

艾草萃取物之抗B型肝炎病毒活性試驗 Anti-Hepatitis B Virus Activity of *Artemisia indica* Willd.

黃瑞齡^{1*}、施慧娟²、陳春香²、潘孝萱³

¹ 美和科技大學生物科技系 副教授

² 美和科技大學護理系 助理教授

³ 美和科技大學健康與生技產業研究所 研究生

*Corresponding author.E-mail: x00002093@meiho.edu.tw

摘要

艾草(*Artemisia indica* Willd.)為菊科艾屬植物，常見於中藥漢方與民間草藥，以及養生的藥酒、精油。客家人對艾草的使用尤其廣泛，艾糕、艾粿、艾草版等等多種添加艾草的食物。全草藥用，具有調經止血、安胎止崩、散寒除濕之效。治月經不調、經痛腹痛、流產、子宮出血，根治風濕性關節炎、頭風、月內風等作用。

B型肝炎是國人常見的肝臟疾病，會引起急性及慢性肝炎，慢性肝炎患者長期染病，極易轉為猛暴性肝炎、肝硬化及肝癌。傳統醫學對肝膽疾病之治療，除了許多經典古籍所記載的經驗方外，尚有許多民間認為對「肝炎」、「黃疸」、「肝硬化」以及「肝癌」具有療效，而為大眾所傳頌之單味藥或偏方，近年來經由科學驗證，這些都是抗B型肝炎病毒中草藥開發之寶貴資源。對病毒具專一性，且對細胞的毒性小，療效指標大，才是理想的抗病毒藥。B型肝炎目前雖然有疫苗，但是國內仍有約300萬病毒帶原者需要治療，目前臨床上使用之治療藥物，以lamivudine(即3TC)，有非常肯定的療效，可惜仍然有抗藥性的問題，因此抗B型肝炎病毒中草藥的開發，仍為當務之急。本計畫以體外細胞培養模式，利用酵素連結免疫吸附分析法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)測定艾草粗萃物對人類B型肝炎病毒表面抗原及e抗原之作用，試驗結果顯示：艾草粗萃物對B型肝炎病毒具極顯著抑制作用，期望有助於中醫臨床抗病毒藥物之開發。

關鍵字：艾草、B型肝炎病毒、表面抗原、e抗原

ABSTRACT

Viral Hepatitis B is the major cause of acute and chronic hepatitis. Chronic infection has been known to be the precursor for cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). Notwithstanding the availability of effective preventive vaccine for HBV in recent years, there are still 300 million existing chronic HBV carriers that urgently need therapy. Lamivudine (also called 3TC), a cytosine nucleoside analogue, has been shown to be very effective in therapeutic treatment of hepatitis B, however, it suffers from the drug-resistant HBV mutants after long-term administration of the drug. In this project, the *in vitro* cell culture model was used to investigate the anti-human hepatitis B virus effects from the crude extract of *Artemisia indica* Willd., The expression of HBsAg and HBeAg was detected by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay system. Our experimental results from anti-viral test showed that the crude extract of *Artemisia indica* depict significant anti-HBV effects..

Keyword: *Artemisia indica* Willd.、human hepatitis B virus、surface antigen、e antigen
itis B virus、surface antigen、e antigen

前言

病毒引起的肝病變是國人常見的肝障礙疾病，其中又以B型肝炎病毒〔Hepatitis B virus，簡稱HBV〕引起的最為普遍。人類B型肝炎病毒(Hepatitis B virus，簡稱HBV)屬於肝去氧核糖核酸病毒科(Hepadnaviridae)，是目前已知最小的DNA 病毒[1-3]。感染B型肝炎病毒，除了會引起急性肝炎(acute hepatitis)外，有些感染者會變成慢性肝炎(chronic hepatitis)，嚴重的發展成肝硬化(cirrhosis)，更有甚者，此病毒與原發性肝癌(hepatocellular carcinoma；HCC)的形成有密切的關係[4-6]。臺灣的B型肝炎之感染率大約為85%，而其中有15%左右的人會轉變成為帶原者(HBV carrier)[7]。據Szmunes 於1978 年發表的流行病報告中[4]，指出全世界有二億人口為B型肝炎病毒帶原者，其中大部分集中在亞洲和非洲流行地區，而這些高B型肝炎病毒帶原地區，亦為世界上肝癌發生比例最高的地區。且依據臺大醫師宋瑞樓多年研究B型肝炎病毒在臺灣之感染情形與其後果，由統計上發現：肝癌患者中有B 型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg)者高達91.2%，顯示B 型肝炎病毒帶原者，極大多數發展成肝癌[8]。1981 年畢斯里氏在臺灣公保門診中心，對公務員B 型肝炎病毒表面抗原陽性及陰性患者追蹤了22,707例，發現表面抗原陽性者獲得肝癌比表面抗原陰性者高223倍[5]，由於以上流行病學研究及臨床觀察，加上現在分子生物學方法，測定肝癌細胞內帶有B型肝炎病毒的去氧核糖核酸，更證實B型肝炎病毒與肝癌之形成息息相關。B型肝炎目前雖然有疫苗，但是國內仍有約300萬病毒帶原者需要治療。最近肝癌罹患的年齡顯著下降，國中、國小學生亦有肝癌患者，實在令人憂心如焚，肝疾危害國人健康至劇，因此抗B型肝炎病毒藥物之開發研究為當務之急。

傳統醫學對肝膽疾病之治療，除了許多經典古籍所記載的經驗方外，尚有許多民間認為對「肝炎」、「黃疸」、「肝硬化」以及「肝癌」具有療效，而為大眾所傳頌之單味藥或偏方，近年來經由科學驗證，這些都是抗B 型肝炎病毒中草藥開發之寶貴資源。對病毒具專一性，且對細胞的毒性小，療效指標大，才是理想的抗病毒藥。

由於B型肝炎病毒的複製靠自己的內源性去氧核糖核酸聚合酶(endogenous HBV DNA polymerase)，先將不完整的正股DNA 補齊後，目前相信是靠宿主的接合酶(ligase)、拓撲酶及第二型聚合酶(polymerase Type II)，利用宿主的轉錄機器裝置(transcriptional machinery)，轉錄出病毒前基因體RNA(pregenomic RNA)，以此為模板靠病毒內源性聚合酶反轉錄出病毒負股DNA，再以負股DNA 為模板靠病毒內源性去氧核糖核酸聚合酶

複製正股DNA，因此B型肝炎病毒的內源性去氧核糖核酸聚合酶本身具備有DNA dependence DNA polymerase activity、encapsidation activity、priming activity、reverse transcriptase activity 及RNase H activity，這些活性對病毒複製缺一不可，因此抑制內源性去氧核糖核酸聚合酶為開發抗B型肝炎病毒藥物的重要標的[9]。

目前臨床上使用之治療藥物，以lamivudine(即3TC)，有非常肯定的療效[10 - 11]，可惜仍然有抗藥性的問題[12 - 13]。lamivudine抗藥性突變株，為B型肝炎病毒聚合酶基因的YMDD位置產生單一點突變成為YIDD或YVDD後，對lamivudine產生抗藥性，導致lamivudine失去作用，病人血清內病毒量反彈上升。本研究室已建立lamivudine抗藥性突變株(mutant type)之穩定轉殖細胞株，進行篩選抗B型肝炎病毒lamivudine抗藥性突變株之中草藥。

最近的篩選工作，已完成215種純化合物(pure compounds)，342種中草药粗抽液(crude extracts)及28種複方之抗人類B型肝炎病毒活性評估。本計畫擬以體外細胞培養模式，利用酵素連結免疫吸附分析法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)測定艾草粗萃物對人類B型肝炎病毒野生型及lamivudine抗藥性突變株於病毒表面抗原及e抗原之作用。將來經由活性導向(Bioassay directed fractionation)追蹤有效分劃，以期有效成分之分離及化學結構之鑑定。且進一步進行有效成分抑制B型肝炎病毒作用機制(action mechanisms)之探討。

研究方法、步驟

第一部份供試藥材之來源及製備

1. 供試藥材之採購、鑑定、製備

艾草萃取物由總計畫製備提供。

第二部份 B型肝炎病毒抑制作用及活性成分的分子生物層次之探討—

1. 細胞株及細胞培養

本計畫使用兩種人類肝癌細胞株，一為MS-G2，此係哈佛大學Dr. Max Essex 之實驗室所建立[14]，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)。本計畫將以此作為B型肝炎病毒野生型模式，進行艾草萃取物抗病毒作用及活性成分的追蹤分離。另一為本研究室執行國科會計畫，所建立的lamivudine(又稱3TC)抗藥性突變株之穩定轉殖細胞株，亦是利用肝癌細胞株HepG2 經轉染(transfection)帶有YMDD突變之HBV DNA (*ayw*)及hygromycin resistance 基因的質體後，以hygromycin篩選，再經由系列稀釋(limiting dilution)得到的細胞株，命名為M33。以此作為B型肝炎病毒lamivudine抗藥性突變株模式，進行抗病毒作用、機轉之探討及活性成分的追蹤分離。

MS-G2細胞培養於含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的RPMI-1640培養基(Gibco Laboratories, Grand Island, NY)中；M33細胞培養於含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的DMEM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。

2. 抗病毒藥物之處理[15]

在 24 well 的細胞培養皿(petri-dish)，種入 MS-G2 細胞 2×10^5 ，或 M33 細胞 1.5×10^5 ，待隔夜後細胞充分附著，更新培養基，同時給予五種不同濃度之供試藥物，每個濃度三重覆。給藥處理 48 小時後，收集上層培養液，進行抗病毒活性測定。並同時以 MTT 測試，留在 24 well 內的細胞存活情形及藥物是否毒害及抑制細胞生長。MTT (3-[4, 5- dimethylthiazol- 2- yl] 2, 5- diphenyl- tetrazolium bromide) 是一種黃色的染劑，會被活細胞所吸收並經由粒線體中的 succinate dehydrogenase 還原成藍紫色的 formazan，可用來檢測細胞之存活與生長變化。在 24 well 的細胞培養皿中，加入 1 mg/ml MTT 溶液，於 37°C 下作用 4 小時。吸除上清液，加入 100 μ l DMSO 將藍紫色的結晶析出。最後，以分光比色計 ELISA reader 在 540 nm 測定吸光值，反映存活細胞的多寡。

3. B 型肝炎病毒表面抗原及 e 抗原之酵素免疫測定[16]

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〔保健生物科技公司，台北，台灣〕，利用抗體—抗原—抗體酵素接合體之三明治複合體，以含過氧化氫的磷苯二氨 (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 %)：

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

抑制百分比在 20—35 為輕度抑制，抑制百分比在 35—50 為中度抑制，抑制百分比在 50—65 為強度抑制，抑制百分比在 65 以上為非常強度抑制。

4. 統計方法

實驗所得之數據以平均值 \pm 標準誤差 (mean \pm standard error of mean) 來表示。實驗組與對照組之間是否有差異以 Student's t-test 或單次變方分析 (one way ANOVA) 測定，當 $p < 0.05$ 時視為有統計意義。

研究結果與討論

本試驗原則上採五種測定濃度，三重覆處理。24 孔培養皿 (2×10^5 cells/1 ml medium)，本次供測藥物艾草粗萃物，以 DMSO 溶解，故 DMSO 2.5 μ l/ml 為 solvent control。結果如下：

1. 艾草粗萃物 the crude extract of *Artemisia indica*

(A). B 型肝炎病毒野生型細胞株 (MS-G2 cell line) [詳 Table 1 & Table 2]：

五個測試濃度 (200、100、50、25 及 12.5 μ g/ml) 均無細胞毒性。100 及 200 μ g/ml 測試濃度對表面抗原具輕度 (+) 抑制作用至強度 (+++) 抑制作用，其抑制百分比分別為 29.7 ± 0.5 及 57.6 ± 4.2 [Fig. 1]。

(B). 拉美夫錠抗藥性突變株 (M33 cell line) [詳 Table 3 & Table 4]：

五個測試濃度 (100、50、25、12.5 及 6.25 μ g/ml) 均無細胞毒性。25、50 和 100 μ g/ml 測試濃度對表面抗原具輕度 (+) 至非常強度 (++++) 抑制作用，其抑制百分比分別為 28.5 ± 5.3 、 45.9 ± 3.6 及 73.1 ± 0.7 ；100 μ g/ml 測試濃度對 e 抗原具中度 (++) 抑制作用，其抑制百分比為 38.2 ± 1.8 [Fig. 2]。

2. 分離自獨活的 Osthole 為正對照組，Osthole 給藥濃度 80 μ M 對 HBV 野生型之表面抗原具強度抑制 (+++) 其抑制百分比為 52.0 ± 1.7 ，對拉美夫錠抗藥性突變株之表面抗原具強度抑制 (+++) 其抑制百分比為 50.8 ± 1.5 ，對 e 抗原無抑制作用。

3. DMSO 組為 solvent control。

Table 1. Anti-HBsAg and Anti-HBeAg Effects of the crude extract of *Artemisia indica* in Wild-Type HBV Cell Line (MS-G2).

Treatments for 48 h	μ g/ml	HBsAg (Inhibition %) Mean \pm S. E.	HBeAg (Inhibition %) Mean \pm S. E.	MTT assay (Inhibition %) Mean \pm S. E.
Control	0	0		0
DMSO	2.5 μ l/ml	0.9 ± 1.6	ND	-2.9 ± 1.1

the crude extract of <i>Artemisia indica</i>	200 µg/ml (200 ppm)	57.6 ± 4.2	ND	-2.4 ± 4.2
	100 µg/ml (100 ppm)	29.7 ± 0.5		-7.7 ± 1.7
	50 µg/ml (50 ppm)	19.0 ± 3.8		-5.5 ± 0.9
	25 µg/ml (25 ppm)	19.4 ± 3.2		-2.6 ± 0.3
	12.5 µg/ml (12.5 ppm)	3.7 ± 1.8		-5.2 ± 2.4
Osthole (From 獨活)	80 µM	52.0 ± 1.7	ND	-13.7 ± 0.8

Values are based on one experiment performed in triplicate.

ND : not detected.

抑制百分比(Inhibition percentage) : 介於 20% - 35%為輕度抑制(+)
介於 35% - 50%為中度抑制(++)
介於 50% - 65%為強度抑制(+++)
大於 65% 為非常強度抑制(++++)

Table 2. Wild-Type HBV Cell Line (MS-G2)

Treatments	HBsAg	HBeAg
the crude extract of <i>Artemisia indica</i>	+++ (五個測試濃度無細胞毒性)	ND
Osthole (80 µM)	+++ (此濃度無細胞毒性)	ND

Table 3. Anti-HBsAg and Anti-HBeAg Effects of 艾草粗萃物 in Lamivudine-Resistant HBV Mutant Cell Line (M33).

Treatments for 48 h	µg/ml	HBsAg (Inhibition %) Mean ± S. E.	HBeAg (Inhibition %) Mean ± S. E.	MTT assay (Inhibition %) Mean ± S. E.
Control	0	0	0	0
DMSO	2.5 µl/ml	3.2 ± 1.9	-3.9 ± 1.0	-0.6 ± 1.0
the crude extract of <i>Artemisia indica</i>	100 µg/ml (100 ppm)	73.1 ± 0.7	38.2 ± 1.8	7.3 ± 2.7
	50 µg/ml (50 ppm)	45.9 ± 3.6	4.4 ± 2.7	11.9 ± 3.4
	25 µg/ml (25 ppm)	28.5 ± 5.3	2.6 ± 1.2	10.0 ± 4.4
	12.5 µg/ml (12.5 ppm)	19.6 ± 0.3	-7.3 ± 2.1	4.7 ± 0.8
	6.25 µg/ml (6.25 ppm)	6.0 ± 2.8	4.1 ± 2.5	0.9 ± 1.7
Osthole (From 獨活)	80 µM	50.8 ± 1.5	12.8 ± 0.6	-0.3 ± 2.8

Values are based on one experiment performed in triplicate.

抑制百分比(Inhibition percentage)：介於 20% - 35%為輕度抑制(+)
介於 35% - 50%為中度抑制(++)
介於 50% - 65%為強度抑制(+++)
大於 65% 為非常強度抑制(++++)

Table 4. Lamivudine- Resistant HBV Mutant Cell Line (M33)

Treatments	HBsAg	HBeAg
the crude extract of <i>Artemisia indica</i>	++++ (五個測試濃度無細胞毒性)	++ (五個測試濃度無細胞毒性)
Osthole (80 µM)	+++ (此濃度無細胞毒性)	- (此濃度無細胞毒性)

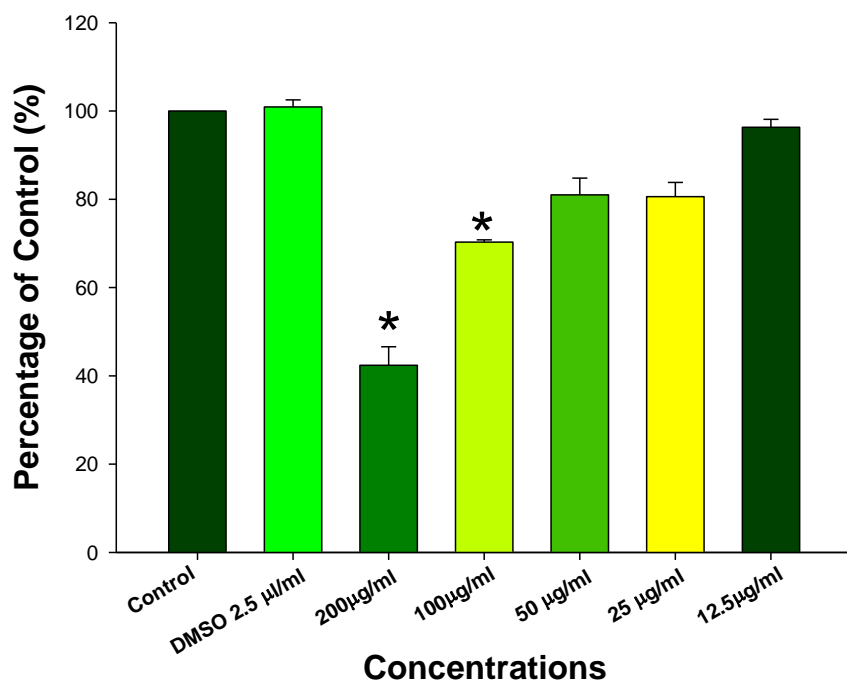


Fig. 1 Anti-HBsAg Effect of the crude extract of *Artemisia indica* in Wild-Type HBV Cell Line (MS-G2).

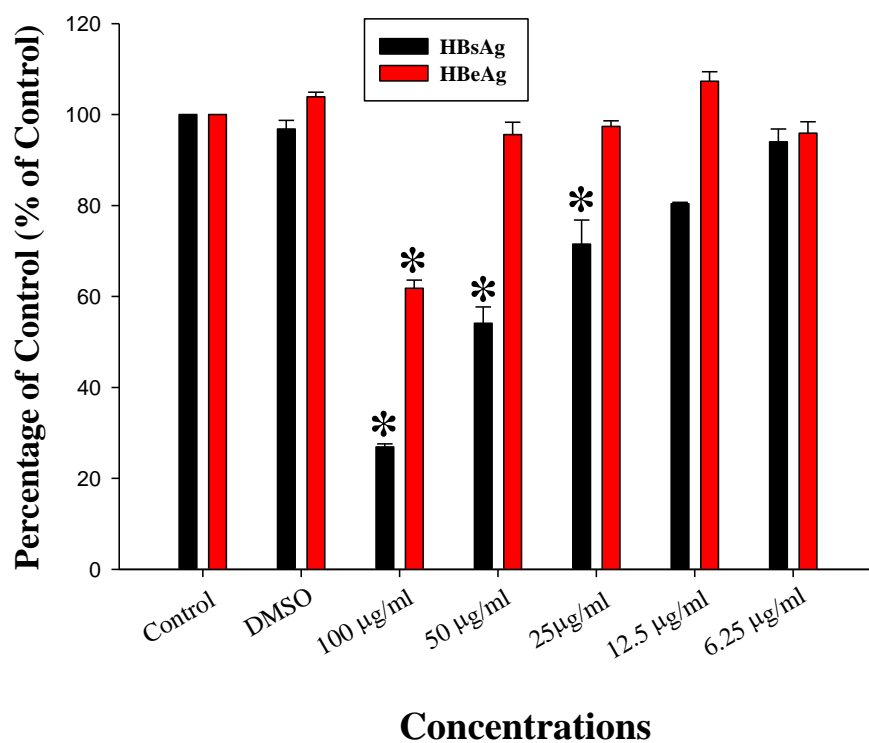


Fig. 2 Anti-HBsAg and Anti-HBeAg Effects of the crude extract of *Artemisia indica* in Lamivudine-Resistant HBV Mutant Cell Line (M33).

結論

艾草(*Artemisia indica* Willd.)為菊科艾屬植物，常見於中藥漢方與民間草藥，以及養生的藥酒、精油。客家人對艾草的使用尤其廣泛，艾糕、艾粿、艾草版等等多種添加艾草的食物。全草藥用，具有調經止血、安胎止崩、散寒除濕之效。治月經不調、經痛腹痛、流產、子宮出血，根治風濕性關節炎、頭風、月內風等作用。

艾草粗萃物(the crude extract of *Artemisia indica*)，五個測試濃度(200、100、50、25及12.5 $\mu\text{g/ml}$)，B型肝炎病毒野生型細胞株(MS-G2 cell line)或是拉美夫錠抗藥性突變株(M33 cell line)，均無細胞毒性，對B型肝炎病毒具極顯著抑制作用，將進一步追蹤活性成分，期望有助於中醫臨床抗病毒藥物之開發。

參考文獻

1. Robinson, W.S., D.A. Clayton, and R.L. Greenman. 1974. DNA of a human hepatitis B virus candidate. *J. Virol.*14: 384-391.
2. Robinson, W.S. 1977. The genome of hepatitis B virus. *Ann. Rev. Microbiol.* 31: 357-377.
3. Delius, H., N.M. Gough, C.H. Cameron, and K. Murray. 1983. Structure of the hepatitis B virus genome. *J. Virol.*47: 337-343.
4. Szmunes, W. 1978. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: evidence for a causal association. *Prog. Med. Virol.*24: 40-69.
5. Beasley, R.P., L.Y. Hwang, C.C. Lin, and C.S. Chien. 1981. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22,707 men in Taiwan. *Lancet*2: 1129-1133.
6. Beasley, R.P., and L.Y. Hwang. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. In Vyas, G. N. (ed): *Viral Hepatitis and Liver Disease*. pp. 209-224, Grune & Stratton, New York, 1984.
7. Tong, M.J., S.C. Sun, B.T. Schaeffer, N.K. Chang, K.J. Lo, and R.L. Peters. 1971. Hepatitis-associated antigen and hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Ann. Intern. Med.* 75: 687-691.
8. Sung, J.L., P.L. Shih, Y.F. Liaw, W.S.J. Lin, T.Y. Tai, S.C. Hsieh, C.Y. Wang, C.K. Chang, T.H. Wang, J.Y. Yu, and J.S. Chen. 1979. A survey and follow-up study of anicteric hepatitis, other asymptomatic liver diseases and hepatitis B surface antigen carriers. *J. Formosan Med. Assoc.*78: 452-459.
9. Huang, R.L., C.C. Chen, Y.L. Huang, D.J. Hsieh, C.P. Hu, C.F. Chen, and Chungming Chang. 1996. Osthole Increases Glycosylation of Hepatitis B surface antigen and suppresses the secretion of Hepatitis B virus *In Vitro*. *Hepatology* 24(3): 508-515.
10. Dienstag JL, Perrillo RP, Schiff ER, Bartholomew M, Vicary C, and Rubin M (1995) A preliminary trial of lamivudine for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 333:1657-1661.
11. Honkoop P, Niesters HG, deMan RA, Osterhaus AD, and Schalm SW (1997) Lamivudine resistance in immunocompetent chronic hepatitis B. Incidence and patterns. *J Hepatol* 26:1393-1395.
12. Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters K-A, Tyrrell DLJ, Brown N,

- and Condreay LD (1998) Identification and characterization of mutation in hepatitis B virus resistant to lamivudine. *Hepatology* 27:1670-1677.
13. Lai CL, Chien R-N, Leung NWY, Chang TT, Guan R, Tai DI, Ng KY, Wu PC, Dent JC, Barber J, Stephenson SL, and Gray DF (1998) A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 339:61-68.
 14. Sureau C., J.L. Romet-Lemonne, J.I. Mullins, and M. Essex. 1986. Production of hepatitis B virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA. *Cell* 47: 37-47.
 15. Huang, R.L., C.C. Chen, Y.L. Huang, D.J. Hsieh, C.P. Hu, C.F. Chen, and C.M. Chang. 1996. Osthole increases glycosylation of hepatitis B surface antigen and suppresses the secretion of hepatitis B virus *in vitro*. *Hepatology* 24(3): 508-515.
 16. Tietz, N.W. 1976. Fundamentals of clinical chemistry. Philadelphia: Saunders, 674.