

# 半枝蓮萃取液對雲芝胞外多醣肽產量、化學特性 及免疫活性之影響

林芳儀<sup>1</sup> 王懿丞<sup>1</sup> 陳南吟<sup>2</sup> 張基郁<sup>1</sup> 徐泰浩<sup>1</sup>

<sup>1</sup>大葉大學生物產業科技學系

51591 彰化縣大村鄉學府路 168 號

<sup>2</sup>中華醫事科技大學餐旅管理系

71703 臺南縣仁德鄉文華一街 89 號

## 摘要

雲芝 (*Coriolus versicolor*, Cv; syn. *Trametes versicolor*) 為傳統中草藥中之一種藥用真菌，其液態發酵培養菌絲體所萃取之胞內多醣肽 PSP (polysaccharopeptide) 與 PSK (polysaccharopeptide krestin) 已被應用為癌症之輔助治療劑。半枝蓮 (*Scutellaria barbata*) 為一多年生中草藥，廣泛分布於南中國及韓國，常被用於抗發炎、利尿與抗腫瘤，尤其是肝癌與肝炎之治療。有關雲芝液態發酵胞外多醣肽 (extracellular polysaccharopeptides, ePSP) 之生產、化學特性與生物活性之研究相當少。本研究比較本土性雲芝品系 LH1 於培養基中添加與未添加微量半枝蓮萃取液對 ePSP 生產、化學特性與免疫調節活性之影響。結果顯示添加半枝蓮萃取液所得之 ePSP-Cv-SBE 與未添加半枝蓮萃取液所得之 ePSP-Cv 在生產、化學特性與免疫調節活性有顯著差異。ePSP-Cv-SBE 多醣體中之不同單糖組成比例與 ePSP-Cv 有顯著差異，ePSP-Cv-SBE 中含 3.89 mg/g 阿拉伯糖 (arabinose)，ePSP-Cv 中則未偵測到。在未添加脂多醣處理下，ePSP-Cv-SBE 誘導巨噬細胞產生 NO 與細胞激素 IL-1 及 IL-6 產量顯著較 ePSP-Cv 為高。

**關鍵詞：**雲芝，半枝蓮，多醣肽，發酵，化學特性，免疫調節

## Effects of *Scutellaria Barbata* Extracts on the Productivity, Chemical Properties and Immunomodulatory Activities of Extracellular Polysaccharopeptides from *Coriolus versicolor* (Yunzhi)

FANG-YI LIN<sup>1</sup>, YI-CHENG WANG<sup>1</sup>, NAN-YIN CHEN<sup>2</sup>, CHI-YUE CHANG<sup>1</sup> and TAI-HAO HSU<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Bioindustry Technology, Da-Yeh University

No. 168, University Rd., Dacun, Changhua, Taiwan 51591, R.O.C.

<sup>2</sup>Department of Restaurant and Hospitality Management, Chung-Hwa University of Medical Technology

No.89, Wenhwa 1st St., Rende, Tainan, Taiwan 71703, R.O.C.

## ABSTRACT

*Coriolus versicolor* (syn. *Trametes versicolor*) is a kind of medicinal fungus used in traditional Chinese herbal remedies. Two substances extracted from the intracellular mycelium by submerged fermentation, polysaccharopeptide (PSP) and polysaccharopeptide Krestin (PSK), are currently being studied as possible complementary cancer treatments. The herb (*Scutellaria barbata*) is a perennial native to southern China and the entire Korean peninsula. In traditional Chinese medicine (TCM), this herb is used as an anti-inflammatory, diuretic, and antitumor agent, especially in liver diseases such as hepatitis and hepatocellular carcinoma. Since little information has previously been reported thereon, the purpose of this study was to compare the production, chemical properties and immuno-regulatory activities of ePSP from *Coriolus versicolor* local-strain LH1 submerged fermentation of the medium with/without the addition of trace amounts of liquid *Scutellaria barbata* extracts (SBE). The results suggest that there are significant differences between ePSP-Cv (without the addition of SBE to the medium) and ePSP-Cv-SBE (with SBE addition). The mycelial biomass, production and productivity of ePSP-Cv-SBE from *Coriolus versicolor* strain LH1 with the addition of SBE to the medium were higher than in the control (without SBE addition). There was a significant difference in the composition percentage of monosaccharide in the polysaccharide of ePSP-Cv-SBE and that in the ePSP-Cv. The arabinose content was 3.89 mg/g in the ePSP-Cv-SBE; however, arabinose could not be detected in the ePSP-Cv. The production of NO, IL-1 $\beta$  and IL-6 from macrophage RAW264.7 induced by the ePSP-Cv-SBE was higher than in the ePSP-Cv without LPS (lipopolysaccharide) treatment.

**Key Words:** *Coriolus versicolor*, *Trametes versicolor*, *Scutellaria barbata*, polysaccharopeptides, fermentation, chemical properties, immuno-regulatory activities

## 一、前言

在輔助與替代醫學中，常使用中草药做為疾病治療之主要或輔助藥物 [29]。傳統中草药中，不少可透過細胞激素之調節具有免疫調節之活性，被視為「草藥免疫調節劑 (herbal immunomodulators)」 [28]。雲芝學名為 *Coriolus versicolor* (syn. *Trametes versicolor*)，為白色菌絲寄生於腐木，是世界廣泛分佈之藥用真菌 [37]，可以菌絲體於深層發酵槽中培養 [7]。日本以 CM-101 品系雲芝所生產之雲芝多醣肽 (*Coriolus versicolor* polysaccharopeptides, Cv-PSPs) 被稱為 PSK (polysaccharopeptide krestin)；中國大陸以 Cov-1 品系雲芝所生產之雲芝多醣肽被稱為 PSP (polysaccharopeptides) [7, 15, 21]。中國大陸利用雲芝菌生產之醣肽 PSP 於體外、體內及臨床實驗上均具有抗癌活性 [13]。雲芝醣肽抗癌活性主要經由免疫調節及生物反應修飾之作用，PSP 明顯增加 IL-1 $\beta$  及 IL-6 之分泌量，且影響人類 HL-60 淋巴瘤細胞 [12]。在動物實驗中，經餵食 PSP 之老鼠會增加巨噬細胞活性氮中間體、含氧陰離子及 TNFs [19]。雲芝多醣肽可活化巨噬細胞，增加分泌細胞激素如

TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  及 IL-1 $\beta$  等，產生抗增生及引起細胞凋亡 [7, 23]。我們最近研究發現雲芝 *Coriolus versicolor* LH1 品系之胞外多醣肽中含葡萄糖、半乳糖、甘露糖及木糖，蛋白質含量 13.8% [17]，而雲芝 ATCC 200801 品系發酵液之胞外多醣肽除葡萄糖、半乳糖、甘露糖及木糖外，還含有阿拉伯糖，其蛋白質含量僅含 2-3% [26]。

半枝蓮 (*Scutellaria barbata* D. Don) 為一種多年生中草药，廣泛分佈於南中國及韓國，常被用於抗發炎、利尿與抗腫瘤，尤其是肝癌、肝炎及肝硬化之治療 [33]，最近從半枝蓮萃取物中分離出類黃酮 (flavonoids) 及二萜類 (diterpenoids) 的新克羅烷 (neoclerodane)、三萜酸 (triterpenic acid) 及谷甾醇葡萄糖甙 (phytosteryl- $\beta$ -D-glucoside) 等具有生物活性 [35, 11, 14, 41, 40]。Dai 等人 [9] 在小鼠肝癌 H22 細胞上也發現半枝蓮萃取物可抑制癌細胞增生，且可做為化學治療的輔助劑。半枝蓮萃取物中所得多醣體為重要生物活性成分，在動物試驗中明顯具抗氧化活性 [1] 及免疫調節功能 [4]。

真菌以深層培養菌絲體時其生長受發酵環境之影響，特

別是培養基成分 [33]。不同雲芝菌株品系 Wr-74 和 ATCC-20545 利用乳清添加於培養基中，也影響其菌絲體及胞外多醣肽之產量 [8]。這些產物之化學組成特性會受到培養基成分之影響，王峰等人 [2] 添加 9 種不同中藥對雞腿麴發酵的影響中其中藥成分影響其菌絲體之生成量，最近我們發現利用添加枸杞萃取液於培養基中培養雲芝 *Coriolus versicolor* LH1，產生由不同單醣組成之胞外多醣肽，其胞外多醣肽會刺激 RAW264.7 巨噬細胞產生不同量之一氧化氮及細胞激素 [17]。

為進一步探討是否其他中藥材萃取物亦有類似之功效，我們選擇半枝蓮萃取液添加於培養基中，分析其菌絲體、胞外多醣肽產量及其化學特性與免疫調節活性。

## 二、材料及方法

### (一) 材料

#### 1. 菌種

*Coriolus versicolor* LH1 (簡稱 Cv) 採自台灣南投縣，寄存於食品工業發展研究所生物資源保存中心。

### (二) 方法

#### 1. 種菌製備

將 Cv 接種於平板 PDA 活化後，再以培養基 (4.0% glucose, 0.3% peptone, 0.15%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  及 0.15%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 於 150 rpm 轉速震盪培養箱 (25°C) 培養 5 天。

#### 2. 半枝蓮中藥萃取液及其多醣肽之製備

半枝蓮 (*Scutellaria barbata*) 購買於員林中藥店，取乾燥半枝蓮 100 g 加入 1L RO 水，經 2 小時煮沸後，上清液以減壓濃縮達到體積為 100 mL，所得為半枝蓮萃取液 (*Salvia barbata* extract, SBE)，SBE 加入四倍量的 95% 酒精，24 小時澱析後再經 3,783 xg、30 分鐘離心，所得沉澱物為半枝蓮多醣肽 (polysaccharopeptide-*Scutellaria barbata*, PSP-SB)。

#### 3. 發酵槽深層培養及雲芝胞外多醣肽製備

將種菌於前述培養基中添加 0.5% (v/v) SBE 培養，以無添加 0.5% (v/v) SBE 為對照組。20 L 發酵槽控制條件：攪拌速率 150 rpm、通氣量 1vvm、溫度 25°C，培養基起始 pH 5.0。前述實驗經三次重複後，發酵液以 3783 xg、30 分鐘離心，上清液加入四倍量的 95% 酒精量後靜置於 4°C 冰箱中 24 小時澱析，再經離心及冷凍乾燥，所得沉澱物為雲芝胞外多醣肽 (extracellular polysaccharopeptides,

ePSP-Cv)。前述培養基中添加半枝蓮萃取液所得之雲芝胞外多醣肽以 ePSP-Cv-SBE (extracellular polysaccharopeptides *Scutellaria barbata* extract) 命名，未加半枝蓮萃取液所得之雲芝胞外多醣肽以 ePSP-Cv 命名。酒精沉澱物中多醣體含量以酚硫酸法定量 [10]。

#### 4. 細胞培養分析用多醣肽樣品製備

將冷凍乾燥 ePSP-Cv、ePSP-Cv-SBE 及 PSP-SB 分別 10 mg 溶於 1 mL 細胞培養基 DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's Basal medium) 中，加入 100 units/mL 青黴素及 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  鏈黴素，經震盪離心後取上清液再以 0.22  $\mu\text{m}$  濾膜過濾，而沉澱物經冷凍乾燥後秤其重量，換算溶於 DMEM 中之重量在加以稀釋至使用之濃度。

#### 5. 多醣肽化學特性分析

(1) 粗蛋白分析：粗蛋白以 AOAC (1995) [5] 方法分析。

(2) 中性單糖含量分析：多醣肽中性單糖 (葡萄糖、半乳糖、甘露糖、木糖及阿拉伯糖) 含量之測定，取 0.5g 不同樣本的多醣肽粉末加入 5 mL 2M 三氟醋酸 (trifluoroacetic acid, TFA)，於 100°C 水浴中密閉條件下進行反應 16 小時，經減壓濃縮，水解液經 80°C 烘烤乾後，加入 5 mL 去離子水溶解再以 1N NaOH 滴定至中性，再以 0.45  $\mu\text{m}$  過濾膜過濾之，以 HPLC (JascoPU-2080 Plus) 分析單醣成分。使用分析管柱為 SUGAR SP0810 (Shodex, 8 mm×300 mm)，流速為 0.8 mL/min，移動相為去離子水。

(3) FTIR 圖譜分析：以傅氏紅外線光譜儀 (Fourier transform infrared, FTIR) 分析其圖譜，將樣品與 KBr 粉末於真空烘箱乾燥 24 小時，混合均勻 (1:100) 後以 FTIR 分析，其波數範圍由 500-4000  $\text{cm}^{-1}$ ，解析度設定 2  $\text{cm}^{-1}$  之圖譜，每一次測定掃描 32 次。

#### 6. 細胞培養及多醣肽添加

老鼠巨噬細胞 RAW264.7 (ATCC TIB-71) 購自食品工業研究所生物資源保存中心。於 DMEM 培養基中添加 10% 胎牛血清及 100 units/mL 青黴素及 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  鏈黴素，細胞培養於 5%  $\text{CO}_2$ 、37°C 恆溫培養箱中。24 孔細胞培養皿中加入 0.5 mL 細胞液 ( $2 \times 10^5$  cells/mL)，培養 24 小時後控制組分別加入 0.25 mL 濃度為 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 ePSP-Cv、ePSP-Cv-SBE 及 PSP-SB 再加入 0.25 mL DMEM，總體積為 1 mL。LPS (lipopolysaccharides) 控制組除加入 ePSP-Cv、ePSP-Cv-SBE 及 PSP-SB 0.25 mL 外再加入 0.25 mL 之 LPS

(20 µg/mL)，總體積為 1 mL。

#### 7. 多醣肽對巨噬細胞之影響

老鼠巨噬細胞 RAW264.7 以 MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2, 5-diphenyl-tetrazdium bromide) 存活率測試法，將細胞種於 96 孔培養盤中使每孔細胞濃度為  $1 \times 10^4$  cells/100L/孔，MTT 測試法測量存活細胞粒線體中去氫酵素 (dehydrogenase) 活性間接測定細胞活性。將細胞添加入 62.5 µg/mL 濃度之 ePSP-Cv、ePSP-Cv-SBE 及 PSP-SB，經 48 小時培養後加入 30 µL MTT。於培養 2 小時後去除上清液再加入 DMSO (dimethyl sulfoxide)，以 ELISA 分析儀 (Bio-Tek, µQuant™) 測其 570 nm 之吸光值，以未加多醣體之 O.D. 值為對照組，每實驗三重複。

#### 8. NO 檢測

將細胞接種於 96 孔培養盤中使每孔細胞濃度為  $1 \times 10^4$  個細胞。每孔中分別加入多醣肽樣品及 LPS，於 48 小時後取細胞上清液加入 96 孔，再加入等量的 Greiss 試劑 (1% sulfanilamide/ 0.1% NED(N-(1-naphthyl)-ethylenediamine) /5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)，於室溫作用 15 分鐘。以 ELISA 分析儀 (Bio-Tek, µQuant™) 於 OD<sub>540</sub> nm 測量其吸光值，以硝酸鈉 (sodium nitrite) 製作標準曲線來對照定量，每實驗三重複。

#### 9. 細胞激素分泌的測定

將細胞接種於 24 孔培養盤中使每孔細胞濃度為  $1 \times 10^5$  個細胞。每孔中分別加入多醣肽樣品及 LPS，並以培養基調整使每孔的其最終體積達到 1 mL。放入細胞培養箱 (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) 中培養 48 小時，收集細胞上清液，冷凍於 -80°C 並進行後續細胞激素分泌的測定分析。

以商業化細胞激素 ELISA 套組測定培養上清液的細胞激素濃度。採用 mouse IL-1β (e-Bioscience)、mouse IL-6 (e-Bioscience)、mouse TNF-α (e-Bioscience) 商業化套組來定量，每實驗三重複。

#### 10. 統計分析

實驗數據以 Statistical Analysis System 6.0 軟體進行分析，以 ANOVA 進行作變異分析，並以 Duncan's multiple range test 做平均值顯著性差異 ( $p < 0.05$ ) 之比較。

### 三、結果與討論

#### (一) 添加半枝蓮萃取液於雲芝培養基中對菌絲體、胞外多醣肽 (ePSP) 及生產力之影響

培養基添加物對雲芝菌絲體生質量、胞外多醣肽產量及生產力之影響如表 1 所示，結果顯示 ePSP-Cv-SBE 產量、生產力及菌絲體生質量高於未添加半枝蓮萃取液之 ePSP-Cv，但小於添加枸杞萃取液之 ePSP-Cv-LBE。Tavares 等人 [30] 研究以雲芝品系 INETI 培養於含有酵母麥芽抽出物 (yeast malt extract) 之培養基中可產生 3.8 g/L 菌絲及 0.70 g/L ePSP，其 ePSP 產量較本研究為低。最近 Cui 等人 [8] 利用雲芝品系 Wr-74 及 ATCC-20545 添加乳清於培養基中，分別得到 8.9 g/L 與 10.6 g/L 菌絲體及其 ePSP 產量分別為 1.15 和 1.32 g/L，亦較本研究中 ePSP-Cv-SBE 為低。

利用 AOAC [5] 方法檢測半枝蓮萃取物之一般化學組成，其碳水化合物佔 38.10%、粗蛋白佔 16.27%、粗脂肪佔 6.75%、灰分佔 10.71% 及粗纖維佔 28.17%，顯示碳水化合物為其主要化學組成。半枝蓮中含有黃芩素苷 (scutellarin)、芹菜素 (apigenin)、木犀草素 (luteolin)、E-1-(4V-hydroxyphenyl)-but-1-en-3-one [5]、原兒茶酸 (protocatechuic acid)、acacetin-7-diglucuronide 及 luteolin-7-diglucuronide [34] 及其他黃酮類化合物等 [3]。微生物培養基之成分在菌體生長及代謝物分泌過程扮演了重要角色，半枝蓮萃取液之添加有益於菌絲生質量及 ePSP 生產可能與其所含成分有關，主要促成產量增加之關鍵物質仍有待進一步探討。

表 1. 培養基添加物對雲芝菌絲體生質量、胞外多醣肽產量及生產力之影響

胞外多醣肽	培養基添加物	菌絲體生質量 (g/L)	胞外多醣肽產量 (g/L)	生產力 <sup>*1</sup>	引用文獻
ePSP-Cv <sup>*2</sup>	無	2.38	0.61	0.26	本研究
ePSP-Cv-SBE <sup>*3</sup>	0.5% 半枝蓮萃取液	3.70	1.37	0.38	本研究
ePSP-Cv-LBE <sup>*4</sup>	0.5% 枸杞萃取液	3.71	1.66	0.45	Lin et al., 2008

註：\*1 生產力：胞外多醣肽/生質量；

\*2 無添加中藥萃取液所得之雲芝胞外多醣肽；

\*3 添加半枝蓮萃取液所得之雲芝胞外多醣肽；

\*4 添加枸杞萃取液所得之雲芝多胞外多醣肽。

## (二) 雲芝胞外多醣肽及半枝蓮多醣肽之特徵

### 1. 蛋白質含量

雲芝培養基中有無添加半枝蓮、枸杞萃取液所得之胞外多醣肽及半枝蓮多醣肽之蛋白質含量比較如表 2 所示。ePSP-Cv-SBE 蛋白質含量 15.6% 與 ePSP-Cv 蛋白質含量 13.8% 相近。一般雲芝 PSP 之蛋白質含量大約為 15% [39]，而日本所產之 PSK 雲芝胞內多醣肽含量約 28-35% [31]。我們過去發現 ePSP-Cv-LBE 中蛋白質含量較 ePSP-Cv 增加 1.7 倍 [17]。而生物活性增加與雲芝多醣肽中之蛋白質含量可能有相關性 [16]。

### 2. 單醣組成

雲芝培養基中有無添加半枝蓮、枸杞萃取液所得之胞外多醣肽及半枝蓮、枸杞多醣肽之單醣組成比較如表 3 所示，比較 ePSP-Cv-SBE 與 ePSP-Cv 之單醣組成發現，ePSP-Cv-SBE 中葡萄糖含量 60.64 mg/g 顯著低於 ePSP-Cv 之 82.27 mg/g 及 ePSP-Cv-LBE 之 80.06 mg/g；ePSP-Cv-SBE

中半乳糖含量 21.38 mg/g 則顯著高於 ePSP-Cv 之 8.67 mg/g 及 ePSP-Cv-LBE 之 9.29 mg/g；ePSP-Cv-SBE 中甘露糖含量為 6.66 mg/g 亦低於 ePSP-Cv 之 8.18 mg/g；ePSP-Cv-SBE 中木糖含量為 7.43 mg/g 則顯著高於 ePSP-Cv 之 0.87 mg/g；ePSP-Cv-SBE 中阿拉伯糖含量佔 3.89 mg/g，其他雲芝胞外多醣肽中則未偵測到。比較 ePSP-Cv-SBE 與 ePSP-Cv-LBE 之單醣組成，ePSP-Cv-SBE 之半乳糖及甘露糖高於 ePSP-Cv-LBE；ePSP-Cv-SBE 之葡萄糖低於 ePSP-Cv-LBE 及 ePSP-Cv，然 ePSP-Cv-LBE 及 ePSP-Cv 亦未偵測到阿拉伯糖。Tavares 等 [30] 利用兩種不同培養基（菇完全培養基及酵母麥芽萃取液）培養雲芝菌發現其醣肽中葡萄糖含量可達 95%。由 ePSP-Cv-SBE 所分析出之單醣組成異於 PSP-SB，PSP-SB 中其單醣比例葡萄糖佔 10.78 mg/g、半乳糖佔 71.00 mg/g、甘露糖佔 15.45 mg/g，與 ePSP-Cv-SBE 中葡萄糖佔 60.64 mg/g、半乳糖佔 21.38 mg/g、甘露糖佔 6.66 mg/g、木糖佔 7.43 mg/g 及阿拉伯糖佔 3.89 mg/g 有顯著不同，顯示微量半枝蓮萃取液可使 ePSP-Cv 中單醣組成比例產生變化。

### 3. FTIR 圖譜分析

利用 FTIR 分析 ePSP-Cv 和 ePSP-Cv-SBE 發現在 3419、1641 及 1078  $\text{cm}^{-1}$  位置有明顯之吸收波峰（如圖 1），Ng 及 Chan [24] 提雲芝 PSP 的 FTIR 圖譜中有一波峰在 1078  $\text{cm}^{-1}$  位置，Yang 及 Zhou [39] 指出雲芝 PSP 的 FTIR 圖譜中在 3400、1650、1050 及 893  $\text{cm}^{-1}$  各代表-OH、-NH<sub>2</sub>、C-O-C 及  $\beta$ -glycosidic 等官能基鍵結。在 930、1038、1078 及 1161  $\text{cm}^{-1}$  位置亦表現出有  $\beta$ -glycosidic 等官能基鍵結 [27]。

表 2. 雲芝培養基中有無添加半枝蓮萃取液所得之胞外多醣肽及半枝蓮多醣肽蛋白質含量比較

多醣肽	蛋白質含量 (%)	引用文獻
ePSP-Cv <sup>*1</sup>	13.8 ± 0.3	Lin 等人 [17]
ePSP-Cv-SBE <sup>*2</sup>	15.6 ± 0.3	本研究
ePSP-Cv-LBE <sup>*3</sup>	22.6 ± 1.5	Lin 等人 [17]
PSP-SB <sup>*4</sup>	19.0 ± 0.7	本研究

註：\*1 無添加中藥萃取液所得之雲芝胞外多醣肽；

\*2 添加半枝蓮萃取液所得之雲芝胞外多醣肽；

\*3 添加枸杞萃取液所得之雲芝胞外多醣肽；

\*4 半枝蓮多醣肽。

表 3. 雲芝培養基中有無添加半枝蓮萃取液所得之胞外多醣肽及半枝蓮多醣肽單醣組成比較

多醣肽	單醣組成 (mg/g ratio)					引用文獻
	葡萄糖	半乳糖	甘露糖	木糖	阿拉伯糖	
ePSP-Cv <sup>*1</sup>	82.27	8.67	8.18	0.87	n.d. <sup>*2</sup>	本研究
ePSP-Cv-SBE <sup>*3</sup>	60.64	21.38	6.66	7.43	3.89	本研究
ePSP-Cv-LBE <sup>*4</sup>	80.06	9.29	1.92	8.73	n.d.	Lin 等人 [17]
PSP-SB <sup>*5</sup>	10.78	71.00	15.45	n.d.	n.d.	本研究
PSP-LB <sup>*6</sup>	49.21	17.06	n.d.	1.33	32.40	Lin 等人 [17]

註：\*1 無添加中藥萃取液所得之雲芝胞外多醣肽；

\*2 n.d.未偵測到；

\*3 添加半枝蓮萃取液所得之雲芝胞外多醣肽；

\*4 添加枸杞萃取液所得之雲芝胞外多醣肽；

\*5 半枝蓮多醣肽；

\*6 枸杞多醣肽。

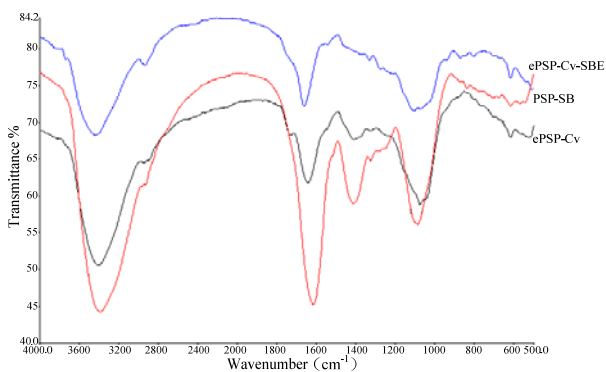


圖 1. 雲芝培養基中有無添加半枝蓮萃取液所得之雲芝胞外多醣肽及半枝蓮多醣肽之 FTIR 圖譜分析

本實驗中三種多醣肽之吸收波峰中雖無 893  $\text{cm}^{-1}$  位置，但有 1078  $\text{cm}^{-1}$  位置可說明具有  $\beta(1\rightarrow3)$  glycosidic 官能基之鍵結。Yang 及 Zhang [38] 報告中指出 905-876  $\text{cm}^{-1}$  位置中有  $\beta$ -D-glucose 之吸收波峰，在 1100-1010  $\text{cm}^{-1}$  範圍 pyranoside 有三個強烈吸收峰，furanoside 有二個吸收峰，本研究於 1100-1010  $\text{cm}^{-1}$  範圍亦顯示有明顯吸收峰出現。Mata 等人 [20] 分析甜菜實驗以 FTIR 之資料亦說明 1146  $\text{cm}^{-1}$  位置上有 glycosidic 鍵結存在。Rau 等人 [26] 研究報導中指出 *C. versicolor* ATCC 200801 之胞外多醣肽中含有以  $(1\rightarrow3)$  為主鏈連結葡萄糖，而在  $\text{C}_6$  側鏈以  $\beta(1\rightarrow6)$  連結另一葡萄糖，說明胞外多醣肽同樣具有生物活性之  $\beta(1\rightarrow3)$  鍵結之結構。

由以上實驗顯示雲芝 LH1 培養基中添加半枝蓮萃取液使得胞外多醣肽產量增加，也使其化學組成蛋白質含量及單醣組成成分改變，而這三種多醣肽 PSP-SB、ePSP-Cv 和 ePSP-Cv-SBE 均具有  $\beta(1\rightarrow3)$  葡聚糖之生物活性結構。

(三) ePSP-Cv、ePSP-Cv-SBE 及 PSP-SB 對免疫調節活性之影響

1. 對巨噬細胞 RAW264.7 細胞存活之影響

如圖 2 所示，巨噬細胞 RAW264.7 添加入 62.5  $\mu\text{g/mL}$  的 ePSP-Cv、ePSP-Cv-SBE 和 PSP-SB，經 48 小時培養後相對細胞生長率為  $101.3 \pm 14.0$ 、 $130.3 \pm 11.9$  及  $120.6 \pm 17.0\%$ ，經統計分析 ( $p < 0.05$ , Duncan's multiple range test) 為 a，顯示此三種萃取物對巨噬細胞存活沒有顯著影響。

2. 對巨噬細胞 RAW264.7 誘導 NO 之影響

有無添加半枝蓮萃取液於培養基中所產生雲芝胞外多醣肽及半枝蓮多醣肽於有無添加脂多醣對巨噬細胞

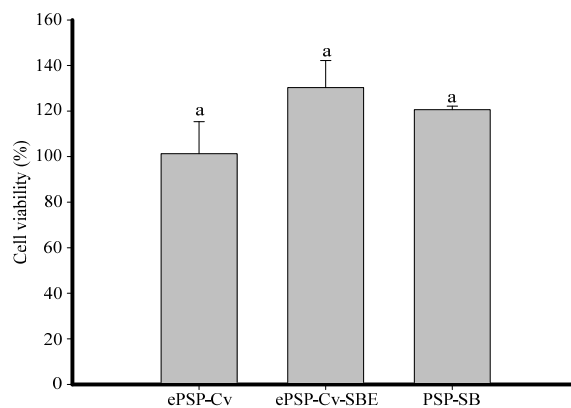


圖 2. ePSP-Cv、ePSP-Cv-SBE 及 PSP-SB 對巨噬細胞增生之影響

RAW264.7 產生 NO 之影響如圖 3 所示，圖柱上方英文字母表示 (A-C or a-c) 為統計分析顯著性差異 ( $p < 0.05$ )。在無添加 LPS 時，ePSP-Cv 與對照組無顯著差異，而添加 ePSP-Cv-SBE 及 PSP-SB 之 NO 生成量顯著增加。添加 LPS 組中，添加 ePSP-Cv 及 ePSP-Cv-SBE 與對照組間並無明顯差異，但添加 PSP-SB 卻有較少 NO 的產量。Wasser [36] 在研究中指出真菌含有  $\beta(1\rightarrow3)$  葡聚糖多醣體可活化巨噬細胞產生 NO，其在許多免疫反應中為重要化學傳遞物質。雲芝多醣肽藥物於體外及體內實驗中亦能增加 NO 量，Pang [25] 利用老鼠腹腔巨噬細胞經添加 LPS 及 PSK 多醣肽後，發現比只添加 LPS 產生更高之 NO 產量。而另一研究經 LPS 處理後 C57BL/6 老鼠也會誘導 NO 產生，餵食來自 *C. versicolor* (Cov-1) 菌株所產之胞外及胞內多醣肽會被刺激產生更高劑量之 NO [30]。本研究中值得注意的是，

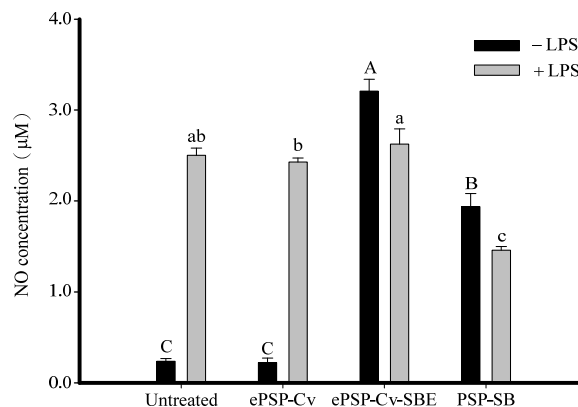


圖 3. ePSP-Cv、ePSP-Cv-SBE 及 PSP-SB 於有無添加 LPS 對巨噬細胞產生 NO 之影響

ePSP-Cv-SBE 可使巨噬細胞產生 NO 產量高達 3.20 M，比無添加任何樣品對照組 0.24 M 及共添加 LPS 及樣品之平均值 2.59 M 為高。

### 3. 對巨噬細胞 RAW264.7 產生細胞激素 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 及 IL-6 產量之影響

有無添加半枝蓮萃取液於培養基中所產生雲芝胞外多醣肽及半枝蓮多醣肽於有無添加脂多醣對巨噬細胞 RAW264.7 產生細胞激素 TNF- $\alpha$  之影響與對照組比較如圖 4 所示，圖柱上方英文字母表示 (A-B or a) 為統計分析顯著性差異 ( $p < 0.05$ ) 顯示這三種多醣肽均能刺激巨噬細胞產生 4-5 倍之 TNF- $\alpha$  劑量，若添加 LPS，ePSP-Cv、ePSP-Cv-SBE 和 PSP-SB 及與對照組無明顯差異。

有無添加半枝蓮萃取液於培養基中所產生雲芝胞外多醣肽及半枝蓮多醣肽於有無添加脂多醣對巨噬細胞 RAW264.7 產生細胞激素 IL-1 $\beta$  產量之影響如圖 5 所示，圖柱上方英文字母表示 (A-B or a-d) 為統計分析顯著性差異 ( $p < 0.05$ ) 結果顯示不論是否加入 LPS，ePSP-Cv-SBE 誘導巨噬細胞生成細胞激素 IL-1 $\beta$  為最高，其次為 PSP-SB。ePSP-Cv-SBE 誘導巨噬細胞生成細胞激素 IL-1 $\beta$  遠高於 ePSP-Cv。

有無添加半枝蓮萃取液於培養基中所產生雲芝胞外多醣肽及半枝蓮多醣肽於有無添加脂多醣對巨噬細胞 RAW264.7 產生細胞激素 IL-6 產量之影響如圖 6 所示，圖柱上方英文字母表示 (A-C or a-c) 為統計分析顯著性差異 ( $p < 0.05$ )，結果顯示巨噬細胞 RAW264.7 添加 ePSP-Cv-SBE 和 PSP-SB，明顯增加 IL-6 產量，與對照組比較增加 19.5

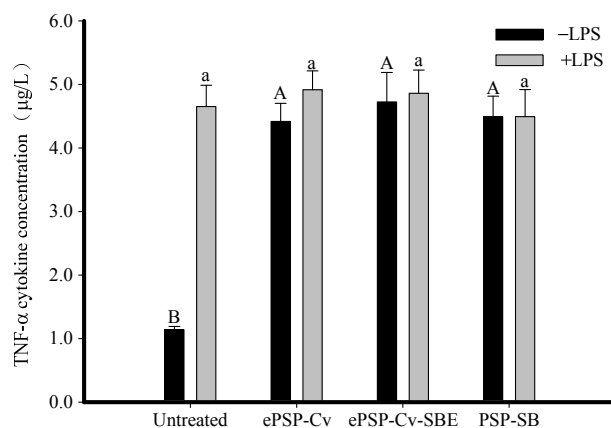


圖 4. ePSP-Cv, ePSP-Cv-SBE 及 PSP-SB 於有無添加 LPS 對巨噬細胞產生 TNF- $\alpha$  之影響

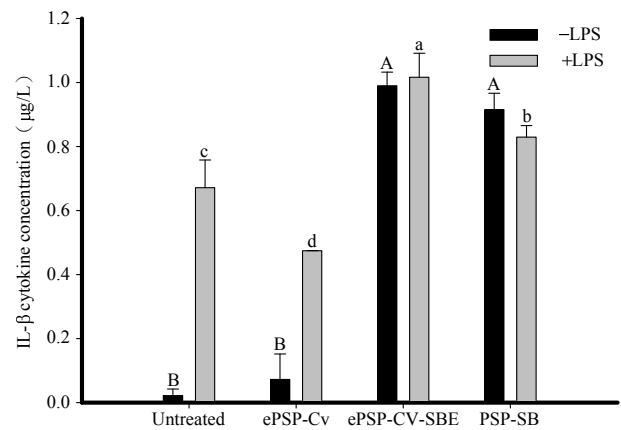


圖 5. ePSP-Cv, ePSP-Cv-SBE 及 PSP-SB 於有無添加 LPS 對巨噬細胞產生 IL-1 $\beta$  之影響

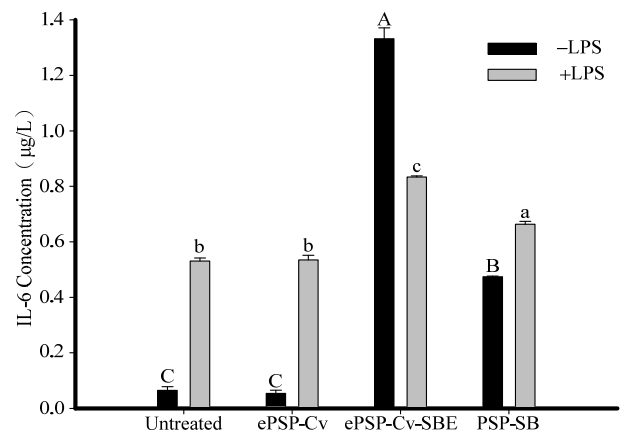


圖 6. ePSP-Cv, ePSP-Cv-SBE 及 PSP-SB 於有無添加 LPS 對巨噬細胞產生 IL-6 影響

及 7.0 倍。

PSP 於體外研究模式以巨噬細胞或其他白血球促進白細胞介素能力之探討廣泛使用於免疫調節活性上 [21]。在本研究中 ePSP-Cv-SBE 可使巨噬細胞增加 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 IL-6 細胞激素之分泌量。TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  對癌細胞有毒殺之效果及活化 T 淋巴細胞之作用 [18, 22]。Müller 及 Meineke [22] 指出細胞激素相互間關係，TNF- $\alpha$  及 IL-1 會誘導 IL-6 合成，而 IL-6 又會抑制 TNF- $\alpha$  及 IL-1，此三種細胞激素在免疫調節上扮演重要角色。Cui 等人 [8] 利用乳清作為雲芝培養基之添加物所得到之胞外及胞內多醣亦有類似的免疫調節活性。我們過去添加枸杞萃取液於雲芝培養基中所得之多醣肽也可增加 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$  之活性 [17]，顯示 PSPs 誘導巨噬細胞所產生免疫活性與其不同之化學組成可

能有密切關係，亦即其組成成分之差異會造成對 RAW264.7 細胞產生不同分泌量之激素。

#### 四、結論

本研究以半枝蓮萃取液添加於雲芝發酵培養基中，發現可以增加雲芝菌絲體及胞外多醣產量。發酵培養液中未添加半枝蓮萃取液所產生之雲芝胞外多醣與添加半枝蓮萃取液所產生之雲芝胞外多醣在其單醣組成比例上有顯著差異。ePSP-Cv-SBE 之葡萄糖及甘露糖比例較 ePSP-Cv 低，半乳糖及木糖所佔比例顯著較 ePSP-Cv 高，且 ePSP-Cv 中未偵測到阿拉伯糖，ePSP-Cv-SBE 中含有 3.89 mg/g 阿拉伯糖。於 FTIR 圖譜分析中，ePSP-Cv 及 ePSP-Cv-SBE 有差異性。對於老鼠巨噬細胞 RAW264.7 之細胞誘導 NO 與細胞激素 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$  生成，未添加 LPS 時 ePSP-Cv-SBE 較 ePSP-Cv 高，顯著可提高 NO 生成、IL-1 $\beta$  及 IL-6 之分泌，顯示 ePSP-Cv-SBE 對老鼠巨噬細胞 RAW264.7 具有免疫調節生物活性。

#### 參考文獻

1. 王志遠、戴玲、張凱 (民 97)，半枝蓮多醣的提取純化及抗氧化活性研究，中國生化藥物雜誌，29(2)，96-103。
2. 王峰、丁重陽、王玉紅、章克昌 (民 94)，九味中藥對雞腿蘑深層發酵的影響，食品科學，26(1)，144-146。
3. 仲浩、薛曉霞、姚慶強 (民 97)，半枝蓮化學成分的研究，中草藥，3(1)，21-23。
4. 林敬明、劉煌、羅榮城 (民 95)，半枝蓮的化學成分及其抗腫瘤作用的研究現狀，中藥材，29(4)，407-410。
5. Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1995) *Official Methods of Analysis*, 16th Ed., AOAC, Arlington, VA.
6. Cha, Y. Y., E. O. Lee, H. J. Lee, Y. D. Park, S. G. Ko, D. H. Kim, H. M. Kim, I. C. Kang and S. H. Kim (2004) Methylene chloride fraction of *Scutellaria barbata* induces apoptosis in human U937 leukemia cells via the mitochondrial signaling pathway. *Clinica Chimica Acta*, 348(1-2), 41-48.
7. Cui, J. and Y. Chisti (2003) Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses and production. *Biotechnology Advances*, 21(2), 109-122.
8. Cui, J., K. K. Goh, R. Archer and H. Singh (2007) Characterisation and bioactivity of protein-bound polysaccharides from submerged-culture fermentation of *Coriolus versicolor* Wr-74 and ATCC-20545 strains. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34(5), 393-402.
9. Dai, Z., X. Liu, Z. Ji, L. Liu, H. Kang, X. Wang and Y. Diao (2008) The effect-enhancing and toxicity-reducing action of the extract of *Herba Scutellariae barbatae* for chemotherapy in hepatoma H22 tumor-bearing mice. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 28(3), 205-210.
10. Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.
11. Ducki, S., J. A. Hadfield, N. J. Lawrence, C. Y. Liu, A. T. McGown and X. Zhang (1996) Isolation of E-1-(4-hydroxyphenyl)-but-1-en-3-one from *Scutellaria barbata*. *Planta Medica*, 62(2), 185-186.
12. Hsieh, T. C., J. Kunicki, Z. Darzynkiewicz and J. M. Wu (2002) Effects of extracts of *Coriolus versicolor* (I'm-Yunity) on cell-cycle progression and expression of interleukins-1 beta-6 and -8 in promyelocytic HL-60 leukemic cells and mitogenically stimulated and nonstimulated human lymphocytes. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 8(5), 591-602.
13. Hsieh, T. C., P. Wu, S. Park and J. M. Wu (2006) Induction of cell cycle changes and modulation of apoptogenic/anti-apoptotic and extracellular signaling regulatory protein expression by water extracts of I'm-Yunity<sup>TM</sup> (PSP). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6, 30.
14. Kizu, H., Y. Imoto, T. Tomimori, T. Kikuchi, S. Kadota and K. Tsubono (1997) Studies on the constituents of *Scutellaria* species. XVII. Structures of neo-clerodane-type diterpenoids from the whole herb of *Scutellaria rivularis* Wall. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 45(1), 152-160.
15. Kobayashi, H., K. Matsunaga and M. Fujii (1993) PSK as a chemopreventive agent. *Cancer Epidemiology, Biomarkers Prevention*, 2(3), 271-276.
16. Lee, C. L., X. Yang and M. F. Wan (2006) The culture duration affects the immunomodulatory and anticancer effect of polysaccharopeptide derived from *Coriolus*



- versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(1-2), 14-21.
17. Lin, F. Y., Y. K. Lai, H. C. Yu, N. Y. Chen, C. Y. Chang, H. C. Lo and T. H. Hsu (2008) Effects of *Lycium barbarum* extract on production and immunomodulatory activity of the extracellular polysaccharopeptides from submerged fermentation culture of *Coriolus versicolor*. *Food Chemistry*, 110(2), 446-453.
  18. Liu, F., M. C. Fung, V. E. C. Ooi and S. T. Chang (1996) Induction in the mouse of gene expression of immunomodulating cytokines by mushroom polysaccharide-protein complexes. *Life Sciences*, 58(21), 1795-1803.
  19. Liu, W. K., T. B. Ng, S. F. Sze and K. W. Tsui (1993) Activation of peritoneal macrophages by polysaccharopeptide from the mushroom, *Coriolus versicolor*. *Immunopharmacology*, 26(2), 139-146.
  20. Mata, Y. N., M. L. Blazquez, A. Ballester, F. Gonzalez and J. A. Munoz (2009) Sugar-beet pulp pectin gels as biosorbent for heavy metals: Preparation and determination of biosorption and desorption characteristics. *Chemical Engineering Journal*, 150(2-3), 289-301.
  21. Moradali, M. F., H. Mostafavi, S. Ghods and G. A. Hedjaroude (2007) Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). *International Immunopharmacology*, 7(6), 701-724.
  22. Müller, K. and V. Meineke (2007) Radiation-induced alterations in cytokine production by skin cells. *Experimental Hematology*, 35(4), 96-104.
  23. Ng, T. B. (1998) A review of research on the protein-bound polysaccharide (polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes: Polyporaceae). *General Pharmacology*, 30(1), 1-4.
  24. Ng, T. B. and W. Y. Chan (1997) Polysaccharopeptide from the mushroom *Coriolus versicolor* possesses analgesic activity but does not produce adverse effects on female reproductive or embryonic development in mice. *General Pharmacology*, 29(2), 269-273.
  25. Pang, Z. J., M. Zhou, Y. Chen and J. Wan (1998) A protein-bound polysaccharide synergistic with lipopolysaccharide induces nitric oxide release and antioxidant enzyme activities in peritoneal macrophages. *American Journal of Chinese Medicine*, 26(2), 133-141.
  26. Rau, U., A. Kuenz, V. Wray, M. Nimtz, J. Wrenger and H. Cicek (2009) Production and structural analysis of the polysaccharide secreted by *Trametes (Coriolus) versicolor* ATCC 200801. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(5), 827-837.
  27. Sandula, J., G. Kogan, M. Kacurakova and E. Machova (1999) Microbial (1→3)-β-D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. *Carbohydrate Polymers*, 38(3), 247-253.
  28. Spelman, K., J. J. Burns, D. Nichols, N. Winters, S. Ottersberg and M. Tenborg (2006) Modulation of cytokine expression by traditional medicines: A review of herbal immunomodulators. *Alternative Medicine Review*, 11(2), 128-150.
  29. Spencer, J. W. (1999) Essential issues in complementary/alternative medicine. In: J. W. Spencer and J. J. Jacobs (Eds.), *Complementary/Alternative Medicine* (pp. 3-36). An Evidence-based Approach. Mosby Inc. St. Louis, Mo.
  30. Tavares, A. P., M. A. Coelho, M. S. Agapito, J. A. Coutinho and A. M. Xavier (2005) Optimization and modeling of laccase production by *Trametes versicolor* in a bioreactor using statistical experimental design. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 134(3), 233-248.
  31. Ueno, S., C. Yoshikummi, F. Hirosem, Y. Omura, T. Wada and T. Fujii (1980) Method of producing nitrogen-containing polysaccharides. U.S. Patent 4, 202, 969.
  32. Wang, H. X., T. B. Ng, W. K. Liu, V. E. Ooi and S. T. Chang (1996) Polysaccharide-peptide complexes from the cultured mycelia of the mushroom *Coriolus versicolor* and their culture medium activate mouse lymphocytes and macrophages. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 28(5), 601-607.
  33. Wang, Y. X. and Z. X. Lu (2005) Optimization of processing parameters for the mycelial growth and extracellular polysaccharide production by *Boletus* spp. ACCC 50328. *Process Biochemistry*, 40(3-4), 1043-1051.
  34. Wang, Y., X. Xue, Y. Xiao, F. Zhang, Q. Xu and X. Liang (2008) Purification and preparation of compounds from an extract of *Scutellaria barbata* D. Don using preparative parallel high performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, 31(10), 1669-1676.
  35. Wang, Z. Q., F. M. Xu, X. Z. Yan and Y. Zhu (1996)

- Scutebarbatine A, a new neoclerodane-type diterpenoid alkaloid from *Scutellaria barbata*. *Chinese Chemical Letters*, 7(4), 333-334.
36. Wasser, S. P. (2005) Reishi or Ling Zhi (*Ganoderma lucidum*). In: *Encycloperdia of Dietary Suppliment*, 603-622. Coates, P., M. R. Blackman, G. Cragg, M. Levine, J. Moss and J. White Eds. Informa Healthcare, New York, NY.
37. Wasser, S. P. and A. L. Weis (1999) Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: A modern perspective. *Critical Reviews in Immunology*, 19(1), 65-96.
38. Yang, L. and L. M. Zhang (2009) Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *Carbohydrate Polymers*, 76(3), 349-361.
39. Yang, Q. Y. and Y. F. Zhou (1993) A protein bound polysaccharide-PSP. In Q. Y. Yang and C. Y. Kwok Eds. Proceedings of PSP International Symposium. Fundan University Press, Shanghai, China.
40. Yin, X., J. Zhou and C. Jie (2004) Anticancer activity and mechanism of *Scutellaria barbata* extract on human lung cancer cell line A549. *Life Sciences*, 75(18), 2233-2244.
41. Yu, J. and J. Lei (2004) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Scutellaria barbata*. *Phytochemistry*, 65(7), 881-884.
- 收件：98.04.01 修正：98.05.18 接受：98.06.19