

編號：CCMP96-RD-215

抑制人類多瘤性病毒，BK 病毒，感染之 中藥篩檢

張德卿

國立中正大學

摘 要

人類多瘤性病毒，BK 病毒 (BKV)，屬於 DNA 病毒。BKV 於腎臟組織再活化，常導致腎臟移植病人腎衰竭，即為多瘤性病毒相關腎病變 (Polyomavirus-associated nephropathy, PVN)。截至目前為止，仍缺乏有效抗 BKV 的藥物，本研究計畫的目的即在於尋找有效抑制 BKV 活性的中藥，以提供治療 PVN 的新藥物。實驗先以抑制 BKV VP1 類病毒殼體血液凝集，篩選可能具有抑制 BK 病毒與細胞受體結合能力之中藥，再以免疫螢光染色確認中藥處理後，BKV 感染細胞後病毒蛋白質表現。同時以溶劑梯度沖提分析中藥之圖譜，確認分離中藥的較佳條件；接著收集不同部分之中藥分離物，測定其血液凝集抑制活性，以作為後續分離鑑定中藥之依據。結果顯示紅景天、枸杞、白芍、黃芩及山楂，可抑制 BK VP1 類病毒殼體血液凝集活性。經由免疫螢光染色，確認紅景天及山楂，具有明顯抑制病毒蛋白質表現之活性。為了探討鑑定紅景天及山楂之有效成分，以不同極性溶劑沖提分離其成分物質，HAI 結果顯示無論以不同濃度甲醇、或乙酸乙酯及正丁醇萃取，紅景天及山楂之有效成分均位於水萃取層；再以 5-50% 乙晴分離此水萃取層中紅景天及山楂之有效成分，結果顯示此部分純化之 20% 乙晴萃取物具有最高之 HAI 活性，且濃度分別增加了 128 及 2048 倍 HAI。未來我們將繼續以不同溶劑及管柱分離純化紅景天及山楂之 20% 乙晴萃取物中的有效成分，並搭配 NMR，2D-NMR，IR，UV，ESI-Mass，Element Analysis 等方法決定其構造式。

接著以 LiChrospher 100 RP-18e 層析管柱，移動相 TFA-CH₃CN 的條件，以不同比率之甲醇濃度沖提分離紅景天及山楂萃取物，繼續以抑制血液凝集試驗分析。結果顯示 80:20 之甲醇濃度時有較佳的血液凝集抑制活性。因此紅景天及山楂抑制 BKV 與細胞受體結合的成分可能位於此分離物中。我們將繼續分離鑑定此物質，以其找到有效抑制 BKV 感染的中藥，作為臨床治療 PVN 用藥之新選擇。

關鍵詞：BK 病毒、多瘤性病毒腎病變、中藥抗病毒

Number: CCMP96-RD-215

Screening of Chinese Herbal Medicine to Inhibit Human Polyomaviruses, BK Virus, Infection

Deching Chang

National Chung Chen University

ABSTRACT

Human polyomavirus, BK virus (BKV), is a small DNA virus. Reactivation of BKV with high level viral replication results in lytic disruption of kidney cells. BKV reactivation may cause renal dysfunction and graft loss in renal transplant patients. This is polyomavirus-associated nephropathy (PVN). There are no effective drugs available for anti-BKV infection. The purpose of this study is to identify effective compounds for anti-BKV infection from Chinese herbal extracts. Herbal extracts were then analyzed for the inhibition of BK VLP hemagglutination activity (HAI). Immunofluorescence assay was performed to analyze viral protein expression in BKV infected cells after herbal treatment. Candidate herbal extracts were separated by chromatography using gradient solvents. The eluents from herbal extracts were then screened for HAI activity. Five examined herbal extracts, *Rhodiola rosea* L, *Paeonia albiflora* Palla, *Lycium chinense* Mill, *Scutellaria baicalensis* Georg, and *Crataegus pinnatifida* Bunge, were able to show HAI activity. In vivo immunofluorescence assay (IFA) demonstrated that only *Rhodiola rosea* L. and *Crataegus pinnatifida* Bunge exhibited a viral infection inhibition effect. Fifty-100% methanols, or butanol and ethylacetate solvent were employed to extract the effective compounds from *Rhodiola rosea* L. and *Crataegus pinnatifida* Bunge. The buffer layer was demonstrated to exhibit HAI activity. Five-50% acetonitrile were then followed to extract the effective compounds from the buffer layer. HAI activity was concentrated to reach 128 and 2048 fold in the partial purified 20% acetonitrile extracts. Further solvent extraction and chromatography separation combined with NMR, IR, ESI-Mass will be employed to identify the structure of the effective compounds from *Rhodiola rosea* L. and *Crataegus pinnatifida* Bunge.

Keywords: BK virus, Polyomavirus-associated nephropathy, Herbal anti-virus

壹、前言

人類多瘤性病毒，BK 病毒 (BKV)，屬於多瘤病毒科，最早於 1971 年在腎臟移植病人的尿液中被分離出來¹¹。其病毒顆粒約 45 nm，為不具套膜之 DNA 病毒。BKV 廣泛分佈於人類²³，從血清學的研究顯示，BKV 的感染在兒童時期⁷，到了成年時期，大部份的人具有抗體^{10, 32}。BKV 的初次感染通常沒有症狀，而潛伏於腎臟^{5, 13, 24}。免疫狀態的改變，如器官或骨髓移植病人，懷孕婦女或 HIV 病人^{2, 6, 14}，通常伴隨著病毒的再活化，病毒隨著被感染的細胞排放於尿液，可在電子顯微鏡下觀察到病毒顆粒，或在細胞檢查學上觀察到含有病毒包含體 (inclusion body) 的 “Decoy cells”。近年來，抑制腎臟移植排斥藥物的使用，使 BKV 再活化，引起多瘤性病毒腎病變 (Polyomavirus-association nephropathy, PVN)²⁵，在許多腎臟移植中心，可引起 5-10% 病人 PVN，而導致 >50% 的這群病人因腎衰竭而移植失敗^{29, 30}。因此，BKV 再活化，已成為腎臟移植病人醫療上愈趨嚴重的問題。

BKV 基因含有大小約為 5 Kb 之雙股螺旋狀 DNA¹⁸，BKV 基因可分為三個區域：分別是調控區，早期基因及晚期基因¹⁵。BKV 殼體由晚期基因的蛋白質 VP1, VP2, VP3 構成，在電子顯微鏡下呈現二十面體的構造^{1, 37}。BKV 感染細胞時，殼體上的 VP1 分子結合至細胞受體，一般認為 VP1 分子 BC1 及 BC2 loop 形成的縫隙，與細胞受體糖蛋白上 N-linked α - (2, 3) sialic acid 分子結^{33, 35}。此外，糖蛋白上 gangliosides GD1b 及 GT1b 分子亦可與 BKV VP1 結合⁸。這些分子與紅血球表面可與 BKV 結合的糖分子類似，BKV 具有血液凝集的特性，若以 Neuraminidase 處理細胞或紅血球表面，Neuraminidase 切掉連結至糖蛋白的 α - (2,3) -linked sialic acid¹⁹，則 BKV 無法感染細胞，同時也喪失了血液凝集能力，因此 BKV 的受體與紅血球上的血液凝集分子有共同性⁸。BKV 腎病變 (Polyomavirus-association nephropathy, PVN)，即是 BKV 在腎臟組織大量複製⁹，引起宿主腎小管細胞溶解性感染，引起腎功能逐漸喪失，最後導致腎衰竭^{27, 30}。

鑒於 BKV 在移植病人引起腎病變的重要性，於 2003 年在瑞典召開第一次全世界對 BKV 在 PVN 的相關研究，包括抑制免疫排斥藥物引起 BKV 再活化，目前治療 BKV 活化藥物的現況及 PVN 的診斷標準^{17, 30}。Tacrolimus (FK506)，cyclosporine A (CsA) 及 mycophenolate mofetil (MMF) 是常用的免疫抑制劑，用以降低器官移植病人的排斥作用¹²。雖然這些免疫抑制劑可有效降低排斥反應，卻常伴隨著 BKV 再活化。BKV 再活化於腎臟皮質及髓質大量複製，腎小管損傷，病人腎功能指標 creatinine 升高，最後進入 PVN 的後期，腎小管損傷溶解，導致病人腎衰竭²⁷。因此若 BKV load 開始增

加，則必須降低免疫抑制劑劑量及使用抗病毒藥物³⁴。目前臨床上抑制BKV活化的藥物，包括cidofovir，leflunomide，quinolone antibiotics及intravenous immunoglobulin (IVIG)²⁰。Cidofovir為廣泛的抗病毒藥物，為核苷酸類似物，但具有腎毒性的副作用¹²。Leflunomide屬於malonitrilamide類的藥物，抑制DNA pyrimidine de novo合成，但可能有肝毒性²²。Quinolone antibiotics藉由與gyrase的DNA binding subunit結合而抑制DNA合成，然其具有關節及心血管毒性的副作用³¹。IVIG配合降低免疫抑制劑劑量，雖然曾被報導可用於治療PVN，但有些移植中心的經驗卻是無法抑制PVN進行²⁰。所以目前在治療BKV腎病變的發展上依然欠缺有效的藥物，只能給予一些支持性療法²¹。因此，臨床上常使用免疫抑制劑，卻導致病毒伺機性感染，已是臨床上常面臨到的難題¹⁶。有鑑於此，我們想從中藥篩檢出有效的抗病毒藥物，以提供臨床上治療BKV活化的抗病毒中藥。

由於BKV的受體與紅血球上的血液凝集分子有共同性⁸，我們實驗室之前對人類多瘤性病毒結構的研究發現，VP1蛋白質於大腸桿菌、酵母菌或昆蟲細胞表達時，可自行組裝成類病毒殼體構造^{3,4,28}，VP1蛋白質上的epitope可能同時負責BKV與受體結合，或與人類O型紅血球凝集相關^{8,36}。因此以抑制BKV VP1組成的類病毒殼體 (Virus-like-particle, VLP) 的血液凝集能力，作為初步篩檢中藥的依據。接著，以免疫螢光染色及同步定量PCR方法，確認篩選出的中藥抑制BKV感染細胞的能力。另一方面，我們也將以不同萃取及分離方法鑑定中藥內有效的成分。希望藉中藥的篩檢及鑑定，能找到有效抑制BKV活性的中藥，提供臨床上治療PVN的新選擇。

貳、材料與方法

一、以酵母菌大量表達 BK VP1

BK 病毒主要結構蛋白 VP1 基因已選殖至酵母菌，酵母菌培養於 YPD (2% glucose, 1% yeast extract, 2% peptone) 培養基，以 20% galactose 誘發 BK VP1 蛋白質表現。菌體離心沉澱，使用法國壓力(French pressure)破細胞，並加入 DNase I (200 U/ml) 去除懸浮液中的大分子 DNA。以 14000 rpm 離心 15 分鐘，可得到含有可溶性 VP1 之上清液。

二、血液凝集測試 (Hemagglutination assay ; HA)

先將人類 O 型血球以 PBS 清洗三次，製成 0.7% 懸浮液，在 96 well 的 microtiter plate 上以 PBS 將樣本(中藥、病毒或病毒類殼體)進行二倍的系列稀釋，再加入 50 μ l 的 0.7% 紅血球懸浮液，混合均勻，4 $^{\circ}$ C 下靜置一小時，觀察並記錄血液凝集的情形。

三、病毒類殼體蛋白純化

確認 VP1 含量與存在之後，為了要得到高純度的 VP1，因此進行 10 ~ 30% 蔗糖濃度梯度(sucrose gradient)離心：以 Beckman L8-70M 超高速離心機 SW-41 Ti rotor，在 35000 rpm 1 小時的離心條件下純化 VP1 蛋白。利用蠕動幫浦收取每管約 200 μ l (為一個 fraction)，收集 24 管(24 fraction)。將收得之 24 管以 12.5% SDS-PAGE 分析蛋白含量與純度，將含有病毒類殼體的數管收集起來，利用 Centricon (YM-30, Millipore)濃縮。

四、SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)分析 BK VP1 的含量及純度

由 10~30% sucrose gradient 後收下的 24 個 fractions 中各取 15 μ l sample，以 12.5% SDS-PAGE 分析，再以 Coomassie blue solution (50% methanol, 10% acetic acid, 0.1% Coomassie blue R-250 (Sigma, USA) 染色，觀察蛋白質純度及含量。

五、中藥製備

中藥材以 H₂O、50% 及 100% 甲醇加熱迴流萃取 3 次，萃取物經冷凍乾燥後，回溶至固定濃度，測其血液凝集抑制活性。具血液凝集抑制活性之萃取物，進一步以不同濃度之甲醇溶液萃取，再測其血液凝集抑制活性。

六、分析紅景天(*Rhodiola rosea* L.)與山楂(*Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br.)之指紋圖譜

由於中藥成分複雜兼具有不同極性之成分，故中藥指紋圖譜分析採用梯度溶媒沖提分析，分析條件：層析管柱 LiChrospher 100 RP-18e (4 x 250

mm, 5 μ m) , 移動相 0.05% TFA-CH₃CN (A) 0 min, 95:5; 50 min, 55:45; 60min, 55:45, 61 min, 95:5; 70min, 95:5 ; (B) 0 min, 95:5; 50 min, 70:30; 60min, 70:30, 61 min, 95:5; 70min, 95:5。流速 1.0 ml/min, 檢測波長 280nm, 管柱溫度 40 $^{\circ}$ C。

七、中藥之血液凝集測試 (Hemagglutination assay, HA)

將已製備成 100 mg/ml 濃度之中藥材料, 先將人類的 O 型紅血球以 PBS 清洗三次, 配製成 0.7% 紅血球懸浮液。在 96 孔的 microtiter plate 上以 PBS 進行兩倍的系列稀釋 50 μ l 的中藥。先後加入 25 μ l 的 virus like particle (VLP) (JC VLP 8 HA; BK VLP 2 HA) 及 50 μ l 的 0.7% 紅血球, 混合均勻。4 $^{\circ}$ C 下靜置 1~2 小時後, 觀察並紀錄血液凝集的情形。取不具有 HA 活性之中藥進行後續實驗分析。

八、中藥之血液凝集抑制測試 (Hemagglutination inhibition assay, HAI)

先取 28 μ l 的中藥, 水浴 56 $^{\circ}$ C 處理 30 分鐘。加入 14 μ l NaIO₄, 於室溫靜置 30 分鐘。加入 14 μ l 5% glycerol/PBS 放置一旁備用。先在 96 well 的 microtiter plate 加入 25 μ l PBS。將處理好之中藥加入, 進行兩倍的系列稀釋。加入 50 μ l 0.7% RBC 在 37 $^{\circ}$ C 培養 1 小時。以 2000 rpm 離心 5 分鐘後, 去除上清液。加入 75 μ l PBS 懸浮紅血球。最後加入 2HA BK VLP 25 μ l 並混合均勻。4 $^{\circ}$ C 下靜置 1~2 小時, 觀察結果。

九、細胞來源及培養條件

Vero (African green monkey kidney cell, CCRC 60013) 培養於 90% DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Invitrogen/Gibco, Grand Island, NY, USA) 加上 10% 胎牛血清 (FBS; Biological Industries, Beit Haemek, Israel), 置於含 5% CO₂ 之 37 $^{\circ}$ C 培養箱中。

十、細胞增生試驗 (Cell proliferation)

以不同種類及濃度的中藥, 分別是山楂、紅景天、黃芩、枸杞、白芍 (31.25 μ g/ml、62.5 μ g/ml、125 μ g/ml、250 μ g/ml、500 μ g/ml、1000 μ g/ml) 等, 4 $^{\circ}$ C 處理 30 分鐘後, 用 4 $^{\circ}$ C PBS 清洗細胞 2 次, 然後加入完全培養液培養。96 小時後利用 trypsin 將細胞收起, 並以 trypan blue 計數細胞數量。

十一、病毒感染細胞

Vero 培養在直徑 100 mm 培養皿中, BK 病毒 (UT strain) 取 2 μ g 置於 1 ml DMEM 培養液內, 將含有 BK 病毒的培養液加入 Vero 細胞內, 於 37 $^{\circ}$ C 1.5 小時進行感染, 每 15 分鐘搖晃細胞。感染後加入完全培養液於細胞內, 置於含 5% CO₂ 之 37 $^{\circ}$ C 培養箱中培養, 每 4 到 5 天繼代培養。

十二、中藥抑制 BK 病毒感染試驗

於前一晚 seeding Vero 細胞 (3×10^5 個細胞) 在 35 mm 培養皿，加入不同種類及濃度的中藥分別是山楂、紅景天、黃芩、枸杞、白芍(31.25 $\mu\text{g/ml}$ 、62.5 $\mu\text{g/ml}$ 、125 $\mu\text{g/ml}$ 、250 $\mu\text{g/ml}$ 、500 $\mu\text{g/ml}$ 、1000 $\mu\text{g/ml}$) 在 4°C 處理 30 分鐘後。用 4°C 的 PBS 清洗細胞 2 次，加入 3 μg BK 病毒感染細胞，在 37°C 處理 1.5 小時(或 4°C 處理 1.5 小時)，期間每 15 分鐘搖晃一次，接著加入完全培養液培養(或先用 4°C 的 PBS 清洗細胞二次後再加入培養液)，每 3~5 天繼代培養一次，利用免疫螢光染色(Fluorescence assay)觀察病毒感染情形。

十三、免疫螢光染色(Immunofluorescence Assay)

利用鑽石刀將 coverslip 切出 1/4，將 1/4 大小的 coverslip 放入乾淨的 35 mm dish 中，細胞面朝上。加入 2 ml PBS 進行複水作用(rehydration)，室溫下反應 10 分鐘。吸掉 PBS，加入 Blocking solution 50 μl (horse serum 1:200 in PBS；0.02% Evan's blue)，室溫下反應 1 小時。加入 2 ml PBS 清洗，每次 3 分鐘，一共 5 次。吸乾 PBS，加入 50 μl primary antibody, mouse anti-SV40 LT 1:100 in PBS (Calbiochem/ Oncogene, Darmstadt, Germany)，室溫下反應 1 小時。加入 2 ml PBS 清洗，每次 3 分鐘，一共 5 次。吸乾 PBS 後，加入 50 μl secondary antibody, goat anti-mouse IgG-FITC (St. Louis, Missouri, USA) 1:128 in PBS，於室溫下避光反應 30 分鐘。加入 2 ml PBS 清洗，每次 3 分鐘，一共 5 次。吸乾 PBS 後，進行封片。在載玻片上滴一滴 mounting solution (DAKOTM FLUORESCENT Mounting Solution 002627)，將細胞面朝下與 mounting solution 接觸，避免氣泡產生，並以指甲油將四周封住。以共軛焦螢光顯微鏡(con-focal fluorescence microscopy, Axioplan2 imaging, ZEISS)觀察，使用 cool CCD Camera (LSM510)擷取影像。

參、結果

一、VLP的製備及純化

培養可以表達 BK 病毒主要結構蛋白質 VP1 的酵母菌菌株，將菌體破碎後取其離心後的上清液。並利用 10~30% 蔗糖連續濃度梯度離心來純化 VLP，超高離心後用蠕動幫浦分別回收每 12 滴溶液於一個 1.5 ml 離心管，以 SDS-PAGE 及 HA 方法分析。BKV VP1 蛋白質於 fraction 3 ~ 21 呈波峰分佈趨勢(圖一)。收集此 fraction 之 BKV VP1 蛋白質，以 Centricon® Plus-20 (Millipore)濃縮，置-20°C 保存。

二、中藥流浸膏之血液凝集測試(Hemagglutination assay, HA)

不具有血液凝集活性之中藥才可進行後續實驗，四十種中藥先進行血液凝集測試。其中十六種中藥不具有 HA 活性，分別是紅花、紅景天、綿茵陳、白芍、冬瓜子、蒼耳子、敗醬草、白芷、板藍根、枸杞、黃芩、山楂、首烏、澤瀉、郁金、山葡萄等(圖二)。

三、中藥流浸膏之血液凝集抑制試驗(Hemagglutination inhibition assay, HAI)

取不具有 HA 活性以水萃取之 16 種中藥當實驗材料，進行血液凝集抑制試驗，中藥處理分成二個方式，一個是中藥先與病毒(VLP)結合反應，以水萃取的 16 種中藥中發現紅景天、枸杞、黃芩及山楂等，具有 HAI 的活性(圖三 A)。另一是中藥先與細胞(RBC)結合反應，在以水萃取的 16 種中藥，BKV-HAI 實驗結果中，發現紅景天、白芍、枸杞、山楂具有顯著的 HAI 活性(圖三 B)。

四、中藥處理對細胞增生試驗

中藥是一種複合物，有些成份可能會影響細胞的生長，甚至毒殺細胞，因此選用不影響細胞生長之濃度，作為後續實驗中藥濃度選擇之依據。紅景天之濃度高於 125 µg/ml 時，其存活的細胞數低於 50%。山楂隨著濃度愈高，產生細胞病變也愈多，但是在各種濃度中其細胞數量皆大於 70%。枸杞、黃芩、白芍則不論濃度高低，皆無觀察到細胞病變產生(圖四)。

五、中藥抑制BK病毒感染試驗

不同濃度之中藥處理細胞後，BKV 感染細胞 1.5 小時，用 4°C 的 PBS 將未與細胞結合的病毒洗掉。感染後以免疫螢光染色，觀察病毒早期蛋白 LT 之表現。未處理紅景天或紅景天濃度為 31.25 µg/ml、62.5 µg/ml 時，第 6 天的病毒感染率分別是 33.7%、28.9%、20.2%(圖五)。未處理山楂或山楂濃度為 31.25 µg/ml、62.5 µg/ml、125 µg/ml、250 µg/ml、500 µg/ml 時，第 6 天的病毒感染率分別是 33.7%、21.6%、10.8%、5.7%、2.54%、0.6%，山楂隨著濃度愈高，對抑制病毒感染有顯著之效果(圖六)。未處理枸杞或處理

枸杞濃度為 31.25 $\mu\text{g/ml}$ 、62.5 $\mu\text{g/ml}$ 、125 $\mu\text{g/ml}$ 、250 $\mu\text{g/ml}$ 、500 $\mu\text{g/ml}$ 、1000 $\mu\text{g/ml}$ 時，第 6 天的病毒感染率分別是 33.7%、29.2%、24.2%、36%、43%、42.1%、43.1%(圖七)。未處理白芍或處理白芍濃度為 31.25 $\mu\text{g/ml}$ 、62.5 $\mu\text{g/ml}$ 、125 $\mu\text{g/ml}$ 、250 $\mu\text{g/ml}$ 、500 $\mu\text{g/ml}$ 、1000 $\mu\text{g/ml}$ 時，第 6 天的病毒感染率分別是 33.7%、18.1%、20.8%、37.4%、34.4%、32%、29.3%(圖八)。

在先前 VLP 與 RBC 的 HAI 實驗中，黃芩不具有 HAI 之活性(圖三)，在此當作 Negative control，在未處理黃芩及處理黃芩當濃度是 31.25 $\mu\text{g/ml}$ 、62.5 $\mu\text{g/ml}$ 、125 $\mu\text{g/ml}$ 、250 $\mu\text{g/ml}$ 、500 $\mu\text{g/ml}$ 、1000 $\mu\text{g/ml}$ 時，第 6 天的病毒感染率分別是 33.7%、20.9%、25%、33.9%、33.8%、34.7%、28.7%(圖九)，黃芩也不具有抑制病毒感染之效果。

六、中藥抑制病毒感染細胞柱狀圖分析

將各種中藥抑制病毒感染細胞之免疫螢光染色結果以柱狀圖表示，可明顯觀察到即使枸杞子、白芍及黃芩濃度達 1000 $\mu\text{g/ml}$ 時，病毒蛋白質表現約 30%，跟對照組比較沒有明顯差異；以 62.5 $\mu\text{g/ml}$ 濃度之紅景天或 500 $\mu\text{g/ml}$ 之山楂處理細胞時，則使病毒表現降至 20 及 0.6% (圖十)。

七、紅景天(*Rhodiola rosea* L.)與山楂(*Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br.)之指紋圖譜分析

由於中藥成分複雜兼具有不同極性之成分，故中藥指紋圖譜分析採用梯度溶媒沖提分析，紅景天之成分(圖十一)以 B 條件分析較佳。山楂亦依循紅景天之模式進行指紋圖譜分析，其結果如(圖十二)所示。

八、紅景天與山楂之有效成分之分離

為了分離紅景天與山楂有效抑制 BKV 感染的物質，我們先以水、50% 甲醇或 100% 甲醇等溶劑萃取紅景天與山楂成分物質，只有水萃取物具有 HAI，分別為 2^5 及 2^4 (圖十三 A、B)，甲醇萃取層則不具 HAI，顯示有效抑制 BKV 病毒的物質可能位於水萃取物。進一步以水、乙酸乙酯及正丁醇等溶劑，萃取紅景天與山楂上述水層成分物質，結果顯示具 HAI 活性依然存在水萃取層(2^7 及 2^4 ，圖十三 C、D)；進一步以 5 - 50% 乙晴(CH_3CN)萃取紅景天與山楂成分物質，最後成分物質再溶於 100% 甲醇。結果顯示 50% 乙晴或 100% 甲醇之萃取物質不具 HAI 活性，無論紅景天或山楂最高 HAI 活性位於 20% 乙晴萃取物中，其最高 HAI 則分別為 2^{12} 及 2^{15} (圖十三 E、F)。

肆、討論

我們實驗室之前對人類多瘤性病毒結構的研究發現，VP1 蛋白質於大腸桿菌、酵母菌或昆蟲細胞表達時，可自行組裝成類病毒殼體構造^{3, 4, 28}，VP1 蛋白質上的 epitope 可能同時負責 BKV 與受體結合，或與人類 O 型紅血球凝集相關^{8, 36}。因此，本研究中我們以 BK 類病毒殼體為材料(圖一)，從 50 種中藥(表一)初步篩選出 16 種不具血液凝集特性的中藥(圖二)。中藥以抑制 BK VLP 血液凝集活性為依據，篩選出紅景天、山楂、枸杞子及白芍等具有 HAI 的活性(圖三)。接著以細胞增生實驗，選擇不具細胞毒性之中藥濃度。枸杞子、黃芩及白芍等中藥，於濃度為 1000 $\mu\text{g/ml}$ 時，細胞的存活率均達 80%，不具明顯細胞毒性；然而紅景天濃度為 125 $\mu\text{g/ml}$ 時，細胞存活率只剩下 50%；山楂濃度為 1000 $\mu\text{g/ml}$ 時，細胞存活率低於 80%，因此我們分別選擇紅景天最高濃度為 62.5 $\mu\text{g/ml}$ ，山楂最高濃度為 500 $\mu\text{g/ml}$ ，枸杞子、黃芩及白芍等中藥最高濃度為 1000 $\mu\text{g/ml}$ ，繼續以免疫螢光偵測病毒蛋白質表現。紅景天及或山楂處理細胞，於病毒感染六天後，可明顯降低病毒蛋白質表現，分別可從 33.7% 降至 20.2% 及 0.6% (圖五、六及十)；然而枸杞子、白芍及黃芩卻無明顯抑制病毒感染細胞之能力(圖七八、九及十)。為了分離紅景天及山楂所含有效抑制 BKV 感染之成分，同時考慮中藥成分複雜兼具有不同極性，我們進一步以梯度溶媒沖提分析紅景天(圖十一)及山楂(圖十二)之成分指紋圖譜，找出合適之分離管柱。接著以水、50% 甲醇或 100% 甲醇萃取紅景天及山楂的成分物質，分析各部分之 HAI 活性。具 HAI 部分以乙酸乙酯、正丁醇或水萃取，再繼續以 5-50% 乙晴萃取，HAI 結果顯示，有效物質位於水層及 20% 乙晴萃取層(圖十三 A - F)。

若將此研究結果以流程圖表示，我們從 50 種中藥篩選出四種具有 HAI 活性的中藥，經由免疫螢光偵測病毒蛋白質表現，再篩選出紅景天及山楂具有抑制病毒感染的活性(圖十四 A, part I)；紅景天及山楂之成分物質再以不同溶劑萃取，各部份成分物質再測其 HAI 活性(圖十四 A, part II)，從柱狀圖顯示主要 HAI 活性位於 20% 乙晴萃取物中(圖十四 B)；且經由幾次溶劑萃取，紅景天及山楂之 HAI，從原先的 2^5 及 2^4 增加至 2^{12} 及 2^{15} ，即濃縮 128 及 2048 倍(圖十四 C)。

此次實驗設計以阻斷病毒上的 epitope (中藥先與 VLP 結合)或阻斷細胞上病毒之受體(中藥先與紅血球結合)實驗，篩選出紅景天、山楂、枸杞子及白芍等中藥(圖三)，進一步實驗證實卻只有紅景天與山楂具有抑制 BKV 感染細胞之能力(圖五-九)。然而，初步篩選實驗中，枸杞子及白芍卻只有 4-8

HAI 活性；此實驗結果顯示：以抑制 BK VLP 血液凝集試驗，可作為快速篩選藥物抑制 BKV 感染的方法。紅景天及山楂抑制 BKV 感染的機制，可能藉由阻斷病毒與細胞受體結合，然而我們亦無法排除是否紅景天及山楂處理細胞後，有效成分進入細胞，進而抑制 BKV 於細胞的複製能力。中藥經肝臟酵素 p-450 代謝及給藥途徑不同，可能產生不同結果³⁸，因此紅景天及山楂經由酵素代謝後，是否仍然具有抑制 BKV 感染的能力，仍需進一步之動物實驗證實。

目前我們以抑制 BK 類病毒殼體血液凝集活性，確認紅景天及山楂之有效成分可能位於 20% 乙晴萃取物中。我們將進一步以 Diaion HP-20、Toyopearl HW-40(F)、Sephadex LH-20 等管柱層析，依次進行分離。若仍無法獲得純化合物則繼續以 MCI-gel CHP-20 管柱、ODS 管柱、製備級 HPLC 等進行純化精製，以逆相之 HPLC 確認純度，並搭配儀器分析，以 NMR，2D-NMR，IR，UV，ESI-Mass，Element Analysis 等儀器進行構造式決定，並以稀酸水解、酵素水解、乙醯化(acetylation)、甲基化(methylation)等化學反應驗證結構。及微量化學反應以鑑定有效物質的結構。

近年來，BKV 再活化所造成之多瘤性病毒腎病變(polyomavirus-associated nephropathy, PVN)，已是許多腎臟移植中心面臨到之日趨嚴重的問題³⁰。降低免疫抑制劑及使用抗病毒藥物是治療 PVN 的準則²⁶，然而目前治療 BKV 腎病變的藥物卻常伴隨著器官毒性之副作用^{12, 20, 22}。我們從 50 種中藥中篩選出紅景天及山楂可能抑制 BKV 感染，同時確認二者有效成分位於 20% 乙晴萃取物中。希望藉由繼續探討紅景天及山楂之有效抑制 BKV 感染物質，以作為治療 PVN 的新選擇。

伍、結論與建議

BKV 再活化所造成之多瘤性病毒腎病變 (polyomavirus-associated nephropathy, PVN)，已是許多腎臟移植中心面臨到之日趨嚴重的問題。降低免疫抑制劑及使用抗病毒藥物是治療 PVN 的準則，然而目前治療 BKV 腎病變的藥物卻常伴隨著器官毒性之副作用。我們從 50 種中藥篩選出四種具有 HAI 活性的中藥，經由免疫螢光方法，再篩選出紅景天及山楂具有抑制病毒感染的活性；紅景天及山楂之成分物質經由以不同溶劑萃取，各部份成分物質再測其 HAI 活性，從柱狀圖顯示主要 HAI 活性位於 20% 乙晴萃取物中；且經由幾次溶劑萃取，紅景天及山楂之 HAI 活性從原先的 2^5 及 2^4 ，濃縮增加至 2^{12} 及 2^{15} 。從上述結果顯示，利用 BKV VP1 重組蛋白我們可以快速篩選可能抑制 BKV 感染的中藥，且經由溶劑萃取及 HAI 篩選，可以快速得決定有效成分物質分佈，且濃度增加了 2^{7-11} 倍。希望藉由此次實驗進行，可以提供中藥抑制其他相同具有血液凝集特性的傳染性病原體的快速篩檢方法，同時紅景天及山楂單方亦可能應用於抑制其他傳染病原體之研究及推廣。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會計畫編號 CCMP96-RD-215 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

1. Barbanti-Brodano G, Minelli GP, Portolani M, Lambertini L, Toppini M (1975) Structural proteins of a human papovavirus (BK virus): a comparison with the structural proteins of simian virus 40. *Virology* 64: 269-271
2. Chang D, Wang M, Ou WC, Lee MS, Ho HN, Tsai RT (1996) Genotypes of human polyomaviruses in urine samples of pregnant women in Taiwan. *Journal of medical virology*, pp 95-101
3. Chang D, Fung CY, Ou WC, Chao PC, Li SY, Wang M, Huang YL, Tzeng TY, Tsai RT (1997) Self-assembly of the JC virus major capsid protein, VP1, expressed in insect cells. *The Journal of general virology* 78 (Pt 6): 1435-1439
4. Chen PL, Wang M, Ou WC, Lii CK, Chen LS, Chang D (2001) Disulfide bonds stabilize JC virus capsid-like structure by protecting calcium ions from chelation. *FEBS letters* 500: 109-113
5. Chesters PM, Heritage J, McCance DJ (1983) Persistence of DNA sequences of BK virus and JC virus in normal human tissues and in diseased tissues. *The Journal of infectious diseases* 147: 676-684
6. Coleman DV, Wolfendale MR, Daniel RA, Dhanjal NK, Gardner SD, Gibson PE, Field AM (1980) A prospective study of human polyomavirus infection in pregnancy. *The Journal of infectious diseases* 142: 1-8
7. Dei R, Marmo F, Corte D, Sampietro MG, Franceschini E, Urbano P (1982) Age-related changes in the prevalence of precipitating antibodies to BK virus in infants and children. *Journal of medical microbiology* 15: 285-291
8. Dugan AS, Eash S, Atwood WJ (2006) Update on BK virus entry and intracellular trafficking. *Transpl Infect Dis* 8: 62-67
9. Fishman JA (2002) BK virus nephropathy--polyomavirus adding insult to injury. *The New England journal of medicine* 347: 527-530
10. Flaegstad T, Traavik T, Kristiansen BE (1986) Age-dependent prevalence of BK virus IgG and IgM antibodies measured by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). *The Journal of hygiene* 96: 523-528
11. Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B (1971) New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1: 1253-1257
12. Gorantla VS, Barker JH, Jones JW, Jr., Prabhune K, Maldonado C, Granger

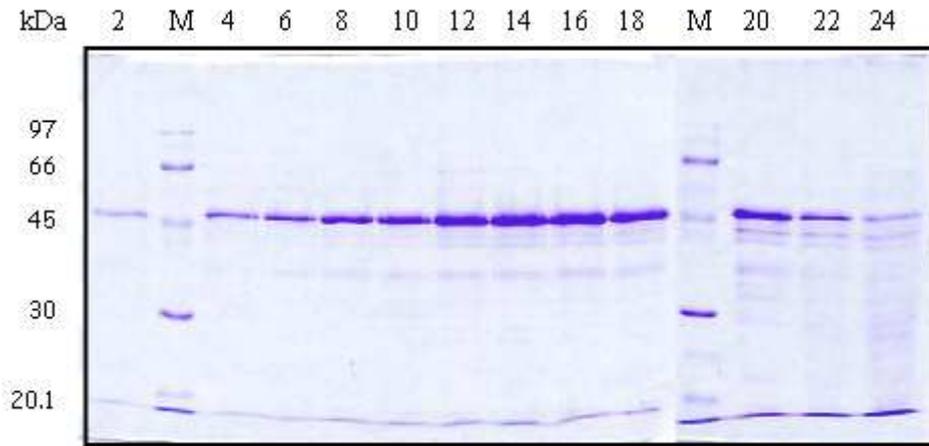
- DK (2000) Immunosuppressive agents in transplantation: mechanisms of action and current anti-rejection strategies. *Microsurgery* 20: 420-429
13. Heritage J, Chesters PM, McCance DJ (1981) The persistence of papovavirus BK DNA sequences in normal human renal tissue. *Journal of medical virology* 8: 143-150
 14. Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, Passweg J, Klimkait T, Mihatsch MJ, Steiger J (2002) Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *The New England journal of medicine* 347: 488-496
 15. Hirsch HH, Steiger J (2003) Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis* 3: 611-623
 16. Hirsch HH (2005) BK virus: opportunity makes a pathogen. *Clin Infect Dis* 41: 354-360
 17. Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, Ginevri F, Gordon J, Limaye AP, Mihatsch MJ, Nickleit V, Ramos E, Randhawa P, Shapiro R, Steiger J, Suthanthiran M, Trofe J (2005) Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation* 79: 1277-1286
 18. Howley PM, Mullarkey MF, Takemoto KK, Martin MA (1975) Characterization of human papovavirus BK DNA. *Journal of virology* 15: 173-181
 19. Iwamori M, Ohta Y, Uchida Y, Tsukada Y (1997) *Arthrobacter ureafaciens* sialidase isoenzymes, L, M1 and M2, cleave fucosyl GM1. *Glycoconjugate journal* 14: 67-73
 20. Josephson MA, Williams JW, Chandraker A, Randhawa PS (2006) Polyomavirus-associated nephropathy: update on antiviral strategies. *Transpl Infect Dis* 8: 95-101
 21. Kwak EJ, Vilchez RA, Randhawa P, Shapiro R, Butel JS, Kusne S (2002) Pathogenesis and management of polyomavirus infection in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 35: 1081-1087
 22. Maddison P, Kiely P, Kirkham B, Lawson T, Moots R, Proudfoot D, Reece R, Scott D, Sword R, Taggart A, Thwaites C, Williams E (2005) Leflunomide in rheumatoid arthritis: recommendations through a process of consensus. *Rheumatology (Oxford, England)* 44: 280-286
 23. Mantyjarvi RA, Meurman OH, Vihma L, Berglund B (1973) A human papovavirus (B.K.), biological properties and seroepidemiology. *Annals of clinical research* 5: 283-287

24. Nickeleit V, Hirsch HH, Binet IF, Gudat F, Prince O, Dalquen P, Thiel G, Mihatsch MJ (1999) Polyomavirus infection of renal allograft recipients: from latent infection to manifest disease. *J Am Soc Nephrol* 10: 1080-1089
25. Nickeleit V, Klimkait T, Binet IF, Dalquen P, Del Zenero V, Thiel G, Mihatsch MJ, Hirsch HH (2000) Testing for polyomavirus type BK DNA in plasma to identify renal-allograft recipients with viral nephropathy. *The New England journal of medicine* 342: 1309-1315
26. Nickeleit V, Singh HK, Mihatsch MJ (2003) Polyomavirus nephropathy: morphology, pathophysiology, and clinical management. *Current opinion in nephrology and hypertension* 12: 599-605
27. Nickeleit V, Mihatsch MJ (2006) Polyomavirus nephropathy in native kidneys and renal allografts: an update on an escalating threat. *Transpl Int* 19: 960-973
28. Ou WC, Hseu TH, Chang D (2001) Molecular investigation of the major structural protein, VP1, of human polyomavirus, JC virus, in capsid assembly. PH. D. Thesis. Department of Life Science. National Tsing Hua University
29. Ramos E, Drachenberg CB, Portocarrero M, Wali R, Klassen DK, Fink JC, Farney A, Hirsch H, Papadimitriou JC, Cangro CB, Weir MR, Bartlett ST (2002) BK virus nephropathy diagnosis and treatment: experience at the University of Maryland Renal Transplant Program. *Clinical transplants*: 143-153
30. Ramos E, Hirsch HH (2006) Polyomavirus-associated nephropathy: updates on a persisting challenge. *Transpl Infect Dis* 8: 59-61
31. Rubinstein E (2001) History of quinolones and their side effects. *Chemotherapy* 47 Suppl 3: 3-8; discussion 44-48
32. Shah K, Daniel R, Madden D, Stagno S (1980) Serological investigation of BK papovavirus infection in pregnant women and their offspring. *Infection and immunity* 30: 29-35
33. Stehle T, Gamblin SJ, Yan Y, Harrison SC (1996) The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution. *Structure* 4: 165-182
34. Trofe J, Hirsch HH, Ramos E (2006) Polyomavirus-associated nephropathy: update of clinical management in kidney transplant patients. *Transpl Infect Dis* 8: 76-85
35. Tsai B, Gilbert JM, Stehle T, Lencer W, Benjamin TL, Rapoport TA (2003)

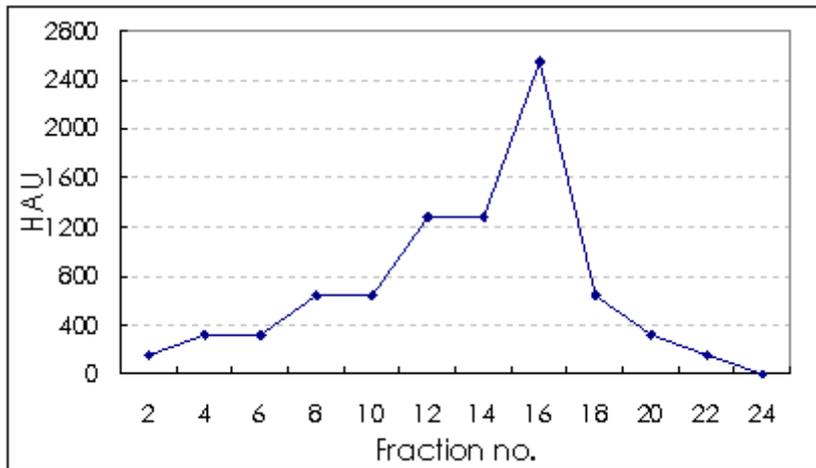
- Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *The EMBO journal* 22: 4346-4355
36. Wang M, Tzeng TY, Fung CY, Ou WC, Tsai RT, Lin CK, Tsay GJ, Chang D (1999) Human anti-JC virus serum reacts with native but not denatured JC virus major capsid protein VP1. *Journal of virological methods* 78: 171-176
37. Wright PJ, Di Mayorca G (1975) Virion polypeptide composition of the human papovavirus BK: comparison with simian virus 40 and polyoma virus. *Journal of virology* 15: 828-835
38. Zhou S, Gao Y, Jiang W, Huang M, Xu A, Paxton JW (2003) Interactions of herbs with cytochrome P450. *Drug metabolism reviews* 35: 35-98

柒、圖、表

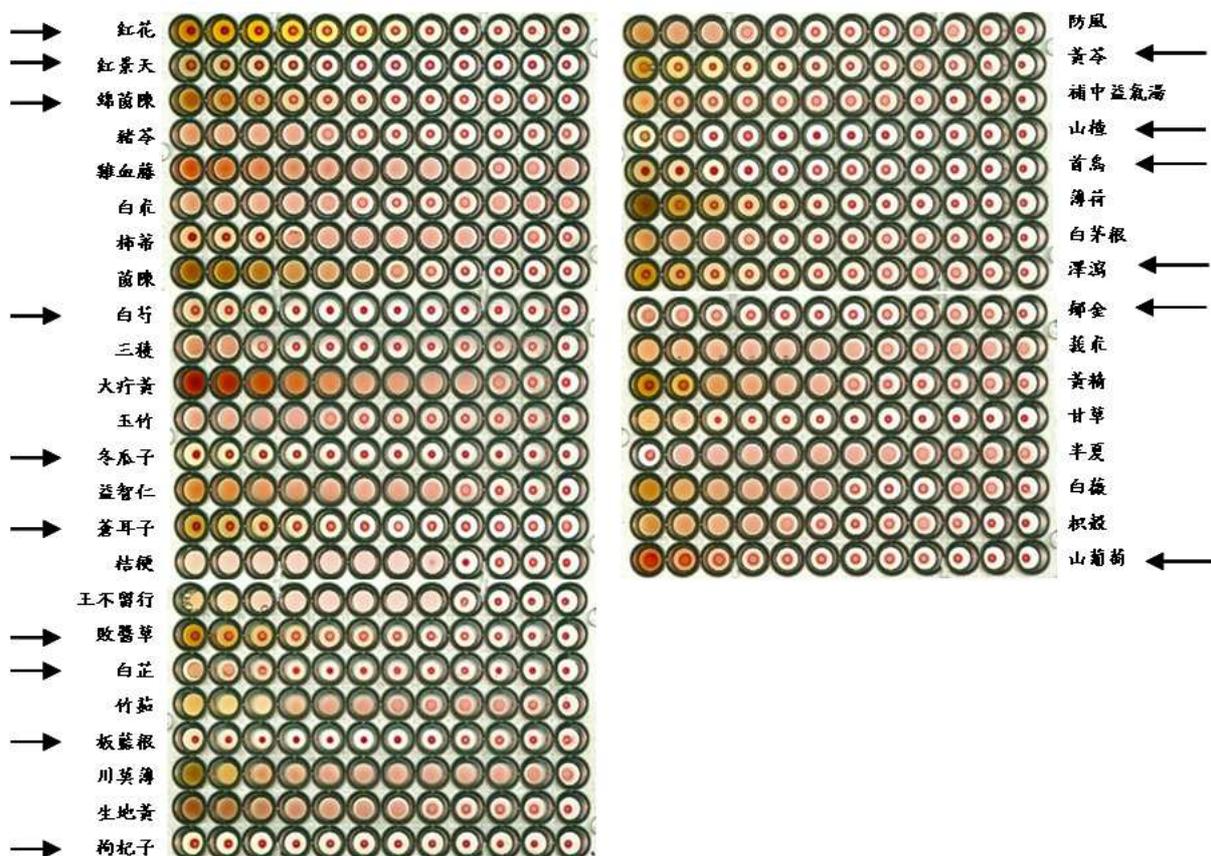
(A)



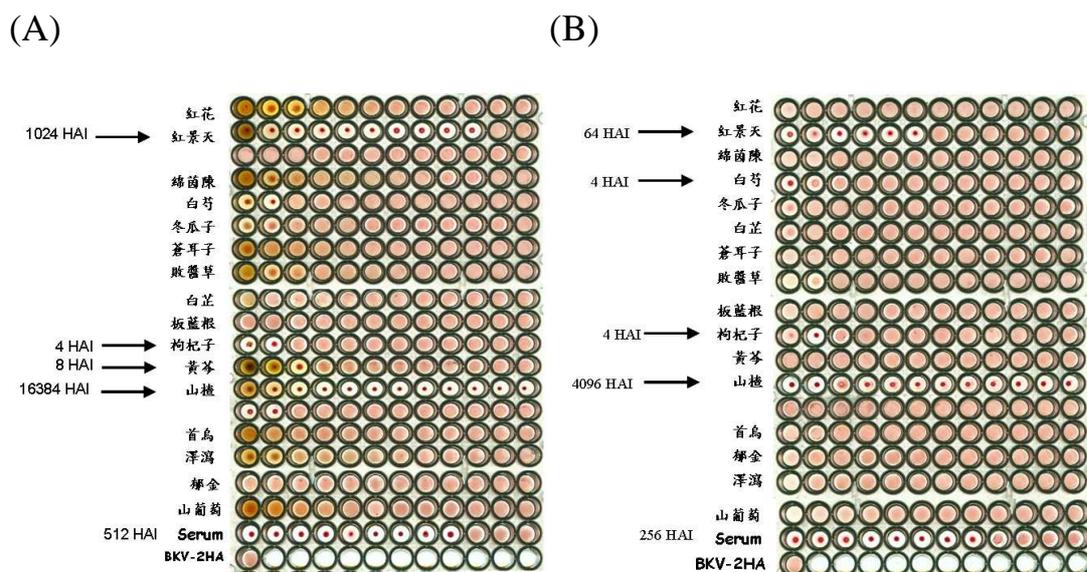
(B)



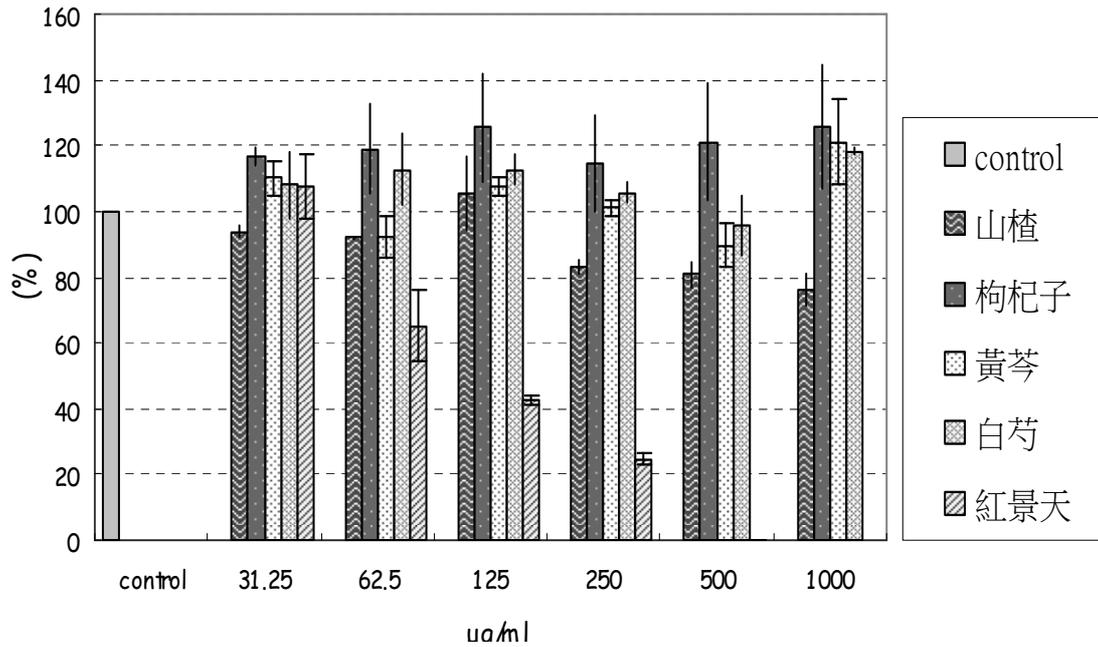
圖一、BK 類病毒殼體(VLP)之純化。(A)在酵母菌內表達之 BK VLP 以 10-30%蔗糖梯度超高速離心，各 fraction 以 12.5% SDS-PAGE 分析。M 代表 Marker，圖上標記數字為各 fraction 的編號。(B)超高速離心各 fraction 之血液凝集活性。



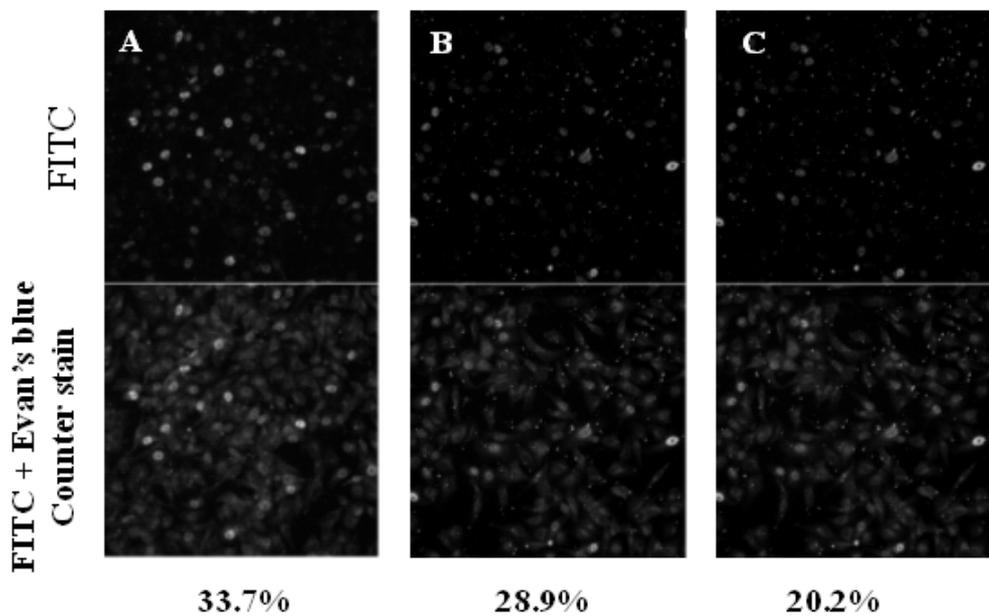
圖二、中藥萃取物之血液凝集試驗。將取得之 40 種中藥進行血液凝集分析。



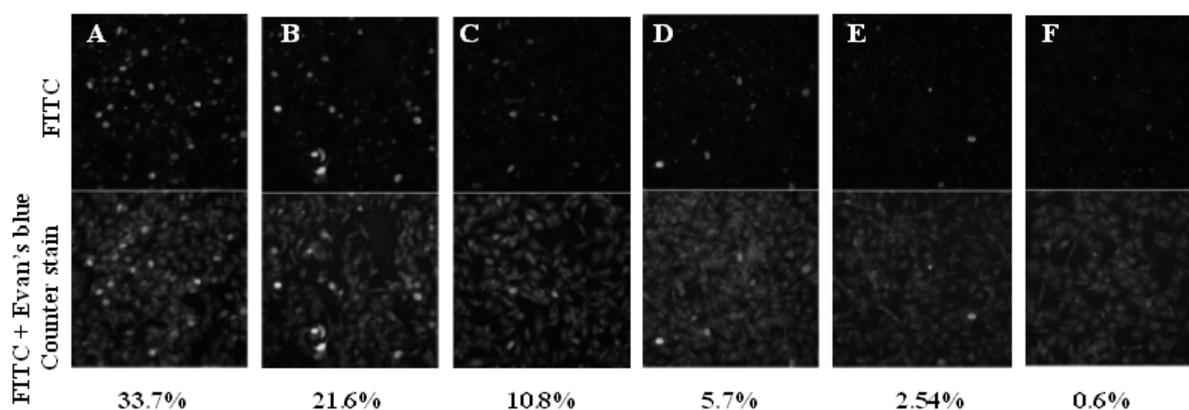
圖三、中藥之血液凝集抑制試驗。(A)中藥先與 VLP 結合；(B)中藥先與紅血球(RBC)結合。



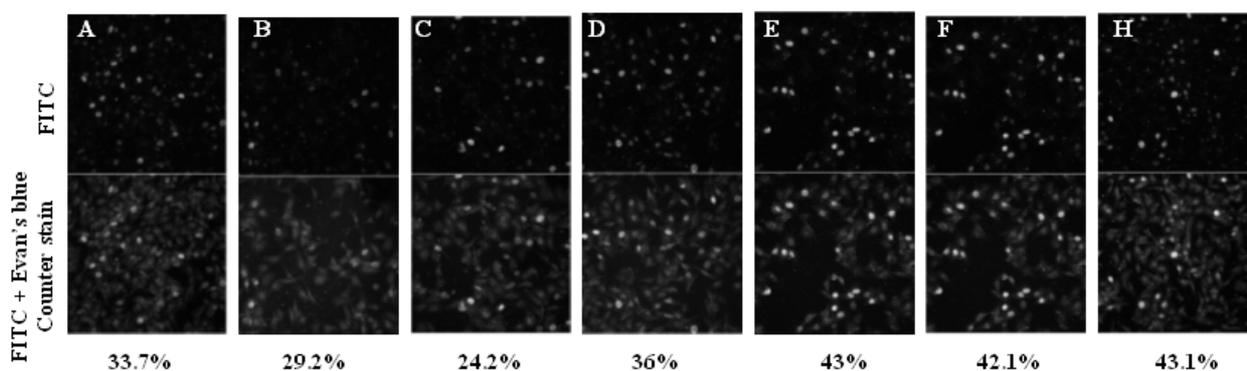
圖四、中藥處理 Vero 細胞的細胞增生試驗(Cell proliferation assay)之量化圖示。中藥處理細胞 96 小時後計數細胞，觀察細胞增生情形。



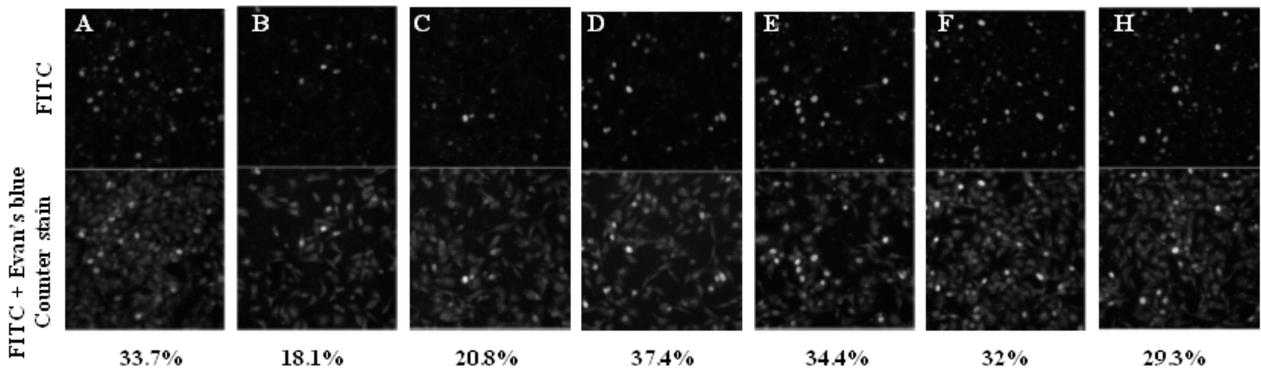
圖五、免疫螢光染色分析紅景天抑制 BK 病毒感染試驗紅景天處理後之細胞，以 BK 病毒感染，六天後以免疫螢光染色分析。(A)未處理中藥，(B)處理紅景天 31.25µg/ml，(C)處理紅景天 62.5µg/ml。



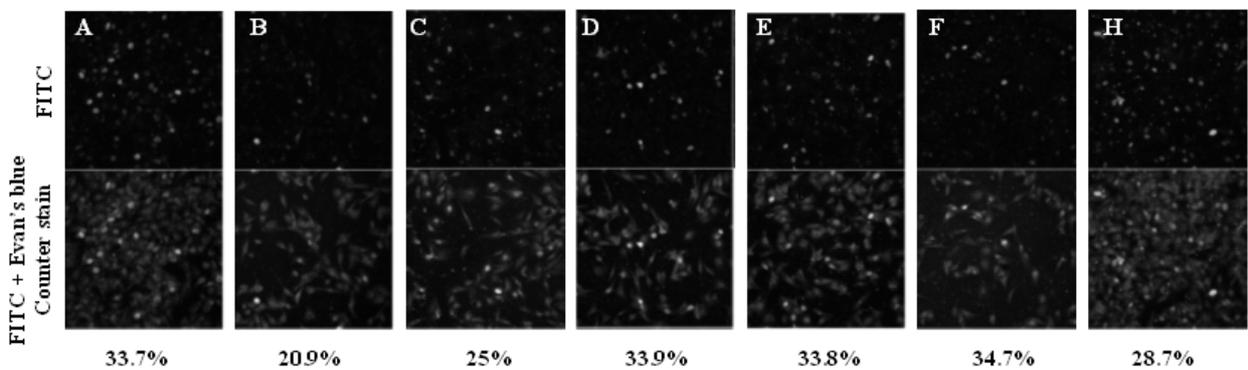
圖六、免疫螢光染色分析山楂抑制 BK 病毒感染試驗。山楂處理後之細胞，以 BK 病毒感染，六天後以免疫螢光染色分析。
(A)未處理中藥，(B)處理山楂 31.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，(C)處理山楂 62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，
(D)處理山楂 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，(E)處理山楂 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，(F)處理山楂 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。



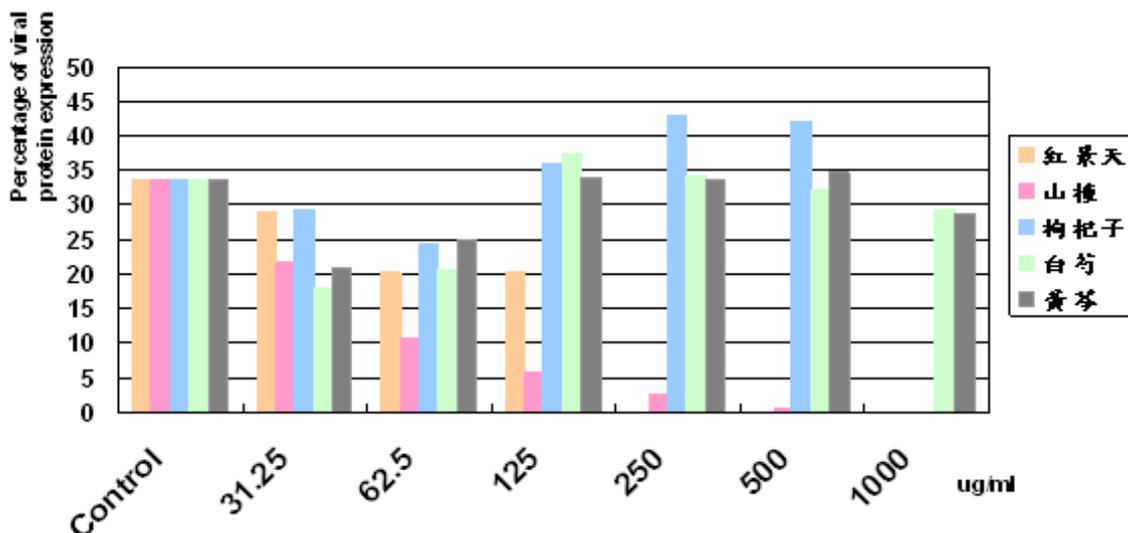
圖七、免疫螢光染色分析枸杞子抑制 BK 病毒感染試驗。枸杞子處理後之細胞，以 BK 病毒感染，六天後以免疫螢光染色分析。
(A)未處理中藥，(B)處理枸杞子 31.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，
(C)處理枸杞子 62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，(D)處理枸杞子 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，
(E)處理枸杞子 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，(F)處理枸杞子 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，
(G)處理枸杞子 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。



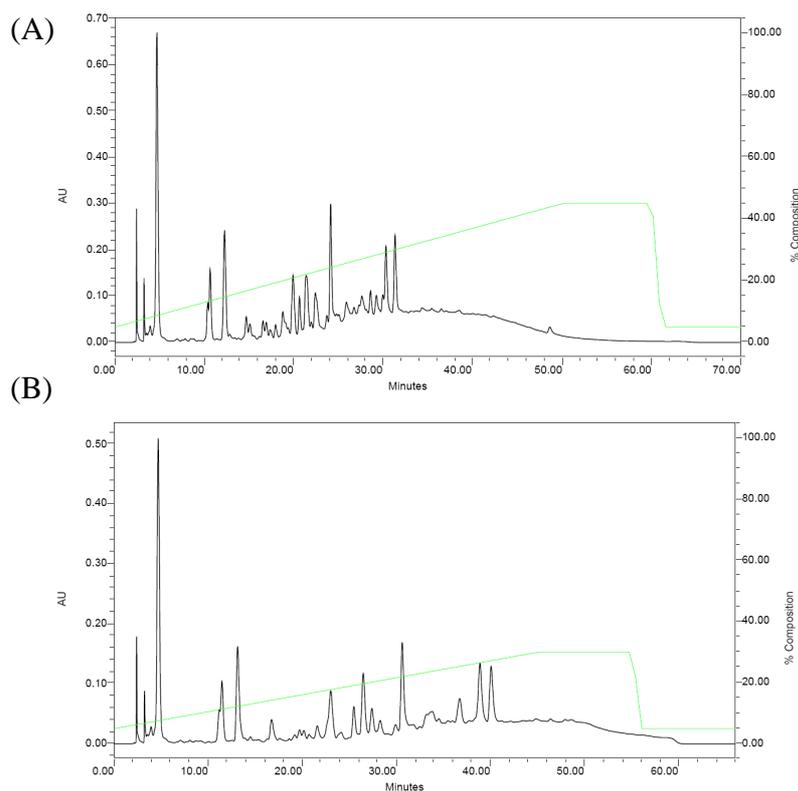
圖八、免疫螢光染色分析白芍抑制 BK 病毒感染試驗。白芍處理後之細胞，以 BK 病毒感染，六天後以免疫螢光染色分析。
 (A)未處理中藥，(B)處理白芍 31.25 μ g/ml，
 (C)處理白芍 62.5 μ g/ml，(D)處理白芍 125 μ g/ml，
 (E)處理白芍 250 μ g/ml，(F)處理白芍 500 μ g/ml，
 (G)處理白芍 1000 μ g/ml。



圖九、免疫螢光染色分析黃芍抑制 BK 病毒感染試驗。黃芍處理後之細胞，以 BK 病毒感染，六天後以免疫螢光染色分析。
 (A)未處理中藥，(B)處理黃芍 31.25 μ g/ml，
 (C)處理黃芍 62.5 μ g/ml，(D)處理黃芍 125 μ g/ml，
 (E)處理黃芍 250 μ g/ml，(F)處理黃芍 500 μ g/ml，
 (G)處理黃芍 1000 μ g/ml。

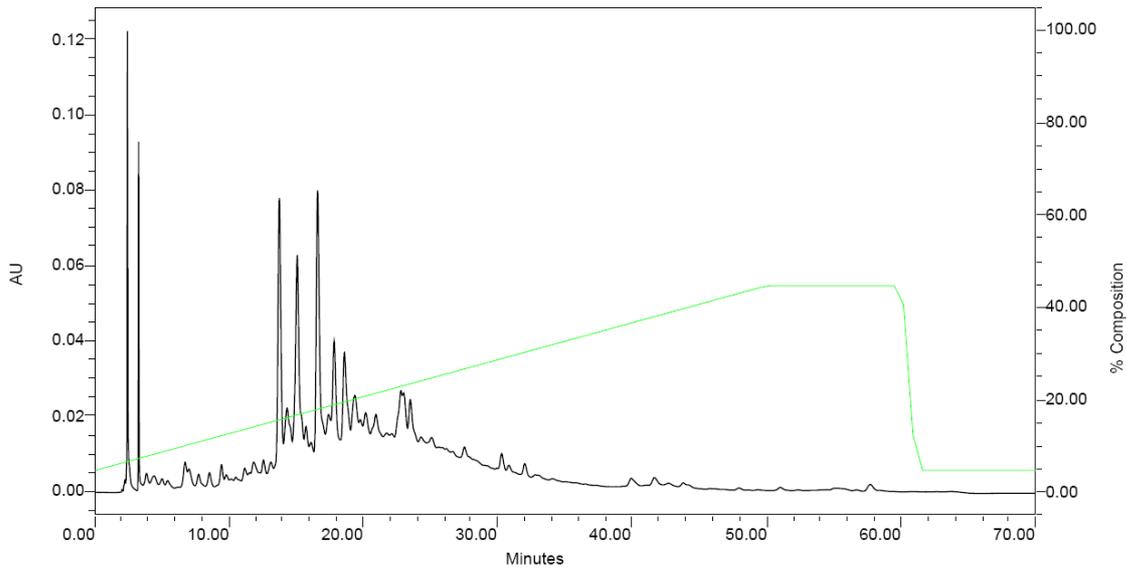


圖十、中藥處理細胞後，病毒蛋白質表現之柱狀圖。中藥處理 30 分鐘後，以緩衝液清洗，再以 BKV 感染細胞，六天後以免疫螢光染色觀察病毒蛋白質表現。

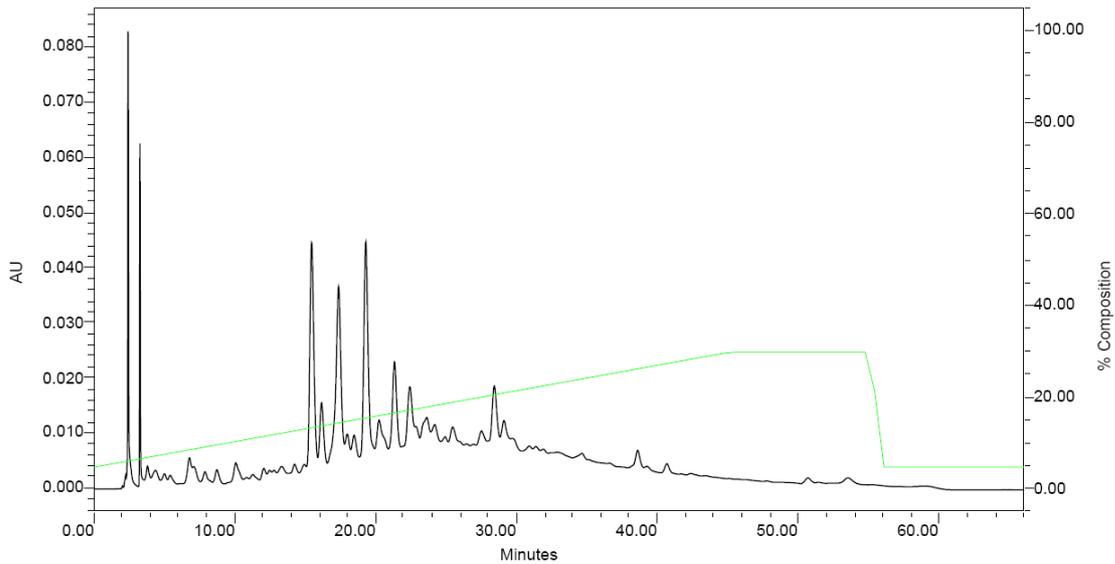


圖十一、紅景天之成分指紋圖譜分析。分析條件：層析管柱 LiChrospher 100 RP-18e (4 x 250 mm, 5um)，移動相 0.05% TFA-CH₃CN (A) 0 min, 95:5; 50 min, 55:45; 60min, 55:45, 61 min, 95:5; 70min, 95:5 ; (B) 0 min, 95:5; 50 min, 70:30; 60min, 70:30, 61 min, 95:5; 70min, 95:5。流速 1.0 ml/min，檢測波長 280nm，管柱溫度 40 °C。

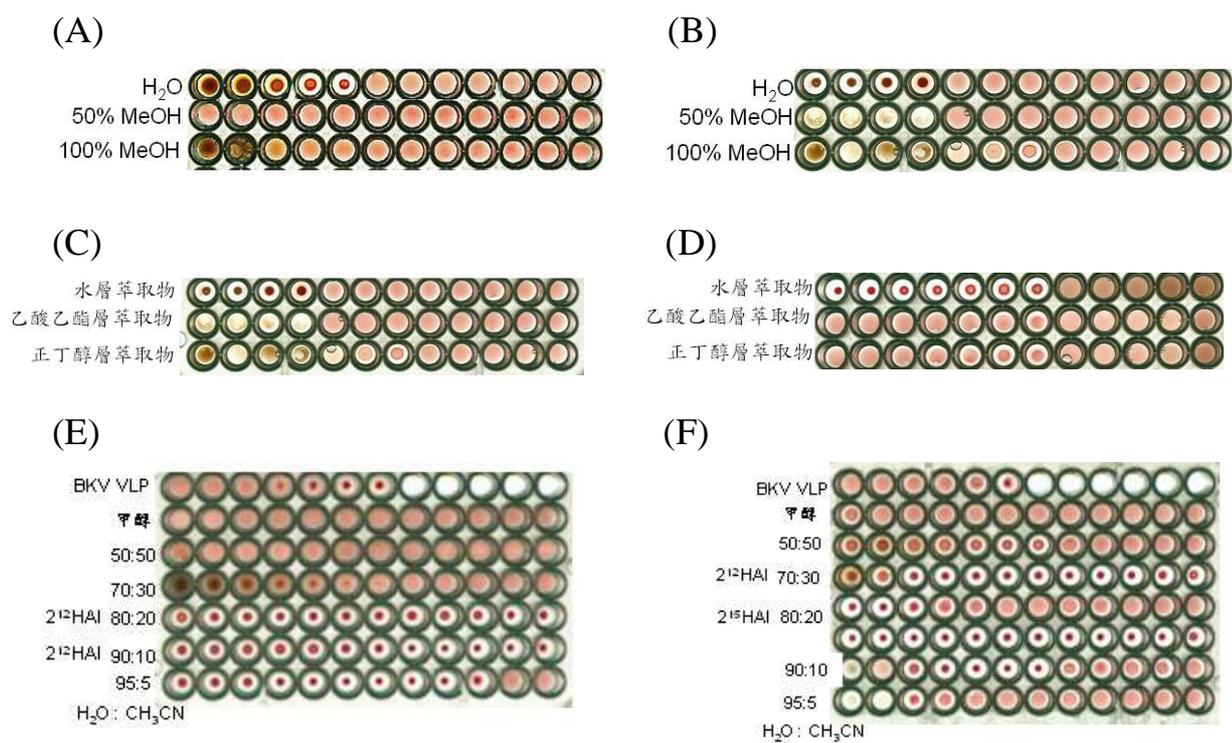
(A)



(B)



圖十二、山楂之成分指紋圖譜分析。分析條件：層析管柱 LiChrospher 100 RP-18e (4 x 250 mm, 5 μ m)，移動相 0.05% TFA-CH₃CN (A) 0 min, 95:5; 50 min, 55:45; 60min, 55:45, 61 min, 95:5; 70min, 95:5 ; (B) 0 min, 95:5; 50 min, 70:30; 60min, 70:30, 61 min, 95:5; 70min, 95:5。流速 1.0 ml/min，檢測波長 280nm，管柱溫度 40 °C。



圖十三、不同溶劑萃取紅景天與山楂之成分物質之血液凝集抑制活性分析。

(A)紅景天以水或甲醇萃取後之 HAI。

(B)山楂以水或甲醇萃取後之 HAI。

(C)紅景天具 HAI 之水萃取物，以正丁醇、乙酸乙酯或水溶液萃取後之 HAI 活性。

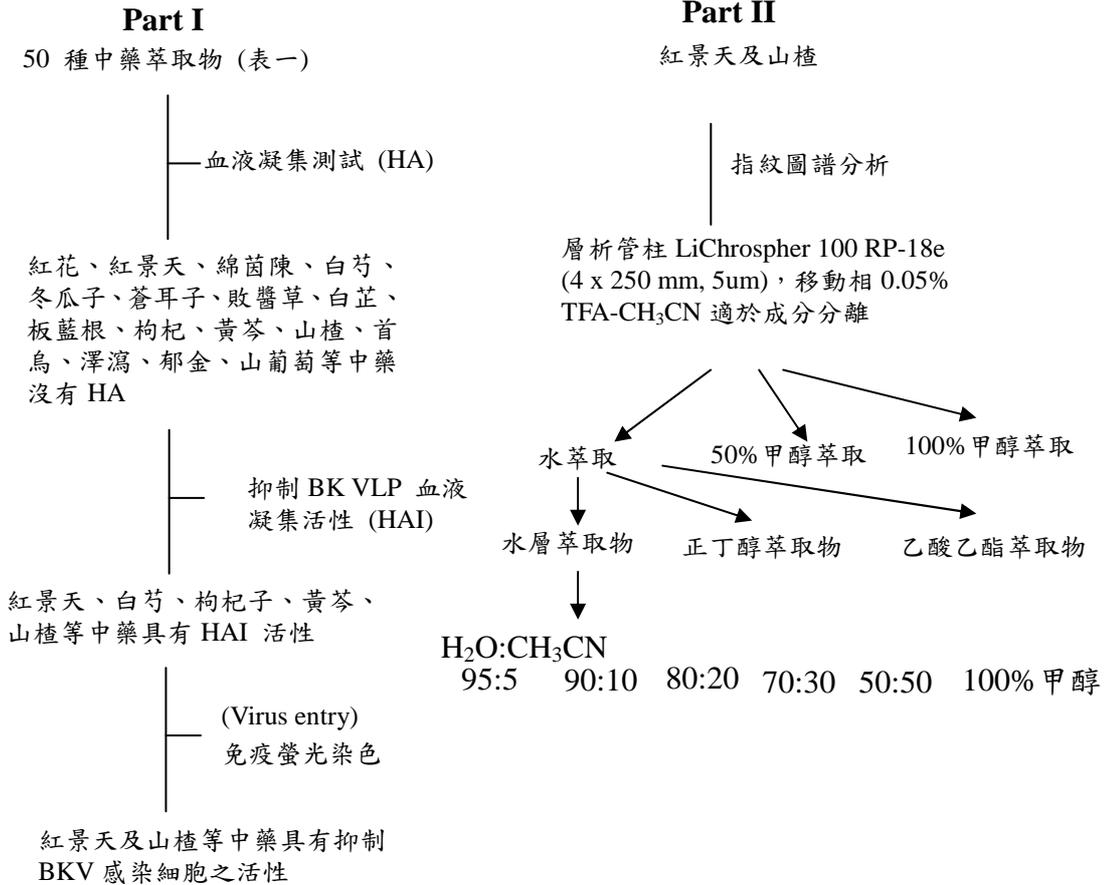
(D)山楂具 HAI 之水萃取物，以正丁醇、乙酸乙酯或水溶液萃取後之 HAI 活性。

(E)紅景天水層萃取物以 5 - 50% 乙晴分離後，各部分之 HAI 活性。

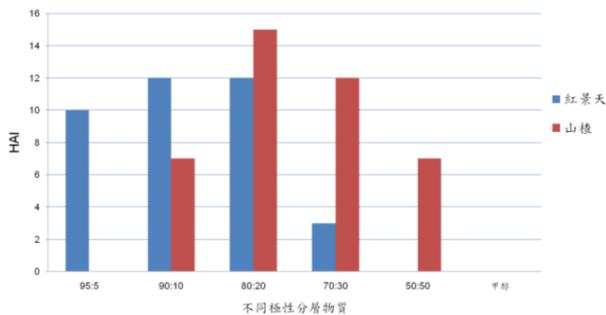
(F)山楂水層萃取物以 5 - 50% 乙晴分離後，各部分之 HAI 活性。

BK VLP 為 HA 活性對照組。

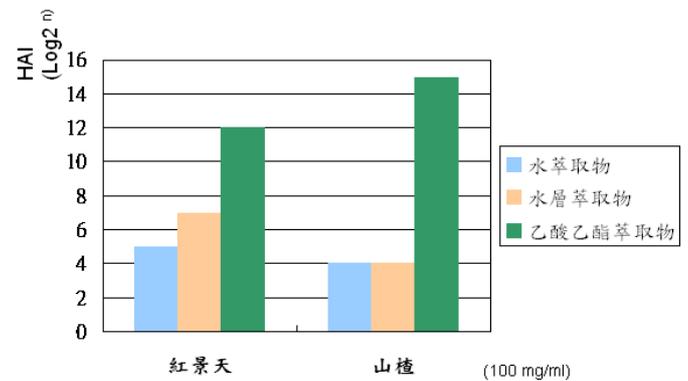
(A)



(B)



(C)



圖十四、此次實驗研究過程以流程圖表示。

(A)Part I 表示 HAI 篩選過程, part II 表示中藥以不同溶劑萃取過程。

(B) 5-50% 乙晴各部分 HAI 活性之柱狀圖。

(C)紅景天及山楂經由溶劑萃取, HAI 活性濃縮增加之柱狀圖。

表一、此次計畫所篩檢之中藥品名

中文名稱	拉丁文名稱	中文名稱	拉丁文名稱
1 紅花	<i>Carthamus tinctorius</i> Linn.	26 防風	<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk.
2 紅景天	<i>Rhodiola rosea</i> L.	27 黃芩	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georg.
3 綿茵陳	<i>Artemisia scoparia</i> Waldst.et Kit.	28 山楂	<i>Crataegus pinnatifida</i> Bunge
4 豬苓	<i>Polyporus umbellatus</i> (Pers.) Er.	29 何首烏	<i>Polygonum multiflorum</i> Thunb.
5 雞血藤	<i>Millettia dielsiana</i> Harms	30 薄荷	<i>Mentha arvensis</i> L. var. <i>piperascens</i> Malinv.
6 白朮	<i>Atractylodes macrocephala</i> Koida	31 白茅根	<i>Imperata cylindrica</i> (L.) Beauv. var. <i>major</i> (Nees.) C. E. Hubb.
7 柿蒂	<i>Diospyros kaki</i> L. f.	32 澤瀉	<i>Alisma orientale</i> (Sam.) Juzep.
8 茵陳蒿	<i>Artemisia capillaris</i> Thunb	33 丹參	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge..
9 白芍	<i>Paeonia albiflora</i> Palla.	34 鬱金	<i>Curcuma aromatica</i> Sallsb.
10 荊三稜	<i>Scirpus yagara</i> Ohwi	35 莢朮	<i>Curcuma zedoaria</i> (Berg.) Roscoe.
11 大丁黃	<i>Euonymus laxiflorus</i> Champ. ex Benth.	36 黃精	<i>Polygonatum sibiricum</i> Redoute
12 玉竹	<i>Polygonatum officinale</i> All	37 甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.
13 冬瓜子	<i>Benincasa hispida</i> (Thunb.) Cogn.	38 半夏	<i>Pinellia ternata</i> (Thunb) Breit
14 益智仁	<i>Alpinia oxyphylla</i> Miq.	39 白薇	<i>Cynanchum atratum</i> Bunge.
15 蒼耳子	<i>Xanthium strumarium</i> Linn.	40 枳殼	<i>Citrus aurantium</i> Linn.
16 桔梗	<i>Platycodon grandiflorum</i> (Jacq.) A. DC.	41 山葡萄	<i>Ampelopsis brevipedunculata</i> (Maxim.) Traut var. <i>hancei</i> (Planch.) Rehder
17 敗醬	<i>Partrinia villosa</i> Juss.	42 紫花地丁	<i>Viola yedoensis</i> Makino.
18 山藥	<i>Dioscorea oppoita</i> Thunb.	43 旋覆花	<i>Inula britannica</i> L. var. <i>chinensis</i> (Rurp.) Regel . <i>Perilla frutescens</i>
19 王不留行	<i>Vaccaria pyramidata</i> Medic	44 紫蘇葉	(L.) Britt. var. <i>acuta</i> (Thunb) Hand-Mazz.
20 天門冬	<i>Asparagus cochinchinensis</i> (Lour.) Merr.	45 白芥子	<i>Brassica alba</i> Boiss.
21 白芷	<i>Angelica dahurica</i> (Fisch ex Hoffm.) Benth. et Hook. f.	46 牛蒡子	<i>Arctium lappa</i> Linn.
22 竹茹	<i>Phyllostachys nigra</i> Munro var. <i>henonis</i> Stapf ex Rendle	47 忍冬	<i>Lonicera japonica</i> Thunb.
23 板藍根	<i>Isatis tinctoria</i> L.	48 川芎	<i>Ligusticum chuanxiong</i> Hort.
24 生地黃	<i>Rehmannia glutinosa</i> Libosch.	49 柴胡	<i>Bupleurum chinense</i> DC.
25 枸杞子	<i>Lycium chinense</i> Mill.	50 白果	<i>Ginkgo biloba</i> Linn.