

利用蛋白質模擬軟體與嵌合分析從抗病毒藥物與中草藥成分中尋找抑制 B 型肝炎病毒聚合酶蛋白活性的新製劑

劉紋君*

明道大學

生物科技學系

林省言**

明道大學

生物科技學系

吳偉綸***

明道大學

生物科技學系

黃俊豪****

明道大學

生物科技學系

摘要

B 型肝炎病毒(HBV)的慢性感染為傷害人類健康的重要疾病，治療慢性 B 型肝炎目前最大問題在於長期服藥後會產生抗藥性問題。核苷酸類似物隨服用時間的增加，會產生嚴重的抗藥性病毒株，增加治療上的困難。因此尋找新的治療慢性 B 型肝炎製劑顯然是急迫的問題。抑制 B 型肝炎病毒聚合酶的作用機制與抑制愛滋病病毒的核(甘)酸類似物抗病毒藥物作用機制相似。因此抗愛滋病病毒藥物皆有可能成為抗 B 型肝炎病毒的藥物之一，但這仍無法改善抗藥性的問題。根據中草藥配方，蒼耳子、當歸、蛇床子、葉天士肝炎方萃取液、小柴胡湯等具有抑制 e 抗原與表面抗原表現的功能，分析中草藥所含成分與抑制病毒複製機制，為開展中草藥抗 B 型肝炎病毒的方向之一。因此本研究將以蛋白質模擬技術與嵌合分析，從抗愛滋病毒藥物中(包含 30 種藥物)及中草藥所含化學分子尋找並推測可能具有抑制 B 型肝炎病毒聚合酶活性的新藥劑，根據嵌合分析結果，抗病毒藥物 R8D、Tenofovir 等及中草藥成分 Butylidenephthalide、Helioxanthin、Imperatorin 可與 B 型肝炎病毒聚合酶活性區嵌合，親和力高於治療慢性 B 型肝炎藥劑(肝安能、肝適能等)，這些成分可能具備成為治療慢性 B 型肝炎的候選藥劑，未來能進一步進行體內外抗 B 型肝炎病毒研究，將有助於減少目前治療慢性 B 型肝炎產生抗藥性病毒株問題。

關鍵字：B 型肝炎病毒、核苷酸類似物、中草藥、蛋白質模擬、嵌合

*通訊作者，劉紋君 明道大學生物科技學系、成功大學醫學院內科

Tel: 06-2353535 轉 5389；E-mail: graceliu8911@gmail.com

New Agents from Antiviral Drugs and in Chinese Herbal Medicines Inhibiting Activity of Hepatitis B Virus polymerase by Molecular Model and Docking Analysis

W.C Liu *

Department of
Biotechnology,
MingDao Univer-
sity, Taiwan

S.Y. Lin **

Department of
Biotechnology,
MingDao Univer-
sity, Taiwan

W.L. Wu ***

Department of
Biotechnology,
MingDao Univer-
sity, Taiwan

J.H. Huang ****

Department of
Biotechnology,
MingDao Univer-
sity, Taiwan

Abstract

Chronic hepatitis B is an irritating disease. The challenge curing chronic hepatitis b is drug-resistant following drug treatment over a long period of time which increasing the difficulty on the treatment. HBV genome has a reverse transcription process similar to HIV. The HBV polymerase is a good target of analogous to HIV for inhibiting the viral replication. One of anti-HIV drugs have been approved for the treatment of chronic HBV infection, such as lamivudine. Therefore, the anti-HIV drugs may become the agents for anti-HBV probably. However these drugs still induce drug resistance. According to Chinese herbal medicines, the extract from *Xanthii strumarium* L., *Angelica sinensis*, *Cnidium monnieri* and *Buplerum chinense* De Candolle. had been indicated to inhibit HBeAg and HBsAg expression. Analyzing the compounds in Chinese herbal medicines is playing an important role in inhibiting viral replication. In the present study, we use molecular modeling and docking analysis to identified new agents from anti-HIV drugs which including 30 drugs and compounds in Chinese herbal medicines. In the results, the antiviral drugs, R8D and Tenofovir, and Butylidenephthalide, Helioxanthin and Imperatorin extracted from Chinese herbal medicines can incorporate into HBV polymerase active-sites with higher fitness than Lamivudine. These compounds will be the perfect candidates for curing chronic hepatitis B.

Key words: Hepatitis B Virus, nucleotide analogous, Chinese herbal, modeling, docking

壹、前言

全球約有超過三億五千萬的人口為慢性 B 型肝炎患者，並且每年約有一百萬人口因病死亡^{1,2}。B 型肝炎病毒(HBV)在分類學歸屬於 *Hepadnaviridae* 科、*Orthohepadnavirus* 屬。HBV 的基因體為部分雙股 DNA，約擁有 3200 個鹼基配對。其含有 4 個相互重疊的 ORF (open reading frame)³，分別可以產生大中小表面 (preS1, preS2, Surface)、核心或前核心 (Core, Pre-core)、聚合酶 (Polymerase) 及 X 蛋白。病毒首先和肝細胞表面的受器結合後而進入細胞中⁴，隨後 HBV 的基因體釋出並進入核內，再利用宿主的機制將原本圓形放鬆狀 (relaxed circular) 且不完整的雙股 DNA 轉成共價

鍵結封閉圓形 (covalently closed circular, ccc) DNA，再以此為轉錄模板形成前基因體 (pregenomic) RNA 而釋出核外，進而再以前基因體 RNA 為模板反轉錄合成病毒基因體 DNA。除了包裝必要的病毒蛋白成為完整的病毒顆粒外，基因體 DNA 也可以再次進入 cccDNA 的循環中 (intracellular conversion pathway, ICP) 以合成更多的病毒^{5,6}。每一個受病毒感染細胞的細胞核約有 5 至 50 個 cccDNA，其可形成一個病毒池 (HBV pool)，在不需 HBV 重覆感染的情形下即可一再的進行複製，這也是許多抗病毒藥物無法有效清除病患體內 HBV 的原因⁷。

目前對於慢性 B 型肝炎的

治療分為調節免疫的「注射型干擾素」及「核酸類口服抗病毒藥」兩大主流。干擾素並不直接作用於病毒，而是通過標靶細胞發揮作用。核酸類口服抗病毒藥是一種核(苷)酸類似物，其作用機轉是經由嵌合入 HBV 的聚合酶 (polymerase) 中，導致病毒 DNA 合成中斷，並且也抑制反轉酶的作用機制。目前的口服藥物包括肝安能 (Lamivudine)⁸、干適能 (Adefovir)⁹、貝樂克 (Entecavir)¹⁰ 以及喜必福 (Telbivudine)¹¹。然而，慢性 B 型肝炎治療最大問題在於長期服藥後會產生抗藥性問題。

「貝樂克」使用 5 年的抗藥性發生率為 1.2%；「肝安能」5 年 65%；「干適能」5 年 29%；「喜必福」2 年 22%。因此，這些藥

物隨服用時間的增加，會產生很嚴重的抗藥性病毒株，增加治療上的困難^{9, 12}。因此尋找新的治療慢性 B 型肝炎製劑顯然是勢在必行。

B 型肝炎病毒聚合酶兼具 DNA 聚合酶、RNA 反轉錄酶、RNase 以及 protein priming 的活性，其中反轉錄酶與愛滋病病毒聚合酶相似且活性區域相同，已有多篇報導利用愛滋病病毒聚合酶當作蛋白質模板來模擬 B 型肝炎的反轉錄酶¹³⁻¹⁵。抑制 HBV 聚合酶的作用機制可由以下方式考量：(1) 競爭性抑制 HBV 的反轉錄酶，(2) 連接到 HBV DNA 的鏈中，而阻斷 DNA 進一步的延長動作，導致鏈結中斷。此作用機制與抑制愛滋病病毒的核(苷)酸類似物抗

病毒藥物作用機制相似。因此抗愛滋病病毒藥物皆有可能成為抗 B 型肝炎病毒的藥物之一，例如：肝安能 (Lamivudine) 就是個成功的例子。因此，本研究將以蛋白質模擬技術與嵌合分析，從抗愛滋病病毒藥物中(包含 30 種藥物)找尋可能抑制 B 型肝炎病毒聚合酶活性的新藥劑。

我國中草藥資源豐富，毒副作用小，開發中草藥抗 HBV 藥物資源將成為重要研究方向之一，利用中草藥萃取物治療慢性 B 型肝炎的相關研究近幾年也慢慢被提出。蒼耳子 (*Xanthiistrumarium L.*) 提取物對鴨的 B 型肝炎病毒具有抗病毒作用；單味紅棗 (*Zizyphus jujuba (L.) Lam.*)、蛇床子 (*Cnidium monni-*

eri)、葉天士肝炎方萃取液、小柴胡湯 (Shiosakoto; Xiao-Chai-Hu-Tang) 皆有抑制 HBeAg 表現的功能¹⁶；甘露消毒丹萃取液、茵陳 (*Artemisia capillaris Thunb.*)、白豆蔻 (*Amomi Cardamomi Fructus*)、黃芩 (*Scutellariae Radix*)、陳皮 (*Pericarpium Citri Reticulatae*) 有抑制 HBsAg 表現的效能。此外，我們已從中醫相關單位取得有關治療肝炎之中草藥藥方(約百種配方)，我們將從中挑選藥效最佳之中草藥，根據中草藥所含化學分子以及成分，利用蛋白質模擬技術與嵌合分析，從中草藥藥物成分中搜尋可能抑制 B 型肝炎病毒聚合酶活性的新藥劑。利用生物資訊方法分析所得的藥劑以及中草藥成分將利

用細胞體外試驗證實其藥性，進一步開發抗 B 型肝炎病毒的新藥劑。

貳、模擬方法與材料

一、B 型肝炎病毒聚合酶蛋白模擬

利用 NCBI 的 GenBank 資料庫搜尋 B 型肝炎病毒（基因型 A~H）聚合酶的胺基酸標準序列，修改成 FASTA 的格式加以儲存。取得標準型序列分別為基因型 A：AAW79830，基因型 B：ABS50164，基因型 C：ACH57602，基因型 D：AAF24680，基因型 E：AAZ08419，基因型 F：ACD03788，基因型 G：BAD91284，基因型 H：AAM09041，以上序列先利用 BLAST 找出模擬聚合酶

蛋白的結構模板，再利用 SWISS-Model automated modeling 模擬聚合酶結構並以 PyMol 呈現分析。

二、抗病毒藥劑與中草藥成分化合物構畫

利用 Prodrug(<http://dav.apc1.bioch.dundee.ac.uk/prodrug/>)，勾畫抗病毒藥物及中草藥成分的結構，再將資料結果儲存為文字檔，匯入 Accelrys Discovery studio 2.5 進行分析及結構最佳化，並轉為 mol2 檔案格式，以便進行嵌合分析。抗病毒藥物包括：Zidovudine(AZT)、Didanosine(ddi)、Zalcitabine、Stavudine、Lamivudine、Saquinavir、Ritonavir、Indinavir、Nevirapine、Nelfinavir、Delavirdine、

Efavirenz 、 Abacavir 、 Amprenavir 、 Lopinavir 、 Tenofovir disoproxil fumarate 、 Adefovir 、 Entecavir 、 Telbivudine 、 Clevudine (L-FMAU) 、 Coviracil 、 Elvucitabine 等。中草藥成分包括 : Saikosaponins 、 Imperatorin 、 Butylidenephthalide 、 Helioxanthin 、 Betulonic acid 、 Oleanonic acid 、 蒼耳子 、 單味紅棗 、 葉天士肝炎方萃取液 、 小柴胡湯 、 甘露消毒丹萃取液 、 茵陳 、 白豆蔻 、 黃芩 、 陳皮 等中草藥萃取成分。

三、嵌合分析

利用 Accelrys Discovery studio 2.5 將 B 型肝炎病毒聚合酶結構、抗病毒藥物結構、中草藥成分結構存為 mol2 格式，利

用 WedDOCK(<http://www.biocadd.com/>)進行嵌合分析，所得結果根據“fitness”數值結果比較各化合物與聚合酶的親和力，親和力數值越高者則選為候選新藥劑。

參、結果與討論

一、B 型肝炎病毒聚合酶蛋白膜擬

B 型肝炎病毒聚合酶結構至今未被研究發表，聚合酶基因可分為四個功能區域為末端蛋白 (terminal protein ; TP) 、 Spacer 、 聚合酶 / 反轉錄酶 (polymerase/reverse transcriptase) 以及核糖核酸酶 H (RNase H) ，其中聚合酶 / 反轉錄酶與愛滋病毒的聚合酶相似。為了模擬 B 型肝炎病毒聚合酶蛋白質結

構，我們利用 NCBI 的 GenBank 資料庫先搜尋 B 型肝炎病毒(基因型 A~H)聚合酶的胺基酸標準序列，分別進行 NCBI protein blast 找出模擬 B 型肝炎病毒聚合酶蛋白的結構模板，結果皆為 1quhB，1quh 是愛滋病毒反轉錄

酶，由 A 和 B 兩條胜肽鏈聚合而成的聚合物，根據 BLAST 結果，1quh 的 A 胜肽鍊適合做為 B 型肝炎病毒聚合酶蛋白的模擬模板，利用 SWISS-Model automated modeling 模擬聚合酶結構(圖一)。

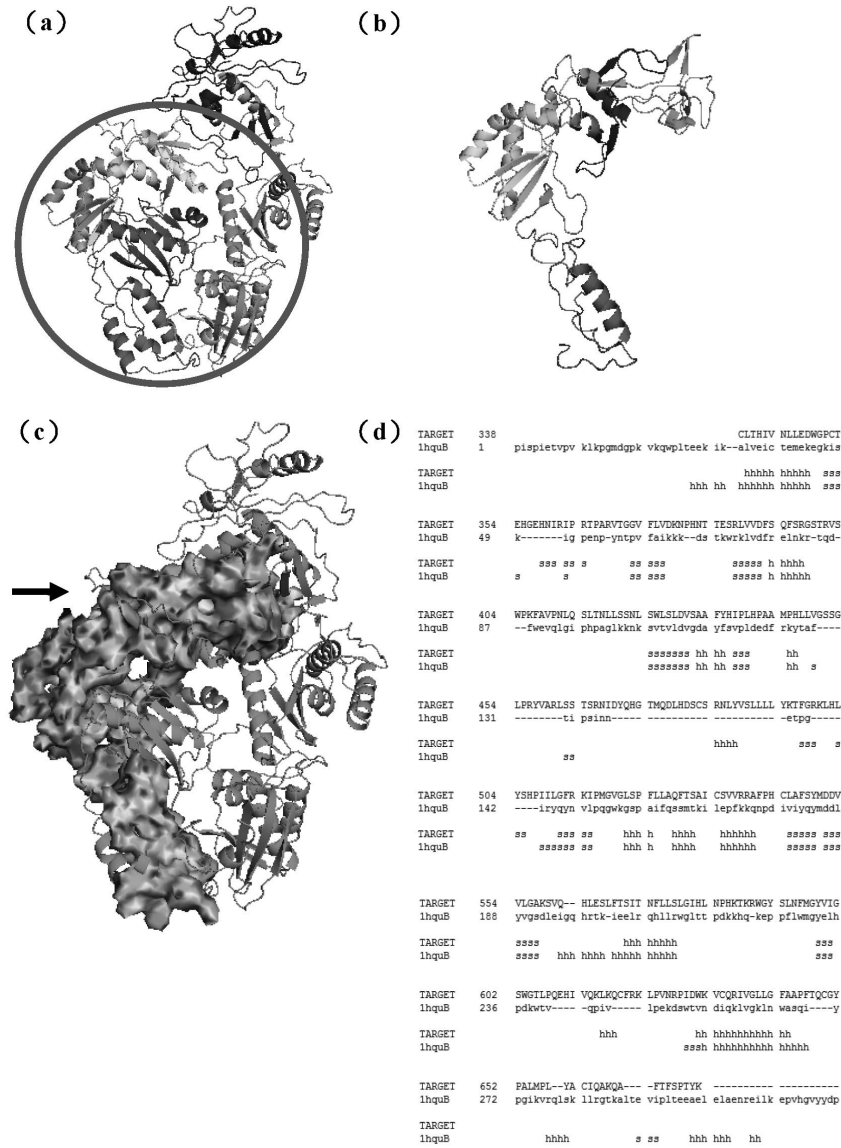


圖 1 B 型肝炎病毒聚合酶結構模擬。(a) 1quhB：愛滋病毒反轉錄酶 B 胜肽鏈結構圖。標示位置為 B 型肝炎病毒聚合酶結構模擬模板；(b) B 型肝炎病毒聚合酶結構模擬圖；(c) B 型肝炎病毒聚合酶結構與愛滋病毒反轉錄酶重疊區域結構圖。“→”表示根據 1quhB 為模板模擬 B 型肝炎病毒聚合酶的結構圖。(d) 1quhB 與 B 型肝炎病毒基因型聚合酶序列(ACH57602)比對結果。‘h’：螺旋結構，‘s’：平板結構

二、抗病毒藥物與中草藥成分 結構模擬

爲了從抗病毒藥物與中草藥成分中尋找候選藥劑，本研究利用 ProdrG 勾畫抗病毒藥物及中草藥成分的結構(圖二、三)。目前治療慢性 B 型肝炎已上市藥物：肝安能(Lamivudine)、肝適能 (Adefovir)、貝樂克(Entecavir)、喜必福(Telbivudine)以及仍在臨床試驗的藥物：Clevudine(L-FMAU)、Racevir、Emtricitabine、MIV-210，皆屬於核苷酸類似物，可直接阻礙聚合酶的活性、抑制複製機制。其餘約有 25 種藥物爲抗愛滋病毒藥劑，亦爲核苷酸類似物，包含 Zidovudine(AZT)、Didanosine(ddi)、Zalcitabine、Stavudine、Lamivudine、Saquinavir、

Ritonavir、Indinavir、Nevirapine、Nelfinavir、Delavirdine、Efavirenz、Abacavir、Amprenavir、Lopinavir、Tenofovir disoproxil fumarate 等(圖二)。抗愛滋病毒藥物中，肝安能曾爲有效治療愛滋病和慢性 B 型肝炎的藥劑，抗愛滋病毒藥物具有成爲治療慢性 B 型肝炎的可能性，因此我們挑選共 25 種抗病毒藥物作爲挑選治療慢性肝炎的候選藥劑。中草藥成分包括：Saikosaponins、Imperatorin、Butylidene phthalide、Helioxanthin、Betulonic acid、Oleanonic acid，亦進行結構構畫(圖三)。Saikosaponins 爲北柴胡及小柴胡湯所含成分，經由細胞實驗，證實抑制病毒複製程度與肝安

能相似²⁰。中藥蛇床子所分離出來的成分 imperatorin 對於野生型 HBV 以及 L515M/M539V 突變株都有不錯的抑制效果，並具有抑制 HBeAg 表現的功能，HBeAg 與聚合酶蛋白的基因共用核心啟動子，並利用聚合酶進行轉錄與複製，形成前基因體 RNA(pregenomic RNA)，因此抑制 HBeAg 的表現與抑制聚合酶蛋白有關¹⁸。Helioxanthin 是從台灣杉心材萃取出的木酚素化合物，亦具有抑制表面抗原表現的活性¹⁹。Betulonic acid 和

oleanonic acid 是葉天士湯中大棗所含成分，根據細胞實驗，具有抑制表面抗原表現的能力¹⁷，B 型肝炎病毒表面抗原基因與聚合酶基因重疊並互相影響，因此推測 betulonic acid 和 oleanonic acid 也具有調控蛋白酶的可能性²⁰。因此我們挑選這些中草藥成分 Saikosaponins、Imperatorin、Butylidenephthalide、Helioxanthin、Betulonic acid、Oleanonic acid 作為候選藥劑的篩選。

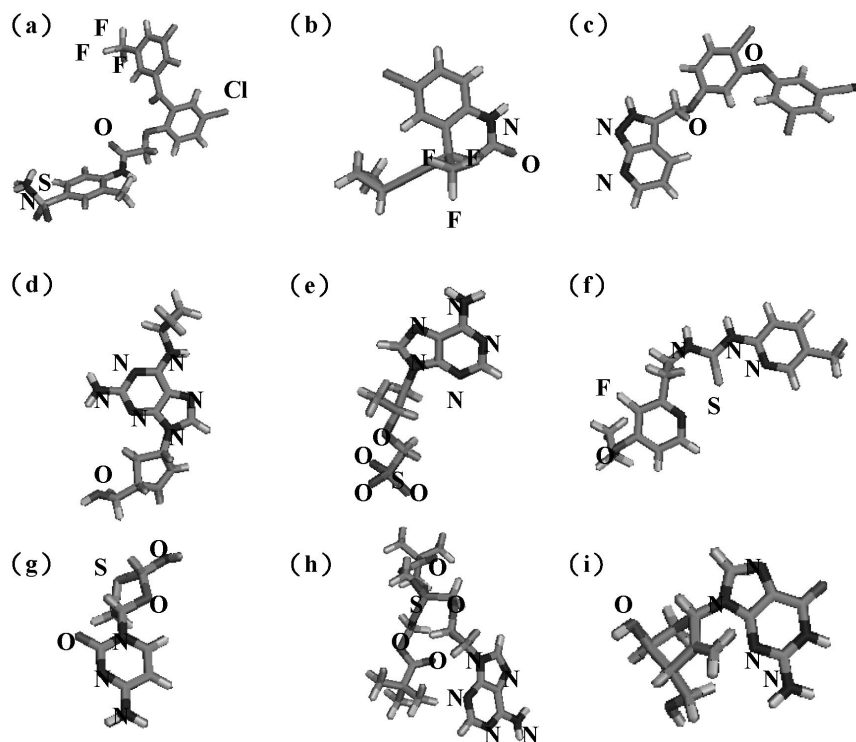


圖 2 抗病毒藥物化合物結構圖。利用 ProdrG 構畫化合物結構。(a) GWE；
(b) Efavirenz；(c) R8D；(d) Abacavir；(e) Tenofovir；(f) Pett2；
(g) 肝安能；(h) 肝適能；(i) 貝樂克。N:氮；O:氧；S:硫；F:氟；
Cl:氯

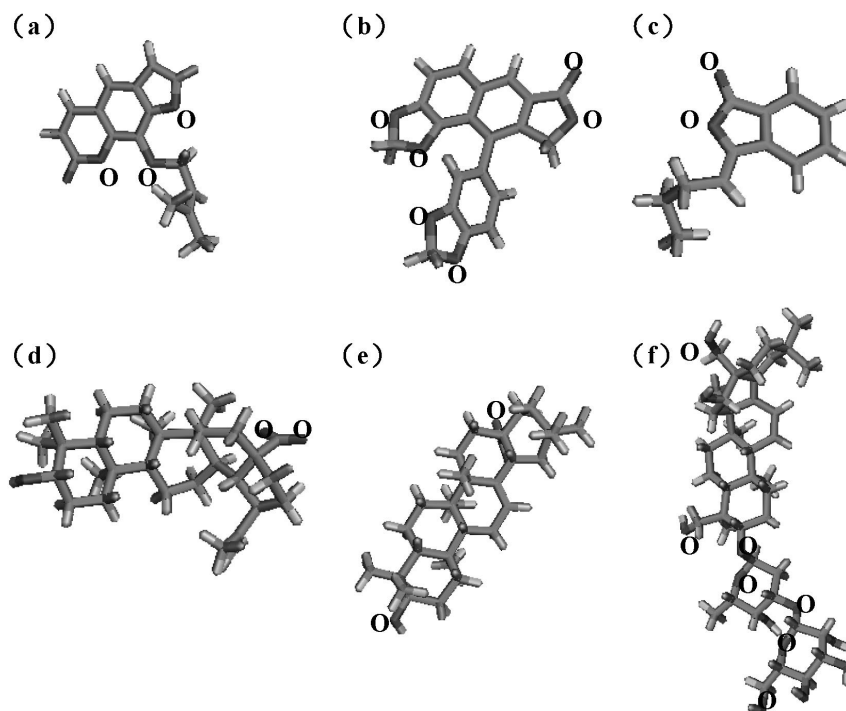


圖 3 抗病毒藥物化合物結構圖。利用 ProdrG 構畫化合物結構。(a) Helioxanthin；(b) Imperatorin；(c) Butylidenephthalide；(d) Betulonic acid；(e) Oleanonic acid；(f) Saikosaponins。O:氧

三、利用嵌合分析提出候選藥劑

將 B 型肝炎病毒聚合酶模擬結構與所有抗病毒藥物以及中草藥成分進行嵌合分析，嵌合位置為 B 型肝炎病毒聚合酶反轉錄區的活性位置 (414 aa.~602 aa) (圖四)，分析結果顯示 (表

一)，抗病毒藥物中 R8D、Tenofovir、Abacavir、Efavirenz、Elvucitabine、ddi、Pett2、Nevirapine 與聚合酶活性區的親和力 (Fitness) 高於肝安能；UC1 以及 Stavudine 與聚合酶活性區的親和力高於貝樂克以及 Telbivudine，另有 11 種抗病毒藥物與聚合酶活性區的親

和力也高於肝適能。這些抗病毒藥物皆為核苷酸類似物，能與聚合酶蛋白結合而進一步抑制聚合酶蛋白的活性以及終止 B 型肝炎病毒複製的機制，因此這 21 種抗愛滋病毒藥物可能有機會成為治療慢性 B 型肝炎的候

選藥劑。惟這些抗病毒藥物仍有導致抗藥性突變株產生的特性，因此若能在中草藥成分中找尋可抑制聚合酶蛋白活性的成分且為非核苷酸類似物，將有助於慢性 B 型肝炎的治療。

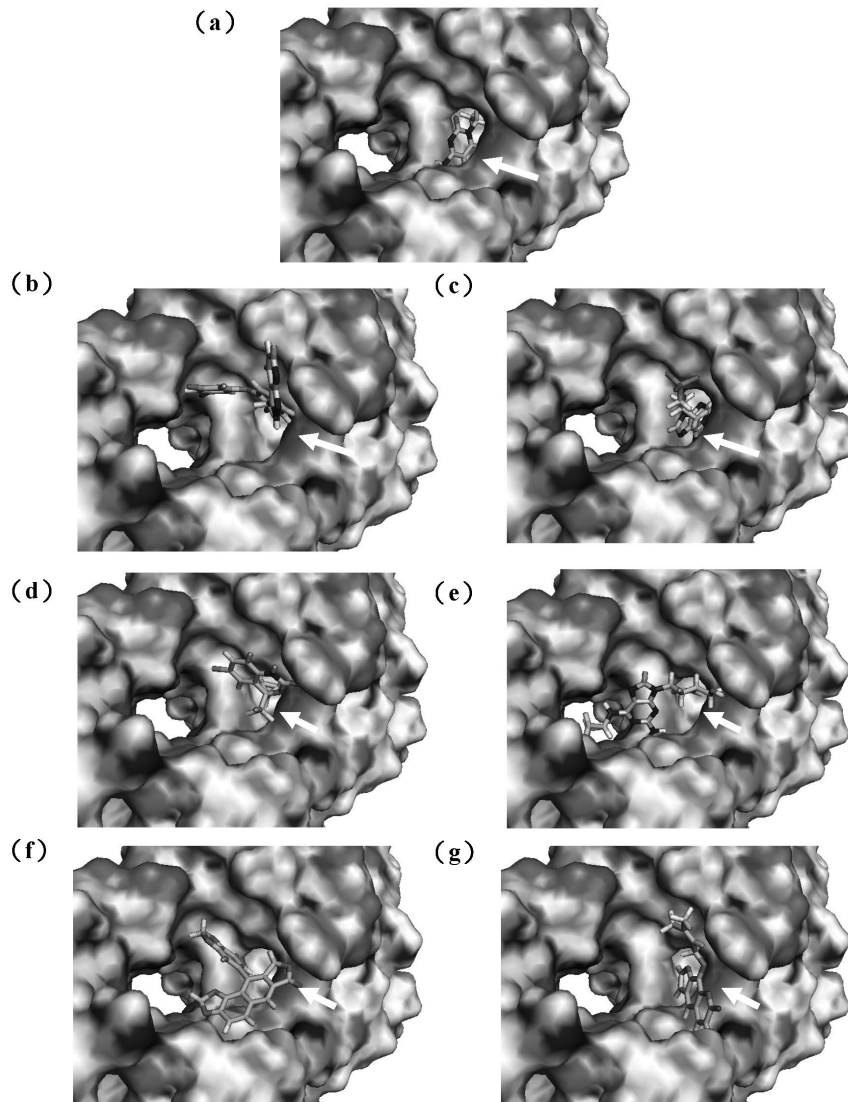


圖 4 B 型肝炎病毒聚合酶蛋白與抗病毒藥物、中草藥成分嵌合結構圖。(a) 肝安能；(b) R8D；(c) Tenofovir；(d) Abacavir；(e) Efavirenz；(f) Helioxanthin；(g) Imperatorin。‘←’：聚合酶活性區

表 1 B 型肝炎病毒聚合酶與抗病毒藥物的親和力

抗病毒藥物	親和力	S(hb_ext)	S(vdw_ext)	S(hb_int)	S(int)
R8D	46.78	0	40.3	0	-8.62
Tenofovir	42.61	0	36.51	0	-7.59
Abacavir	41.69	0.52	34.74	0	-6.6
Efavirenz	39.32	0.62	26.47	0	2.31
Elvucitabine	38.34	1.7	28.17	0	-2.08
ddi	37.89	2.4	27.33	0	-2.08
Pett2	36.52	0	34.5	0	-10.92
Nevirapine	34.93	2	26.07	0	-2.92
Lamivudine*	34.8	1.47	25.77	0	-2.1
UC1	34.54	0	33.05	0	-10.9
Stavudine	33.93	1.02	25.39	0	-2
Telbivudine*	32.19	0.17	27.99	0	-6.47
Entecavir*	31.5	0.22	25.43	0	-3.69
Zalcitabine	31.27	0.73	23.06	0	-1.17
HBQ	30.43	2	22.42	0	-2.39
Coviracil	30.23	2	22.13	0	-2.2
Clevudine*	30	2	21.46	0	-1.51
GWE	28.85	0	28.74	0	-10.66
Saquinavir	27.67	0	41.08	0	-28.83
Ritonavir	25.04	0	35.93	0	-24.36
Delavirdine	24.53	0.18	30.67	0	-17.82
Amprenavir	22.64	0	29.59	0	-18.04
GWJ	21.17	0	34.83	0	-26.72
U05	13.68	1.75	28.32	0	-27
Adefovir*	13.47	0	25.96	0	-22.22
AZT2	13.47	0	23.74	0	-19.17
Nelfinavir	12.45	0	27.43	0	-25.27
Indinavir	10.7	12.22	28.15	0	-40.23
lopinavir	10.04	0	24.24	0	-23.29
HBV	-70.29	0	20.84	0	-98.94

*目前已使用於治療慢性 B 型肝炎藥物

本研究收集使用於中醫治療肝炎之藥方，根據治療成果優劣嚴選多種中草藥萃取成分進行分析，成分包含：(1)蛇床子萃取成分：Imperatorin；(2)當歸萃取成分：Butylidenephthalide；(3)小柴胡湯所含成分：Saikosaponins 及其多種衍生物；(4)葉天士湯中大棗所含成分：Betulonic acid 和 Oleanonic acid；(5)杉心材萃取成分：Helioxanthin，利用嵌合分析找尋可抑制聚合酶蛋白活性的成分。分析結果顯示(表二)，中草藥成分中 Butylidenephthalide、Helioxanthin 與 Imperatorin 與聚合酶蛋白的親和力高，此三種成分結構屬酚類，具有與核苷酸相似的結構但為非核苷酸類似物因此能執行抑制聚合酶蛋白的活性區以及間接地抑制病毒複製機

制。這三種化合物及中草藥期望能成為治療慢性 B 型肝炎的候選藥劑，並且解決抗藥性突變株發生的問題。已有報導指出 Saikosaponins 經由細胞實驗，可抑制病毒複製程度與肝安能相似，但在本研究模擬結果中卻只有相當低的親和力，不具抑制聚合酶的效果。我們推論兩種可能性：(1) Saikosaponins 與聚合酶的結合不在活性區中，所以模擬結果親合力不佳；(2) Saikosaponins 可能是抑制 B 型肝炎病毒中另一個與聚合酶合成有關的核心蛋白，Saikosaponins 可能抑制核心蛋白的機制，抑制病毒前基因體 RNA(pregenomic RNA)的形成，因此直接影響聚合酶的產生，導致 HBV-DNA、HBsAg、HBeAg 表現受到抑制。

表 2 B 型肝炎病毒聚合酶與中草藥成分的親和力

抗病毒藥物	親和力	S(hb_ext)	S(vdw_ext)	S(hb_int)	S(int)
Butylidenephthalide	45.69	1.41	33.87	0	-2.28
Helioxanthin	44.58	0.57	31.88	0	0.17
Imperatorin	27.85	0	25.31	0	-6.95
Betulinic_acid	9.45	0.33	29.88	0	-31.96
SaikogeninF	-14.91	0	24.15	0	-48.11
Oleanonic_acid	-17.8	2.09	23.01	0	-51.53
SaikogeninG	-21.32	1.98	17.54	0	-47.42
SaikosaponinsD	-37.59	0.47	33.84	0	-84.59
SaikosaponinsB1	-43.79	0	9.66	0	-57.07
SaikosaponinsA	-59.67	0	9.93	0	-73.33
SaikosaponinsB3	-67.36	1.36	14.03	0	-88.02
SaikosaponinsB2	-73.67	0.01	-7.69	0	-63.11
SaikosaponinsB4	-110.33	0	-3.18	0	-105.96

肆、結論

本研究成功模擬 B 型肝炎病毒聚合酶結構並利用嵌合分析，從抗愛滋病病毒藥物中(包含 30 種藥物)及中草藥所含化學分子推測可能抑制 B 型肝炎病毒聚合酶活性的新藥劑，根據模擬與嵌合結果，抗病毒藥物 R8D、Tenofovir、Abacavir、

Efavirenz、Elvucitabine、ddi、Pett2、Nevirapine 等與中草藥成分 Butylidenephthalide、Helioxanthin、Imperatorin 可與 B 型肝炎病毒聚合酶活性區嵌合，親和力高於目前治療慢性 B 型肝炎藥劑(肝安能、肝適能等)，因此這些成分可能成為未來治療慢性 B 型肝炎的候選藥劑，尤其中草

藥成分爲非核苷酸類似物，不易引起抗藥性突變，在本研究模擬實驗中又具有與聚合酶活性區結合的高親和力，可有效阻擋聚合酶與核苷酸結合位置，抑制病毒複製能力，因此有助於解決目前治療慢性 B 型肝炎產生抗藥性病毒株問題。蛋白質模擬技術爲近幾年蛋白質體學的重大演進，有助於在進行基礎實驗前以模擬方式進行地毯式搜索^{14,15}，縮小尋找或挑選生藥及抗病毒藥物的範圍。本研究未來將利用 HepG2 細胞執行體外實驗，轉殖含有 3.2X HBV 基因體的載體，進行聚合酶活性分析、病毒複製量以及病毒蛋白表現的實驗，證實模擬結果並找尋新藥劑。

伍、參考文獻

1. Alter, M.J. Epidemiology and prevention of hepatitis B. *Seminars in liver disease* **23**, 39-46 (2003).
2. Kane, M. Global programme for control of hepatitis B infection. *Vaccine* **13 Suppl 1**, S47-49 (1995).
3. Locarnini, S., McMillan, J. & Bartholomeusz, A. The hepatitis B virus and common mutants. *Seminars in liver disease* **23**, 5-20 (2003).
4. Treichel, U., Meyer zum Buschenfelde, K.H., Dienes, H.P. & Gerken, G. Receptor-mediated entry of hepatitis B virus particles into liver cells. *Archives of virology* **142**,

- 493-498 (1997).
5. Seeger, C. & Mason, W.S. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 51-68 (2000).
6. Singh, M., Dicaire, A., Wakil, A.E., Luscombe, C. & Sacks, S.L. Quantitation of hepatitis B virus (HBV) covalently closed circular DNA (cccDNA) in the liver of HBV-infected patients by LightCycler real-time PCR. *Journal of virological methods* **118**, 159-167 (2004).
7. Feld, J., Lee, J.Y. & Locarnini, S. New targets and possible new therapeutic approaches in the chemotherapy of chronic hepatitis B. *Hepatology (Baltimore, Md)* **38**, 545-553 (2003).
8. Delaney, W.E.t. et al. Cross-resistance testing of antihepadnaviral compounds using novel recombinant baculoviruses which encode drug-resistant strains of hepatitis B virus. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **45**, 1705-1713 (2001).
9. Hui, C.K. et al. 96 weeks combination of adefovir dipivoxil plus emtricitabine vs. adefovir dipivoxil monotherapy in the treatment of chronic hepatitis B. *Journal of hep-*

- tology* **48**, 714-720 (2008).
10. de Man, R.A. *et al.* Safety and efficacy of oral entecavir given for 28 days in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology (Baltimore, Md)* **34**, 578-582 (2001).
11. Lai, C.L. *et al.* A dose-finding study of once-daily oral telbivudine in HBeAg-positive patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology (Baltimore, Md)* **40**, 719-726 (2004).
12. Sasadeusz, J.J., Locarnini, S.L. & Macdonald, G. Why do we not yet have combination chemotherapy for chronic hepatitis B? *The Medical journal of Australia* **186**, 204-206 (2007).
13. Langley, D.R. *et al.* Inhibition of hepatitis B virus polymerase by entecavir. *Journal of virology* **81**, 3992-4001 (2007).
14. Walsh, A.W., Langley, D.R., Colonno, R.J. & Tenney, D.J. Mechanistic characterization and molecular modeling of hepatitis B virus polymerase resistance to entecavir. *PloS one* **5**, e9195.
15. Sharon, A. & Chu, C.K. Understanding the molecular basis of HBV drug resistance by molecular modeling. *Antiviral research* **80**, 339-353 (2008).

16. Kleiner, H.E. *et al.* Effects of naturally occurring coumarins on hepatic drug-metabolizing enzymes in mice. *Toxicology and applied pharmacology* **232**, 337-350 (2008).
17. 劉河順(1994)，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。
18. 廖清瑩(2002)，建立 B 型肝炎病毒抗 Lamivudine 突變株的穩定轉殖細胞及中草藥抗病毒突變株作用之探討，國立陽明大學藥理學研究所碩士論文。
19. 曾雅蘋(2008)，Helioxanthin 抑制人類 B 型肝炎病毒複製及基因表現作用機制之探討，國立陽明大學生化暨分子生物研究所碩士論文。
20. Chiang LC, Ng LT, Liu LT, Shieh DE, Lin CC. Cytotoxicity and anti-hepatitis B virus activities of saikosaponins from *Bupleurum* species. *Planta Med.* 69(8):705-9(2003).