

編號：CCMP97-RD-112

三黃瀉心湯及相關成分抑制 A 型流行性感冒病毒及呼吸道融合病毒複製及誘導免疫機轉探討之體外研究(2-2)

林俊清
高雄醫學大學

摘 要

本研究目標乃從生命科學發展迅速的分子生物學理論與傳統中國醫藥方劑之作用相互配合，深入探索其抗病毒之活性機轉，如此不僅可增加西方醫學對中國醫藥作用的接受度，並賦與中國醫藥複方藥效的現代化意義。病毒感染目前為威脅人類健康的頭號敵人，雖然全世界各國都投入大量的資源進行研究，但目前仍有許多困難仍需克服：其中包括許多臨床藥物不能完全殲滅病毒傳染。再者，對於一些具高度突變的病毒會發展出高度的抗藥性，造成治療的失敗。因此，本研究將測試三黃瀉心湯對 A 型流感病毒是否具有良好抑制作用，以突破目前臨床抗病毒藥物不足之窘境與解決抗藥性病毒問題。

藥物對細胞增生的抑制活性，抗病毒活性試驗，抑制病毒繁殖的劑量與時間效應，抑制病毒融合作用，抑制病毒吸附試驗與抑制病毒穿透試驗以 XTT 方式測得。藥物對病毒去活化試驗由病毒痘斑試驗測得。而藥物對免疫同控分析由 RT-PCR 法測得。除此之外，抑制病毒蛋白分析以免疫螢光分析法測得。

本研究中以三黃瀉心湯及其組成生藥黃芩、黃連、大黃之甲醇和水提取物等 8 種萃取物，及大黃與黃連所含之 4 種相關成分，在體外測試是否有抑制狗腎細胞(MDCK)作用。結果發現，粗抽物其 CC_{50} 皆在大於 400 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度，對細胞並沒有增生抑制與影響細胞生長效果。而三黃瀉心湯抗流感病毒的 IC_{50} 為 50.2 $\mu\text{g/ml}$ 。又在三黃瀉心湯相關組成藥物裡面發現，大黃醇抽與黃連醇抽對病毒都有很好的抑制作用，其 IC_{50} 分別為 59.8 與 20.8 $\mu\text{g/ml}$ ，且以黃連醇抽物對病毒的作用最好，而黃連所含相關純品(berberin 與 coptisine)其 IC_{50} 分別為 12.5 及 1.5 $\mu\text{g/ml}$ ，以黃連鹼(coptisine)對病毒的抑制最好。

且利用免疫螢光分析三黃瀉心湯、黃連及黃連鹼對病毒融合蛋白的影響發現，此藥物對病毒有明顯抑制作用。除此之外，在藥物抑制病毒時間點發現，黃連醇抽在病毒感染前加入病毒、感染同時加入病毒或是病毒感染後加入發現，三

黃瀉心湯、黃連及黃連鹼對病毒同時感染及感染後有良好的抑制活性。從此初步結果推測，三黃瀉心湯之所以對病毒同時感染有良好作用或許與黃連醇抽物及黃連鹼有關，但作用機轉是否與誘導免疫反應、病毒去活化、影響病毒吸附、穿透或結合有關而作探討。實驗結果發現，三黃瀉心湯、黃連及黃連鹼對病毒的作用機轉與誘導干擾素- α/β 、去活化病毒及影響穿透無關，但卻可明顯影響病毒與宿主細胞的結合。

綜合種種的研究發現，三黃瀉心湯與相關成分對 A 型流感病毒具有良好抑制作用，由於在病毒感染同時及感染後皆有明顯療效，表示此藥物具有治療作用。建議此後可以進一步發展為臨床藥物。

關鍵字：三黃瀉心湯、A 型流感病毒、呼吸道融合病毒

Number: CCMP97-RD-112

The Mechanism of the Inhibitive Replication and Inducible Immunization of San-Ou-Say-Sin-To and its Related Ingredients in Influenza A Virus and RSV in vitro (2-2)

Chun-Ching Lin

Kaohsiung Medical University

ABSTRACT

According to the data from epidemiology, pandemic can influenza take place on average every 10 years. The medicine for treatment does not apply using on clinic at present. In addition, influenza A virus also makes the serious pneumonia easy to infect with of child, teenagers or old people amalgamate disease and cause losses of social economy. So, the research and prevention and control of the epidemic influenza virus, are also taking very important role in public hygiene. The host range of influenza A virus is relatively wide, including the mankind, horse, pig and birds. Our laboratory focuses on the integration of traditional Chinese traditional medicines (CTM) with molecular biology to further study the active mechanism their anti-viral activity. This allows a better appreciation of CTM in the modern era and also a better understanding of its underlying potential for therapy, thus increasing its acceptance in Western medicine.

Cell proliferation inhibition, antiviral assay, viral replication, viral inactivation, viral attachment and viral penetration were assay by XTT and plaque assay. Viral inactivation used plaque assay. Besides, viral protein was detected by immunofluorescence and immune expression was detected by RT-PCR.

Our study reports here for the first time the antiviral effect of SOSST in upper respiratory tract virus influenza A virus. The results indicated that SOSST and associated crude extract or pure compound successfully inhibited influenza A virus infection in MDCK (Monkey kidney epithelial cell) without significantly affecting cell viability and growth. Interestingly, our initial results from the time-of-addition studies indicated that SOSST, CC (M) and coptisine could inhibit IFA infection whether added

at times of infection (0 h), or post-infection (1 to 4 h). Base on the result, we hypothesize that SOSST, CC (M) and coptisine maybe inhibited viral inactivation, viral attachment, penetration or immune responsion. The data showed that SOSST, CC (M) and coptisin could not inhibit the IFA inactivation, penetration and immune reaction. However, SOSST, CC (M) and coptisine could inhibit the IFA to target cells.

Together, these results suggested that SOSST possesses antiviral activities that can interfere with IFA infection, including directly averting viral attachment (preventive effect). The antiviral mechanisms observed along with its low cytotoxicity level and high selectivity at effective concentration, suggest that the use of SOSST as direct or supportive treatment for IFA infection merits to be developed.

Keywords: *San-Ou-Say-Sin-To*, Influenza A virus, RSV

壹、前言

本計畫依據行政院衛生署中醫藥委員會九十六年研究重點，研究項目、8-1；研究目的為將生命科學發展迅速的系統生物學與中國醫藥之作用相互配合，如此可增加西方醫學對中國醫藥作用的接受度，以達中國醫藥現代化的目標，並將中國醫藥推廣到世界各國，進一步促進全球人類的健康。

三黃瀉心湯為中國傳統之方劑，是由黃芩、黃連、大黃所組成，出自於漢代醫家張仲景〈金匱要略〉。在傳統使用上，主治血壓高、逆上、頭暈、神經質、不眠、不安、心部痞塞感、便秘、神經衰弱、胃潰瘍、胃酸過多、及其它胃腸系疾病、心氣不足、心內火盛、迫血妄行、吐血、咯血、便血、便秘溲赤，或口舌生瘡、口苦咽乾、黃疸痞滿、外科癰腫等。其組成藥物黃芩、黃連、大黃也都具有抗病毒之活性。

A 型流行性感感冒病毒(Influenza A virus)是一種有外套膜包含單鏈 RNA(ssRNA)的病毒，是 *Orthomyxoviridae* 病毒屬。RNA 聚合酵素由 PB2、PB1 和 PA 形成，用作複製 RNA。它與 RNP 連接著，具有核酸內切酵素的活性。NS1 和 NS2 蛋白具有調整作用，用以促進病毒成份在被感染細胞內的形成。病毒的表層為一雙層脂肪膜，來自生產病毒的細胞。膜上有著由 HA，NA 及 M2 蛋白組成的突出物。該脂肪膜包圍著由 M1 蛋白組成的間質。A 型流行性感感冒病毒表面具有兩各主要蛋白血球凝集素 haemagglutinin (HA)及神經氨酸酶 neuraminidase (NA)，其功能主要幫助病毒吸附及穿透進入細胞內。NS1A binding protein 是流感病毒表面的一種非結構蛋白，有兩種主要特性，其一幫助流感病毒突變使病毒產生多樣性，其二會經由影響 Interferon regulation factor (IRF-3)表現進而抑制 JNK 而影響 INFalpha/beta 免疫反應[1]。由於流感病毒就有八段單獨存在的 RNA，所以大約每隔一至兩年就會突變一次產生區域性的流行，而每隔十年的突變就會產生全球性的大流行，且臨床藥物往往不敷使用，所以發展抗病毒藥物是目前刻不容緩急需去執行之事。

根據流行病學的探討，常見的流行性流感冒病毒的類型有 A 型、B 型及 C 型三種，流行性感感冒是孩童、青少年以及老年人最常見的上呼吸道病毒性傳染性疾病，大約每隔十年左右便會發生一次世界性的流行性感感冒大流行；且目前在臨床上治療用藥早已不敷使用。除此之外，流行性感感冒病毒亦使得孩童、青少年或老年人容易感染嚴重的肺炎合併症，而造成社會經濟的損失；因此，流行性感感冒病毒的研究與防治工作，在公共衛生學上

亦佔著很重要的角色[2-6]。通常流行性感冒在每年的秋冬交際開始，然後在冬季快速的傳播開來，但在東南亞及台灣地區，夏季亦有流行性感冒個案的發生[7,8]。

目前來說，最重要已被確定的流行性感冒有三種類型，即 A 型、B 型及 C 型，而此三種不同類型的流行性感冒所呈現的臨床症狀大同小異大，只是個別症狀輕重程度不一。B 型流行性感冒病毒能從人類身上分離出來，而 C 型流行性感冒病毒則存在於豬的個體上，至於 A 型流行性感冒病毒的宿主範圍較廣，其中包括人類、馬、豬以及鳥類。

由於 A 型流行性感冒病毒較易引起世界性大流行，因此在預防醫學上，A 型流行性感冒較 B 型、C 型受到重視[9-11]。流行性感冒是經由呼吸道飛沫所傳染的，其病毒潛藏在呼吸道中，極少移走到血液或其他器官，而病毒本身首先會附著在呼吸道的上皮細胞，並進行生長繁殖與複製，造成上皮細胞的傷害，並使得黏膜纖毛細胞受到侵襲，使得清除病原體的能力降低[6,12]，而出現一連串相關的上呼吸道症狀，其典型症狀包括有突發性的體溫上升，嚴重的肌肉脛骨疼痛、頭痛甚至出現畏寒的現象，某些罹患者會伴隨著流鼻水、咽喉痛以及咳嗽；假若罹患個體是孩童或青少年，則或許會出現發燒、腹瀉、嘔吐以及腹痛的現象，某些較少見的症候包括有嚴重哮喘(尤其是 A 型流行性感冒病毒的感染)、氣喘的惡化、肌肉炎(尤其是小腿肌肉)、心肌炎、腮腺炎甚至腦病變以及腎炎[2,8]。病毒感染是氣喘喘鳴或惡化之最重要及最常見之因素。雖然臨床上有喘鳴症狀者不一定是氣喘患者，但是二歲以下之嬰幼兒常因感染呼吸融合病毒或副流感病毒而有喘鳴之細支氣管炎(症狀：喘鳴、呼吸急促、肺充氣)。另外，所謂一般感冒病毒、鼻病毒、冠狀病毒，會使氣喘患者之喘鳴增加，但不誘發氣喘。而流感病毒和呼吸融合病毒都會破壞呼吸道表皮細胞，而影響其功能及呼吸道平滑肌。

目前臨床上用來治療流感病毒的藥物如：Amantadine、Rimantadine 及克流感，其藥物大多作用在病毒的表面蛋白如：M1、M2 等等。期刊發表研究顯示，近十年受具抗 amantadine 及抗金剛乙胺(Rimantadine)性的 H3N2 病毒之感染個案不斷上升。報告指出，在 1994-2005 年間，收集了全球 7,000 個 A 型流感病毒樣本，而對 Amantadine 及金剛乙胺(Rimantadine)出現抗藥反應的由 0.4% 升至 12.3%[13]。再者，由南韓、台灣、香港及中國所收集病毒樣本，當中的抗藥反應竟分別為 15%、23%、70% 及 74%。最近，美國從病人身上抽取 H3N2 流感病毒化驗，發現病毒中 M2 蛋白的胺基酸 31 位置出現變異，而這位置就是產生對 Amantadine 及金剛乙胺(Rimantadine)抗藥

性。基於以上原因，美國疾病控制中心建議在 2005-06 年度以下的流感季節不要採用 Amantadine 及金剛乙胺(Rimantadine)作治療及預防流感用途[13]。在臨床試驗中，服用抗病毒藥物大多會出現一些副作用如頭暈、嘔吐、厭食、口乾及中樞神經徵狀(失眠、頭昏、神經緊張)。還有一些較少見的不良徵狀(0.3 to 1%)，如肚瀉、消化不良、不能集中精神、動作機能不協調、嗜睡、狂躁、抑鬱、出疹、耳鳴及氣喘[14]。由於抗病毒藥物會產生抗藥性及副作用，因此，開拓篩選新抗病毒藥物之領域仍需不斷努力。

呼吸道融合病毒 (Respiratory syncytial virus 簡稱 RSV)，是一種有外套包含單鏈 RNA 病毒，屬於 *Paramyxoviridae* 科，*Pneumovirus* 屬，RSV 的基因組成大約含有 15,200 nucleotides 單股 negative sense RNA 病毒。可區分為亞型 A 和 B，亞型 A 的臨床表現較亞型 B 來得嚴重。

RSV 含有 3 種表面糖蛋白：F 蛋白、G 蛋白和 SH 蛋白；F 蛋白，跟病毒結合(binding)及進入(entry)細胞有關；G 蛋白，跟病毒附著(attachment)到細胞有關係，F 蛋白、G 蛋白都可以增加病毒感染細胞。SH 蛋白，到目前為止對此蛋白的功能了解並不清楚。Nucleocapsid protein 包括有：nucleocapsid protein (N protein)，phosphoprotein (P protein)，M2-1 protein，M2-2 protein，M1 protein，NS-1 protein，NS-2 protein 等[15-17]。RSV 感染後會活化 NF- κ B，接著活化 pro-inflammatory cytokines 和 chemokines，例如：IL-1、IL-8、RANTES 等，引起過敏反應[18]。

呼吸道融合病毒在 1957 年首度被提出來，是因為在培養時會導致產生巨大的融合細胞，因此被命名[19]。呼吸道融合病毒在流行季節，小於 1 歲的嬰幼兒因細支管炎或肺炎而住院的病患中，RSV 是引起細支氣管炎及肺炎的主要原因，而且此病毒已經被認定是主要引起全球嬰幼兒嚴重呼吸道感染的主因，RSV 通常發生在出生後的六星期到 2 歲之間（少見於小於一個月的嬰兒），潛伏期約二~四天，會造成嚴重的細支氣管炎及肺炎[20]。兩歲以上的幼童已感染過 RSV，不過之前得到感染，並不能完全避免再度感染[20,21]。感染方式可藉由飛沫或直接接觸患者的分泌物傳染。除此之外，RSV 也是造成五歲以下的嬰幼兒、先天心臟病、慢性肺部疾病、骨髓移植的病人或者是免疫功能不全的病患死亡常見病原[15,16]。

RSV 難以治療及預防的原因是因為 RSV 為 RNA 的病毒，具有高度的變異性，主要是 RNA 病毒缺乏 proof-reading 的機轉，導致在研發疫苗上遇到相當大的挑戰[22,23]。世界衛生組織(WHO)在 2001 年發表的報告中指出，RSV 會引起 18,000-75,000 住院病人的感染，而且每年會造成 1900 人的死亡，根據 CDC 對全球的推斷，年齡大的感染人數是嬰幼兒感染人數的

四倍，每年大約 2.4 到 4 百萬人會被感染，因此 RSV 被指定為主要治療及研究的目標[24]。目前世界各國紛紛投入研究抑制 RSV 感染，除了開發合成新的藥物之外，也積極在傳統生藥以及自然界中找出有效並且具有安全性的藥物，例如在 1985 年 Kaul 氏等人發現 quercetin 以及 hesperetin 會減少 RSV 在細胞內複製，而 catechin 可以抑制 RSV 的感染[25]；在 1993 年，Barnard 和 Wyde 等人發現天然的多酚類聚合物(polyphenolic polymer)具有抑制 RSV 的活性[26]；Roccatagliata 等人在 1996 年發現從天然植物所得的硫化固醇類(sulfated steroids)具有抑制 RSV 的活性[27]；1998 年，Kernan 等人所發表的論文中指出，來自東非的天然植物 *Markhmi* *lutea* 所得的 phenylpropanoid glycosides 具有抑制 RSV 的活性[28]；同年，Chen 氏等人從 *Barleria prionitis* 所得的環烯醚類(iridoids)具有抑制 RSV 的活性[29]；除了以上所提到的生藥具有抑制 RSV 之外，在 2002 年，Ma 氏等人，發現中國傳統生藥黃芩所含成分 wogonin 具有抗 RSV 的效果[30]，因此選用含黃芩之藥方進行抗 RSV 之研究。

目前雖然有許多抗病毒藥物已陸續被有效使用於臨床上，但近年來抗藥性病毒也日見浮現。抗藥性產生之原因主要是病毒之基因產生突變而使得抗病毒藥物喪失其作用之標的物所致。例如 Influenza A virus 之 M2 蛋白基因突變，則會對 amantadine 或 rimantadine 產生抗藥性[31]。治療 RSV 所用臨床上常用的藥物：Ribavirin (Viraxzol)鼻噴劑，是廣效性抗 RNA 病毒的藥物[32,33]，作用為干擾病毒早期的轉譯時的核糖蛋白的形成，使病毒無法完成後續的複製機轉。例如：抑制病毒的 polymerase、抑制 RNA 的合成和抑制 IMP dehydrogenase 導致細胞內 GTP 量的減少[34]。然而有文獻指出 ribavirin 會引起溶血性貧血(hemolytic anemia)，而且價格昂貴，因此需要找出更符合大眾使用的藥物[35]。免疫療法—Palivizumab (Synagis)，目前雖然使用的普便性不高，但是已經有研究人員開始針對 RSV 抗藥性作相關研究，研究結果顯示雖然不具有抗藥性，但可能仍是一大隱憂[36]。

干擾素(Interferon)是一種蛋白質，當人體在遇到病毒侵入時，會自動產生。它是人體內對抗病毒入侵的最快反應部隊，當體內干擾素製造不足時，會增加疾病感染的嚴重性。干擾素主要分成三大種類： α 、 β 、 γ [37-39]。干擾素可調節輔助性 T 細胞及抑制性 T 細胞增加免疫系統毒性 T 細胞對感染細胞的確認，並予以殲滅。干擾素也會影響第一型主要組織配合複合體在肝細胞的表現，進而促使殺手型 T 細胞對病毒抗原的成功辨認及反應。干擾素可增進自然殺手細胞的活性並加強吞噬細胞的吞噬作用。這其中於癌症免疫治療領域中，最受重視的當屬 interferon-alpha。干擾素與細胞表面接

受器接觸後，刺激細胞產生 2'-5'-oligoadenylate synthetase、ds RNA-dependent protein kinase、MX protein 等。這些產物會抑制病毒蛋白的合成、抑制病毒核酸密碼的轉錄及分解病毒 RNA 的核酸。目前在臨床上 B 型及 C 型肝炎病毒感染時，會投與針劑干擾素的治療且效果通常很顯著[40]。但已知對干擾素製劑過敏、嚴重的心臟病、嚴重的肝、腎或骨髓功能不良、癲癇及/或中樞神經系統功能受到傷害及伴有進展性代償力消失之肝硬化的慢性肝炎皆不能投與干擾素治療[41]。除此之外，干擾素治療也會產生大小不一的副作用如：感冒般的症狀：發燒、疲倦、畏寒、頭痛、肌肉酸痛、食慾不振等。所以如果能從傳統方劑或生藥中尋找可以誘發干擾素的藥物，不但可以自行誘導免疫反應產生干擾素對抗病毒感染還可以減少外在投與干擾素所產生的副作用。但由於在流行性感冒病毒非結構性蛋白質 1(NS1)會躲避和對抗 IFN α/β 反應。NS1 可以隔離病毒 dsRNA 防止由細胞感應器識別病毒而躲避 IFN α/β 釋放[42,43]。干擾素調節因子(Interferon regulation factor; IRF-3)是干擾素的主要調控分子，一般正常狀態存在於細胞質中，屬於非活化的 IRF-3。但是當有病毒感染時，會使 IRF-3 磷酸化而進入細胞核內經由 JNK/STAT-1 pathway 而誘導干擾素產生，進而消滅病毒減少細胞損傷[37,44,45]。

有鑑於此，本實驗主要研究方向為，解析三黃瀉心湯和相關成分抗病毒的作用機轉。以此基礎研究結果提供臨床使用。

貳、材料與方法

一、傳統中藥方劑之組成及來源

三黃瀉心湯《金匱要略》

黃芩 8g、黃連 8g、大黃 8g

二、三黃瀉心湯之製備

(一)預計萃取三黃瀉心湯粗萃物(aqueous extract)，使用方法如下：將所買到之生藥，秤取 100g 以水抽方式加 1000ml 二次水，煮沸，連續煮兩個小時後，再以紗布及濾紙過濾水煮液二次；或是將所收集之生藥加入 99% 甲醇 1000 ml，裝上回流管煮一個小時後，再以紗布及濾紙過濾萃取液二次；來獲得萃取液後，再以減壓濃縮方式濃縮萃取物，最後以冷凍乾燥製備成生藥粉末，計算產率。分別放入瓶內且置於微電腦除濕保管箱，以備每次實驗所需。

(二)黃連 fractions 的萃取分離方法

100 g 黃連加入 800 ml MeOH 加熱迴流 2 小時，萃取兩次合併萃取液過濾、真空濃縮抽乾後，粗萃物以水與乙酸乙酯進行 partition，分離後濃縮抽乾並冷凍乾燥後，獲得水層 10.2 g 與乙酸乙酯層 2.4 g。乙酸乙酯層以 silica gel 進行管柱層析，分別以 *n*-Hexane、acetone 與 methanol 逐步調高極性進行層析，共獲的 9 個 fractions (如表一)。

三、三黃瀉心湯抗病毒之分子機轉研究

(一)細胞培養

人類喉頭癌細胞 Hep2 和狗腎細胞 MDCK 培養於 DMEM 培養液中。其含 10% 牛血清(Fetal calf serum)及含 100units/ml penicillin G、100 μ g/ml streptomycin 和 0.25 μ g/ml amphotericin B，培養在 37 $^{\circ}$ C 與 5% CO₂ 的培養箱內。每三天更換一次培養基溶液，當長至培養瓶單層長滿(confluent)，便做繼代培養(subculture)。實驗期視實驗目的，以血球計數器計算細胞數，再取細胞數目作分析。

(二)病毒的培養

在抗病毒活性試驗中，以流行性感冒病毒(influenza virus)和呼吸道融合病毒(Respiratory syncytial virus)來測試抗病毒活性。首先將 MDCK 和 Hep2 細胞培養於 75T 培養瓶後，加入 10ml 含 10% FCS 的 DMEM 的 medium 培養三天。細胞數約八分滿時，倒掉 medium 後以 PBS 沖洗掉培養基可能含有的 antibody 後再加入

1000 μ l (1ml) 之病毒液及 5ml 的不含 FCS 的 DMEM 進行感染 1 小時。然後，再加入 2ml 的 10% FCS 與 8ml 的無血清 DMEM (血清最後含量為 2%) 培養基，於 5%CO₂ 之 37°C 培養箱培養一至三天，其間均需每天觀察是否有細胞病變(Cytopathic effect, CPE)的現象產生。當細胞不再附著並呈懸浮狀態達 75%時，再進行物理性方法收集病毒。首先將含有病毒液之 flask 置於-20°C 冷凍櫃冷凍 30 分鐘，再置於水中 5 分鐘解凍，重複 3 次，此方法可將細胞膜打破，釋出病毒。將含有病毒之 medium 收集到離心管內，以 470g (1500 rpm)，4°C 離心 15 分鐘，收集含有病毒之上清液，而後分裝至冷凍瓶 (每瓶裝約 300-500 μ l)，置於-70°C 冷凍櫃保存，以供將來進行病毒定量及抗病毒活性測試。

(三)病毒的定量

定量病毒的 TCID₅₀ (50% tissue culture infective dose): MDCK 細胞加入 5 ml PBS 將殘餘的牛血清洗掉後，加入 5-6 滴的 1% trypsin 放入培養箱 3-5 分鐘使附著的細胞脫落，再加入 2-5 ml PBS，收集倒入 15ml 之離心管，經由 220g (1000 rpm)離心 5min 後，倒掉上清液，沉澱細胞加入 5ml 含 2%FCS 的 DMEM 震盪使細胞分散均勻，取 10 μ l 至細胞計數盤計算細胞數。加含有 2%FCS 的 DMEM 調整 MDCK 細胞數至 1.0×10^5 cells/ml，混合均勻後，每孔加入 100 μ l 的細胞液到 96 孔盤內，於 37°C 的 5% CO₂ 培養箱培養一天後；將病毒原液連續稀釋 ($10^{-1} \sim 10^{-10}$) 後，從每種濃度的病毒液取出 100 μ l 加到 96 孔盤的每一孔內，每一個稀釋濃度作四重複，於 37°C、5%CO₂ 培養箱培養三天，其間觀察細胞感染病毒後之細胞病變現象 (CPE) 之變化，並經過 3 天後計算有 CPE 百分比。其 CPE 觀察結果為利用細胞對照組及病毒感染實驗組相互對照判斷，而計算方式是參考 Reed and Muenc 的方法算出比例距(proportionate distance, PD): $PD = (> 50\% \text{ 死亡率} - 50\% \text{ 死亡率}) / (> 50\% \text{ 死亡率} - < 50\% \text{ 死亡率})$ 。再以 log 值運算求出 TCID₅₀，1 單位 TCID₅₀，表示有 50%細胞被感染而產生細胞病變的病毒濃度。本研究各病毒採用之 TCID₅₀ 量是選用會造成無抗病毒藥處理之病毒對照組，與無病毒和測試藥之細胞對照組比較下，OD₄₉₂ 吸光值減少 50%之值[46]，故進行抗病毒活性測試時所用病毒濃度為，IFA 用 100 TCID₅₀。

(四)細胞增生抑制作用分析

XTT(sodium3'-[1-(phenylamino-carbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate)方法測定原理是利用細胞內粒線體上的脫氫酵素(dehydrogenase)，可將四錯鹽(tetrazolium salt)還原反應產生一水溶性、無毒性、橘紅色螢光的Formazan之現象。先處理細胞將之種於96Well內使得每一Well最終為 10×10^4 個細胞，於培養箱培養24小時後重新注入新的培養液90 μ l並加入不同濃度的藥物10 μ l。所使用之藥物濃度為1000、500及250 μ g/ml。所設定的時間經處理後，則加入50 μ l的XTT labeling mixture在每個well內。放置於37 $^{\circ}$ C與5% CO₂的培養箱內過4至6小時，以波長492nm及690nm測其光學活性(optical density, O.D.)而求得藥物所能抑制50% (IC₅₀)癌細胞生長之濃度。

(五)抗病毒活性試驗

首先調整MDCK細胞數至 1.0×10^5 cells/ml，以80 μ l/well加入96孔盤之每孔中培養一天待細胞附著，然後加入10 μ l 100 TCID₅₀之病毒於培養盤內後，置於37 $^{\circ}$ C含5% CO₂的培養箱內培養2小時，再加入10 μ l事先溶於無菌二次水稀釋為125 μ g/ml、250 μ g/ml、500 μ g/ml或125 μ g/ml、250 μ g/ml、370 μ g/ml三種不同濃度的各種生藥萃取物，或不同濃度之純品(0.1~20 μ g/ml)為實驗組，Ribavirin及無菌二次水或1% DMSO做為標準藥及細胞對照組，每種濃度均作三重複。培養於37 $^{\circ}$ C含5% CO₂的培養箱內三天後，以XTT細胞增生kit測試：96孔盤每孔需要加入50 μ l XTT混合液，在37 $^{\circ}$ C恆溫培養箱3小時後利用ELISA reader (Multiskan EX, Labsystems)測定波長492nm和690nm吸光值，再算出(OD₄₉₂-OD₆₉₀)值以下列公式來計算抑制病毒百分比：

$$\text{抑制}\% = \{ [(OD_T)_V - (OD_C)_V] / [(OD_C)_D - (OD_C)_V] \} \times 100\%$$

(OD_T)_V是有病毒感染後加入各種濃度測試藥物的實驗組吸光值

(OD_C)_V表示只有病毒感染的病毒對照組吸光值

(OD_C)_D為只加無菌二次水或1% DMSO於未感染病毒之細胞對照組吸光值獲得之抑制百分比再對照其各種不同測試濃度，求出保護50%細胞免受病毒感染致死所須之生藥濃度，即EC₅₀值[46]。

(六)抑制病毒繁殖的劑量效應(Dose response)

同抗病毒活性的測定方法將MDCK細胞數調整至 1×10^5 cells/ml後加入96孔盤中，每孔加入80 μ l，培養24小時後分成兩

個時段進行實驗：第一時段為同時加入病毒與藥物，第二時段為感染病毒後，分別在 2 小時加入劑量 12.5、25、37.5 $\mu\text{g/ml}$ 或是 12.5、25、50 $\mu\text{g/ml}$ 等不同濃度的藥物或純品(0.1~20 $\mu\text{g/ml}$)，培養於 37°C 含 5% CO_2 的培養箱內三天後，以 XTT 細胞增生測試法加入 XTT 試劑，在三小時後利用 ELISA reader 測波長 492 和 690nm 之吸光值，算出 $(\text{OD}_{492}-\text{OD}_{690})$ 值後再計算抑制病毒的百分比，以測試抑制病毒繁殖的劑量效應。

(七)病毒去活化實驗(Viral inactivation assay)

病毒去活化實驗為證明藥物是否為 virucidal 或是在細胞外即有將病毒中和之效果。直接以病毒的 stock 與藥物在 37°C 作用 2 小時，再以滴定的方式將病毒與藥物的混合液加入細胞培養皿中，48 小時後再以 plaque assay 觀察病毒感染的情形。

(八)抑制病毒吸附試驗(Viral attachment assay)

本實驗步驟是依據 De Logu 等人[47,48]所描述的方法，稍作一些修飾。首先調整細胞數至 1.0×10^5 的 MDCK cells/ml，加入 24 孔盤之每孔中培養一天待細胞附著，將其置放在 4°C 約 1 小時，然後再將培養液吸掉，緊接著在每一孔中分別加入事先以培養液稀釋為 125 $\mu\text{g/ml}$ 、250 $\mu\text{g/ml}$ 、500 $\mu\text{g/ml}$ 三種不同濃度測試的生藥萃取物及 100 TCID_{50} 的 RSV，以 DMSO 做為細胞對照組，之後放置在 4°C 約 3 小時。然後，先將培養液吸掉，接著用 PBS 沖洗三次，緊接著在每一孔中加入 1000 μl 的培養液，在 5% CO_2 ，37°C 的培養箱培養 72 小時後，以 XTT 細胞增生測試法加入 XTT 試劑，於四小時後利用 ELISA reader 測 $(\text{OD}_{492}-\text{OD}_{690})$ 值吸光值，並計算抑制病毒的百分比：

$$\text{抑制}\% = \left\{ \frac{[(\text{OD}_T)_V - (\text{OD}_C)_V]}{[(\text{OD}_C)_D - (\text{OD}_C)_V]} \right\} \times 100\%$$

(九)抑制病毒穿透試驗(Viral penetration assay)

本實驗步驟是依據 Barnad 等人以及 Cheng 等人[26,48]所描述的方法，稍作一些修飾。首先調整細胞數至 1.0×10^5 的 MDCK cells/ml，加入 24 孔盤之每孔中培養一天待細胞附著，將其置放在 4°C 約 1 小時，然後再將培養液吸掉，緊接著在每一孔中分別加入 100 TCID_{50} 的 IFA，之後在放置 4°C 約 3 小時。然後在每一孔中分別加入事先以培養液稀釋為 125 $\mu\text{g/ml}$ 、250 $\mu\text{g/ml}$ 、500 $\mu\text{g/ml}$ 三種不同濃度測試的生藥萃取物，以 DMSO 做為細胞對照組，在 5% CO_2 ，37°C 的培養箱培養 3 小時後，加入 0.5ml pH=3 的 PBS 作用

1 分鐘，之後再加入 pH=7 的 PBS 來中和 pH=3 的 PBS。在吸掉 PBS 之後，分別在每一孔內加入 1000 μ l 的培養液，在 5%CO₂，37°C 的培養箱培養 72 小時後，以 XTT 細胞增生測試法加入 XTT 試劑，於四小時後利用 ELISA reader 測(OD₄₉₂-OD₆₉₀)值吸光值，並計算抑制病毒的百分比：算法如前。

(十)免疫組織染色法(Immunofluorescence)

將以藥物處理過的細胞取出，取 4 \times 10⁶ 個細胞，以 PBS 清洗一次，緩和加入 1000 μ l 的絕對酒精來固定細胞，然後置於 4°C 下 30 分鐘。待細胞固定完成後，離心去除上清液，並加入含 0.5% Triton 之 PBS 於 37°C 下作用 1 小時，再加入含 100 μ g/ml fusion protein (1:100)之 PBS 於 4°C 下放置 overnight。以 PBS 清洗一次，加入 100 μ l FITC，以螢光顯微鏡分析。

(十一)藥物對 INF- α 、 β mRNA 活性試驗

收集以藥物處理後之細胞，並分離出 total mRNA。將 mRNA 以反轉錄為 cDNA 再以 PCR 的方式放大。最後以瓊膠電泳方式分離。並以特定軟體定量 band 的密度作為定量參考。

參、結果

一、三黃瀉心湯與組成藥物對於狗腎細胞(MDCK)之增生抑制效果

研究傳統方劑本研究中以三黃瀉心湯及其相關成分黃芩、黃連、大黃之甲醇和水抽取物等 8 種生藥，以及大黃與黃連之 4 種相關成分，在體外測試是否有抑制狗腎細胞(MDCK)。結果發現並沒有細胞增生抑制效果，粗抽物其 CC_{50} 皆大於 400 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度對細胞並沒有增生抑制與影響細胞生長效果，其中只有黃連醇抽物的毒殺效果最為明顯 CC_{50} 130.5 $\mu\text{g/ml}$ ，且經過測試所分離出黃連的九個 fraction 中，其中只有 fraction 1-9 對細胞具有明顯的毒殺， IC_{50} 皆小於 30 $\mu\text{g/ml}$ ，尤其以 fraction 2、3 的細胞毒殺作用最為顯著， IC_{50} 為 20 $\mu\text{g/ml}$ 。而黃連、大黃之四種相關成分則以 emodin 的毒性最為顯著 10.9 $\mu\text{g/ml}$ ，而黃連之四種相關成分則以 coptisine 的毒性最為顯著 20.9 $\mu\text{g/ml}$ ，(表二、表三、表四、表五)。

所以在接下來的病毒毒殺試驗中將以低於 CC_{50} 的計量進行測試。以增加結果的正確性。

二、三黃瀉心湯及其相關成分抗 A 型流感病毒 (Influenza A virus) 活性試驗

三黃瀉心湯及其相關成分黃芩、黃連、大黃之甲醇和水抽取物等 8 種生藥，以及大黃及黃連之 4 種相關成分抗 A 型流感病毒 (Influenza A virus) 活性試驗結果發現，三黃瀉心湯醇抽物、黃連水抽與醇抽物及大黃醇抽與水抽物對 A 型流感病毒具有良好抗病毒活性，且選擇指數 SI 值皆大於五以上，其中又以三黃瀉心湯醇抽物最好。由於黃連醇抽物抗病毒作用比大黃純抽物佳，所以進一步分離相關 fraction。經過測試所分離出黃連的九個 fraction 中，其中只有 fraction 5-7 具有抗 A 型流感病毒的效果， IC_{50} 皆小於 10 $\mu\text{g/ml}$ ，尤其以 fraction 6 的效果最為顯著， IC_{50} 為 3.6 $\mu\text{g/ml}$ ，其 SI 為 7.8。(表三)

相關成分中則以黃連的 berberin 及 coptisine 抗病毒效果最為明顯 IC_{50} 12.5 及 1.5 $\mu\text{g/ml}$ ，大黃則以 crysophanol 具有抗病毒作用其 IC_{50} 為 72.6 $\mu\text{g/ml}$ ，其 SI 直接大於 3 以上(表四、表五)。

三、三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼可抑制 A 型流感病毒表現於病毒感染細胞

從先前的實驗中發現，三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼具有良好抑制 A 型流感病毒作用，所以利用 RT-PCR 法測試三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼是否對病毒 RNA 具有明顯影響。從實驗結果發現，三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼對病毒的 RNA 具有明顯的抑制作

用(圖一),從此結果也與先前的結果相互印證三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼對 A 型流感病毒具有明顯抑制作用,從此結果也推測三黃瀉心湯之所以對此病毒有抑制作用應與黃連及黃連鹼有關,而黃連鹼可能是活性指標成分之一。

四、三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼可抑制 A 型流感病毒於藥物與病毒同時作用及病毒感染後

在時間效應試驗中,三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼在病毒感染前之 4 小時或 2 小時、同時感染及感染後 2 或 4 小時之間加入三黃瀉心湯醇抽物(100 $\mu\text{g/ml}$)與黃連醇抽物(40 $\mu\text{g/ml}$)及黃連鹼(2 $\mu\text{g/ml}$),以找出抑制病毒感染的的作用時間點。結果顯示三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼抑制 A 型流感病毒的作用中,在感染前對病毒並不具有抑制的作用,但同時感染與病毒感染後加入皆具有明顯的抑制病毒感染效果,約有百分之六十以上的抑制率出現,經 one-way ANOVA 做分析, Scheff test 做事後檢定,具有顯著性的差異 ($P < 0.05$) (圖二)。

所以推測三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼應該與影響病毒與宿主細胞結合、影響病毒穿透進入宿主細胞或病毒直接去活化有關。所以接下來將進一步針對以上幾點分析相關作用機轉。

五、三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼並不去活化 A 型流感病毒

在時間效應試驗中,三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼在病毒同時感染及感染後 2 或 4 小時之間加入三黃瀉心湯醇抽物(100 $\mu\text{g/ml}$)與黃連醇抽物 (40 $\mu\text{g/ml}$)及黃連鹼(2 $\mu\text{g/ml}$),發現對病毒具有明顯抑制作用。由此推測,三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼作用機轉或許可將 A 型流感病毒去活化,以達到抑制病毒感染的效果。

實驗結果發現,將三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼與病毒作用兩小時,之後加入細胞培養 48 小時。其結果發現,並不阻撓病毒對細胞的損傷,由此可得知三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼其抗病毒的作用機轉與病毒去活化無關。(圖三)。

接下來將進一步測試三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼對免疫調控的影響。

六、三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼並不影響宿主細胞的免疫反應

在時間效應試驗中,三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼在病毒同時感染及感染後 2 或 4 小時之間加入三黃瀉心湯醇抽物(100 $\mu\text{g/ml}$)與黃連醇抽物 (40 $\mu\text{g/ml}$)及黃連鹼(2 $\mu\text{g/ml}$),發現對病毒具有明顯抑制作用。由此推測,三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼作用機轉或許可調控干擾素的表現,以達到抑制病毒感染的效果。

實驗結果發現，將三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼與病毒同時作用，並培養 48 小時。其結果發現，三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼於病毒感染組，並不影響干擾素的表現，由此結果得知其抗病毒的作用機轉與誘導宿主免疫無關。(圖四)。接下來將進一步測試三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼對病毒吸附(attachment)或穿透(penetration)的影響。

七、三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼不影響 A 型流感病毒穿透 (penetration) 至宿主細胞

在時間效應試驗中，三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼在病毒同時感染及感染後 2 或 4 小時之間加入不同濃度三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物(12.5, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$)及黃連鹼(0.7, 1.5, 3 $\mu\text{g/ml}$)，發現對病毒具有明顯抑制作用。由此推測，三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼作用機轉或許可干擾病毒穿透進入宿主細胞，以達到抑制病毒感染的效果。

實驗結果發現，三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼加入細胞培養 3 小時之後，再加入病毒培養於 37 度並於 48 小時偵測。三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼並不影響病毒穿透進入宿主細胞，且隨著劑量的增加抑制率和濃度並無相關性，且測試藥物及陰性對照組之間根據 Student's t-test 作統計分析，都不具有顯著性的差異 ($P > 0.05$) (圖五)，顯示三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼抗 A 型流感病毒的作用與干擾病毒穿透進入宿主細胞無關。因此推測，三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼抗 A 型流感病毒的作用應該與影響病毒吸附至宿主細胞有關。

八、三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼可抑制 A 型流感病毒吸附 (attachment) 至宿主細胞

在時間效應試驗中，三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼在病毒同時感染及感染後 2 或 4 小時之間加入不同濃度三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物(12.5, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$)及黃連鹼(0.7, 1.5, 3 $\mu\text{g/ml}$)，發現對病毒具有明顯抑制作用。由此推測，三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼作用機轉或許可干擾病毒吸附至宿主細胞，以達到抑制病毒感染的效果。

實驗結果發現，三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼與病毒同時作用三小時後，再加入細胞培養 48 小時。三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼對影響病毒吸附至宿主細胞，隨著劑量的增加抑制率和濃度呈正比 ($p < 0.05$) 測試藥物及陰性對照組之間根據 Student's t-test 作統計分析，都具有顯著性的差異 ($P < 0.05$) (圖六)，顯示大三黃瀉心湯醇抽物與黃連醇抽物及黃連鹼抗 A 型流感病毒的作用是經由干擾病毒與宿主細胞的結合，以達成減少病毒對宿主細胞的傷害。

肆、討論

三黃瀉心湯在過去一直被使用於降血壓、便秘及利膽(林俊清, 民 77)等疾病, 近年來, 學者發現它具有鬆弛胃部肌肉[49], 但是將它拿來測試抑制病毒的活性, 尚無報告。過去的研究報告指出, 其相關成分藥皆具有抑制病毒的活性, 例如抑制流行性感冒病毒的活性[50-52], 抗 HIV[53], wogonin 具有抗 B 型肝炎病毒[54]以及對第一型單純疱疹病毒(HSV-1)及呼吸道融合病毒 (RSV) 都具有抑制的效果[55]。

三黃瀉心湯, 為中國傳統方劑, 在本實驗中發現它病毒感染同時加入藥物可抑制 A 型流感病毒作用高於百分之五十, (表二), 此抗病毒活性乃是新發現, 由實驗結果推測, 三黃瀉心湯甲醇粗萃物可保護細胞免於 A 型流感病毒的感染, 而黃芩不具有抑制 A 型流感病毒活性, 但是黃連及大黃的水抽及甲醇粗萃物確實有抑制 A 型流感病毒感染的活性 (表二)。

黃連甲醇粗萃物抑制 A 型流感病毒, 劑量 20.8 $\mu\text{g/ml}$ 抑制病毒就超過百分之五十, 顯示出對病毒有良好的抑制活性, 然而黃連水抽粗萃物抑制病毒百分之五十所需劑量為 31.6 $\mu\text{g/ml}$, 顯示水抽物與醇抽物同時具有抗病毒作用。而大黃甲醇粗萃物抑制 A 型流感病毒, 劑量 55.9 $\mu\text{g/ml}$ 抑制病毒就超過百分之五十, 顯示出對病毒有良好的抑制活性, 然而大黃水抽粗萃物抑制病毒百分之五十所需劑量為 77.6 $\mu\text{g/ml}$, 顯示水抽物需較高濃度才具有抗病毒作用 (表四)。且根據目前市面上能購買的黃連及大黃相關成分測試抗 A 型流感病毒所得的實驗結果發現, 黃連的 berberin 及 coptisine 抗病毒效果最為明顯 IC₅₀ 12.5 及 1.5 $\mu\text{g/ml}$, 大黃則以 crysophanol 具有抗病毒作用其 IC₅₀ 為 72.6 $\mu\text{g/ml}$, 其 SI 直接大於 3 以上 (表四、表五)。根據上述結果得知, 推斷主要是因為黃連及大黃所含的活性成分大多為非水溶性, 其中大黃含有 aloe-emodin, 1991 年 Sydiskis 等人發現大黃所含成分 aloe-emodin 對有套膜 (enveloped) 的病毒具有抑制活性 (包括有 HSV-1 and HSV-2, varicella-zoster virus, pseudorabies virus, influenza virus A, adenovirus and rhinovirus) [56], 而 A 型流感病毒為有套膜病毒。且根據最新的研究報告指出, 黃連的活性相關成分 berberin 及 coptisine 具有抑制 B 型肝炎病毒 s 及 e 抗原的表現[57]。但除此之外, 目前對於其他病毒並沒有其他文獻報導。

所以本實驗為首次發現三黃瀉心湯、黃連醇抽物及黃連 fraction 5、6、7、黃連相關成分 berberin 及 coptisine 具有抗 A 型流感病毒。而從實驗結果中得知，黃連醇抽物為三黃瀉心湯組成藥物中抗病毒效果最顯著的藥材，因此值得進一步深入去探究其相關成分抑制 A 型流感病毒活性和抗病毒機轉，並進一步證實黃連的相關成分 coptisine 可為三黃瀉心湯抗 A 型流感病毒的活性指標成分之一。所以在初步三黃瀉心湯、黃連醇抽物及黃連相關成分 coptisine 抑制 A 型流感病毒感染之時間點結果顯示：在感染同時感染及感染後加藥都具有 A 型流感病毒感染抑制活性，大約都在百分之六十(圖二)。從以上的結果推測，三黃瀉心湯、黃連醇抽物及黃連相關成分 coptisine 具有很好預防 A 型流感病毒感染及阻止 A 型流感病毒感染後增殖活性。根據報導 emodin 具有抑制 HSV 和 HCMV 等套膜病毒的效果[56]，而在本實驗中，發現 berberin 與 coptisine 具有抗 A 型流感病毒的效果，抗此有套膜病毒活性會隨著劑量增加抑制活性也會增加，在 12.5 及 1.5 μ g/ml 時，抑制活性可達百分之五十(表四)，其藥效遠比臨床用藥 ribavirin 要強。但由於黃連鹼(coptisine)是黃連相關成分中抗病毒活性最好的，其抑制病毒感染與複製機轉等方面，還未知。且從時間點的實驗也推測，三黃瀉心湯醇抽物、黃連醇抽物之所以在病毒感染後與同時就有良好抗病毒作用，應該與黃連鹼有關。而此點推測，在圖一、二也獲得證實。而黃連醇抽物與黃連鹼具有此特別的藥效，此為一新發現，因此本實驗也進一步詳加分析三黃瀉心湯醇抽物、黃連醇抽物及黃連鹼對抑制 A 型流感病毒的吸附、穿透、去活化作用及免疫機轉探討。

從時間點結果推測三黃瀉心湯、黃連醇抽物及黃連相關成分 coptisine 應該與抑制 A 型流感病毒的吸附、穿透、去活化作用及免疫有關。首先測試三黃瀉心湯、黃連醇抽物及黃連相關成分 coptisine 對 A 型流感病毒去活化作用。實驗結果發現，三黃瀉心湯、黃連醇抽物及黃連相關成分 coptisine 並不影響病毒去活化。由此得知，測試藥物抗病毒作用機轉與去活化病毒無關(圖三)。且從試驗三黃瀉心湯、黃連醇抽物及黃連相關成分 coptisine 與免疫調控的實驗結果發現，此測試藥物在病毒感染後並不誘導干擾素的表現(圖四)，因此也證實三黃瀉心湯、黃連醇抽物及黃連相關成分 coptisine

抗病毒的作用機轉與調控免疫表現無關。除了測試吸附作用之外，同時也測試藥物是否同時可抑制病毒穿透作用，結果發現三黃瀉心湯、黃連醇抽物及黃連相關成分 coptisine 並不抑制 A 型流感病毒穿透進入宿主細胞的作用（圖五）。在此實驗結果中發現，三黃瀉心湯、黃連醇抽物及黃連相關成分 coptisine 具有明顯抑制 A 型流感病毒吸附作用，會隨著劑量增加抑制 A 型流感病毒吸附制宿主細胞也相對增加（圖六），從此實驗結果也明瞭三黃瀉心湯之所以對 A 型流感病毒有如此明確的療效，可能是由於組成份中含有黃連與黃連鹼，尚盼能與相關單位合作可再進一步分離裡面所含成分。因此三黃瀉心湯的活性成分和抗病毒機轉，值得將來更進一步研究。

伍、結論與建議

研究發現傳統方劑三黃瀉心湯與其相關成分對常感染人類呼吸道感染的病毒如呼吸道融合病毒與 A 型流感病毒在不影響宿主細胞生長情況下具有良好抑制病毒感染效果。但根據研究數據發現三黃瀉心湯與其相關成分抑制 A 型流感病毒效果較佳。而在三黃瀉心湯相關組成裡發現，以黃連醇抽物對病毒的作用最好，且黃連相關純品裡又以黃連鹼對病毒的抑制最好。除此之外，在藥物抑制病毒時間點發現，黃連醇抽物與黃連鹼在病毒感染同時加入病毒或是病毒感染後加入皆發現，此藥物有良好的抑制活性。從此初步結果推測，黃連醇抽物之所以對病毒感染前與同時感染有良好作用或許與黃連鹼有關。病毒吸附、穿探與去活化試驗中結果發現，三黃瀉心湯醇抽物、黃連醇抽物與黃連鹼其抗病毒的作用機轉並不會將病毒去活化，也不誘導免疫反應及干擾病毒穿透進入宿主細胞。實驗結果則證實三黃瀉心湯醇抽物、黃連醇抽物與黃連鹼其抗病毒的作用機轉是干擾病毒與宿主細胞表面接受器的結合有關。目前的研究發現，不同種類的藥物對病毒有不同的藥理作用，而本實驗所測試的黃連鹼 *coptisine* 初步的研究發現可干擾病毒與細胞表面結合，但初步研究並無法了解是與哪一個分子相關，且目前並無相關期刊論文針對此點做進一步的探討。且利用免疫螢光分析三黃瀉心湯醇抽物、黃連醇抽物與黃連鹼對病毒蛋白的影響發現，此藥物對病毒有明顯抑制作用。綜合種種的研究發現，三黃瀉心湯醇抽物、黃連醇抽物與黃連鹼對 A 型流感病毒具有良好抑制作用，且三黃瀉心湯主藥抗病毒的成分應該與黃連及黃連鹼有關。由於在病毒感染同時及感染後皆有明顯療效，表示此藥物具有預防與治療作用。未來除市面上可購得的 *coptisine* 外，其他的活性成分也希望能逐步大量分離及確證效能。

本研究最大的發現乃舊藥新用及新療效的發現因此，更進一步的人體實驗以及相關的實驗可更深入評估三黃瀉心湯在臨床的使用價值和安全性。

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 CCMP97-RD-112 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. Falcon AM, Marion RM, Zurcher T, Gomez P, Portela A, Nieto A, Ortin J. Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive influenza viruses expressing deleted forms of the NS1 protein. *J Virol* 2004;78 (8):3880-8.
2. Gao P, Watanabe S, Ito T, Goto H, Wells K, McGregor M, Cooley AJ, Kawaoka Y. Biological heterogeneity, including systemic replication in mice, of H5N1 influenza A virus isolates from humans in Hong Kong. *J Virol* 1999;73 (4):3184-9.
3. Hayden FG. Antivirals for pandemic influenza. *J Infect Dis* 1997;176 Suppl 1:S56-61.
4. Simonsen L, Clarke MJ, Williamson GD, Stroup DF, Arden NH, Schonberger LB. The impact of influenza epidemics on mortality: introducing a severity index. *Am J Public Health* 1997;87 (12):1944-50.
5. Ludwig S, Pleschka S, Wolff T. A fatal relationship--influenza virus interactions with the host cell. *Viral Immunol* 1999;12 (3):175-96.
6. Geiss GK, Salvatore M, Tumpey TM, Carter VS, Wang X, Basler CF, Taubenberger JK, Bumgarner RE, Palese P, Katze MG, Garcia-Sastre A. Cellular transcriptional profiling in influenza A virus-infected lung epithelial cells: the role of the nonstructural NS1 protein in the evasion of the host innate defense and its potential contribution to pandemic influenza. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99 (16):10736-41.
7. Brown EG. Influenza virus genetics. *Biomed Pharmacother* 2000;54 (4):196-209.
8. Taubenberger JK, Reid AH, Fanning TG. The 1918 influenza virus: A killer comes into view. *Virology* 2000;274 (2):241-5.
9. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 1992;56 (1):152-79.
10. Gubareva LV, Matrosovich MN, Brenner MK, Bethell RC, Webster RG. Evidence for zanamivir resistance in an immunocompromised child infected with influenza B virus. *J Infect Dis* 1998;178 (5):1257-62.
11. Luscher-Mattli M. Influenza chemotherapy: a review of the present state of art and of new drugs in development. *Arch Virol* 2000;145 (11):2233-48.
12. Ronni T, Matikainen S, Sareneva T, Melen K, Pirhonen J, Keskinen P, Julkunen I. Regulation of IFN-alpha/beta, MxA, 2',5'-oligoadenylate synthetase, and HLA gene expression in influenza A-infected human lung epithelial cells. *J Immunol* 1997;158 (5):2363-74.

13. Bright RA, Medina MJ, Xu X, Perez-Oronoz G, Wallis TR, Davis XM, Povinelli L, Cox NJ, Klimov AI. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet* 2005;366 (9492):1175-81.
14. Monto AS, Ohmit SE, Hornbuckle K, Pearce CL. Safety and efficacy of long-term use of rimantadine for prophylaxis of type A influenza in nursing homes. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39 (10):2224-8.
15. Falsey AR, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clin Microbiol Rev* 2000;13 (3):371-84.
16. Cane PA. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol* 2001;11 (2):103-16.
17. Mori K, Kido T, Daikuhara H, Sakakibara I, Sakata T, Shimizu K, Amagaya S, Sasaki H, Komatsu Y. Effect of Hochu-ekki-to (TJ-41), a Japanese herbal medicine, on the survival of mice infected with influenza virus. *Antiviral Res* 1999;44 (2):103-11.
18. Bitko V, Velazquez A, Yang L, Yang YC, Barik S. Transcriptional induction of multiple cytokines by human respiratory syncytial virus requires activation of NF-kappa B and is inhibited by sodium salicylate and aspirin. *Virology* 1997;232 (2):369-78.
19. Bricks LF. Prevention of respiratory syncytial virus infections. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 2001;56 (3):79-90.
20. Glezen WP, Taber LH, Frank AL, Kasel JA. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am J Dis Child* 1986;140 (6):543-6.
21. Henderson FW, Collier AM, Clyde WA, Jr., Denny FW. Respiratory-syncytial-virus infections, reinfections and immunity. A prospective, longitudinal study in young children. *N Engl J Med* 1979;300 (10):530-4.
22. Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol* 1997;51:151-78.
23. Sullender WM. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. *Clin Microbiol Rev* 2000;13 (1):1-15, table of contents.
24. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, Brammer L, Cox N, Anderson LJ, Fukuda K. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *Jama* 2003;289 (2):179-86.
25. Kaul TN, Middleton E, Jr., Ogra PL. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *J Med Virol* 1985;15 (1):71-9.

26. Barnard DL, Fairbairn DW, O'Neill KL, Gage TL, Sidwell RW. Anti-human cytomegalovirus activity and toxicity of sulfonated anthraquinones and anthraquinone derivatives. *Antiviral Res* 1995;28 (4):317-29.
27. Roccatagliata AJ, Maier MS, Seldes AM, Pujol CA, Damonte EB. Antiviral sulfated steroids from the ophiuroid *Ophioplocus januarii*. *J Nat Prod* 1996;59 (9):887-9.
28. Kernan MR, Amarquaye A, Chen JL, Chan J, Sesin DF, Parkinson N, Ye Z, Barrett M, Bales C, Stoddart CA, Sloan B, Blanc P, Limbach C, Mrisho S, Rozhon EJ. Antiviral phenylpropanoid glycosides from the medicinal plant *Markhamia lutea*. *J Nat Prod* 1998;61 (5):564-70.
29. Chen JL, Blanc P, Stoddart CA, Bogan M, Rozhon EJ, Parkinson N, Ye Z, Cooper R, Balick M, Nanakorn W, Kernan MR. New iridoids from the medicinal plant *Barleria prionitis* with potent activity against respiratory syncytial virus. *J Nat Prod* 1998;61 (10):1295-7.
30. Ma SC, Du J, But PP, Deng XL, Zhang YW, Ooi VE, Xu HX, Lee SH, Lee SF. Antiviral Chinese medicinal herbs against respiratory syncytial virus. *J Ethnopharmacol* 2002;79 (2):205-11.
31. Field AK, Biron KK. "The end of innocence" revisited: resistance of herpesviruses to antiviral drugs. *Clin Microbiol Rev* 1994;7 (1):1-13.
32. De Clercq E. Antiviral agents: characteristic activity spectrum depending on the molecular target with which they interact. *Adv Virus Res* 1993;42:1-55.
33. Wray SK, Gilbert BE, Knight V. Effect of ribavirin triphosphate on primer generation and elongation during influenza virus transcription in vitro. *Antiviral Res* 1985;5 (1):39-48.
34. De Clercq E. Antiviral drugs in current clinical use. *J Clin Virol* 2004;30 (2):115-33.
35. De Franceschi L, Fattovich G, Turrini F, Ayi K, Brugnara C, Manzato F, Noventa F, Stanzial AM, Solero P, Corrocher R. Hemolytic anemia induced by ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection: role of membrane oxidative damage. *Hepatology* 2000;31 (4):997-1004.
36. DeVincenzo JP, Hall CB, Kimberlin DW, Sanchez PJ, Rodriguez WJ, Jantusch BA, Corey L, Kahn JS, Englund JA, Suzich JA, Palmer-Hill FJ, Branco L, Johnson S, Patel NK, Piazza FM. Surveillance of clinical isolates of respiratory syncytial virus for palivizumab (Synagis)-resistant mutants. *J Infect Dis* 2004;190 (5):975-8.
37. Melroe GT, DeLuca NA, Knipe DM. Herpes simplex virus 1 has multiple

- mechanisms for blocking virus-induced interferon production. *J Virol* 2004;78 (16):8411-20.
38. Halford WP, Halford KJ, Pierce AT. Mathematical analysis demonstrates that interferons-beta and -gamma interact in a multiplicative manner to disrupt herpes simplex virus replication. *J Theor Biol* 2005;234 (3):439-54.
 39. Nanda SK, Baron MD. Rinderpest virus blocks type I and type II interferon action: role of structural and nonstructural proteins. *J Virol* 2006;80 (15):7555-68.
 40. Qing YL, Zhao JJ, Ren H. [Antivirus effect of plasmid co expressing hepatitis B surface antigen and granulocyte macrophage-colony stimulating factor]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2004;12 (4):201-4.
 41. Vershinina M, Deriabin PG, Mezentseva MV, Narovlianskii AN. [Antiviral effect of alpha-interferon and cytokine mRNA level in cell cultures infected with a cytopathogenic variant of the hepatitis C virus]. *Vopr Virusol* 2003;48 (1):26-30.
 42. Garcia-Sastre A, Egorov A, Matassov D, Brandt S, Levy DE, Durbin JE, Palese P, Muster T. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* 1998;252 (2):324-30.
 43. Gamblin SJ, Haire LF, Russell RJ, Stevens DJ, Xiao B, Ha Y, Vasisht N, Steinhauer DA, Daniels RS, Elliot A, Wiley DC, Skehel JJ. The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin. *Science* 2004;303 (5665):1838-42.
 44. Preston CM, Harman AN, Nicholl MJ. Activation of interferon response factor-3 in human cells infected with herpes simplex virus type 1 or human cytomegalovirus. *J Virol* 2001;75 (19):8909-16.
 45. Melchjorsen J, Siren J, Julkunen I, Paludan SR, Matikainen S. Induction of cytokine expression by herpes simplex virus in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells is dependent on virus replication and is counteracted by ICP27 targeting NF-kappaB and IRF-3. *J Gen Virol* 2006;87 (Pt 5):1099-108.
 46. Chiang LC, Chiang W, Chang MY, Ng LT, Lin CC. Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds in vitro. *Antiviral Res* 2002;55 (1):53-62.
 47. De Logu A, Loy G, Pellerano ML, Bonsignore L, Schivo ML. Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to-cell virus spread by *Santolina insularis* essential oil. *Antiviral Res* 2000;48 (3):177-85.
 48. Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LY, Lim W, Nicholls J, Yee WK,

- Yan WW, Cheung MT, Cheng VC, Chan KH, Tsang DN, Yung RW, Ng TK, Yuen KY. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003;361 (9366):1319-25.
49. Lin WC, Tan TW. The role of gastric muscle relaxation in cytoprotection induced by san-huang-xie-xin-tang in rats. *J Ethnopharmacol* 1994;44 (3):171-9.
50. Nagai T, Miyaichi Y, Tomimori T, Suzuki Y, Yamada H. Inhibition of influenza virus sialidase and anti-influenza virus activity by plant flavonoids. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1990;38 (5):1329-32.
51. Nagai T, Miyaichi Y, Tomimori T, Suzuki Y, Yamada H. In vivo anti-influenza virus activity of plant flavonoids possessing inhibitory activity for influenza virus sialidase. *Antiviral Res* 1992;19 (3):207-17.
52. Nagai T, Moriguchi R, Suzuki Y, Tomimori T, Yamada H. Mode of action of the anti-influenza virus activity of plant flavonoid, 5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavone, from the roots of *Scutellaria baicalensis*. *Antiviral Res* 1995;26 (1):11-25.
53. Li BQ, Fu T, Yan YD, Baylor NW, Ruscetti FW, Kung HF. Inhibition of HIV infection by baicalin--a flavonoid compound purified from Chinese herbal medicine. *Cell Mol Biol Res* 1993;39 (2):119-24.
54. Huang RL, Chen CC, Huang HL, Chang CG, Chen CF, Chang C, Hsieh MT. Anti-hepatitis B virus effects of wogonin isolated from *Scutellaria baicalensis*. *Planta Med* 2000;66 (8):694-8.
55. Li Y, Ooi LS, Wang H, But PP, Ooi VE. Antiviral activities of medicinal herbs traditionally used in southern mainland China. *Phytother Res* 2004;18 (9):718-22.
56. Sydiskis RJ, Owen DG, Lohr JL, Rosler KH, Blomster RN. Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35 (12):2463-6.
57. Li HL, Han T, Liu RH, Zhang C, Chen HS, Zhang WD. Alkaloids from *Corydalis saxicola* and their anti-hepatitis B virus activity. *Chem Biodivers* 2008;5 (5):777-83.
58. Andersen DO, Weber ND, Wood SG, Hughes BG, Murray BK, North JA. In vitro virucidal activity of selected anthraquinones and anthraquinone derivatives. *Antiviral Res* 1991;16 (2):185-96.

柒、圖、表

表一、黃連 fraction

fractions	1	2	3	4	5	6	7	8	9
流洗極性	A:H = 1:30	A:H = 1:20	A:H = 1:10	A:H = 1:5	A:H = 1:1	A:H = 2:1	Pure A	M:A = 1:10	M:A = 1:5

註：A：acetone

H：n-Hexane

M：methanol

表二、Anti-IFA activities of SOSST and related compounds.

	CC₅₀	EC₅₀	SI
SOSST (M)三黃瀉心湯	579.5±2.0	50.2±0.4	11.5
SOSST (W)	680.0±2.1	126.1±1.6	5.4
SB (M)黃芩	430.5±1.2	140.8±2.1	3.1
SB (W)	480.0±1.0	291.6±2.1	1.6
CC (M)黃連	130.5±3.7	20.8±1.1	5.3
CC (W)	280.0±1.4	31.6±2.6	8.9
RO (M)大黃	470.5±3.7	59.8±1.1	7.9
RO (W)	533.0±3.8	77.6±3.6	6.9

Values are mean ± S.E. of three independent experiments of triplicate measurements in each experiment.

M：methanolic extract；

A：aqueous extract.

CC₅₀: 50% Cytotoxic concentration of normal human lymphocytes (μg/ml).

EC₅₀: 50% Inhibition concentration (μg/ml).

Selectivity index (SI)=CC50/IC50.

表三、Anti-IFA activities of CC. and related fraction.

	CC₅₀	EC₅₀	SI
Fraction 1	29.5±2.6	-	-
Fraction 2	20.0±2.1	-	-
Fraction 3	20.5±1.2	-	-
Fraction 4	28.0±3.0	-	-
Fraction 5	21.5±2.7	9.8±1.3	2.2
Fraction 6	28.0±2.4	3.6±2.1	7.8
Fraction 7	27.5±3.7	9.1±3.1	3.0
Fraction 8	23.0±3.8	-	-
Fraction 9	26.0±2.3	-	-

Values are mean ± S.E. of three independent experiments of triplicate measurements in each experiment.

M : methanolic extract ;

A : aqueous extract.

CC₅₀: 50% Cytotoxic concentration of normal human lymphocytes (µg/ml).

EC₅₀: 50% Inhibition concentration (µg/ml).

Selectivity index (SI) = CC50/IC50.

表四、Anti-IFA activities of RO. and related compounds.

	CC₅₀	EC₅₀	SI
Ribavirin	275.9±3.2	13.5	20.4
Berberin	42.6±1.1	12.5±2.1	3.4
Coptisine	20.9±1.2	1.5±0.1	13.9
Palmatine	37.9±2.8	—	—

Values are mean ± S.E. of three independent experiments of triplicate measurements in each experiment.

M : methanolic extract ;

A : aqueous extract.

CC₅₀: 50% Cytotoxic concentration of normal human lymphocytes (µg/ml).

EC₅₀: 50% Inhibition concentration (µg/ml).

Selectivity index (SI) = CC₅₀/IC₅₀.

- : Not antiviral activity.

表五、Anti-IFA activities of CC. and related compounds.

	CC₅₀	EC₅₀	SI
Ribavirin	275.9±3.2	13.5	20.4
Chrysophanol	342.6±1.1	72.6±0.1	4.8
Emodin	10.9±2.2	—	—
Sennoside A	107.9±2.8	—	—
Rhein	32.1±3.3	—	—

Values are mean ± S.E. of three independent experiments of triplicate measurements in each experiment.

M : methanolic extract ;

A : aqueous extract.

CC₅₀: 50% Cytotoxic concentration of normal human lymphocytes (µg/ml).

EC₅₀: 50% Inhibition concentration (µg/ml).

Selectivity index (SI) = CC₅₀/IC₅₀.

- : Not antiviral activity.

Influenza A virus

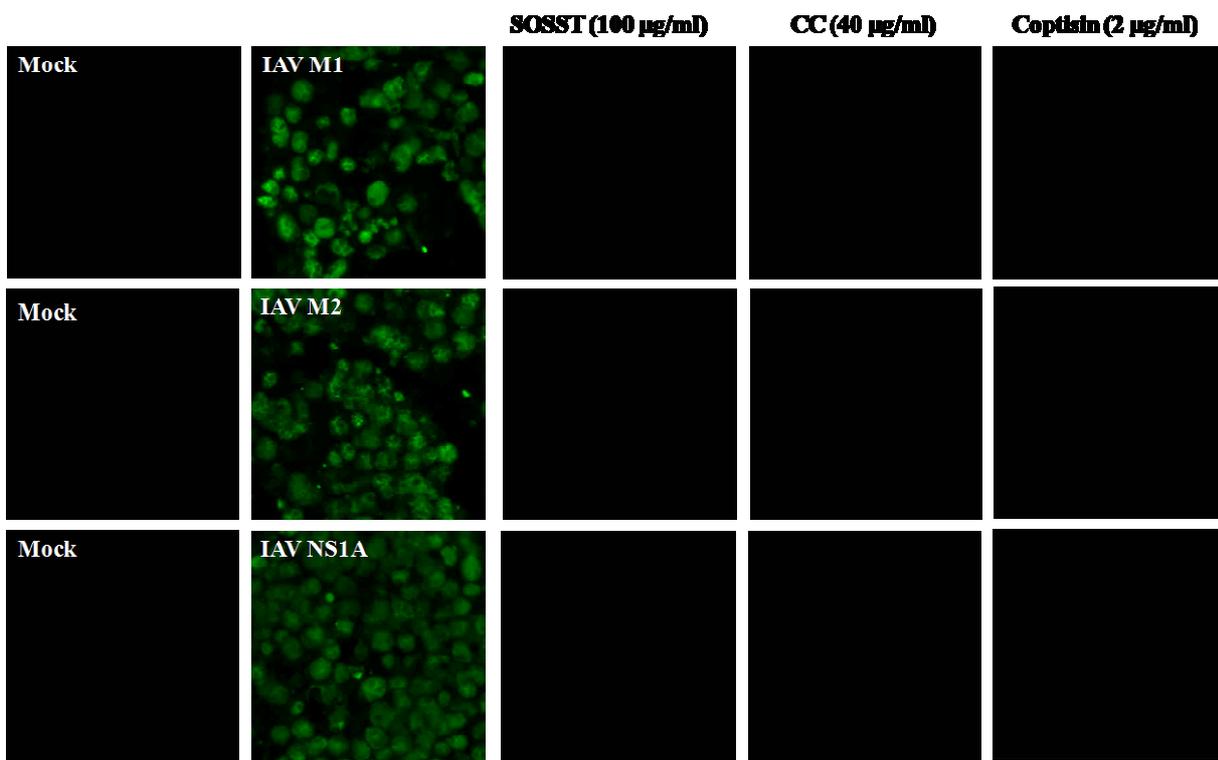


Fig. 1

SOSST, CC.(M), Coptisine suppress IFA protein expression. MDCK cells were infected with IFA (MOI = 0.1) in the presence or absence of SOSST, CC., Coptisine treatment (100, 40, and 2 µg/ml). After 72h, then washed by ice-cold PBS and subsequently subjected to standard surface protein staining procedures for immunofluorescence analysis using the monoclonal anti-IFA M1, M2, NS1A primary antibody followed by Alexa Fluor 488 secondary antibody. Mock-infected cells and IFA-only-infected cells were used as controls.

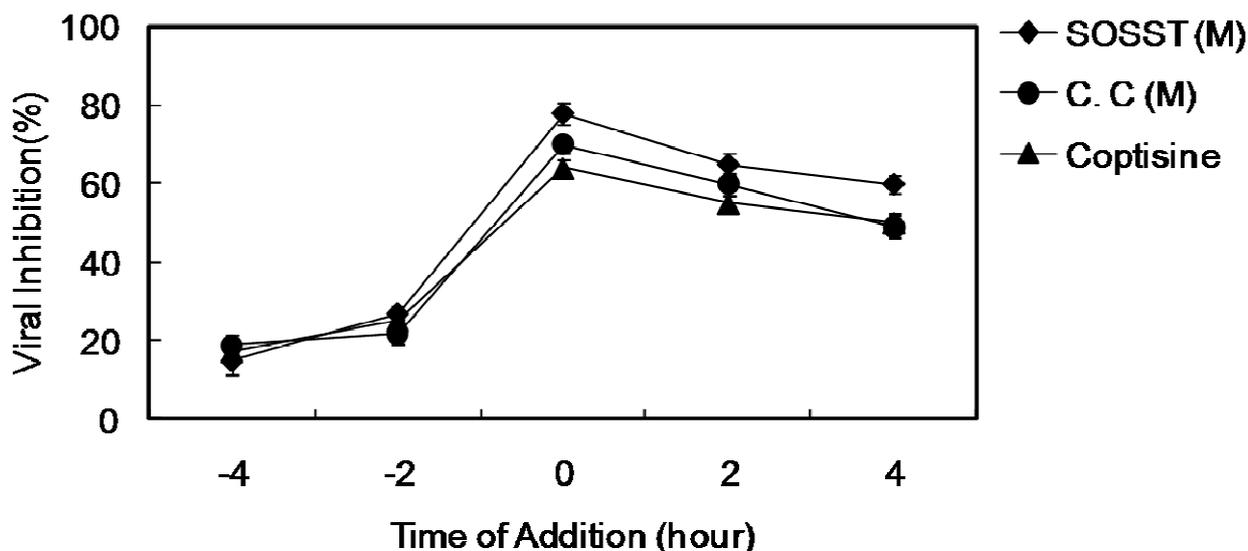


Fig. 2

Time-course effect of treatment with SOSST (M), C. C (M) and coptisine on IFA infection. SOSST (M) (100 $\mu\text{g/ml}$), C. C (M) (40 $\mu\text{g/ml}$), and coptisine (2 $\mu\text{g/ml}$) were added at different time periods of IFA infection on MDCK cells at 37 °C: pre-infection (-4 to -1 h), infection (0 h), or post-infection (1 to 4 h p.i.). For pre-infection treatment, the antiviral compounds were always removed prior viral infection. After 72 h p.i., the percentage of viral inhibition was evaluated by XTT method and expressed relative to the treatment control (DMSO). Each time point represents the mean \pm S.D. of three independent experiments with each treatment in triplicate. The asterisk (*) indicates significant difference ($P < 0.05$) between drug treatment and control group as analyzed by one-way ANOVA and Scheffe post-hoc test.

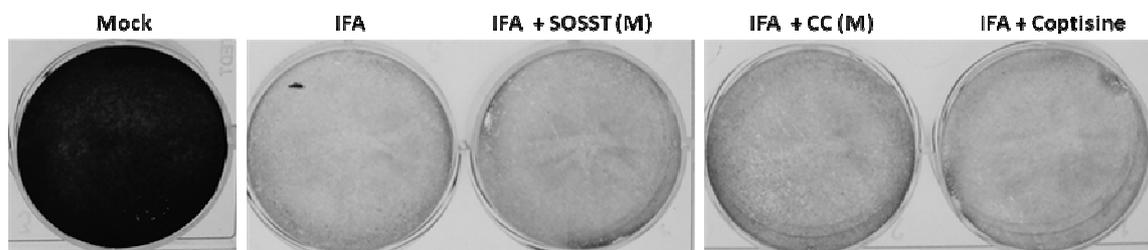


Fig. 3

SOSST, C. C (M) and Coptisine do not inactivate IFA viral particles. IFA virus stocks were mixed with DMEM medium only (no drug) or with SOSST (M) (100 $\mu\text{g/ml}$), C. C (M) (40 $\mu\text{g/ml}$), and coptisine (2 $\mu\text{g/ml}$) treatment at 37 °C for 1 h. The Virus mixtures were then diluted 1,000-fold before infection on MDCK cells. Plates were stained 72 h p.i. for assessment by plaque reduction assay. Results are presented from one of two independent experiments.

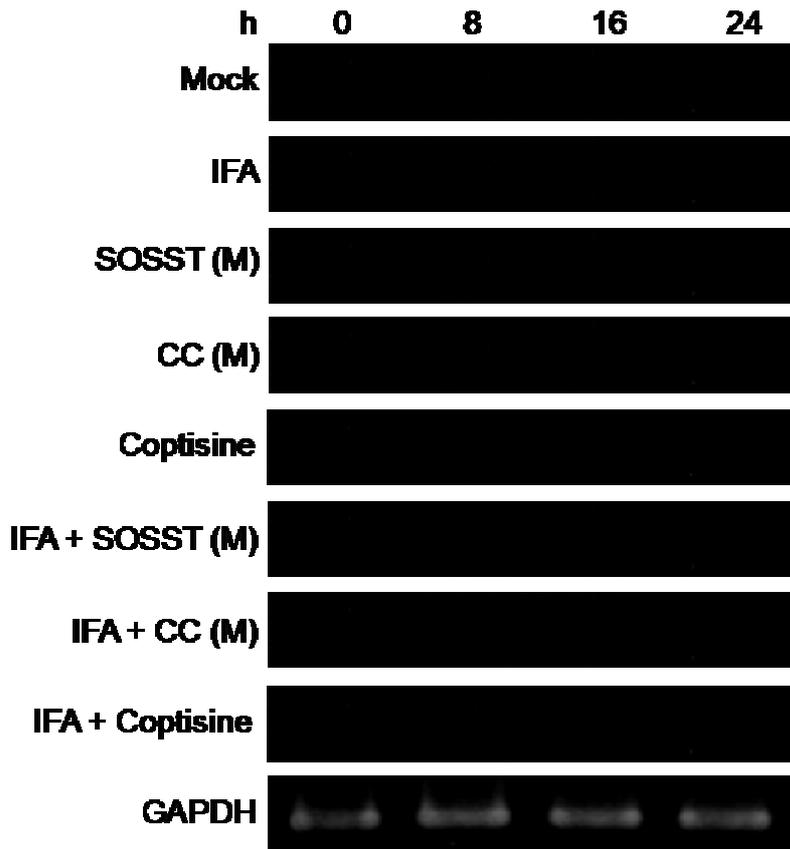


Fig. 4
SOSST, C. C (M) and Coptisine do not induce IFN- β mRNA expression. MDCK cells was mock-infected or infected with ifa (MOI = 0.1) in the presence or absence of SOSST (M) (100 μ g/ml), C. C (M) (40 μ g/ml), and coptisine (2 μ g/ml). After 48 h p.i., total cellular RNA was isolated and subjected to RT-PCR analysis for determination of IFN- β mRNA expression. The GAPDH gene was used as an internal control.

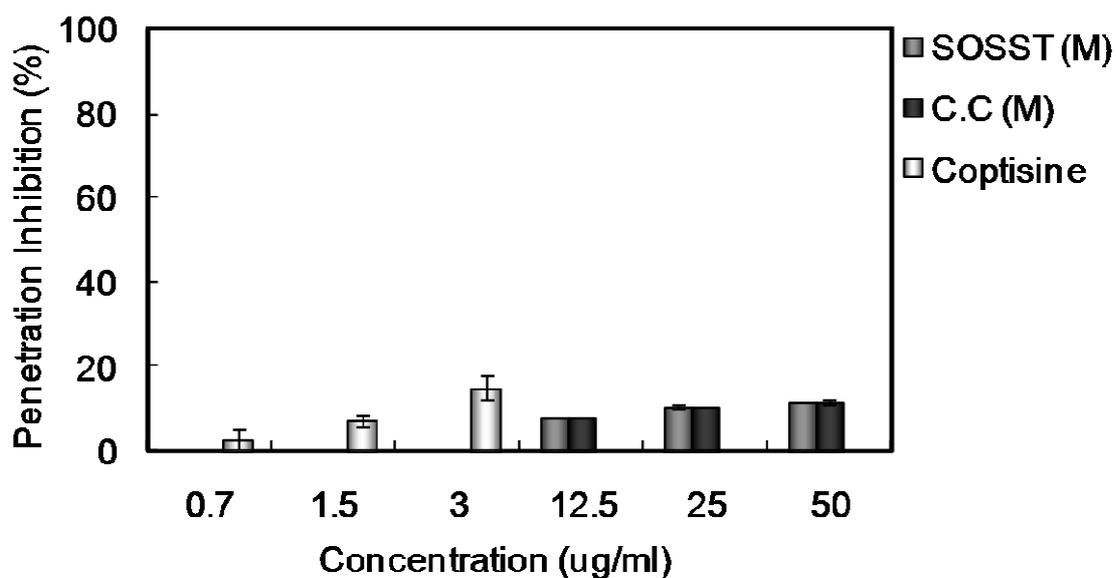


Fig. 5
SOSST, C. C (M) and Coptisine prevent viral attachment but not penetration of IFA to MDCK cells. MDCK cells (1×10^4) were pre-chilled at 4 °C for 1 h and then inoculated with IFA (MOI = 1) in the presence or absence of the test compounds SOSST (M) (100 μ g/ml), C. C(M) (40 μ g/ml), and coptisine (2 μ g/ml) for 3 h at 4 °C. Unabsorbed virus was then removed by washing the cell monolayer with PBS three times. After 2 days of incubation at 37 °C, the percentage of viral attachment after treatment with the test compound was evaluated by XTT assay.

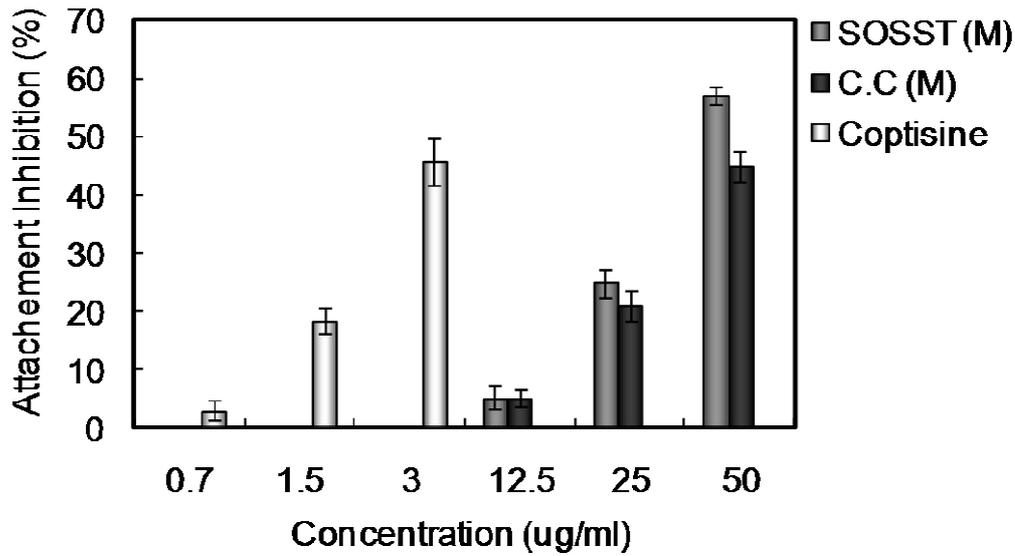


Fig. 6

SOSST, C. C (M) and Coptisine were not penetration of IFA to MDCK cells. MDCK cells (1×10^4) were pre-chilled at 4 °C for 1 h and then infected with IFA (MOI = 1) at 4 °C for 3 h. After the 3 h incubation, cells were treated with or without SOSST (M) (100 μ g/ml), C. C(M) (40 μ g/ml), and coptisine (2 μ g/ml), and then further incubated for an additional 1 h with temperature shifted to 37 °C to maximize viral penetration. At the end of the incubation, extracellular virus was inactivated by PBS at pH 3 for 1 min and the acidic medium was then neutralized with PBS of pH 11. The neutral PBS was removed and 2 % FCS medium was added. After 2 days of incubation at 37 °C, the percentage of viral penetration was evaluated by XTT assay. ND: no drug (DMSO control). Each point represents the mean \pm S.D. of triplicate samples in each of the three independent experiments.

