

Evaluation of the Anti-Influenza Type A (H1N1) Effect on Liquid Fermentation *Sanghuangporus sanghuang* Mycelia

Lynn-Huey Chiang¹, I-Chen Li¹, Hsin-Tung Chu¹, Tsung-Ju Li¹, Chang Zhao², Chang-Jer Wu³, Chin-Chu Chen^{1*}

¹Grape King Bio. Ltd., Taiwan

²Shanghai Grape King Enterprise Co., Ltd., Shanghai

³Department of Food Science, National Taiwan Ocean University, Taiwan

Email: *gkbioeng@grapeking.com.tw

Received: Jun. 22nd, 2020; accepted: Jul. 10th, 2020; published: Jul. 17th, 2020

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the anti-influenza (H1N1) effect *in vitro* using submerge fermentation of *Sanghuangporus sanghuang* mycelia with cell test and analyze its active compound fractions. Three different timing (pre-treatment, co-treatment and post-treatment) of infection was used to evaluate the anti-influenza effect. MTS assay was used after treatment to analysis if *Sanghuangporus sanghuang* mycelia extracts can effectively lower the H1N1 virus cytotoxicity. The results showed that ethanol extract had better protective effect than the water extract. Next, the ethanol extract was partition to four fractions: water layer (PIH₂O), 1-butanol layer (PIBtOH), dichloromethane layer (PIDCM) and hexane layer (PIHex). Among these fractions, both PIBtOH and PIDCM showed that it can significantly improve the cell protective effect in the pre-treatment, co-treatment and post-treatment group ($p < 0.05$). Compared to the UPLC analysis of four fractions results, result showed that PIBtOH and PIDCM contain hispidin, but only PIBtOH contains hypholomine B (HB) in addition to hispidin. In this study, PIBtOH showed the best anti-influenza effect followed by PIDCM. In conclusion, we demonstrated that the effect of anti-influenza comes from hispidin and HB containing in submerge fermentation *Sanghuangporus sanghuang* mycelia.

Keywords

Influenza Type A (H1N1), Liquid Fermentation *Sanghuangporus sanghuang* Mycelia, Extract, Hypholomine B, Hispidin

*通讯作者。

液态发酵桑黄菌丝体抗A型流感(H1N1)病毒之效用评估

江玲慧¹, 李宜蓁¹, 朱心彤¹, 李宗儒¹, 赵 敞², 吴彰哲³, 陈劲初^{1*}

¹葡萄王生技股份有限公司, 台湾

²上海葡萄王企业有限公司, 上海

³国立台湾海洋大学食品科学系, 台湾

Email: *gkbioeng@grapeking.com.tw

收稿日期: 2020年6月22日; 录用日期: 2020年7月10日; 发布日期: 2020年7月17日

摘 要

本研究旨在利用细胞试验评估液态发酵桑黄(*Sanghuangporus sanghuang*)菌丝体萃取物之抗A型流感病毒(H1N1)的能力, 并进而分析活性所在之分层。实验使用MTS法评估桑黄菌丝体萃取物分别在预防、共培养以及治疗三种试验中减轻病毒对于宿主细胞的毒杀性的效果。结果显示酒萃物优于水萃物, 再将酒萃物进行层析分离, 共获得四种分层, 分别为水层(PIH₂O)、1-丁醇层(PIBtOH)、二氯甲烷层(PIDCM)以及己烷层(PIHex)。其中, 以PIBtOH、PIDCM两组在预防试验、共培养试验以及治疗试验中, 皆可见显著提升细胞存活率之效果($p < 0.05$)。对比四分层的UPLC图谱后发现, PIBtOH及PIDCM内皆含有较高的hispidin, PIBtOH另含有hypholomine B (HB), 抗病毒试验中则以PIBtOH最强, PIDCM次之, 因此推估液态发酵桑黄菌丝体之抗H1N1流感病毒功效可能来自于hispidin以及HB。

关键词

A型流感(H1N1), 液态发酵桑黄菌丝体, 萃取物, Hypholomine B, Hispidin

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

季节性流行性感冒是由流感病毒所引起的急性上呼吸道感染症, 病原为一种正黏液病毒科(Orthomyxoviridae)的滤过性病毒, 主要感染途径经由飞沫或直接接触病人的分泌物而感染, 病毒会在人类上呼吸道黏膜上皮细胞进行复制后, 破坏上皮细胞并且大量扩散与破坏, 进而造成肺炎, 引起的症状包括发烧、全身肌肉酸痛、头痛、咽喉发炎, 鼻炎, 偶尔会出现咳嗽及虚弱等症状[1]。此疾病可发生在所有的年龄层, 且幼童、老人(大于 65 岁)或慢性病患者由于免疫功能降低, 常引起严重的合并症如继发性细菌性肺炎(secondary bacterial pneumonia)、原发性病毒性肺炎(primary viral pneumonia)、脑炎(encephalitis)或脑病变(encephalopathy)、心肌炎(myocarditis)或心包膜炎(pericarditis)及雷氏症候群(Reye syndrome)等进而造成死亡, 且由于流感病毒传染速率极快, 往往在短时间内导致大量人口感染[2]。病毒

学分类中,流感病毒属于一种负向单股 RNA 病毒,依其所拥有之糖蛋白产生的抗原性蛋白,可分作 A、B、C 及 D 型四种,其中,尤以 A 及 B 型为目前被解析最具传染人类能力的类型。目前临床上已有针对流感所开发出的药物,例如克流感(Tamiflu®),为一种神经氨酸酶的特异性抑制剂,其抑制神经氨酸酶的作用,可以抑制成熟的流感病毒脱离宿主细胞,从而抑制流感病毒在人体内的传播,以起到治疗流行性感冒的作用。但因流感病毒属于 RNA 病毒,于分类学上属于具有及高变异性的病毒,若长时间使用药物治疗即可能产生病毒抗药性,而使治疗失效,且其用量亦受限于其药物毒性,用途上限制相当多,因此找出具有抗病毒效用的天然物质为非常需要的课题。

桑黄(*Sanghuangporus sanghuang*)为一种于中国被人类食用逾千年之久的药用真菌,其被认为具有良好的药用效果[3]。由于过去因形态学及分子鉴定技术不成熟,一度被误认其学名为 *Inonotus sanghuang*,直到 Wu 等人于 2012 年重新鉴定并确认为新属 *Sanghuangporus*,才正式改命名为 *Sanghuangporus sanghuang* [4]。菌种鉴定结果确认后,本报告所用之桑黄(*Sanghuangporus sanghuang*)菌丝体亦经菌种鉴定且已经过动物实验证实其安全性[5]。近来许多研究报告皆证实桑黄具有抗发炎、抗肿瘤、抗过敏、抗血管新生、抗氧化、调节血糖、调节血脂以及免疫调节之作用[6] [7]。上述各药理效用被认为是源自于桑黄子实体所含之小分子化合物(Low-molecular-weight compounds),例如, Hispidin 是一种被认为存于桑黄之中的独特多酚类化合物,此物质已被多数研究证实具有抗氧化[8]、抗肥胖[9]、抗癌[10]、抗病毒[11]、抗过敏[12]、抗菌以及抗过敏[13]等功效。而另一种被认为是桑黄活性成分的 Hypholomine B (HB)亦被确认为具有抗氧化、抗菌及抗病毒等功效[14],但 Hwang 等人所使用之样品为 *Phellinus baumii* 子实体,不仅分类与本实验室所用桑黄不同,本报告亦使用不同的培养方式及部位,桑黄(*Sanghuangporus sanghuang*)液态发酵菌丝体至今为止鲜少被探讨其抗病毒功效。

综合上述,本研究旨在探讨液态发酵培养之桑黄菌丝体是否可产生有效抑制 H1N1 流感病毒之感染功效成分,并探索最佳处理病毒模式,以期后续可以大量生产低廉辅助抗流感病毒之产品。

2. 材料与方法

2.1. 菌种

2.1.1. 来源

本篇报告所用桑黄菌丝体与 Li 等人于 2020 年所发表报告的样品相同,系由关西镇(台湾,新竹县)山区间采集之野生子实体中所分离而得。将菌丝体纯化培养后使用 Internal transcribed spacer (ITS)序列鉴定法鉴定真菌种类,在完成菌种鉴定后寄存于食品工业发展研究所[5],生物资源中心菌种编号为 BCRC930210。

2.1.2. 液态发酵菌丝体发酵条件

由桑黄菌丝体琼脂平板上取约 1 cm^3 之小方块投入装有 1.0 L 之配方培养基(内含 1%葡萄糖、0.3%酵母抽出物、0.05% MgSO_4 ,并将溶液调整至 pH 5)的 2 升大摇瓶内,使菌丝体于 25℃ 环境下以转速 120 rpm 之条件震荡培养 7 天,而后逐步由摇瓶接种至 500 L 以及 20 ton 发酵槽进行大量培养。经 10 天的培养后,所得之菌丝体发酵液则进行收槽加热、冻干以及磨粉程序,将桑黄菌丝体冻干粉存放于室温处,待进一步分析或萃取流程。

2.2. 样品制备与分析方法

2.2.1. 桑黄萃取物制备方法

菌丝体冻干粉称重后,将粉末与纯水以重量比 1:20 之比例混合加热 121℃, 30 分钟,而后将萃出

液体离心去除沉淀物，将上清液进行冷冻干燥即得水萃取物。酒萃取物则是将菌丝体冻干粉末用乙醇以重量比 1:20 之比例混浸泡震荡萃取 1 小时，连续萃取三次，合并萃取液经减压浓缩后，即获得酒萃取物。将得到的酒萃取物与依序与正己烷、二氯甲烷及正丁醇溶剂进行分配分离萃取(partition)，则获得正己烷层(PIHex)、二氯甲烷层(PIDCM)、正丁醇层(PIBtOH)及水层(PIH₂O)共四个分层，并分别进行 UPLC 分析及活性测试。

2.2.2. 萃取物分析法

以上四个分层利用逆相 UPLC (Agilent 1290 infinity II)进行分析，使用分析级管柱(kinetex 1.7 μ m C18 100 $\times$ 3 mm)，DAD 检测波长设在 380 nm，流动相为 0.1%甲酸:乙腈 = 85:15~60:40 (0~10 min)、60:40~0:100 (10~10.1 min)、0:100 (10.1~12 min)、0:100~85:15 (12~12.5 min)及 85:15 (12.5~15 min)，流速 1 ml/min 之条件下进行分析。Hispidin 标准品购自于 Sigma，HB 标准品则由本实验室自行纯化而得。

2.3. 病毒株

2.3.1. 来源

流感病毒株为 A 型流感病毒 A/WSN/33 (H1N1)，由中央研究院基因体研究中心詹家琮博士所提供，为 1993 年分离之病毒株。

2.3.2. 培养及增幅(Virus Amplify)

将 A 型流感病毒(H1N1)液注射 100 μ L (约 100 TCID₅₀)入 SPF (Specific pathogen free)鸡胚蛋的尿囊膜后以蜡封住洞口进行繁殖，放在培养箱中培养 1 至 2 天，再放入 4℃等待凝结，最后再将尿囊膜中液体抽出，置入-80℃保存。

2.4. 细胞株

2.4.1. 来源

MDCK (Madin-Darby Canine Kidney cells): 犬肾上皮细胞，购自食品工业研究所之生物资源中心 (Bioresource Collection and Research Center, BCRC)，细胞株编号为 BCRC 60004。

2.4.2. 细胞保存

细胞经计数后，将其浓度调整为 1×10^6 细胞/mL，添加培养液与最适培养浓度之 FBS，并加入 10% DMSO 作为抗冻剂，再注入冻管中。将冻管放入注满异丙醇(isopropanol)之渐冻盒，再置于-80℃隔夜后转存放于液态氮中保存。

2.4.3. 细胞活化

首先于细胞培养皿中加入 9 mL DMEM 及 1 mL FBS 备用，再将保存于-80℃冻藏柜或是液态氮中的细胞株在 37℃水浴槽中回温至稍有残冰，尔后吸出细胞液至先前准备好的培养液中，置于 37℃及 5% CO₂ 之培养箱中培养。

2.4.4. 细胞培养及继代(Cell Culture and Passage)

当细胞长到八分满的时进行继代培养，首先吸除旧有细胞培养液，用磷酸缓冲生理食盐水 PBS 洗去残留的血清及代谢物，加入 1 mL 胰蛋白酶 trypsin-EDTA 后，置于 37℃下作用 3~5 分钟，轻拍细胞盘侧促使贴附于盘底之细胞脱落，镜检确认细胞被切下后，以 0.5 mL 胎牛血清 FBS 中止胰蛋白酶的作用，以 DMEM medium 冲下细胞并收集于 50 mL 离心管中进行离心(条件设定为 500 $\times$ g, 5 分钟, 4℃)，

而后吸除上清液，再以 DMEM medium 回溶沉淀之细胞并进行计数，将细胞浓度调整为 3×10^5 细胞/盘，最后种于细胞培养皿，并加入含有 10% FBS 之 DMEM medium 共 10 mL，培养于 37℃ 及 5% CO₂ 之培养箱。

2.5. 细胞存活率试验(Cell Viability Assay)

将 1×10^4 细胞/孔的 MDCK 种在 96 孔盘中，置于含有 37℃ 与 5% CO₂ 培养箱中培养 24 小时后，再分别加入不同浓度之桑黄萃取物作用 48 小时，利用 MTS assay 测其细胞存活率。培养液与 MTS reagent 添加的比例为 5:1，将 MTS reagent 加入细胞液后，于培养箱中避光反应 1 小时，再使用 ELISA reader 在 490 nm 测量其吸光值进行计算。

2.6. 桑黄萃取物对于 H1N1 病毒感染之影响

先将桑黄水萃物和酒萃物分别以 PBS 以及 DMSO 溶解至适当浓度，将 MDCK 培养至 96 孔盘内，隔夜培养待细胞贴附后，以 MTS assay 测定桑黄萃取物对 H1N1 于不同感染时间点于 MDCK 存活率之效果。

2.6.1. 预防试验(Pre-Treatment)

在病毒吸附阶段前，于细胞中加入不同浓度桑黄萃取液于培养箱中作用 1 小时，吸除培养液后再加入 m.o.i. = 0.05 (病毒感染剂量 multiplicity of infection, MOI) 之 H1N1 溶液与细胞于培养箱作用 1 小时，移除培养液并加入含 2% FBS 之新鲜 DMEM 培养液，于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 48 小时，最后以 MTS assay 测其细胞存活率。

2.6.2. 共培养试验(Co-Treatment)

将不同浓度之桑黄萃取液与 m.o.i. = 0.05 之 H1N1 共培养 1 小时，之后将各浓度混和液分别加入细胞中于培养箱作用 1 小时，移除原培养液并加入含 2% FBS 之新鲜 DMEM 培养液，于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 48 小时，最后以 MTS assay 测其细胞存活率。

2.6.3. 治疗试验(Post-Treatment)

于细胞中加入 m.o.i. = 0.05 之 H1N1 并放入培养箱中作用 1 小时，吸除培养液后分别加入不同浓度之桑黄萃取液再于培养箱中作用 1 小时，移除原培养液并加入含 2% FBS 之新鲜 DMEM 培养液，于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 48 小时，最后以 MTS assay 测其细胞存活率。

2.7. 统计分析

实验数据结果以平均值标准偏差 mean $\pm$ SD 表示，主要以 Student's t-test 进行统计分析，当 $p < 0.05$ 表示在统计上具有显著差异，以*代表；当 $p < 0.01$ ，则以**表示之。

3. 实验结果

3.1. 桑黄菌丝体水、酒萃物抗 H1N1 之效用

进行桑黄萃取物抗病毒试验前，先评估其对于病毒宿主细胞 MDCK 是否具有毒性影响。桑黄酒萃物以 DMSO 由最高浓度 2 mg/mL 连续对半稀释至 0.0625 mg/mL，水萃物则以 PBS 从最高浓度 2 mg/mL 连续对半稀释至 0.0625 mg/mL，进行 MTS 评估，结果显示桑黄酒萃物于 0.25 mg/mL 对于 MDCK 的细胞存活率大于 80%；桑黄水萃物则于 1 mg/mL 对于 MDCK 细胞的细胞存活率大于 80%，后续将以此浓度进行实验(图 1)。

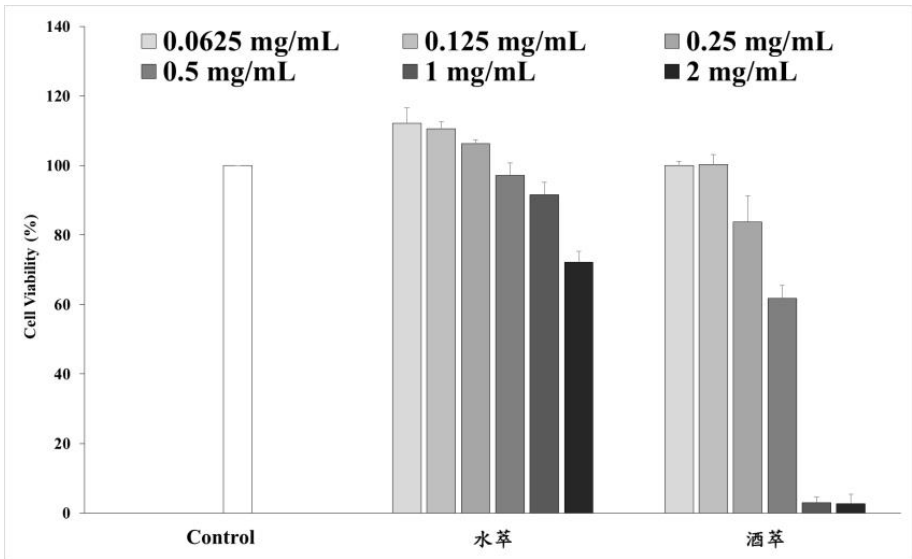


Figure 1. Effects of *Sanghuangporus sanghuang* extractions on cell viability of MDCK cells
图 1. 桑黄萃取物对 MDCK 细胞的存活率

3.1.1. 预防

预防试验结果显示，桑黄酒萃物以及水萃物皆无法有效改善因 H1N1 病毒感染所造成的细胞毒杀现象(图 2)。

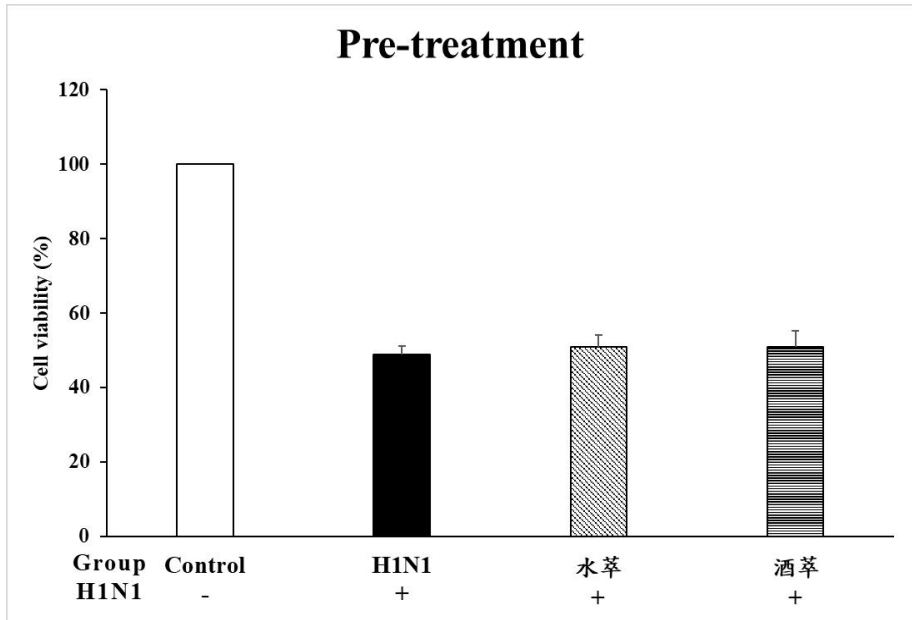


Figure 2. Pre-treatment effects of *Sanghuangporus sanghuang* extractions on cell viability with H1N1 infection
图 2. 桑黄萃取物对于受 H1N1 病毒感染之细胞的存活率影响(预防试验)

3.1.2. 共培养

共培养处理的桑黄酒萃物之细胞存活率与 H1N1 组相比增加 26.3% ($p < 0.01$)；水萃物则与 H1N1 组无显著差异(图 3)。

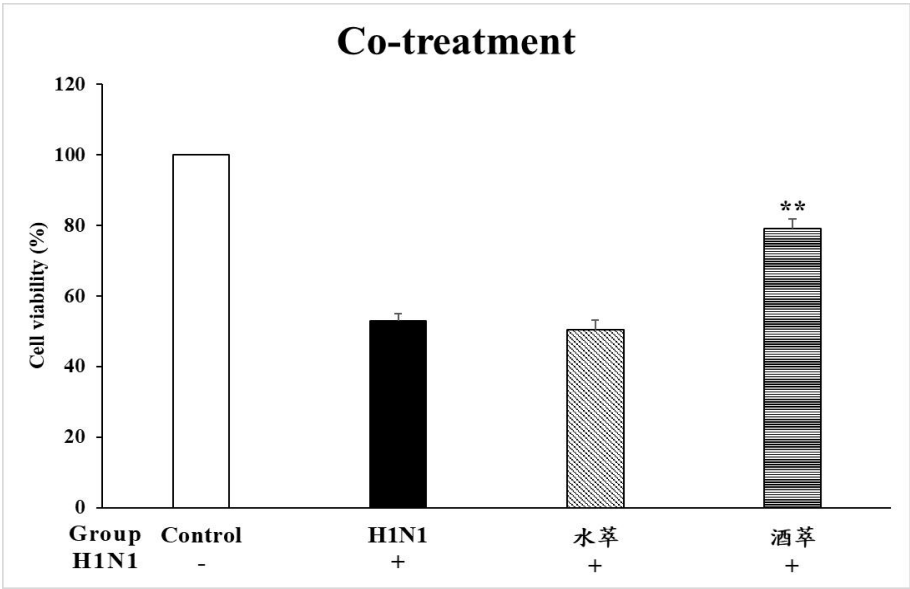


Figure 3. Effects of *Sanghuangporus sanghuang* extracts on cell viability after co-treatment with H1N1 infection
图 3. 桑黄萃取物对于受 H1N1 病毒感染之细胞的存活率影响(共培养试验)

3.1.3. 治疗

桑黄酒萃取物组于攻毒后治疗试验中之细胞存活率与 H1N1 组相比提升了 4.5% ($p < 0.01$)；水萃物之细胞存活率则与 H1N1 组无显著差异，无助于减缓病毒毒杀作用(图 4)。

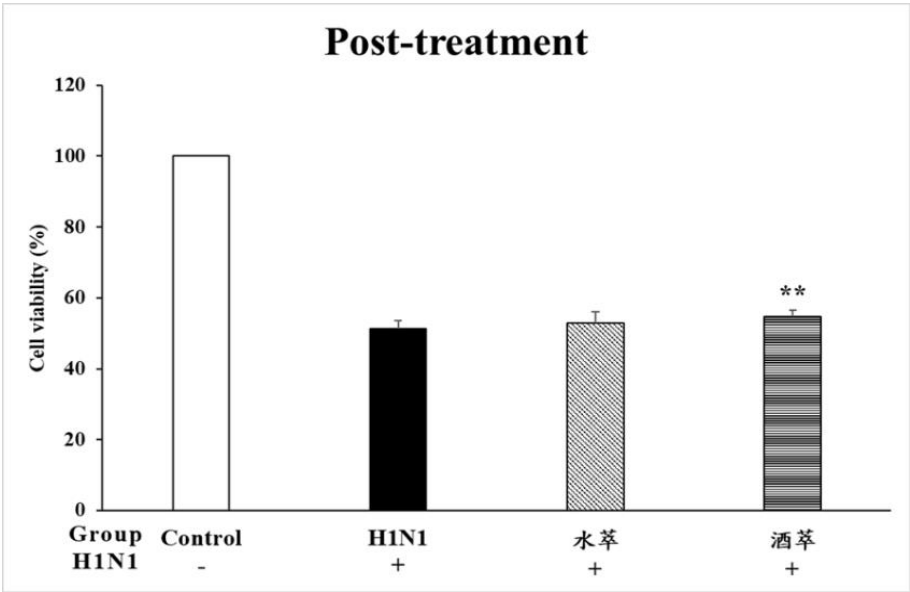


Figure 4. Effects of *Sanghuangporus sanghuang* extracts on cell viability with H1N1 infection (Post-treatment)
图 4. 桑黄萃取物对于受 H1N1 病毒感染之细胞的存活率影响(治疗试验)

3.2. 桑黄酒萃取物分层抗 H1N1 之效用

首先以 MTS assay 再次评估桑黄酒萃取物分层在不同浓度下对 MDCK 之毒杀性，依据实验结果挑选存

活率大于 80%之浓度作为后续抗病毒试验之最高剂量，因此将 PIH₂O、PIEtOH、PIDCM、PIHex 的最高浓度分别设定为 500、62.5、125、500 $\mu\text{g/mL}$ (图 5)。

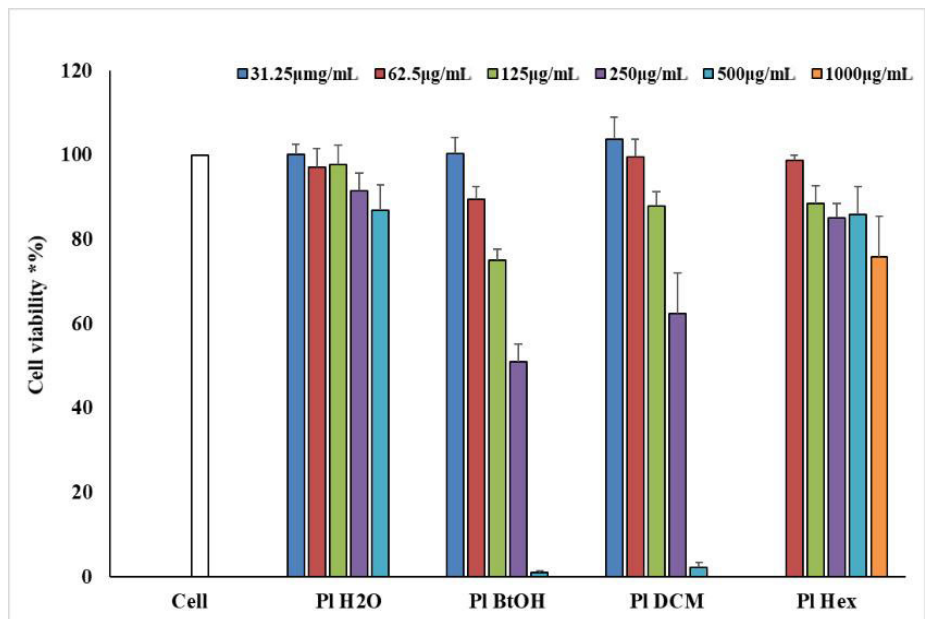


Figure 5. Effects of *Sanghuangporus sanghuang* extract partition on cell viability of MDCK cells
图 5. 桑黄萃取物分层对 MDCK 细胞的存活率之影响

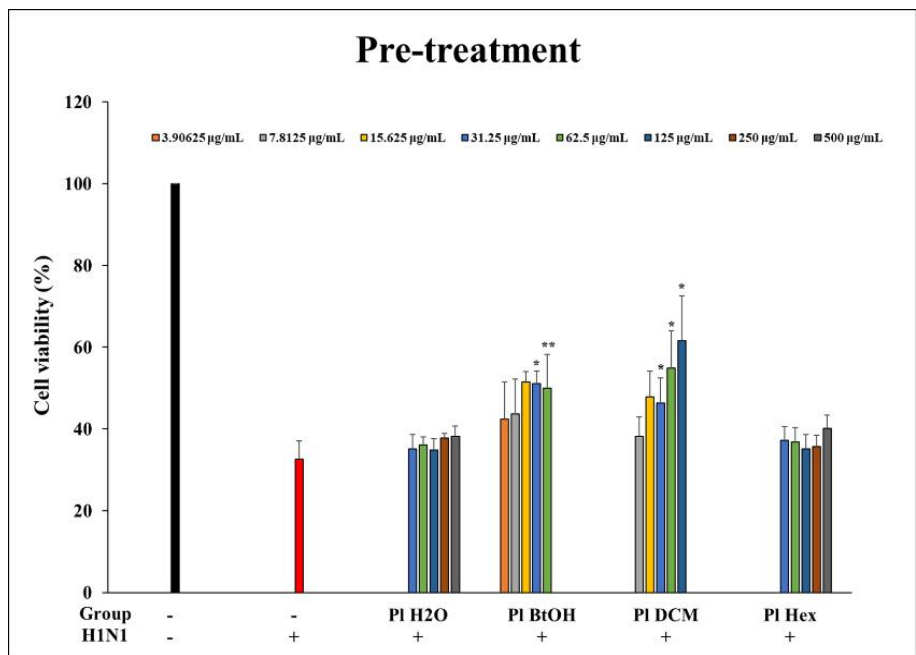


Figure 6. Effects of *Sanghuangporus sanghuang* extract partition on cell viability with H1N1 infection (Pre-treatment)

图 6. 桑黄萃取物分层对于受 H1N1 病毒感染之细胞的存活率影响(预防试验)

3.2.1. 预防

预防处理时，与 H1N1 组相比，500 $\mu\text{g/mL}$ 的 PIH₂O、PIHex 组之细胞存活率分别提升 5.65% ($p < 0.05$)、

7.54% ($p < 0.05$), 且 PIH₂O 于 250 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下仍然具有显著差异; 而 125 $\mu\text{g/mL}$ 的 PIDCM 之细胞存活率提升 29.09% ($p < 0.05$), 且 PIDCM 于 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下仍然具有显著差异; 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 PIBtOH 之细胞存活率提升 17.42% ($p < 0.001$), 且于 31.25 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下仍然具有显著差异(图 6)。

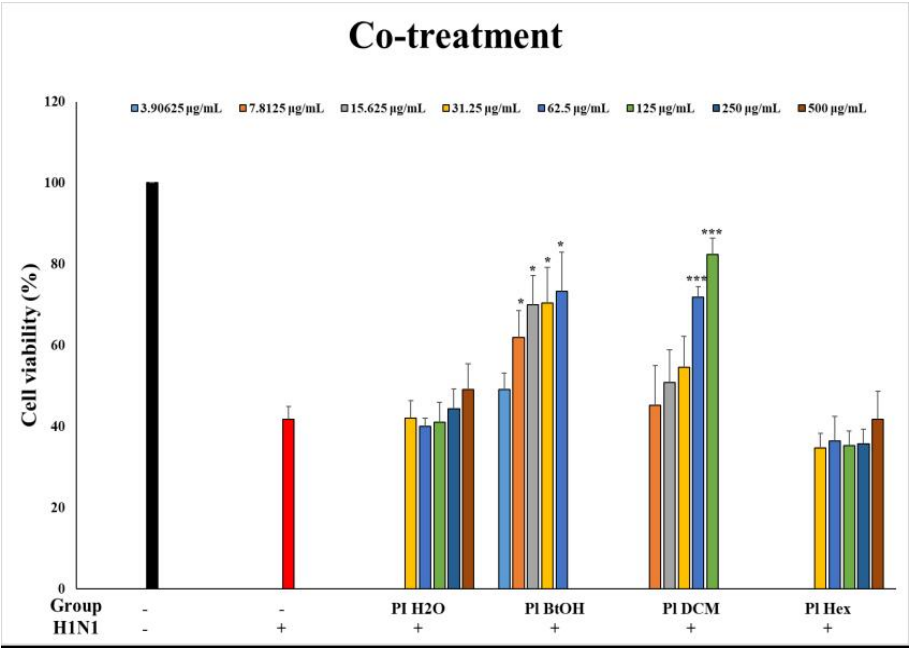


Figure 7. Effects of *Sanghuangporus sanghuang* extract partitions on cell viability with H1N1 infection (Co-treatment)

图 7. 桑黄萃取物分层对于受 H1N1 病毒感染之细胞的存活率影响(共培养试验)

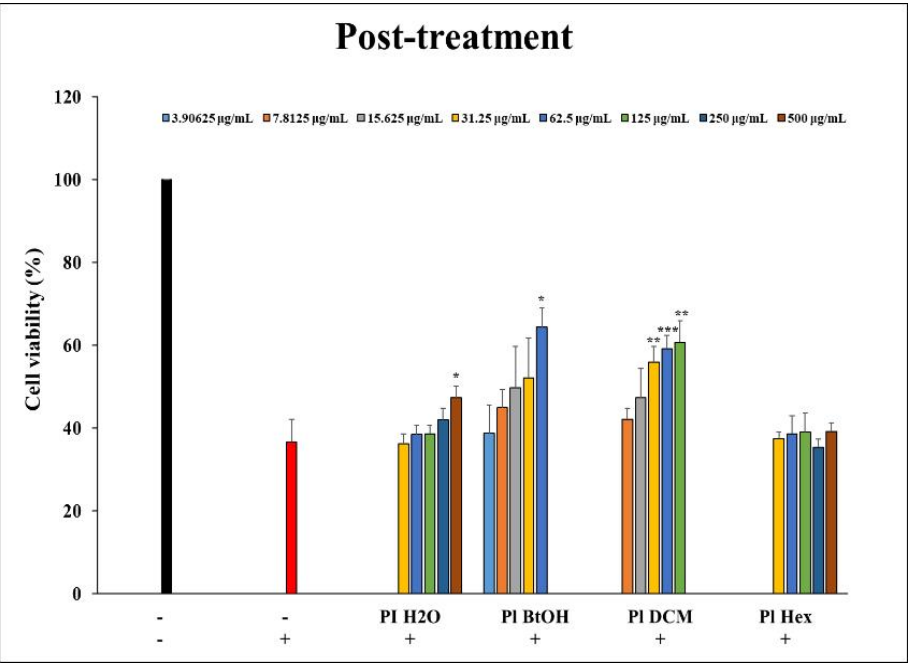


Figure 8. Effects of *Sanghuangporus sanghuang* extract partition on cell viability with H1N1 infection (Post-treatment)

图 8. 桑黄萃取物分层对于受 H1N1 病毒感染之细胞的存活率影响(治疗试验)

3.2.2. 共培养

共培养处理条件下与 H1N1 组相比, 125 $\mu\text{g/mL}$ 的 PIDCM 之细胞存活率提升 40.67% ($p < 0.001$), 且于 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 仍具有显著差异; 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 PIBtOH 之细胞存活率则提升 31.56% ($p < 0.05$), 低至于 7.8125 $\mu\text{g/mL}$ 时也仍具有显著差异, 且呈现剂量效应(图 7)。

3.2.3. 治疗

治疗处理条件时, 与 H1N1 组相比, 500 $\mu\text{g/mL}$ 的 PIH₂O 之细胞存活率提升 10.67% ($p < 0.05$); 125 $\mu\text{g/mL}$ 的 PIDCM 之细胞存活率提升 23.97% ($p < 0.01$), 且于 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 仍具有显著差异; 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 PIBtOH 之细胞存活率则提升 27.65% ($p < 0.05$) (图 8)。

3.3. UPLC 分析结果

比对标准品及数据库后, 于滞留时间 3.36 min 及 3.99 min, 分别得到化合物 Hispidin 及 Hypholomin B 讯号。结果显示, 四种桑黄酒萃分层中, PIH₂O、PIBtOH 及 PIDCM 图谱皆出现明显的 Hispidin 讯号, 但其中仅 PIBtOH 分层的图谱中同时也侦测到 HB 的讯号(表 1)。

Table 1. UPLC chromatogram

表 1. UPLC 分析结果

样品	Hispidin (ppm)	HB (ppm)
PIHex	0	0
PIDCM	122.67	0
PIBtOH	120.99	44.28
PIH ₂ O	1.16	0

4. 讨论

本次采用之桑黄菌丝体, 为自行于台湾采集之子实体中所分离而得, 并完成菌种鉴定及多项动物实验确认其食用安全性, 且可稳定大量培养[5]。实验以 H1N1 病毒感染 MDCK 犬肾细胞作为感染模式, 评估经样品处理后是否可以提升因病毒感染而下降的细胞存活率, 为一种广泛被使用的细胞筛选模式。结果显示, 桑黄酒萃物在共培养以及治疗试验中的效果都显著优于水萃物, 但两样品于预防试验中皆未看见明显保护作用。水萃物在三项处理模式中皆未见到显著的活性, 根据 Chiu 等人于 2012 年的研究指出, 大分子物质如多醣可能会藉由包覆病毒颗粒或是覆盖于宿主细胞表面抑制病毒感染进而达到保护及预防感染的效果[15], 对比本报告之研究结果显示, 并未见到如上所述的现象, 反观酒萃物则可显著提升细胞存活率, 桑黄酒萃物中多为多酚类以及色素等小分子物质[16], 除了被指出可调节巨噬细胞之免疫反应外[17], 于体外试验中发现其亦可能直接作用于流感病毒表面膜蛋白, 降低其感染活性[14], 但也不排除为实验过程中酒萃物添加后, DMSO 浓度被稀释, 导致溶解度降低而析出沉淀于细胞表面, 遮蔽病毒感染点进而达到抗病毒效用, 所以仍需进行动物实验。

将酒萃物进行分层纯化, 依其极性分作四层, 分离萃取(partition)获得正己烷层(PIHex)、二氯甲烷层(PIDCM)、正丁醇层(PIBtOH)及水层(PIH₂O)共四个分层, 分别进行 UPLC 分析及活性测试。结果显示无论是在预防、共培养或是治疗试验组, 活性集中在二氯甲烷层(PIDCM)、正丁醇层(PIBtOH)两组, 且其效果相当(共培养组存活率约在 70%), 并皆显著优于正己烷层(PIHex)及水层(PIH₂O) (共培养组存活率约在 40%)。另, 三种处理模式中, 以共培养最佳, 治疗效果次之, 预防结果为末。

为探究其实际作用之活性物质, 经比对 UPLC 分析后, 结果如表 1, 发现 Hispidin 含量分别为 PIH₂O

1.16 ppm、PIBtOH 120.99 ppm 及 PIDCM 122.67 ppm, 而 HB 则仅被发现于 BtOH 层(44.28 ppm); 由于共培养试验中 PIDCM 组内未发现 HB, 但仍具有活性, 故推测 Hispidin 可能为活性成分之一。又由于 PIBtOH 最低有效浓度为 7.2 ug/mL, 而 PIDCM 则为 125 ug/mL, 两者作用浓度相差近 18 倍, 故推测 HB 可能为另一个更有效的抗病毒活性成分。此与 Hwang 等人之研究成果相符[14], HB 之活性优于 Hispidin, 至于最强的 Phelligradin D 则因缺乏标准品而未能评估。

本次实验中, 发现到无论是桑黄萃取物或是其分层, 皆属共培养试验模式最为有效, 基于其试验设计, 乃会先将样品与病毒进行接触混合一小时, 再将其混合液与细胞接触进行攻毒, 而此结果即造成病毒感染力下降, 由此推测可能是样品即可直接对于病毒产生影响, 使其对于细胞的杀伤力下降, 而产生保护效果。另外, 预防试验的保护效果皆不如治疗试验组, 此现象与现今讨论度极高之抗病毒药物瑞德西韦(Remdesivir)雷同, 亦是治疗效果胜于预防, 其药理机制为当病毒感染进入细胞后, 准备进行复制时, 作用在病毒用以复制(replication)自身核酸所用之复制酶(RNA replicase), 进而使病毒无法顺利于感染细胞内增殖, 达到阻断细胞被进一步感染的危机, 此现象与文献[14]吻合, 桑黄内多酚类物质可有效降低 A 型流感病毒膜蛋白上神经氨酸酶(neuraminidase, NA)之活性, 抑制流感病毒于宿主细胞内完成复制后, 裂解细胞进行下一步感染的流程[18]。为验证此构想, 虽以本篇研究报告中的数据仍不够解释, 但可后续设计不同感染时间点其细胞内病毒表现量, 进而推断是否作用于复制酶。预防试验之设计为将样品先与细胞接触一个小时候, 以 PBS 洗去多余样品再加入病毒进行感染, 却未见有效果, 推测为先进入细胞之桑黄成份可能已被代谢转化, 因此酒萃物及其分层内的活性物质无法确实于预防模式中发挥抗病毒效用。后续将进行动物试验以了解活体功效。

5. 结论

本实验证实, 以液态发酵培养之桑黄菌丝体萃取物可有效缓解 MDCK 细胞因 H1N1 感染而导致的死亡现象, 达到保护效果, 且以共培养方式可产生最佳的抗病毒效果, 并证明液态培养亦能产生 Hispidin 以及 HB 两种存在于桑黄子实体内的活性成分。

参考文献

- [1] La Gruta, N.L., Kedzierska, K., Stambas, J. and Doherty, P.C. (2007) A Question of Self-Preservation: Immunopathology in Influenza Virus Infection. *Immunology and Cell Biology*, **85**, 85-92. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100026>
- [2] Heymann, D.L. (2007) The World Health Report 2007: A Safer Future: Global Public Health Security in the 21st Century. World Health Organization, Geneva.
- [3] Chen, H., Tian, T., Miao, H. and Zhao, Y.Y. (2016) Traditional Uses, Fermentation, Phytochemistry and Pharmacology of *Phellinus linteus*: A Review. *Fitoterapia*, **113**, 6-26. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.06.009>
- [4] Wu, S.H., Dai, Y.C., Hattori, T., Yu, T.W., Wang, D.M., Parmasto, E., Chang, H.Y. and Shin, S.Y. (2012) Species Clarification for the Medicinally Valuable “Sanghuang” Mushroom. *Botanical Studies*, **53**, 135-149.
- [5] Li, I.C., Chen, C.C., Sheu, S.J., Huang, I.H. and Chen, C.C. (2020) Optimized Production and Safety Evaluation of Hispidin-Enriched *Sanghuangporus sanghuang* Mycelia. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 1-10.
- [6] Liu, Y., Wang, C., Li, J., Mei, Y. and Liang, Y. (2019). Hypoglycemic and Hypolipidemic Effects of *Phellinus linteus* Mycelial Extract from Solid-State Culture in a Rat Model of Type 2 Diabetes. *Nutrients*, **11**, 296. <https://doi.org/10.3390/nu11020296>
- [7] Sliva, D. (2010) Medicinal Mushroom *Phellinus linteus* as an Alternative Cancer Therapy. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **1**, 407-411. <https://doi.org/10.3892/etm.00000063>
- [8] Park, I.H., Chung, S.K., Lee, K.B., Yoo, Y.C., Kim, S.K., Kim, G.S. and Song, K.S. (2004) An Antioxidant Hispidin from the Mycelial Cultures of *Phellinus linteus*. *Archives of Pharmacal Research*, **27**, 615. <https://doi.org/10.1007/BF02980159>
- [9] Tu, P.T.B. and Tawata, S. (2014) Anti-Obesity Effects of Hispidin and Alpinia Zerumbet Bioactives in 3T3-L1 Adipocytes. *Molecules*, **19**, 16656-16671. <https://doi.org/10.3390/molecules191016656>

- [10] Lim, J.H., Lee, Y.M., Park, S.R., Kim, D.H. and Lim, B.O. (2014) Anticancer Activity of Hispidin via Reactive Oxygen Species-Mediated Apoptosis in Colon Cancer Cells. *Anticancer Research*, **34**, 4087-4093.
- [11] Awadh Ali, N.A., Mothana, R.A.A., Lesnau, A., Pilgrim, H. and Lindequist, U. (2003) Antiviral Activity of *Inonotus hispidus*. *Fitoterapia*, **74**, 483-485. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(03\)00119-9](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(03)00119-9)
- [12] Tamrakar, S., Fukami, K., Parajuli, G.P. and Shimizu, K. (2018) Antiallergic Activity of the Wild Mushrooms of Nepal And the Pure Compound Hispidin. *Journal of Journal of Medicinal Food*, **22**, 225-227. <https://doi.org/10.1089/jmf.2018.4267>
- [13] Shao, H.J., Jeong, J.B., Kim, K.J. and Lee, S.H. (2015) Anti-Inflammatory Activity of Mushroom-Derived Hispidin through Blocking of NF-kappaB Activation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **95**, 2482-2486. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6978>
- [14] Hwang, B.S., Lee, I.K., Choi, H.J. and Yun, B.S. (2015) Anti-Influenza Activities of Polyphenols from the Medicinal Mushroom *Phellinus baumii*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **25**, 3256-3260. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.05.081>
- [15] Chiu, Y.H., Chan, Y.L., Tsai, L.W., Li, T.L. and Wu, C.J. (2012) Prevention of Human Enterovirus 71 Infection by Kappa Carrageenan. *Antiviral Research*, **19**, 128-134. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.05.009>
- [16] Lin, W.C., Deng, J.S., Huang, S.S., Wu, S.H., Lin, H.Y. and Huang, G.J. (2017) Evaluation of Antioxidant, Anti-Inflammatory and Anti-Proliferative Activities of Ethanol Extracts from Different Varieties of Sanghuang Species. *RSC Advances*, **7**, 7780-7788. <https://doi.org/10.1039/C6RA27198G>
- [17] Zhang, M.D., Xie, Y., Su, X., Liu, K., Zhang, Y.J., Pang, W.Y. and Wang, J.P. (2019) *Inonotus sanghuang* Polyphenols Attenuate Inflammatory Response via Modulating the Crosstalk between Macrophages and Adipocytes. *Frontiers in Immunology*, **10**, 286. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00286>
- [18] Chen, Y.Q., Wohlbold, T.J., Zheng, N.Y., Huang, M., Huang, Y.P., Karlynn, E.N., Lee, J.W., Wan, H.Q., Karla, T.R., Ericka, K.P., Carole, H., Anna-Karin E.P., Christopher, T.S., Yu, L.L., Topham, D., Treanor, J., Wrammert, J., Ahmed, R. and Wilson, P.C. (2018) Influenza Infection in Humans Induces Broadly Cross-Reactive and Protective Neuraminidase-Reactive Antibodies. *Cell*, **5**, 417-429.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.030>