

## 農委會九十三年度科技計畫期末結案報告

一、細部計畫編號：93 農科-5.1.3 糧-Z3

細部計畫名稱：天然及人工栽培樟芝之降血脂功能評估

二、主持人：梁有志 / 執行單位：臺北醫學大學生物醫學技術研究所

英文摘要：

*Antrodia camphorata* (*A. camphorata*) is a kind of fungus and parasite on the inner heartwood wall of *Cinnamomum kanehirai* in wilderness. It is a Taiwan-specific and known traditional Chinese medicine, and has been used to treatment of diarrhea, hypertension, itchy skin, and liver cancer. It also exhibits several biological activities such as antioxidative and hepatoprotective activities. To gain large amount of *A. camphorata*, several culture technologies have been developed, including solid-type culture and liquid-type culture. However, different culture conditions affect the components of functional chemicals in *A. camphorata*. In this plan, first we want to investigate the possibility of *A. camphorata* on the hypolipidemic activity by cell-base experiment. Second, we want to compare the hypolipidemic effect of solid-type culture, liquid-type culture, and wildness *A. camphorata*. The results indicated that both extractions of solid-type culture and wildness were able to inhibit the FAS expression and induce the activation of PPARalpha or PPARgamma. However, extracts from liquid-type culture had a little effect on the inhibition of FAS expression and activation of PPARalpha or PPARgamma. Methanol extracts was shown to have more effects than water extracts in the inhibiting FAS and activating PPARalpha and PPARgamma. These results suggest that *A. camphorata* may exhibit a hypolipidemic effect and further studies are to examine the hypolipidemic effect by animal model.

中文摘要：

本計劃利用細胞株來評估天然及人工栽培(固態或液態)樟芝對脂質代謝的影響探討野生樟芝、固態栽培樟芝、液態培養樟芝，改善(或降低)血脂之可能性。實驗結果顯示，液態培養樟芝之各種萃取物均無法抑制脂肪合成酶，而固態栽培樟芝及野生樟芝對脂肪合成酶均有不同程度的抑制，其中又以甲醇萃取物的抑制效果最好，而固態栽培樟芝與野生樟芝的抑制效果是差不多的。另一實驗顯示，液態培養樟芝之各種萃取物均有些微增加 PPAR $\alpha$  或 PPAR $\gamma$ 活性的作用，而固態栽培樟芝及野生樟芝對 PPAR $\alpha$  或 PPAR $\gamma$ 活性有顯著增加其活性作用，其中又以甲醇萃取物的活化效果最好，而固態栽培樟芝與野生樟芝的活化效果是差不多的。實驗初步證實，固態

栽培樟芝與野生樟芝具有抑制脂肪合成酶(FAS)的表量及活化 PPAR 的活性，顯示固態栽培樟芝與野生樟芝可能具有降血脂的功能；而且固態栽培樟芝的生理功能與野生樟芝相似，顯示固態栽培之樟芝優於態栽培之樟芝。

## 前言

樟芝 *Antrodia camphorata* (Chang & Chou) W& Ryvardeen<sup>(1)</sup> 為台灣特有之藥用真菌，寄生於牛樟樹 (*Cinnamomum kanehirai*) 之心材內壁，或倒伏無樹皮之近土表的木材表面。野生樟芝逐漸枯竭，積極開發人工栽培之樟芝時有當務之急，目前樟芝有以液態發酵或固體栽培之技術，但其生理功能的成分是否有差異 值得進一步研究。

脂肪合成酶(fatty acid synthase, FAS) 是由二條相同的多功能的蛋白鏈組合而成，單一蛋白鏈含有七個不同功能的domains，二條蛋白鏈頭尾反向面對面形成複合體，其中心為組合脂肪酸之所在，可經由37個一系列反應，將acetyl- and malonyl-CoA 組合成palmitic acid，是形成脂肪的關鍵性酵素。脂肪合成酶抑制劑 可啟動體重下降路徑 (weight-reducing pathways)，而具有抗肥胖的作用。此外脂肪合成酶在能量代謝，肥胖，心血管疾病及癌症上，均扮演極重要的角色。例如，人類腫瘤常發現脂肪合成酶過度表現，而抑制脂肪合成酶，可選擇性造成腫瘤細胞死亡。先前的研究多數在尋找脂肪合成酶酵素活性的抑制劑，然而若能阻止脂肪合成酶基因的表現，更能達到抑制脂肪的形成。

過氧化体增殖因子活化受体(Peroxisome proliferator-activated receptors; PPARs)是一種依靠配位体(ligand)而活化的轉錄因子，與 thyroid hormone, retinoids, steroid hormone 及 vitamin D 的受体(receptor)，同屬核賀爾蒙受体大家族中的一員。三種 PPAR 已被鑑定出來，分別是 $\alpha$  form,  $\beta$  (又稱 NUC1) form 及  $\gamma$  form. 當與活化因子結合後，可調控多種基因的表現，這些基因的表現，在調節血脂及血糖生理上扮演著重要角色。PPARs 已知可被多種合成及天然化物所活化，包括降血脂藥物(如 clofibrate, WY 14643)，某些工業用化合物(如 phthalate ester metabolite)，非類固醇抗發炎藥物(如 indomethacin)及抗糖尿病藥物(如 rosiglitazone)。PPAR $\alpha$ 及 PPAR $\gamma$  已知可被內生性的 prostaglandin J2 衍生物及一些抗糖尿病的合成藥物，如 thiazolidinediones 所活化，它在調控脂質、糖類的代謝，脂肪組織的分化及能量的恆定，扮演重要的調控角色。近來發現 PPAR $\gamma$ 在免疫系統上，具有抗發炎的功能，且在動物及細胞實驗上發現 PPAR $\gamma$ 具有對抗腫瘤生長的現象；活化 PPAR $\gamma$ 似乎也可減緩動脈粥狀硬化的進行。

## 方法與材料

- (1) 不同來源樟芝以冷水、熱水、甲醇萃取 (得自子計畫一) 後, 冷凍乾燥後保存之, 使用前以 DMSO/water = 1/1 溶劑溶解使用。
- (2) 肝腫瘤細胞株 Hep3B 以 MEM 培養基加入 10% 胎牛血清培養之; 而小鼠 RAW264.7 細胞株以 RPMI 培養基加入 10% 胎牛血清培養之。
- (3) 肝 Hep3B 細胞以 EGF (epidermal growth factor) 增加其表現脂肪合成酶 (FAS), 同時加入不同來源樟芝以冷水、熱水、甲醇萃取物, 24 小時後以 Western blot 技術測量到 Fatty acid synthase (FAS) 的蛋白質的表現。評估 FAS 之蛋白的表現, 若有明顯下降, 表示樟芝有可能抑制脂質合成, 達到降血脂之效果。
- (4) RAW264.7 細胞轉殖會表現 PPAR $\gamma$  或 PPAR $\alpha$  之質體 (pPPAR $\gamma$  plasmid) 及 PPARE 報告基因 (AOx-TK reporter plasmid), 再處理不同來源樟芝之冷水、熱水、甲醇萃取物, 24 小時後, 測量報告基因的表現。評估報告基因之表現量為測量冷光之強度, 若冷光強度高於基本值, 則可能有活化 PPAR 的能力, 亦即有降血脂的功能。

## 結果與討論

1. 不同來源樟芝以冷水、熱水、甲醇萃取, 再以這些萃取物處理肝細胞 24 小時後, 以西方墨點法偵測脂肪合成酶(FAS)的表現量, 結果如表一所示, 液態培養樟芝之各種萃取物均無法抑制脂肪合成酶, 而固態栽培樟芝及野生樟芝對脂肪合成酶均有不同程度的抑制, 其中又以甲醇萃取物的抑制效果最好, 而固態栽培樟芝與野生樟芝的抑制效果是差不多的。

2. 小鼠吞噬細胞 RAW264.7 先轉殖會表現 PPAR $\alpha$  或 PPAR $\gamma$  以及 PPARE 報告基因的質體 若 PPAR 被活化 則 PPAR 會結合到 PPARE 的 DNA 序列 啟動 PPARE 上報告基因的表現 此報告基因會做出冷光酶蛋白 在冷光試劑存在下會放出冷光 再利用冷光儀測量之 實驗開始後上述細胞處以不同來源樟芝的冷水、熱水、甲醇萃取 24 小時後, 以冷光儀測量冷光之表現量, 結果如表二、三所示, 液態培養樟芝之各種萃取物均有些微增加 PPAR $\alpha$  或 PPAR $\gamma$  活性的作用, 而固態栽培樟芝及野生樟芝對 PPAR $\alpha$  或 PPAR $\gamma$  活性有顯著增加其活性作用, 其中又以甲醇萃取物的活化效果最好, 而固態栽培樟芝與野生樟芝的活化效果是差不多的。

3. 上述實驗初步證實, 固態栽培樟芝與野生樟芝具有抑制脂肪合成酶

(FAS)的表量及活化PPAR的活性,顯示固態栽培樟芝與野生樟芝可能具有降血脂的功能;而且固態栽培樟芝的生理功能與野生樟芝相似,顯示固態栽培之樟芝優於態栽培之樟芝。由於此份報告所試驗的樣品上嫌不足正確的資料以所發表的論文為準。之後我們還將進行動物實驗來證實樟芝的確具有降血脂的生理功能。

表一、不同來源樟芝萃取物對脂肪合成酶(FAS)蛋白質之抑制作用。

	液態培養樟芝	固態栽培樟芝	野生樟芝
冷水萃取物#	99.1 ± 1.8 %##	85.4 ± 3.5 %	81.8 ± 1.9 %
熱水萃取物	97.5 ± 3.2 %	83.8 ± 1.7 %	79.5 ± 3.1 %
甲醇萃取物	98.2 ± 1.3 %	79.2 ± 2.2 %	75.0 ± 1.6 %

# 各種萃取物的使用濃度均為 100 µg/ml。

## 數字為脂肪合成酶蛋白質的含量相對於控制組的百分比;控制組之脂肪合成酶含量定為 100%。

表二、不同來源樟芝萃取物活化  $PPAR\alpha$  之作用。

	液態培養樟芝	固態栽培樟芝	野生樟芝
冷水萃取物#	1.2##	1.6	1.5
熱水萃取物	1.3	1.9	1.8
甲醇萃取物	1.2	2.1	2.2

#各種萃取物的使用濃度均為 100 µg/ml。

##數字為冷光強度相對於控制組的倍數;控制組之冷光表現量定為 1。

表三、不同來源樟芝萃取物活化  $PPAR\gamma$  之作用。

	液態培養樟芝	固態栽培樟芝	野生樟芝
冷水萃取物 <sup>#</sup>	1.1 <sup>##</sup>	2.1	2.0
熱水萃取物	1.3	2.5	2.4
甲醇萃取物	1.7	3.5	3.5

<sup>#</sup>各種萃取物的使用濃度均為 100  $\mu\text{g/ml}$ 。

<sup>##</sup>數字為冷光強度相對於控制組的倍數；控制組之冷光表現量定為 1。