

謝誌

首先由衷的感謝指導老師 楊芳鏘教授，在我兩年的研究所生活中，學術課業研究上的指導，總是能啟發我的邏輯思考與隨機應變的能力，在日常生活中的待人處事，也帶給我很大的學習機會以及自由發揮的空間。感謝共同指導的 盧錫祺教授，能去食科系做實驗是一個非常寶貴的機會，學到許多與化工領域較不同的經驗，感謝盧老師在學術研究上的悉心指導，以及於論文撰寫期間詳加的校閱指正。

感謝 顏宏偉老師，時常給我許多建議與指點，讓我的研究進行的更加順利。感謝中興大學化工系 林松池教授與生技所 王敏盈教授，於百忙中對本論文內容進行審閱，並給予了許多寶貴的建議，使我的論文內容更為完善、完整，在此特別謝謝以上的老師們。

在兩年研究所生活中，得之於人的太多，感謝宣銘學長，從我一年級開始，在實驗上及生活上的教導與關懷。感謝子元與素敏時常互相鼓勵與幫忙，許多學長、同學們及學弟妹若凡、宜珈、孟琪的幫助與打氣。另外感謝昌宇、憶芝、采竹、凱平於生活上的關心與包容，吃喝玩樂的陪伴以及實驗上的幫忙，讓我的日子更加多采多姿。最後要感謝世威一路上的陪伴與關懷，還有家人們的支持與鼓勵，謝謝你們！

中文摘要

樟芝(*Antrodia camphorata*)是台灣特有的一種藥用菇類，已知主要的有效成份為多醣體以及三帖類，其生理活性成份及功能仍是目前研究重點。本研究中，我們期望利用樟芝多醣體具有抗氧化、清除自由基等功能，開發出新的抗老化產品。研究方法是以前層培養方式得到大量發酵液及樟芝菌絲體，取其胞外多醣體及菌絲萃取物，應用於抑制 3T3 小鼠纖維母細胞分泌之基質金屬蛋白酶 (Matrix Metalloproteinases, MMPs)，並藉由 Gelatin zymography 分析 MMP-2 及 MMP-9 的活性。結果發現：樟芝胞外多醣體在濃度 3.5 mg/ml 的劑量下，處理 3T3 纖維母細胞培養液，可達到良好抑制 MMP-2 及 MMP-9 活性的效果，且具有還原力及 DPPH 自由基捕捉能力；而在菌絲體萃取物部份，以甲醇、乙醇及純水為溶劑，進行微波萃取，發現這三種萃取物對 3T3 細胞培養液內 MMPs 有明顯的抑制效果，其中以純水為溶劑之菌絲體微波萃取物抑制效果最為良好，對 MMP-2 及 MMP-9 之抑制率分別為 60%及 82%，且在抗氧化部份，其還原力及 DPPH 自由基捕捉率與化學合成之抗氧化劑 BHA 非常接近，顯示具有非常強之抗氧化性。因此綜合以上研究結果，我們認為樟芝之胞外多醣體及菌絲體萃取物，在抗老化化妝品的有效成份應用上，的確具有開發潛力。

關鍵字：樟芝、基質金屬蛋白酶、明膠電泳酵素分析法、抗氧化、抗老化

Abstract

Antrodia camphorata is an endemic medical mushroom in Taiwan. It is well known that the major effective components in this medical fungus are polysaccharides and triterpenoids. The bioactivity and efficacy of *A. camphorate* are still the main focus in many researches. The study expects to take the availability of antioxidant activity and DPPH radical scavenging activity for developing new antiaging cosmetics. The submerged culture of *A. camphorate* produced abundant fermentation broth and mycelium. The purpose of this study was to investigate the exopolysaccharides from broth and the extraction from mycelium in inhibiting the activities of matrix metalloproteinases(MMPs) secreted from 3T3 fibroblast. The analysis by gelatin zymography showed that exopolysaccharides at the concentration 3.5 mg/ml did inhibit the activities of MMP-2 and MMP-9. It also had well reducing power and DPPH radicals scavenging ability. The mycelium was extracted by microwave with the solvent of methanol, ethanol, and water. These three mycelium extracts all had obvious inhibition on MMP-2 and MMP-9, especially the water one. The mycelium extract by microwave with the solution of water had the inhibition 60% and 82% on MMP-2 and MMP-9. Besides, it had great antioxidant activity based on the reducing power determination and the DPPH radicals scavenging test. In conclusion, we suggest that exopolysaccharides and mycelium extracts from *Antrodia camphorate* do have the antiaging capacities and can be effective used in antiaging cosmetics.

Key words: *Antrodia camphorate*, matrix metalloproteinase(MMPs), antiaging, gelatin zymography, antioxidant activity

目錄

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
目錄.....	III
表目錄.....	VII
圖目錄.....	VII
第一章 緒論	
1-1 緒論.....	1
1-2 生物性化妝品.....	2
1-3 研究動機.....	2
第二章 文獻回顧	
2-1 樟芝之介紹.....	4
2-1-1 樟芝之命名.....	4
2-1-2 樟芝之分類.....	4
2-1-3 樟芝之活性成份與生理功能.....	6
2-2 皮膚與老化.....	8
2-2-1 皮膚的構造.....	8
2-2-2 皮膚老化程序.....	10

2-3 基質金屬蛋白酶與皮膚老化.....	12
2-3-1 基質金屬蛋白酶的種類與結構.....	12
2-3-2 基質金屬蛋白酶與皮膚老化之關聯性.....	14
2-4 皮膚老化之自由基學說.....	17
2-4-1 自由基.....	18
2-4-2 活性氧.....	18
2-4-3 脂質氧化反應.....	19
2-4-4 抗氧化作用與機制.....	21
2-5 實驗架構.....	22
第三章 材料與方法	
3-1 實驗菌株及細胞.....	23
3-2 實驗藥品.....	23
3-3 實驗儀器與設備.....	25
3-4 分析方法.....	26
3-5 實驗方法.....	31
3-5-1 樟芝菌種培養與保存.....	31
3-5-1-1 菌種斜面試管保存.....	31
3-5-1-2 培養皿平面培養與接菌活化.....	31

3-5-1-3 種菌的製備.....	31
3-5-2 三角瓶液態培養試驗.....	32
3-5-3 樟芝胞外多醣體濃度測定與製備.....	32
3-5-4 樟芝菌絲體酵素萃取物之製備.....	33
3-5-5 樟芝菌絲體微波萃取物之製備.....	34
3-5-6 細胞培養與繼代.....	35
3-5-7 細胞存活率之測試 (WST-1 assay)	35
3-5-8 抑制 MMP-2 及 MMP-9 活性之測試 (Gelatin zymography).....	36
 第四章 結果與討論	
4-1 樟芝三角瓶液態培養試驗.....	38
4-2 樟芝胞外多醣體之細胞效應.....	40
4-2-1 樟芝多醣體濃度對細胞存活率之影響.....	40
4-2-2 樟芝多醣體濃度對抑制 MMP-2 及 MMP-9 活性之影響.....	42
4-2-3 樟芝多醣體處理細胞培養液反應時間對抑制 MMP-2 及 MMP-9 活 性之影響.....	45
4-3 樟芝菌絲體酵素萃取物之細胞效應.....	48
4-3-1 樟芝菌絲體酵素萃取物對細胞存活率之影響.....	48
4-3-2 樟芝菌絲體酵素萃取物對抑制 MMP-2 及 MMP-9 活性之影響.....	50

4-4 樟芝菌絲體微波萃取物之細胞效應.....	53
4-4-1 樟芝菌絲體微波萃取物對細胞存活率之影響.....	53
4-4-2 樟芝菌絲體微波萃取物對抑制 MMP-2 及 MMP-9 活性之影響.....	55
4-5 MMP-2 及 MMP-9 活性之直接抑制分析.....	58
4-5-1 樟芝多醣體對 MMP-2 及 MMP-9 活性之直接抑制.....	58
4-5-2 樟芝菌絲體微波萃取物對 MMP-2 及 MMP-9 活性之直接抑制.....	61
4-6 還原力之測定.....	64
4-6-1 樟芝胞外多醣體還原力之測定.....	64
4-6-2 樟芝菌絲體萃取物還原力之測定.....	66
4-7 捕捉 DPPH 自由基能力之測定.....	68
4-7-1 樟芝胞外多醣體對 DPPH 自由基捕捉率之測定.....	68
4-7-2 樟芝菌絲體萃取物對 DPPH 自由基捕捉率之測定.....	70
第五章 結論與未來展望	
5-1 結論.....	72
5-2 未來展望.....	74
參考文獻.....	75

表目錄

表 3-1 各酵素之反應 pH 及溫度.....	33
表 3-2 細胞培養基組成.....	35

圖目錄

圖 2-1 樟芝固態平面培養.....	5
圖 2-2 樟芝液態培養14天形成之菌絲球.....	5
圖 2-3 皮膚表皮層的主要結構.....	8
圖 2-4 細胞各層的結構組成.....	11
圖 2-5 基質金屬蛋白酶(MMPs)之分類.....	13
圖 2-6 MMPs 分解第一型膠原蛋白.....	15
圖 2-7 基質金屬蛋白酶(MMPs)三級結構示意圖.....	16
圖 2-8 丙二醛之結構式.....	20
圖 4-1 時間對樟芝液態培養及多醣體生成之影響.....	39
圖 4-2 樟芝胞外多醣體濃度對細胞存活率之影響.....	41
圖 4-3 樟芝胞外多醣體濃度對 MMP-2 及 MMP-9 活性之影響.....	43
圖 4-4 樟芝胞外多醣體濃度對 MMP-2 及 MMP-9 活性抑制之影響.....	44
圖 4-5 樟芝胞外多醣體處理時間對 MMP-2 及 MMP-9 活性之影響.....	46
圖 4-6 樟芝胞外多醣體處理時間對 MMP-2 及 MMP-9 活性抑制之影響.....	47

圖 4-7 不同酵素分解菌絲體之萃取物對細胞存活率之影響.....	49
圖 4-8 不同酵素分解菌絲體之萃取物對 MMP-2 及 MMP-9 活性之影響.....	51
圖 4-9 不同酵素分解菌絲體之萃取物 MMP-2 及 MMP-9 活性抑制之影響..	52
圖 4-10 不同樟芝菌絲體微波萃取物對細胞存活率之影響.....	54
圖 4-11 不同菌絲體微波萃取物對 MMP-2 及 MMP-9 活性之影響.....	56
圖 4-12 不同菌絲體微波萃取物對 MMP-2 及 MMP-9 活性抑制之影響.....	57
圖 4-13 樟芝胞外多醣體濃度對直接抑制細胞分泌 MMP-2 及 MMP-9 之影 響.....	59
圖 4-14 樟芝胞外多醣體濃度對直接抑制細胞分泌 MMP-2 及 MMP-9 活性 之影響.....	60
圖 4-15 不同菌絲體微波萃取物對直接抑制細胞分泌 MMP-2 及 MMP-9 之 影響.....	62
圖 4-16 不同菌絲體微波萃取物對直接抑制細胞分泌 MMP-2 及 MMP-9 活 性之影響.....	63
圖 4-17 樟芝多醣體濃度對還原力之影響.....	65
圖 4-18 不同樟芝菌絲體萃取物對還原力之影響.....	67
圖 4-19 樟芝多醣體濃度對 DPPH 自由基捕捉率之影響.....	69
圖 4-20 樟芝菌絲體萃取物對 DPPH 自由基捕捉率之影響.....	71

第一章 緒論

1-1 緒論

近年來，化妝品市場已逐漸捨棄化學合成物質，取而代之新興的是崇尚自然安全的天然物質有效成份，化妝品的保養功效也已經漸漸趨向多元化，例如抗菌、清潔、抗氧化、防曬、美白、抗老化與保溼等等，自從生技產業興起之後，化妝品也開始引入生物技術，形成生技化妝品產業，其研究方向的研發趨勢如有（江，2005）：皮膚防護、美肌效果的新種生技化妝品開發，並針對體內、體外雙重作用，將高科技美肌設備與生技化妝品結合，且應用於奈米材料與生技抗氧化劑。

人口老化是全球性的趨勢，而老化後最明顯的即是皮膚的變化，因此延緩老化的活性成份特別受到矚目。一般抗老化的定義，是使皮膚看起來更年輕、減少細紋及皺紋的產生、修復細胞、改善及補充皮膚內的細胞間質或含水量等（邱與陳，2006）。2001年歐美國家的皮膚抗老化產品活性成份市場，主要成份包括維生素(65%)、多醣類(18%)、植物性藥物(6%)、蛋白質及胜肽(6%)以及酵素/輔酶(5%)等。而針對老化之機制可能採取的預防對策有：(1) 避免接觸老化因子，如紫外線、吸煙等，減少細胞老化基因被誘發的可能；(2) 適當補充抗氧化劑，消除過量的自由基或活性氧物質；(3) 適當調控基質金屬蛋白酶的活性，減少胞外基質的適度分解(邱與陳，2006)。

1-2 生物性化妝品

人類發現化妝品不但有保護肌膚的功效，還能使外觀變得更為亮麗，因此人類便開始與化妝品有密不可分的關係。1970年生物技術興起，對化妝品產業衝擊不小，化妝品產業開始引入生物技術，形成生技化妝品產業（江，2005）。

近年來化妝品市場追求自然，化學合成物質漸漸被捨棄，取而代之的是天然物質中的有效成份，來源如動物組織、植物萃取物以及微生物發酵產物等等。目前已開發出來的成份如動物組織中的玻尿酸、膠原蛋白，植物或中藥萃取物，以及微生物發酵生成之多醣體、麩酸、甲殼素以及幾丁聚醣，對皮膚具有不同的保溼、美白、抗氧化等等功效。

1-3 研究動機

化妝品是兼具科技與美學的產品，具有高經濟附加價值，近年來人們逐漸捨棄化學合成物質，進而追求天然的有效成份。其中以植物及中藥之萃取物作為化妝品原料逐漸成為一種趨勢，許多中藥複方如川芎、細辛、白朮以及杏仁之萃取物具有美白及抗老化的效果，可增加皮膚含水量及彈性，且可對皮膚中的黑色素有改善的效果（范，2006），微生物發酵之液態納豆應用於化妝品可作為膚色保護劑、紫外線吸收、抗氧化和抗青春痘菌的化妝品原

料(呂,2004)。以往在樟芝生理活性的部份,大部分是研究應用於抗腫瘤、癌症、降血糖等部份。本研究希望藉由樟芝具有抗氧化性、清除自由基等功能,開發出新的抗老化產品。本實驗藉由樟芝液態培養,得到大量的樟芝菌絲體及發酵液,取其胞外多醣體與菌絲體萃取物,希望開發出樟芝有效成份,並應於抗老化化妝品上。

第二章 文獻回顧

2-1 樟芝之介紹

2-1-1 樟芝之命名

樟芝 (*Antrodia camphorata*) 又稱牛樟芝、牛樟菇、樟菰等，只生長在台灣特有的國寶級保育樹種台灣牛樟樹上。第一次被發表時因為標本沾染靈芝孢子因而歸屬為靈芝屬，命名為 *Ganoderma comphoratum* (臧及蘇，1990)。張東柱等人於1995年，針對樟芝子實體外觀、氣味、生長速度及孢子顯微鏡結構等進行研究，重新命名為 *Antrodia cinnamomea*。之後此兩種學名被證明代表同一種真菌，因而學名被合併為 *Antrodia camphorata* (王與黃，2002)，而 *Antrodia cinnamomea* 被當作是同義名。

2-1-2 樟芝之分類

樟芝在分類上屬於真菌界(Fungi)、擔子菌(Basidiomycota)、擔子菌亞門(Basidiomycotina)、同擔子菌綱(Homobasidiomycetes)、無褶菌目(Aphulphorales)、多孔菌科(Polyporaceae)、薄孔菌屬(*Antrodia*) (黃，2000)。

樟芝的子實體屬多年生植物，散發出微微清香含有高量精油，其子實體具強烈的樟樹香氣，外型為板狀或鐘狀且無柄 (張，2001)。



圖2-1 樟芝固態平面培養30天



圖2-2 樟芝液態培養14天形成之菌絲球(pellet)

2-1-3 樟芝之活性與生理功能

樟芝之新鮮子實體含有68%水分，其乾物成分中主要含有粗纖維及碳水化合物，但亦含有高量的粗脂質(32~37%)。而菌絲體中主要成分則為碳水化合物及蛋白質(53.46% 和 23.83%)。子實體與菌絲體之甲醇萃取物皆具有強的抗氧化性質，在抗氧化力、還原力、捕捉DPPH自由基及螯合亞鐵離子之能力隨著濃度增加而有上升之趨勢。樟芝的甲醇萃取物中含有多酚類化合物，但子實體含量顯著高於菌絲體，而其良好的抗氧化性質可能因其含有如多酚類之抗氧化成分所致（黃，2000）。

樟芝的組成成份包括多醣體(polysaccharides)及三帖類(triterpenoids)。多醣體在植物當中大概佔其組成75%，為生物體基本結構以及儲存能量用的聚合物，具有生物活性，可促進細胞分裂或是有抗腫瘤的作用等等(Song and Yen, 2002)。樟芝多醣體以具有抗腫瘤活性的 β -D (1,3) 葡萄聚醣主幹，而三帖類則為樟芝的二次代謝產物，已被分離鑑定出超過百種，且被證實為樟芝的苦味來源。

目前樟芝的成份及生理活性仍在持續被研究當中。文獻中指出，樟芝發酵液或菌絲體具有降低血糖之效果（嚴，2002），且可改善血脂異常並能改善肝臟之氧化壓力，對於改善糖尿病具有正面的保健效果（劉，2002）。

樟芝多醣體可增強免疫力以及抑制腫瘤細胞生長(Lu et al, 2000)；菌絲體甲醇萃取物具良好抗氧化活性且可作為DPPH自由基之清除劑(蔣, 2005)；樟芝菌絲體及子實體對於酒精所誘發之急性肝損傷有降低之效果(戴, 2001)。

另外李炫樟指出，樟芝菌絲體之熱水萃取物在10 mg/ml的劑量下，可顯著抑制SK-Hep-1肝癌細胞所分泌的MMP-2及MMP-9活性，推測可能與樟芝熱水萃取物含有高量多醣體有關(李, 2003)。以上文獻可證明樟芝之子實體、菌絲體及發酵液皆具有良好之生理活性，可應用於抑制腫瘤，調節肝功能，抗氧化，清除自由基等研究。

2-2 皮膚與老化

2-2-1 皮膚的構造

皮膚是人類身體的最大器官，大約佔體重的16%，負責保護身體的內部組織(Laure et al，2002)、提供免疫功能、幫助調節維持體溫以及合成維他命D等等作用(Wickett et al，2006)。皮膚的結構主要可以分為表皮層(Epidermis)、真皮層(Dermis)以及皮下組織(Hypodermis)。表皮層(Epidermis)：表皮層的基本構造是由細胞所構成的薄膜，這兩種細胞為角質細胞以及樹突狀細胞。表皮層存在於皮膚最外層，厚度大約為60~300 μm左右，又可分為五層，由表層至深層分別為角質層、透明層、顆粒層、棘層與基底層。

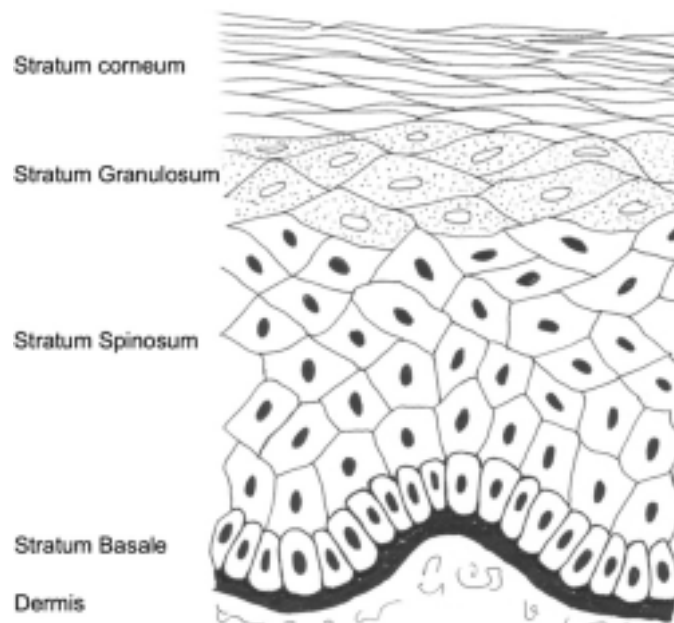


圖2-3 皮膚表皮層的主要結構(Wickett et al，2006)

1.1 角質層(stratum corneum)：

由許多互相層疊的扁平角質所構成。角質細胞(keratinocyte)會產生角蛋白(keratin)來促進皮膚的角質化，外層與脂肪物質相接合，產生脂質屏障，提供防水的功能，並可避免皮膚破裂及細菌感染，保護皮膚避免受到外來的刺激，且角質層通常可藉由體內的新陳代謝而很快的更新。

1.2 透明層(stratum lucidum)：

位於角質層與顆粒層之間，為一種透明的薄層，只存在於手掌及腳掌，作用為中和外來的鹼性物質。

1.3 顆粒層(stratum granulosum)：

有三到五層的扁平多角形細胞，結構中充滿角質層透明顆粒(karatohyaline granules)，可中和外來的酸性物質。

1.4 棘層(stratum spinosum)：

此層由許多呈方形、多角形的扁平細胞構成，且充滿許多纖維絲束狀的細胞質突起，可維持細胞間的結合以及抵抗摩擦力，是表皮層中最厚的一層。

1.5 基底層(stratum basal layer)：

位於表皮層的最底部，與真皮層接觸，由圓柱形細胞所構成。此層的角質細胞得到養分進行細胞分裂，產生新的角質細胞，並向表層發

展，逐漸取代舊有老化細胞，此程序稱為「角化過程」。另外黑色素細胞也存在於基底層，可產生黑色素。

2. 真皮層(Dermis)：是皮膚主要功能運作的地方，由結締組織所構成，可使皮膚堅韌有彈性，同時也因為富含水分及彈力蛋白，也使皮膚兼具柔軟彈性。彈性纖維的結締組織及網狀組織含有75%的膠原蛋白(collagen)、2%的彈力蛋白(elastin)以及網狀蛋白(reticulin)。
3. 皮下組織(Hypodermis)：位於皮膚的最內層，主要由脂肪組織所組成，具有維持身體體溫等功能（陳與洪，1997）。

2-2-2 皮膚老化程序

皮膚的老化可分為自然老化以及光化性老化。自然老化是隨著年齡的老化，生理也跟著自然老化（陳等人，1998）。皮膚因為細胞逐漸減少而變薄，皮膚內的膠原蛋白、彈力蛋白以及細胞間質等等，也因為年齡的衰老而逐漸流失，造成皮膚乾燥、黯淡以及產生皺紋(Uitto，1986)。自然老化是由基因來控制的，無法避免。

許多因素都會造成皮膚老化，紫外線的照射，也是引起皮膚光老化的原因之一，會產生一連串複雜相關的生化反應。首先造成發炎(inflammation)現

象，產生自由基，各種金屬蛋白酶(Matrix metalloproteinases, MMPs)被活化，然後造成膠原蛋白、彈力蛋白等胞外基質的異常降解，導致皮膚光老化(Pillai et al, 2005)。且因為長期在紫外線下曝曬，皮膚各層（圖2-4）產生複雜的生化反應(Karin et al, 2000)，細胞會分泌基質金屬蛋白酶，降解膠原蛋白、纖維蛋白以及彈力蛋白，破壞基底膜，皮膚受到光損害，造成提早老化(Chung, 2003)。

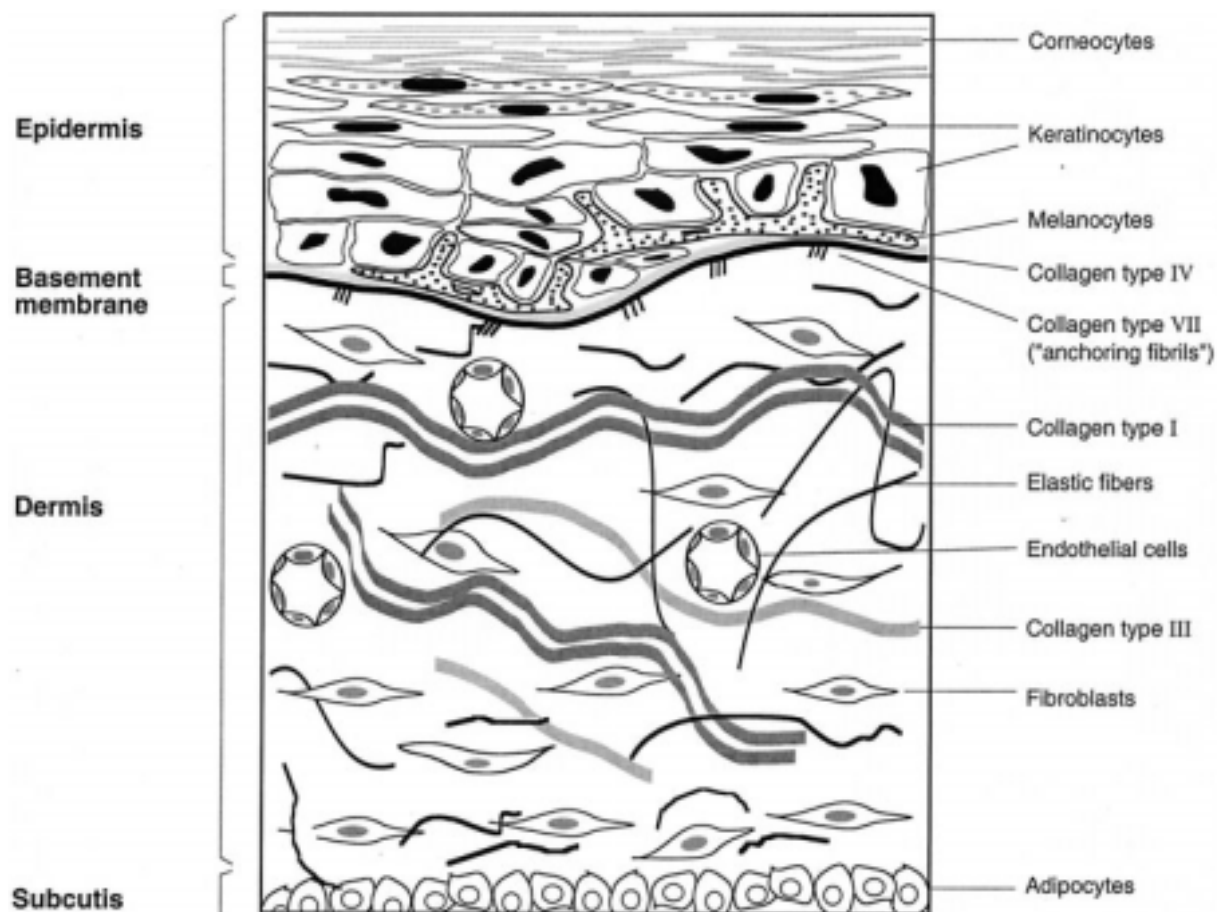


圖2-4 細胞各層的结构組成(Karin et al, 2000)

2-3 基質金屬蛋白酶與皮膚老化

2-3-1 基質金屬蛋白酶的種類與結構

基質金屬蛋白酶(Matrix Metalloproteinases, MMPs)是一種依賴金屬離子的內切胜肽酵素(metal-dependent endopeptidases)，為一群結構類似，且含有金屬離子鋅(Zinc ion)的蛋白酶，主要可分解胞外基質(extracellular matrix)以及結締組織，在正常或有病的細胞中，都扮演很重要的角色(Nagase et al, 1999)，目前已經被發現的有28種不同的相關蛋白酶，稱之為MMP家族(Sternlicht et al, 2001)。

MMPs可依據特質及初級結構分成四大類：collagenases、gelatinases、stromelysins及MT-MMPs。

1. 膠原蛋白酶(collagenase)：包括 collagenase-1 間質性膠原蛋白(Interstitial collagenase, MMP-1)，collagenase-2 嗜中性膠原蛋白 (Neutrophil collagenase, MMP-8)，collagenase-3(MMP-13)，collagenase-4(MMP-18)，可分解皮膚裡主要的膠原蛋白 Type-1 collagen，及其他型的膠原蛋白。
2. 明膠酶 (gelatinase)：包括 gelatinase-A (MMP-2) 以及 gelatinase-B (MMP-9)，其分子量分別為72-kDa及92-kDa(Bigg et al, 2001)。
3. 基質溶素 (stromelysin)：主要包含有 Stromelysin-1(MMP-3)、Stromelysin-2(MMP-10) 及Stromelysin-3(MMP-11)，可分解胞外基質。

4. 膜型MMP(membrane-type MMP):此種類型的基質金屬蛋白酶是鍵結在細胞膜上的酵素，其作用尚未非常明確而仍在研究當中(Thomas et al, 1999)。主要包含有 MT1-MMP(MMP-14)、MT2-MMP(MMP-15)、MT3-MMP(MMP-16)及MT4-MMP(MMP-17)等等。

No.	MMP No.	Class	Enzyme
1	MMP-1	Collagenases	Collagenase-1
2	MMP-8		Neutrophil collagenase
3	MMP-13		Collagenase-3
4	MMP-18		Collagenase-4
5	MMP-2	Gelatinases	Gelatinase-A
6	MMP-9		Gelatinases-B
7	MMP-3	Stromelysins	Stromelysin-1
8	MMP-10		Stromelysin-2
9	MMP-11		Stromelysin-3
10	MMP-27		Homology to stromelysin-2 (51.6%)
11	MMP-7	Matrilysins	Matrilysin (PUMP)
12	MMP-26		Matrilysin-2
13	MMP-14	MT-MMP (membrane type)	MT1-MMP
14	MMP-15		MT2-MMP
15	MMP-16		MT3-MMP
16	MMP-17		MT4-MMP
17	MMP-24		MT5-MMP
18	MMP-25		MT6-MMP
19	MMP-12	Other enzymes	Macrophage metalloelastase
20	MMP-19		RASI 1
21	MMP-20		Enamelysin
22	MMP-21		MMP identified on chromosome 1
23	MMP-22		MMP identified on chromosome 1
24	MMP-23		From human ovary cDNA
25	MMP-28		Epilysin
26	MMP-29		Unnamed

圖2-5 基質金屬蛋白酶(MMPs)之分類(Rajeshwar et al, 2007)

2-3-2 基質金屬蛋白酶與皮膚老化之關聯性

在皮膚當中的膠原蛋白主要為Type I (佔70%左右)，以及Type III (約佔15%)，其他還有膠原蛋白Type V~VIII，彈力蛋白(elastin)，蛋白多醣(proteoglycans)，纖維網狀蛋白(fibronectin)和其他胞外基質蛋白(Laure et al，2002)。

UV照射造成皮膚提早老化，基質金屬蛋白酶(Matrix Metalloproteinases, MMPs)扮演重要的角色。在光老化的過程中，基質金屬蛋白酶異常活化，會導致膠原纖維變質，能降解基底膜膠原蛋白、纖維蛋白和彈性蛋白，並具有明膠溶解作用，使皮膚網狀結構瓦解(鄭，2005)。在光老化的皮膚當中，Type I 的膠原蛋白被發現因被分解而減少，老化過程中會藉由 MMPs來分解膠原蛋白，MMPs 會造成膠原蛋白酶的活性過度表現，因而導致胞外基質及結締組織受到分解(West et al，1989)。

在第一型膠原蛋白(collagen type-1)的分解過程中可以發現，經由 collagenase進行起始剪切後，是由 MMP-2 及 MMP-9 進行最終分解，將膠原蛋白完全降解，所以 MMP-2,9 在最終分解纖維膠原蛋白的程序上扮演非常重要的角色。而除了在最終分解部份，根據文獻指出(Aimes et al，1995)，明膠酶也具有起始剪切膠原蛋白的能力，MMP-2 被發現也會剪切第一型的膠原蛋白，其所產生的片段(N端3/4及C端1/4)，也與 collagenase 所剪切出來

的片段是完全相同的，所以MMP-2及MMP-9具有起始和最終分解第一型膠原蛋白的能力，在胞外基質膠原蛋白組成的改變及製造中，扮演非常重要的角色(Okada et al，1995)。

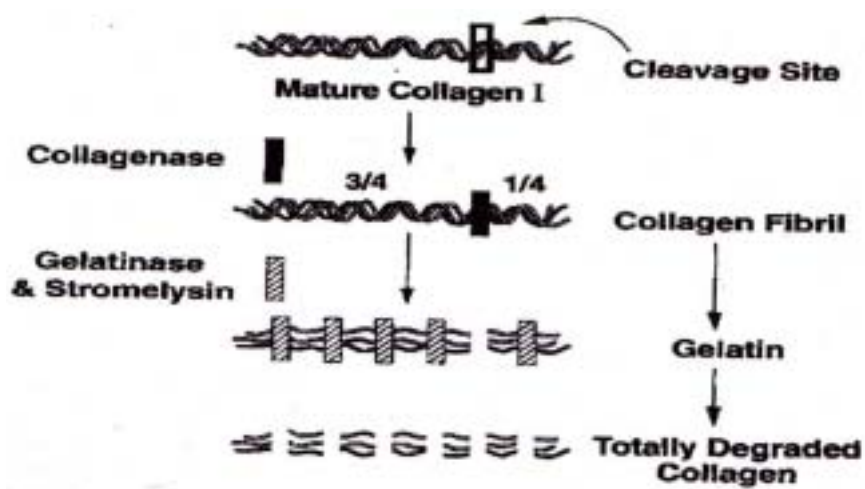


圖2-6 MMPs分解第一型膠原蛋白(Gross J，1984)

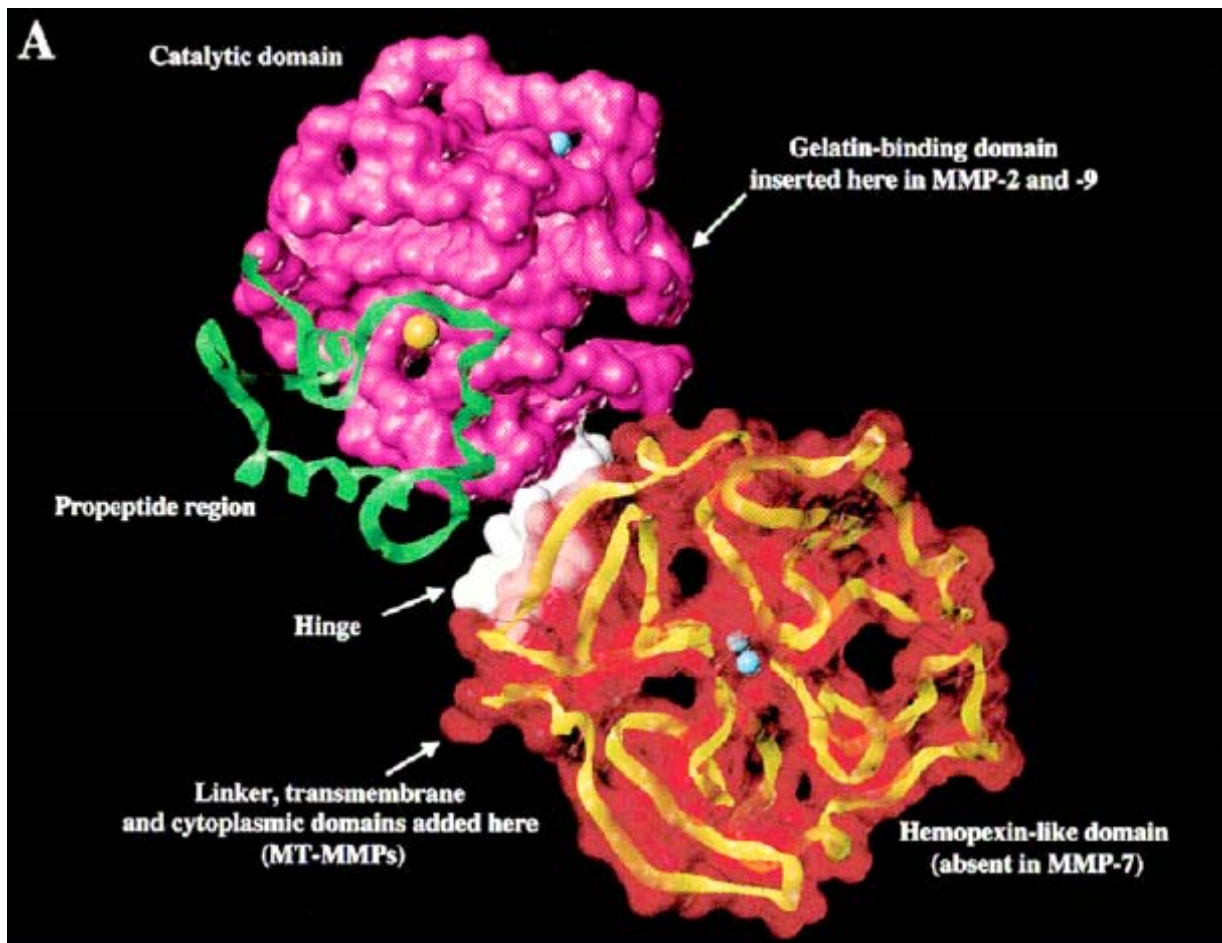


圖2-7 基質金屬蛋白酶(MMPs)三級結構示意圖(Massova et al, 1998)

2-4 皮膚老化之自由基學說

在皮膚老化的自由基學說主要認為，隨著年齡增大的老化現象是由於自由基的副作用所引起的。在正常的情況下，生物體內所含自由基的產生與消失是處於一種動態平衡，自由基(free radical)在正常細胞的新陳代謝中不斷的產生，並且參與了正常生物體內各種有益的作用，例如防禦作用，或是某些生理活性物質的合成等等。在生物體的發育階段或是正常運作階段，即使某種自由基的產生多了一些，也會被生物體內的各種自由基清除機制所清除掉，而不至於會對生物體造成加害。這些自由基的清除機制包括一系列的酵素，例如超氧化歧酶(SOD)及過氧化氫酶等，以及一些抗氧化劑像是維生素A、維生素C及維生素E等等。

當生物體逐漸衰老時，體內清除自由基的能力就會出現急性或慢性減弱的現象，進而產生了清除不了的多餘自由基，這使得自由基的產生與清除失去了平衡。過剩的自由基對於構成細胞組織的大分子化學結構會發生破壞性反應，隨著此破壞的層次逐漸擴展，會使得正常組織型態造成損傷且失去功能的完整性，當損傷程度超過修復，或是喪失代謝能力後，組織器官的機能就會逐步發生紊亂及障礙，也就表現出老化現象。老化是一個極為複雜的過程，自由基老化學說只能解釋一部分的現象，但是自由基在促使衰老過程加快的作用是確切的(Jenkins, 1988; Davies et al, 1982)。

2-4-1 自由基

自由基(free radical)指的是以游離狀態存在，且帶有一個或多個不成對電子的分子、原子或離子，可依照其未成對電子所在的地方，區分為以碳、氮、氧或硫為中心的不同自由基。自由基的表示方法通常在帶有不成對電子的原子符號上，標注一個原點，例如「HO₂·」等等。一般來說，具有非常活潑化學活性的原子同時其自由基也會有非常高的反應性。

許多生物體內自由基的作用是由氧分子所獲得，大部分自由基具有高度的反應性，處於較不穩定的狀態，且會與非自由基發生連鎖反應(chain reaction)以產生新的自由基。

生物體內所存在的自由基，是從1986年發現了清除超氧化物自由基(O₂·或HO₂·)的超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)之後，證實了生物體內內源性自由基的存在。與生物體老化有關的自由基主要是一些含氧的自由基，例如活性氧自由基與過氧化氫自由基等等。

2-4-2 活性氧

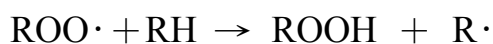
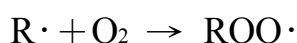
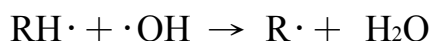
活性氧(active oxygens)是指當氧連續受單電子的持續還原所形成的一連串中間產物與反應物，或三態氧氧分子(triplet oxygen, O₃)，被激發到單態的含氧分子。自從發現SOD具有清除超氧化物自由基的作用後，發現氧的某些

代謝產物 $O_2\cdot^-$ 、 $HO_2\cdot$ 、 H_2O_2 與 $\cdot OH$ 以及其衍生物的活性物質會損傷生物體，例如脂質過氧化物與單線態氧($\cdot O_2$)。這些自由基都是氧的某些代謝產物以及含氧的衍生物，直接或間接由氧轉化而成的，由於它們都含有氧，且具有較氧活潑的化學反應性因此將氧自由基(oxy-radicals)與其他非自由基含氧衍生物，通稱為活性氧。

2-4-3 脂質氧化反應

一般油脂在室溫下會與氧結合，引起自氧化反應。不飽和脂肪酸或含不飽和脂肪酸之油脂在自氧化反應的初期，會先產生過氧化物，然後再分解成揮發性的醛類及酮類。現今有許多證據顯示，油脂的過氧化產物與人的老化、致癌性及心血管疾病有著密切關係(Thomas, 1995)。

活性氧自由基對皮膚老化有著重要的作用，隨著年齡的增加以及各種疾病的影響，使得人體內的活性氧自由基增加，再加上外部原因如紫外線的照射、溫度、溼度的變化都可以使人體內產生活性氧自由基。活性氧可以引發人體內脂質中的不飽和脂肪酸氧化，發生脂質氧化反應，產生脂質過氧化自由基 $R\cdot$ 、 $ROO\cdot$ 與 $ROOH$ ，這些反應如下：



以上反應為產生脂質过氧化物的鏈式反應，而ROOH會與R·反應，導致鏈分裂而得到脂質過氧化物最終產物之一的丙二醛。丙二醛為不飽和脂質過氧化作用的特產物，它在人體老化過程中扮演重要的角色。

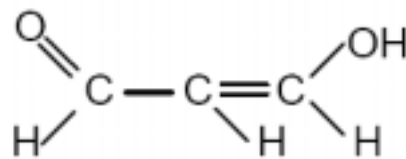


圖2-8 丙二醛之結構式

人體的細胞膜是由脂質以及蛋白質所組成，正常情況下膜蛋白質會不斷的進行締合(association)以及解離過程，但是當自由基的增多引起了脂質過氧化作用，使得膜蛋白質處於永久性的締合狀態，會改變蛋白複合體的分佈狀況，嚴重損害生物膜的功能。而脂質過氧化作用會造成膜的不飽和脂肪酸減少，飽和脂肪酸相對增多，這會讓膜變為剛性狀態，流動柔軟性降低。另外脂質過氧化作用所產生的自由基會對膜上的蛋白質或膜結合酶起作用，使得膜結構起變化，導致膜功能異常而使機體更加處於不正常狀態，表現在皮膚上則使皮膚乾燥、出現皺紋等老化現象。

而以上脂質過氧化反應中的產物丙二醛，它會與蛋白質反應生成一種螢光產物希夫碱(Schiff Base)。丙二醛也會與核酸上的氨基或是磷脂類起反應，生成類似的螢光產物，這些產物就表現為老年色素（脂褐素），也就是俗稱

的老年斑，是皮膚老化的一種現象。

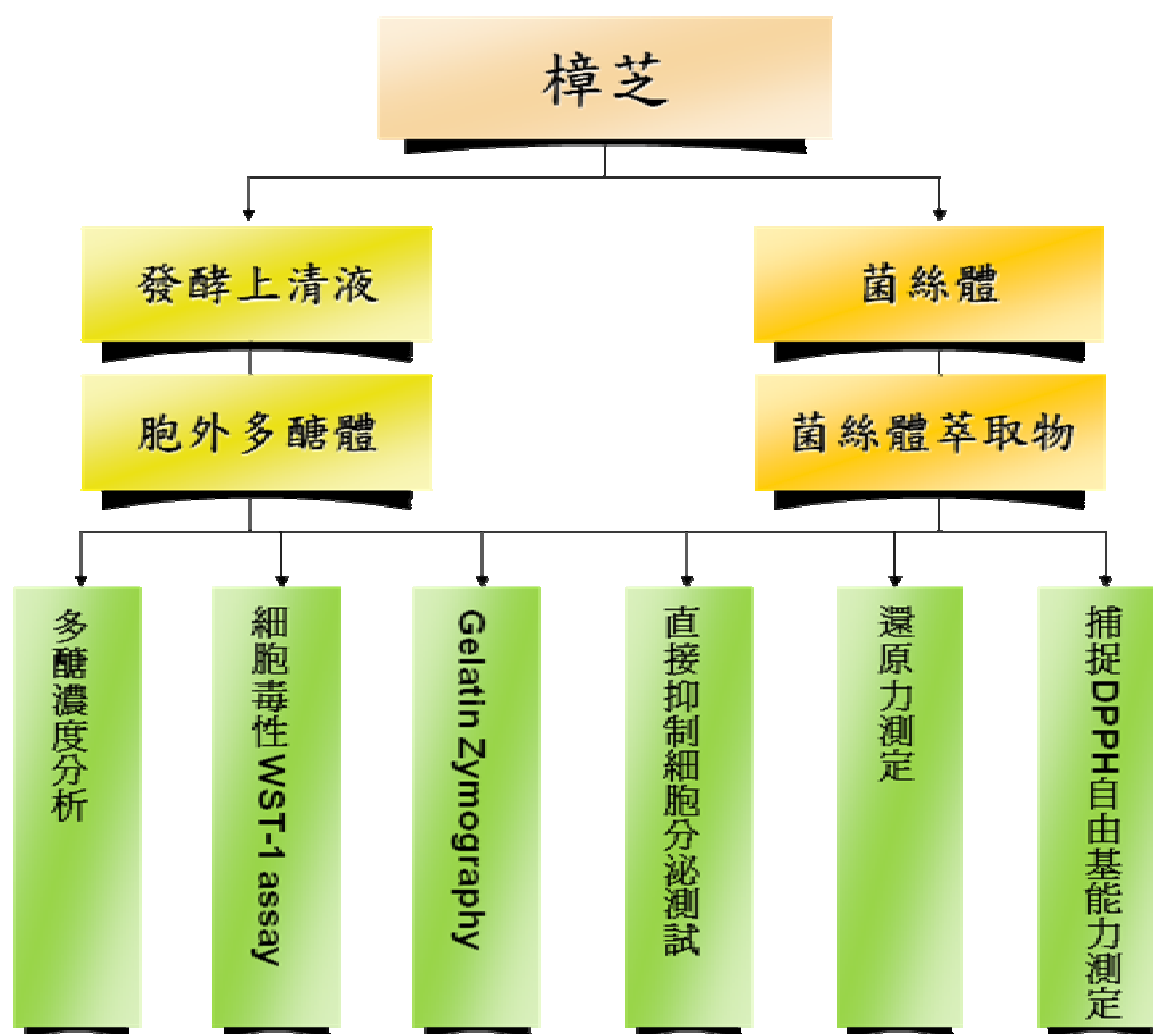
2-4-4 抗氧化作用與機制

要防止脂質氧化首先就是去除其周圍的氧，然後為去除促氧化的因子，所以可藉由添加阻止脂質氧化連鎖反應的物質，來達到預防或是延緩氧化的發生。添加抗氧化劑主要可將脂質氧化過程中生成的各種自由基清除，並且中斷連鎖反應已達到阻止脂質氧化反應之進行。以下由抗氧化劑作用的原理，可分為三大類(Dziezak, 1984)：

1. 自由基終止劑：藉由釋放氫氧基上的氫原子，提供一個電子或直接供給氫原子給自由基，使其形成較穩定的形式，而終止氧化反應之進行，例如酚類化合物的抗氧化劑即屬於此類。
2. 還原劑、清除劑：利用捕捉氧原子，提供一個傾向還原狀態的環境，或是將以氧化的過氧化物還原，以減緩氧化的進行，此類型的抗氧化有核黃素(riboflacin)等等。
3. 金屬螯合劑：金屬離子會促進自由基的生成，加速氧化反應的進行，再許多種離子中，以銅和鐵離子的促氧化能力最強，如果抗氧化劑具有捕捉並螯合金屬離子的能力，便可以達到延緩氧化的效果，檸檬酸和EDTA便是屬於此類型的抗氧化劑。

2-5 實驗架構

本實驗將樟芝以液態培養方式，得到大量發酵液與菌絲體，進而製備為胞外多醣體及菌絲體萃取物，進行各項分析。



第三章 材料與分析

3-1 實驗菌株及細胞

本實驗所採用的樟芝菌株為 *Antrodia camphorata* (BCRC 35396) 係購自食品工業發展研究所生物資源中心，菌株以生資中心所提供之配方 (Glucose 2%，Malt extract 2%，Peptone 0.1%，Agar 2%) 做為斜面培養基，在 25 °C 培養箱生長，之後置於 4 °C 冰箱中保存。

細胞株為購買自食品工業發展研究所生物資源中心之3T3小鼠纖維母細胞 (BCRC 60071)，屬於貼附型細胞(adherent-type cell)，培養於37°C、5% CO₂ 的細胞培養箱。

3-2 實驗藥品

藥品名稱	來源
Corn starch	日正
YM Broth	DIFCO
Peptone	DIFCO
Malt extract	MERCK
Tris	Sigma
Gelatin	Sigma

Ammonium persulfate	Sigma
Glycine	Sigma
SDS	Sigma
Coomassie Brilliant Blue R	Sigma
Triton X-100	Sigma
Sulfuric acid	SHOWA
Phenol	聯工
TEMED	Sigma
DMSO	Sigma
95% Ethanol	友和
Potassium ferricyanide	SHOWA
Ferric chloride	SHOWA
Trichloroacetic acid	Sigma
1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl	Sigma
Acetic acid	SHOWA
XY-X, Papain, Cellulase, Bromelain	嘉年生化
Methanol	ECHO

3-3 實驗儀器與設備

儀器設備	型號	廠牌
pH meter	Cyberscan pH510	美國 EUTECH
電磁加熱攪拌機	C-MAG HS7	德國 IKA
高壓滅菌釜	HI-340	台灣宏霖
無菌操作台	JW-4N	台灣亮盛
試管振盪器	MSI minishaker	德國 IKA
迴轉式震盪培養箱	LUS-150	台灣亮盛
往復式震盪恆溫水槽	OSI-500	台灣健鑫
分光光度計	GENESYS UV10	美國 Thermo
微電腦蒸餾水製造機	WSC044	英國 FISTREEM
超純水製造機	Simplicity	美國 Millipore
超音波震盪機	5210	美國 BRANSON
迷你電泳槽	SE250	美國 Hoefer
電泳電源供應器	EPS301	美國 Hoefer
高速中型離心機	Universal-32R	德國 Hettich
高速冷凍離心機	HARRIER 18/80	日本 SANYO

冷卻器	KCO3	台灣健鑫
冷凍乾燥機	CT-110	丹麥 HETO
高真空油壓式幫浦	PASCAL 2010 C1	法國 ALCATEL
CO ₂ 培養箱		美國 Thermo
微孔盤分析儀	MRXII	英國 Dynex

3-4 分析方法

pH 測定

使用 pH meter 測定。

菌體濃度

取適當培養發酵液，以 100 mesh 篩網過濾，再以蒸餾水沖洗菌體 3-5 次，之後將過濾後的菌體裝於已知重量的鋁盤，放置於 60°C 烘箱烘乾後，即可測量其菌體乾重量。

多醣濃度測定

以酚-硫酸法 (Phenol-sulfuric acid assay) 檢測多醣體含量，標準品為 D(+)-glucose，其濃度範圍為 0.01~0.2 mg/ml。取適當稀釋過後之樣品溶液 2 ml，加入 1 ml 5% 酚溶液混合，再加入 5 ml 濃硫酸，於抽風櫃靜置 10

分鐘，之後於 25°C 恆溫水槽水浴反應 15分鐘，待呈色穩定後，以分光光度計測其在波長 490 nm 下之吸光值。對照葡萄糖標準品濃度與吸光值標準曲線，即可求得多醣濃度。

細胞毒性測試

利用 Premixed WST-1 Cell Proliferation Reagent 來進行細胞存活率的測定。於 96 孔盤加入 3T3 細胞懸浮液(5×10^4 cells/ml)，培養 24 小時使細胞貼附，之後加入各濃度樣品，使總體積為 100 μ l，反應 24 及 48 小時後，加入 10 μ l 的 WST-1 溶液，再培養 4 小時，然後以 ELISA reader 測其在 450 nm 下的吸收值。

$$\text{細胞存活率(\%)} = \text{樣品組吸收值} / \text{控制組吸收值} \times 100\%$$

Gelatin Zymography (David et al, 1994)

收集細胞培養液，將樣品加入並反應適當時間後，進行以明膠為受質的電泳酵素分析法。首先製備含有 0.1% Gelatin 的 8% SDS-PAGE 電泳膠片，並將樣品與 sample loading buffer 以 1:1 的比例混合，加入膠片中，以 100 伏特的條件進行電泳分離。完成後將電泳膠片拆下，置於 washing buffer 洗 15 分鐘共兩次，然後移除 washing buffer 並加入 reaction buffer，在 37°C 反應 16~20 小時。反應完畢後以 fixing buffer 固定 20 分鐘，再以 Coomassie

blue R-250 進行染色 20 分鐘，之後進行退染，直到透明的 band 清晰可見，最後拍照並以 ImageJ (NIH, USA)軟體進行分析。

1. Separating Gel 的製備：配製含 0.1% Gelatin 的 8% SDS-PAGE 膠片

1.5 M Tris-HCl 緩衝溶液，pH 8.8	2.5 ml
40 % acrylamide /Bis solution	2 ml
Ammonium Persulfate (10 mg/ml)	0.5 ml
2 % gelatin solution	0.5 ml
10 % SDS buffer	100 μ l
dd H ₂ O	4.5 ml
TEMED	7.5 μ l

2. Stacking Gel 的製備：

0.5 M Tris-HCl 緩衝溶液，pH 6.8	1.3 ml
40 % acrylamide /Bis solution	0.5 ml
Ammonium Persulfate (10 mg/ml)	0.25 ml
10 % SDS buffer	50 μ l
dd H ₂ O	2.9 ml
TEMED	10 μ l

3. Running Buffer：

Tris-base	3.0 g
Glycine	14.7 g
10 % SDS	10 ml

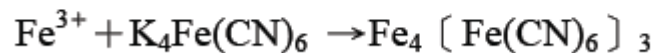
dd H₂O

1000 ml

4. Washing Buffer : 2.5% Triton X-100
5. Reaction Buffer : 40 mM Tris-HCl pH8.0 , 10 mM CaCl₂ , 0.02% NaN₃
6. Fixing Buffer : 45% methanol , 10% acetic acid

還原力測定 (Oyaize , 1986)

還原力的測定,此方法主要是依據普魯士藍 Fe₄[Fe(CN)₆]₃ (Prussian blue) 的生成量為指標,原理為將赤血鹽 K₃Fe(CN)₆ 還原成黃血鹽 K₄Fe(CN)₆,然後黃血鹽再利用 Fe³⁺形成普魯士藍,藉由波長 700 nm 的吸光值變化來檢測還原力的大小,吸光值越高則表示還原力越強。



取 0.25 ml 的樣品,加入 0.25 ml 之 0.2 M 磷酸緩衝液(pH 6.6)以及 0.25 ml 的 1% potassium ferricyanide (赤血鹽),在 50°C 水浴反應 20 分鐘後,快速使其冷卻,然後加入 0.25 ml 10% TCA (trichloroacetic acid)溶液,均勻混合後以 1000 × g 離心 10 分鐘,取其上清液 0.5 ml,再加入 0.5 ml 蒸餾水以及 0.1 ml 之 0.1% ferric chloride,混合後再反應 10 分鐘,以分光光度計測其在波長為 700 nm 之吸光值。

捕捉 DPPH 自由基能力測定 (Yamaguchi et al, 1998)

DPPH (α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) 自由基是一種非常穩定的自由基。在抗氧化的研究常常使用 DPPH($C_{18}H_{12}N_6O_5$) 來檢測抗氧化劑提供氫的能力，藉由測定樣品在 517 nm 的吸收值來判定樣品是否具有清除自由基的能力，當吸收值越低，就代表樣品對於 DPPH 自由基的捕捉能力越強，也就是其具有良好提供氫的能力。

取 0.2 ml 樣品溶液，加入 3.8 ml 的甲醇溶液以及 1 ml 之 0.2 mM DPPH 自由基甲醇溶液，充分混合後，靜置反應 30 分鐘，再以分光光度計測其於 517 nm 波長下之吸光值，並計算其自由基捕捉率。

$$\text{捕捉率(\%)} = (A_c - A_s) / A_c \times 100\%$$

A_c ：不含樣品之對照組於 517 nm 之吸光值

A_s ：含有樣品之實驗組於 517 nm 之吸光值

3-5 實驗方法

3-5-1 樟芝菌種培養與保存

3-5-1-1 菌種斜面試管保存

本實驗以試管斜面保存菌種。配製 Malt extract 2%、Glucose 2%、Peptone 2%、Agar 2%作為斜面培養基，接菌時取一白金鉤，過火焰燒至通紅三次後，將樟芝菌種刮取小塊移植至空白斜面試管，標示清楚後放入 25°C 培養箱培養，待其長滿後放入 4°C 冰箱保存備用。

3-5-1-2 培養皿平面培養與接菌活化

以 Malt extract 2%、Glucose 2%、Peptone 2%、Agar 2%作為培養皿平面培養基，接菌時取一已長有樟芝菌絲之斜面菌種，以白金鉤刮取一小塊移至空白培養皿中央，之後放入 25°C 培養箱中靜置活化培養。

3-5-1-3 種菌的製備

本實驗種菌所採用的液態培養基為食品工業發展研究所提供之基礎培養基配方，其組成成份為：Malt extract 2%、Glucose 2%、Peptone 0.1%，並利用 0.1N HCl 及 0.1N NaOH 將培養基 pH 值調整為 5。

裝於三角瓶的培養基經滅菌過後，取一已長滿樟芝菌絲之平面培養皿，

用鋁片製成的切割器，切 4 個單位的菌絲塊(每塊單位面積 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$)，以白金鈎將菌絲塊接入液態基礎培養基中，並置於 25°C 迴轉式恆溫培養箱，以轉速 100 rpm 培養 7 天做為種菌。

3-5-2 三角瓶液態培養試驗

樟芝三角瓶液態培養所採用之培養基，係為本實驗室於先前研究中以回應曲面法(RSM)所探討出來的最佳培養組成(黃, 2001)，以玉米澱粉(corn starch)為碳源，氮源則是採用 YM Broth，其組成為：Corn starch 4.78%、YM Broth 3.19%，並利用 0.1N HCl 及 0.1N NaOH 將培養基 pH 值調整為 5.54。

將基礎培養基培養 7 天後的種菌，以滅過菌的均質機(polytron)攪碎菌絲球，並以 10% 的接菌量接至每個三角瓶，然後放入 25°C 迴轉式恆溫培養箱，以轉速 100 rpm 培養。

3-5-3 樟芝胞外多醣體濃度測定與製備

樟芝胞外多醣體採用乙醇沈澱法來分離。將三角瓶液態培養適當天數後，以 100 mesh 篩網過濾分離樟芝菌絲體，將去除菌絲球之發酵液以 2500 rpm 離心 20 分鐘，取其上清液與 95% 之酒精以體積比 1:4 之比例混合，於 4°C 冰箱中靜置 24 小時以沈澱多醣體。

之後再以 2500 rpm 離心 20 分鐘，收集其沈澱物，置於 60°C 烘箱去除酒精，然後加入去離子水回溶，並將樣品經適度稀釋後，以酚-硫酸法測定其多醣濃度。將已知濃度之多醣溶液以 0.22 μm 過濾，稀釋成各個濃度，並保存於 4°C 備用。

3-5-4 樟芝菌絲體酵素萃取物之製備

將樟芝菌絲體用 100 mesh 篩網過濾分離後，以去離子水沖洗 3~5 次，然後裝於 50 ml 之玻璃樣品瓶，放置於 -20°C 冰箱冷凍，之後以冷凍乾燥機進行乾燥。

取 XY-X、Bromelain、Papain 及 Cellulase 酵素各 1 g，冷凍乾燥後的樟芝菌絲體 2 g，加入 200 ml 之去離子水，以 0.1N HCl 及 0.1N NaOH 將 pH 調整至各酵素作用範圍，然後依各酵素作用之最佳溫度萃取 6 小時，之後將萃取液以 2500 rpm 於室溫下離心 20 分鐘，取其上清液保存備用。

表 3-1 各酵素之反應 pH 及溫度

酵素	pH	萃取溫度 ()
Papain	5	50
Bromelain	6	45
Cellulase	4.5	55
XY-X	4.5	50

3-5-5 樟芝菌絲體微波萃取物之製備

微波萃取法的優點有：萃取成份提高、時間耗時少，且操作層面簡單不繁瑣。其原理為：(1)利用頻率高的電磁波，穿透萃取溶劑到內部組織，使細胞壁因受熱而膨脹，導致細胞破裂，因而將細胞內的有效成份釋放出來並溶解在萃取溶劑中；(2)微波所產生的電磁波，會加速被萃取部份成份向萃取溶劑介面擴散的速率，假若用水當為萃取溶劑，在微波的磁場下水分子會形成激發態，這種能量為一種高能不穩定態，它會增加主要活性成份的萃出，再加上水分子本身會釋放能量回到基態，此能量會傳遞給其他物質，加速熱傳導而減少本來所需要的時間，進而使萃取速率提高。

將樟芝菌絲體用 100 mesh 篩網過濾分離後，以去離子水沖洗 3~5 次，然後裝於 50 ml 之玻璃樣品瓶，放置於 -20°C 冰箱冷凍，之後以冷凍乾燥機進行乾燥。

取甲醇、乙醇及純水各 200 ml 當作溶劑，分別加入 2 g 的冷凍乾燥樟芝菌絲體，放入微波爐內進行微波萃取，每 30 秒拿出冷卻至 30°C 以下才可繼續進行微波，總共重複八次，之後進行離心，取上清液冷凍乾燥，再將所得粉末以適量水回溶備用。

3-5-6 細胞培養與繼代

本實驗所用細胞株為購自食品工業研究所之 3T3 小鼠胚胎纖維母細胞 (BCRC 60071)，屬於貼附型細胞(Adherent cell)，培養於 37°C、5% CO₂ 培養箱，以顯微鏡觀察細胞生長狀況，長至 8~9 分滿進行繼代。

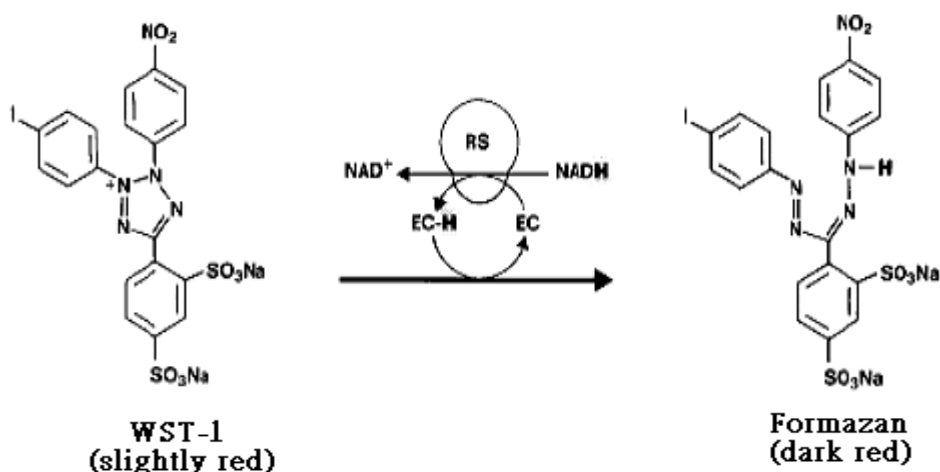
表 3-2 細胞培養基組成

培養基成份	廠牌	添加量
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	GIBCO	88%
FBS (Fetal bovine serum)	Biological	10%
P/S	Biological	1%
L-Glutamine	BioWhittaker	1%

3-5-7 細胞存活率之測試 (WST-1 assay)

本實驗利用 Premixed WST-1 Cell Proliferation Reagent(Clontech)來進行細胞毒性測試。WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate)是一種 tetrazolium salts，可以用來測量活細胞受生長因子、細胞激素、營養素刺激後的增殖，也可以用來分析細胞毒性化合物，如抗癌或其他毒性藥物對細胞的影響。此測試利用活細胞粒線體中的酵素 (succinate dehydrogenase)可將淡紅色的 WST-1 代謝轉化成深紅色結晶狀的

formazan，以藉由 WST-1 被代謝的情況來評估活細胞量的多寡。此反應如下：



在 96 孔盤中置入每孔 5×10^3 cells/100 μ l，培養 24 小時使細胞貼附後，加入不同樣品溶液，於 37°C、5% CO₂ 培養 24、48 小時後，加入 10 μ l 之 WST-1 溶液，再培養 3 小時，然後以 microplate reader 於 450 nm (reference 650 nm) 波長下讀取吸光值，並與控制組比較計算得到細胞存活率。

3-5-8 抑制 MMP-2 及 MMP-9 活性之測試(Gelatin Zymography)

以明膠為 substrate 的酵素電泳法，利用 substrate (protein) 會與 proteinase 結合而受分解的原理，將 substrate (gelatin) 加入 SDS-PAGE 的下層膠中，經過電泳後樣品中所含的 proteinase 會依據分子量大小的不同而停留在 SDS-PAGE 的特定位置。經過染色後，在藍色背景下，proteinase 所在的位置便會呈現透明(clear band)，再依據白色區域的深淺和大小，便可判斷此 proteinase 的活性高低。

首先製備含 0.1% Gelatin 的 8% SDS-PAGE 電泳膠片，將 sample 與 sample buffer 混合後，loading 至膠片中，以 100 伏特進行電泳，完成後將膠片拆下，加入 washing buffer 洗 30~40 分鐘，然後移除 washing buffer，並加入 reaction buffer 於 37°C 反應 16~20 小時，之後染色並進行退染，直到 clear band 可清楚可見，拍照後以影像軟體 ImageJ (NIH, USA) 進行分析。

第四章 結果與討論

4-1 樟芝三角瓶液態培養試驗

將經過基礎培養基培養七天過後的樟芝種菌，以 polytron 均質機打碎菌絲體後，接種量為 10% 接至新鮮液態培養基進行培養。因為樟芝的生長速率非常緩慢，培養的開始前幾天皆看不出有明顯的變化，再加上液態培養基的碳源為不可溶性的玉米澱粉，前幾天會呈現濃稠狀，故選擇從生長第六天開始測量各項分析，此時玉米澱粉已被大量消化，培養液大致上轉為澄清，但為避免測定 biomass 時受到殘餘玉米澱粉的干擾，樟芝菌絲體均會先以清水洗 3~5 次之後才會進行烘乾。

由圖 4-1 顯示，樟芝菌絲體在第 6~10 天間快速的生長，至第 10 天之後進入穩定期，菌絲體最大量可達到 26.90 g/L。在多醣體部份，因為液態培養基中本身就含有多醣的成份，因此從圖中可看出前 28 天均有多醣的存在，且濃度隨著時間而下降，直至第 28 天達最低點後，開始往上升，最高可達到 4.33 mg/ml，故可由此推論，第 28 天之後培養液中的多醣組成才被消耗完，至此開始所測得的數據才完全為樟芝多醣體。因此，欲製備樟芝二次代謝產物多醣樣品時，培養天數必須大於 28 天，才能真正得到樟芝本身生成之多醣體。

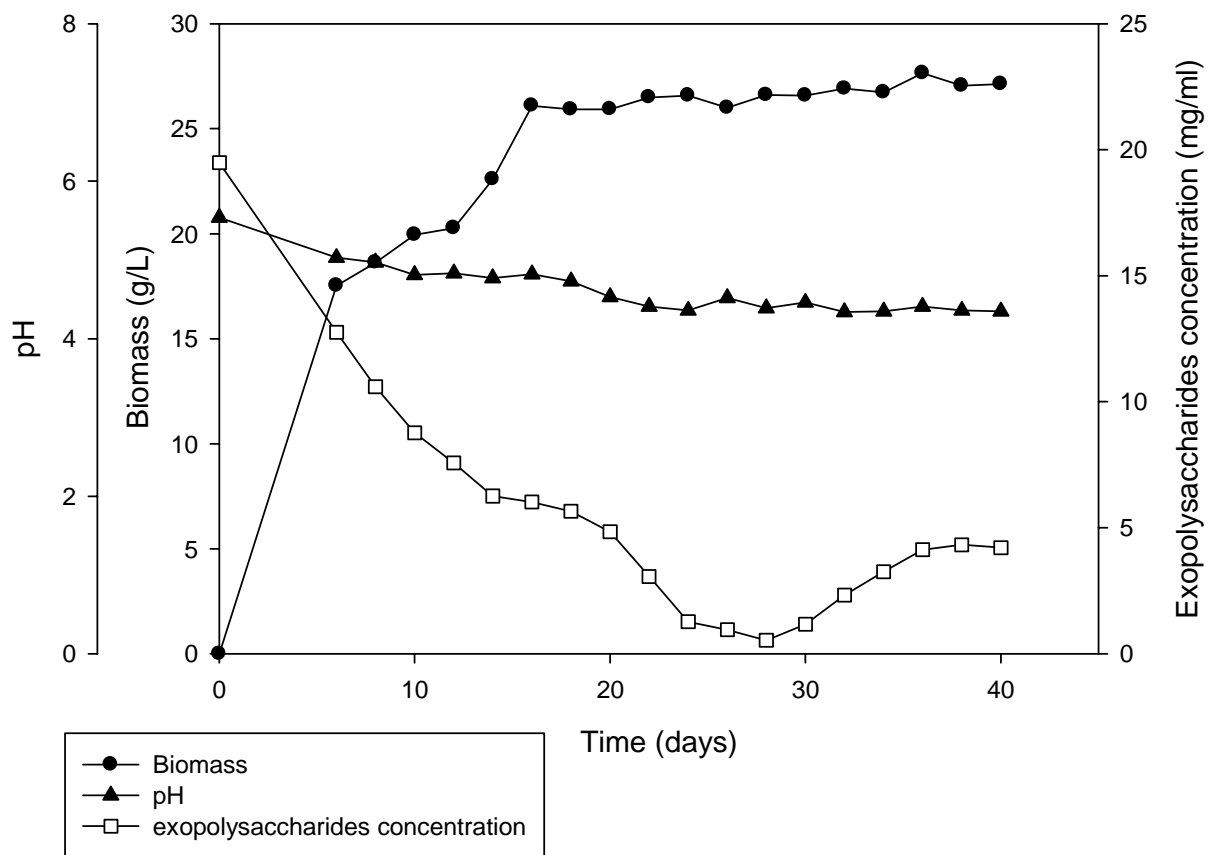


圖 4-1 時間對樟芝液態培養及多醣體生成之影響

培養基成份：Corn starch 4.78%

YM broth 3.19%

培養條件：接菌量 10%，初始 pH 5.54，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

4-2 樟芝胞外多醣體之細胞效應

4-2-1 樟芝多醣體濃度對細胞存活率之影響

在以樣品處理 3T3 細胞進行實驗前，必須先做細胞毒性測試，以確認在不同濃度的樟芝多醣體劑量下，不會對細胞造成毒性傷害。此毒性分析主要在偵測樟芝多醣樣品處理過後的細胞存活率，以 WST-1 assay 來進行測試。

首先製備樟芝多醣體，我們選取的濃度範圍為 0~5 mg/ml，處理細胞 48 小時之後，進行 WST-1 毒性測試，以控制組(未添加任何樣品)的存活率為 100%，分析細胞的存活率。結果如圖 4-2 顯示，在此濃度範圍劑量下的樟芝多醣體樣品溶液，處理細胞 24 及 48 時，均未對小鼠 3T3 纖維母細胞造成毒害，不會產生細胞毒性，因此在此範圍內均為安全劑量。

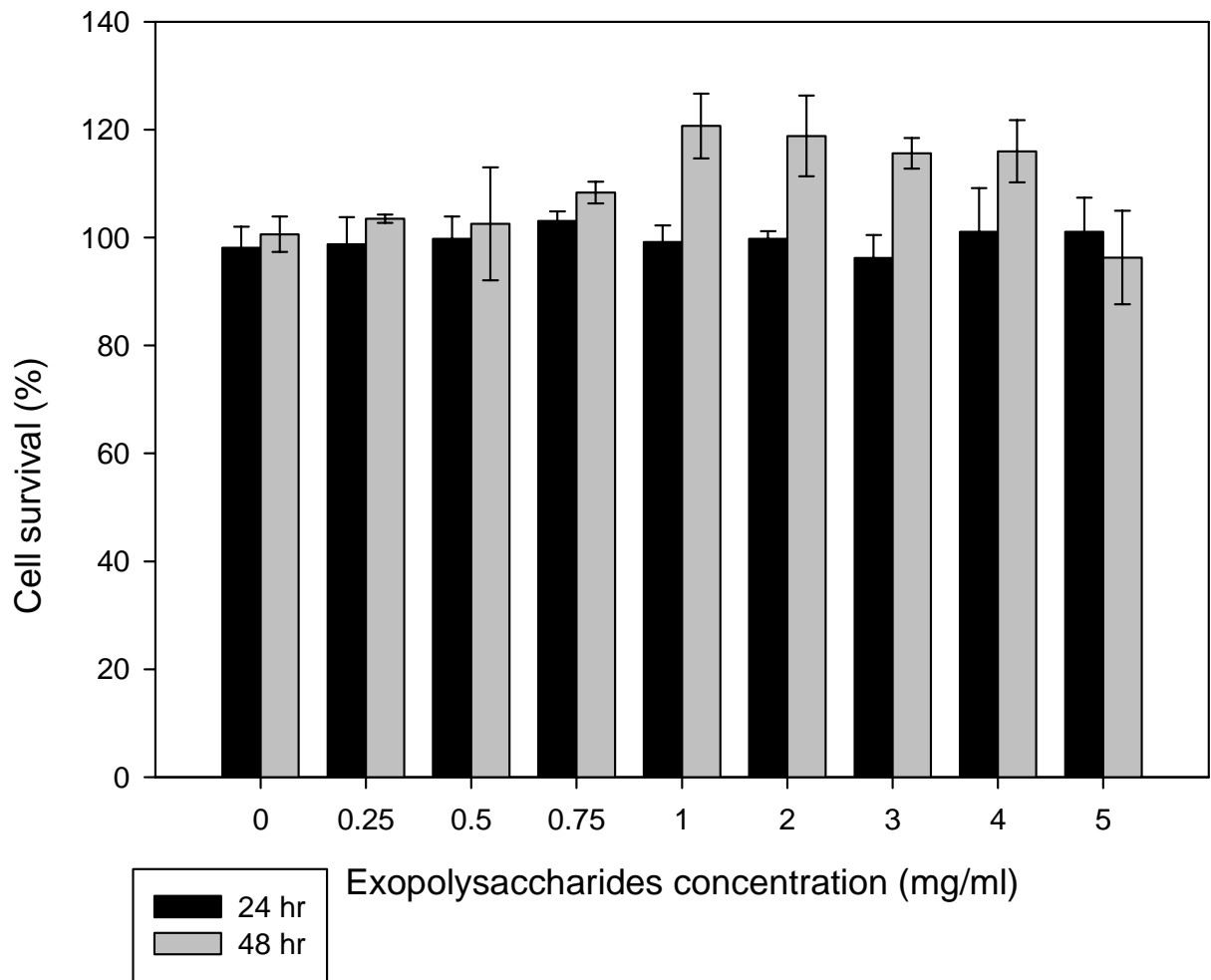


圖 4-2 樟芝胞外多醣體濃度對細胞存活率之影響

以不同濃度(0~5 mg/ml)的樟芝多醣體處理 3T3 細胞 48 小時，分析細胞存活率。

control 組：未添加樟芝多醣體處理之 3T3 細胞存活率，以此設定為 100%

4-2-2 樟芝多醣體濃度對 MMP-2 及 MMP-9 活性之影響

在樟芝多醣體濃度對於 MMPs 活性影響的實驗中，首先 3T3 細胞經正常培養 48 小時後，將培養液換成 serum free medium 再培養 24 小時，之後收集細胞培養液，加入各濃度之樟芝多醣體與其反應，之後進行 Gelatin Zymography 分析 MMP-2 及 MMP-9 之活性，以確認樟芝多醣體是否會抑制 MMPs 的酵素活性。

由實驗結果圖 4-4 顯示，在加入各濃度(0~5 mg/ml)的樟芝多醣體，處理 3T3 細胞培養液 48 小時後，對細胞培養液內所含 MMP-2 及 MMP-9 的活性，的確具有抑制的效果。在 MMP-2 的部份，其酵素活性的抑制效果，隨著樟芝多醣體濃度增加而趨見明顯，在 3.5 mg/ml 濃度以上的劑量效果逐漸達穩定，抑制率可達到 50%左右，而在 MMP-9 部份，樟芝多醣體濃度在 3 mg/ml 以上的劑量，抑制效果最為顯著，可達到 60%以上。

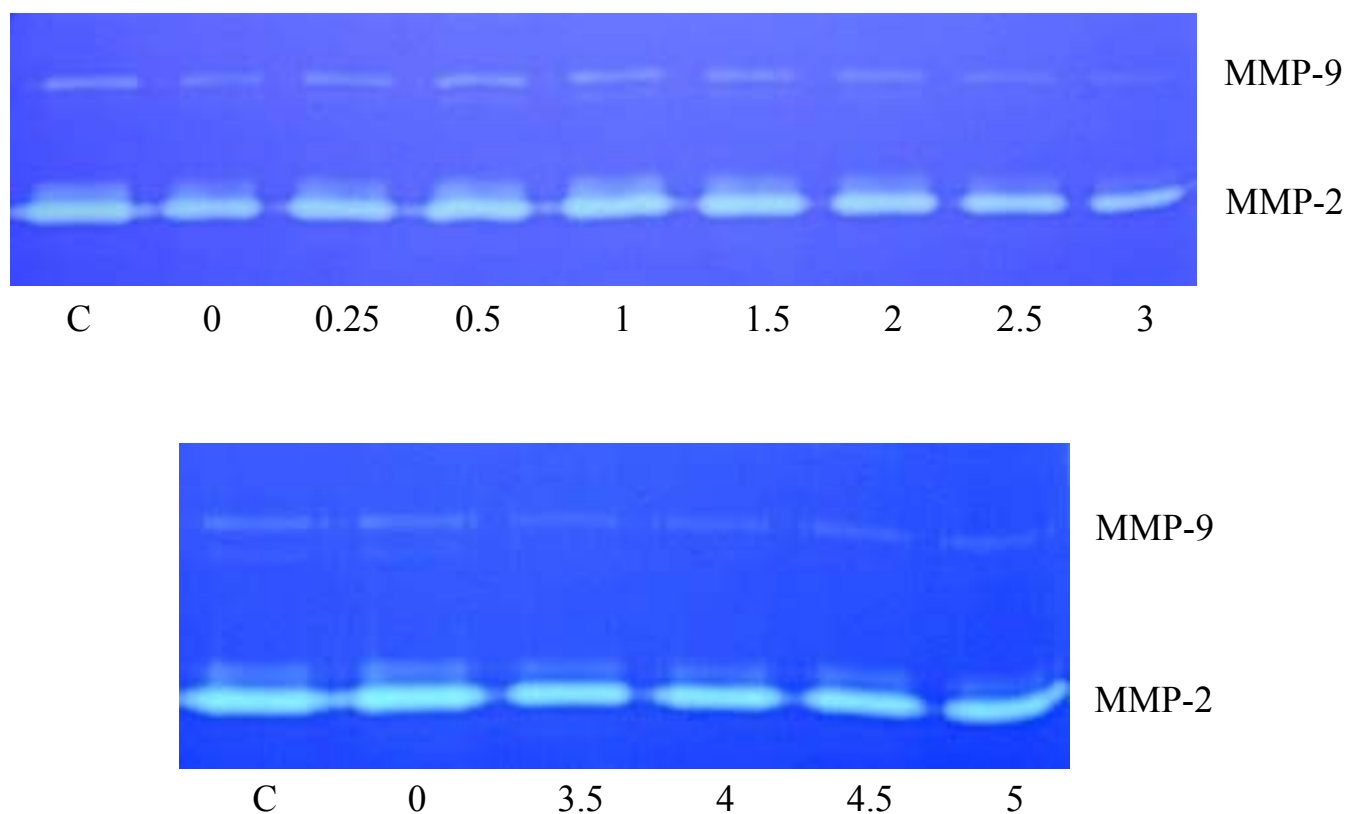


圖 4-3 樟芝胞外多醣體濃度對 MMP-2 及 MMP-9 活性之影響

以不同濃度(0~5 mg/ml)的樟芝多醣體處理 3T3 細胞培養液 48 小時，以 gelatin zymography 分析 MMP-2 及 MMP-9 活性。

C(control 組)：未添加樟芝多醣體處理之 3T3 細胞培養液放置 48 小時

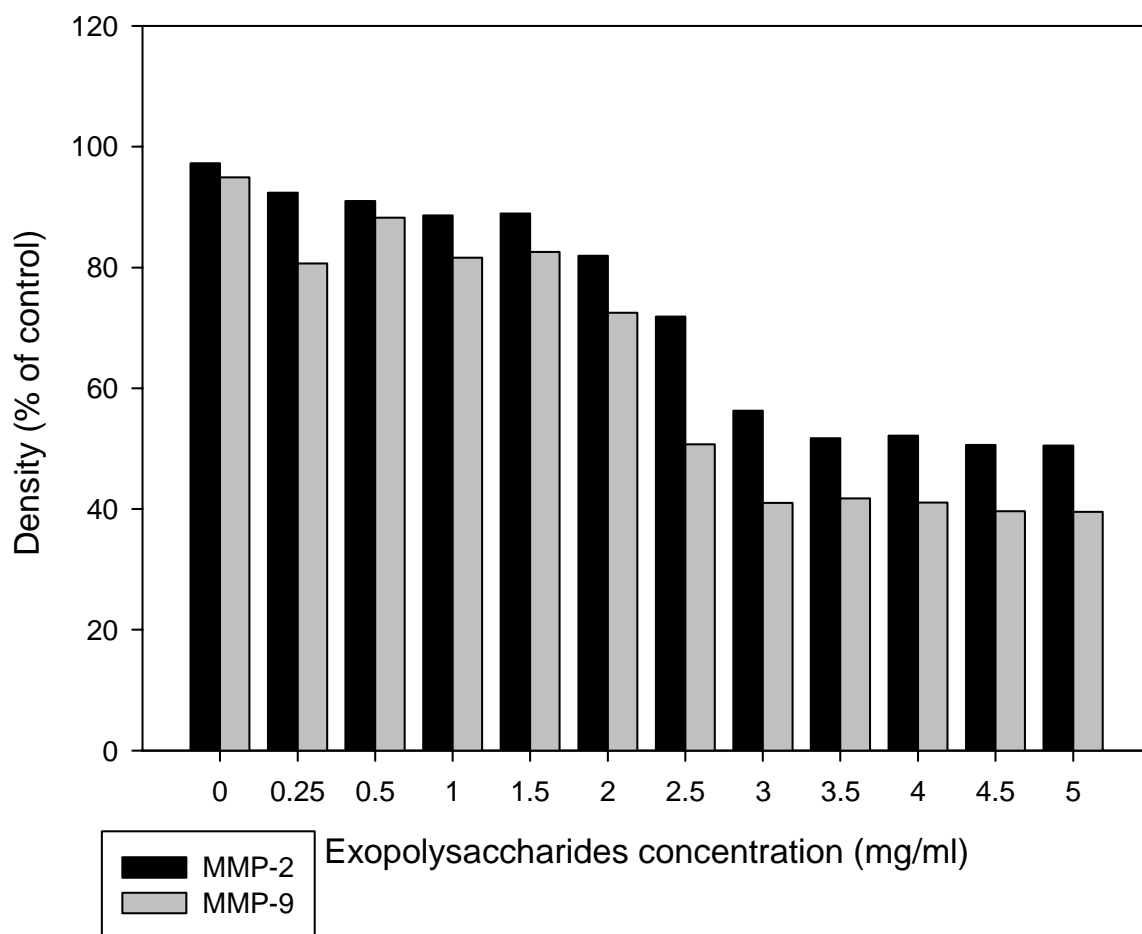


圖 4-4 樟芝胞外多醣體濃度對 MMP-2 及 MMP-9 活性抑制之影響

以不同濃度(0~5 mg/ml)的樟芝多醣體處理 3T3 細胞培養液 48 小時，分析其 MMP-2 及 MMP-9 活性。

control 組：未添加樟芝多醣體處理之 3T3 細胞培養液，以此設定為 100%

4-2-3 樟芝多醣體處理細胞培養液反應時間對抑制 MMP-2 及 MMP-9 活性之影響

在樟芝多醣體樣品濃度對 MMPs 活性影響的實驗中，我們發現多醣濃度在 3.5 mg/ml 就對 MMP-2 有明顯的抑制效果，而 MMP-9 則在 3 mg/ml 的多醣濃度下就有良好的抑制效果，因此本實驗選用樟芝多醣濃度為 3.5 mg/ml 的劑量，進行處理 3T3 細胞培養液反應時間對抑制 MMPs 活性的影響。

結果如圖 4-5 顯示，在加入 3.5 mg/ml 濃度的樟芝多醣體處理細胞培養液 3~12 小時後，對 MMPs 活性的抑制效果逐漸增加，到 24 小時後最為明顯，之後抑制 MMPs 活性的效果漸漸不受反應時間影響，而趨於穩定。因此，樟芝多醣體 3.5 mg/ml 加入 3T3 細胞培養液以抑制 MMP-2 及 MMP-9，經 24 小時，即可達到明顯的抑制效果。

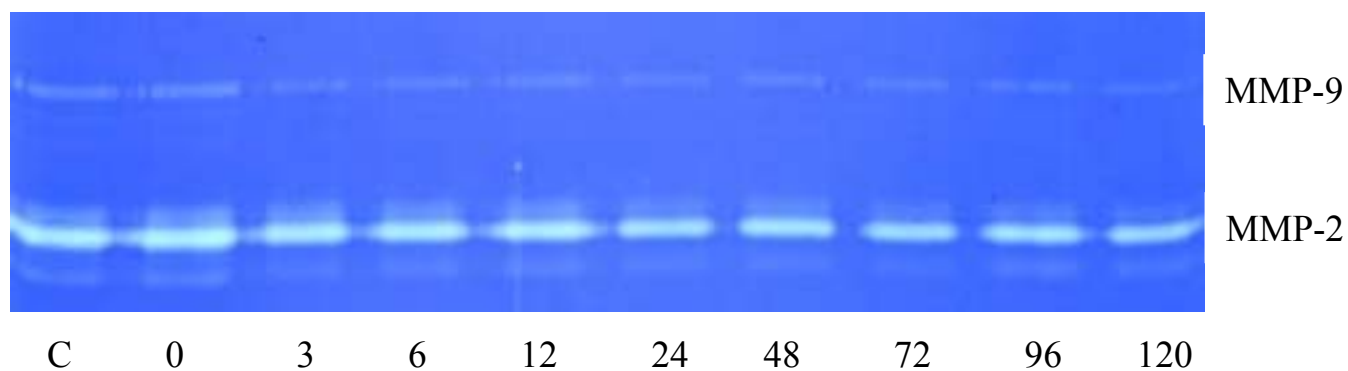


圖 4-5 樟芝胞外多醣體處理時間對 MMP-2 及 MMP-9 活性之影響

以樟芝多醣體濃度 3.5 mg/ml 的劑量下處理 3T3 細胞培養液 0~120 小時，以 gelatin zymography 分析 MMP-2 及 MMP-9 活性。

C(control 組)：未添加樟芝多醣體處理之 3T3 細胞培養液放置 120 個小時

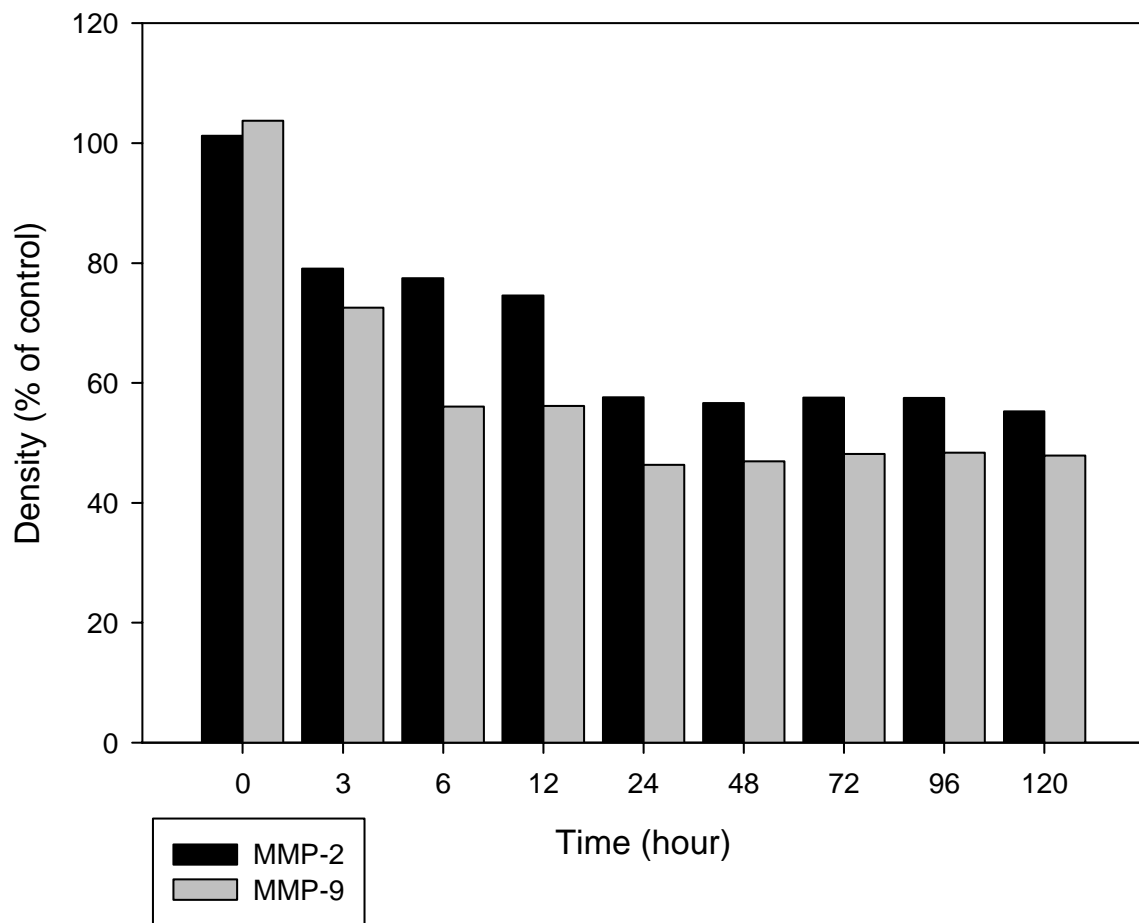


圖 4-6 樟芝胞外多醣體處理時間對 MMP-2 及 MMP-9 活性抑制之影響

以樟芝多醣體濃度 3.5 mg/ml 的劑量下處理 3T3 細胞培養液 0~120 小時，分析 MMP-2 及 MMP-9 活性。

control 組：未添加樟芝多醣體處理之 3T3 細胞培養液放置 120 個小時，以此設定為 100%

4-3 樟芝菌絲體酵素萃取物之細胞效應

4-3-1 樟芝菌絲體酵素萃取物對細胞存活率之影響

除了樟芝發酵液之胞外多醣體部份，本研究也試圖從樟芝菌絲體取得有效成份，因此我們將液態培養之後的樟芝菌絲體冷凍乾燥，分別加入 XY-X、Papain、Bromelain 及 Cellulase 四種酵素進行萃取，反應六小時後進行離心，收集上清液備用。此樣品於使用前均會先加熱，以使酵素失活，避免干擾結果的分析。

將樟芝菌絲體酵素萃取物樣品，加入含有 3T3 老鼠纖維母細胞之 96 孔盤，再培養 24 及 48 小時後，加入 WST-1 試劑進行測試。從結果圖 4-7 可以看得出來，XY-X 酵素之樟芝菌絲體萃取物對 3T3 老鼠纖維母細胞會產生毒性，48 小時之後存活率降至 68% 左右，而其他三種酵素萃取物均不會對細胞造成毒性，因此在之後的實驗中可以直接使用，為安全劑量。

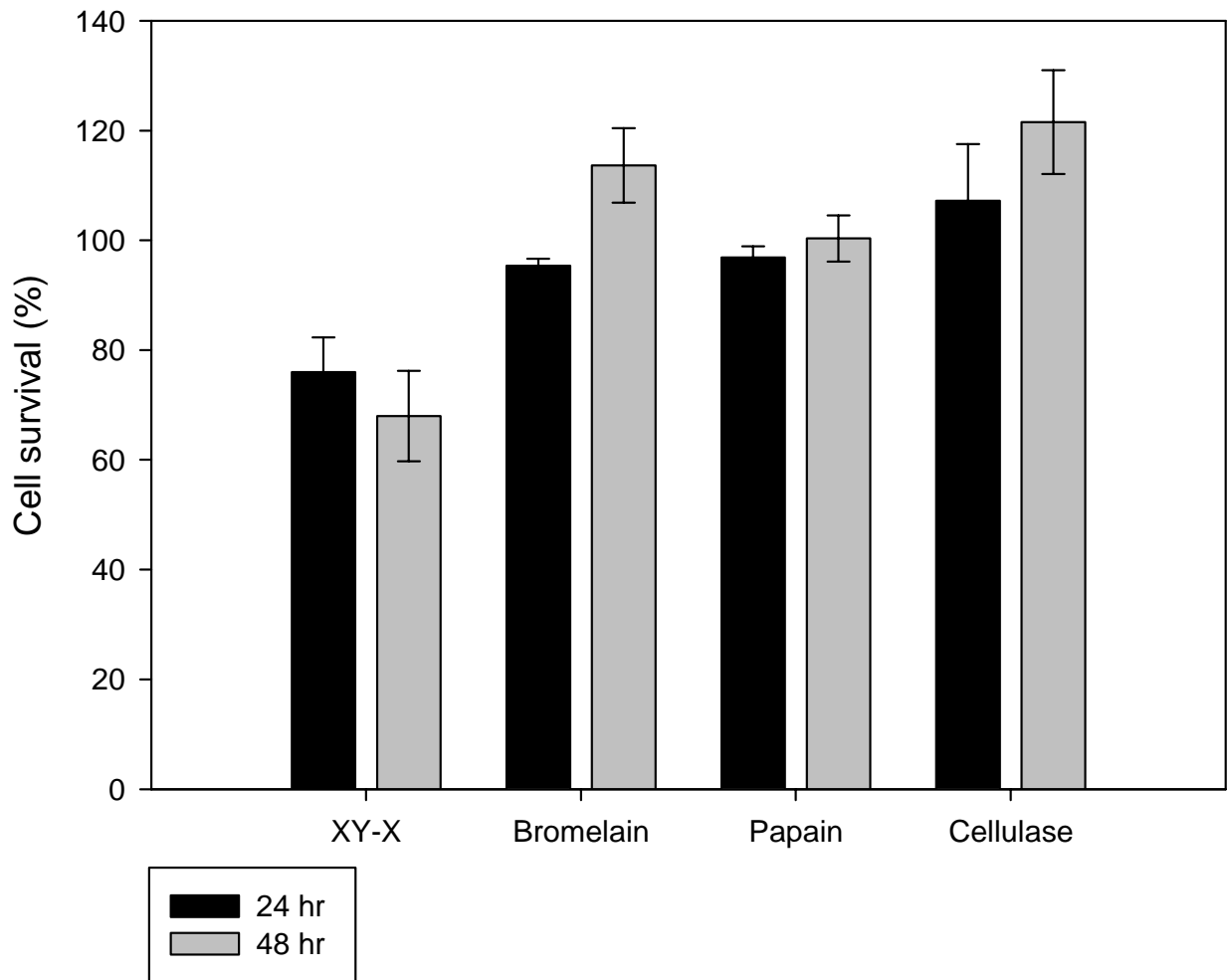


圖 4-7 不同酵素分解菌絲體之萃取物對細胞存活率之影響

不同酵素之樟芝菌絲體萃取物處理 3T3 細胞 48 小時，分析細胞存活率。

control 組：未添加樟芝菌絲體酵素萃取物之 3T3 細胞存活率，以此設定為 100%

4-3-2 樟芝菌絲體酵素萃取物對抑制 MMP-2 及 MMP-9 活性之影響

經過 WST-1 測試之後，發現以酵素 Bromelain、Papain 及 Cellulase 萃取之樟芝菌絲體萃取物均不會對 3T3 細胞產生毒性，因此我們繼續進行 Gelatin Zymography 分析，以確認是否對 MMP-2 及 MMP-9 有活性抑制的效果。

由結果的圖 4-9 顯示，在 MMP-2 部份，酵素 Bromelain、Papain 及 Cellulase 之萃取物，對 MMP-2 產生 22%、26%及 30% 之抑制效果。而在 MMP-9 的部份，經 Bromelain 及 Papain 處理過的菌絲體萃取物抑制效果非常微弱，Cellulase 則略好一些，但也僅可達到 25%左右。

整體來說，樟芝菌絲體的酵素萃取物對 MMP-2 及 MMP-9 的抑制效果並不非常明顯，與樟芝胞外多醣體的抑制率比較起來較微弱，推測也許真正參與抑制反應的有效成份並不能被酵素萃取所釋放出來，或是經酵素作用被剪切為更小的片段，以致失去效用。

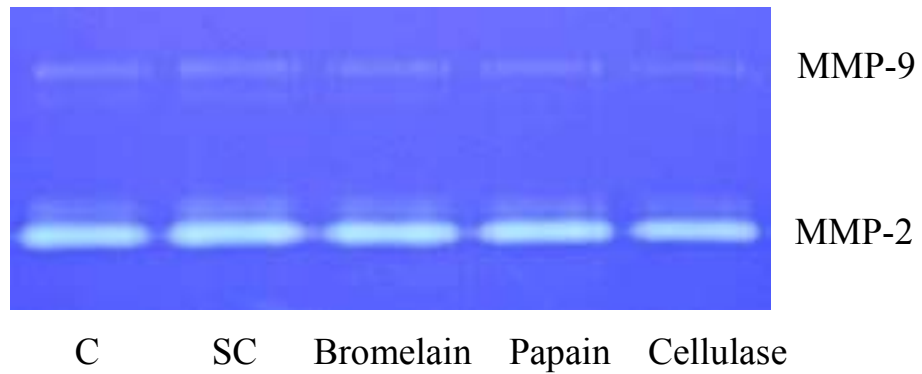


圖 4-8 不同酵素分解菌絲體之萃取物對 MMP-2 及 MMP-9 活性之影響

不同樟芝菌絲體酵素萃取物處理 3T3 細胞培養液 48 小時，以 gelatin zymography 分析 MMP-2 及 MMP-9 活性。

C(control 組)：未添加樟芝菌絲體酵素萃取物之 3T3 細胞培養液放置 48 小時

SC(Solvent control)：未添加酵素萃取物，以等量之純水處理細胞培養液 48 小時

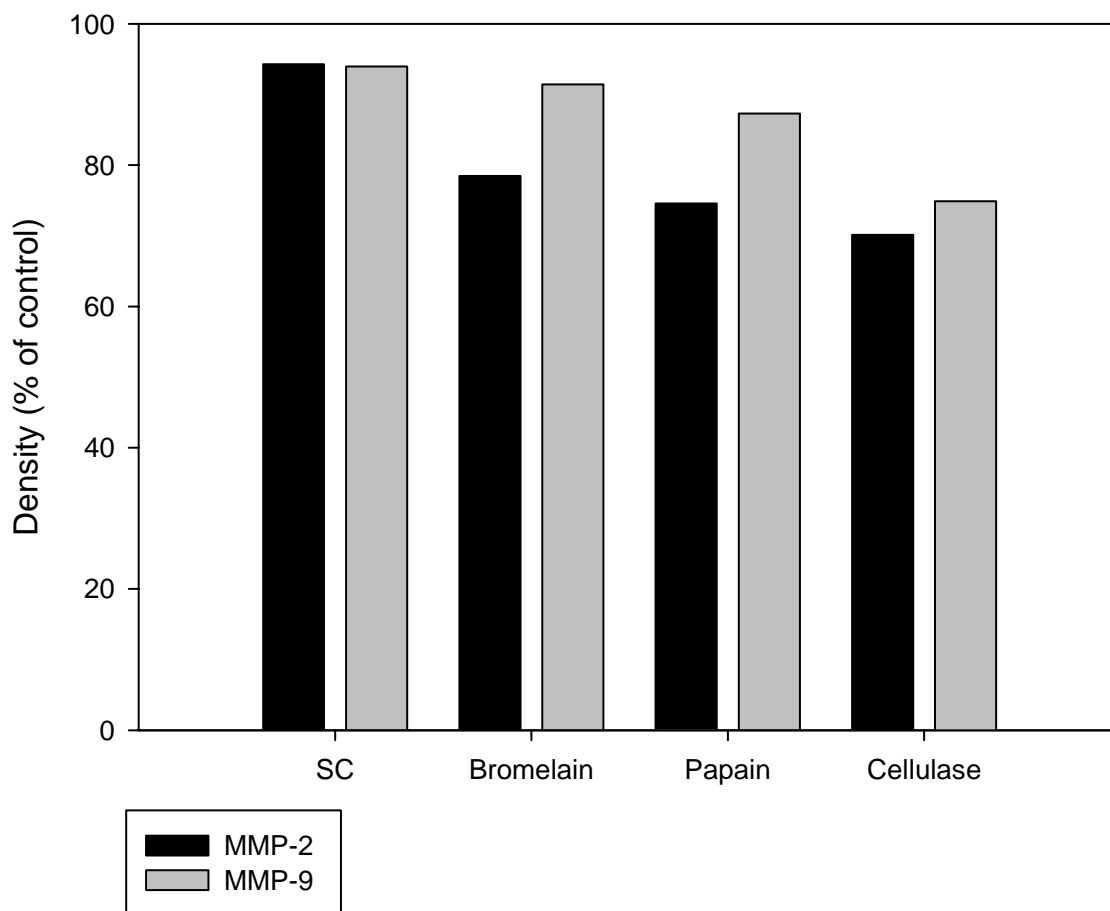


圖 4-9 不同酵素分解菌絲體之萃取物對 MMP-2 及 MMP-9 活性抑制之影響

不同樟芝菌絲體酵素萃取物處理 3T3 細胞培養液 48 小時，分析 MMP-2 及 MMP-9 活性。

control 組：未添加樟芝菌絲體酵素萃取物之 3T3 細胞培養液放置 48 小時，

以此設定為 100%

SC(Solvent control)：未加酵素萃取物，以等量純水處理細胞培養液 48 小時

4-4 樟芝菌絲體微波萃取物之細胞效應

4-4-1 樟芝菌絲體微波萃取物對細胞存活率之影響

除了以酵素作用萃取樟芝菌絲體，我們也嘗試不同的方法萃取處理樟芝菌絲體，以期能得到更好的抑制效果，因此採用了微波萃取法，此方法可以使得萃取成份提高、時間耗時少，且操作層面簡單不繁瑣。此部份選用的萃取溶劑有甲醇、乙醇以及純水，將菌絲體以這些溶劑進行微波萃取後，離心收集其上清液，之後冷凍乾燥得到萃出物粉末，再以太離子水回溶備用(0.5 mg/ml)。

同樣也將這些微波萃出物樣品溶液，進行 WST-1 細胞毒性測試。結果顯示甲醇、乙醇及純水微波萃取樟芝菌絲體樣品，在 24 及 48 小時之後，對細胞的存活率均不會造成傷害，所以我們進一步進行對細胞培養液 MMP-2 及 MMP-9 活性抑制分析實驗。

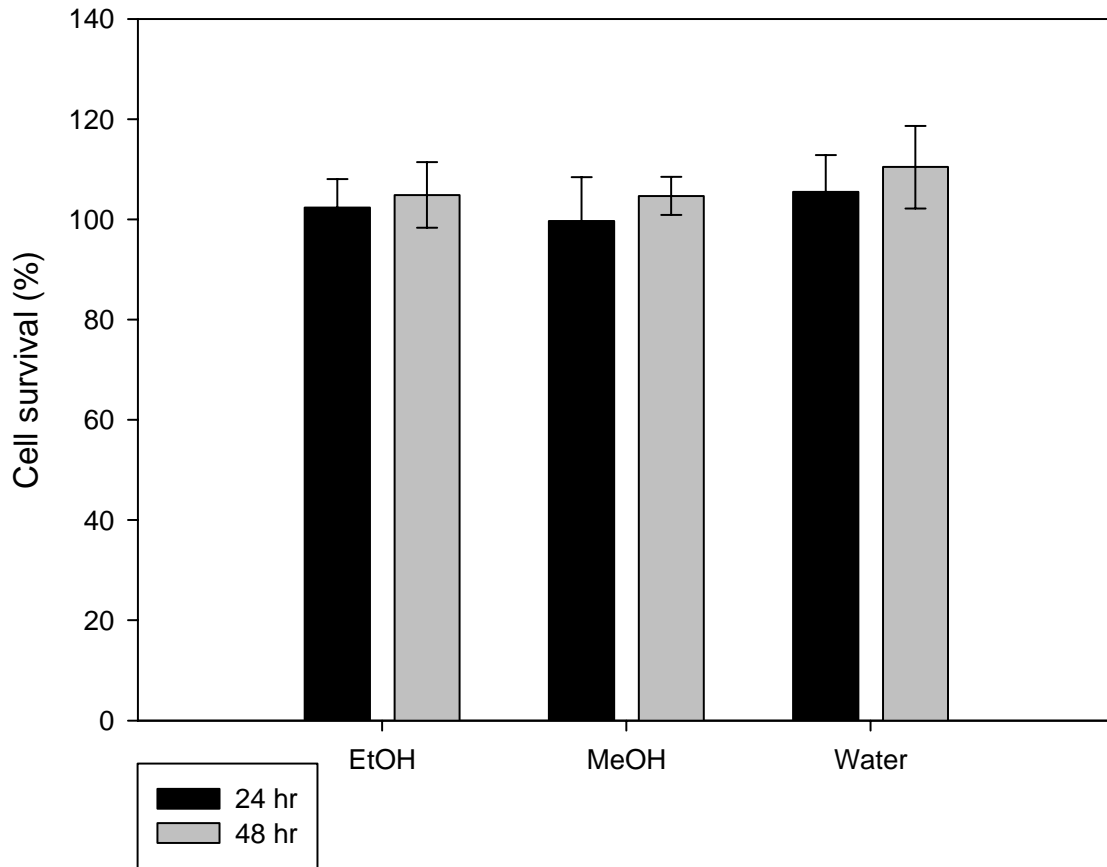


圖 4-10 不同樟芝菌絲體微波萃取物對細胞存活率之影響

不同溶劑之樟芝菌絲體微波萃取物處理 3T3 細胞 48 小時，分析細胞存活率。

control 組：未添加樟芝菌絲體微波萃取物之 3T3 細胞存活率，以此設定為 100%

4-4-2 樟芝菌絲體微波萃取物對抑制 MMP-2 及 MMP-9 活性之影響

微波萃取法為一快速有效之萃取方法，不像以高溫加熱容易破壞所含成份之組成，以微波萃取可以避免更多結構被破壞，且較省時，萃取效率高。本實驗以甲醇、乙醇及純水為萃取溶劑，微波萃取後再以冷凍乾燥處理，得到萃取物粉末，然後以水回溶製備為樣品溶液，之後加入 3T3 細胞培養液進行反應 48 小時，以 Gelatin zymography 分析 MMP-2 及 MMP-9 活性。

由圖 4-12 顯示，甲醇、乙醇及純水之樟芝菌絲體微波萃取物，均對 3T3 纖維母細胞培養液當中之 MMP-2 及 MMP-9 有良好的活性抑制效果。乙醇微波萃取物，對 MMP-2 及 MMP-9 的抑制率約為 40%及 60%，與樟芝多醣體之抑制效果差不多，而甲醇微波萃取物之抑制效果又較乙醇更好一些，純水之菌絲體微波萃取物則有最大的抑制效果，MMP-2 及 MMP-9 之抑制率分別可達到 60%及 80%左右，為各組中最佳。李以熱水萃取樟芝菌絲體，其萃取物可明顯抑制 MMP-2 及 MMP-9，推測可能是和含有高量多醣體有關（李，2003）。本實驗將菌絲體三種微波萃取物樣品進行分析，發現以甲醇、乙醇及純水為萃取溶劑之萃取物其多醣含量分別為 5.48%、3.96%及 7.57%，與抑制效果之趨勢相同，但真正的抑制機轉及胞內多醣結構等仍需進一步研究證實。

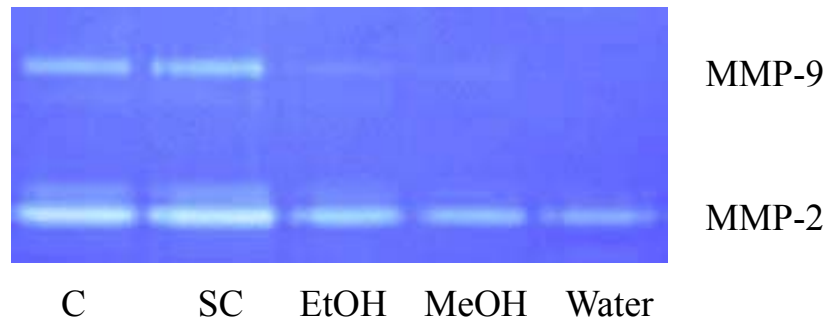


圖 4-11 不同菌絲體微波萃取物對 MMP-2 及 MMP-9 活性之影響

不同溶劑之樟芝菌絲體微波萃取物處理 3T3 細胞培養液 48 小時，以 gelatin zymography 分析 MMP-2 及 MMP-9 活性。

C(control 組)：未添加樟芝菌絲體微波萃取物之 3T3 細胞培養液放置 48 小時

SC(Solvent control)：未添加微波萃取物，以等量之純水處理細胞培養液 48

小時

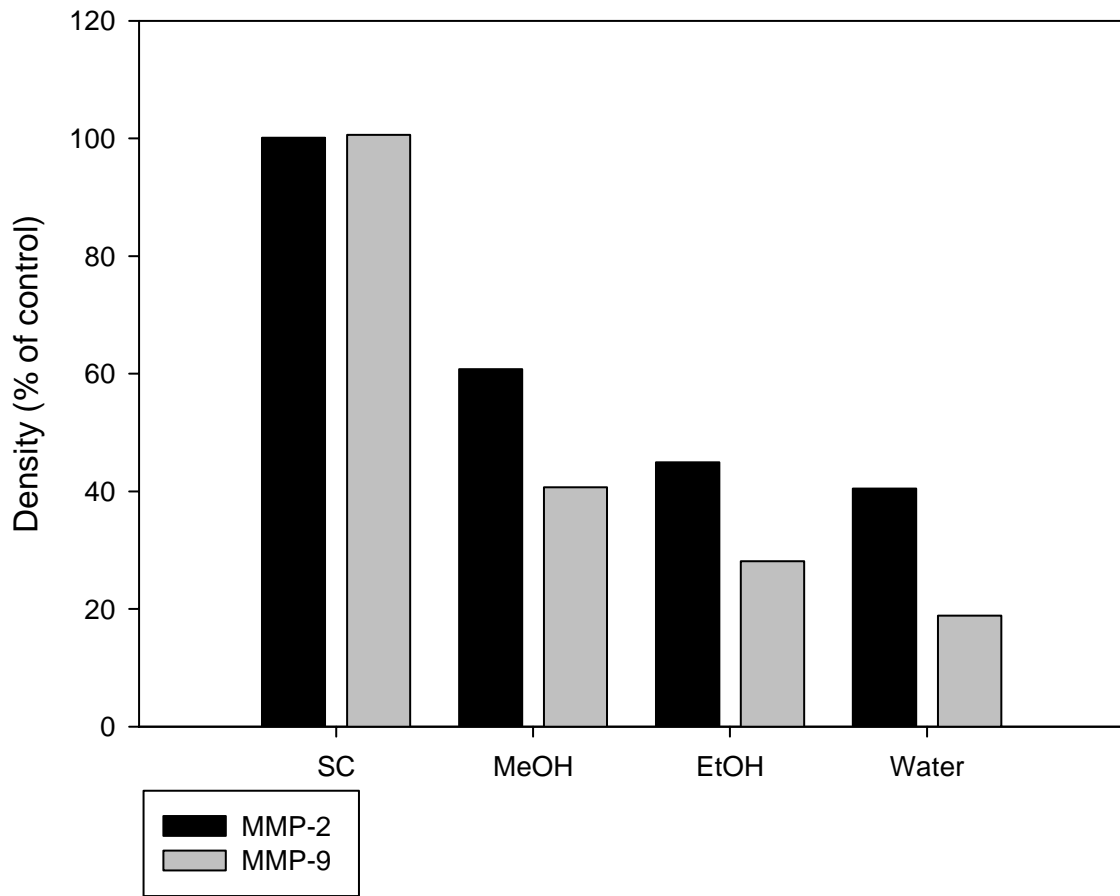


圖 4-12 不同菌絲體微波萃取物對 MMP-2 及 MMP-9 活性抑制之影響

不同溶劑之樟芝菌絲體微波萃取物處理 3T3 細胞培養液 48 小時，分析 MMP-2 及 MMP-9 活性。

control 組：未添加樟芝菌絲體微波萃取物之 3T3 細胞培養液放置 48 小時，

以此設定為 100%

SC(Solvent control)：未加微波萃取物，以等量純水處理細胞培養液 48 小時

4-5 MMP-2 及 MMP-9 活性之直接抑制分析

4-5-1 樟芝多醣體對 MMP-2 及 MMP-9 活性之直接抑制

由先前實驗可以發現，樟芝之胞外多醣體對細胞培養液當中的 MMP-2 及 MMP-9 具有良好的活性抑制效果，因此我們更進一步，將樟芝胞外多醣體樣品溶液加入與細胞共同培養，希望能更直接抑制 3T3 小鼠纖維母細胞分泌 MMP-2 及 MMP-9 至胞外。

將樟芝胞外多醣體加入與細胞正常培養 48 小時後，把培養液換為 serum free medium，再培養 24 小時，收集培養液並進行 gelatin zymography 分析。結果顯示，加入樟芝胞外多醣體與 3T3 細胞共同培養，對於細胞分泌之 MMP-2 活性均沒有達到任何抑制效果，而對於 MMP-9，則僅有稍微抑制的效果，與多醣體抑制細胞培養液中 MMP-2 及 MMP-9 之效果差異非常大，由此可知，樟芝胞外多醣體對於抑制細胞中 MMPs 的活性表現效果並不良好。有文獻指出，抑制 MMPs 活性的機制，可能是藉由兩者之間某種方式的結合 (binding)，而影響 MMPs 的活性 (劉，1999)。所以也許是因為此原因，樟芝胞外多醣體對培養液中 MMPs 具有抑制效果，但卻無法有效抑制 3T3 纖維母細胞分泌 MMPs。

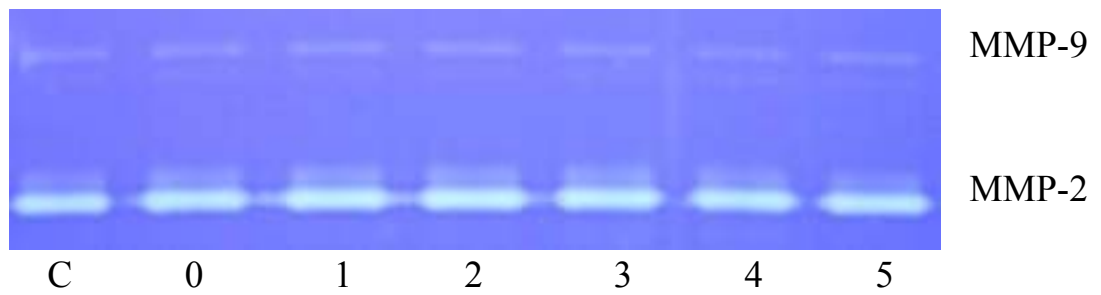


圖 4-13 樟芝胞外多醣體濃度對直接抑制細胞分泌 MMP-2 及 MMP-9 之影響

不同濃度(0~5 mg/ml)之樟芝胞外多醣體與 3T3 細胞共同培養 48 小時，以 gelatin zymography 分析 MMP-2 及 MMP-9 活性。

C(control 組)：未添加樟芝胞外多醣體與 3T3 細胞共同培養 48 小時

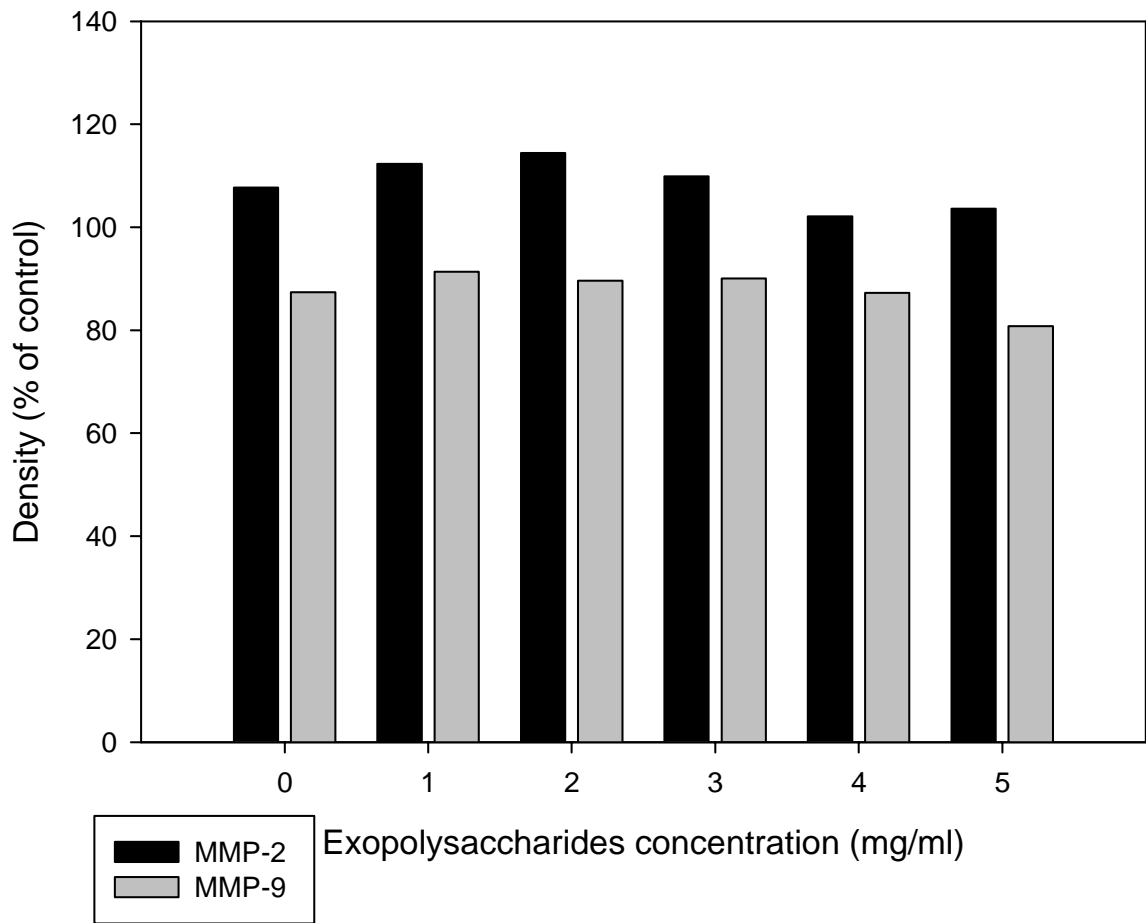


圖 4-14 樟芝胞外多醣體濃度對直接抑制細胞分泌 MMP-2 及 MMP-9 活性之影響

不同濃度(0~5 mg/ml)之樟芝胞外多醣體與 3T3 細胞共同培養 48 小時，分析 MMP-2 及 MMP-9 活性。

control 組：未添加樟芝胞外多醣體與 3T3 細胞共同培養 48 小時，以此設定為 100%

4-5-2 樟芝菌絲體微波萃取物對 MMP-2 及 MMP-9 活性之直接抑制

由實驗 4-3-2 可以發現，甲醇、乙醇及純水之樟芝菌絲體微波萃取物對細胞培養液當中 MMP-2 及 MMP-9 之抑制效果非常良好且明顯，因此我們同樣也將微波萃取物樣品溶液，加入與 3T3 細胞共同培養，以測試是否有同樣佳之抑制效果。

結果如圖 4-15 顯示，不論是甲醇、乙醇或是純水之微波萃取物，對於細胞直接分泌 MMP-2 及 MMP-9，僅有些微少許的抑制效果，與實驗 5-3-2 抑制細胞培養液中 MMPs 之效果比較起來非常不明顯。

由以上實驗可得知，樟芝胞外多醣體及菌絲體微波萃取物，對 3T3 細胞培養液內之 MMP-2 及 MMP-9 有良好明顯之抑制效果，但卻無法有效直接抑制 3T3 細胞分泌 MMP-2 及 MMP-9。

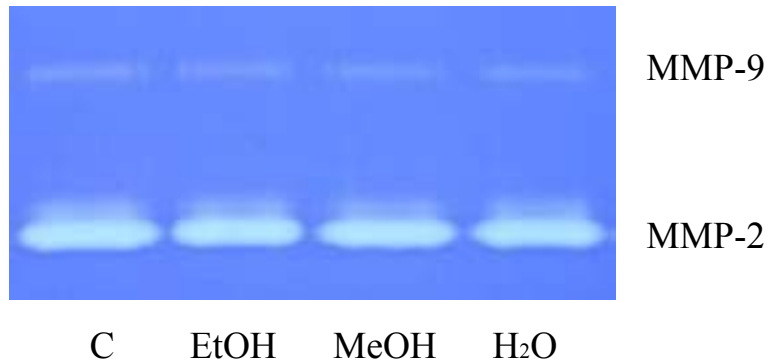


圖 4-15 不同菌絲體微波萃取物對直接抑制細胞分泌 MMP-2 及 MMP-9 之影響

不同溶劑之樟芝菌絲體與微波萃取物與 3T3 細胞共同培養 48 小時，以 gelatin zymography 分析 MMP-2 及 MMP-9 活性。

C(control 組)：未添加菌絲體微波萃取物與 3T3 細胞共同培養 48 小時

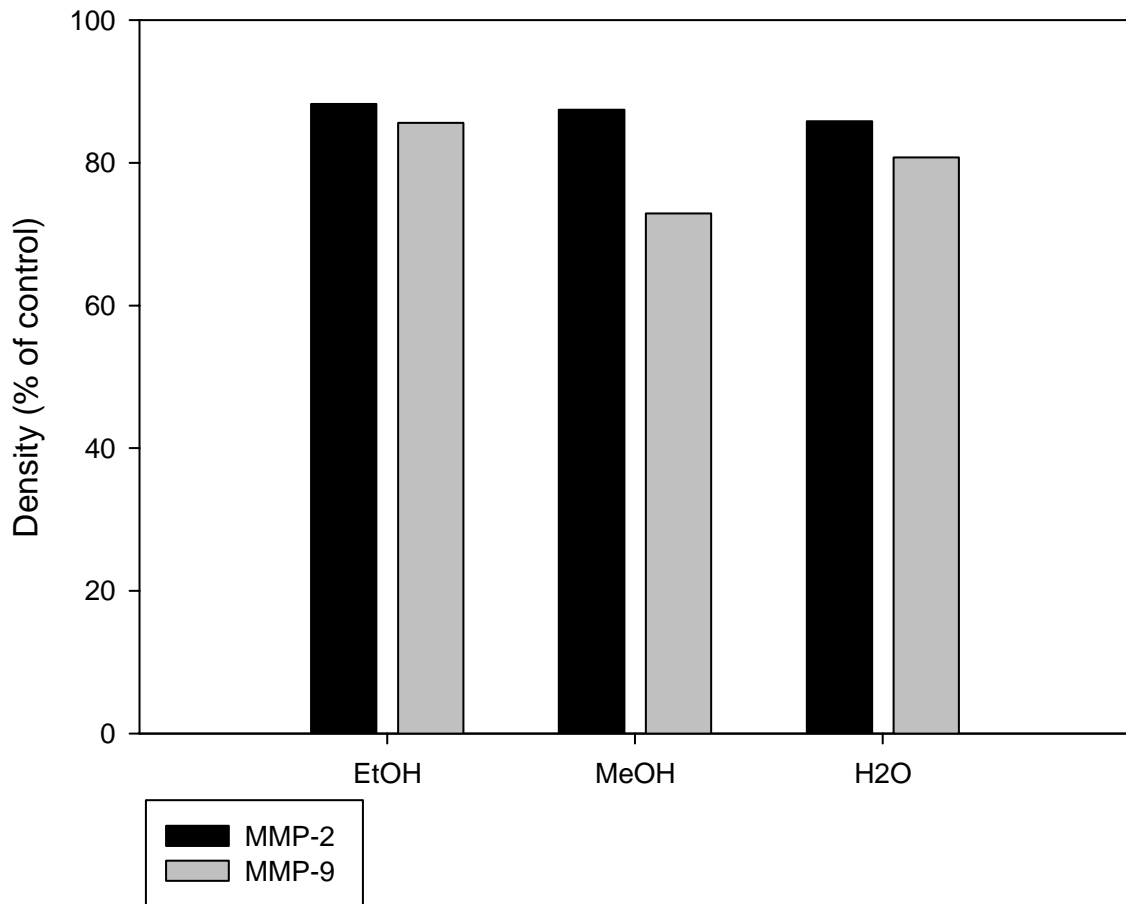


圖 4-16 不同菌絲體微波萃取物對直接抑制細胞分泌 MMP-2 及 MMP-9 活性之影響

不同溶劑之樟芝菌絲體與微波萃取物與 3T3 細胞共同培養 48 小時，分析 MMP-2 及 MMP-9 活性。

control 組：未添加菌絲體微波萃取物與 3T3 細胞共同培養 48 小時，以此設定為 100%

4-6 還原力之測定

4-6-1 樟芝胞外多醣體還原力之測定

皮膚的老化與脂質過氧化反應息息相關，所以抗氧化性物質通常被添加於抗老化化妝品中作為有效成份。其中還原劑的原理為利用捕捉氧原子，提供一個傾向還原狀態的環境，或是將以氧化的過氧化物還原，以減緩氧化的進行。

樟芝胞外多醣體對於抑制細胞培養液中 MMPs 活性有良好的效果，因此我們進行還原力的測定，以瞭解樟芝多醣體是否同樣也具有抗氧化性。

結果如圖 4-17，不同濃度(0~5 mg/ml)樟芝胞外多醣體所具有的抗氧化力，隨著濃度上升而成正比增加。與人工合成抗氧化劑 BHA (butylated hydroxytoluene)比較，在多醣濃度 3 mg/ml 以上之還原力可達到 BHA 的 50% 以上，顯示樟芝胞外多醣體具有不錯的抗氧化性。

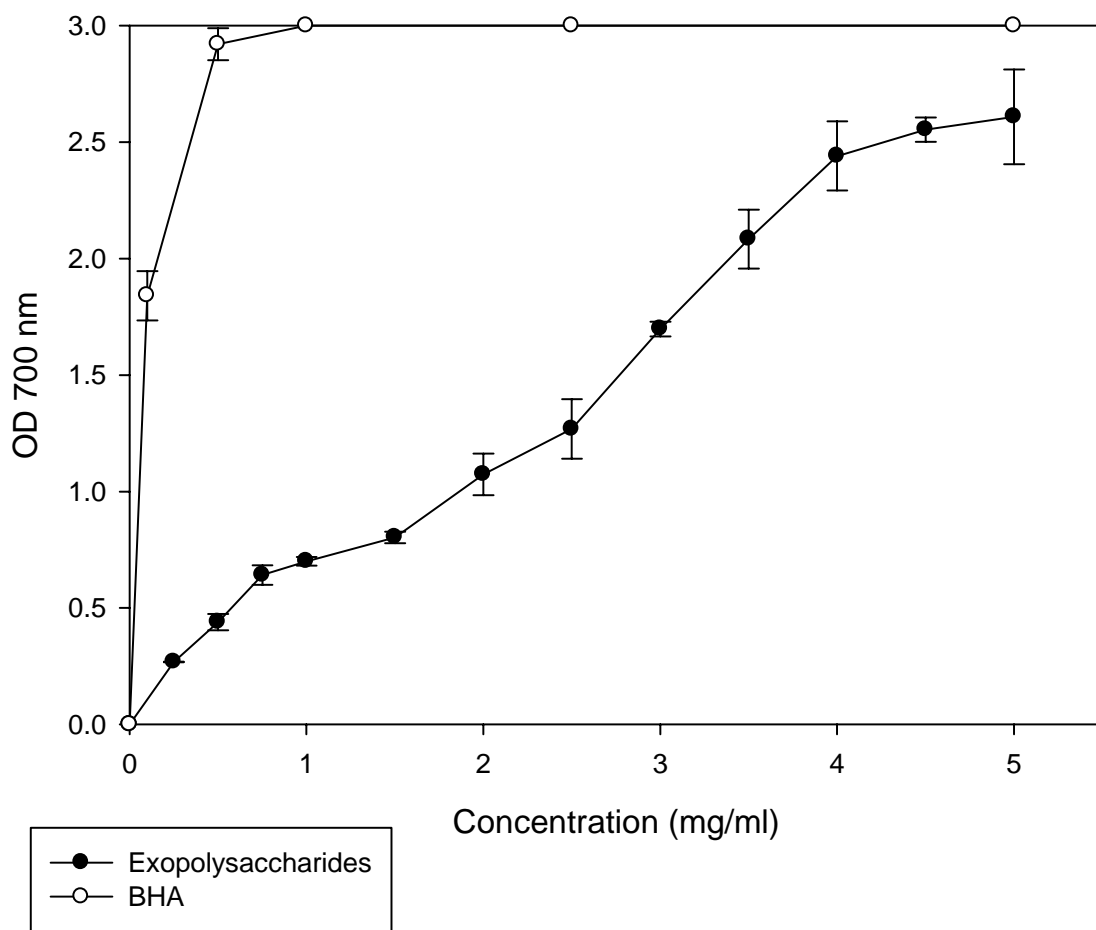


圖 4-17 樟芝多醣體濃度對還原力之影響

4-6-2 樟芝菌絲體萃取物還原力之測定

除了樟芝胞外多醣體，同樣的，我們也進行菌絲體萃取物的還原力測定。在樟芝菌絲體酵素萃取物部份，Bromelain、Papain 及 Cellulas 的萃取液還原力均不強，大概只有 BHA 的 20%左右；在樟芝菌絲體微波萃取物的部份，以甲醇及乙醇為溶劑的菌絲體微波萃取物，其還原力大約為同樣濃度 (0.5 mg/ml) BHA 的 55%左右，比同樣濃度的樟芝胞外多醣體高出許多，而以 H₂O 為溶劑的樟芝菌絲微波萃取物，其在波長 700 nm 下之吸收值甚至比 BHA 還要高，是所有樣品當中還原力最強的，可應用於抗老化化妝品有效成份當中作為抗氧化劑。

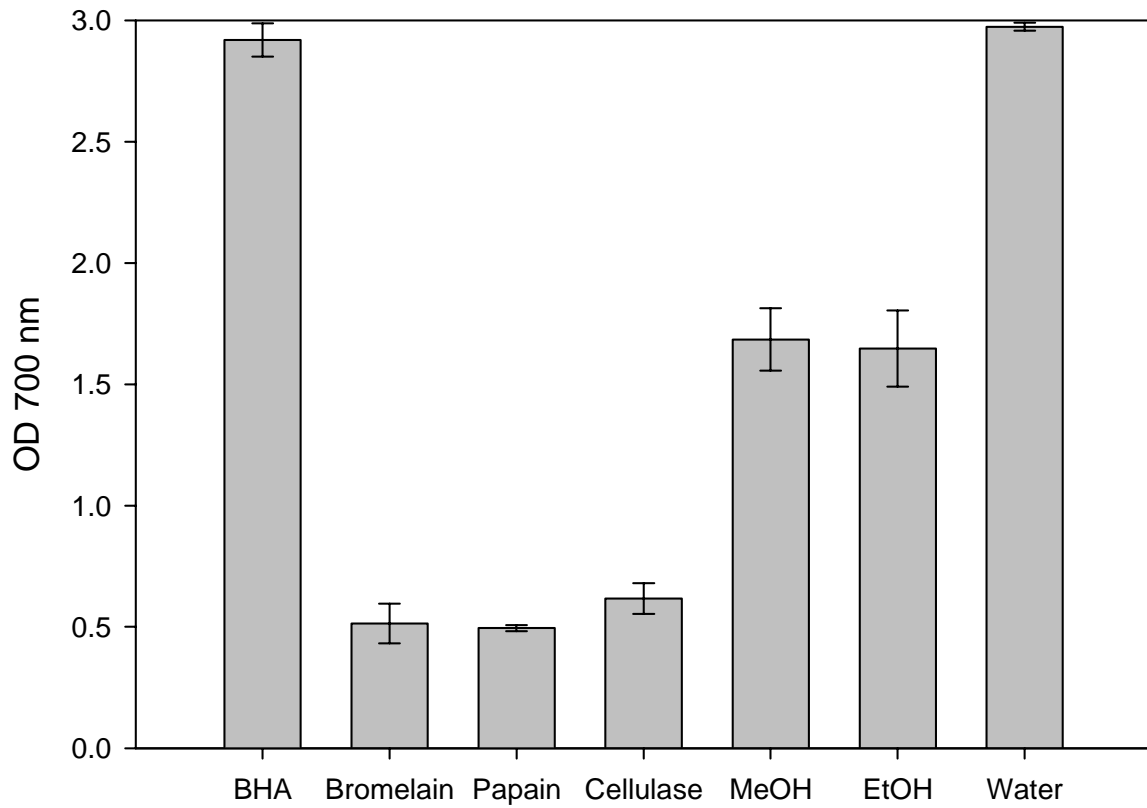


圖 4-18 不同樟芝菌絲體萃取物對還原力之影響

BHA 濃度為 0.5 mg/ml

Bromelain、Papain、Cellulase 為不同酵素分解菌絲體之萃取物

MeOH、EtOH、Water 為不同溶劑微波萃取菌絲體經冷凍乾燥後，以水回溶之萃取液(0.5 mg/ml)

4-7 捕捉 DPPH 自由基能力之測定

4-7-1 樟芝胞外多醣體對 DPPH 自由基捕捉率之測定

皮膚老化時，脂質在自氧化的過程中，會產生自由基造成一連串反應，導致脂質的酸敗，抗氧化劑可藉由提供氫(hydrogen doner)來抑制油脂過氧化的連鎖反應，藉由釋放氫氧基上的氫原子，提供一個電子或直接供給氫原子給自由基，使其形成較穩定的形式，而終止氧化反應之進行。因此我們進行對 DPPH 自由基捕捉率之能力測定，以測試樟芝胞外多醣體是否也具有此特性與抗氧化能力。

對於 DPPH 自由基捕捉率的結果顯示，樟芝胞外多醣體具有清除 DPPH 自由基的功效，且捕捉能力隨著多醣體濃度增加而上升，在樟芝多醣體濃度 3 mg/ml 以上時，捕捉率可達到 40%以上，表示樟芝多醣體在清除 DPPH 自由基上具有不錯的能力。

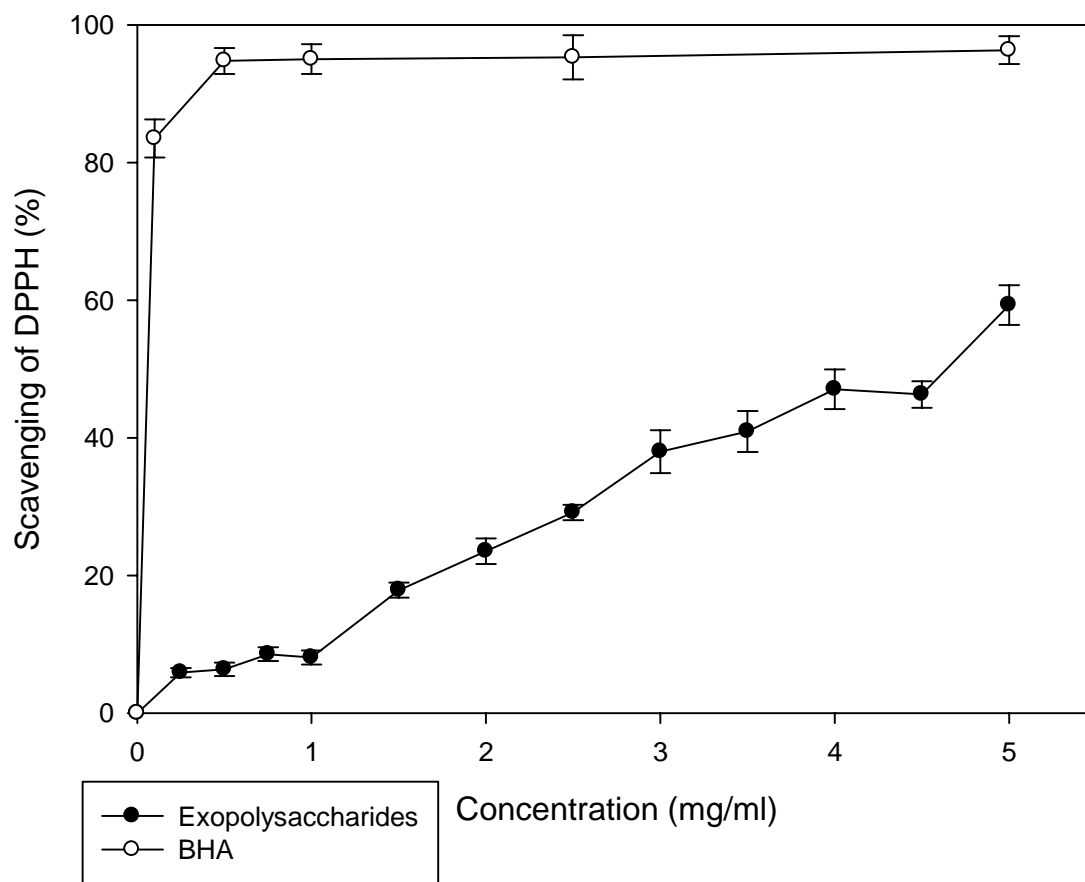


圖 4-19 樟芝多醣體濃度對 DPPH 自由基捕捉率之影響

4-7-2 樟芝菌絲體萃取物對 DPPH 自由基捕捉率之測定

同樣也將菌絲體萃取物樣品拿來進行捕捉 DPPH 自由基能力的測試。在樟芝菌絲體酵素萃取物部份，Bromelain、Papain 及 Cellulas 的菌絲體萃取液對 DPPH 自由基之捕捉率 Bromelain > Cellulase > Papain，但效果均不好，平均在 20% 左右而已；而樟芝菌絲體微波萃取物部份，對 DPPH 自由基之捕捉率則較好，各萃取溶劑之比較為 H₂O > EtOH > MeOH，以甲醇及乙醇為溶劑之菌絲體微波萃取物，捕捉率約有 55%，達到 BHA 的一半以上，而其中對 DPPH 自由基捕捉能力最強的則為以 H₂O 為溶劑之樟芝菌絲體微波萃取物，其捕捉率高達 89% 左右，與 BHA 之 94% 很接近，且其還原力也非常強，在應用於抗老化化妝品具有非常大的潛力。

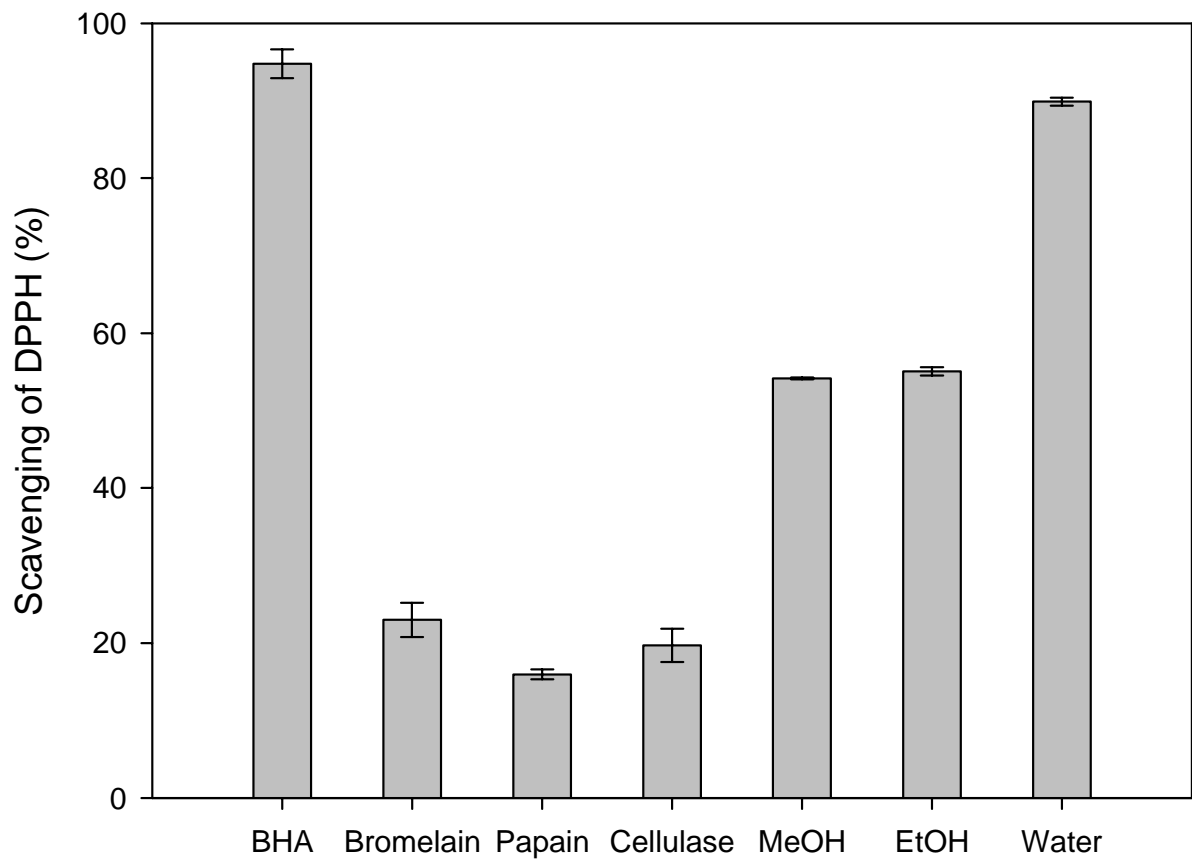


圖 4-20 樟芝菌絲體萃取物對 DPPH 自由基捕捉率之影響

BHA 濃度為 0.5 mg/ml

Bromelain、Papain、Cellulase 為不同酵素分解菌絲體之萃取物

MeOH、EtOH 及 H₂O 為不同溶劑微波萃取菌絲體經冷凍乾燥後，以水回溶之萃取液(0.5 mg/ml)

第五章 結論與未來展望

5-1 結論

本研究主要探討樟芝液態培養之胞外多醣體及菌絲體萃取物，是否能有效的抑制 3T3 小鼠纖維母細胞所分泌的基質金屬蛋白酶 MMP-2 與 MMP-9，以及是否具有良好之抗氧化性（還原力及捕捉 DPPH 自由基能力）。實驗使用之樣品分為培養液所純化出來的胞外多醣體以及菌絲體的酵素與微波萃取物。

1. 樟芝胞外多醣體：在 WST-1 的測試中，樟芝胞外多醣體濃度在 5 mg/ml 以下，均不會對 3T3 細胞造成毒害，為安全劑量範圍，且在抑制細胞培養液中 MMP-2 及 MMP-9 活性試驗，發現多醣體濃度 3.5 mg/ml 的劑量下，處理細胞培養液 24 小時，可達到良好的抑制效果，對 MMP-2 及 MMP-9 之抑制率分別為 42%及 53%，但與 3T3 細胞共同培養，直接抑制纖維母細胞分泌 MMP-2 與 MMP-9 的效果卻較微弱。抗氧化性部份，樟芝胞外多醣體有不錯的還原力且隨著濃度上升而增加，對於 DPPH 自由基的捕捉率在多醣濃度 3 mg/ml 以上，也可達到 40%以上。
2. 菌絲體酵素萃取物：使用 XY-X、Bromelain、Papain 及 Cellulase 萃取菌絲體，其中 XY-X 木醣酵素菌絲體萃取物在 WST-1 測試中，48 小時後細胞存活率降至 68%左右，其他酵素萃取物則不會產生細胞毒性。在抑制

MMP-2 及 MMP-9 活性方面，不論是對於細胞培養液中的 MMPs，或是直接抑制細胞分泌 MMPs 效果均不明顯，與胞外多醣體比較起來抑制能力非常有限，另外此三種菌絲體酵素萃取物之還原力以及捕捉 DPPH 自由基能力也都不佳，推測可能的原因也許是這些酵素並無法萃取出菌絲體的有效成份，或是酵素的作用使得原本被釋放出來的有效成份，被切成更小的片段，以致無法發揮效用。

3. 菌絲體微波萃取物：以甲醇、乙醇及純水為萃取溶劑之菌絲體微波萃取物，對細胞皆不會造成毒害，且對細胞培養液內 MMP-2 及 MMP-9 有非常良好的抑制效果，其中以純水為溶劑之樟芝菌絲體微波萃取物，抑制 MMP-2 與 MMP-9 活性抑制率可高達 60%與 82%，但直接抑制細胞分泌 MMPs 效果不佳。此三種菌絲體微波萃取物之還原力及自由基捕捉能力均效果良好，特別是以純水為溶劑之樟芝菌絲體微波萃取物，還原力及自由基捕捉率與化學合成之抗氧化劑 BHA 非常接近，顯示具有強抗氧化性。

5-2 未來展望

本研究顯示，樟芝液態培養之胞外多醣體及菌絲體萃取物，可有效抑制 3T3 小鼠纖維母細胞所分泌之 MMP-2 及 MMP-9 活性，且具有良好抗氧化性。在胞外多醣體部份，有文獻提出抑制酵素活性與多醣體的分子量範圍有相當大的關係（鄭，2005），若能進一步探討，應有助於抑制率的再提高。在菌絲體萃取物部份，微波萃取是非常有效率的萃取方式，耗時少，程序簡單且萃取率高，其中萃取溶劑的選擇為主要關鍵，值得討論。而有效成份的確定，本實驗利用不同溶劑微波萃取樟芝菌絲體，其中抑制 MMP-2 及 MMP-9 效果最好且抗氧化性最強之純水微波萃取物，其多醣含量亦為最高，初步推測此效果與胞內多醣體有關，但進一步的成份分析確定以及對 MMPs 的抑制機轉，值得再深入研究探討。本實驗使用 3T3 小鼠纖維母細胞所分泌之 MMPs 為檢測目標，未來可進而進行動物實驗或是人體試驗，對於有效成份的確定及功效提供更有力的佐證。

本研究結果顯示，樟芝液態培養之胞外多醣體及菌絲體萃取物，確實具有開發成新的抗老化化妝品產品的潛力，將來也可應用在包含其他種食藥用菇類之新的生理活性有效成份研究。

參考文獻

- 王伯徹、黃仁彰(2002)。靈芝與樟芝之研究與市場面面觀。食品工業，34(5)：3-17。
- 江晃榮(2005)。生物技術化妝品之市場與技術。化工資訊與商情，23：74-78。
- 呂易珍(2004)。液態納豆應用於化妝品之研究。私立靜宜大學應用化學研究所碩士論文，台中。
- 李炫璋(2003)。牛樟芝菌絲體之體內保肝功能評估及其熱水萃取物在體外對基質金屬蛋白水解酶活性之影響。國立中興大學食品科學研究所碩士論文，台中。
- 邱惜禾、陳瑞娟(2006)。皮膚抗老化市場及活性成份簡介。化工資訊與商情，39：41-49。
- 范元鵠(2006)。川芎、細辛、白朮及杏仁萃取物之美白與抗老化效果與含此等萃取物之化妝品的有效性。國立海洋大學食品科學系碩士論文，基隆。
- 梁靖宗(2005)。羊肚菌與蜜環菌之抗氧化性質分析。私立大同大學生物工程研究所碩士論文，台北。
- 陳榮秀、洪偉章(1997)。化妝品科技概論。高立出版社，台北。
- 陳榮秀、洪偉章、李金枝(1998)。化妝品原料及功能。藝軒圖書出版社，台北。

- 黃鈴娟(2000)。樟芝與姬松茸之抗氧化性質及多醣組成。國立中興大學食品科學研究所碩士論文，台中。
- 黃惠琴(2001)。樟芝菌絲體深層培養之研究。私立東海大學化工系碩士論文，台中。
- 張益軒(2001)。牛樟芝分子生物鑑定系統之研究。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文，台北。
- 臧穆、蘇慶華(1990)。我國台灣產靈芝屬新種樟芝。雲南植物研究，12：395-396。
- 鄭懿芳(2005)。樟芝菌絲體培養之胞外多醣體應用於抗老化化妝品成份之研究。私立嘉南藥理科技大學生物科技系碩士論文，台南。
- 蔣雅慧(2005)。添加物對樟芝菌絲與抗氧化活性生成之影響。私立東海大學化學工程研究所碩士論文，台中。
- 劉翠玲(2002)。樟芝對倉鼠體內脂質代謝與抗氧化狀態之影響。私立輔仁大學食品營養學系碩士論文，台北。
- 劉淑慧(2000)。由靈芝子實體廢渣製成薄膜(SACCHACHITIN)對角質細胞及matrix metalloproteinases(MMPs)之影響。國立臺北醫學院細胞及分子生物研究所碩士論文，台北。
- 戴宇昀(2001)。樟芝菌絲體與子實體對四氯化碳及酒精誘導之慢性及急性肝

- 損傷之保肝功能評估。國立中興大學食品科學研究所碩士論文，台中。
- 嚴貴榮(2002)。樟芝對 STZ 誘發高血糖鼠血糖調節與抗氧化之影響。私立輔仁大學食品營養學系碩士論文，台北。
- Aimes R.T., Quigley J.P.(1995), Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase, *Biol Chem*, 270 : 5827-5876.
- Bigg H.F., Rowan A.D.(2001), The inhibition of metalloproteinases as a therapeutic target in rheumatoid arthritis and osteoarthritis, *Cur Opin in Pharmacol*, 1 : 314-320.
- David E. and William G.(1994), Quantitative Zymography: Detection of Picogram Quantities of Gelatinase, *Analytical Biochem*, 218 : 325-329.
- Davies K.J.A., Qaintanilha A.T., Brooks G.A., Packer L.(1982), Appraisal of the safety of chemicals in food, drugs and cosmetics, *Pharmacologic* , 93 : 377-392.
- Dziezak J.D.(1986), Preservatives: Antioxidants, *Food Technol*, 40 : 94-102.
- Gross J.(1981), An assay on biological degradation of collagen, *Cell Biology Extracellular Matrix*, In Hay ED(ed), New York.
- J. Uitto(1986), Connective tissue biochemistry of the aging dermis, *Dermatol Clin*, 4 : 433-446.
- Jenkins R.R.(1988), Free radical chemistry: relationship to exercise, *Sport Medi*, 5 : 156-170.

- Karin S.K., Peter B., Jutta W., Gernot H., Weijan M., Lale K., Cristian M., Meinhard W.(2000), Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms, *Exp Gerontol*, 35 : 307-316.
- Laure R., Gary J.(2002), UV-light-induced signal cascades and skin aging, *Aging Research Reviews*, 1 : 705-720.
- Lu K.M., Wilhelm S.M., Collier I.E, Marmer B.L(2000), Studies of lipopolysaccharides of IBA treated *Solanum lyratum* cell suspension culture, *J Chin Med.*, 11 : 135-142.
- Massova I., Kotra L.P., Fridman R., Mobashery S.(1998), Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification, *FASEB J.* , 12 : 1075-1095.
- Nagase H., Sasaki T., Yadomae T., Chiba N., Adachi Y.(1999), Activation mechanisms of matrix metalloproteinases, *Biochem J.*, 378 : 151-159.
- Pillai S., Oresajo C., Hayward J. (2005), Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation – a review, *Int JI of Cosmet Sci*, 27 : 17-34.
- Okada Y., Nara K., Kawatnura L.(1995), Localization of matrix metalloproteinase 9 (92 kDa gelatinase / type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts : implications for bone resorption, *Lab Invest*, 72 : 311-312.

- Rajeshwar P. Verma, Corwin Hansch(2007), Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical-biological functions and (Q)SARs, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15 : 2223-2268.
- Oyaize M.(1986), Antioxidative activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography, *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 35 : 771-775.
- Song T.Y., Yen G.C.(2002), Antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture, *J Agric Food Chem*, 50 : 3322-3327.
- Sternlicht M.D., Werb Z.(2001), How Matrix Metalloproteinases regulate cell behavior, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 7 : 463-516.
- Thomas G.T., Lewis M.P., Speight P.M.(1999), Matrix metalloproteinases and oral cancer, *Oral Oncology*, 35 : 227-233.
- West M.D., Pereira-Smith M.O., Smith J.R.(1989), Replicative senescence of human skin fibroblasts correlates with a loss of regulation and overexpression of collagenase activity, *Exp Cell Res.*, 184 : 138-147.
- Wickett R.R., Visscher M.O.(2006), Structure and function of the epidermal barrier, *Am J Infect Control*, 34 : 98-110.
- Yamaguchi T., Takamuta H., Matoba J.(1998), HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, *Biosci Biotechol Biochem*, 62 : 1201-1204.