

編號：CCMP97-RD-208

魚腥草抗單純皰疹病毒作用機制之研究

李君男

國立臺灣大學醫學檢驗暨生物技術學系

摘要

單純皰疹病毒(Herpes simplex virus, HSV)是一種普遍潛伏在人體的病毒，多數人都感染過此種病毒。單純皰疹病毒感染可引起嚴重的腦炎或全身性感染等症狀，嚴重者甚至導致死亡。現行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，故急需發展新的藥物以治療單純皰疹病毒之感染。

魚腥草為一天然中草藥，已有文獻指出魚腥草對於某些病毒感染(如流感病毒)具有抑制效果。本實驗室於 2001 年也曾經利用魚腥草測試其抑制 HSV-1 之效果。實驗結果已初步證實魚腥草對於 HSV-1 的感染具有抑制效果，本研究的目標為了解魚腥草是否對第二型單純皰疹病毒(HSV-2)感染也具有抑制作用，並進一步探討其抑制單純皰疹病毒之機轉。

利用溶斑減少試驗首先發現魚腥草初萃提取物除了可以抑制 HSV-1 之外，另外對於 HSV-2 以及 Acyclovir resistant HSV-1 (HSV-AR)也具有很好的抑制效果。接下來進一步將魚腥草初萃提取物依據分子量分成 1000 Dalton 以下、1000-3000 Dalton 之間、3000 Dalton 以上三個部分，發現三個部分皆具有抗病毒的成分，但其中以 1000 Dalton 以下的部分抑制效果最好。另外魚腥草對於人類喉癌 HEp-2 細胞株以及人類肺癌細胞 A549 有很低的毒性，同時也可抑制 HSV 在 HEp-2 以及 A549 細胞中的感染。

而在魚腥草抑制病毒機制研究方面，結果顯示魚腥草可經由直接和病毒顆粒作用而抑制病毒進入細胞。此外，在病毒進入細胞後，魚腥草也可能是經由抑制細胞 NF- κ B 活化而減少 NF- κ B 結合至 HSV 的 ICP0 基因啟動子(promoter)而抑制 HSV 複製。

分析六種魚腥草成分作用發現其中 B、E 以及 F 具有抗 HSV 活性。其中 B 可以同時抑制病毒進入細胞以及 NF- κ B 活化。

未來將進一步分析魚腥草所含有有效的抑制病毒成份以及對於其抑制病毒的機制進行深入的探討。另外期望利用動物模式將在體外試驗(in vitro)中所觀察到的魚腥草抗單純皰疹病毒效用與機制在活體中進行認證(in vivo)。

關鍵詞：單純皰疹病毒、魚腥草、抗病毒作用、NF- κ B

Number: CCMP97-RD-208

Study the Mechanism of Anti-Herpes Simplex Virus Activity of *Houttuynia Cordata*

Chun-Nan Lee
National Taiwan University

ABSTRACT

Herpes simplex virus (HSV) is a common latent virus in human, and most people have been infected. HSV infection may cause encephalitis or serious systemic symptoms, and even cause death. The drug, acyclovir, for treatment of HSV infection was used increasingly currently and that caused the virus resistant to the drug. It is necessary to develop new drugs for the treatment of HSV infection.

Houttuynia cordata (HC) is a natural Chinese herbal medicine. Some studies have pointed out the inhibitory effect of HC for viral infection. Previously our laboratory showed that HC could inhibit HSV-1 infection. The objectives of this project are to study whether HC could inhibit the infection of HSV-2 and acyclovir (ACV) resistant HSV-1 and to study the anti-viral mechanism of HC for HSV infection.

Our results showed that HC could inhibit the replication of HSV-1 and also HSV-2 and acyclovir (ACV) resistant HSV-1. HC water extract was further divided into three fractions based on the molecular weight (below 1000 Dalton, 1000 to 3000 Dalton, and above 3000 Dalton). The inhibitory effect of the fraction below 1000 Dalton was better than those of the other two fractions. The data further showed that HC had little cytotoxicity for human laryngeal carcinoma HEP-2 cell and human pulmonary epithelial A549 cell, and HC could also inhibit HSV-2 replication in these human cell lines. In the study of the anti-HSV mechanism, we showed that HC could act on virus particles directly before viral entry. In addition, HC could also inhibit HSV-induced NF- κ B activation. Further analysis of six compounds of HC, were found that three had anti-HSV activity. Compound B could inhibit viral entry and NF- κ B activation.

Further studies will be required to explore the anti-HSV mechanism of HC and the mouse model will be used to assess the anti-HSV activity in vivo.

Keywords: Herpes simplex virus, *Houttuynia cordata*, anti-viral activity NF- κ B

壹、前言

病毒感染長久以來都是人類健康及公共衛生上極欲克服的難題。臨床上，許多病毒感染造成的疾病都缺乏有效的藥物，例如困擾國人已久的肝炎病毒，至今仍無藥物可以有效對抗肝炎病毒。另外，2003年由冠狀病毒所引起之嚴重急性呼吸道症候群(SARS)，在短時間內奪走多人性命，有鑑於此，抗病毒藥物的研發確實是一個重要的議題。

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) (20, 21)。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(1,4,5,18)，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。以往抗病毒藥物多半著重於西藥之開發。然而，近年來中草藥對抗病毒之功效已慢慢被注意。2006年10月31日FDA通過第一個由天然植物分離而來的藥物 Veregen™ (Polyphenon®E) 15% Ointment，且已被證實能治療人類乳突狀病毒造成之生殖道疣(25)。

目前有關以中草藥發展抗單純皰疹病毒感染藥物之研究不多，然而由於中草藥漸漸受到重視，近幾年還是有幾篇文獻陸續證實中草藥能對抗單純皰疹病毒之感染(9, 16, 24)。1990年中國大陸曾有一篇研究報告(28)，測試了472種中草藥，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藥，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(11, 12, 27)。

利用體外試驗(in vitro)方法找出魚腥草抗單純皰疹病毒之效用與機制後，將進一步利用體內試驗(in vivo)將體外試驗所得到的抗病毒效用與機制在小鼠模式中作認證(6, 8)。期望將體外試驗結果在小鼠模式中得到證實，並真正應用於所需之抗病毒治療。魚腥草為一天然中草藥，已有文獻指出魚腥草對於某些病毒感染(如流感病毒)具有抑制效果。本實驗室於2001年

也曾經利用魚腥草測試其抑制第一型單純皰疹病毒之效果。實驗結果已初步證實魚腥草對於第一型單純皰疹病毒的感染具有抑制效果，然而先前的研究並未測試 HSV-2 及 acyclovir 抗藥性 HSV-1 且未探討其抑制病毒之機制。目前全世界也缺乏對於魚腥草抗病毒成份及其作用機轉之研究。在此計畫中，我們期望測試魚腥草是否對第二型單純皰疹病毒及 acyclovir 抗藥性 HSV-1 感染也具有抑制作用，並進一步探討其抑制單純皰疹病毒之機轉。最後期望利用動物模式將在體外試驗(in vitro)中所觀察到的魚腥草抗單純皰疹病毒效用與機制在活體中進行認證(in vivo)。

貳、材料與方法

一、萃取中草藥

(一)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 100 g + 1 L ddH₂O

(二)以小火煮沸至體積 400 ml。

(三)離心 3000 rpm、10 分鐘，收取上清液。

(四)藥液再分別以棉花、100 mesh 金屬網、0.2 μ m 過濾膜依序過濾。

(五)分裝至 15 ml 離心管，置於-70°C 保存備用。

(六)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。

二、魚腥草內含成分製備

化合物 A、B、C、D、E 以及 F 皆由 Sigma Aldrich 購買。所有藥物皆溶於 dimethyl sulfoxide (DMSO)。

三、細胞培養

可於體外連續培養之細胞株 Vero 細胞（猴腎細胞）、A549 細胞（人類肺癌細胞）以及 HEP-2 細胞（人類喉癌細胞），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% CO₂ 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。

四、病毒培養

將人類單純皰疹病毒 HSV 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% CO₂ 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。

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

將 3×10⁴ 的 Vero 細胞於 37°C、5% CO₂ 培養箱隔夜培養於 96 孔盤。稀釋魚腥草粗萃取液，最高濃度的魚腥草與 2×濃度的 E-4 (2×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×序列稀

釋。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°C 培養 3 天。加入 MTT (5 mg/ml PBSA) 25 μ l/well，置於 37°C 2 小時。加入 lysis buffer 100 μ l/well，37°C 2 小時後，移至室溫放置 24 小時。以 OD 570 分析。

六、溶斑試驗

度調整到 8×10^5 cells/ml，放入 6-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。稀釋病毒，以 E-2 將 HSV 序列稀釋。緩慢吸去細胞培養基，加入 100 μ l 病毒稀釋液/well，細胞對照組則加 100 μ l E-2，置於 37°C 使病毒吸附 1 小時準備含有 Methylcellulose (MC)之 Overlay medium，2% MC 與 $2 \times E-4$ 以 1:1 的比例混合，加入 2 ml/well，37°C 培養 3 天。加入 1 ml 10% Formalin/well，固定 1 小時。倒掉所有覆蓋液體，滴上 1% crystal violet，染色 10 分鐘。以清水溫和地潤洗，計數溶斑(Plaque-forming unit, PFU)

PFU/ml = (溶斑平均數) \times (1/接種體積) \times (1/稀釋倍數)

七、溶斑減少試驗

度調整到 5×10^5 cells/ml，放入 6 well 細胞培養盤，37°C 培養 24 小時。稀釋病毒，以 E-2 調整病毒濃度至 100 PFU/100 μ l。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°C 使病毒吸附 1 小時。加上含有不同濃度魚腥草粗萃取液的 MC working solution 2 ml/well，37°C 培養 3 天。加入 1 ml 10% Formalin/well，固定 1 小時。倒掉所有覆蓋液體，滴上 1% crystal violet，染色 10 分鐘。以清水溫和地潤洗，計數溶斑。

八、病毒前處理試驗(Virus pretreatment assay)

將 5×10^5 的 Vero 細胞於 37°C、5% CO₂ 培養箱隔夜培養於 6 孔盤。隔天在病毒感染前 3 小時，先將 HSV-1 用培養液稀釋並加入不同濃度的魚腥草使病毒力價為 100 PFU/100 μ l。將病毒和魚腥草在室溫下作用 3 小時。之後將細胞培養液移除，加入已和魚腥草作用過病毒 100 μ l，在 37°C 下感染 1 小時，之後吸去病毒液，再以 2 ml PBS 潤洗細胞三次。再加入 2 ml 不含魚腥草之 MC 覆蓋液。三天後讀取細胞溶斑數。再將加藥物之實驗組與病毒控制組作比較。

九、細胞前處理試驗(Virus pretreatment assay)

將 5×10^5 的 Vero 細胞於 37°C、5% CO₂ 培養箱隔夜培養於 6 孔盤。隔天在病毒感染前 3 小時，先將孔內培養液換成含有不同濃度魚腥草的培養液，在 37°C 下作用 3 小時。3 小時移去上清液，再以 2 ml PBS 潤洗細胞三次。每孔感染 100 PFU/100 μ l 的 HSV-1，在 37°C 下感染 1 小時，之後吸去病毒液，再以 2

ml PBS潤洗細胞三次。再加入2ml不含魚腥草之MC覆蓋液。三天後讀取細胞溶斑數。再將加藥物之實驗組與病毒控制組作比較。

十、病毒吸附試驗(Attachment assay)

將 5×10^5 的Vero細胞於 37°C 、5% CO_2 培養箱隔夜培養於6孔盤。第二天於實驗前先將6孔盤置於 4°C 預冷，1小時後吸去培養液每孔並加入力價含100 PFU/ $100 \mu\text{l}$ HSV-1病毒及特定濃度魚腥草之混合液 $100 \mu\text{l}$ ，病毒控制組則加入不含藥物之病毒液 $100 \mu\text{l}$ ，再將6孔盤置於 4°C 1.5小時，病毒於 4°C 下只能吸附在細胞表面，無法進入細胞。1.5小時後將病毒液吸去並以預冷之磷酸緩衝溶液(PBS)清洗三次以洗去殘餘藥物，再加入2ml不含魚腥草之MC覆蓋液。三天後讀取細胞溶斑數。再將加藥物之實驗組與病毒控制組作比較。

十一、病毒穿透試驗(Penetration assay)

將 5×10^5 的Vero細胞於 37°C 、5% CO_2 培養箱隔夜培養於6孔盤。第二天於實驗前先將6孔盤置於 4°C 預冷，1小時後吸去培養液，每孔並加入力價含100 PFU/ $100 \mu\text{l}$ HSV-1病毒，在 4°C 下吸附2小時，之後吸去病毒液，每孔加入1ml含有魚腥草的培養液， 37°C 培養15分鐘，以允許病毒穿透細胞膜。之後吸去培養液，每孔加入1ml酸性PBS (pH 3)作用1分鐘，將細胞外上外穿透細胞膜的病毒去活化，再以1 ml PBS潤洗細胞三次以中和酸鹼性。之後每孔加入2ml不含魚腥草之MC覆蓋液。三天後讀取細胞溶斑數。再將加藥物之實驗組與病毒控制組作比較。

十二、藥物加入作用時間點試驗(Time-of-addition)

將 5×10^5 的Vero細胞於 37°C 、5% CO_2 培養箱隔夜培養於6孔盤。第二天吸去培養液，每孔感染1 MOI的病毒。在 37°C 下感染1小時，之後吸去病毒液，再以2 ml PBS潤洗細胞三次。0小時組加入2 ml含有1 mg/ml的魚腥草培養液，其餘組則加入不含魚腥草的培養液。分別在感染後的不同時間點吸去細胞上清液，以2 ml PBS潤洗細胞，加入2 ml含有1 mg/ml的魚腥草培養液。24小時之後，將細胞上清液移去，以PBS潤洗細胞，利用Trypsin將細胞打下，懸浮於1 ml培養液。在 -80°C 下冰凍解凍三次。以5000rpm離心10分鐘，將上清液保存在 -80°C 。利用溶斑試驗定量不同時間點加藥的病毒量。

十三、病毒 RNA 萃取(Viral RNA extraction)

將Vero細胞以 5×10^5 cells/well種於六孔盤，待隔日細胞長滿後以1MOI之病毒感染細胞。病毒吸附1小時後將病毒液吸起，並補入含1mg/ml魚腥草之維持培養液1 ml，病毒控制組則補入維持培養液。置於 37°C 培養箱培養，分別在之後的第2、10、及24小時以trypsin將各組細胞打下收於1.5ml微量離心管，以2500 rpm離心10分鐘後將trypsin移除並以 $200 \mu\text{l}$ 維持培養液將細

胞混勻暫時冰於4°C保存。之後將細胞離心並移去維持培養液，再加入1mlTRIzol Reagent混合均勻後置於室溫5分鐘，再加入0.2 ml氯仿(Chloroform)並劇烈混合15秒後靜置於室溫3分鐘，再以12000 rpm於4°C離心15分鐘。將上層含RNA之水溶液移至新的1.5 ml 微量離心管並加入0.5 ml異丙醇(isopropanol)混合均勻後靜置於室溫10分鐘，再以12000 rpm於4°C離心10分鐘後去除上清液。以1 ml 75%酒精清洗沉澱於管底之RNA，再以7500 rpm於4°C離心5分鐘後小心的移去酒精，並利用真空抽乾5分鐘將RNA 乾燥，再以20 μ l DEPC水(去除RNase 之二次水)回溶RNA。為去除DNA 的干擾，RNA中可再加入5 μ l DNase I、3 μ l 10X DNase buffer再補DEPC水至體積30 μ l，置於37 °C水浴槽作用20分鐘後，再加入50 mM EDTA 3.5 μ l於75°C水浴槽作用10分鐘後可將RNA保存於-80°C。

十四、反轉錄酶(Reverse transcription)反應

以上述步驟所萃取的 RNA 作為模板，利用 Oligo(dT)₁₅，以反轉錄酵素(reverse transcriptase)將所有 RNA 反轉錄為 cDNA。在進行 RNA 反轉錄前須先將 RNA、primers 以 72°C 加熱 10 分鐘破壞可能存在的二級結構。取 5.0 μ l RNA、1 μ l Oligo(dT)₁₅(0.5 μ g/ml)、7 μ l 二次水混合均勻，置入聚合酵素連鎖反應機器以 72°C 加熱 10 分鐘。加熱後置於冰上 5 分鐘。破壞 RNA、primer 之二級結構後，再加入 15 μ l 二次水、5 μ l 反轉錄酶緩衝溶液、5 μ l dNTP、0.25 μ l 反轉錄酶、5 μ l RNase inhibitor，使反轉錄反應之總體積為 50 μ l，置於聚合酵素連鎖反應機器中，反應條件為：42°C—1 小時。接著 72°C—15 分鐘，產物置於-20°C保存。

十五、即時聚合酶連鎖反應(real-time PCR)

將轉好的 cDNA 稀釋成 5ng/ μ l。取 cDNA 2 μ l、特定引子(primer) 1.2 μ l (5mM)、二次水 6.8 μ l 以及 2 X SYBR mix 10 μ l，使反應總體積為 20 μ l。置於即時聚合酵素連鎖反應機器中，反應條件為：50°C—2 分鐘、95°C—5 分鐘、[95°C—15 秒、60°C—1 分鐘]40 個循環、95°C—15 秒、60°C—15 秒以及 95°C—15 秒。

十六、西方墨點法(Western blot)

取出轉漬蛋白完成的 PVDF membrane 放到乾淨的盒子中，加入 10.0 ml blocking buffer，於室溫中反應 2 小時以上。待遮蔽作用完成後，以 PBST 清洗 PVDF membrane 三次，每次 5 分鐘，接著加入 10.0 ml 以 5 % 脫脂奶粉稀釋後的一級抗體，在室溫中反應 2 小時，再以 PBST 清洗三次，再加入 10.0 ml 以 5 % 脫脂奶粉稀釋後的二級抗體，在室溫中反應 2 小時，最後再以 PBST 清洗二次、PBS 清洗一次之後呈色。

參、結果

一、中草藥之細胞毒性試驗

測試經處理後魚腥草粗萃取液對細胞之毒性，將藥液連續兩倍稀釋，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(Control)，即使在所使用之最高濃度(50 mg/ml)，細胞仍然可以維持 50% 以上的活性。

二、魚腥草抑制病毒試驗

首先將大量培養的單純皰疹病毒連續 10 倍稀釋，以溶斑試驗測定病毒之濃度，再將含有 100 PFU 的病毒液在 37°C 下感染 Vero 細胞一小時。洗去病毒液後，加入含有不同魚腥草粗萃取液濃度的 1% MC。三天後讀取細胞溶斑數。圖二顯示測試之結果，魚腥草抑制 HSV-1、HSV-2 以及 AR-HSV-1 的百分之五十感染力之藥液濃度(EC₅₀)分別為 0.692 mg/ml、0.3 mg/ml 以及 1.11 mg/ml。此部份魚腥草粗萃取液抑制單純皰疹病毒之濃度結果總結於表一中。

三、以 cell pretreatment assay 以及 virus pretreatment assay 探討魚腥草抑制 HSV-1 以及 HSV-2 的機制

為了測試魚腥草是經由作用在細胞或是病毒顆粒本身而達到抑制病毒的作用，因此將不同濃度的魚腥草分別和病毒以及細胞在室溫以及 37°C 下作用 3 小時，以 100 PFU 的病毒在 37°C 感染細胞一小時後，以 PBS 洗細胞三次，加入 MC 覆蓋液。3 天後判讀細胞溶斑數。圖三結果顯示低於 IC₅₀ 濃度的魚腥草在室溫下和病毒作用 3 小時後，就可以完全抑制細胞產生溶斑，而將細胞先和魚腥草在 37°C 下作用則無法抑制病毒感染細胞。此結果顯示魚腥草可能是經由直接和病毒顆粒作用而抑制病毒進入細胞。在 HSV-1 以及 HSV-2 皆可以觀察到一樣的結果。為了進一步了解在病毒和魚腥草作用的三小時後，病毒是否已死亡，將 10⁵ PFU 的病毒和不同濃度魚腥草作用三小時，之後將病毒稀釋 1000 倍以降低魚腥草的作用，將稀釋後的病毒感染細胞，此含有 100 PFU 的病毒在 37°C 感染細胞一小時後，以 PBS 洗細胞三次，加入 MC 覆蓋液。3 天後判讀細胞溶斑數。結果顯示，和最高濃度 0.1 mg/ml 魚腥草作用後三小時的病毒，其病毒顆粒仍然具有感染力，顯示魚腥草和病毒作用並不會直接殺死病毒(圖四)。

四、以西方墨點法試驗偵測魚腥草抑制病毒吸附細胞試驗

為了更進一步確認魚腥草是否可以抑制病毒進入細胞，將病毒感染預冷之 Vero 細胞並同時給與不同濃度之魚腥草，待病毒吸附一個半小時後，以預冷之 PBS 將病毒洗去。之後將細胞刮下，以抗病毒 glycoprotein D

(anti-gD)的抗體偵測魚腥草是否可以抑制病毒貼附在細胞上。圖五顯示隨著魚腥草濃度增加，病毒貼附到細胞上的量會越來越少，顯示魚腥草的確可以抑制病毒貼附在細胞上。

五、魚腥草抑制 HSV 吸附細胞以及穿透細胞試驗

根據藥物作用時間點的結果，魚腥草應該是在病毒感染細胞的前期抑制了 HSV 感染 Vero 細胞。因此進一步探討魚腥草抑制病毒進入的機制。將病毒感染預冷之 Vero 細胞並同時給予不同濃度之魚腥草，待病毒吸附一個半小時後，以預冷之 PBS 將病毒洗去，並加入不含魚腥草的培養液。如此一來可針對病毒吸附細胞的過程是否被抑制來做探討。結果顯示有加魚腥草的實驗組有效的抑制住 CPE 的生成。而在魚腥草抑制 HSV 穿透細胞試驗方面，利用病毒於 4°C 下只能吸附在細胞表面，無法穿透細胞的特性。先將病毒液與細胞於 4°C 作用一段時間，之後再加入藥物並將已被病毒吸附之細胞於 37°C 培養。結果顯示魚腥草同時也可以抑制病毒穿透細胞（圖六）。已知 ACV 不會抑制細胞吸附，做為實驗控制組。

六、藉由偵測核內 VP16 蛋白質以及質內 ICP4 蛋白質表現觀察魚腥草抑制病毒吸附及穿透細胞試驗

先前文獻指出，當 HSV 進入細胞後，病毒的 VP16 蛋白質會從細胞質轉移到細胞核內，同時病毒的急早期(immediate early)蛋白質 ICP4 會在細胞質內表現。根據此特性，分別在病毒吸附以及穿透細胞時加入魚腥草，之後將細胞收下，萃取細胞核蛋白質以及細胞質蛋白質分別以西方墨點法偵測病毒 VP16 以及 ICP4 蛋白質表現，藉此確認魚腥草是否會抑制病毒吸附以及穿透細胞。圖七顯示，隨著魚腥草濃度增加，病毒 VP16 蛋白質以及 ICP4 蛋白質表現量可看到被抑制的現象。顯示魚腥草確實可以抑制病毒吸附以及穿透細胞。

七、魚腥草抑制病毒 gD 蛋白質吸附細胞試驗

HSV 的 Glycoprotein D (gD)可以和宿主細胞表面蛋白質結合而調控病毒進入細胞內，是病毒進入細胞很重要的一個蛋白質，為了瞭解魚腥草是否會經由結合病毒 gD 蛋白質而抑制病毒進入細胞，因此利用桿狀病毒系統(Baculovirus)表現 HSV-2 的 gD 蛋白質。將 $10^{-5} \mu\text{g}/\text{cell}$ 的重組 gD 蛋白質加入 Vero 細胞內，在 37°C 下作用 1 小時，以 PBS 潤洗細胞三次，之後將細胞刮下，以西方墨點法偵測魚腥草是否可以抑制 gD 蛋白質結合到細胞上。圖八結果顯示隨著魚腥草濃度增加，抑制 gD 蛋白質結合到細胞上的作用就更加明顯。由此實驗推論魚腥草可能是經由結合病毒 gD 蛋白質而抑制病毒進入細胞內。另外為了證明魚腥草是否抑制 gD 蛋白質結合到細胞上而並非抑制 gD 蛋白質表現，將 gD 蛋白質與不同濃度魚腥草在 37°C 下作用 1 小時，

利用西方墨點法分析 gD 蛋白質的量（圖九），推測魚腥草並不會改變 gD 蛋白質的量。

八、藥物作用時間點試驗

為了更進一步了解魚腥草抑制病毒的機制，利用藥物作用時間點試驗探討魚腥草抑制 HSV 的時間點。以 1 MOI 的 HSV-1 感染細胞一小時，在感染後的不同時間點加入 1 mg/ml 的魚腥草，於 24 小時後將細胞上清液移去，再以 trypsin 將細胞打下，懸浮於培養液後，冰凍解凍三次將病毒釋放出，最後利用溶斑試驗定量病毒。圖十顯示，在經過感染 12 小時後加魚腥草，仍然可以抑制 98% 以上的病毒量，因此推測魚腥草除了可以抑制病毒進入細胞外，也有可能可以抑制病毒在細胞內的複製。

九、利用免疫螢光試驗(Immunofluorescence assay)魚腥草抑制病毒蛋白質合成試驗

目前推測魚腥草除了可以抑制病毒進入細胞外，可能也可以抑制病毒在細胞內的複製。為了瞭解魚腥草是抑制病毒複製的何一步驟，將分別根據病毒蛋白質合成以及不同時期基因表現來探討。首先研究魚腥草是否會抑制病毒蛋白質合成。以 1 MOI 的 HSV 感染細胞一小時，等病毒進入細胞後以 PBS 潤洗除去未進入細胞內的病毒，之後加入 1 mg/ml 的魚腥草，24 小時以後將細胞收下，點在玻片上，待細胞風乾固定後，以抗 HSV (anti-HSV) 的抗體偵測病毒蛋白質表現。結果顯示加入魚腥草後，病毒的螢光量減少很多(圖十一)，顯示魚腥草可以有效抑制病毒蛋白質的合成。

十、以即時聚合酶連鎖反應(real-time PCR)偵測魚腥草抑制不同時期 HSV 基因表現

目前已知魚腥草可在病毒進入細胞後抑制病毒蛋白質表現，為了更進一步探討魚腥草是抑制蛋白質合成前的何一步驟，因此利用 real-time PCR 分別偵測病毒急早期(immediate early)、早期(early)以及晚期(late)基因的表現，以得知魚腥草是抑制病毒複製何一步驟。以 1 MOI 的 HSV 感染細胞一小時，等病毒進入細胞後以 PBS 洗去未進入細胞內的病毒，加入 1 mg/ml 的魚腥草，分別在感染後 2、10 以及 12 小時收下細胞，抽取細胞 RNA，轉成 cDNA 後以 real-time PCR 分別偵測病毒急早期、早期以及晚期基因的表現。圖十二顯示魚腥草可以抑制 HSV-1 晚期基因(UL13)高達 1000 倍，而對於早期基因(UL52)也有 300 倍的差異。偵測四種急早期基因發現，魚腥草可抑制 HSV-1 的 ICP0 基因表現，而對於其他三個急早期基因(ICP22、ICP27 以及 ICP47)則沒有抑制情形(圖十三)。而在 HSV-2 也可以觀察到一樣的現象(圖十四)。推測魚腥草可能是經由抑制病毒急早期基因 ICP0 表現而達到抑制病毒在細胞內複製。

十一、以西方墨點法偵測魚腥草抑制 HSV 感染所引起的細胞 NF- κ B 活化

目前研究顯示魚腥草可能是經由抑制 HSV 急早期基因 ICP0 來抑制病毒在細胞內的複製。先前文獻指出，魚腥草可以抑制 stem cell factor 所引起的 NF- κ B 活化(10)，而另一文獻也指出 NF- κ B 可以經由結合到 HSV ICP0 的啟動子(promoter)上幫助 HSV 的複製(7)。因此推論魚腥草可以抑制 NF- κ B 的活化而抑制 HSV ICP0 表現，因而抑制病毒複製。以 1 MOI 的 HSV 感染細胞一小時，等病毒進入細胞後以 PBS 洗去未進入細胞內的病毒，加入不同濃度的魚腥草，在感染後 3 小時將細胞收下，抽取細胞核蛋白質，以西方墨點法偵測魚腥草是否可以抑制 NF- κ B 的活化。圖十七顯示隨著魚腥草濃度增加，NF- κ B 的抑制也有增加的現象，顯示魚腥草可以抑制 HSV 感染所引起的細胞 NF- κ B 活化。

十二、探討魚腥草對人類細胞株之毒性以及其抑制 HSV-1 感染人類細胞株的活性

先前所有的實驗都是在猴腎細胞株 Vero 上所進行，為了瞭解魚腥草對人類細胞是否具有毒性，因此選用了 A549 細胞(人類肺癌細胞)以及 HEp-2 細胞(人類喉癌細胞)。首先以 MTT 試驗研究魚腥草對此兩株細胞的毒性。將魚腥草連續兩倍稀釋，加在預先培養好之細胞上，以 MTT 試驗來測試。結果顯示，魚腥草對於 A549 以及 HEp-2 細胞的毒性作用和 Vero 細胞上類似，與細胞對照組比較 (Control)，即使在所使用之最高濃度(50mg/ml)，細胞仍然可以維持 50% 以上的活性(圖十八)。接下來利用溶斑減少試驗探討魚腥草是否可以抑制 HSV 在人類細胞(A549、HEp-2)內的感染。此部份魚腥草粗萃取液抑制單純皰疹病毒之濃度結果總結於表一中。

十三、以溶斑減少試驗分析不同分子量魚腥草抗 HSV 活性分析

為了進一步探討在魚腥草中具有抗 HSV 活性的成分，使用 QuixStand 系統進一步將魚腥草初萃取物依據分子量分成 1000 Dalton 以下、1000-3000 Dalton 之間、3000 Dalton 以上三個部分。利用溶斑減少實驗進一步分析此三種不同分子量的魚腥草抗 HSV 活性。結果顯示此三個部分皆具有抗病毒的成分，但其中以 1000 Dalton 以下的部分抑制效果最好($EC_{50}=0.069$ mg/ml)。而 1000-3000 Dalton 之間以及 3000 Dalton 以上的 EC_{50} 則分別為 0.183 mg/ml、0.564 mg/ml。此部份魚腥草抑制單純皰疹病毒之濃度結果總結於表一中。

十四、以溶斑減少試驗分析不同魚腥草成分抗 HSV 活性分析

根據目前文獻指出，魚腥草內所含成分已經大致了解。大部分的物質分子量都在 1000 Dalton 以下，因此接下來將進一步分析這些分子中的抗 HSV 活性以及其機制。本實驗選定了六種成分進行分析。首先利用溶斑減

少實驗分析此六種不同分子的抗 HSV 活性。根據表二顯示，在這六種分子中，B、E 以及 F 具有抗 HSV-1 以及 HSV-2 的活性。

十五、以病毒前處理試驗以及西方墨點法分析不同魚腥草成分抑制 HSV 吸附細胞

根據之前結果顯示魚腥草可以經由直接和病毒顆粒作用而抑制病毒進入細胞。接下來將進一步分析在魚腥草內是何種成分可以抑制病毒進入細胞。首先將三種確定具有抗 HSV 活性的魚腥草成分利用病毒前處理試驗分析魚腥草的不同成分是否可以抑制病毒進入細胞。將不同濃度的化合物分別和病毒以及細胞在室溫以及 37°C 下作用 3 小時，以 100 PFU 的病毒在 37°C 感染細胞一小時後，以 PBS 洗細胞三次，加入 MC 覆蓋液。3 天後判讀細胞溶斑數。圖十六顯示三種具有抗 HSV 活性之物質中只有 B 可以直接和病毒作用而抑制病毒進入細胞內。利用西方墨點法做進一步確認。將病毒感染預冷之 Vero 細胞並同時給予不同濃度之魚腥草，待病毒在 4°C 下吸附五小時後，以預冷之 PBS 將病毒洗去。之後將細胞刮下，以抗病毒 glycoprotein D (anti-gD) 的抗體偵測魚腥草是否可以抑制病毒進入細胞內。隨著 B 濃度增加，抑制病毒結合到細胞上的作用就更加明顯，而 E 則無法觀察到此現象(圖十九)。顯示 B 確實可以抑制病毒吸附在細胞上。

十六、以西方墨點法分析不同魚腥草成分抑制 HSV 感染所引起的細胞 NF- κ B 活化

魚腥草除了可以經由直接和病毒顆粒作用而抑制病毒進入細胞，在病毒進入細胞後，魚腥草也可以經由抑制細胞 NF- κ B 活化而減少 NF- κ B 結合至 HSV 的 ICPO 基因啟動子(promoter)而抑制 HSV 複製。接下來將分析在魚腥草內是何種成分可以抑制 HSV 感染所引起的細胞 NF- κ B 活化。以 1 MOI 的 HSV 感染細胞一小時，等病毒進入細胞後以 PBS 洗去未進入細胞內的病毒，分別加入不同濃度的化合物，在感染後 3 小時將細胞收下，抽取細胞核蛋白質，以西方墨點法偵測是否可以抑制 NF- κ B 的活化。圖二十顯示 B 可以抑制 NF- κ B 的活化，而 E 則無此明顯抑制現象。

肆、討論

由本研究之結果，顯示魚腥草除了可以抑制 HSV-1 之外，另外對於 HSV-2 以及 Acyclovir resistant HSV-1(HSV-AR)也具有很好的抑制效果。且魚腥草在高濃度時對細胞亦無毒性。

將魚腥草初萃取物依據分子量分成 1000 Dalton 以下、1000-3000 Dalton 之間、3000 Dalton 以上三個部分，發現三個部分皆具有抗病毒的成分，而其中又以 1000 (Dalton)以下的部分抑制效果最好。因為利用 QuixStand 系統分離不同分子量物質時，無法完全將小分子量物質從大分子量中分離出來，故分子量 3000 Dalton 以上可能仍然含有部份的小分子量物質。因此分子量 1000-3000 之間以及 3000 Dalton 以上的抗 HSV 活性有可能是因為分子量 1000 Dalton 以下殘留所導致。另外未來實驗將測試此三種不同分子量成分彼此之間是否具 synergistic effect。

而在魚腥草抑制病毒機制研究方面，結果顯示魚腥草可能可以抑制病毒感染不同步驟。首先在病毒感染前，魚腥草可能經由直接和病毒的 glycoprotein D 結合而抑制病毒進入細胞內。除了 glycoprotein D 可以和宿主細胞表面蛋白質結合並調控病毒進入細胞之外，glycoprotein B 也扮演了重要角色，因此未來將探討魚腥草是否也會結合病毒 glycoprotein B 而抑制 HSV 進入細胞內。在病毒進入細胞後，魚腥草也可以抑制因 HSV 感染所引起的細胞 NF- κ B 活化，進而減少 NF- κ B 結合至 HSV 的 ICPO 基因啟動子 (promoter) 而抑制 HSV 複製。本研究證實了魚腥草確實可以抑制因 HSV 感染所引起的細胞 NF- κ B 活化，然而是否真的有減少 NF- κ B 結合到 HSV ICPO 基因啟動子需要做更進一步的實驗才能證實。

計畫原先是希望利用活性導引追蹤分析具有抗病毒的成分，然而考慮到此方法所需成本及時間甚大，才會考慮先從市面上購買部份化合物成分，未來，一方面會以 HPLC 等方法繼續分析魚腥草其他可能有效物質，另一方面則會尋求在此方面已有成果的專家合作。目前分析六種魚腥草成分作用發現其中三種化合物 B、E 以及 F 具有抗 HSV 活性。其中 B 已被報導具有抗 HSV 的功效(13)，然而其抑制 HSV 的機制尚未被證明。而 E 尚未有文獻指出具有抗 HSV 的活性。本研究指出 B 可以抑制病毒進入細胞以及 NF- κ B 活化，F 與 E 抑制 HSV 的機制目前則尚未了解。B 已知為抗氧化物質，目前有研究指出 B 可以抑制 NF- κ B 活化而有抗氧化的功能。另外在 HSV 感染時也會促使 NF- κ b 活化而增加細胞內氧化壓力，且 HSV 的 ICP27 也可增加細胞內 ROS (reactive oxygen species) 以促使細胞凋亡。而 B 的抗氧化特性和抗病毒活性之間是否具有關連則須待進一步實驗證實。

另外魚腥草對於人類喉癌 HEp-2 細胞株以及人類肺癌細胞 A549 有很低的毒性，顯示此種藥物對於應用到臨床實驗的可行性很高。

未來將進一步分析魚腥草所含有效的抑制病毒成份以及對於其抑制病毒的機制進行深入的探討。另外期望未來利用動物模式將在體外試驗(in vitro)中所觀察到的魚腥草抗單純皰疹病毒效用與機制在活體中進行研究(in vivo)。

伍、結論與建議

由本研究之結果，顯示魚腥草除了可以抑制 HSV-1 之外，另外對於 HSV-2 以及 Acyclovir resistant HSV-1 (HSV-AR) 也具有很好的抑制效果。且魚腥草在高濃度時對細胞亦無毒性。將魚腥草初萃取物依據分子量分成 1000 Dalton 以下、1000-3000 Dalton 之間、3000 Dalton 以上三個部分，發現三個部分皆具有抗病毒的成分，而其中又以 1000 Dalton 以下的部分抑制效果最好。而在魚腥草抑制病毒機制研究方面，結果顯示魚腥草可能可以抑制病毒感染的不同步驟。首先在病毒感染前，魚腥草可能經由直接和病毒的 glycoprotein D 結合而抑制病毒進入細胞內。在病毒進入細胞後，魚腥草也可以抑制因 HSV 感染所引起的細胞 NF- κ B 活化，進而可能減少 NF- κ B 結合至 HSV 的 ICP0 基因啟動子(promoter)而抑制 HSV 複製。本研究證實了魚腥草確實可以抑制因 HSV 感染所引起的細胞 NF- κ B 活化，然而是否真的有減少 NF- κ B 結合到 HSV ICP0 基因啟動子需要做更進一步的實驗才能證實。分析六種魚腥草成分作用發現其中三種具有抗 HSV 活性。B 可以抑制病毒進入細胞以及 NF- κ B 活化，F 與 E 抑制 HSV 的機制目前則尚未了解。未來將進一步考慮此三種成分抗 HSV 申請專利的可能性。另外魚腥草對於人類喉癌 HEp-2 細胞株以及人類肺癌細胞 A549 有很低的毒性，顯示此種藥物有機會應用到臨床試驗。未來將進一步分析魚腥草所含有效的抑制病毒成份以及對於其抑制病毒的機制進行深入的探討。另外外來期望利用動物模式將在體外試驗(in vitro)中所觀察到的魚腥草抗單純皰疹病毒效用與機制在活體中進行研究(in vivo)。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會計畫編號 CCMP97-RD-208 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. 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. Gerald Kleymann et al. 2002. New helicase-primase inhibitors as drug candidates for the treatment of herpes simplex disease. *Nature Medicine*. 8: 392-8
7. Goodkin ML, Ting AT, Blaho JA. 2003. NF-kappaB is required for apoptosis prevention during herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol*. 77:7261-80
8. JAMES J. CRUTE et al. 2002. Herpes simplex virus helicase-primase inhibitors are active in animal models of human disease. *Nature Medicine*. 8: 386-91
9. Khan, M. T. H., A. Ather, K. D. Thompson, and R. Gambari. 2005. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. *Antiviral Res*. 67:107-119.
10. Kim IS, Kim JH, Kim JS, Yun CY, Kim DH, Lee JS. 2007. The inhibitory effect of *Houttuynia cordata* extract on stem cell factor-induced HMC-1 cell migration. *J Ethnopharmacol*. 112(1):90-5.
11. 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.
12. 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.

- 13.L. C. Chiang, W. Chiang, M. C. Liu, C. C. Lin. 2003. In vitro antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related Flavonoids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52 : 194–198
- 14.Li GZ, Chai OH, Lee MS, Han EH, Kim HT, Song CH. 2005. Inhibitory effects of *Houttuynia cordata* water extracts on anaphylactic reaction and mast cell activation. *Biol Pharm Bull.* 28(10):1864-8.
- 15.Lien-Chai Chiang, Jung-San Chang, Chi-Chain Chen, Lean-Teik Ng, Chun-Ching Lin. 2003. Anti-Herpes simplex virus activity of *Bidens pilosa* and *Houttuynia cordata*. *Am J Chin Med.* 31(3):355-62.
- 16.Liu, F., Y. Liu, Y. Meng, M. Yang, and K. He. 2004. Structure of polysaccharide from *Polygonatum cyrtoneura* Hua and the antiherpetic activity of its hydrolyzed fragments. *Antiviral Res.* 63:183-189.
- 17.Lu HM, Liang YZ, Yi LZ, Wu XJ. 2006. Anti-inflammatory effect of *Houttuynia cordata* injection. *J Ethnopharmacol.* 104(1-2):245-9.
- 18.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.
- 19.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.
- 20.Pauls FP, Dowdle WR. 1967. A serologic study of herpes hominis strain by micro-neutralization test. *J Immunol* 98:941-947.
- 21.Plummer G. 1964. Serologic comparison of the herpes viruses. *Brit J Exp Pathol* 45:135-141.
- 22.Tabba 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.
- 23.Tao J, Hu Q, Yang J, Li R, Li X, Lu C, Chen C, Wang L, Shattock R, Ben K. 2007. In vitro anti-HIV and -HSV activity and safety of sodium rutin sulfate as a microbicide candidate. *Antiviral Res.* 75:227-33
- 24.Tolo, F. M., G. M. Rukunga, F. W. Muli, E. N. M. Njagi, W. Njue, K. Kumon, G. M. Mungai, C. N. Muthaura, J. M. Muli, L. K. Keter, E. Oishi, and M. W. Kofi-Tsekpo. 2006. Anti-viral activity of the extracts of a Kenyan medicinal plant *Carissa edulis* against herpes simplex virus. *J Ethnopharmacol.*

104:92-99.

25. W-S Ahn, J Yoo, S-W Huh, C-K Kim, J-M Lee, S-E Namkoong, S-M Bae, I P Lee. 2003. Protective effects of green tea extracts (polyphenon E and EGCG) on human cervical lesions. *Eur J Cancer Prev.* 12(5):383-390
26. Whitley RJ. 1996. Herpes simplex viruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE, editors. *Fields Virology*, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. p 2297-2342.
27. 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.
28. 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.

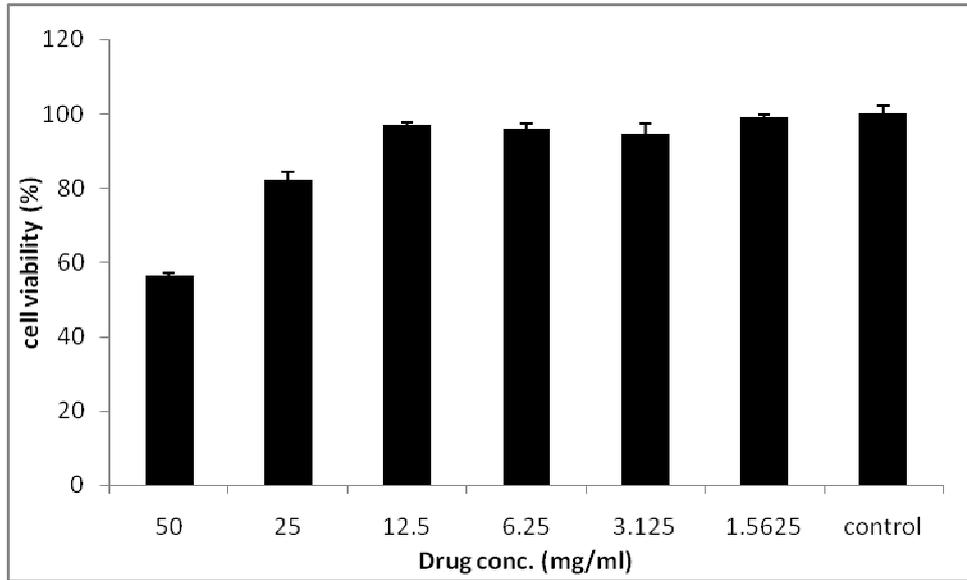
柒、圖、表

表一、魚腥草粗萃取液抑制單純皰疹病毒之劑量

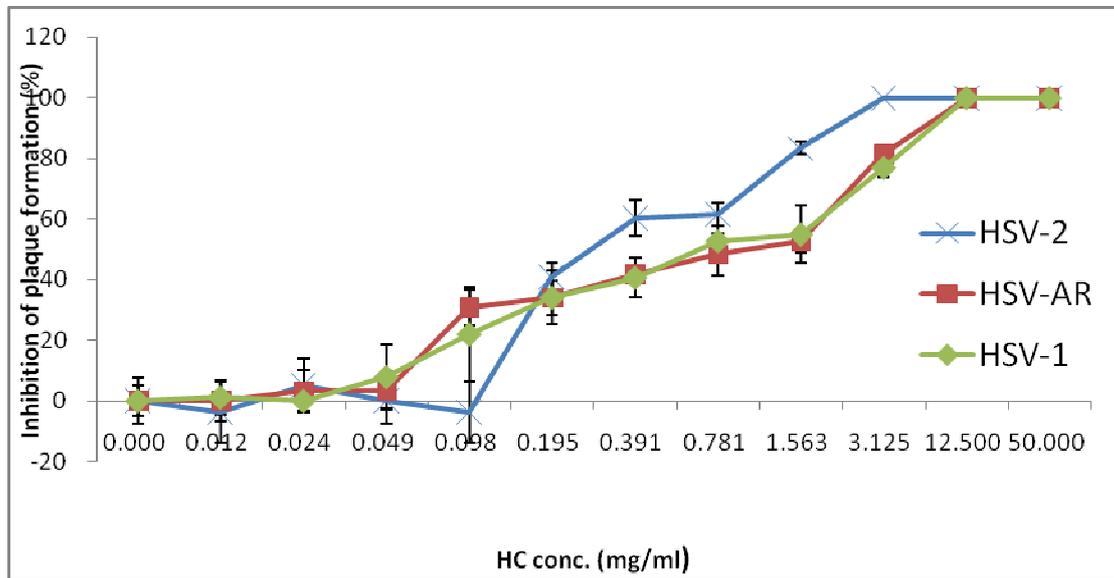
Cell	drug	fraction	CC ₅₀	HSV-2		HSV-AR		HSV-1	
				EC ₅₀	SI	EC ₅₀	SI	EC ₅₀	SI
Vero	Houttuynia cordata (mg/ml)	Crude extraction	>50	0.3	>166.67	1.11	>45.05	0.69	>72.46
		<1000 kDa	>50	0.07	>714.28	-	-	-	-
		1000-3000 kDa	>50	0.18	>277.77	-	-	-	-
		>3000 kDa	>50	0.56	>89.28	-	-	-	-
HEp-2	Houttuynia cordata (mg/ml)	Crude extraction	>50	0.41	>121.9	-	-	-	-
A549	Houttuynia cordata (mg/ml)	Crude extraction	>50	0.31	>161.29	-	-	-	-
Vero	Acyclovir (μg/ml)		>50	0.82	>548.7	14.02	>32.1	0.74	>608.1

表二、不同魚腥草成分抑制單純皰疹病毒之劑量

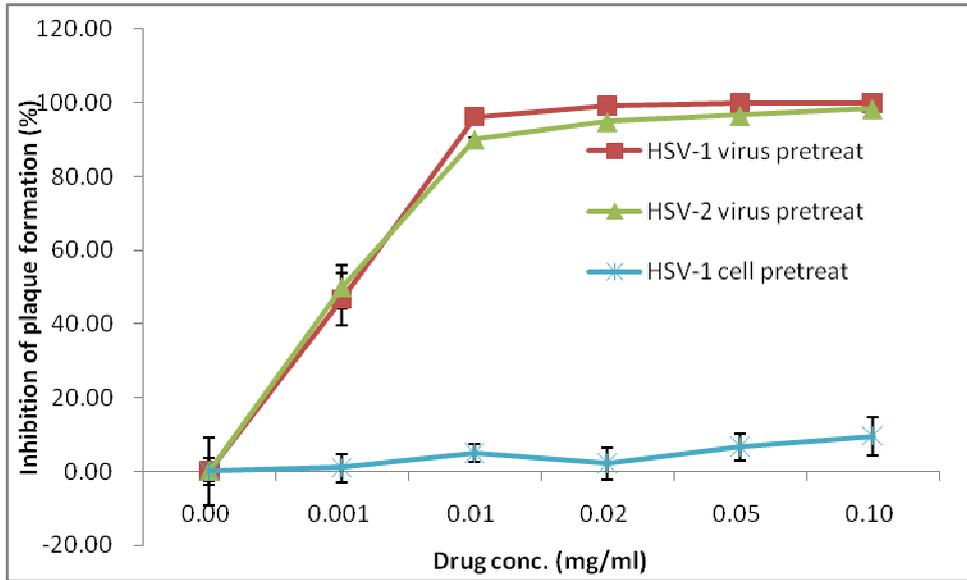
	CC ₅₀ (μg/ml)	HSV-1		HSV-2	
		EC50 (μg/ml)	SI	EC50 (μg/ml)	SI
A	142.16	-	-	-	-
B	485.69	52.9	9.18	70.01	6.94
C	1243.07	-	-	-	-
D	>500	-	-	-	-
E	702.45	187.58	>3.745	169.42	>4.146
F	>200	0.42	>476.2	0.39	>512.8



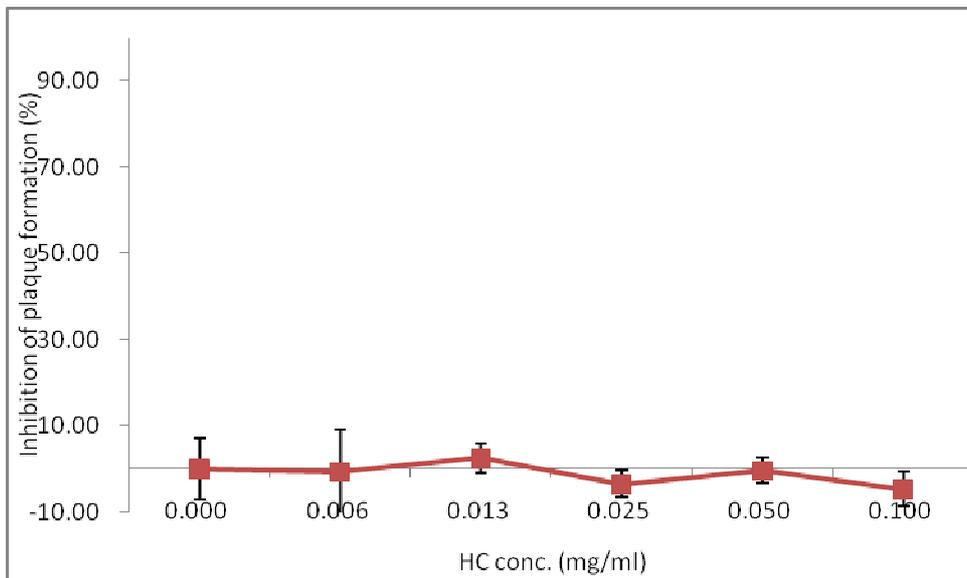
圖一、以 MTT 試驗測試魚腥草對 Vero 細胞之毒性



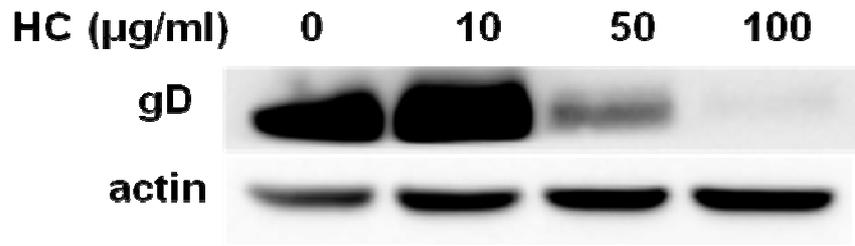
圖二、以溶斑減少試驗測試魚腥草抑制 HSV-1、HSV-2 以及 ACV-HSV-1 之作用



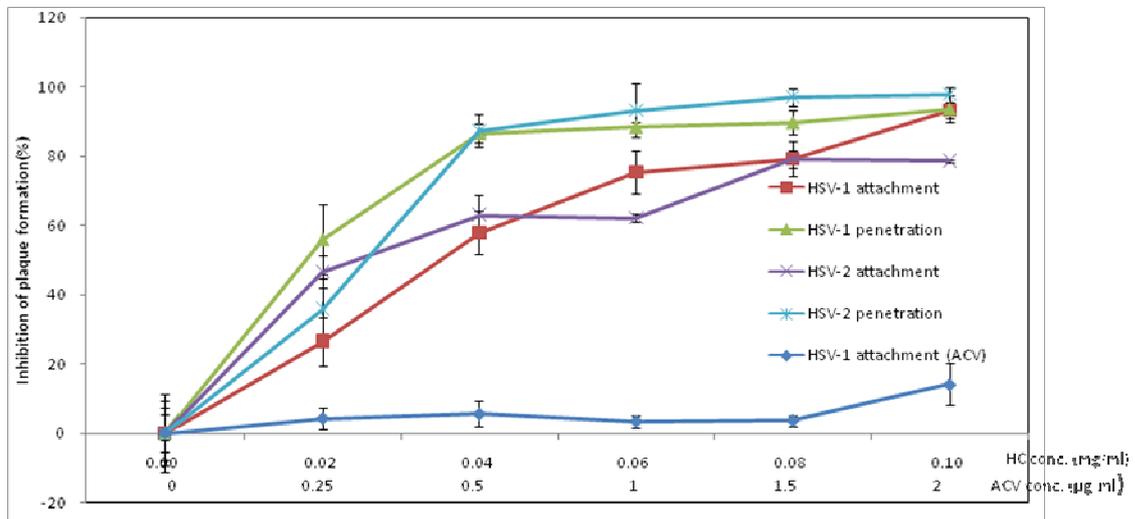
圖三、以 cell pretreatment assay 以及 virus pretreatment assay 探討魚腥草抑制 HSV-1 以及 HSV-2 的機制



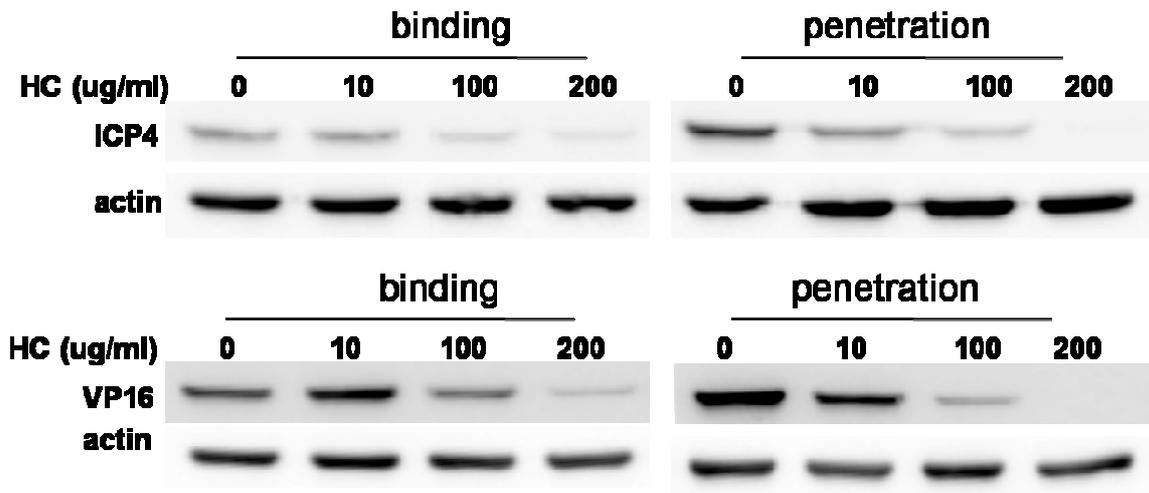
圖四、以溶斑試驗測試魚腥草和病毒作用是否會殺死病毒



圖五、以西方墨點發偵測魚腥草抑制病毒貼附細胞試驗



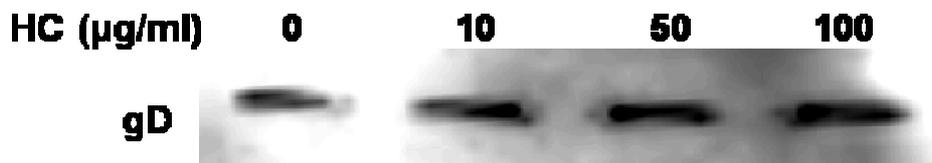
圖六、魚腥草抑制 HSV 吸附細胞以及穿透細胞試驗



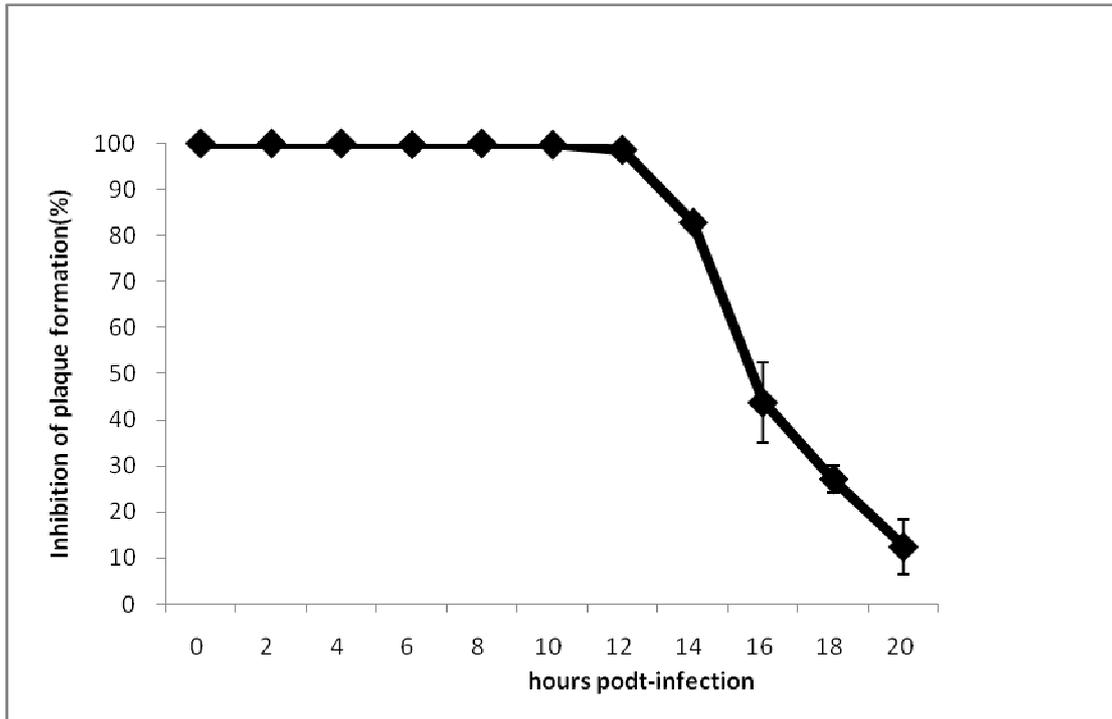
圖七、藉由偵測細胞核內 VP16 以及細胞質內 ICP4 表現觀察魚腥草抑制病毒貼附及穿透細胞試驗



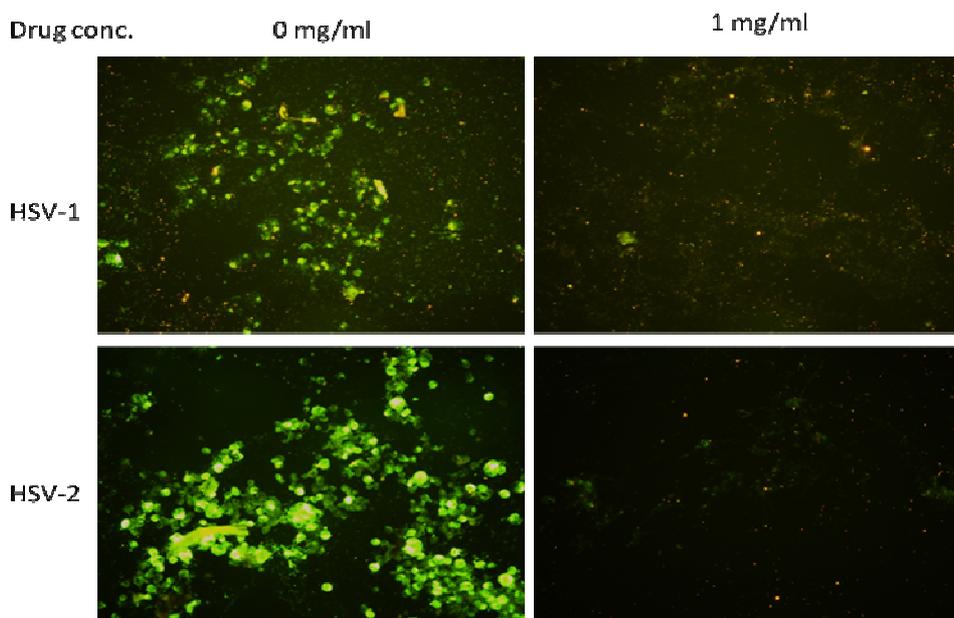
圖八、魚腥草抑制病毒 gD 蛋白質貼附細胞試驗



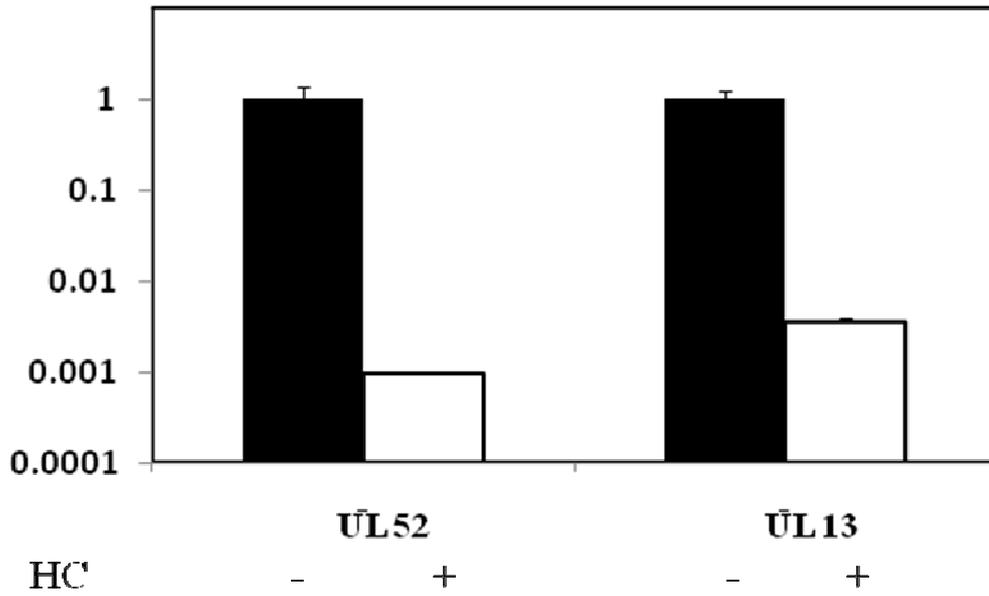
圖九、以西方墨點法分析魚腥草是否會抑制 gD 蛋白質表現



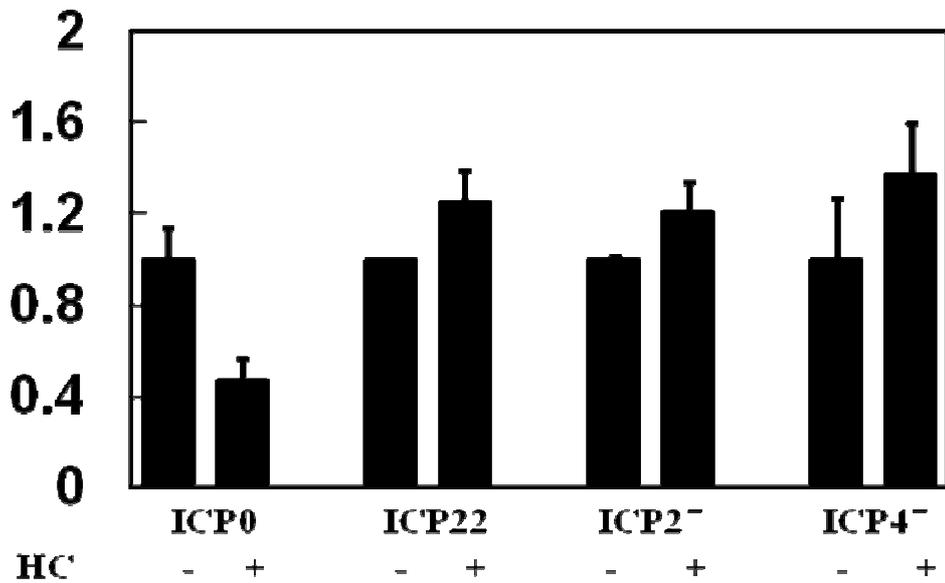
圖十、測試魚腥草抑制 HSV-1 感染的作用時間點試驗



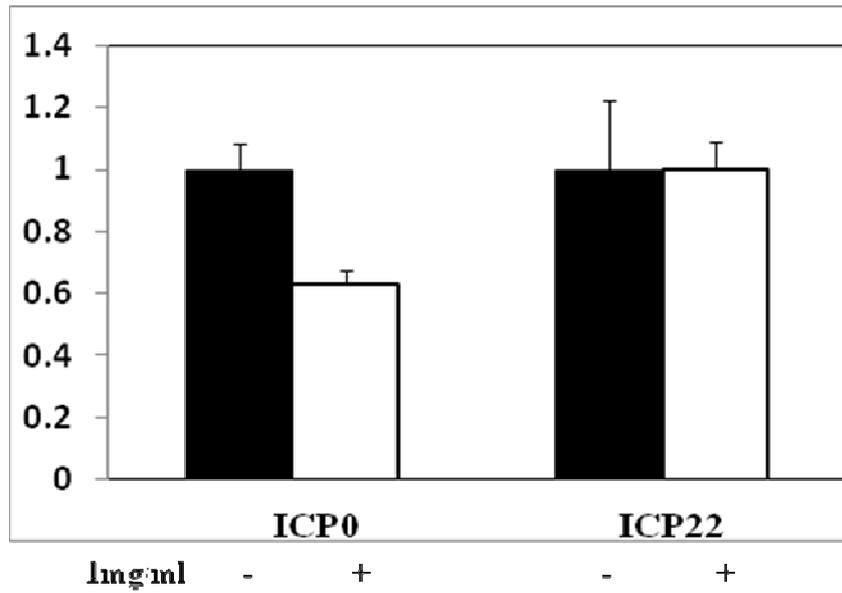
圖十一、利用螢光試驗(Fluorescence assay)偵測魚腥草是否抑制 HSV 蛋白質合成



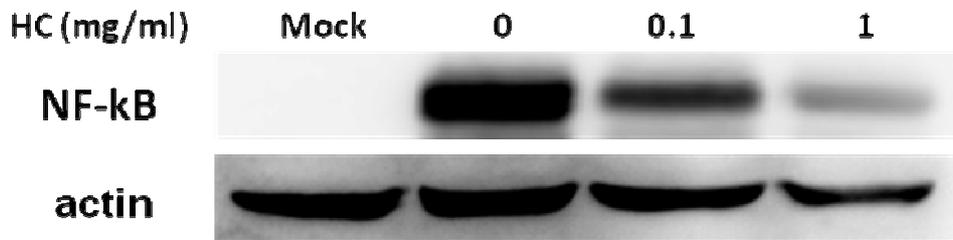
圖十二、以即時聚合酶連鎖反應偵測魚腥草抑制 HSV-1 早期(UL52)及晚期(UL13)基因表現



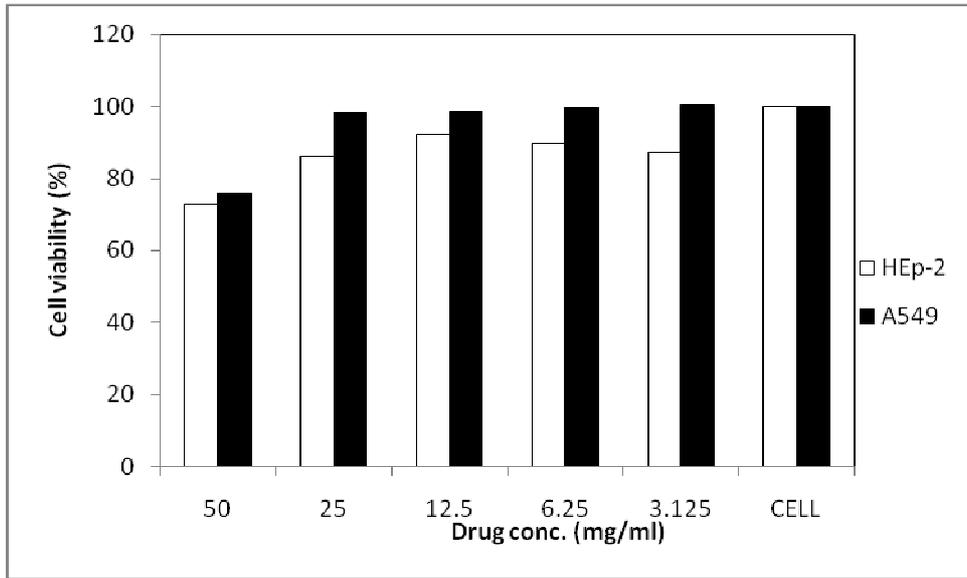
圖十三、以即時聚合酶連鎖反應偵測魚腥草抑制 HSV-1 及早期(ICP0、ICP22、ICP27 以及 ICP47)基因表現



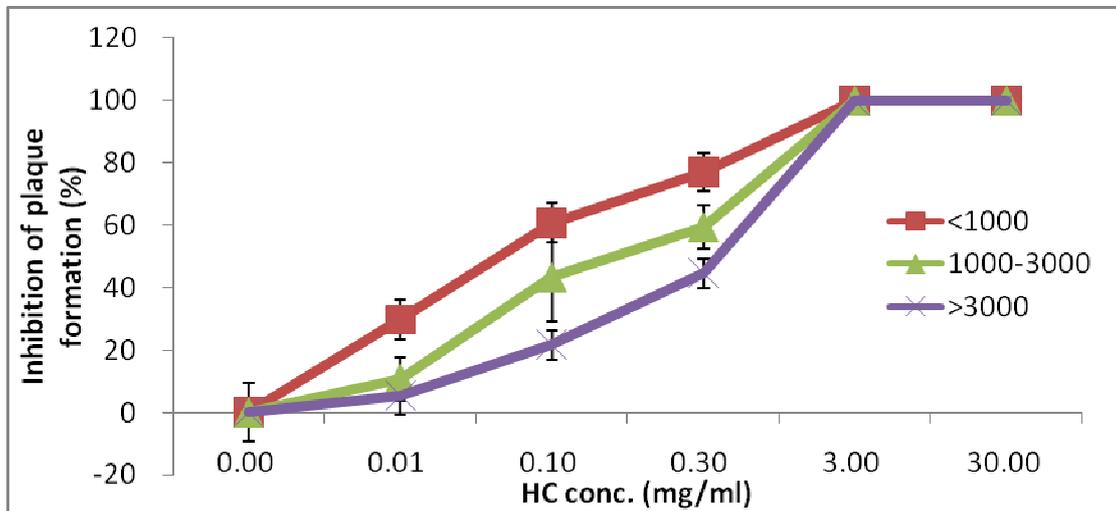
圖十四、以即時聚合酶連鎖反應偵測魚腥草抑制 HSV-2 及早期 (ICP0、ICP22) 基因表現



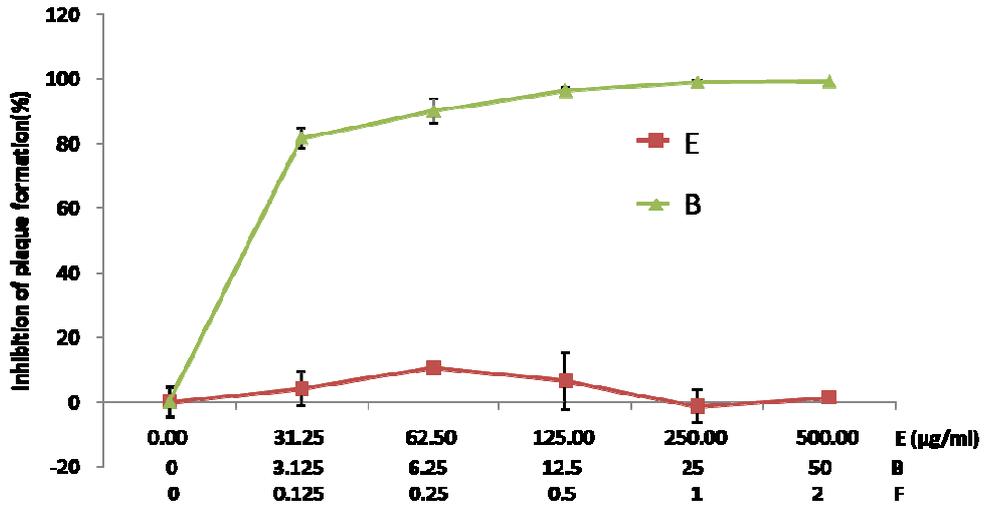
圖十五、以西方墨點法偵測魚腥草抑制 HSV 感染所引起的細胞 NF-κB 活化



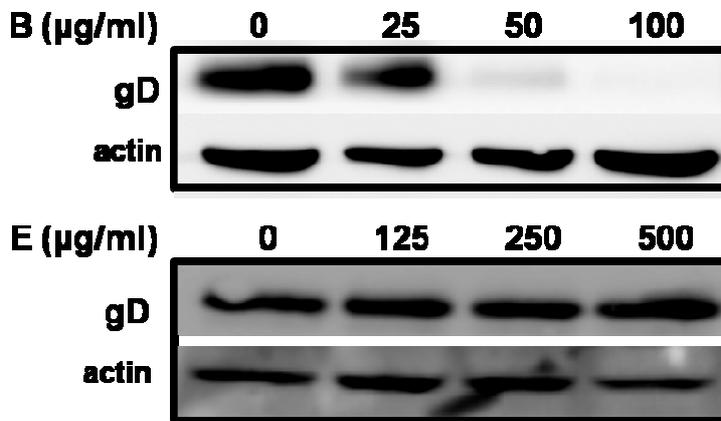
圖十六、以 MTT 試驗測試魚腥草對 HEP-2 以及 A549 細胞之毒性



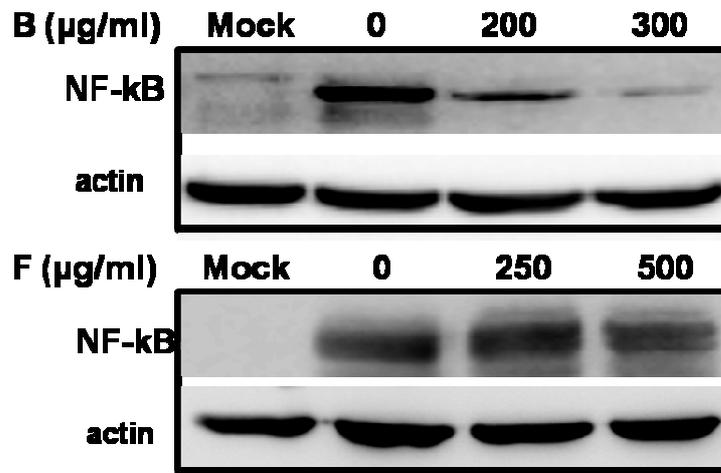
圖十七、以溶斑減少試驗分析不同分子量魚腥草抗 HSV-1 活性



圖十八、以病毒前處理試驗分析 B 以及 E 抑制 HSV 試驗



圖十九、以西方墨點法分析 B 以及 E 抑制 HSV 貼附細胞



圖二十、以西方墨點法分析 B 以及 E 抑制 HSV 感染所引起的細胞 NF- κ B 活化