

第二章 樟芝菌株發酵過濾液對四氯化碳 誘發大鼠慢性肝損傷之改善作用

前 言

樟芝在民間認為有多種療效，肝硬化是其中重要的一項，因此樟芝對肝硬化的研究受到重視。已有研究指出樟芝菌絲體對四氯化碳誘發大鼠慢性肝炎沒有改善效果(戴宇昀, 2001)，樟芝菌絲體及野生樟芝子實體對酒精誘發大鼠急性肝炎有保護效果(戴宇昀, 2001)。

如緒論所言，本研究的目的是在探討食工所提供的樟芝菌株發酵過濾液(簡稱樟芝發酵液)的功效，以做為產業開發的參考。最近的研究顯示樟芝發酵液能抑制四氯化碳引起的大鼠急性肝炎(宋祖瑩, 2002)。樟芝發酵液於四氯化碳投於前一週先給予，可以減輕四氯化碳誘發大鼠慢性肝炎(沈立言, 2002)，顯示樟芝發酵液對四氯化碳誘發大鼠慢性肝炎有預防、減輕的效果，至於有無治療作用，及其可能的作用機轉則無進一步的說明。

基於此，在本章實驗大鼠以四氯化碳作誘發肝損傷後滿四週，才經口投予樟芝發酵液，探討其是否對四氯化碳誘發的肝損傷有治療的效果，最後的肝檢品抽出 RNA，進行 cDNA 基因晶片試驗，收集、解析這些基因情報的表現，提供樟芝發酵液護肝作用機轉的線索，作為進一步解明其作用的基礎。

材 料 及 方 法

一、樟芝菌株發酵過濾液(簡稱樟芝發酵液；FMAC)之製備

食品工業發展研究所使用 250 公升發酵槽進行菌株 *Antrodia camphorata*

CCRC 93032 之發酵培養，並回收發酵液 160 公升。發酵液交給本研究室前經高溫滅菌以防菌種外流。發酵液經減壓低溫(50 以下)濃縮 20 倍，每毫升濃縮液完全烘乾後所得固體重約為 450 毫克，即發酵濃縮液濃度約為 450 mg / ml，儲存於-30 備用。臨用時以水配成適當濃度使用。

二、動物

使用 Wistar 品系雄性大白鼠，體重約 180-220 公克，購自國科會動物中心。飼養環境維持 22 ± 3 ，相對濕度 55 ± 5 %，明、暗各十二小時的環境。飼食標準飼料(福壽公司)，飲水經過逆滲透處理。

三、四氯化碳誘發慢性肝毒性

實驗前隨機將大鼠分成兩大組，一為控制組 12 隻，另一組為四氯化碳肝損傷組 75 隻。四氯化碳組之大鼠每週兩次經口投予 25 % 四氯化碳溶液 (四氯化碳溶於橄欖油，投予量為 0.5ml / Rat)，投予滿四週時，所有大鼠在乙醚麻醉下由尾動脈抽血，測定血清 GPT 值。四氯化碳組選用 GPT 值介於 300-500 U/L 的大鼠，隨機分成四組，每組 12 隻，各組間之體重及血清 GPT、GOT 值無統計差異。

所有大鼠共分五組，藥物處理組每天經口投予或 FMAC 0.5、1.0 g/kg 或 silymarin 0.2g/kg 一次，控制組與肝損傷對照組每天經口投予蒸餾水。四氯化碳投予滿六週時，大鼠在乙醚麻醉下由尾動脈抽血，供血清生化值檢定。採血當日，於採血後才給蒸餾水或治療藥物。第八週時，大鼠犧牲同時由腹腔採血，血液供血清生化值及凝血時間測定，解剖取出肝臟及脾臟，以冰冷生理食鹽水洗淨後，吸乾水份，稱重。最大葉肝臟分成三部分，第一部分固定於 10 % 中性福馬林溶液中供病理切片觀察，第二部分稱重後烘乾供膠原蛋白含量測定，第三部分快速冷凍於液態氮中供 mRNA 的抽取。其餘肝臟依解剖相關位置分成四袋，儲存於-80 ，供脂質過氧化及抗氧化酵素活性的測定。

實驗中每週記錄大鼠體重變化，作為當週投予試驗物質之體重依據。

四、肝功能之測定

將採取收集的血液靜置，於 4℃，3000 rpm 離心十分鐘。取上層血清以自動生化分析儀 (Roche ; COBAS MIRA Plus) 檢測麩氨酸草乙酸轉氨 (GOT)、麩氨酸丙氨基轉氨 (GPT)、總蛋白 (total protein)、白蛋白 (albumin)，另外檢測血液凝血 時間 (PT; prothrombin time)。

使用 Roche 公司的生化測定試劑 (test kits) :

AST (GOT; glutamate oxaloacetate transaminase): Art. 0736414

ALT (GPT ;glutamate pyruvate transaminase): Art.0736384

ALB (albumin): Art.1970569

TP (total protein):Art.0736783

五、肝臟膠原蛋白 (hydroxyproline) 含量測定

hydroxyproline 的含量測定實驗是依照 Neuman and Logan (1950)的方法。將肝組織秤取約 600 mg 切成細長條狀於 100℃ 烘箱中隔夜乾燥。秤取乾燥肝組織約 200 mg 放於試管中，加入 5 ml 的 6 N HCl，於 100℃ 烘箱中放置 16 小時水解之。冷卻後取 1 ml 水解物以 10,000 rpm 離心 30 分鐘。取 0.2 ml 標準品 hydroxyproline 或上清液加至 0.2 ml 的 6 N NaOH 中和水解物，之後加入 0.6 ml 水。加 1 ml 新鮮配置 0.01 M 的 CuSO₄ 至試管內，取 1 ml 2.5 N NaOH、1 ml 6% H₂O₂ 先後加入試管內，振盪混合 5 分鐘後，以 80℃ 水浴劇烈搖盪 5 分鐘，加熱和震搖可破壞過多之過氧化物。取出以冰水冷卻，加入 2 ml 之 5% P-dimethylaminobenzaldehyde 及 4 ml 之 3 N H₂SO₄ 振盪混勻，於 70℃ 水浴 16 分鐘，以冰水冷卻至室溫，以分光光度計(HITACHI,U-2001;Japan) 於 540nm 測量吸光值，利用純品 hydroxyproline 當作標準，以多重校正曲線計算 hydroxyproline 的含量。

六、病理檢驗

肝組織在 10 % 的中性福馬林固定一段時間 (一週) 後, 再將此肝組織以脫水滲腊機(LIPSHOW)先進行脫水, 再進行石腊包埋。包埋後以旋轉式切片機(YAMATO)切成約 4-5 μm 之肝組織切片。進行蘇木青與伊紅染色 (Haematoxylin and eosin stain)和肝臟膠原纖維特殊染色 (Masson stain), 於光學顯微鏡下觀察各組肝細胞之特異情況及組織病理變化, 比較並拍照評估肝纖維化程度。為了避免觀察者主觀上的偏差, 所有的組織病理切片均是由最大右葉肝的同一位置切取下來。

七、肝臟脂質過氧化(lipid peroxidation)之測定

依據 Ohkawa *et al.*(1979)的方法測定脂質過氧化的量, 取肝組織 1 g 加 10 ml KCl (1.15 %)溶液, 以均質機均質化。取 0.2 ml 均漿順序加入 0.2 ml sodium dodecyl sulfate (8.1 %)、1.5 ml acetic acid (20 %), 並以 NaOH 調整酸鹼度(pH 3.5)。加入 1.5 ml 2-thiobarbituric acid (0.8 %), 再以去離子水調整容積為 4 ml, 99 熱水中加熱一小時。取出, 以冰水冷卻, 加入 1 ml 去離子水及 5 ml 之 n-butanol / pyridine 混合溶液 (15 : 1, v/v), 劇烈振盪混勻後, 在 25 $^{\circ}\text{C}$, 4,000 rpm 下離心 10 分鐘, 取有機層以分光光度計(HITACHI U-2001; Japan)於 532 nm 測定吸光值, 以多重校正曲線計算濃度。肝組織的脂質過氧化量以 nmol malondialdehyde (MDA) / mg protein 表示。同時依照 Lowry *et al.*(1951)所述的方法, 測定肝組織蛋白質含量, 以牛血漿蛋白為標準品。

八、肝臟 Glutathione(GSH)含量測定

實驗依照 Sedlak and Lindsay (1968)的方法。取肝組織 0.4 克加 16 ml EDTA (0.02 M) 溶液, 以均質機均質化。取 5 ml 肝均漿順序加入 4 ml 蒸餾水、1 ml trichloroacetic acid (50%), 震盪混合均勻, 3,000g 離心 15 分鐘。取上清液 2 ml

加入 4 ml tris buffer 與 0.1 ml 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (0.396% in methanol), 混合均勻後以分光光度計於 412nm 測定吸光值, 以多重校正曲線計算濃度。肝組織的 glutathione 以 $\mu\text{mol} / \text{g wet liver}$ 表示。

九、肝臟超氧化物歧化 (superoxide dismutase; SOD) 活性測定

實驗參照 Marklund (1974) 等人所描述之方法進行, 取肝組織 0.5g, 加入 5ml buffer (0.32 mol/L sucrose、1 m mol / L EDTA、10 nmol / L Tris-HCl, pH 7.4), 以均質機均質化, 高速離心 30 分鐘 (13,600 xg, 4)。取上清液稀釋, 稀釋液取 50 μl , 再加上 100 μl tris buffer (pH 8.2, 50mM)、二次去離子水 830 μl , 最後加入 20 μl pyrogallol (10 mM), 混合均勻後, 於 420 nm 測量吸光值。每隔 40 秒測量一次, 共測量 5 分鐘, 計算每分鐘吸光值變化速率。以多重校正曲線計算濃度。SOD 活性以單位時間內抑制 pyrogallol 自動氧化速率達 50% 時的量, 為一單位(U)。組織內 SOD 活性以 U / mg protein 表示。

十、肝臟過氧化氫 (catalase) 活性之測定

實驗參照 Aebi (1984) 所描述之方法進行。取肝組織 0.5g 加入 5 ml 磷酸鹽 buffer (Na_2HPO_4 0.01M, NaH_2PO_4 0.01M, NaCl 2M, pH 7.4), 以均質機均質化, 離心 10 分鐘 (700 xg, 4), 取上清液 0.9 ml 加入 0.1 ml Triton X-100 (10%), 混合均勻。取混合液以磷酸鹽緩衝液 (50 mM, pH 7.0) 稀釋, 將 4 ml 稀釋液加入 2 ml H_2O_2 (30 mM), 混合均勻後於溫控 25 、波長 240 nm 條件下測吸光值, 每隔 5 秒測量一次, 時間總共 1 分鐘。計算求得反應速率常數 K (1 / min)。組織 catalase 活性以 K / mg protein 表示。

$$K = (2.3 / t) \log A_1 / A_2$$

t : 時間間隔 (分鐘)。

A_1 : T_1 時間, 檢品之吸光值。

A_2 : T_2 時間, 檢品之吸光值。

十一、肝臟巯胱 過 氧 化(Glutathione peroxidase; GSH-Px)

活性之測定

實驗參照 Hafeman *et al.* (1974) 所描述之方法進行,取肝組織0.5 g加5 ml buffer (0.32 mol/L sucrose、 1 m mol / L EDTA、 10 nmol / L Tris-HCl , pH 7.4) , 以均質機均質化 , 高速離心 30 分鐘 (13,600 xg、 4)。取上清液稀釋。稀釋液取 0.4ml 加入 0.4 ml glutathione (1 mM) , 置於 37 水浴加熱 3 分鐘。之後再加入 H₂O₂ 0.2 ml , 置於 37 水浴加熱 5 分鐘。然後迅速置於冰中冷卻。冷卻後加入 4 ml 偏磷酸鈉溶液 (偏磷酸鈉 0.635% , NaCl 30% , EDTA 0.2%) , 混合後以 3,000 rpm 離心 10 分鐘。取上清液 2 ml , 加入 2 ml Na₂HPO₄ 溶液 (0.4M)與 1 ml 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (0.04% , sodium citrate 1%) 溶液 , 混合均勻後於 412 nm 測量吸光值 , 以多重校正曲線計算濃度。另外測量非酵素所造成 GSH 的氧化 , 其步驟與測量酵素反應步驟相同 , 兩者差別只是將組織稀釋液以蒸餾水取代。GSH-Px 以 Hafeman 單位(U)表示 , Hafeman 單位定義為單位時間內檢品消耗之 glutathione (GSH) 濃度對數值 (log[GSH]_E) , 減去非酵素反應消耗之 glutathione (GSH) 濃度對數值 (log[GSH]_{NE}) , 所得值之千分之一為 GSH-Px 活性單位(U) :

$$U = (\log[GSH]_E - \log[GSH]_{NE}) / 1000 \times t$$

組織內 GSH-Px 活性以 U / mg protein 表示。

十二、cDNA 基因微陣列試驗

(一) RNA 之萃取:

Total RNA 的萃取是參照 Chomczynski *et al.*, (1987)所描述之方法進行 , 取適量肝組織於研鉢內 , 加入液態氮研成細粉 , 將研好之細粉秤取約 0.05 0.1g 於 eppendorf 內 , 加入 1ml **TRI Reagent®** (MRC)於室溫下靜置 5 分鐘。使用 1ml 滅菌針筒以 20G 注射針頭反覆均質之。加入 0.2 ml chloroform

(SHOWA), 上下混合約 15 秒, 於室溫下靜置 3 分鐘; 以 12,000 g 於 4 離心 15 分鐘, 取上清液至已滅菌的 eppendorf, 加 0.5ml isopropanol (Wako)震盪混合均勻; 於室溫下靜置 10 分鐘, 以 12,000 g 於 4 離心 10 分鐘。 移除上清液, 加 75%酒精清洗 RNA pellet; 於 4 , 以 7,500 g 離心 5 分鐘去酒精, 於無菌操作台風乾, 使酒精蒸發(不可至全乾)。 加 60 μ l 滅菌水溶解已風乾之 RNA 沈澱, 使用 Spectrophotometer (HITACHI,U-2001;Japan) 以波長 260nm 及 280nm 測量吸光值, 估算 RNA 的純度及濃度。 檢測後將 RNA 調整為適當濃度, 置於-80 冷凍備用。

(二) 晶片之操作

正常組、四氯化碳組、四氯化碳 + 樟芝發酵液高劑量組每組合併 9 隻, 抽取的 RNA 委託百恩諾生物科技公司進行兩對晶片操作, 即正常組和四氯化碳組一對、四氯化碳組和四氯化碳 + 樟芝發酵液高劑量組一對。 每對 RNA 分別先以 cy 3 及 cy 5 兩種螢光試劑加以標定再與基因晶片上之 cDNA 進行雜合反應, 反應完成後之晶片經過洗去多餘物質及乾燥後, 再以雷射光打出波長 635nm 及 532nm 的光源, 以激發晶片中的螢光試劑 cy 3 及 cy 5, 並以軟體加以判讀所激發出的訊號強弱, 並計算其訊號強度以作為量化之數據, 進而得知每一基因之表現情形, 而得到的資料再交由本研究室解析。

十三、統計方法

以單尾變異數分析(One-Way analysis of variance; ANOVA)方法分析, 並進行 Dunnett 測試, 以 P 值小於 0.05 認為有顯著差異。

結 果

一、對體重的影響

實驗開始大鼠各組平均體重約為 244 g。四氯化碳投于後滿四週，四氯化碳處理 4 組平均體重皆較正常控制組低，四氯化碳處理組間沒有差異(表 2-1)。大鼠經四氯化碳處理八週後，其平均體重與正常組比較明顯降低。四氯化碳處理大鼠投予樟芝發酵液 0.5、1.0 g/kg 或 Silymarin 0.2g/kg 的平均體重與四氯化碳組比較沒有差異 (表 2-1)。

二、對肝臟和脾臟重量的影響

四氯化碳處理的大鼠最後肝臟重量與正常組比較沒有明顯的差異。樟芝發酵液(1.0 g/kg)處理的大鼠肝臟重量明顯增加 (圖 2-1)。四氯化碳處理的大鼠脾臟重量與正常組比較明顯增加。樟芝發酵液(1.0 g/kg)處理的大鼠脾臟重量明顯減輕 (圖 2-2)。Silymarin 對肝臟及脾臟的重量沒有影響。

四氯化碳處理的大鼠出現腹水的隻數為 9/12，樟芝發酵液 0.5、1.0 g/kg 或 Silymarin 處理之大鼠，腹水出現隻數分別為 9/12、4/12、6/12。

三、對血清生化值的影響

如圖 2-3、2-4 所示，大鼠投予四氯化碳之後，第四、六及八週的 GPT、GOT 值均顯著高於正常控制組，於第 6 週達最高，第 8 週時有降低的情形。於第 4 週，四氯化碳處理各組間的血清 GPT、GOT 值沒有差異。於第 6 週，樟芝發酵液 0.5、1.0 g/kg 或 Silymarin 處理之大鼠，對 GPT、GOT 值有明顯降低作用。於第 8 週，樟芝發酵液或 Silymarin 處理之大鼠，對 GPT、GOT 值都沒有影響。

如圖 2-5、2-6 所示，大鼠投予四氯化碳之後，最終血清 albumin 濃度及 albumin / globulin (A/G) 比值顯著低於正常組。樟芝發酵液(1.0 g/kg)處理之大鼠，可以增加血清 albumin 濃度及 A/G 比值。Silymarin 處理之大鼠對此二者沒有影響。

四、對血液凝血 時間的影響

如圖 2-7 所示，大鼠投予四氯化碳之後，最終血液 prothrombin time 明顯長於正常組。樟芝發酵液(1.0 g/kg)的處理，可以縮短 prothrombin time。Silymarin 處理之大鼠對此沒有影響。

五、對肝臟蛋白質、脂質過氧化、hydroxyproline 及 glutathione 含量的影響

四氯化碳誘發大鼠慢性肝損傷，使肝臟蛋白質含量減少、脂質過氧化程度及 hydroxyproline 含量增加 對 glutathione 含量沒有影響 樟芝發酵液(1 g/kg)的處理能增加肝臟蛋白質含量(圖 2-8)，減少脂質過氧化程度(圖 2-9)及 hydroxyproline 含量(圖 2-10)，有增加 glutathione 含量的傾向(圖 2-11)。Silymarin 的處理可以增加肝臟蛋白質及 glutathione 含量，對脂質過氧化程度及 hydroxyproline 含量沒有影響。

六、對肝臟 SOD、catalase、glutathione peroxidase(GSH-P_x) 活性的影響

四氯化碳誘發大鼠慢性肝損傷，使肝臟中 SOD、catalase、GSH-P_x 的活性明顯下降。樟芝發酵液及 Silymarin 的處理對肝中 SOD、catalase、GSH-P_x 的活性沒有影響 (表 2-2)。

七、病理檢驗

肝臟病理切片的觀察顯示，投予四氯化碳八週之大鼠，肝臟纖維化和發炎的程度相當明顯；出現膠原蛋白纖維束，充滿發炎細胞、腫脹、玻璃樣變性(圖 2-12B、2-13B)。但是缺乏脂肪浸潤，這些現象與先前其他學者之結果一致 (Lieber,1996)。投予樟芝菌株發酵液 1.0 g/kg，肝纖維化和發炎的情況有改善的現象 (圖 2-12D、2-13D)。

八、基因微陣列

本實驗樣本分成四氯化碳對控制組及四氯化碳對四氯化碳+樟芝發酵液兩對晶片進行比對，由百恩諾公司資訊部門判讀及計算篩選後，得到之數據中可篩選出 885 個基因，在給予四氯化碳組中其訊號量大於 3000 且與正常組相較之比值 (ratio) 大於 2，即視為此基因有大量表現；並依基因功能將這些基因分為：蛋白質合成與轉錄作用、細胞基質與結構蛋白的合成、細胞間的訊息傳遞。再由兩組數據中挑選出四氯化碳對正常組中高表現量基因，對應於四氯化碳對樟芝發酵液晶片上之同一基因，其 ratio 低於四氯化碳對正常組晶片 ratio 的二分之一以下並列出於表中 (Tabl 2-3)。

討 論

大鼠先以四氯化碳投予 4 週誘發肝損傷後投予樟芝發酵液 4 週，結果顯示樟芝發酵液能明顯的降低第 6 週的肝炎指標 GOT、GPT 值，也能改善最終肝纖維化的指標。

肝臟受到傷害，肝細胞內的 GOT 和 GPT 會漏出，使血清中的 GOT 和 GPT 活性上升，是最常用的肝臟損傷生化指標 (Sturgill and Lambert, 1997)。其中 GPT 較有專一性，GOT 也存在於心臟、腎臟、骨骼肌、腦部 (Sturgill and Lambert, 1997)。在本試驗使用四氯化碳造成肝損傷，血清中 GOT 和 GPT 的活性明顯上升。樟芝發酵液能降低第六週的血清中 GOT 和 GPT 活性，顯示其能減輕四氯化碳對肝臟的傷害。

GOT 和 GPT 只能靜態的反應出肝臟最近受到的傷害，雖是肝臟所有傷害的指標，但其無法估算肝臟還殘留多少能力 (Sturgill and Lambert, 1997)。血

液的凝血時間反應出肝臟合成凝血因子的能力，血清中的白蛋白主要來自肝臟的合成；因此在慢性肝炎，凝血時間延長；血清中白蛋白值下降，球蛋白值上升，白蛋白/球蛋白比值下降 (Vandenbergh, 1996)。在本試驗四氯化碳誘發慢性肝炎，最後也出現血清中白蛋白、白蛋白/球蛋白比值下降、血液凝血時間延長、及肝臟蛋白質含量減少的情形。樟芝發酵液能提升血清中的白蛋白、白蛋白/球蛋白比值，及縮短凝血時間，增加肝臟蛋白質含量，這些顯示樟芝發酵液能改善四氯化碳誘發慢性肝炎的肝功能減退。

肝硬化時，血流進入肝臟受到阻力，引起門脈高壓，連帶影響到脾臟的血流，會使脾臟腫大、門脈高壓及血中白蛋白減少，亦會引起腹水(Gill and Kircbain, 1997)。本試驗四氯化碳誘發慢性肝炎，最後出現脾腫大及腹水隻數增加的情形。樟芝發酵液能改善脾臟腫大，及減少腹水出現隻數的情形，顯示其有減緩肝臟纖維化的作用。

慢性肝炎會引起肝臟纖維化，即結締組織增生。結締組織主要由膠原蛋白構成，Hydroxyproline 是膠原蛋白特有的成分，測定 Hydroxyproline 的含量可以反應膠原蛋白的量，可用來表示纖維化的程度(Hanauske-Abel, 1996)。在本試驗四氯化碳誘發慢性肝炎，其肝臟 Hydroxyproline 含量明顯增加，樟芝發酵液能使 Hydroxyproline 含量減少，顯示其可以減輕肝纖維化的作用。此作用在組織病理檢驗得到進一步證實。

一般而言，慢性肝炎的改善指標主要在血清 GPT、GOT 值，GOT 和 GPT 活性的下降意謂肝功能恢復。但在嚴重肝損傷之後，GOT 和 GPT 活性下降並不是肝功能恢復的前兆，反而是反應出肝細胞功能喪失(Sturgill and Lamebert, 1997)。四氯化碳慢性投予，引起慢性肝炎，最後也會引起肝纖維化/肝硬化，此時大量的 GPT、GOT 已釋出，因此最後的血清 GPT、GOT 值會偏低(Yoshitake *et al.*, 1991)。亦即在最後階段，GPT、GOT 已不是重要的指標，重要的是肝硬化併發症有無改善作用。我們也發現在最後階段，大鼠肝炎嚴重接近死亡

時，其血清 GOT 和 GPT 值嚴重偏低。因此若試驗物質在最後能降低 GOT 和 GPT 值時，還得看其它肝臟纖維化併發症的指標有無改善作用，否則可能誤判。

樟芝發酵液在最後第八週時，血清 GPT、GOT 值沒有下降作用，雖然如此，樟芝發酵液對第八週大鼠肝纖維化的相關指標，如血清中白蛋白的下降，血液凝血時間的縮短、脾臟腫大等有明顯改善作用。這些顯示樟芝發酵液最後還是對肝臟有很好的保護作用。

已知四氯化碳造成肝臟纖維化，與自由基的傷害造成脂質過氧化(lipid peroxidation)有關(Camps *et al.*, 1992)。在本試驗四氯化碳誘發慢性肝炎，最後肝臟組織的脂質過氧化明顯增加，樟芝發酵液能降低脂質過氧化的程度，顯示其護肝作用與減少自由基的傷害有密切關係。在本試驗四氯化碳誘發大鼠慢性肝炎，導致肝臟中清除自由基的三種酵素 SOD、Catalase 和 GSH-Px 活性明顯下降。樟芝發酵液對此三種酵素的活性沒有改善作用。樟芝發酵液也沒有顯著增加肝臟內的抗氧化劑 glutathione 含量。一些研究指出樟芝發酵液有抗氧化的能力(顏國欽, 2001)，樟芝發酵液的保肝作用是否與其本身的抗氧化作用有關，有待進一步研究。

在本實驗使用 Silymarin (200 mg/kg, p.o.)為正對照藥物，雖有部分改善效果，如對第 6 週的 GOT 值，及最後肝臟的蛋白質及 glutathione 含量。但對肝纖維化的重要指標沒有得到正面結果。一些臨床文獻指出 Silymarin 對慢性肝炎(Trincher *et al.*, 1989; Kieseewetter *et al.*, 1977)及肝硬化(Pares, *et al.*, 1998; Ferenci *et al.*, 1989)無效。動物實驗方面，雖有對慢性四氯化碳肝損傷有效的結果(Mourelle *et al.*, 1989)，但也有無效的結果 (Hall, *et al.*, 1994)。Silymarin 不易被吸收 (Scott, 1998)，因此在對四氯化碳急性小鼠毒性的試驗有使用 Silymarin 劑量達 800 mg/kg, i.p.的文獻(Letteron *et al.*, 1990)。

目前認為能改善肝纖維化藥物的作用機轉有(1)改善肝臟營養，如增加

glutathione、methionine 的含量、(2) 抑制 microsome enzyme 、(3) 抑制免疫發炎等(Lieber, 2000)。四氯化碳慢性投予很容易誘發肝纖維化，乃因四氯化碳受到肝臟代謝產生自由基(Camps *et al.*, 1992)，除對肝細胞造成壞死外，也可以刺激 Kupffer cell 釋放 cytokine，促進 Ito cell 增生，產生膠原蛋白(Jiang *et al.*, 1991)。進行 cDNA 基因微陣列試驗的主要目的是希望得到樟芝發酵液作用機轉的線索，以供進一步研究的參考。但由於使用的是實驗最終肝臟檢體，因此與前階段作用相關的 cytochrome P450、免疫發炎反應等相關的基因表現未能顯現出來，因此無法得到樟芝發酵液對這些基因的作用情報。

由 cDNA 基因微陣列試驗得到相當龐大的基因表現情報，很難一一解析。就影響顯著的基因表現由 NIA/NIH Genomics 網站查詢資料綜合歸納如下：

在四氯化碳末期肝臟檢體基因表現以 procollagen type III 及 type I 最顯著，即表示肝臟膠原蛋白嚴重增加，與病理切片及肝臟 hydroxyproline 含量上升的結果一致。樟芝發酵液明顯抑制 procollagen type III 及 type I 的基因表現，再度證實樟芝發酵液對四氯化碳肝纖維化的有效性。

肝臟可自行調節本身的生長和分化，四氯化碳對肝細胞造成損傷，會啟動訊息傳遞調控相關基因如 cathepsin，刺激細胞開始生長分化及增殖，由基因微陣列試驗的結果發現與細胞複製相關基因如 ribosomal protein、poly A binding protein、translationally regulated transcriptor、proliferin 等，及細胞骨架組成成分相關基因如 actin、tubulin 等紛紛被活化，表現量明顯增加。樟芝發酵液對四氯化碳組所引發的上述基因表現有顯著下降作用，亦可說明樟芝發酵液具有減輕四氯化碳對肝細胞造成的損傷。

基因微陣列試驗的結果進一步支持了樟芝發酵液對肝纖維化的有效性，至於作用機轉的解析與肝臟檢體取得的時間點有密切關係，尚待進一步的試驗來解明。