

第四章 樟芝菌株發酵過濾液的 免疫調節作用初步試驗

前 言

免疫製劑可分為免疫增強劑和免疫抑制劑兩大類，前者的效應特點是促進免疫功能，而後者表現為對免疫應答的抑制。癌症為目前難病之一，癌症化學療法的副作用很多，尤其對於免疫的抑制作用，若能減輕這些副作用，可提高化療的品質。衛生署公告的「健康食品之免疫調節功能評估方法」主要針對前者，至於抗過敏及減輕化療副作用的評估方法已準備研擬中。

樟芝價格昂貴，若能對難病的治療有幫助才能顯現其價值。真菌類植物所含的多醣體在免疫功能的效用備受重視，因此樟芝發酵液是否也有這方面的效用值得探討。本章研究的主要目的是利用簡單的活體內(*in vivo*) 試驗探討樟芝發酵液是否能減輕化療藥物 cyclophosphamide、5-fluorouracil 的免疫抑制作用，及是否具有抗過敏作用。

又同為化療藥物的 cisplatin 系經由自由基的作用引起嚴重腎毒性 (Matsushima *et al.*, 1998)。佐劑型關節炎(Adjuvant arthritis)是細胞免疫、免疫複合物所引起的炎症反應，是研究抗風溼性藥物的重要動物模式 (Hiroi *et al.*, 1988)，在本章試驗中也一併探討樟芝發酵液對這些的效果，提供樟芝發酵液進一步開發為保健食品的參考。

材 料 及 方 法

一、樟芝菌株發酵過濾液(簡稱樟芝發酵液)之製備

詳第二章材料與方法。

二、動物

使用 Wistar 品系雄性大白鼠，或 ICR 小鼠，購自國科會動物中心。飼養環境維持 22 ± 3 ，相對濕度 $55 \pm 5\%$ ，明、暗各十二小時的環境。餵食標準飼料(福壽公司)，自動飲水系統供水。

三、對 cyclophosphamide、5-fluorouracil 及 cisplatin 的影響

(一) 對 cyclophosphamide 的影響

對 cyclophosphamide 的影響參照 Qian *et al.* (1997) 及 Chevreau *et al.* (1995)的方法，腹腔注射 cyclophosphamide 100 mg/kg 前 3 天起，每天經口投予樟芝發酵液一次，持續至 cyclophosphamide 給藥後 7 天。實驗終了，在乙醚麻醉下，由腹腔靜脈採血，供血液學檢驗；取出脾臟稱重比較之。

(二) 對 5-fluorouracil 的影響

對 5-fluorouracil 的影響參照 Chevreau *et al.* (1995)的方法，腹腔注射 5-fluorouracil 420 mg/kg 前 3 天起，小鼠每天經口投予樟芝發酵液一次，持續至 5-fluorouracil 給藥後 7 天。實驗終了，在乙醚麻醉下，由腹腔靜脈採血，供血液學檢驗。取出胸腺、脾臟稱重比較之。

(三) 對 cisplatin 的影響

參照 Matsushima *et al.* (1998)的方法，大鼠靜脈注射 cisplatin (5 mg/kg)，樟芝發酵液每天經口投與，每天稱體重。第五天在乙醚麻醉下由腹靜脈採血，供血清生化學檢驗 (creatinine, blood urea nitrogen 為主)。於第五天大鼠犧牲前於

代謝籠收集尿液 6 小時供測定 creatinine，並算出 creatinine clearance。

$\text{Creatinine clearance} = \text{urinary creatinine} \times \text{urinary volume} / \text{hrs} / \text{serum creatinine}$

四、抗發炎

(一) 足蹠浮腫

使用雄性大鼠，樟芝發酵液於實驗前 1 小時經口投與。在右後腳足蹠皮下注入 1 % (carrageenan)，使用容積法(Plethysmometer, Ugo Bsile, Italy)測定足蹠浮腫體積。

(二) 皮膚血管滲透性

使用雄性大鼠，樟芝發酵液於實驗前 1 小時經口投與。大鼠在乙醚麻醉下，剃除腹部上的毛，由尾靜脈注入 1 ml 的 1 % Evans blue，兩分鐘後，在腹部內皮分區給與不同致炎物質如：bradykinin (5 nmol/site)、 prostaglandin E2 (3 nmol/site)、 compound 48/80 (1 g/site)。一小時後，在乙醚麻醉下放血致死。取下直徑 20 mm 大的滲藍皮膚，將其剪碎，先經 1 N KOH 消化，使用 acetone and phosphoric acid 抽出色素定量之。

(三) 佐劑性關節炎 (Adjuvant arthritis)

使用雄性 Wistar 大鼠，體重 150 - 200 g。以容積法 (Plethysmometer, Ugo Bsile, Italy)先測量左右肢踝關節體積。樟芝發酵液經口投與，一日一次，連續 24 天。第一天給藥後 1 小時，每鼠右後足蹠皮下注射 Freund's Adjuvant 0.1 ml，此後，隔天測量大鼠左右肢踝關節體積。實驗結束時，比較各組動物足腫脹程度。

五、抗過敏

(一) 第一型：Passive cutaneous anaphylaxis

依據 Lee *et al.* (1997)的方法，大鼠背部剃毛，皮內注射 Anti-DNP-IgE antibody (500 ng/site), 48 小時後大鼠在乙醚麻醉下，由尾靜脈注入 DNP-human serum albumin (1 mg/rat) and 1 % Evans blue , 30 分鐘後將大鼠犧牲，剪下背部皮膚，先經 1 N KOH 消化，使用 acetone and phosphoric acid 抽出色素定量之。樟芝發酵液在注射抗原前 1 小時經口投與。

(二) 第二型：Reversed cutaneous anaphylaxis

依據 Yanagihara *et al.*, (1989) 的方法，大鼠背部皮內注射 0.05 ml rabbit anti-rat serum (1/4 dilution) , 1.5 小時後由尾靜脈注入 1 ml 的 1 % Evans blue , 30 分鐘後將大鼠犧牲，剪下背部皮膚，先經 1 N KOH 消化，使用 acetone and phosphoric acid 抽出色素定量之。樟芝發酵液在注射抗原前 1 小時經口投與。

(三) 第三型：Reversed Arthus reaction

依據 Yanagihara *et al.*, (1989) 的方法，大鼠靜脈注射 2 ml / kg of 2 % ovalbumin 溶液，30 分鐘後，在背部皮內注射 0.1 ml rabbit anti-ovalbumin serum (1/2 dilution) , 30 分鐘後由尾靜脈注入 1 ml 的 1 % Evans blue , 再經 30 分鐘後將大鼠犧牲，剪下背部皮膚，先經 1 N KOH 消化，使用 acetone and phosphoric acid 抽出色素定量之。樟芝發酵液在注射抗體前 1 小時經口投予。

(四) 第四型：Contact dermatitis

依據 Yanagihara *et al.*, (1989) 的方法，一天兩次在鱗鼠腹部滴上 20 μ l 的 0.5 % 2,4-dinitrofluorobenzene (in acetone-olive oil) , 4 天後，在鱗鼠右耳抹上 10 μ l 的 0.2 % 2,4-dinitrofluorobenzene (in acetone-olive oil) , 24 小時後由尾靜脈注

射 0.3 ml 的 1 % Evans blue , 30 分鐘後將小鼠犧牲，取下右耳，先經 1 N KOH 消化，使用 acetone and phosphoric acid 抽出色素定量之。樟芝發酵液在耳朵抹上抗原前 1 小時經口投予。

六、統計方法

本實驗所得之數據，均以單尾變異數分析(one-way analysis of variance ; ANOVA)，並進行 Dunnet 測試，以 P 值小於 0.05 認為有顯著差異。

結果與討論

一、對化療藥物的影響

癌症化學療法藥物 cyclophosphamide 和 5-fluorouracil 是很強的免疫抑制劑 (Ziauddin *et al.*, 1996; Konishi *et al.*, 1996)。在本試驗小鼠經 cyclophosphamide (100 mg/kg, i.p.) 或 5-fluorouracil (420 mg/kg, i.p.) 處理，脾臟重量及白血球數目明顯減少(表 4-1)，顯示此二藥物的免疫抑制作用。樟芝發酵液的處理沒有改善 cyclophosphamide 或 5-fluorouracil 引起的免疫抑制作用。

抗癌藥物 cisplatin 經由自由基的作用引起很強的腎毒性作用 (Matsushima *et al.*, 1998)。在本試驗大鼠經 cisplatin 處理引起體重下降、尿量增加(表 4-2)，血中尿素氮增加及 creatinine 清除率下降(表 4-3)，腎臟脂質過氧化程度 (malondialdehyde ; MDA 的含量)、 glutathione 含量增加及蛋白質含量下降(表 4-4)。低劑量樟芝發酵液 (0.5 g/kg) 的處理可以部分改善 cisplatin 引起的腎毒性作用，如尿量、血中尿素氮、腎臟蛋白質含量。雖有研究指出樟芝發酵液具抗氧化作用，但其不能降低脂質過氧化程度，由此推測低劑量樟芝發酵液部分減輕 cisplatin 腎毒性不是來自其抗氧化作用。高劑量樟芝發酵液對

cisplatin 腎毒性沒有改善作用，此點值得留意，或許與其高劑量時嚴重減少排尿有關(詳第五章)。

二、 抗發炎

如表 4-5 所示，樟芝發酵液對 carrageenan 所引起的大鼠足蹠浮腫沒有抑制效果。對 compound 48/80、bradykinin、prostaglandin E₂ 引起的皮膚血管滲透性增加也沒有抑制效果(表 4-6)。對以 Freund's Adjuvant 引起的佐劑型關節炎也沒有明顯效果(表 4-7)。這些顯示樟芝發酵液不具抗發炎作用。

三、 抗過敏反應

過敏分為四型 (Coombs and Gell, 1975)，第一型過敏反應又稱為立即性免疫反應，在接觸已被致敏的抗原數分鐘內就會發生反應。第二型過敏反應是抗體引起的過敏反應。第三型過敏反應是由免疫複合物沉積造成的疾病。第四型過敏反應是免疫細胞引起的過敏反應，這種反應並不需要抗體，在一到三天後才會出現，為遲發型過敏反應，又稱為接觸性過敏反應，其作用機制與 T 細胞被激活有關。樟芝發酵液僅能抑制第四型過敏反應(表 4-8)。樟芝發酵液在此方面的作用有待進一步深入探討。