

編號：CCMP98-RD-029

蚤休抗腸病毒活性及其免疫調節機制 之研究

王苑春

國立中興大學食品暨應用生物科技學系

摘要

研究目的：

本研究探討蚤休抑制腸病毒(EV71 及 CVB3)活性及對宿主細胞之免疫調節機制。抗腸病毒活性之分析項目包括有 50%病毒抑制濃度、選擇指數及對病毒作用之時間點分析等。免疫調節作用包括蚤休對感染病毒宿主細胞之細胞激素(IFN- α 、IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α)及一氧化氮等含量之影響。

研究方法：

以 trypan blue 排除法測定蚤休 95% 乙醇萃取物對宿主細胞之 CC₅₀。分別以中和試驗法及病毒班減少分析法測定萃取物對 EV71 及 CVB3 之 IC₅₀ 及時間點分析。細胞激素含量測定依套組之操作指示；一氧化氮含量以 Griess reagent 法。

結果與討論：

蚤休 95% 乙醇萃取物對腸病毒 71 型及克沙奇 B3 型均顯示出良好之對抗活性。對 EV71 之 IC₅₀ 為正對照組之 12.5—23%，對 CVB3 則與正對照組相似。萃取物對 EV71 及 CVB3 之抑制作用包括預防病毒感染、直接殺死病毒(或抑制病毒吸附於宿主細胞)以及抑制病毒之複製作用。蚤休 95% 乙醇萃取物對感染 EV71 及 CVB3 之宿主細胞，均會顯著增加 IL-6 及降低 IL-8、IL-1 β (僅對感染 EV71 之宿主細胞) 含量，對其他細胞激素(IL-2、TNF- α 、INF- γ)及一氧化氮等則無影響。萃取物對 EV71 或 CVB3 之抑制作用與 IL-6 之增加有高度相關性；IL-1 β 及 IL-8 之減少可以減緩宿主細胞免疫反應造成之嚴重致病性。萃取物兼具致死病毒及減緩宿主免疫致病性之雙重功效。

關鍵詞：蚤休、腸病毒 71 型、克沙奇 B3 型、免疫調節

Number: CCMP98-RD-029

Anti-enterovirus Activity of *Paris polyphylla* Smith and its Immune Modulation

Yuan-Chuen Wang, Ph.D.

Department of Food Science and Biotechnology, National Chung Hsing University

ABSTRACT

Aim:

In this study, we investigated anti-EV71 and CVB3 activity of the *P. polyphylla* Smith 95% ethanol extract as well as its immune modulation. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀), selective index (SI), time-of-addition assay, and levels of cytokines and nitric oxide in the EV71- and CVB3-infected cells were determined.

Method:

A trypan blue exclusion method was used for the determination of CC₅₀ for the *Paris polyphylla* Smith 95% ethanol extract. The neutralization method and plaque reduction assay were used for both IC₅₀ and time-of-addition assay against EV71 and CVB3, respectively. Cytokine determination was according to the manufacturer's instructions of the commercial kits. Griess reagent method was used for the nitric oxide determination.

Results & Discussion:

The IC₅₀ for the *P. polyphylla* Smith 95% ethanol extract against EV71 and CVB3 were 12.5-23 and 99-156% of that of ribavirin, a positive control. Prophylactic virus infection, direct contact viricidal action, and anti-viral replication for the extract were observed in both EV71 and CVB3 infections. The extract significantly increased the IL-6 and decreased the IL-8 levels both for the EV71- and CVB3-infected cells. A high correlation was demonstrated in the high amounts of IL-6 induction and the anti-viral activity of the *P. polyphylla* Smith 95% ethanol extract. The decreasing IL-8 and IL-1 β levels carry the benefit of decreasing immune response pathogenesis from the host cells. In conclusion, the *P. polyphylla* Smith 95% ethanol extract exhibited both anti-EV71 and CVB3 activity and neutralized the viral-induced severe pathogenesis.

Keywords: *Paris polyphylla* Smith, enterovirus 71, coxsackievirus B3, immune modulation

壹、前言

一、腸病毒 71 型及克沙奇 B3 型

腸病毒 71 型自 1997 年以來在亞洲國家大流行，包括臺灣、日本、香港、馬來西亞等，其他國家如保加利亞及匈牙利等亦發生類似的大流行(呂等，1999)。EV71 一般引起一些輕微症狀，如發燒、上呼吸道疾病及斑疹丘等，但是在臺灣、日本、香港及馬來西亞等，同時出現手足口病及嚴重中樞神經系統疾病如腦炎及心肺水腫等，並造成死亡案例 (Lin et al., 2002; Lin et al., 2007; Lin et al., 2003 呂等，1999；葉等，1999)。EV71 進入中樞神經後會侵入神經元，並複製而造成神經元的破壞 (Shen et al., 2000)

克沙奇 B3 型每年在世界各地均會造成流行(Morens and Pallansch, 1995)。美國感染案例之平均致死率為 5.4% (Khetsuriani, et al., 2006)。臺灣分別在 1996 年及 2005 年爆發流行，造成小嬰兒敗血症候群等嚴重症狀，死亡率高達 11% (Hsieh et al., 1997；行政院衛生署疾病管制局，2006)。CVB3 型亦曾造成子宮內胎兒的感染(Ouellet et al., 2004)。克沙奇 B3 型主要侵犯心臟組織，繼而衍生成為嚴重之心臟疾病，包括慢性心肌炎、心肌擴張、心臟收縮力減弱等(Kim, et al., 2001; Chau, et al., 2007；Groarke and Pevear, 1999)。CVB3 造成心肌炎之原因，主要為病毒攻擊心臟組織，造成細胞凋亡，以致引起內外之心肌發炎(Olivetti et al., 1997)。此外，CVB3 會在胰臟器官進行病毒複製，造成外分泌之器官受損 (Henke et al., 2001)。

腸病毒為一種極微小的 RNA 病毒，屬於 Picornavirusesdk 中的 enterovirus 屬，為正單股(positive single strain)之 RNA 病毒。人類腸病毒被分離出來的有 70 多種血清型，其中包括 3 型小兒麻痺病毒 (poliovirus)：type-1、type-2、type-3；23 型克沙奇病毒 A 群 (coxsackievirus A, CVA)：A1-A22，A24 型；6 型克沙奇病毒 B 群(coxsackievirus B, CVB)：B1-B6 型；31 型伊科病毒(echovirus)：1-33 型(除 type 10 及 28 外)及 4 型腸病毒 (enterovirus)：68-71 (Melnick, 1996)。腸病毒 71 型(enterovirus 71, EV71)是最晚發現的腸病毒，全長為 7,408 個 nucleotides (Brown et al., 1995)。

二、抗 EV71 及 CVB3 之研究

目前臨床上無任何可對抗 EV71 及 CVB3 之藥物。有一些抗腸病毒 71 型及克沙奇 B3 型之研究，包括植物萃取物、由此等分離之成分及合成化合物。九層塔(*Ocimum basilium*)萃取物具有抑制 EV71 感染及複製作用，其抑制 EV71 之活性成分包括 linalool、apigenin 及 ursolic acid 等(Chiang et al, 2005)。丹參(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)區分物具有抑制 EV71 造成細胞病變之活性(Wu et al., 2007)。由螺旋藻(*Spirulina platensis*)分離之異藻膽藍素

(allophycocyanin)具有抑制腸病毒 71 型早期複製之活性，以及抑制 EV71 造成的細胞凋亡及延緩病毒 RNA 的合成 (Shih et al., 2003)。牛與人乳鐵蛋白均具有抑制 EV71 吸附於宿主細胞之作用(Lin et al., 2002)。一些類黃酮衍生物對 EV71 之 IC_{50} 為 $0.45 \pm 0.05 - 14.58 \pm 1.39 \mu M$ (Genovese et al., 1995)。合成之 pyridyl imidazolidinones 衍生物有相當好之抑制 EV71 活性(Shia et al., 2002)。Ribavirin 為治療病毒感染之臨床藥物，具有抑制 EV71 複製能力(Li et al., 2008)。張(1998)對手足口病之幼兒，給予中藥方劑如銀翹散、導赤散及涼膈散，中藥如板藍根、黃芩、葛根、黃連、甘草、金銀花、柴胡、連翹、石膏、滑石、烏梅、土伏苓、蛇退、王不留行及大黃等，結果顯示出，病童均在 3~4 天內痊癒。

華紫金牛(*Ardisia chinensis* Benth)水萃取物(Su et al., 2006)及包括大血藤(*Guanidine Sargentodoxa*)等 6 種藥草之沸水萃取物(Guo et al., 2006)對 CVB3 均顯示出抑制活性。雞三樹(*Pithecellobium clyperia*)葉部分離之黃烷類(flavans)、紅景天(*Rhodiola rosea*)之成分 salidroside 及鵝掌藤分離之三萜類(triterpenoids)均顯示出對 CVB3 之抑制活性(Li et al., 2006, 2007; Wang et al., 2009)。此外，合成化合物包括 homoisoflavonoids、amiloride、[(biphenyloxy)propyl]isoxazole 及 arbidol 等之衍生物，亦被發現具抑制 CVB3 活性(Tait et al., 2006; Harrison et al., 2008; Makarov et al., 2005; Shi et al., 2007)。中國大陸學者何(2003)及姚(2005)亦指出，一些單味中藥如黃氏、大黃、苦參、柴胡、虎杖、桂枝、空心蓮子草、連翹、苦瓜、紅景天及板藍根等，及一些中藥複方如小柴胡湯、玉屏風散、生脈散及甘露消毒丹等具抑制 CVB3 之功效。

三、感染病毒宿主細胞之細胞激素調節作用

細胞激素(cytokine)為細胞分泌之小分子蛋白質，具有調節細胞之免疫、發炎及造血等作用，目前已被發現之細胞激素有 20 餘種。與病毒有關之細胞激包括有 interleukin 1α (IL- 1α)、IL- 1β 、IL-2、IL-4 ~ IL-12、interferon α (IFN- α)、IFN- β 、IFN- γ 、tumor necrosis factor α (TNF- α)及 TNF- β 等，其作用為抑制病毒吸附、抑制病毒複製、活化自然殺手、巨噬及 B 細胞、刺激活性氧(reactive oxygen species, ROS)產生、刺激淋巴 B 細胞及誘導 T 細胞分化等(Neuzil and Graham, 1996)。宿主細胞遭受 EV71 感染，會誘導產生發炎前期(proinflammatory)之細胞激素如 IL- 1β 、IL-6 及 TNF- α 等，以滅絕病毒(Lin et al., 2002, 2003; Lin, 2007)，但同時亦會引發細胞凋亡，以避免病毒於宿主細胞的擴散，但是這也是造成 EV71 致病性的主因，嚴重者造成腦炎及心肺水腫。宿主細胞遭受 CVB3 感染，則會產生 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-10、IL-12 及 NO 等(Wang et al., 2009; Szalay et al., 2006)。TNF 會抑制多

種 RNA 及 DNA 病毒之複製，具有很強的抗病毒活性(Ramshaw et al., 1997; Herbein and O'Brien, 2000)，這些抗病毒活性包括誘導病毒凋亡、干擾病毒進入宿主細胞、抑制病毒 mRNA 及病毒蛋白質合成等(Herbein and O'Brien, 2000; Seo and Webster, 2002)。Interferons (IFN- α 、IFN- β 及 IFN- γ)由白血球及纖維母細胞 (fibroblast) 產生，經由被病毒感染之宿主細胞非專一性免疫反應所產生，具有抑制病毒複製活性。此外，interferon 亦會誘導 nitric oxide synthase (iNOS)活化產生 NO，NO 具有致死病原菌及病毒能力；但當濃度高時，對宿主細胞亦造成毒害(Lin et al., 1997)。

四、蚤休

蚤休生長於臺灣 1800-3000m 間之疏林中。全株均可入藥，傳統上用於消腫止痛、清熱解毒等。主治流行性乙型腦炎、腮腺炎、慢性氣管炎及癌症等。蚤休之組成分包括 steroid glycosides、phenylpropanoid glycosides、diosgenin glycosides、pennogenin glycosides、steroidal saponins 及 gosaccharides 等，其生理活性包括有止血作用、抗腫瘤、抑制胃黏膜損傷、免疫調節作用及促進肌肉收縮等作用(Wang et al., 2007; Zhang et al., 2007; Guo et al., 2008; Yan et al., 2009)。

我們先前在臺灣藥用植物抗腸病毒 71 型活性篩選試驗中，發現蚤休有很好之抗腸病毒 71 型活性(Hsu et al., submitted to Indian J Med Res for publishing)，低於丹參 (Wu et al., 2007)、九層塔(鄭, 2003)及魚腥草(劉, 2005)萃取物及人類乳鐵蛋白，甚至低於臨床上用於對抗病毒感染之 ribavirin (Li et al., 2008)；相近於牛乳鐵蛋白(Lin et al., 2002)。因此，本研究探討蚤休抑制腸病毒(EV71 及 CVB3)活性及其相關之調節機制，研究成果將有助於蚤休開發成為抗腸病毒之保健食品，或進一步分離其活性成分，開發成為抗腸病毒之藥物。

五、研究目的及內容

本研究探討蚤休抑制腸病毒(EV71 及 CVB3)活性及對宿主細胞之免疫調節作用。抗腸病毒活性之分析項目包括有 50%病毒抑制濃度、選擇指數及對病毒作用之時間點分析等。免疫調節作用包括蚤休萃取物對感染病毒宿主細胞之細胞激素(IFN- α 、IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α)及一氧化氮等含量之影響。

貳、材料與方法

一、材料

(一) 蚤休(*Paris polyphylla* Smith)

由本地草藥店購得蚤休(*Paris polyphylla* Smith)生藥材(入藥部位為根部)，屬百合科(Liliaceae)，亦稱為七葉蓮、七葉一枝花、重樓、重樓金線及三層草等。蚤休樣本經由中興大學森林系曾彥學教授鑑定基源，並做成標本寄存於中興大學森林系標本館(No. TCF 13518)。

(二) 宿主細胞

人類肌肉纖維母細胞(human embryonal rhabdomyosarcoma, RD; BCRC 60113)及人類子宮頸癌細胞(Human cervical epitheloid carcinoma cell, HeLa S3) BCRC60101 (ATCC CCL-2.2)，購自 Bioresources Collection and Research Center (Hsinchu, Taiwan)，分別為 EV71 及 CVB3 之宿主細胞。

(三) 病毒株

測試之腸病毒病毒株，包括腸病毒 71 型(EV71)及克沙奇 B3 型(CVB3)。EV71 包括標準株 EV71 ATCC-VR784，購自美國菌種中心(American Type Culture Collection, ATCC)；及臨床株 EV71 CMUH 527-1、CMUH-V4079 及 CMUH-627-14，來自於中國醫藥大學。CVB3 包括臨床株 CVB3 KMUH-92225、KMUH-034189、KMUH-K516 及 KMUH-99168，來自於高雄醫藥大學。

二、方法

(一) 萃取物製備

30 g 蚤休生藥材以 200 ml 之 95% 乙醇於室溫攪拌萃取 1 h。9000 rpm 離心 15 min，收集濾液，殘渣重複萃取 2 次，合併全部萃取液，於低於 40 °C 減壓濃縮至乾，得萃取物。

(二) 細胞培養

細胞以含有 10% 胎牛血清(Fetal Bovien Serum, FBS)之 Dulbecco's modified Eagle's minimum essential (DMEM; Gibco, NY) (RD 細胞)或 Nutrient Mixture F-12 Ham (F-12k, Sigma, USA) (HeLa S3 細胞)，於 37 °C 含有 5% 二氧化碳之環境培養至長滿 80%。以磷酸鹽緩衝溶液沖洗，加入 trypsin-EDTA 切除細胞，以培養基稀釋至 $3-5 \times 10^5$ cell/ml，進行各項試驗。

(三) 50% 細胞毒性濃度 (50% cytotoxic concentration, CC₅₀) 測定

測定蚤休 95% 乙醇萃取物對宿主細胞之 50% 細胞毒性濃度，以 trypan blue 排除法測定。接種 RD (EV71) 或 HeLa S3 (CVB3) 細胞於 24 孔盤，於含有 5% CO₂ 環境培養 24 h (長滿 80%)。以 PBS 沖洗，加入 2 倍序列稀釋之萃取物，0% 萃取物者為對照組，於 37 °C 含有 5% CO₂ 環境培養 48 (Hela S3) 或 72h (RD)。加入 trypsin-EDTA 切除細胞，以倒立顯微鏡觀察細胞，待全部變圓，每孔加入培養基混合均勻，細胞液與 trypan blue 等體積混合，吸取少量於血球計數器以倒立顯微鏡計算活細胞數目，計算各濃度萃取物之細胞存活率(%)，並以此計算出萃取物對 RD 細胞或 HeLa S3 細胞之 50% 細胞毒性濃度。實驗做三個獨立試驗，每個試驗做二重複，結果以平均值±標準偏差表示。

(四) 50% 抑制濃度 (50% inhibitory concentration, IC₅₀) 測定

1. 中和試驗 (neutrolization test)

測定蚤休 95% 乙醇萃取物對 EV71 之 IC₅₀，以中和試驗法進行。96 孔盤加入 RD 細胞(3×10^5 cell/ml)，於 37°C 之 5% CO₂ 環境中培養 24 h。以 PBS 洗滌，各孔洞加入 0.1 ml 含有 100 TCID₅₀ 之病毒液及 0.1 ml 不同濃度之測試樣品 (以含有 2% FBS 之 DMEM 為稀釋溶劑)；以 ribavirin (Wako, Japan) 為正控制組，以 0% 萃取物為負控制組 (細胞控制組：mock-infected cells，病毒控制組：virus-infected cells)。於 37°C 之 5% CO₂ 環境中培養 72 ± 1 h。以 PBS 洗滌，加入 0.5% (w/v) methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma, USA)，於室溫及暗處反應 2 h，加入 DMSO 靜置以使產物 formazan 溶解，以 FLUOstar OPTIMA spectrophotometer (BMG Labtech, Germany) 測 OD₅₇₀ 吸收值，計算測試樣品對病毒株之抑制率。全部實驗做三個獨立試驗，每個試驗做三重複，結果以平均值±標準偏差表示。

2. 病毒斑減少分析法 (plaque reduction assay)

測定蚤休 95% 乙醇萃取物對 CVB3 之 IC₅₀，以病毒斑減少分析法進行。6 孔盤中加入 HeLa S3 細胞(5×10^5 cell/ml)，於 37°C 之 5% CO₂ 環境中培養 24 h。以 PBS 洗滌，各孔洞加入 0.5 ml 含有 100 PFU 病毒液及 2 倍序列稀釋之萃取物，0% 者為為負控制組；以 ribavirin (Sigma, USA) 為正控制組，於 4°C 之 5% CO₂ 環境中作用 1 h 使病毒吸附，吸除含有病毒液之培養基，加入 2 ml 含有相同濃度測試樣品之覆蓋培養基，於 37°C 之 5% CO₂ 環境中培養 48 ± 1 h。加入福馬林固定細胞，以結晶紫染色，計數病毒斑

(plaques/well)，計算萃取物對 CVB3 病毒株之抑制百分率。全部實驗做三個獨立試驗，每個試驗做二重複，結果以平均值±標準偏差表示。

(五)作用時間點分析

於病毒感染宿主細胞期間 (-2~24 h) 加入蚤休 95% 乙醇萃取物，測定萃取物於不同感染時間點對 CVB3 之抑制率。

1. 對 EV71 之時間點分析

以 EV71 ATCC-VR784 為試驗病毒株，以中和試驗法進行。96 孔盤加入 RD 細胞 (3×10^5 cell/ml)，於 37°C 之 5% CO₂ 環境中培養 24 h。將細胞分為實驗組 (A)、病毒控制組 (B) 及細胞控制組 (C)。(A) **實驗組**：於不同時間點 (-2—24 h) 加入萃取物。**-2 h、-1 h**：孔洞加入含有不同濃度之萃取物，於 37°C 之 5% CO₂ 環境中培養 1 或 2 h；以 PBS 洗滌，加入含有 10,000 TCID₅₀ 病毒液，於 37°C 之 5% CO₂ 環境中作用 1 h，吸除病毒液，加入不含萃取物之培養基。**0 h**：孔洞中加入 10,000 TCID₅₀ 病毒液及不同濃度之萃取物，於 37°C 之 5% CO₂ 環境中作用 1 h，吸除培養基，加入不含萃取物之培養基。**1- 24 h**：孔洞中加入含有 10,000 TCID₅₀ 病毒液之培養基，於 37°C 之 5% CO₂ 環境中作用 1 h，吸除病毒液，加入不含萃取物之培養基，於即刻、1-23 h 後吸除培養基，加入含有萃取物之培養基。(B) **病毒控制組**：孔洞中加入 10,000 TCID₅₀ 病毒液，於 37°C 之 5% CO₂ 環境中作用 1 h，吸除病毒液，加入不含萃取物之培養基。(C) **細胞控制組**：與病毒控制組相同，但不加入病毒液。(A)、(B)及(C)組於 37°C 之 5% CO₂ 環境中培養 72 ± 1 h。以 PBS 洗滌，以 MTT 染色，以 FLUOstar OPTIMA spectrophotometer 測 OD570 吸收值，計算各時間點萃取物對病毒之抑制率(%)。全部實驗做三個獨立試驗，每個試驗做三重複，結果以平均值±標準偏差表示。

2. 對 CVB3 之時間點分析

以 CVB3 KMHU-034189 為試驗病毒株，以病毒斑減少分析法進行。6 孔盤中加入 HeLa S3 細胞(5×10^5 cell/ml)，於 37°C 之 5% CO₂ 環境中培養 24 h。將細胞分為實驗組(A)、病毒控制組(B)及細胞控制組(C)。(A)**實驗組**：於不同時間點加入萃取物。**-2 h、-1 h**：孔洞中加入含有不同濃度萃取物之培養基，於 37°C 之 5% CO₂ 環境中培養 1 或 2 h，以 PBS 洗滌，加入含有 100 PFU 病毒液，於 4°C 之 5% CO₂ 環境中作用 1 h，吸除病毒液，加入不含萃

取物之覆蓋培養基。**0 h**：孔洞中加入含有 100 PFU 病毒液及不同濃度之萃取物，於 4°C 之 5% CO₂ 環境中作用 1 h，吸除培養基，加入不含萃取物之覆蓋培養基。**1-24 h**：孔洞中加入含有 100 PFU 之病毒液，於 4°C 之 5% CO₂ 環境中作用 1 h，吸除病毒液，加入不含萃取物之培養基，於即刻、1- 23 後吸除培養基，加入含有萃取物之覆蓋培養基。**(B)病毒控制組**：孔洞中加入含有 100 PFU 之病毒液，於 4°C 之 5% CO₂ 環境中作用 1 h，吸除病毒液，加入不含萃取物之覆蓋培養基。**(C)細胞控制組**：與病毒控制組相同，但不加入病毒液。(A)、(B)及(C)組於 37°C 之 5% CO₂ 環境中培養 48 ± 1 h。吸除覆蓋培養基，加入福馬林固定細胞，以結晶紫染色，計數病毒斑，計算各時間點萃取物對病毒之抑制率(%)。全部實驗做三個獨立試驗，每個試驗做二重複，結果以平均值±標準偏差表示。

(六) 宿主細胞之免疫調節測定

蚤休 95% 乙醇萃取物加入感染病毒之宿主細胞中，測定對宿主細胞產生細胞激素(IL-8, 6, 2, 1β, TNF-α, INF-α)及一氧化氮之影響，以未感染病毒之宿主細胞對照組。

1. 對感染EV71宿主細胞之免疫調節測定

以 EV71 ATCC-VR784 為測試病毒株，測定蚤休 95% 乙醇萃取物對 RD 細胞之細胞激素及一氧化氮含量之影響。24 孔盤加入 RD 細胞 (3×10^5 cell/ml)，於 37°C 之 5% CO₂ 環境中培養 24 h。各孔洞加入含有 3000 TCID₅₀ 病毒液及不同濃度之萃取物，0% 者為病毒控制組；細胞組為含相同濃度之萃取物但無病毒液。於 37°C 之 5% CO₂ 環境中培養 48 ± 1 h。吸取細胞培養液，以 9000 rpm 於 4°C 離心 10 min，收集上清液，以酵素免疫分析套組測定細胞激素包括 IL-6 (R&D, USA)、IL-8 (R&D, USA)、IL-2 (R&D, USA)、IL-1β (DIACLONE, France)、TNF-α (DIACLONE, France) 及 IFN-α (VeriKineTM, USA) 等之含量；以 Griess reagent 測定一氧化氮含量(μM)。分析方法依套組之操作指示。

2. 對感染CVB3之宿主細胞免疫調節測定

以 CVB3 KMH-034189 為測試病毒株，測定蚤休 95% 乙醇萃取物對 HeLa S3 細胞之細胞激素及一氧化氮含量之影響。24 孔盤加入細胞液 (5×10^5 cell/ml)，於 37°C 之 5% CO₂ 環境中培養 24 h。各孔洞加入含有 200 PFU 病毒液及不同濃度之萃取物，0% 者為病毒控制組；細胞組為含相同濃度測試樣品但無病毒液。於

37°C 之 5% CO₂ 環境中培養 48 ± 1 h。吸取細胞培養液，以 9000 rpm 於 4°C 離心 10 min，收集上清液，以酵素免疫分析套組測定細胞激素包括 IL-6 (R&D, USA)、IL-8 (R&D, USA)、IL-2 (R&D, USA)、IL-1β (DIACLONE, France)、TNF-α (DIACLONE, France) 及 IFN-α (*VeriKine*TM, USA) 等之含量 (pg/ml)；以 Griess reagent 測定一氧化氮含量 (μM)。分析方法依套組之操作指示。

(七) 統計分析

時間點分析及細胞激素含量之結果，分別以 Duncan 及 Dunnett 試驗進行統計分析，*p* 值低於 0.05 及 0.01 分別表示統計上具有顯著及極顯著差異。

參、結果

一、蚤休 95% 乙醇萃取物對 RD 及 HeLa S3 細胞之 CC_{50}

結果如表一所示。蚤休 95% 乙醇萃取物對 EV71 及 CVB3 宿主細胞之 CC_{50} 分別為 $744.77 \pm 9.05 \mu\text{g/ml}$ (RD) 及 $522.25 \pm 19.29 \mu\text{g/ml}$ (HeLa S3); 對 ribavirin (正對照組) 分別為 $2593.37 \pm 183.22 \mu\text{g/ml}$ (RD) 及 $2120.94 \pm 125.20 \mu\text{g/ml}$ (HeLa S3)。

二、蚤休 95% 乙醇萃取物對 EV71 及 CVB3 之 IC_{50}

蚤休 95% 乙醇萃取物對 EV71 及 CVB3 之 IC_{50} 結果如表二所示。蚤休 95% 乙醇萃取物對 EV71 及 CVB3 均顯示出抑制活性，但對 EV71 之活性優於 CVB3。對 EV71 之 IC_{50} 之結果顯示出，萃取物對四株 EV71 之 IC_{50} 為 $78.46 \pm 2.80 - 125.00 \pm 0.00 \mu\text{g/ml}$ ，為正對照組之 12.5—23% ($338.15 \pm 3.68 - 1000.00 \pm 0.00 \mu\text{g/ml}$)，其中對 EV71 ATCC-VR784 有最低之 IC_{50} 最低。選擇指數 (CC_{50}/IC_{50}) 為評估抗病毒藥物之參數，數值愈高，表示藥物毒性愈小，抗病毒活性愈高。蚤休 95% 乙醇萃取物對四株 EV71 之 SI 為 5.96—9.49，為正對照組 (2.53—7.67) 之 123.73—235.57%。

對 CVB3 之 IC_{50} 之結果顯示出，蚤休 95% 乙醇萃取物對四株 CVB3 之 IC_{50} 為 $126.39 \pm 1.44 - 197.15 \pm 4.93 \mu\text{g/ml}$ ，為正對照組之 100.00—156.00% ($96.70 \pm 5.72 - 161.98 \pm 4.31 \mu\text{g/ml}$)，其中對 CVB3 KMHU-034189 之 IC_{50} 最低。蚤休 95% 乙醇萃取物對四株 CVB3 之 SI 為 2.65—4.13，為正對照組之 19.32—20.24% (13.09—21.38)。

三、蚤休 95% 乙醇萃取物對病毒作用之時間點分析

(一) 對 EV71 之時間點分析

以 EV71 ATCC-VR784 為測試病毒株。蚤休 95% 乙醇萃取物對 EV71 ATCC VR784 之時間點分析結果如圖一所示。蚤休 95% 乙醇萃取物之處理劑量愈高，對 EV71 ATCC-VR784 抑制率顯著的增加 ($p < 0.05$)。31.25 $\mu\text{g/ml}$ 處理劑量之抑制率為 $0.70 \pm 0.28 - 40.39 \pm 3.45\%$ ，200 $\mu\text{g/ml}$ 處理劑量上升至 $20.91 \pm 1.09 - 96.51 \pm 2.83\%$ ，顯示出萃取物對 EV71 ATCC-VR784 之作用呈現劑量依賴型。於病毒感染細胞前(-2 及 -1 h) 加入萃取物，對病毒具抑制作用，31.25—200.00 $\mu\text{g/ml}$ 處理之抑制率為 $0.70 \pm 0.28 - 23.44 \pm 1.54\%$ ，顯示出蚤休 95% 乙醇萃取物能於細胞停留一段時間，對宿主細胞具有預防感染 EV71 之作用。於 0 小時加入萃取物，31.25—200 $\mu\text{g/ml}$ 處理之抑制率為 $4.92 \pm 0.37 - 25.17 \pm 2.08\%$ ，顯示出萃取物具有直接殺死病毒或抑制病毒吸附宿主細胞之作用。於病毒感染細胞後 1—24

小時加入萃取物，31.25–200 $\mu\text{g/ml}$ 處理之抑制率為 $4.46 \pm 0.27 - 96.51 \pm 2.83\%$ ；其中以病毒感染後 1 小時加入之抑制率最高 ($40.39 \pm 3.45 - 96.51 \pm 2.83\%$)，隨萃取物加入時間之延遲，抑制率逐漸下降，24 小時後加入者，抑制率降至 $4.46 \pm 0.27 - 55.22 \pm 3.51\%$ ；此階段萃取物對 EV71 之抑制作用為抑制病毒複製，其中包括直接殺死病毒之作用。

綜合圖一之結果，蚤休 95% 乙醇萃取物對 EV71 ATCC-VR784 之抑制作用，包括預防病毒感染、直接殺死病毒（或抑制病毒吸附於宿主細胞）以及抑制病毒之複製作用，其中抑制病毒之複製為主要之抑制作用；於病毒進入主細胞初期 (1h) 之抑制高達 $96.51 \pm 2.83\%$ (200 $\mu\text{g/ml}$)。

(二)對 CVB3 之時間點分析

以 CVB3 KMUH-034189 為測試病毒株。蚤休 95% 乙醇萃取物對 CVB3 KMUH-034189 之時間點分析結果如圖二所示。蚤休 95% 乙醇萃取物之處理劑量愈高，抑制率呈顯著的增加 ($p < 0.05$)。50 $\mu\text{g/ml}$ 處理劑量之抑制率為 $4.93 \pm 0.01 - 16.30 \pm 0.89\%$ ，200 $\mu\text{g/ml}$ 處理劑量則上升至 $19.04 \pm 1.43 - 59.18 \pm 2.74\%$ ，萃取物對 CVB3 KMUH-034189 之作用呈現劑量依賴型 (dose-dependent)。於病毒感染細胞前 (-2 及 -1 h) 加入萃取物對病毒具抑制作用，200 $\mu\text{g/ml}$ 處理劑量之抑制率為 $23.56 \pm 5.60 - 38.66 \pm 15.60\%$ ，顯示出蚤休 95% 乙醇萃取物能於細胞停留一段時間，對宿主細胞具有預防感染之效用。於 0 小時加入萃取物，50–200 $\mu\text{g/ml}$ 處理之抑制率為 $9.69 \pm 0.11 - 19.04 \pm 1.43\%$ ，顯示出萃取物具有直接殺死病毒或抑制病毒吸附宿主細胞之作用。於病毒感染細胞後 1 小時加入萃取物，50–200 $\mu\text{g/ml}$ 處理之抑制率為 $15.18 \pm 0.74 - 34.22 \pm 1.47\%$ ，顯示出萃取物可直接殺死殘留於細胞表面的病毒以及抑制病毒早期之複製。於病毒感染細胞後 2–8 小時加入萃取物，50–200 $\mu\text{g/ml}$ 處理之抑制率為 $4.93 \pm 0.01 - 34.64 \pm 2.63\%$ ，顯示出蚤休 95% 乙醇萃取物具有抑制病毒複製之作用。於病毒感染細胞 12–24 小時加入萃取物，50–200 $\mu\text{g/ml}$ 處理之抑制率為 $13.93 \pm 0.93 - 59.18 \pm 2.74\%$ ，此階段之病毒已於細胞內複製完成 (Buenz and Howe, 2006)，並由宿主細胞釋出至培養基中，因此萃取物對病毒之抑制作用包括抑制病毒之複製及直接殺死由宿主細胞釋出之病毒。

綜合圖二之結果，蚤休 95% 乙醇萃取物對 CVB3 KMUH-034189 之抑制作用，包括預防病毒感染、直接殺死病毒(或

抑制病毒吸附於宿主細胞)以及抑制病毒之複製作用，其中後兩者為主要之抑制作用；於病毒感染宿主細胞 12 h 後達抑制作用高峰。

四、蚤休 95% 乙醇萃取物對感染病毒宿主細胞之細胞激素產生之影響

(一)對感染 EV71 宿主細胞之影響

以 EV71 ATCC-VR784 為測試病毒株。蚤休 95% 乙醇萃取物對 RD 宿主細胞之細胞激素生成之結果如圖三所示。圖三(A)為 IL-6 之結果。RD 細胞本身之 IL-6 生成量低(77.42 ± 9.32 pg/ml)，20—160 μ g/ml 之蚤休 95% 乙醇萃取物對 RD 細胞之 IL-6 生成無影響 ($p < 0.01$)。RD 細胞經 EV71 ATCC-VR784 感染會誘導 IL-6 生成，為未染之 155.2%。蚤休 95% 乙醇萃取物會顯著增加已感染病毒 RD 細胞之 IL-6 生成，劑量越高 IL-6 生成量越高 ($p < 0.05$)，40 μ g/ml 處理之 IL-6 生成量為對照組 (cell/virus) 之 155.4%。但當作用劑量 ≥ 80 μ g/ml 時，則 IL-6 生成量呈下降趨勢，160 μ g/ml 之處理劑量僅為對照組之 24.0% (39.16 ± 23.92 pg/ml)，其原因可能為萃取物之作用劑量高於對 EV71 ATCC-VR784 之 IC_{50} (78.46 ± 2.80 μ g/ml)。

圖三(B)為 IL-8 之生成量。RD 細胞會產生高量之 IL-8 (918.47 ± 45.73 pg/ml)，低劑量 (20 μ g/ml) 萃取物對 IL-8 生成無影響，但當萃取物劑量 ≥ 40 μ g/ml 時，IL-8 生成量明顯下降，作用劑量愈高 IL-8 生成量下降愈大；80 μ g/ml 處理之 IL-8 生成量 (409.62 ± 27.51 pg/ml) 為對照組之 44.6%；因其有部分 RD 細胞被萃取物抑制 (CC_{50} : 744.77 ± 9.05 μ g/ml)；160 μ g/ml 處理之 IL-8 生成量急驟下降至對照組之 0.5%。RD 細胞感染 EV71 ATCC-VR784 不會影響 IL-8 生成；低劑量 (≤ 40 μ g/ml) 萃取物對感染 EV71 ATCC-VR784 之 RD 細胞之 IL-8 生成無影響；當萃取物劑量 ≥ 80 μ g/ml 時，IL-8 生成量明顯下降 ($p < 0.05$, $p < 0.01$)，作用劑量愈高 IL-8 生成量下降愈大；80 μ g/ml 處理之 IL-8 生成量 (569.26 ± 35.22 pg/ml) 降至對照組 (869.04 ± 10.30 pg/ml) 之 65.5%，160 μ g/ml 再降至對照組之 1.4%。綜合圖三(B)之結果，蚤休 95% 乙醇萃取物會同時降低未感染及已感染 EV71 ATCC-VR784 之 RD 細胞之 IL-8 生成。

圖三(C)為 IL-1 β 之生成量。RD 宿主細胞之 IL-1 β 生成量非常低 (9.34 ± 0.41 pg/ml)，蚤休 95% 乙醇萃取物之各處理 (20—160 μ g/ml) 對 RD 細胞之 IL-1 β 生成量無影響 ($p < 0.05$)。感染 EV71 ATCC-VR784 之 RD 細胞不影響 IL-1 β 生成 (11.39 ± 0.54 pg/ml)，其生成量隨萃取物處理劑量增加而降低 ($p < 0.05$)，20-160 μ g/ml 處理劑量之 IL-1 β 含量為對照組之 50-92%。

圖三(D)為 IL-2 之生成量。RD 細胞之 IL-2 生成量非常低(6.90 ± 0.27 pg/ml)，20–80 μ g/ml 之蚤休 95% 乙醇萃取物對 RD 細胞之 IL-2 生成量無太大影響(6.36 ± 0.40 – 7.66 ± 0.26 pg/ml)。感染 EV71 ATCC-VR784 不影響 RD 細胞之 IL-2 生成(6.90 ± 0.22 pg/ml)；20–80 μ g/ml 劑量對 IL-2 生成量無影響($p < 0.05$)，160 μ g/ml 之萃取物對未感染及已感染 EV71 ATCC-VR784 之 RD 細胞均降低 IL-2 之生成($p < 0.05$)，因處理劑量已對部分 RD 細胞產生毒性(CC_{50} : 744.77 ± 9.05 μ g/ml)。

圖三(E)為 TNF- α 之生成量。EV71 ATCC-VR784 之 RD 宿主細胞之 TNF- α 生成量非常低(4.52 ± 1.29 pg/ml)，蚤休 95% 乙醇萃取物之各處理(20–160 μ g/ml)對 RD 細胞之 TNF- α 生成量無影響($p < 0.05$)。感染 CVB3 KMUH-034189 不會誘導細胞生成 TNF- α (5.46 ± 1.09 pg/ml)，各萃取物處理亦對已感染 EV71 ATCC-VR784 之 RD 細胞之 TNF- α 生成無影響 ($p < 0.05$)。

圖三(F)為 IFN- α 之生成量。RD 細胞之 IFN- α 生成量非常低(2.93 ± 1.22 pg/ml)，且不甚穩定，蚤休 95% 乙醇萃取物之各處理 (20–160 μ g/ml) 對 RD 細胞之 TNF- α 生成量無影響($p < 0.05$)。RD 細胞感染 EV71 ATCC-VR784 不會誘導細胞生成 IFN- α (0.34 ± 1.38 pg/ml)，萃取物之各處理，亦對感染 EV71 ATCC-VR784 之 RD 細胞之 TNF- α 生成無影響 ($p < 0.05$)。

綜合圖三之結果，感染 EV71 之 RD 細胞之細胞激素，蚤休 95% 乙醇萃取物會顯著地增加 IL-6 生成，劑量越高 IL-6 生成量越高。高劑量(≥ 80 μ g/ml)致使 IL-8 生成量明顯下降，劑量愈高下降愈大；其餘之細胞激素包括 IL-1 β 、TNF- α 及 IFN- α 等則無影響。

(二)對感染 CVB3 宿主細胞之影響

以 CVB3 KMUH-034189 為測試病毒株。蚤休 95% 乙醇萃取物對 HeLa S3 宿主細胞之細胞激素生成之結果如圖四所示。圖四(A)為 IL-6 之結果。HeLa S3 細胞本身會生成高量之 IL-6 (6404.4 ± 852.6 pg/ml)，經萃取物處理會再顯著地誘導 HeLa S3 細胞生成 IL-6 ($p < 0.05$, $p < 0.01$)，31.25 μ g/ml 處理之 IL-6 生成量為對照組之 163.8%；但當處理劑量達 250 μ g/ml 時，IL-6 生成量下降，其原因為此劑量已對部分 HeLa S3 細胞產生毒性 (CC_{50} : 522.25 ± 19.29 μ g/ml)。HeLa S3 細胞感染 CVB3 KMUH-034189 不會增加 IL-6 之生成；但以蚤休 95% 乙醇萃取物處理已感染 CVB3 KMUH-034189 之 HeLa S3 細胞，則顯著地誘導 IL-6 生成 ($p < 0.05$, $p < 0.01$)，31.25

—125 $\mu\text{g/ml}$ 之處理之 IL-6 生成量為對照組之 176.2—209.5%；但當作用劑量達 250 $\mu\text{g/ml}$ 時，IL-6 生成量急驟下降，因為萃取物之作用劑量已為對 CVB3 KMUH-034189 之 IC_{50} ($126.39 \pm 1.44 \mu\text{g/ml}$) 兩倍值，有超過 50% 以上之病毒活性為萃取物所抑制。

圖四(B)為 IL-8 之生成量。HeLa S3 細胞會產生高量之 IL-8 ($1832.8 \pm 144.1 \text{ pg/ml}$)；低劑量(31.25—62.5 $\mu\text{g/ml}$)之萃取物對 HeLa S3 細胞之 IL-8 生成無影響，但當作用量 $\geq 125 \mu\text{g/ml}$ 時，HeLa S3 細胞之 IL-8 生成量下降($1260.6 \pm 192.6 \text{ pg/ml}$)，為對照組($1832.8 \pm 144.1 \text{ pg/ml}$)之 67.8%；因其有部分 HeLa S3 細胞被萃取物抑制 (CC_{50} : $522.25 \pm 19.29 \mu\text{g/ml}$)；250 $\mu\text{g/ml}$ 之作用量，IL-8 急驟下降至對照組之 0.3%。HeLa S3 細胞感染 CVB3 KMUH-034189 不會影響 IL-8 之生成；但蚤休 95% 乙醇萃取物明顯地降低感染 CVB3 KMUH-034189 之 HeLa S3 細胞 IL-8 生成量，萃取物劑量愈高，IL-8 生成量下降愈大($p < 0.01$)，125 $\mu\text{g/ml}$ 處理之 IL-8 生成量($381.0 \pm 48.7 \text{ pg/ml}$)為對照組($1983.7 \pm 89.0 \text{ pg/ml}$)之 19.2%，250 $\mu\text{g/ml}$ 之處理則再降低為對照組之 2.4%。綜合圖四(B)之結果，蚤休 95% 乙醇萃取物會同時降低未感染及已感染 CVB3 KMUH-034189 之 HeLa S3 細胞之 IL-8 生成。

圖四(C)為 IL-1 β 之生成量。HeLa S3 細胞之 IL-1 β 生成量非常低 ($4.78 \pm 1.02 \text{ pg/ml}$)，蚤休 95% 乙醇萃取物之各處理 (31.25—250 $\mu\text{g/ml}$) 對 HeLa S3 細胞之 IL-1 β 生成量無影響 ($p < 0.05$)。感染 CVB3 KMUH-034189 不會誘導細胞生成 IL-1 β ($4.63 \pm 0.41 \text{ pg/ml}$)，各萃取物處理亦對感染 CVB3 KMUH-034189 之 HeLa S3 細胞之 IL-1 β 生成無影響($p < 0.05$)。

圖四(D)為 IL-2 之生成量。HeLa S3 細胞之 IL-2 生成量非常低 ($6.68 \pm 0.59 \text{ pg/ml}$)，31.25—125 $\mu\text{g/ml}$ 之萃取物對 HeLa S3 細胞之 IL-2 生成量無影響 ($p < 0.05$)，250 $\mu\text{g/ml}$ 處理之 IL-2 生成量則略為降低($5.00 \pm 0.11 \text{ pg/ml}$)，因此劑量已對部分 HeLa S3 細胞產生毒性 (CC_{50} : $522.25 \pm 19.29 \mu\text{g/ml}$)。HeLa S3 細胞感染 CVB3 KMUH-034189 不會影響 IL-2 之生成($6.22 \pm 0.33 \text{ pg/ml}$)，但 62.5—125 $\mu\text{g/ml}$ 之蚤休 95% 乙醇萃取物略為增加其 IL-2 生成量(6.84 ± 0.15 — $7.08 \pm 0.15 \mu\text{g/ml}$)。綜合圖四(C)之結果，未感染及已感染 CVB3 KMUH-034189 之 HeLa S3 細胞之 IL-2 生成量均非常低，萃取物對彼等無太大影響。

圖四(E)為 TNF- α 之生成量。HeLa S3 細胞之 TNF- α 生成量非

常低(3.49 ± 3.89 pg/ml)且不甚穩定，蚤休 95%乙醇萃取物之各處理($31.25 - 250$ $\mu\text{g/mL}$)對 HeLa S3 之 TNF- α 生成量無影響 ($p < 0.05$)。感染 CVB3 KMUH-034189 不會誘導細胞生成 TNF- α (3.34 ± 2.34 pg/ml)，各萃取物處理亦對感染 CVB3 KMUH-034189 之 HeLa S3 細胞之 TNF- α 生成無影響($p < 0.05$)。

圖四(F)為 IFN- α 之生成量。HeLa S3 之 IFN- α 生成量非常低(3.86 ± 2.68 pg/ml) 且不甚穩定，蚤休 95%乙醇萃取物之各處理($31.25 - 250$ $\mu\text{g/ml}$) 對 HeLa S3 細胞之 IFN- α 生成量無影響 ($p < 0.05$)。感染 CVB3 KMUH-034189 不會誘導細胞生成 IFN- α (4.96 ± 2.43 pg/ml)，各萃取物處理亦對感染 CVB3 KMUH-034189 之 HeLa S3 細胞之 IFN- α 生成無影響 ($p < 0.05$)。

綜合圖四之結果，感染 CVB3 之 HeLa S3 細胞之細胞激素，蚤休 95%乙醇萃取物會顯著地增加 IL-6 生成，顯著地降低 IL-8 生成；其餘之細胞激素包括 IL-2、IL-1 β 、TNF- α 及 IFN- α 等則無影響。

五、蚤休 95%乙醇萃取物對感染病毒宿主細胞之一氧化氮產生之影響

如圖五所示。圖五(A) 為 EV71 ATCC-VR784 之結果。EV71 ATCC-VR784 之 RD 宿主細胞之 NO 生成量非常低(10.49 ± 6.12 μM)，且不甚穩定，蚤休 95%乙醇萃取物之各處理($20 - 160$ $\mu\text{g/ml}$)對 RD 細胞之 NO 生成量無影響 ($p < 0.05$)。感染 EV71 ATCC-VR784 不會誘導細胞生成 NO (8.41 ± 4.54 μM)，萃取物各處理亦對已感染 EV71 ATCC-VR784 之 RD 細胞之 NO 生成無影響 ($p < 0.05$)。

圖五(B)為 CVB3 KMUH-034189 之結果。CVB3 KMUH-034189 之 HeLa S3 宿主細胞之 NO 生成量非常低 (0.55 ± 0.72 μM)，且不甚穩定，蚤休 95%乙醇萃取物之各處理($31.25 - 250$ $\mu\text{g/ml}$)對 HeLa S3 細胞之 NO 生成量無影響($p < 0.05$)。感染 CVB3 KMUH-034189 不會誘導 HeLa S3 細胞生成 NO (0.55 ± 0.04 μM)，各萃取物處理亦對已感染 CVB3 KMUH-034189 之 HeLa S3 細胞之 NO 生成無影響 ($p < 0.05$)。

肆、討論

蚤休 95% 乙醇萃取物對腸病毒 71 型及克沙奇 B3 均顯示出良好之對抗活性。對 EV71 之 IC_{50} 為正對照組(ribavirin, 一種臨床上對抗病毒之藥物) 之 12.5—23%，對 CVB3 則與正對照組相似。萃取物對 EV71 及 CVB3 之抑制作用包括預防病毒感染、直接殺死病毒(或抑制病毒吸附於宿主細胞)以及抑制病毒之複製作用。蚤休 95% 乙醇萃取物對感染 EV71 或 CVB3 之宿主細胞，均會顯著增加 IL-6 及降低 IL-8 等細胞激素含量。

有一些抗腸病毒 71 型及克沙奇 B3 型之研究，包括植物萃取物、由此等分離之成分及合成化合物。九層塔(*Ocimum basilium*)萃取物具有抑制腸病毒 71 型作用(IC_{50} : $198.9 \pm 1.8 - 202.2 \pm 3.2 \mu\text{g/mL}$)，其中之成分包括 linalool、apigenin 及 ursolic acid 等亦具抑制活性(IC_{50} : $0.5 \pm 0.2 - 42.2 \pm 1.8 \mu\text{g/mL}$) (Chiang et al, 2005)。丹參(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)區分物對 EV71 之 IC_{50} 為 $364 \pm 205 - 847 \pm 475 \mu\text{g/mL}$ (Wu et al., 2007)。由螺旋藻(*Spirulina platensis*)分離之異藻膽藍素(allophycocyanin)對 EV71 之 IC_{50} 為 $4.68 \pm 1.25 \mu\text{g/mL}$ (Shih et al., 2003)。牛與人類乳鐵蛋白均具抑制 EV71 功效， IC_{50} 分別為 $10.5 \pm 2.1 - 24.5 \pm 6.2$ 及 $103.3 \pm 22.5 - 185.0 \pm 37.7 \mu\text{g/ml}$ (Lin et al., 2002)。類黃酮衍生物對 EV71 之 IC_{50} 為 $0.45 \pm 0.05 - 14.58 \pm 1.39 \mu\text{M}$ (Genovese et al., 1995)。合成之 pyridyl imidazolidinones 衍生物對 EV71 之 IC_{50} 為 $0.04 \pm 0.001 - 12.04 \pm 0.776 \mu\text{M}$ (Shia et al., 2002)。我們曾對 60 種臺灣藥用植物對抗 EV71 篩選之研究，其中板藍根 95% 乙醇萃取物對測試之 4 株 EV71 均不具對抗活性，金銀花僅抑制其中之 3 株， IC_{50} 高於蚤休萃取物(為其之 100-311%)，於此 60 種臺灣藥用植物中，蚤休、風不動(*Ficus pumila* L.)、野牡丹(*Melastoma candidum* D. Don)為其中活性最佳者，其次為螺蕨草(*Lemmaphyllum microphyllum* Presl)及雞血藤(*Spatholobi Caulis*)，其餘之 50 餘種之抗 EV71 活性表現中等或不佳(Hsu et al., 2009. Submitted to Indian J Med Res for publishing)。

華紫金牛(*Ardisia chinensis* Benth)水萃取物(Su et al., 2006)及包括大血藤(*Guanidine Sargentodoxa*)等 6 種藥草之沸水萃取物(Guo et al., 2006)對 CVB3 之 IC_{50} 分別為 31.3 及 19.2-115.3 $\mu\text{g/mL}$ 。鵝掌藤(*Schefflera heptaphylla*)各部位沸水萃取物對 CVB3 之 IC_{50} 為 12.5—70 $\mu\text{g/mL}$ (Li et al., 2007)。雞三樹(*Pithecellobium clyperia*)葉分離之黃烷類(flavans)、紅景天(*Rhodiola rosea*)之成分 salidroside 及鵝掌藤分離之三萜類(triterpenoids)，對 CVB3 之 IC_{50} 分別為 12.5—25、 39.0 ± 1.2 及 12.5—25 $\mu\text{g/mL}$ (Li et al., 2006, 2007; Wang et al., 2009)。此外，合成化合物包括 homoisoflavonoids、amiloride、

[(biphenyloxy)propyl]isoxazole 及 arbidol 等之衍生物，亦被發現具抑制 CVB3 活性， IC_{50} 分別為 $4.0 \pm 0.2 - 30 \pm 2.1$ 、 $2 - 60 \mu M$ 、 $0.013 - 3.99$ 及 $13.1 \pm 0.6 \mu g/mL$ 等 (Tait et al., 2006; Harrison et al., 2008; Makarov et al., 2005; Shi et al., 2007)。

比較本研究之結果，蚤休 95% 乙醇萃取物對 EV71 及 CVB3 之 IC_{50} 分別為 $74.09 \pm 5.86 - 150.48 \pm 1.06$ 及 $126.39 \pm 1.44 - 197.15 \pm 4.93 \mu g/mL$ (表二)。對 EV71 之 IC_{50} 低於九層塔萃取物 (Chiang et al., 2005)、丹參 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 區分物 (Wu et al., 2007)、人類乳鐵蛋白 (Lin et al., 2002) 及我們篩選之 50 餘種臺灣藥用植物，包括板藍根、金銀花、螺厭草及雞血藤等 (2009, Submitted to Indian J Med Res for publishing)。高於上述之分離或合成化合物 (Chiang et al., 2005; Shin et al., 2003; Lin et al., 2002; Genovese et al., 1995; Shia et al., 2002)。對 CVB3 之 IC_{50} ，則高於上數文獻。

IL-6、IL-1 β 及 IL-8 均為發炎前期 (pro-inflammatory) 細胞激素，在感染 EV71 之腦炎併發心肺水腫病患 (Lin et al., 2002b, 2003; Hein and Weiss, 2004; Liang et al., 2004; Wang et al., 2006) 及感染 CVB3 之心肌炎病患 (Hemi and Weiss, 2004; Hemi et al., 2009) 均有高量產生。IL-6 會抑制病毒複製，包括 EV71 (Lin et al., 2007)、human immunodeficiency (HIV) (Rogez-Kreuz et al., 2005) 及 hepatitis B virus (HBV) (Kuo et al., 2009) 等。IL-6 抑制病毒複製之機制，Kuo 等人 (2009) 在 HVB 之研究指出，IL-6 抑制 HVB 之 capsid 轉錄 (transcription)，因此造成構成 capsid 之蛋白質合成下降，於此同時 IL-6 亦明顯降低 HVB 病毒之 genome-containing nucleocapsid 含量；因此 capsid 蛋白質合成受阻及 genome-containing nucleocapsid 含量大幅降低，為 IL-6 抑制 HVB 複製之主因。於 EV71 及 CVB3 感染後期，高量之 IL-6 引發細胞發炎凋亡，以去除被感染之細胞，避免病毒於宿主細胞複製擴散，但這亦是造成 EV71 及 CVB3 致病性的主因，嚴重者造成腦脊髓炎及心肺水腫 (EV71) (Li, et al., 2002; Lin, et al., 2002b, 2003, 2007; Liang et al., 2004; Wang et al., 2006) 及心肌炎 (CVB3) 等 (Schmidtke et al., 2000)。IL-1 β 於感染後期可以抑制病毒複製 (Lin et al., 2007)；此外，IL-1 β 會誘導 cyclooxygenase type 2 (COX 2) 及 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 之表現及生成，造成 prostaglandin-E2 (PGE2) 及一氧化氮生成增加，致使細胞凋亡、壞死以及造成廣泛的發炎等 (Dinarello, 2009)。IL-8 為一種 chemokine，會活化嗜中性白血球 (neutrophil) 使之穿透 (infiltration) 至病毒感染位置；於感染位置產生大量活性氧物質 (reactive active substances, ROS)，ROS 作用於感染部位之細胞，致使細胞損傷、凋亡以致壞死 (Mizuki et al., 2000; Huang et al., 1995; Noach et al., 1994)，因此 IL-8 具致死病毒之作用，此作用係由於 ROS 所導致。

本研究之結果顯示出，蚤休 95% 乙醇萃取物對感染 EV71 或 CVB3 之宿主細胞，會顯著增加 IL-6 (圖三、圖四) 及降低 IL-1 β (圖三) 及 IL-8 (圖三、圖四) 之細胞激素含量。此結果顯示出萃取物對病毒之抑制作用，與萃取物誘導感染病毒 (EV71 及 CVB3) 宿主細胞產生高量之 IL-6 有高度的相關性；IL-6 可能抑制病毒 capsid 蛋白質及 genome-containing nucleocapsid 之生成，進而抑制病毒之複製作用 (Kuo et al., 2009)，時間點分析之結果 (圖一、圖二) 亦顯示病毒複製被抑制為主要之抑制作用。IL-6 雖具抑制病毒複製之作用，但是相對的，高量之 IL-6 亦對宿主細胞產生嚴重的毒害，造成腦脊髓炎、心肺水腫 (EV71) 及心肌炎 (CVB3) 等嚴重之致病性。因此，特別值得注意的，蚤休 95% 乙醇萃取物有助於感染病毒宿主細胞之 IL-1 β (對 infected-RD) 及 IL-8 (infected-RD 及 infected-Hela) 大幅降低，也就是說，萃取物具有降低由宿主細胞免疫反應造成之發炎、凋亡及壞死等作用，對降低 EV71 及 CVB3 之嚴重致病性具正面的作用。總之，蚤休 95% 乙醇萃取物兼具雙重功效，一方面誘發宿主細胞產生高量之 IL-6 以對抗病毒，一方面降低 IL-8 及 IL-1 β 之生成，減緩宿主細胞發炎造成之嚴重致病性。

伍、結論及建議

蚤休 95% 乙醇萃取物對腸病毒 71 型及克沙奇 B3 型均顯示出良好之對抗活性。對 EV71 之 IC_{50} 為正對照組 (ribavirin, 一種臨床上對抗病毒之藥物) 之 12.5—23%, 對 CVB3 則與正對照組相似。萃取物對 EV71 及 CVB3 之抑制作用包括預防病毒感染、直接殺死病毒 (或抑制病毒吸附於宿主細胞) 以及抑制病毒之複製作用。蚤休 95% 乙醇萃取物對被 EV71 及 CVB3 感染之宿主細胞, 均會顯著增加 IL-6 及降低 IL-1 β (僅對感染 EV71 之宿主細胞)、IL-8 之含量, 對其他細胞激素 (IL-2、TNF- α 、INF- γ) 及一氧化氮等則無影響。萃取物對 EV71 或 CVB3 之抑制作用與 IL-6 之增加有密切相關性。特別值得注意的是, IL-1 β 及 IL-8 之減少, 可以減緩宿主細胞免疫反應造成發炎之嚴重致病毒害。蚤休 95% 乙醇萃取物具有開發成為對抗腸病毒保健食品材料之高度潛力。

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 CCMP98-RD-029 提供經費贊助, 使本計畫得以順利完成, 特此誌謝。

陸、參考文獻

1. 呂俊毅、黃立民、李慶雲。腸病毒 71 型。臺灣醫學。1999, 3:49-51。
2. 行政院衛生署疾病管制局。傳染病統計暨監視年報。2006。中華民國九十四年。
3. 衛生署食品衛生處。可供食品使用原料：(1) 草本植物類。2009。台北。
4. 何寬其。中草藥抗柯薩奇 B3 病毒實驗研究進展。中國中醫藥信息雜誌。2003, 10 (9): 86-87。
5. 姚瑩。中藥抗柯薩奇 B3 病毒的實驗研究進展。西北醫學雜誌。2005, 20 (4):190-192。
6. 葉彥伯、黃凱琳、許守道、吳聰能、趙黛瑜、李秉穎、何美鄉。1998 年臺灣腸病毒疫情總論。臺灣醫學。1999, 3(1):57-61。
7. 鄭佩雯。九層塔及相關成分之抗病毒及抗癌研究。高雄醫學大學醫學研究所。2003。碩士論文。
8. Brown BA, and Pallanasch MA: Complete nucleotoid sequence of enterovirus 71 is distinct from poliovirus. *Virus Res* 1995 ; 39: 195-205.
9. Chau DHW, Yuan J, Zhang H, Cheung P, Lim T, Liu Z, Sall A, and Yang D: Coxsackievirus B3 protease 2A and 3C induce apoptotic cell death through mitochondrial injury and cleavage of eIF4GI but not DAP5/p97/NAT1. *Apoptosis* 2007 ; 12: 513-524.
10. Chiang LC, Ng LK, Cheng PW, Chiang W, and Lin CC: Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum*. *Clin Experim Pharm Physiol* 2005 ; 32: 811-816.
11. Christine RK, Benjamin M, Marc M, Nathalie DB, Jacques M, Dominique D and Pascal C: Involvement of IL-6 in the anti-human immunodeficiency virus activity of IFN- γ in human macrophages. *Int Immunol* 2005 ; 17 : 1047-1057.
12. Costa D, Marques AP, Reis RL, Lima JLFC, and Fernandes E: Inhibition of human neutrophil oxidative burst by pyrazolone derivatives. *Free Radical Med* 2006 ; 40: 632-640.
13. Dinarello CA: Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2009 ; 27: 519-550.
14. Dodd DA, Giddings Jr TH, and Kirkegaard K: Poliovirus 3A protein limits interleukin-6 (IL-6), IL-8, and beta interferon secretion during viral infection. *J Virol* 2001 ; 75: 8158-8165.

15. Genovese D, Conti C, Tomao P, Desideri N, Stein ML, Catone S, and Fiore L: Effect of chloro-, cyno-, and amidino-substituted flavanoids on enterovirus infection in vitro. *Antivir Res* 1995 ; 27: 123-126.
16. Groarke JM, and Pevear DC: Attenuated virulence of Pleconaril-resistant coxsackievirus B3 Variants. *J Infect Dis* 1999 ; 179: 1538-1541.
17. Guo JP, Pang J, Wang XW, Shen ZQ, Jin, M, and Li JW: *In vitro* screening of traditionally used medicinal plants in China against enteroviruses. *World J Gastroenterol* 2006 ; 12: 4078-4081.
18. Guo L, Su J, Deng BW, Yu ZY, Kang LP, Zhao ZH, Shan YJ, Chen JP, Ma BP, Cong YW: Active pharmaceutical ingredients and mechanisms underlying phasic myometrial contractions stimulated with the saponin extract from *Paris polyphylla* Sm. var. *yunnanensis* used for abnormal uterine bleeding. *Hum Reprod* 2008 ; 964-971.
19. Harrison DN, Gazina EV, Purcell DF, Anderson DA, and Petrou S: Amiloride derivatives inhibit coxsackievirus B3 RNA replication. *J Virol* 2008 ; 82: 1465-1473.
20. Heim A and Weiss S: Interferons in enteroviral heart disease: modulation of cytokine expression and antiviral activity. *Med Microbiol Immunol* 2004 ; 93 : 149–154.
21. Heim A, Zeuke S, Weiss S, Ruschewski W, and Grumbach IM : Transient Induction of Cytokine Production in Human Myocardial Fibroblasts by Coxsackievirus B3. *Circ Res* 2000 ; 86 : 753-759.
22. Henke A, Nestler M, Strunze S, Saluz HP, Hortschansky P, Menzel B, Martin U, Zell R, Stelzner A, and Munder T: The apoptotic capability of coxsackievirus B3 is influenced by the efficient interaction between the capsid protein VP2 and the proapoptotic host protein Siva. *Virology* 2001 ; 289: 15–22.
23. Herbein G, and O'Brien WA: Tumor necrosis factor (TNF)--alpha and TNF receptors in viral pathogenesis. *Pro Soc Exp Biol Med* 2000 ; 223: 241-257.
24. Hsieh WS, Yang PH, Chu SM, Lin TY, Ning HC, and Yeh TF: Clinical manifestations of coxsackievirus in neonates: Comparative analysis between neonates with coxsackievirus B1 and B3 infections. *Pediatr Res* 1997 ; 41: 222A.
25. Hsu HW, Wang JH, Liu CL, Chen CS, and Wang YC: Anti-enterovirus activity of Taiwanese medicinal plants. Submitted to *Indian J Med Res* for

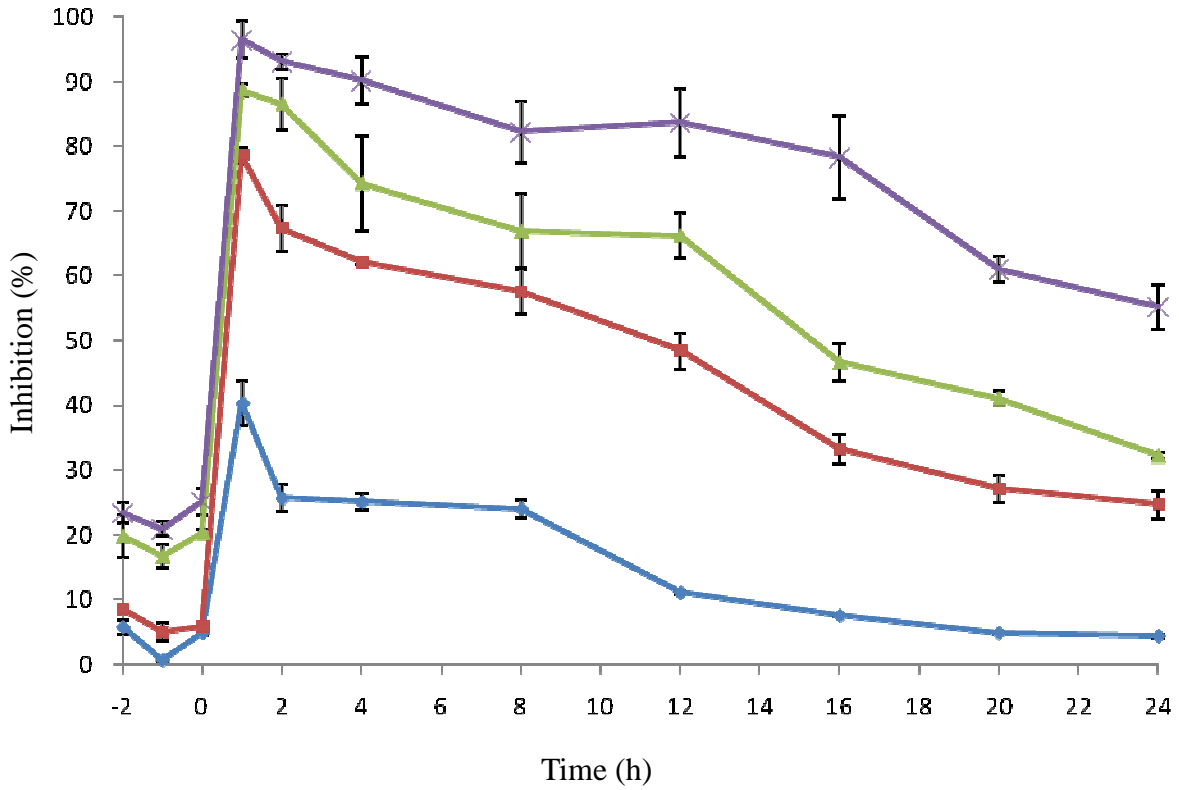
- publishing*, 2009.
26. Huang J, Otoole PW, Doing P, Trust TJ: Stimulation of interleukin-8 production in epithelial cell lines by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1995 ; 63: 1732-1738.
 27. Khetsuriani N, LaMonte-Fowlkes A, Oberste S, and Pallansch M: Enterovirus Surveillance-United States, 1970-2005. *Surveillance Summaries* 2006 ; 55: 1-20.
 28. Kim KS, Hufnagel G, Chapman NM, and Tracy S: The group B coxsackieviruses and myocarditis. *Rev Med Virol* 2001; 11: 355-368.
 29. Li ML, Hsu TA, Chen TC, Chang SC, Lee JC, Chen CC, Stollar V, and Shih SR: The 3C protease activity of enterovirus 71 induces human neural cell apoptosis. 2002 ; *Virology* 293: 386-395.
 30. Li Y, Leung KT, Yao F, Ooi LS, and Ooi VE: Antiviral flavans from the leaves of *Pithecellobium clypearia*. *J Nat Prod* 2006 ; 69: 833-835.
 31. Li Y, Jiang R, Ooi LS, But PP, and Ooi VE: Antiviral triterpenoids from the medicinal plant *Schefflera heptaphylla*. *Phytother Res* 2007 ; 21: 466-470.
 32. Li ZH, Li CM, Ling P, Shen FH, Chen SH, Liu CC, Yu CK, and Chen SH: Ribavirin reduces mortality in enterovirus 71-infected mice by decreasing viral replication. *J Infect Dis* 2008 ; 197: 854-857.
 33. Lin CW, Eu CF, Hsiao NW, Chang CY, Li SW, Wan L, Lin YJ, and Lin WY: Aloe-emodin is an interferon-inducing agent with antiviral activity against Japanese encephalitis virus and enterovirus 71. *Intl J Antimicrob Ag* 2008 ; 2: 355-359.
 34. Lin TY, Chu C, and Chiu CH: Lactoferrin inhibits enterovirus 71 infection of human embryonal rhabdomyosarcoma cells in vitro. *J Infect Dis* 2002a ; 186: 1161-1164.
 35. Lin TY, Chang LY, Huang YC, Hsu KH, Chiu CH, and Yang KD. Different proinflammatory reactions in fatal and non-fatal enterovirus 71 infections: implications for early recognition and therapy. *Acta Paediatr* 2002b ; 91: 632-635.
 36. Lin YC, Juan HC, and Cheng YC: Ozone exposure in the culture medium inhibits enterovirus 71 virus replication and modulates cytokine production in rhabdomyosarcoma cells. *Antivir Res* 2007; 76: 241-251.
 37. Lin YL, Huang YL, and Ma SH: Inhibition of Japanese encephalitis virus infection by nitric oxide: antiviral effect of nitric oxide on RNA virus

- replication. *J Virol* 1997 ; 71: 5227-5235.
38. Liang CC, Sun MJ, Lei HY, Chen SH, Yu CK, Liu CC, Wang JR, and Yeh TM: Human endothelial cell activation and apoptosis induced by enterovirus 71 infection. *J Med Virol* 2004 ; 74: 597-603.
 39. Makarov VA, Riabova OB, Granik VG, Wutzler P, and Schmidtke M: Novel [(biphenyloxy)propyl]isoxazole derivatives for inhibition of human rhinovirus 2 and coxsackievirus B3 replication. *J Antimicrob Chemother* 2005 ; 55: 483-488.
 40. Mizuki I, Shimoyama T, Fukuda S, Liu Q, Nakaji S, and Munakata A: Association of gastric epithelial apoptosis with the ability of *Helicobacter pylori* to induce a neutrophil oxidative burst. *J Med Microbiol* 2000 ; 49: 521-524.
 41. Morens DM, and Pallansch MA. In: Rotbart, H.A. (Ed.), Human Enterovirus Infections, Epidemiology. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA 1995, pp. 3-23.
 42. Muir P, Kammerer U, and Korn K: Molecular typing of enterovirus current status and future requirements. *REV Clin Microbiol* 1998; 11: 202-207.
 43. Neuzil KM, and Graham BS: Cytokine release and innate immunity in respiratory viral infection. *Virology* 1996 ; 7: 255-264.
 44. Noach LA, Bosma NB, Jansen J, Hoek FH, van Deventer SJH, and Tytgat GNJ: Mucosal tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and interleukin-8 production in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol* 1994 ; 29: 425-429.
 45. Ning HC, Taso KC, and Shih SR: Laboratory diagnosis of enterovirus infection in Chang Gung memorial Hospital during 1998 summer outbreak. *Bulletin of Association of Laboratory Medicine*, ROC 1998; 13: 56.
 46. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, and Anversa P: Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 1997 ; 336: 1131-1141.
 47. Ouellet A, Sherlock R, Toye B, and Fung KF: Antenatal diagnosis of intrauterine infection with coxsackievirus B3 associated with live birth. *Infec Dis Obstet Gynecol* 2004 ; 12: 23-26.
 48. Ramshaw IA, Ramsay AJ, Karupiah G, Rolph MS, Mahalingam S, and Ruby JC: Cytokines and immunity to viral infections. *Immunol Rev* 1997 ; 159: 119-135.

49. Schmidtke M, Gluck B, Merkle I, Hofmann P, Stelzner A, Gemsa D: Cytokine profiles in heart, spleen, and thymus during the acute stage of experimental coxsackievirus B3-induced chronic myocarditis. *J Med Virol* 2000 ; 61: 518-526.
50. Shen WC, Tsai C, Chiu H, and Chow K: MRI of Enterovirus 71 myelitis with monoplegia. *Neuroradiology* 2000 ; 42: 124-127.
51. Shi L, Xiong H, He J, Deng H, Li Q, Zhong Q, Hou W, Cheng L, Xiao H and Yang Z: Antiviral activity of arbidol against influenza A virus, respiratory syncytial virus, rhinovirus, coxsackie virus and adenovirus *in vitro* and *in vivo*. *Arch Virol* 2007 ; 152: 1447-1455.
52. Shia KS, Li WT, Chang CM, Hsu MC, Chern JH, Leong MK, Tseng SN, Lee CC, Lee YC, Chen SJ, Peng KC, Tseng HY, Chang YL, Tai CL, and Shih SR. Design, synthesis, and structure-activity relationship of pyridyl imidazolidinones: a novel class of potent and selective human enterovirus 71 inhibitors. *J Med Chem* 2002 ; 45: 1644-1655.
53. Shih SR, Tsai KN, Li YS, Chueh CC, and Chan EC: Inhibition of enterovirus 71-induced apoptosis by allophycocyanin isolated from a blue-green alga *Spirulina platensis*. *J Med Virol* 2003; 70: 119-125.
54. Seo SH, and Webster RG: Tumor necrosis factor alpha exerts powerful anti-influenza virus effects in lung epithelial cells. *J Viro* 2002 ; 76: 1071-1076.
55. Su M, Li Y, Leung KT, Chen Y, Li T, Chen R, and Ooi VE: Antiviral activity and constituent of *Ardisia chinensis* benth against coxsackie B3 virus. *Phytother Res* 2006 ; 20:634-639.
56. Szalay G, Meiners S, Voigt A, Lauber J, Spieth C, Speer N, Sauter M, Kuckelkorn U, Zell A, Klingel K, Stangel K, and Kandolf R: Ongoing coxsackievirus myocarditis is associated with increased formation and activity of myocardial immunoproteasomes. *Am J Pathol* 2006 ; 168: 1542-1552.
57. Tait S, Salvati AL, Desideri N, and Fiore L: Antiviral activity of substituted homoisoflavonoids on enteroviruses. *Antivir Res* 2006; 72: 252-255.
58. Tu PV, Thao TT, Perera D, Huu TK, Tien NTK, Thuong TC, How OM, Cardosa MJ, and McMinn PC: Epidemiologic and virologic investigation of hand, foot, and mouth diseases, southern vietnam, 2005. *Emerg Infect Dis* 2005 ; 13:1733-1741.

59. Wang H, Ding Y, Zhou J, Sun X, and Wang S: The *in vitro* and *in vivo* antiviral effects of salidroside from *Rhodiola rosea* L. against coxsackievirus B3. *Phytomedicine* 2009 ; 16: 146-155.
60. Wang SM, Lei HY, Huang MC, Su LY, Lin HC, Yu CK, Wang JL, and Liu CC: Modulation of cytokine production by intravenous immunoglobulin in patients with enterovirus 71-associated brainstem encephalitis. *J Clin Virol* 2006 ; 37: 47-52.
61. Wang YX, Cunha V, Vincelette J, White K, Velichko S, Xu Y, Gross C, Fitch, RM, Halks-Miller M, Larsen BR, Yajima T, Knowlton KU, Vergona R, Sullivan ME, Croze E: Antiviral and myocyte protective effects of murine interferon- β and - $\alpha 2$ in coxsackievirus B3-induced myocarditis and epicarditis in Balb/c mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007 ; H69-H76.
62. Webster ADB: Pleconaril-an advance in the treatment of enteroviral infection in immune-compromised patients. *J Clin Virol* 2005 ; 32: 1-6.
63. Wu BW, Pan TL, Leu YL, Chang YK, Tai PJ, Lin KH, and Horng JT: Antiviral effects of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) against enterovirus 71. *Amer J Chin Med* 2007 ; 35: 153-168.
64. Yan LL, Zhang YJ, Gao WY, Ma SL, Wang Y: *In vitro* and *in vivo* anticancer activity of steroid saponins of *Paris ployphylla* var. *yunnanensis*. *Exp Oncol* 2009 ; 31: 27-32.
65. Zhang XF, Cui Y, Huang JJ, Zhang YZ, Nie Z, Wang LF, Yan BZ, Tang YL, Liu Y: Immuno-stimulating properties of diosgenyl saponins isolated from *Paris polyphylla*. *Bioorg Med Chem Lett* 2007 ; 17: 8-2413.

柒、圖、表

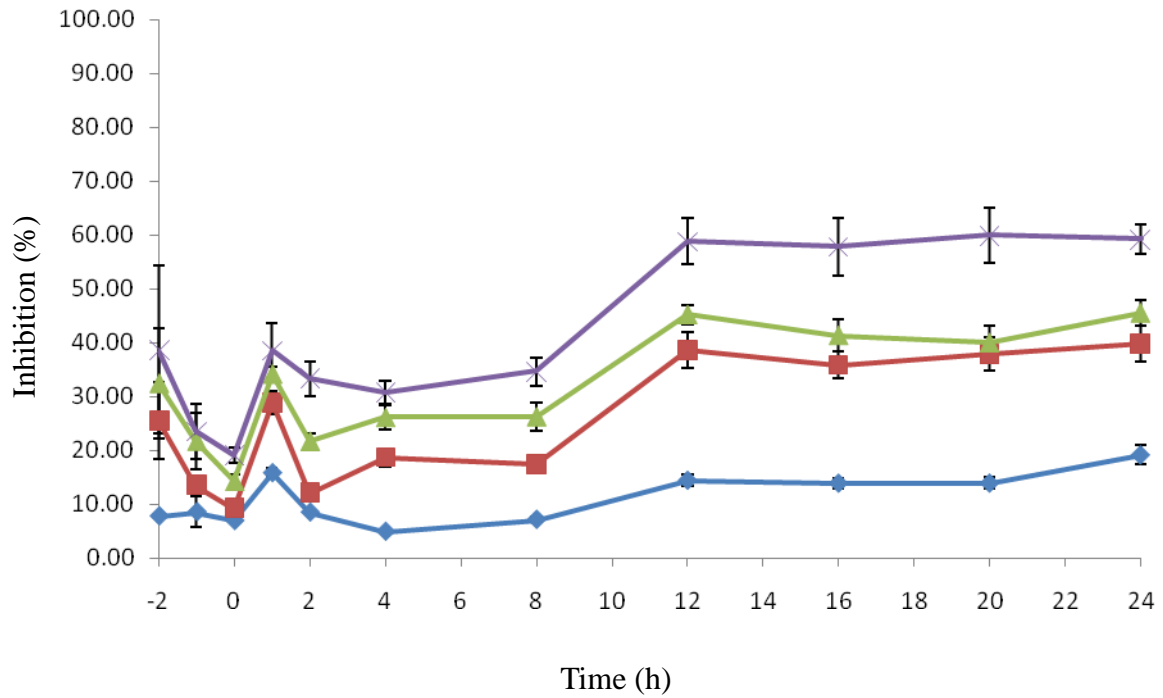


圖一、蚤休 95% 乙醇萃取物對 EV71 ATCC-VR784 之時間點效應

Fig. 1. Time-of-addition assay for the *P. polyphylla* Smith 95% ethanol extract against EV71 ATCC VR-784. The extract was added to the cell monolayers at pre- (-1, -2 h), co- (0 h) and post (1-24 h) infections at the concentrations of 31.25 (-■-), 62.5(-■-), 125 (-■-), and 200 (-■-) µg/mL. Data points represented are mean ± SD (n = 3).

蚤休 95% 乙醇萃取物對 EV71 ATCC-VR784 之時間點效應

Time (h)	Inhibition (%)			
	31.25 $\mu\text{g/mL}$	62.5 $\mu\text{g/mL}$	125 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$
-2	b 5.77 \pm 1.16 DE	b 8.59 \pm 0.23 H	a 19.88 \pm 3.28 F	a 23.44 \pm 1.54 E
-1	c 0.70 \pm 0.28 F	c 5.03 \pm 1.34 H	b 16.71 \pm 1.84 F	a 20.91 \pm 1.09 E
0	d 4.92 \pm 0.37 E	c 5.89 \pm 0.55 H	b 20.34 \pm 0.51 F	a 25.17 \pm 2.08 E
1	c 40.39 \pm 3.45 A	c 78.59 \pm 1.26 A	b 88.70 \pm 1.00 A	a 96.51 \pm 2.83 A
2	d 25.68 \pm 2.06 B	c 67.38 \pm 3.61 B	b 86.50 \pm 3.92 A	a 93.13 \pm 1.19 AB
4	d 25.13 \pm 1.34 B	c 62.10 \pm 0.30 C	b 74.39 \pm 7.29 B	a 87.50 \pm 6.02 B
8	d 24.09 \pm 1.35 B	c 57.57 \pm 3.38 D	b 66.90 \pm 5.73 C	a 82.24 \pm 4.77 C
12	d 11.12 \pm 0.30 C	c 48.45 \pm 2.76 E	b 66.23 \pm 3.46 C	a 83.69 \pm 5.21 C
16	d 7.57 \pm 0.17 D	c 33.25 \pm 2.20 F	b 46.69 \pm 2.93 D	a 78.31 \pm 6.42 C
20	d 4.90 \pm 0.18 E	c 27.15 \pm 2.02 G	b 41.10 \pm 1.08 D	a 61.07 \pm 1.95 D
24	d 4.46 \pm 0.27 E	c 24.74 \pm 2.17 G	b 32.24 \pm 0.51 E	a 55.22 \pm 3.51 D

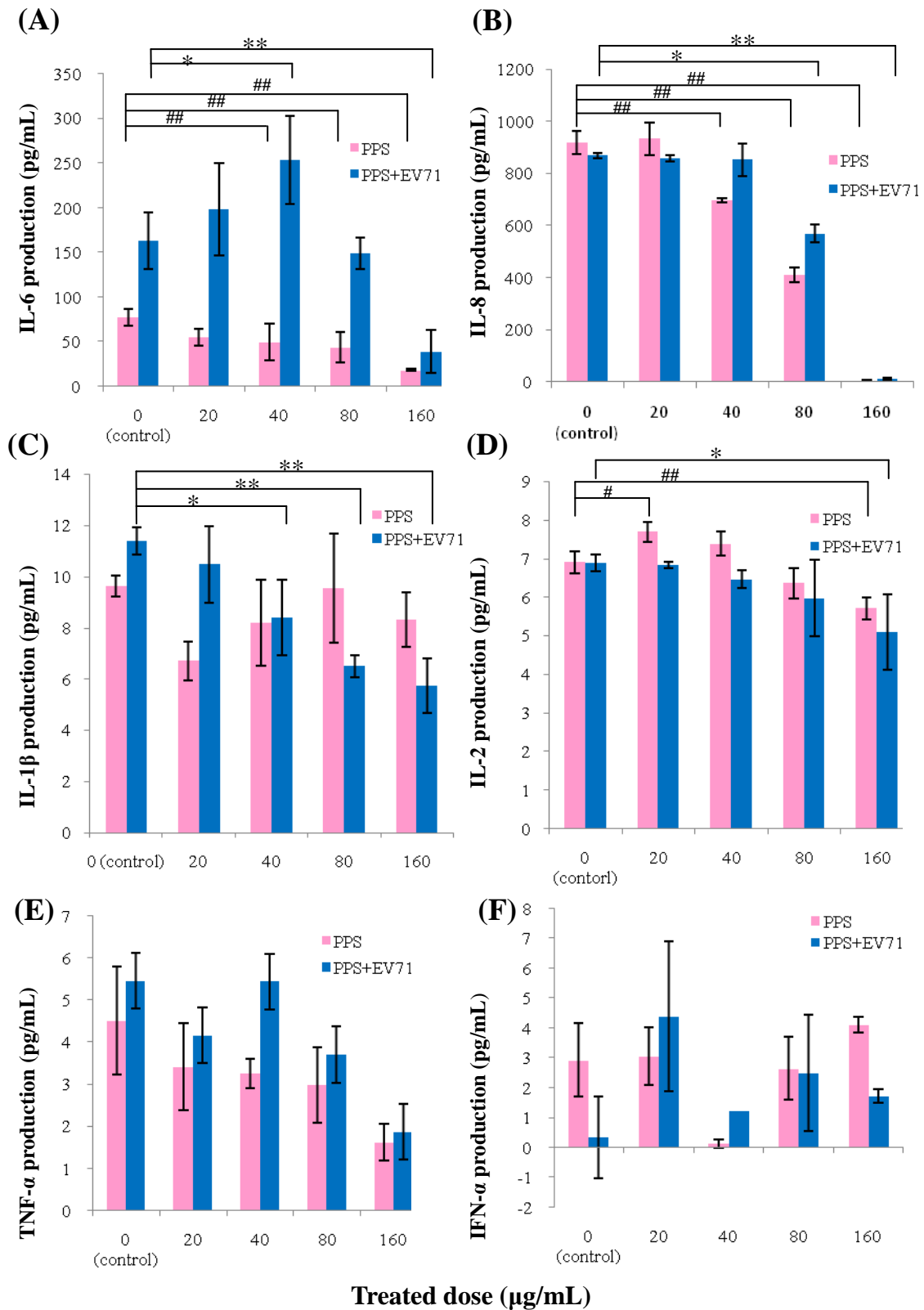


圖二、蚤休 95% 乙醇萃取物對 CVB3 KMHU-034189 之時間點效應

Fig. 2. Time-of-addition assay for the *P. polyphylla* Smith 95% ethanol extract against CVB3 KMHU-034189. The extract was added to the cell monolayers at pre- (-1, -2 h), co- (0 h) and post (1-24 h) infections at the concentrations of 50 (-■-), 100 (-■-), 150 (-■-), and 200 (-■-) µg/mL. Data points represented are mean ± SD (n = 3).

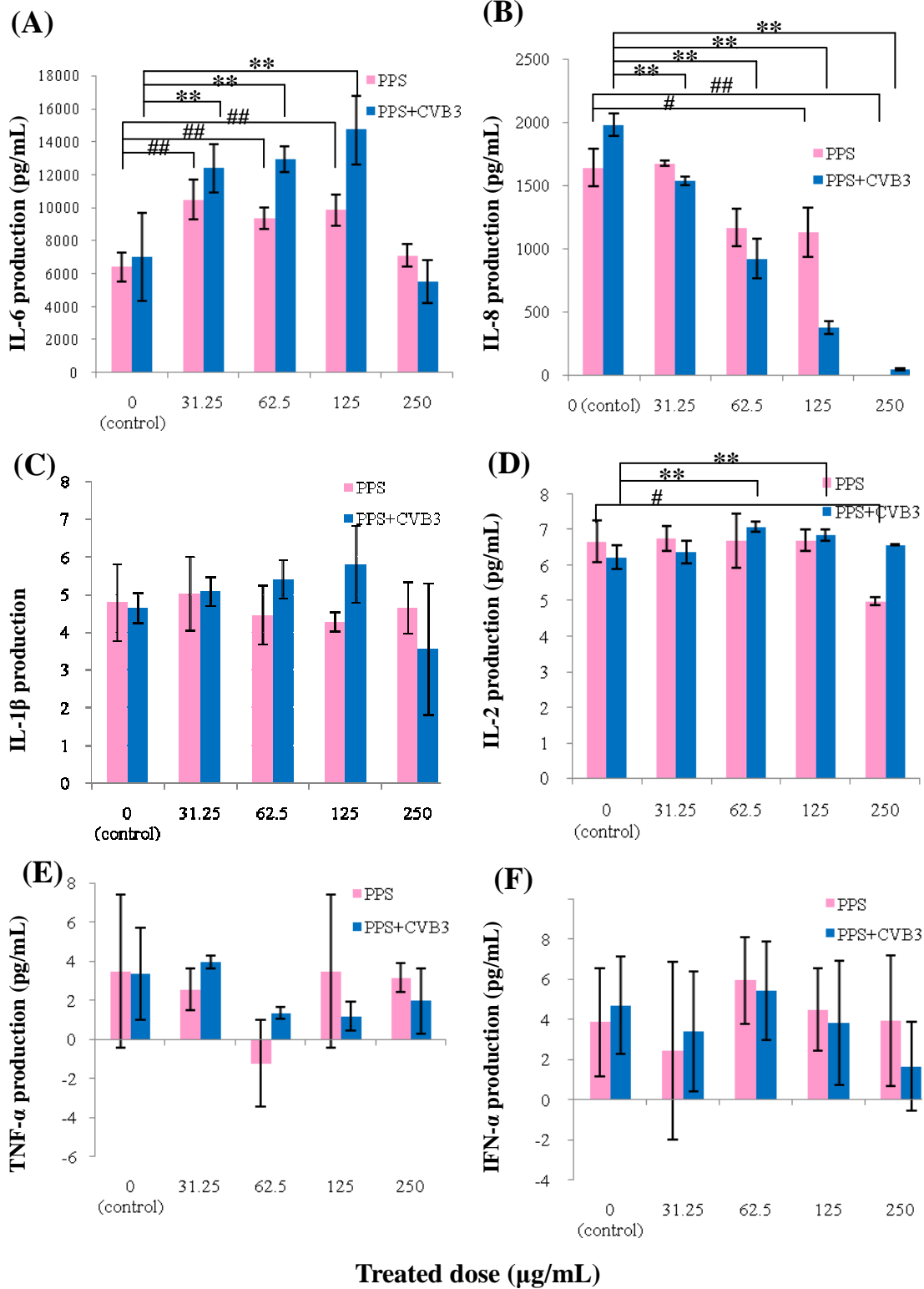
蚤休 95% 乙醇萃取物對 CVB3 KMUH-034189 之時間點效應

Time (h)	Inhibition (%)			
	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	150 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$
-2	b 7.83 ± 0.36 C	b 13.38 ± 1.14 B	a 32.50 ± 10.19 CD	a 38.66 ± 15.60 B
-1	b 8.61 ± 2.95 C	b 13.55 ± 0.94 DE	a 21.73 ± 5.30 E	a 23.56 ± 5.60 CD
0	d 6.96 ± 0.11 CD	c 9.19 ± 0.63 E	b 14.27 ± 1.32 F	a 19.04 ± 1.43 D
1	c 15.18 ± 0.74 B	b 28.88 ± 2.10 B	a 34.22 ± 1.30 BC	b 30.73 ± 1.47 B
2	d 8.51 ± 0.30 C	c 12.16 ± 0.06 DE	b 21.69 ± 1.45 E	a 33.38 ± 3.20 BC
4	d 4.93 ± 0.01 D	c 18.67 ± 1.64 CD	b 26.13 ± 2.27 DE	a 30.78 ± 2.12 BC
8	d 7.11 ± 0.62 C	c 17.40 ± 1.06 CD	b 26.28 ± 2.57 DE	a 34.64 ± 2.63 B
12	d 14.47 ± 1.05 B	c 38.56 ± 3.30 A	b 42.56 ± 2.97 A	a 58.85 ± 4.21 A
16	c 13.93 ± 0.93 B	b 35.90 ± 2.50 A	b 41.39 ± 2.90 A	a 57.85 ± 5.31 A
20	c 13.95 ± 1.08 B	b 37.58 ± 3.12 A	b 40.06 ± 3.19 AB	a 58.93 ± 6.39 A
24	d 16.30 ± 0.89 A	c 39.86 ± 3.37 A	b 43.78 ± 1.48 A	a 59.18 ± 2.74 A



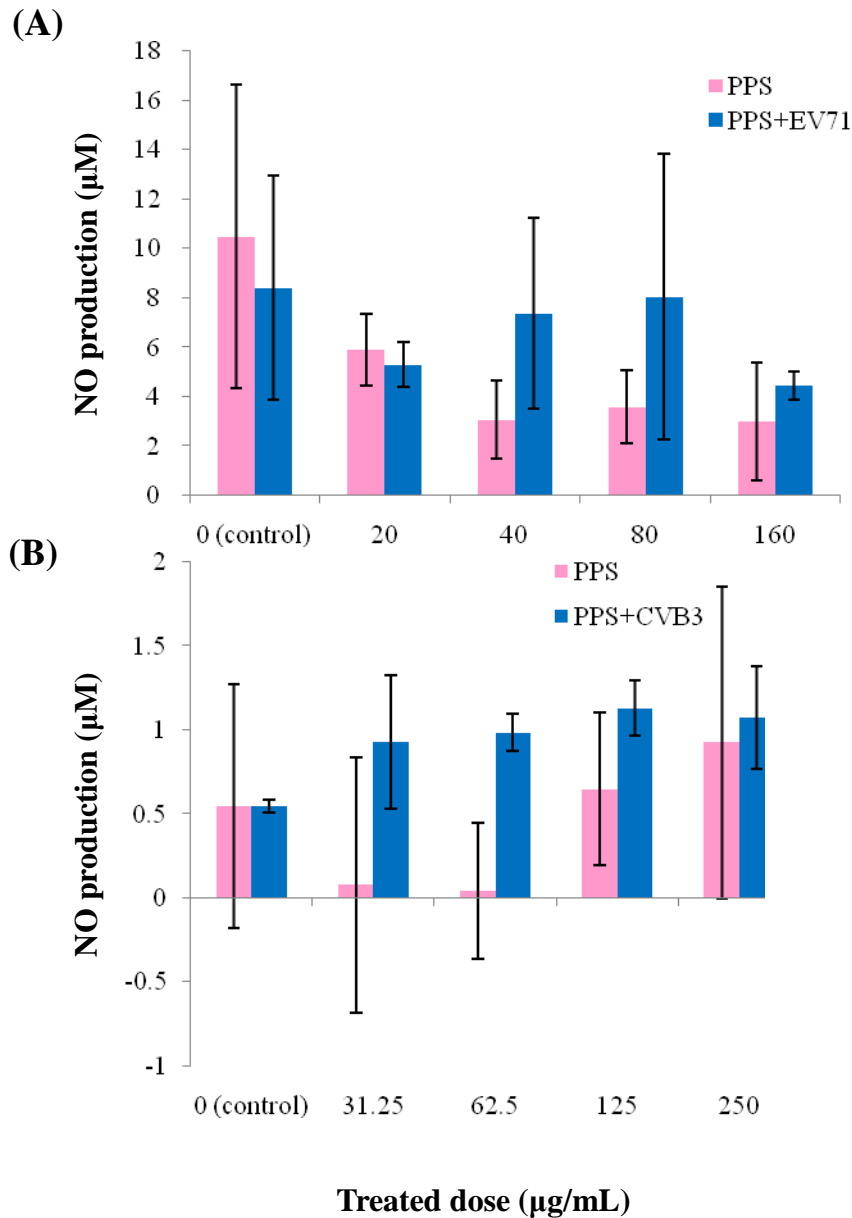
圖三、蚤休 95% 乙醇萃取物對感染 EV71 ATCC-VR784 之 RD 細胞細胞激素產生量之影響

Fig. 3 Effect of the *P. polyphylla* Smith 95% ethanol extract on the cytokines of (A) IL-6, (B) IL-8, (C) IL-1β, (D) IL-2, (E) TNF-α, and (F) IFN-α productions in the EV71 ATCC VR784-infected (-■-) and mock-infected (-□-) RD cells. Bars represented are mean ± SD (n = 3), which are labeled with single and double symbols showing significant difference from the controls at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.



圖四、蚤休 95% 乙醇萃取物對感染 CVB3 KMUH 034189 之 RD 細胞細胞激素產生量之影響

Fig. 4 Effect of the *P. polyphylla* Smith 95% ethanol extract on the cytokines of (A) IL-6, (B) IL-8, (C) IL-1β, (D) IL-2, (E) TNF-α, and (F) IFN-α productions in the CVB3 KMUH 034189-infected (-■-) and mock-infected (-■-) HeLa S3 cells. Bars represented are mean ± SD (n = 3), which are labeled with single and double symbols showing significant difference from the controls at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.



圖五、蚤休 95% 乙醇提取物對 EV71 ATCC-VR784 及 CVB3 KMUH-034189 誘發一氧化氮之影響

Fig. 5 Effect of the *P. polyphylla* Smith 95% ethanol extract on the nitric oxide production in the EV71 ATCC VR784 or CVB3 KMUH 034189-infected (-■-) and mock-infected (-□-) cells. Bars represented are mean \pm SD (n = 3), which are labeled with single and double symbols showing significant difference from the controls at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

表一、蚤休 95% 乙醇萃取物對 HeLa S3 及 RD 細胞之 CC_{50} Table 1 CC_{50} for the *P. polyphylla* Smith (PPS) 95% ethanol extract against RD and HeLa S3 cells

Cell line	CC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ^a	
	PPS 95% ethanol extract	Ribavirin
RD	744.77 \pm 9.05	2593.37 \pm 183.22
HeLa S3	522.25 \pm 19.29	2120.94 \pm 125.20

^a Values are mean \pm SD, each value was obtained from three individual experiments in triplicates per experiment.

表二、蚤休 95% 乙醇萃取物對腸病毒 71 型及克沙奇 B3 型之 IC_{50} 及選擇指數，EV71 以中和試驗法，CVB3 以病毒斑減少分析法Table 2 IC_{50} and SI for the *P. polyphylla* Smith 95% ethanol extract against EV71 and CVB3. A neutralization method and plaque reduction assay were used for EV71 and CVB3, respectively.

Enterovirus	PPS extract		Ribavirin	
	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ^a	SI ^b	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ^a	SI ^b
EV71				
ATCC-VR784	78.46 \pm 2.80	9.49	338.15 \pm 3.68	7.67
CMUH-527-1	119.21 \pm 6.71	6.25	1000.00 \pm 0.00	2.59
CMUH-V4079	125.00 \pm 0.00	5.96	509.68 \pm 11.86	5.09
CMUH-627-14	92.79 \pm 2.98	7.32	1024.08 \pm 41.71	2.53
CVB3				
KMUH -92225	154.55 \pm 4.19	3.38	130.35 \pm 1.28	16.27
KMUH-034189	126.39 \pm 1.44	4.13	127.23 \pm 6.29	16.67
KMUH-K516	150.84 \pm 6.70	3.46	96.70 \pm 5.72	21.38
KMUH-99168	197.15 \pm 4.93	2.65	161.98 \pm 4.31	13.09

^a Values are mean \pm SD, each value was obtained from three individual experiments in triplicates per experiment.

^b Selective index (SI), CC_{50}/IC_{50} . The CC_{50} for the *P. polyphylla* Smith 95% ethanol extract against RD and HeLa S3 cells were 744.77 \pm 9.05 and 522.25 \pm 19.29 $\mu\text{g/ml}$, respectively; and for ribavirin were 2593.37 \pm 183.22 and 2120.94 \pm 125.20 $\mu\text{g/ml}$, respectively.