

臺北醫學大學 醫學科學研究所 微生物免疫組

碩士論文

Department of Microbiology and Immunology

Graduate Institute of Medical Science

Taipei Medical University

Master Thesis

牛樟芝萃取物中與兩性黴素協同抗癌成分之探討

Study on components of *Taiwanofungus camphoratus* for
anti-cancer synergistic effects with Amphotericin B

研究生：黃元辰 Yuan-Chen Huang 撰

指導教授：蘇慶華 博士

Advisor：Ching-Hua Su, Ph. D.

中華民國 一百年 七月

July, 2011

臺北醫學大學碩士學位考試委員審定書


論文題目(中文) 牛樟芝萃取物與兩性黴素之抗癌毒殺協同作用之研究


(英文) Study on components of *Taiwanofungus camphoratus* for anti-cancer synergistic effects with Amphotericin B


本論文係 黃元辰 君 (學號 M120098007)臺北醫學大學醫學院醫學科學研究所完成之碩士學位論文，承下列委員審查通過及口試及格，特此證明。

論文考試委員：

召集人簽名 
(許瑞祥 教授，台灣大學生化科技學系)

委員簽名 
(蔡英傑 教授，陽明大學生化暨分子生物研究所)

委員簽名 
(許明照 教授，臺北醫學大學藥學系)

委員簽名 
(蔡翠敏 教授，臺北醫學大學生醫材料暨工程研究所)

指導教授簽名 
(蘇慶華 教授，臺北醫學大學醫學科學研究所)

中華民國 一 百 年 七 月 四 日

臺北醫學大學電子暨紙本學位論文書目同意公開申請書

(本文件影本與論文一併裝訂)

申請人姓名	黃元辰	畢業年月	民國 100 年 7 月
學號	M120098007	系所名稱	醫科所微免組
聯絡電話	0934022502	學位	<input checked="" type="checkbox"/> 碩士班 <input type="checkbox"/> 博士班
電子郵件	atsnnc@gmail.com		
論文題目	牛樟芝萃取物中與兩性黴素協同抗癌成分之探討		
同意項目			
<input checked="" type="checkbox"/> 立即公開	※若選擇立即公開，相關研究成果即將喪失申請專利權利		
<input type="checkbox"/> 延後公開 含紙本論文及電子 論文書目資料(包 含書目、目次、摘 要、引用文獻)	延後公開原因：		
	公開日期： 中華民國 年 月 日起(年限最長為5年)		
	備註 1：紙本論文(平裝本)連同本申請書正本提供教務處；另提供紙本論文予圖書館(精裝本)及系所(平裝本)，各保管單位應盡保密責任。 備註 2：電子論文全文延後公開，請於系統提交論文時務必於系統上勾選延後公開及設定時間。		

申請人簽名： 黃元辰

指導教授簽名： 李慶華

研究所所長簽名： 醫科所 所長 李文森

申請日期：中華民國 100 年 7 月 22 日

臺北醫學大學學位考試保密同意書暨簽到表

(本文件影本與論文一併裝訂)

學位考試基本資料：

論文題目	牛樟芝萃取物與兩性黴素之抗癌毒殺協同作用之研究		
	<i>effect</i>		
	Study on anti-cancer synergistic therapy based on extracts of Taiwanofungus camphoratus and Amphotericin B		
指導教授	蘇慶華	職 稱	教授
學生姓名	黃元辰	系 所	醫學科學研究所
		學 號	M120098007
考試時間	100 年 7 月 4 日 上/下午 10 時 00 分		
考試地點	醫學綜合大樓 12 樓		

本論文考試涉及揭露方所告知或交付之研發成果或技術秘密等重要智慧財產權，該機密資訊為揭露方所擁有之法定權利或期待利益，僅限以下特定人士參與，所有與會者了解並同意對參與本考試所接觸到之機密內容保守秘密，不得自行利用或以任何方式使第三人利用「機密資訊」或取得任何權利，直到本論文開放閱覽或完成專利申請為止。

考試委員簽署：

姓名	服務單位	職稱	簽名
許瑞祥	台大生化科技學系	教授	許瑞祥
蘇英傑	陽明大學生化所	教授	蘇英傑
蔡翠敏	北醫生工所	教授	蔡翠敏
翁厚平	北醫微生物所	教授	翁厚平
邱明煌	北醫藥學系	教授	邱明煌

致謝

經過一年的扎根訓練，一年的投入，終於完成了碩士論文，也以論文撰寫完成，為我的學生生涯畫下句點。在這一路上，感謝許多人的幫助與指引，讓我在學術知識與個人發展上都獲得許多充實與成長。首先要謝謝指導教授蘇慶華老師，您的督促與指導讓我在探索管理知識之路上收穫良多，最重要的是學到負責任、誠正的做人處事態度，雖然老師身兼數職依然不忘對我細心的教導。感謝口試委員老師的建議與溫馨的鼓勵，蔡翠敏老師深入的見解與指教。還有微免組師長們的指點，是自我培育過程的明燈！

感謝方陌、楷誠這些無論在課業與生活的日子互相砥礪，最要感謝熱心助人的瑋寧對大家的照顧。朝澧學長、明莉、雅柏與Ivy在這一段承受壓力的辛苦日子裡的貼心問候與生活上的照應，與大家同在一個實驗室是非常愉快的事，雖然中途實驗室搬遷無數，但動搖不了彼此的關心。感謝微免組所有同學的關懷與互相幫助。

宣告學生生涯結束，再次踏入社會之際，我最要感謝我的父母為孩子的犧牲與苦心栽培，希望我的努力能讓你們感到欣慰與驕傲。

黃元辰

謹誌于 2011 年 7 月

中文摘要

根據實驗室之前研究樟芝酒精萃取抗癌活性指出，癌細胞株經樟芝酒萃物處理後不僅顯示能促進癌細胞凋亡，另外再藉由先處理低劑量之樟芝萃取物後，再搭配兩性黴素 B 使用，更具有協同作用性。兩性黴素 B 是常見之抗真菌藥劑，藉由與真菌細胞膜上所嵌之麥角甾醇結合產生孔洞而造成細胞膜通透性的改變，因而細胞產生裂解造成真菌細胞死亡。因此，我們假設樟芝萃取物中含有某種脂醇物質對於兩性黴素 B 具有高親和力，而且這些脂醇容易取代癌細胞膜上的膽固醇，使得兩性黴素 B 易於結合。本假說亦推測癌細胞膜上的磷脂質與正常細胞有所不同，導致樟芝中的特定脂醇更容易替換癌細胞而非正常細胞上的膽固醇。透過不同極性的有機溶劑來萃取樟芝固態子實體，其粗萃取後搭配兩性黴素 B，結果顯示經正己烷粗萃取所得成份對於抑制大腸直腸癌細胞株 HT-29 具有最佳之協同抑制性。藉由製備型色層分析所分離正己烷粗萃取所得兩區域，為在波長 254 nm 下呈現短波藍色區域簡稱 SB 以及可見光下紅色區域簡稱 LR 兩部份與兩性黴素 B 共同作用最具協同效果，其產量約為 0.01%。藉由 MTT 細胞存活試驗顯示，LR 在單獨處理癌細胞株後相較於 SB 低，其相對存活率分別為 80.87 % 與 64.12 %，然而先以 5 $\mu\text{g/ml}$ 的 LR 處理，再搭配濃度 3 $\mu\text{g/ml}$ 的兩性黴素 B 24 小時後，使相對存活率由 $85.81 \pm 3.39 \%$

降低至 $47.3 \pm 3.88\%$ 。當進一步針對 LR 萃取物以製備型色層分析法分析，另可得到 LR-LG、LR-1、LR-R 等三種成分。其中 LR-LG 和 LR-R 此兩成份與兩性黴素 B 具有劑量依賴性，能以低劑量即可達到最佳協同作用，故推測此兩成份具有目標成份。LR-LG/LR-R 和兩性黴素 B 透過結合使用不僅可以降低及減少細胞毒性，又可以當作一種抗癌療法，因此 LR-LG 和 LR-R 此兩成份之化學結構值得再更深入的研究與探討。



英文摘要

Our previous study on anti-tumor activity of *Taiwanofungus camphoratus* alcohol extract (TCAE) suggested that the treatment of TCAE on HT-29 colon cancer cell line not only promoted apoptosis but also conferred a synergistic effect by pretreating a small dose of TCAE at first and then combined with amphotericin B (AmB) of HT-29. AmB is a common antifungal agent used to treat systemic fungal infection by direct binding to ergosterol resulted in producing pore in fungal membrane which led to cell death. Therefore, we hypothesized that the extract of *T. camphoratus* contains a certain kind of sterol that has higher affinity to AmB and these sterols can easily replace the existing cholesterol in the cell membrane of cancer cells and then the replaced sterols became the target of AmB later on. The hypotheses also suggested the the phospholipid composition of cancer cells might be different from normal cells that attracted easier than normal cells to the sterols from *T. camphoratus*. Organic solvents in different polarity were employed to extract solid state cultivated *T. camphoratus* and n-hexane was found to be the most effective solvent for the extraction of AmB synergistic component to inhibit the growth HT-29 cell line other than TCAE. The n-hexane extract was separated by preparative thin layer chromatography (PLC) and two fractions (SB and LR) were found to be active in synergistic to AmB. SB demonstrated blue band under 254 nm UV and LR was a red color fraction under visible light spectrum with the yield around 0.01% for both fractions. MTT assay indicated that LR fraction had a low cytotoxicity to both HT-29 and normal cell HEK-293 when LR and SB is used alone with the relative survival rate at 80.87 % and 64.12 %, respectively. However, if 5 μ g/ml of LR was pretreated to HT-29 and combined with 3 μ g/ml of AmB for 24 hr later, the survival rate was dropped to 47.3 \pm 3.88 %. Three components were obtained LR-LG, LR-1 and LR-R by further purification by PLC. LR-LG and LR-R were suggested to be the target components with a synergistic effect in dose dependent manner with AmB. The combined use of LR-LG / LR-R and AmB could be useful for the therapy of cancer for both the doses of LR-LG/LR-R and AmB can be minimized and less cytotoxicity was observed to normal cell in this administration system. The chemical structure of LR-LG and LR-R are under investigation.

主目錄

致謝	I
中文摘要	II
英文摘要	IV
主目錄	1
圖表目錄	3
第一章 研究內容	5
1-1 前言	5
1-2 文獻回顧	8
1-2-1 細胞膜之組成	8
1-2-2 脂質	9
1-2-3 牛樟芝	11
1-2-3-1 命名與分類	12
1-2-3-2 生理活性	13
1-2-3-3 多醣體	14
1-2-3-4 三萜類	15
1-2-3-5 抗癌功能	19
1-2-4 兩性黴素 B	29
1-2-4-1 作用與用途	29
1-2-4-2 藥理機制	29
1-2-4-3 藥物用量及其副作用	29
1-2-4-4 討論	30
第二章 研究目標	33
第三章 實驗材料與方法	34
3-1 細胞來源與培養條件	34
3-1-1 細胞來源	34
3-1-2 培養條件	34
3-2 實驗材料與儀器	35

3-3 實驗流程圖	38
3-4 實驗方法	39
3-4-1 三萜類萃取及純化分析	39
3-4-1-1 樟芝有效成分之萃取	39
3-4-1-2 TLC 薄層液相色層分析法	39
3-4-1-3 PLC 製備型液相色層分析法	40
3-4-1-4 HPLC 高效能液相色層分析法	40
3-4-2 樟芝對於大腸癌細胞株與正常細胞株之影響	41
3-4-2-1 四錯鹽分析法測試細胞毒性(MTT tetrazolium salt assay) :	41
3-4-2-2 細胞膜脂質萃取	42
3-4-2-3 統計分析	42
第四章 實驗結果	43
4-1 樟芝與兩性黴素 B 結合能力	43
4-2 樟芝與兩性黴素 B 不同濃度對於大腸直腸癌細胞株(HT-29)與正常細胞株 (HEK-293)影響	46
4-3 樟芝與兩性黴素 B 結合能力對於大腸直腸癌細胞株(HT-29)的影響	49
4-4 樟芝不同極性萃取方式對於大腸直腸癌細胞株(HT-29)的影響	50
4-5 正己烷(n-Hexane)萃取之化合物對於大腸直腸癌細胞株(HT-29)的影響	51
4-6 正己烷(n-Hexane)萃取之 LR 分析	54
4-7 正己烷(n-Hexane)萃取之 LR 對於大腸直腸癌細胞株(HT-29)的影響	58
4-8 酒精萃取之樟芝粗萃物對於大腸直腸癌細胞株(HT-29)與正常細胞株 (HEK-293)細胞膜脂質的影響	60
第五章 實驗討論	61
第六章 結論	64
第七章 參考文獻	66

圖表目錄

圖 1-1	三萜類的合成機制 ³⁴ 。.....	22
圖 1-2	1992 年高曉葳從野生樟芝分離出的三種氧化型三萜類 ³⁵ 。.....	23
圖 1-4	1996 年 Yang 等人發現的 2 種以 ergostane 為骨架的新化合物，分別是 Zhankuic acid D(2)和 Zhankuic acid E(5)，以及發現 3 種以 lanostane(6~8) 為骨架的新化合物 ³⁷ 。.....	24
圖 1-5	1995 年 Cherng 從樟芝子實體用甲醇萃取出，以 ergostane 為骨架的新三萜類化合物 antcin A(1)，antcin B(2)，antcin C(3) ³⁹ 。.....	25
圖 1-6	Chiang 等人 1995 年從子實體萃取出物中找到三種新的三萜類化合物，分別是 antrocine (1)、4,7-dimethoxy-5-methyl-1,3-benzodioxole (2) 和 2,2,5,5,-tetramethoxy-3,4,3,4-bi-methyl-enedioxy-6,6-dimethylbiphenyl (3) ³⁹ 。.....	25
圖 1-7	1996 年 Cherng 等人再度從樟芝子實體的新發現四種三萜類化合物：antcin E(5)、antcin F(6)、methyl antcinate G(7a)、methyl antcinate H(8a) ³⁸ 。.....	26
圖 1-8	2003 年 Shen 從牛樟芝子實體酒精萃取物分離出成份 ⁴⁰ 。.....	27
圖 1-9	2008 年 Male 由樟芝子實體所分離出來的八種三萜類 ⁴² 。.....	27
圖 1-10	2004 年 Nakamura 所分離出的衍生物 3-isobutyl-4-[4-(3-methyl-2-butenyloxy)phenyl]-1 <i>H</i> -pyrrole-2,5-dione by X-ray analysis ⁴³ 。.....	28
圖 1-11	2003 年 Shen 等人分離出來的 MMH01 結構，由 Chen 等人證明具有對抗人類白血病與胰腺癌細胞能力。.....	28
圖 1-12	兩性黴素與 Cholesterol、ergosterol 結構示意。.....	32
圖 2-1	實驗假說，單獨處理樟芝和樟芝與兩性黴素 B 協同作用。.....	33
圖 4-1	<i>T. camphorata</i> and AmB combination test.	44
圖 4-2	高效能液相層析圖譜，野生樟芝(紅色)，絕對酒精初萃物(綠色)，95% 酒精初萃物(藍色).....	45
圖 4-3	Cell proliferation by MTT assay was performed on HT29 and HEK-293 after treatment with TCAE at different concentrations.	47
圖 4-4	Cell proliferation by MTT assay was performed on HT29 and HEK-293 after treatment with Amphotericin B at different concentrations.	47
圖 4-5	Cell proliferation by MTT assay was performed on HT29 pretreatment of	

	TCAE at different concentrations then treat with Amphotericin B at different concentrations.	48
圖 4-6	Cell proliferation by MTT assay was performed on HT29 co-treatment of TCAE with Amphotericin B or pre-treatment of TCAE with Amphotericin B.	49
圖 4-7	Cell proliferation by MTT assay was performed on HT29 pre-treat different polarity solvent 25 µg/ml.....	50
圖 4-8	Preparative-layer chromatograms obtained from n-Hexane extraction of TCAE.....	52
圖 4-9	Cell proliferation by MTT assay was performed on HT29 after treatment with n-Hexane extraction of TCAE(A), PLC purification position, LR and SB (B) at different concentrations pre-treatment of LR(C) or SB(D) with Amphotericin B.....	53
圖 4-10	Preparative-layer chromatograms obtained from n-Hexane extraction of TCAE by different solvent.....	55
圖 4-11	Thin-layer chromatograms compare with n-Hexane extract and ethanolic extract.	56
圖 4-12	Preparative-layer chromatograms obtained from n-Hexane extract, LR..	57
圖 4-13	Cell proliferation by MTT assay was performed on HT29 after treatment with n-Hexane extraction of TCAE,LR after PLC purification position, LR-R(A) and LR-1(B) and LR-LG (C).....	59
圖 4-14	Thin-layer chromatographs of lipids isolated from cell line HT-29 and HEK-293 with or without TCAE	60

第一章 研究內容

1-1 前言

根據行政院衛生署於民國九十九年的統計，惡性腫瘤仍為國人十大死因之首，其中又以肺癌、胃癌、肝癌、結腸直腸癌和食道癌為男性死亡之前五大癌症，而乳腺癌、肺癌、胃癌、結腸直腸癌和子宮頸癌則為女性前五大癌症¹。由於文明快速發展，生活環境中含有許多無形的有害物質，長時間曝露於此種環境中將對身體有所傷害，而經過流行病學及統計學研究，顯示大約有八成的癌症是由外在因素所引起，其中包括生活方式的改變、傳染病造成之感染因素、職業及其環境造成之因素等，而當中又以化學致癌物為最具危險之因子，化學致癌物一旦經人體吸收進入體內經過代謝活化，將可能導致細胞內基因發生一連串的突變，使細胞失去控制而持續不斷分裂生長，最終導致腫瘤細胞之形成²。也因此各種針對癌症的治療方式不斷被研發，包含化療、放射線治療、免疫療法、單株抗體療法等，然而其中亦突顯出許多問題，如化療所產生一連串的副作用或者病患對藥物產生抗藥性及藥物專一性等問題³。一般癌症治療不如其他疾病具有單一處方，因此若能研究出單一且專一性的「癌症治療法」也就相當重要，為解決此問題，除研發癌症預防藥劑外，也開始往天然食物研究，篩選出具有抗癌潛力之功能性食物或營養食物也變成一個重要的方向⁴。在

過去研究中亦有許多中草藥被推測具有抗癌效果，其中天然藥物-牛樟芝在近幾年的文獻中被認為不僅只是有保肝之效，還因其萃取物中富含三萜類及多種醇類，可對細胞造成毒性，被推測有抗癌之效⁵。

1979 年 Julia Dieckam 等學者利用轉殖技術使 AKR 小鼠罹患白血病，經由兩性黴素 B (Amphotericin B，簡稱 AmB) 處理後發現其具有對抗白血病細胞株之抗癌能力，推測兩性黴素 B 具有毒殺癌細胞之作用⁶。1986 年 Shimokawa 等學者藉由改變 *Candida albicans* (白色念珠菌) 細胞膜上的 sterol (甾醇) 組成，由 cholesterol (膽固醇) 置換為帶有較多雙鍵結構的 lanosterol (羊毛甾醇) 造成細胞膜通透性之改變⁷，如此可以利用 ergosterol (麥角甾醇) 或是其他 sterol 以取代癌細胞膜上的 cholesterol，提高其對於多烯類之抗真菌藥物的親和力，達到毒殺作用^{8,9}。因此，1999 年 Feigin 等學者提出利用改變 sterol 的組成可能可以做為新的癌症治療方法，實驗中利用高膽固醇飲食並使用膽固醇合成抑制劑- AY-9944，使膽固醇合成過程中皆停留於膽固醇前驅物 - 7-Dehydrocholesterol。由於肝癌細胞代謝速度高於正常肝細胞，因此可在癌細胞中大量累積 7-Dehydrocholesterol，可能造成癌細胞中膽固醇相關功能受損並對於抗癌藥劑耐受性降低。此時再分別加入兩性黴素 B，因 7-Dehydrocholesterol 此結構所含雙鍵多於 cholesterol，兩性黴素 B 對於前者親和力較大即造成癌細胞膜上之阻隔性變差，因

此推測此方法可做為癌症療法^{10,11}。

先前研究報告顯示癌細胞經樟芝酒精初萃物處理後搭配兩性黴素 B，可以有效抑制癌細胞株生長，並且發現以低劑量樟芝萃取物搭配兩性黴素 B 即有良好的效果¹²，透過細胞流式儀分析亦顯示經此處理後可促進細胞凋亡，使大腸癌細胞株停留於 G2/M 期，而細胞內蛋白質轉錄轉譯方面，利用西方墨點法再透過特定抗體針對其訊號傳遞，顯示不但會減少抗細胞凋亡因子 Bcl-2、Bcl-XL，並同時活化凋亡因子 procaspase-3、procaspase-9、Bax，也會導致胞內粒線體膜上的不穩定。除體外細胞試驗，針對小鼠餵食樟芝粉末及兩性黴素 B，觀察其體內腫瘤變化，經過測量發現有顯著縮小趨勢。

本論文主要目的為檢視樟芝萃取物與兩性黴素 B 的搭配是否對於人類大腸直腸癌細胞株具有協同作用，同時盼能進一步得知樟芝萃取物中何種化合物能與兩性黴素 B 結合而導致細胞穿孔死亡，最後將所篩選出來的化合物經過高效能液相層析(HPLC)與質譜儀(MS)來確認化合物結構，進一步分析確認化合物與細胞膜之間的關係，如此可了解正常細胞與癌細胞之間是否因為細胞膜上磷脂質結構有所差異或膜上所嵌入之醇類不同，導致受到藥物刺激後呈現出不同結果。

1-2 文獻回顧

細胞是構成動物及植物的基本單元，而這些基本單元皆由細胞膜來區隔細胞內外，將不同的介質及組成分隔出來，構成一個適合細胞器進行作用的特殊空間，細胞膜上嵌有一些特殊蛋白質及酵素，是細胞與周圍環境及細胞與細胞間進行物質交換、信息傳遞的重要路徑。原生質膜透過其上之孔隙與跨膜蛋白所賦予之某些功能，使細胞膜對於物質運輸具有選擇性調控作用。此外，細胞內之胞器如內質網膜上所鑲嵌的特殊蛋白質可產生能量，以提供生物體活動¹³。

1-2-1 細胞膜之組成

細胞膜的基本成分為脂質、蛋白質及醣類，其中佔最大比例為脂質。生物體中脂質的比例以磷脂質(phospholipids)占最主要，第二為固醇脂，其餘為醣脂。這些脂類分子皆具有雙親性(amphiphilic)，頭部為親水區，尾部為親油厭水區，由不同長度的碳鏈構成¹⁴，其中磷脂質之頭部區域含有一磷酸根。當雙親性分子存在於水相環境時，其尾部因厭水性會使所有的磷脂質尾部聚集在一起，形成上下兩層尾部對尾部之單層細胞膜 (lipid bilayer)，此現象稱之為疏水效應(hydrophobic effect)，而此單層細胞膜中的脂質非固定不動，而是可做動態的二維流動及上下層的翻動。

1-2-2 脂質

磷脂質又可由頭部分子群及尾部碳鏈的長度來區分種類。由頭部區分則有 phosphatidyl-choline (PC)、phosphatidyl-glycerol (PG)、phosphatidyl-ethanolamine (PE) 等，且各分子在空間上佔不同大小，亦具不同電性，PG 帶一個負電荷，PC、PE 為中性不帶電。其中 PC 在生物體中含量最多為最重要的成分。此外，尾部碳鏈又可依碳鏈長度及碳鏈是否彎折來做區分¹⁵，磷脂及醣脂的脂肪鏈通常為偶數碳，數目介於 16 至 20 個碳之間，一般來說 16 及 18 個碳的脂肪酸最常見，而無論是飽和脂肪酸或含有雙鍵的不飽和脂肪酸其構行皆為順式，而其碳鏈的長度及不飽和程度皆會影響磷脂質的流動性，在某些生物體可以調控細胞膜流動性，透過改變其磷脂質組成稱作 homeoviscous adaptation¹⁶。整個細胞膜是疏水性尾部相互作用，利用非共價鍵方式固定在一起，然而這結構是相當具有流動性而非堅硬固定，代表這些磷脂質分子可再細胞膜層間自由擴散且可以快速的往側向移動，但在內外層之間的雙層膜中交換卻是相當緩慢的過程，而細胞膜內的膽固醇在這些疏水性尾部的細胞膜是不規則分布且不同密度的分散，會影響細胞膜的硬化程度。

經上述可以知道脂質對於構成生物體細胞膜具有相當重要的角色，不僅在於本身雙極性所構成的雙層磷脂質，也是能量重要的來源，

若其過度儲存或使用都會造成能量的不平衡，而導致代謝發展上的疾病。脂質也會透過共價鍵或是非共價鍵的方式與蛋白質作連結，另外除蛋白質可以當作細胞傳導之介質，脂質在自體免疫反應中也直接或間接作為訊號傳導的分子用以維持胞內平衡，而這些訊號分子可以是神經傳導物質、荷爾蒙或是細胞激素¹⁷。在許多文獻中指出，透過脂質介質可以調節細胞增生與分化，隨著對脂質愈來愈深入的研究，跟隨著基因體學還有蛋白質體學的發展，也獨自行伸出一門脂質體學，稱Lipidomics^{18,19}，其內主要研究生物系統內與脂質有關的細胞途徑，脂質體(lipidome)用來說明完整的細胞、組織與器官中脂質的架構。為了能夠研究脂質體學，主要是透過日新月異的電子技術，包括質譜儀(mass spectrometry, MS)、飛行時間二次離子質譜儀(time of flight secondary ion mass spectrometry, TOF-SIMS)、核磁共振光譜儀(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)、螢光光譜儀(fluorescence spectroscopy)、雙偏極干涉儀(dual polarisation interferometry, DPI)及一些相關計算方法²⁰，了解細胞內功能的變化，因此透過上述之分析方法及追蹤細胞內平衡，鑒定數以千計的細胞脂質分子種類及與其他脂肪、蛋白質和代謝產物的交互定量並透過研究檢查結構、功能、相互作用和細胞脂質代謝²¹，同時經由臨床上針對脂質代謝相關疾病如肥胖、動脈粥樣硬化、中風、高血壓和糖尿病等的研究，同時再配合

基因體學與蛋白質體學之研究，構成一個完整的系統生物學架構²²。

1-2-3 牛樟芝

牛樟芝 (*Taiwanofungus camphoratus* Wu et al.)是臺灣特有品種，民間的稱呼有樟菇、樟菰、樟內菰、牛樟菇或紅樟，視為中國傳統醫學中的重要藥材之一，過去被原住民做為治療肝病及食物、藥物中毒之用。是一種只能寄生於牛樟樹 (*Cinnamomum kanehirai* Hay) 樹洞內壁的寄生真菌，造成牛樟樹木材腐朽，中心空洞，最後倒伏的元兇²³。牛樟樹在臺灣地理上的分佈可劃分為四區，目前主要生產地分佈在桃園縣、苗栗縣、南投縣、高雄縣、台東縣的海拔 450 公尺至 1500 公尺的深山中²⁴。牛樟樹本身有濃厚香氣，為優良之驅蟲劑，目前已有研究發現牛樟樹精油之主要成分 terpineol、safrole、camphor 在低濃度下，可促進樟芝之生長速度，但對靈芝、雲芝及茯苓等常見菇類則無此效應²⁵。牛樟樹為台灣特有的常綠闊葉大喬木，與一般常見之樟樹不同，葉長約 15 cm，寬約 9 cm，適用於雕刻及製作高級家具，生長於 200-2000m 的山區。

1-2-3-1 命名與分類

牛樟芝之命名最早為 1990 年大陸著名真菌學者—昆明植物研究所的 臧穆 教授與臺灣台北醫學大學 蘇慶華 博士共同發表「我國臺灣產靈芝屬一新種—樟芝」，宣告樟芝為靈芝科真菌中的新種 *Ganoderma camphoratum*²⁶。1995 年，臺灣省林業試驗所的 張東柱 博士等人對樟芝種名進行訂正，將其歸入多孔菌科薄孔菌屬之新種，命名為 *Antrodia cinnamomea* (Zang & Su, 1990)，對樟芝子實體的外觀、氣味、生長速度、孢子顯微結構等，均有詳細記載²⁷。1997 年，吳聲新等人整合前兩次文獻內容後，再次訂正樟芝種名，將樟芝重新命名為 *Antrodia camphorata* Zang & Su²⁸。2004 年學者吳聲華教授等人重新鑑定牛樟芝 LSU rDNA 序列及 SSU rDNA 序列，結果發現其形態特徵雖接近 *Antrodia* 及 *Antrodiella*，但與其親源並不接近，且與縣芝的多孔菌各屬均不相符，因此提出多孔菌新屬：台芝屬 (*Taiwanofungus*)，並重新提出樟芝的新的組合名：*Taiwanofungus camphorates*，樟芝在學界有了正式的歸屬。

牛樟芝在分類上，屬於：

真菌界 Fungi

擔子菌門 Basidiomycota

擔子菌綱 Basidiomycotina

同擔子菌亞綱 Homo Basidiomycetes

非褶菌目 Aphlllophorales

多孔菌科 Polyporaceae

台芝屬 *Taiwanofungus*

樟芝種 *camphorates*

1-2-3-2 生理活性

根據國內外研究報告及文獻指出，食藥用菇類具有機能性成分如多醣體、類三萜化合物、腺甘、鍍化合物與有機硒，具有抗癌、降血壓、降血糖、抑制膽固醇、免疫等療效，牛樟芝擁有豐富的生理活性成分，如多醣體、五味子、三萜類化合物(triterpenois)、固醇類、蛋白質(含免疫蛋白)、維生素(Vit.B、菸鹼酸、麥角固醇)、苯類(benzenoids)以及馬來酸(maleic acid)和琥珀酸(succinic acid)之衍生物²⁹等，同時經過多年的實驗證實牛樟芝對於人體之健康有相當幫助，如降血壓、抗高脂血症(anti-hyperlipidemic)、免疫調節、抗腫瘤，抗發炎、抗氧化

等特性³⁰。牛樟芝子實體或菌絲體的產品經實驗證實具有輔助治療肝病之效，同時還可預防酒精、四氯化碳(CCl₄)和細胞激素(cytokine)所引發的肝炎，並可抑制乙型肝炎病毒所造成的病毒性肝炎、改善脂肪肝的纖維化和抑制肝癌細胞之生長³⁰。

1-2-3-3 多醣體

多醣體是由單醣類等多數結合而成，這些多醣類不論在構成醣的種類、化學結合方式，或是分子大小與性質方面，也因品種或萃取方法皆會造成結構的差異。研究顯示樟芝多醣體具有防癌、抗癌的效果，是由於樟芝多醣體有免疫活性的關係，其中多醣體中的葡聚醣(β -D-glucan)成分，因有 β -D-glucopyranosyl-(1-3)-A-D-glucopyranosyl 及 C-6 側枝之構造，具有刺激巨噬細胞、T 淋巴細胞、B 淋巴細胞與殺手細胞活動等的作用，以達到增加免疫力之效，進而抑制腫瘤細胞。 β -D-glucan 之結構經 X-射線繞射分析得知，這種以 β -1,3 鍵結的 D-glucose 骨架呈現三股右旋之螺旋型結構，而有文獻指出此種螺旋結構可能是引發抗腫瘤作用的重要結構³¹。

1-2-3-4 三萜類

三萜類為真菌之重要二次代謝物，主要作用是抑制寄生植物之生長以利本身之生長，三萜類是由 30 個碳素結合而成六角形或五角形所構成分子的天然有機化合物之總稱，普遍存在於植物界，在動物界為數甚少。萜類的主要分類法是根據分子中包含異戊二烯單體數目分類，將含有兩個異戊二烯單體稱為單萜(monoterpene)；含有三個異戊二烯單體稱為半倍萜(sesquiterpene)；含有四個異戊二烯單體稱為雙萜(diterpene)；含有五個異戊二烯單體稱為二倍半萜(sesterterpene)；含有六個異戊二烯單體稱為三萜(triterpene)³²，單萜和倍半萜多以萜烴或簡單含氧衍生物的形式存在於揮發油中，分佈於植物界，自然界常見的烯類如下，二烯萜為單萜存在於檸檬、橘子，而薄荷醇為自薄荷油所得的萜醇亦屬於單萜；玫瑰花油及其他植物含有三萜醇(Farnesal)是屬於倍半萜；維生素 A 屬於雙萜；squalene 為三萜存在魚油中，是少數存在動物之脂肪中的萜類，中藥中常用的人參、甘草、地榆等均含三萜，其藥理作用在臨床上效果是很顯著的。由真菌所產生的三萜及固醇類之研究，陸續發現許多不同體幹的三萜類，經整理可歸為八類：(1) C27，含有 Cholestane 膽固醇之衍生物；(2) C28，C-24 位置有甲基取代的 Ergostane 之固醇骨幹；(3) C31，C-24 位置有甲基或甲烯基取代的 Lanostane 骨幹之衍生物；(4)雜類之三萜，包括少數五

環三萜，以及各種在 C-4、C-14 有去甲基化之 Lanostane 或 C-24-methyl lanostane 之類固醇；(5) Fusidane 和 Propane 不同骨幹之三萜類；(6) Viridin 和其衍生物；(7) C-24 位置有乙烷基或乙烯基取代之 Cholestane 衍生物³³。在動物或植物體裡，cholesterol 及 lanosterol 在生理或生化方面均扮演著非常重要的角色，研究證實了 cholesterol 及 lanosterol 分別是動物和植物中經由 squalene 生合成 sterol 途徑之中間產物，在此生合成途徑中，配合順序不同的 C-4、C-14 之去甲基 (demethylation)，C-24 的甲基 (methylation)、氧化還原及雙鍵等步驟，可得到不同的類三萜化合物(圖 1-1)，這些類三萜廣泛存在於生物體中，對於生物演化上佔有其關鍵的地位³⁴。由於膽固醇是細胞膜的重要組成物質，若樟芝所含之氧化型類三萜在合成膽固醇的過程中，有抑制或加速的作用，則對於癌細胞生長分裂會有很大的影響。

牛樟芝本身或其提取物的苦味成分之一，即屬於三萜類的成分。從牛樟芝子實體所純化出來的化合物主要區分為兩大類型，分別為 ergostane 型與 lanostane 型，而 ergostane 型的三萜類成分中，其結構均具有 24(28)-en 的側鏈，顯示牛樟芝的類三萜類代謝途徑與靈芝有很大的差異，此側鏈的架構應可當作牛樟芝的特徵成分。

1992 年，高曉薇的研究成果為將牛樟芝子實體粉末先以丙酮萃取，萃取物再以甲醇溶解後離心，除去低極性物質，取上清液經減壓

濃縮後純化分析，所得的結晶共六種，經光譜鑑定結構，解出三種新
型化合物分別屬於 type III 的 15-hydroxy-3,23-dioxo-lanosta-
7,9(11)-dien-26-oic acid，及 type I 的 3,11-dioxo-8,23-dien-26-oic acid
與 Ganolucidic acid type 的 15-hydroxy-3,11-dioxo-lanosta-8,23-dien-
26-oic acid (圖 1-2)，皆為氧化型三萜類，其中的化合物 B 具有降低
四氯化碳誘發急性肝障礙小鼠之血中 GPT 作用³⁵。

1995 年 Chen³⁶ 等人由樟芝子實體酒精萃取物中分離出三個
steroid acid，分別為 zhankuic acids A、B 及 C (圖 1-3)。1996 年 Yang
等人也利用相同的方法發現二種以 ergostane 為骨架的新化合物，分
別是 Zhankuic acid D 和 Zhankuic acid E，以及發現三種以 lanostane
為骨架的新化合物，分別是 15 α -acetyl-dehydro-sulphurenic acid、
dehydroe-buricoic acid 和 dehydro-sulphurenic acid (圖 1-4)³⁷。

1995 年 Cherng³⁸ 發表從樟芝子實體用甲醇萃取出以 ergostane 為
骨架的新三萜類化合物，分別命名為：

antcin A (4 α -methylergosta-8,24(28)-dien-3,11-dien-26-oic acid)、

antcin B (4 α -methylergosta-8,24(28)-dien-3,7,11-trien-26-oic acid)、

antcin C (4 α -methylergosta-8,24(28)-dien-3,11-trien-7 β -26-oic acid)³⁹

(圖 1-5)。antcin A 經藥理研究證實可抑制鼠血癌 P-388 murine
leukemia 細胞毒素之活性達 IC₅₀=4.1 μ g/ml，antcin B 有抗副交感神經

(anticholinergic) 和抗血清素 (antiserotonin) 的作用。Chiang 等人 1995 年亦從子實體萃取物中找到三種新的三萜類化合物，分別是 antrocin、4,7-dimethoxy-5-methyl-1,3-benzodioxole 和 2,2,5,5,- tetramethoxy-3,4,3,4-bi-methyl-enedioxy-6,6-dimethylbiphenyl³⁹ (圖 1-6)。

1996 年 Cherng 等人再度從樟芝子實體的新發現四種三萜類化合物：antcin E (3,11-dioxo-4 α -methylergost-8,14,24(28)-trien-26-oic acid)、antcin F (6,3,11-dioxo-7 β -hydroxy-4 α -methylergost-8,14,24(28)-trien-26-oic acid)、methyl antcinate G (7 α -acetoxy-3,11-dioxo-4 α -methylergost-8,24(28)-dien-26-oate)、methyl antcinate H (3 α -12 α -dihydroxy-7,11-dioxo-4 α -methylergost-8,24(28)-dien-26-oate) (圖 1-7)。

2003 年 Shen⁴⁰ 等人從牛樟芝子實體酒精提取物分離出十四種成分，分別為 3 β ,15 α -dihydroxylanosta-7,9(11),24-trien-21-oic acid、antcin K、dehydroeburicoic acid、eburicoic acid、methyl antcinate B、methyl antcinate H、zhankuic acid A、zhankuic acid B、dehydrosulphurenic acid、sulphurenic acid、15 α -acetyl-dehydrosulphurenic acid、versisponic acid D、zhankuic acid C 和 2,2,5,5,-tetramethoxy-3,4,3,4-bis- methyl-enedioxy-6,6-dimethylbiphenyl。其中四種成分 3 β ,15 α -dihydroxylanosta-7,9(11),24-trien-21-oic acid、antcin K、sulphurenic acid、versisponic acid D，係首次從牛樟芝獲得，成分 3 β ,15 α -dihydroxylanosta-7,9(11),24-trien-

21-oic acid、antcin K 更是首次在天然物界發現(圖 1-8)，翌年 Shen⁴¹ 證實從樟芝子實體中分離出來的 zhankuic acid A,B,C 以及 antcin K 具有抗發炎的作用且是藉由抑制活性氧物質的生成，以及 fMLP 或 PMA 所誘導的 firm adhesion 這兩條路徑。

2008 年 Male⁴² 利用 n-hexane/EtOAc 分離出 A-E 五種區域，包含八種三萜類分別是 methyl antcinate B 或 methyl zhankuic acid A, dehydroeburicoic acid 和 15a-acetyl dehydrosulphurenic acid，15a-dihydroxy lanosta-7,9 (11), 24-triene-21-oic acid and zhankuic acid A (5) 及 Dehydrosulphurenic acid and zhankuic acid C、Sulphurenic acid 其結構分別呈現於圖(圖 1-9)。

1-2-3-5 抗癌功能

2004 年 Nakamura⁴³ 等人從樟芝菌絲體中分離出五個成分 maleic 及 succinic acid 的衍生物發現具有抑制癌細胞生長的效果(圖 1-10)。

2004 年 Liu 等人⁴⁴ 萃取樟芝菌絲體中特有的多醣體，分別在細胞實驗及動物實驗證實具有抑制癌細胞生長的效果。2006 年 Peng⁴⁵ 等人利用固態栽培樟芝酒精萃取物為材料，結果發現可以抑制惡性人類膀胱癌細胞株 T24 的生長及轉移，並降低 MMP-9 的活性。2005 年 Hsu 等人⁴⁶ 利用樟芝子實體乙酸乙酯層萃取物為材料，發現可以抑制肝癌細胞的生長並促使肝癌細胞凋亡。2006 年 Yang⁴⁷ 等人利用樟芝為材

料，發現可以抑制乳癌細胞的生長且誘導走向凋亡。2009 年 Yeh 等人利用 Male 等人分離的部分再繼續探討，除在 zhankuic acids A 和 C 在 P-388 小鼠白血病細胞株已經被研究顯示，但對於其中作用機制卻沒有任何研究表示，發現其中三種 ergostane 具有抑制細胞週期使其停留在 sub-G1 時期，並而透過切斷 poly(ADP-ribose) polymerase、pro-caspase-3 及 Bcl-2 傳導，促進細胞凋亡，最後也顯示，在 HT-29 大腸癌細胞同時處理這三種 ergostane 的三萜顯示出協同作用的毒殺能力⁴⁸。另外 2009 年 Chen 等人利用 2003 年 Shen 所分離出來的其中一種 MMH01 (24-Methylenelanosta-7,9(11)-diene-3b,15a-diol-21-oic acid) (圖 1-11)，證明其化合物具有對抗人類白血病與胰腺癌細胞能力⁴⁹。

大部分研究顯示針對牛樟芝對於癌症的抑制功效，三萜類為主要具有毒殺癌細胞之成分。文獻顯示，從牛樟芝的子實體或是菌絲體粗萃取對於白血病細胞株 HL 60 及乳腺癌細胞株 MDA-MB-231 (雌激素 nonresponsive)和 mcf-7 (雌激素反應) 細胞都顯示抗癌活性，而對健康乳腺細胞 (HBL100) 和臍靜脈內皮細胞沒有影響⁵⁰⁻⁵²，從子實體萃取顯示出細胞毒性在膀胱癌細胞，將細胞停留在 G2/M 階段⁵³，從菌絲體酒精粹取物可以抑制肺癌細胞株 A-549 生長卻不會影響正常胎兒肺部纖維母細胞株 MRC-5⁵⁴，而甲醇萃取物顯示可以抑制癌細胞 Hep

G2 的生存率及促進細胞凋亡透過活化 caspase-3 及 caspase-8 使停留在 G0/G1 細胞週期⁵⁵，乙酸乙酯提取物(EAC)可以透過調控 Bcl-2 蛋白的表現來抑制 Hep G2 and PLC/PRF/5 肝癌細胞生長⁵⁶。另外牛樟芝可以有效的抑制體外或體內 MDA-MB-231 乳癌細胞生長藉由促進細胞凋亡⁵⁷。動物實驗顯示大鼠如果持續 28 天每日口服 500 毫克/公斤劑量的牛樟芝，可以增加食物與藥品的效果⁵⁸。



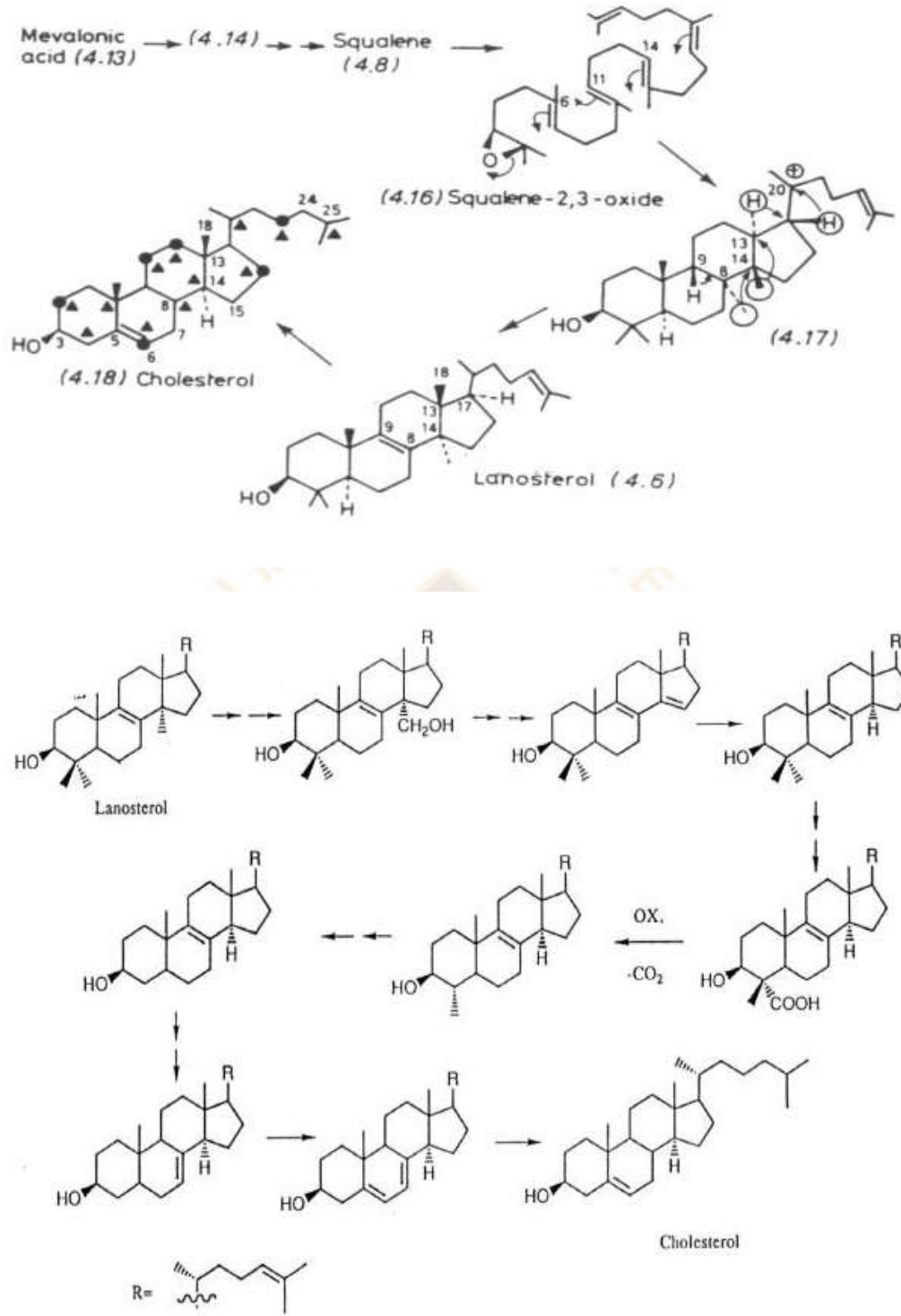
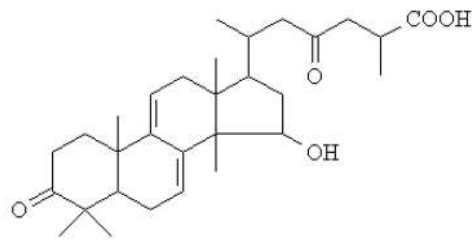
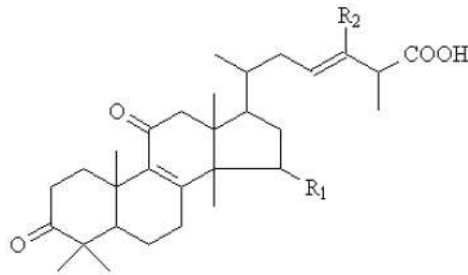


圖 1-1 三萜類的合成機制³⁴。



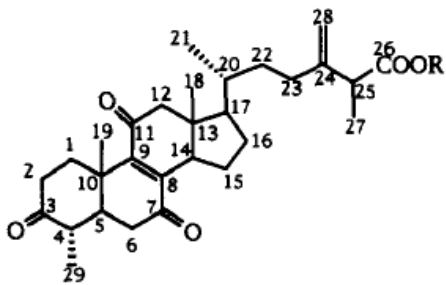
Compound A



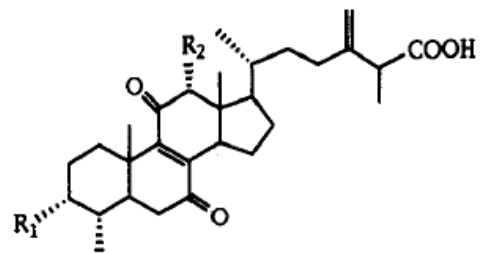
Compound B $R_1 = OH$ $R_2 = CH_3$

Compound C $R_1 = OH$ $R_2 = H$

圖 1-2 1992 年高曉葳從野生樟芝分離出的三種氧化型三萜類³⁵。

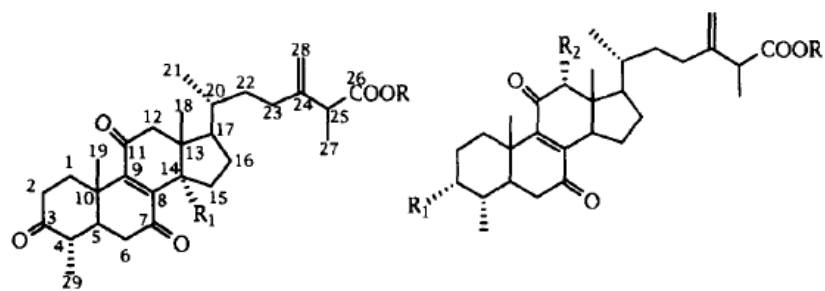


1 $R = H$
4 $R = Me$



2 $R_1 = OH, R_2 = H$
3 $R_1 = R_2 = OH$
5 $R_1 = OAc, R_2 = H$
6 $R_1 = R_2 = OAc$

圖 1-3 1995 年 Chen 由樟芝子實體酒精萃取物中分離出三個 steroid acid，分別為 zhankuic acids A(1)，B(2) and C(3)³⁶。



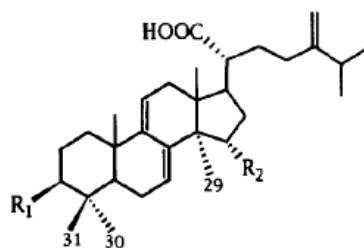
1 R = R₁ = H

2 R = CH₂CH₃ R₁ = H

3 R = H R₁ = OH R₂ = H

4 R = H R₁ = R₂ = OH

5 R = CH₂CH₃ R₁ = R₂ = OH



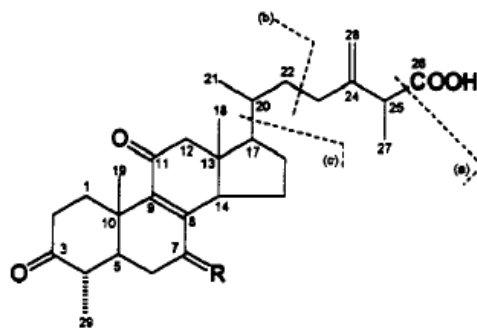
6 R₁ = OH R₂ = OAc

7 R₁ = OH R₂ = H

8 R₁ = R₂ = OH

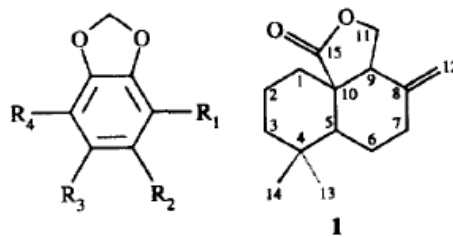
9 R₁ = OAc R₂ = H

圖 1-4 1996 年 Yang 等人發現的 2 種以 ergostane 為骨架的新化合物，分別是 Zhankuic acid D(2)和 Zhankuic acid E(5)，以及發現 3 種以 lanostane(6~8)為骨架的新化合物³⁷。



- 1 R=H, H
 2 R=O
 3 R=β-OH, H

圖 1-5 1995 年 Cherng 從樟芝子實體用甲醇萃取出，以 ergostane 為骨架的新三萜類化合物 antcin A(1)，antcin B(2)，antcin C(3)³⁹。



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
2a	OMe	H	Me	OMe
2b	H	Me	OMe	OMe
2c	Me	H	OMe	OMe
2d	H	OMe	Me	OMe
2e	Me	OMe	H	OMe
2f	H	OMe	OMe	Me

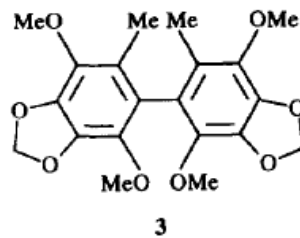
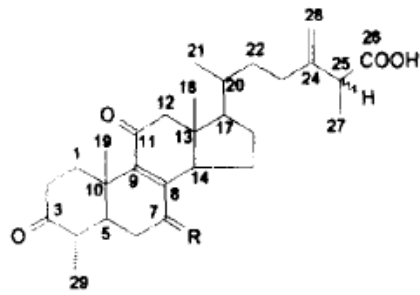
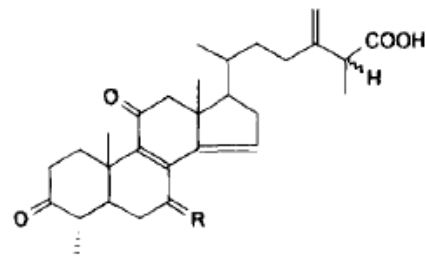


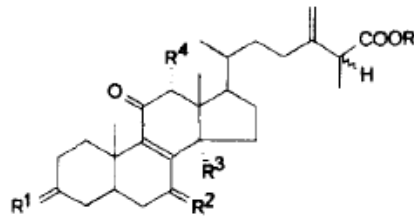
圖 1-6 Chiang 等人 1995 年從子實體萃取出物中找到三種新的三萜類化合物，分別是 antrocin (1)、4,7-dimethoxy-5-methyl-1,3-benzodioxole (2)和 2,2,5,5,-tetramethoxy-3,4,3',4'-bi-methyl-enedioxy-6,6-dimethylbiphenyl (3)³⁹。



R
 1 H₂
 2 O
 3 β-OH
 α-H

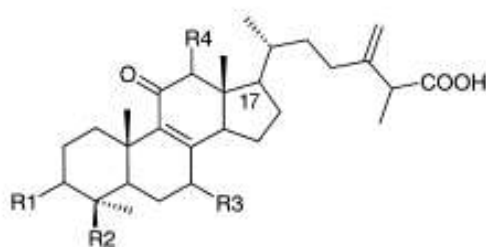


R
 5 H₂
 6 α-H
 β-OH



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R
4	O	O	α-OH	H ₂	H
7a	O	α-OAc β-H	α-H	H ₂	CH ₃
8a	α-OH β-H	O	α-H	α-OH β-H	CH ₃

圖 1-7 1996 年 Cherng 等人再度從樟芝子實體的新發現四種三萜類化合物：
 antcin E(5)、antcin F(6)、methyl antcinate G(7a)、methyl antcinate H(8a)³⁸。



	R1	R2	R3	R4
Zhankuic acid A	=O	H	=O	H
Zhankuic acid B	α -OH	H	=O	H
Zhankuic acid C	α -OH	H	=O	α -OH
Antcin K	α -OH	β -OH	β -OH	H

圖 1-8 2003 年 Shen 從牛樟芝子實體酒精提取物分離出成份⁴⁰。

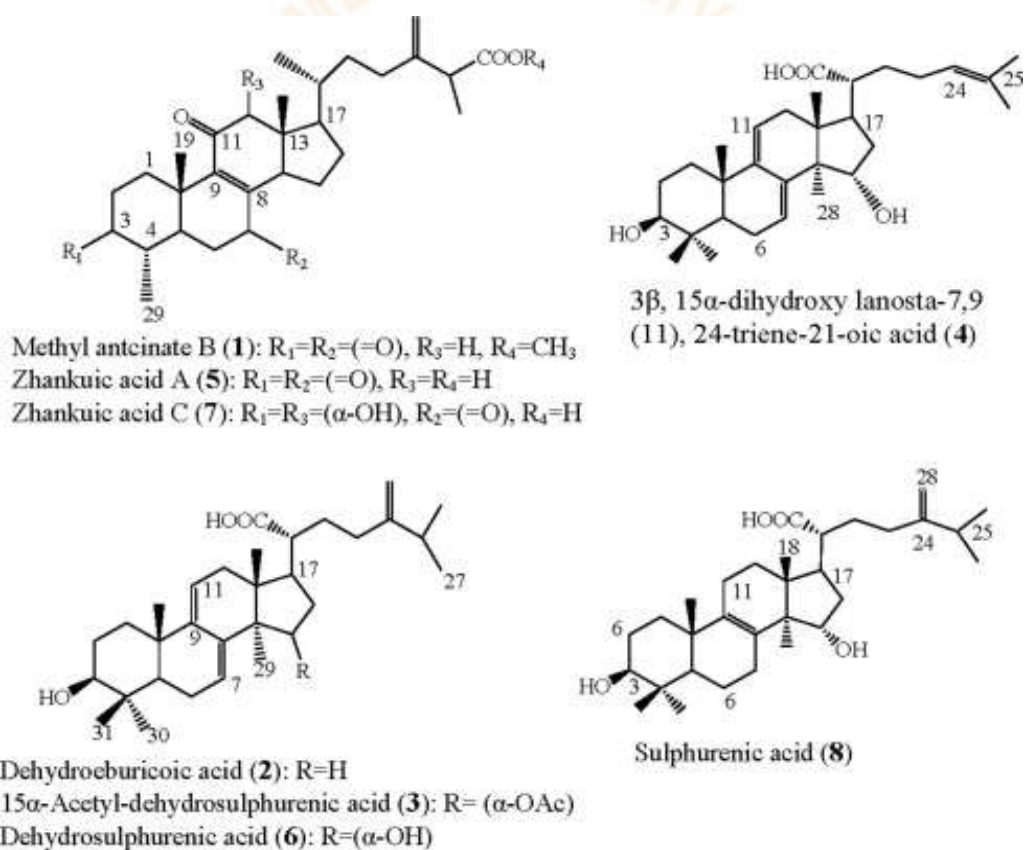


圖 1-9 2008 年 Male 由樟芝子實體所分離出來的八種三萜類⁴²。

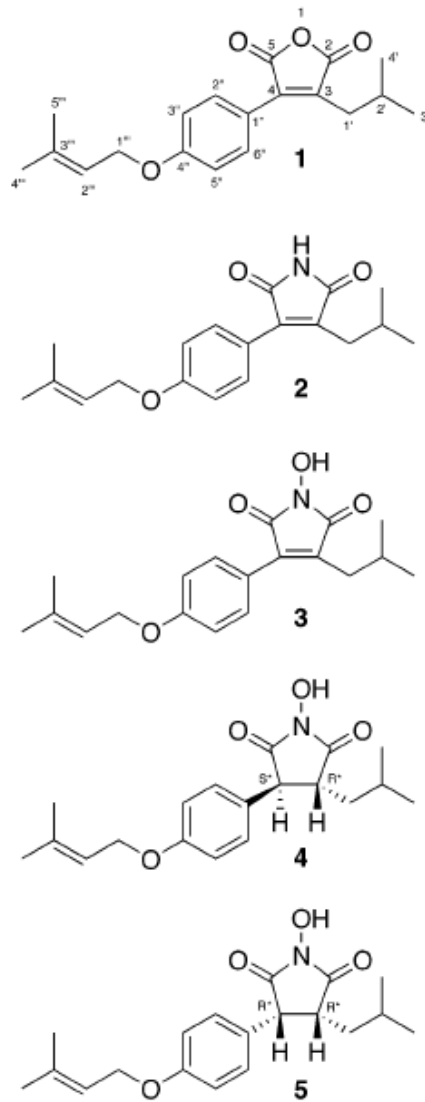


圖 1-10 2004 年 Nakamura 所分離出的衍生物
3-isobutyl-4-[4-(3-methyl-2-butenyloxy)phenyl]-1H-pyrrole-2,5-dione by X-ray
analysis⁴³。

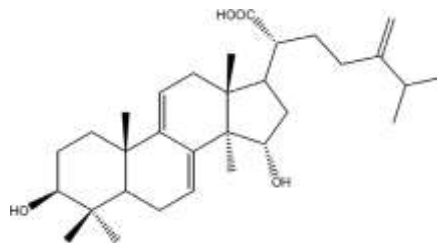


圖 1-11 2003 年 Shen 等人分離出來的 MMH01 結構，由 Chen 等人證明具有對
抗人類白血病與胰腺癌細胞能力。

1-2-4 兩性黴素 B

1-2-4-1 作用與用途

兩性黴素 B 是一種具有抑菌或殺菌作用的多烯類抗黴菌劑，是目前臨床上治療全身性隱球菌、白色念珠菌、組織胞漿菌、球孢子菌、釀母菌的一種有效的藥物^{59,60}，但使用該藥若劑量過高將產生較為嚴重的副作用，因此在臨床上用藥劑量須小心控制。多烯類抗生素可以根據其結構中的共軛雙鍵分為四烯、五烯、六烯、七烯等四類。

1-2-4-2 藥理機制

在真菌的細胞膜上因嵌有脂醇- 麥角甾醇，當與藥物結合時將造成細胞膜通透性的改變，導致真菌細胞內的成分如鉀離子、胺基酸、蛋白質等擴散到膜外，破壞真菌正常代謝及抑制生長⁶¹⁻⁶⁴，細胞產生裂解而造成真菌細胞死亡。

1-2-4-3 藥物用量及其副作用

一般用量以靜脈注射時可先從 1 ~ 5 mg 或按體重每次 0.02 ~ 0.1 mg / kg 給藥，之後根據患者耐受情況每日或隔日增加 5 mg，當增加至每次 0.5 ~ 0.7 mg/kg 時即可暫停增加劑量。最高單次劑量按體重不

超過 1 mg/kg，每日或隔 1~2 日給藥一次，總累積量 1.5~3.0g，療程為 1~3 月左右，需視患者病情及疾病種類而定⁶⁵。

靜脈給予時，50 %~80 %的病人出現發熱、發冷、寒戰、噁心及嘔吐、頭痛及肌肉與關節痛。此藥物的急性不良反應為上腹部痛或腹絞痛、腹瀉(有些病人伴有胃腸道出血)、低血壓、焦慮及血栓形成性靜脈炎，兒童又比成人為多見。^{59,62,66-69}

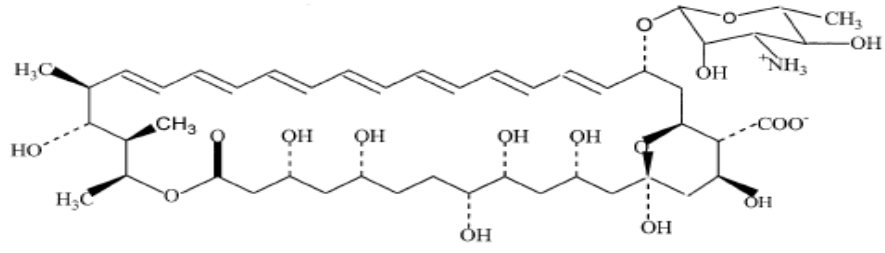
1-2-4-4 討論

兩性黴素 B 是一種多烯類廣譜抗真菌藥，主要用於治療深部真菌感染，但該藥在治療劑量時可能產生急性紅細胞溶血、腎小管毒性等比較嚴重的不良反應，限制了它在臨床上的應用⁷⁰。微脂體是脂質空心微球，體徑約 0.0025-3.5 mm，懸浮於水相中，脂質膜主要是由磷脂分子的磷酸端所構成的脂質雙層(liposome bilayers)。磷脂分子的磷酸端為親水性，脂質端為疏水性，由此所形成的脂質層雙面為親水，夾層內為疏水之膜，類似細胞膜。水溶性物質如(藥物)，可包在球心之溶液，油溶性物質則包覆在球皮膜層內(類似三夾板)。因此微脂體可當作水性物質及油性物質之載體。研究表明，脂質體作為藥物載體可以顯著降低兩性黴素 B 的毒性。兩性黴素 B 脂質體是利用磷脂雙分子層膜形成的囊泡包裹藥物分子而製成的具有靶向給藥功能的新型藥物製劑，較普

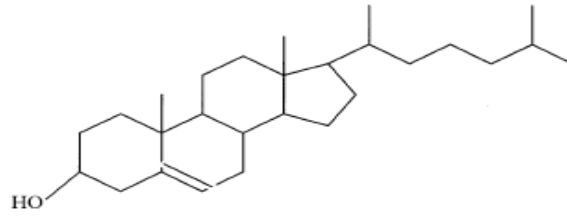
通製劑具有更好的耐受性，一方面它可以較多地分佈在肝、脾、肺，而在其它臟器尤其在腎組織內的濃度較低，另一方面，脂質體中的膽固醇成分可降低藥物與人體細胞中膽固醇的結合而增強對真菌細胞麥角固醇的結合，對腎臟等的副作用相對較小⁷¹⁻⁷⁵。

由於細菌的細胞膜上並不含麥角甾醇，故此藥對細菌並無抑制作用。而人和動物的細胞膜上，則以膽固醇為主要成份，一般來說兩性黴素 B 對於真菌細胞膜上麥角甾醇的親和力比動物細胞膜的膽固醇好，此外先前實驗室研究指出，在處理兩性黴素 B 過後比較癌細胞株與正常細胞株，並無明顯差異。

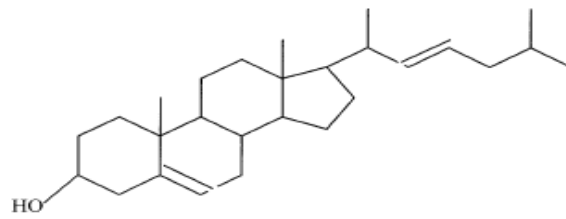
兩性黴素B其結構如圖1-12顯示，一端為疏水性由七個雙鍵組成，另一端為是親水端，包含幾個極性取代基，而膽固醇及麥角甾醇是非常相似的結構，差別在麥角甾醇的側鏈上多了一個甲基及一個雙鍵⁶⁰。



AmB



cholesterol



ergosterol

圖 1-12 兩性黴素與 Cholesterol、ergosterol 結構示意。

第二章 研究目標

相關的文獻中已指出樟芝所含的三萜類種類多達兩百種，總含量佔 30 %，而三萜類具有抗癌、保肝、抗氧化等效果，許多研究證明樟芝萃取物可以透過毒殺或是抑制等方式達到抗癌效果。本實驗假說透過樟芝萃取物的三萜類可以轉換成酯醇，取代細胞膜的膽固醇成為特定酯醇，再篩選出對於兩性黴素 B 具有較佳親和力之成分，進而影響細胞膜之功能性，使得兩性黴素 B 可以與樟芝萃取物達到最佳協同作用的抑制能力，成為一種治療癌症的複合療法，如下圖 2-1 所示。此外進一步探討樟芝萃取物中何種成分可與兩性黴素 B 形成複合體以達成毒殺癌細胞作用，將所篩選出來的化合物經過高效能液相層析與質譜儀來確認化合物結構，同時再搭配 TLC 來確認其細胞膜上組成的差異，以證實其機制。

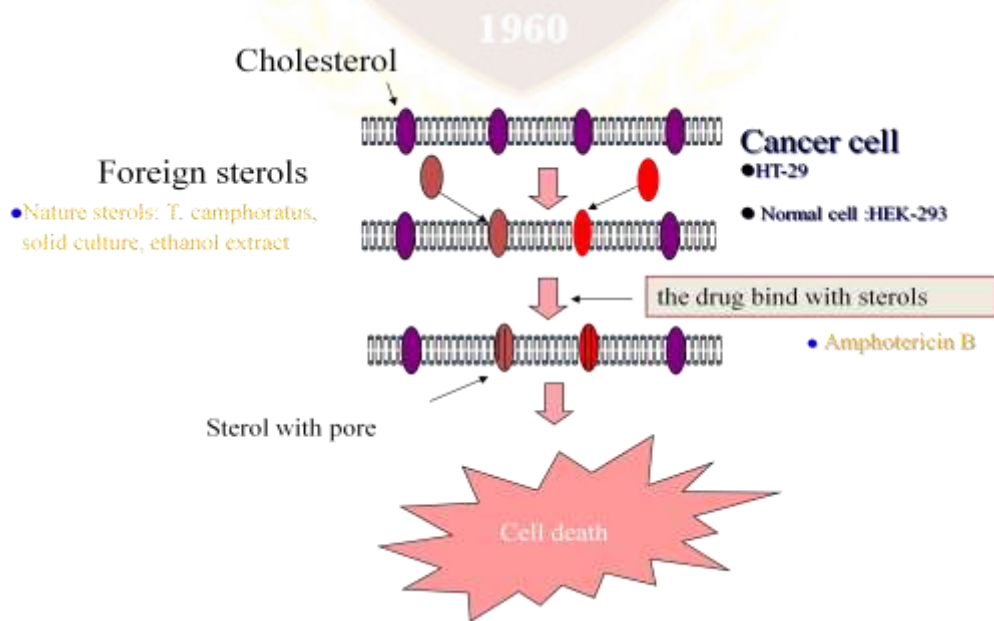


圖 2-1 實驗假說，單獨處理樟芝和樟芝與兩性黴素 B 協同作用。

第三章 實驗材料與方法

3-1 細胞來源與培養條件

3-1-1 細胞來源

細胞株	細胞編號	提供來源
HEK-293	ATCC CRL-1573 TM	北醫醫研所 陳政潔助理教授
HT-29	ATCC HTB-38 TM	食品工業發展研究所

3-1-2 培養條件

將細胞株培養在含有10 % FBS、10 % L-GLU以及100 U/ml penicillin +100g/ml streptomycin的DMEM或是MEM的培養液中，並置於37 °C，5 % CO₂的培養箱中，每三天更換一次培養液，等到七到八分滿左右，將培養液抽乾，利用trypsin / EDTA及培養液將細胞收集於15 cc的離心管，離心1200 rpm，3分鐘，將細胞沉澱下來，將培養液抽乾再加培養液，透過細胞計數器將細胞調整為 1×10^5 /ml，其中一部份置於原盤繼續培養，其餘視實驗需求培養於12-well或是24-well、96-well作為細胞存活或是細胞膜脂質萃取之用。

3-2 實驗材料與儀器

材料

藥品名稱	來源	城市/國家
Fetal Bovine Serum, FBS	GIBCO	CA,USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM	GIBCO	CA,USA
Minimal Essential Medium powder, MEM	GIBCO	CA,USA
P/S-L Glutamine	GIBCO	CA,USA
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS) (10X), liquid	GIBCO	CA,USA
Trypsin, EDTA(10X)	GIBCO	CA,USA
Dimethyl sulfoxide, DMSO	SIGMA	MO,USA
Acetone	J.C.BAKER	PA, USA
Acetonitrile	J.C.BAKER	PA, USA
Acetic acid	J.C.BAKER	PA, USA
Chloroform	J.C.BAKER	PA, USA
Cupric sulfate	SIGMA	MO,USA
Ethyl acetate	J.C.BAKER	PA, USA
Ethyl alcohol	J.C.BAKER	PA, USA
Sulfate acid	J.C.BAKER	PA, USA
Isopropyl ether	J.C.BAKER	PA, USA
Methanol	J.C.BAKER	PA, USA
n-Hexane	J.C.BAKER	PA, USA
Phosphoric acid	J.C.BAKER	PA, USA

Amphotericin B	SIGMA	MO,USA
Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT	SIGMA	MO,USA

實驗儀器

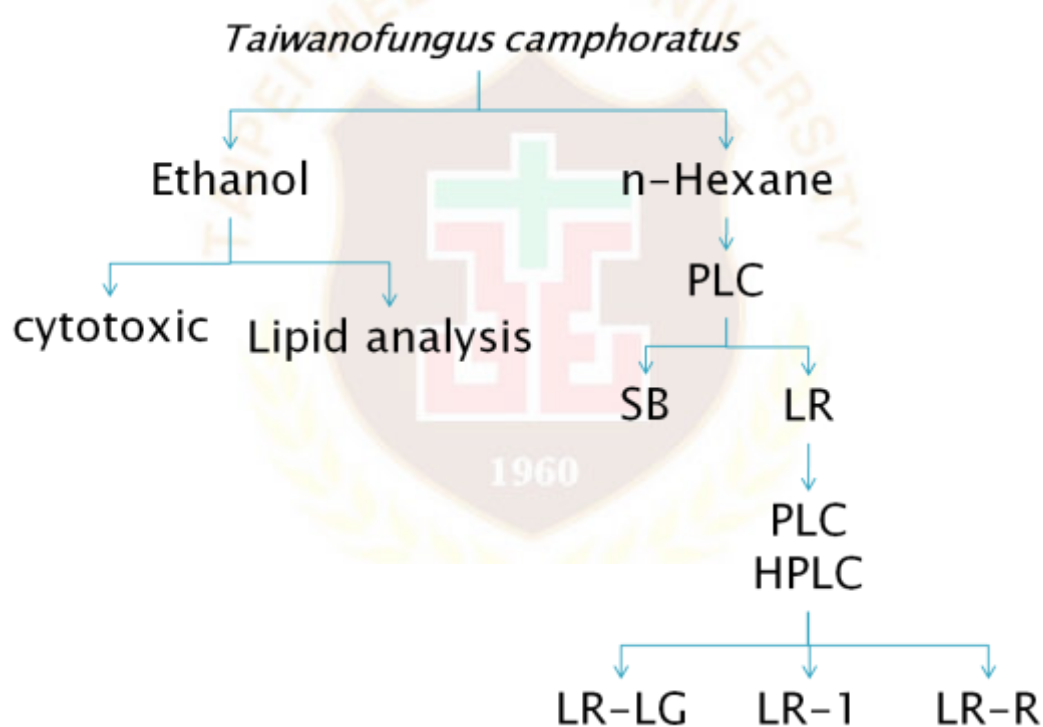
中文名稱	英文名稱	來源
高溫高壓滅菌機	Autoclave	TOMIN
無菌操作台	Lamina flow	
旋轉攪拌器	Stirrer/Hot plate	CORNING
水浴槽	WB-24	SHIN KWANG
烘箱	NDO-601SD	ELELA
離心機	KN-70	KUBATO
酸鹼值測定機	MP220	友榆公司代理
光學顯微鏡	BX51	Olympus
減壓濃縮機	N-1000	ELELA
電動天秤	HR-200	AND,USA
薄層層析矽膠	TLC : kieselgel 60 F ₂₅₄ (0.2mm thick)	Merck
製備薄層層析矽膠	(PLC): kieselgel 60 F ₂₅₄ (0.5-2mm thick)	Merck
高效能液相層析儀	High Performance Liquid Chromatography	
	Column:LiChroCART 250-4 , C18	Merck

	Injector: SIL-10AD	
	Detector: SPD-10A	Shimadzu
	Pump: LC-10AT	Shimadzu
液相層析質譜儀	LC/MS/MS	Esquire 3000 plus
紫外線照光機	UVGL-58	ENTECLA,USA
超音波震盪機	511R-DTH	BRANSON ,USA
酵素免疫分析儀	ELISA reader 312e	Bio-TEK



3-3 實驗流程圖

萃取樟芝子實體粉末利用不同極性萃取之粗萃物進行後續實驗，首先先利用絕對酒精萃取之粗萃物進行細胞實驗，進行 MTT 分析其細胞毒性與萃取細胞脂質做薄層色層分析細胞膜成分之不同，另外正己烷萃取之粗萃物透過製備型色層分析所得產物再進一步分析內成分與目標相符合，所得 LR 再一次透過製備型色層與高效能液相色層分析其內含物。



3-4 實驗方法

3-4-1 三萜類萃取及純化分析

3-4-1-1 樟芝有效成分之萃取

本研究所使用的樟芝(*T. camphorata*)材料源自偉翔生物科技公司栽培之樟芝子實體。以下為其萃取之步驟：將樟芝固態栽培粉末 20 克於室溫下以乙醇萃取(約 1000 ml)24 小時後，以濾紙過濾取得上清液，將上清液以減壓濃縮機濃縮，取得乙醇初萃取物，約可得 10 % ~15 %粗萃取率。在經過冷凍乾燥過後，最後將萃取物溶解在乙醇裡，配置成藥物濃度為 100 mg/ml 稱 *T. camphorate* alcohol extract (TCAE)。

3-4-1-2 TLC 薄層液相色層分析法

分別取5 μ l的樣品萃取物，點於具矽膠鋁箔平板下緣1公分處，每一試樣具0.5公分，展開溶劑為 CHCl_3 : Methanol : H_2O = 30 : 4 : 1，展開距離為10公分，待溶劑揮發後，在UV254 nm波長下檢視，再以 10 % H_2SO_4 酒精溶液均勻噴灑，於烘箱105 $^\circ\text{C}$ 呈色後立即拍照比較其呈色點，其中以偉翔公司人工固態栽培樟芝、松杉靈芝子實體的酒精萃取物做為對照組。

3-4-1-3 PLC 製備型液相色層分析法

樟芝固態栽培粉末 5 克於室溫下以 n-Hexane 萃取 1 : 50 比率萃取(約 250 ml)24 小時後，以濾紙過濾，將上清液以減壓濃縮機濃縮，取得 n-Hexane 粗萃取物，約可得 1%粗萃取率；將粗萃物點於 PLC 玻璃片上約 1.5 公分處，展開溶劑為 CHCl_3 : Methanol=98 : 2，待溶劑揮發後以 UV254 nm 波長與 UV366 nm 波長觀察後，圈選出目標範圍，刮取後以，再經減壓濃縮機後，以後酒精回溶置於 eppendorf，再以氮氣吹乾後，於微量天平秤重，methanol 回溶純化以利後續實驗。

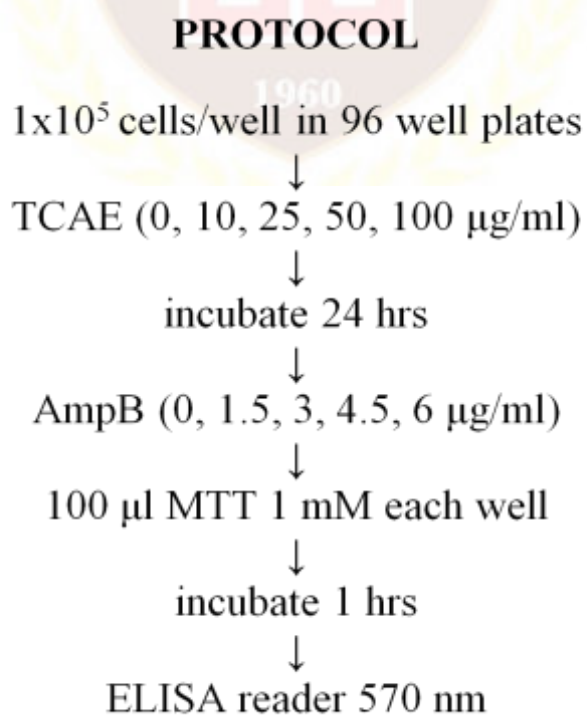
3-4-1-4 HPLC 高效能液相色層分析法

將萃取之樣品加入甲醇至 0.5ml 為分析樣本。每一試樣萃取液取 20ul，以 HPLC 分析，採逆向 C-18 column 之分析管柱，移動相為 (A)30% acetonitrile + 1% Acetic acid，(B)100% acetonitrile + 1% Acetic acid，0~20min : gradient，20~40 : mobile phase (B)，流速為 1ml/min，管柱以恆溫箱控溫於 42°C，以 UV274 nm 偵測，紀錄 45 分鐘。

3-4-2 樟芝對於大腸癌細胞株與正常細胞株之影響

3-4-2-1 四錯鹽分析法測試細胞毒性(MTT tetrazolium salt assay)：

將定量的細胞(1×10^5 /ml) 培養在96-well multiplates，並在 37°C 、5% CO_2 培養箱中，生長8小時，之後進行starvation overnight後，接著加入TCAE濃度分別10、25、50、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及Amphotericin B濃度1-6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 進行細胞毒性測試，或是加入25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的TCAE進行pre-treat後，再以PBS清洗後，加入不同濃度Amphotericin B測試，最後於每個well加入100 μl 的MTT溶液反應1小時後，再置換成DMSO使其藍色產物溶解後，使用酵素免疫分析儀(ELISA reader 312e, Bio-TEK) 於波長570 nm下測定其optical density。



3-4-2-2 細胞膜脂質萃取

根據Folch method，將細胞混合於5 cc的氯仿/甲醇 (2/1)，搖晃後將整個混合物分散，置於室溫60分鐘。加入1 cc的0.9 %氯化鈉，再均勻震盪5秒後，以低速離心約2000 rpm，15分鐘，移除上層水相部分，以甲醇/水沖洗介面一或兩次，不混合整個製備溶液以保留下層有機層，再以氮氣吹乾濃縮至1~2毫升⁷⁶。

比較細胞膜脂質成份，經定量完後的脂質萃取物點於矽膠鋁箔平板下緣1公分處，經過兩次展開溶液分離，第一次展開溶液為chloroform-methanol-acetic acid-water 35:15:6:1 (v/v)，待完全揮發後，第二展開溶液為hexane-isopropyl etheracetic acid 65:35:2 (v/v)，在以呈色液 10% cupric sulfate溶於 8% phosphoric acid溶液均勻噴灑，於烘箱105 °C呈色後立即拍照比較其呈色點⁷⁷。

3-4-2-3 統計分析

所有結果數據以Mean±SD(Mean±Standard error of mean)呈現，分析方法為AVOVA，且統計中顯著的差異定為P<0.05，以鑑定實驗中所得之組數是否具有顯著差異

第四章 實驗結果

4-1 樟芝與兩性黴素 B 結合能力

首先證明樟芝初萃物與兩性黴素具有鍵結能力，將兩性黴素 B 與由偉翔生技公司提供的樟芝的水萃物做混合，利用兩性黴素 B 與水溶液不互溶方式，來證明樟芝萃取物中具有與兩性黴素 B 親和力的未知物做結合，圖 4-1 中(A)至(C)分別為短波、長波及利用呈色劑所呈現，Line 1~3 分別為兩性黴素 B、兩性黴素 B 與水、兩性黴素 B 與樟芝水粹物，Line 4~6 分別為標準品樟芝水萃物、樟芝酒萃物、松杉靈芝。結果顯示樟芝水萃物具有如樟芝酒萃物的三萜類及醇類等成分，而 line 3 與 4 顯示出樟芝水萃物與兩性黴素 B 具鍵結能力。利用高效能液相層析比較野生樟芝與生技公司初萃物，顯示其萃取物與野生樟芝具有相同結構物，如圖 4-2 所示。

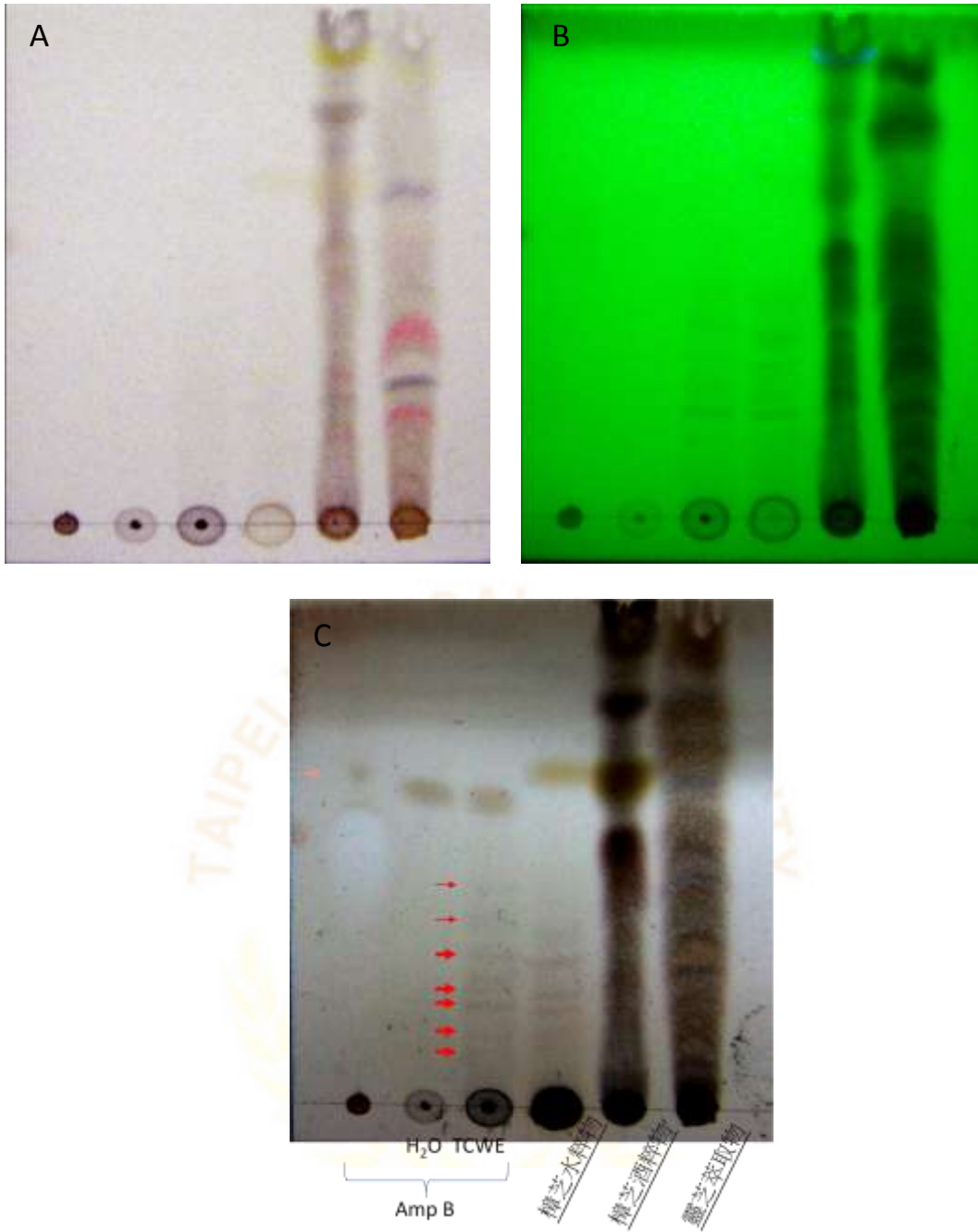


圖 4-1 *T. camphorata* and AmB combination test.

The stationary phase was silica gel and the mobile phase $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$, 30 : 4 : 1. The plates were developed and scanned at (b) 254 nm after derivatisation with $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-EtOH}$, 9 : 1.

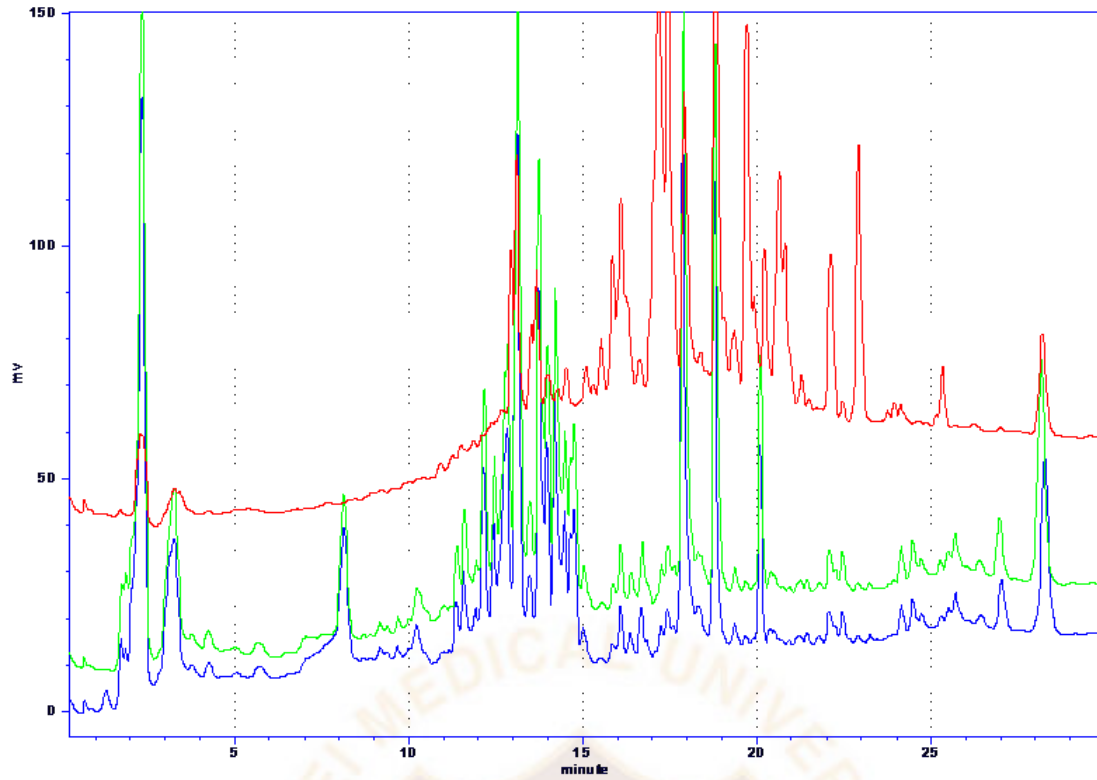


圖 4-2 高效能液相層析圖譜，野生樟芝(紅色)，絕對酒精初萃物(綠色)，95%酒精初萃物(藍色)

4-2 樟芝與兩性黴素 B 不同濃度對於大腸直腸癌細胞株(HT-29)與正常細胞株(HEK-293)影響

利用 MTT 細胞活性測試樟芝初萃物及兩性黴素 B 對癌細胞株生長毒性試驗，並比較共同處理及搭配處理的差異是否達到協同作用，初步檢驗樟芝萃取物濃度，由圖 4-3 顯示樟芝粗萃取物($> 100\mu\text{g/ml}$)具有明顯抑制 HT-29 之效果，而正常細胞則否。圖 4-4，兩性黴素 B 對於無論正常或癌細胞株毒性在 $6\mu\text{g/ml}$ 則無敏顯差異。在前後處理樟芝粗萃取物($0 - 100\mu\text{g/ml}$)及兩性黴素 B ($0 - 6\mu\text{g/ml}$)，顯示低濃度的樟芝萃取物搭配兩性黴素 B 的使用，顯著的降低 HT-29 癌細胞的生長。如圖 4-5。

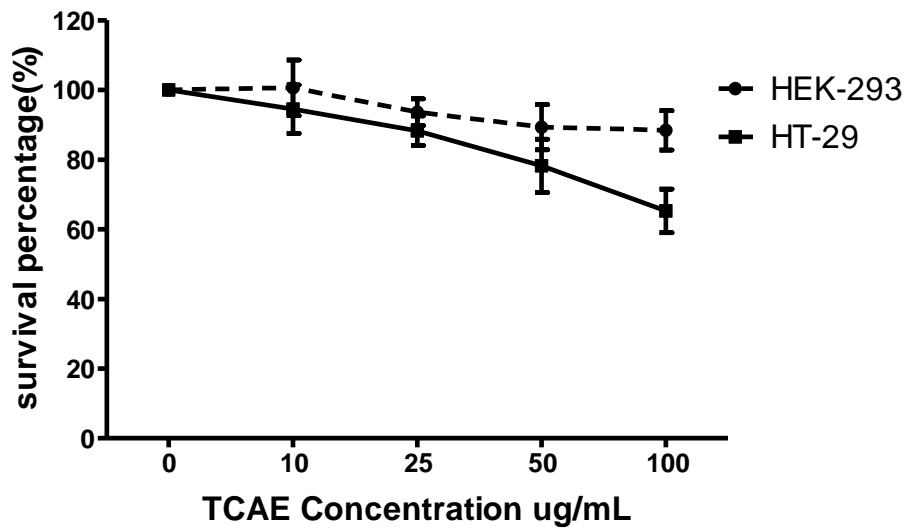


圖 4-3 Cell proliferation by MTT assay was performed on HT29 and HEK-293 after treatment with TCAE at different concentrations.

Values are shown as the percentage of living cells relative to the control with the control values set at 100%. The results represent the mean \pm standard deviation (n=3) of five independent experiments.

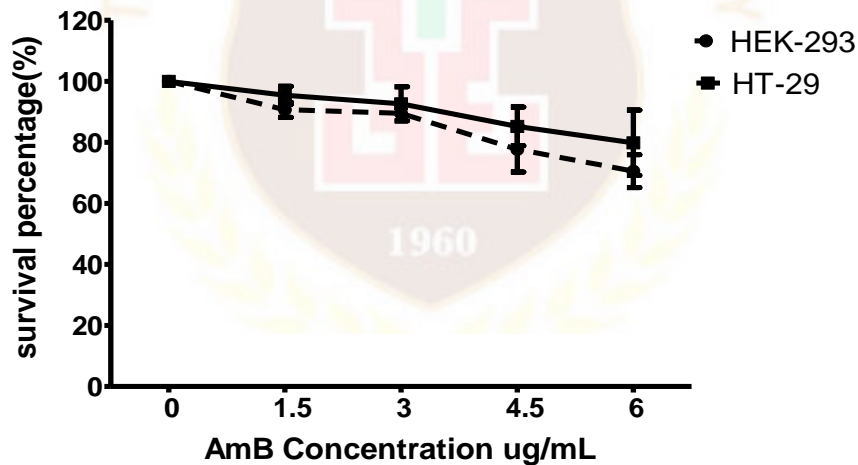


圖 4-4 Cell proliferation by MTT assay was performed on HT29 and HEK-293 after treatment with Amphotericin B at different concentrations.

Values are shown as the percentage of living cells relative to the control with the control values set at 100%. The results represent the mean \pm standard deviation (n=3) of five independent experiments.

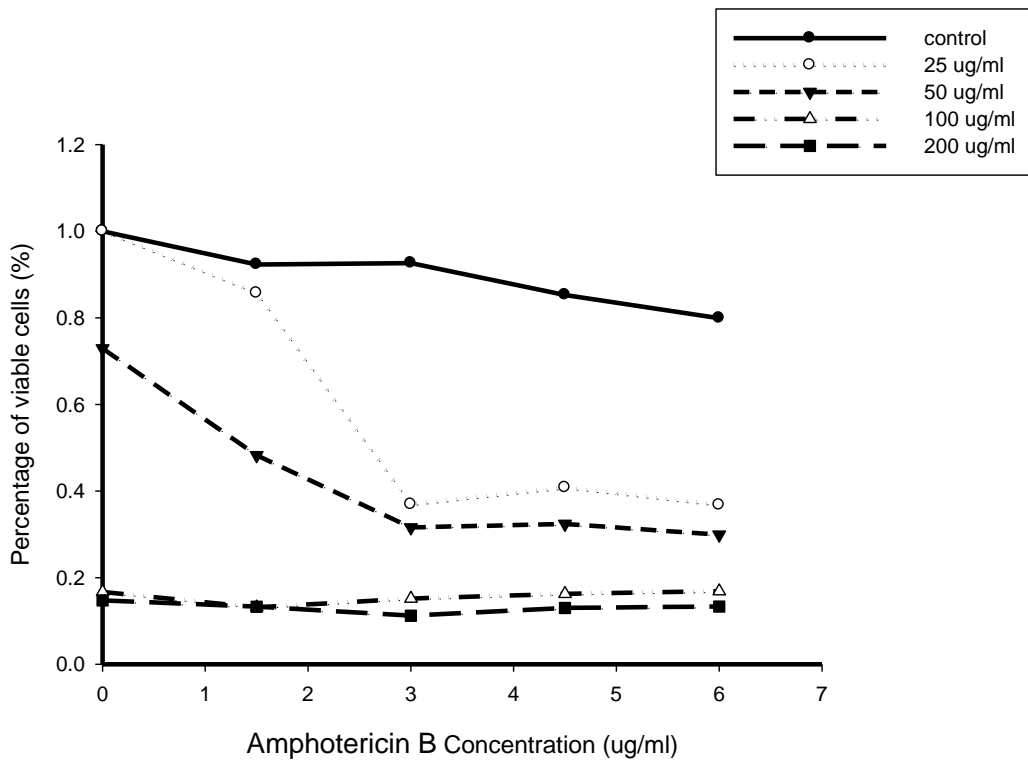
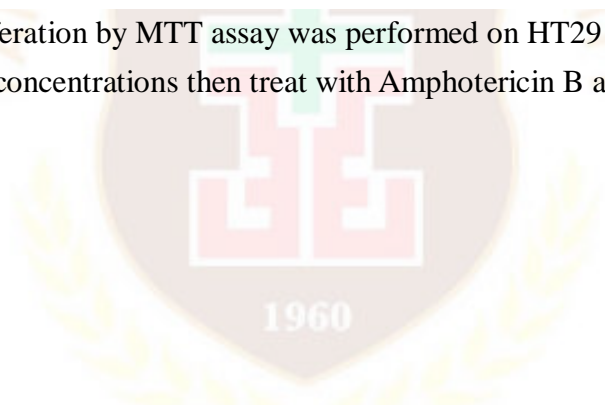


圖 4-5 Cell proliferation by MTT assay was performed on HT29 pretreatment of TCAE at different concentrations then treat with Amphotericin B at different concentrations.



4-3 樟芝與兩性黴素 B 結合能力對於大腸直腸癌細胞株(HT-29)的影響

比較 HT-29 細胞株於 pre-treat、co-treat 以及 control 三種條件處理下所得結果如圖 4-6 所示，在 pre-treat 組別中先將細胞株以樟芝萃取得物處理 24 小時，再搭配兩性黴素 B，而 co-treat 組別中則是同時加入樟芝萃取得物與兩性黴素 B，同時在與 control 組別做對照，結果顯示以 pre-treat 組別方式進行實驗，對於抑制癌細胞之生長有明顯抑制效果。

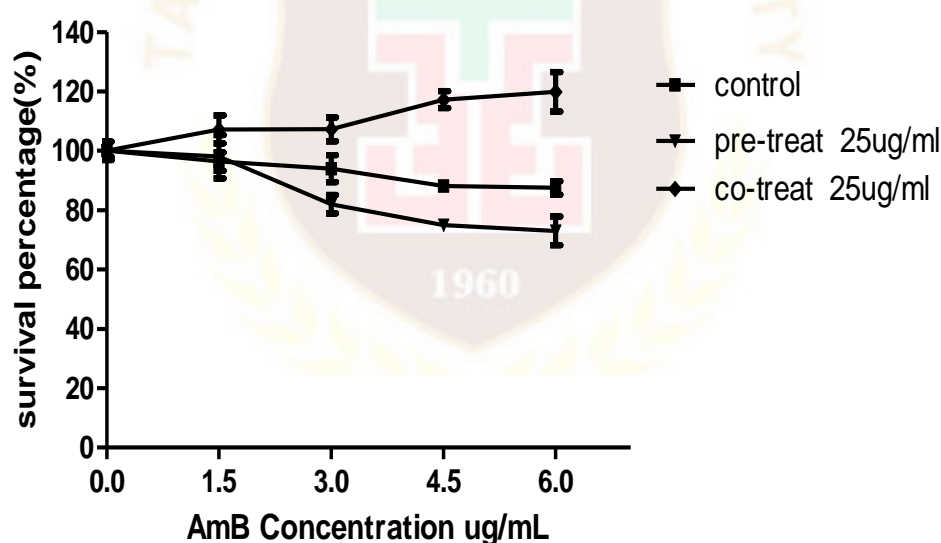


圖 4-6 Cell proliferation by MTT assay was performed on HT29 co-treatment of TCAE with Amphotericin B or pre-treatment of TCAE with Amphotericin B. Values are shown as the percentage of living cells relative to the control with the control values set at 100%. The results represent the mean \pm standard deviation (n=3) of three independent experiments.

4-4 樟芝不同極性萃取方式對於大腸直腸癌細胞株(HT-29)的影響

由此上述結果顯示，需經過樟芝萃取物中之特定化合物進行作用後，再處理兩性黴素 B 才具有毒殺效果，與實驗假說相符。因此更進一步為確認在樟芝初萃取物中，哪些極性分子可與兩性黴素 B 結合，進一步造成細胞膜上穿孔進而抑制癌細胞生長。故利用不同極性之溶劑將樟芝初萃物再次進行萃取，HT-29 細胞株經此萃取液處理並同時搭配兩性黴素 B 所得結果如圖 4-7，利用丙酮(Acetone)萃取之組別與不加藥物之對照組所得結果趨勢相似，表示無明顯效果，而經正己烷(n-Hexane)及乙酸乙酯(Ethyl Acetate)萃取所得樟芝萃取液，皆使細胞存活率明顯下降，表示利用此二種極性溶劑皆可萃取有效成份與兩性黴素 B 達到協同作用，抑制癌細胞之生長。

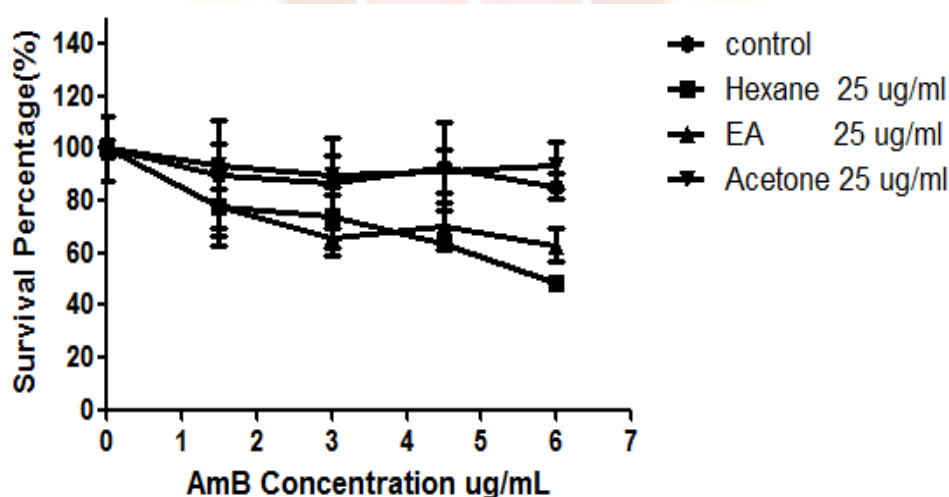


圖 4-7 Cell proliferation by MTT assay was performed on HT29 pre-treat different polarity solvent 25 μ g/ml. Values are shown as the percentage of living cells relative to the control with the control values set at 100%. The results represent the mean \pm standard deviation (n=3) of three independent experiments.

4-5 正己烷(n-Hexane)萃取之化合物對於大腸直腸癌細胞株(HT-29)的影響

選定最低極性之溶劑正己烷作為後續分析之方向，以正己烷萃取 5 克牛樟芝，可以得到約 50 毫克(1%)粗萃物，透過薄層色層分析法確認後，再以製備型色層分析片進行正己烷粗萃混合物成分之分離，以確認哪些物質可與兩性黴素 B 做鍵結，結果可分別得到 A1 到 T0 十種不同成份之萃取物，如圖 4-8。將各成份分別處理 HT-29 大腸癌細胞株 24 小時後，再加入兩性黴素 B 以確認有效區域，篩選出兩個特別區域分別為紫外光短波下藍色區域稱 SB 及可見光下紅色區域稱 LR，初期結果顯示在 SB 及 LR 兩區具有與兩性黴素 B 結合之毒殺能力，同時發現於單獨處理情況下發現 LR 此成份對於細胞毒性低，在 10 $\mu\text{g/ml}$ 情況下細胞存活率 LR 約為 80%，而 SB 為 64.12%，如圖 4-9-(B)所示。然而在搭配兩性黴素 B 時，隨其濃度增加，癌細胞死亡率將隨之提升。此外在前處理中加入 5 $\mu\text{g/ml}$ LR 再加入 3、6 mg/ml 兩性黴素 B 後，死亡率可達到 $52.43 \pm 3.05\%$ 及 $43.71 \pm 5.75\%$ ；加入 10 $\mu\text{g/ml}$ LR 時死亡率則分別為 $52.7 \pm 3.88\%$ 及 $53.92 \pm 3.37\%$ ，如圖 4-9-(C)。反觀，細胞株以不同濃度(0.1、1 及 10 $\mu\text{g/ml}$)之 SB 處理，再加入相同濃度之兩性黴素 B，各組別間皆無明顯差異，圖 4-9-(D)。故可推測經正己烷萃取後所得之混合物內含有能與兩性黴素 B 協同

作用之成份，符合本實驗之推論。

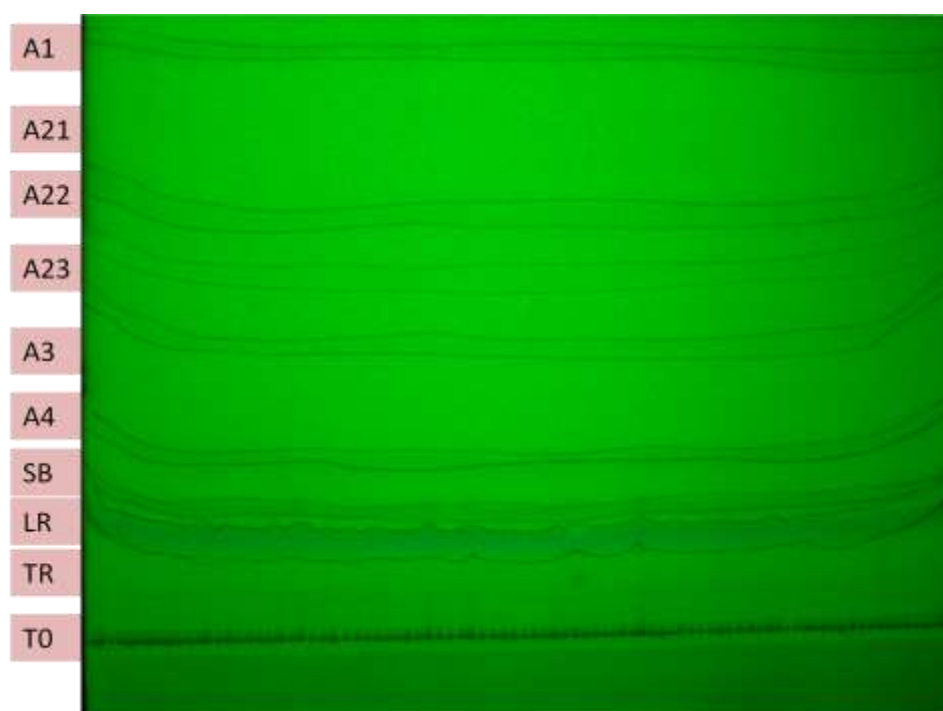


圖 4-8 Preparative-layer chromatograms obtained from n-Hexane extraction of TCAE.

The stationary phase was silica gel and the mobile phase was CHCl_3 . The plates were scanned at 254nm. The region marked with a pencil was scraped off and subjected to further purification.

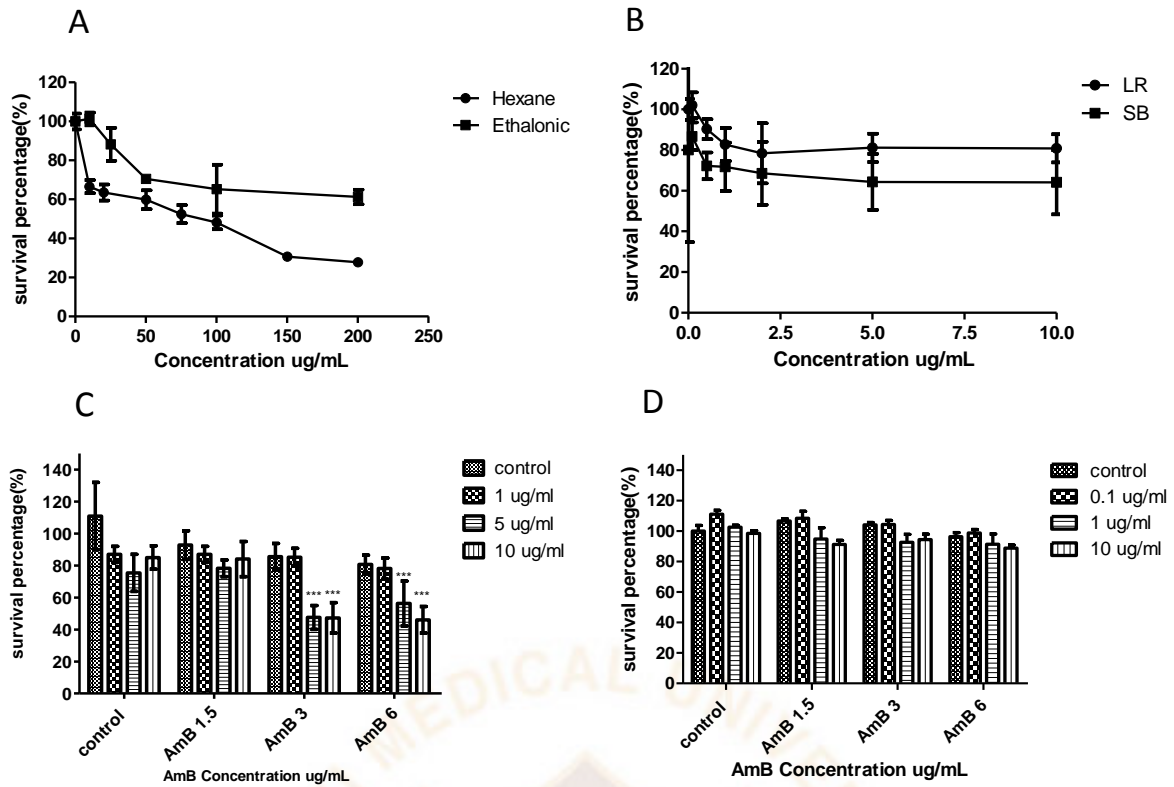


圖 4-9 Cell proliferation by MTT assay was performed on HT29 after treatment with n-Hexane extraction of TCAE(A), PLC purification postion, LR and SB (B) at different concentrations pre-treatment of LR(C) or SB(D) with Amphotericin B. Values are shown as the percentage of living cells relative to the control with the control values set at 100%. The results represent the mean \pm standard deviation (n=5) of three independent experiments.

4-6 正己烷(n-Hexane)萃取之 LR 分析

為能將圖 8 中所得結果 SB 及 LR 能更明顯展開，以避免兩成份因過於接近而影響實驗結果，因此改變展開劑之溶液極性為 $\text{CHCl}_3\text{-MeOH:98-2}$ ，展開正己烷之樟芝粗萃取物，可得結果如圖 10。再次以薄層色層分析確認改變展開劑條件所得結果，如圖 4-11，line 1、2 為標準品，正己烷之樟芝粗萃取物，lin3 與 lin4 為 SB 與 LR，line5 為新展開條件後取得的 LR 部份，line6 為原先條件下刮取下來的 LR，比較過後發現，LR 部份已不含有 SB 成份。刮下圖 9 上 LR 區域後，以相同條件利用製備型色層分析得到 LR-LG、LR-1、LR-R，以分別得其純化物 1.5 毫克(0.03%)、1.4 毫克(0.028%)、1.3 毫克(0.026%)，如圖 4-12。



圖 4-10 Preparative-layer chromatograms obtained from n-Hexane extraction of TCAE by different solvent.

The stationary phase was silica gel and the mobile phase CHCl_3 -MeOH : 98-2. The plates were scanned at 254nm. The region marked with a pencil was scraped off and subjected to further purification..

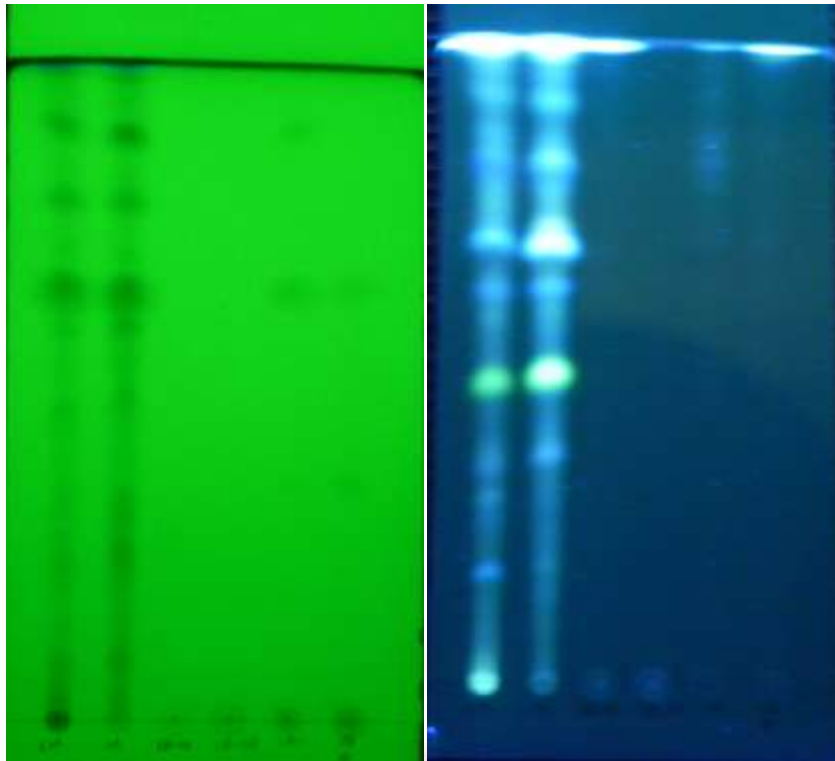


圖 4-11 Thin-layer chromatograms compare with n-Hexane extract and ethanolic extract.

The stationary phase was silica gel and the mobile phase was CHCl_3 -MeOH : 98-2. The plates were scanned at 254nm(A) and 366 nm(B). The line1 and line 2 are alcohol and n-Hexane extraction of *T.Camphoratus*. line 3 and line 4 are separation from LR , LR-SB and LR- LR by TLC. Line 5 and 6 are scraped off and further purification from PLC mobile phase was CHCl_3 -MeOH : 98-2.

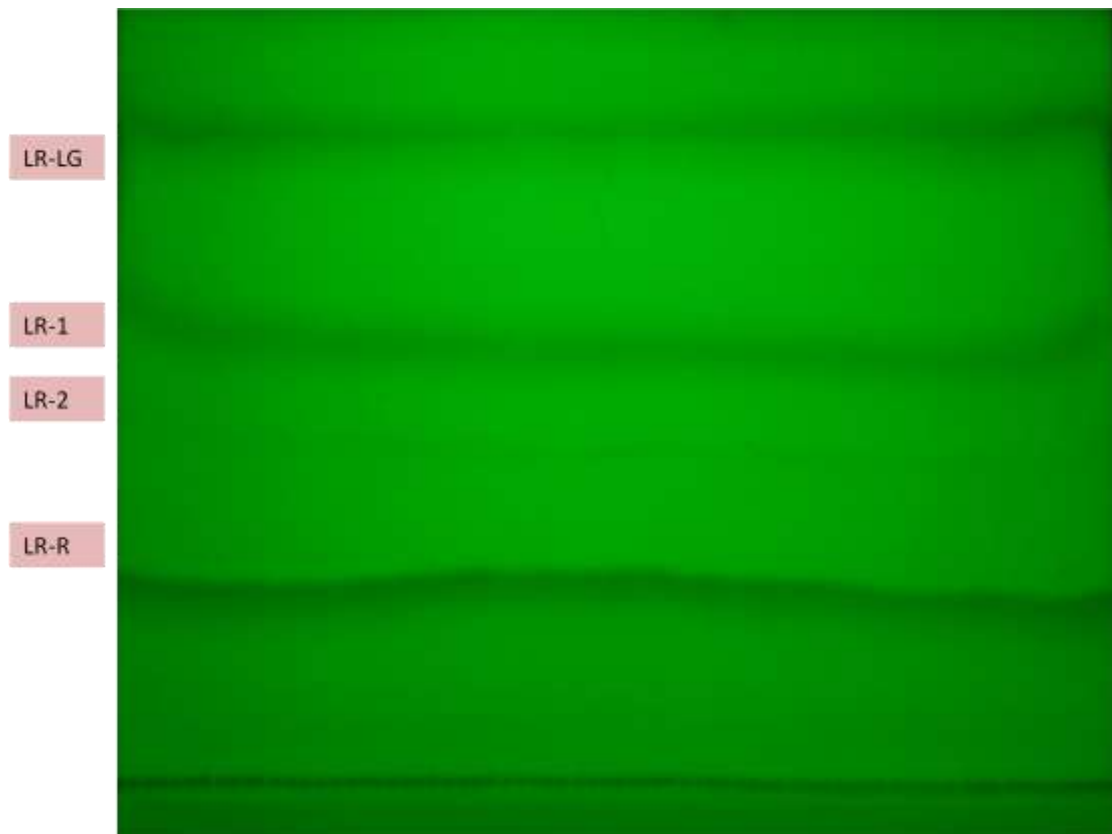


圖 4-12 Preparative-layer chromatograms obtained from n-Hexane extract, LR. The stationary phase was silica gel and the mobile phase $\text{CHCl}_3\text{-MeOH} : 98\text{-}2$. The plates were scanned at 254nm. The region marked with a pencil was scraped off and subjected to further purification.

4-7 正己烷(n-Hexane)萃取之LR對於大腸直腸癌細胞株(HT-29)的影響

為了確認 LR 內特定成分可以與兩性黴素 B 進行協同毒殺作用，利用細胞試驗，針對大腸直腸癌細胞株 HT-29 先處理萃取物後搭配兩性黴素 B，實驗方式為先各別先處理 1、5 及 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 LR-LG、LR-1、LR-R，再加入 1.5、3 及 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的兩性黴素 B 後，與正常組比較，顯示 LR-LG 與 LR-R 兩種部份與兩性黴素 B 搭配使用下，比單獨處理的狀況下，高出一倍，如圖 4-13。



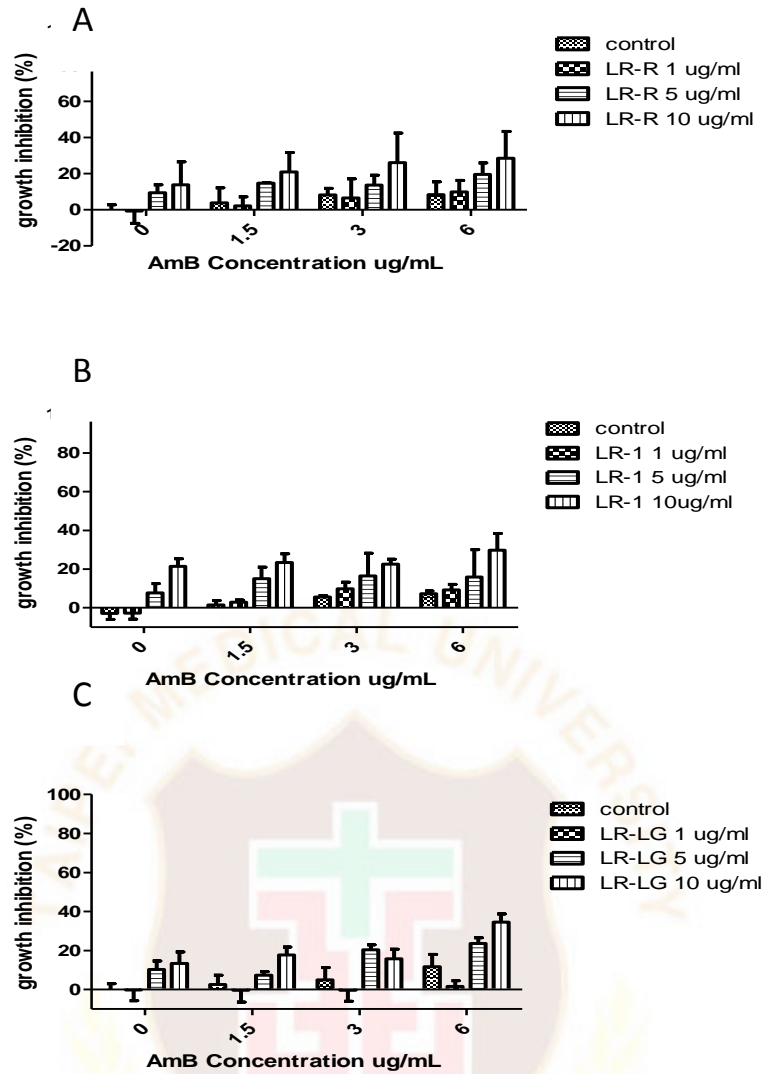


圖 4-13 Cell proliferation by MTT assay was performed on HT29 after treatment with n-Hexane extraction of TCAE,LR after PLC purification position, LR-R(A) and LR-1(B) and LR-LG (C).

pre-treatment at different concentrations then with Amphotericin B. Values are shown as the percentage of living cells relative to the control with the control values set at 100%. The results represent the mean \pm standard deviation (n=5) of three independent experiments.

4-8 酒精萃取之樟芝粗萃物對於大腸直腸癌細胞株(HT-29)與正常細胞株(HEK-293)細胞膜脂質的影響

初步分析不同細胞株之細胞膜，處理樟芝初萃物與對照組相比較，經過定量後點於 TLC 片上，在經過兩次展開液的分離與呈色後所得知結果，結果顯示右側為標準品 C, cholesterol; PE, phosphatidylethanolamine; PS, phosphatidylserine; PC, phosphatidylcholine，比較處理後其細胞膜上脂質成分，可以發現其組成份不論在比例與量之不同，如

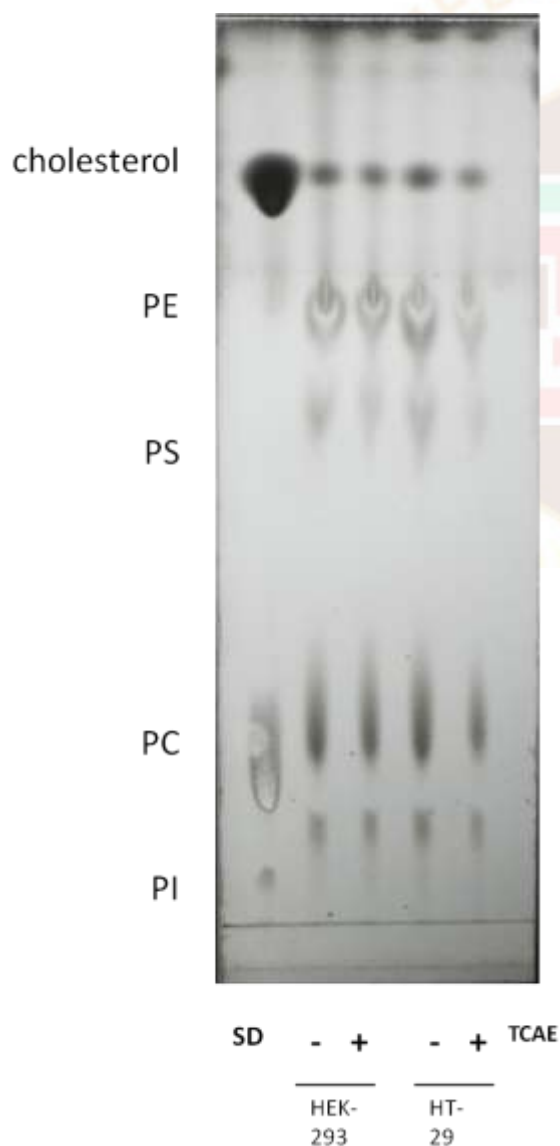


圖 4-14。

圖 4-14 Thin-layer chromatographs of lipids isolated from cell line HT-29 and HEK-293 with or without TCAE; C, cholesterol; PE, phosphatidylethanolamine; PS, phosphatidylserine; PI, phosphatidylinositol; PC, phosphatidylcholine. The plates were washed in the first solvent, heated to 110°C for 30 min and then developed with two solvents in one-dimension. The first solvent was chloroform-methanol-acetic acid-water 35:15:6:1 (v/v); the second was hexane-isopropyl etheracetic acid 65:35:2 (v/v). After charring the plates with a solution of 10% cupric sulfate in 8% phosphoric acid.

第五章 實驗討論

許多文獻指出利用其他甾醇(sterol)以取代癌細胞膜上的膽固醇，提高其對於多烯類之抗真菌藥物的親和力，達到毒殺作用。本實驗選取樟芝萃取物與兩性黴素 B 結合模式，篩選出特定化合物其具抗癌效果，成為具專一性之中草藥新療法。推測癌細胞較正常細胞代謝速率快，因此細胞膜的生合成更加快速，外來的甾醇類更容易嵌入細胞膜，導致加入多烯類之抗真菌藥物如兩性黴素 B 造成癌細胞其膜上通透性增大，達到殺死癌細胞而不影響正常細胞之結果。先前實驗室研究顯示直接加入麥角甾醇或是利用微質體包覆送入麥角甾醇或是其他膽固醇前驅物，以達成置換或嵌入細胞膜，再搭配兩性黴素 B 達成毒殺作用，其效果不佳，唯有透過樟芝粗萃物再搭配兩性黴素 B，才具有極明顯的抑制癌細胞株生長，無論在動物實驗與細胞株體外實驗皆有明顯的效果，為進一步了解樟芝成分中哪種物質可與兩性黴素 B 造成細胞膜通透性之改變，實驗初期透過樟芝水萃取與兩性黴素 B 做結合，利用兩性黴素 B 不溶於水的方式，挑選可與其做結合的物質後，驗證是否樟芝內含有與兩性黴素 B 做結合的成份，結果顯示兩性黴素 B 與純水組別和兩性黴素 B 與樟芝水萃物組別上，兩性黴素 B 可以攜帶部份樟芝萃取成分。文獻指出，在酒精萃取的樟芝粗萃物中，具有許多抗癌成分，首先檢驗粗萃物與兩性黴素 B 單獨毒性，顯示在

大腸直腸癌細胞株 HT-29 大於 100 $\mu\text{g/ml}$ 樟芝酒精粗萃物及正常細胞株 HEK-293 在 3 $\mu\text{g/ml}$ 兩性黴素 B 下具有較明顯的毒性，而在搭配處理情況下顯示只需要 25 $\mu\text{g/ml}$ 的樟芝粗萃物前處理，在加入大於 3 $\mu\text{g/ml}$ 兩性黴素 B 就可以達到 60% 的抑制效果，但是在共同處理情況下，反而對於癌細胞株無明顯抑制作用，推測在粗萃物中之成分需要先與細胞作用後，才有增加癌細胞死亡的效果，若在共同處理下，則消除其抑制作用。推測其目標化合物已經與兩性黴素 B 結合，而無法透過取代或是嵌入細胞膜上，完成增加細胞膜上的通透效果，在實驗初期的試驗中，發現在酒精萃取樟芝的粗萃物，受到酒精極性的影響，在 95% 酒精萃取與絕對酒精萃取，效果不同，進而推測其物質或許極性萃取影響下所導致。因此，為了從樟芝粗萃中篩選出特定效果，利用不同極性的溶劑，將樟芝萃取後，在進行細胞試驗，其結果顯示於圖 4-7，發現低極性萃取後如正己烷和乙酸乙酯所得物質與兩性黴素搭配後，皆使癌細胞生存率明顯下降

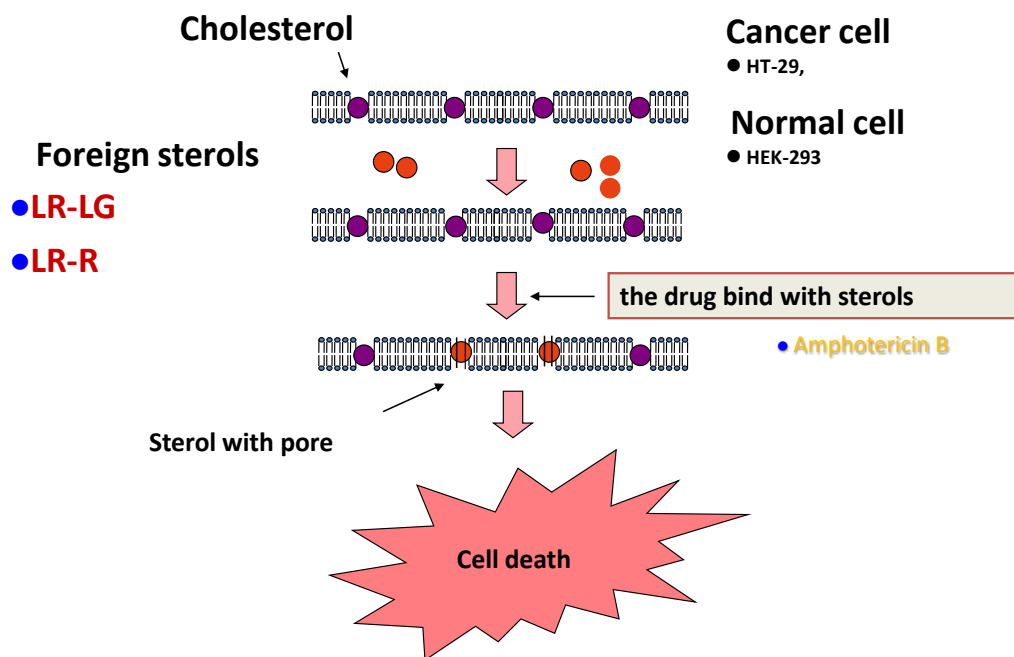
因此，選定由正己烷萃取樟芝所得之粗萃物進行後續分析，利用製備型色層分析方法，將正己烷粗萃物分成十組，由低極性到高極性分成 A1~A4，A2 又分成 A21~A23，以及在短波紫外光下呈現藍色區域簡稱 SB 與可見光下呈現紅色區域簡稱 LR，原點及剩下的區域稱為 T0 和 TR，在將上述十種部份經過減壓濃縮後，與兩性黴素 B 進

行大腸直腸癌細胞 HT-29 毒性試驗，結果顯示在 SB、LR、TR 部份和兩性黴素 B 處理後與對照組比對，隨著兩性黴素 B 濃度增加，其毒殺效果越好。再利用薄層色層分析方法確定其區域還含有哪些物質，發現其中 SB 還含有 LR 部份，造成其 SB 也具有與兩性黴素 B 結合毒殺能力，如圖 4-11，利用改變流動相的極性嘗試將其分離後，再測試一次細胞試驗，圖 4-9(C)、(D)顯示只有 LR 部份具有明顯的毒殺效果，前處理中加入 5 $\mu\text{g/ml}$ LR 再加入 3、6 mg/ml 兩性黴素 B 後，死亡率可達到 $52.43 \pm 3.05\%$ 及 $43.71 \pm 5.75\%$ ；加入 10 $\mu\text{g/ml}$ LR 時死亡率則分別為 $52.7 \pm 3.88\%$ 及 $53.92 \pm 3.37\%$ ，反觀，以不同濃度 (0.1、1 及 10 $\mu\text{g/ml}$) 之 SB 處理後，加入相同濃度之兩性黴素 B，各組別間皆無明顯差異，而單獨處理 0~10 $\mu\text{g/ml}$ 的 LR 及 SB 對於 HT-29 細胞毒性最高分別為 80% 和 64.12%，顯示 LR 對於細胞毒性低，然後搭配兩性黴素 B 卻可以造成高達 50% 的抑制癌細胞生長的作用，其內成分或許具有可以嵌入細胞膜而不會造成細胞死亡，有別於文獻由樟芝萃取物的成分具有抗癌成分，但搭配兩性黴素 B 效果比單獨處理有效，與實驗室先前粗萃物處理不同細胞株或是動物實驗利用餵與樟芝後，再以靜脈注射兩性黴素 B，結果一致。

第六章 結論

樟芝是只生長於牛樟樹之台灣特有種，有關樟芝抗癌的研究不論是子實體或者純化物至今已有許多相關文獻，其生物活性在活體與細胞實驗也截然不同，還需要實際臨床研究來證實其抗癌效果，而目前研究大多針對其直接抗癌成分做為標的，其樟芝粗萃物參雜不同混合物也導致效果需更完整的評估，鑒於逐年樟芝量減少導致其價格不斷攀升，透過本研究也許可以提供另一種減少樟芝攝取搭配兩性黴素 B 達到更良好的治療癌症的方法，然而其分子機制還未完全闡明，需要更多的研究人員投入來解釋與發現，透過薄層液相色層分析法與氣態質譜儀分析癌症細胞與正常細胞中細胞膜上的磷脂質與醇類的差異，或許可以證實在細胞膜上脂質是可以做為研究標的，開拓癌症治療的另一個方向。然而，其結果並不能解釋樟芝所萃取出來的成份 LR 及 LR 分得的成份是透過何種方式進入細胞膜，可能因為癌症細胞代謝速率比一般正常細胞快，導致其容易嵌入外來真菌甾醇，或是細胞膜雙層磷脂質的脂肪酸鏈含有較多的雙鍵，容易吸引含有較多雙鍵的三萜類或真菌甾醇類，透過氣態質譜儀與二次離子質譜儀更可以準確計算出磷脂質上脂肪酸鏈上比例，及準確顯示出正常細胞膜上脂質分布與癌症相關性，是否因磷脂質上的脂肪酸鏈具有較多的雙鍵或是組成

分布上的差異，以導致樟芝三萜類對於細胞敏感度不同，更能進一步說明其機制。



46



第七章 參考文獻

- 1 行政院衛生署.
http://www.doh.gov.tw/CHT2006/DM/DM2_p01.aspx?class_no=25&level_no=1&doc_no=80728. (2011).
- 2 Weinberg, R. E. The biology of cancer. *New York: Garland Science* (2007).
- 3 Tillman, K., Burton, B., Jacques, L. B. & Phurrough, S. E. Compendia and anticancer therapy under medicare. *Annals of Internal Medicine* **150**, 348-350 (2009).
- 4 Kaefer, C. M. & Milner, J. A. The role of herbs and spices in cancer prevention. *Journal of Nutritional Biochemistry* **19**, 347-361, doi:10.1016/j.jnutbio.2007.11.003 (2008).
- 5 Dzubak, P. *et al.* Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural Product Reports* **23**, 394-411, doi:10.1039/b515312n (2006).
- 6 Valeriote, F., Medoff, G. & Dieckman, J. Potentiation of anticancer agent cytotoxicity against sensitive and resistant AKR leukemia by amphotericin B. *Cancer Research* **39**, 2041-2045 (1979).
- 7 Shimokawa, O., Kato, Y. & Nakayama, H. Increased drug sensitivity in *Candida albicans* cells accumulating 14-methylated sterols. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* **24**, 481-483 (1986).
- 8 Bard, M. Biochemical and genetic aspects of nystatin resistance in *saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **111**, 649-657 (1972).
- 9 Barton, D. H. R., Corrie, J. E. T., Widdowson, D. A., Bard, M. & Woods, R. A. Biosynthetic implications of the sterol content of ergosterol-deficient mutants of yeast. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 30-31, doi:10.1039/c39740000030 (1974).
- 10 Feigin, A. M. Selective modification of sterol composition of hepatomas: New opportunities for chemotherapy. *Medical Hypotheses* **52**, 383-388, doi:10.1054/mehy.1995.0678 (1999).
- 11 Charbonneau, C., Fournier, I., Dufresne, S., Barwicz, J. & Tancredi, P. The interactions of amphotericin B with various sterols in relation to its possible use in anticancer therapy. *Biophysical Chemistry* **91**, 125-133, doi:10.1016/s0301-4622(01)00164-8 (2001).
- 12 Chen, Y. C., Ho, H. O., Su, C. H. & Sheu, M. T. Anticancer Effects of *Taiwanofungus camphoratus* Extracts, Isolated Compounds and its Combinational use. *Journal of Experimental and Clinical Medicine* **2**, 274-281,

- doi:10.1016/j.jecm.2010.08.003 (2010).
- 13 Campbell NA, R. J. BIOLOGY. 138-144 (2002).
- 14 Fahy, E. *et al.* A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research* **46**, 839-861, doi:10.1194/jlr.E400004-JLR200 (2005).
- 15 歐陽鐘汕, 劉. 從肥皂泡到液晶生物膜 新世紀物理研習叢書 **9** (1995).
- 16 Pruitt, N. L. Adaptations to temperature in the cellular membranes of crustacea: membrane structure and metabolism. *Journal of Thermal Biology* **15**, 1-8, doi:10.1016/0306-4565(90)90040-o (1990).
- 17 Vance DE, V. J. t. e. E. b. Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. (2004).
- 18 Wenk, M. R. The emerging field of lipidomics. *Nature Reviews Drug Discovery* **4**, 594-610, doi:10.1038/nrd1776 (2005).
- 19 Watson, A. D. Thematic review series: Systems biology approaches to metabolic and cardiovascular disorders. Lipidomics: A global approach to lipid analysis in biological systems. *Journal of Lipid Research* **47**, 2101-2111, doi:10.1194/jlr.R600022-JLR200 (2006).
- 20 Hermansson, M., Uphoff, A., Käkälä, R. & Somerharju, P. Automated quantitative analysis of complex lipidomes by liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **77**, 2166-2175, doi:10.1021/ac048489s (2005).
- 21 Yetukuri, L. *et al.* Bioinformatics strategies for lipidomics analysis: Characterization of obesity related hepatic steatosis. *BMC Systems Biology* **1**, doi:10.1186/1752-0509-1-12 (2007).
- 22 Han, X. Neurolipidomics: challenges and developments. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **12**, 2601-2615 (2007).
- 23 張東柱. 牛樟之病害, 牛樟生物學及育林技術研討會論文集. *林業叢刊* **72**, 127-131 (1997).
- 24 Chen, J. C. *et al.* Development of *Antrodia camphorata* mycelium with submerge culture. *Fungal Sciences* **16**, 7-22 (2001).
- 25 許勝傑, 陳清農, 陳勁初. 樟芝宿主專一性之探討. *台灣農業化學與食品科學* **38**, 533-539 (2000).
- 26 Zang M, S. C. *Ganoderma comphoratum*, a new taxon in genus *Ganoderma* from Taiwan. *China Acta Bot Yunnancia*, 395-396 (1990).
- 27 Chang TT, C. W. *Antrodia cinnamomea* sp. nov. on *Cinnamomum kanehirai* in Taiwan. *Mycological Research* **99**, 756-758 (1995).
- 28 Wu SH, R. L., Chang TT. *Antrodia camphorata* ('niu-chang-chih'), new combination of a medicinal fungus in Taiwan. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **38**, 273-275 (1997).

- 29 Chang, C. Y., Lue, M. Y. & Pan, T. M. Determination of adenosine, cordycepin and ergosterol contents in cultivated *Antrodia camphorata* by HPLC method. *Journal of Food and Drug Analysis* **13**, 338-342 (2005).
- 30 Ao, Z.-H. *et al.* Niuchangchih (*Antrodia camphorata*) and its potential in treating liver diseases. *Journal of Ethnopharmacology* **121**, 194-212, doi:10.1016/j.jep.2008.10.039 (2009).
- 31 Mizuno, T., Hagiwara, T., Nakamura, T., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T. and Asakura, A. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "Himematsutake," the fruiting body of *Agaricus blazei murill.* *Agric. Biol. Chem* **54**, 2889-2896 (1990).
- 32 李一宏. 樟芝菌絲體之培養及其多醣體抗乙型肝炎病毒活性評估, (2003).
- 33 Turner, W.B. and Aldridge, D.C. *Fungus Metabolites II.* (1983).
- 34 Manitto. Biosynthesis of Natural products, . 319 (1981).
- 35 高曉薇. 台灣靈芝屬新種樟芝之三萜類成分研究, 台北醫學院天然物醫學研究所碩士論文, (1992).
- 36 Chen, C. H., Yang, S. W. & Shen, Y. C. New steroid acids from *Antrodia cinnamomea*, a fungal parasite of *Cinnamomum micranthum*. *Journal of Natural Products* **58**, 1655-1661 (1995).
- 37 Yang, S. W., Shen, Y. C. & Chen, C. H. Steroids and triterpenoids of *Antrodia cinnamomea* - A fungus parasitic on *Cinnamomum micranthum*. *Phytochemistry* **41**, 1389-1392 (1996).
- 38 Cherng, I. H., Wu, D. P. & Chiang, H. C. Triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*. *Phytochemistry* **41**, 263-267 (1996).
- 39 Cherng, I. H., Chiang, H. C., Cheng, M. C. & Wang, Y. Three new triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*. *Journal of Natural Products (Lloydia)* **58**, 365-371 (1995).
- 40 Shen CC, Kuo YC, Huang RL, Lin LC, Don MJ, Chang T T , Chou CJ. New ergostane and lanostane from *Antrodia camphorata*. *J Chin Med* **14**, 247-258 (2003).
- 41 Shen, Y. C. *et al.* Evaluation of the anti-inflammatory activity of zhankuic acids isolated from the fruiting bodies of *Antrodia camphorata*. *Planta Medica* **70**, 310-314 (2004).
- 42 Male, K. B. *et al.* Probing inhibitory effects of *Antrodia camphorata* isolates using insect cell-based impedance spectroscopy: Inhibition vs chemical structure. *Chemical Research in Toxicology* **21**, 2127-2133, doi:10.1021/tx800202a (2008).
- 43 Nakamura, N. *et al.* Five new maleic and succinic acid derivatives from the mycelium of *Antrodia camphorata* and their cytotoxic effects on LLC tumor

- cell line. *J Nat Prod* **67**, 46-48 (2004).
- 44 Liu, J. J. *et al.* Antitumor effects of the partially purified polysaccharides from *Antrodia camphorata* and the mechanism of its action. *Toxicol Appl Pharmacol* **201**, 186-193 (2004).
- 45 Peng, C. C., Chen, K. C., Peng, R. Y., Su, C. H. & Hsieh-Li, H. M. Human urinary bladder cancer T24 cells are susceptible to the *Antrodia camphorata* extracts. *Cancer Lett* (2006).
- 46 Hsu, Y. L. *et al.* Apoptotic effects of extract from *Antrodia camphorata* fruiting bodies in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Lett* **221**, 77-89 (2005).
- 47 Yang, H. L. *et al.* Growth inhibition and induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by *Antrodia camphorata*. *Cancer Lett* **231**, 215-227 (2006).
- 48 Yeh, C. T. *et al.* Cytotoxic triterpenes from *Antrodia camphorata* and their mode of action in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer Letters* **285**, 73-79 (2009).
- 49 Chen, Y.-J., Chou, C.-J. & Chang, T.-T. Compound MMH01 possesses toxicity against human leukemia and pancreatic cancer cells. *Toxicology in Vitro* **23**, 418-424, doi:10.1016/j.tiv.2009.01.011 (2009).
- 50 Hseu, Y. C. *et al.* Induction of apoptosis by *Antrodia camphorata* in human premyelocytic leukemia HL-60 cells. *Nutrition and Cancer* **48**, 189-197 (2004).
- 51 Hseu, Y.-C. *et al.* Inhibition of cyclooxygenase-2 and induction of apoptosis in estrogen-nonresponsive breast cancer cells by *Antrodia camphorata*. *Food and Chemical Toxicology* **45**, 1107-1115, doi:10.1016/j.fct.2006.12.012 (2007).
- 52 Yang, H.-L. *et al.* Growth inhibition and induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by *Antrodia camphorata*. *Cancer Letters* **231**, 215-227, doi:10.1016/j.canlet.2005.02.004 (2006).
- 53 Peng, C.-C., Chen, K.-C., Peng, R. Y., Su, C.-H. & Hsieh-Li, H. M. Human urinary bladder cancer T24 cells are susceptible to the *Antrodia camphorata* extracts. *Cancer Letters* **243**, 109-119, doi:10.1016/j.canlet.2005.11.021 (2006).
- 54 Wu, H. *et al.* Proteomic analysis of the effect of *Antrodia camphorata* extract on human lung cancer A549 cell. *PROTEOMICS* **6**, 826-835, doi:10.1002/pmic.200401341 (2006).
- 55 Song, T.-Y., Hsu, S.-L. & Yen, G.-C. Induction of apoptosis in human hepatoma cells by mycelia of *Antrodia camphorata* in submerged culture. *Journal of Ethnopharmacology* **100**, 158-167, doi:10.1016/j.jep.2005.02.043 (2005).
- 56 Hsu, Y.-L. *et al.* Apoptotic effects of extract from *Antrodia camphorata* fruiting bodies in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Letters* **221**, 77-89, doi:10.1016/j.canlet.2004.08.012 (2005).

- 57 Hseu, Y.-C., Chen, S.-C., Chen, H.-C., Liao, J.-W. & Yang, H.-L. *Antrodia camphorata* inhibits proliferation of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Food and Chemical Toxicology* **46**, 2680-2688, doi:10.1016/j.fct.2008.04.036 (2008).
- 58 W.C. Lin, S. C. K., Y.W. Wu. Effects of 28-Days' Repeated Oral Administration of the Fermented Extract of Mycelia of *Antrodia Comphorate* (CCRC 93032) on Rats. *J. Chin. Med* **12**, 293-303 (2001).
- 59 Brajtburg, J., Powderly, W. G., Kobayashi, G. S. & Medoff, G. Amphotericin B: Current understanding of mechanisms of action. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **34**, 183-188 (1990).
- 60 Huang, W. *et al.* Ion channel behavior of Amphotericin B in sterol-free and cholesterol- or ergosterol-containing supported phosphatidylcholine bilayer model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy. *Biophysical Journal* **83**, 3245-3255 (2002).
- 61 Baginski, M. a. C., J. Amphotericin B and Its New Derivatives - Mode of Action. *Current Drug Metabolism* **10**, 459-469 (2009).
- 62 Fujii, G., Chang, J. E., Coley, T. & Steere, B. The formation of amphotericin B ion channels in lipid bilayers. *Biochemistry* **36**, 4959-4968 (1997).
- 63 Kruijff, B. D., W. J. Gerritsen, A. R. Oerlemans, A. Demel, and L. L. M. V. Deenen. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholesplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. II. Temperature dependence of the polyene antibiotic-sterol complex formation. *iochim. Biophys. Acta.* **339**, 44-56 (1974).
- 64 Bonilla-Marín, M., Moreno-Bello, M. & Ortega-Blake, I. A microscopic electrostatic model for the amphotericin B channel. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1061**, 65-77, doi:10.1016/0005-2736(91)90269-e (1991).
- 65 Kintzel, P. E. & Smith, G. H. Practical guidelines for preparing and administering amphotericin B. *American Journal of Hospital Pharmacy* **49**, 1156-1164 (1992).
- 66 Laniado-Laborín, R. & Cabrales-Vargas, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Revista Iberoamericana de Micología* **26**, 223-227, doi:10.1016/j.riam.2009.06.003.
- 67 Bolard, J., Legrand, P., Heitz, F. & Cybulska, B. One-sided action of amphotericin B on cholesterol-containing membranes is determined by its self-association in the medium. *Biochemistry* **30**, 5707-5715 (1991).
- 68 Brutyan, R. A. & McPhie, P. On the one-sided action of amphotericin B on lipid bilayer membranes. *Journal of General Physiology* **107**, 69-78 (1996).

- 69 Ockman, N. Reflection spectra from monolayers of amphotericin B and amphotericin B cholesterol spread on water. *Biochimica et Biophysica Acta* **373**, 481-489 (1974).
- 70 Gallis HA, D. R., Pickard WW. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Ref Infect Dis* **12**, 308-329 (1990).
- 71 Prentice, H. G. *et al.* A randomized comparison of liposomal versus conventional amphotericin B for the treatment of pyrexia of unknown origin in neutropenic patients. *British Journal of Haematology* **98**, 711-718 (1997).
- 72 Walsh, T. J. *et al.* Liposomal amphotericin b for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. *New England Journal of Medicine* **340**, 764-771, doi:10.1056/nejm199903113401004 (1999).
- 73 De Lucca, A. J. & Walsh, T. J. Antifungal peptides: Novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 1-11 (1999).
- 74 Adler-Moore, J. P., Olson, J. A. & Proffitt, R. T. Alternative dosing regimens of liposomal amphotericin B (AmBisome) effective in treating murine systemic candidiasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **54**, 1096-1102, doi:10.1093/jac/dkh460 (2004).
- 75 White, M. H. *et al.* Amphotericin B colloidal dispersion vs. amphotericin B as therapy for invasive aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases* **24**, 635-642 (1997).
- 76 Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry* **226**, 497-509 (1957).
- 77 Aveldano, M. I. & Horrocks, L. A. Quantitative release of fatty acids from lipids by a simple hydrolysis procedure. *Journal of Lipid Research* **24**, 1101-1105 (1983).