

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

利用細胞模式開發抗 C 型肝炎病毒中藥之研究

Study on the Screening of Anti-hepatitis C Virus Herbs by *In Vitro* Cell Model

計畫編號：NSC90-2320-B-039-022

執行期限：90 年 08 月 01 日至 91 年 07 月 31 日

主持人：吳世祿 中國醫藥學院生化學科

共同主持人：方世華 中國醫藥學院微生物學科

計畫參與人員：侯庭鏞 中國醫藥學院中醫所

項千芸 中國醫藥學院微生物學科

一、中文摘要

C 型肝炎病毒 (hepatitis C virus; HCV) 的感染是一種嚴重的全球性健康問題。目前美國食品與藥物檢驗局建議的治療方式為 α 干擾素及 ribavirin 合併給藥，可是這些藥物仍會產生相當多的副作用。為了搜尋中草藥是否具有抗 HCV 的效用，我們建立 HCV 體外增殖系統，並利用競爭性巢式反轉錄鈣聚合鈣連鎖反應進行病毒的定量。在攻毒 7 天後，我們可以偵測到 HCV 正股及負股 RNA，顯示病毒可以在 Vero 細胞中增殖。進一步利用 HCV 體外增殖系統進行中草藥的篩選，發現 α 干擾素如同預期一般可以抑制 HCV RNA 的複製，中藥方劑加味四逆散不具抑制 HCV RNA 複製的效用，然而其中的單味藥紫草卻可以顯著的降低 HCV RNA 的量。因此，本計畫所建立的 HCV 體外增殖系統確實可以應用於中草藥抗 HCV 效用的篩選，至於本計畫所篩選出的紫草是藉由何種機制抑制病毒的複製，以及紫草中的主要成分為何，仍需進一步探討。

關鍵詞：C 型肝炎病毒、中草藥、細胞模式

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) infection is a serious global health problem. Interferon- α

(IFN- α) and ribavirin have demonstrated efficacy in the treatment of HCV infection; however, these therapies display many side effects. To screen the anti-HCV compounds from plants, we established an *in vitro* model for propagation of HCV by centrifugation-facilitated method. The HCV RNA molecules were then quantitated by nested competitive reverse transcription-polymerase chain reaction using fluorescein-labeled primers, and analyzed by ABI Prism™ 310. The positive and negative strands of HCV RNA were detectable in Vero cells on Day 7 post-infection, indicating that the HCV RNA was replicating in the cell model system. The cell culture system was further used to screen the anti-HCV activities of 4 Chinese herbal formulas and 15 formula components. IFN- α showed an anti-viral effect. The formulas exhibited no anti-HCV activities, while *Arnebia euchroma* and *Thlaspi arvense* displayed significant anti-HCV activities. Therefore, these results pointed out the possibility by using the cell culture system established in this study to screen the herb extracts for their anti-HCV activities.

Keywords: Hepatitis C Virus, Herb, Cell Model

二、緣由與目的

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，尤其是 C 型肝炎病毒 (hepatitis C virus; HCV) 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。 α 干擾素單獨給藥及與 ribavirin 合併用藥為美國食品與藥物檢驗局核准用來治療慢性 C 型肝炎的方法[1]。這兩種藥物雖然可以降低 15~66% 病人血液中 HCV 的濃度 [2,3]，但也具有相當多的副作用[4]，因此抗 HCV 藥物的開發是相當重要的。

抗病毒藥物的篩選通常需要一個可供病毒增殖的細胞系統。HCV 可以在極少數的細胞中複製，這些細胞包括人類及黑猩猩的初代肝臟細胞[5]、肝細胞癌細胞株[6]及人類造血細胞株[7]，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[8]，因此利用細胞培養系統增殖 HCV 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 vi 疹病毒、感冒病毒、腸病毒及腺病毒[9,10,11]等都可得到良好的結果。然而 HCV 仍未利用這種方式加以分離及應用。

因此為了搜尋中草藥是否具抗 HCV 的效果，我們利用細胞分生的模式，建立 HCV 體外增殖模式、病毒定性及定量分析，進一步利用細胞模式評估中藥方劑清除 HCV 的效果。

三、結果與討論

(一) HCV RNA 的定量

HCV 之定量分析是採競爭性巢式反轉錄鈣聚合鈣連鎖反應 (nested competitive reverse transcription-polymerase chain reaction; nested cRT-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 W_a ，競爭者 band 的面積當作 C_a ，則校正後的競爭者 band 的面積 C_{ac} 之計算為 $C_a \times \text{野生株長度} / \text{競爭者長度}$ 。在經校正後，可利用競爭者分子數量當作 X 軸， C_{ac} 除以 W_a 的數值當作 Y 軸，定出標準曲線，而當 $C_{ac}=W_a$ (即 C_{ac} 除以 W_a 等於 1) 時之相對分子數即為野生株之病毒基因體數量。

利用競爭性 RT-PCR 進行血清樣品中病毒基因體的定量。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 C_{ac} 等於 W_a 時，可求出每毫升血清中的 HCV RNA 分子數約為 1.3×10^8 個。

為了了解競爭性 RT-PCR 的敏感性，我們將已知分子數(100)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，在病毒分子數為 100 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 100。因此，以競爭性 RT-PCR 進行病毒的定量，可以成功地定量出 100 個分子數之 HCV RNA。

(二) HCV 細胞培養之最適化條件

為了篩選中藥對抗 HCV 的效用，我們建立 HCV 體外增殖系統。病毒利用離心促進法感染 Vero 細胞，HCV RNA 的定量是利用 C_a/W_a 的比例。當 C_a/W_a 的比例等於 1，表示 HCV RNA 的數量與競爭性 RNA 分子一樣。我們首先測試病毒感染的時間。將病毒液加到細胞後，先置於室溫 30 分鐘，再於 37°C 感染 45 或 90 分鐘，最後萃取病毒 RNA。結果顯示，將病毒於室溫感染 30 分鐘後，再於 37°C 感染 90 分鐘，

可以增加病毒感染細胞的機率。

其次為測定病毒的最佳感染劑量 (multiplicity of infection; m.o.i.)。將細胞分別感染 5.2、2.6、1.3、0.7、或 0.3 m.o.i. 的病毒，再進行 HCV RNA 的定量，發現當病毒感染量愈高時，HCV RNA 的分子數愈高，但因顧慮血清來源不易，因此我們選定 1.3 m.o.i. 的病毒量進行後續實驗。

為了將體外增殖模式應用於中藥的篩選，我們必須先測試體外模式的穩定性及再現性。我們進行 5 次獨立的試驗，再分別進行 HCV RNA 的定量。結果發現，5 次獨立試驗的 Ca/Wa 並沒有明顯的差別，顯示本計畫所建立的方法是具有再現性的。

(三) HCV 正股及負股 RNA 的偵測

為了確定 HCV 確實能在細胞中增殖，我們進行時序性的實驗。將 HCV 感染細胞後，於不同時間收集樣品，再偵測正股及負股 RNA 是否存在。結果發現正股 RNA 再感染後第 0、3 及 7 天都可偵測到，而負股 RNA 於感染後第 3 天也可偵測到。因為負股 RNA 為病毒複製過程中的中間產物，因此負股 RNA 的出現顯示 HCV 確實可以再細胞中進行核酸的複製。

(四) 中草藥的篩選

在中藥方劑清除 HCV 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、白皮者) 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; TC₅₀)。我們選定 selective index 為 8 的濃度 (即 1/8 TC₅₀) 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 HCV 的細胞中，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對照組減少 75%，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。

四、計畫成果自評

(一) 研究內容與原計畫相符程度

研究內容為建立 HCV 體外增殖系統及建立 HCV 的定量分析，與原計畫研究內容相符。

(二) 達成預期目標情況

本計畫已達成預期的四項目標：(一) HCV RNA 的定量；(二) HCV 細胞培養之最適化條件；(三) HCV 正股及負股 RNA 的偵測；(四) 中草藥的篩選。

(三) 研究成果的學術或應用價值

本計畫的研究成果，在學術及醫學應用上，可建立 HCV 體外感染模式及病毒定量技術平台，快速進行抗 HCV 中藥的大量篩選，從中尋找有效抑制病毒複製的藥物。對於參與本計畫的人員，將可獲得良好的分子病毒學及分子生物學方面的知識，並且獲得實務的遺傳工程技術方面的操作經驗，為國家未來生物科技的發展培育不可多得的人才。

(四) 是否適合在學術期刊發表或申請專利

本研究相關成果已投稿至 Antiviral Research [12]。

五、參考文獻

- [1] Rosen, HR. and Gretch, DR. 1999. Hepatitis C virus: current understanding and prospects for future therapies. *Mol. Med. Today* 5, 393-399.
- [2] Hoofnagle, J. and Lau, D. 1996. Chronic viral hepatitis-benefits of current therapies. *N. Engl. J. Med.* 44, 1470-1471.
- [3] McHutchison, J.G., Gordon, S.C., Schiff, E.R., Shiffman, M.L., Lee, W.M., Rustgi, V.K., Goodman, Z.D., Ling, M.H., Cort, S. and Albrecht, J.K. 1998. Interferon alpha-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *N. Eng. J. Med.* 339, 1485-1492.
- [4] Sherman, A. 1999. HCV on the threshold. *Infect. Med.* 16, 92-94.
- [5] Ito, T., Mukaigawa, J., Zuo, J., Hirabayashi, Y., Mitamura, K. and Yasui, K. 1996. Cultivation of hepatitis C virus in primary hepatocyte culture from patients with chronic hepatitis C results in release of high titer infectious virus. *J. Gen. Virol.* 77, 1043-1054.
- [6] Seipp, S., Mueller, H.M., Pfaff, E., Stremmel, W., Theilmann, L. and Goeser, T. 1997.

- Establishment of persistent hepatitis C virus infection and replication in vitro. *J. Gen. Virol.* 78, 2467-2476.
- [7] Sugiyama K, Kato N, Mizutani T, Ikeda M, Tanaka T, Shimotohno K. Genetic analysis of the hepatitis C virus genome from HCV-infected human T cells. *J Gen Virol* 1997, 78:329-336.
- [8] Yoo BJ, Selby MJ, Choe J, Suh BS, Choi SH, Joh JS, Nuovo GJ, Lee HS, Houghton M, Han JH. Transfection of a differentiated human hepatoma cell line (Huh 7) with in vitro transcribed hepatitis C virus (HCV) RNA and establishment of a long-term culture persistently infected with HCV. *J Virol* 1995, 69:32-38.
- [9] Brumback BG, Wade CD. Simultaneous culture for adenovirus, cytomegalovirus, and herpes simplex virus in same shell vial by using three-color fluorescence. *J Clin Microbiol* 1994, 32:2289-2290.
- [10] Ziegler T, Hall H, Sanchez-Fauquier A, Gamble WC, Cox NJ. Type- and subtype-specific detection of influenza viruses in clinical specimens by rapid culture assay. *J Clin Microbiol* 1995, 33:318-321.
- [11] Klespies SL, Cebula DE, Kelly CL, Galehouse D, Maurer CC. Detection of enteroviruses from clinical specimens by spin amplification shell vial culture and monoclonal antibody assay. *J Clin Microbiol* 1996, 34:1465-1467.
- [12] Ho TY, Wu SL, Lai IL, Cheng KS, Kao ST, and Hsiang CY. An *in vitro* system combined with an in-house quantitation assay for screening hepatitis C virus inhibitors. Revised.

