

大溪地等鞭金藻抗 B 型肝炎病毒野生型及 lamivudine 抗藥性 突變株作用之探討

盧泯任*、李孟修**、陳錫金***、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 lamivudine (即 3TC)，有非常肯定的療效，可惜仍然有抗藥性的問題。因長期服用 lamivudine 藥物的 B 型肝炎患者會因產生抗藥性而使病毒量嚴重升高，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 YVDD，因此全世界許多國家仍在努力研究中，對此是否能另外從海洋中找尋出抗 B 型肝炎病毒藥物為重點。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，測定大溪地等鞭金藻甲醇萃取物對人類 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。結果顯示大溪地等鞭金藻甲醇萃取物在 lamivudine 抗藥性突變株(M33 細胞株)之表面抗原具有極顯著的抑制作用，但是在野生型(MS-G2 細胞株)之表面抗原不具抑制作用。而兩細胞株在 e 抗原的表現上均無抑制作用。期望有助於臨床抗病毒藥物之開發。

關鍵字：人類 B 型肝炎病毒、野生型、lamivudine 抗藥性突變株、大溪地等鞭金藻、表面抗原、e 抗原。

*美和技術學院生物科技系學生

**中國醫藥大學中藥資源系助理教授

***明志科技大學環境與安全衛生工程系副教授

****美和技術學院生物科技系副教授

壹、前言

B 型肝炎病毒〔Hepatitis B virus, 簡稱 HBV〕引起病毒性肝病變是國人常見的肝障礙疾病。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 (Robinson, 1974; Robinson, 1977; Delius, 1983)。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 (Szmunes, 1978; Beasley, 1981; Beasley, 1984)。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) (Beasley, 1971)。據 Szmunes 於 1978 年發表的流行病報告中 (Szmunes, 1978), 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 (Sung, 1979)。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 (Beasley, 1981), 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。

目前臨床上使用之治療藥物, 以 lamivudine(即 3TC), 有非常肯定的療效 (Dienstag, 1995; Honkoop, 1997), 可惜仍然有抗藥性的問題 (Allen, 1998; Lai, 1998)。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。本實驗室已建立抗 lamivudine 突變株(mutant type) 之穩定轉殖細胞株, 進行篩選抗 B 型肝炎病毒突變株之藥物 (廖, 2002)。

海洋中生物種類繁多, 海洋微藻就占了 40.86 %。以等鞭金藻為例, 因其適應環境強、生長速度快、營養價值高, 且能自行合成 eicosapentaenoic acid(EPA)、docosahexaenoic acid (DHA)而受到重視, 水產養殖中輪蟲及蝦類因食用富含 EPA、DHA 微藻而營養強化, 再做為仔魚餌料, 有效提升仔魚存活率。其更富含高量蛋白質及特殊成分, 如色素、多醣體、維生素、水溶性纖維、礦物質等, 具有開發保健食品的潛力, 市面上已有許多其他類似產品出現(藍藻、綠藻、紅

藻、螺旋藻等)。其他方面也可做為化妝保養品及生物試劑(周, 2000)。

本實驗中所培養之微藻是於 1983 年 Parke 在英國海洋生物試驗站養魚池的海水中分離出來, 是一種黃色鞭毛藻, 定鞭金藻門、定鞭金藻綱、等鞭金藻目、等鞭金藻科、等鞭金藻屬, 本身並無細胞壁, 僅由細胞漿質膜(plasma membrane)包圍細胞, 外觀上有兩條等長鞭毛, 鞭毛之間有一根退化的定鞭(haptonema), 細胞外緣有多層橢圓形具放射性鱗片包圍, 因含金藻素, 故為等鞭金藻 (*Isochrysis aff.*) (劉, 2000)。等鞭金藻(*Isochrysis aff. galbana*)是一種含金藻素的黃色鞭毛藻, 體積小、繁殖快且富含 DHA、EPA, 利於蝦魚苗的吸收與繁殖, 主要用於水產養殖上。其胞內含高量蛋白質以及特殊成分, 具有開發保健食品的潛力與醫學研究價值。

長期服用 lamivudine 藥物的 B 型肝炎患者會因產生抗藥性而使病毒量升高嚴重可能會致死, 另外 lamivudine 也無法完全治癒 B 型肝炎, 對此是否能從海洋中找尋出抗 B 型肝炎病毒藥物為重點。本論文以大溪地等鞭金藻甲醇萃取物對於 B 型肝炎病毒野生型及 lamivudine 抗藥性突變株進行表面抗原、e 抗原及細胞毒性評估。

貳、材料與方法

1. 供試藥材之採購、培養、製備

(一) 藻種來源與培養設備

實驗所需的大溪地等鞭金藻(*Isochrysis aff. galbana* Tahitain clone T-iso)及韋因(walne)培養液購自東港水產試驗所。實驗種源以 70ml 透明螺帽玻璃試管為培養容器, 培養條件為溫度 25°C、瓶身距燈管 15 cm、連續光照下靜置培養。實驗過程中, 小量培養以 70ml 透明螺帽玻璃試管來培養, 中量培養以 250ml 透明三角瓶來培養, 大量培養以 2L 圓錐瓶來培養。70ml 與 250ml 為靜置培養, 2L 為打氣培養。

(二) 培養用海水處理

天然海水以 1 號濾紙抽氣過濾, 再經高溫高壓滅菌(121°C 40min)後, 放置於室溫下保存。培養液於使用時加入, 添加方式為 1L 海水+1ml 韋因(walne)培養液。

(三) 小量、中量靜置培養

初期以 70ml 透明螺帽試管小量靜置培養, 量為 5ml 藻種、45ml 含韋因(walne)培養液海水, 經對數成長期時, 接種至 250ml 三角瓶中, 量為 50ml 藻種、150ml 含韋因(walne)培養液海水, 靜置培養, 小量及中量培養條件皆為溫度 25°C、瓶身距燈管 15 cm、連續光照、pH7.5。

(四) 大量打氣培養

經對數成長期之中量靜置培養 200ml 藻種，接種至 2L 圓錐瓶中，量為 400ml 藻種、1200ml 含韋因 (walne) 培養液海水，培養條件溫度 25°C、瓶身距燈管 15 cm、連續照光、pH7.2、打氣量 15 LPM (L/Mim)。

(五) 藻類生長曲線測定

測試 2L 打氣培養等鞭金藻之藻齡，以分光光度計(Hitachi, U-2800) OD680nm 吸光值為藻細胞生長指標。

(六) 天然活性材料製備與成分萃取

將對數生長期後的等鞭金藻藻液取至離心瓶，以高速離心機(Hitachi himac, CR21G)轉速 10000xg 離心 2min，放至-80°C 冰凍三天，再以冷凍乾燥機除去水分，經研磨成粉末後，秤重 3g 並加入 40ml 甲醇震盪萃取三次，每次萃取兩天，共得 120ml，再以減壓縮機濃縮除去甲醇後，刮取活性成份取 69mg 溶於 5ml dimethyl sulfoxide (DMSO)，於室溫下保存。

2. 細胞株及細胞培養

本論文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 (Sureau, 1986)，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)。本論文以此作為 B 型肝炎病毒野生型模式，進行大溪地等鞭金藻甲醇萃取物抗病毒作用機轉之探討及活性成分的追蹤分離。另一為本實驗室執行國科會計劃，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，進行大溪地等鞭金藻甲醇萃取物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 g 鏈黴素 (streptomycin)、2.5 g 防治黴(fungizone)、2 mM 麩氨酸(L-glutamine)及 100 M 之非必需性氨基酸(non-essential amino acid，包括 14.7 g glutamic acid, 7.5 g glycine, 8.9 g alanine, 13.3 g aspartic acid, 11.5 g proline, 15 g asparagine

及 10.5 g serine)，以上稱完全培養基，置於含 5%二氧化碳的 37°C 培養箱中。

3. 抗病毒藥物之處理 (Huang, 1996)

在 24 well 的細胞培養皿(petri-dish)，種入 MS-G2 細胞 2×10^5 ，或 M33 細胞 2×10^5 ，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。

4. B 型肝炎病毒表面抗原及 e 抗原之酵素免疫測定 (Tietz, 1976)

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〔永進生物科技公司，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 %)：

對照組吸光值－給藥組吸光值

----- $\times 100\% =$ 抑制百分比(Inhibition %)

對照組吸光值

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。

5. 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 測定，當 $p < 0.05$ 時視為有統計意義。

參、結果

一、成功建立大溪地等鞭金藻培養系統

爲了收集更多的的等鞭金藻藻液，初期購得的 50ml 藻種，經由小量 50ml 培養、中量 200ml 培養、大量 2L 培養過程後，成功建立起一套完善的藻類培養系統。(Fig.1)。

等鞭金藻生長曲線圖

經由分光光度計(Hitachi,U-2800)OD680nm 測定後，得到在第八天至第十一天爲對數生長期，通常都在第十四天就取出藻體。(Fig.2)。

二、大溪地等鞭金藻甲醇萃取物之細胞毒性及抗病毒研究

細胞存活率測定(MTT assay)

在細胞存活率測定試驗中，大溪地等鞭金藻甲醇萃取物，六種測定濃度(6.25 μ g/ml、12.5 μ g/ml、25 μ g/ml、50 μ g/ml、100 μ g/ml、200 μ g/ml)，三重覆處理，給藥 48 小時後，進行測定，結果顯示大溪地等鞭金藻甲醇萃取物對於 MS-G2 野生型(Fig.3)及 M33 抗藥性突變型(Fig.4)，均不具有細胞毒性。

B 型肝炎病毒表面抗原及 e 抗原之酵素連結免疫吸附分析法

在表面抗原及 e 抗原之酵素連結免疫吸附分析法中，大溪地等鞭金藻甲醇萃取物同時給六種測定濃度(6.25 μ g/ml、12.5 μ g/ml、25 μ g/ml、50 μ g/ml、100 μ g/ml、200 μ g/ml)，三重覆處理，給藥 48 小時後，蒐集上清液，進行測定，結果顯示大溪地等鞭金藻甲醇萃取物對於 B 型肝炎病毒野生型 MS-G2 細胞株 (Fig.5)之表面抗原不具抑制作用。

大溪地等鞭金藻甲醇萃取物，給藥濃度 50 μ g/ml、100 μ g/ml 及 200 μ g/ml，對 B 型肝炎病毒 lamivudine 抗藥性突變株 M33 (Fig.6)之表面抗原具輕度至強度抑制作用，其抑制百分比可達 21.65%-58.38%。

大溪地等鞭金藻甲醇萃取物同時給六種測定濃度(6.25 μ g/ml、12.5 μ g/ml、25 μ g/ml、50 μ g/ml、100 μ g/ml、200 μ g/ml)，對 B 型肝炎病毒野生型 MS-G2 細胞株(Fig.7)及 B 型肝炎病毒 lamivudine 抗藥性突變株 M33 (Fig.8)之 e 抗原均無抑制作用。

肆、討論

等鞭金藻適應環境強、生長速度快是這次能成功建立起藻類培養系統的主因。本論文中藻類的培養條件為參考前人實驗方法(周, 2003)(劉, 2000), 針對溫度、PH、打氣量來自行設定, 再三測試以求達到等鞭金藻最佳生長環境, 以便能夠在相同時間內能夠培養出更多的藻體。

本研究以大溪地等鞭金藻甲醇萃取物對於 B 型肝炎病毒野生型 MS-G2 細胞株及 B 型肝炎病毒 lamivudine 抗藥性突變株 M33, 進行表面抗原、e 抗原及細胞毒性試驗。結果發現大溪地等鞭金藻甲醇萃取物在 M33 細胞株之表面抗原具有顯著的抑制作用, 可達 21.65%-58.38%, 在 MS-G2 細胞株之表面抗原不具抑制作用。而兩細胞株在 e 抗原的表現上均無抑制作用。

表面抗原早期稱澳洲抗原(Australia Antigen)為 Blumberg 於 1965 年在澳洲土著的血液中所發現 (Blumberg et al., 1965 & 1967; Sutnick et al., 1968), 表面抗原是嵌在內質網(endoplasmic reticulum)上的 trans-membrane 蛋白, 構成 B 型肝炎病毒的外套, 大溪地等鞭金藻甲醇萃取物之成份, 顯著抑制 B 型肝炎病毒 lamivudine 抗藥性突變株表面抗原表現; e 抗原則是分泌型(secrete)的蛋白, 大溪地等鞭金藻甲醇萃取物之成份對 e 抗原無抑制作用。因為大溪地等鞭金藻甲醇萃取物之成份只對於 M33 細胞株有明顯的抑制作用, 這在抗病毒研究上是具有重大意義。另外, 大溪地等鞭金藻甲醇萃取物對兩細胞株無細胞毒性, 有利於對往後能夠繼續更深入研究的價值。至於大溪地等鞭金藻甲醇萃取物對於 B 型肝炎病毒 MS-G2 野生型及 M33 lamivudine 抗藥性突變型的表面抗原、e 抗原及細胞毒性確實的作用機轉及萃取液有效成分, 則有待未來進一步探討。

參考文獻

- 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，未出版，台北。
- 劉清標 (2000)。海洋微藻 *Isochrysis sp. CCMP 1324* 超微細結構與不飽和脂肪酸之生成。國立臺灣大學農業化學研究所博士論文，未出版，台北。
- 周廷耀 (2003)。碳源的添加對等鞭金藻增殖的影響。國立中山大學海洋生物研究所碩士論文，未出版，台北。
- 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.
- Beasley, R. P., Hwang, L.Y., Lin, C. C., & Chien, C.S. (1981). Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22,707 men in Taiwan. *Lancet*, 2, 1129-1133.
- Beasley, R. P., & Hwang, L. Y. (1984). Epidemiology of hepatocellular carcinoma. In Vyas, G. N. (Ed), *Viral Hepatitis and Liver Disease* (pp. 209-224). New York: Grune & Stratton.
- Blumberg, B. S., Alter, H. J., & Visnich, S. (1965). A "new" antigen in leukemia sera. *J.A.M.A.* 191, 541-546.
- Blumberg, B. S., Gerstley, B. J. S., Hungerford, D. A., London, W. T., & Sutnick, A. I. (1967). A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome leukemia and hepatitis. *Ann. Intern. Med.* 66, 924-931.
- Delius, H., Gough, N. M., Cameron, C. H., & Murray, K. (1983). Structure of the hepatitis B virus genome. *J. Virol*, 47, 337-343.
- 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.
- 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, Chungming. (1996). Osthole Increases Glycosylation of Hepatitis B surface antigen and suppresses the secretion of Hepatitis B virus *In Vitro*. *Hepatology*, 24(3), 508-515.
- Lai CL, C. 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.
- Robinson, W. S., Clayton, D. A., & Greenman, R. L. (1974). DNA of a human hepatitis B virus candidate. *J. Virol*, 14, 384-391.
- Robinson, W.S. (1977). The genome of hepatitis B virus. *Ann. Rev. Microbiol*, 31, 357-377.
- Sung, J. L., Shih, P. L., Liaw, Y. F., Lin, W. S. J., Tai, T. Y., Hsieh, S. C., Wang, C. Y., Chang, C. K., Wang, T. H., Yu, J. Y., & Chen, J. S. (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.
- 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.
- Sutnick, A. I., London, W. T., Gerstley, B. J. S., Cronlund, M. M., & Blumberg, B. S. (1968). Anicteric hepatitis associated with Australia antigen. Occurrence in patient with Downs's syndrome. *J.A.M.A.*, 205, 670-674.
- Szmuness, W. (1978). Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: evidence for a causal association. *Prog. Med. Virol*, 24, 40-69.
- Tietz, N.W. (1976). *Fundamentals of clinical chemistry*. Philadelphia: Saunders.

附圖



Fig.1. Culture system of *Isochrysis aff. galbaan*.

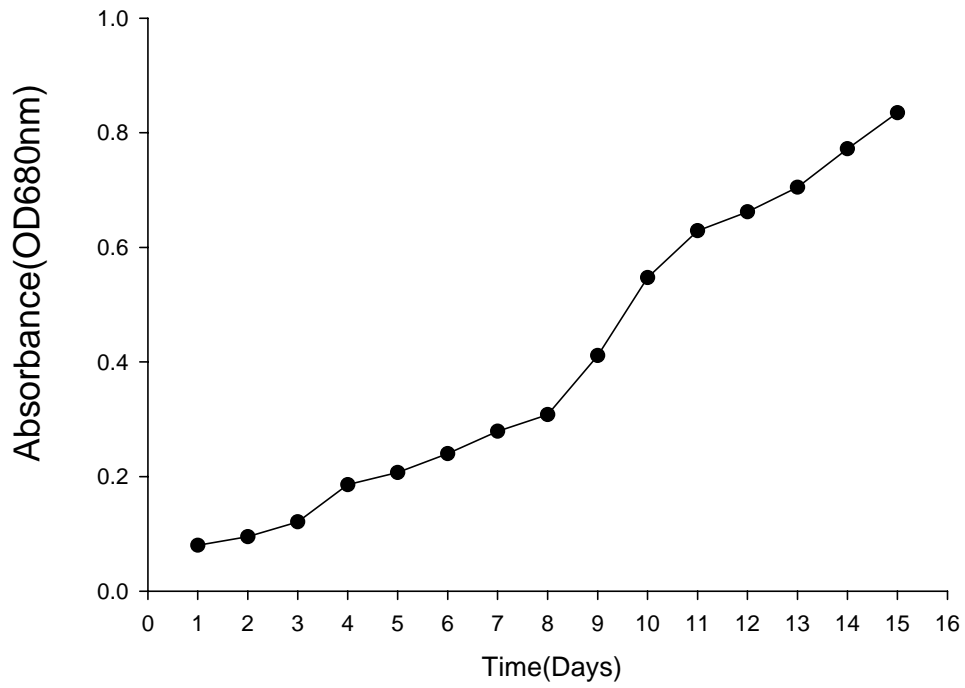


Fig.2. Growth curve of *Isochrysis aff. galbana* in 2L waane culture medium with pH 7.2.

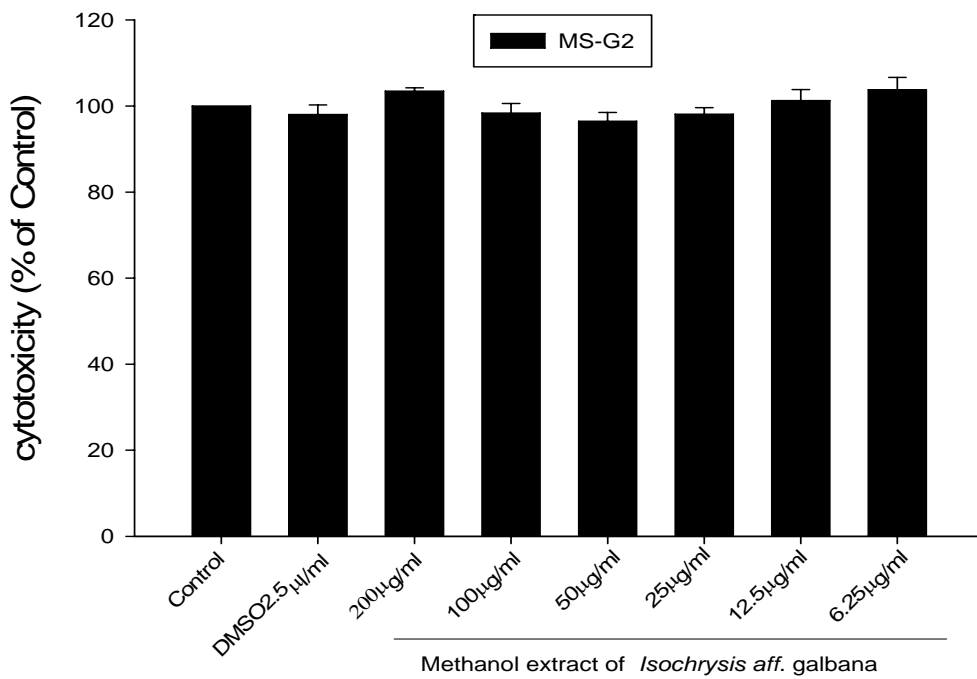


Fig.3. The cytotoxicity of *Isochrysis aff. galbana* in HBV wild type by using MTT assay.

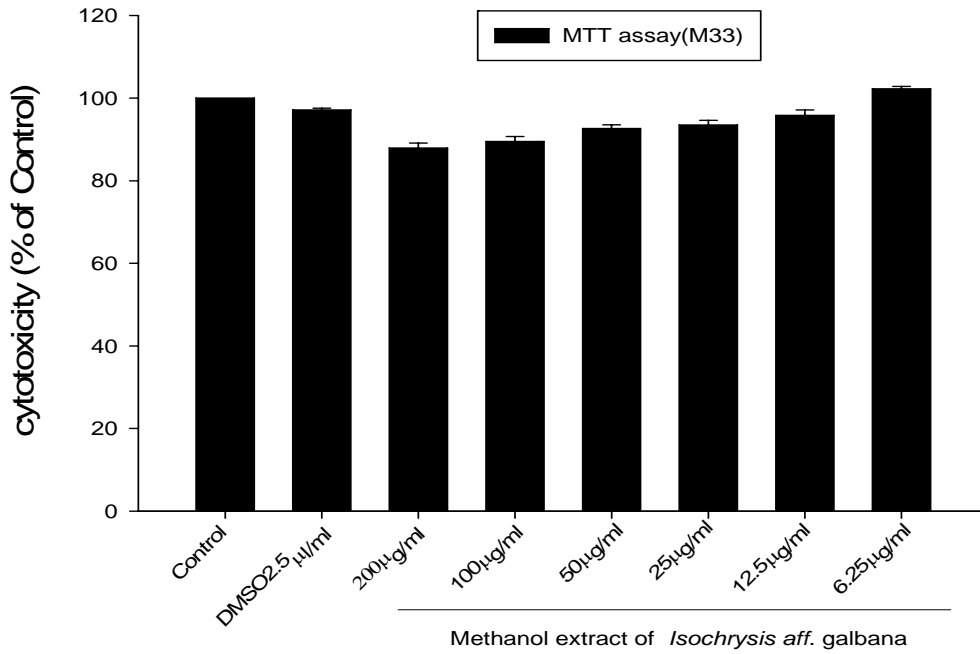


Fig.4. The cytotoxicity of *Isochrysis aff. galbana* in lamivudine-resistant mutant by using MTT assay.

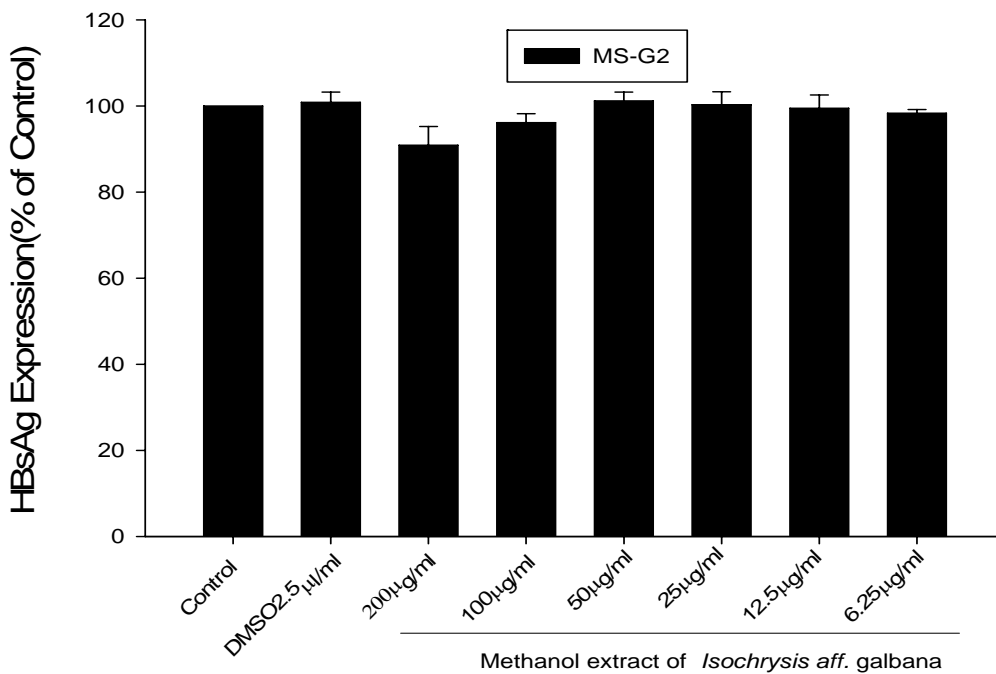


Fig.5. Effect of *Isochrysis aff. galbana* on the expression of HBsAg in HBV wild type.

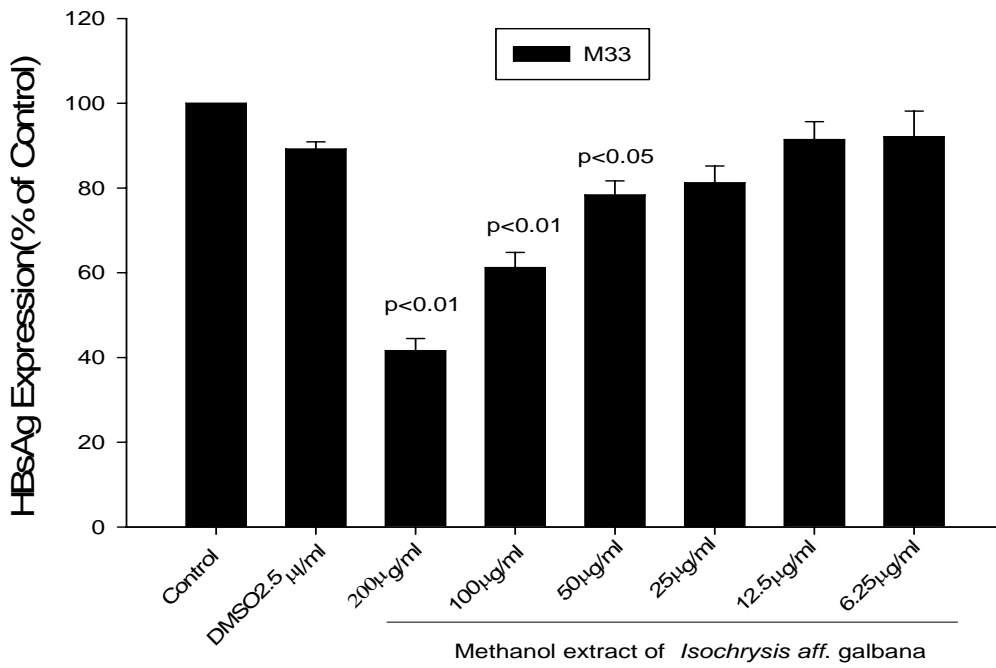


Fig. 6. Effect of *Isochrysis aff. galbaan* on the expression of HBsAg in lamivudine-resistant mutant.

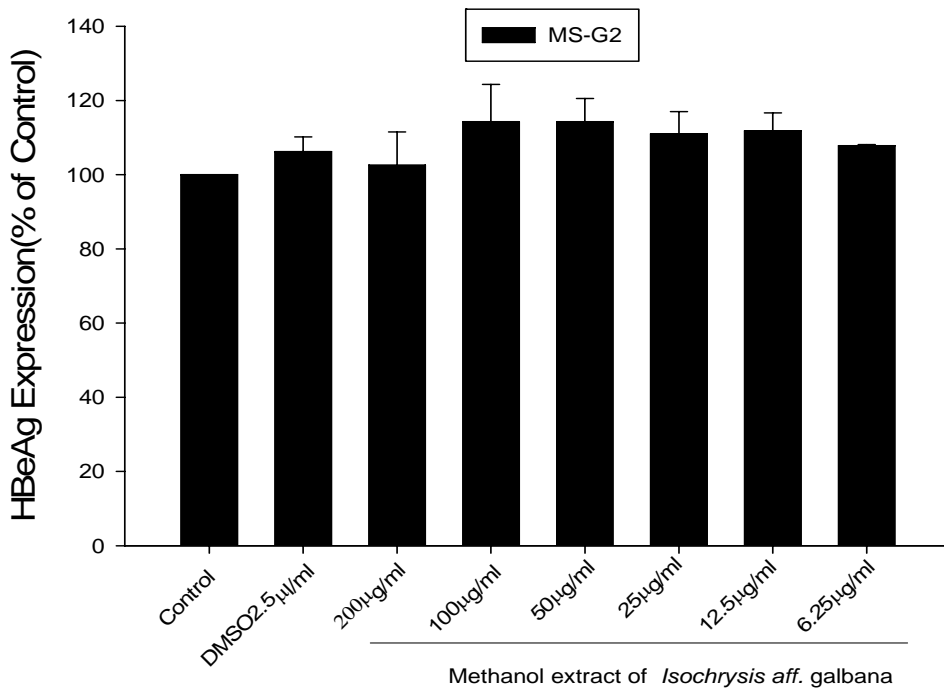


Fig. 7. Effect of *Isochrysis aff. galbana* on the expression of HBeAg in HBV wild type.

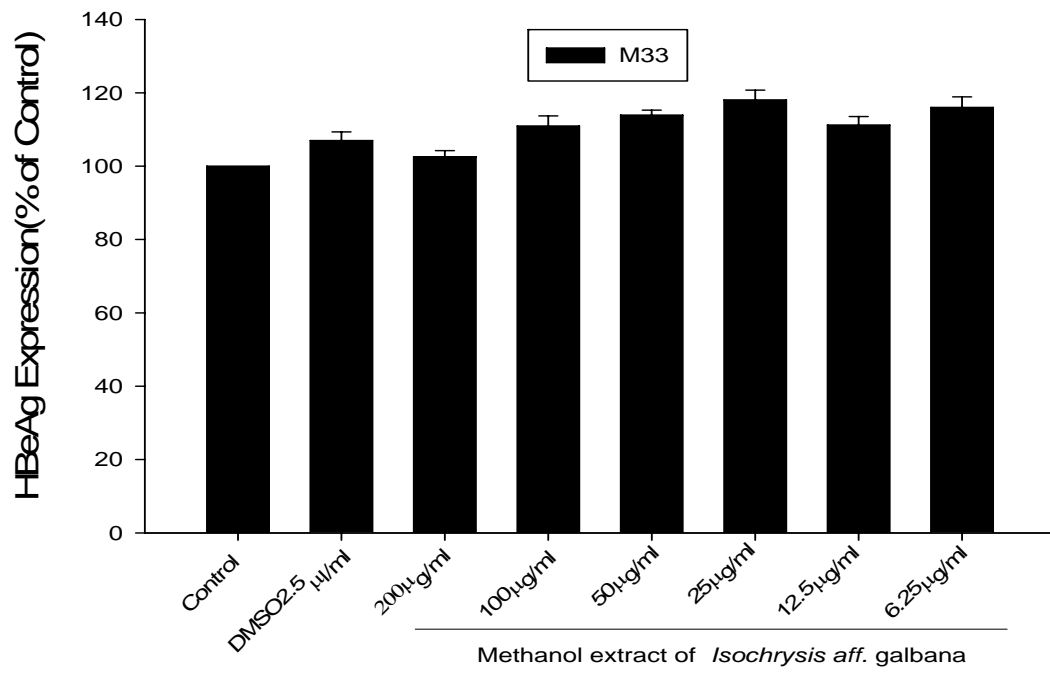


Fig. 8. Effect of *Isochrysis aff. galbana* on the expression of HBeAg in lamivudine-resistant mutant.

Studies of Anti-HBV Effects of *Isochrysis aff. galbana* on Wild-type HBV and Lamivudine-Resistant Mutant HBV

Min-Ren Lu*, Meng-Shiou Lee**, Hsi-Jien Chen***, Ray-Ling Huang****

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). Despite the availability of an effective preventive vaccine for HBV in recent years, there are still 300 million existing chronic HBV carriers that urgently need therapy. Recently, lamivudine (also called 3TC), a cytosine nucleoside analogue, has been shown to be very effective in therapeutic treatment of hepatitis B. However, after long-term administration of lamivudine, drug-resistant HBV mutations can occur. The drug-resistant mutations are believed to be due to site-directed mutagenesis on YMDD motif of the wild-type HBV DNA polymerase gene. To address the issue, many research efforts worldwide are now focused on identifying marine-based drugs with effective anti-HBV effects while free from the above-mentioned drug-resistant mutations. In this paper, we use an *in vitro* cell culture system and the ELISA method to assay the inhibition of surface and e antigen in *Isochrysis aff. galbana* on wild-type HBV(MS-G2 cell line) and lamivudine-Resistant Mutant HBV(M33 cell line). Our results showed that the methanol extract of *Isochrysis aff. galbana* exhibits very significant inhibition on the expression of the surface antigen from the lamivudine-Resistant Mutant HBV. However, no significant inhibition on the expression of surface antigen from wild-type HBV was found. In addition, the methanol extract of *Isochrysis aff. galbana* exhibits no effect on the expression of e antigen from either lamivudine-Resistant Mutant HBV or wild-type HBV.

Key words: Human Hepatitis B Virus, Wild-Type, lamivudine-resistant mutant, *Isochrysis aff. galbana*, surface antigen, e antigen.

* Undergraduate student, Dept. Biological Science and Technology, Meiho Institute of Technology

** Assistant Professor, School of Chinese Medicine Resource, China Medical University

*** Associate Professor, Dept. Safety, Health and Environmental Engineering, Mingchi University of Technology

**** Associate Professor, Dept. Biological Science and Technology, Meiho Institute of Technology

