

以體外細胞培養法建立抗病毒中藥篩檢： 大蒜與台灣金線蓮抽取液之評估

詹前朕 *侯嘉隆 **鍾楚紅 劉武哲

國立陽明醫學院 醫事技術學系
*國立陽明醫學院 傳統醫學研究所
**中國醫藥學院 醫事技術學系

摘 要

使用抗A型流行性感冒病毒的兩種單株抗體：抗病毒核殼蛋白(anti-NP)與抗病毒血球凝集素(anti-HA)，做免疫螢光染色，可判定HL-CZ細胞受病毒感染的情況。在測知大蒜精溶液及台灣金線蓮抽取液的最低細胞毒殺濃度分別為10倍稀釋(10%w/v)與4.0 mg/ml之後，以稍低於此濃度的藥液與病毒懸浮液一起加入細胞培養中，在數個特定培養時段分別收集定量細胞做成抹片，並給予免疫螢光染色。初步結果顯示，只接種病毒的陽性對照組及加入大蒜液、金線蓮液與三環胺(amantadine, 西藥對照)的實驗組，其平均抗NP與抗HA螢光細胞百分率分別為59.7%、19.4%、33.6%及30.6%，據此推測，這些藥液在48小時內可部分抑制病毒抗原在細胞內的表現。如果以核酸聚合酶連鎖反應(PCR)來偵測細胞內病毒RNA反轉錄成cDNA之質與量則可用來了解藥液對病毒基因在細胞內複製的影響，目前已知病毒的第四段RNA (HA1基因)在感染細胞後12小時可用PCR方法測得。我們的這套實驗模式可做為未來發展抗病毒中藥體外篩檢研究之參考。

前 言

傳統中國醫書記載的一些食用植物或草藥是是否具有預防及治療傳染病(特別是因病毒感染而引起的疾病)的效果，頗受國人及中醫藥界關心；事實上能抗病毒的西藥也不多見。中國民間相傳，大蒜(garlic)可用於感冒的預防與治療。本世紀來，西方的學者曾對大蒜中的兩種重要化學成分：蒜素(allicin)與蒜苷(alliin)，做過許多詳盡的研究，不少古代與現代的醫者指出大蒜具有某些療效⁽¹⁾。多年生草本蘭科植物——台灣金線蓮(*Anoectochilus formosanus* Hay)，俗稱「藥虎」，意思是指可治疑難雜症、稀有而不易採得的珍貴藥材。金線蓮雖有藥虎之名，但藥性卻相當溫和，全草清炎無毒，生食熬煮均宜。傳統中藥書籍指出金線蓮有清涼退火、涼血潤肺、調和五臟六腑之功，主治虛而有熱、漲悶鬱

結、肺病、胸痛、咳嗽、高血壓、腎虧…等諸症。因此，本實驗擬以這兩種植物的抽取液，嘗試建立體外細胞培養篩檢抗病毒中藥的模式。

流行性感冒病毒(Influenza viruses)通常是造成人畜急性上呼吸道感染病症的主要病原體，該病毒常藉著高度的抗原變異性(antigenic variation)而在全世界的人畜間造成流行。在人類的流行病學史上，A型與B型病毒在過去的二百年內，至少曾發生10次以上的全球性大流行(pandemics)，間接或直接導致高死亡率及經濟損失。台北榮總病毒室自1977年到1988年間，分離出五百多株病毒⁽²⁾，以現有的資源，我們選用流行性感冒病毒來進行實驗。我們的實驗室在1989年成功地建立了一個細胞株，這是從一位白血病患者血液中所分離出來的早期單核球(promonocyte)細胞株，名為HL-CZ⁽³⁾。1990年我們將此細胞株單株化(clone)，其中兩個單細胞株(CCC-3和CCC-6)嘗試用來培養登革熱病毒(de-

ngue virus),經實驗證實,登革熱病毒在該單細胞株內的繁殖情況與一般用來分離登革熱病毒的蚊子C6/36細胞株之情況相似⁽⁴⁾。有了上述的成功經驗後,我們接著測試流行性感冒病毒是否可在HL-CZ細胞內生長。初步的結果顯示,HL-CZ之CCC-3細胞株對流行性感冒病毒A型/Taiwan/86(H₁N₁)株具有感受性(susceptibility)。因此我們擬用HL-CZ細胞來培養A型流行性感冒病毒,試驗並評估大蒜精商品抽取液及用50%甲醇所萃取之金線蓮抽取液對病毒是否有抗病毒作用,並與文獻中指出能抗流行性感冒病毒的西藥三環胺作比較^(5,6)。

在目前,一般的實驗室甚少有真正實用且方便的方法來做抗病毒的分析研究,以常用的病毒斑縮減分析(plaque reduction assay)為例,它雖可用但卻費時費事。在抑制劑(inhibitory agents)的存在下來定量病毒複製(viral replication)的方法有:核酸互交法(nucleic acid hybridization)^(7,8),免疫螢光染色法(immunofluorescence staining)⁽⁹⁾、免疫過氧化酶染色法(immunoperoxidase staining)⁽¹⁰⁾、酵素免疫分析法(enzyme immunoassay)⁽¹¹⁾及其他方法等^{(12),(13)},這些抗病毒作用的分析方法仍有待標準化。本實驗乃是使用對流行性感冒病毒具有特異性的單株抗體(monoclonal antibodies),與病毒抗原作用再經免疫螢光抗體染色,做為中藥抗病毒作用分析的基本方法,並配合核酸聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction; PCR)來偵測病毒基因在細胞內的複製情形。

材料與方法

一、病毒的收集與細胞培養

本實驗所使用的流行性感冒A型與B型病毒株分別是A/Taiwan/86(H₁N₁)與B/Yamagata,從三天培養的初代猴腎細胞(PMK)、犬腎細胞株(MDCK)或雞胚胎卵(embryonic egg)中,收集到這些病毒⁽¹⁴⁾。HL-CZ的單細胞株CCC-3培養於塑膠的培養瓶內(Corning culture flask),以含有10%胎牛血清、100 units/ml青黴素、100 mg/ml鏈黴素及100 mg/ml安福黴素B之RPMI-1640培養基來培養。裝有細胞的培養瓶置於37°C、含有5%二氧化碳的孵育箱中培養數天。

二、抽取液的製備與細胞毒殺作用試驗

(一)金線蓮(圖一)購買自南投埔里某處養殖實驗室。整株人工養殖六個月左右的金線液(包含根、

莖、葉)經過清洗、陰乾與稱重後,以50%的甲醇水溶液(methanol-water)萃取24小時,總共三次。抽取液再經蒸餾以去除甲醇,抽取液連瓶稱重後進行冷凍乾燥16小時。每一小瓶最後得到0.123~0.125g的金線蓮抽取物,加入12.3~12.5 ml的RPMI-1640培養液而成為濃度10 mg/ml的濃貯液(stock solution)。

(二)商聖公司(台中,台灣)所出品的「大蒜精(garlic essence)」為黑色膏狀物,稱取適量溶於水中,利用慢速煮沸(100°C、5分鐘)以溶解、萃取大蒜精。溶液經濾紙過濾及高速離心(10,000rpm)10分鐘後,以RPMI-1640培養液調整濃貯液的濃度為20% w/v或1:5倍稀釋。

(三)每一顆三環胺錠(PK-Merz,德國)磨碎後稱重有1.379g藥粉(內含amantadine-sulfate 100 mg),完全溶於40 ml的RPMI-1640培養液中,經過過濾與10,000rpm離心10分鐘後,得到濃度為53 mM的濃貯液。

上述的三種濃貯液必須通過0.45 μ m及0.22 μ m的濾菌膜(Millipore,美國),證實無菌後才進行實驗。

取各種不同稀釋濃度的大蒜和金線蓮抽取液,與健康、定量的細胞懸浮液一起培養7天。每天收集定量的細胞培養液,以0.5%的錐藍(trypsin blue)活細胞排除染色法染色,用血球計數盤(hemocytometer)計算出活細胞數與細胞總數。如此,這些抽取液對細胞的最低毒殺濃度(minimum concentration of cytotoxicity;MCC)就可被訂定。

三、HL-CZ細胞對流行性感冒病毒的感受性

在評估大蒜與金線蓮抽取液對流行性感冒病毒的抗病毒作用之前,明瞭HL-CZ細胞對病毒的感受性如何是很重要的。1 ml的細胞培養液與1 ml的病毒懸浮液在離心管中混合,接種的病毒濃度,本研究以血球凝集試驗單位(hemagglutination unit;HAU)表示:A型病毒的HAU為64;B型病毒的HAU為32。病毒接種後須經過90分鐘的吸附作用(adsorption)並洗去未吸附的病毒,然後將溶液換到培養瓶中並加入2 ml新鮮的RPMI-1640培養基,培養於37°C下8天,每隔3天加1.5 ml培養基。

在病毒接種後的第1、2、4、6、8天,以血球凝集試驗(hemagglutination test)微量平盤(V型盤)法來檢測病毒在培養液中的存在情形。測定方法是取50 μ l的培養上清液與等量的0.5%天竺鼠紅血球懸浮液,混合於微量平盤內,水平搖晃平盤20秒,在室溫下靜置1小時後觀察血球凝集的結果⁽²⁾。收集

培養液時，取上清液進行上述的血球凝集試驗，留下的細胞用磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)清洗三次。最後調整細胞的數目為5百萬個/ml，滴15 μ l細胞懸浮液於多孔玻片(multiple wells slide)的孔內，待風乾後以-20°C的冰丙酮固定10分鐘。固定後的細胞玻片分成三組，以三種不同的單株抗體(Clonatec, Biosoft, Paris, 法國)來處理，第一組與第二組分別用抗A型與抗B型病毒核殼蛋白(nucleoprotein, NP)；第三組則用抗A型病毒血球凝集素(hemagglutinin, HA)亞型H₁N₁。單株抗體作用後的玻片，再染以帶有螢光物質的山羊抗老鼠免疫球蛋白抗體(FITC conjugated goat anti-mouse Ig antibodies, Flow, 美國)^(15,16)。最後以螢光顯微鏡(Zeiss, 德國)觀察細胞的螢光反應，攝下相片並加以計算陽性細胞百分率。

四、抽取液的抗病毒作用分析

四支離心管各含有1 ml的細胞培養液(約有6至8百萬個細胞)，分別同時加入1 ml的A型病毒懸浮液(HAU=64)與三種不同藥液，經過37°C、90分鐘的吸附作用後，洗去未結合的病毒。離心後的各管細胞分別加入5 ml的培養液(對照組)、5 ml含濃度為4或3.8 mg/ml的金線蓮抽取液之培養液、5 ml含濃度為1:10稀釋或1:12稀釋的大蒜液之培養液、5 ml含濃度為0.53mM或0.5mM三環胺藥液之培養液，將細胞重新懸浮後移至新的培養瓶中，37°C、5% CO₂下培養48小時。在培養後的第1、3、5、7、9、12、24及48小時，分別定量(0.5 ml)吸取細胞懸浮液製成抹片，操作免疫螢光染色法來檢測病毒抗原之表現。上述的每一組四瓶培養的實驗至少重覆執行三次。

五、病毒RNA的抽取

前述做完免疫螢光染色所餘之細胞懸浮液1 ml，經三次重覆的冷凍解凍後，以低速離心去除細胞碎片。取1 ml的上清液加入含有3.0M NaCl的75% polyethylene glycol 6,000(PEG) 0.5 ml，充份混合後置於冰浴中45分鐘。接著12,000 rpm高速離心20分鐘，去除上清液，以pH 8.0的TNE緩衝液(含有0.01M Tris-HCl, 0.1M NaCl以及0.001M EDTA)⁽¹⁷⁾50 μ l來溶解沈澱物。加入等量(50 μ l)的去離子水飽和的酚(ion-free distilled water saturated phenol)，激烈振盪混合1分鐘後以高速離心(12,000rpm)5分鐘分層。取上層液至另一小管，原下層液再加入50 μ l的TE緩衝液，再重覆振盪。重覆三次收集150 μ l的上層液再經兩次等體積的酚/氯

仿(chloroform)(1:1)溶液上下搖晃混勻，取上層液，加入1/10體積的3M醋酸鈉(sodium acetate, pH 5.3)和2倍體積之絕對酒精(absolute ethanol)，混合均勻後置於-20°C冰櫃中沈澱3至4小時。接著以高速離心15分鐘，傾去上清液，再用70%酒精清洗並離心5分鐘，最後以Speed Vac(Model SC-100, Savant Instrument Inc, 美國)離心真空抽乾。

六、以PCR增幅HA1基因

PCR增幅之區域涵蓋了HA基因中之HA1的大部分⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾，除了WL-16引子(primer)(Clontech, 美國)外，加入相對於HA1基因3'端之定次序(sequence)的引子P4(Promega, 美國)。在總共50 μ l的反應液中，包括純化後的RNA溶於20 μ l 0.5%的diethylpyrocarbonate (DEPC) water(Sigma, 美國)、各1 μ l (50 p mole)的引子WL-16與引子P4、0.5 μ l(14 units)的AMV超級反轉錄酶(AMV super reverse transcriptase)(Molecular Genetic Resources, 美國)、0.5 μ l(25 units)的耐熱菌 *Thermus aquaticus* (Taq)DNA聚合酶與10 μ l 10倍的Taq緩衝液(Promega, 美國)、5 μ l的dNTP(2.5mM, pH7.0)以及12 μ l的DEPC水。反應液最後覆蓋一層150 μ l的礦物油(mineral oil)。病毒RNA的增幅過程，首先是反轉錄作用(42°C、45分鐘與94°C、5分鐘之反應)合成cDNA後進入PCR循環，包含了94°C變性作用(denaturation)1分鐘、37°C煉合(reannealing)2分鐘及72°C引子延伸(extention)2分鐘的加熱週期30次，使用的機器為DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus, 美國)。反應終止後，去除礦物油，吸取5 μ l的PCR產物在1.8%洋菜膠(agarose gel)上進行電泳分析(mini-gel electrophoresis)⁽¹⁷⁾。使用的裝置為Mupid-II(Cosmo Bio. Co. LTD, 日本)與TBE(Tris/Borate/EDTA)緩衝液系統。

結 果

由表一可明顯看出HL-CZ細胞對流行性感感冒病毒的感受性。細胞外病毒顆粒的測定—血球凝集試驗，無論A型或B型病毒均呈現陰性結果(±結果在此可視為陰性)，表示在8天的培養期間內沒有大量的A型或B型病毒釋放到細胞培養液中。不過，在細胞內的病毒抗原表現—即免疫螢光染色之結果顯示，A型病毒的NP抗原與HA抗原在病毒感染細胞後的四天內，均表現出強陽性反應(HA抗原的表現結果未列於表一內)，而B型病毒的抗原表現仍是陰性反應。因此，選擇A型流行性感感冒病毒來

做實驗,分析方法則用免疫螢光染色法。

大蒜與金線蓮抽取液對細胞毒性的測定結果(活細胞的百分率)列於表二。活細胞與細胞總數之計數與觀察,可以繪製出細胞的生長曲線圖(growth curve)(圖二與圖三),由此資料可評估藥液對細胞的毒殺作用程度。100倍稀釋(1:100 dilution)的大蒜液在5天之內對細胞均無毒性,但濃度提高10倍(1:10 dilution)時,可明顯看出培養2天後之活細胞百分率只有63.8%,到了第3天則降至

19.7%。同樣的情形也見於金線蓮抽取液,濃度為4 mg/ml,培養2天之活細胞有89.7%,到了第3天則降為25%。沒有加藥的對照組細胞在5天的培養內,活細胞一直維持在95%以上。我們訂定在培養第3天時,使活細胞下降至50%以下之藥液濃度為MCC,由此可知,大蒜液與金線蓮液的MCCs分別是1:10稀釋(10%w/v)與4 mg/ml。

表三列出了以免疫螢光染色法測定加了藥液之螢光細胞百分率結果。從表三中可看出,四組實

Table 1. Susceptibility of HL-CZ to influenza virus infection

antigen detection		day(s) of post-infection				
HA or IFA*	virus strain	1	2	4	6	8
extra-cellular (HA)	influenza A	±**	—	—	—	—
	influenza B	—	—	—	—	—
	control	—	—	—	—	—
intra-cellular (IFA)	influenza A	+++	++	++	±	+
	influenza B	±	—	—	—	—
	control	—	—	—	—	—

*HA=hemagglutination with 0.5% guinea pig RBC at 25°C.
IFA=immunofluorescence staining with specific influenza A and B virus NP monoclonal antibodies (indirect method).
**±represent a trace of positive result.

Table 2. The viable cell count of HL-CZ cells treated with different concentrations of Chinese herb extracts

concentration of Chinese herb extracts		day(s) of cultivation					
		0*	1	2	3	4	5
Garlic stock: (1:5 dilution)	1:100	95.4**	98.0	96.4	97.8	96.7	93.6
	1:50	95.7	93.8	94.9	87.5	82.1	80.7
	1:20	96.4	95.6	95.8	91.2	91.9	79.2
	1:10	96.8	87.1	63.8	19.7	8.3	9.8
	1:8	93.9	81.3	39.7	16.1	15.5	15.7
<i>A. formosanus</i> stock: (10 mg/ml)	0.1	98.3	98.6	100	98.4	99.3	98.6
	1.0	96.8	95.5	98.2	99.1	97.2	96.9
	2.0	98.1	97.5	97.0	96.8	93.5	80.7
	3.0	94.6	95.5	82.6	59.0	48.6	16.8
	4.0	87.5	88.5	89.7	25.0	12.5	10.9
	5.0	96.7	93.0	64.1	22.8	14.4	6.8
HL-CZ (CCC-3)		98.5	98.4	95.7	98.1	98.2	98.8

*The cells were counted before treatment of extracts at the beginning of experiment.
**viability of the cells(%)

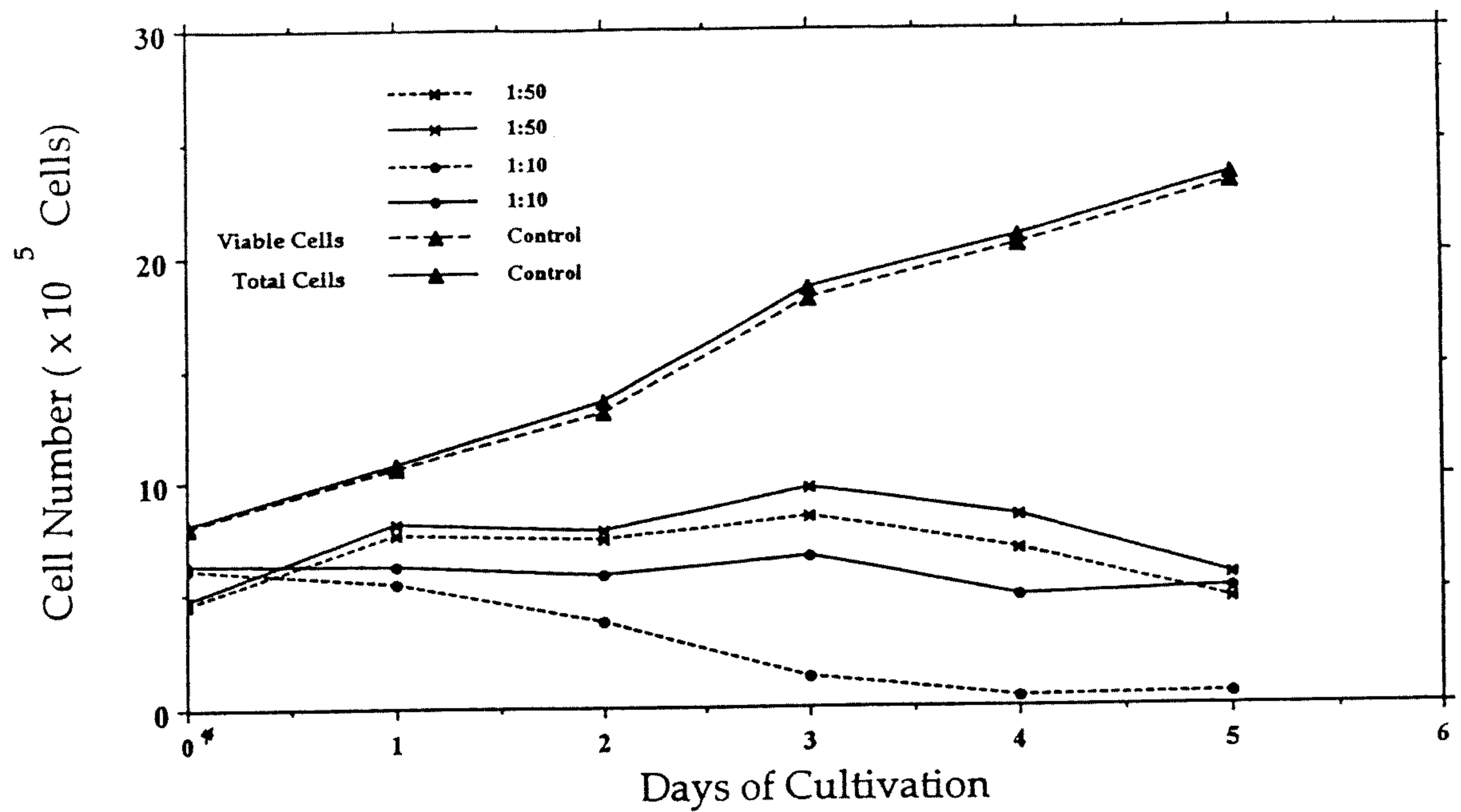


Figure 2. The effect of garlic extract on growth curve of HL-CZ cells.
*The extracts (1:10 and 1:50 dilution) were added at the beginning of experiment.

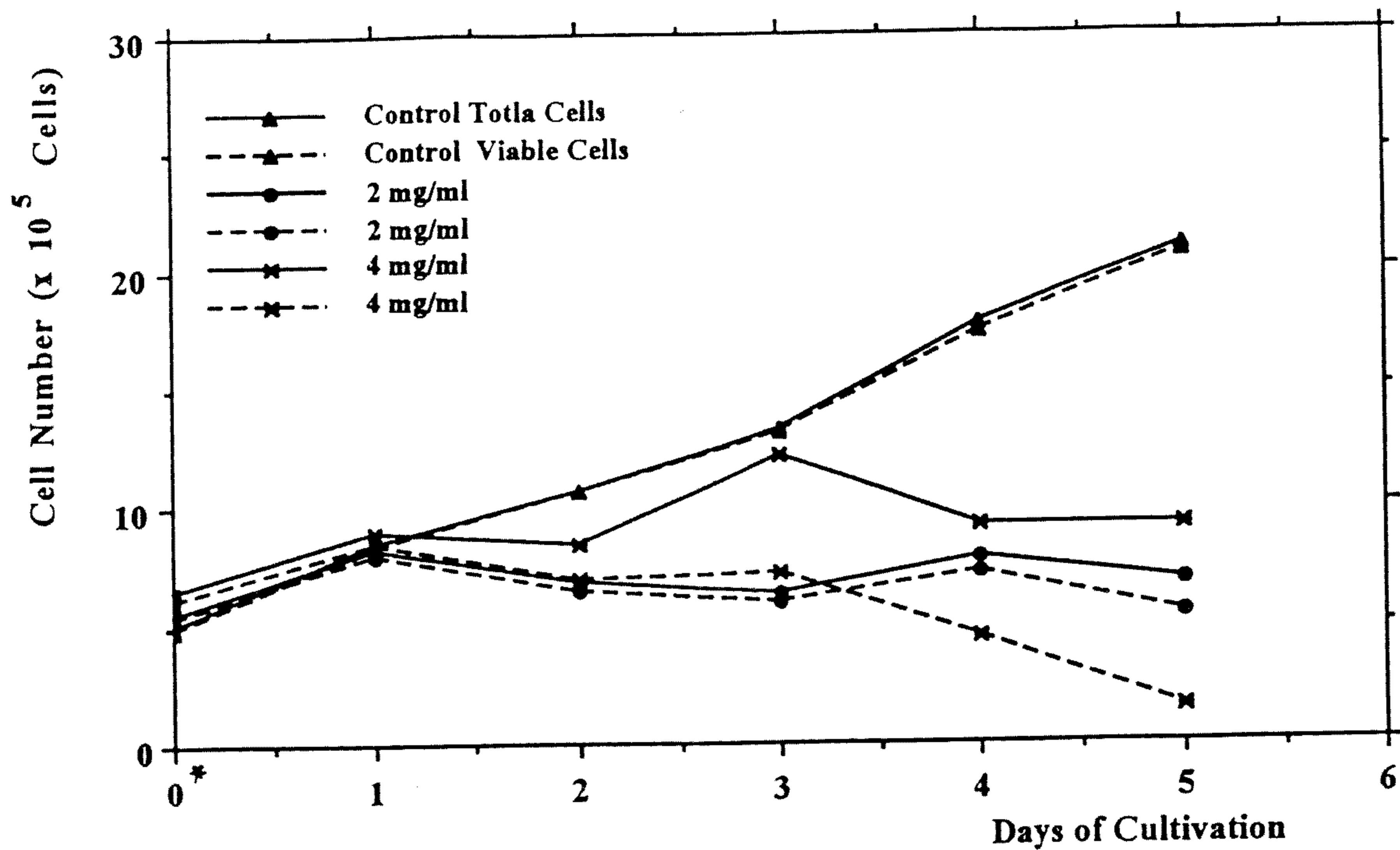


Figure 3. The effect of extract of *A. formosanus* Hay on growth curve of HL-CZ cells.
*The extracts (4 and 2 mg/ml) were added at the beginning of experiment.

驗在病毒接種後(post-inoculation;pi)7小時內,其細胞表現病毒NP與HA抗原的百分率(螢光陽性細胞百分率)沒有顯著的差別。但在接種第7小時後,只接種病毒(沒有加任何藥液的陽性對照組中,平均約有33.3%的NP抗原與75%的HA抗原陽性表現率。同時段,無論是加了大蒜液、金線蓮抽取液或三環胺藥液的實驗組,與陽性對照組比較起來,其百分率明顯地較低,如此顯示這三種藥液的添加對病毒NP與HA抗原在受感染細胞內的表現有某種程度的抑制作用。類似的抗原表現抑制現象在病毒感染後的9到48小時內均存在,例如加了大蒜液的實驗組,在24小時pi所測得之抗NP與抗HA螢光細胞百分率為18.4%與13%;加入金線蓮液者為30.8%與26.1%;加了三環胺藥液者為32.6%與32.8%。圖四例舉出兩張具有代表性的細胞免疫螢光相片,左圖為只接種病毒的對照組(9小時pi);右圖為加了大蒜液的實驗組(9小時pi)。

以核酸聚合酶連鎖反應(PCR)增幅A型流行性感感冒病毒A1基因的結果列於圖五。在這初步的DNA電泳結果中可看出,直接取病毒懸浮液(Lanes 5、6)做一管式反轉錄作用/PCR (one tube RT/PCR method),與DNA標識物(marker)(Lane 3)比較,在1,027鹽基對(base pair,bp)處出現DNA產物。Lane 2與Lane 4是做為陰性對照的blank與沒接種病毒的細胞溶解物,均無產物出現。Lane 1是細胞接種病毒12小時後之細胞溶解物,其增幅後的

DNA產物除了可能與HA1基因相似的1,027bp附近之band外,多餘且非特定的DNA band亦出現於281/271bp處。

討 論

有關流行性感感冒病毒在HL-CZ細胞內的複製情形,根據文獻⁽²⁰⁾指出,以抗血球凝集素單株抗體測定A型病毒經由Fc接受器(Fc receptor)感染老鼠類巨噬細胞細胞株(murine macrophage-like cell line)P338D1時,發現病毒的複製可能會「流產



Figure 1. Whole plant of *Anoectochilus formosanus* Hay (from tissue culture).

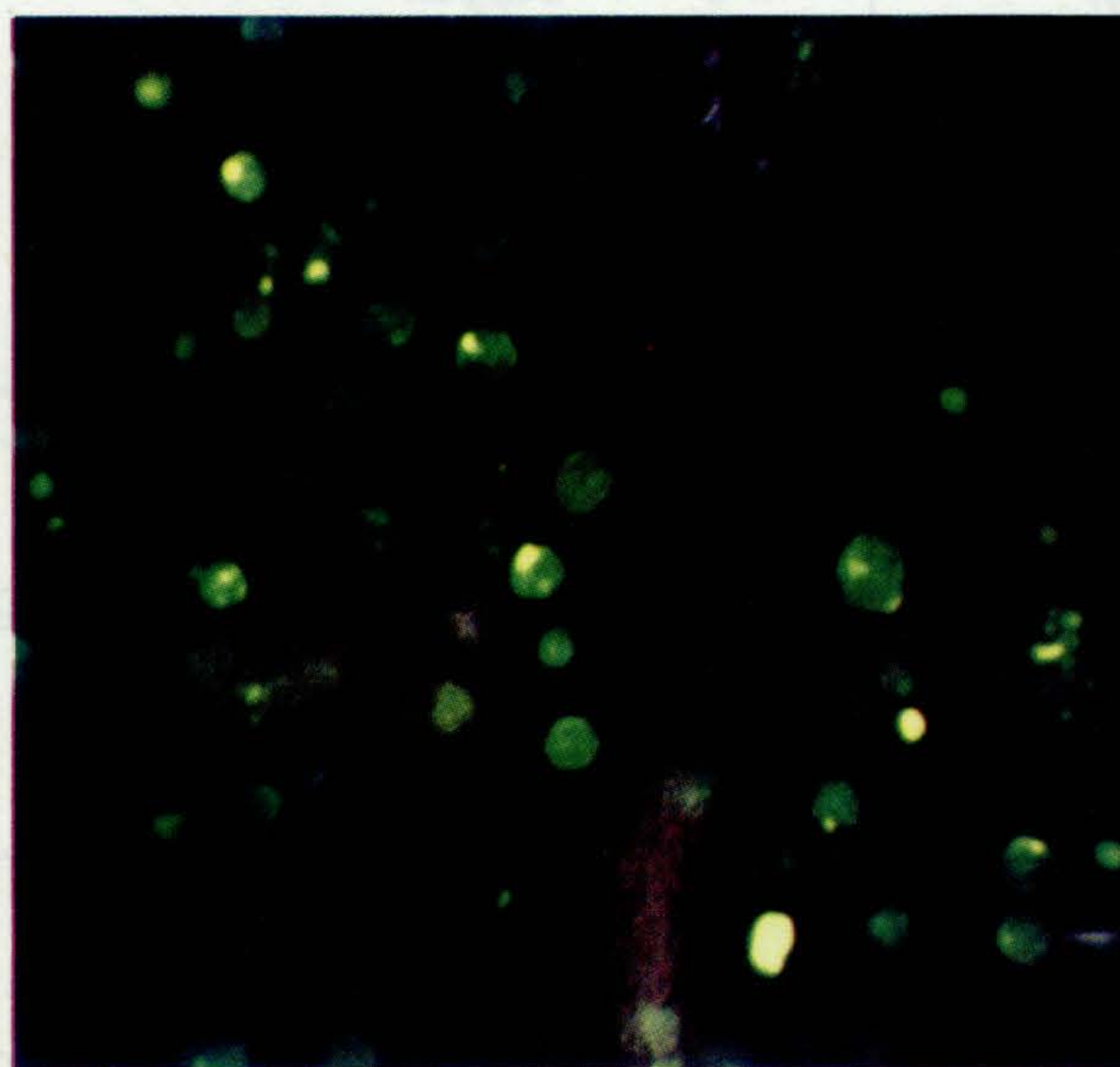
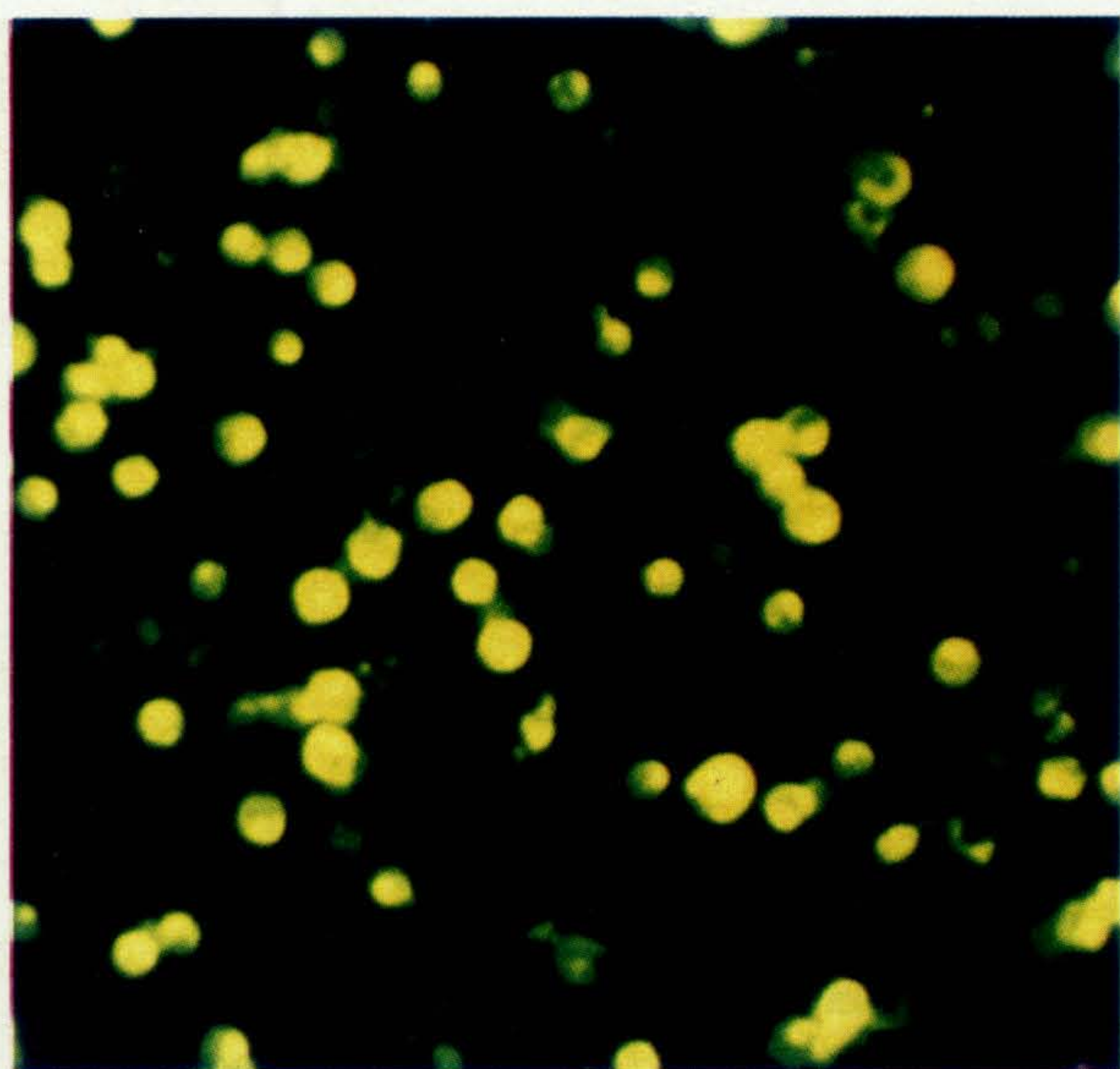


Figure 4. Photographs of immunofluorescence staining (McAb specific to viral HA) of HL-CZ cells inoculated with virus stock (control, Left) and garlic extract treated virus solution (Right) at 9 hours post-inoculation.

Table 3. Immunofluorescence positive rate of HL-CZ cells with different inoculation of extracts.

Time course of post- inoculation	Virus control		Garlic*		<i>A. formosanus</i> *		Amantadine*	
	NP	HA	NP	HA	NP	HA	NP	HA
1 hr	10.5	37.5	7.1	14.7	5.1	21.8	8.2	22.9
3 hrs	10.1	20.7	7.5	23.2	10.2	12.6	7.1	16.1
5 hrs	19.5	30.4	11.6	10.3	10.7	14.1	9.4	8.1
7 hrs	33.3	59.7	17.3	19.8	19.5	33.1	17.1	10.4
9 hrs	57.7	66.8	22.2	14.5	32.5	25.3	27.7	39.6
12 hrs	48.1	75.0	19.6	22.8	35.8	36.0	29.4	51.8
24 hrs	57.1	59.2	18.4	13.0	30.8	26.1	32.6	32.8
48 hrs	65.3	75.2	21.7	25.0	61.7	35.5	26.5	38.1

*The used concentration (MCCs) of garlic, *A. formosanus* Hay and amantadine were 1:10 dilution, 4 mg/ml and 0.53 mM, respectively.

(aborted)」而無法自細胞釋出病毒顆粒。本實驗的結果也應證可能有類似的情形。以血球凝集試驗測定細胞外病毒顆粒之存在結果均為陰性,但病毒抗原卻可在受感染細胞內隨培養時間的延長而逐漸表現,可用免疫螢光染色法測得。至於HL-CZ細胞對A型與B型兩種不同病毒之感受性差異如何,以及病毒顆粒是否真正無法自細胞釋出,有待使用更多的A型與B型亞型病毒株來做進一步的感受性試驗。目前所得的初步結論是一使用特定、準確的單株抗體商品來做免疫螢光染色,不失為一種測定病毒在細胞內生長情形的簡便、有效方法。

有關中國藥草或食用植物抽取液對養殖細胞之影響的文獻很少見。本實驗最低細胞毒殺濃度(MCC)之訂定僅供參考,每一種實驗若使用不同的病毒、細胞株及藥液,則有不同的決定方法,關於這點可進一步研究而加以標準化。我們的訂定標準是以在培養3天內使活細胞降至50%以下之濃度為MCC,如此決定是依據表一的結果:細胞接種病毒後3天內之病毒抗原的免疫螢光結果最好,後來加入藥液的測試實驗時段(time course)也以此為根據訂為48小時(表三)。只要在48小時內,60~80%以上的受感染細胞不被高濃度藥液所毒殺,理論上細胞的病毒抗原均可表現出來,除非細胞死亡或是藥液抑制了病毒在整個感染繁殖過程中的某一階段,而使其抗原表現受阻。

HL-CZ細胞對大蒜及金線蓮抽取液的耐受性很強,即使使用如MCC之高濃度處理數天,去除死亡細胞後再將存活細胞施予次培養仍可再度生長良好。至於在藥液處理過程中,細胞形態的變化、細

胞生理是否受到藥液及病毒的潛在影響,於本實驗沒有進行。

三環胺是一種合成的對稱性胺基化合物,胺基末端接有一分子的氯化氫(hydrochloride)。三環胺是目前比較確定少數有效果的抗病毒化學藥物之一,常用於大流行時預防之用,對已確立的疾病無效,只能縮短病程,改善病情。在抗病毒機制方面,可能是抑制A型流行性感冒病毒在感染細胞時的脫殼作用(uncoating),阻止病毒的複製並防止細胞受到病毒破壞。由於有這些抗病毒藥物的研究成果支持,我們選用三環胺來做為對照,讓病毒與細胞在含有0.53mM三環胺的培養液中接觸,測試A型病毒是否因無法吸附上細胞而使培養2天後的細胞不表現出病毒抗原。結果不甚滿意,自9小時到48小時的細胞培養中,平均仍有約30%的細胞出現螢光,這佔了陽性對照組同時段細胞平均有60%出現螢光的一半。探究原因,除了實驗模式與其它文獻之研究不同外,三環胺濃度過高可能也是原因之一。根據國外研究三環胺的體外試驗有效濃度之文獻記載,在某些實驗如病毒斑形成(plaque formation)的抑制,對A型病毒最有效的濃度,大多落於0.001 mM到0.002mM之間⁽²¹⁾,將濃度提高到0.5 mM時,對B型病毒或其他病毒亦有效,不過卻降低了對A型病毒的抑制效果⁽²¹⁾。有關三環胺對細胞的毒殺作用我們沒有測試,原因是有文獻報告適當的體外試驗濃度為依據,事實也證明0.53 mM的三環胺不影響HL-CZ細胞的正常生長。

本實驗的目的在於評估我們這套研究模式(如研究材料—HL-CZ細胞和流行性感冒病毒與研究

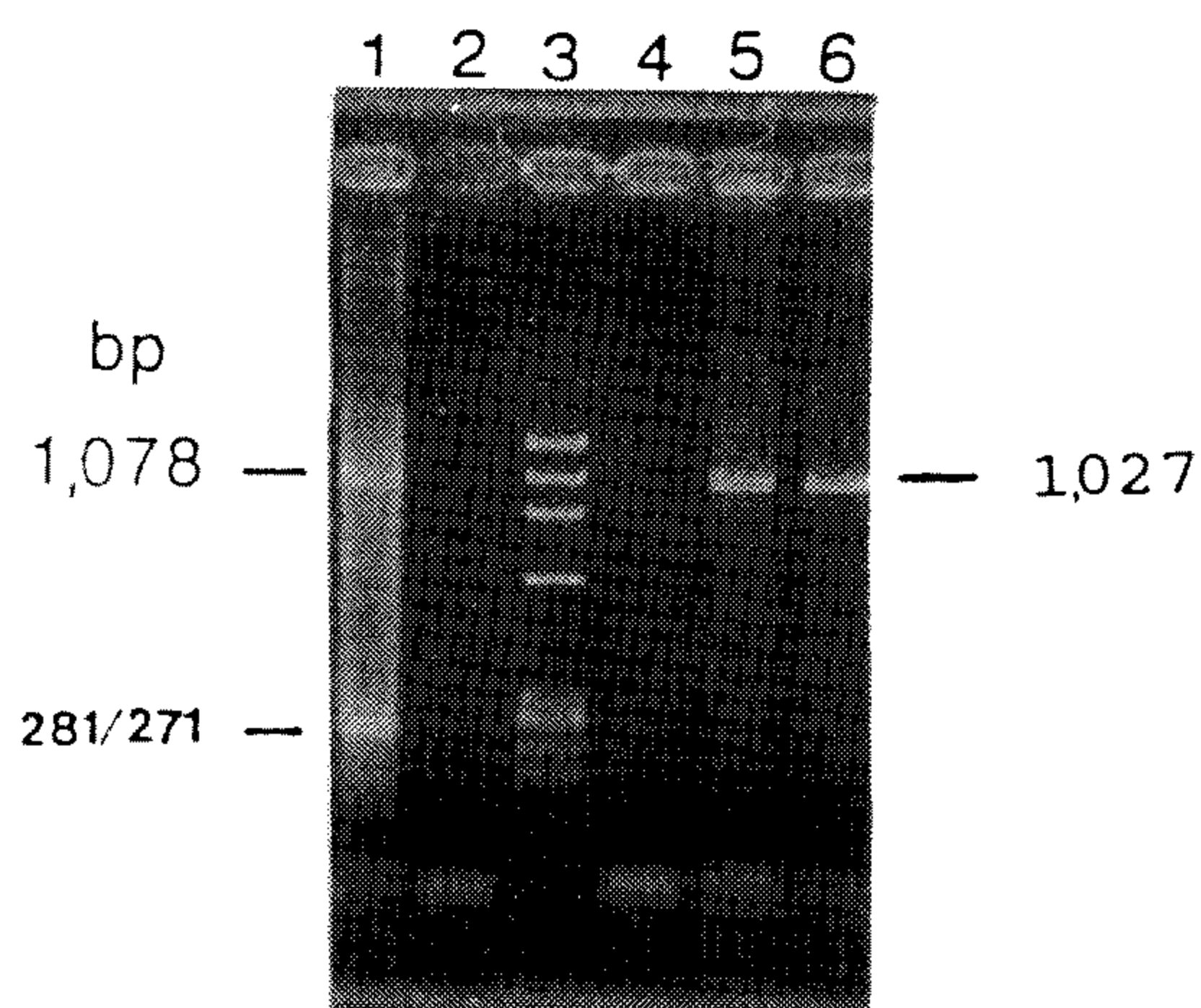


Figure 5. The product of HA1 gene amplification by PCR analyzed by agarose gel electrophoresis. Lane 1: cell lysate of virus-infected cells (12 hrs post-inoculation); Lane 2: blank; Lane 3: DNA marker (phi-X 174); Lane 4: cell lysate of control cells; Lane 5 and 6: 0.25 ml and 0.5 ml of virus stock (HA unit=64), respectively.

方法一免疫螢光染色和PCR)是否適用於其他中藥材之抗病毒作用的研究,因此在藥液濃度的使用與作用方法只初步局限於一點,如此較能掌握實驗條件的一致。關於這點,討論如下:(1)假如某種藥液確實可抑制A型病毒對細胞的感染,那真正有效的濃度範圍不一定與濃度的增強成正比,也就是說,需要多次、大量的實驗,測試或篩選才有可能找到最有效的抑制濃度。我們對這三種藥液均採用高濃度(如MCC或稍低於MCC),目的只是先看看在不傷害細胞前提下的最高濃度藥液對病毒是否有抑制作用。(2)藥液與病毒和細胞作用的方式有許多種,例如藥液與病毒(或細胞)先作用一段時間(時間的長短亦是一個可研究的因素),再與細胞(或病毒)接觸之方式;藥液、病毒與細胞三者同時作用,培養時亦維持相同藥液…等。同樣地,由於變數太多,需要長期投入人力物力才能一一控制變數將之付諸實驗。本實驗依據三環胺可抑制病毒的脫殼作用來考慮,採用藥液與病毒同時接種到細胞培養中的方法,並在隨後的2天培養中,維持相同的藥液濃度。由結果看來,我們初步的方向是正確的。上面提到的更進一步研究,我們正在進行中。

在本實驗中,大蒜抽取液抑制病毒抗原表現的效果最好,不過其粗抽取液對細胞的殺傷力也較強。這除了與實驗濃度有關外,大蒜精商品的其他添加物或大蒜植物本身的非藥理成份可能也會影

響細胞的生長。大蒜抽取液中主要有藥理作用的兩種化學成分是蒜苷與蒜素⁽¹⁾,本實驗使用的大蒜精,據廠商指出是以低溫萃煉法來保存這兩種重要成分的活性。進一步的實驗將可比較直接磨搗生大蒜之有機溶劑萃取液與本抽取液的差別。至於金線蓮方面,由於它屬於中藥材,有興趣的研究議題有很多,如不同來源的金線蓮:組織培養(本實驗所用);野生的;曬乾的藥材等。例如我們曾比較兩批不同金線蓮抽取物對細胞的毒性,發現有些差異,目前正在進行這些抽取液的抗病毒效果評估。將來進一步分析金線蓮抽取液中的化學成分與藥理研究,亦可充分應用於抗病毒作用之探討。

PCR這項增幅微量DNA或cDNA的技術非常方便、實用,自1986年廣泛地被全球各實驗室所爭相使用以來,其發展可謂日新月異,一日千里。在操作技術方面,DNA的抽取與增幅較不成問題,各種基因片段引子的選用與合成也有許多文獻可供參考。唯有細胞RNA或病毒RNA的抽取,反轉錄成cDNA及cDNA的大量增幅…等技術要克服。

如同本實驗所做,直接以數種不同濃度的病毒懸浮液為標本,增幅血球凝集素(HA)基因,均可得到1,027 bp的DNA產物。另外,選用不同的引子對,增幅非結構蛋白部分基因(NS gene)也已有成效。本實驗應用PCR技術來偵測A型流行性感冒病毒基因在細胞內的存在與複製之目的,在於進一步佐證免疫螢光染色法可作為抗病毒藥物篩選的工具。若是某種藥液在一定的作用方式與時間下,抑制了病毒HA與NP在細胞內的表現,而細胞內的病毒基因以PCR增幅仍無法測得時,可推測該藥物不僅抑制了病毒抗原的表現,也可能使病毒基因的複製作用受阻,如此可對此藥物做進一步的藥理成分分析及抗病毒作用機制的研究。本實驗的初步結果證實,抽取受病毒感染細胞內的病毒與細胞混合RNA,經反轉錄作用成cDNA後以PCR增幅,在感染12小時以後均可得到適當的DNA產物,不過仍有少量的非特定餘產物(extra-product)(圖五的Lane 1),這點有待進一步研究。

誌 謝

本研究接受衛生署中醫藥委員會計劃DOH-CD34及DOH-82-CM-061之資助,特此誌謝。感謝台北榮總病毒室醫檢師蔡正賢及陽明醫學院微生物暨免疫學研究所研究生陳樹人在實驗操作上的協助。

參考文獻

1. Block, E. 1985. The chemistry of garlic and onions. *Scientific American*. 232(3) : 94-99.
2. Liu, W.T., Wei, H.Y., Peng, Y.C. and Wang, H.C. 1989. Influenza virus isolates in Taiwan, 1977-1988. *J. Infect. Dis. Soci. Roc.* 2 : 1-8.
3. Liu, W.T., Chen, S.C., Lee, N., Tan, S.K., Liu, S.F., Dunn, P. and Chang, K.S.S. 1989. Establishment and characterization of a cell line of monocytic origin, HL-CZ, from human leukemia. *J. Biomed. Lab. Sci.* 4 : 283-292.
4. Liu, W.T., Chen, C.L., Lee, S.S.J., Chan, C. C., Lo, F.L. and Ko, Y.C. 1991. Isolation of dengue virus with a human promonocyte cell line. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44(5) : 494-499.
5. Hay, A.J., Wolstenholme, A.J., Skehel, J.J. and Smith, M.H. 1985. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J.* 4 : 3021-3024.
6. Sugrue, R.J., Bahadur, G., Zambom, M.C., Hall-Smith, M., Douglas, A.R. and Hay, A.J. 1990. Specific structural alteration of the influenza hemagglutinin by amantadine. *EMBO J.* 9 : 3469-3476.
7. Gadler, H., Larsson, A. and Solver, E. 1984. Nucleic acid hybridization, a method to determine effects of antiviral compounds on herpes simplex virus type 1 DNA synthesis. *Antiviral Res.* 4 : 63-70.
8. Swierkosz, E.M., Scholl, D.R., Brown J.L., Jollick, J.D. and Gleaves, C.A. 1987. Improved DNA hybridization method for detection of acyclovir-resistant herpes simplex virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31 : 1465-1469.
9. Telenti, A. and Smith, T.F. 1989. Screening with a shell vial assay for antiviral activity against cytomegalovirus. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 12 : 5-8.
10. Howell, C.L. and Miller, M.J. 1984. Rapid method for determining the susceptibility of herpes simplex virus to acyclovir. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2 : 77-84.
11. Rabalais, G.P., Levin, M.J. and Berkowitz, F. E. 1987. Rapid herpes simplex virus susceptibility testing using an enzyme-linked immunosorbent assay performed *in situ* on fixed virus-infected monolayers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31 : 946-948.
12. McLaren, C., Ellis, M.N. and Hunter, G.A. 1983. A colorimetric assay for the measurement of the sensitivity of herpes simplex viruses to antiviral agents. *Antiviral Res.* 3 : 223-234.
13. Prichard, M.N., Turk, S.R., Coleman, L.A. Engelhardt, S.L., Shipman, C. and Drach, J.C. 1990. A microtiter virus yield reduction assay for the evaluation of antiviral compounds against human cytomegalovirus and herpes simplex virus. *J. Virol. Methods.* 28 : 101-106.
14. Lathey, J.L., Van Voris, L.P. and Belshe, R.B. 1986. Superiority of tissue-culture-grown antigens over egg-grown antigens for serologic diagnosis of influenza B virus infections. *J. Med. Virol.* 19 : 155-159.
15. Brown, L.E., Hinshaw, V.S. and Webster, R.G. 1983. Antigenic variation in the influenza A viruses non-structure protein, NS1. *Virol.* 130 : 134-143.
16. Walls, H.H., Harmon, M.W.M, Slagle, J.J., Stocksadale, C. and Kendal, A.P. 1986. Characterization and evaluation of monoclonal antibodies developed for typing influenza A and B viruses. *J. Clin. Microbiol.* 23 : 240-245.
17. Maniatis, T., Fritsch, E. and Sambrooke, J. 1982. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. pp.187-193.
18. Rajakumar, A., Swierkosz, E.M. and Schulze, T. 1990. Sequence of an influenza virus hemagglutinin determined directly from a clinical sample. *Proc. Natl. Sci. Acad. USA.* 87 : 4154-4158.
19. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H. A. 1988. Enzymatic amplification of gammaglobin genomic sequences and restriction sites analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. *Science.* 230 : 1350-1354.
20. Ochaii, H., Kurokawa, M., Matsui, S., Yamamoto, T., Uroki, Y., Kishimoto, C. and Shira-

ki, K. 1992. Infection enhancement of influenza A NWS virus in primary murine macrophages by anti-hemagglutinin monoclonal antibody. J. Med. Virol. 36 : 217-221.

21. Hayden, F.G., Cote, K.M. and Douglas, R.G. Jr. 1980. Plaque inhibition assay for drug susceptibility testing of influenza viruses. Antimicrob. Agents Chemother. 17 : 865-870.

Evaluation of an in Vitro Virus Culture System for Anti-Virus Study of the Chinese Herb

CH'IEH-CHEN CHAN,*CIA-LON HOU, **CHU-HUNG CHUNG AND WU-TSE LIU

School of Medical Technology, National Yang-Ming Medical College, Taipei, Taiwan, R.O.C.

**Graduate Institute of Traditional Chinese Medicine, National Yang-Ming Medical College, Taipei, Taiwan, R.O.C*

***Department of Medical Technology, China Medical College, Taichung, Taiwan, R.O.C*

ABSTRACT

Influenza A virus was selected for anti-virus study with a garlic extract and a Chinese herb, *Anoectochilus formosanus* Hay. The virus was inoculated into the human promonocyte cell line, HL-CZ, which had been established in this laboratory. The infected cells have shown viral antigens detected by immunofluorescence staining with both monoclonal antibodies against virus nucleoprotein (NP) and hemagglutinin (HA) after 1-3 days of virus inoculation. This *in vitro* virus culture system was used as a tentative model for evaluating anti-virus activity of Chinese herbs.

The relative minimum concentration of cytotoxicity (MCC) of the herb preparation to the HL-CZ cells was observed and determined during 7 days of cultivation. The MCCs tested for garlic and *A. formosanus* Hay extracts were 1:10 dilution (from the original package of garlic essence) (10% w/v) and 4.0 mg/ml, respectively. In

several experiments, the average number of cells infected with the influenza A virus was 59.7%; those of the cells simultaneously treated with sub-MCC of garlic, *A. formosanus* Hay and amantadine solutions were 19.4%, 33.6%, and 30.6%, respectively. These results suggest that the expression of influenza viral antigens in cells was partially inhibited by the component in these herb extracts. In addition, the replication of viral RNA was measured by polymerase chain reaction (PCR) after the HA1 region of viral hemagglutinin gene was converted into cDNA with reverse transcription. It was shown that viral HA gene could be detected 12 hours post-inoculation even in the presence of Chinese herbs. This method could be applied to detect the replication of viral RNA when the virus-infected cells were treated with the extracts of Chinese herbs.

Key Words : Influenza virus, Chinese herb, Immunofluorescence staining, Polymerase chain reaction (PCR)