嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CN9803

總計畫名稱：多酚化合物活性及有效成分探討

子計畫（三）名稱:虎杖乙醇萃取物抗EB病毒主要活性成分之鑑定

執行期間：98 年 1 月 1 日至 98 年 12 月 31 日

■整合型計畫	□個別型計畫
計畫總主持人：楊朝成	計畫主持人：
子計畫主持人：一. 楊朝成 二. 吳明娟 三. 葉東柏	

中華民國 99 年 2 月 28 日

子計畫三：虎杖乙醇萃取物抗 EB 病毒主要活性成分之鑑定

主持人：生物科技系 葉東柏
共同主持人：保健營養系 林翠品

一、摘要

EB 病毒從潛伏循環再活化至溶裂循環會導致病毒顆粒的產生而使得細胞受到 EB 病毒的感染。在這個研究我們探討虎杖乙醇萃取物抑制 EB 病毒溶裂循環的主要活性成分, 結果發現虎杖乙醇萃取物(PcE)在 25 μg/ml 時，抑制 50%以上 Rta、Zta 及 EA-D 的表現，而正己烷處理之極性層分劃物[PcE(H)]在 50 μg/ml 對 EB 病毒溶裂循環蛋白質，Rta 及 EA-D 表現才有 50%的抑制能力，另外對 Zta 表現只有約 26%的抑制效果。進一步的研究顯示，乙酸乙酯分劃物(PcEE) 只需 3.1 μg/ml 對 EB 病毒溶裂循環蛋白質，Zta 及 EA-D 表現就有 50%的抑制能力。而且也發現在具有抑制 EB 病毒溶裂蛋白質表現的濃度下對細胞不會造成毒性。此外，也發現乙酸乙酯分劃物(PcEE)的大黃素含量也上升 6 倍，所以由這些結果顯示大黃素在虎杖乙醇萃取物中很可能就是扮演著抑制病毒進入溶裂循環，進而阻擋病毒再活化的主要成分。

關鍵字: Epstein-Barr 病毒；虎杖萃取物；抗病毒；細胞毒性

二、緣由與目的

EB 病毒是人類的皰疹病毒(herpesvirus)，會感染淋巴球細胞及上皮細胞[1]，導致傳染性單核球增多症(infectious monnucleosis)[2]及多種惡質病(malignant disease)包括巴克氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)[3]、T 細胞淋巴瘤[4]、霍奇金氏病(Hodgkin's disease)[5]、胃癌(gastric cancer)[6]及鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma)[7]。病毒感染 B 淋巴球細胞後會進入潛伏時期(latent) [8]，但是當受到外在因子包括紫外線[9]、12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)[10], sodium butyrate(SB) [11]就會由潛伏時期進入溶裂循環(lytic cycle)進行增殖作用再感染其他細胞，此作用與 EB 病毒所導致的疾病有重要的相關性。在溶裂循環時期病毒會表現兩個較早期基因(immediate-early genes)，BRLF1 及 BZLF1 它們分別可以表現轉錄因子 Rta 及 Zta [12]，這兩個轉錄因子可以互相作用或單獨活化其他與溶裂循環時期有關的基因表現，包括 BMRF1 及 BALF5 分別表現 diffused early antigen (EA-D)及 DNA 聚合酶(polymerase) [13]。換言之，如果沒有這些溶裂蛋白質的表現就無法完成溶裂循環，就可以降低發生 EB 病毒相關疾病的危險性。目前一般對皰疹病毒的治療是以 acyclovir 和 ganciclovir，這兩種是核苷酸的類似物主要抑制 DNA 聚合酶(polymerase)使病毒無法進行溶裂循環，也就無法再感染其他的細胞 [14]。在先前研究發現虎杖根乙醇萃取物在濃度 25 μg/ml 時能夠抑制丁酸鈉 (sodium butyrate) 所誘發 EB 病毒早期基因的轉錄，影響 EB 病毒溶裂蛋白質的表現，進而抑制病毒顆粒的產生。分析虎杖根乙醇萃取物的成分，發現大黃素及白黎蘆醇在萃取物中分別佔 5.1%及 2.1%，以大黃素及白黎蘆醇探討對 EB 病毒溶裂循環的影響發現分別在 9.37 μM (2.53 μg/ml)及 55 μM (12.55 μg/ml)才有明顯抑制病毒顆粒產生的能力，使 EB 病毒早期基因的轉錄及蛋白質的表現降低，進而抑制病毒顆粒的產生。所以推測虎杖根乙醇萃取物含有抑制 EB 病毒溶裂循環，而

此作用不只藉由大黃素及白黎蘆醇的作用，可能還有其他物質參與，所以本研究將進一步純化並且鑑定虎杖乙醇萃取物內抗病毒的活性成分，研究成果將有助於開發預防鼻咽癌及胃癌的天然物，也提高虎杖的經濟效益及利用率。

三、材料與方法

(一)、虎杖根乙醇萃取物及分劃物的製備

將虎杖根放置烘箱以 37℃乾燥五天讓水分完全去除，之後使用粉碎機打成粉末。秤取 10 克的粉末以 100 ml 95% 乙醇在 80℃水浴機迴流 2 小時，經由紗布初過濾後，再經由 6500 xg 離心 10 分鐘去除雜質收集上清液(這些步驟重複二次)，接著將三次所收集的上清液進行真空減壓濃縮 (EYELA rotary evaporator N-100) 去除有機溶劑，以冷凍乾燥得到虎杖根乙醇萃取物粉末(PcE)備用 (圖一 A)，萃取率為 21.6%。10 克虎杖根乙醇萃取物粉末回溶於 1000 ml 乙醇 (1:100, W/V)，再加入 100 ml 的水及 1000 ml 正己烷進行分相萃取，經分層後取極性層的部分再重複以 1000 ml 正己烷進行分相萃取，經分層取極性層的部分進行真空減壓濃縮及冷凍乾燥得到正己烷處理之極性層分劃物[PcE(H)]粉末；萃取率為 17.8%。此外也將減壓濃縮至去除正己烷處理之極性層分劃物的濃縮物溶於水總量為 100 ml 並且加入等量的乙酸乙酯進行分相萃取，靜置分層後取乙酸乙酯層進行減壓濃縮及冷凍乾燥得到乙酸乙酯分劃物(PcEE)粉末，萃取率為 4.4%。取部分粉末溶於 DMSO (最終濃度 0.1%)進行活性分析。

(二)、虎杖根乙醇萃取物內活性成份之逆相式高效液相色層分析

將虎杖根乙醇萃取物(PcE)，正己烷處理之極性層分劃物[PcE(H)]及乙酸乙酯分劃物(PcEE)以高效液相色層分析，所用的條件：逆相式，C18 (250 × 8 mm)的分離管，移動相為甲醇及水 (methanol: 0－15 min, 30－50%; 15－35 min, 50－90%; 35－45 min, 95%)，流速為 1 ml/min，檢測器設定值為 280 nm，此外乙酸乙酯分劃物(PcEE)經由逆相式高效液相色層分析，接著收集不同時間點出現的波峰，將收集液分成三群(F1-F3) (F1=0~20.96，F2=20.96~33.28，F3=33.28~45)，進一步將收集液減壓濃縮去除有機溶劑，以真空冷凍乾燥所得粉末定量溶於 DMSO 測量抗病毒生物活性。

(三)、抗病毒生物活性分析

抗病毒活性分析，將 P3HR1 細胞 (6×10^5 cell/ml) 放置在 5% CO_2 、37℃培養 24 小時後，再加入 SB (Sodium butyrate)誘導細胞進入溶裂循環前一小時加入虎杖根乙醇萃取物(PcE)，正己烷處理之極性層分劃物[PcE(H)]及乙酸乙酯分劃物(PcEE)培養 24 小時後收集細胞，再以 lysis buffer 溶解細胞，經過離心取得上清液蛋白質，進一步利用西方墨點法來分析 EB 病毒溶裂蛋白質 Rta, Zta 及 EA-D 的表現並且以影像分析軟體(VisionWorksLS)掃描影像強度進行數據分析，以β-actn 相對比較換算 Rta，Zta 及 EA-D 相對表現量。

(四)、細胞毒性分析

將 1×10^5 cell/ml 的 P3HR1 細胞以含有 10% 胎牛血清及 1% 抗生素(penicillin-G & streptomycin)的 HyQ RPMI 1640 培養基，在 5% CO_2 、37℃培養 24 小時後，分別添加

不同濃度的虎杖根乙醇萃取物(PcE)，正己烷處理之極性層分劃物[PcE(H)]及乙酸乙酯分劃物(PcEE)，培養 24 小時後，加入 0.5 mg/ml 的 MTT 試劑，置於 5% CO_2 、37℃反應作用 4 小時，接著離心收集細胞去除培養基，將收集的細胞加入 1 ml 100% DMSO 溶出暗藍色沉澱物，測定A_{492}。

相對細胞生長存活率(%)＝(A_{492}treatment / A_{492}control)× 100%

四、結果

(一)、虎杖根乙醇萃取物及分劃物內活性成份之逆相式高效液相色層分析

將虎杖根乙醇萃取物(PcE)，正己烷處理之極性層分劃物[PcE(H)]，乙酸乙酯分劃物(PcEE)及 PcEE 乙酸乙酯分離物 F1- F3 以高效液相色層分析，發現各萃取物及分劃物所含大黃素的純度分別為 5.1%，5.6%，23.1%，0.3%，0.4%及 93.4%, ；所含白黎蘆醇的醇度分別為 2.1%，2.5%，5%，10.5%，0%及 0.02%（圖二）。

（二）、虎杖根乙醇萃取物及分劃物對 EB 病毒溶裂蛋白質的影響

EB病毒感染B細胞後即進入潛伏時期，當受到紫外光或是TPA、SB等誘導，便會促使Rta及Zta轉錄因子的表現,進而使EB病毒走向溶裂循環。這兩個轉錄因子會活化BMRF1基因產生EA-D蛋白質，而增加病毒聚合酶效能，使病毒大量的複製。所以如果虎杖根乙醇萃取物或分劃物能夠抑制這些蛋白質的表現，就可以抑制EB病毒走向溶裂循環。首先培養P3HR1細胞 (6×10^5/ml)，加入不同濃度的虎杖根乙醇萃取物(PcE)，正己烷處理之極性層分劃物[PcE(H)]及乙酸乙酯分劃物(PcEE)，接著加入SB，經過24小時培養，將細胞收集並打破，利用西方墨點法偵測細胞中Rta、Zta及EA-D蛋白質的表現。結果顯示PcE在濃度12.5 mg/ml對EB病毒溶裂循環蛋白質，Rta，Zta及EA-D的表現就有明顯抑制。在25 μg/ml時，抑制50%以上Rta、Zta及EA-D的表現(圖三A)。正己烷處理之極性層分劃物[PcE(H)]在25 μg/ml對EB病毒溶裂循環蛋白質，Rta，Zta及EA-D的表現已有明顯抑制；在50 μg/ml對EB病毒溶裂循環蛋白質，Rta及EA-D的表現則有50%的抑制能力，但是對Zta的表現卻只有約26%的抑制效果(圖三B)。乙酸乙酯分劃物(PcEE)在3.1 μg/ml就對EB病毒溶裂循環蛋白質，Zta及EA-D的表現有50%抑制能力，但是對Rta蛋白質的表現卻只有22%的抑制能力(圖三C)。

(三)、虎杖根乙醇萃取物及分劃物對P3HR1細胞的毒性

將不同濃度的虎杖根乙醇萃取物(PcE)，正己烷處理之極性層分劃物[PcE(H)]，乙酸乙酯分劃物(PcEE)加入含有6×10^5/ml P3HR1細胞的培養液中，培養24小時後，利用MTT方法來測定這些樣品對於P3HR1細胞是否有毒性。結果顯示，PcE在25 μg/ml濃度以下對對P3HR1細胞存活率不會影響，但是當濃度上升至50 μg/ml時會影響細胞存活率約毒殺15%的細胞，至100 μg/ml約毒殺29%的細胞數(圖四A)。正己烷處理之極性層分劃物[PcE(H)]在50 μg/ml濃度以下對對P3HR1細胞存活率不會影響，但是當濃度上升至100 μg/ml時會影響細胞存活率約毒殺21%的細胞。而乙酸乙酯分劃物(PcEE) 在12.5 μg/ml濃度以下對P3HR1細胞存活率不會影響，當濃度為25 μg/ml時，其細胞存活率約 56%左右(圖四C)。

五、討論

皰疹病毒感染所導致的臨床症狀有唇皰疹(cold sores)，生殖器疹(genital herps)，水痘(chicken pox)及感染性單核球增多症(infectious mononucleosis)都和病毒的再活化有關。因此一般抗皰疹病毒的藥劑，如 acyclovir 和 ganciclovir 是核苷酸的類似物抑制皰疹的 DNA 聚合酶及病毒溶裂循環的複製。早期的研究證明 EB 病毒顆粒是由 B 淋巴球細胞產生傾向再去感染上皮細胞。因此在 B 淋巴球細胞中的 EB 病毒溶裂循環的再活化是導致上皮細胞癌，如鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma; NPC)重要癌化的步驟。因此篩選抑制溶裂循環的新物質是可以治療與 EB 病毒感染有關的疾病。

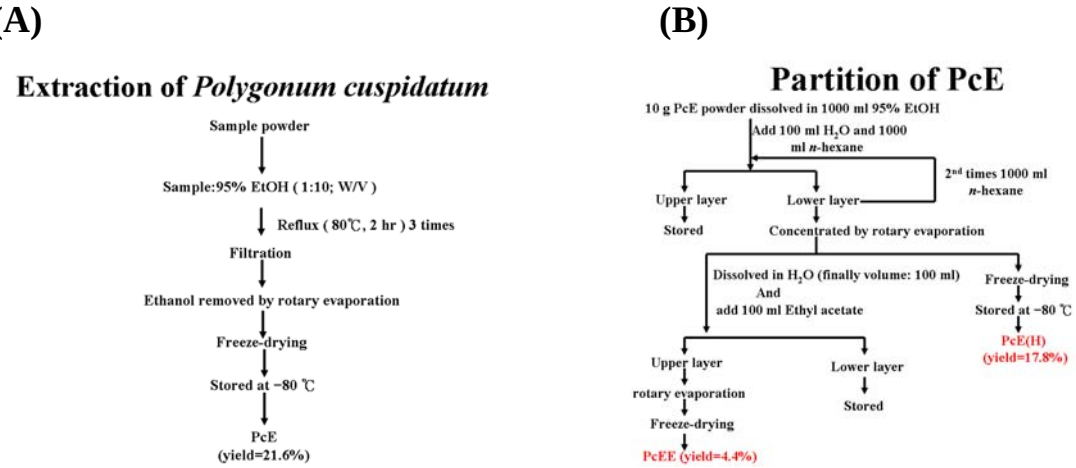
本研究發現 PcE 在 25 μg/ml 時，抑制 50%以上 Rta、Zta 及 EA-D 的表現，而正己烷處理之極性層分劃物[PcE(H)]在 50 μg/ml 時對 EB 病毒溶裂循環蛋白質，Rta 及 EA-D 表現才有 50%抑制能力，而對 Zta 表現只有約 26%的抑制效果。本研究進一步的研究發現，乙酸乙酯分劃物(PcEE) 只需 3.1 μg/ml 就對 EB 病毒溶裂循環蛋白質，Zta 及 EA-D 表現有 50%的抑制能力。而且也發現具有抑制 EB 病毒溶裂蛋白質表現的濃度對細胞不會造成毒性。所以，本研究確認了虎杖乙醇萃取物及分劃物具有抑制病毒進入溶裂循環，阻擋病毒的再活化的效果。此外，乙酸乙酯分劃物(PcEE)的大黃素含量上升 6 倍，而抑制 EB 病毒溶裂循環蛋白質表現所需的濃度也由 25 μg/ml 降至 3.1 μg/ml，由這些結果顯示大黃素在虎杖乙醇萃取物中應是扮演抑制病毒進入溶裂循環，阻擋病毒再活化的主要成分。

本研究的成果與原計畫之設定相符，且達預期目標的百分之八十以上。這個研究將有助於了解虎杖乙醇萃取物抗 EB 病毒的主要成分，如此將有利於抗病毒試劑的開發。這個研究也達成一位生物科技系碩士生及數位專題生在藥草純化及抗病毒研究技術的訓練目標。

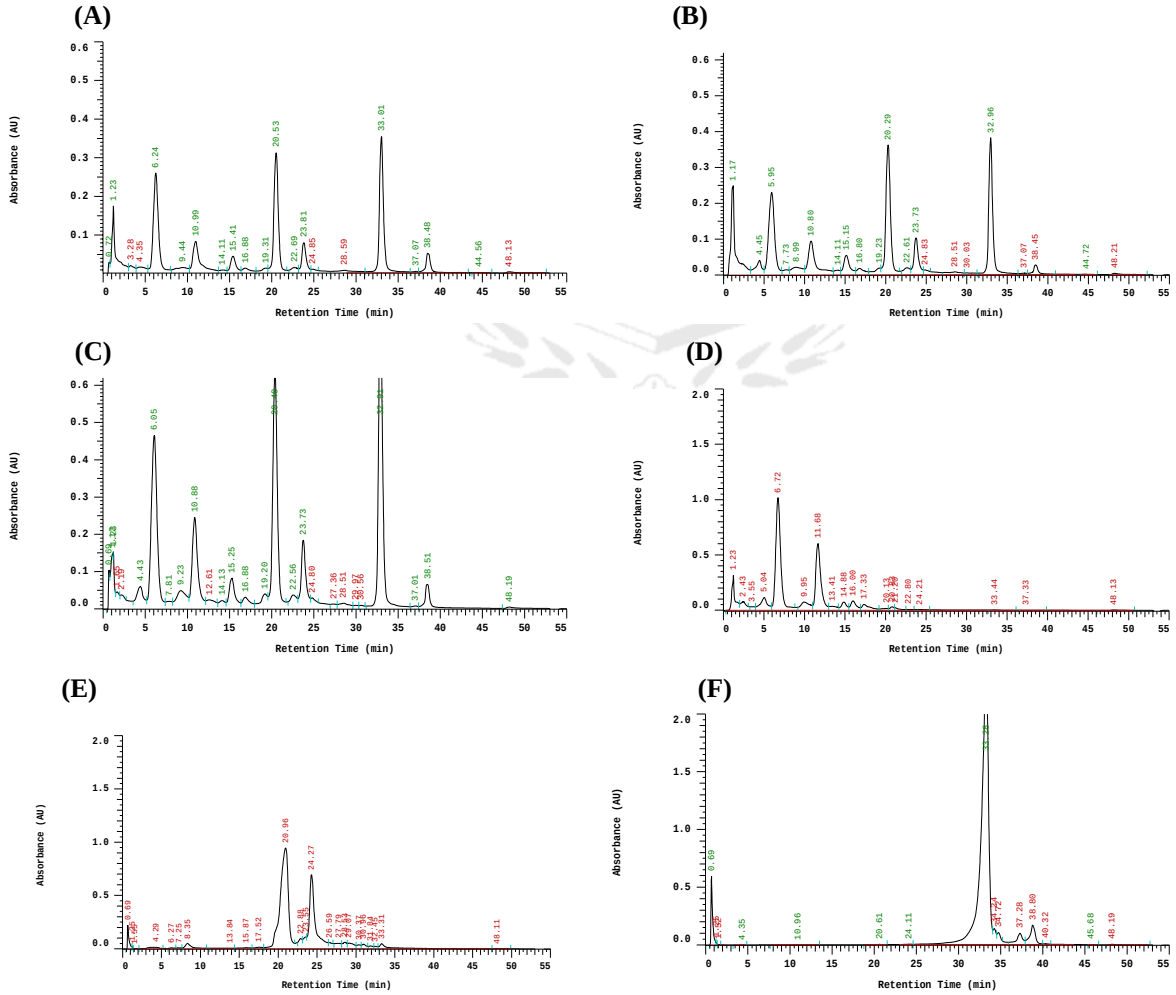
六、參考文獻

1. Roizman, B.; Carmichael, L. E.; Deinhardt, F.; de-The, G.; Nahmias, A. J.; Plowright, W.; Rapp, F.; Sheldrick, P.; Takahashi, M.; Wolf, K., Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses. Intervirology 1981;16:201-17.
2. Niedobitek, G.; Hamilton-Dutoit, S.; Herbst, H.; Finn, T.; Vetner, M.; Pallesen, G.; Stein, H., Identification of Epstein-Barr virus-infected cells in tonsils of acute infectious mononucleosis by in situ hybridization. Hum Pathol 1989;20:796-9.
3. Magrath, I.; Jain, V.; Bhatia, K., Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma. Semin Cancer Biol 1992;3:285-95.
4. Jones, J. F.; Shurin, S.; Abramowsky, C.; Tubbs, R. R.; Sciotto, C. G.; Wahl, R.; Sands, J.; Gottman, D.; Katz, B. Z.; Sklar, J., T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. N Engl J Med 1988;318:733-41.
5. Weiss, L. M.; Movahed, L. A.; Warnke, R. A.; Sklar, J., Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. N Engl J Med 1989;320:502-6.
6. Shibata, D.; Weiss, L. M., Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. Am J Pathol 1992;140:769-74.
7. zur Hausen, H.; Schulte-Holthausen, H.; Klein, G.; Henle, W.; Henle, G.; Clifford, P.; Santesson, L., EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. Nature 1970;228:1056-8.
8. Lindahl, T.; Adams, A.; Bjursell, G.; Bornkamm, G. W.; Kaschka-Dierich, C.; Jehn, U., Covalently closed circular duplex DNA of Epstein-Barr virus in a human lymphoid cell line. J Mol Biol 1976;102:511-30.
9. Miller, G., The switch between latency and replication of Epstein-Barr virus. J Infect Dis 1990;161:833-44.
10. zur Hausen, H.; O'Neill, F. J.; Freese, U. K.; Hecker, E., Persisting oncogenic herpesvirus induced by the tumour promotor TPA. Nature 1978;272:373-5.
11. Luka, J.; Kallin, B.; Klein, G., Induction of the Epstein-Barr virus (EBV) cycle in latently infected cells by n-butyrate. Virology 1979;94:228-31.
12. Giot, J. F.; Mikaelian, I.; Buisson, M.; Manet, E.; Joab, I.; Nicolas, J. C.; Sergeant, A., Transcriptional interference between the EBV transcription factors EB1 and R: both DNA-binding and activation domains of EB1 are required. Nucleic Acids Res 1991;19:1251-8.
13. Fixman, E. D.; Hayward, G. S.; Hayward, S. D., trans-acting requirements for replication of Epstein-Barr virus ori-Lyt. J Virol 1992;66:5030-9.
14. Feederle, R.; Kost, M.; Baumann, M.; Janz, A.; Drouet, E.; Hammerschmidt, W.; Delecluse, H. J., The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the co-operative functions of two transactivators. Embo J 2000;19:3080-9.

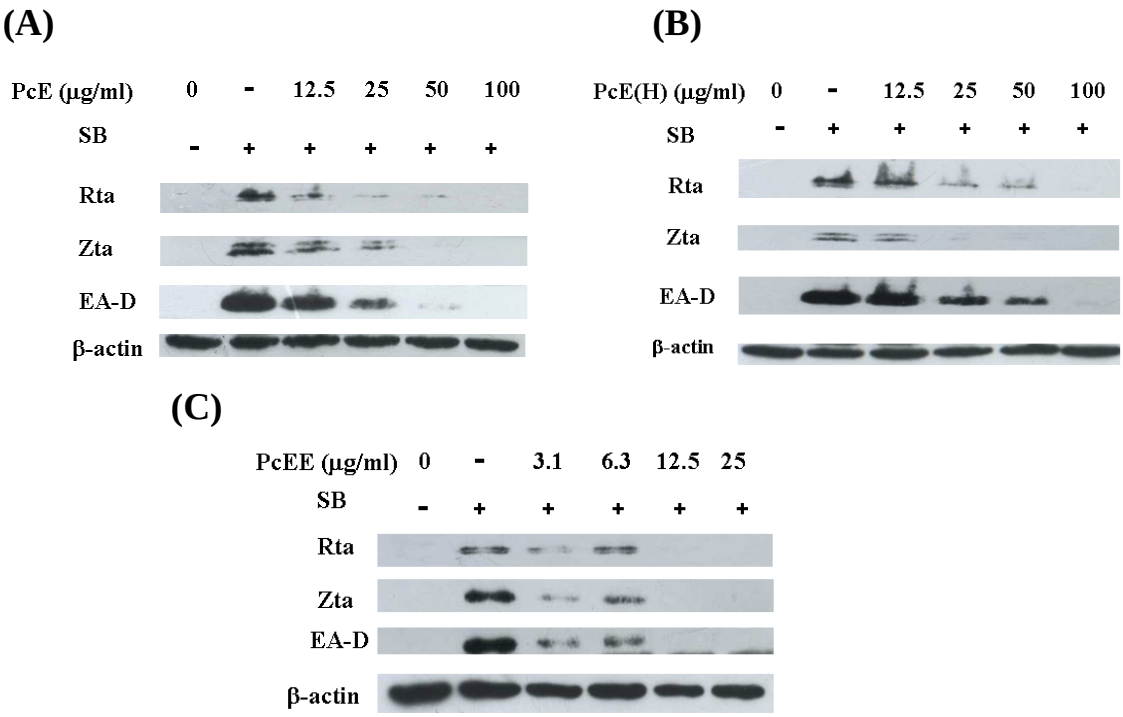
七、圖表



圖一、虎杖根乙醇萃取物的製備流程圖。

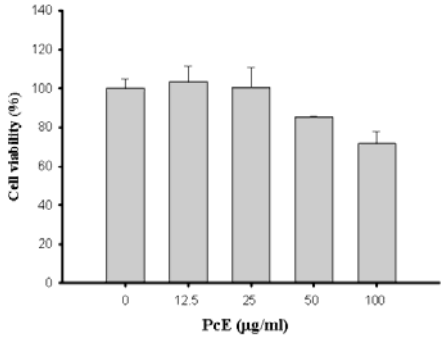


圖二、虎杖根乙醇萃取物及分劃物以 HPLC 分析之層析圖。(A)PcE，虎杖根乙醇萃取物(B) PcE(H)，正己烷處理之極性層分劃物 (C) PcEE，乙酸乙酯分劃物 (D) PcEE 乙酸乙酯分離物 F1 (E) PcEE 乙酸乙酯分離物 F2 (F) PcEE 乙酸乙酯分離物 F3。移動相: 甲醇–水(methanol: 0–15 min, 30–50%; 15–35 min, 50–90%; 35–45 min, 95%); 流速: 1.0 ml / min; 偵測的波長: 280 nm。

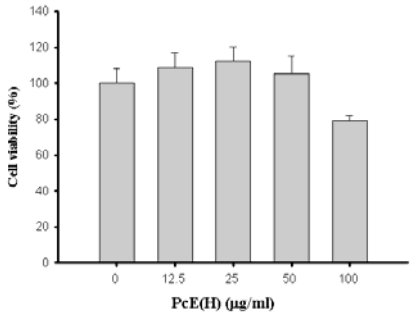


圖三、虎杖根乙醇萃取物及分劃物抑制 EB 病毒溶裂蛋白質的影響。培養含有 EB 病毒的 P3HR1 細胞 (6×10^5cell/ml)，經過 24 小時後，添加不同濃度的虎杖根之乙醇萃取物(A)、正己烷處理之極性層分劃物(B)或乙酸乙酯分劃物(C)處理，並加入誘導劑 (SB)，促使病毒走向溶裂循環，培養 24 小時後，收集細胞蛋白質。利用西方墨點法偵測 EB 病毒溶裂蛋白質 Rta、Zta、EA-D 的表現。

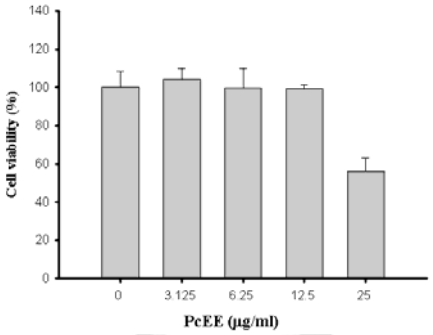
(A)



(B)



(C)



圖四、虎杖根乙醇萃取物及分劃物對於 P3HR1 細胞存活率的影響。培養含有 EB 病毒的 P3HR1 細胞 (6×10^5 cell/ml)，經過 24 小時後，添加不同濃度的虎杖根乙醇萃取物(A)、正己烷處理之極性層分劃物(B)或乙酸乙酯分劃物(C) 培養 24 小時使用 MTT 試驗法，測試不同濃度的樣品對於細胞存活率的影響。