

編號：CCMP 95 -RD-034

## 抗 C 型肝炎病毒中草藥新藥之研發

吳永昌  
高雄醫學大學

### 摘要

C 型肝炎病毒 (Hepatitis C Virus) (HCV) 形成慢性肝炎、肝癌、肝硬化的主因之一。目前全球約有一億七千萬人為 HCV 帶原者，在台灣也有約三十萬的人口受到感染，這些人口仍會持續增加。目前治療 HCV 的方法大多都採用 interferon- (IFN；干擾素) 結合口服 ribavirin 一起使用，然而接受 IFN 治療的病患中只有 40~50% 得到長期的改善，而且有副作用，因此開發新藥來達到有效治療是個重要的研究方向，中草藥正提供一個新穎藥物的來源。首先以 42 個不同純天然化合物及 24 個中草藥萃取物利用 HCV 複製子-報導基因細胞進行初步篩選，在 10 $\mu$ M 或 50 g/ml 濃度下處理三天，之後取其培養液測 SEAP 活性。結果發現其中有 2 個化合物 (編號 AN26 兒茶素及 AN38) 及五個中草藥化合物(桂枝、半夏、防風、甘草、五味子)有明顯抑制 SEAP 活性具有明顯抑制效果 (大於 50%)，藉由 Northern Blot 已證實 AN26 確實能抑制 HCV 複製，且病毒 RNA 量隨著藥物濃度增加而減少，當濃度 100 $\mu$ M 可以完全抑制病毒複製，而在濃度 400 $\mu$ M 時仍不具細胞毒性。目前正針對結合干擾素使用時，是否具有加成抑制效果進行研究。在 5 個中草藥萃取物方面，尚待進一步確認是否抑制 HCV 病毒複製。在此報告中，我們也已建立細胞內分析病毒標的基因的活性分析，包括 IRES 及 NS3/4A 蛋白酶。總而言之，AN26 提供一個將來可以提供藥物治療及基因體研究的藥物。

關鍵詞【至少三項】：C 型肝炎病毒、複製子、兒茶素、中草藥、天然物

編號：CCMP 95 -RD-034

## R & D on the anti-HCV new drugs of Chinese and Herbal Medicine

Yang-Chang Wu  
Kaohsiung Medical University

### ABSTRACT

Hepatitis C virus (HCV) plays an important role to chronic hepatitis, hepatoma, as well as cirrhosis of liver. The population of HCV carriers goes beyond 170 millions causing a serious health problem worldwide. In Taiwan, 2% of the population is suffering from this terrible disease, and unfortunately the infected rate is still increasing rapidly. Moreover, a current therapy in combination with the nucleotide analogue ribavirin is only effective in 50~60% of infected individuals and caused severe side-effects. Therefore, the identification of new compounds with anti-HCV activity is essential to provide solution to the therapy of HCV. The Chinese and Herbal Medicine provide a novel drug source against HCV. In this project, 42 pure compounds and 24 crude extracts obtained from different plants were used to test anti-HCV activity with HCV replicon-reporter system at 10 $\mu$ M or 50 g/ml in primary inhibitors screening. After 72h, the culture medium was harvested for analysis of SEAP activity. The preliminary results showed that two pure compounds, termed AN26(a catechin) and AN38, and five crude extracts including *Cinnamomi Ramulus*、*Pinellia ternata*、*Sileris Radix*、*Radix Glycyrrhizae*、*Schizandra chinensis* exhibited higher potency of anti-HCV activity. Furthermore, The anti-HCV effect of AN26 was also evaluated by Northern Blotting, in which the level of HCV RNA declined upon AN26 treatment in a dose-dependent manner. The HCV replication was completely inhibited at 100 $\mu$ M. There was no observed cellular toxicity, as revealed by MTS assay, when cells were treated with AN26 at 400 $\mu$ M.

Recently, we would further used whether the combination of AN26 and interferon exerted synergistic, additive, or antagonistic anti-HCV effects. In addition, the five cure extracts would be evaluated by Northern Blotting. In this report, we also have established activity assay system for viral molecule targets including IRES and NS3/4A protease in a cell-based condition. Collectively, the AN26 will be a good candidate for new therapy and genomic study in the future.

Keywords : Hepatitis C Virus ,replicon, catechin, Chinses and Herbal Medicine, natural product

## 壹、前言

C 型肝炎病毒(Hepatitis C Virus)是造成慢性肝炎的原因之一，根據統計，全世界約有 1.7 億人口感染此病毒(約 3-4%)，此數目高出受愛滋病毒(HIV)感染約有四倍之多(1)，在台灣也有三十萬(約 2%~4%)的人口受到感染，這些人口仍會持續增加。目前治療 HCV 的方法大多都採用 interferon- $\alpha$  (IFN；干擾素)結合口服 ribavirin 一起使用，然而 IFN 不是對於六種病毒基因型都有良好的效果，在接受 IFN 治療的病患中只有 40%~50% 得到了長期的改善，而且也有副作用，包括憂鬱症、感冒症狀、白血球減少及會產生溶血性貧血等，因此使得病人接受治療的意願降低，目前也沒有有效的疫苗，顯然 C 型肝炎是本世紀醫學上另一個公共衛生問題(2-4, 15)。

C 型肝炎病毒在病毒分類學上屬於黃熱病毒科。本身是一個含單一正股的 RNA 病毒，此 RNA 序列長度約有 9.5 kb，由病毒的 Internal Ribosomal Entry Sites (IRES) 轉譯序列可以轉譯成一個約 3,000 個氨基酸的聚蛋白。藉由寄主細胞及病毒本身的蛋白酶(Proteases)將其切割成 10 個 polypeptides；分成結構蛋白及非結構蛋白，結構蛋白的部分有 C or capsid、E1 and E2 glycoproteins(主要和肝細胞的 CD81 接合)、p7，非結構蛋白的部分有 NS2 proteases、NS3 protease-helicase、NS4a protease co-factor、NS4、NS5a and NS5b RNA-dependent RNA polymerase (5)。對抗病毒藥物的研發策略上，主要根據 HCV 病毒上重要的基因產物當做藥物作用的標的物，其中 RdRp 病毒核酸轉錄酶是病毒核酸複製重要的酵素，NS3 蛋白酶則具有蛋白水解、helicase、及 NTPase 多重作用，被認為對病毒其它蛋白的成熟、病毒的複製及抑制細胞免疫有關，因為寄主細胞本身並不含有這些酵素蛋白質，故這些都被認為具有病毒專一性的藥物標的物(6-9)。

近年來，Lohmann et al. 及 Blight et al. 等人分別於 1999 及 2000 年開發出含 HCV 複製子的細胞株(10, 11)，此項發現提高抗 HCV 病毒的藥物開發及其相關科學上研究的可行性。我們已從美國 Apath 公司取得 HCV 複製子的細胞株 (Ava5) 及 HCV 複製子載體，配合報導基因(EG( $\Delta$ 4AB)SEAP)的設計，所改造之報導基因的複製子細胞稱為 Ava5-EG( $\Delta$ 4AB)SEAP，由實驗證實此細胞株可以用來進行藥物篩選，而且更易於應用與抗病毒藥物高速篩選系統(7)。故本計畫的藥物篩選部分，擬先以 HCV 複製子系統進行藥物篩選。

## 貳、材料與方法

### 一、細胞株培養：

此次實驗所利用的細胞株為人類肝臟細胞：Huh7B 及含有 HCV subgenomic 的 Ava5 (含 subgenomic 的 Huh7 細胞)，培養於含有 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum)、1% antibiotic 及 1% 的 nonessential amino acid 的 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 的 DMEM 中，貼附培養於 10cm 的培養皿中，並置於含 5% CO<sub>2</sub> 之 37°C 的 incubator 中培養。當細胞進行繼代培養時，先抽掉培養液，以 PBS 沖洗乾淨後，加入 2ml~3ml 的胰蛋白酶 (trypsin) 處理細胞，靜置 3~5 分鐘使細胞從培養皿上脫落懸浮，並加入適當的 medium (DMEM) 沖洗並分置新的培養皿中繼續於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 進行培養。

### 二、HCV 複製子-報導基因細胞篩選抗病毒抑制劑：

將 Ava5-EG( $\Delta$ 4AB)SEAP 細胞貼附在 24-well plate，細胞數量為  $2 \times 10^4$ /well，隔夜之後，處理不同濃度的藥物，每個濃度有三個重複的 well。靜置 48 小時之後，置換新的培養液，再經過 24 小時之後即取出 10 $\mu$ l 的培養液，以 Phospha-Light assay kit (Tropix, Foster City, Calif) 試劑組檢測 SEAP 活性。所測試之 42 種化合物及 24 種市售常用中草藥萃取物所如表一所示 (16)。

### 三、細胞毒性測試：

將 Ava5 細胞以  $5 \times 10^3$  貼附於 96 well 中 24Hr 後，以欲測試的藥物處理三天，並以 Actinomycin D (10 $\mu$ M) 作為細胞死亡的對照組，三天後將 medium 抽掉加入 80 $\mu$ l phenol red free DMEM，及 20 $\mu$ l 的 MTS reagent (Promega CellTiter 96 Aqueous ONE)，放入含 5% CO<sub>2</sub> 37°C 的培養箱中，以 490nm 的波長測其 3Hr 的讀值，以無藥物處理過的細胞之讀值為基礎，進行細胞存活率的運算。

#### 四、北方雜合(northern blot)

利用 TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA) 抽取經過藥物處理三天的細胞 RNA, 將其以每 well 6 $\mu$ g 的量以 formaldehyde-agarose gel 進行電泳(100V), 電泳完成後以毛細法進行轉漬, 費時約 8 小時, 接著以 80°C 烘烤 2Hr 進行 cross-linked。最後, 以  $\alpha$ -<sup>32</sup>P 標定的 NS5B(HCV) 以及細胞內常態表現之 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 基因片段當作探針進行核酸雜交反應。

#### 五、西方雜合 (western blot)

以 8 $\mu$ g 每 well 的量, 以 12% Acrylamide gel 進行電泳, 並利用 BioRad semi-dry (15V、15min) 進行轉漬。接著以 5% 之脫脂牛奶進行 blocking 約 30 min, 之後, 分別以 Anti-NS3 以及 Anti-actin 的抗體處理 1Hr (分別以 1:1000 及 1:4000 的比例與 5% 脫脂牛奶混合), 以 PBS-T wash 3 次, 每次 10 分鐘, 以驢抗鼠抗體 (1:10000 的比例與 5% 脫脂牛奶混合) 處理 30min, 以 PBS-T wash 3 次, 每次 10 分鐘, 最後以 ECL 試劑對而及抗體上之酵素進行反應, 所散發之冷光於 X 光片進行顯影。

### 參、結果

#### 一、 中草藥及天然物之分離與純化

24 種中草藥購買自港香蘭藥廠, 42 種天然物與化學半合成之化合物主要來自本實驗室大量化合物資料庫。AN26 為大黃的兒茶素, AN38 為無根草的生物鹼成分。

#### 二、 以 HCV 複製子-報導基因系統初步的快速篩選抗病毒藥物

本實驗針對 42 種不同天然與化學半合成之化合物及 24 種常用之中草藥萃取物 (水溶性部分) 進行初步篩選, 處理 HCV 複製子細胞 (Ava5-EG( $\Delta$ 4AB)SEAP) 的時間為三天, 受測純化合物及混合物之濃

度分別為 10 $\mu$ M 及 50 $\mu$ g/ml，之後偵測報導基因 SEAP 活性，其測試原理如附錄一所示。在不影響細胞生長或死亡的條件下，結果發現有兩個純化合物（AN26 及 AN38）及五個中草藥化合物(桂枝、半夏、防風、甘草、五味子)有明顯抑制 SEAP 活性效果，SEAP 活性測試以 AN26 為例（圖一），而抑制效果如列表一所示。其中 AN26 為已知之化學結構且純化的量較多，故優先進行抑制病毒複製確認分析。

### 三、藥物 AN26 抑制 C 型肝炎病毒複製及其細胞毒性測試

為證明 AN26 是否抑制 HCV 病毒複製，必須直接偵測 HCV RNA 含量之變化，於是分別以不同濃之 AN26 (5 $\mu$ M, 25 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 75 $\mu$ M, 100 $\mu$ M, 150 $\mu$ M) 處理三天，將所抽取之 RNA 以病毒 NS5b 片段基因當探針進行北方雜交實驗(Northern blot hybridization)，結果顯示，HCV RNA 含量隨著藥物濃度增加而明顯減少（圖二, A），當濃度為 75 $\mu$ M 幾乎可以完全抑制病毒量。在此同時，也以不同濃度之 AN26 處理細胞，用 MTS 試劑組分析藥物的細胞毒性，結果如圖二, B 所示，當濃度達 250 $\mu$ M 仍未見細胞毒性。綜合以上所述，AN26 值得進一步探討用於藥物治療之可行性及其抑制病毒機轉之研究。

### 四、AN26 相類似衍生物之抗病毒活性測試

AN26 是來自大黃之萃取物，從核磁共振光譜之結構分析得知與市售兒茶素(catechin)相同。兒茶素(catechin)是綠茶主要成分，從文獻得知，其他類 catechin 物質如 EGC(Epigallocatechin)與兩種酯化沒食子酸 (gallic acid): ECG (epicatechin gallate)、EGCG (epigallocatechin gallate)，其中 EGCG 抑制感冒病毒、腺病毒、感冒病毒及 HIV 病毒效果最佳(12-14)。為進一步分析是否這些存於綠茶的成分也有抑制 HCV 效果，於是由 Sigma 購得這些化合物，分別

以 50 $\mu$ M 及 75 $\mu$ M 濃度處理三天，結果顯示，除了 AN26 外，其餘均沒有明顯抑制 HCV 病毒效果(圖三)，顯然抽取自大黃之 catechin 有別於來自綠茶的萃取成分，這是一個有趣的問題，值得就其結構與活性關係進一步進行探索。各個結構見於附錄二。

## 五、病毒標的物活性測試系統建立

本計畫所要建立的病毒標的物活性分析系統分別是 IRES、NS3/4A 蛋白酶及 RdRp 病毒核酸轉錄酶。目前針對 IRES 及 NS3/4A 蛋白酶胞內分析系統已建構完成，結果如圖四、五所示，以短暫基因轉殖或建立基因持續表達細胞株，其基因活性測試均已達成可測定的數值，下一步將可用於高速篩選專一性的病毒標的藥物。RdRp 設計與活性分析系統如圖六所示，目前報導基因質體正建構中，預計 12 月中即可完成活性測試。

## 肆、討論

肝炎可以說是台灣的國病，以 B 型肝炎病毒感染為首位，占總人口數約 15%~20%，C 型肝炎病毒次之，約 2%~4%，而近二十年來，由於新生兒接種 B 型肝炎疫苗，已使台灣 B 型肝炎大幅降低，然而，因 C 型肝炎尚未有疫苗的開發，故 C 型肝炎的防治將成為下一個重要的公共衛生問題。臨床上對 C 行肝炎病毒的唯一的治療方式是以干擾素合併 Ribavirin，但是仍然會有約一半的人治療失敗，包括治療無反應或是復發，再者，C 型肝炎的治療藥物半年醫藥費高達三十萬元，近年來雖已納入全民健保，但仍有其使用資格及治療時程的限制，這些都將形成醫療上的負擔。

台灣民間對於抗病毒性肝炎，常有一些似是而非或無法證實的之

複方或單方，例如南部民眾利用五爪金英與散血草等草藥治療肝炎。而中醫師治療肝病的複方亦有加味逍遙散、四逆湯小柴胡湯、柴胡清肝湯、龍膽瀉肝湯等，這些藥方中的何種成分有抑制 C 型肝炎病毒的效果，實有迫切研究之必要。本計畫即是希望從傳統的中草藥及天然藥物中尋求新的抗 C 型肝炎病毒藥物。首先以本實驗室所萃取出來的 42 種已定出結構的化合物及 24 種常用之中草藥混合的萃取物進行初步抗病毒篩選，這 42 種純化合物中有抗感冒病毒、抗 HIV 病毒及抑制 EBV 病毒活化的藥物，很幸運的，從初步的藥物篩選，找到兩個抑制效果達 50% 的純化合物：AN26 及 AN38；中草藥萃取物則有桂枝、半夏、防風、甘草、五味子。AN26 來自大黃的萃取物，化學結構上與綠茶中的兒茶素 (Catechin) 相同，綠茶中其他重要的兒茶素成分尚有(-)表兒茶素 [(-)EC]、(±)沒食子兒茶素 [(±)-GC]、(-)-表沒食子兒茶素 [(-)-EGC]、(-)-表沒食子兒茶素沒食子酸酯 [(-)-EGCG]、(-)表兒茶素沒食子酸酯 [(-)ECG]，其中以 EGCG 被證實抗病毒(例如腺病毒及 HIV 病毒)效果最好(12-14)。為進一步探討是否在 C 型肝炎病毒也有類式的抑制效果，於是向 Sigma 購得 EGC(Epigallocatechin)、 ECG (epicatechin gallate)、 EGCG 及 (+)Catechin hydrate 進行活性測試，結果令人意外的是，這些來自綠茶的成分均沒有明顯抑制 C 肝病毒複製，只由來自大黃的 Catechin 有很顯著的抑制效果，於是我們再將 AN26 及(+)-Catechin hydrate (sigma) 進行質譜分析，結果所得數據仍是一致的，這是一個有趣的問題，值得繼續就其純化來源及細微結構進行探討。

在中草藥萃取之混和物中，也不乏有抗病毒的特性，例如桂枝有抑菌、抗病毒；甘草有免疫、抗癌作用，抗老、抗氧化作用，保肝、抗潰瘍作用，降血脂、抗凝血作用，抗炎、抗菌、抗病毒等作用，甘

草多糖能誘生  $\gamma$ -干擾素，有免疫調解作用，臨床上可治療消化性潰瘍、病毒性肝炎；五味子製劑則用於治療病毒性肝炎；半夏及防風常用於保肝的複方中。這些未來將進一步確認是否單方可以抑制 C 肝病毒複製，或者以複方的抑制效果較佳，待篩選出最具抑制效果的混和物，則將可繼續分離、純化其有效成分，這個策略可以減少研究人力的浪費，能有效地在短時間找出副作用少之肝藥。

在建立 C 肝病毒細胞感染系統方面，雖然嘗試用 1a, 1b strain 之 RNA 基因體轉殖 huh7B 肝細胞，但未能有病毒子代生產。而與日本 Dr. Wakita 聯繫，希望取得他在 2005 以 2a strain (JFH1) 所研發的細胞感染系統，然因專利的問題，至今已逾三個多月，尚未能取得此系統，除了繼續聯繫合作事宜外，未來必須考慮與臨床醫師合作，自己研發病毒細胞感染系統，雖然這是一件很不容易的實驗。

## 伍、結論與建議

本計畫執行到目前為止時間並不是很長（從五月至十一月），很幸運的，篩選出幾個深具潛力的抗病毒藥物，為了測試 AN26 是否可以改善目前干擾素療法的成效及降低副作用，將繼續分析合併處理的方式，當兩個成分都降低其使用量時，是否有加成的效果，這種治療方式將有助於療效及降低藥物副作用，這些結果將對病毒性肝炎的治療有重大貢獻。此外，未來在中藥的篩選過程中，與臨床中醫師的合作將有助於新藥的開發及病人的治療。為能夠繼續探討藥物的基因體研究，希望能夠有機會再獲得中醫藥委員會的支持與補助。

## 致 謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會(計畫編號 CCMP95-RD-034)提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此致謝。

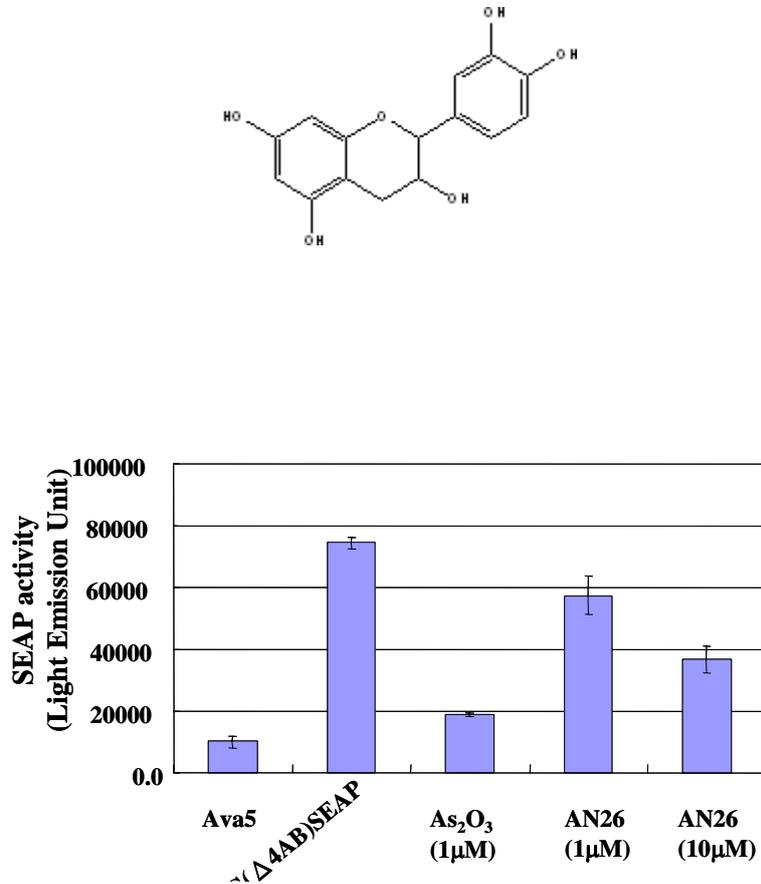
## 陸、參考文獻

1. WHO. Hepatitis C: global prevalence. *Wkly Epidemiol Rec* 72, 341-344. 1997.
2. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001;345:41-52.
3. Poynard T, McHutchison J, Manns M, Trepo C, Lindsay K, Goodman Z, Ling MH, Albrecht J. Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2002;122:1303-1313.
4. Pawlotsky JM. The nature of interferon-alpha resistance in hepatitis C virus infection. *Curr Opin Infect Dis* 2003;16:587-592.
5. Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of the hepatitis C virus. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2000;14:241-254.
6. Bartenschlager R. Hepatitis C virus replicons: potential role for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:911-916.
7. Lee JC, Chang CF, Chi YH, Hwang DR, Hsu JT. A reporter-based assay for identifying hepatitis C virus inhibitors based on subgenomic replicon cells. *J Virol Methods* 2004;116:27-33.
8. De Francesco R, Migliaccio G. Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature* 2005;436:953-960.
9. Hiscott J, Lin R, Nakhaei P, Paz S. MasterCARD: a priceless link to innate immunity. *Trends Mol Med* 2006;12:53-56.
10. Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999;285:110-113.
11. Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 2000;290:1972-1974.
12. Song JM, Lee KH, Seong BL. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral Res* 2005;68:66-74.
13. Weber JM, Ruzindana-Umunyana A, Imbeault L, Sircar S. Inhibition of adenovirus infection and adenain by green tea catechins. *Antiviral Res* 2003;58:167-173.
14. Yamaguchi K, Honda M, Ikigai H, Hara Y, Shimamura T. Inhibitory effects of (-)-epigallocatechin gallate on the life cycle of human

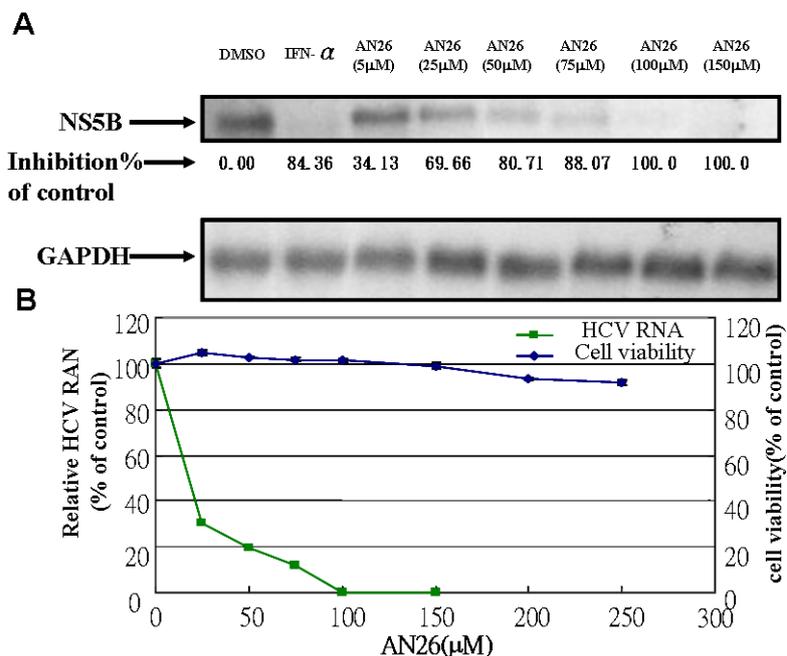
immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Antiviral Res 2002;53:19-34.

15. 急慢性肝炎。行政院衛生署中醫藥委員會出版。89年12月。
16. 常用中藥材圖鑑。行政院衛生署中醫藥委員會出版。95年11月。

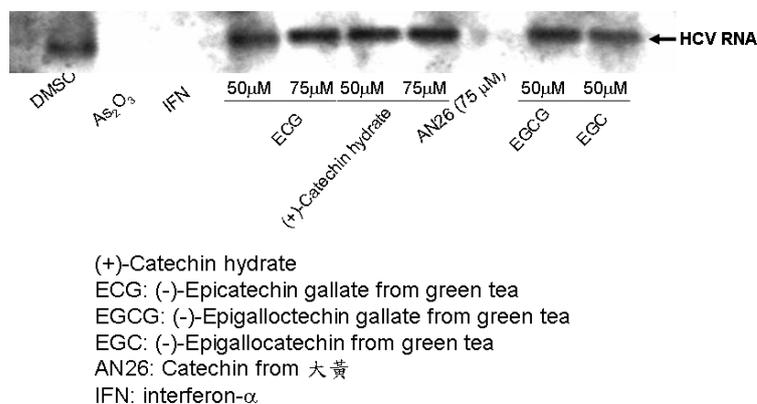
## 柒、圖表



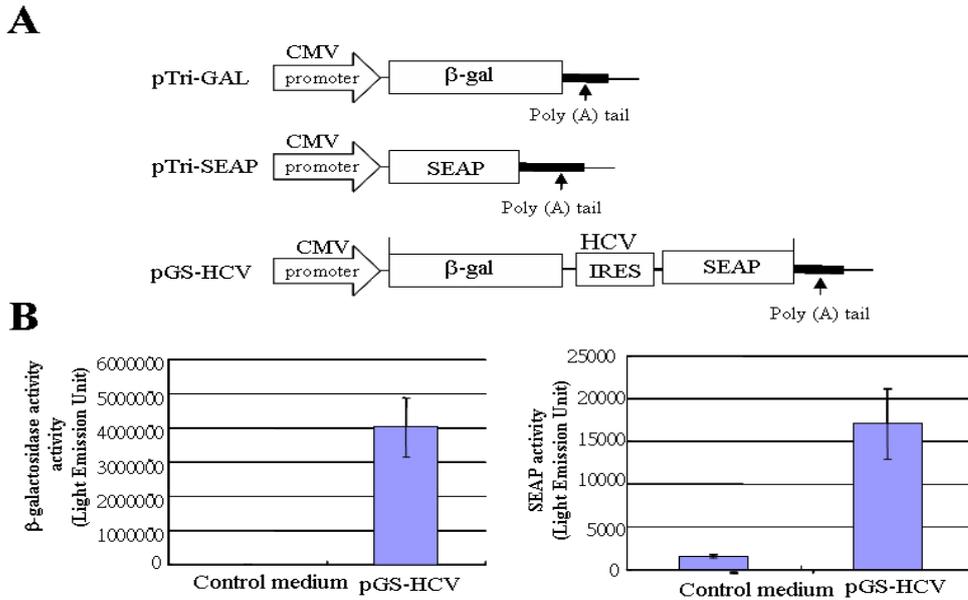
圖一：以 HCV-複製子報導基因細胞檢測 AN26 抗病毒效應。Ava5 是一個含 HCV 複製子的細胞株，Ava5-EG(Δ4AB)SEAP 為一個帶有雙報導基因：EG(Δ4AB)SEAP，其中 Δ4AB 為一段能被 HCV NS3/4A 蛋白酶切除的序列 (DEMEEC-ASHL)。As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 為本次實驗的對照組。處理的時間為三天，之後取培養液進行 SEAP 活性檢測。



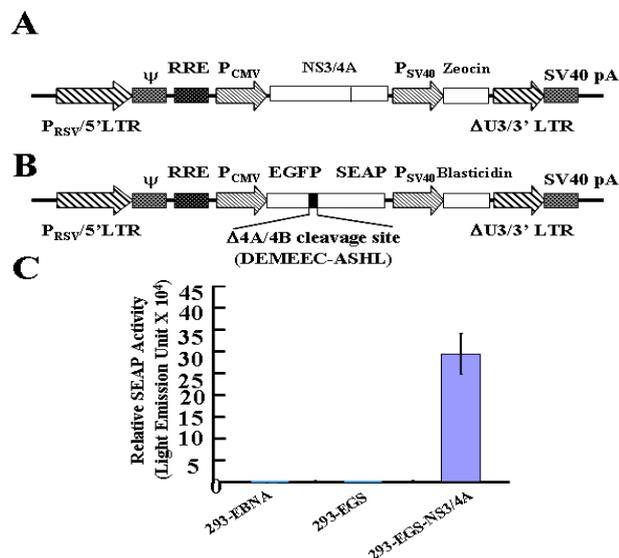
圖二：病毒 RNA 量的分析與細胞毒性測試。A. 以 HCV NS5 基因片段當作探針對藥物處理的細胞進行 Northern Blotting 分析，細胞基因 GAPDH 當作此實驗檢測 RNA 量的對照組。藥物處理濃度如圖所標示。B. 細胞毒性以 MTS 試劑組檢測，處理濃度如圖所標示。藥物處理時間為三天，重複三次實驗。



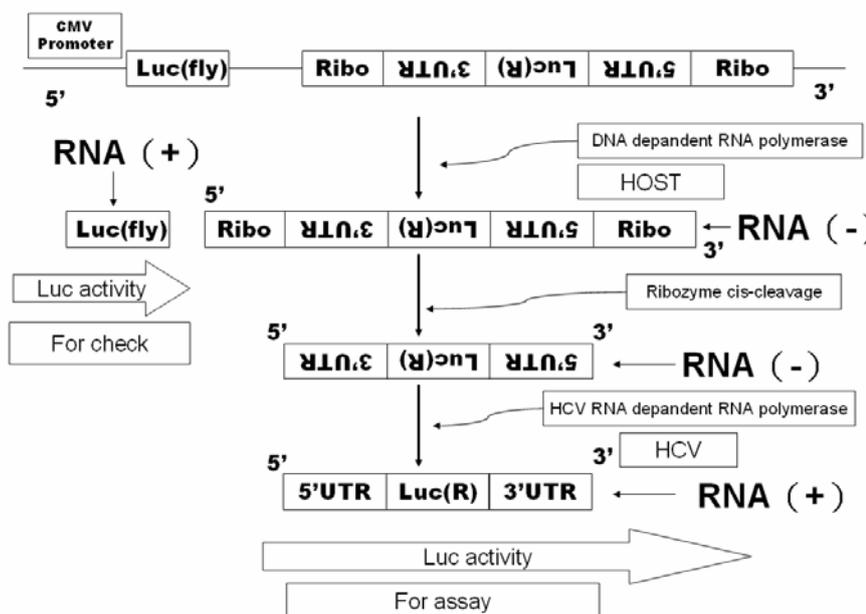
圖三：AN26 及 Catechin 衍生物之抗病毒活性測試。以 Northern Blotting 方法分別檢測不同藥物在不同濃度下 (如圖所示) 抑制 HCV RNA 效果。此實驗以 HCV NS5B 基因片段當檢測探針。



圖四：HCV IRES 構築與活性檢測。A 為構築之載體設計；pTri-GAL 及 pTri-SEAP 分別代表兩個報導β-galactosidase 及 SEAP 之對照載體。pGS-HCV 為一雙效載體(bi-cistronic)，由 CMV 病毒啟動子控制 β-galactosidase -IRES-SEAP RNA 表現。B 為與對照的細胞培養液比較之β-galactosidase 及 SEAP 活性。檢測的時間為基因轉殖 Huh7B 後 48 小時收取樣品。實驗重複三次。



圖五：HCV NS3/4A 蛋白酶活性之檢測系統。A, B 分別代表 NS3/4A 及其雙報導基因之構築載體。C 為將上述兩個載體轉殖至 293-EBNA 細胞，建立基因持續表現細胞株，細胞培養三天之後，取培養液進行 SEAP 活性檢測。293-ENBA 代表原始母細胞；293-EGS 中的雙報導基因間並沒有 NS3/4A 蛋白酶切位，當作此次實驗對照組。



圖六：HCV RdRp 核酸聚合酶檢測系統之設計與原理。報導基因(Luc(R) )兩端接上 HCV 的複製序列：3'UTR 及 5'UTR。為讓轉錄之後之 RNA 複製序列顯現，在兩端會自切的 ribozyme 序列。首先由 CMV 病毒啟動子利用細胞之核酸聚合酶轉錄負補股的上述之 RNA，接著由病毒 RdRp 核酸聚合酶接負股 RNA 複製成正股 RNA，最後由 5'UTR 內的 IRES 轉譯 Luc(R) 蛋白質進行活性檢測。其中接於 CMV 後之 Luc(Fly) 當作轉錄效率檢測。

表一：以 HCV 複製子-報導細胞株進行的藥物初步篩選。

化合物名稱或編號	使用濃度	抑制百分比	細胞毒性 (初步細胞型態之觀察)	備註
IFN- $\alpha$ (干擾素)	100unit/ml	84.0%	-	
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (砒礬)	1 $\mu$ M	85.4%	-	
New compound from 白樹子	10 $\mu$ M	46.0%	-	
Ovataodiolide	10 $\mu$ M	-12151.0%	+++	
Ursolic acid	10 $\mu$ M	-59.0%	-	
Oleanolic acid	10 $\mu$ M	-88.4%	-	
Bockioside B	10 $\mu$ M	-56.0%	-	
Coumarin acid	10 $\mu$ M	-15.0%	-	
4-methoxychalcone	10 $\mu$ M	19.0%	-	
2-(4-methoxy-phenyl)-chroman-4-one	10 $\mu$ M	20%	-	
Cleroda-3,13E-dien-15-oic acid		29%	-	
Goniothalamine	No test	-	-	
$\beta$ ,17-diacetoxy- <i>ent</i> -kauran -19-oic acid	10 $\mu$ M	3%	-	
Cyclohexylamine-HCl	10 $\mu$ M	-34%	-	
Zeylanidine-A	10 $\mu$ M	16%	-	
Zeylanidiine-B	10 $\mu$ M	-35%	-	
Artabotryside B	10 $\mu$ M	28%	-	
Bergenine	10 $\mu$ M	9%	-	
3,4,5-trihydroxy- Benzoic acid methyl ester	10 $\mu$ M	40.0%	-	
2-hydroxymethyl-6- (3-hydroxy-5-methyl-phenoxy) -tetrahydro-pyran-3,4,5-trio	10 $\mu$ M	22.0%	-	
Penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucoside	10 $\mu$ M	33.0%	++	
Quercetin	10 $\mu$ M	27.0%	-	
Rutin	10 $\mu$ M	23.0%	-	
10b-hydroxy-6b-methoxy furaneremophilane	10 $\mu$ M	16.0%	-	
Norchelerythrine	10 $\mu$ M	12.0%	-	
Adenosine	10 $\mu$ M	68.0%	+++	
Xanthiazone	10 $\mu$ M	52.0%	-	*
AN26	10 $\mu$ M	58.1%	-	*
Naringene	10 $\mu$ M	-7.0%	-	
Euphol	10 $\mu$ M	34.0%	-	
3,3',4'-trimethoxyellagic acid	10 $\mu$ M	-14.0%	-	
Protoapigenone	No test	-		
Kaokusaginine	10 $\mu$ M	32.0%	-	

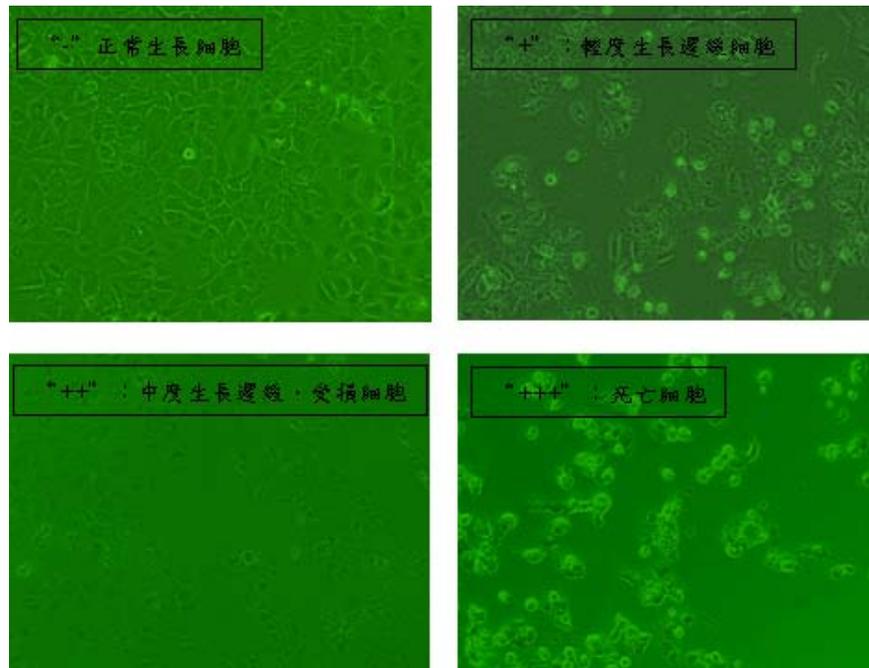
Samarcandin	10 $\mu$ M	-21.0%	-	
Neveskone	10 $\mu$ M	-30.0%	-	
Polythi;onon	10 $\mu$ M	19.0%	-	
New compound	10 $\mu$ M	-22.0%	-	
Foetidin	10 $\mu$ M	-69.0%	-	
4-hydroxywithanolide	10 $\mu$ M	77.2%	+++	
AN38	10 $\mu$ M	60.2%	-	*
AN39 similar to AN28	10 $\mu$ M	63.7%	+	
AN40 similar to AN38	10 $\mu$ M	37.5%	+	
PPEAM	10 $\mu$ M	-56.0%	+	
FM2-4-1	10 $\mu$ M	9.0%	++	

中藥粗萃取物	使用濃度	抑制百分比	細胞毒性 (初步細胞型態之觀察) <sup>註1</sup>	備註 <sup>註1</sup>
白芍藥	50 $\mu$ g/ml	64.2%	-	
杜仲	50 $\mu$ g/ml	56.5%	-	
枇杷葉	50 $\mu$ g/ml	65.0%	-	
桂枝	50 $\mu$ g/ml	82.7%	-	*
防風	50 $\mu$ g/ml	50.0%	-	*
甘草	50 $\mu$ g/ml	70.0%	-	*
陳皮	50 $\mu$ g/ml	53%	-	
當歸	50 $\mu$ g/ml	49.0%	-	
麻黃	50 $\mu$ g/ml	72.7%	-	
紅花	50 $\mu$ g/ml	46.4%	-	
半夏	50 $\mu$ g/ml	65.0%	-	*
大棗	50 $\mu$ g/ml	39%	-	
茯苓	50 $\mu$ g/ml	38.3%	-	
山藥	50 $\mu$ g/ml	59.4%	-	
桔梗	50 $\mu$ g/ml	43%	-	
黑棗	50 $\mu$ g/ml	35%	-	
熟地黃	50 $\mu$ g/ml	28%	-	
生地黃	50 $\mu$ g/ml	42.0%	-	
天門冬	50 $\mu$ g/ml	35%	-	
麥門冬	50 $\mu$ g/ml	48.6%	-	
黃耆	50 $\mu$ g/ml	30%	-	

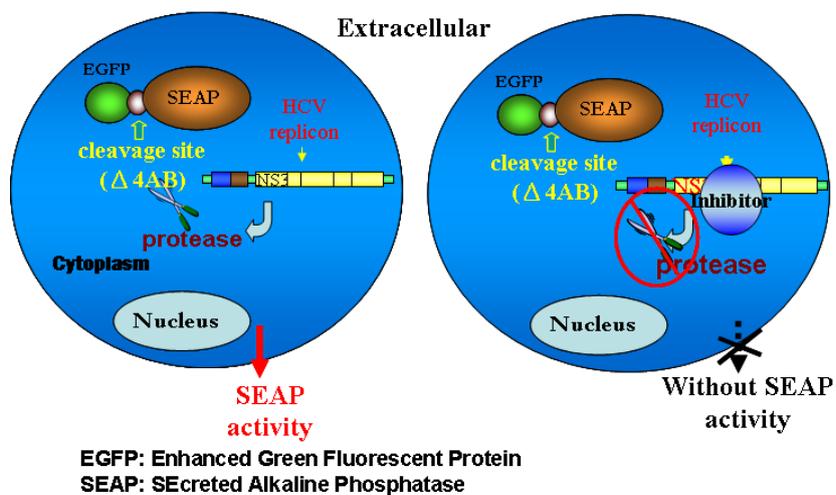
生脈散	50µg/ml	45.8%	-	
五味子	50µg/ml	59%	-	*
人參	50µg/ml	35.6%	-	

註 1：細胞毒性：與無藥物處理之細胞的型態及生長觀察比較，”-“ 代表細胞型態、生長正常，”+” 代表輕度細胞型態損傷、生長遲緩，”++”代表中度細胞型態損傷、生長遲緩，”+++”代表重度細胞型態損傷-細胞死亡。

註 2：“\*” 代表較具抑制病毒複製潛力。



附錄一：HCV 複製子-報導細胞株的篩選抑制劑原理



附錄二：綠茶酚中各個成分之結構圖。取自 Antiviral Research 68 (2005) 66–74

