

## 中文摘要

B 型肝炎為亞非地區廣泛流行之疾病，尤其在台灣地區有相當高比例帶原者。由流行病學研究顯示，B 型肝炎帶原者罹患肝癌比例遠高於正常人，並且發現大部分肝癌細胞中都含有 B 型肝炎病毒 (HBV) DNA，由此可知 B 型肝炎病毒感染和肝細胞癌化有密切的關係，我們試著從傳統中藥斑蝥探討對肝癌細胞株和 B 型肝炎病毒複製有影響之活性成分。斑蝥素 (cantharidin) 為斑蝥的主要有效成分，已被證實具有抗腫瘤作用，還會引起白血球增加及出血等症狀。目前仍然未知其藥理作用機轉，因此我們計畫評估斑蝥類化合物對於肝癌細胞株及 B 型肝炎病毒的影響。

斑蝥類化合物對肝癌細胞株 2.2.15 細胞的毒殺性，其  $CC_{50}$  值 (影響 50% 細胞數目的藥物濃度) 分別為 Na CTD (disodium cantharidate) =  $3.69\mu\text{M}$ ，Na DHNCTD (disodium dehydronorcantharidate)  $> 50\mu\text{M}$ ，NCTD (norcantharidin) =  $14.12\mu\text{M}$ ，DHNCTD (dehydronorcantharidin) =  $16.61\mu\text{M}$ 。藉由 Wright-Giemsa stain 染色法，發現 2.2.15 細胞在加入  $12.5\mu\text{M}$  Na CTD 培養 12 天後，出現空泡化、型態改變。經由流式細胞分析儀研究 2.2.15 細胞在斑蝥類藥物作用後 DNA 分佈情形，發現在高濃度的 Na CTD 及 NCTD 作用下會使細胞週期的 S 期受到抑制。

斑蝥類化合物對於 HBV 病毒的影響，藉由分析細胞外的 HBsAg 的含量來檢測藥物抗病毒的作用。應用 EIA 套裝試劑測量 PLC/PRF/5 細胞培養液中 HBsAg 的濃度，細胞數目以錐藍排除法來計數，分別考慮其  $CC_{50}$  (影響 50% PLC/PRF/5 細胞數目的藥物濃度) 及  $IC_{50}$  (影響 50% HBsAg 分泌量的藥物濃度)，所計算出的 SI 值 (selective index =  $CC_{50}/IC_{50}$ ) 為 NCTD > Na DHNCTD > DHNCTD > Na CTD 依序遞減。根據實驗結果顯示，隨著藥物濃度上升，細胞外的 HBsAg 濃度呈劑量依賴性減少。

在本篇研究中，我們討論斑蝥類化合物對於肝癌細胞株及抗病毒作用的影響，由本實驗的初步數據，這些化合物將可被考慮用來發展為抗肝癌及抗 B 型肝炎病毒的藥物。

## Abstract

Chronic hepatitis B virus is one of the most widespread disease in Asia and Africa. Especially in Taiwan, there is having prevalence of hepatitis B carriers. The epidemiological studies showed that the indent rate of hepatoma in those carriers is far beyond the normal population. Another finding showed that a majority of the hepatoma cell line contains hepatitis B virus DNA, hence a high correlation in between them is expected. We have tried to trace the affective components of hepatoma cell line and hepatitis B virus in Mylabris. Cantharidin, the active constituent of mylabris, has been demonstrated to possess antitumor properties, and causes leukocytosis and hemorrhagic property. The pharmacological mechanism is still unknown. Our purpose is to evaluate the effect of cantharidin analogues on hepatoma cell line and hepatitis B virus.

The drug concentration caused 50% cellular cytotoxicity in 2.2.15 cell number ( $CC_{50}$ ) of cantharidin analogues, Na CTD (disodium cantharidate) =3.69 $\mu$ M, Na DHNCTD (disodium dehydronorcantharidate) > 50 $\mu$ M, NCTD (norcantharidin) =14.12 $\mu$ M, DHNCTD (dehydronorcantharidin) =16.61 $\mu$ M, respectively. By Wright-Giemsa stain, the morphology in 12.5 $\mu$ M Na CTD for 12days can observed vacuolization and degeneration changes of the 2.2.15 cell line. By the Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis of DNA profiles in 2.2.15 cell line, the distribution of cell cycle phase induced that high dose of Na CTD and NCTD inhibited the S phase.

The antiviral effects of cantharidin analogues were measured by analysis of HBsAg contents. The HBsAg of PLC/PRF/5 cells in culture medium were measure by enzyme immunoassay (EIA) kits. Cell numbers were determined by trypan blue

exclusion. The selective index ( $SI = CC_{50} / IC_{50}$ ) sequentially decreased from NCTD > Na DHNCTD > DHNCTD > Na CTD. The experiment revealed that the amounts of HBsAg were decreased by a dose-dependent manner for each drug.

In this study, we describe the effect of hepatoma cell line and antiviral activity of cantharidin analogues. These compounds should be considered for development as anti-cancer and anti-HBV drugs.

# 目錄

授權書.....	1
學位考試證明書.....	2
誌謝.....	3
中文摘要.....	4
英文摘要.....	6
目錄.....	8
表目錄.....	9
圖目錄.....	10
第一章 緒論	
第一節 B 型肝炎與肝癌.....	11
第二節 B 型肝炎病毒.....	13
第三節 抗病毒藥物的發展.....	16
第四節 斑蝥及其化合物.....	17
第五節 2.2.15 細胞株.....	23
第六節 細胞週期.....	26
第二章 實驗材料和方法	
第一節 實驗材料與儀器.....	27
第二節 斑蝥類化合物的配製.....	29
第三節 2.2.15 肝癌細胞的培養.....	30
第四節 斑蝥類化合物對 2.2.15 細胞毒殺性的影響.....	30
第五節 斑蝥類化合物對 2.2.15 細胞型態的影響.....	31
第六節 斑蝥類化合物對 2.2.15 細胞週期的影響.....	32
第七節 斑蝥類化合物對 2.2.15 細胞 DNA 的影響.....	33
第八節 斑蝥類化合物對 B 型肝炎表面抗原的影響.....	34
第三章 結果	
第一節 斑蝥類化合物對 2.2.15 細胞毒殺性的影響.....	36
第二節 斑蝥類化合物對 2.2.15 細胞型態的影響.....	42
第三節 斑蝥類化合物對 2.2.15 細胞週期的影響.....	45
第四節 斑蝥類化合物對 2.2.15 細胞 DNA 的影響.....	50
第五節 斑蝥類化合物對 B 型肝炎表面抗原的影響.....	52
第四章 討論.....	55
參考文獻.....	61

## 表目錄

Table 1. Quantitation of viable 2.2.15 cells treated with cantharidin analogues for 1-9 days.....	37
Table 2-1. Cell cycle phase distribution of 2.2.15 cells treated with (1)Na CTD for 1-6 days.....	46
Table 2-2. Cell cycle phase distribution of 2.2.15 cells treated with (2)Na DHNCTD for 1-9 days.....	47
Table 2-3. Cell cycle phase distribution of 2.2.15 cells treated with (3)NCTD for 1-9 days.....	48
Table 2-4. Cell cycle phase distribution of 2.2.15 cells treated with (4)DHNCTD for 1-9 days.....	49
Table 3. Effect of HBsAg section on PLC/PRF/5 cells treated with various concentrations of cantharidin analogues for 3 days.....	53
Table 4. Comparative potencies of cantharidin analogues as monitored by HBsAg section, cytotoxicity.....	54

## 圖目錄

Figure 1.	(A) Schematic section through an infectious hepatitis B virion.	
	(B) Genome organization of HBV.	
	(C) The three forms of Hepatitis B surface antigen.	
	(D) The infectious cycle. .... .	15
Figure 2.	Chemical structure and preparation of cantharidin and its series compounds. .... .	18
Figure 3-1.	Time-course effects of (1)Na CTD on 2.2.15 cells for different time (1-9 days). .... .	38
Figure 3-2.	Time-course effects of (2)Na DHNCTD on 2.2.15 cells for different time (1-9 days). .... .	39
Figure 3-3.	Time-course effects of (3)NCTD on 2.2.15 cells for different time (1-9 days). .... .	40
Figure 3-4.	Time-course effects of (4)DHNCTD on 2.2.15 cells for different time (1-9 days). .... .	41
Figure 4.	Morphology appearance of 2.2.15 cells were seeded in a 24-well plate treated with cantharidin analogues for 3 days by Wright-Giemsa stain (200X). .... .	43
Figure 5.	Morphology appearances of 2.2.15 cells were treated with cantharidin analogues for 12 days by Wright-Giemsa stain (400X). The cells were mounted on a microscopic slide by cytospin. .... .	44
Figure 6.	Electrophoresis of genomic DNA from 2.2.15 cells treated with cantharidin analogues for 12 days. .... .	51

# 第一章 緒論

## 第一節 B 型肝炎與肝癌

根據流行病學統計,全球預估有超過三億五千萬人受過 B 型肝炎病毒的慢性持續感染 (De Clercq, 1999)。B 型肝炎病毒的感染主要會引起急性和慢性肝炎,在慢性 B 型肝炎帶原者中,有高度危險因子會導致肝硬化 (cirrhosis),甚至與原發性肝細胞腫瘤 (primary hepatocellular carcinoma; PHC)的發展有密不可分的關係 (De Clercq, 1999; Ganem and Varmus, 1987)。

在台灣地區,每五個成人就有一人罹患肝炎,根據行政院衛生署研究資料顯示,近三年來,十大癌症死因高居首位者正是肝癌。台灣地區約 80%的肝硬化、肝細胞瘤與 B 型肝炎病毒感染有關,每年有五千人死於肝癌,四千人死於肝硬化。國人到四十歲時,大約有 90%的人曾被 B 型肝炎病毒感染,其中高達 15-20% (約三百萬人)受病毒感染的個體會發展為慢性持續性帶原者 (Ganem and Varmus, 1987)。慢性肝炎患者約在 20 至 25 年後有五分之一機會發生肝硬化,之後每年有 5% 機率轉變成肝癌 (Chang et al., 1998),而長期慢性感染的 HBsAg 帶原者得到肝癌的危險因子是正常人的 223 倍以上 (Beasley et al., 1981)。

目前 HBV 感染引起肝癌的可能機轉有下列幾點：



(1)因為病毒蛋白 (例如 envelope、nucleocapsid)表現在肝細胞表面，引起宿主免疫系統中毒殺性 T 細胞 (cytotoxic T cell)和 B 細胞反應，造成肝臟的嚴重損害，當肝臟進行再生性修補時，因病毒不斷複製造成肝臟反覆性的損害和再生，可能會導致肝癌的形成 (Milich et al., 1985; Milich and McLachlan, 1986)。

(2)帶原者的持續感染，使大量病毒表面抗原 (HBsAg)堆積在肝細胞的內質網 (endoplasmic reticulum; ER)，導致非免疫性的發炎反應，造成肝細胞死亡，最後可能導致肝癌 (Chisari et al., 1989)。

(3)在肝炎細胞中常發現有病毒 DNA 的嵌入，肝細胞的染色體因病毒 DNA 嵌入而造成突變，包括缺失 (deletion) ( Rogler et al., 1985; Wang and Rogler, 1988)、轉位 (translocation) ( Tokino et al., 1987)和插入活化 (insertional activation) (Moroy et al., 1986; Wang, et al., 1990)，這些異常可能牽涉到肝癌形成過程中。

(4)HBV 的基因產物，X protein，是一個轉活化因子 (transactivator)，可以轉活化病毒內許多蛋白與蛋白之間的作用 (Zahm et al., 1987; Twu and Schloemer, 1987; Spandau and Lee, 1988)，也能與 DNA 結合，成為細胞基因的啟動子 (Twu and Robinson, 1989; Rossner, 1992; Avantaggiati et al., 1993)，尤其可以和細胞中轉錄因子的 DNA 接合而增強其作用，因此許多細胞中的分子如 c-myc，組織

相容抗原之基因等均可能受 X 基因蛋白轉活化 (Twu et al., 1993)。

由此可知，HBV 感染與肝癌形成關係密切，如何干擾病毒複製，抑制致癌基因表現，改善宿主免疫反應，徹底根除慢性感染，正好成為抗病毒治療的主要研究目標。

## 第二節 B 型肝炎病毒

B 型肝炎病毒 (Hepatitis B virus ; HBV) 屬於肝病毒科 (Hepadnaviridae family)，同屬於肝炎病毒族群，還包括土撥鼠肝炎病毒 (WHV)、鴨子 B 型肝炎病毒 (DHBV)、地面松鼠病毒 (GSHV)，以及其它鳥類或哺乳類的病毒屬。這些利用血清篩檢偵測到的病毒，和人類 B 型肝炎病毒有相似性，都是藉由附著寄生於宿主的肝細胞，而且可對受感染的動物造成長期持續性，附有增殖性的感染 (Nassal, 1997)。

從人類血清中純化的 HBV 在電子顯微鏡下觀察，可區別出三種不同形態的病毒顆粒：(1)球狀顆粒 (spherical articles)，直徑 20nm，(2)絲狀顆粒 (filament particles)，具有 20nm 的直徑及多變性的長度，這兩者都屬於無感染性的微粒，由過量的病毒外套蛋白 (即 B 型肝炎表面抗原；HBsAg) 構成，不含核酸成分。(3)鄧氏顆粒 (Dane particles)，直徑 42nm，雙層構造，帶有去氧核糖核酸基因體的微粒，

為完整的病毒顆粒，具有感染能力，由一 27nm 的核質中心 (核心抗原； HBcAg) 包覆上病毒外套蛋白、醣類及脂質而成 (圖 2-A, 2-C.) (Ganem, 1987)。

B 型肝炎病毒是一種可以造成持續性非細胞病變性 (noncytopathic) 肝臟感染的小型去氧核糖核酸類病毒體，具有蛋白外套 (envelope) 的複合對稱病毒，是目前發現人類肝炎病毒中唯一的 DNA 病毒。HBV 包含一段不完全雙股的環狀核酸結構，約 3.2Kb 長的基因組 (genome)，具有四個具重疊性的開讀架 (overlapping open reading frames； ORF)：S 區控制表面抗原的形成，可再分為 S 基因、Pre-S<sub>1</sub> 及 Pre-S<sub>2</sub> 區； C 基因控制核抗原之形成； P 區的產物為 DNA polymerase，也提供 reverse transcriptase 的功能； X 基因的蛋白質產物可用來當作轉錄作用的轉活化因子 (transcription transactivators)，幫助病毒進行複製 (圖 2-B.) (Ganem, 1987; Lee, 1997)。

近年來，對於 HBV 感染的預防工作，由於疫苗的普遍使用已有不錯的成效 (Gitlin, 1997)，但在慢性 B 型肝炎帶原者的治療上，仍無法徹底根除病毒，是造成 HBV 引發肝臟疾病高致死率的主因，如何開發有效抑制 HBV 的抗病毒藥物受到迫切的需要。

### 第三節 抗病毒藥物的發展

在治療病毒性疾病的發展上，自從何大一博士採用雞尾酒療法治療愛滋病，即同時使用二種以上抗病毒藥物治療，得到好的療效之後，病毒性肝炎目前也隨此原則進行研究。

就慢性 B 型肝炎而言，以干擾素治療可以部分使 B 型肝炎病毒活性降低，甚至可使 e 抗原消失，e 抗體產生，但 B 型肝炎表面抗原一般無法完全消失，因此單獨使用干擾素雖然有效，但距離治癒肝炎還有一段距離 (Lin et al., 1999)。

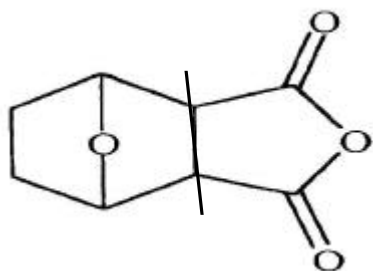
最近研究發現，拿美夫定 Lamivudine (即 3-TC)，是一種抗反轉錄酵素的藥物，原本用於治療愛滋病病毒雞尾酒療法中的藥物之一。臨床上發現，運用在 B 型肝炎患者治療上，可使 B 型肝炎病毒活性降低，及大量消滅血液中的病毒，有效率達 90% 以上，同時可使肝功能指數回復正常，且少數病人之 e 抗原可以消失，藥物副作用小，且用量為原來抗愛滋病毒用量的五分之一，但不幸停藥後，病毒量會很快上升，肝炎再度復發，甚至少數患者有較原先更嚴重的病情，但因單獨使用時間較短，仍須更進一步研究 (Pessoa et al., 1999)。

國內外學者目前針對慢性 B 型肝炎及肝硬化患者，嘗試從傳統醫學來尋找有效療法，期望能以抗病毒藥物消除 B 型肝炎病毒，增強自身免疫能力，長期穩定的抑制病毒複製。

#### 第四節 斑蝥及其化合物

斑蝥 (mylabris)出自 神農本草經 ，作為藥用的有南方大斑蝥 (Mylabris phalerate)和黃黑小斑蝥 (M. cichorii)兩類，在中國傳統藥物中已有二千年的歷史。民間用藥習慣為去頭、足、翅，取其乾燥蟲體，外用治療神經性皮炎、顏面神經麻痺、斑禿、傳染性疣、頭痛、過敏性鼻炎，內服治療肝炎、肝癌等 (楊素娟, 1992)。

##### 斑蝥素 (cantharidin)



斑蝥 (mylabris)其有效成分為斑蝥素 (cantharidin,  $C_{10}H_{12}O_4$ )，斑蝥素是一種會使皮膚潰爛的毒劑，對泌尿道有強烈刺激性，但具有抗腫瘤的作用，還會引起白血球升高及出血等症狀 (Yi et al., 1991)。以斑蝥素 1.25-2mg/kg 來治療小鼠腹水型網狀細胞肝癌和腹水型肝癌，發現會引起小鼠腹水型肝癌細胞明顯萎縮、退化、多空泡等型態改變，有明顯抑制肝癌細胞的現象。小鼠的急性致死劑量  $LD_{50}$  (i.p.)為 1.71mg/kg，藥物有效劑量過於接近毒殺劑量。實驗證明斑蝥素首先會抑制癌細胞的蛋白質合成，繼而影響去氧核糖核酸 (DNA)和核糖核酸 (RNA)的合成，最終抑制癌細胞的生長和分裂，其作用原理是

抑制癌細胞的蛋白質和核酸合成 (Wang, 1989)。

除研究斑蝥中固有的自然存在成分外，為降低斑蝥素的副作用，大陸學者研究一系列斑蝥素類化合物，大多以斑蝥素為原料進行半合成而得。目前已合成的有：斑蝥酸鈉 (Na CTD)、去氫去甲基斑蝥酸鈉 (Na DHNCTD)、去甲基斑蝥素 (NCTD)、去氫去甲基斑蝥素 (DHNCTD)、  
、  
、  
等 (Wang, 1989)。在生理生化研究中發現這些化合物，在抗癌作用上依：斑蝥素、斑蝥酸鈉、去甲基斑蝥素順序增強，而泌尿系統副作用依次降低，其中以去甲基斑蝥素幾乎無副作用，因而證明斑蝥素結構中的二基團，可能是導致泌尿系統刺激的主要活性官能基。去甲基斑蝥素是目前該類成分中較理想的結構 (趙景和, 1992)。

曾有學者研究以脂溶性斑蝥素治療急性新城疫雞瘟病，有 90% 以上顯著治癒率 (戴新民, 1986)，由於抗病毒有不錯的療效，故嘗試以斑蝥素治療病毒性肝炎，臨床上初步發現，斑蝥素用於治療病毒性肝炎療效快，療程短，值得進一步探索 (王日衛, 1980)。

### **斑蝥酸鈉 (disodium cantharidate)**

在體外實驗中，斑蝥酸鈉對 HeLa (人類子宮頸癌細胞)、CaEs-17 (人類食管鱗癌細胞)、BEL-7402 (人肝癌細胞)，以及 EAC (艾氏腹水

癌細胞)、 、 、 等，均有顯著抑制和殺傷能力，斑蝥酸鈉主要作用在癌細胞的粒腺體和細胞核，抑制其 DNA 和蛋白質的合成 (王廣生, 1980)。

使用<sup>[3H]</sup> 斑蝥酸鈉腹腔注射肝癌小鼠及艾氏腹水癌小鼠，進行吸收後觀察分佈及排泄情形，在小鼠的膀胱、膽、腎、肝、瘤組織中均有較高分佈。口服較易吸收，主要自尿中排出，血液中仍維持較高濃度。電子顯微鏡下可見斑蝥酸鈉進入癌細胞核中，出現癌細胞變形、空泡化 (Wang, 1989)。

#### 去氫去甲基斑蝥酸鈉 (disodium dehydronorcantharidate)

去氫去甲基斑蝥酸鈉是在斑蝥素的基礎上，經人工合成的一種新型抗腫瘤藥物。經臨床和實驗發現對原發性肝癌有一定的療效 (王廣生, 1980 and 1986)。去氫去甲基斑蝥酸鈉藥物機轉，目前尚未深入了解。而同一系列衍生物中，去甲基斑蝥酸鈉已有學者研究發現，經藥物連續治療 8 天後的小鼠，在使白血球細胞數增多的同時，也會使骨髓中造血幹細胞 (CFU-S) 數目增加，周邊白血球細胞數量的維持有賴於骨髓造血幹細胞的不斷增殖和分化，可能就因此促進了更多骨髓造血幹細胞進入細胞週期 (易受南, 1988)。

用去甲基斑蝥酸鈉 10 $\mu$ g/ml 處理 CHO (中國倉鼠卵巢非正常二倍體細胞)、HeLa 細胞株 6-24 小時，觀察到 CHO 和 HeLa 細胞質骨架

結構有明顯的變化，可能會干擾細胞有絲分裂的進行（連慕蘭, 1991）。去甲基斑蝥酸鈉 1mg/kg 腹腔給藥 3 天，使正常小鼠骨髓 CFU-GM 細胞產率增加，繼續給藥 5 天，在放射損傷老鼠周邊白血球上升的同時，還可使小鼠骨髓 CFU-GM 細胞產率獲得部分恢復（易受南, 1989）。

在使用抗腫瘤藥物後，大多數患者會表現不同程度的骨髓抑制現象，導致周邊白血球數目減少，免疫力降低而影響療效，如果藥物能促進骨髓造血幹細胞的增殖和分化，或許就可以降低抗腫瘤藥物的副作用。至於去氫去甲基斑蝥酸鈉的藥物影響，現階段還在致力研究中有待更進一步討論。

### **去甲基斑蝥素 (norcantharidin)**

去甲基斑蝥素 (norcantharidin) 是斑蝥素去甲基 (demethylation) 之類似物，毒性較低，尤其泌尿道刺激作用有緩解作用（王廣生, 1983），仍具有生化活性，有抗腫瘤作用，對小鼠急性 LD<sub>50</sub> 為 12.4mg/kg (i.p.) (Wang, 1989)。在體外對人類白血球細胞株 HL-60 的 DNA 和蛋白質合成有抑制作用，對 RNA 合成未見明顯影響；在正常人骨髓細胞 DNA 合成卻沒有抑制，反而出現促進作用（郭建芬, 1994）。

去甲基斑蝥素在體外實驗中，會抑制部分腫瘤細胞的增生，如：



HeLa、CaEs-17、BEL-7402、SMMC-7721 (human hepatoma)、CHO (Chinese hamster ovary)、Hep-2 (human epidermoid laryngocarcinoma) (Wang, 1989), 可能是藉由中斷 DNA 的合成及阻止細胞週期的進行, 然而去甲基斑蝥素對正常細胞亦具有些微毒性 (Yi et al., 1988), 會刺激正常及放射損傷老鼠體外顆粒球細胞的增生 (Yi et al., 1989)。此外, 去甲基斑蝥素會因阻斷細胞週期中 G<sub>2</sub>/M phase, 而抑制 K562 細胞株 (human myeloid leukemia) (Yi et al., 1991)。去甲基斑蝥素在致癌的裸鼠 (nude mice) 身上, 會抑制 human HepG<sub>2</sub> cell-transplanted tumor, 並延長老鼠生存壽命 (Yang et al., 1997), 可能在治療人類肝細胞癌 (HCC) 具有相當療效。最近, 去甲基斑蝥素被證實為 xanthine oxidase 的抑制劑, 而此酵素會上升於肝炎、輕度肝中毒、腦瘤, 並造成 DNA 損傷 (Tsauer et al., 1997)。

去甲基斑蝥素在臨床治療上, 對於慢性活動性肝炎及肝硬化第一期有 80% 的患者症狀得以改善, 去甲基斑蝥素能提高免疫功能, 不會產生骨髓抑制, 而白血球有升高趨勢, 可降低藥物的副作用 (崔振宇, 1984; 王廣生, 1986)。

在治療 B 型肝炎表面抗原帶原者的療效觀察上, 去甲基斑蝥素對 B 型肝炎病毒複製有一定抑制作用, 停藥半年及一年後的療效穩定, 對 HBsAg 顯性而 HBeAg 和 anti-HBe 均隱性者的療效較好 (譚知顯,

1988)。

### 去氫去甲基斑蝥素 (dehydronorcantharidin)

去氫去甲基斑蝥素 (dehydronorcantharidin)是合成去甲基斑蝥素的中間產物，已被證實能抑制老鼠腹水癌細胞，具有抗腫瘤的作用，能抑制腫瘤細胞的增生，具有直接的劑量效應 (Shimi et al., 1982)。

在 Swiss albino mice 體內實驗中發現，去氫去甲基斑蝥素對於癌細胞有直接的細胞毒殺性，會造成細胞質空泡化及破裂，隨後伴隨不規則的核分裂及染色體潰散。在給予老鼠 2mg/kg (i.p.)劑量的去氫去甲基斑蝥素，可觀察到對於骨髓細胞的 DNA 合成，具有顯著的促進性 (Zhou et al., 1987)。

在斑蝥類化合物的抗腫瘤、保護放射治療以及化學治療後骨髓造血功能等方面，發現具有抗癌化療的依據和潛力；至於對抗病毒療效只有少部分臨床證據，其詳細作用機轉，還有待更進一步研究。

## 第五節 2.2.15 細胞株

抗 HBV 治療法至今尚未被有效的開發出來，主要研究障礙來自於寄主範圍實在太狹隘，因而限制實驗培養系統的門徑 (Tuttleman et al., 1986)。以 cloned HBV DNA 在非洲黑猩猩身上引發肝炎，可用來

當作實驗動物模式 (Will et al., 1982), 目前發現 HBV 只會在人類與非洲黑猩猩體內進行複製 (Shin et al., 1989), 因此體外實驗系統不斷地被開發。

以 DHBV 感染原發性鴨子肝細胞培養, 可建立 DHBV 在體外複製的實驗系統 (Tuttleman et al., 1986), Yokota 等人曾以此模式來比較數種 nucleoside analogs 抑制體外 DHBV 的作用 (Yokota et al., 1990)。而人類 B 型肝炎病毒的體外複製, 最早是以病毒感染細胞的方式來進行, 如: 在 1988 年, 以 HBV 感染成人肝細胞培養來進行病毒研究 (Gripon et al., 1988); 亦可使用原發性人類胎兒肝細胞接受 HBV 感染 (Ochiya et al., 1989) 成為病毒的體外實驗模式, 直到後來運用基因轉染技術, 才建立起體外病毒複製系統。

原發性肝細胞的培養是相當棘手的事, 因此在 1987 年, Sells 等人盡可能從一些分化良好的穩定細胞株著手, 而這些細胞株是肝腫瘤細胞經過 HBV DNA 轉移進入可釋放具感染病毒的細胞。在 HBV DNA polymerase 尚未純化出來前, 利用導入穩定 HBV DNA 的細胞株, 可產生感染性病毒來測試化合物是否會影響病毒反轉錄及正股 DNA 合成, 亦可利用此系統來測試是否會影響病毒 genome 的突變及 nucleocapsid、envelope 的組裝 (Sells et al., 1987)。

利用載體攜帶 cloned HBV DNA, 轉染 (transfected) 到 HepG<sub>2</sub> 細

胞株 (hepatoblastoma cell line)中，可製造出大量的 HBsAg、HBeAg 及具感染性的完整病毒顆粒。在 HBV 基因組中，發現病毒 DNA 有完整染色體序列、鬆弛環狀 (relaxed circular)、超螺旋構造、不完全的基因組、、、等多種型態的 B 型肝炎病毒 DNA 被複製出來。在免疫電子顯微鏡的觀察中，病毒顆粒型態可見到 22nm 球狀及絲狀的 HBsAg 病毒顆粒，還有類似 42nm Dane particles，因此證明此種細胞株不僅會組裝及分泌數種 HBV DNA 複製的中間產物，還會有 Dane-like particles 的產生。這種由 HBV genome 經轉染到 HepG<sub>2</sub> 細胞株的新培養系統被命名為 2.2.15 細胞株，可考慮用來研究 HBV 複製週期，是一個不錯的體外實驗系統 (Sells et al., 1987 and 1988)。

2.2.15 細胞株已經成功地被應用在數個會影響 HBV 複製的 nucleoside analogues 證明上，如：2'-deoxyguanosine 的 carbocyclic analogue 幾乎可完全中斷 HBV 病毒複製，而且在高達最低抑制濃度的 200 倍時還不具有藥物毒性 (Price et al., 1988)。將修飾後的 pyrimidine nucleosides 應用在 2.2.15 cell line，可見到 FddThd、ddeThd、FddMeCyt，如同 ClddMeCyt、AddMeCyt 具有幾乎完全阻斷病毒顆粒的產生，在體外有效抑制 HBV (Matthes et al., 1990)。在 1991 年，Doong 等人測試一系列 2',3'-dideoxy-3'-thiapyrimidine nucleosides，發現到病毒受藥物抑制而缺乏細胞內病毒 DNA，推測抑

制目標在於 HBV DNA 的合成 (Doong et al., 1991)。

目前，某些藥物對於 HBV 複製的作用機轉與效力，在體外培養中已能成功地被研發，而這些培養系統已被頻繁地使用在篩選具有潛力能影響肝病毒 DNA 生活史中任何階段的藥物裡。本研究計畫應用 2.2.15 細胞株為篩選系統，試著去發掘傳統中醫藥物和其半合成化合物中，更多具有抑制 HBV 複製的藥物。

## 第六節 細胞週期

細胞的生長和增殖具有一定的規律性，藉由染色體的複製及傳遞遺傳訊息給子細胞的能力，細胞才能進行生長、分裂，此過程稱之為細胞週期，可分為  $G_0$  /  $G_1$ 、S 及  $G_2$  / M 等數期。

在  $G_0$  期的細胞沒有增殖的活性，就是細胞處於休息期。 $G_1$  期是子細胞生長發育階段，細胞週期的時間長短主要由  $G_1$  期決定，之後才進行到 DNA 合成。S 期是從 DNA 開始合成到 DNA 合成結束的全部過程，會使 DNA 含量由  $G_0$  期的  $2N$ ，增加一倍成為 S 期的  $4N$ ，扮演細胞增殖的關鍵，為許多抗癌、抗病毒藥物的主要作用階段。 $G_2$  期是從 DNA 合成結束到細胞有絲分裂之前的階段，而 M 期則是將遺傳物質複製完全的母細胞，均等分配形成二個子細胞的過程。

## 第二章 實驗材料和方法

### 第一節 實驗材料與儀器

#### (一) 藥品

1. 斑蝥及其化合物 (Beijing Fourth Pharmaceutical Work, China)
  - (1) 斑蝥酸鈉 Na CTD (disodium cantharidate) , M.W.=258.16。
  - (2) 去氫去甲基斑蝥酸鈉 Na DHNCTD (disodium dehydronorcantharidate) , M.W.=256.16。
  - (3) 去甲基斑蝥素 NCTD (norcantharidin) , M.W.=168.15 。
  - (4) 去氫去甲基斑蝥素 DHNCTD (dehydronorcantharidin) , M.W.=166.13。
2. 購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) 的試劑  
Absoluted ethanol、Agarose、BamHI、Denhardt's reagent、Dideoxycytidine (DDC)、Dimethylsulfoxide (DMSO)、Ethidium bromide (EtBr)、Formamide、Glucose、LB broth、Lysozyme、Propidium iodide (PI)、Proteinase K、Ribonuclease A (RNase)、Tris-HCl、Triton-X100、0.4% Trypan blue solution、Wright-Giemsa stain solution
3. 購自 Gibco Laboratories (Grand Island, NY) 的試劑  
Antibiotics (penicillin, streptomycin)、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)、Fetal bovine serum (FBS)、Glacial acetic acid、

L-glutamine、 Non-essential amino acid

4. 購自德國默克公司 Merck Co. 的試劑

Chloroform 、 Disodium ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 、  
Ethanol、 Polyethylene glycol (PEG) 、 Potassium acetate、 Sodium  
chloride (NaCl) 、 Sodium dodecyl sulfate (SDS)

5. 購自日本和光純藥工業公司 Wako Pure Chemical Industries, LTD.  
的試劑

Sodium citrate dihydrate、 Sodium hydroxide (NaOH)

6. 購自保健科技股份有限公司 General Biologicals Corp. 的試劑

Surase B-96 (HBsAg EIA Kit; B 型肝炎表面抗原試劑)

(二) 儀器

流式細胞分析儀【FACSCalibur™ System (Becton Dickinson)】

細胞抹片機【Cytospin 3 (Shandon Inc.)】

水浴槽【ZC-4000 (Kansin Instruments Co., LTD)】

電泳槽【Mupid®-2 (Cosmo Bio Co., LTD)】

短波長紫外線燈【SpectroLine® Model TC-312A UV transilluminator】

拍立得照相機【Camera (Kodak Co., LTD)】

垂直式無菌操作檯【Laminar Flow (Tang Ocean Co., LTD)】

倒立式光學顯微鏡【Nikon Ellipse TE300 (Nikon Co., Japan)】

高速離心機【Hettich EBA 12R (Hettich Co., Japan)】

細胞培養箱【Revco 3000TVBA】

細菌培養箱【Orbital Shaker Incubator LM-570R】

(三) 細胞株 (cell lines)

2.2.15 細胞株：由台大醫學院董馨蓮老師提供

以包含 B 型肝炎病毒基因組 (HBV genome) 的質體轉染 HepG<sub>2</sub> 細胞 (人類肝腫瘤細胞株；Human hepatoblastoma cell line)，經過 G418 selection，選擇出具有分泌 HBsAg particle, nucleocapsid 和 virion 的細胞株 (Sells et al., 1987 and 1988)。

PLC/PRF/5 細胞株：由中國醫藥學院醫學系病理科提供

人類肝腫瘤細胞株 (Human hepatoblastoma cell line)，具有 mycoplasma 污染，以及分泌 B 型肝炎表面抗原 (HBsAg) 的能力。

## 第二節 斑蝥類化合物的配製

配製斑蝥類化合物 (cantharidin analogues)：

斑蝥酸鈉 Na CTD，以及去氫去甲基斑蝥酸鈉 Na DHNCTD 溶於水中；而去甲基斑蝥素 NCTD，以及去氫去甲基斑蝥素 DHNCTD 溶於 DMSO (dimethylsulfoxide) 中；配置濃度為 1.25、0.625、0.312、0.156、0.078 mM 五個序列稀釋濃度。(Tsauer et al., 1997)



在培養液中加入 2, 3- dideoxycytidine (DDC) 終濃度 50 $\mu$ M , 可完全抑制 HBV 釋放 , 當作正控制組 (positive control) ; 而負控制組 (negative control) 即不在培養液中加入任何藥物。

### 第三節 2.2.15 肝癌細胞的培養

#### 2.2.15 肝癌細胞培養 :

2.2.15 細胞株 (HepG<sub>2</sub> were transferred with a plasmid contain HBV DNA), 培養在每個 25 cm<sup>2</sup> flask 中 , 含有 1X10<sup>5</sup> 個細胞及 5ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 培養 , DMEM 中含 10% fetal bovine serum/ 1% non-essential amino acid/ 1% glutamine/ 1% pencillin-streptomycin 等成分 , 將它們置於 37 , 5% CO<sub>2</sub> 的培養箱中培養。隔天 , 分別加入 50 $\mu$ l 不同濃度的藥物 , 至終濃度為 12.5、 6.25、 3.12、 1.56、 0.78 $\mu$ M , 每隔三天更換一次細胞培養液 , 並添加藥物 , 細胞暴露於藥物中共計 12 天。(Korba and Milman, 1991; Doong et al., 1991)

### 第四節 斑蝥類化合物對 2.2.15 細胞毒殺性的影響

#### 藥物對細胞的毒殺性 (Cytotoxicity) :

將細胞培養於 10% FBS (fetal bovin serum) 的 DMEM 培養液中 , 起始細胞密度為 1X10<sup>5</sup>/5ml DMEM , 在接種到 25cm<sup>2</sup> flask 經

過 16~18 小時後，加入各種濃度 (0.78-12.5 $\mu$ M)的藥物，培養至欲觀察的時間 (1、3、6、9、12 天)後，取出以 trypsin 處理成單一細胞懸浮液，以錐藍 (0.4% trypan blue)取定量細胞液來染色，滴在血球計數盤，200X 顯微鏡下觀察並計算細胞總數。為瞭解藥物對培養細胞增殖的影響，應用錐蘭排除法 (trypan blue exclusion)來決定細胞的存活，活細胞不會讓 trypan blue 進入而呈現透明完整的外觀，而死細胞會讓 trypan blue 進入而呈現淡藍色。

## 第五節 斑蝥類化合物對 2.2.15 細胞型態的影響

細胞型態的觀察 (Morphology) :

### (1) Wright-Giemsa stain

將  $1 \times 10^5$ /well 細胞接種到 24-well plate 中，培養於含 10% FBS (fetal bovin serum)的 DMEM 培養液，置於 37 $^{\circ}$ C，5% CO<sub>2</sub> 培養箱，在經過 16~18 小時，加入各種濃度 (0.78-12.5 $\mu$ M)的藥物，再經 3 天培養後取出，移去上層培養液，以 1X PBS (phosphate buffered saline, pH=7.2) (0.14M NaCl/ 0.002M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/ 0.012M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/ 0.0027M KCl)清洗二次，加入 100% 絕對酒精浸潤 20 分鐘後，吸除多餘酒精，待室溫風乾後，存放於-20 $^{\circ}$ C 冰箱隔夜。

從冰箱取出 24-well plate 之後，置於室溫下待回溫後，取 200 $\mu$ l 的 Wright-Giemsa stain solution 滴於每一個 well 中，經反應 1 分鐘

後，再加入等量的去離子水 (pH = 6.8-7.2)，均勻搖晃使其混合，待 1-3 分鐘取大量去離子水，將染劑輕輕沖洗乾淨，並置於室溫中晾乾，經由光學顯微鏡以 200X 視野觀察並照相紀錄。

## (2) Cytospin

將  $1 \times 10^5$  細胞接種到  $25\text{cm}^2$  flask 中，培養於含 10% FBS 的 DMEM 培養液 5ml，置於  $37^\circ\text{C}$ ，5%  $\text{CO}_2$  培養箱，在經過 16~18 小時，加入各種濃度的藥物，每隔 3 天更換培養液，並添加藥物，經 12 天培養後取出，移去上層培養液，以 trypsin 處理成單一細胞懸浮液，取細胞約  $1 \times 10^4$  / 0.5ml 置於細胞抹片裝置中的漏斗內，然後將整個裝置放入細胞抹片機中，以 300 rpm，離心 5 分鐘，取出細胞抹片置於 100% 絕對酒精浸潤 20 分鐘後取出，待室溫風乾後，存放於  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中隔夜。

從冰箱取出細胞抹片之後，置於室溫下待回復室溫後，取 20 $\mu\text{l}$  的 Wright-Giemsa stain solution 滴在細胞抹片上，經反應 1 分鐘後，再加入等量的去離子水 (pH = 6.8-7.2)，均勻搖晃使其混合，待 1-3 分鐘取大量去離子水，將染劑輕輕沖洗乾淨，並置於室溫中晾乾，經由光學顯微鏡以 400X 視野觀察並照相紀錄。

## 第六節 斑蝥類化合物對 2.2.15 細胞週期的影響

細胞週期分析 (Cell cycle) :

將  $1 \times 10^5$  細胞分別加藥培養 1、3、6、9 天，以便觀察加藥 (0.78-12.5 $\mu$ M) 後不同時間對於細胞週期的影響。以 trypsin 處理每個 25 cm<sup>2</sup> flask 中經加藥培養的 2.2.15 細胞，使成單一細胞懸浮液，收集到離心管中經離心後移去上清液，以 1X PBS 清洗細胞，離心 1000 g，5 分鐘，吸除上清液，並將底部細胞打散。震盪混合細胞懸浮液，同時加入 70% 酒精後，靜置 -20 冰箱中。

從冰箱中取出離心管，離心 1000 g，5 分鐘，移除上清液，打散底部細胞，以 1X PBS 清洗細胞二次後，盡量吸除上清液，並將細胞團塊均勻打散。加入 1ml 的 stain solution (終濃度為 1% Triton X-100，0.1mg/ml RNase A，4 $\mu$ g/ml Propidium Iodide)，混合後置於室溫下避光 30 分鐘，在一小時內利用流式細胞分析儀 FACSCalibur<sup>TM</sup> System (Becton Dickinson Immunocytometry System)，以 ModFit<sup>TM</sup> LT 細胞週期分析軟體收集細胞，再應用 CELLQuest<sup>TM</sup> 軟體進行分析。

## 第七節 斑蝥類化合物對 2.2.15 細胞 DNA 的影響

### 萃取培養細胞 DNA：

將加藥培養 12 天後的 2.2.15 細胞，以 trypsin 作用形成單一細胞懸浮液，加 1X PBS 沖洗細胞，打散後離心 1000 g，5 分鐘，重覆二次，之後，盡量移除上清液，再加入 Resuspension buffer 1ml (10mM

Tris-HCl, pH7.5/ 5mM EDTA/ 150mM NaCl/ 1%SDS), 打散細胞成懸浮狀, 加入 proteinase K 至終濃度 100 $\mu$ g/ml, 置於 55 $^{\circ}$ C 水浴隔夜。小心取出溶液至 eppendorff, 並加入等量體積的 phenol/ chloroform (1:1) (vol/vol), 經均勻搖晃後, 離心 10000 g, 5 分鐘, 待分層將上清液移至新 eppendorff 中, 重覆上述步驟兩次, 混合震盪均勻, 離心 10000 g, 10 分鐘 小心移取上清液至 eppendorff 中, 使用 0.8% agarose gel/ 0.5X TAE system 跑電泳分離 DNA, 以 EtBr 染色後, 拍立得照相觀察。  
(Doong et al., 1991 ; modified from Blin and Stafford, 1976)

## 第八節 斑蝥類化合物對 B 型肝炎表面抗原的影響

測試 B 型肝炎表面抗原 (Surase B-96 ; HBsAg EIA assay) :

將  $1 \times 10^5$ / well 的 PLC/ PRF/ 5 細胞接種到 24-well 平盤中, 培養於含 10% FBS 的 DMEM 培養液, 置於 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培養箱, 在經過 16~18 小時, 加入各種濃度 (3.12-50 $\mu$ M) 的藥物, 再經 3 天培養後取出, 收集上層培養液, 經離心 2000 g, 10 分鐘, 將上清液移至新 eppendorff 中。各取 50 $\mu$ l 檢體至 96-well 反應盤中, 包括負控制組 (negative control), 以及呈序列稀釋的正控制組 (positive control), 再加入 Anti-HBs Peroxidase Solution 50 $\mu$ l, 置於室溫反應 20 $\pm$  4 小時後, 以稀釋 20X 的 washing solution 清洗反

應盤,加入 OPD Solution 100 $\mu$ l,室溫反應 30分鐘,再加入 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 $\mu$ l 終止反應,在 570nm 波長下測 OD 值。以此套裝試劑所附之 positive control 所測得 OD 值,計算 OD 值與 HBsAg 濃度的線性回歸方程式,再由所測得的各檢體 OD 值換算出 HBsAg 濃度,作為定量分析。

(換算公式出自 HBsAg EIA kit 所附之換算公式)

**Standard curve :  $Y = a + bX$  by linear regression of standard.**

Y : Log<sub>10</sub> (OD values of standard)

X : Log<sub>10</sub> (Values of HBsAg concentration)

a : Intercept

b : Slope

各檢體 OD 值換算出 HBsAg 濃度 = (10<sup>X</sup> ng/ ml) X 稀釋倍數

## 第三章 結果

### 第一節 斑蝥類化合物對 2.2.15 細胞毒殺性的影響

將斑蝥類化合物濃度由高至低序列稀釋，用來篩選較合適的藥物有效劑量。經不同濃度藥物處理 1、3、6、9 天的 2.2.15 細胞（人類肝癌細胞），以錐藍排除法（trypan blue exclusion）來決定細胞的存活量，所計算出的細胞數與添加溶媒 H<sub>2</sub>O 及 1% DMSO 的控制組作比較，再除以控制組的細胞數，即為藥物影響細胞的抑制百分比。

在這一系列化合物中，對於 2.2.15 細胞株都具有不同程度的毒殺性（表 1），其中以斑蝥酸鈉（Na CTD）對於細胞數目的影響最為顯著，在 12.5 $\mu$ M Na CTD 作用到第三天時，對細胞增殖抑制百分比已高達 90% 以上。其次是去甲基斑蝥素（NCTD）、去氫去甲基斑蝥素（DHNCTD）兩種化合物，在濃度 12.5 $\mu$ M 影響下，觀察第 6、9 天的細胞數，也都有超過 50% 以上的細胞毒殺性。相較之下，去氫去甲基斑蝥酸鈉（Na DHNCTD）對於細胞的毒殺性較不如其他相關衍生物顯著，而這些斑蝥類化合物對於 2.2.15 細胞的增殖抑制，大部分都具有劑量依賴性（dose-dependent）。

## Trypan Blue Exclusion

	1 day		3 day		6 day		9 day	
	Cell number (X10 <sup>5</sup> )	Inh.(%)	Cell number (X10 <sup>5</sup> )	Inh.(%)	Cell number (X10 <sup>5</sup> )	Inh.(%)	Cell number (X10 <sup>5</sup> )	Inh.(%)
<b>(1)Na CTD</b>								
Control	2.00±0.30	0.00	8.75±0.72	0.00	29.90±5.53	0.00	43.23±8.55	0.00
1%DMSO	1.68±0.37	16.43	7.27±0.33	16.52	19.57±6.90	35.54	37.20±8.40	14.20
12.5mM DDC	1.54±0.40	23.71	6.12±1.68	29.97	20.27±10.7	34.84	32.05±14.6	28.17
0.78mM	1.40±0.43	29.95	8.25±0.77	5.69	29.57±5.40	1.07	35.13±4.46	15.55
1.56mM	1.60±0.54	20.56	7.42±1.76	15.75	19.60±7.13	32.86	26.27±8.11	35.83
3.12mM	1.80±0.36	9.91	4.55±1.31	48.38	16.53±8.14	44.43	23.05±6.34	43.97
6.25mM	1.54±0.48	22.24	1.76±0.60	80.16	5.23±1.17	82.58	9.08±3.32	77.56
12.5mM	0.92±0.30	51.83	0.86±0.30	90.20	2.13±0.93	93.03	1.68±1.14	95.87
<b>(2)Na DHNCTD</b>								
Control	2.00±0.30	0.00	8.75±0.72	0.00	29.90±5.53	0.00	43.23±8.55	0.00
1%DMSO	1.68±0.37	16.43	7.27±0.33	16.52	19.57±6.90	35.54	37.20±8.40	14.20
12.5mM DDC	1.54±0.40	23.71	6.12±1.68	29.97	20.27±10.7	34.84	32.05±14.6	28.17
0.78mM	1.60±0.19	19.73	8.14±1.65	7.70	25.37±8.64	16.70	41.40±9.49	4.54
1.56mM	1.40±0.33	29.53	5.97±1.55	31.94	21.23±8.03	30.42	36.03±14.8	18.81
3.12mM	1.44±0.21	27.68	7.13±1.46	18.04	23.90±9.81	20.32	38.30±8.83	11.74
6.25mM	1.32±0.37	34.9	6.73±1.04	22.52	19.60±8.14	36.01	37.97±13.3	13.78
12.5mM	1.24±0.24	36.76	6.75±0.82	23.02	14.50±4.66	51.91	35.87±13.5	18.68
<b>(3)NCTD</b>								
Control	2.00±0.30	0.00	8.75±0.72	0.00	29.90±5.53	0.00	43.23±8.55	0.00
1%DMSO	1.68±0.37	16.43	7.27±0.33	16.52	19.57±6.90	35.54	37.20±8.40	14.20
12.5mM DDC	1.54±0.40	23.71	6.12±1.68	29.97	20.27±10.7	34.84	32.05±14.6	28.17
0.78mM	1.30±0.48	34.44	8.21±0.57	6.07	25.37±8.64	16.70	38.70±5.35	9.68
1.56mM	1.38±0.48	30.72	6.84±0.57	21.93	21.23±8.03	30.42	30.38±8.69	30.47
3.12mM	1.36±0.47	31.07	6.30±0.78	27.95	23.90±9.81	20.32	25.62±10.3	42.06
6.25mM	1.16±0.36	41.52	5.42±0.54	37.77	19.60±8.14	36.01	30.48±1.99	27.37
12.5mM	0.96±0.32	50.60	5.75±0.95	34.02	14.50±4.66	51.92	17.48±5.03	59.81
<b>(4)DHNCTD</b>								
Control	2.00±0.30	0.00	8.75±0.72	0.00	29.90±5.53	0.00	43.23±8.55	0.00
1%DMSO	1.68±0.37	16.43	7.27±0.33	16.52	19.57±6.90	35.54	37.20±8.40	14.20
12.5mM DDC	1.54±0.40	23.71	6.12±1.68	29.97	20.27±10.7	34.84	32.05±14.6	28.17
0.78mM	1.36±0.14	30.78	6.43±1.25	25.64	22.60±7.63	25.01	34.72±7.10	18.92
1.56mM	1.28±0.28	34.38	6.18±1.08	29.28	22.43±11.8	27.64	34.70±6.71	18.86
3.12mM	1.56±0.10	20.64	6.44±0.56	26.48	23.42±5.45	21.92	34.57±6.62	19.21
6.25mM	1.16±0.33	40.58	6.35±1.53	27.71	22.23±10.8	28.29	32.55±1.43	22.70
12.5mM	0.98±0.23	49.83	5.06±1.84	41.89	10.63±2.60	63.00	24.03±11.2	46.19

Table 1. Quantitation of viable 2.2.15 cells. 1X10<sup>5</sup> cells were seeded in 25cm<sup>2</sup> flask for each flask with or without various concentrations of cantharidin analogues. The total number of viable cells in each of these flasks was quantitated by counting cells which exclude trypan blue.



## 第二節 斑蝥類化合物對 2.2.15 細胞型態的影響

將細胞接種到 24-well plate，待 16-18 小時細胞融合後，加入不同濃度的斑蝥類化合物再培養 3 天，用來觀察藥物在短時間內對於 2.2.15 細胞型態上的變異情形。藉由光學顯微鏡 200X 視野觀察 Wright- Giemsa stain 染色後的細胞（圖 3），與控制組比較可發現，在高濃度的斑蝥類化合物作用下，固定視野內的細胞數目明顯減少，其中以 Na CTD 最為顯著，有出現細胞質萎縮、細胞核濃染，趨向死亡的細胞增加，有別於控制組的平整細胞外膜、紡錘狀融合重疊的細胞形態。在 12.5 $\mu$ M NCTD 和 DHNCTD 二種化合物作用下，也出現細胞退化、變形。而 Na DHNCTD 對細胞的變化雖然並不顯著，還是可見到細胞膨脹、細胞核偏側的情形。

為了進一步瞭解斑蝥類化合物在 2.2.15 細胞培養長時間後，受到藥物影響的情形，將細胞接種於 25cm<sup>2</sup> flask 中，經藥物影響 12 天後，以 trypsin 處理細胞呈單一懸浮液，藉細胞抹片機 (cytospin) 固定細胞在玻片上，利用 Wright- Giemsa 染劑加以染色，在光學顯微鏡 400X 視野下觀察（圖 4）。

用 12.5 $\mu$ M Na CTD 處理 12 天後的 2.2.15 細胞，明顯發現有形態改變、空泡化的情形，細胞膜邊緣破碎、細胞核偏向單側，部分細胞已趨向分解、死亡。在更高濃度作用下，幾乎見不到存活細胞。

### 第三節 斑蝥類化合物對 2.2.15 細胞週期的影響

近年來，應用流式細胞分析儀 (flow cytometry) 來分析細胞在不同階段的生化特性及生理功能狀態，藉由加入不同種類的藥物，探索藥物在細胞週期中所影響的階段。

先將細胞製成單一懸浮液後與螢光性染料反應，在本實驗選用螢光性染料為 Propidium Iodide (PI)，PI 是一種嵌入性螢光染料，能嵌入雙股 DNA 及 RNA 的鹼基對中，再將此懸浮液送入流式細胞分析儀 FACSCalibur™ System (Becton Dickinson Immunocytometry System)，此時細胞經液相懸浮系統分離，幾乎以單一細胞狀態通過管路，藉由光學系統雷射光照射後激發 PI，以 ModFit™ LT 細胞週期分析軟體收集細胞，再應用 CELLQuest™ 軟體進行定量分析。

選用斑蝥類化合物處理 2.2.15 細胞，觀察 1、3、6、9 中細胞週期的變化。細胞培養至第 9 天，12.5 $\mu$ M 和 6.25 $\mu$ M Na CTD 因為藥物毒殺性過高，細胞幾乎都已趨向死亡，而無法進行細胞週期的分析，但觀察高濃度的 Na CTD 作用在培養第 1 天會對 S 期有 72.5% 的抑制，第 3 天對 S 期有 39.4% 的抑制 (表 2-1)。在 12.5 $\mu$ M NCTD 在加藥後第 3 天對 S 期有 64.8% 的抑制 (表 2-3)。而 DHNCTD 會隨濃度升高出現 G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> 期上升 S 期下降的情形，在 DHNCTD 高濃度 12.5 $\mu$ M 作用下第 6 天對 G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> 期有 14.7% 的促進，以及對 S 期有 42.8% 的抑

制 (表 2-4)。至於 Na DHNCTD 的藥物作用，在 2.2.15 細胞中細胞週期的影響並不顯著 (表 2-2)。

(1)Na CTD	Treatment time (day)	Percent of cells number (%)		
		G <sub>0</sub> -G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> -M
Control	1	47.42±1.90	30.76±4.36	21.82±3.33
1%DMSO	1	47.78±2.21	32.72±1.59	19.50±0.91
12.5nM DDC	1	46.66±4.94	32.30±1.69	21.04±3.25
0.78nM	1	46.31±1.58	31.36±4.75	22.32±3.21
1.56nM	1	49.34±0.88	29.44±2.27	21.22±1.71
3.12nM	1	52.93±1.96**	26.21±1.01	20.95±2.24
6.25nM	1	62.77±2.22***	14.88±0.92**	22.35±2.91
12.5nM	1	56.51±1.67**	8.45±3.11**	35.04±2.73*
Control	3	61.00±2.46	21.90±3.31	17.10±0.93
1%DMSO	3	70.82±4.39*	12.78±3.33*	16.40±1.72
12.5nM DDC	3	67.50±2.07*	14.05±4.99	18.44±3.45
0.78nM	3	65.12±4.46	16.32±4.61	18.56±1.17
1.56nM	3	64.96±4.13	10.52±4.06*	24.52±2.04**
3.12nM	3	69.34±3.25*	4.15±2.70**	26.50±5.21*
6.25nM	3	70.51±1.00**	4.77±2.55**	24.73±2.77*
12.5nM	3	71.73±6.13*	13.28±9.83	14.99±8.49
Control	6	77.15±2.82	10.25±0.20	12.60±3.01
1%DMSO	6	87.61±0.95*	4.04±1.84**	8.35±2.76
12.5nM DDC	6	82.84±3.30	7.56±0.90*	9.60±3.24
0.78nM	6	68.75±7.52	9.42±1.45	21.83±7.24
1.56nM	6	68.04±6.18	9.51±3.52	22.46±4.35*
3.12nM	6	73.62±6.80	4.84±0.89***	21.58±7.69
6.25nM	6			
12.5nM	6			

: significantly death of 2.2.15 cells were not assayed by FACS.

Table 2-1. Cell cycle phase distribution of 2.2.15 cells treated with cantharidin analogues. 2.2.15 cells were treated with or without various concentration of (1)Na CTD and harvest at 1, 3, 6days. The distributions of cell cycle phase were determined by FACS analysis, as described in method. Values are mean ±SD, N≥3.

\* significantly different between control and treatment group.

(\*p<0.05, \*\*p<0.005, \*\*\*p<0.001, Student's t-test)

(2)NaDHNCTD	Treatment time	Percent of cells number (%)		
	(day)	G <sub>0</sub> -G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> -M
<b>Control</b>	1	47.42±1.90	30.76±4.36	21.82±3.33
<b>1%DMSO</b>	1	47.78±2.21	32.72±1.59	19.50±0.91
<b>12.5nM DDC</b>	1	46.66±4.94	32.30±1.69	21.04±3.25
<b>0.78nM</b>	1	45.73±0.85	30.67±3.18	23.60±2.42
<b>1.56nM</b>	1	45.98±2.40	32.30±4.27	21.72±1.91
<b>3.12nM</b>	1	46.74±2.38	31.11±3.99	22.15±1.69
<b>6.25nM</b>	1	45.31±2.41	34.53±3.16	19.96±2.23
<b>12.5nM</b>	1	47.27±1.48	31.24±1.87	21.49±0.75
<b>Control</b>	3	61.00±2.46	21.90±3.31	17.10±0.93
<b>1%DMSO</b>	3	70.82±4.39*	12.78±3.33*	16.40±1.72
<b>12.5nM DDC</b>	3	67.50±2.07*	14.05±4.99	18.44±3.45
<b>0.78nM</b>	3	62.86±1.78	17.84±3.81	19.30±2.26
<b>1.56nM</b>	3	62.24±0.30	19.89±1.24	17.87±1.36
<b>3.12nM</b>	3	63.05±2.62	19.20±2.55	17.75±0.80
<b>6.25nM</b>	3	64.91±1.89	18.35±1.76	16.74±1.28
<b>12.5nM</b>	3	63.85±3.80	19.89±4.69	16.26±0.90
<b>Control</b>	6	77.15±2.82	10.25±0.20	12.60±3.01
<b>1%DMSO</b>	6	87.61±0.95*	4.04±1.84**	8.35±2.76
<b>12.5nM DDC</b>	6	82.84±3.30	7.56±0.90*	9.60±3.24
<b>0.78nM</b>	6	74.46±6.46	12.34±2.79	13.20±3.88
<b>1.56nM</b>	6	76.14±5.29	11.99±2.64	11.87±3.42
<b>3.12nM</b>	6	73.65±9.13	16.63±8.26	9.72±3.09
<b>6.25nM</b>	6	74.32±8.49	13.67±10.0	12.01±2.51
<b>12.5nM</b>	6	75.10±5.32	10.20±3.74	14.70±6.07
<b>Control</b>	9	74.26±0.32	14.35±1.61	11.40±1.29
<b>1%DMSO</b>	9	78.03±1.52	10.34±3.24	11.64±1.71
<b>12.5nM DDC</b>	9	84.08±1.48*	7.64±3.15	8.29±4.62
<b>0.78nM</b>	9	74.25±0.83	14.60±1.50	11.16±0.67
<b>1.56nM</b>	9	73.73±3.05	15.47±2.81	10.81±5.88
<b>3.12nM</b>	9	77.11±0.56*	9.03±0.62	13.87±0.07
<b>6.25nM</b>	9	77.78±0.72*	12.39±2.23	9.84±2.95*
<b>12.5nM</b>	9	73.01±3.63	15.65±3.63	11.34±0.00

Table 2-2. Cell cycle phase distribution of 2.2.15 cells treated with cantharidin analogues. 2.2.15 cells were treated with or without various concentration of (2)Na DHNCTD and harvest at 1, 3, 6, 9days. The distributions of cell cycle phase were determined by FACS analysis, as described in method. Values are mean ±SD, N≥3.

\* significantly different between control and treatment group.

(\*p<0.05, \*\*p<0.005, \*\*\*p<0.001 , Student' s t-test)

(3)NCTD	Treatment time (day)	Percent of cells number (%)		
		G <sub>0</sub> -G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> -M
Control	1	47.42±1.90	30.76±4.36	21.82±3.33
1%DMSO	1	47.78±2.21	32.72±1.59	19.50±0.91
12.5nM DDC	1	46.66±4.94	32.30±1.69	21.04±3.25
0.78nM	1	48.50±5.35	30.27±5.06	21.24±1.85
1.56nM	1	49.50±4.54	30.47±3.43	20.07±1.92
3.12nM	1	48.37±4.73	30.89±5.68	20.74±3.47
6.25nM	1	50.81±3.14	29.14±5.24	20.05±2.55
12.5nM	1	51.58±7.10	27.98±6.54	20.44±2.41
Control	3	61.00±2.46	21.90±3.31	17.10±0.93
1%DMSO	3	70.82±4.39*	12.78±3.33*	16.40±1.72
12.5nM DDC	3	67.50±2.07*	14.05±4.99	18.44±3.45
0.78nM	3	73.08±3.19*	13.83±5.01	13.09±2.49
1.56nM	3	71.54±4.28*	10.66±4.66*	17.81±0.55
3.12nM	3	72.76±4.76*	12.50±3.25*	14.73±1.54
6.25nM	3	73.64±1.82**	9.57±0.51**	16.79±1.33
12.5nM	3	74.89±1.64**	7.72±0.44**	17.39±1.55
Control	6	77.15±2.82	10.25±0.20	12.60±3.01
1%DMSO	6	87.61±0.95*	4.04±1.84**	8.35±2.76
12.5nM DDC	6	82.84±3.30	7.56±0.90*	9.60±3.24
0.78nM	6	83.61±3.06	7.93±1.29*	8.45±3.00
1.56nM	6	84.48±4.48	7.69±2.61	7.83±1.94
3.12nM	6	84.29±5.36	3.45±3.53*	12.26±7.55
6.25nM	6	85.85±6.24	5.67±1.45*	8.48±4.93
12.5nM	6	81.21±8.63	4.67±0.78**	14.12±9.40
Control	9	74.26±0.32	14.35±1.61	11.40±1.29
1%DMSO	9	78.03±1.52	10.34±3.24	11.64±1.71
12.5nM DDC	9	84.08±1.48*	7.64±3.15	8.29±4.62
0.78nM	9	84.76±0.56	4.84±2.06*	10.41±2.62
1.56nM	9	80.81±1.24	7.08±0.12*	12.12±1.13
3.12nM	9	81.58±6.00	9.06±2.62	9.37±3.38
6.25nM	9	75.57±1.51*	8.04±1.22*	16.40±1.22
12.5nM	9	76.65±4.13**	8.67±1.63	14.69±2.50

Table 2-3. Cell cycle phase distribution of 2.2.15 cells treated with cantharidin analogues. 2.2.15 cells were treated with or without various concentration of (3)NCTD and harvest at 1, 3, 6, 9days. The distributions of cell cycle phase were determined by FACS analysis, as described in method. Values are mean ±SD, N≥3.

\* significantly different between control and treatment group.

(\*p<0.05, \*\*p<0.005, \*\*\*p<0.001 , Student' s t-test)

(4)DHNCTD	Treatment time (day)	Percent of cells number (%)		
		G <sub>0</sub> -G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> -M
Control	1	47.42±1.90	30.76±4.36	21.82±3.33
1%DMSO	1	47.78±2.21	32.72±1.59	19.50±0.91
12.5nM DDC	1	46.66±4.94	32.30±1.69	21.04±3.25
0.78nM	1	46.32±4.59	33.07±5.76	20.61±2.08
1.56nM	1	47.53±4.02	32.44±4.10	20.03±0.68
3.12nM	1	49.02±5.63	28.53±2.27	22.45±4.79
6.25nM	1	48.42±3.92	30.92±3.46	20.66±1.80
12.5nM	1	49.64±3.54	30.50±2.45	19.86±1.89
Control	3	61.00±2.46	21.90±3.31	17.10±0.93
1%DMSO	3	70.82±4.39*	12.78±3.33*	16.40±1.72
12.5nM DDC	3	67.50±2.07*	14.05±4.99	18.44±3.45
0.78nM	3	70.87±4.29*	13.66±4.25	15.47±1.79
1.56nM	3	69.88±3.54*	12.89±5.56	17.24±2.23
3.12nM	3	70.79±3.74*	12.41±5.39	16.80±1.78
6.25nM	3	68.29±0.65*	13.73±2.88*	17.98±2.42
12.5nM	3	72.56±1.87**	10.03±4.03*	17.41±2.22
Control	6	77.15±2.82	10.25±0.20	12.60±3.01
1%DMSO	6	87.61±0.95*	4.04±1.84**	8.35±2.76
12.5nM DDC	6	82.84±3.30	7.56±0.90*	9.60±3.24
0.78nM	6	84.70±2.51**	5.55±1.47*	9.75±1.07
1.56nM	6	83.91±6.00	7.38±4.90	8.72±1.16
3.12nM	6	88.30±2.63*	4.88±1.55**	6.82±1.33*
6.25nM	6	89.15±6.09**	5.50±3.51	5.41±9.28
12.5nM	6	88.52±1.57**	5.86±2.21*	5.61±2.17*
Control	9	74.26±0.32	14.35±1.61	11.40±1.29
1%DMSO	9	78.03±1.52	10.34±3.24	11.64±1.71
12.5nM DDC	9	84.08±1.48*	7.64±3.15	8.29±4.62
0.78nM	9	83.55±0.21***	4.63±0.58*	11.82±0.37
1.56nM	9	79.89±0.61*	8.48±3.06	11.64±3.67
3.12nM	9	78.34±0.13**	10.67±7.79	10.99±7.67
6.25nM	9	78.35±3.00	9.38±6.22	12.27±3.22
12.5nM	9	80.59±0.00**	10.79±0.00	8.62±0.00

Table 2-4. Cell cycle phase distribution of 2.2.15 cells treated with cantharidin analogues. 2.2.15 cells were treated with or without various concentration of (4)DHNCTD and harvest at 1, 3, 6, 9days. The distributions of cell cycle phase were determined by FACS analysis, as described in method. Values are mean ±SD, N≥3.

\* significantly different between control and treatment group.

(\*p<0.05, \*\*p<0.005, \*\*\*p<0.001 , Student' s t-test)

#### 第四節 斑蝥類化合物對 2.2.15 細胞 DNA 的影響

2.2.15 細胞經培養於不同濃度的斑蝥類化合物中，在第十二天收集細胞，抽取細胞內染色體去氧核糖核酸 (chromosome DNA)，藉由電泳分離 DNA 片段，經 ethidium bromide (EtBr) 染色後，於 UV 燈下觀察藥物對於細胞 chromosome DNA 的影響。

與不加任何藥物的控制組作對照，斑蝥類化合物會隨濃度增加出現 DNA 損傷 (damage)，有劑量依賴性 (dose-dependent)。在 50 $\mu$ M Na CTD 和 NCTD 高濃度影響下，幾乎所有細胞在第十二天都已呈現死亡狀態，細胞裂解、DNA 片段不易清楚觀察，而 DHNCTD 作用會使 chromosome DNA 看到明顯破壞，DNA 碎片隨濃度上升而增多。在 Na DHNCTD 亦有 DNA 損傷情形出現，相較於其他斑蝥類化合物影響較不明顯。由移動的 DNA 碎片多寡及 DNA 損傷情形加深，可以確定斑蝥類化合物會破壞人類肝癌細胞 2.2.15 細胞的染色體 DNA。

## 第五節 斑蝥類化合物對 B 型肝炎表面抗原的影響

為測試 B 型肝炎表面抗原 (HBsAg)，將細胞培養於 24-well plate 加藥 3 天後，收集上層培養液，以 B 型肝炎表面抗原 EIA 試劑 (Surase B-96)，初步篩選斑蝥類化合物對於 HBsAg 的影響。

在多次選用加藥培養的 2.2.15 細胞來測試 B 型肝炎表面抗原，發現 2.2.15 細胞可能因為釋出病毒量不足，不適用於 EIA 試劑，故改用 PLC/PRF/5 肝癌細胞株來測試，在相同細胞數的培養液中，PLC/PRF/5 細胞的 B 型肝炎表面抗原表現量較高，適用於本實驗。

初步篩選斑蝥類化合物抑制 B 型肝炎表面抗原的結果發現，Na CTD、NCTD、DHNCTD 三種藥物有較明顯效果。經加藥後的培養液 HBsAg 濃度會受到藥物影響，具有劑量依賴性，而 Na DHNCTD 對於 HBsAg 的作用並不顯著 (表 3)。在測試 HBsAg 表現量減少的同時，還必須考慮藥物對於 PLC/PRF/5 細胞株的毒殺性，實驗結果顯示 Na CTD 對細胞毒殺性最強 (表 3)。

為比較藥物間對於治療 HBV 的有效程度，我們依藥物濃度、細胞數目、病毒濃度的相關性，使用線性回歸方程式計算出  $CC_{50}$  (影響 50% 細胞數目的藥物濃度) 及  $IC_{50}$  (影響 50% HBsAg 分泌量的藥物濃度)，來評估斑蝥類化合物對於 HBV 病毒抑制程度的差異性 (表 4)。



<b>ELISA</b>	<b>Cell number</b>	<b>OD value</b>	<b>HBsAg conc.</b>
<b>(1)Na CTD</b>	<b>(X10<sup>5</sup>)</b>	<b>(at 570nm)</b>	<b>(ng/ml)</b>
Control	1.41±0.13	0.446±0.027	2X10 <sup>2.19</sup>
1%DMSO	1.26±0.17	0.314±0.003	2X10 <sup>1.90</sup>
50nM DDC	0.90±0.17	0.278±0.004	2X10 <sup>1.80</sup>
<b>3.12nM</b>	1.38±0.08	0.414±0.013	2X10 <sup>2.13</sup>
<b>6.25nM</b>	1.32±0.08	0.339±0.025	2X10 <sup>1.96</sup>
<b>12.5nM</b>	0.57±0.21	0.331±0.008	2X10 <sup>1.94</sup>
<b>25.0nM</b>	0.45±0.13	0.282±0.001	2X10 <sup>1.81</sup>
<b>50.0nM</b>	0.12±0.08	0.244±0.001	2X10 <sup>1.69</sup>
<b>(2)Na DHNCTD</b>	<b>Cell number</b>	<b>OD value</b>	<b>HBsAg conc.</b>
Control	1.41±0.13	0.446±0.027	2X10 <sup>2.19</sup>
1%DMSO	1.26±0.17	0.314±0.003	2X10 <sup>1.90</sup>
50nM DDC	0.90±0.17	0.278±0.004	2X10 <sup>1.80</sup>
<b>3.12nM</b>	1.08±0.25	0.421±0.045	2X10 <sup>2.14</sup>
<b>6.25nM</b>	0.96±0.08	0.334±0.006	2X10 <sup>1.95</sup>
<b>12.5nM</b>	0.96±0.25	0.331±0.009	2X10 <sup>1.94</sup>
<b>25.0nM</b>	0.90±0.08	0.319±0.030	2X10 <sup>1.91</sup>
<b>50.0nM</b>	0.96±0.08	0.320±0.011	2X10 <sup>1.91</sup>
<b>(3)NCTD</b>	<b>Cell number</b>	<b>OD value</b>	<b>HBsAg conc.</b>
Control	1.41±0.13	0.446±0.027	2X10 <sup>2.19</sup>
1%DMSO	1.26±0.17	0.314±0.003	2X10 <sup>1.90</sup>
50nM DDC	0.90±0.17	0.278±0.004	2X10 <sup>1.80</sup>
<b>3.12nM</b>	1.38±0.08	0.291±0.001	2X10 <sup>1.83</sup>
<b>6.25nM</b>	1.32±0.08	0.262±0.003	2X10 <sup>1.75</sup>
<b>12.5nM</b>	1.32±0.08	0.252±0.001	2X10 <sup>1.71</sup>
<b>25.0nM</b>	1.32±0.01	0.252±0.002	2X10 <sup>1.71</sup>
<b>50.0nM</b>	1.20±0.17	0.243±0.001	2X10 <sup>1.68</sup>
<b>(4)DHNCTD</b>	<b>Cell number</b>	<b>OD value</b>	<b>HBsAg conc.</b>
Control	1.41±0.13	0.446±0.027	2X10 <sup>2.19</sup>
1%DMSO	1.26±0.17	0.314±0.003	2X10 <sup>1.90</sup>
50nM DDC	0.90±0.17	0.278±0.004	2X10 <sup>1.80</sup>
<b>3.12nM</b>	1.35±0.04	0.345±0.006	2X10 <sup>1.98</sup>
<b>6.25nM</b>	1.29±0.21	0.288±0.003	2X10 <sup>1.83</sup>
<b>12.5nM</b>	1.23±0.13	0.291±0.001	2X10 <sup>1.75</sup>
<b>25.0nM</b>	1.20±0.25	0.265±0.002	2X10 <sup>1.84</sup>
<b>50.0nM</b>	1.12±0.25	0.294±0.009	2X10 <sup>1.83</sup>

Table 3. Effect of HBsAg section on PLC/ PRF/ 5 cells treated with or without various concentrations of cantharidin analogues for 3 days. The total number of viable cells was quantitated by trypan blue exclusion. Measure the OD value with a spectrophotometer at the wavelength of 570nm. Calculate the HBsAg concentration of each specimen by linear regression of standard. Values are mean ±SD, N=2.

在四種斑蝥類化合物中，其 SI 值由高至低分別為 NCTD > Na DHNCTD > DHNCTD > Na CTD，比較四種化合物以 NCTD 較具 B 型肝炎表面抗原抑制作用，且對於 PLC/ PRF/ 5 細胞毒殺性較小，可用來進一步考慮藥物對抗病毒的療效。

<b>Compounds</b>	<b>CC<sub>50</sub> (mM)</b>	<b>IC<sub>50</sub> (mM)</b>	<b>SI</b>
<b>(1)Na CTD</b>	21.72	52.11	0.42
<b>(2)Na DHNCTD</b>	200.41	112.81	1.78
<b>(3)NCTD</b>	203.71	70.76	2.88
<b>(4)DHNCTD</b>	186.78	137.38	1.36

Table 4. Comparative potencies of cantharidin analogues as monitored by HBsAg section, cytotoxicity. Effect of HBsAg section on PLC/ PRF/ 5 cells treated with cantharidin analogues for 3days. Calculate the CC<sub>50</sub> and IC<sub>50</sub> values of each specimen by linear regression of standard.

SI, selective index (CC<sub>50</sub>/ IC<sub>50</sub>)

CC<sub>50</sub> is the concentration of cantharidin analogues that showed 50% cellular cytotoxicity in PLC/ PRF/ 5 cells.

IC<sub>50</sub> is the concentration of cantharidin analogues that exerted 50% reduction on HBsAg secretion in PLC/ PRF/ 5 cells.

## 第四章 討論

根據文獻報導指出，臨床上斑蝥外用於治療神經性皮炎、顏面神經麻痺、斑禿、傳染性疣、頭痛、過敏性鼻炎，內服可治療肝炎、肝癌等（楊素娟, 1992）。斑蝥素為斑蝥之有效成分，由實驗結果知道，斑蝥素具有抗腫瘤的作用，還會引起白血球升高及出血等症狀（Yi et al., 1991）。以斑蝥素治療小鼠腹水型網狀細胞肝癌和腹水型肝癌，有明顯抑制肝癌細胞的現象（Wang, 1989）。學者研究一系列斑蝥素類化合物，經臨床研究發現去甲基斑蝥素在抗肝癌療效上，優於斑蝥酸鈉、斑蝥素（趙景和, 1992）。曾有學者研究以脂溶性斑蝥素治療急性新城疫雞瘟病，有顯著的治癒率（戴新民, 1986），可知其具有抗病毒的作用。另外，以斑蝥素治療病毒性肝炎，臨床上初步發現，斑蝥素療效快，療程短，值得進一步探索（王日衛, 1980）。去甲基斑蝥素在臨床治療上，對於慢性活動性肝炎及肝硬化第一期患者症狀得以改善（崔振宇, 1984; 王廣生, 1986）。由此可知斑蝥具有抗腫瘤和抑制病毒的作用，但其藥物作用機轉仍不甚清楚，而確實的實驗數據也尚缺乏。因此，本實驗想進一步探討斑蝥類化合物對於人類肝癌細胞毒殺性、型態及細胞週期的影響，並且篩選斑蝥類化合物是否會干擾 B 型肝炎病毒顆粒的釋放，進而抑制病毒複製。

在臨床使用藥物治療相關疾病時，以對宿主細胞不具有相關毒殺

性為優先 (Chang et al., 1992; Zhu et al., 1998)。因此，篩選毒性小而且具療效的藥物濃度是首先步驟。學者在體外實驗中，證實斑蝥酸鈉對 HeLa、CaEs-17、BEL-7402，以及 EAC 等，均有顯著抑制和殺傷能力 (王廣生, 1980)。而去甲基斑蝥素在體外實驗中，會抑制部分腫瘤細胞的增生，如：HeLa、CaEs-17、BEL-7402、SMMC-7721、CHO、Hep-2 (Wang, 1989)，對正常細胞亦具有些微毒性 (Yi et al., 1988)，會刺激正常及放射損傷老鼠體外顆粒球細胞的增生 (Yi et al., 1989)。去甲基斑蝥素對小鼠急性 LD<sub>50</sub> 為 12.4mg/kg (i.p.) (Wang, 1989)，在致癌的裸鼠身上，會抑制肝腫瘤細胞增生，並延長老鼠生存壽命 (Yang et al., 1997)。去氫去甲基斑蝥素已被證實能抑制老鼠腹水癌細胞，具有抗腫瘤的作用 (Shimi et al., 1982)。在 Swiss albino mice 體內實驗中發現，去氫去甲基斑蝥素對於癌細胞有直接的細胞毒殺性 (Zhou et al., 1987)。在四種斑蝥類化合物中，其 CC<sub>50</sub> 值 (影響 50%細胞數目的藥物濃度)在斑蝥酸鈉、去氫去甲基斑蝥酸鈉、去甲基斑蝥素、去氫去甲基斑蝥素依序分別為 3.69 $\mu$ M、大於 50 $\mu$ M、14.12 $\mu$ M、16.61 $\mu$ M，藥物對於 2.2.15 細胞毒殺性由高至低依序為斑蝥酸鈉、去甲基斑蝥素、去氫去甲基斑蝥素、去氫去甲基斑蝥酸鈉。其中以斑蝥酸鈉影響最為顯著，在 12.5 $\mu$ M 斑蝥酸鈉作用到第三天時，對細胞增殖抑制百分比已高達 90% 以上；其次是去甲基斑蝥素、

去氫去甲基斑蝥素兩種化合物，在濃度 12.5 $\mu$ M 影響下，觀察第 6、9 天的細胞數，也都有超過 50% 以上的細胞毒殺性。由以上結果，本實驗選用的實驗濃度為 12.5-0.78 $\mu$ M。

學者在體外實驗發現，斑蝥類化合物對於不同的癌細胞均有顯著抑制和殺傷能力（王廣生, 1986）。在本實驗中加藥培養 12 天的 2.2.15 細胞，經 Wright-Giemsa stain 染色後觀察，發現細胞型態變異、細胞質空泡化，有別於控制組細胞。四種斑蝥類化合物在高濃度作用下，對於 2.2.15 細胞的型態都具有不同程度的影響，其中以 12.5 $\mu$ M 斑蝥酸鈉對於癌細胞有直接的細胞毒殺性，會造成細胞質空泡化及破裂，隨後伴隨不規則的核分裂及染色體潰散。此結果和文獻報導，使用 [ $^3$ H] 斑蝥酸鈉腹腔注射肝癌小鼠及艾氏腹水癌小鼠，在電子顯微鏡下可見斑蝥酸鈉進入癌細胞核中，出現癌細胞變形、空泡化（Wang, 1989）有相似之處。

在藥物作用於 2.2.15 細胞，對於染色質去氧核糖核酸 (chromosome DNA) 的影響，根據 DNA 電泳圖顯示，隨著藥物濃度上升，移動的 DNA fragment 增加，而 DNA damage 損傷情形加深。我們實驗發現斑蝥類化合物在高濃度作用下，對細胞進行毒殺、破壞細胞型態，並且造成 DNA 損傷，具有劑量依賴性。學者發現斑蝥類化合物在體外實驗，對於癌細胞的 DNA 合成具有抑制性，斑蝥酸鈉主

要作用在癌細胞的粒腺體和細胞核，抑制其 DNA 和蛋白質的合成 (王廣生, 1980)。而去甲基斑蝥素在體外實驗中，會抑制部分腫瘤細胞的增生，可能是藉由中斷 DNA 的合成及阻止細胞週期的進行 (Wang, 1989)，去甲基斑蝥素在體外對人類白血球細胞株 HL-60 的 DNA 和蛋白質合成有抑制作用；在正常人骨髓細胞 DNA 合成反而出現促進作用 (郭建芬, 1994)。在給予老鼠 2mg/kg (i.p.)劑量的去氫去甲基斑蝥素，可觀察到對於骨髓細胞的 DNA 合成，具有顯著的促進性 (Zhou et al., 1987)。

觀察斑蝥類化合物對於細胞週期的影響，在加藥培養第 3、6、9 天，發現斑蝥酸鈉、去甲基斑蝥素、去氫去甲基斑蝥素三種化合物對於 2.2.15 細胞皆有不同程度的 S 期抑制。觀察高濃度的斑蝥酸鈉作用在培養第 1 天會對 S 期有 72.5% 的抑制，第 3 天對 S 期有 39.4% 的抑制；在 12.5 $\mu$ M 去甲基斑蝥素在加藥後第 3 天對 S 期有 64.8% 的抑制；而去氫去甲基斑蝥素會隨濃度升高出現 G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> 期上升、S 期下降的情形，在去氫去甲基斑蝥素高濃度 12.5 $\mu$ M 作用下第 6 天對 G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> 期有 14.7% 的促進，以及對 S 期有 42.8% 的抑制。至於去氫去甲基斑蝥酸鈉的藥物作用，在 2.2.15 細胞中細胞週期的影響並不顯著。我們推測斑蝥類化合物抑制體外細胞增生，可能是藉由抑制 S 期來中斷 DNA 合成以及阻擾細胞週期的進行。而有學者研究，去甲基斑蝥素會因阻

斷細胞週期中 G<sub>2</sub>/M phase，而抑制 K562 細胞株 (human myeloid leukemia) (Yi et al., 1991)，因此，斑蝥對細胞週期影響可能會因細胞種類差異而出現不同抑制作用，此結果有待進一步的證明。

在中國傳統藥物及中草藥成分用於篩選抗病毒藥物上，已有學者研究 *Rubia cordifolia* 及其三種主要成分 (furomollugin、mollugin、rubilactone)，發現對於 B 型肝炎表面抗原具有一定的抑制效果，其 IC<sub>50</sub>=2.0μg/ml (Ho et al., 1996)。在治療 B 型肝炎表面抗原帶原者的療效觀察上，去甲基斑蝥素對 B 型肝炎病毒複製有一定抑制作用 (譚知顯, 1988)，因此斑蝥在臨床上也有效用於肝炎病毒的治療。我們應用 EIA 原理，以 B 型肝炎表面抗原試劑初步篩選有效抗病毒的斑蝥類化合物，在本實驗中，我們比較細胞減少的數目，以及 B 型肝炎表面抗原濃度的改變量，藉以探討藥物對於病毒治療的有效性。實驗結果發現到斑蝥類化合物其 SI 值 (CC<sub>50</sub>/ IC<sub>50</sub>)由高至低分別為去甲基斑蝥素、去氫去甲基斑蝥酸鈉、去氫去甲基斑蝥素、斑蝥酸鈉，在初步實驗中，發現去甲基斑蝥素對於 PLC/PRF/5 細胞所釋放出的 HBsAg 濃度較具有抑制性，且對細胞毒殺性較小。

在目前一些有效抑制 HBV 的核苷酸衍生物中，會有低程度的抑制培養細胞生長，同時也出現治療藥物逐漸發展出抗藥性的缺點，因此中國傳統用藥也逐漸受到重視，用於臨床治療已有特定療效者，將進

一步被學者研究分析。在本篇研究中，我們討論斑蝥類化合物對於肝癌細胞株及抗病毒作用的影響，由本實驗的初步數據，這些化合物將可被考慮用來發展為抗肝癌及抗 B 型肝炎病毒的藥物。





## 參考文獻

- Avantaggiati, M. L., Natoli, G., Balsano, C., Chirillo, P., Artini, M., De Marzio, E., Colleparodo, D., and Lerrero, M. The hepatitis B virus (HBV) pX transactivates the c-fos promoter through multiple cis-acting element. *Oncogene* 8: 1567-1574, 1993.
- Beasley, R. P., Hwang, L. Y., Lin, C. C., and Chin, C. S. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. *Lancet* 2: 1129-1132, 1981.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research* 7(6): 1513-1523, 1979.
- Blin, N., and Stafford, D. W. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acid Research* 3(9): 2303-2308, 1976.
- Chang, C. N., Doong, S. L., Zhou, J. H., Beach, J. W., Jeong, L. S., Chu, C. K., Tsai, C. H., and Cheng, Y. C. Deoxycytidine deaminase-resistant stereoisomer is the active form of (±)-2', 3'-dideoxy-3'-thiacytidine in the inhibition of hepatitis B virus. *J. Biol. Chem.* 267(20): 13938-13942, 1992.
- Chang, M. H. Chronic hepatitis virus infection in children. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 13: 541-548, 1998.
- Chisari, F. V., Klopchin, K., Moviyama, T., Pasquinelli, C., and Dansford, H. A. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell* 59: 1145-1156, 1989.
- De Clercq, E. Perspectives for the treatment of hepatitis B virus infections. *J. Antimicrob. Agents* 12: 81-95, 1999.
- Doong, S. L., Tsai, C. H., Schinazi, R. F., Liotta, D. C., and Cheng, Y. C. Inhibition of the replication of hepatitis B virus in vitro by 2', 3'-dideoxy-3'-thiacytidine and related analogues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8495-8499, 1991.
- Ganem, D., and Varmus, H. E. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 651-93, 1987.
- Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochem.* 132(1): 6-13, 1983.
- Gitlin, N. Hepatitis B: diagnosis, prevention, and treatment. *Clin. Chem.* 43(8): 1500-1506, 1997.
- Gripon, P., Diot, C., Thézé, N., Fourel, I., Loreal, O., Brechot, C., and Guguen-Guillouzo, C. Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide. *J. Virology* 62(11): 4136-4143, 1988.
- Ho, L. K., Don, M. J., Chen, H. C., Yeh, S. F., and Chen, J. M. Inhibition of hepatitis B surface antigen secretion on human hepatoma cells.

- Components from *Rubia cordifolia*. *J. Nat. Prod.* 59: 330-333, 1996.
- Ish-Horowicz, D., and Burke, J. F. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Research* 9(13): 2989-2998, 1981.
- Korba, B. E., and Miman, G. A cell culture assay for compounds which inhibit hepatitis B virus replication. *Antiviral Research* 15: 217-228, 1991.
- Lee, B., Luo, W., Suzuki, S., Robins, M. J., and Tyrrell, D. J. In vitro and in vivo comparison of the abilities of purine and pyrimidine 2', 3' - dideoxynucleosides to inhibit duck hepatitis B virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33(3): 336-339, 1989.
- Lee, W. M. Hepatitis B virus infection. *N. Engl. J. Med.* 337: 1733-1745, 1997.
- Lin, S. M., Sheen, I. S., Chen, R. N., Chu, C. M., and Liaw, Y. F. Long-term beneficial effect of interferon therapy in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 29(3): 971-5, 1999.
- Mason, W. S., Cullen, J., Moraleda, G., Saputelli, J., Aldrich, C. E., Miller, D. S., Tennant, B., Frick, L., Averett, D., Condreay, L. D., and Jilbert, A. R. Lamivudine therapy of WHV-infected woodchucks. *Virology* 245: 18-32, 1998.
- Matthes, E., Langen, P., Janta-Lipinski, M. V., Will, H., Schröder, H. C., Merz, H., Weiler, B. E., and Müller, W. E. G. Potent inhibition of hepatitis B virus production in vitro by modified pyrimidine nucleosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34(10): 1986-1990, 1990.
- Milich, D. R., and McLachlan, A. The nucleocapsid of hepatitis B virus is both a T-cell dependent and a T-cell independent antigen. *Science* 234: 1398-1401, 1986.
- Milich, D. R., Thornton, G. B., and Neurath, A. Enhanced immunogenicity of the pre-S region of hepatitis B virus surface antigen. *Science* 228: 1195-1199, 1985.
- Moriarty, A. M., Hoyer, B. H., Shin, J. W., Gerin, J. L., and Homer, D. H. Expression of the hepatitis B virus surface antigen gene in cell culture by using a simian virus 40 vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78(4): 2606-2610, 1981.
- Moroy, T., Marchio, A., Etiemble, J., Trepo, C., and Buendia, M. A. Rearrangement and enhance depression of c-myc in hepatocellular carcinoma of hepatitis B virus infected woodchuck. *Nature* 324: 276-279, 1986.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology* 24: 17-27, 1992.
- Nassal, M. Hepatitis B virus replication: novel roles for virus-host interactions. *Intervirology* 42: 100-116, 1999.

- Nassal, M. Novel molecular approaches toward therapy of hepatitis B. *Arch. Virol.* 142: 611-628, 1997.
- Ochiya, T., Tsurimoto, T., Ueda, K., Okubo, K., Shiozawa, M., and Matsubara, K. An in vitro system for infection with hepatitis B virus that uses primary human fetal hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1875-1879, 1989.
- Ozer, A., Khaoustov, V. I., Mearns, M., Lewis, D. E., Genta, R. M., Darlington, G. T., and Yoffe, B. Effect of hepatocyte proliferation and cellular DNA synthesis on hepatitis B virus replication. *Gastroenterology* 110: 1519-1528, 1996.
- Pai, S. B., Liu, S. H., Zhu, Y. L., Chu, C. K., and Cheng, Y. C. Inhibition of hepatitis B virus by a novel L-nucleoside, 2'-fluoro-5-methyl- $\beta$ -L-arabinofuranosyl uracil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40(2): 380-386, 1996.
- Pessoa, M. G., and Wright, T. L. Update on clinical trials in the treatment of hepatitis B. *J of Gastroenterol. & Hepatol.* 14 Suppl: S6-11, 1999.
- Price, P. M., Banerjee, R., and Acs, G. Inhibition of the replication of hepatitis B virus by the carbocyclic analogue of 2' - deoxyguanosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8541-8544, 1989.
- Rogler, C. E., Sherman, M., Su, C. Y., and Shafritz, D. A. Deletion in chromosome 11p associated with a hepatitis B virus interaction site in HCC. *Science* 230: 319-322, 1985.
- Rossner, M. T. Hepatitis B virus X gene product: a promiscuous transcriptional activator. *J. Med. Virol.* 36: 101-117, 1992.
- Seeger, C., Ganem, D., and Varmus, H. E. Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science* 232: 477-84, 1986.
- Sells, M. A., Chen, M. L., and Acs, G. Production of hepatitis B virus particles in HepG<sub>2</sub> cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 1005-1009, 1987.
- Sells, M. A., Zelent, A. Z., Shvartsman, M., and Acs, G. Replication intermediates of hepatitis B virus in HepG<sub>2</sub> cells that produce infectious virions. *J. Virol.* 62(8): 2836-2844, 1988.
- Shimi, I. R., Zaki, Z., Shoukry, S. and Medhat, A. M. A new antitumour substance, 7-oxabicyclo (2.2.1)-5-heptene-2, 3- dicarboxylic anhydride. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 18(8): 785-793, 1982.
- Southern, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol. Bio.* 98(3): 503-517, 1975.
- Spandau, D., and Lee, C. H. Trans-activation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein. *J. Virol.* 62: 427-434, 1988.
- Summers, J. Three recently described animal virus models for human hepatitis B virus. *Hepatology* 1: 179-83, 1981.

- Summers, J., and Mason W. S. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 29: 477-84, 1982.
- Tokino, Y., Fukushige, S., Nakamura, T., and Matsubara, K. Chromosomal translocation and inverted duplication associate with integrated hepatitis B virus in HCC. *J. Virol.* 61: 3848-3854, 1987.
- Tsauer, W., Lin, J. G., Lin, P. Y., Hsu, F. L., and Chiang, H. C. The effect of cantharidin analogues on xanthine oxidase. *Anticancer Res.* 17: 2095-2098, 1997.
- Tuttleman, J. S., Pugh, J. C., and Summers, J. W. In vitro experimental infection of primary duck hepatocyte cultures with duck hepatitis B virus. *J. Virol.* 58(1): 17-25, 1986.
- Tuttleman, J., Pourcel, C., and Summers, J. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus infected cells. *Cell* 47: 451-60, 1986.
- Twu, J. S. and Schloemer, R. H., Transcriptional transactivating function of hepatitis B virus. *J. Virol.* 61: 3448-3453, 1987.
- Twu, J. S., and Robinson, W. S. Hepatitis B virus X gene can transactivate heterologous viral sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 2046-2050, 1989.
- Twu, J. S., Lai, M. Y., Chen, D. S., Robinson, W. S. Activation of protooncogene c-jun by the X protein of hepatitis B virus. *Virology* 192: 346-350, 1993.
- Wang, G. S. Medical uses of mylabris in ancient China and recent studies. *J. Ethnopharmacol.* 26: 147-162, 1989.
- Wang, H. P., and Rogler, C. E. Deletion in chromosome 11p and 13q in primary HCC. *Cytogenet. Cell Genet.* 48: 72-78, 1988.
- Wang, J., Chenwesse, X., Henglein, B., and Brechot, C. Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature* 343: 555-557, 1990.
- Weber, B., Bayer, A., Kirch, P., Schlüter, V., Schlieper, D., and Melchior, W. Improved detection of hepatitis B virus surface antigen by a new rapid automated assay. *J. Clin. Microbiol.* 37(8): 2639-2647, 1999.
- Will, H., Cattaneo, R., Koch, H. G., Darai, G., and Schaller, H. Cloned HBV DNA causes hepatitis in chimpanzees. *Nature* 299: 740-742, 1982.
- Yang, E. B., Tang, W. Y., Zhang, K., Cheng, L. Y., and Mack, P. O. P. Norcantharidin inhibits growth of human HepG<sub>2</sub> cell-transplanted tumor in nude mice and prolongs host survival. *Cancer Letters* 117: 93-98, 1997.
- Yi, S. N., Li, M. F., and Xu, Y. H. Effect of sodium norcantharidin on granulopoiesis in normal and irradiated mice. *Bull. Hunan Med. Univ.* 14: 122-124, 1989.

- Yi, S. N., Luo, F. Y., and Sun, J. Q. Preliminary study on the mechanism of increasing leukocyte count induced by norcantharidin. *Bull. Hunan Med. Univ.* 13, 327-329, 1988.
- Yi, S. N., Wass, J., Vincent, P., and Iland, H. Inhibitory effect of norcantharidin on K562 human myeloid leukemia cells in vitro. *Leukemia Res.* 15(10): 883-886, 1991.
- Yokota, T., Konno, K., Chonan, E., Mochizuki, S., Kojima, K., Shigeta, S., and De Clercq E. Comparative activities of several nucleoside analogs against duck hepatitis B virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34(7): 1326-1330, 1990.
- Zahm, P., Hofschneider, P. H., and Koshy, R. The HBV X-ORF encodes a transactivator: a potential factor in viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 3: 169-177, 1987.
- Zhou, A. R., Deng, G., Ru, J., Hou, Y. Y. and Wang, G. S. Effect on DNA biosynthesis of bone marrow cells in mice with the disodium salts of norcantharidin and 5-dehydronorcantharidin. *Chinese Pharmaceutical Bulletin* 22(7): 427, 1987.
- Zhu, Y. L., Dutschman, G. E., Liu, S. H., Bridges, E. G., and Cheng, Y. C. Anti-hepatitis B virus activity and metabolism of 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydro- $\beta$ -L(-)-5-fluorocytidine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42(7): 1805-1810, 1998.
- Zhu, Y. L., Pai, S. B., Liu, S. H., Grove, K. L., Jones, B. C. N. M., Simons, C., Zemlicka, J., and Cheng, Y. C. Inhibition of replication of hepatitis B virus by cytallene in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41(8): 1755-1760, 1997.
- Zoulim, F., and Trépo C. Drug therapy for chronic hepatitis B: antiviral efficacy and influence of hepatitis B virus polymerase mutations on the outcome of therapy. *J. Hepatol.* 29: 151-168, 1998.
- 王日衛, 梅玉秀, 斑蝥素治療病毒性肝炎. *遼寧中級醫刊* 3: 36, 1980.
- 王廣生, 仲懷玉, 黃謹遠, 陸鳳翔等, 去甲斑蝥素治療原發性肝癌 244 例. *藥學通報* 21(2): 90-94, 1986.
- 王廣生, 斑蝥的抗癌應用及其發展. *藥學通報* 15(3): 23-26, 1980.
- 王廣生, 斑蝥素水解及去甲基對泌尿系統刺激的緩解. *藥學通報* 18(7): 402-403, 1983.
- 易受南, 夙慧英, 孫駿奇, 去甲斑蝥酸鈉增加白細胞機理初探. *湖南醫學院學報* 13(4): 327-329, 1988.
- 易受南, 李美芬, 徐有恒, 去甲斑蝥酸鈉對正常及放射損傷小鼠粒系造血的影響. *湖南醫科大學學報* 14(2): 122-124, 1989.
- 崔振宇, 蘇盛, 牛潤英, 劉桂芬等, 去甲斑蝥素治療 44 例慢性活動性肝炎及肝硬變的第一期療效觀察. *藥學通報* 19(9): 567, 1984.
- 連慕蘭, 徐淑惠, 曾長青, 王永潮等, 去甲斑蝥酸鈉干擾細胞有絲分

- 裂的機制. 解剖學報 22(3): 286-290, 1991.
- 郭建芬, 李廣元, 翁其亮, 王廣生, 去甲斑蝥素在體外對白血病細胞核酸和蛋白質合成的影響. 西安醫科大學學報 15(3): 227-229, 1994.
- 楊素娟, 楊紹俊, 斑蝥的臨床應用及研究進展. 中醫藥信息 1: 33-35, 1992.
- 趙景和, 孫洪利, 抗癌動物藥斑蝥的研究發展. 中醫藥信息 3: 31-32, 1992.
- 譚知顯, 李聰賢, 王廣生, 去甲斑蝥素治療乙型肝炎表面抗原攜帶者的療效觀察. 藥學通報 23(1): 46, 1988.