

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

桑黃(*phellinus igniarius*)深層培養液之抗肝癌細胞增殖
及抗血管增生能力之探討

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2313-B-041-008-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：嘉南藥理科技大學餐旅管理系

計畫主持人：宋祖瑩

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 94 年 10 月 31 日

桑黃(*Phellinus igniarius*)深層培養液之抗肝癌細胞增殖及抗

血管增生能力之探討

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC93-2313-B-041-008

執行期間： 93 年 8 月 1 日至 94 年 7 月 31 日

計畫主持人：宋祖瑩

共同主持人：

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：嘉南藥理科技大學

中 華 民 國 94 年 10 月 20 日

一、中文摘要

已有很多研究證實,天然植物具有之成分可能具有預防及治療癌症的形成及惡化的能力。桑黃是寄生於野生桑樹的多孔菌。本研究乃欲探討桑黃子實體及菌絲體區分物對三種不同癌細胞(HL60、A549及HepG2)的抑制增生能力,並初步推測其可能機轉。桑黃各萃取物(熱水、乙醇萃取物及多醣體)對HL60、A549及HepG2三種癌細胞之抑制增生能力均以桑黃子實體乙醇萃取物(F-ES)為最佳,IC₅₀分別為50.7、63.8及157.4 μg/ml,菌絲體各區分物在500 mg/ml仍未有明顯抑制癌細胞增生的現象。當25 μg/ml之F-ES與化療藥物(0.1 μM oxaplatin或1 μM 5-fluorouracil)和三種癌細胞共同培養時,顯著與化療藥物具有相乘效應地抑制癌細胞增生的能力。細胞週期分析顯示,F-ES有促使三種癌細胞在G2/M期停滯的現象。此外,F-ES具有抑制內皮細胞生長、移行及血管腔形成能力,因此推測桑黃具有成為化療藥物之輔助療法的潛力。

關鍵詞：桑黃、抗癌細胞增生、血管增生、細胞週期

二、英文摘要

Studies have shown that phytochemicals can prevent and cure cancer. *Phellinus igniarius* is parasitic to a wild mulberry of the family *Polyporaceae* that has anticancer effects. This study was designed to investigate the anti-proliferative effects of white mulberry extracts of the fruiting body and mycelia in three cancer cell lines, HL60, A549 and HepG2. The results show that the ethanol extract of the fruiting body (F-ES) had the highest inhibition on the proliferation of the three cell lines, with IC₅₀ values of 50.7, 63.8, 157.4 μg/ml, while the extract of mycelia had little effects. The combination of 25 μg/ml of F-ES with 0.1 μM oxaliplatin or with 1 μM 5-fluorouracil produced synergistic anti-proliferative effects. Cell cycle analysis showed that the combination arrested the cell cycle at G2/M. In addition, F-ES demonstrated inhibitory effects on the growth, migration and angiogenesis of rat heart endothelial cells (RHEC). Thus, the F-ES has the potential to become a useful adjuvant of cancer drugs.

Key words: *Phellinus igniarius*, anti-proliferation, angiogenesis, cell cycle

三、前言

目前常見的癌症治療有化學療法、免疫療法、外科療法等,其中化學藥物治療癌症的機轉主要是利用對細胞生長的抑制而達到殺死腫瘤細胞的效果,通常同時使用數種藥物,希望能由不同藥物的抑癌機制來殺死癌細胞以提高化學治療的效果。但是化學藥物

也可能因類似的機轉傷害了正常細胞,造成病人的不良反應,如骨髓造血系統的抑制、噁心及嘔吐、口腔炎及落髮等副作用。有許多文獻指出,某些天然植物具有之成分可能具有預防及治療癌症的形成及惡化的能力。因此,若能將天然具有抗癌功能的成分配合低劑量的化療藥物同時使用,將有利於降低化療藥物對人體所產生的毒性作用,又能達治療癌症的效果。

桑黃是寄生於野生桑樹的多孔菌,屬針裂蹄蘑菇,主要分布於日本、中國、菲律賓、澳大利亞、北美及中南美等地。中國產的基原為針層孔科(*Phellinus igniarius*),日本產的桑黃基原為 *Phellinus linteus*,尚有部分菌種,其外觀相似於真正的桑黃,但其菌種並不相同,所含有效成分也差異很大。自古就有“如果得到附著在桑樹上的黃色疙瘩(桑黃),死人也可以復活”的傳說,它的療效透過使用者的口耳相傳,而為眾所知。目前有關桑黃在科學上的文獻多由韓國學者所發表,且大部分的研究多是以多醣體為主(Kim et al., 2003a; Kim et al., 2003b)。Cho 等人(2002)的研究亦指出,桑黃萃取物具有透過不活化 ERK1/2 及 p38 MAP kinase 的路徑,以抑制 gap junctional intercellular communication (GJIC)的抗腫瘤能力。亦有研究指出,70%之桑黃酒精萃取物具有之抗氧化及抗血管增生的能力,因此推測其應具有抗腫瘤的能力 (Song et al., 2003); Shon 等人(2003)則指出桑黃之甲醇及熱水萃取物之總酚類含量分別為 33.3 及 20.7 mg/100ml,應與其清除自由基的能力有關。

四、研究目的

本研究乃評估桑黃子實體及菌絲體液體培養液中最具有抑制癌細胞增生能力的區分物(熱水、酒精萃取物及多醣體),並初步推測其可能機轉;此外,亦測試其與低濃度之化療藥物對癌細胞是否具有相乘性的抑制增生效應。

五、材料與方法：

(一) 材料

1. 癌細胞株(A549、HL-60 及 HepG2)均購自食品工業研究所
2. 初代培養心臟血管內皮細胞 (rat heart endothelial cell, RHEC)所犧牲之 Sprague-Dawley 幼鼠,由台中榮民總醫院動物中心提供
3. 桑黃子實體及菌絲體培養液由科達中藥公司所提供

(二) 方法

1. **桑黃子實體及菌絲體各區分層的置備**：子實體及菌絲體分別以磨碎及均質機均質後,以 5 倍(w/w)沸水回流萃取 6 h,合併三次回流上層液,加入 4 倍(w/w) 95%EtOH 放置 24 h (4)後,以 4000rpm 離心 20min,沈澱物分冷凍乾燥後別為 F-HP 及 M-HP;而上清液減壓濃縮六倍體積後,予以冷凍乾燥,分別為 F-HS 及 M-HS。子實體及菌絲體分別加 5 倍(w/w) 95%EtOH 於室溫以磁石攪拌 1 h,重複三次後,取

上清液減壓濃縮至乾，得 F-ES 及 M-ES。上述六種樣品之收率，如表一。

2. **細胞培養**：A-549、HL-60 及 HepG2、RHEC 分別以 RPMI 及 DMEM 完全培養液於 37 °C、5% CO₂ 的培養箱中，每隔兩天更換一次細胞培養液。
3. **細胞存活率測試**：將培養培養皿中的細胞經 trypsin 處理後，以 2~3 ml 培養液將細胞打下後，再用 0.4% Trypan blue dye 染色，以血球計數器 (hemocytometer) 計算細胞數目。
4. **細胞週期分析**：以 Flow cytometer (FACScan, Becton Dickson) 儀器分析，所得結果再以 ModFIT LT2.0 軟體分析，並加以量化。
5. **DNA 合成試驗**：細胞加入氚標識胸腺嘧啶培養一小時後，以 scintillation counter 偵測放射線強度。
6. **細胞轉移之分析 (Wound-healing assay)**：RHEC 植入 12 孔培養盤 24 小時，以 tip 將長滿的細胞刮成平行線，加入樣品培養 24 h，以 ZEISS Axiovert 200M 顯微鏡照相。
7. **體外血管生成試驗 (Angiogenesis assay)**：
抑制血管增生能力乃參考 Gho 等人(1999)的方法。加入 320 μl 之 Matrigel/well 於 24 孔洞之培養皿中，在 37 °C 培養至少 30 分鐘，使 Matrigel 發生聚合反應 (polymerization)。調整細胞數為 80,000/ml medium 之密度，加入 500 μl 於每個孔洞，並確定細胞能均勻分布於 Matrigel 表面。加入樣品後，置放於 5% CO₂ 培養箱培養 16 h 後，去除上層液，加入數滴 Diff-Quick Fixative (turquoise blue) 使其蓋過細胞表面，再傾斜培養皿使其完全吸除。最後以螢光顯微鏡鏡檢樣品是否具有抑制血管增生的能力。

六、結果與討論

1. 桑黃樣品對不同癌細胞的增生能力影響

由圖一、二及三結果可知，桑黃各萃取物對 HL60、A549 及 HepG2 三種癌細胞之抑制增生能力均以桑黃子實體乙醇萃取物(F-ES)為最佳，顯見顯著之時間及劑量效應，其次為 F-HS。相對地，菌絲體之各萃取物在 500 μg/ml 之濃度下培養至 72 h，並未觀察到具有抑制三種癌細胞增生的能力。

2. 桑黃子實體乙醇萃取物(F-ES)對不同癌細胞增生能力的影響

圖四結果顯示，F-ES 對 HL60、A549 及 HepG2 三種癌細胞均有顯著的濃度及時間抑制增生效應，且其抑制能力為 HL60>A549>HepG2，IC₅₀ 分別為 50.7、63.8 及 157.4 μg/ml。此外，亦可得知，F-ES 在 100 μg/ml 之濃度以下，對 A549 及 HepG2 具有抑制增生能力，但不會造成細胞死亡，但此濃度下卻會造成 HL-60 的死亡。

3. F-ES 與化療藥物之相乘效應

為初步評估 F-ES 是否具有開發為化療藥物的輔助療法，乃選擇一不會造成癌細胞顯著傷害的低濃度化療藥物 (0.1 μM oxaplatin 及 1 μM 5-fluorouracil) 與 F-ES 和癌細胞一起共同培養。由表二結果可知，當 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之 F-ES 與 0.1 μM oxaplatin 和三種癌細胞共同培養時，顯著與 oxaplatin 具有相乘效應地抑制癌細胞增生的能力。均有明顯抑制癌細胞增生的相乘效應，共同培養 72 h 對 HL60、A549 及 HepG2 之相乘率分別為 1.45、1.89 及 2.37；與 1 μM 5-fluorouracil 共同培養 72 h 對之相乘率分別為 1.89、1.65 及 1.80。由此結果可推測 F-ES 的輔助使用，將有助於化療藥物抑制癌細胞的增生能力，又不會對正常細胞造成毒害。

4. F-ES 對不同癌細胞之細胞週期影響

由上述結果可知(圖四)，在 100 mg/ml 之 F-ES 處理，可抑制癌細胞的增生，為進一步探討癌細胞生長被抑制的現象是否與其抑制細胞週期的進行有關，乃以流式細胞儀分析以 F-ES 處理的細胞。由圖五結果可知，以 F-ES 處理的細胞顯著有較於對照組呈現細胞週期 G2/M 期的停滯現象，因此推測其可能與 F-ES 抑制增生的能力有關。結果亦顯示，F-ES 在 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的濃度下，會誘導約 35% 左右的 HL60 凋亡，但對 A549 及 HepG2 則不會有明顯的誘導凋亡作用。

5. F-ES 對肝癌細胞 DNA 合成能力的影響

樣品抑制細胞生長連帶有可能會影響 DNA 的合成，故以 ^3H -labeled thymidine 的分析方法，評估不同濃度(25~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的 F-ES 與 HepG2 培養 24 的 DNA 合成能力。由圖六結果可知，合成能力顯著隨 F-ES 濃度的增加而降低，即處理 F-ES 濃度越高，對 HepG2 之 DNA 合成的抑制作用越顯著。

6. F-ES 對不同 RHEC 增生能力的影響

以 25~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 不同濃度之 F-ES 分別與 RHEC 共同培養 24, 48 及 72 h，發現培養 72 h 之 IC_{50} 約為 142.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (圖七)。結果顯示在 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的低濃度下，即有顯著的抑制增生能力，至 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 幾乎可完全抑制細胞的增生，但當濃度大於 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 時，F-ES 則對 RHEC 開始有毒害作用，由顯微鏡下觀察，可以看到一些圓起漂浮的死亡細胞。

7. F-ES 對 RHEC 之細胞週期影響

由表三結果可知，以 F-ES 處理的細胞顯著有較於對照組呈現細胞週期 G1 期的停滯現象，因此推測抑制細胞週期的進行可能與 F-ES 抑制 RHEC 增生的能力有關。

8. F-ES 對 RHEC 轉移能力之影響

在長滿內皮細胞的培養盤中，以 tip 將細胞刮傷後，分別加入 25 和 50 $\mu\text{g/ml}$ 之 F-HS 處理 24 h 後，觀察相對於對照組的細胞生長與轉移情形。由圖八結果可知，F-ES 處理組與控制組相較，有明顯的抑制生長及移行現象，但是否具有抑制內皮細胞轉移能力，仍須進一步探討。

9. F-ES 抑制 RHEC 血管腔形成能力之影響

血管是由內皮細胞形成單層、扁平的緊密管壁構造而成，在血管形成和血管增生現象中，正常的內皮細胞在基底膜上會彼此連結而圍成立體的管腔構造。實驗中，在植入 matrigel matrix 培養盤後二小時，加入 50 $\mu\text{g/ml}$ 之 F-ES，由圖九可觀察到，對照組內皮細胞隨著培養時間的增加，漸漸形成管腔結構，但以 F-ES 處理的內皮細胞，在相同培養時間下，其管腔的形成受到明顯的抑制。因此推測 F-ES 對內皮細胞管腔結構形成的抑制，可能是經由基因轉錄層次的調控，再造成蛋白表現的差異，而導致血管腔形成受阻。但詳細的分子調控情形仍待進一步探討。

七、結論及成果自評

由本實驗結果可知，桑黃在低濃度即有抑制癌細胞增生，及抑制癌細胞轉移的潛力，值得進一步探討，具有在學術期刊發表的意義。

八、參考文獻

- Cho, J. H., Cho, S. D., Hu, H., Kim, S. H., Lee, S. K., Lee, Y. S. and Kang, K. S. **2002**. The roles of ERK1/2 and p38 MAP kinases in the preventive mechanisms of mushroom *Phellinus linteus* against the inhibition of gap junctional intercellular communication by hydrogen peroxide. *Carcinogenesis* 23: 1163-9.
- Gho, Y. S., Kleinman H.K. and Sosne, G. **1999**. Angiogenic activity of human soluble intercellular adhesion molecule-1. *Cancer Res.* 59: 5128-32.
- Kim, D. H., Yang, B. K., Jeong, S. C., Park, J. B., Cho, S. P., Das, S., Yun, J. W. and Song, C. H. **2001**. Production of a hypoglycemic, extracellular polysaccharide from the submerged culture of the mushroom *Phellinus linteus*. *Biotechnology Letters* 23: 513-7.
- Kim, G. Y., Kim, S. H., Hwang, S. Y., Kim, H. Y., Park, Y. M., Park, S. K., Lee, M. K., Lee, S. H., Lee, T. H. and Lee, J. D. **2003c**. Oral administration of proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* in the prevention and treatment of collagen-induced arthritis in mice. *Biol. Pharm. Bull* 26: 823-31.
- Kim, G. Y., Park, H. S., Nam, B. H., Lee, S. J. and Lee, J. D. **2003a**. Purification and characterization of acidic proteo-heteroglycan from the fruiting body of *Phellinus linteus* (Berk. & M.A. Curtis) Teng. *Bioresour. Technol.* 89: 81-7.

- Kim, G. Y., Park, S. K., Lee, M. K., Lee, S. H., Oh, Y. H., Kwak, J. Y., Yoon, S., Lee, J. D. and Park Y. M. **2003b**. Proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* activates murine B lymphocytes via protein kinase C and protein tyrosine kinase. *Int. Immunopharm.* 3: 1281-92.
- Kim, G. Y., Roh, S. I., Park, S. K., Ahn, S. C., Oh, S. C., Lee, J. D. and Park, Y. M. **2003d**. Alleviation of experimental septic shock in mice by acidic polysaccharide isolated from the medicinal mushroom *Phellinus linteus*. *Biol. Pharm. Bull.* 26: 1418-23.
- Kim, H. M., Han, S. B., Oh, G. T., Kim, Y. H., Hong, D. H., Hong, N. D. and Yoo, I. D. **1996**. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Int. J. Immunopharmacol.* 18: 295-303.
- Kim, S. W., Hwang, H. J., Park, J. P., Cho, Y. J., Song, C. H. and Yun, J. W. **2002**. Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 56-61.
- Shon, M. Y., Kim, T. H. and Sung, N. J. **2003**. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of *Hymenochaetaceae*) extracts. *Food Chem.* 82: 593-7.
- Shon, Y. H. and Nam, K. S. **2001a**. Inhibition of cytochrome P450 isozymes in rat liver microsomes by polysaccharides derived from *Phellinus linteus*. *Biotechnol. Lett.* 25: 167-72.
- Song, K. S., Cho, S. M. Lee, J. H., Kim, H. M., Han, S. B, Ko, K. S. and Yoo, I. D. **1995**. B-lymphocyte-stimulating polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo) 43:2105-8.
- Song, Y. S., Kim, S. H., Sa, J. H., Jin, C., Lim, C. J. and Park, E. H. **2003**. Anti-angiogenic, antioxidant and Xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom *Phellinus linteus*. *J. Ethnopharm.* 88:113-116.

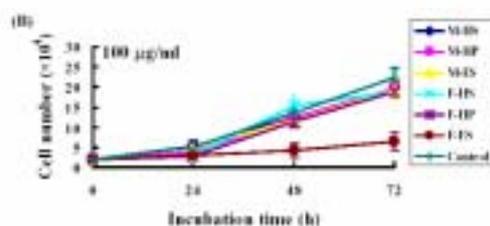
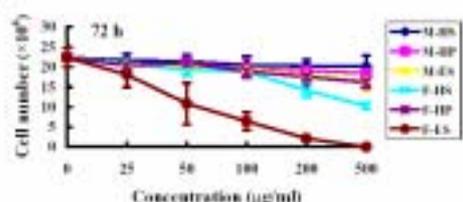
表一、桑黃子實體及菌絲體之不同區分物收率

Table 1. The yield of subfractions in fruiting body and mycelium of *Phellinus igniarius*

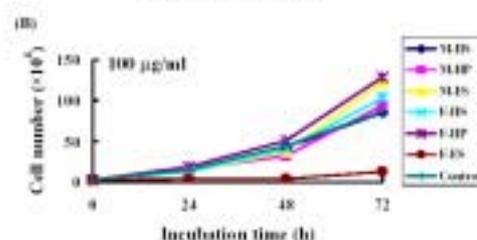
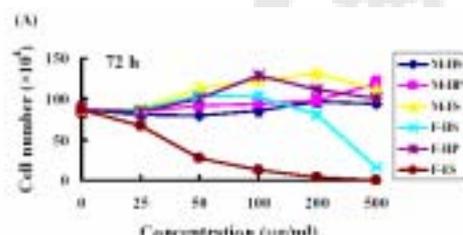
Subfractions	Yield (%)
F-HS*	5.28±0.14
F-HP	3.36±0.11
F-ES	1.04±0.28
M-HS	47.68±0.71
M-HP	13.2±1.31
M-ES	23.02±0.73

M-HS: supernatant of hot water extract of mycelium; M-HP: precipitate of hot water extract of mycelium; M-ES: ethanol extract of mycelium; F-HS: supernatant of hot water extract of fruiting body; F-HP: precipitate of hot water extract of fruiting body;

F: (A)



圖一、桑黃子實體及菌絲體區分物抑制神經細胞 (A-549) 增生之濃度及時間



圖二、桑黃子實體及菌絲體區分物抑制人類肝癌細胞 (HL-60) 增生之濃度及時間

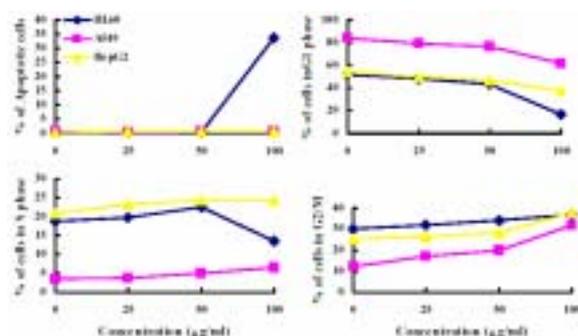
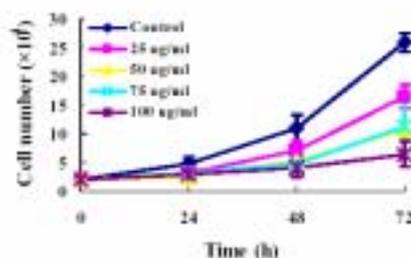
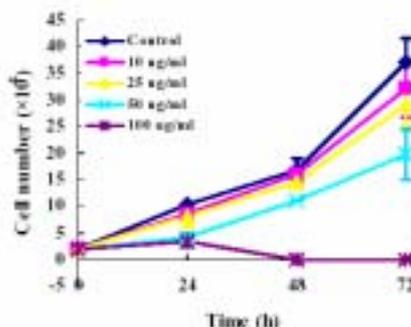


Figure 5. Flow cytometric analysis of ethanol extract of *Phellinus igniarius* (F-ES) F-ES-mediated cell cycle distribution of cancer cells. Cancer cells were treated with 0, 25, 50 and 100 µg/ml of EEPI for 72 h, respectively. Cell cycle distribution was analyzed by FACS.

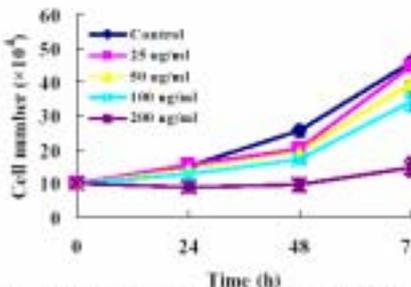
(A)



(B)



(C)



圖四、桑黃乙醇萃取物抑制細胞增生的濃度及時間效應

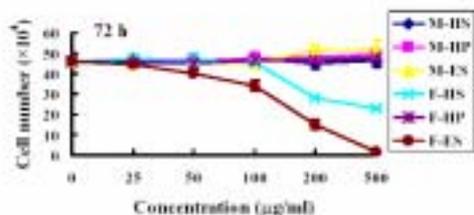
表二、桑黃乙醇萃取物與化學藥物對癌細胞的相乘效應

Table 2. The synergistic effect of ethanol extract of *Phellinus igniarius* on chemotherapy drug (oxaliplatin (Oxa) and 5-fluorouracil (5-FU)) to cancer cells (A549, HL60 and HepG2)

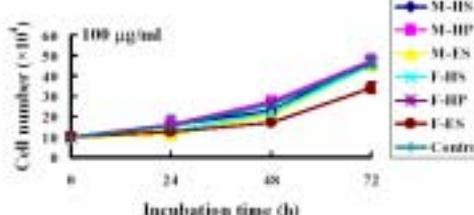
Chemotherapy drug	Synergistic effect (25 µg/ml)*		
	A549	HL60	HepG2
0.1 µM Oxa	1.89±0.58	1.45±0.21	2.37±0.32
1 µM 5FU	1.65±0.11	1.89±0.21	1.80±0.12

* Cancer cells were treated with 25µg/ml of F-ES and chemotherapy drug for 72 h

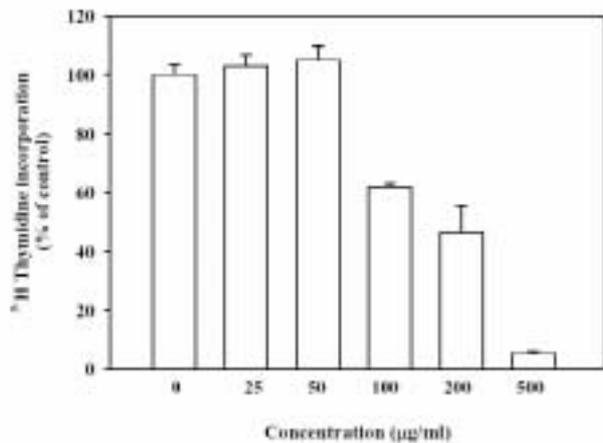
(A)



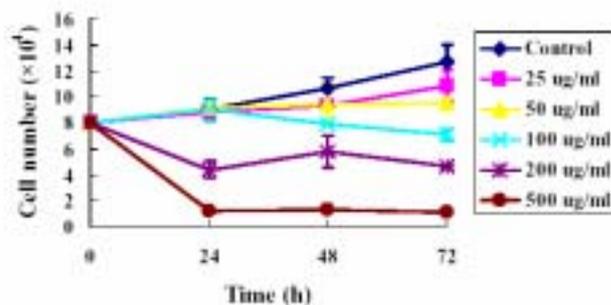
(B)



圖二、桑黃子實體及菌絲體區分物抑制肝癌細胞 (HepG2) 增生之濃度及時間效應



圖六、桑寄生醇萃取物對 HepG2 細胞 DNA 合成能力的影響。



圖七、桑寄生醇萃取物抑制大鼠心臟內皮細胞的濃度及時間效應。

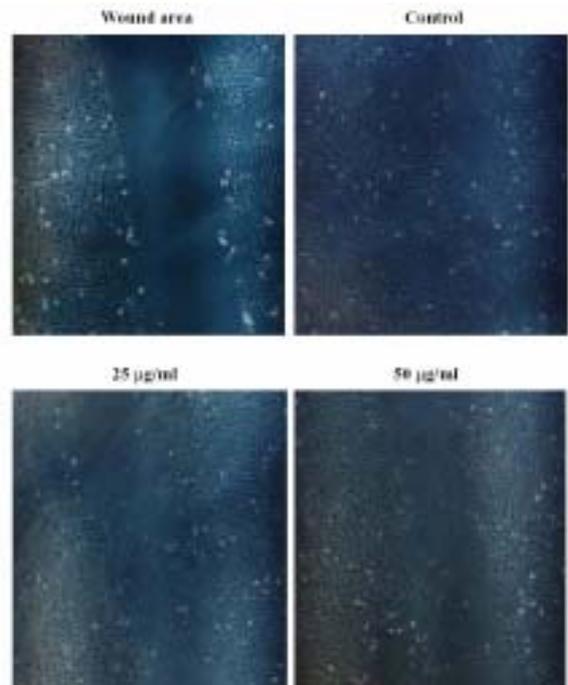
表三、桑寄生醇萃取物對大鼠心臟內皮細胞細胞週期的影響

Table 3. Flow cytometric analysis of ethanol extract of *Phellinus igniarius* (F-ES) F-ES-mediated cell cycle distribution of cancer cells (A549, HL60 and HepG2) and rat heart endothelial cells (RHEC)

Conc. (µg/ml)	SubG1 (%)	G ₁ phase (%)	S phase (%)	G ₂ /M phase (%)
0*	2.6±0.2**	77.9±3.9	8.4±1.6	11.6±1.2
25	2.3±0.9	77.6±3.4	9.5±1.4	11.0±2.2
50	2.6±0.3	78.1±3.5	9.9±1.2	10.2±1.4
100	2.5±0.5	87.2±2.1	3.1±0.5	7.6±2.3

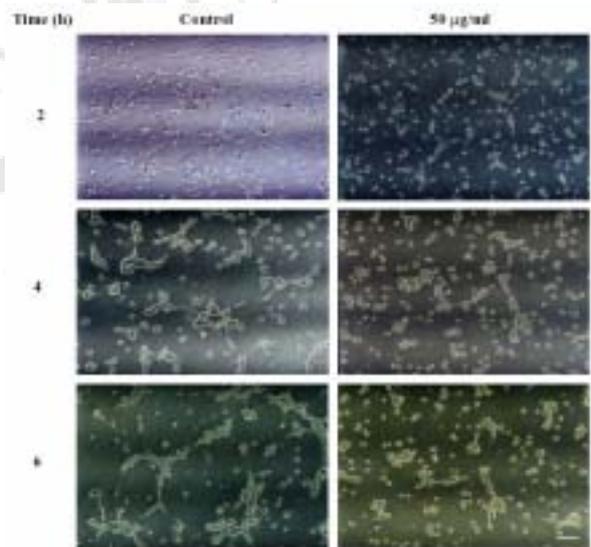
* RHEC were treated with 0, 25, 50 and 100 µg/ml of EEPI for 72 h

** Cell cycle distribution was analyzed by FACS



圖八、桑寄生醇萃取物抑制大鼠心臟內皮細胞增殖及遷移的能力。

Fig. 8. The effect of ethanol extract of *Phellinus igniarius* (F-ES) on the proliferation and migration of rat heart endothelial cells (RHEC). Confluent cultured RHECs were wounded using a sterile tip, and then treated without or with 25 and 50 µg/ml for 24 h. Photomicrographs were obtained using an Olympus IX70 phase contrast microscope (40×).



圖九、桑寄生醇萃取物抑制大鼠心臟內皮細胞新生血管形成的能力。

Fig. 9. The effect of ethanol extract of *Phellinus igniarius* (F-ES) on the angiogenesis of rat heart endothelial cells (RHEC). After RHEC were seeded into Matrigel matrix-coated plates for 2 h, then treated without or with 50 µg/ml of EEPI and incubated continuously for indicated time periods. Photomicrographs were obtained using an Olympus IX70 phase contrast microscope (100×). Scale bar, 50 µm.