

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

食藥用真菌之保護皮膚細胞能力評估

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNCS-92-13

執行期間：92年1月1日至92年12月31日

計畫主持人：蔡玫琳

共同主持人：

計畫參與人員：

執行單位：化粧品應用與管理系

中華民國 93 年 02 月 24 日

摘要

本計畫在研究靈芝之保護皮膚細胞對抗 UVA 傷害的能力，以熱水萃出的多醣體為研究對象，分別於 UVA 照射之前和照射之後添加靈芝多醣萃取液，測試其對細胞存活的影響。結果顯示，經 UVA 照射後的細胞，因輻射傷害，造成細胞存活率下降，但若在 UVA 照射之前添加靈芝多醣，可增加細胞的存活率，以在較高的照射強度下 (150 J/cm^2)，影響較大。經 UVA 照射後添加靈芝多醣萃取液也出現類似的情形。靈芝多醣可能減少因 UVA 照射所衍生之活性氧，以達到其保護皮膚纖維母細胞的功能。

關鍵字：靈芝、多醣、纖維母細胞、UVA

The major objective of this investigation was to estimate the potential of *Ganoderma lucidum* protecting skin fibroblast against the damage from UVA. The hot-water extracted polysaccharides of *G. lucidum* were added into culture medium before or after UVA radiation. The results displayed that UVA contributed the decrease of the cell viability because of the radiation damage. However, the addition of the *G. lucidum* polysaccharides before radiation can increase the cell viability, especially at high radiation dosage. Similar results were also found in the study of the polysaccharides added after UVA radiation. The polysaccharides of *G. lucidum* may reduce the active oxygen species derived from UVA radiation and lead to photoprotective property.

Keywords: *Ganoderma lucidum*, polysaccharides, fibroblast, UVA

壹、前言

自由基與活性氧易與其他分子發生作用，並引起連鎖反應而形成更多的自由基。自由基會攻擊細胞成分，造成細胞損傷。自由基的來源有內因性的，即人體內代謝過程中所產生的自由基，以及外在的環境因子如空氣污染、輻射、藥物等。生物體內具有抗氧化防禦系統來防止自由基的傷害。但若自由基超過體內抗氧化能力時，即造成氧化壓力，可能導致人體的許多疾病如癌症、動脈硬化、白內障，同時亦是造成老化的重要因素。

食藥用真菌的子實體及菌絲體除含有豐富的營養成分，並具有多種生物活性，其中，以靈芝的研究最多。靈芝為中國傳統醫學上之重要藥材，屬於擔子菌綱 (Basidiomycetes)，多孔菌目 (Polyporales)，多孔菌科 (Polyporaceae)，靈芝屬 (*Ganoderma*)。神農本草經根據形態和顏色將其分成赤芝、黑芝、青芝、白芝、黃芝、紫芝六種。目前研究與應用較多的為赤芝 (*Ganoderma lucidum*) 與松杉靈芝 (*Ganoderma tsuaga*)。靈芝含有多醣 (polysaccharides)、三萜類 (triterpenoids)、腺苷 (adenosine) 及鍺 (germanium) 等多種活性成分，具有抗腫瘤、抗發炎、免疫調節、降血糖、降低膽固醇、降血壓、抑制血小板凝集、保護肝細胞因化學性所造成的損傷、抗氧化等性質。因此，除了當作藥材使用外，目前也是保健食品市場的明星。本計畫在研究食藥用真菌之保護皮膚細胞能力，也先以靈芝中的赤芝為材料，以作為在化粧品市場的應用參考。

貳、材料與方法

一、材料

赤芝 (*Ganoderma lucidum*) 子實體，購自中藥行。皮膚纖維母細胞 (skin fibroblast) 來自生物資源保存及研究中心 (BCRC)。

二、方法

1、製備靈芝萃取液

將靈芝磨成細絲狀。取適量樣品，加 30 倍體積的蒸餾水，置於圓底燒瓶中，於 95°C 下萃取 1 小時。上清液以濾紙過濾。重覆萃取步驟三次，收集濾液，以減壓濃縮機濃縮，加入四倍體積之 95% 乙醇沉降，離心後得到沉澱物，以冷凍乾燥機乾燥。

2、粗多醣的定量

以酚—硫酸法 (Dubois et al., 1956) 測定。取 1 ml 樣品溶液 (約含 10–100 µg 的葡萄糖)，加入 1 ml 5% phenol 溶液混合後，快速加入 5 ml 濃硫酸，20 分鐘後將試管置入流水中冷卻，10 分鐘後以分光光度計測定溶液於 488 nm 下的吸光值。另以葡萄糖標準液作為對照。

3、細胞培養

HS 68 皮膚纖維母細胞培養在添加 10% 胎牛血清，4 mM L-glutamine，1.5 g/L sodium bicarbonate，4.5 g/L glucose，1.0 mM sodium pyruvate 的 90% DMEM 培養基中。培養條件為 37°C，5% CO₂。

4、靈芝萃取液的保護細胞能力測定

(1) UVA 照射前添加靈芝萃取液

將細胞培養於 6 well 的培養盤中，待達到 80% 佈滿率時，加入含靈芝萃取液 (200 µg/mL) 的培養液培養 24 小時。將培養液吸取掉，以 phosphate buffer saline (PBS) 清洗後，加入 1 mL 的 PBS，以 UVA 照射至不同劑量後，再作細胞存活率測定。

(2) UVA 照射後添加靈芝萃取液

將細胞培養於 6 well 的培養盤中，將培養液吸取掉，以 PBS 清洗後，加入 1 mL 的 PBS，以 UVA 照射至不同劑量後，吸取掉 PBS，加入含靈芝萃取液 (200 µg/mL) 的培養液培養 24 小時，再作細胞存活率測定。

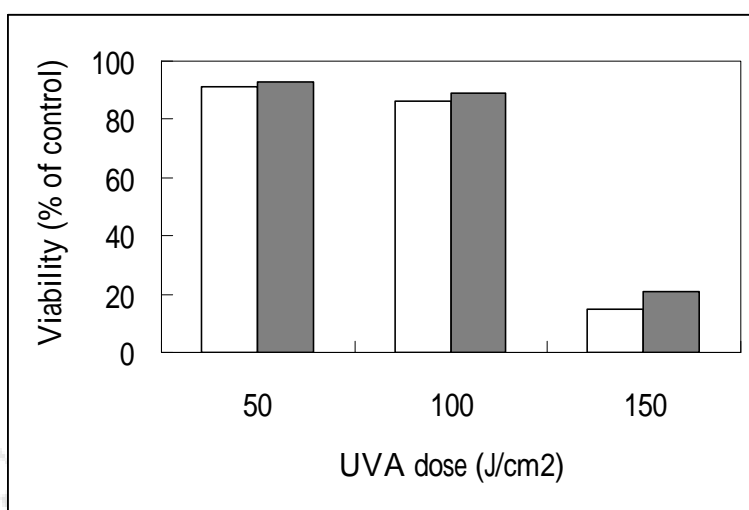
5、細胞存活率測定

細胞存活率測定以 MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 法進行。將培養液移除掉，加入 1 mL 的 MTT 試劑 (2.5 mg/mL)，於 37°C 下反應 4 小時後，吸取掉 MTT 溶液，加入 0.5 mL 溶劑 (內含 50% dimethylformamide 及 20% sodium dodecyl sulfate (pH 4.8)) 將細胞打落沖散，再以 ELISA reader 儀器測定溶液在 570 nm 吸光值。

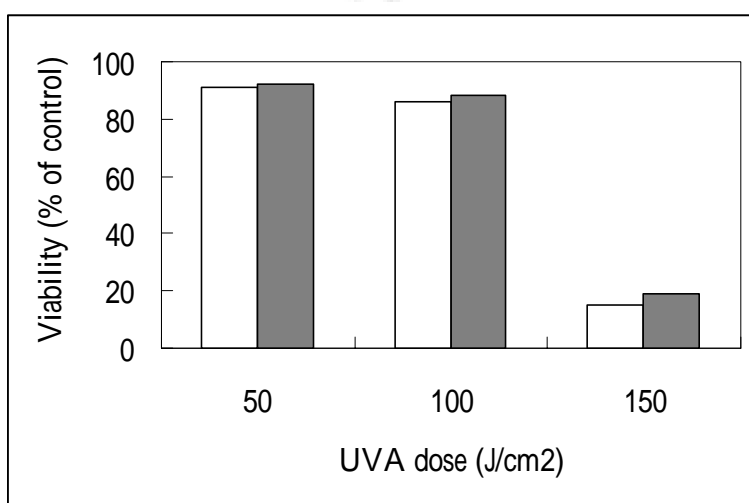
參、結果與討論

芝子實體中含有單醣、多醣、胺基酸、蛋白質、甾類、三萜類、香豆素、揮發油、樹脂、油脂、礦物質等多種成分。文獻指出，真菌多醣體如樟芝、姬松茸的多醣體具有抗氧化功能，可修復肝細胞 DNA 損傷。因此本研究以熱水萃出的多醣體為研究對象，分別於 UVA 照射之前和照射之後添加靈芝多醣萃取液，測試其對細胞存活的影響。結果顯示，經 UVA 照射後的細胞，因輻射傷害，造成細胞存活率下降，尤其在 150 J/cm² 下，細胞存活率驟降 (15%)，但若在 UVA 照射之前

添加靈芝多醣，可增加細胞的存活率，在較低照射強度下（50 和 100 J/cm²），效果較不顯著，分別由 91 % 提高至 93 %，以及由 86 % 提高至 89 %，在較高的照射強度下（150 J/cm²），則影響較大，由 15 % 提高至 21 %（圖一）。經 UVA 照射後添加靈芝多醣萃取液也出現類似的情形，在較低照射強度下（50 和 100 J/cm²），效果較不顯著，細胞的存活率分別由 91 % 提高至 92 %，以及由 86 % 提高至 88 %，在較高的照射強度下（150 J/cm²），則影響較大，由 15 % 提高至 19 %（圖二）。UV 照射，會降低細胞內的抗氧化物質，使抗氧化酵素失去活性，並產生活性氧，造成脂質過氧化，DNA 受損。靈芝多醣可能減少因 UVA 照射所衍生之活性氧，以達到其保護皮膚纖維母細胞的功能。因此，未來將進一步驗證此推論，並尋找其他具有抗紫外線傷害的真菌。



圖一 照射 UVA 前添加靈芝多醣萃取液對細胞存活率的影響。白色長條：未添加靈芝萃取液；灰色長條：添加靈芝萃取液



圖二 照射 UVA 後添加靈芝多醣萃取液對細胞存活率的影響。白色長條：未添加靈芝萃取液；灰色長條：添加靈芝萃取液

肆、參考文獻

- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K. and Rebers, P. A. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Nature* 167.
- Evelson, P., Ordonez, C. P., Llesuy, S. and Boveris, A. 1997. Oxidative stress and in vivo chemiluminescence in mouse skin exposed to UVA radiation. *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology* 38, 215-219.
- Green, L. M., Reade, J. L., Ware, C. F. 1984. Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J. Immunol. Methods* 70, 257-268.
- Huang, L.-C. 2000. Antioxidant properties and polysaccharide composition analysis of *Antrodia camphorata* and *Agaricus blazei*. National Chung-Hsing University Master Thesis.
- Kim, K.C. and Kim, I. G. 1999. Ganoderma lucidum extract protects DNA from strand breakage caused by hydroxyl radical and UV irradiation. *Int. J. Mol. Med.* 4, 273-277.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- Noel-Hudson, M. S., Braut-Boucher, F., Rebert, M., Aubery, M. and Wepierre, J. 1997. Comparison of six different methods to assess UVA cytotoxicity on reconstructed epidermis. Relevance of a fluorimetric assay (the Calcein-AM) to evaluate the photoprotective effects of α -tocopherol. *Toxicology in Vitro* 11, 645-651.
- Offord, E. A., Gautier, J. C., Avanti, O., Scaletta, C., Runge, F., Karmer, K. and Applegate, L. A. 2002. Photoprotective potential of lycopene, β -carotene, vitamin E, vitamin C and carnosisic acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts. *Free Radical Biology & Medicine*, 32, 1293-1303.
- Tsai, Y.-H. 2002. Antioxidant properties of filtrate and polysaccharide from *Antrodia camphorata* in submerged culture. National Chung-Hsing University Master Thesis.