

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

常見真菌類食材對人類 B 型肝炎病毒 基因表現之體外細胞
抑制作用(2/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2313-B-002-298-

執行期間：91 年 08 月 01 日至 92 年 07 月 31 日

執行單位：國立臺灣大學食品科技研究所

計畫主持人：張鴻民

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 2 月 10 日

常見真菌類食材對人類 B 型肝炎病毒基因表現之體外細胞抑制作用

The inhibitory effect of **edible fungi (mushroom)** against gene expression of human hepatitis B virus – an *in vitro* study

計畫主持人：張鴻民教授 臺灣大學食品科技研究所

計畫編號：NSC 91-2313-B-002-298

執行期限：民國 89 年 8 月 1 日起至民國 90 年 7 月 31 日止

一、中文摘要

茯苓乃中國傳統醫學中常用的藥材，因其溫和藥性而廣泛地使用於各藥方中。已知茯苓的粗萃取物可有效地刺激人體週邊血單核球細胞(human peripheral blood mononuclear cells, PBMNC)產生許多細胞激素。經茯苓的粗萃取物刺激過的人體週邊血單核球細胞培養液(conditioned medium, CM)具有對 Hep G2 細胞株中之 HbsAg 表現的抑制活性。經冷水萃取之茯苓的粗萃取物再經酒精沈澱後之沈澱物，再依序進行一連續的分離純化步驟：陽離子交換樹脂管柱、陰離子交換樹脂管柱及膠過濾管柱等之分離。而得到一具有對 Hep G2 細胞株中之 HbsAg 表現的抑制活性的區分物。濃度約 30 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)之此區分物對 PBMNC 刺激之 CM 可抑制 Hep G2 細胞株中相對 HbsAg 表現率達到約 43.3 %。然而，其同時也對 Hep G2 細胞株本身具有毒殺作用。此區分物推測為一中性多醣且其分子量估計約 160 kDa。

經冷水萃取之茯苓的粗萃取物再經酒精沈澱後之上澄清液，再經同上之分離純化步驟。而得到一具有對 Hep G2 細胞株中之 HbsAg 表現的抑制活性的區分物。濃度約 5 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)之此區分物對 PBMNC 刺激之 CM 可抑制 Hep G2 細胞株中相對 HbsAg 表現率達到約 38.8 %。而且其在濃度約 5 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)以下幾乎無對 Hep G2 細胞株本身具有毒殺作用。以上兩個對 HbsAg 表現有抑制活性的區分物經刺激 PBMNC 後之 CM 中皆測出相當量的細胞激素；兩者細胞激素分泌皆不同。是否有其它的細胞激素參與對抑制 Hep G2 細胞株 HbsAg 表現作用；尚待進一步研究。

關鍵詞：茯苓，人體週邊血單核球細胞，B 型肝炎病毒，HbsAg

Abstract

Fuling (Poria cocos, PC) is a traditional Chinese herb with mild adverse pharmacological effect. The gentle physiological effect and multiple medical uses make PC become one of the most useful components in the prescriptions of Chinese traditional medicines.

The crude extracts of PC have been found to stimulate the human peripheral blood mononuclear cells (PBMNC) to secrete many cytokines. The conditioned medium (CM) exerted the inhibitory activities to the expression of HbsAg in Hep G2 cell line that is stably transfected with HBV DNA. The fractions which cool water extracting then precipitated by ethanol were performed with series of separating procedures: cationic ionic exchange chromatography, anion ionic exchange chromatography and gel filtration chromatography. The most active fraction that its CM can significantly inhibit the expression of HbsAg in Hep G2 cell line was obtained. The relative expression of HbsAg in Hep G2 cell line was about 43.3 % when the CM was stimulated with this fraction at 30 ($\mu\text{g}/\text{mL}$). However, it also exerted obvious cytotoxicity to Hep G2 cells. This active fraction was assumed to be a neutral polysaccharide that the molecular weight estimated about 160 kDa. By the same separating procedures, the other active fraction was obtained from the supernatant of crude extract that cool water extracting then precipitated by ethanol. It assumed to be an anionic polymer at about 28 kDa. The remarkably inhibitory activity to the expression of HbsAg in Hep G2 cell when cultured with the

CM of this polymer was observed. It reached to about 38.8 % when the CM was stimulated with this fraction. Meanwhile, it exhibited no or little cytotoxicity to Hep G2 cell line when the CM stimulated with lower than 5 ($\mu\text{g/mL}$). Both of the CM stimulated by this active fractions from pc exhibited large amount of IFN- γ , TNF- α and IL-1 β , but the profiles of cytokines secretion were different. Whether the other cytokines involved in the inhibitory activities of the expression of HbsAg in Hep G2 cell need more study.

二、緣由與目的

從多種食用菇類 *Cordyceps sinensis*, *Lentinus edodes*, *Ganoderma tsugae*, *Agaricus blazei* Murill, *Wolfiporia cocos* Gilbertson(*Poria cocos*)、*Flammulina velutipes* 等篩選

出茯苓具有抗 B 型肝炎病毒活性。已知 *Poria cocos* 可有效地提昇人體免疫系統並抗腫瘤(Kanayama H. *et al.*, 1986)。其它現代藥理研究確定其具有如鎮靜、抗氧化、利尿、抗發炎、免疫調節、抗腫瘤、止吐等作用。研究顯示其主要生物活性份為多醣體及三帖類。(Ukiya *et al.*, 2002, Yasukawa K. *et al.*, 1998,)M.在細胞試驗中其可有效地刺激 PBMNC(週邊血液單核球細胞)產生許多細胞激素如 IFN- γ , TNF- α 和 IL-1 β 。(Tseng J. and Chang JG. 1992; Yu SJ. and Tseng J., 1996) 等。已知 TNF- α 和 IFN- γ 在人體對抗入侵病毒之免疫反應中扮演了重要角色。而由之前我們的實驗可確定 *Poria cocos* 之水粗萃物在刺激了人類 PBMNC 後之 conditioned medium 具有抑制 Hep G2 細胞中 HBV 之表現 expression。已知從真菌 *Antrodia camphorata* 所分離出之 polysaccharides 具有 anti-hepatitis B e antigen 活性且無毒殺細胞之作用(Lee I.-Hung *et al.* 2002)。而另一真菌 *Polyporus umbellatus* 所分離出之 polysaccharides 可對 chronic hepatitis B carriers 產生降低 serum HbeAg 和 HBV DNA 的效果 (Yan *et al.*, 1988; Miao *et al.*, 1994)。香菇萃取之多醣體 Lentinan 在慢性 B 型肝炎病毒帶原者之注射後對病毒具有抑制作用(Wu *et al.*, 1996)。繼續將此 *Poria cocos* 之水粗萃物加以分離純化。希望找出具有活性之物質。並分析其對人類 PBMNC 產生何種可能的刺激反應或是 cytokines 的分泌; 進而提昇人體抑制 Hep G2 細胞中 HBV 之表現。

結果與討論

雖然茯苓粗萃物之區分中分別具有對 Hep G2 細胞中 HBV 之表現 expression 有直接抑制作用及間接抑制作用, 但是間接抑制作用較具食品保健上的意義。亦即間接提昇人體免疫來抗 B 型肝炎病毒。而直接作用, 往往同時也具有相對的藥理、毒理作用。故選擇以具較明顯間接抑制作用之區分物來進行分離純化。

將 CWEP 及 CWES 區分物分別以離子交換樹脂(SEPHADEX-C-25 cation ion exchange chromatography)過濾後, 分離出之各區別 peak 進行間接抑制作用活性篩選。將具有抑制 Hep G2 細胞中 HBV 之表現之 peak 收集後再經離子交換樹脂(SEPHADEX-A-25 cation ion exchange chromatography)過濾作進一步分離。如圖 1 所列之分離純化流程圖。CWEP 在(0-2 M NaCl/0.01 M phosphate buffer, pH 7.0)條件於 SEPHADEX-C-25 cation ion exchange 分離後具 4 個 peaks, 如圖 2。其中經收集後測定其對 PBMNC 之刺激後所得 conditioned medium 只有 CWEP-C25-BG-F1 具抑制活性。如圖 3。其具有劑量-反應相關性地間接抑制活性。在 200 ($\mu\text{g/mL}$)時達到抑制了 HEP G2 細胞株中 HBV 為控制組之 57.3 %。將此 CWEP-C25-BG-F1 收集冷凍乾燥後再經 SEPHADEX-A-25 anion ion exchange 過濾作進一步分離; 在(0-2 M NaCl/0.01 M phosphate buffer, pH 7.0)條件於 SEPHADEX-A-25 cation ion exchange 分離後具 4 個 peaks, 如圖 4。其中經收集後測定其對 PBMNC 之刺激後所得 conditioned medium 發現有 CWEP-A25-BG-F1 及 CWEP-A25-AG-F4 具抑制活性。其中 CWEP-A25-AG-F4 具有劑量-反應相關性地間接抑制活性。在 100 ($\mu\text{g/mL}$)時達到抑制了 HEP G2 細胞株中 HBV 為控制組之 56.1 %; 且代表細胞存活率之 MTT 值經統計分析並無顯著差異。如圖 5。然而, 此 FRACTIONS 之量極微小, 不易收集足夠進一步地篩選分離。而另

— FRACTIONS CWEP-A25-BG-F1 在之前的研究中在間接刺激 PBMNC 後對 U937 及 HL-60 兩個 leukemia 有抑制生長及促進分化成熟之活性。此 peak 具有劑量-反應相關性地間接抑制活性。在 100 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 時達到抑制了 HEP G2 細胞株中 HBV 為控制組之 51.3 %; 但代表細胞存活率之 MTT 值則有顯著差異地下降。如圖 6。此 CWEP-A25-BG-F1 收集冷凍乾燥後再經 SEPHACRYL-S400 gel filtration chromatography 過濾作進一步分離後具 2 個 PEAKS, 如圖 7。其中經收集後測定其對 PBMNC 之刺激後所得 conditioned medium 發現有分子量約 160 kDa 之 fractions 具有劑量-反應相關性地間接抑制活性。在 30 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 時達到抑制了 HEP G2 細胞株中 HBV 為控制組之 43.3 %。如圖 8。如前一一樣代表細胞存活率之 MTT 值則有顯著差異地下降。此 fractions 經分析具有 96.4% 的 carbohydrate content 和 2.1% 的 protein content。而分離過程中, 無論是陽離子交換樹脂或是陰陽離子交換樹脂皆在鹽梯度前顯現。推論可能是中性多醣體, 暫時將之稱為 PC-PS。此分子量約 160kDa 之中性多醣體雖然非直接地作用在感染病毒的人體細胞上而是藉由刺激 PBMNC 產生 cytokines 的作用。然而由其持續下降之 MTT 值觀察, 其間接刺激 PBMNC 後卻有細胞毒殺作用。將此等具有明顯間接抑制活性的 fractions 刺激後所得 conditioned medium 以 ELISA 測定其中之 IFN- γ , TNF- α 和 IL-1。分子量約 160 kDa 之 fractions (濃度在 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 下) 在共同培養刺激 PBMNC 後所得 conditioned medium 中, 發現 IFN- γ 之分泌量隨著刺激的天數增加而增加 (具有劑量-反應相關性), 其在第五天達最高 (536 \pm 26 pg/mL)。TNF- α 之分泌量則是在第一天便達最高 (1346 \pm 68 pg/mL), 隨著刺激的天數增加而有些微下降的趨勢。已知 TNF- α 具有活化 hepatitis B virus (HBV)-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) 的活性 (Kasahara S. *et al.*, .2003)。IL-1 之分泌量也是在第一天便達最高 (976 \pm 65 pg/mL), 隨著刺激的天數增加而有明顯下降的趨勢, 在第五天為 (687 \pm 54 pg/mL)。以上三種 cytokines 不論是在正常組 (normal), 控制組 (control) 或是未刺激 PBMNC 之單純 160 kDa 之 fractions 組 (pc-ps-alone) 都顯示出極低或是測不出之分泌量。以 PHA 作為本實驗之正控制組 (positive control) 顯示此模式系統無異常。

CWES 在 (0-2 M NaCl/0.01 M phosphate buffer, pH 7.0) 條件於 SEPHADEX-C-25 cation ion exchange 分離後具 4 個 peaks 其中經收集後測定其對 PBMNC 之刺激後所得 conditioned medium 只有 CWES-C25-BG-F2 具抑制活性。如圖 9。其具有劑量-反應相關性地間接抑制活性。在 50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 時達到抑制了 HEP G2 細胞株中 HBV 為控制組之 43.7 %。如圖 10。將此 CWEP-C25-BG-F2 收集冷凍乾燥後再經 SEPHADEX-A-25 anion ion exchange 過濾作進一步分離; 在 (0-2 M NaCl/0.01 M phosphate buffer, pH 7.0) 條件於 SEPHADEX-A-25 cation ion exchange 分離後具 4 個 PEAKS, 如圖 11。其中經收集後測定其對 PBMNC 之刺激後所得 conditioned medium 發現有 CWES-A25-AG-F3 具抑制活性。其具有劑量-反應相關性地間接抑制活性。在 15 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 時達到抑制了 HEP G2 細胞株中 HBV 為控制組之 48.1%; 且代表細胞存活率之 MTT 值在經統計分析並無顯著差異。然而, 當濃度在 30 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 時則 MTT 值有統計意義的下降為原來控制組之 71.15 %。如圖 12。此 CWES-A25-AG-F3 收集冷凍乾燥後再經 SEPHACRYL-S200 gel filtration chromatography 過濾作進一步分離後具 3 個 peaks, 如圖 13。其中經收集後測定其對 PBMNC 之刺激後所得 conditioned medium 發現有分子量約 28 kDa (以 12.4kDa 之 cytochrome C, 45 kDa 之 egg albumin 和 66 kDa 之 abovin serum albumin 之 standard 作 calibration curve 之迴歸曲線估計 ($R^2=0.986$)) 之 fractions 具有劑量-反應相關性地間接抑制活性, 暫時將之稱為 PC-P28。在 5 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 時達到抑制了 HEP G2 細胞株中 HBV 為控制組之 38.8 %。且代表細胞存活率之 MTT 值在 5 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 濃度以下經統計分析並無顯著差異。然而, 當濃度在 0 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 以上時則 MTT 值有統計意義的下降為原來控制組之 74.76 %。如圖 14。將此等具有明顯間接抑制活性的 FRACTIONS 刺激後所得 conditioned medium 以 ELISA 測定其中之 IFN- γ , TNF- α 和 IL-1。分子量約 28 kDa 之 fractions (濃度在 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 下) 在共同培養刺激 PBMNC 後所得

conditioned medium 中，發現 IFN- γ 之分泌量隨著刺激的天數增加而減少(具有劑量-反應相關性)，其在第一天達最高(1093 \pm 81 pg/mL)。TNF- α 之分泌量則也是在第一天便達最高(1395 \pm 98 pg/mL)，隨著刺激的天數增加而有些微下降的趨勢。已知 hepatitis B virus (HBV)-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs)可分泌 IFN- γ 和 TNF- α 對肝臟中已感染病毒之肝細胞外之複製病毒有清除作用且無毒殺肝細胞作用(Guidotti LG. *et al.*, 1996)。IL-1 β 之分泌量也是在第一天便達最高(534 \pm 50 pg/mL)，隨著刺激的天數增加而有明顯下降的趨勢，在第五天為(256 \pm 30 pg/mL)。已知 IL-1 β 可加強 IFN- α 和 TNF- α 對 HBV 病毒之表現抑制作用(Hamasaki K. *et al.*, 1992)。以上三種 cytokines 不論是在正常組(normal)，控制組(control)或是未刺激 PBMC 之單純 28 kDa 之 fractions 組(PC-p28-alone)都顯示出極低或是測不出之分泌量。以 PHA 作為本實驗之正控制組(positive control)顯示此模式系統無異常。如表 1。

此說明了分子量約 28 kDa 之 fractions 非直接地作用在感染病毒的人體細胞上而是藉由刺激 PBMC 產生 cytokines 的作用。其在 5ug/ml 以下對人體細胞不致於有毒害作用；但尚可有效地抑制 Hep G2 細胞株中 HBV 病毒之表現。其是否有其它重要的 cytokines 參與尚需進一步的探討。綜觀以上兩種具有免疫活性的 fractions，PC-PS 和 PC-P28，雖然皆可有效地抑制 HEP G2 細胞株中 HBV 病毒之表現。然而 PC-PS 同時具有毒殺細胞之作用；而 PC-P28 則在一定劑量下具有抑制 HEP G2 細胞株中 HBV 病毒之表現且無毒殺細胞之作用。PC-PS 在對白血球腫瘤細胞株 U-937 和 HL-60 兩者具有促進分化成熟及抑制其增殖的作用(Yue-Yawn Chen and Hung-Min Chang, 2003)。

參考文獻

Guidotti LG. Ishikawa T. Hobbs MV. Matzke B. Schreiber R. Chisari FV. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*. 4(1):25-36, 1996 Jan

Hamasaki K. Nakata K. Nakao K. Mitsuoka S. Tsutsumi T. Kato Y. Shima M. Ishii N. Tamaoki T. Nagataki S. Interaction of interferon-alpha with interleukin-1 beta or tumor necrosis factor-alpha on hepatitis B virus enhancer activity. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 183(2):904-9, 1992 Mar 16

Kanayama H. Adachi N. Fukai Y. Takeuchi I. Togami M. Studies on the antitumor active polysaccharides from the mycelia of *Poria cocos* Wolf. III. Antitumor activity against mouse tumors. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 1986 Apr. ; 106(4):307-12,

Kasahara S. Ando K. Saito K. Sekikawa K. Ito H. Ishikawa T. Ohnishi H. Seishima M. Kakumu S. Moriwaki H. 2003 Lack of tumor necrosis factor alpha induces impaired proliferation of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Virology*. 2003 ; 77(4):2469-76

Lee I.-Hung, Huang Ray-Ling, Chen Chi-Ting, Chen Hsiao-Chuan, Hsu Wen-Chi, Lu Mei-Kuang 2002 *Antrodia camphorata* polysaccharides exhibit anti-hepatitis B virus effects. *FEMS Microbiology Letters* 2002 ; 209 : 63-67.

Miao 1994 Miao ZQ, Tao BG, Ye JM. Observation on short-term therapeutic effect of interferon, *Polyporus umbellatus* polysaccharide and thymosin D in treatment of chronic hepatitis B. *Chinese Journal of Clinical Hepatology* 1994;10(1):49-51.

Tseng J. and Chang JG 1992. Chinese Journal of Microbiology & Immunology. 1992 Feb. ; 25(1):1-11,
Yu SJ. Tseng J. 1996 International Journal of Immunopharmacology. 1996 Jan ; 18(1):37-44,

Ukiya M. Akihisa T. Tokuda H. Hirano M. Oshikubo M. Nobukuni Y. Kimura Y. Tai T. Kondo S. Nishino H. Inhibition of tumor-promoting effects by poricoic acids G and H and other lanostane-type triterpenes and cytotoxic activity of poricoic acids A and G from **Poria cocos**. Journal of Natural Products. 65(4):462-5, 2002

Wu 1996 Wu LK, Yu DH, Wang HL, Zhou JP, Li JL, Lv ZG. Effect of Lentinan injection on peripheral blood endoxin and TNF in patients with chronic hepatitis B. Chinese Journal of Hepatology 1996;4(1):49-50.

Yan 1988 Yan SC, Cao WF, Zhang YH, Li LF, Yu CY, Zhu ZS, et al. Clinical and experimental research on Polyporus umbellatus polysaccharide in treating chronic viral hepatitis. Chinese Journal of Integrated Traditional & Western Medicine 1988;8(3):141-3.

Yasukawa K. Kaminaga T. Kitanaka S. Tai T. Nunoura Y. Natori S. Takido M. 3 beta-p-hydroxybenzoyldehydrotumulosic acid from **Poria cocos**, and its anti-inflammatory effect. Phytochemistry. 48(8):1357-60, 1998

Yue-Yawn Chen and Hung-Min Chang. Antiproliferative and Differentiating Effects of Polysaccharide Fraction from Fu-Ling (*Poria cocos*) on Human Leukemic U937 and HL-60 Cells Source. FOOD CHEM TOXICOL. (in press). (SCI).

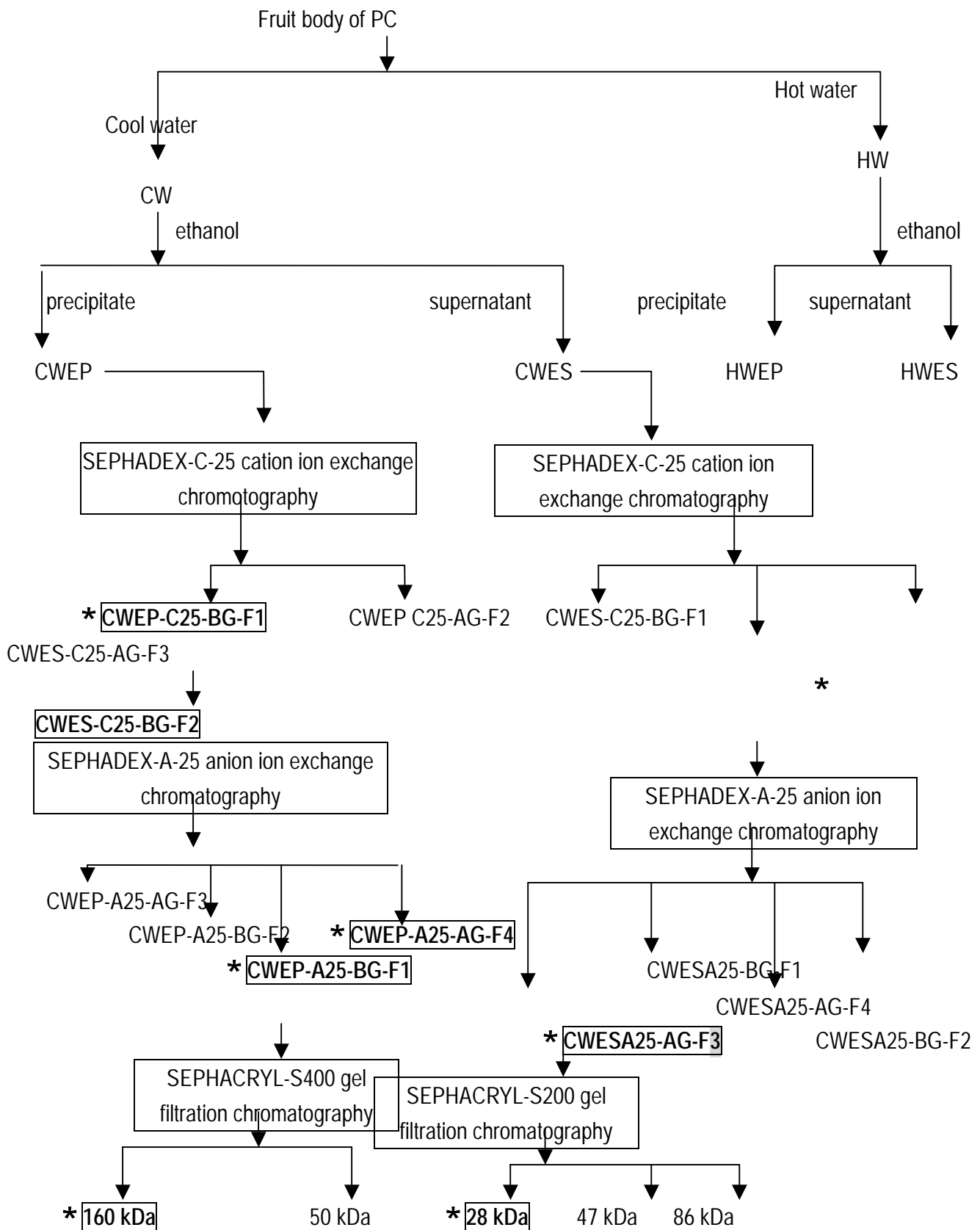


Fig.1. Isolation of immunomodulating fractions on anti-virus activities of hepatitis B virus

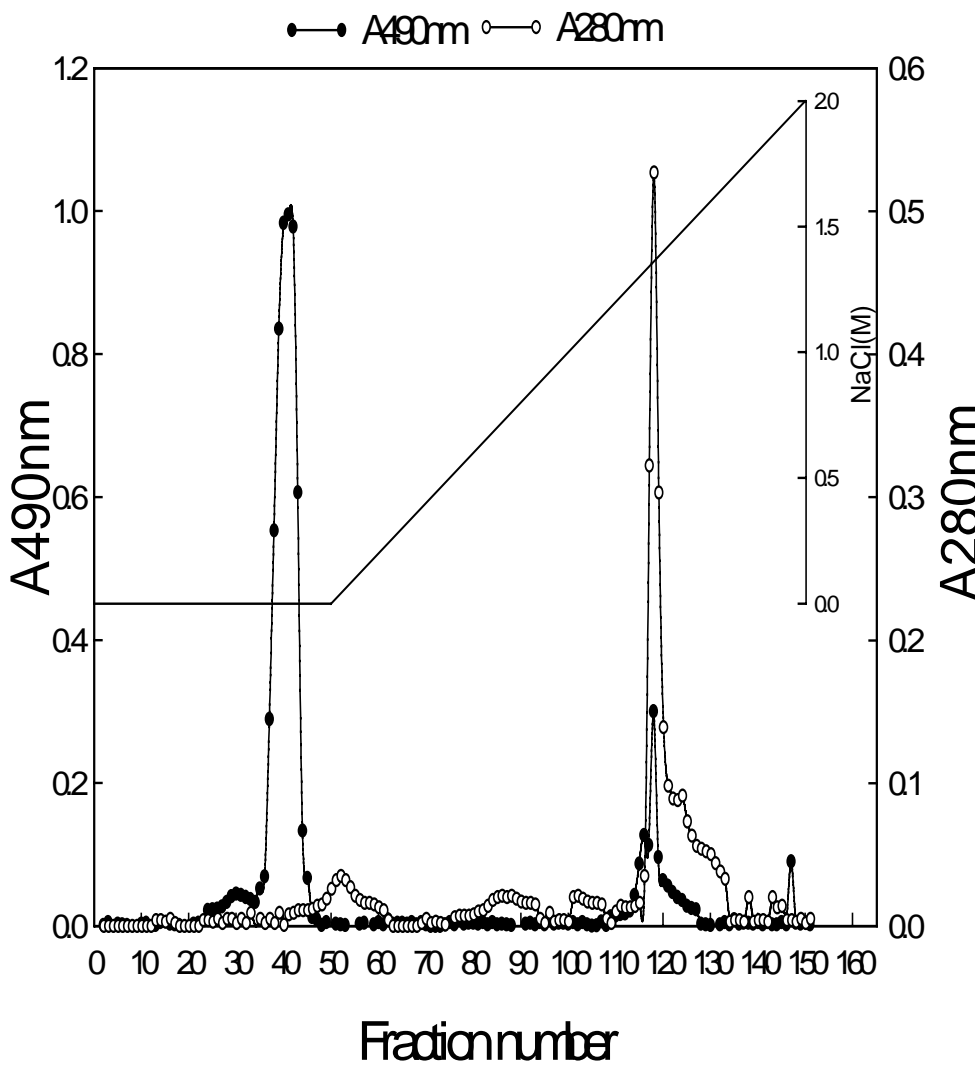


Fig.2 . Chromatograms of crude portions from PC on a Sephadex C-25 cation-exchange chromatography. The polysaccharide content in each tube was determined by phenol-sulfuric acid method

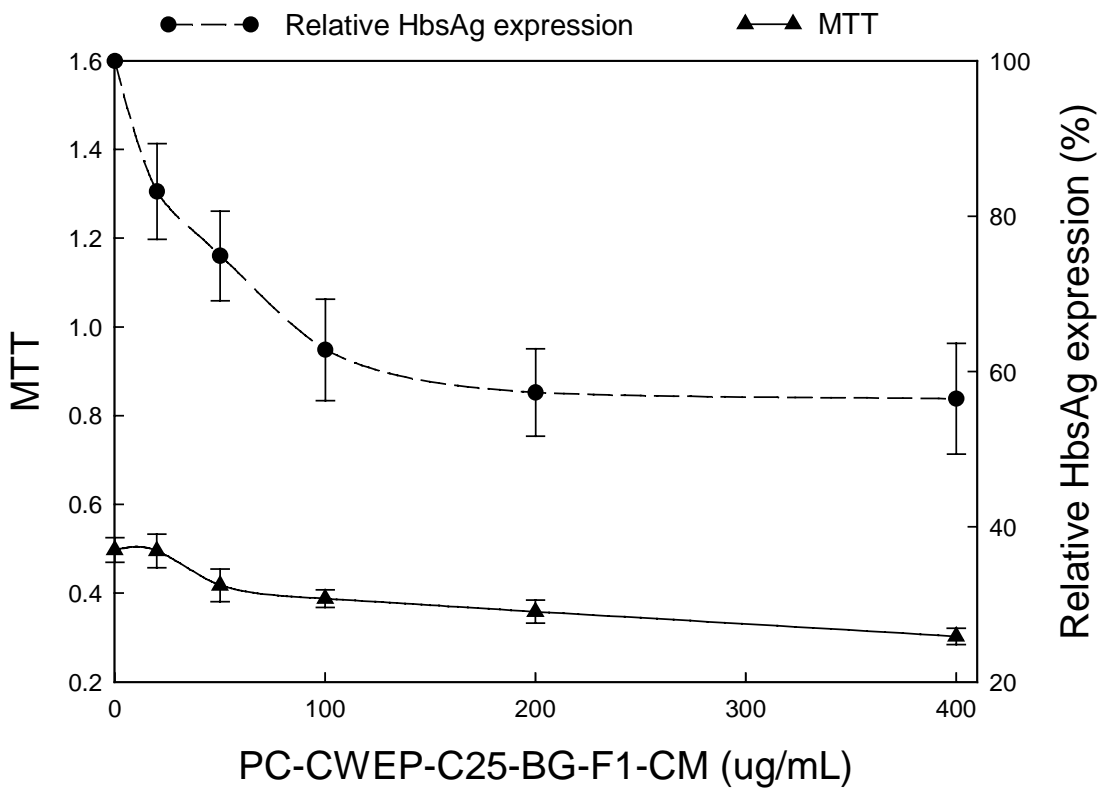


Fig. 3 . The relative HbsAg expression of Hep G2 after incubation with CWEP-C25-BG-F1 conditioned medium.

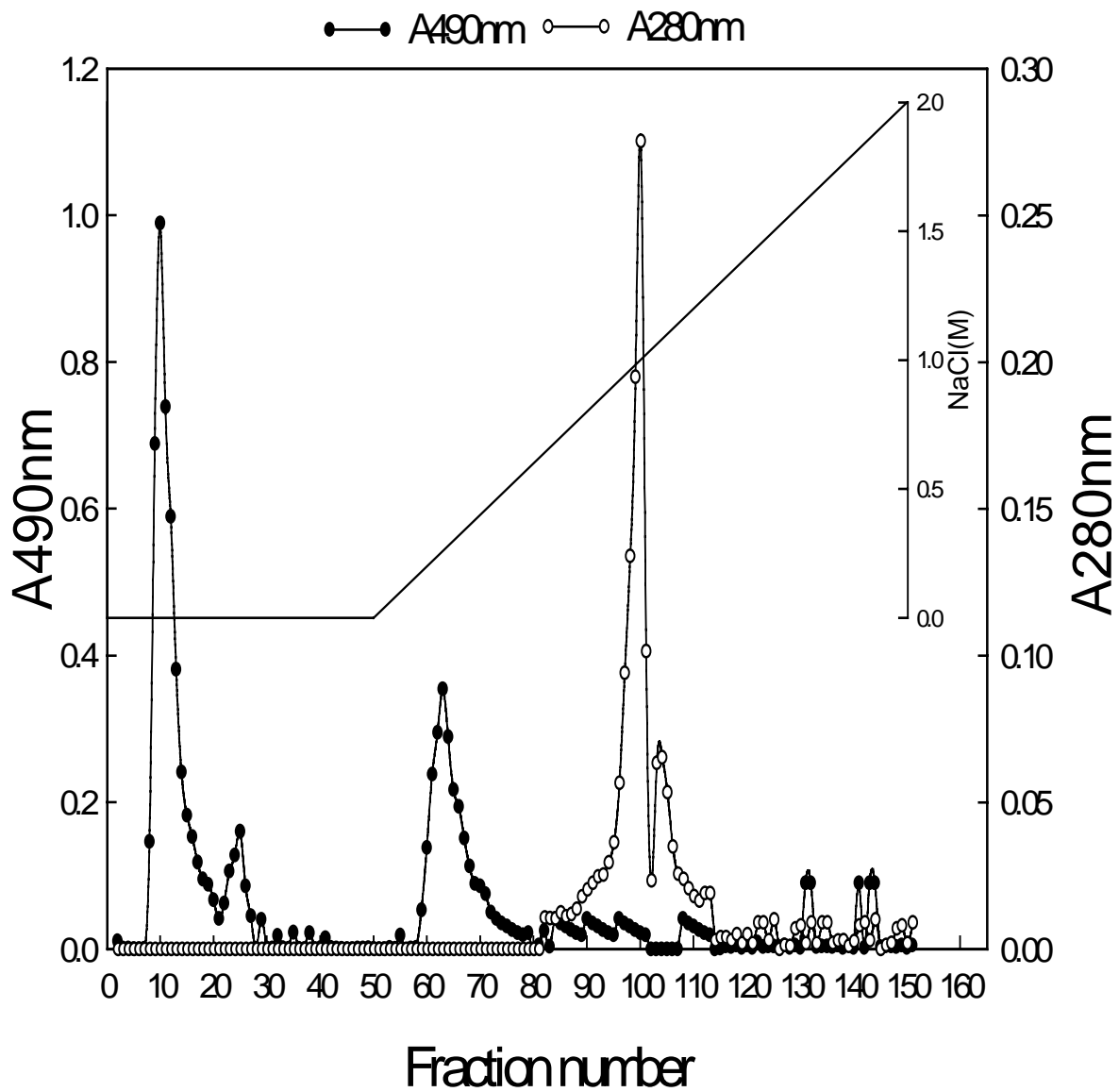


Fig. 4. Chromatograms of crude portions from PC on Sephadex A-25 anion-exchange chromatography. Polysaccharide content in each fraction was determined by phenol-sulfuric acid method.

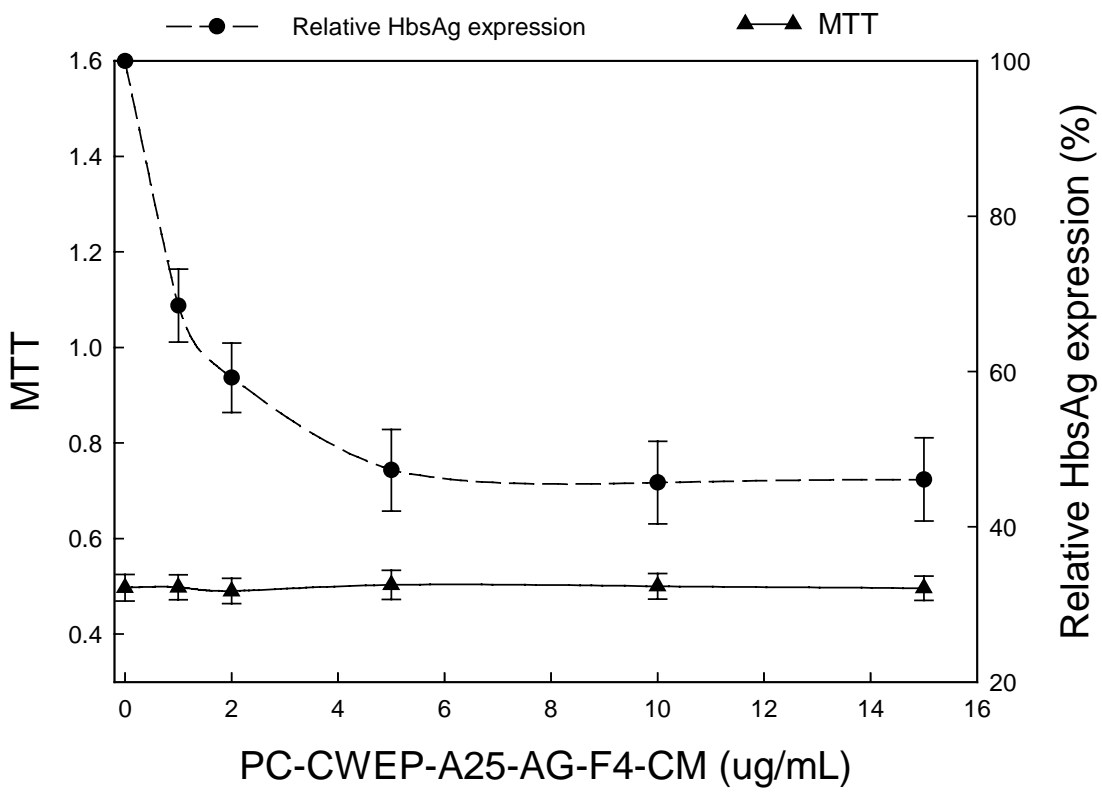


Fig. 5. The relative HbsAg expression of Hep G2 after incubation with CWEP-A25-AG-F4 conditioned medium.

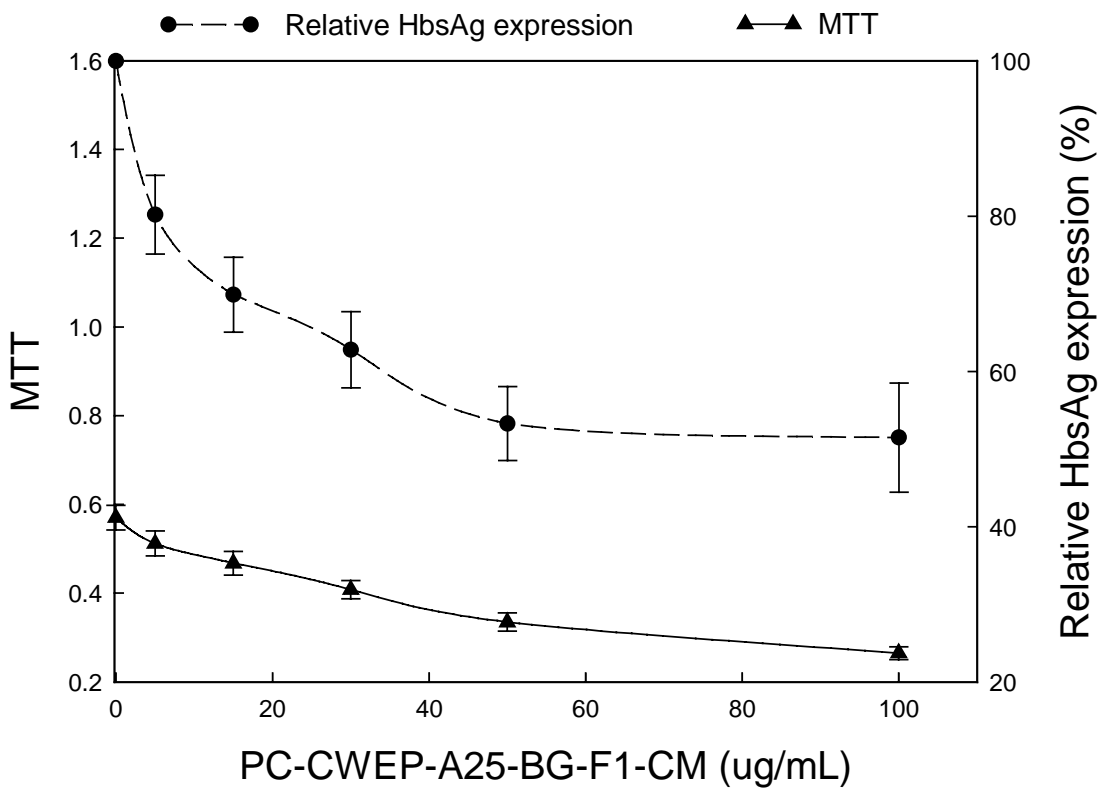


Fig.6 . The relative HbsAg expression of Hep G2 after incubation with CWEP-A25-BG-F1 conditioned medium.

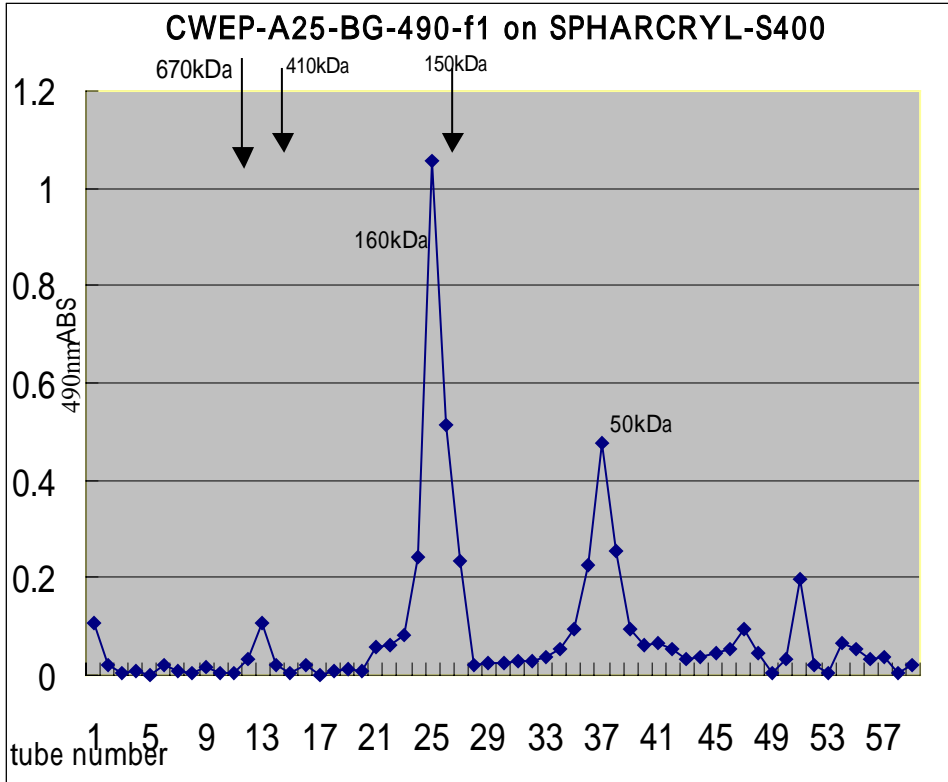


Fig.7 . Chromatograms of CWEP-A25-BG-F1 fractions from PC on a Sephacryl-S400 gel permeation chromatography. The polysaccharide content in each tube was determined by phenol- sulfuric acid method

Dextrans at about 150 kDa, 410 kDa and 670 kDa were standard markers.

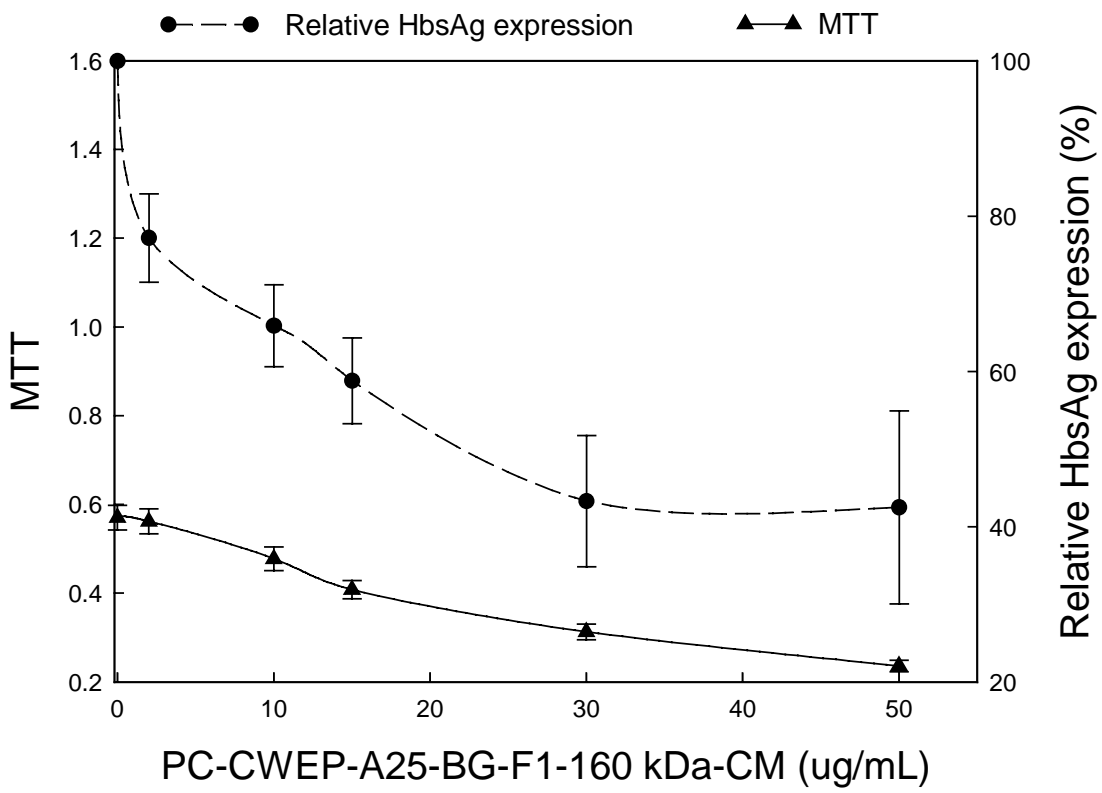


Fig. 8. The relative HbsAg expression of Hep G2 after incubation with CWEP-A25-BG-F1-160 kDa conditioned medium.

CWES on Sephadex-C25-cationic ion exchange chromatogram

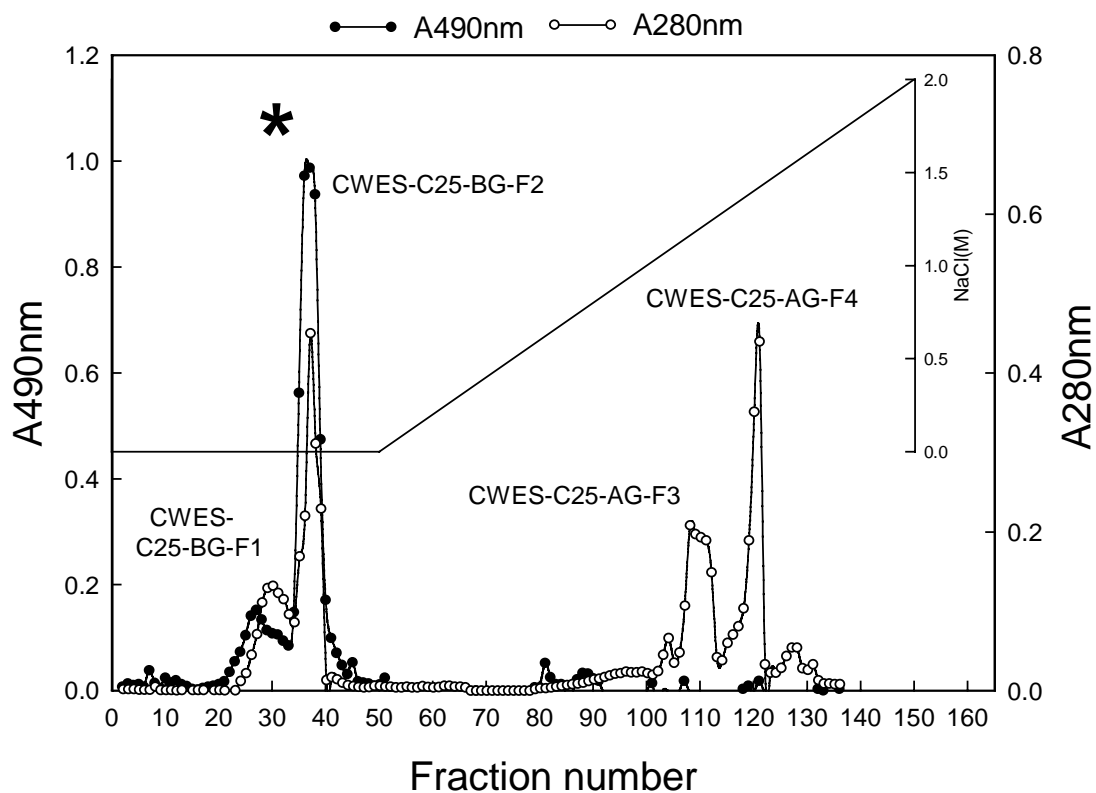


Fig. 9. Chromatograms of crude portions from PC on a Sephadex C-25 cation-exchange chromatography. The polysaccharide content in each tube was determined by phenol- sulfuric acid method

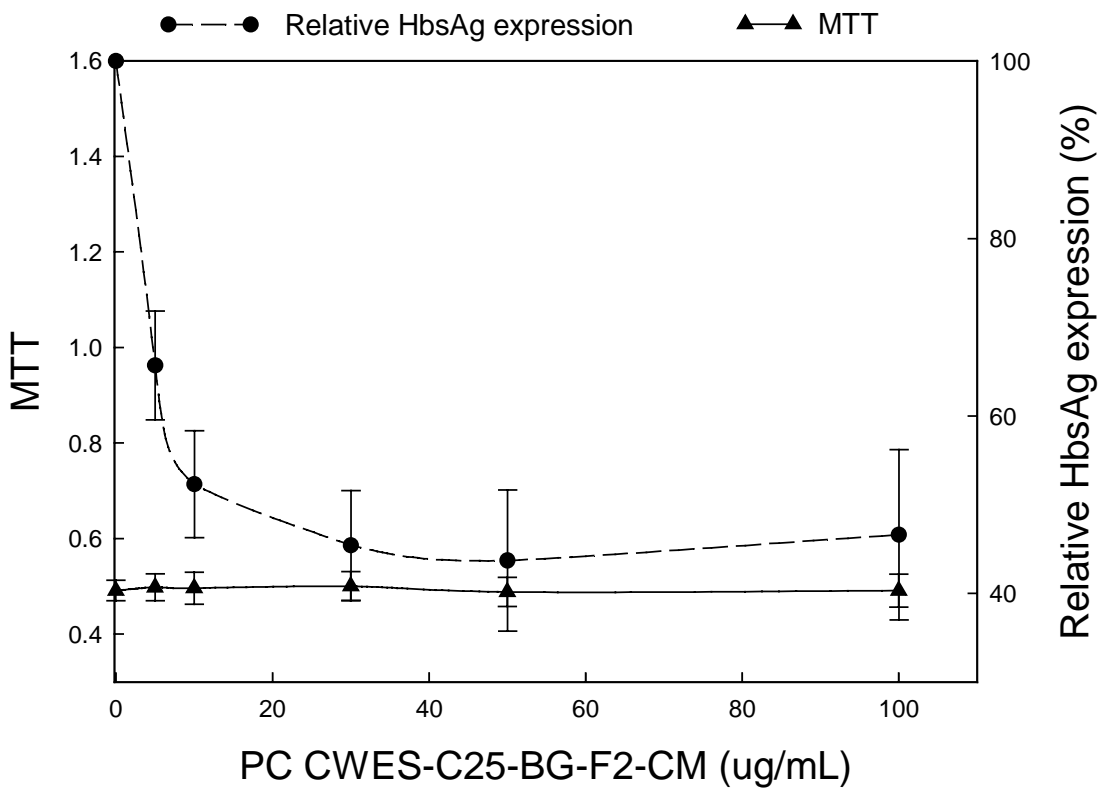


Fig. 10. The relative HbsAg expression of Hep G2 after incubated with CWES-C25-BG-F2 conditioned medium.

**CWES-C25-BG-F2 on
Sephadex-A25-cationic ion exchange chromatogram**

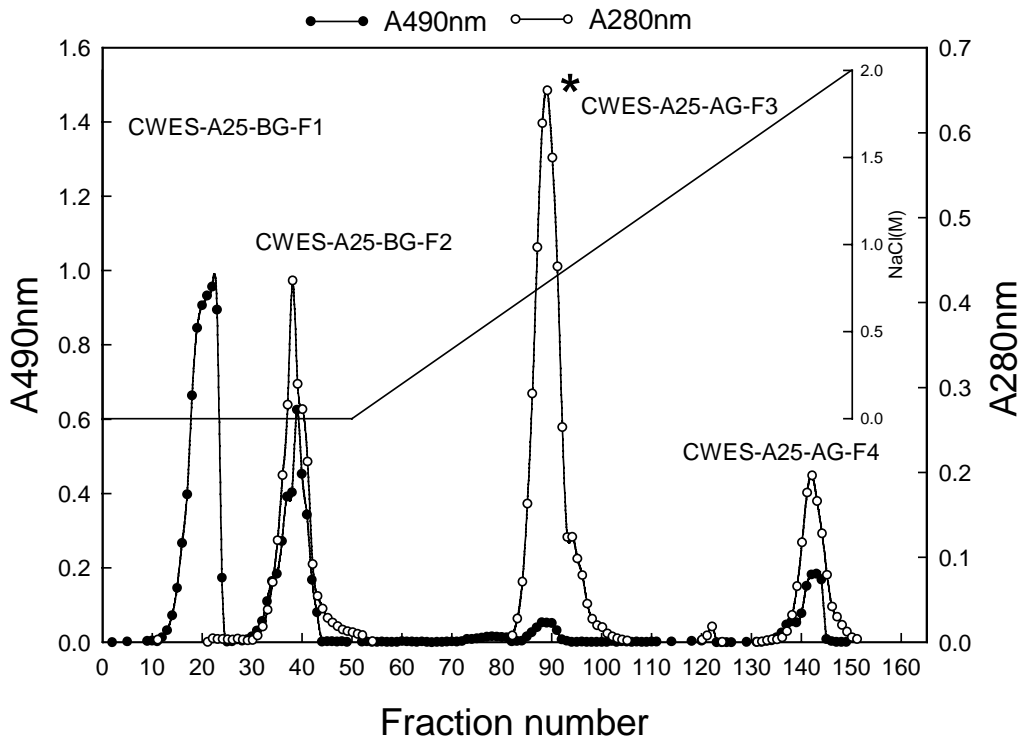


Fig. 11. Chromatograms of crude portions from PC on a Sephadex A-25 cation-exchange chromatography. The polysaccharide content in each tube was determined by phenol- sulfuric acid method

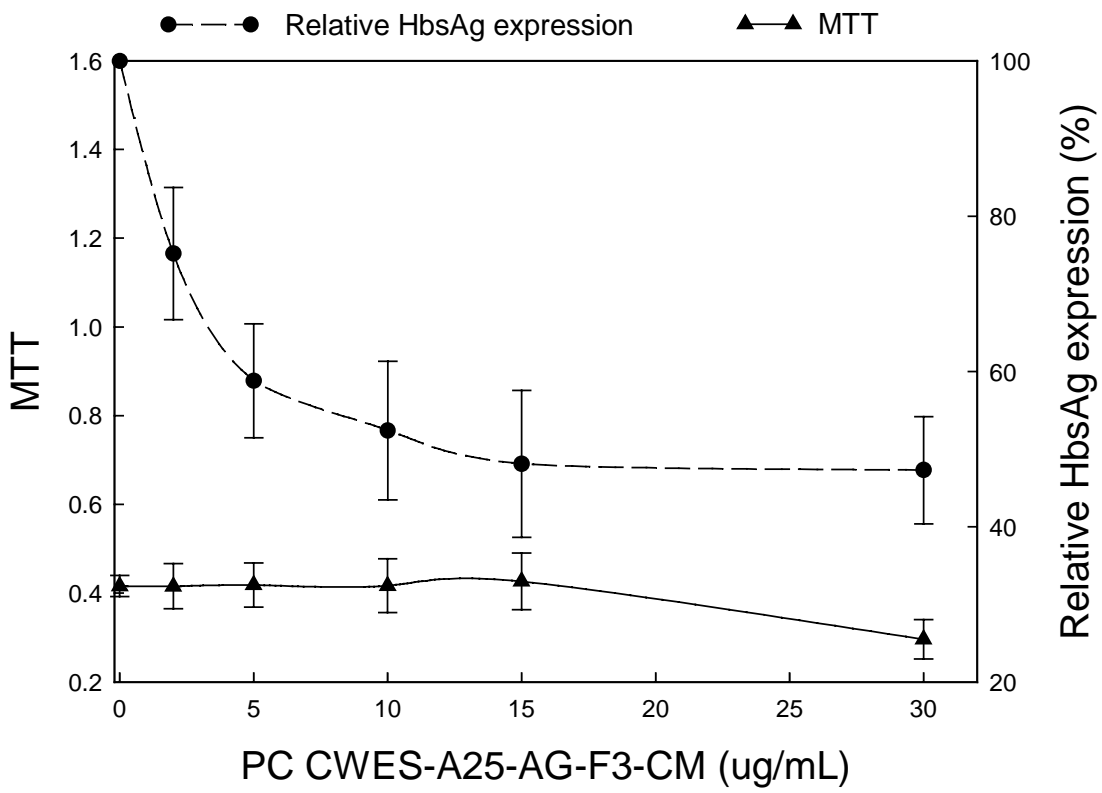


Fig.12. The relative HbsAg expression of Hep G2 after incubation with CWES-A25-AG-F3 conditioned medium.

CWEP-C25-AG-280-F2 on Sephacryl-S200 gel filtration chromatogram

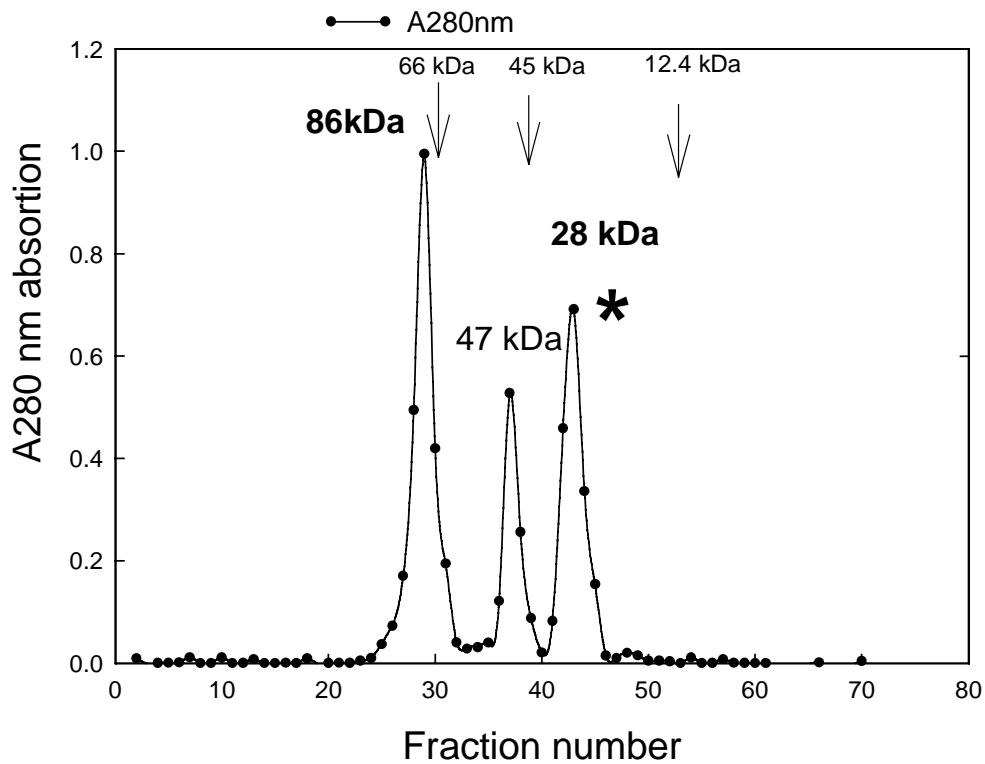


Fig. 13. Chromatograms of CWES-A25-AG-F3 Fractions from PC on a SEPHACRYL-S200 gel filtration chromatography. The polysaccharide content in each tube was determined by phenol- sulfuric acid method. Standard marker: cytochrome C, 12.4kDa; egg albumin, 45 kDa; abovin serum albumin, 66 kDa

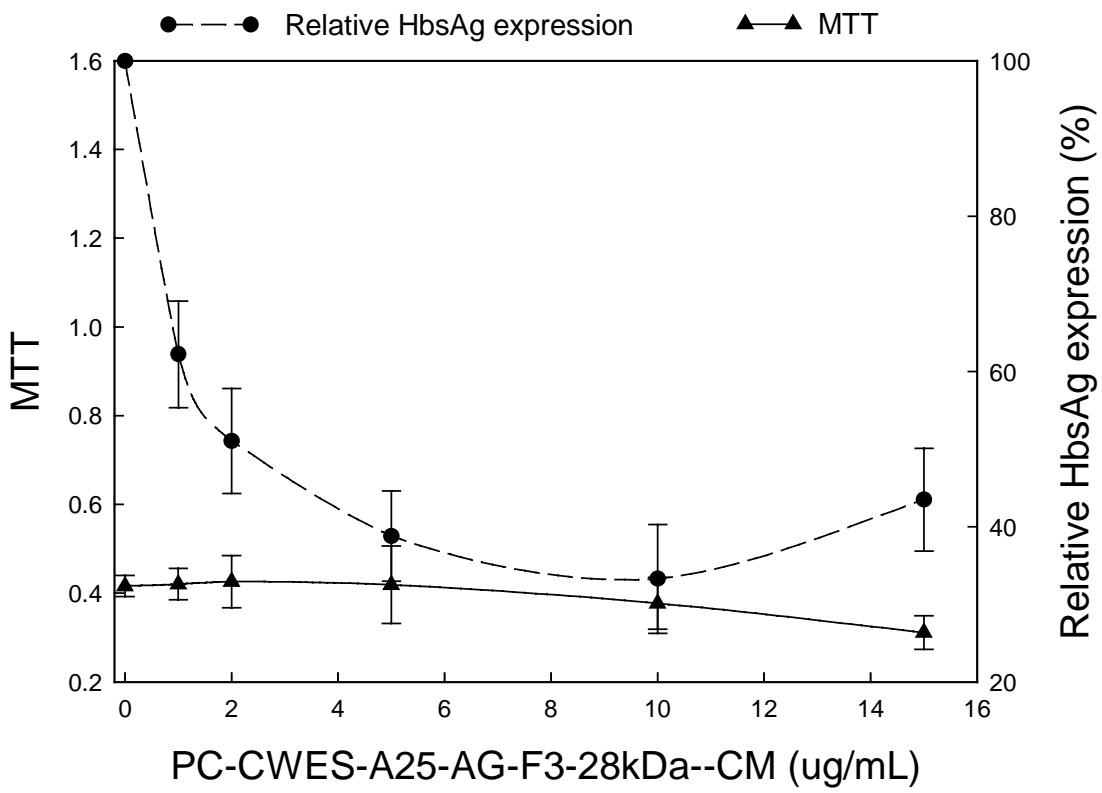


Fig. 14. The relative HbsAg expression of Hep G2 after incubation with CWES-A25-AG-F3-28 kDa conditioned medium.