

抗人類單純皰疹病毒中草藥體外篩選研究

In vitro screening of Chinese herbal medicine with anti-HSV activity

國立台灣大學

李 君 男

摘 要

單純皰疹病毒是一種普遍存在的病毒，大部分的人都感染過此類病毒，可引起嚴重的腦炎或全身性的症狀，甚者導致死亡。感染後病毒會潛伏於體內，伺機復發。近年來，單純皰疹病毒感染的發生率與嚴重性皆有增加的趨勢，此與免疫功能有缺失的病人數目不斷上升有關。現治療單純皰疹病毒感染之藥物 acyclovir，使用量不斷增加，因而產生具有抗藥性之病毒，故極需發展新的藥物以治療單純皰疹病毒之感染。

本計畫篩選具有抗人類單純皰疹病毒作用之中草藥，以做為後續發展藥物之基礎。首先大量培養並以溶斑試驗定量單純皰疹病毒，同時定出中草藥萃取物之安全劑量，再以不同濃度的中草藥與一定量的病毒作用，進行溶斑減少試驗，由之測定中草藥抑制人類單純皰疹病毒之作用。由結果顯示，魚腥草與綬草不論是新鮮或乾燥的藥材、直接抽取或經煎煮冷凍乾燥，均有明顯的抑制第一型單純皰疹病毒感染力的效果。此二中草藥所含之有效成分應是對熱的處理相當的穩定。魚腥草的抑制效果較綬草為佳，且在高濃度時對細胞亦無毒性。

本研究初步完成兩種中草藥的抗第一型單純皰疹病毒的活性篩檢，兩者都具有未來開發新藥的潛力，中草藥中仍有許多有待篩檢者，應持續此項工作。並應持續魚腥草與綬草針對第二型單純皰疹病毒與對 Acyclovir 具抗藥性之病毒進行測試，確定兩種中草藥之抗病毒作用。魚腥草與綬草可有效的抑制第一型單純皰疹病毒之生長，其作用之機制為何是有待探討的問題。

關鍵詞：單純皰疹病毒，中草藥，抗病毒藥物篩檢

National Taiwan University

Chun-Nan Lee

ABSTRACT

Herpes simplex virus (HSV) is a common pathogen. The majority of the human have been infected by HSV. The HSV infections may cause severe systematic illness and even to death. The viruses persist in the host indefinitely and may reactivate intermittently. In recent years, the incidence and severity of HSV infections have increased due to the growth in numbers of immunocompromised patients. Drug resistant HSV emerged after the increasing usage of acyclovir. It is necessary to develop new medicine for treatment of HSV infection. Some Chinese herbal medicines were described as having anti-HSV activity. They are potentially the candidates of new anti-viral agents for HSV.

In this study, the anti-HSV activity of *Spiranthes sinensis* and *Houttuynia cordata* was tested. First, HSV-1 was grown in large amount and quantified by plaque assay. The cytotoxicity of the Chinese herbal medicine treated on the cells was examined. Plaque reduction assay was performed by mixing various dilutions of the Chinese herbal medicine with fixed amount of HSV-1. The crude aqueous extract of the fresh or

dried plants, or the freeze-dried boiled extract of the dried plants, from both *Spiranthes sinensis* and *Houttuynia cordata*, showed anti-HSV activity. The ingredients with antiviral activity were stable after boiling treatment. The anti-HSV activity of *Houttuynia cordata* was higher than that of *Spiranthes sinensis* when compared at the same concentration. The cytotoxicity of *Houttuynia cordata* was very low even at high concentration.

This study showed both *Spiranthes sinensis* and *Houttuynia cordata* with the potential to develop new anti-HSV drug. Further studies concerning their effects on HSV-2 and acyclovir-resistant viral strains will be required. To study the mechanism of anti-HSV activity is also necessary for future drug development.

Keywords: Herpes simplex virus, Chinese herbal medicine, antiviral drug screening

壹、前言

單純皰疹病毒 (Herpes simplex virus, HSV) 是一種普遍存在的病毒，大部分的人都感染過此類病毒，引起的疾病症狀變異大，輕微者出現皮膚與粘膜的皰疹，也有的完全無症狀，嚴重者出現腦炎或全身性的症狀，甚至死亡。感染過單純皰疹病毒後，病毒會潛伏於體內，伺機復發，往往在初感染處或其附近再度產生病變(13)。

單純皰疹病毒屬於皰疹病毒科 (herpesviridae) 中的 α 皰疹病毒亞科 (alphaherpesvirinae)，由於其表面蛋白質抗原性有所不同而可區分為兩種血清型，即第一型單純皰疹病毒 (HSV-1) 與第二型單純皰疹病毒 (HSV-2) (10,11)。第一型單純皰疹病毒的感染好發於口咽部與眼睛，第二型單純皰疹病毒則好發於生殖器與肛門周圍的皮膚，初次感染後，常潛伏於三叉神經節或薦骨神經節 (2,3)。

近年來，單純皰疹病毒感染的發生率與嚴重性皆有增加的趨勢，此與免疫功能有缺失的病人數目不斷上升有關。如癌症病人接受化學治療、器

官移植後服用免疫抑制劑、愛滋病毒感染等皆會造成免疫功能的缺失，體內潛伏的單純皰疹病毒極可能復發，但此時無論是復發或是初次感染，症狀皆會很嚴重。如此一來，治療單純皰疹病毒感染之藥物（1,4,5,8），如 acyclovir，使用量即不斷增加，繼之又會產生具有抗藥性之病毒，因而極需發展新的藥物以治療單純皰疹病毒之感染。民間使用之中草藥中，據傳有些對於單純皰疹病毒之感染，具有療效，這些中草药有潛力開發成為新的治療單純皰疹病毒感染之藥物。

目前有關以中草药發展抗單純皰疹病毒感染藥物之研究不多，1990年中國大陸曾有一篇研究報告(15)，測試了 472 種中草药，發現其中有 10 種可有效抑制單純皰疹病毒的生長。針對其中的兩種中草药，即夏枯草與鹽膚木，在加拿大與日本的專家進而分別分離出抗單純皰疹病毒之有效成分（6,7,14）。綬草（盤龍參）與魚腥草兩種藥材並不在前述之報告中，至於是否在受測試之 472 種中草药之中則不得而知。

本計畫擬建立篩選系統，以篩選出具有抗人類單純皰疹病毒作用之中草藥，以做為後續發展中草药之基礎。首先測試的中草藥為綬草與魚腥草。

貳、材料與方法

萃取中草药

1. 將買進的中草藥清洗後，加入適量的蒸餾水，以攪拌切割機打碎，分別以下列比例配製：

魚腥草（生）	400 g	+1.5 L	ddH ₂ O
魚腥草（乾）	100 g	+1 L	ddH ₂ O（約 90°C 熱水）
綬草（乾）	100 g	+1 L	ddH ₂ O（約 90°C 熱水）
2. 離心 3000 rpm、10 分鐘，收取上清液
3. 另將乾的魚腥草與綬草分別加入 1.2 L ddH₂O，煮沸後以小火熬煮

至體積 400 ml

4. 各種藥液再分別以棉花、100 mesh 金屬網、0.2 μm 過濾膜依序過濾
5. 分裝至 15 ml 離心管，置於 -70°C 保存備用
6. 經煎煮之藥液以冷凍乾燥處理後，再秤重配製成 100 mg/ml 之濃度。

細胞培養

可於體外連續培養之細胞株 Vero 細胞（猴腎細胞）與 A549 細胞（人肺細胞），由冷凍保存於液態氮中取出後快速解凍，經離心去除冰凍保存液，加入含有胎牛血清之細胞生長培養基，移至細胞培養瓶中，置於內含 5% CO_2 之 37°C 培養箱進行培養。細胞每三至四天進行一次繼代培養，當細胞生長形成完整的單層細胞時，將培養基移除，經以 PBS（磷酸鹽緩衝液）清洗兩次後，加入 trypsin（胰蛋白質酵素）作用 5 至 10 分鐘，見細胞脫落即可加入生長培養基，細胞經充分混合均勻後，即以 1:4 之比例分裝於新的培養瓶中。或經計數細胞數目後，稀釋成適當的濃度，以供培養病毒或後續之測試之用。

病毒培養

將人類單純皰疹病毒 HSV-1 接種於細胞，置於 37°C 使病毒吸附於細胞，一小時後，換上新鮮的維持培養基，置於內含 5% CO_2 之 37°C 培養箱進行培養。培養直至細胞病變大於 75% 即可收取病毒，病毒液在 4 (C 5000 rpm (Hitachi SCR20B) 離心 30 分鐘以移除細胞沈澱物。已去除細胞的病毒培養上清液，以少量分裝於小安瓶內，保存於 -80°C 。

以 MTT 試驗測試中草藥之細胞毒性 (Cytotoxicity assay)

1. 以 1×PBS 潤洗細胞，0.05% Trypsin 作用約 5 分鐘，加入細胞生長培養基 E-10（含有 10% FBS 之細胞培養基 EMEM），打下 Vero 細胞
2. 將細胞濃度調整到 3×10^4 cells/ml，放入 96 well 細胞培養盤

- (100 μ l/well，切記：細胞要放勻)，37 $^{\circ}$ C 培養 24 小時
3. 中藥稀釋：最高濃度的中草藥與 2 \times 濃度的 E-4 (2 \times EMEM 含 4% FBS) 以 1:1 等體積稀釋，其他濃度以 E-2 (EMEM 含 2% FBS) 做 2 \times 序列稀釋
 4. 緩慢吸去細胞培養基，加入 100 μ l 中草藥稀釋液/well，細胞對照組則加 100 μ l E-2，37 $^{\circ}$ C 培養 3 天
 5. 加入 MTT (5 mg/ml PBSA) 25 μ l /well，置於 37 $^{\circ}$ C 2 小時
 6. 加入 lysis buffer 100 μ l/well，37 $^{\circ}$ C 2 小時後，移至室溫放置 24 小時
 7. 以 OD 570 分析

以 MTT 試驗測試中草藥抑制病毒之作用 -

1. 以 1 \times PBSA 潤洗細胞，0.05% Trypsin 打下 Vero 細胞
2. 將細胞濃度調整到 3 \times 10⁴ cells/ml，放入 96 well 細胞培養盤 (100 μ l/well，切記：細胞要放勻)，37 $^{\circ}$ C 培養 24 小時
3. 中藥稀釋：最高濃度的中草藥與 2 \times 濃度的 E-4 以 1:1 等體積稀釋，其他濃度以 E-2 做 2 \times 序列稀釋
4. 病毒稀釋：以 E-2 調整病毒濃度至 100 PFU/100 μ l
5. 中和反應：將中草藥、病毒以 1:1 等體積混勻，使最後病毒濃度達 50 PFU/100 μ l，置於 37 $^{\circ}$ C 1 小時
6. 緩慢吸去細胞培養基，加入 100 μ l mixture/well，細胞對照組則加 100 μ l E-2，病毒對照組直接加上病毒，37 $^{\circ}$ C 培養 3 天
7. 加入 MTT (5 mg/ml PBSA) 25 μ l /well，37 $^{\circ}$ C 2 小時
8. 加入 lysis buffer 100 μ l/well，37 $^{\circ}$ C 2 小時後，移至室溫放置 24 小時
9. 以 OD 570 分析

溶斑試驗

1. 以 1 \times PBSA 潤洗細胞，0.05% Trypsin 作用約 5 分鐘，加入細胞生長培養基 E-10，打下 Vero 細胞
2. 將細胞濃度調整到 2 \times 10⁵ cells/ml，放入 24-well 細胞培養盤 (1 ml/

- well，切記：輕拍四周，使細胞均勻分佈），37°C 培養 24 小時
3. 病毒稀釋：以 E-2 將第一型單純皰疹病毒做 10× 序列稀釋（切記：病毒充分混勻、稀釋時要更換 tip、在冰上操作）
 4. 緩慢吸去細胞培養基，加入 100µl 病毒稀釋液/well，細胞對照組則加 100µl E-2，置於 37°C 使病毒吸附 1 小時
 5. 準備含有 Methylcellulose (MC) 之 Overlay medium，2% MC 與 2× E-4 以 1：1 的比例混合，加入 2 ml/well，37°C 培養 3 天
 6. 加入 1 ml 10% Formalin/well，固定 1 小時
 7. 倒掉所有覆蓋液體，滴上 1 % crystal violet，染色 10 分鐘
 8. 以清水溫和地潤洗，計數溶斑 (Plaque-forming unit, PFU) $PFU/ml = (\text{溶斑平均數}) \times (1/\text{接種體積}) \times (1/\text{稀釋倍數})$

溶斑減少試驗

1. 以 1× PBSA 潤洗細胞，0.05% Trypsin 作用約 5 分鐘，加入細胞生長培養基 E-10，打下 Vero 細胞
2. 將細胞濃度調整到 2×10^5 cells/ml，放入 24 well 細胞培養盤（1 ml/well，切記：輕拍四周，使細胞均勻分佈），37°C 培養 24 小時
3. 中藥稀釋：以最高濃度的中草藥與 2× 濃度的 E-4 以 1：1 等體積稀釋，接著以 E-2 做 2× 序列稀釋
4. 病毒稀釋：以 E-2 調整病毒濃度至 100 PFU/100µl
5. 中和反應：將中草藥、病毒以 1：1 等體積混勻，使最後病毒濃度達 50 PFU/100µl，置於 37°C 1 小時
6. 緩慢吸去細胞培養基，加入 100µl mixture/well，細胞對照組則加 100µl E-2，病毒對照組直接加上病毒，37°C 使病毒吸附 1 小時
7. 加上 MC working solution 2 ml/well，37°C 培養 3 天
8. 加入 1 ml 10% Formalin/well，固定 1 小時
9. 倒掉所有覆蓋液體，滴上 1 % crystal violet，染色 10 分鐘
10. 以清水溫和地潤洗，計數溶斑

參、結 果

在市面上，魚腥草可購得新鮮與乾燥兩種藥材，而綬草僅可購得乾燥藥材，經清洗後，加入蒸餾水以攪拌切割機打碎，乾燥藥材則拌以熱水。新鮮的魚腥草在去除殘渣並過濾後，粗估在後續試驗中可得之最大濃度為 200 mg/ml，而乾燥的魚腥草與綬草為 50 mg/ml。另經煎煮並冷凍乾燥處理之魚腥草與綬草在後續試驗中之最大濃度為 50 mg/ml。

中草藥之細胞毒性試驗

測試經處理後魚腥草與綬草之溶液對細胞之毒性，將三種未經煎煮之藥液連續兩倍稀釋，加在預先培養好之細胞上，以 MTT 試驗來測試。圖一顯示測試之結果，與細胞對照組比較 (C)，由新鮮的魚腥草 (生) 與乾燥的魚腥草所得之藥液，即使在所使用之最高濃度亦不會有毒性之反應。由乾燥的綬草所得之藥液，在 50 mg/ml 與 25 mg/ml 之濃度有明顯的毒性反應，在 12.5 mg/ml 與 6.25 mg/ml 之濃度則有輕微的毒性反應，而在 3.125 mg/ml 及其以下之濃度無細胞毒性反應。

中草藥之抑制病毒試驗

首先將大量培養的第一型單純皰疹病毒連續 10 倍稀釋，以溶斑試驗測定病毒之濃度，再將含有 50 PFU 的病毒液與連續 2 倍稀釋之藥液混合作用，以溶斑減少試驗來偵測魚腥草與綬草之藥液對抑制第一型單純皰疹病毒之作用。圖二顯示測試之結果，由新鮮的魚腥草 (生) 所得之藥液，12.5 mg/ml 及其以上之濃度可完全抑制病毒之感染力，抑制病毒百分之八十感染力之藥液濃度 (IC₈₀) 為 3.125 mg/ml，抑制病毒百分之五十感染力之藥液濃度 (IC₅₀) 為 0.78 mg/ml。由乾燥的魚腥草所得之藥液，0.78 mg/ml 及其以上之濃度可完全抑制病毒之感染力，抑制病毒百分之八十感染力之藥液濃度 (IC₈₀) 為 0.19 mg/ml，抑制病毒百分之五十感染力之藥液濃度 (IC₅₀) 為 0.049

mg/ml。由乾燥的綬草所得之藥液，25 mg/ml 及 50 mg/ml 之濃度可完全抑制病毒之感染力，抑制病毒百分之八十感染力之藥液濃度 (IC₈₀) 為 1.57 mg/ml，抑制病毒百分之五十感染力之藥液濃度 (IC₅₀) 為 0.19 mg/ml。另經煎煮並冷凍乾燥處理所配製之藥液，魚腥草抑制病毒百分之八十感染力之藥液濃度 (IC₈₀) 已超出稀釋濃度之範圍 0.195 mg/ml。綬草抑制病毒百分之八十感染力之藥液濃度 (IC₈₀) 為 0.195 mg/ml，抑制病毒百分之五十感染力之藥液濃度 (IC₅₀) 已超出稀釋濃度之範圍。此部份魚腥草與綬草藥液抑制單純皰疹病毒之濃度結果總結於表一中。

因為溶斑減少試驗的方法較為繁複，於是我們探討是否可以利用 MTT 試驗來測試藥液對抑制第一型單純皰疹病毒之作用，但未見明確之結果 (圖三)。

肆、討 論

由本研究之結果，顯示魚腥草不論是新鮮或乾燥的藥材、直接抽取或經煎煮冷凍乾燥，均有明顯的抑制第一型單純皰疹病毒感染力的效果，且在高濃度時對細胞亦無毒性。而綬草亦可抑制第一型單純皰疹病毒感染力，有效抑制的劑量較魚腥草為高，但在高濃度時對細胞具有毒性，好在其有效的抑制濃度已低於其具毒性之濃度。

經煎煮冷凍乾燥處理之藥液，所需抑制單純皰疹病毒的濃度較直接抽取者為低，此與煎煮冷凍乾燥處理所配製之濃度較精準有關，其所含有效成分之濃度較高。兩種草藥經煎煮後仍具有抑制病毒之作用，可以推測此有效成分應是對熱的處理相當的穩定。

本研究受限於時間之不足，初步僅測試第一型單純皰疹病毒，未來應持續針對第二型單純皰疹病毒與對 Acyclovir 具抗藥性之病毒進行測試，確定兩種中草藥之抗病毒作用。

魚腥草與綬草可有效的抑制第一型單純皰疹病毒之生長，其作用之機制為何是有待探討的問題，接續的計畫亦應朝此方向進行。

伍、結論與建議

由本研究之結果，顯示魚腥草與綬草不論是新鮮或乾燥的藥材、直接抽取或經煎煮冷凍乾燥，均有明顯的抑制第一型單純皰疹病毒感染力的效果。魚腥草的抑制效果較綬草為佳，且在高濃度時對細胞亦無毒性。其所含有效成分應是對熱的處理相當的穩定。

本研究初步完成兩種中草藥的抗第一型單純皰疹病毒的活性篩檢，獲得可喜的結果，這些都有未來開發新藥的潛力，中草藥中仍有許多有待篩檢者，應持續此項工作。

應持續魚腥草與綬草針對第二型單純皰疹病毒與對 Acyclovir 具抗藥性之病毒進行測試，確定兩種中草藥之抗病毒作用。魚腥草與綬草可有效的抑制第一型單純皰疹病毒之生長，其作用之機制為何是有待探討的問題，接續的計畫亦應朝此方向進行。

陸、參考文獻

1. Balfour HH Jr. 1983. Resistance of herpes simplex virus to acyclovir. *Ann Intern Med* 98: 404-406.
2. Baringer JR. 1974. Recovery of herpes simplex virus from human sacral ganglions. *N Engl J Med* 291: 828.
3. Bastain Fo, Rabson AS, Yee CL. 1972. Herpes virus hominis: isolation from human trigeminal ganglion. *Science* 178: 306.
4. Burns WH, Sanat R, Santos GW. 1982. Isolation and characterization of resistant herpes simplex virus after acyclovir therapy. *Lancet* I: 421-424.

5. Englund JA, Zimmerman ME, Swierkosz, Balfour HH. 1990. Herpes simplex virus resistant to acyclovir. A study in a tertiary care center. *Ann Intern Med* 112: 416-422.
6. Kurokawa M, Ochiai H, Nagasaka K, Neki M, Xu HX, Kadota S, Sutardjo S, Matsumoto T, Namba T, Shiraki K. 1993. Antiviral traditional medicines against herpes simplex virus (HSV-1), poliovirus and measles virus in vitro and their therapeutic efficacies for HSV-1 infection in mice. *Antiviral Res.* 22: 175-188.
7. Kurokawa M, Basnet P, Ohsugi M, Hozumi T, Kadota S, Namba T, Kawana T, Shiraki K. 1999. Anti-herpes simplex virus activity of moronic acid purified from *Rhus javanica* in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 289(1): 72-8.
8. McLaren C, Chen MS, Ghazzouli I, Saral R, Burns WH. 1985. Drug resistance patterns of herpes simplex virus isolates from patients treated with acyclovir. *Antimicrob Agents Chemother* 28: 740-744.
9. Nagasaka K, Kurokawa M, Imakita M, Terasawa K, Shiraki K. 1995. Efficacy of kakkon-to, a traditional herb medicine, in herpes simplex virus type 1 infection in mice. *J Med Virol.* 46(1): 28-34.
10. Pauls FP, Dowdle WR. 1967. A serologic study of herpes hominis strain by micro-neutralization test. *J Immunol* 98: 941-947.
11. Plummer G. 1964. Serologic comparison of the herpes viruses. *Brit J Exp Pathol* 45: 135-141.
12. Tappa HD, Chan RS, Smith KM. 1989. Isolation, purification and partial characterization of prunellin, an anti-HIV compound from aqueous extracts of *Prunella vulgaris*. *Antiviral Res.* 11: 263-274.
13. Whitley RJ. 1996. Herpes simplex viruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE, edi-

tors. Fields Virology, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. p 2297-2342.

14. Xu HX, Lee SHS, Lee SF, White RL, Blay J. 1999. Isolation and characterization of an anti-HSV polysaccharide from *Prunella vulgaris*. *Antiviral Res.* 44(1): 43-54.
15. Zheng M. 1990. [Experimental study of 472 herbs with antiviral action against the herpes simplex virus]. *Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 10(1): 39-41, Chinese.

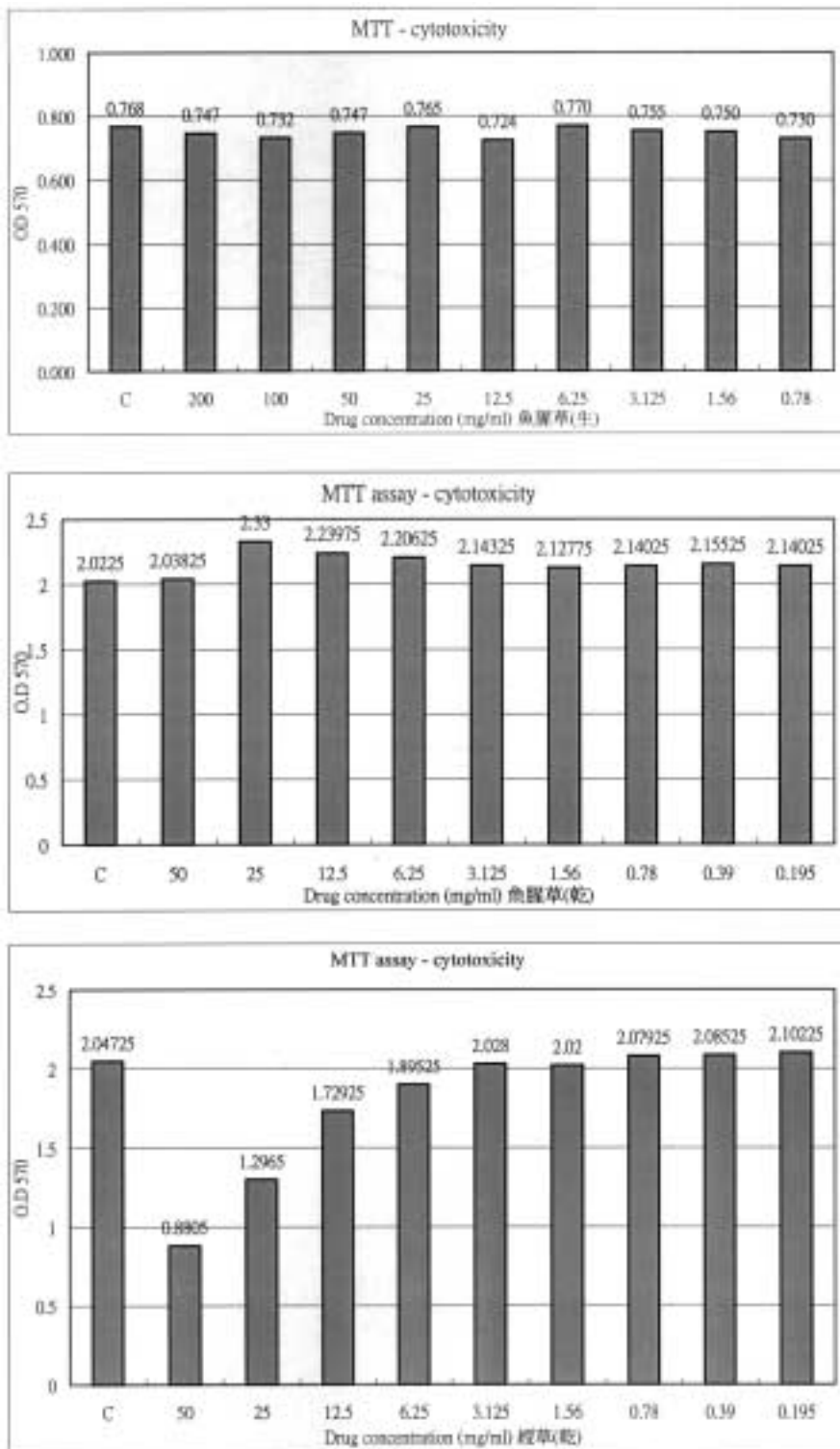
柒、圖、表

表一、魚腥草與綬草抑制單純皰疹病毒之劑量

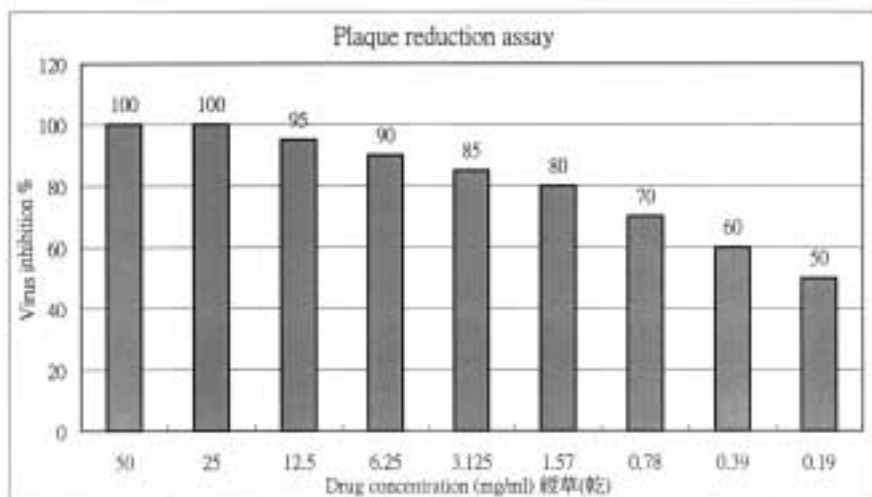
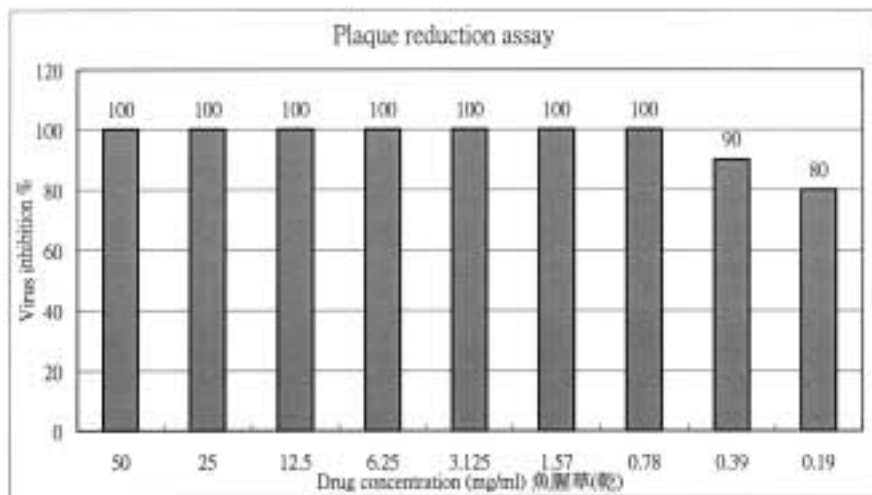
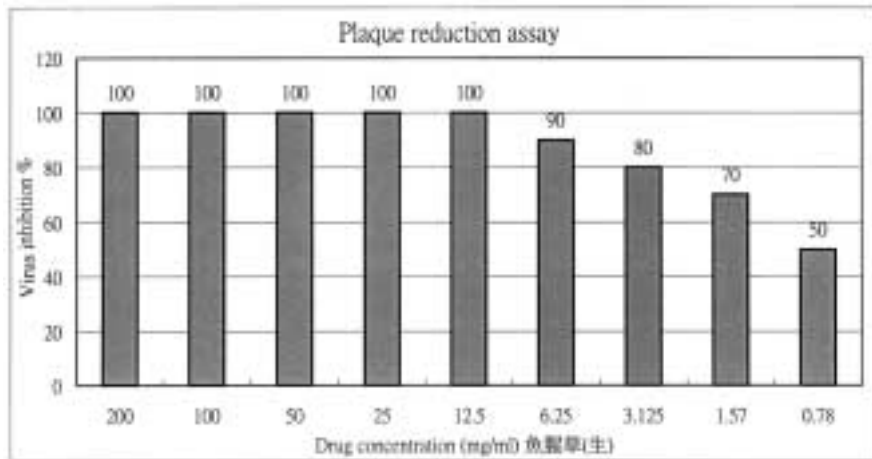
藥材	Virus Inhibition Concentration (mg/ml) *	
	IC ₈₀	IC ₅₀
魚腥草 (生)	3.125	0.78
魚腥草 (乾)	0.19	0.049
魚腥草 (煮乾)	<0.195	<0.195
綬草 (乾)	1.57	0.19
綬草 (煮乾)	0.195	<0.195

*IC₅₀: 抑制 50% 病毒感染力之濃度；IC₈₀: 抑制 80% 病毒感染力之濃度

圖一、以 MTT 試驗測試魚腥草與綬草對細胞之毒性



圖二、以溶斑減少試驗測試魚腥草與綬草抑制第一型單純皰疹病毒之作用



圖三、以 MTT 試驗測試魚腥草與綬草抑制第一型單純疱疹病毒之作用

