

編號：CCMP96-RD-214

穿心蓮乙酸乙酯層區分物對影響腸病毒感 染力之研究

林壁鳳
台灣大學

摘 要

自從 1998 年來台灣多次發生腸病毒的感染與流行，尤以腸病毒 71 型為甚，至今仍無有效藥物治療，且許多臨床症狀已知腸病毒 71 型感染之病人，呈現嚴重發炎反應。腸病毒 71 型(EV71)，屬於小 RNA 病毒科(Picornaviridae)中的腸病毒屬(Enterovirus)，是腸病毒中最主要造成手足症以及神經方面嚴重併發症的病毒。穿心蓮 (*Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees) 為爵床科一年生草本植物的全草及葉，有清熱、解毒、抗病毒之效。為響應衛生署中草藥委員會所提出研究類之「中草藥與感染正疾病」之研究重點，探討穿心蓮乙酸乙酯層區分物對腸病毒 71 型之影響及其機轉，本實驗欲以分配萃取進行分離純化所得之穿心蓮乙酸乙酯層(EtOAc, EA)區分物，利用腸病毒易感染的細胞(Rhabdomyosarcoma, RD cell)作為腸病毒感染的標靶細胞(Target cell)，進行細胞共同培養方式，探討穿心蓮及其各種萃取溶液中的乙酸乙酯層和進一步的區分物之作用，偵測是否減少腸病毒毒殺目標細胞能力，探討中草藥是否可阻斷腸病毒與標靶細胞之間的作用，並期能求得有效抑制腸病毒或甚至其他類似病毒的有效成份。本實驗已成功由穿心蓮乙酸乙酯萃取物分離、純化得到 26 個化合物，將其與腸病毒培養，實驗結果發現 5-hydroxy-7,8-dimethoxyflavanone (2)、Cinnamic acid (5)、5-hydroxy-7,8,2',5'-tetramethoxyflavone (9)、andrograpanin (10)、ergosterol peroxide (11)、新化合物(15)、14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (17)、3,19-O-acetyl-14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (19)、新合成衍生物 20、23、24、25 等化合物具保護腸病毒感染之潛力。

關鍵詞：穿心蓮、腸病毒 71 型、14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide

Number: CCMP96-RD-214

Effect of *Andrographis paniculata* EtOAc Fraction Extract on Enterovirus 71 Infection

Bi-Fong Lin

National Taiwan University

ABSTRACT

Enterovirus 71 (EV71) belongs to Enterovirus genus within Picornaviridae. Enterovirus 71 has been the most important enterovirus to cause hand-foot and mouth disease accompanied with neurological complication. *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees. (It is called Chuan-Chin-Lian in Chinese) of Acanthaceae family is one of the Chinese herbs reputed to be effective in the treatment of infection, inflammation, cold and fever. To investigate and pursue a effective Chinese herb medicine to for anti-infection, the effect of *Andrographis paniculata* EtOAc fraction extract will be studied using EV71 target cell RD cells for co-culture study of *Andrographis paniculata*. Total 12 pure compounds were isolated by the bioassay guided fractionation test. The isolated active compounds were identified by NMR and mass spectrometry to elucidate the chemical structures. Our data shown that 5-hydroxy-7, 8-dimethoxyflavanone (**2**), Cinnamic acid (**5**), 5-hydroxy-7,8,2',5'-tetramethoxyflavone (**9**), andrograpanin (**10**), ergosterol peroxide (**11**), compound **15** was for the first time isolated from *A. paniculata* and reported here as new natural products, 14-deoxy-11, 12-didehydroandrographolide (**17**), synthesized products 3,19-*O*-acetyl-14-deoxy-11, 12-didehydroandrographolide (**19**) and new synthesized products **20**, **23**, **24**, **25** all have anti-EV71 infection in RD cell.

Keywords: *Andrographis paniculata*, EV71, 14-deoxy-14, 15-dehydroandrographolide

壹、前言

五千年文化所孕育出的中醫藥學，在近年來追求學理驗證的努力下，已逐漸受到全世界的重視與肯定，目前正是中醫藥學蓬勃發展的時代。然而，尚有許多中醫藥典記載的中草藥與功能，如許多文獻記載，大多數扶正中藥，屬於免疫促進劑，而扶正中藥又叫滋補強壯藥，是對正氣虛而設的，據中醫辨證，正氣虛有氣虛（肺脾氣虛）、血虛（心脾血虛或肝脾血虛）、陰虛（腎陰虛或肝腎陰虛）、陽虛（腎陽虛或脾腎陽虛）等證。按中藥補氣、補血、補陰、補陽的功能分類，討論其免疫調節作用。總之，補益肺衛之氣的藥如人蔘、黃耆、健脾益氣的黨蔘、靈芝、白朮、茯苓、薏仁、以及菇菌類都有調節免疫系統的功能。常用補血藥如當歸、雞血藤、阿膠、熟地等皆可調節免疫。補陽藥淫陽藿、菟絲子、肉蓯蓉、巴戟天、補骨脂、鎖陽、肉桂等都具免疫調節作用。補陰藥枸杞子、山茱萸、五味子、女貞子、銀耳、冬蟲夏草、桑寄生、黃精、何首烏、石斛等也都有免疫調節作用^(1,2)。

綜上所述，補氣、補血、補陰、補陽藥多可提高免疫功能，屬於中藥免疫促進劑。另外免疫功能出現過高的免疫反應，則會造成生物體損傷而導致免疫性疾病。因此需要抑制此種過度反應，使之趨於正常，達到免疫平衡，亦即中醫的陰陽平衡。而免疫反應是在抗原作用下各種免疫細胞成份相互作用的結果，表現為抗體形成或特異性免疫活化細胞的產生，因此；清除抗原或抑制抗體，或抑制活性免疫細胞的產生，均可達到抑制免疫反應之目的，如清熱解毒類藥物穿心蓮、板藍根、銀花、大青葉、魚腥草、黃連、黃芩、白花蛇舌草、槐子、蒲公英、龍膽草等都可抑制免疫反應，一般說來，去邪類中藥，主要起抑制免疫的作用⁽³⁾。所以在中醫辨證原則指導下，調節陰陽，即可從而調節免疫。總之扶正藥主要發揮促進細胞免疫作用，去邪藥主要抑制體液免疫，相輔相成，以增強免疫反應，達到免疫平衡。仍待科學方法加以確定。而建立篩選平台，可否更有效的從種類繁多的中草藥篩檢出調節免疫力、促進健康的中草藥？是值得探討的問題。因此，本研究室四年前建立以啟動子轉殖細胞株篩檢調節免疫力之中藥的模式，進而由二十多種中草藥中進行篩選與動物模式驗證等，在中草藥科學驗證努力上，盡一份心力。

中草藥已在華人社會使用超過兩千年以上之歷史且治癒無數疾病，並有許多著名之本草著作流傳至今。但就治療人類疾病而言，相較於合成藥物，天然草藥往往欠缺直接之科學實驗證據來支持其治病或調節身體機能

之功用與機轉，因而阻礙了天然草藥的被接受性與發展；然而目前預防重於治療的觀念，保健養生與華人傳統藥膳養生的飲食習慣不謀而合，人們開始尋求由植物來源之可能用於保健或治病的良方，也使得中草藥受到國際社會與華人的重新重視。由於近幾年來病毒感染相關疾病，經常發生而常有因無抗感染的免疫力，而造成流行或傷亡的損失。因此，本研究欲先利用在研究室較易進行探討而無安全上顧慮的腸病毒，作為中草藥可能具有潛在抗病毒的研究，希望能藉由此研究，將來也能進一步探討其他亦具有同樣初篩結果的中草藥材，或以類似機轉探討對其他病毒也具抑制抗感染力的中草藥。

腸病毒 71 型(Enterovirus 71；EV71)分類上屬於小 RNA 病毒科(Picornaviridae)，腸病毒屬(Enterovirus genus)；不含外套膜的正股 RNA 病毒，其基因大小約 7.5 kb，臨床症狀主要造成手足口症，而對於三歲以下嬰幼兒則較常併發神經系統病變或肺部發炎浸潤，甚至造成死亡，且腸病毒併發肺水腫的原因除了中樞神經系統病變外，也可能與感染期間誘發過度發炎反應促使細胞分泌過量的細胞激素進而造成肺部細胞的浸潤有關，也是一種會造成神經性疾病的病毒，也曾在世界各地由於中樞神經系統的感染而引起大量的死亡及致病的病例。許多的研究已指出，病毒的感染會引起發炎反應並會誘發 iNOS 還有 COX-2 的表現。自從 1998 年來台灣多次發生腸病毒 71 型的感染與流行，其主要感染對象為五歲以下兒童，輕微感染時出現手足口症、咽峽炎等症狀，腸病毒 71 型的嚴重性在於造成致死性的肺水腫，以及侵犯中樞神經系統，造成腦膜炎、無菌性腦膜炎以及小兒麻痺樣症候群等症狀⁽⁴⁻⁹⁾。

而由本實驗室之前研究顯示，具清熱、解毒之穿心蓮 EtOAc 萃取物，可顯著延長發炎小鼠之存活率，與其血清、腹腔細胞中 TNF- α 、IL-12 p40、MIP-2、NO 含量顯著降低，及腦、肺臟組織中 MIP-2、iNOS mRNA 表現量降低具有相關性(CCMP95-RD-213)。且將穿心蓮乙酸乙酯層萃取物以不同極性(100% Hexane, 5% EA/Hexane, 10% EA/Hexane, 20% EA/Hexane, 30% EA/Hexane, 50% EA/Hexane, 70% EA/Hexane, 100% EA/Hexane, 10% Methnal/EA, 30% Methnal/EA, 50% Methnal/EA) 流洗，以純化、分離活性成份。實驗結果經 ¹H-NMR 測定已鑑定出經由 50% EA/Hexane 流洗得到純化合物 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide；而 100% EA/Hexane 流洗得到已知為穿心蓮之主成份的純化合物 andrographolide，及其他區分物。

關於穿心蓮於抗病毒方面之研究，Chiou 等人⁽¹⁰⁾於 2006 年研究發現，穿心蓮可顯著降低感冒病毒(influenza A virus strain A/PR/8/34 (H1N1))感染

人類支氣管上皮細胞(A549)分泌化學趨化物質 Rantes 之含量。然而；穿心蓮目前尚無有關腸病毒 71 型感染之相關文獻報導。自從 1998 年來台灣多次發生腸病毒 71 型的感染與流行，至今仍無有效藥物治療，且許多臨床症狀已知腸病毒 71 型感染之病人，呈現嚴重發炎反應。而本實驗室已於先前一系列穿心蓮於抗發炎之研究，發現可顯著降低 NF- κ B Luciferase 活性，減少 NF- κ B 啟動發炎反應之進行，預期穿心蓮可抑制腸病毒造成的嚴重發炎反應。故，本實驗將穿心蓮乙酸乙酯萃取物以不同極性流洗，單離、鑑定出純化合物，將進一步利用腸病毒易感染的細胞(Rhabdomyosarcoma, RD cell)作為腸病毒感染的標靶細胞(Target cell)，進行細胞共同培養方式，探討穿心蓮各種化合物之作用，偵測是否減少腸病毒毒殺標靶細胞能力，或是添加於腸病毒與 RD 細胞共同培養時，是否可阻斷腸病毒與標靶細胞之間的作用，並期能求得有效抑制腸病毒之活性成份。

貳、材料與方法

一、穿心蓮乙酸乙酯層化合物分離、純化與鑑定

穿心蓮為爵床科一年生草本植物穿心蓮 (*Andrographis paniculata* (Burm. F.)Nees) 的全草及葉。中藥飲片購自台北市迪化街永盛藥行，穿心蓮中藥飲片經勝昌製藥李威著博士鑑定基源。將 9 公斤之穿心蓮乾燥全草及葉，以 95% ethanol (60 L) 於室溫下浸泡 3 次，每次 5 天，將三次乙醇萃取液經減壓濃縮所得之萃取物濃縮液，以 1:1 的水和乙酸乙酯進行分配萃取，萃取 3 次，經減壓濃縮所得之穿心蓮乙酸乙酯萃取物約為 316.88 g，以 1.5 倍重量之矽膠吸附乙酸乙酯萃取物，充填 10 倍重量之矽膠進行色層分析，沖提液依序為 Hexane、ethyl acetate (EtOAc)、Methanol。

由 9 公斤之穿心蓮乾燥全草及葉所萃得之乙酸乙酯層萃取物約為 316.88 g，以 1.5 倍重量之矽膠吸附乙酸乙酯萃取物，充填 10 倍重量之矽膠進行色層分析，沖提液依序為 100 % Hexane、5% EA/Hex、10% EA/Hex、20% EA/Hex、30% EA/Hex、50% EA/Hex、70% EA/Hex、100% EA、10% MeOH/EA、30% MeOH/EA、50% MeOH/EA，每 1.5 L 流洗體積收集一瓶，共收得 220 瓶，經加總所有粗分重量為 265.39 g，顯示此次回收率約為 84%。而所得之 220 瓶流洗液經減壓濃縮所得粗產物，以 TLC 點片合併，共得 26 個區分物，以短暫轉染 pNF- κ B Luciferase 轉錄活性分析，作為追蹤穿心蓮活性區分物之實驗模式，發現在第 9-14 區分物(active fractions A)和 15-16 區分物(active fractions B)皆具有顯著降低經 LPS/IFN- γ 活化下 pNF- κ B Luciferase 活性($p < 0.05$)。

【9-14 區分物 (active fractions A) 之單離與結構鑑定】

首先；將具有活性之第 9-14 區分物全部合併後，減壓濃縮所得粗產物，進行色層分析，沖提液依序為 10% EA/Hex、20% EA/Hex、30% EA/Hex、50% EA/Hex、70% EA/Hex、100% EA，每 200 ml 流洗體積收集一瓶，共收得 95 瓶，經加總所有再流洗重量為 8.95 g，顯示此次回收率約為 81%。而所得之 95 瓶流洗液經減壓濃縮，再以 TLC 點片合併，共得 15 個區分物，以 pNF- κ B Luciferase 活性追蹤穿心蓮具有活性區分物，顯示在第 7-10 區分物和 12-14 區分物具有顯著降低經 LPS/IFN- γ 活化下 pNF- κ B Luciferase 活性($p < 0.05$)。接著將第 7-10 區分物和 12-14 區分物，分別以各種不同比例之溶劑進行 HPLC 分離、純化，且進行 ^1H NMR 光譜鑑定，經由比對結果，發現得純化合物分別為：5-hydroxy-7,8-dimethoxyflavone (1)、5-hydroxy-7,8-dimethoxyflavanone (2) ⁽¹¹⁾，和一個混合存在的化合物 β -sitosterol and stigmasterol (3) ⁽¹²⁾，3,4-dimethoxy-benzoic acid methyl ester (4)，Cinnamic acid (5)，5-hydroxy-7,8,2',3'-tetramethoxyflavone (6)，同時也

得到一個天然物首次分離的七個碳之化合物 (7)，1-(4-hydroxyphenyl)ethanone (8)，5-hydroxy-7,8,2',5'-tetramethoxyflavone (9)，andrograpanin (10)⁽¹³⁾，ergosterol peroxide (11)⁽¹⁴⁾，1-(2,5-dimethoxyphenyl)ethanol (12)，aurantiamide acetate (13)⁽¹⁵⁾，新化合物 (14) 等。

【15-16 區分物(active fractions B)之單離與結構鑑定】

再將具有活性之第 15-16 區分物全部合併後，減壓濃縮所得粗產物，進行色層分析，沖提液依序為 10% EA/Hex、20% EA/Hex、30% EA/Hex、50% EA/Hex、70% EA/Hex、100% EA，每 100 ml 流洗體積收集一瓶，共收得 62 瓶，經加總所有再流洗重量為 2.55 g，顯示此次回收率約為 73%。而所得之 62 瓶流洗液經減壓濃縮，再以 TLC 點片合併，共得 18 個區分物，以 pNF- κ B Luciferase 活性追蹤穿心蓮具有活性區分物，其結果顯示在第 8-9 區分物和 11-12 區分物具有顯著降低經 LPS/IFN- γ 活化下 pNF- κ B Luciferase 活性 ($p < 0.05$)。接著將第 8-9 區分物和 11-12 區分物，分別以各種不同比例之溶劑進行 HPLC 分離、純化，得到兩個新化合物(15)、(16)。

【17、21 區分物再結晶之單離與結構鑑定】

以 50% EA/Hex 進行流洗過程中所收集之瓶數為 110-115 等瓶 (17 區分物)，經減壓濃縮後產生大量粉狀化合物，經再結晶，以 ¹H NMR 光譜鑑定，經由比對結果，發現得純化合物 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (17)⁽¹⁶⁾。

以 100% EA ~ 10% MeOH/ EA 進行流洗過程中所收集之瓶數為 156-179 等瓶(21 區分物)，經減壓濃縮後產生大量粉狀化合物，經再結晶，以 ¹H NMR 光譜鑑定，經由比對結果，發現得純化合物 andrographolide (18)⁽¹⁷⁾，其為已知穿心蓮中主要 diterpene lactones 成份之一。

【乙醯化反應之單離與結構鑑定】

取化合物 17 進行乙醯化反應，再以 HPLC 分離、純化、光譜鑑定，經比對結果，發現得純化合物為 3,19-*O*-acetyl-14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (19)、新合成衍生物(20)。另外；取化合物 18 進行乙醯化反應，再以 HPLC 分離、純化、光譜鑑定，經比對結果，發現得純化合物 3,19-*O*-diacetylanhydroandrographolide (21)、及新合成衍生物 22。

【氫化反應之單離與結構鑑定】

將化合物 17 進行氫化反應，再進行 HPLC 分離、純化、光譜鑑定，經由比對結果，純化得產物為一新合成衍生物 23。

【氧化反應之單離與結構鑑定】

取化合物 17 進行氧化反應，再以 HPLC 分離、純化、光譜鑑定，純化得產物分別為兩個新合成衍生物 24、25 及 3-oxolabda-8(17),11*E*,13-trien-

16,15-olide (26)。

二、RD (Human rhabdomyosarcoma) 細胞培養

將人類胚胎橫紋肌肉瘤細胞 (RD cell) 培養於含有 10% FBS-Minimum Essential Medium (10% FBS-MEM α medium)，置於 5% CO₂ 之 37°C 培養箱。

三、腸病毒 71 型 (EV 71, 2272 strain) 培養

先以含 10% FBS-MEM α medium 於 15 cm 培養盤，並使之長成約 7~8 分滿，吸除舊的培養液，再加入含 2% FBS-MEM α medium，並接種入 15 μ l EV 71，置於 5% CO₂ 之 37°C 培養箱培養約 3 天後，連同培養液吸入 50 ml 離心管，以 3000 rpm 離心 10 分鐘，吸取 1 ml 上清液分裝，保存於 -70°C 冰箱，以待測定每 1 ml 病毒液的半數組織培養感染劑量 (TCID₅₀/ml)。

四、半數組織培養感染劑量 (Tissue culture infection dose, TCID₅₀)

先將 RD cell 以 2×10^4 cell/well 培養至 96 well plate，將待測病毒先經由 10 倍序列稀釋後，加入 50 μ l 稀釋過的病毒液於 96 well plate， $10^{-3} \sim 10^{-10}$ (三重覆)，放入 5% CO₂ 之 37°C 培養箱，3 天後取出 96 well plate，觀察是否有細胞病變 (cytopathic effect, CPE) 產生，並將之記錄下來分別計算每 1 ml 病毒液有多少 TCID₅₀。

五、FACScan 分析

將 RD cell 以 3×10^5 cell/well 培養至 6 well plate，放入 5% CO₂ 之 37°C 培養箱隔夜培養，吸掉舊培養基，添加不同濃度之穿心蓮乙酸乙酯萃取物 (50 ~ 10 μ g/ml)、純化合物 1 ~ 12 (10 ~ 2.5 μ g/ml) 與 RD cell 預培養 2 小時，再添加由 TCID₅₀ 實驗求得之 EV 71 病毒液，共同培養 48 小時後，以顯微靜觀察 CPE 情形，並拍照記錄之。

加入適量 trypsin 處理細胞，使其由 6 well plate 培養皿表面脫落，再添加適量 2% FBS-MEM α medium 終止 trypsin 反應，以 3000 rpm 離心 5 分鐘，吸去上清液，加入 1 x PBS buffer，3000 rpm 離心 5 分鐘，吸去上清液，加入 methanol 於 4°C 反應 30 分鐘，3000 rpm 離心 5 分鐘，吸去上清液，加入 1 x PBS buffer，3000 rpm 離心 5 分鐘，吸去上清液，加入 RNAase A 於室溫下反應 10 分鐘，再加入 PI (Propidium iodide, Sigma)，於冰上避光反應 15 分鐘，以流式細胞儀 (FACScan, BD) 收集細胞，並以 CellQuest 軟體分析數據。

六、統計分析

實驗結果均以平均值 \pm 標準偏差 (Mean \pm SD) 表示。以 Student's *t*-test 來檢定兩者間之顯著差異， $p < 0.05$ 即視為有顯著差異 (在本次實驗中以 * 表 $p < 0.05$ ；統計分析係用 SAS 軟體 (SAS/STAT version 8.2; SAS Institute, Cary, NC, USA)。

參、結果與討論

一、半數組織培養感染劑量(Tissue culture infection dose, TCID₅₀)之決定

圖 1 是本次實驗所製備之 EV 71 病毒液之 TCID₅₀，經由 10 倍序列稀釋後，加入 50 μ l 稀釋過的病毒液於 96 well plate， $10^{-3} \sim 10^{-10}$ (三重覆)，放入 5% CO₂ 之 37°C 培養箱，3 天後取出 96 well plate，觀察細胞病變 (CPE) 產生結果，RD 細胞為紡錘狀之細胞，如果被 EV 71 病毒感染，細胞會變圓並死亡，這種細胞型態之改變稱為細胞病理效應 (CPE)，可作為評估腸病毒感染之指標之一，但應再進一步配合能進行定量之判讀指標。由本次實驗結果顯示， $10^{-3} \sim 10^{-6}$ EV 71 病毒液會造成 RD cell 全部產生 CPE 情形，而 10^{-7} EV 71 病毒液在 10 個 well 中僅有 4 個 well 呈現 CPE 情形，另外 $10^{-8} \sim 10^{-10}$ EV 71 病毒液不會造成 RD cell 產生 CPE，經由公式計算出此批實驗每 1 ml 病毒液之 TCID₅₀ 為 10^{-7} 。

圖 2 之實驗結果是腸病毒 EV 71 感染 RD 細胞，48 小時後產生細胞病變之結果。Normal RD cell 是指僅以 2% FBS-MEM α medium 培養 48 小時；而 DMSO only 是指僅以含有等同穿心蓮乙酸乙酯萃取物之 DMSO 溶劑溶於 2% FBS-MEM α medium 培養 48 小時；另外 EV 71 10^{-8} 意指添加之病毒液經由 10 倍序列稀釋後為 10^{-8} 者。上述三種處理經由顯微鏡觀察結果顯示，皆不會造成細胞病變之產生。反之；隨著病毒液經由 10 倍序列稀釋後為 $10^{-5} \sim 10^{-7}$ 者，其產生 CPE 之嚴重度為 $10^{-5} > 10^{-6} > 10^{-7}$ 。再利用 PI stain 染色，將腸病毒造成 RD 細胞 apoptosis 之 subG1 值定量分析，由結果可知，隨腸病毒濃度增加 apoptosis 產生之 subG1 值越高，EV71 10^{-6} (subG1 = 86%) > EV71 10^{-7} (subG1 = 61%) > EV71 10^{-8} (subG1 = 22%)，其結果如圖 3 所示，同時由顯微鏡觀察結果亦可發現隨腸病毒濃度增加 CPE 產生情形愈嚴重。研究已知 RD 細胞經 EV71 感染後會誘導進行 apoptosis 而死亡，利用 PI 染色經 flow cytometry 分析可發現 subG1 (此數值可進行定量) 明顯增加，此結果亦可作為判讀腸病毒感染之指標之一⁽¹⁸⁾。

二、穿心蓮乙酸乙酯層萃取物對影響腸病毒感染力之結果

在預備實驗中，曾先將穿心蓮乙酸乙酯萃取物與腸病毒 EV 71 預培養 2 小時，再加入腸病毒易感染的細胞 (RD cell)，但對於 RD cell 產生 CPE 情形並無保護效果。因此；本次實驗主要先將穿心蓮乙酸乙酯萃取物與 RD cell 預培養 2 小時，再加入腸病毒 EV 71 病毒液。而利用腸病毒易感染的細胞作為腸病毒感染的標靶細胞 (Target cell)，進行細胞共同培養方式，探討中草藥之作用。

當給予不同濃度之穿心蓮 (Andrographis paniculata, Ap) 乙酸乙酯萃取物與 RD cell 預培養 2 小時，其對腸病毒 EV 71 產生細胞病變之結果，發現穿心蓮乙酸乙酯萃取物濃度為 45~25 μ g/ml 時，對於產生 CPE 之情形最具

保護效果。且由流式細胞儀 (flow cytometric) 分析之結果顯示穿心蓮乙酸乙酯萃取物濃度為 45~25 $\mu\text{l/ml}$ ，對於腸病毒造成 apoptosis 產生之 subG1 值較低，如圖 4 所示。

三、分離、純化自穿心蓮之化合物及其合成衍生物

本實驗由穿心蓮乙酸乙酯層萃取物，經不同極性流洗共得 26 個區分物，以短暫轉染 pNF- κ B Luciferase 轉錄活性分析，作為追蹤穿心蓮活性區分物之實驗模式，發現在第 9-14 區分物 (active fractions A) 和 15-16 區分物 (active fractions B) 皆具有顯著降低經 LPS/IFN- γ 活化下 pNF- κ B Luciferase 活性表現 ($p < 0.05$)，如圖 5 所示。

再將第 9-14 區分物 (active fractions A) 和 15-16 區分物 (active fractions B) 分別經不同極性流洗，以短暫轉染 pNF- κ B Luciferase 轉錄活性分析，作為追蹤穿心蓮活性區分物，如圖 6 ~7 所示。更進一步再分別以各種不同比例之溶劑進行 HPLC 分離、純化，且進行 ^1H NMR 光譜鑑定，經由比對結果，已鑑定出穿心蓮中具有活性之成份共有 26 個化合物，其中 1 ~ 18 個由天然物分離得到，其中 7, 14, 15, 16 這 4 個是新化合物；另外，也將穿心蓮中含量最豐富的兩個化合物 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (17) 如圖 8, andrographolide (18) 如圖 9，利用化學合成 (乙醯化、氫化和氧化反應)，合成 8 個衍生物分別為 19 ~ 26，其中 20, 22, 23, 24, 25 衍生物是新化合物。穿心蓮有關抗發炎之研究已有許多文獻報告^(19~25)，有些為已知化合物，然本次實驗中亦有發現由穿心蓮中所分離純化而得之新化合物和衍生物。

四、分離、純化自穿心蓮之化合物及其合成衍生物對影響腸病毒感染力之結果

本實驗由穿心蓮乙酸乙酯萃取物分離、純化得到 26 個化合物，將其與腸病毒 EV71 進行培養，實驗結果發現由 active fractions A 中所找到的 5-hydroxy-7,8-dimethoxyflavanone (2)、由 active fractions B 中所找到的新化合物 (15) 具保護腸病毒感染之潛力；但是再結晶純化所得之 andrographolide (18)、由 active fractions B 中所找到的新化合物 (16) 則不具保護腸病毒感染之效果，如圖 10 所示。

因此；將自穿心蓮乙酸乙酯萃取物分離、純化得到 26 個化合物，與腸病毒培養進行有效化合物篩選，其結果如表 1 所示，有 12 個化合物具保護腸病毒感染之潛力，另外有 5 個化合物可能具有保護感染之潛力，其餘的化合物則不具保護腸病毒感染之作用。

更進一步將具保護腸病毒感染潛力的化合物，以不同濃度進行保護腸病毒感染之實驗，並以流式細胞儀分析其 sub G1 含量，結果顯示 5-hydroxy-7,8-dimethoxyflavanone (2)、Cinnamic acid (5)、5-hydroxy-7,8,2',5'-tetramethoxyflavone (9)、andrograpanin (10)、ergosterol peroxide (11)、新化

合物(15)、14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (17)、3,19-*O*-acetyl-14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (19)、新合成衍生物 20、23、24、25 等化合物具保護腸病毒感染之潛力，且具顯著劑量效應，如表 2 所示，同時，這些化合物所需劑量較穿心蓮乙酸乙酯萃取物更低，且目前尚未有文獻報告。其中本次實驗所篩選出具有抗腸病毒之化合物，主要可分為 flavonoids 類：如化合物 2, 9、diterpenoids 類：如化合物 10, 17, 19 新合成衍生物及固醇類：如化合物 11 和其他類化合物如 Cinnamic acid 等，由表 2 之實驗結果可發現，可能因各類化合物上官能基團不同，而使其在抑制腸病毒感染後之 subG1 (%) 沒有呈現明顯劑量效應或結構—活性相關性 (Structure-activity relationship)。在本實驗中 flavonoids 類化合物和固醇類化合物具有劑量效應，diterpenoids 類化合物只有 3 個新合成衍生物不具劑量效應，推測可能在這濃度範圍內 (2.5 ~ 10 ug/ml) 不是其有些作用濃度。目前已知抗小 RNA 病毒的藥物：rhodamine, flavonoids, chalcones, aralkylamino-pyridines, oxazolinyl isoxazole, pyridainamine, imidazole 等系列，因此本實驗由穿心蓮中所分離出之 flavonoids 類化合物極具開發價值，另外 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (17) 已知具有抗 HIV、HSV-1 活性^(26 ~ 27)，顯示由中草藥材中尋找具有抗病毒感染之有效成分，將帶給人類一線曙光。

在本實驗中亦探討由穿心蓮中所分離出具有抗腸病毒感染之化合物，其對於 IFN- γ 活化之影響，將 5-hydroxy-7,8-dimethoxyflavanone (2)、Cinnamic acid (5)、5-hydroxy-7,8,2',5'-tetramethoxyflavone (9)、andrograpanin (10)、ergosterol peroxide (11)、新化合物(15)、14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (17)、3,19-*O*-acetyl-14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (19)、新合成衍生物 20、23、24、25 等化合物，添加於經 pIFN- γ 短暫轉染之 EL-4 T 細胞，偵測其 pIFN- γ Luciferase activity，其結果如圖 11(A) 所示，其中以化合物 5, 15, 新合成衍生物 23、24、25 可顯著增加 pIFN- γ Luciferase activity，將這些化合物影響 pIFN- γ Luciferase activity 與影響 RD 細胞 subG1 生成量進行相關性分析，結果顯示 pIFN- γ Luciferase activity 愈高，subG1 生成量愈少，呈現顯著負相關 ($r = -0.5$, $p = 0.01$)。另外；也將其進行 pNF- κ B Luciferase activity 分析，其結果如圖 11(B) 所示，這些化合物在沒有添加刺激劑 LPS/IFN- γ 下並不會活化 NF- κ B，此實驗方法與上述用來作為追蹤穿心蓮活性區分物之實驗模式不同。在抗病毒之免疫系統中主要以活化 T 細胞分泌 IFN- γ 來達成，因此由此實驗可知本次所篩選出具有抗病毒之化合物主要經活化 IFN- γ 來降低腸病毒之感染有關。

肆、結論

中草藥已在華人社會使用超過兩千年以上之歷史且治癒無數疾病，並有許多著名之本草著作流傳至今。但就治療人類疾病而言，相較於合成藥物，天然草藥往往欠缺直接之科學實驗證據來支持其治病或調節身體機能之功用與機轉，因而阻礙了天然草藥的被接受性與發展；而目前由於合成藥物面臨發展瓶頸，人類開始尋求由植物來源之可能用於保健或治病的良方，也使得中草藥受到國際社會與華人的重新重視。過去傳統中藥使用多以複方為主，加上中藥成分複雜，所以在研究上受到許多限制，但近年來隨著藥理學的發展，許多中藥的有效成分已被確定，且進一步分離純化出來，唯有本著結合天然物分離、純化、鑑定與藥理活性篩選之研究，才能有機會把中草藥真正推向國際，廣為全世界使用。

本研究由穿心蓮萃取物中分離、純化出具影響腸病毒感染力之化合物；另一方面，也利用化學合成（乙醯化、氫化和氧化反應）將已知化合物經化學修飾產生衍生物，並且確定其化合物結構，共有 12 種化合物，其中包括 5 種化合物為 new compound，另外 7 種為已知化合物，但其影響腸病毒感染力之效果為首次發現，具申請專利價值，本研究正擬專利申請。

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-214 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

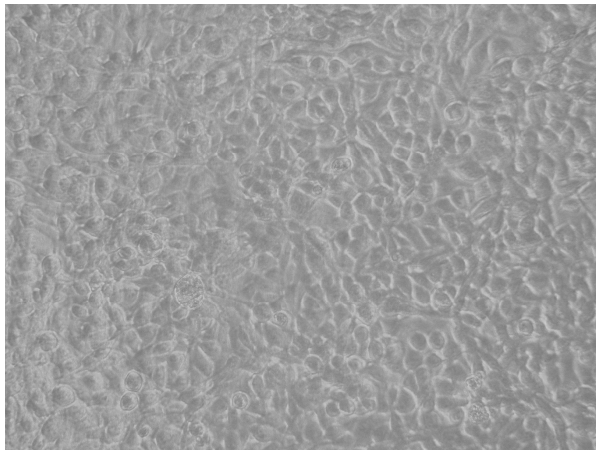
伍、參考文獻

1. 行政院衛生署中華藥典中藥集編修小組：中華中藥典，行政院衛生署編印，台北市，2004。
2. 陳榮福、顏焜熒：中藥藥理學，國立中國醫藥研究所，台北市，1991。
3. 李沐勳、李威著：常用中草藥手冊，國立中國醫藥研究所，台北市，2001。
4. 林才宇：腸病毒 71 型之 VP1 蛋白質及 DNA 在小鼠誘發免疫反應之研究。碩士論文。國立台灣大學口腔生物科學研究所，2003。
5. 蔡幸娟：研究腸病毒 71 型的外鞘蛋白抗原性作為腸病毒疫苗開發。碩士論文。國立台灣大學口腔生物科學研究所，2006。
6. Wen YY, Chang TY, Chen ST, Li C, Liu HS. Comparative study of enterovirus 71 infection of human cell lines. J of Med Virol 2003,70:109-118.
7. Liang CC, Sun MJ, Lei HY, Chen SH, Yu CK, Liu CC, Wang JR, Yeh TM. Human endothelial cell activation and apoptosis induced by enterovirus 71 infection. J of Med Virol 2004,74:597-603.
8. Chang LY, Hsiung CA, Lu CY, Lin TY, Huang FY, Lai YH, Chiang YP, Chiang BL, Lee CY, Huang LM. Status of cellular rather than humoral immunity is correlated with clinical outcome of enterovirus 71. Pediatr Res 2006,60:466-471.
9. Chiang LC, Ng LT, Cheng PW, Chiang W, Lin CC. Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum*. Clin Exp Pharmacol Physiol 2005,32:811-816.
10. Ko HC, Wei BL, Chiou WF. The effect of medicinal plants used in Chinese folk medicine on RANTES secretion by virus-injected human epithelial cells. J of Ethnopharmacol 2006,107:205-210.
11. Kuroyanagi M, Sato M, Ueno A, Nishi K. Flavonoids from *Andrographis paniculata*. Chem Pharm Bull 1987,35(11):4429-4435.
12. Plat J, Brzezinka H, Lutjohann D, Mensink RP, Bergmann K. Oxidized plant sterols in human serum and lipid infusions as measured by combined gas-liquid chromatography mass spectrometry. J Lipid Res 2001,42:2030-2038.
13. Chen LX, Qiu F, Wei H, Qu GX, Yao XS. Nine new *ent*-labdane diterpenoids from the aerial parts of *Andrographis paniculata*. Helv Chim Acta 2006,89:2654-2664
14. Kobori M, Yoshida M, Ohnishi-Kameyama M, Shinmoto H. Ergosterol

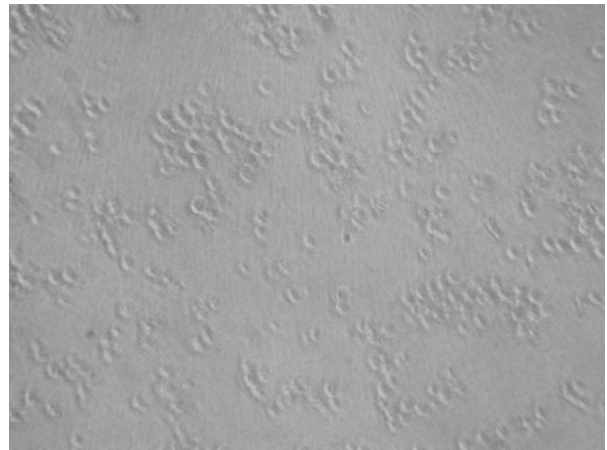
- peroxide from an edible mushroom suppresses inflammatory responses in RAW264.7 macrophages and growth of HT29 colon adenocarcinoma cells. *Br J Pharm* 2007, 150:209-219.
15. Isobe T, Doe M, Morimoto Y, Nagata K, Masuoka N, Ohsaki A. Biological activity tests of chemical constituents from two Brazilian Labiatae plants. *Yakugaku Zasshi* 2007,127:389-395.
 16. Matsuda T, Kuroyanagi M, Sugiyama S, Umehara K, Ueno A, Nishi K. Cell differentiation inducing diterpenes from *Andrographis paniculata* Nees. *Chem Pharm Bull* 1994,42:1216-1225.
 17. Fujita T, Fujitani R, Takeda Y, Takaishi Y, Yamada T, Kido M, Miura I. On the diterpenoids of *Andrographis paniculata*: X-ray crystallographic analysis of andrographolide and structure determination of new minor diterpenoids. *Chem Pharm Bull* 1984,32:2117-2125.
 18. Wu BW, Pan TL, Leu YL, Chang YK, Tai PJ, Lin KH, Horng JT. Antiviral effects of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) against enterovirus 71. *Ame J of Chinese Med* 2007, 35(1):153-168.
 19. Xia YF, Ye BQ, Li YD, Wang JG, He XJ, Lin X, et al. Andrographolide attenuates inflammation by inhibition of NF- κ B activation through covalent modification of reduced cysteine 62 of p50. *J Immunol* 2004,173:4207-17.
 20. Chiou WF, Chen CF, Lin JJ. Mechanisms of suppression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW 264.7 cells by andrographolide. *Br J Pharmacol* 2000,129:1553-60.
 21. Rao YK, Vimalamma G, Rao CV, Tzeng YM. Flavonoids and andrographolides from *Andrographis paniculata*. *Phytochemistry* 2004, 65:2317-2321.
 22. Chen LX, Qiu F, Wei H, Qu GX, Yao XS. Nine new *ent*-labdane diterpenoids from the aerial parts of *Andrographis paniculata*. *Helv Chim Acta* 2006,89,2654-2664.
 23. Qin LH, Kong L, Shi G, Wang ZT, Ge BX. Andrographolide inhibits the production of TNF- α and IL-12 in LPS stimulated macrophages: role of mitogen activated protein kinases. *Biol Pharm Bull* 2006,29:220-224.
 24. Li J, Huang W, Zhang H, Wang X, Zhou H. Synthesis of andrographolide derivatives and their TNF- α and IL-6 expression inhibitory activities. *Bio Med Chem Letters* 2007,17:6891-6894.
 25. Liu J, Wang ZT, Ge BX. Andrograpanin, isolated from *Andrographis paniculata*, exhibits anti-inflammatory property in lipopolysaccharide

- induced macrophage cells through down regulating the p38 MAPKs signaling pathways. *Int Immunopharmacol* 2008,8:951-958.
26. Reddy VL, Reddy SM, Ravikanth V, Krishnaiah P, Goud TV, Rao TP, Ram TS, Gonnade RG, Bhadbhade M, Venkateswarlu Y. A new bis-andrographolide ether from *Andrographis paniculata* Nees and evaluation of anti-HIV activity. *Nat Prod Res* 2005,19(3):223-230.
27. Wiart C, Kumar K, Yusof MY, Hamimah H, Fauzi ZM, Sulaiman M. Antiviral properties of ent-labdene diterpenes of *Andrographis paniculata* Nees, inhibitors of herpes simplex virus type I. *Phytother Res* 2005,19:1069-1070.

陸、圖、表



Normal RD cells



EV 71 2272 strain infection

RD Cell TCID₅₀

10-3	10/10 =1
10-4	10/10 =1
10-5	10/10 =1
10-6	10/10 =1
10-7	4/10 =0.4
10-8	0/10 =0
10-9	0/10 =0
10-10	0/10 =0
Total:	4.4
Log TCID ₅₀ = -3-1(4.4-0.5)	
= -6.9	
=10 ⁻⁷	

圖 1、腸病毒 EV 71 半數組織培養感染劑量(Tissue culture infection dose, TCID₅₀)之結果

48 h

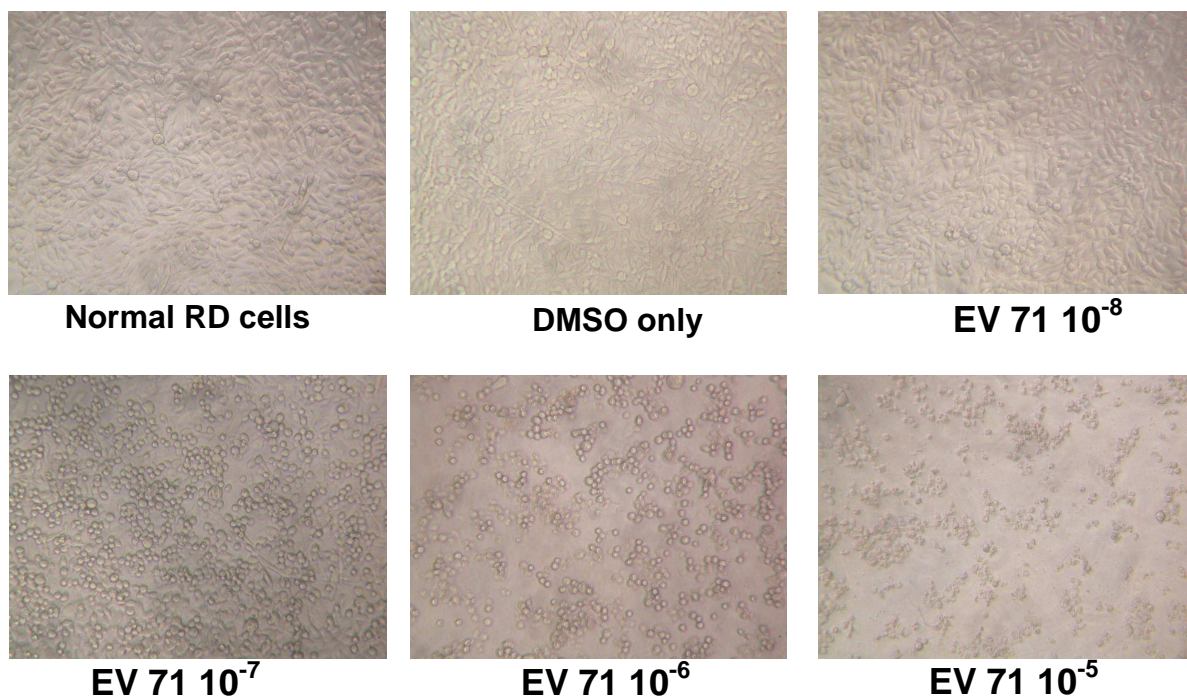


圖 2、腸病毒 EV 71 感染 RD 細胞 48 小時後產生細胞病變(CPE)之結果

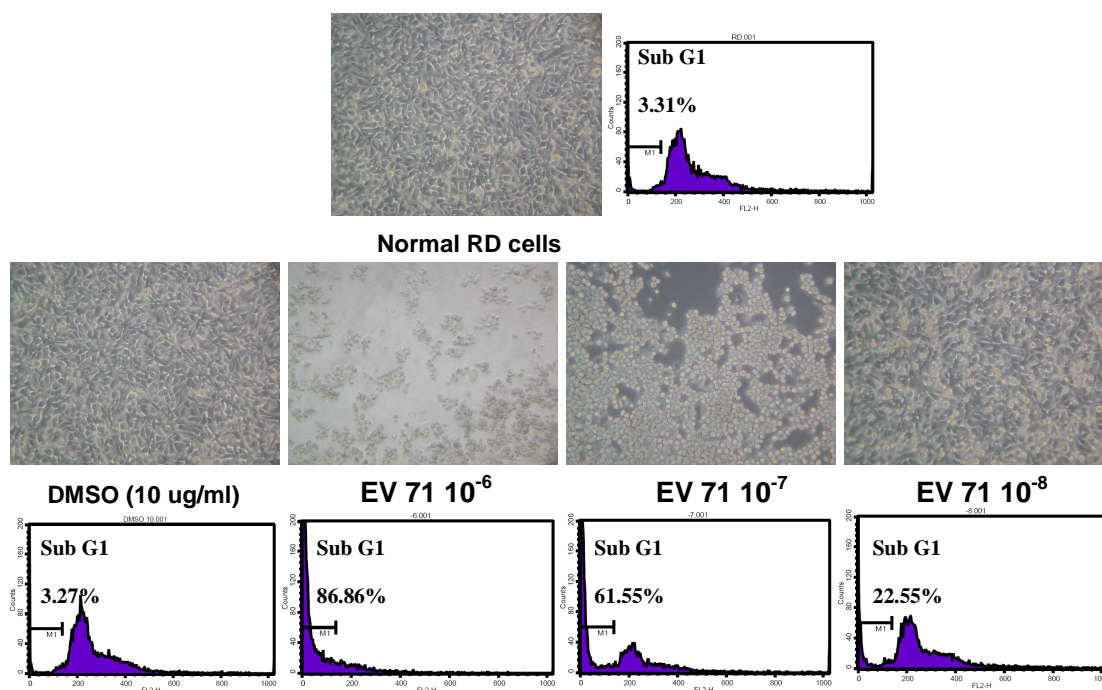


圖3、Flow cytometric analysis of EV 71 infected RD cells. The sub G1 gated region indicates cells undergoing apoptotic changes. The FL-2 represents the intensity of propidium iodide (PI).

不同稀釋濃度之腸病毒對 RD 細胞感染之結果
subG1 (由 apoptosis cells)組成

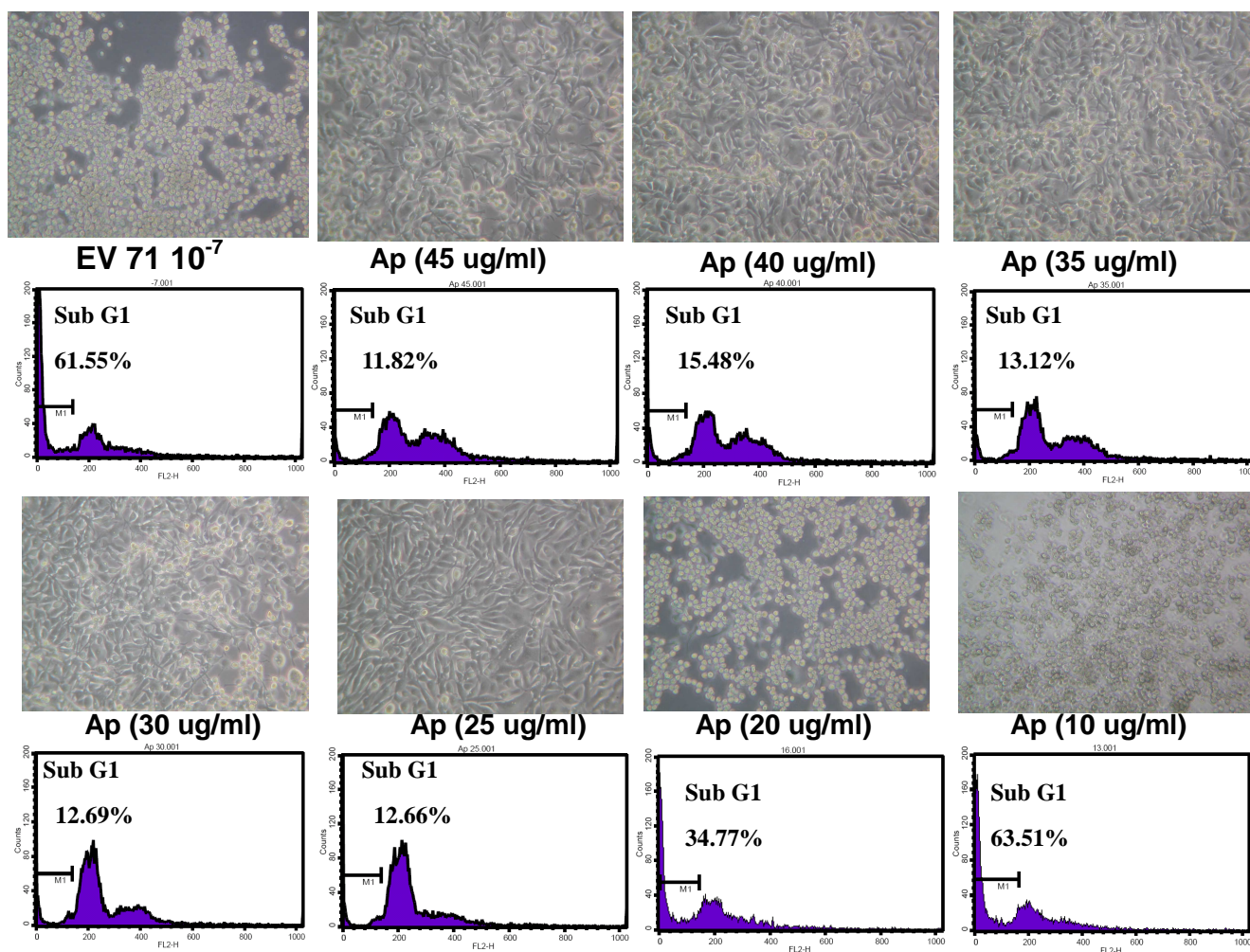


圖 4、不同濃度穿心蓮乙酸乙酯萃取物 (Ap) 對抗腸病毒感染之結果

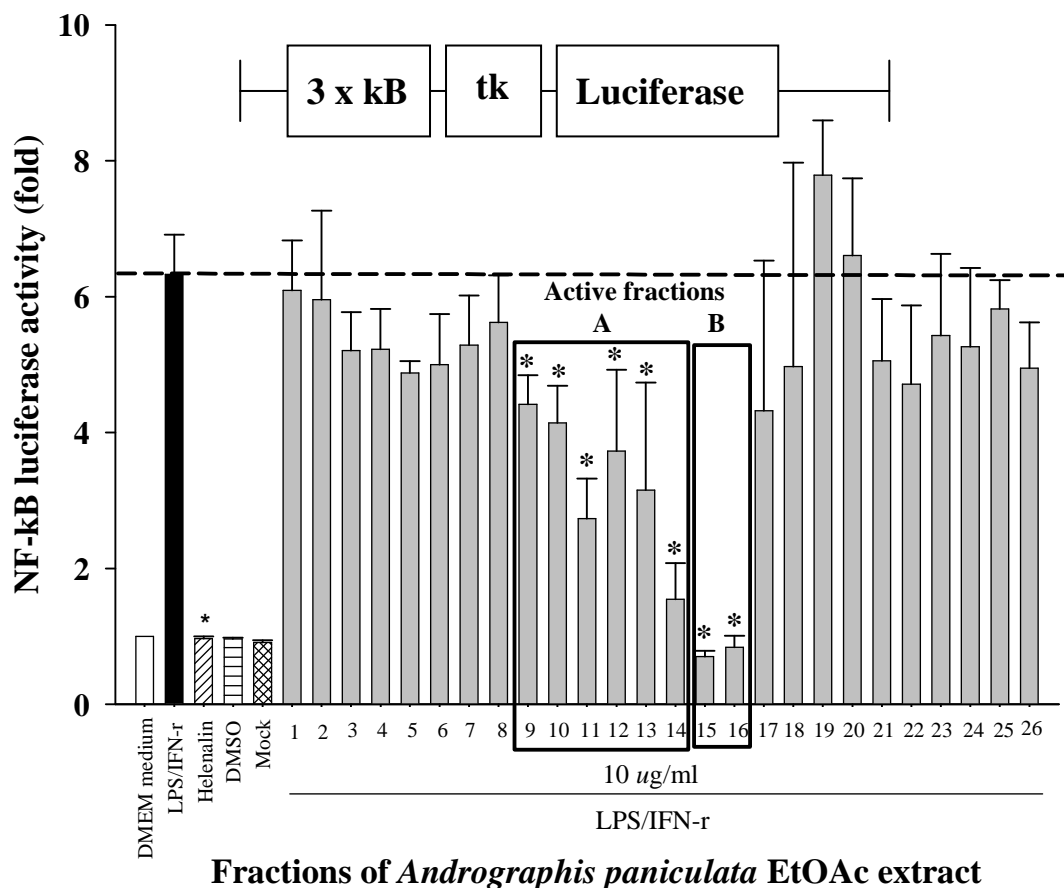
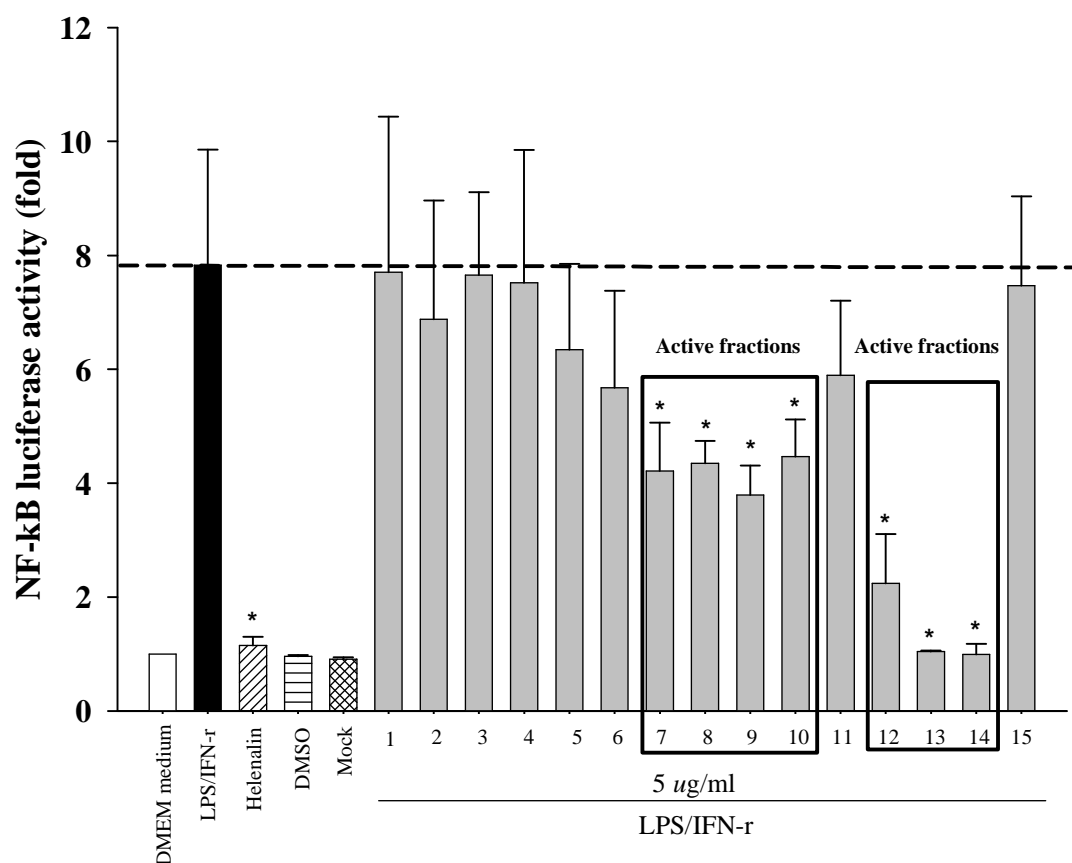
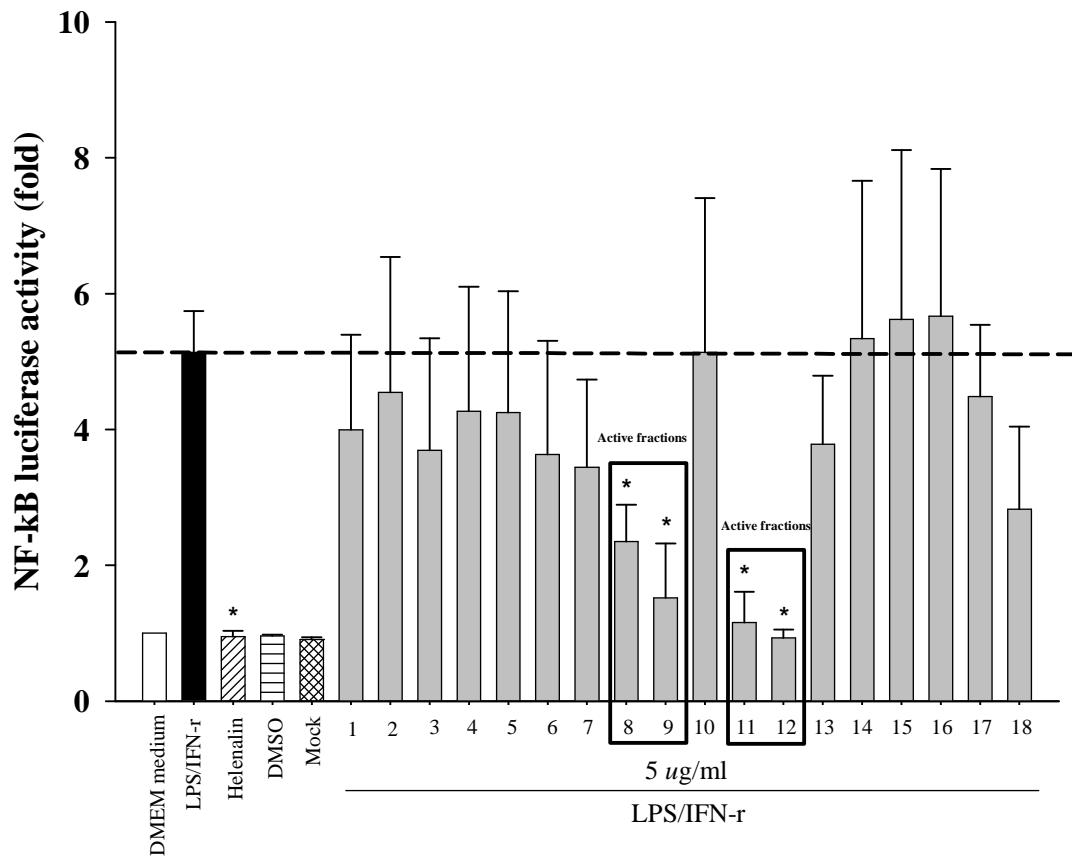


圖 5、Bioactivity-guided chromatographic fractionation of EtOAc extract fractions of *A. paniculata*. RAW 264.7 macrophages transient transfection with a NF-κB reporter plasmid were pre-treated with 26 fractions or helenalin (NF-κB inhibitor, 10 μM) for 1 h and then stimulated with LPS 100 ng/ml/IFN-γ 1000 units/ml for 8 h. The activity of NF-κB was estimated by the Dual-Glo Luciferase reporter assay. The data are reported as the means ± SD from three independent experiments. (*) $p < 0.05$ versus LPS/IFN-γ treated group.



Refractionation of *A. paniculata* EtOAc extract from Fig. 5 active fractions A including 9-14 fractions

圖6、Bioactivity-guided chromatographic fractionation of EtOAc extract 9-14 fractions of *A. paniculata*. RAW 264.7 macrophages transient transfection with a NF-κB reporter plasmid were pre-treated with 15 fractions or helenalin (NF-κB inhibitor, 10 μ M) for 1 h and then stimulated with LPS 100 ng/ml/IFN- γ 1000 units/ml for 8 h. The activity of NF-κB was estimated by the Dual-Glo Luciferase reporter assay. The data are reported as the means \pm SD from three independent experiments. (*) $p < 0.05$ versus LPS/IFN- γ treated group.



Refractionation of *A. paniculata* EtOAc extract from Fig. 5 active fraction B including 15-16 fractions

圖7、Bioactivity-guided chromatographic fractionation of EtOAc extract 15-16 fractions of *A. paniculata*. RAW 264.7 macrophages transient transfection with a NF-κB reporter plasmid were pre-treated with 18 fractions or helenalin (NF-κB inhibitor, 10 μ M) for 1 h and then stimulated with LPS 100 ng/ml/IFN- γ 1000 units/ml for 8 h. The activity of NF-κB was estimated by the Dual-Glo Luciferase reporter assay. The data are reported as the means \pm SD from three independent experiments. (*) $p < 0.05$ versus LPS/IFN- γ treated group.

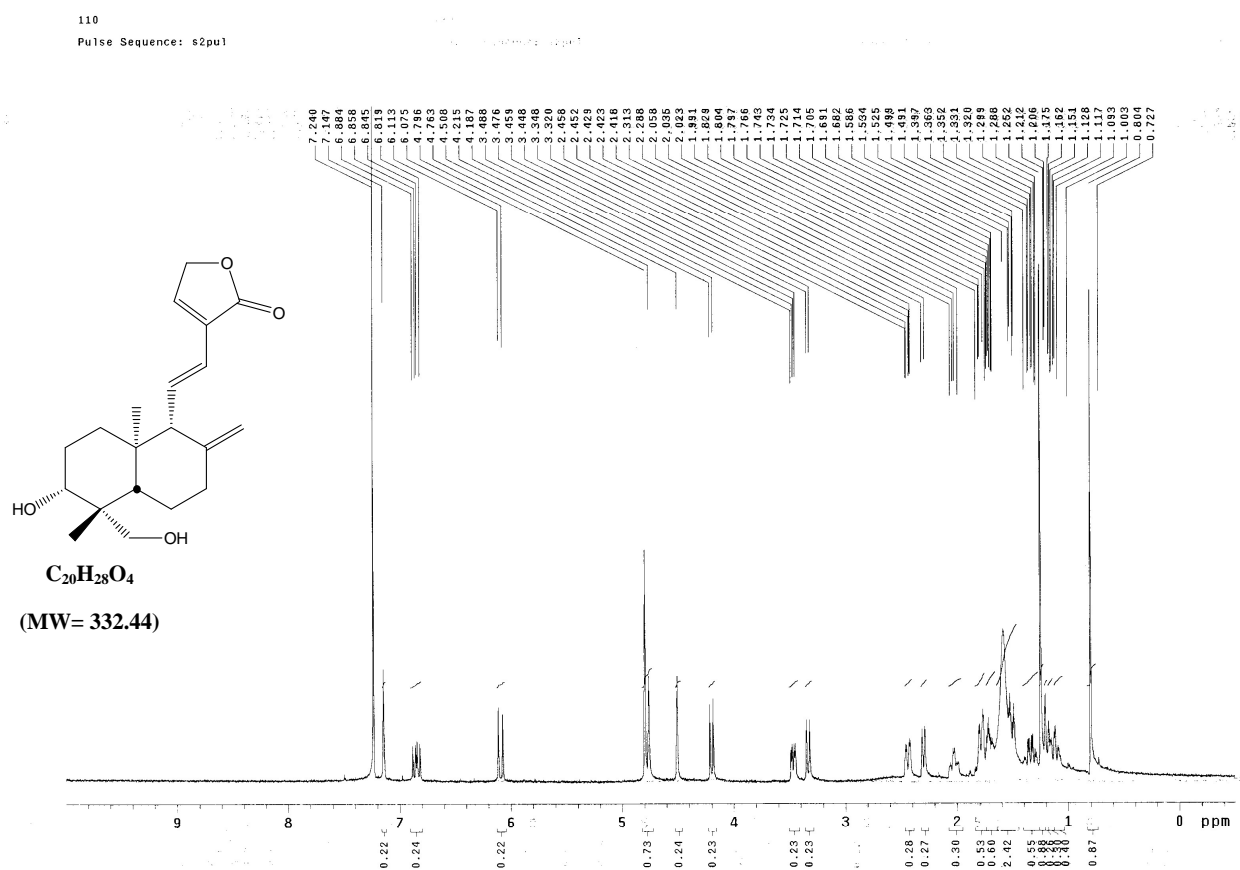
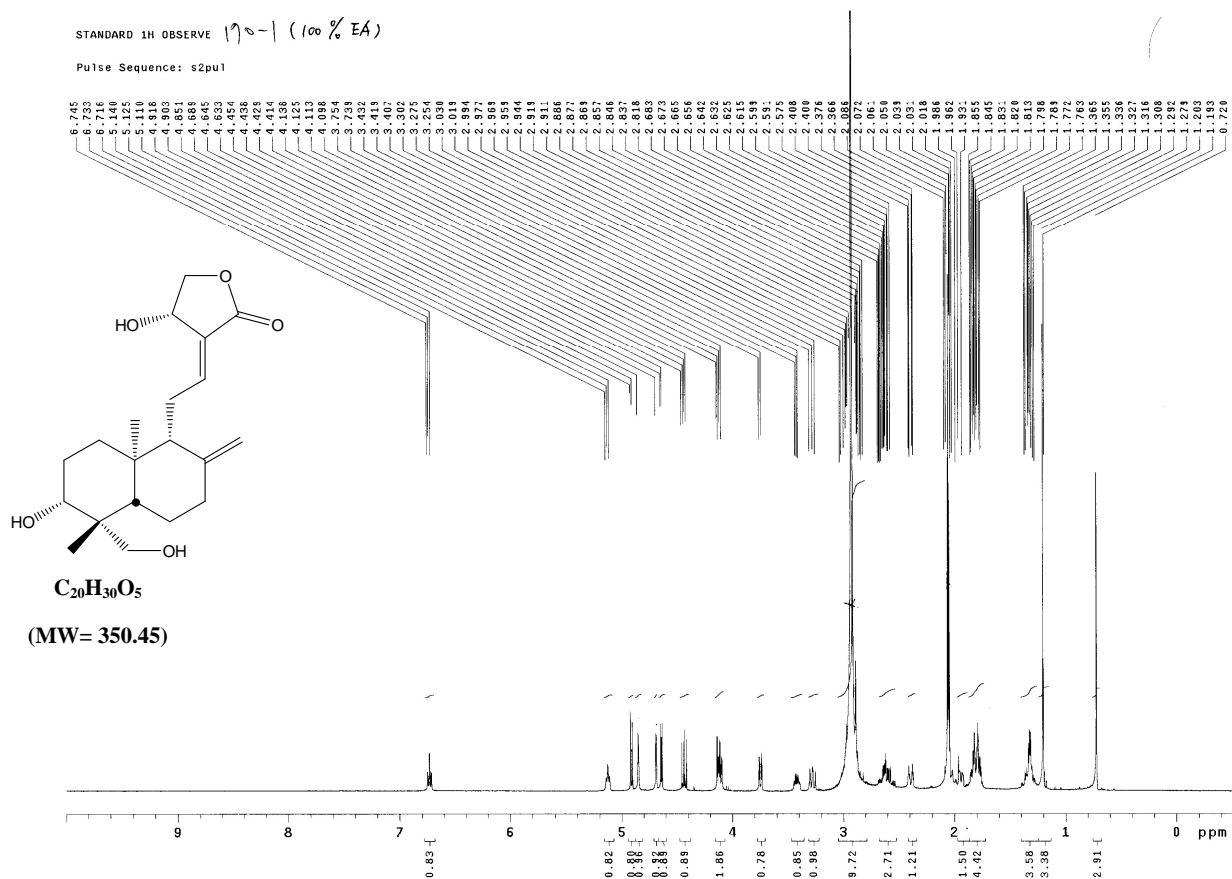


圖8、穿心蓮EtOAc萃取物17區分物純化、再結晶之化合物(17) ^1H NMR圖譜



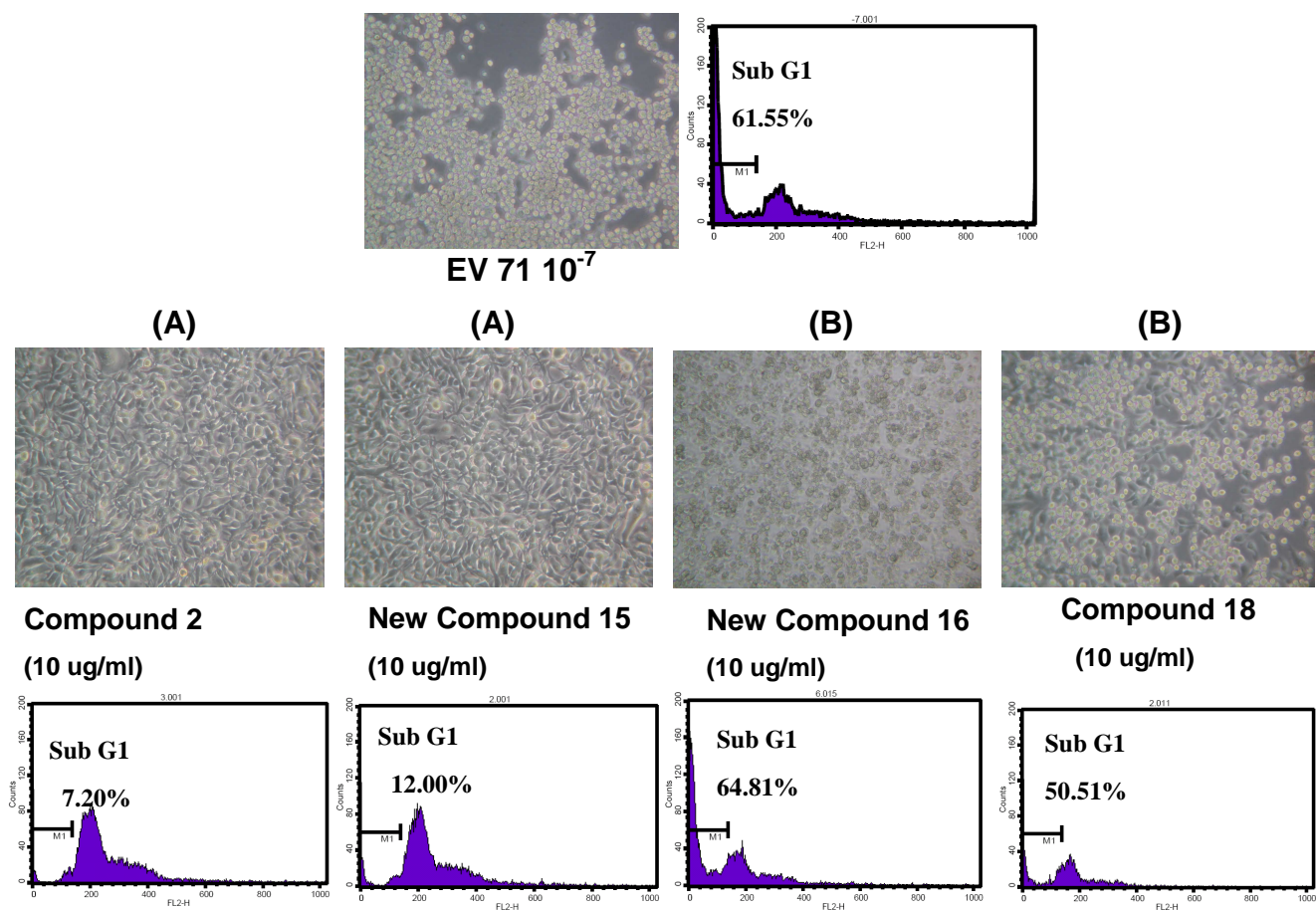


圖10、分離、純化自穿心蓮乙酸乙酯萃取物之純化合物對抗腸病毒感染之結果

(A)example of active compound
(B)example of inactive compound

表 1、篩選具保護腸病毒感染的穿心蓮化合物 1 ~ 26

Compounds isolated from <i>Andrographis paniculata</i>	active	inactive
5-hydroxy-7,8-dimethoxyflavone (1)		√
5-hydroxy-7,8-dimethoxyflavanone (2)	√	
β-sitosterol and stigmasterol (3)		√
3,4-dimethoxy-benzoic acid methyl ester (4)		√
Cinnamic acid (5)	√	
5-hydroxy-7,8,2',3'-tetramethoxyflavone (6)		√
天然物首分化合物 (7)		√
1-(4-hydroxyphenyl)ethanone (8)		√
5-hydroxy-7,8,2',5'-tetramethoxyflavone (9)	√	
andrograpanin (10)	√	
ergosterol peroxide (11)	√	
1-(2,5-dimethoxyphenyl)ethanol (12)		√
aurantiamide acetate (13)		√
新化合物 (14)		
新化合物 (15)	√	
新化合物 (16)		
14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (17)	√	
andrographolide (18)		
3,19- <i>O</i> -acetyl-14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (19)	√	
新合成衍生物 (20)	√	
3,19- <i>O</i> -diacetylanhydroandrographolide (21)		
新合成衍生物 (22)		
新合成衍生物 (23)	√	
新合成衍生物 (24)	√	
新合成衍生物 (25)	√	
3-oxolabda-8(17),11 <i>E</i> ,13-trien-16,15-olide (26)		√

Table 2 Flow cytometric analysis of EV 71 infected RD cells

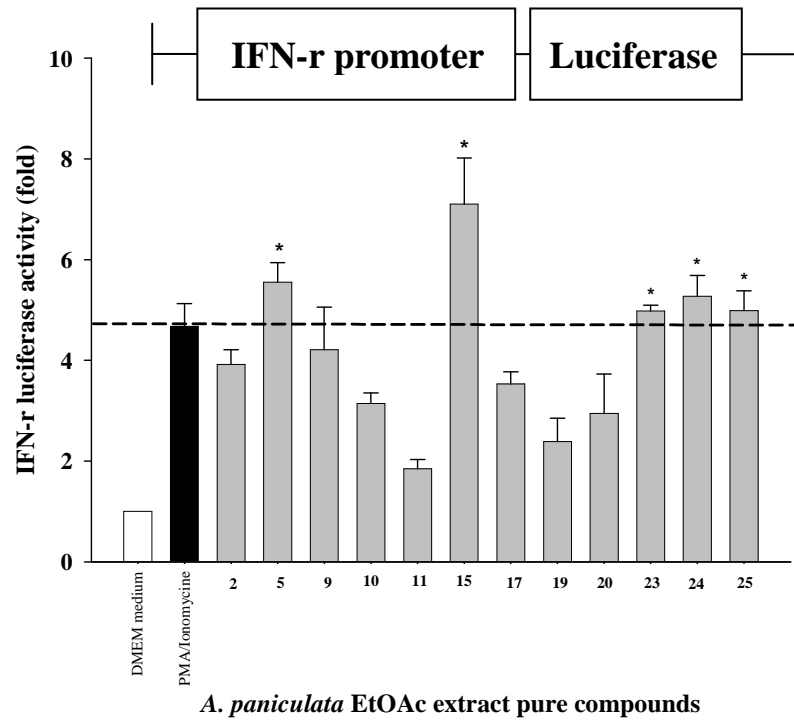
Compounds isolated from <i>Andrographis paniculata</i>	10 µg/ml	5 µg/ml	2.5 µg/ml
	sub G1 (%)		
5-hydroxy-7,8-dimethoxyflavanone (2)	7.60 ± 0.57*	20.54 ± 0.66*	39.96 ± 0.35*
Cinnamic acid (5)	8.55 ± 0.92*	14.39 ± 0.86*	25.41 ± 1.97*
5-hydroxy-7,8,2',5'-tetramethoxyflavone (9)	9.11 ± 0.64*	19.12 ± 1.25*	37.14 ± 3.34*
andrograpanin (10)	8.33 ± 1.56*	13.71 ± 1.82*	21.25 ± 1.91*
ergosterol peroxide (11)	8.15 ± 2.45*	10.47 ± 0.75*	14.99 ± 2.14*
新化合物 15	10.85 ± 1.63*	26.40 ± 4.31*	33.24 ± 1.18*
14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (17)	15.29 ± 3.20*	21.89 ± 0.87*	26.44 ± 4.61*
3,19- <i>O</i> -acetyl-14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (19)	5.61 ± 1.70*	9.16 ± 2.32*	18.24 ± 2.77*
新合成衍生物 20	17.14 ± 3.42*	37.15 ± 1.62*	63.16 ± 0.50
新合成衍生物 23	28.08 ± 1.27*	40.58 ± 0.82*	60.23 ± 5.61
新合成衍生物 24	22.99 ± 1.43*	34.03 ± 1.45*	57.34 ± 2.74
新合成衍生物 25	18.87 ± 0.33*	21.86 ± 1.50*	36.55 ± 3.05*
新化合物 14	45.02 ± 7.07	—	—
新化合物 16	62.21 ± 3.68	—	—
andrographolide (18)	46.82 ± 5.22	—	—
3,19- <i>O</i> -diacetylanhydroandrographolide (21)	51.75 ± 8.78	—	—
新合成衍生物 22	64.44 ± 2.88	—	—
穿心蓮乙酸乙酯萃取物	57.21 ± 8.92	—	—
2% FBS-MEM α medium only	4.46 ± 1.63*	4.46 ± 1.63*	4.46 ± 1.63*
1 % DMSO only	4.05 ± 1.10*	4.05 ± 1.10*	4.05 ± 1.10*
EV 71 only	64.96 ± 4.82	64.96 ± 4.82	64.96 ± 4.82

The sub G1 gated region indicates cells undergoing apoptotic changes.

Values are expressed as means \pm S.D of three independent experiments with three replicates each and statistically analyzed by using Student's *t*-test. A significant difference from the EV 71 only group was indicated **p*<0.05.

— not detect

(A)



(B)

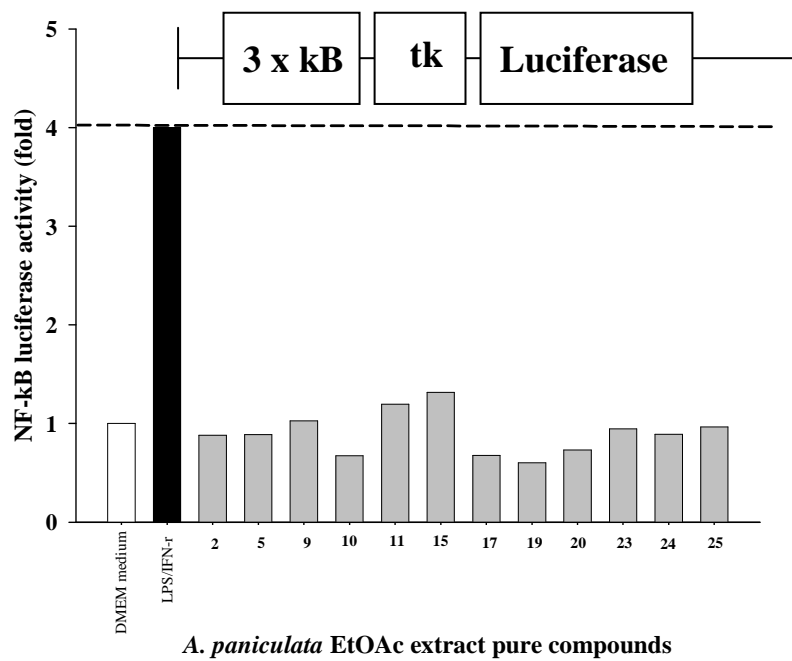


圖 11、由穿心蓮分離、純化出具抗腸病毒感染之化合物對 pIFN- γ Luciferase activity (A)及 pNF- κ B Luciferase activity (B)活化表現之影響

