

# 第一章 緒 論

在開發人工合成藥物之前，人類所用的藥物都來自動物、礦物及植物，尤以後者為主。目前，全世界存在的高等植物大約有 25 至 75 萬種<sup>(1)</sup>。德國學者 Ebers 於 1892 年在埃及發現古本草，約在公元前 1550 年由埃及人寫在草紙上的著作，含有 811 種處方的草藥書<sup>(2)</sup>。

中國人認為「藥本於草」，因之稱藥書為「本草」。而 1973 年底，在湖南 長沙附近發現的古漢墓內，有成書於公元前三世紀的《五十二病方》，共載藥 14 類 247 種，方 383 種，病名 103 種。在公元第一世紀完成的《神農本草經》載藥 365 種。南北朝 陶弘景編著之《集注本草經》則載藥 730 種。唐朝《新修本草》收藥 850 種，《證類本草》收藥 1,744 種。至公元 1596 年，明朝 李時珍所編著之《本草綱目》載藥 1,898 種，處方 11,096 種。近世 1979 年中國大陸出版之《中藥大辭典》，收載中藥 5,767 種，目前中國大陸所用植物藥已達 11,146 種。可見臨床使用的植物藥，隨著人類經驗的累積，日益增加。甚至目前所用之西藥，也有百分之三十以上源自自然界。但和世界上植物的總數比較，人類懂得利用的天然藥材，仍然偏低。

由於人工合成的化學藥品，其毒性作用顯著，利用不及七十年的磺胺藥及抗生素、微生物對之已產生抗藥性。加上許多疾病，如多種原因引起的慢性病及老年病，隨著人類壽命的延長，更突顯現代醫學不足之處。以致，目前包括中醫藥、印度阿優吠陀（Ayurveda，壽明論）等的替代醫學大受重視，其中對中草藥或植物藥的開發更是重點。

中草藥或植物藥必須栽種於恰當的地區、溫度、濕度等條件下，還需要大量人力，及面臨病蟲害、農藥殘留、旱災、水災等問題。尤其，人類快速增加（1900年 16 億，1960 年 30 億，2000 年 60 億）及老化（二十世紀初年平均壽命不足 40 歲，目前工業化國家已近 80 歲），以致大量土地被開發為公路及耕地，所以，動、植物繁殖生長之地相對大量減少，而原可利用為藥材的生物則可能消失，永遠沒機會被人類利用。如甘草之採收已導致對水土保持嚴重的破壞，甚至匪夷所思的，是形成中國北部甚至遠襲到台灣的沙塵暴原因之一，迫使中國大陸為水土保持，而開始減量出口。而人參，不但野生者甚難發現，即使栽培者，也因為將土壤中某些成分吸收殆盡，竟要用休耕或輪耕的方法去補救。

人類利用植物，主要是利用油、脂、糖、澱粉、蛋白質等一級代謝物，而主要供給食物的植物如米、麥、豆、薯、甘蔗等不過四十種左右。但只在某種植物的某些特殊細胞，在特殊時期合成的少量物質，如生物鹼（alkaloids）、配糖體（glycosides）、皂素（saponins）、樹膠（gums）、樹脂（resins）、揮發油（volatile oils）稱為第二級代謝物，也是人類利用的植物藥效成分。

目前這些藥用植物，大部份採用人工種植，如中國大陸就有 600 處生產基地，面積 580 萬畝，產量 35 萬噸。可是除了要供應大陸十三億人口所需，還要出口至韓國、日本、香港、台灣、東南亞，甚至歐、美等地區。由於產量不足，例如一棵數十年長成的紫杉所含抗癌成分，尚不足以治療一位病人，導致誤用、攙假、偽品充斥<sup>(3)</sup>。所以，除了

大量種植以外，科學家更希望，甚至實際上，利用水耕、細胞培養、組織培養，及遺傳工程的方法，以大量生產藥用的第二級代謝物。

台灣山多、平地少、地價高、人工貴、水土保護不易，想在台灣栽種大量植物，以提取藥效成分的可能性宜慎重考慮。利用植物細胞培養時，有下列缺點，(1)在培養基內，細胞生長數量有限（細胞乾重40-50g/L）；(2)生長不若細菌快（如細菌生長加倍時間為時或分，而植物細胞需3-10天）；(3)植物細胞增殖的培養條件，並不一定適合於大量生產條件。所以利用遺傳工程的技術，找出生物合成二級代謝物有關的基因及條件，將此基因置入短時間快速分裂的大腸桿菌、或酵母菌，來大量生產二級代謝物，例如動物性的胰島素，已可應用此法來生產。此法之缺點，是要對生物合成二級代謝物有關的基因，要有深入的研究及掌握<sup>(4)</sup>。

所以，生長快速及生長條件可被控制的中藥，最具研究及利用的價值。其中以真菌產生二級代謝物的速度，及條件最有利於開發者尤佳。是故靈芝、冬蟲夏草、茯苓等菌類，最早受到研究者的青睞，並藉著發酵來大量生產。

樟芝 (*Antrodia camphorata* WU, 原名 *A. cinnamomea* CHANG 或 *Ganoderma camphoratum* ZANG & SU), 又稱為樟芝、樟菇，僅生長在台灣特有的牛樟樹 (*Cinnamomun kanehirai* HAYATA), 是台灣特有的真菌，乃擔子菌亞門，菌蕈綱，無摺菌目，多孔菌科，*Antrodia* 屬的新種。它在民間用於治療肝病，並已有一些初步的研究成果，所以如能進一

步大量生產其生物活性成分(含有倍半 類、固醇類、三 類)<sup>(5,6,7,8,9)</sup> , 對學術乃至於產業界, 均將有重大的貢獻。

有鑒於樟芝菌種培植不易, 因此利用發酵技術進行樟芝菌絲體和二級代謝物的培養, 可說是最符合經濟效益的方式。由於有關樟芝子實體、菌絲體及菌絲培養液之生物活性, 除對病毒性肝炎, 已有相當之報導, 所以本研究方向為, 先在採集的不同樟芝菌種中, 確定在繁殖有 B 型肝炎病毒細胞株 ( Ms-G2 cell line ) 上, 何者抑制病毒的活性最強。其次, 利用不同培養條件, 培養樟芝, 並測定對糖類化合物合成之影響。本研究係利用帶有人類乙型肝炎病毒 DNA 序列嵌入之人類肝癌細胞株, 作為抗乙型肝炎病毒藥物之體外篩檢模式。進行中草藥抗乙型肝炎病毒活性之評估, 活性成分之追蹤、分離。

## 第二章 總論

靈芝自古以來就被國人視為吉祥寶物及治療百病的靈藥，於梁山伯、祝英台劇本中之千年靈芝蓋此也。「因露寢兮產靈芝，像三德兮應瑞圖，延壽命兮光此都。」從這首班固的靈芝歌可以看出，靈芝在仙家的眼中是既神秘而吉祥的東西，認為吃了會長生不老，甚至會羽化登仙。在日本它被稱為吉祥茸或山神杓子，可見靈芝於日本照樣受寵。漢書武帝紀中記載：當時人民相信靈芝生，乃天下太平之兆，皇帝因而舉行盛宴，普赦天下眾生，以示慶祝<sup>(10)</sup>。

靈芝依中外藥用植物學文獻，均指為多孔菌科 (Polyporaceae) 靈芝族 (Ganoderea) 若干靈芝屬的全株子實體供藥用。神農本草始著錄，列為本經草木部上品，分青芝、赤芝、黃芝、白芝、黑芝、紫芝六種。歷代諸家本草如別錄、陶注、新修、嘉祐、證類、品彙、綱目、蒙筌、長編等均有著錄。我國自古即用於治虛勞、咳嗽、氣喘、失眠、消化不良及神經衰弱，及至最近二十年，美、日等國醫學界以靈芝試驗治療癌症、肝炎、慢性氣管炎、心臟病、高血壓、神經痛、風濕症、精力減退、神經衰弱、造血系統疾病、腦震盪後遺症、血管性頭痛、胃疾、關節炎及降低膽固醇等有效的報告<sup>(10)</sup>。此乃祖先遺留下來的寶貴醫藥遺產，歐、美及日本等國已在積極進行科學研究，希望將靈芝應用在現代醫學治療及健康食品保健上，我們如不能迎頭趕上，將愧對祖先。關於台灣地區所產靈芝族亦有多種，人工栽培已獲至成功，台灣地狹人多，靠天然繁殖已不符生機，宜由組織培養利用遺傳工程，

找出生物合成二次代謝產物有關的基因及條件，並藉著發酵來大量生產，以提取藥效成分應用於肝病治療等醫療保健之應用，於學術研究尚未見正式報告，著者因進行靈芝之本草考察，以期有助於台灣藥材之開發。並且探討其某些成分可對抗乙型肝炎病毒活性，均將有裨益人民的健康。

## 第一節 靈芝之文獻考察

### 一、靈芝之本草文獻考察

#### 1. 歷代諸家本草所錄靈芝之原文

本經：「青芝。味酸平。主明目，補肝氣，安精魂，仁恕。久食輕身不老，延年神仙。一名龍芝。」「赤芝。味苦平。主胸中結，益心氣，補中，增智慧不忘。久食輕身不老，延年神仙。一名丹芝。」「黃芝。味甘平。主心腹五邪，益脾氣，安神，忠信和樂。久食輕身不老，延年神仙。一名金芝」「白芝。味辛平。主 欬逆上氣，益肺氣，通利口鼻，強志意勇悍，安魂。久食輕身不老，延年神仙。一名玉芝。」「黑芝。味鹹平。主癰，利水道，益腎氣，通九竅，聰察。久食輕身不老，延年神仙。一名玄芝。」「紫芝。味甘溫。主身聾，利關節，保神，益精氣，堅筋骨，好顏色。久食輕身，不老延年。一名木芝。」<sup>(11)</sup>

別錄：「青芝。生泰山。」「赤芝。生霍山」「黃芝。生嵩山。」「白芝。生華山。」「黑芝。生常山。」「紫芝。生高夏山谷。六芝皆無毒。六、八月採。」<sup>(12)</sup>

藥對：「署預為之使，得髮良，得麻子仁，白瓜子，牡桂共益人，惡常山，畏扁青，茵陳蒿。」<sup>(13)</sup>

陶注：「赤芝。南嶽本是衡山，漢武帝始以小霍山代之，非正也。此則應生衡山也。」「紫芝。按郡縣無高夏名，恐是山名爾。此六芝皆仙草之類，俗所稀見，族種色多，形色壤異，並載芝草圖中。今俗所用紫芝，此是朽樹木株上所生，狀如木樗，名為紫芝，蓋止療痔，而

不宜以合諸補丸藥也。凡得芝草便正爾食之，無餘節度，故皆不云服法也。」<sup>(13)</sup>

唐本注：「黑芝。謹按五芝經云：『皆以五色生於五嶽，諸方所獻，白芝未必華山，黑芝又非常嶽，且芝多黃白，稀有青黑者，然紫芝最多，非五芝類，但芝自難得，縱獲一二，豈得終久服耶。』」<sup>(14,15)</sup>

嘉祐引爾雅：「茵，芝。注：芝，一歲三華，瑞草。疏：瑞草名也，一歲三華，一名茵，一名芝。王充論衡云：芝生於土，土氣和，故芝草生。瑞命禮曰：王者仁慈，則芝草生是也。」<sup>(16)</sup>

嘉祐引抱朴子：「赤者如珊瑚，白者如截肪，黑者如澤漆，青者如翠羽，黃者如紫金，而皆先明洞澈如堅冰也。又云：木芝者，松柏脂漏地千歲化為茯苓，萬歲其上生小木，狀似蓮花，名曰木威喜芝，夜視有芝，持之甚滑，燒之不焦，帶之辟兵。」<sup>(16)</sup>

引藥性論：「紫芝使，畏髮。味甘平。無毒。主能保神益壽。」<sup>(16)</sup>

證類引唐本：「赤芝。安心神。」「青芝。不忘強志。」<sup>(16,17)</sup>

本草品彙精要：黑芝：氣：味原於氣，陰中之陽；臭：朽；助：山藥為之使，得髮良；反：畏扁青、茵陳蒿、惡常山；製水洗剉碎或為末用；合麻子仁、白瓜子、牡桂共益人。青芝、白芝、黃芝、紫芝同黑芝。<sup>(18)</sup>

綱目：[校正]時珍曰：「芝。本經正品。併入本經青赤黃白黑紫六芝。」<sup>(19)</sup>

[釋名]時珍曰：「芝本作之。篆文象草生地上之形。後人借之字為語辭，遂加草以別之也。爾雅云：茵、芝也。註云：一歲生三華瑞草，



或曰：生於剛處曰菌，生於柔處曰芝。昔四皓采芝，群仙服食，則芝赤菌屬可食者，故移入藥部。」<sup>(19)</sup>

[集解]時珍曰：芝類甚多，亦有花實者，本草惟以六芝標名，然其種屬不可不識。神農經云：山川雲雨，四時五行陰陽晝夜之精，以生五色神芝，為聖王休祥。瑞應圖云：「芝草常以六月生，春青夏紫，秋白冬黑。」葛洪抱朴子云：芝有石芝，木芝，肉芝，菌芝。凡數百種也。石芝石象，生於海隅石山島嶼之涯；肉芝狀如肉。附於大石，頭尾具有，乃生物也；赤者如珊瑚，白者如截肪，黑者如澤漆，青者如翠羽，黃者如紫金，皆先明洞澈如堅非也。大者十餘斤，小者三四斤，凡求芝草入名山，必以三月九月，乃山開出神藥之月，必以三輔時出三奇吉門，到山須六陰之日，明堂之時，帶靈寶符，牽白犬，抱白雞，包白鹽一斗，及開山符檄，著大石上，執吳唐草一把入山，山神喜，必得見芝，須禹步往采，以王相專和支干相生之日，刻以骨刀，陰? 為末服，乃有功效。若人不至精久齋，行穢德薄，又不曉入山之術，雖得其圖，鬼神不以與，人終不可得見也。曰菌芝，生深山之中，大木之上，泉水之側。其狀或如宮室，如龍虎，如車馬，如飛鳥，五色無常，凡百二十種，自有圖也。曰木威喜芝，乃松脂漏地，千年化為茯苓，萬歲其上生小木，狀似蓮花，夜視有光，持之甚滑，燒之不焦，帶之辟兵，服之神仙。曰飛節芝，生千歲老松上，皮中有脂，狀如飛形，服之長生。曰木渠芝，寄生大木生，狀如蓮生九莖一叢，味甘而辛。曰黃蘗芝，生於千歲黃蘗根下，有細根如縷，服之地仙。曰建木芝。生於都廣，其皮如纓，其實如鸞。曰參成芝，赤色有光，扣其枝葉，如金石之音。曰樊桃芝，其木如籠，其花如丹蘿，其實如翠

鳥，並可服食。曰千歲芝，生枯木下，根如坐人，刻之有血，血塗二足，可行水隱形，又可治病，已上皆木芝也<sup>(19)</sup>。

曰獨搖芝，無風自動，其莖大如手指，葉似莧，根有大魁如斗，同邊有細子十二枚繞之，相去丈許，生高山深谷，服之神仙。曰牛角芝，生虎壽山及吳陵上，狀似蔥而特出如牛角，長三四尺，青色。曰龍仙芝，似昇龍相負之形。曰案珠芝，莖黃葉赤，實如李而紫色。曰白符芝，似梅，大雪而花，季冬而實。曰米草芝，九曲三葉，葉有實也，其莖如鍼。曰五德芝，狀似樓殿，五色各具，方莖紫氣，已上皆草芝也，有百二十種，人得服之神仙<sup>(19)</sup>。

曰玉暗芝，生於有玉之山，狀似鳥獸，色無常彩，多似水蒼玉，亦如鮮明水晶。曰七孔九光芝，生於臨水石崖之間，狀如盤？，洞微，一名螢火芝。曰石蜜芝，生少室石戶中石上，終難得。曰桂芝，生石穴中，似桂樹，乃石也，光明味辛。曰石腦芝，石中黃，皆石芝類也。

千歲蝙蝠、千歲龜、萬歲蟾蜍，山中見小人，皆肉芝類也。凡百二十種。又按採芝圖云：鳳凰芝，生名山金玉間，服食一年，與鳳凰俱也，曰燕胎芝，形如葵，紫色，有燕象。曰黑雲芝，生山谷之陰，黑蓋赤理墨莖，味鹹苦。又有五色龍芝，五方芝。天芝，地芝，人芝，山芝，土芝，石芝，金芝，水芝，火芝，雷芝，甘露芝，青雲芝，雲氣芝，白虎芝，草馬芝，太一芝等。名狀不一<sup>(19)</sup>。

張華博物志云：名山生神芝不死之草，上芝為車馬，中芝人形，下芝六畜形。又按段成式酉陽雜俎云：屋柱無故生芝者，白主喪，赤主血，黑主賊，黃主喜，形如人面者亡財，如牛馬者遠役，如龜蛇者蠶耗。時珍嘗疑芝乃腐朽餘氣所生，正如人生瘤贅，而古今皆以為瑞

草，又云服食可仙，誠為迂謬，近讀成式之言，始知先得我所欲言，其揆一也。又方士以木積濕處，用藥傳之，即生五色芝。嘉靖中王金嘗生以獻世宗，此昔人所未言者，不可不知。」<sup>(19)</sup>

〔氣味〕時珍曰：「五色之芝，配以五行之味，蓋亦據理而已，未必其味便隨五色也，即如五畜以羊屬火，五果以杏配心，皆云味苦之義。」

〔主治〕時珍曰：「紫芝。療虛勞，治痔。」<sup>(19)</sup>

〔附方〕時珍曰：「紫芝丸。治虛勞短氣，胸膈苦傷，手足逆冷，或時煩躁，口乾，目視流流，腹內時痛，不思飲食，此藥安神保精也。紫芝一兩半，山芋焙，天雄炮去皮，柏子仁炒，巴戟天去心，白茯苓去皮，枳實去瓢麩炒，各三錢五分，生地黃焙，麥蘗冬去心焙，五味子炒，半夏制炒，附子炒去皮，牡丹皮，人參各七錢五分，遠志去心，蓼實各二錢五分，瓜子仁炒，澤瀉各五錢，為末，煉蜜丸梧子大，每服十五丸，漸至三十丸，溫酒下，日三服。聖濟總錄。」<sup>(19)</sup>

本草蒙筌：靈芝草，色分六品，味應五行，氣稟俱平，服餌無毒。青芝如翠羽，一名龍芝，應木味酸，產泰山，專補肝氣，與仁恕強志，明眼目安魂。赤芝如珊瑚，一名珊芝，應火味苦，產衡山，善養心神，增智慧不忘，開胸膈除結。白芝，截肪可比，一名玉芝，味辛應金，華山生，益肺定魂，止咳逆，潤毛皮。黑芝，澤瀉堪倫，一名玄芝，味鹹應水，常山出，益腎驅癰，利二便，通丸竅，黃芝與黃金類，一名金芝，嵩岳山多。紫芝與紫衣同，一名木芝，高夏山有，兼味甘應土，咸逐邪益脾，堅骨健筋，悅顏駐色，六芝俱主祥瑞，夜視光彩映人，燒不焦，藏不朽。久服延壽，常帶關兵，世所難求，醫絕不用，但附其說，俾識其詳。

長編引內則芝札疏庾蔚云：無華葉而生者，曰芝札，盧氏云：芝，木芝也。主肅云：無華而實老名札，皆芝屬也。庾又云：自牛修至薑桂，凡三十一物，則芝札應是一物也。今春夏生於木，可用為菹；其有白者，不堪食也。賀氏云：札，？棗；亦云：芝，木椹也。以芝，札為二物。鄭下汪云：三十一物，則數芝札為一物也。陳注：芝如今木耳之類<sup>(21)</sup>。

長編引爾雅翼：芝，瑞草，一歲三華，故楚辭謂之三秀。無根而生，故其字從之。說文之字曰：出也，象草枝莖益大，有所之。一者，地也，芝生於土，故宜從焉。言芝者，多異說，唯論衡云：芝生於土，土氣和，故芝草生，最為簡要。古以為香草，大夫之擊芝蘭。又曰：與善人居，如入芝蘭之室，久而不聞其香，則與之化矣。今芝不香，未知何救。芝乃多種，故方術家有六芝，其五芝，備五色、五味，乃生五嶽，惟紫芝最多。昔四老避秦入商洛山，采芝食之，作歌曰：煜煜紫芝，可以療饑是也。古稱上藥養命，中藥養性，下藥治病。養命則五石之鍊形，六芝之延年；養性則合歡蠲忿，萱草忘憂；治病則大黃除實，當歸止痛。芝之品，其略有六，至葛稚川則云：芝有石芝，有木芝，有草芝，有肉芝，有菌芝，各百許種，則芝類非特六矣<sup>(21)</sup>。

孝經 授神契曰：威喜辟兵，威喜，亦木芝之一也。松柏之脂，入地千歲化茯苓；茯苓萬歲，上生小木如蓮華，名曰木威喜芝，夜視有光，持之甚滑，燒之不然，帶之辟兵。又建木實生都廣，皮如纓蛇，實如鸞鳥者，亦謂之芝，則芝所不備。然大抵紫芝最多，陶隱居獨怪今俗所用紫芝，乃是朽木株上所生，狀如木樗者，然古人言芝，蓋只如此。內則：人君燕食，所加庶羞，有芝栴凌棋之屬。庾蔚云：無華

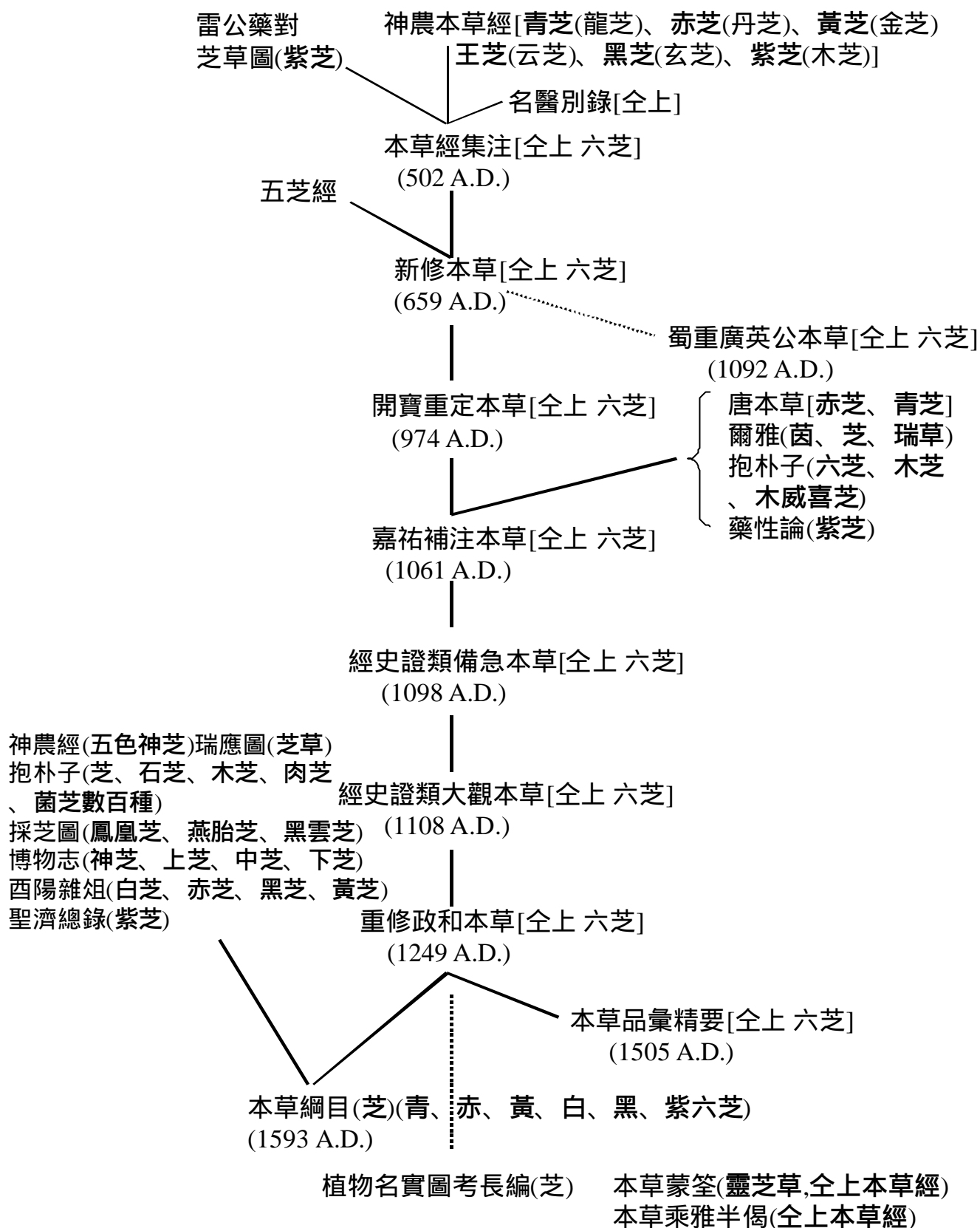
葉而生者，曰芝柄，皆芝屬；芝柄春夏生于木，可用為菹，其有白者不堪食。賀氏亦云：芝，木槴，獨別謂為札為？棗，則多一物，不合鄭氏三十一物之數。然則樛槴類總名芝矣。莊子朝菌，司馬亦云：大芝也，天陰生糞土，見日則死。崔云：糞上芝，朝生暮死，簡文云：歛生之芝也。是菌皆得芝名。太玄曰：黃菌不誕，俟于慶雲靈芝也。漢藝文志有黃帝雜子芝菌十八卷<sup>(21)</sup>。

(覈)曰：出五嶽名山者貴，嘗以六月生，應六月之卦以表德也。神農經云：山川雲雨，四時五行陰陽之精，以生五色神芝，為聖王休祥。瑞命禮云：王者仁慈，則芝艸生。論衡云：芝生於土，土氣和則芝艸生，不假種識，隨處寄生，隨緣現相。先人云：靈異無根，如優曇一現，若盤繞層臺，寄生于土者，此其嘗也。本經惟標六芝，然其色相奇異，不可不識，存錄以廣見聞。菌芝，生深山大木之上，淵泉之側，五色無嘗，或如宮室龍虎，車馬飛鳥之形。木威喜芝，生千年伏芝上，上生小木，狀似蓮花，夜視有光，持之甚滑，燒之不焦。飛節芝，生千歲松樹上，皮中有脂，形狀如飛。木渠芝，寄生大木，如蓮花，九莖一叢，味甘且辛。黃檗芝，生千年黃檗根下，下有細根如縷。建木芝，其皮如纓，其實如鸞。？成芝，赤色有光，扣其枝葉，作金石音。樊桃芝，其木如籠。其花如丹，其實如翠鳥。千歲芝，生枯木下，根如人形趺坐，刻之有血，塗人兩足，能行水上，亦可隱形。以上皆木芝也。獨搖芝，有風不動，無風自搖，一莖直上，中空外赤，貼莖杪之半，生細小尖葉，梢頭成穗，作花灰白，結子十二枚，至秋不落，卻透虛入莖中，還筒而下，根大如斗，更有游子十二枚，相為環繞。牛角芝，生虎壽山，及吳淩，狀似蔥，特出如角，色青翠，長

三四尺。龍仙芝，宛如昇龍相負之形。紫珠芝，葉黃實赤，狀似紫李色。白符芝，大雪而花，季冬而實。朱艸芝，其莖如針，九曲三葉，葉有實也。五德芝，狀似樓殿，五色具備，方莖紫色。以上皆艸芝也。玉暗芝，生有玉之山，狀如鳥獸，色無嘗彩，多似山水蒼玉，亦如鮮明水晶。七孔九光芝，生臨水石崖間，狀如盤盞，有莖有葉，葉有七孔，夜視有光，食之七孔洞徹。石蜜芝，生少室石戶中。桂芝，生石穴，似桂，乃石也，其色光明。石腦芝，石中黃，亦石芝類也。石芝，石象，生於海隅及石山島嶼之涯。肉芝，其狀如肉，附於大石，頭尾俱有，乃生物也，赤如珊瑚，白如截肪，黃如紫金，黑如重漆，青如翠羽，光明洞徹，儼若堅水，大者重十多觔。千歲燕、千歲蝙蝠、千歲龜、萬歲蟾蜍，山中小人，皆肉芝類也。鳳凰芝，生名山金玉間。燕胎芝，形如紫葵，紫色如燕狀。黑雲芝，生山谷之陰，黑？赤理，莖黑味鹹。又有五色龍芝、五方神芝、甘露芝、青雲芝、雲氣芝、白虎芝、車馬芝、太乙芝，名狀不一，皆服食仙去者也，抱璞子云：欲求芝草，當入名山，必以三月、九月，乃山開出神藥之月也。忌山假日，用天輔時，出三奇吉門。到山須六陰之日，明堂之時。帶靈寶符，牽白犬，抱白雞，包白鹽一斗，及開山符檄，著大石上。入山執吳唐艸一把，山神喜，芝乃得見。禹步往采，以旺相專和、支干上下相生之日，刻以骨刀，陰乾為末，服有神異。若人不致精久齋，行穢德薄，又不曉入山之術，雖得其圖，鬼神不與，終不可得。郭璞云：一歲三華，瑞艸也。昔四皓采芝，群仙服食者也。智者大師云：服食石藥，但可平疾，服食芝艸，併可得仙。陶隱居云：凡得芝，正爾食之，無餘節度，故皆不云服法也。天有五？，御五方，而生五嶽，此指神芝所生

緣。山川雲雨，四時五行陰陽之精，此指神芝能生因，則神芝不惟為五芝首，且獨為五嶽主矣。故欲盡神芝希有功德，須從生成能所中，看得廣大圓滿。先人云：芝艸為仙家服食，藥之上品上生者也。從山石水木之靈氣，鬱蒸所結，亦艸亦木，亦石亦土，而非艸非木，非石非土，與菌栢瓊別。要在名山大川，古木仙境中得者，服之自然靈妙。李瀕湖以為可食，溷置菜部，是何異高隱灌園耶。予從固陵山中，獲小黃芝，細咀微嚙，頃之喉間涼潤如雲，盤繞五內，信是氣鍾，非灌溉滋生之比，靈異無根，如優曇一現，宜特尊諸首。又云：神農為民疾，偏嘗艸木，以起夭扎。芝則可以養性移情，進之於德，如仁慈忠信，和樂勇悍，非艸木所能滋益也。感天地氤氳之和，屬精神，不屬形質，故主治如此耳<sup>(22)</sup>。

## 2. 靈芝之本草系統圖





### 3. 靈芝之本草考察

#### (1) 藥名之考訂

靈芝之名，自古迄宋未有文獻予以著錄，靈芝俗稱靈芝草，始載於明陳嘉謨本草蒙筌<sup>(15)</sup>書中，古稱瑞草或神草，中國人自古認為是吉祥寶物及治療百病的靈藥，於梁祝劇本中的千年靈芝蓋此也，為中國醫藥中一種珍貴的藥用真菌。早在周朝列子書中曰：「朽壤之上，有菌芝者」的記載。

神農本草經<sup>(11)</sup>草木部上品並列青芝、赤芝、黃芝、白芝、黑芝、紫芝六種，兩後歷代諸家本草如別錄、陶注、新修、蜀本草、開寶、嘉祐、證類、大觀、重修政和、品彙精要、蒙筌、爾雅半偈等均沿用六種名稱為正名，明指靈芝名目極多，以其色澤青、赤、黃、白、黑、紫六色芝供藥用之藥材兼菌體為正名矣。自明李時珍本草綱目併青赤黃白黑紫六芝，總稱芝之植物菌絲，列為芝類本經正品，爾後本草蒙筌以靈芝草為名，而色分六品，然不知何由，清代所有本草皆未嘗著錄，是否因神仙說不老延年或不老不死不滅之謊言，因而被禁；或者因取得困難，遂失傳仍值得探索與追溯！

至於靈芝之別名，本草經首就正名並一名著錄曰：「青芝，一名龍芝；赤芝，一名丹芝；黃芝，一名金芝；白芝，一名玉芝；黑芝，一名玄芝；紫芝，一名木芝。」爾後正統本草如別錄、陶注、新修、

蜀本草、開寶、嘉祐、證類、品彙精要、蒙筌、爾雅半偈等皆因襲之，雖然後代略有增益其品目及出處，由以引用抱朴子、博物志、瑞應圖、酉陽雜俎為多，然敘述皆同。至綱目「釋名」時珍曰：「芝本作之，篆文象草生地上之形。後人借之字為語辭，遂加草以別之也。爾雅之茵，芝也。註云：一歲三華瑞草，或曰，生於剛處曰茵，生於柔處曰芝。昔四皓彩芝，群仙服食，則芝，赤茵屬可食者，故移入藥部。」此六芝之名義用語及造字象形定義全然予以詮釋，則綱目總名為芝，其意義可知。

靈芝之別名，龍芝、丹芝、金芝、玉芝、玄芝、木芝等六芝因色澤與形質之表現，於嘉祐本草引爾雅曰：茵、芝、瑞草，乃指其生長情況、生態與皆仙草之神效而名。復引抱朴子及綱目重引諸書，更因形質、分類、生態、寄生物類、神仙說五行、產地、時間長短等種種因素，其別名有五色神芝、芝草、芝、石芝、木芝、肉芝、茵芝、本威喜芝、飛節芝、本渠芝、黃檗芝、建木芝、參成芝、樊桃芝、千歲芝、獨搖芝、牛角芝、龍仙芝、案珠芝、白符芝、米草芝、五德芝、玉暗芝、七孔九光芝、螢火芝、石密芝、桂芝、石腦芝、石中黃、千歲蝙蝠芝、千歲龜芝、萬歲蟾蜍芝、鳳凰芝、燕胎芝、黑雲芝、五色龍芝、五方芝、天芝、地芝、人芝、山芝、土芝、石芝、金芝、水芝、火芝、雷芝、甘露芝、青雲芝、雲氣芝、白虎芝、車馬芝、太一芝、

上芝、中芝、下芝、珊芝、芝札、三秀、草芝、芝栴、慶雲靈芝等別名；如此眾多別名，令人難以記憶，亦不勝枚舉，而各類芝中，亦各有百二十種別名，可見靈芝自古品類十分繁雜，則因出處、寄主....等而有不同種之靈芝矣，而牛樟芝自然亦是其產物與別名之一。

據文獻並綜如上述，靈芝仍一通俗名稱，首錄於神農本草經者，明指因色澤而分類者，有青芝、赤芝、黃芝、白芝、黑芝、紫芝等六芝。由於產地、形態、效用、生態、形質、寄主、品種、五行、神仙說、生長時間長短、祥瑞之物等種種因素，因種類繁多，而有數百種之名稱，茲就其別名，概括列述而有下列，龍芝、丹芝、金芝、玉芝、玄芝、木芝、芝、茵、瑞草、三秀、五色神芝、芝草、石芝、肉芝、菌芝、本威喜芝、飛節芝、木渠芝、黃檗芝、建木芝、參成汁、樊桃芝、千歲芝、獨搖芝、牛角芝、龍仙芝、案珠芝、白符芝、米草芝、五德芝、玉暗芝、七孔九光芝、螢火芝、石蜜芝、桂芝、石腦芝、石中黃、千歲蝙蝠芝、千歲龜芝、萬歲蟾蜍芝、鳳凰芝、燕胎芝、黑雲芝、五色龍芝、五方芝、天芝、地芝、人芝、山芝、土芝、石芝、水芝、火芝、雷芝、甘露芝、青雲芝、雲氣芝、白虎芝、車馬芝、太一芝、上芝、中芝、下芝、珊芝、芝札、草芝、芝栴、慶雲靈芝、靈芝草等別名、古名及商品名，林林種種，真是不勝枚舉。

## (2)形態、種類及產地之考訂

本經、別錄未載六芝之形態，陶注云：此六芝皆仙草之類，俗所稀見，族種色多，形色壞異，並載芝草圖中。今俗所用紫芝，此是朽樹木株上所生，狀如木樗，名為紫芝。為最早敘述其形態之本草，隨後唐本草謹案五芝經芸：「皆以五色生於五嶽，諸方所獻，白芝未必華山，黑芝又非常嶽，且之多黃白，稀有青黑者，然紫芝最多，非五芝類，但芝自難得，縱獲一二，豈得終久服耶。」至嘉祐引爾雅：注芝，一歲三華，瑞草。疏：瑞草名也，一歲三華。又引論衡云：芝生於土，土氣和，故芝草生。瑞命禮曰：王者仁慈，則芝草生是也。又引抱朴子：赤者如珊瑚，白者如截肪，黃者如紫金，黑者如重澤，青者如翠羽，而皆光明洞徹如堅冰也。又云：木芝者，松柏脂漏地千歲化為茯苓，萬歲其上生小木，狀似蓮花，名曰本威喜芝，夜視有芝，持之甚滑，燒之不焦，帶之辟兵。以上仍嘉祐本草實施全國第二次生藥大普查之際，引諸家論靈芝色澤、形質、形態與種類，可知其為木或土上寄生之真菌類。

至綱目〔集解〕時珍曰：「芝類甚多，亦有花實者，本草惟以六芝標名，然其種屬不可不識。神農經云：山川雲雨，四時五行陰陽晝夜之精，以生五色神芝，為聖王休祥。瑞應圖云：「芝草常以六月生，春青夏紫，秋白冬黑。」葛洪抱朴子云：芝有石芝，木芝，肉芝，菌

芝。凡數百種也。石芝石象，生於海隅石山島嶼之涯；肉芝狀如肉。附於大石，頭尾具有，乃生物也；赤者如珊瑚，白者如截肪，黑者如澤漆，青者如翠羽，黃者如紫金，皆先明洞澈如堅冰也。大者十餘斤，小者三四斤，凡求芝草入名山，必以三月九月，乃山開出神藥之月，必以三輔時出三奇吉門，到山須六陰之日，明堂之時，帶靈寶符，牽白犬，抱白雞，包白鹽一斗，及開山符檄，著大石上，執吳唐草一把入山，山神喜，必得見芝，須禹步往采，以王相專和支干相生之日，刻以骨刀，陰? 為末服，乃有功效。（餘則詳前節原文引述自抱朴子、博物志及爾雅半偈之文，為節篇幅，從略）

以上為本草所述形狀、品質、外型及優佳類次色澤名稱等，可知其品種凡數百種。

關於靈芝產地，本經未載而別錄曰：「青芝。生泰山。」「赤芝。生霍山」「黃芝。生嵩山。」「白芝。生華山。」「黑芝。生常山。」「紫芝。生高夏山谷。」迄陶注辯駁曰：「赤芝。南嶽本是衡山，漢武帝始以小霍山代之，非正也。此則應生衡山也。」「紫芝。按郡縣無高夏名，恐是山名爾。」葛洪抱朴子曰：茵芝，生深山之中。牛角芝，生虎壽山及吳陵上。玉暗芝，生於有玉之山。七孔九光芝，生於臨水石崖之間。石蜜芝，生少室石戶中石上。以上為古本草所錄六芝之產地<sup>(22)</sup>。

泰山仍今山東省泰安縣北五里，是為東嶽，亦曰岱宗。霍山仍今河南省臨汝縣西南六十里，亦曰霍陽山，即霍山縣。嵩山仍今河南省登封縣北，古曰外方，亦曰太室，又名嵩高。華山仍今江蘇省吳縣西，又名天池山。常山即恒山，仍今山東省諸城縣南二十里。高夏陶注指為山名。衡山仍今安徽省堂塗縣北六十里，今名橫望山。吳陵仍今江蘇省吳縣。即蘇州是也。臨水仍今江西省樂安縣西北大盤山，名寶唐水。少室山即嵩山。虎壽山仍今江蘇省吳縣西北七里，一名海湧山。故古靈芝產地十分廣泛，主以山東、河南、江蘇、安徽、江西及各名山產玉及崖石高山為名產地<sup>(23)</sup>。

綜如上述靈芝之型態與種類有數百種，以品彙精要、綱目等所敘述及藥圖，並引述抱朴子等云：芝有石芝，木芝，肉芝，菌芝，凡數百種也，說明我國古代記載的芝，種類比較複雜，不僅是菌類的芝，也可能是六類真菌而非六種，依前述紫芝可能是多孔菌科 Polyporaceae 紫芝屬 Ganoderma，亦有薄樹芝及薄孔菌芝。等芝存在，台灣靈芝種類很多，有猴板橙及牛樟芝、麻黃芝、相思芝。有其研究之空間。其產地中國普遍分佈，以長江以南高溫多雨地帶為多。

### (3) 性味及藥能之考訂

本經曰：「青芝。味酸平。主明目，補肝氣，安精魂，仁恕。久食輕身不老，延年神仙。」「赤芝。味苦平。主胸中結，益心氣，補中，增智慧不忘。久食輕身不老，延年神仙。」「黃芝。味甘平。主心腹五邪，益脾氣，安神，忠信和樂。久食輕身不老，延年神仙。」「白芝。味辛平。主欬逆上氣，益肺氣，通利口鼻，強志意勇悍，安魂。久食輕身不老，延年神仙。」「黑芝。味鹹平。主癰，利水道，益腎氣，通九竅，聰察。久食輕身不老，延年神仙。」迄陶注云：「紫芝。蓋止療瘵，而不宜以合諸補丸藥也。凡得芝草便正爾食之，無餘節度，故皆不云服法也。」嘉祐引藥性論曰：「紫芝。味甘、平。無毒。主能保神益壽。」證類引唐本云：「赤芝。安心神。」「青芝。不忘強志。」至綱目[主治]時珍曰：「紫芝。治虛勞。治痔。」綱目[氣味]時珍曰：「五色之芝，配以五行之味。蓋亦據理而已，未必其便隨五色也，即如五畜以羊屬火，五果以杏配心，皆云味苦之義。」

綜如上述，六芝性味各異，主治亦有別，以本經所論述極為完備，青芝，味酸平，主明目，補肝氣；赤芝，味苦平，主胸中結，益心氣，補中，增智慧不忘；黃芝，味甘平，主心腹五邪，益脾氣，安神，忠信和樂；白芝，味辛平，主欬逆上氣，益肺氣，通利口鼻，強志意勇悍；黑芝，味鹹平，主癰，利水道，益腎氣，通九竅，聰察；

紫芝，味甘、溫，主身聾，利關節，保神，益精氣，堅筋骨，好顏色。然靈芝於應用上，以赤芝、紫芝為普遍、無毒，主益氣血，安心神，健脾胃。主治虛勞、心悸、失眠、頭暈、神疲乏力、久咳氣喘、冠心病、矽肺、腫瘤。古神仙說常用，迄清代已無本草收錄，亦無其用途之說，台灣近二十年來皆開發於保健食品予以使用。



## 二、靈芝之藥用植物及生藥學文獻考察

靈芝是一種高等真菌，在植物分類學的位置，屬於隱花植物 Flowerless Plant 菌藻類 Thallophyta 菌類 Fungimyceter 絲狀菌類 Eumyceter 真菌類 True-Fungi ;? 子菌綱 Bacidiomyceter 同? 子菌亞綱 Homobasidia 無菌褶茸目 Aphylophorales 多孔菌科 Polyporaceae 靈芝族 Ganodermeae 靈芝屬 *Ganoderma*。一般人誤認所有多孔菌科之類似菇類即為靈芝，其實多孔菌科被發現者，就有 25 屬 2300 多種之多，列數種非靈芝屬列述如下<sup>(10,24)</sup>

植物	學名
皺蓋烏芝(皺蓋假芝)	<i>Amavroderma rude</i> ( BERK. ) PAT.
牛樟芝(樟芝、樟菇)	<i>Antrodia cinnamomea</i>
雲茸(雲芝)	<i>Coriolus versicolor</i> ( AR. ) QUEL.
肉桂茸	<i>Coltricia cinnamomea</i>
千年靈芝，猴板凳	<i>Fomes pinicola</i> COOK.( <i>Fomitopsis pinicola</i> COOK.)
靈芝	<i>Potystus versicolor</i> (L.)FR.

靈芝屬 *Ganoderma* 包括青芝、赤芝、白芝、黃芝、黑芝、紫芝、靈芝茸、山神杓子、鹿角靈芝、大型靈芝、蝙蝠靈芝、花紋靈芝等，在中國產者 27 種中，目前栽培主要來源有兩種，茲列述其學名如下

(25,26,27,28) 。

植物	學名
紫芝（日本層孔菌、層孔）	<i>Ganoderma japonicum</i> (FR.) LLOYD
赤芝（靈芝、赤靈芝）	<i>Ganoderma lucidum</i> (LEYSS ex FR.) KARST.

現在所見的中藥靈芝標本，其原植物主要為赤芝 *Ganoderma lucidum* (LEYSS ex FR.) KARST. 紫芝 *Ganoderma japonicum* (FR.) LLOYD 這兩種真菌。

### 三、靈芝之成分文獻考察

靈芝成分研究報告相當多，茲簡述部分已經被確認且證實具有療效之成分如下<sup>(27,28)</sup>：

1. 靈芝孢子粉含 13 種氨基酸：精氨酸(arginine)、色氨酸(tryptophane)、天門冬酸(aspartic acid)、甘氨酸(glycine)、丙氨酸(alanine)、蘇氨酸(threonine)、絲氨酸(serine)、谷氨酸(glutamic acid)等。
2. 含有有機銻及鈣、鎂、鈉、錳、鐵、鋅、銅、硫等元素，有機銻被認為目前較理想且強而有力的免疫增強劑。
3. 靈芝中含有多種多糖類有效成分：一種具抗腫瘤活性的水溶性多糖 GL-1(Polysaccharide GL-1)，係由葡萄糖(glucose)、木糖(xylose)和阿拉伯糖(arabinose)按莫耳係數比為 18.8 : 1.5 : 1.0 所組成。另有具降血糖活性的靈芝多糖(ganoderan)。
4. 從靈芝的子實體、菌絲體、孢子粉及發酵液的提取物中分離得到 100 餘種三類成分。
5. 又含多糖類；從子實體分離得到的一種水溶性的葡萄糖 G-A (glucan G-A)，有抗腫瘤作用及阻斷由角叉菜膠所誘發的水腫；從菌絲體分離得到的另一種葡聚糖，稱為靈芝多糖，具有降血糖、降血膽固醇和抗腫瘤作用。

#### 四、樟芝之文獻考察

樟芝 (*Antrodia camphorata* WU, 原名 *A. cinnamomea* CHANG 或 *Ganoderma camphoratum* ZANG & SU), 又稱為樟芝、樟菇, 僅生長在台灣特有的牛樟樹 (*Cinnamomun Kanehirai* HAYATA), 是台灣特有的真菌, 乃擔子菌亞門, 菌蕈綱, 無褶菌目, 多孔菌科, *Antrodia* 屬的新種。

##### 1. 基原鑑定：

樟芝 (*Antrodia camphorata*) 為台灣特有品種, 依目前所知主要分布在苗栗南庄鄉、三灣鄉, 桃園復興鄉 角板山, 南投竹山鎮 水里鄉 以及高雄六龜等四大區域。它生長於保育類的牛樟樹上, 生長期為每年的六月至十月間。樟芝在植物界的分類地位為<sup>(29)</sup>：

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 (Aphyllporales)

多孔菌科 (Polyporaceae)

薄孔菌屬 (*Antrodia*)

## 2. 性狀：

樟芝，別名「牛樟芝」、「樟菇」、「樟菇」、「樟菰」、「樟窟內菰」、「紅樟」、「紅樟芝」、「紅樟菰」、「陰陽對口菇」等。它只寄生在台灣地方特有的樹種——牛樟樹樹幹腐朽之心材內壁、或是枯死之牛樟木材陰暗潮濕之表面。素有「靈芝之王」美譽的牛樟芝，其唯一宿主牛樟樹 (*Cinnamomum kanehirai* HAYATA) 是臺灣特有的常綠闊葉大喬木，其外型不同於一般常見的樟樹，葉長約 15 公分、寬約 9 公分，生長於臺灣山區海拔 450~1,500 公尺間，1899 年，日據時期曾建立樟腦專業制度，一度造成樟樹等樟樹類植物被肆無忌憚的濫砍濫伐，再加上近數十年間，林育保護工作不夠完善，使得現存的樟樹愈來愈少見。樟芝子實體屬多年生，從樟樹幹的中空內部長出，具有強烈的樟樹香味，將其子實體含入口中，舌尖會感到有辛麻的感覺，若是將乾燥的樟芝製品含入，則有辛苦之感。子實體外觀呈板狀或鐘乳狀，最初為扁平形，無柄，產生擔孢子的子實層表面呈鮭紅色者，漸長後會轉變為乳白色、淡紅褐色或淡黃褐色；子實體形狀由板形 (subpendant) 至不規則形 (irregular)，其表面若呈鐘乳狀、馬蹄狀或塔狀者，緊貼覆在樟樹木材上，邊緣為木頭色，具強烈苦味，成熟後顏色則呈桔色或黃色。樟芝子實體表面徑長 10~20  $\times$  8 公分、厚 2~2.5 公分，具有不明顯的

縱皺，有光澤，邊緣呈半圓形或不規則形，菌肉上層為木材色，下層為象牙色，厚度約為 1-1.5 公分<sup>(30)</sup>。

鐘狀形態者，充滿微細綿密、管口小之菌孔( 4~6 個菌孔 / mm<sup>2</sup> )，菌孔為圓形至多角形<sup>(33)</sup>，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  $\times$  1.5~2  $\mu$  m)。樟芝之產期在六至十一月，十一月至五月，幾乎停止生長。含水率隨雨季而增加。

板狀型態者，整面全有菌孔，板底層有淺黃白色的木栓質，藉此木栓質附著在樟樹中空心材內壁上生長。新鮮樟芝子實體含水量約 68%，樟芝之新鮮子實體中粗脂質含量為 37.44%，風乾物則約含 32.23%，這比一般菇類含約 2-8% 之脂質為高<sup>(31)</sup>。

樟芝的菌絲體有營養菌絲 ( generative hyphae )，直徑 2~3.5  $\mu$  m，具有扣子體 ( clamp connections ) 與骨架菌絲 ( skeletal hyphae )，直徑 4.5  $\mu$  m，有性器官為擔子 ( basidia ) 棍棒狀 ( clavate )，12~14  $\times$  5  $\mu$  m，擔孢子 ( basidiospore ) 圓柱狀 ( cylindrical )，狀平滑，略為彎曲，透明無色，不具澱粉質。

臧穆及蘇慶華進行第一次樟芝的新種發表，但卻因為標本沾染了靈芝的擔孢子，導致在描述樟芝性狀時，誤以為這個樟芝的孢子就是靈芝孢子，造成樟芝被歸類為靈芝屬 ( *Ganoderma* ) 的訛誤，並命名

為 *Ganoderma camphoratum* ZANG & SU, 這項錯誤<sup>(32)</sup> ;一直到 1995 年, 才由張東柱等人在發表第二次的樟芝新種時修正過來, 將樟芝命名為 *Antrodia cinnamomea* CHANG, 針對樟芝子實體的外觀、氣味、生長速率、孢子顯微結構等, 作了一番詳細的記載<sup>(33)</sup>。直到 1997 年, 吳聲華等人整合前兩次文獻中相同的內容, 進行第三次的新種發表, 才將樟芝重新命名為 *Antrodia camphorata* WU<sup>(34)</sup>。

### 3. 化學成分：

以往有關樟芝的成分研究, 大多集中在多醣體 ( polysaccharides ) 三類 ( triterpenoids ) 和固醇類 ( steroids ) 等相關主題。

樟芝子實體及菌絲體內含水解胺基酸及游離胺基酸, 其中最特殊者為含有 GABA 此一抑制性中樞神經信息傳遞物質。樟芝菌絲體維生素 B<sub>6</sub> 及 Niacin 含量高於子實體, 尤其 niacin 高於子實體 130 倍。

黃鈴娟於 2000 指出, 樟芝含有大分子之多醣體發酵濾液中之分子量在 1.1 萬左右, 水萃物及鹼萃物所含的 76 萬左右<sup>(35)</sup>。三者皆有葡萄糖、木糖、甘露糖、半乳糖等單糖, 屬於雜多醣, 但經光譜分析後皆含有具生理活性之  $\beta$ -D-葡聚糖 (  $\beta$ -D-glucans )。

Chiang et al.於 1995 從樟芝子實體萃取物發現的三 類新化合物<sup>(7)</sup>有  
antrocín、 4,7-dimethoxy-5-methyl- 1,3-benzodioxole 和  
2,2',5,5'-tetramethoxy-3,4,3',4'-bi-  
methyl-enedioxy-6,6'-dimethylbiphenyl。

1995 年,Cherng et al.發現在樟芝中以 ergostane 為骨架之新三 類  
化合物有 antcin A、 antcin B、 antcin C、 antcin E、 antcin F、 methyl antcinate  
G 和 methyl antcinate H<sup>(36)</sup>。



## 五、樟芝之藥理作用文獻考察

### 1. 護肝功能：

利用四氯化碳誘發大鼠類慢性肝炎，藉此評估樟芝是否有護肝作用。

首先發現大鼠類肝細胞，添加 2% 及 4% CCRC93032 樟芝菌株發酵萃取液，經 24 小時後檢查對肝細胞之生存力、抗氧化力及解毒代謝能力等進行分析，發現皆有良好之效果。對 dimethylnitrosamine 誘發的大鼠肝纖維化及其併發症可改善<sup>(37,38,39)</sup>。

同時在 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，從組織切片上觀察，也證實對肝細胞無傷害性。樟芝菌絲體或發酵液對於鼠類之脂質代謝與抗氧化能力具有正面保護效果。在人類紅血球也有抗氧化作用<sup>(40)</sup>，而樟芝除了可降低血脂質及血糖外，並可改善糖尿病鼠的高血糖濃度，以致減少併發症的產生。樟芝發酵液亦可以改善用 dimethylnitrosamine (DMN) 誘發鼠類所引起的肝纖維化及其併發症，連續投予 28 天後，可加強腸黏膜及胃黏膜蛋白質含量，增強週邊及中樞組織的抗氧化能力<sup>(41,42)</sup>。

## 2. 提昇免疫功能<sup>(43)</sup>：

樟芝含有多醣體，主要成分為  $\beta$ -D-glucan，這些  $\beta$ -D-glucan 能透過刺激巨噬細胞、T 淋巴細胞、B 淋巴細胞以及自然殺手細胞等，增強免疫功能進而達到抗腫瘤的效果。

## 3. 抗氧化能力

在抗氧化能力的研究討論上，經 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 OH 自由基等 6 種抗氧化模式，評估樟芝子實體及菌絲體之甲醇萃取液是否具有強抗氧化性，結果發現其抗氧化能力以新鮮子實體及菌絲體優於風乾子實體<sup>(44)</sup>。

樟芝發酵濾液乾燥物之抗氧化作用與 BHA 相當<sup>(45)</sup>，可提升倉鼠血清總抗氧化能力，降低低密度脂蛋白氧化之發生，增加大鼠紅血球 glutathion, superoxide dismutase, glutathion peroxidase 之活性，對大鼠肝細胞也有相似作用，樟芝菌絲體水萃取液亦可保護人類紅血球受氧化傷害<sup>(40)</sup>。

## 4. 抑制腫瘤細胞生長：

樟芝子實體分離出的化合物 Zhankuic acid A、B 及 C，發現三者各有不同抗癌效果<sup>(46)</sup>，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<sup>(47)</sup>，此外另一已被鑑定之化合物 dehydroeburicoic acid 則具抗炎作用。

亦有報告指出，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<sup>(48)</sup>。

低劑量的樟芝菌絲體之甲醇萃取液，加入肝腫瘤細胞 Hep G2 中，發現能有效的毒殺腫瘤細胞。在樟芝抑制腫瘤細胞的成果比較中，食品工業研究所發現萃取樟芝胞外有效成分，以及業界萃取樟芝胞內成分，皆可有效抑制肝癌、子宮頸癌、胃癌及乳癌<sup>(49)</sup>。

## 5. 毒性

在安全評估方面，以 630mg/kg 劑量之子實體，連續餵食大白鼠 14 天，並無體重異常或組織病變出現。菌絲體以 Ames test，以沙門氏菌 TA100 為對象，顯示不具致突變性<sup>(50)</sup>。樟芝菌絲體懸浮液，在 3000mg/kg 劑量下，對雄及雌大白鼠服用 14 天內，對動物不引起任何毒性症狀，器官亦無組織病變<sup>(51)</sup>。以胃管連續餵服 20、200、2000mg/kg 劑量之樟芝菌絲體凍乾品，28 天予大白鼠，無動物死亡、器官組織病變、血清生化值改變之現象，動物體重亦持續正常成長，大白鼠連續服用混在飼料之乾燥樟芝（0.5、1、2%）90 天，亦無毒性發現<sup>(52)</sup>。在 50、150、500mg/kg/day 之劑量，以餵食針給予懷孕等 6 天至 15 天之 SD

大白鼠，也未發現在子宮重量、生育力指數、受精卵著床前流失率、著床後死亡率、胎鼠平均體重改變及畸胎之影響<sup>(53)</sup>。

## 第二節 乙型肝炎病毒

至目前文獻資料，尚未有樟芝對乙型肝炎病毒影響之研究，故本實驗擬研究樟芝多醣體對抗乙型肝炎病毒之活性。下文就乙型肝炎病毒加以介紹。

### 一、乙型肝炎病毒之構造及其感染性

屬於肝病毒科(*Hepadnaviridae*)的人類乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus, 簡稱 HBV), 是已知最小的 DNA 病毒。它含有環狀 DNA 長(負)[L(-)]股及短(正)股[S(+)]的環狀 DNA<sup>(54,55,56)</sup>。此 DNA 包在核心顆粒(core particle)中<sup>(57,58)</sup>, 核心顆粒內有 DNA 聚合酶 (Polymerase), 與其長股 5'端 DNA 結合在一起<sup>(59)</sup>。核心顆粒中亦含有蛋白質激酶 (protein kinase)活性<sup>(60)</sup>。核心顆粒外圍則由病毒的表面抗原(HB<sub>s</sub>Ag)及宿主的脂質所組成的外套(envelope)覆蓋, 形成 42nm 具有感染性的鄧氏顆粒(Dane particle)<sup>(61,62)</sup>。除了鄧氏顆粒外, 尚有不具感染性的次病毒顆粒(subviral particle), 如直徑為 22nm 的球型顆粒, 及直徑亦為 22nm 但具不同長度的長柱型顆粒<sup>(63)</sup>, 因顆粒內不含病毒核酸, 故不具感染性。

感染乙型肝炎病毒, 會引起急性肝炎外, 可能會變成慢性肝炎、肝硬化, 且與肝癌的形成有密切的關係<sup>(64,65,66)</sup>。台灣的乙型肝炎之感染率大約為 85%, 而其中有 15%左右的人會轉變成為帶原者。乙型肝炎帶原者, 極大多數發展成肝癌。表面抗原陽性者獲得肝癌比表面抗原陰性者高 223 倍<sup>(66)</sup>。故乙型肝炎病毒與肝癌之形成息息相關。

## 二、乙型肝炎病毒轉錄(transcription)及訊息 RNA

乙型肝炎病毒感染了宿主後，主要的轉錄產物為 3.5Kb 及 2.1Kb RNA<sup>(67)</sup>，其中 3.5Kb RNA 可分為兩種，較長的 3.5Kb RNA、又稱前核心 RNA(precore RNA)，並經轉譯後 process 成為可釋出之 e 抗原(HbeAg)，可作為轉錄 RNA(mRNA)以產生前核心抗原(precore protein)。較短的 3.5Kb 轉錄 RNA，又稱為前基因體 RNA(prenomic RNA)，它作為轉錄 RNA 以產生核心抗原及 DNA 聚合酶，同時可被包入病毒核心顆粒中，而被用來作為合成 DNA 之模版，以保存病毒之基因訊息。這兩種 3.5Kb RNA 的 3'端都結束於 HBV 基因群上僅有的 polyadenylation site。2.1Kb RNA 之 5'端起點有三處，一處位於 pre-S2 區域上游，可用以合成中型表面抗原(middle HBsAg)；另兩群位於 pre-S2 區域中間，只能用以合成主要表面抗原(Major HBsAg)<sup>(68,69)</sup>。

乙型肝炎病毒轉染的細胞中<sup>(69)</sup>或是在病毒感染的組織中<sup>(68)</sup>，可見到一種含量較少的 2.4Kb 訊息 RNA，它的 5'端起點只有一處，位於 pre-S1 區域上游，可以合成大型表面抗原(large HbsAg)<sup>(70)</sup>。

### 三、乙型肝炎病毒之轉譯(translation)及其抗原(antigen)

長股的 DNA 共有四個開放式編閱結構(open reading frame , ORF) 即 S、C、P 及 X 區域，分別譯製(encoded)表面蛋白、核心蛋白、DNA 聚合體及 X 蛋白，在血清中可測到表面抗原、核心抗原和 e 抗原。

#### 1. 表面抗原(Hepatitis B Surface Antigen , HBsAg)

表面抗原有三種，即主要表面抗原，中型表面抗原和大型表面抗原<sup>(71)</sup>。由 S 基因合成主要抗原，pre-S2 加上 S 基因可合成中型表面抗原，pre-S1，pre-S2 與 S 基因合起來可合成大型表面抗<sup>(72,73,74,75)</sup>。

##### (1)主要表面抗原(the major HBsAg)

主要表面抗原，以 p24 蛋白和 gp27 醣蛋白兩種型式存含有 226 個胺基酸部分的 p24 及 gp27 並以雙硫鍵(disulfide bond)結合成二聚體(dimer)存在，若雙硫鍵分解，抗原性也劇降<sup>(73)</sup>。

##### (2)中型表面抗原(the middle HBsAg)

中型表面抗原以單醣基的 gp33 醣蛋白和雙醣基的 gp36 醣蛋白兩種型式存在，含有 281 個胺基酸<sup>(76)</sup>。

### (3)大型表面抗原(the large HBsAg)

大型表面抗原以 p39 蛋白和 p42 醣蛋白兩種型式存在，含有 389 個胺基酸(*ay* 亞型)或 400 胺基酸(*ad* 亞型)<sup>(75)</sup>。可與肝細胞細胞膜結合<sup>(77)</sup>。對於 pre-S2 基因譯製的抗原決定基(antigenic determinant)和 pre-S1 基因譯製的抗原決定基(21-47 位置的胺基酸)若以可結合這些區域的單株抗體注射入黑猩猩，可使黑猩猩避免受 B 型肝炎病毒的感染<sup>(88)</sup>。

### 2. 核心抗原(HbcAg)與 e 抗原(HBeAg)

核心抗原(HBcAg)含 183 個胺基酸，可自行組合成具正二十面體結構之核心顆粒。實為 180 個 p21 的蛋白顆粒(為水溶性)，可直接刺激 B 細胞產生抗體，而不需要依賴 T 細胞<sup>(79)</sup>。

乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)為 Pre-C 基因和基因 C 所譯製的兩個次單位 p17 組成，<sup>(71,80,81,82)</sup>。e 抗原具水溶性，它並不像核心抗原一般形成顆粒，因此抗原性強度就不如核心抗原，而需仰賴 T 細胞的幫忙去刺激 B 細胞產生抗體<sup>(79)</sup>。

## 四、乙型肝炎病毒之生活史(life cycle)

乙型肝炎病毒之生活史，可分成：

1.附著(attachment)：乙型肝炎病毒進入宿主體內，具有趨肝性(hepatotropism)，藉由病毒外套體上的大型表面抗原附著在宿主的肝細胞接受器上，進行感染。



2.貫穿(penetration)和去外套(uncoating)：目前相信 HBV 是經由接器所介的方式進到肝細胞後，去掉外套體，將病毒之核心顆粒體(nucleocapsid)送入肝細胞核內。

3.修補(repairing)和接合(ligation)：當病毒核心顆粒體進入肝細胞核內後，病毒基因體靠擴散進來的去氧核糖核酸，以病毒自帶的 DNA 聚合體，將部分雙股 DNA 修補且接合成共價性封閉式環型 DNA(cccDNA)。

4.轉錄(transcription)和轉譯(translation)：以 cccDNA 為模板，利用宿主轉錄系統，開始轉錄出病毒 RNA。這些 RNA 包括 3.5Kb 的前基因體 RNA(pregenomic RNA)及次基因體 RNA(subgenomic RNA)。病毒 RNA 再利用宿主轉錄系統，轉譯出病毒蛋白，包括各種表面抗原、核心蛋白、e 抗原、DNA 聚合體以及 X 蛋白。

5. 包裹(packaging)、核套體形成(encapsidation)和組合(assembly)：當病毒的核心蛋白、DNA 聚合體以及前基因體 RNA 的量足夠時，病毒蛋白開始聚集，進行包裹作用，將 3.5Kb 的前基因體 RNA 及 DNA 聚合體包裹核心顆粒內，形成核套體。此核套體與排列在內質網上的病毒表面抗原組合成帶有宿主脂質為外套的病毒體(virion)。

# 第三章 材料與方法

## 第一節 實驗材料

### 一、實驗材料

將草藥店買來的樟芝及寄生於香杉上的樟芝及人工以太空包培養樟芝之水萃取物及酒精萃取物。經冷凍乾燥、磨碎，重覆以下步驟 3 次加入材料 20 倍重量的二次水在 80℃，加熱 6 小時後以 2,500rpm，30mins 分離，取上清液。將 3 次萃取液冷凍乾燥得到水萃取物，上述方法的殘渣部份，重覆以下步驟 3 次：

加入 20 倍重量的 95% 酒精，在 80℃，加熱 6 小時後以 2,500rpm, 30mins 分離，取上清液。將 3 次萃取液加熱除去酒精得到酒精萃取物，進行樟芝粗蛋白測量實驗(第二節,第一項實驗)。

選用食品工業研究所販售之樟芝 CCRC35396<sup>(83)</sup>以黑暗下，在 28℃，圓盤培養的方式培養於滅菌過的 25ml，pH5.6，39g/L 的馬鈴薯培養基(PDA)中，添加不同的糖類：Glucose, fructose, xylose, sucrose, rhamnose, maltose, galactose,及濃度 10g/L, 20g/L, 40g/L, 80g/L，於培養 60 天時，刮下菌絲，以 250mMNaCl 洗淨，冷凍乾燥。進行不同含糖培養基對樟芝醣類合成之實驗(第二節,第二項實驗)。

選擇食品工業研究所販售之樟芝 CCRC35396, CCRC35398, 及張東柱老師提供的 B71, B85, B86 五種菌種, (其中編號 CCRC35396, CCRC35398, B85, B86 送台大許瑞祥教授由研究生張益軒進行分子生物鑑定)以黑暗下, 在 28℃, 圓盤培養的方式培養於 25ml, pH5.6, 39g/L 的馬鈴薯培養基(PDA)中, 於 28℃ 下培養 19 天後, 將成長中的菌絲切成 1x1cm, 再移置裝有 25ml, pH=5.6 的 PDB(48gPDB/L 內含 20g/L 的 glucose), 250ml 的瓶子中, 黑暗下繼續培養 26 天。之後以 250mM 的 NaCl 洗淨, 以 3,000 轉離心洗去 medium, 經冷凍乾燥後, 儲存於 4℃ 的冰箱中, 進行相同培養條件下不同種樟芝多醣之測量實驗(第二節, 第三項實驗)。

選用乙型肝炎病毒產生的 MS-G2 cell Line, 置於  $3 \times 10^5$  cells/ml-well 的組織培養皿中, 經一夜的培養, 確定其細胞完全附著, 進行抗乙型肝炎病毒活性之測定(第二節, 第四項實驗)。

## 二、實驗藥品

1. 95%酒精購自台灣公賣局),
2.  $\text{H}_3\text{BO}_3$  購自 MERCK CO. GERMANY
3.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  購自 MERCK CO. GERMANY
4. NaOH 購自 MERCK CO. GERMANY
5. NaOAc 購自 Fluka
6. POTATO DEXTROSE AGAR ( 簡稱 PDA ) 購自 Sigma Co.
7. POTATO DEXTROSE BROTH ( 簡稱 PDB ) 購自 Sigma Co.
8. HCl 購自 MERCK CO.
9. NaCl 購自 J.T.BAKER
10.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  購自 MERCK CO. GERMANY
11. glucose、fucose、xylose、sucrose、rhamnose、maltose、galactose  
均購自 Sigma Co.

### 三、實驗儀器

1. 生長箱為 Sigma Co. ( Saint Louis, MO,USA ) 出產的 solid culture。
2. 恆溫水浴槽( SHAKER BATH ) 為 BT-150 INSTRUMENTS CO.,LTD 製造。
3. 冷凍乾燥機為 VIRTIS 出產的 FM-25XL, homogenize 均質機
4. 離心機 SORVALL RT 6000D ( 為 DUPONT 出產 )
5. Speed-Vac 為 Dionex, USA 產品
6. high-performance anion-exchange chromatography (HPAEC) system 為 Dionex, USA 產品

## 第二節 實驗方法

### 一、樟芝粗蛋白之測量

取 20mg 萃取物(水萃取物及酒精萃取物)，加入 25ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，以紅外線恆溫水解儀酸水解，再以以粗蛋白分析儀測量其總氮量及粗蛋白百分比。

### 二、不同含醣培養基對樟芝醣類合成之影響

#### 1. 醣類的添加對菌絲生長的影響

實驗組與對照組相比較之下，在實驗中添加 glucose、fucose、xylose、sucrose、rhamnase、maltose、galactose 在不同劑量下觀察菌絲的生長，其生長速率以生長第 n 天的菌絲體直徑相對於第 0 天的接種時菌絲體直徑的比例表示。

#### 2. 醣類的添加對菌絲細胞中游離醣的影響

將處理過之樟芝 CCRC35396 菌絲磨成粉，取 20mg 的菌絲粉末 +5ml 80% ETOH 以 homogenize 混和攪拌均勻<sup>(84)</sup>。置於 80 水浴槽 30min (不定時取出攪拌) 後，於 3,000rpm 離心 10mins。取上清液。另沉澱物+5ml 80% EtOH 以 homogenize 混和攪拌均勻，置於 80 水浴槽 30min (不定時取出攪拌)，在 3,000rpm 離心 10mins，再取上清液。

將兩次上清液混合均勻，取 1ml，Speed-Vac 乾燥，除去酒精，溶回 1ml Q 水以 Millipore-GX nylon membrane 過濾，濾液稀釋 100 倍，取 10 $\mu$ l 注入 HPAEC 偵測。

用 80% (v/v) EtOH 在 80 $^{\circ}$ C 萃取後的沉澱物乾燥後，加入 6N HCl 在 80 $^{\circ}$ C 進行酸水解 6 小時，冷卻後以 Speed-Vac 乾燥，除去 HCl，取得細胞壁水解後的單醣，再溶於三次水中，並以 Millipore-GX nylon membrane 過濾，取 10 $\mu$ l 注入 HPAEC 偵測。

### 3. 醣類的添加對菌絲細胞中非游離醣的影響

將上述 80% 酒精不溶的部份加以水解，分析其中的單醣組成。

## 三、相同培養條件下不同種樟芝多醣之測量

冷凍乾燥後的菌絲磨成粉(CCRC35396、CCRC35398、B71、B85、B86 五種菌種)，加入 100 倍體積的 2 次水，在 80 $^{\circ}$ C 水浴槽內萃取 6 小時，置冷後，以 3,000rpm，離心 10 分鐘，取上清液，加入上清液 4 倍體積的 95% 酒精，搖勻，保存於 4 $^{\circ}$ C 的冰箱中過一夜，再以 3,000rpm，離心 10 分鐘，取沉澱物冷凍乾燥，獲得了粗多醣。以重量 100 倍的三次水溶解粗多醣，混合均勻後以 Millipore-GX nylon membrane 過濾，取 10 $\mu$ l 注入 HPAEC 偵測。

乾燥的粗多醣取 1mg 置於水解管中，加入 2ml 6N HCl 在 80 $^{\circ}$ C 進行酸水解 6-8 小時，冷卻後以 Speed-Vac 乾燥，除去 HCl，取得粗多醣

水解後的單醣，再溶於三次水中，並以 Millipore-GX nylon membrane 過濾，取 10 $\mu$ l 注入 HPAEC 偵測。

High-performance anion-exchange chromatography (HPAEC) system (Dionex, USA) 包含 pump、pulsed amperometric detector(PAD-II)、anion-exchange column(Carbopac PA-100 , 4.6 $\times$ 250mm)、sample 以 autosampler(AS3500,Spectra SYSTEM) 經由 200- $\mu$ l sample loop 注入，將多醣在室溫下帶於 90mM NaOH 含有 NaOAc 的溶液中，採取拉梯度的方式，90 分鐘內將 NaOAc 的濃度由 100mM 提升到 700mM，測得的數值由 PRIME DAK system ( HPLC Technology, Ltd., UK ) 處理、積分。

以 phenol-sulfuric acid 法測定碳水化合物的濃度，以 Bradford 法測定蛋白質濃度，以自動旋光儀 polarimeter，589nm，測定特定的光學旋轉性。

粗多醣完全水解後的單醣，以 HPAEC 測定，使用上述之陰離子交換 Column (Carbopac PA-10 , 4.6x25mm , Dionex) , 單醣則在室溫下 18mM NaOH 的緩衝液中進行分析。

#### 四、抗乙型肝炎病毒活性之測定

乙型肝炎病毒產生的 MS-G2 cell Line，置於 3 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ml-well 的組織培養皿中，經一夜的培養，確定其細胞完全附著，再以多醣拮抗



之，同時用  $\gamma$ -干擾素比較，試劑以 10mg/ml，25mg/ml，50mg/ml 滅菌過的 Q 水中溶解，且以等量的 Q 水為對照組，第三天後進行抗病毒分析。

採用 Elisa kit，以 power wave X Elisa reader 492 mM 測得 HBsAg 及 HBeAg 值，並與對照組抑制病毒的百分率比較，來評估抗病毒的活性，三組的結果用 S.E.統計，並以 AST 測定細胞的損傷，AST 值高於 25 (I.U./L)，表示對細胞有毒害。

## 第四章 實驗結果

### 一、樟芝粗蛋白之測量

	水萃取物	酒精萃取物
樟芝	15.82%Protein	12.33%Protein
香杉樹上的樟芝	11.87%Protein	9.89%Protein
人工太空包培養樟芝	62.65%Protein	18.47%Protein

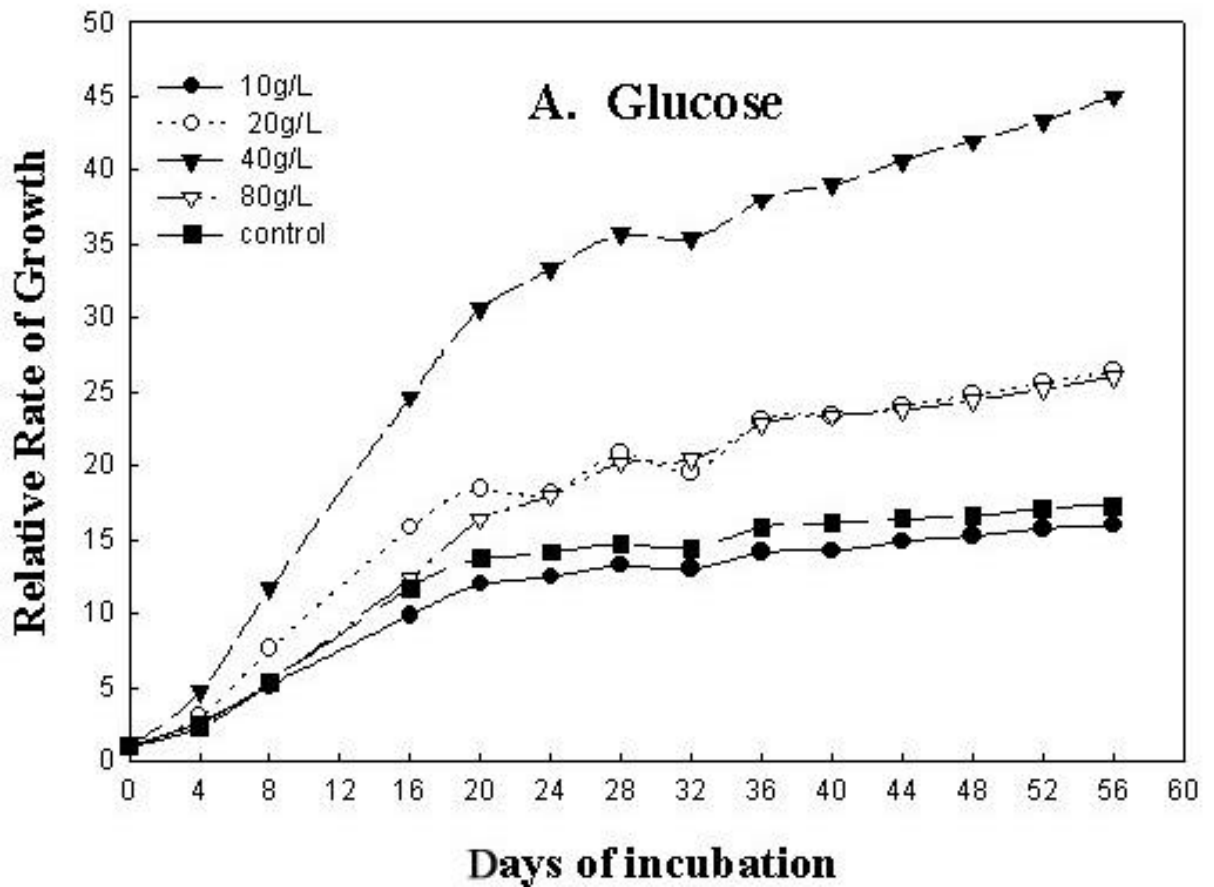
由此表可知，無論是水萃取物、酒精萃取物的粗蛋白含量都是人工太空包中培養樟芝含量較多。

但是，由於太空包中的樟芝深入培養基交雜生長，無法分離，因此此數據有些誤差。

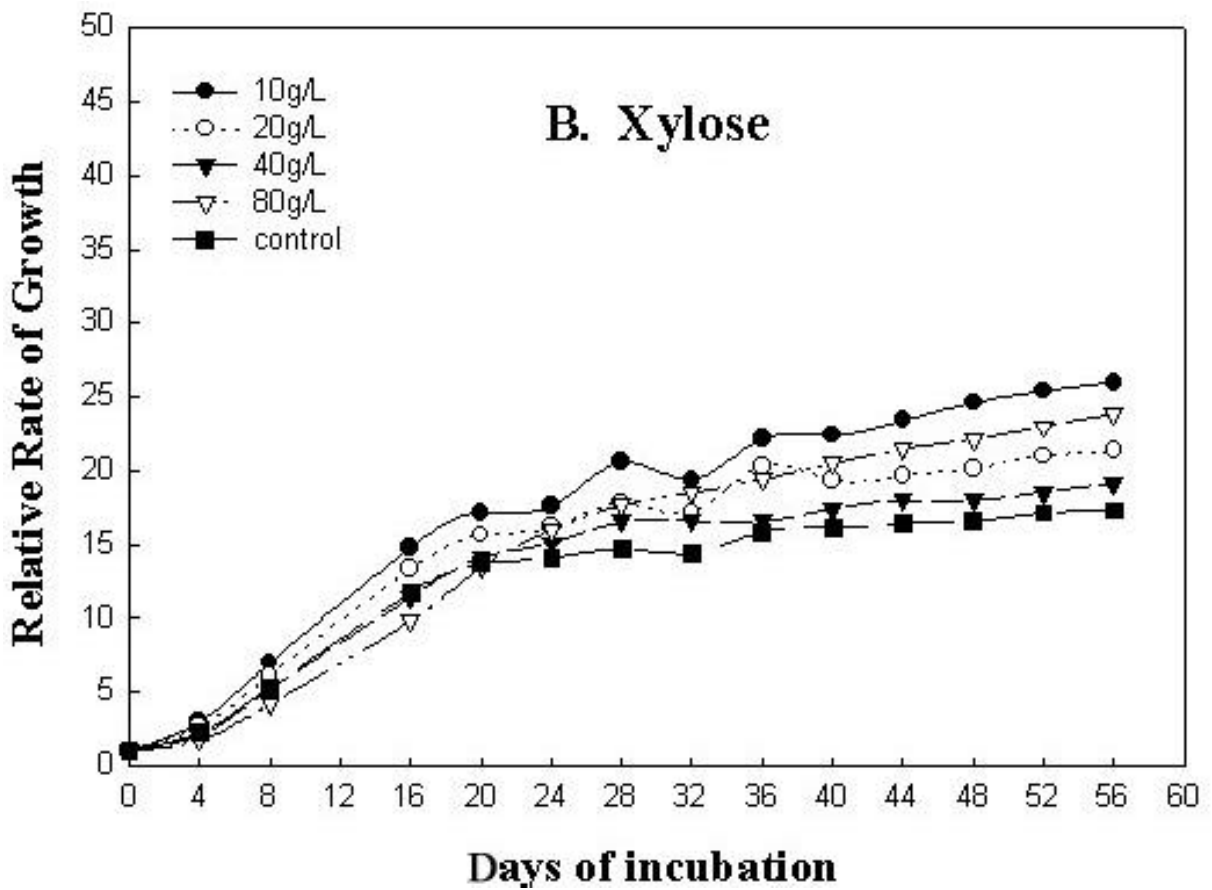
## 二、不同含醣培養基對樟芝醣類合成之影響

### 1. 醣類的添加對菌絲生長的影響

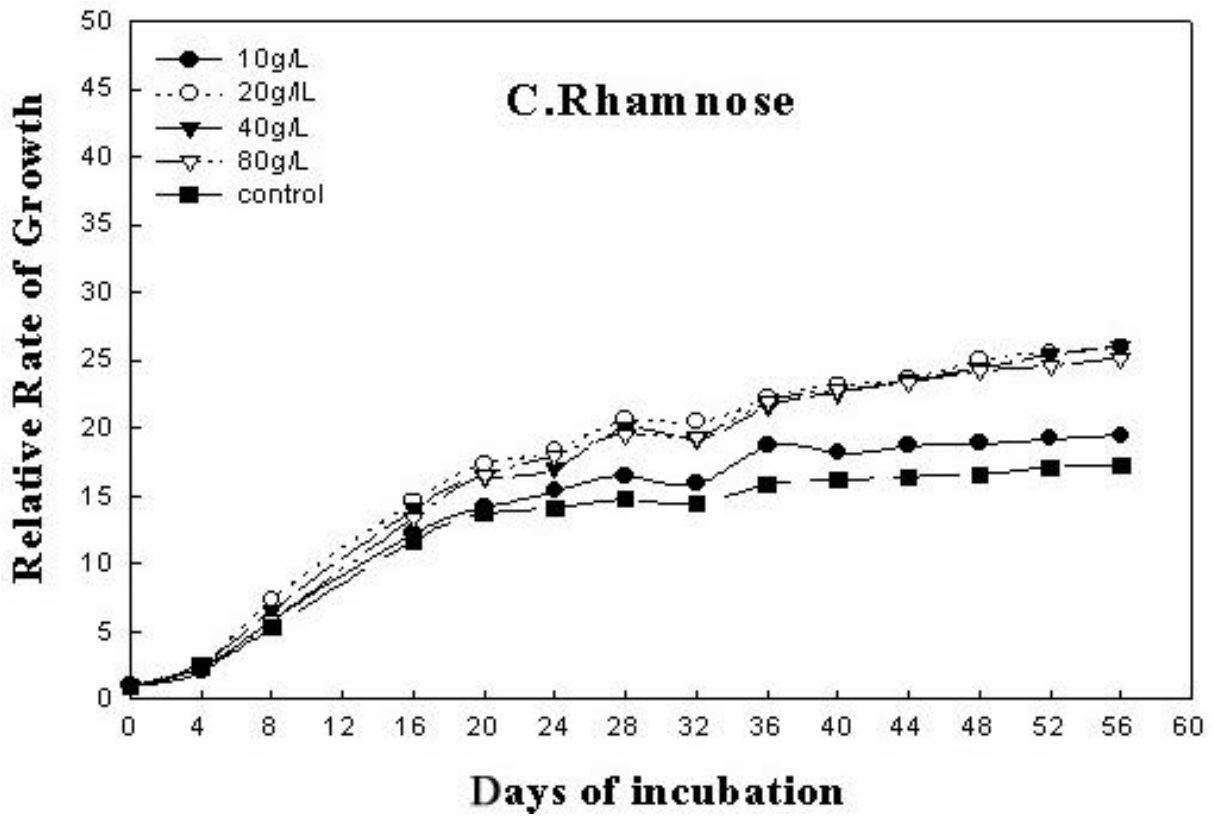
由全部的生長曲線（圖一至七）看來，前四天是 lag phase，五至二十天為 log phase。實驗組與對照組相比較之下，實驗中添加的醣類在不同劑量下幾乎都可增加菌絲的生長。添加 10, 20, 40, 80g/L glucose 的培養基在第 56 天時的相對生長速率分別為 16, 26.4, 45, 和 26。添加 10, 20, 40, 80g/L galactose 的培養基在第 56 天時的相對生長速率分別為 31, 25.4, 47, 和 29.4。對 CCRC35396 而言，在培養基中添加 40g/L 是最有效益的劑量。當 rhamnose, xylose, maltose 成為培養基中碳的來源時，它們給予的劑量對菌絲生長的影響不顯著。添加 80g/L sucrose 及 maltose 的培養基在第 56 天時的相對生長速率為 33 及 23。



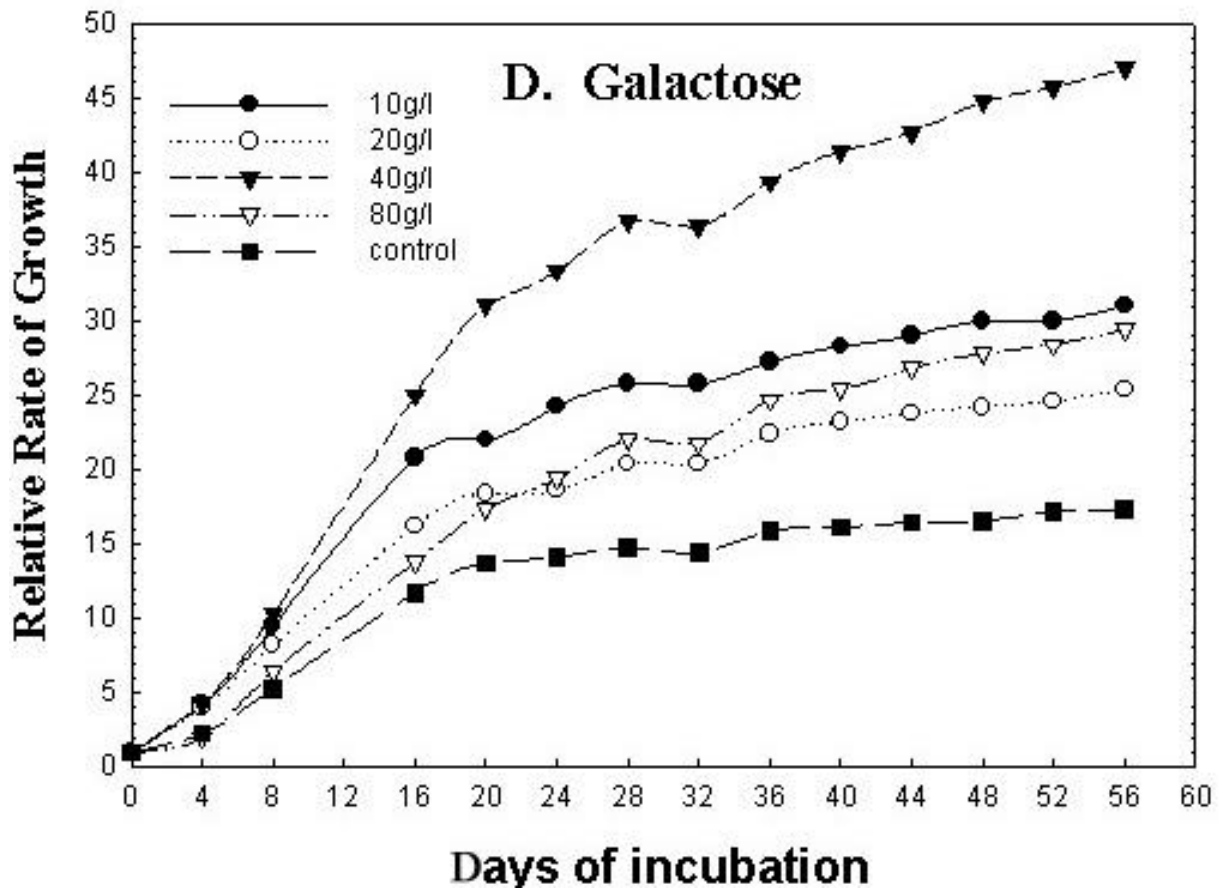
圖一：Glucose(葡萄糖)對培養樟芝菌絲體生長之影響；生長速率以生長第 n 天的菌絲體直徑相對於第 0 天的接種時菌絲體直徑的比例表示。



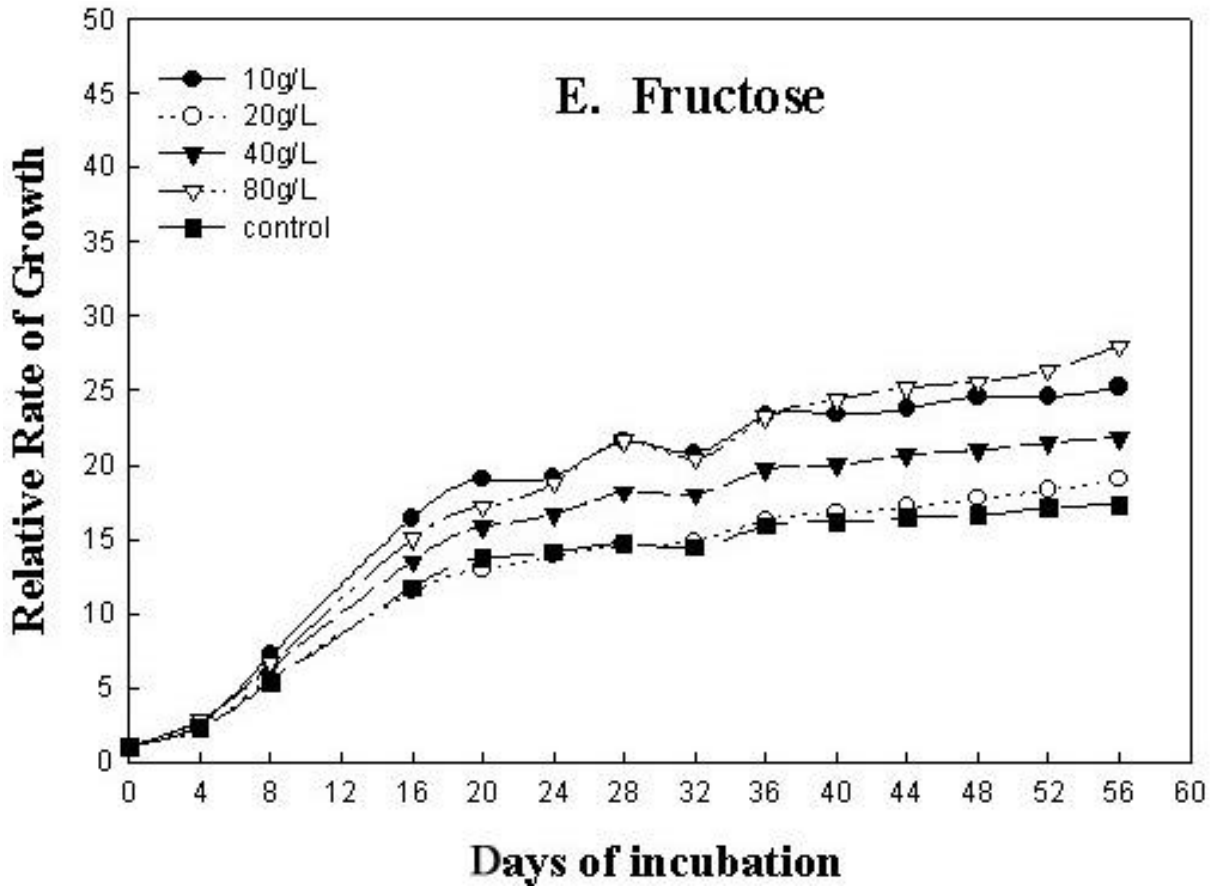
圖二：Xylose(木糖)對培養樟芝菌絲體生長之影響；生長速率以生長第 n 天的菌絲體直徑相對於第 0 天的接種時菌絲體直徑的比例表示。



圖三：Rhamnose(鼠李糖)對培養樟芝菌絲體生長之影響；生長速率以生長第 n 天的菌絲體直徑相對於第 0 天的接種時菌絲體直徑的比例表示。

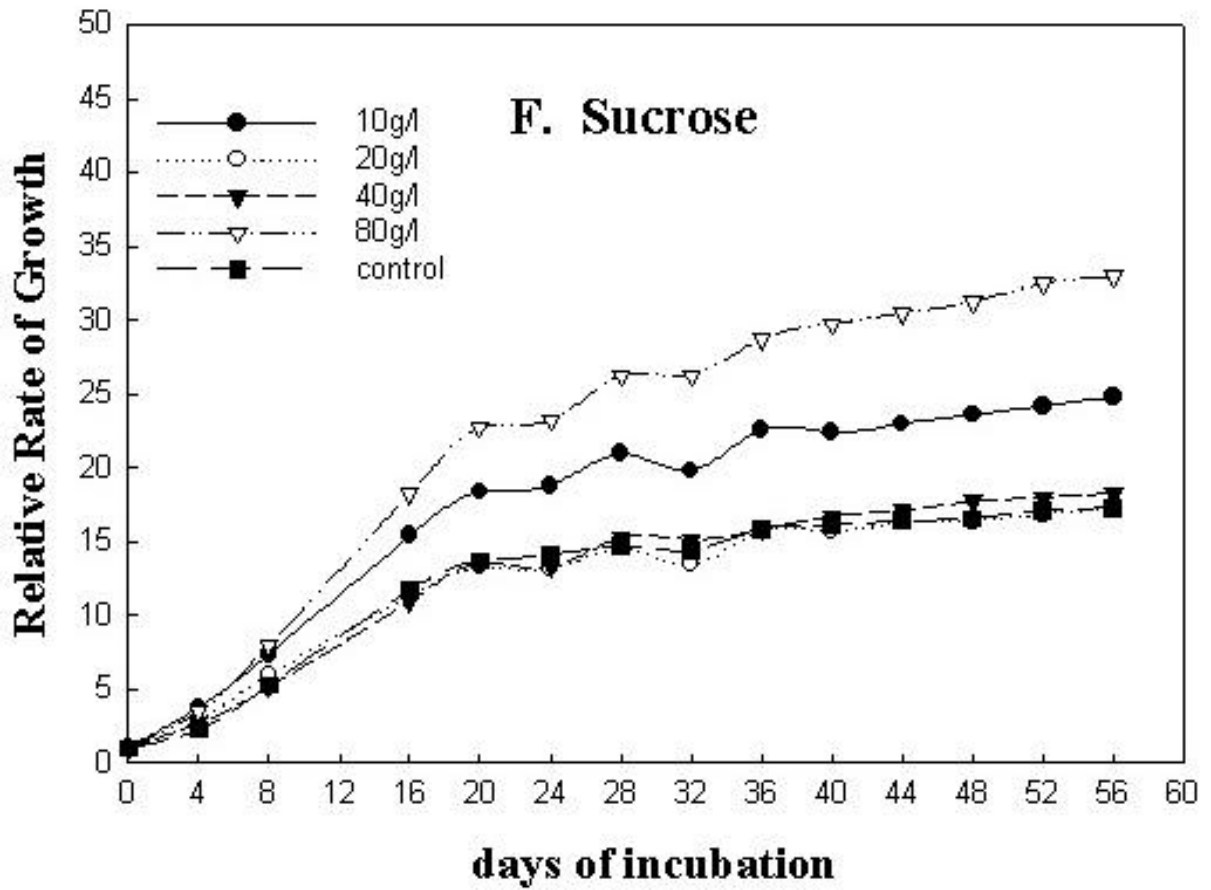


圖四：Galactose(半乳糖)對培養樟芝菌絲體生長之影響；生長速率以生長第 n 天的菌絲體直徑相對於第 0 天的接種時菌絲體直徑的比例表示。

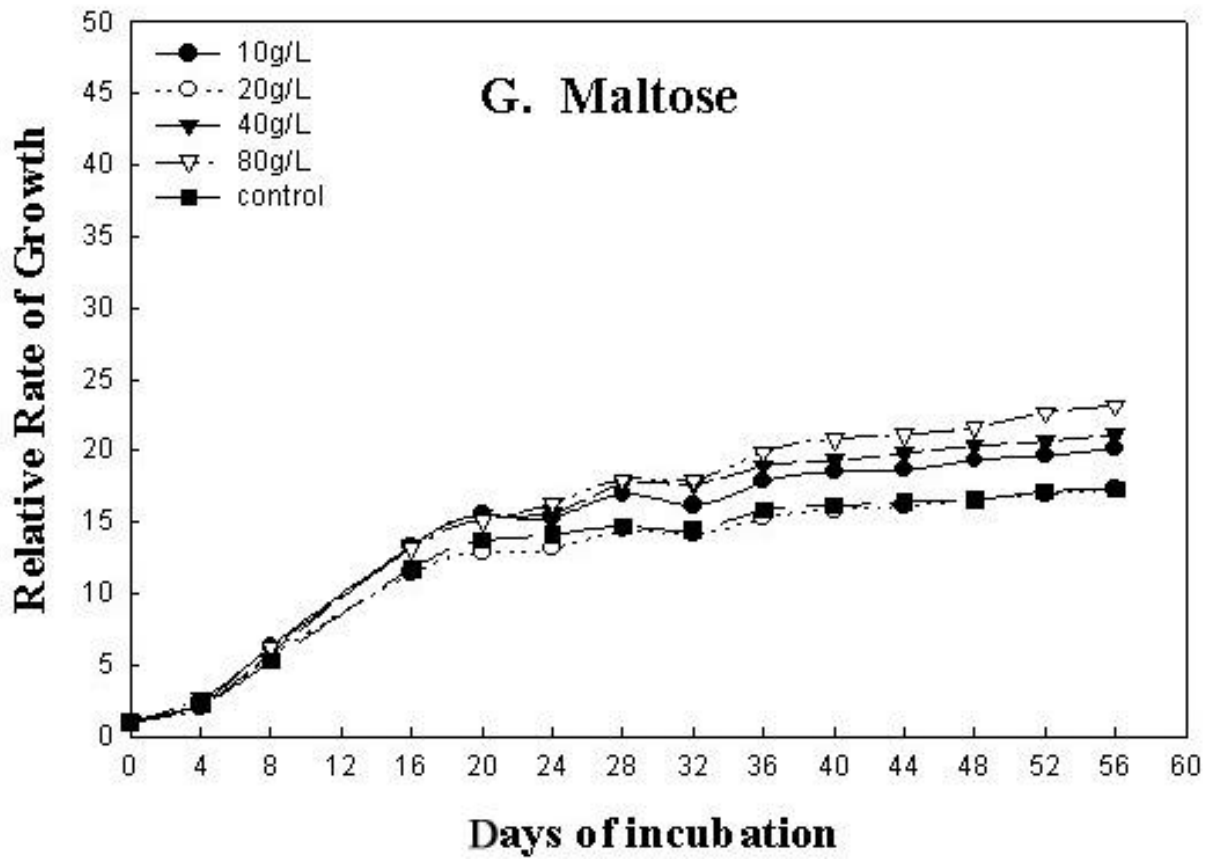


圖五：Fructose(果糖)對培養樟芝菌絲體生長之影響；生長速率以生長第 n 天的菌絲體直徑相對於第 0 天的接種時菌絲體直徑的比例表示。





圖六：Sucrose(蔗糖)對培養樟芝菌絲體生長之影響；生長速率以生長第 n 天的菌絲體直徑相對於第 0 天的接種時菌絲體直徑的比例表示。



圖七：Maltose(麥芽糖)對培養樟芝菌絲體生長之影響；生長速率以生長第 n 天的菌絲體直徑相對於第 0 天的接種時菌絲體直徑的比例表示。

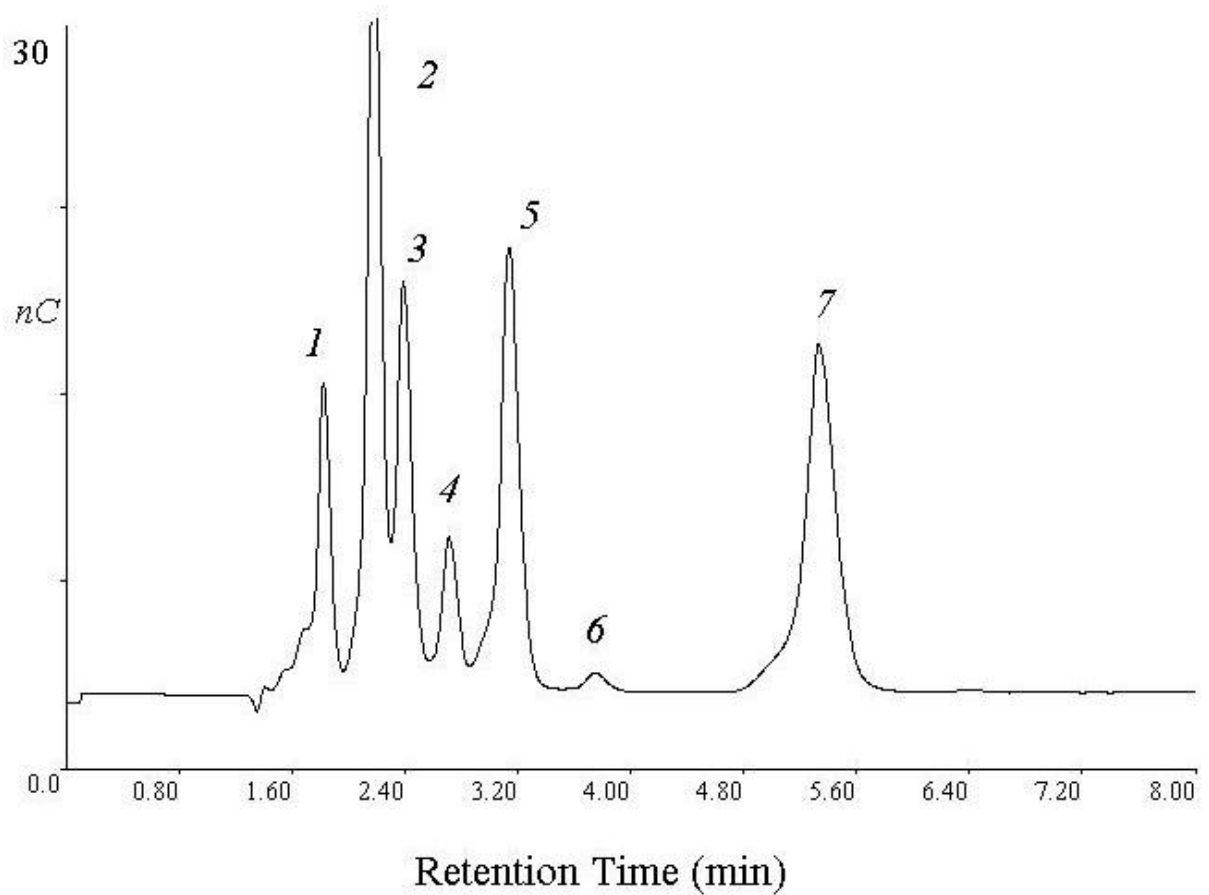
## 2. 醣類的添加對菌絲細胞中游離醣的影響

運用陰離子交換層析來測定細胞中的游離醣。層析管柱在 90mM NaOH, 1ml/min 流速下, 可將 myo-inositol, arabitol, ducitol, mannitol, fucose, rhamnase 及 glucose 於 8 分鐘內分離。(圖八)

用 80% 酒精萃取細胞中的游離醣, 比較在培養基中不同劑量碳水化合物及碳源不同時, 游離醣的差異。所有偵測到的碳水化合物的範圍都小於 0.1% 的菌絲乾重。在對照組 (PDA 中不添加碳水化合物) 的菌絲中, arabitol 和 mannitol 是最主要的游離醣, 它們的量分別為 1g 乾重菌絲中含有 1.7mg 及 1.68mg。隨著添加在培養基中 glucose 濃度的增加 (圖九), arabitol 和 glucose 在菌絲中的量也隨之增加。添加的 glucose 量為 10, 40, 80g/L 時, 1g 乾重菌絲中 arabitol 的量為 2.62, 4.95, 5.96mg, 而 glucose 的量為 1.1, 1.1, 3.8mg。由於 xylose 劑量的增加 (圖十) 對 mannitol 及 glucose 的含量有減少的效果, 猜測它能抑制此兩種醣類的合成。添加的 xylose 量為 10, 20, 40g/L 時, 1g 乾重菌絲中 mannitol 的量為 1.2, 0.64, 0.43mg。添加的 xylose 量為 10, 20, 40, 80g/L 時, 1g 乾重菌絲中 glucose 的量為 0.45, 0.27, 0.21, 0.20mg。添加 rhamnase (圖十一) 對菌絲中的 rhamnase 有正相關的影響, 對其它醣類含量無影響。添加的 rhamnase 量為 10, 20, 40, 80g/L 時, 1g 乾重菌絲中 rhamnase 的量為 0.3, 0.6, 4.0, 5.4mg。添加的 galactose (圖十二) 濃度在 40g/L 或低一些時對 glucose 的合成可能有促進的效果, 而在高濃度 (80g/L) 時則對 glucose 有了抑制的作用。Galactose 添加在培養基的濃度為 10, 20, 40, 80g/L 時, 1g 乾重菌絲中 glucose 的量分別為 0.2, 0.3, 2.4, 1.1mg。galactose 的添加對 myo-inositol 來說有明顯的反應, 添加的濃度為

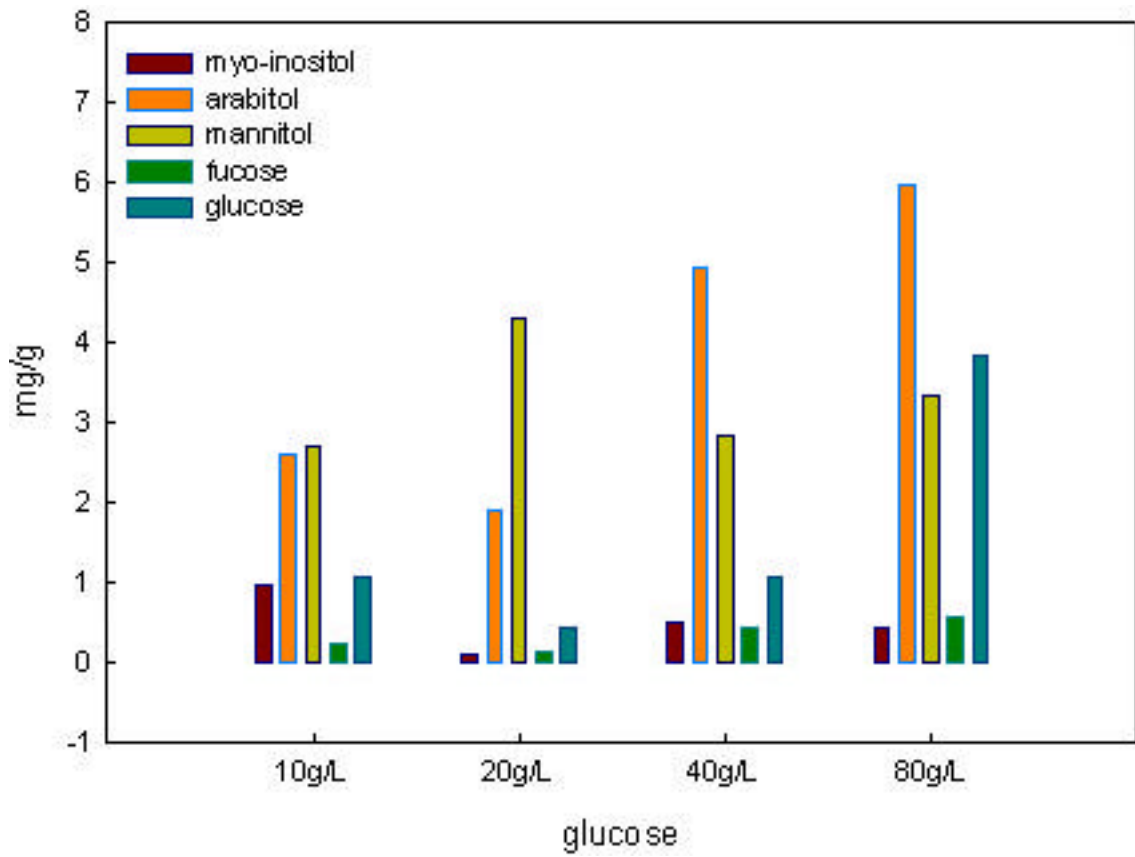
10, 20, 40, 80g/L 時, 1g 乾重菌絲中 myo-inositol 的量為 0.06, 0.06, 0.07, 1.00mg。添加的 fructose 濃度低於或相當 20g/L 時, 可以引發 mannitol 的合成, 濃度為 10, 20g/L 時, 1g 乾重菌絲中 mannitol 的量為 4.1 及 7.1mg (圖十三)。添加 sucrose 於培養基時, mannitol 隨著 sucrose 劑量的增加而增加, 添加的濃度為 10, 20, 40, 80g/L 時, 1g 乾重菌絲中 mannitol 的量為 0.7, 2.6, 3.6, 7.8mg (圖十四)。添加 maltose 於培養基時, 在 40g/L 以下的劑量, mannitol、glucose 隨著 maltose 濃度的增加而增加, 高濃度的 maltose 會抑制 glucose 的合成。Maltose 添加的濃度為 10, 40, 80g/L 時, 1g 乾重菌絲中 glucose 的量為 1.00, 4.50, 0.01mg。(圖十五)

實驗的對照組使用基本的馬鈴薯培養基(PDA), 所培養出之樟芝菌絲體 1g 乾重中測得 myo-inositol 的量為 0.005mg, arabitol 的量為 1.7mg, mannitol 的量為 1.6mg, fucose 的量為 0.01mg, 而 glucose 的量為 0.2mg (圖十六)

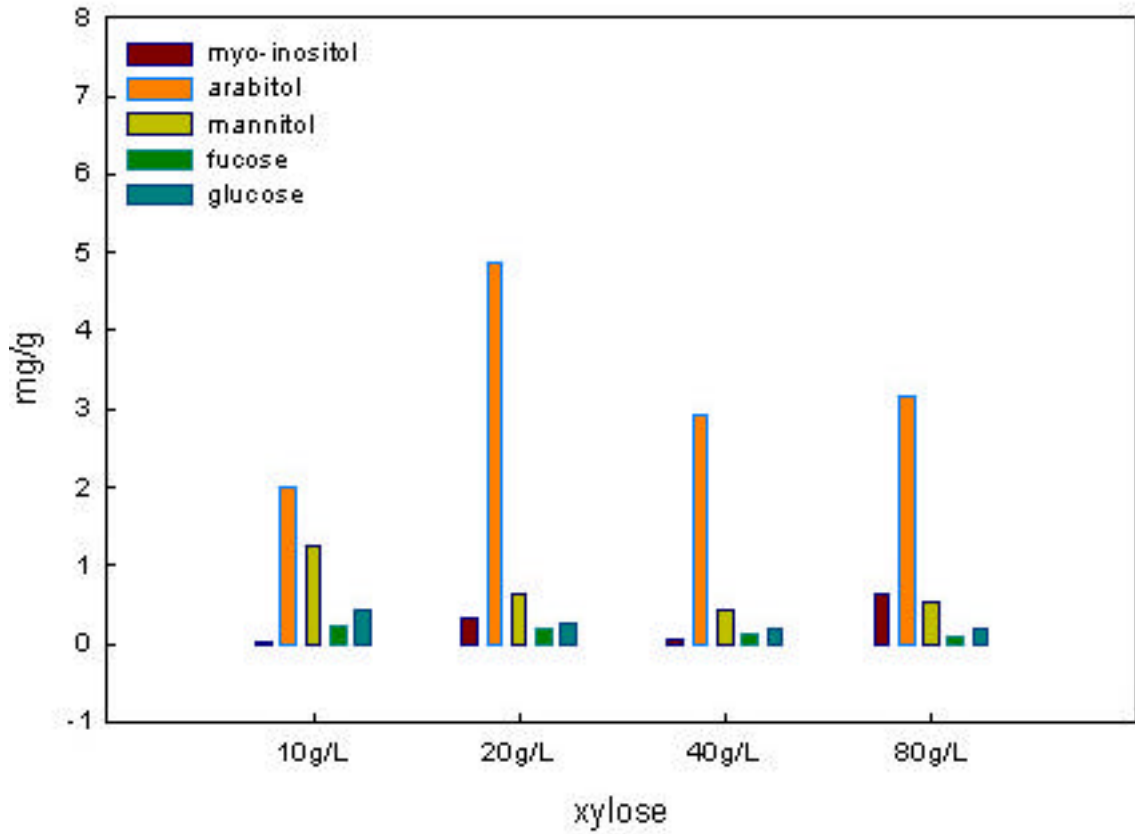


圖八：七種單糖之 HPLC 分析圖

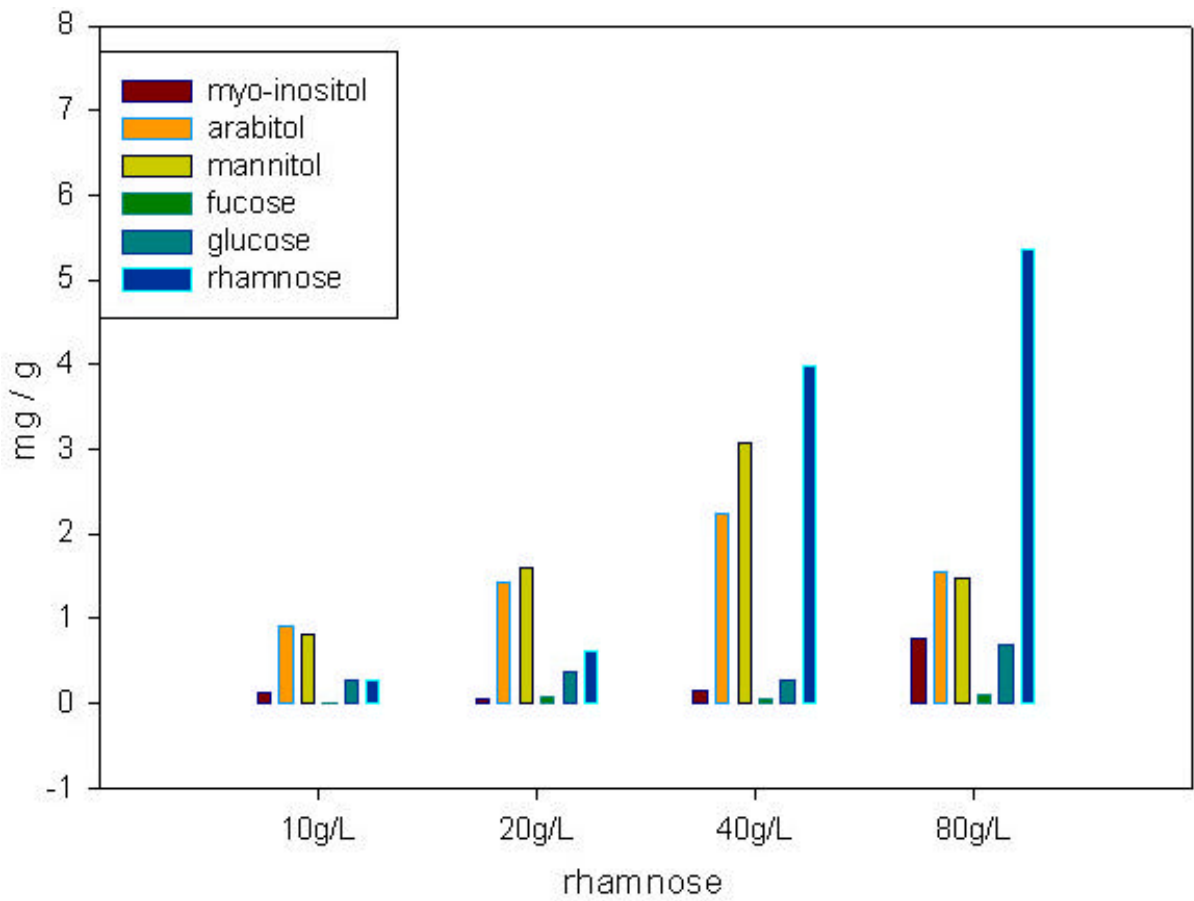
在 90mM NaOH, 1ml/min 流速下, myo-inositol( 1 ), arabitol( 2 ), ducitol ( 3 ), mannitol ( 4 ), fucose ( 5 ), rhamnose ( 6 ) 及 glucose ( 7 ) 於 8 分鐘內分離、



圖九：Glucose(葡萄糖)對培養樟芝菌絲體所含 myo-inositol , arabinol , mannitol , fucose 及 glucose 量之影響。

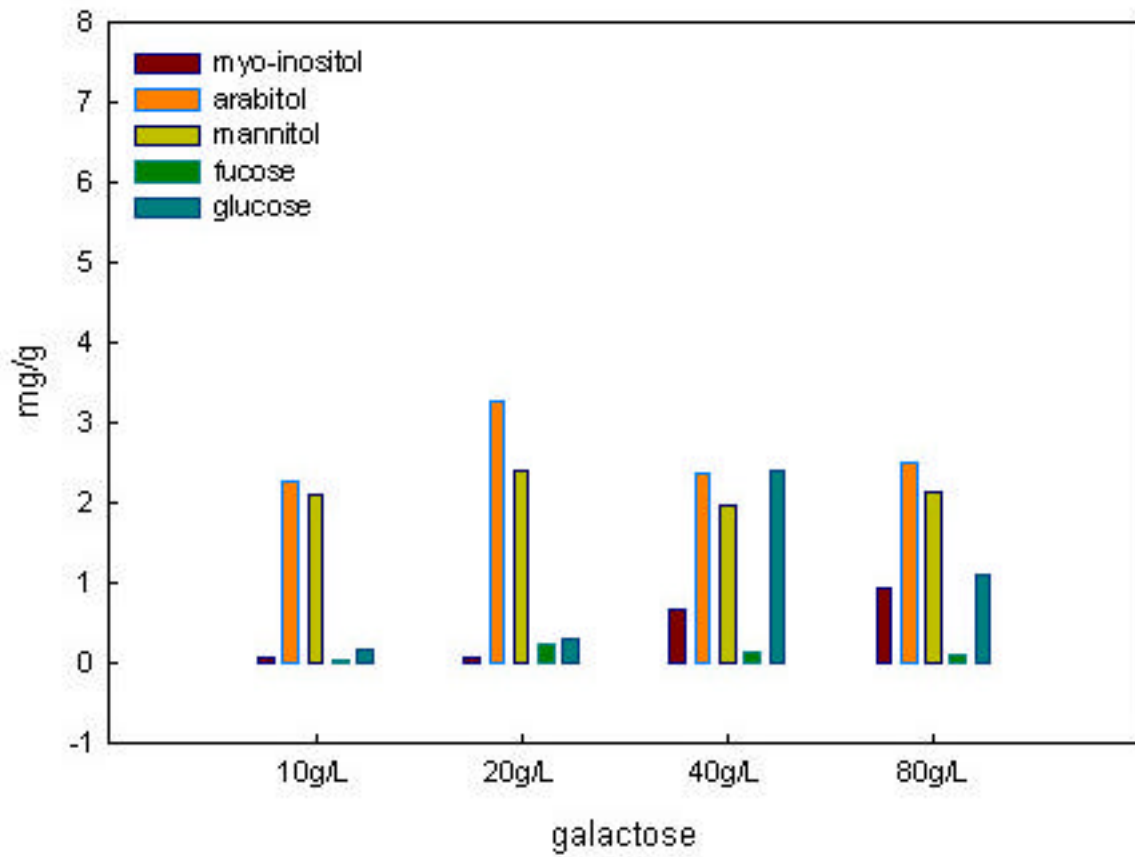


圖十：Xylose(木糖)對培養樟芝菌絲體所含 myo-inositol , arabitol , mannitol , fucose 及 glucose 量之影響。

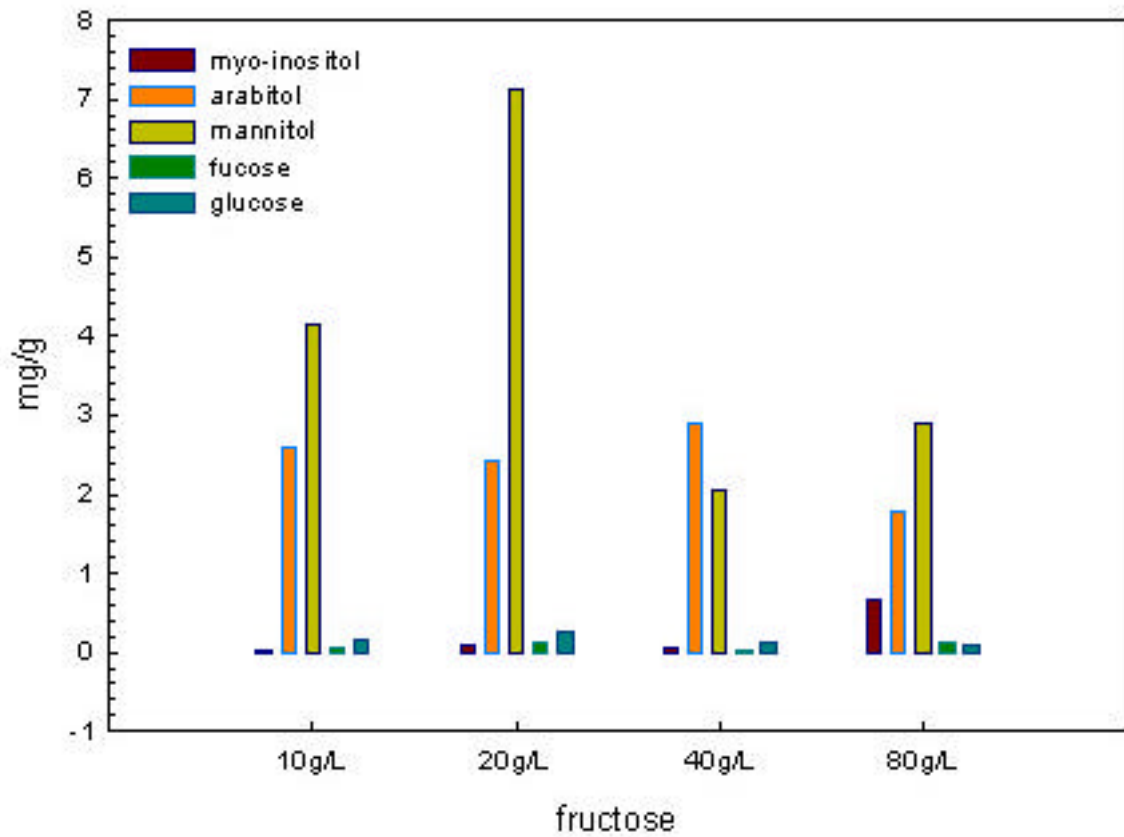


圖十一：Rhamnase(鼠李糖)對培養樟芝菌絲體所含 myo-inositol , arabitol , mannitol , fucose 及 glucose 量之影響。

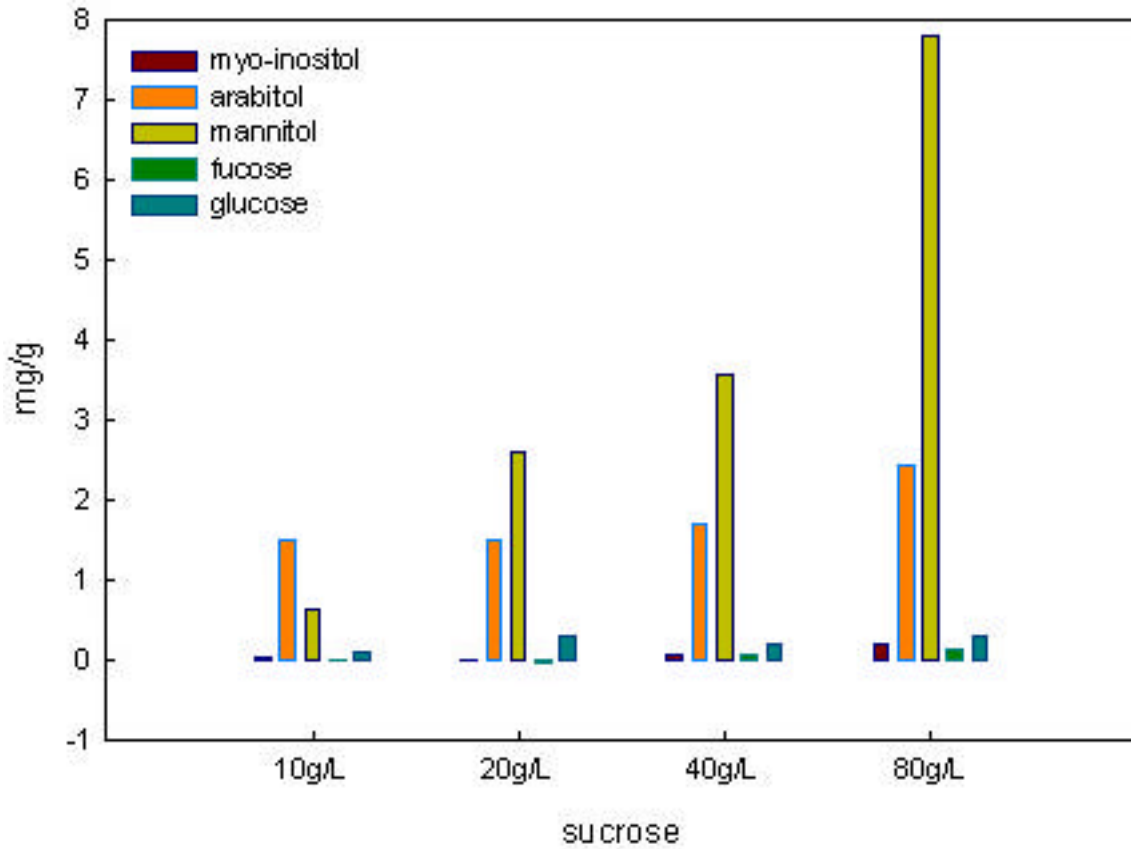




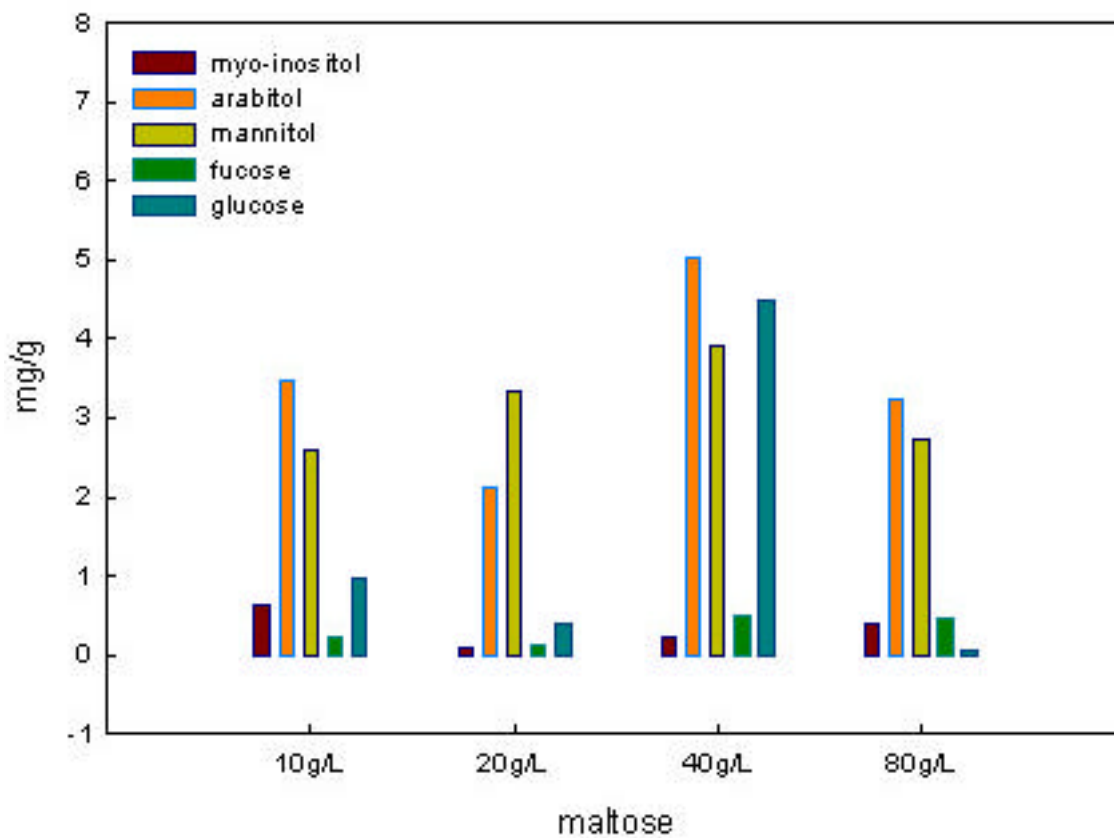
圖十二：Galactose(半乳糖)對培養樟芝菌絲體所含 myo-inositol , arabinol , mannitol , fucose 及 glucose 量之影響。



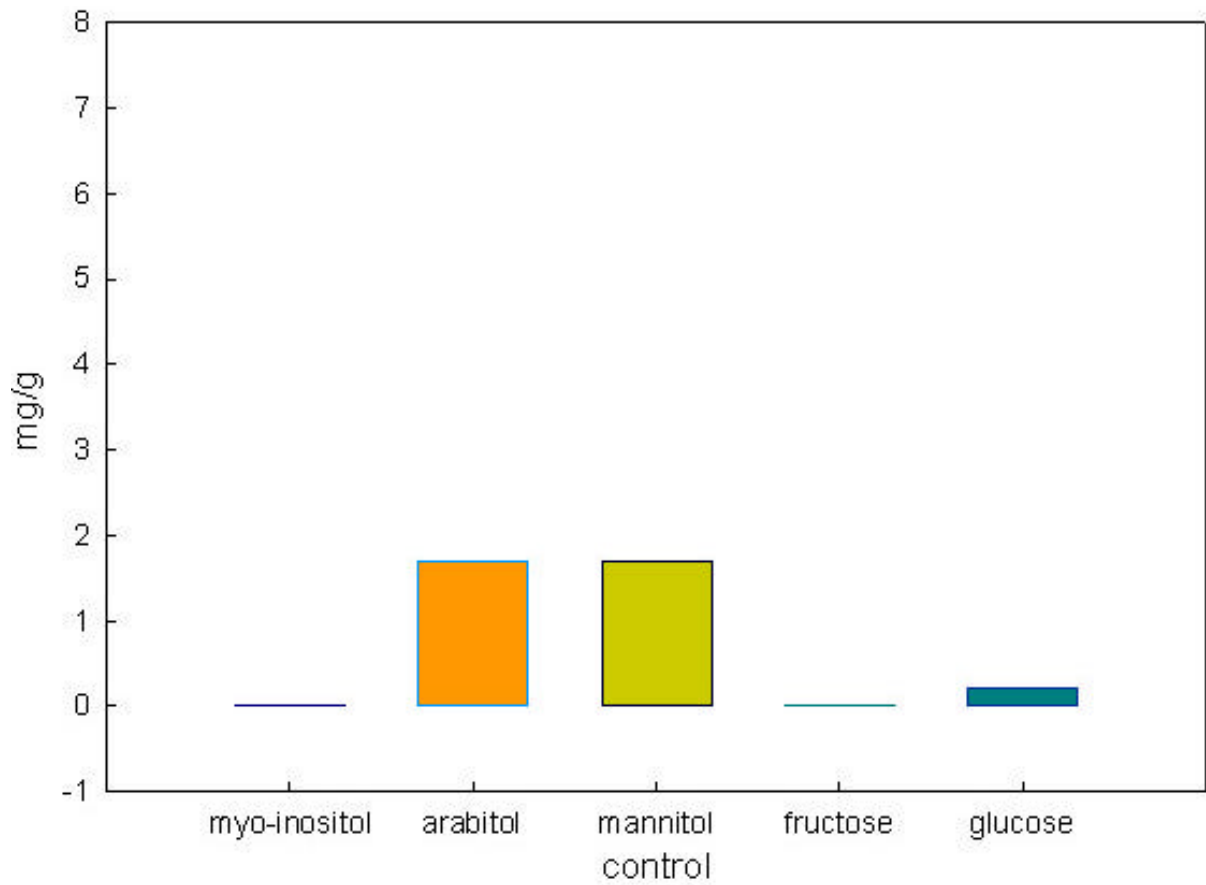
圖十三：Fructose(果糖)對培養樟芝菌絲體所含 myo-inositol , arabinol , mannitol , fucose 及 glucose 量之影響。



圖十四：Sucrose(蔗糖)對培養樟芝菌絲體所含 myo-inositol , arabitol , mannitol , fucose 及 glucose 量之影響。



圖十五：Maltose(麥芽糖)對培養樟芝菌絲體所含 myo-inositol , arabinol , mannitol , fucose 及 glucose 量之影響。



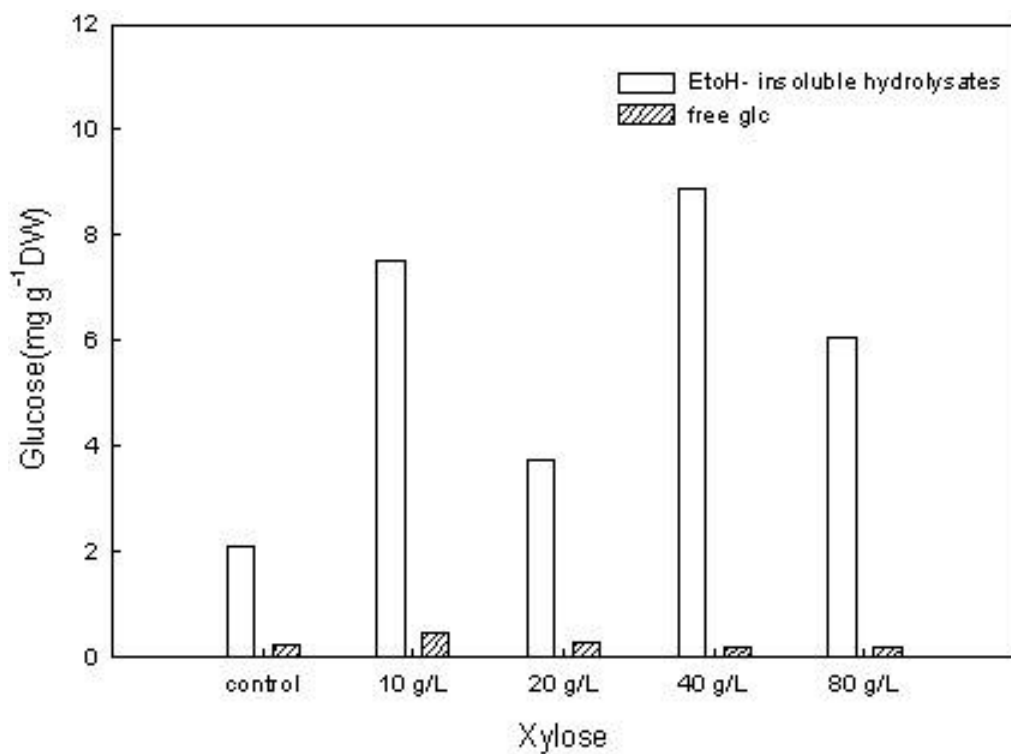
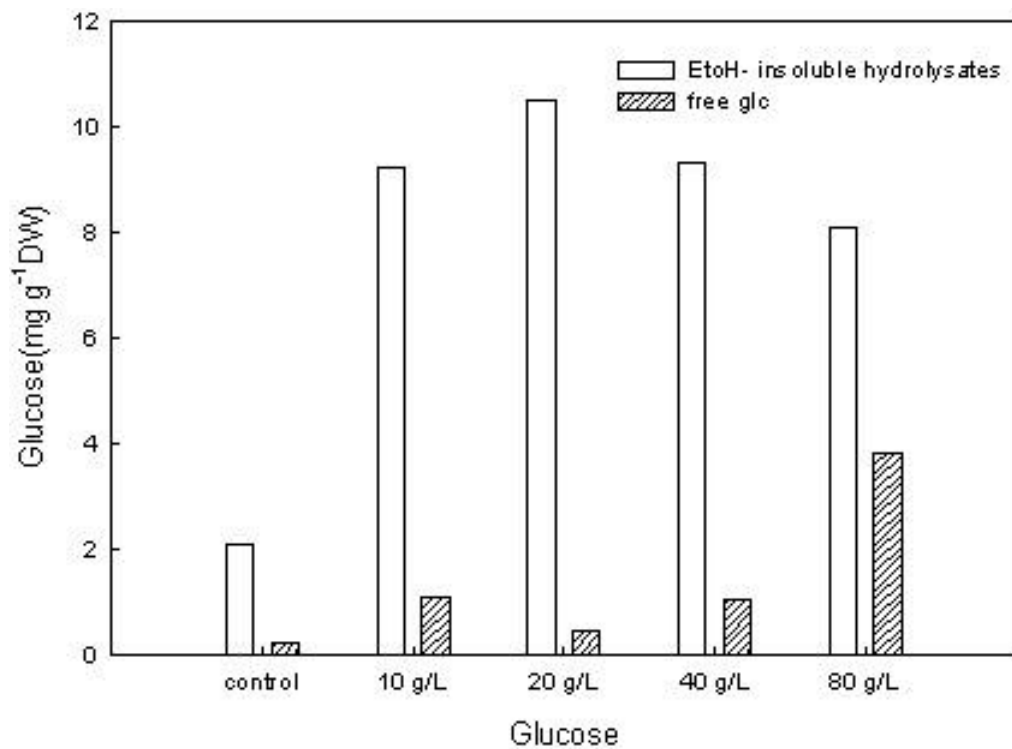
圖十六：對照培養樟芝菌絲體所含 myo-inositol , arabitol , mannitol , fucose 及 glucose 量之影響

### 3. 醣類的添加對菌絲細胞中非游離醣的影響

將 80% 酒精不溶的菌絲細胞內游離醣加以水解，分析其中的單醣組成，想了解菌絲是否將菌絲細胞內無法容納的醣類轉而形成細胞壁等非游離物質。

(圖十七)比較了添加 glucose 及 xylose 的菌絲。細胞壁水解後的單醣大部分是 glucose，符合 Burczyk 等人於 1995 的報告。隨著 glucose 的添加在 20g/L 以下時，細胞壁及細胞中的 glucose 均有增加，添加的 glucose 量為 0，10，20，40，80g/L 時，1g 細胞壁組成中 glucose 的量為 2.1，9.2，10.5，9.3 及 8.1mg。1g 菌絲中游離的 glucose 量為 0.2，1.1，0.4，1.0 及 3.8mg。

添加 xylose 看似可以抑制游離 glucose 的量，而 xylose 對細胞壁中 glucose 沒多大影響。添加的 xylose 量為 0，10，20，40，80g/L 時，1g 細胞壁組成中 glucose 的量為 2.1，7.5，3.7，8.9 及 6.0mg。1g 菌絲中游離的 glucose 量為 0.2，0.4，0.3，0.2 及 0.2mg。

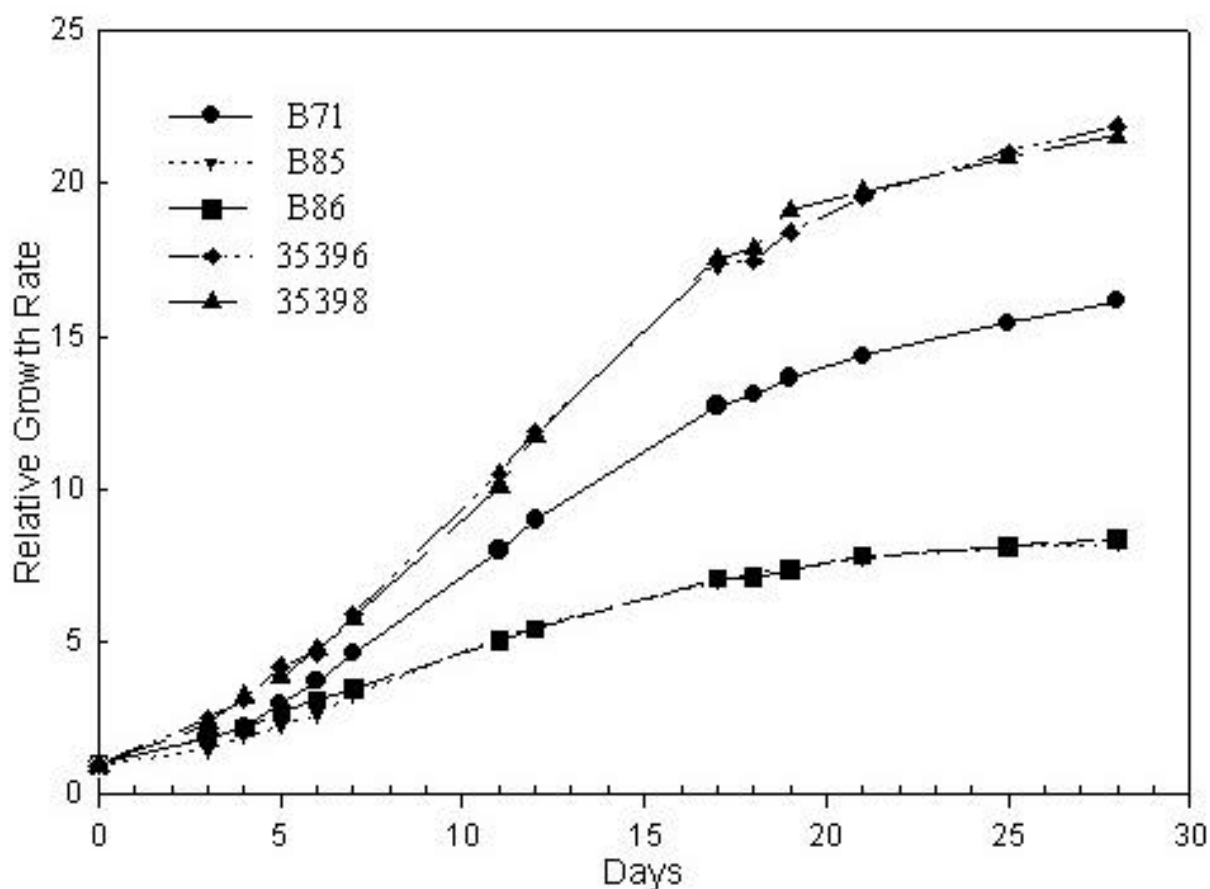


圖十七：葡萄糖及木糖的添加對樟芝菌絲體中游離的葡萄糖及酒精不溶成分中葡萄糖的影響；EtOH-insoluble hydrolysates 在本實驗中表示 80%酒精不溶的部分,即為細胞壁。

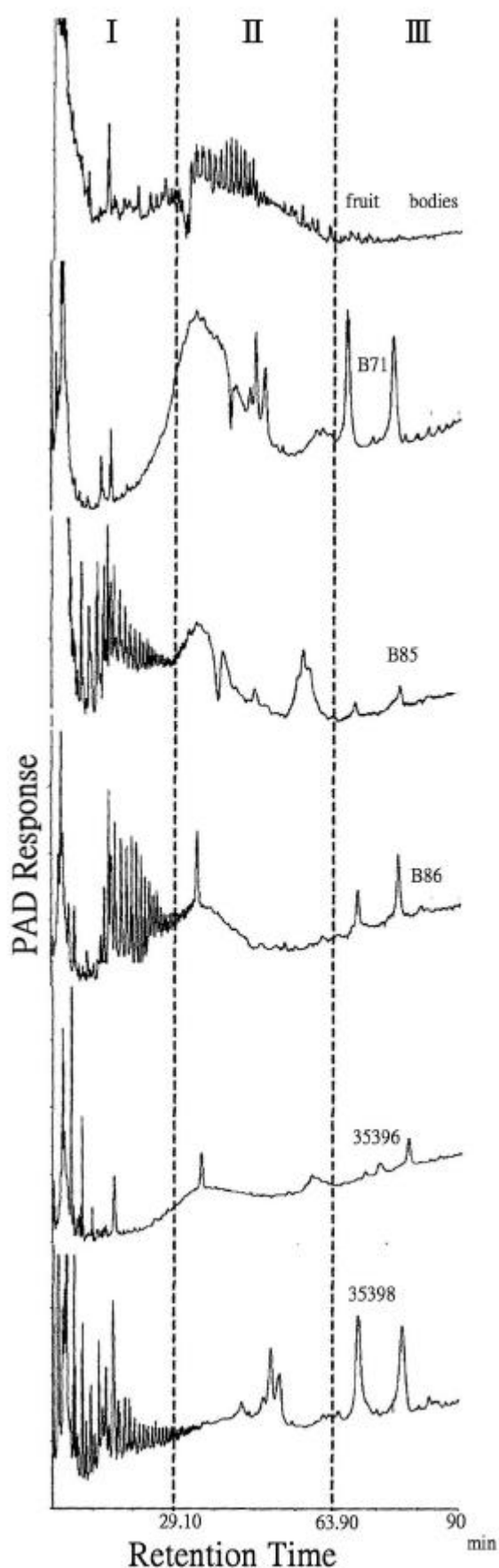
### 三、相同培養條件下不同種樟芝多醣之測量

經培養的結果(圖十八), 35396, 35398 較其他生長的更快, 培養 18 天即可達 log phase, 在醣分析儀圖(圖十九)顯示有三個部分( , , ):( )小分子量, B85、B86、35398 有很多 ( )中分子量:子實體中很多 ( )高分子量:子實體有幾個吸收? 但濃度均很低, 其他 5 種樟芝在高分子量處均有 2 至 3 個多醣的吸收? 出現, B71 及 35398 尤其大量。





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；生長速率以生長第 n 天的菌絲乾重相對於第 0 天的菌絲乾重的比例表示。經培養後 35396 與 35398 兩菌株生長速度較其他菌株快，培養 18 天即可達生長對數期(log phase)。



圖十九：牛樟芝多醣的高效液相層析 (HPLC)圖譜。在室溫下，90分鐘內醋酸鈉(NaOAc)由 100~700mM 梯度，90 mM 氫氧化鈉的條件下分析。圖中顯示子實體(fruit bodies)含有很多中分子量化合物，以及有幾個高分子量化合物吸收峰，但是濃度均很低。

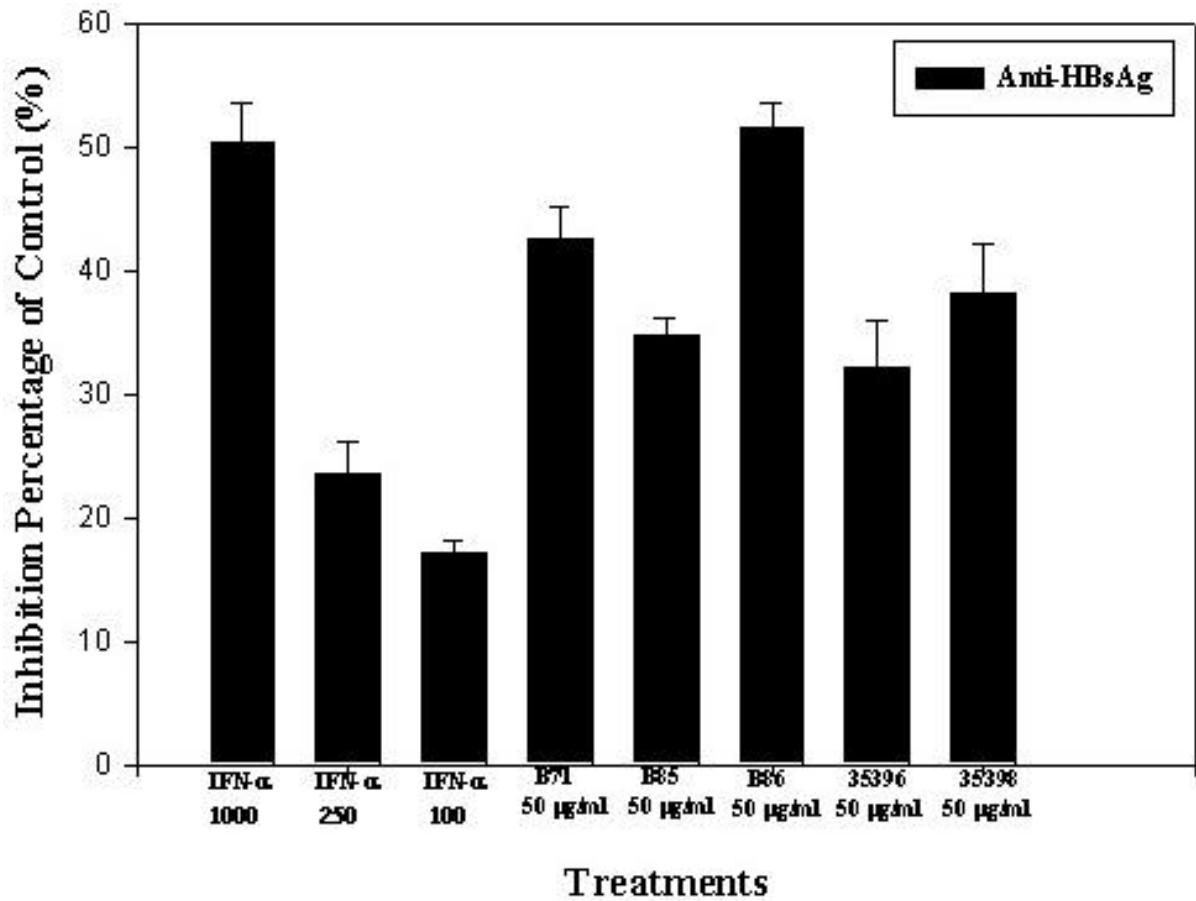
B85、B86、35398 菌株有很多分子量較小的化合物，但是在高分子量處均有 2 至 3 個多醣的吸收峰出現，B71 菌株及 35398 菌株尤其含有大量的吸收峰。

上述小分子量化合物，係指分布在延滯時間 30 分鐘以前的吸收峰；中分子量化合物，係指分布在延滯時間 30~65 分鐘的吸收峰；高分子量化合物，係指分布在延滯時間 66~90 分鐘的吸收峰。

#### 四、抗乙型肝炎病毒活性之測定

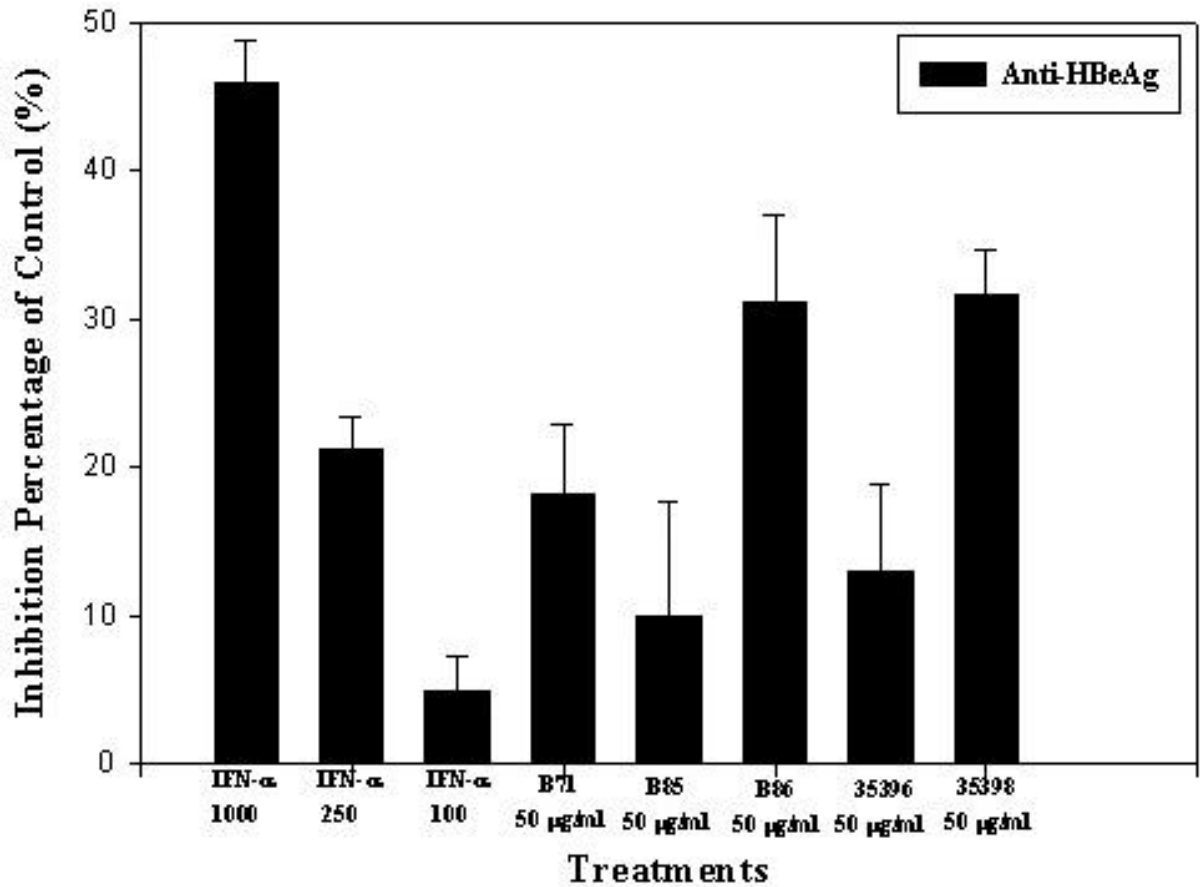
抗 B 型肝炎病毒實驗，用 Ms-G2 cell 抵抗 B 型肝炎病毒的程度來評估五種樟芝多醣之抗病毒能力，發現 B86 同時對 HBsAg 及 HBeAg 均有顯著之抑制作用，其 Anti-HBsAg 的抑制比率比 1,000 units/ml 的  $\alpha$ -干擾素較高，B71、B85、35396、35398 皆比 250 units/ml 的  $\alpha$  干擾素有效，而只有 B86 35398 有 Anti-HBeAg 的活性，其有效性比 1,000 units/ml 的  $\alpha$ -干擾素低，但比 250units/ml 的  $\alpha$ -干擾素高(圖二十、圖二十一)。

控制組之 AST(I.U./L)為 14-25 (I.U./L)，而  $\alpha$ -干擾素及不同樟芝多醣體對培養細胞的 AST 釋放並沒有增加，仍在 14-25 (I.U./L)範圍內，表示均無細胞毒性(表一)。



圖二十： $\alpha$ -干擾素(units/ml)及五種培養樟芝多醣體之抗 B 型肝炎表面抗原活性，對病毒增生抑制的百分比依下公式計得到：

抑制百分比 = (對照組 OD 值-樣品 OD 值) / 對照組 OD 值。



圖二十一： $\alpha$ -干擾素(units/ml)及五種培養樟芝多醣體之抗 B 型肝炎 e

抗原活性，對病毒增生抑制的百分比依下公式計得到：

抑制百分比 = (對照組 OD 值 - 樣品 OD 值) / 對照組 OD 值。

表一：五種培養樟芝菌絲多醣體之抗 HbsAg 及抗 HbeAg 活性

**Table 5. Anti-HBsAg and Anti-HBeAg Effects of the Five Cultured Mycelia Polysaccharide Isolated from *Antrodia camphorata***

<b>Treatments</b>	<b>mg/ml</b>	<b>HBsAg (Inhibition %)</b>	<b>HBeAg (Inhibition %)</b>	<b>AST (IU/L)</b>
<b>Control</b>	<b>2.5 ml/ml</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>14-25</b>
<b>a-Interferon</b>	<b>1000 units/ml</b>	<b>50.4 ± 3.1</b>	<b>46.0 ± 2.9</b>	<b>14-25</b>
	<b>250 units/ml</b>	<b>23.5 ± 2.7</b>	<b>21.2 ± 2.3</b>	<b>14-25</b>
	<b>100 units/ml</b>	<b>17.2 ± 0.9</b>	<b>4.9 ± 2.4</b>	<b>14-25</b>
<b>B71</b>	<b>50.0</b>	<b>42.6 ± 2.6</b>	<b>18.3 ± 4.6</b>	<b>14-25</b>
	<b>25.0</b>	<b>25.2 ± 2.2</b>	<b>5.4 ± 2.3</b>	<b>14-25</b>
	<b>10.0</b>	<b>10.6 ± 2.3</b>	<b>-0.7 ± 0.4</b>	<b>14-25</b>
<b>B85</b>	<b>50.0</b>	<b>34.7 ± 1.5</b>	<b>9.9 ± 7.8</b>	<b>14-25</b>
	<b>25.0</b>	<b>26.8 ± 1.9</b>	<b>5.7 ± 2.9</b>	<b>14-25</b>
	<b>10.0</b>	<b>10.6 ± 1.2</b>	<b>-8.4 ± 6.0</b>	<b>14-25</b>
<b>B86</b>	<b>50.0</b>	<b>51.6 ± 2.0</b>	<b>31.1 ± 6.0</b>	<b>14-25</b>
	<b>25.0</b>	<b>33.8 ± 0.4</b>	<b>17.3 ± 5.1</b>	<b>14-25</b>
	<b>10.0</b>	<b>24.9 ± 1.5</b>	<b>11.9 ± 1.8</b>	<b>14-25</b>
<b>353 96</b>	<b>50.0</b>	<b>32.2 ± 3.8</b>	<b>13.0 ± 5.9</b>	<b>14-25</b>
	<b>25.0</b>	<b>20.4 ± 0.6</b>	<b>10.1 ± 1.8</b>	<b>14-25</b>
	<b>10.0</b>	<b>8.6 ± 2.3</b>	<b>1.5 ± 3.6</b>	<b>14-25</b>
<b>353 98</b>	<b>50.0</b>	<b>38.1 ± 4.1</b>	<b>31.6 ± 3.1</b>	<b>14-25</b>
	<b>25.0</b>	<b>22.8 ± 4.1</b>	<b>20.4 ± 1.8</b>	<b>14-25</b>
	<b>10.0</b>	<b>11.1 ± 1.8</b>	<b>13.0 ± 2.7</b>	<b>14-25</b>

Each value represents the mean ± standard deviation obtained from 3 repeated experiments.

## 第五章 討論

中草藥所引起的生物活性，一定是中草藥中所含的某一活性成分之作用或數種活性成分之相互作用的結果。野生態的樟芝因樟樹日益減少，而產量趨少。所以利用培養方法以生產大量的樟芝菌絲體是最好的可以量產的方式。毫無疑問的，培養的樟芝菌絲體，其所含之第一級及第二級代謝物，除了培養環境，如溫度、光線、濕度、固態或液態培養，尤以液態培養培養槽空氣通氣量、槽的旋轉或攪拌情況，最主要的因素應該是培養基之條件(如 pH 值，無機鹽成分)及有機物等先質(precursor)的質與量。

有鑒於樟芝菌種培植不易，因此利用發酵技術進行樟芝菌絲體和二級代謝物的培養，可說是最符合經濟效益的方式。由於有關樟芝子實體、菌絲體及菌絲培養液之生物活性，除對病毒性肝炎，已有相當之報導，但是對於抗乙型肝炎病毒卻不曾著墨；所以本研究之目的除了探討利用不同培養條件，培養樟芝，並測定對醣類化合物合成之影響。並研究樟芝菌絲體中多醣類與抑制乙型肝炎活性之相關性。

在樟芝粗蛋白測量實驗中，水萃取物較酒精萃取物高，實驗中添加的單糖，在不同劑量下，幾乎都可以增加菌絲的生長，以添加 40g/L galactose 的生長速率最高，但 80g/L galactose 生長速率反而降低，添加 glucose 亦有此情形，並非添加劑量增加，生長速度就增加，而是找到一最適當的濃度。另外，rhamnose，xylose，maltose 對菌絲生長影響不顯著，是故，找出最適當的醣類與劑量，對菌絲的生長速度最佳，

仍有繼續研究的空間。

就醣類添加物對菌絲細胞中游離醣的影響，glucose 增加 arabitol 和 glucose 的量，fructose 增加 mannitol 的量，scrose 增加 mannitol 的量，這些醣類的合成均有正向的增加。但添加 rhamnase 對其他醣類並無促進合成的現象；而，添加 galactose 在 40g/L 時 glucose 量增加，在 80g/L 時反而減少，低濃度促進 glucose 合成，高濃度反而抑制，這種情形在添加 mannitol 時，對 glucose 的影響亦相同。由於添加 Xylose 對 mmanitol 及 glucose 含量均有減少的作用，猜測木醣能抑制其合成，本實驗，印證菌絲的細胞壁水解後的單醣大部分是 glucose，且在相同的培養條件下，35396 及 35398 生長的速度最快。

評估五種樟芝多醣體，發現 B86 及 35398 對 HbsAg 及 HbeAg 均有明顯的抑制作用。就 Anti-HbsAg 而言，五種均有活性，且皆比 250units/ml 的 干擾素有效。就 Anti-HbsAg 而言，只有 B86，35398 有活性，其有效性比 1000units/ml 的 干擾素差，但比 250units/ml 的 干擾素佳。

人類乙型肝炎病毒只能感染人類及黑猩猩(chimpanzee)，故很難在實驗室中觀察病毒的複製過程，但利用完整的病毒 DNA 轉染到高度分化的人類肝癌細胞株中，可偵測到病毒 DNA 在這些細胞中進行基因轉錄、轉譯以及複製，並釋放出具有感染性的病毒顆粒<sup>(85,86,87,88)</sup>；乃可以利用以進行抗乙型肝炎病毒藥物之篩選。



本論文所用之生物活性測定模式(bioassay model) 為 MS-G2 細胞株，此乃人類肝癌細胞株 Hep G2 經轉染(transfection)帶有 HBV DNA 及 neomycin resistance 基因的質體，經 G418 篩選得到，此細胞株有乙型肝炎病毒 DNA 嵌入，且已形成一個穩定的細胞株，故可持續地生產具有活性的 HBV 病毒體，為 HBV permanent expression system<sup>(85)</sup>。

由於樟芝多醣體對 AST 之值均小於 25，表示無細胞毒性，所以其抑制 HBsAg 及 HBeAg 並非細胞毒性所致。在五種樟芝中，B86 多醣體同時具有明顯的抑制 HBsAg 及 HBeAg 之作用。B86 之部份基因序列已加以確定<sup>(89)</sup>，而此多醣體之化學性質、其口服時生體可用率、以及在乙型肝炎病人體內之臨床效果如何，值得進一步研究。

## 第六章 結論

本研究獲致如下結論：

一、在樟芝粗蛋白之測量實驗中，發現無論是水萃取物或酒精萃取物的粗蛋白含量都是人工太空包中培養樟芝含量最多。

二、在不同含醣培養基對樟芝醣類合成之影響實驗中

1. 醣類的添加對菌絲生長的影響：在培養基中添加 glucose 40g/L，對菌絲生長是最有效益的劑量。
2. 醣類的添加對菌絲細胞中游離醣的影響：
  - (1)隨著培養基中添加 glucose 濃度的增加，arabitol 和 glucose 在菌絲中的量也隨之增加，其餘的游離醣量影響不大。
  - (2)隨著培養基中添加 rhamnose 濃度的增加，對菌絲中的 rhamnose 的含量亦有正面的影響。
  - (3)培養基中添加的 fructose 濃度(= 20g/L)時，可以引發 mannitol 的合成。
  - (4)隨著添加培養基中 sucrose 濃度的增加，mannitol 的含量亦隨著 sucrose 濃度的增加而增加。
  - (5)隨著添加培養基中 xylose 濃度的增加，mannitol 及 glucose 的含量在菌絲中的含量反而減少。
  - (6)培養基中添加低濃度 galactose(= 40g/L)時，對 glucose 的合成可能有促進的效果，而在高濃度(80 g/L)時，對 glucose 的含量反而有抑制的作用。

(7)培養基中添加低濃度 maltose(= 40g/L)時，對 mannitol、glucose 的含量有增加的效果；但添加高濃度 maltose 反而會抑制 glucose 的合成。

3. 醣類的添加對菌絲細胞中非游離醣的影響:培養基中添加 glucose, 對細胞壁及細胞中的 glucose 均有影響，而培養基中添加 xylose, 可以抑制細胞中游離 glucose 的量。

三、相同培養條件下不同種樟芝多醣之測量：在相同的培養條件下，35396 及 35398 生長的速度最快。

四、抗乙型肝炎病毒活性之測定：

1. 對於 Anti-HBsAg 活性，B71、B85、B86、35396、35398 均有顯著之抑制作用(比 250units/ml 的  $\alpha$ -干擾素高)，其中以 B86 的效果最好(比 1000 units/ml 的  $\alpha$ -干擾素高)。
2. 對於 Anti-HBeAg 的活性，以 B86、35398 之抑制作用較顯著 (比 1000 units/ml 的  $\alpha$ -干擾素低，但比 250units/ml 的  $\alpha$ -干擾素高)。
3. 五種樟芝多醣體只有 B86 同時對 HBsAg 及 HBeAg 均有顯著之抑制作用。

## 謝 辭

本論文承蒙恩師中國醫藥學院教授謝明村博士、國立中國醫藥研究所副研究員盧美光博士、本校謝文全博士之悉心指導與諄諄教誨，始得以順利完成，同時感謝中國醫藥學院中國藥學研究所所長張永勳博士，國立中國醫藥研究所所長陳介甫教授之賜新知與鼎力支持。

感謝陳忠川教授、劉正雄教授、葉豐次教授、李珮端教授、張賢哲教授、吳金濱教授之提攜與肯定，本校技正、中草藥專家邱年永博士，本校動物中心主任彭文煌博士、本校副教授林安邦博士、吳龍源博士、闕甫？博士、吳啟瑞博士之解答疑惑與勉勵，讓我在學習及研究方法上，乃至於為人處世上均獲益良多。

在學期間，屢獲劉淑鈴博士、廖容君、楊淑娥、林穎志、柯裕仁、謝佳玲、林昆宏、林文能、謝昀志、林立偉、廖隆德等諸位學姐學長同學學弟們多年來在學業上及行政上的協助，特此致上由衷之謝忱。

最後，謹以此論文獻給家人及在各方面協助我的工作夥伴，以及喜愛傳統中國醫藥的朋友們。

## 參考文獻

1. 陳介甫:從自然涵養觀念談中藥及天然物的研究。科學月刊 1989;20(6) : 413-418。
2. Holmstedt B. & G. Liljestrand (Eds.), Readings in Pharmacology, Pergamon Press Ltd., The Macmillan Co. New York, 1963, pp:1-2.
3. 孔憲鐸 : 中藥現代化。科學農業 2000;48(3,4) : 90-97。
4. 陳介甫 : 植物組織培養及藥物動力學之重要性。國立中國醫藥研究所研究成果發表會論文集 , 2002;pp52-54。
5. Cherng IW, Wu DP, Chiang HC. Triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*. Phytochem 1996;41: 263-267
6. Yang SW, Shen YC, Chen CH. Steroids and triterpenoids of *Antrodia cinnamomea*- a fungus parasitic on *Cinnamomum micranthum*. Phytochem 1996;41: 1389-1392.
7. Chiang HC, Wu DP, Cherng IW, Ueng CH. A sesquiterpene lactone, phenyl and biphenyl compounds from *Antrodia cinnamomea*. Phytochem 1995;39: 613-616.
8. Chen CH, Yang SW. New steroid acids from *Antrodia cinnamomea*, a fungal parasite of *Cinnamomum micranthum*. J Nat Products 1995;58: 1655-1661.

9. Wu SH, Ryvardeen L, Chang TT. *Antrodia camphorata* ('niu-chang-chih'), new combination of a medicinal fungus in Taiwan. Bot Bull Acad Sin 1997;38:273-275.
10. 蔡宗統、廖淑女：靈芝之採集、栽培與利用，參雲出版社，台中，1992;pp37-74。
11. 謝文全重輯，神農本草經（古今功能輯注本），中國藥學研究所，台中 1995。
12. 那琦、謝文全重輯：重輯名醫別錄，中國藥學研究所，台中，1997;pp25-26
13. 陶弘景校注、小山島尚真、森立之重輯、岡西為人訂補解題，本草經集注，南大阪印刷株式會社，日本 1972;pp36-37。
14. 謝文全、李妍樞重輯，重輯重廣英公本草，中國藥學研究所，台中，2000;pp74-75。
15. 謝文全、林豐定重輯，重輯開寶重定本草，中國藥學研究所，台中，1998。
16. 謝文全、黃耀聰重輯：經史證類備急本草，中國藥學研究所，台中，2002。
17. 宋唐慎微撰，張存惠重刊，那琦解題并序，魏德文索引并刊：重修政和經史証類備用本草，南天書局有限公司，台北，1976;pp168。

- 18.明劉文泰等奉敕撰：御製本草品彙精要（弘治原本影縮版），台灣寶樹銀同藏書，苗栗，1988;pp276-280。
- 19.明 李時珍著，圖解本草綱目（下），文光圖書公司印行，台北，1970;pp1990。
- 20.明 陳嘉謨撰，王淑民等點校，本草蒙筌卷之八，人民衛生出版社，北京，1988。
- 21.吳其濬撰、楊家駱主編：植物名實圖考長編上，世界書局印行，台北，1981;pp182-185。
- 22.陸費達總勘，抱朴子內篇內十一，台灣中華書局，台北，1968;pp2-5。
- 23.臧勵蘇編：中國古今地名大辭典，台灣商務印書館，台北，1975;pp4-820。
- 24.甘偉忬著：藥用植物學，國立中國醫藥研究所，台北，2001;pp88-89。
- 25.汪昭武：拉漢藥用植物名稱和檢索手冊，中國醫藥科技出版社，北京，1990;pp573-575。
- 26.陳德昌等：中國中藥材真偽鑑別圖典I，廣東科技出版社，廣東，1995;pp238-240。
- 27.中華本草編委會：中華本草精選本上冊，上海科學技術出版社，上海，1999;pp169-179。
- 28.編委會：中藥大辭典，商務印書館，香港，1978;pp1180-1182。

- 29.Hiroi J. Ohara K. Kobayashi K. Fujii T. Effects of FR50948, a new orally active antiallergic agent, in experiment allergic models. Japanese Journal Pharmacology, 1998;46(4):337-348.
- 30.高小微：台灣靈芝新種靈芝之三類成分研究。台北醫學院天然藥物醫學研究所 碩士論文。
- 31.廖英明：菇類中的許不了 樟芝。農業世界雜誌 1998;176：76-79。
- 32.Zang, M. & Q. Su, *Ganoderma camphoratum*, a new taxon in genus *Ganoderma* from Taiwan, China. *Acta Bot. Yunnanica*. 1990;12:395-396.
- 33.Chang, T.T. & W.N. Chou, *Antrodia cinnamomea* sp. Nov. on *Cinnmorum Kamehirai* in Taiwan. *Mycol. Res*. 1995;99:756-758.
- 34.Wu, S.H., R. Leif & T.T. Chang, *Antrodia camphorata* (“niu-chang-chih”), new combination of a medicinal fungus in Taiwan. *Bot. Bull. Acad. Sin*. 1997;38:273-275.
- 35.黃鈴娟：牛樟芝與姬松茸之抗氧化性質及其多醣組成分析。中興大學食品科學系 碩士論文 民國八十九。
- 36.Cherng, I.H. & H.C. Chiang, Three new triterpenoids from *Antrodia Cinnamomea*, *Journal of Natural Products*. 1995;58:1655-1661.
- 37.Lieber CS. Prevention and treatment of liver fibrosis based on pathogenesis. *Alcohol Clin Exp Res*. 1999 May;23(5):944-9. Review.



- 38.Osman E, Owen JS, Burroughs AK. Review article: S-adenosyl-L-methionine--a new therapeutic agent in liver disease? *Aliment Pharmacol Ther.* 1993 Feb;7(1):21-8. Review.
- 39.Mato JM, Camara J, Fernandez de Paz J, Caballeria L, Coll S, Caballero A, Garcia-Buey L, Beltran J, Benita V, Caballeria J, Sola R, Moreno-Otero R, Barrao F, Martin-Duce A, Correa JA, Pares A, Barrao E, Garcia-Magaz I, Puerta JL, Moreno J, Boissard G, Ortiz P, Rodes J. S-adenosylmethionine in alcoholic liver cirrhosis: a randomized, placebo-controlled, double-blind, multicenter clinical trial. *J Hepatol.* 1999 Jun;30(6):1081-9.
- 40.Hsu, Y.C., W.C. Chang, Y.T. Hseu, C.Y. Lee, P.C. Chen, J.Y. Chen & H.L. Yang, Protection of oxidative damage by aqueous extract from *Antrodia Camphorata* mycelia in normal human erythrocytes. *Life Sciences* 2002;71:469-482.
- 41.Ala-Kokko L, Pihlajaniemi T, Myers JC, Kivirikko KI, Savolainen ER. Gene expression of type I, III and IV collagens in hepatic fibrosis induced by dimethylnitrosamine in the rat. *Biochem J.* 1987 May 15;244(1):75-9.
- 42.Ryhanen L, Stenback F, Ala-Kokko L, Savolainen ER. The effect of malotilate on type III and type IV collagen, laminin and fibronectin metabolism in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in the rat. *J Hepatol.* 1996 Feb;24(2):238-45.

43. Mizuno T, Kinoshita T, Zhuang C, Ito H, Mayuzumi Y. Antitumor-active heteroglycans from niohshimeji mushroom, *Tricholoma giganteum*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1995 Apr;59(4):568-71.
44. Huang L.C., S.J. Huang, C.C. Chen & J.L. Mau. Antioxidant properties of *Antrodia camphorata*. 3<sup>rd</sup> International conference on Mushroom Biology and Mushroom Product & AMGA's 26<sup>th</sup> National Mushroom Industry conference, 1999 Oct. 12-16, Sydney, Australia.
45. Song, T.Y. & Yen, G.C. Antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture. *J. Agri. Food Chem*. 2002;50:3322-3327.
46. 楊書威：中藥樟菇活性成分之研究。台灣大學藥學研究所 碩士論文 民國八十年。
47. Chen, C.H., S.W. Yang, & Y.C. Shen, New steroid acids from *antrodia cinnamomea*, a fungal parasite of *Cinnamomum micranthum*. *J. Nat. Prod*. 1995;58:1655-1661.
48. Cherng, I.H. & H.C. Chiang, Three new triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*. *J. Natural Products* 1995;58:365-371.
49. 陳勁初、林文鑫、陳清農、許勝傑、黃仕政、陳炎鍊。台灣特有真菌-樟芝菌絲體之開發。中華真菌學會會刊。2001;16 (1,2) : 7-22。
50. 黃坤正、丁懷謙、余俊強、何漣漪。基因毒理與動物病理組織之系統分析，依「食品新興製造系統整合及關鍵技術發四年計劃(第四年

度)」2000 計劃標號：007051-04:3-12。



- 51.許勝傑、鍾煒惠、陳勁初、蔡明憲、王聖耀、蔡慶龍、陳巧文。大白鼠口服高劑量樟芝菌絲體之急性毒性試驗。2001 中華保健食品學會第二屆第一次會員大會。
- 52.陳清農、林文鑫、盛莉莎、黃仕政、陳勁初、劉宗榮。樟芝對 Sprague-Dawley 大白鼠之連續投藥口服急性毒性。2001 中華保健食品學會第二屆第一次會員大會。
- 53.林金鑫、曾虹萍、陳勁初、蔡明憲、楊明芬、陳巧文。大鼠致畸測一樟芝發酵原液凍乾成品。2001 中華保健食品學會第二屆第一次會員大會。
- 54.Robinson, W. S., D. A. Clayton, and R. L. Greenman. DNA of a human hepatitis B virus candidate. *J. Virol.* 1974;14: 384-391.
- 55.Robinson, W. S. The genome of hepatitis B virus. *Ann. Rev. Microbiol.* 1977 ; 31: 357-377.
- 56.Delius, H., N. M. Gough, C. H. Cameron, and K. Murray. Structure of the hepatitis B virus genome. *J. Virol.* 1983;47: 337-343.
- 57.Almeida, J. D., D. Rubenstein, and E.J. Stott. New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. *Lancet* 1971;2:1225-1227.
- 58.Onodera, S., H. Ohori, M. Yamaki, and N. Ishida. Electron microscopy of human hepatitis B virus core by negative staining-carbon film technique. *J. Med. Virol.* 1982;10: 147-155.

59. Gerlish, W. H., and W. S. Robinson. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* 1980;21: 801-809.
60. Kaplan, P. M., R. L. Greenman, J. L. Gerin, R. H. Purcell, and W. S. Robinson. DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J. Virol.* 1973;12: 995-1005.
61. Blumberg, B.S., H.J. Alter, and S. Visnich. A "new" antigen in leukemia sera. *J.A.M.A.* 1965;191: 541-546.
62. Dane, D. S., C.H. Cameron, and M. Briggs. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1970;1: 695-698.
63. Bayer M.E., B.S. Blumberg, and B. Werner. Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukemia, Down's syndrome and hepatitis. *Nature* 1968;218: 1057-1059.
64. Beasley, R.P., L.-Y. Hwang, C.-C. Lin, and C.-S. Chien. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22, 707 men in Taiwan. *Lancet* 1980;2: 1129-1133.
65. Szmunes, W. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: evidence for a causal association. *Prog. Med. Virol.* 1978;24: 273-275.

66. Beasley, R.P., and L.-Y. Hwang. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. In Vyas, G.N. (ed): *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Grune & Stratton, New York 1984;pp209-224.
67. Cattaneo, R., H. Will and H. Schaller. Hepatitis B virus transcription in the infected liver. *EMBO J.* 1984;3: 2191-2196
68. Cattaneo, R., H. Will, N. Hernandez, and H. Schaller. Signals regulating hepatitis B surface antigen transcription. *Nature* (London) 1983;305: 336-338.
69. Standring, D. N., W. J. Rutter, H. E. Varmus, and D. Ganem. Transcription of the hepatitis B surface antigen gene in cultured murine cells initiates within the presurface region. *J. Virol.* 1984;50: 563-571.
70. Rall, L. B., D. N. Standring, O. Laub, and W. J. Rutter. Transcription of hepatitis B virus by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* 1983;3: 1766-1773.
71. Pasek, M., T. Goto, W. Gillberg, B. Zink, H. Schaller, P. Mackay, G. Leadbetter, and K. Murray. Hepatitis B virus genes and their expression in *E. coli*. *Nature* 1979;282: 575-579.
72. Peterson, D. L., I. M. Roberts, and B. N. Vyas. Partial amino acid sequence of two major component polypeptides of hepatitis B surface antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977;74: 1530-1534.

73. Mishiro, S., M. Imai, K. Takahashi, A. Machida, T. Gotanda, Y. Miyakawa, and M. Mayumi. A 49,000-dalton polypeptide bearing all antigenic determinants and full immunogenicity of 22-nm hepatitis B surface antigen particles. *J. Immunol.* 1980;124: 1589-1593.
74. Stibbe, W., and W. H. Gerlich. Structural relationships between minor and major proteins of hepatitis B surface antigen. *J. Virol.* 1983;46: 626-670.
75. Heermann, K. H., U. Goldmann, W. Schwartz, T. Seyffarth, H. Baumgarten, and W. H. Gerlich. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-S sequence. *J. Virol.* 1984;52: 396-402.
76. Stibbe, W., and W. H. Gerlich. Variable protein composition of hepatitis B surface antigen from different donors. *Virology* 1982;123: 436-442.
77. Neurath A. R., S. B. H. Kent, N. Strick, et al. Identification and chemical synthesis of a host receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell* 1986;46: 429-436.
78. Iwarson, S., E. Tabor, H. C. Thomasf, et al. Neutralization of hepatitis B virus infectivity by a murine monoclonal antibody: an experimental study in the chimpanzee. *J. Med. Virol.* 1985;16: 89-96.
79. Salfeld, J., E. Pfaff, M. Noarl, and H. Schaller. Antigenic determinants and functional domains in core antigen and e antigen from hepatitis B virus. *J. Virol.* 1989;63: 789-792.

80. Garcia, P. D., J.-H. Ou, W. J. Rutter, and P. Walter. Targeting of the hepatitis B virus precore protein to the endoplasmic reticulum membrane and the product released into the cytoplasm. *J. Cell Biol.* 1988;106: 1093-1104.
81. OU, J.-H. D. H. Standring, F. R. Masiarze, and W. J. Rutter. A signal peptide encoded within the precore region of hepatitis B virus directs the secretion of a heterogeneous population of antigen in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988;85: 8405-8409.
82. Bruss, V., and W.H. Gerlich. Formation of transmembraneous hepatitis B antigen by cotranslational *in vitro* processing of the viral precore protein. *Virology* 1988;163: 268-275.
83. Chang TT, Chou WN. *Antrodia cinnamomea* sp. Nov. on *Cinnamomum kanehirai* in Taiwan. *Mycol Res* 1995;99:756-758.
84. Wang HL, Lee PD, Liu LF, Su JC. Effect of sorbitol induced osmotic stress on the changes of carbohydrate and free Sugar Flux in *Antrodia Camphorata* 30 amino acid pools in sweet potato cell suspension cultures. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 1999;40: 219-225.
85. Sureau C, Romet-Lemonne JL, Mullins JJ, Essex M. Production of hepatitis B virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA. *Cell.* 1986 Oct 10;47(1):37-47.



86. Acs G, Sells MA, Purcell RH, Price P, Engle R, Shapiro M, Popper H. Hepatitis B virus produced by transfected Hep G2 cells causes hepatitis in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Jul;84(13):4641-4644.
87. Tsurimoto T, Fujiyama A, Matsubara K. Stable expression and replication of hepatitis B virus genome in an integrated state in a human hepatoma cell line transfected with the cloned viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Jan;84(2):444-448.
88. Imazeki F, Yaginuma K, Omata M, Okuda K, Kobayashi M, Koike K. RNA transcripts of hepatitis B virus in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1987 Jul-Aug;7(4):753-757.
89. 張益軒：牛樟芝分子生物鑑定系統之研究。國立台灣大學農業化學研究所 碩士論文 民國九十一年。