

編號：CCMP96 -RD-015

桑黃輔助癌症化學治療與評估改善多重藥物抗藥性表現之藥理機制探討

褚俊傑
南台科技大學

摘要

桑黃的學名為 *Phellinus linteus*，是寄生於桑樹上的一種多年生菌類，生長緩慢，難以用人工方法栽培，在韓國與日本已被採用作為醫治癌症的藥物。近年研究發現，桑黃具有抗腫瘤及免疫調節等功效。在最近這幾年中，人們開始注意到桑黃 (*Phellinus Linteus*) 這種藥用菌對醫治癌症的特效性。許多日本及韓國的醫學研究者已確認桑黃具有絕佳的抗腫瘤活性，最近幾年日本也將桑黃當成健康食品正式進口販售，韓國政府更正式許可桑黃成為第一種以菌類作為抗癌劑的醫藥品。由於桑黃具有提升免疫效價與抗腫瘤功效，且不具有副作用等優點，然而野生桑黃生長緩慢且數量有限，故本研究乃利用菌絲體發酵技術，研究桑黃發酵菌絲體單獨與合併抗癌藥物 cisplatin, etoposide 及 doxorubicin 之作用評估。首先，我們評估桑黃多醣萃取液對肺癌細胞與黑色素瘤細胞等細胞毒殺能力，接著透過活體組織培養方式來進一步探討，在巨噬細胞存在下桑黃多醣萃取液透過免疫調節的抗癌能力，最後直接以腫瘤動物模式：靜脈注射誘導轉移性肺癌模式，來測試桑黃多醣萃取液是否能輔助抗癌藥物在腫瘤動物模式下的抗癌能力。

研究結果顯示，多種桑黃樣品經由酚硫酸呈色法的比較下與抗氧化評估試驗中發現，利用酒精沉澱取得的多醣具有較好的抗氧化活性，我們挑選了當中粗多醣(crude polysaccharides) 含量較高的桑黃組來進行計畫中的各項腫瘤抑制與輔助化療等試驗中，也發現桑黃多醣在加入抗癌藥物 (cisplatin, etoposide) 後在細胞實驗上有顯著的輔助效

果，而細胞轉移試驗中加入桑黃多醣輔助治療的組別與抗癌藥物複方相比有減緩細胞遷徙的情形，給予桑黃多醣與巨噬細胞共同培養下對於肺癌細胞皮下荷瘤組織体外培養模式（Histoculture）有顯著抑制腫瘤生長的表現，利用 ELISA 的方式評估加入桑黃多醣萃取液後培養基中細胞激素的表現量發現促進腫瘤轉移的細胞激素 M-CSF 在給予抗癌藥物複方後有增多的情形（ $p < 0.05$ ），但是加入桑黃多醣輔助抗癌藥物治療後發現 M-CSF 的表現量有被降低的情形，但是在其他細胞激素（IL-1, TNF- α ）的表現量跟未給藥組相比並沒有很大的差異出現，腫瘤轉移的動物模式中發現，桑黃多醣能提高腫瘤動物之存活率，特別是腫瘤轉移的情形也有明顯之降低。由以上結果顯示，我們可以推斷桑黃多醣對於癌症輔助治療有良好的成效，更可以減緩腫瘤轉移的產生，但是其相關分子作用機制仍需更進一步的實驗來證明。

關鍵詞：桑黃，抗藥性，抗氧化，黑色素細胞癌，肺癌，腫瘤動物模式

編號：CCMP 96-RD-015

The molecular mechanism of *Phellinus linteus* play an adjuvant role on a variety of anti-cancer drugs and improve multidrug resistance expression in animal models

Jiunn-Jye Chuu

Southern Taiwan University

ABSTRACT

The *Phellinus linteus*, is a perennial mushroom ,slow growth, parasitic in Mulberry. It is difficult to artificial cultivation. In South Korea and Japan, has been used as a cure cancer drugs. Recent studies have shown that, *Phellinus linteus* has anti-tumor and immune regulation, and effectiveness. In recently, people have begun to realize that *Phellinus Linteus* such medicinal mushroom on the effects of cancer treatment. Many Japanese and Korean medical researchers have confirmed *Phellinus Linteus* has excellent anti-tumor activity, The late, Japan will also sell *Phellinus Linteus* as a health food imports sold officially. The South Korean government more formal permission *Phellinus Linteus* became the first to mushroom as an anti-Cancer of the medicine. The *Phellinus Linteus* enhance immune funtion of anti-tumor effect and without side effects with the advantages, but Wild Mulberry grow slowly and sparsely. So this study is use of mycelium fermentation technology, to research *Phellinus Linteus* polysaccharides alone or with the anticancer drug cisplatin, etoposide and doxorubicin assessment of the role. First, we assess the cytotoxicity of *Phellinus Linteus* polysaccharide extracted on lung cancer cells and melanoma cells, and then through the histoculture to further explore the study. In the presence of macrophages *Phellinus Linteus* polysaccharide extract of immune regulation through the

anticancer ability, and finally directly to tumor animal models: metastatic lung cancer induced by intravenous injection model to test extracts of *Phellinus Linteus* polysaccharide can support anti-cancer drug in tumor animal models of cancer capacity.

The results showed that multiple samples of through the phenol - sulfuric acid method by comparison with the assessment test antioxidant found that the use of alcohol precipitation polysaccharide has good antioxidant activity. We selected these rough polysaccharide (crude polysaccharides) higher levels of the *Phellinus Linteus* polysaccharides group to carry out the plan of the tumor suppressor and adjuvant chemotherapy. Other tests, also found in the *Phellinus Linteus* polysaccharide combined therapy with anti-cancer drugs (cisplatin, etoposide) in the cell experiments have the significant effects. In the cell migration experiments, we putted *Phellinus Linteus* polysaccharide adjuvant treatment group compared with the anti-cancer drug compound, cell migration has slowed. We used the *Phellinus Linteus* polysaccharides and macrophage cells cocultured with lung cancer cells tumor (Histoculture) significantly inhibited tumor growth performance. And assessed *Phellinus Linteus* polysaccharide in the medium after the performance of cytokines using the ELISA. The cytokines (IL-1, TNF- α and M-CSF) have not with the performance of treatment group compared with anticancer drugs no significant difference. In tumor metastasis, we found in the animal model to feed the *Phellinus Linteus* polysaccharide animals can improve the survival rate, especially in particular tumor metastasis there is significant lower. According to the above results show that, we can infer *Phellinus Linteus* polysaccharide for adjuvant treatment of cancer with good results, can also slow down the formation of tumor metastasis, but its relevant molecular mechanisms need further experiments to prove.

Keywords : *Phellinus linteus*, multidrug resistance , antioxidant , Malignant melanoma , lung cancer , tumor animal model

壹、前言

衛生署日前公佈了去年國人的十大死因統計，惡性腫瘤（癌症）又第二十度蟬聯冠軍，而且是每四名死亡人口中，就有一人「因癌而死」⁽¹⁾。十大癌症死因中，又以肺癌居首，其次是肝癌、結腸直腸癌、女性乳癌、胃癌、子宮頸癌、口腔癌、攝護腺癌、淋巴癌及食道癌⁽²⁾。

肝癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)是在世界是常見的癌症之一，每年約有 25 萬人被診斷出來罹患肝癌而約有數十萬人因此死亡⁽³⁾。根據流行病學統計結果指出，肝癌的發生率之分佈差異很大，在歐、美等已開發的國家，發生率約每十萬人只有 1~3 人罹患。而發生肝癌的高危險區如：東南亞、中國大陸沿海區域及撒哈拉沙漠以南之非洲國家，肝癌每年的發生人數可達二十五萬至一百二十萬⁽⁴⁾。若以世界各地癌症發生率來看的話，肝癌發生率為所有癌症之第八位，分別為男性第六位及女性第十一位，年死亡人數至少達一百萬人⁽⁵⁾。

而肝癌在台灣亦屬於在高罹患率區域，肝癌的可能危險因子包括 B 型肝炎及 C 型肝炎病毒造成之慢性感染及肝硬化、代謝性及酒精性慢性肝病、肝毒性物質之暴露、肝硬化、家族有肝癌病人、有肝病的病史、紅血球 Rh 系統 c 抗原陽性等⁽⁶⁾⁽³²⁾⁽³³⁾。此外，免疫機轉的缺損、營養不良、感染、長期酗酒、服用過量藥物如類固醇、荷爾蒙及先天性新陳代謝之缺陷等，亦和肝癌有關。目前治療肝癌的方法包括外科處理（如：手術切除或肝臟移植）或非經手術之物理療法（如：局部酒精注射、局部醋酸注射、經導管栓塞療法、化學治療、放射線治療、免疫療法及支持性治療）等⁽⁷⁾⁽³⁴⁾。儘管各種療法可以單獨使用或合併使用，但就整體而言，多數肝癌病患主因肝細胞壞死的地方太多且普遍肝功能不佳，故治癒機會有限。因此，研發更有效之抗肝癌藥物，仍屬當務之急。

根據行政院衛生署最新統計數據指出，肺癌在男性癌症死亡原因中僅次於肝癌居於第二、女性肺癌則高居首位⁽⁸⁾。根據流行病學統計結果指出，除了台灣之外，肺癌在世界上（包括歐美）也是發生率最高、死亡率最高的疾病⁽¹²⁾。引起肺癌的可能危險因子包括抽菸⁽¹³⁾、二手菸暴露⁽¹⁴⁾、空氣汙染、烹調時油煙汙染⁽¹⁵⁾，因職業暴露⁽¹⁶⁾、營養因素⁽¹⁷⁾、

放射線物質⁽¹⁸⁾、遺傳因子⁽¹⁹⁾有關或曾患有肺部疾病者，如肺結核、肺炎、慢性支氣管炎、肺氣腫、矽肺、肺部外傷等⁽²⁰⁾⁽²¹⁾，或缺乏維生素 A、免疫機能不足⁽²²⁾、內分泌失調、黃麴毒素⁽²³⁾、病毒感染⁽²²⁾等因素，均可能誘發肺癌。目前常用的肺癌治療方法可分外科治療⁽²⁴⁾如手術切除、移植手術等，或非手術之物理療法如化學治療⁽²⁵⁾⁽²⁶⁾、放射線治療⁽²⁷⁾、免疫治療及混合治療等。肺癌和其他種類的癌症皆是由不正常的細胞，不斷地分裂增殖並破壞周圍正常組織而形成。肺癌缺乏特有的臨床症狀，甚至沒有早期症狀，當它成長至足以由 X ray 檢測出來時，患者可能只剩短短的一兩年性命。儘管近年來醫學進展十分快速，但是肺癌的治療卻非常令人失望。以外科手術切除腫瘤是根治肺癌的優先選擇，然而若腫瘤太大且已具轉移性的肺癌，通常則不考慮開刀治療；能夠接受開刀治療的病人約只有 20%，其中一半可經手術完全切除腫瘤，而整體肺癌治療的 5 年存活率也只有 10-15%⁽²⁸⁾。目前肺癌治療的主要研究方向為提高治療的成功率，及改善肺癌的預後，而發展出更具效率與專一性的輔助療法，如：化學療法、免疫療法…等，以及抑制癌細胞轉移的發生，來作為研究重點。化學療法和免疫療法須克服的問題，除了癌細胞產生之抗藥性外，尚有治療藥物專一性不足，導致於正常細胞有副作用產生的問題。

臨床上肺癌分為兩大類，即小細胞癌 (Small Cell Lung Cancers, SCLCs)與非小細胞癌 (Non-Small Cell Lung Cancers, NSCLCs)，多數患者屬於非小細胞癌，肺非小細胞癌又可分為肺腺癌 (adenocarcinoma lung cancer)、肺鱗狀細胞癌 (squamous cell lung cancer)和肺大細胞癌 (large cell lung cancer)，其中肺腺癌為肺癌患者中最常見，無吸煙者所罹患肺癌常為此類，而肺鱗狀細胞癌則常見於吸煙患者當中⁽²⁹⁾。小細胞型肺癌以化學藥物療法為主，非小細胞型肺癌以早期發現，早期切除為主要治療方式，若無法手術之病患，尚可以其他治療方法作為輔助療法⁽³⁰⁾。化學療法除了對病患的身體造成極大的負擔之外，抗癌藥物的交叉使用，容易造成抗藥性的發生。而且各種抗癌藥物會產生副作用，如噁心、嘔吐、食慾減退、脫髮、白細胞減少等。如果腸胃道的反應嚴重，或出現骨髓被壓抑的現象，應用適當的緩解藥物和調整藥物的劑量。由於肺癌預後情況差，通常診斷發現時已屆末期，即使

是現代最先進的西方醫學在面對癌症患者時也沒有輕言治癒的把握。因此，找到適當且有效的治療方法為當務之急，在傳統醫學的瓶頸限制下，配套的替代醫療與統合醫療呼之欲出，而在這個領域中，菇類的抗癌作用尤其被寄予厚望⁽⁹⁾。目前菇類的人工耕種技術已趨成熟；若能從菇類中找到有效的抗癌成分並純化萃取的話將是癌症患者症狀緩解甚或治癒的新希望。

桑黃(日本名為 Mesimakobu)又稱桑耳、夢幻菇草、女島瘤等，二次大戰後日本國家醫學界針對遭受原子彈輻射影響而產生慢性癌症病變的病患進行追蹤，意外的發現某一特定區域的癌症患者陸續傳出初期癌症康復或是健康狀況改善的情形⁽¹⁰⁾，經過日本的醫學專家不斷的深入核比對後，發現是當地居民服用生長在桑樹上的桑黃所造成；而經實驗證實桑黃在臨床上的確對腫瘤有抑制的效果⁽¹¹⁾，且協同抗癌藥物併用時也可以減輕抗癌藥物的副作用。桑黃的天然子實體內含有強化人體免疫系統的成分，並能夠在人體及動物體內活化生理功能，其中包含 150kd 的高分子多醣體 β -(1-3)D 葡聚糖、蛋白質結構的酸性雜聚糖 α -(1-4)三帖類、線苷、脂肪酸(C22 及 C24)、蛋白質、礦物質及胺基酸，醣和蛋白質為主成分，其中醣類佔了八成。桑黃在藥理學上的活性包括抑制腫瘤、動脈粥狀硬化、免疫刺激、降低血脂等，其中的氧化酵素(Xanthine oxidase)具有抗血栓及抗氧化的功能，現代社會中眾人最困擾的疾病如，癌症、過敏疾病、心臟病、腦中風或糖尿病等，幾乎都和自由基等物質有關。然而，現代醫療對此卻束手無策。提到抗氧化物質，一般人容易聯想到維他命 C、E、 β 胡蘿蔔素。只要積極攝取，消除壓力，同時避免化學物質，就可以防止日常生活中的自由基危害。不過，似乎很大多數人都沒有注意到這一點。而桑黃其有效成分的抗氧化性，在韓國作為中草藥已有多年歷史⁽³¹⁾，從桑黃分離出的多醣體能顯著的刺激細胞生理的免疫反應，桑黃的經過甲醇萃取後再經正丁醇萃取液在動物腫瘤模式中能抑制血管增生(angiogenic)的活性、止痛、以及調節人類體液免疫反應(29)。正丁醇萃取物可透過第一型基質氧化酶抑制 Lipopolysaccharide (LPS) 刺激巨噬細胞的發炎反應；活化腹腔巨噬細胞，促進腹腔巨噬細胞分泌一氧化氮(NO)，透過 NO 分子來毒殺對 NO 敏感的 B16

黑色素癌細胞，經實驗得知桑黃萃取物能夠經由 TLR-2 及 TLR-4 的路徑，使突觸細胞 (Dendritic cell) 趨於成熟，誘導 Th1 細胞分化，產生大量的 IL-12 與 IFN-gamma，來達到抑制癌細胞生長之效果。由於桑黃的免疫與抗腫瘤功效，且不具有副作用的優點，可以應用輔助抗癌藥物合併治療癌症。

目前，人工培育菇類菌絲體的技術已經成熟，人工培育可以分為固態發酵以及液體發酵，以營養的角度觀察，菌絲體的營養價值遠大於子實體；菇類沒有葉綠素；不會行光合作用，所有的營養物直接靠菌絲在土壤或世紀生的枯木吸取養分，近年日韓對桑黃菌絲體的研究皆有不錯的效果，甚至有的研究指出桑黃的抗癌能力高達 96.7%，這個優異的數據可能跟桑黃富含的多醣體能提高免疫能力有關，而桑黃的固態培養出的菌絲體比液體培養菌絲體抗癌的效果好，具備很多抗氧化及抗氧化的特殊微量元素，具有其他菇菌類比不上的效果。液態培養的主要材料是來自于添加糖類、澱粉或是一些微量元素於無菌水中，經由攪拌的方式培養出大量的菌絲體，相較於使用腐生木質、土壤或與其他菌類共生的固態發酵，液態發酵更具有抗癌的能力，故在本次實驗中應用科學化的實驗證明，分階段探討桑黃改善抗癌藥物 Cisplatin, Etoposide 等所引起的副作用之可行性，盼望能找到明確的科學證據證明桑黃的確可改善抗癌藥物副作用的產生。

貳、材料與方法

本計劃想藉由癌症動物模式的建立來評估桑黃對於癌症病人在接受輔助抗癌時的情形，首先，用肺癌細胞株將桑黃多醣萃取液加入抗癌藥 Cisplatin 與 Etoposide 中觀察桑黃多醣萃取液對於抗癌藥輔助治療的效果，接著以細胞轉移試驗測試桑黃多醣萃取液對於腫瘤轉移的影響，再來以桑黃多醣萃取液加入巨噬細胞共同培養後利用酵素結合免疫分析法的方式來測量培養液 cytokines 的濃度如 TNF- α 等，並擬以黑色素細胞癌及肺癌等動物模式，將不同的桑黃多醣萃取液 100, 500mg /kg 在經由尾靜脈注射腫瘤細胞 24 小時後以 o.p 的方式給予，觀察對於誘發腫瘤動物模式給予桑黃多醣體的影響。給藥後 10 天犧牲取肺臟和腫瘤組織利用西方墨點法來檢測之指標性產物的量如 AKT、TNF-a、NF-Kb 等相關蛋白質的表現量。最後，進行相關抗腫

瘤試驗之評估試驗，如實驗動物之存活率、腫瘤大小與體重比率之紀錄與分析，來評估桑黃是否具有輔助其他相關抗癌藥物較佳的療效並探討桑黃之抗癌藥理活性與分子機制。

由國科會國家動物中心購進5~6週齡之雄性毛鼠(BALB/C)與雄性裸鼠(ICR-nu/nu, male nudemice)。飼養於動物房中，飼養環境控制在12小時光/暗循環條件下，任其隨意進食及進水。動物實驗於約8週齡時進行。

壹、樣品分析

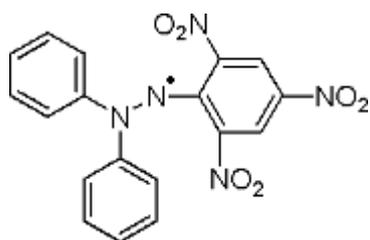
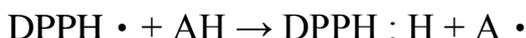
一、清除(DPPH)自由基的能力

原理：

油脂在自氧化的過程中會產生自由基而造成油脂酸敗，常見的抗氧化物藉由提供氫來清除脂質過氧化物自由基，進而達到抑制氧化連鎖反應之進行，在抗氧化的研究上通常使用DPPH來評估抗氧化的供氫能力。

機制：

DPPH是一種含有奇數個安定性佳的自由基，且在517nm附近有很強的吸光值。當DPPH被含有抗氧化能力的試藥還原或是與另一個自由基結合時，吸光值就會降低，因此吸光值降越低，表示反應物對DPPH自由基的清除效果越強。



實驗步驟：

1. 在96well盤中加入濃度為2mg/ml的樣品溶液
2. 再加入95%的乙醇溶液
3. 之後迅速加入40 μ l新鮮配製的DPPH甲醇溶液,使最後總體積為200 μ l
4. 之後在室溫下避光振盪30分鐘使之混合均勻
5. 於550 nm測其吸光值

二、膠滲透層析 (Gel Permeation Chromatography, GPC)

原理：

將聚合物稀釋溶液的試樣自管柱的上游注入而被溶劑沖下層析

管柱。當聚合體經過層析管柱時，較小的分子較深入凝膠內部的微孔，較大的分子能滲入的孔較少或根本無法滲入。因此較小的分子滯留在管柱的時間較長，較大的分子先被溶劑帶出層析管柱，如此則可有效的分離聚合物。因折射率計隨時量測層析管柱下游的濃度，其訊號曲線顯示溶劑的體積與流出液中聚合物重量百分率之間的關係。流過的溶劑體積與聚合體的分子量成正比，因此記錄器上繪出的曲線即為分子量分佈曲線。每一支分離管的總容量，由分離管柱長度及內徑大小決定。粒子大小分離技術主要取決於聚合物溶液濃度是否夠低，使得各個粒子能獨立活動。若非如上所述，則粒子與粒子會相互影響，在管柱中之滯留會增加濃度的影響，理論上流過層析管柱的滯留時間與聚合體的分子量成反比，因此積分後所劃出的曲線即為分子量分佈曲線。

方法：

為達到有效分離及分子量測定，一般待測物的樣品須充份溶解於適當的溶劑中，在樣品注射前，須先以0.45 μ m 的過濾器除去雜質以防止層析管堵塞，接下來將其分別注射入層析管柱中求出其滯留時間。

三. 酚硫酸呈色法

將乾燥後的酒精沈澱物加入1mL的蒸餾水溶解混勻後加入1mL 5%的酚溶液，充分混勻後，加入5mL的濃硫酸，靜置10分鐘後，於常溫水浴15分鐘。最後以分光光度計測量490nm的吸光值，對照標準檢量線，帶入標準檢量線回歸方程式，計算樣品多醣含量。

體外實驗部分(In vitro)

一、細胞培養與藥物處理

1. 細胞株來源及培養條件

老鼠(mice)肺癌細胞(LL/2)、黑色素瘤(B16F10)與人類肺癌細胞株(A549)購自新竹食品工業發展研究所。將老鼠(mice)肺癌細胞(LL/2)、黑色素瘤(B16F10)與人類肺癌細胞株(A549)同樣以含有10% 胎牛血清 (FBS)、0.1 mM nonessential amino acid (NEAA)、2 mM-L-glutamine、1.5 g/L sodium bicarbonate 及 antibiotic solution (100 U/ml penicillin 及 100 μ g/ml streptomycin) 之 Dulbecco, s Modified

Eafale's Medium中，並將細胞培養於5% CO₂，37°C及溼度90% 恆溫的二氧化碳培養箱內，每2~3 天更換新鮮的培養基。

2. 抗癌藥物配製

將各種不同抗癌藥物(Cisplatin, Etoposide)粉末依其分子量溶於DMSO (dimethyl sulfoxide, Sigma, St. Louis, MO, USA) 配製成濃度為10mM stock，以石蠟紙 (paraffin) 封口置於4°C冰箱中避光備用，使用時稀釋成所需濃度。

二、細胞毒性測試—MTT assay

當細胞在 75T flask中生長密度達到80-90%時，將trypsinize，計算細胞數後，取細胞培養於 10% FBS MEM之96-well plates中，每孔加入100 μ l 含10 % FBS 之培養液，培養24 小時後，待細胞吸附於底部，移除培養液，再加入200 μ l 含有藥物的培養液，再繼續培養24、48、72 小時。待各培養時間到達時，每孔加入20 μ l MTT溶液 (溶於5mg/ml PBS中)，同時置入5% CO₂，37°C及溼度90% 恆溫的二氧化碳培養箱內與細胞反應4 小時，之後傾倒上清液，於每一培養孔加入100 μ l DMSO 溶解藍紫色結晶，避光作用約10分鐘並均勻搖晃96 -well plates 以確保藍紫色結晶完全溶解，以酵素免疫分析測讀儀讀取波長570 nm 之吸光值，即可計算出實驗組的細胞中粒線體酵素代謝活性的相對值。讀值愈高，代表相對之活細胞數目愈多。

三、細胞轉移試驗

將腫瘤細胞培養在6公分dish中，待細胞長至80~90%時利用200 μ l 的tip在dish中間刮出一道痕跡，並給予藥物治療，於給藥後12及24小時以顯微鏡觀察並拍照。

貳、體內試驗部分(In vivo)

一、動物試驗

1. 皮下腫瘤接種模式

腫瘤接種模式動物經兩個星期穩定飼養後，依下列程序將癌細胞以皮下注射方式接種予裸鼠上：將LL2細胞以 1×10^7 cells/200 μ l MEM之量混勻後，打入裸鼠右後腿上方待形成腫瘤。接種完畢後，將裸鼠依細胞分類並依平均體重分籠，每3天量一次體重並紀錄。

2. 癌組織體外組織培養與免疫活性分析

將培養的肺癌細胞(LL/2)與乳癌細胞(JC) 等用trypsin打下，使細胞形成 1×10^6 /0.5ml數目的細胞懸浮液，再將癌細胞注射入ICR裸鼠的皮下，以待形成腫瘤，等腫瘤長至約直徑1公分大小，接著利用CO₂將裸鼠犧牲，取其裸鼠皮下的腫瘤塊後，先以未加FBS的medium (DMEM)沖洗，再放置dish盤(有少許FBS的medium)，然後將腫瘤細切為約3mm²(3mg)的腫瘤小塊，將6個腫瘤小塊排列放置到先前已用medium泡軟分切好的人工組織上，再將放置有腫瘤小塊的人工組織分別放置6-well盤上，形成每個well有兩個人工組織塊，然後再用MEM+DMEM混合medium + 10%FBS的培養液培養於5% CO₂ 之37°C恆溫培養箱培養48小時，每個well medium約8ml，由於組織體外生長壽命約十天，所以須在時間內進行給藥測試。

在組織培養48小時後除去舊的medium，接著加入不同濃度之桑黃多醣萃取液，分別培養在24、48、72、96 小時時間點，將一個人工組織塊夾至另一個6-well盤，新的6-well盤則加入含Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide 每well 2.5mg的培養液培養16小時，接著吸除含有MTT試劑的舊培養液後加入Dimethyl Sulfoxide每well 0.5ml搖晃培養約30分鐘，然後一樣以microreader測OD值分析其活性(ELISA micro reader 540 nm)。

3.靜脈注射誘導腫瘤轉移模式

我們利用6到8周齡大，體重約20g至30g之間的BALB/C小鼠，以平均體重將其分成4組，將經過細胞培養後細胞數量達 1×10^6 cells的黑色素瘤細胞(B16F10),以尾部靜脈注射的方式誘導打入0.3 ml的量，經過大約6至8天的時間肺部便會形成腫瘤。

二、藥物給予

動物實驗流程如上所示，當接種癌細胞後24小時即開始進行給予桑黃多醣萃取液，持續10天的給藥時間。

三、西方墨點法

取下肺臟經過研磨後以蛋白質定量後的組織內總蛋白抽取液(50g)，加入等體積的2× sample buffer充分震盪混合均勻然後加熱99°C，5~10 分鐘使蛋白質變性後，馬上將蛋白質樣本放置冰上冷卻備用，在注膠後將蛋白質樣品及protein marker依序注入含4%stacking gel及10% Resolving gel電泳槽中以100伏特跑電泳，電泳結束後取下膠片置於gel sandwich (分別為纖維墊、過濾紙、膠片、NC membrane)放入濕式蛋白質轉移槽內注滿transfer buffer以200毫安培進行蛋白質轉移。蛋白質轉移結束後取下NC membrane加入blocking buffer室溫下震

盪2小時，PBST震盪清洗10分鐘後倒出，加入TNF- α 、NF- κ B與AKT一級抗體震盪1 hr，室溫下以PBST清洗NC membrane 15分鐘重覆四次以去除未結合之一級抗體，再加入二級抗體震盪90分鐘後以PBST清洗NC membrane 15分鐘重覆四次，最後加入HRP呈色劑（Reagent A + Reagent B以1：1比例）於NC membrane上室溫下反應1分鐘再利用冷光影像分析儀(FUJIFILM LAS - 3000)顯影。

參、數據處理與分析(Data Analysis)

在本研究中，實驗結果數據統計之表示方式為平均值 \pm 標準誤差(mean \pm S.E.)。而樣本差異性使用ANOVA加上事後檢定(Scheffe法)，計算出P值，當P值小於0.05時即表示兩樣本在統計學上具有明顯差異。

肆、結果

先將收集來的桑黃樣品利用抗氧化實驗中的清除(DPPH)自由基的能力來評估所收集來的樣品其抗氧化活性如何，接下來再進一步將桑黃樣品與目前市面上所使用的抗癌藥物對癌症細胞做合併治療，接著利用細胞毒性測試(MTT ASSAY)桑黃是否能輔助抗癌藥物，抑制癌細胞生長。以抗氧化活性試驗（圖一）測試桑黃樣品，結果顯示不同萃取方式取得的桑黃樣品具有不同的抗氧化能力，結果顯示桑黃酒精沈澱多醣的抗氧化活性效果最高，接著我們利用膠體層析法(GPC)來鑑定不同菇蕈類多醣萃取液中的成分（圖二），接著以GPC測試不同萃取法所取得的桑黃萃取液，發現其成份含量也不同，其中以桑黃酒精沉澱萃取液的大分子含量較多(圖三)，接著我們利用酚硫酸呈色法分析不同萃取法得到的桑黃多醣含量，最後我們選擇經由酚硫酸呈色法(圖四)測定出多醣含量較高的桑黃樣品來當本計劃實驗中的樣品-桑黃酒精沈澱多醣。

體外試驗為利用老鼠肺癌細胞株LL2以及人類肺癌細胞株A549，加入桑黃與臨床上所使用的抗癌藥物 Cisplatin、Etoposide 及 Doxorubicin利用合併治療的方式給予，結果發現低劑量（100 g/ml）與高劑量（500 g/ml）桑黃單純給予癌細胞時皆無明顯抑制肺癌細胞的生長（圖五、六），但在與抗癌藥物合併治療時發現不論是老鼠肺癌細胞株LL2以及人類肺癌細胞株A549上對於高劑量桑黃（500

g/ml) 與抗癌藥物給予皆有明顯輔助治療的效果，且透過細胞轉移試驗的結果發現，給予低劑量 (100 g/ml) 與高劑量 (500 g/ml) 桑黃加上抗癌藥培養12或24小時後，皆能減緩黑色素瘤細胞B16F10轉移的情形 (圖七)，綜合上述體外實驗結果，顯示桑黃合併抗癌藥物Cisplatin與Etoposide，比單獨給予桑黃時具更好的療效，可明顯抑制老鼠肺癌細胞LL2和人類肺癌細胞A549增生，細胞轉移試驗發現，桑黃單獨或合併抗癌藥物皆能減緩黑色素瘤細胞B16F10轉移。

因此，目前已進一步參考本實驗室之前發表在期刊中(Chuu JJ, Liu JM, Tsou MH, Huang CL, Chen CP, Wang HS, Chen CT. Effects of paclitaxel and doxorubicin in histocultures of hepatocellular carcinomas. J Biomed Sci. 2007 Mar; 14 (2):233-44. 2007)異體癌組織體外之培養的方式，去模擬腫瘤組織在體內生長的情形，以及接受藥物治療之後的表現是否與在細胞層級上的情形一致。有鑑於桑黃的免疫與抗腫瘤功效且不具有副作用的優點，可以應用輔助抗癌藥物合併治療癌症，因此本計劃試想將腫瘤組織與巨噬細胞共同培養探討巨噬細胞與腫瘤組織之間的關係，利用腫瘤組織培養的方式加入巨噬細胞共同培養後，由腫瘤組織的細胞毒性測試(MTT)結果顯示隨著天數的增加與巨噬細胞共同培養的腫瘤組織比沒有與巨噬細胞共同培養的腫瘤組織其腫瘤的生長有明顯受到抑制的情形 (圖八)，因此我們加入桑黃多醣萃取液從低劑量到高劑量 (10 g/ml、50 g/ml、100 g/ml) 分別作用24、48、72小時來測試加入桑黃多醣後是否能更有效的抑制腫瘤組織生長以及作用的時間約多長，結果顯示腫瘤組織的生長會隨著給藥時間的增加而降低 (圖九) 不管是低劑量或高劑量在72小時其腫瘤生長與未給予桑黃多醣組相比皆能有效抑制 ($P < 0.001$)，根據此結果我們把抗癌藥物Cisplatin和Etoposide加入與巨噬細胞共同培養的腫瘤組織作用96小時後取其培養液以酵素結合免疫分析法來檢測所含有細胞激素TNF- α 、IL-1以及M-CSF的差異，發現與未給藥物組相比TNF- α 有明顯提高但是與給予抗癌藥複方相比並沒有差異而IL-1和M-CSF的表現量並沒有因為給予桑黃多醣而有出現差異 (圖十、十一)。

根據細胞轉移試驗的數據 (圖七) 我們更進一步用腫瘤轉移的動物模式來測試桑黃多醣對於腫瘤轉移的影響，由動物生存曲線的數據發現未給予桑黃的老鼠從打入細胞後約9天後開始出現死亡，而給予桑黃的老鼠約在第15天候才開始出現死亡，與未給予桑黃的老鼠約差7天，不過到了第21天時給予桑黃的老鼠死去的時間開始減短，有可能是因為到後期腫瘤的轉移情形已經相當的嚴重，給予桑黃並無法治

癒腫瘤轉移的情形只能減緩轉移形成。將黑色素細胞瘤B16F10經由尾靜脈打入老鼠體內，24小時後開始持續以口服的方式給予桑黃多醣，10天後犧牲並檢測老鼠肺部的腫瘤結節數量來作為腫瘤轉移的標的，由圖十四我們可以看到腫瘤結節數隨著給予劑量的增加而減少，且減少的數量十分明顯 ($P < 0.001$) 由此可判斷出桑黃多醣對於腫瘤轉移的抑制有不錯的效果，接著將取出的肺臟萃取蛋白質後利用西方墨點法觀察蛋白質的表現量發現給予桑黃500 mg/kg 的TNF-alpha表現量較未給藥組高，推測桑黃或許為輔助提高TNF-alpha的表現來達到輔助癌症治療的效果。

伍、討論

先利用抗氧化試驗DPPH所得到的結果可以發現經由酒精沉澱後的多醣抗氧化能力也比酒萃與水萃來的好很多。接著再將不同萃取方式所得到的萃取物打入GPC中去檢測其萃取物質中的多醣含量大多是分布在多少分子量的範圍內，可以發現利用不同萃取方式所得到的萃取物其分子量的分布也不相同，然後再把不同的菇蕈類多醣萃取物以GPC來做比較其萃取物中的分子量是否也不相同，所以才會形成不同的功效，酚-硫酸呈色法去觀察利用不同的萃取方式以及不同的樣品所含有的多醣含量有何不同，來決定我們所要利用的萃取方式。然後把桑黃萃取物加入不同的癌細胞中看其抑制癌細胞的效果如何，發現桑黃萃取物對於老鼠肺癌細胞LL2有較好的效果，透過利用桑黃合併抗癌藥物Cisplatin與Etoposide治療老鼠肺癌細胞LL2和人類肺癌細胞A549，發現桑黃抗癌藥合併治療後產生比單純給予時更好的療效，由細胞轉移實驗的數據我們發現當桑黃多醣與抗癌藥物Cisplatin合併給予黑色素瘤細胞B16F10時，會比單純使用抗癌藥物複方時更能有效的減緩細胞轉移的情形產生，且桑黃多醣在單獨加入黑色素瘤細胞時就已經有不錯的抗轉移效果產生，關於桑黃多醣在抗腫瘤轉移方面已經有前人文獻證明其效果，但大部分都是以前人為實驗材料。

再透過異體組織培養的方式將巨噬細胞(Macrophage)加入有桑黃治療腫瘤組織，來觀察桑黃是否會透過巨噬細胞對腫瘤生長進行調節，發現有加入巨噬細胞的腫瘤會產生更有效的抑制效果。由實驗結果可推論桑黃確實有輔助抗癌藥物治療而且從組織培養的結果可發現桑黃加上巨噬細胞能更有效的產生抑癌的效果。且經過腫瘤轉移的動物實驗我們可以清楚的發現到桑黃多醣對於腫瘤轉移有很好的減緩效果($P < 0.001$)，綜合以上的實驗結果我們可以做出初步的假設，

桑黃對於癌症的輔助治療上有不錯的效果且對於腫瘤的轉移也有減緩的表現。

陸、結論與建議

經由抗氧化實驗DPPH與TEAC的結果(圖二、圖三)可以得知桑黃多醣萃取物對於抗氧化活性方面在DPPH實驗中其IC50在0.51mg/ml就已經出現，而桑黃酒萃物要到有較好16.11mg/ml才會達到IC50的效果，而且在利用GPC做更進一步分析不同萃取方式所得到的萃取物其分子量組成也大不相同(圖四)且不同的菇蕈類其多醣萃取物的分子量分布也不同(圖五)，或許這可以用來證明為何相同的物質經過不同的萃取之後，其作用功效也會大大的改變更何況是不同的物質。之後透過不同的癌細胞MTT試驗中可以發現到桑黃對於肝癌作用並不是很好，必須要到高劑量才会有相對的效果出現(圖六)，但是將桑黃加入肺癌細胞中輔助抗癌藥物的治療方面來說，桑黃的確能看到不錯的輔助效果(圖七)。接著再利用癌組織的腫瘤培養模式並加入巨噬細胞共同培養以更進一步模擬腫瘤在體內生長的环境及方式，結果也顯示加入桑黃之後桑黃與巨噬細胞之間會產生交互作用，使得桑黃對於腫瘤的抑制出現了不錯的效果(圖九)，再來把具有高度轉移性的腫瘤細胞B16F10老鼠黑色素瘤透過老鼠尾靜脈注射的方式打入老鼠體內模擬腫瘤轉移的模式，打入後24小時開始給予桑黃，持續給予10天後以肺部腫瘤節結數的結果顯示桑黃多醣萃取物具有明顯減緩腫瘤轉移發生的效果(圖十~十三)，由以上的實驗結果建議在癌症化療時期可攝取一些桑黃來幫助免疫力的提高並輔住癌症治療的效果且減緩腫瘤轉移的發生，使得患者能有更高的機率可以將癌症治癒。

致謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會(計畫編號：CCMP96-RD-015)提供經費贊助，使本計畫得以順利完成特此致謝。

柒、參考文獻

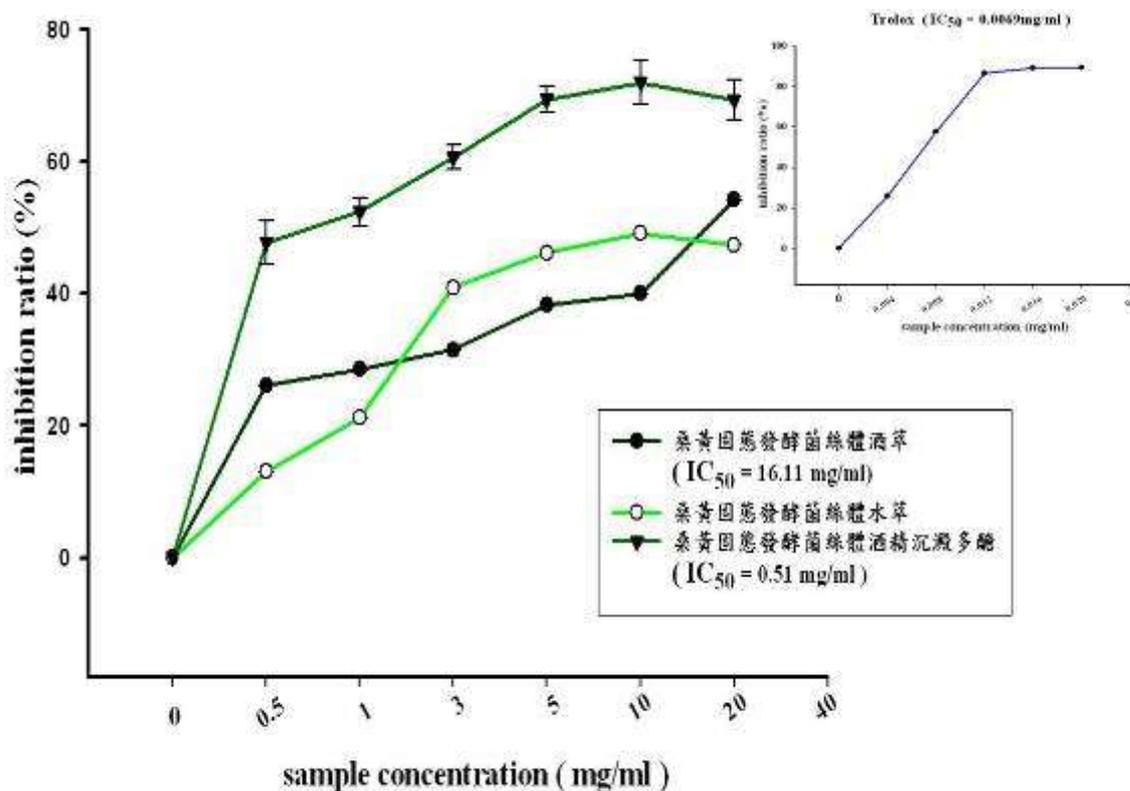
1. 行政院衛生署全國衛生統計資訊網(Health and National Health Insurance Annual Statistics Information Service)- 臺灣地區主要死因死亡率趨勢圖 <http://www.doh.gov.tw/statistic/data/死因摘要/93年/統計圖/2.主要死因死亡率圖.xls>
2. 行政院衛生署全國衛生統計資訊網(Health and National Health Insurance Annual Statistics Information Service)- 中華民國九十三年臺灣地區死因統計結果摘要 <http://www.doh.gov.tw/statistic/data/死因摘要/93年/93年摘要分析.doc>
3. 中華民國公共衛生學會(Cancer Registration System)台灣癌症統計資料 http://crs.cph.ntu.edu.tw/crs_c/annual.html
4. 行政院衛生署全國衛生統計資訊網(Health and National Health Insurance Annual Statistics Information Service)-癌症每十萬人口標準化死亡率之國際比較 <http://www.doh.gov.tw/statistic/data/死因摘要/93年/表42.xls>
5. 中華民國公共衛生學會台灣地區癌症發生率描述流行病學 http://crs.cph.ntu.edu.tw/crs_c/annual.html
6. Hepatocellular carcinoma :diagnosis, investigation, and management /edited by Anthony S.-Y. Leong . [et al.]. London :Arnold ;1999.New York :Distributed in the US and Canada by Oxford University Press,
7. Hepatocellular carcinoma and liver metastases diagnosis and treatment/ H.-M.Hoogewoud ; with a foreword by A. Rohner. Berlin ; New York : Springer-Verlag, c1993.
8. 行政院衛生署全國衛生統計資訊網(Health and National Health Insurance Annual Statistics Information Service)- 臺灣地區主要癌症死亡率趨勢圖 <http://www.doh.gov.tw/statistic/data/死因摘要/93年/統計圖/5.主要癌症死亡率.xls>
9. 高木繁，2004，桑黃，青春出版
10. 理一真修，2005，能量桑黃解碼，世茂出版
11. 齊藤隆，2004，抗癌成功宣言，安立出版社
12. American cancer society. Cancer Facts & Figures-2004
13. Chen CJ, Wu HY, Chuang YC, Chang AS, Luh KT, Chao HH, Chen KY, Chen SG, Lai G.M, and Huang HH. Epidemiological characteristics and multiple risk factors of lung cancer in Taiwan.

- Anticancer Res.*, 10:971-976, 1990
14. Gao YT, Blot WJ, Zheng W, Ershow AG, Hsu CW, Levin LI, Zhang R, and Fraumeni JF Jr. Lung cancer among Chinese women. *Int. J. Cancer*, 40:604-609, 1987
 15. Dubrow R, and Wegman DH. Cancer and occupation in Massachusetts : a death certificate study. *Am. J. Indus. Med.*, 6:207-230, 1984
 16. McCulloch J. Saving the asbestos industry, 1960 to 2006. *Public Health Rep.* 2006 Sep-Oct;121(5):609-14.
 17. Okada M, Yamamoto H, Satake S, Kujime K, Sugio T, Jinnai K, Takahashi K. Sleeve lobectomy for lung carcinoma in a patient with muscular dystrophy. *Thorac Cardiovasc Surg.* 1996 Oct;44(5):264-5.
 18. Matiullah, Ahad A, Rehman S, Mirza ML. Indoor radon levels and lung cancer risk estimates in seven cities of the Bahawalpur Division, Pakistan. *Radiat Prot Dosimetry.* 2003;107(4):269-76.
 19. Coldren CD, Helfrich BA, Witta SE, Sugita M, Lapadat R, Zeng C, Baron A, Franklin WA, Hirsch FR, Geraci MW, Bunn PA Jr. Baseline gene expression predicts sensitivity to gefitinib in non-small cell lung cancer cell lines. *Mol Cancer Res.* 2006 Aug;4(8):521-8
 20. Muraoka M, Tagawa T, Akamine S, Oka T, Tsuchiya T, Araki M, Hayashi T, Nagayasu T. Acute interstitial pneumonia following surgery for primary lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006 Oct;30(4):657-62. Epub 2006 Aug 8.
 21. Hayashi K, Fukushima K, Sagara Y, Takeshita M. Surgical treatment for patients with lung cancer complicated by severe pulmonary emphysema. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999 Dec;47(12):583-7
 22. Knysz B, Zalewska M, Rzeszutko M, Gladysz A. Lung cancer as an immune reconstitution disease in an HIV-1 positive man receiving HAART. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2006;60:181-3.
 23. Van Vleet TR, Klein PJ, Coulombe RA Jr. Metabolism and cytotoxicity of aflatoxin b1 in cytochrome p-450-expressing human lung cells. *J Toxicol Environ Health A.* 2002 Jun 28;65(12):853-67.
 24. de Leyn P, Decker G. Surgical treatment of non-small cell lung cancer. *Rev Mal Respir* 2004 Nov;21(5 Pt 1):971-82.
 25. Tomaszewski D, Zajac-Lenczewska I, Plichta L, Lapinski M, Murawski M, Sternau A, Skokowski J. Effect of neoadjuvant

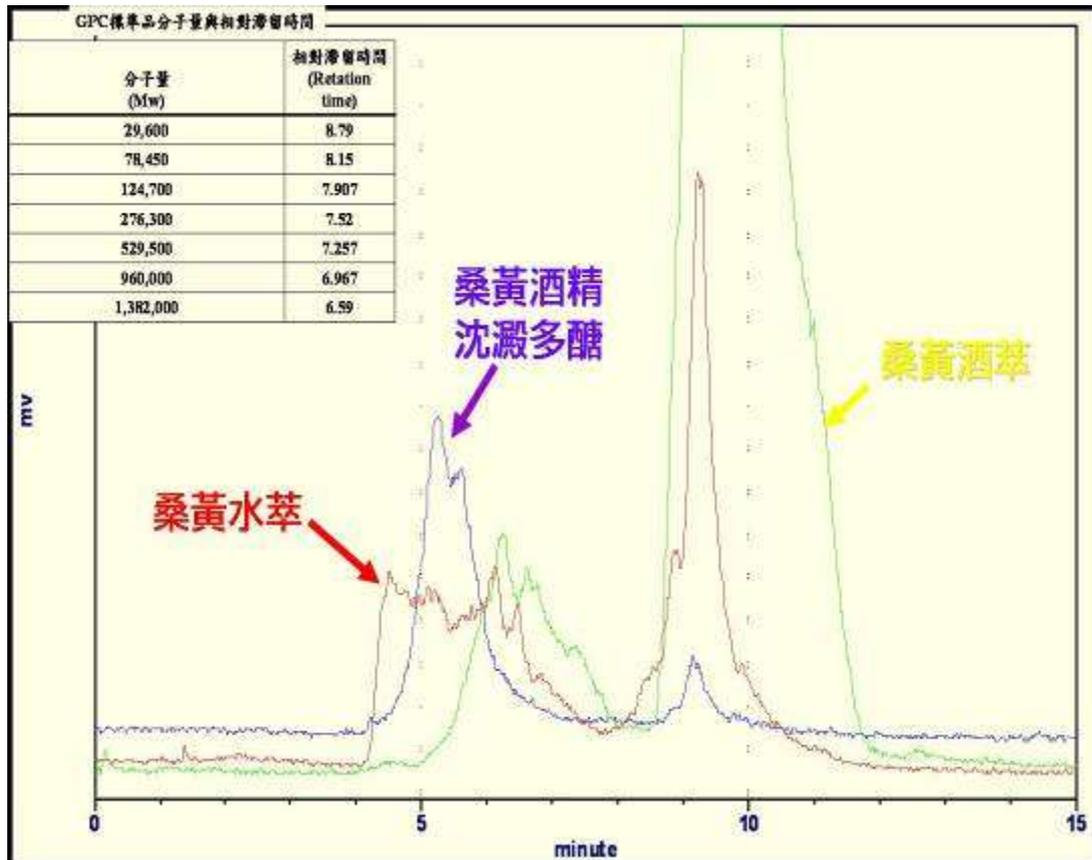
- chemotherapy on complications in patients undergoing surgical treatment for non small cell lung cancer. *Pneumonol Alergol Pol.* 2004;72(11-12):477-81. Polish
26. Charpidou A, Hatzidarellis EP, Alamara C, Dilana K, Pantazopoulos K, Kotieas E, Georgatou N, Syrigos KN. Pegylated Liposomal Doxorubicin HCL (Caelyx) in combination with Sandostatin LAR as salvage therapy in patients with small-cell lung cancer. *In Vivo.* 2006 Jul-Aug;20(4):553-7.
27. Tsutsumi K, Yasuda M, Nishioka T. X-ray irradiation altered chemosensitivity of a p53-null non-small cell lung cancer cell line. *Cell Struct Funct.* 2006; 31(2): 47-52.
28. Molina JR, Adjei AA, Jett JR, (2005) , Advances in Chemotherapy of Non-small Cell Lung Cancer. *Am J Ind Med.* Oct; 130(4):1211-9.
29. Postmus PE., (1999) Smoking and lung cancer, *Ned Tijdschr Tandheelkd.* 1999 Nov;106(11):408-14. Review. Dutch.
30. Isobe T, Herbst RS, Onn A (2005) Current management of advanced non-small cell lung cancer: targeted therapy, *Semin Oncol.* 2005 Jun;32(3):315-28.
31. Shon YS , Kim SH , Sa JH , Jin C , Lim CJ and Park EH. 2003. Antimutagenicity and induction of anticarcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes. *Journal of Ethnopharmacology.* 77 , 103-109
32. 劉宗榮 台北榮總教研部 評估中藥中有化學預防肝癌成分之方法
編號：DOH84-CM-007 84 年度 行政院衛生署中醫藥委員會
33. 高尚德 中國醫藥大學 常見疾病中醫證型診斷基準研究(3-3)-慢性 B 型、慢性 C 型肝炎中醫證型診斷基準研究 編號：
CCMP92-RD-106 92 年度 行政院衛生署中醫藥委員會
34. 蔡榮發 高雄醫學院醫學系內科 天然產物抗人類肝細胞癌活性之研究： 芸香科生物鹼之篩選 編號： CCMP87-RD-042 86 年度行政院衛生署中醫藥委員會

捌、圖表

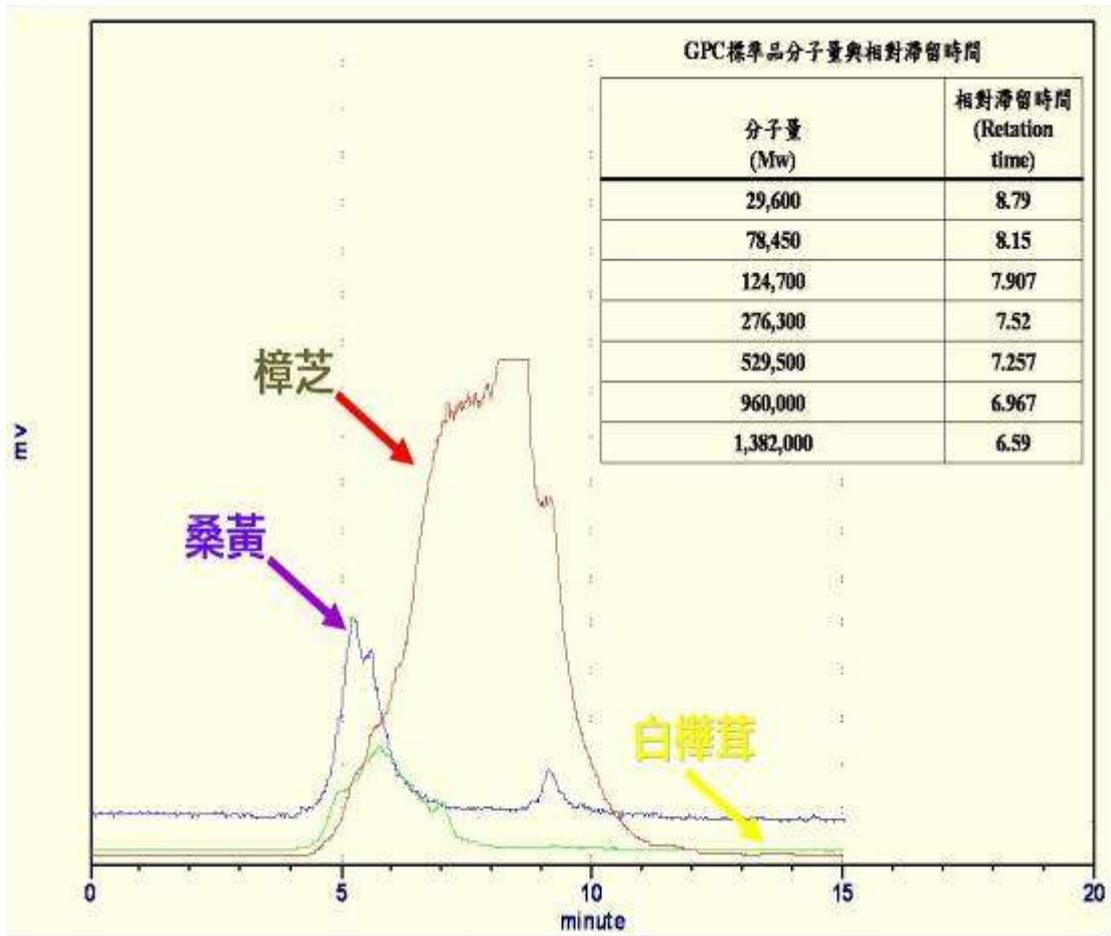
桑黃固態發酵菌絲體萃取消除DPPH能力



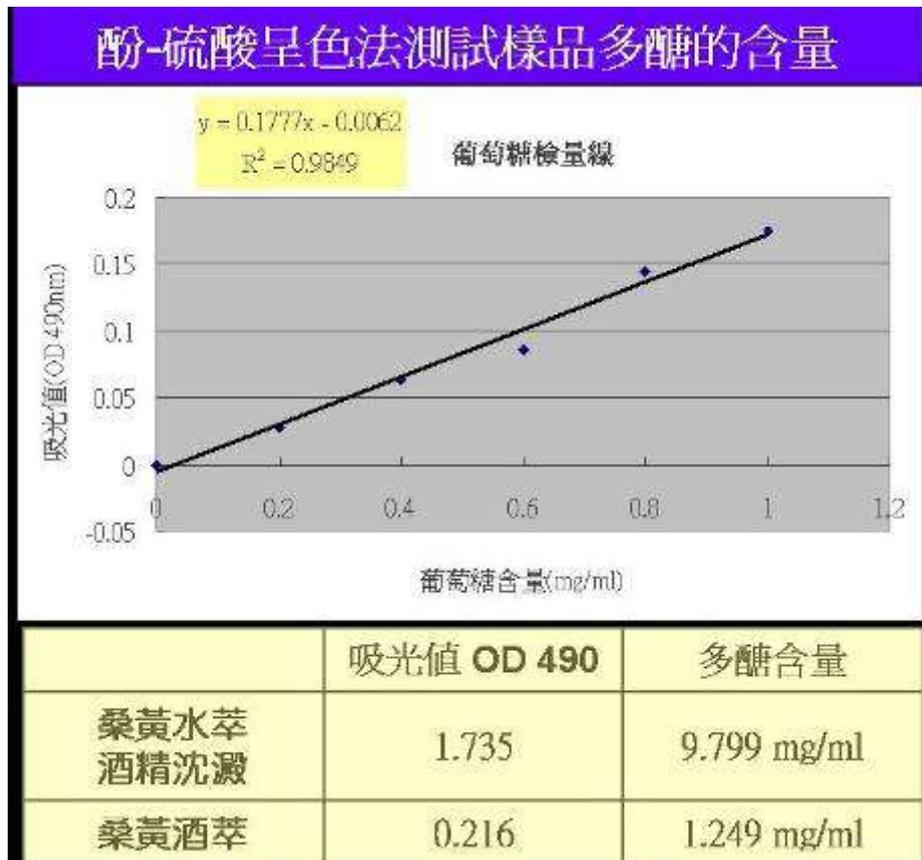
圖一、常見的抗氧化物藉由提供氫來清除脂質過氧化物自由基，進而達到抑制氧化連鎖反應之進行，在抗氧化的研究上通常使用DPPH來評估抗氧化的供氫能力，因此利用清除DPPH的能力試驗來看桑黃(樣本A)與桑黃(樣本B)的抗氧化能力，由數據顯示桑黃(樣本A)其清除DPPH的能力在500mg/ml時就已經達到50%的抑制率。



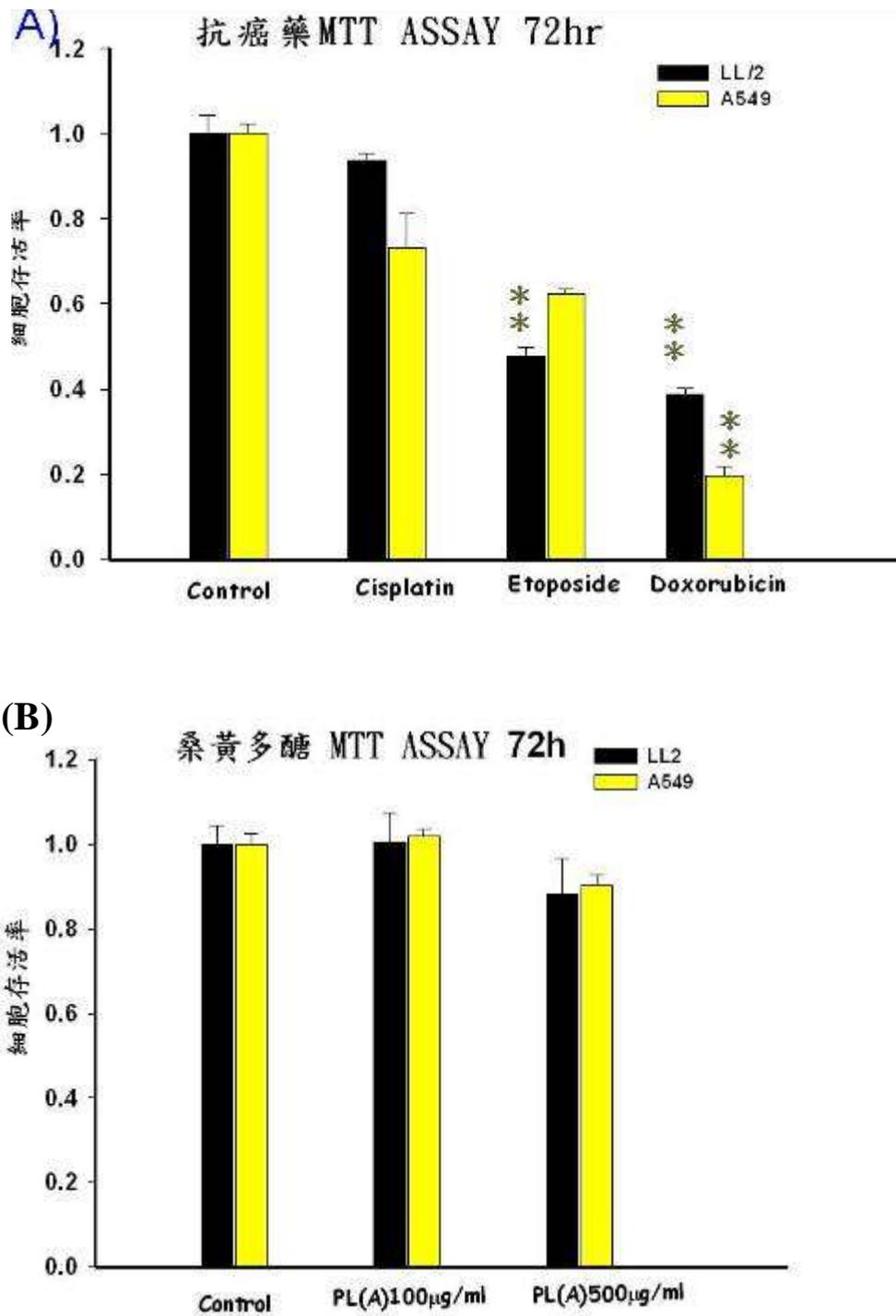
圖二、將用不同萃取方式萃取的桑黃固態發酵物，利用凝膠滲透層析 (Gel Permeation Chromatography, GPC) 的方式去測定萃取出來的物質分子量的大小分佈。



圖三、將用不同菇蕈類如:桑黃、白樺茸跟樟芝多醣的萃取物，利用凝膠滲透層析(Gel Permeation Chromatography, GPC)的方式去測定萃取出來的物質分子量的大小分佈以及差異。

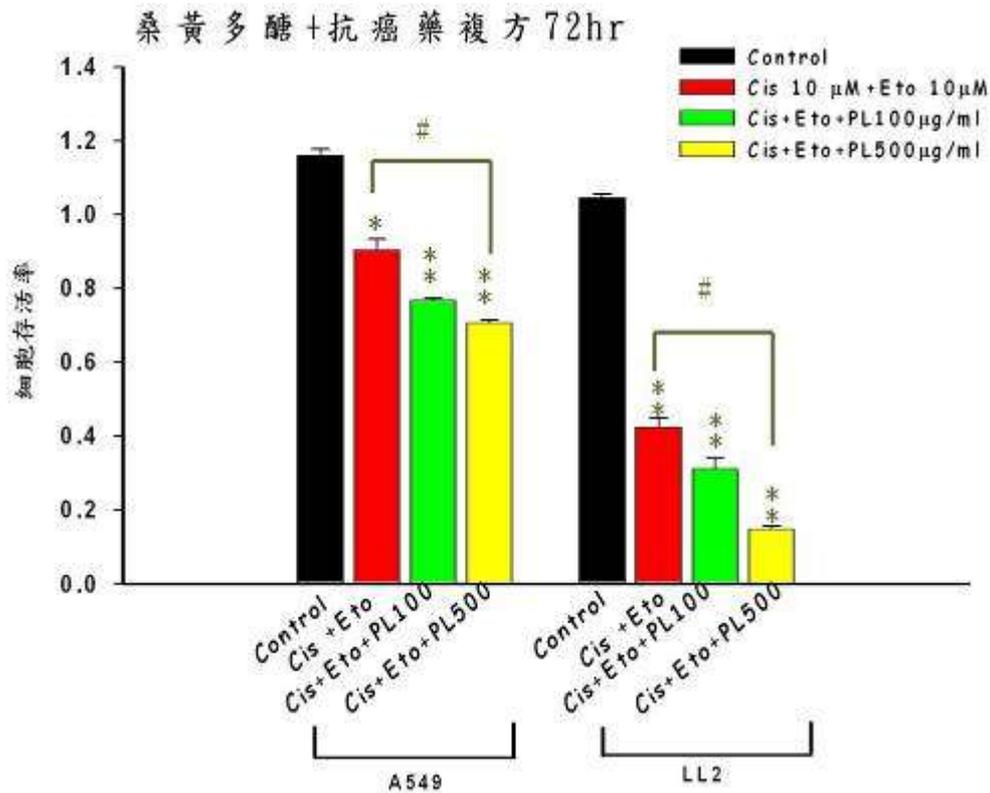


圖四、利用酚-硫酸呈色法 (Phenol-sulfuric acid method) 將不同的桑黃樣品利用不同的方式回溶去檢測經由酒精沉澱後的萃取物，其多醣的含量有何不同。



圖五、抗癌藥物Cisplatin、Etoposide與Doxorubicin(A)以及桑黃多醣(B)給予老鼠肺癌細胞LL2和人類肺癌細胞A549培養72小時後觀測其細胞毒性試驗，發現和其他抗癌藥物相比Cisplatin對於老鼠肺癌細胞LL2和人類肺癌細胞A549來說較無抑制效果，而

桑黃無治療效果。(*:與Control相比 P value<0.05 ,* *: P value<0.001)



圖六、再來將單純使用較沒療效的桑黃多醣及抗癌藥物Cisplatin和Etoposide加入老鼠肺癌細胞LL2與人類肺癌細胞A549培養72小時之後觀測其細胞毒性試驗，發現當抗癌藥物Cisplatin和Etoposide與桑黃一起給予癌細胞會有明顯的治療效果，因此可以看出桑黃的確有輔助治療的效果。(* *:與Control相比 P value>0.001) (#:與Cis+Eto相比 P value<0.05)

12小時



未給藥



PL100µg/ml



PL500µg/ml



CDDP10µM+
ETO10µM



CDDP10µM+
PL100 µg/ml



CDDP10µM+
PL500 µg/ml

24小時



未給藥



PL100µg/ml



PL500µg/ml



CDDP10µM+
ETO10µM



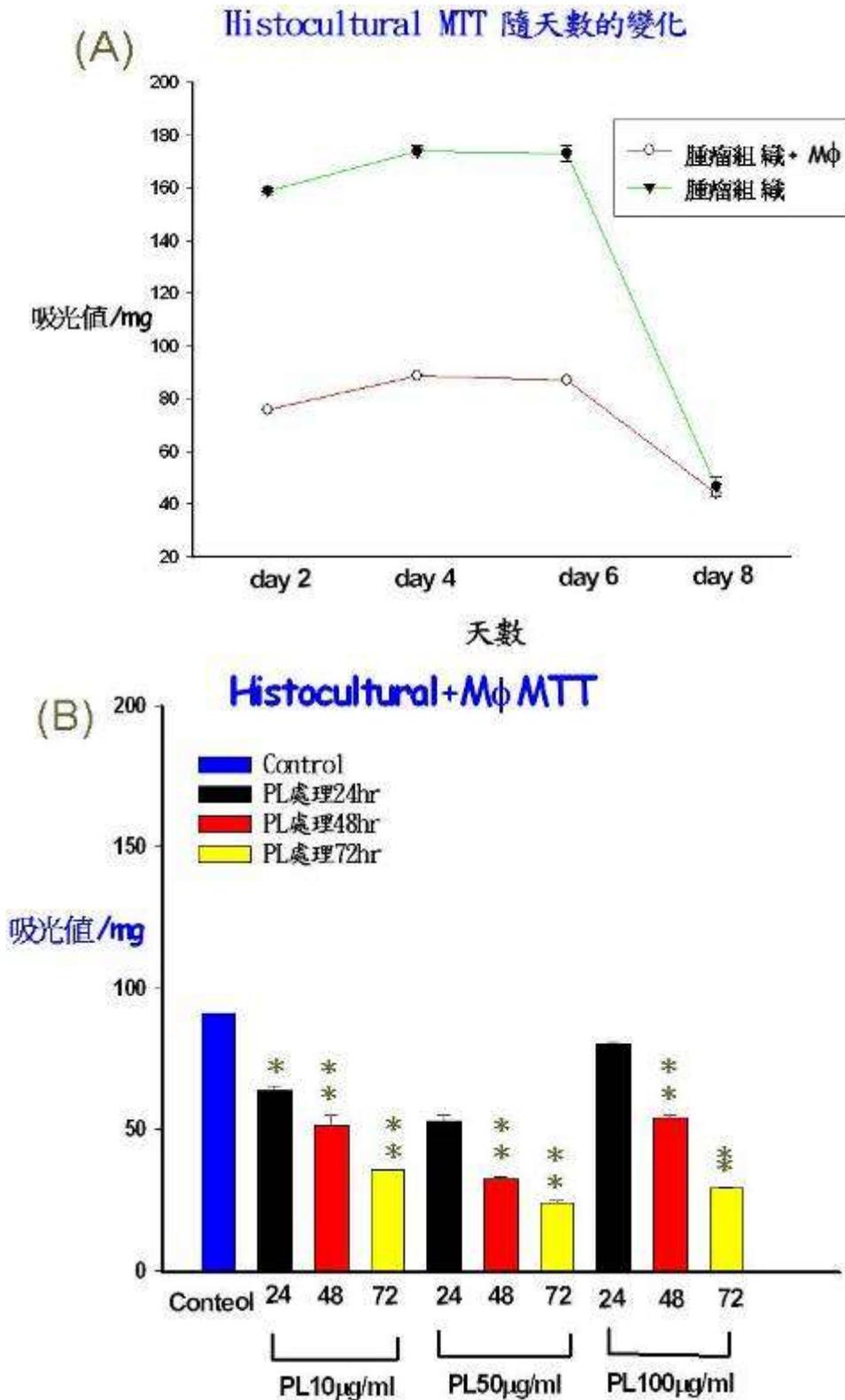
CDDP10µM+
PL100 µg/ml



CDDP10µM+
PL500 µg/ml

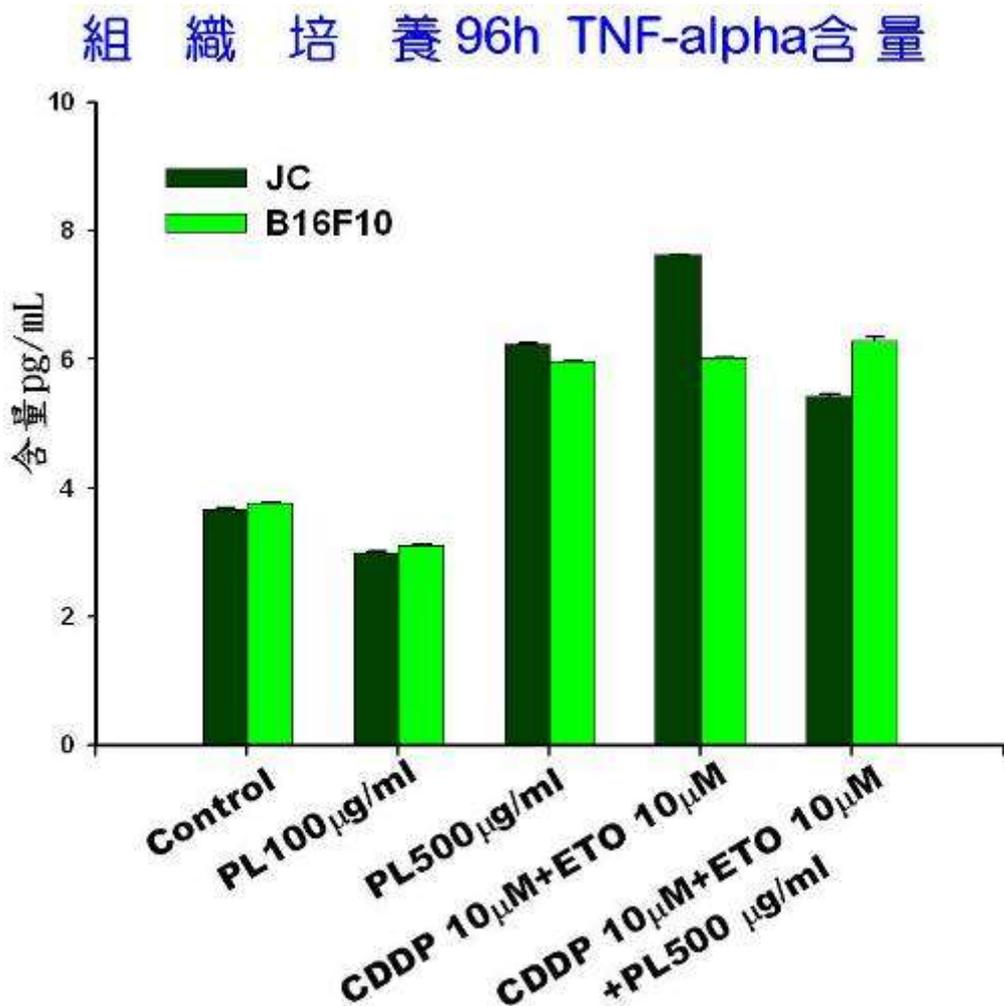
圖七、桑黃多醣萃取液加入巨噬細胞(Macrophage)中培養24小時後取出培養液，加入已經用tip刮除部份腫瘤細胞(B16F10)的dish中，觀察12及24小時桑黃與抗癌用藥對於腫瘤細胞轉移的影響

響。

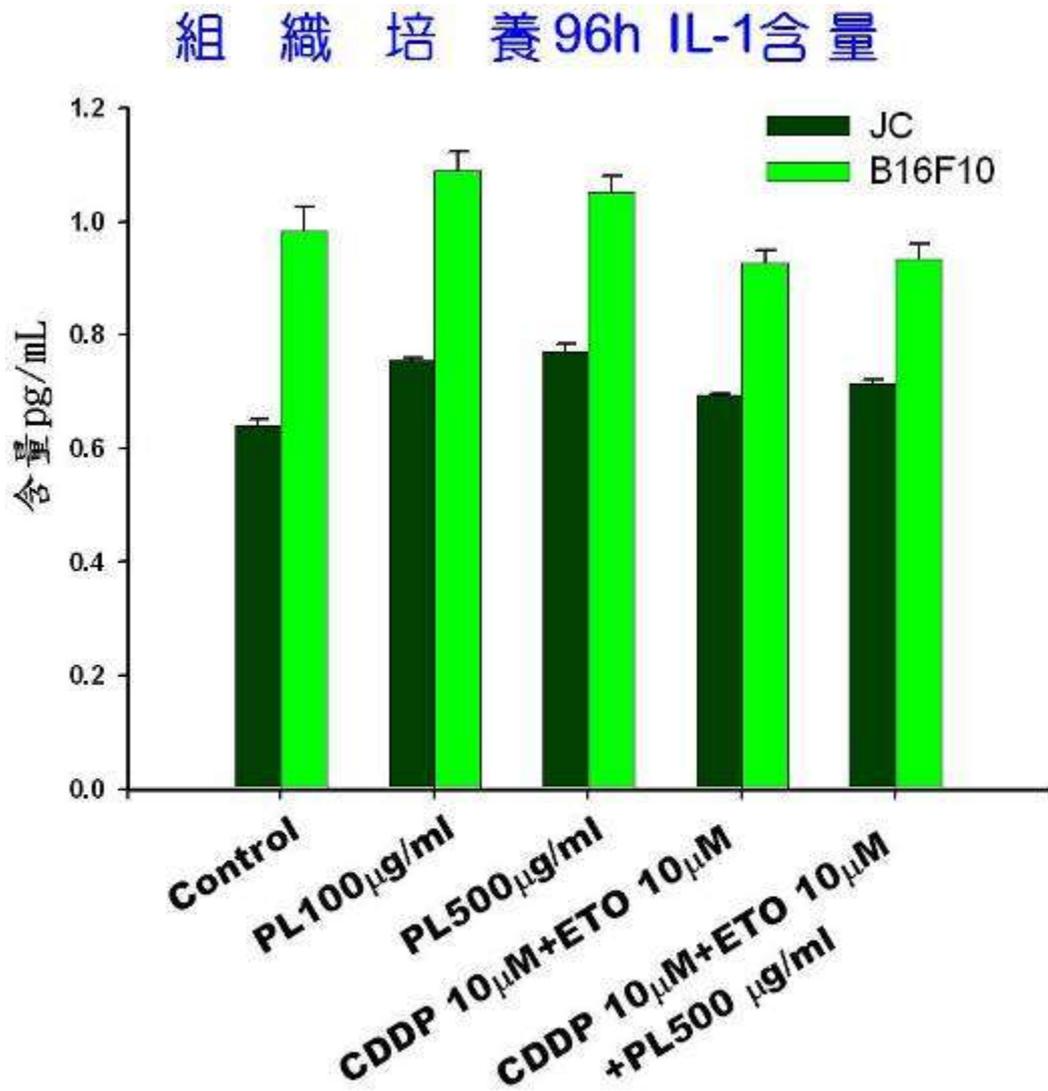


圖八、腫瘤組織與巨噬細胞之間的影響(A)桑黃多醣給予癌組織(LL2)並加入巨噬細胞(Macrophage)共同培養數天後 (B)，用細胞毒性試驗觀察桑黃多醣給予之後對腫瘤的影響(*:與Control相

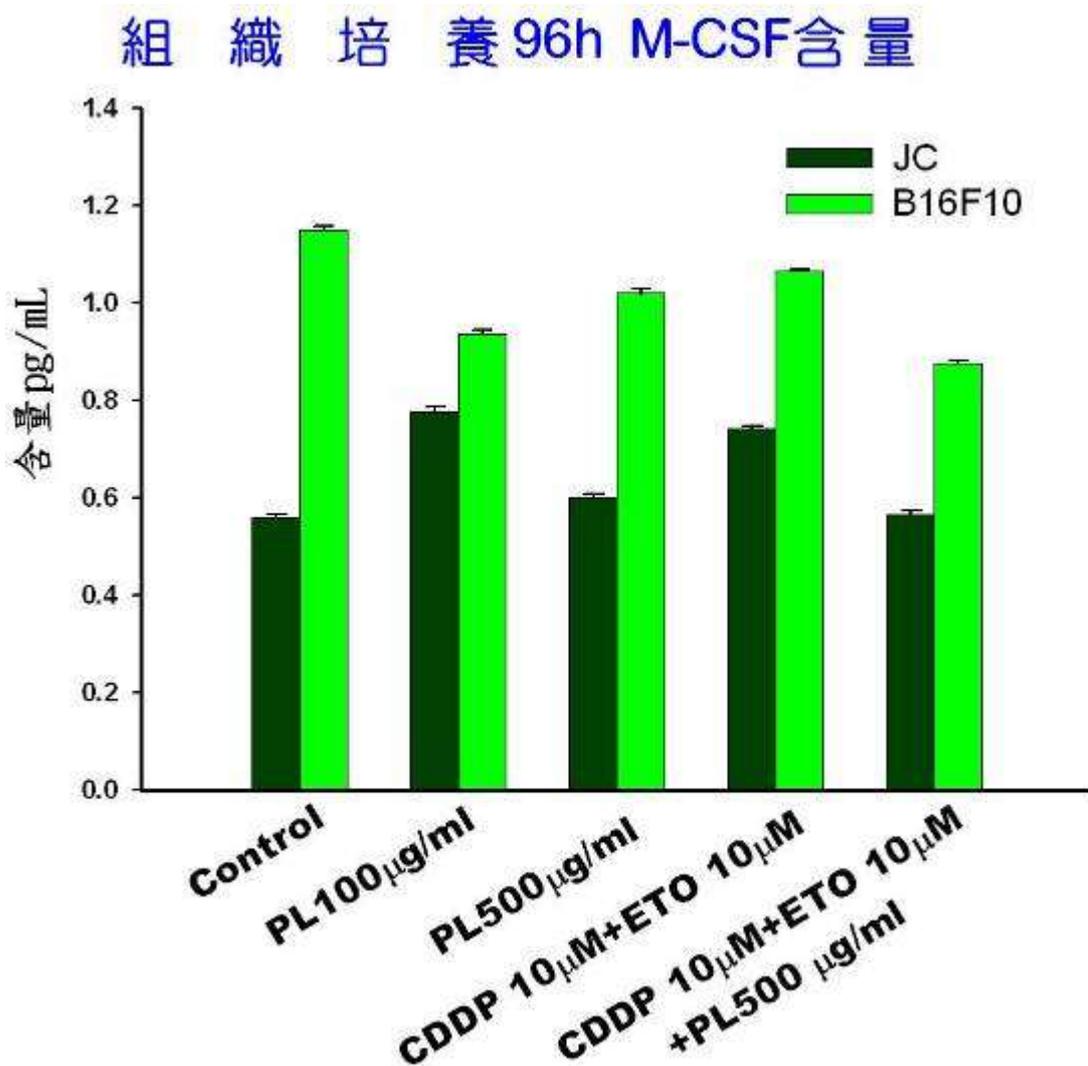
比 P value<0.05 ,** : P value<0.001)



圖九、桑黃多醣萃取液給予兩種癌組織(B16F10與JC)並加入巨噬細胞(Macrophage)共同培養數天後，用ELISA試驗觀察桑黃給予腫瘤組織與巨噬細胞之間細胞激素TNF-alpha的影響。

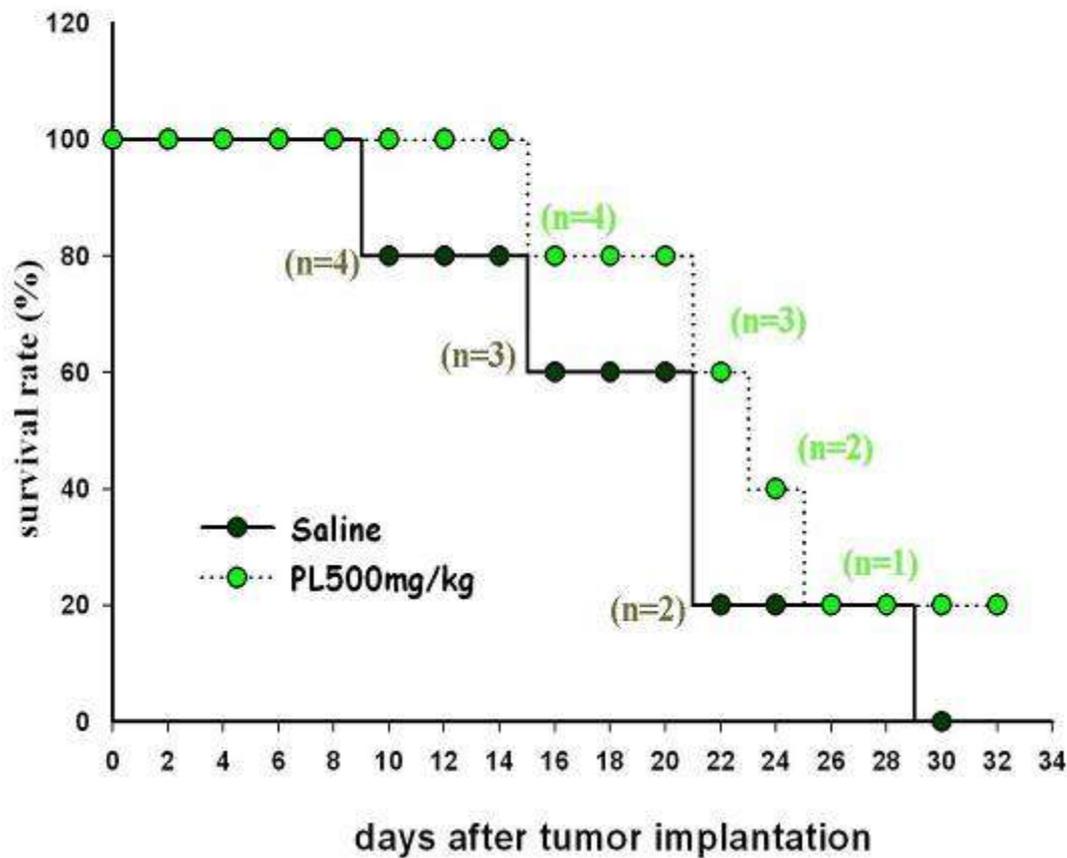


圖十、桑黃多醣萃取液給予兩種癌組織(B16F10與JC)並加入巨噬細胞(Macrophage)共同培養數天後，用ELISA試驗觀察桑黃給予腫瘤組織與巨噬細胞之間細胞激素IL-1的影響。



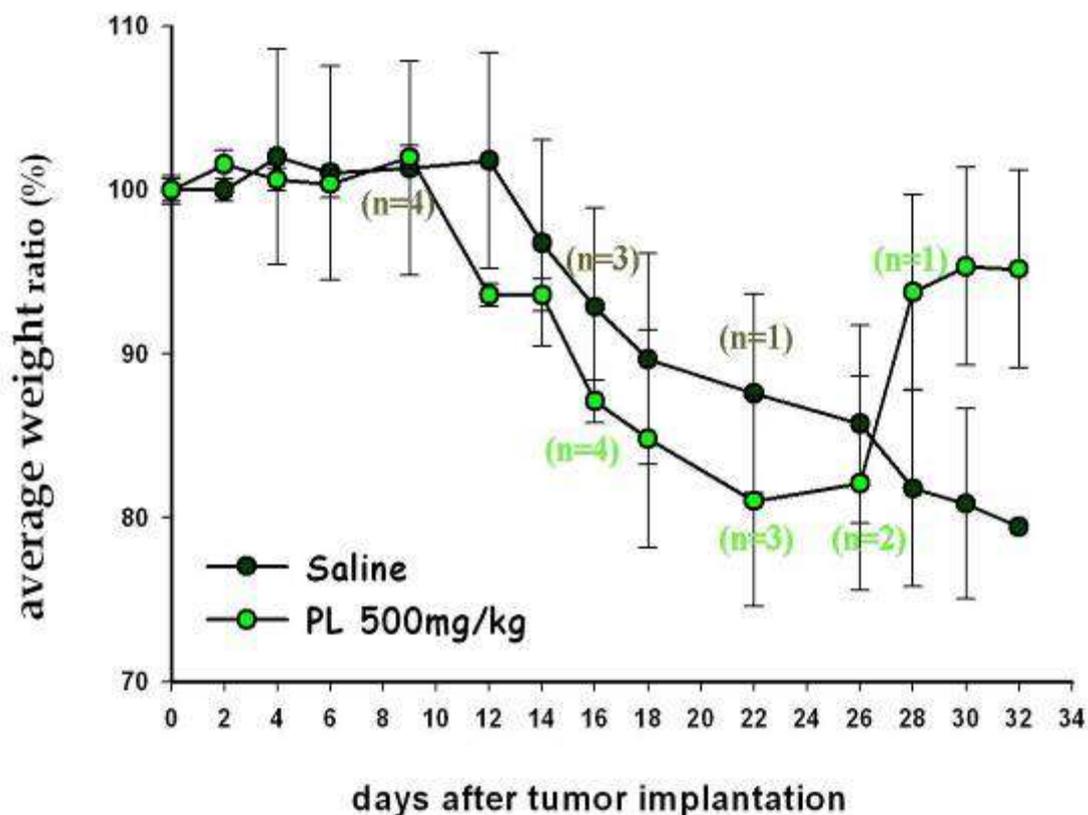
圖十一、桑黃多醣萃取液給予兩種癌組織(B16F10與JC)並加入巨噬細胞(Macrophage)共同培養數天後，用ELISA試驗觀察桑黃給予腫瘤組織與巨噬細胞之間細胞激素M-CSF的影響。

BALB/C mice iv survival rate

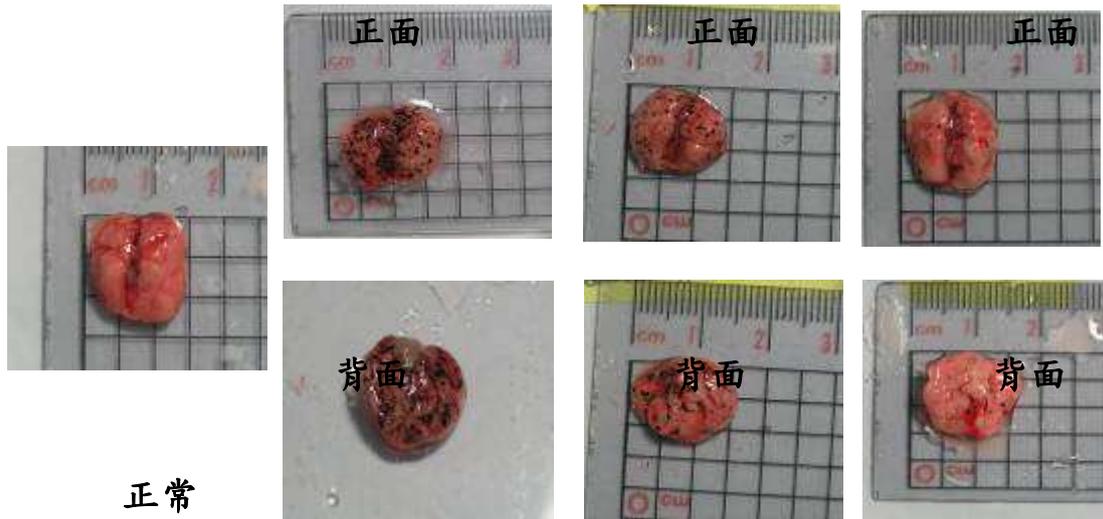


圖十二、腫瘤轉移動物模式將黑色素瘤細胞B16F10以i.v的方式打入老鼠體內，24h後開始給予口服不同濃度桑黃多醣萃取物持續給予之生存曲線。

BALB/C mice iv average weight

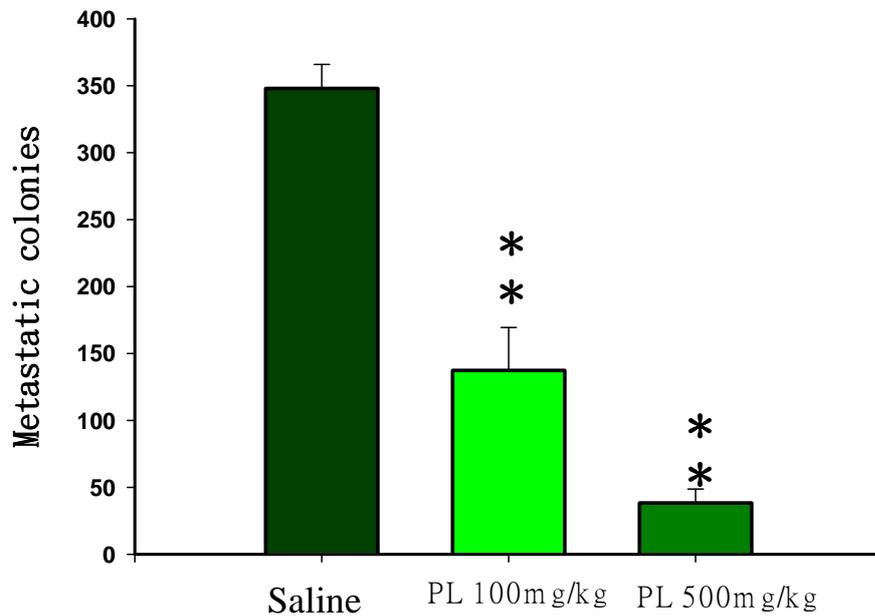


圖十三、腫瘤轉移動物模式將黑色素瘤細胞B16F10以i.v的方式打入老鼠體內，24h後開始給予口服不同濃度桑黃多醣萃取物持續給予之平均體重變化。

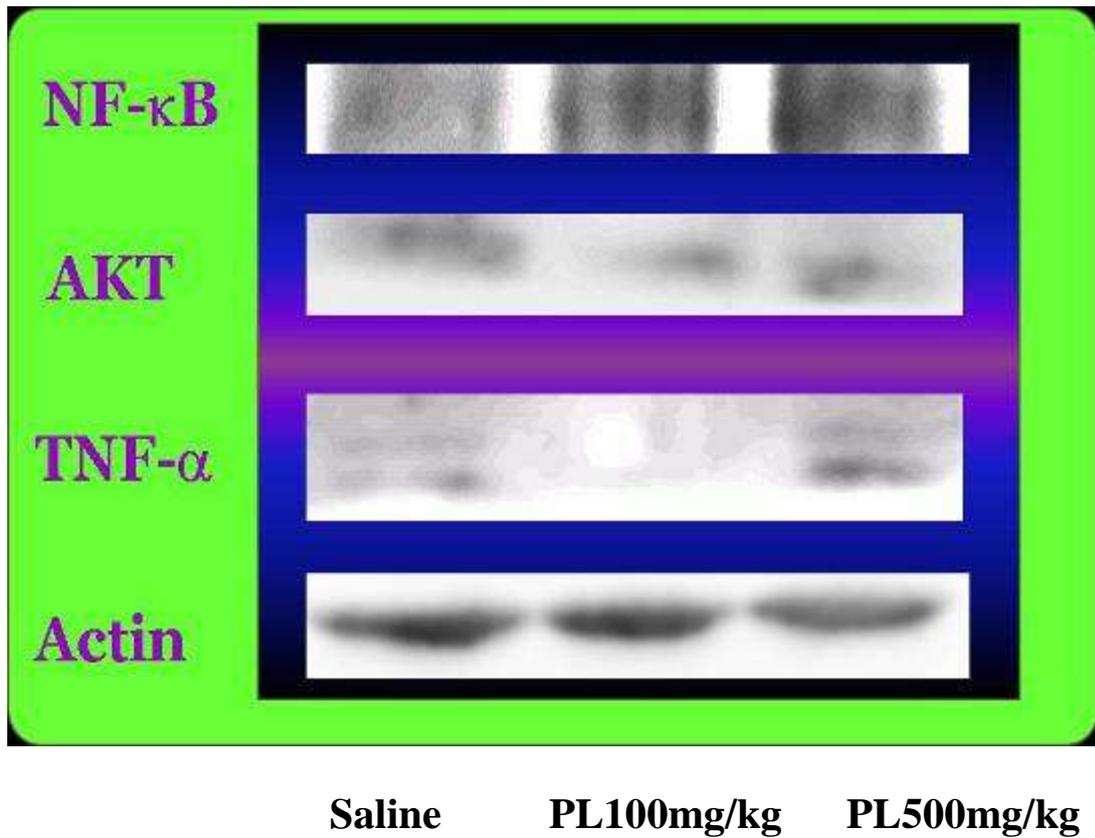


Saline PL100mg/kg PL500mg/kg

腫瘤轉移動物實驗(B16F10)
 ~給予桑黃多醣萃取物後老鼠肺部結節數



圖十四、腫瘤轉移動物模式將黑色素瘤細胞B16F10以i.v的方式打入老鼠體內，24h後開始給予口服桑黃多醣萃取液持續給予10天，犧牲之後肺臟的正面與背面，可清楚看到許多的黑色素瘤結節數。(*:與saline相比 P value<0.05 ,** : P value<0.001)



圖十五、腫瘤轉移動物模式將黑色素瘤細胞B16F10以i.v的方式打入老鼠體內，24h後開始給予口服桑黃多醣萃取液持續給予10天，犧牲之後的肺臟磨碎萃取蛋白質跑電泳偵測蛋白質表現量。