

# 第六章 樟芝菌株發酵過濾液對大鼠 體內抗氧化能力的影響

## 前 言

當生體曝露於活性氧或自由基之環境下時，自由基會直接或間接的攻擊生物分子而造成傷害。細胞膜脂質上之不飽和鍵結是自由基作用的主要目標，而其它如蛋白質、DNA、RNA等亦均是活性氧與自由基之攻擊標的(Halliwell., 1992)。

生物體內促氧化劑和抗氧化劑是處在一種動態平衡中，若氧化劑作用增大或抗氧化劑作用下降，生體便處於氧化應激狀態(oxidative stress)，導致生體內過多的自由基而衍生出種種的疾病如肝損傷、動脈粥狀硬化、癌症、老化及一些退化性疾病(Wiseman, 1995； Poli, 1993)。

生體內的抗氧化系統包含體內生成的抗氧化劑和清除自由基的酵素系統(Machlin, 1987)。前者如穀胱甘肽 ((glutathione)、vitamins C 和 E、還有胡蘿蔔素( $\beta$ -carotene)等，後者有過氧化物歧化酶 (superoxide dismutase； SOD)、穀胱甘肽過氧化酶 (Glutathione peroxidase； GSH-Px)、過氧化氫酶 (Catalase)等。

樟芝發酵液活體外抗氧化作用及對一些氧化應激的效果已有研究(宋祖瑩，2002)。本章試驗利用第七章，雄性大鼠連續餵食樟芝發酵液 28 天所保留的部分組織，檢討樟芝發酵液對組織氧化傷害有無保護作用。並探討紅血球、肝臟抗氧化酵素的活性。並另進行血中總抗氧化力的測定。

## 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

使用雄性 SD 大鼠體重約為 182 公克。大鼠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。大鼠連續經口餵食樟芝發酵液 28 天，犧牲後保留部分臟器進行下列實驗。

## 三、組織抗氧化相關的測定

脂質過氧化 (lipid peroxidation)、麩胱 (Glutathione) 含量測定及過氧化物歧化 (superoxide dismutase; SOD)、麩胱 過氧化物酵素 (glutathione peroxidase; GSH-Px)、過氧化氫酵素(Catalase)活性測定詳第二章材料與方法。

## 四、紅血球抗氧化相關的測定

紅血球的前處理如下：全血離心後(3000 rpm，4℃，10 分鐘)去除血漿，紅血球加入生理食鹽水混勻後，離心(3000 rpm，4℃，10 分鐘) 去除上清液，重複連續三次，紅血球加蒸餾水水解。

### (一) 脂質過氧化：

依照 Jain 等人方法 (1990) 測量，取紅血球 0.2ml 加入 0.8ml Phosphate buffer saline，0.025ml BHT，0.5ml TCA(30%)混和均勻後靜置2小時後離心(2000 rpm，15 分鐘)，取上清液 1.0ml 加入 0.075 ml EDTA (0.1M)，0.25ml TBA (1% in 0.05N NaOH solution)，混合均勻後於沸水浴中加熱15分鐘，於波長532 和600 nm測得吸光值A<sub>532</sub>，A<sub>600</sub>，紅血球脂質過氧化濃度以

( A532-A600 ) /1.56/100000求得，紅血球脂質過氧化濃度以nmol MDA/mg hemoglobin 表示。hemoglobin的測定使用市售試劑(Sigma)。

## (二) Glutathione測定

方法依照 Beutler *et al.* (1963)方法加以修飾，glutathione 含量以 $\mu\text{mol} / \text{mg}$  hemoglobin 表示。

## (三) SOD 活性測定

取水解的紅血球溶液 1ml 加入 0.4ml 萃取液(ethanol: chloroform = 5:3) 混合後離心(140000 rpm , 4℃ , 30 分鐘)，取上清液測定，請詳第二章材料與方法，紅血球過氧化物歧化 活性以U/mg hemoglobin 表示。

## (四) GSH-Px 活性測定：

測定請詳第二章材料與方法，紅血球穀胱 過氧化物酵素活性以U/mg hemoglobin 表示。

## (五) Catalase 活性測定：

測定請詳第二章材料與方法，紅血球過氧化氫酵素活性以U/mg hemoglobin 表示。

## 五、 總抗氧化力測定

大鼠於投藥前，在乙醚麻醉下由尾動脈抽血。經口投予樟芝發酵液後每隔一小時抽血一次，至第三小時止。取得的血液使用市售 Total Antioxidant Status 試劑組測試 (Randox Lab. Ltd)血漿總抗氧化力。取 0.5 ml peroxidase、0.5 ml 2,2'-azino-bis [3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid] (ABTS) 溶液以及

3.5 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 混合均勻，待產生藍綠色 ABTS<sup>•</sup> 自由基後，加入 1 ml 血清，測 734 nm 吸光值。測得後再由 trolox 檢量線，換算其相當的濃度(Miller *et al.*, 1993)。

## 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

## 一、腦部脂質過氧化

樟芝發酵液連續投予 28 天，對大鼠腦部皮質、紋狀體、海馬迴、腦幹、小腦及血漿的脂質過氧化影響，如表 6-1 所示，僅對海馬迴有明顯減少作用 (2、3 g/kg)，對其餘部位則無影響。

## 二、週邊組織脂質過氧化

如表 6-3、6-4 所示樟芝發酵液連續投予 28 天，對大鼠腎藏、心臟、脾臟、睪丸、肝臟及紅血球的脂質過氧化程度沒有影響。

## 二、週邊組織麩胱 含量

如表 6-3、6-4 所示，樟芝發酵液高劑量(3 g/kg)能增加大腦皮質麩胱含量，亦會減少心臟麩胱 含量。樟芝發酵液(2, 3 g/kg)增加肝臟及紅血球麩胱 含量。對其他組織的麩胱 含量沒有影響。

## 三、週邊組織蛋白質含量

如表 6-2 所示，樟芝發酵液(1 g/kg)使腦部海馬迴的蛋白質含量增加，高劑

量(3 g/kg)時使腦幹蛋白質含量減少。樟芝發酵液(2、3 g/kg)使脾臟蛋白質含量明顯減少。對其他組織的蛋白質含量沒有影響(表 6-3)。

#### 四、肝臟、紅血球抗氧化酵素活性

樟芝發酵液(2、3 g/kg)使肝臟 catalase 活性上升，對 SOD、GSH-Px 活性沒有影響(表 6-5)。樟芝發酵液(2、3 g/kg)使的紅血球 SOD、GSH-Px 活性上升，對 catalase 的活性沒有影響(表 6-6)。

#### (二) 血中總抗氧化狀態

樟芝發酵液連續投予 28 天，大鼠犧牲時取得的血漿以市售 Total antioxidant status 試劑測定其總抗氧化力，給予樟芝發酵液與控制組之間無明顯差異。

另以大鼠經口投予單一劑量樟芝發酵液 (1, 3 g/kg)，投予前及投予後 1、2、3 小時採得的血漿，同樣以市售 Total antioxidant status 試劑，測定其總抗氧化力。樟芝發酵液投予前及投予後血中總抗氧化力沒有明顯差異。

## 討 論

脂質過氧化程度是自由基傷害常用的指標之一(Janero, 1990)，生物膜含有多價不飽和脂肪酸易受自由基攻擊引起連鎖反應，最終產物有多種，其中的 malondialdehyde 與 thiobarbituric acid 經加熱結合產生粉紅色物質，可以分光光度計測量，是脂質過氧化測定最常用的方法(Ce Zwart *et al.*, 1999)。

本研究測定組織中脂質過氧化程度，除了可以清楚 FMAC 對組織是否有抗氧化保護作用。在另一方面，也可瞭解 FMAC 是否對組織有傷害作用，已知很多藥物對某些組織的副作用會使該組織的脂質過氧化程度上升(Keown,

1991; Kuhlmann *et al.*, 1997), 且不同的組織對抗自由基傷害的能力不同, 如腦組織較易受自由基的攻擊, 而肝組織對自由基的清除能力較強(Evans, 1993)。

因此本實驗以雄鼠的組織來進行, 因 FMAC 對雄鼠的副作用高於雌鼠。在本實驗探討 FMAC 對血漿、紅血球、腦部的大腦皮質、紋狀體、海馬迴、腦幹、小腦, 及肝臟、腎臟、心臟、脾臟、睪丸的脂質過氧化影響。除腦部海馬迴外, FMAC 對這些組織不會造成氧化傷害, 也沒有減輕氧化傷害的作用。FMAC 明顯降低腦部海馬迴的脂質過氧化程度, 海馬迴在學習記憶之形成佔重要地位(Graham, 1990), FMAC 是否有此作用值得進一步探討。

在脂質過氧化的實驗, 同時也要測定組織蛋白質含量, 意外發現高劑量的 FMAC 明顯減少脾臟、腦幹的蛋白質含量, FMAC 對脾臟、腦幹的副作用應進一步探討。

麩胱 是組織內重要的抗氧化劑, 對組織具有保護降低傷害的作用, 往往藥物對組織的傷害也會排空該組織麩胱 的含量(Keown, 1991; Kuhlmann *et al.*, 1997)。在本實驗測定 FMAC 對血漿、紅血球、大腦皮質、及肝臟、腎臟、心臟、脾臟、睪丸的麩胱 含量, 發現 FMAC 可以增加紅血球、大腦皮質、肝臟、心臟麩胱 含量。此顯示 FMAC 可能對紅血球、大腦皮質、肝臟、心臟有保護作用。

在本實驗檢討 FMAC 對紅血球和肝臟三個抗氧化酵素的活性, 發現 FMAC 能提升紅血球 SOD、GSH-Px, 及肝臟的 catalase 活性。由於抗氧化酵素的活性與機體中整體的抗氧化能力調節有關, 此提升作用有可能是加強了紅血球、肝臟的清除自由基能力, 但也不能排除由於 FMAC 引起的氧化傷害增加, 而活化了紅血球、肝臟的抗氧化系統。

**Table. 6-1.** Chronic effect of FMAC on lipid peroxidation in the brain and plasma of rats.

	Lipid peroxidation (nmol MDA / mg protein)			
	Control	FMAC (g/kg/day)		
		1	2	3
Brain cortex	1.5 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.4 ± 0.1
Striatum	2.3 ± 0.2	2.4 ± 0.2	2.1 ± 0.2	2.5 ± 0.3
Hipocampus	2.7 ± 0.2	3.1 ± 0.2	1.7 ± 0.1**	1.8 ± 0.1**
Brain stem	2.6 ± 0.2	2.6 ± 0.7	2.1 ± 0.2	2.6 ± 0.2
Cerebellum	2.6 ± 0.8	2.9 ± 0.3	2.9 ± 0.2	2.9 ± 0.1
Plasma	11.8 ± 0.6	11.4 ± 0.6	10.7 ± 0.5	12.2 ± 1.2

All values are means ± S.E. (n = 10). \*\*P < 0.05 compared with control group.

FMAC: filtrate of fermented mycelia of *Antrodia camphorata*

**Table. 6-2.** Chronic effect of FMAC on Protein contents in the brain of rats.

	Protein mg/g tissue			
	Control	FMAC (g/kg/day)		
		1	2	3
Striatum	72.3 ± 2.6	66.8 ± 3.5	73.7 ± 2.0	70.7 ± 1.3
Hipocampus	60.3 ± 2.9	72.4 ± 3.5*	65.8 ± 2.2	63.1 ± 2.3
Brain stem	45.0 ± 1.1	47.3 ± 1.2	43.4 ± 1.5	40.1 ± 1.1*
Cerebellum	58.3 ± 0.7	55.8 ± 0.9	59.6 ± 1.0	59.4 ± 0.9

All values are means ± S.E. (n = 10). \*\*P < 0.05 compared with control group.

FMAC: filtrate of fermented mycelia of *Antrodia camphorata*

**Table. 6-3.** Chronic effect of FMAC on lipid peroxidation , glutathione and protein contents in the various tissues of rats.

Drug	Dose (g/kg/day)	Lipid Peroxidation (nmol MDA / mg rotein)	Glutathione ( $\mu$ mol / g tissue)	Protein (mg / g tissue)
Kidney				
Control		2.1 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.0	130.7 $\pm$ 2.5
FMAC	1	2.3 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.1	130.8 $\pm$ 8.4
	2	1.9 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.0	129.3 $\pm$ 4.0
	3	2.2 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.0	124.1 $\pm$ 2.3
Heart				
Control		1.5 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.0	104.3 $\pm$ 2.8
FEMAC	1	1.7 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.0	102.8 $\pm$ 2.3
	2	1.6 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.0	105.6 $\pm$ 2.1
	3	1.7 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.0*	103.7 $\pm$ 2.3
Spleen				
Control		1.0 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1	196.7 $\pm$ 4.7
FMAC	1	1.1 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1	193.7 $\pm$ 5.4
	2	1.1 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.0	174.5 $\pm$ 4.8**
	3	1.1 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.0	172.4 $\pm$ 3.3***
Testis				
Control		2.1 $\pm$ 0.1	3.0 $\pm$ 0.0	104.7 $\pm$ 1.3
FMAC	1	1.8 $\pm$ 0.2	3.1 $\pm$ 0.0	102.6 $\pm$ 1.4
	2	2.2 $\pm$ 0.1	3.0 $\pm$ 0.0	103.1 $\pm$ 1.0
	3	2.0 $\pm$ 0.2	3.1 $\pm$ 0.0	106.2 $\pm$ 1.0



**Table. 6-3.(continued)**

Drug	Dose (g/kg/day)	MDA (nmol / mg protein)	Glutathione ( $\mu$ mol / g tissue)	Protein (mg / g tissue)
Liver				
Control		3.0 $\pm$ 0.3	1.8 $\pm$ 0.0	209.2 $\pm$ 6.7
FMAC	1	2.4 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.1	203.9 $\pm$ 5.8
	2	2.4 $\pm$ 0.3	2.0 $\pm$ 0.0**	212.1 $\pm$ 2.5
	3	3.3 $\pm$ 0.6	1.9 $\pm$ 0.0*	206.9 $\pm$ 5.4
Brain Cortex				
Control		1.48 $\pm$ 0.10	0.83 $\pm$ 0.04	82.4 $\pm$ 1.9
FMAC	1	1.29 $\pm$ 0.13	0.87 $\pm$ 0.03	87.4 $\pm$ 3.1
	2	1.14 $\pm$ 0.14	0.88 $\pm$ 0.04	82.1 $\pm$ 1.9
	3	1.44 $\pm$ 0.14	0.97 $\pm$ 0.03**	80.3 $\pm$ 1.9

All values are means  $\pm$  S.E. (n= 10) \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 compared with control group.

FMAC: filtrate of fermented mycelia of *Antrodia camphorata*

**Table. 6-4.** Chronic effect of FMAC on lipid peroxidation and glutathione content in the red blood cells of rats.

Drug	Dose (g/kg/day)	Lipid peroxidation (nmol MDA / mg Hb)	Glutathione ( $\mu$ mol / mg Hb)	Hemoglobin (mg/dL)
Control		1.1 $\pm$ 0.1	26.0 $\pm$ 2.8	8.1 $\pm$ 0.3
FMAC	2	1.2 $\pm$ 0.15	2.30 $\pm$ 1.6***	7.2 $\pm$ 0.3
FMAC	3	1.37 $\pm$ 0.1	47.5 $\pm$ 3.9***	7.5 $\pm$ 0.4

All values are means  $\pm$  S.E. (n= 10) \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 compared with control group.

FMAC: filtrate of fermented mycelia of *Antrodia camphorata*;

Hb: hemoglobin

**Table 6-5.** Chronic effect of FMAC on activities of superoxide dismutase (SOD), catalase and glutathione peroxidase (GSH-Px) in the livers of rats.

Drug	Dose (g/kg/day)	SOD (U / mg protein)	Catalase (U / mg protein)	GSH-Px (U / mg protein)
Control		6.7 $\pm$ 1.2	13.5 $\pm$ 0.4	946.4 $\pm$ 21.1
FMAC	1	6.1 $\pm$ 1.6	12.8 $\pm$ 0.7	958.8 $\pm$ 23.3
FMAC	2	7.6 $\pm$ 1.2	15.7 $\pm$ 0.7*	970.4 $\pm$ 22.3
FMAC	3	7.1 $\pm$ 1.5	14.9 $\pm$ 0.3*	969.6 $\pm$ 10.1

All values are means  $\pm$  S.E. (n= 10) \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 compared with control group.

FMAC: filtrate of fermented mycelia of *Antrodia camphorata*;

**Table. 6-6.** Chronic effect of FMAC on activities of superoxide dismutase (SOD), catalase and glutathione peroxidase (GSH-Px) in the red blood cells of rats.

Drug	Dose (g/kg/day)	SOD (U / mg Hb)	Catalase (U / mg Hb)	GSH-Px (U / mg Hb)
Control		2060 ± 1229	4.5 ± 0.1	1.0 ± 0.0
FMAC	2	3320 ± 316**	4.7 ± 0.2	1.1 ± 0.0*
FMAC	3	3266 ± 289**	4.3 ± 0.2	1.1 ± 0.0**

All values are means ± S.E. (n= 10) \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001

compared with control group.

FMAC: filtrate of fermented mycelia of *Antrodia camphorata*;

Hb: hemoglobin