

動物病毒之研究、檢測試劑及基因重組桿狀病毒次單位疫苗之研發

筆者回國至屏科大獸醫系及生

技所服務已 12 年，基於研究及教學需要而成立分子病毒學暨生物技術研究室。研究室之主要研究重點包含動物病毒致病機序之研究、診斷試劑開發、基因重組桿狀病毒之疫苗開發平台之建立及篩選抗病毒或 cancer 之活性天然物成分及其機制之研究。筆者也積極參與國內外之學術研討會、專題演講及國內外期刊審稿工作。回國服務至今已發表超過百篇之學術期刊論文與專利及近百篇之國內外研討會論文。主要研究成果簡述如后：

(一)動物病毒之致病機序及病毒蛋白生物功能之研究

筆者在家禽里奧病毒之研究包含診斷方法之建立、ELISA kit 之開發及家禽里奧病毒之基因重組桿狀病毒次單位疫苗之開發蛋白(σ C、 σ A、P10 及 P17)之生物功能之研究、病毒之演化機制、病毒複製調控及致病機序之探討、以 siRNA 抑制病毒複製、病毒調控宿主細胞之 cell cycle 及轉譯作用及誘發宿主細胞凋亡之訊號傳遞途徑等等做了一系列深入研究。研究成果已發表超過 40 篇以上之 SCI 期刊論文或專利，在此領域之研究已具國際學術地位。

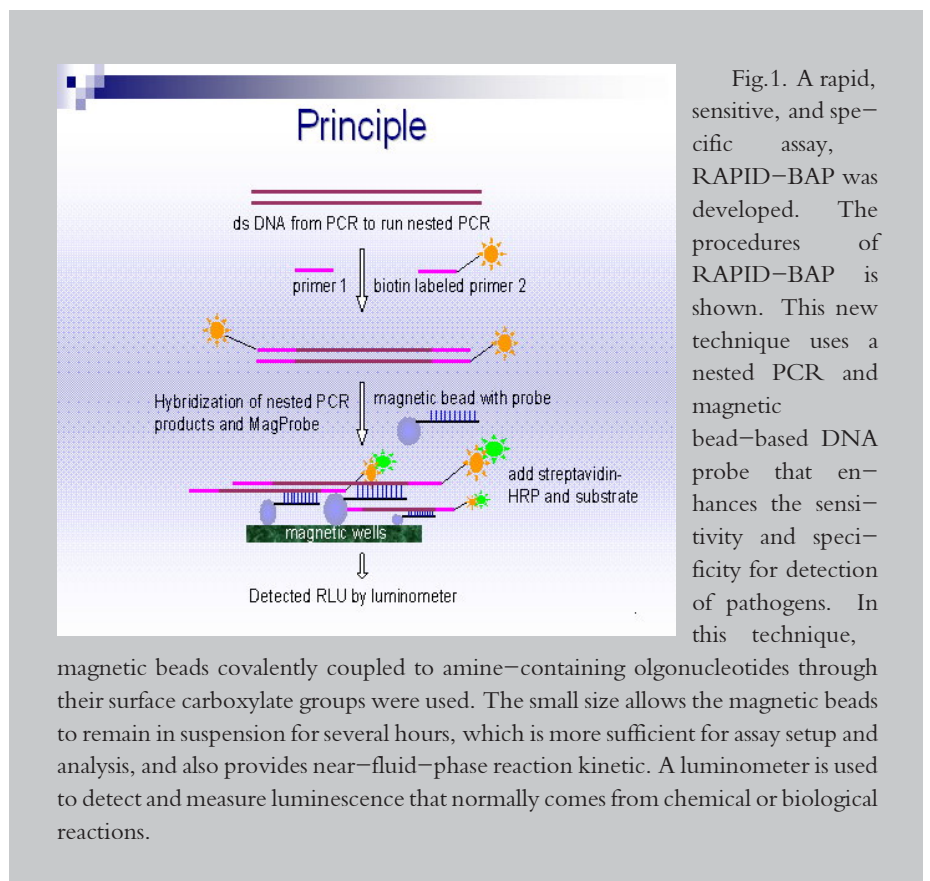
近年來為釐清台灣新城病病毒是否發生變異及解決家禽業者所面臨之困難及嚴重之經濟損失。筆者研究團隊針對新城病病毒之抗原性、致病性、流行病學、病毒血球凝集能力及 V 蛋白提升其它病毒於細胞內之複製，作了一系列深入之探討及研究，也獲致豐碩成果。重要研究成果如發現 1999 年爆發於本省之變異型 NDV 病毒及新基因型(VI);首次發現野外新城

病病毒株 HN 蛋白之第 80 胺基酸序列 V 若變異為 M，可影響病毒血球凝集素之活力，進而影響血球凝集力價之測定；發現新城病病毒 V 蛋白除可提升家禽里奧病毒及其它多種動物及人類病毒於細胞內之增殖效力(10-104)。在家禽華氏囊病毒之研究首次發表台灣高病原性家禽華氏囊病毒之親緣關係之基因型，同時也建立以 yeast 表現系統表現家禽華氏囊病毒 VP2 蛋白作為次單位抗原製診斷試劑。

近年來酪農業者因牛流行熱之周期性發生而遭受經濟損失，但本病之

獸醫學系 劉宏仁教授兼生科所所長

研究至今仍不多，為了解酪農業者之問題，筆者研究團隊針對牛流行熱做了一系列深入研究。筆者研究團隊首先進行開發 ELISA kit 及核酸探針檢驗試劑。一般以血清抗體中和試驗作為檢測抗體力價之方法，此法費時又費力，對急欲知道免疫結果之畜主而言，似乎是緩不濟急，為能檢測大量臨床樣品，因此開發可測 G 蛋白抗體之 ELISA kit 替代傳統之血清抗體中和試驗。牛流行熱傳統之診斷方式，乃利用牛隻血清中抗體效價之高低作為判定牛隻是否感染之依據，但此法受限於檢體收集所需時間長，無法達到



早期偵測之效果。因此，筆者研究團隊開發核酸探針檢驗試劑（液態晶片）應用於臨床血液或病理切片組織等檢體中病毒核酸之偵測及鑑定，提高牛流行熱病偵測之毒靈敏度與專一性。除了檢驗試劑之開發，也針對本病毒複製、抗病毒藥物之研究及誘發 apoptosis 之訊號傳遞途徑等做了一系列深入研究。因此首次證實牛流行熱病毒可誘導細胞凋亡及其誘發 apoptosis 是需活化 Fas-mitochondria 訊號傳遞途徑。也首次提出牛流行熱病毒可透過抑制 mTOR/complex 1 及活化 mTOR/complex 2 之機序來促進及提升病毒複製。同時亦證明非類固醇消炎藥劑 aspirin 及水楊酸可抑制牛流行熱病毒之複製。aspirin 可藉由抑制 COX 活性而抑制病毒複製，而水楊酸則藉由調控 Src-JNK-AP1 訊息傳遞路徑以達抑制 BEFV 之複製，此新發現具臨床及學術價值。在牛流行熱病毒之研究成果已發表數篇 SCI 研究報告及申請國內外專利。

（二）開發磁珠核酸探針檢測試劑

與南科之亞洲基因科技公司共同開發牛流行熱病毒、新城病病毒、家

禽里奧病毒及禽流感病毒等之磁珠核酸探針檢測試劑。研究成果已發表數篇 SCI 研究報告及申請國內外專利。此技術具高靈敏度與專一性，可偵測到 1-10 copies 之病毒，遠較 PCR 及 Real-time PCR 之靈敏度還高 10-100 倍。此技術平台頗具臨床應用價值，此技術之檢測流程詳見 Fig.1。新加坡亞洲新聞台亦於筆者之研究室拍攝專集介紹此檢測試劑之開發及臨床應用，因此提升筆者研究團隊國際知名度。

（三）建立疫苗開發平台及研發基因重組桿狀病毒次單位疫苗

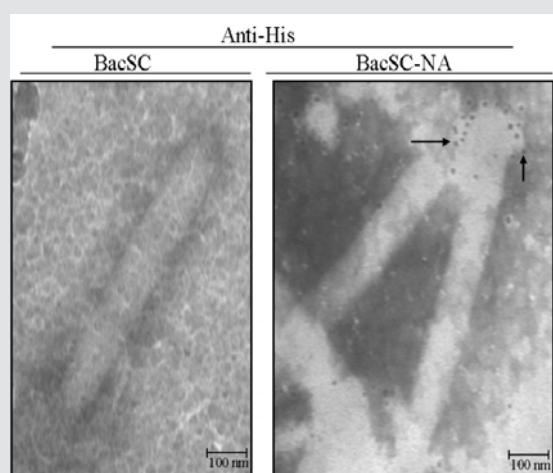
建立 an universal Baculovirus display system(UBSDS) 表現平台，此表現平台具有桿狀病毒 gp64 SS、His6、multiple cloning sites、桿狀病毒 gp64 TM 與 gp64 CTD 及 EFP 等，可作為製備次單位疫苗之新穎工具。應用此平台可建構不同之基因重組桿狀病毒作為次單位疫苗。此表現平台具 EFP 可快速篩選基因重組桿狀病毒，縮短製備基因重組桿狀病毒之時間，因此 UBSDS 平台具學術及臨床應用價值。應用此平台已建構之禽流感

NA (Fig. 2A) 及 HA (Fig. 2B)、家禽里奧病毒 σ C 及 σ B 蛋白、犬小病毒 VP2 蛋白、豬瘟病毒 E2 及 Erns 蛋白之基因重組桿狀病毒次單位疫苗。研究成果已發表數篇報告於 Vaccine 期刊及申請台灣及美國專利。此 UBSDS 系統是開發基因重組桿狀病毒次單位疫苗之有利工具，有助於疫苗之研究發展。

（四）分離及鑑定天然物 Damnacanthal 及抗 cancer 機制之研究

筆者研究團隊自 *Morinda citrifolia* (Rubiaceae) 分離一個具活性之主要 compound，經 NMR 鑑定其結構命名為 damnacanthal，此 compound 含量豐富，可具誘發多種不同癌細胞發生凋亡。此活性天然物成分 damnacanthal 對正常細胞之毒性低及具選擇性，具有發展成為抗癌保健產品之潛力。筆者研究團隊亦已證實 damnacanthal 誘發細胞凋亡之主要機序乃活化 p53-mitochondria、TNF α 及 TRAIL 等訊號傳遞途徑 (Fig. 3) 而誘細胞凋亡，而 damnacanthal 抗癌效力之動物臨床試驗正進行中。

(A) The avian influenza virus NA/recombinant baculovirus (BacSC-NA)



(B) The avian influenza HA/recombinant baculovirus (BacSC-HA)

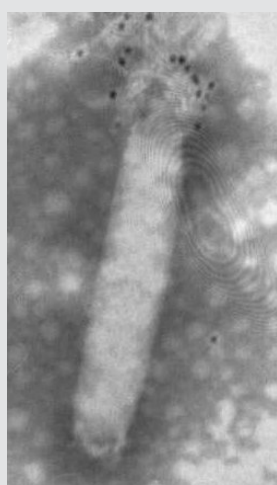


Fig.2. Immunogold electron micrographs of recombinant baculoviruses using anti-His6 monoclonal antibody as the primary antibody and anti-mouse IgG conjugated with 5-nm gold particles as the secondary antibody. Two avian influenza virus/recombinant baculoviruses (BacSC-NA and BacSC-HA) were constructed successfully. Arrows indicate the NA (A) or HA proteins (B) of avian reovirus displayed on baculovirus envelop. BacSC is a negative control that did not display any foreign proteins on baculovirus envelop.

Fig.3. A proposed model for the Damnacanthal-induced apoptosis in human hepatoma SKHep 1 cells is shown. The damnacanthal (Dam), an anthraquinone, was isolated from *Morinda citrifolia*. Treatment of SKHep 1 with Dam resulted in the inhibition of viability and induction of apoptosis in a dose-dependent manner. Caspase-3,-8,-9 inhibitors, anti-TRAIL R2, anti-TNFR1 and anti-Fas antibodies reversed the cell apoptosis induced by Dam. Dam induces an up-regulation of pro-apoptotic p53, caspase 8, Bid, Bax, AIF, activates caspase-9 and PARP expression. In addition, Dam dissipates the mitochondrial membrane potential. Western blot analysis indicated that DAM induced an up-regulation of p53, caspase 8 and Bid. Bax translocation from cytosol to mitochondria and cytochrome c but not AIF or Smac was released from mitochondria into the cytoplasm and apoptosis protease-activating factor 1 (Apaf-1) is up-regulated following the cytochrome c release to cytoplasm were also observed. Moreover, death receptor TNFR1 and DR5 were up-regulated in Dam treated cells. Dam activated p38 MAPK, leading to transcriptional induction of TNFR1/TNF, DR5/TRAIL and the p53-regulated Bax genes. Dam-dependent expression of death receptors and their corresponding ligands induces caspase 8 activation and Bid cleavage. t-Bid, together with Dam-induced Bax, promotes cytochrome c release and caspase 9 activation, leading to apoptosis.

