

樟芝酸——牛樟芝特有活性成分

王升陽¹

引言

牛樟芝是臺灣特有藥用真菌，因最早發現是寄生於臺灣特有一級闊葉樹牛樟木材上而被命名。由於牛樟芝被宣稱具有解毒、鎮痛、降血壓、治療肝臟發炎以及抗癌等活性，使其價格居高不下，目前子實體的售價(乾重)每公斤可達美金25,000元左右。且先不論牛樟芝被宣稱之活性真實性如何，但由美國國家衛生研究所轄的美國國家醫學圖書館(National Center for Biotechnology Information, 簡稱NCBI)PubMed資料庫在2020年1月，以牛樟芝為關鍵字搜尋的研究論文篇數高達520篇來看，這個菌種的確是受到學界所重視的藥用真菌。本文將聚焦於國立中興大學森林學系林木代謝學及天然藥物開發研究室，於牛樟芝子實體特有化合物——樟芝酸衍生物的活性研究成果做一綜合的整理。

牛樟芝的三萜類？

一般認為牛樟芝或靈芝等藥用真菌的活性成分為其所含之「三萜類(Triterpenoids)」，但就定義上來說，三萜類是指由6個異戊二烯(Isoprene)鍵結而成的由30個碳原子所組成的化合物。在牛樟芝的菌絲體與子實體中所發現的「三萜類」，其實是31個碳與29個碳數的固醇類(Steroids)。三萜類與固醇類共享大部分的合成路徑，二者都是從植物細胞的細胞質和內質網中的乙酰/甲經戊酸

途徑(Acetate/Mevalonate pathway)生合成的。異戊烯基焦磷酸酯(Isopentenyl diphosphate；IPP)是所有萜類化合物(包括固醇類)生合成的基本組成單元。IPP轉化為二甲基烯丙基二磷酸酯(Dimethylallyl pyrophosphate；DMAPP)，其為異戊二烯基轉移酶(Prenyltransferase)延伸的起始化合物。DMAPP在異戊二烯基轉移酶催化下與IPP合成香葉基焦磷酸(Geranyl diphosphate；GPP)。接著GPP可在異戊二烯基轉移酶催化下與IPP合成法呢基焦磷酸(Farnesyl diphosphate，FPP)，FPP是鯊烯(Squalene)及其所衍生的三萜類和固醇類的直鏈C₃₀化合物生合成的分支點。固醇類和三萜合成路徑最後一個常見中間產物是2,3-氧化鯊烯(2,3-oxidosqualene)。固醇類和三萜類都具有四環環戊[a]菲環(Tetracyclic cyclopenta[a]phenanthrene ring)和C₁₇碳原子上長側鏈所組成。2,3-氧化鯊烯的環化反應是由2,3-氧化鯊烯的過氧化氫酶(2,3-Oxidosqualene catalases)所催化，這個環化酶可形成20,000種以上不同的三萜類或固醇類。三萜的最常見結構，包括直鏈、單、雙、三、四和五環三萜。研究最多的三萜類化合物和固醇類是四環衍生物，三萜類化合物在植物化學和製藥工業中受到相當的重視。

目前已從牛樟芝和香杉芝中鑑定出超過160化合物。其中有49個固醇類，包括34個麥角固醇(Ergostanes)和10個羊毛固醇(Lanostanes)。固醇類為牛樟芝的子實體主要成分，約占乾重的60%。在子實體和菌絲體中均

¹ 國立中興大學森林學系終身特聘教授，中央研究院農業生物科技中心研究員

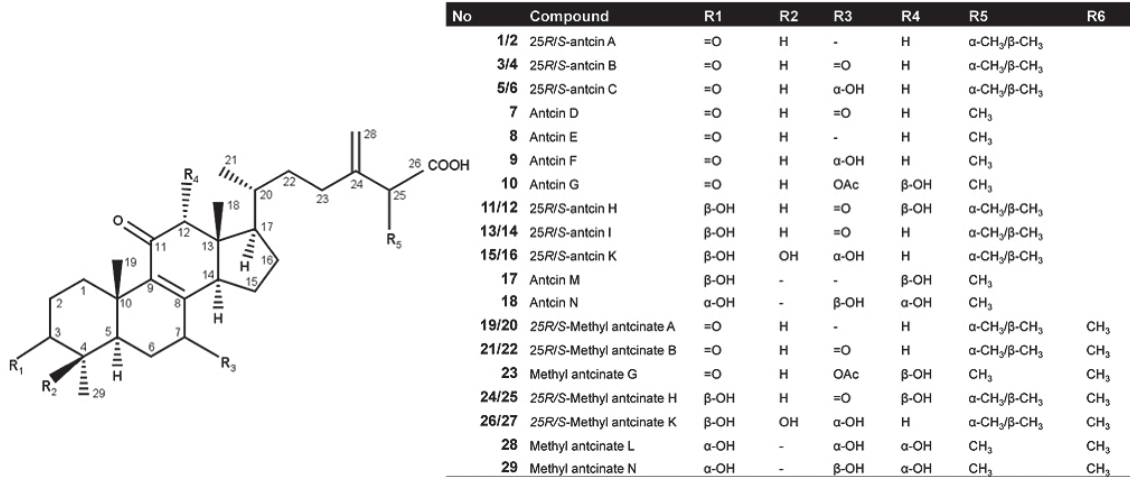


圖1 從牛樟芝和香杉芝所分離出的樟芝酸(Antcin X)及其衍生物。

可產生羊毛固醇，而麥角固醇則僅在子實體中產生，因此麥角固醇被認為是子實體形成的特徵。牛樟芝子實體所分離出之麥角固醇習慣上將其稱為「樟芝酸(Antcin X)」，第一個樟芝酸於1995年分離出到2020年為止，已經從牛樟芝和香杉芝中分離和鑑定了29種麥角固醇(圖1)。

R-Antcin X和S-Antcin X

圖1所整理的牛樟芝所分離出的樟芝酸出現了R、S的鏡像異構物(Enantiomers)，如R-Antcin A(1)和S-Antcin A(2)。這是因為化合物在C₂₅為一個掌性中心(Chirality center)，因此形成一對鏡像異構物。鏡像異構物的化學與物理性質完全一樣，但其生物活性卻有時會出現不同的表現。我們曾利用不同層析的手段，將兩個Antcin C的鏡像異構物分離，並製備了Antcin C的苯基甘氨酸甲酯(Phenylglycine methyl ester; PGME)的光學

活性衍生物，續以NMR分析確定R-Antcin C和S-Antcin C的絕對構型。經MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)分析，S-Antcin C表現出對肝癌細胞株(Hep G2)和乳癌細胞株(MCF-7)的細胞毒性，IC₅₀分別為14.50和12.83 μ g/mL，但R-Antcin C在相同條件處理下未顯示出明顯的細胞毒性。我們的結果顯示Antcin C在C₂₅的構型對其細胞毒性而言是重要的(Nat Prod Commun, 7(7): 835-836.)。因此，從品質的角度來看，牛樟芝的產品中需要鑑定和定量R-和S-鏡像異構物的比例是必須的。

樟芝酸顯著的抑制發炎活性

發炎是人體面對損傷的第一步生物學反應，換句話說是人體第一線的防禦系統，但過度的發炎需要藥物的治療來減輕對組織、器官的痛苦與傷害，且長期的慢性發炎已被

證實與肥胖、心血管疾病、糖尿病，甚至癌症有密切的相關，所以俗話說「萬病從發炎起」實在是有其道理。牛樟芝無論是子實體或是菌絲體的成分，均表現出顯著的抗發炎活性。來自於自然資源的天然物一直是用來做為治療各種發炎、發燒、疼痛、偏頭痛和關節炎等疾病的傳統藥物來源，牛樟芝即是具有相當顯著的抗發炎活性的藥用真菌。我們的研究顯示，牛樟芝的乙醇萃取物在細胞試驗與動物試驗中均表現出極佳的抗發炎活性(J Agric Food Chem, 58: 3153-3158)，而由乙醇萃取物所分離出的樟芝酸，也表現出顯著的抗發炎活性(J Agric Food Chem, 59: 7626-7635)。之後我們也證明樟芝酸A(Antcin A)顯著的抗發炎活性，是可扮演如糖皮質激素(Glucocorticoids)之功能，來表現出抗發炎的活性(Acta Pharmacol Sin, 32 : 904-911)。

樟芝酸與癌症化學預防

關於牛樟芝的醫療保健功能，最被國人重視的還是在於與癌症相關的議題。癌症發生是指正常的細胞轉變成惡性細胞之過程，通常可將其分成三個階段，也就是「起始期」、「促進期」及「惡性化的進展期」。目前認為抑制細胞進入起始期，或是讓已開始惡化的細胞回復到正常狀態的策略，為合理控制癌症及具效率的策略之一。正常的代謝機制可透過酵素系統對致癌化合物進行結構修飾，目的就是增加這些脂溶性化合物的水溶性，以利於排出體外。這些參與「解毒(Detoxification)」代謝的酵素可依其反應型式分為兩大類，即第一相酵素(Phase I enzymes)和第二相酵素(Phase II enzymes)。

在細胞核內有一段抗氧化反應序列(ARE, Antioxidant response element)，藉由誘導物的作用再透過ARE來誘導第二相酵素，包括過氧化物水解酵素(CAT)、穀胱甘肽轉移酵素(GST)、葡萄糖醛酸轉移酵素、血紅素加氧酶(HO-1)、乙醛脫氫酶、NAD(P)H對苯二醌脫氫酶(NQO1)、硫酸轉移酵素、氫甲基及氧甲基轉移酵素、N-乙醯基轉移酵素及氨基酸轉移酵素等的基因轉錄。誘導物可由其結構再分成九大類，分別是麥可加成反應類、二酚類、苯醌類、異硫氰酸鹽類、過氧化物類、硫醇類、三價砷類、重金屬類及雙硫氫硫化物類，之後科學家又發現誘導物是透過Nrf2(Nuclear factor E2 related factor 2)蛋白的傳遞，將表達的訊號傳遞給ARE使其表現。Nrf2是存在細胞質中與其蛋白伴侶分子Keap1(Kelch-like ECH-associated protein 1)相結合，當Nrf2與Keap1結合時是不具活性的，並且在這種狀態下會隨即被降解。但是，一旦在活性氧或其他親核電子基的作用下Nrf2與Keap1會分離，這時候Nrf2即具活性，並轉移至細胞核中，先與Maf蛋白形成二聚體再與ARE結合，接下來第二級酵素就開始表現了。

我們利用肝細胞株(HepG2)和小鼠模式證實牛樟芝子實體的成分樟芝酸C(Antcin C)可以保護肝臟細胞避免自由基誘導的細胞凋亡(Evid Complement and Alternat Med, 2013 Article ID 296082)。我們預先以樟芝酸C處理肝細胞，可阻止因自由基所誘導的活性氧分子對肝細胞之傷害而產生的細胞死亡。此外，自由基引起的脂質過氧化同時也被樟芝酸C所抑制。我們也證實樟芝酸C的抗氧化能力也是透過Nrf2的轉錄表達，促使細胞內

的抗氧化基因的表現，包括HO-1、NQO-1、 γ -GCLC和SOD的誘導有關，而Nrf2的活化則是樟芝酸C透過JNK1/2和PI3K的訊號傳遞路徑所誘導。此外，自由基所誘導的細胞凋亡是透過降低促細胞凋亡因子，包括Bax蛋白、細胞色素C、capase-9、-4、-12、-3和PARP之表現。於動物試驗中樟芝酸C同樣可以表現出顯著保護小鼠肝臟免受自由基所誘導的肝損傷。此外免疫細胞化學分析顯示，樟芝酸C顯著增加了小鼠肝組織中HO-1和Nrf2的表現。這些結果支持樟芝酸C可透過Nrf2/ARE激活保護肝細胞免受氧化應激和細胞死亡。

細胞受到外來或內生活性氧分子(ROS)攻擊，會導致DNA產生突變，一般相信此為腫瘤形成的起始。以慢性發炎反應來說，在發炎的過程中會誘發免疫細胞釋放出活性氧分子、活性氮分子(RNS)、細胞激素(Cytokines)和生長因子(Growth factors)等，這些物質會使得DNA損傷、細胞增生以及細胞侵襲轉移等。癌症預防的概念，即是透過飲食或藥物的補充來避免上述癌化反應的形成，或是癌細胞已形成但讓它停止惡化，甚至將其修復。「親電子的解毒酵素(Electrophile detoxifying enzymes)」和抗氧化酵素，就是因為科學家相信透過提升體內這兩種酵素的表現，可以達到癌症預防之目的。我們的研究證實牛樟芝成分確實可以透過啟動體內的抗氧化系統，達到保護細胞免受氧化壓力或發炎反應所造成的損傷。

樟芝酸可抑制腫瘤生成與癌細胞轉移

我們的研究團隊在十年前就證明樟芝酸A可以如糖皮質激素表現出抗發炎的活性，

而臨床上糖皮質激素經常和化療合併使用在乳腺癌治療中當作緩和治療。我們最近研究發現，糖皮質激素治療誘導卵巢癌細胞中的microRNA-708(miR-708)的表現進而抑制腫瘤細胞的轉移，如果在乳癌細胞中強制表達miR-708可抑制腫瘤細胞增殖和轉移(Carcinogenesis, 40(2): 335-348)。此外，在慢性淋巴細胞性白血病中，NF- κ B的上游激酶IKK β 受miR-708調控，然而在乳癌細胞中糖皮質激素誘導的miR-708的譜系及其下游NF- κ B的標的皆尚待確定。在這項研究中，我們發現用合成的糖皮質激素地塞米松(Dexamethasone, DEX)或天然的糖皮質激素相似物樟芝酸A(Antcin A, ATA)處理人類乳癌細胞MCF-7和MDA-MB-231後，透過活化糖皮質激素受體 α (GR α)顯著增加miR-708表現。藉由糖皮質激素受體(Glucocorticoid receptor, GR)促進劑誘導miR-708表現可有效抑制人類乳癌細胞增殖、細胞週期進程以及腫瘤幹細胞表現和癌細胞轉移。另外，糖皮質激素受體(GR)促進劑或miR-708轉染處理細胞，皆顯著抑制IKK β 的表現，也抑制NF- κ B活性及其下游目標基因，包括COX-2、cMYC、Cyclin D1、MMP-2、MMP-9、CD24和CD44的表現，並提高參與癌細胞增生、細胞週期進程、轉移和腫瘤幹細胞標記蛋白p21CIP1和p27KIP1的表現量。人類乳癌細胞異種移植模式試驗發現，用糖皮質激素受體(GR)促進劑治療動物，可顯著抑制腫瘤生長以及腫瘤重量和體積。因此由我們的發現，糖皮質激素受體(GR)促進劑誘發miR-708表現和抑制NF- κ B下游信號傳導，可成為一新型治療方式應用於乳癌治療。

同樣是最近的研究，我們從另一個角度提出牛樟芝這個獨特的樟芝酸A在體外對人乳腺癌細胞的上皮-間質轉化(Epithelial-mesenchymal transition; EMT)，抗癌細胞遷移和抗侵襲潛力的調節(Plant Med, 85: 755-765)。我們將人乳腺癌細胞株MCF-7和MDA-MB-231與樟芝酸A一起培養24小時，並進行傷口癒合、跨孔侵襲、蛋白質印跡、q-PCR、F-肌動蛋白染色和免疫熒光測定。我們發現樟芝酸A可顯著阻斷了EMT過程，此可透過抑制E-鈣粘蛋白和occludin以及透過抑制其轉錄抑制因子ZEB1減低N-鈣粘蛋白和波形蛋白來證明。我們也發現樟芝酸A可以誘導miR-200c，來活化與p53的轉錄有關，正如樟芝酸A未能誘導miR-200c或抑制p53抑制細胞中ZEB1活性所證實。進一步的體外傷口癒合和跨孔侵襲測定支持樟芝酸A可以抑制乳腺癌細胞的遷移和侵襲潛力，並且該效果可能與誘導的表型調節有關。我們的研究證明，樟芝酸A具有用於乳腺癌治療的抗轉移藥物開發的先導天然化合物。

樟芝酸可以抗衰老

老化是自然的、不可避免的生物學過程，所有生物都是多組織/器官系統，研究證明老化的過程對每個器官的影響是有很大的差異，有些器官會定期更新，而有些則很少更新，例如：皮膚和腸道的細胞會不斷變化，而心臟和大腦的細胞則很少。皮膚老化是由內在因素和外在因素共同引起，內在衰老是遺傳決定的退化性老化過程，導致細小、乾燥、細紋和皮膚逐漸萎縮，而外部刺激則是由如空氣汙染、吸煙、營養不良和紫外線輻射等所造成。最近的研究提出，糖尿病會造成皮膚的

老化。於是我們利用體外的高糖誘導試驗與線蟲動物試驗進行樟芝酸的抗衰老活性進行評估，所選用的樟芝酸包括樟芝酸A(1/2)、樟芝酸B(3/4)、樟芝酸C(5/6)、樟芝酸H(11/12)、樟芝酸K(15/16)和樟芝酸M(17)。首先由細胞毒性分析結果來看，樟芝酸B(3/4)和樟芝酸K(15/16)對人類皮膚纖維母細胞(CCD966SK)具有細胞毒性，IC₅₀值分別為7.11和2.89 mM，因此不進行進一步的評估。其餘不具細胞毒性的樟芝酸，包括樟芝酸A(1/2)、樟芝酸H(11/12)和樟芝酸M(17)等，經過與老化相關的 β -半乳糖苷酶(SA- β -Gal)的分析，以評估其抑制高糖環境所誘導老化的活性，結果顯示樟芝酸M是其中活性表現最佳的樟芝酸，可有效抑制高糖所誘導的老化和生長停滯的活性。我們進一步地探討樟芝酸M的活性機制發現，透過激發細胞週期調節蛋白(如細胞週期蛋白D、細胞週期蛋白E、CDK4、CDK6、CDK2和蛋白視網膜母細胞瘤等)的表達表現，樟芝酸M可抑制高糖環靜所誘導的細胞週期停滯。此外，樟芝酸M可透過活化內源性抗氧化劑的機制，即藉由Nrf-2的轉錄活化來誘導抗氧化劑基因HO-1、NQO-1消除了高糖所誘導的活性氧分子(ROS)的產生。由進一步高糖誘導秀麗隱桿線蟲老化的動物模型中也得到證實，線蟲的壽命可在樟芝酸M的保護下顯著增加，並保護免受高糖誘導的氧化損害。我們的研究結果認為樟芝酸M可能可運用於與年齡相關疾病的預防劑(Oncotarget, 7: 62836-62861)。