

編號：CCMP96-RD-211

以細胞株培養、小白鼠模式、及臨床試驗方式做有系統探討及比較中西方天然草本製劑對抗病毒感染及增加免疫功能之效用：細胞層級的試驗（全程總報告）

黎慶

國立嘉義大學

摘要

隨著時代的演變及進步，跳越物種的新興病毒之種類、變異、及致病能力，似乎已越來越無法預測與防治。然而化學合成的抗病毒感染藥物，常受到高細胞毒性及其副作用的限制，相反的中草藥療效溫和，正可彌補西藥的缺點與不足。因此在本計畫裡，我們探討固有方劑舉元煎與草藥板藍根及紫花地丁等兩味，對臺灣流行的病毒疾病之療效。此外由於西方國家裡盛行“順勢療法”的天然方劑 Método Canova 對愛滋病毒可能有療效，所以也做同時而平行的實驗，期望在抗病毒之藥理研究及藥物研發上，能與國際接軌及比較。本計畫原來申請為歷時兩年半、含三個子計畫之整合型計畫，但僅被核准較短期之第一子計畫，那就是：以細胞株培養模式，做有系統探討及比較中西方天然草本製劑，對抗病毒感染及增加免疫功能之效用。

本計畫以一年半的時間（96.8.1 ~ 97.12.31）利用細胞株培養方式，從事五種中草藥劑及西方天然方劑 Método Canova，於抵抗在臺灣流行病毒（單純皰疹病毒一型、腸病毒 71 型、登革病毒、及 EB 病毒）感染能力，做有系統且深入的探討與比較。於執行實驗時，這些藥劑將去處理不同病毒的宿主細胞，之後檢測是否可抑制此四種病毒的感染。同時也將探討這些方劑，可否誘發人類周邊白血球（PBMC）分泌免疫分子，達到間接殺死病毒的效力。而最近所研發成功之病毒基因體晶片（EB 病毒晶片），也會用來探討當 EB 病毒的複製，受中草藥刺激時，其基因表達之改變。在此實驗設計之下，受驗 6 種草本天然方劑的抗病毒效用，就會被測定出來。

本計畫的前期（96.8.1 ~ 96.12.31），我們請 GMP 製藥廠煎煮出五種方劑（舉元煎、舉元煎加味板藍根、舉元煎加味紫花地、板藍根、紫花地）的浸膏，並且

完成了腦、肝、B-、及膀胱等細胞株毒性的試驗，得到可用濃度範圍的結果，而且所需要的 6 種細胞株與 4 種病毒，已全部取得，與大量繁殖與儲備，而 EBV 晶片也足量製備。第二年度計畫（97.1.1 ~ 97.12.31）的目標，則是測試上述六種方劑，對單純疱疹病毒一型及腸病毒 71 型感染人類神經細胞 SK-N-SH、登革病毒感染人類肝細胞 HepG2、及 EB 病毒在人類 B 細胞 B95-8 內基因表達之抑制效果。試驗的結果顯示，將這些方劑以最高無細胞毒性濃度（600 μ g/ml），直接加入細胞株後，僅有舉元煎加味紫花地丁或紫花地丁的處理，可導致單純疱疹病毒一型及腸病毒 71 型感染 SK-N-SH 細胞的病毒繁殖量，比沒有或其他藥劑處理時，減少了 1 個 log 值；這代表紫花地丁抑制此兩病毒複製的療效；然而此六種方劑對於登革病毒感染人類肝細胞 HepG2、及 EB 病毒在 B95-8 內基因表達，並無抑制的功效。若將它們加到 PBMC 培養液，以間接的方法去處理細胞株，則所有的方劑，都失去抑制病毒的能力。為了探討天然中草藥方劑參與抑制病毒的可能機轉，我們已運用了其他經費去測試這六方劑，對 Balb/c 實驗小白鼠調節免疫功能的效力，因此吾人得以了解方劑所參與反應機轉的可能路徑及療效基礎。

關鍵詞：舉元煎、板藍根、紫花地丁、順勢療法、Método Canova、抗病毒感染療效、腸病毒、單純疱疹病毒、EV 病毒、登革病毒

Number: CCMP96-RD-211

The Uses of Cell Line and Mouse Models and Clinical Pilot Trials for Systematic Analysis and Comparison of the Efficacies of Chinese and Western Herbal Medicines in Controlling Viral Infections and Modulating Immunity: Testing with a Cell Model (Final Report)

Ching Li, Ph.D.

National Chiayi University

ABSTRACT

Aim:

There are numerous domestic outbreaks of emerging/reemerging viral diseases in the recent years, and the threats will become more intense and frequent in the future. Sadly, the compound drugs targeting to viruses are frequently accompanying with high cytotoxicity. Since Chinese traditional herbal medicine (CTHM) aims to “improving physical strength” but is with minimal side effect, it becomes an idea therapeutic method to solve the difficulty of the modern medicine against virus diseases. We thus proposed a three-component program project to systematic analyze the efficacies of Chinese herbal medicines in controlling viral infections. However, only this component project, which working with a cell line study model, was granted.

Method:

In the research years, we applied the widely circulate CTHM (*Chui-Uien-Chien*, *Chui-Uien-Chien* plus *Radix Isatidis*, *Chui-Uien-Chien* plus *Viola yedoensis* Makino) for testing their efficacy in inhibiting virus replication. We also tested the Brazilian homeopathic medicament “*Método Canova*” in parallel. For this, CTHM drugs and *Método Canova* were applied to the appropriated cell cultures for possible inhibiting the growth of four viruses prevalent in Taiwan, which include herpes simplex virus-1 (HSV-1), enterovirus-71 (EV-71), dengue virus (Den2), and Epstein-Barr virus (EBV).

One-step growth curve plotting has been used to monitor the replication of HSV-1, EV-71, and Den2; whereas EBV-genome chip hybridization has been performed for detecting the viral gene expression alternations. Since the medicaments may elicit immune factors, the drugs were treated with PBMC, following by testing whether the culture supernatants can suppress the replication of these four viruses.

Results & Discussion:

The works of the first period (8-1-07 to 12-31-07) yielded the following results: (A), all CTHM drugs were sufficiently prepared; (B), the cytotoxicities of CTHM drugs were tested on a variety of human cell lines; (C) all cell lines and viruses were properly stored; and (D), adequate numbers of EBV-chip have prepared. The subsequent experiments (1-1-08 to 12-1-08) yielded results showing that only when *Chui-Uren-Chine* plus *Viola yedoensis* Makino or *Viola yedoensis* Makino alone was applied to cells, the one-step growth curve for HSV-1 or EV-71, but not Den2 or EBV, exhibited an one-log lower value in viral titer than those cells without treatment or treated with other herbal agents, suggesting that *Viola yedoensis* Makino possesses antiviral potentiality. Furthermore, none of these 6 agents were effective if pre-incubating with PBMC, suggesting that they did not stimulate PBMC to secrete any antiviral factor. In parallel to the investigation, we have obtained an outside fund to test of the immunomodulatory properties of the tested medicinal agents with Balb/c mice. The result of the animal study is helpful in interpreting the antiviral effect observed in cell lines infecting with the viral pathogens.

Keywords: *Chui-Uien-Chien*, *Radix Isatidis*, *Viola yedoensis* Makino, Homeopathic medicine, *Método Canova*, Antiviral therapy, Enterovirus 71, Herpes simplex virus-1, Dengue virus, Epstein-Barr virus, Immune modulation

壹、前言

除了在人類流行了上千年的病毒，及其所造成之疾病是方興未艾外，跳越物種而感染人類新興病毒之種類，也隨著時代的演變及進步，而次數增加與頻率加快。在過去的 100 年中，造成全球的流行及恐慌之人類新興病毒疾病，至少有人類免疫不全病毒 (HIV) [1,2] 及 SARS 病毒 [3,4] 兩種是確知的，而 1918 年的“西班牙流感”，也可能是由鳥類傳染過來的 [5]，至於其他地域性及小地區之感染，則不計其數，譬如說 1993 美國新墨西哥州的 hantavirus [6]、1998 馬來西亞的 nipah virus [7]、及 1999 美國紐約市的 West Nile virus [8] 等。到現在最令流行病學家擔心的是，禽流感 (H5N1) 病毒 [9,10] 在何時，及在何處爆發人類的大流行，而不再是“會不會”的問題了，因為全世界有一半的地區，如歐、亞、非等三洲，已有大批家禽或野鳥受 H5N1 病毒感染或死亡的記錄，而零星或群聚禽流感病毒感染人類的案例，也在許多衛生管控不佳，及人畜禽混處的國家與地區發生。動物的病毒之所以能夠傳播到人類來，是因為近年來世界各地人口稠密、交通發達、土地開發、及畜禽養殖等原因，造成人類族群與野生動物接觸頻繁所致。事實上，由於病毒是完全的寄生體，它必須依賴宿主細胞之代謝，及合成路徑來複製自己，所以化學合成藥物的研發及使用，常受到會傷害自身細胞之毒性及副作用的限制；如今人體內毫無免疫能力的新興病毒又隨時可能發生，而且其變異速度及致病能力似乎也越來越強，這都是本計畫為何如此急需的要研究中醫藥對抗病毒疾病之重要理由。

中草藥之運用在中國已有三千多年歷史，留下的許多醫書典籍，成為我們研究中草藥藥理、藥性的重要依據 [11]，而中醫學是從臨床實踐醫學為出發點的學問，三千多年之醫書，雖不能直接當成現代醫學之具體臨床範本，但亦提供了一條通往臨床驗證的捷徑，因為中醫藥是以廣大的累積經驗，來達到溫和療效及改善體質等之治本目的，因此中草藥運用在病毒感染症，正可彌補西藥的缺點與不足。舉例說：中醫的學理論基礎中，有“正氣存內、邪不可幹、邪之所奏、其氣必虛”，故正氣調節陰陽平衡，而能保護機體，因此與現代免疫學概念是一致的。另外，認為嚴重的免疫缺陷，若是發病於內因：即為“氣虛”，所以當以“補中益氣、養血滋陰”處置；若得病於外，如因感染病毒所致，則是發病的外因，宜以“清熱解毒”處置以解“邪、毒”。記載中可以“補中益氣、養血滋陰”的中藥，有黃耆、炙甘草、人參、黨參、白朮、當歸、升麻、柴胡、橘皮、靈芝、地黃、甘草、山藥、紫花地丁、白花蛇舌草、大青葉、大棗等。例如中國中醫科學院的吳伯平等，將防治愛滋病有關的中藥分類列出 [12]，在臨床上有一定參考價值：人

參、白朮、黃耆、當歸、香菇、及絞股藍，能促進輔助性 T 細胞的增殖，並增強其功能、提高 CD4⁺/CD8⁺ 比值[13]；其中人參可增加白細胞數量，及中性粒細胞吞噬功能。綜言之，以西方科學來說，上述草藥可以促進細胞免疫功能、增加嗜中性粒細胞及單核巨噬細胞吞噬功能、誘導干擾素生成，及促進抗體形成等作用。另外因為板藍根、紫花地丁等則有抗病毒、細菌的成份，因此中草藥被認為可用於提升免疫力，及抵抗感染與致病的種類很多，但是否對抑制病毒有效，則需要予以驗證與研發。

中醫診治講求辨證論治，如不明病患臨床症狀，雖然知道病因，仍無從用藥，例如一般愛滋病患常見症狀為發熱、乏力、消瘦、腹瀉、咳嗽等（此些症狀與流感、登革熱等病毒症相彷彿），依此症狀去參考當今使用舉元煎、四君子湯、或補中益氣湯的研究報告，再協同西藥抑制病毒藥物之使用，因而希望取得更好的療效，是一個值得考量與研究的課題。嚴重的免疫缺陷是根本，是發病的內在因素；外來病毒侵入人體，是發病的外在條件；外在與內在因素，都是導致疾病的重要因素。如今西藥確已有不錯的抑制病毒藥物，但是使用的療效仍然不夠理想，倘若能配合內在因素體質的調整，可能是獲得更有治療效果的關鍵力量。依前述有促進單核巨噬細胞的中藥，有雲芝、香菇、及甘草等；能促進巨噬細胞吞噬功能的中藥有黃耆、人參、黨參、白朮、香菇、當歸、及杜仲等，而這些中藥的主要成份，都收集於舉元煎方劑內。綜言之，人體中之輔助性 T 細胞若能增強，同時 CD4⁺/CD8⁺ 比值又提高，則 Th2 活性與細胞免疫 (cellular immunity) 機轉，就有利於有效的消滅任何入侵之病毒，這包括本計畫所提到在臺灣長流行的病毒如：腸病毒、單純皰疹病毒、EV 病毒及登革病毒。

在本計畫裡，考量到補中益氣湯（源自李東垣《脾胃論》，含九味藥：黃耆、人參、白朮、當歸、升麻、柴胡、陳皮、甘草、及大棗）具有補中益氣，調補脾胃功能，主治氣虛發熱、食少無味、脾胃虛弱、元氣不足、肢體倦怠乏力、中氣下陷、及久瀉久痢。雖依據近年來臨床資料顯示，補中益氣湯、中國中研 2 號卓有療效，有利於愛滋病患免疫功能之提升，惟此些方劑藥味頗多，不利於藥物的研究開發。而《景岳全書》五十一卷記載舉元煎之組成為人參、黃耆、炙甘草、升麻、白朮等精華五味，用以治療氣虛下陷，血崩血脫，亡陽垂危等證。歸屬於補氣升提類之方劑，組方精神接近於補中益氣湯，但藥物組成較簡單，有利於臨床研究分析，若配以能夠清熱解毒的板藍根、紫花地丁、大青葉、或魚腥草之一項，必能提高患者之免疫功能，而致廣效的抑制各式病毒的感染。因此試驗組方中除了以舉元煎用以“補氣滋陰”而提升免疫系統外，酌加經近代研究得知，也具有清熱解毒、與對抑制病毒作用的板藍根（板藍根為十字花科植物菘藍 *Isatis indigotica* Fort 的乾燥根，性味苦，寒。歸心、胃經。功能主治為清

熱解毒，涼血利咽，有抗病毒、抗菌、解熱、抗炎、解毒、免疫調解等功效，且急性毒性極低）或紫花地丁，組成“加味舉元煎”（舉元煎、舉元煎加味板藍根、及舉元煎加味紫花地丁），用細胞株培養試驗，來測試這些天然草本製劑，對包括腸病毒、單純皰疹病毒、EV 病毒、或登革病毒（血清二型）之抑制感染效果。

另外，因為國外也已重視及使用抗病毒之中草藥方劑，為能在藥理研究及藥物研發上與國際接軌，本研究也引進在西方國家裡所盛行“順勢療法（homeopathic medicine）”的天然方劑，與上述中草藥方劑，做同時而平行的實驗。順勢療法在西方屬於補充（complementary）療法之一種，其流傳在歐洲早已久遠，但在 18 世紀才由德國醫生 Samuel Hahnemann（1755-1843）大力倡導，而於 1807 述諸文字推廣。這順勢療法與華人社會，所倚重的草藥方劑有部分雷同的性質，它們都被現代醫學，歸類為“第三醫療法（alternative）”的治病方法[14]。其中一種順勢療法的藥劑叫 Método Canova®，是在 19 世紀由 Francisco Canova 醫師所創，主旨在於治療癌症病人。Laboratory Canova of Brazil 所生產的 Método Canova 含有非常稀釋量的 *Aconitum napellus*、*Arsenicum album*、*Bryonia alb*、*Lachesis muta*、及 *Thuya occidentalis* 混合萃取物，同時就因為它是極稀釋液，所以被認為不具毒性，但卻有幫助與調整失調的免疫系統，而在巴西被廣泛的使用，去抵抗疾病與病原體的入侵。當實驗測試時，Método Canova 可以活化巨噬細胞[15]，並大量減少該細胞分泌發炎性的細胞激素 TNF- α ，而對細胞免疫力有幫助，同時它也被認為對抗癌症有效[16]。在 2001 年時，該藥劑正式於巴西申請臨床人體試驗（由 Federal University of Paraná 的 Dr. Mota Silveira Sasaki 提出），以探討可以增加愛滋病毒感染者的免疫能力。由於 Método Canova 被證實有活化巨噬細胞（macrophages）的作用，所以也值得我們去深入研究，該方劑全面對調控免疫的功能，與是否具有消滅病毒的效用。

在本計畫裡，我們以舉元煎、舉元煎加味板藍根、或舉元煎加味紫花地丁、Método Canova 的四方劑，用細胞株培養模式，來測試對包括單純皰疹病毒一型（HSV-1）[17]、腸病毒 71 型（EV71）[18,19]、EV 病毒（EBV）[20]、及登革病毒（血清二型，Den2）[21]之抑制感染效果，如果試驗有成而效果卓著，則新藥的開發必有遠景，對國民的健康也必然多一層的保障。

貳、材料與方法

本計畫遵照研究之主旨，制定下列的研究策略、方法、及步驟。

一、中草藥方劑的製備

本計畫需使用舉元煎、舉元煎加味板藍根、及舉元煎加味紫花地丁做為三種測試的中草藥方劑，並以板藍根及紫花地丁單方為對照組，其配伍用量如表一。而製備的地方為可生產有藥證方劑 GMP 科學中藥廠。中草藥製備單位已被要求，嚴選草藥的來源及品質，務求沒有農藥及重金屬的污染，同時由進料至製成一次生產足夠供應整個計畫（於 96.8.1 開始執行計畫時起，至 97 年底）的所需用藥。至於 Laboratory Canova of Brazil 所生產的 Método Canova[®]，則由國外[www.canovabrasil.com.br]直接進口使用。

二、細胞株的培養

為測試中草藥方劑對抑制各種病毒生長，包括腸病毒 71 型、單純皰疹病毒一型、EV 病毒、及登革病毒（血清二型）的能力，所需的細胞株必先取得增殖，再予以液態氮中儲藏。這些細胞株包括 SK-N-SH（感染 HSV-1 及 EV71）、Vero（HSV-1 溶菌斑定量）、RD（EV71 溶菌斑定量）、HepG2（感染 Den2）、BHK21（感染 Den2 溶菌斑定量）、及 B59-8（已被 EBV 感染，將偵測病毒基因表達之變化），其來源、用途、及培養方法，則參照表二或是『財團法人食品工業發展研究所、生物資源保存及研究中心』（台灣省、新竹市）的方法。另外，腸病毒、單純皰疹病毒、及登革病毒的病毒株種（表三），也要大量的增殖做為實驗時接種用（viral stocks），所以也需事先繁殖與定量。其繁殖的方法就是以可被感染的細胞，接種適量 M.O.I.（multiplicity of infection）的病毒，於 37°C、5% CO₂ 培養 3-4 天後，收集其上清液為接種 viral stock 液，並於稀釋 10⁵ 至 10⁸ 倍後，用可受性細胞（susceptible cells）做溶菌斑（plaque assay）定量。由此方法可以一次大量的產生知曉濃度的 viral stocks，於分裝入小塑膠瓶後，放置在 -80°C 冰箱內保存至使用。當細胞培養完備與足量冷凍儲藏，同時病毒株也一一增殖定量後，即可以五種中草藥方劑（舉元煎、舉元煎加味板藍根、舉元煎加味紫花地丁、板藍根、及紫花地丁）與 Método Canova，在指定的年度裡一同做直接與間接抑制病毒的測試，而直接與間接的方法將詳載於後。

三、中草藥方劑的毒性試驗

因為要確定中草藥方劑的用量，是在不會導致細胞毒性的範圍，才能測試其對病毒的抑制能力，所以參考過去實驗的經驗，以由 100 µg/ml 到 1,000 µg/ml 的濃度處理各種細胞株，以檢測其 LD₅₀ 來決定可使用之劑量。我們以腦細胞株 SK-N-SH、肝細胞株 HepG2（以上兩者分別是 EV71、HSV-1 與 Den2 的宿主細胞）、及膀胱細胞株 T24 為測試細胞，以先前報告過的 cell

proliferation assay (CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Kit; Promega, Madison, WI, USA) 方法[22,23]，從事細胞施藥存活率的實驗。

四、草藥方劑直接與間接抑制病毒感染之效果

本研究測試了臺灣常見的四種病毒，其中腸病毒 71 型 (M.O.I. = 2.5 ~ 5)、單純皰疹病毒一型 (M.O.I. = 0.1)、及登革病毒 (M.O.I. = 10) 的感染狀況，是以溶菌斑方法 (plaque assay) 來定量，並劃出病毒的生長曲線 (one-step growth curve) 做為療效比較之基準。而 B59-8 細胞株因已含持續繁殖的 EBV 病毒，所以此些方劑是被用於偵測對病毒基因表達 (即是複製) 的抑制能力。而測試方劑是否可以抑制病毒感染，可分以直接與間接的角度去評估；直接抑制的想法是，天然方劑可以 (一)、與病毒或宿主細胞直接結合，使得病毒失去進入/感染細胞的能力，或 (二)、促進宿主細胞產生抗性，不讓病毒後進入細胞、體內複製、或釋出傳播。因此直接測試的方法是將適量方劑 (舉元煎、舉元煎加味板藍根、板藍根、舉元煎加味紫花地丁、及紫花地丁等方劑無害細胞生長的濃度：SK-N-SH, 600 $\mu\text{g/ml}$ 、HepG2, 100 $\mu\text{g/ml}$ 、及 B59-8, 200 $\mu\text{g/ml}$ ；50 $\mu\text{l/ml}$ Método Canova 對所有細胞均安全；如結果、一、(一)) 加入培養基，並讓 SK-N-SH 及 HepG2 (均以 4×10^5 細胞於 3 cm 盤子操作) 與方劑培養 6 小時後，適量 M.O.I. 數目的病毒液，就會用來感染細胞，之後再依所設定時間點 (參見結果、五)，取出 30 μl 上清細胞培養液，去做溶菌斑實驗，即可定量病毒數目，進而劃出 one-step growth curve 來比較升降。當要偵測中草藥方劑對 EBV 基因表達的影響時， 1×10^6 的 B95-8 細胞也是如前的處理 24 小時，接著去分離 mRNA 做 EBV-晶片雜合的實驗，最後去觀察病毒基因表達，在方劑處理前後類型的變化，去判定是否抑制病毒複製。

至於間接抑制則是指，中草藥方劑可否刺激白血球，分泌出抑制病毒複製的蛋白因子，間接的作用在其他宿主細胞，而產生對病毒的抗性。為此，約 2×10^6 顆來自正常自願捐血者的周邊血液單核球 (PBMC)，會用來與中草藥方劑 (600 $\mu\text{g/ml}$ 的舉元煎、舉元煎加味板藍根、板藍根、舉元煎加味紫花地丁、或紫花地丁及 50 $\mu\text{l/ml}$ 的 Método Canova) 共同培養 24 小時，之後其上清液 300 μl 加到 600 μl 的宿主細胞 (SK-N-SH、HepG2 及 B95-8 細胞) 培養液，經 24 小時後再以 100 μl 的適量病毒液去感染。為分辨療效來源及品管控制，我們增加兩項控制組：取用 (1)、沒有被任何藥物處理過，及 (2)、是處理了 LPS (lipopolysacharride, 20 $\mu\text{g/ml}$) 及 PHA (phytohemagglutinin, 1.5%) 的 PMBC 上清細胞培養液，來同時做平行的感染實驗。簡言之，這種間接抑制做法，就如同做直接抑制實驗一樣，但卻是以藥劑處理過 PMBC 的上清細胞培養液，間接的加入細胞株，之後仍

依步驟在不同時間點，收集上清細胞培養液，做溶菌斑實驗與生長曲線，而測定其間接療效。

五、病毒溶菌斑定量及生長曲線測定

溶菌斑定量 (plaque assay) 的方法是將 $4 \times 10^5 \sim 1 \times 10^5$ 的 Vero、RD、或 BHK21 細胞放置 6 孔或 12 盤中，經於 5% CO_2 、 37°C 培養 16 小時後，加入十分之一體積之病毒液，再經一小時後，上層覆蓋含粘性之培養基 (參入 1% 甲基纖維素及 2% 胎牛血清)。這樣的培養要持續 3 天，才會將含甲基纖維素的培養基移除，並以結晶紫-福馬林 (crystal violet-formalin) 液體染色一小時後，觀察溶菌斑數目 (圖一)。而生長曲線 (one-step growth curve) 之測定，則是各病毒於感染其宿主細胞後，在所設定的時間點，收集上清液後，用 plaque assay 定出病毒量，由此而劃出的曲線，進而可以比較在處理六種方劑後，病毒複製的消長。

六、點製 EBV-晶片與雜合 (hybridization) 反應

本計畫是以 EBV-晶片探討中草藥方劑抑制 EBV 複製 (病毒基因表達) 之工具，其點製晶片及雜合反應之方法，已發表於最近的期刊上[24,25]。簡言之，71 對 PCR 引子，在參考 EBV 基因體 (GenBank accession number NC001345) 的序列後被合成出來，並且用於生產 71 段 1-3 kbp 的 EBV 基因片段，這些 DNA 片段的序列是可頭尾相連的覆蓋整個病毒的基因體 (172,281-bp)。在點製 EBV-晶片時，我們使用國產的微矩陣點製機 Arrayer 03 機型 (Wittech Co. 台灣省、台北市)，將 71 基因片段加上 12 個 DNA 控制組 (APS1、ASA1、GA4、HAT4、HAT22)、LhcI、RbcL、及 Rca 是來自植物，噬菌體 λ 【*Pst*I- 水解的 1.1- 與 1.2-kb 片段】，及人類 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 基因和 β -actin 基因)，以白果能教授的方法，一起點製在尼龍的薄膜上，而最後的成品是製成含 83 個圓點 (每點有 10 ng DNA)，其大小為直徑 120 μ ，間距為 150 μ 的 EBV-晶片 [22,25]。

當從事基因晶片雜合反應時，沒有處理過或被草藥方劑處理過的 B59-8 細胞，以 TRIzol 試劑 (Gibco 公司) 將全部的細胞 RNA 分離出來，之後再以 Oligotex mRNA Purification System (Qiagen-Taigen Bioscience Corp) 試劑組將訊息 mRNA 純化之。本研究經常以 1 μg 的 mRNA 去製備 biotin-標訂的 cDNA，然後以已發表的方法去做雜合反應 [24,25]，因此一但 B59-8 細胞內的病毒表達出 mRNA，就會雜合 EBV-晶片上的相對基因點，而產生深淺不一的藍色信號，而且顏色愈深代表表達愈多。我們因而可以用高解析度掃描器 (PowerLook 3000, UMAX) 量化其基因表達程度，再用 Eisen 等人研發的軟體 [26]，將數據做適當的分析及呈現，另外吾人也以自己研發的軟體 [27]，從事基因表達數據的比較。

參、結果

一、中草藥方劑的製備

GMP 科學中藥廠已依本計畫的需要，依藥方成份與劑量，一次足量製備了使用的舉元煎、舉元煎加味板藍根、舉元煎加味紫花地丁、板藍根、及紫花地丁等五種測試的中草藥方劑，其浸潤膏可讓成年人服用 90 日。而 Método Canova[®]則由巴西 Laboratory Canova of Brazil 進口了 48 瓶（每瓶 50 ml，成人劑量是每日服用 6 次，每次 10 滴）使用。

(一)中草藥方劑的細胞毒性

由於所製備的中草藥方劑是依成人使用的劑量，當用於細胞株使用時，沒有共同認可的換算公式可以依循，乃參考過去實驗的經驗，以由 100 $\mu\text{g/ml}$ 到 1 mg/ml 的濃度處理細胞株，以檢測其毒性與可使用之劑量。一開始我們以腦細胞株 SK-N-SH (EV71 與 HSV-1 的宿主細胞) 為測試細胞，以先前報告過的方法[22,23]，從事 cell proliferation assay，得到的結果是此細胞對這些藥劑非常不敏感，直到 1 mg/ml 的用量，也不會令其停止生長（圖四）。雖然不會使用更高的濃度於真正的實驗，但以後將繼續測試 2 及 3 mg/ml 的濃度做為參考用量。中草藥方劑對 HepG2 肝癌 (Den2 的宿主細胞)、B95-8 (偵測 EBV 的基因表達)、及 T24 膀胱癌細胞株的抑制量就比較低，分別是 100、200、及 50 $\mu\text{g/ml}$ ；故這些濃度就被用來處理細胞，並觀察是否有抑制病毒複製的基本用量。

(二)Método Canova[®]的重金屬含量

Método Canova[®]在巴西已是上市的产品並也註明使用劑量，在先前我們為確保其品質，曾將進口的樣品，送請國立嘉義大學水生生物科學系檢測其重金屬（銅、鋅、鉛、鎘、砷、汞）含量，所得結果並無顯示有任何過量的測值。

二、細胞與病毒株的培養與增殖

所有的細胞與病毒株（表二、三）已依計畫大量的增殖，而儲備的細胞與病毒株分別存放於液態氮與 -80°C 冰箱中（表四）。受僱之專任助理與參與實驗之同學，已分別、多次的演練病毒 plaque assay（圖一）及 one-step growth curve 的實驗。

三、點製 EBV-晶片

我們已有足夠的 EBV-晶片去完成計畫中的實驗。

四、中草藥方劑直接抑制感染的效果

當以 GMP 中藥廠製備的舉元煎、舉元煎加味板藍根、板藍根、舉元煎

加味紫花地丁、及紫花地丁(依細胞不同使用不同之量,見**結果**、一、(一)),及 Método Canova (50 $\mu\text{l/ml}$) 被用來抑制 HSV-1、EV71、Den2 的感染(分別為圖五至七),其結果顯示有紫花地丁成份的方劑,對 HSV-1 及 EV71 的 one-step grow cure 都有壓制的作用,但對 Den2 則無;其幅度可達 10 倍的療效(圖五、六)。值得一提的是,做正常的病毒 one-step growth curve 時,宿主細胞是於加入六種方劑培養 6 小時後,才以適量數目的病毒感染細胞,之後再分別在各時間點,收集上清細胞培養液,去做溶菌斑定量劃成曲線的。然考量到也許中草藥等方劑,可能會直接與病毒產生聚合作用,而抑制進入細胞的步驟,所以我們在做所有病毒生長曲線的同時,都會多做一項控制實驗,那就是反將等數的宿主細胞,先加入相同數目的病毒去感染 4 小時後,才處理六種方劑,之後於 36 小時時間點,收集一次上清細胞培養液,去做溶菌斑定量,而此數據與 one-step growth curve 的同一時間點(36 小時)做比對。由圖五至圖七的結果顯示,無論是病毒先於或而後才加到細胞株感染,其病毒繁殖數量沒有很大差異;這代表中草藥六方劑,不會直接與病毒聚合,導致感染細胞效率的升或降。

由於 EBV 無法被大量純化或有效感染細胞,我們乃以病毒基因表達的改變,作為評估中草藥方劑,是否可以抑制該病毒複製的指標,在此 EBV-晶片被用於 EBV 基因表達的偵測。做法是以適量舉元煎、舉元煎加味板藍根、板藍根、舉元煎加味紫花地丁、紫花地丁(以上 200 $\mu\text{g/ml}$)、及 Método Canova (50 $\mu\text{l/ml}$) 等,分別處理 B95-8 細胞後,取出 mRNA 並轉成 biotin-標訂的 cDNA。由於 EBV 持續於 B95-8 細胞中複製,病毒的 mRNA 也會大量存在於細胞中,並一起被純化與合成 biotin-cDNA,因此當與 EBV-晶片做雜合反應時,就會附著在晶片上相對應的基因片段,而於而後反應中呈現藍色(圖八 B.-H.)。由這實驗裡,不同方劑處理所得的 biotin-cDNA 檢體會產生不同的藍色晶片影像,這影像再以 UMAX PowerLook 3000 高解析度掃瞄器,量化其基因表達程度為數據,再用兩個的軟體[26,27],先後將所得數據以背景呈色(沒有基因區域的呈色深淺),實驗操作差異(以 12 個控制 DNA 呈色為基準)做整合修正(normalization),而這些來自不同方劑處理所產生的數據就可以相互比較。經過電腦比較所有晶片上的基因點的藍色數據,我們得到:U937 除了在控制基因外,多數病毒基因並不產生數據(圖八 A.),因為它是不含 EBV 的細胞株。然而經 Método Canova(圖八 C.)、舉元煎(D.)、舉元煎加味板藍根(E.)、板藍根(F.)、舉元煎加味紫花地丁(G.)、或紫花地丁(H.)的數據與無處理對照組(圖八 B.)比較,所有的病毒基因的表達數據,並沒有偵測到顯著的差異(數據省略);因此我們認為若使用這 6 種方劑在 B59-8 細胞培養時,不會引起 EBV 複製的明顯改變。

五、中草藥方劑間接抑制感染的效果

我們以舉元煎、舉元煎加味板藍根、板藍根、舉元煎加味紫花地丁、及紫花地丁等五種測試中草藥方劑，與 Método Canova 分別處理 PBMC 一天後，其上清液加入細胞株、再感染適量數目的病毒、最後做溶菌斑實驗與生長曲線，而測定其間接療效。在此我們加入兩項上清細胞培養液當作控制組，那就是 PMBC 沒有被任何藥物處理過，或是處理了 LPS 及 PHA，去做同時及平行的感染實驗。這種間接抑制是去確認，中草藥方劑可否會刺激白血球，分泌出抑制病毒複製的蛋白因子，間接的作用在宿主細胞而產生對病毒的抗性。

圖九與圖十是天然六種方劑，間接抑制單純皰疹病毒一型，與腸病毒 71 型的實驗結果，由中我們沒有觀察到任何抑制效果（包括紫花地丁單方在內）。而處理宿主 SK-N-SH 細胞的上清液，若是來自於 LPS + PHA 培養過的 PBMC 細胞，則可以小幅度抑制 DNA 的病毒 HSV-1（圖九），卻強有力的抑制 RNA 腸病毒 71 型（圖十）的複製。這樣的結果與 LPS + PHA 可以刺激白血球分泌干擾素（interferon- α 與 interferon- β ）[28]，而誘導尚未被感染的細胞，啟動抑制蛋白質合成，及主動水解 RNA 的細胞免疫防禦機制，是有一致性的。

因為由直接抑制病毒感染的實驗裡，我們得到包括含紫花地丁的任一種方劑，均對登革或 EB 病毒沒有任何抑制作用（圖七及圖八），加上在從事間接抑制病毒感染的實驗時，我們觀察到連紫花地丁，也失去在直接培養時，那種抑制 HSV-1 及 EV71 之療效（圖九與圖十），因此推論所有六種中草藥方劑，對 Den2 或 EB 病毒不會有任何間接抑制作用（數據省略）。

肆、討論

舉元煎、舉元煎加味板藍根、舉元煎加味紫花地丁、板藍根、及紫花地丁等五種測試中草藥方劑的濃縮液，是以 PBS 溶液稀釋到要使用的濃度，而所有的藥物均有不溶之沉澱物出現，我們以 0.2 μm 的過濾器去除雜質與細菌。由於每種中草藥方劑也均含近半量的水份，當計算細胞使用量時，我們均排除水份而以固形物之量去配製。

在舉元煎、舉元煎加味板藍根、舉元煎加味紫花地丁、板藍根、紫花地丁、及 Método Canova 等六種測試的天然物方劑中，只有舉元煎加味紫花地丁及紫花地丁，可以於直接加以到細胞後，有效抑制了單純皰疹病毒一型及腸病毒 71 型的繁殖，由此推斷紫花地丁方劑含有有效的分子。紫花地丁早被認為含有抗病毒、細菌的成份，它的萃取液乾燥粉末，在市面上已經有針對皮膚感染/叮咬傷製成擦劑之販售[http://www.fzrm.com/plantextracts/Tokyo_Violet_Herb_extract.htm]。在古代，紫花地丁早已被收錄在治病的草藥方中[29]，它在近代則被證實可以抑制細菌的生長（以 *Bacillus subtilis* 與 *Pseudomonas syringae* 做測試細菌）302732]，同時紫花地丁也被用來試驗抗病毒的活性，尤其注重在抗愛滋病毒（HIV）的成份[31-33]，另外，也有研究是以小鼠為實驗動物，探討它對調節免疫的功能[34]。在抗菌方面，似乎長鍊的 carboxylic acid 是有效用的，然抗 HIV 成份則以 cycloviolacin Y5（一種極度親脂性的 cyclotides）最強力；另外還有 flavone C-glycosides 也由紫花地丁中，被定性、分離出來[35]。不過由於本實驗所觀察到效果，是較為廣效的對抗兩種病毒，而先前的一篇報導，則敘述了不抗單純皰疹病毒的狹效結果[31]，因此在本實驗裡，是何種抗病毒分子及其牽涉到的反應機轉，有待更多的研究。

為了探討天然中草藥方劑參與抑制病毒的可能免疫機轉，本實驗室與廖慧芬老師的研究團隊，聯手運用了其他的經費去測試這六方劑，對 Balb/c 實驗小白鼠的調節免疫能力。結果顯示服用舉元煎的老鼠，在血清中 IgG 之含量，比起未服任何藥劑控制組之老鼠，有顯著的增高（數據省略），另外餵食舉元煎加味板藍根的小鼠，血液中的 chemokine [C-X-C motif] ligand 13 or B lymphocyte chemoattractant [36]與 macrophage inflammatory protein 2 [37]之含量也增加許多（數據省略）。不過這樣的結果，似乎也無法支持增加細胞免疫力，而足以抵抗病毒侵襲的想法，因此研討這些中藥草，是否能夠誘導其他免疫活性，及其抑制病毒的機轉，值得我們繼續深究。

伍、結論與建議

我們已依計畫中的步驟與時間，完成人員聘雇、材料採購、藥劑製備、與 EBV-晶片點製，並且細胞株與病毒株都已足量增殖及備份儲存。在 96 年度裡工作同仁也已經接受訓練完成，並且於即刻開始正式實驗。

於 97 年度底計畫將結案時，我們已完成了測試舉元煎、舉元煎加味板藍根、舉元煎加味紫花地丁、板藍根、紫花地丁、及 Método Canova 等六種中草藥方劑，對單純疱疹病毒一型、腸病毒 71 型、登革病毒(血清二型)、及 EV 病毒，直接與間接繁殖的抑制療效。結果顯示，將這些方劑直接加入細胞株後，僅有舉元煎加味紫花地丁或紫花地丁，可導致單純疱疹病毒一型及腸病毒 71 型感染 SK-N-SH 細胞的病毒繁殖量，減少了 1 個 log 值；然而若將它們加到 PBMC 培養液，再間接以 conditioned medium 的方法去抑制病毒株，則所有方劑(包括紫花地丁)都失去抑制病毒感染的效果，因此紫花地丁的直接抗病毒效果，是我們值得繼續深究。

如果衛生署的預算是由年頭到年尾，則建議計畫宜由年初開始執行，以免如本計畫由 96 年 8 月開始，僅五個月不到，在 96 年底尚未有充實成果時，即要交該年度報告，徒增困擾。

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-211 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. Schwartz SA, Nair MP: Current concepts in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *Clin & Diagn Lab Immunol* 1999;6:295-305.
2. Garzino-Demo A, DeVico AL, Gallo RC: Chemokine receptors and chemokines in HIV infection. *J Clin Immunol* 1998;18:243-55.
3. Lee N, Hui D, Wu A, et al: A Major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med* 2003;348:1986-94.
4. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al: A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:1953-66.
5. Taubenberger JK, Morens DM: 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerg Inf Dis* 2006;12:15-22.
6. Douglass RJ, et al: State-by-state incidences of hantavirus pulmonary syndrome in the United States, 1993-2004. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2005;5:189-92.
7. Epstein JH, et al: Nipah virus: impact, origins, and causes of emergence. *Curr Infect Dis Rep* 2006;8:59-65.
8. Reisen W, Brault AC: West Nile virus in North America: perspectives on epidemiology and intervention. *Pest Manag Sci* 2007;63:641-6.
9. Lim WS, et al: Preparing for the next flu pandemic. *BMJ* 2007;334:268-9.
10. Coombes R: Hunting down the H5N1 virus. *BMJ* 2007;334:342-4.
11. 行政院衛生署中醫藥委員會，中醫藥資訊網：<http://www.ccmp.gov.tw/>
12. Hu YP: Immunologic study of the treatment of AIDS with traditional Chinese medicine. *Chin J of Clin Rehab* 2006;10:47.
13. 江揚清等，中西醫結合內科學，北京出版社，132-138。
14. Piemonte MDaR, Buchi DDeF: Analysis of IL-2, INF- γ and TNF- α production, $\alpha 5\beta 1$ integrins and actin filaments distribution in peritoneal mouse macrophages treated with homeopathic medicament. *Submicroscopic Cytology & Pathology* 2002;34:255-63.
15. Oliveira CC: The effect of a homeopathic medicine on mouse macrophages. Abstract Book of Molecular Biology of the Cell, Poster 2057, 42nd American Society for cell Biology Annual Meeting, P365a, 2002.
16. Wal R: Immunomodulation in sarcoma-180 bearing mice. Abstract Book of Cell and Molecular Biology of Cancer, Poster Section A, Swiss Institute for Experimental Cancer Research Conference, p34, 2003.
17. Whitley RJ: Herpes simplex viruses. in Knipe, D.M. et al. eds. *Fields*

- Virology*, vol. 2, 2461-509, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2001.
18. Ho M: Enterovirus 71: the virus, its infections and outbreaks. *J Microbiol Immunol Inf* 2002;33:205-16.
 19. Stanway G: Structure, function and evolution of picornaviruses. *J Gen Virol* 1990;71:2483-2501.
 20. Herrmann K, Niedobitek G: Epstein-Barr virus-associated carcinomas: facts and fiction. *J Pathol* 2003;199:140-5.
 21. Murray PR, ed: Togaviruses and Flaviviruses (Chapter 63). in *Medical Microbiology*, 5th ed. 637-50, Elsevier Mosby, Philadelphia, PA, 2005.
 22. Chen CC, Jin YT, Liao YE, et al: Microarray profiling of gene expression patterns in bladder tumor cells treated with genistein. *J Biomed Sci* 2001;8:214-22.
 23. Li C, Teng RH, Tsai YC, et al: H-ras oncogene counteracts the growth-inhibitory effect of genistein in T24 bladder carcinoma cells. *Br J Cancer* 2005;92:80-8.
 24. Chiu YF, Tung CP, Lee YH, et al: A Comprehensive Library of Mutations of Epstein-Barr Virus. *J Gen Virol* 2007;88:2463-72.
 25. Chen JJ, Wu W, Yang R et al: Profiling expression patterns and isolating differentially expressed genes by cDNA microarray system with colorimetry detection. *Genomics* 1998;51:313-24.
 26. Eisen MB, et al: Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14863-8.
 27. Shieh B, Li C: Microarray profiling of gene expression patterns of genistein in tumor cells. in *Phytochemicals in Health and Disease* (Y. Bao and R. Fenwick, eds.), 2004;pp.77-103, Marcel Dekker, Inc., New York, NY.
 28. Roitt I, et al: Immunity to viruses. in *Immunology*, 6th ed. 2001, Mosby Co., London, England.
 29. X GL: Herbological study of some medicinal plants from Viola. *Zhong Yao Cai* 1997;20:371-3.
 30. Xie C, et al: Antibacterial activity of the Chinese medicine, Zi Hua Di Ding. *Phytother Res* 2004;18:497-500.
 31. Chng RS, Yeung HW: Inhibition of growth of human immunodeficiency virus in vitro by crude extracts of Chinese medicinal herbs. *Antiviral Res* 1988;9:163-75.

32. Ngan F, et al: Isolation, purification and partial characterization of an active anti-HIV compound from the Chinese medicinal herb *Viola yedoensis*. *Antiviral Res* 1988;10:107-16.
33. Wang CK, et al: Anti-HIV cyclotides from the Chinese medicinal herb *Viola yedoensis*. *J Nat Prod* 2008;71:47-52.
34. TsingHua: In vitro study of *Viola yedoensis* Makino decoction of regulating immunocyte functions in mice. *J Fujiang College Trad Chin Med* 2003. [<http://www.shvoong.com/medicine-and-health/1609328-vitro-study-viola-yedoensis-makino/>]
35. Xie C, et al: Flavon C-glycosides from *Viola yedoensis* Makino. *Chem Pharm Bull* 2003;51:1204-07.
36. costa-Rodríguez EV, et al: Cytokines and chemokines shaping the B-cell compartment. *Cytok Gr Fact Rev* 2007;18:73-83.
37. Fruehauf S, et al: Innovative strategies for PBPC Mobilization. *Cytother* 2005;7:438-46.

柒、圖與表

表一、三種中藥方劑的配伍與配製法

方名	舉元煎加味板藍根	舉元煎加味紫花地丁
舉元煎的配伍 (一錢=3.75 公克)	人參 二錢 黃耆 三錢 炙甘草 二錢 升麻 一錢 炒白朮 三錢	
加味 (錢)	板藍根 二錢	紫花地丁 三錢
配製	製備過程是將所有需要的藥材，全數投入煎煮槽中，依藥物重量取 10 倍之水量，90°C 煎煮 1 小時，以此法萃取藥物成份 3 次，將所得汁液以減壓濃縮機製成濃縮浸膏。	
用法	秤浸膏重量後稀釋至適當體積溶液使用於細胞培養	

表二、本研究所使用的細胞株

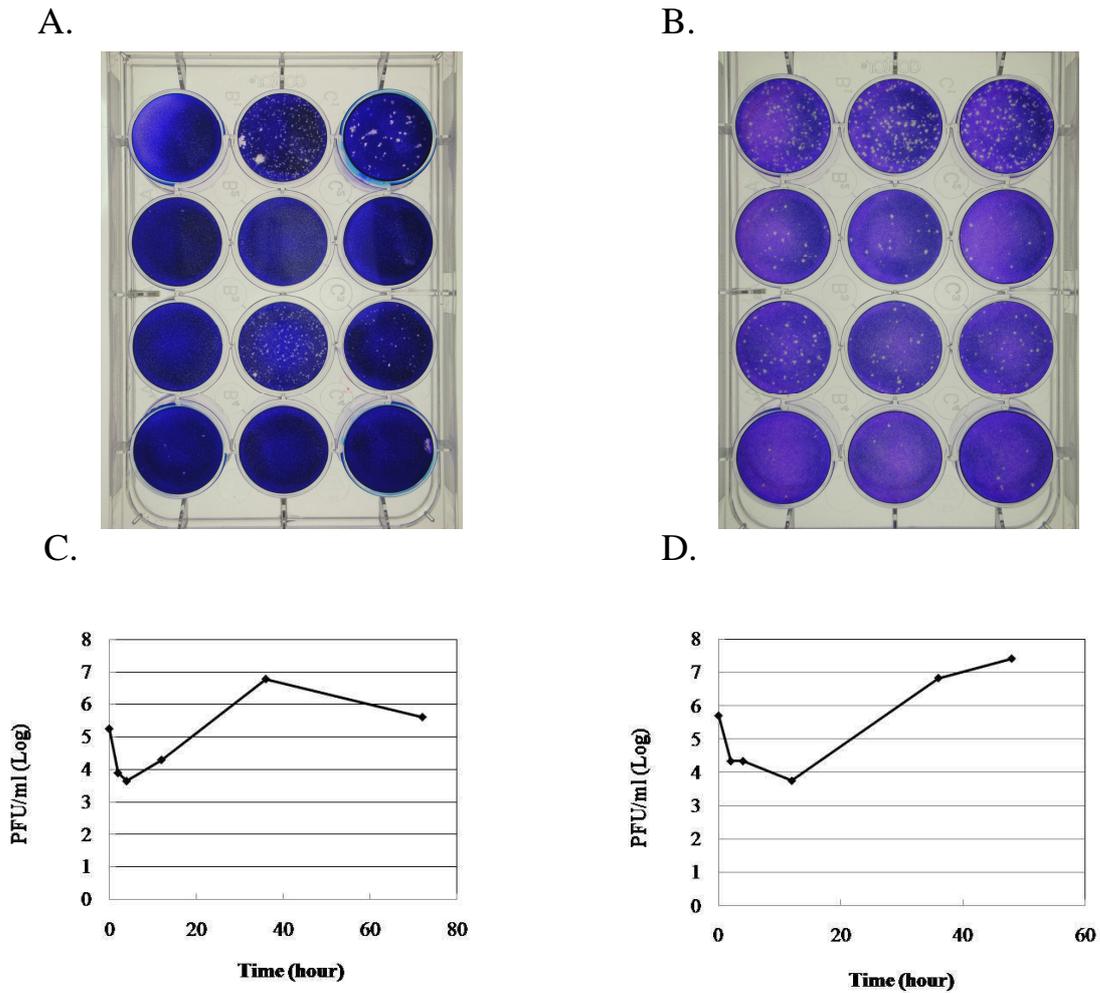
名稱	SK-N-SH	B59-8	HepG2	Vero	RD	BHK21
來源	Human neuro-blastoma cells	Marmoset EBV-transformed B lymphocytes	Human hepatoma cells	Monkey kidney cells	Human rhabdomyosarcoma cells	Baby hamster kidney cells
型態	Adherent epithelial	Suspension lymphoblast/fibroblast	Adherent epithelial	Adherent epithelial	Adherent epithelial	Adherent epithelial
生長	DMEM, 10% FBS, P/S, 5% CO ₂ , 37 °C	RPMI 1640, 10% FBS, P/S, 5% CO ₂ , 37 °C	DMEM, 10% FBS, P/S, 5% CO ₂ , 37 °C	DMEM, 10% FBS, P/S, 5% CO ₂ , 37 °C	DMEM, 10% FBS, P/S, 5% CO ₂ , 37 °C	DMEM, 10% FBS, P/S, 5% CO ₂ , 37 °C
用途	感染腸病毒及單純皰疹病毒	EBV 基因表達分析	感染登革病毒	單純皰疹病毒 plaque assay	腸病毒 plaque assay	登革病毒 plaque assay

表三、將接受測試之臺灣流行病毒

名稱	腸病毒 71 型	單純皰疹病毒一型	登革病毒	EB 病毒
來源	4643 成大醫院 臨床分離株	Kos 第一型 實驗室株	血清二型 實驗室株	感染 B95-8 細胞的 病毒株，從 Burkitt's lymphoma 得來
培養	已存於黎慶 實驗室	已存於黎慶實驗室	已由劉校生老 師實驗室取 得，存於黎慶 實驗室	已存於黎慶實驗 室

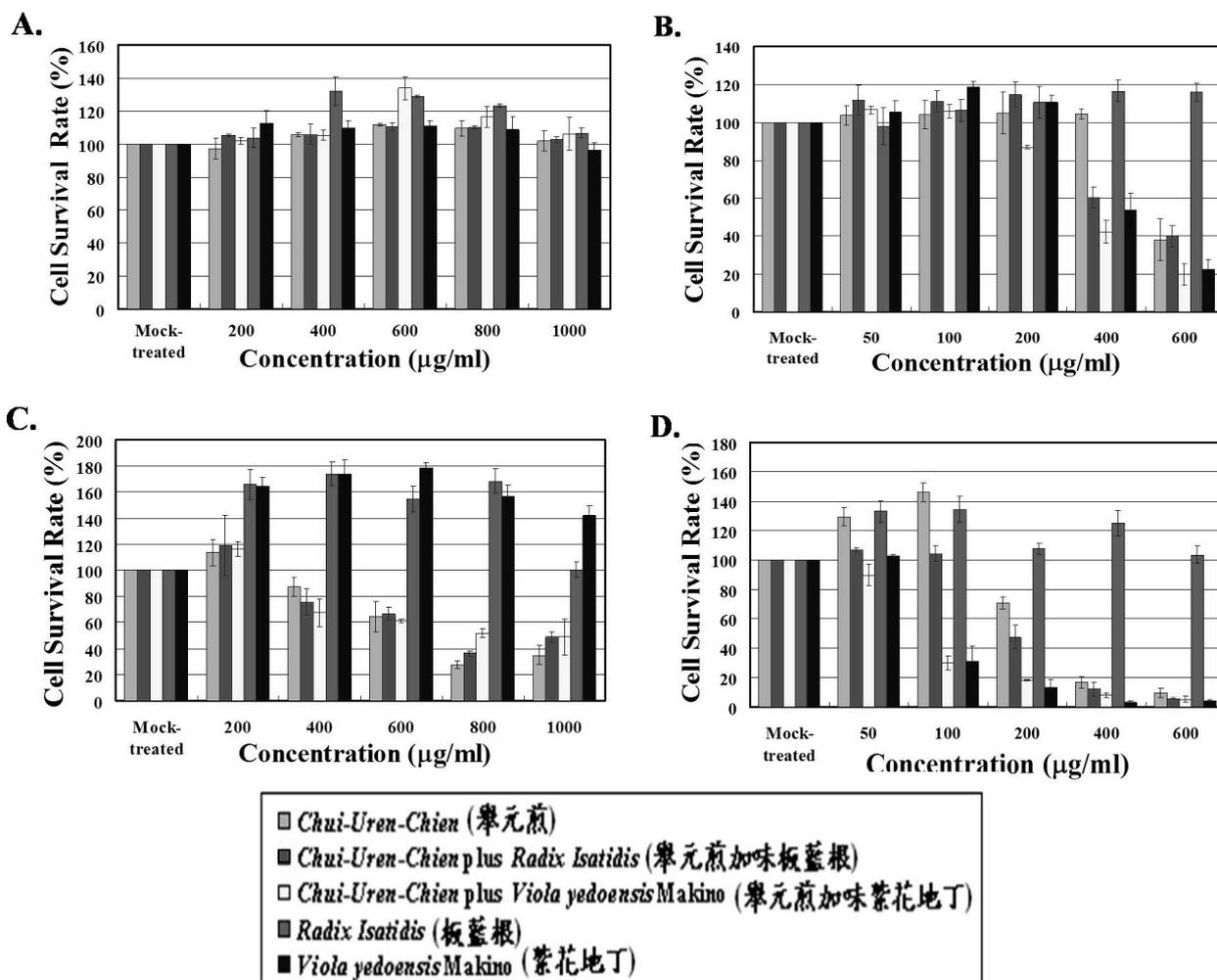
表四、儲備於-80°C 冰箱的病毒與細胞株

名稱	存量	備註
EV71	2×10^6 pfu/ml : 57 tubes	腸病毒 71 型，使用 M.O.I.=2.5 ~ 5
HSV-1	8×10^7 pfu/ml : 50 tubes	單純皰疹病毒一型，使用 M.O.I.=0.1
Dengue virus	5×10^6 pfu/ml : 10 tubes	登革病毒（第二型），使用 M.O.I.=10
SK-N-SH	10^7 cells/ml : 14 tubes	腦細胞，EV71 與 HSV-1 宿主細胞
B95-8	10^7 cells/ml : 15 tubes	B 細胞株，從事 EBV 晶片實驗使用
Vero	2×10^7 cells/ml : 20 tubes	HSV-1 溶菌斑定量使用
RD	10^7 cells/ml : 20 tubes	EV71 溶菌斑定量使用
BHK21	10^7 cells/ml : 20 tubes	Den2 溶菌斑定量使用



圖一、病毒溶菌斑定量實驗

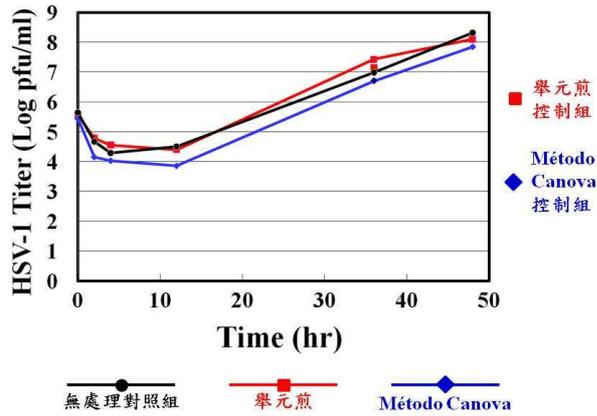
病毒溶菌斑實驗 (plaque assay) 以 RD (human rhabdomyosarcoma cell) 或 Vero (monkey kidney cell) 細胞為宿主，分別感染不同稀釋倍數的 EV71 (A) 或 HSV-1 (B) 病毒。在一片藍色結晶紫染色細胞層上，凡被一顆病毒 (virion) 感染的地方，即會產生空白的小點，稱為溶菌斑，由此而可推算出其病毒的濃度，及做病毒生長曲線 (one-step growth curve); (C) 與 (D) 分別是 EV71 與 HSV-1 的 one-step growth curve。



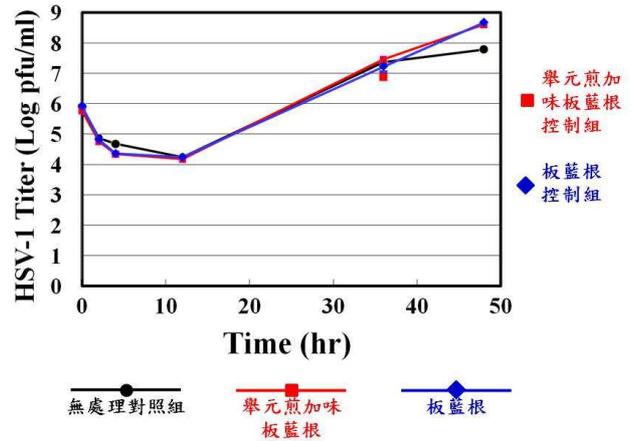
圖二、以四種細胞測試五種中草藥方劑濃縮液的細胞毒性

腦細胞 SK-N-SH (A)、肝細胞 HepG2 (B)、B95-8 細胞 (C)、及膀胱細胞 T24 (D) 等，被 cell proliferation assay 之方法，來測試此五種中草藥方劑，在何種濃度時，會抑制細胞的生長。SK-N-SH 細胞在 1,000 µg/ml 仍不受到抑制，HepG2、B95-8、及 T24 細胞，則分別在約 100 µg/ml、200 µg/ml、及 50 µg/ml 濃度時，可維持正常的生長。此圖以存活的百分比(%)，比較經某一味中草藥(參考顏色代碼)與未經任何藥物處理的細胞(mock-treated)生長狀況之差異。

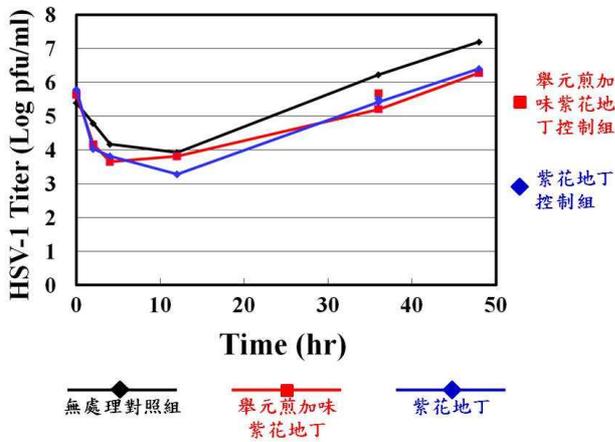
A.



B.



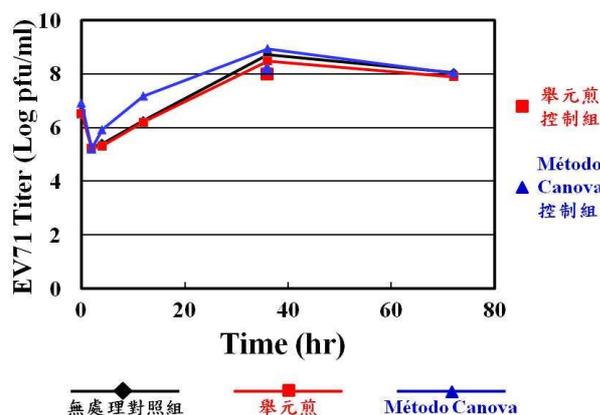
C.



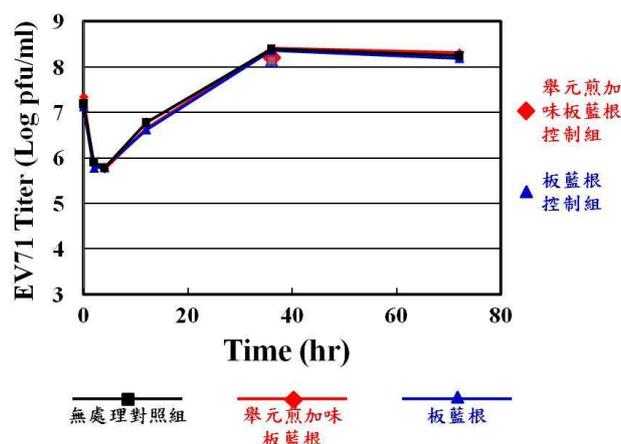
圖三、五種中草藥方劑與 Método Canova 對單純皰疹病毒一型的直接抑制效果

舉元煎、舉元煎加味板藍根、板藍根、舉元煎加味紫花地丁、紫花地丁 (以上 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、及 Método Canova (50 $\mu\text{l}/\text{ml}$) 等，分別處理 SK-N-SH 後，以病毒生長曲線，測定單純皰疹病毒一型複製的升降。由於每一生長曲線有許多時間點 (感染 0 小時及而後之 2、4、12、36、及 48 小時)，而每時間點要做病毒液，不同倍數稀釋的溶菌斑實驗，所以每次實驗只能做上述兩項中草藥方劑，加上沒有方劑培養 (無處理對照組) 的共三條病毒生長曲線。因此本圖呈現 (A)、舉元煎及 Método Canova，(B)、舉元煎加味板藍根及板藍根，與 (C)、舉元煎加味紫花地丁及紫花地丁的實驗結果。同時本圖也在 36 小時處，增列先用病毒去感染宿主細胞 4 小時後，才處理六種方劑的結果，並顯示出該數據，與生長曲線 (處理方劑 6 小時後，才感染病毒) 第 36 小時的病毒數目，沒有巨大差異。

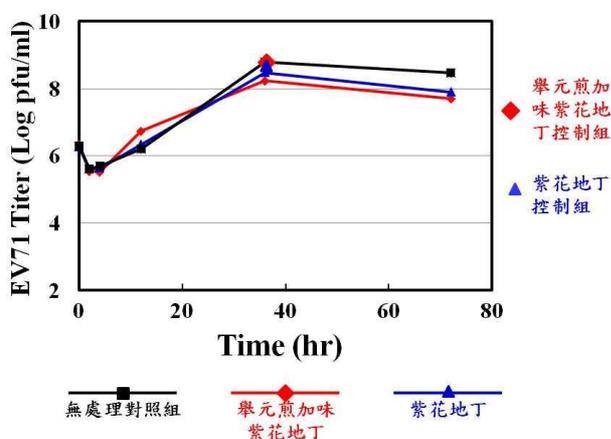
A.



B.



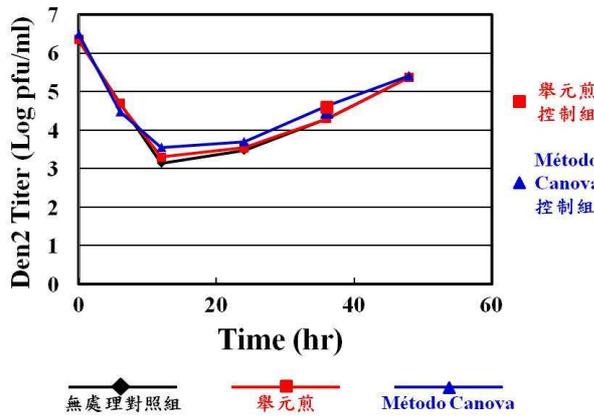
C.



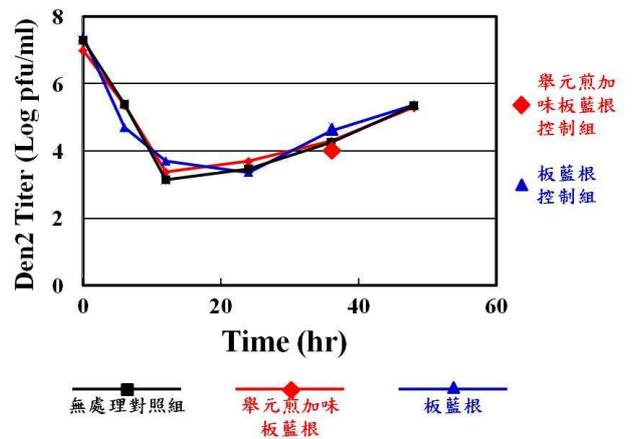
圖四、五種中草藥方劑與 Método Canova 對腸病毒 71 型的直接抑制效果

舉元煎、舉元煎加味板藍根、板藍根、舉元煎加味紫花地丁、紫花地丁 (以上 600 $\mu\text{g/ml}$)、及 Método Canova (50 $\mu\text{l/ml}$) 等，分別處理 SK-N-SH 後，以病毒生長曲線測定 EV71 複製的升降。由於每一生長曲線有許多時間點 (感染 0 小時及而後之 2、4、12、36、及 72 小時)，而每時間點要做病毒液，不同倍數稀釋的溶菌斑實驗，所以每次實驗只能做上述兩項中草藥方劑，加上沒有方劑培養 (無處理對照組) 的共三條病毒生長曲線。因此本圖呈現 (A)、舉元煎及 Método Canova，(B)、舉元煎加味板藍根及板藍根，與 (C)、舉元煎加味紫花地丁及紫花地丁的實驗結果。同時本圖也在 36 小時處，增列先用病毒去感染宿主細胞 4 小時後，才處理六種方劑的結果，並顯示出該數據，與生長曲線 (處理方劑 6 小時後，才感染病毒) 第 36 小時的病毒數目，沒有巨大差異。

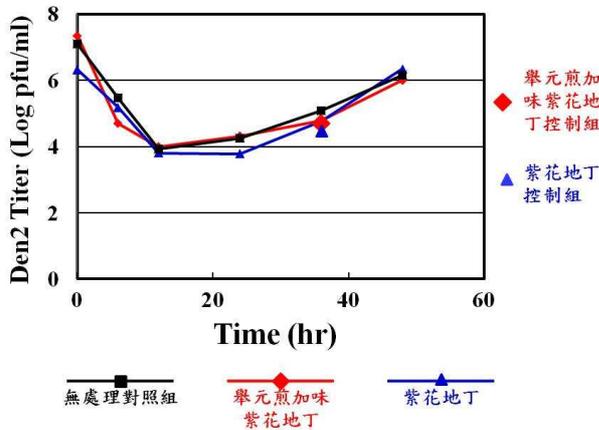
A.



B.

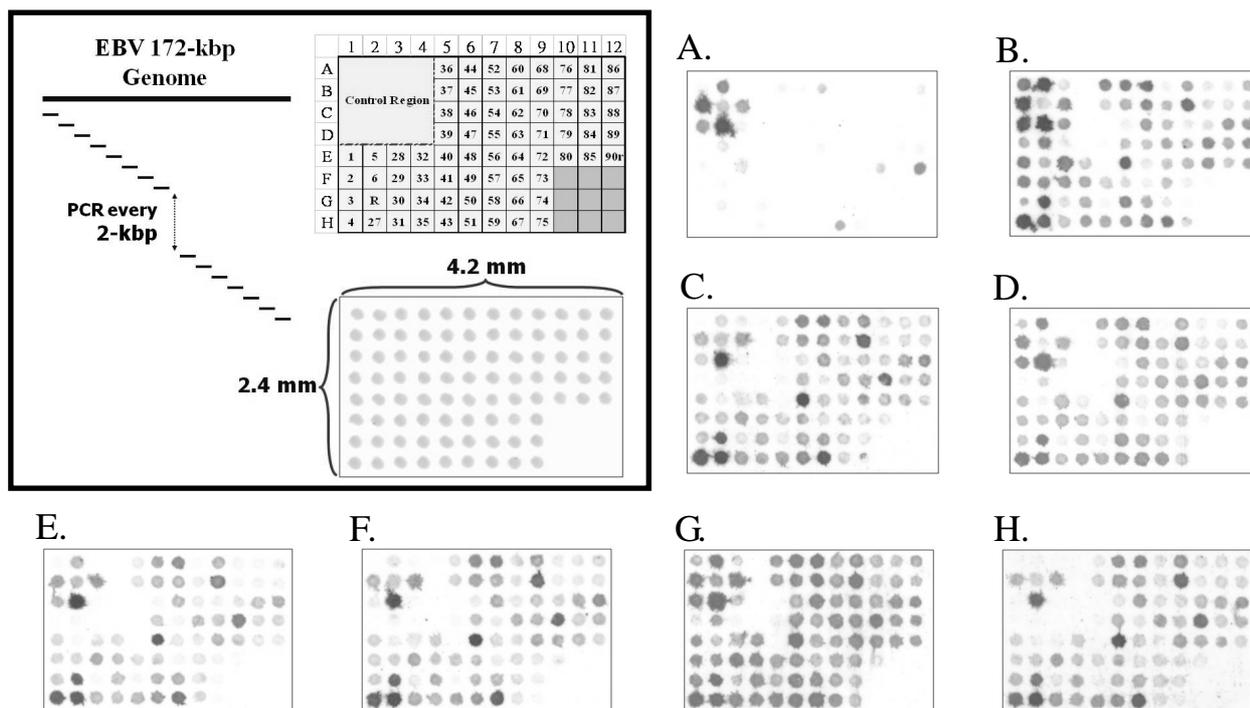


C.



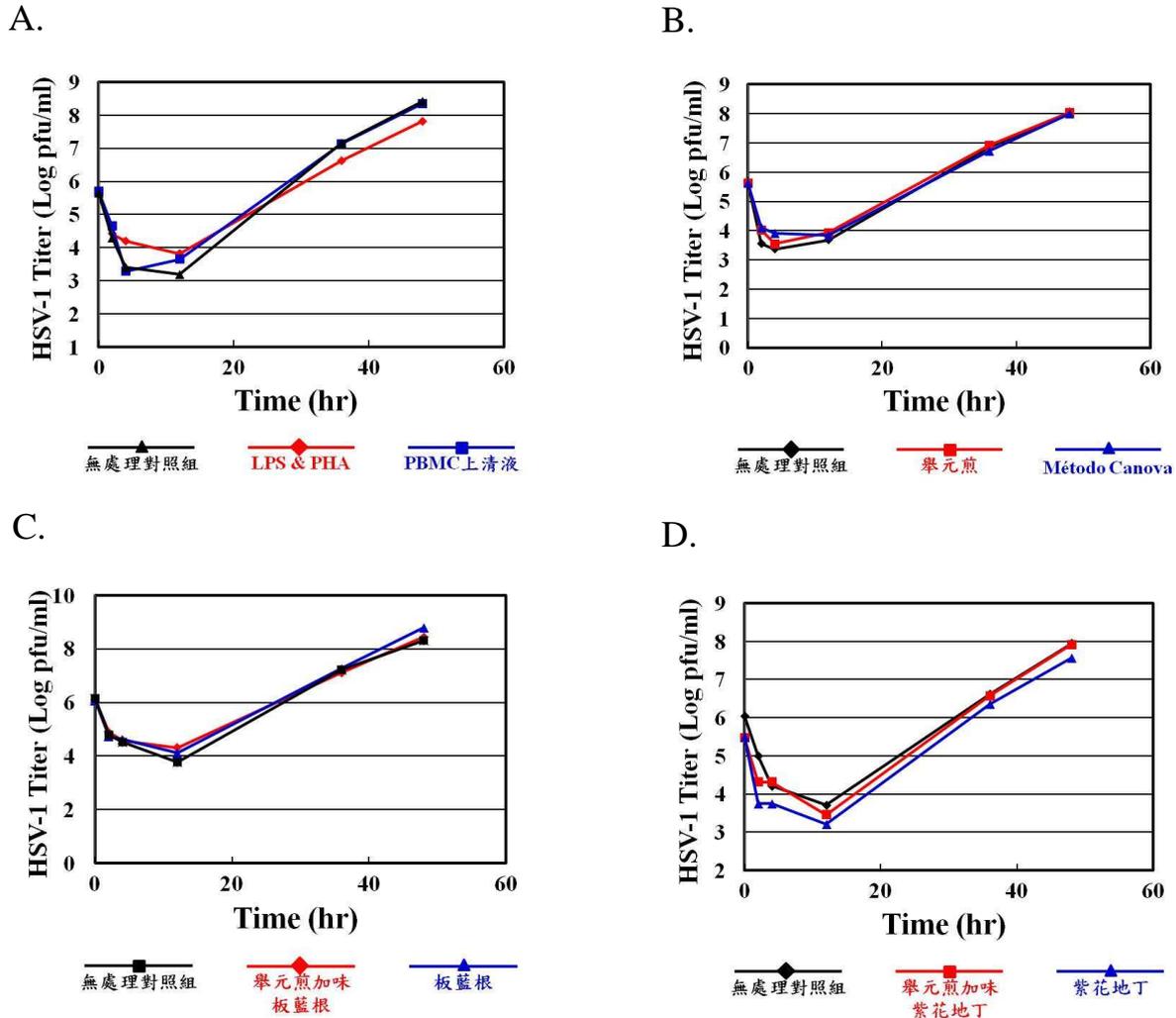
圖五、五種中草藥方劑與 Método Canova 對登革病毒血清二型的直接抑制效果

舉元煎、舉元煎加味板藍根、板藍根、舉元煎加味紫花地丁、紫花地丁（以上 100 $\mu\text{g/ml}$ ）、及 Método Canova（50 $\mu\text{l/ml}$ ）等，分別處理 HepG2 後，以病毒生長曲線，測定 Den2 病毒複製的升降。由於每一生長曲線有許多時間點（感染 0 小時及而後之 6、12、24、36、及 48 小時），而每時間點要做病毒液，不同倍數稀釋的溶菌斑實驗，所以每次實驗只能做上述兩項中草藥方劑，加上沒有方劑培養（無處理對照組）的共三條病毒生長曲線。因此本圖呈現（A）、舉元煎及 Método Canova，（B）、舉元煎加味板藍根及板藍根，與（C）、舉元煎加味紫花地丁及紫花地丁的實驗結果。同時本圖也在 36 小時處，增列先用病毒去感染宿主細胞 4 小時後，才處理六種方劑的結果，並顯示出該數據，與生長曲線（處理方劑 6 小時後，才感染病毒）第 36 小時的病毒數目，沒有巨大差異。



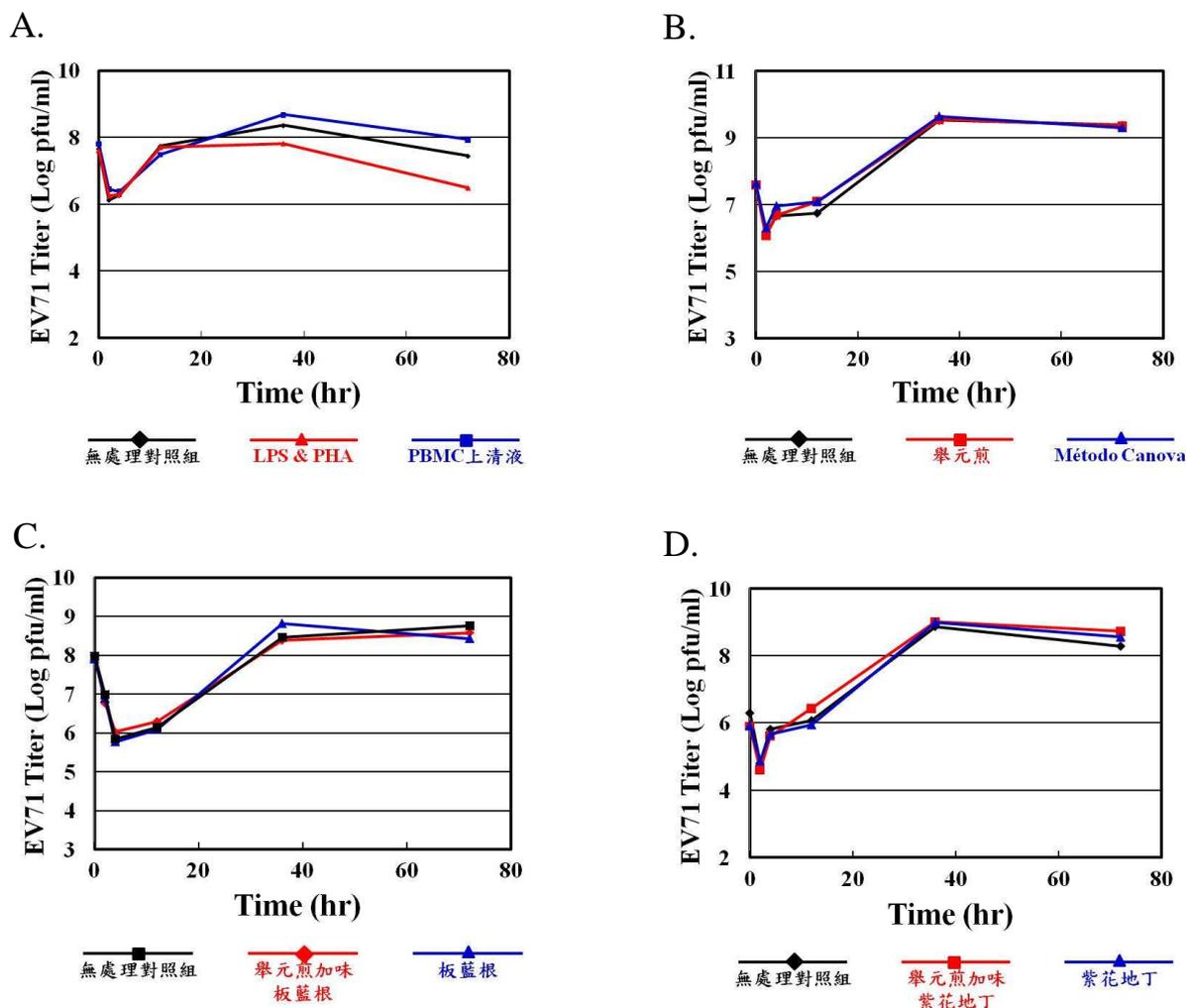
圖六、五種中草藥方劑與 Método Canova 對 EB 病毒基因表達的直接影響

舉元煎、舉元煎加味板藍根、板藍根、舉元煎加味紫花地丁、紫花地丁（以上 200 $\mu\text{g/ml}$ ）、及 Método Canova（50 $\mu\text{l/ml}$ ）等，分別處理 B95-8 細胞（內含持續複製的 EB 病毒）後，以 EBV-晶片來偵測病毒基因表達類型的消長。左上角區塊說明 EB-晶片的組成，是由 71 段 PCR 產生的基因片段（1-3 kbp EBV；如左邊圖示，可頭尾相連的覆蓋整個病毒 172,281-bp 的基因體），在尼龍薄膜上點製成含 83 圓點的小區格（4.2 mm \times 2.4 mm）。每一個圓點（含 10 ng DNA），其大小為直徑 120 μ ，間距為 150 μ ，而其基因片段與控制組基因（12 個）的位置，也一起表列於此。另外，由於雜合在 EBV-晶片的病毒 cDNA，是被 biotin-標定的，所以雜合反應的結果，會是以藍點呈現，而且顏色愈深代表表達愈多。在本實驗裡，我們以無 EBV 感染的 U937 細胞 mRNA，做為 negative 控制組（A），B95-8 細胞則依既定方法被（B）、無處理對照組（C）、Método Canova，（D）、舉元煎，（E）、舉元煎加味板藍根，（F）、板藍根，（G）、舉元煎加味紫花地丁，與（H）、紫花地丁等處理後，所得到的晶片雜合之圖像。之後它們用高解析度 PowerLook 3000 掃描器，攝取影像及量化其顏色深淺程度，再用軟體將數據做適當的分析及比較。於此，我們發現這六種方劑的處理（C - H）與無處理（B）結果，並沒有巨大的差異。



圖七、六種草藥方劑處理 PBMC 的上清液對單純皰疹病毒一型之間接抑制效果

舉元煎、舉元煎加味板藍根、板藍根、舉元煎加味紫花地丁、紫花地丁（以上 600 $\mu\text{g/ml}$ ）、及 Método Canova（50 $\mu\text{l/ml}$ ）等，分別處理周邊血液單核球（PBMC）後，其上清液加入 SK-N-SH 細胞株，以病毒 one-step growth curve（如圖一），測定 HSV-1 複製的變化。本實驗每次只做上述兩項中草藥方劑，加上沒有方劑培養（無處理對照組）的共三條病毒生長曲線。並且周邊血液單核球沒有被任何藥物處理過（PBMC 上清液），或是處理了 LPS 及 PHA（LPS & PHA）的上清細胞培養液，也被做為控制組，去確認感染的實驗（A）。其他的間接抑制實驗為：（B）、舉元煎及 Método Canova，（C）、舉元煎加味板藍根及板藍根，與（D）、舉元煎加味紫花地丁及紫花地丁的實驗結果。此圖顯示來自於 LPS + PHA 培養過的 PBMC 細胞上清液，可以小幅度抑制 HSV-1 感染，但包括紫花地丁的受測六種天然方劑，卻沒有任何抑制效果。



圖八、六種草藥方劑處理 PBMC 的上清液對腸病毒 71 型之間接抑制效果

舉元煎、舉元煎加味板藍根、板藍根、舉元煎加味紫花地丁、紫花地丁（以上 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）、及 Método Canova（50 $\mu\text{l}/\text{ml}$ ）等，分別處理周邊血液單核球（PBMC）後，其上清液加入 SK-N-SH 細胞株，以病毒 one-step growth curve（如圖二），測定 EV-71 複製的變化。本實驗每次只做上述兩項草藥方劑，加上沒有方劑培養（無處理對照組）的共三條病毒生長曲線。並且周邊血液單核球沒有被任何藥物處理過（PBMC 上清液），或是處理了 LPS 及 PHA（LPS & PHA）的上清細胞培養液，也被做為控制組，去確認感染的實驗（A）。其他的間接抑制實驗為：（B）、舉元煎及 Método Canova，（C）、舉元煎加味板藍根及板藍根，與（D）、舉元煎加味紫花地丁及紫花地丁的實驗結果。此圖顯示來自於 LPS + PHA 培養過的 PBMC 細胞上清液，可以強烈抑制 EV-71 感染，但包括紫花地丁的受測六種天然方劑，卻沒有任何抑制效果。