編號：CCMP89-RD-102

中醫藥對慢性病毒性肝炎療效評估之研究

Efficacy of Traditional Chinese Medicine in Chronic Viral Hepatitis

高尚德　鄭庚申　吳禮字　項千芸　侯庭鏞　鄭如茜

摘　要

本研究以逍遙散加味治療肝鬱脾虛，濕熱未盡型 HBsAg、HBeAg 及 HBV-DNA 陽性之慢性 B 型肝炎患者，實驗組患者服用逍遙散加味濃縮藥粉，一天 9 克，分三次服用，連續服用 24 星期，對照組則服用安慰劑，52 位患者隨機雙盲分配，實驗組共 28 名，對照組 24 名，完成 24 星期療程者，實驗組 21 名，對照組 11 名，治療前與治療 24 星期後各項檢查結果平均值如下：實驗組：AST：60.62±31.67IU/L 比 45.29±25.4IU/L，ALT：114.19±87.79IU/L 比 72.52±67.83IU/L，total bilirubin：1.03±0.34mg/dl 比 0.93±0.31 mg/dl，Alkaline phosphophatase：80.24±42.77 IU/L 比 75.86±41.32 IU/L，albumin/globulin 比值：1.53±0.28 比 1.47±0.23。對照組：AST：74.82±55.13 IU/L 比 75.27±46.43 IU/L，ALT：108.91±68.19 IU/L 比 117.91±88.67 IU/L，total bilirubin：1.05±0.36 mg/dl 比 0.98±0.37mg/dl，Alkaline phosphophatase：76.09±29.24 IU/L 比 72.36±25.60 IU/L，A/G 比值：1.29±0.34 比 1.34±0.26。ALT 方面實驗組 33%患者 ALT 達到正常，實驗組較對照組有顯著降低（$p<0.05$），AST、total bilirubin、direct bilirubin、Alk-P、r-GT、albumin、globulin、A/G 比值二組間沒有明顯差

異。二組皆無血中 HBV-DNA 轉陰，HBeAg 陰轉方面，實驗組有 5 位患者 HBeAg 轉陰，Anti-HBe 轉陽（24%），對照組則無患者 HBeAg 轉陰及 Anti-Hbe 轉陽性（0%）。

以人類肝癌細胞株染色體上帶有 B 型肝炎病毒 DNA 之 2.2.15 細胞株，進行逍遙散和逍遙散加味及其組成的單味藥對 B 型肝炎病毒複製具有抑制作用初步篩選， 測試有效的抑制 B 型肝炎病毒活性之藥物濃度及在較低濃度下可抑制 B 型肝炎病毒活性而不殺死細胞者。結果顯示只有逍遙散加味在最高濃度 5X 稀釋對細胞抑制的百分比達 50%，其他藥物均未達 50%。在 5X 稀釋倍數的炒白朮，5X 稀釋倍數的敗醬草和 5X 逍遙散加味具有對病毒 DNA 抑制作用分別為 36.5%, 32.5%, 29.3%。其他藥物在 5 X 稀釋倍數未有抑制現象產生。但藥物停止作用六天後此抑制現象並未持續存在。

以加味四逆散治療肝鬱氣滯，濕熱內蘊型 Anti-HCV 及 HCV-RNA 陽性、AST 及 ALT 值介於 2-10 倍正常值之慢性 C 型肝炎患者，實驗組患者服用加味四逆散濃縮藥粉，一天 9 克，分三次服用，連續服用 24 星期，對照組則服用安慰劑，59 位患者隨機，雙盲分配，實驗組共 30 名，對照組共 29 名，完成 24 星期療程者，實驗組 30 名，對照組 20 名，治療前與治療後各項檢查結果平均值如下：實驗組：AST：85.6 IU/L 比 76.17IU/L，ALT：132.1 IU/L 比 109.4 IU/L，total bilirubin：0.97mg/dl 比 0.89mg/dl，Alk-P：67.2IU/L 比 67.73IU/L，A/G 比值：1.34 比 1.31。對照組：AST：85 IU/L 比 75.6 IU/L，ALT：139.8 IU/L 比 123.3 IU/L，total bilirubin：1.04mg/dl 比 0.95mg/dl，Alk-P：60.35U/L 比 59.4U/L，A/G 比值：1.15 比 1.27。雖然實驗組之 ALT 值由治療前之 132.1IU/L 降至 109.4IU/L，二組間 AST、ALT、total bilirubin、direct bilirubin、Alk-P、r-GT、Albumin、globulin、A/G 比值沒有明顯差異。血中 HCV-RNA 陰轉方面，實驗組 3 位（10%），對照組 1 位（5%）。

利用細胞分生的模式，進行中藥方劑四逆散、加味四逆散、逍遙散、

及逍遙散加味根除 C 型肝炎病毒的體外療效評估。本計畫分為三大部分加以執行，第一部份、C 型肝炎病毒體外增殖模式之建立。蒐集適當的臨床樣品，以不同細胞株搭配離心促進接種法，建立 C 型肝炎病毒體外增殖模式，以突破現今抗C型肝炎病毒藥物研究的瓶頸；第二部份、C 型肝炎病毒定性及定量分析。設計適當的引子，利用反轉錄聚合酶連鎖反應及競爭型反轉錄聚合酶連鎖反應，進行 C 型肝炎病毒的偵測及病毒 RNA 的定量；第三部份、以細胞模式評估中藥方劑四逆散及加味四逆散清除C型肝炎病毒的效果。利用傳統製劑及現代生藥萃取法，分析中藥方劑中之有效成分，而抗病毒藥的效用以計算藥物毒性及有效抑制病毒的劑量為主，兩者比例差距愈大，則相對藥效愈大。在逍遙散、逍遙散加味、四逆散、加味四逆散，及其中所含之 15 種藥進行抗C型肝炎病毒的篩選，將這 19 種中藥經由萃取後，先定義其細胞毒殺濃度（TC50），再以 SI=8 的濃度及 1/8 TC50 之濃度，加入已感染 C 型肝炎病毒之細胞中，進行病毒的定量。結果發現，紫草處理組中所含的病毒基因體數量較其他組少，顯示紫草可能具有抑制病毒複製或是促進病毒分解的能力，而紫草的抗病毒效果及其中的有效分子仍待近一步憎蝎 M。本計畫的執行，一方面可支援中醫藥治療 C 型肝炎臨床療效之評估，另一方面則可以有效地解釋中藥方劑對抑制 C 型肝炎病毒複製之療效及機轉。

關鍵詞： 慢性B型肝炎、B型肝炎病毒、慢性C型肝炎、C型肝炎病毒、2.2.15 細胞株、中藥、逍遙散、逍遙散加味、四逆散、加味四逆散

Kao Shung Te

ABTRACT

52 patients with chronic hepatitis B were randomly assigned to receive either 9

gm of Xiao-Yao-Sann-Jia-Wei (XYSJW) or placebo daily for 24wks. 28 in the XYSJW group and 24 in the placebo group. The mean data of AST, ALT, total bilirubin and A/G ratio at pretreatment and 24wks after treatment as follow: XYSJW group: AST: 60.62IU/L vs 45.29IU/L, ALT: 114.19IU/L vs 72.52IU/L, total bilirubin: 1.03mg/dl vs 0.93mg/dl, A/G ratio: 1.53 vs 1.47, placebo group: AST: 74.82IU/L vs 75.27IU/L, ALT: 1.08.91IU/L vs 117.91IU/L, total bilirubin: 1.05mg/dl vs 0.98mg/dl, A/G ratio: 1.29 vs 1.34. ALT is significantly decrease at XYSJW group when compared with placebo group ($p<0.05$), There is no patient with undectable serum HBV-DNA level at both group. XYSJW recipients were more likely to undergo HBeAg seroconversion (23.8% vs 0%).

To evaluate the effect of Xiao-Yao-Sann and Xiao-Yao-Sann-Jia-Wei to hepatitis B virus. We are interesting in inhibition of replication of hepatitis B virus DNA in a HBV-transfected cell line (2.2.15). In this study, The 5X dilution concentration of Xiao-Yao-Sann-Jia-Wei, Atractylodes macrocephala and Thlaspiarvensis L., which had about 30% inhibition of hepatitis B virus DNA. The antiviral action of Xiao-Yao-Sann-Jia-Wei was reversible.

59 patients with chronic hepatitis C were randomly assigned to receive either 9 gm of Jia-Wei-Syh-Nih-Sann (JWSNS) or placebo daily for 24wks. 50 were included in the efficacy analysis: 30 in the JWSNS group and 20 in the placebo group. The mean data of AST, ALT, total bilirubin and A/G ratio as follow: JWSNS group: AST: 85.6 IU/L vs 76.17IU/L, ALT: 132.1IU/L vs 109.4IU/L, total bilirubin: 0.97mg/dl vs 0.89mg/sl, A/G ratio: 1.34 vs 1.31. placebo group: AST: 85IU/L vs 75.6IU/L, ALT: 139.8IU/L vs 123.3IU/L, total bilirebin: 1.04mg/dl vs 0.95mg/dl, A/G ratio: 1.15 vs 1.27. There is no significante difference at ALT between JWSNS group and placebo group. At the end of treatment, the rates of the absence of serum HCV-RNA were higher among the patients who had been treated with JWSNS for 24wks (3 of 30 patients, 10%) than among those who had received placebo (1 of 20 patients, 5%).

To understand the mechanism of herb extracts against hepatitis C virus (HCV), an in vitro model is established in this project. The items of this works are: (1) estab-

lishment of an in vitro model for HCV replication,（2）establishment of a system for qualification and quantification of HCV, and（3）study on the therapeutic effect of herb extracts on HCV replication. The in vitro model established in this project could be helpful for further studying the viral biology and screening of herb compounds responsible for eradicating the HCV.

Keywords: Hepatitis B , hepatitis B virus, Jia-Wei-Syh-Nih-Saun, Xiao-Yao-Sann-Jia-Wei, hepatitis C hepatitis C virus, herbs, in vitro model

前　言

肝病是國人健康的大敵，也是最大的本土病。根據衛生署 87 年度國人死因統計，肝癌為癌症死因第一名，而慢性肝病及肝硬化也排名十大死因的第六名，約造成 4940 人死亡。慢性肝病、肝硬化及肝癌主要是由肝炎病毒感染所造成的，其中最重要的是 B 型肝炎病毒與 C 型肝炎病毒。

根據流行病學的統計，全球估計超過三億五千萬人受過 B 型肝炎病毒（hepatitis B virus; HBV）的慢性持續感染[1]，B 型肝炎病毒的感染會引起急性和慢性肝炎，在慢性 B 型肝炎帶原者中，有高度危險因子會導致肝硬化（cirrhosis），甚至與原發性肝細胞癌（primary hepatocellular carcinoma; PHC）的發展有密不可分的關係[2]。台灣人口中每五個成人有一人患肝炎，每年有五千人死於肝癌，四千人死於肝硬化。肝癌為癌症死亡率男性佔第一位女性佔第二位。台灣有三百萬人是 B 型肝炎帶原者，此病人得到慢性肝炎，約 20 至 25 年後有五分之一機會發生肝硬化，之後每年有 5%之機率轉變成肝癌[3]。而長期慢性感染的 HBsAg 帶原者得到肝癌的危險因子是正常人的 223 倍以上[4]。B 型肝炎病毒的感染可分為垂直感染（vertically）與水平感染（horizontally）兩種類型[2]。垂直感染是由 B 型肝炎病毒帶原者的母親感染新生兒，此類感染會造成 95%新生兒在免疫系統不成熟的情況下，轉變成無症狀慢性 B 型肝炎病毒帶原者。近年

來，對於 B 型肝炎病毒感染的預防工作，由於疫苗的普遍使用已有不錯的成效[5]，但在慢性 B 型肝炎帶原者的治療上，仍無法徹底根除病毒，是造成 B 型肝炎病毒引發肝臟疾病高致死率的主因。

慢性 B 型肝炎最終的治療目標即是預防進行到肝硬化及發展成肝細胞癌，為了達到這個目的，在過去 20 年，很多抗病毒藥物，免疫調節藥物或二者合併療法曾經被用來治療慢性 B 型肝炎病毒感染[6-7]，在這些藥物中，干擾素-α（Interferon-α，IFN-α）算是效果較好的，30-40%之成年白人患者使用干擾素-α，500 萬 單位/天 或 100 萬 單位，一星期三次治療連續使用 16 週可將 Alanine Aminotransferase（ALT）恢復正常及 B 型肝炎 e 肝原、HBV-DNA 轉陰[8-9]。雖然先短期使用類固醇治療能提高干擾素之功效，但是這種有效率並未臻理想，尤其是亞洲地區的患者[10-11]。Lamivudine 是治療 B 型肝炎的口服藥物，慢性 B 型肝炎患者服用一年 Lamivudine 治療後，16%之患者 HbeAg 轉陰而 HBV-DNA 消失[12]，有臨床研究報告指出 Lamivudine 能改善肝功能，甚至 96%之患者 HBV-DNA 能清除[13-14]，但 Lamivudine 的缺點為一旦停藥後症狀即會出現，若持續用藥則會出現抗藥性[15-18]，因此醫界都在尋找更有效的治療方法，中醫古典醫籍中並無肝炎之病名，肝炎一般可歸類於中醫黃疸、脅痛，臌脹等範疇，從中醫、西醫與中醫結合等幾個不同方向就慢性肝炎之中醫用藥可歸納出治療處方之一些主要原則。

大量的文獻資料充分說明中醫對肝膽的生理及病理具有系統的認識和較完備的理論，許多行之有效的防治方法至今仍有效的使用於臨床治療，中醫治療慢性 B 型肝炎常用方劑：逍遙散[28-30]，其有疏肝解郁，養血培土之作用，符合肝病之生理病理特點與發展規律，實驗證明逍遙散能減輕實驗性肝炎肝細胞的脂肪變性，恢復期間能促使肝細胞再生，方中當歸、茯苓具明顯的抗肝細胞壞死的效果，當歸、柴胡、茯苓有顯著的抗氣球樣變性作用，茯苓又有使肝細胞腫脹消退的功效，能降低膽紅素，AST 和 ALT，對肝細胞又有保護作用[31-32]。慢性肝炎中醫認為濕熱、氣滯、

血瘀是三個主要病理因素，其中又以濕熱為最。在逍遙散原方基礎上再加入臨床使用療效佳之清熱利濕，活血化瘀藥物：丹參、虎杖、敗醬草、白茅根組成逍遙散加味方劑，丹參有良好的護肝降，改善血清蛋白含量，提高免疫功能，促進纖維吸收等功能[33-34]，虎杖、敗醬草有減輕肝實質炎症，防止肝細胞壞死，促進肝細胞修復和再生，降低ALT，同時具抑制體液免疫亢進，提昇細胞免疫之功能，體外試驗並有抑制、清除 B 型肝炎病毒及抑制HBV-DNA之作用。白茅根有抑制體液免疫反應亢進，清除免疫複合物等作用，可協同其他藥物治療慢性肝炎[35-38]。本臨床試驗在評估逍遙散加味向�googleC 性 B 型肝炎之療效。

治療病毒性的疾病，自從何大一博士採用雞尾酒療法治療愛滋病，即同時使用二種以上之抗病毒藥物治療，得到好的療效之後，病毒性肝炎之治療目前也追隨此原則進行研究。Sells 等人在 1987 年利用載體攜帶 cloned B 型肝炎病毒 DNA 轉染（transfected）到 HepG2 細胞株（hepatoblastoma cell line）中，可製造出大量的 HBsAg、HBeAg 及具感染性的完整病毒顆粒。在 B 型肝炎病毒基因組中，發現病毒 DNA 有完整染色體序列、鬆弛環狀（relaxed circular）、超螺旋構造、不完全的基因組、、等多種型態的 B 型肝炎病毒 DNA 被複製出來。在免疫電子顯微鏡的觀察中，病毒顆粒型態（morphology）可見到 22nm 球狀（spherical）及絲狀（filamentous）的 HBsAg 病毒顆粒，還有類似 42nm Dane particles，因此證明此種細胞株不僅會組裝及分泌數種 B 型肝炎病毒 DNA 複製的中間產物，還會有 Dane-like particles 的產生。這種由 B 型肝炎病毒基因經轉染到 HepG2 細胞株的新培養系統被命名為 2.2.15 細胞株，可考慮用來研究 B 型肝炎病毒複製週期，是一個不錯的體外實驗系統[39-40]。2.2.15 細胞株已經成功地被應用在數個會影響 B 型肝炎病毒複製的 nucleoside analogues 證明上，Price 等人在 1989 年發現 2'-deoxyguanosine 的 carbocyclic analogue 幾乎完全中斷 B 型肝炎病毒毒病毒複製，而且在高達最低抑制濃度的 200 倍時還不具有藥物毒性[41]。1990 年 Matthes 等人將修飾後的 pyrimidine nucleosides 應用在 2.2.15 cell line，可見到 FddThd、ddeThd、FddMeCyt，如同 ClddMeCyt、AddMeCyt 具有幾乎完全阻斷病毒顆粒的產生，在體外有效抑制 B 型肝炎病毒[42]。在 1991 年，Doong, S.-L.等人測試一系列 2',3'-dideoxy-3'-thiapyrimidine nucleosides，發現到病毒受藥物抑制而缺乏細胞內病毒 DNA，推測抑制目標在於 B 型肝炎病毒 DNA 的合成[43]。某些藥物對於 B 型肝炎病毒複製的作用機轉與效力，在體外培養中已能成功地被研發，而這些培養系統也漸漸被頻繁地使用在有潛力能影響肝病毒 DNA 生活史中任何階段的藥物篩選。

以三度空間細胞模式評估中藥方劑是否透過免疫系統達成清除 B 型肝炎病毒效果體外模式是利用三度空間立體培養的方式完成[44-47]。首先以包覆膠原蛋白的濾紙作為 basal membrane，培養上皮細胞及 M 細胞，而淋巴細胞則培養在濾紙的另一面。在加入抗原的情況下，可以藉由濾紙的分隔，觀察中藥方劑萃取液在經由上皮細胞傳送到下層的免疫細胞後，所誘發免疫反應發生的機轉及其清除 B 型肝炎病毒效果。應用 2.2.15 細胞株為篩選系統分析傳統中藥逍遙散、逍遙散加味及其組成各成分對人類肝癌細胞株 B 型肝炎病毒 DNA 複製影響, 並用五方面來作此研究：一、是 intact cell 在培養基中分別有無加入逍遙散、加味逍遙散及其各成分，再利用顯微鏡照相檢測細胞型態。二、是分別加入不同濃度逍遙散、加味逍遙散及其各成分再檢測培養基內釋放出來之病毒含量。三、抽取細胞染色體 DNA 和 RNA 看嵌在染色體上的 B 型肝炎病毒 DNA 是否受影響。四、加藥 12 天後停止用藥繼續培養細胞 6-12 天再檢測培養基內釋放出來之病毒含量。五、以三度空間細胞模式評估中藥方劑是否透過免疫系統達成 根除 B 型肝炎病毒的效果。並進一步以此實驗為依歸來進行提升免疫力並防止病毒破壞肝細胞或阻止癌化等動物試驗。使傳統藥物作用機轉能以細胞分生實驗來佐證, 繼而應　峔鴞傢鴒{床上治療肝炎的研究。

台灣地區感染 C 型肝炎病毒的人口約為 2～4％ ，C 型肝炎病毒感染的患者約有 50～80％ 會變成慢型肝炎，而 C 型肝炎患者約有 20％ 會轉

變為肝硬化。，世界衛生組織估計全球感染 C 型肝炎病毒的人數約在一億七千萬人，而美國的盛行率估計為三百九十萬人，約為感染人類免疫缺陷病毒人數的四倍，因為 C 型肝炎病毒具有潛伏感染的特性，因此只有一百萬人實際被診斷出來[48]。大約 90％ 的 C 型肝炎患者無法得到適當的治療，而且因為病毒的特性，有效的疫苗也無法被開發，因此 C 型肝炎已經成為慢性肝病、肝硬化及肝癌的主因。許多試圖治療 C 型肝炎病毒的療法都得到令人失望的結果。干擾素-α為美國食品與藥物檢驗局核准用來治療慢性 C 型肝炎的藥物，在連續六個月的療程，以病毒的清除率為評估標準下，呈現 20～25％ 的失敗率[49]，而在不連續的療程下，患者在前幾個月約有 30～70％ 的復發率，在六個月後，只有 10-15％ 的患者出現病毒清除率增加的療效[50]，且干擾素-α2b 的副作用相當多。雖然許多研究顯示干擾素確實可以降低因感染 C 型肝炎病毒導致肝細胞癌發生的風險，但在風險/效益的比例及治療所花費的金錢上，干擾素療法都顯得相當的昂貴。臨床上為了能增加長期有效反應，不同藥物合併治療一直被試用，干擾素- 曾與下列藥物合併使用：ribavirin、ursodeoxycholic acid、N-acetyl cysteine、類固醇及非類固醇抗發炎劑，其中 ribavirin 長期效果最佳，合併 Ribavirin 與干擾素治療慢性 C 型肝炎患者雖可增加治癒率並減低復發率，但仍有近 50% 病人不能完全根治[51]。然而合併療法的副作用卻是相當的嚴重。Ribavirin 經常造成溶血性貧血，而使得治療劑量必須降低，此外 ribavirin 也會導致畸形胎的發生[52]。目前已發表的 C 型肝炎病毒株至少可分成四種主要基因型，不同的基因型對於臨床和病理病程可能有不同程度的影響。臺灣地區 C 型肝炎病毒分離株 以 1b 型為主。偵測血清中 C 型肝炎病毒 RNA 為病毒在體內廓清與否的唯一相關指標。

依臨床經驗，慢性 C 型肝炎與慢性 B 型肝炎之證型與臨床症狀之分佈情形不太相同，肝失疏泄，肝鬱氣滯之比例佔相當部份。中醫治療慢性 C 型肝炎有效之常用方劑-四逆散，符合肝病之生理病理特點，我們研究證明四逆散能降低肝臟損傷後血清之 AST、ALT，減少細胞壞死，脂肪堆

積，脂肪變性及中心靜脈、門靜脈周圍 Kupffer 細胞與淋巴球的浸潤，同時四逆散可中和自由基毒性，降低過氧化物濃度，亦可矯正抗氧化酵素（superoxide dimutase、catalase、glutathione peroxidase）之紊亂與肝脂肪過氧化情形[53-54]。四逆散中之柴胡有誘導干擾素的作用，促進肝炎病毒之抑制與排除，柴胡皂膭能增加肝內蛋白質的合成，促進肝功能恢復，其抗肝損傷的作用非常突出，又具有顯著抑制纖維增生的作用，防止肝硬化的發生。慢性肝炎中醫認為濕熱、氣滯、血瘀是三個主要病理因素，其中又以濕熱為最，且慢性 C 型肝炎患者形成肝硬化所需之時間較慢性 B 型肝炎短，依據 C 型肝炎病毒之特性與肝炎發展規律，在四逆散基礎上再加入臨床使用後療效佳之藥物：紫草、生黃耆、虎杖、敗醬草組成加味四逆散，紫草入肝經，涼血解毒，對京科 68-1 病毒、流感病毒有抑制作用，對 B 型肝炎抗原（HBsAg）能產生抑制免疫作用，虎杖、敗醬草有減輕肝實質炎症，防止肝細 M 壞死，促進肝細胞修復和再生，降低 ALT 之作用。黃耆皂甲有促進 DNA 合成，加速肝臟分化增殖作用，能增強病毒誘生干擾素的能力，並能增強網狀內皮系統的功能，且其可改善肝內微循環，促進免疫複合物的吸收與消除，加快病灶的修復和肝細胞的再生。本臨床試驗在評估加味四逆散對慢性 C 型肝炎患者之臨床療效。

針對西藥上的缺點，美國國家衛生院（National Institute of Health）於 1999 年八月於美國馬里蘭州舉辦『Complementary and Alternative Medicine in Chronic Liver Disease』會議，會中指出傳統醫學用藥對病毒性肝炎仍有相當大的拓展及輔助的空間，利用現代科學分子生物技術及細胞模式，解釋並證實其對 C 型肝炎病毒的療效機轉。C 型肝炎病毒是慢性肝病的主因。近年來雖然對於病毒基因體結構及功能的了解有顯著的進展，但對於病毒的生物學及持續性感染的機制仍所知甚少，而歸究其原因，大部分是因為缺乏一個可供病毒在體外增殖的細胞株系。到目前為止，許多研究試圖建立可供C型肝炎病毒增殖的細胞株系，但通常都得到負面的結果。C 型肝炎病毒可以在極少數種的細胞中複製，這些細胞包括人類及黑猩猩的

初代肝臟細胞、肝細胞癌細胞株、及人類造血細胞株，但增殖後所產生的病毒力價並不穩定，而且在感染後數天或數週後就無法偵測到病毒的存在。此外，因為病毒感染的細胞無法產生明顯的細胞病變效應，因此利用細胞培養系統增殖 C 型肝炎病毒是相當困難的。近年來，將病材樣品接種到細胞後再離心的做法，已受到診斷病毒學的重視及應用，因為這種方式可以增加許多不同種類病毒的分離率及縮短病毒偵測的時間，包括巨細胞病毒、單純疱疹病毒、感冒病毒、腸病毒、及腺病毒等都可得到良好的結果。然而 C 型肝炎病毒仍未利用這種方式加以分離及應用。我們利用細胞分生的模式，建立 C 型肝炎病毒體外增殖模式及 C 型肝炎病毒定性及定量分析，進一步利用細胞模式評估四逆散、加味四逆散及其各組成成分清除 C 型肝炎病毒的效果。

材料與方法

逍遙散加味對慢性 B 型肝炎療效之研究

一、患者之篩選：

在中國醫藥學院附設醫院肝炎特別門診篩選 52 名慢性 B 型肝炎患者，每位患者作詳細病歷記錄。並由二位中醫師共同診斷確定其證型。

(一)、入組標準：

1. Alanine aminotransferase（ALT）介於正常值 1.3 倍到 10 倍間。
2. 血清 HBsAg、HBeAg 陽性至少 6 個月以上。
3. 血清 HBVDNA 在進入研究時為陽性。
4. 年齡在 16 歲至 65 歲間。
5. 肝鬱脾虛、濕熱未盡證型。

(二)、出組標準：

1. 不符合肝鬱脾虛濕熱未盡證型患者。

2.感染A型、C型、D型、E型肝炎。

3.已使用干擾素或其他相關西藥者。

4.肝硬化。

5.肝癌。

6.糖尿病。

7.腎臟病。

8.其他癌症。

9.懷孕。

10.其他原因造成肝臟疾病者。

二、實驗分組與藥物治療設計：

實驗分二組，先診斷確定證型後，隨機雙盲分組，共52名患者，實驗組28名，對照組24名，完成24星期療程者，實驗組21名，平均26歲，男14名、女7名，對照組11名，平均32.5歲，男6名、女5名。

實驗組：每日服用逍遙散加味濃縮藥粉9克，分3次服用（Tid、PC）。

對照組：每日服用安慰劑9克，分3次服用（Tid、PC）。每組治療時間皆為24星期。

三、實驗室檢查：

1.每組於治療前及開始治療後每4星期檢查 AST、ALT、bilirubin、Alk-P、γ-GT，連續6次。

2.每組於治療前及開始治療後第12、24星期測HBsAg、Anti-HBs、HBeAg、Anti-HBe及HBV-DNA濃度。

3.每組於治療前及開始治療後24星期各作一次肝臟超音波檢查。

4.肝功能檢查採用TBA-80FR生化自動分析儀。

5.HBsAg、Anti-HBs、HBeAg及Anti-HBe檢測採用ABBOTT公司之MEIA Kit以ABBOTT AXYSM之全自動酵素免疫分析儀測定。

6. 檢測 HBV-DNA 使用 HBV-DNA kit，其分析方法如下：

HBV 定量採 Roche 公司的 Amplicor PCR HBV 分子定量方式進行。簡述如下：取等量病人血清抽取血清中病毒核酸，以 biotin 標示的引子經 PCR 放大之後，將等量的終產物加入覆被有 streptavidin 的微定量盤中，再以特意性與非特異性探針分別進行雜合（hybridization）作用，經呈色後以 405nm 波長進行比色，取特異性雜合反應與非特異性雜合反應的比值定出標準檢量，在將檢體取得的比值與標準檢量線比對，求得檢體反應的相對病毒分子濃度，乘以稀釋倍數，即取得檢體病毒分子濃度，單位為 copy number/ml。

四、逍遙散加味之組成比例與製備：

1. 逍遙散加味之組成比例：

柴胡 4　當歸 4　炒白芍 4　炒白朮 4　茯苓 4　薄荷 2　煨生薑 4
炙甘草 2　虎杖 4　敗醬草 4　丹參 3　白茅根 2

2. 請中國醫藥學院附設醫院中藥局鑑定中藥基源，並委託科達 GMP 藥廠製成濃縮藥粉。

⑴逍遙散及逍遙散加味之組成基源

柴胡：Bupleurum chinese DC.
當歸：Angelica sinensis DIELS.
白芍：Paeonia lactiilora PALL.
白朮：Atractylodes macrocephala KOIDZ.
茯苓：Poria cocos Wolf.
薄荷：Mentha haplocalyx BRIG.
煨生薑：Zingiber officinale ROSC.
甘草：Glycyrrhiza uraleusis FISCH.
虎杖：Polygonum cuspidatum SI.
敗醬草：Patrinia villosa JUSS.

丹參：Salvia mittiorrhiza BGE.

白茅根：Imperata cylindrica C. E. HUBB.

(2)製備

將逍遙散或逍遙散加味原料入七倍水量並煮 60 分鐘，煎液經 140 目篩網過濾，為第一萃取液，將藥渣加入五倍水量煎煮 50 分鐘，煎液經 140 目篩網過濾，為第二萃取液，二次萃取液混合濃縮浸膏，再與賦形（澱粉）混合，乾燥製成濃縮藥粉。

五、 療效指標：

1. Primary endpoint:

(1)肝功能 AST, ALT, total bilirubin, direct bilirubin 等改善。

(2)血清 HBV-DNA 轉陰，HbeAg 轉陰。

2. Secondary endpoint:

血清 anti-Hbe 轉陽。

六、 統計方法：

以 T-test 及 multiple linear regression 法探討二組間對於 B 型肝炎患者血清 AST、ALT、Total bilirubin、direct bilirubin、Alkaphosphate、γ-GT 與 HBsAg、Anti-HBs、HBeAg、Anti-HBe、HBV-DNA 之變化。

逍遙散及逍遙散加味對於 B 型肝炎病毒抑制和根除之體外療效的評估

一、實驗材料

柴胡、當歸、薄荷、炒白朮、煨生薑、炙甘草、炒白芍、茯苓為逍遙散成分，逍遙散加味則再加入虎杖、白茅根、丹參、敗醬草四味藥。以上藥物皆製備為浸膏（GMP 藥廠備製），並以 DMSO（dimethylsulfoxide）作不同濃度稀釋。

二、實驗控制組

在細胞培養基中加入 50 ìM 2,3-didoxycytidine（ddC）可完成抑制 HBV 的釋放當作 positive control; negative control 不在培養基中加任何藥物。

三、細胞株（cell lines）

2.2.15 細胞株：由台大醫學院董馨蓮老師提供

以包含 B 型肝炎病毒基因組（HBV genome）的質體轉染 $HepG_2$ 細胞（人類肝腫瘤細胞株；Human hepatoblastoma cell line），經過 G418 selection，選擇出具有分泌 HBsAg particle，nucleocapsid 和 virion 的細胞株（Sells et al., 1987; Sells et al., 1988）。

質體（plasmid pAM6）（Hoyer, W. H., 1981）

由 Escherichia coli strain HB101 選殖出帶有 HBV 全長基因組（full-length genome）的質體 Pam6，經 BamHI 切割後用來當作探針（probe）的模版 DNA（American Type Culture Collect）。

四、藥物對細胞的毒殺性（Cytotoxicity）：

將細胞培養於 10% FBS（fetal bovin serum）的 MEM 培養液中，起初細胞密度為 $1X10^5$/ 5ml，在接種到 $25cm^2$ flask 經過 16～18 小時後，加入各種濃度（0.78-12.5µM）的藥物，培養至欲觀察的時間（1、3、6、9、12 天）後，取出以 trypsin 處理成單一細胞懸浮液，以錐藍（0.4% trypan blue）取定量細胞液來染色，滴在血球計數盤，200X 顯微鏡下觀察並計算細胞總數。為瞭解藥物對培養細胞增殖的影響，應用錐蘭排除法（trypan blue exclusion）來決定細胞的存活，活細胞不會讓 trypan blue 進入而呈現透明完整的外觀，而死細胞會讓 trypan blue 進入而呈現淡藍色。

抑制百分比：控制組細胞數目-實驗組細胞數/控制組細胞數目（%）

五、細胞染色體 DNA 萃取

（43）（modified from Blin and Stafford, 1976）

將加藥培養 12 天後的 2.2.15 細胞，以 trypsin 作用形成單一細胞懸浮液，加 1X PBS 沖洗細胞，打散後離心 1000 g，5 分鐘，重覆二次，之後，盡量移除上清液，再加入 Resuspnsion buffer 1ml（10mM Tris-HCl, pH7.5/ 5mM EDTA/ 150mM NaCl/ 1%SDS），打散細胞成懸浮狀 ，加入 proteinase K 至終濃度 100　g/ ml，置於 55℃水浴隔夜。小心取出溶液至 eppendorff，並加入等量體積的 phenol/ chloroform（1:1）（vol/ vol），經均勻搖晃後，離心 10000 g，5 分鐘，待分層將上清液移至新 eppendorff 中，重覆上述步驟兩次，混合震盪均勻，離心 10000 g，10 分鐘。小心移取上清液至 eppendorff 中，使用 0.8% agarose gel/ 0.5X TAE system 跑電泳分離 DNA，以 EtBr 染色後，拍立得照相觀察。

六、病毒顆粒的萃取：（43）

收集加藥培養經固定時間 12 天的培養液於離心管中，離心 2000 g，10 分鐘，將上清液移至新離心管中，加入 polyethylene glycol（PEG）（Mr,6000）至終濃度 10%（wt/ vol）。在 4℃，均勻搖晃隔夜後，取出至 eppendorff，經離心 10000 g， 10 分鐘，使病毒顆粒沈澱下來，盡量移除上清液。加 1% 原體積 TNE（10mM Tris-HCl, pH7.5/ 100mM NaCl/ 1mM EDTA）將病毒顆粒懸浮，加 SDS 與 proteinase K 到懸浮液中至終濃度 1%與 0.5mg/ ml，然後置於 55℃水浴隔夜。取出 eppendorff 加入等量體積的 phenol/ chloroform（1:1）（vol/ vol），經劇烈震盪後，離心 10000 g，5 分鐘，待分層將上清液移至新 eppendorff 中，重覆上述步驟兩次，用兩倍體積的 100%絕對酒精於 -70℃，30 分鐘沈澱 DNA。經離心 10000 g，15 分鐘，去除酒精並乾燥沉澱的 DNA，再以 TE_{80} buffer（10mM Tris-HCl, pH8.0/ 1mM EDTA）溶解 DNA，用 0.8% agarose gel/ 0.5X TAE（Tris-Acetate electrophoresis buffer, pH= 8.5）（0.04M Tris/ 0.11%（vol/ vol）glacial acetic acid/ 0.002M EDTA）跑電泳分離 DNA

利用 Hybaid Vacu-Aid 將 gel 上 DNA 轉移至 Hybond-N membrane：預先處理步驟（pre-treatment step）：

↓	Depurination	0.25M HCl	2X15mins
↓	Denaturation	0.5M NaOH	2X20mins
		1.5M NaCl	2X20mins
↓	Neutralisation	3.0M NaCl	2X20mins
		0.5M Tris, pH7.0	

七、DNA 轉移步驟（Vacuum transfer procedure）：

在 gel 經預先處理完畢後，就要組裝 Vacu-Aid 裝置，將 Vacu-Aid base unit 與 Vacu-Aid pump unit 連結，依序放上 support cross lattice、porous screen、3MM paper、membrane、rubber mat、agarose gel、Vacu-Aid top manifold，以 2X SSC（0.15M NaCl/ 0.015M sodium citrate dihydrate）為 transfer buffer 潤濕 gel，使用 vacuum pressure 80cm，60 分鐘，讓 DNA 完全轉移至 Hybond-N membrane。

1. 製備 DNA 探針（DNA probe preparation）：

⑴將含有 pAM6/ HB101 的 E. coli 接種於 LB broth 中大量複製，以 SDS-alkaline lysis method：

（modified from Birnboim and Doly, 1979; Ish-Horowicz and Burke, 1981）SDS-alkaline lysis method 來萃取 plasmid DNA，經 BamHI 切開 plasmid pAM6 跑電泳確定後，使用 Geneclean kit 回收 gel 上的 HBV DNA，再以 Random primer labeling system（redi prim^{TM}II）來製備探針。

⑵Geneclean kit：

由 gel 上切下所需 DNA 片段的 gel，加入 3 倍體積 NaI stock solution，在 55℃水浴至電泳膠完全溶解，視 DNA 含量添加 GLASSMILK，最大量不超過 5 ìl，混合後室溫靜置 5 分鐘，每隔 1～2 分鐘上下搖勻，時間延長可增加回收量，但不超過 15 分鐘作用時間。離心約 5 秒後移除上清液，上清液可做第二次回

收，加 10～50 倍體積的 ice-cold New Wash solution 再懸浮，離心 5 秒，移除上清液，如此重覆兩次，以便完全移去上清液，再加入兩倍體積的 elution solution，水浴 55℃作用 3～5 分鐘，離心 30 秒，收集上清液至新 eppendorff 中，即所需回收之 DNA。第一次回收 80%的 DNA，再進行第二次回收，約可再回收 10～20%，盡量能完全回收 DNA。

⑶Random primer labeling system：（Feinberg et al., 1983）

先將 template DNA（2.5-25ng）以 TE buffer（10mM Tris-HCl, pH8.0/ 1mM EDTA）稀釋至總體積 45il，加熱 95℃，3～5 分鐘，快速將 denatured DNA 置於冰上 5 分鐘，將 template DNA 取至反應管中，反應管中已含有試劑 Buffered solution of dATP, dGTP, dTTP， Exonuclease free Klenow enzyme，Random primers，另外再加入[α-^{32}P] dCTP，均勻混合後，經離心 spin down，在 37℃水浴 4 小時，或者，室溫反應隔夜會使 probe 形成更好，最後，再加入 0.2M EDTA（pH8.0）5 1 來終止反應，經填充 Sephadex-G50 的 spin column，藉由離心 1200 g，3 分鐘將未反應的 mononucleotide 和合成好的 polynucleotide 分開，離心下來的 polynucleotide 以 100℃，加熱 3-5 分鐘將 DNA 變性，置於冰上 5 分鐘後備用。

九、Southern blotting：（Southern, 1975）

1. Hybridization procedure：

先將 nylon membrane 以 6X SSC 完全潤濕 2 分鐘，再放入 hybridization pouch 中，加入 prehybridization buffer（6X SSC/ 5X Denhardt's reagent/ 0.5% SDS/ 100 g/ml denature, fragmented salmon sperm DNA/ 50% formamide），prehybridization buffer 量決定於 nylon membrane 的大小（0.2ml/ cm^2），封口後置於 43℃，反應至少 1-2 小時後，倒掉袋中的 prehybridization buffer，加入 hybridization buffer（6X SSC/ 0.5% SDS/ 100 g/ml denature, fragmented salmon sperm DNA/ 50% formamide）。在 hybridization buffer（0.2ml/ cm^2）中，加入經加熱95℃，3-5分鐘，迅速移至冰上靜置5分鐘，預先處理過的 denatured probe，封口後在43℃反應隔夜。

2. Stringency wash procedure：

加入 washing solution（2X SSC/ 0.1% SDS）於室溫劇烈震盪15分鐘，重複三次，再以 washing solution（0.2X SSC/ 0.1% SDS）於50℃劇烈震盪15分鐘，重複四次。

3. Film exposure：

將 membrane 上水分適度滴乾，放入 polypropylene sheet protector 中，不可將潮濕面與底片接觸。處理好的 membrane 含 DNA 那面朝上，與底片直接接觸於 -70℃冰箱中反應隔夜，即可取出顯影，並將 autoradiographic bands 強度以 scanning densitometer 來定量。 或是以 FUJI imaging plate 蓋上膠片放置1小時再以 FUJIX BAS 1000 phosphoimager 掃瞄 imaging plate 即可獲得影像再以 Macbas 軟體定量和計算結果。

十、培養細胞的 RNA 抽取

將細胞單層培養在 $25cm^2$ flask 中，直接加入 TRI_{zol} reagent 溶解細胞，用手劇烈震盪 15 sec，15-30℃反應 2-3 mins，在 4℃中離心 12,000Xg，15mins，可見分成淡紅色的 phenol-chloroform 層，中間層，及無色 aqueous 上層。RNA 包含在水層。將 aqueous phase 移至新 eppendorff 中，在每 1ml TRI_{zol} reagent 中加入 0.5ml isopropyl alcohol，混合均勻後 15-30℃反應 10 mins。在 4℃中離心 12,000Xg，15mins，會在底部沈澱出 gel-like 的 RNA，移除上清液，以 75% alcohol 清洗 RNA，均勻混合震盪後，在4℃中離心 7500Xg，5mins，風乾 RNA pellet，溶解於 RNase-free water 中，在 55-60℃反應 10 mins，萃取出的 RNA 以含 formaldehyde 電泳膠片跑電泳轉移至 Hybond-N membrane 後用 32P-labeled HBV DNA probe 雜交。

加味四逆散對慢性 C 型肝炎療效之研究

一、患者之篩選：

在中國醫藥學院附設醫院肝炎特別門診篩選 59 名慢性 C 型肝炎患者，每位患者先作詳細病歷記錄。並由二位中醫師共同診斷確定其證型。

(一)、入組標準：

1. Alanine aminotransferase（ALT）介於正常值 2-10 倍間。
2. 血清 Anti-HCV 陽性。
3. 血清 HCV-RNA 陽性。
4. 年齡在 16 歲至 65 歲間。
5. 肝鬱氣滯、濕熱內蘊證型。

(二)、出組標準：

1. 不符合肝鬱氣滯、濕熱內蘊之證型患者。
2. 感染 A 型、B 型、D 型、E 型肝炎。
3. 已使用干擾素或其他相關西藥者。
4. 肝硬化。
5. 肝癌。
6. 糖尿病。
7. 腎臟病。
8. 其他癌症。
9. 懷孕。
10. 其他原因造成肝臟疾病者。

二、實驗分組與藥物治療設計：

實驗分二組，診斷確定證型後，隨機雙盲分組，共 59 名患者，

實驗組 30 名。對照組 29 名，完成 24 星期療程者，實驗組 30 名，平均 48.3 歲，男 23 名，女 7 名，對照組 20 名，平均 47.3 歲，男 12 名、女 8 名。

實驗組：每日服用加味四逆散濃縮藥粉 9 克，分 3 次服用（Tid、pc），連續 24 星期。

對照組：每日服用安慰劑 9 克，分 3 次服用（Tid、pc），連續 24 星期。

三、實驗室分析：

1. 各組於治療前及開始治療後每四星期檢查 AST、ALT、total bilirubin、direct bilirubin、Alk-p、γ-GT，連續 6 次。
2. 血清 HCV-RNA，各組於治療前、開始治療後第 12、24 星期各測量一次。
3. 肝臟超音波檢查，每組於治療前及治療 24 星期後各作一次肝臟超音波檢查。
4. 肝功能測定：採用 TBA-80FR 生化自動分析儀。
5. 血清 Anti-HCV 測定：C 型肝炎病毒抗體的測定採用亞培第三代酵素免疫法，試劑包括 C 型肝炎病毒的核心與非結構蛋白包含核心抗原與非結構性蛋白質 NS3, NS4 與 NS5 區域。患者的血清 C 型肝炎病毒抗體 IgG 呈陽性則定義為慢性 C 型肝炎。
6. 血清 HCV-RNA 與 C 型肝炎病毒基因型之測定：

⑴血清中 C 型肝炎病毒 RNA 的抽取

血清中 C 型肝炎病毒 RNA 的抽取方法如參考文獻所示[57]。取 C 型肝炎患者之血清 50µl，加入 450µl solution D（4M guanidineisothiocyanate, 25mM sodium citrate, pH7.0, 0.5 % sarcosy1,100 mM 2 -mercaptoethanol）混合均勻，然後依序加入加入 50µl 的 2M sodium acetate（pH4.0），500µl 的 acid phenol（內含 0.1 % 8-hydroquinolin），及 100µl chloroform-isoamylalcohol（49：

1），混合均勻後靜置冰上 15 分鐘然後在微量離心機以 13 krpm 的轉速離心 20 分鐘，取上層液，加入 1μl glycogen（20 mg/ml）和等體積的 isopropanol 沈澱。沈澱物以 70 %的酒精清洗後，溶於 5μl 的去離子水，以便製備互補 DNA（cDNA）。

⑵反轉錄聚合酶連鎖反應（RT-nested PCR）

反轉錄聚合酶連鎖反應進行如下： 將上述 RNA 在 95℃ 加熱三分鐘，使核酸的二級結構打開。接著加入 4μl 的 5X MMLV RT buffer（1X：50mM Tris, pH8.3, 75mM KCl 3mM MgCl2 ），10mM 的 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 各 2.5μl, 0.2μM random primer（Promega, Madison, WI），0.5μl RNasin（40 unit/l）, 以及 1μl 的反轉錄酶（Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase）（200 unit/μl），在 37℃ 反應 2 小時，即可得到病毒基因體的 cDNA。進一步利用兩次 PCR 提高病毒 cDNA 的產量。PCR 反應首先取 5μl 的 cDNA，加入 10mM 的 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 各 1μl, 10μl 的 5X PCR buffer（1X：50mM KCl, 10mM Tris, pH9, 0.1 % Triton X-100, 5mM MgCl2）以及 100ng 引子, 並以去離子水調整體積到 49.5μl，接著加入 0.5μl Taq DNA 聚合（Taq DNA polymerase；5 unit/μl）並以 50μl 的礦物油（mineral oil）覆蓋於上。反應條件與反應用引子配對方式依不同實驗需求設定。

⑶C 型肝炎病毒基因型的測定

C 型肝炎病毒基因型的測定採用包括特定基因型引子組（type-specific primers）之反轉錄聚合酶連鎖反應（Okamoto et al., 1992; Chen et al., 1994）。PCR 增幅放大反應條件為：95℃ 30 秒鐘（DNA 變性），60℃ 30 秒鐘（引子煉合）接續 72℃ 90 秒鐘（延伸反應）。反應結束後取反應體積 1/5 進行瓊脂電泳分析，由 PCR 產物的長度區分四種基因型的 C 型肝炎病毒（I-IV 型）。實驗過程將避免偽陽性反應（Kwok and Higuchi, 1989）。

⑷C 型肝炎病毒濃度的測定

HCV 定量採 real-time quantification 方式進行。首先於 HCV 保守區域設計引子（F: 5'-TGCGGAACCGGTGAGTACA-3'; R:5'-CTTAAGGTTTAGGATTCGTGCTCAT-3'），以事先構築含有 HCV5'NTR 與 Core 區域的載體 pGEM4Z-C5NTR-Core 進行 PCR 測試，經電泳後，可得到近 250 bp 的終產物。再將此載體以 T7 RNA polymerase 進行體外轉譯，得到的 RNA 經 OD=260nm 定量後，進行系列稀釋。取含 0.01pg/ml, 0.1pg/ml, 1pg/ml, 10pg/ml, 及 100pg/ml 的 RNA 與定量血清所抽取的 RNA 檢體，以 SYBR Green I 試劑組進行 real-time RT-PCR 反應；設定 48℃30 min, 95℃10 min 後再經 95℃15 sec, 62℃1 min 共 40 cycles 反應，以 PE-5700 定量系統偵測每個反應的螢光標示值，定出各反應 Ct 質（cycle threshold），再依已知檢量線濃度換算成個檢體濃度，單位為 pg/ml。所得檢量線標示圖顯示，本偵測方法可定量 5 個 log 範圍。

四、加味四逆散之組成比例與製備：

1. 加味四逆散之組成比例：

柴胡 3　炒白芍 3　枳實 3　炙甘草 3　虎杖 3　敗醬草 3　紫草 2　生黃耆 3

2. 請中國醫藥學院附設醫院中藥局鑑定中藥基源，並委託科達 GMP 藥廠製成濃縮藥粉。

⑴加味四逆散之組成基源

柴胡：Bupleurum chinese DC.

白芍：Paeonia lactiilora PALL.

枳實：Citrus aurantium L.

甘草：Glycyrrhiza uraleusis FISCH.

虎杖：Polygonum Cuspidatum SI.

敗醬草：Patrinia villosa JUSS.

紫草：Arnebia enchroma（Royle）JOHNST.

生黃耆：Astragalus membranacens Bge. Var. mongholicus（Bge）HSIAO.

⑵製備

將加味四逆散原料入七倍水量並煮 60 分鐘，煎液經 140 目篩網過濾，為第一萃取液，將藥渣加入五倍水量煎煮 50 分鐘，煎液經 140 目篩網過濾，為第二萃取液，二次萃取液混合濃縮浸膏，再與賦形劑（澱粉）混合，乾燥製成濃縮藥粉。

五、療效指標：

1. Primary endpoint:

肝功能：AST, ALT, total bilirubin, direct bilirubin 等改善。

2. Secondary endpoint:

血清：HCV-RNA 轉陽。

六、統計方法

以 T-test 及 multiple linear regression 法探討二組間對於 C 型肝炎患者血清 AST、ALT、total bilirubin direct bilimbin、ALK-P、γ-GT 與 HCV-RNA 之變化。

利用細胞分生模式研究 C 型肝炎病毒中醫藥療程之體外療效

一、C 型肝炎病毒體外增殖模式之建立

(一)、病毒樣品

自檢驗室中選出 C 型肝炎病毒 RNA 陽性血清作為病毒分離的樣品。所有的樣品都含有每毫升至少 10^6 個 C 型肝炎病毒基因體，而樣品必須保存在-80℃中待用。

(二)、細胞株的選擇及離心促進接種法

目前對於 C 型肝炎病毒的生物學及持續性感染的機制所知甚少，

歸究其原因，大部分是因為缺乏一個可供病毒在體外增殖的細胞株系。到目前為止，許多研究試圖建立可供 C 型肝炎病毒增殖的細胞株系，但通常都得到負面的結果。本計畫進行病毒分離所嘗試使用的細胞株取材自目前實驗室已有的細胞種類，包括 Hep G2（肝細胞癌）及 Vero（腎臟纖維芽母細胞）等。繼代兩天內的細胞先與 2 ml 經稀釋後之血清樣品混合接觸，再利用 2000 xg 於 35℃下離心 45 分鐘。在離心後，去除接種液，以無菌磷酸鹽緩衝液沖洗細胞兩次，最後再加入 5 ml 培養液於 37℃培養箱中培養 15 至 30 天。之後以第二部分之實驗設計進行病毒的定性及定量分析。

二、C 型肝炎病毒定性及定量分析

(一)、RNA 的抽取

病毒感染的細胞或血清中的 RNA 利用 guanidinium thiocyanate -phenol- chloroform 法（Chomczynski and Sacchi, 1987）抽取。簡言之，取 50 μl 血清加入 450 μl solution D（4 M guanidinium thiocyanate; 25 mM sodium citrate, pH 7.0; 0.5% sarcosyl; 0.1 M 2-mercaptoethanol）或將病毒感染的細胞加入 500 μl solution D 溶解細胞，再分別加入 50 μl sodium acetate（pH 4.0）、0.5 ml phenol 及 0.1 ml chloroform-isoamyl alcohol（49:1），劇烈震盪混合 15 分鐘後，以 10,000 xg 於 4℃離心 20 分鐘。離心後抽取含有 RNA 的水層，加入 0.5 ml isopropanol，置於-80℃、15 分鐘，再於 4℃下離心 10,000 xg、20 分鐘，收集 RNA 沈澱。最後，RNA 沈澱以 75 % 酒精清洗一次，烘乾後，溶於適量 DDW 中，保存於-80℃。

(二)、C 型肝炎病毒的定性分析

C 型肝炎病毒的定性分析採巢式反轉錄聚合酶連鎖反應（nested reverse transcription-polymerase chain reaction；nested RT-PCR）的方式進行，其中引子的位置是座落於 C 型肝炎病毒基因體上最具保留性的 5'-untranslated region。首先進行 cDNA 的合成。取上述方法抽出

之 RNA 11.3 µl 加入 1 µl 之 25 µM 隨機引子及 1 µl 之 20 mM dNTPs，於 65℃下作用 5 分鐘，隨後立刻放於冰上，再加入 2 µl 之 10x PCR buffer、3.2 µl 之 25 mM $MgCl_2$、20 U RNasin，於 25℃作用 10 分鐘。在加入 200 U SuperScript II（BRL）後，置於 42℃作用 1 小時，以完成第一股 cDNA 的合成。

第一次的 PCR 反應為取上述合成之 cDNA 20 µl，分別加入 1 µl 之 10 µM 引子 HCV F1（5'-AACTACTGTCTTCACGCAGAA-3'）、1 µl 之 10 µM 引子 HCV R1（5'-GATGCACGGTCTACGAG-ACCTC-3'）、8 µl 之 10x PCR buffer、2.8 µl 之 25 mM $MgCl_2$ 及 2.5 U Taq DNA polymerase，最後補入 DDW 至 100 µl。PCR 作用的溫度及時間為 94℃、5 分鐘；55℃、2 分鐘；72℃、2 分鐘；共 1 次循環。94℃、1 分鐘；55℃、2 分鐘；72℃、2 分鐘；共 33 次循環。94℃、1 分鐘；55℃、2 分鐘；72℃、10 分鐘；共 1 次循環。

第二次的 PCR 反應為取上述第一次 PCR 之 DNA 10 µl，分別加入 1 µl 之 10 µM 引子 HCV F2（5'-TTCACGCAGAAAGCG-TCTAG-3'）、1 µl 之 10 µM 引子 HCV R2（5'-CACTCTCGAGCACC-CTATCAGGCAGT-3'）、10 µl 之 10x PCR buffer、6 µl 之 25 mM $MgCl_2$、1 µl 之 20 mM dNTPs 及 2.5 U Taq DNA polymerase，最後補入 DDW 至 100 µl。PCR 作用的溫度及時間為 94℃、5 分鐘；55℃、2 分鐘；72℃、2 分鐘；共 1 次循環。94℃、1 分鐘；55℃、2 分鐘；72℃、2 分鐘；共 38 次循環。94℃、1 分鐘；55℃、2 分鐘；72℃、10 分鐘；共 1 次循環。經過兩次 PCR 後，取 10 µl 樣品以 2.5% agarose 進行電泳分析，預估可以偵測到的片段長度為 250 bp。

(三)、競爭性 RNA 的構築及合成（圖一）

將上述病毒 RNA 利用 HCV F1 及 HCV R1 引子進行第一次 PCR 後，可增殖出長約 289 bp 的 DNA 片段。先將這一片段以 blund end ligation 的方式，架接進入載體 pBluescrip II 之 SmaI 位置中，成為

HCV5F1。之後利用位於 286 bp DNA 片段中的兩個限制酶 PpuMI 及 NheI，進行內部切割，約可去除 60 bp 的 DNA 片段。經 PpuMI 及 NheI 切割後的 HCV5F1，經過 self ligation 的過程，構築出 HCV5F1a。進一步進行定序反應，確定DNA片段的方向性，再利用 Riboprobe® In Vitro Transcription Systems（Promega）進行 RNA 的產製。產生出來的 RNA 利用 agarose 進行電泳分析，再以 spectrophotometer 定量後，保存於-80℃。

(四)、C 型肝炎病毒 RNA 的定量

C 型肝炎病毒 RNA 的定量是利用競爭性巢式 RT-PCR 的方式進行。取上述方法抽出之 RNA 6.3 µl 加入 1 µl 之 2 µM 引子 HCV R1、5 µl 已知分子數的競爭性 HCV5F1a RNA 及 1 µl 之 20 mM dNTPs，於 65℃下作用 5 分鐘，隨後立刻放於冰上，再加入 2 µl 之 10x PCR buffer、3.2 µl 之 25 mM $MgCl_2$、20 U RNasin，於 25℃作用 10 分鐘。在加入 200 U SuperScript II（BRL）後，置於 42℃作用 1 小時，以完成第一股 cDNA 的合成。第一次及第二次的 PCR 反應條件與上述之定性分析相同。PCR 產物利用 agarose 電泳分析，可以得到預估長度為野生株 250 bp 及競爭者 190 bp。病毒 RNA 的計算為利用密度分析儀計算競爭性分子及野生株分子於 agarose 上 band 的區域，先依照長度的不同加以校正，再以校正後之競爭性分子密度除以野生株分子密度為 Y 軸、以競爭性分子的已知分子數為 X 軸，畫出標準曲線。當校正後之競爭性分子密度除以野生株分子密度等於 1 時，相對於競爭性型分子的分子數，即為 C 型肝炎病毒基因體的分子數。

三、以細胞模式評估中藥方劑清除 C 型肝炎病毒的效果

(一)、清除 C 型肝炎病毒效用之評估

為了研究 C 型肝炎病毒對不同藥物的敏感性，將病毒感染的細胞培養於 6-well plate 上，再加入含有不同濃度中藥萃取物的培養液。在培養 15 至 30 天後，收取細胞，利用第二部份的實驗方法評估病毒

的力價，以測試中藥藥方對抗 C 型肝炎病毒之效用。抗病毒藥的效用以計算藥物毒性及有效抑制病毒的劑量為主，兩者比例差距愈大則相對藥效愈大。

(二)、四逆散及加味四逆散之拆解分析

四逆散及加味四逆散具有疏肝解郁、益氣健脾、養血清熱等功效，因此臨床上通常用來治療肝炎、盆腔炎等。為了了解四逆散及加味四逆散抑制C型肝炎病毒的效果，本計畫擬以傳統製劑（水煎劑）及現代生藥學的萃取方法，併合各單味藥中之純化合物，解析原方劑及加味方劑、或不同萃取物對於 C 型肝炎病毒之清除作用。以下分述各組萃取物之來源及取材方法：

1. 藥方組成

四逆散取材自傷寒論，是由白芍（Paeonia lactiilora PALL.）、柴胡（Bupleurum chinese DC.）、甘草（Glycyrrhiza uraleusis FISCH.）及枳實（Citrus aurantium L.）所組成。加味四逆散則是由白芍、柴胡、甘草、枳實、虎杖（Polygonum cuspidatum SI.）、敗醬草（Patrinia villosa JUSS.）、紫　草（Arnebia enchroma JOHNST.）、及生黃耆（Astragalus membranacens Bge. Var. mongholicus（Bge）HSIAO.）以 3：3：3：3：3：3：2：3 的比例所組成。

2. 藥方萃取物

四逆散及加味四逆散傳統上是以散劑或水煎劑的方式給予患者，因此本計畫先以傳統製劑—水煎劑為藥方來源，進入清除病毒的分析。

為了研究的單純化，同時解析各單味藥對病毒複製的影響，本計畫擬以現代生藥學的萃取方式，進行單味藥成分的萃取。萃取方法分為下列五項：⑴水浸液萃取物：將 4 g 的單味藥粉浸入 40 ml 水中，浸泡過夜，去除藥渣後，主要可萃取出氨基酸、蛋白質等；

⑵熱水浸液萃取物：將 4 g 的單味藥粉浸入 40 ml 水中，浸泡過夜，去除藥渣後，置於 60℃加熱 10 分鐘，主要可萃取出糖酶、有機酸、皂酶、酚酶、鞣質、水溶性生物鹼等；⑶中性醇萃取物：將 5 g 的單味藥粉浸入 60 ml 的 95%乙醇，於水浸中加熱回流 20 分鐘，主要可萃取出黃酮類、香豆精、揮發油類、甾體等；⑷酸性醇萃取物：將 2 g 的單味藥粉浸入 10 ml 的 0.5%鹽酸酒精中，於水浸中加熱回流 20 分鐘，主要可萃取出生物鹼類物質；⑸甲醇萃取物：將 5 g 的單味藥粉浸入 60 ml 的 100%甲醇，於水浸中加熱回流 20 分鐘，主要可萃取出兼具水浸液及乙醇萃取物等物質。單味藥之萃取物經冷凍乾燥後，保存於-80℃，準備進行細胞毒殺作用分析及病毒清除分析。

3. 單味藥主成分的分析及取得

加味四逆散是由白芍、柴胡、甘草、枳實、虎杖、敗醬草、紫草、及生黃耆所組成。由這些單味藥的成分分析，擬選出柴胡成分 saikosaponins；甘草成分 glycyrrhizin、glycyrrhezic acid、liquilltin；白芍成分 paeoniflorin；枳實成分 hesperidine 等，進行單味藥主成分對根除病毒作用的藥效評估。除了研究這些純化合物抑制病毒的機轉及所需劑量外，擬以體外系統，組成最佳的劑量及用藥時機之排列，以現今西醫干擾素及 ribavirin 模式為依據加以分析，由基礎實驗的數據，提供臨床用藥時機及劑量評估之參考。

結　果

逍遙散加味對慢性 B 型肝炎療效之研究

實驗組 28 名，完成試驗者 21 名，drop out 7 名，drop out 之原因，3 名因肝功能無明顯改善，未回診。3 名因個人因素，無法繼續就診，1 名同時服用西藥。對照組 24 名，完成試驗者 11 名，drop out 13 名，8 名因

肝功能無明顯改善，未回診，3 名因個人因素，無法繼續就診，2 名在試驗期間急性發作。

完成試驗之實驗組與對照組患者在年齡、性別、肝功能上無統計上的差異。

一、生化檢查

治療前與治療 24 星期後實驗組與對照組各生化檢查結果如下：

實驗組：AST: 60.62±31.67IU/L 比 45.29±25.4IU/L.

ALT: 114.19±87.79IU/L 比 75.52±67.83IU/L.

total bilirubin: 1.03±0.34mg/dl 比 0.93±0.31mg/dl.

direct bilirubin: 0.18±0.12mg/dl 比 0.21±0.23mg/dl.

Alk-P: 80.24±42.77IU/L 比 75.86±41.32IU/L.

γ-GT:: 21.19±15.98IU/L 比 21.86±14.69IU/L.

albumin: 4.5±0.28g/dl 比 4.43±0.26g/dl

globulin: 3.02±0.5mg/dl 比 3.06±0.41mg/dl.

A/G 比值: 1.53±0.28 比 1.47±0.23.

對照組：AST: 74.82±55.13IU/L 比 75.27±46.43IU/L.

ALT: 108.91±68.19IU/L 比 117.91±88.67IU/L.

total bilirubin: 1.05±0.36mg/dl 比 0.98±0.37mg/dl.

direct biliruin: 0.16±0.06mg/dl 比 0.25±0.26mg/dl.

Alk-P: 76.09±29.24IU/L 比 72.36±25.60IU/L.

γ-GT:: 22.91±17.82 比 28.64±30.15.

albumin: 4.06±0.59g/dl 比 4.17±0.43g/dl.

globulin: 3.27±0.55mg/dl 比 3.17±0.40mg/dl.

A/G 值: 1.29±0.34 比 1.34±0.26.

用複迴歸方法統計分析，治療 24 星期後，實驗組 ALT 明顯較對照組降低（$p<0.05$）（圖二），治療 24 星期與治療前之 ALT 差值，二組間亦呈顯著差異（$p<0.05$），實驗組有 33%患者 ALT 降至正常，對

照組無患者 ALT 降至正常。AST、total bilirubin、direct bilirubin、Alk-P、γ-GT、albumin、globulin 及 A/G 比值二組間並無顯著差異。逍遙散加味服用 24 星期，對腎功能（serum creatinine）、血液（Hb. platelet. WBC）並無不良影響。

二、 對 B 型肝炎病毒之影響

1. 實驗組治療前血中 HBV-DNA 之濃度平均為 1.93×10^{7}copy N#，對照組為 7.8×107 copy N#，經過 24 星期治療，二組皆無患者出現血中 HBV-DNA 轉陰情形。
2. 實驗組有 5 位患者HBeAg轉陰，Anti-HBe轉陽（5/21. 24 ％）（表一），其中 1 位在治療 12 星期後Anti-HBe轉陽，其餘 4 位皆在第 24 星期 Anti-HBe 轉陽，對照組則無患者 HBe 轉陰及 Anti-HBe 轉陽（0/11. 0 ％）。

逍遙散及逍遙散加味對於 B 型肝炎病毒抑制和根除之體外療效的評估研究

本次篩選的藥物有中藥方劑的逍遙散和逍遙散加味（組成如表二，表三），方劑中藥方的組成有柴胡、當歸、薄荷、炒白朮、煨生薑、炙甘草、炒白芍、茯苓、虎杖、白茅根、丹參、敗醬草等，以上的藥物以浸膏作適當稀釋後，以不同的稀釋倍數進行本試驗。因中藥製成浸膏無法抽乾，所以以上的藥物以浸膏用 DMSO 作適當稀釋後，以不同的稀釋倍數進行本試驗。結果以原浸膏稀釋倍數表示，以不加藥和加同體積 DMSO 作為 Negative control，以加 50, 10, 2, 0.4　M 2,3-didoxycytidine（ddC）作為 Postive control 。

初篩選濃度有 10X, 50X, 100X, 200X。最高濃厚 10X 稀釋對細胞抑制的百分比均未達 50%其中 10X 稀釋倍數的炒白朮，10X 稀釋倍數的敗醬草和 50X 逍遙散加味具有對病毒 DNA 抑制作用分別為 35.7%, 32.3%,

28.9%。其他藥物在 10 X 稀釋倍數未有抑制現象產生。進一步提高藥物濃度只有逍遙散加味在最高濃度 5X 稀釋對細胞抑制的百分比達 50%，其他藥物均未達 50%，使用原倍未稀釋之浸膏在加藥三天後細胞全部浮起，其可能原因是浸膏太濃稠所導致現象。在 5X 稀釋倍數的炒白朮，5X 稀釋倍數的敗醬草和 5X 逍遙散加味具有對病毒 DNA 抑制作用分別為 36.5%, 32.5%（圖二）, 29.3%。但藥物停止作用六天後此抑制現象並未持續存在。經逍遙散加味，炒白朮，敗醬草作用後細胞染色體 DNA 上的嵌入 HBV DNA 的量在最高濃度的作用下均未減少（圖三）。細胞經 HBV 轉錄 RNA 也未受藥物的影響。

計劃中所使用的 2.2.15 細胞株（Sells et al., 1987; 1988），在經過幾十代世步培養並不會有 DNA 失落的現象。因此提高了實驗的可信度。本次篩選中藥物浸膏對病毒 DNA 約有 30% 抑制的有 5X 稀釋倍數的炒白朮、敗醬草和 5X 逍遙散加味具有對病毒 DNA 28.9% 抑制。進一步我們可將這些藥物濃度升高仍有更高倍濃度作用下對細胞毒性仍未達 50%，而有更好的病毒抑制作用。

加味四逆散對慢性 C 型肝炎療效之研究

對照組 29 名,完成試驗者 20 名，9 名 drop out，其中 5 名因肝功能無明顯改善，未回診，4 名因個人因素無法繼續參與試驗。完成試驗之實驗組與對照組患者在年齡、性別、肝功能上無統計上的差異。

一、 生化檢查

治療前與治療 24 星期後實驗組與對照組各生化檢查結果如下：

實驗組：AST: 85.6±37.58IU/L 比 76.17±39.13IU/L.

ALT: 132.10±53.85IU/L 比 109.40±58.62IU/L.

total bilirubin: 0.97±0.30mg/dl 比 0.89±0.32mg/dl.

direct bilirubin: 0.22±0.21mg/dl 比 0.27±0.26mg/dl.

Alk-P: 67.20±14.47IU/L 比 67.73±23.15IU/L.

γ-GT:: 45.63±35.43 IU/L 比 42.33±30.54IU/L.

albumin: 4.25±0.35mg/dl 比 4.16±0.37mg/dl.

globulin: 3.30±0.58mg/dl 比 3.33±0.67mg/dl.

A/G 比值: 1.34±0.32 比 1.31±0.37.

對照組：AST: 85.00±41.74IU/L 比 75.55±40.93IU/L.

ALT: 139.80±78.88IU/L 比 123.30±75.807IU/L.

total bilirubin: 1.04±0.29mg/dl 比 0.95±0.33mg/dl.

direct biliruin: 0.18±0.10mg/dl 比 0.21±0.16mg/dl.

Alk-P: 60.35±22.09IU/L 比 59.40±21.16IU/L.

γ-GT: 37.15±35.25 IU/L.比 34.01±38.26IU/L.

albumin: 4.04±0.19 比 4.17±0.29g/dl.

globulin: 3.60±0.54mg/dl 比 3.37±0.52mg/dl.

A/G 比值: 1.15±0.18 比 1.27±0.24.

二組在 AST、ALT（圖四）、total bilirubin、direct bilirubin、Alk-P、γ-GT、albumin、globulin 及 A/G 比值皆無顯著差異。經過 24 星期加味逍遙散治療，對腎功能（serum creatinine）、血液（Hb. Platelet. WBC）皆無不良影響。

三、 C 型肝炎病毒之影響

實驗組治療前血中 HCV-RNA 濃度平均為 0.76pg/ml，對照組為 0.75pg/ml，經過 24 星期治療後實驗組 3 位患者（3/30. 10 %），對照組 1 位患者（1/20. 5 %）血中 HCV-RNA 轉陰。

利用細胞分生模式研究 C 型肝炎病毒中醫藥療程之體外療效

一、C 型肝炎病毒定性及定量分析

(一)、定性分析——巢式 RT-PCR

C 型肝炎病毒的定性分析是採巢式 RT-PCR 的方式加以進行。二對引子設計的位置座落於 C 型肝炎病毒基因體最具保留性的 5'-UTR 處，分別為 F1 引子-289～-269，R1 引子-21～+1 及 F2 引子-279～-260，R2 引子-53～-28（圖五、六）。為了了解巢式 RT-PCR 的敏感性，我們將已知病毒量的血清，利用 AGPC 的方法抽取病毒 RNA，將病毒 RNA 進行二倍稀釋後，再進行巢式 RT-PCR。

結果顯示，若進行 40 次循環的巢式 RT-PCR，其敏感性可達 $8.2*10^3$ 個病毒基因體即可偵測到（圖七 A），若將循環數增加到 50，則在病毒濃度過高或過低的狀態下，都出現非特異性的雜訊，而其敏感性仍然維持在 $8.2*10^3$ 個病毒基因體才可偵測到（圖七 B）。因此，利用巢式 RT-PCR 進行 40 次循環的反應可應用於每毫升血清中含有 104 個病毒基因體之定性分析上。

(二)、定量分析——競爭性 RT-PCR 及競爭性巢式 RT-PCR

C 型肝炎病毒之定量分析是採競爭性 RT-PCR 的方式加以進行。其基本原理為在 RT-PCR 反應中加入一連串已知分子數之 RNA，因為競爭性 RNA 與野生株病毒含有相同的引子結合位置，但二者長度不同，因此進行 RT-PCR 後，將反應物進行電泳分析，可同時顯現野生株及競爭者所增幅的相對濃度，即二者 band 的面積。進一步，我們進行定量分析，以密度分析定量 band 的面積。因為二條 band 的長度不同，所插入的染色劑 ethidium bromide 數量不同，所呈現之亮度也就不同，因此必須先將二條 band 的面積加以校正。若將野生株 band 的面積當做 Wa，競爭者 band 的面積當作 Ca，則校正後的競爭者 band 的面積 Cac 之計算為 Ca x 野生株長度／競爭者長度。在經校正後，

可利用競爭者分子數量當作X軸，Cac除以Wa的數值當作Y軸，定出標準曲線，而當Cac=Wa（即Cac除以Wa等於1）時之相對分子數即為野生株之病毒基因體數量（圖八）。

在競爭性RT-PCR中，競爭性RNA的設計為一重要的考量，因為競爭性RNA必須與野生株含有相同的引子結合位置，且其序列鹽基比例及分布要相近，才不至於在進行RT-PCR時，因產生偏差而導致定量失當。因此我們在設計競爭性RNA時，是採取將野生株進行內部缺損而完成的。首先將病毒RNA利用上述巢式RT-PCR增殖252 bp的產物，並將其架接到pBluescrpt後，利用位於252 bp內之限制脢Sma I及PpuM I切割，以得到較野生株少59 bp之競爭片段，最後利用 in vitro transcription 合成長度為193 bp 之競爭性 RNA（圖九）。

利用競爭性RT-PCR進行血清樣品中病毒基因體的定量，由圖十顯示。當競爭者RNA的數量增加後，野生株及競爭者所增幅出來的band相對比例會隨之變化。但在競爭RNA分子數超過8×10^8時，則出現非特異性產物。若利用上述定量方法加以計算，則當Cac等於Wa時，可求出血清中的C型肝炎病毒RNA的分子數約為5×10^5個（圖十一）。

為了了解競爭性RT-PCR的敏感性，我們將已知分子數（5.12×10^4及5.12×10^3）之病毒RNA與一連串已知分子數之競爭性RNA混合，共同進行RT-PCR，圖十二顯示，在病毒分子數為5.12×10^3時，利用標準曲線定義出之線性迴歸，可求得病毒分子數也如預期一般為10^3。因此，以競爭性RT-PCR進行病毒的定量，可以成功地定量出10^3個分子數之C型肝炎病毒RNA。

為了進一步增加競爭性RT-PCR的敏感性，我們利用競爭性巢式RT-PCR的方式進行測試。首先先構築另一株競爭性RNA，其引子結合位置為F1及R1，長度為229 bp（圖五）。之後將一連串已知分子

數之競爭性 RNA 與野生株共同進行巢式 RT-PCR。圖十三顯示，再 lane 4 時，野生株與競爭者呈現相類似之相對亮度，因此利用競爭性巢式 RT-PCR，可將敏感性上升到 10^2 個分子即可偵測到。

二、C 型肝炎病毒體外增值模式之建立

C 型肝炎病毒體外增殖模式主要是利用離心促進接種法，將病毒接種於 Vero（猿猴腎臟纖維芽母細胞）或 Hep G2（肝細胞癌）上，再利用競爭性巢式 RT-PCR 加以偵測。（一）C 型肝炎病毒體外感染之變因探討——繼代數目、感染時間及感染量

為了了解 C 型肝炎病毒體外感染之最佳條件，我們測試繼代數目、感染時間及感染量等變因，之後將病毒感染之細胞收集起來，抽取細胞總RNA，再與 200 個競爭性RNA分子混合後，進行競爭性巢式 RT-PCR。判讀的依據為野生株所增幅之亮度較競爭者為強，則表示野生株之分子數多於競爭者。圖十二 A 顯示在繼代數目方面，將病毒感染一天後之細胞（lane 1）及病毒感染後經一次繼代之細胞（lane 2、3）收集後加以分析，發現在繼代後C型肝炎病毒的數量較未繼代前減少，顯示 C 型肝炎病毒可能隨細胞繼代次數的增加而遭受分解。

在感染時間方面，我們將血清加入細胞後，於室溫作用 30 分鐘，使血清之病毒吸附於細胞上，再於 37℃ 作用 45 分鐘或 90 分鐘，使病毒穿透細胞膜進入細胞內，而於一天後，進行細胞病毒之定量。結果顯示，在 37℃ 作用 90 分鐘時，所感染之病毒較 45 分鐘者為佳（圖十四 A）。

至於感染量方面，我們將相同稀釋倍數的血清，分別加入 1 至 6 ml 於細胞中進行感染，結果顯示，1 ml 的感染體積明顯地較其他組為佳。因此，由上述結果，我們採取以 1 ml 的感染量，於室溫作用 30 分鐘，37℃ 感染 90 分鐘後，再以 2000 xg 離心 20 分鐘的攻毒方式，進行後序之實驗。

(二)、C 型肝炎體外感染之變因探討——血清稀釋倍數

為了了解C型肝炎病毒感染細胞時所需之最小 multiplicity of infection（m.o.i），我們將含有 2 x 10^6 個病毒的血清經過二倍稀釋後進行感染。圖十四 B 顯示，血清稀釋至 80 倍，即血清中含有 2.5 x 10^4 個病毒基因體時，仍能感染成立，但感染之病毒量明顯地較 5 倍稀釋者為差，因此我們採取將血清稀釋 20 倍，以m.o.i.等於 0.1 的數量，進行後序實驗。

(三)、C 型肝炎病毒體外感染之變因探討——均質性試驗

為了了解並控制 C 型肝炎病毒體外感染之均質性，我們利用上述的最佳條件同步進行五組細胞的感染，結果顯示，這五組細胞中所感染之C型肝炎病毒數量並無明顯的差異（圖十四C）。因此，利用相同的感染條件，可以同步進行後續 19 種藥物之篩選，以減少不同批細胞感染的變因。

三、以細胞模式評估中藥方劑清除 C 型肝炎病毒的效果

在中藥方劑清除 C 型肝炎病毒效果方面，四種方劑（逍遙散、加味逍遙散、四逆散、加味四逆散）及方劑中之15種單味藥（薄荷、炙甘草、炒白芍、茯苓、丹參、虎杖、枳實、紫草、柴胡、當歸、炒白朮、煨生薑、白茅根、敗醬草、白皮耆）由順天堂及科達藥廠分讓後，先利用甲醇萃取，再訂出 50％ 細胞毒殺濃度（50% toxicity concentration；TC_{50}）（表四）。我們選定selective index為8的濃度（即1/8 TC_{50}）為中藥測試濃度，並利用 ribavirin 為陽性對照組，以溶劑（甲醇）為陰性對照組，加入已感染 C 型肝炎病毒的 Vero 細胞中，於 24 小時後，抽取RNA，進行定量PCR。結果發現，紫草處理組中所含的病毒量較其他組少（圖十五），顯示紫草可能具有抑制病毒複製或是促進病毒分解的能力。

進一步為了了解這些藥物是作用於抑制病毒之吸附及穿透，我們於病毒感染同時加入上述藥物，再於感染一天後，進行病毒的定量。

圖十顯示，紫草處理組所含之病毒量較其他組少，因此顯示，紫草可能具有抑制病毒吸附及穿透的能力。

表一、逍遙散加味治療慢性 B 型肝炎血清 HBeAg 之變化

	治療前		治療 24 星期	
	HBeAg 陽性	Anti-HBe 陽性	HBeAg 陽性	Anti-HBe 陽性
實驗組（n=21）	21	0	16	5（23.8%）
對照組（n=11）	11	0	11	0（0%）

表二、逍遙散浸膏成分和產率

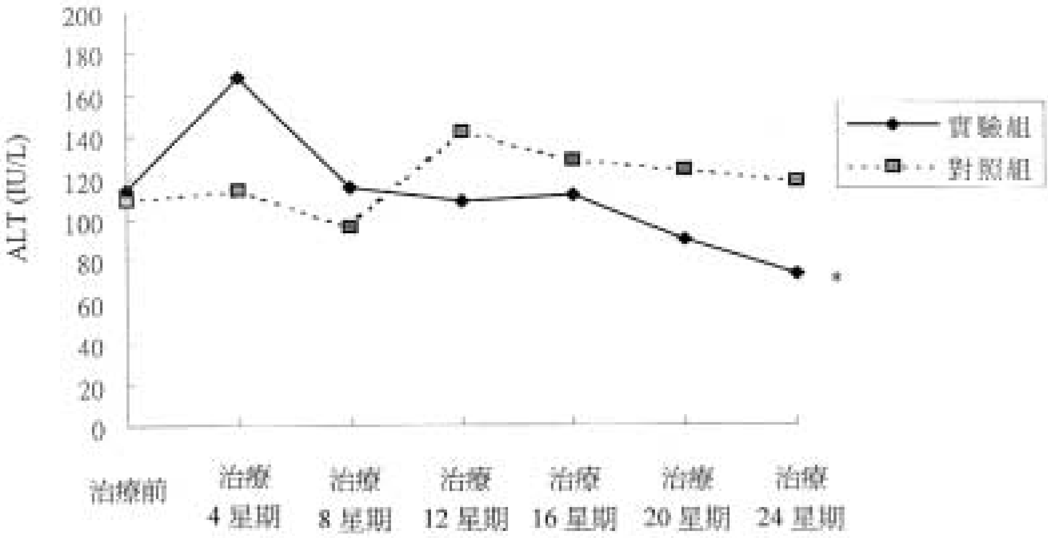
藥物	柴胡	當歸	薄荷	炒白術	煨生薑	炒白芍	炙甘草	茯苓	合計	濕浸膏量
重量(g)	71.4	71.4	35.7	71.4	71.4	71.4	35.7	71.4	499.8	318
乾浸膏率：41.7% 產率：26.6%										

表三、逍遙散加味浸膏成分和產率藥

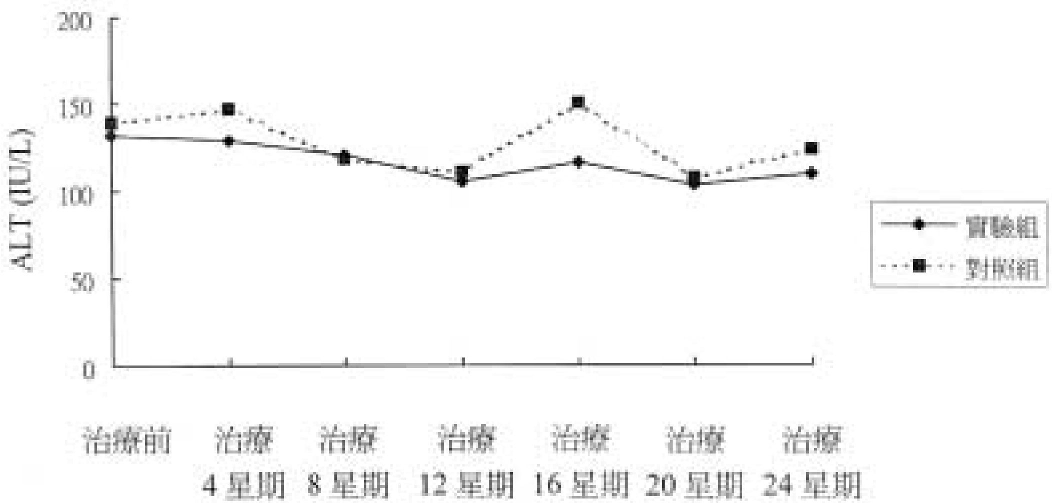
藥物	柴胡	當歸	薄荷	炒白術	煨生薑	炒白芍	炙甘草	茯苓	虎杖	白根	丹參	敗醬草	合計	濕浸膏量
重量(g)	48.8	48.8	24.4	48.8	48.8	48.8	35.7	48.8	48.8	24.4	36.6	48.8	500.2	317.5
乾浸膏率：39.22% 產率：24.9%														

表四、四種方劑及十五種單味藥之 50%細胞毒殺濃度。

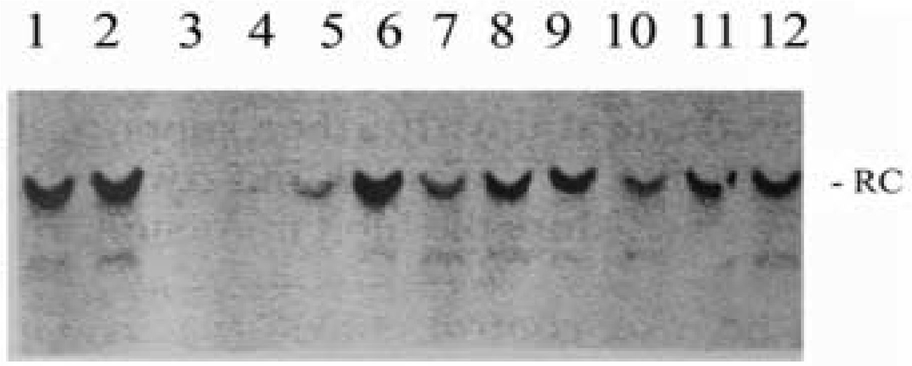
藥名	TC50（μg/ml）
逍遙散	53
加味四逆散	98
四逆散	32
加味四逆散	34
薄荷（Mentha haplocalyx）	21
炙甘草（Gly cyrrhiza uralensis）	16
炒白芍（Paeonia lactiflora）	265
茯苓（Smilax glabra）	9.8
丹參（Salvia miltiorhiza）	8.9
虎杖（Polygonum cuspidatum）	28.9
枳實（Poncirus trifoliata）	92.7
紫草（Arnebia euchroma）	4.2
柴胡（Bupleurum chinense）	11.8
當歸（Angelica sinensis）	39
炒白術（Atractylodes macrocephala.）	22
煨生薑（Zingiber officinale.）	26
白茅根（Imperata cylindrica）	75
敗醬草（Thlaspi arvensis L.）	48
白皮耆（Astragalus membranacens）	61



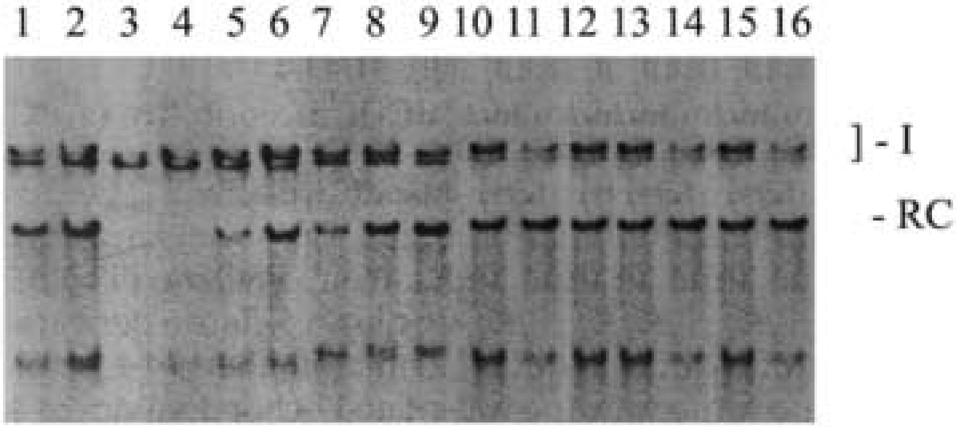
圖一、逍遙散加味治療慢性 B 型肝炎患者血中 ALT 之變化
*P<0.05，以複迴歸控制年齡、性別及治療前 ALT 值，實驗組比對照組。



圖四、加味四逆散治療慢性 C 型肝炎患者血中 ALT 之變化

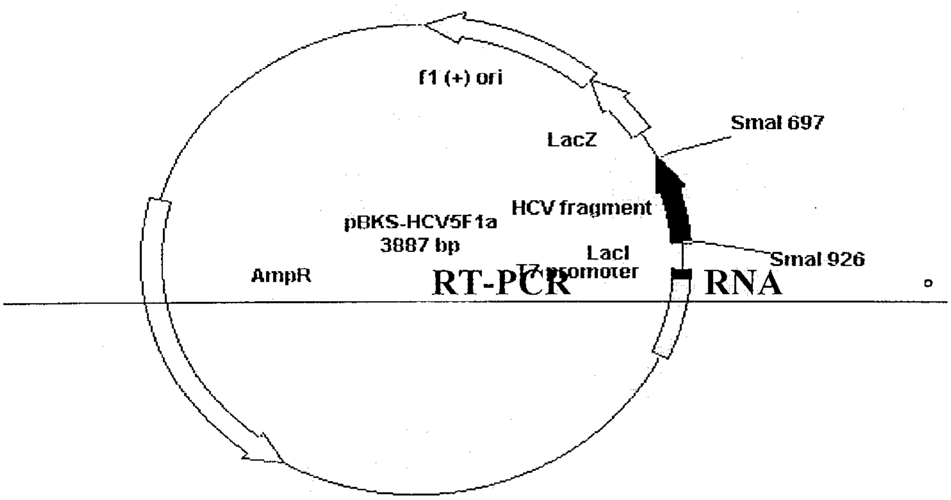


圖二、培養基收取病毒抽取 HBV DNA，以 pAM6 質體回收 HBV DNA 當探子經南方默漬法作用結果。1. 控制組; 2 加入 DMSO ;3,4,5,6 是加入 ddc 50, 10, 2, 0.4 mM; 7,8,9 是加入 5X, 50X, 200X 炒白朮; 10,11,12 加入 5X, 50X, 200X 敗醬草。RC（relaxed circular HBV DNA）

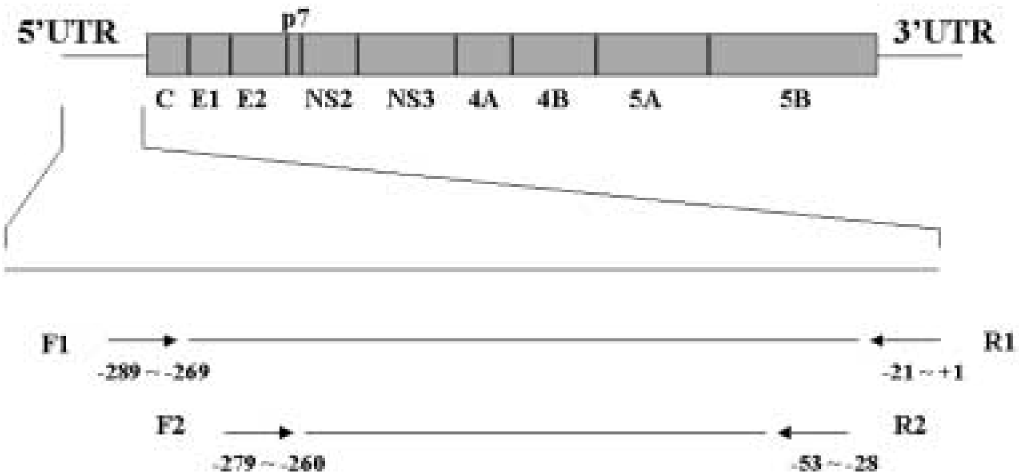


圖三、培養細胞染色体 DNA 經 HindIII 切割後南方默漬法作用結果。

1. 控制組；2 加入 DMSO ;3,4,5 是加入 ddc 50, 10, 2mM；6, 7,8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 分別為 5X 稀釋逍遙散加味，柴胡、當歸、薄荷、炒白朮、煨生薑、茯苓、虎杖、白茅根、丹參、敗醬草。RC（relaxed circular）, I（integrated HBV DNA）

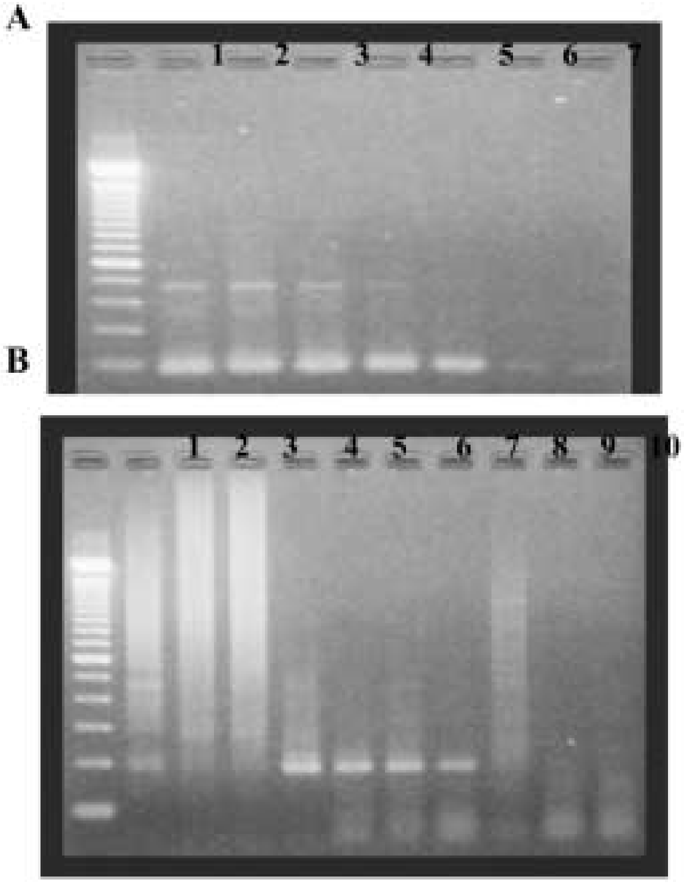


圖五、



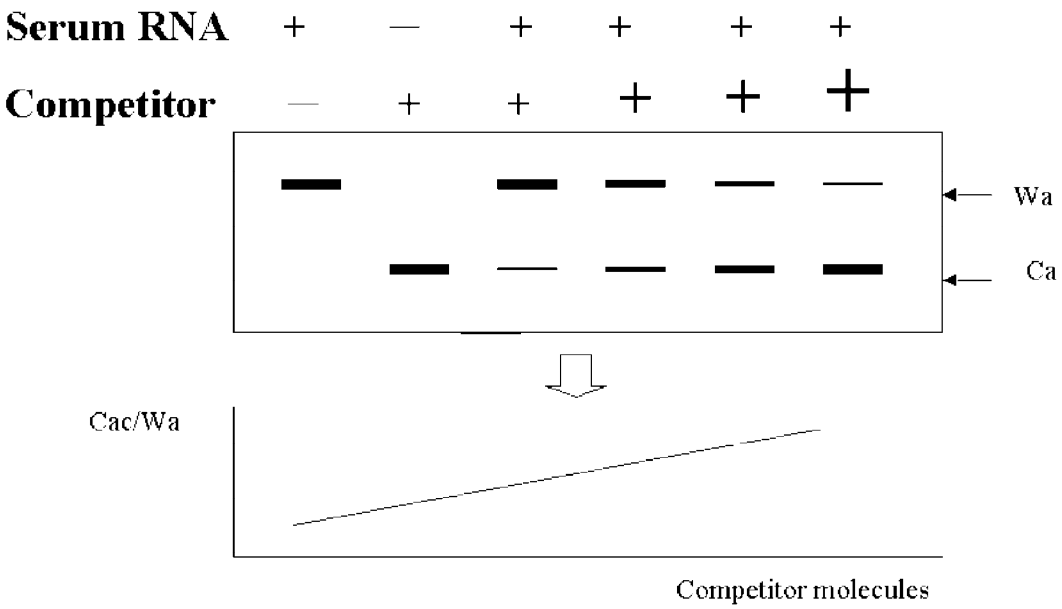
圖六、C 型肝炎病毒基因體的結構及巢式 RT-PCR 引子的位置。

上圖為 C 型肝炎病毒基因體的結構，UTR 表示 untranslated region，下圖為巢式 RT-PCR 位置及方向。本實驗所使用之二對引子分別為 F1 (-289～-269)及 R1 (-21～+1)、F2 (-279～-262)及 R2 (-53～-28)。



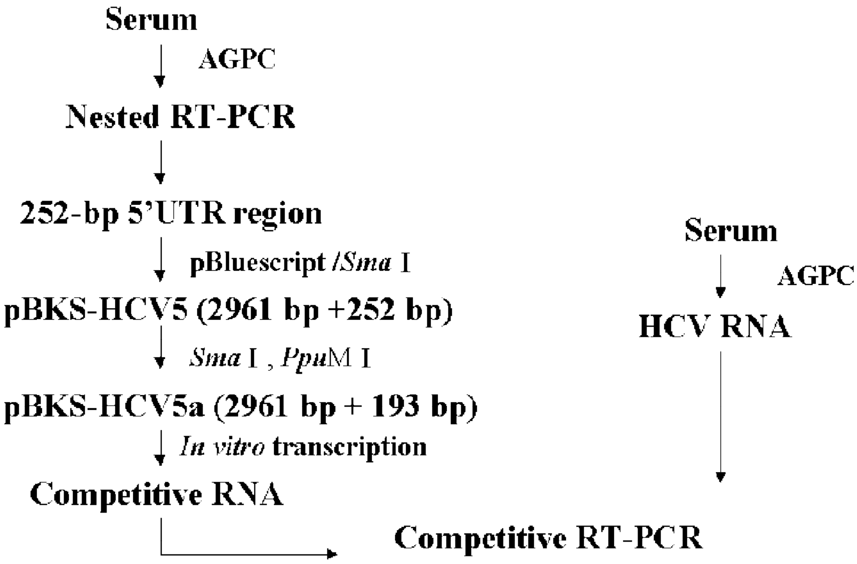
<u>圖七、巢式 RT-PCR 的敏感性。</u>

將分子數分別為 1.3×10^{8}（lane 1）、2.3×10^{7}（lane 2）、5.1×10^{6}（lane 3）、1×10^{6}（lane 4）、2×10^{5}（lane 5）、4.1×10^{4}（lane 6）、8.2×10^{3}（lane 7）、1.6×10^{3}（lane ）、3.3×10^{2}（lane 9）及 6.6×10（lane 10）的病毒 RNA 利用 F1、R2 及 F2、R2 之對引子，經過 40 次（A）及 50 次（B）循環之巢式 RT-PCR 增殖後，所得之產物以 2.5%之電泳膠體分析。

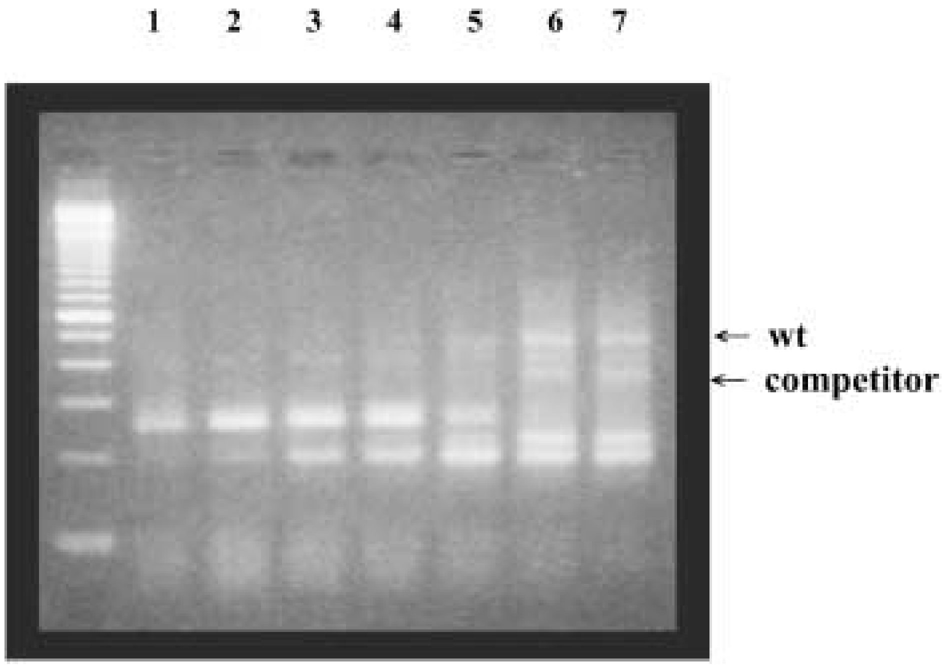


圖八、利用競爭性 RT-PCR 定量 C 型肝炎病毒 RNA 的原理。

上圖表示血清中病毒 RNA 與一連串已知分子數之競爭者（competiter）共同進行競爭性 RT-PCR 後，利用電泳膠體分析之模式圖。其中 Wa 表野生株 band 的面積，Ca 表競爭者 band 的面積。下圖為將競爭者分子數當作 X 軸，校正後之 Ca（Cac）除以 Wa 之數值為 Y 軸，所繪出之標準曲線。



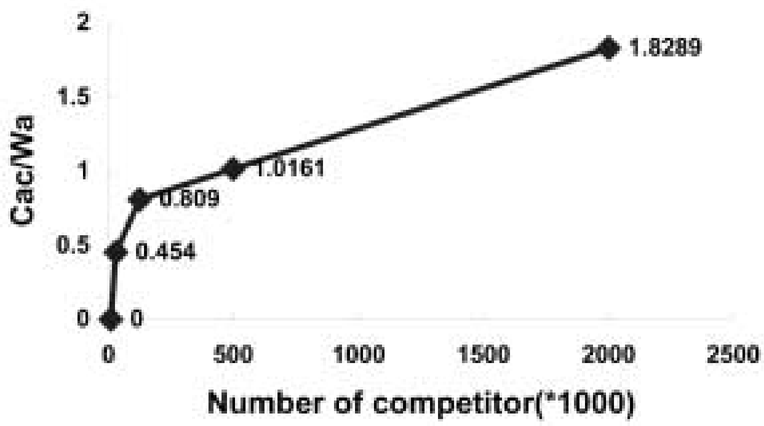
圖九、應用於競爭性 RT-PCR 之競爭性 RNA 的構築。



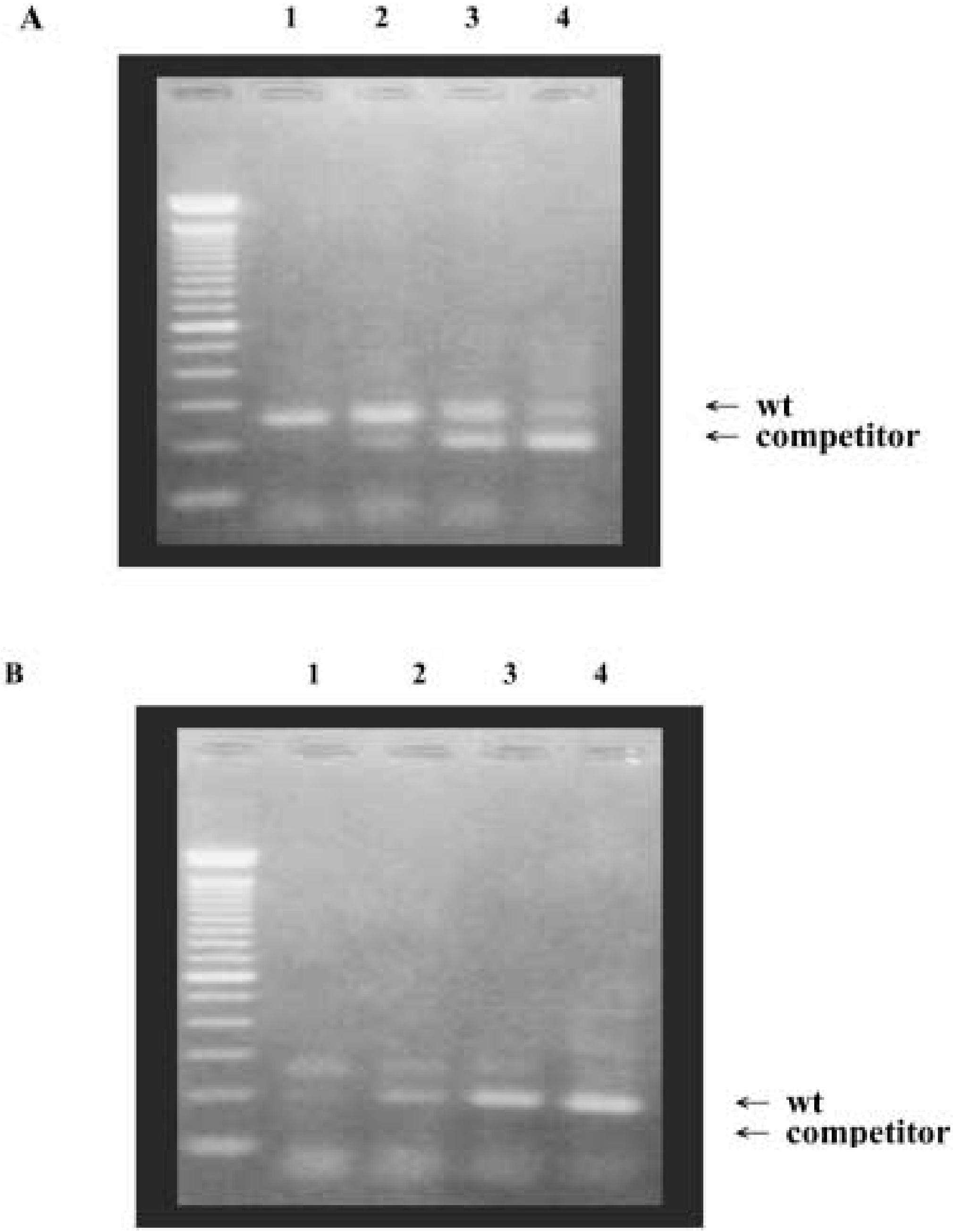
圖十、利用競爭性 RT-PCR 定量 C 型肝炎病毒 RNA。

將血清中之病毒RNA與 7.8×10^3（lane 1）、3.1×10^4（lane 2）、1.3×10^5（lane 3）、5×10^5（lane 4）、2×10^6（lane 5）、8×10^6（lane 6）及 3.2×10^7（lane 7）個競爭性 RNA 分子混合後，進行競爭性 RT-PCR，所得之產物以 2.5%電泳膠體分析。Wt（野生株）及 competiter（競爭者）的位置標示於右邊。

	Lane 1	Lane 2	Lane 3	Lane 4	Lane 5
Wa	0.0129	1.0467	0.05179	0.04911	0.02723
Ca	0	0.01622	0.03209	0.03823	0.03816
Cac	0	0.0212	0.0419	0.0499	0.0498
Cac/Wa	**0**	**0.454**	**0.809**	**1.0161**	**1.8289**
CRNA Molecule(*10^3)	**7.8**	**31.25**	**125**	**500**	**2000**

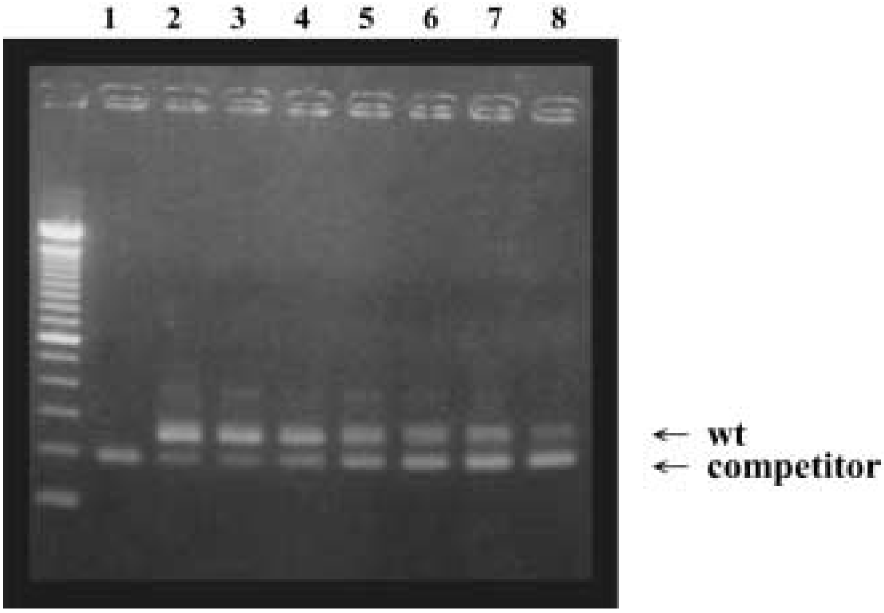


圖十一、利用競爭性 RT-PCR 計算 C 型肝炎病毒 RNA 的結果。



圖十二、競爭性 RT-PCR 的敏感性。

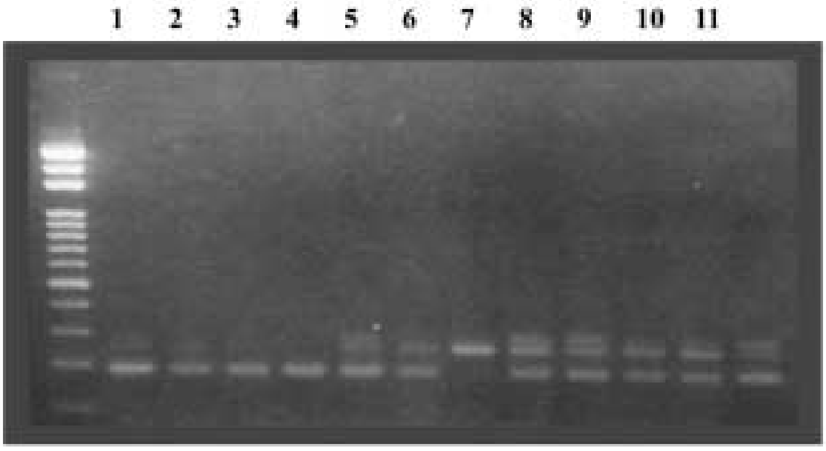
將 1.6 x 10^3（lane 1）、8.2 x 10^3（lane 2）、4.1 x 10^4（lane 3）及 2 x 10^5（lane 4）個分子的競爭者與 5.12 x 10^4（A）及 5.12 x 10^3（B）個分子的 C 型肝炎病毒 RNA 混合後，進行競爭性 RT-PCR，所得之產物以 2.5%電泳膠體分析。Wt（野生株）及 competitor（競爭者）的位置標示於圖右或圖左。



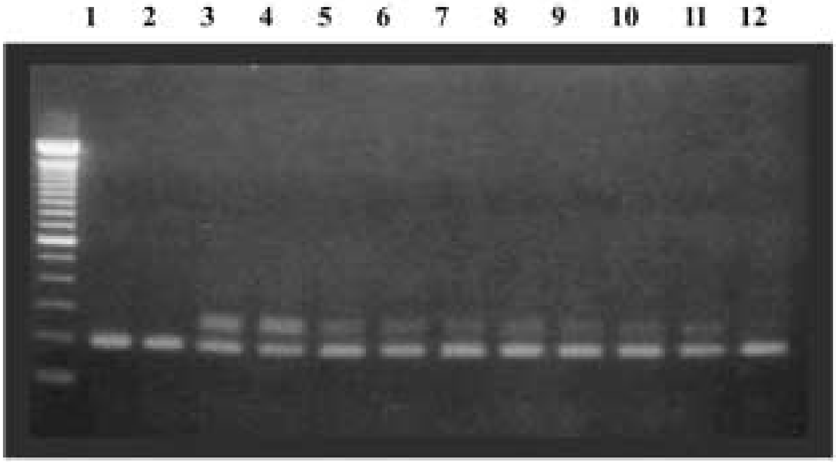
圖十三、競爭性巢式 RT-PCR 的敏感性。

將血清中之病毒RNA與 7.5 x 10（lane 2）、1.6 x 10^2（lane 3）、3.1 x 10^2（lane 4）、6.3 x 10^2（lane 5）、1.3 x 10^3（lane 6）、2.5 x 10^3（lane 7）及 5 x 10^3（lane 8）個競爭性RNA分子的混合後，進行競爭性巢式 RT-PCR，所得之產物以 2.5%電泳膠體分析。Wt（野生株）及 competitor（競爭者）的位置標示於右邊。

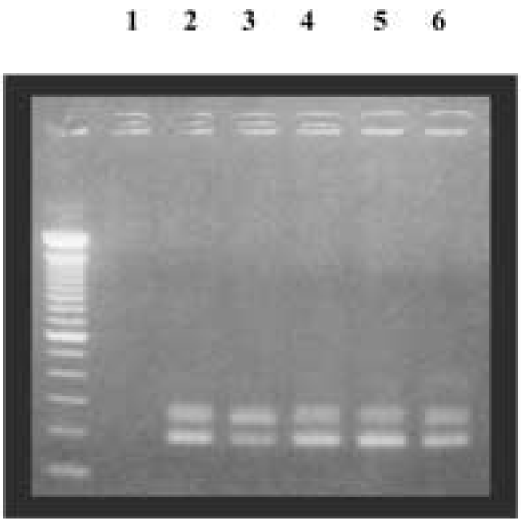
A



B



C



圖十四、C 型肝炎病毒體外感染之最佳條件。

（A）繼代數目、感染時間及感染量

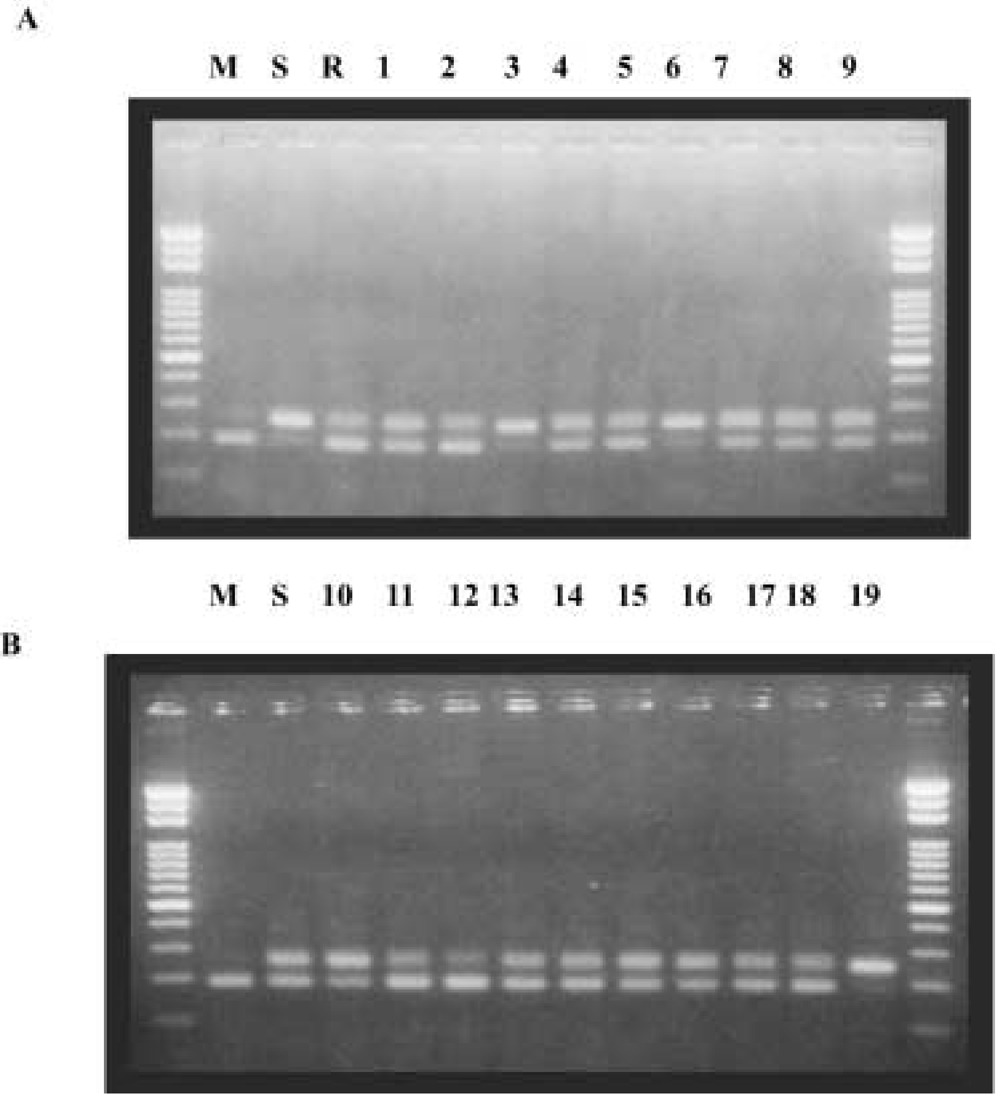
將病毒感染細胞後第一天（lane 1）、病毒感染後細胞繼代第一次（lane 2、3）、病毒室溫感染 30 分鐘再於 37℃感染 45 分鐘（lane 5）、90 分鐘（lane 6）、感染病毒量為 1 ml（lane 7）、2 ml（lane 8）、3 ml（alne 9）、4 ml（lane 10）、5 ml（lane 11）及 6 ml（lane 12）等各組細胞抽取總 RNA 後，與 200 個競爭性 RNA 分子混合。

（B）病毒稀釋倍數

將含有 2 x 10^6 個 C 型肝炎病毒 RNA 的血清經過 5 倍（lane 1、2）、10 倍（lane 3、4）、20 倍（lane 5、6）、40 倍（lane 7、8）及 80 倍（lane 9、10）稀釋，感染細胞後，抽取總 RNA，與 200 個競爭性 RNA 分子混合，進行競爭性巢式 RT-PCR。

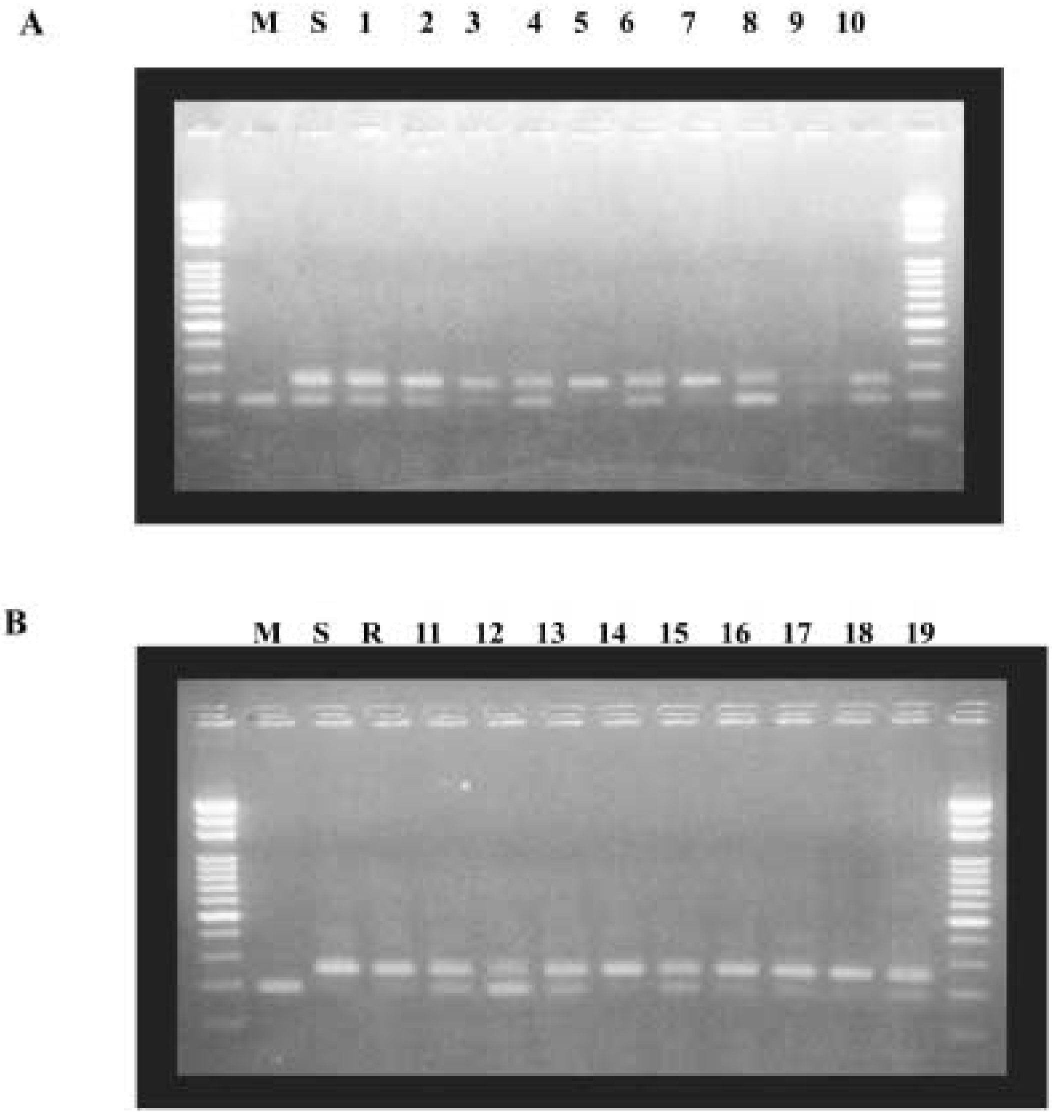
（C）均質性試驗

將五組細胞以相同方式同步攻毒後，抽取總 RNA 與 400 個分子的競爭性 RNA 混合，進行競爭性巢式 RT-PCR，所得之產物以 2.5%電泳膠體分析。



圖十五、抗 C 型肝炎病毒中藥的篩選。

將病毒感染細胞後一天，加入溶劑對照組（lane S）、ribavirine（lane R）、逍遙散（lane 1）、逍遙散加味（lane 2）、四逆散（lane 3）、加味四逆散（lane 4）、薄荷（lane 5）、炙甘草（lane 6）、炒白朮（lane 7）、茯苓（lane 8）、丹參（lane 9）、虎杖（lane 9）、枳實（lane 11）、紫草（lane 12）、柴胡（lane 13）、當歸（lane 14）、炒白朮（lane 15）、煨生薑（lane 16）、白茅根（lane 17）、敗醬草（lane 18）、白皮耆（lane 19）作用一天後，抽取總RNA，與200 個競爭性RNA分子混合，進行競爭性巢式RT-PCR，所得之產物以 2.5%電泳膠體分析。



圖十六、中藥對 C 型肝炎病毒吸附及穿透的影響。

在病毒感染細胞同時，加入溶劑（lane S）、逍遙散（lane 1）、逍遙散加味（lane 2）、四逆散（lane 3）、加味四逆散（lane 4）、薄荷（lane 5）、炙甘草（lane 6）、炒白朮（lane 7）、茯苓（lane 8）、丹參（lane 9）、虎杖（lane 10）、枳實（lane 11）、紫草（lane 12）、柴胡（lane 13）、當歸（lane 14）、炒白朮（lane 15）、煨生薑（lane 16）、白茅根（lane 17）、敗醬草（lane 18）、白皮耆（lane 19），在感染後一天抽取總RNA，與 200 個分子的競爭性 RNA 混合，進行競爭性巢式 RT-PCR，所得之產物以 2.5%電泳膠體分析。

討　論

治療慢性 B 型肝炎，降低 ALT 達到正常標準，血中 HBV-DNA，HBeAg 轉陰，Anti-HBe 轉陽及減少肝組織損傷是治療的目標。逍遙散加味治療慢性B型肝炎患者 24 星期後，33 %患者ALT達至正常標準，ALT 降低實驗組顯著大於對照組，但血中HBV-DNA並無患者轉陰，在HBeAg 陰轉方面，則有 24 %患者出現 Anti-HBe，相較於 Lamivudine 治療 52 星期後，ALT 41 %患者達到正常，HBeAg 陰性達 32 %，Anti-HBe 轉陽 17 %，而病毒反應，HBV-DNA 轉陰達 44 %，中醫治療在處方配伍，治療慢性 B 型肝炎上仍有開發之空間。

本研究所使用的 2.2.15 細胞株[39. 40]，在經過幾十代世步培養並不會有 DNA 失落的現象。因此提高了實驗的可信度。本次篩選中藥物浸膏對 B 型肝炎病毒 DNA 約有 30% 抑制的有 5X 稀釋倍數的炒白朮、敗醬草和 5X 逍遙散加味具有對病毒 DNA 28.9% 抑制。進一步我們可將這些藥物濃度升高仍有更高倍濃度作用下對細胞毒性仍未達 50%，而有更好的病毒抑制作用。

治療慢性 C 型肝炎，以降低 ALT 達正常標準，血中 HCV-RNA 轉陰及減少肝組織損傷為治療的目標，加味四逆散治療慢性 C 型肝炎患者 24 星期後，7 %患者 ALT 降至正常標準，雖然實驗組 ALT 由治療前之 132.1IU/L 降至 109.40IU/L，但在統計上加味四逆散並不明顯優於安慰劑。在病毒方面，實驗組有 10 %患者血中HCV-RNA轉陰，對照組則為 5 %。加味四逆散對慢性 C 型肝炎之療效並不如預期，治療 C 型肝炎之中醫方劑與藥物值得再努力。

目前對於C型肝炎的治療為α-2 干擾素單獨給藥或是合併 Ribavirin。作為C型肝炎治療用的干擾素包括α-2b 干擾素（Intron-A）、α-2a 干擾素（Roferon-A）、α-1n 干擾素（Welferon）等，這幾種干擾素之臨床效果非常相似。干擾素療法，除了價格昂貴外，在長期使用下會產生許多副作

用。此外，大約有 40 %慢性 C 型肝炎患者在干擾素治療下，會有初步的效果，但隨即回復為原來之狀態。至於 Ribavirin 單獨給藥對降低或去除 C 型肝炎病毒 RNA 量的效果與安慰組相同，因為 Ribavirin 會降低 ALT 的活性，改善肝臟的組織病變現象，但並無抗病毒的效果，因此 Ribavirin 可能具有調節免疫的功能。Ribavirin 主要的副作用為在長期治療下會產生溶血性貧血，因此持續追蹤紅血球的狀態是必須的。雖然目前歐盟組織、美國及加拿大建議干擾素及 Ribavirin 合併治療慢性 C 型肝炎，但合併治療法對將近 60%的病人沒有療效，因此尋求更有效副作用較小的藥物是相當需要的。

抗病毒藥物的篩選通常需要借助細胞培養系統，但適合 C 型肝炎病毒複製的細胞仍未被建立。利用肝臟來源或淋巴球來源的人類細胞培養 C 型肝炎病毒複製的力價並不高或是差異很大，若是利用初代肝臟細胞培養 C 型肝炎病毒，則病毒在感染後於上清中可持續存在數週，而且病毒的複製也可被偵測到。但因初代肝臟細胞的取得不易，肝臟細胞的分離也相當耗時費力，因此並不適合藥物大量篩選用。而在我們的研究中，選取猿猴腎臟細胞（Vero）為細胞來源，搭配離心促進法的感染方式，確實可以得到均質感染 C 型肝炎病毒的細胞。並可將其應用於藥物的篩選上。抗病毒藥物除了傳統抑制病毒複製的篩選方式外，科學家也開發許多不同的標的。例如干擾病毒分子結合到細胞接受器的藥物，可以抑制病毒進入到細胞內，目前已發現 polysulfate PAVAS 可阻斷 C 型肝炎病毒感染初代肝臟細胞；抑制病毒蛋白分解酶的藥物，會影響病毒蛋白質的分割，造成子代病毒無法組裝；抑制病毒解旋酶及 RNA 聚合酶的藥物，可影響病毒基因體的複製等。另外，科學家也嘗試開發 ribozyme 及 antisense oligonucleotide 療法，以分解或干擾 C 型肝炎病毒的複製。在本研究中，我們發現篩選的 19 種中藥中，紫草的甲醇萃取物中，有會抑制病毒吸附及穿透的分子。紫草在臨床用藥上，用於斑疹、痲疹。紫草性寒、能涼血，活血。尤善清血分熱毒，故為斑疹、痲疹、熱毒盛的人常用之藥。如至溫病發斑，

其色紫黑者，常與丹皮、赤芍、大青葉等同用，以涼血活血、解毒消斑。至麻疹透發不暢者，常配赤芍、蟬衣等，以涼血活血而透疹。若麻疹咽喉疼痛者，常與牛旁子、連翹、山豆根等同用，以解毒利喉。若麻疹患者，氣血素虛、透發較遲，色澤欠紅者，常與人參、當歸同用，以益氣養血、解毒透疹。本品能利大腸，故麻疹便秘者，能用之解毒通便、發疹益輕。若出疹不快，大便瀉利者，須與木香、茯苓、白朮等同用，既可解毒透疹，又可健脾止瀉，如『直指方』紫草木香湯。中國大陸期刊研究已發表紫草的藥理作用：1、抗炎作用；2、解熱、鎮痛、鎮靜作用；3、抗病原微生物作用；4、抗腫瘤作用；5、抗生育作用；6、對心血管系統作用；7、對平滑肌作用。紫草成分：根含 shikonin、acetylshikonin、β-hydroxyisovalalerylshikonin、deoxyshikonin、isovalerylshikonin、α-methyl -n-butyrlshikonin、isobutyrlshikonin、β, β-dimethylacetylshikonin、2,3-dimethylacetylshikonin、lithospermidinA、lithospermidinB、caffeic acid、stearyl alcohol、1-eicosanol、1-docosanol、1-tetraacosanol。因此紫草的抗 C 型肝炎病毒效果及其中的有效分子可由此方向思考並追尋其中主藥效成分。

結論與建議

消遙散加味治療慢性 B 型肝炎在處方配伍方面可再研發，應可提高其療效，加味四逆散其組成成分在實驗室之研究對實驗性肝炎具有療效，但本臨床研究之結果對治療慢性 C 型肝炎並不如預期理想。

2.2.15 是一個很穩定的能釋放B型肝炎病毒的肝炎細胞株。而且也一直被用在測試和篩選抑制 B 型肝炎病毒藥物實驗裡，因此利用此套篩選系統配合臨床或動物試驗使我們傳統的中醫藥科學化或國際化是一個必要的途徑。本計畫所的結果中可知逍遙散和其等組成單位藥浸膏製劑在 5 倍稀釋濃度對細胞沒有細胞毒性，但對 B 型肝炎病毒無明顯的抑制作用，逍遙散和逍遙散加味臨床上常使用於肝炎和 B 型肝炎卻有相當的療效，

而此試驗未能達到預期作用是否因有效成分未能抽取出來。因此在藥物劑型改變或以不同溶媒抽取是未來要繼續此實驗應該考慮的方向。

傳統中藥在典籍中對治療肝病已有相當之記載，但其科學化研究並不多見，本研究提供一非常好之抗 C 型肝炎藥物之搜尋平台，未來可藉由此一技術平台，有系統地對中藥進行搜尋，希望能結合能傳統醫學及現代分子醫學，以中藥為基礎開發一具世界上重要且產值高之藥品。

參考文獻

1. De Clercq, E. Perspectives for the treatment of hepatitis B virus infections. J. Antimicrob. Agents 12: 81-95, 1999.
2. Ganem, D., and Varmus, H. E. The molecular biology of the hepatitis B viruses. Ann. Rev. Biochem. 56: 651-93, 1987.
3. Chang MH. Chronic hepatitis virus infection in children. Journal of Gastroenterology & Hepatology. 13:541-8, 1998.
4. Beasley, R. P., Hwang, L. Y., Lin, C. C., and Chin, C. S. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. Lancet 2: 1129-1132, 1981.
5. Gitlin, N. Hepatitis B: diagnosis, prevention, and treatment. Clin. Chem. 43 (8): 1500-1506, 1997.
6. Liaw YF, Chu CM, Huang MJ, et al: Determinants for hepatitis B e antigen clearance in chronic type B hepatitis. Liver 1984.4:301-8.
7. Liaw YF, Chu CM, Su IJ, Huang MJ, Lin DY, Chang Chien CS. Clinical and histological events preceding hepatitis B e antigen seroconvenion in chronic type B hepatitis. Gastroenterology 1983; 84: 216-9.
8. Hanson RG, Peter MG, Hoofnagle JH: Effects of immunosuppressive therapy with prednisone on B and T lymphocyte function in patients with chronic type B hepatitis. Hepa- tology 1986; 6: 173-9.

9. Sagnelli E, Maio G, Felaco FM, et al: Serum levels of hepatitis B surface and core antigens during immunosuppressive treatment of HBsAg-positive chronic active hepatitis. Lancet 1980; 2: 395-7.
10. Hoofnagle JH, Davis GL, Pappas C, et al: A short course of prednisolone in chronic type B hepatitis. Report of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Ann Intern Med 1986; 104: 12-7.
11. Scullard GH, Smigh CL, Merigan TC, et al: Effects of immunosuppressive therapy in viral markers in chronic active hepatitis B. Gastroenterology 1981; 81: 987-91.
12. Lai CL, Chien RN, Leung NWY, Chang TT, Guan R, Tai DI, Ng KY, Wu PC, Dent J, Barber J, Stephenson SL, Gray DF. A one-year trial of lamivudine for chromic hepatitis B. N. Engl J Med 339: 61-68. 1998.
13. Lai CL, Ching CK, Tung AKM, Lie, Young J, HillA, Wong BCY, Dent J, Wu Pc. Lamivudine is effective in suppressing hepatitis B virus DNA in Chinese hepatitis B surface antigen carriers a placebo controled trial. Hepatology 25: 241-244, 1997.
14. Dienstag JL, Perrillo RP, Schiff ER, Bartholomew M, Vicary C, Rubin M,. Apreliminary trail of lancivudine for chronic hepatitis B infection. N Engl J Med 333: 1657-1661. 1995.
15. Nevens F, Main J, Honkoop P, Tyrrell DL, Barber J, Sullivan MT, Fevery J, De Man RA, Thomas HC. Lamivudine therapy for chronic hepatitis B: a six-month randomised dose-ranging study. Gastroenterology 113: 1258-1263. 1997.
16. Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Waiters K-A, Tyrrell DLJ, Brown N for The Lamivudine Clinical Investigation Group, Condreay LD. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Hepatology 27: 1670-1677. 1998.

17. Bartholomew MM,Jansen RW,Jeffers LJ, Reddy KR, Johnson LC, Bunzendahl H, Condreay LD, Tzakis AG, Schiff ER, Brown NA. Hepatitis-B-virus resistance to lamivudine given for recurrent infection after orthotopic liver transplantation. Lancet 349: 20-22. 1997.
18. Ling R, Mutimer D, Ahmed M, Boxall EH, Elias E, Dusheiko GM, Harrison TJ. Selection of mutations in the hepatitis B virus polymerase during therapy of transplant recipients with lamivudine. Hepatollgu 24: 711-713. 1996.
19. Niesters HGM, Honkoop P, Haagsma EB, de Man RA, Schalm SW, Osterhaus ADME. 1998. Identification of more than one mutations in the hepatitis B virus polymerase gene arising during prolonged lamivudine treatment. J Infect Dis 177: 1382-1385.
20. 王伯祥。中醫肝膽病學。中心醫藥科技出版社。1993。
21. 馬光亞。中醫如何診治肝病。九思出版社。1998。
22. 尹常健。慢性肝炎辨證分型研究近況及設想[綜述]。山東中醫學院學報。1988 30.江克明。逍遙散的應用中成藥研究。1984(6): 29-30。
23. 范桂枝，慢性肝炎病理診斷和臨床診斷與中醫分型的關係，中西醫結合雜誌 1992(1): 35。
24. 姜春華。慢性肝炎治療與研究。中西醫結合雜誌。1984(2): 37-76。
25. 鄭忠興。中醫治療慢性肝炎有關問題的探討。新中醫。1985(3): 10。
26. 趙蕾。中西醫結合治療慢性乙型肝炎病毒。攜帶看中醫雜誌。1988(10): 40-41。
27. 陳世發。中西醫結合治療乙型肝炎血清標記物陽轉的臨床觀察。廣東醫學 1989(4): 37。
28. 宋・和劑局方。新文豐出版社。1981。
29. 韓德五。逍遙散對實驗性肝損傷的治療作用。中華內科雜誌。1983(6): 30。
30. 趙慶君。病毒性肝炎的中藥運用。遼寧中醫雜誌。1988(2): 10-1256。

31. 倪印山。中醫治療乙型肝炎進展。湖南中醫雜誌。1991(1): -53-55。
32. 肖田。初代培養大鼠肝細胞中和漢藥作用機理的研究：柴胡皂甘對體外實驗中四氯化碳肝損害的影響[譯]《國外醫學》中醫中藥分冊 1983(6): 50-51.
33. 周孜。丹參的藥理作用及臨床運用中西醫結合雜志 1990(4): 242-243.
34. 王靈台。中醫中藥對乙型肝炎表面抗原（HBsAg）轉陰作用的研究[綜述]。上海中醫藥雜誌。1984(9): 2-6。
35. 金實。中醫藥消除乙型肝炎病毒感染復制指標的研究近況。南京中醫學院學報。1987(1): 49-51。
36. 鄭民實。100 種中草藥對乙型肝炎病毒表面抗原抑制作用的觀察。中草藥。1987(10): 27-29。
37. 鄭民實。中草藥抗 HBsAg 的實驗研究。微生物學雜誌。1987(4): 1。
38. Sells, M. A., Chen, M. L., and Acs, G. Production of hepatitis B virus particles in HepG2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 1005-1009, 1987.
39. Sells, M. A., Zelent, A. Z., Shvartsman, M., and Acs, G. Replication intermediates of hepatitis B virus in HepG2 cells that produce infectious virions. J. Virology 62(8): 2836-2844, 1988.
40. Price, P. M., Banerjee, R., and Acs, G. Inhibition of the replication of hepatitis B virus by the carbocyclic analogue of 2'-deoxyguanosine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8541-8544, 1989.
41. Matthes, E., Langen, P., Janta-Lipinski, M. V., Will, H., Schroder, H. C., Merz, H., Weiler, B. E., and Muller, W. E. G. Potent inhibition of hepatitis B virus production in vitro by modified pyrimidine nucleosides. Antimicriob. Agents Chemother. 34(10): 1986-1990, 1990.
42. Doong, S. L., Tsai, C. H., Schinazi, R. F., Liotta, D. C., and Cheng, Y. C. Inhibition of the replication of hepatitis B virus in vitro by 2',3'-dideoxy-3'-

thiacytidine and related analogues. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8495-8499, 1991.

43. De Beauregard, M.-A.C., Pringault, E., Robine, S., and Louvard, D. 1995. Suppression of villin expression by antisense RNA impairs brush border assembly in polarized epithelial intestinal cells. EMBO J. 14: 409-421

44. Kaoutzani, P., Colgan, S.P., Cepek, K.L., Burkard, P.G., Carlson, S., Delp-Archer, C., Brenner, M.B., and Madara, J.L. 1994. Reconstitution of cultured intestinal epithelial monolayers with a mucosal-derived T lymphocyte cell line. J. Clin. Invest. 94: 788-796.

45. Kerneis, S., Bogdanova, A., Kraehenbuhl, J.-P., and Pringault, E. 1997. Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. Science 277: 949-952.

46. Sherlock S. Clinical features of hepatitis. In: Zuckerman AJ, Thomas HC, eds. Viral Hepatitis, 2nd ed. London: Churchill Livingston; 1998: 1-13.

47. Lindsay KL. Therapy of hepatitis C: an overview. NIH Consensus Development Conference: Management of Hepatitis C. April 1998. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland.

48. McHutchinson JG, Gordon SC, Schiff ER, et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. N Eng J Med 1998;339:1485-1492.

49. Sherman A. HCV on the threshold. Infect Med 1999; 16: 92-94.

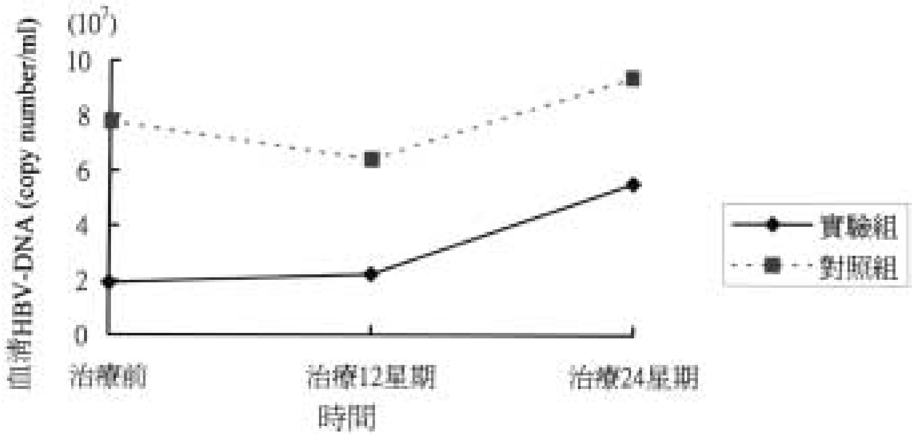
50. Tsai, C.-C., Kao, S.-T., Hsu, C.-T., Lin, C.-C., Lia, J.-S., and Lin, J.-G. 1997. Evaluation of four prescriptions of tradional Chinese medicine:Syh-Mo-Yiin, Guizhi-Fuling-Wan and Syh-Nih-Sann on experimental acute liver damage in rats. J. Ethnopharmaco. 55: 213-222.

51. Tsai, C.-C., Kao, S.-T., Hsu, C.-T., Lin, C.-C., Lia, J.-S., and Lin, J.-G. 1997. Ameliorative effect of tradional Chinese medicine prescriptions on α-Nap-

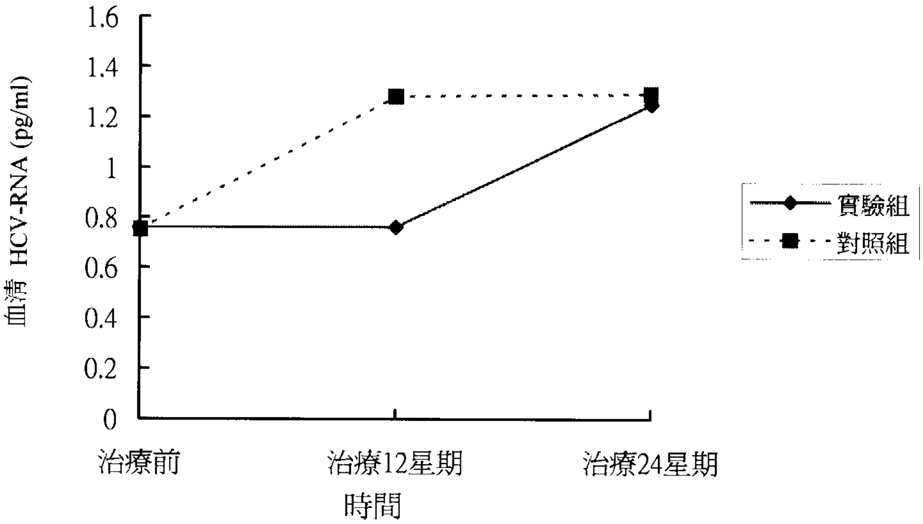
hthylisothiocynate and carbon tetrachloride induced toxicity in rats. Am. J. Chin. Med. XXV: 185-196.

52. Carithers RL. Therapy of hepatitis C: Interferon Alfa-2B. NIH Consensus Development Conference: Management of Hepatitis C. April 1998. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland.

53. Dienstag JL, Schiff ER, Wright TL etal. Lamiruine as initial treatment for chronic hepatitis B in the uwteel states. N Engl J med 1999; 341: 1256-63.



圖十七、逍遙散加味治療慢性 B 型肝炎患者血清 HBV-DNA 之變化



圖十八、加味四逆散治療慢性 C 型肝炎患者血清中 HCV-RNA 之變化