

**INFECTION OF DENGUE VIRUS TO A MEGAKARYOBLASTIC  
CELL LINE, MEG-01: A MODEL TO INVESTIGATE THE  
ROLES OF DENGUE VIRUS AND PLATELETS IN THE  
IMMUNOPATHOGENESIS OF DENGUE  
HEMORRHAGIC FEVER (DHF)**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE (IMMUNOLOGY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY**

**2008**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การติดเชื้อไวรัสเด็งกีและผลกระทบต่อ Megakaryoblastic cell line, MEG-01: ต้นแบบของการศึกษาผลกระทบของการติดเชื้อไวรัสเด็งกีต่อระบบเกล็ดเลือดในโรคไข้เลือดออก

(INFECTION OF DENGUE VIRUS TO A MEGAKARYOBLASTIC CELL LINE, MEG-01: A MODEL TO INVESTIGATE THE ROLES OF DENGUE VIRUS AND PLATELETS IN THE IMMUNO-PATHOGENESIS OF DENGUE HEMORRHAGIC FEVER (DHF))

นาย สมชาย เทียมเมฆา 4836191 SIIM/M

วท.ม. (วิทยุสมัครเล่น)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ปณิษฐ อวิรุทธินันท์, พ.บ., Ph.D.

ปรีดา มาลาสิทธิ์, พ.บ., F.R.C.P.

### บทคัดย่อ

ภาวะเกล็ดเลือดต่ำและการลดจำนวนของเซลล์ไขกระดูกพบได้ในระยะแรกของผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเด็งกี โดยเฉพาะในผู้ป่วยไข้เลือดออก การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในภาวะที่มีการติดเชื้อไวรัสเด็งกีจะมีการใช้เกล็ดเลือดที่เพิ่มมากขึ้นและจำนวนเกล็ดเลือดลดลง ยังไม่มีงานวิจัยที่ศึกษาผลกระทบของการติดเชื้อไวรัสเด็งกีต่อเซลล์ Megakaryocytes ซึ่งเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเกล็ดเลือดและผลกระทบที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้อ

ผู้วิจัยได้ใช้เซลล์เพาะเลี้ยง MEG-01 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีระยะอ่อนกว่า Megakaryocytes มาศึกษาผลกระทบของการติดเชื้อไวรัสเด็งกีต่อเซลล์ Megakaryocytes โดยผสมเซลล์ MEG-01 กับไวรัสเด็งกีในอัตราส่วนของจำนวนเซลล์ต่อไวรัสเป็น 1 ต่อ 1 แล้วนำเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เก็บได้ในวันที่ 1, 3, 5, และ 7 หลังการผสมมาตรวจการติดเชื้อไวรัสเด็งกีในเซลล์ MEG-01 โดยการย้อมโปรตีนของไวรัสภายในเซลล์ พร้อมทั้งหาจำนวนของไวรัสโดยใช้วิธี focus forming unit assay (FFU) และใช้วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เพื่อวัดปริมาณโปรตีน nonstructural protein 1 protein และ envelope protein ของไวรัสที่ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์

ผลการศึกษาพบว่าเชื้อไวรัสเด็งกีได้ทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถเพิ่มจำนวนและปล่อยไวรัสออกนอกเซลล์ MEG-01 ได้เป็นจำนวนมาก การติดเชื้อไม่ทำให้เซลล์ตาย (apoptosis) ในระยะแรกของการติดเชื้อ แต่เซลล์จะเริ่มตายมากขึ้นในวันที่ 5 เมื่อติดตามจำนวนเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีพบว่าในวันที่ 1 และ 3 มีเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีประมาณ 20% และเพิ่มขึ้นเป็น 60% ในวันที่ 5 และ 7 ส่วนปริมาณไวรัสที่ถูกปล่อยออกนอกเซลล์นั้นมีประมาณ  $10^4$  FFU/ml ในวันที่ 1 และเพิ่มขึ้นเป็น  $10^7$  FFU/ml ในวันที่ 5 และเมื่อเปรียบเทียบการติดเชื้อไวรัสเด็งกีระหว่างเซลล์ MEG-01 และ Vero cell พบว่าเซลล์ทั้งสองชนิดปล่อย envelope protein ออกมาเท่ากัน แต่เซลล์ MEG-01 ปล่อย nonstructural protein 1 ออกมาน้อยกว่า และในวันที่ 5 ซึ่งมีจำนวนเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีเท่ากันที่ 65% แต่ MEG-01 กลับปล่อยไวรัสออกนอกเซลล์ ได้มากกว่า Vero cell ( $10^7$  FFU/ml และ  $10^6$  FFU/ml ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังพบ small vesicles ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ (Flow cytometry) และพบว่ามีโปรตีน nonstructural protein 1 (ELISA) และมีไวรัสเด็งกีภายใน (FFU)

การศึกษานี้สรุปได้ว่า Megakaryocytes อาจจะเป็นเซลล์เป้าหมายหนึ่งของเชื้อไวรัสเด็งกี และอาจเป็นหนึ่งในแหล่งที่สร้างไวรัส และโปรตีนของไวรัสซึ่งเกี่ยวข้องกับกลไกการก่อโรคของโรคไข้เลือดออก

INFECTION OF DENGUE VIRUS TO A MEGAKARYOBLASTIC CELL LINE, MEG-01: A MODEL TO INVESTIGATE THE ROLES OF DENGUE VIRUS AND PLATELETS IN THE IMMUNOPATHOGENESIS OF DENGUE HEMORRHAGIC FEVER (DHF)

SOMCHAI THIEMMECA 4836191 SIIM/M

M.Sc. (IMMUNOLOGY)

THESIS ADVISORS : PANISADEE AVIRUTNAN, M.D., Ph.D.  
PRIDA MALASIT, M.D., F.R.C.P.

**ABSTRACT**

Thrombocytopenia and bone marrow suppression occur in the early phase of dengue virus (DV) infection. Several studies have demonstrated that thrombocytopenia is a result of increased platelet consumption during DV infection. However, the effect of dengue virus on megakaryocytes (i. e. cells which produce platelets) remains unclear.

To investigate whether megakaryocytes are susceptible to dengue virus infection and replication, megakaryoblastic cell line (MEG-01) was infected with DV at multiplicity (MOI) of 1 and followed-up at days 1, 3, 5, and 7 after infection. The percentage of DV infection and secreted nonstructural protein 1 (NS1) and envelope (E) protein were determined by immuno-fluorescence staining and enzyme-linked immuno-sorbent assay respectively. Virus production was determined by focus forming unit assay.

All serotypes of DV infected MEG-01 and produced high titers of virus. The infection of DV induced apoptosis in a proportion of cells. 20% of cells were infected at day 1 and 3 which rose to 60% at day 5 and 7 after infection.  $10^4$  FFU/ml of virus were produced on day 1, rising to  $10^7$  FFU/ml on day 5 after infection. Compared with Vero cell, MEG-01 secreted less NS1 protein but an equal amount of E protein. On day 5 of infection, when 65% of cells were infected,  $10^7$  FFU/ml of virus were produced in MEG-01 compared to  $10^6$  FFU/ml from Vero cells.

In addition, small vesicles were detected in the culture supernatant by flow cytometry. These vesicles contained NS1 antigen as assayed by an NS1-specific ELISA. Lysate from the vesicles contained infectious virus.

In conclusion, megakaryocytes might be one of the major targets for virus replication and one of the sources producing infectious virus and viral proteins involved in the immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. Infection of megakaryocytes and the subsequent events might be factors contributing to thrombocytopenia.

**KEYWORDS :** THROMBOCYTOPENIA / PLATELETS / DENGUE VIRUS (DV) / MEG-01 / MICROPARTICLES

94 pp.