

# 美和科技大學

## 100 年度教師產學合作計畫

### 結案報告書

計畫名稱：中草藥抑制 B 型肝炎病毒作用之研究

計畫編號：100-FI-DBT-ICA-R-002

計畫期間：100 年 6 月 1 日至 101 年 5 月 31 日

計畫主持人：黃瑞齡

共同主持人：施慧娟、陳春香

經費總額：50,000 元

經費來源：葡萄王生技股份有限公司

中華民國 101 年 06 月 14 日

致謝

感謝葡萄王生技股份有限公司提供研究經費

使本計畫得以順利完成

由衷感謝

## 摘要

B型肝炎是國人常見的肝臟疾病，會引起急性及慢性肝炎，慢性肝炎患者長期染病，極易轉為猛暴性肝炎、肝硬化及肝癌。

本產學計畫以體外細胞培養模式，利用酵素連結免疫吸附分析法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 測定葡萄王生技股份有限公司提供之十種中草藥萃取物，對人類 B 型肝炎病毒野生型及 lamivudine 抗藥性突變株於病毒表面抗原及 e 抗原之作用。0.25% DMSO 組為 solvent control，無細胞毒性，對 HBV 野生型及拉美夫錠抗藥性突變株之表面抗原和 e 抗原均無抑制作用。分離自獨活的 Osthole 為正對照組，Osthole 給藥濃度 80  $\mu$ M 對 HBV 野生型之表面抗原具強度抑制(+++)其抑制百分比為  $50.1 \pm 2.3$ ，對拉美夫錠抗藥性突變株之表面抗原具強度抑制(+++)其抑制百分比為  $52.9 \pm 3.0$  對 HBV 野生型及拉美夫錠抗藥性突變株之 e 抗原均無顯著抑制作用。GK-Lr-W-Me25、GK-Lr-W-HW25、GK-Lr-M-Me25、GK-Lr-M-HW25、MAL-Lr-SCL-Me25、MAL-Lr-SCL-HW25、MAL-Lr-M- Me25、MAL-Lr-M-HW25、MAL-Lr-SCL-CA 及 WT-Lr-SCL-HW20 等 10 個供測樣品，對 HBV 野生型及拉美夫錠抗藥性突變株之表面抗原和 e 抗原均無抑制作用。

## (二) 研究計畫之背景及目的

病毒引起的肝病變是國人常見的肝障礙疾病，其中又以B型肝炎病毒〔Hepatitis B virus，簡稱HBV〕引起最為普遍。人類B型肝炎病毒(Hepatitis B virus，簡稱HBV)屬於肝去氧核糖核酸病毒科(Hepadnaviridae)，是目前已知最小的DNA病毒[1-3]。感染B型肝炎病毒，除了會引起急性肝炎(acute hepatitis)外，有些感染者會變成慢性肝炎(chronic hepatitis)，嚴重的發展成肝硬化(cirrhosis)，更有甚者，此病毒與原發性肝癌(hepatocellular carcinoma；HCC)的形成有密切的關係[4-6]。臺灣的B型肝炎之感染率大約為85%，而其中有15%左右的人會轉變成為帶原者(HBV carrier)[7]。據Szmuness於1978年發表的流行病報告中[24]，指出全世界有二億人口為B型肝炎病毒帶原者，其中大部分集中在亞洲和非洲流行地區，而這些高B型肝炎病毒帶原地區，亦為世界上肝癌發生比例最高的地區。且依據臺大醫師宋瑞樓多年研究B型肝炎病毒在臺灣之感染情形與其後果，由統計上發現：肝癌患者中有B型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)者高達91.2%，顯示B型肝炎病毒帶原者，極大多數發展成肝癌[8]。1981年畢斯里氏在臺灣公保門診中心，對公務員B型肝炎病毒表面抗原陽性及陰性患者追蹤了22,707例，發現表面抗原陽性者獲得肝癌比表面抗原陰性者高223倍[5]，由於以上流行病學研究及臨床觀察，加上現在分子生物學方法，測定肝癌細胞內帶有B型肝炎病毒的去氧核糖核酸，更證實B型肝炎病毒與肝癌之形成息息相關。B型肝炎目前雖然有疫苗，但是國內仍有約300萬病毒帶原者需要治療。最近肝癌罹患的年齡顯著下降，國中、國小學生亦有肝癌患者，實在令人憂心如焚，肝疾危害國人健康至劇，因此抗B型肝炎病毒藥物之開發研究為當務之急。

傳統醫學對肝膽疾病之治療，除了許多經典古籍所記載的經驗方外，尚有許多民間認為對「肝炎」、「黃疸」、「肝硬化」以及「肝癌」具有療效，而為大眾所傳頌之單味藥或偏方，近年來經由科學驗證，這些都是抗B型肝炎病毒中草藥開發之寶貴資源。對病毒具專一性，且對細胞的毒性小，療效指標大，才是理想的抗病毒藥。

由於B型肝炎病毒的複製靠自己的內源性去氧核糖核酸聚合酶(endogenous HBV DNA polymerase)，先將不完整的正股DNA補齊後，目前相信是靠宿主的接合酶(ligase)、拓樸酶及第二型聚合酶(polymerase Type II)，利用宿主的轉錄機器裝置(transcriptional machinery)，轉錄出病毒前基因體RNA(pregenomic RNA)，以此為模板靠病毒內源性聚合酶反轉錄出病毒負股DNA，再以負股DNA為模板靠病毒內源性去氧核糖核酸聚合酶複製正股DNA，因此B型肝炎病毒的內源性去氧核糖核酸聚合酶本身具備有DNA dependence DNA polymerase activity、encapsidation activity、priming activity、reverse

transcriptase activity 及RNase H activity，這些活性對病毒複製缺一不可，因此抑制內源性去氧核糖核酸聚合酶為開發抗B型肝炎病毒藥物的重要標的[9]。

目前臨床上使用之治療藥物，以 lamivudine(即 3TC)，有非常肯定的療效[10 - 11]，可惜仍然有抗藥性的問題[12 - 13]。lamivudine 抗藥性突變株，為 B 型肝炎病毒聚合酶基因的 YMDD 位置產生單一點突變成為 YIDD 或 YVDD 後，對 lamivudine 產生抗藥性，導致 lamivudine 失去作用，病人血清內病毒量反彈上升。本研究室已建立 lamivudine 抗藥性突變株(mutant type) 之穩定轉殖細胞株，進行篩選 B 型肝炎病毒 lamivudine 抗藥性突變株之中草藥。

最近的篩選工作，已完成215種純化合物(pure compounds)，342種中草藥粗抽液(crude extracts)及28種複方之抗人類B型肝炎病毒活性評估。本產學計畫以體外細胞培養模式，利用酵素連結免疫吸附分析法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)測定十種葡萄王提供之中草藥萃取物對人類B型肝炎病毒野生型及lamivudine抗藥性突變株於病毒表面抗原及e抗原之作用。將來經由活性導向(Bioassay directed fractionation)追蹤有效分劃，以期有效成分之分離及化學結構之鑑定。並進一步進行有效成分抑制B型肝炎病毒作用機制(action mechanisms)之探討。

### (三) 研究方法、進行步驟及執行進度

#### 第一部份供試藥材之來源及製備

##### 1. 供試藥材之採購、鑑定、製備

十種中草藥萃取物由葡萄王生物科技股份有限公司提供。

#### 第二部份 B型肝炎病毒抑制作用及活性成分之分子生物層次之探討—

##### 1. 細胞株及細胞培養

本計畫使用兩種產人類B型肝炎病毒(Human Hepatitis B Virus)之人類肝癌細胞株，一為HepG2.215，此係Mt. Sinai Medical College Dr. Acs之實驗室所建立[14]，乃利用肝癌細胞株HepG2經轉染(transfection)帶有完整HBV DNA (*ayw*)及neomycin resistance 基因的質體後，以G418 篩選，再經由系列稀釋(limiting dilution)得到的細胞株，命名為HepG2.215。由於此細胞株有完整的HBV DNA 的嵌入 (integrated)，且已形成一個穩定的細胞株，故可持續高量的分泌B 型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg)、e 抗原(HBeAg)及病毒顆粒體(42 nm Dane particles and 22 nm subviral particles)。本計畫將以此作為B型肝炎病毒野生型模式，進行益陞康牛樟芝抗B型肝炎病毒檢測及活性成分的追蹤分離。另一為本實驗室執行國科會計畫，所建立的lamivudine(又稱3TC)抗藥性突變株之穩定轉殖細胞株，亦是利用肝癌細胞株HepG2 經轉染(transfection)帶有YMDD突變之HBV DNA (*ayw*)及hygromycin resistance 基因的質體後，以hygromycin篩選，再經由系列稀釋(limiting dilution)得到的細胞株，命名為M33。以此作為B型肝炎病毒抗lamivudine突變型模式，進行益陞康牛樟芝抗B型肝炎病毒活性及有效成分之分離鑑定。

GepG2.215細胞與M33細胞分別培養於含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的DMEM培養基(Gibco Laboratories, Grand Island, NY)中。每毫升的培養基內添加100 I.U.青黴素 (penicillin)、100 µg 鏈黴素(streptomycin)、2.5 µg 防治黴(fungizone)、2 mM麩氨酸(L-glutamine)及100 µM 之非必需性氨基酸(non-essential amino acid，包括14.7 µg glutamic acid, 7.5 µg glycine, 8.9 µg alanine, 13.3 µg aspartic acid, 11.5 µg proline, 15 µg asparagine 及10.5 µg serine)，以上稱完全培養基，置於含5%二氧化碳的37°C 培養箱中。

## 2. 抗病毒藥物之處理[15]

在 24 well 的細胞培養皿(petri-dish)，種入 MS-G2 細胞  $2 \times 10^5$ ，或 M33 細胞  $1.5 \times 10^5$ ，待隔夜後細胞充分附著，更新培養基，同時給予五種不同濃度之供試藥物，每個濃度三重覆。給藥處理 48 小時後，收集上層培養液，進行抗病毒活性測定。並同時以 MTT 測試，留在 24 well 內的細胞存活情形及藥物是否毒害及抑制細胞生長。MTT(3-[4, 5- dimethylthiazol- 2- yl] 2, 5- diphenyl- tetrazolium bromide) 是一種黃色的染劑，會被活細胞所吸收並經由粒線體中的 succinate dehydrogenase 還原成藍紫色的 formazan，可用來檢測細胞之存活與生長變化。在 24 well 的細胞培養皿中，加入 1 mg/ml MTT 溶液，於 37°C 下作用 4 小時。吸除上清液，加入 100  $\mu$ l DMSO 將藍紫色的結晶析出。最後，以分光比色計 ELISA reader 在 540 nm 測定吸光值，反映存活細胞的多寡。

3. B 型肝炎病毒表面抗原及 e 抗原之酵素免疫測定[16] 利用酵素連結免疫吸附分析法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)，使用抗人類 B 型肝炎病毒表面抗原之單株抗體及抗人類 B 型肝炎病毒 core/e 抗原之多源抗體的酵素免疫檢驗試劑〔保健生物科技公司，台北，台灣〕，利用抗體—抗原—抗體酵素接合體之三明治複合體，以含過氧化氫的磷苯二氫 (OPD) 溶液呈色之，再以分光比色計 BioTek ELX800 型 ELISA reader 在 450 nm 測定之，所得的吸光值 (O.D. value) 反應出抗原的多寡。並以對照組的吸光值當 100，依以下公式計算其抑制百分比 (Inhibition %)：

$$\frac{\text{對照組吸光值} - \text{給藥組吸光值}}{\text{對照組吸光值}} \times 100\% = \text{抑制百分比 (Inhibition \%)}$$

抑制百分比在 20—35 為輕度抑制，抑制百分比在 35—50 為中度抑制，抑制百分比在 50—65 為強度抑制，抑制百分比在 65 以上為非常強度抑制。

## 4. 統計方法

實驗所得之數據以平均值 $\pm$ 標準誤差 (mean  $\pm$  standard error of mean) 來表示。實驗組與對照組之間是否有差異以 Student's t-test 測定，當  $p < 0.05$  時視為有統計意義。

#### (四) 結果與討論

本試驗每種供測藥品，原則上採五種測定濃度，三重覆處理。本次供測藥物，以 DMSO 溶解，故 0.25% DMSO 為 solvent control。結果如下：

##### 1. GK-Lr-W-Me25

(A). B 型肝炎病毒野生型細胞株(HepG2215 cell line)[詳 Table 1 & Table 2]：

五個測試濃度 100、50、25、12.5 及 6.25  $\mu\text{g/ml}$  無細胞毒性[Fig. 1a]，對表面抗原及 e 抗原均無抑制作用 [Fig. 11a]。

(B). 拉美夫錠抗藥性突變株(M33 cell line) [詳 Table 3 & Table 4]：

五個測試濃度 100、50、25、12.5 及 6.25  $\mu\text{g/ml}$  無細胞毒性[Fig. 1b]，對表面抗原及 e 抗原均無抑制作用 [Fig. 11b]。

##### 2. GK-Lr-W-HW25

(A). B 型肝炎病毒野生型細胞株(HepG2215 cell line)[詳 Table 1 & Table 2]：

五個測試濃度 100、50、25、12.5 及 6.25  $\mu\text{g/ml}$  無細胞毒性[Fig. 2a]，對表面抗原及 e 抗原均無抑制作用 [Fig. 12a]。

(B). 拉美夫錠抗藥性突變株(M33 cell line) [詳 Table 3 & Table 4]：

五個測試濃度 100、50、25、12.5 及 6.25  $\mu\text{g/ml}$  無細胞毒性[Fig. 2b]，對表面抗原及 e 抗原均無抑制作用 [Fig. 12b]。

##### 3. GK-Lr-M-Me25

(A). B 型肝炎病毒野生型細胞株(HepG2215 cell line)[詳 Table 1 & Table 2]：

五個測試濃度 100、50、25、12.5 及 6.25  $\mu\text{g/ml}$  無細胞毒性[Fig. 3a]，對表面抗原及 e 抗原均無抑制作用 [Fig. 13a]。

(B). 拉美夫錠抗藥性突變株(M33 cell line) [詳 Table 3 & Table 4]：

五個測試濃度 100、50、25、12.5 及 6.25  $\mu\text{g/ml}$  無細胞毒性[Fig. 3b]，對表面抗原及 e 抗原均無抑制作用 [Fig. 13b]。

##### 4. GK-Lr-M-HW25

(A). B 型肝炎病毒野生型細胞株(HepG2215 cell line)[詳 Table 1 & Table 2]：

五個測試濃度 100、50、25、12.5 及 6.25  $\mu\text{g/ml}$  無細胞毒性[Fig. 4a]，對表面抗原及 e 抗原均無抑制作用 [Fig. 14a]。

(B). 拉美夫錠抗藥性突變株(M33 cell line) [詳 Table 3 & Table 4]：

五個測試濃度 100、50、25、12.5 及 6.25  $\mu\text{g/ml}$  無細胞毒性[Fig. 4b]，對表面抗原及 e 抗原均無抑制作用 [Fig. 14b]。



## 5. MAL-Lr-SCL-Me25

(A). B 型肝炎病毒野生型細胞株(HepG2215 cell line)[詳 Table 1 & Table 2] :

五個測試濃度 100、 50、 25、 12.5 及 6.25  $\mu\text{g/ml}$  無細胞毒性[Fig. 5a]，對表面抗原及 e 抗原均無抑制作用 [Fig. 15a]。

(B). 拉美夫錠抗藥性突變株(M33 cell line) [詳 Table 3 & Table 4] :

五個測試濃度 100、 50、 25、 12.5 及 6.25  $\mu\text{g/ml}$  無細胞毒性[Fig. 5b]，對表面抗原及 e 抗原均無抑制作用 [Fig. 15b]。

## 6. MAL-Lr-SCL-HW25

(A). B 型肝炎病毒野生型細胞株(HepG2215 cell line)[詳 Table 1 & Table 2] :

五個測試濃度 100、 50、 25、 12.5 及 6.25  $\mu\text{g/ml}$  無細胞毒性[Fig. 6a]，對表面抗原及 e 抗原均無抑制作用 [Fig. 16a]。

(B). 拉美夫錠抗藥性突變株(M33 cell line) [詳 Table 3 & Table 4] :

五個測試濃度 100、 50、 25、 12.5 及 6.25  $\mu\text{g/ml}$  無細胞毒性[Fig. 6b]，對表面抗原及 e 抗原均無抑制作用 [Fig. 16b]。

## 7. MAL-Lr-M-Me25

(A). B 型肝炎病毒野生型細胞株(HepG2215 cell line)[詳 Table 1 & Table 2] :

五個測試濃度 100、 50、 25、 12.5 及 6.25  $\mu\text{g/ml}$  無細胞毒性[Fig. 7a]，對表面抗原及 e 抗原均無抑制作用 [Fig. 17a]。

(B). 拉美夫錠抗藥性突變株(M33 cell line) [詳 Table 3 & Table 4] :

五個測試濃度 100、 50、 25、 12.5 及 6.25  $\mu\text{g/ml}$  無細胞毒性[Fig. 7b]，對表面抗原及 e 抗原均無抑制作用 [Fig. 17b]。

## 8. MAL-Lr-M-HW25

(A). B 型肝炎病毒野生型細胞株(HepG2215 cell line)[詳 Table 1 & Table 2] :

五個測試濃度 100、 50、 25、 12.5 及 6.25  $\mu\text{g/ml}$  無細胞毒性[Fig. 8a]，對表面抗原及 e 抗原均無抑制作用 [Fig. 18a]。

(B). 拉美夫錠抗藥性突變株(M33 cell line) [詳 Table 3 & Table 4] :

五個測試濃度 100、 50、 25、 12.5 及 6.25  $\mu\text{g/ml}$  無細胞毒性[Fig. 8b]，對表面抗原及 e 抗原均無抑制作用 [Fig. 18b]。

## 9. MAL-Lr-SCL-CA

(A). B 型肝炎病毒野生型細胞株(HepG2215 cell line)[詳 Table 1 & Table 2] :

五個測試濃度 100、 50、 25、 12.5 及 6.25  $\mu\text{g/ml}$  無細胞毒性[Fig. 9a]，對表面抗原及 e 抗原均無抑制作用 [Fig. 19a]。

(B). 拉美夫錠抗藥性突變株(M33 cell line) [詳 Table 3 & Table 4] :

五個測試濃度 100、 50、 25、 12.5 及 6.25  $\mu\text{g/ml}$  無細胞毒性[Fig. 9b]，對表面抗原及 e 抗原均無抑制作用 [Fig. 19b]。

#### 10. WT-Lr-SCL-HW20

(A). B 型肝炎病毒野生型細胞株(HepG2215 cell line)[詳 Table 1 & Table 2] :

五個測試濃度 100、 50、 25、 12.5 及 6.25  $\mu\text{g/ml}$  無細胞毒性[Fig. 10a]，對表面抗原及 e 抗原均無抑制作用 [Fig. 20a]。

(B). 拉美夫錠抗藥性突變株(M33 cell line) [詳 Table 3 & Table 4] :

五個測試濃度 100、 50、 25、 12.5 及 6.25  $\mu\text{g/ml}$  無細胞毒性[Fig. 10b]，對表面抗原及 e 抗原均無抑制作用 [Fig. 20b]。

11. 分離自獨活的 Osthole 為正對照組，Osthole 給藥濃度 80  $\mu\text{M}$  對 HBV 野生型之表面抗原具強度抑制(+++)其抑制百分比為  $50.1 \pm 2.3$ ，對拉美夫錠抗藥性突變株之表面抗原具強度抑制(+++)其抑制百分比為  $52.9 \pm 3.0$  對 HBV 野生型及拉美夫錠抗藥性突變株之 e 抗原均無顯著抑制作用。

12. 0.25% DMSO 組為 solvent control，無細胞毒性，對 HBV 野生型及拉美夫錠抗藥性突變株之表面抗原和 e 抗原均無顯著抑制作用。

## (五) 參考文獻

1. Robinson, W.S., D.A. Clayton, and R.L. Greenman. 1974. DNA of a human hepatitis B virus candidate. *J. Virol.* 14: 384-391.
2. Robinson, W.S. 1977. The genome of hepatitis B virus. *Ann. Rev. Microbiol.* 31: 357-377.
3. Delius, H., N.M. Gough, C.H. Cameron, and K. Murray. 1983. Structure of the hepatitis B virus genome. *J. Virol.* 47: 337-343.
4. Szmunes, W. 1978. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: evidence for a causal association. *Prog. Med. Virol.* 24: 40-69.
5. Beasley, R.P., L.Y. Hwang, C.C. Lin, and C.S. Chien. 1981. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22,707 men in Taiwan. *Lancet* 2: 1129-1133.
6. Beasley, R.P., and L.Y. Hwang. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. In Vyas, G. N. (ed): *Viral Hepatitis and Liver Disease*. pp. 209-224, Grune & Stratton, New York, 1984.
7. Tong, M.J., S.C. Sun, B.T. Schaeffer, N.K. Chang, K.J. Lo, and R.L. Peters. 1971. Hepatitis-associated antigen and hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Ann. Intern. Med.* 75: 687-691.
8. Sung, J.L., P.L. Shih, Y.F. Liaw, W.S.J. Lin, T.Y. Tai, S.C. Hsieh, C.Y. Wang, C.K. Chang, T.H. Wang, J.Y. Yu, and J.S. Chen. 1979. A survey and follow-up study of anicteric hepatitis, other asymptomatic liver diseases and hepatitis B surface antigen carriers. *J. Formosan Med. Assoc.* 78: 452-459.
9. Huang, R.L., C.C. Chen, Y.L. Huang, D.J. Hsieh, C.P. Hu, C.F. Chen, and Chungming Chang. 1996. Osthole Increases Glycosylation of Hepatitis B surface antigen and suppresses the secretion of Hepatitis B virus *In Vitro*. *Hepatology* 24(3): 508-515.
10. Dienstag JL, Perrillo RP, Schiff ER, Bartholomew M, Vicary C, and Rubin M (1995) A preliminary trial of lamivudine for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 333:1657-1661.
11. Honkoop P, Niesters HG, deMan RA, Osterhaus AD, and Schalm SW (1997) Lamivudine resistance in immunocompetent chronic hepatitis B. Incidence and patterns. *J Hepatol* 26:1393-1395.
12. Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters K-A, Tyrrell DLJ, Brown N, and Condreay LD (1998) Identification and characterization of mutation in hepatitis B virus resistant to lamivudine. *Hepatology* 27:1670-1677.
13. Lai CL, Chien R-N, Leung NWY, Chang TT, Guan R, Tai DI, Ng KY, Wu PC, Dent JC, Barber J, Stephenson SL, and Gray DF (1998) A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 339:61-68.
14. Acs G, Sells MA, Purcell RH, Price P, Engle R, Shapiro M, Popper H. Hepatitis B virus produced by transfected Hep G2 cells causes hepatitis in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987, 84 (13): 4641-4.
15. Huang, R.L., C.C. Chen, Y.L. Huang, D.J. Hsieh, C.P. Hu, C.F. Chen, and C.M. Chang. 1996. Osthole

increases glycosylation of hepatitis B surface antigen and suppresses the secretion of hepatitis B virus *in vitro*. *Hepatology* 24(3): 508-515.

16. Tietz, N.W. 1976. Fundamentals of clinical chemistry. Philadelphia: Saunders, 674.

**Table 1. Anti-HBsAg and Anti-HBeAg Effects of 10 samples in Wild-Type HBV Producing Cell Line (HepG2215).**

<b>Treatments</b>  <b>for 48 h</b>	<b>µg/ml</b>	<b>HBsAg</b> <b>(Inhibition %)</b> <b>Mean ± S. E.</b>	<b>HBeAg</b> <b>(Inhibition %)</b> <b>Mean ± S. E.</b>	<b>MTT assay</b> <b>(Inhibition %)</b> <b>Mean ± S. E.</b>
<b>Control</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>DMSO</b>	<b>2.5 µl/ml</b>	<b>0.5 ± 0.7</b>	<b>0.3 ± 0.9</b>	<b>-1.2 ± 0.8</b>
<b>GK-Lr-W-Me25</b>	100 µg/ml (100 ppm)	-0.9 ± 0.8	-1.5 ± 1.3	-0.1 ± 1.0
	50 µg/ml (50 ppm)	-1.1 ± 1.4	-4.9 ± 0.8	3.5 ± 3.1
	25 µg/ml (25 ppm)	-0.5 ± 0.9	-4.5 ± 1.9	1.6 ± 1.3
	12.5 µg/ml (12.5 ppm)	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.4	5.4 ± 1.8
	6.25 µg/ml (6.25 ppm)	-0.1 ± 1.2	-0.7 ± 0.6	1.4 ± 0.3
<b>GK-Lr-W-HW25</b>	100 µg/ml (100 ppm)	-0.8 ± 1.7	5.6 ± 0.5	-7.3 ± 0.4
	50 µg/ml (50 ppm)	-2.0 ± 0.7	3.6 ± 2.0	1.1 ± 0.8
	25 µg/ml (25 ppm)	-0.5 ± 1.2	-4.2 ± 2.3	2.2 ± 1.9
	12.5 µg/ml (12.5 ppm)	-0.3 ± 0.1	1.7 ± 1.7	3.7 ± 1.4
	6.25 µg/ml (6.25 ppm)	-0.3 ± 1.4	1.3 ± 2.7	1.6 ± 2.5
<b>GK-Lr-M-Me25</b>	100 µg/ml (100 ppm)	0.7 ± 0.6	-8.8 ± 3.2	7.7 ± 0.5
	50 µg/ml (50 ppm)	0.9 ± 1.1	-3.0 ± 0.8	5.8 ± 0.5
	25 µg/ml (25 ppm)	0.8 ± 1.4	-4.2 ± 1.2	3.0 ± 2.9
	12.5 µg/ml (12.5 ppm)	1.3 ± 0.3	-3.5 ± 1.1	2.2 ± 1.1
	6.25 µg/ml (6.25 ppm)	0.8 ± 0.3	1.8 ± 2.4	0.3 ± 3.4
<b>GK-Lr-M-HW25</b>	100 µg/ml (100 ppm)	-0.6 ± 2.0	-8.3 ± 0.4	2.5 ± 1.3
	50 µg/ml (50 ppm)	-1.1 ± 0.6	-0.2 ± 0.3	5.9 ± 0.8
	25 µg/ml (25 ppm)	-0.1 ± 1.6	-1.3 ± 1.7	3.1 ± 2.0
	12.5 µg/ml (12.5 ppm)	-0.7 ± 1.9	3.1 ± 0.7	2.1 ± 1.1
	6.25 µg/ml (6.25 ppm)	-0.3 ± 0.5	0.3 ± 2.0	2.8 ± 2.1
<b>MAL-Lr-S-CL-Me25</b>	100 µg/ml (100 ppm)	-3.3 ± 0.8	4.8 ± 3.2	9.1 ± 1.3
	50 µg/ml (50 ppm)	-0.7 ± 0.6	2.5 ± 1.5	6.6 ± 1.2
	25 µg/ml (25 ppm)	-0.7 ± 1.0	-3.4 ± 2.9	5.0 ± 1.1
	12.5 µg/ml (12.5 ppm)	-0.7 ± 0.9	-4.0 ± 5.8	3.5 ± 1.7
	6.25 µg/ml (6.25 ppm)	0.1 ± 0.6	0.9 ± 2.5	2.0 ± 1.1
<b>MAL-Lr-S-CL-HW25</b>	100 µg/ml (100 ppm)	-1.9 ± 0.7	-2.1 ± 3.9	5.6 ± 1.3
	50 µg/ml (50 ppm)	-1.2 ± 0.4	1.7 ± 2.5	7.0 ± 1.3
	25 µg/ml (25 ppm)	-1.2 ± 0.6	-2.2 ± 3.4	6.2 ± 1.0
	12.5 µg/ml (12.5 ppm)	-2.0 ± 0.2	3.6 ± 2.8	7.7 ± 2.1
	6.25 µg/ml (6.25 ppm)	0.0 ± 0.6	5.7 ± 1.2	0.1 ± 2.1

<b>MAL-Lr-M -Me25</b>	100 µg/ml (100 ppm)	-2.5 ± 0.8	-5.3 ± 2.7	2.7 ± 0.1
	50 µg/ml (50 ppm)	-2.0 ± 0.3	-2.4 ± 1.1	7.1 ± 0.5
	25 µg/ml (25 ppm)	-0.6 ± 2.0	-7.4 ± 4.9	5.9 ± 1.7
	12.5 µg/ml (12.5 ppm)	-1.0 ± 0.1	-4.2 ± 3.0	3.8 ± 0.8
	6.25 µg/ml (6.25 ppm)	0.9 ± 0.8	-4.3 ± 3.3	4.5 ± 1.6
<b>MAL-Lr-M -HW25</b>	100 µg/ml (100 ppm)	-1.2 ± 0.2	-7.3 ± 5.2	2.3 ± 1.9
	50 µg/ml (50 ppm)	0.3 ± 0.8	2.5 ± 1.4	5.4 ± 1.6
	25 µg/ml (25 ppm)	-0.2 ± 0.7	-4.2 ± 4.4	11.0 ± 1.1
	12.5 µg/ml (12.5 ppm)	-0.7 ± 0.3	-0.3 ± 2.4	5.3 ± 2.2
	6.25 µg/ml (6.25 ppm)	0.3 ± 0.4	-1.4 ± 0.9	4.1 ± 2.3
<b>MAL-Lr-S CL-CA</b>	100 µg/ml (100 ppm)	1.2 ± 0.8	-1.9 ± 1.5	3.4 ± 1.1
	50 µg/ml (50 ppm)	1.9 ± 0.6	-1.3 ± 1.5	6.0 ± 1.7
	25 µg/ml (25 ppm)	0.3 ± 0.5	-2.2 ± 1.0	5.9 ± 2.4
	12.5 µg/ml (12.5 ppm)	0.5 ± 0.9	4.1 ± 1.2	2.4 ± 3.5
	6.25 µg/ml (6.25 ppm)	0.6 ± 0.3	1.3 ± 1.2	0.1 ± 1.0
<b>WT-Lr-SC L-HW20</b>	100 µg/ml (100 ppm)	-0.4 ± 0.5	0.0 ± 1.0	4.5 ± 0.7
	50 µg/ml (50 ppm)	-0.2 ± 0.8	-1.3 ± 2.4	3.7 ± 0.4
	25 µg/ml (25 ppm)	-0.7 ± 0.3	1.4 ± 0.4	4.6 ± 1.3
	12.5 µg/ml (12.5 ppm)	-0.6 ± 0.9	-0.9 ± 1.7	2.3 ± 1.7
	6.25 µg/ml (6.25 ppm)	0.5 ± 0.2	-2.7 ± 0.9	3.4 ± 1.5
<b>Osthole</b> (From 獨活)	80 µM	<b>50.1 ± 2.3</b>	-2.0 ± 3.3	-4.7 ± 2.1

Values are based on one experiment performed in triplicate.

抑制百分比(Inhibition percentage) : 介於 20% - 35% 為輕度抑制(+)  
 介於 35% - 50% 為中度抑制(++)  
 介於 50% - 65% 為強度抑制(+++)  
 大於 65% 為非常強度抑制(++++)

Table 2. Wild-Type HBV Producing Cell Line (HepG2215)

Treatments	HBsAg	HBeAg
<b>GK-Lr-W-Me25</b>	- (五個測試濃度均無細胞毒性)	- (五個測試濃度均無細胞毒性)
<b>GK-Lr-W-HW25</b>	- (五個測試濃度均無細胞毒性)	- (五個測試濃度均無細胞毒性)

GK-Lr-M-Me25	- (五個測試濃度均無細胞毒性)	- (五個測試濃度均無細胞毒性)
GK-Lr-M-HW25	- (五個測試濃度均無細胞毒性)	- (五個測試濃度均無細胞毒性)
MAL-Lr-SCL-Me25	- (五個測試濃度均無細胞毒性)	- (五個測試濃度均無細胞毒性)
MAL-Lr-SCL-HW25	- (五個測試濃度均無細胞毒性)	- (五個測試濃度均無細胞毒性)
MAL-Lr-M-Me25	- (五個測試濃度均無細胞毒性)	- (五個測試濃度均無細胞毒性)
MAL-Lr-M-HW25	- (五個測試濃度均無細胞毒性)	- (五個測試濃度均無細胞毒性)
MAL-Lr-SCL-CA	- (五個測試濃度均無細胞毒性)	- (五個測試濃度均無細胞毒性)
WT-Lr-SCL-HW20	- (五個測試濃度均無細胞毒性)	- (五個測試濃度均無細胞毒性)
Osthole (80 $\mu$ M)	+++ (此濃度無細胞毒性)	- (此濃度無細胞毒性)

**Table 3. Anti-HBsAg and Anti-HBeAg Effects of 10 samples in Lamivudine- Resistant HBV Mutant Cell Line (M33).**

<b>Treatments</b>  <b>for 48 h</b>	<b>µg/ml</b>	<b>HBsAg</b> <b>(Inhibition %)</b> <b>Mean ± S. E.</b>	<b>HBeAg</b> <b>(Inhibition %)</b> <b>Mean ± S. E.</b>	<b>MTT assay</b> <b>(Inhibition %)</b> <b>Mean ± S. E.</b>
<b>Control</b>	<b>0</b>	<b>0</b>		<b>0</b>
<b>DMSO</b>	<b>2.5 µl/ml</b>	<b>1.4 ± 1.8</b>	<b>-1.8 ± 2.6</b>	<b>2.6 ± 1.2</b>
<b>GK-Lr-W-Me25</b>	<b>100 µg/ml (100 ppm)</b>	<b>3.7 ± 1.9</b>	<b>-8.8 ± 1.9</b>	<b>-3.2 ± 1.0</b>
	<b>50 µg/ml (50 ppm)</b>	<b>8.3 ± 2.1</b>	<b>-4.2 ± 4.3</b>	<b>2.0 ± 2.2</b>
	<b>25 µg/ml (25 ppm)</b>	<b>1.8 ± 2.5</b>	<b>-8.5 ± 3.1</b>	<b>8.2 ± 2.4</b>
	<b>12.5 µg/ml (12.5 ppm)</b>	<b>5.5 ± 0.8</b>	<b>-3.9 ± 1.1</b>	<b>6.8 ± 3.1</b>
	<b>6.25 µg/ml (6.25 ppm)</b>	<b>-0.7 ± 1.4</b>	<b>-5.8 ± 1.9</b>	<b>7.2 ± 3.5</b>
<b>GK-Lr-W-HW25</b>	<b>100 µg/ml (100 ppm)</b>	<b>2.1 ± 1.0</b>	<b>-2.8 ± 2.7</b>	<b>-8.5 ± 0.9</b>
	<b>50 µg/ml (50 ppm)</b>	<b>2.6 ± 1.7</b>	<b>-3.8 ± 0.9</b>	<b>4.0 ± 1.8</b>
	<b>25 µg/ml (25 ppm)</b>	<b>1.7 ± 2.6</b>	<b>-1.7 ± 0.6</b>	<b>0.7 ± 3.6</b>
	<b>12.5 µg/ml (12.5 ppm)</b>	<b>0.9 ± 3.0</b>	<b>-2.2 ± 2.8</b>	<b>0.9 ± 4.0</b>
	<b>6.25 µg/ml (6.25 ppm)</b>	<b>0.3 ± 2.6</b>	<b>-3.5 ± 3.1</b>	<b>2.0 ± 2.6</b>
<b>GK-Lr-M-Me25</b>	<b>100 µg/ml (100 ppm)</b>	<b>4.6 ± 0.9</b>	<b>3.1 ± 2.7</b>	<b>9.5 ± 0.7</b>
	<b>50 µg/ml (50 ppm)</b>	<b>4.8 ± 0.6</b>	<b>-3.0 ± 2.6</b>	<b>2.8 ± 1.5</b>
	<b>25 µg/ml (25 ppm)</b>	<b>0.7 ± 3.5</b>	<b>-0.2 ± 1.4</b>	<b>0.9 ± 2.5</b>
	<b>12.5 µg/ml (12.5 ppm)</b>	<b>4.8 ± 3.7</b>	<b>3.5 ± 0.9</b>	<b>7.4 ± 1.6</b>
	<b>6.25 µg/ml (6.25 ppm)</b>	<b>2.3 ± 1.2</b>	<b>3.9 ± 3.0</b>	<b>3.3 ± 3.7</b>
<b>GK-Lr-M-HW25</b>	<b>100 µg/ml (100 ppm)</b>	<b>5.6 ± 0.8</b>	<b>2.2 ± 4.0</b>	<b>10.0 ± 1.5</b>
	<b>50 µg/ml (50 ppm)</b>	<b>0.5 ± 1.8</b>	<b>5.2 ± 1.5</b>	<b>6.8 ± 2.1</b>
	<b>25 µg/ml (25 ppm)</b>	<b>0.3 ± 3.3</b>	<b>5.6 ± 1.4</b>	<b>4.1 ± 2.6</b>
	<b>12.5 µg/ml (12.5 ppm)</b>	<b>1.8 ± 1.1</b>	<b>1.7 ± 2.8</b>	<b>2.6 ± 3.1</b>
	<b>6.25 µg/ml (6.25 ppm)</b>	<b>0.7 ± 1.7</b>	<b>3.8 ± 4.1</b>	<b>8.8 ± 2.8</b>
<b>MAL-Lr-S-CL-Me25</b>	<b>100 µg/ml (100 ppm)</b>	<b>4.4 ± 3.2</b>	<b>-1.3 ± 2.0</b>	<b>11.1 ± 0.8</b>
	<b>50 µg/ml (50 ppm)</b>	<b>2.8 ± 4.3</b>	<b>-3.7 ± 3.5</b>	<b>2.0 ± 1.0</b>
	<b>25 µg/ml (25 ppm)</b>	<b>4.6 ± 2.7</b>	<b>-3.2 ± 1.5</b>	<b>5.6 ± 1.4</b>
	<b>12.5 µg/ml (12.5 ppm)</b>	<b>0.7 ± 0.6</b>	<b>-6.0 ± 1.6</b>	<b>3.8 ± 1.9</b>
	<b>6.25 µg/ml (6.25 ppm)</b>	<b>2.6 ± 2.8</b>	<b>-3.2 ± 3.1</b>	<b>0.6 ± 2.2</b>
<b>MAL-Lr-S-CL-HW25</b>	<b>100 µg/ml (100 ppm)</b>	<b>6.7 ± 1.5</b>	<b>-3.2 ± 2.4</b>	<b>5.7 ± 1.1</b>
	<b>50 µg/ml (50 ppm)</b>	<b>7.0 ± 3.2</b>	<b>2.0 ± 2.1</b>	<b>7.1 ± 1.6</b>
	<b>25 µg/ml (25 ppm)</b>	<b>0.9 ± 1.8</b>	<b>-1.6 ± 2.7</b>	<b>5.0 ± 1.3</b>
	<b>12.5 µg/ml (12.5 ppm)</b>	<b>0.6 ± 0.6</b>	<b>-4.8 ± 2.8</b>	<b>1.4 ± 2.3</b>
	<b>6.25 µg/ml (6.25 ppm)</b>	<b>-1.5 ± 0.7</b>	<b>4.0 ± 2.0</b>	<b>3.0 ± 2.3</b>



<b>MAL-Lr-M -Me25</b>	100 µg/ml (100 ppm)	2.3 ± 1.6	-1.9 ± 1.1	0.2 ± 1.9
	50 µg/ml (50 ppm)	1.7 ± 3.1	0.3 ± 3.4	4.2 ± 2.8
	25 µg/ml (25 ppm)	-1.3 ± 2.9	2.1 ± 1.1	7.3 ± 3.8
	12.5 µg/ml (12.5 ppm)	3.1 ± 0.7	0.6 ± 2.0	6.4 ± 2.6
	6.25 µg/ml (6.25 ppm)	-3.7 ± 1.4	1.6 ± 3.6	1.9 ± 1.4
<b>MAL-Lr-M -HW25</b>	100 µg/ml (100 ppm)	8.0 ± 4.9	-2.2 ± 0.9	8.9 ± 2.8
	50 µg/ml (50 ppm)	4.8 ± 3.8	4.3 ± 1.5	6.3 ± 3.4
	25 µg/ml (25 ppm)	1.9 ± 1.4	-2.7 ± 1.5	6.5 ± 2.8
	12.5 µg/ml (12.5 ppm)	2.0 ± 2.1	3.3 ± 0.6	5.9 ± 1.6
	6.25 µg/ml (6.25 ppm)	3.4 ± 1.7	-1.9 ± 0.7	2.7 ± 1.7
<b>MAL-Lr-S CL-CA</b>	100 µg/ml (100 ppm)	3.1 ± 1.8	-6.6 ± 4.7	8.1 ± 0.8
	50 µg/ml (50 ppm)	0.7 ± 2.3	2.9 ± 3.3	9.0 ± 2.4
	25 µg/ml (25 ppm)	4.2 ± 2.6	-2.2 ± 1.8	2.0 ± 1.7
	12.5 µg/ml (12.5 ppm)	1.6 ± 3.9	-1.1 ± 2.6	0.8 ± 2.2
	6.25 µg/ml (6.25 ppm)	1.8 ± 0.8	1.0 ± 1.9	1.9 ± 0.9
<b>WT-Lr-SC L-HW20</b>	100 µg/ml (100 ppm)	18.7 ± 2.3	1.9 ± 3.9	10.6 ± 1.0
	50 µg/ml (50 ppm)	3.4 ± 2.8	2.3 ± 1.7	3.0 ± 2.3
	25 µg/ml (25 ppm)	3.7 ± 2.3	4.2 ± 3.0	0.7 ± 3.1
	12.5 µg/ml (12.5 ppm)	2.1 ± 0.8	-0.4 ± 2.4	1.9 ± 2.1
	6.25 µg/ml (6.25 ppm)	-0.7 ± 2.4	-0.8 ± 0.7	6.8 ± 1.8
<b>Osthole</b> (From 獨活)	80 µM	52.9 ± 3.0	9.3 ± 1.4	5.3 ± 2.6

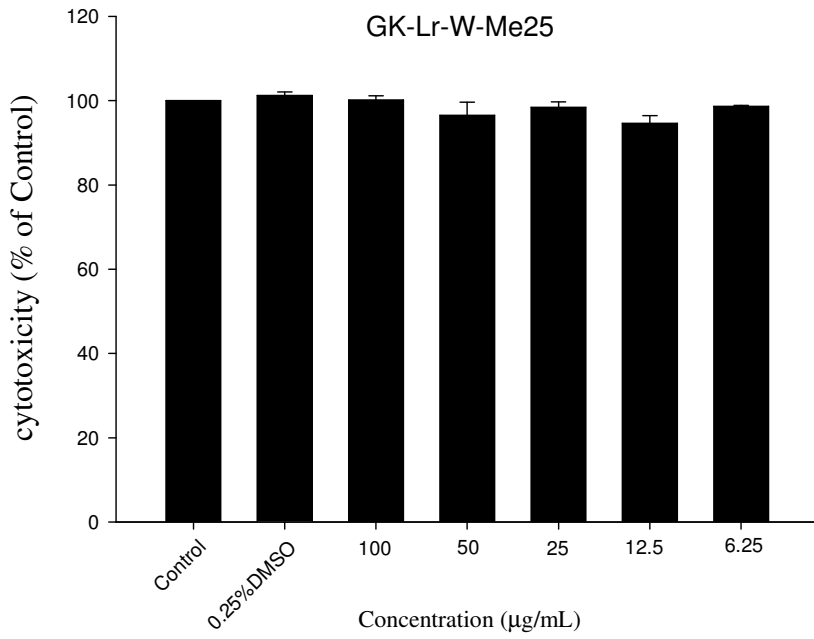
Values are based on one experiment performed in triplicate.

抑制百分比(Inhibition percentage) : 介於 20% - 35% 為輕度抑制(+)  
 介於 35% - 50% 為中度抑制(++)  
 介於 50% - 65% 為強度抑制(+++)  
 大於 65% 為非常強度抑制(++++)

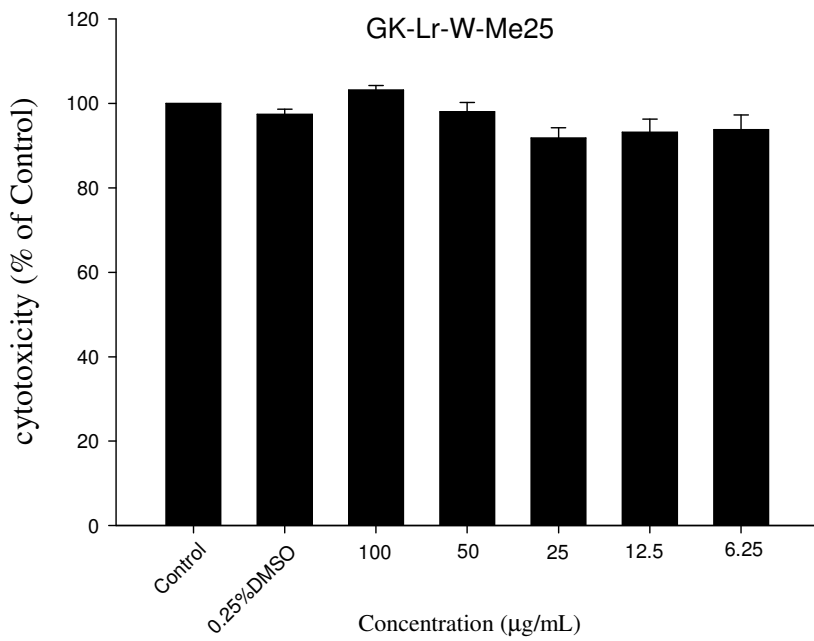
Table 4. Lamivudine- Resistant HBV Mutant Cell Line (M33)

Treatments	HBsAg	HBeAg
<b>GK-Lr-W-Me25</b>	-	-
	(五個測試濃度均無細胞毒性)	(五個測試濃度均無細胞毒性)
<b>GK-Lr-W-HW25</b>	-	-

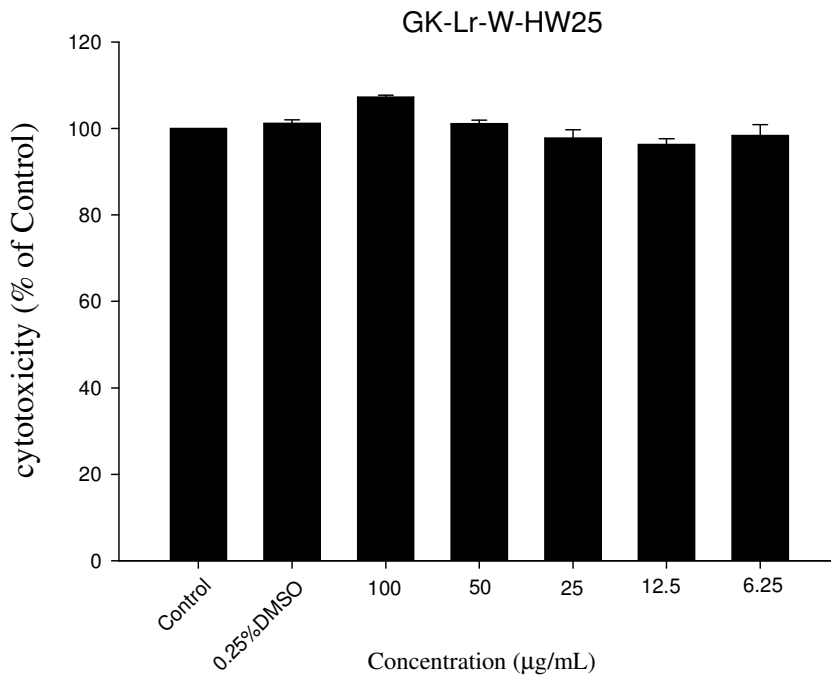
	(五個測試濃度均無細胞毒性)	(五個測試濃度均無細胞毒性)
GK-Lr-M-Me25	- (五個測試濃度均無細胞毒性)	- (五個測試濃度均無細胞毒性)
GK-Lr-M-HW25	- (五個測試濃度均無細胞毒性)	- (五個測試濃度均無細胞毒性)
MAL-Lr-SCL-Me25	- (五個測試濃度均無細胞毒性)	- (五個測試濃度均無細胞毒性)
MAL-Lr-SCL-HW25	- (五個測試濃度均無細胞毒性)	- (五個測試濃度均無細胞毒性)
MAL-Lr-M-Me25	- (五個測試濃度均無細胞毒性)	- (五個測試濃度均無細胞毒性)
MAL-Lr-M-HW25	- (五個測試濃度均無細胞毒性)	- (五個測試濃度均無細胞毒性)
MAL-Lr-SCL-CA	- (五個測試濃度均無細胞毒性)	- (五個測試濃度均無細胞毒性)
WT-Lr-SCL-HW20	- (五個測試濃度均無細胞毒性)	- (五個測試濃度均無細胞毒性)
Osthole (80 $\mu$ M)	+++ (此濃度無細胞毒性)	- (此濃度無細胞毒性)



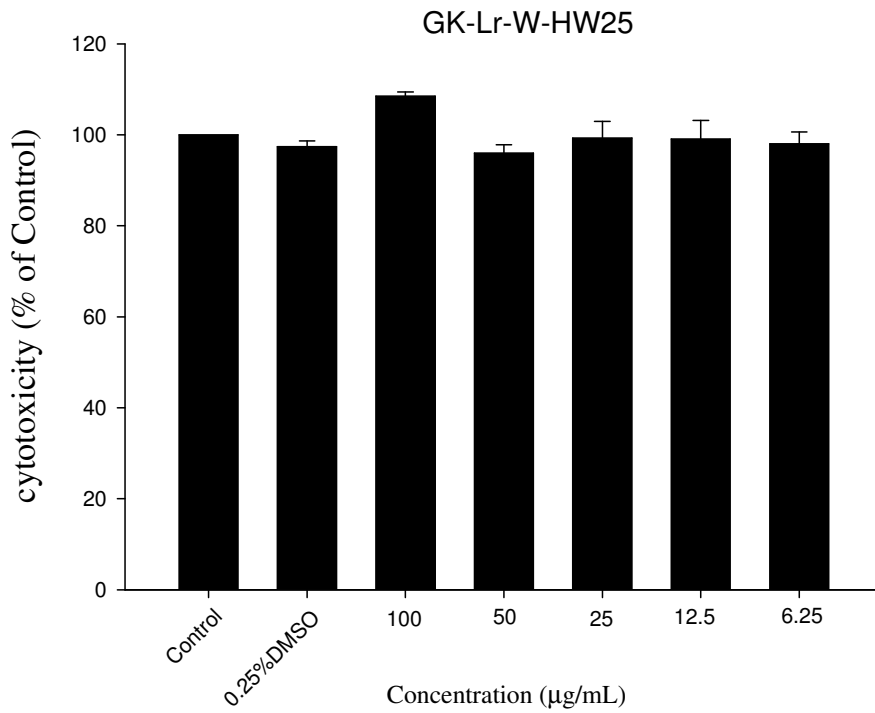
**Fig. 1a Cytotoxicity of GK-Lr-W-Me25 in Wild-Type HBV Producing Cell Line (HepG2215).**



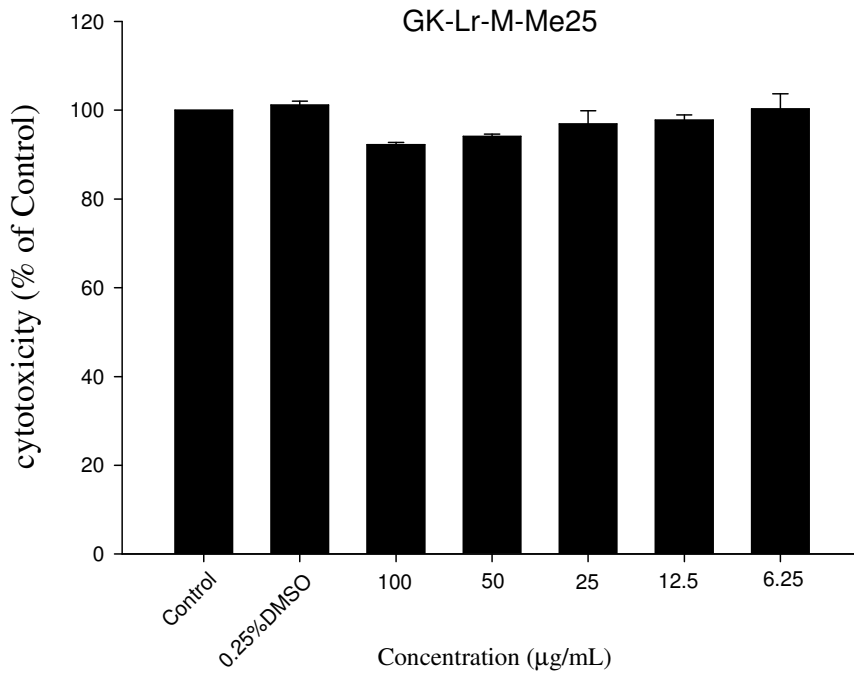
**Fig. 1b Cytotoxicity of GK-Lr-W-Me25 in Lamivudine-Resistant HBV Mutant Cell Line (M33).**



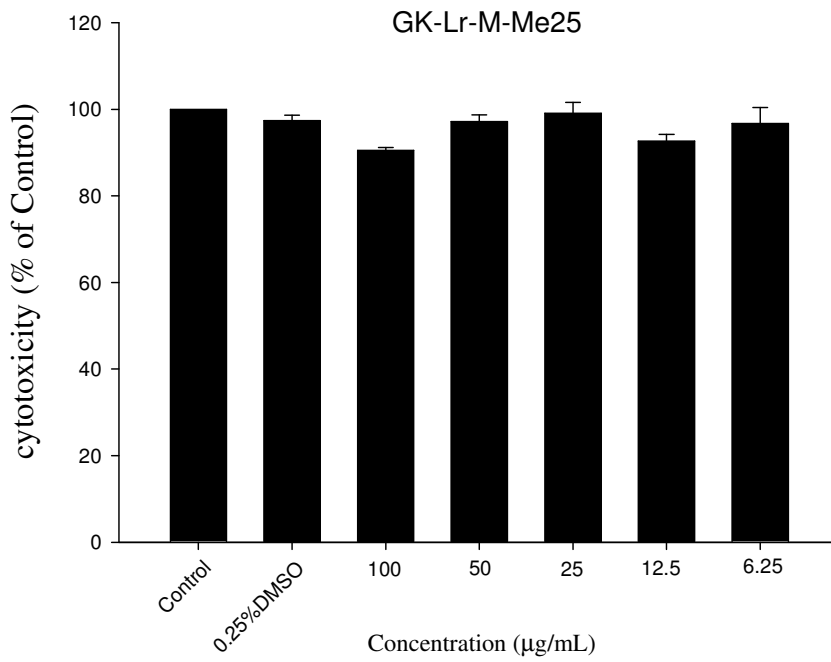
**Fig. 2a Cytotoxicity of GK-Lr-W-HW25 in Wild-Type HBV Producing Cell Line (HepG2215).**



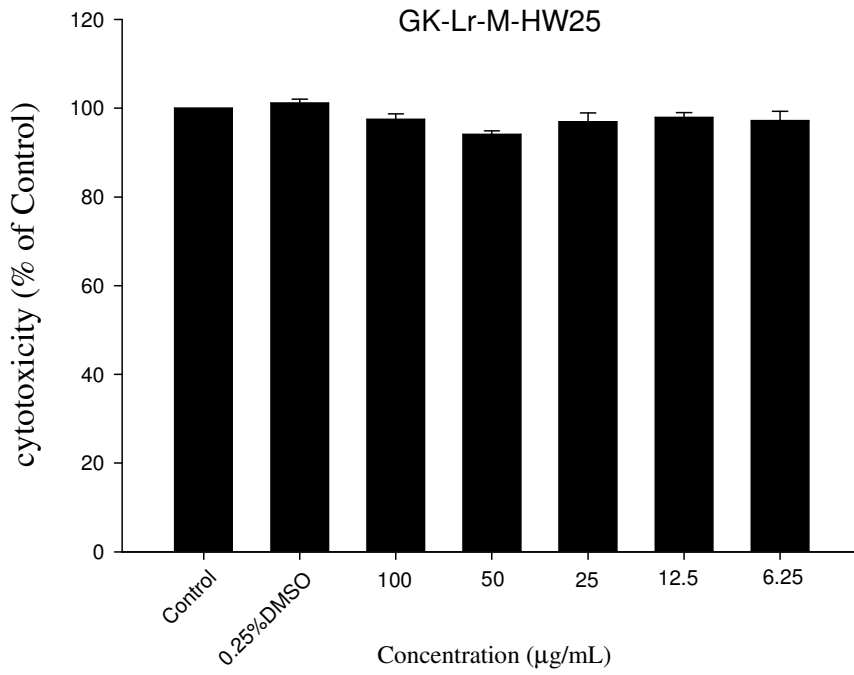
**Fig. 2b Cytotoxicity of GK-Lr-W-HW25 in Lamivudine-Resistant HBV Mutant Cell Line (M33).**



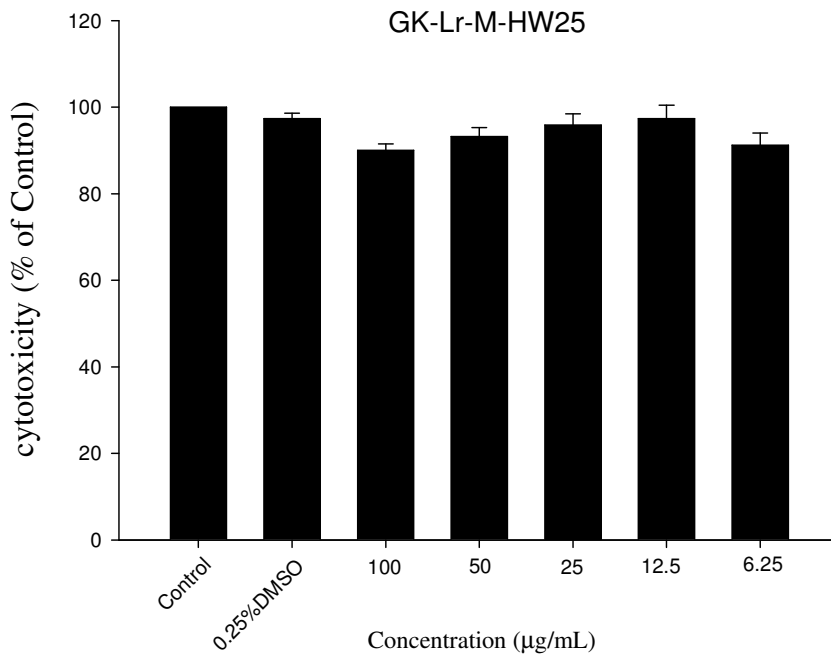
**Fig. 3a Cytotoxicity of GK-Lr-M-Me25 in Wild-Type HBV Producing Cell Line (HepG2215).**



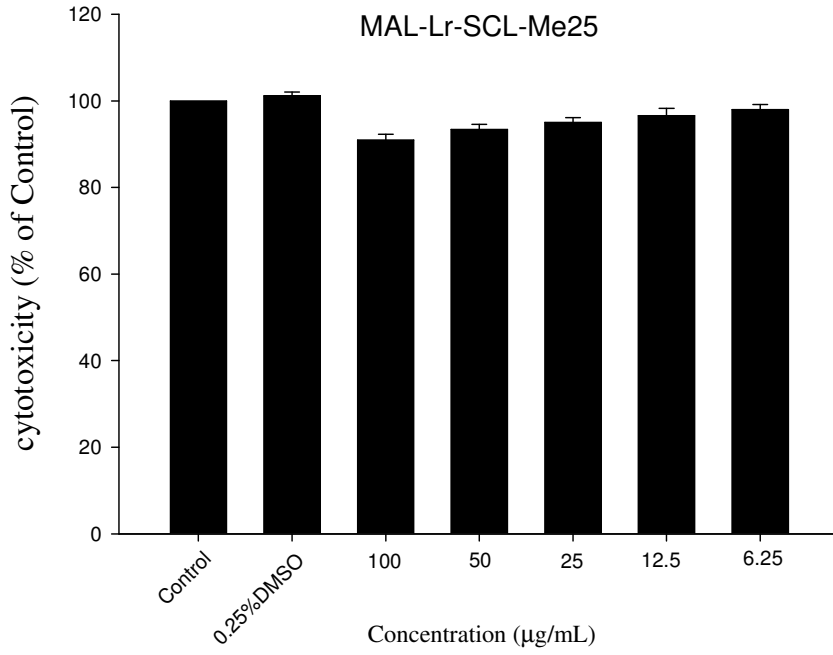
**Fig. 3b Cytotoxicity of GK-Lr-M-Me25 in Lamivudine-Resistant HBV Mutant Cell Line (M33).**



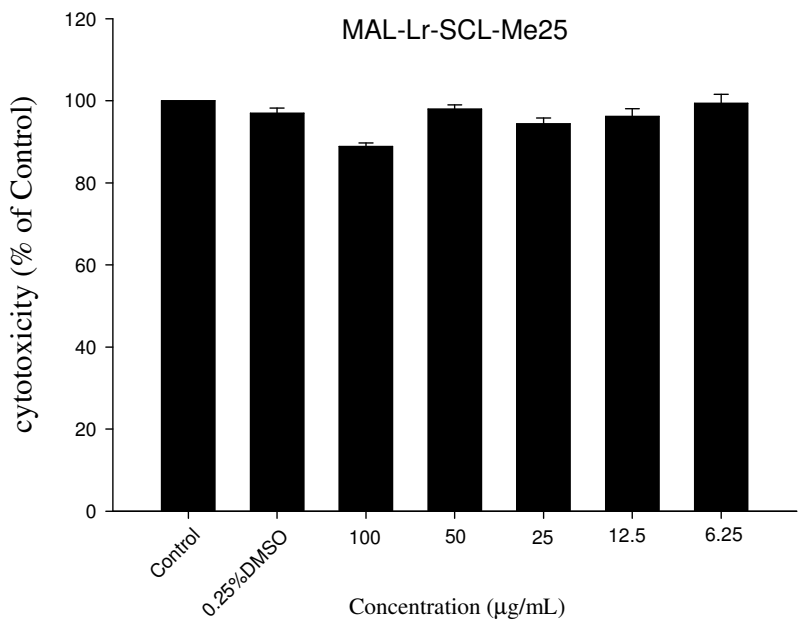
**Fig. 4a Cytotoxicity of GK-Lr-M-HW25 in Wild-Type HBV Producing Cell Line (HepG2215).**



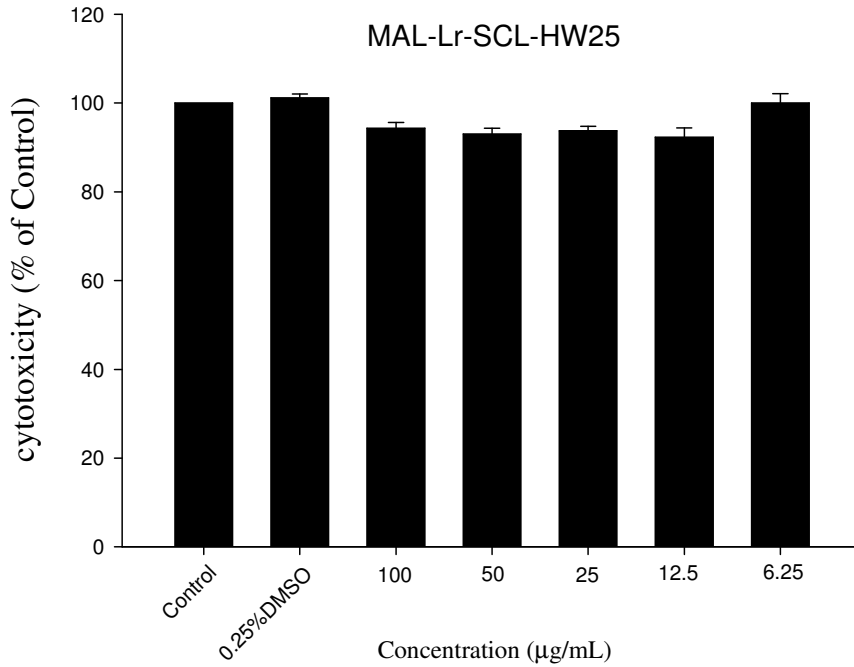
**Fig. 4b Cytotoxicity of GK-Lr-M-HW25 in Lamivudine-Resistant HBV Mutant Cell Line (M33).**



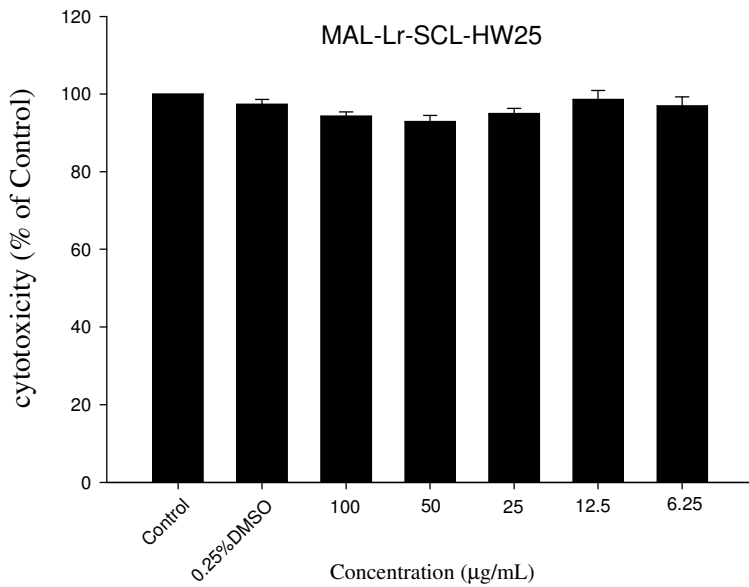
**Fig. 5a Cytotoxicity of MAL-Lr-SCL-Me25 in Wild-Type HBV Producing Cell Line (HepG2215).**



**Fig. 5b Cytotoxicity of MAL-Lr-SCL-Me25 in Lamivudine- Resistant HBV Mutant Cell Line (M33).**

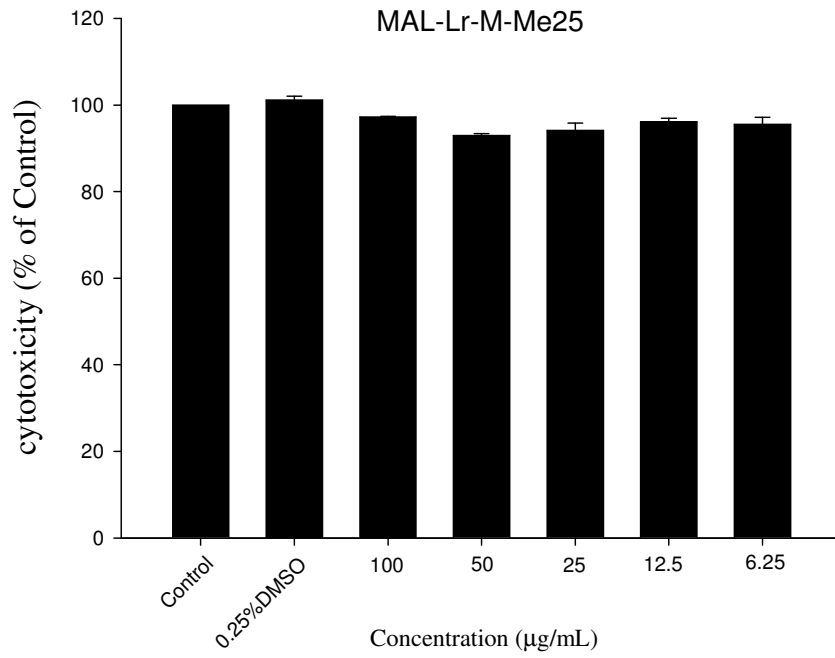


**Fig. 6a Cytotoxicity of MAL-Lr-SCL-HW25 in Wild-Type HBV Producing Cell Line (HepG2215).**

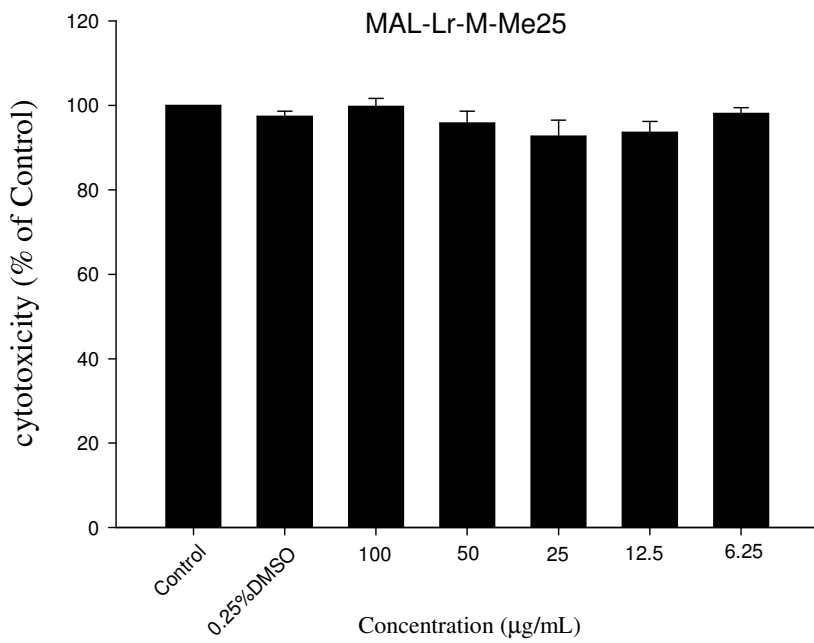


**Fig. 6b Cytotoxicity of MAL-Lr-SCL-HW25 in Lamivudine-Resistant HBV Mutant Cell Line (M33).**

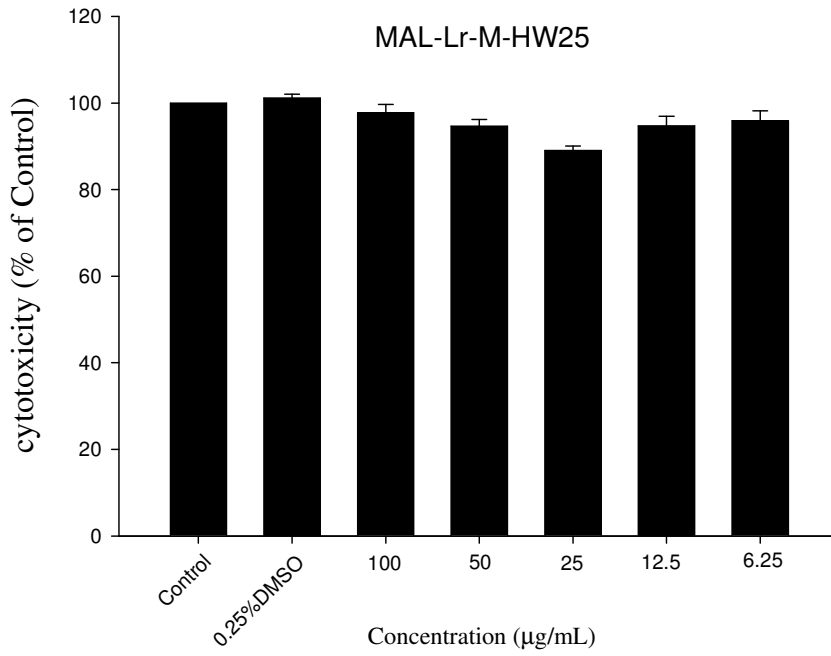




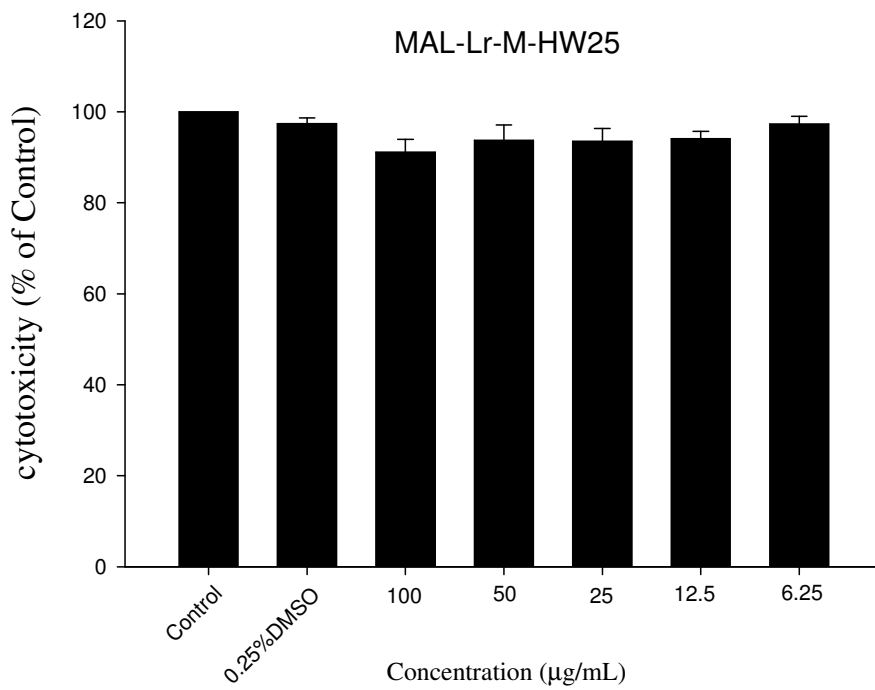
**Fig. 7a Cytotoxicity of MAL-Lr-M-Me25 in Wild-Type HBV Producing Cell Line (HepG2215).**



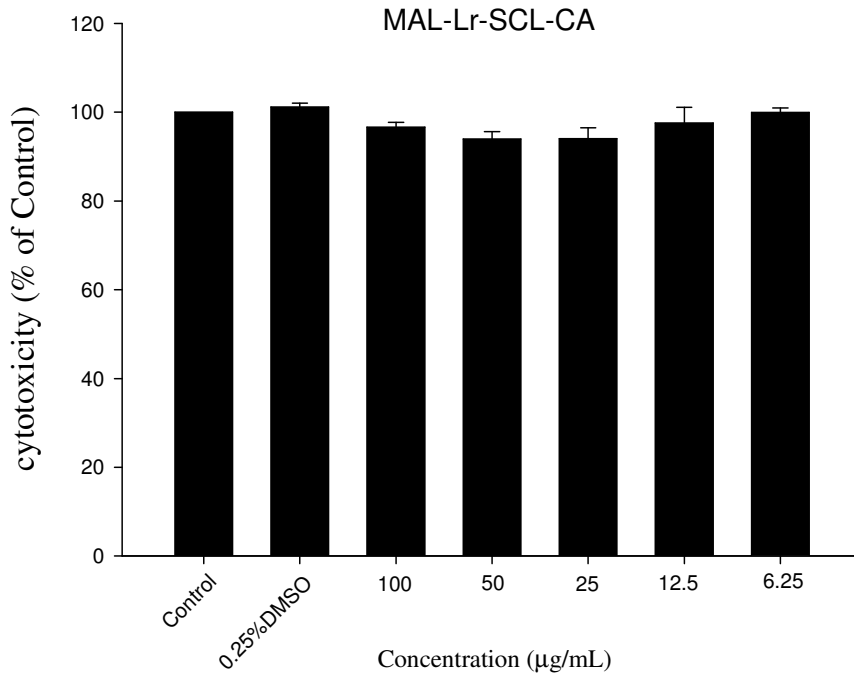
**Fig. 7b Cytotoxicity of MAL-Lr-M-Me25 in Lamivudine-Resistant HBV Mutant Cell Line (M33).**



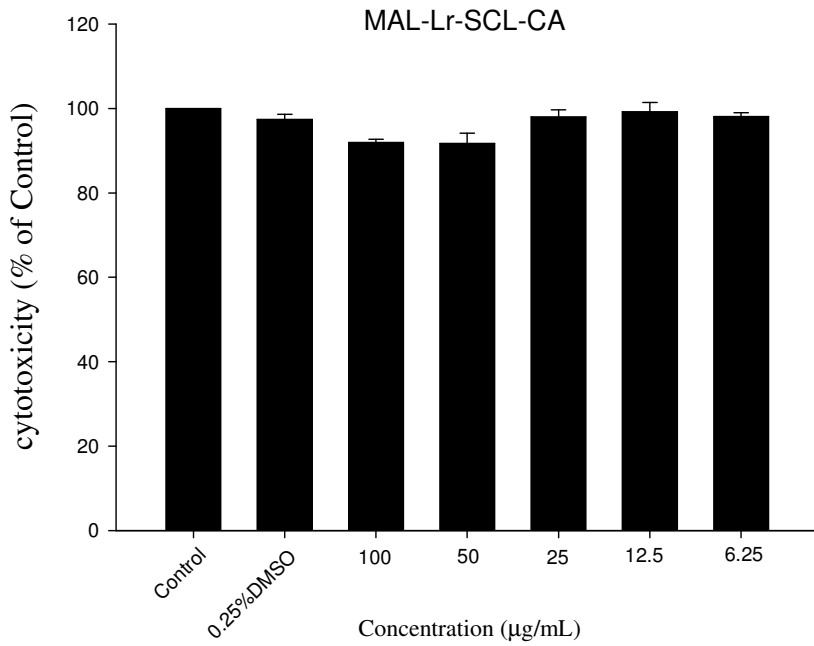
**Fig. 8a** Cytotoxicity of MAL-Lr-M-HW25 in Wild-Type HBV Producing Cell Line (HepG2215).



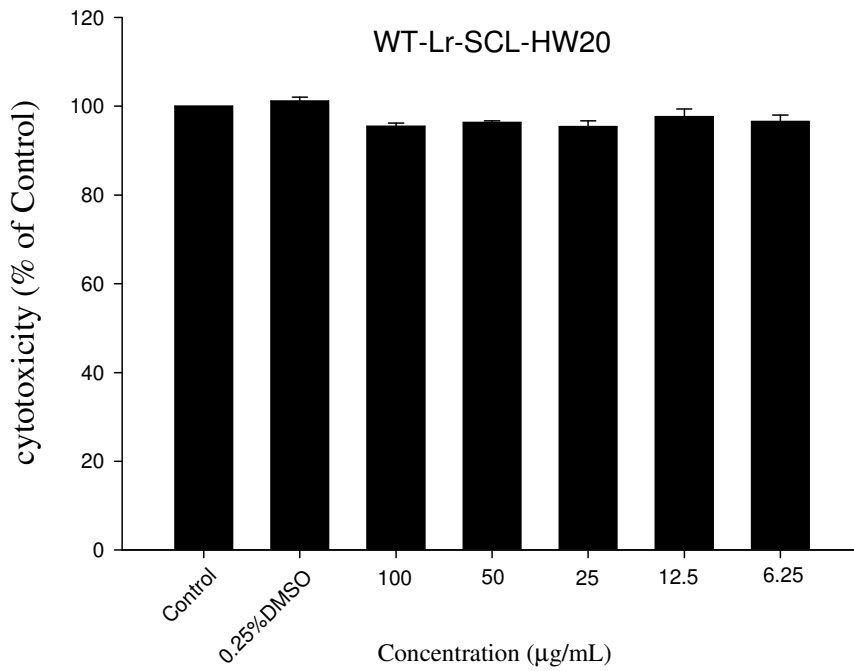
**Fig. 8b** Cytotoxicity of MAL-Lr-M-HW25 in Lamivudine-Resistant HBV Mutant Cell Line (M33).



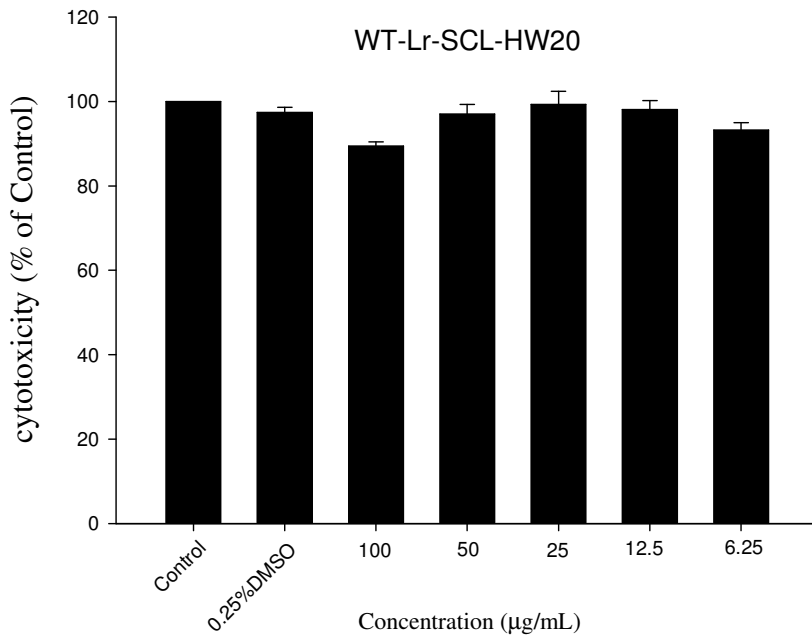
**Fig. 9a** Cytotoxicity of MAL-Lr-SCL-CA in Wild-Type HBV Producing Cell Line (HepG2215).



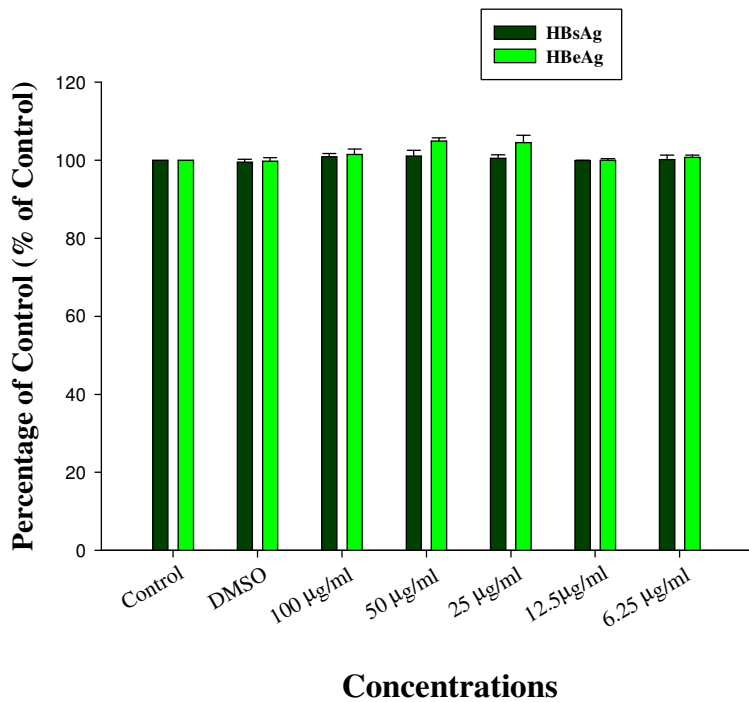
**Fig. 9b** Cytotoxicity of MAL-Lr-SCL-CA in Lamivudine-Resistant HBV Mutant Cell Line (M33).



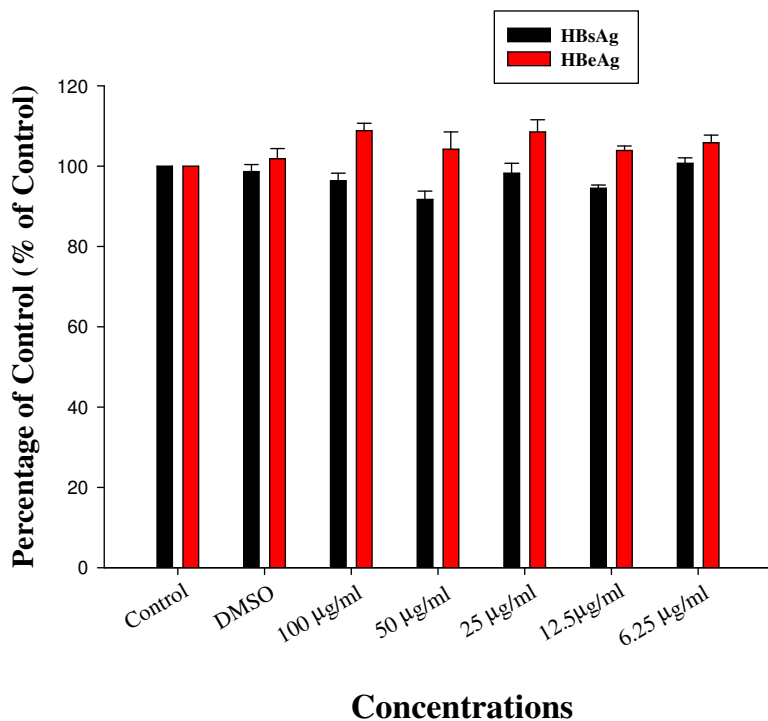
**Fig. 10a Cytotoxicity of WT-Lr-SCL-HW20 in Wild-Type HBV Producing Cell Line (HepG2215).**



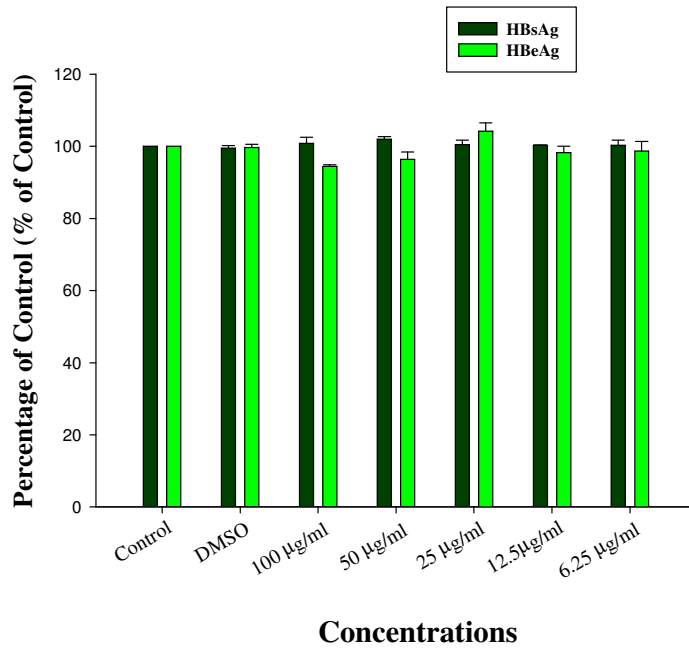
**Fig. 10b Cytotoxicity of WT-Lr-SCL-HW20 in Lamivudine-Resistant HBV Mutant Cell Line (M33).**



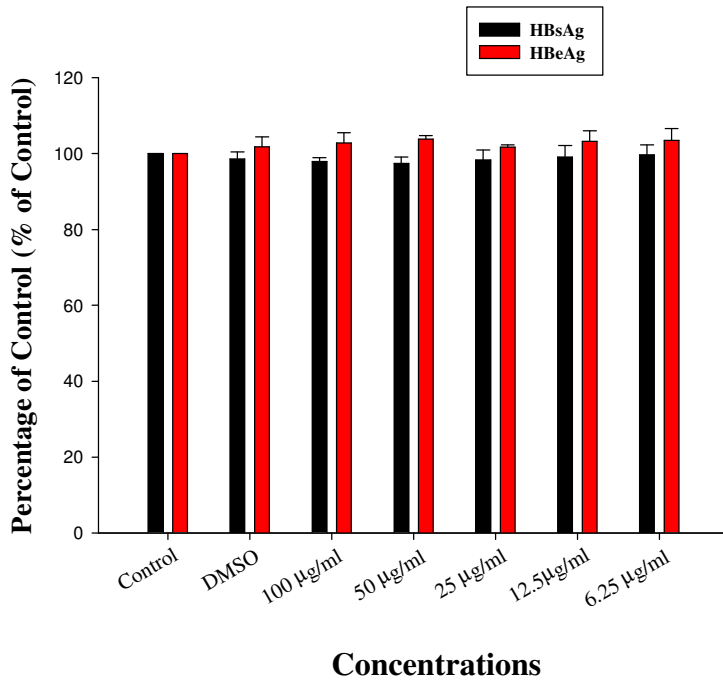
**Fig. 11a Anti-HBsAg and Anti-HBeAg Effects of GK-Lr-W-Me25 in Wild-Type HBV Producing Cell Line (HepG2215).**



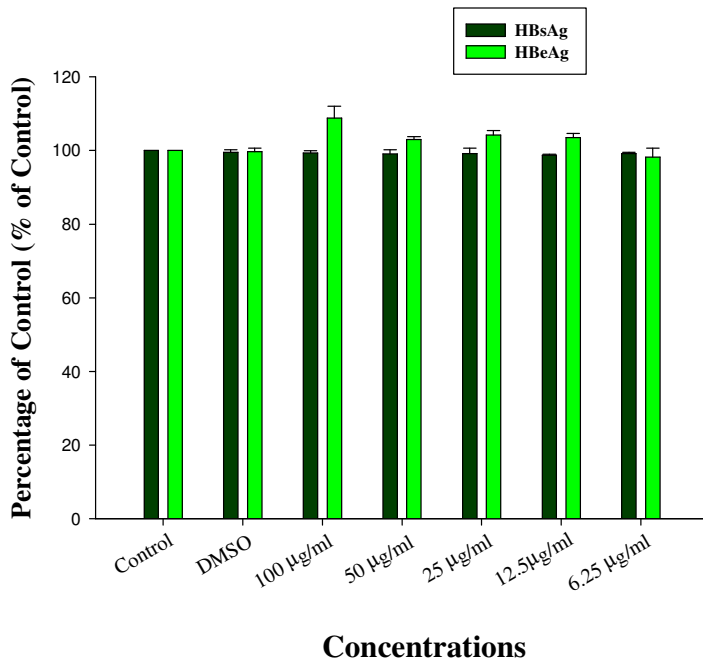
**Fig. 11b Anti-HBsAg and Anti-HBeAg Effects of GK-Lr-W-Me25 in Lamivudine- Resistant HBV Mutant Cell Line (M33).**



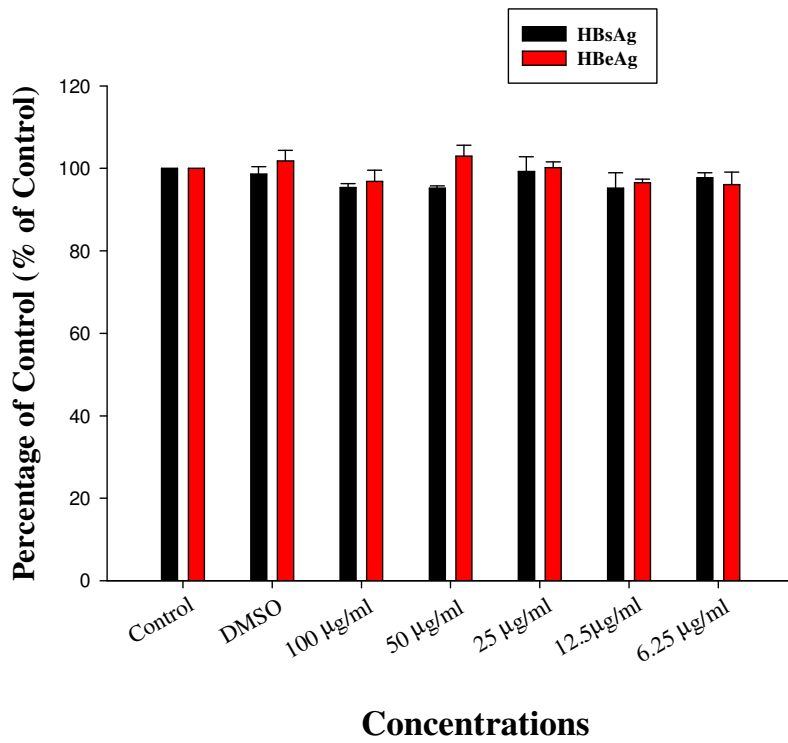
**Fig. 12a Anti-HBsAg and Anti-HBeAg Effects of GK-Lr-W-HW25 in Wild-Type HBV Producing Cell Line (HepG2215).**



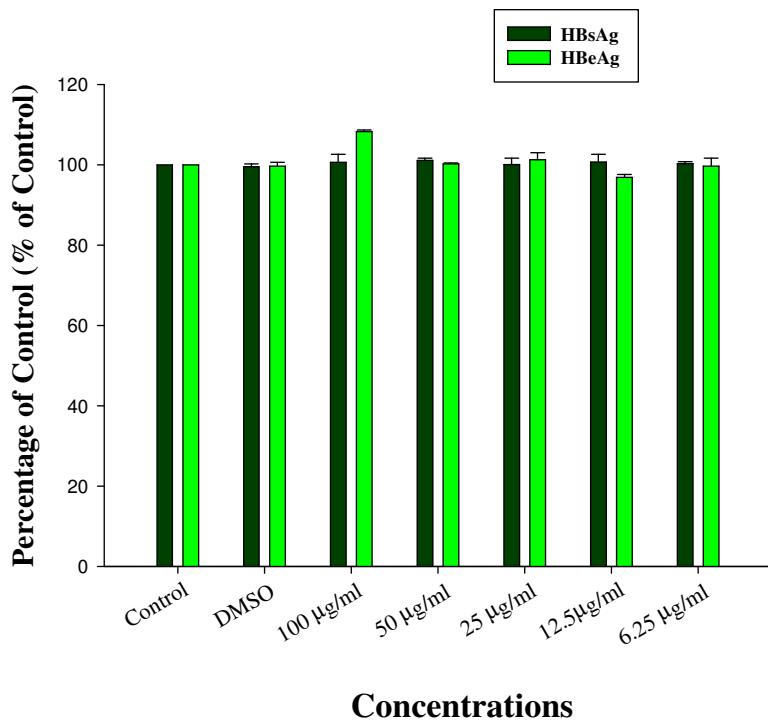
**Fig. 12b Anti-HBsAg and Anti-HBeAg Effects of GK-Lr-W-HW25 in Lamivudine-Resistant HBV Mutant Cell Line (M33).**



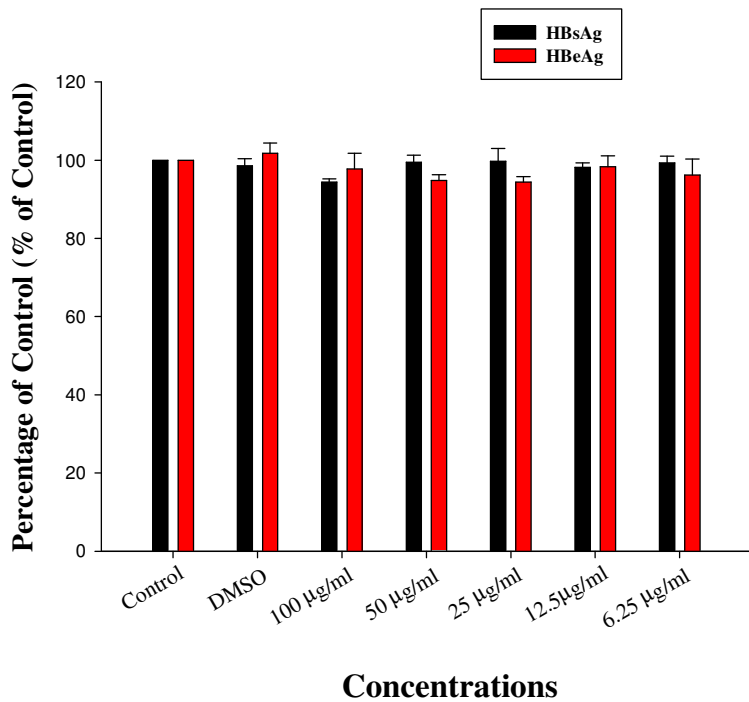
**Fig. 13a Anti-HBsAg and Anti-HBeAg Effects of GK-Lr-M-Me25 in Wild-Type HBV Producing Cell Line (HepG2215).**



**Fig. 13b Anti-HBsAg and Anti-HBeAg Effects of GK-Lr-M-Me25 in Lamivudine- Resistant HBV Mutant Cell Line (M33).**

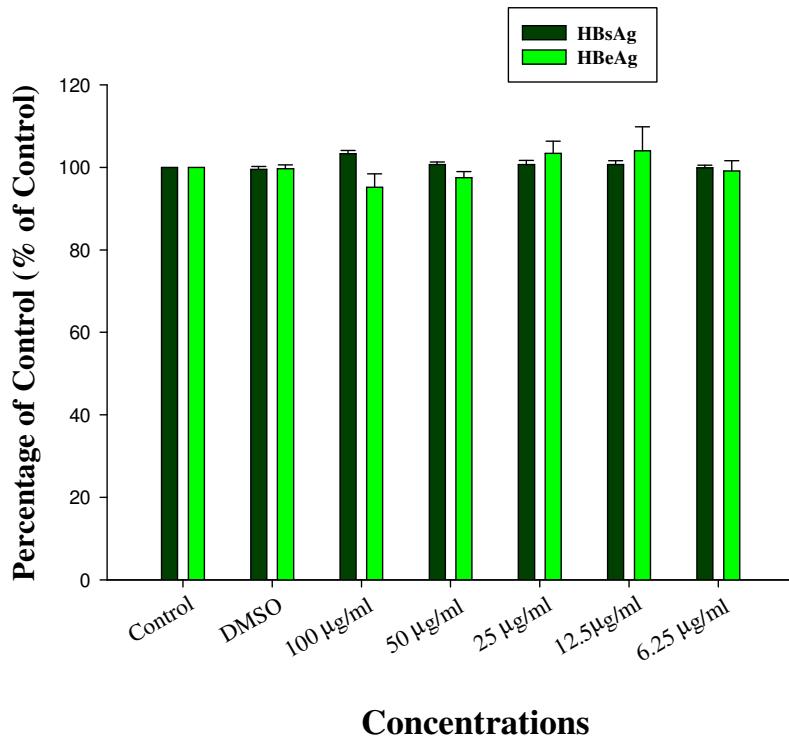


**Fig. 14a Anti-HBsAg and Anti-HBeAg Effects of GK-Lr-M-HW25 in Wild-Type HBV Producing Cell Line (HepG2215).**

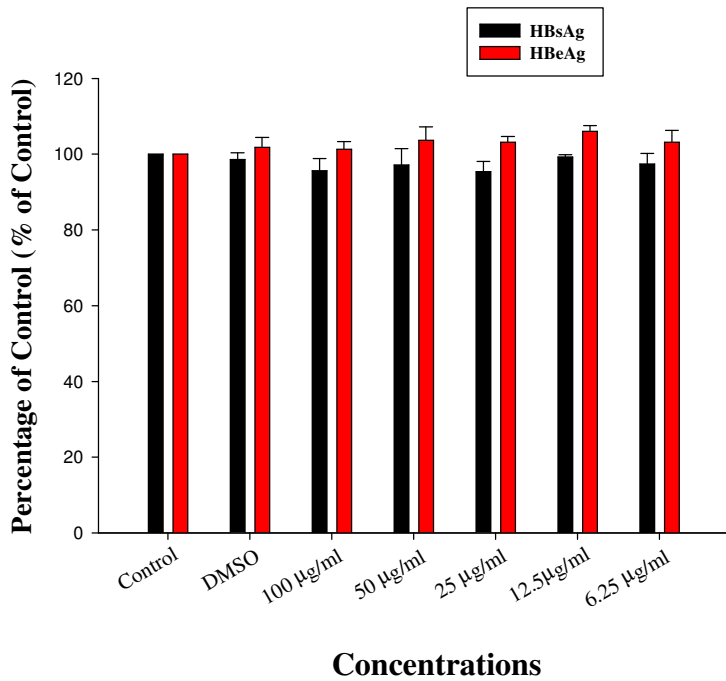


**Fig. 14b Anti-HBsAg and Anti-HBeAg Effects of GK-Lr-M-HW25 in Lamivudine- Resistant HBV Mutant Cell Line (M33).**

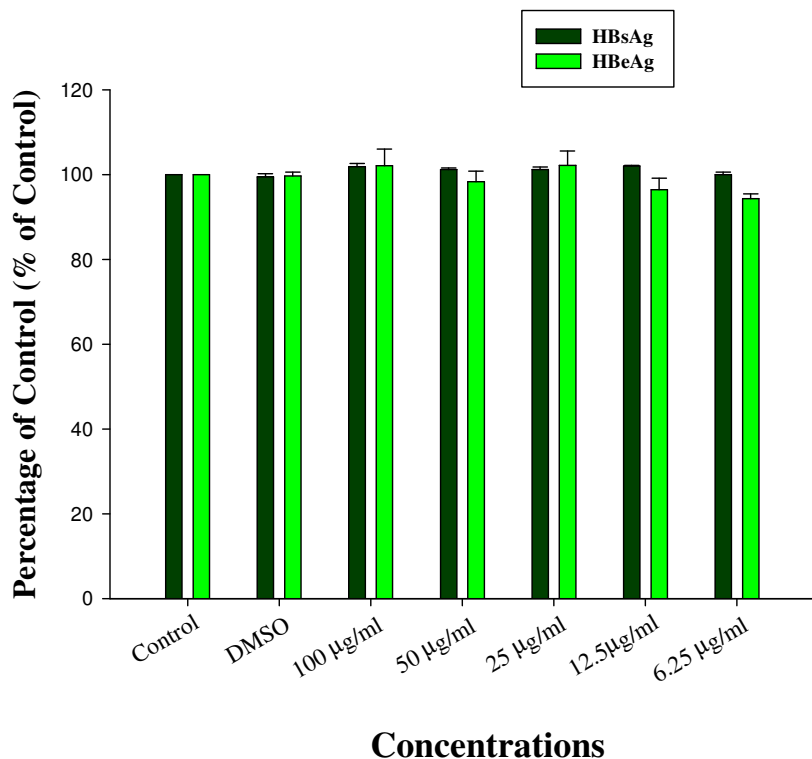




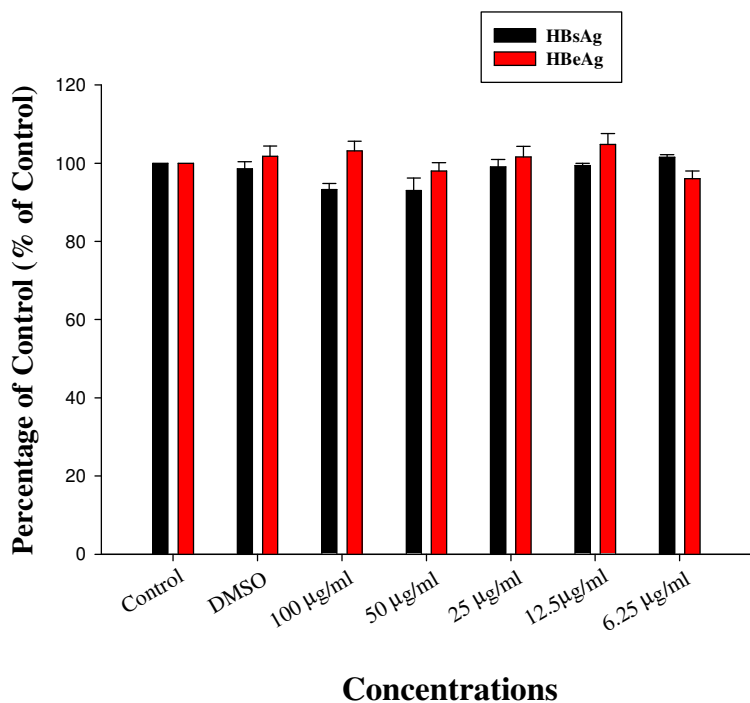
**Fig. 15a Anti-HBsAg and Anti-HBeAg Effects of MAL-Lr-SCL-Me25 in Wild-Type HBV Producing Cell Line (HepG2215).**



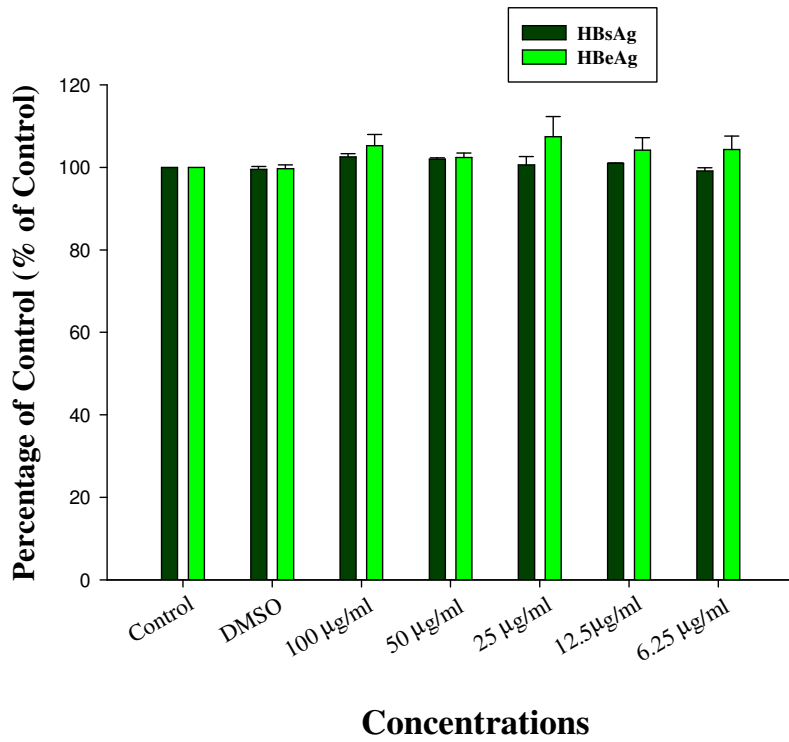
**Fig. 15b Anti-HBsAg and Anti-HBeAg Effects of MAL-Lr-SCL-Me25 in Lamivudine-Resistant HBV Mutant Cell Line (M33).**



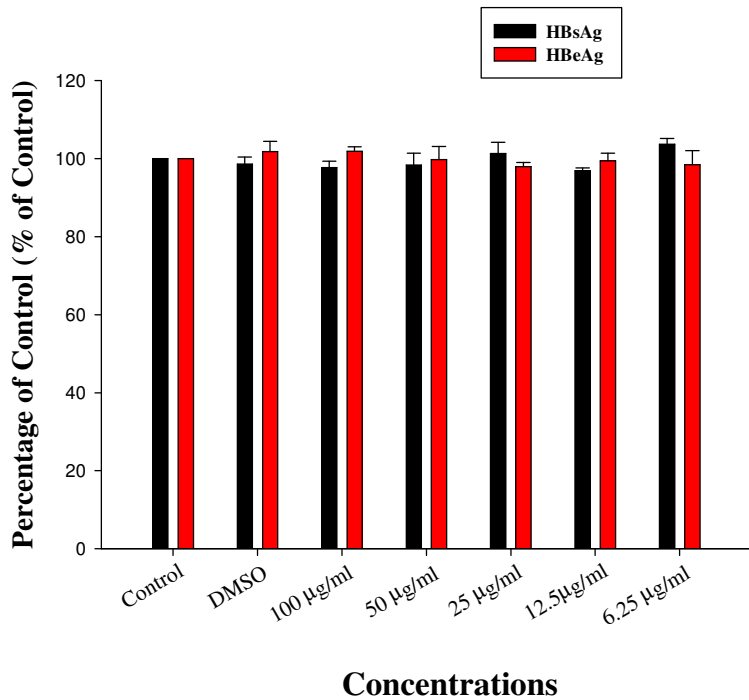
**Fig. 16a Anti-HBsAg and Anti-HBeAg Effects of MAL-Lr-SCL-HW25 in Wild-Type HBV Producing Cell Line (HepG2215).**



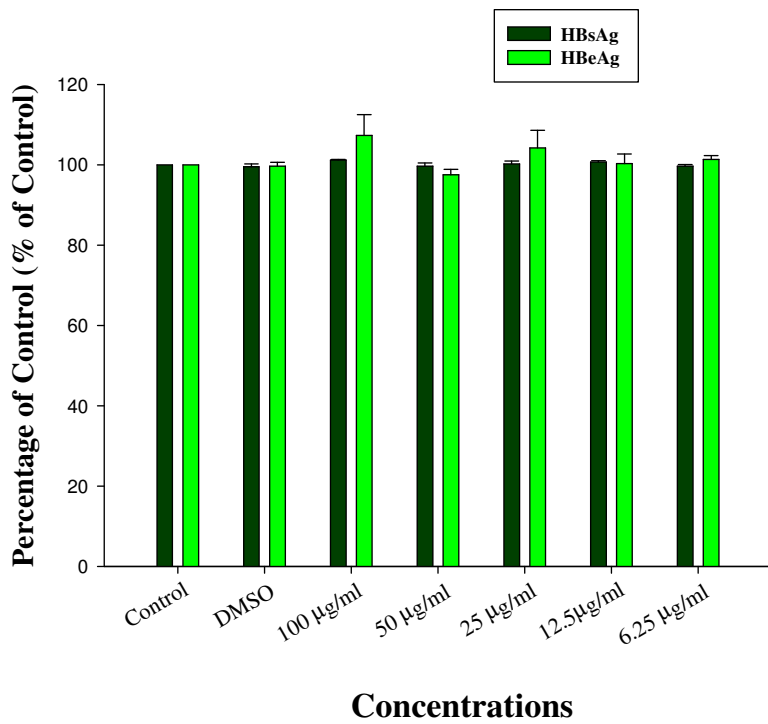
**Fig. 16b Anti-HBsAg and Anti-HBeAg Effects of MAL-Lr-SCL-HW25 in Lamivudine-Resistant HBV Mutant Cell Line (M33).**



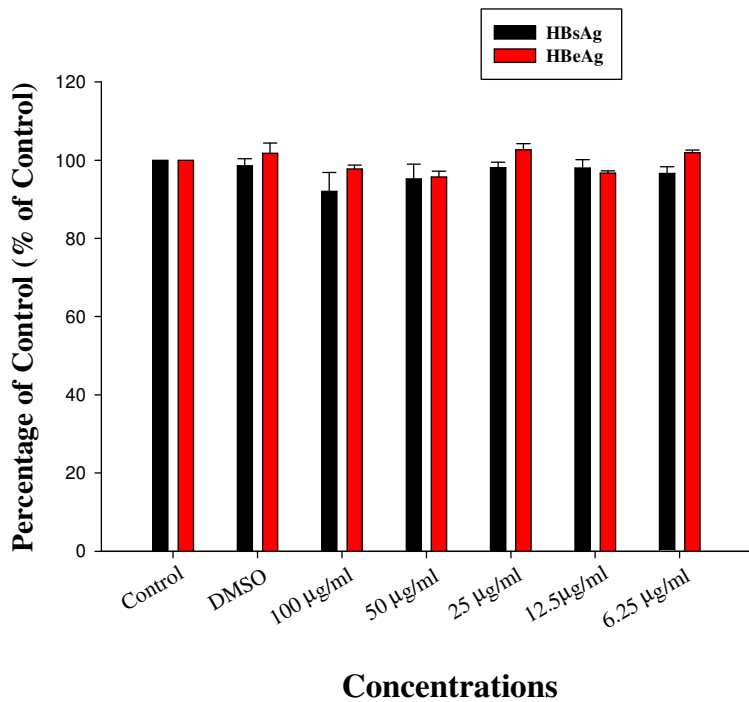
**Fig. 17a Anti-HBsAg and Anti-HBeAg Effects of MAL-Lr-M-Me25 in Wild-Type HBV Producing Cell Line (HepG2215).**



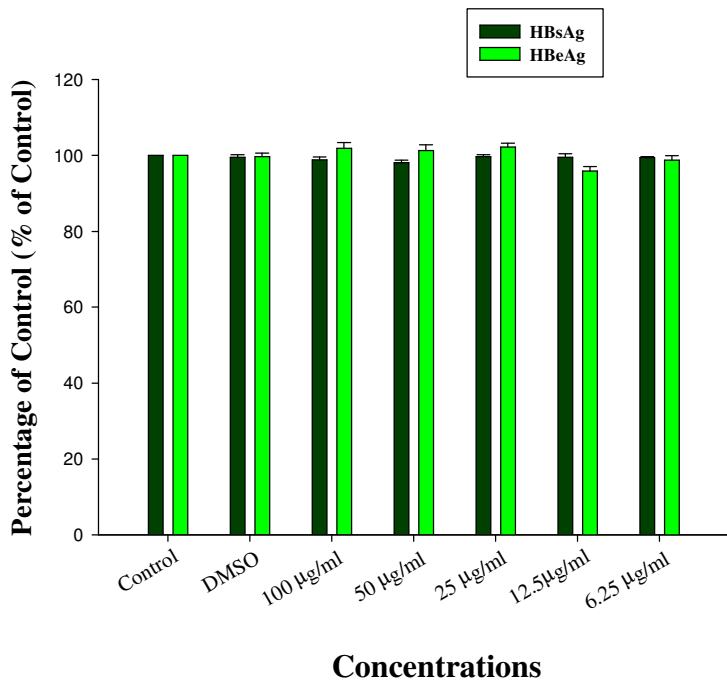
**Fig. 17b Anti-HBsAg and Anti-HBeAg Effects of MAL-Lr-M-Me25 in Lamivudine-Resistant HBV Mutant Cell Line (M33).**



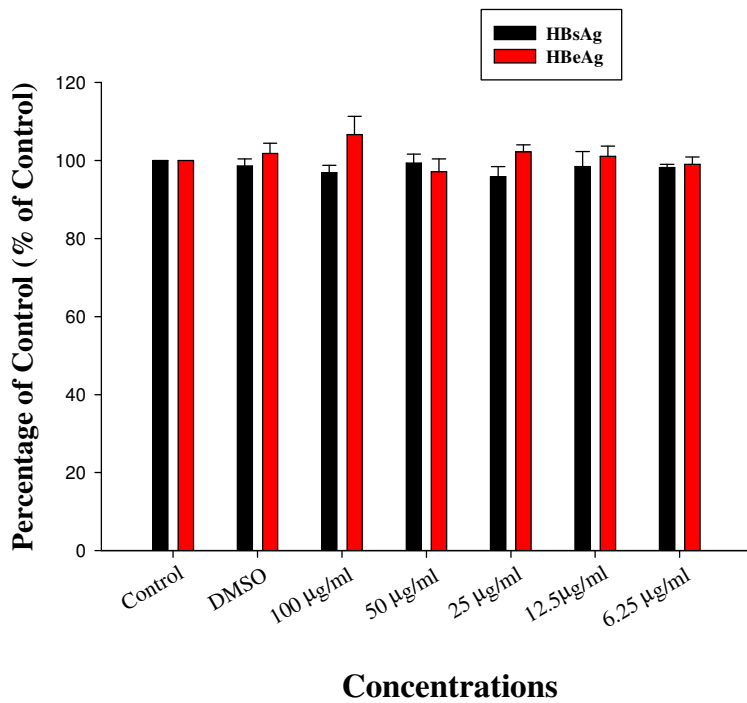
**Fig. 18a Anti-HBsAg and Anti-HBeAg Effects of MAL-Lr-M-HW25 in Wild-Type HBV Producing Cell Line (HepG2215).**



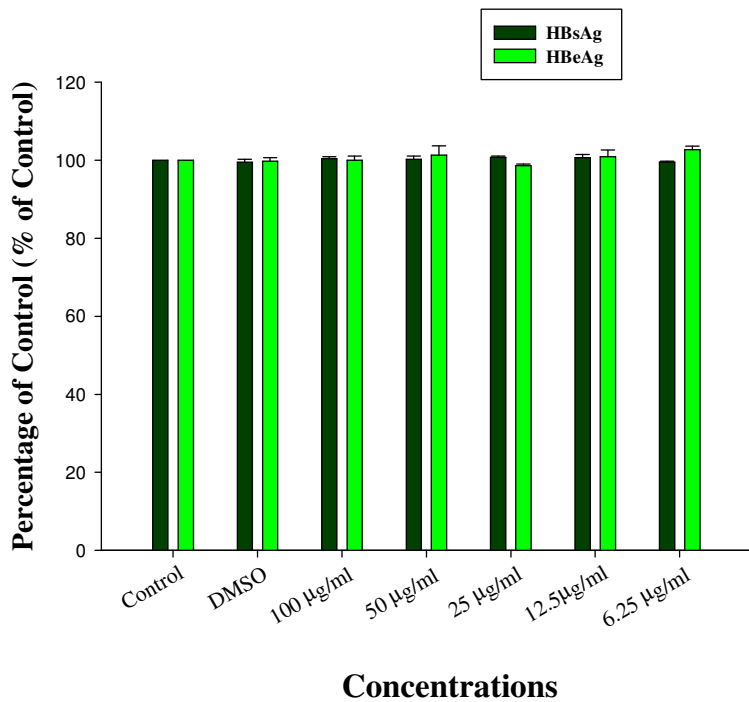
**Fig. 18b Anti-HBsAg and Anti-HBeAg Effects of MAL-Lr-M-HW25 in Lamivudine-Resistant HBV Mutant Cell Line (M33).**



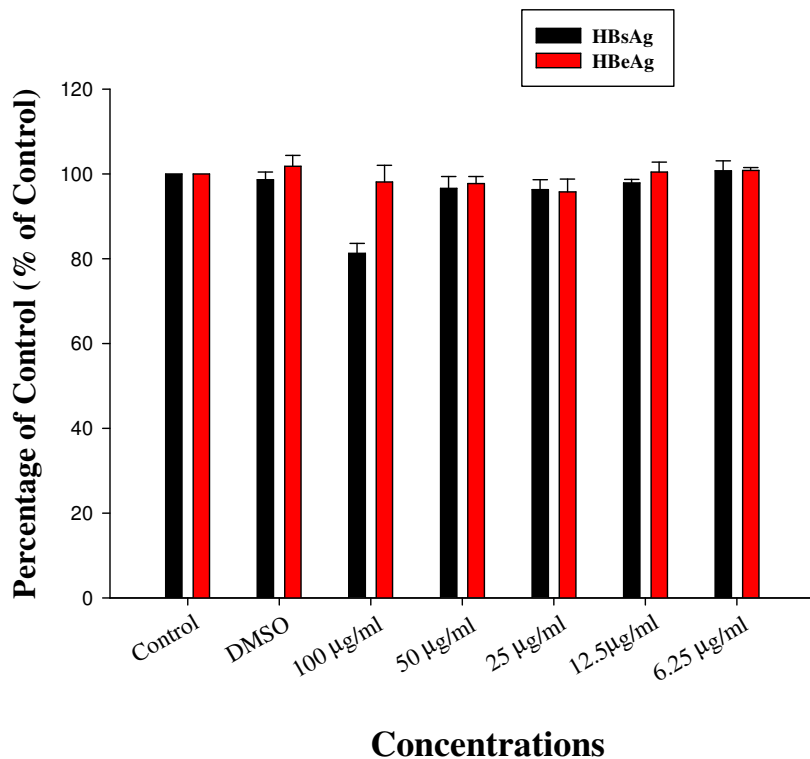
**Fig. 19a Anti-HBsAg and Anti-HBeAg Effects of MAL-Lr-SCL-CA in Wild-Type HBV Producing Cell Line (HepG2215).**



**Fig. 19b Anti-HBsAg and Anti-HBeAg Effects of MAL-Lr-SCL-CA in Lamivudine- Resistant HBV Mutant Cell Line (M33).**



**Fig. 20a Anti-HBsAg and Anti-HBeAg Effects of WT-Lr-SCL-HW20 in Wild-Type HBV Producing Cell Line (HepG2215).**



**Fig. 20b Anti-HBsAg and Anti-HBeAg Effects of WT-Lr-SCL-HW20 in Lamivudine- Resistant HBV Mutant Cell Line (M33).**