，結果顯示隨著 Annexin II siRNA 濃度的提高，細胞中 Annexin II mRNA 的表現量也有明顯下降的趨勢(P100 v.s. C ; $P < 0.001$) (圖三)。

3.2. siRNA 降解 Vero 細胞中 Annexin II 對 HSV-1 病毒的影響

3.2.1. Annexin II 降解對 Vero 細胞上清液中 HSV-1 病毒價數所產生的影響

在確認 Annexin II siRNA 的降解效果之後，我們進一步要觀察細胞中 Annexin II 蛋白的降解是否會對 HSV-1 病毒的產生造成影響。我們選用 Vero 細胞來進行實驗，同樣轉染不同濃度(100pmol、50pmol)之 Annexin II siRNA、Negative control siRNA 及 lipofectamine 2000 進入細胞。於轉染後 48 小時感染 HSV-1 病毒，感染

後 18 小時 (單純疱疹病毒之生長周期約為 18-20 小時) , 分別收取細胞及細胞上清液, 所收取之細胞藉由 RT-PCR 及西方墨點法確認細胞中之 Annexin II mRNA 表現量和 Annexin II 蛋白表現量; 另一方面藉由溶菌斑試驗定量上清液中病毒價數。RT-PCR 結果顯示, 在有轉染 siRNA-Annexin II 的 Vero 細胞中, Annexin II mRNA 表現量和正常細胞相比有約 50% 的下降效果(圖四), 西方墨點法之圖片也顯示, 隨著加入的 siRNA 濃度越高, Vero 細胞中 Annexin II 蛋白的表現量有越明顯下降的趨勢(圖五), 此現象和 RT-PCR 的結果一致; 另一方面, 溶菌斑試驗的結果顯示, 隨著加入的 siRNA 濃度越高, Vero 細胞上清液中之病毒量也有下降的趨勢(圖六)。由此實驗我們也發現, 在加入 100pmol 的 siRNA-Annexin II 進入細胞後, 所產生之 Annexin II 降解效果較好, 故將選用此濃度之 siRNA 進行後續之實驗。

3.2.2. 單純疱疹病毒對於 Annexin II 降解之 Vero 細胞與正常 Vero 細胞之感染比率

由於受到 Annexin II 降解之細胞, 上清液中單純疱疹病毒之價數較正常細胞低, 我們想要了解此現象是否因為細胞被單純疱疹病毒所感染之比例不同所造成。故重複實驗轉染 100pmol 之 Annexin II siRNA、Negative control siRNA 及 lipofectamine 2000 進入 Vero 細胞, 於轉染後 48 小時感染 HSV-1(VP22 GFP)病毒, 感染後 18 小時收取細胞, 由於有被 HSV-1(VP22 GFP)病毒所感染之細胞會表現 GFP, 因此我們可以利用流式細胞儀進行細胞計數, 觀察細胞被 HSV-1(VP22 GFP)病毒感染之比例, 由結果顯示, 在 Annexin II 降解的 Vero 細胞中, 其 GFP 表現比例和未受到 Annexin II 降解之細胞 GFP 表現比例並無明顯差異(圖七)。

由此現象我們想要進一步了解 Annexin II 降解是如何影響 HSV-1 病毒的產生, 將針對 HSV-1 病毒生長周期中之不同階段進行實驗。依照已知單純疱疹病毒的生長過程, 推測可能影響其產生效率的可能原因包括: 病毒和細胞膜上受體結合後, 病毒套膜與細胞膜進行融合, 將病毒主體送入細胞的效率; 病毒遺傳物質在細胞內複製的效率; 病毒顆粒組裝的效率以及病毒由細胞膜包覆完整後釋放到胞外的

效率。

3.2.3. Annexin II 降解對於 HSV-1 病毒侵入 Vero 細胞之效率所造成之影響

實驗中轉染 100pmol 之 Annexin II siRNA、Negative control siRNA 及 lipofectamine 2000 進入 Vero 細胞，於轉染後 48 小時感染 HSV-1(VP22 GFP)病毒，進行病毒穿透試驗，收下細胞後萃取 DNA，利用 SYBR 即時定量聚合酶鏈鎖反應，定量進入細胞中的病毒量。從量化的結果來看，單純疱疹病毒侵入受 Annexin II 降解之 Vero 細胞和侵入正常 Vero 細胞之效率並無顯著差異（圖八），從上述結果推測，單純疱疹病毒侵入細胞之能力並不會因為細胞中 Annexin II 表現量下降而受到影響。

3.2.4. Vero 細胞中 Annexin II 降解對 HSV-1 病毒複製過程所造成之影響

在確認細胞中 Annexin II 表現量降低並不會對單純疱疹病毒侵入細胞的過程造成影響後，接著我們想要知道細胞中 Annexin II 表現量的改變是否會對單純疱疹病毒的複製過程造成影響。首先，我們由不同時間點的病毒總數來觀察細胞中 Annexin II 降解是否會影響病毒之生長。實驗中轉染 100pmol 之 Annexin II siRNA、Negative control siRNA 及 lipofectamine 2000 進入 Vero 細胞，於轉染後 48 小時感染 HSV-1(VP22 GFP)病毒，並於感染後 9 小時、12 小時及 18 小時，分別收取細胞上清液及細胞進行病毒價數定量，由病毒總數(細胞上清液中病毒價數與細胞中病毒價數之總和)來看，在 Annexin II 降解的狀況下，其病毒總數與其他控制組之病毒總數並無差異(圖九 A)，但在觀察各時間點之細胞上清液中病毒價數可以發現在 Annexin II 降解之狀況下，其細胞上清液中之病毒價數較其他控制組之細胞上清液中病毒價數低(圖九 B)，此現象與前述實驗結果相符合。

此外，我們也想進一步測試病毒的遺傳物質在 Annexin II 降解之 Vero 細胞及正常 Vero 細胞中的複製情形是否有所差異。重複進行實驗利用 Vero 細胞轉染

100pmol 之 Annexin II siRNA 進入細胞，於轉染後 48 小時感染 HSV-1 病毒，感染後 18 小時收取細胞，由西方墨點法的結果可以觀察到，隨著加入的 siRNA 濃度越高，Vero 細胞中 Annexin II 蛋白的表現量有越明顯下降的趨勢，此現象和 RT-PCR 的結果一致，但細胞中之病毒後期蛋白(late protein) VP16 並沒有明顯下降的趨勢(圖十)。因此可以初步推論上清液中 HSV-1 病毒價數下降並不是因為 Annexin II 的降解影響了病毒複製的過程，而可能經由影響病毒複製後之組裝及釋放的過程，而造成細胞上清液中 HSV-1 病毒價數的下降。

3.2.5. Vero 細胞中 Annexin II 降解對 HSV-1 病毒釋放效率所造成之影響

為了確定 Annexin II 降解所影響的步驟是在病毒組裝或是釋放階段，我們必須要確定細胞內病毒價數是否有改變，若 Annexin II 的降解所影響的是病毒組裝的步驟，則細胞內及細胞外之病毒價數皆須有下降的現象；而若 Annexin II 的降解會影響病毒釋放的步驟，則應該只有細胞外之病毒價數會受到影響。

因此我們重複進行實驗利用 Vero 細胞轉染 100pmol 之 Annexin II siRNA 進入細胞，於轉染後 48 小時感染 HSV-1 病毒，感染後 18 小時收取細胞上清液及細胞，由溶菌斑試驗定量病毒價數。從病毒價數定量結果我們可以發現，細胞上清液的病毒價數顯示，P100 的上清液病毒價數和 siRNA-negative control, Lipofectamine 2000, 及細胞控制組之細胞上清液病毒價數有顯著差異(圖十一)，而細胞中病毒價數則顯示 P100 和 siRNA-negative control, Lipofectamine 2000, 及細胞控制組比較並無明顯差異(圖十二)。進一步計算病毒釋放比例發現 HSV-1 病毒釋放效率在 Annexin II 降解的 Vero 細胞中明顯比未受到 Annexin II 中來的低(圖十三)。由以上實驗結果，我們可以初步確定細胞中 Annexin II 量降低會影響 HSV-1 病毒從細胞中釋放的步驟造成細胞外之病毒量下降。

3.2.6. HSV-1 病毒蛋白 VP22 在 Annexin II 降解之 Vero 細胞及正常細胞中之分布比較

在發現細胞中 Annexin II 量降低會影響 HSV-1 病毒從細胞中釋放之現象後，我們想要進一步確認 Annexin II 蛋白是否會與 HSV-1 之病毒蛋白進行交互作用而幫助病毒之釋放。如果 Annexin II 會影響 HSV-1 的釋放，則病毒顆粒可能會在細胞中堆積。因此接下來要分析 HSV-1 病毒顆粒在細胞中的運送至釋放過程是否會因為 Annexin II 蛋白質表現量的減少而有改變。

我們利用共軛焦顯微鏡觀察 Vero 細胞在 Annexin II 降解或是正常情況下，HSV-1 病毒在細胞內的位置是否有所不同，實驗中 Vero 細胞在轉染 100pmol 之 Annexin II siRNA 進入細胞後，於轉染後 48 小時感染 HSV-1(VP22 GFP)病毒，所使用之 M.O.I 為 0.3，感染後 18 小時固定細胞並進行免疫螢光染色，由觀察 GFP 表現位置可以發現，在 Annexin II 降解之情況下，HSV-1 之 VP22 皆表現在核膜周圍(圖十四 A)；而在其他控制組細胞中，HSV-1 之 VP22 則是大部分散布於細胞質當中(圖十四 B、C、D)。將共軛焦顯微鏡之圖像結果進一步計數後，可得到如(圖十五)之結果，由條狀圖結果顯示，在 Annexin II 降解之情況下，HSV-1 之 VP22 大部分表現在核膜周圍，只有少部分 VP22 會散布於細胞質中；另一方面，其他控制組細胞中，HSV-1 之 VP22 之散佈情況則是相反。

由上述實驗結果，我們可以初步推論，在 Vero 細胞中，Annexin II 表現量的降低會導致 HSV-1 病毒的釋放過程受到影響，而造成細胞上清液中之病毒價數降低，而此現象有可能是因為在缺少 Annexin II 的情況下，HSV-1 病毒顆粒大部分聚集於細胞核膜周圍，無法進一步藉由細胞質中之囊泡(vesicle)運送到細胞膜而釋放所導致。

3.3. siRNA 降解 A549 細胞中 Annexin II 表現量對 HSV-1 病毒之影響

由先前的實驗我們發現，在 Annexin II 降解之 Vero 細胞上清液中，單純疱疹病毒價數比正常 Vero 細胞上清液中病毒價數低，為了證明這樣的結果並非是 Vero 細胞的特異性，我們利用 A549 細胞進行相同的實驗，A549 也是一種已知可支持單純疱疹複製的肺表皮細胞株。實驗中轉染 100pmol 之 Annexin II siRNA、Negative control siRNA 及 lipofectamine 2000 進入 Vero 細胞，於轉染後 48 小時感染 HSV-1(VP22 GFP)病毒，感染後 18 小時分別收取細胞上清液及細胞，由溶菌斑試驗定量病毒價數，西方墨點法確認 Annexin II 蛋白表現量。從病毒價數定量結果我們可以發現，P100 的上清液病毒價數和 siRNA，Lipofectamine 2000，及細胞控制組之細胞上清液病毒價數有顯著差異(圖十六)；而細胞中病毒價數則顯示 P100 和 siRNA-negative control 及 Lipofectamine 2000 細胞控制組相比較並無明顯差異(圖十七)。進一步計算病毒釋放比例發現 HSV-1 病毒釋放效率在 Annexin II 降解的 Vero 細胞中明顯比未受到 Annexin II 中來的低(圖十八)。此外，由西方墨點法的結果可以觀察到，隨著加入的 siRNA 濃度越高，Vero 細胞中 Annexin II 蛋白的表現量有越明顯下降的趨勢，但細胞中之病毒後期蛋白(late protein) VP16 沒有明顯下降的趨勢(圖十九)。

以上在 A549 細胞中所得之結果，皆與 Vero 細胞中所觀察到之現象相符，因此我們可以確定此現象並非是由 Vero 細胞的特異性所造成。

3.4. 過度表現 Annexin II 對 HSV-1 病毒的影響

由先前實驗我們初步推論，細胞中 Annexin II 表現量的降低會導致 HSV-1 病毒的釋放過程受到影響，進而造成細胞上清液中之病毒價數降低，因此我們想要進一步探討是否細胞中 Annexin II 表現量增加會反過來幫助病毒的釋放。由於 siRNA 在 Vero 細胞中轉染效率較差，導致 Vero 細胞中 Annexin II 的表現量無法抑制到很低來進行基因過度表現的實驗，因此我們選用 293T 細胞(在此細胞株中的

Annexin II 表現量相當低)來當作 Annexin II knock out 模型，在此細胞株中觀察過度表現 Annexin II 是否會幫助 HSV-1 病毒的生成。

3.4.1. pRK5-Anx2 質體 DNA 之製備

在進行基因過度表現之實驗前我們須先製備能持續表現 Annexin II 基因之質體 DNA，實驗中我們萃取 Vero 細胞中的 mRNA，接著利用 oligo dT 進行反轉錄反應，再用核酸引子 Anx2-Bam HI-F 及 Anx2-XBa I-R 進行聚合酶連鎖反應放大全長之 Annexin II 基因，將所放大出來之 Annexin II 基因利用 TA cloning 的方法接入 PCR II-TOPO 載體中，再由 BamHI 及 Xba I 兩個限制酵素將 1.2 kb 之全長 Annexin II 基因從 PCR II-TOPO 上切下，接入由 BamHI 及 Xba I 兩個限制酵素處理過之 pRK5-Flag 載體中，得到全長 5.9 kb 之 pRK5-Anx2 質體 DNA(圖二十)。

3.4.2. pRK5-Anx2 質體 DNA 過度表現 Annexin II 基因之實驗

實驗中轉染不同濃度(0 μ g、1 μ g、2 μ g、4 μ g)之 pRK5-Anx2 質體 DNA 進入 LNCaP 細胞(攝護腺癌細胞，在此細胞株中的 Annexin II 基因高度甲基化，導致無法表現蛋白)中，再利用西方墨點法觀察 LNCaP 細胞中之 Annexin II 蛋白表現量，西方墨點法結果顯示，pRK5-Anx2 質體 DNA 確實能夠在 LNCaP 細胞中表現 Annexin II 基因並表現蛋白質(圖二十一)。

3.4.3. 在 293T 細胞中過度表現 Annexin II 蛋白對 HSV-1 病毒產生所造成之影響

在確認 pRK5-Anx2 質體 DNA 確實能夠在細胞中過度表現 Annexin II 基因後，進一步我們轉染 pRK5-Anx2 進入 293T 細胞中，於轉染後 48 小時感染 HSV-1 病毒，所使用之 M.O.I 為 0.3，感染後 18 小時收取細胞上清液及細胞，由溶菌斑試驗定量病毒價數，西方墨點法觀察細胞中蛋白之表現量。從病毒價數定量結果我們可以發現，過度表現 Annexin II 基因的 293T 細胞上清液中病毒價數和 Lipofectamine 2000 控制組之細胞上清液中病毒價數有顯著差異($P < 0.001$)(圖二十二)，而細胞中

病毒價數則顯示和 Lipofectamine 2000 控制組相比較並無明顯差異(圖二十三)。進一步計算病毒釋放比例發現 HSV-1 病毒釋放效率在過度表現 Annexin II 基因的 293To 細胞中明顯比 Lipofectamine 2000 控制組來的高(圖二十四)。

此外，由西方墨點法的結果可以發現，在過度表現 Annexin II 基因之 293T 細胞中，Annexin II 蛋白表現量確實比 Lipofectamine 2000 控制組多，但細胞中之病毒後期蛋白(late protein) VP16 表現量並沒有隨著 Annexin II 蛋白表現量提高而改變(圖二十五)。

由上述實驗結果，我們可以得知，於細胞中過度表現 Annexin II 蛋白確實能夠增加細胞上清液中 HSV-1 病毒價數，提高 HSV-1 從細胞中釋放之效率，且此現象並非由於過度表現 Annexin II 蛋白影響病毒複製過程所導致。



第四章 討論

在本研究中，我們想要探討細胞當中之 Annexin II 蛋白在人類單純疱疹病毒第一型生長過程中所扮演的角色。從結果得知，在 Annexin II 蛋白降解的 Vero 細胞中，感染單純疱疹病毒第一型第 18 小時上清液中之病毒價數較正常細胞有明顯減少的現象，而此現象並非是因為 Annexin II 蛋白降解影響病毒進入細胞(Entry)或病毒複製過程所導致；由於受到 Annexin II 降解之 Vero 細胞在感染病毒後第 18 小時之細胞中病毒價數與正常細胞相比並無明顯差異，所以我們推論 Vero 細胞在受到 Annexin II 降解並感染 HSV-1 後第 18 小時之細胞上清液中病毒價數降低，應是由於 Annexin II 降解影響病毒從細胞中釋放的過程所導致。

Annexin II 蛋白在先前的文獻中已被證明與多種病毒之生長過程或致病過程相關，包含 DNA 病毒(如人類巨細胞病毒)及 RNA 病毒(如流感病毒，C 型肝炎病毒及人類免疫不全病毒第一型)。由於巨細胞病毒與單純疱疹病毒同為 DNA 病毒也同屬疱疹病毒科，故於巨細胞病毒中之研究結果值得我們探討，在人類巨細胞病毒的研究中，首先發現到從人類纖維母細胞中所培養出來之病毒顆粒，其中帶有宿主細胞之 Annexin II 蛋白(80)；後續的研究指出，細胞中的 Annexin II 蛋白會與巨細胞病毒中之 glycoprotein B 進行交互作用(58)，除此之外，Annexin II 蛋白的存在會幫助病毒與宿主細胞膜結合及融合(59)，但在 Annexin II 蛋白缺少的情況下，巨細胞病毒進入人類纖維母細胞的能力並不受到影響(57)，此現象與本篇研究中所

得之結果一致，本篇研究中利用 siRNA 降解細胞中之 Annexin II 蛋白並不會影響單純疱疹病毒進入細胞的能力。但本研究與文獻之實驗條件及測定方法尚有相異之處，如本研究中所使用進行病毒入侵實驗(entry assay)之細胞為 Vero 細胞而文獻中所使用之細胞為 293 細胞；另外本篇研究利用即時定量聚合酶連鎖反應針對單純疱疹病毒之 ICP4 病毒基因進行放大以定量進入細胞中之病毒數量，而文獻中則是利用免疫螢光染色的方法，偵測細胞中單純疱疹病毒之迅早期蛋白 IE72 的數量來定量病毒進入到細胞中之效率。另外，先前也有論文已證明，於細胞外之單純疱疹病毒顆粒中存在有宿主細胞之 Annexin II 蛋白(45)，唯獨 Annexin II 蛋白與單純疱疹病毒之間是否有交互作用則尚待被證實。

單純疱疹病毒從細胞核進入細胞質並取得病毒套膜後，會進一步藉由細胞內的多泡溶酶體(multivesicular endosome)運送到細胞膜，囊泡和細胞膜進一步融合後即可將病毒顆粒釋放到胞外。已有許多研究指出，多泡溶酶體(multivesicular endosome)對單純疱疹病毒的產生相當重要(6, 56)，而多泡溶酶體的生成須要三個重要的分子，分別為 HRS(hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate)，ESCRT(endosomal sorting complex required for transport)複合體及 Annexin II。文獻中已針對 ESCRT 進行研究，發現當影響 ESCRT 之正常功能，單純疱疹病毒的產生也會受到影響，如過度表現 ESCRT 複合體中之 ESCRT-III 顯性抑制(dominant negative)蛋白，會導致單純疱疹病毒從細胞中釋放之步驟受到抑制，但卻不影響病

毒侵入細胞之能力(56)。此現象也與本篇實驗之結果相符，當細胞中之 Annexin II 蛋白受到降解，會影響單純疱疹病毒從細胞中釋放之能力，因此我們可以推論單純疱疹病毒在 Annexin II 降解細胞中之釋放能力降低有可能是因為多泡溶酶體 (multivesicular endosome)失去正常功能所造成。

在本篇研究中，我們分別針對 Vero、A549、293T 三種不同細胞進行實驗，觀察單純疱疹病毒於這些細胞中之釋放效率，從結果中我們可以發現，在正常細胞中釋放比例由 5%至 80%不等，其中又以 293T 細胞釋放效率最差，而病毒在 A549 細胞中之釋放效率則是極佳，差異非常大，然而並無文獻探究這些細胞間之差異。於先前之文獻中有討論到，利用 M.O.I=0.4 之單純疱疹病毒感染 Vero 細胞後，24 小時之病毒釋放比例約為 15% (73)，與本篇實驗所得之結果 20%有些不同，推測此差異可能為初始病毒量(文獻為 0.4 而本篇研究為 0.3)及感染時間點(文獻中收取感染後第 24 小時之上清液及細胞，本篇實驗則收取感染後第 18 小時之上清液及細胞)之不同所造成。

在先前的文獻中已有實驗證明，單純疱疹病毒在感染正常 COS-7 細胞或 Annexin II 蛋白喪失之 LNCaP 細胞後，其細胞中病毒價數並無明顯差異(55)，本篇研究之實驗結果也與此發現差異不大，單純疱疹病毒在過度表現 Annexin II 蛋白之 293T 細胞及正常 293T 細胞中或是 Annexin II 降解之 Vero 細胞及正常 Vero 細胞中，其病毒價數並無顯著差異。然而本篇研究與文獻主要的差異在於文獻中使用兩種不同細胞進行比較，且所收取細胞之時間點為感染後 72 小時，另外，文獻中也未針對細胞上清液中之病毒價數進行比較。而由此篇文獻之結果，我們發現到在完

全喪失 Annexin II 蛋白之 LNCaP 細胞當中，單純疱疹病毒之價數竟與 Annexin II 正常表現之 COS-7 細胞中病毒價數相當，由此可推論單純疱疹病毒於 Annexin II 蛋白喪失的狀況下還是能夠在細胞質中進行運送，只是此過程所仰賴之分子為何，還須進一步證實，但在此可以推測或許是 HRS 或 ESCRT 複合體彌補了 Annexin II 所喪失之功能。

Annexin II 蛋白在許多的研究中已被指出能夠和肌動蛋白之細胞骨架進行交互作用(22)，而有趣的是，單純疱疹病毒之外鞘蛋白(nucleocapsids)也是藉由肌動蛋白細胞骨架，在細胞核中移動至細胞核膜的位置進一步進入細胞質中(18)，因此 Annexin II 蛋白可能幫助細胞核中之外鞘蛋白在細胞核中移動，或是藉由其能夠組織細胞膜之功能幫助外鞘蛋白與內核膜結合。由此推論可以解釋本篇實驗中共軛焦顯微鏡所觀察到之結果，在 Annexin II 蛋白降解之 Vero 細胞中，大部分攜帶 VP22 GFP 之病毒顆粒都聚集於細胞核周圍，然而在正常之 Vero 細胞中，VP22 GFP 則是均勻的散佈在整個細胞質當中。

由本篇研究我們發現，細胞中 Annexin II 降解會導致單純疱疹病毒聚集在細胞核周圍，造成病毒從細胞中釋放的效率降低。因此後續之實驗，我們將要利用 membrane flotation 的方法來確認共軛焦顯微鏡所觀察到的現象，是否在 Annexin II 降解之細胞中，HSV-1 病毒顆粒主要是聚集在細胞核膜周圍，而此現象是否因為

Annexin II 的降解影響其與病毒蛋白之交互作用而造成病毒釋放的效率降低；另一方面，我們將探討 Annexin II 蛋白是如何與人類單純疱疹病毒第一型進行交互作用，我們可以利用免疫共同沉澱法將細胞中會與 Annexin II 蛋白相結合之蛋白共沉澱下來，從中搜尋是否有人類單純疱疹第一型之病毒蛋白存在，如確實有發現病毒蛋白會與 Annexin II 蛋白交互作用，則下一步將探討兩者間是透過何種機制作用而影響病毒顆粒的釋放，藉由確認 Anneixn II 蛋白與人類單純疱疹第一型病毒蛋白兩者間的作用機制，可以幫助我們進一步研究對抗人類單純疱疹病毒第一型的方法。



第五章 參考文獻

1. Ali, S. M., M. J. Geisow, and R. D. Burgoyne. 1989. A role for calpactin in calcium-dependent exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Nature* 340:313-5.
2. Alwine, J. C., W. L. Steinhart, and C. W. Hill. 1974. Transcription of herpes simplex type 1 DNA in nuclei isolated from infected HEp-2 and KB cells. *Virology* 60:302-7.
3. Backes, P., D. Quinkert, S. Reiss, M. Binder, M. Zayas, U. Rescher, V. Gerke, R. Bartenschlager, and V. Lohmann. Role of annexin A2 in the production of infectious hepatitis C virus particles. *J Virol*.
4. Batterson, W., and B. Roizman. 1983. Characterization of the herpes simplex virion-associated factor responsible for the induction of alpha genes. *J Virol* 46:371-7.
5. Bowzard, J. B., R. J. Visalli, C. B. Wilson, J. S. Loomis, E. M. Callahan, R. J. Courtney, and J. W. Wills. 2000. Membrane targeting properties of a herpesvirus tegument protein-retrovirus Gag chimera. *J Virol* 74:8692-9.
6. Calistri, A., P. Sette, C. Salata, E. Cancellotti, C. Forghieri, A. Comin, H. Gottlinger, G. Campadelli-Fiume, G. Palu, and C. Parolin. 2007. Intracellular trafficking and maturation of herpes simplex virus type 1 gB and virus egress require functional biogenesis of multivesicular bodies. *J Virol* 81:11468-78.
7. Campadelli-Fiume, G., F. Cocchi, L. Menotti, and M. Lopez. 2000. The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells. *Rev Med Virol* 10:305-19.
8. Chasserot-Golaz, S., N. Vitale, I. Sagot, B. Delouche, S. Dirrig, L. A. Pradel, J. P. Henry, D. Aunis, and M. F. Bader. 1996. Annexin II in exocytosis: catecholamine secretion requires the translocation of p36 to the subplasmalemmal region in chromaffin cells. *J Cell Biol* 133:1217-36.
9. Chiang, Y., A. Rizzino, Z. A. Sibenaller, M. S. Wold, and J. K. Vishwanatha. 1999. Specific down-regulation of annexin II expression in human cells interferes with cell proliferation. *Mol Cell Biochem* 199:139-47.
10. Cocchi, F., L. Menotti, P. Dubreuil, M. Lopez, and G. Campadelli-Fiume. 2000. Cell-to-cell spread of wild-type herpes simplex virus type 1, but not of syncytial strains, is mediated by the immunoglobulin-like receptors that mediate virion entry, nectin1 (PRR1/HveC/HlgR) and nectin2 (PRR2/HveB). *J Virol* 74:3909-17.
11. Conley, A. J., D. M. Knipe, P. C. Jones, and B. Roizman. 1981. Molecular genetics of herpes simplex virus. VII. Characterization of a

- temperature-sensitive mutant produced by in vitro mutagenesis and defective in DNA synthesis and accumulation of gamma polypeptides. *J Virol* 37:191-206.
12. Costa, R. H., B. G. Devi, K. P. Anderson, B. H. Gaylord, and E. K. Wagner. 1981. Characterization of a major late herpes simplex virus type 1 mRNA. *J Virol* 38:483-96.
 13. Costanzo, F., G. Campadelli-Fiume, L. Foa-Tomasi, and E. Cassai. 1977. Evidence that herpes simplex virus DNA is transcribed by cellular RNA polymerase B. *J Virol* 21:996-1001.
 14. Creutz, C. E., L. G. Dowling, J. J. Sando, C. Villar-Palasi, J. H. Whipple, and W. J. Zaks. 1983. Characterization of the chromobindins. Soluble proteins that bind to the chromaffin granule membrane in the presence of Ca²⁺. *J Biol Chem* 258:14664-74.
 15. Crump, C. M., B. Bruun, S. Bell, L. E. Pomeranz, T. Minson, and H. M. Browne. 2004. Alphaherpesvirus glycoprotein M causes the relocalization of plasma membrane proteins. *J Gen Virol* 85:3517-27.
 16. Elliott, G., and P. O'Hare. 1997. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 88:223-33.
 17. Emans, N., J. P. Gorvel, C. Walter, V. Gerke, R. Kellner, G. Griffiths, and J. Gruenberg. 1993. Annexin II is a major component of fusogenic endosomal vesicles. *J Cell Biol* 120:1357-69.
 18. Forest, T., S. Barnard, and J. D. Baines. 2005. Active intranuclear movement of herpesvirus capsids. *Nat Cell Biol* 7:429-31.
 19. Geisow, M. J. 1986. Common domain structure of Ca²⁺ and lipid-binding proteins. *FEBS Lett* 203:99-103.
 20. Geraghty, R. J., C. Krummenacher, G. H. Cohen, R. J. Eisenberg, and P. G. Spear. 1998. Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* 280:1618-20.
 21. Gerke, V., C. E. Creutz, and S. E. Moss. 2005. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:449-61.
 22. Gerke, V., and S. E. Moss. 2002. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* 82:331-71.
 23. Gibson, W., and B. Roizman. 1971. Compartmentalization of spermine and spermidine in the herpes simplex virion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:2818-21.
 24. Goto, H., and Y. Kawaoka. 1998. A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10224-8.
 25. Goto, H., K. Wells, A. Takada, and Y. Kawaoka. 2001. Plasminogen-binding activity of neuraminidase determines the pathogenicity of influenza A virus. *J*

- Virol 75:9297-301.
26. Graham, M. E., V. Gerke, and R. D. Burgoyne. 1997. Modification of annexin II expression in PC12 cell lines does not affect Ca(2+)-dependent exocytosis. *Mol Biol Cell* 8:431-42.
 27. Gruenberg, J., and H. Stenmark. 2004. The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:317-23.
 28. Hajjar, K. A., and S. Krishnan. 1999. Annexin II: a mediator of the plasmin/plasminogen activator system. *Trends Cardiovasc Med* 9:128-38.
 29. Harder, T., and V. Gerke. 1993. The subcellular distribution of early endosomes is affected by the annexin IIp11(2) complex. *J Cell Biol* 123:1119-32.
 30. Harrist, A. V., E. V. Ryzhova, T. Harvey, and F. Gonzalez-Scarano. 2009. Anx2 interacts with HIV-1 Gag at phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate-containing lipid rafts and increases viral production in 293T cells. *PLoS One* 4:e5020.
 31. Hayes, M. J., C. J. Merrifield, D. Shao, J. Ayala-Sanmartin, C. D. Schorey, T. P. Levine, J. Proust, J. Curran, M. Bailly, and S. E. Moss. 2004. Annexin 2 binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on endocytic vesicles is regulated by the stress response pathway. *J Biol Chem* 279:14157-64.
 32. Hayes, M. J., D. M. Shao, A. Grieve, T. Levine, M. Bailly, and S. E. Moss. 2009. Annexin A2 at the interface between F-actin and membranes enriched in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochim Biophys Acta* 1793:1086-95.
 33. Herold, B. C., D. WuDunn, N. Soltys, and P. G. Spear. 1991. Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity. *J Virol* 65:1090-8.
 34. Homa, F. L., and J. C. Brown. 1997. Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus. *Rev Med Virol* 7:107-122.
 35. Honess, R. W., and B. Roizman. 1974. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J Virol* 14:8-19.
 36. Jones, P. C., and B. Roizman. 1979. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. VIII. The transcription program consists of three phases during which both extent of transcription and accumulation of RNA in the cytoplasm are regulated. *J Virol* 31:299-314.
 37. Jost, M., D. Zeuschner, J. Seemann, K. Weber, and V. Gerke. 1997. Identification and characterization of a novel type of annexin-membrane interaction: Ca²⁺ is not required for the association of annexin II with early endosomes. *J Cell Sci* 110 (Pt 2):221-8.
 38. Knipe, D. M., and A. Cliffe. 2008. Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. *Nat Rev Microbiol* 6:211-21.

39. Knop, M., E. Aareskjold, G. Bode, and V. Gerke. 2004. Rab3D and annexin A2 play a role in regulated secretion of vWF, but not tPA, from endothelial cells. *EMBO J* 23:2982-92.
40. Konig, J., J. Prenen, B. Nilius, and V. Gerke. 1998. The annexin II-p11 complex is involved in regulated exocytosis in bovine pulmonary artery endothelial cells. *J Biol Chem* 273:19679-84.
41. Lambert, O., N. Cavusoglu, J. Gallay, M. Vincent, J. L. Rigaud, J. P. Henry, and J. Ayala-Sanmartin. 2004. Novel organization and properties of annexin 2-membrane complexes. *J Biol Chem* 279:10872-82.
42. LeBouder, F., E. Morello, G. F. Rimmelzwaan, F. Bosse, C. Pechoux, B. Delmas, and B. Riteau. 2008. Annexin II incorporated into influenza virus particles supports virus replication by converting plasminogen into plasmin. *J Virol* 82:6820-8.
43. Leuzinger, H., U. Ziegler, E. M. Schraner, C. Fraefel, D. L. Glauser, I. Heid, M. Ackermann, M. Mueller, and P. Wild. 2005. Herpes simplex virus 1 envelopment follows two diverse pathways. *J Virol* 79:13047-59.
44. Loomis, J. S., R. J. Courtney, and J. W. Wills. 2003. Binding partners for the UL11 tegument protein of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 77:11417-24.
45. Loret, S., G. Guay, and R. Lippe. 2008. Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol* 82:8605-18.
46. Mayran, N., R. G. Parton, and J. Gruenberg. 2003. Annexin II regulates multivesicular endosome biogenesis in the degradation pathway of animal cells. *EMBO J* 22:3242-53.
47. Merrifield, C. J., S. E. Moss, C. Ballestrem, B. A. Imhof, G. Giese, I. Wunderlich, and W. Almers. 1999. Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in cultured mast cells. *Nat Cell Biol* 1:72-4.
48. Merrifield, C. J., U. Rescher, W. Almers, J. Proust, V. Gerke, A. S. Sechi, and S. E. Moss. 2001. Annexin 2 has an essential role in actin-based macropinocytic rocketing. *Curr Biol* 11:1136-41.
49. Mettenleiter, T. C. 2002. Herpesvirus assembly and egress. *J Virol* 76:1537-47.
50. Mettenleiter, T. C. 2006. Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: the herpesvirus assembly puzzle. *Vet Microbiol* 113:163-9.
51. Mettenleiter, T. C., B. G. Klupp, and H. Granzow. 2006. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr Opin Microbiol* 9:423-9.
52. Mettenleiter, T. C., and T. Minson. 2006. Egress of alphaherpesviruses. *J Virol* 80:1610-1; author reply 1611-2.
53. Montgomery, R. I., M. S. Warner, B. J. Lum, and P. G. Spear. 1996. Herpes

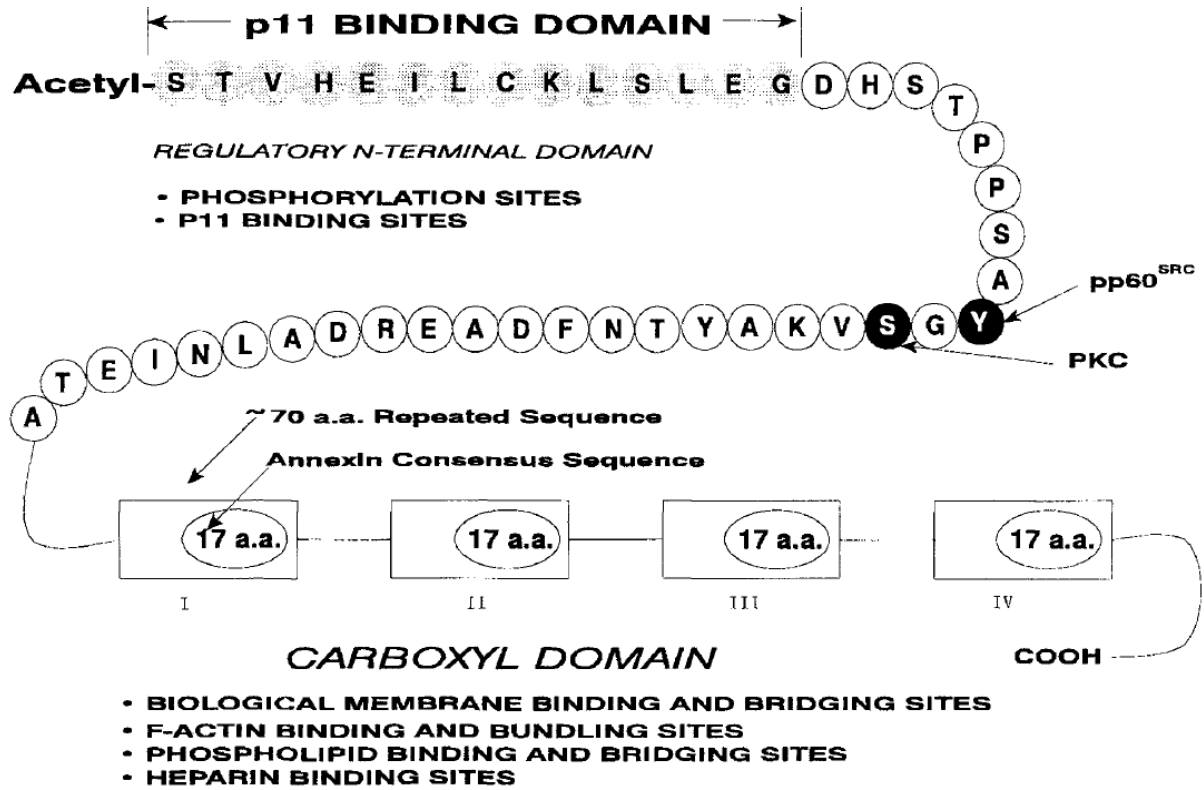
- simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* 87:427-36.
54. Ojala, P. M., B. Sodeik, M. W. Ebersold, U. Kutay, and A. Helenius. 2000. Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol Cell Biol* 20:4922-31.
 55. Padula, M. E., M. L. Sydnor, and D. W. Wilson. 2009. Isolation and preliminary characterization of herpes simplex virus 1 primary enveloped virions from the perinuclear space. *J Virol* 83:4757-65.
 56. Pawliczek, T., and C. M. Crump. 2009. Herpes simplex virus type 1 production requires a functional ESCRT-III complex but is independent of TSG101 and ALIX expression. *J Virol* 83:11254-64.
 57. Pietropaolo, R., and T. Compton. 1999. Interference with annexin II has no effect on entry of human cytomegalovirus into fibroblast cells. *J Gen Virol* 80 (Pt 7):1807-16.
 58. Pietropaolo, R. L., and T. Compton. 1997. Direct interaction between human cytomegalovirus glycoprotein B and cellular annexin II. *J Virol* 71:9803-7.
 59. Raynor, C. M., J. F. Wright, D. M. Waisman, and E. L. Pryzdial. 1999. Annexin II enhances cytomegalovirus binding and fusion to phospholipid membranes. *Biochemistry* 38:5089-95.
 60. Rescher, U., and V. Gerke. 2004. Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci* 117:2631-9.
 61. Rescher, U., D. Ruhe, C. Ludwig, N. Zobiack, and V. Gerke. 2004. Annexin 2 is a phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding protein recruited to actin assembly sites at cellular membranes. *J Cell Sci* 117:3473-80.
 62. Reynolds, A. E., L. Liang, and J. D. Baines. 2004. Conformational changes in the nuclear lamina induced by herpes simplex virus type 1 require genes U(L)31 and U(L)34. *J Virol* 78:5564-75.
 63. Ryzhova, E. V., R. M. Vos, A. V. Albright, A. V. Harrist, T. Harvey, and F. Gonzalez-Scarano. 2006. Annexin 2: a novel human immunodeficiency virus type 1 Gag binding protein involved in replication in monocyte-derived macrophages. *J Virol* 80:2694-704.
 64. Sarafian, T., L. A. Pradel, J. P. Henry, D. Aunis, and M. F. Bader. 1991. The participation of annexin II (calpactin I) in calcium-evoked exocytosis requires protein kinase C. *J Cell Biol* 114:1135-47.
 65. Seemann, J., K. Weber, M. Osborn, R. G. Parton, and V. Gerke. 1996. The association of annexin I with early endosomes is regulated by Ca²⁺ and requires an intact N-terminal domain. *Mol Biol Cell* 7:1359-74.

66. Shieh, M. T., D. WuDunn, R. I. Montgomery, J. D. Esko, and P. G. Spear. 1992. Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. *J Cell Biol* 116:1273-81.
67. Shukla, D., J. Liu, P. Blaiklock, N. W. Shworak, X. Bai, J. D. Esko, G. H. Cohen, R. J. Eisenberg, R. D. Rosenberg, and P. G. Spear. 1999. A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* 99:13-22.
68. Silver, S., and B. Roizman. 1985. gamma 2-Thymidine kinase chimeras are identically transcribed but regulated a gamma 2 genes in herpes simplex virus genomes and as beta genes in cell genomes. *Mol Cell Biol* 5:518-28.
69. Singer, G. P., W. W. Newcomb, D. R. Thomsen, F. L. Homa, and J. C. Brown. 2005. Identification of a region in the herpes simplex virus scaffolding protein required for interaction with the portal. *J Virol* 79:132-9.
70. Sodeik, B., M. W. Ebersold, and A. Helenius. 1997. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol* 136:1007-21.
71. Spear, P. G., and R. Longnecker. 2003. Herpesvirus entry: an update. *J Virol* 77:10179-85.
72. Strang, B. L., and N. D. Stow. 2005. Circularization of the herpes simplex virus type 1 genome upon lytic infection. *J Virol* 79:12487-94.
73. Su, C. T., J. T. Hsu, H. P. Hsieh, P. H. Lin, T. C. Chen, C. L. Kao, C. N. Lee, and S. Y. Chang. 2008. Anti-HSV activity of digitoxin and its possible mechanisms. *Antiviral Res* 79:62-70.
74. Subramanian, R. P., and R. J. Geraghty. 2007. Herpes simplex virus type 1 mediates fusion through a hemifusion intermediate by sequential activity of glycoproteins D, H, L, and B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:2903-8.
75. Turcotte, S., J. Letellier, and R. Lippe. 2005. Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress. *J Virol* 79:8847-60.
76. Waisman, D. M. 1995. Annexin II tetramer: structure and function. *Mol Cell Biochem* 149-150:301-22.
77. Walters, J. N., G. L. Sexton, J. M. McCaffery, and P. Desai. 2003. Mutation of single hydrophobic residue I27, L35, F39, L58, L65, L67, or L71 in the N terminus of VP5 abolishes interaction with the scaffold protein and prevents closure of herpes simplex virus type 1 capsid shells. *J Virol* 77:4043-59.
78. Warner, M. S., R. J. Geraghty, W. M. Martinez, R. I. Montgomery, J. C. Whitbeck, R. Xu, R. J. Eisenberg, G. H. Cohen, and P. G. Spear. 1998. A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HveB) confers susceptibility to infection by mutants of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type

- 2, and pseudorabies virus. *Virology* 246:179-89.
79. Wild, P., M. Engels, C. Senn, K. Tobler, U. Ziegler, E. M. Schraner, E. Loepfe, M. Ackermann, M. Mueller, and P. Walther. 2005. Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells. *J Virol* 79:1071-83.
80. Wright, J. F., A. Kurosky, E. L. Pryzdial, and S. Wasi. 1995. Host cellular annexin II is associated with cytomegalovirus particles isolated from cultured human fibroblasts. *J Virol* 69:4784-91.
81. WuDunn, D., and P. G. Spear. 1989. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J Virol* 63:52-8.
82. Zhang, J., and K. R. McCrae. 2005. Annexin A2 mediates endothelial cell activation by antiphospholipid/anti-beta2 glycoprotein I antibodies. *Blood* 105:1964-9.
83. Zhou, Z. H., D. H. Chen, J. Jakana, F. J. Rixon, and W. Chiu. 1999. Visualization of tegument-capsid interactions and DNA in intact herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol* 73:3210-8.

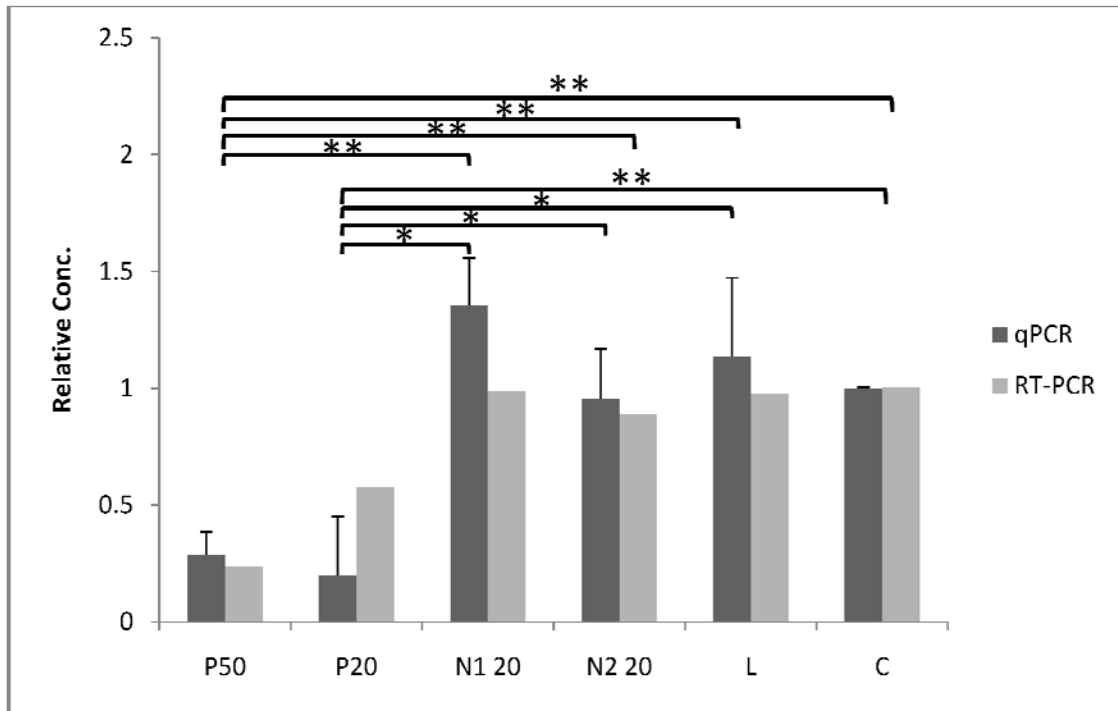


圖表



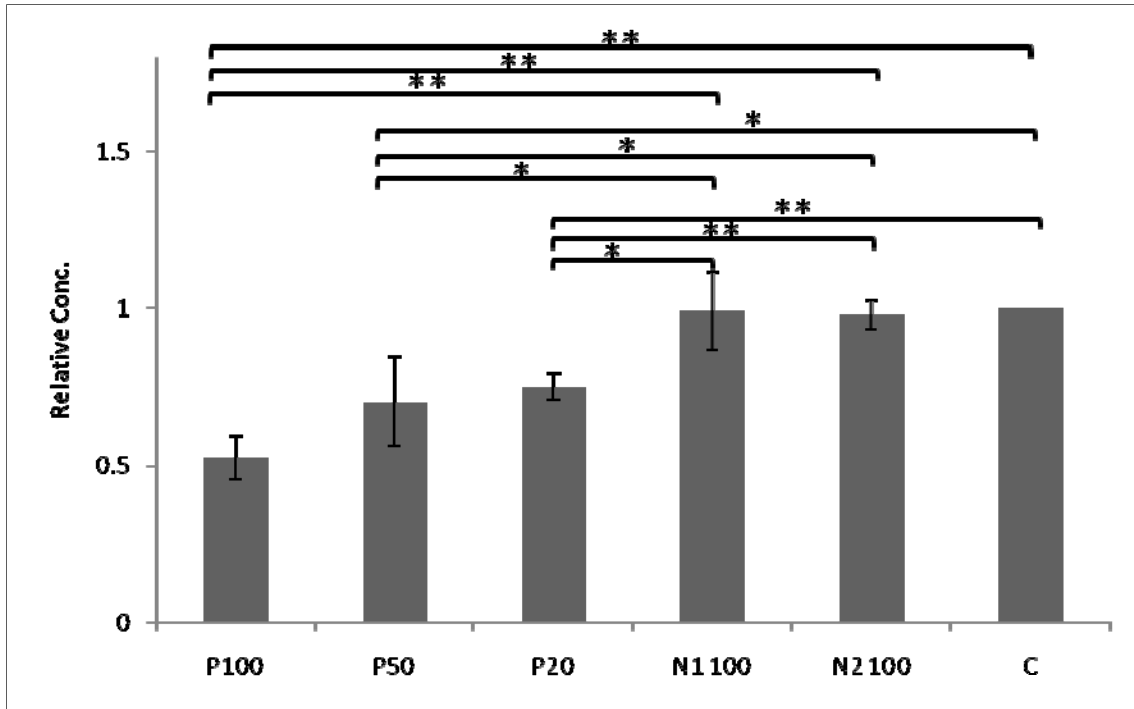
圖一 Annexin II 蛋白之結構及功能區域 (76)

Annexin II 的結構是由 2 個主要結構 (structural domains) 所組成，包括中央核心部份(由 4 個重複的胜肽鏈組成包含有 5 個鈣離子結合位置的右旋超螺旋結構) 以及一段 N-terminal 的尾端。Annexin II 蛋白的氨基端(amino-terminal)含有 p11 子單元的結合位以及 pp60^{SRC} 和蛋白激酶 C (protein kinase C) 的磷酸化點 (phosphorylation site)。而 Annexin II 蛋白的羧基端則包含了磷脂質(phospholipid)、纖維性肌動蛋白(F-actin)以及肝素(heparin)的結合位。



圖二 293T細胞在轉染不同濃度之 Annexin II siRNA 後細胞中 Annexin II mRNA 下降之情況

293T 細胞在轉染不同濃度(50 pmol、20 pmol)之 Annexin II siRNA 及 Negative control siRNA 進入細胞後,48 小時收取細胞進行 RNA 萃取並進行 RT-PCR 及 Real time Q-PCR, 發現無論是 RT-PCR 或是 qPCR 的結果都顯示隨著 Annexin II siRNA 濃度的提高, 細胞中 Annexin II mRNA 的表現量下降越明顯, 和細胞控制組相比較有將近七成的降解效果。P50 為 50 pmol Annexin II siRNA, P20 為 20 pmol Annexin II siRNA, N1 20 為 Negative control #1 20 pmol, N2 20 為 Negative control #2 20 pmol, L 為 Lipofectamine 2000 控制組, C 為細胞控制組。(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; N=3)



圖三 Vero 細胞在轉染不同濃度之 Annexin II siRNA 後細胞中 Annexin II mRNA 下降之情況

Vero 細胞在轉染不同濃度(100pmol、50pmol、20pmol)之 Annexin II siRNA 及 Negative control siRNA 進入細胞後，48 小時收取細胞進行 RNA 萃取並進行 Real time Q-PCR，結果顯示隨著 Annexin II siRNA 濃度的提高，細胞中 Annexin II mRNA 的表現量下降越多。P50 為 50 pmol Annexin II siRNA，P20 為 20 pmol Annexin II siRNA，N1 100 為 Negative control #1 100 pmol，N2 100 為 Negative control #2 100 pmol，C 為細胞控制組。(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; N=3)

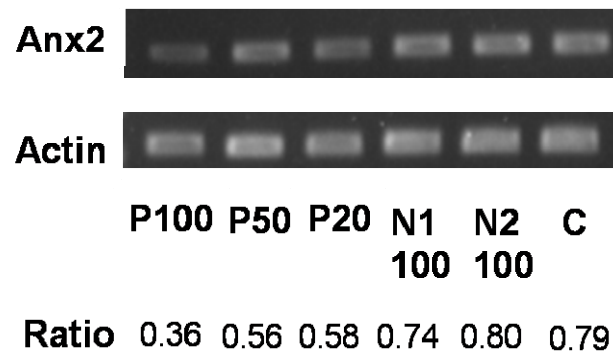


圖 四 Vero 細胞在轉染不同濃度之 Annexin II siRNA 並感染 HSV-1 後細胞中 Annexin II mRNA 之表現狀況

Vero 細胞在轉染不同濃度(100pmol、50pmol、20pmol)之 Annexin II siRNA 及 Negative control siRNA 進入細胞後，於轉染後 48 小時感染 HSV-1 病毒，所使用之 M.O.I (multiplicity of infection) 為 0.3，感染後 18 小時收取細胞進行 RNA 萃取並進行 RT-PCR，發現隨著 Annexin II siRNA 濃度的提高，細胞中 Annexin II mRNA 的表現量下降越明顯，此現象與在 293T 細胞中所觀察到的結果相符。P100 為 100 pmol，P50 為 50 pmol，P20 為 20 pmol，N1 100 為 Negative control #1 100 pmol，N2 100 為 Negative control #2 100 pmol，C 為細胞控制組。Ratio 為 Anx2 表現量/Actin 表現量。

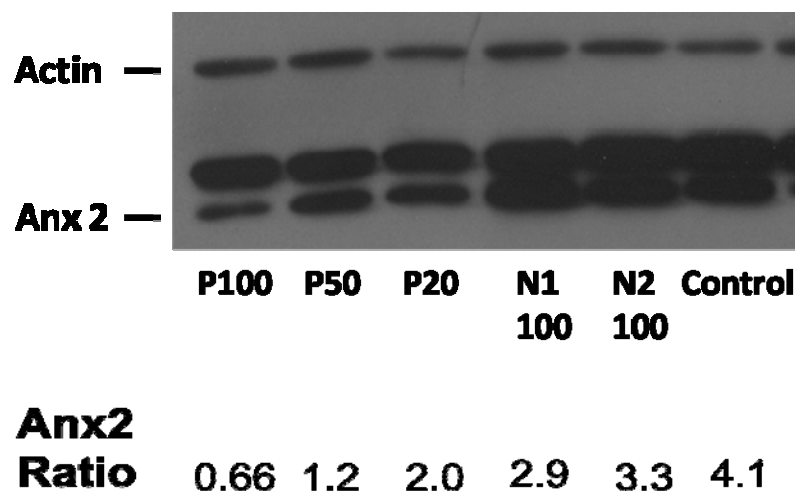
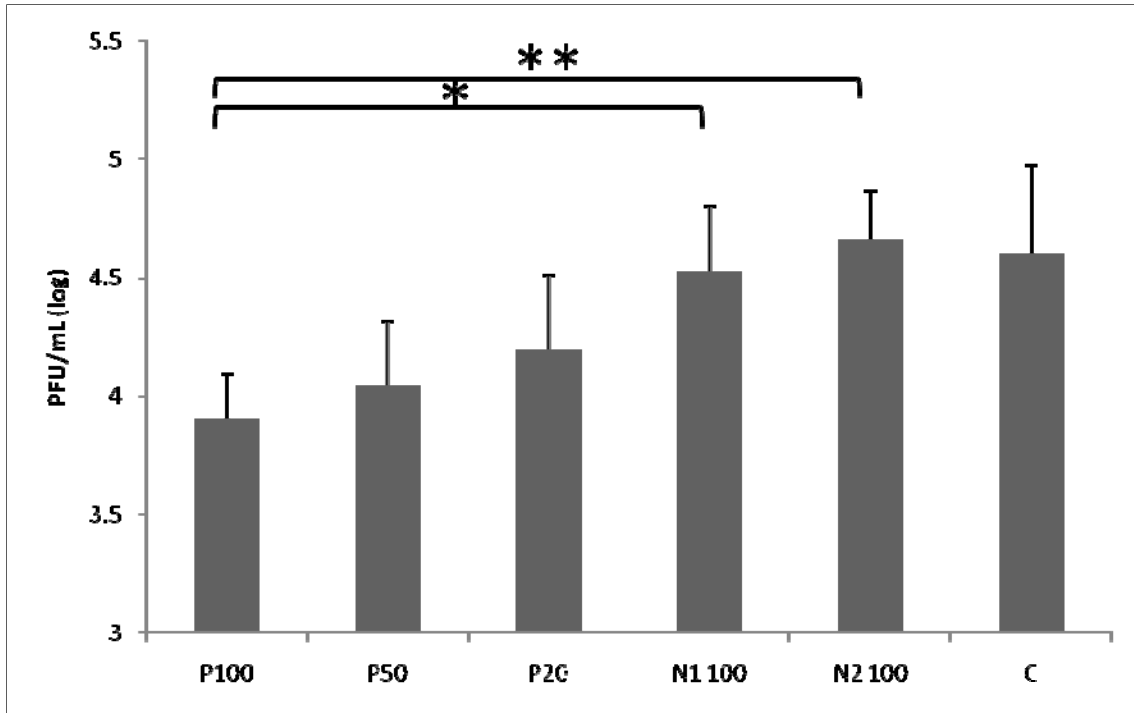


圖 五 Vero 細胞在轉染不同濃度之 Annexin II siRNA 並感染 HSV-1 後細胞中 Annexin II 蛋白之表現量

Vero 細胞在轉染不同濃度(100pmol、50pmol、20pmol)之 Annexin II siRNA 及 Negative control siRNA 進入細胞後，於轉染後 48 小時感染 HSV-1 病毒，所使用之 M.O.I (multiplicity of infection) 為 0.3，感染後 18 小時收取細胞進行西方墨點法，由結果可以觀察到，隨著加入的 siRNA 濃度越高，Vero 細胞中 Annexin II 蛋白的表現量有越明顯下降的趨勢。P100 為 100 pmol，P50 為 50 pmol，P20 為 20 pmol，N1 100 為 Negative control #1 100 pmol，N2 100 為 Negative control #2 100 pmol，C 為細胞控制組。Ratio 為 Anx2 表現量/Actin 表現量。



圖六 Vero 細胞在轉染不同濃度之 Annexin II siRNA 並感染 HSV-1 後細胞上清液中之病毒價數

Vero 細胞在轉染不同濃度(100pmol、50pmol、20pmol)之 Annexin II siRNA 及 Negative control siRNA 進入細胞後，於轉染後 48 小時感染 HSV-1 病毒，所使用之 M.O.I (multiplicity of infection) 為 0.3，感染後 18 小時收取細胞上清液進行溶菌斑試驗，結果顯示隨著加入的 siRNA 濃度越高，Vero 細胞上清液中之病毒量也有下降的趨勢，以 P100 和 control 相比有接近兩倍的差異。P100 為 100 pmol siRNA-Annexin II，P50 為 50 pmol siRNA-Annexin II，P20 為 20 pmol siRNA-Annexin II，N1 100 為 Negative control #1 100 pmol，N2 100 為 Negative control #2 100 pmol，C 為細胞控制組。(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; N=3)

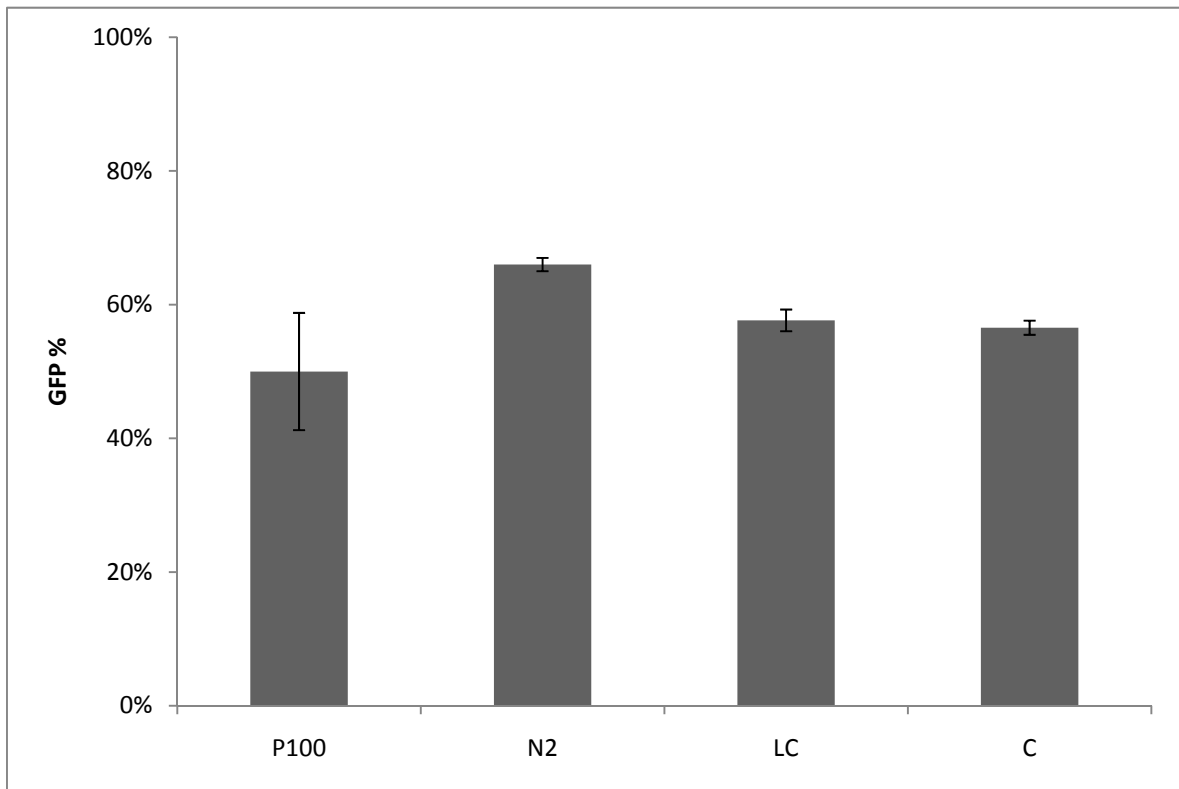


圖 七 單純疱疹病毒對於 Annexin II 降解之 Vero 細胞與正常 Vero 細胞之感染率

Vero 細胞在轉染 100pmol 之 Annexin II siRNA 進入細胞後，於轉染後 48 小時感染 HSV-1(VP22 GFP)病毒，所使用之 M.O.I (multiplicity of infection)為 0.3，感染後 18 小時收取細胞，利用流式細胞儀進行細胞計數，觀察細胞被 HSV-1(VP22 GFP)病毒所感染之比例，由結果顯示，在 Annexin II 降解的 Vero 細胞中，其 GFP 表現比例和未受到 Annexin II 降解之細胞 GFP 表現比例並無明顯差異。P100 為 100 pmol siRNA-Annexin II，N2 為 Negative control #2 100 pmol，LC 為 Lipofectamine 2000 控制組，C 為細胞控制組。(N=3)

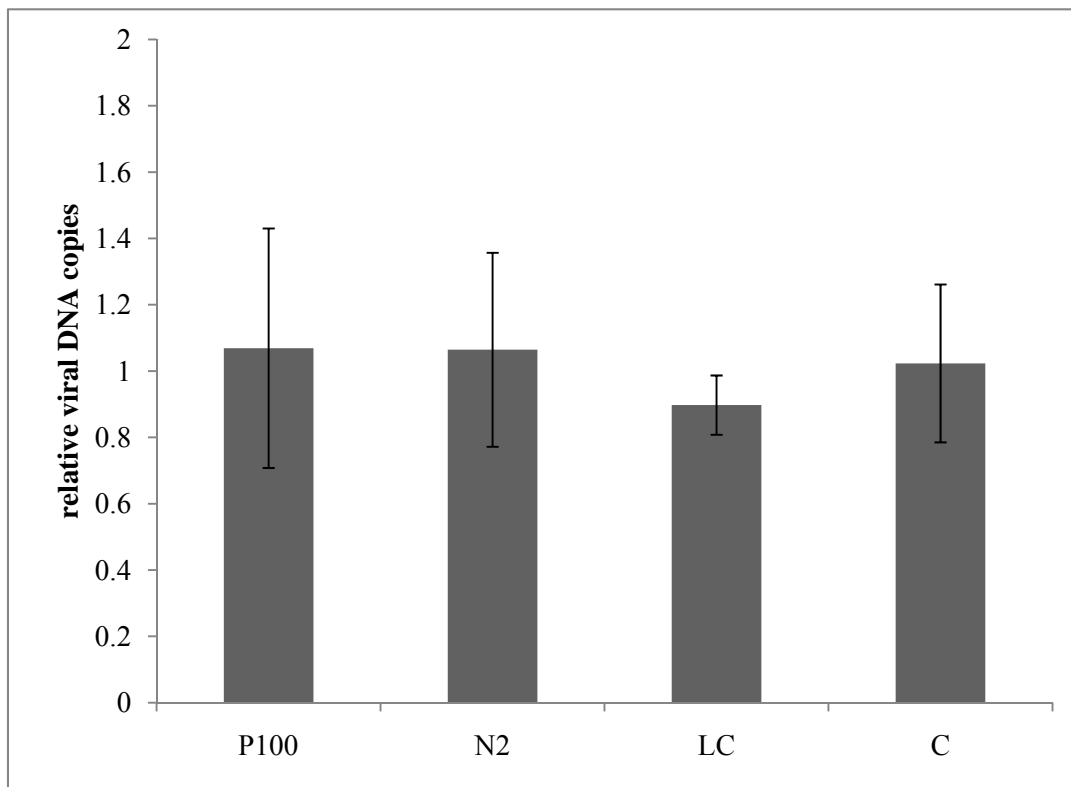
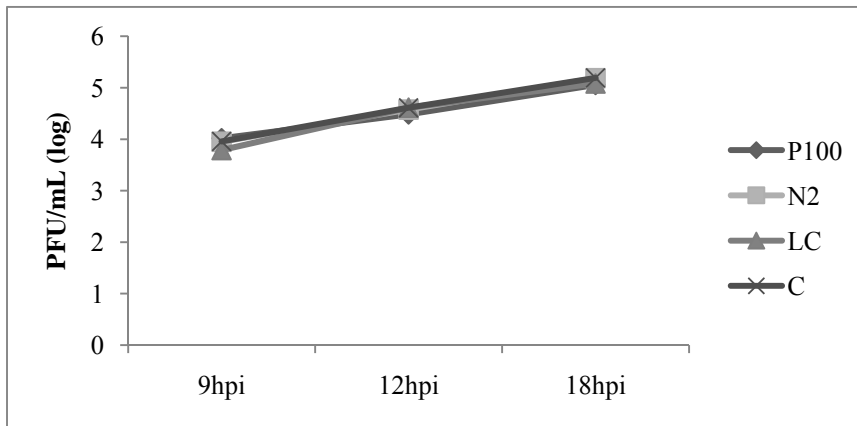


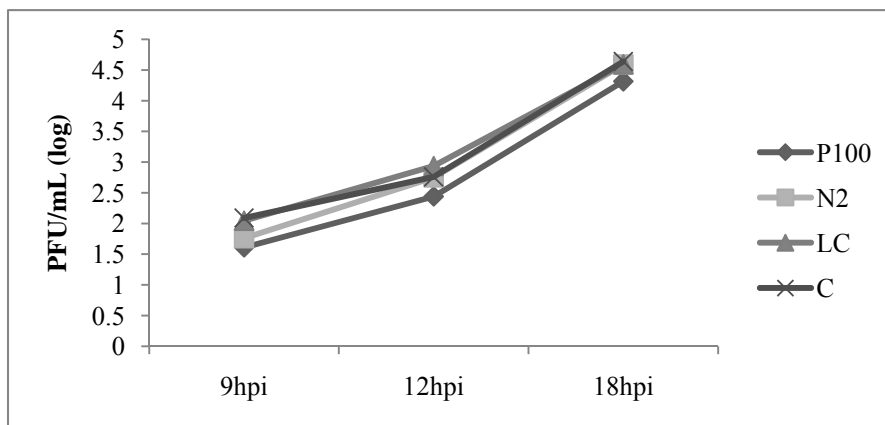
圖 八 單純疱疹病毒侵入 Annexin II 降解之 Vero 細胞與正常 Vero 細胞之效率

轉染 100pmol 之 Annexin II siRNA、Negative control siRNA 及 lipofectamine 2000 進入 Vero 細胞，於轉染後 48 小時感染 HSV-1(VP22 GFP)病毒，M.O.I=0.3，進行病毒穿透試驗，利用 SYBR 即時定量聚合酶鏈鎖反應，定量進入細胞中的病毒量。從量化的結果來看，單純疱疹病毒侵入受 Annexin II 降解之 Vero 細胞和侵入正常 Vero 細胞之效率並無顯著差異。P100 為 100 pmol siRNA-Annexin II，N2 為 Negative control #2 100 pmol，LC 為 Lipofectamine 2000 控制組，C 為細胞控制組。(N=5)。

(A)各時間點整體病毒價數(上清液與細胞中病毒價數之總和)

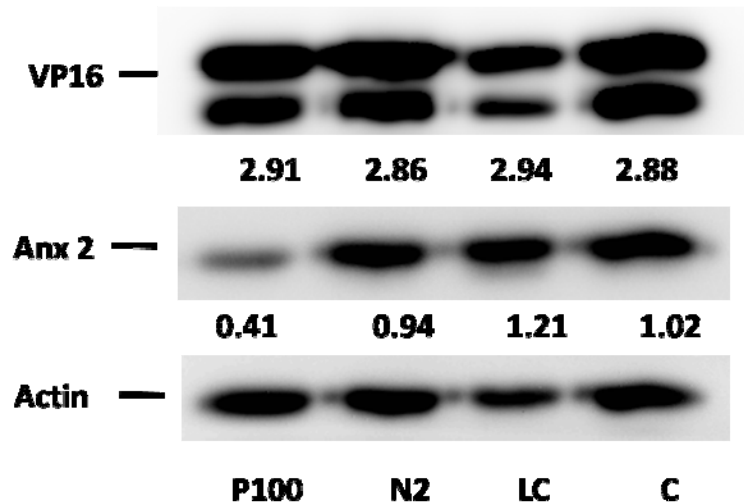


(B)各時間點細胞上清液中病毒價數



圖九 單純疱疹病毒在 Annexin II 降解細胞及正常細胞中之生長狀況

Vero 細胞在轉染 100pmol 之 Annexin II siRNA 進入細胞後，於轉染後 48 小時感染 HSV-1 病毒，所使用之 M.O.I (multiplicity of infection) 為 0.3，感染後 9、12、18 小時各收取細胞上清液及細胞進行溶菌斑試驗，(A) 結果顯示在 Annexin II 降解的狀況下，其病毒生長曲線與其他控制組之病毒生長曲線並無差異，(B) 但在觀察各時間點之細胞上清液中病毒價數可以發現在 Annexin II 降解之狀況下，其細胞上清液中之病毒價數較其他控制組之細胞上清液中病毒價數低。P100 為 100 pmol siRNA-Annexin II，N2 為 Negative control #2 100 pmol，LC 為 Lipofectamine 2000 控制組，C 為細胞控制組。



圖十 HSV-1 病毒蛋白 VP16 在 Annexin II 降解之 Vero 細胞與正常 Vero 細胞中之表現情況

利用 Vero 細胞轉染 100pmol 之 Annexin II siRNA、siRNA-Negative control #2 及 Lipofectamine 2000 進入細胞，於轉染後 48 小時感染 HSV-1 病毒，M.O.I=0.3，感染後 18 小時收取細胞，進行西方墨點法分析，由結果可以觀察到隨著加入的 siRNA 濃度越高，Vero 細胞中 Annexin II 蛋白的表現量有明顯下降的趨勢，但細胞中之病毒後期蛋白(late protein) VP16 並沒有明顯下降的趨勢。P100 為 100 pmol siRNA-Annexin II，N2 為 Negative control #2 100 pmol，LC 為 Lipofectamine 2000 控制組，C 為細胞控制組。

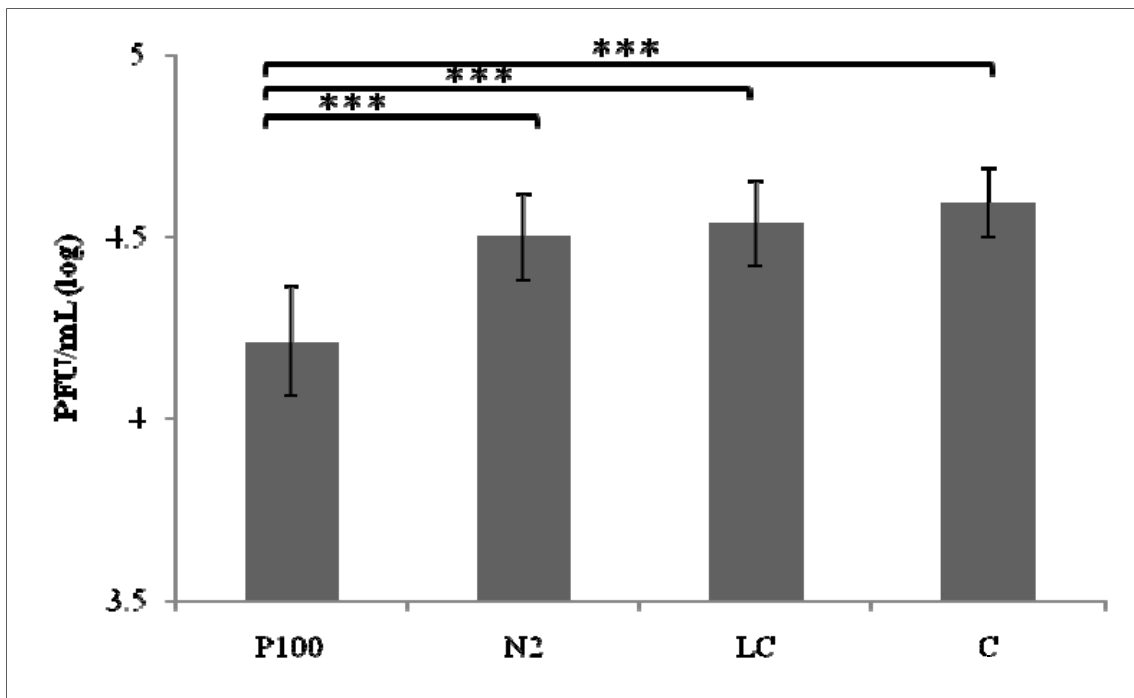


圖 十一 Annexin II 降解之 Vero 細胞及正常 Vero 細胞在感染 HSV-1 後上清液中病毒價數之比較

Vero 細胞在轉染 100pmol 之 Annexin II siRNA 進入細胞後，於轉染後 48 小時感染 HSV-1 病毒，所使用之 M.O.I (multiplicity of infection) 為 0.3，感染後 18 小時收取細胞上清液進行溶菌斑試驗，結果顯示加入 100pmol Annexin II siRNA 之 Vero 細胞上清液中之病毒量和 siRNA，Lipofectamine 2000，及細胞控制組之 Vero 細胞上清液中之病毒量相比有統計上之顯著差異。P100 為 100 pmol siRNA-Annexin II，N2 為 Negative control #2 100 pmol，LC 為 Lipofectamine 2000 控制組，C 為細胞控制組。(***, $P < 0.001$; N=3)

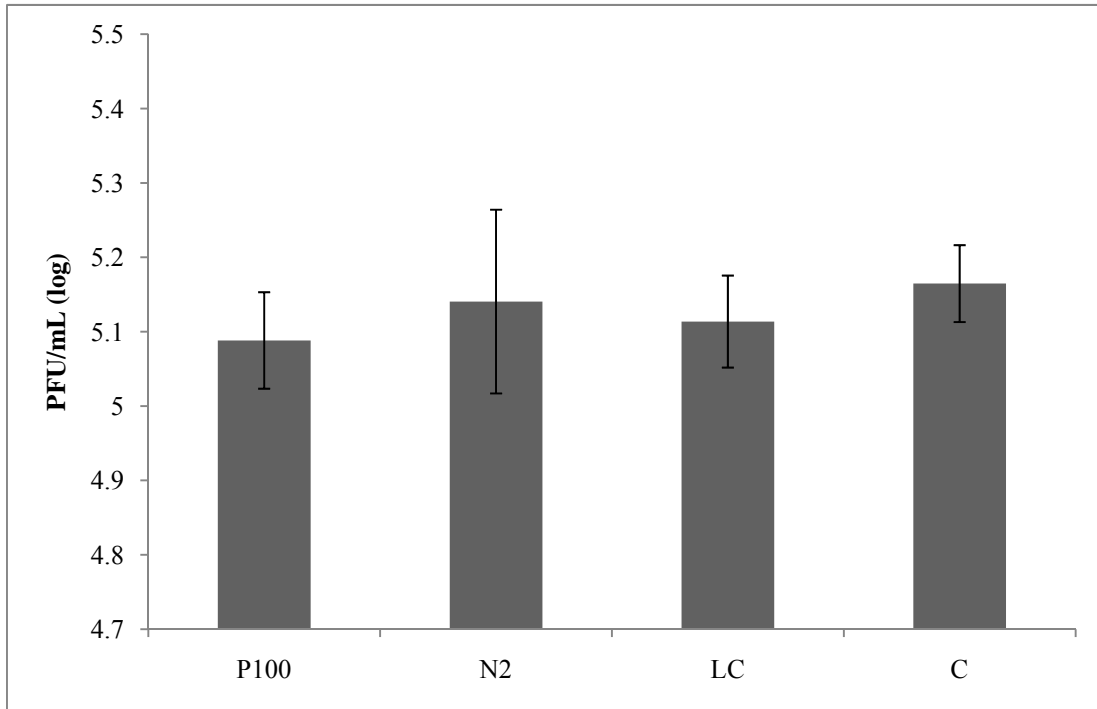


圖 十二 Annexin II 降解之 Vero 細胞及正常 Vero 細胞在感染 HSV-1 後細胞中病毒價數之比較

Vero 細胞在轉染 100pmol 之 Annexin II siRNA 進入細胞後，於轉染後 48 小時感染 HSV-1 病毒，所使用之 M.O.I (multiplicity of infection) 為 0.3，感染後 18 小時收取細胞進行溶菌斑試驗，結果顯示加入 100pmol Annexin II siRNA 之 Vero 細胞中之病毒量和 siRNA-Negative control #2, Lipofectamine 2000, 及細胞控制組之 Vero 細胞中之病毒量相比並無顯著差異。P100 為 100 pmol siRNA-Annexin II，N2 為 Negative control #2 100 pmol，LC 為 Lipofectamine 2000 控制組，C 為細胞控制組。(N=3)

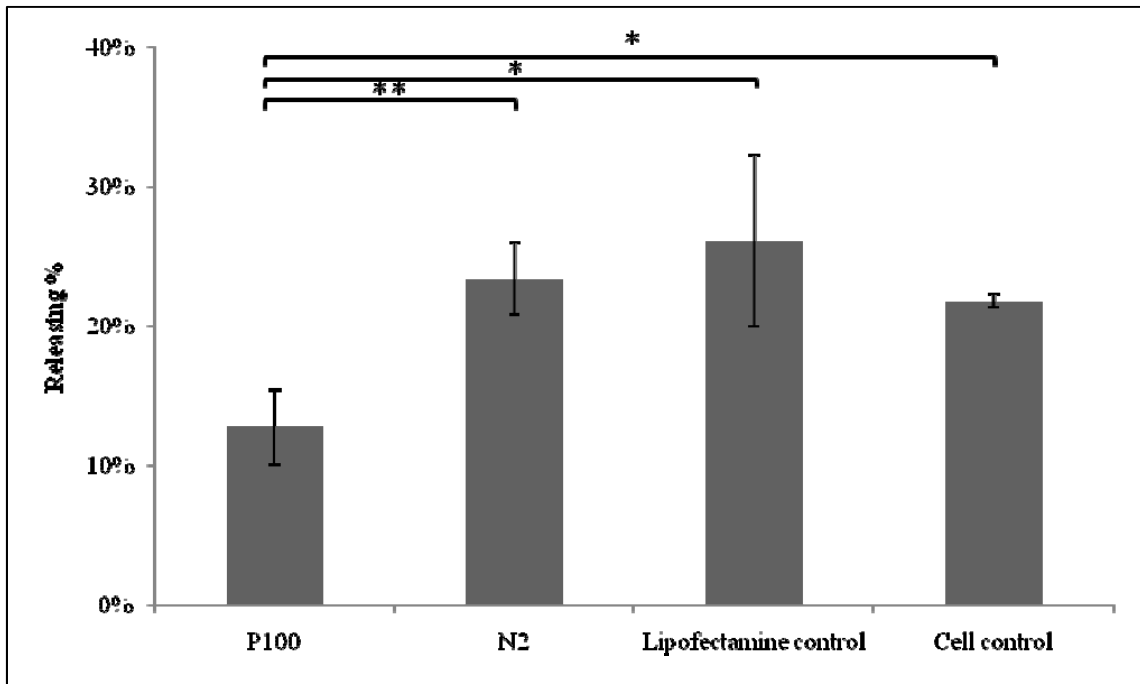
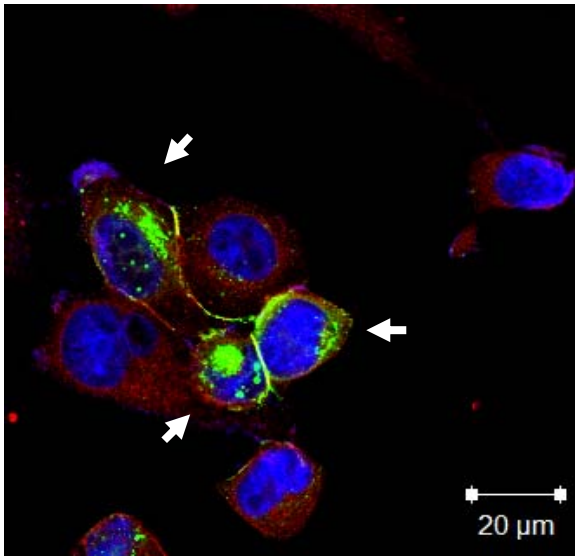


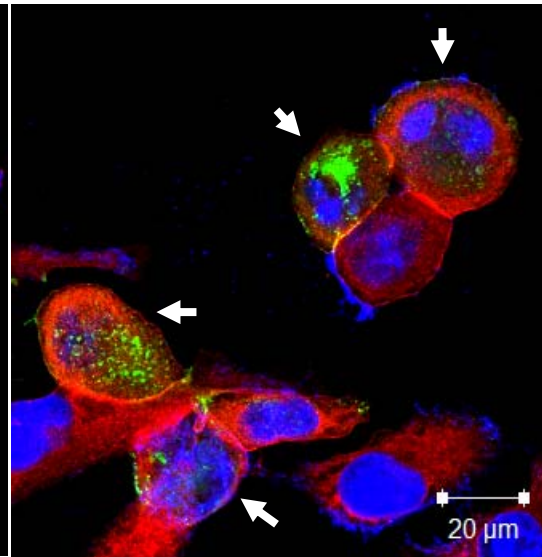
圖 十三 HSV-1 病毒從 Annexin II 降解之 Vero 細胞及正常 Vero 細胞中釋放之比例

Vero 細胞在轉染 100pmol 之 Annexin II siRNA 進入細胞後，於轉染後 48 小時感染 HSV-1 病毒，所使用之 M.O.I (multiplicity of infection) 為 0.3，感染後 18 小時收取細胞上清液中病毒及細胞中病毒，進一步計算病毒釋放比例發現 HSV-1 病毒釋放效率在 Annexin II 降解的 Vero 細胞中明顯比未受到 Annexin II 降解之細胞中來的低。P100 為 100 pmol siRNA-Annexin II，N2 為 Negative control #2 100 pmol，LC 為 Lipofectamine 2000 控制組，C 為細胞控制組。(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; N=3)

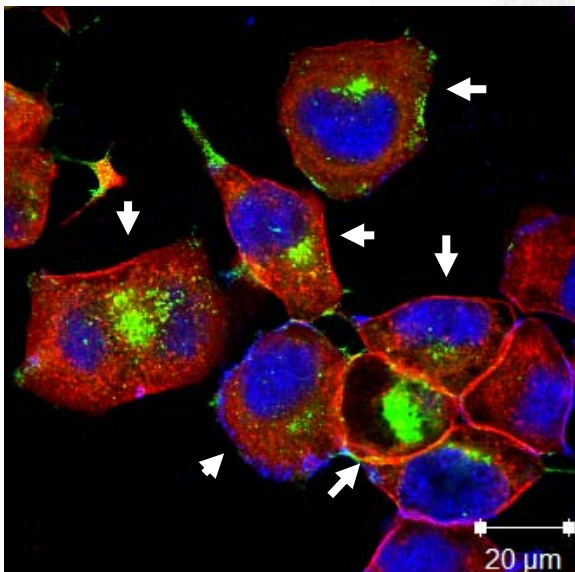
(A) P100



(B) N2



LC



(D) C

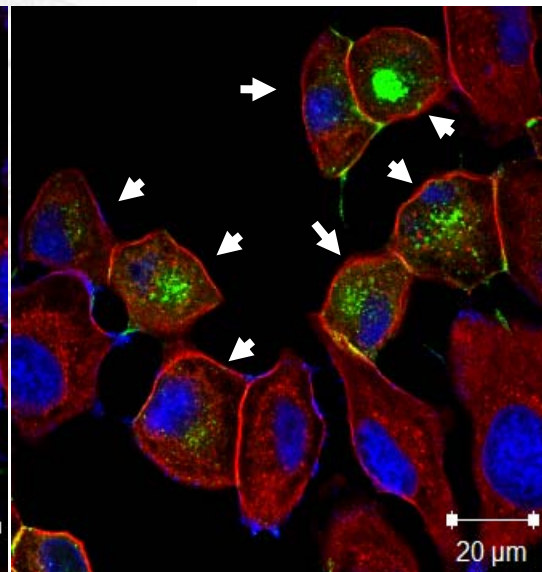


圖 十四 HSV-1 病毒蛋白 VP22 在 Annexin II 降解之 Vero 細胞及正常細胞中之分布比較

利用共軛焦顯微鏡觀察 Vero 細胞在 Annexin II 降解或是正常情況下，感染 HSV-1 後病毒之散布情形，由觀察 GFP 表現位置可以發現，在 Annexin II 降解之情況下，HSV-1 之 VP22 皆表現在核膜周圍；而在其他控制組細胞中，HSV-1 之 VP22 則是大部分散布於細胞質當中(箭頭所指為有 VP22 GFP 表現之細胞)。P100 為 100 pmol siRNA-Annexin II，N2 為 Negative control #2 100 pmol，LC 為 Lipofectamine 2000 控制組，C 為細胞控制組。

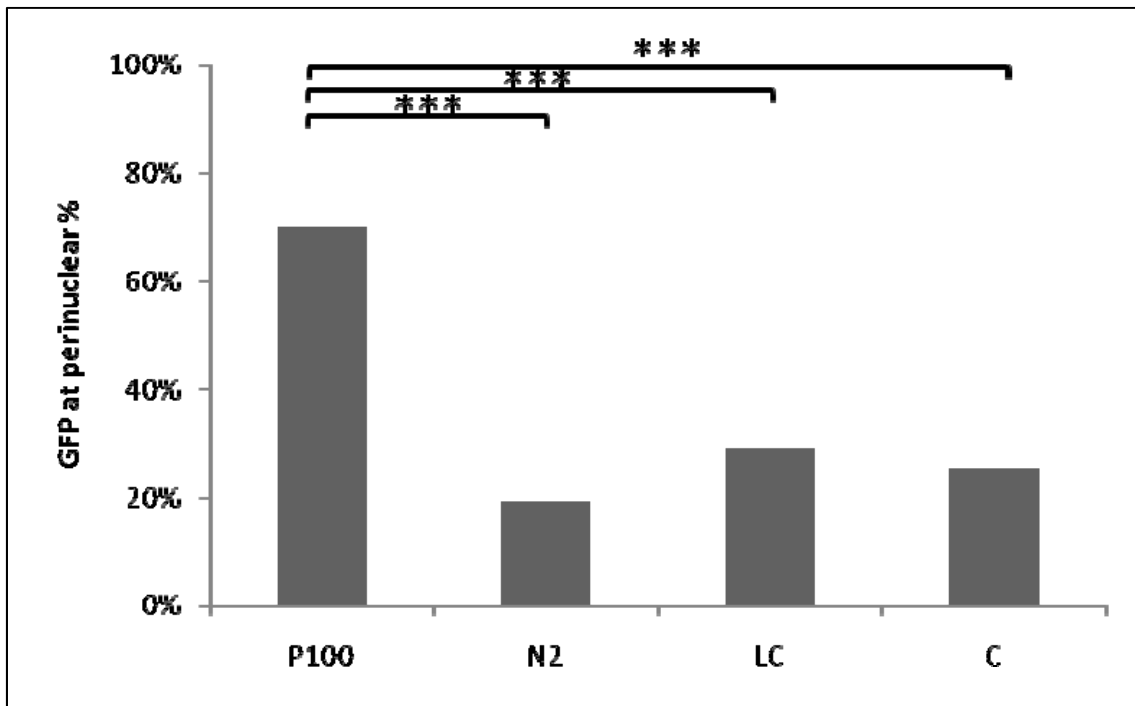


圖 十五 Vero 細胞在不同 Annexin II 含量下感染 HSV-1 後 VP22 GFP 表現位置之分析

將共軛焦顯微鏡之結果進行計數，由條狀圖結果顯示，在 Annexin II 降解之情況下，HSV-1 之 VP22 大部分表現在核膜周圍，只有少部分 VP22 會散布於細胞質中；另一方面，其他控制組細胞中，HSV-1 之 VP22 之散佈情況則是相反。P100 為 100 pmol siRNA-Annexin II，N2 為 Negative control #2 100 pmol，LC 為 Lipofectamine 2000 控制組，C 為細胞控制組。

(***, $P < 0.001$; P100, N=133 ; N2, N=103 ; LC, N=128 ; C, N=122)

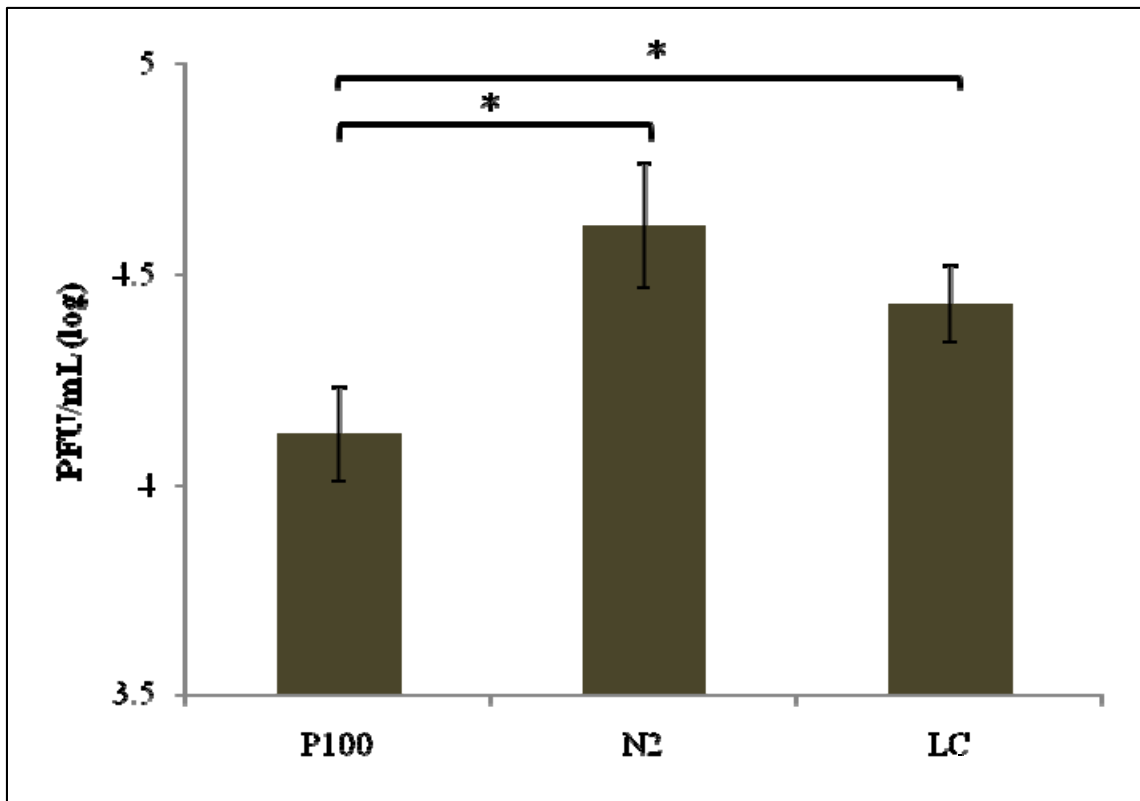


圖 十六 Annexin II 降解之 A549 細胞及正常 A549 細胞在感染 HSV-1 後上清液中病毒價數之比較

實驗中轉染 100pmol 之 Annexin II siRNA、Negative control siRNA 及 lipofectamine 2000 進入 Vero 細胞，於轉染後 48 小時感染 HSV-1(VP22 GFP)病毒，M.O.I=0.3，感染後 18 小時收取細胞上清液，由溶菌斑試驗定量病毒價數。從病毒價數定量結果發現，P100 的上清液病毒價數和 siRNA，Lipofectamine 2000，及細胞控制組之細胞上清液病毒價數有顯著差異。P100 為 100 pmol siRNA-Annexin II，N2 為 Negative control #2 100 pmol，LC 為 Lipofectamine 2000 控制組。(P<0.05；N=3)。

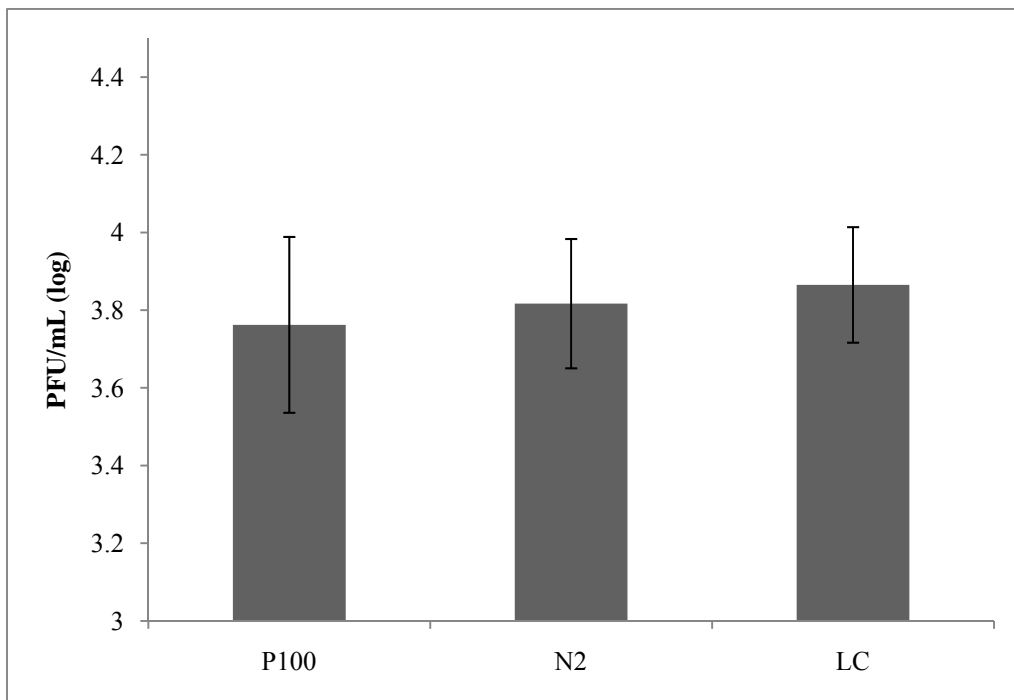


圖 十七 Annexin II 降解之 A549 細胞及正常 A549 細胞在感染 HSV-1 後細胞中病毒價數之比較

A549 細胞在轉染 100pmol 之 Annexin II siRNA 進入細胞後，於轉染後 48 小時感染 HSV-1 病毒，所使用之 M.O.I (multiplicity of infection) 為 0.3，感染後 18 小時收取細胞進行溶菌斑試驗，結果顯示加入 100pmol Annexin II siRNA 之 A549 細胞中之病毒量和 siRNA-Negative control #2 及 Lipofectamine 2000 細胞控制組之 A549 細胞中之病毒量相比並無顯著差異。P100 為 100 pmol siRNA-Annexin II，N2 為 Negative control #2 100 pmol，LC 為 Lipofectamine 2000 控制組。(N=4)

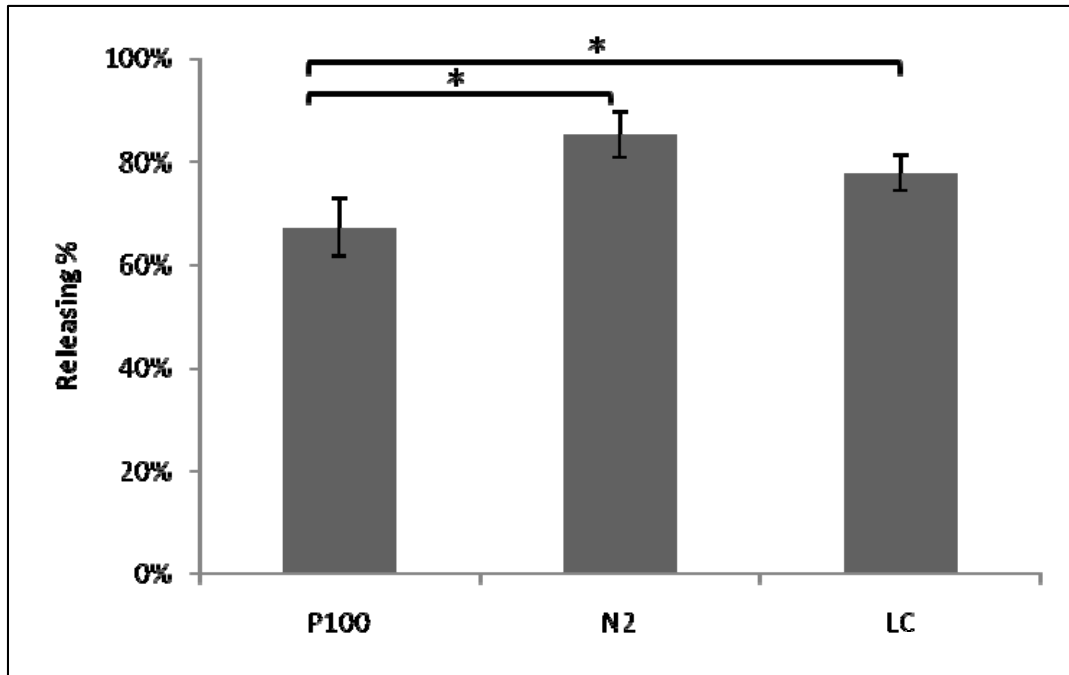


圖 十八 HSV-1 病毒從 Annexin II 降解之 A549 細胞及正常 A549 細胞中釋放之效率

A549 細胞在轉染 100pmol 之 Annexin II siRNA 進入細胞後，於轉染後 48 小時感染 HSV-1 病毒，所使用之 M.O.I (multiplicity of infection) 為 0.3，感染後 18 小時收取細胞上清液中病毒及細胞中病毒，進一步計算病毒釋放比例發現 HSV-1 病毒釋放效率在 Annexin II 降解的 A549 細胞中明顯比未受到 Annexin II 降解之細胞中來的低。P100 為 100 pmol siRNA-Annexin II，N2 為 Negative control #2 100 pmol，LC 為 Lipofectamine 2000 控制組。(*, $P < 0.05$; N=4)

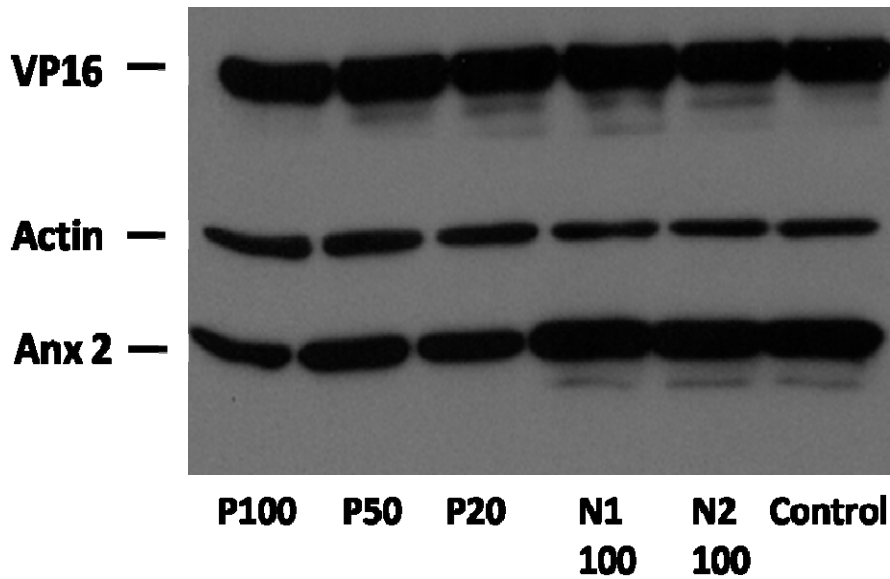


圖 十九 HSV-1 病毒蛋白 VP16 在 Annexin II 降解之 A549 細胞與正常 A549 細胞中之表現情況

實驗中轉染 100pmol 之 Annexin II siRNA、Negative control siRNA 及 lipofectamine 2000 進入 Vero 細胞，於轉染後 48 小時感染 HSV-1(VP22 GFP)病毒，M.O.I=0.3，感染後 18 小時收取細胞進行西方墨點法實驗，確認 Annexin II 蛋白表現量。由結果可以觀察到，隨著加入的 siRNA 濃度越高，Vero 細胞中 Annexin II 蛋白的表現量有越明顯下降的趨勢，但細胞中之病毒後期蛋白(late protein) VP16 沒有明顯下降的趨勢。P100 為 100 pmol，P50 為 50 pmol，P20 為 20 pmol，N1 100 為 Negative control #1 100 pmol，N2 100 為 Negative control #2 100 pmol，C 為細胞控制組。

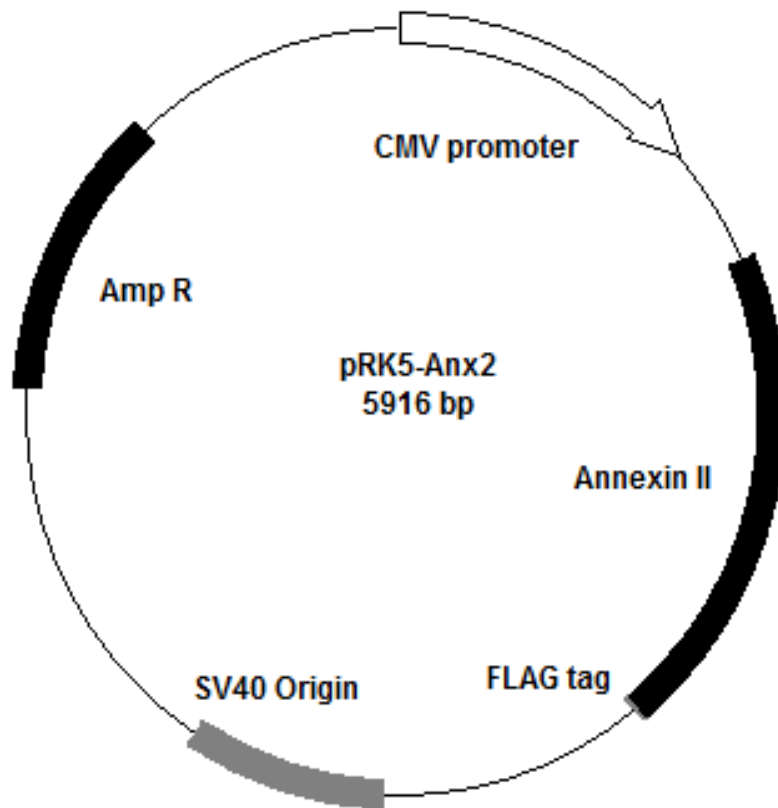


圖 二十 pRK5-Anx2 質體 DNA 示意圖



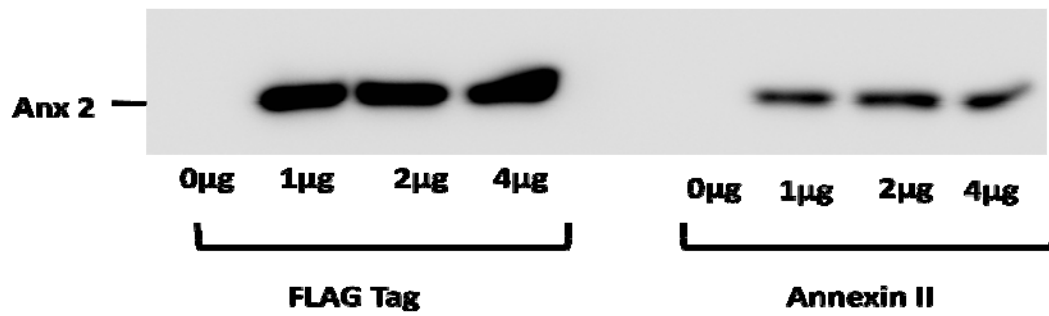


圖 二十一 pRK5-Anx2 質體表現 Annexin II 蛋白之測試

轉染不同濃度之 pRK5-Anx2 質體 DNA 進入 LNCaP 細胞中，於轉染後 48 小時收取細胞，再利用西方墨點法觀察 LNCaP 細胞中之 Annexin II 蛋白表現量，西方墨點法結果顯示 pRK5-Anx2 質體 DNA 確實能夠在 LNCaP 細胞中表現 Annexin II 基因並表現蛋白質。



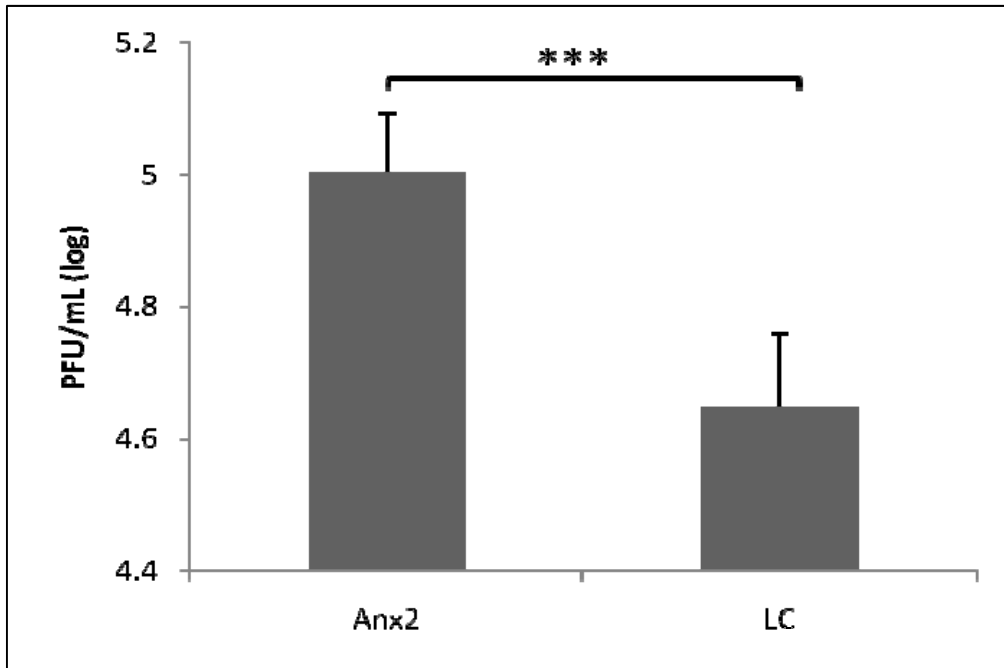
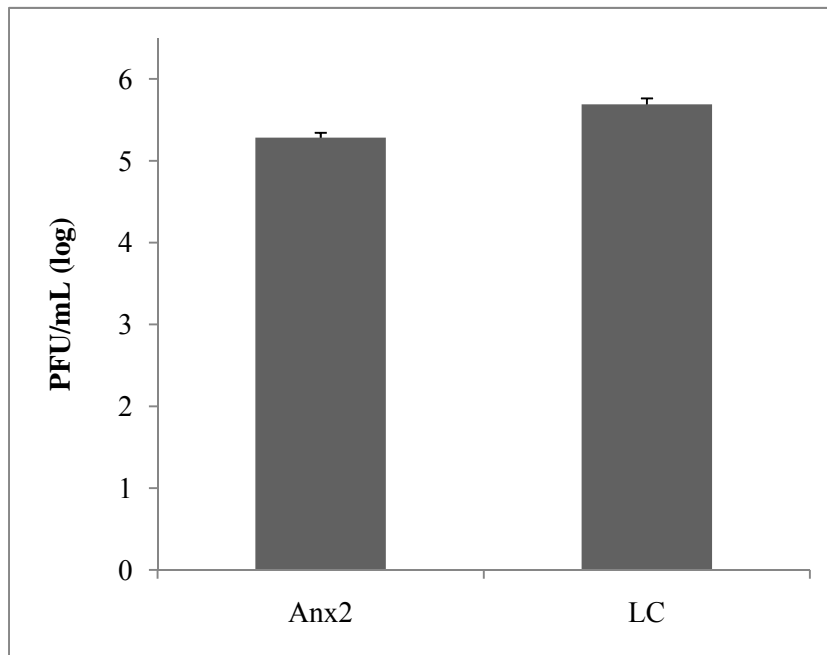


圖 二十二 過度表現 Annexin II 基因之 293T 細胞與正常 293T 細胞在感染單純疱疹病毒後細胞上清液中之病毒價數

轉染 pRK5-Anx2 進入 293T 細胞中，於轉染後 48 小時感染 HSV-1 病毒，所使用之 M.O.I 為 0.3，感染後 18 小時收取細胞上清液，由溶菌斑試驗定量病毒價數，從結果發現，過度表現 Annexin II 基因的 293T 細胞上清液中病毒價數和 Lipofectamine 2000 控制組之細胞上清液中病毒價數有顯著差異。Anx2 為 2 μ g pRK5-Anx2，LC 為 Lipofectamine 2000 控制組。(P<0.001；N=5)。



圖二十三 過度表現 Annexin II 基因之 293T 細胞與正常 293T 細胞在感染單純疱疹病毒後細胞中之病毒價數

在轉染 pRK5-Anx2 進入 293T 細胞後，於轉染後 48 小時感染 HSV-1 病毒，所使用之 M.O.I (multiplicity of infection) 為 0.3，感染後 18 小時收取細胞進行溶菌斑試驗，結果顯示過度表現 Annexin II 基因之 293T 細胞中病毒量和 Lipofectamine 2000 細胞控制組之 293T 細胞中病毒量相比並無顯著差異。Anx2 為 2 μ g pRK5-Anx2，LC 為 Lipofectamine 2000 控制組。(N=5)

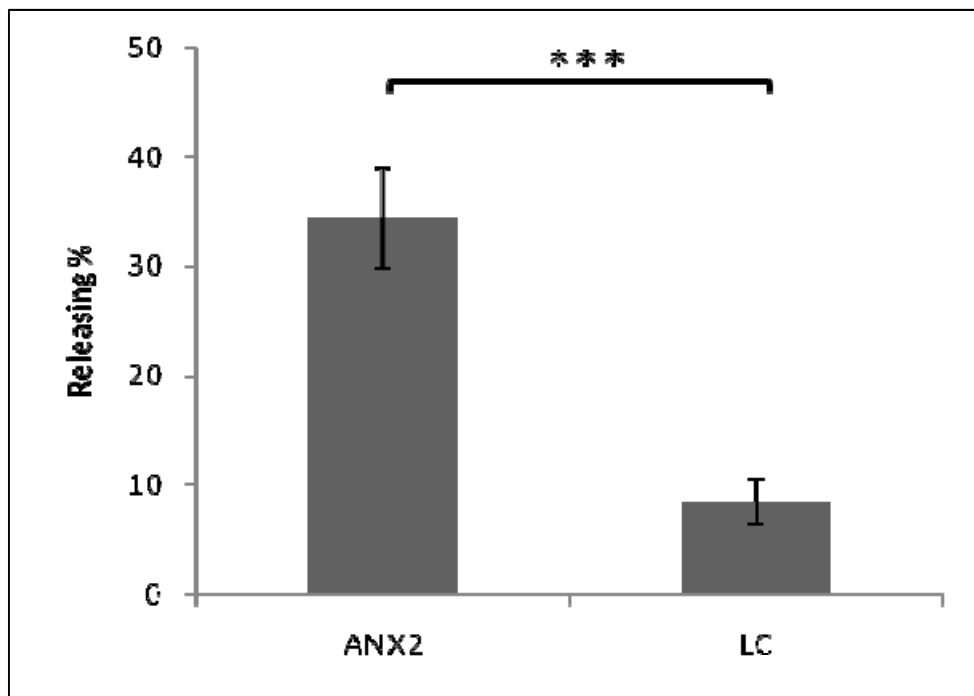


圖 二十四 HSV-1 病毒從過度表現 Annexin II 基因之 293T 細胞及正常 293T 細胞中釋放之效率

293T 細胞在轉染 pRK5-Anx2 進入細胞後，於轉染後 48 小時感染 HSV-1 病毒，所使用之 M.O.I (multiplicity of infection) 為 0.3，感染後 18 小時收取細胞上清液中病毒及細胞中病毒，進一步計算病毒釋放比例發現 HSV-1 病毒釋放效率在過度表現 Annexin II 基因的 293T 細胞中明顯比 Lipofectamine 2000 控制組來的高。Anx2 為 2 μ g pRK5-Anx2，LC 為 Lipofectamine 2000 控制組。(P<0.001；N=5)

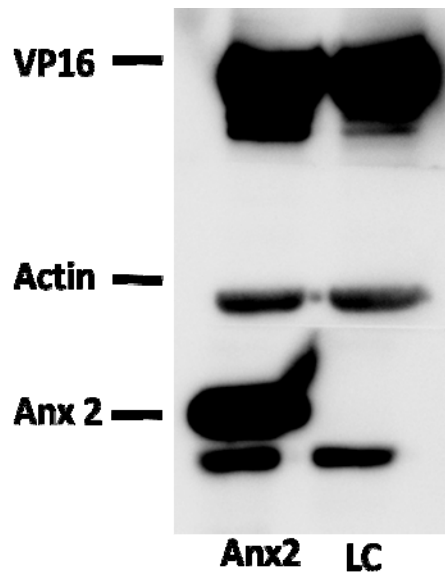


圖 二十五 HSV-1 病毒蛋白 VP16 在過度表現 Annexin II 基因之 293T 細胞及正常 293T 細胞中之表現情況

293T 細胞在轉染 pRK5-Anx2 進入細胞後，於轉染後 48 小時感染 HSV-1 病毒，所使用之 M.O.I 為 0.3，感染後 18 小時收取細胞，由西方墨點法的結果可以發現，在過度表現 Annexin II 基因之 293T 細胞中，Annexin II 蛋白表現量確實比 Lipofectamine 2000 控制組多，但細胞中之病毒後期蛋白(late protein) VP16 表現量並沒有隨著 Annexin II 蛋白表現量提高而改變。Anx2 為 2 μ g pRK5-Anx2，LC 為 Lipofectamine 2000 控制組。

附表

表 一. 聚合酶鏈鎖反應使用之引子序列

Primer	sequence
Anx2-BamHI-F	5'-GGA TCC ATG TCT ACT GTT CAC G-3'
Anx2-XbaI-R	5'-TCT AGA GTC ATC TCC ACC ACA C-3'
Anx2-sequence	5'-TCC GCA AGC TGA TGG TTG CC-3'
F-Annexin II qPCR	5'-TGC CTT CGC CTA CCA GAG AA-3'
R-Annexin II qPCR	5'-TCA TAC TGA GCA GGT GTC TTC AA-3'
Actin-S	5'-TCC TGT GGC ATC CAC GAA ACT-3'
Actin-AS	5'-GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT-3'
qHSV-gpB-F	5'-TGT TGG CGA CTG GCG ACT TTG-3'
qHSV-gpB-R	5'-TAC ATG TCC CCG TTT TAC GGC TAC CGG-3'
ICP4-1	5'-CGA CAC GGA TCC ACG ACC C-3'
ICP4-3	5'- TGC TTG TTC TCC GAC GCC ATC-3'