

中國醫藥學院中國藥學研究所博士論文

編號：ICPS-D42

指導教授：謝明村 博士

共同指導教授：盧美光 博士

共同指導教授：謝文全 博士

論文題目

樟芝菌絲體之培養及其多醣體

抗乙型肝炎病毒活性評估

Studies on the culture of *Antrodia camphorata* mycelia  
and its polysaccharides against hepatitis B virus

研究生：李一宏

中國醫藥學院 中國藥學研究所

中華民國九十二年六月

# 目 錄

目 錄	-----	
圖表目錄	-----	
中文摘要	-----	
英文摘要	-----	
第一章 緒 論	-----	1
第二章 總 論	-----	5
第一節 靈芝之文獻考察	-----	7
一、靈芝之本草文獻考察	-----	7
二、靈芝之藥用植物及生藥學文獻考察	-----	25
三、靈芝之成分文獻考察	-----	27
四、樟芝之文獻考察	-----	28
五、樟芝之藥理作用文獻考察	-----	33
第二節 乙型肝炎病毒	-----	37
一、乙型肝炎病毒之構造及其感染性	-----	37
二、乙型肝炎病毒轉錄(transcription)及訊息 RNA	-----	38
三、乙型肝炎病毒之轉譯(translation)及其抗原(antigen)	----	39
四、乙型肝炎病毒之生活史(life cycle)	-----	40
第三章 材料與方法	-----	42
第一節 實驗材料	-----	42
一、實驗材料	-----	42
二、實驗藥品	-----	44
三、實驗儀器	-----	45

第二節 實驗方法-----	46
一、樟芝粗蛋白之測量-----	46
二、不同含醣培養基對樟芝糖類合成之影響-----	46
三、相同培養條件下不同種樟芝多糖之測量-----	47
四、抗乙型肝炎病毒活性之測定-----	48
第四章 實驗結果-----	50
一、樟芝粗蛋白之測量-----	50
二、不同含醣培養基對樟芝醣類合成之影響-----	51
三、相同培養條件下不同種樟芝多醣之測量-----	72
四、抗乙型肝炎病毒活性之測定-----	75
第五章 討論-----	79
第六章 結論-----	82
謝 辭-----	84
參考文獻-----	85

## 圖表目錄

表一	五種培養樟芝菌絲多醣體之抗 HbsAg 及抗 HbeAg 活性---	78
圖一	葡萄糖對培養樟芝菌絲體生長之影響-----	52
圖二	木糖對培養樟芝菌絲體生長之影響-----	53
圖三	鼠李糖對培養樟芝菌絲體生長之影響-----	54
圖四	半乳糖對培養樟芝菌絲體生長之影響-----	55
圖五	果糖對培養樟芝菌絲體生長之影響-----	56
圖六	蔗糖對培養樟芝菌絲體生長之影響-----	57
圖七	麥芽糖對培養樟芝菌絲體生長之影響-----	58
圖八	七種單糖之 HPLC 分析圖-----	61
圖九	葡萄糖對培養樟芝菌絲體所含 myo-inositol , arabitol , mannitol , fucose 及 glucose 量之影響-----	62
圖十	木糖對培養樟芝菌絲體所含 myo-inositol , arabitol , mannitol , fucose 及 glucose 量之影響-----	63
圖十一	鼠李糖對培養樟芝菌絲體所含 myo-inositol , arabitol , mannitol , fucose 及 glucose 量之影響-----	64
圖十二	半乳糖對培養樟芝菌絲體所含 myo-inositol , arabitol , mannitol , fucose 及 glucose 量之影響-----	65
圖十三	果糖對培養樟芝菌絲體所含 myo-inositol , arabitol , mannitol , fucose 及 glucose 量之影響-----	66
圖十四	蔗糖對培養樟芝菌絲體所含 myo-inositol , arabitol , mannitol , fucose 及 glucose 量之影響-----	67
圖十五	麥芽糖對培養樟芝菌絲體所含 myo-inositol , arabitol , mannitol , fucose 及 glucose 量之影響-----	68
圖十六	對照培養樟芝菌絲體所含 myo-inositol , arabitol , mannitol , fucose 及 glucose 量之影響-----	69

圖十七	葡萄糖及木糖的添加對樟芝菌絲體中游離的葡萄糖及酒精不溶成分中葡萄糖的影響-----	63
圖十八	五種牛樟芝菌絲體在添加葡萄糖培養基之生長情形-----	65
圖十九	牛樟芝多醣的高效液態層析(HPLC)圖譜-----	66
圖二十	-干擾素及五種培養樟芝多醣體之抗 B 型肝炎表面抗原活性-----	68
圖二十一	-干擾素及五種培養樟芝多醣體之抗 B 型肝炎 e 抗原活性-----	69

# 樟芝菌絲體之培養及其多醣體 抗乙型肝炎病毒活性評估

研究生 李一宏

中國醫藥學院 中國藥學研究所

## 摘要

樟芝只寄生在牛樟樹腐朽的樹幹內，樟芝是台灣民間經常應用的中草藥，含有三類、胺基酸、蛋白質、糖類和多醣體。

本研究包括：(1)測量樟芝多糖體之單醣組成，(2)不同含糖培養基對樟芝醣類化合物合成之影響，(3)利用 high-performance anion-exchange Chromatography(HPAEC)對於五種樟芝的多醣作定性分析，(4)以 B 型肝炎病毒產生的 MS-G2 cell Line 研究五種樟芝多醣體對抗 B 型肝炎病毒的作用。

本研究的結論為：(1)添加 40g/L 濃度的葡萄糖和半乳糖，樟芝生長速度均有明顯的增加，且最快速。添加 10-80g/L 濃度的鼠李糖、木糖、麥芽糖，對樟芝生長速度無明顯之影響。分析培養 60 天的樟芝菌絲體，添加葡萄糖可以增加阿拉伯糖和葡萄糖的量，添加蔗糖則提高木蜜醇的合成，添加鼠李糖可以提高鼠李糖在細胞中的合成，添加半乳糖可以提高肌醇和葡萄糖的量，木

糖則降低葡萄糖和木蜜醇的合成。(2)樟芝子實體和培養的菌絲體之多糖體不同，分析培養 26 天的樟芝菌絲體，有中性糖，半乳糖，葡萄糖，甘露醇，半乳糖胺。(3)所有的樟芝菌絲多醣體均有抗 B 型肝炎抗毒的活性，其中 B86 在 50  $\mu$ g/ml 有強烈抑制 B 型肝炎病毒表面抗原的作用，而且比 1000 單位/ml 的  $\gamma$ -干擾素還有效，只有 B86 及 35398 兩種有對抗 B 型肝炎病毒核心抗原的活性，所有樟芝菌絲體均無細胞毒性。

本研究中，五種樟芝菌絲體中的 B86 表現出優良的抗 B 型肝炎作用，其生物效能及活體實驗，值得再繼續研究。

# **Studies on the Culture of *Antrodia Camphorata* mycelia and its polysaccharides against hepatitis B virus**

I.-Hung Lee

Institute of Chinese Pharmaceutical Sciences

China Medical College

## **Abstract**

*Antrodia camphorata*, a fungal parasite of *Cinnamomum kanehirai*, as well as a valuable Chinese medicinal fungus, contains a wide range of triterpenoids, amino acids, proteins, sugars and polysaccharides.

In this study: (1) The characteristics of crude polysaccharide fractions isolated from *A.camphorata* were determined. (2)The effects of polysaccharides synthesized in the growth medium of *A.camphorata* were examined both in the respects of growth rate and the monosaccharide composition in the free sugar pool of the cells. (3) Polysaccharide profiles of the five strains were determined by high-performance anion-exchange chromatography. (4)Anti-hepatitis B virus effects of 5 mycelia polysaccharide preparations were studied using HBV-producing cell line MS-G2.

Our results demonstrated that: (1) Both glucose and galactose as the carbon source greatly enhanced growth rate in the concentration of 40g/L. Mycelial growth was insensitive to the addition of rhamnose, xylose, and maltose in all tested concentrations(10-80g/L).



Analysis of 60-day-old mycelia showed that glucose induced the formation of free arabinol and glucose. Sucrose enhanced the mannitol synthesis. The addition of rhamnose was able to up-regulate the synthesis of rhamnose in the cells. Galactose up-regulated the formation of myo-inositol and glucose. Xylose down-regulated the synthesis of glucose and mannitol. (2) *A.camphorata* fruit bodies also had different polysaccharide patterns compared to the cultured mycelium. Analysis of 26-day-old mycelia showed that the neutral sugars galactose, glucose, mannose, and galactosamine were predominant. (3) All mycelia polysaccharide preparations exhibited anti-hepatitis B virus activity. Polysaccharides from strain B86 at a concentration of 50  $\mu$  g/ml showed the highest level of anti-hepatitis B surface antigen effect, which was higher than  $\alpha$ -interferon at a dosage of 1000U/ml. Only strains B86 and 35398 had substantial anti-hepatitis B e antigen activities. None of the polysaccharides exhibited cytotoxic effects.

Thus, among five strains of *A.camphorata* tested, B86 shows highest potential anti-hepatitis effect, the bioavailability and *in vivo* effects of B86 polysaccharide should be further studied.