行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※※

一、 中文摘要

由以前實驗證明 *Ganoderma resinaceum* (CCRC-36147)在 65 種靈芝中,具有最豐富之三萜類類型,並於細胞實驗中證實對 HL-60 細胞具有 Apoptosis 作用。本研究延續此一結果針對 *G. resinaceum* 的三萜類酒精萃取物,進行蛋白質水解酵素的抑制物之篩選。其三萜類酒精萃取物,分別做 Collagenase inhibitor assay 、Chymotrypsin 抑制活性測試,並以 HeLa cell line 做細胞實驗,篩選出有效成份。每一成分別經由 MPLC 及 TLC 將其粗分離,再經由 PLC 純化,找出最後最有效的單一成分。實驗結果可知由 *G. resinaceum* 的酒精萃取物由 MPLC 及 TLC 粗分離成 4 個部分,最有效成分為 T 組,再由 PLC 純化成 8 個成分,最有效為 T-2 組,再由 T-2 組純化出 T-2-1 為有效成分及再次純化出 T-2-1-1 為 T 組中單一有效成分。T-2-1-1 對細胞存活率有明顯的抑制其存活,在流式細胞儀實驗中,看出加入 T-2-1-1 其細胞碎片增加至 73.59%,且細胞型態變得比較不規則。在 *in vitro* assay 中,T-2-1-1 對 Collagenase 抑制其斜率為-1.9E-6 (Negative contorl 為 0.86E-6)明顯有抑制效果;在 Chymotrypsin 抑制活性測式方面,T-2-1-1 其水解圈為 0.4cm (Negative control 為 0.9cm)有明顯的抑制效果。最後推測 T-2-1-1 的結構為一個 27 個碳之三萜類物質。經由本研究結果證實;此一三萜類能當蛋白質水解酵素的抑制物,將大量收集,做為腫瘤細胞之抑制物質之研究。

關鍵字 : *G. resinaceum*、三萜類、蛋白質水解酵素、抑制物

Abstract

Previous study on survey of 65 *ganoderma* fruiting bodies demonstrated that alcoholic extract of *G. resinaceum* (CCRC-26147) enhanced apoptosis of HL-60 cell lines. The present study has focused on the proteinase inhibition activity against collagenase and chymotrypsin of this species as well as a growth inhibitor of HeLa cell. Fruiting body (10 kg) of *G. resinaceum* was extracted and fractionation into four groups (C, B, M, and T) by MPLC system, in which only T fraction showed inhibitory on the assays. Then, T fraction was further separated into T-2, T-2-1, and T-2-1-1 by preparative TLC. All these fractions demonstrated strong inhibitory activity on collagenase, chymotrypsin and cell growth of HeLa cell line. NMR spectrum suggested T-2-1-1 was C_{27} triterpenoid related to lucidenic acid in literature. The result indicated that triterpenoids in *G. resinaceum* could be a potential drug for the treatment of carcinoma.

Key words : *G. resinaceum*、triterpenoid、proteinase、inhibitor

二、 緣由與目的

靈芝具有抗腫瘤的作用，過去一直認為是 polysaccharide 的功能，但根據一些研究顯示靈芝不只含有 polysaccharide 還含有三萜類、幾丁質等物質，所以本實驗著重在三萜類且一些證據顯示三萜類也有抗腫瘤之功能，故我們以三萜類為主題去探討。本實驗採用 *G. resinaceum* (CCRC-36147)為實驗樣品原因:本實驗室曾經進行不同種靈芝三萜類 HPLC 模式之分析，並分成 18 類，其中 *G. resinaceum* 能產生最多樣的三萜類而且其產量大、易於栽種，並且先前之試驗[1]亦證明本菌種之子實體對 HL-60 cell line 具有促使其 Apoptosis 之作用，一些研究可知癌細胞的一些基本的特性，且我們知道癌症最可怕在於它會擴散到身體各處造成嚴重的傷害，這是因為它會分泌一些蛋白質水解酵素去水解正常細胞之結締組織，經常為 matrix metallo-proteinase (MMP) [2、3]。並進行血管新生(angiogenesis)的現象，使腫瘤細胞經由血管得到養分補給，繼續進行細胞分裂。1998 年， el-Mekkawy 等人，證實 *G.lucidum* 中分離已知成份之 Ganoderiol F 及 Ganodermanontriol 具有對 HIV-1 之 protease 酵素具有抑制作用[4]。同年 Min 等人亦在 *G. lucidum* 孢子中分離 Ganoderic acid B、C_1、H 及 Ganoderiol A、B 具相同之效果[5]，顯示靈芝三萜類做為蛋白質水解酶抑制物之可能。所以本實驗將用 *G. resinaceum* (CCRC-36147)做為材料。

實驗的目的在於承續以往三萜類的研究，建立一個初步篩選靈芝三萜類為蛋白質水解酵素抑制物的模式，以便進一步更深入的去探討三萜類的功能。

三、 結果與討論

靈芝三萜類在抗腫瘤方面的研究，已有多年了，只是看到三萜類有抑制癌細胞的生長或是有毒殺肝癌細胞的功能 [6]。而腫瘤發展過程中，經由蛋白質水解酵素分解正常細胞之結締組織，並進行血管新生 (angiogenesis)，使腫瘤細胞經由血管得到養分補給，繼續進行細胞分裂，如果三萜類可以當做蛋白質水解酵素的抑制物的話，可使腫瘤細胞不會水解正常組織，而不會 metastasis 及 angiogenesis。至 1998 年 el-Mekkawy 等人的研究中，Ganoderiol F 及 Ganodermanontriol 兩種三萜類可當 HIV protease 的 inhibitor[4];同年，Min 等人研究中 Ganoderic acid B、C_1、H 及 Ganoderiol A、B 等三萜類也會抑制 HIV protease[5]，於是三萜類為 protease 抑制劑的可能性已被證實。因此如能藉由三萜類抑制 matrix metallo-proinase (MMP)，則可能將侵入性的腫瘤細胞轉為非侵入的腫瘤細胞，對於腫瘤治療上有很大意義。

因此本實驗朝兩個方向進行，一為 *G.resinaceum* 由 MPLC、TLC 及 PLC 等實驗方法所分離到的成分，對於 HeLa cell line 生長的影響;二為分離成分在 in vitro assay 的 collagenase inhibitor assay 及 Chymotrypsin 抑制活性測試有無抑制的效果。結果顯示由 *G.resinaceum* 分離成分中，T 組所分離的單一成分 T-2-1-1，有對 HeLa cell line 的生長有明顯的影響(表 1 及表

2)。而 collagenase inhibitor assay 及 Chymotrypsin 抑制檢測中 T-2-1-1 也是有明顯的抑制效果(表 3 及圖 1) 。兩者之間是否有任何關係由目前所做的數據無法看出，只能說 *G.resinaceum* 含有抑制 HeLa cell line 生長的成分，且 in vitro assay 中此成分有明顯抑制 protease 的效果，往後必須進一步證實 *G.resinaceum* 分離成分中，會抑制癌細胞所分泌的 metalloprotease。本實驗使用的 HeLa cell line 會分泌 metalloprotease-2 (MMP-2)及 metalloprotease-9 (MMP-9)，在 1997 年 Nuovo 等人研究中，HeLa cells 假如 invasion 時，比不具 invasion 能力的 HeLa cells 分泌更多的 MMP-2 及 MMP-9，分別增加了 48%及 33%，由此可知這些 metalloprotease 對於 HeLa cell 的 invasion 占很重要的角色，所以如果能抑制 HeLa cell 所分泌的 MMP-2 及 MMP-9 則可使不進行 invasion[7]。

除了最有效成分 T-2-1-1 之外，其他成分對於細胞的生長也有影響，由圖可知 M、B 及 C 組也對 HeLa cell line 有明顯抑制生長效果，只是沒有 T 組來的明顯(表 1 及表 2)。在 Collagenase inhibitor assay 中，M 組及 C 組有抑制效果，但 B 組沒有抑制效果(表 3)。在 Chymotrypsin 抑制檢測中 M、B 及 C 組也是有抑制效果，只是沒有 T 組抑制效大(圖 1)。相同的 T 組所分離成分中，T-3、T-4、T-5 及 T-6 對於 HeLa cell line 生長也有抑制的效果，但沒有 T-2 組抑制的程度大。而 T-2 所分離的成分 T-2-1 及再次分離的 T-2-1-1 也是對 HeLa cell line 生長有抑制的效果(表 1 及表 2)。在 Collagenase inhibitor assay 中，T-2、T-4、T-5 及 T-6 有抑制效果;T-1、T-3、T-7 及 T-8 沒有抑制效果。同樣的由 T-2 分離的成分 T-2-1 及再次分離的 T-2-1-1 也有抑制效果(表 3)。在 Chymotrypsin 抑制檢測方面，由 T 組所分離的 8 個成分都有抑制效果，但 T-2 的抑制效果最好，再由 T-2 所分離的 T-2-1 及再次分離的 T-2-1-1 也是對 Chymotrypsin 也是有抑制作用(圖 1)。

四、 計畫成果自評

本研究做出一個方向就是，靈芝三萜類在癌細胞實驗中，會使癌細死亡，in vitro 實驗中也看出靈芝三萜類會使蛋白質水解酵素受到抑制，再者最近研究不像早期偏重於成分鑑定，以及部分生理活性，包括抗過敏、降血脂，而是以酵素抑制作用做為生理活性之探討方向，腫瘤細胞發展過程中，經由蛋白質水解尤其以 metallo-proteinase 分解正常細胞之結締組織。並進行血管新生(agiogenesis) ，使腫瘤細胞經由血管得到養分補給，繼續進行細胞分裂，因此最近之文獻顯示包括:乳癌、膀胱癌等多種 solid tumor 細胞周圍均可測及 MMP (Matrix metallo-proteinase)之過度表現(overespression) ，並且指出腫瘤細胞之侵入性 (invasion) ，基本上源自 MMP 之大量分泌[2、3]。

因此如能藉由三萜類抑制 MMP，則可能將侵入性的腫瘤細胞轉為非侵入的腫瘤細胞，對於腫瘤治療上有很大意義，對於往後癌症的治療可作為輔助之用。再者把成分更精確的鑑

定出來對於靈芝三萜類如何抑制癌細胞生長的機轉更可以明朗化,對於期刊發表及申請專利有正面的幫助。

五、 參考資料

[1] 楊依珍 (1995): 靈芝屬三萜類成分之分佈模式與對肝功能及 HL-60 細胞之影響。臺北醫學院醫學研究所碩士論文

[2] Evans, J.D., Ghaneh, P., Kawesha, A., Neoptolemos, J.P. (1997) : Role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in pancreatic cancer. [Review][106 refs] Digestion.. 58(6):520-8.

[3] Seftor, R. E., Seftor, E. A., De Larco, J. E., Kleiner, D. E., Leferson, J., Stetler-Stevenson, W. G., McNamara, T. E., Golub, L. M., Hendrix, M. J. (1998) : Chemically modified tetracyclines inhibit human melanoma cell invasion and metastasis. Clinical & Experimental Metastasis.16(3):217-225.

[4] el-Mekkawy, S., Meselhy, M.R., Nakamura, N., Tezuka, Y., Hattori, M., Kakiuchi, N., Shimotohno, K., Kawahata, T., and Otake, T. (1998) : Anti-HIV-1 and HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*. Phytochemistry. 49(6):1651-1657.

[5] Min, B.S., Nakamura, N., Miyashiro, H., Bae, K.W., and Hattori, M. (1998) :Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory activity against HIV-1 protease. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 46(10):1607-1612.

[6] Toth, J. O., Liu, B., Ourisson, G. (1983) : Ganoderic acid T to Z : cytototoxic triterpenes from *Ganoderma lucidum*. Tetrahedron Lett. 24:1081-1084.

[7] Nuovo, G. J. (1997) : In situ detection of PCR-amplified metalloproteinase cDNAs, their inhibitors and human papillomavirus transcripts in cervical carcinoma cell lines. International Journal of Cancer. 71(6):1056-1060.

表 1　*G. resinaceum* 含酒精萃取物對於 HeLa 細胞細胞數目之影響

Code	Fraction	Cell number (1×10^6)		
		1 day	3 days	5 days
N.C.	RPMI 1640	1.12±0.07	1.90±0.09	4.26±0.07
P.C.	Retinoic acid	0.91±0.04	1.03±0.08*	0.60±0.02**
T		0.86±0.047	0.02±0.002**	0.0065±0.0004**
M	MPLC	1.17±0.01	0.98±0.005	0.90±0.05**
B	MPLC	1.14±0.015	1.33±0.05	1.15±0.08**
C	MPLC	1.07±0.037	1.00±0.042*	0.9±0.01*
T-1	PLC	1.1±0.065	2.62±0.037	4.55±0.06
T-2	PLC	1.05±0.012	0.40±0.09**	0.45±0.055**
T-3	PLC	1.3±0.05	0.66±0.03*	0.47±0.03**
T-4	PLC	1.29±0.11	1.01±0.06*	0.96±0.13**
T-5	PLC	0.94±0.05	0.73±0.095*	0.91±0.18*
T-6	PLC	1.04±0.09	1.20±0.05*	1.48±0.13**
T-7	PLC	0.94±0.05	2.05±0.037	4.20±0.09
T-8	PLC	0.98±0.03	1.77±0.08	3.72±0.03
T-2-1	PLC	1.01±0.06	0.14±0.025**	0.07±0.012**
T-2-1-1	PLC	0.97±0.14	0.098±0.03**	0.083±0.006**

1. Retinoic acid us as positive control (P.C.) : 1μM
2. *G. resinaceum* 酒精萃取物濃度 : 50μM/ml

Significantly different from N.C. : *p<0.05　　**p<0.01　(student`s t-test)

表 2 流式細胞儀分析 *G. resinaceum* 酒精萃取物對 HeLa 細胞生長之影響

Code	Fraction	% of inhibition			
		R1	R2	R3	R4
N.C.	RPMI 1640	5.20±0.44	41.49±0.71	15.05±0.57	19.78±0.87
P.C.	Retinoic acid	58.7±0.54**	27.32±0.53**	3.59±0.19**	5.15±0.26**
T		56.96±0.6**	26.80±0.15**	5.73±0.22**	4.93±0.24**
M		6.93±0.16*	42.30±1.00	15.01±0.66	22.5±0.27
B	MPLC	6.33±0.07	41.20±1.77	12.23±0.18*	19.35±0.50**
C		12.12±0.17**	35.69±0.17*	13.23±0.25	18.38±0.04
T-1		5.88±0.12	28.26±0.95**	9.22±0.34**	20.73±0.27
T-2		44.57±0.58**	22.83±2.26**	10.41±0.04**	8.93±0.05**
T-3		6.17±0.03	28.95±0.20**	10.01±0.14**	19.97±0.44
T-4		8.67±0.15**	33.02±0.99**	11.80±0.38*	20.31±0.32
T-5		10.22±0.12**	39.65±0.50	14.17±0.99	17.89±0.20
T-6	PLC	9.83±0.32**	37.50±0.61*	12.57±0.21*	17.82±0.27
T-7		6.20±0.03	28.82±0.22**	9.73±0.56*	19.47±0.74
T-8		6.11±0.28	29.95±0.28**	10.36±0.08*	19.32±0.31
T-2-1		67.45±2.7**	14.97±0.59**	5.28±0.55**	4.79±0.62**
T-2-1-1		73.59±0.67**	12.91±0.27**	4.67±0.17**	3.83±0.06**

1. Retinoic acid us as positive control (P.C.) : 1μM
2. *G. resinaceum* 酒精萃取物濃度 : 50μM/ml
Significantly different from N.C. : *p<0.05 **p<0.01 (student`s t-test)

R1 : 細胞碎片
R2 : G0/G1 phase
R3 : S phase
R4 : G2/M phase

表 3 *G. resinaceum* 含三萜類酒精萃取物於 Collagenase inhibitor assay 之檢測-以斜率表示其抑制程度

Code	Fraction	Slope
N.C.	RPMI 1640	0.86 E-6
P.C.	Retinoic acid	0.56 E-6
T	MPLC	-2.90 E-6
M		-2.50 E-6
B		2.20 E-6
C		-1.80 E-6
T-1	PLC	2.10 E-6
T-2		-2.70 E-6
T-3		1.14 E-6
T-4		-1.40 E-6
T-5		-1.50 E-6
T-6		-2.20 E-6
T-7		1.40 E-6
T-8		1.32 E-6
T-2-1		-3.20 E-6
T-2-1-1		-1.90 E-6

1. Retinoic acid us as positive control (P.C.) : 1μM
2. *G. resinaceum* 酒精萃取物濃度 : 50μM/ml

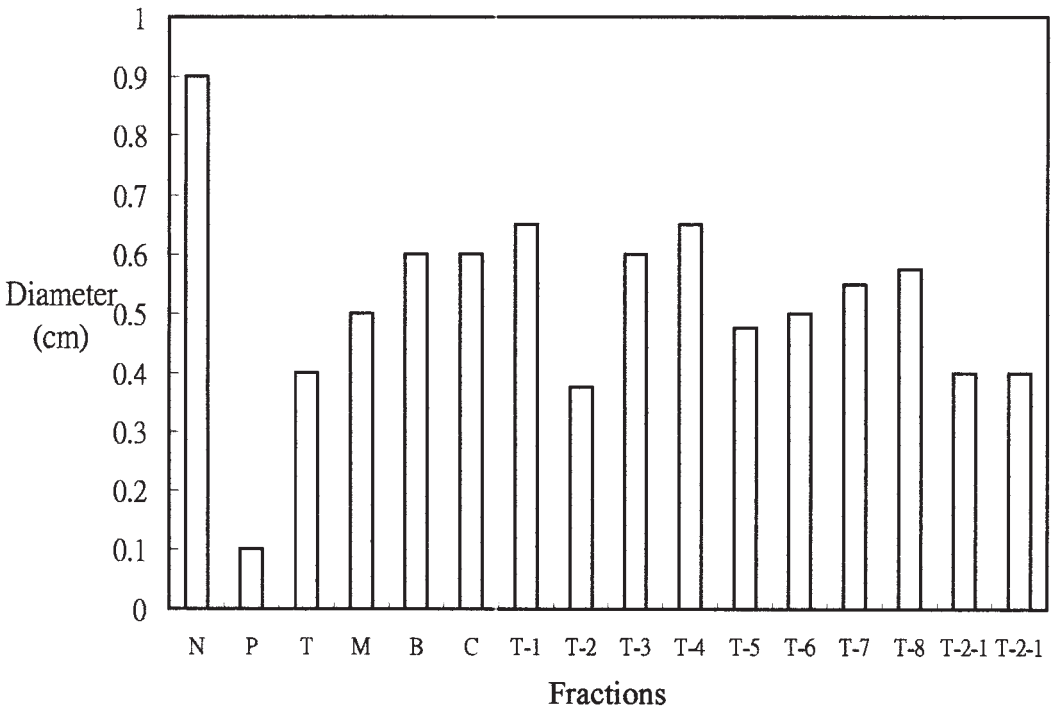

圖 1 *G. resinaceum* 含三萜類酒精萃取物於 Chymotrypsin 抑制活性之檢測統計圖