

編號：CCMP97-RD-003

比較野生樟芝與實驗室人工栽培樟芝活性功效之研究

張懿欣

中山醫學大學 醫學檢驗暨生物技術學系

摘要

樟芝(*Antrodia camphorata*)是臺灣特有褐腐菌，只能生長在常綠闊葉樹—牛樟(*Cinnamomum kanehirae* hay)的內壁。樟芝氣味芳香、味辛苦，子實體富含多醣體與三萜類等成分，有抗 B 型肝炎與防癌等功效。基於其功效以及野生樟芝子實體數量極少，加上人工栽培不易等因素，所以價格昂貴；業者往往為了採取野生樟芝而大肆盜伐牛樟樹，使臺灣特有珍貴樹種瀕臨滅絕、破壞森林多樣性與生態平衡。本實驗室執行 95-96 年度中醫藥委員會「藥用植物資源開發研究類」委託計畫「樟芝栽培與其抗癌活性之研究」(CCMP95-TP-044)已有優良研究成果，不但已建立牛樟芝的人工栽培條件與技術，並證實在實驗室人工栽培之牛樟芝具有抗腫瘤細胞生長與誘發細胞凋亡作用的活性。本年度計畫結合跨校之林農業與醫學生物技術學者的專長與跨校單位間人員之良好合作模式與默契，以執行 95-96 年度計畫既有之成果、經驗與實驗技術內容為根基，利用動物模式分析比較野生樟芝與本實驗室自行栽培樟芝的活性，選殖富含活性成分之菌種與建立人工栽培方式，確立可大量生產富含活性成分樟芝之人工栽培法，研發藥用樟芝之抗癌活性相關保健產品。本研究計畫之目標符合推動傳統藥材生技研發類之研究重點 2-2：中草藥品質之確保研究(3)野生與栽培藥材藥效比較之研究。實驗結果顯示不論是發酵液、水萃液或甲醇萃取液等 3 種自行培育之樟芝萃取液都具有抑制小鼠腫瘤生長之活性，其抑癌活性依序為發酵液、甲醇萃取物與水萃物。另外，野生樟芝水萃液與甲醇萃取液也都具有抑制腫瘤生長活性，其中以高濃度樟芝甲醇萃取液抑制效果較佳。以上結果證實本實驗自行人工栽培樟芝的抑制腫瘤效果可媲美野生樟芝，甚而人工栽培樟芝培養過程中產生之發酵液的抑癌效果比野生樟芝更為顯著，所需劑量也較低。另外，餵食野生樟芝水萃液 4 週的小鼠，其血清 IL-6 的濃度比起餵食 1 週及 2 週的小鼠顯著增加；推測野生樟芝水萃液可能透過提升 IL-6 分泌量誘發發炎反應來抑制癌細胞的生長。未來將根據上述研究成果，進行人工培養及篩檢研發符合市場需求的樟芝保健產品，符合社會大眾與市場需求以及推動推廣中草藥產業之目標。更可有效遏止盜伐，挽救臺灣特有珍貴樹種牛樟樹避免瀕臨滅絕。

關鍵字：樟芝、人工栽培、抗癌活性、活性比較

Number: CCMP97-RD-003

Comparison and Analysis of the Anti-Tumor and Immune-Promoting Activities of Wild *Antrodia Camphorata* and Laboratory Cultured *Antrodia Camphorate*

Yih-Hsin Chang

School of Medical Laboratory and Biotechnology Chung Shan Medical
University

ABSTRACT

Antrodia camphorata (AS) is a unique brown-rot fungus species which only parasitizes in the decayed heart wood of stout camphor (*Cinnamomum kanehirae* hay) in Taiwan. The AS fruiting body contains abundant polysaccharides and terpenes that are proved to have effective anti-viral function and anti-tumor activity. The price of AS therefore rocketed in the market and it has become the target of illegal harvesting. Consequently, AS has become an endangered species in Taiwan due to the illegal felling. Owing to our conduction of the DOH-supported grant “Study on the culture techniques and anti-tumor activities of *Antrodia camphorate*”, and good mutual cooperative relationship established among 4 departments of 3 universities; the present proposal was aimed to investigate and compare the *in vivo* anti-tumor and immune-promoting activities between wild and cultured AS based on our good achievements in the execution of the last year project. Our results demonstrated that the anti-tumor activities of our in-house cultured AS was comparable to that of the wild AS. Among the extracts prepared from the in-house cultured AS, the fermentation fluids had the most potent anti-tumor activities, which was even more potent than the wild AS extracts. In addition, our data suggested that AS anti-tumor activities might result from the up-regulation of pro-inflammatory cytokine interleukin-6. The implementation of this project can not only prove that our in-house cultured AS anti-tumor and immune-promoting activities which are comparable to the wild AS, but also establish effective and optimal culture conditions and techniques that can culture

AS with high content of active components in large scale. By establishing the effective and optimal culture techniques to produce AS in large scale, the price of AS can not only be decreased, the crisis in which *C. kanehirae* extinction resulted from illegally harvesting AS as well as the destroy of forest ecology in Taiwan can also be saved and solved.

Keywords: *Antrodia camphorata*, optimal culture conditions and techniques, anti-tumor activity

壹、前言

一、食藥用真菌菇類簡介

市場上常見的食用菇類種類繁多，常見的人工栽培菇類有洋菇 (*Agaricus bisporus*)、香菇 (*Lentinus edodes*) 及秀珍菇 (*Pleurotus ostreatus*) 等。此外，靈芝 (*Ganoderma lucidum*)、冬蟲夏草 (*Cordyceps sinensis*)、舞菇 (*Grifola frondosa*)、樟芝 (*Antrodia camphorata*) 等都是具有保健機能與保健食品發展潛力的藥用菇類(王伯徹等，1994)。

藥用真菌在中國傳統藥草中佔有極重要的角色，近三十年來經過多方的努力研究，透過菌種分離培養、液態發酵技術、藥理分析、毒性試驗及臨床研究，已發展出二十餘種商業化產品。這一些藥用真菌成分大多是無毒或是低毒性的免疫促進劑——多醣體，可以增加免疫力，強化身體健康。

二、採用人工培養技術開發真菌次級代謝物之重要性

市場上大多採用發酵技術生產食藥用菇類相關產品。目前商業上較常被應用的是液體發酵技術，發酵槽體積已超過五萬公升。然而液體培養真菌與天然栽培子實體的代謝不同，所以液體發酵多半只能生產以多醣體為主要成分之真菌初級代謝物，無法獲得大量具生物活性的真菌次級代謝物。真菌次級代謝物種類較多，結構變化也較大，有寬廣而值得開發的生物醫藥活性(王聲遠等，2001)。固態發酵是一種較接近天然栽培的技術，可培養出有效成分濃度遠高於液體發酵的真菌，因此具有很高的商業化潛力。

三、樟芝背景簡介

樟芝 (*Antrodia camphorata*) 是屬於褐腐菌之臺灣特有真菌，樟芝的生長有宿主專一性，只能生長在常綠闊葉樹——牛樟 (*Cinnamomun kanehirai hay*) 腐朽心材的內壁。樟芝氣味芳香、味辛苦，早期原住民以樟芝解酒醒腦，甚至患有重症的原住民服食樟芝後竟然不藥而癒(臺灣原住民藥用植物彙編，2000；臺灣原住民藥用植物彙編(二版)，2001；臺灣原住民藥用植物彙編〈三版〉，2002；臺灣原住民藥用植物彙編(英文版)，2003)。此後樟芝的功效即廣被流傳，並素有「靈芝之王」美譽；此外，因樟芝子實體呈橘褐色，又稱為「臺灣紅寶石」(臺灣常用藥用植物圖鑑〈二〉、〈三〉，2004)。

樟芝子實體富含多醣體(polysaccharides)、倍半萜(sesquiterpenes)、三萜類(triterpenes)、類固醇(steroids)、酚與二酚衍生物等成分(Chiang *et al.*, 1995; Cherng *et al.*, 1995; Cherng *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996)，除了有靈芝的優點，也有抗B型肝炎(陳建志等，2001)、抗氧化與防癌(Lee *et al.*, 2002)等功

效。從此樟芝的抗肝炎病毒及抗腫瘤功效逐漸確立，不再僅是民俗療方；使樟芝成為極具學術研究價值與生物利用潛力的藥用真菌而在市場上奇貨可居，變成盜伐者趨之若鶩的對象。

四、已知的樟芝活性成分

(一)多醣體

多醣體是目前藥用真菌市場上的主要產品。樟芝多醣體含量約為1-2%，主要成份為 β -D- glucan，可有效刺激人體免疫反應，為對抗腫瘤的生物反應調節劑(Kitamura *et al.*,1994)。多醣體之主要功效包括增進免疫系統細胞間的訊息傳遞、活化巨噬細胞的吞噬作用與誘發補體活化反應、促進免疫細胞分泌介白素(如interleukin-1 [IL-1]與IL-2)及干擾素(γ -interferon, IFN- γ)等提升免疫作用之細胞激素，增強宿主免疫機能，抑制癌細胞增殖。

(二)三萜類

萜類(terpene)是碳氫化合物或脂質代謝而產生的物質，以異戊二烯為單體單元，分子式為 $(C_5H_8)_n$ ；由六個異戊二烯單體聚合而成的化合物稱為三萜(triterpenes；肖崇厚等，1989)。靈芝子實體含有上百種三萜類化合物，其中靈芝酸具有抑制肝癌細胞的活性(Zhong *et al.*, 2001)。樟芝子實體的三萜類含量約占10-45%，而靈芝的三萜類含量僅約1-3%。樟芝三萜類具有抗腫瘤及抑制癌細胞生長以及活化神經細胞生長的功效。

(三)其他物質

樟芝還含有核苷酸、超氧歧化酵素、維生素B、菸鹼酸、礦物質與蛋白質等成分。腺苷有抗血栓作用(李奇翰，2001)，超氧歧化酵素可迅速將超氧自由基轉換為過氧化氫而有抗氧化的效果(毛正倫等，2003)。另外，樟芝也含鈣、磷、鋇與鐵等多種礦物質(吳德鵬，1995)。

五、樟芝之活性功效研究

樟芝含有多醣體、三萜類化合物與凝集素等具生理活性之多種複雜成分，所以極具學術研究價值與產業發展潛力。臺灣地區之學術與研究機構已發表許多有關樟芝活性功效與成分分析之文獻，茲將近年於樟芝在增強免疫作用與抑癌等功能性研究與實驗結果整理摘錄如下：

(一)抗癌活性

1. 以樟芝多醣體刺激人類末梢血液單核球細胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)所製備的單核球細胞條件培養基與人

類白血病細胞株U937共同培養後，對U937的生長抑制作用可達55.3% (劉俊仁，2003)。

2. 樟芝菌絲體具有抑制人類白血病細胞株HL-60的顯著細胞毒性，但對人類內皮細胞則無細胞毒性(Hseu *et al.*, 2002)。
3. 以樟芝多醣體刺激之PBMCs的條件培養基除了可抑制U937的增生之外，並具有誘導U937細胞分化成為成熟之單核球巨噬細胞的活性。此外，利用口服或餵食方式讓植入Sarcoma 180癌症細胞的ICR小鼠攝取樟芝多醣體，可顯著抑制腫瘤細胞生長。綜合上述實驗，推測樟芝可透過提升免疫作用機能，發揮制癌活性(呂鋒洲，2002)。

(二)增強免疫作用之活性

1. 在缺乏發炎刺激物或是在誘導發炎反應之脂多醣(lipopolysaccharride, LPS)刺激的環境中，樟芝發酵液都可促進脾臟細胞之IL-2及INF- γ 等細胞激素的基因表現，具有增強免疫活性之功能(賴宏亮等，2002)。
2. 樟芝菌絲體具有促進淋巴細胞增生的功效，可刺激脾臟細胞產生Th1細胞激素IL-2，並抑制Th2細胞激素IL-4之生成(陳啟禎，2002)。
3. 以樟芝多醣體刺激之PBMCs的條件培養基除了可抑制U937的增生之外，並具有誘導U937細胞分化成為成熟之單核球巨噬細胞的活性。因此樟芝可能可透過誘發白血球之成熟分化，提升免疫作用(呂鋒洲，2002)。
4. 以血吸蟲感染C57BL/6和BALB/c小鼠並餵食樟芝菌絲體發酵液，結果顯示經餵食發酵液四週後，兩種小鼠體內之血吸蟲數量分別是對照組小鼠(未餵食發酵液)的60%和48%；餵食樟芝菌絲體發酵液小鼠體內之TNF- α 、INF- γ 和IL-2濃度皆明顯增加(陳勁初等，2001)。此實驗證實樟芝可提昇Th1細胞性免疫作用，預防寄生蟲感染。

誠如上述，雖然臺灣地區之學術與研究機構業已發表許多有關樟芝活性功效與成分分析之研究報告，但大多數樟芝生理活性之相關實驗數據多以產業界或新竹食品工業發展研究所提供之樟芝菌種為實驗材料，鮮少有實驗室自行研發樟芝人工培育技術並比較自行栽培樟芝與野生樟芝活性之研究。

六、樟芝之需求與醫療保健及產業之相關性

天然樟芝只生長在臺灣特有樹種牛樟樹上，所以也僅在臺灣才能採到天然樟芝。目前市面上的樟芝產品多是僅含菌絲體萃取物(多為多醣體)的食用膠囊，現今人工栽培技術仍無法成功的大量栽培樟芝。產業界雖然常應用已臻成熟的液體發酵技術生產食藥用樟芝成分產品，發酵槽體積也已超過五萬公升以上，但由於液體培養真菌與天然栽培真菌的代謝作用不同，所以液體發酵無法取得如同天然栽培藥用真菌子實體生物藥理活性較佳的次級代謝物。固態發酵是較接近天然栽培真菌的培育技術，培養出的有效真菌成分濃度遠高於液體發酵產品，因此有高度商業化潛力。

基於樟芝之功效以及野生樟芝子實體數量極少，加上樟芝人工栽培不易等多項因素，所以樟芝價格昂貴。業者往往為了採取野生樟芝而大肆盜伐牛樟樹，使臺灣特有珍貴樹種瀕臨滅絕的危機。這種行為不僅使違法者獲利，喪失法律尊嚴，甚至更破壞森林多樣性與生態平衡。本實驗室研究團隊執行95-96年度中醫藥委員會「藥用植物資源開發研究類」委託計畫”樟芝栽培與其抗癌活性之研究”(CCMP95-TP-044)之研究成果，已建立樟芝的人工栽培條件與技術，並證實人工栽培樟芝具有抑制細胞生長與誘發細胞自戕作用的抗腫瘤活性。本實驗室執行上述計畫之經驗不但已建立良好之跨校單位人員合作模式與默契，更基於既有之執行成果與實驗技術內容，有信心透過本計劃之執行提供臺灣本土特有藥用菇菌之文獻資料相關資訊、建立藥用菇菌之最佳人工栽培條件與技術。計畫執行遠程目標為透過研發發掘並進一步發展新穎之樟芝活性成分與製程，進行人工培養及篩檢研發符合市場需求的樟芝保健產品，使一般大眾可享有物美價廉之保健食品，符合社會大眾與市場需求以及推動推廣中草藥產業之目標(行政院衛生署中醫藥委員會成立六週年特刊—臺灣中醫藥未來的發展與策略，2001)。此外，更可有效遏止大肆盜伐牛樟樹，以挽救臺灣特有珍貴樹種牛樟樹，避免瀕臨滅絕的命運。

七、產品與研究方法之構想

(一)產品與研究方法之構想

樟芝是具有高經濟價值的藥用真菌，而且因牛樟為珍貴稀少樹種，所以菌種之取得更加不易。樟芝之液態發酵菌絲體雖然成長快速，但與自然生長真菌之代謝途徑不甚相同，主要產物是初級代謝物，因此有效之活性次級代謝物成分遠低於自然生長真菌。研發實驗室樟芝培育技術不但可得到較多的有效次級代謝物成分，生長也不受季節或地理環境等因素限制，極具生物醫藥開發潛力。目前國內市場上產品大都是生物科技業者利用深層發酵

槽大量培養樟芝菌絲體所得之樟芝菌絲體初級代謝物的多醣體相關產品，而實驗室樟芝功效驗證則大多以生物科技業者或食品工業發展研究所所提供之菌種為實驗材料；鮮少研究室自行發展樟芝人工培育技術並以自行培育之樟芝為實驗材料，分析自行培育樟芝與野生樟芝的活性比較。

本研究有鑑於樟芝數量稀少但具保健功效、保育臺灣特有珍貴樹種與森林多樣性和生態平衡等以及社會大眾與產業等多方需求，結合嘉義大學林產學系與森林暨自然資源學系之真菌培育以及中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系和弘光科技大學基礎醫學科之醫學生物技術專業研究團隊，執行95-96年度中醫藥委員「藥用植物資源開發研究類」委託計畫「樟芝栽培與其抗癌活性之研究(CCMP95-TP-044)」，積極投入研發並建立樟芝人工培養技術與條件，並評估分析鑑定自行培養樟芝具抑癌細胞生長之有效活性作用機轉。目前本實驗室已有優良研究成果，不但建立牛樟芝的人工栽培條件與技術，也證實自行人工栽培樟芝具有抗腫瘤細胞生長與誘發細胞自戕作用等抗癌活性。本實驗室以上述實驗結果為基礎，進一步探討並比較野生樟芝與本實驗自行培育之人工栽培牛樟芝抗癌活性與增進人體免疫作用之作用機制，研發相關之抗癌保健產品。

(二) 研究目標

本研究計畫主要執行方式是由中山醫學大學與弘光科技大學的生物醫學專業人員利用由嘉義大學研究團隊人工培育樟芝為原料，以動物模式比較分析野生與自行人工栽培樟芝之抗癌與提升免疫作用之活性功效；選殖富含活性成分之人工培育樟芝選殖並富含活性成分之樟芝人工培養技術，研發符合市場需求的樟芝保健產品。本計畫之重要工作項目及研究目標為比較野生與人工栽培樟芝對小鼠動物模式體內(*in vivo*)之抗癌作用與免疫反應之的影響、功效與機制；選殖並確立同時具有高含量抗癌活性與提昇免疫反應活性成分之樟芝菌種與樟芝人工培養技術。

貳、材料與方法

一、試驗材料：實驗室人工培養樟芝

(一)試驗菌株

由林試所生物組張東柱博士提供樟芝 *Antrodia cinnamomea* Chang T T & W N Chou 菌體(採集於高雄縣六龜鄉)。

(二)固態培養基備製

秤取下列 MPA⁺培養基(主要成份為麥芽抽出物 30 g/L、蛋白胨 5 g/L、瓊脂 8 g/L、磷酸二氫鉀 3 g/L、維他命 B1 10 mg 及硫酸鎂 1.5 g/L)加入去離子水，將培養液倒入燒瓶，放置於高溫高壓滅菌釜中蒸煮(溫度 121°C、壓力 1.5 kg/cm²、30 分鐘)，進行滅菌。滅菌後將培養液倒入培養皿內(25cc)，待冷卻凝固即完成培養基製備。

(三)樟芝栽培：於無菌操作臺中用解剖刀分別將樟芝菌絲體分割為 5 mm × 5 mm 大小，分別將樟芝菌絲體接種至培養基中心並加以密封，置於生長箱中以 30±1°C 培養至第七週，作為後續實驗之原料。

二、利用實驗動物模式比較探討野生與人工栽培樟芝之 *in vivo* 抗癌活性功效

(一)野生與人工栽培樟芝萃取液製備

以上述在實驗室人工栽培之樟芝與野生樟芝為試驗材料，首先將培養於三角瓶中之樟芝子實體與培養液分開，將所得培養液離心處理(4°C，8000 rpm 15 分鐘)後，取上清液，再以冷凍乾燥機處理為粉末狀態，此及為樟芝發酵液萃取物。樟芝子實體經水洗及冷凍乾燥處理，取 10 g 以均質機打成碎片，加入 2 L 之去離子水，再以超音波破碎機處理以破碎細胞壁，將處理完之液體裝入三角瓶中，置於震盪箱中以 30 °C 萃取 24 hr，以 Whatman#2 濾紙抽氣過濾，過濾液用冷凍乾燥機處理為粉末狀態，此及為樟芝水萃物。取 10 g 以均質機打成碎片，加入 2 L 之 99 % 甲醇，再以超音波破碎機處理以破碎細胞壁，將處理完之液體裝入三角瓶中，置於震盪箱中以 30 °C 萃取 24 hr，以 Whatman#2 濾紙抽氣過濾後，再以減壓濃縮機濃縮至乾，得膏狀物，此及為樟芝甲醇萃取物。

(二)實驗動物

本實驗將以 ICR 小白鼠為實驗細胞模式，探討野生與人工栽培樟芝之活體內抗癌與提升免疫作用活性功效、機制與有效成分。ICR 小鼠為廣為採用之腫瘤抑制實驗動物模式，而且基於免疫排斥問題，S180 腫瘤細胞只能在 ICR 小鼠體內生長，故採用 ICR 小鼠進

行本實驗。實驗組 ICR 小鼠數量為 3 隻(每一樟芝劑量餵食之小鼠自成一組；一組 3 隻)；對照組 ICR 小鼠數量為 3 隻。本實驗重複 2 次，所以每組 ICR 小鼠數量為 6 隻。

(三)試驗方法

1. 細胞激素分泌(cytokine-induced assay)

不同萃取條件所產的樟芝萃取物配於生理食鹽水中，以管餵以食鹽水，25 g 之小鼠需餵以 0.25 ml 食鹽水，此 0.25 ml 中應含 0.025 g 樟芝萃取物(0.1 g/ml)，管餵後觀察其 72 小時內 cytokine 分泌情形，利用老鼠眼窩抽血每次 400 μ l，將所得血液離心處理(室溫，2500 rpm 15 分鐘)後，取上清液約 200 μ l，利用 cytokine KIT 反應試劑與上清液作用，最後利用 ELISA reader 在波長 450 nm 讀取吸收值。

2. T 細胞活化分析

取 50 ml 正常人之全血，置於 EDTA 管中，取 Ficoll-Hypaque 4 ml 到 15 ml 離心管中，緩慢加入全血，全血與 Ficoll-Hypaque 的比例為 2:1，離心(2000 rpm, 30 min, 25°C)之後 Ficoll-Hypaque 會將全血分層，吸取 HPBMCs (human peripheral blood mononuclear cells)層，之後將細胞 2×10^6 /ml 置於 12 孔盤中。細胞以培養基(RPMI)培養，並分為 3 組: Positive control 加入 10 μ l PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)；control 為不添加任何物質；實驗組加入樟芝發酵液(400 μ g/ml)，置於 37°C，待 24-27 小時後收取 medium 至離心管中，以 PBS wash 後離心，收取細胞，加入 100 μ l PBS 打散細胞後個別加入 20 μ l FITC (anti-human CD4)及 PE (anti-human CD45RA)，放冰上避光 30 min，之後離心(2500rpm, 5min, 4°C)並以 PBS 清洗掉未反應物質，低溫離心 2500 rpm, 5 min 後倒掉上清液，加入 1 ml 冰的 PBS 混合後，以 Flow cytometry 分析(各收 50000 個細胞)。

3. 小鼠體內腫瘤大小、數量與轉移情形

本實驗室以 ICR 小鼠為實驗細胞模式，從皮下將 Sarcoma 180 腫瘤細胞注射入 ICR 小鼠體內，誘發腫瘤生成。接著將已帶有 Sarcoma 180 腫瘤細胞之 ICR 小鼠分為兩組，對照組於實驗組小鼠分開飼養，每一樟芝劑量餵食之小鼠自成一組，亦分籠飼養。實驗組小鼠(每一樟芝劑量餵食之小鼠自成一組；一組 3 隻)餵食不同濃度之自行培育樟芝發酵液、樟芝水萃液或樟芝甲醇萃

取液(50, 200 mg/kg)，每天餵食一次，連續餵食 4 週，並持續測量小鼠體內之腫瘤大小；對照組小鼠(3 隻)則是餵飼等量之二次水，其餘實驗操作過程皆相同。在第 0 天，將 ICR 小鼠皮下注入 Sarcoma-180 腫瘤細胞(1×10^6)經過 24 小時之後，每天餵以不同濃度的樟芝萃取物(25、50、100、200 mg/kg)，持續 4 週，測量腫瘤的大小、數量與觀察是否有轉移之情形。

$$\text{腫瘤大小} = a \times b^2/2$$

a 為腫瘤的長度(mm) b 為腫瘤的寬度

$$\text{抑制率(\%)} = \{1 - (\text{實驗組腫瘤大小} / \text{對照組腫瘤大小}) \times 100\%$$

三、統計分析及計算

統計分析以 SPSS 10.0 版本為主，進行變異數分析，並以 one way ANOVA 來檢定不同處理時的顯著差異效果。

參、結果

一、野生與人工栽培樟芝萃取液製備

本實驗室自行培養之樟芝型態如 Fig. 1a 所示。自行培養樟芝之菌落型態在培養初期的菌落顏色為橘紅色，在整個培養期間菌落外緣呈現均勻生長，菌絲平滑伏生至潛生到固態培養基中。利用經上述自行培養之樟芝製備樟芝發酵液、樟芝水萃物及樟芝甲醇萃取物；詳盡製備方法如材料及方法中所述。另外，亦從市面購買野生樟芝（其型態如 Fig. 1b 所示），同時製備樟芝水萃物及樟芝甲醇萃取物，供後續活性分析用。

二、人工栽培樟芝萃取液之抗癌活性功效

本實驗室以 ICR 小鼠為實驗細胞模式，從皮下將 Sarcoma 180 腫瘤細胞注射入 ICR 小鼠體內，誘發腫瘤生成(Fig. 2)。接著將不同濃度之自行培育樟芝發酵液、樟芝水萃液或樟芝甲醇萃取液(50, 200 mg/kg) 餵食已帶有 Sarcoma 180 腫瘤細胞之 ICR 小鼠，每天餵食一次，連續餵食 4 週，並持續測量小鼠體內之腫瘤大小。結果顯示不論是樟芝發酵液(Fig. 3)、樟芝水萃液(Fig. 4)或樟芝甲醇萃取液(Fig. 5)等 3 種自行培育之樟芝萃取液都具有抑制腫瘤生長之活性，其中以樟芝發酵液抑制腫瘤生長之效果最佳--低濃度之發酵液即有顯著之抑癌活性(50 mg/kg；Fig. 3)；其次為樟芝甲醇萃取物，樟芝水萃物則必須較高濃度才有較顯著之抑癌活性(200 mg/kg；Fig. 5)。將樟芝發酵液餵食劑量提高至 400 mg/kg 之後，其抑癌活性與 200 mg/kg 並無明顯差異。

三、野生樟芝萃取液之抗癌活性功效

利用不同濃度之野生樟芝水萃液與野生樟芝甲醇萃取液(50, 200 mg/kg) 餵食於帶有 Sarcoma 180 腫瘤之 ICR 小鼠，每天餵食一次，連續餵食 4 週，並持續測量小鼠體內之腫瘤大小。結果發現野生樟芝水萃液與野生樟芝甲醇萃取液都具有抑制腫瘤生長之活性，其中以高濃度之樟芝甲醇萃取液(200 mg/kg)抑制效果最佳(Fig. 6a)；將腫瘤組織取出加以秤重也顯示高濃度之樟芝甲醇萃取液餵食小鼠的腫瘤細胞重量最輕，抑制效果最佳(Fig. 6a)。Fig.3~Fig.6 為餵食樟芝實驗組小鼠與對照組小鼠之腫瘤大小變化，結果顯示不論是發酵液(Fig. 3)、水萃液(Fig. 4)或甲醇萃取液(Fig. 5)等 3 種自行培育之樟芝萃取液都具有抑制腫瘤生長之活性。其中以樟芝發酵液抑制腫瘤生長之效果最佳--低濃度之發酵液即有顯著之抑癌活性(50 mg/kg；Fig. 3)，其次為樟芝甲醇萃取物，樟芝水萃物則必須較高濃度才有較顯著之抑癌活性(200 mg/kg；Fig. 5)。且上述三種萃取物之抑癌活性都與劑量成正比-劑量

越高抑癌效果愈佳(Fig.3~Fig.5);但將樟芝發酵液餵食劑量提高至 400 mg/kg 之後,其抑癌活性與 200 mg/kg 並無明顯差異。另外,皮下注射 Sarcoma 180 腫瘤細胞誘發腫瘤生成的過程中,ICR 小鼠之體重會隨著飼養天數增加而些微增加,但不同餵食組別小鼠與對照組小鼠之重量並無明顯差異(Fig.7)。綜合上述數據,腫瘤大小重量之變化的確來自樟芝萃取物的抑癌作用,和小鼠體重無關。

四、提昇免疫力活性功效

(一)細胞激素分泌

本實驗餵食皮下注射Sarcoma-180腫瘤細胞之ICR小鼠野生樟芝水萃液與甲醇萃取液(50, 200 mg/kg),連續餵食4週,並持續測量血清中IL-6的含量。結果發現,在餵食4週野生樟芝水萃液(50 mg/kg)之後,IL-6濃度顯著增加【^c $p < 0.05$ vs 野生樟芝水萃液50 mg/kg (餵食第1週),^d $p < 0.05$ vs 野生樟芝水萃液50 mg/kg (餵食第2週)】(Fig.8)。

(二)T細胞活化分析

為探討樟芝萃取物對T細胞活化作用之影響,本實驗室先自正常健康個體之全血分離周邊血液單核細胞(HPBMCs; human peripheral blood mononuclear cells),之後將細胞加入樟芝發酵液培養於37°C,待24小時後以流式細胞儀分析T細胞之CD4與CD45RA分子表現情形,了解樟芝發酵液對T細胞的影響。此實驗初步結果顯示樟芝發酵液似乎對T細胞之CD4與CD45RA分子表現並無顯著影響(Fig.9);但此觀察現象尚需加以進一步確認。

肆、討論

天然樟芝只生長在臺灣特有樹種牛樟樹上，所以也僅在臺灣才能採到天然樟芝。樟芝含有多醣體、三萜類化合物、凝集素等具生理活性之多種複雜成分；由於野生樟芝取得不易，且樟芝又有提升免疫作用機能及抑癌活性(呂鋒洲，2002)，所以極具學術研究價值與產業發展潛力。目前國內市場上產品大都是生物科技業者利用深層發酵槽大量培養樟芝菌絲體所得之樟芝菌絲體初級代謝物的多醣體相關產品，而實驗室樟芝功效驗證則大多以生物科技業者或食品工業發展研究所所提供之菌種為實驗材料；鮮少研究室自行發展樟芝人工培育技術並以自行培育之樟芝為實驗材料，分析自行培育樟芝與野生樟芝的活性比較。本實驗室執行 95-96 年度中醫藥委員「藥用植物資源開發研究類」委託計畫「樟芝栽培與其抗癌活性之研究(CCMP95-TP-044)」，積極投入研發並建立樟芝之人工培養技術與條件，並評估分析鑑定實驗室培養樟芝具抑癌細胞生長之有效活性作用機轉。本計劃以上述實驗結果為基礎，進一步利用體內(*in vivo*)實驗動物模式，比較野生與人工栽培樟芝之抗癌功效。

動物實驗模式中，將 Sarcoma-180 腫瘤細胞(1×10^6)注射於 ICR 小鼠的皮下，誘發腫瘤的形成，觀察於餵食野生與人工栽培樟芝之萃取物後，腫瘤被抑制的情形。以 Sarcoma-180 腫瘤細胞注射於 ICR 小鼠的皮下可成功誘發腫瘤的形成(Fig. 2)。結果顯示不論是樟芝發酵液(Fig. 3)、樟芝水萃液(Fig. 4)或樟芝甲醇萃液(Fig. 5)等 3 種自行培育之樟芝萃液都具有抑制腫瘤生長之情形，其中以樟芝發酵液抑制腫瘤生長之效果最佳，低濃度之發酵液(50 mg/kg; Fig. 3)即有顯著之抑癌活性；其次為樟芝甲醇萃液，再其次為樟芝水萃液。另外，野生樟芝水萃液與甲醇萃液也都具有抑制腫瘤生長活性，其中以高濃度之樟芝甲醇萃液(200 mg/kg)抑制效果較佳(Fig. 6a)。上述 ICR 小鼠之體重會隨著飼養天數增加而些微增加，但不同餵食組別小鼠與對照組小鼠之重量並無明顯差異，此結果表示腫瘤重量之減輕的確來自樟芝萃液之抑癌作用，而不是因為小鼠體重差異所導致。

由 Fig. 3、Fig. 4 和 Fig. 5 之結果，推論人工栽培樟芝發酵液抑制腫瘤生長的效果最佳，依次分別為甲醇和水萃液；其中發酵液為培育樟芝之後所得之培養液，水萃液則是利用冷凍乾燥備製，都不含極性或有機溶劑；而甲醇萃液則利用減壓濃縮備製，萃液試樣中之甲醇等極性溶劑會在乾燥過程中揮發，所以萃液試樣中不含可能引起細胞毒性之溶劑。因此抑制腫瘤活性之差異，並非來自溶劑之毒性反應，而是來自溶劑之萃取效率差異性導致萃取成份不同而導致的結果。

比較本實驗室與野生樟芝之抑癌活性效果時，活性最佳之自行培育樟

芝發酵液僅需低濃度(50 mg/kg)就有顯著之活性產生,在餵食 4 週後腫瘤大小可控制在 3000 mm^3 (Fig.3), 而低濃度之樟芝水萃液與樟芝甲醇萃液在餵食 4 週後腫瘤大小分別約可控制在 5000 mm^3 (Fig. 4) 與 4000 mm^3 (Fig. 5)。至於餵食野生樟芝之小鼠實驗結果顯示野生樟芝水萃液與野生樟芝甲醇萃液都具有抑制腫瘤生長之情形,其中以高濃度之樟芝甲醇萃液(200 mg/kg)抑制效果最佳,餵食 4 週後腫瘤大小約可控制在 2000 mm^3 (Fig. 6a), 其餘劑量之萃取物(包括 50 mg/kg 與 200 mg/kg 之水萃物與低劑量 50 mg/kg 甲醇萃液) 餵食 4 週後腫瘤大小約可控制在 $6000\sim 7000 \text{ mm}^3$ (Fig. 6a)。

Fig.6 (a)為餵食小鼠樟芝萃取物 4 週期間,連續測量腫瘤大小之數據。根據本實驗結果,高濃度之甲醇萃取物(M200)抑制腫瘤生長效果較佳,低劑量之甲醇萃取物與水萃物的確抑癌效果較不顯著(W50、W200 與 M200)。完成連續腫瘤大小測量之後,準備從小鼠身上取下腫瘤組織秤重時,我們發現小鼠的腫瘤組織會產生潰爛與液化情況,且小鼠間彼此會互相咬食腫瘤組織,所以最後得到的腫瘤重量比連續測量期間較小,而導致圖(a)中 Wild W200 組 tumor volume 和 control 曲線圖結果差異不大,但圖(b)tumor weight 和 control 卻有明顯差異的情形 ($*p<0.05$)。以後執行類似實驗時將會縮短秤重時間,避免上述情況發生。

已知以樟芝菌絲體發酵液連續餵食血吸蟲感染 C57BL/6 和 BALB/c 小鼠四週後體內之 TNF- α 、INF- γ 和 IL-2 濃度皆明顯增加(陳勁初等, 2001)。此實驗證實樟芝可提昇 Th1 細胞性免疫作用,預防寄生蟲感染。本計劃以樟芝萃取物連續餵食帶有腫瘤小鼠四週期間,連續測量血清中 IL-6 濃度的變化。實驗結果顯示餵食野生樟芝水萃液(50 mg/kg)4 週的小鼠,其血清 IL-6 的濃度比起餵食 1 週及 2 週的小鼠顯著增加($^c p<0.05$, $^d p<0.05$; Fig.8)。綜合上述野生樟芝水萃液具有抑制腫瘤生長活性之結果(Fig. 6a),推測野生樟芝水萃液可能透過提升 IL-6 濃度誘發發炎反應來抑制癌細胞的生長。

以上實驗結果驗證了本實驗自行人工栽培樟芝的抑制腫瘤效果可媲美野生樟芝,甚而人工栽培樟芝的培養過程中所產生的發酵液抑癌效果比野生樟芝更為顯著,且所需劑量也較低。綜合以上結果得知自行人工培養樟芝不但具有抗癌功效,且人工培養過程中所產生的發酵液,無論是在動物實驗及癌細胞實驗中均具有抗癌功效,加上可大量栽培生產,所以人工栽培樟芝具有更高的經濟效益。未來將根據上述研究成果,進行大量人工培養及篩檢研發符合市場需求的樟芝保健產品,符合社會大眾與市場需求以及推動推廣中草藥產業之目標,更可有效遏止盜伐,挽救臺灣特有珍貴樹種牛樟樹避免瀕臨滅絕。

伍、結論與建議

本實驗延續 95-96 年度中醫藥委員「藥用植物資源開發研究類」委託計畫”樟芝栽培與其抗癌活性之研究(CCMP95-TP-044)”中的體外實驗結果，以動物模式進一步驗證並比較人工培養與野生樟芝之抗癌功效。

實驗結果證實本實驗自行人工栽培樟芝的抑制腫瘤效果媲美野生樟芝，甚而人工栽培樟芝的培養過程中所產生的發酵液抑癌效果比野生樟芝更為顯著，且所需劑量也較低。綜合以上結果得知，自行人工培養樟芝不但具有抗癌功效，且人工培養過程中所產生的發酵液，無論是在動物實驗及癌細胞實驗中均具有抗癌功效，加上可大量栽培生產，所以人工栽培樟芝具有更高的經濟效益。未來將根據上述研究成果，進行大量人工培養及篩檢研發符合市場需求的樟芝保健產品，符合社會大眾與市場需求以及推動推廣中草藥產業之目標，更可有效遏止盜伐，挽救臺灣特有珍貴樹種牛樟樹避免瀕臨滅絕。

惟本計劃執行過程中較感到非常困擾之處為野生樟芝實驗樣本之取得。野生樟芝為本實驗設計中與自行培育樟芝活性比較之重要材料，但取得不易、價格昂貴，而且市售樟芝品質良莠不齊，所以在野生樟芝的搜尋與購買上不但花費不貲，且擔心市售樟芝品質而影響整體實驗數據之判讀。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會計畫編號CCMP97-RD-003 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

1. 毛正倫、黃佩甯、黃仕政、陳勁初 (2003) 深層培養中樟芝抗氧化物產生之時程。Fungal Science 18(3,4)
2. 王伯徹、陳啓楨 (1994) 常用食藥用菇類介紹。食品工業研究所
3. 王聲遠、蕭明熙 (2001) 開發真菌次級代謝物為醫藥品。Fungal Science 16:1-6
4. 呂鋒洲 (2002) 牛樟芝各種抗腫瘤有效成分的分離、純化，誘發腫瘤凋亡及其作用機轉的研究。行政院國家科學委員會91年度保健食品研究開發計畫報告。pp.13-16
5. 吳德鵬 (1995) 樟芝微量成分之研究。臺灣師範大學化學研究所碩士論文
6. 李奇翰 (2001) 靈芝抗癌之效果。國立臺灣大學醫事技術學研究所碩士論文
7. 肖崇厚、陳蘊如 (1989) 中藥化學。上海科學技術出版社
8. 行政院衛生署中醫藥委員會出版品 (2000) 臺灣原住民藥用植物彙編
9. 行政院衛生署中醫藥委員會出版品 (2001) 臺灣原住民藥用植物彙編 (二版)
10. 行政院衛生署中醫藥委員會出版品 (2002) 臺灣原住民藥用植物彙編 (三版)
11. 行政院衛生署中醫藥委員會出版品 (2003) 臺灣原住民藥用植物彙編 (英文版)
12. 行政院衛生署中醫藥委員會出版品 (2004) 臺灣常用藥用植物圖鑑 (二)、(三)
13. 行政院衛生署中醫藥委員會出版品 (2001) 行政院衛生署中醫藥委員會成立六週年特刊—臺灣中醫藥未來的發展與策略
14. 陳建志、陳勁初、陳清農、許勝傑、曾虹萍、盛莉莎 (2001) 樟芝菌絲體對B型肝炎病毒表面抗原及e抗原之活性檢測。中華民國食品科學技術學會第三十一次會員大會論文摘要
15. 陳勁初、林文鑫、陳清農、許勝傑、黃仕政、陳炎鍊 (2001) 臺灣特有真菌-樟芝菌絲體之開發。菌類科學 16: 7-22
16. 陳啟楨 (2002) 樟芝人工栽培與液體發酵萃取物之抗生活性探討。中華民國食品科技學會第三十二次年會年會壁報論文摘要
17. 劉俊仁 (2003) 中草藥抗癌機制研究(壹):黃芩素及黃芩苷對血管新生作

- 用之影響及其機制探討；(貳):樟芝活性多醣體之生物活性分析及其經由免疫調節抑制腫瘤生長之研究。國立臺灣大學生物化學暨分子生物學研究所。博士論文
18. 賴宏亮、呂美津、陳武元、莊秀琪 (2002) 樟芝免疫調節活性之研究。臺灣保健食品學會第二屆第二次年會
 19. 嚴貴榮 (2002) 樟芝對STZ誘發高血糖鼠血糖調節與抗氧化之影響。輔仁大學食品營養學系碩士論文
 20. Cherng, I.H. and H.C. Chiang (1995) Three new triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*. *Journal of Natural Products* 58(3):365-371.
 21. Cherng, I.H., D.P. Wu, and H.C. Chiang (1996) Triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*. *Phytochemistry*, Vol 41(1):263-267.
 22. Chiang, H.C., D.P. Wu, I.H. Cherng, and C.H. Ueng (1995) A sesquiterpene lactone, phenyl and biphenyl compounds from *Antrodia cinnamomea*. *Phytochemistry*, Vol 39(3):613-616.
 23. Hseu, Y.C., W.C. Chang, Y.T. Hseu, C.Y. Lee, Y.J. Yech, P.C. Chen, J.Y. Chen, and H.L. Yang, (2002) Protection of oxidative damage by aqueous extract from *Antrodia camphorate* mycelia in normal human erythrocytes, *Life Sci.* 71:469-482
 24. Lee, I.H. R.L. Huang, C.T. Chen, H.C. Chen, W.C. Hsu and M.K. Lu (2002) *Antrodia camphorata* polysaccharides exhibit anti-hepatitis B virus effects. *FEMS Microbiology Letters* 209:63-67.
 25. Kitamura, S., T. Hori, K. Kurita, K. Takeo, C. Hara, W. Itoh, K. Tabata, A. Elasaeter and B. T. Stokke (1994) An antitumor branched β -(1-3)-D-glucan from a water extract of fruiting bodies of *Cryptoporus volvatus*. *Carbohydrate Research* 263:111-121.
 26. Yang, S.W., Y.C. Shen, and C.H. Chen (1996) Steroids and triterpenoids of *Antrodia cinnamomea*—a fungus parasitic on *Cinnamomum micranthum*. *Phytochemistry* 41(5): 1389-1392.
 27. Zhong, J.J., Y.J. Tang, and Q. H. Fang (2001) Significance of inoculation density control in production of polysaccharides and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry* 37:1375-1379.

柒、圖、表

(a)



(b)



Fig. 1. 野生與人工栽培樟芝。

(a)為實驗室人工栽培樟芝。

(b)為生長於樟木之野生樟芝。

(a)



(b)



Fig. 2. ICR 小鼠皮下注射 Sarcoma-180 腫瘤細胞，對照組之腫瘤生長情形。

(a)Sarcoma-180 於 ICR 小鼠皮下腫瘤生長情形。

(b)腫瘤實際大小。n=8。

(a)



Control

50 mg/ml

200 mg/ml

(b)

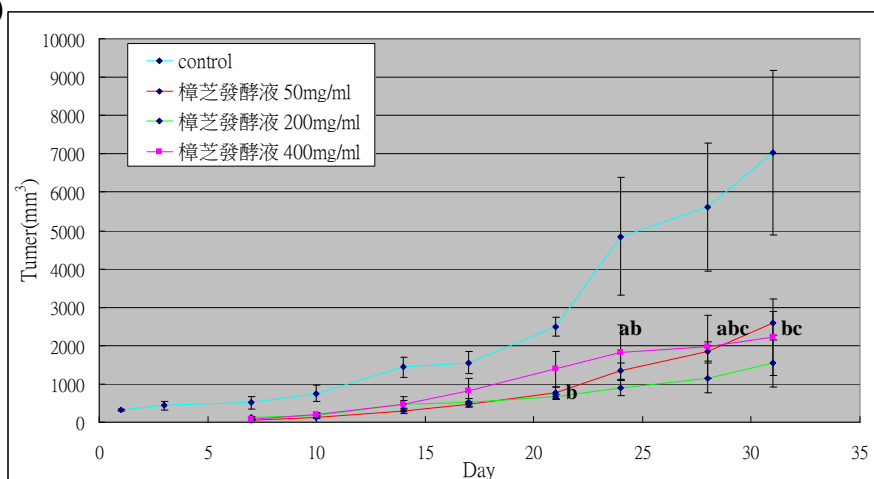


Fig. 3. ICR 小鼠皮下注射 Sarcoma-180 腫瘤細胞，持續餵食不同濃度的實驗室人工栽培樟芝發酵液(50、200 及 400 mg/kg)，測量腫瘤的大小。

(a)Sarcoma-180 於 ICR 小鼠皮下腫瘤生長情形。

(b)腫瘤實際大小。(n=3，實驗進行 2 重複)。^a $p<0.05$ ，樟芝發酵液 50 mg/kg vs control；^b $p<0.05$ ，樟芝發酵液 200 mg/kg vs control；^c $p<0.05$ ，樟芝發酵液 400 mg/kg vs control。(p<0.05, by one way ANOVA)

(a)



Control

50 mg/ml

200 mg/ml

(b)

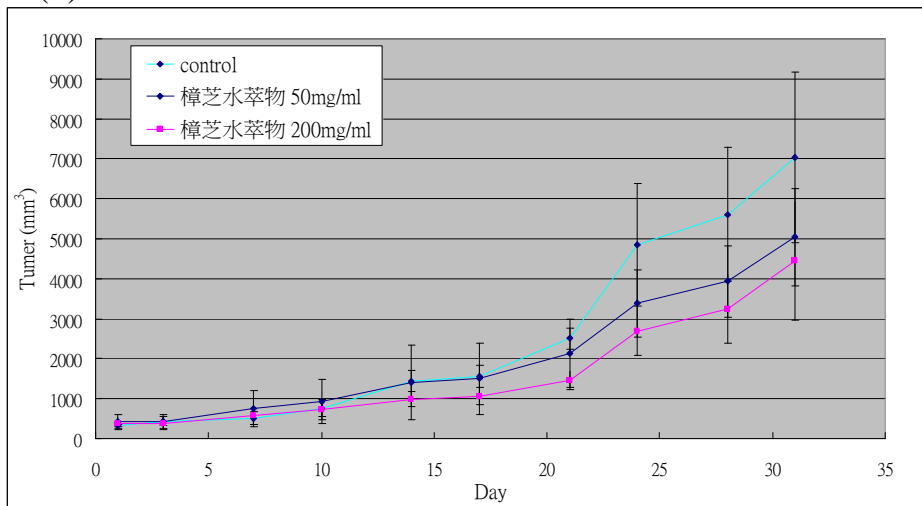


Fig. 4. ICR 小鼠皮下注射 Sarcoma-180 腫瘤細胞，持續餵食不同濃度的實驗室人工栽培樟芝水萃物(50 及 200 mg/kg)，測量腫瘤的大小。

(a) Sarcoma-180 於 ICR 小鼠皮下腫瘤生長情形。

(b) 腫瘤實際大小。(n=3，實驗進行 2 重複)。

(a)



Control

50 mg/ml

200 mg/ml

(b)

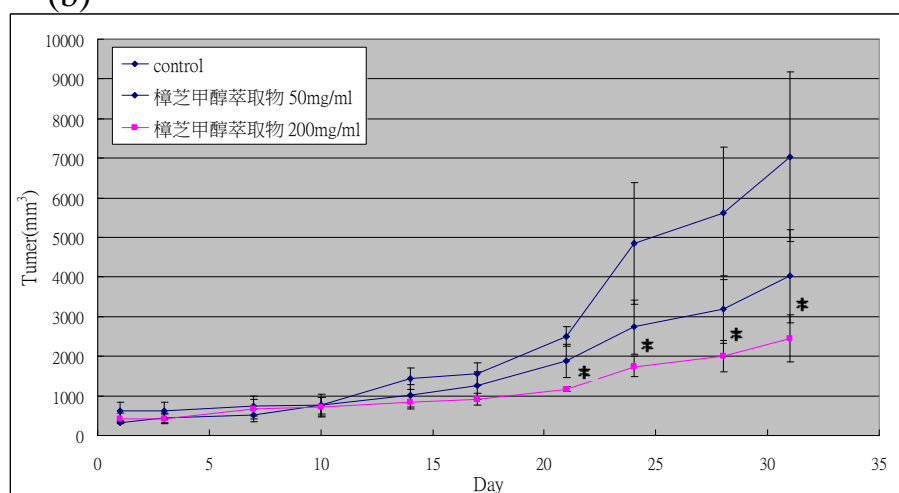
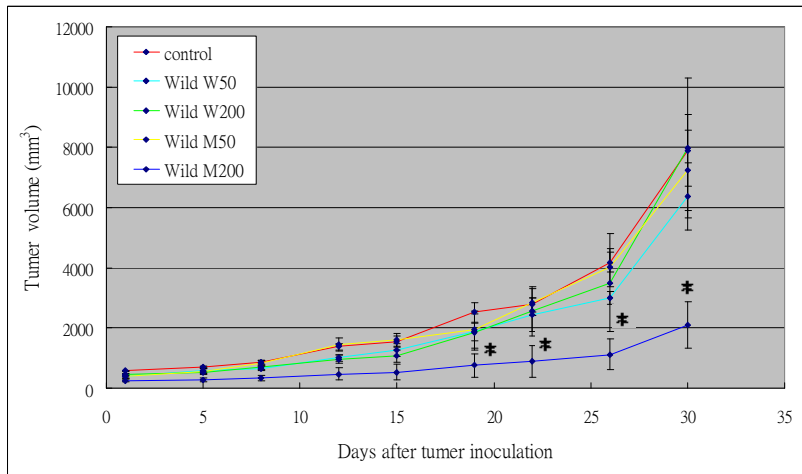


Fig. 5. ICR 小鼠皮下注射 Sarcoma-180 腫瘤細胞，持續餵食不同濃度的實驗室人工栽培樟芝甲醇萃取物(50 及 200 mg/kg)，測量腫瘤的大小。
(a) Sarcoma-180 於 ICR 小鼠皮下腫瘤生長情形。
(b) 腫瘤實際大小。(n=3，實驗進行 2 重複)。* $p < 0.05$ ，樟芝甲醇萃取物 200 mg/kg vs control。($p < 0.05$, by one way ANOVA)

(a)



(b)

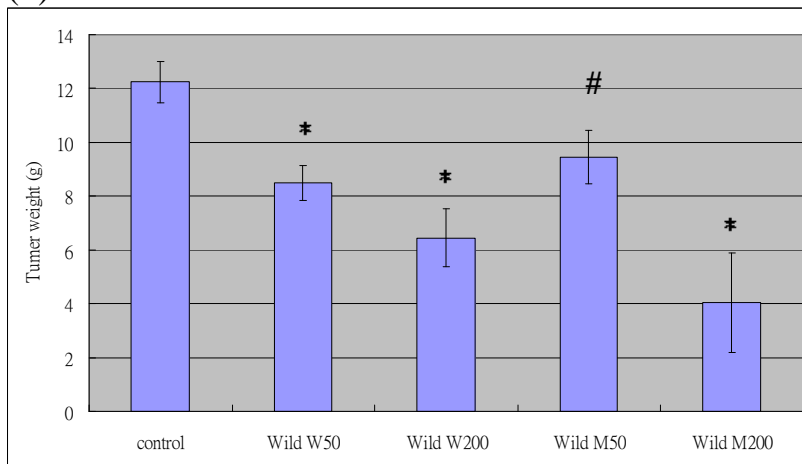


Fig. 6. ICR 小鼠皮下注射 Sarcoma-180 腫瘤細胞，持續餵食不同濃度的野生樟芝水萃物及甲醇萃物(50、200 mg/kg)。

(a)測量腫瘤的大小。* $p < 0.05$ ，野生樟芝甲醇萃物 200 mg/kg vs control。

(b)測量腫瘤的重量。* $p < 0.05$ vs control；# $p < 0.05$ vs 野生樟芝甲醇萃物 200 mg/kg。(n=3，實驗進行 2 重複)。($p < 0.05$, by one way ANOVA)

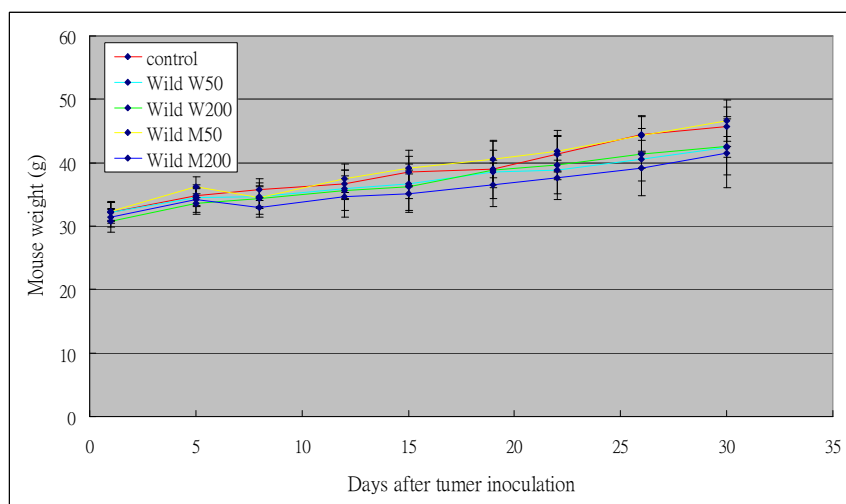


Fig. 7. ICR 小鼠皮下注射 Sarcoma-180 腫瘤細胞後，持續餵食不同濃度的野生樟芝萃取物及甲醇萃取物(50、200 mg/kg)，測量體重變化。(n=3，實驗進行 2 重複)

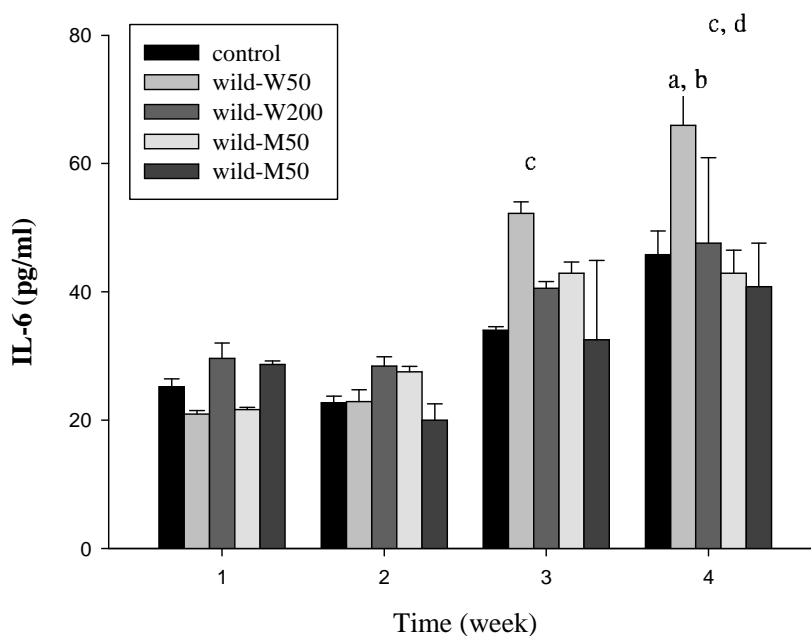


Fig. 8. ICR 小鼠皮下注射 Sarcoma-180 腫瘤細胞後餵食野生樟芝水萃液與野生樟芝甲醇萃取液(50, 200 mg/kg)，連續餵食 4 週，並以 ELISA KIT 持續測量血清中 IL-6 的含量。對照組為餵食不含野生樟芝萃取物之食鹽水，(control n=8，其餘各組 n=5)。^a $p < 0.05$ vs control(餵食第 1 週)，^b $p < 0.05$ vs control(餵食第 2 週)，^c $p < 0.05$ vs 野生樟芝水萃液 50 mg/kg (餵食第 1 週)，^d $p < 0.05$ vs 野生樟芝水萃液 50 mg/kg (餵食第 2 週)。(p<0.05, by one way ANOVA)

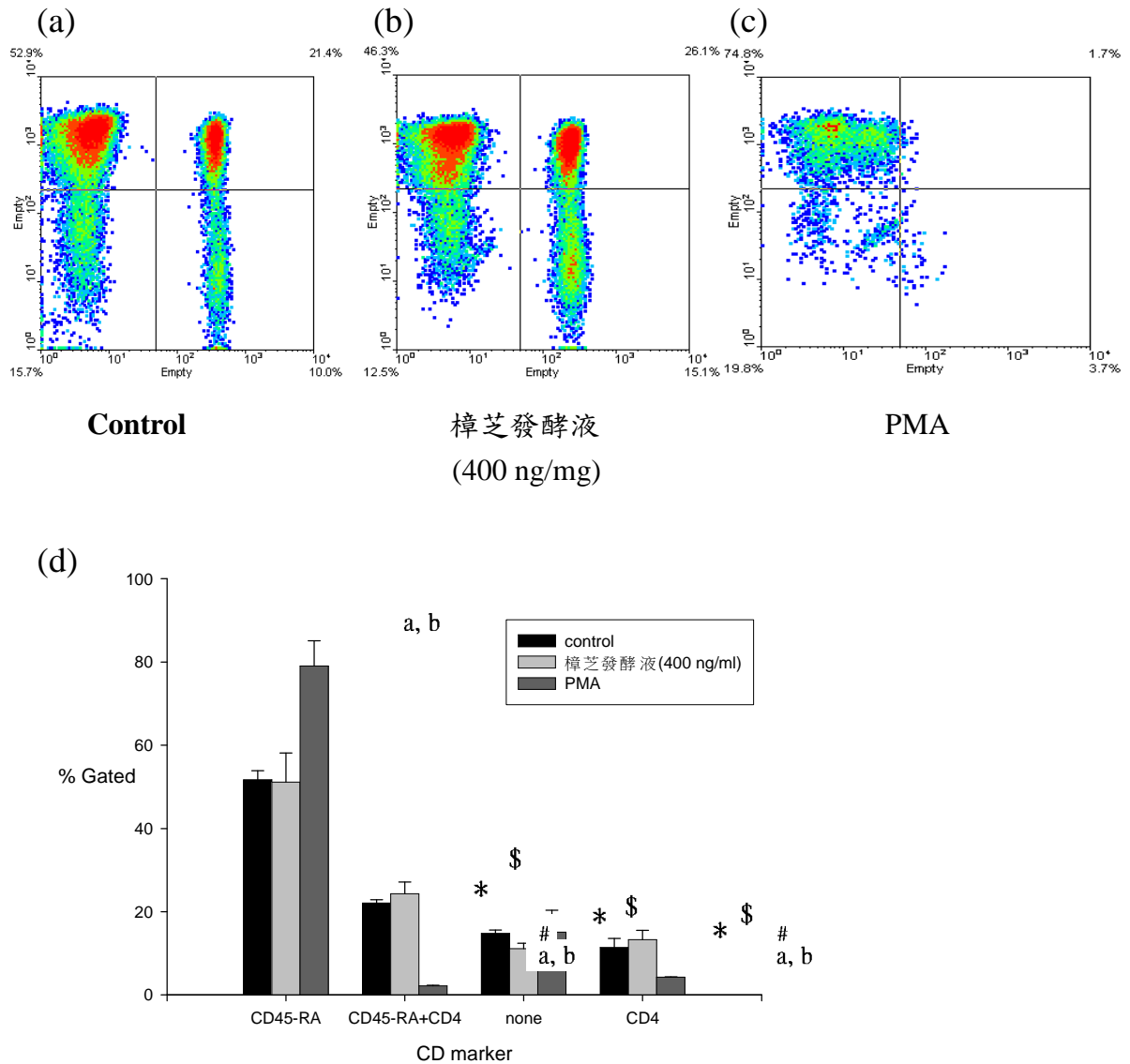


Fig. 9. 取正常人之全血之 HPBMCs，細胞分為 3 組：Positive control 加入 99 % PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) 10 μ l；control 為不添加任何物質；實驗組加入 樟芝發酵液(400 μ g/ml)，添加 20 μ l FITC (anti-human CD4)及 PE (anti-human CD45RA)後以 Flow cytometry 分析。

(a)為 control ；

(b)為加入 樟芝發酵液(400 μ g/ml)之實驗組 ；

(c)為加入 PMA 之組別。【圖表分為 4 區，左上為 CD45-RA positive，右上為 CD45-RA CD-4 positive，左下為 CD45-RA CD-4 negative，右下為 CD-4 positive】。

(d)為量化圖；^a $p < 0.05$ vs control，^b $p < 0.05$ vs 樟芝發酵液(400 μ g/ml)，^{*} $p < 0.05$ vs control 之 CD45RA，^{\$} $p < 0.05$ vs 樟芝發酵液(400 μ g/ml)之 CD45RA，[#] $p < 0.05$ vs PMA 之 CD45RA。(p < 0.05, by one way ANOVA)

