

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(2-2)

黎慶

國立嘉義大學

摘要

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，所以也與上述中草藥方劑，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，從事六種中西方天然草本方劑（舉元煎、舉元煎加味板藍根、板藍根、舉元煎加味紫花地丁、紫花地丁、及 Método Canova）於抵抗四種經常在臺灣流行病毒（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，與增強免疫力等方面，做有系統且深入的探討與比較，期能詳細分析其異同。於執行實驗時，這些藥劑將分別去處理不同病毒的宿主細胞，之後檢測是否可直接抑制此四種病毒的感染。同時本研究也將探討這些方劑，可否誘發人類周邊白血球（PBMC）分泌免疫分子，以達到間接殺死病毒的效力。於此方劑會被加到 PBMC 培養液中，經 24 小時後再檢測上清液中，是否含有可以抑制上述病毒之因子，以初步了解其療效的可能機轉。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 種方劑之抗病毒效用，及其有效濃度就會被測定出來。

本年度計畫（97.1.1~97.12.31）的目標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 內基因表達之直接與間接的抑制效果。試驗的結果顯示，將這些方劑之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；這代表被報導具有促進細胞免疫功能，及抗細菌成份的紫花地丁，可能有直接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，並無直接抑制的功效。另外若將它們加到 PBMC 培養液，並經培養所得的細胞上清液，以間接的方法去處理細胞株，則紫花地丁也失去抑制病毒感染的效果。為了探討天然中草藥方劑參，與抑制病毒的免疫機轉，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能力的效力，由此動物試驗的結果，吾人因此了解受測方劑在整體抑毒效果中，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 (2-2)

Ching Li, Ph.D.

National Chiayi University

ABSTRACT

Aim:

Chinese traditional herbal medicine (CTHM) is an idea alternative medication to compensate the difficulty of modern medicine against virus diseases. This is because the efficacy of herbal drug is believed to be contributed to “improve physical strength” of the patient in accompanying with a minimal side effect. We thus proposed a three-component program project to systematic analyze and compare the efficacies of Chinese and Western herbal medicines in controlling viral infections and modulating immunity. However, only this component project, which working with a cell line study model, was granted.

Method:

At this stage of the research project (1-1-08 to 12-31-08), we test mainly the effects of five widely circulated CTHM, which includes *Chui-Uren-Chine*, *Chui-Uren-Chine* plus *Radix Isatidis*, *Radix Isatidis*, *Chui-Uren-Chine* plus *Viola yedoensis* Makino, and *Viola yedoensis* Makino, as well as the Brazilian homeopathic medicament “*Método Canova*” on inhibiting the replication of four viruses prevalent in Taiwan, which include the infection of herpes simplex virus-1 (HSV-1) and enterovirus-71 (EV-71) to human neuroblastoma SK-N-SH cell line, the infection of dengue virus (Den2) to human hepatoma HepG2 cell line, and the gene expression of Epstein-Barr virus (EBV) in a marmoset cell line B95-8. To do this, one-step growth

curve are applied to monitor the replication of HSV-1, EV-71, and Den2; whereas EBV-genome chip hybridization is used for detecting the viral gene expression alternations. Since the medicaments may elicit immune factors that can suppress virus replication, the same amounts of the drugs are added to the cell medium for incubating peripheral blood mononuclear cells (PBMC), following by testing whether the culture supernatants can suppress virus replication.

Results & Discussion:

The result showed that only when *Chui-Uren-Chine* plus *Viola yedoensis* Makino or *Viola yedoensis* Makino alone was used in cell cultures infecting with HSV-1 or EV-71, the one-step growth curve for either virus reproducibly exhibited an one-log lower value in viral titer than those cells without treatment or treated with other herbal extracts or *Método Canova*, suggesting that *Viola yedoensis* Makino possesses antiviral potentiality upon direct contacting to these viruses. On the other hand, no effect was observed for inhibiting the infection of Den2 or gene expression during EBV propagation. Furthermore, none of these six agents were effective if they were incubated with PBMC for 24 hour prior to the treatment of the supernatants to the infections of all viruses, suggesting that CTHM and *Método Canova* did not stimulate PBMC to secrete any antiviral factor. In parallel to the ongoing investigation, we have sought and obtained an outside fund to support the tests 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

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[1]，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。由於在過去的 100 年中，造成全球的流行及恐慌的人類新興病毒疾病才方興未艾，跳越物種而感染人類的新興病毒之種類，也隨著時代的演變及進步，而次數增加與頻率加快。至今至少有人類免疫不全病毒 (HIV) [2,3]及 SARS 病毒[4,5]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[6]，至於其他地域性及小地區之感染則不計其數，譬如 1993 美國新墨西哥州的 hantavirus [7]、1998 馬來西亞的 nipah virus [8]、及 1999 美國紐約市的 West Nile virus [9]等。然而近年來世界各地更是人口稠密、交通發達、土地開發、及畜禽養殖等原因，造成動物疾病的病毒，可以更容易的傳播到人類來。因此在目前西方的化學合成藥物，無法有效抑制病毒感染，或是會造成嚴重副作用的狀況下，運用中草藥在病毒感染症的研發及使用，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。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），依此症狀再參考現今使用舉元煎、四君子湯、或補中益氣湯協同西藥，去抑制病毒複製藥物的研究報告，進而思考如何取得更好的療效，是一個值得研究的課題。推論之，嚴重的免疫缺陷是根本，是發病的內在因素，而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。另外，免疫缺陷若是導致發病於內：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”。而可以“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。例如在臨床上人參、白朮、黃耆、當歸、香菇、及絞股藍，被認為有促進輔助性 T 細胞的增殖，並提高 CD4⁺/CD8⁺比之功能[10]。另外因為板藍根、紫花地丁等有抗病毒、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。

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，組方的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。因此試驗組方劑中，除了以舉元煎用來“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，與對病毒有抑制作用的板藍根或紫花地丁，組成“加味舉元煎”方劑組（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，對包括單純皰疹病毒一型、腸病毒 71 型、登革病毒（血清二型）、或 EV 病毒之抑制感染效果。

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，本研究也將引進在西方國家裡，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，而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[11]。一種順勢療法的藥劑叫 Método Canova®，含有非常稀釋量的 *Aconitum napellus*、*Arsenicum album*、*Bryonia alb*、*Lachesis muta*、及 *Thuya occidentalis* 混合萃提取物。同時就因為它是極稀釋液，所以被認為不具毒性，但卻被報導可以活化巨噬細胞[12]，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[13]。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），以探討可否增加愛滋病毒感染者/愛滋病患免疫的能力。因此 Método Canova 也值得我們去深入研究，該方劑對全面調控免疫的功能，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、板藍根、舉元煎加味紫花地丁、紫花地丁、或 Método Canova 的六方劑，用細胞株培養模式，來測試對包括單純皰疹病毒一型（HSV-1）[14]、腸病毒 71 型（EV71）[15,16]、登革病毒（Den2）[17]、及 EV 病毒（EBV）[18]之抑制感染，或基因表達之效果，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、中草藥方劑製備與細胞株培養

本計畫商請 GMP 科學中藥廠，依藥方成份與劑量，一次足量製備了所需使用的舉元煎、舉元煎加味板藍根、及舉元煎加味紫花地丁，做為測試的三種中草藥方劑，並以板藍根及紫花地丁單方為對照組。而 Método Canova[®]則由巴西 Laboratory Canova of Brazil [www.canovadobrasil.com.br] 直接進口使用。在先前的毒性試驗中，各中草藥方劑對不同細胞有不一樣抑制生長的量，所以我們於不同的細胞加入不同的方劑量：SK-N-SH，600 $\mu\text{g/ml}$ 、HepG2，100 $\mu\text{g/ml}$ 、及 B59-8，200 $\mu\text{g/ml}$ 。而 Método Canova 在 50 $\mu\text{l/ml}$ 時，亦不會抑制這些細胞株之生長；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。

為測試中草藥方劑與對抑制各種病毒生長，本研究使用的細胞株包括 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），其培養過程則參照『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。

二、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）加入培養基，使之達到 SK-N-SH，600 $\mu\text{g/ml}$ 、HepG2，100 $\mu\text{g/ml}$ 、及 B59-8，200 $\mu\text{g/ml}$ 或 50 $\mu\text{l/ml}$ （Método Canova）的濃度，當 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（見圖一 ~ 三），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質控制，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 (lipopolysaccharide, 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。

三、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。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。

四、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 [19,20]。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，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[21,22]。

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（內含持續複製的 EB 病毒），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 μ g 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[19,20]，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瞄器（PowerLook 3000, UMAX）量化其基因表達程度，再用 Eisen 等人研發的軟體[23]，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[24]，從事基因表達數據的比較。

參、結果

一、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，見方法、二），及 Método Canova (50 μ l/ml) 被用來抑制 HSV-1、EV71、Den2 的感染（分別為圖一至三），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（圖一、二）。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。由圖一至圖三的結果顯示，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 μ g/ml）、及 Método Canova (50 μ 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（圖四 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 高解析度掃描器，量化其基因表達程度為數據，再用兩個的軟體[23,24]，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（圖四 A.），因為它是不含 EBV 的細胞株。然而經 Método Canova（圖四 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 (圖四 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。

二、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。

圖五與圖六是天然六種方劑，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 (圖五)，卻強有力的抑制 RNA 腸病毒 71 型 (圖六) 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) [25]，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 (圖三及圖四)，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 (圖五及圖六)，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

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[26]，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）[27]，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[28-30]，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[31]。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[32]。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[28]，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 [33]與 macrophage inflammatory protein 2 [34]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。

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

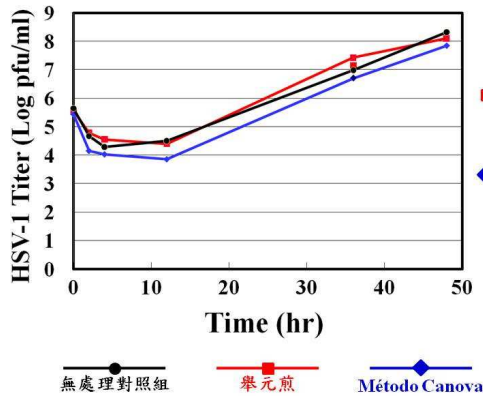
1. 行政院衛生署中醫藥委員會，中醫藥資訊網：<http://www.ccmp.gov.tw/>
2. Schwartz SA, Nair MP: Current concepts in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *Clin & Diagn Lab Immunol* 1999;6:295-305.
3. Garzino-Demo A, DeVico AL, Gallo RC: Chemokine receptors and chemokines in HIV infection. *J Clin Immunol* 1998;18:243-55.
4. 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.
5. 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.
6. Taubenberger JK, Morens DM: 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerg Inf Dis* 2006;12:15-22.
7. 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.
8. Epstein JH, et al: Nipah virus: impact, origins, and causes of emergence. *Curr Infect Dis Rep* 2006;8:59-65.
9. Reisen W, Brault AC: West Nile virus in North America: perspectives on epidemiology and intervention. *Pest Manag Sci* 2007;63:641-6.
10. 江揚清等，中西醫結合內科學，北京出版社，132-138。
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Whitley RJ: Herpes simplex viruses. in Knipe, D.M. et al. eds. *Fields Virology*, vol. 2, 2461-509, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2001.
15. Ho M: Enterovirus 71: the virus, its infections and outbreaks. *J Microbiol Immunol Inf* 2002;33:205-16.

16. Stanway G: Structure, function and evolution of picornaviruses. *J Gen Virol* 1990;71:2483-2501.
17. Murray PR, ed: Togaviruses and Flaviviruses (Chapter 63). in *Medical Microbiology*, 5th ed. 637-50, Elsevier Mosby, Philadelphia, PA, 2005.
18. Herrmann K, Niedobitek G: Epstein-Barr virus-associated carcinomas: facts and fiction. *J Pathol* 2003;199:140-5.
19. Li C, et al: Detection of EBV infection and gene expressions in human tumors by microarray analysis. *J Virol Meth* 2006;133:158-66.
20. Chiu YF, et al: A Comprehensive Library of Mutations of Epstein-Barr Virus. *J Gen Virol* 2007;88:2463-72.
21. Chen JJ, et al: Profiling expression patterns and isolating differentially expressed genes by cDNA microarray system with colorimetry detection. *Genomics* 1998;51:313-24.
22. Chen CC, et al: Microarray profiling of gene expression patterns in bladder tumor cells treated with genistein. *J Biomed Sci* 2001;8:214-22.
23. Eisen MB, et al: Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14863-8.
24. 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.
25. Roitt I, et al: Immunity to viruses. in *Immunology*, 6th ed. 2001, Mosby Co., London, England.
26. X GL: Herbological study of some medicinal plants from Viola. *Zhong Yao Cai* 1997;20:371-3.
27. Xie C, et al: Antibacterial activity of the Chinese medicine, Zi Hua Di Ding. *Phytother Res* 2004;18:497-500.
28. 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.
29. 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.
30. Wang CK, et al: Anti-HIV cyclotides from the Chinese medicinal herb Viola yedoensis. *J Nat Prod* 2008;71:47-52.
31. TsingHua: In vitro study of Viola yedoensis Makino decoction of regulating

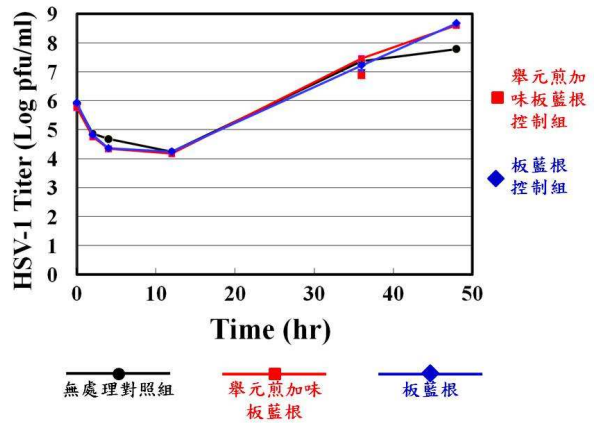
- immunocyte functions in mice. *J Fujiang College Trad Chin Med* 2003. [<http://www.shvoong.com/medicine-and-health/1609328-vitro-study-viola-yedoensis-makino/>]
32. Xie C, et al: Flavon C-glycosides from *Viola yedoensis* Makino. *Chem Pharm Bull* 2003;51:1204-07.
33. costa-Rodríguez EV, et al: Cytokines and chemokines shaping the B-cell compartment. *Cytok Gr Fact Rev* 2007;18:73-83.
34. Fruehauf S, et al: Innovative strategies for PBPC Mobilization. *Cytother* 2005;7:438-46.

染、圖、表

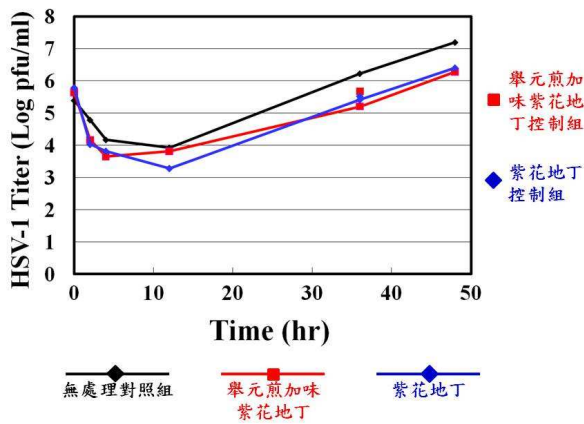
A.



B.

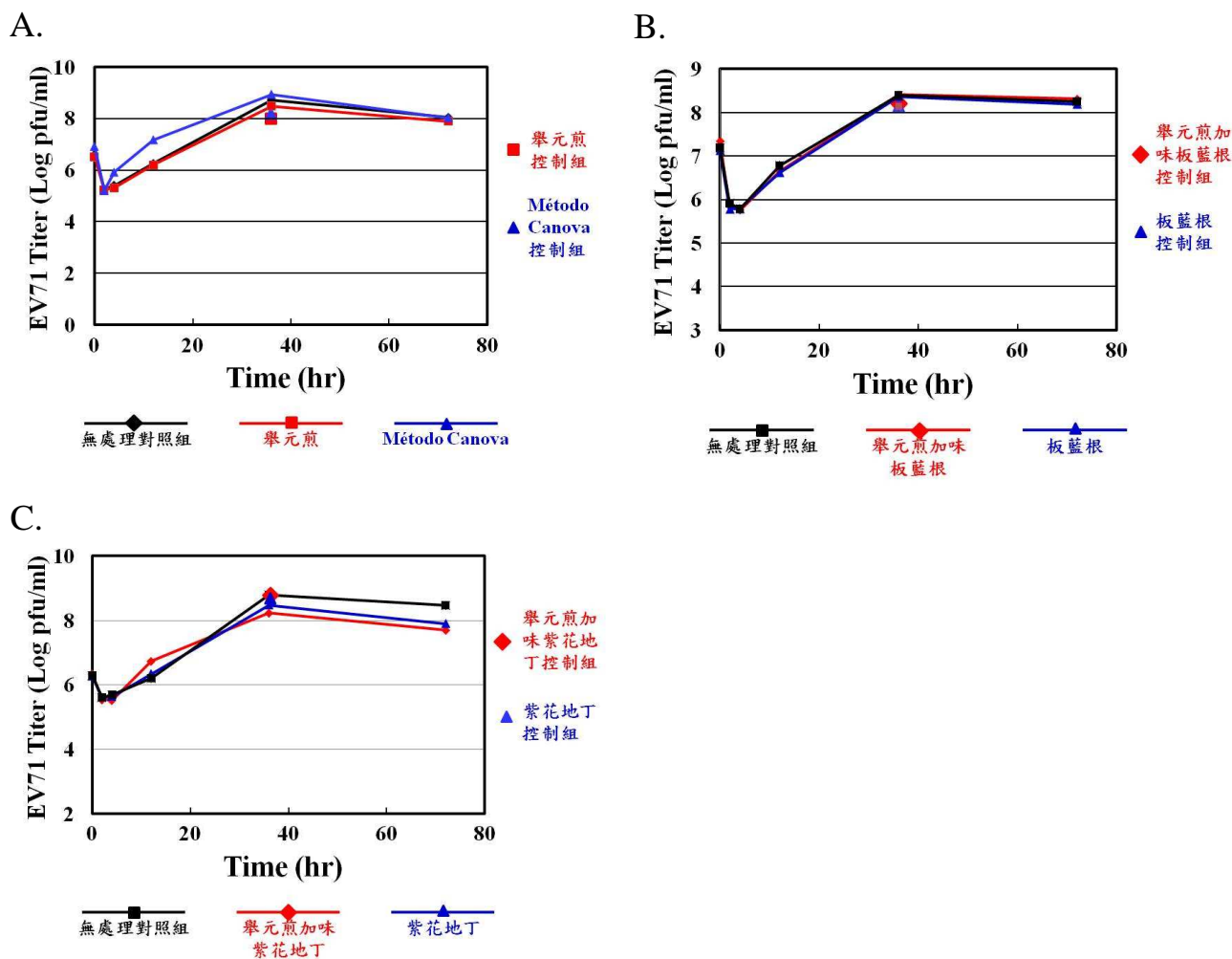


C.



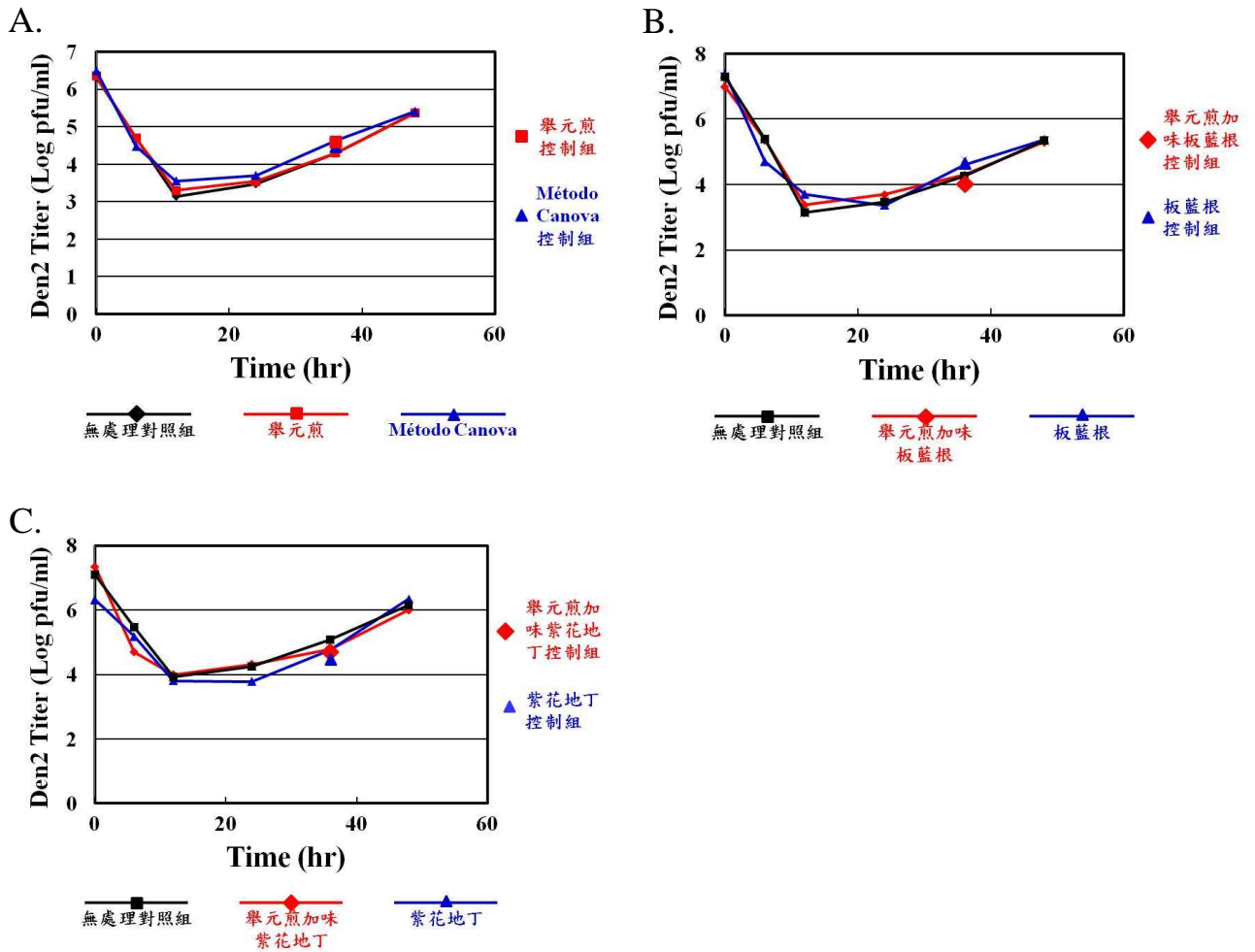
圖一、五種中草藥方劑與 Método Canova 對單純皰疹病毒一型的直接抑制效果

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 $\mu\text{g/ml}$)、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。



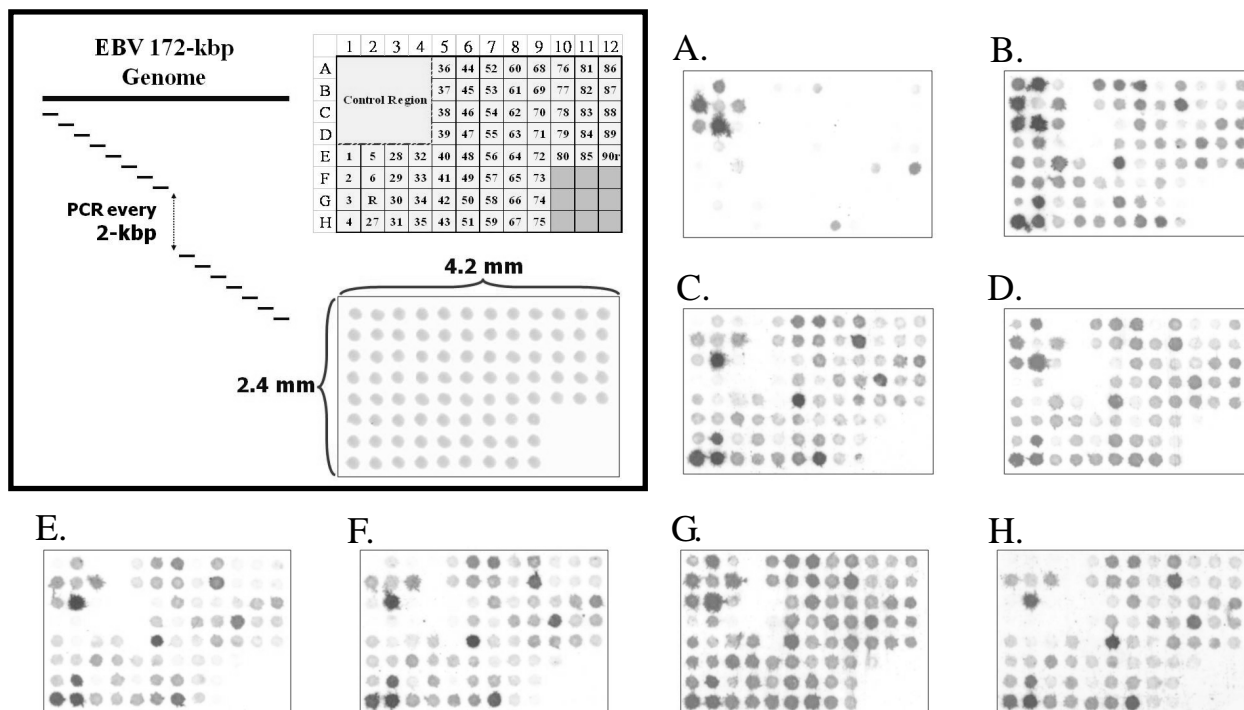
圖二、五種中草藥方劑與 Método Canova 對腸病毒 71 型的直接抑制效果

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。



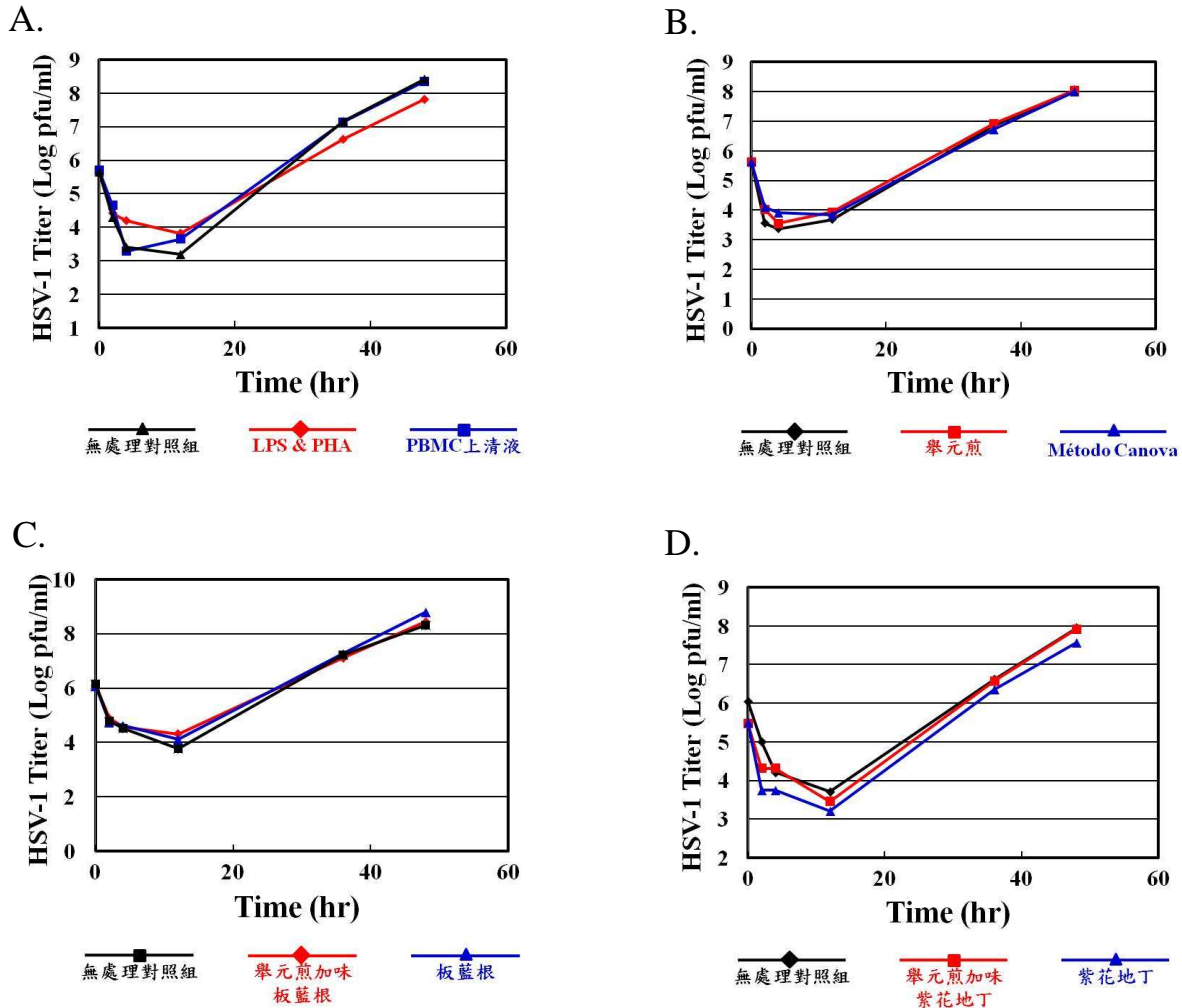
圖三、五種中草藥方劑與 Método Canova 對登革病毒血清二型的直接抑制效果

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 μg/ml）、及 Método Canova（50 μl/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。



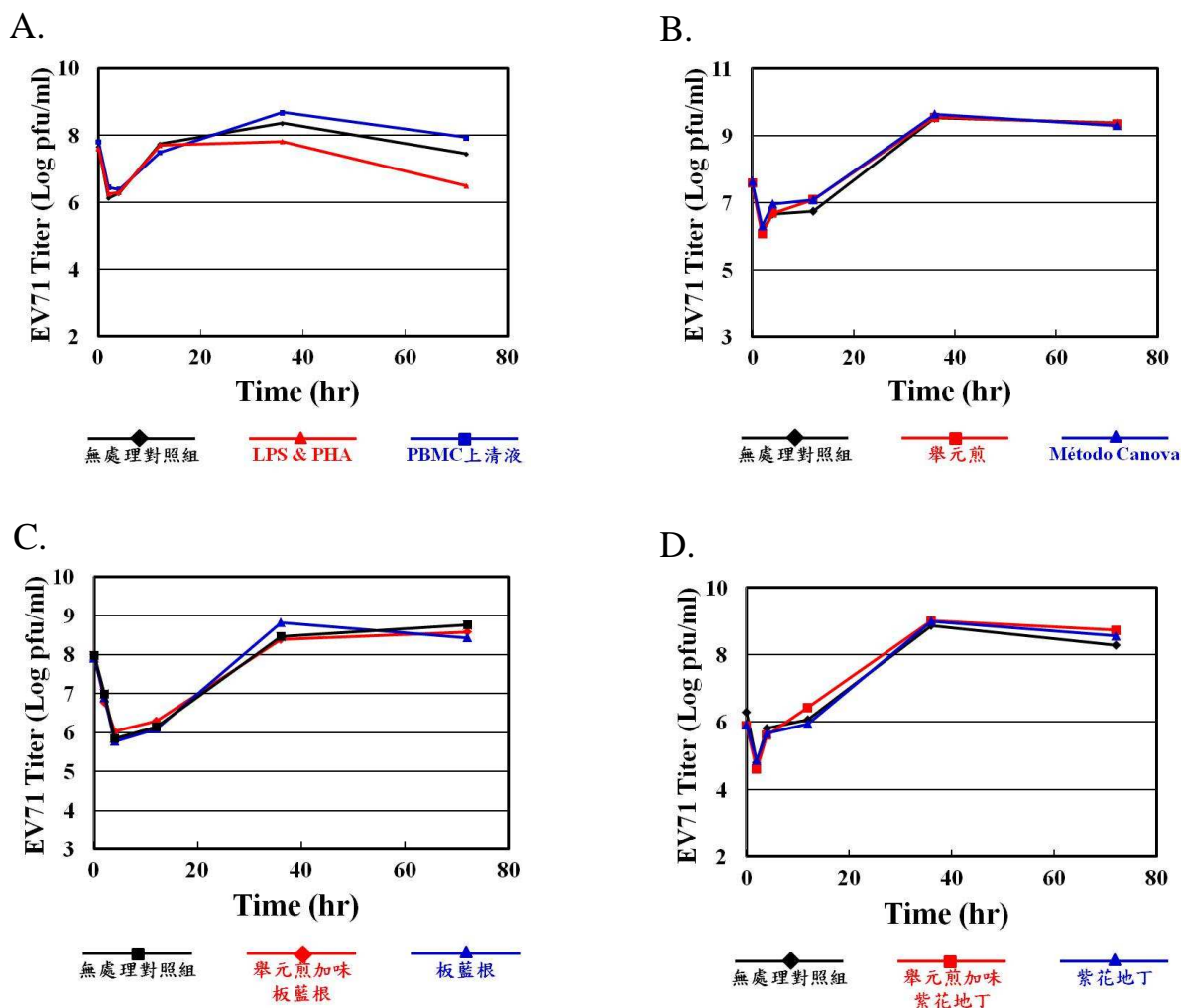
圖四、五種中草藥方劑與 Método Canova 對 EB 病毒基因表達的直接影響

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。



圖五、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。



圖六、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 $\mu\text{g/ml}$ ）、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。