

中國醫藥大學藥學院  
藥物化學研究所碩士論文

指導教授：吳金濱 教授  
共同指導教授：林文川 教授

牛樟芝萃取物對四氯化碳引發大鼠肝纖維化的保護作用

**Protective effect of *Taiwanofungus camphoratus* extracts on  
carbon tetrachloride induced liver fibrosis in rats**

研究生：謝杰儒

**HSIEH CHIEH-JU**

中 華 民 國            102 年            1 月

中國醫藥大學藥學院  
藥物化學研究所碩士論文

指導教授：吳金濱 教授

共同指導教授：林文川 教授

牛樟芝萃取物對四氯化碳引發大鼠肝纖維化的保護作用

Protection effect of *Taiwanofungus camphoratus* extract on  
carbon tetrachloride induced liver fibrosis in rats

研究生：謝杰儒

HSIEH CHIEH-JU

中 華 民 國 102 年 1 月

中國醫藥大學藥學院藥物化學研究所

碩士學位考試

牛樟芝萃取物對四氯化碳引發大鼠肝纖維化的保護作用

Protection effect of Taiwanofungus camphoratus extract on  
carbon tetrachloride induced liver fibrosis in rats

指 導 老 師 : 吳金濱 教授

共同指導老師 : 林文川 教授

研 究 生 : 謝杰儒

本論文係謝杰儒同學於中國醫藥大學藥學院藥物化學  
研究所完成之碩士論文，經考試委員審查及口試合格，特此  
證明。

## 論文口試委員審定書

考試委員： 謝長奇  
林文川  
吳金濱

所 長： 張誌祥

中 華 民 國 102 年 1 月 25 日

## 致謝詞

這兩年的碩士班生涯，從當初進來的懵懵懂懂，到現在會一點稱不上嚴謹的實驗技術，和一個不怎麼專業的腦袋，這都要歸功於老師林文川教授和吳金濱教授兩位不管在實驗方面還是心靈導師方面惠我良多的老師，沒有這兩位老師在我遇到困境的時候不離不棄，小的大概還在泥沼裡掙扎吧！到現在才有了這本論文的完成。謝謝。

口試審查期間要感謝本校基醫所謝文聰副教授還有東海大學畜產系謝長奇副教授對本論文的撥冗審查，對於您們提出的寶貴意見，使得這本論文而我有獲益的地方，在這裡獻上最誠摯的謝意。

感謝藥化所莊聲宏所長、黃麗嬌所長、神科所梁育民教授、藥理科譚思維主任、生化科張乃文副教授在生涯以及學術課程上的指導，我現在站在這裡，必須感謝您們的提攜。也必須感謝技佐柯毅文先生和藥化所龔姐在我的碩士生涯諸多幫忙，謝謝。

感謝實驗室的學姐楊筱嬋、學姊王郁文、學長蕭宏柏、學長古致翔、學長陳楷璋、學長陳建安、學長陳清玉、助理陳怡姬、林佑軒、學弟吳佩韓在我實驗期間的諸多幫助跟關懷。

最後要感謝的就是在我身邊整整兩年的同學俊智、睿芳、芳濱、文平、重儀、名詣、國山、君鼎、岳軒、承秀、品君、書涵、佳雯、

建宇，感謝你們這整整兩年滿滿的愛，在我腦袋短路的時候站在我身邊。

最後，最重要的也是必須放在最後提的就是我的父母和姐姐，如果沒有在我脆弱不堪的時候不求回報地付出與默默支持，在我想躲起來哭的時候帶給我勇氣與力量，有你們，我才能繼續向前走，謝謝。



## 目錄

目錄.....	V
圖表目錄.....	VII
中文摘要.....	IX
英文摘要.....	X
第一章 緒論.....	1
一、 研究背景與目的.....	1
二、 牛樟芝文獻考察.....	2
(一) 牛樟芝型態.....	3
(二) 牛樟芝段木栽培.....	4
(三) 牛樟芝化學成分.....	5
(四) 牛樟芝藥理研究.....	5
(五) 純化合物的藥理活性.....	8
三、 肝臟纖維化病理機制.....	16
(一) 肝臟纖維化病理成因.....	16
(二) 四氯化碳動物病理模式.....	18
(三) 抗氧化酵素.....	20
第二章 材料與方法.....	22

第三章 結果..... 30

第四章 討論..... 34

第五章 參考文獻..... 53



## 圖表目錄

- Fig.1 第八週牛樟芝對 CCl<sub>4</sub> 誘發大鼠慢性肝炎 AST、ALT 的影響
- Fig.2 第八週牛樟芝對 CCl<sub>4</sub> 誘發大鼠慢性肝炎 albumin 值的影響
- Fig.3 牛樟芝對 CCl<sub>4</sub> 誘發大鼠慢性肝炎肝臟重量的影響
- Fig.4 牛樟芝對 CCl<sub>4</sub> 誘發大鼠慢性肝炎脾臟重量的影響
- Fig.5 牛樟芝對 CCl<sub>4</sub> 誘發大鼠慢性肝炎肝臟 glutathione 含量的影響
- Fig.6 牛樟芝對 CCl<sub>4</sub> 誘發大鼠慢性肝炎肝臟脂質過氧化的影響
- Fig.7 牛樟芝對 CCl<sub>4</sub> 誘發大鼠慢性肝炎肝臟蛋白質含量的影響
- Fig.8 牛樟芝對 CCl<sub>4</sub> 誘發大鼠慢性肝炎 hydroxyproline 含量的影響
- Fig.9 牛樟芝對 CCl<sub>4</sub> 誘發大鼠慢性 SOD 活性的影響
- Fig.10 牛樟芝對 CCl<sub>4</sub> 誘發大鼠慢性 Catalase 活性的影響
- Fig.11 牛樟芝對 CCl<sub>4</sub> 誘發大鼠慢性 GSH-Px 活性的影響
- Fig.12 大鼠肝臟組織圖(HE stain)
- Fig.13 大鼠肝臟組織圖(Sirius red stain)



- Fig.14 牛樟芝對 CCl<sub>4</sub> 誘發慢性肝炎肝臟組織纖維化的影響
- Fig.15 大鼠肝臟組織圖(IHC α-SMA stain)
- Fig.16 牛樟芝對 CCl<sub>4</sub> 誘發肝纖維化肝組織 Colα1 and α-SMA mRNA 表現之影響
- Table 1 牛樟芝對 CCl<sub>4</sub> 誘發大鼠慢性肝炎肝臟組織壞死的影響
- Table 2 primer 序列
- Table 3 牛樟芝在現有文獻中的藥理活性



# 牛樟芝萃取物對四氯化碳引發大鼠肝纖維化的保護作用

謝杰儒

中文摘要

本篇研究是在探討椴木栽培的牛樟芝 (*Taiwanofungus camphoratus*) 子實體超臨界萃取物 (TCSE) 能否改善四氯化碳引起的大鼠肝臟纖維化病症。大鼠每 100 g 體重經口給予 0.2 毫升的四氯化碳 (20%)，每週兩次，持續八週。每天給予 TCSE，八週後犧牲大鼠並採取檢體。第八週的 alanine transaminase、aspartate transaminase 均有顯著下降，白蛋白則是有顯著回升。肝臟檢體的膠原蛋白含量以及切片檢查均顯示 TCSE 能顯著抑制膠原蛋白的產生。肝臟檢體的 Glutathione 顯著回升與 Malondialdehyde 顯著下降顯示 TCSE 能顯著提升抗氧化能力。免疫組織染色的部份顯示 TCSE 能有效降低 alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) 的產生。RT-PCR 的數據顯示 TCSE 能顯著抑制 Coll $\alpha$ 1 與  $\alpha$ -SMA 兩個基因的表現。

依據以上數據，推論 TCSE 抑制四氯化碳誘導的肝纖維化，可能是經由抑制肝星狀細胞 (hepatic stellate cell; HSC) 的活化來達到保肝作用。

# **Protective effect of *Taiwanofungus camphoratus* extracts on carbon tetrachloride induced liver fibrosis in rats**

HSIEH CHIEH-JU

This article investigated whether *Taiwanofungus camphoratus* carpophore's supercritical extract(TCSE) can improve liver fibrosis on rats induced by carbon tetrachloride. Rats got 0.2 mL carbon tetrachloride (20%) per 100g body weight orally, twice a week, for eight weeks. Rats treated with TCSE, and were sacrificed. The value of aspartatetransaminase and alanine transaminase on the eighth week decreased significantly, and albumin increased. Collagen quantity of liver samples and slides' check showed that TCSE can inhibit production of collagen. Glutathione increasing significantly and malondialdehyde decreasing significantly showed that TCSE can promote anti-oxidative activity. Tissue immunochromatography slides showed that TCSE can reduce the production of alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA). TCSE can also inhibit mRNA of Col1 $\alpha$ 1 and  $\alpha$ -SMA on RT-PCR Data.

According to above data, we can infer that TCSE can inhibit liver fibrosis process induced by carbon tetrachloride and have liver protection, probably through inhibiting activity of hepatic stellate cell(HSC).

## 第一章 緒論

### 一、 研究背景與目的

牛樟芝是一種被台灣原住民形容為「台灣森林中的紅寶石」的真菌，只能生長在腐朽牛樟木樹幹上之特殊菌種，被原住民視為祖傳秘方，更有不少專家學者認為其有抗癌功能。

牛樟樹 (*Cinnamomum Kanehirai* HAYATA) 為台灣的特有樹種，分布於桃園角板山、苗栗南庄、南投竹山、高雄六龜等地，海拔 450-1500 公尺的山區，由於數量稀少，已被列為保育類一級國寶樹木，間接使得牛樟芝難以取得，價格昂貴。

牛樟芝在台灣原住民的傳統藥用文化中，用於長期飲酒所引起的肝炎與肝癌。現已有研究能夠改善酒精性肝炎引起的肝損傷[1]，還有抑制肝腫瘤細胞增殖[2]。

慢性肝炎在台灣是相當普遍的疾病，不管是由於酒精性、非酒精性或是病毒引起的慢性肝炎，都有可能造成肝臟纖維化，嚴重一點會造成肝壞死，需要換肝治療。通常短期的肝損傷，人體的肝臟會自我修復，但是當長期損傷發生時，會使得肝臟產生纖維化的病症。

四氯化碳所誘導肝損傷的動物模式已被普遍的使用，主要是經由細胞內質網中 cytochrome p450 的氧化酶系統催化，使得四氯化碳轉變為三氯甲烷自由基，之後再氧化成為過三氯甲烷自由基，能與細胞

膜上的多元不飽和脂肪酸結合造成脂質過氧化，亦會造成鈣細胞離子通道蛋白被破壞，導致細胞死亡[3]。肝細胞死亡會誘發庫氏細胞活化，釋放出細胞發炎激素，使得肝星狀細胞活化，促使肝纖維化的發生。

現存市面上牛樟芝的保健食品有許多不同的來源，涵蓋野生牛樟芝、椴木栽培、發酵菌絲體、固態培養近似子實體等。本實驗使用的是牛樟芝為椴木栽培的子實體，以超臨界技術萃取。

本實驗是希望藉由四氯化碳的肝損傷動物模型，來確認牛樟芝對於大鼠的肝纖維化是否有抑制的活性，並且探討其藥理活性機轉，以其能增加未來對抗慢性肝病的新藥開發可能性。

## 二、牛樟芝文獻考察

樟芝存在已久，1990年才由中國科學院昆明植物研究所臧穆教授和台北醫學院蘇慶華教授首次發表，將之歸類為靈芝屬，命名為 *Ganoderma camphorata*。1995年，張東柱博士依據樟芝子實體外觀、氣味、生長速率、孢子顯微結構特性，判定應為多孔菌科 *Antrodia* 屬之一種，命名為 *Antrodia cinnamomea* (Chang and Chou, 1995)。1997年，吳聲華等人整合前兩次文獻內容後重新發表，將樟芝命名為 *Antrodia comphorata*。2004年，吳聲華博士等兩岸諸位學者共同發

表 *Taiwanofungus*, a polypore new genus 研究報告認為牛樟芝的 LSU rDNA 序列分析結果與 *Antrodia* 和 *Antrodiella* 的親緣性並不接近。應該將原本所歸屬的薄孔菌屬 (*Antrodia*) 區分出來，並將牛樟芝歸類在新屬之中，即為台芝屬 (*Taiwanofungus*) [4]。

### (一) 牛樟芝型態

牛樟芝在分類學的地位：

真菌界 (Fungi)

擔子菌門 (Basidiomycota)

擔子菌綱 (Basidiomycetes)

多孔菌目 (Polyporales)

多孔菌科 (Polyporaceae)

台芝屬 (*Taiwanofungus*)

牛樟芝 (*Taiwanofungus camphoratus*) 別名有樟芝、樟菇、牛樟芝、樟內菇、樟菰、樟窟內菰、紅樟及紅樟芝等等。子實體散發出濃郁的香樟味且含有高量精油，為多年生，外形多變化，有板型、鐘形、馬蹄形或不規則狀。子實體不具菌柄，緊密平貼於木材表面，邊緣不孕，木栓化或木質化，味極苦。菌蓋具同心環且有波溝，每微米有四至六個菌孔，菌孔朝上，成圓形至角形，菌管長達 40 mm，不分層，與菌孔同色。上表面初生時為鮮橘紅色，褐橘色至淡肉色，質地柔軟，



漸長則變為淡黃色，老熟時變為褐棕色至黑褐色。質地也因木栓化而堅硬。[5]

牛樟芝分布於台灣山區海拔 450m 到 1500m 之間。由於牛樟芝與其他真菌一樣，不具有葉綠素，無法經由光合作用製造其生長與繁殖等生理活動所需之營養及能量，因此必須營腐生之生活。野生樟芝在自然界僅生長於牛樟芝樹幹之腐朽心材內壁，或枯死倒伏隻牛樟木材陰暗潮濕的表面，菌絲生長過程中所需要的各種營養都是從朽木吸收的。[6]

## (二) 牛樟芝椴木栽培

今日的牛樟芝除了野生之外的取得方法有以下幾種：椴木栽培、固態栽培、液態栽培。

椴木栽培是以具有牛樟芝原基的牛樟椴木以增加濕度的方式促進子實體長出，由這個很容易得到子實體，但只有椴木的側方及下方較容易長出並維持其子實體結構，上方會明顯消退。

固態栽培通常以 MEA 培養基(Malt extract 20g、Glucose 20g、Peptone 1g、Agar 20g 加水定量至 1L，高壓滅菌後使用)或是 PDA 培養基(Potato Dextrose Agar)，於 25~30°C 的溫度生長，但是生長速度較緩慢。如果要促進其子實體產生，通常要給予機械傷害，可以有效

讓其分化為子實體。

液態栽培在適當的溫度和光照條件下，於液態發酵槽中，利用深層發酵(SCM, submerged cultivation Mycelium)的原理量產，速度快產量大，但是液態栽培的方式並無子實體產生。

### (三) 牛樟芝化學成分

牛樟芝大約有 78 個化合物已經被純化結構辨認。子實體當中大多數成分為三萜類 (39 個化合物)。大多數三萜類 (31 種結構) 擁有相似甚至一樣的骨架，普遍為麥角甾烷 (ergostane) 或羊毛甾烷 (lanostane)。63% 的三萜類從子實體而來。其餘成分包括：benzenoids, lignans, benzoquinones 和 maleic/succinic acid derivatives，還有 polysaccharides。[5]

### (四) 牛樟芝藥理研究

#### 1. 抗癌活性：

- ①、子實體和菌絲體抽出物能抑制肝癌細胞 Hep G2 和 PLC/PRF/5 增生。[7]
- ②、能藉由抑制內質往鈣離子通道使人類肝癌細胞 Hep 3B 凋亡。[8]



- ③、三氯甲烷抽出物對癌細胞 Jurkat, Hep G2, Colon 205 和 MCF 7 有細胞毒殺作用。[9]

2. 抗發炎活性：

- ①、深層培養菌體(SCM, submerged cultivation Mycelium)抽出物有抗發炎活性，能抑制自由基產生[10]

- ②、SCM 水抽出物能抑制 LPS 引起的 NO、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、PGE<sub>2</sub> 產生，也能透過 NF- $\kappa$ B 路徑抑制巨噬細胞 iNOS 和 COX-2 的蛋白表現。[11]

- ③、子實體的三氯甲烷和甲醇抽出物能透過抑制 iNOS 表現或是 TNF- $\alpha$  和 IL-12 產生來抑制 NO 產生。[12]

3. 抗 B 肝病毒複製：

- ①、菌絲抽出物在體內試驗有抗 B 肝活性而沒有細胞毒殺作用[13]

- ②、乙醇抽出物對於廣泛還有抗 lamivudine 突變的病毒有活性[14]

4. 抗氧化活性：

- ①、抽出物能清除自由基[15]

- ②、發酵培養抽出物和菌絲體水抽出物能抑制脂質氧化。[16]
- ③、發酵培養抽出物和菌絲體水抽出物能抑制靜脈平滑肌細胞凋亡，透過減少 DNA 碎片、cytochrome c 釋放、caspase-3 活化、Bcl-2 和 Bax 調節失效。[17]

5. 保肝活性：

- ①、對於酒精引起的急性肝毒性能抑制肝發炎和脂肪肝[18]
- ②、子實體的水萃取物對於四氯化碳引起的肝損傷有抑制作用[19]
- ③、抽出物能降低 GSH 相關酶(glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione S-transferase)[20]
- ④、能降低四氯化碳引起的 ALT 上升[21]

6. 抗肝纖維化活性：

- ①、四氯化碳大鼠模型中，發酵濾出液能預防和治療肝纖維化。[22]
- ②、能降低四氯化碳大鼠模型中，collagen I、

TGF- $\beta$ 1、TIMP-1、的 mRNA。並能有效降低  
MDA 和 hydroxyproline[22]

(五) 純化合物的藥理活性

1. Terpenoids：由以下 Table 3 可以得知牛樟芝三萜類的藥理活性。由於三萜類針對腫瘤細胞的細胞毒性大於正常細胞，導致了其抗癌活性。深層培養含有的化合物與野生的子實體類似[44]。Zhankuic acids A (10) 和 C (16)能夠毒殺 P-388 murine leukemia cells[45]。其分子機轉現在仍不能完全確立。zhankuic acids A (10) 和 C (16) and methyl antcinatate B (20)對於昆蟲細胞 *Spodoptera frugiperda Sf 9* 有毒殺能力。zhankuic acids, (10, 16 和 20)被認為對直腸癌、乳癌、肝癌、和肺癌細胞有專一性。其中 methyl antcinatate B (20)活性最強。化合物 10、16、20 能誘導直腸癌細胞 HT-29 凋亡(sub-G<sub>1</sub> 期休止和 DNA 斷裂)[46]。poly-(ADP-ribose) polymerase cleavage、Bcl-2 和 procaspase-3 的癘線都被抑制。另外，化合物 9、18 和 20 被認為有抗幽門螺旋桿菌(anti-*Helicobacter pylori*)活性，並且抑制位

上皮細胞 AGS cells 的發炎(抑制 NF- $\kappa$ B 的活化和抑制 IL-8 的釋放)[47]。

Antcins A (9)、 B (10) 和 eburicol (31) 可以抑制 N-formylmethionylleucyl-phenylalanine (fMLP) 引起的發炎反應[48]。 antcin C (11)、 dehydroeburicoic acid (25) 和 eburicoic acid (28) 能夠調節免疫系統，減少 ROS 的產生[49]。化合物 10、17、16 和 antcin K (18) 能夠抑制 fMLP and TPA 誘導的嗜中性白血球的發炎反應[50]。化合物 2、3、4、5 和 6 在 Harlan Sprague-Dawley 大鼠有神經保護的作用[51]。

2. Maleic 和 Succinic Acid 衍生物：深層培養的化合物中有五種對於肺癌細胞 LLC tumor cells 有毒殺作用 [52]。深層培養的化合物 antrodins A-E (56, 60, 62, 64 and 66) 有抗肝炎活性[53]。子實體 54 號化合物有抗發炎和免疫促進活性(增加未被 LPS 活化的 RAW264.7 cells TNF- $\alpha$  分泌和抑制 IL-6 產生)，化合物 57、58 和 61 抑制 IL-6 的產生(LPS 誘導) [54]。深層培養的化合物 Antrocinnamomins A (65) 能抑制巨噬細胞產生 NO[55]。化合物 60、62、64、56、66 具有 HCV 蛋白

酶抑制活性[56]。

3. 多糖：牛樟芝的多糖主要由單醣類、galactose、glucose、mannose 組成[57]。子實體與深層培養的多糖都有抗 B 型肝炎活性[57]，特別的是其他真菌純化出的多醣目前都沒有抗 B 型肝炎活性。現在純化出的多醣有抗腫瘤和免疫調節活性[58]。例如抑制血癌 U937 cell 的增生[59]、抑制上皮細胞的血管增生作用(抑制 cyclin D1 的表現)[60]。深層培養的熱水提取物多糖 ACN2a 對於小鼠 *Propionibacterium acnes*-LPS 誘導的肝損傷有保護作用。多糖 AC-1, AC-2, AC-3, AC-4 and AC-5 對於巨噬細胞有抗發炎活性(抑制 LPS 誘導的 NO 產生和 iNOS 的蛋白質表現)[61]。深層培養出來的多糖能夠調節發炎的細胞激素(Th1-type cytokines such as IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ )[62]。深層發酵的水溶性多糖可以減少 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 誘導 Chang liver cells DNA 損傷和 ROS 的產生[63]。深層培養純化硫化多糖(sulfated polysaccharides ;SPSs)能夠抑制血管增生，並且避免 PC-12 cells 的凋亡[64]。
4. 其他：biphenyl 化合物 68 能夠抑制 HBsAg 和 HBeAg

levels[65]。深層培養的化合物 74 能夠抑制 COX-2 的活性[54]。化合物 43 與 53 能夠抑制被 fMLP 產生的超氧化物[48]。子實體和深層培養的 Antroquinonol (71) 能對下列癌細胞有毒殺作用：MCF-7、MDA-MB-231、Hep 3B、Hep G2、DU-145、LNCaP[66]。化合物 71 能夠抑制 TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  的產生(RAW 264.7 cells)[67]。化合物 71 對 HBsAg 和 HBeAg 抑制作用[108]。深層培養得到的化合物 75、76、77、78 和 56 能夠抑制 LPS 誘導的 NO 產生[69]。化合物 40 能夠抑制直腸癌細胞 COLO 205 增值(G0/G1 休止並誘導凋亡)[70]。

Table 3 牛樟芝在現有文獻中的藥理活性

No.	Compound name	Source	Biological activity	Ref.
	<i>Terpenoids</i>			
1	Antrocin	F	<i>In vitro</i> neuroprotective	[71]
2	19-Hydroxyabda-8(17)-en-16,15-olide	F	<i>In vitro</i> neuroprotective	[51]
3	3 $\beta$ ,19-Dihydroxyabda-8(17),11E-dien-16,15-olide	F	<i>In vitro</i> neuroprotective	[51]
4	13- <i>epi</i> -3 $\beta$ ,19-Dihydroxyabda-8(17),11E-dien-16,15-olide	F	<i>In vitro</i> neuroprotective	[51]
5	19-Hydroxyabda-8(17),13-dien-16,15-	F	<i>In vitro</i> neuroprotective	[51]



	olide			
6	14-Deoxy-11,12-didehydroandrographolide	F		[51]
7	14-Deoxyandrographolide	F		[51]
8	Pinusolidic acid	F		[51]
9	Antcin A	F	<i>In vitro</i> anti-inflammatory, anti-insecticidal and cytotoxic	[48]
10	Antcin B (Zhankuic acid A)	F	<i>In vitro</i> anti-inflammatory, anti-insecticidal and cytotoxic	[48]
11	Antcin C	F	<i>In vitro</i> anti-inflammatory and cytotoxic	[49]
12	Antcin D (Zhankuic acid F)	F		[72]
13	Antcin E	F		[73]
14	Antcin F	F		[73]
15	Antcin G	F		[73]
16	Antcin H (Zhankuic acid C)	F	<i>In vitro</i> anti-inflammatory, anti-insecticidal and cytotoxic	[74]
17	Antcin I (Zhankuic acid B)	F	<i>In vitro</i> anti-inflammatory	[50]
18	Antcin K	F	<i>In vitro</i> anti-inflammatory	[50]
19	Methyl antcinate A	F		[75]
20	Methyl antcinate B	F	<i>In vitro</i> anti-insecticidal and cytotoxic	[76]
21	Zhankuic acid D	F		[75]
22	Methyl antcinate G	F		[73]
23	Methyl antcinate H	F		[73]

24	Zhankuic acid E	F		
25	Dehydroeburicoic acid	F	<i>In vitro</i> anti-inflammatory, anti-insecticidal	[76]
26	Dehydrosulphurenic acid	F	<i>In vitro</i> anti-insecticidal and cytotoxic	[76]
27	15 $\alpha$ -Acetyl-dehydrosulphurenic acid	F	<i>In vitro</i> anti-insecticidal and cytotoxic	[76]
28	Eburicoic acid	F	<i>In vitro</i> anti-insecticidal and cytotoxic	[76]
29	Sulphurenic acid	F	<i>In vitro</i> anti-insecticidal and cytotoxic	[76]
30	Versisponic acid D	F		
31	Eburicol (24-methylenedihydrolanosterol)	F	<i>In vitro</i> anti-inflammatory	[48]
32	3 $\beta$ , 15 $\alpha$ -Dihydroxy lanosta-7,9(11),24-triene-21-oic acid	F	<i>In vitro</i> anti-insecticidal and cytotoxic	[76]
33	3 $\beta$ -Hydroxy lanosta-	F		[17]
34	$\beta$ -Sitosterol	F		[78]
35	$\beta$ -Sitostenone	F		[78]
36	Stigmasterol	F		[78]
37	Ergosterol	F		[78]
38	Ergosta-4,6,8(14)22-tetraen-3-on3	F		[48]
39	<i>epi</i> -Friedelinol	F		[48]
	<i>Benzenoids</i>			
40	1,4-Dimethoxy-2,3-methylenedioxy-5- methylbenzene	F	<i>In vitro</i> cytotoxic	[70]
41	1,4-Dimethoxy-2,3-methylenedioxy-5- benzoate	F		[52]
42	1,6-Dimethoxy-2,3-methylenedioxy-4- benzoic	F		[52]



	acid			
43	Antrocamphin A	F	<i>In vitro</i> anti-inflammatory	[48]
44	Antrocamphin B	F		[48]
45	2,3,4,5-Tetramethoxybenzoyl chloride	F		[48]
46	Antrodioxolanone	F		[48]
47	Isobutylphenol	F		[80]
	<i>Lignans</i>			
48	(+) Sesamin	F		[80]
49	4-Hydroxy sesamin	F		[80]
50	(-) Sesamin	F		[80]
	<i>Benzoquinone derivatives</i>			
51	5-Methyl-benzo(1,3)-dioxole-4,7-dione	M		[80]
52	2-Methoxy-5-methyl(1,4)benzoquinone	M	<i>In vitro</i> anti-oxidant	[80]
53	2,3-Dimethoxy-5-methyl(1,4)benzoquinone	M	<i>In vitro</i> anti-inflammatory	[80]
	<i>Succinic and Maleic derivatives</i>			
54	<i>trans</i> -3-Isobutyl-4-[4-(3-methyl-2-butenyloxy)phenyl]pyrrolidine-2,5-dione	F	<i>In vitro</i> anti-inflammatory	[55]
55	<i>trans</i> -1-Hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4-isobutylpyrrolidine-2,5-dione	F	<i>In vitro</i> anti-inflammatory	[55]
56	3 <i>R</i> *,4 <i>S</i> *-1-Hydroxy-3-isobutyl-4-[4-(3-methyl-2-butenyloxy)phenyl]pyrrolidine-2,5-dione (antrodin D or Camphorataimide E)	F, M	<i>In vitro</i> anti-inflammatory, anti-HBV and anti-HCV	[55]
57	<i>cis</i> -3-(4-Hydroxyphenyl)-4-isobutylidihydrofuran-2,5-dione	F	<i>In vitro</i> anti-inflammatory	[55]
58	3-(4-Hydroxyphenyl)-4-isobutyl-1 <i>H</i> pyrrole-2,5-dione	F	<i>In vitro</i> anti-inflammatory	[55]

59	3-(4-Hydroxyphenyl)-4-isobutylfuran-2,5-dione (Antrocinnamomin C)	F	<i>In vitro</i> anti-inflammatory	[55]
60	3-Isobutyl-4-[4-(3-methyl-2-butenyloxy)phenyl]furan-2,5-dione (antrodin A or Camphorataanhydride A)	M	<i>In vitro</i> anti-HBV and anti-HCV	[81]
61	Dimethyl 2-(4-hydroxyphenyl)-3-isobutylmaleate	F	<i>In vitro</i> anti-inflammatory	[55]
62	3-Isobutyl-4-[4-(3-methyl-2-butenyloxy)phenyl]-1 <i>H</i> -pyrrole-2,5-dione (Antrodin B or Camphorataimide B)	M, B	<i>In vitro</i> anti-inflammatory, anti-HBV and anti-HCV	[81]
63	Antrocinnamomin D	M		[82]
64	3-Isobutyl-4-[4-(3-methyl-2-nyloxy)phenyl]-1 <i>H</i> -pyrrol-1-ol-2,5-dione (antrodin C or) Camphorataimide C)	M	<i>In vitro</i> anti-inflammatory, anti-HBV and anti-HCV	[54][78]
65	Antrocinnamomins A	M	<i>In vitro</i> anti-inflammatory	[83]
66	3 <i>R</i> *,4 <i>R</i> *-1-Hydroxy-3-isobutyl-4-[4-(3-methyl-2-butenyloxy)phenyl]pyrrolidine-2,5-dione (Antrodin E or Camphorataimide D)	M	<i>In vitro</i> anti-HBV and anti-HCV	[54]
67	Antrocinnamomins B	M	<i>In vitro</i> anti-inflammatory	[83]
	<i>Miscellaneous compounds</i>			
68	2,2_,5,5_-Tetramethoxy-3,4,3_,4_-bimethylenedioxy-6,6_-dimethylbiphenyl	F	<i>In vitro</i> anti-HBV	[65]
69	$\alpha$ -Tocospiro B	F		[48]
70	Methyl oleate	F		[80]
71	Antroquinonol	M, F	<i>In vitro</i> cytotoxic, anti-inflammatory,	[66]

			anti-HBV	
72	Adenosine	M	Prevention of PC 12 cells apoptosis	[83]
73	Cordycepin	M		[83]
74	2,4,5-trimethoxybenzaldehyde	M	Prevention of PC 12 cells apoptosis	[54]
75	Antroquinonol B	M	<i>In vitro</i> anti-inflammatory	[69]
76	4-acetyl-antroquinonol B	M	<i>In vitro</i> anti-inflammatory	[69]
77	2,3-(methylenedioxy)-6-methylbenzene-1,4-diol	M	<i>In vitro</i> anti-inflammatory	[69]
78	2,4-dimethoxy-6-methylbenzene-1,3-diol	M	<i>In vitro</i> anti-inflammatory	[69]

F: Fruiting bodies; M: Mycelium; B: Culture broth.

### 三、 肝臟纖維化病理機制

#### (一) 肝臟纖維化病理成因

肝纖維化是肝臟受損修復重複不斷的反應。經過急性肝損傷後，器質性細胞(parenchymal cells)再生以接替壞死或凋亡的細胞，這當中伴隨著發炎反應和細胞外間質(extracellular matrix ;ECM)的堆積。如果肝損傷持續至肝細胞再生失敗，肝細胞會被大量的 ECM 取代，其中包括了膠原蛋白。[23]

在肝纖維化進展到後期，ECM 的量是正常肝臟的六倍，其中包括 collagens (I, III, and IV), fibronectin, undulin, elastin, laminin, hyaluronan, and proteoglycans。ECM 的增加同時其因於合成增加和降

解減少。[24]

肝星狀細胞(HSCs)是 ECM 主要的產生細胞[25]。正常的肝臟中，星狀細胞存在於周竇間隙，並能夠貯存維生素 A。當長期的肝損傷使得星狀細胞活化並轉化為類肌成纖維細胞[26]。活化的星狀細胞遷移至再生的組織處，分泌大量的 ECM。

靜止的星狀細胞表現出脂肪細胞的特徵(PPAR $\gamma$ , SREBP-1c, 及 leptin)和活化的星狀細胞的肌纖維形成特徵不同( $\alpha$  smooth muscle actin, c-myb, 及 myocyte enhancer factor-2)[23]

肝臟纖維化是由不同的肝細胞交互影響而成的[27]。肝細胞受到肝毒性的化合物攻擊，包括肝病毒、酒精代謝產物和膽酸[28]。受損的肝細胞釋出自由基和纖維化介質並促使白血球回流發生發炎反應。受損的肝細胞凋亡刺激肝肌纖維母細胞的增殖作用[29]。促進發炎的細胞，淋巴球或是多核球活化星狀細胞分泌膠原蛋白[30]。活化的星狀細胞分泌發炎趨化素。發炎反應和纖維化反應交錯影響使得狀況惡化[31]。庫氏細胞是一種常駐在肝的細胞，藉由釋放自由基和細胞激素大大影響發炎反應[32]。

膠原蛋白(collagen)主要有六種，包含：type I(存在於疤痕組織)、III(存在於血管中)、IV(存在於基質周圍的上皮細胞中)、V(存在於膠原蛋白纖維中)、VI(存在於結締組織中，能固定膠原纖維)、

VII(固定基質與基底膜)。肝臟纖維化是細胞外基質(Extracellular Matrix; ECM)大量增生的結果,增生的 ECM 主要是由膠原蛋白 type I 和 III 所構成,是由肝星狀細胞(HSC)分泌出來的。膠原蛋白其結構為一三股螺旋的結構,其中每一股的氨基酸序列一般以 Glycine-Proline-Hydroxyproline(Hyp)的順序重複出現,這三者胺基酸的連續序列使得三股的氨基酸鍊能夠緊密的以氫鍵結合在一起,膠原蛋白得以在生物體結構中提供足夠的強度去支撐器官組織等等的構成[34]。由於一般蛋白質中膠原蛋白含量很少,但是膠原蛋白中 Hyp 的含量可達總胺基酸含量的 12.5% (Edward and O'Brien,1980),所以我們可以在測出 Hyp 後回推換算有多少膠原蛋白總量。

## (二) 四氯化碳動物病理模式

在動物模式當中,四氯化碳誘導大鼠肝損傷或纖維化被普遍使用。四氯化碳的代謝過程中會造成肝毒性,如:脂質變性、肝臟纖維化、肝細胞死亡甚至肝硬化以及肝癌的形成。在四氯化碳的代謝途徑中,藉著細胞色素 CYP2E1、CYP2B1、CYP2B2 或 CYP3A 催化成三氯甲烷自由基  $\text{CCl}_3\cdot$ 。此自由基能夠減少核酸、RNA 及磷脂質的甲基化,而抑制蛋白質的合成、脂蛋白的分泌,並影響鈣離子在粒線體、內質網及細胞膜上的通透性,導致鈣離子濃度下降而造成細胞死亡。三氯甲烷自由基更進一步能夠與氧結合形成三氯甲烷自由基

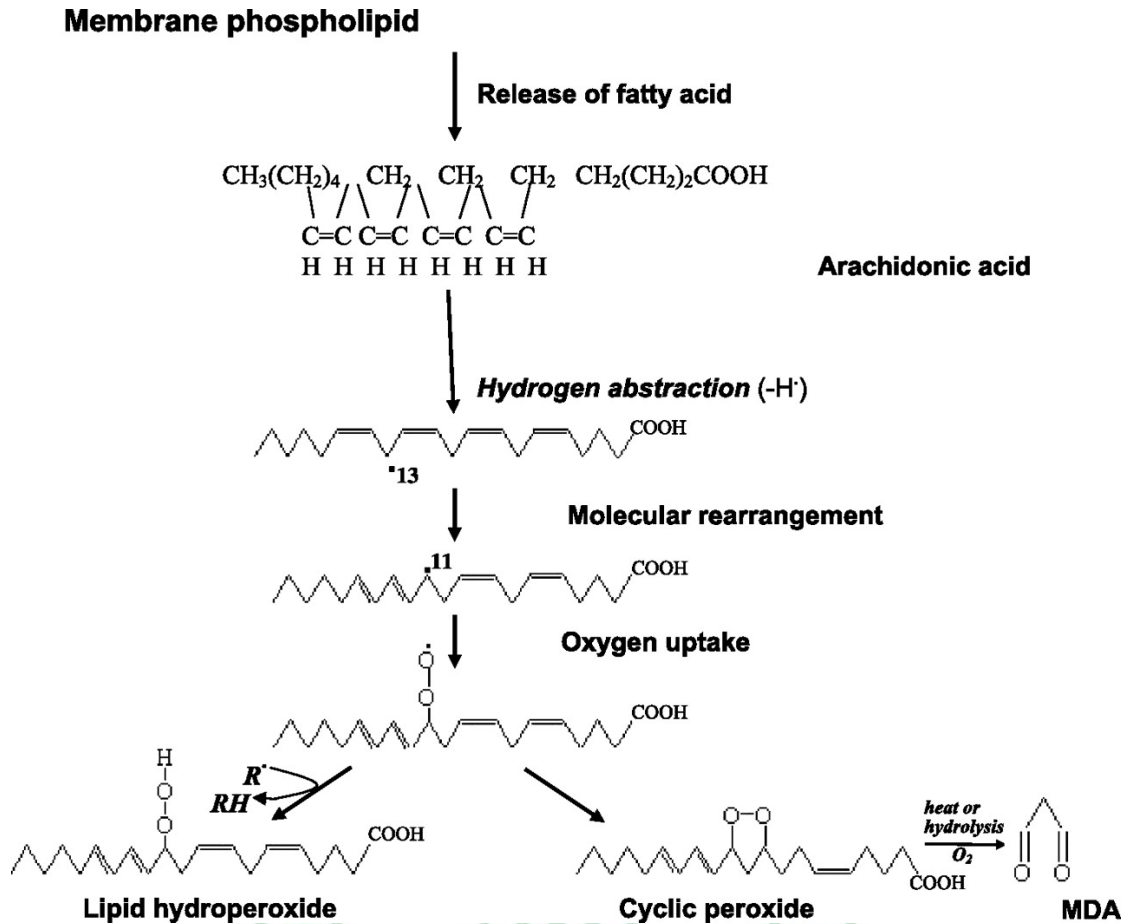
$\text{CCl}_3\text{OO}^\cdot$ ，攻擊多元不飽和脂肪酸形成脂質過氧化，尤其是與磷脂質的結合，上述這些影響都可能是造成肝損傷的重要因素 [3]。

穀胱甘肽(Glutathione; GSH)為一三肽，由谷氨酸、半胱胺酸、甘胺酸所構成。通常在動物細胞中作為抗氧化劑的功用，此外，在動物體中它亦有解毒、抗紫外線(對抗 UV 造成的 DNA 損傷)、抗癌(防止 DNA 損傷)等功用[35]，並認為與下列疾病有關：糖尿病[36]、AIDS[37]、免疫反應[38]、帕金森氏症[39]。GSH 存在於細胞質中，避免細胞 DNA 被氧化。在細胞中有 GSH(還原態)和 GSSG(氧化肽)兩種型態。

脂質過氧化(Lipid peroxidation; LPO)為一種脂質氧化的過程。當生物體有外來自由基出現，可能會誘發不飽和脂肪酸形成脂質過氧化物自由基，由於脂質是細胞膜的組成，脂質過氧化如果持續發生可能會導致脂質變性，有併發癌症的危險。

體內 LPO 生合成的途徑如下圖：



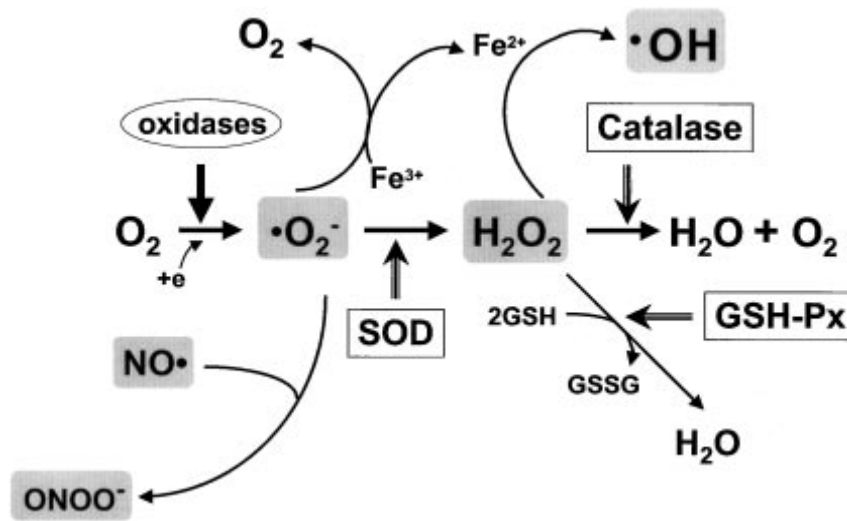


最後我們能得出產物 Malondialdehyde(MDA)，4-hydroxynonenal (4-HNE)，通常我們利用 Thiobarbituric Acid (TBA)去定量 MDA，由於 TBA 會與 MDA 形成加和物，在波長 532 nm 有明顯的螢光吸收，藉此來定量 MDA，也就能估計生物體內 LPO 的產生量了[40]。

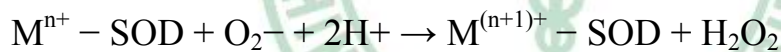
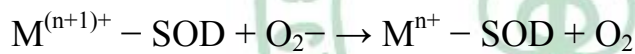
### (三) 抗氧化酵素

在生物體內，氧化壓力(oxidative stress)會衍生出許多病變，例如癌症、腎病、神經病變等等。活性氧 reactive oxygen species(ROS)在這當中扮演著重要的角色。生物體內有許多種活性氧，包括：nitric oxide (NO<sup>•</sup>), superoxide (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and

peroxynitrite (ONOO·)。ROS 的反應如下圖：

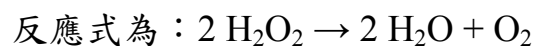


這當中，與 ROS 的生合成有關的酵素包括了：SOD、Catalase、GSH-Px。超氧化物歧化酶 superoxide dismutase (SOD)於生物體內能夠將超氧化物轉變為過氧化氫。其反應步驟為：



金屬離子 M 可為：Cu、Mn、Fe、Ni。

過氧化氫酶 Catalase 在生物體內可以將過氧化氫轉變為氧和水。



谷胱甘肽過氧化物酶(GSH-Px)為生物體內另一能將游離態過氧化氫還原成水的抗氧化酵素，在這過程中，同時將谷胱甘肽 GSH 催化成其氧化態 GSSG。

經過檢測生物體內的這幾種酶活性，可以量化生物體受到的氧化壓力，也就是活性氧生成量的多寡，並可試驗藥物是否有抗氧化的作



用。

SOD 測定原理：利用 xanthine 和 xanthine oxidase (XOD) 反應，作為 superoxide 產生的來源。所產生的 superoxide 與 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride (INT) 反應，產生紅色的 formaza。SOD 的活性依據 formaza 受抑制的程度而定。

Catalase 測定原理：利用在 240nm 波長範圍的  $H_2O_2$  吸光值，在單位時間內的差值來測量 catalase 的活性。需注意的是為了避免  $O_2$  產生的速度過快，氣泡影響測量精確性，必須用低濃度的  $H_2O_2$ 。另外，最恰當的反應溫度和 pH 值為  $20^\circ C$  和 pH7.0[41]。

GSH-Px 測定原理：cumene hydroperoxidase 催化 GSH-Px，使 Glutathione 氧化，氧化的 Glutathione 與 glutathione reductase 和 NADPH 反應，NADPH 所減少的量可在波長 340nm 測出，可估算出 GSH-Px 的活性。

## 第二章 材料與方法

### 一、牛樟芝試驗物質製備

本實驗使用的為牛樟芝是由椴木栽培所得到的子實體，其超臨界萃取物製作成滴丸，以下簡稱 TCSE。TCSE 以去離子水配成濃度為 10、60 mg/ml 的懸浮液使用。大鼠經口投予體積為每 100 公克大鼠體重投與 1 毫升

## 二、 藥品試劑

編號	名稱	廠牌
1	TBE buffer	Amresco
2	Sodium chloride	Amresco
3	福馬林 10%	BS chemicals
4	Diethylpyrocarbonate, DEPC	Biotecx
5	Sulfuric acid	Fluka
6	Sodium hydroxide , pellets	J.T.Baker
7	Sirius red	Muto Pure chemicals
8	Potassium chloride , KCl	MERCK
9	Alcohol	Panreac
10	Hydrochloric acid	Riedol-de Haen
11	ALT (ALAT/GPT)	Roche/Hitachi
12	AST (ASAT/GOT)	Roche/Hitachi
13	Xylene	Scharlau
14	3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochlorodehydrate, 97%	Sigma

15	Carboxyl methylcellulose sodium salt	Sigma
16	2-Thiobarbituric acid, TBA	Sigma
17	4-(Dimethylamino)benzaldehyde	Sigma
18	Sodium sulfate, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sigma
19	Hydrogen peroxide, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wako
20	Isopropanol	Scharlau Chemie S.A.
21	Chloroform	Showa

### 三、 儀器設備

編號	名稱	廠牌
1	KUBOTA 3500 離心機	KUBOTA
2	pH meter HM-5S	TOA Electronics
3	Spectrophotometer	Hitachi
4	ASTEC program temp. control system	ASTEC
5	Gene Amp. PCR system 9700	A&B (Applied Biosystems)
6	AlphaDigDoc hardware	Alpha Innotech Co.
7	Fluoroskan Ascent FL	Thermo Scientific
8	Microplate reader model 550	Bio-RAD
9	CoBAS MIRA PLUS 生化自動分析儀	Roche

#### 四、 實驗動物

實驗動物選用 Wistar 雄性大鼠，體重 220-260g，購自國家實驗動物繁殖研究中心。飼養環境維持  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ ，相對溼度  $55\pm 5^{\circ}\text{C}$ ，光照為 12 小時亮 12 小時暗(早上八點亮，下午八點暗)，自由飲水及攝食。

將大鼠隨機分為四組，分別為控制組 (n=10)、四氯化碳+ $\text{H}_2\text{O}$  組 (n=12)、四氯化碳+TCSE (100、600 mg/kg body weight; n=12、12)、四氯化碳+Silymarin(n=10)。每週經胃管給予四氯化碳 (20% v/v 溶於橄欖油; 0.2 ml/100 g body weight) 兩次，藥物則每天經胃管給予，投與體積皆為每 100g 給予 1 mL，為期八週。之後犧牲大鼠取其肝臟及脾臟以及血液檢體進行實驗分析。肝臟與脾臟秤重並觀察外觀有無異常。

#### 五、 肝功能分析

投藥滿八週，利用乙醚麻醉後，使用 10 mL 針管由大鼠腹腔動脈採血致死，在室溫下 4700 rpm 離心 10 min 分離出血漿。使用 Roche 試劑，以自動生化儀檢測 alanine aminotransferase (ALT)、aspartate aminotransferase (AST) 的活性和白蛋白(albumin)濃度。

Glutathione 測定方法：肝組織 GSH 的測定依據 Hissin & Hlil (1973)的方法，秤取肝組織 0.5g，加入 5mL 的 1.15%KCl 溶液，以均質機均漿，去 1mL 均漿液，加入 1mL trichloroacetic acid 10%，混和均勻後，以 3000 g 離心 15 min。取 0.01 mL 上清液，加入 0.18 mL phosphate-EDTA 緩衝液及新鮮配置的 0.01mL  $\sigma$ -phthalaldehyde (OPA) (1mg/mL methanol)溶液，混和均勻後，以螢光 420 nm，激發波長 350 nm 測之。以  $\mu\text{mole/g}$  表示之。

LPO 測定方法：肝臟脂質過氧化測定參考 Ohkawa 等人(1979)的方法。秤取肝臟組織 0.5 g 加入 5 mL 1.15% KCl 溶液，以均質機均質化後，取 0.1 mL，依序加入 0.2 mL Sodium dodecyl sulfate(8.1%)，1.5 mL Acetic acid (20%)，1.5 mL 2-thiobarbituric acid (0.8%)，再以去離子水定量到 4 mL，以 95°C 水浴 1h，待冷卻後，加入 4 mL n-butanol/pyridine 混和液(15:1,v/v)劇烈震盪混和均勻後，於 4000 g 離心 10 min，取有機層已分光光度計於 532 nm 測量吸光值。肝臟組織的脂質過氧化以 nmol malondiadehyde(MDA)/mg protein 表示。組織同時依照 Congdon 等人(1993)之 Coomassie Blue 蛋白質定量法，測定肝臟組織蛋白質含量，以胎牛血清(Bovine derum albumin)為標準品。

SOD 的測定方法：組織之前處理依據 Xia et al.(1995)的方法。活性的測定使用市售 SOD 活性檢驗試劑 Ransod (RANDOX Lab. Ltd.

UK)。SOD 的活性定義為 2-(2-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride 還原反應速率 50%所需要的酵素量為一的單位(U)，以 U/mg protein 表示。

Catalase 的測定方法：肝組織加入磷酸鹽 KCl 緩衝，配成 10%均漿，離心後，取上層液加入 Triton X-100 (1%)成為 stock homogenate。加入適量之磷酸緩衝溶液進行稀釋，並調整成 pH 7 成為 dilute homogenate (D.H.)。取 D.H. 2 mL 加入 1mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.03 M)，劇烈搖晃均勻，以分光光度計於 25°C，波長 240 nm 測得吸光值，共測兩次，間隔 30s，之後計算反應速率常數 K。K 之計算方式如右：  
$$K = (2.3/t_2 - t_1)(\log A_1/A_2)$$
。A<sub>1</sub> 為 t<sub>1</sub>=0 秒的吸光值；A<sub>2</sub> 為 t<sub>2</sub>=30 秒的吸光值。以 K 表示 catalase 活性，單位為 U/ mg protein。

GSH-Px 測定方法：組織之前處理依據 Xia et al.(1995)的方法。GSH-Px 活性測試使用市售 GSH-Px 活性檢驗試劑 Ransel(RONDOX Lab.Ltd.UK)。活性定義為每分鐘氧化 1μmol NADPH 所需的酵素量為一單位(U)。肝組織的 GSH-Px 活性以 mU/mg protein 表示。

## 六、 肝臟 Hydroxyproline 含量測定

Hydroxyproline 的測定參照 Neuman and Logan 的方法[33]。取大鼠肝臟約 0.5g，於 100°C 放置隔夜烘乾，將乾燥的肝臟秤重後，加 5mL



6N HCl 100°C 加熱 16 小時，加以水解。待冷卻後，取樣品 1mL 離心 1000 rpm，30 min。取 0.1 mL 的上清液，以 1N NaOH 中和水解產物，每管分別加入檢體 0.1 mL，0.1 mL CuSO<sub>4</sub> (0.01M)、0.1mL NaOH (2.5N)、0.1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6%) 震盪後靜置反應 5min，之後 80°C 加熱 5min，去除多餘過氧化物。冷卻後加入 0.2 mL 5% P-dimethylaminobenzaldehyde，0.4 mL 3N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 劇烈震盪混和均勻後，於 70°C 水浴 20 min，冷卻後已分光光度計於 540 nm 測量吸光值。以 Hydroxyproline 為標準品，含量以 µg/g 組織表示。

#### 七、 肝臟病理切片評估

於老鼠犧牲時取下肝臟最大葉的 1/3，浸泡在 10% 福馬林中固定，進行石蠟包埋及切片（中興大學獸醫病理所廖俊旺副教授協助製作）。將組織的切片進行蘇木紫和伊紅染色，觀察肝臟組織變性及壞死的程度。

肝臟切片染色首先利用 xylene 將石蠟脫掉進行復水，染以天狼星紅的染劑，可將肝臟組織上的膠原蛋白染成紅色，之後進行脫水，復蠟。以 10\*4 倍的顯微鏡下照相，利用影像分析軟體計算出肝組織上膠原蛋白分布的程度。

## 八、 免疫組織化學染色

石蠟包埋的切片先經由烘箱 60°C 烘一個小時，然後依順序經由 xylene 五分鐘\*3、100%酒精、95%酒精、70%酒精各一分鐘脫蠟。放入 3%過氧化氫五分鐘，放入草酸緩衝溶液水浴加熱一個小時恢復抗原活性，冷卻後以 TBS-T 潤洗。 $\alpha$ -SMA 抗體處理 4°C 24 小時，TBS-T 潤洗去多餘抗體並滴加二抗室溫一小時。以 TBS-T 潤洗後，DAB 30 分鐘；以 TBS-T 潤洗後按照 70%酒精、95%酒精、100%酒精、xylene 脫水，之後包埋。

## 九、 RT-PCR

抽 RNA：取 0.1g 肝組織於加入液態氮的研鉢中研碎，粉末加入 Trizol，以 18G 和 23G 針頭讓其均質化，Trizol 吸出加入氯仿，混勻靜置十分鐘靜待分層，12700 rpm 10 min 4°C 離心後，抽出上層溶液，加入 75%酒精上下搖動，-30°C 30min，待酒精揮發後以 DEPC 水溶解，測定 OD 260nm 和 OD 280nm 以確定其純度。-80°C 貯存。

cDNA 製備：以 MMLV-RT kit，取 0.1 $\mu$ l 的 mRNA 加入 kit，混和均勻後置於 PCR 系統中反應，-20°C 貯存。

PCR：cDNA 加入適當的 primer，以特定的溫度加入 PCR Master Mix kit 反應。產物 5 $\mu$ l 與 1 $\mu$ l 6x DNA loading dye 混合均勻，加入內



含 2% agar 的 EtBr 與 0.5% 的 TBE buffer 中 100V 電泳。照相後以 AlphaDigiDoc 軟體分析。

Table 2、primer 序列

mRNA	Primer sequence	Length (bp)
$\alpha$ -SMA	Forward: CTGCTCTGCCTCTAGCACAC	138
	Reverse: TTAAGGGTAGCACATGTCTG	
Col1 $\alpha$ 1	Forward: GGGACTTCTTGAGGTTGCCA	132
	Reverse: ATCCTGCCGATGTCGCTATC	

#### 十、統計方法

數值結果以平均值 (mean)  $\pm$  標準偏差 (standard deviation, SD) 表示。各組與對照間的數據以 SPSS 19 軟體運行 One-Way ANOVA 統計分析，並進行 Dunnett test，以 p 值小於 0.05 表示在統計學上組間有顯著差異。

### 第三章 結果

#### 一、肝功能分析

動物實驗處理第八週的 AST、ALT (Fig.1)，四氯化碳+H<sub>2</sub>O

組與控制組相較，大鼠血漿 AST、ALT 含量顯著上升，代表實驗模型建立成功，給予 TCSE 後能夠顯著降低大鼠血液中 AST 與 ALT。低劑量下，AST、ALT 分別降低了 33%、36%；高劑量下，AST、ALT 則是下降了 40%、27%。

白蛋白(Albumin；ALB)的方面，四氯化碳+H<sub>2</sub>O 組與控制組相較，大鼠血漿 ALB 含量顯著下降。經投予 TCSE 後，能血液上升中的 ALB (Fig.2)。低劑量下，ALB 回升了 49%，高劑量下，ALB 回升 82%。

## 二、 肝臟脾臟檢查

實驗八週後的肝臟重量如 Fig.3 所示，給予四氯化碳後，與正常肝臟相較，發生了腫大的現象。給予 TCSE 後，不管是低劑量或是高劑量，肝臟重量都幾乎沒有改變。

實驗八週後的脾臟重量如 Fig.4 所示，給予四氯化碳後，脾臟發生了腫大的現象。TCSE 低劑量下，脾臟重量下降了 46%；高劑量下，則下降了 61%。

## 三、 肝臟 Glutathione 含量與脂質過氧化的影響

動物實驗八週後肝臟的 Glutathione 含量如 Fig.5，我們可發現給

予四氯化碳後，肝臟的 Glutathione 被消耗而降低，但是在給予 TCSE 後，低劑量下，回升了 58%；高劑量下，回升了 113%，甚至比原本正常組要高。

另外，肝臟內 Malondialdehyde (MDA)的含量，八週後實驗數據如 Fig.6，我們可發現給予四氯化碳造成的 MDA 上升由於給予 TCSE 後下降了，低劑量下，下降了 40%；高劑量下，則是下降了 60%。

#### 四、 肝臟蛋白質與 Hydroxyproline 的影響

肝臟蛋白質第八週實驗數據如 Fig.7，四氯化碳造成的肝臟蛋白質下降，給予低劑量 TCSE 下，蛋白質回升了 11%；高劑量下，蛋白質則是顯著回升了 33%。

肝臟第八週 Hydroxyproline 的實驗數據如 Fig.8，四氯化碳造成的肝臟 Hydroxyproline 增加。低劑量下，Hydroxyproline 下降了 26%；高劑量，Hyp 下降了 55%。

#### 五、 SOD、Catalase 與 GSH-Px 的活性影響

SOD 動物實驗八週後測得的數據如 Fig.9，TCSE 低劑量下，SOD 回升了 5%；高劑量下，SOD 則是顯著的回升了 26%。

Catalase 動物實驗八週後所得到的數據如 Fig.10，TCSE 低劑量

下，Catalase 回升了 22%；高劑量下，Catalase 回升了 13%。

GSH-Px 動物實驗八週後所得到的數據如 Fig.11，TCSE 低劑量下，GSH-Px 回升了 8%；高劑量下，只回升了 1%，幾乎無差異。

#### 六、 肝臟病理切片 HE 染色分析

如 Table 1 及 Fig. 12 所示，四氯化碳誘發大鼠慢性肝炎，以 H.E. 染色可以明顯看出組織壞死的情形(Fig.12 B)。TSCE 三個劑量組的組織壞死情形與 CCl<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O 組比較沒有明顯差異。

#### 七、肝臟病理切片 Sirius Red 染色分析

天狼星紅(Sirius Red)染色能夠染出肝臟切片上的膠原蛋白，用於切片鏡檢能判斷肝臟纖維化程度的多寡，實驗八週後得到的切片照片如 Fig.12，由照片我們可發現，給予 TCSE 後，呈現紅色的膠原蛋白明顯減少了。

經由 Image Pro 軟體計算面積比例得到的數據見 Fig.13，低劑量下，纖維化的百分比下降了 29%；高劑量下，下降則顯著達到了 40%。

#### 七、 免疫組織化學染色

實驗八週後的數據如 Fig.14，對照正常組別，四氯化碳引起  $\alpha$ -SMA

的表現增加。給予 TCSE 後， $\alpha$ -SMA 的表現下降了。

#### 八、 Col $\alpha$ 1 和 $\alpha$ -SMA 的 mRNA 表現

經由 RT-PCR 確認第一型膠原蛋白  $\alpha$  亞型(Coll $\alpha$ 1)和 Alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)這兩個基因表現的強弱來解釋病理切片結果，第八週實驗結果如 Fig.15 我們可以發現給予 TCSE 能夠有效抑制 Col $\alpha$ 1 和  $\alpha$ -SMA 這兩個基因的表現。Col $\alpha$ 1 分別在低、高劑量下，下降了 41%與 43%。



#### 第四章討論

此動物實驗的設計方法為實驗開始時一週給予兩次四氯化碳同時每天給予 TCSE，跟其他的文獻相較，本實驗算是預防性給藥，而非治療性給藥。

Aspartate Transaminase (AST)與 Alanine transaminase (ALT)兩種酵素在肝臟中能執行轉胺基作用(transamination)，能夠將 alanine 或 Aspartic acid 上的氨基轉移到  $\alpha$ -Ketoglutaric acid 上。讓肝臟能將必需胺基酸合成非必需胺基酸的一項重要功能。由實驗結果我們可以發現：大鼠餵食 TCSE 能顯著降低肝指數 AST 和 ALT。一般 AST 和 ALT



兩種酵素在血液中含有量十分稀少；但在四氯化碳的動物實驗模型中，給予四氯化碳會造成肝細胞受損壞死，使得細胞內的兩種酶釋出，血液中的 AST 和 ALT 因而大量增加，所以臨床上可以將這兩項肝指數作為指標判斷肝受損的程度。實驗結果中四氯化碳與正常組別相比較，AST 和 ALT 含量顯著上升，這表示實驗模型建立成功；而口服給予 TCSE，能顯著改善肝細胞受損的狀況。

白蛋白(albumin ;ALB)在正常生理下，由肝臟 parenchymal cell 合成，存在於血液之中，能夠維持血液的滲透壓並參與許多物質的運送。長期慢性肝炎影響肝臟合成白蛋白，當肝細胞 parenchymal cell 受損後，合成白蛋白的能力會下降，使得血液的滲透壓下降，並因為門脈高壓，組織液生成增多，導致腹水的產生。長期投予四氯化碳，造成大鼠血中白蛋白濃度下降，經由口服給予 TSCE 後，能減少血中白蛋白濃度降低，顯示 TSCE 有改善肝臟合成白蛋白的功能。

肝臟受到損傷時會有發炎的情形，也會啟動再生的功能[42]，因此肝臟重量增加，但若嚴重時，肝臟組織大面積壞死，器官的結構塌陷，造成萎縮[43]。因此，肝臟重量不是慢性肝損傷穩定的指標。本實驗四氯化碳組最後出現肝腫大的情形，TSCE 對增加的肝臟重量沒有影響。

脾臟重量能表現出生物體是否有肝病病癥，當生物體有肝硬化病



灶會導致門脈高壓，脾臟充血腫大，所以脾腫大的程度能判定肝硬化的程度。由實驗結果可發現隨著加大 TCSE 劑量，脾腫大能顯著被抑制，顯示 TSCE 能降低四氯化碳引起的大鼠門脈高壓。

Glutathione (GSH) 為一肝臟貯存的三肽，當生物體遭到外來毒物入侵時，此三肽會從原本的還原態，將外來具有氧化能力的分子(例如自由基)還原，避免生物體遭到氧化而受損，所以肝臟 Glutathione 的含量代表生物體的解毒能力。經由口服給予 TCSE，肝臟的解毒能力顯著回升，甚至比正常組別要好。

正常肝臟的脂質，受到外來氧化物氧化後，會產生 Malondialdehyde，我們可以由這項數據來判斷生物體受到了多少氧化壓力(oxidative stress)。四氯化碳的誘導導致 Malondialdehyde 上升，經由給予樟芝能夠有效降低肝臟因氧化導致的脂質變性。

肝臟中所合成蛋白質的含量也能代表其肝功能，四氯化碳造成肝功能下降後，給予高劑量的 TCSE 造成肝功能的顯著回升。肝臟纖維化的病理模式中，隨著肝纖維化的病程發展，肝臟內的 ECM 合成(膠原蛋白為其主成分)會大量增加，而 Hydroxyproline 為膠原蛋白三股螺旋穩定結構的組成之一，一般來說，生物體肝臟在正常狀況下，Hydroxyproline 的含量相當低，所以在實驗中能用以判斷肝臟纖維化的嚴重程度。而經由餵食 TCSE 隨著劑量增加能顯著抑制肝纖維化的

程度。

天狼星紅(Sirius Red)能染出膠原蛋白成紅色。經由軟體計算統計而出的肝臟纖維化面積，能表示纖維化的程度。經餵食 TCSE 後，肝臟纖維化的面積顯著的下降了。

當肝纖維化發生時，肝星狀細胞(Hepatic Stellate Cell;HSC)會活化，並且分泌出細胞外基質(extracellular matrix;ECM)成為肝纖維化病癥。當 HSC 活化時， $\alpha$ -SMA 的表現亦會增加；所以  $\alpha$ -SMA 為肝星狀細胞活化的表現因子，能觀察出細胞外基質(ECM)堆積作用的旺盛程度，經由給予 TCSE 後，顯著降低了  $\alpha$ -SMA 的表現。

最後，在 Col1 $\alpha$ 1 和  $\alpha$ -SMA 這兩個訊息 RNA 分別代表著膠原蛋白合成與星狀細胞活化的基因活性，給予樟芝均能顯著降低其表現。

SOD 能將外來的超氧化物轉化為氧氣和過氧化氫，Catalase 能將過氧化氫轉化為氧氣和水，GSH-Px 能催化 GSH 將對體內有害的過氧化物還原，這三者都是由於外來的活性氧 reactive oxygen species (ROS) 的生合成路徑而被消耗掉的，所以這三者的多寡能視作生物體的抗氧化能力。SOD 在餵食高劑量樟芝能顯著回升，Catalase 與 GSH-Px 經由餵食樟芝後無顯著影響。

在過去，牛樟芝的用於動物實驗以及細胞實驗的來源大多數為野生的子實體或是菌絲體，或是發酵菌絲體作為來源。本篇則是用來自

椴木栽培的方式得到的子實體經 CO<sub>2</sub> 超臨界萃取(Supercritical Fluid Extract; SFE)做成的滴丸劑型。CO<sub>2</sub> 超臨界萃取是在高壓下，將液態的二氧化碳與待萃取物接觸，將其中成分依極性不同而萃取出來，優點在於：以低溫萃取，避免活性成分遭破壞；萃取步驟叫一般萃取單一；萃取出成分易與 CO<sub>2</sub> 分離。滴丸劑型是由有效成分與基質融化，在滴入冷凝液中，使之冷凝，之後乾燥而成。主成分在劑型當中分散均勻，製程中溫度變化小，成分穩定度高是其優點。由實驗結果我們可以發現：用椴木栽培的方式，得到的牛樟芝保肝抗肝纖維化方面，是有顯著活性的。由於市面上健康食品大多是發酵菌絲體的方式作為來源，但是發現菌絲體與原生野生的組成成分上有相當大的差異，那麼在健康食品上若是以椴木栽培法作為來源得到的牛樟芝或許是最貼近原先原住民野生用藥的來源，也一樣有效。

依據現在國內牛樟芝所做的保肝藥理活性(郭淑卿，2002)，我們可以發現在動物實驗數據的部分，不管是 AST、ALT、ALB、Protein、LPO、Hyp，牛樟芝發酵液得到類似於椴木栽培子實體的結果，而在抗氧化酵素 SOD、catalase、GSH-Px 三者都無明顯影響，但是在 GSH 的測定可發現，段木栽培的子實體能顯著改善因四氯化碳引起的 GSH 下降，這或許是因為其成分差異而導致的結果。

藉由椴木栽培法得到的牛樟芝經由本實驗證明對於肝纖維化有

保肝活性，但是其還是需要進一步細胞實驗探討其藥理機轉，以證明  
椴木栽培法與發酵菌絲體的成分不同導致的療效差異。



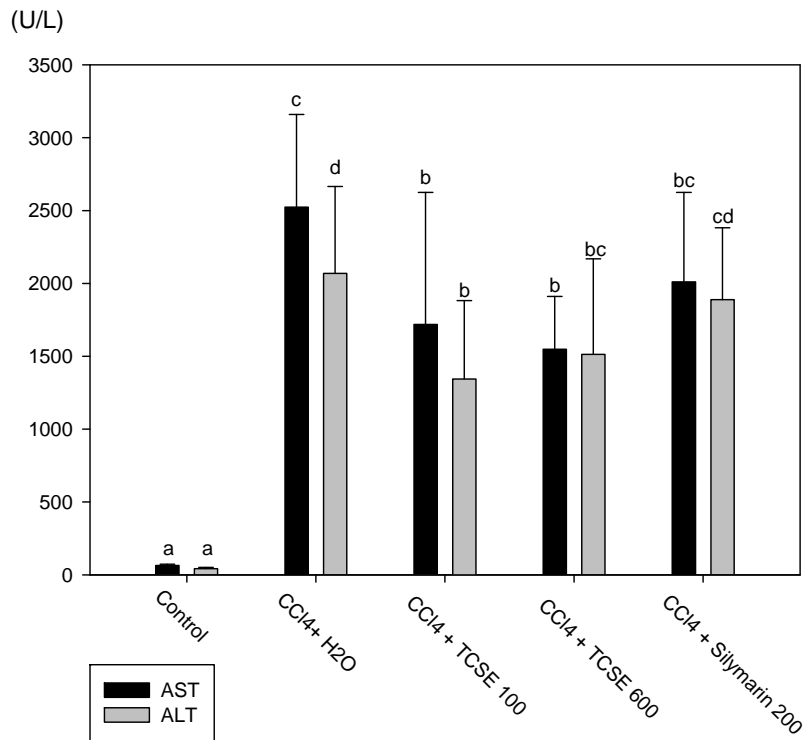


Fig.1 第八週樟芝對 CCl<sub>4</sub> 誘發大鼠慢性肝炎 AST、ALT 的影響。所有數據均以 Mean ± SD (n = 12 ;Silymarin n=10) 表示。以英文字母 a、b、c 及 d 表示統計之結果，相同字母表示組間不具統計上差異 (p>0.05)。

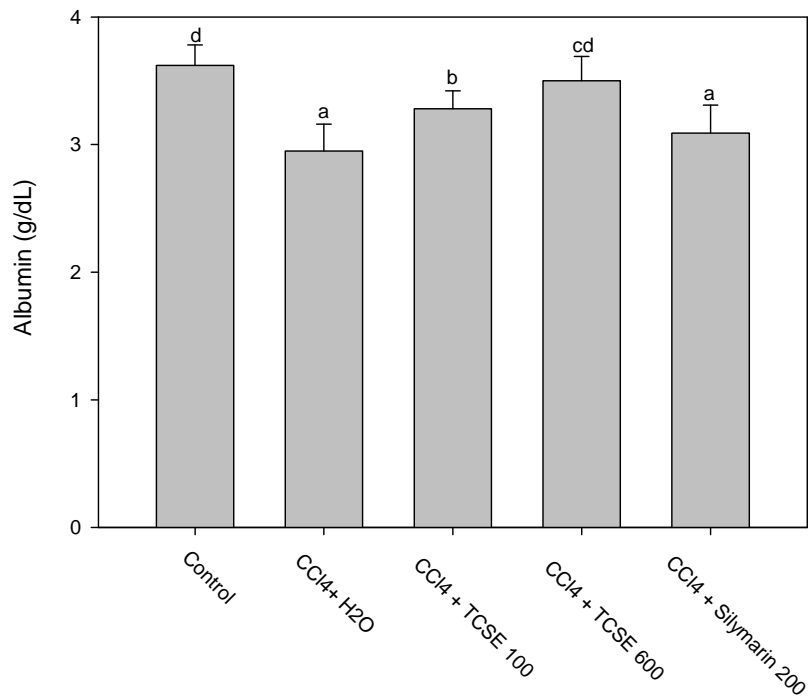


Fig. 2 第八週樟芝對 CCl<sub>4</sub> 誘發大鼠慢性肝炎 albumin 值的影響。所有數據均以 Mean ± SD (n = 12 ;Silymarin n=10) 表示。以英文字母 a、b、c 及 d 表示統計之結果，相同字母表示組間不具統計上差異 (p>0.05)。



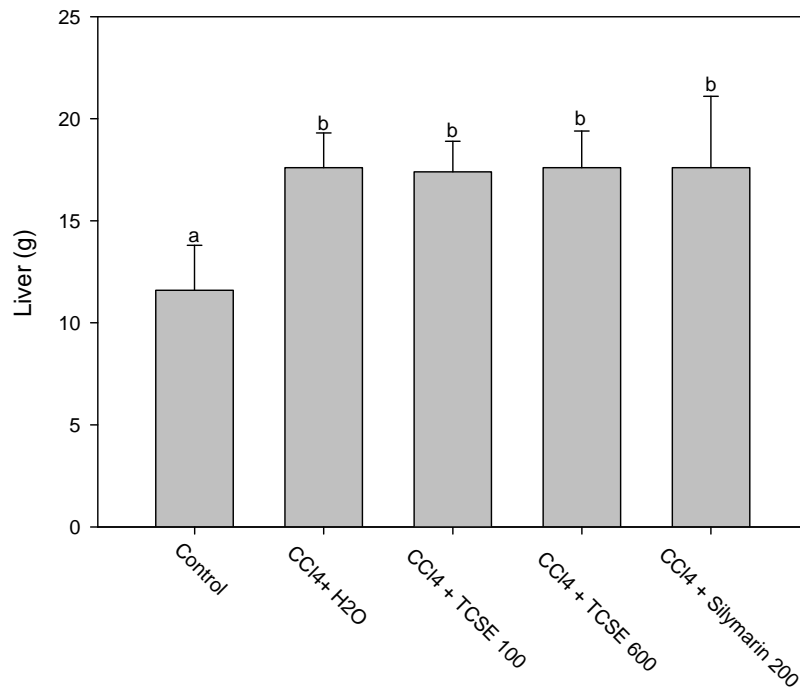


Fig. 3 樟芝對 CCl<sub>4</sub> 誘發大鼠慢性肝炎肝臟重量的影響。  
 所有數據均以 Mean ± SD (n = 12 ;Silymarin n=10) 表示。以英文字母 a 及 b 表示統計之結果，相同字母表示組間不具統計上差異 (p>0.05)。

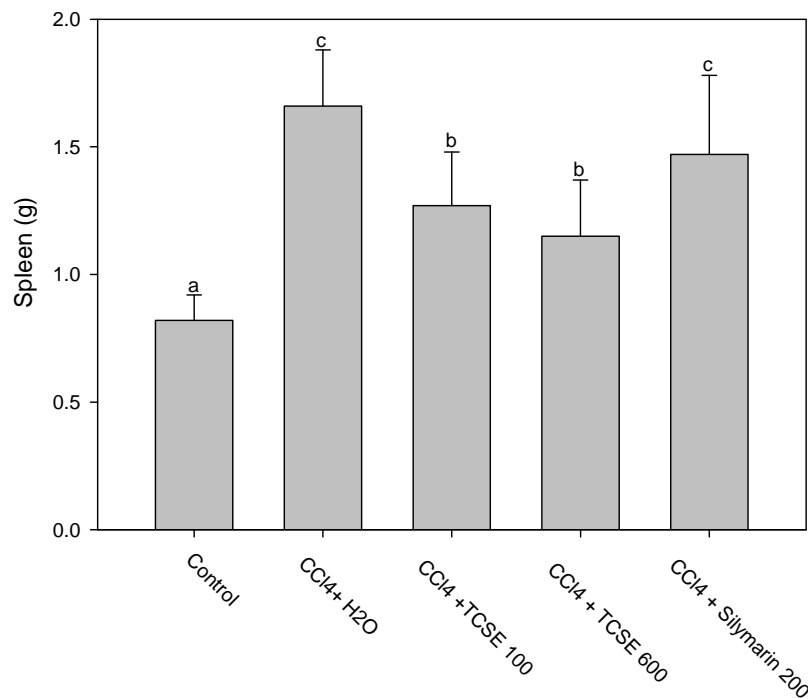


Fig. 4 樟芝對 CCl<sub>4</sub> 誘發大鼠慢性肝炎脾臟重量的影響。  
 所有數據均以 Mean ± SD (n = 12 ;Silymarin n=10) 表示。以英文字母 a、b 及 c 表示統計之結果，相同字母表示組間不具統計上差異 (p>0.05)。

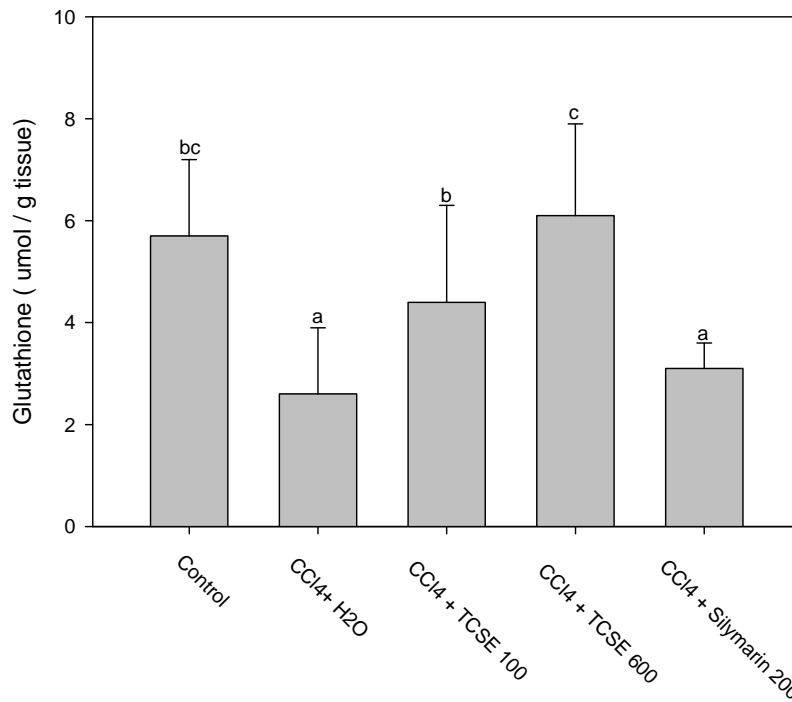


Fig. 5 樟芝對 CCl<sub>4</sub> 誘發大鼠慢性肝炎肝臟 glutathione 含量的影響。所有數據均以 Mean ± SD (n = 12 ;Silymarin n=10) 表示。以英文字母 a、b 及 c 表示統計之結果，相同字母表示組間不具統計上差異 (p>0.05)。

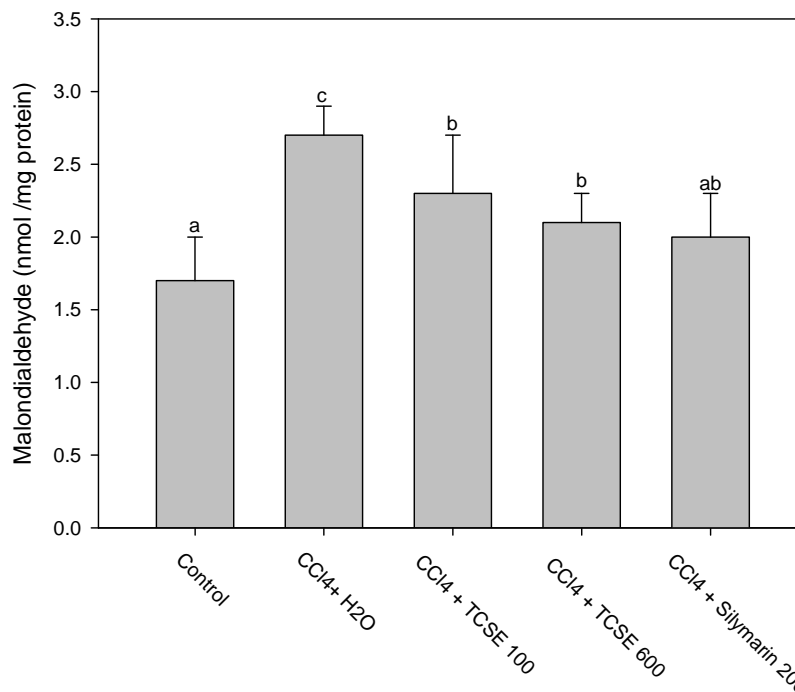


Fig. 6 樟芝對 CCl<sub>4</sub> 誘發大鼠慢性肝炎肝臟脂質過氧化的影響。所有數據均以 Mean ± SD (n = 12 ;Silymarin n=10) 表示。以英文字母 a、b 及 c 表示統計之結果，相同字母表示組間不具統計上差異 (p>0.05)。

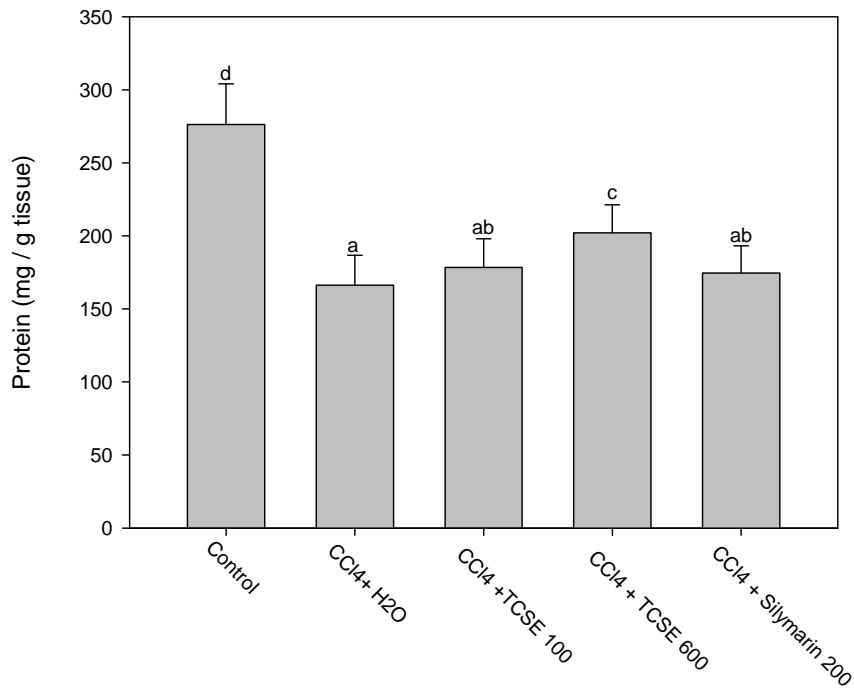


Fig. 7 樟芝對 CCl<sub>4</sub> 誘發大鼠慢性肝炎肝臟蛋白質含量的影響。  
 所有數據均以 Mean ± SD (n = 12 ;Silymarin n=10) 表示。以英文字母 a、b、c 及 d 表示統計之結果，相同字母表示組間不具統計上差異 ( $p>0.05$ )。

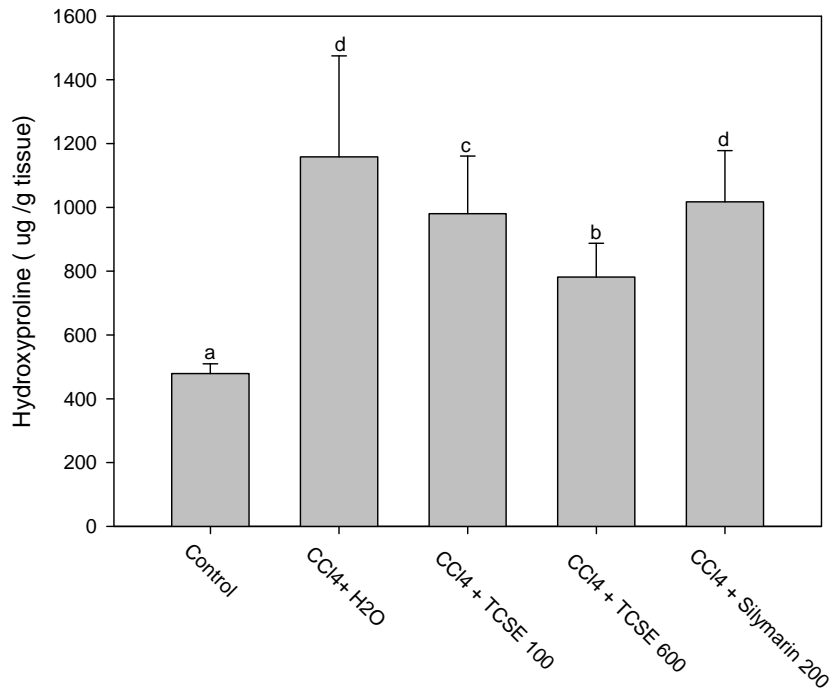


Fig. 8 樟芝對 CCl<sub>4</sub> 誘發大鼠慢性肝炎 hydroxyproline 含量的影響。  
 所有數據均以 Mean ± SD (n = 12 ;Silymarin n=10) 表示。以英文字母 a、b 及 c 表示統計之結果，相同字母表示組間不具統計上差異 ( $p>0.05$ )。

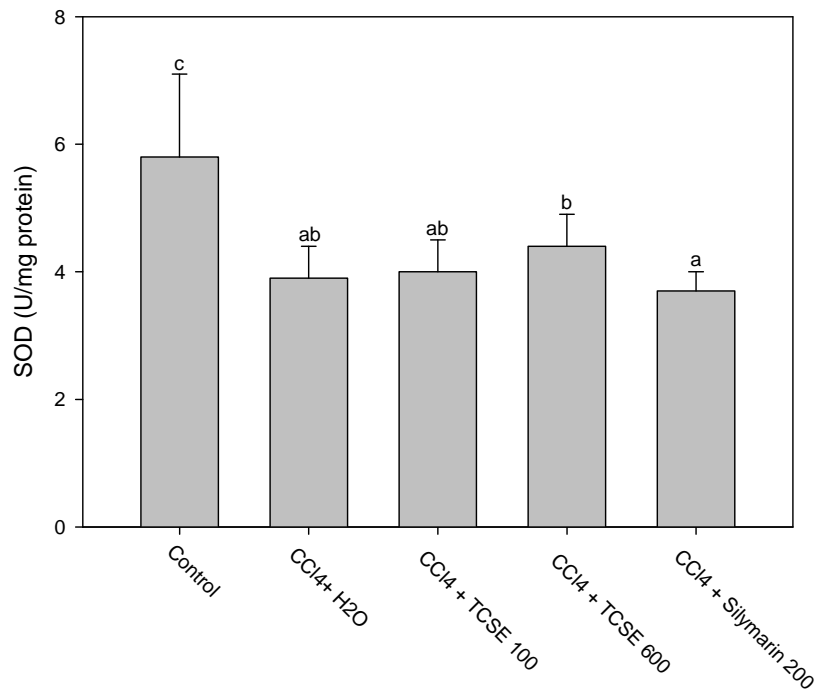


Fig.9 樟芝對 CCl<sub>4</sub> 誘發大鼠慢性 SOD 活性的影響。  
 所有數據均以 Mean ± SD (n = 12 ;Silymarin n=10) 表示。以英文字母 a、b 及 c 表示統計之結果，相同字母表示組間不具統計上差異 ( $p>0.05$ )。

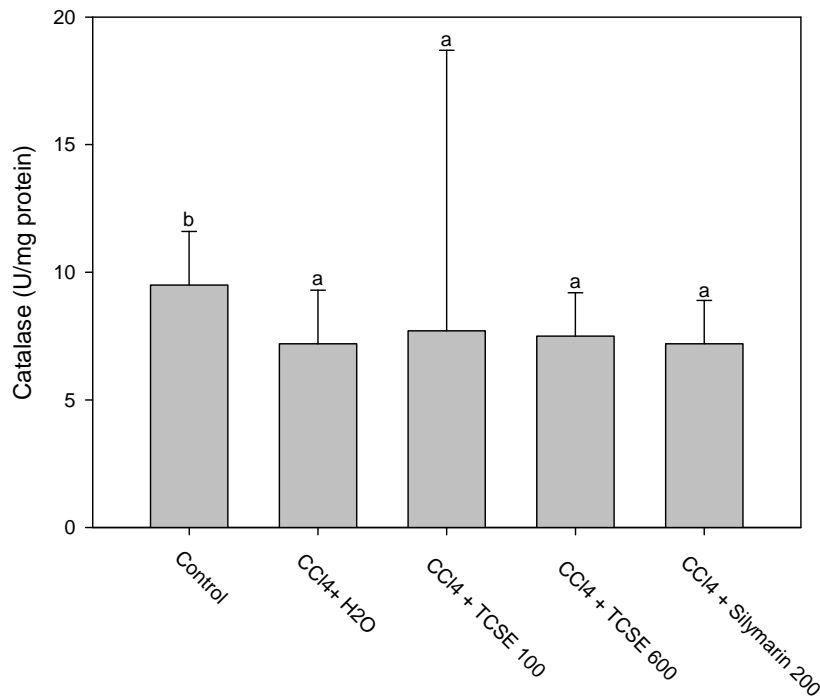


Fig.10 樟芝對 CCl<sub>4</sub> 誘發大鼠慢性 Catalase 活性的影響。  
 所有數據均以 Mean ± SD (n = 12 ;Silymarin n=10) 表示。以英文字母 a 及 b 表示統計之結果，相同字母表示組間不具統計上差異 ( $p>0.05$ )。

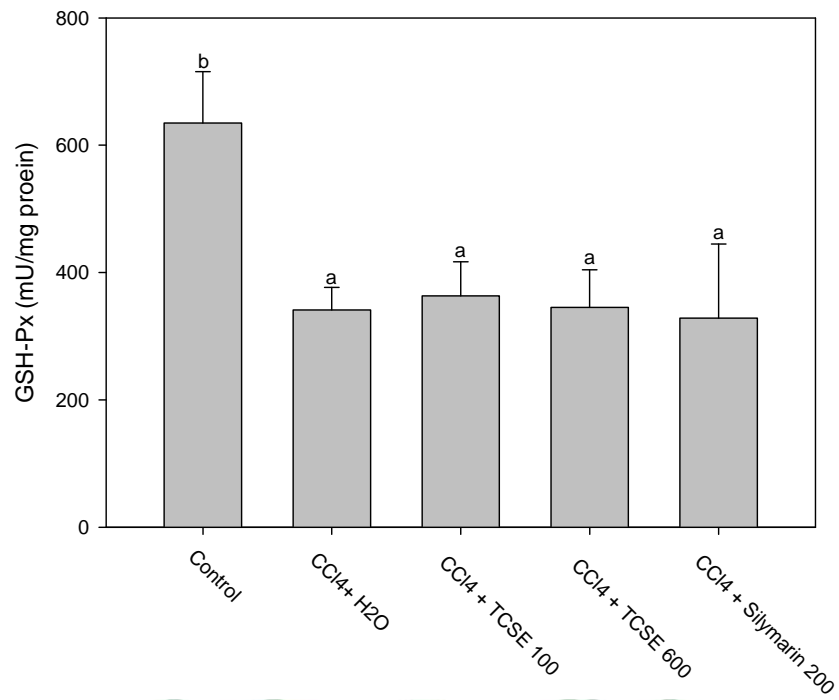


Fig.11 樟芝對 CCl<sub>4</sub> 誘發大鼠慢性 GSH-Px 活性的影響。  
所有數據均以 Mean ± SD (n = 12 ;Silymarin n=10) 表示。以英文字母 a 及 b 表示統計之結果，相同字母表示組間不具統計上差異 (p>0.05)。



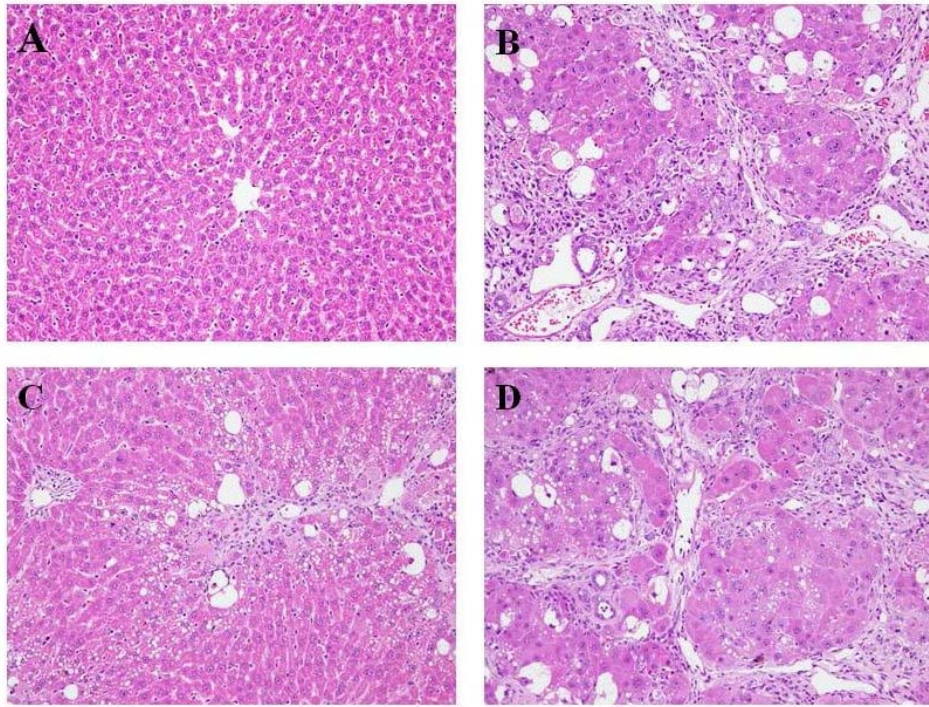


Fig. 12. 大鼠肝臟組織圖(H.E. stain)。(A) normal control; (B) received  $\text{CCl}_4$ . Note that fatty change and necrosis was observed. (C)  $\text{CCl}_4$  + TSCE 600 mg/kg (D)  $\text{CCl}_4$  + silymarin 200 mg /kg. 200X





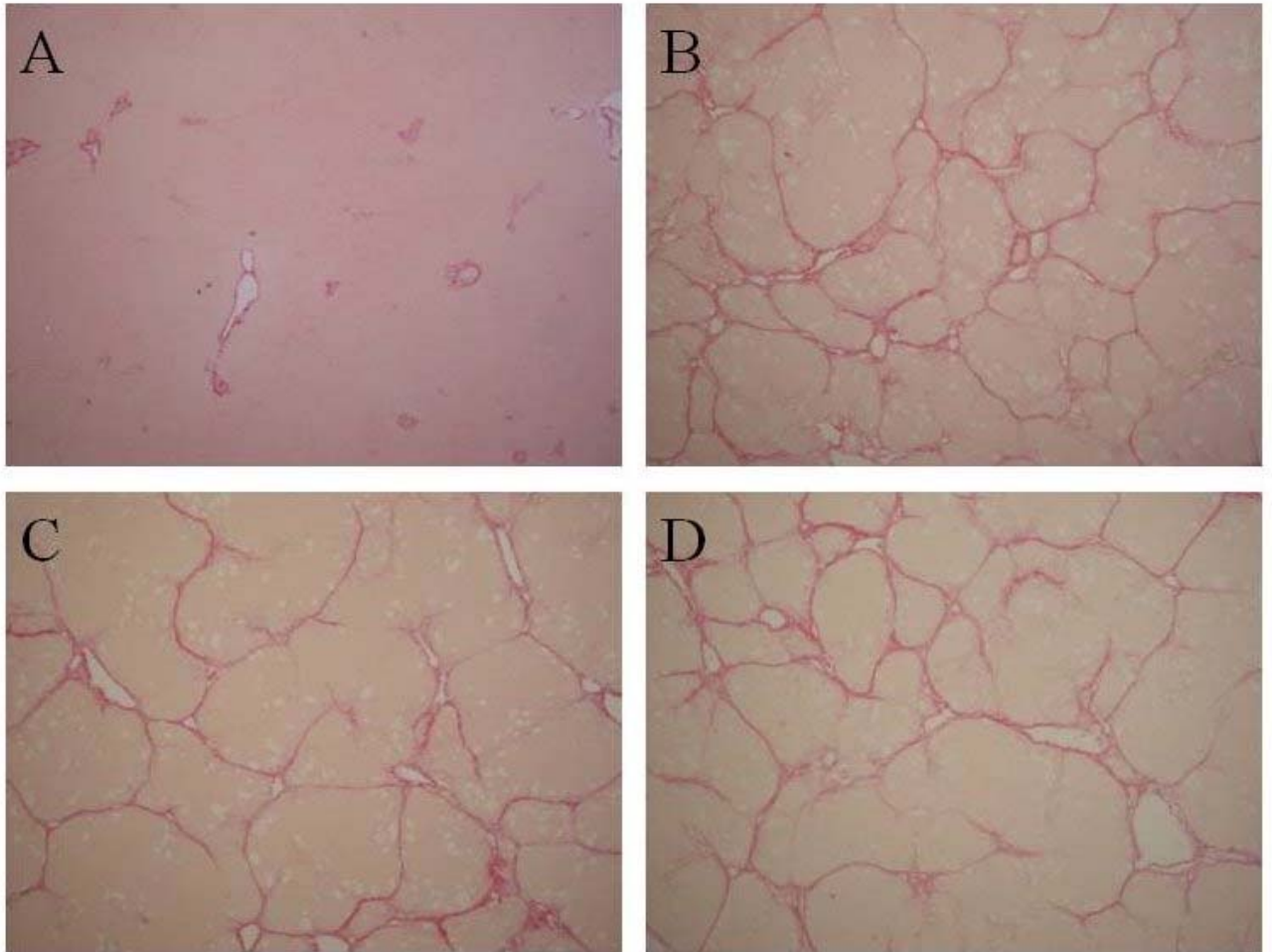


Fig. 13、大鼠肝臟組織圖(Sirius red stain)。(A) normal control; (B) received CCl<sub>4</sub>. Note that nodular formation and complete septa interconnecting with each other was observed. (C) CCl<sub>4</sub> +TSCE 600 mg/kg (D) CCl<sub>4</sub> + silymarin 200 mg /kg. 40×

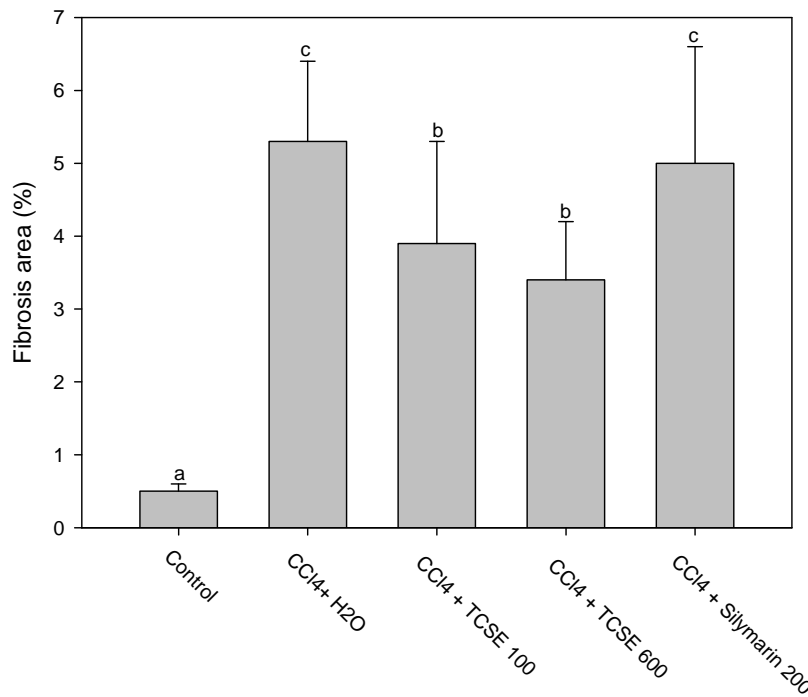


Fig.14. 樟芝對四氯化碳誘發慢性肝炎肝臟組織纖維化的影響。所有數據均以 Mean  $\pm$  SD (n = 12 ;Silymarin n=10) 表示。以英文字母 a、b 及 c 表示統計之結果，相同字母表示組間不具統計上差異 (p>0.05)。



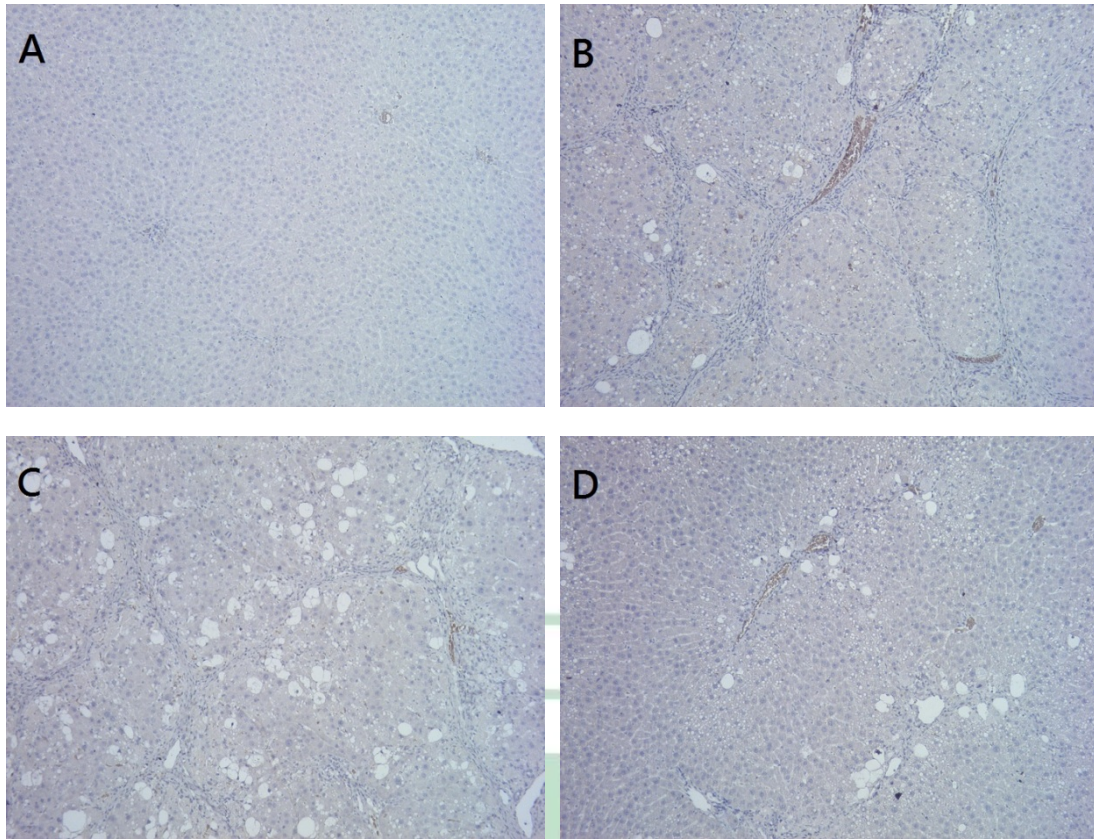


Fig. 15、大鼠肝臟組織圖(IHC  $\alpha$ -SMA stain)。(A) normal control; (B) received CCl<sub>4</sub>. Note that nodular formation and complete septa interconnecting with each other was observed. (C) CCl<sub>4</sub> + TSCE 100 mg/kg (D) CCl<sub>4</sub> + TSCE 600 mg /kg. 40×

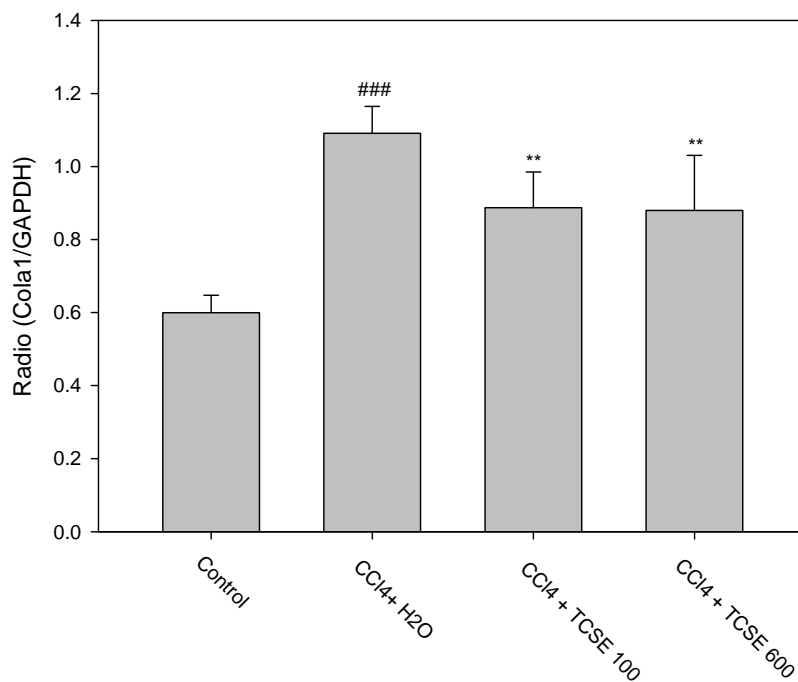
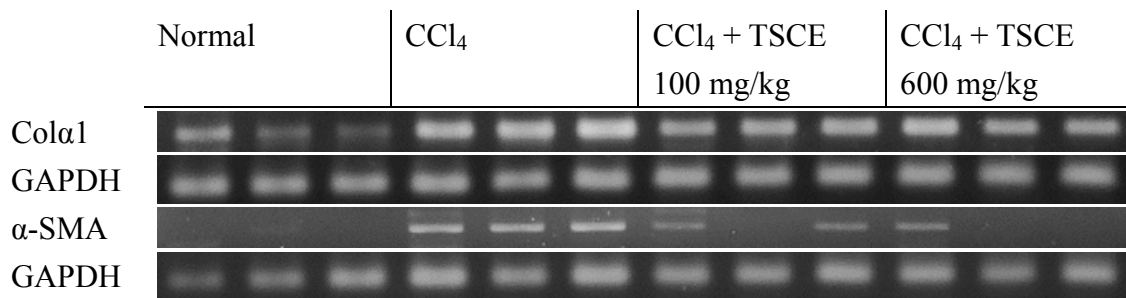


Fig.16、樟芝對四氯化碳誘發肝纖維化肝組織 Colα1 and α-SMA mRNA 表現之影響所有數據均以 Mean ± SD (n = 12) 表示。\*\*代表具統計上差異 (p<0.01)，###代表具有統計上之差異(p<0.001)。

Table 1、樟芝對 CCl<sub>4</sub> 誘發大鼠慢性肝炎肝臟組織壞死的影響

Drugs	Doses (mg/kg)	Necrosis					Average
		0	1	2	3	4	
Control	-	10	0	0	0	0	0 ± 0 <sup>a</sup>
CCl <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O	-	0	0	5	5	0	2.5 ± 0.5 <sup>###</sup>
CCl <sub>4</sub> + 樟芝	100	0	2	2	6	0	2.4 ± 0.8
	600	0	0	5	5	0	2.5 ± 0.5
+Silymarin	200	0	1	6	3	0	2.2 ± 0.6 <sup>b</sup>

Grade designation of the histological findings; (0) normal, (1) very slight, (2) slight, (3) moderate, (4) severe. ◦ <sup>###</sup>P < 0.01 as compared with control group.





## Reference

1. Wen CL, Chang CC, Huang SS, Kuo CL, Hsu SL, Deng JS, Huang GJ. Anti-inflammatory effects of methanol extract of *Antrodia cinnamomea* mycelia both in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol.* 2011;137(1):575-84.
2. Lin YW, Chiang BH. 4-acetylanthroquinonol B isolated from *Antrodia cinnamomea* arrests proliferation of human hepatocellular carcinoma HepG2 cell by affecting p53, p21 and p27 levels. *J Agric Food Chem.* 2011;59(16):8625-31.
3. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol.* 2003;33(2):105-36.
4. Wu SH, Yu ZH, Dai YC, Chen CT, Su CH, Chen LC, Hsu WC, Hwang GY. *Taiwanofungus*, a polypore new genus. *Fung. Sci.* 2004;19:109-116.
5. Geethangili M, Tzeng YM. Review of Pharmacological Effects of *Antrodia camphorata* and its Bioactive Compounds. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011;212641.
6. Chang TT, Chou WN. *Antrodia cinnamomea* sp. nov. on *Cinnamomum kanehirai* in Taiwan. *Mycol. Res.* 1995;99:756-758.
7. Hsu YL, Kuo YC, Kuo PL, Ng LT, Kuo YH, Lin CC. Apoptotic effects of extract from *Antrodia camphorata* fruiting bodies in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Letters.* 2005;221(1):77-89.
8. Kuo PL, Hsu YL, Cho CY, Ng LT, Kuo YH, Lin CC. Apoptotic effects of *Antrodia cinnamomea* fruiting bodies extract are mediated through calcium and calpain-independent pathways in Hep 3B cells. *Food and Chemical Toxicology.* 2006;44(8):1316-1326.
9. Rao YK, Fang SH, Tzeng YM. Evaluation of the anti-inflammatory and anti-proliferation tumoral cells activities of *Antrodia camphorata*, *Cordyceps sinensis*, and *Cinnamomum osmophloeum* bark extracts. *Journal of Ethnopharmacology.* 2007;114(1):78-85.
10. Shen YC, Chou CJ, Wang YH, Chen CF, Chou YC, Lu MK. Anti-inflammatory activity of the extracts from mycelia of *Antrodia camphorata* cultured with watersoluble fractions from five different *Cinnamomum* species. *FEMSMicrobiology Letters.* 2004;231(1):137-143.



11. Hseu YC, Wu FY, Wu JJ, Chen JY, Chang WH, Lu FJ, Lai YC, Yang HL. Anti-inflammatory potential of *Antrodia camphorata* through inhibition of iNOS, COX-2 and cytokines via the NF- $\kappa$ B pathway. *International Immunopharmacology*. 2005;5(13-14):1914–1925.
12. Rao YK, Fang SH, Tzeng YM. Evaluation of the anti-inflammatory and anti-proliferation tumoral cells activities of *Antrodia camphorata*, *Cordyceps sinensis*, and *Cinnamomum osmophloeum* bark extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007;114(1):78–85.
13. Chen JC, Chen CN, Sheu SJ et al. Liver-caring medicine containing *Antrodia camphorata*. 2003;US 0113297(003):6-19.
14. Huang RL, Huang Q, Chen CF, Chang TT, hou CJ. Anti-viral effects of active compounds from *Antrodia amphorata* on wild-type and lamivudine-resistant mutant BV. *Chinese Pharmaceutical Journal*. 2003;55(5):371-379.
15. Shu CH, Lung MY. Effect of culture pH on the antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*. 2008;39(1):1-8.
16. Song TY, Yen GC. Antioxidant properties of *Antrodia amphorata* in submerged culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002;50(11):3322-3327.
17. Hseu YC, Chen SC, Yech YJ, Wang L, Yang HL. Antioxidant activity of *Antrodia camphorata* on free radical-induced endothelial cell damage. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008;118(2):237-245.
18. Dai YY, Chuang CH, Tsai CC et al. The protection of *Anthrodia camphorata* against acute hepatotoxicity of alcohol in rats. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2003;11:177-185.
19. Hsiao G, Shen MY, Lin KH, Lan MH, Wu LY, Chou DS, Lin CH, Su CH, Sheu JR. Antioxidative and hepatoprotective effects of *Antrodia camphorata* extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003;51(11):3302-3308.
20. Song TY, Yen GC. Protective effects of fermented filtrate from *Antrodia camphorata* in submerged culture against CCl<sub>4</sub>-induced hepatic toxicity in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003;51(6): 1571– 577.
21. Huang JS, Chang HC, Li EIC, Huang TM, Su YH, and Wang KC. Enhancement of hepatoprotective efficacy of *Antrodia camphorata* by Chinese tradition medicine. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2006;21(supplement 2): A234.

22. Lin WC, Kuo SC, Lin WL, Fang HL, Wang BC. Filtrate of fermented mycelia from *Antrodia camphorata* reduces liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *World Journal of Gastroenterology*. 2006;12(15): 2369–2374.
23. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005;115(2):209-18.
24. Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000;279(2):G245-9.
25. Gäbele E, Brenner DA, Rippe RA. Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. *Front Biosci*. 2003;8:d69-77.
26. Marra F. Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation. *J Hepatol*. 1999;31(6):1120-30.
27. Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2001;161:III-XIII, 1-151.
28. Higuchi H, Gores GJ. Mechanisms of liver injury: an overview. *Curr Mol Med*. 2003;3(6):483-90.
29. Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology*. 2004;39(2):273-8.
30. Casini A, Ceni E, Salzano R, Biondi P, Parola M, Galli A, Foschi M, Caligiuri A, Pinzani M, Surrenti C. Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide. *Hepatology*. 1997;25(2):361-7.
31. Maher JJ. Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. *Semin Liver Dis*. 2001;21(3):417-26.
32. Naito M, Hasegawa G, Ebe Y, Yamamoto T. Differentiation and function of Kupffer cells. *Med Electron Microsc*. 2004;37(1):16-28.
33. Neuman Re, Logan Ma. The determination of hydroxyproline. *J Biol Chem*. 1950;184(1):299-306.
34. Dr. Emilio Orfei. REVIEW OF PATHOLOGY OF THE LIVER.  
Loyola University of Chicago Stritch School of Medicine  
Department of Pathology
35. Estrela JM, Ortega A, Obrador E. Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2006;43(2):143-81.
36. De Mattia G, Bravi MC, Laurenti O, Cassone-Faldetta M, Armiento A, Ferri C, Balsano F. Influence of reduced glutathione infusion on

- glucose metabolism in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*. 1998;47(8):993-7.
37. Palamara AT, Perno CF, Aquaro S, Buè MC, Dini L, Garaci E. Glutathione inhibits HIV replication by acting at late stages of the virus life cycle. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1996;12(16):1537-41.
  38. Bounous G, Batist G, Gold P. Immunoenhancing property of dietary whey protein in mice: role of glutathione. *Clin Invest Med*. 1989;12(3):154-61.
  39. Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem*. 2000;267(16):4904-11.
  40. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*. 2008 ;88(4):1243-76.
  41. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105:121-6.
  42. Yamada Y, Fausto N. Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride injury in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor. *Am J Pathol*. 1998;152(6):1577-89.
  43. Pérez Tamayo R. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl<sub>4</sub> an adequate model of human cirrhosis? *Hepatology*. 1983;3(1):112-20.
  44. Chen CJ, Su CH, Lan MH. Study on solid cultivation and bioactivity of *Antrodia camphorata*. *Fungal Sciences*. 2010;16:65-72.
  45. Chen CH, Yang SW, Shen YC. New steroid acids from *Antrodia cinnamomea*, a fungal parasite of *Cinnamomum micranthum*. *Journal of Natural Products*. 1995;58(11):1655-1661.
  46. Yeh CT, Rao YK, Yeh CF et al. Cytotoxic triterpenes from *Antrodia camphorata* and their mode of action in HT- 29 human colon cancer cells. *Cancer Letters*. 2009;285(1):73-79.
  47. Geethangili M, Fang SH et al. Inhibitory effect of *Antrodia camphorata* constituents on the *Helicobacter pylori*-associated gastric inflammation. *Food Chemistry*. 2010;119(1):149-153.
  48. Chen JJ, Lin WJ et al. Antiinflammatory benzenoids from *Antrodia camphorata*. *Journal of Natural Products*. 2007;70(6):989-992.
  49. Chen YC, Chen CF et al. Evaluation of the immuno-modulating activity of some active principles isolated from the fruiting bodies of *Antrodia camphorata*. *Chinese Pharmaceutical Journal*. 2003;55(5):313-318.
  50. Shen YC, Wang YH, Chou YC, Chen CF, Lin LC, Chang TT, Tien JH,

- Chou CJ. Evaluation of the anti-inflammatory activity of zhankeic acids isolated from the fruiting bodies of *Antrodia camphorata*. *Planta Medica*. 2004;70(4):310-314.
51. Chen CC, Shiao YJ, Lin RD et al. Neuroprotective diterpenes from the fruiting body of *Antrodia camphorata*. *Journal of Natural Products*. 2006;69(4):689-691.
  52. Huang KF, Huang WM, Chiang HC. Phenyl compounds from *Antrodia cinnamomea*. *Chinese Pharmaceutical Journal*. 2001;53(6):327-331.
  53. Shen CC, Yang HC, Huang RL et al. Anti-HBV principle from the culture broth of *Antrodia camphorata* (strain # CCRC-35396). *The Journal of Chinese Medicine*. 2005;16:57-61.
  54. Chen CC, Chyau CC, Hseu TH. Production of a COX-2 inhibitor, 2,4,5-trimethoxybenzaldehyde, with submerged cultured *Antrodia camphorata*. *Letters in Applied Microbiology*. 2007;44(4):387-392.
  55. Chien SC, Chen ML et al. Anti-inflammatory activities of new succinic and maleic derivatives from the fruiting body of *Antrodia camphorata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008;56(16):7017-7022.
  56. Wang GJ, Tseng HW et al. The vasorelaxation of *Antrodia camphorata* mycelia: involvement of endothelial Ca<sup>2+</sup>-NO-cGMP pathway. *Life Sciences*. 2003;73(21):2769-2783.
  57. Lee IH, Huang RL et al. *Antrodia camphorata* polysaccharides exhibit anti-hepatitis B virus effects. *FEMS Microbiology Letters*. 2002;209(1):63-67.
  58. Schepetkin IA, Quinn MT. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International Immunopharmacology*. 2006;6(3):317-333.
  59. Liu JJ, Huanf TS et al. Antitumor effects of the partially purified polysaccharides from *Antrodia camphorata* and the mechanism of its action. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2004;201(2):186-193.
  60. Cheng JJ, Huanf NK et al. Study for anti-angiogenic activities of polysaccharides isolated from *Antrodia cinnamomea* in endothelial cells. *Life Sciences*. 2005;76(26):3029-3042.
  61. Chen CC, Liu YW, Ker YB et al. Chemical characterization and anti-inflammatory effect of polysaccharides fractionated from submerge-cultured *Antrodia camphorata* mycelia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55(13):5007-5012.



62. Chen YJ, Cheng PC, Lin CN et al. Polysaccharides from *Antrodia camphorata* mycelia extracts possess immunomodulatory activity and inhibits infection of *Schistosoma mansoni*. *International Immunopharmacology*. 2008;8(3):458-467.
63. Tsai MC, Song TY, Shih PH et al. Antioxidant properties of water-soluble polysaccharides from *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. *Food Chemistry*. 2007;104(3):1115-1122.
64. Cheng JJ, Huang NK, Lur HS et al. Characterization and biological functions of sulfated polysaccharides from sulfated-salt treatment of *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochemistry*. 2009;44(4):453-459.
65. Huang RL, Huang Q, Chen CF et al. Anti-viral effects of active compounds from *Antrodia camphorata* on wild-type and lamivudine-resistant mutant HBV. *Chinese Pharmaceutical Journal*. 2003;55(5):371-379.
66. Lee TH, Lee CK, Tsou WL et al. A new cytotoxic agent from solid-state fermented mycelium of *Antrodia camphorate*. *Planta Medica*. 2007;73(13):1412-1415.
67. Chang JM, Lee YR, Hung LM et al. An extract of *Antrodia camphorata* mycelia attenuates the progression of nephritis in systemic lupus erythematosus-prone NZB/W F1 mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011:465894.
68. Liu SY, Kuo MT, Wen WC. Inhibition of hepatitis B virus by cyclohexenone compounds from *Antrodia camphorate*. 2009:US US 7411003.
69. Yang SS, Wang GJ, Wang SY et al. New constituents with iNOS inhibitory activity from mycelium of *Antrodia camphorate*. *Planta Medica*. 2009;75(5):512-516.
70. Lien HM, Lin HW, Wang YJ et al. Inhibition of anchorage-independent proliferation and G0/G1 cell cycle regulation in human colorectal carcinoma cells by 4,7-dimethoxy-5-methyl-1,3-benzodioxole isolated from the fruiting body of *Antrodia camphorate*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011:984027.
71. Chiang CH, Wu DP, Cherng IW et al. A sesquiterpene lactone, phenyl and biphenyl compounds from *Antrodia cinnamomea*. *Phytochemistry*. 1995;39(3):613-616.
72. Shen YC, Yang SW, Lin CS et al. Zhankuic acid F: a new metabolite

- from 14 Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine a formosan fungus *Antrodia cinnamomea*. *Planta Medica*. 1997;63(1):86-88.
73. Cherng IH, Wu DP, Chiang HC. Triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*. *Phytochemistry*. 1996;41(1):263-267.
  74. Chen CH, Yang SW, Shen YC. New steroid acids from *Antrodia cinnamomea*, a fungal parasite of *Cinnamomum micranthum*. *Journal of Natural Products*. 1995;58(11):1655-1661.
  75. Shen CC, Kuo YC, Huang RL et al. New ergostane and lanostane from *Antrodia camphorate*. *The Journal of Chinese Medicine*. 2003;14:247-58.
  76. Male KB, Rao YK, Tzeng YM et al. Probing inhibitory effects of *Antrodia camphorata* isolates using insect cell-based impedance spectroscopy: inhibition vs chemical structure. *Chemical Research in Toxicology*. 2008;21(11):2127-2133.
  77. Cherng IH, Chiang HC, Cheng MC et al. Three new triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*. *Journal of Natural Products*. 1995;58(3):365-371.
  78. Chen CC, Shiao YJ, Lin RD et al. Neuroprotective diterpenes from the fruiting body of *Antrodia camphorate*. *Journal of Natural Products*. 2006;69(4):689-691.
  79. Wu MD, Cheng MJ, Wang BC et al. Chemical constituents from the mycelia of *Antrodia cinnamomea*. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 2007;52(4):1338-1340.
  80. Wu DP, Chiang CH. Constituents of *Antrodia cinnamomea*. *Journal of the Chinese Chemical Society*. 1995;42:797-800.
  81. Hattori M, Sheu CC. Compounds from *Antrodia camphorate* having anti-inflammatory and anti-tumor activity. 2006:US 7109232.
  82. Wu MD, Cheng MJ, Wang BC et al. Maleimide and maleic anhydride derivatives from the mycelia of *Antrodia cinnamomea* and their nitric oxide inhibitory activities in macrophages. *Journal of Natural Products*. 2008;71(7):1258-1261.
  83. Lu MK, Cheng JJ, Lai WL et al. Adenosine as an active component of *Antrodia cinnamomea* that prevents rat PC12 cells from serum deprivation-induced apoptosis through the activation of adenosine A2A receptors. *Life Sciences*. 2006;79(3):252-258.