

中藥「乙肝康」對豬傳染性胃腸炎病毒 在細胞培養時感染力的影響

林恕弘 鄭益謙 翁仲男 *陳啓銘

台灣養豬科學研究所病理生物系 苗栗縣竹南鎮
(收稿日期: 88年8月18日。接受日期: 89年3月14日)

摘要 中藥「乙肝康」為台灣本土所研發之新型方劑，為數種草藥萃取物以不同比例混合而成。為了解該中藥在獸醫學可能的應用，我們用傳染性胃腸炎病毒 (TGEV) 的豬睪丸細胞組織培養系統為研究模式，探討該中藥對 TGEV 感染力的影響。藉由 TCID₅₀ 的測量發現中藥與病毒混合後，在不同濃度中藥與作用溫度，病毒對細胞的感染力均受到相當程度之抑制。由濃度與細胞數的關係，得到中藥對細胞之 ID₅₀ 為 28.8 µg/mL。TGEV 經中藥低於 ID₅₀ 的三個濃度 (6.3, 10 及 25 µg/mL) 混合作用，其 TCID₅₀ 分別為對照組之 12.07 ± 2.85%，3.02 ± 0.78% 和 8.84 ± 1.07%；顯示中藥濃度與病毒感染力之抑制，並非呈線性關係。若中藥與病毒分別在 4, 25, 37°C 作用，發現只有在 25 與 37°C 時病毒感染力受到抑制，其 TCID₅₀ 分別為對照組之 44.53 ± 9.24%，3.02 ± 0.42%；顯示在生理溫度時中藥的抑制作用最高。考慮中藥對細胞前處理對病毒感染力的影響，發現細胞分別經中藥 2 或 8 小時處理後，病毒感染力受到相同程度抑制，其 TCID₅₀ 約為對照組之四分之一。這點表示中藥的處理可改變細胞性質使病毒對細胞的感染受到抑制，此過程在處理 2 小時內即可完成。[林恕弘、鄭益謙、翁仲男、*陳啓銘。中藥「乙肝康」對豬傳染性胃腸炎病毒在細胞培養時感染力的影響。中華獸醫誌 26 (2): 110-116, 2000。*聯絡人 TEL: 037-672 352, FAX: 37-692 820, E-mail: chimin@mail.prit.org.tw]

關鍵詞: 中藥, 豬傳染性胃腸炎病毒, 毒性分析

緒 言

將植物的萃取物應用於疾病之預防與治療，是目前醫學研究一個重要的方向，例如紫衫醇 (Taxol) 應用於癌症治療便相當成功 [4]。中藥在東亞諸國流傳的歷史久遠，因此衍生出各式方劑，其中包含了許多植物成份對保健與疾病治療上有其效果。若先就中藥的成效加以科學性驗證再分離其有效成份，將是新藥開發的一個理想途徑。除了人類醫學外，應用中藥於家畜禽的飼養管理，例如生長促進劑和獸醫學之研究，亦將對這方面產業的發展有所助益。

「乙肝康」是台灣本土廠商新研發的中藥方劑，乙肝康為數種中藥，主要成份含：枸杞子 (*Fructus lycii*)，黃耆 (*Radix astragali* Seu *Hedysari*)，山楂 (*Fructus crataegi*)，重樓

(*Rhizoma paridis*)，當歸 (*Radix angelicae Sinensis*)，白花蛇草 (*Ancistrodon acutus*)，山藥 (*Rhizoma dioscoreae*)，以及五葉蔘 (*Radix codonopsis lanceolatae*) 的萃取物製成的方劑，其組成份均有其藥理作用 [1]。根據非正式研究報告指出，「乙肝康」在體外試驗和臨床試驗中對 B 型肝炎病毒具抑制作用。為求擴大該中藥之適用範圍，必須驗證對其它病毒之影響。豬的傳染性胃腸炎病毒 (transmissible gastroenteritis virus; TGEV) 是冠狀病毒的一個成員，可感染於各年齡層豬，但主要在仔豬引起嚴重下痢與極高死亡率 [9]。TGEV 是 RNA 正鏈病毒，易於培養並進行相關的研究，因此選作乙肝康與 RNA 病毒交互作用的研究模式。TGEV 可利用多種初代細胞或細胞株來培養增殖 [6]，在這個過程中，病毒會引發典型的細胞病變 (cytopathic effect; CPE)，可據此測量 TCID₅₀ (50% tissue culture infective dose)

以定量病毒對細胞的感染能力 [8]。

這個試驗的目的，是利用體外細胞培養系統來探討中藥「乙肝康」對 TGEV 感染能力的影響，做為該中藥應用於獸醫學的首次評估。

材料與方法

病毒株，細胞株和培養方法 所使用 TGEV 病毒 (TFI-55) 為台灣分離株，增殖於豬睪丸細胞株 (swine testis cell; ST cell)。以 E-MEM (Eagle's minimum essential medium) 添加 10% 胎牛血清與抗生素，100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin 以及 100 IU/mL penicillin，做為基本培養液。細胞在 37°C，5% CO₂ 恆溫培養箱生長至全滿後，病毒以 0.5 m.o.i. (multiplicity of infection) 比例感染細胞，經 24 小時增殖後收取上清液並以低速離心除去細胞碎片。離心液儲存在 -70°C 冰箱後，取出部份樣品經過連續 10 倍稀釋滴定病毒感染力價，TCID₅₀，以供使用。

中藥 所有本試驗所用中藥「乙肝康」為廠商同批樣品，並已製成針劑型式，滲透壓和體液與基本培養液相同。在無菌操作台 (laminar flow) 截開針劑包裝之玻璃瓶後，倒出中藥液並通過 0.22 μm 過濾器以確保無菌狀態。

中藥對細胞之毒性試驗 細胞以 10⁴ 個/孔濃度種至 96 孔培養盤 (Corning, USA) 在基本培養液，37°C，5% CO₂ 恆溫培養箱培養 24 小時。之後除去培養盤內基本培養液並用 PBS (phosphate-buffered saline) 洗淨，再加入含以下濃度中藥之 1% 胎牛血清 E-MEM: 100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。其中每個濃度處理重覆四孔。經過 24 小時中藥培養後，以標準細胞計數法包括 Trypan blue 染色法 [5] 計算每個孔內活細胞數。數據以 EXCEL 之線性迴歸模式 (Microsoft, USA) 處理，得到趨勢線公式並藉以推算中藥「乙肝康」對細胞之 ID₅₀ (50% of Inhibition Dose)。

中藥對 TGEV 感染力之影響 本試驗以如下三種設計，探討中藥「乙肝康」對 TGEV 感染力可能之影響：

TGEV 分別與三種低於 ID₅₀ 濃度 (6.3, 10,

25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 之中藥，在 37°C 下混合作用 2 小時，之後以含 1% 胎牛血清的基本培養液作 10 倍連續稀釋至 10⁷。細胞以 2 × 10⁴ 個/孔濃度種至 96 孔培養盤，24 小時後移除原培養液再加入以上病毒稀釋液，其中每個稀釋組重覆 8 孔。36 小時後觀察 CPE 並根據 Reed & Muench 公式 [8] 計算 TCID₅₀，來評估 TGEV 感染力的變化。

TGEV 在 4, 25, 37°C 環境下分別與中藥 (濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 混合作用 2 小時，之後重複以上過程計算 TCID₅₀，來評估 TGEV 感染力的變化。

細胞 (濃度 10⁴ 個/孔) 種至 96 孔培養盤，24 小時後移除原培養液，PBS 清洗後加入中藥 (濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，37°C，5% CO₂ 恆溫培養箱培養 2 或 8 小時。細胞經過如此中藥前處理後，再加入 TGEV，並重複上述過程計算 TCID₅₀ 以評估 TGEV 感染力的變化。

除了以 CPE 做為 TCID₅₀ 計算的根據外，以上三項實驗均再用間接螢光染色 [2] 來確定 TGEV 的感染現象。螢光染色使用抗 TGEV 核酸蛋白的單株抗體 17D9，以 1000 倍 PBS 稀釋後，加入已用丙酮固定之細胞樣品。於 37°C 下感作 30 分後，以 PBS 清洗三次，再加上 500 倍 PBS 稀釋之 FITC 結合山羊抗小白鼠 IgG 抗體 (Biogenesis, England)。在以上條件感作和清洗後，在螢光倒立顯微鏡下觀察。細胞質內有 FITC 螢光者，判定為有 TGEV 感染之細胞。

統計方法

以單因子變異數分析 (one-way analysis of variance) 方法，分析超過二組實驗組間差異。以成對觀測值 *t* 檢定 (paired *t*-test)，分析對照組與實驗組差異或二組實驗組間差異。

結 果

中藥「乙肝康」對豬睪丸細胞株的毒性試驗 中藥以 6 種濃度處理豬睪丸細胞 (詳見材料與方法)，發現濃度愈高活細胞數愈少 (Fig. 1 (A))，顯示中藥具有毒性。以 Log₂ 表示濃度數量，與細胞數 (以對照組百分比顯示) 相對應呈線性關係。採用線性迴歸模式處理數據，得趨勢線公式 (Fig. 1 (B))。根據公式算出 ID₅₀ (50% inhibition dose)

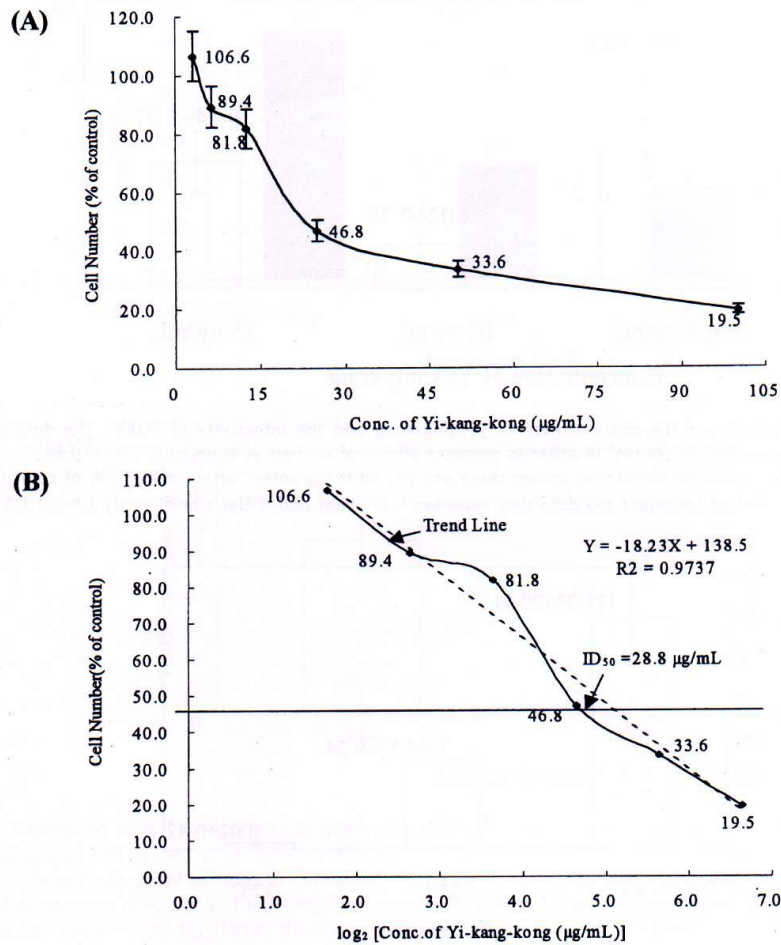


Fig. 1 Toxicological effects of the Chinese drug yi-kang-kong on the ST cell line. (A) Relationship between the concentration of yi-kang-kong and the number of viable cells, represented as percentage of control (without addition of yi-kang-kong), after 24h of culture with yi-kang-kong. Dose-dependent growth-inhibitory effects were observed in the cell line. Values represent the average of 3 separate experiments with quaternary wells. (B) The trend line, based on the growth-inhibitory curve of yi-kang-kong and calculated by the linear regression model supplied by Excel (Microsoft, USA), indicates that the 50% inhibition dose (ID_{50}) of the drug is 28.8 µg/mL.

為 28.8 µg/mL。即中藥濃度 28.8 µg/mL 時，可抑制 50% 細胞量。

中藥「乙肝康」濃度對 TGEV 感染力之影響

以三種低於 ID_{50} 濃度中藥，分別與 TGEV 在 37°C 作用 2 小時（中藥與病毒混合後濃度各為 6.3 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL）。之後將混合物連續 10 倍稀釋，以測量每 mL 病毒液 $TCID_{50}$ 做為感染力

指標。其 $TCID_{50}$ 的對數值分別為 4.38, 4.23, 及 4.69，與對照組 5.76 相比較，有顯著性差異 ($P < 0.01$)。將處理組數量以對照組百分比表示 (Fig. 2)，發現各組 $TCID_{50}$ 分別為對照組之 $12.07 \pm 2.85\%$, $3.02 \pm 0.78\%$ 和 $8.84 \pm 1.07\%$ (按濃度由低至高順序)，以 10 µg/mL 中藥對 TGEV 感染力的抑制效果較佳。

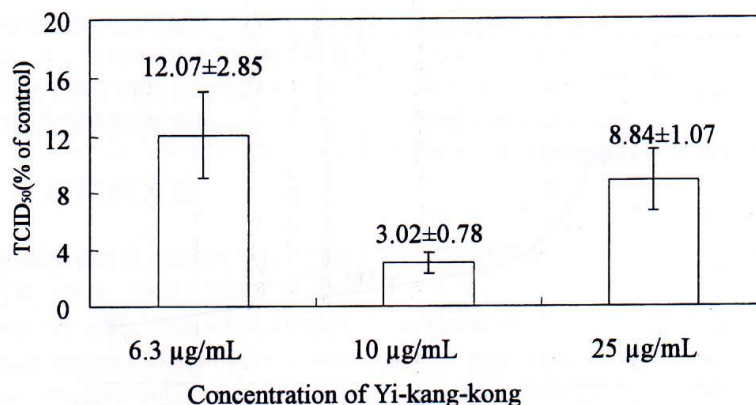


Fig. 2 Relationship between the concentration of yi-kang-kong and the infectivity of TGEV. The data of TCID₅₀ were presented as percentage of control in order to compare effects of various yi-kang-kong concentrations under the same basis. The TGEV infectivity decreased among these groups, to the greatest extent about 3% of control in concentration 10 µg/mL. Values represent the data that repeated four times and differ significantly ($P < 0.05$).

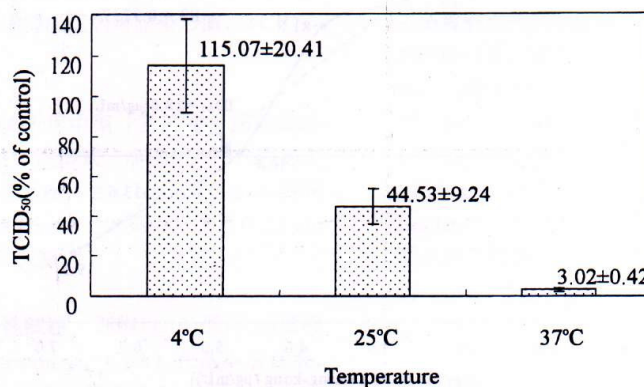


Fig. 3 The effects of yi-kang-kong incubating temperature on the TGEV infectivity. The data of TCID₅₀ were presented as percentage of control to compare yi-kang-kong effects in various temperatures on TGEV infectivity, which decreased mostly in physiological temperature (37°C). Values represent the data that repeated four times and show significant difference ($P < 0.001$).

中藥「乙肝康」與 TGEV 作用之溫度對該病毒感染力之影響 將中藥與 TGEV 分別在 4, 25, 37°C 混合作用 2 小時 (中藥與病毒混合後濃度為 10 µg/mL)。之後將混合物連續 10 倍稀釋, 以測量每 mL 病毒液 TCID₅₀ 做為感染力指標。三種溫度處理中, 在 25°C 時的 TCID₅₀, 控制組與實驗組的對數值分別為 6.15 與 5.79, 具有顯著性差異 ($P < 0.05$)。在 37°C 時的 TCID₅₀, 控制組與實驗組的對數值分別為 5.76 與 4.23, 也具有顯著性差異 ($P < 0.01$)。但是, 在 4°C 時的 TCID₅₀, 控制

組與實驗組的對數值分別為 6.17 與 6.23, 沒有顯著性差異。將處理組數量以對照組百分比表示 (Fig. 3), 發現 25°C 和 37°C 組 TCID₅₀ 分別為對照組之 44.53±9.24% 及 3.02±0.42%。代表中藥在室溫和生理溫度時對 TGEV 感染力有相當的抑制效果。

中藥「乙肝康」對豬睪丸細胞的前處理影響 TGEV 對該細胞的感染力 豬睪丸細胞在 96 孔培養盤生長 24 小時 (詳見材料與方法), 之後加入

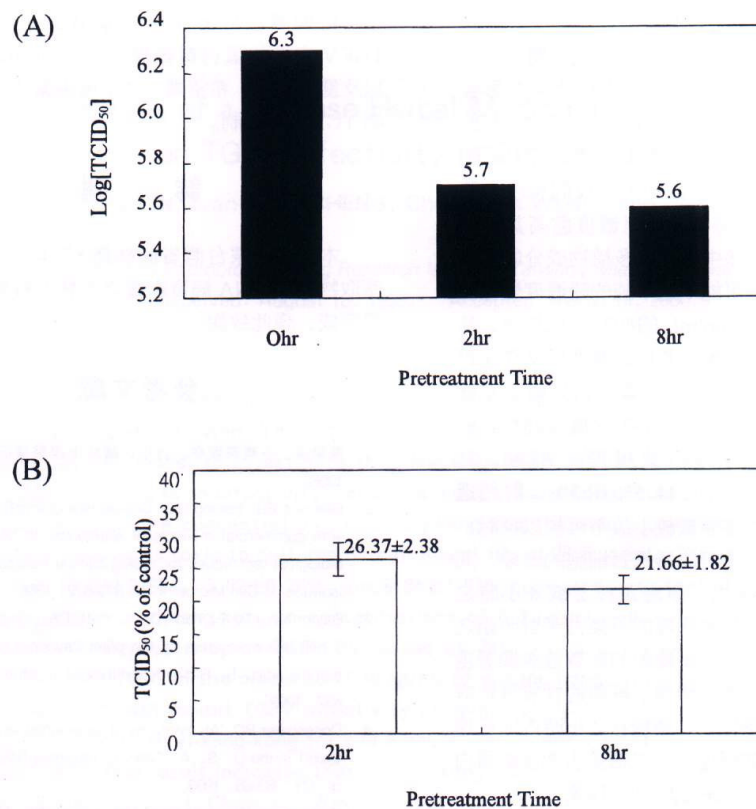


Fig. 4 Decreasing of TGEV infectivity by pretreating with yi-kang-kong in ST cells. (A) ST cells were pretreated with yi-kang-kong (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) either for 2 or 8 hours. Significant differences between values for control (without yi-kang-kong pretreatment) and samples are observed: $P < 0.01$. (B) The data of TCID₅₀ were presented as percentage of control to compare effects of yi-kang-kong pretreatment for different time. Values represent the data that repeated four times and there was no significant difference between 2 and 8 hours for $P < 0.05$.

中藥 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至培養盤，處理時間分別為 2 小時或 8 小時；經中藥前處理之細胞，再感染 TGEV 並測其 TCID₅₀。將 TCID₅₀ 以對數值表現數量 (Fig. 4 (A))，顯示二處理組之 TCID₅₀ 均較對照組低 ($P < 0.01$)。將處理組數量以對照組百分比表示 (Fig. 4 (B))，發現 TCID₅₀ 分別為對照組之 26.37±2.38% (2 小時) 和 21.66±1.82% (8 小時)，此二者並無統計上差異。

討 論

試驗中所用中藥「乙肝康」為針劑型，藥液之滲透壓和基本培養液相同。因此毒性試驗中所表現

的細胞抑制現象，應是藥劑之濃度所控制，而非滲透壓變化導致細胞死亡。在毒性試驗時，中藥作用時間為 24 小時，若選用更長時間 (如 48 小時)，某些高濃度處理組其細胞數反而增多 (數據未呈現)。由於藥液中可能含有揮發性成分，在較長作用時間後改變原先的成分以及滲透壓，反而促進了細胞生長。因此，為避免反應複雜化，只考慮 24 小時的作用。在此系統得到中藥濃度與毒性對應關係的趨勢線，據此推算 ID₅₀ 為 28.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。另外，根據文獻資料有些中藥對不同類細胞有不同毒性；如小柴胡湯只對癌化的細胞株有毒性 [7,10]。因此若中藥「乙肝康」試驗所用材料為初代培養豬睪丸細胞 (primary ST cells)，而非豬睪丸細胞株

(ST cell line)，則結果可能有所不同。如果能擴大測試的細胞種類，這個試驗的意義將更完整。

中藥「乙肝康」的濃度對 TGEV 感染力影響的試驗，選擇之濃度均低於 ID_{50} 。若濃度大於 ID_{50} ，則中藥毒性作用可能會嚴重干擾病毒對細胞的感染，也影響 CPE 現象之判定。我們發現中藥的確會抑制 TGEV 的感染力，但濃度愈高其抑制作用不會愈強。由於該中藥是許多植物成分的複合體，因此其作用趨勢可能不是單純的隨濃度變化而增減。結果以濃度 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的抑制作用最強，其 $TCID_{50}$ 約為對照組之 3%。若以此濃度為基礎探討作用溫度對 TGEV 感染力的影響，結果顯示在低溫 (4°C) 並無抑制現象；然而在室溫 (25°C) 與生理溫度 (37°C) 均有相當程度之抑制，其 $TCID_{50}$ 分別降為對照組之 44.5% 和 3%。對超過 37°C 之更高溫，因生理意義較小故不再加以探討。

中藥「乙肝康」亦可能透過對細胞的改變，間接影響 TGEV 的感染力。試驗選擇 2 或 8 小時之作用時間，結果均能抑制病毒的感染力至對照組之四分之一左右；然而，二試驗組的影響並無顯著差別。這點代表「乙肝康」轉變了細胞的性質導致病毒對細胞的感染力降低，其過程在 2 小時內即可達成。至於該過程是如何進行，包括是否牽涉新蛋白質的合成，須要在未來的試驗加以探索。

由於 TGEV 在細胞的複製過程牽涉到；1. 病毒與細胞上的受體結合；2. nucleocapsid 進入細胞質；3. 轉錄與轉譯病毒的核酸以及結構，非結構蛋白質；4. 組合成具活性的病毒。任何一個步驟受到影響均可影響病毒的複製，因而造成 $TCID_{50}$ 的變化。這個試驗在考慮如何評估中藥對 TGEV 感染力的影響時，選擇 $TCID_{50}$ 做為指標，是因為 $TCID_{50}$ 可以定量具感染力的病毒顆粒。在試驗過程中除了觀測 CPE 現象外，並以間接螢光染色確定 TGEV 對細胞的感染，如此增加了試驗可信度。乙肝康由於是複方組成的中藥方劑，每一種藥草均有其中醫藥理學上的功效，而且藥草也是混合物。因此，在本研究中，無法而且也不易在極複雜的組成份中分離出抑制病毒的主要化合物。比較可能的推測是，此種複方組成，經由某種仍有待研究的機制，影響了上述病毒複製過程的一個甚或數個的過程而減少了 TGEV 在 ST 細胞的生成。未來試驗

方向可能專注於分子生物學層次上的研究，如 TGEV 病毒的蛋白質表現 [3] 以及 mRNA 的質以及量的變化，希望進一步了解中藥「乙肝康」抑制 TGEV 的機制。

誌 謝

本研究承蒙台灣省農林廳 87 年度計劃「中華萃取物對豬 DNA 病毒影響之評估」經費補助，始得完成，謹此致謝。

參考文獻

1. 陳榮福。中藥藥理學。台中，國立中國醫藥研究所，73-76，1996。
2. Balkovic EB, Hsiung GD. Comparison of immunofluorescence with commercial monoclonal antibodies to biochemical and biological techniques for typing clinical herpes simplex virus isolates. *J Clin Microbiol* 22: 870-872, 1985.
3. Baylor NW, Fu T, Yan YD, Ruscetti FW. Inhibition of human T cell leukemia virus by the plant flavonoid baicalin (7-glucuronic acid, 5, 6-dihydroxyflavone) *J Infect Dis* 165: 433-437, 1992.
4. Donehower RC. An overview of experience with taxol (Paclitaxel) in the U. S. A. *Cancer Treatment Reviews* 19 (suppl. C): 63-66, 1993.
5. Kaltenbach JP, Kalenbach MH, Lyons WB. Nigrosin as dye for differentiating live and dead ascites cells. *Exp Cell Res* 15: 112-117, 1958.
6. Kemeny LJ. Isolation of transmissible gastroenteritis virus from pharyngeal swabs obtained from sows at slaughter. *Am J Vet Res* 39: 703-705, 1978.
7. Motoo Y, Sawabu N. Antitumor effects of saikosaponins, baicalin and baicalein on human hepatoma cell lines. *Cancer Let* 86: 91-95, 1994.
8. Reed IJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 27: 493-497, 1938.
9. Saif LJ, Wesley RD. Transmissible gastroenteritis. In: Leiman AD, ed. *Disease of swine VII*. Iowa, Iowa State University Press, 362-386, 1992.
10. Yano H, Mizoguchi A, Fukuda K, Haramaki M, Ogasawara S, Momosaki S, Kojiro M. The herbal medicine sho-saiko-to inhibits proliferation of cancer cell lines by inducing apoptosis and arrest at the G0/G1 phase. *Cancer Res* 54: 448-454, 1994.

Effects of a Chinese Herbal Medicine Yi-Kang-Kong on TGEV Infectivity in Tissue Culture

Shu-Hung LIN, Ivan-Chen CHENG, Chung-Nan WENG, and *Chi-Min CHEN

Department of Pathobiology, Pig Research Institute Taiwan, Miaoli, Taiwan 350, ROC

(Received: August 18, 1999. Accepted: March 14, 2000.)

ABSTRACT A Chinese herbal medicine, yi-kang-kong, composed of several herbal extracts was recently developed in Taiwan. To test its possible application in veterinary medicine, we used the TGEV/ST cell model to investigate the effect against viral infections of yi-kang-kong. By measuring the TCID₅₀ as an infectivity index, we found yi-kang-kong could decrease viral infectivity, depending on the concentration of yi-kang-kong and the incubation temperature with the cells. Yi-kang-kong is toxic to cultured ST cell line at ID₅₀ of 28.8 µg/mL. The infectivity of TGEV decreased 12.07±2.85%, 3.02±0.78%, and 8.84±1.07% compared with that of the control group when mixed with yi-kang-kong in concentrations of 6.3 µg/mL, 10 µg/mL, and 25 µg/mL, respectively. The infectivity of TGEV decreased at 25°C and 37°C by 44.53±9.24% and 3.02±0.42%, respectively, in the presence of 10 µg/mL of yi-kang-kong. This result indicates that yi-kang-kong could best inhibit TGEV infectivity at normal physiological temperature. When cells were pretreated with yi-kang-kong for 2 or 8 hours, the infectivity of TGEV could be decreased by about 25%. This result indicates that yi-kang-kong pretreatment can strengthen cells against TGEV infection. [Lin SH, Cheng IC, Weng CN, and *Chen CM. Effects of Chinese herbal medicine Yi-Kang-Kong on TGEV infectivity in tissue culture. *J Chin Soc Vet Sci* 26 (2): 110-116, 2000. * Corresponding author TEL: 037-672 352, FAX: 037-692 820, E-mail: chimin@mail.prit.org.tw]

Keywords: *Chinese herbal medicine, TGEV, Infectivity*