

# 樟芝發酵液對大鼠肝臟纖維化及胃腸功能之改善作用

研究生 郭淑卿

中國醫藥學院 中國藥學研究所



## 摘要

本研究之目的在探討樟芝菌株 CCRC93032 發酵過濾液(以下簡稱樟芝發酵液)的安全性及保健功效,為樟芝發酵液的開發與利用之基礎研究,得到如下結果:

以四氯化碳連續經口投予八週誘發慢性肝炎,樟芝發酵液由第四週開始口服投予至實驗終了,由血清生化值及肝臟膠原蛋白含量顯示樟芝發酵液(1 g/kg)有改善四氯化碳誘發慢性肝炎的效果。另外,樟芝發酵液(2 g/kg)也能抑制 dimethylnitrosamine 所引起的肝臟纖維化。經過四週的投予,樟芝發酵液(3 mg/kg)能增加盲腸的乳酸菌量。本研究也顯示樟芝發酵液(2 mg/kg)能抑制第四型過敏反應、胃酸分泌及排尿作用。連續經口投予 28 天的毒性試驗顯示樟芝發酵液的安全劑量在 2 g / kg 以下。急性毒性試驗也發現樟芝發酵液(15 g/kg)引起嚴重下痢。

結論:樟芝發酵液有可能開發成護肝的健康食品。



# 第一章 緒 論

## 第一節 研究背景與目的

「打造台灣成為中草藥科技島」是政府近年來的重要經濟政策之一，若能開發出具本土性特色的中草藥則將有更大的經濟利益。台灣地處亞熱帶，天然資源豐富，民間流傳使用的草藥不計其數，其中最昂貴，最有開發潛力的當屬【樟芝】。

樟芝(*Antrodia camphorata*)又名牛樟菇或牛樟芝，僅生長在臺灣特有的國寶級保育樹種臺灣牛樟樹(*Cinnamomum kanehirai*)之中空心材內壁組織上。在分類上為多孔菌科，*Antrodia* 屬的新種(Wu *et al* ,1997 ; Chang and chou ,1995 ; 臧穆、蘇慶華，1990)。

早期的傳說與原住民特有的飲酒文化有關，因喝酒過多導致肝病變的比率居高不下，但久食樟芝烹煮液後，肝病竟不藥而癒、強身健體，解酒效力更是一流，因此原住民將樟芝奉為上品，成為原住民的傳統珍貴藥材（王伯徹，2000）。

民間流傳有解酒、活血化瘀、祛風行氣、安神、保肝、抗癌、治療急性腹痛等功效（王伯徹，2000）。野生的樟芝來源有限，且相傳其藥效極佳，導致身價大漲、無法有效阻止盜採而日益減少。因此產學界大力投入人工生產樟芝，可說是兼顧經濟與環保的科技產品。

目前樟芝菌絲體已可採用深層發酵原理量產，且已有產品在市場上推出。由於此培養技術上並無子實體的形成，與一般野生所採食之樟芝子實體有別，因此產業界也投入固態培養樟芝之開發，已有初步成果（陳啟楨，2001）。另外，財團法人食品工業研究所菌種保存及研究中心對樟芝菌種也有深入的研究，分出多種品系，其中 CCRC 93032 樟芝菌株已取得專利，其活性

成分存在於發酵液中，因此可直接使用發酵液，與一般使用菌株有別。

樟芝菌株 CCRC 93032 發酵液的生物活性所知的並不多，跨部會「保健食品研究開發計畫」將其列為重點項目，本研究為該開發計畫的子計畫之一，主要目的在探討樟芝菌株 CCRC 93032 發酵過濾液的安全性及具有那些保健功效，足以開發成健康食品。稱為過濾液是把菌絲體過濾後才提供使用之意。

「健康食品護肝功能評估方法」以四氯化碳誘發鼠類慢性肝炎，來評估試驗材料是否有護肝作用。所有慢性肝炎都有可能轉變成肝纖維化或肝硬化，因此四氯化碳誘發的慢性肝炎也是肝纖維化研究的很好動物模式。目前正在進行臨床試驗的肝硬化藥物 S-adenosyl-L-methionine 對四氯化碳誘發肝纖維化也有很好的效果(Lieber 1999；Osman *et al.*, 1993；Mato *et al.*, 1999)。

基因微陣列技術是將數千或數萬個 DNA 或 cDNA 探針，以高密度點陣固定在處理過的玻璃材質上，而受測的樣品與探針進行雜交反應(Hybridization)，並記錄下有雜交反應的點的位置，經一次的實驗，cDNA 微陣列晶片能夠將成千上萬的基因表現(Gene Expression) 記錄下來。由於一片生物晶片上含有上千萬的基因，故一個細胞內少數幾個訊息 RNA 的改變，使得研究者能透過晶片上的數據得整體性訊息(Nicole *et al.*, 2000)。肝纖維化的進展是一連串基因的表現(Brenner, 2000)，因此我們也企圖利用 cDNA 基因微陣列的技術來分析這些相關的基因情報。

沈立言等人(2002)與本研究室合作，依照衛生署公告的方法進行樟芝菌株 CCRC 93032 發酵過濾液的護肝功能評估得到正面的結果。由於粗過濾液藥理實驗再現性可能較差，為了增強樟芝菌株 CCRC 93032 的護肝產品的開發信心，本研究雖採用相同的四氯化碳大鼠慢性肝炎模式，但也做了一些改變，即大鼠先經四氯化碳處理 4 週後再投予樟芝菌株發酵過濾液，檢討是否有治療的效果。並利用 cDNA 微陣列技術分析最後肝臟檢體的基因表現，希望有助於作用途徑的瞭解。除此之外，本研究也進一步使用二甲基亞硝酸胺

(Dimethylnitrosamine ; DMN) 誘導的大鼠肝臟纖維化實驗模式 (Ala-Kokko *et al.*,1987 ; Ryhanen *et al.*,1996)來確認樟芝發酵過濾液的護肝作用

樟芝價格昂貴，若能對難病的預防治療有幫助才能顯現其價值。癌症為目前難病之一，癌症化學療法引起的副作用是臨床上很棘手的問題。一些化療藥物主要的問題在於免疫抑制作用。在本研究中使用化療藥物 cyclophosphamide、5- Fluorouracil (Ziauddin *et al.*, 1996; Konishi *et al.*, 1996)誘發小鼠免疫抑制作用，探討樟芝發酵液是否有增強免疫的活性。又同為化療藥物的 cisplatin 系經由自由基的作用引起嚴重腎毒性 (Matsushima *et al.*, 1998)，在本研究中也將一併探討。

免疫製劑分為免疫增強劑和免疫抑制劑兩大類。前者的效應特點是促進免疫功能，而後者表現為對免疫應答的抑制。免疫應答的抑制即為抗過敏的藥物。在本研究中也初步探討樟芝發酵過濾液對 4 種型式過敏及佐劑型關節炎(adjuvant arthritis)的效果。由於過敏的媒介物質與發炎反應有密切關係，為明瞭是否經由抗發炎而顯現抗過敏作用，因此也檢討抗發炎作用。

雖然衛生署公佈的健康食品評估方法無降血壓這項目，但需服用藥物控制高血壓的病患很多，因此樟芝發酵液是否對血壓的控制有幫助也是值得探討的，在本研究使用自發性高血壓大鼠，測定清醒動物尾動脈壓來評估樟芝有無降壓作用。同時也檢討其對排尿的影響。

機能性食品或健康食品由於是每天可以服用的，因此其安全性相當重要，樟芝發酵過濾液是否能開發為保健食品其服用的安全性是關鍵所在，因此在本研究中也進行樟芝發酵液連續餵食 28 天的毒性試驗。為使實驗發揮最大的效益，在此實驗終了動物犧牲時也保留部分臟器進行胃腸功能試驗及組織抗氧化活力的測定。

89 年 8 月「健康食品法」開始實施，衛生署公告了一些健康食品的評估方法，從此由草藥開發成健康食品有一規範可循，此法的實施，對中草藥的

開發影響深遠。由於有這些法規，使草藥 ⇒ 食品 ⇒ 健康食品 ⇒ 藥品的開發模式變得可行，有助於增加業界投入中草藥研發的信心。依照此模式來開發樟芝發酵過濾液是我們努力的目標。

## 第二節 文獻考察

### 一、植物基原考察

樟芝之植物學分類 (Hawksworth *et al.*, 1996)

真菌界 (Fungi)

擔子菌門 (Basidiomycota)

擔子菌亞門 (Basidiomycotina)

同擔子菌綱 (Homobasidiomycetes)

無褶菌目 (Aphyllorphales)

多孔菌科 (Polyporaceae)

薄孔菌屬 (*Antrodia*)

樟芝第一次新種發表是在 1990 年，但由於標本沾染了靈芝的孢子，因而在描述時將靈芝孢子誤作為樟芝的孢子，而被誤發表為靈芝屬(*Ganoderma*)的成員。此時其基名為 *Ganoderma camphoratum*。(Zang & Su.1990)。1995 年時，張東柱等人進行樟芝第二次的新種發表，命名為 *Antrodia cinnamomea*，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。到了 1997 年，吳聲華 (Wu S.-H.)等人經整合前兩次文獻中的一致內容後，進行第三次的新種發表，將樟芝重新命名為 *Antrodia camphorata*。

樟芝的別名尚有「樟菇」、「樟菰」、「樟窟內菰」、「牛樟菇」、「牛樟芝」、「紅樟」、「紅樟芝」等。

樟芝一直被民間視為「靈芝之王」，是臺灣特有的菇類。分佈於臺灣山區海拔 450-1,500 公尺間之牛樟樹樹幹腐朽之心材內壁、或枯死倒伏之牛樟木材陰暗潮濕之表面。其子實體屬多年生，具有強烈沖鼻的樟樹香氣，此與一般靈芝類有很大的差異。

樟法子實體外型呈板狀或鐘狀，無柄，新鮮者表面呈鮭紅色，老熟後顏色則呈桔色或黃色，菌蓋半圓形，直徑 10-20 × 3-8 公分、厚 2-2.5 公分，其表面褐色至黑褐色，具不明顯的縱皺，有光澤、邊緣平而鈍，菌肉兩層，上層為木材色、下層為象牙色，厚 1-1.5 公分(高，1991)。

板狀型態者，整面全有菌孔，板底層有淺黃白色的木栓質，藉此木栓質附著在牛樟樹中空心材內壁上生長。鐘狀形態者，充滿菌孔( 4-5 個菌孔/mm)，內有孢子味極苦，鐘體則呈暗綠褐色的皮殼。以顯微鏡觀察其擔孢子，其型態為平滑無色之透明微彎柱形(3.5-5 × 1.5-2 μ m)。

樟芝最早存在的年代已不可考，因其只生長在臺灣特有的牛樟樹上，所以從牛樟樹在臺灣的分佈情形與歷史，即可略知樟芝存在的軌跡。牛樟樹

(*Cinnamomum kanehirai*)是臺灣特有的常綠闊葉大喬木，與一般常見的樟樹不同，葉長約 15 公分、寬約 9 公分，適用於雕刻及製作高級家具，生長於臺灣海拔 200-2,000 的山區，尤其是桃園角板山、南庄三灣、南投竹山、高雄六龜等四大區。隨著台灣的高度開發，在日人據台期間，1899 年建立樟腦專業制度，在台灣大肆砍伐牛樟樹等樟樹類，製作樟腦油。最近 100 年來，砍闢及無造林工作的雙重打擊，牛樟樹已難得一見，並被台灣列為一級木的國寶級保護樹種。

## 二、 成分考察

有關樟芝的成分研究，大多著重在大分子的多醣體(polysaccharides)和小分子的三 類(triterpenoids)和固醇類(steroids)。

樟芝含有大分子之多醣體，以不同單糖組成存在於其子實體及菌絲體中，但經光譜分析後皆含有具生理活性之  $\beta$ -D-葡聚醣( $\beta$ -D-glucans) (黃鈴娟, 2000)。

從子實體得到的三類化合物有 antrocin、4,7-dimethoxy-5-methyl-1,3-benzodioxole 和 2,2',5,5'-tetramethoxy-3,4,3',4'-bi-methyl-enedioxy-6,6'-dimethylbiphenyl (Chiang *et al.*,1995)，以 ergostane 為骨架之新三類化合物 antcin A、antcin B、antcin C、antcin E、antcin F、methyl antcinate G 和 methyl antcinate H (Cherng *et al.*, 1995, 1996)。

子實體另含以 ergostane 為骨架的化合物 Zhankuic acid A、B 及 C、zhankuic acid D 和 zhankuic acid E (Chen and Yang, 1995; Yang 1996)。以 lanostane 為骨架的新化合物是 15-acetyl-dehydro-sulphurenic acid、dehydroeburicoic acid 和 dehydro-sulphurenic acid (陳勁初, 2001)。

目前所知，樟芝本身或其抽出物的苦味成分，很可能為多氧化型之三類及固醇類(吳德鵬, 1995)。

至於菌絲體方面的鑑定則仍缺乏，僅曾鑑定出 arabitol、trehalose、erythritol、xylitol、ergosterol、 $\beta$ -sitosterol 等植物常見成分(陳勁初, 2001)。

### 三、藥理活性考察

已知樟芝其子實體甲醇萃取物可抑制金黃色葡萄球菌和鬚癬小芽癬菌之生長及抗膽鹼、腸弛緩運動及血小板凝集作用等 (簡秋源等, 1997)。

樟芝的抗氧化能力研究結果顯示，樟芝子實體及菌絲體之甲醇萃取液亦皆具有強抗氧化性，經以 DETBA 法、共軛雙烯法、還原力、捕捉超氧陰離子、螯合亞鐵離子及捕捉  $\text{OH}^\bullet$  自由基等 6 種抗氧化模式評估結果，其抗氧化能力以新鮮子實體及菌絲體優於風乾子實體 (Huang *et al.*, 1999)。

樟芝子實體經分離出的化合物 Zhankuic acid A、B 及 C，其中 A 和 C 對



P-388 淋巴癌細胞株有細胞毒殺作用，而 A 和 B 具有 anticholinergic 及 antiserotonergic 的效果 (Chen and Yang, 1995)，此外另一已被鑑定之化合物 dehydroeburicoic acid (楊書威，1991) 則具抗炎作用。antcin A 具有抑制老鼠血癌 (P-388 murine leukemia) 細胞毒素的活性，antcin B 具有抗副交感神經作用 (anticholinergic) 及抗血清素 (antiserotonin) 活性 (Cherng and Chiang, 1995)。

在大白鼠初代肝細胞之研究上，添加發酵萃取液 2 % 及 4 %，經 24 小時後對肝細胞之生存力、抗氧化力及解毒代謝能力皆有良好之效果 (沈立言，2000)。另在 SD 大白鼠的活體試驗中證明，樟芝子實體具有降低酒精所誘發之 sGOT、sGPT、TBARs 值上升及降低酒精所誘發之 SOD、Catalase 活性，並由組織切片觀察，印證對肝細胞無傷害性 (戴宇昀等，2001)。另有研究顯示樟芝發酵液能抑制四氯化碳引起的大鼠急性肝炎 (宋祖瑩，2002)。

樟芝菌絲體發酵液暴露於 TK6 人類淋巴母細胞，結果顯示樟芝對化學致癌物 DAC 所誘發的 DNA 損傷有明顯的拮抗作用，即有抗基因毒性的功能 (江素瑛等，2002)。另以樟芝原菌液利用小白鼠的實驗證實其成分，對 T cell 確實有促進 IL-2 及 INF- $\gamma$  基因表現的功能，即具有可提升免疫系統的調節作用 (賴宏亮等，2002)。