



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106038695 B

(45)授权公告日 2020.05.05

(21)申请号 201610216155.8

(22)申请日 2016.04.08

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106038695 A

(43)申请公布日 2016.10.26

(30)优先权数据  
TW104111384 2015.04.09 TW

(73)专利权人 高雄医学大学  
地址 中国台湾高雄市三民区十全一路100号

(72)发明人 李景钦 陈益昇 张训硕 曾敬凯  
林俊光

(74)专利代理机构 广州文冠倪律知识产权代理  
事务所(普通合伙) 44348  
代理人 倪小敏

(51)Int.Cl.

A61K 36/54(2006.01)

A61K 31/01(2006.01)

A61P 31/14(2006.01)

A23L 33/105(2016.01)

A23L 33/16(2016.01)

审查员 王倩仪

权利要求书1页 说明书9页  
序列表5页 附图18页

(54)发明名称

鳄梨萃取物、鳄梨醇B及(2R,4R)-1,2,4-三羟基十七碳-16-炔的用途,以及包含鳄梨萃取物的保健食品

(57)摘要

本发明是有关鳄梨萃取物的用途,其用于制备预防黄病毒科病毒感染的保健食品或食物添加物的用途。本发明也提供一种鳄梨醇B(avocadenol B)用于制备治疗或预防黄病毒科病毒感染的药物的用途。本发明也提供一种(2R,4R)-1,2,4-三羟基十七碳-16-炔用于制备治疗或预防黄病毒科病毒感染的药物的用途。本发明更提供一种抑制黄病毒科病毒复制或病毒性发炎反应的保健食品,包括有效量的鳄梨萃取物为活性成分以及医药学上可接受的载剂。

1. 一种鳄梨萃取物用于制备预防黄病毒科病毒感染的保健食品的用途,其中该鳄梨萃取物包括鳄梨醇B或(2R,4R)-1,2,4-三羟基十七碳-16-炔作为活性成分。

2. 如权利要求1所述的用途,其中黄病毒科病毒包括:登革病毒、黄热病病毒、西尼罗河病毒、日本脑炎病毒或丙型肝炎病毒。

3. 如权利要求1或2所述的用途,其中该鳄梨萃取物具有抑制登革病毒的蛋白质及RNA生成的能力。

4. 如权利要求1或2所述的用途,其中该鳄梨萃取物具有抑制登革病毒所诱导的发炎反应的能力。

5. 如权利要求1或2所述的用途,其中该鳄梨萃取物具有诱导受到登革病毒感染的细胞产生干扰素的能力。

6. 一种鳄梨萃取物用于制备预防黄病毒科病毒感染的食品添加物的用途,其中该鳄梨萃取物包括鳄梨醇B 或(2R,4R)-1,2,4-三羟基十七碳-16-炔作为活性成分。

7. 如权利要求6所述的用途,其中黄病毒科病毒包括:登革病毒、黄热病病毒、西尼罗河病毒、日本脑炎病毒或丙型肝炎病毒。

8. 一种鳄梨醇B用于制备治疗或预防黄病毒科病毒感染的药物的用途。

9. 一种(2R,4R)-1,2,4-三羟基十七碳-16-炔用于制备治疗或预防黄病毒科病毒感染的药物的用途。

10. 一种抑制黄病毒科病毒复制活性或病毒性发炎反应的保健食品,包括一有效量的鳄梨醇B或(2R,4R)-1,2,4-三羟基十七碳-16-炔为活性成分以及一医药学上可接受的载剂或盐类。

11. 如权利要求10所述的保健食品,其中黄病毒科病毒包括:登革病毒、黄热病病毒、西尼罗河病毒、日本脑炎病毒或丙型肝炎病毒。

## 鳄梨萃取物、鳄梨醇B及(2R,4R)-1,2,4-三羟基十七碳-16-炔 的用途,以及包含鳄梨萃取物的保健食品

### 技术领域

[0001] 本发明是有关于一种鳄梨萃取物,特别是关于其用于制备预防黄病毒科(Flaviviridae family)病毒的保健食品的用途。

### 背景技术

[0002] 黄病毒科(Flaviviridae family)病毒的感染防治为各国公共卫生的重要课题之一。黄病毒科的病毒主要发现于节肢动物(arthropods)中,而感染对象主要为哺乳类动物,其遗传物质为单股的RNA,长度约为9.6~12.3 kb,具有病毒包膜(viral envelope)的结构。

[0003] 黄病毒科(Flaviviridae family)包括多种病毒,例如,登革病毒(Dengue virus)、黄热病病毒(Yellow fever virus)、西尼罗河病毒(West Nile virus)、日本脑炎病毒(Japanese encephalitis virus)、丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus)或牛科病毒性腹泻病毒(Bovine viral diarrhea virus)等。黄病毒科的病毒会使遭受感染的个体产生脑炎、脑脊髓炎、出血性疾病(hemorrhagic diseases)或其他全身性感染的疾病。

[0004] 其中属于黄病毒属(Flaviviridae Genus)的登革病毒(Dengue virus,DENV),主要由3个结构蛋白、衣壳蛋白C(capsid protein C)、膜蛋白M(membrane protein M)、包膜蛋白E(envelope protein E)以及7个非结构蛋白(nonstructural protein,简称NS)所构成。目前研究已知,部份非结构蛋白在登革病毒感染的机制中扮演重要角色,对于病毒感染所引起的症状,例如,登革热(dengue fever)、登革休克综合征(dengue shock syndrome)及登革出血热(dengue hemorrhagic fever)亦有密切关联。

[0005] 另外,依其抗原性的不同,登革病毒可分为四种血清型,分别为DENV-1、DENV-2、DENV-3及DENV-4,皆具有感染致病的能力。登革病毒主要借助蚊子作为媒介传染给人类,登革病毒感染造成的疾病主要好发于热带、亚热带等有埃及斑蚊(*Aedes aegypti*)及白线斑蚊(*Aedes albopictus*)分布的国家。但随着各国之间的交流及往返趋于频繁,自1980年代后,登革热亦开始有向各国蔓延的趋势,逐渐成为全球性的公共卫生问题。

[0006] 然而,目前并没有特定用以治疗登革热的药物,而疫苗的研发可能是控制登革病毒感染最好方法。近年来,许多研究尝试研发可同时对四种血清型登革病毒产生免疫的疫苗,但在临床上仍遭遇了许多困难,像是无法产生具有长期免疫效果的疫苗等。因此,如何有效地预防登革病毒的感染为相当重要的公共卫生议题。

### 发明内容

[0007] 本发明的一个实施例提供一种鳄梨(*Persea americana*)萃取物用于制备预防黄病毒科(Flaviviridae family)病毒感染的保健食品的用途。

[0008] 本发明的一个实施例提供一种鳄梨(*Persea americana*)萃取物用于制备预防黄病毒科(Flaviviridae family)病毒感染的食品添加物的用途。

[0009] 本发明的又一个实施例提供一种鳄梨醇B(avocadenol B, avoB)用于制备治疗或预防黄病毒科(Flaviviridae family)病毒感染的药物的用途。

[0010] 本发明的再一个实施例提供一种(2R,4R)-1,2,4-三羟基十七碳-16-炔((2R,4R)-1,2,4-trihydroxyheptadec-16-yne, THHY)用于制备治疗或预防黄病毒科(Flaviviridae family)病毒感染的药物的用途。

[0011] 本发明的更一个实施例提供一种抑制黄病毒科(Flaviviridae family)病毒复制或活性或病毒性发炎反应的保健食品,包括有效量的鳄梨(*Persea americana*)萃取物为活性成分以及医药学上可接受的载剂。

## 附图说明

[0012] 图1A~1C是根据本发明的一些实施例中,以蛋白质印迹法检测在不同浓度的鳄梨萃取物、avoB及THHY处理下,经登革病毒感染的Huh-7细胞中登革病毒的蛋白质含量。

[0013] 图2A~2C是根据本发明的一些实施例中,以RT-qPCR检测在不同浓度的鳄梨萃取物、avoB以及THHY处理下,经登革病毒感染的Huh-7细胞中登革病毒的相对RNA量的柱状图(\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ )。

[0014] 图3A~3B为根据本发明的一些实施例中,以RT-qPCR检测在不同浓度的鳄梨萃取物、avoB以及THHY处理下,经DENV-1、DENV-2、DENV-3及DENV-4血清型的登革病毒感染的Huh-7细胞中登革病毒的相对RNA量的柱状图(\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ )。

[0015] 图4A~4B、图5A~5B及图6A~6B是根据本发明的一些实施例中,以RT-qPCR检测在不同浓度的鳄梨萃取物、avoB以及THHY处理下,经登革病毒感染的Huh-7细胞中IFN- $\alpha 2$ 及IFN- $\alpha 17$ 的相对RNA量的柱状图。

[0016] 图7A~7D及图8~9为根据本发明的一些实施例中,以RT-qPCR检测在不同浓度的鳄梨萃取物、avoB以及THHY处理下,经登革病毒感染的Huh-7细胞中OAS-1、OAS-2、OAS-3及PKR的相对RNA量的柱状图。

[0017] 图10A~10C、11A~11C及12A~12C为根据本发明的一些实施例中,以RT-qPCR检测在不同浓度的鳄梨萃取物、avoB以及THHY处理下,经登革病毒感染的Huh-7细胞中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 及IL-6的相对RNA量的柱状图(\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ )。

[0018] 图13A~13C为根据本发明的一些实施例中,在不同浓度的鳄梨萃取物、avoB以及THHY处理下,Huh-7细胞存活率的折线图。

[0019] 图14A为不同浓度的鳄梨萃取物处理下,经日本脑炎病毒感染的BHK细胞中日本脑炎病毒的相对RNA量的柱状图(\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ )。

[0020] 图14B为不同浓度的avoB处理下,经日本脑炎病毒感染的BHK细胞中日本脑炎病毒的相对RNA量的柱状图(\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ )。

[0021] 图15A为不同浓度的鳄梨萃取物处理下,经丙型肝炎病毒感染的BHK细胞中丙型肝炎病毒的相对RNA量的柱状图(\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ )。

[0022] 图15B为不同浓度的THHY处理下,经丙型肝炎病毒感染的BHK细胞中丙型肝炎病毒的相对RNA量的柱状图(\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ )。

[0023] 图15C为不同浓度的avoB处理下,经丙型肝炎病毒感染的BHK细胞中丙型肝炎病毒的相对RNA量的柱状图(\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ )。

### 具体实施方式

[0024] 以下公开许多不同的实施方法或是例子来实行本发明的不同特征,以下描述具体的元件及其排列的例子以阐述本发明。当然这些仅是例子且不该以此限定本发明的范围。

[0025] 本案发明人发现鳄梨 (*Persea americana*) 萃取物具有抑制登革病毒复制活性及病毒性发炎反应的效果,且亦具有诱导受登革病毒感染的细胞产生干扰素 (interferon, IFN) 的能力。特别地,鳄梨萃取物包含鳄梨醇B (avocadenol B) 或 (2R,4R)-1,2,4-三羟基十七碳-16-炔作为主要的活性成分。

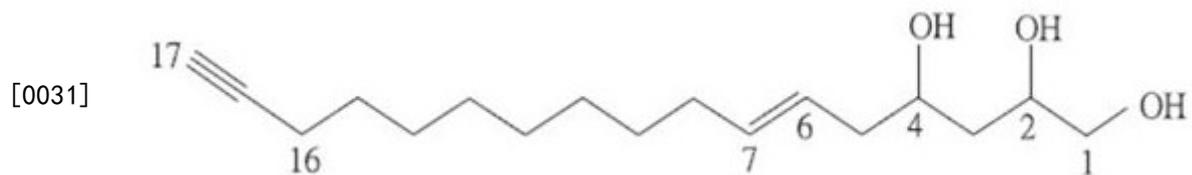
[0026] 本发明所述的“鳄梨萃取物”是指萃取自鳄梨 (*Persea americana*) 植物体的萃取物。鳄梨原产于中美洲及墨西哥,属于被子植物门的樟科 (*Lauraceae*),其含有多种维生素、矿物质以及有益的植化素,富含生物活性及抗氧化功能且不具胆固醇,被金氏世界纪录列为最营养的水果。应注意的是,本发明使用的鳄梨可源自任何产地或为经改良的品种。

[0027] 本发明的鳄梨萃取物选用鳄梨果实,经切片烘干后,以有机溶剂进行萃取。烘干温度可为20℃~80℃、40℃~60℃,例如可为50℃。而上述有机溶剂可为C1至C12醇类,例如,甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、丁醇、2-丁醇、戊醇、己醇、庚醇、辛醇、壬醇、癸醇、十一醇、十二醇或其组合,但不限于此。有机溶剂亦可为芳香烃类,例如,苯、甲苯或二甲苯,但不限于此。在一实施例中,是采用甲醇作为萃取溶液,甲醇的浓度可为80%~100%,例如可为99.5%。

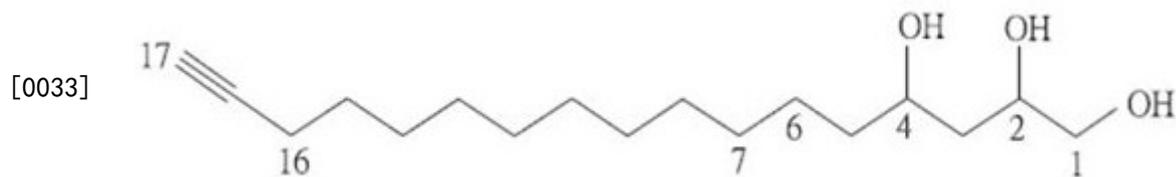
[0028] 萃取的温度及时间可视使用的溶剂特性等条件决定,没有特别限定。萃取温度可为5℃~50℃或10℃~30℃,例如可为25℃。另外,可重复多次上述萃取步骤以获得纯度较高的萃取物,例如,可重复进行3次萃取。

[0029] 接着,上述萃取步骤得到的鳄梨萃取物可再经纯化步骤,以更进一步的提升其纯度。纯化步骤可为柱层析 (column chromatography)、薄层层析 (thin layer chromatography)、气相层析 (gas chromatography)、高效液相层析 (high performance liquid chromatography)、离子交换层析 (ion exchange chromatography) 或其组合,例如,可使用以二氧化硅填充的柱层析。

[0030] 经上述萃取及纯化步骤,以核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR) 分析及比对,可获得鳄梨醇B (avocadenol B) (如下式 (I) 所示) 以及 (2R,4R)-1,2,4-三羟基十七碳-16-炔 (如下式 (II) 所示):



[0032] 式 (I)



[0034] 式 (II)

[0035] 鳄梨醇B (avocadenol B), 化学简式为  $C_{17}H_{30}O_3$ , 全名为 (2R,4R,6E)-1,2,4-三羟基

十七碳-6-烯-16-炔((2R,4R,6E)-1,2,4-trihydroxyheptadec-6-en-16-yne)。已有研究证实鳄梨醇B具有抗分枝杆菌(antimycobacterial)的活性(Y.-C. Lu *et al.* Secondary metabolites from the unripe of *Persea americana* and their antimycobacterial activities. Food Chemistry 135(2012) 2904-0929)。

[0036] (2R,4R)-1,2,4-三羟基十七碳-16-炔【(2R,4R)-1,2,4-trihydroxyheptadec-16-yne】，化学简式为C<sub>17</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub>，尚无研究指出与其相关的生物活性。

[0037] 发明人将上述鳄梨萃取物及由该鳄梨萃取物纯化取得的avocadenol B及(2R,4R)-1,2,4-三羟基十七碳-16-炔进行细胞试验。发现鳄梨萃取物、鳄梨醇 B及(2R,4R)-1,2,4-三羟基十七碳-16-炔皆具有抑制黄病毒科(Flaviviridae family)病毒的功效。

[0038] 值得注意的是，至今从未有文献指出鳄梨萃取物、鳄梨醇B或(2R,4R)-1,2,4-三羟基十七碳-16-炔与黄病毒科(Flaviviridae family)病毒的感染的预防或治疗有相关性。

[0039] 如上述，本发明所述的“黄病毒科”病毒可包括登革病毒(Dengue virus)、黄热病病毒(Yellow fever virus)、西尼罗河病毒(West Nile virus)、日本脑炎病毒(Japanese encephalitis virus)或丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus)等，可包含所有属于黄病毒科的病毒。

[0040] 在一些实施例中，鳄梨萃取物、鳄梨醇B及(2R,4R)-1,2,4-三羟基十七碳-16-炔可抑制登革病毒的蛋白质及RNA生成，即，抑制病毒的复制活性。在一些实施例中，鳄梨萃取物、鳄梨醇 B及(2R,4R)-1,2,4-三羟基十七碳-16-炔可抑制登革病毒所诱导的发炎反应。又，在一些实施例中，鳄梨萃取物、鳄梨醇 B及(2R,4R)-1,2,4-三羟基十七碳-16-炔可诱导受到登革病毒感染的细胞产生干扰素(interferon, IFN)。

[0041] 因此，本发明也提供一种将上述鳄梨萃取物、鳄梨醇 B或(2R,4R)-1,2,4-三羟基十七碳-16-炔用于制备预防黄病毒科病毒感染的保健食品或食物添加物的用途。另外，本发明也提供一种将鳄梨萃取物、鳄梨醇 B或(2R,4R)-1,2,4-三羟基十七碳-16-炔用于制备治疗或预防黄病毒科病毒(例如：登革病毒)的感染的药物的用途。除此之外，也亦可将其用于制备膳食增补剂、营养产品或医学食品等用途。

[0042] 在一实施例中，上述用于制备预防黄病毒科病毒感染的保健食品、食物添加物或药物可更包括医药学上可接受的载剂(carrier)或盐类。医药学上可接受的载剂或盐类可占保健食品、食物添加物或药物的0.5~99 wt%，较佳为5~95 wt%。

[0043] 而上述医药学上可接受的载剂可包括一般在食品或药物的制造上可使用的添加剂、赋形剂、防腐剂、矫味剂等。例如，淀粉、玉米淀粉、乳糖、糊精、环糊精、甲基纤维素、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、明胶、树胶(gum)、洋菜胶、古阿树胶(guar)、果胶、阿拉伯胶、黄芪胶(tragacanth)、鹿角胶(carrageenan)、或类似的添加剂。另外，医药学上可接受的载剂亦可为溶剂、分散介质(dispersion medium)、包膜(coating)、抗菌或抗真菌试剂等。

[0044] 另外，医药学上可接受的盐类可为无机阳离子，例如，碱金属盐类，如钠、钾或铵盐，碱土金属盐类，如镁、钙盐，含二价或四价阳离子的盐类，如锌、铝或镉盐。此外，医药学上可接受的盐类亦可为有机盐类，如二环己胺盐类、甲基-D-葡糖胺，氨基酸盐类，如精氨酸、赖氨酸、组氨酸或谷氨酰胺等。

[0045] 前述药物可根据给予路径适当设计剂型，例如可为锭剂、胶囊剂、膜衣锭剂、散剂、颗粒剂、糖浆、悬浮剂(suspensions)、乳剂(emulsions)、注射剂、栓剂或贴剂等。给予路径

可为,例如口服、皮下注射、腹腔内注射、静脉内注射、肌肉注射、肛门给予、吸入性投药或局部投药等。药物的使用剂量可依医师或执事人员根据患者体重、年龄、患部症状、生理状况、投药路径等条件,适当调配。

[0046] 此外,本发明所述的“有效量”是指具有可以抑制病毒活性、杀死病毒、减少病毒数目、或者完全消灭病毒的剂量。此有效量通常是根据病患体表面积,病患的重量以及病患情况的不同来供应给病患。根据本领域技术人员所知,有效剂量亦会随着以下条件的不同而变化,包括:药物的给予路径,药物的剂型或是否并用其他治疗法等。

[0047] 综上所述,本案发明人发现鳄梨萃取物具有抑制黄病毒科(Flaviviridae family)病毒的功效。特别地,鳄梨萃取物可抑制登革病毒的复制活性及病毒性发炎反应,且也可诱导受登革病毒感染的细胞产生干扰素(interferon, IFN)以对抗病毒。另外,发明人亦发现鳄梨萃取物包含鳄梨醇B(avocadenol B)或(2R,4R)-1,2,4-三羟基十七碳-16-炔作为抑制登革病毒活性的主要成分。

[0048] 以下进一步以实施例及比较例具体说明本发明,然其并非用来限定本发明的内容。

## 实施例

[0049] 鳄梨的萃取及纯化

[0050] 可参照Y.-C. Lu *et al.* Secondary metabolites from the unripe of *Persea americana* and their antimycobacterial activities. Food Chemistry 135(2012) 2904-0929的方法,将未成熟的鳄梨果实(约11.9 kg)切片后,置于50°C的烘箱干燥以取得干燥的鳄梨样本(约2.3 kg,占原重量的19.3%)。在室温下,利用浓度大于99.5%甲醇萃取干燥的鳄梨样本,并且重复萃取步骤三次。接着,加入乙酸乙酯(ethyl acetate, EtOAc)水溶液(EtOAc:H<sub>2</sub>O为1:1)使甲醇萃取物分离为可溶于乙酸乙酯的部分(EtOAc-soluble fraction)及可溶于水的部分(H<sub>2</sub>O-soluble fraction)。得到可溶于乙酸乙酯的部分约为280 g,而可溶于水的部分约为283 g,其中可溶于乙酸乙酯的部分即为用于后续实验中的鳄梨萃取物。

[0051] 接着,将一部分可溶于乙酸乙酯的部分(约100 g)加入填充二氧化硅胶体的管柱(70~230, Merck)进行层析及纯化。利用浓度梯度的洗脱液(elution)正己烷-乙酸乙酯(n-hexane-EtOAc)洗脱后,得到12个部分(fraction) (A-1~A-12)。接着将10.5 g的A-12分离液利用正己烷重新结晶化,以获取结晶(A-12-C)以及母液(A-12-M)。

[0052] 接着,将10 g的A-12-M以填充二氧化硅胶体的管柱(230~400 mesh, Merck)进行层析,利用浓度梯度的洗脱液正己烷-乙酸乙酯洗脱后,得到7个部分(A-12-M-1~A-12-M-7)。

[0053] 另外,将7.3 g的A-12-M-4以RP-C18管柱(spherical C18 100A reversed-phase silica gel (RP-18), 20~40 $\mu$ M, Silicycle)进行层析,并且利用丙酮-水(1:1)进行洗脱,洗脱后得到25.2 mg的鳄梨醇B(avocadenol B)以及113 mg的(2R,4R)-1,2,4-三羟基十七碳-16-炔((2R,4R)-1,2,4-trihydroxyheptadec-16-yne)。为方便说明,下文的叙述中将分别以avoB及THHY简称avocadenol B以及(2R,4R)-1,2,4-三羟基十七碳-16-炔。

[0054] 检测Huh-7细胞中生成的病毒蛋白质

[0055] 使用登革病毒株16681 (DENV-2血清型)感染人类肝癌细胞株的Huh-7细胞,其中Huh-7细胞培养于24孔盘,Huh-7细胞的密度为 $5 \times 10^4$  cells/well,而病毒感染的MOI (multiplicity of infection)为0.2。接着分别以不同浓度的鳄梨萃取物、avoB以及THHY处理Huh-7细胞,培养3天。应注意的是,除特别说明外,下述实验中登革病毒感染Huh-7细胞的实验条件皆与此相同。接着,将上述细胞溶解于RIPA裂解缓冲液(RIPA lysis buffer)中,并将细胞溶解液(cell lysate)离心以收集Huh-7细胞的总蛋白质(total protein)。

[0056] 接着,利用蛋白质印迹法(western blot)检测Huh-7细胞中登革病毒的蛋白质生成量。以登革病毒的病毒蛋白NS2B作为标靶,利用其专一性抗体(rabbit polyclonal anti-NS2B antibody, GeneTex, CA, USA)进行检测,并以细胞中表现量稳定的GAPDH作为内部对照组(internal control)。另外,使用ECL检测套组(PerkinElmer, CT)进行信号检测。

[0057] 图1A~1C分别显示以蛋白质印迹法检测在不同浓度的鳄梨萃取物、avoB以及THHY处理下,经登革病毒感染的Huh-7细胞中登革病毒的蛋白质含量,图中对照组为0.1% DMSO。图1A~1C显示,当鳄梨萃取物、avoB以及THHY处理Huh-7细胞浓度增加时,Huh-7细胞中登革病毒的蛋白质生成量下降。鳄梨萃取物、avoB以及THHY皆抑制了登革病毒的蛋白质生成,且抑制效果有显著性及浓度依赖性。由此可知,鳄梨萃取物、avoB以及THHY具有抑制登革病毒制造蛋白质的功效。

[0058] 检测Huh-7细胞中生成的病毒RNA

[0059] 此外,发明人也检测Huh-7细胞中病毒的RNA生成量,以进一步确认上述蛋白质部分的实验结果。分别使用登革病毒株16681 (DENV-2血清型)或四种不同血清型的登革病毒株DENV-1、DENV-2、DENV-3及DENV-4 (DENV-1~DENV-4病毒株是从疾病管制署取得的生物材料,DENV-1的编号为8700828A;DENV-2的编号为454009A;DENV-3的编号为8700829A;DENV-4的编号为S9201818)感染人类肝癌细胞株的Huh-7细胞。接着,使用Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)纯化Huh-7细胞的总细胞RNA(total cellular RNA)。

[0060] 接着,以实时反转录定量聚合酶连锁反应(real-time quantitative reverse transcription PCR)检测经登革病毒感染的Huh-7细胞中的病毒RNA生成量。实时反转录定量聚合酶连锁反应在反应体积为10 $\mu$ l的条件下进行,其中反应溶液含有200 ng cDNA、5  $\mu$ l Power SYBER Green PCR Master及0.4  $\mu$ M的引物对(primer pair)。而PCR反应的温度条件设定为:在95 $^{\circ}$ C反应10分钟 $\rightarrow$ (95 $^{\circ}$ C反应15秒 $\rightarrow$ 60 $^{\circ}$ C反应1分钟)循环40次 $\rightarrow$ 95 $^{\circ}$ C反应15秒 $\rightarrow$ 60 $^{\circ}$ C反应1分钟 $\rightarrow$ 95 $^{\circ}$ C反应15秒。其中,使用的引物对对于登革病毒的病毒蛋白NS2具有专一辨识度,实验中使用序列辨识号1及2所示的引子对以检测登革病毒的RNA。此外,实验中使用序列辨识号3及4所示的引物对检测寄主细胞的GAPDH(作为对照组)。

[0061] 图2A~2C分别显示以RT-qPCR检测在不同浓度的鳄梨萃取物、avoB以及THHY处理下,经16681登革病毒感染的Huh-7细胞中登革病毒的相对RNA量(relative RNA)的柱状图,图中对照组为0.1% DMSO,另外,图中的数据皆为经GAPDH标准化(normalization)的量化结果。

[0062] 图2A~2C显示,当处理Huh-7细胞的鳄梨萃取物、avoB以及THHY的浓度增加时,Huh-7细胞中登革病毒的RNA显著地减少(t-test,  $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ )。此外,利用内插法计算可得鳄梨萃取物、avoB以及THHY抑制登革病毒RNA生成的半效应浓度(effective concentration 50, EC<sub>50</sub>)分别为 $36 \pm 3.4$   $\mu$ g/ml、 $7.6 \pm 1.3$   $\mu$ M以及 $2.9 \pm 2.6$   $\mu$ M。

[0063] 此外,图3A~3B显示以RT-qPCR检测在不同浓度的鳄梨萃取物、avoB以及THHY处理下,经四种不同血清型(DENV-1、DENV-2、DENV-3及DENV-4)登革病毒感染的Huh-7细胞中登革病毒的相对RNA量的柱状图,图中数据皆为经GAPDH标准化(normalization)的量化结果。

[0064] 如图3A所示,当处理Huh-7细胞的鳄梨萃取物的浓度增加时,Huh-7细胞中登革病毒的RNA显著地减少( $t$ -test, $p<0.05$ ; $p<0.01$ ),且在四种血清型的登革病毒中情形皆相同(DENV-1~DENV-4)。换句话说,鳄梨萃取物能够有效抑制DENV-1、DENV-2、DENV-3及DENV-4型的登革病毒的RNA合成。另外,利用内插法计算可得鳄梨萃取物抑制DENV-1、DENV-2、DENV-3及DENV-4登革病毒RNA生成的半效应浓度分别为 $65\pm 5.1\ \mu\text{g/ml}$ 、 $42\pm 6.1\ \mu\text{g/ml}$ 、 $33\pm 4.8\ \mu\text{g/ml}$ 以及 $74\pm 3.4\ \mu\text{g/ml}$ 。

[0065] 另外,如图3B所示,当avoB以及THHY处理Huh-7细胞的浓度增加时,Huh-7细胞中登革病毒的RNA显著地减少( $t$ -test, $p<0.05$ ; $p<0.01$ ),且在四种血清型的登革病毒中皆相同(DENV-1~DENV-4)。由图可知,avoB以及THHY也能够有效地抑制DENV-1、DENV-2、DENV-3及DENV-4型的登革病毒的RNA合成。另外,利用内插法计算可得avoB抑制DENV-1、DENV-2、DENV-3及DENV-4登革病毒RNA生成的半效应浓度分别为 $14.4\pm 2.1\ \mu\text{M}$ 、 $8.4\pm 1.8\ \mu\text{M}$ 、 $13.4\pm 2.2\ \mu\text{M}$ 以及 $15.2\pm 4.1\ \mu\text{M}$ 。而THHY抑制DENV-1、DENV-2、DENV-3及DENV-4登革病毒RNA生成的半效应浓度则分别为 $16.3\pm 3.4\ \mu\text{M}$ 、 $3.4\pm 1.1\ \mu\text{M}$ 、 $13.7\pm 4.1\ \mu\text{M}$ 以及 $14.7\pm 2.3\ \mu\text{M}$ 。

[0066] 检测Huh-7细胞中生成的干扰素

[0067] 干扰素(interferon, IFN)为细胞受到病毒感染后所分泌的细胞因子,干扰素借助与周围未感染的细胞上的相关受体作用,促使未感染的细胞合成抗病毒蛋白以防制感染扩大,因而具有抗病毒的作用。然而,许多病毒具有对抗干扰素的能力,例如,登革病毒可破坏宿主细胞内干扰素生成的信号传递路径。

[0068] 如上述,发明人进行下续实验以探讨鳄梨萃取物、avoB以及THHY是否会影响经登革病毒感染的细胞内的干扰素信号传递路径。

[0069] 实验方法同样以前述的实时反转录定量聚合酶连锁反应(real-time quantitative reverse transcription PCR)进行,而检测的目标则改为宿主细胞中干扰素基因的RNA。在此使用对干扰素基因(IFN- $\alpha$ 2及IFN- $\alpha$ 17)具有识别专一性的引物对,详细而言,使用序列辨识号5及6所示的引物对以检测IFN- $\alpha$ 2的RNA,而使用序列辨识号7及8所示的引物对以检测IFN- $\alpha$ 17的RNA。

[0070] 图4A~4B、5A~5B及6A~6B分别显示以RT-qPCR检测在不同浓度的鳄梨萃取物、avoB以及THHY处理下,经16681登革病毒感染的Huh-7细胞中IFN- $\alpha$ 2及IFN- $\alpha$ 17的相对RNA量的柱状图,图中对照组为0.1% DMSO,另外,图中的数据皆为经GAPDH标准化(normalization)的量化结果。

[0071] 如图4A~4B、5A~5B及6A~6B所示,当处理Huh-7细胞的鳄梨萃取物、avoB以及THHY的浓度增加时,Huh-7细胞中IFN- $\alpha$ 2及IFN- $\alpha$ 17的RNA生成量皆明显地增加。由上述结果可知,鳄梨萃取物、avoB以及THHY皆能诱导受登革病毒感染的细胞产生干扰素以对抗登革病毒。

[0072] 此外,发明人也针对干扰素的下游信息传递分子OAS-1、OAS-2、OAS-3及PKR进行相关检测,更进一步地确认鳄梨萃取物、avoB以及THHY对于感染细胞的干扰素信号传递路径的影响。另外,使用序列辨识号9及10所示的引物对检测OAS-1的RNA;使用序列辨识号11及

12所示的引物对检测OAS-2的RNA;使用序列辨识号13及14所示的引物对检测OAS-3的RNA;及使用序列辨识号15及16所示的引物对检测PKR的RNA。

[0073] 图7A~7D显示以RT-qPCR检测在不同浓度的鳄梨萃取物、avoB以及THHY处理下,经16681登革病毒感染的Huh-7细胞中OAS-1、OAS-2、OAS-3及PKR的相对RNA量的柱状图,图中对照组为0.1% DMSO,另外,图中的数据皆为经GAPDH标准化(normalization)的量化结果。相似地,图8~9显示经16681登革病毒感染的Huh-7细胞中OAS-1、OAS-2及OAS-3的相对RNA量的柱状图。

[0074] 如图7A~7D及8~9所示,当处理Huh-7细胞的鳄梨萃取物、avoB以及THHY的浓度增加时,Huh-7细胞中OAS-1、OAS-2、OAS-3及PKR的RNA生成量皆明显地增加。由此可知,鳄梨萃取物、avoB以及THHY不仅能诱导受登革病毒感染的细胞产生干扰素,它们亦促使干扰素的下游信息传递分子进行合成。因此,鳄梨萃取物、avoB以及THHY抑制登革病毒的机制的确与干扰素密切相关。另外,可进一步地推断鳄梨萃取物、avoB以及THHY抑制登革病毒的机制,可能是借助恢复或增强抗病毒的干扰素的生成而达成。

[0075] 检测Huh-7细胞中病毒诱导的发炎反应

[0076] 此外,发明人也进行下述实验,以测试鳄梨萃取物、avoB以及THHY对于病毒感染所引起的发炎反应(inflammatory response)的影响。

[0077] 实验方法亦以前述的实时反转录定量聚合酶连锁反应进行,而检测的目标则为宿主细胞中与发炎反应相关的因子或细胞激素的RNA。在此使用对肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、细胞激素-6 (IL-6)具有识别专一性的引物对。详细而言,使用序列辨识号17及18所示的引物对检测TNF- $\alpha$ 的RNA;使用序列辨识号19及20所示的引物对检测IL-1 $\beta$ 的RNA;及使用序列辨识号21及22所示的引物对检测IL-6的RNA。

[0078] 图10A~10C、11A~11C及12A~12C分别显示以RT-qPCR检测在不同浓度的鳄梨萃取物、avoB以及THHY处理下,经16681登革病毒感染的Huh-7细胞中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 及IL-6的相对RNA量的柱状图,图中对照组为0.1% DMSO,另外,图中的数据皆为经GAPDH标准化(normalization)的量化结果。

[0079] 如图10A~10C、11A~11C及12A~12C所示,当处理Huh-7细胞的鳄梨萃取物、avoB以及THHY的浓度增加时,Huh-7细胞中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 及IL-6的RNA生成量皆显著地减少( $t$ -test,  $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ )。由此可知,鳄梨萃取物、avoB以及THHY能够有效地抑制登革病毒感染所造成的发炎反应。此外,利用内插法计算可得鳄梨萃取物抑制TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 及IL-6 RNA生成的半效应浓度分别为 $56.7 \pm 2.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $67.4 \pm 4.9 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以及 $80.6 \pm 1.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。而avoB抑制TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 及IL-6 RNA生成的半效应浓度分别为 $11.7 \pm 3.4 \mu\text{M}$ 、 $8.7 \pm 3.1 \mu\text{M}$ 以及 $22.4 \pm 5.7 \mu\text{M}$ 。THHY抑制TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 及IL-6 RNA生成的半效应浓度则分别为 $7.8 \pm 2.7 \mu\text{M}$ 、 $4.1 \pm 1.4 \mu\text{M}$ 以及 $48.6 \pm 4.2 \mu\text{M}$ 。

[0080] 细胞毒性分析

[0081] 此外,发明人也进行以下实验,以测试鳄梨萃取物、avoB以及THHY的浓度对于Huh-7细胞存活率(cell viability)的影响。

[0082] 分别以不同浓度的鳄梨萃取物、avoB以及THHY处理Huh-7细胞,细胞经3天培养后,以细胞毒性测试试剂盒(MTS assay kit, CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell proliferation assay system, Promega, WI, USA)测定鳄梨萃取物、avoB以及THHY对于Huh-

7细胞存活率的影响(细胞毒性)。根据套组所附的操作手册进行实验,使用550 BioRad plate-reader (Bio-Rad, Hertfordshire, UK), 测定波长490 nm下的吸光值。

[0083] 实验结果经换算后,可得到不同浓度的鳄梨萃取物、avoB以及THHY相对于Huh-7细胞存活率,结果如图13A~13C所示,图中对照组为0.1% DMSO,且图中数据为三次重复实验所得的结果。应注意的是,对Huh-7细胞而言,鳄梨萃取物、avoB以及THHY的CC<sub>50</sub> (cytotoxic concentration 50)分别为960±5.8 μg/ml、103±6.2 μM以及142±4.7 μM。

[0084] 前述实验中处理Huh-7细胞的鳄梨萃取物、avoB以及THHY的最高浓度分别不超过80 μg/ml、20 μM以及20 μM,皆远小于鳄梨萃取物、avoB以及THHY的CC<sub>50</sub>。由此可知,前述处理Huh-7细胞的鳄梨萃取物、avoB及THHY浓度对于Huh-7细胞是没有毒性的。

[0085] 综上所述,鳄梨萃取物、avocadenol B以及(2R,4R)-1,2,4-三羟基十七碳-16-炔可有效地抑制登革病毒的RNA及蛋白质的生成,具有抑制登革病毒的复制活性的功效。另外,鳄梨萃取物、avocadenol B以及(2R,4R)-1,2,4-三羟基十七碳-16-炔可诱导受登革病毒感染细胞产生干扰素以对抗病毒。此外,它们亦可有效地抑制登革病毒所诱导的炎症反应。

[0086] 值得注意的是,鳄梨萃取物、avoB以及THHY抑制登革病毒的机制,很可能是借助恢复或增强经病毒感染的细胞中用以对抗病毒的干扰素而达成。

[0087] 对日本脑炎病毒的抑制测试

[0088] 本试验选用经日本脑炎病毒感染的BHK细胞,以不同浓度的鳄梨萃取物(50~200 μg/ml)、AvoB(1~20 μM)处理后,定量日本脑炎病毒的RNA(经GAPDH标准化),并以处理0.1% DMSO的BHK细胞(同样经日本脑炎病毒感染)的RNA含量作为对照组,其结果分别如图14A、14B所示,证实本发明的鳄梨萃取物、avoB均具有可以抑制日本脑炎病毒复制的活性。

[0089] 对丙型肝炎病毒的抑制测试

[0090] 本试验则是选用经丙型肝炎病毒感染的Huh-7细胞,以不同浓度的鳄梨萃取物(20~50 μg/ml)、THHY(1~20 μM)、avoB(1~20 μM)处理后,定量丙型肝炎病毒的RNA(经GAPDH标准化),并以处理0.1% DMSO的Huh-7细胞(同样经丙型肝炎病毒感染)的RNA含量作为对照组,其结果分别如图15A、15B、15C所示,证实本发明的鳄梨萃取物、THHY、avoB均具有可以抑制丙型肝炎病毒复制的活性。

[0091] 虽然本发明已以数个较佳实施例如上,然其并非用来限定本发明,任何所属技术领域中具有通常知识人员,在不脱离本发明的精神和范围内,可作任意的更动与润饰,因此本发明的保护范围以申请专利范围所界定内容为准。

[0001]	<110>	高雄医学大学	
[0002]	<120>	鳄梨萃取物、鳄梨醇B及(2R,4R)-1,2,4-三羟基十七碳-16-炔的用途,以及包含鳄梨萃取物的保健食品	
[0003]	<130>	16455CN	
[0004]	<150>	TW104111384	
[0005]	<151>	2015-04-09	
[0006]	<160>	22	
[0007]	<170>	PatentIn version 3.5	
[0008]	<210>	1	
[0009]	<211>	20	
[0010]	<212>	DNA	
[0011]	<213>	人工序列	
[0012]	<220>		
[0013]	<223>	primer_bind	
[0014]	<400>	1	
[0015]		aaggtgagaa gcaatgcagc	20
[0016]	<210>	2	
[0017]	<211>	20	
[0018]	<212>	DNA	
[0019]	<213>	人工序列	
[0020]	<220>		
[0021]	<223>	primer_bind	
[0022]	<400>	2	
[0023]		ccactcaggg agttctctct	20
[0024]	<210>	3	
[0025]	<211>	20	
[0026]	<212>	DNA	
[0027]	<213>	人工序列	
[0028]	<220>		
[0029]	<223>	primer_bind	
[0030]	<400>	3	
[0031]		gtcttcacca ccatggagaa	20
[0032]	<210>	4	
[0033]	<211>	20	
[0034]	<212>	DNA	
[0035]	<213>	人工序列	
[0036]	<220>		
[0037]	<223>	primer_bind	

[0038]	<400> 4	
[0039]	atggcatgga ctgtgggtcat	20
[0040]	<210> 5	
[0041]	<211> 20	
[0042]	<212> DNA	
[0043]	<213> 人工序列	
[0044]	<220>	
[0045]	<223> primer_bind	
[0046]	<400> 5	
[0047]	gcaagtcaag ctgctctgtg	20
[0048]	<210> 6	
[0049]	<211> 20	
[0050]	<212> DNA	
[0051]	<213> 人工序列	
[0052]	<220>	
[0053]	<223> primer_bind	
[0054]	<400> 6	
[0055]	gatggtttca gccttttggga	20
[0056]	<210> 7	
[0057]	<211> 20	
[0058]	<212> DNA	
[0059]	<213> 人工序列	
[0060]	<220>	
[0061]	<223> primer_bind	
[0062]	<400> 7	
[0063]	aggagtttga tggcaaccag	20
[0064]	<210> 8	
[0065]	<211> 20	
[0066]	<212> DNA	
[0067]	<213> 人工序列	
[0068]	<220>	
[0069]	<223> primer_bind	
[0070]	<400> 8	
[0071]	catcagggga gtctcttcca	20
[0072]	<210> 9	
[0073]	<211> 20	
[0074]	<212> DNA	
[0075]	<213> 人工序列	
[0076]	<220>	

[0077]	<223>	primer_bind	
[0078]	<400>	9	
[0079]		caagcttaag agcctcatcc	20
[0080]	<210>	10	
[0081]	<211>	20	
[0082]	<212>	DNA	
[0083]	<213>	人工序列	
[0084]	<220>		
[0085]	<223>	primer_bind	
[0086]	<400>	10	
[0087]		tgggctgtgt tgaaatgtgt	20
[0088]	<210>	11	
[0089]	<211>	20	
[0090]	<212>	DNA	
[0091]	<213>	人工序列	
[0092]	<220>		
[0093]	<223>	primer_bind	
[0094]	<400>	11	
[0095]		acagctgaaa gccttttgga	20
[0096]	<210>	12	
[0097]	<211>	20	
[0098]	<212>	DNA	
[0099]	<213>	人工序列	
[0100]	<220>		
[0101]	<223>	primer_bind	
[0102]	<400>	12	
[0103]		gcattaaagg caggaagcac	20
[0104]	<210>	13	
[0105]	<211>	20	
[0106]	<212>	DNA	
[0107]	<213>	人工序列	
[0108]	<220>		
[0109]	<223>	primer_bind	
[0110]	<400>	13	
[0111]		cactgacatc ccagacgatg	20
[0112]	<210>	14	
[0113]	<211>	20	
[0114]	<212>	DNA	
[0115]	<213>	人工序列	

[0116]	<220>	
[0117]	<223> primer_bind	
[0118]	<400> 14	
[0119]	gatcaggctc ttcagcttgg	20
[0120]	<210> 15	
[0121]	<211> 20	
[0122]	<212> DNA	
[0123]	<213> 人工序列	
[0124]	<220>	
[0125]	<223> primer_bind	
[0126]	<400> 15	
[0127]	atgatggaaa gccaacaagg	20
[0128]	<210> 16	
[0129]	<211> 20	
[0130]	<212> DNA	
[0131]	<213> 人工序列	
[0132]	<220>	
[0133]	<223> primer_bind	
[0134]	<400> 16	
[0135]	gagatgatgc catcccgtag	20
[0136]	<210> 17	
[0137]	<211> 18	
[0138]	<212> DNA	
[0139]	<213> 人工序列	
[0140]	<220>	
[0141]	<223> primer_bind	
[0142]	<400> 17	
[0143]	cctgtgagga ggacgaac	18
[0144]	<210> 18	
[0145]	<211> 18	
[0146]	<212> DNA	
[0147]	<213> 人工序列	
[0148]	<220>	
[0149]	<223> primer_bind	
[0150]	<400> 18	
[0151]	aagtgggtgt cttgttgc	18
[0152]	<210> 19	
[0153]	<211> 18	
[0154]	<212> DNA	

[0155]	<213>	人工序列	
[0156]	<220>		
[0157]	<223>	primer_bind	
[0158]	<400>	19	
[0159]		ggagaatgac ctgagcac	18
[0160]	<210>	20	
[0161]	<211>	18	
[0162]	<212>	DNA	
[0163]	<213>	人工序列	
[0164]	<220>		
[0165]	<223>	primer_bind	
[0166]	<400>	20	
[0167]		gaccagacat caccaagc	18
[0168]	<210>	21	
[0169]	<211>	19	
[0170]	<212>	DNA	
[0171]	<213>	人工序列	
[0172]	<220>		
[0173]	<223>	primer_bind	
[0174]	<400>	21	
[0175]		tcagaattgc cattgcaca	19
[0176]	<210>	22	
[0177]	<211>	22	
[0178]	<212>	DNA	
[0179]	<213>	人工序列	
[0180]	<220>		
[0181]	<223>	primer_bind	
[0182]	<400>	22	
[0183]		gtcggaggct taattacaca tg	22

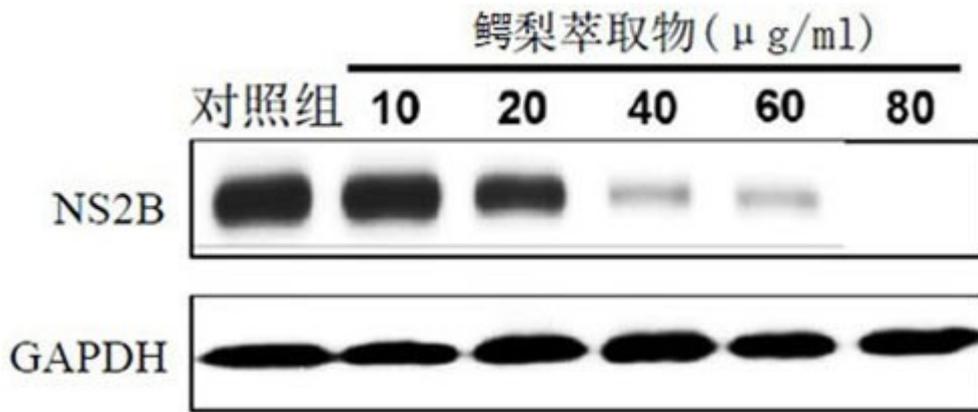


图1A

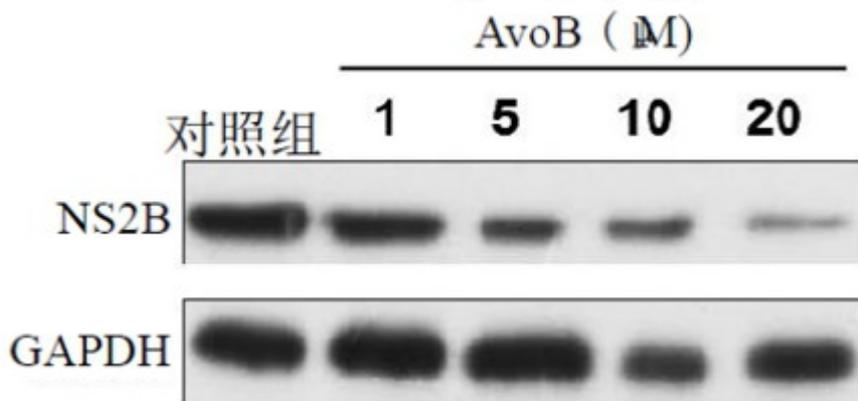


图1B

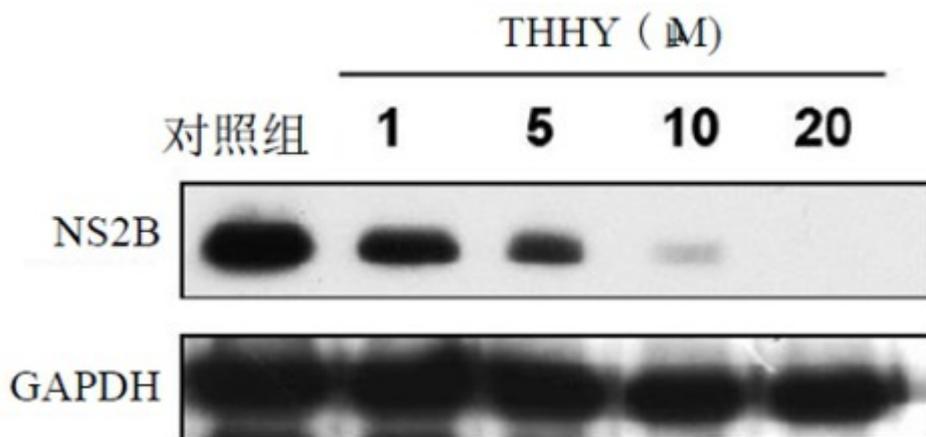


图1C

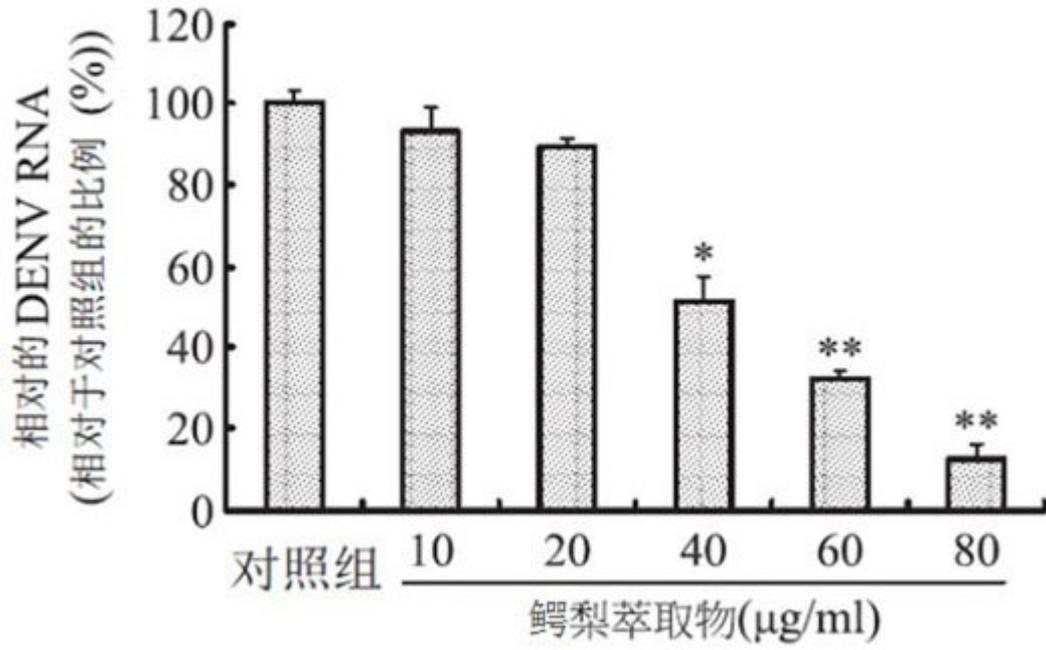


图2A

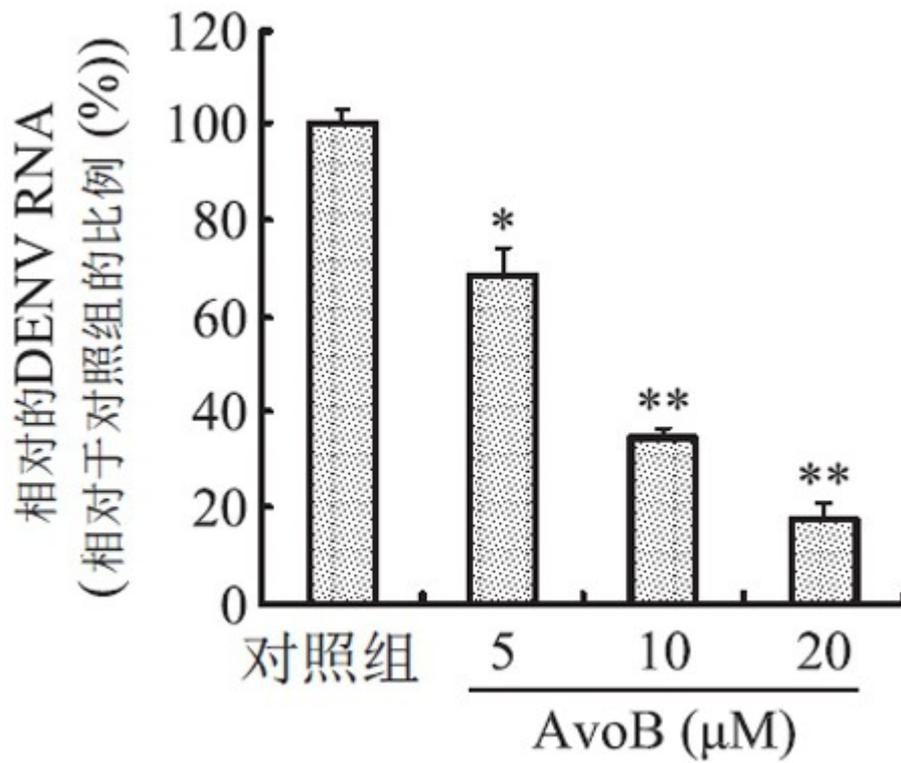


图2B

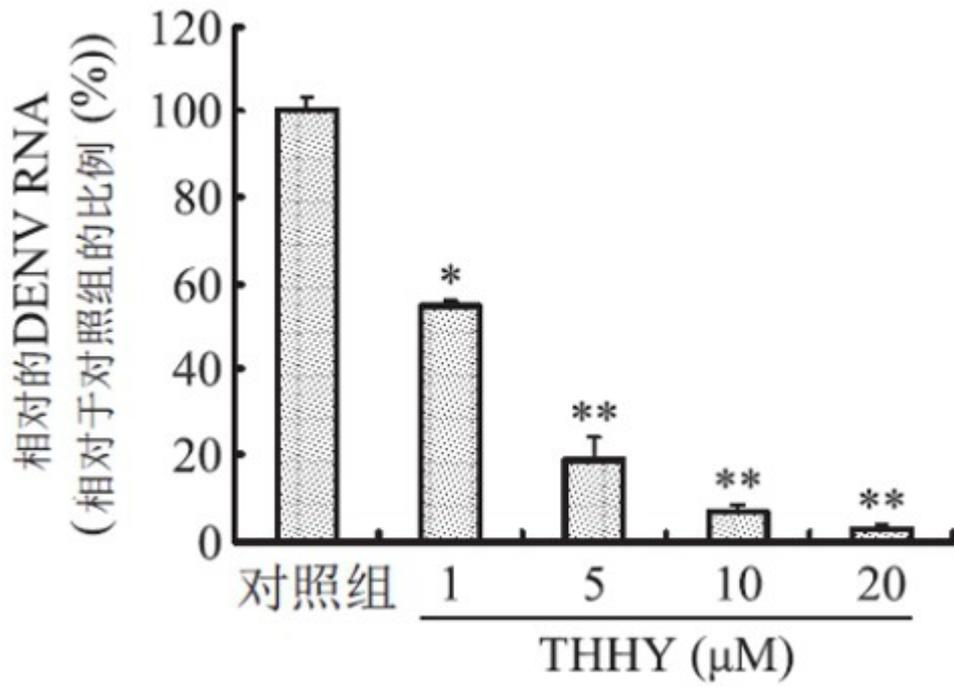


图2C

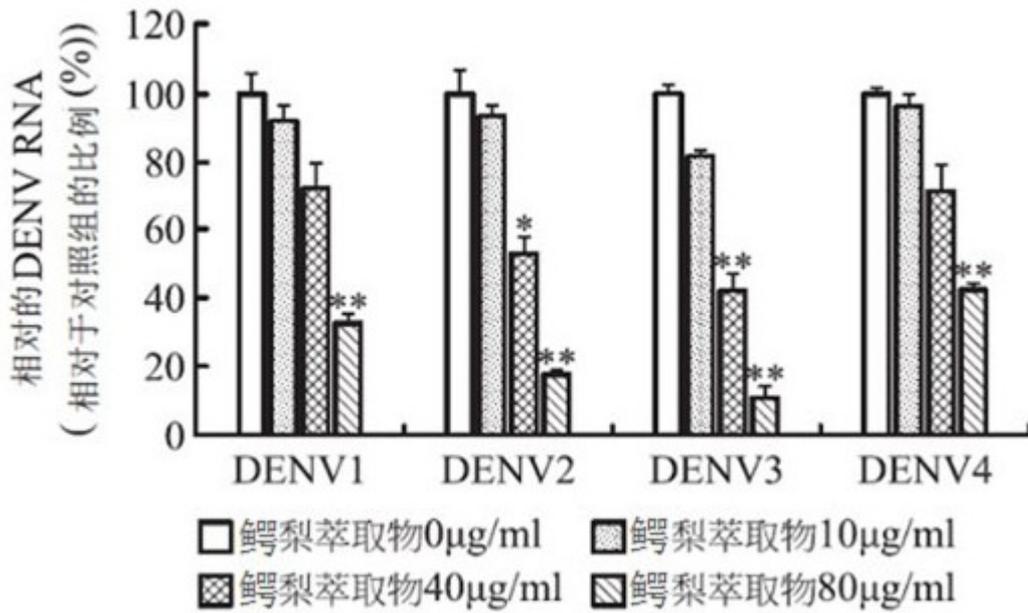


图3A

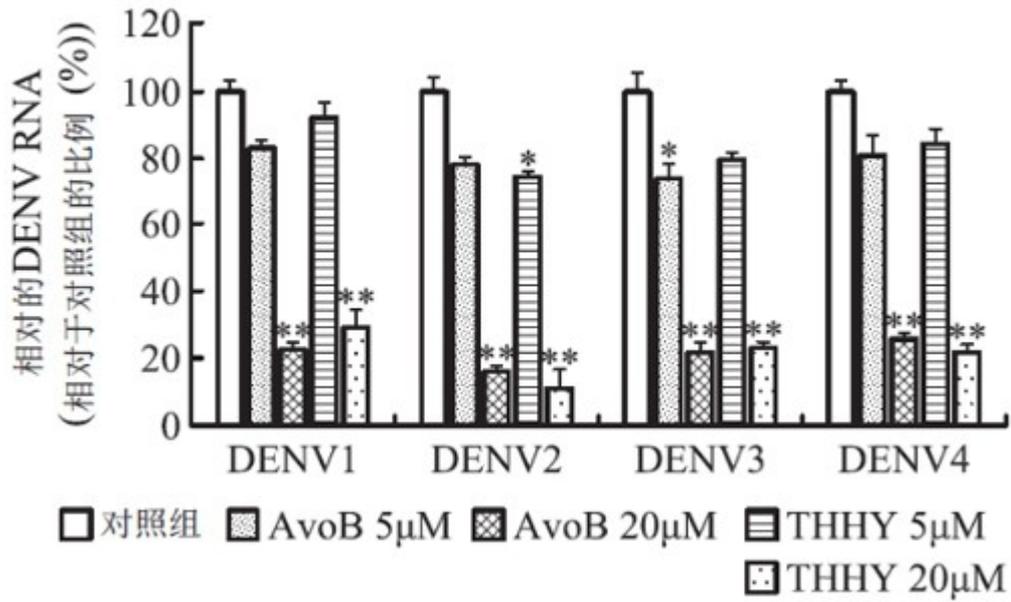


图3B

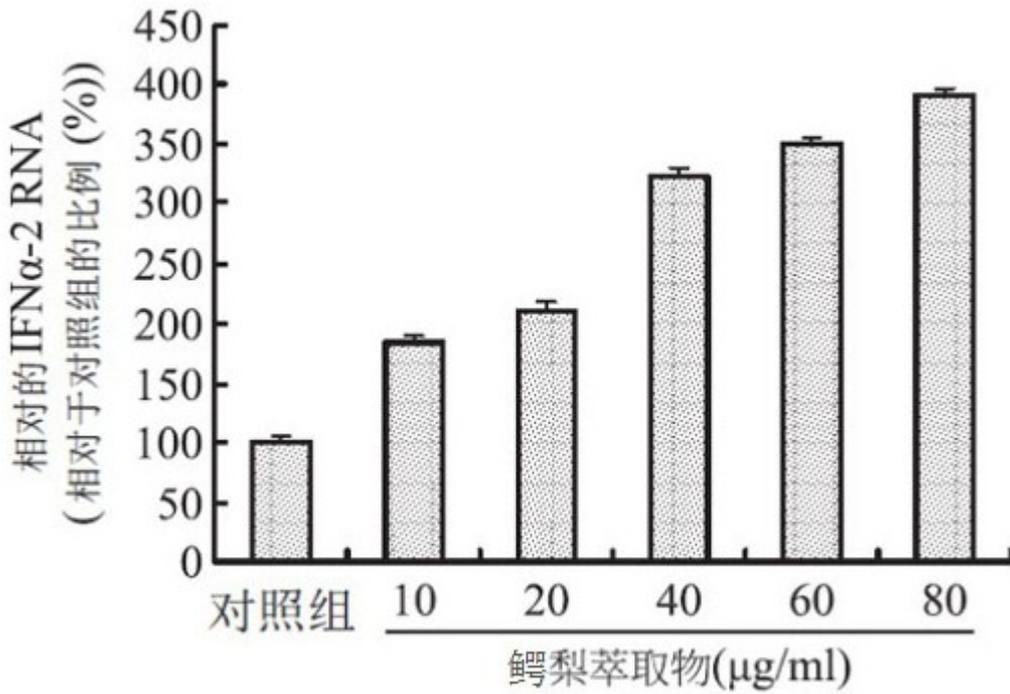


图4A

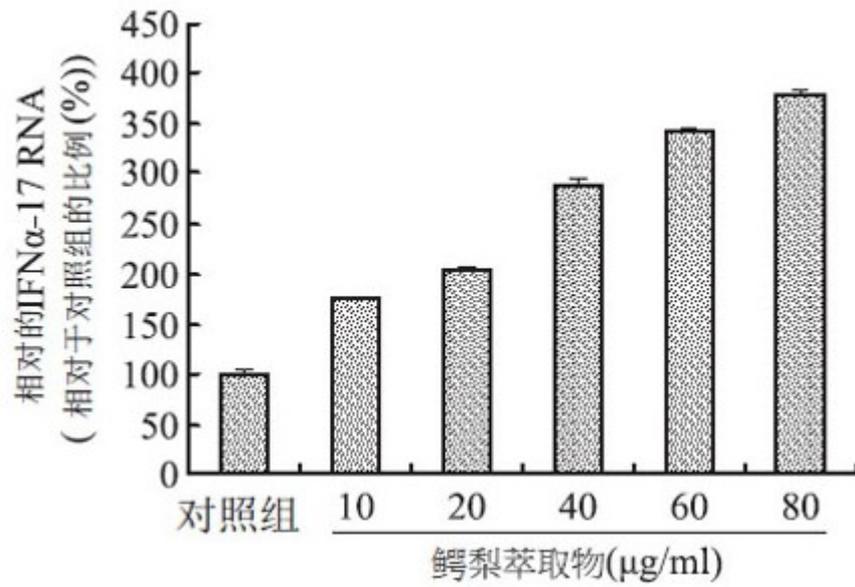


图4B

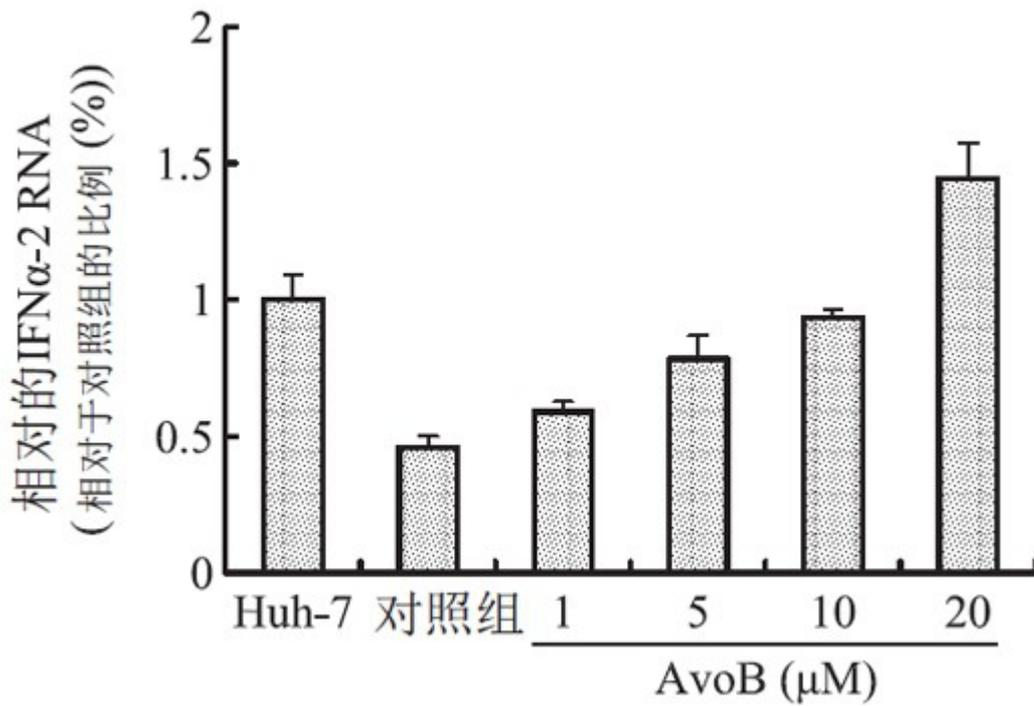


图5A

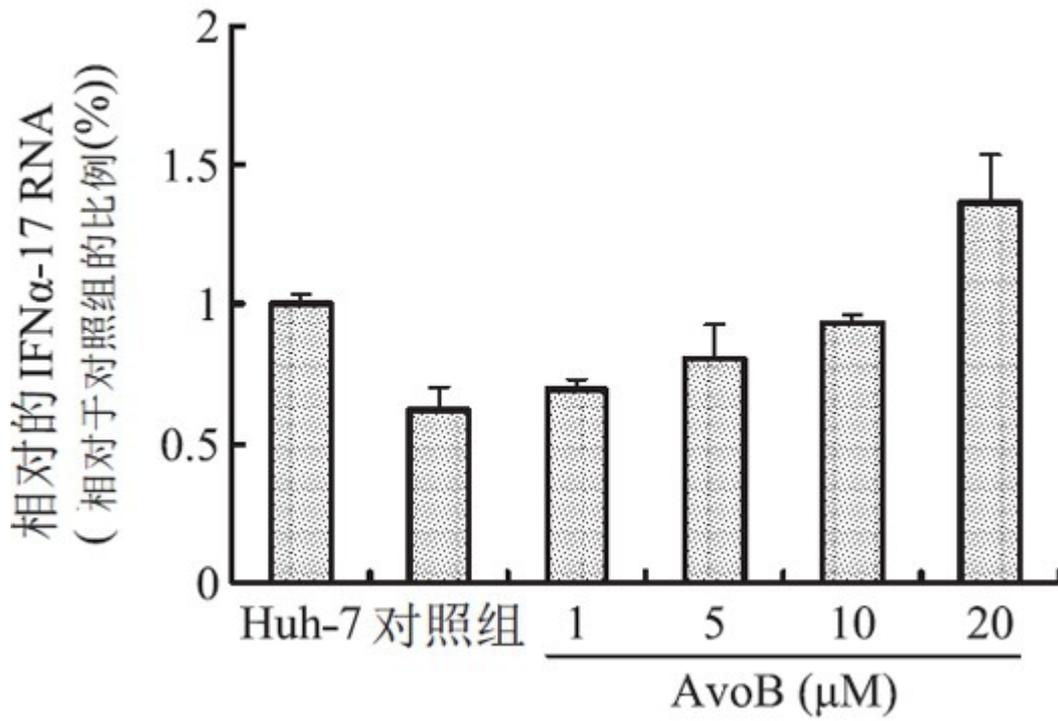


图5B

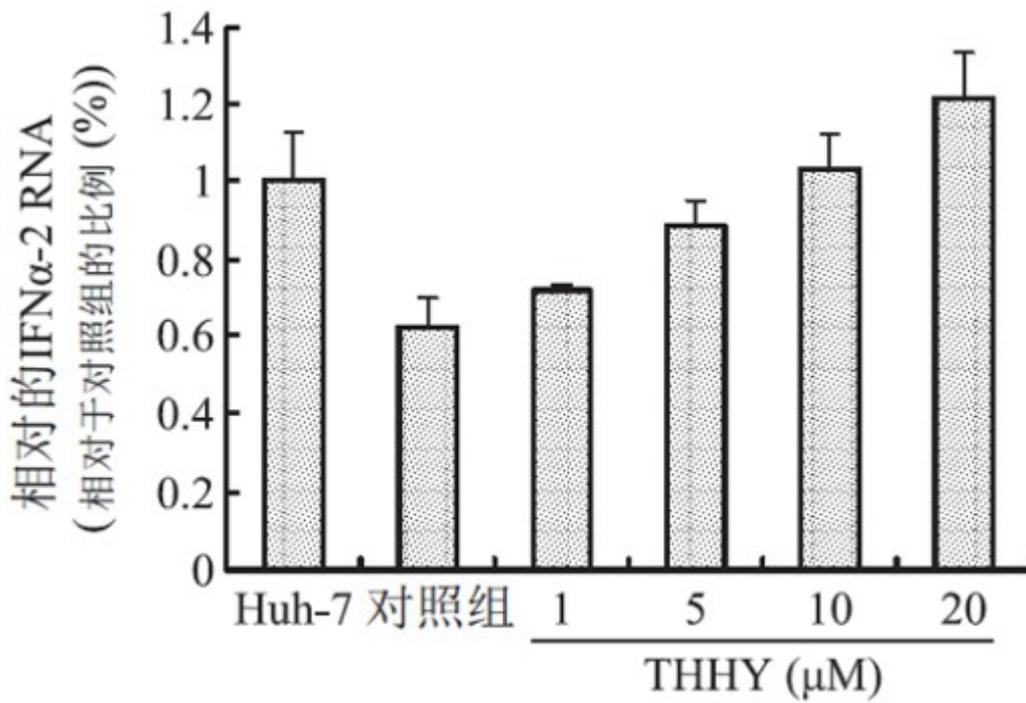


图6A

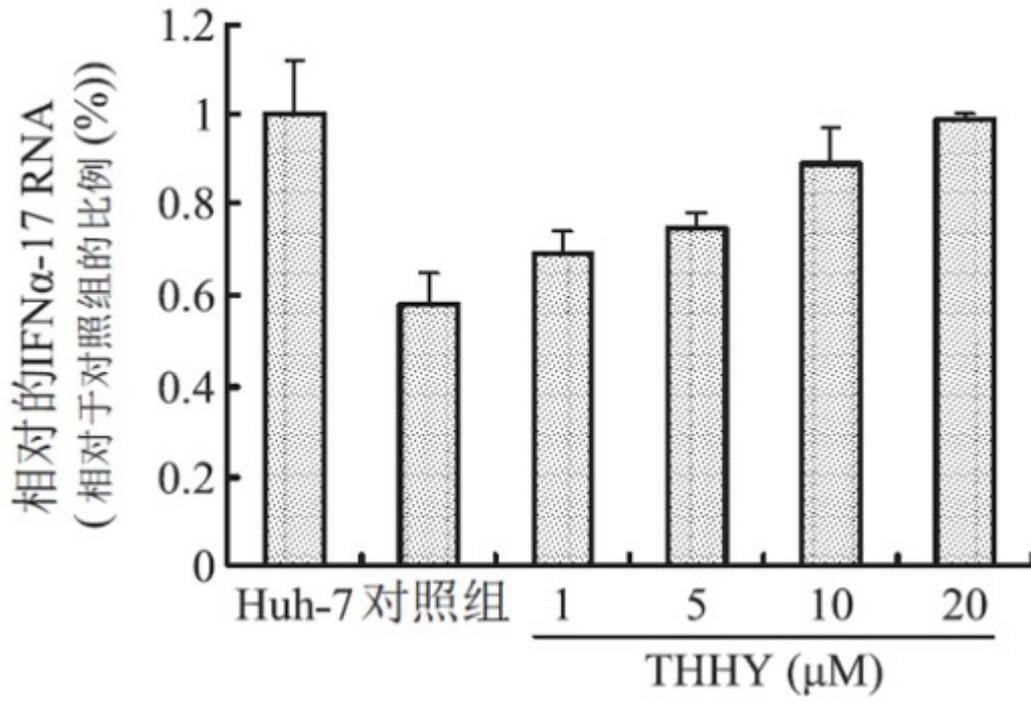


图6B

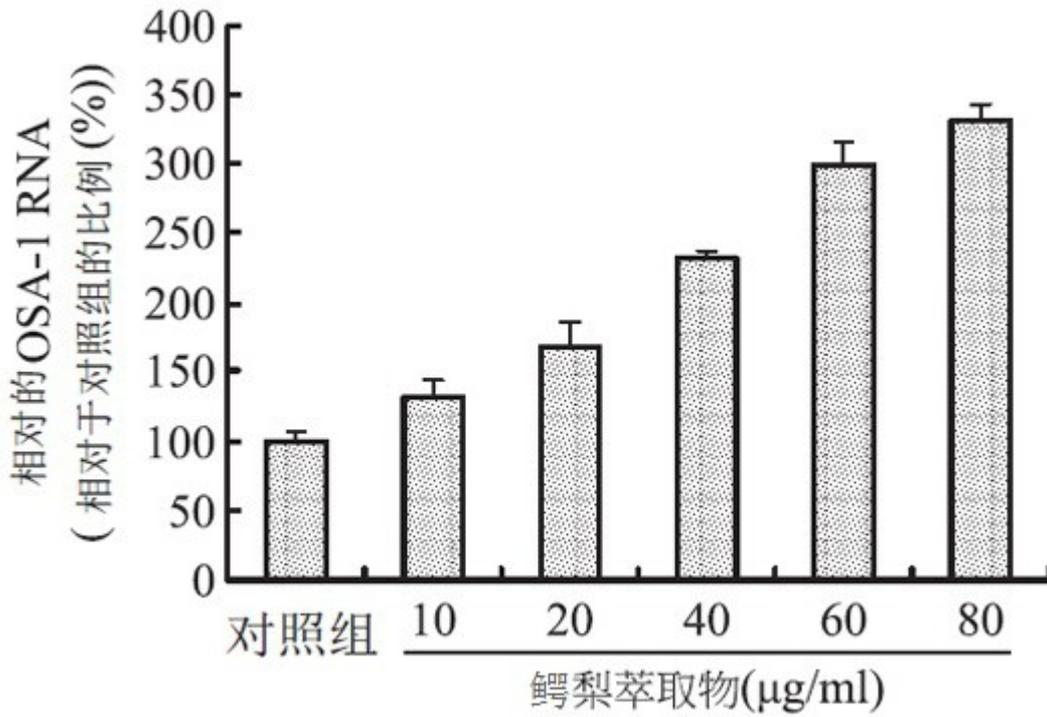


图7A

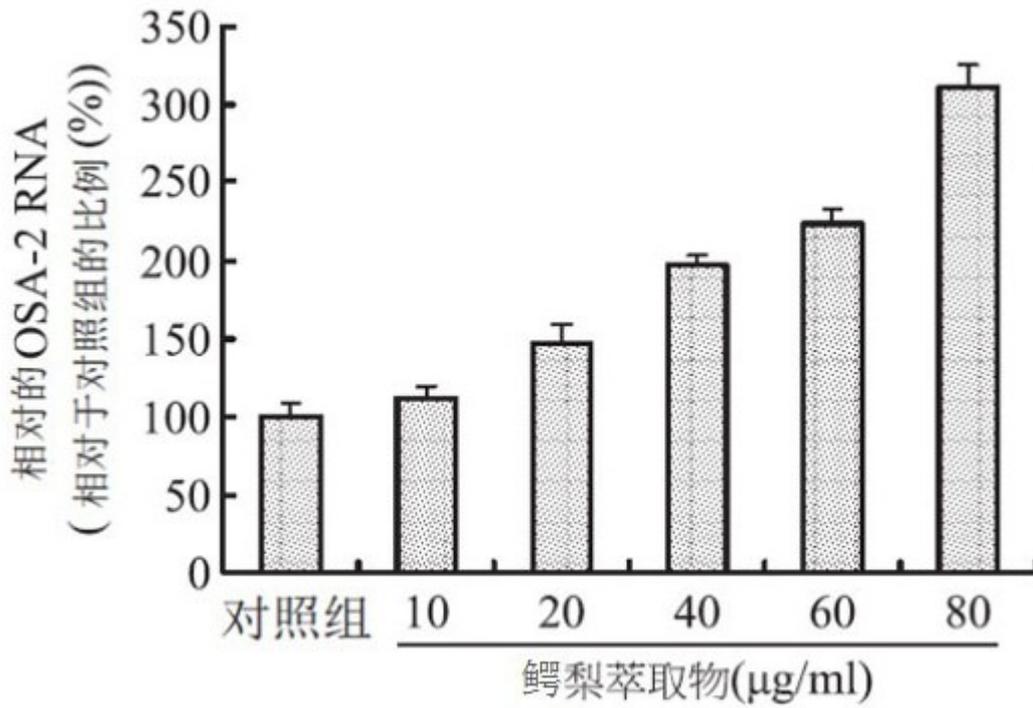


图7B

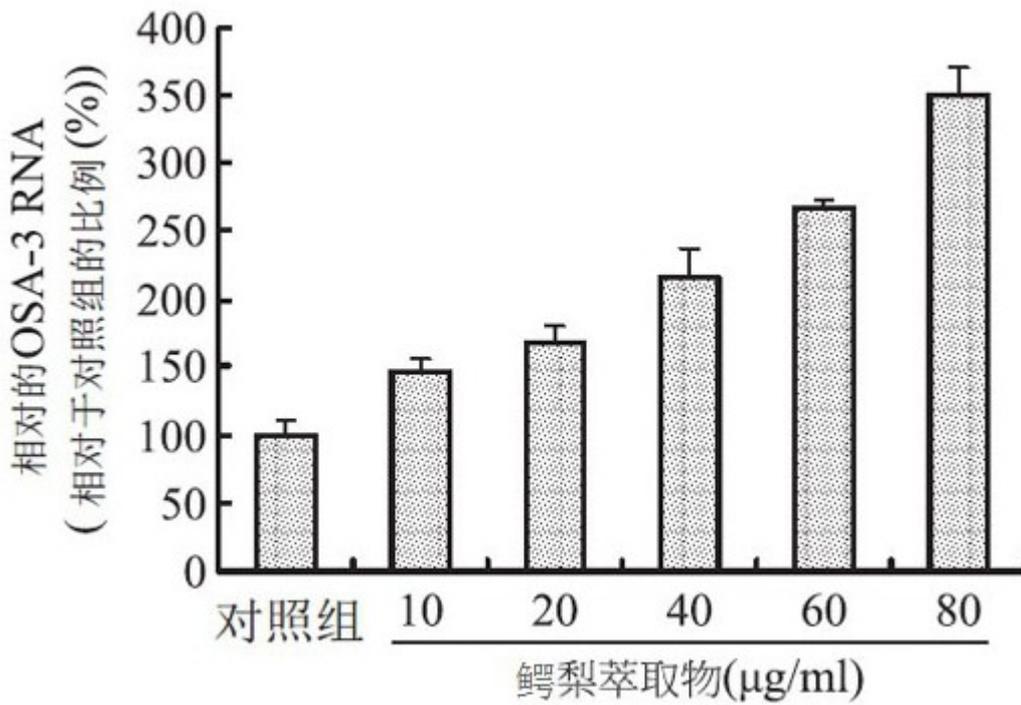


图7C

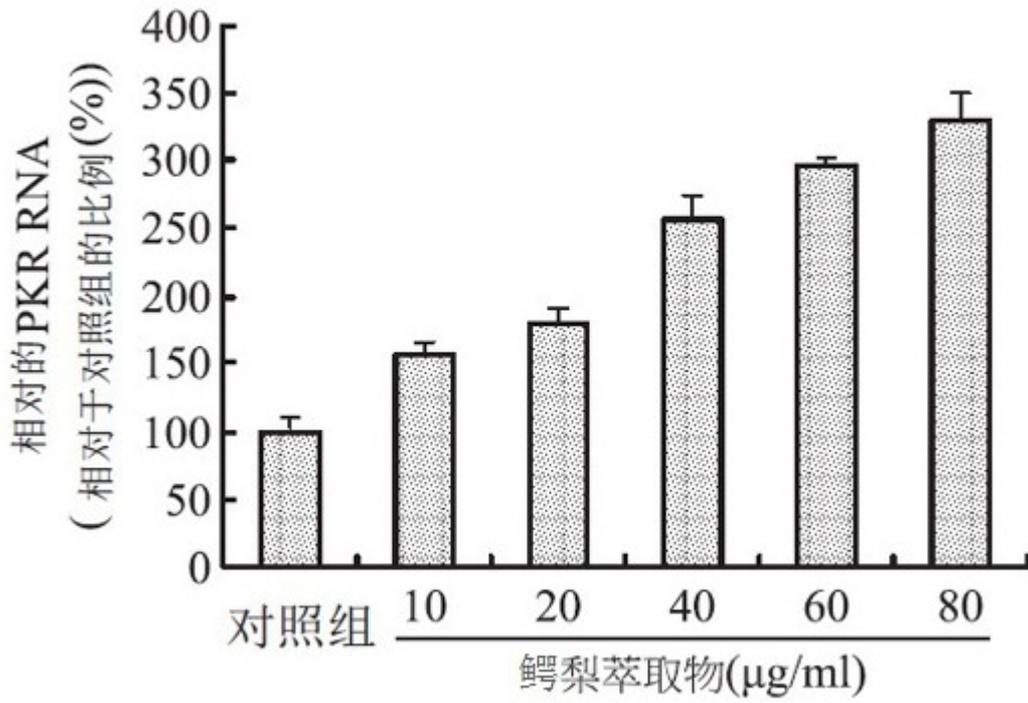


图7D

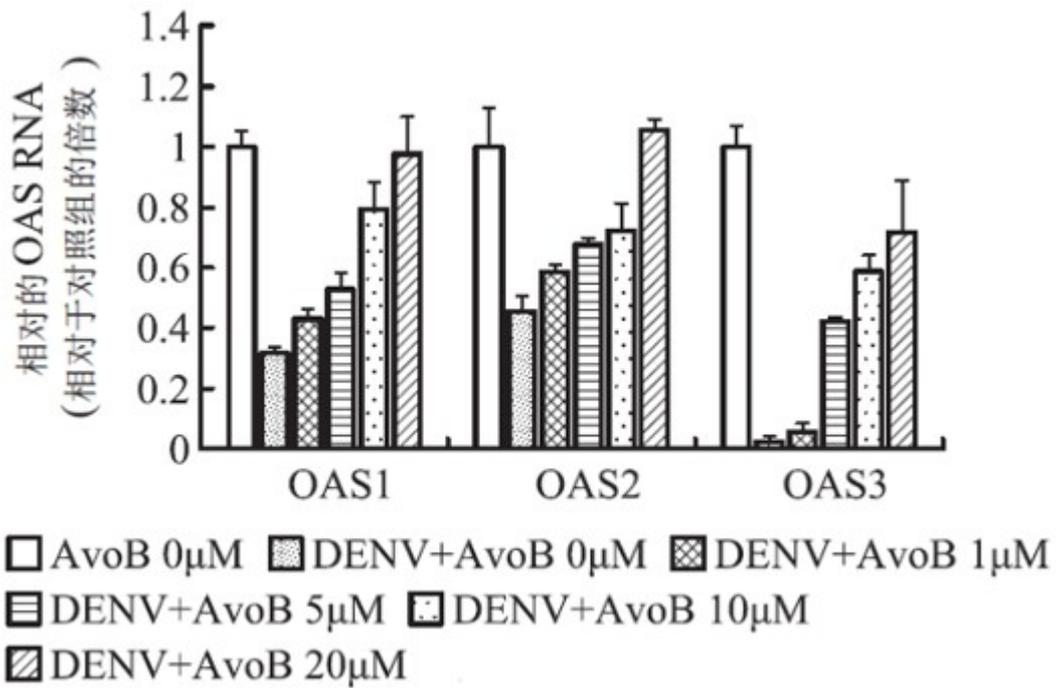


图8

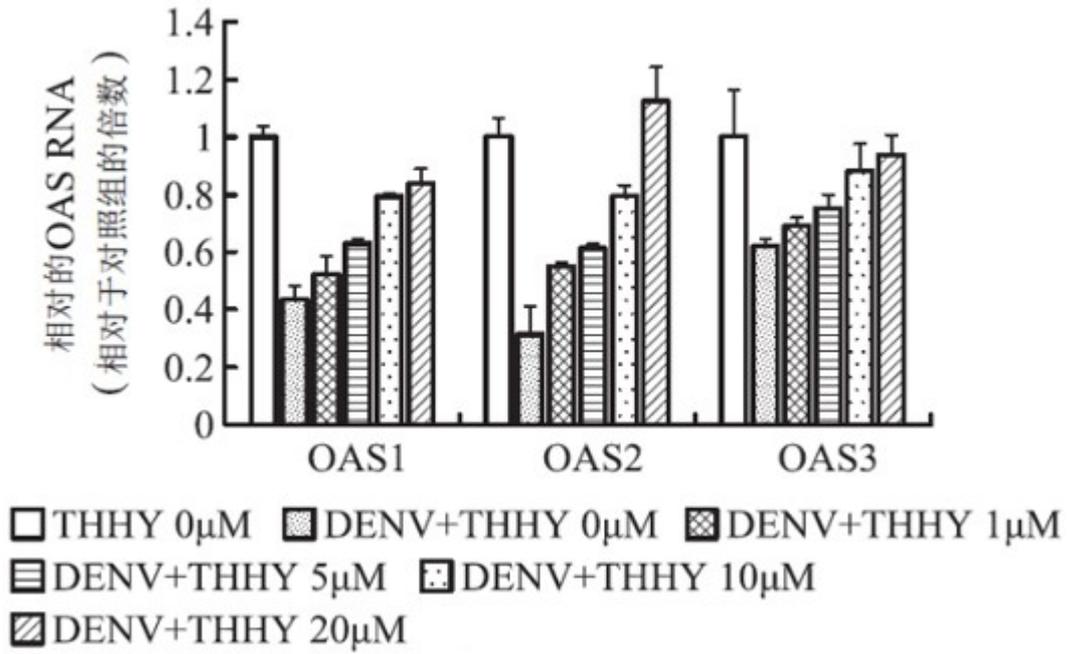


图9

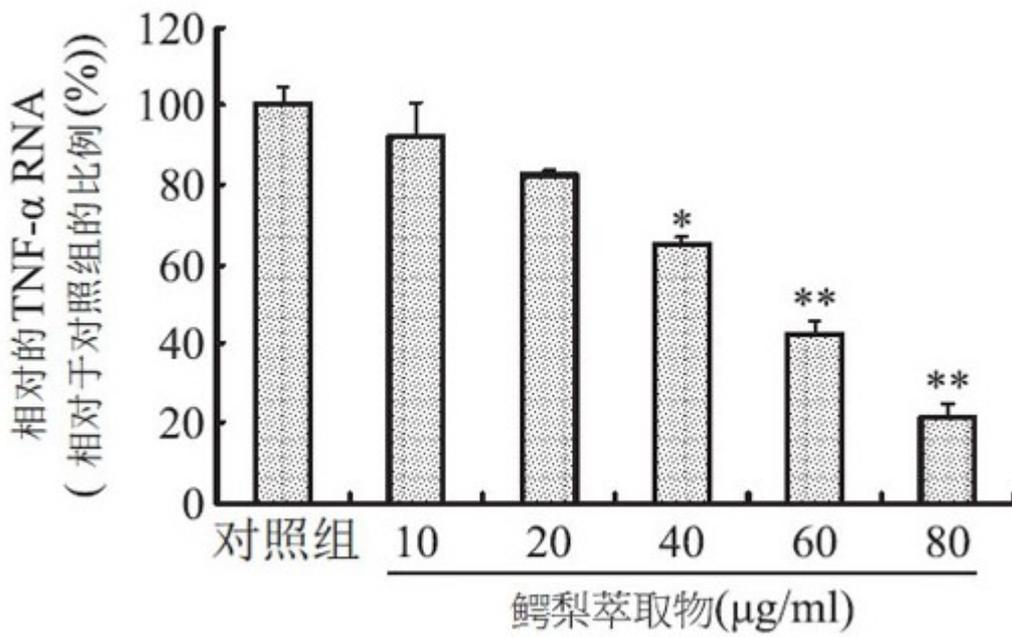


图10A

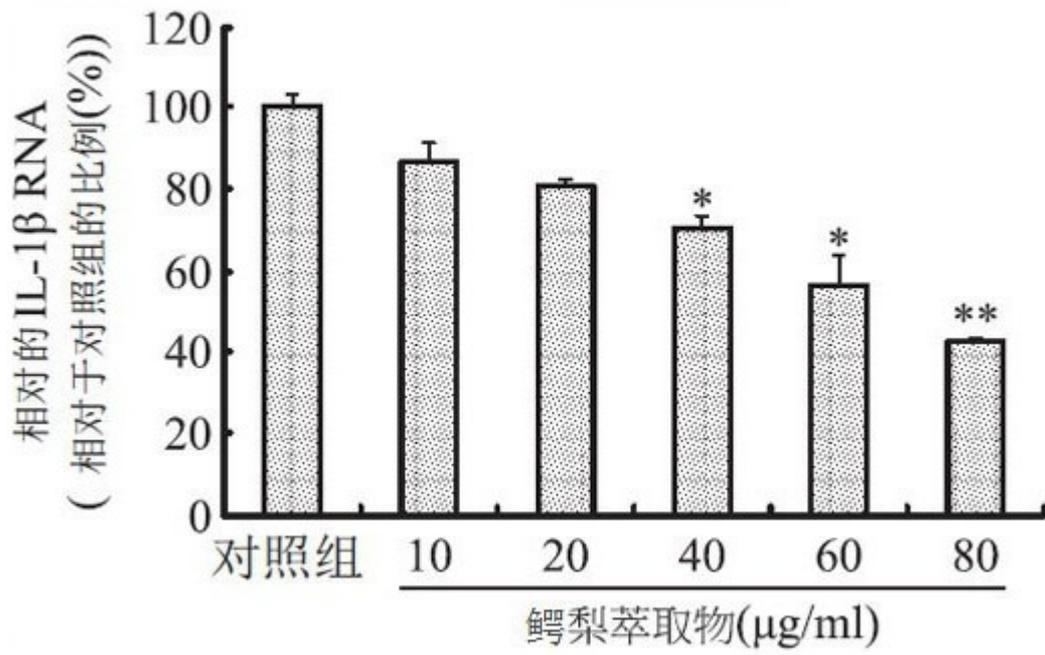


图10B

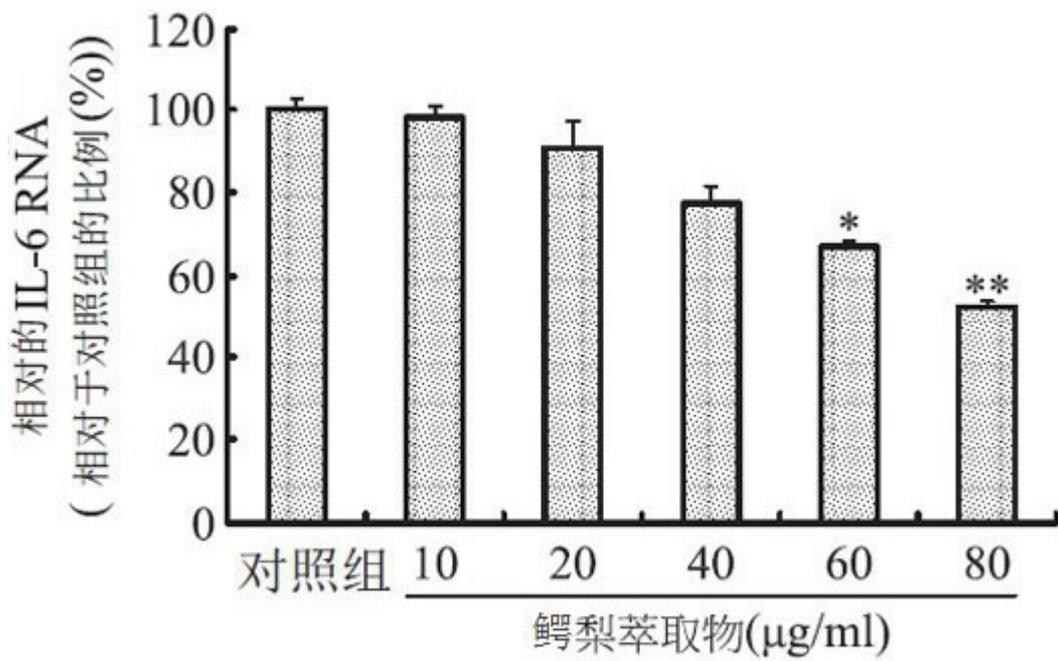


图10C

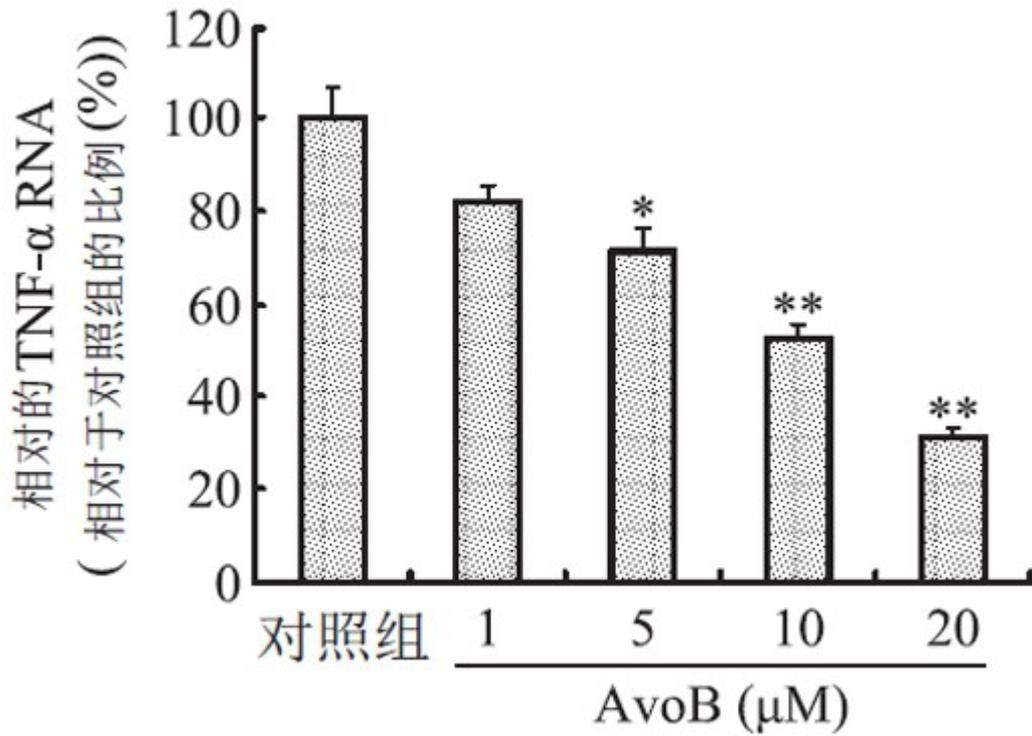


图11A

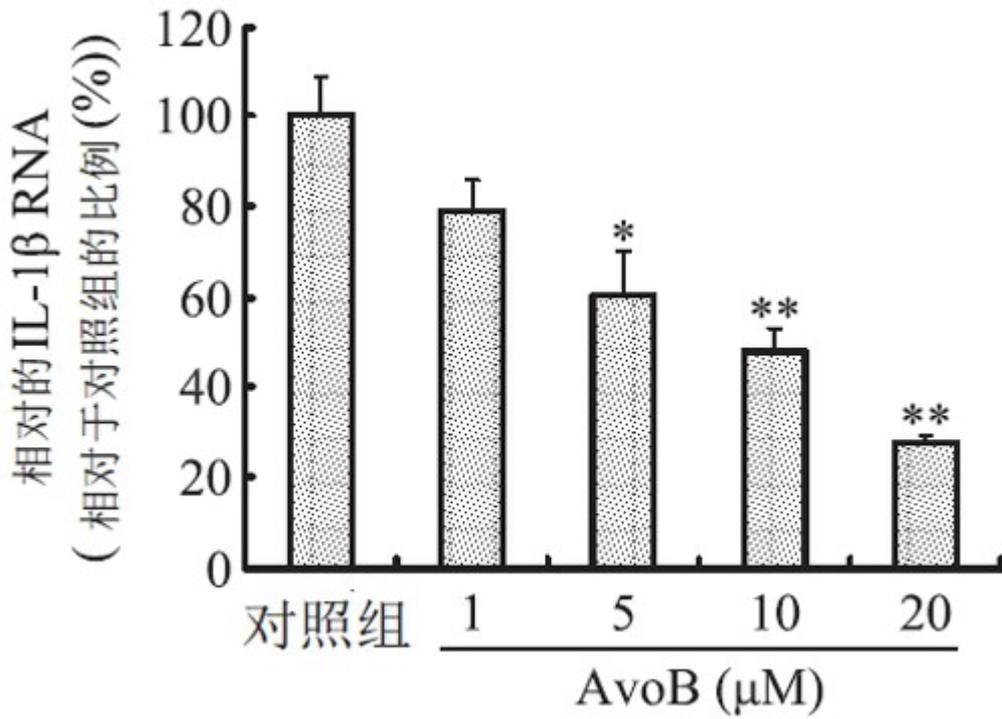


图11B

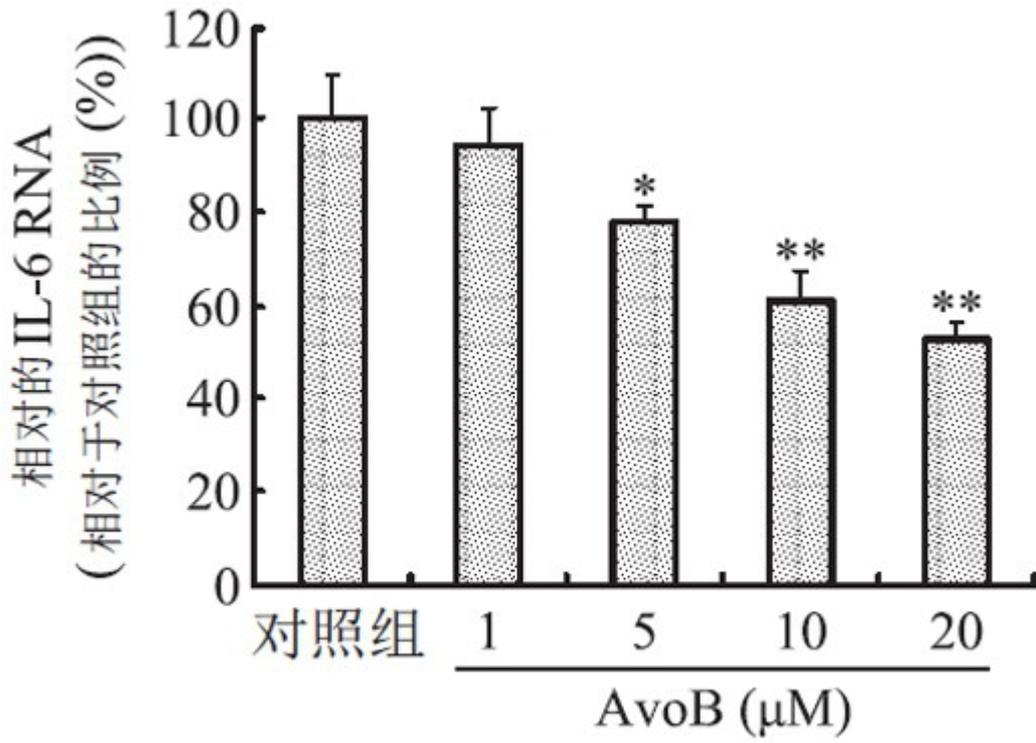


图11C

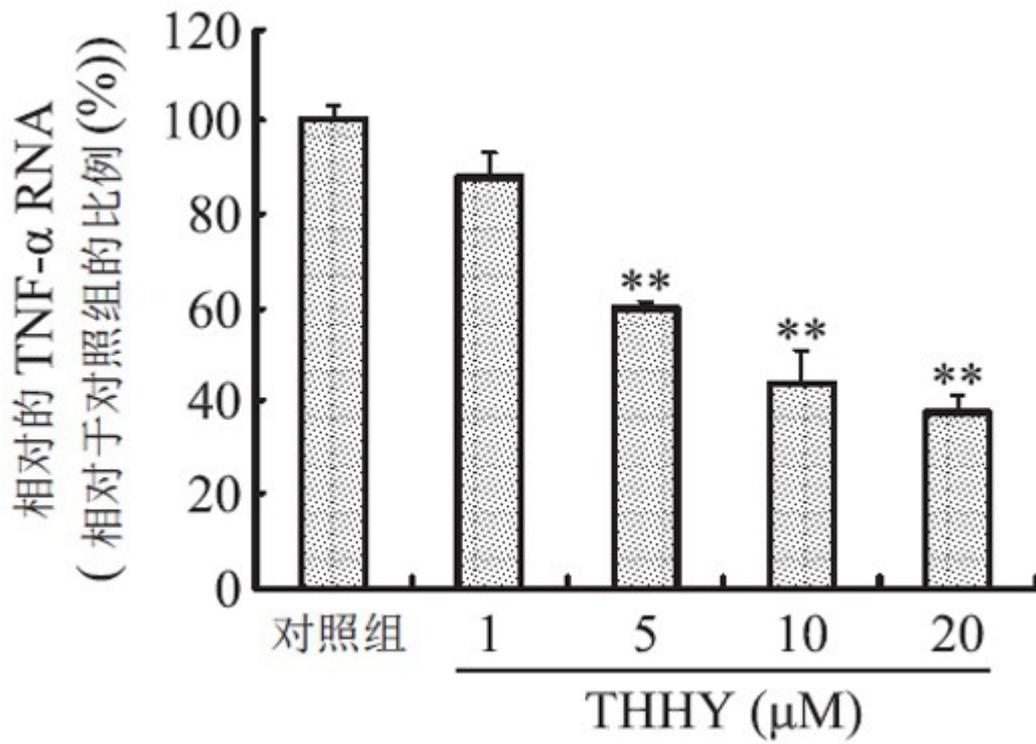


图12A

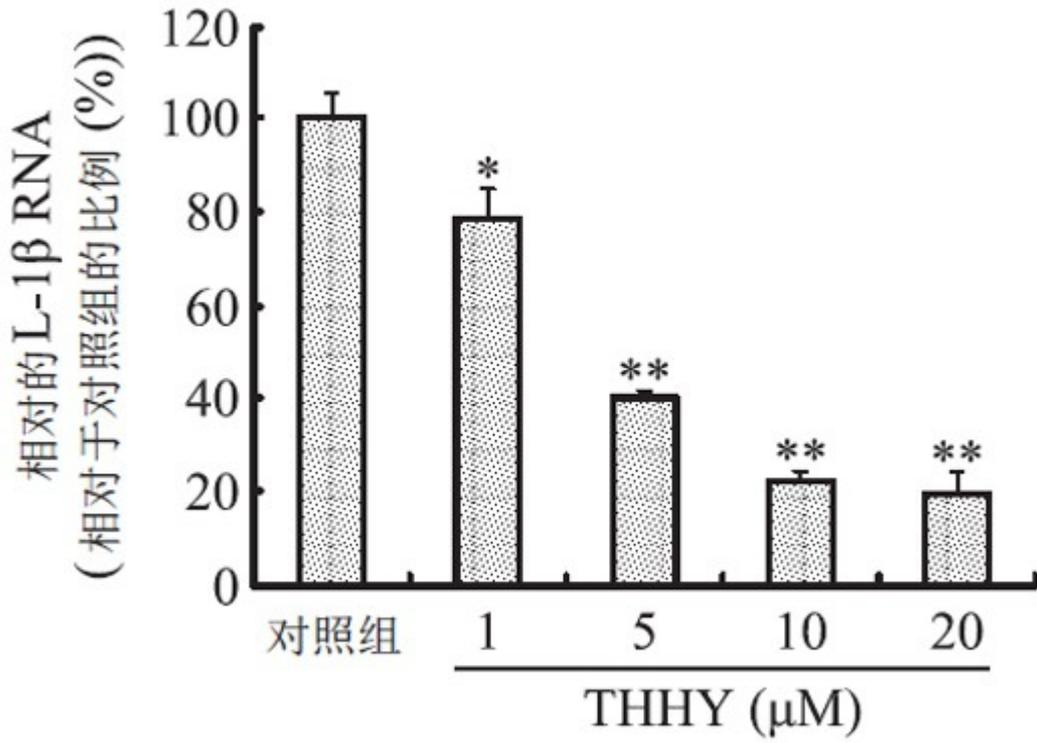


图12B

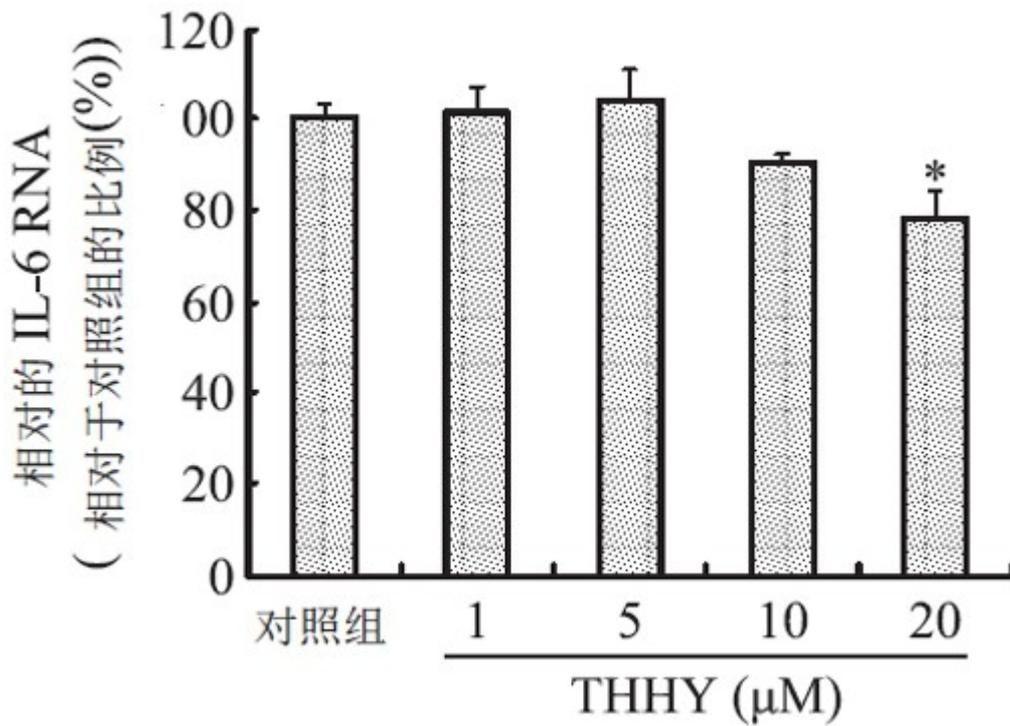


图12C

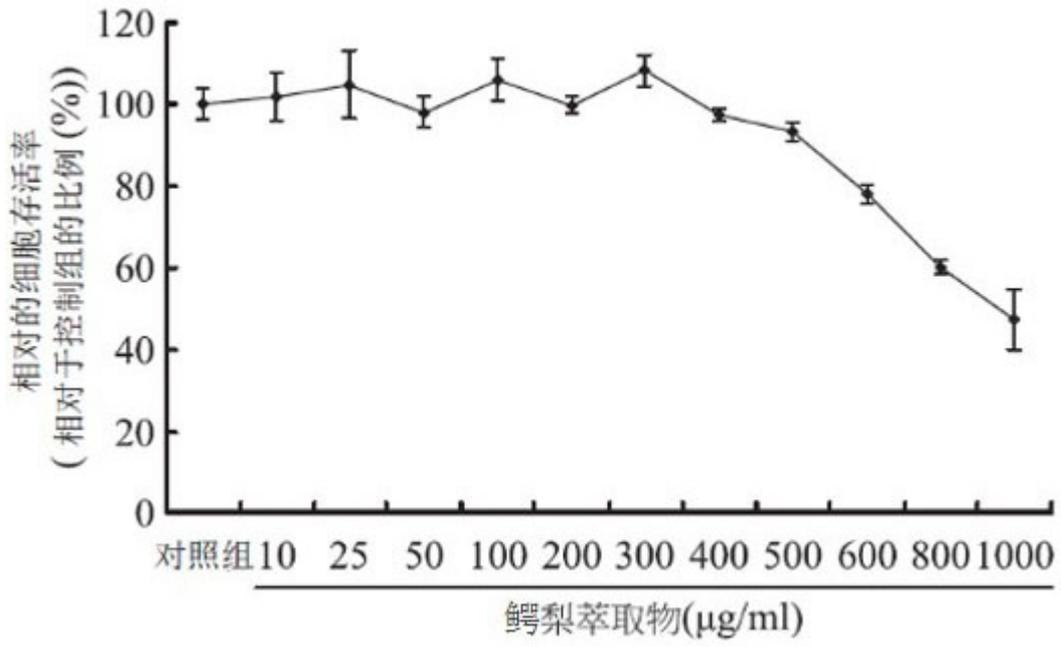


图13A

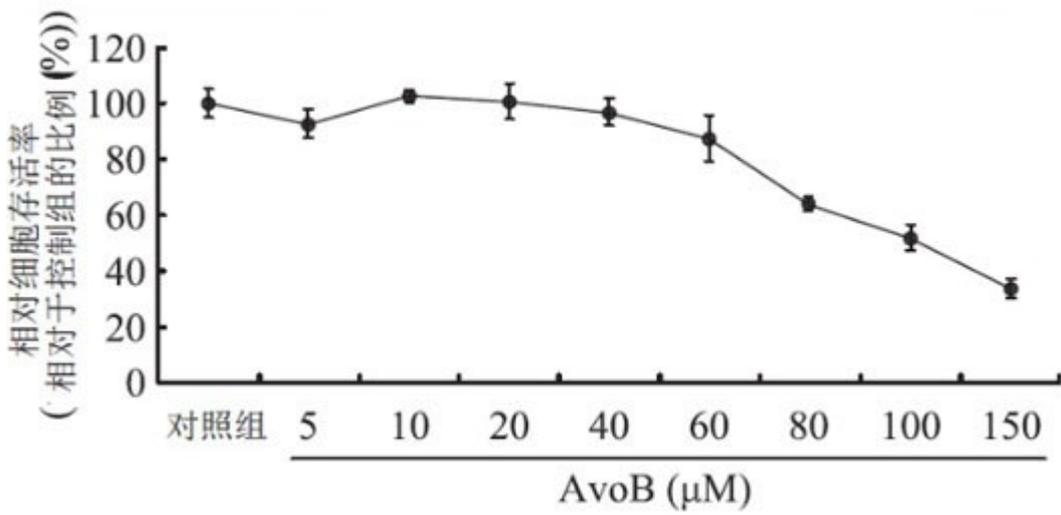


图13B

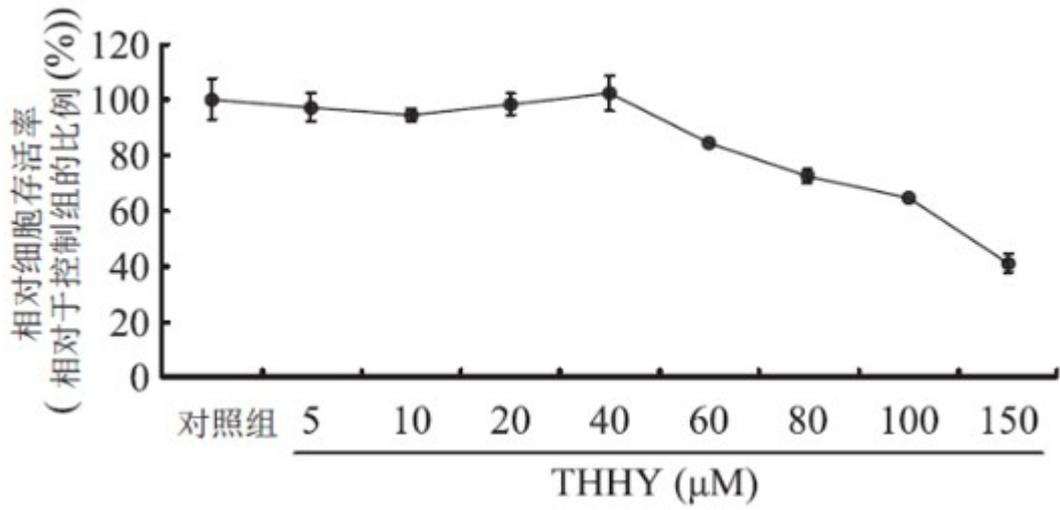


图13C

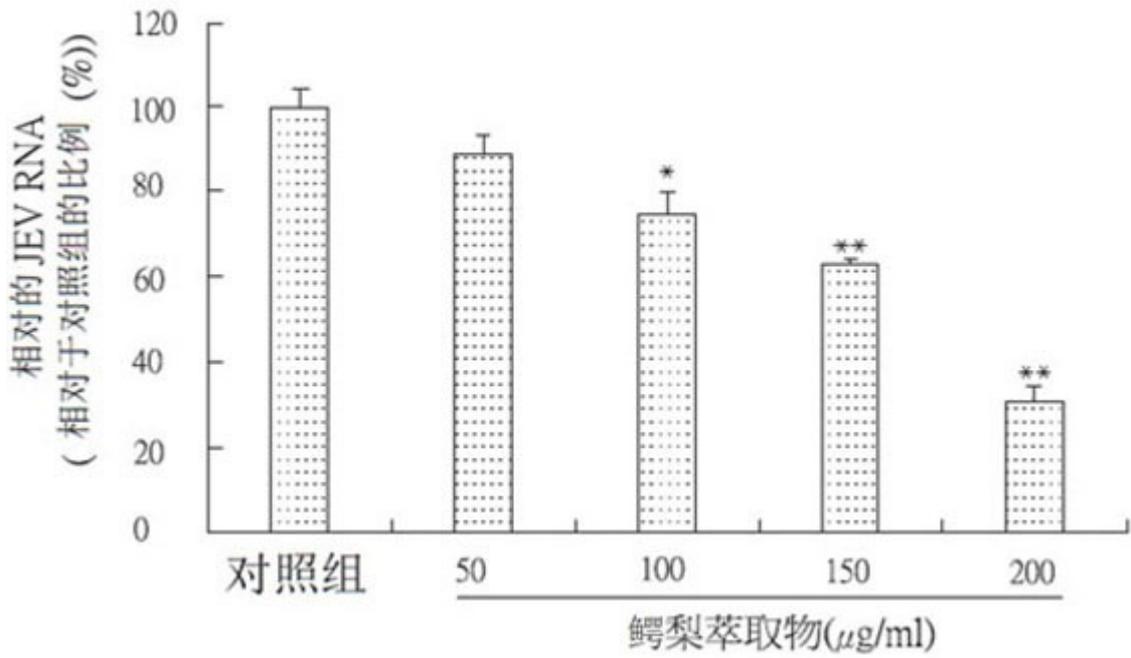


图14A

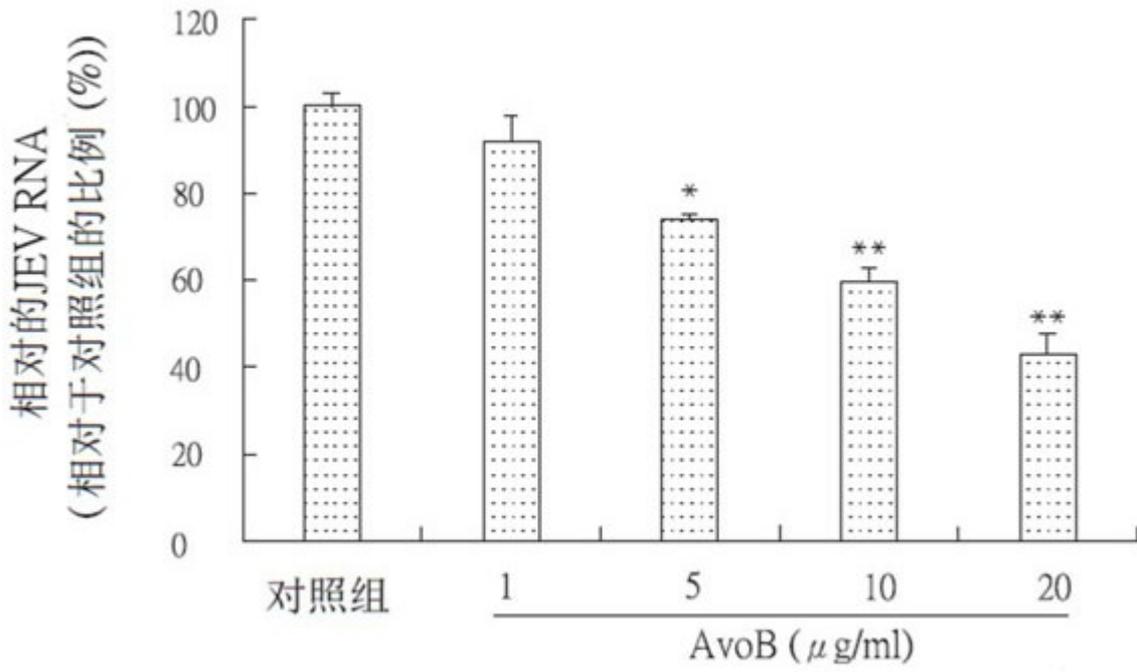


图14B

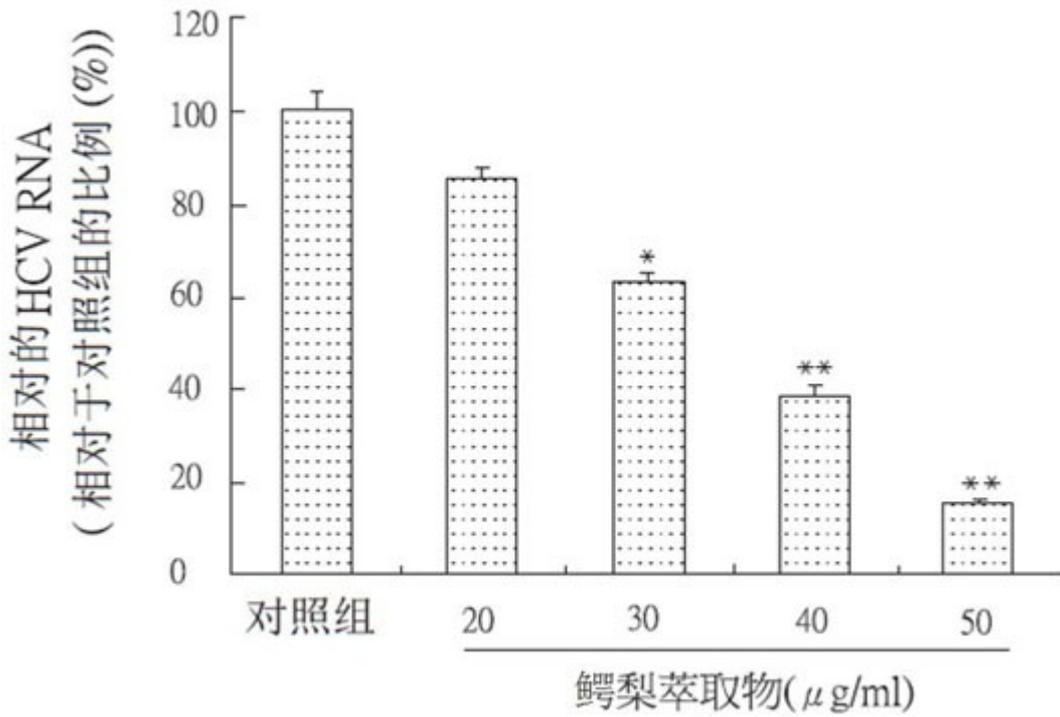


图15A

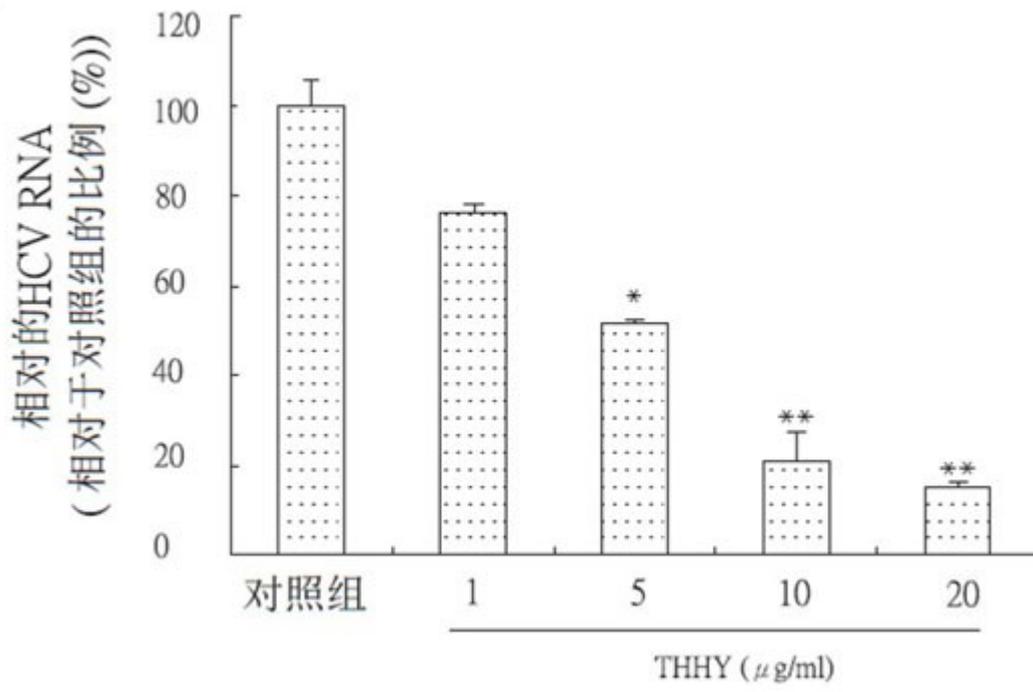


图15B

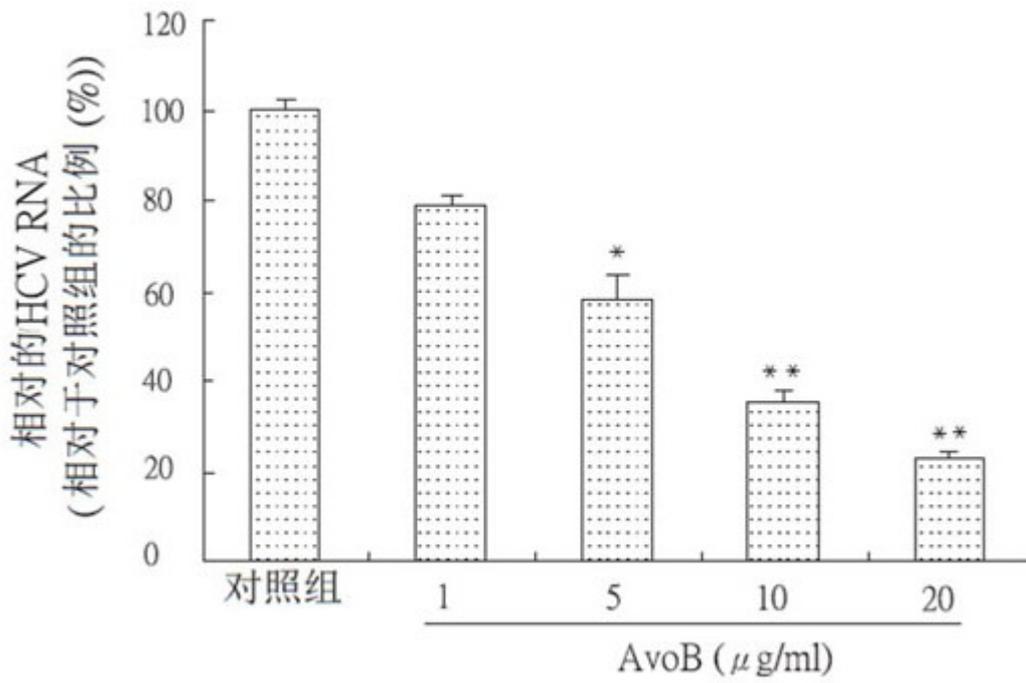


图15C