

硫磺菌 (*Laetiporus sulphureus*) 之液態培養及其生理活性研究

陳明陽¹ 鄭淑蓉² 陳啟楨² 陳健祺^{2*}

¹麻豆新樓醫院泌尿科

²南台科技大學生物科技系

(收稿日期：2005.5.31，接受日期：2005.6.24)

摘要

硫磺菌 (*Laetiporus sulphureus*) 在傳統的中醫治療中可作為乳腺癌、前列腺癌之輔助食物，它可以幫助病患對抗癌症，但其作用機制尚未釐清？本實驗探討在不同培養條件下對硫磺菌生長速率之影響，在實驗過程中利用固態培養基探討最適培養硫磺菌之 pH 值、溫度及培養基，再以液態培養探討最適生長培養基之碳氮源組成及比例。結果顯示，在 24 °C、pH 6.0 下以 0.5 % 蛋白胨 (peptone) 加 3 % 麥芽糖抽出物 (malt extract) 為培養基，菌絲體生長狀況最好。

利用液態培養所得之硫磺菌發酵液處理腫瘤細胞，結果顯示，隨著發酵天數遞增，對抑制腫瘤細胞的增生能力有顯著遞增現象，第十二天硫磺菌發酵液抑制腫瘤細胞 (HeLa、Hep G2、HT1080、DU-145、MCF-7 以及 MDA-MB-231) 的增生能力皆大於 75%。硫磺菌發酵液處理 HT1080 細胞後以 gelatin zymography analysis 分析，結果發現硫磺菌發酵液具有顯著地抑制 HT-1080 細胞分泌金屬蛋白酶-9 (metalloproteinase-9) 的能力。因此本實驗的結果顯示，硫磺菌之液態發酵液不僅具有腫瘤細胞的增生，同時也具有抑制腫瘤細胞轉移的功能，由此可知，硫磺菌是值得進一步探討的食用菇類。

關鍵詞：硫磺菌，菌絲體，液態培養，腫瘤細胞，抑癌試驗，金屬蛋白酶-2，金屬蛋白酶-9，轉移

緒言

過去研究顯示食用菇萃取物質具備許多生物活性功能包括有：抗腫瘤、增加免疫能力、抗病毒、抗高血壓、抑制血小板凝集、降血糖、降膽固醇、抗細菌、抗寄生蟲等 (Jong and Birmingham, 1993; Wasser and Weis, 1999; Wasser, 2002; Alquini *et al.*, 2004)。因為具有上述的生理活性功能，所以近十幾年食用菇生理活性成份的萃取，以及生理功能的研究廣泛地引起醫界與學界的注意，因此，食用菇之子實體、菌絲體以及發酵液的應用逐漸的被世人重視。

硫磺菌 (*Laetiporus sulphureus*) 為褐腐型木材腐朽菌，屬擔子菌 (basidiomycete) 真菌，它的分布為泛世界性，在台灣常於低海拔地區

之闊葉樹幹上被發現。過去的研究顯示，食用菇的確具有生理活性功能之有效成分，如多醣體、三萜類及固醇類等 (Mizuno *et al.*, 1995; Leung *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2002; Talorete *et al.*, 2002; Wasser, 2002; Zjawiony, 2004)。雖然相較於其他食用菇的研究，硫磺菌的研究是相對欠缺，但是 Leon 等人 (2004) 指出硫磺菌的子實體中也可萃取出三萜類物質 (lanostanoid triterpene)，這種物質可導致人類骨髓瘤細胞 (myeloid leukemia cells) 凋亡 (apoptosis)。至於在多醣體方面，有學者在硫磺菌的子實體分離出兩種多醣體，一為與 β -葡聚糖 (β -glucan) 相似的 laminaran，以 β -(1 \rightarrow 3) 為主鏈；另一種多醣體其主鏈為 (1 \rightarrow 6) 結構，支鏈則帶有 α -D-galactopyranosyl 的 fucomannogalactan (Alquini *et al.*, 2004)。

*通訊作者：陳健祺(Jian-Chyi Chen); FAX: 886-6-2125741; E-mail: jianchy@mail.stut.edu.tw

硫磺菌之相關文獻中除已證實其子實體對 *Salmonella aureus* 及 *E. coli* 具強抗菌活性外 (Suay *et al.*, 2000; Staments, 2002), 其他與硫磺菌有關的研究僅止於探討子實體中萃取物之其成分分析以及測試其相關的生理功能 (Yoshikawa *et al.*, 2001; Alquini *et al.*, 2004; Leon *et al.*, 2004), 因此本研究針對硫磺菌固態與液態發酵培養, 以及發酵液抑制腫瘤細胞增生之生物活性研究。

材料與方法

生物材料

實驗中所使用的硫磺菌 (BCRC 37154) 以及腫瘤細胞 (纖維囊腫細胞 (HT1080, BCRC60037)、乳癌細胞 (MCF 7, BCRC60436 以及MDA MB 231, BCRC60425)、肝癌細胞 (Hep G2, BCRC60025)、子宮頸癌細胞 (HeLa, BCRC60005) 前列腺癌細胞 (DU-145, BCRC60348)) 皆購自食品工業發展研究所。

硫磺菌最適碳氮源固態培養 (solid cultures) 測試

定量之硫磺菌菌絲體 (mycelium) 接種於各種不同碳氮源之培養基 (pH 6), 於 24°C 恆溫培養箱下培養, 每隔 24 小時測量其菌絲生長直徑。碳源的種類有葡萄糖 (glucose)、蔗糖 (sucrose)、果糖 (fructose)、玉米粉 (corn flour)、馬鈴薯粉 (potato flour)、可溶性澱粉 (soluble starch) 以及麥芽抽出物 (malt extract) 等; 氮源的種類有: 玉米漿 (corn steep liquor)、黃豆粉 (soy beans flour)、酵母抽出物 (yeast extract) 以及蛋白胨 (peptone) 等。

硫磺菌最適碳氮源液態發酵培養 (liquid-fermented cultures) 測試

將長滿繡球菌之固態培養皿 (90 mm) 放入含有 100 ml 無菌水的均質機中, 攪拌 30 秒後將菌液接種於不同培養基的錐形瓶中進行液態震盪培養 (培養條件: pH 值為 6、接菌量為 5%、振盪速度為 100 rpm/min 以及培養溫度為 18°C、24°C、30°C)。液態發酵所收集菌絲體與發酵液則進行硫磺菌生長曲線變化分析以及各

種生理活性試驗。

腫瘤細胞細胞存活率測定 (MTT assay)

將HT1080、MCF-7、MDA-MB-231、Hep G2、HT1080 及DU-145 等細胞分別接種於 96 孔培養盤, 於 37°C 培養與 5% CO₂ 下 24 小時, 第二天加入各種不同培養條件下所得之硫磺菌發酵液樣品, 每孔加入 20μL 硫磺菌發酵液 (經高溫滅菌), 最終處理腫瘤細胞之濃度為原來發酵液十分之一的濃度, 於 37°C 與 5% CO₂ 下培養 72 小時後加入 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltrazolium bromide), 在 37°C 下作用 4 小時後, 移除培養基並加入 100μL/孔 DMSO (dimethyl sulfoxide), 於室溫下振盪 5 分鐘後以酵素免疫分析儀 (550 nm) 來測定腫瘤細胞的存活率 (Mosmann, 1983)。

$$\text{細胞存活率 (\%)} = \frac{\text{實驗組 O.D. 值}}{\text{對照組 O.D. 值}} \times 100 \%$$

細胞分泌蛋白質 (conditioned medium) 之收集

將HT1080 細胞培養在 6 孔盤中 (8×10⁵ cells/孔) 培養隔夜, 再以含 0.1% BSA 的培養基於 4 小時之內洗腫瘤細胞 3 次, 清洗後加入各種不同濃度硫磺菌發酵液, 濃度分別為 25μL/mL、50μL/mL 與 100μL/mL, 同時在每個處理組內加入 10μL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 100 ng/mL), 處理後的細胞於 37°C 與 5% CO₂ 下培養 24 小時, 細胞於培養 24 小時後收集其培養液, 最後每個樣品再以 centricon (10000MW; MILLIPORE) 在 6000 rpm 下離心 35 分鐘, 收集之濃縮液進行蛋白質電泳分析或保存於 -80°C 備用。

金屬蛋白酶-2 與金屬蛋白酶-9 表現的分析 (Gelatin Zymography Analysis)

細胞分泌蛋白質 (conditioned medium) 與 2X 樣品緩衝液 (Laemmli, 0.125 M Tris-HCl pH6、4% SDS、0.04% w/v Bromophenol blue、20% Glycerol) 以 1:1 混合, 於 55°C 下加熱 5 分鐘後蛋白質樣品進行蛋白質電泳分析 (7% SDS-polyacrylamide + 0.1% gelatin (w/v))。電泳膠以 2.5% Triton X-100 清洗兩次約 15 分鐘後,

表一、不同碳與氮源培養基對硫磺菌 (*L. sulphureus*) 成長之影響。Table 1. Growth rate of *L. sulphureus* in different carbon and nitrogen sources at 24 °C, pH 6.0. Data were conducted in triplicate.

Nutrient Sources		Growth rate (cm) / Mean ± S.E.				
		Incubation time (day)				
2% Nitrogen	2% Carbon	2	3	4	5	6
Corn steep liquor	Glucose	2.12 ± 0.28	3.32 ± 0.28	4.52 ± 0.23	5.85 ± 0.31	7.42 ± 0.13
Soy beans flour	Glucose	1.72 ± 0.12	3.13 ± 0.03	4.48 ± 0.14	5.97 ± 0.06	7.52 ± 0.06
Peptone	Glucose	2.03 ± 0.06	3.33 ± 0.14	4.72 ± 0.18	6.13 ± 0.36	7.78 ± 0.28
Yeast extract	Glucose	2.05 ± 0.01	3.43 ± 0.03	4.77 ± 0.03	6.33 ± 0.08	7.85 ± 0.05
Corn steep liquor	Fructose	2.02 ± 0.14	3.00 ± 0.05	4.23 ± 0.10	5.50 ± 0.01	7.00 ± 0.01
Soy beans flour	Fructose	1.53 ± 0.03	2.55 ± 0.1	3.77 ± 0.08	5.07 ± 0.06	6.43 ± 0.06
Peptone	Fructose	1.75 ± 0.05	3.17 ± 0.03	4.63 ± 0.03	6.45 ± 0.05	8.07 ± 0.08
Yeast extract	Fructose	1.67 ± 0.03	2.98 ± 0.06	4.30 ± 0.05	5.93 ± 0.13	7.55 ± 0.17
Corn steep liquor	Sucrose	1.55 ± 0.09	3.13 ± 0.13	4.78 ± 0.18	6.80 ± 0.18	8.37 ± 0.08
Soy beans flour	Sucrose	1.15 ± 0.09	1.83 ± 0.19	3.35 ± 0.15	4.37 ± 0.28	5.78 ± 0.26
Peptone	Sucrose	1.28 ± 0.08	2.77 ± 0.06	4.15 ± 0.18	5.78 ± 0.36	7.02 ± 0.58
Yeast extract	Sucrose	1.65 ± 0.22	3.22 ± 0.26	4.85 ± 0.09	5.75 ± 0.05	6.20 ± 0.10
Corn steep liquor	Malt extract	1.52 ± 0.03	3.02 ± 0.03	4.38 ± 0.03	6.00 ± 0.05	7.55 ± 0.09
Soy beans flour	Malt extract	1.52 ± 0.03	2.90 ± 0.10	4.30 ± 0.17	5.68 ± 0.19	7.12 ± 0.16
Peptone	Malt extract	1.48 ± 0.08	2.98 ± 0.06	4.33 ± 0.08	6.02 ± 0.03	7.48 ± 0.28
Yeast extract	Malt extract	1.78 ± 0.12	3.13 ± 0.03	4.33 ± 0.08	5.73 ± 0.13	7.30 ± 0.20
Corn steep liquor	Corn flour	2.03 ± 0.03	3.48 ± 0.03	5.02 ± 0.03	6.95 ± 0.05	8.45 ± 0.09
Soy beans flour	Corn flour	1.47 ± 0.03	2.28 ± 0.08	3.30 ± 0.26	4.37 ± 0.24	5.47 ± 0.15
Peptone	Corn flour	1.60 ± 0.05	2.87 ± 0.10	4.07 ± 0.12	5.38 ± 0.08	6.67 ± 0.06
Yeast extract	Corn flour	1.43 ± 0.15	2.80 ± 0.22	3.90 ± 0.26	5.25 ± 0.39	6.33 ± 0.53
Corn steep liquor	Potato flour	1.95 ± 0.05	3.48 ± 0.08	4.97 ± 0.06	6.80 ± 0.20	8.18 ± 0.16
Soy beans flour	Potato flour	1.40 ± 0.05	2.30 ± 0.13	3.25 ± 0.31	4.38 ± 0.16	5.68 ± 0.28
Peptone	Potato flour	1.73 ± 0.03	2.90 ± 0.13	3.95 ± 0.17	5.45 ± 0.35	6.47 ± 0.51
Yeast extract	Potato flour	1.68 ± 0.03	3.05 ± 0.09	4.33 ± 0.15	5.77 ± 0.10	6.88 ± 0.25
Corn steep liquor	Soluble starch	2.05 ± 0.05	3.53 ± 0.03	5.15 ± 0.05	6.97 ± 0.19	8.50 ± 0.01
Soy beans flour	Soluble starch	1.48 ± 0.16	2.35 ± 0.17	3.58 ± 0.14	4.80 ± 0.19	6.02 ± 0.03
Peptone	Soluble starch	1.77 ± 0.13	3.07 ± 0.12	4.37 ± 0.25	6.05 ± 0.35	6.97 ± 0.03
Yeast extract	Soluble starch	1.68 ± 0.08	3.03 ± 0.12	4.57 ± 0.03	6.07 ± 0.12	7.53 ± 0.08

加入顯像緩衝溶液 (Development Buffer; 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.05 mM CaCl₂, 0.02% NaN₃) 於室溫下輕微搖晃 15 分鐘, 再將電泳膠片移至 37 °C 培養箱培養 16 至 20 小時, 之後將顯像緩衝溶液移除並加入固定溶液 (Fixing Solution; methanol : acetic acid : water = 4.5 : 1 : 4.5, v : v : v) 於室溫下輕微搖晃約 15 分鐘後, 移除固定溶液並以染色溶液 (Staining Solution; 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v) in Destaining Solution) 進行染色, 將電泳膠置於去染色溶液 (Destaining Solution; methanol : acetic acid : water = 4.5 : 1 : 4.5, v : v : v) 中進行退染, 直到條紋清楚的呈現為止, 再將電泳膠片放入去離子水中停止退染 (Hawkes *et al.*, 2001)。電泳膠片經過densitometer (Bio-Rad) 掃描後再進行MMP-2 與MMP-9 表現的定量。

統計分析

本實驗數據結果利用 Sigma Stat 軟體進行

數據分析, 以 Turkey test 進行統計分析, p<0.05, 則表示有顯著性的差異比較。三次重覆數據之結果以平均值±SE (standard error) 表示。

結果

硫磺菌固態培養與液態發酵培養的探討

在初步硫磺菌培養條件的探討上, 發現固態培養基酸鹼值為 6.0 與培養溫度為 24°C 下可以得到最佳硫磺菌的培養條件, 因此在這種條件下進行不同碳氮源組合培養條件的篩選。當碳氮源各固定為 2 % 之條件下, 以固態培養的方式進行硫磺菌的固態培養基的篩選試驗, 結果如表一所示, 四種較佳碳氮源組合為: (玉米漿+玉米澱粉)、(玉米漿+可溶性澱粉)、(蛋白脛+麥芽糖抽出物) 及 (酵母抽出物+麥芽糖抽出物)。雖然 (玉米漿+玉米澱粉) 及 (玉米漿+可溶性澱粉) 培養基組合生長速率最快, 但菌絲

表二、不同比例之蛋白 與麥芽糖抽出物培養基對硫磺菌 (*L. sulphureus*) 成長之影響。

Table 2. Growth rate of *L. sulphureus* in different ratio of peptone and malt extract at 24 °C, pH 6.0. Data were conducted in triplicate. (N: Peptone; C: Malt Extract).

Nutrient Sources		Growth Rate (cm) / Mean ± S.E.				
		Incubation Time (day)				
N(%)	C(%)	2	3	4	5	6
P _{2.0%}	M _{2%}	1.53 ± 0.08	3.05 ± 0.05	4.32 ± 0.08	6.08 ± 0.08	7.50 ± 0.05
P _{0.5%}	M _{1%}	1.05 ± 0.05	1.98 ± 0.10	3.22 ± 0.13	4.40 ± 0.28	6.37 ± 0.47
P _{0.5%}	M _{3%}	2.22 ± 0.08	3.73 ± 0.03	5.22 ± 0.08	6.83 ± 0.10	8.47 ± 0.06
P _{0.5%}	M _{5%}	2.28 ± 0.10	3.70 ± 0.18	5.20 ± 0.10	6.85 ± 0.09	8.40 ± 0.10
P _{1.5%}	M _{1%}	1.18 ± 0.08	2.38 ± 0.08	3.95 ± 0.13	5.33 ± 0.15	7.17 ± 0.15
P _{1.5%}	M _{3%}	1.07 ± 0.10	2.28 ± 0.13	5.05 ± 0.05	6.48 ± 0.10	7.90 ± 0.10
P _{1.5%}	M _{5%}	1.03 ± 0.03	2.10 ± 0.05	3.40 ± 0.10	4.52 ± 0.18	6.17 ± 0.18
P _{2.5%}	M _{1%}	1.65 ± 0.05	3.18 ± 0.14	4.50 ± 0.05	6.58 ± 0.14	8.08 ± 0.08
P _{2.5%}	M _{3%}	1.67 ± 0.08	3.27 ± 0.15	4.52 ± 0.08	5.97 ± 0.14	7.80 ± 0.10
P _{2.5%}	M _{5%}	1.00 ± 0.05	2.08 ± 0.08	3.10 ± 0.10	4.08 ± 0.16	5.40 ± 0.10

體生長的密度比較稀疏，相較之下 (蛋白腓+麥芽糖抽出物, PM) 及 (酵母抽出物+麥芽糖抽出物, YM) 培養基組合是比較有利於硫磺菌菌絲體生長，其菌絲生長的密度較其他培養基組合緻密，菌絲的厚度也較其他碳氮源組合厚，因此比較適合硫磺菌生長的培養基組合為 PM 與 YM，此兩組培養基又以 PM 較佳 (數據未登出)。

為了進一步確認最佳蛋白腓與麥芽糖抽出物 (PM) 之培養比例，利用十種不同比例的蛋白腓與麥芽糖抽出物組合培養基進行固態最佳培養篩選，結果如表二，初步篩選出較佳蛋白腓與麥芽糖抽出物之培養比例條件依序為：(0.5%蛋白腓+3%麥芽糖抽出物)、(0.5%蛋白腓+5%麥芽糖抽出物)及 (2.5%蛋白腓+1%麥芽糖抽出物)。

硫磺菌液態發酵培養的探討

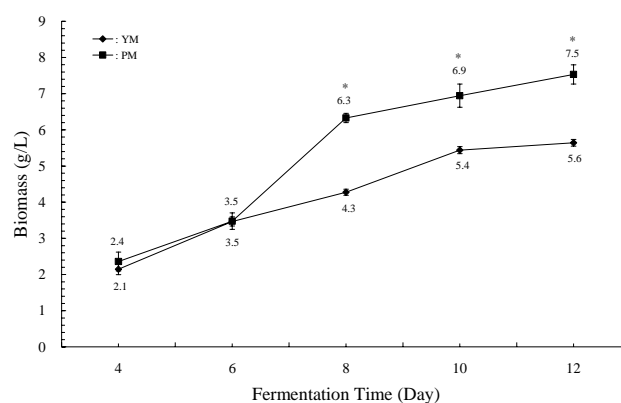
由上述所得硫磺菌較佳之固態培養條件進一步探討其液態發酵條件，在pH 6.0，24 °C條件下利用不同培養基 (PM與YM) 進行硫磺菌液態發酵培養，結果如圖一顯示，在 12 天液態發酵培養過程中，以PM培養基培養之硫磺菌菌絲體生長量於第八天隨即顯著的多於YM ($p < 0.05$)，由以上結果得知，在固定碳氮源比例各為 2%之條件下，硫磺菌最適培養條件為蛋白腓+麥芽糖抽出物 (PM)。

硫磺菌以不同培養基之發酵液對腫瘤細胞株存活率的影響

在初步硫磺菌生理活性探討試驗中發現，

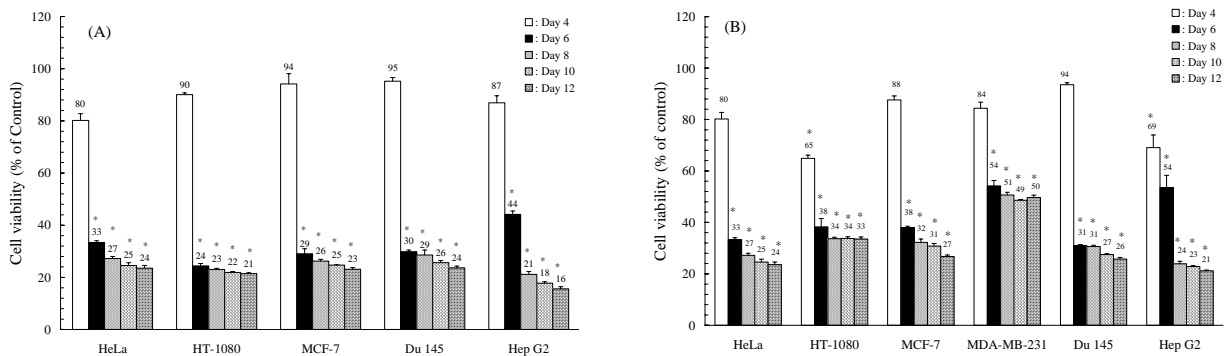
利用 (玉米漿+玉米澱粉)、(玉米漿+可溶性澱粉)、(蛋白腓+麥芽糖抽出物) 及 (酵母抽出物+麥芽糖抽出物) 等培養基組合之發酵液皆能顯著的抑制子宮頸腫瘤細胞 (HeLa) 的成長 ($p < 0.05$)，其中以 (蛋白腓+麥芽糖抽出物, PM) 與 (酵母抽出物+麥芽糖抽出物, YM) 培養所得發酵液抑制腫瘤細胞成長的效果較佳，但是發酵所得之菌絲體則無此生理活性功能 (數據未登出)。

為了進一步探討硫磺菌發酵液對腫瘤細胞的影響，收集硫磺菌以 YM 或 PM 為培養基培養之發酵液進行腫瘤細胞成長抑制試驗，結果如圖二顯示，隨著培養天數遞增，兩種培養基



■一、以 YM 或 PM 為培養基組合進行硫磺菌 (*L. sulphureus*) 液態發酵培養之菌絲量。

Figure 1. Biomass of *L. sulphureus* grown in different nitrogen and carbon sources (YM and PM) at 24 °C, pH 6.0, and 100 rpm/min. YM: 2% yeast extract + 2% malt extract; PM: 2% peptone + 2% malt extract. Data are represented as the Mean ± S.E. in triplicate.*: Significantly different between PM and YM ($p < 0.05$).



圖二、硫磺菌 (*L. sulphureus*) 在不同培養基 (PM 與 YM) 與不同培養天數下所收集之發酵液對腫瘤細胞株存活之影響。

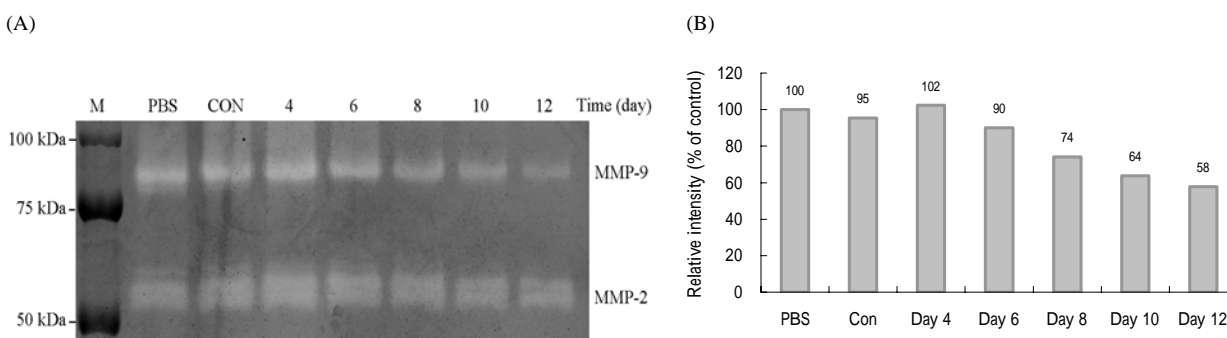
Figure 2. Growth inhibitory effect of different liquid cultures from *L. sulphureus* on tumor cells. A: 2% peptone + 2% malt extract (PM); B 2% yeast extract + 2% malt extract (YM); Data are represented as the Mean \pm S.E. in triplicate. *: Significantly different control ($p < 0.05$).

組合對腫瘤細胞 (HT-1080、MCF-7、MDA-MB-231、Hep G2、HT-1080 以及 DU-145) 的存活率皆有顯著遞減現象產生，亦即液態培養天數越久，抑制腫瘤細胞增生能力也隨之增加。由圖二可以得知，硫磺菌之第六天發酵液即有非常顯著的抑制腫瘤細胞增生效果。硫磺菌以 YM 或 PM 培養至第 12 天的發酵液，其抑腫瘤細胞存活率皆大於 70% 以上 (圖二)，由以上實驗結果得知硫磺菌培養液對於此 6 種腫瘤細胞之增生都有顯著的抑制效果。

金屬蛋白酶-2 與金屬蛋白酶-9 的表現

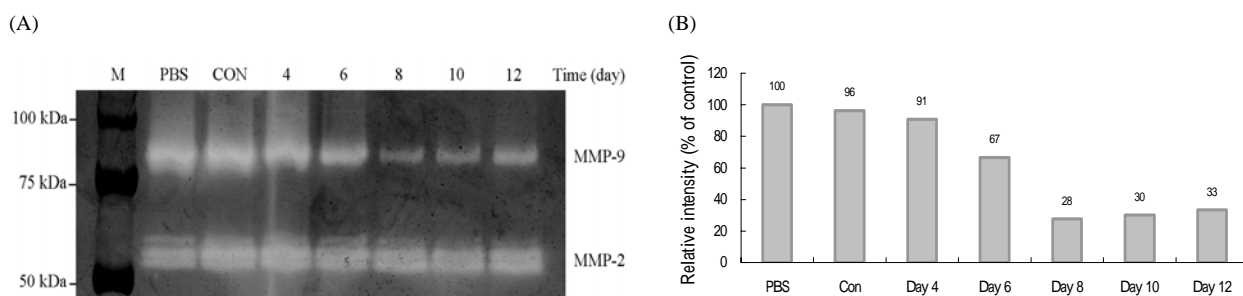
由於硫磺菌液態培養所得之發酵濾液對腫瘤細胞 (HT1080、MCF-7、MDA-MB-231、Hep

G2、HT1080 以及 DU-145) 之增生有顯著的抑制效果，而 HT-1080 細胞又可分泌 MMP-2 及 MMP-9 以促進癌細胞的轉移，因此利用硫磺菌液態培養所收集之 YM 與 PM 發酵液處理 HT-1080 細胞，以探討腫瘤細胞經硫磺菌發酵液處理後，MMP-2 或 MMP-9 的分泌量是否會被降低或阻斷；HT-1080 細胞處理發酵液的同時加入 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 以刺激 HT-1080 細胞產生更多的 MMP-2 以及 MMP-9。結果如圖三與圖四顯示，硫磺菌以 YM 及 PM 培養 8 天後，發酵液即可顯著地抑制 HT-1080 分泌 MMP-9，相較於控制組 (YM 與 PM) 其抑制 MMP-9 分泌的能力分別為 26% 與 72%，然對 MMP-2 的分泌則無明顯的影響；第



圖三、以 YM 培養基進行硫磺菌 (*L. sulphureus*) 液態培養後其發酵濾液對 HT-1080 細胞分泌金屬蛋白酶 (metalloproteinase-2 與 metalloproteinase-9) 之影響。

Figure 3. The effect of liquid culture (YM) from *L. sulphureus* on of MMP-2 and MMP-9 enzymatic activity. HT-1080 cells were treated with PBS (lane 2), non-fermented YM medium (lane 3), day 4 fermented YM medium (lane 4), day 6 fermented YM medium (lane 5), day 8 fermented YM medium (lane 6), day 10 fermented YM medium (lane 7), day 12 fermented YM medium (lane 8) in the presence of 100 ng/ml PMA for 24 h; M: marker (lane 1). Supernatants were harvested and subjected to gelatin zymography, as described in *Materials and Methods*. (A) Gelatin Zymographic analysis of MMP-9 and MMP-2 expression. (B) The gelatinolytic activities of MMP-9 measured by densitometry (Bio-Rad) and the expression levels of MMP-9 were normalized to actin (data not shown).



■四、以 PM 培養基進行硫磺菌 (*L. sulphureus*) 液態培養後其發酵濾液對 HT-1080 細胞分泌金屬蛋白酶 (metalloproteinase-2 與 metalloproteinase-9) 之影響。

Figure 4. The effect of liquid culture (PM) from *L. sulphureus* on of MMP-2 and MMP-9 enzymatic activity. HT-1080 cells were treated with PBS (lane 2), non-fermented PM medium (lane 3), day 4 fermented PM medium (lane 4), day 6 fermented PM medium (lane 5), day 8 fermented PM medium (lane 6), day 10 fermented PM medium (lane 7), day 12 fermented PM medium (lane 8) in the presence of 100 ng/ml PMA for 24 h; M: marker (lane 1). Supernatants were harvested and subjected to gelatin zymography, as described in *Materials and Methods*. (A) Gelatin Zymographic analysis of MMP-9 and MMP-2 expression. (B) The gelatinolytic activities of MMP-9 measured by densitometry (Bio-Rad) and the expression levels of MMP-9 were normalized to actin (data not shown).

12 天 YM 與 PM 發酵液對 MMP-9 分泌的抑制力分別為 42% 與 67%。相較於 YM，硫磺菌以 PM 培養所得的發酵液對 HT-1080 細胞分泌 MMP-9 的表現有較佳的抑制能力 (圖三與圖四)。

討 論

利用固態培養探討最適 pH 值、溫度及培養基組成條件時，我們不僅以生長直徑為判斷依據，同時也以菌絲體生長之厚薄度、緊實度為判斷依歸。雖然實驗數據顯示最佳的生長曲線 pH 值為 5 或 6，但硫磺菌在 pH 6.0 的條件下培養所得之菌絲體厚度較 pH 5.0 下所得之菌絲體厚，因此硫磺菌最佳生長速率應是在 pH 6.0。碳氮營養組合篩選中，發現四種較佳碳氮源組合：(玉米漿+玉米澱粉)、(玉米漿+可溶性澱粉)、(蛋白胨+麥芽糖抽出物) 及 (酵母抽出物+麥芽糖抽出物)。其中 (玉米漿+玉米澱粉) 及 (玉米漿+可溶性澱粉) 培養基組合雖然生長速率最快 (表一)，但菌絲體生長密度較為稀疏。相對於 (蛋白胨+麥芽糖抽出物) 及 (酵母抽出物+麥芽糖抽出物) 培養基組合培養之菌絲體雖然其生長速率並非最快，但其菌絲體密度從一開始就相當緻密，厚度也是所有碳氮源組合中最厚。故選定 (蛋白胨+麥芽糖抽出物) 及 (酵母抽出物+麥芽糖抽出物) 培養基組合進行液態培養，並測其搖瓶生長曲線變化，以進一

步確認最佳碳氮源組合。

過去許多的研究顯示食用菇類分離出之多醣體與三萜類 (triterpenes) 具有抗腫瘤的生理活性功能 (Suzuki *et al.*, 1989; Jong and Birmingham, 1993; Wasser, 2002; Zjawiony, 2004); Leon 等人 (2004) 也指出由硫磺菌之子實體分離出的三萜類具有促進骨髓瘤細胞進行細胞凋亡 (apoptosis) 的功能，然大部份的三萜類都是由食用菇之子實體萃取而得 (Zjawiony, 2004)，一般的食用菇類是無法以液態發酵的技術產生三萜類，因此本實驗抑制腫瘤細胞的生物活性物質應不屬於三萜類。Alquini 等人 (2003) 的研究發現硫磺菌之子實體中可分離出兩種多醣體 laminaran 與 fucomannogalactan，以及過去的研究發現食用菇可以分離出多種的多醣體 (例如 β -glucan)，這些多醣體可以有效的抑制腫瘤細胞的增生 (Dong *et al.*, 1996; Wasser, 2002; Zjawiony, 2004); 雖然本實驗所得之硫磺菌發酵液可以顯著地抑制腫瘤細胞的增生，並且抑制能力隨著天數增加而增強 (圖二)，但是液態培養硫磺菌所得多醣體的含量卻隨著培養天數增加而遞減 (多醣數據未發表)，因此本研究中培養之硫磺菌發酵液具有抑制腫瘤細胞增生之生物活性物質可能不屬於多醣體，或是不具有抑制腫瘤細胞增生的 β -glucan，然本實驗發酵條件下所得硫磺菌發酵產物與其他食用菇的產物在抑制腫瘤細胞增生的作用機制上之差異性是值得進一步的探討。

Himelstein 等人 (1995) 指出金屬蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 參與腫瘤轉移過程中的數個步驟，包含有侵入、轉移及血管新生作用，因此 MMPs 在癌細胞的轉移扮演著相當重要的角色，此外許多學者也認為當腫瘤細胞在轉移時會大量分泌 MMPs 以溶解胞外基質 (extracellular matrix, ECM)，以便有利於腫瘤細胞穿過基底膜 (basement membrane) 轉移至生物體內其他的部位 (Nagase and Woessner, 1999; Westermarck and Kahari, 1999; Chang and Werb, 2001; Chakraborti *et al.*, 2003); 此外有許多的研究指出 MMP-2 及 MMP-9 與許多癌症腫瘤細胞的轉移有極大的關連性，例如肝癌、乳癌、前列腺癌、膀胱癌、膽管癌、大腸癌...等 (Jimenez *et al.*, 2000; Sier *et al.*, 2000; Chae *et al.*, 2003; Ishida *et al.*, 2003; Wass *et al.*, 2003)，近來的研究數據也指出阻斷腫瘤細胞分泌金屬蛋白酶 (如 MMP-2 或 MMP-9)，可以降低腫瘤細胞的轉移能力 (Ramos-DeSimone *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000; Yoon *et al.*, 2001; Dona *et al.*, 2004); 再者，Zhang 等人 (2000) 指出雲芝 (*Coriolus versicolor*) 萃取出 (PSK) 可以藉著降低腫瘤細胞分泌金屬蛋白酶 (MMP-2 與 MMP-9) 而達到抑制腫瘤細胞的轉移，根據圖三與圖四的數據顯示硫磺菌的液態發酵液可以顯著的降低 HT-1080 細胞分泌金屬蛋白酶-9，因此我們可以推斷硫磺菌的液態發酵產物具有抑制腫瘤細胞轉移的生物活性物質，至於是那一種生物活性物質可以降低腫瘤細胞分泌金屬蛋白酶是值得進一步的探討。

誌謝

本實驗之所以能夠順利完成要感謝新樓醫院麻豆分院在研究人力與研究經費上的資助。

參考文獻

- Alquini G, Carbonero ER, Rosado FR, Cosentino C and Iacomini M. 2004. Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. FEMS Microbiology Letters 230: 47-52.
- Chae, KJ, Rha SY, Oh BY, Koo SJ, Kim YJ, Choi J, Park C and Park YN. 2003. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 in intraductal and nonintraductal growth type of cholangiocarcinoma. American Journal of Gastroenterology 1046: 1572-0241.
- Chang C and Werb Z. 2001. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. Trend in Cell Biology 11: S37-S43.
- Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A and Chakraborti T. 2003. Regulation of matrix metalloproteinases: An overview. Molecular and Cellular Biochemistry 253: 269-285.
- Dona M, Dell'Aica I, Pezzato E, Sartor L, Calabrese F, Barabera MD, Donella-Deana A, Appendino G, Borsarini A, Caniato R and Garbisa S. 2004. Hyperforin inhibits cancer invasion and metastasis. Cancer Research 64: 6225-6232.
- Dong Y, Kwan CY, Chen ZN and Yang MM. 1996. Antitumor effects of a refined polysaccharide peptide fraction isolated from *Coriolus versicolor*: *in vitro* and *in vivo* studies. Research Communications in Molecular Pathology & Pharmacology 92: 140-148.
- Hawkes SP, Li H and Taniguchi GT. 2001. Zymography and reverse zymography for detecting MMPs, and TIMPs. In Clark IM(eds), Methods in Molecular Biology: Matrix Metalloproteinase Protocols, Human Press Inc., Totowa, New Jersey, pp 399-410.
- Himelstein BP, Canete-Soler R, Bernhand EJ, Dilks DW and Muschel RJ. 1995. Metalloproteinases in tumor progression: The contribution of MMP-9. Invasion Metastasis 14: 246-258.
- Ishida H, Murata N, Tada M, Okada N, Hashimoto D, Kubota S, Shirakawa K and Wakasug H. 2003. Determining the levels of matrix metalloproteinase-9 in portal and peripheral bloods in useful for predicting liver metastasis of colorectal cancer. Japanese Journal of Clinical Oncology 33: 186-191.
- Jimenez RE, Hartwig W, Antoniu BA and Comptom CC. 2000. Effect of matrix metalloproteinase inhibition on pancreatic cancer invasion and Metastasis. Annals of Surgery 231: 644-654.
- Jong SC and Birmingham JM. 1993. Medicinal and therapeutic value of the shiitake

- mushroom. *Advances in Applied Microbiology* 39:153-184.
- Kim YM, Jang JW, Lee OH, Yeon J, Choi EY, Kim KW, Lee ST and Kwon YG. 2000. Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase 2. *Cancer Research* 60: 5410-5413.
- Lee IH, Huang RL, Chen CT, Chen HC, Hsu WC and Lu MK. 2002. *Antrodia camphorate* polysaccharides exhibit anti-hepatitis B virus effects. *FEMS Microbiology Letters* 209: 63-67.
- Leon F, Quintana J, Rivera A, Estevez F and Bermejo J. 2004. Lanostanoid triperpene from *Laetiporus sulphureus* and apoptosis induction on HL-60 human myeloid leukemia cells. *Journal of Natural Products* 67: 2008-2011.
- Leung MYK, Fung KP and Choy YM. 1997. The isolation and characterization of an immunomodulatory and anti-tumor polysaccharide preparation from *Flammulina velutipes*. *Immunopharmacology* 35: 225-263.
- Mizuno T, Saito H, Nishitoba T and Kawagishi H. 1995. Antitumor-active substances from mushroom. *Food Reviews International* 11: 23 - 61.
- Mosmann T. 1983. A rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
- Nagase H and Woessner JF. 1999. Matrix metalloproteinases. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 21491-21494.
- Ramos-DeSimone N, Hahn-Dantona E, Siple J, Nagase H, French DL and Quigley JP. 1999. Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 13066-13076.
- Sier CFM, Casetta G, Verheijen JH, Tizzani A, Agape V, Kos J, Blasi F and Hanemaaijer R. 2000. Enhanced urinary gelatinase activities (matrix metalloproteinases 2 and 9) are associated with early-stage bladder carcinoma: A comparison with clinical used tumor marker. *Clinical Cancer Research* 6: 2333-2340.
- Staments P, 2002. Novel Antimicrobials from Mushrooms, *HerbalGram*. American Botanical Council. 54: 28-33.
- Suay I., Arenal F, Asenio F, Basilio A, Cabello M and Diez MT. 2000. Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. *Antonie van Leeuwenhoek*. 78: 129-139.
- Suzuki I, Hashimoto K, Oikawa S, Sato K, Osawa M and Yadomae T. 1989. Antitumor and immunomodulating activities of a beta-glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 37: 410-413.
- Talorete TPN, Isoda H and Maekawa T. 2002. *Agaricus blazei* (Class Basidiomycotina) aqueous extract enhances the expression of c-jun protein in MCF-7 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 5162-5166.
- Waas ET, Wobbes T, Lomme RMLM, DeGroot J, Ruers T and Hendriks T. 2003. Matrix metalloproteinase 2 and 9 activity in patient with colorectal cancer liver metastasis. *British Journal of Surgery* 90: 1556-1564.
- Wasser SP and Weis AL. 1999. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushroom: a modern perspective. *Critical Reviews in Immunology* 19: 65-96.
- Wasser SP. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immuno- modulating polysaccharides. *Applied Microbiology & Biotechnology*. 60: 258-274.
- Westermarck J and Kahari VM. 1999. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB Journal* 13: 781-792.
- Yoon SO, Kim MM and Chung AS. 2001. Inhibitory effect of selenite on invasion of HT1080 tumor cells. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 20085-20092.
- Yoshikawa K, Bando S, Arihara S, Matsumura E and Katayama S. 2001. A benzofuran glycoside and an acetylenic acid from the fungus *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus*. *Chemistry and Pharmacology Bulletin* 49: 327-329.
- Zhang H, Morisaki T, Matsunaga H, Sato N, Uchiyama A, Hashizume K, Nagumo F, Tadano J and Katano M. 2001. Protein-bound polysaccharide PSK inhibits tumor

invasiveness by down-regulation of TGF- β 1 and MMPs. *Clinical & Experimental Metastasis* 18: 343-352.

Zjawiony JK. 2004. Biologically active compounds from Aphyllophorales (polypore) fungi. *Journal of Natural Products* 67: 300-310.

The Study of Liquid Culture and Bioactivity in *Laetiporus sulphureus*

Ming-Yang Chen¹, Shu-Jung Cheng², Chee-Jen Chen², Jian-Chyi Chen^{2*}

¹Department of Urology, Sinlau Hospital, Matou Branch, Matou Town
Tainan, Taiwan

²Department of Biotechnology, Southern Taiwan University of Technology, Yung-Kang City
Tainan Taiwan

(Received: 31 May 2005, accepted: 24 June 2005)

ABSTRACT

Laetiporus sulphureus has been used in Chinese traditional medicine for a long time. However, there are very few scientific evidence to support its biological functions. Therefore, the optimal culture conditions for *L. sulphureus*, such as pH or temperature, were investigated in this study. The biological activities of cultural broth and mycelium of *L. sulphureus*, including antitumor activity and antimetastasis, were evaluated. The growth inhibition in tumor cells was evaluated by MTT-microculture tetrazolium assay and the ability of anti-metastasis was investigated by Gelatin Zymography analysis.

The results showed that the optimal temperature was under 24 °C and optimal pH was around 6, and the best nutrient composition was 0.5% peptone + 3 % malt extract. Moreover, the liquid culture of *L. sulphureus* at day 12 showed the best inhibitory effect on the growth of tumor cells, such as HeLa, Hep G2, HT1080, DU-145, MCF-7 and MDA-MB-231 cells, by almost more than 75%. Furthermore, Gelatin Zymography analysis revealed that the expression of metalloproteinase-9 (MMP-9) in HT1080 cells treated with day-12 cultured broth of *L. sulphureus* was significantly suppressed. This result reveals that it is worthy to do more studies to illustrate the bioactivities of *L. sulphureus*.

Key words: *Laetiporus sulphureus*, mycelium, liquid culture, solid culture, antitumor, MTT, gelatin zymography, metalloproteinase, MMP-9, antimetastasis.