

治療肝疾方劑抗人類 B 型肝炎病毒作用之探討

六個傳統中藥複方抗人類 B 型肝炎病毒作用之研究

黃瑞齡¹，陳建志¹，張永勳²，張成國²，陳介甫¹，謝明村²

¹ 國立中國醫藥研究所

台北

² 中國醫藥學院

台中

(1999 年 7 月 19 日受理，1999 年 9 月 9 日收校訂稿，1999 年 9 月 14 日接受刊載)

摘 要

柴胡疏肝散、加味道遙散、一貫煎、血府逐瘀湯、甘露消毒丹及葉天士肝炎方等六個中藥複方。首先以酵素連結免疫吸附法(ELISA)分析測定 B 型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)及 e 抗原(HBeAg)的抑制為指標，結果顯示 (1) 柴胡疏肝散、加味道遙散、一貫煎及血府逐瘀湯，對 B 型肝炎病毒表面抗原及 e 抗原無抑制作用，亦無顯著細胞毒害作用。(2) 甘露消毒丹的甲醇提取物，在劑量 200 $\mu\text{g/ml}$ ，無細胞毒害作用下，具有抑制 B 型肝炎病毒表面抗原之作用 ($P < 0.01$)，其抑制作用隨劑量之增加而增強，其抑制百分比於給藥處理第九天達到最高為 32.5%。(3) 葉天士肝炎方的甲醇提取物，在劑量 200 $\mu\text{g/ml}$ ，無細胞毒害作用下，具有抑制 B 型肝炎病毒表面抗原 ($P < 0.01$) 及 e 抗原之作用 ($P < 0.01$)，其抑制最高百分比分別為 28.7 及 30.3%。

關鍵詞：B 型肝炎病毒，表面抗原，e 抗原，中藥複方。

連絡人：謝明村，中國醫藥學院中國藥學研究所，電話：(04)2053366 轉 1706。

前言

人類 B 型肝炎病毒感染是引起急性及慢性肝炎的主要病因之一、長期感染極易發展成肝硬化或發生原發性肝癌¹⁻³。危害國人健康至劇，因此抗 B 型肝炎病毒藥物之開發研究為當務之急。人類肝癌細胞株 (MS-G2)，由於此細胞株的染色體上有 HBV DNA 嵌入(integrated)，可持續高量地分泌 B 型肝炎病毒顆粒體，為極佳之研究 B 型肝炎病毒複製，及探討藥物活性的體外模式(*In Vitro Cell Culture Model*)⁴。從天然物(natural products)中尋找具有抗病毒能力之藥物，是近年來重要的研究途徑，尤其從已有臨床依據的中藥方中，尋找抗病毒藥物，更是目前的研究方針。

柴胡疏肝散、加味道遙散、一貫煎、血府逐瘀湯、甘露消毒丹及葉天士肝炎方等六個中藥複方，在臨床上使用已有悠久的歷史，根據記載及臨床經驗得知，具有治療右脅疼痛、黃疸及肝疾的療效。其對於 B 型肝炎病毒之作用值得探討。本研究以 MS-G2 為體外模式，首先以酵素連結免疫吸附法(ELISA)分析測定 B 型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)及 e 抗原(HBeAg)的抑制為指標，結果顯示僅甘露消毒丹及葉天士肝炎具有抑制 B 型肝炎病毒之作用。

材料與方法

1. 供試藥材之組成、出處、採購

供試藥材。柴胡疏肝散、加味道遙散、一貫煎、血府逐瘀湯、甘露消毒丹及葉天士肝炎方等六個中藥複方，其組成分別為：(1).柴胡疏肝散《景岳全書古方八陣》：陳皮醋炒 6 g、柴胡 6 g、川芎 4.5 g、香附 4.5 g、枳殼麩炒 4.5 g、芍藥 4.5 g、甘草炙 1.5 g。(2).加味道遙散《內科摘要》：柴胡 30 g、當歸微炒 30 g、白芍 30 g、白朮 30 g、茯苓 30 g、丹皮 30 g、梔子 30 g、甘草微炙赤 15 g。(3).一貫煎《柳州醫話》：北沙參 10 g、麥冬 10 g、地黃 30 g、當歸 10 g、杞子 12 g、川楝子 5 g。(4).血府逐瘀湯《醫林改錯》：當歸 9 g、生地 9 g、桃仁 12 g、紅花 9 g、枳殼 6 g、赤芍 6 g、柴胡 3g、甘草 6 g、桔梗 5 g、川芎 5 g、牛膝 9 g。(5).甘露消毒丹《續名醫類案》：飛滑石 45 g、淡黃芩 30g、綿茵陳

33 g、石菖蒲 18 g、川貝母 15g、木通 15 g、藿香 12 g、連翹 12 g、白蔻仁 12 g、薄荷 12 g、射干 12 g、(6).葉天士肝炎方《臨症指南醫案》:黃耆 7.5 g、甘草 7.5 g、白朮 7.5 g、生薑 7.5 g、白芍 7.5 g、白扁豆 7.5 g、茯苓 7.5 g、大棗 3.75 g。以上六個供測試之中藥複方，均購自台北春元中藥行。

2. 供試樣品之製備

每一複方之總重量約 100 公克，然後依單方之抽取方式，冷凍乾燥，所得之抽出物，先稱取約 50 毫克進行活性檢測。所剩之抽出物再以甲醇溶解，過濾，濾液濃縮去除甲醇，即得甲醇抽出物，稱取甲醇抽出物約 50 毫克，進行活性檢測。

3. 細胞培養⁵

人類肝癌細胞株 MS-G2，培養於含 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 RPMI-1640 培養基(Gibco Laboratories, Grand Island, NY)中，每毫升的培養基內添加 100 I.U.青黴素(penicillin)、100 µg 鏈黴素(streptomycin)、2.5 µg 防治黴(fungizone)、2 mM 麩氨酸(L-glutamine)及 100 µM 之非必需性氨基酸(non-essential amino acid，包括 14.7 µg glutamic acid, 7.5 µg glycine, 8.9 µg alanine, 13.3 µg aspartic acid, 11.5 µg proline, 15 µg asparagine 及 10.5 µg serine)，以上稱完全培養基，置於含 5%二氧化碳的 37°C 培養箱中。

4. 抗病毒藥物之處理

在 24 well 的細胞培養皿，每 well 種入 MS-G2 3.0×10^5 細胞，待一天後細胞充分附著於細胞培養皿底部，更新培養基，同時給予三種 (200, 150,及 100 µg/ml) 不同劑量之供試藥物，每個劑量三重覆。每三天更換一次新的培養基並繼續給予測試藥物。給藥處理第三、六、九及十二天，收集上層培養液，進行抗病毒活性測定。供試藥物溶於三次蒸餾之無菌水者，其對照組亦加入等體積之三次蒸餾之無菌水，若供試藥物溶於 dimethyl sulfoxide (DMSO) 者，其對照組亦加入等體積之 DMSO，DMSO 之劑量最高為 2.5 µl/ml。

5. Aspartate Aminotransferase (AST)之測定⁶

給藥處理後，收集上層培養液，以 Abbott Vision II AST assay kit 測定 AST 值，其單位為 International Unit per Liter，簡稱 I.U./L，用以作為藥物是否具細胞毒性 (cytotoxicity) 之指標。在 24 well 的細胞培養皿，每 well 種入 MS-G2 $3.0 \times$

10⁵ 細胞，其 AST 正常值不超過 25 I.U./L，AST 值隨著細胞壞死的嚴重程度而升高。

6. B 型肝炎病毒表面抗原及 e 抗原之酵素免疫測定⁷

利用酵素連結免疫吸附分析法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)，使用抗人類 B 型肝炎病毒表面抗原之單株抗體及抗人類 B 型肝炎病毒 core/e 抗原之多源抗體的酵素免疫檢驗試劑 (普生生物科技公司, 新竹, 台灣)，利用抗體-抗原-抗體-酵素接合體之三明治複合體，以含過氧化氫的熾苯二氨 (OPD) 溶液呈色之，再以分光比色計 DYNATECH MR7000 型 ELISA reader 在 490 nm 測定之，所得的吸光值(O.D. value)反應出抗原的多寡。並以對照組的吸光值當 100，依以下公式計算其抑制百分比(Inhibition %)：

$$\frac{\text{對照組吸光值}-\text{給藥組吸光值}}{\text{對照組吸光值}} \times 100\% = \text{抑制百分比(Inhibition \%)}$$

7. 統計分析

本研究所有結果的數據為三次重覆實驗所得以平均值 ± 標準偏差(Mean ± S.D.)表之。並以 unpaired student's t-test 方法分析其間差異之顯著性。P 值小於 0.05 時則認定其差異具統計學上之意義。

結果

柴胡疏肝散、加味道遙散、一貫煎、血府逐瘀湯、甘露消毒丹及葉天士肝炎方等六個中藥複方之抗病毒作用的篩選，初步結果如表一所示：(1) 柴胡疏肝散、加味道遙散、一貫煎及血府逐瘀湯等四個中藥複方的甲醇提取物，在供測試的三個劑量 (100、150、200 μg/ml)，給藥處理六天，對 B 型肝炎病毒表面抗原及 e 抗原均無抑制作用。(2) 供測試的六個中藥複方除了一貫煎在劑量 200 μg/ml，AST 值 26.3 I.U./L，有極輕微的高於正常值 25.0 I.U./L，其餘五個中藥複方均無顯著細胞毒害作用。(3) 甘露消毒丹的甲醇提取物，給藥處理六天，在劑量 150 μg/ml 無細胞毒害作用，具有顯著抑制 B 型肝炎病毒表面抗原之作用 (P < 0.01)，其抑制百分比為 27.5%，其抑制作用隨劑量之增加而增強，在劑量 200

$\mu\text{g/ml}$ ，其抑制百分比為 31.1 % ($P < 0.01$)。(4) 葉天士肝炎方的甲醇提取物，給藥處理六天，在劑量 150 $\mu\text{g/ml}$ 無細胞毒害作用，具有抑制 B 型肝炎病毒表面抗原 ($P < 0.05$) 及 e 抗原之作用 ($P < 0.05$)，其抑制百分比分別為 22.6 及 19.3 %，其抑制作用隨劑量之增加而增強，在劑量 200 $\mu\text{g/ml}$ ，具有顯著抑制 B 型肝炎病毒表面抗原 ($P < 0.01$) 及 e 抗原 ($P < 0.01$) 之作用，其抑制百分比分別為 27.1 及 26.1 %。

為了更進一步探討給藥處理六天呈現抑制病毒作用之甘露消毒丹及葉天士肝炎方二個中藥複方，其作用的時間趨勢及長時間處理的效應，進行給藥處理三、六、九、十二天，監測 B 型肝炎病毒產生的量。結果如圖一，甘露消毒丹的甲醇提取物在劑量 150 及 200 $\mu\text{g/ml}$ ，給藥處理三天，就具有抑制 B 型肝炎病毒表面抗原之作用，其抑制百分比分別為 21.8 ($P < 0.05$) 及 28.2 % ($P < 0.05$)，於給藥處理第九天達到最高為 32.5 %，150 及 200 $\mu\text{g/ml}$ 二劑量之間的作用強度差異隨著處理時間的加長漸小。圖二顯示，葉天士肝炎方的甲醇提取物在劑量 150 及 200 $\mu\text{g/ml}$ ，給藥處理三天，對於 B 型肝炎病毒表面抗原之抑制百分比分別為 20.6 ($P < 0.05$) 及 24.2 % ($P < 0.05$)，其抑制 B 型肝炎病毒表面抗原之作用，於給藥處理第九天達到最高為 28.7 ($P < 0.01$)，也呈現 150 及 200 $\mu\text{g/ml}$ 二劑量之間的作用差異漸小的現象。圖三顯示，葉天士肝炎方的甲醇提取物在劑量 150 $\mu\text{g/ml}$ ，給藥處理三、六、九、十二天，對於 B 型肝炎病毒 e 抗原無抑制作用，劑量 200 $\mu\text{g/ml}$ ，對於 B 型肝炎病毒 e 抗原之抑制百分比分別為 22.4、26.7、27.5 及 30.3 %，隨著處理時間的加長抑制作用增強。

討論

近年來我們以具有 B 型肝炎病毒基因體嵌入其內之人類肝癌細胞株 MS-G2，進行中草藥抗 B 型肝炎病毒藥物之篩檢工作。人類肝癌細胞株 MS-G2，係哈佛大學 Dr. Max Essex 之實驗室所建立，乃利用肝癌細胞株 HepG2 經轉染 (transfection) 帶有完整 HBV DNA (*ayw*)及 neomycin resistance 基因的質體後，以 G418 篩選，再經由系列稀釋 (limiting dilution) 得到的細胞株，命名為 MS-G2。

由於此細胞株有完整的 HBV DNA 的嵌入 (integrated), 且已形成一個穩定的細胞株, 故可持續高量的分泌 B 型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、e 抗原(HBeAg) 及病毒顆粒體 (42 nm Dane particles and 22 nm subviral particles), 為極佳之研究 B 型肝炎病毒複製, 及探討藥物活性的體外模式⁴。

柴胡疏肝散、加味道遙散、一貫煎、血府逐瘀湯、甘露消毒丹及葉天士肝炎方, 為中醫臨床使用於治療肝炎之六個經驗方, 其對於 B 型肝炎病毒之作用值得探討。此六個中藥複方除了葉天士肝炎方有文獻報導具抑制 B 型肝炎病毒表面抗原之作用外⁸, 其餘五個中藥複方為首次進行抗 B 型肝炎病毒之測試。至於具抗病毒作用之單味藥材, 其有效成分之追蹤及分離正在進行中。待分離得有效成分後, 進一步探討其作用機制。

致謝

本文係中國醫藥學院中西整合指導委員會之專題研究計畫 (SCIWCM-86-H001) 之成果, 特此致謝。

參考文獻

1. Szmunness W. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: evidence for a causal association. *Prog Med Virol* 24: 40-69, 1978.
2. Beasley RP, Huang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22,707 men in Taiwan. *Lancet* 2: 1129-1133, 1981.
3. Beasley RP, Hwang LY. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. In Vyas, G. N. (eds). *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Grune & Stratton, New York, pp.209-224, 1984.
4. Sureau C, Romet-Lemonne JL, Mullins JI, Essex. M. Production of hepatitis B virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA. *Cell* 47:37-47, 1986.

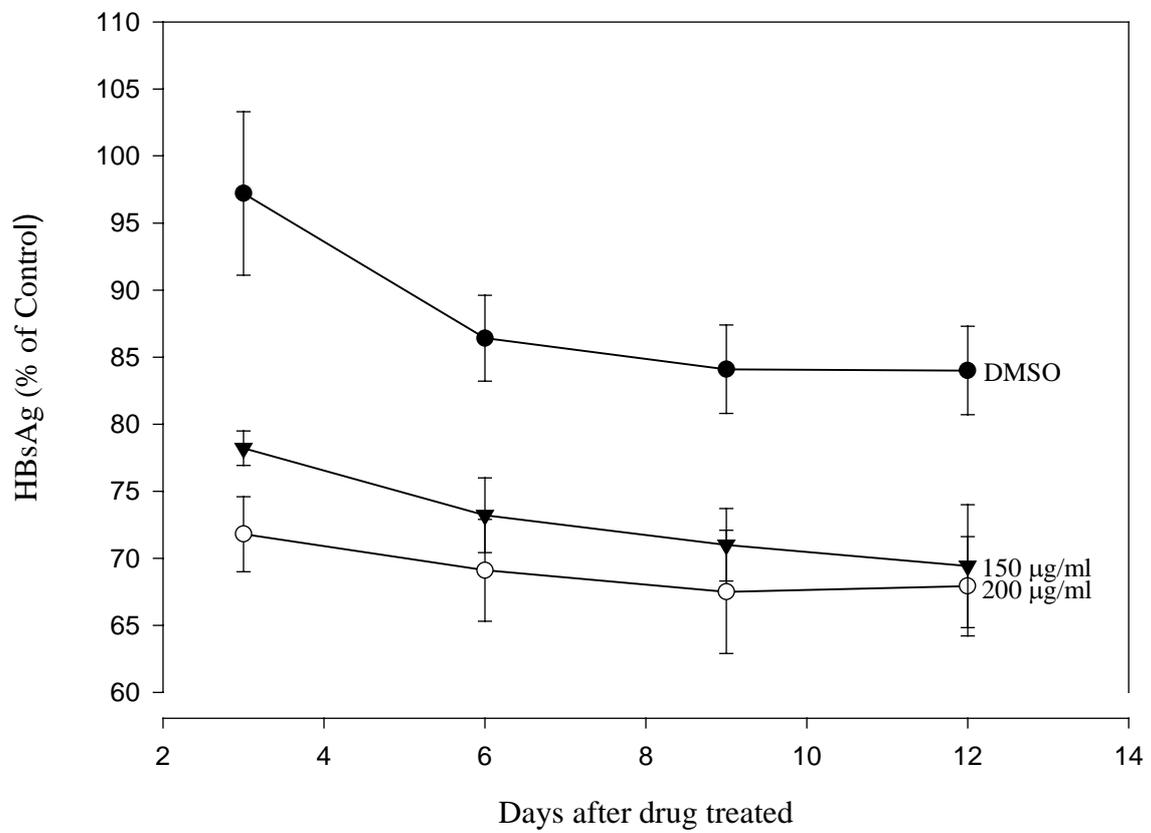
5. Huang, RL, Chen CC, Huang YL, Hsieh DJ, Hu CP, Chen CF, Chang CM. Osthole increases glycosylation of hepatitis B surface antigen and suppresses the secretion of hepatitis B virus *in vitro*. HEPATOLOGY 24(3):508-515, 1996.
6. Tietz, NW. Fundamentals of clinical chemistry. Philadelphia: Saunders, 674, 1976.
7. Lee, HS, Vyas GN. Diagnosis of viral hepatitis. Clin. Lab. Med. 7:757, 1987.
8. 劉河順，葉天士湯在人類肝癌細胞株 A₂ 對抗 B 型肝炎病毒表面抗原成份之研究，陽明大學藥理所碩士論文，1994。

表一、六種中藥複方抗 B 型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)及 e 抗原 (HBeAg)之作用

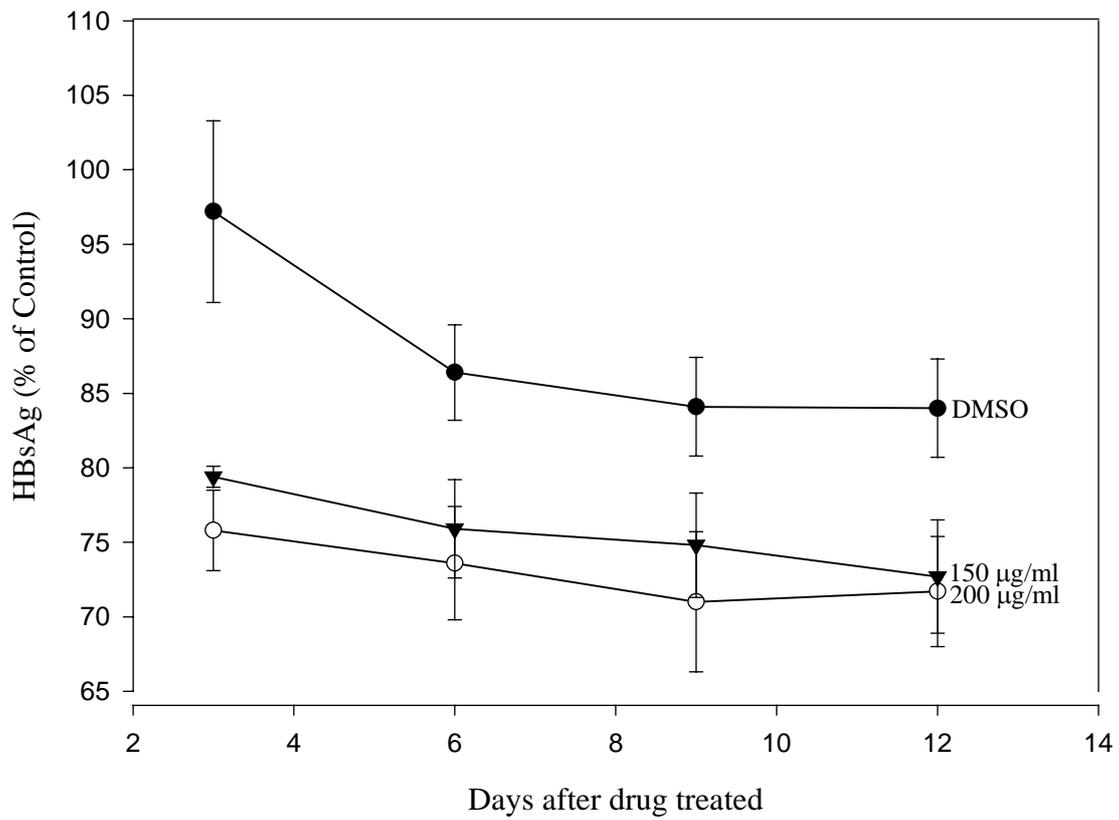
Treatments for 6 days	µg/ml	HBsAg (Inhibition %) (Mean± S.D.)	HBeAg (Inhibition %) (Mean± S.D.)	AST (I.U./L) (Mean± S.D.)
Control	0	0	0	< 25
DMSO	2.5 µl/ml	15.1 ± 3.7	15.4 ± 1.9	< 25
柴胡疏肝湯	200µg/ml	19.3 ± 3.2	-24.7 ± 3.0	21.0 ± 2.0
	150µg/ml	10.2 ± 3.7	-21.9 ± 3.2	20.4 ± 2.1
	100µg/ml	14.4 ± 1.6	-17.8 ± 0.8	15.5 ± 0.9
加味逍遙散	200µg/ml	19.8 ± 3.2	-22.5 ± 3.2	18.5 ± 0.8
	150µg/ml	18.0 ± 3.4	-8.8 ± 2.5	17.2 ± 2.0
	100µg/ml	16.1 ± 1.7	-5.5 ± 0.8	15.3 ± 1.6
一貫煎	200µg/ml	-3.5 ± 12.8	5.3 ± 2.6	26.3 ± 2.1
	150µg/ml	2.2 ± 9.2	2.4 ± 7.8	25.6 ± 2.7
	100µg/ml	-0.6 ± 8.4	16.4 ± 2.6	20.4 ± 0.7
血府逐瘀湯	200µg/ml	8.0 ± 4.0	-9.9 ± 4.2	20.3 ± 1.1
	150µg/ml	8.2 ± 1.1	0.4 ± 7.9	18.2 ± 2.1
	100µg/ml	9.0 ± 2.8	1.8 ± 6.1	16.4 ± 1.1
甘露消毒丹	200µg/ml	31.1 ± 2.0**	15.7 ± 3.0	20.6 ± 1.5
	150µg/ml	27.5 ± 0.9**	13.9 ± 1.6	17.9 ± 1.7
	100µg/ml	1.5 ± 11.1	8.9 ± 2.1	16.5 ± 0.9
葉天士肝炎方	200µg/ml	27.1 ± 2.1**	26.1 ± 1.4**	23.0 ± 1.2
	150µg/ml	22.6 ± 2.2*	19.3 ± 0.8*	17.6 ± 1.4
	100µg/ml	17.6 ± 1.5	15.3 ± 2.1	14.6 ± 1.8

AST : aspartate aminotransferase (= GOT).

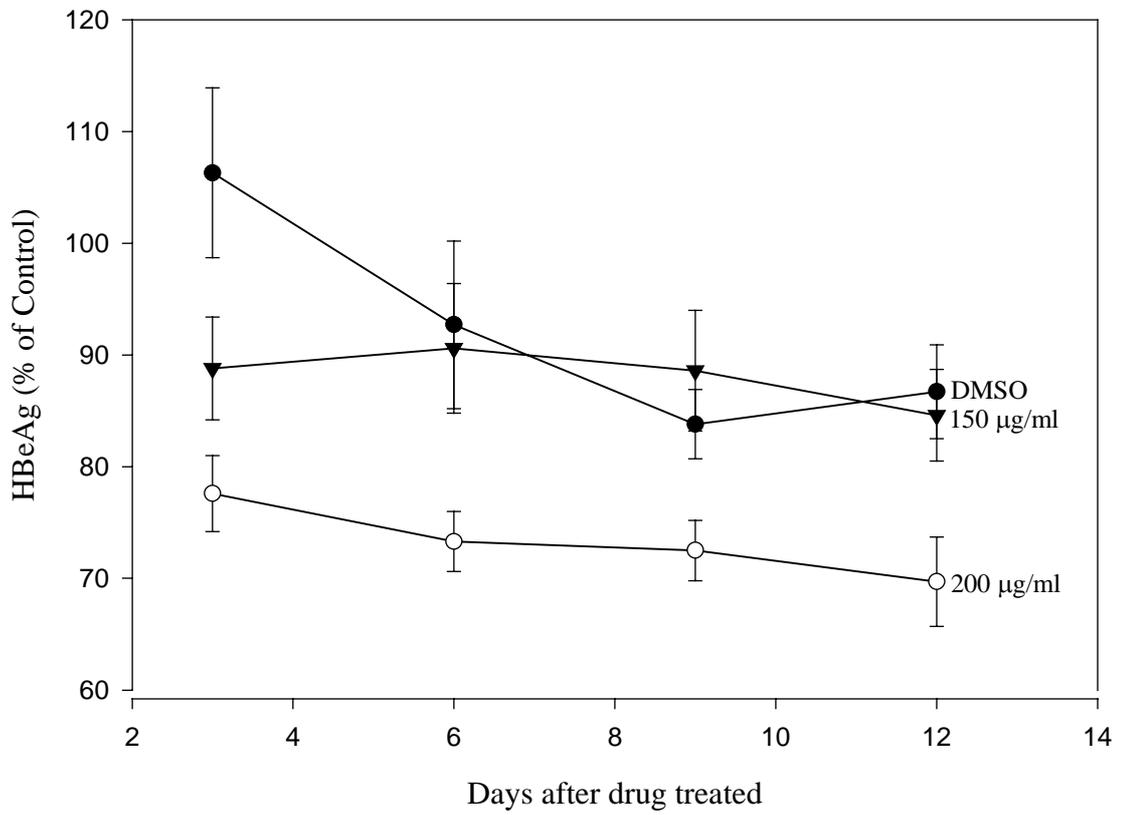
Each value represents the mean ± standard deviation obtained from 3 repeats. Values significantly different from DMSO treated group are indicated by student's t test. * P< 0.05; ** P< 0.01.



圖一、甘露消毒丹給藥處理十二天抑制 B 型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg)之作用



圖二、葉天士肝炎方給藥處理十二天抑制 B 型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 之作用



圖三、葉天士肝炎方給藥處理十二天抑制 B 型肝炎病毒 e 抗原 (HBeAg)之作用

Studies on the Anti-Human Hepatitis B Virus Activities of the Prescriptions treating for Liver Disease

Anti-HBV Effects of Six Traditional Chinese Prescriptions

Ray-Ling Huang¹, Chien-Chih Chen¹, Yuan-Shiun Chang², Chung-Gwo Chang², Chieh-Fu Chen¹, and Ming-Tsuen Hsieh²

¹National Research Institute of Chinese Medicine
Taipei

²China Medical College
Taichung

(Received 19th July 1999, revised Ms received 9th September 1999, accepted 14th September 1999)

Chai-hu-shu-kan-san(柴胡疏肝散), Chia-wei-shiau-yau-san(加味道遙散), I-quan-chien(一貫煎), Xue-fu-zhju-yu-tang(血府逐瘀湯), Kan-lu-hsiao-tu-dan(甘露消毒丹), and Yap's soup(葉天士肝炎方) are six most commonly employed decoctions in traditional Chinese medicine for treating pain of right upper-abdomen, jaundice, hepatitis, and liver disease. In this study, we study their effects by analyzing the HBsAg and HBeAg as anti-viral indicators by using ELISA assay. Our results showed that : (1) Chai-hu-shu-kan-san, Chia-wei-shiau-yau-san, I-quan-chien, and Xue-fu-zhju-yu-tang depict either anti-HBV effects no cytotoxic effects. (2) The methanol extract of Kan-lu-hsiao-tu-dan , at dose 200 µg/ml, depicts anti-HBsAg activity(P<0.01) and without cytotoxic effect. The inhibition effect was found to be dose dependent. This effect was highest after drug treatment at the ninth days with the inhibition percentage up to 32.5%. (3) The methanol extract of Yap's soup , at dose 200 µg/ml, depicts no cytotoxic effect while showing anti-HBsAg (P<0.01) and anti-HBeAg (P<0.01)activities. The highest inhibition percentage of HBsAg and HBeAg is 27.1 and 26.1%; respectively.

Key Words: Hepatitis B virus, Surface antigen, e antigen, Chinese prescription.

Correspondence to: Ming-Tsuen Hsieh, Graduate Institute of Chinese Pharmaceutical Science, China Medical College, TEL: (04)2053366-1706