

第五章 樟芝菌株發酵過濾液對鼠類 胃腸功能、血壓及排尿的影響

前 言

消化器官的主要功能是使食物消化，營養素吸收及排便。消化最主要是經由消化酵素的作用，自律神經的調節及體液性的調節等系統來控制。因此，除了病原菌的侵襲外，過敏、老化、精神壓力及各種飲食內容的改變，都會引起胃腸道的不適亦會造成腸內菌相平衡的崩解，進而引起便秘、下痢。因此胃腸不適是普遍存在的疾病，改善胃腸功能的保健食品有很大的市場。

衛生署公告的「健康食品之胃腸道功能改善評估方法」中，動物實驗需要服用試驗物質 4 週以上。因此利用第七章進行大鼠餵食樟芝發酵液 28 天安全性評估實驗，大鼠犧牲時所取得的盲腸糞便供細菌相測定，同時也保留胃及部分小腸供消化酵素活性及抗氧化的相關測定。並另外檢討單一劑量樟芝發酵液對其他胃腸功能的影響。

本章試驗也進行了樟芝發酵液對自發性高血壓大鼠的影響，及對一般大鼠的排尿作用，評估其在心血管系統有無保健作用或副作用。

材 料 及 方 法

一、樟芝菌株發酵過濾液的製備 (以下簡稱樟芝發酵液)

詳第二章材料與方法。

二、動物

使用 SD 雌性大鼠體重約為及 165 公克，及 ICR 雄性小鼠體重約 20-25 公克，皆購自國科會動物中心。飼養室溫度控制在 23℃，明、暗各十二小時的環境。使用福壽牌大鼠飼料，飲水經過逆滲透處理。

三、胃腸功能試驗

(一) 連續投予試驗

第七章試驗雌性大鼠犧牲時，取出盲腸內容物供細菌相培養，同時取出胃及小腸片斷(由幽門竇算起 20 公分)，胃由小彎剖開，以冰冷生理食鹽水洗淨胃及小腸後，儲存於-80℃ 備用。

1. 腸道細菌相測定

乳酸菌 (Lactobacilli)：在厭氧操作箱取出盲腸內容物，秤取約 1 g，加入含 9 ml 無菌厭氧稀釋液之試管中，進行一系列十倍稀釋。取適當稀釋倍數，以表面塗抹法加入乳酸桿菌培養基中，置於厭氧操作箱，於 35~37℃ 培養二天，計數菌落數。

產氣莢膜梭菌(Clostridium perfringens)：取適當稀釋倍數樣品 1 ml，置於含 D-cycloserine 及 egg yolk 之 TSC 培養基上，再加入 5 ml 不含 egg yolk 之 TSC medium，使與 1 ml 樣品均勻混合，待固化後，將培養皿正放培養，置於厭氧操作箱中，於 35~37℃ 培養二天，計數中心呈黑色且周圍有透明環之菌落數。

2. 消化酵素活性之測定

取幽門後約 10 公分長的小腸片段，刮下腸黏膜，取 0.2 g 加入 2 ml 含 protease 抑制劑之 4℃、0.9% NaCl 溶液，以均質機均質化。

(1) 雙醣酵素(disaccharidase)活性測定

依照 Zarling (1987), Dahlqvist (1968) 等人所描述的方法, 取 30 μ l 的腸黏膜均質液加入 15 μ l 56 mM 雙醣溶液於 37 $^{\circ}$ C 下作用 30 分鐘, 再加入 100 μ l 的 0.6 N NaOH 溶液溶解細胞, 另以 10 μ l 的 6 N HCl 溶液中中和之。取 45 μ l 處理過後之腸黏膜液與 625 μ l 反應緩衝液、150 μ l 的 1 mM ATP、150 μ l 的 1 mM NADP、15 μ l 的 330 IU/ml hexokinase 與 15 μ l 的 1 mM NADP、15 μ l 的 170 IU/ml glucose- 6-phosphate dehydrogenase 於 37 $^{\circ}$ C 下作用 30 分鐘, 最後將樣品置於冰浴上以終止其反應。雙醣酵素產物含量則以分光光度計於 340 nm 波長下測定的 NADPH 增加量, 並以改良的 Lowry 方法測定樣品中蛋白質含量, 而雙醣酵素活性以 μ M 葡萄糖 / 分鐘 / μ g 蛋白質表示之。

(2) 脂解酵素(lipase)活性測定

實驗參照 Schneeman (1978), Tietz (1966) 等人的方法進行, 使用市售試劑組(Sigma Lipase-PSTM)測定之。以改良的 Lowry 方法測定樣品中蛋白質含量, 脂解酵素活性以 unit / μ g 蛋白質表示之。

(3) 白氨酸氨基酵素(leucineaminopeptidase, LAP)活性測定

實驗參照 Schneeman *et al.* (1980) 所描述之方法進行, 使用市售試劑組(Sigma Diagnostics LAP)測定之。以改良的 Lowry 方法測定樣品中蛋白質含量, 而白氨酸氨基酵素活性以 Sigma unit / μ g 蛋白質表示之。

3. 對胃、腸黏膜蛋白質、脂質過氧化、glutathione 含量測定

刮取胃、腸黏膜，腸黏膜是由幽門竇後約 10-20 公分長的小腸片段刮取。腸黏膜均漿製備及 glutathione、脂質過氧化、蛋白質含量測定方法詳見第二章。

(二) 單一劑量試驗

(1) 對胃排空的影響

使用雄性小鼠，經 4 小時絕食後，口服投與樟芝發酵液，投與 1 小時後，給與 0.2 ml 的 0.5 % carboxymethyl cellulose solution (含 0.1% Evans blue)，經 30 分鐘後，將小鼠犧牲，取出胃。將胃切開浸漬於 4 ml 的 6M Urea，振盪之，順序加入 8 ml acetone、0.4 ml 20 % ZnSO₄、0.4 ml 1 N NaOH，過濾後，於 620 nm 測吸光度。胃排出能(%) = $[1 - (\text{胃內殘留色素量} / \text{投與色素量})] \times 100$ 。

(2) 對小腸運送能的作用

使用雄性小鼠，經 4 小時絕食後，口服投與樟芝發酵液，投與 1 小時後，給與 0.2 ml 的 0.5 % carboxymethyl cellulose solution (含 0.1 % Evans blue)，經 30 分鐘後，將小鼠犧牲，取出小腸。浸漬於冰冷生理食鹽水，由十二指腸起始部起測定色素到達的先端。小腸運送能 (%) = $(\text{色素最先進部} / \text{小腸全長}) \times 100$ 。

(3) 對胃分泌的影響

使用雄性大鼠，絕食一個晚上，在乙醚麻醉下，剖開腹腔，結紮幽門，即刻由十二指腸注入樟芝發酵液，縫合腹部。投藥後 4 小時，在乙醚麻醉下，取出胃，收集內容物，經離心後，測定胃液量，酸的濃度以 0.1 N NaOH 定量之，算出胃酸分泌量。

四、血壓及排尿試驗

(一) 對血壓的影響

使用雄性自發性高血壓大鼠(Spontaneous hypertensive rats), 實驗前連續五天以 Volume Oscillometric (UR-5000; UDEA)由尾動脈測定清醒動物血壓及心跳變化, 使大鼠適應實驗條件。樟芝發酵液, 經口投予。第一次投予時, 投予前及投予後每隔一小時, 測定血壓一次, 至投予後第五小時止。藥物連續投予二十天。每日一回, 每隔十天測定未投藥前血壓一次。

(二) 排尿作用

使用雄性 Wistar 大鼠, 體重 200 – 230 g, 大鼠每 100 公克體重經口投予 2.5 ml 的去離子水, 內含樟芝發酵液。使用代謝籠每隔 30 分鐘或 60 分鐘記錄尿液體積, 連續 6 小時 使用鈉 鉀 氯離子測定儀 (Shimadzu; CM-104, Japan) 測定 6 小時排出尿液中的鈉、鉀、氯離子的量。

五、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

一、對腸道細菌相的影響

如圖 5-1 所示, 高劑量樟芝發酵液(3g/kg) 連續餵食大鼠 28 天, 明顯增加益生菌乳酸菌的數目, 但對有害菌產氣莢膜梭菌的數目沒有影響; 產氣莢膜梭菌的數目, 控制組 FMAC 1、2、3 g/kg 組的菌數分別為 9629.7 ± 3412.7 、 4915.0 ± 931.9 、 14991.5 ± 3648.3 、 14716.6 ± 3173.0 (CFU / mg stool)。

二、對消化酵素的影響

如表 5-1 所示，樟芝發酵液連續餵食大鼠 28 天，對近幽門處腸道黏膜的三種雙醣酵素(乳糖、麥芽糖及蔗糖酵素)、脂解酵素及白氨酸氨基酵素的活性皆沒有影響。

三、對胃、腸黏膜脂質過氧化、麩胱 及蛋白質含量的影響

如表 5-2 所示，高劑量(3 g/ kg) 樟芝發酵液連續餵食大鼠 28 天，能增加胃黏膜麩胱 及蛋白質含量，但對脂質過氧化程度沒有影響。對小腸黏膜，高劑量樟芝發酵液能增加麩胱 含量，但對脂質過氧化及蛋白質含量沒有影響。

四、對大鼠胃酸分泌的影響

如圖 5-2 所示，比較 4 小時的胃液量及胃酸分泌量，大鼠由十二指腸注入樟芝發酵液 (2、3 g/kg)，明顯低於控制組。

五、對小鼠胃排出能及腸運動能的影響

如圖 5-3 所示，樟芝發酵液(1、2 g/kg) 對小鼠胃排出能及腸運動能有增強作用，但高劑量(3g/kg)時反而沒有影響。

六、排尿作用

樟芝發酵液有明顯的減少排尿作用，如表 5-3 所示，大鼠經口投予樟芝發酵液以累積尿量計，投予半小時後出現抑制作用，低劑量(0.5 g/kg)持續至第 4 小時，中、高劑量(1、3 g/kg) 抑制作用持續 6 小時以上。累積 6 小時尿中鈉、鉀、氯離子含量(表 5-4)，高劑量組明顯高於控制組，此應與樟芝發酵液本身含有的鈉、鉀、氯離子量有關。樟芝發酵液 300 mg/ml 的鈉、鉀、氯離

濃度分別為 591 mMol、147 mMol、402 mMol。

七、高血壓

如表 5-5 所示，樟芝發酵液單一劑量經口投予，對自發性高血壓大鼠 5 小時內平均血壓沒有影響，對照藥物 guanethidine (30 mg/kg)於投予後第 2 小時出現降壓作用，可持續 5 小時以上。樟芝發酵液高劑量對心跳沒有影響，然而低劑量有心跳減慢作用，由於正常組的心跳速率也不穩定，第 3 小時有減少的情形，因此樟芝發酵液低劑量的心跳減慢作用有可能是實驗操作的問題。Guanethidine 的心跳減慢作用或許也與實驗操作有關。

低劑量樟芝發酵液連續投予 20 天，對自發性高血壓大鼠的血壓及心跳沒有影響，高劑量於第 20 天出現升壓及心跳加快的作用 (表 5-6)。

討 論

改善胃腸功能的實驗，希望能由此發現樟芝發酵液具有此保健功效，以利其開發為健康食品，因此本實驗使用樟芝發酵液副作用較小的雌鼠檢體來進行。

乳酸桿菌是人體和一般動物體內常駐的腸道菌種，對於維持腸道的平衡扮演重要的角色。其對人體產生之益處包括對腸道有害菌的抑制、抗癌與免疫的效果、降低膽固醇、緩和乳糖不耐症及改善營養價值和乳糖的消化性(橫倉輝男, 1995 ; Tamine, 1995 ; Yaeshima, 1996)。樟芝發酵液連續餵食四週後，使大鼠盲腸的有益菌乳酸桿菌增加，對有害菌產氣莢膜梭菌數沒有影響，顯示樟芝發酵液含有使乳酸桿菌增加的成分，此將有利於樟芝發酵液保健食品的開發。

樟芝發酵液對腸道黏膜的消化酵素活性沒有影響。在此實驗的同時，我

們也測定胃、腸黏膜的脂質過氧化程度及麩胱 含量，發現樟芝發酵液對胃、腸黏膜的脂質過氧化程度沒有影響，但卻能提升胃、腸黏膜麩胱 含量。已有文獻指出麩胱 能保護胃、腸黏膜，減輕潰瘍的傷害 (Szabo, 1981)。由此推測樟芝發酵液對胃、腸黏膜具有保護作用。

其它單一劑量的實驗，顯示樟芝發酵液可以促進胃排空能力、及腸運送能力，但高劑量時此作用消失，或許樟芝發酵液對胃、腸道有雙向作用。

胃酸的實驗顯示樟芝發酵液有很好的抑制胃酸分泌作用，合併樟芝發酵液提升胃、腸黏膜麩胱 含量的作用，顯示樟芝發酵液對胃、腸潰瘍值得進一步研究。

在本章實驗樟芝發酵液有明顯減少排尿作用，這些水分有可能從腸道排出，此應與第七章急性毒性試驗，樟芝發酵液高劑量引起下痢作用有關。至於樟芝發酵液是否會直接影響排尿功能，需要進一步的求證。對高血壓大鼠，樟芝發酵液沒有降壓作用。這些結果顯示樟芝發酵液在利尿、控制血壓方面沒有幫助。