

麗豐樟芝發酵產品抑制 B 型肝炎病毒表面抗原和 e 抗原活性 檢測及有效成分之測定

黃俊智*、陳志杰*、陳立耿**、黃瑞齡***

摘要

B 型肝炎是國人常見的肝疾，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。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，以肝安能(lamivudine;即 3TC)有非常肯定的療效，可惜仍然有抗藥性的問題。本論文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)測定由麗豐實業股份有限公司提供的樟芝發酵產品抑制 B 型肝炎病毒表面抗原和 e 抗原活性及有效成分之分離及測定。結果顯示：麗豐實業股份有限公司經由發酵槽大量培養之樟芝菌絲體，以 95%乙醇粗提得到四個粗萃物 AN-L-EA、AN-L-W、AN-M-EA 及 AN-M-W，抗病毒試驗結果顯示：其中 AN-M-EA 對 B 型肝炎病毒具極顯著抑制作用。進一步取 AN-M-EA 分離得到 ACEA M37、ACEA M41、ACEA M43、ACEA M53、ACEA M55、ACEA M65、ACEA M69、ACEA M74、ACEA M78、ACEA M84 及一個純化合物(4-acetylanthroquinonol B)，抗病毒測試結果顯示：ACEA M55、ACEA M65 及 4-acetylanthroquinonol B 均具有非常顯著抑制 B 型肝炎野生型病毒株及肝安能抗藥性突變株之表面抗原及 e 抗原之活性。

關鍵詞：人類 B 型肝炎病毒、表面抗原、e 抗原、樟芝、發酵產品。

*麗豐實業股份有限公司

*麗豐實業股份有限公司

**嘉義大學微生物免疫與生物藥學系助理教授

***美和科技大學生物科技系副教授(通訊作者)

壹、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 型肝炎病毒屬於肝去氧核糖核酸病毒科 (Hepadnaviridae)，是目前已知最小的 DNA 病毒。全世界約有四億人感染 B 型肝炎 (Bader & Korba, 2010)，每年全球死於 B 型肝炎引發之疾病約有百萬人之多 (Zhang, Zhong & Guo, 2013; Song et al., 2013)，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，以肝安能 (lamivudine 拉美夫錠；即 3TC)，它是 B 型肝炎病毒反轉錄酶抑制劑，具有非常肯定的療效 (Dienstag et al., 1995; Honkoop, Niesters, deMan, Osterhaus & Schalm, 1997)，可惜仍然有抗藥性的問題 (Allen et al., 1998; Lai et al., 1998; Feld & Locarnini, 2002; Perrillo, 2005)，目前臨床用藥及治療困境中，除肝安能之抗藥性外，其他如 Adefovir、Entecavir、Telbivudine 等藥物存有耐藥性、服用期限及其他如肝適能具毒性等缺點且無法消除 HBsAg 等，而積極地以天然藥物樟芝開發為抗 B 型肝炎的藥物，輔助 B 型肝炎治療。肝安能抗藥性突變株，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，對肝安能產生抗藥性，導致肝安能失去作用，病人血清內病毒量反彈上升 (Tipples et al., 1996; Ling et al., 1996; Honkoop et al., 1997)，病毒與病人免疫系統之間的拉鋸戰，慢性肝炎反覆發作，轉為肝硬化，最後導致原發性肝癌 (hepatocellular carcinoma; HCC)。

牛樟芝 (*Antrodia cinnamomea*) 為擔子菌門擬層孔菌科的藥用性真菌類，用於養生保健，只生長在台灣特有種高海拔的常綠闊葉大喬木的牛樟樹 (*Cinnamomum kanehirae*) 上，在傳統療法，牛樟芝被喻為是一種「補肝良藥」。牛樟芝的粗萃物具有抗氧化、抗癌、抗發炎、免疫調節、抗人類 B 型肝炎病毒、保肝以及預防肝臟纖維化等藥理活性 (Geethangili and Tzeng, 2011; Huang, Huang, Chen, Chang & Chou, 2003; Lee et al., 2002)。牛樟芝由於其寄主的專一性，生長緩慢，以及不易以人工方式栽培出子實體，近十年來由於需求大增，是它珍稀價昂的主要原因。由於牛樟樹是台灣特有植物，受到極度的重視，並列為國寶級保育類。麗豐實業股份有限公司以液態深層培養方式進行樟芝菌絲體之生產，與野外採集、椴木栽培、皿培及太空包固態栽培不同，不需砍伐台灣特有之保育樹種牛樟樹，具環保概念，且液態培養為快速、省時、省工、大量生產、品質保障。本論文進行麗豐實業股份有限公司樟芝發酵產品抑制 B 型肝炎病毒表面抗原和 e 抗原活性及有效成分之活性測定。

貳、材料與方法

一、細胞株(Cell lines)及細胞培養(Cell culture)

本論文使用兩種產人類 B 型肝炎病毒(Human Hepatitis B Virus)之人類肝癌細胞株，一為 MS-G2，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 (Sureau, Romet-Lemonne, Mullins, & Essex. 1986; Huang et al., 1996)。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)。另一為美和科技大學生物科技系黃瑞齡老師實驗室，執行國科會計畫案，所建立之抗肝安能 lamivudine 突變株(mutant type)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，提供篩選抗 B 型肝炎病毒突變株之中草藥(Janmanchi et al., 2010)。本論文將以 MS-G2 細胞作為 B 型肝炎病毒野生型模式，以 M33 細胞作為 B 型肝炎病毒肝安能抗藥性突變株模式，進行麗豐實業股份有限公司樟芝菌絲體發酵產物，抗 B 型肝炎病毒活性測試，本實驗室為生物安全等級 P2 實驗室。

MS-G2 細胞與 M33 細胞分別培養於含 10%胎牛血清(fetal bovine serum; FBS)的 DMEM 完全培養基(Gibco Laboratories, Grand Island, NY)中，置於含 5% 二氧化碳的 37°C 培養箱中，2 到 3 天繼代培養一次。

二、MTT assay 進行供測藥物細胞毒殺測試

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-yl)-2,5-di-phenyltetrazolium 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琥珀酸去氫酶(succinate dehydrogenase)還原成藍紫色的 formazan，可用來檢測細胞存活與生長變化。在 96 well 的細胞培養皿(petri-dish)，種入 2×10^4 細胞，培養於 5% CO₂, 37°C incubator 中，待隔夜細胞充份附著，更新培養基，同時給予供測藥物，各五種濃度(200、100、50、25、12.5 μ g/mL)，每種濃度三重複。給藥處理 48 小時後，盤中留下 100 μ L 培養液，加入 25 μ L 含有 5 mg/mL MTT 溶液，MTT 最終濃度為 1 mg/mL，放回 5% CO₂, 37°C incubator 4 小時，再移除培養液加入 100 μ L 的 100% DMSO 於室溫下震盪 5 分鐘，待紫色結晶完全溶解後，在 540 nm 測定吸光值，將不同處理後之吸光值扣除空白組吸光值後，帶入下列公式以求得細胞存活率 Cell viability (%)。

$$\text{Cell viability (\%)} = [\text{OD}_{540}(\text{sample}) / \text{OD}_{540}(\text{control})] \times 100 \%$$

細胞存活率低於 80%者，認定為具有顯著細胞毒性(cytotoxic)。

三、抗病毒藥物之處理

在 24 well 的細胞培養皿，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，同時給予樟芝菌絲體發酵產物，各五種濃度，每種濃度三重複。給藥處理 48 小時後，收集上層培養液，進行抗病毒活性測定。

四、B型肝炎病毒表面抗原及e 抗原之酵素免疫測定

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[普生股份有限公司，新竹縣，台灣]，利用抗體—抗原—抗體酵素接合體之三明治複合體，以 TMB 呈色劑呈色之，再以分光比色計 BioTek ELX800 型 ELISA reader 在 450 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(++++)。

五、統計方法

實驗所得之數據以平均值+標準誤差(mean + 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 測定，當 $p < 0.05$ 時視為有統計意義。

參、結果與討論

一、樟芝菌絲體發酵及95% 乙醇抽取物流程（此步驟由麗豐實業股份有限公司負責提供）

(一)發酵槽大量培養樟芝菌絲體之流程(詳圖1)。

(二) 95%乙醇抽取物之提取(詳圖2)。

A.樟芝菌絲體的抽取與分離

樟芝菌絲體，先經由 95%乙醇加熱萃取，過濾後所得乙醇萃取液，濃縮至乾，即得菌絲體乙醇萃取物，此乙醇萃取物用乙酸乙酯與水(1:1)，進行 partition。分層完之後，再將乙酸乙酯層濃縮至乾，即得菌絲體乙酸乙酯抽出物(AN-M-EA)。而水層進行冷凍乾燥，即得菌絲體水抽出物(AN-M-W)。

B.樟芝菌液乾燥物的抽取與分離

樟芝菌液乾燥物，先經由 95%乙醇加熱萃取，過濾後所得乙醇萃取液，濃縮至乾，即得菌液乙醇萃取物，此乙醇萃取物用乙酸乙酯與水(1:1)，進行 partition。分層完之後，再將以酸乙酯層濃縮至乾，即得菌液乙酸乙酯抽出

物(AN-L-EA)。而水層進行冷凍乾燥，即得菌液水抽出物(AN-L-W)。

二、AN-L-EA、AN-L-W、AN-M-EA及AN-M-W抗B型肝炎野生型病毒株活性測試

由表 1 結果顯示：AN-L-EA，200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 對 MS-G2 cell line 具有細胞毒性，調整五個測試濃度為 100、50、25、12.5 及 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 均無細胞毒性。100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 測試濃度對表面抗原具中度(++)抑制作用，其抑制百分比為 36.3 ± 2.6 ；對 e 抗原無抑制作用。AN-L-W 五個測試濃度(200、100、50、25 及 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)均無細胞毒性。200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 測試濃度對表面抗原具中度(++)抑制作用，其抑制百分比為 37.6 ± 6.4 ；對 e 抗原無抑制作用。AN-M-EA，200、100 及 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 對 MS-G2 cell line 具有毒性，調整五個測試濃度為 25、12.5、6.25、3.125 及 1.5625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 均無細胞毒性。3.125、6.25、12.5 和 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 26.9 ± 3.7 、 56.5 ± 0.2 、 68.1 ± 2.2 及 71.1 ± 2.0 ；對 e 抗原無抑制作用。AN-M-W 五個測試濃度(200、100、50、25 及 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)均無細胞毒性。100 和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 測試濃度對表面抗原具輕度(+)至中度(++)抑制作用，其抑制百分比分別為 22.5 ± 0.8 及 44.1 ± 3.2 ；對 e 抗原無抑制作用。分離自獨活的 *Osthole* 為正對照組，*Osthole* 給藥濃度 80 μM ，無細胞毒性，對 HBV 野生型之表面抗原具強度抑制(+++)其抑制百分比為 50.4 ± 2.6 ；對 e 抗原無抑制作用。

三、AN-L-EA、AN-L-W、AN-M-EA及AN-M-W抗B型肝炎病毒肝安能抗藥性突變株活性測試

由表 2 結果顯示：AN-L-EA 100 和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 對 M33 cell line 具有毒性，50、25 及 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 無細胞毒性，50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 測試濃度對表面抗原具輕度(+)抑制作用，其抑制百分比為 28.1 ± 0.9 ；對 e 抗原無抑制作用。AN-L-W 五個測試濃度(200、100、50、25 及 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)均無細胞毒性。50、100 和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 測試濃度對表面抗原具輕度(+)至中度(++)抑制作用，其抑制百分比分別為 26.3 ± 0.2 、 35.5 ± 1.4 及 43.8 ± 2.1 ；對 e 抗原無抑制作用。AN-M-EA 200、100、50、25、12.5 及 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 具有毒性。1.5625 及 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 無細胞毒性。對表面抗原具輕度(+)抑制作用，其抑制百分比分別為 24.6 ± 1.4 及 33.1 ± 2.5 ；對 e 抗原無抑制作用。AN-M-W 五個測試濃度(200、100、50、25 及 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)均無細胞毒性。50、100 和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 測試濃度對表面抗原具輕度(+)至強度(+++)抑制作用，其抑制百分比分別為 22.5 ± 3.1 、 41.5 ± 0.7 及 51.4 ± 5.3 ；對 e 抗原無抑制作用。*Osthole* 給藥濃度 80 μM ，無細胞毒性，對肝安能抗藥性突變株之表面抗原具強度抑制(+++)其抑制百分比為 51.0 ± 3.3 ；對 e 抗原無抑制作用。

四、ACEA M55、ACEA M65及4-acetylantroquinonol B抗B型肝炎病毒活性

進一步取抗 B 型肝炎野生型病毒株活性最強的 AN-M-EA，繼續分離得到 ACEA M37、ACEA M41、ACEA M43、ACEA M53、ACEA M55、ACEA M65、ACEA M69、ACEA M74、ACEA M78、ACEA M84 及一個純化合物(鑑定結果為已知成分 4-acetylantroquinonol B)(圖 3)，實驗結果顯示 ACEA M55、ACEA M65

及 4-acetylanthroquinonol B 具有非常顯著抗 B 型肝炎野生型病毒株及肝安能抗藥性突變株活性。

(一) ACEA M55

A. B 型肝炎病毒野生型細胞株(MS-G2 cell line) [詳表 3 及圖 4]：

四個測試濃度(25、12.5、6.25 及 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，25 及 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 具有細胞毒性，3.125 及 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 無細胞毒性，對表面抗原具輕度(+)至強度(+++)抑制作用，其抑制百分比分別為 24.9 ± 1.7 及 51.8 ± 2.8 ；6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 對 e 抗原具輕度(+)抑制作用，其抑制百分比為 34.7 ± 1.6 。

B. 肝安能抗藥性突變株(M33 cell line) [詳表 4 及圖 5]：

七個測試濃度(200、100、50、25、12.5、6.25 及 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，200、100、50 及 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 具有細胞毒性，3.125、6.25 及 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 無細胞毒性，對表面抗原具輕度(+)至中度(++)抑制作用，其抑制百分比分別為 23.7 ± 1.9 、 33.1 ± 5.1 及 47.3 ± 1.7 ；6.25 及 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 對 e 抗原具輕度(+)至中度(++)抑制作用，其抑制百分比分別為 33.4 ± 0.3 及 42.1 ± 5.3 。

(二) ACEA M65

A. B 型肝炎病毒野生型細胞株(MS-G2 cell line) [詳表 3 及圖 6]：

五個測試濃度(50、25、12.5、6.25 及 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，50、25 及 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 具有細胞毒性，3.125 及 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 無細胞毒性，對表面抗原具輕度(+)至中度(++)抑制作用，其抑制百分比分別為 23.4 ± 1.9 及 37.7 ± 2.7 。6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 對 e 抗原具輕度(+)抑制作用，其抑制百分比為 22.5 ± 3.0 。

B. 肝安能抗藥性突變株(M33 cell line) [詳表 4 及圖 7]：

五個測試濃度(200、100、50、25 及 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，200 及 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 具有細胞毒性，12.5、25 及 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 無細胞毒性，對表面抗原具中度(++)至強度(+++)抑制作用，其抑制百分比分別為 47.6 ± 0.8 、 48.9 ± 0.5 及 50.6 ± 0.8 ；對 e 抗原具輕度(+)至中度(++)抑制作用，其抑制百分比分別為 28.2 ± 6.2 、 37.9 ± 0.2 及 48.0 ± 1.4 。

(三) 4-acetylanthroquinonol B

A. B 型肝炎病毒野生型細胞株(MS-G2 cell line) [詳表 3 及圖 8]：

三個測試濃度(3.125、1.5625 及 0.78125 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，3.125 及 1.5625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 具有細胞毒性，0.78125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 無細胞毒性，對表面抗原具強度(+++)抑制作用，其抑制百分比為 61.3 ± 1.8 ；對 e 抗原具中度(++)抑制作用，其抑制百分比為 49.2 ± 2.2 。

B. 肝安能抗藥性突變株(M33 cell line) [詳表 4 及圖 9]：

八個測試濃度(100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.5625 及 0.78125 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，100、50、25、12.5 及 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 具有細胞毒性，0.78125、1.5625 及 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 無細胞毒性，對表面抗原具輕度(+)至強度(+++)抑制作用，其抑制百分比分別為 24.8 ± 0.8 、 35.7 ± 1.0 及 56.6 ± 1.5 ；1.5625 及 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 對 e 抗原具輕度(+)至中度(++)抑制作用，其抑制百分比分別為 28.1 ± 0.9 及 45.1

± 2.0。

五、分離自獨活的Osthole為正對照組

Osthole 給藥濃度 80 μM 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 ，對肝安能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。

六、DMSO組為solvent control

0.25% DMSO 對 HBV 野生型及肝安能抗藥性突變株之表面抗原和 e 抗原均無抑制作用。

肆、結論

人類 B 型肝炎病毒(Human Hepatitis B Virus; HBV)只能感染人類及黑猩猩(Rehermann & Nascimbeni; 2005)，與感染土撥鼠之土撥鼠肝炎病毒(Woodchuck Hepatitis Virus; WHV) (Menne & Cote, 2007)、感染地松鼠之地松鼠肝炎病毒 Ground Squirrel Hepatitis Virus (GSHV)及感染鴨子之鴨子 B 型肝炎病毒(Duck Hepatitis Virus; DHV) (Liu et al., 2014; Souza, Drexler, de Lima, do Rosário, Netto, 2014)是不同病毒，黑猩猩動物模式非常不容易，因此目前國內外抗 B 型肝炎病毒活性，均利用帶有人類 B 型肝炎病毒 DNA 序列嵌入之人類肝癌細胞株，體外細胞培養模式(*In Vitro* Cell-Based Model)，進行中草藥萃取物抑制病毒作用之評估，抗病毒活性成份之追蹤及抗病毒機制之探討。

首先經由 MTT 測試藥物對細胞的毒性，選擇無細胞毒性的濃度，進行病毒抑制作用之評估。麗豐牛樟芝發酵產品經實驗結果證實有多種發酵產物具有抑制 B 型肝炎病毒表面抗原和 e 抗原之活性，如 ACEA M55、ACEA M65 及 4-acetylanthroquinonol B 等，其中 4-acetylanthroquinonol B 效果最佳，濃度 0.78125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 對 MS-G2 cell line 無細胞毒性，對表面抗原具有強度(+++)抑制作用，其抑制百分比為 $61.3 \pm 1.8\%$ ；對 e 抗原具中度(++)抑制作用，其抑制百分比為 49.2 ± 2.2 。另外 4-acetylanthroquinonol B 濃度 0.78125、1.5625 及 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 對 M33 cell line 無細胞毒性，對表面抗原具輕度(+)至強度(+++)抑制作用，其抑制百分比分別為 24.8 ± 0.8 、 35.7 ± 1.0 及 $56.6 \pm 1.5\%$ ；1.5625 及 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 對 e 抗原具輕度(+)至中度(++)抑制作用，其抑制百分比分別為 28.1 ± 0.9 及 $45.1 \pm 2.0\%$ 。麗豐牛樟芝發酵產品試驗確實在 B 型肝炎病毒模式(MS-G2 及 M33 cell line)有抑制作用，正對照組(甲氧基歐芹酚)雖然對表面抗原有抑制作用(+++)但對 e 抗原並無效用，而牛樟芝發酵產品(4-acetylanthroquinonol B)不僅僅具有抑制表面抗原活性(+++)且對 e 抗原同樣具有良好的抑制效果(++)，故可有效降低 B 型肝炎病毒活動力及傳染性，因此應具有藥物輔助療法保健食品之潛力。目前雖然 B 型肝炎具有疫苗，但國內約尚有百餘萬人隱藏帶原者危機，因此牛樟芝發酵產品具有龐大潛力開發為護肝保健食品，並且期望能有助於臨床抗病毒藥物之開發與輔助治療。

參考文獻

- Allen, M. I., Deslauriers, M., Andrews, C. W., Tipples, G. A., Walters, K-A., Tyrrell, D. L. J., Brown, N., & Condreay, L. D. (1998) Identification and characterization of mutation in hepatitis B virus resistant to lamivudine. *Hepatology*, 27, 1670-1677.
- Bader, T., & Korba, B. (2010) Simvastatin potentiates the anti-hepatitis B virus activity of FDA-approved nucleoside analogue inhibitors *in vitro*. *Antiviral Res*, 86, 241- 245.
- Dienstag, J. L., Perrillo, R. P., Schiff, E. R., Bartholomew, M., Vicary, C., & Rubin, M. (1995). A preliminary trial of lamivudine for chronic hepatitis B. *N Engl J Med*, 333, 1657-1661.
- Feld, J., & Locarnini, S. (2002). Antiviral therapy for hepatitis B virus infections: new targets and technical challenges. *J Clin Virol*, 25, 267-283.
- Geethangili, M., & Tzeng, Y. M. (2011). Review of Pharmacological Effects of *Antrodia camphorata* and Its Bioactive Compounds. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine., <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2011/212641/>
- Honkoop, P., Niesters, H. G., deMan, R. A., Osterhaus, A. D., & Schalm, S. W. (1997). Lamivudine resistance in immunocompetent chronic hepatitis B. Incidence and patterns. *J Hepatol*, 26, 1393-1395.
- Huang, R-L., Chen, C-C., Huang, Y-L., Hsieh, D-J., Hu, C-P., Chen, C-F., & Chang, C. (1996). Osthole increases glycosylation of hepatitis B surface antigen and suppresses the secretion of hepatitis B virus *In Vitro*. *Hepatology*, 24, 508-515.
- Huang, R-L., Huang, Q., Chen, C-F., Chang, T-T., & Chou, C-J. (2003). Anti-viral effects of active compounds from *Antrodia camphorata* on wild-type and lamivudine-resistant mutant HBV. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 55, 371-379.
- Janmanchi, D., Tseng, Y. P., Wang, K-C., Huang, R. L., Lin, C. H., & Yeh, S. F. (2010). Synthesis and the biological evaluation of aryl-naphthalene lignans as anti-hepatitis B virus agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 1213-1226.
- Lai, C. L., Chien, R-N., Leung, N. W. Y., Chang, T.T., Guan, R., Tai, D. I., Ng, K. Y., Wu, P. C., Dent, J. C., Barber, J., Stephenson, S. L., & Gray, D. F. (1998). A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. *N Engl J Med*, 339, 61-68.
- Lee, I.H., Huang, R.L., Chen, C.T., Chen, H.C., Hsu, W.C., & Lu, M.K. (2002). *Antrodia camphorata* Polysaccharides Exhibit Anti-Hepatitis B Virus Effects. *FEMS Microbiology Letters*, 209, 63-67.

- Lin, Y.-W., Pan, J.-H., Liu, R. H., Kuo, Y.-H., Sheen, L.-Y., Chiang, B.-H. (2010). The 4-acetylanthroquinol B isolated from mycelium of *Antrodia cinnamomea* inhibits proliferation of hepatoma cells. *J. of the Science of Food and Agri*, 90, 1739-1744.
- Ling, R., Mutimer, D., Ahmed, M., Boxall, E. H., Ellas, E., Dusheiko, G. M., & Harrison, T. J. (1996). Selection of mutations in the hepatitis B virus polymerase during therapy of transplant recipients with lamivudine. *Hepatology*, 24, 711-713.
- Liu, N., Wang, F., Shi, J., Zheng, L., Wang, X., Zhang, D. (2014). Molecular characterization of a duck hepatitis virus 3-like astrovirus. *Veterinary Microbiology*, 170, 39-47.
- Menne, S., & Cote, P. J. (2007). The woodchuck as an animal model for pathogenesis and therapy of chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*, 13(1), 104-124.
- Perrillo, R. P. (2005). Current treatment of chronic hepatitis B: benefits and limitations. *Semin Liver Dis*, 25 (Suppl.), 20-28.
- Rehermann, B., & Nascimbeni, M. (2005). Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nature Reviews Immunology*, 5, 215-229.
- Song, P. P., Feng, X. B., Zhang, K. M., Song, T. Q., Ma, K. S., Kokudo, N., Dong, J. H., Yao, L. N., & Tang, W. (2013). Screening for and surveillance of high-risk patients with HBV-related chronic liver disease: Promoting the early detection of hepatocellular carcinoma in China. *Biosci Trends*, 7, 1-6.
- Souza, B. F. de C. D., Drexler, J. F., de Lima, R.S., do Rosário, M. de Oliveira H. V., Netto, E. M., (2014). Theories about evolutionary origins of human hepatitis B virus in primates and humans. *brazjinfectedis*, 18(5), 535-543.
- Sureau, C., Romet-Lemonne, J.L., Mullins, J.I., & Essex, M. (1986). Production of hepatitis B virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA. *Cell*, 47, 37-47.
- Tipples, G. A., Ma, M.M., Fischer, K. P., Bain, V. G., Kneteman, N. M., & Tyrrell, D. L. (1996). Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo. *Hepatology*, 24, 714-717.
- Zhang, C. Y., Zhong, Y. S., & Guo, L. P. (2013). Strategies to prevent hepatitis B virus infection in China: Immunization, screening, and standard medical practices. *Biosci Trends*, 7, 7-12.

表 1

Anti-HBsAg and Anti-HBeAg Effects of AN-L-EA, AN-L-W, AN-M-EA, AN-M-W in Wild-Type HBV Cell Line (MS-G2).

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	1.9 ± 1.0	2.3 ± 2.8	-2.6 ± 1.5
AN-L-EA	200 µg/mL (200 ppm)	cytotoxic		23.9 ± 3.4
	100 µg/mL (100 ppm)	36.3 ± 2.6	12.2 ± 3.0	1.1 ± 2.2
	50 µg/mL (50 ppm)	10.2 ± 3.3	9.8 ± 2.6	-2.6 ± 1.5
	25 µg/mL (25 ppm)	7.9 ± 3.3	10.9 ± 1.7	4.3 ± 4.7
	12.5 µg/mL (12.5 ppm)	4.6 ± 0.7	11.2 ± 3.2	5.0 ± 3.3
	6.25 µg/mL (6.25 ppm)	-3.5 ± 2.6	9.5 ± 1.3	0.3 ± 1.8
AN-L-W	200 µg/mL (200 ppm)	37.6 ± 6.4	9.7 ± 2.4	11.7 ± 2.5
	100 µg/mL (100 ppm)	14.4 ± 4.1	6.5 ± 3.3	7.0 ± 2.1
	50 µg/mL (50 ppm)	10.6 ± 1.2	9.0 ± 2.8	6.1 ± 3.4
	25 µg/mL (25 ppm)	5.5 ± 2.4	2.8 ± 1.9	4.0 ± 2.7
	12.5 µg/mL (12.5 ppm)	2.7 ± 1.6	0.9 ± 2.5	-1.9 ± 1.1
AN-M-EA	200 µg/mL (200 ppm)	cytotoxic		49.5 ± 2.9
	100 µg/mL (100 ppm)	cytotoxic		30.2 ± 3.2
	50 µg/mL (50 ppm)	cytotoxic		21.4 ± 2.7
	25 µg/mL (25 ppm)	71.1 ± 2.0	11.5 ± 1.1	16.5 ± 0.5
	12.5 µg/mL (12.5 ppm)	68.1 ± 2.2	10.3 ± 1.8	13.1 ± 1.3
	6.25 µg/mL (6.25 ppm)	56.5 ± 0.2	8.8 ± 1.6	4.0 ± 1.1
	3.125 µg/mL (3.125 ppm)	26.9 ± 3.7	6.9 ± 3.1	3.6 ± 3.7
	1.5625 µg/mL (1.5625 ppm)	11.5 ± 2.5	4.7 ± 1.9	9.2 ± 3.1
AN-M-W	200 µg/mL (200 ppm)	44.1 ± 3.2	12.9 ± 2.8	9.6 ± 1.5
	100 µg/mL (100 ppm)	22.5 ± 0.8	9.3 ± 3.1	8.0 ± 3.0
	50 µg/mL (50 ppm)	14.0 ± 2.4	10.2 ± 1.6	8.1 ± 4.1
	25 µg/mL (25 ppm)	8.1 ± 3.0	3.7 ± 0.8	12.8 ± 6.0
	12.5 µg/mL (12.5 ppm)	2.3 ± 2.7	-1.2 ± 2.2	8.9 ± 4.9
Osthole (From 獨活)	80 µM	50.4 ± 2.6	16.7 ± 2.1	-8.3 ± 0.9

Values are based on one experiment performed in triplicate.

表 2

Anti-HBsAg and Anti-HBeAg Effects of AN-L-EA, AN-L-W, AN-M-EA, AN-M-W 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	5.4 ± 2.8	-0.8 ± 2.4	-1.7 ± 1.3
AN-L-EA	200 µg/mL (200 ppm)	cytotoxic		30.6 ± 0.4
	100 µg/mL (100 ppm)	cytotoxic		23.2 ± 0.3
	50 µg/mL (50 ppm)	28.1 ± 0.9	2.1 ± 4.1	18.4 ± 0.8
	25 µg/mL (25 ppm)	14.5 ± 6.4	0.1 ± 1.9	16.2 ± 3.7
	12.5 µg/mL (12.5 ppm)	-3.7 ± 7.9	-9.6 ± 4.7	7.0 ± 3.4
AN-L-W	200 µg/mL (200 ppm)	43.8 ± 2.1	10.9 ± 2.5	14.6 ± 2.3
	100 µg/mL (100 ppm)	35.5 ± 1.4	6.4 ± 4.9	15.3 ± 1.8
	50 µg/mL (50 ppm)	26.3 ± 0.2	5.5 ± 0.2	12.9 ± 2.1
	25 µg/mL (25 ppm)	7.1 ± 2.6	2.4 ± 2.9	9.4 ± 1.4
	12.5 µg/mL (12.5 ppm)	4.0 ± 1.3	1.7 ± 3.0	2.7 ± 1.5
AN-M-EA	200 µg/mL (200 ppm)	cytotoxic		40.4 ± 1.8
	100 µg/mL (100 ppm)	cytotoxic		32.5 ± 0.4
	50 µg/mL (50 ppm)	cytotoxic		29.2 ± 0.8
	25 µg/mL (25 ppm)	cytotoxic		27.6 ± 1.6
	12.5 µg/mL (12.5 ppm)	cytotoxic		25.4 ± 0.4
	6.25 µg/mL (6.25 ppm)	cytotoxic		21.6 ± 2.3
	3.125 µg/mL (3.125 ppm)	33.1 ± 2.5	11.0 ± 1.1	6.7 ± 2.0
1.5625 µg/mL (1.5625 ppm)	24.6 ± 1.4	4.4 ± 2.2	3.5 ± 1.8	
AN-M-W	200 µg/mL (200 ppm)	51.4 ± 5.3	13.6 ± 2.0	14.3 ± 1.7
	100 µg/mL (100 ppm)	41.5 ± 0.7	0.9 ± 4.8	10.3 ± 1.7
	50 µg/mL (50 ppm)	22.5 ± 3.1	-0.5 ± 3.3	6.5 ± 1.9
	25 µg/mL (25 ppm)	6.6 ± 3.5	2.6 ± 1.5	4.2 ± 1.0
	12.5 µg/mL (12.5 ppm)	2.9 ± 0.8	-4.3 ± 3.2	-2.1 ± 0.5
Osthole	80 µM	51.0 ± 3.3	14.0 ± 1.8	-2.5 ± 2.7

(From 獨活)

Values are based on one experiment performed in triplicate.

表 3

Anti-HBsAg and Anti-HBeAg Effects of ACEA M55, ACEA M65 and 4-acetylanthroquinonol B in Wild-Type HBV Cell Line (MS-G2).

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	0.9 ± 1.6	3.3 ± 2.5	-2.9 ± 1.1
ACEA M55	25 µg/mL (25 ppm)		cytotoxic	29.0 ± 1.8
	12.5 µg/mL (12.5 ppm)		cytotoxic	27.7 ± 1.7
	6.25 µg/mL (6.25 ppm)	51.8 ± 2.8	34.7 ± 1.6	19.0 ± 1.4
	3.125 µg/mL (3.125 ppm)	24.9 ± 1.7	15.9 ± 2.3	4.2 ± 2.1
	1.5625 µg/mL (1.5625 ppm)	9.3 ± 1.5	4.6 ± 3.1	2.7 ± 2.4
ACEA M65	50 µg/mL (50 ppm)		cytotoxic	36.5 ± 1.5
	25 µg/mL (25 ppm)		cytotoxic	29.7 ± 3.0
	12.5 µg/mL (12.5 ppm)		cytotoxic	21.5 ± 1.6
	6.25 µg/mL (6.25 ppm)	37.7 ± 2.7	22.5 ± 1.5	7.5 ± 1.8
	3.125 µg/mL (3.125 ppm)	23.4 ± 1.9	13.7 ± 0.8	4.3 ± 2.6
	1.5625 µg/mL (1.5625 ppm)	10.2 ± 2.9	0.8 ± 1.1	0.9 ± 1.7
4-acetylanthroquinonol B	3.125 µg/mL (3.125 ppm)		cytotoxic	33.9 ± 1.0
	1.5625 µg/mL (1.5625 ppm)		cytotoxic	30.0 ± 3.9
	0.78125 µg/mL (0.78125 ppm)	61.3 ± 1.8	49.2 ± 2.2	12.5 ± 1.9
Osthole	80 µM	52.0 ± 1.7	14.2 ± 1.8	-13.7 ± 0.8

(From 獨活)

Values are based on one experiment performed in triplicate.

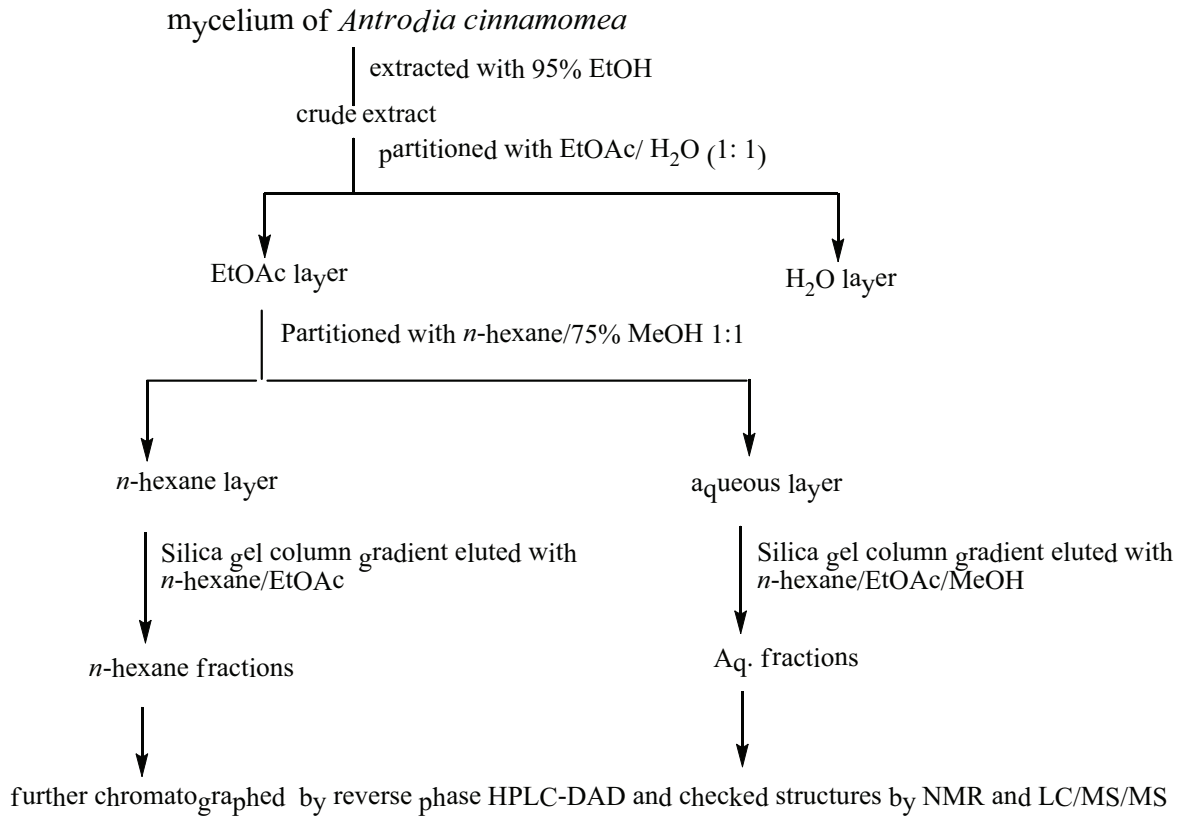
表 4

Anti-HBsAg and Anti-HBeAg Effects of ACEA M55, ACEA M65 and 4-acetylanthroquinonol B 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	-0.5 ± 2.4	-0.6 ± 1.0
ACEA M55	200 µg/mL (200 ppm)	cytotoxic		95.5 ± 2.9
	100 µg/mL (100 ppm)	cytotoxic		89.3 ± 3.3
	50 µg/mL (50 ppm)	cytotoxic		27.1 ± 3.0
	25 µg/mL (25 ppm)	cytotoxic		22.7 ± 2.1
	12.5 µg/mL (12.5 ppm)	47.3 ± 1.7	42.1 ± 5.3	15.1 ± 1.2
	6.25 µg/mL (6.25 ppm)	33.1 ± 5.1	33.4 ± 0.3	14.1 ± 0.2
	3.125 µg/mL (3.125 ppm)	23.7 ± 1.9	9.8 ± 5.3	11.2 ± 1.8
ACEA M65	200 µg/mL (200 ppm)	cytotoxic		76.4 ± 1.8
	100 µg/mL (100 ppm)	cytotoxic		33.7 ± 4.1
	50 µg/mL (50 ppm)	50.6 ± 0.8	48.0 ± 1.4	15.7 ± 1.3
	25 µg/mL (25 ppm)	48.9 ± 0.5	37.9 ± 0.2	17.9 ± 0.8
	12.5 µg/mL (12.5 ppm)	47.6 ± 0.8	28.2 ± 6.2	13.5 ± 1.9
4-acetylanthroquinonol B	100 µg/mL (100 ppm)	cytotoxic		94.1 ± 2.0
	50 µg/mL (50 ppm)	cytotoxic		63.6 ± 1.1
	25 µg/mL (25 ppm)	cytotoxic		41.8 ± 3.5
	12.5 µg/mL (12.5 ppm)	cytotoxic		36.7 ± 2.8
	6.25 µg/mL (6.25 ppm)	cytotoxic		22.5 ± 3.9
	3.125 µg/mL (3.125 ppm)	56.6 ± 1.5	45.1 ± 2.0	19.9 ± 0.6
	1.5625 µg/mL (1.5625 ppm)	35.7 ± 1.0	28.1 ± 0.9	15.8 ± 1.0
	0.78125 µg/mL (0.78125 ppm)	24.8 ± 0.8	-3.7 ± 7.9	10.1 ± 1.6
Osthole	80 µM	50.8 ± 1.5	12.8 ± 0.6	-0.3 ± 2.8

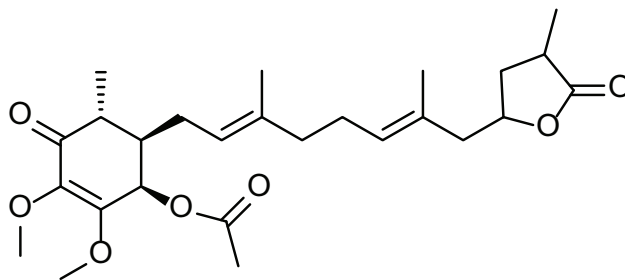
(From 獨活)

Values are based on one experiment performed in triplicate.



scheme 1. isolation of *Antrodia cinnamomea* (mycelium)

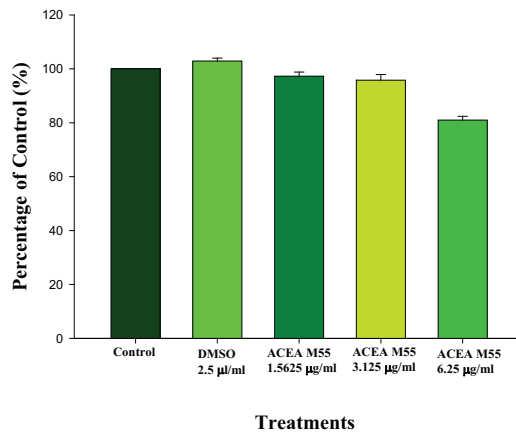
圖 2 樟芝菌絲體分離流程，樟芝菌絲體經 95% 乙醇抽取物之提取流程(麗豐實業股份有限公司提供)



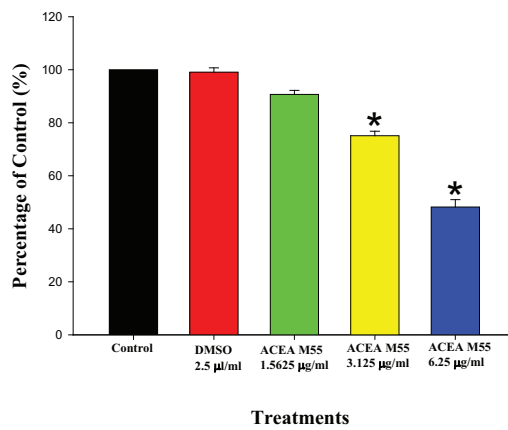
MW: 462

圖 3 4-acetyl-antroquinonol B 的化學結構式 (Lin et al., 2010)

(a)



(b)



(c)

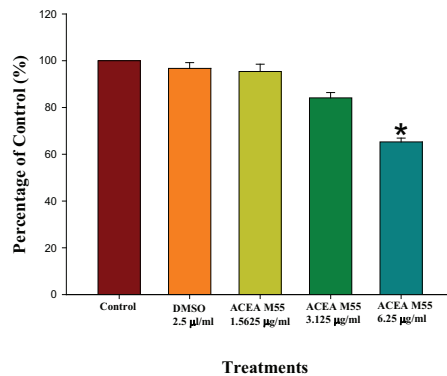
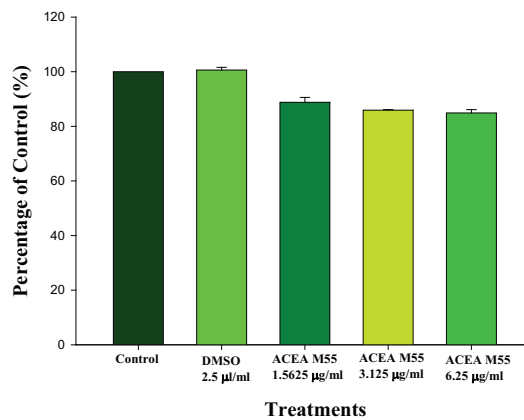
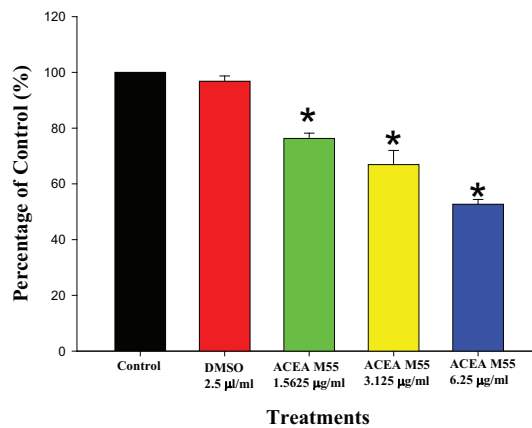


圖 4 MTT assay 及 ELISA 測定 ACEA M55，處理 48 小時，對 MS-G2 之作用。(a) 為 MTT 測定結果；(b) 為表面抗原活性抑制作用；(c) 為 e 抗原活性抑制。Each value is mean \pm S.E. of three replicate analyses. * represents significant difference as compared with control ($P < 0.05$).

(a)



(b)



(c)

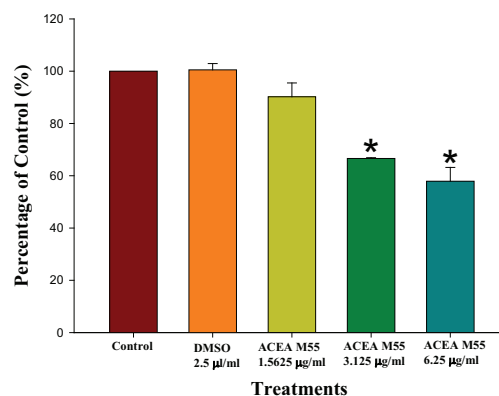
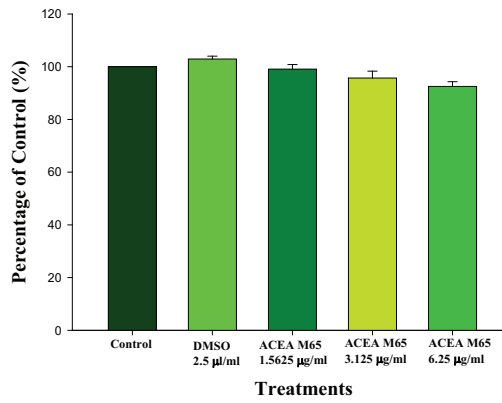
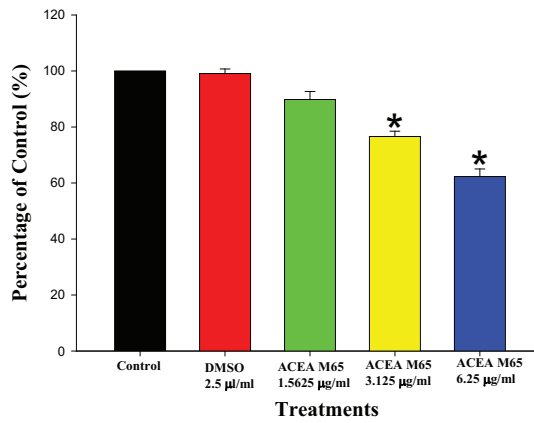


圖 5 MTT assay 及 ELISA 測定 ACEA M55，處理 48 小時，對 M33 之作用。(a) 為 MTT 測定結果；(b) 為表面抗原活性抑制作用；(c) 為 e 抗原活性抑制。Each value is mean \pm S.E. of three replicate analyses. * represents significant difference as compared with control ($P < 0.05$).

(a)



(b)



(c)

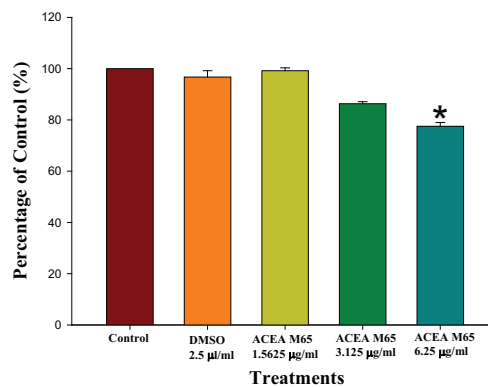
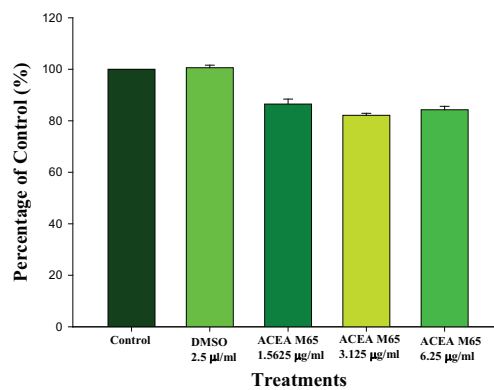
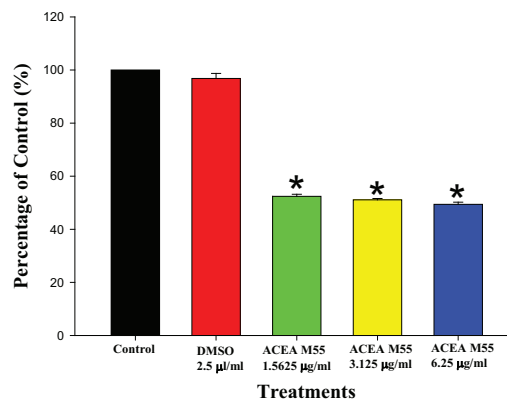


圖 6 MTT assay 及 ELISA 測定 ACEA M65，處理 48 小時，對 MS-G2 之作用。(a) 為 MTT 測定結果；(b) 為表面抗原活性抑制作用；(c) 為 e 抗原活性抑制。Each value is mean \pm S.E. of three replicate analyses. * represents significant difference as compared with control ($P < 0.05$).

(a)



(b)



(c)

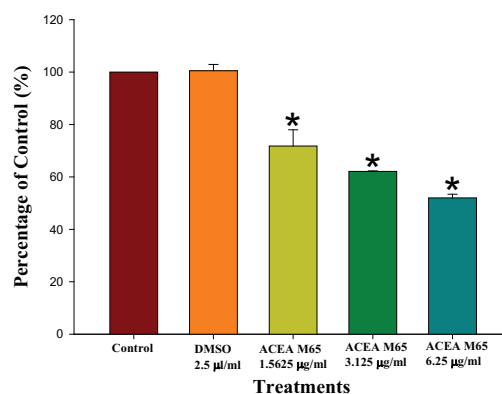
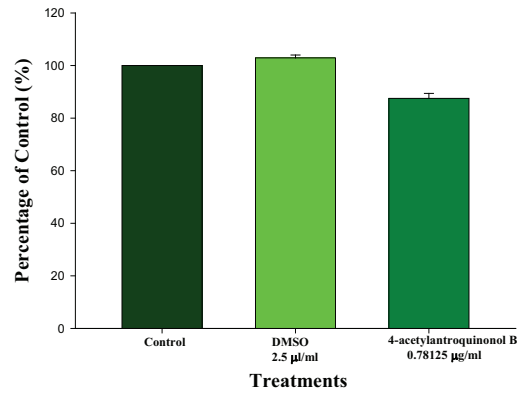
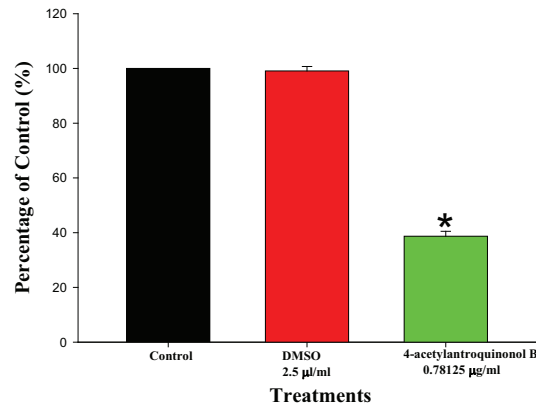


圖 7 MTT assay 及 ELISA 測定 ACEA M65，處理 48 小時，對 M33 之作用。(a) 為 MTT 測定結果；(b) 為表面抗原活性抑制作用；(c) 為 e 抗原活性抑制。Each value is mean \pm S.E. of three replicate analyses. * represents significant difference as compared with control ($P < 0.05$).

(a)



(b)



(c)

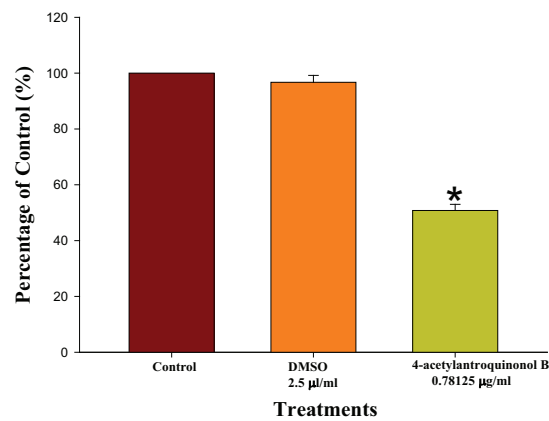
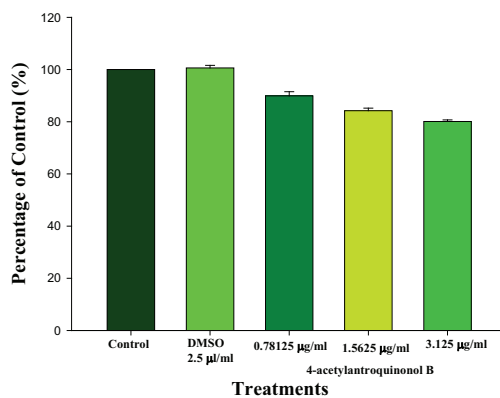
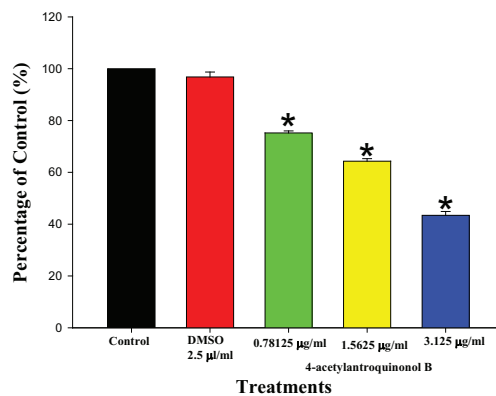


圖 8 MTT assay 及 ELISA 測定 4-acetyl-anthroquinol B，處理 48 小時，對 MS-G2 之作用。(a) 為 MTT 測定結果；(b) 為表面抗原活性抑制作用；(c) 為 e 抗原活性抑制。Each value is mean \pm S.E. of three replicate analyses. * represents significant difference as compared with control ($P < 0.05$).

(a)



(b)



(c)

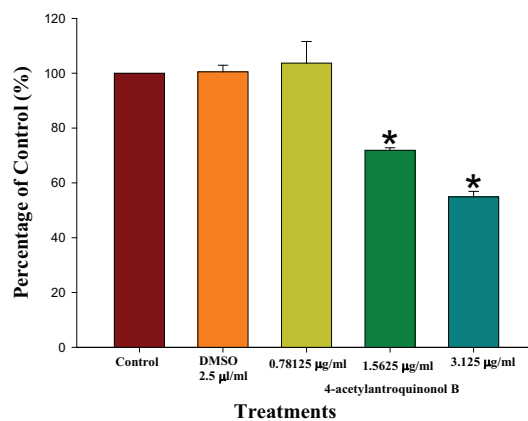


圖9 MTT assay 及 ELISA 測定 4-acetyl-anthroquinol B，處理 48 小時，對 M33 之作用。(a) 為 MTT 測定結果；(b) 為表面抗原活性抑制作用；(c) 為 e 抗原活性抑制。Each value is mean \pm S.E. of three replicate analyses. * represents significant difference as compared with control ($P < 0.05$).

**Inhibition of HBsAg and HBeAg Activities from
Fermentation Products & Its Effective Compounds of
Antrodia cinnamomea by NEW BELLUS ENTERPRISES**

Chun-Chih Huang*, Chih-Chieh Chen*, Lih-Geeng Chen**, Ray-Ling

Huang***

Abstract

Viral Hepatitis B is known to be a major cause of acute and chronic hepatitis. Chronic infection has been identified as a precursor for cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). Despite the availability of effective preventive vaccine for HBV in recent years, there are still 300 million existing chronic HBV carriers that urgently need therapy. Although lamivudine (also called 3TC), a cytosine nucleoside analogue, is very effective in therapeutic treatment of hepatitis B, HBV can mutate and develop resistance to the drug after long-term administration. In this paper, the *in vitro* cell culture model was used to investigate the inhibition of HBsAg and HBeAg activities from the fermentation products of *Antrodia cinnamomea* manufactured by NEW BELLUS ENTERPRISES as well as the isolation and detection of its effective compounds. The expression of HBsAg and HBeAg was detected by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay system. Through 95% methanol extracts from a large fermentation culture of *Antrodia cinnamomea* (manufactured by NEW BELLUS ENTERPRISES), we obtained 4 crude extracts, AN-L-EA, AN-L-W, AN-M-EA, and AN-M-W. Among them, AN-M-EA shows very significant inhibition of HBsAg activities. By further extraction from AN-M-EA, we obtained ACEA M37, ACEA M41, ACEA M43, ACEA M53, ACEA M55, ACEA M65, ACEA M69, ACEA M74, ACEA M78, ACEA M84 and a pure compound (4-acetylanthroquinol B). Our experimental results from anti-viral test show that ACEA M55, ACEA M65 and 4-acetylanthroquinol B all depict significant inhibition of HBsAg and HBeAg activities for both wild-type and lamivudine-resistant mutations.

Key words: human hepatitis B virus, HBsAg, HBeAg, *Antrodia cinnamomea*, fermentation products.

* NEW BELLUS ENTERPRISES Co., LTD, Taiwan, ROC.

* NEW BELLUS ENTERPRISES Co., LTD, Taiwan, ROC.

** Assistant Professor, Dept. Microbiology, immunology and Biopharmaceuticals, National Chiayi University.

*** Associate Professor, Department of Biological Science and Technology, Meiho University. (Corresponding author)