

編號：CCMP95-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(2-1)

黎慶

國立嘉義大學

摘 要

有許多人類新興病毒疾病是由動物傳播到人類來而引發起來的，隨著時代的演變及進步，人口更稠密，及交通更發達等因素，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。然而化學合成藥物的使用，常受到高細胞毒性及其副作用的限制，相反的，中草藥的使用已有三千多年歷史，是從臨床實踐醫學而累積出廣大醫療經驗，發展出療效溫和及改善體質的醫療方法，正可彌補西藥的缺點與不足，使得中草藥在病毒感染症上之可能療效受到重視。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的天然方劑Método Canova對愛滋病毒可能有療效，所以也加入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。本計畫於申請時為歷時兩年半、含三個子計畫之整合型計畫，但僅被核准其中之第一子計畫：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。

本計畫擬以一年半時間（兩年期：96.8.1~97.12.31）以細胞株培養方式，從事四種中西方天然草本方劑（舉元煎、舉元煎加味板藍根、舉元煎加味紫花地、及Método Canova）在抵抗四種病毒療效（腸病毒、單純皰疹病毒、EV病毒、或登革熱病毒）與增強免疫功能方面，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，這些藥劑將以三個濃度去處理宿主細胞，之後檢測是否可直接抑制四種病毒的複製。同時也將探討可否

誘發免疫分子的間接毒殺效力，其作法將三種濃度之這些方劑與人體周邊白血球共同培養，再檢測培養白血球的上清液（conditional medium）中，是否含有可以抑制上述病毒增殖之因子，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表達晶片，也會用來探討EV病毒受中草藥抑制時，其基因表達之改變。在此實驗設計之下，受驗四種方劑的抗病毒效用，及其有效濃度就會被測定出來。

本年度計畫（96.8.1~96.12.31）的執行，我們已請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，並且我們已做了腦、膀胱、及肝等細胞株毒性的試驗，得到可用濃度範圍的結果，而所需要的4種細胞株與4種病毒，已全部取得與大量繁殖與儲備，至於EBV晶片也已足量製備；這些都將有助於在下年度一開始經費到位後，就依計畫內容立即執行。

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、單純皰疹病毒、EV病毒、登革熱病毒

Number:CCMP95-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 (2-1)

Ching Li, Ph.D.

National Chiayi University

ABSTRACT

There are numerous local or demestic outbreaks of emerging and reemerging viral diseases in the recent years. The threat by these viruses will only become more intense and frequenier in the future, because more polulated people gathering in the urban areas, more travelers coming back and forth, and other social- and cultural-related activities in these days than earlier. Worse enough, when considering virus is an obligate parasite that it can only survive by using host's metabolic pathways for replication, and therefore the drugs targeting to virus replication are frequent hampered by high cytotoxcity. Since Chinese tradtional herbal medicine (CTHM) is developed according to experiences from a widely-based human uses that has been lasting for more then 3,000 years of history with written records in Chinese societies, its efficacy due to so called "improving physical strength", accompanying with minimal sideeffects, has been proven. Therefore CTHM is an idea alternative medication method to complement the difficulty of morden medicine against virus diseases. 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.

In this one-and-half-year research project (8-1-07 ~ 12-3-08), we intend to apply the widely circulate CTHM that contain Chui-Uien-Chien, Chui-Uien-Chien plus Radix Isatidis, Chui-Uien-Chien plus Viola yedoensis Makino for testing their efficacy in inhibiting virus replication. For comparison, we will also test the Brazilian homeopathic medicament “Método Canova” in this research. To do this, the herbal medicines and Método Canova will be applied, in three concentrations, to the appropriated cell cultures for possible inhibiting the growth of enterovirus 71, herpes simplex virus-1, or dengue virus. Their inhibitory efficacies will be monitored by assaying virus growth rates. Since the medicaments may elicit immune factors that can suppress virus replication, the same amounts of the drugs will be added to the cell medium incubating peripheral blood mononuclear cells, following by isolating the culture supernatants and adding to cell lines supporting virus replication, and finally assaying the capability of virus growth suppression. Furthermore, newly developed EBV genomoe-chip will be used to detect the drug-induced gene expression pattern, as to analyze global EBV gene expression alternation responding to the drug treatments.

The works carried out between 8-1-07 to the present time yielded the following results: (A), all CTHM drugs were prepared by GMP Pharmaceutical Company; (B), the cytotoxicities of the prepared drugs were tested on human nerve, bladder, and liver cell lines and the thus experimental doses could be determined; (C) four cell lines and four viruses were properly propogated and storage; and (D), enough numbers of EBV-chip have obtained. Therefore, we are ready to perform growth inhibitory study as soon as next project year is engaged.

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

壹、前言

除了在人類間流行了上千年的病毒所造成的疾病是方興未艾外，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。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，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，至於其他地域性及小地區感染則不計其數，譬如說1993美國新

墨西哥州的hantavirus[5]、1998馬來西亞的nipah virus[6]、及1999美國紐約市的West Nile virus[7]等。到現在最令流行性病學家擔心的是，禽流感（H5N1）病毒[8,9]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時時可能發生，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[10]，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”。所以可以“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吳伯平等將防治愛滋病有關的中藥分類列出[11]，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[12]；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，例如一般發現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），依此症狀參考當今研究報告使用舉元煎、四君子湯、或補中益氣湯協同西藥抑制病毒複製藥物，希望取得更好的療效，是一個值得研究的課題。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。如今西藥有不錯的抑制病毒藥物使用，但是仍然不夠理想，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常流行的病毒如：腸病毒、單純皰疹病毒、EV病毒、及登革熱病毒。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、或登革熱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，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。這西方國家裡所盛行的順勢療法，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[13]。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 Thuja 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[14]，並大量減少該細胞分泌發炎性的細胞激素 $\text{TNF-}\alpha$ 而對細胞免疫力有幫助，同時它也被認為對抗癌症有效[15]。在2001年時，該藥劑於巴西正式申請進入臨床人體試驗（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／愛滋病患免疫的能力。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，我們擬以舉元煎、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腸病毒（EV71）[16,17]、單純皰疹病毒（HSV-1）[18]、EV病毒（EBV）[19]、及登革熱病毒[20]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的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汙染，同時於96.8.1計畫開始執行時啟至年底的五個月裡，由進料至製成一次生產足夠供應整個計畫的所需用藥。至於 Laboratory Canova of Brazil所生產的Método Canova[®]，則由國外 [www.canovado brasil.com.br]直接進口使用。

二、細胞株的培養

為測試中草藥方劑與對抑制各種病毒生長，包括腸病毒、單純皰疹病毒、EV病毒、及登革熱病毒的能力，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、Vero、B59-8、及Huh7，其來源、用途、及培養方法已列於表二。另外，腸病毒71型、單純皰疹病毒一型、及登革熱病毒的病毒株種（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MOI為1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97年度裡一同做直接與間接抑制病毒的測試。直接與間接的方法將詳載於該年度的計畫書中。

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100µg/ml到1,000µg/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Huh7與HepG2（以上兩者分別是EV71、HSV-1與dengue virus的宿主細胞）、及膀胱細胞株T24與TSGH-8301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[24,25]，從事細胞施藥存活率的實驗。

四、點製EBV-晶片

由於在第二（下）年度中，本計畫擬以EBV-晶片做草藥方劑抑制EBV複製之實驗，所本年度須開始著手點製病毒基因晶片，而其方法已發表於期刊上[21,22]。簡言之，71對PCR引子，在事先參考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基因體的(172,281-bp)。在點製EBV-晶片時，我們使用國產的microarrayer (Arrayer 03, Wittech Co., Taipei, Taiwan, ROC)，將71基因片段加上12個控制DNA (APS1、ASA1、GA4、HAT4、HAT22、LhcI、RbcL、及Rca是來自植物，噬菌體λ【PstI-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，一起點製在尼龍的厚薄膜上，而最後的成品是製成含83個圓點（每點有10ng DNA），其大小為直徑120 μ ，間距為150 μ 的EBV-晶片[23,24]。

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，製備了舉元煎、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（圖一）。而Método Canova[®]則已由國外進口48瓶（每瓶50 ml，成人劑量是每日服用6次，每次10滴）使用（圖二）。

(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 μ 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[24,25]，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（圖三）。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3mg/ml的濃度做為參考用量。中草藥方劑對膀胱（T24、TSGH-8301）的抑制量就比較低，大概在20 - 40 μ g/ml之間（圖三）。我國現在正在從事肝細胞株（Huh7與HepG2：dengue virus的宿主細胞）及血球（U937、Jurkat）等細胞株的毒性試驗，待完成所有實驗後，就能整合數據決定這些中草藥方劑對不同細胞的毒性，與病毒感染細胞實驗之可使用劑量。

(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（圖二）。

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 $^{\circ}$ 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（圖四）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。

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。

自計畫開始執行至今，從事細胞毒性實驗的次數僅少數幾次，故圖三須要用不同細胞株再做重複的實驗求證，另外也須用廣納互多不同器官的細胞株做毒性的實驗，以求試驗量之通用性。除了以cell proliferation assay從事細胞毒性實驗，在顯微鏡下觀察其細胞型態的變異(CPE)，也是我們正在做的實驗。

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。工作同仁也已經接受訓練，並且於即刻開始正式實驗。

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8月開始，僅五個月不到，尚未有充實成果時，即要交報告，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. Douglass RJ, Calisher CH, Bradley KC: State-by-state incidences of hantavirus pulmonary syndrome in the United States, 1993-2004. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2005; 5: 189-92.
6. Epstein JH, Field HE, Luby, et al: Nipah virus: impact, origins, and causes of emergence. *Curr Infect Dis Rep* 2006; 8: 59-65.
7. Reisen W, Brault AC: West Nile virus in North America: perspectives on epidemiology and intervention. *Pest Manag Sci* 2007; 63: 641-6.
8. Lim WS, Thomson A, Little P: Preparing for the next flu pandemic. *BMJ* 2007; 334: 268-9.
9. Coombes R: Hunting down the H5N1 virus. *BMJ* 2007; 334: 342-4.
10. 行政院衛生署中醫藥委員會，中醫藥資訊網：<http://www.ccmp.gov.tw>
11. Hu YP: Immunologic study of the treatment of AIDS with traditional Chinese medicine. *Chin J of Clin Rehab* 2006; 10: 47.
12. 江揚清等，中西醫結合內科學，北京出版社，132-138。
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Ho M: Enterovirus 71: the virus, its infections and outbreaks. *J Microbiol Immunol Inf* 2002; 33: 205-16.

17. Stanway G: Structure, function and evolution of picornaviruses. *J Gen Virol* 1990; 71: 2483-2501.
18. Whitley RJ: Herpes simplex viruses. in Knipe, D.M. et al. eds. *Fields Virology*, vol. 2, 2461-509, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2001.
19. Herrmann K, Niedobitek G: Epstein-Barr virus-associated carcinomas: facts and fiction. *J Pathol* 2003; 199: 140-5.
20. Murray PR, ed: Togaviruses and Flaviviruses (Chapter 63). in *Medical Microbiology*, 5th ed. 637-50, Elsevier Mosby, Philadelphia, PA, 2005.
21. Li C, Chen RS, Hung SK, et al: Detection of EBV infection and gene expressions in human tumors by microarray analysis. *J Virol Meth* 2006; 133: 158-66.
22. Chiu YF, Tung CP, Lee YH, et al: A Comprehensive Library of Mutations of Epstein-Barr Virus. *J Gen Virol* 2007; 88: 2463-72.
23. 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.
24. 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.
25. 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.

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 黃耆 炙甘草 升麻 炒白朮	二錢 三錢 二錢 一錢 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℃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	Vero	B59-8	Huh7
來源	Human neuroblastoma cells	Monkey kidney cells	Marmoset EBV-transformed B lymphocytes	Human hepatoma cells
型態	Adherent epithelial	Adherent epithelial	Suspension lymphoblast/fibroblast	Adherent epithelial
生長	DMEM, 10% FBS, P/S, 5% CO ₂ , 37 °C	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
用途	腸病毒及單純皰疹病毒之感染	腸病毒、單純皰疹病毒、及登革熱病毒之 plaque assay	EBV之基因表達分析	登革熱病毒之感染與 plaque assay
培養	已在黎慶實驗室液態氮中儲藏	已在黎慶實驗室液態氮中儲藏	已在黎慶實驗室液態氮中儲藏	已在黎慶實驗室液態氮中儲藏

表三、在臺灣流行之病毒將接受測試

名稱	腸病毒	單純皰疹病毒	登革熱病毒	EB病毒
來源	4643 成大醫院 臨床分離株	Kos 第一型 實驗室株	第二型 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，存 取黎慶實，於 黎慶實，驗室	已存於黎慶實驗室

表四、已完成儲備於-80°C 冰箱的病毒與細胞株

名稱	存量	備註
EV71	2 × 10 ⁶ pfu/ml : 57	腸病毒 71 型，使用 M.O.I. = 5
HSV-1	8 × 10 ⁷ pfu/ml : 50	單純皰疹病毒一型，使用 M.O.I. = 0.1
Dengue virus	5 × 10 ⁶ pfu/ml : 5 tubes	登革熱（第二型），使用 M.O.I. = 50
SK-N-SH	107 cells/ml : 14 tubes	腦細胞，EV71 與 HSV-1 宿主細胞
B95-8	107 cells/ml : 9 tubes	B 細胞株，從事 EBV 晶片實驗使用
Vero	2 × 10 ⁷ cells/ml : 10 tubes	HSV-1 溶菌斑定量使用
RD	107 cells/ml : 20 tubes	EV71 溶菌斑定量使用
BHK21	107 cells/ml : 10 tubes	dengue virus 溶菌斑定量使用



圖一

國立嘉義大學水生生物科學系
Department of Aquatic Biosciences
NATIONAL CHIAYI UNIVERSITY
嘉義市學府路 300 號。☎：05-2717845。☎：05-2752661
水產養殖分析實驗室
AQUACULTURE ANALYTICAL SERVICES LAB.
檢驗報告
REFERENCE REPORT

報告日期：2006 年 03 月 02 日

以下測試樣品係由供應廠商所提供及確認：
送驗單位：黎慶
收件日期：2006 年 02 月 22 日。測試日期：2006 年 02 月 24 日。
測試項目及方法：
鉛 pb、鎘 Cd、砷 As：GF-AAS
汞 Hg：Direct Mercury Analysis，USEPA Method 7473
檢體：中藥液
測試結果：

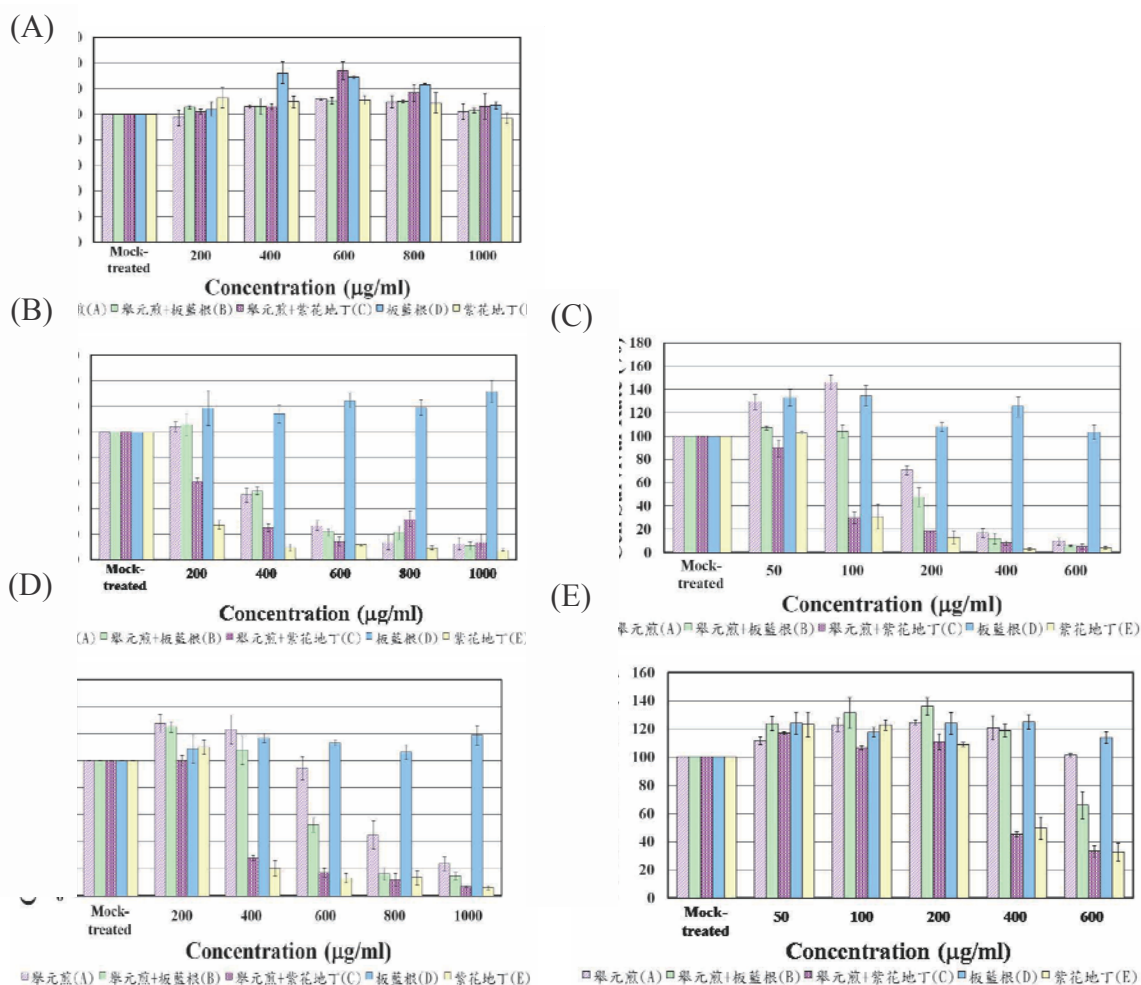
檢驗項目	檢驗方法	中藥液 mg/kg (ppm)	檢出基準
銅 Cu	Voltammetry AA	0.5	>10
鋅 Zn	Voltammetry AA	nd	
鉛 Pb	Voltammetry AA	nd	
鎘 Cd	Voltammetry AA	nd	
砷 As	Voltammetry AA	nd	
汞 Hg	汞分析儀	0.025	檢出 < 0.05

檢驗負責人：秦宗顯
檢驗員：林呈翰·劉祐凌

本資料僅供參考使用
不得用於其他用途

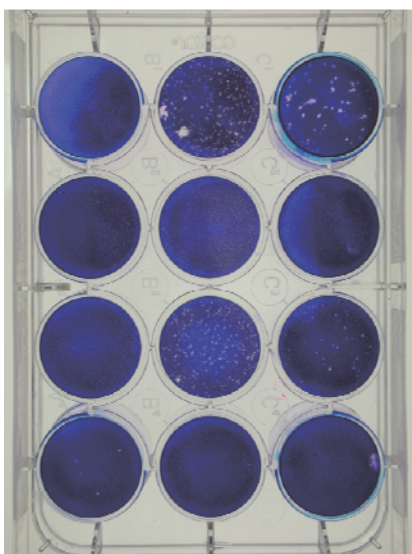
圖二、Método Canova[®]的實物與重金屬檢驗的結果

Método Canova[®]在巴西已是上市的产品（左圖），並也註明使用劑量，一整瓶樣品(50 ml)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、及汞的含量（右圖），得到陰性的結果。

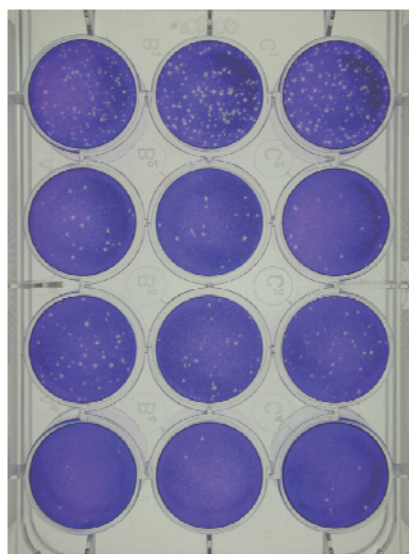


圖三、以腦及膀胱細胞測試五種中草藥方劑濃縮液的細胞毒性 腦細胞 SK-N-SH(A)及膀胱細胞T24(B、C)與TSGH-8301(D、E)被用來測試此五種中草藥方劑在何種濃度時，會抑制細胞的生長。以cell proliferation assay之方法，SK-N-SH細胞在1,000µg/ml仍不受到抑制，T24及TSGH-8301細胞則分別在約50µg/ml與200µg/ml濃度時，可維持正常的生長。此圖以存活的百分比(%), 比較經某一味中草藥(參考顏色代碼)與未經任何藥物處理的細胞(Mock-treated)生長狀況之差異。

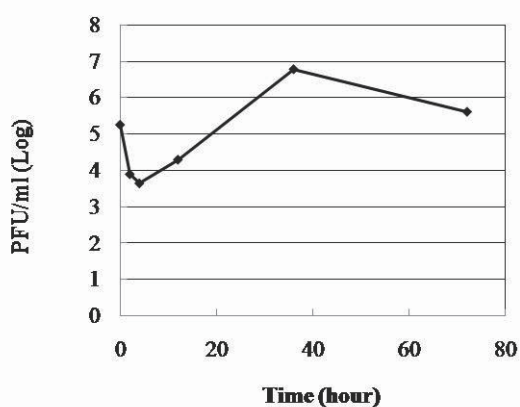
(A)



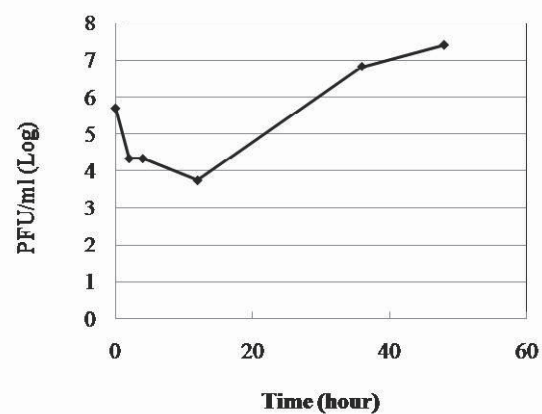
(B)



(C)



(D)



圖四、病毒定量實驗

病毒定量實驗(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，由此可推算出其病毒的濃度及病毒生長曲線(one-step growth curve)。(C)與(D)分別是EV71與HSV-1的one-step growth curve。

