

Evaluation of Effectiveness of Liquid Fermented *Lignosus rhinocerus* Mycelium against H1N1 Influenza Virus Infections

Jingyi Lin¹, Chang Zhao², Chang-Jer Wu³, Chinchu Chen^{1,4,5,6*}

¹Grape King Bio Ltd., Taoyuan Taiwan

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

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

⁴School of Pharmacy, China Medical University, Taichung Taiwan

⁵Department of Food Science, Nutrition, and Nutraceutical Biotechnology, Shih Chien University, Taipei Taiwan

⁶Bioscience Technology, Chung Yuan Christian University, Taoyuan Taiwan

Email: *gkbiocn@grapeking.com.cn

Received: May 5th, 2020; accepted: May 19th, 2020; published: May 26th, 2020

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the *in vitro* anti-influenza A virus (H1N1) potential of extracts from liquid fermented *Lignosus rhinocerus* mycelia and identify the active compounds that may be responsible. Cytotoxicities of *Lignosus rhinocerus* mycelia extracts were first determined using MTS assay, by means of time-of-addition experiments: pre-treatment, simultaneous treatment, and post-treatment. As the ethanol extract exhibited a higher survival rate than the aqueous extract, it was then further subjected to differential bioguided fractionation. A total of four fractions, namely aqueous (Lr H2O), butanol (Lr BtOH), ethyl acetate (Lr EA) and hexane (Lr Hex) were obtained from the ethanol extract of *Lignosus rhinocerus* mycelia using partitioning process. Among these fractions, Lr H2O and Lr Hex significantly enhanced the cell survival rate in the simultaneous treatment and post-treatment tests. Conclusively, these findings suggest that ethanolic extract from liquid fermented *Lignosus rhinocerus* mycelia may contain two anti-H1N1 influenza virus compounds through bioguided fractionation, as the polarities of these two components are very different.

Keywords

Influenza Type A (H1N1), Submerge Fermentation, *Lignosus rhinoceros* Mycelia, Extract

液态发酵虎乳灵芝菌丝体抗A型流感(H1N1)病毒之效用评估

*通讯作者。

文章引用: 林靖倚, 赵敞, 吴彰哲, 陈劲初. 液态发酵虎乳灵芝菌丝体抗A型流感(H1N1)病毒之效用评估[J]. 食品与营养科学, 2020, 9(2): 201-210. DOI: 10.12677/hjfn.2020.92027

林靖倚¹, 赵 敞², 吴彰哲³, 陈劲初^{1,4,5,6*}

¹葡萄王生技股份有限公司, 台湾 桃园

²上海葡萄王企业有限公司, 上海

³海洋大学食品科学系, 台湾 基隆

⁴中国医药大学药学系, 台湾 台中

⁵实践大学食品营养与保健生技学系, 台湾 台北

⁶中原大学生物科技学系, 台湾 桃园

Email: gkbiocn@grapeking.com.cn

收稿日期: 2020年5月5日; 录用日期: 2020年5月19日; 发布日期: 2020年5月26日

摘 要

本研究以MDCK犬肾上皮感染H1N1流感病毒模式, 评估液态发酵虎乳灵芝(*Lignosus rhinocerus*)菌丝体萃取物之抗A型流感病毒(H1N1)能力, 其中使用MTS法测定病毒或萃取物对宿主细胞之毒杀性, 再依药物与病毒作用时间点之不同, 分别设定为萃取物预处理、共处理以及后处理三组。结果显示酒萃物之保护效果在共处理组明显优于水萃物, 因此将同一批次之虎乳灵芝菌丝体酒萃物进行层析纯化, 共获得四种分层, 分别为水层(Lr H2O)、正丁醇层(Lr BtOH)、乙酸乙酯层(Lr EA)以及正己烷层(Lr Hex)。其中, 以Lr H2O、Lr Hex两组在共处理试验(分别为 $p < 0.01$, $p < 0.001$)以及后处理试验(分别为 $p < 0.01$, $p < 0.01$)中皆可见显著提升细胞存活率之效果。因此两种成分的极性差异悬殊, 故推估液态发酵虎乳灵芝菌丝体的酒萃物中可能具有两种抗H1N1流感病毒之功效成分。

关键词

A型流感(H1N1), 液态发酵虎乳灵芝菌丝体, 萃取物

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

流感病毒属于正黏液病毒科(Orthomyxoviridae), 其遗传物质为 RNA, 根据其核蛋白(nucleoprotein)的差异, 可区分为 A、B、C 三型。新型 H1N1 流感病毒是 A 型流感病毒的一种, 也是人类最常感染的流感病毒之一。该病毒首次暴发于 2009 年春天, 由于在人群中快速传播的能力, 感染全球 200 多个国家估计影响人数超过 100 万人。有至少 20,000 证实死亡, 而死亡病患大多是 20 到 40 岁的壮年人。典型的临床症状与季节性流感类似, 包括发烧、咳嗽、喉咙痛、全身酸痛、头痛、发冷与疲劳, 最后出现严重的肺炎, 有些病例则会出现腹泻、呕吐症状[1]。H1N1 原是一种于猪只中感染的疾病, 并且包含多种猪流感病毒株的基因, 但除了来自不同的猪流感病毒的基因外, 其中还发现了包含人类和禽流感病毒的遗传物质。因此认为 H1N1 病毒是通过基因重排进化而来的。疫苗注射虽是目前减低流感冲击最有效的方法, 但依然不可能及时生产和施用有效疫苗来中止正在进行的全球大流行, 因此近年来利用抗病毒药物来治疗及预防流感亦已成为另一种防治的策略。现阶段获准使用的抗病毒药物包括金刚胺(amantadine)、金刚烷乙胺(rimantadine)、瑞乐沙(zanamivir)、及克流感(oseltamivir)等四种。依据目前现有的各种资料,

这四种药物在对于减少 A 型流感的发病病程上仅限于那些没有并发症的患者有效, 也没有任何资料显示这些药物可以减缓流感并发症。此外在中枢神经、胃肠的药物副作用及长时间使用药物治疗可能产生的病毒抗药性, 亦是医师用药时的考量。由于用途上限制相当多, 因此找出具有抗病毒效用的天然物质为非常需要正视的课题。

虎乳灵芝(*Lignosus rhinocerus*)为传统中草药, 在中国及马来西亚具有相当悠久的食用历史。完整的虎乳灵芝子实体惟菌核具有功效, 而菌核实为菌丝体聚集而成, 生长于土壤中。由于野外数量极低, 被当地居民视为珍贵药材, 在马来西亚甚至称之为国宝, 2005 年中国也将虎乳灵芝列在中国最有开发前景的主要药用真菌名单之内[2]。中医学上将虎乳灵芝用于治疗胃溃疡和肝脏相关疾病如慢性肝炎和肝癌[3]。明朝李时珍于《草本纲目》中亦有记载, 虎乳灵芝具有治疗胃病、哮喘及高血压的功能。研究指出, 虎乳灵芝含有高达 33.95% 的 β -葡聚糖, 具调节免疫力[4] [5] [6]、抗发炎[7]、抑制癌细胞增生[8] [9] 的能力且对正常细胞没有毒杀作用。此外虎乳灵芝更被指出具有抗氧化性[10] [11] 及神经刺激作用[12]。亦有文献指出虎乳灵芝具有抗登革热病毒及 HIV-1 病毒之效果[13] [14]。

综合上述, 本研究旨在探讨液态发酵培养之虎乳灵芝菌丝体是否可产生有效抑制 H1N1 流感病毒之感染功效及成分, 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

本篇报告所用虎乳灵芝菌丝体取自马来西亚虎乳灵芝朵菌种分离纯化, 并以 ITS-1 引子进行菌珠 DNA 序列分析(表 1), 经由 NCBI 之 BLAST Search 比对证实所纯化获得之菌种与虎乳灵芝序列具有 99% 相似度。序列比对结果如下: ITS1 Lr-230 bp (定序公司: 明欣生物科技有限公司)

```
GGGTTGTAGCTGGCTTTCTCCGGGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCAATCCACACTCTTACACCTGT
GCACTCACTGTGGGTTTTTCAGCCGGCGTTTGCATCCGTGCGGCGTTGACTGTGGGCCTGCGTTATCC
ACTACAAACCACACTGTCAGTATCAGAATGTTTCATACGTTTGCGATGTTCAAACGCATAATTACAA
CTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCAT
```

Table 1. Sequence analysis (ITS-1)

表 1. ITS-1 序列鉴定结果[9]

Sample	Query coverage	MAX identity	Gaps
<i>Lignosus rhinocerus</i>	100%	229/230 (99%)	1/230 (0%)

2.1.2. 液态发酵菌丝体发酵条件

切取虎乳灵芝菌丝体琼脂平板约 1 cm³ 之小方块接种至 2 L 之三角摇瓶(内含 2% 葡萄糖、0.6% 酵母抽出物、0.03% MgSO₄, 并将溶液调整至 pH 5), 并于 25℃、转速 120 rpm 之条件下震荡培养 7 天, 而后逐步由摇瓶接种至 500 L 以及 20 ton 大型发酵槽。经 10 天的培养后, 加热所得之菌丝体发酵液再经过浓缩冻干以及磨粉等程序, 即可进一步分析或萃取。

2.2. 样品制备与分析方法

虎乳灵芝菌丝体萃取物之制备

将虎乳灵芝菌丝体冻干粉末与纯水依重量比 1:20 之比例混合, 超音波震荡 1 小时后将去除沉淀物之上清液进行冷冻干燥即得水萃取物。另将虎乳灵芝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, 过滤后的萃取液经减压浓缩即为酒萃取物。接着将酒萃取物依序与正己烷、乙酸乙酯及正丁醇溶剂进行三次十倍比例之分配分离萃取(Partition), 即可得正己烷层(LrHex)、乙酸乙酯层(LrEA)、正丁醇层(LrBtOH)及水层(LrH₂O)共四个分层, 可分别进行活性测试。

2.3. 病毒株

2.3.1. 来源

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, 在 1993 年分离之病毒株。

2.3.2. 培养及增幅 (Virus amplify)

将 100 μ L (约 100 TCID₅₀) A 型流感病毒(H1N1)液注射入 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, 再将尿囊膜中液体抽出, 置于-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, 细胞株编号为 BCRC 60004。购自食品工业研究所之生物资源中心(Bioresource Collection and Research Center, BCRC)。

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 xg, 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虎乳灵芝萃取物作用 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. 虎乳灵芝菌丝体萃取物对于 H1N1 病毒感染之影响

先将虎乳灵芝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, 于不同感染时间点以 MTS assay 测定虎乳灵芝萃取物对 H1N1 感染 MDCK 存活率之影响。

2.6.1. 预处理试验(Pre-treatment)

先于细胞中加入不同浓度虎乳灵芝萃取液于培养箱中作用 1 小时, 吸除培养液, 再加入 $\text{moi} = 0.05$ (病毒感染剂量 Multiplicity of infection, MOI) 之 H1N1 溶液, 置于培养箱作用 1 小时, 再移除培养液并加入含 2% FBS 之新鲜 DMEM 培养液, 继续于 5% CO_2 、37°C 下培养 48 小时, 最后以 MTS assay 测其细胞存活率。

2.6.2. 共处理试验(Co-treatment)

将不同浓度之虎乳灵芝萃取液与 $\text{moi} = 0.05$ 之 H1N1 先混合共培养 1 小时后, 将各浓度混和液分别加入细胞中, 于培养箱作用 1 小时, 再移除原培养液, 并随即加入含 2% FBS 之新鲜 DMEM 培养液, 于 5% CO_2 、37°C 下培养 48 小时, 最后以 MTS assay 测其细胞存活率。

2.6.3. 后处理试验(Post-treatment)

于细胞中加入 $\text{moi} = 0.05$ 之 H1N1 并放入培养箱中作用 1 小时后, 吸除培养液, 再分别加入不同浓度之虎乳灵芝萃取液于培养箱中作用 1 小时, 然后移除原培养液并加入含 2% FBS 之新鲜 DMEM 培养液, 于 5% CO_2 、37°C 培养箱培养 48 小时, 最后以 MTS assay 测其细胞存活率。

2.6.4. 数据分析方法

采用 MTS assay 测定细胞存活率。

MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-fulphophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] 为 tetrazolium salt 的黄色物质, 原理为活细胞内粒线体会产生 NADPH 能将 tetrazolium salt 还原成褐色的 formazan, 而细胞存活率与 formazan 的产生量呈正比。再利用波长 490 nm 测定吸光值即可推算出细胞存活率。

3. 结果

3.1. 虎乳灵芝菌丝体水、酒萃物抗 H1N1 之效果

进行虎乳灵芝萃取物抗病毒试验前, 先评估其在何种浓度下会对于病毒宿主细胞 MDCK 造成毒性, 继而找出存活率大于 80% 之供试剂量(图 1)。虎乳灵芝酒萃物以 DMSO 配置成浓度 2 mg/mL, 再连续对半稀释至 0.0625 mg/mL, 水萃物则以 PBS 配成最高浓度 2 mg/mL, 经连续对半稀释至 0.0625 mg/mL, 再进行 MTS 评估, 结果显示虎乳灵芝酒萃物于 1 mg/mL 对于 MDCK 的细胞存活率大于 80%, 在不造成细胞毒性之考虑下, 乃选择以 0.25 mg/mL 浓度进行实验; 水萃物则于 2 mg/mL 对于 MDCK 细胞的细胞存活率大于 80%, 同样选择以 1 mg/mL 以下浓度进行实验。

3.1.1. 预处理试验

如(图 2)结果所示, 虎乳灵芝酒萃物以及水萃物在各供试剂量下皆无法有效改善因 H1N1 病毒感染所造成的细胞毒杀现象。

3.1.2. 共处理

虎乳灵芝酒萃物先与 H1N1 病毒反应一小时后, 再感染 MDCK 细胞, 结果发现可增加细胞存活率(与 H1N1 组相比增加 14.9%); 但水萃物则与 H1N1 之共处理组则对 MDCK 存活率无显著影响(图 3)。

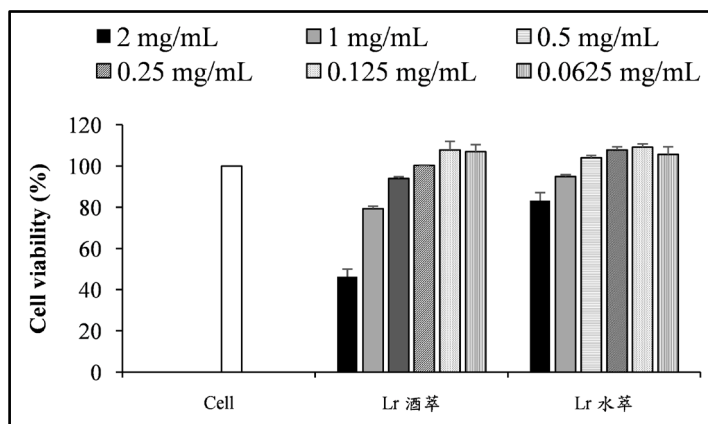


Figure 1. Effects of *Lignosus rhinocerus* extractions on cell viability of MDCK cells
图 1. 虎乳灵芝萃取物对 MDCK 细胞之抑制性评估

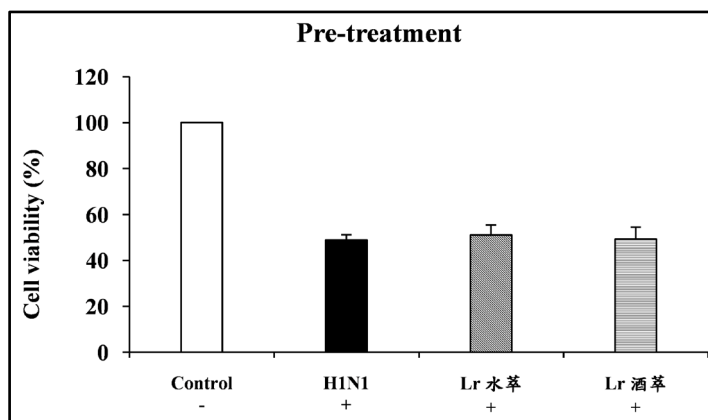


Figure 2. Pre-treatment effects of *Lignosus rhinocerus* extracts on cell viability before H1N1 infection
图 2. 虎乳灵芝萃取物预处理 MDCK 细胞后，对于受 H1N1 病毒感染细胞的存活率影响

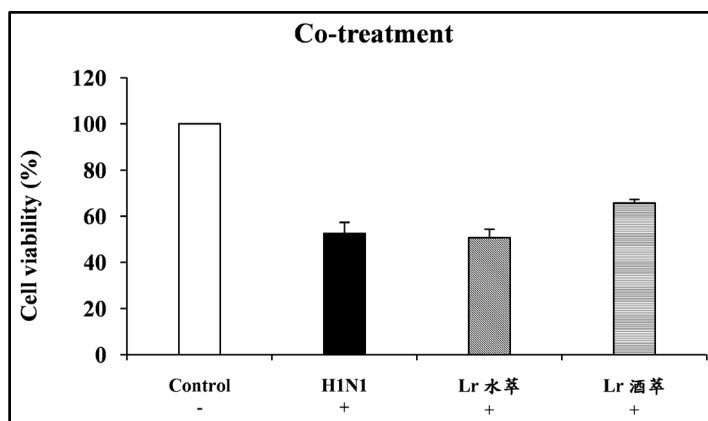


Figure 3. Effects of *Lignosus rhinocerus* extracts on cell viability after co-treatment with H1N1 virus
图 3. 虎乳灵芝萃取物处理 H1N1 病毒后，对感染细胞的存活率之影响(共处理试验)

3.1.3. 后处理

虎乳灵芝酒萃物组对于预先以 H1N1 攻毒后之细胞存活率与 H1N1 组相比无显著差异，显示细胞一旦受感染后，酒萃物无助于减缓病毒毒杀作用，水萃物亦同样无减缓病毒毒杀之功效(图 4)。

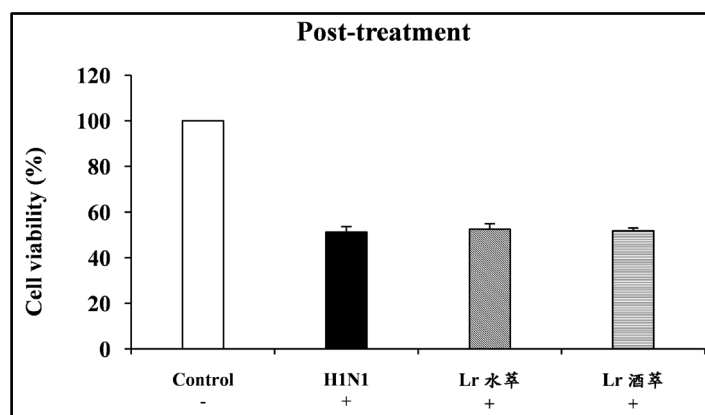


Figure 4. Effects of *Lignosus rhinocerus* extracts on cell viability on anti-H1N1 activity

图 4. 虎乳灵芝萃取物对于既受 H1N1 病毒感染之细胞的存活率影响(后处理试验)

3.2. 虎乳灵芝酒萃物分层抗 H1N1 之效用

首先以 MTS assay 再次评估虎乳灵芝酒萃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 LrH2O、LrBtOH、LrEA、LrHex 的最高浓度分别配成 1000、1000、250、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 四组最高浓度, 再依序对半稀释成各种浓度(图 5)。

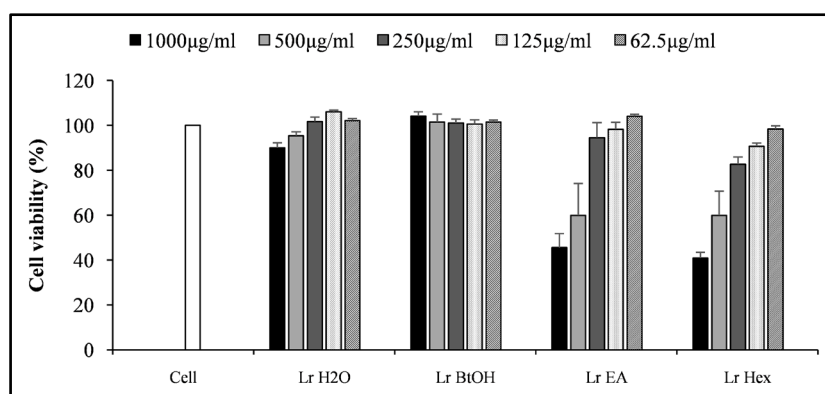


Figure 5. Effects of *Lignosus rhinocerus* extract partition on cell viability of MDCK cells

图 5. 虎乳灵芝萃取物各分层对 MDCK 细胞的存活率之影响

3.2.1. 预处理

预防处理时, 与对照之 H1N1 组相比, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Lr H2O 及 LrBtOH 之细胞存活率分别提升 5.14% ($p < 0.05$)以及 7.47 % ($p < 0.01$), 其中 LrBtOH 于 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下仍然可具有显著差异; 而 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Lr Hex 及 Lr EA 之细胞存活率分别提升 6.30% ($p < 0.01$)以及 6.43% ($p < 0.05$), 且 LrEA 于 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下仍然具有显著改善细胞存活率之效果(图 6)。

3.2.2. 共处理

与 H1N1 组相比, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Lr H2O 及 LrBtOH 之共处理可以分别提升细胞存活率 25.47% ($p < 0.01$)及 12.07% ($p < 0.01$), 且两者浓度降至 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 仍然可具有显著之改善存活率效果; 至于 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Lr EA 及 Lr Hex 之细胞存活率分别提升 18.25% ($p < 0.05$)及 15.48% ($p < 0.001$), 且 Lr Hex 于 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度下仍然具有显著效果(图 7)。

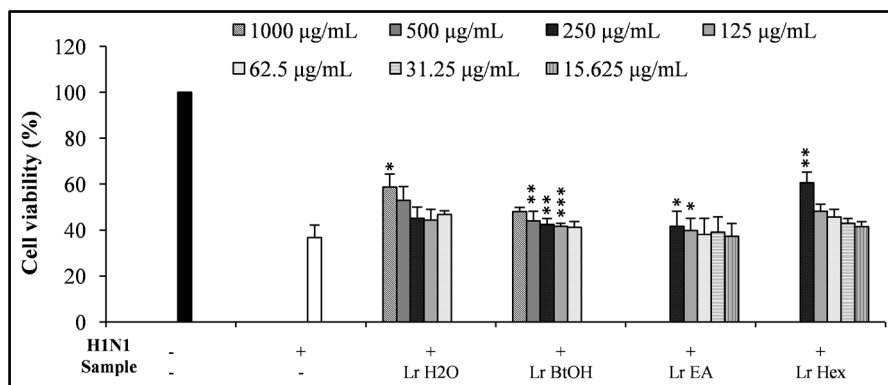


Figure 6. Pre-treatment effects of *Lignosus rhinocerus* extract partition on cell viability against H1N1 infection
图 6. 虎乳灵芝萃取物分层对于受 H1N1 病毒感染之细胞的存活率影响(预处理试验)

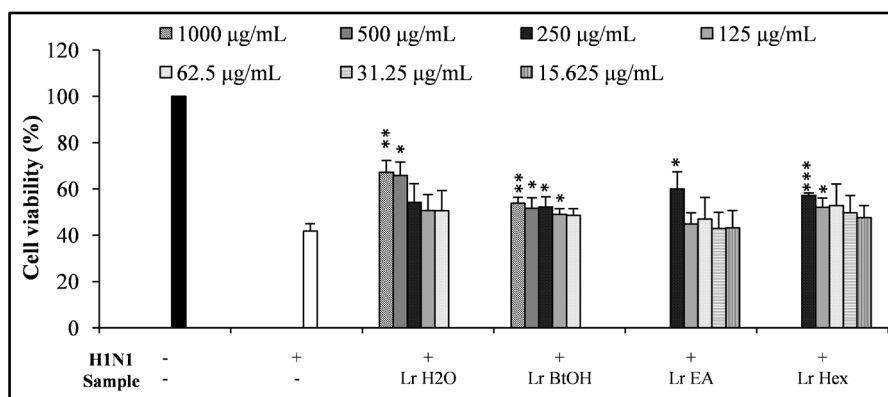


Figure 7. Pre-treatment effects of *Lignosus rhinocerus* extract partition on cell viability against H1N1 infection
图 7. 虎乳灵芝萃取物各分层之共处理对于受 H1N1 病毒感染之细胞的存活率影响

3.2.3. 后处理

在治疗模式之后处理组中, 1000 µg/mL 的 Lr H2O、LrBtOH 之细胞存活率与 H1N1 组相比, 分别提升 22.09% ($p < 0.01$)、11.34% ($p < 0.001$), 且 Lr H2O 于 500 µg/mL 的浓度下仍有显著提升效果; Lr Hex 在 250 µg/mL 之细胞存活率提升 23.89% ($p < 0.01$), 甚至浓度低至 31.25 µg/mL 亦皆可达统计上之显著差异。Lr EA 则皆无效果(图 8)。

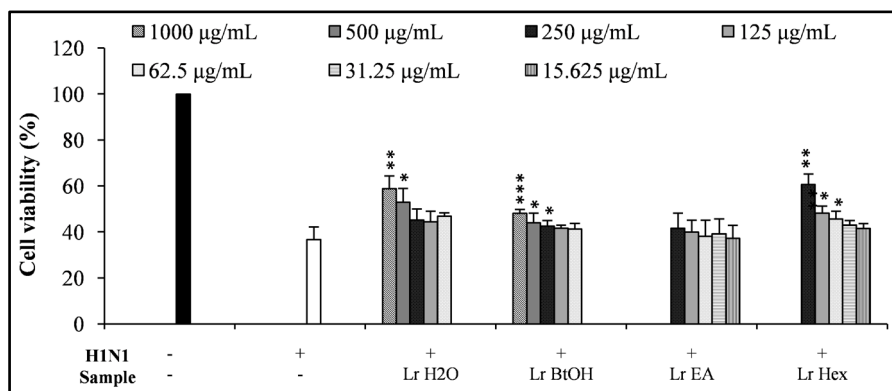


Figure 8. Effects of *Lignosus rhinocerus* extract partition on cell viability on anti-H1N1 activity (Post-treatment)
图 8. 虎乳灵芝萃取物各分层对于既受 H1N1 病毒感染之细胞的存活率影响(后处理试验)

4. 讨论

病毒性疾病向来于人类史上造成数度浩劫，其中尤以流行性感冒最为人知，A 型流感是一种具高度传染性的急性呼吸道感染症，即使在医疗科技及预防保健发达的今天，仍是会导致相当高的致病率与死亡率，到目前为止虽有药物或疫苗可对抗流感病毒，但由于流感病毒属 RNA 病毒，具有极高变异性，几乎每年流行的病毒株都会有所改变，原施打的疫苗对不同抗原之病毒便不具免疫力，导致保护效果降低[15]。

本次采用之虎乳灵芝菌丝体，取自马来西亚虎乳灵芝朵菌种分离纯化，以液态发酵培养而得，并完成多项动物实验证实其食用安全性[16] [17]。实验以 H1N1 病毒感染 MDCK 犬肾细胞作为感染模式，进而探讨经样品处理后是否可以防止因病毒感染而死亡的细胞存活率，为一种广泛被使用的细胞筛选模式。结果显示，虎乳灵芝酒萃物在共处理试验中的效果显著优于水萃物，但两样品于预防及后处理试验中皆未看见明显保护作用。由于大分子物质如多糖等可能会藉由包覆病毒颗粒或是覆盖于宿主细胞表面达到阻隔遮蔽病毒感染效果，进而达到保护及预防感染的结果[18]，此现象尤易发生在 *in vitro* 试验中。然对比本报告之研究结果，易含多糖体或是部分胜肽类物质之水萃物组，并未看到显著抗病毒之效用，反观酒萃物则可显著提升细胞存活率，因此推测虎乳灵芝酒萃物中具有抗病毒功效可能偏向小分子化合物。

进一步将酒萃物内物质依其极性分作四层，分离萃取(Partition) 获得正己烷层(Lr Hex)、乙酸乙酯层(Lr EA)、正丁醇层(Lr BtOH)及水层(Lr H₂O)共四个分层，分别进行活性测试。结果显示无论是在预防、共处理或是后处理试验组，四个分层与 H1N1 感染组相比，都可有效提升细胞存活率。其中 Lr H₂O、Lr BtOH 在共处理及后处理组的效果尤佳；Lr EA 在共处理试验效果最佳，而 Lr He 则是以后处理尤佳，共处理效果次之，预处理结果为末。

本次实验中，发现到无论是虎乳灵芝酒萃取物或是其分层，皆属共处理试验最为有效，考虑其试验设计，基于会先将样品与病毒进行接触混合培养，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，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，查其治疗机转，药理机制为当病毒与药物接触时无法产生直接影响，作用点是在当病毒感染进入细胞后，准备进行复制时，药物即会作用在病毒用以复制(replication)自身核酸所用之复制酶，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。

5. 结论

经由本次实验可以推测，以此报告内配方所培养之虎乳灵芝菌丝体萃取物可有效缓解细胞因病毒感染而导致的死亡现象，达到保护效果，尤其是以 Lr H₂O、Lr Hex 两组在共处理试验以及治疗试验中提升细胞存活率之效果最为显著。虽尚未能确知其功效性物质，但可以从初步纯化的实验结果得知，虎乳灵芝得酒萃物中至少含有两项抗病毒之功效成分，且极性相差甚大。往后可再设计进一步纯化，并搭配进行抗病毒活性实验，以利找出虎乳灵芝分层中化合物对于流感病毒的关键性功效物质。经确认后即可进行虎乳灵芝菌丝体的制程优化，以期能发挥更加良好的抗病毒效用。

参考文献

- [1] Heymann, D.L. (2007) The World Health Report 2007: A Safer Future: Global Public Health Security in the 21st Century. World Health Organization, Geneva.
- [2] 林志兆, 柯惠菁, 罗秀容. 2009 亚洲国际真菌学术大会暨第十一届国际海洋及溪流真菌学研讨会纪事《国家卫生

研究院电子报》第 338 期。

http://enews2.nhri.org.tw/enews_list_new2_more.php?volume_idx=338&showx=showarticle&article_idx=7537

- [3] 黄年来. 中国最有开发前景的主要药用真菌[J]. 食用菌, 2005, 27(1): 3-4.
- [4] Wong, K.H., Connie Lai, K.M. and Peter Cheung, C.K. (2009) Stimulation of Human Innate Immune Cells by Medicinal Mushroom Sclerotial Polysaccharides. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, **11**, 215-223. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v11.i3.10>
- [5] Wong, K.H., Connie Lai, K.M. and Peter Cheung, C.K. (2011) Immunomodulatory Activities of Mushroom Sclerotial Polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, **25**, 150-158. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.04.008>
- [6] Lee, S.S., Tan, N.H., Fung, S.Y., Sim, S.M., Tan, C.S. and Ng, S.T. (2014) Anti-Inflammatory Effect of the Sclerotium of *Lignosusrhinocerotis* (Cooke) Ryvardeen, the Tiger Milk Mushroom. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **14**, 359. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-359>
- [7] Lee, M.L., Tan, N.H., Fung, S.Y., Tan, C.S. and Ng, S.T. (2012) The Antiproliferative Activity of Sclerotia of *Lignosus rhinocerus* (Tiger Milk Mushroom). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2012**, Article ID: 697603. <https://doi.org/10.1155/2012/697603>
- [8] Lai, C.K.M., Wong, K.H. and Cheung, P.C.K. (2008) Antiproliferative Effects of Sclerotial Polysaccharides from *Polyporus rhinocerus* Cooke (Aphyllphoromycetidae) on Different Kinds of Leukemic Cells. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, **10**, 255-264. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v10.i3.60>
- [9] *Lignosus rhinocerotis* Strain TM02 Internal Transcribed Spacer 1, Partial Sequence; 5.8S Ribosomal RNA Gene, Complete Sequence; and Internal Transcribed Spacer 2, Partial Sequence. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/JQ409479.1?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=1&RID=C9WJXR71014](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/JQ409479.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=C9WJXR71014)
- [10] Yap, Y.H., Tan, N., Fung, S., Aziz, A.A., Tan, C. and Ng, S. (2013) Nutrient Composition, Antioxidant Properties, and Anti-Proliferative Activity of *Lignosus rhinocerus* Cooke Sclerotium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **93**, 2945-2952. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6121>
- [11] Yap, Y.H., Tan, N., Fung, S., Aziz, A.A., Tan, C. and Ng, S. (2014) Energy and Nutritional Composition of Tiger Milk Mushroom (*Lignosus tigris* Chon S. Tan) Sclerotia and the Antioxidant Activity of Its Extracts. *International Journal of Medicine Science*, **11**, 602-607. <https://doi.org/10.7150/ijms.8341>
- [12] Eik, L.-F., Naidu, M., David, P., Wong, K.-H., Tan, Y.-S. and Sabaratnam, V. (2012) *Lignosus rhinocerus* (Cooke) Ryvardeen: A Medicinal Mushroom That Stimulates Neurite Outgrowth in PC 12 Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2012**, Article ID: 320308. <https://doi.org/10.1155/2012/320308>
- [13] Ellan, K., Thayan, R., Raman, J., Hidari, K.I.P.J., Ismail, N. and Sabaratnam, V. (2019) Anti-Viral Activity of Culinary and Medicinal Mushroom Extracts against Dengue Virus Serotype 2: An *In-Vitro* Study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **19**, 260. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2629-y>
- [14] Sillapachaiyaporn, C. and Chuchawankul, S. (2019) HIV-1 Protease and Reverse Transcriptase Inhibition by Tiger Milk Mushroom (*Lignosus rhinocerus*) Sclerotium Extracts: *In Vitro* and *in Silico* Studies. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2019.08.002>
- [15] Itoh, Y., Shinya, K., Kiso, M., Watanabe, T. and Sakoda, Y. (2009) *In Vitro* and *in Vivo* Characterization of New Swine-Origin H1N1 Influenza Viruses. *Nature*, **460**, 1021-1025. <https://doi.org/10.1038/nature08260>
- [16] Chen, T.-I., Zhuang, H.-W., Chiao, Y.-C. and Chen, C.-C. (2013) Mutagenicity and Genotoxicity Effects of *Lignosus rhinocerotis* Mushroom Mycelium. *Journal of Ethnopharmacology*, **149**, 70-74.
- [17] Jhou, B.-Y., Liu, H.-H., Yeh, S.-H. and Chen, C.-C. (2017) Oral Reproductive and Developmental Toxicity of *Lignosus rhinocerotis* Mycelium in Rat. *Journal of Ethnopharmacology*, **208**, 66-71. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.06.029>
- [18] 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>