

中國醫藥大學營養學系

碩士論文

探討毛木耳萃取物改善非酒精性脂肪肝病大鼠

肝損傷程度之影響

**Effects of *Auricularia polytricha* Extracts on Improving Liver  
Damage in Rats with Nonalcoholic Fatty Liver Disease**

研究生：周育瑄 撰

Yu-Hsuan Chou

指導教授：楊惠婷 博士

Hui-Ting Yang, Ph. D.

中華民國 一 百 年 五 月

## 目錄

摘要 .....	i
Abstract.....	ii
第一章 前言 .....	1
第二章 文獻回顧 .....	3
第一節 NAFLD相關流行病學調查 .....	3
第二節 非酒精性脂肪肝炎之文獻回顧 .....	4
(一) 非酒精性脂肪肝炎之簡介 .....	4
(二) 臨床上肝臟脂肪肝暨非酒精性脂肪肝的判定方法 .....	4
(三) 非酒精性脂肪肝炎與飲食相關性 .....	5
(四) 非酒精性脂肪肝炎之代謝表徵與致病機轉假說 (two hits).....	6
(五) 非酒精性脂肪肝炎與酒精性脂肪肝的病理及體內代謝差異比較 .....	10
(六) NASH 動物模式介紹 .....	12
第三節 菇類的功效性研究 .....	14
(一) 菇類對肝臟之研究 .....	14
第四節 毛木耳之文獻回顧 .....	16
(一) 菇類簡介 .....	16
(二) 毛木耳之介紹 .....	16
(三) 毛木耳的營養價值 .....	19
(四) 毛木耳之成分分析及已知功能介紹 .....	21
1. 對於體內氧化壓力的影響 .....	21
2. 降低膽固醇作用 .....	22
3. 抗發炎作用 .....	22
4. 調節宿主免疫反應作用 .....	23
5. 血糖調節之研究 .....	23
6. 抗血栓研究 .....	24
7. 抗腫瘤研究 .....	24
8. 黑木耳與減重的關係 .....	25
第三章 研究動機及目的 .....	26
第四章 研究架構 .....	28
第五章 材料與方法 .....	29
第一節 實驗設計 .....	29
第二節 實驗材料 .....	32
第三節 實驗方法 .....	36
第四節 統計分析 .....	54
第六章 結果 .....	55
第七章 討論 .....	64

第八章 結論 .....88  
參考文獻 ..... 119



## 表目錄

表一 ALD 與 NASH的差異 .....	11
表二 NASH動物模式 .....	13
表三 毛木耳與黑木耳差別 .....	18
表四 新鮮木耳成分分析 (100 克) .....	19
表五 Laboratory Rodent Diet 5001 主要營養組成 .....	33
表六 高脂飲食配製方法及三大營養素比例 .....	34
表七 高脂飲食之三大營養素比例 .....	35
表八 餵食實驗飼料飲食 8 週後對大鼠肝指標的影響 .....	89
表九 餵食實驗飼料飲食 8 週後對大鼠血脂質的影響 .....	90
表十 餵食實驗飼料飲食 8 週後對大鼠空腹葡萄糖、游離脂肪酸及脂質過氧化作用的影響 .....	91
表十一 毛木耳萃取物一般成分分析 .....	92
表十二 毛木耳萃取物中主成分 .....	93
表十三 毛木耳萃取物之抗氧化活性 .....	94
表十四 毛木耳萃取物之可溶性纖維及不可溶性纖維含量 □ .....	95
表十五 餵食實驗飼料飲食 12 週後對大鼠攝食量、體重、肝重、之影響 .....	96
表十六 餵食實驗飼料 12 週後對大鼠肝功能指標之影響 .....	97
表十七 餵食實驗飼料飲食 12 週後對大鼠血脂肪指標之影響 .....	98
表十八 餵食實驗飼料飲食 12 週後對大鼠血中餐前血糖、胰島素及HOMA-IR 指標之影響 .....	99
表十九 餵食實驗飼料十二週後血漿中脂肪酸組成 .....	100
表二十 餵食實驗飼料十二週後肝臟磷脂質中脂肪酸組成 .....	101

## 圖目錄

圖一 NASH病理進程 .....	9
圖二 實驗設計流程 .....	29
圖三 餵食實驗飼料 12 週後之肝臟三酸甘油酯及肝臟膽固醇濃度 .....	102
圖四 餵食實驗飼料 12 週後之肝臟丙二醛濃度 .....	103
圖五 餵食實驗飼料 12 週後之血漿游離脂肪酸濃度 .....	104
圖六 餵食實驗飼料 12 週後之血漿丙二醛濃度 .....	105
圖七 餵食實驗飼料 12 週後之血漿維生素E濃度 .....	106
圖八 餵食實驗飼料 12 週後之血漿維生素C濃度 .....	107
圖九 餵食實驗飼料 12 週後之肝臟GR濃度 .....	108
圖十 餵食實驗飼料 12 週後之肝臟GPx濃度 .....	109
圖十一 餵食實驗飼料 12 週後之肝臟超氧歧化酶濃度 .....	110
圖十二 餵食實驗飼料 12 週後之肝臟catalase濃度 .....	111
圖十三 餵食實驗飼料 12 週後之肝臟維生素E濃度 .....	112
圖十四 餵食實驗飼料 12 週後之肝臟腫瘤壞死因子 $\alpha$ 濃度 .....	113
圖十五 餵食實驗飼料 12 週後之肝臟IL-6 濃度 .....	114
圖十六 餵食實驗飼料 12 週後之肝臟CYP4A 表現量 .....	115
圖十七 預實驗肝臟H&E染色病理切片圖 .....	116
圖十八 肝臟H&E染色病理切片圖 .....	117
圖十九 肝臟Masson's trichrome染色病理切片圖 .....	118

## 摘要

非酒精性脂肪肝炎NASH (nonalcoholic steatohepatitis)屬於慢性脂肪肝病的一種。形成NASH的病理因素以two-hit”假說最廣為接受，first hit為脂肪堆積在肝臟，形成脂肪肝，second hit則為氧化壓力及發炎反應造成肝臟脂肪肝炎。毛木耳(學名:*Auricularia polytricha*)，與黑木耳同屬木耳科木耳屬，已有研究指出具有降血糖、降血漿中膽固醇、抗氧化及抗發炎的作用，因此本實驗探討毛木耳萃取物是否可以藉由改善NASH ”two-hit”假說而達到減輕NASH的肝損傷程度。本研究以四十隻六週齡之雄性Sprague Dawley大白鼠為實驗動物，經適應後環境隨機分成五組，除對照實驗組之Control組及高脂飲食組(HFD)外，實驗組分為三組，HC組: 餵食高脂飲食 8 週後給予Chow diet 4 週，LO組及HO組: 餵食高脂飲食 8 週後，分別給予低劑量毛木耳萃取物 0.75%及高劑量毛木耳萃取物 1.5%。實驗期間每週測量體重，實驗為期 12 週後犧牲採集血液及肝臟進行分析。結果顯示，餵食毛木耳萃取物可以顯著降低肝損傷指標(AST、ALT)，在first hit方面，降低血漿中葡萄糖含量改善胰島素抵抗，改善血脂代謝及游離脂肪酸含量 ( $p < 0.05$ )，在肝臟方面高劑量毛木耳萃取物可以降低肝臟中膽固醇及三酸甘油酯含量 ( $p < 0.05$ )，在Second hit方面降低了血漿及肝臟中的脂質過氧化作用及肝臟中的發炎反應 ( $p < 0.05$ )，以肝臟病理組織切片觀察結果可知，毛木耳萃取物降低肝臟脂肪滴泡及發炎細胞含量，顯示具有改善肝損傷的效果。綜合以上結果顯示，毛木耳萃取物可以改善NASH動物模式中的”two-hit”假說而達到改善NASH的肝損傷程度。

**關鍵詞**：毛木耳萃取物、非酒精性脂肪肝、二次打擊假說、發炎反應



## Abstract

The pathology leading to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is often characterized by the “two-hit” theory. The “first-hit” is triggered with obesity and insulin resistance, which causes excess hepatic lipid accumulation and hepatic steatosis. The steatotic liver is vulnerable to “second-hits,” which was mediated by inflammation and oxidative stress, resulting in lipid peroxidation then NASH. *Auricularia polytricha* is found to have therapeutic effects, including anti-inflammatory, antitumor, hypercholesterolemia, etc. The purpose of the study was to examine whether *Auricularia polytricha* extract (APE) improved liver damage in the animal model of NASH. 40 Male Sprague Dawley rats were randomly divided into five groups. Except the normal and high fat control group (control, HFD group), the experimental groups were fed with high fat diet for 8 weeks then divided into three groups by different amount of APE supplementation (0, 0.5, 1.5%) for 4 weeks. After 12 weeks of treatment, animals were sacrificed; blood samples and liver tissues were collected immediately for biological analysis. The results show that 1.5% APE significantly lowered plasma AST and ALT level and ameliorated hepatic steatosis and necroinflammation; In the first hit, APE improved the dyslipidemia, liver lipid metabolism and plasma free fatty acid level, as well as increased insulin sensitivity; In the aspect of second hit, 1.5% APE decreased the plasma and hepatic MDA content, liver inflammatory response then improved the antioxidant status. In conclusion, APE presents an effective improvement on liver damage of nonalcoholic steatohepatitis model.

**Key word :** *Auricularia polytricha* extract, nonalcoholic steatohepatitis, two-hit, inflammation

## 第一章 前言

根據行政院衛生署的統計顯示，慢性肝病及肝硬化一直位於國人十大死因之一，台灣肝臟學術文教基金會過去的調查顯示，國內成年人口脂肪肝的盛行率高達 26-34%，遠高於 B 型肝炎及 C 型肝炎之盛行率，這些調查顯示肝臟疾病對國人健康造成很大的威脅性，國內最盛行之肝病。

NAFLD(nonalcoholic fatty liver disease)非酒精性肝臟疾病和肥胖及胰島素阻抗以至於代謝症候群均具有很大的相關性，也有相同的特徵，如血漿三酸甘油酯偏高及高密度脂蛋白濃較低等等…。從單純的脂肪肝到肝纖維化都稱之為 NAFLD，患者最主要特徵為無明顯的飲酒史，NASH (Nonalcoholic steatohepatitis)為 NAFLD 的其中一種，脂肪肝經發炎反應會使肝細胞發炎而形成脂肪肝最後會轉變成肝纖維化、硬化。造成 NASH 的主要機制為二次打擊假說為主，”First hit”肝臟的脂質代謝續亂，造成脂質堆積在肝臟後經過”Second hit”發炎反應及氧化壓力來刺激肝臟細胞引發肝發炎。因為患者幾乎不可能會針對少數脂質異常的症狀進行肝臟切片分析，因此，目前對於 NASH 及相關 NAFLD 盛行率所知有限。若是探討與 NASH 高度相關的代謝症候群盛行率，根據 2005-2008 國民營養變遷調查統計顯示，19 歲以上代謝症候群盛行率不論性別均有二成以上，隨著年齡有增加的趨勢，此一族群同為 NASH 的高危險群，不可忽視。

「衣食同源，藥食同根」，所謂許多的食用性植物除了食用價值之外，也兼具藥理功能。現今社會，人們因為豐衣足食，引起大眾對飲食與健



康的高度關心。由於近來已有針對樟芝、靈芝等食品機能性的研究及開發，對於菇類的機能性成分的生理活性也有更深入的了解。

在中國，無論是藥用還是食用菇類的應用已有兩千年多年的歷史，而在台灣木耳種類的黑木耳 (*Auricularia auricula-judae*) 與毛木耳 (*A. polytricha*)。為最普遍的實用菌之一，毛木耳外形與黑木耳相近，但毛較長，質地也較硬脆。近年來學者研究發現真菌多醣體可有效作為醫療用途，毛木耳其有效成份為毛木耳多醣體，已有文獻指出毛/黑木耳子實體功效具有降血糖、降血中膽固醇、抗氧化、抑制血小板凝血能力、抑制腫瘤及提高宿主免疫能力等作用。其中因毛木耳的降膽固醇、降血糖及抗氧化能力這些都與 NASH 相關的代謝性症候群有關，因此本實驗室結合了農試所萃取技術，將毛木耳水萃取物應用於 NASH 方面的研究，達到改善的效果，未來希望可作為菇類保健食品開發新原料。

## 第二章 文獻回顧

### 第一節 NAFLD 相關流行病學調查

肝臟為人體最大的器官，具有許多的複雜機能，其中包含代謝、轉化、解毒、合成蛋白質等作用，肝臟若受損，營養素的代謝、吸收都會受到阻礙甚而影響到人體的免疫系統。肝臟從血液中攝取的游離脂肪酸最後會在肝中合成三酸甘油酯並儲存，再以VLDL-C形式將三酸甘油酯轉運出肝外進入血液中循環。若肝臟受損會導致之質代謝異常而囤積在肝臟內形成脂肪肝。長久以來，根據行政院衛生署的統計顯示慢性肝病及肝硬化一直位於國人十大死因之一，而台灣肝臟學術文教基金會過去的調查顯示，國內成年人口脂肪肝的盛行率高達26-34%，遠高於B型肝炎的15-20%及C型肝炎之2-4%，可稱為國內最盛行之肝病。NAFLD在美國及全世界被認為具有形成慢性疾病的趨勢[1]，在西方國家及一些中國地區NASH及NAFLD的盛行率分別是1%-5%及15%-39%[2]，而NAFLD同時有肥胖及糖尿病的盛行率正在增加[3]，NAFLD和胰島素阻抗、高三酸甘油酯血症、代謝症候群有很大的相關性[4]，而脂肪肝是主要造成心血管疾病及大多和肥胖的發病率及死亡率相關[5]。NAFLD盛行率為10~24%而在肥胖及第二型糖尿病中盛行率增加到25~75%[6]，在台灣地區高血糖、高血脂及高血壓等三種慢性疾病為高盛行率之慢性疾病，而依據行政院衛生署健康局調查顯示，臨床上國人98%以上的糖尿病患都屬於第2型糖尿病，第1型佔1-1.5%，15歲以上高血壓盛行率為21.38%，高血糖為7.47%，高膽固醇盛行率為10.9%，高三酸甘油酯盛行率為15.6%。

## 第二節 非酒精性脂肪肝炎之文獻回顧

### (一)非酒精性脂肪肝炎之簡介

非酒精性脂肪肝炎 NASH (non-alcoholic steatohepatitis)屬於非酒精性脂肪肝疾病(NAFLD)的其中一種症狀，非酒精性脂肪肝疾病 NAFLD (nonalcoholic fatty liver disease)所涵蓋的肝臟疾病範圍很廣，從單純脂肪肝、脂肪肝炎、纖維化，到肝硬化都稱之 NAFLD[6]。而非酒精性脂肪肝炎”之病理診斷名詞首度由 Ludwig 等人所提出”，指出 20 位無飲酒的女性糖尿病患者，在肝臟病理卻發現有大的脂肪滴泡(macrovesicular lipid droplet)、肝細胞壞死、發炎、類竇旁纖維化(perisinusoidal fibrosis)、ballooning degeneration 及 Mallory hyaline 等類似酒精性脂肪肝的現象 [7]。在 NAFLD 病人身上發現，ALT 的變化量會比 AST 來的顯著，但若逆轉此趨勢(AST 表現量較顯著)表示肝臟開始纖維化[8]。

### (二)臨床上肝臟脂肪肝暨非酒精性脂肪肝的判定方法

脂肪肝為相當常見的慢性疾病，最佳診斷方式為侵入性病理組織染色切片分析，臨床上所稱的「脂肪肝」是指肝臟內所含的脂肪(主要是三酸甘油酯)的重量超過全肝臟重量的百分之五，或是依據 Brunt 判定方法，在肝組織 H&E 染色切片中超過百分之十以上的肝細胞呈現脂肪空泡變性的現象；而輕度脂肪肝是含脂肪變性的肝細胞少於 33%，中度為介於 33-66%之間，而重度則佔 66%以上[9, 10]。

非酒精性脂肪肝炎(NASH)之診斷標準[11]

目前臨床上針對 NASH 診斷方式多以消去法進行判定

下列 1-5 點或 1-3 點同時有第六點就可稱為 NASH

- (1)沒有飲酒史或每週飲酒量男性小於 140g 及女性小於 70g
- (2)特殊疾病造成脂肪肝但是濾過性病毒肝炎、藥物誘導成肝臟疾病、全靜脈營養及 Wilson's disease 亦要被排除。
- (3)除臨床表徵其他非特異性症狀例如疲勞、消化不良、肝脾腫大
- (4)有代謝性症候群或不知道什麼原因增加血漿中 ALT 多於四週
- (5)肝臟影像研究達到瀰漫性脂肪肝的影像診斷準則
- (6) 組織學診斷達到脂肪肝炎標準

### (三)非酒精性脂肪肝炎與飲食相關性

飲食習慣可能直接促進脂肪肝經由調節肝臟三酸甘油酯的積聚及抗氧化酵素也可直接影響胰島素的敏感性及飯後三酸甘油酯的代謝 [12]。

肥胖伴隨著脂肪肝的出現首度被Westwater及fainer提出[13]，而飲食因子也可能會影響肝臟脂肪肝，研究指出飲食中富含飽和脂肪酸會增加肝臟脂質及血漿胰島素濃度而引起胰島素阻抗[14]，而在NAFLD病人身上發現，大量攝取飽和脂肪及膽固醇並降低多元不飽和脂肪酸的攝取，這種飲食習慣會透過影響餐後三酸甘油酯的代謝及胰島素的敏感性而造成脂肪肝及肝臟的氧化傷害[12]，或者大量攝取脂質(增加n-6/n-3脂肪酸的比例)與果糖，會增加游離脂肪酸的合成而造成脂質積聚在肝臟促



進肝臟發炎有關[15]。

文獻指出給予 SD 大鼠長時間的高脂飲食可以誘導成 NASH，而給予低脂飲食、標準飲食可能可以避免從 NAFLD 變成 NASH，但脂肪滴泡卻沒有減少的現象[16]。給予 n-3 脂肪酸(EPA、DHA)可以改善冠狀心臟疾病的危險性經由影響代謝的變化量例如血中三酸甘油酯，而 n-6 脂肪酸(linoleic acid)是主要調節低密度脂蛋白(LDL-C)代謝的飲食脂肪酸，於體內會增加 LDL-C 的清除率及減少 LDL-C 的產生，對改善 NAFLD 較有幫助[17]。低碳水化合物和高纖維的新鮮蔬菜、水果、豆莢類及穀類可同時對降低胰島素阻抗及脂質標記有益，而降低碳水化合物的攝取可以降低肝臟 Acetyl-CoA 因此可降低脂質合成[18]。Huang 等人給予 NASH 病患熱量限制飲食 1400kcal/diet，結果顯示可以改善肝臟脂肪肝炎的狀況[19]。

#### (四)非酒精性脂肪肝炎之代謝表徵與致病機轉假說 (two hits)

胰島素阻抗、氧化壓力及發炎在NAFLD的發展進程中佔了很重要的角色[20]，NAFLD的成因是多樣性的，其中以Day與James所提出的二次打擊假說(Two-hit hypothesis)為主要被學者廣為接受[21]，第一個衝擊(first hit)為脂肪堆積在肝臟成為脂肪肝(fatty liver)，第二個衝擊(second hit)則為出現脂肪肝炎 (fatty hepatitis)。第一個衝擊肇因於肝內脂肪的過度堆積，其原因有肥胖症、高血脂症、糖尿病、及胰島素抗性等原因，而第二個衝擊則起因於氧化壓力(oxidative stress)，會造成肝細胞膜上脂質過氧化 (peroxidation)，並藉由釋放前發炎細胞激素和活化星狀細胞進一步造成纖維化。而這些造成肝損傷機制直接對肝細胞進行兩次攻擊，

並導致肝臟發生瀰漫性脂肪浸潤、炎症反應、壞死、凋亡、再生損害以及肝星狀細胞活化等一系列病理連鎖性免疫攻擊反應。

從 $\beta$ -氧化作用而來的氧化壓力會活化NF- $\kappa$ B路徑的表現而產生促發炎激素(TNF- $\alpha$ 、TGF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8)及脂肪細胞激素的表現兩者共同作用而形成了第二衝擊點並造成肝損傷發炎甚而纖維化[22]。在NASH肥胖病人身上發現，發炎細胞激素會造成胰島素訊號缺陷、細胞損傷、中性白血球的趨藥性、肝臟星狀細胞的活化、細胞凋亡、並會增加肝臟及脂肪組織TNF- $\alpha$ 及其接收器的表現，這些都和纖維化有關[23]，而TNF- $\alpha$ 已知為促發炎因子，在肝細胞發炎及細胞凋亡上扮演重要的角色[8]。

胰島素阻抗會導致高胰島素血症而血漿中過多的胰島素會刺激內臟脂肪釋放出游離脂肪酸，在肝臟胰島素會抑制 $\beta$ -氧化作用，進而促進脂肪酸合成，最後胰島素阻抗會誘導過多的飽和脂肪酸堆積在肝臟[24]，而過多的脂肪酸不只有毒也會活化細胞內胞器例如粒線體、微粒體、過氧化小體，尤其是微粒體，CYP2E1被誘導代謝過多的脂肪酸而活化產生ROS，這些氧化壓力被認為造成粒線體損傷及肝細胞損傷[25]。

CYP2E1與CYP4A可誘導肝臟微粒體進行脂肪酸的hydroxylation，可形成脂質過氧化作用，和NASH的臨床特徵有關的每個因子：肥胖、糖尿病、高血脂，尤其是胰島素阻抗會增加CYP2E1表現量 [26]，CYP4A受PPAR $\alpha$ (peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ )所調控，PPAR $\alpha$ 為轉錄因子，可調控基因例如脂肪酸的調節與運輸。而微粒體的脂肪酸氧化作用占比較小的部分，但在禁食、糖尿病及過度營養伴隨著肝臟脂質代謝紊亂，CYP4A蛋白可能為主要的適應性反應的中間物[27]。

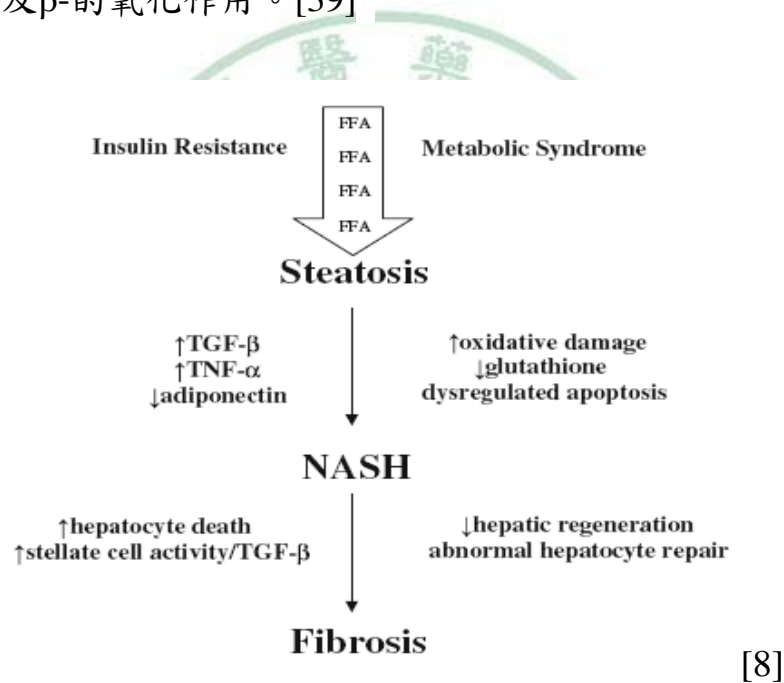


許多文獻已探討氧化壓力和形成NASH有很大的關係，Sanyal等人指出在NAFLD、NASH病人身上肝臟活體組織染色：脂質過氧化蛋白(3-nitrotyrosine)會大量表現[26]，在NAFLD病人身上，增加ROS、促發炎激素、肝臟細胞壞死而導致粒線體功能缺陷扮演著重要角色。氧化壓力是NASH的主要特徵及ROS(reactive oxidative species)的來源，在肥胖病人身上會造成肝臟內肝臟實質細胞、慢性發炎細胞及脂肪組織浸潤而活化巨噬細胞[28]。Pessayre等人提出ROS及脂質過氧化可以解釋所有典型NASH組織特徵[29]，而脂質過氧化終產物4-HNE、MDA可和肝臟蛋白形成共價而形成的產物可能潛在的危害免疫反應也可刺激細胞外基質蛋白的合成。和脂肪肝不同的是，NASH會有粒線體缺損的現象[26]。活化肝臟CYP2E1、肝臟粒線體缺損、脂肪組織及鐵過多都是ROS的來源，在肥胖者中CYP2E1表現量皆會增加，在動物實驗指出會增加CYP2E1的蛋白表現量[30]，CYP2E1表現量在NASH病人比在沒有NASH病人上表現更為顯著，且肥胖者造成有肝臟疾病CYP2E1扮演著重要角色，其機制可能為和CYP2E1酵素所結合的受質會造成未耦合電子的氧化及連鎖反應產生氧自由基及過氧化氫而產生細胞內膜的損傷[31, 32]。

CYP450酵素CYP4A、CYP2E1共同催化氧化還原系統時產生自由基，並在內質網代謝脂肪酸過程中產生ROS[33]，CYP4A和CYP2E1在共同代謝不同的內生性脂質受質上扮演著重要角色，例如脂肪酸及花生四烯酸[34]，這些可指出CYP4A酵素可以催化活化氧的產物及脂質過氧化物[35]，在過氧化體增值劑(PP, peroxisome proliferator)中CYP4A蛋白為主要在脂質代謝的適應性反應過程中扮演主要媒介，肝臟CYP4A酵素在脂肪酸及前列腺素的 $\omega$ -氧化作用可被高脂血症試劑神經纖維酸(fibric acid)

及其他過氧化體增值劑高度誘導，透過PP誘導CYP4A酵素是經由調節細胞核中PPAR $\alpha$ ，而脂肪酸被定義為PPAR $\alpha$ 的配位體而PPAR $\alpha$ 的接受器指出可以調節脂質恆定[36]。

文獻指出給予高指飲食會增加CYP4A(內質網進行 $\omega$ -氧化作用的)的表現量[37]，肥胖、胰島素阻抗及NASH危險因子式因為增加脂肪組織釋放出游離脂肪酸，NASH病人胰島素阻抗會增加脂肪組織內的脂解作用增加游離脂肪酸[38]，而游離脂肪酸轉入到肝臟會刺激PPAR- $\alpha$ 造成增加脂肪酸的 $\omega$ -及 $\beta$ -的氧化作用。[39]



圖一 NASH 病理進程

圖一顯示代謝性症候群及胰島素指抗會增加游離脂肪酸含量，造成肝臟脂質代謝異常、續亂，形成肝臟脂肪炎，代謝過程中產生氧化壓力及發炎反應使發炎反應增加，TNF- $\alpha$ 表現量增加、降低adiponectin表現量，抗氧化物質含量降低，對肝臟進行第二次攻擊形成NASH，肝細胞再生能力，降低修復能力降低活化星狀細胞TGF-表現量增加造成纖維

化。

#### (五) 非酒精性脂肪肝與酒精性脂肪肝的病理及體內代謝差異比較

脂肪肝是一種病理現象，而其原因卻是複雜多樣的。一般而言，病因粗分為酒精性與非酒精性。非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的病因也有許多，包括某些藥物及毒物、先天性代謝疾病、及後天代謝性疾病，其中最常見病因的就是肥胖症、糖尿病、及高血脂症，肝臟活體組織檢察被認為是診斷的黃金準則也是唯一方法辨別NASH脂肪肝炎有沒有發炎現象[40]，NASH在組織學上和酒精性脂肪肝(Alcoholic liver disease, ALD)非常相似但卻沒有過多酒精的攝取現象，NASH和ALD(Alcoholic liver disease)的病理機轉在許多地方都非常相似包括氧化壓力、鐵離子沉積、過度表現CYP2E1及參與內毒素及TNF- $\alpha$ [41]，由於NASH和ALD有這麼多的相似之處，且無法得到適合的診斷工具來區別，所以在診斷是否為NASH上有沒有喝酒為不可或缺的。例如5年過去內有飲酒量女性多於20g/day及男性多於30g/day為排除為NAFLD的重要因子[42]，一些ALD患者例如”kitchen-drinker”，可能會忽視喝酒的事實，因為在肝在組織的相似度及缺少了飲酒的證據下而導致誤診為NASH。一般的肥胖被廣為接受的分為兩種形式：一種為內臟脂肪肥胖的形式，另一種為皮下脂肪肥胖型式，而內臟脂肪肥胖和代謝性症候群有很密切的關係，包括第二型糖尿病[43]。研究指出NASH和ALD患者最大的不同點在於營養狀態上，雖然相較於NASH患者，ALD患者AST/ALT比率及 $\gamma$ -GT( $\gamma$ -Glutamyl transferase)提高較為顯著[44]，而NASH患者和生活形態所導致的疾病(lifestyle-related diseases)尤其是糖尿病較為相關，在NASH病人身上發現內臟脂肪的積聚和肝臟發炎及胰島素阻抗有很大的關聯，而內臟脂肪的區域和ALT及HOMA-IR成正相關

[44]，而造成胰島素阻抗的主要原因為內臟脂肪所釋放的游離脂肪酸及 TNF- $\alpha$ (tumor-necrosis factor- $\alpha$ )。在ALD患者身上氧化壓力也是造成肝損傷的主因[45]。在NASH及ALD病人身上CYP2E1都會被誘導活化而產生 ROS，但在ALD病人身上，過多的酒精是CYP2E1的主要受質，因無法完全被酒精去氫酶 (alcohol dehydrogenase)給代謝完全[46]，因此造成 NASH及ALD氧化壓力的受質並不相同[44]。

表一 ALD 與 NASH 的差異

	ALD	NASH
判定方法	飲酒造成脂肪肝	酒精攝取女生： $<20\text{g/day}$ 男生： $<30\text{g/day}$ [47]
肝指標	同：AST 與 ALT 皆表現量增加	ALT 表現量較高[11]
	異：AST/ALT、 $\gamma$ -GT 表現較顯著[44]	
脂肪肝形成原因	酒精攝取[48]	第二型糖尿病、代謝性症候群、肥胖等[21]
肝損傷原因	氧化壓力 酒精代謝產生 ROS[48]	氧化壓力、發炎反應 CYP2E1 被誘導代謝過多的脂肪酸而活化產生 ROS[25]
CYP2E1 表現量	上升 酒精代謝成乙醛，會造成肝臟代謝性及功能性擾亂，CYP2E1 為酒精受質，當大量飲酒時表現量會被誘導上升[48]	上升 脂質代謝會誘導 CYP2E1 上升，NASH 病人 CYP4A 表現量也會被誘導上升[37]



## (六) NASH 動物模式介紹

NASH 動物模式可經由多種不同的因子來造成肝臟脂肪的沉積，這些因子包括過度營養、methionine-choline缺乏飲食、胰島素阻抗、肝毒素及缺乏瘦體素或受體素的接受器[49]。NASH動物模式有很多種，但卻很少符合NASH病人真正形成病理狀態的因素，最常用的為餵食大鼠methionine-choline缺乏飲食產生出營養缺乏的現象[50]，文獻指出阻塞性睡眠窒息症(obstructive sleep apnea, OSA)病人在睡眠時反覆的通氣道阻塞會有潛在性嚴重的低氧血症，在肥胖病人上會有發展成脂肪肝的危險性[51]，也有證據顯示OSA可能成為肝臟損傷-缺血性肝炎的危險因子[52]，持續性的或間斷性的低血氧症在NASH的發展上扮演著重要角色-NASH肝臟脂肪肝伴隨有低血氧症的現象[53]。

Nitrite已被認為是含氧量低的緩衝液，可以有助於調節含氧量低的血管擴張及含氧量低的粒腺體呼吸作用[54]，因此Fusako Takayama等人給予methionine-choline缺乏飲食四週後腹腔注射sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ ) 40 mg/kg四週來誘導成NASH動物模式[50]，雖然MCD飲食誘導典型改變成NASH模式及SD大鼠自由攝取三週的液態高脂飲食(liquid high-fat diet, LHFD)也可造成NAH典型的病狀，包括脂肪炎、肝臟發炎、纖維化[55]。這些動物模式並不能反映NASH病人的飲食特徵，例如MCD飲食在人體上並不常見，而MCD飲食可造成嚴重的體重流失等惡病質，而這些並非NAH病人的特徵[56]。LHFD動物模式和NASH患者飲食高飽和脂肪酸及低多元不飽和脂肪酸的型態完全不同。雖然經由缺乏瘦體素及其接受器來誘導的NASH動物模式很成功但並不能反映出自然形成NAFLD與NASH病人的病因且有可能阻抗發展成纖維化。上述誘導模式

均無法反映由多種因素構成的NASH病人特徵，並不符合NASH生理病徵。

Zheng-Jie Xu作者等人新建立一個NASH動物模式餵食自製的高脂飲食(每100g含有88g chow diet、10g豬油及2g膽固醇)，顯示出代謝症候群的一些特徵例如增加內臟肥胖、高脂血症、血液游離脂肪酸濃度增加及TNF- $\alpha$ [49]。

表二 NASH 動物模式

動物模式	不適用原因
methionine-choline 缺乏飲食	產生體重流失等惡病質，在 NASH 病人身上並無觀察到此現象[56]
methionine-choline 缺乏飲食 +腹腔注射 sodium nitrite	本研究預實驗肝切片結果經病理科醫師判讀為肝細胞因腹腔注射 sodium nitrite 而直接壞死，和 NASH 病人肝組織切片並不相同[50]
液態高脂飲食(71% from Fat)	與 NASH 患者飲食高飽和脂肪酸及低多元不飽和脂肪酸形態不同，NASH 病人血漿中 ALT 含量會顯著增加，但在此實驗上和 Control 組無顯著差異[55]
高熱量飲食 (37% corn oil, 185% caloric)	CYP2E1 及 PPAR- $\alpha$ 表現量下降和 NASH 病人不同[57]
db/db or ob/ob mice	經由缺乏瘦體素及其接受器來誘導的 NASH 動物模式很成功，但並不能反應出自然形成 NAFLD 與 NASH 病人的病因且有可能阻抗發展成纖維化[49]



### 第三節 菇類的功效性研究

食用菇類為一高經濟價值之產品，可食菇類已知不但富含營養素低熱量且含有豐富蛋白質及維生素，最近已被高度注意在保健食療上治療上的價值。菇類已被研究出具有抗腫瘤、抗菌效果、免疫調節、抗血小板凝、降膽固醇及降血糖作用及保護心血管及肝臟的功效。菇類成分中能引起生物生理活性物質已被文獻指出像是多醣體、三萜類(terpenoids)、多醣體生態複合物(polysaccharide-peptide complexes)及蛋白質[58]。

#### (一) 菇類對肝臟之研究

給予 *Lentinula edodes* (shiitake) 椎茸具有保護 Concanavalin A 所誘發的肝損傷的作用，水萃之椎茸所含多酚類以丁香酸(Syringic Acid)及香草酸(Vanilic Acid)為主，研究顯示椎茸不但可以降低 AST、ALT、且能降低 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6 發炎細胞激素，也能有效清除自由基，這些抗氧化作用能有效抑制氧化傷害引起的肝損傷[59]。

給予糖尿病大鼠 *Agaricus bisporus* (white button mushroom; WBM) 洋菇冷凍乾燥粉末顯示可以降低血漿中葡萄糖及三酸甘油酯的含量，肝臟酵素活性(AST、ALT)肝臟重量。另外在高膽固醇血症大鼠上，洋菇可以顯著降低血漿中總膽固醇及低密度脂蛋白(LDL-C)含量及肝臟中膽固醇及三酸甘油酯含量並隨著增加血漿中高密度脂蛋白含量，以上結果顯示洋菇具有降血糖及血脂的效用[60]。

Mukitake mushroom (*Panellus serotinus*) 剝茸給予誘導成非酒精性肝臟疾病的 db/db 小鼠，顯示可以降低肝臟中三酸甘油酯含量及肝腫大的

現象，降低 AST、ALT，增加脂肪分解酵素 carnitine palmitoyltransferase (CPT)活性，降低脂質合成酵素 fatty acid synthase (FAS) 及 malic enzyme 活性，另外也能顯著降低在血漿中胰島素、adiponectin、單核細胞趨化蛋白-1(MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1) 含量，抑制 IKK $\beta$  活性，顯示可以改善胰島素抗性、抑制發炎細胞激素，發現撥茸可以透過干擾 IKK $\beta$ -NF $\kappa$ B 訊息傳遞路徑而降低了 MCP-1 的含量來達到減緩 NAFLD 的進展[61]。

研究顯示不論是水萃或是乾燥粉末之 Hatakeshimeji(學名: *Lyophyllum decastes* Sing.) (北風菌)，顯示可以降低給予高膽固醇飲食大鼠血漿中的膽固醇且並不影響到血中 HDL-C 的量，在一般飲食大鼠上，給予 Hatakeshimeji 也顯示可以降低血漿中三酸甘油酯及磷脂質的含量，會增加 7 $\alpha$ -hydroxylase 酵素活性增加糞便中膽酸排出量，可能是 Hatakeshimeji 中的可溶性膳食纖維 $\beta$ -葡聚糖可增加小腸的黏著性降低膽酸及膽固醇及三酸甘油酯及/或在吸收因此降低血漿中總膽固醇濃度 [62]。

## 第四節 毛木耳之文獻回顧

### (一) 菇類簡介

“醫食同源，藥食同根”這句名言可謂菇類做為食品的最佳註解，近年來對菇類的關心與研究越來越高，作為食品的菇類，從營養特性、嗜好特性加上食用後調整身體機能三方面來做評價，近年來的報告指出菇類的藥理活性除了可增強免疫力、調節體況及病病康復力等作用外，對癌症、腦中風、心臟病等所謂的成人病有預防及改善的效果，此外也發現菇類含有降血壓與膽固醇等物質，在當今營養過剩且高齡化的社會，菇類必能成為未來新興機能性食品並引起關注。[63]

菇類富含  $\beta$ -葡聚糖、幾丁質、雜多糖(果膠質、半纖維素、聚糖醛酸苷)等食用纖維，可作為低熱量食品原料，並有特有香味和鮮味，在當今社會相當受歡迎，。菇類的美味是以 GMP、AMP 等核苷酸為主體，在取決於麩胺酸、琥珀酸、蘋果酸等及游離糖來作調和[63]。

### (二) 毛木耳之介紹

毛木耳(學名:*Auricularia polytricha*)又俗稱為紅茸或或黑茸，在歐美國家又稱為 Jew's ear(意旨猶太人的耳朵)，為膠質菇(jelly fungi)的一種，屬木耳科(*Auriculariaceae*)木耳屬(*Auricularia*)，外型略似耳狀，呈棕色或棕黑色，中國木耳類最早記載於(神農本草經)收錄有<五木耳>之名稱。毛木耳多產於溫帶及亞熱帶、熱帶地區，而台灣屬亞熱帶、熱帶地區所以非常適合栽培。杜金池與龔調查台灣產野生木耳屬 得到 *A. auricula-judae*、*A. polytricha*、*A. delicata*、*A. mesenterica*、*A. peltata* 以

及 *A. fuscusuccinea* 共七種[64]。目前廣為栽培食用的木耳為黑木耳 (*A. auricula-judae*) 與毛木耳 (*A. polytricha*)，毛木耳子實體中具有髓質，茸毛層有較長的茸毛，而黑木耳則沒有髓層，茸毛層的茸毛也較短。因此與黑木耳相比，毛木耳質地較為粗韌有嚼勁，黑木耳質地較軟嫩，毛木耳不但是中國人普遍的食用菌之一也可作為藥用，有滋養強壯、清肺益氣、補血活血、鎮靜止痛、防止高血壓及便秘等功效[65]。

毛木耳是一種以木材為營養源的腐生型好氣性真菌，喜歡在偏微鹼的環境中生長屬木材腐朽菌。早期台灣採用段木天然培植法，近幾年自日本引進太空包技術取代段木培植法，不但可降低生產成本可使產量大幅提升[65]。



表三 毛木耳與黑木耳差別

	毛木耳	黑木耳
圖片		
學名	<i>Auricularia Polytricha</i>	<i>Auricularia auricula</i>
別名	wood ear 、red ear	雲耳
產地	亞熱帶、熱帶 (東南、亞台灣)	溫帶 (東北亞)
口感	粗韌有嚼勁	軟嫩
茸毛	較長	較短
髓層	有	無



### (三) 毛木耳的營養價值

毛木耳是中國人普遍的食用菌之一，為低熱量、富含膳食纖維、維生素及多種酵素的高營養價值食品，也是人類最早利用為副食品的菇類。菇類的營養成分大致介於肉類和蔬果之間，肉類雖含高量蛋白質，也含有高脂肪和高膽固醇[65]。

研究指出毛木耳的蛋白質是米、麵、蔬菜無可比擬的，富含所有的必需胺基酸，其維生素 B<sub>2</sub> 的含量是米、麵的十倍，鐵質比肉類高一百倍，鈣質含量是肉類的 30~70 倍，每一百克新鮮子實體內含有維生素 C 達兩百毫克[65]。

毛木耳多醣成分主要部分是熱水及鹼均不溶的葡聚糖 II 為主體，而熱水或鹼可提取的水溶性酸性多醣僅占 13%，從木耳取得的多醣為由木糖：甘露糖：葡萄糖：葡糖醛酸=1.0:4.1:1.3:1.3 所組成[63]。

表四 新鮮木耳成分分析 (100 克)

熱量 (kcal)	水分 (g)	粗蛋白 (g)	粗脂肪 (g)	碳水化 合物 (g)	粗纖維 (g)	膳食纖 維 (g)	灰分 (g)	維生素 B <sub>2</sub> (mg)
35	90.8	0.9	0.3	7.7	0.9	6.5	0.3	0.05
菸鹼素 (mg)	鈉 (mg)	鉀 (mg)	鈣 (mg)	鎂 (mg)	磷 (mg)	鐵 (mg)	鋅 (mg)	
0.5	28	40	33	15	17	1.1	0.1	

資料來源：行政院食品衛生處



木耳已知為傳統中國藥物且通常被當作為食材，在台灣有五種常見的木耳種類包括毛木耳、jin ear 等，而毛木耳被發現在治療抗發炎、抗腫瘤、血壓調節、心血管疾病、高膽固醇血症、高脂血症及慢性支氣管炎，具有醫療活性[66]，推測可能是他們的抗氧化能力。與其他木耳相比，毛木耳不僅具有好的抗氧化能力也有好的螯合鐵離子的能力[67]。研究也指出毛木耳含有維生素 C、 $\alpha$ -tocopherol、 $\beta$ -tocopherol、 $\gamma$ -tocopherol、 $\delta$ -tocopherol 與豐富的多酚含量及單寧等抗氧化物質，而多酚具有清除自由基、捕捉氫離子的能力可有效抑制脂質過氧化作用[67, 68]，也有研究指出黑木耳除了多醣體外還有豐富的生物鹼、B1、B2 維生素 C 及礦物質成分[69]。



#### (四) 毛木耳之成分分析及已知功能介紹

食用或藥用菇類的多醣體被認為對健康有眾多好處，而攝食的量與頻率和降低癌症死亡率有關係。在中國，黑木耳傳統被當作為食物和藥物，而黑木耳的果實是一種可食的 black-brown mushroom，含有多量的碳水化合物(將近 630g/kg 的乾重)及蛋白質，黑木耳所含的蛋白質、礦物質(鈣、磷、鐵)和銀耳相較之下較高，而蛋白質富含離胺酸與白胺酸已知對健康有益[70]。

##### 1. 對於體內氧化壓力的影響

作者 Yangchao Luo 等人指出餵食老鼠黑木耳多醣體不但可增加血漿及肝臟超氧化物歧化酶(SOD)含量降低 MDA 的量且能增加清除氫氧自由基、超氧自由基的能力，顯示出在抑制自由基及抑制 LDL 氧化上有很強的抗氧化能力，同時也能改善肝臟的抗氧化酵素[71]。

酒精萃取黑木耳子實體可以延緩共軛雙烯出現且會抑制終產物 thiobarbituric acireactive substance(TBARS)產生，具有很高的抗氧化能力[72]。

大陸學者探討黑木耳對家兔脂質過氧化脂效果，結果顯示黑木耳不但在降血脂和抗動脈粥狀動脈硬化有很好的效果，也具有抑制脂質過氧化的作用，可能因黑木耳含有高量的維生素 E、矽、鎂、鐵等微量元素有關[73]。

黑木耳在濃度為 200 $\mu$ g/ml 時可超過 50% 降低亞麻油酸的過氧化作

用，在抗氧化能力及清除 DPPH 上都有不錯的能力，文獻也指出植物萃取物的抗氧化能力及清除自由基的能力被認為是具有酚類、維生素 C、生育醇(tocopherol)及類胡蘿蔔素(carotenoids)等[74]。

## 2. 降低膽固醇作用

除香菇所含的低分子降膽固醇物質(eritadenine)外，黑木耳所含的酸性多醣(glucuronoxylomannan)有顯著的降膽固醇作用[63]，研究指出給予餵食高膽固醇飲食的 ICR 小鼠黑木耳子實體 120mg/kg/day，不但在維持 HDL-C 的情況下可顯著降低血漿中總膽固醇及低密度脂蛋白膽固醇含量並可增加 LPL 與總抗氧化能力的活性，顯示能有效抑制粥狀動脈硬化的進展 [75]。黑木耳含有豐富的 $\beta$ -葡聚糖、葡糖醛木糖聚糖及膳食纖維，而葡糖醛木糖聚糖含有陰離子官能基可減少膽固醇在腸道的吸收、增加膽酸的排出，增加肝臟膽固醇轉換成膽酸量而有降低肝臟膽固醇的效果 [76]。在毛木耳的鹼不溶葡聚糖 II 不能發現這種降膽固醇的作用，所以一般認為降血膽固醇的作用可能是葡聚糖醛酸支鏈的  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-甘露聚糖所具有的特殊酸性多醣結構，能抑制腸膜絨毛細胞吸收膽固醇及其衍生物，毛木耳也含有亞麻油酸，可在體內與膽固醇結合成膽固醇酯，可降低血漿中膽固醇[65]。

## 3. 抗發炎作用

在 Carrageenin 誘導的發炎反應試驗中發現給予老鼠黑木耳多醣體 (Glucuronoxylomannan、Glucuronoxylomannan) 可以有效降低足蹠

的腫脹程度而在燙傷誘導發炎反應試驗中具有降低痛覺反應的現象[77]。此一結果證實了木耳多醣體的抗發炎效應。

#### 4. 調節宿主免疫反應作用

菇類蛋白質可以影響宿主的免疫系統，在治療許多不同的疾病上可能具有潛力。毛木耳純化出之免疫調節蛋白(immunomodulatory protein,APP)可顯著調節淋巴細胞及巨噬細胞，AAP可以促進細胞增生、增加干擾素(IFN- $\gamma$ )的分泌及促進 LPS 誘導的巨噬細胞(macrophage)增加一氧化氮(NO)及腫瘤壞死因子(TNF- $\alpha$ )產生，根據這些結果顯示 APP 是一種免疫刺激物可強化宿主的免疫反應[58]。

#### 5. 血糖調節之研究

Sone 作者等人指出黑木耳水溶性多醣體富含酸性異多醣(heteropolysaccharide)及少量的的中性  $\beta$ -D-glucan，給予 diabetic KK-A<sup>y</sup> mice 黑木耳萃取之水溶性多醣，尤其是中性多醣，發現可以有降低血漿中餐前血糖、胰島素、糖化血色素(HbA1c)、尿糖、攝食量及飲水量之作用，因此可以改善高血糖(hyperglycemia)、高胰島素血症(hyperinsulinemia)及攝食亢進(hyperphagia)，也發現限制食物攝取並不是降低血糖的主要因子[78]。

## 6. 抗血栓研究

給予實驗動物黑木耳萃取多醣，發現可以抑制血小板凝集及血液凝固，和水萃取及酸萃取相比，顯示用鹼萃取不含硫基的黑木耳多醣顯示有較高的抗凝血活性，可經由催化抗凝血酶 (antithrombin) 來抑制凝血酶 (thrombin) 的作用並不是經由肝素輔因子二號 (heparin cofactor II)。黑木耳子實體可抑制血小板聚集，降低血液凝塊緩和動脈粥狀硬化，防止血栓形成[79]。Markhija and Bailey 作者發現黑木耳中的腺嘌呤 (Adenosine) 含量高達 154mg/g，此種物質在抑制血小板凝集有顯著的作用，尤其有抑制腦部栓塞解除腦部血小板凝集的作用[80]。

## 7. 抗腫瘤研究

已知香菇多醣 (lentinan) 及 schizophyllan (裂褶菌多醣) 在抗腫瘤是較具代表性，與一般菇類相比，木耳持有兩種分支度更高的  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-葡聚糖，在抗腫瘤的活性亦不同，將此兩種葡聚糖用腹腔給予小白鼠探討對 Sarcoma-180 固形腫瘤的抑制效果，研究顯示用熱水提取的葡聚糖 I (分支度 2/3) 與 schizophyllan (裂褶菌多醣) 有一樣的抑制效果，但分支度極高的鹼不溶性葡聚糖 II (分支度 3/4)，在抗腫瘤的活性上相對較低，其抑制率為 18% [63]。

Mengyao Yu 作者等人給予 sarcoma180 腫瘤小鼠酒精萃取毛木耳，其中的某一部分多醣體 APP II A-由甘露糖 (mannose) 及木糖 (xylose) 組成，顯示會增加經由活化巨噬細胞，增加 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  分泌、及 iNOS



的表現量來達到抗腫瘤的效果[81]。

#### 8. 黑木耳與減重的關係

黑木耳為膠質菇的一種，乾燥後再吸水的膨脹係數很高，食用之後會讓胃有飽的感覺，進入胃腸吸濕膨脹之後隨著胃腸蠕動貼附在絨毛細胞表面，可減緩胃腸酵素分泌到胃腸中，且含有纖維素、半纖維素、果膠等膳食纖維可促進胃腸蠕動幫助排便[65]。



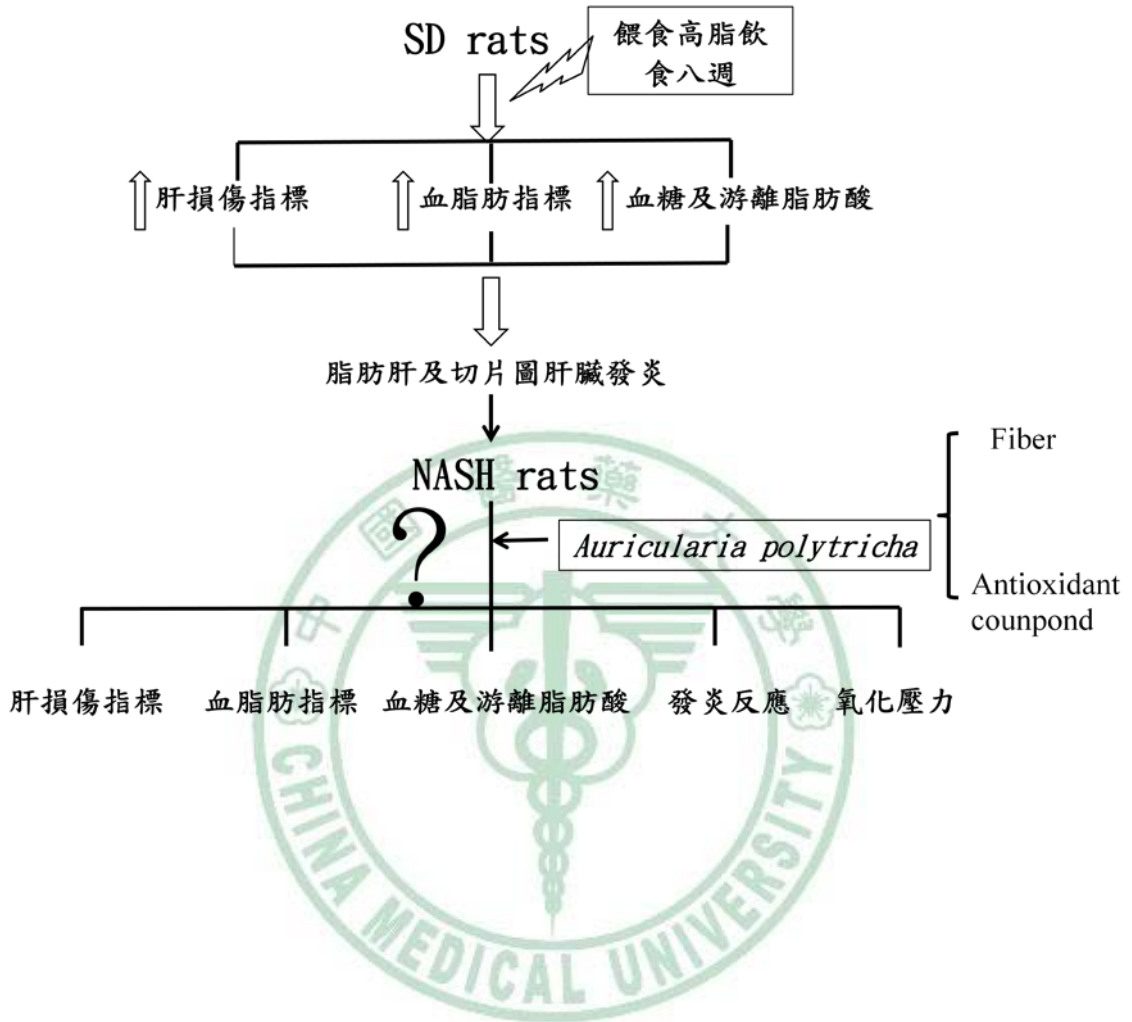


### 第三章 研究動機及目的

長久以來，我們總將脂肪肝通常和酒精攝取聯想在一起，臨床上，歐美國家最主要的肝臟疾病是因長期多量飲酒，因絕大部份的肝疾病都是由於酒精的傷害，但在近 15-20 年以來，非酒精性脂肪肝疾病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 卻成為歐美國家人口群中，肝功異常必要先考慮的病因。在台灣由於飲食及生活習慣的改變，隨著肥胖人口及罹患糖尿病的人口有逐漸增加的趨勢，罹患非酒精性脂肪肝的病人也有日趨增加的趨勢，而此疾病更與更年期、年齡、代謝性症候群、高血脂等常見之疾病有很大的相關性，可見問題之嚴重性。

在台灣，毛木耳的產量占大宗，卻鮮少有毛木耳相關的研究，先前的研究大多針對於黑木耳，像是黑木耳多醣體已被研究出具有調節血脂、血糖及抗發炎、提高體內抗氧化能力等功效，而毛木耳對於肝臟疾病之研究又更少。先前本實驗室已研究出毛木耳萃取物具有降低卵巢切除大鼠血中脂質代謝異常、增加肝功能指標 GOT、GPT 的作用，加上毛木耳萃取物被研究出含有豐富的抗氧化物質，因此本實驗將利用毛木耳萃取物探討是否具有改善 NASH model 的”two-hit”作用來達到延緩 NASH 的病理進程。

研究假說



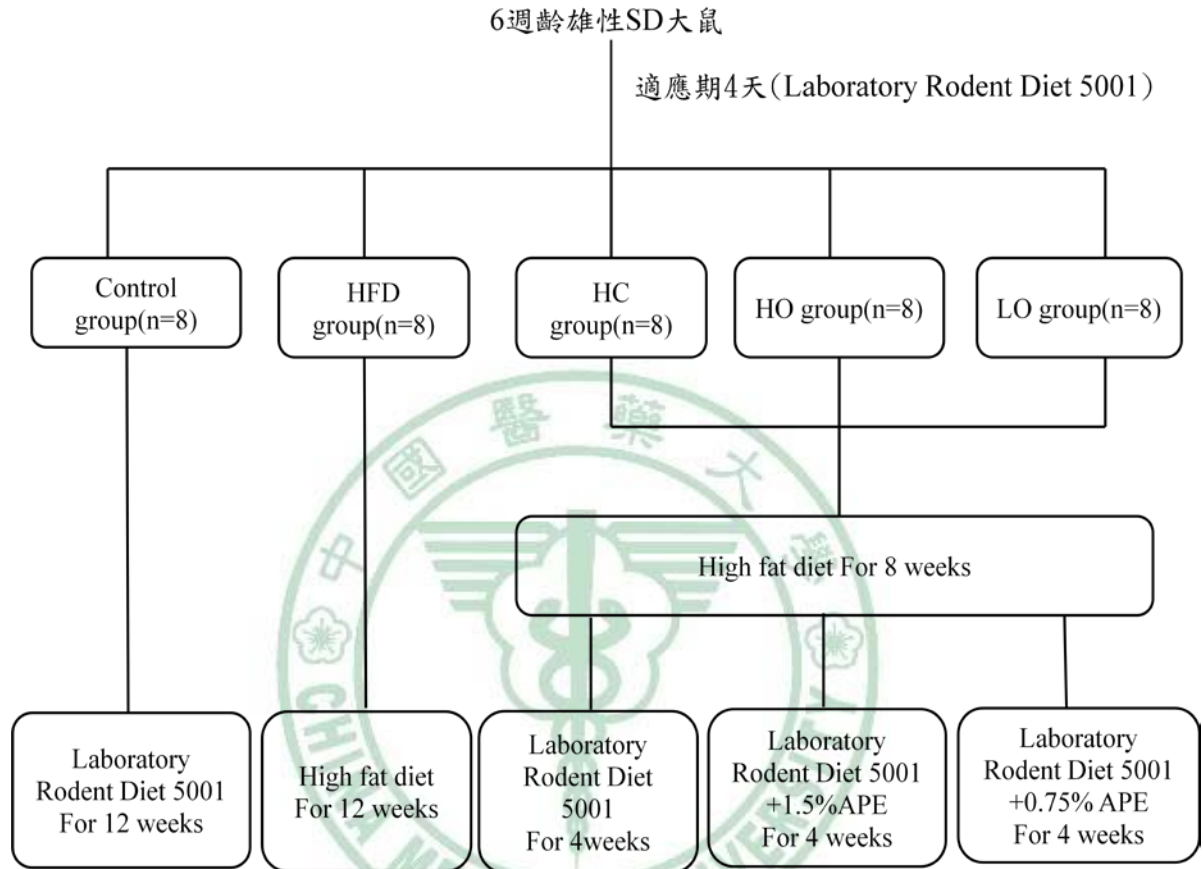
#### 第四章 研究架構

使用 40 隻六週齡雄性 Spraque Dawley 大白鼠經適應期 4 天後，先經由尾靜脈採血及體重測量後將老鼠分組，並給予不同劑量之毛木耳萃取物，實驗動物採自由給食 (ad libitum) 並記錄每天飲食攝取量以監測每組所吃的量，每週監測體重，實驗為期 12 週。犧牲前禁食 12 小時後採集血液、取肝臟組織進行分析。



## 第五章 材料與方法

### 第一節 實驗設計



Groups :

Control: rats fed on laboratory rodent diet

HFD: rats fed on high fat diet

HC: rats fed on high fat diet for 8 weeks then fed on laboratory rodent diet for 4 weeks

HO: rats fed on high fat diet for 8 weeks then fed on laboratory rodent diet supplemented with 1.5% APE

LO: rats fed on high fat diet for 8 weeks then fed on laboratory rodent diet supplemented with 0.75% APE

圖二 實驗設計流程

## 一、 檢體收集

### 1. 血液

採集血液檢體後放置於含有 EDTA 及 heparin 的採血管後，於條件為 4°C 以下之離心機離心（3220 g）20 分鐘，分離出血漿與血球，取出上層血漿於微量離心管後，加入生理食鹽水，再以相同的條件離心，目的為清洗血球，連續清洗三次後將紅血球分裝於微量離心管中，保存於-80°C 下，待日後分析。

### 2. 肝臟組織

取下肝臟後，取肝大葉 1cm\*1cm 左右大小，泡置於 10% 福馬林中，室溫保存待日後切片分析。





## 二、 分析項目

血液分析	aspartate aminotransaminase、alanine aminotransaminase、total cholesterol、triglyceride、high dencity lipoprotein-cholesterol、low dencity lipoprotein- cholesterol、glucose AC、insulin、Vitamin E、TBARS、Vitamin C、free fatty acid、fatty acid profile
肝臟分析	肝臟 H&E、Masson's trichrome 切片染色、total cholesterol、triglyceride、Vitamin E、硫代巴比妥酸反應物質(TBARS)、超氧歧化酶(SOD)、catalase、glutathione reductase、glutathione peroxidase、CYP 4A、fatty acid profile



## 第二節 實驗材料

### 1. 實驗動物

本實驗使用至 BioLASCO 公司購入六周齡的 SD 大鼠 40 隻，實驗動物飼於動物房之不銹鋼籠中，飼養於十二小時 light-dark cycle，恆溫的動物房內(23±1°C)，濕度 40-60%，水分與飼料充分供給，經適應期 4 天後將實驗動物分成五組：Control、HFD、HC、HO、LO 組。

### 2. 毛木耳萃取物

原料來源以太空包栽培之嘉義中埔地區商業栽培菌株，在冬季進行取樣。取樣後由行政院農業委員會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所進行毛木耳萃取以提供實驗所需。

### 3. 飼料配製


本實驗分為五組，使用 Laboratory Rodent Diet 5001 (Purina Co., MO, USA)，高脂飲食配製方法如表六所示，HO 及 LO 組依比例（圖二）加入毛木耳萃取物，飼料每兩週配製一次，並放於 4°C 中備用。

#### 4. 飲食組成分

表五 Laboratory Rodent Diet 5001 主要營養組成

Table 5 Composition of Laboratory Rodent Diet 5001

Ingredient	(W/W)%
Protein	23.9
Fat	5.0
Fiber(Crude)	5.1
Carbohydrate	48.7
Ash	7.0



表六 高脂飲食配製方法及三大營養素比例

Table 6 Composition and of the high fat diets

Composition	(W/W)%
Chow diet	88
Lard oil	10
Cholesterol	2



表七高脂飲食之三大營養素比例

Table 7 Energy of high fat diet and fiber content

Groups	Control	HFD	HC	HO	LO
Carbohydrate	58%	52%	58%	58%	58%
Fat	13%	30%	13%	13%	13%
Protein	29%	18%	29%	29%	29%
Fiber	1.79g/day	1.57 g/day	1.79g/day	2.25g/day	2.02g/day





### 第三節 實驗方法

#### 一、 毛木耳萃取物分析

##### 1. 毛木耳萃取物製備

由行政院農業委員會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所製備提供，萃取技術目前已申請專利。

##### 2. 毛木耳萃取液成分分析

###### i. 蛋白質含量測定[82]

取樣品 200 $\mu$ L、180 $\mu$ L A 劑及 20 $\mu$ L B 劑於 50 $^{\circ}$ C 反應 20 分鐘，待冷卻後加入 600 $\mu$ L C 劑於 50 $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘，離心(10,621g)1 分鐘，利用分光光度計測 650 nm 之吸光值，與標準溶液之吸光值對照換算得知蛋白質含量。

A 劑：0.4% K · Na tartrate + 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 0.5M NaOH

B 劑：2% K · Na tartrate + 3% CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O + 0.1M NaOH

C 劑：Folin-Ciocalteu reagent 稀釋液(FC reagent : H<sub>2</sub>O = 1 : 15)

###### ii. 總多醣測定[83]

根據 Phenol-sulfuric acid method 測定。取樣品 200 $\mu$ L 加入 200 $\mu$ L 5% phenol slon. 及 1ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，小心混合，靜置 30 分鐘後利用分光光度計測 490 nm 之吸光值，與標準溶液之吸光值對照換算得知總多醣含量。

### iii. 總多酚含量測定[84]

取樣品 1mL 加 5mL 水及 0.5mL Folin-Ciocalteus reagent，充分震盪後靜置 5 分鐘，加入 0.5mL 20%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ，混合後作用 2 小時，利用分光光度計在 750nm 下測吸光值，以 gallic acid 為標準，利用標準取線得到的斜率，依照公式計算濃度。

## 3. 毛木耳萃取液抗氧化活性測定

### 一、 清除 DPPH 自由基能力測定[85]

取樣品 1mL 加 1mL 水及 0.2ml 5mM DPPH 在室溫下反應 30 分鐘，利用分光光度計測 517nm 之吸光值，與標準溶液之吸光值對照換算得知清除 DPPH 自由基能力。

### 二、 還原力測定[86]

取樣品 0.1mL 加 1mL working reagent (Acetate buffer : TPTZ :  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} = 10 : 1 : 1$ )，在  $37^\circ\text{C}$  下反應 15 分鐘，利用分光光度計測 592nm 之吸光值，與標準溶液之吸光值對照換算得知還原能力。

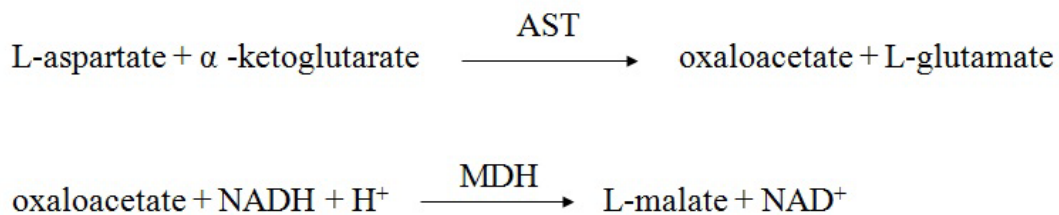
### 三、 總抗氧化能力測定[87]

根據 trolox equivalent antioxidant capacity 方法，取  $100\mu\text{L}$  稀釋後的  $\text{ABTS}^+$  及  $10\mu\text{L}$  樣品反應 15 分鐘後，用分光光度計測 734nm 之吸光值，與標準溶液之吸光值對照換算得知總抗氧化力。

## 二、 血漿分析

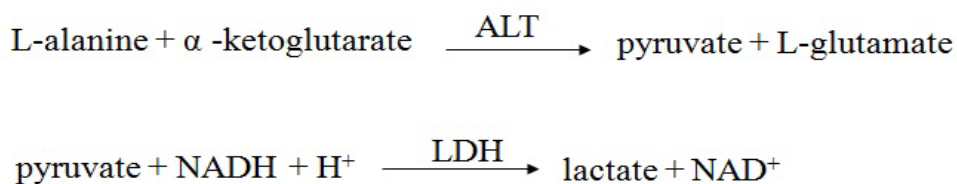
### 1. 天門冬胺酸轉胺酶(aspartate aminotransaminase，以下簡稱 AST)

AST 測定是使用 DiaSYS 的商業組合試劑 (Holzheim, Germany)。  
AST 是將 L-aspartate 及  $\alpha$ -ketoglutarate 轉變為 oxaloacetate 及 L-glutamate 的酵素。oxaloacetate 與 NADH 經由 MDH (malate dehydrogenase) 作用形成  $\text{NAD}^+$ ，而 AST 酵素活性是利用分光光度計測 NADH 氧化成  $\text{NAD}^+$  在 340nm 下其吸光值的減少速率變化量。



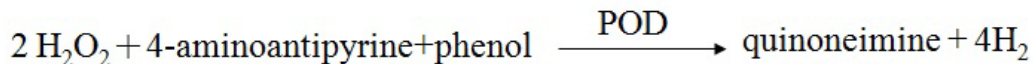
### 2. 丙胺酸轉胺酶(alanine aminotransaminase，以下簡稱 ALT)

ALT 測定是使用 DiaSYS 的商業組合試劑 (Holzheim, Germany)。  
ALT 是將 L-alanine 及  $\alpha$ -ketoglutarate 轉變為 pyruvate 及 glutamate 的酵素。pyruvate 與 NADH 經由 LDH (lactate dehydrogenase) 作用形成  $\text{NAD}^+$ ，而 ALT 酵素活性是利用分光光度計測 NADH 氧化成  $\text{NAD}^+$  在 340nm 下其吸光值的減少速率變化量。



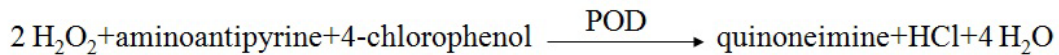
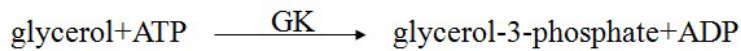
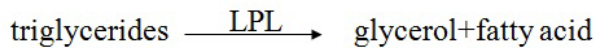
### 3. 血漿總膽固醇 (total cholesterol, 以下簡稱 TC)

TC 的測定是使用 DiaSYS 的商業組合試劑 (Holzheim, Germany)。原理是利用 enzymatic colorimetric method (CHOP-PAP 法)，將定量的血漿加入呈色劑以 37°C 水浴 5 分鐘，利用 cholesterol hydrolase、CHO (cholesterol oxidase)、POD (peroxidase) 與樣品中的 cholesterol 及 CHE (cholesteryl ester) 作用，生成紅色的 4- (p-benzoquinone-mono-imino) 化合物，利用分光光度計在 500 nm 測其吸光值，再與標準溶液之吸光值對照換算得知 TC 的濃度。



### 4. 三酸甘油酯 (triglyceride, 以下簡稱 TG)

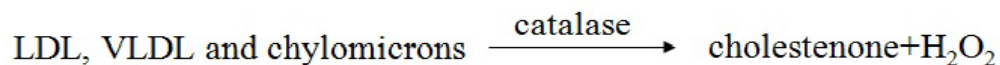
TG 的測定是使用 DiaSYS 的商業組合試劑 (Holzheim, Germany)。原理是利用 LPL (lipoprotein lipase) 將 TG 分解產生 glycerol，glycerol 經由 GK (glycerokinase) 作用產生 G-3-P (glycerol-3-phosphate)，G-3-P 經由 GPO (glycerol-3-phosphate-oxidase) 作用產生過氧化氫 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)，H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 與 aminoantipyrine、4-chlorophenol 經由 POD (peroxidase) 反應形成 quinoneimine。TG 的測定是利用分光光度計在 500nm 下測吸光值，再與標準溶液之吸光值對照換算得知血漿 TG 的濃度。



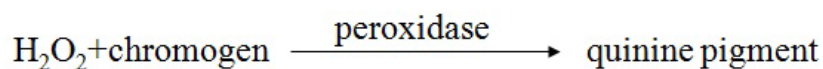
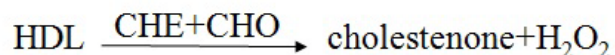
## 5. 高密度脂蛋白膽固醇 (high density lipoprotein-cholesterol, 以下簡稱 HDL-C)

HDL-C 的測定是使用 DiaSYS 的商業組合試劑 (Wiesbaden, Germany)。原理是利用第一步驟去除 LDL, VLDL and chylomicrons, 在經第二步驟呈色後, 利用分光光度計測其在 593nm 之吸光值, 再與標準溶液之吸光值對照換算得知血漿 HDL-C 的濃度。

\* 1st step



\* 2nd step:

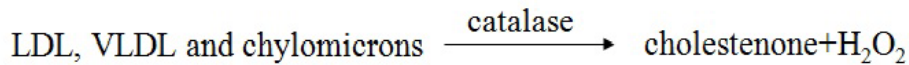




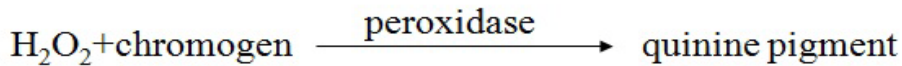
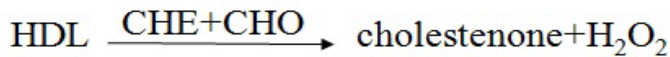
## 6. 低密度脂蛋白(low density lipoprotein-cholesterol, 以下簡稱 LDL-C)

LDL-C 的測定是使用 DiaSYS 的商業組合試劑 (Wiesbaden, Germany)。原理是利用第一步驟去除 HDL, VLDL and chylomicrons, 在經第二步驟呈色後, 利用分光光度計測其在 593nm 下之吸光值, 再與標準溶液之吸光值對照換算得知血漿 LDL-C 的濃度。

\* 1st step:



\* 2nd step:



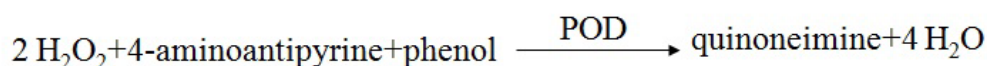
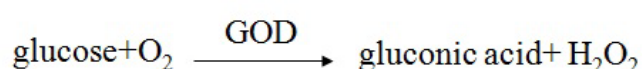
## 7. 極低密度脂蛋白 (Very low density lipoprotein-cholesterol, 以下簡稱 VLDL-C)

本實驗以功式計算方式求出極低密度脂蛋白膽固醇之濃度。

極低密度脂蛋白膽固醇(VLDL-C) = 總膽固醇 (TC) - 高密度脂蛋白 (HDL-C) - 低密度脂蛋白 (LDL-C)

## 8. 空腹血糖 (glucose AC)

glucose AC 的測定是使用 DiaSYS 的商業組合試劑 (Holzheim, Germany)。原理是利用 GOD (glucose oxidase) 作用將 glucose 氧化產生  $H_2O_2$ ， $H_2O_2$  與 4-aminoantipyrine、phenol 經由 POD (peroxidase) 反應形成 quinoneimine。glucose AC 的測定是利用在 500nm 下測吸光值的變化量。



## 9. 血漿胰島素測定

使用市售試劑組 (Rat Insulin ELISA, Merckodia AB, Uppsala, Sweden) 以酵素免疫分析法 (ELISA)，在波長 450nm 下，與標準溶液之吸光值對照並換算得知血漿胰島素濃度。

## 10. 維生素 E (Vitamin E) [88]

取 200 $\mu$ L 血漿加入 300 $\mu$ L 50 $\mu$ g/mL  $\alpha$ -tocopheryl acetate，充分震盪 1 分鐘，再加入 600 $\mu$ L hexane 充分震盪 2 分鐘，於 4 $^{\circ}$ C 下，以 10,621g 離心 10 分鐘，收集上層液至另一微量離心管，重複上述步驟兩次，三次的萃取液以真空抽乾，加入 350 $\mu$ L methanol 回溶，用真空過濾裝置 (Vacuum Manifold, MultiScreen<sup>TM</sup> HTS) 0.45 $\mu$ m 過濾，然後注射 80 $\mu$ L 到 HPLC 中分析。血漿維生素 E 濃度，利用標準取線得到的斜率，依照

公式計算濃度。最後血漿維生素 E 濃度表示為  $\mu\text{L}/\text{mL}$  plasma 表示。

\* HPLC 條件如下

- 儀器：L-7100 pump (Hitachi)、L-7420 UV-VIS detector (Hitachi)
- 管柱：C-18,  $5\mu\text{m}$ ,  $25\text{cm}\times 4.6\text{mm}$
- 移動相：methanol:  $\text{H}_2\text{O}$  = 98 : 2
- 波長：290nm

## 11. 維生素 C (Vitamin C) [89]

取 100ul 血漿加入 900ul  $4^\circ\text{C}$  的 Methanol，充分震盪 20 秒，以 10000g 離心 3min，收集上層液，用真空過濾裝置 (Vacuum Manifold, MultiScreen<sup>TM</sup> HTS)  $0.45\mu\text{m}$  過濾，並保存於  $-20^\circ\text{C}$  直到注射到 HPLC 中分析，注射  $50\mu\text{L}$  到 HPLC 中分析。血漿維生素 C 濃度，利用標準取線得到的斜率，依照公式計算濃度。最後血漿維生素 C 濃度表示為  $\mu\text{M}$  plasma 表示。

\* HPLC 條件如下

- 儀器：L-7100 pump (Hitachi)、L-7420 UV-VIS detector (Hitachi)
- 管柱：C-18,  $5\mu\text{m}$ ,  $25\text{cm}\times 4.6\text{mm}$
- 移動相：methanol:  $\text{H}_2\text{O}$ : acetic acid glacial = 80 : 17.5 : 2.5

- 波長：254nm

## 12. TBARS (thiobarbituric acid reactive substance) [90]

取 100 $\mu$ L 加入 4mL 0.22%  $H_2SO_4$ 、0.5mL 10% phosphotungstic acid、1mL 0.67% thiobarbituric acid (溶於  $H_2O$  : GAA = 1 : 1)，於 95 $^{\circ}C$  水浴 1 小時，冰浴後加入 3mL butanol 進行萃取，在 4 $^{\circ}C$  下

離心 15 分鐘，取上層液於螢光光度計 Ex515 nm/Em555 nm 下測其含量。

## 13. 血漿脂肪酸分析[91]

第一步加入 200 $\mu$ l 血漿以 methanol、chloroform (3 : 4.5 by volume) 做粗脂質的萃取，所取得之萃取液予以真空抽氣抽乾後秤重即為粗脂肪重。第二步加入內部標準品 (17 : 0, heptapalmitic acid)、12%  $BF_3$ -methanol (boron trifluoride- methanol) 於 96 $^{\circ}C$  下加熱 30 分鐘進行脂質甲酯化反應，加入 pentane 於 4 $^{\circ}C$ 、3, 220 g 離心 20 分鐘後，取其上清液後抽乾，溶於定量之 hexane 後，以氣相層析儀分析其脂肪酸組成。

\* 氣相層析儀條件如下

- 儀器：Trace GC
- 管柱：30m $\times$ 0.32m $\times$ 0.2 $\mu$ m 90% biscyanopropyl/10%

## phenylcyanipropyl polysiloxane

- 氮氣流速：30ml/min (split ratio = 1 : 10)
- FID 檢測器：H<sub>2</sub> 流速 30ml/min，Air 流速 350 ml/min
- 積分儀：Chrom-Card
- 管柱溫度：160°C-240°C，每分鐘上升 1.5°C 之速度至 240°C，

維持 10 分鐘

- 注入溫度：260°C
- 檢測器溫度：260°C

### 三、 肝臟分析

#### 1. 病理切片製作

動物犧牲後，摘除肝臟並以 0.9% 生理食鹽水灌流肝門靜脈後，以生理食鹽水清洗，剝除多餘的結締組織，秤重並剪取最大葉肝臟，浸泡於 10% 福馬林中後，送至中國醫藥大學附設醫院病理科以進行組織的脫水、清洗、浸潤以及包埋等步驟，最後製成石蠟切片進行蘇木紫-伊紅染色 (haematoxylin&eosin stain) 及 Masson's trichrome stain 作為病理方面的觀察，每個切片分成五個區域來觀察並記錄每個區域的分數以做統計。

依據 Brunt 等法，脂肪堆積分爲 0~3 等級[10]

Grade 0：含明顯脂肪顆粒之細胞佔肝臟細胞面積的 0%



Grade 1：含明顯脂肪顆粒之細胞佔肝臟細胞面積的 33% 以下

Grade 2：含明顯脂肪顆粒之細胞佔肝臟細胞面積的 33~66%

Grade 3：含明顯脂肪顆粒之細胞佔肝臟細胞面積的 66% 以上

依據 Brunt 等法，發炎細胞分為 0~3 等級[10]

Grade 0：沒有發炎細胞浸潤

Grade 1：1-2 foci/field

Grade 2：2-4 foci/field

Grade 3：more than 4 foci/field.

## 2. 肝臟膽固醇濃度之測定

### 前製備

將冷凍的肝臟取出解凍，剪取 0.5g 肝臟組織，加入萃取溶劑 2 cc(chloroform:methanol=2:1,v/v)，在冰浴中以均質機磨碎後儲存於-20°C 以待日後分析用。

取肝臟萃取液 10 $\mu$ L，加入 Triton-x-100，均勻混勻後以減壓濃縮機抽乾，以市售試劑組(Rendox CH201;Antrim,U.K.)進行分析。加入反應劑 1000 $\mu$ L 混勻後在 37°C 下以乾熱器加熱 5 分鐘，以分光光度計在波長 500nm 下測量吸光值，利用標準曲線換算出肝臟膽固醇濃度。

## 3. 肝臟三酸甘油酯濃度之測定

### 前製備

將冷凍的肝臟取出解凍，剪取 0.5g 肝臟組織，加入萃取溶劑 2 cc(chloroform:methanol=2:1,v/v)，在冰浴中以均質機磨碎後儲存於-20°C 以待日後分析用。

取肝臟萃取液 10 $\mu$ L，加入 Triton-x-100，均勻混勻後以減壓濃縮機抽乾，以市售試劑組(Rendox TR213;Antrim,U.K.)進行分析。加入反應劑 1000 $\mu$ L 混勻後在 37°C 下以乾熱器加熱 5 分鐘，以分光光度計在 500nm 波長下測量吸光值，利用標準曲線換算出肝臟三酸甘油酯濃度。

#### 4. TBARS ( thiobarbituric acid reactive substance ) [90]

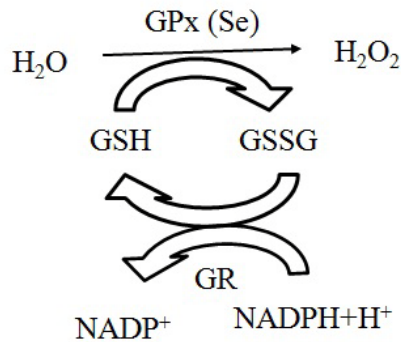
剪取 0.5g 肝臟組織，加入萃取溶劑 2 cc(chloroform:methanol=2:1,v/v)，取均質液進行 TBARS 測定，測定方法同血漿中測定 TBARS 之方法。

#### 5. 肝臟細胞質(Cytosol)及微粒體(Microsome)之製備

取 1 克肝臟於離心管中，加入 4 毫升 0.01M phosphate buffer(1 公升含 1.068g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.52gKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、11.5gKCl，pH7.4)均質後，離心 3000g 15 分鐘，吸取上層液，再以 10000g 離心 30 分鐘，最後以超高速離心機離心(32000g 、1 小時)，將上清液移至 1.5ml 離心管，此部分即為細胞質，而附著於超高速離心管壁的顆粒即為微粒體，加入 1ml microsome suspension buffer(1 公升含 6.23g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.94g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.37gEDTA，pH7.7)放置於-80 以待日後分析。

## 6. 肝臟 Glutathione Peroxidase 之活性測定

原理



本實驗採商業分析套組(Glutathione Peroxidase assay kit, Cayman, Ann Arbor, MI, USA)分析 GPx 之活性。本套組利用 Glutathione reductase 之作用間接測量 GPx 之活性。當 GPx 將氫過氧化物 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hydroperoxide) 轉換成 H<sub>2</sub>O，並將還原型 GSH 代謝成氧化型 GSSG，而 GSSG 則需靠 GR 以 NADPH 當輔酶轉換成 GSH，因此酵素活性分析是在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 當受值時，利用分光光度計以 340nm 波長測量計算 NADPH 減少的速度，間接求出 GPx 的活性，nmol/min/mg protein 表示。

計算方式：

$$\Delta A_{340}/\text{min.} = \frac{A_{340}(\text{Time 2}) - A_{340}(\text{Time 1})}{\text{Time 2}(\text{min.}) - \text{Time 1}(\text{min.})}$$

$$\text{GPx activity} = \frac{\Delta A_{340}/\text{min.}}{0.00373\text{M}^{-1}} \times \frac{0.19\text{ml}}{0.02\text{ml}} \times \text{Sample dilution} \div \text{Total protein}$$

## 7. 肝臟 Glutathione reductase 之活性測定

### 原理



本實驗採商業分析套組(Glutathione reductase assay kit, Cayman, Ann Arbor, MI, USA)分析 GR 之活性。GR 主要可將 GSSG 還原成 GSH，以維持細胞內 GSH 脂濃度，進而對抗氧化壓力。本套組利用 NADPH 氧化之速率測定 GR 之活性。當 GSH 被氧化為 GSSG 時，GR 與 NADPH 便會再將 GSSG 還原回 GSH，且 NADPH 會氧化成 NADP<sup>+</sup>，於波長 340nm 下之吸光值會隨時間增加而遞減，及吸光值減少之速率與 GR 之活性成比例關係，單位以 nmol/min/mg protein 表示。

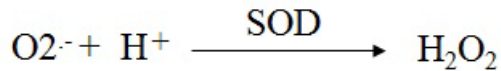
計算方式：

$$\Delta A_{340}/\text{min.} = \frac{A_{340}(\text{Time 2}) - A_{340}(\text{Time 1})}{\text{Time 2}(\text{min.}) - \text{Time 1}(\text{min.})}$$

$$\text{GR activity} = \frac{\Delta A_{340}/\text{min.}}{0.00373\text{M}^{-1}} \times \frac{0.19\text{ml}}{0.02\text{ml}} \times \text{Sample dilution} \div \text{Total protein}$$

## 8. 肝臟 Superoxidase dismutase(SOD)之活性測定

原理



本實驗採商業分析套組(Superoxidase dismutase assay kit, Cayman, Ann Arbor, MI, USA)分析 SOD 之活性。SOD 是含有金屬之抗氧化酵素，主要可將超氧陰離子( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )轉變成  $\text{H}_2\text{O}_2$  與  $\text{O}_2$ ，在細胞內重要抗氧化防禦機制上扮演重要角色。本套組利用 Tetrazolium salt 之作用測定 SOD 之活性。當 xanthine oxidase 存在下， $\text{O}_2$  會轉變成  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ，此時 Tetrazolium salt 會與  $\text{O}_2^{\cdot-}$  結合並產生黃色物質 Formazan dye，以測定 SOD 清除  $\text{O}_2^{\cdot-}$  之活性，在波長 450nm 下測定吸光值。單位以 U/mg protein 表示。

## 9. 肝臟 Catalase 之活性測定

原理



本實驗採商業分析套組(Catalase assay kit, Cayman, Ann Arbor, MI, USA)分析 Catalase 之活性。Catalase 普遍存在生物體內之抗氧化酵素，其主要可清除細胞內之過氧化氫( $\text{H}_2\text{O}_2$ )與活性氧物質(ROS)。本套主利用 Catalase 之過氧化功能來測定其活性。在  $\text{H}_2\text{O}_2$  存在下，含有甲醇的酵素會與  $\text{H}_2\text{O}_2$  形成甲醛 (Formaldehyde) 會與特殊成色劑 Purpald(4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-trizole) 形成一含有



Aldehydes 之雙環結構，並隨著氧化反應而從無色液體轉變成紫色之測試液，在波長 540nm 下測定吸光值，算出肝臟中 Catalase 的活性，單位以  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$  表示。

計算方式：

$$\text{Catalase activity} = \frac{\text{formaldehyde}(\mu\text{M})}{20\text{min}} \times \text{sample dilution} \div \text{Total protein}$$

## 10. 肝臟 TNF- $\alpha$ 含量之測定

操作原理

實驗採商業分析套組(Rat tumor Necrosis Factor alpha ELISA kit, ASSAYPRO, Winfield, Mo, USA)來分析肝臟 TNF- $\alpha$  的含量。本套組利用三明治酵素免疫分析法(Sandwich enzyme immunoassay)來測量 TNF- $\alpha$  含量，老鼠單株抗體特異性老鼠的 TNF- $\alpha$  已預先 coating 在九十六孔盤上，利用 immobilized antibody 及 biotinylated 多株抗體的三明治酵素免疫法去特異性結合 TNF- $\alpha$  標準品及樣品的 TNF- $\alpha$  含量，用 Streptavidin-peroxidase conjugate 來識別，其他未結合的物質利用 wash buffer 沖洗掉，並加入 peroxidase enzyme substrate，最後於波長 450nm 下測得吸光值。

## 11. 肝臟 IL-6 含量之測定

### 操作原理

實驗採商業分析套組(Rat IL-6 Platinum ELISA kit, eBioscience, BMS625TWO, RUO,USA)來分析肝臟 TNF- $\alpha$  的含量。本套組利用三明治酵素免疫分析法(Sandwich enzyme immunoassay)來測量 IL-6 含量，老鼠單株抗體特異性老鼠的 IL-6 已預先 coating 在九十六孔盤上，血漿中的 IL-6 含量會和孔盤上的 IL-6 抗體結合後再加入 Biotin-Conjugate 作為一抗，用 Wash buffer 將多餘的 Biotin-Conjugate 一抗洗掉再加入 Streptavidin-HRP 和一抗結合，用 Wash buffer 將多餘的 Streptavidin-HRP 洗掉後加入 Tetramethyl-benzidine 產生紫色色澤，加入 Stop solution 來終止反應，最後用波長 450nm 下測得之吸光值回推測得吸光質回推標準曲線測得樣品 IL-6 含量。

## 12. 肝臟 CYP4A 蛋白質之表現量

將肝臟微粒體蛋白質定量後調整至 1 $\mu$ g/ $\mu$ l，取 10 $\mu$ l 樣品加入等體積 sample buffer 均勻混合，於 95 $^{\circ}$ C 條件下加熱 5 分鐘，之後轉移至 10% acrylamide gels 樣品槽中，以 130 伏特電壓進行電泳分析。

西方墨點法(Western blotting)與免疫分析:電泳完成後先切除 stacking gel，同時截取一片 separating gel 大小相同之轉印模 (polyvinylidene difluoride membrane,PVDF)，將此膜先浸泡於 95% methanol 5 分鐘，浸泡後依序將海綿、濾紙、separating gel、PVDF 膜、濾紙、海綿放置於三明治式塑膠板中，隨即放入轉印槽以 400mA 下轉印 1 個半小時，轉印完成後將 PVDF 膜取出放入含 10%脫脂奶粉的

blocking buffer 1 個小時，取出後以 wash buffer 沖洗三次，每次 5 分鐘，再以 PBS 稀釋 1000 倍的 CYP4A 一級單株抗體至於室溫下 1 小時；之後取出之 PVDF 膜同樣以 wash buffer 沖洗三次，每次 5 分鐘，再加以 PBS 稀釋 10000 倍的二級抗體至於室溫下反應 1 小時；以 wash buffer 沖洗三次，每次 5 分鐘；最後加入 1ml 的顯色劑，經適當時間反應後陰乾以 Image Gauge 軟體分析其蛋白質表現量。

### 13. 脂肪酸分析[91]

第一步以取 0.25g 肝臟加入 1c.c. methanol 作粗脂質的萃取，所取得之萃取液予以真空抽氣抽乾後秤重即為粗脂肪重。第二步利用 aminopropanol silica column 萃出紅血球磷脂質。第三步加入內部標準品 (17:0, heptapalmitic acid)、12% BF<sub>3</sub>-methanol (boron trifluoride-methanol) 於 96°C 下加熱 30 分鐘進行脂質甲酯化反應，加入 pentane 於 4°C、3,220 g 離心 20 分鐘後，取其上清液後抽乾，溶於定量之 hexane 後，以氣相層析儀分析其脂肪酸組成。

氣相層析儀條件：同血漿脂肪酸分析。

#### 第四節 統計分析

實驗結果以 SPSS12.0 軟體進行統計，以 One-way ANOVA 進行分析，數據以平均值及標準偏差(mean±SEM)， $p < 0.05$  代表有顯著差異。



## 第六章 結果

### 一、 非酒精性脂肪肝炎的模式誘發

在預實驗方面，經過餵食高脂飲食飼料四週後，實驗動物肝切片圖見圖十七，結果顯示，和 Control 組(Grade 0)相比，餵食四週的高脂飲食老鼠顯著增加肝臟中脂肪滴泡(Grade 2)及發炎細胞含量(Grade 2) ( $P < 0.05$ )。

本研究顯示，餵食高脂飲食的老鼠(HFD、HC、HO、LO 組)和 Control 組相比，如表八所示，肝損傷指標方面，餵食高脂飲食的老鼠和 Control 組相比，血中 AST 及 ALT 顯著增加( $P < 0.05$ )；在血漿脂質方面，如表九所示，餵食高脂飲食的老鼠血中總膽固醇、三酸甘油酯、低密度脂蛋白皆顯著高於 Control 組( $P < 0.05$ )，而血漿中高密度脂蛋白膽固醇顯著降低( $P < 0.05$ )；空腹葡萄糖、游離脂肪酸及血漿脂質過氧化作用方面，如表十所示，餵食高脂飲食的老鼠血中空腹葡萄糖、游離脂肪酸及血漿脂質過氧化作用皆顯著高於 Control 組( $P < 0.05$ )，這些結果顯示，實驗動物在餵食八週的高脂飲食後造成非酒精性脂肪肝炎，意即本研究所採取的飲食誘導模式可以有效引發實驗動物非酒精性脂肪肝炎。

### 二、 毛木耳萃取物成分分析、抗氧化活性

如表十一所示，毛木耳萃取物中所含脂肪、粗纖維、蛋白、粗灰份及醣類分別佔乾重的 1.36%、89.77%、5.15%、1.92%及 1.80%。而毛木耳萃取物中總多酚(total phenol)、總黃酮(total flavone)及單寧(tannin)含量分別是  $9.10 \pm 0.08$  (mg gallic acid /g)、 $8.49 \pm 0.07$  (mg quercetin /g)



及  $841.70 \pm 15.92$  ( $\mu\text{g/g}$ ) (表 十二)。毛木耳萃取物之抗氧化活性分析中，清除 DPPH 自由基的能力、還原力及總抗氧化能力分別為  $45.92 \pm 0.22$  ( $\%$  ;  $100\mu\text{g/ml L-ascorbic acid}$ )、 $87.74 \pm 0.51$  ( $\mu\text{M trolox/g}$ ) 及  $127.20 \pm 10.24$  ( $\mu\text{M trolox/g}$ ) (表十三)。分析毛木耳萃取物中的纖維型態，可溶性纖維佔  $73.97 \pm 0.27\%$ 、不可溶性纖維佔  $22.59 \pm 2.85\%$  (表十四)。

### 三、 毛木耳萃取物對大鼠攝食量、體重、肝重之影響

如表十五所示，實驗鼠在進入實驗期前各組間體重並無顯著差異 ( $p > 0.05$ )，餵食實驗飼料十二週後 HFD 組體重顯著高於 C 及 HO 組 ( $p < 0.05$ )，而 HC 及 LO 組則與 C、HFD、HO 組皆無顯著差異 ( $p > 0.05$ )；在食物攝取方面，各組間並無顯著差異 ( $p > 0.05$ )；本實驗利用每天體重增加量除以每天攝食量來計算攝食效率，結果顯示，HFD 組顯著高於 C 與 HO 組 ( $p < 0.05$ ) 和 HC 與 LO 組無顯著差異 ( $p > 0.05$ )；在肝臟重量方面，HFD 組顯著高於其他組 (C、HC、HO、LO 組) ( $p < 0.05$ )，而 HC、HO 及 LO 組又顯著高於 control 組 ( $p < 0.05$ )。利用肝重除以體重來計算相對肝重，HFD 組的相對肝重顯著高於其他組 (C、HC、HO、LO 組) ( $p < 0.05$ )，HO 組則與 HC 及 LO 組無顯著差異 ( $p > 0.05$ ) 且皆高於 Control 組。

### 四、 毛木耳萃取物對各組間肝功能指標之影響

如表十六所示，在肝功能指標方面，HFD 組之 AST、ALT 皆顯著高於 Control 組，但 HC、LO 組之 AST 指標則與 C 及 HFD 組無顯著差

異，而給予高劑量之毛木耳萃取物(HO 組)可以顯著降低血漿 AST 含量 ( $p < 0.05$ )；在 ALT 方面 HO 組之 ALT 顯著低於 HFD 組 ( $p < 0.05$ )，而 HC 及 LO 組則與各組間則無顯著差異，在切片判讀方面，依據 Brunt 等法，如圖十八所示，和 Control 組(Grade 0)相比，HFD 組顯著增加肝臟內的脂肪細胞(Grade 3)及發炎細胞(Grade 2-3)，而給予毛木耳萃取物和 HC 組(脂肪滴泡：Grade 2、發炎細胞：Grade 1-2)比顯著降低肝細胞內脂肪滴泡含量(HO：Grade 0-1、LO：Grade 1-2)及的發炎細胞(HO 及 LO：Grade 0-1)；在纖維化方面，如圖十九所示，和 Control 組相比，HFD 組並沒有纖維化的現象。

## 五、 毛木耳萃取物對各組間血脂質指標之影響

如表十七所示，餵食十二週實驗飼料後，HFD 組之膽固醇、低密度脂蛋白及高密度脂蛋白皆顯著高於其他組(C、HC、HO、LO 組) ( $p < 0.05$ )；在血漿膽固醇及低密度脂蛋白方面，HC 組顯著高於 Control 組 ( $p < 0.05$ ) 而 HO 及 LO 組和 Control 組皆無顯著差異 ( $p > 0.05$ )；在三酸甘油酯方面，HFD 及 HC 組之三酸甘油酯含量顯著高於 Control、HO 及 LO 組 ( $p < 0.05$ )；在高密度膽固醇方面，HO 及 LO 組顯著高於 HC 組 ( $p < 0.05$ ) 而與 Control 組皆無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。在極低密脂蛋白方面 HFD 及 HC 組顯著低於 Control 組 ( $p < 0.05$ ) 而 HO 及 LO 組則和 Control 組及 HC 組皆無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。

## 六、 毛木耳萃取物對大鼠血中餐前血糖、胰島素及 HOMA-IR 指標之影響

如表十八所示，餵食十二週實驗飼料後，給予高劑量極低劑量毛木耳萃取物(HO 及 LO 組)之餐前血糖顯著低於 HFD 組( $P < 0.05$ )和 control 組無顯著差異( $P > 0.05$ )，而 HC 組則與 HFD 組無顯著差異( $P > 0.05$ )。

在血漿胰島素濃度方面，HFD 組之血漿胰島素濃度顯著高於 control、HC、HO 與 LO 組( $P < 0.05$ )而其他組間則皆無差異則無顯著差異( $P > 0.05$ )。

利用血漿胰島素及血漿空腹血糖含量來計算 HOMA-IR index 的值，來看胰島素阻抗程度，發現 HFD 組之血漿胰島素濃度顯著高於 control、HO 及 LO 組( $P < 0.05$ )，而 HC 組則與各組間(Control、HFD、HO、LO 組)無顯著差異( $P > 0.05$ )。

## 七、 毛木耳萃取物對於肝臟膽固醇、三酸甘油酯、丙二醛之影響

如圖三所示，餵食實驗飼料 12 週後，HFD 組之肝臟三酸甘油酯及膽固醇含量顯著高於其他組(C、HC、HO、LO) ( $P < 0.05$ )，在肝臟總膽固醇方面，HO 及 LO 組和 Control 組無顯著差異( $P > 0.05$ )；在肝臟總三酸甘油酯方面，HC 及 LO 組顯著高於 Control 組( $P < 0.05$ )，HO 組和 Control 組則無顯著差異( $P > 0.05$ )。

如圖四所示，肝臟丙二醛(malondialdehyde；MDA)含量方面，餵食實驗飼料 12 週後 HFD 組 MDA 含量顯著高於其他組 (C、HC、HO、LO 組) ( $p < 0.05$ )，而給予高劑量及低劑量之木耳萃取物(HO、LO 組)

後可以顯著降低肝臟 MDA 含量與 Control 組無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。

#### 八、 毛木耳萃取物對於血漿游離脂肪酸、丙二醛之影響

如圖五所示，給予高劑量及低劑量毛木耳萃取物(HO 及 LO 組) 血漿游離脂肪酸含量顯著低於 HFD 組( $P < 0.05$ )和 Control 組無顯著差異( $p > 0.05$ )，而 HFD 組則與 HC 組間無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。

如圖六所示，血漿丙二醛(malondialdehyde；MDA)含量方面，餵食實驗飼料 12 週後 HFD 組 MDA 含量顯著高於 Control 及 HO 組( $p < 0.05$ )，其他兩組(HC、LO)則與 Control、HFD、HO 組都無顯著差異( $p > 0.05$ )。



## 九、 毛木耳萃取物對於血漿抗氧化酵素之影響

如圖七所示，在 VitE 含量方面，餵食實驗飼料 12 週後 HFD 組之血漿維生素 E 濃度顯著低於 Control、HO 及 LO 組 ( $p < 0.05$ )，HC 組則與其他組間(Control、HFD、HO、LO 組)都無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。

如圖八所示，維生素 C 含量方面，餵食實驗飼料 12 週後，HFD 組維生素 C 顯著低於其他組(HFD、HC、HO、LO 組)，給予高劑量及低劑量毛木耳萃取物 HO 及 LO 組顯著高於 HC 組 ( $p < 0.05$ )，但 HO 組又顯著高於 Control 組 ( $p < 0.05$ )，而 Control 與 LO 組間無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。

## 十、 毛木耳萃取物對於肝臟抗氧化酵素及維生素 E 之影響

如圖九所示，在 GR 含量方面，餵食實驗飼料 12 週後給予高劑量毛木耳萃取物(HO 組) 和 HFD 組相比可以顯著增加肝臟 GR 含量( $P < 0.05$ )，HO 組則和 Control 組無顯著差異 ( $p > 0.05$ )，而 HFD 組和其他兩組間(HC、LO)則無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。

如圖十所示，GPx 方面，餵食實驗飼料 12 週後，和 HFD、HC 組相比，Control 和 HO 組顯著增加肝臟 GPx 含量( $P < 0.05$ )，而 HO 與 LO 組無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。

如圖十一所示，在超氧歧化酶含量方面，和 HFD 組相比，給予高劑量毛木耳萃取物後(HO 組)和 Control 組可以顯著增加肝臟超氧歧化酶濃度( $P < 0.05$ )，而 HC 及 LO 組則和各組間皆無顯著差異( $P > 0.05$ )。



如圖十二所示，餵食實驗飼料 12 週後 HFD 組之肝臟 Catalase 顯著高於其他組(C、HC、HO、LO) ( $P < 0.05$ )，其他組間(C、HC、HO、LO 組)則無顯著差異( $P > 0.05$ )。

如圖十三所示，餵食實驗飼料 12 週後 Control 組之肝臟維生素 E 濃度顯著高於其他組間(HFD、HC、HO、LO 組)( $P < 0.05$ )，而和 HFD 組相比，給予高劑量及低劑量毛木耳萃取物(HO、LO 組)可以顯著增加肝臟維生素 E 含量( $P < 0.05$ )，而 HC 組和 HFD 與 LO 相比皆無顯著差異 ( $P > 0.05$ )。

#### 十一、毛木耳萃取物對於肝臟發炎反應之影響

如圖十四所示，在肝臟腫瘤壞死因子方面，給予高劑量及低劑量毛木耳萃取物(HO 及 LO 組)後肝臟 TNF- $\alpha$  含量顯著低於 HFD 與 HC 組( $P < 0.05$ )，而與 Control 組無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。

如圖十五所示，HFD 組相比，給予高劑量及低劑量毛木耳萃取物(HO、LO 組)可以顯著降低肝臟 IL-6 濃度 ( $P < 0.05$ )和 Control 組無顯著差異( $P > 0.05$ )，而 HC 組則和其他組皆無顯著差異 ( $P > 0.05$ )。

#### 十二、毛木耳萃取物對於肝臟 CYP4A 表現量之影響

如圖十六所示，和 Control 組相比，HFD 組顯著增加肝臟中 CYP4a 表現量( $P < .05$ )，而和其他組間(HC、HO、LO 組)皆無顯著差異 ( $P > 0.05$ )。

### 十三、毛木耳萃取物對於 NASH 動物模式血漿及肝臟脂肪酸組成之影響

如表十九所示，在血漿方面，多元不飽和脂肪酸 Control 組顯著高於其他組(HFD、HC、HO 及 LO 組) ( $P < 0.05$ )，在 n-6 及 n-3 脂肪酸含量，高脂飲食血漿 n-6 及 n-3 含量顯著低於 Control 組( $P < 0.05$ )，和其他組間則無顯著差異(HC、HO、LO 組) ( $P > 0.05$ )；在 C20:4n-6 方面；和 Control 組相比，HFD 組顯著降低血漿中 C20:4,n-6 含量( $P < 0.05$ )，而給予毛木耳萃取物顯著增加 C20:4n-6 含量( $P < 0.05$ )，雖然和 HC 組相比無顯著差異( $P > 0.05$ )；在 n-6/n-3 比例方面，高脂飲食組和 Control 組相比，顯著增加血漿中 n-6/n-3 比例，而給予高劑量毛木耳萃取物更增加血漿中 n-6/n-3 比例( $P < 0.05$ )，LO 組則和 HFD 及 HC 組無顯著差異( $P > 0.05$ )。在血漿 desaturase 方面，HFD 組血漿中的  $\Delta 6$ (C18:3n6/C18:2n6)、 $\Delta 5$  (C20:5n3/C20:4n6)及  $\Delta 9$ (C16:1n7/C16:0) desaturase 皆顯著高於 control 組( $P < 0.05$ )，而給予毛木耳萃取物(HO 及 LO 組) 和 HC 及 Control 組相比， $\Delta 5$  及  $\Delta 9$  desaturase 無顯著差異( $P > 0.05$ )， $\Delta 6$  desaturase 方面則與其他組間(Control、HFD、HC 組)皆無顯著差異( $P > 0.05$ )。

如表二十所示，在肝臟方面，HO 組和其他組相比顯著增加肝臟中多元不飽和脂肪酸比例( $P < 0.05$ )，其他組間(C、HFD、HO 及 LO 組)則無顯著差異( $P > 0.05$ )；在(C20:5+C22:6)/C18:3 方面，和 Control 組相比，HFD 組顯著降低肝臟磷脂質中(C20:5+C22:6)/C18:3 含量( $P < 0.05$ )，而給予木耳萃取物(C20:5+C22:6)/C18:3 含量和各組間皆無顯著差異( $P > 0.05$ )；在 C20:4/C18:2 含量方面，和 control 組相比，HFD 組顯著降低 C20:4/C18:2 含量( $P < 0.05$ )，而給予高劑量毛木耳萃取物顯著增加了 C20:4/C18:2 含量；在 n-6/n-3 比例方面，各組間皆無顯著差異( $P > 0.05$ )。

在 desaturase 方面和 Control 組相比，HFD 組顯著增加  $\Delta 5$  及  $\Delta 9$  desaturase 含量，而給予毛木耳萃取物(HO 及 LO 組)肝臟中  $\Delta 5$  desaturase 和 Control 組及 HC 組相比皆無顯著差異( $P > 0.05$ )， $\Delta 9$  desaturase 方面則和 HFD 及 HC 組相比無顯著差異( $P > 0.05$ )； $\Delta 6$  desaturase 含量各組間皆無顯著差異( $P > 0.05$ )。



## 第七章 討論

### 一、 毛木耳萃取物對於攝食量、體重的影響

在本實驗過程期間雖然每組間的攝食量並無顯著差異，但給予高脂飲食組體重卻顯著增加，攝取高劑量的毛木耳萃取物顯示可以降低高脂飲食所造成體重增加的結果，毛木耳萃取物顯示含有豐富的 $\beta$ -葡聚糖，而研究顯示， $\beta$ -葡聚糖顯示可增加腸道的黏著性及短鏈脂肪酸含量，改變熱量吸收及代謝而具有降低體重的效果[92]。多酚類化合物透過降低蛋白質的消化率來達到降低食物攝取量及生長程度[93]，在老化鼠動物模式中發現攝取毛木耳萃取物並不會使體重增加[94]，一項針對黑木耳含有卵磷脂可將體內脂肪乳化液質狀態有利於完全消耗並降低體脂肪含量[65]，在攝食量無顯著差異下甚至具有降低體重的效果，可能是降低了動物血脂質而產生的效果[95]。在 HFD 組顯著增加體重可能是因過多的脂質堆積在肝臟組織中[96]，在本實驗顯示和給予正常飲食相比，雖然給予毛木耳萃取物並無顯著降低食物攝食量但高劑量之毛木耳萃取物具有降低體重的效果。在肝臟重量方面，NASH 病人通常會有肝臟腫大情形[11]，在本實驗給予高脂飲食組顯著增加肝臟重量造成肝腫大，和 HC 組相比，與先前研究結果一致，顯示給予毛木耳菌絲及萃取物皆不會降低肝臟重量[97]。

## 二、 毛木耳萃取物改善 NASH 動物模式肝損傷程度

研究指出當血漿中肝臟酵素 AST、ALT 濃度增加時表示肝臟已損傷，因此兩酵素正常存在細胞質中，當細胞若受到損傷則會釋放到循環中[98]，而 ALT 的增加又和第二型糖尿病及代謝性症候群有更大的關係[99]。肝臟的胰島素阻抗在肝臟的損傷上及增加肝臟酵素上扮演著重要的角色[100]，本實驗結果顯示餵食十二週的高脂飲食後和 Control 組相比，顯著增加血漿中 AST 及 ALT 含量，顯示給予高脂飲食會引起肝損傷造成肝毒性。先前研究也發現黑木耳菌絲可以改善 STZ 誘導的糖尿病老鼠血漿中的高 AST 及 ALT 濃度[101]，在本實驗給予高劑量的毛木耳萃取後可以改善血漿中的 AST 及 ALT 含量顯著改善高脂飲食引起的肝損傷程度。肝切片方面高脂飲食組顯著增加脂肪滴泡及發炎細胞含量，而給予毛木耳萃取物顯著降低肝臟中的脂肪滴泡及發炎細胞含量，顯示毛木耳萃取物確實具有改善肝損傷的效果。



### 三、 毛木耳萃取物對於 NASH 胰島素抵抗的影響

在人體實驗發現，高脂飲食是主要造成脂肪細胞肥大並和糖尿病高脂血症有很大的關係[102]，而肥大的脂肪細胞會製造出 TNF- $\alpha$  及游離脂肪酸，這些會造成周邊組織(骨骼肌及肝臟)的胰島素抵抗[103]。

研究指出胰島素抵抗在肝臟脂肪炎的病理進程上扮演著重要角色，雖然胰島素抵抗並不是造成脂肪肝炎的唯一因素，但卻會增加構成和脂肪肝炎有關的相關基因表現例如脂質合成作用、發炎及纖維化的形成。胰島素是主要控制葡萄糖及脂質代謝的主要荷爾蒙，餵食高脂飲食會抑制糖解作用、降低 PI3K 的活性而造成骨骼肌胰島素抵抗[104]，在人體中也發現透過抑制胰島素刺激葡萄糖的運輸(抑制 pyruvate dehydrogenase 及 phosphofructokinase)與磷酸化會造成人體骨骼肌的胰島素抵抗[105]，在第二型糖尿病，胰島素抵抗是形成高血糖、高胰島素血症及葡萄糖耐受不良的主要因素，在治療、防預 NASH 的病理進程上以胰島素抵抗及肥胖性糖尿病被視為必須治療目標[106]。研究顯示 NAFLD 與肝臟及脂肪組織的胰島素抵抗有很大的關係，也會降低體內對胰島素的敏感度，胰島素抵抗則會透過降低了胰島素抑制脂解作用，增加游離脂肪酸運送到肝臟而造成脂肪肝，臨床研究也發現 NAFLD 病人身上有增加游離脂肪酸及降低脂解作用的情形[107]，在本實驗指，出給予高脂飲食會增加血漿中葡萄糖及胰島素含量，降低 HOMA-IR 指標(測量空腹狀態下胰島素抵抗情形指標)，顯示 HFD 組降低體內對於胰島素的敏感度。而給予高劑量及低劑量毛木耳萃取物可以改善此現象，給予高脂飲食後恢復到正常飲食的 HC 組，空腹血糖量及 HOMA-IR 指標和 HFD 組卻無顯著差異。

水溶性的膳食纖維已被研究指出給予糖尿病病患或是動物顯示具有降低血糖的效果[108]。可食菇類具有很豐富的纖維量，膳食纖維在胃中會形成黏著的物質可延遲胃排空， $\beta$ -葡聚糖可增加食物的黏著性，降低升糖指數，因此可降低胰島素分泌的反應[109]。目前已有研究指出高黏著性的膳食纖維可以延長胃排空抑制或延遲腸道的消化吸收醣類，菇類多醣體顯示可活化 PPAR- $\gamma$ (peroxisomal proliferator-activated receptor gamma)，以調節肝臟脂質儲存及脂肪細胞分化進而可調節脂質代謝異常及降低血漿葡萄糖含量[110]，PPAR- $\gamma$  可以降低高脂飲食所誘導的脂肪細胞肥大及胰島素阻抗[111]，Yuan 作者等人利用黑木耳萃取出來之多醣體和纖維素相比，有較高的黏著性，可增加對腸道的黏著性，降低胃排空的速率及腸蠕動而降低了葡萄糖的吸收，然而添加了與毛木耳類似的黑木耳多醣體延遲了葡萄糖的吸收是改善高血糖、高胰島素血症及胰島素阻抗及葡萄糖不耐的主要因素[78]。

在本實驗也證實餵食高劑量及低劑量毛木耳萃提取物(HO 及 LO 組)發現血漿中的胰島素和血糖量同時顯著低於高脂飲食組，而高脂飲食後恢復正常飲食的 HC 組雖然胰島素分泌量和 HO 及 LO 組無顯著差異但血糖量卻明顯較高，顯示給予毛木耳萃提取物降低胰島素的分泌量可能是增加週邊組織對胰島素的敏感性，進而改善胰島素抗性。

Sung-Kyu Kim 等人給予 STZ 誘導的糖尿病老鼠黑木耳菌絲，具有降低血漿中葡萄糖含量的效果，顯示可以修復 STZ 造成的  $\beta$ -細胞損傷及促進胰島素的合成[101]。

#### 四、 毛木耳萃取物對於血漿游離脂肪酸的影響

游離脂肪酸是肥胖、胰島素阻抗及的 2 型糖尿病最重要的關連，主要原因有二，第一：因在大部分的肥胖患者身上發現會有增加血漿中的游離脂肪酸含量的現象，第二：不管是否有第二型糖尿病患者，游離脂肪酸的增加會抑制胰島素去刺激週邊對葡萄糖的攝取[103]。研究指出在動物或人體試驗中發現當血漿中的游離脂肪酸含量增加時會使胰島素分泌缺陷而導致胰島素阻抗[112]，因此會降低骨骼肌葡萄糖的運輸，促進糖質新生作用及肝醣分解作用[113]。餵食齧齒類動物高脂飲食會緩慢增加血漿中的游離脂肪酸而導致骨骼肌及肝臟的胰島素阻抗[103]，胰島素阻抗也會增加血漿中的游離脂肪酸含量，增加的脂肪酸含量會進入到肝臟，促進肝臟進行脂質生合成作用勝過游離脂肪酸的  $\beta$ -氧化作用及 VLDL 的輸出，造成肝臟脂肪肝炎[114]，在本實驗發現給予木耳萃取物可以降低血漿中的游離脂肪酸量可能是因毛木耳萃取物改善週邊胰島素抗性的影響。

## 五、 毛木耳萃取物對於血脂質代謝的影響

脂質代謝異常，像是增加血漿中三酸甘油酯、膽固醇及 LDL-C 膽固醇含量及降低 HDL-C 含量，均易引發脂肪肝炎，也是形成 NASH 的先決條件之一[115]，先前已有研究指出給予黑木耳萃取物具有降低血膽固醇作用，因此本實驗探討毛木耳萃取物是否能調節 NAASH 動物模式中的血脂代謝。膽固醇在血漿中及組織中以四種不同形式脂蛋白來攜帶，chylomicron、VLDL-C、LDL-C 及 HDL-C。VLDL 是從肝臟內質網製造並運輸新合成的膽固醇及三酸甘油酯到脂肪組織及骨骼肌；LDL 則是從血漿中合成，血漿中主要攜帶膽固醇的形式，運輸到需要膽固醇的組織；HDL 則是負責將周邊組織中過多的膽固醇運回肝臟代謝，並在血漿中扮演維持膽固醇恆定的角色[116]。

功能性食品及保健食品降低膽固醇的作用基本分成五種：(1) HMG-CoA reductase inhibitor：最主要降低血漿中膽固醇的方式；(2) LDL receptor activators：有效的移除血漿中 LDL-C 以維持血漿膽固醇濃度在健康的範圍；(3) acyl CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) inhibitors：在小腸可降低對膽固醇的吸收，在肝臟可降低 VLDL-C 的釋出；(4) cholesterol-bile acid absorption inhibitors：增加膽酸釋出使肝臟中的膽固醇合成膽酸作用增加，降低肝臟中膽固醇會增加 LDL receptor 表現，使血漿中的膽固醇及 LDL-C 含量降低；(5) cholesteryl ester transport protein (CETP) inhibitors：可增加血漿中 HDL-C 含量[116]。研究指出降低 LPL 的活性會增加血漿中 TG 含量及降低 HDL-C 的含量[117]。Chen G 作者等人餵食高膽固醇飲食的老鼠會降低 LPL 的活性、增加血漿中 TC、LDL-C 及 HDL-C 的含量，給予黑木耳多醣卻只會降低 TC 及 LDL 含量



不影響 HDL-C 含量，發現總膽固醇含量的降低可能是因為降低了血漿中 LDL-C 的量[75]。本實驗給予老鼠毛木耳萃取物也可以降低血漿中 TC 及 LDL-C 含量，但在 HDL-C 方面卻可以增加 HDL-C 含量。而黑木耳多醣也被發現可以增加體內的總抗氧化能力並同時增加 LPL 的活性，顯示此兩者呈現正相關，而本實驗發現給予高劑量及低劑量的木耳萃取物可以降低血漿中 TG 及增加 HDL-C 含量，可能是因木耳的多酚提高體內的抗氧化物能力而增加了 LPL 的活性[75]。

肝臟三酸甘油酯的恆定是透過肝臟對 VLDL-C 的製造，研究指出急性的脂肪肝炎會抑制肝臟的  $\beta$ -氧化作用但並不會影響 VLDL-C 的產生[118]，在胰島素阻抗或是第二型糖尿病病人身上發現過度表現 VLDL-C 和增加 TG 及 apo B100 分泌是造成血漿中 VLDL-C 上升的主要因素[119]，Bandsma RH 作者指出抑制 Glucose-6-Phosphate 轉運活性會增加內生性的脂質合成作用及肝臟脂肪炎現象但不會影響 VLDL-C 的製造情形[120]。慢性的脂肪肝炎會導致肝臟胰島素阻抗，降低胰島素抑制 VLDL-C 產生的作用以致血漿中 VLDL-C 大量表現[121]，在本實驗餵食了十二週的高脂飲食 HFD 組不但有胰島素阻抗的現象更顯著增加血漿中 VLDL-C 含量，證實了胰島素阻抗會增加體內 VLDL-C 的含量，在本實驗給予毛木耳萃取物可以降低 VLDL-C 的含量可能是因為改善了胰島素阻抗情形。

在胰島素阻抗的病人身上發現會降低 HDL-C 的濃度，過度表現 VLDL-C 會增加血漿中 TG 含量並降低 HDL-C 含量[121]，血漿中 HDL-C 膽固醇為抗粥狀動脈指標，可將過多膽固醇帶回肝臟代謝，研究已指出一些膳食纖維具有增加血漿中 HDL-C 的功效[122]，而木耳增加 HDL 的



功效可能在於降低 HDL-C 轉換成 LDL-C 的作用[95]。

黑木耳萃取物可以降低 LDL-C 含量並增加 HDL-C 含量[95]，在本實驗給予毛木耳萃取物可以顯著增加血漿中 HDL-C 含量和先前研究極為相似[69]，黑木耳菌絲透過促進胰島素的分泌量去影響 LPL 表現進而改善糖尿病所產生的血脂異常[101]。黑木耳降血漿中三酸甘酯含量可能是富含的高纖維量直接干擾三酸甘油酯的吸收並增加糞便中三酸甘油酯的排出量[123]，黑木耳降血漿中三酸甘油酯及總膽固醇量可能是因抑制了小腸中 micelles 的形成並干擾腸道黏膜的物理特性[124]，在本實驗給予毛木耳萃取物同時降低了血漿中總膽固醇、三酸甘油酯及 LDL-C 可能是因透過抑制 HMG-CoA reductase 降低了肝臟中膽固醇的合成及從組織中有效的將 LDL-C 移除[125]

血漿中 VLDL-C 的代謝會影響 LDL-C 的含量包括 VLDL-C 轉換成 LDL-C 的速率，成熟的 VLDL-C 經 LPL 作用將 TG 移除轉換成 LDL-C，Shen 作者等人也指出 *Psyllium* 透過降低 VLDL-C 轉換成 LDL-C 的速度來減少血漿中 LDL-C 的含量[126]，黑木耳透過降低肝臟中膽固醇的合成來改善高膽固醇血症，並可能同時抑制了膽固醇的吸收 LDL-C 的合成，促進轉換速率[95]。

## 六、 毛木耳萃取物對於肝臟脂質代謝的影響

肝臟是主要調節膽固醇的代謝器官，膽固醇一般不是內生性形成不然就是從飲食吸收，與膽酸結合排出，而肥胖、代謝性症候群、第二型糖尿病被指出體內會降低對飲食膽固醇的吸收能力並增加體內膽固醇的合成[127]，在 NAFLD 也有觀察到此現象[128]。膽固醇的代謝和肝臟脂質含量有關和體重的增加卻沒有關係[128]，NAFLD 認為和肝臟過多的脂質積聚，尤其是三酸甘油酯及游離脂肪酸，會導致發炎、細胞激素過度表現以至於細胞的損傷，但近來研究發現過多的膽固醇積聚在肝臟勝過於游離脂肪酸更會造成對肝細胞的損傷[129]。當酯化過程無法負荷過多的內生性膽固醇合成作用，則會導致膽固醇積聚在肝臟，而當過量的膽固醇毒化細胞，可能會加速 NAFLD 的病理進程進而發展到脂肪肝炎[128]；肝臟膽固醇含量和腸道膽固醇的吸收速度及運輸到肝臟的速度有關[130]。在本實驗給予高脂飲食的 NASH 動物模式上看到肝臟的三酸甘油酯及膽固醇都顯著高於對照組，此一結果更可證實肝臟膽固醇及三酸甘油酯在造成 NASH 上是很重要的因素。

本實驗的毛木耳萃取物含有豐富的膳食纖維，先前研究顯示膳食纖維降低肝臟膽固醇作用可分成三個機制：(1)降低腸道對膽固醇的吸收及膽鹽的再吸收作用，增加肝臟膽固醇轉換成膽鹽的速率及對血漿膽固醇的攝入作用；(2)低升糖作用使胰島素分泌降低：大部分的可溶性纖維可降低葡萄糖吸收速度，降低血漿葡萄糖及胰島素含量而降低胰島素促進肝臟合成膽固醇作用[131]；(3)膳食纖維在腸道中發酵成短鏈脂肪酸 (acetic、propionic 及 butyric acid)，可在結腸中被吸收而抑制肝臟膽固醇的合成作用[132]。

研究指出降低了膽固醇的吸收可避免過多膽固醇積聚在肝臟及顯著降低血漿 TC 及 LDL-C 含量，在本實驗給予毛木耳萃取物的粗纖維佔 90%，顯示其含有豐富的纖維質，其中水溶性纖維又較非水溶性纖維高，黑木耳含有豐富不可消化的非澱粉多醣體，例如  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)葡聚糖及葡糖醛木甘聚糖，研究指出黑木耳黏著性及形成膠質的能力可以經由抑制小腸乳糜微粒的形成降低老鼠膽固醇的吸收[133]，而葡萄糖醛木甘聚糖的陰離子電荷也可干擾膽固醇的吸收，透過消化道內類似離子交換樹脂的方式[134]。而 Peter 等人研究發現給予黑木耳粉末可以增加糞便中性固醇的排出，更證實了以上的說法，膳食纖維及其他的成分可能也會和膽酸作用，降低腸肝循環的再吸收作用，導致膽酸排出增加而提高肝臟的膽固醇轉換成膽酸的能力，黑木耳粉末可以增加膽酸結合排出而這個機制可能是木耳造成肝臟膽固醇含量下降的主要機制[76]。先前研究指出，黑木耳萃取物中的多酚類不但可降低 HMG-CoA reductase 也增加了膽酸合成的速率限制酵素( $7\alpha$ -hydroxylase)，顯示可增加肝臟內膽固醇轉換成膽酸的能力達到降低肝臟膽固醇含量[69]，Del Bas 等人研究指出紅酒多酚透過調節膽酸，促進  $7\alpha$ -hydroxylase 作用來降低肝臟膽固醇[135]。由本實驗結果發現，給予高劑量及低劑量木耳萃取物(HO 及 LO 組)可以降低肝臟內的膽固醇含量，和 Control 組沒有顯著差異(可回復至與正常組相似的情況)，而高脂飲食後恢復到正常飲食的 HC 組雖然和 HO 及 LO 組沒有差異但和 Control 組相比顯示增加了肝臟膽固醇的含量，由此可知毛木耳的豐富纖維、多醣量及多酚具有降膽固醇的作用。

過量攝取高熱量飲食尤其是高脂飲食，在發展成 NASH 或者是 NAFLD 上扮演著決定性的角色，研究顯示高脂飲食會增加大鼠肝臟的 SREBP-1c、FAS 及 ACC 的轉錄作用但會降低 PPAR- $\alpha$  的轉錄作用[136]，



而 SREBP-1c 負責調節膽固醇、三酸甘油酯及 VLDL 的合成[137]，PPAR- $\alpha$  可調節肝臟及粒線體中脂肪酸的  $\beta$ -氧化作用[138]，而 SREBP-1c 及 PPAR- $\alpha$  在 NAFLD 的病理進程上扮演著重要的角色[139]。肝臟脂質代謝機制分成三方面：(1)重新合成及汲取游離脂肪酸(2)肝臟  $\beta$ -氧化作用及重新合成三酸甘油酯(3)以三酸甘油酯及 VLDL 型式釋出肝臟中的游離脂肪酸[140]，肝臟脂肪酸可以來自不同的方式，可以從外源性如飲食、脂肪細胞的脂解作用釋放出來又或者是從肝臟內生性合成(*de novo lipogenesis*)而來，無論當三酸甘油酯的運輸、合成、輸出或是氧化作用在任何一種路徑下失去平衡都會造成脂質堆積在肝臟[141]，而給予高脂飲食會造成肝臟脂質堆積已在動物及人體試驗中得到證實，給予脂質飲食會經由降低 GLUT4 的表現而導致胰島素阻抗並增加肌肉及肝臟脂質的積聚[142]，肥胖已知和胰島素阻抗有很大的關係，會降低脂肪組織對胰島素的敏感性，如此不但導致脂肪組織中的 TG 脂解作用增加且會抑制脂肪組織攝入脂肪酸，這些作用皆會增加 FFA 運輸到肝臟[143]，在本研究顯示餵食十二週的高脂飲食後顯著增加肝臟三酸甘油酯的含量形成脂肪肝，脂肪肝會降低胰島素抑制葡萄糖及極低密度脂蛋白製造而這個結果會造成高血糖、高胰島素血症、高三酸甘油酯血症導致降低高密度脂蛋白的含量[144]，研究顯示餵食不可溶性纖維質可以顯著增加調節肝臟脂質恆定轉錄因子(*Foxa2* 及 *Pgc-1 $\beta$* )的表現，兩者共同表現可促使粒線體  $\beta$ -氧化作用的酵素基因表現量增加，降低肝臟脂質堆積[145]。降低胰島素的清除率已知和脂肪肝的形成有關[146]，而增加胰島素敏感性可降低肝臟中脂質含量[147]，給予  $\beta$ -葡聚糖可降低肝臟中 TG 含量和降低血漿中胰島素含量有關， $\beta$ -葡聚糖也可降低 FAS mRNA 的表現量，顯示降低肝臟脂質堆積可能是因降低 *fatty acid synthase* 有關[92]。黑木

耳萃取物中的多酚化合物具有降低肝臟中三酸甘油酯含量[69]作用，在本實驗餵食高劑量毛木耳萃取物和高脂飲食組比可以顯著降低肝臟中 TG 含量及改善胰島素抗性，相較於高脂飲食後恢復正常飲食的 HC 組，額外添加高劑量毛木耳萃取物顯示更可改善肝臟 TG 含量，可能是因毛木耳中的  $\beta$ -葡聚糖可以增加胰島素敏感性及脂肪酸合成酵素作用的效果。

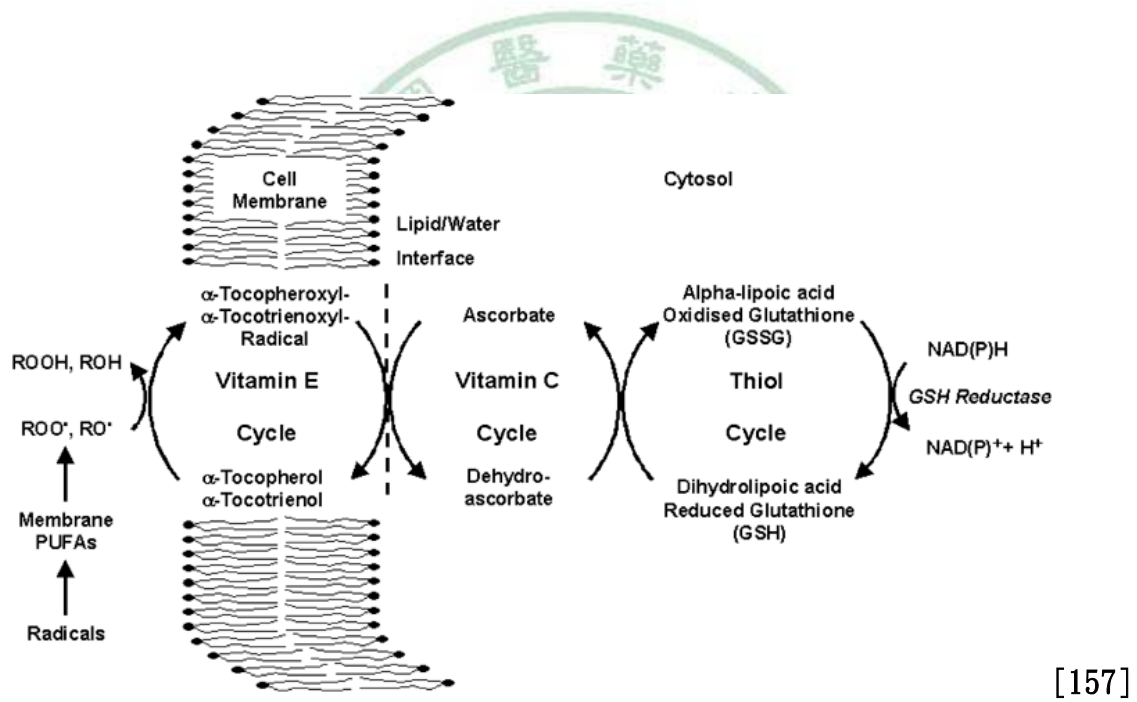
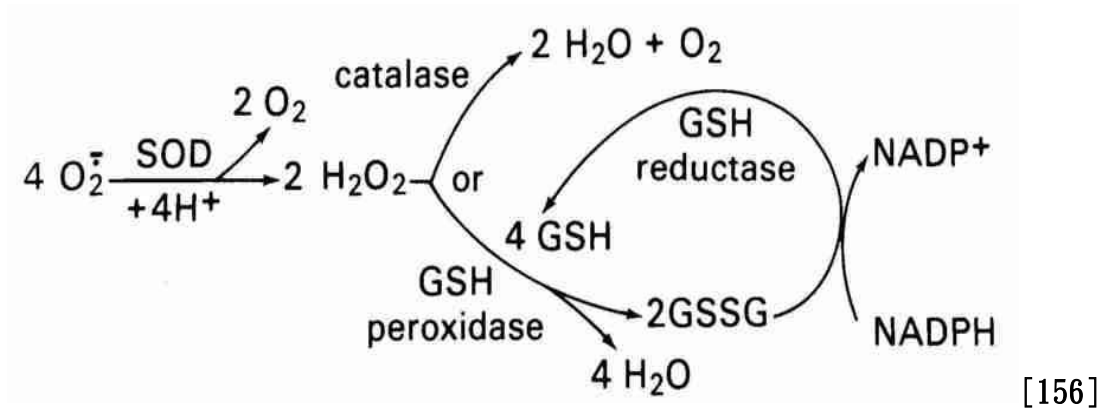




## 七、 毛木耳萃取物改善血漿及肝臟內脂質過氧化程度

脂質過氧化會產生醛類，而 MDA 被認為是最重要的脂質過氧化終產物，也為氧化壓力的指標，當體內的 MDA 含量減少，表示降低了體內脂質過氧化作用及氧化壓力[148]，高膽固醇血症會造成氧自由基的增加，形成脂質過氧化作用，增加 MDA 的產生[149]，血漿中的脂質過氧化作用是用 TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)測得，當血漿中的 TBARS 增加表示降低了體內的抗氧化狀態[150]。三酸甘油酯及游離脂肪酸的增加會造成三酸甘油酯堆積在非脂肪組織，包括肝臟並會造成脂質的過氧化作用[151]，NAFLD 病人會增加體內的氧化壓力及脂質過氧化程度，而糖尿病、胰島素阻抗也是促使脂肪肝氧化壓力及脂質過氧化作用很重要的狀態[152]，Acharya 作者等人指出黑木耳萃取物可以增加清除羥基自由基及抑制脂質過氧化程度[153]，黑木耳萃取物也可降低 benzo( $\alpha$ )pyrene-treated 小鼠肝損傷及脂質過氧化程度[154]，而黑木耳多醣體也可透過增加老化老鼠體內 SOD 及 GPx 的抗氧化能力來降低體內 MDA 含量[94]；給予餵食高膽固醇飲食老鼠黑木耳萃取物可透過體內總抗氧化能力來降低血漿中 MDA 含量[69]。研究指出維生素 E 可以中斷脂質連鎖反應，降低脂質的過氧化程度[155]，在本實驗給予高脂飲食的老鼠顯著增加血漿及肝臟中的 MDA 含量，而相較於高脂飲食後恢復到正常飲食的 HC 組，攝取額外添加高劑量的毛木耳萃取物可以顯著降低血漿及肝臟中 MDA 含量而低劑量毛木耳萃取物只降低肝臟中 MDA 含量，可能是毛木耳萃取物透過增加抗氧化能力及維生素 E 含量而降低體內脂質過氧化程度。

八、 毛木耳萃取物對於抗氧化作用的影響



此二圖示為體內抗氧化防禦系統機制圖

當體內的促氧化物與抗氧化物狀態不平衡就會產生氧化壓力，研究顯示 NASH 會消耗體內抗氧化酵素(Glutathione、維生素 E、維生素 C)及/或者是增加體內自由基的產生[152]，NASH 病人體內的抗氧化狀態顯然無法抵銷體內的氧化壓力，可能是因脂肪炎會誘導產生脂質過氧化

作用及 ROS，進而消耗體內的抗氧化酵素及維生素含量[158]，菇類中富含不同的抗氧化物質像是多醣體、麥角固醇(ergosterol)、菸酸、nicotinic acid、三帖類化合物(triterpenes)及酚酸化合物(phenolic compounds)，具有很好的抗氧化能力[159]。毛木耳萃取物顯示能抑制脂質過氧化作用、可清除自由基及螯合金屬離子能力並具有很好的抗氧化能力[67]，Hua Zhang 作者等人指出給予老化老鼠黑木耳萃取物顯示可以增加體內 SOD 及 GPx 抗氧化能力，提高了體內抗氧化系統的抗氧化能力[94]，在本實驗給予高脂飲食誘導的 NASH 動物模式顯示和前人研究 NASH 模式相同，都顯著降低肝臟內的抗氧化酵素(GR、GPx、SOD)[160]，而給予高劑量之毛木耳萃取物可以增加肝臟中 GR、GPx 及 SOD 含量，可能是因毛木耳萃取物含有豐富的抗氧化物質進而改善體內的抗氧化能力。GR、GPx、SOD、Catalase 為體內的第一道抗氧化防禦系統，SOD 主要是催化  $O_2^-$  成  $H_2O_2$  而 Catalase 催化  $H_2O_2$  成  $H_2O$  及氧，GPx 也可透過降低體內的  $H_2O_2$  及脂質過氧化成  $H_2O$ ，而維生素 E 及維生素 C 為體內的第二道防禦系統，維生素 C 可直接作用於自由基像是  $O_2^-$ 、OH 基[161]。維生素 E 可中斷自由基引起的脂質連鎖反應，維生素 E 在脂質的過氧或作用及細胞膜穩定上扮演著重要角色，而維生素 E 可以保護不飽和脂肪酸的脂質過氧化作用來穩定細胞膜[155]，研究顯示有 NASH 病人血漿中維生素 E 含量通常較低[162]，在本實驗中餵食高脂飲食顯著降低肝臟及血漿中的維生素 E 含量，而給予毛木耳萃取物可以顯著增加體內的維生素 E 含量，研究指出植物萃取物的抗氧化活性及清除自由基的能力可能是因含有抗氧化的化合物例如酚酸、維生素 C、tocopherols 及 carotenoids[74]，而毛木耳含有維生素 C、 $\alpha$ -tocopherol、 $\beta$ -tocopherol、 $\gamma$ -tocopherol、 $\delta$ -tocopherol 與豐富的多酚含量及單寧等抗氧化物質[67]，

Catalase 方面，Catalase 和 GPx 共同作用於 SOD 抗氧化所產生的  $H_2O_2$ ，將  $H_2O_2$  轉換成  $H_2O$  [161]，在本實驗給予高脂飲食組的老鼠肝臟中 GPx 含量顯著降低而 Catalase 含量卻增加，推測可能是因體內 GPx 含量不足以將  $H_2O_2$  轉換成  $H_2O$ ，促使 Catalase 作用代償性的增加，在酒精性脂肪肝病人士身上也發現血漿中 SOD 含量顯著增加是因代償性作用來降低體內的氧化壓力，SOD 視為一個氧化壓力指標[48]，在其他組間的 Catalase 含量顯著降低可能是因 GPx 足以代謝體內  $H_2O_2$ ，catalase 得以節省因而使其不被活化所致。

雖然膳食纖維可透過(1)移除腸道中或結腸中的抑制劑，(2)移除高脂飲食造成腸道菌叢合成的毒性物質，會毒化酵素，(3)膳食纖維中的組成物會活化抗氧化酵素，來提高體內的抗氧化酵素系統活性，給予膳食纖維(30%)可以透過控制自由基的形成來降低脂質過氧化作用的形成 [163]，Orange 及 lime peels 兩種高纖維含量相等，但只有 lime peels 顯示出具有很強的抗氧化能力，這樣的差異可能是因 lime peels 內所含的多酚(ellagic acid、quercetin 及 Kaempferol)作用[164]。先前雖然已研究指出麵包中添加黑木耳多醣體確實可以增加清除自由基能力[70]而給予高膽固醇飲食老鼠毛木耳多醣體可提高體內抗氧化能力的效果[75]，但在本實驗室先前餵食卵巢切除大鼠毛木耳子實體與萃取物，發現給予子實體並不能改善脂質過氧化作用。研究顯示給予餵食高膽固醇及一般飼料老鼠老鼠上高纖維(3.5g/day)和高纖維額外添加富含多酚類的 Cocoa fiber (多酚佔 0.1g/day)，給予 Cocoa fiber 可降低血漿及肝臟中 MDA 含量增加體內的抗氧化酵素(GR、GPx)，顯示 Cocoa fiber 內的多酚不管在有氧化壓力下或正常狀況下都能具有抑制脂質過氧化作用的情形 [165]，攝取多酚可透過增加體內抗氧化酵素系統來降低氧化壓力對肝臟



的損傷[166]，如表七所示，在本實驗 HC 飼料(1.8g/day)和 HO 飼料(2.2g/day)的纖維含量僅差 0.4g，卻能抑制體內脂質過氧化作用、增加體內的抗氧化作用，顯示可能是毛木耳萃取物中的多酚含量(0.3g/day)協同作用所具效果。





## 九、 毛木耳萃取物對於發炎反應指標的影響

本實驗結果發現餵食高脂飲食的老鼠和控制組相比顯著增加肝臟內 TNF- $\alpha$  及 IL-6 濃度。內臟脂肪組織會透過分泌 TNF- $\alpha$  來影響 NASH 的病理進程，臨床上 NASH 和單純的脂肪肝病人相較之下有較高的 TNF- $\alpha$  表現量[167]，研究顯示游離脂肪酸會透過促進肝臟脂肪毒性作用 (lipotoxicity) 誘導 TNF- $\alpha$  的產生，而 TNF- $\alpha$  會透過 TNF $\alpha$ -receptor 活化 NF- $\kappa$ B，為許多促發炎激素的轉錄因子[168]，TNF- $\alpha$  接著會更加促進肝臟的脂質合成作用造成肝臟脂質堆積，顯示 TNF- $\alpha$  也是造成 NASH 病理進程上重要的決定因子[169]。

TNF- $\alpha$  也會促進粒線體生成 ROS 導致肝細胞凋亡，引發肝細胞發炎[143]，在 NASH 動物模式及病人身上發現若可以降低 TNF- $\alpha$  的生成就可以改善脂肪肝的現象，顯示 TNF- $\alpha$  表現增加和脂肪肝的形成具有相關性[170]。脂肪酸會誘導肝細胞內激酶的傳遞路徑例如 IKK $\beta$  轉錄因子，促使肝細胞內 TNF- $\alpha$  及 IL-6 的生合成[168]。研究顯示給予高脂飲食會造成肝臟粒線體內過多的脂肪酸氧化而產生過氧化產物，而活化了 IKK $\beta$  路徑，降低胰島素傳遞路徑造成胰島素阻抗[171]。氧化游離脂肪酸引起慢性的氧化壓力會增加細胞激素的分泌例如 TNF- $\alpha$  及 IL-6[172]，而 IL-6 會促進 SOCS3(suppressor of cytokine signaling 3)的表現並造成胰島素阻抗的現象[173]，先前研究指出在 Carrageenin 誘導的發炎反應試驗中發現給予老鼠黑木耳多醣體可以改善足蹠的腫脹程度[77]，而在本實驗看到給予毛木耳萃取物可以顯著降低體內的發炎反應，改善 NASH 的 second hit。

研究指出，酚酸除了具有很好的抗氧化作用也具有抗發炎作用

[174]，可以螯合金屬能力、抑制脂氧化酶 (lipoxygenase)及清除自由基 [175]，毛木耳中的酚類又以 Gallic acid、Tannic acid、protocatechuic acid 為主 [68]，而這些酚類物質顯示可透過清除超氧陰離子、myeloperoxidase、降低 IL-6、TNF- $\alpha$ 、C-反應蛋白、單核球趨化蛋白 (MCP-1)作用並增加體內 GSH 含量來達到抗發炎與抗氧化的作用 [176-178]。



## 十、 毛木耳萃取物對於 CYP4A 表現量之影響

CYP4A 參與微粒體的  $\omega$ -氧化作用，當粒線體內及過氧化小體脂質過氧化作用過度增加時會誘導 CYP4A 表現量增加， $\omega$ -氧化作用會引起毒性二羧基脂肪酸(dicarboxylic fatty acid)產生過氧化氫因而造成細胞損傷[179]，而 CYP4A 和 CYP2E1 共同作用微粒體中的脂肪酸的羥基化作用(hydroxylation)，可引起脂質過氧化作用[27]，雖然微粒體脂肪酸氧化作用佔較小的路徑，但在糖尿病或營養過度狀態導致肝臟脂質代謝紊亂上，CYP4A 扮演著重要調節性角色。小鼠缺乏 acyl CoA oxidase(AOX) 顯示會增加會造成粒線體的損傷，促進形成 NASH[180]，缺乏 AOX 造成長鏈脂肪酸積聚在肝臟促使 PPAR- $\alpha$  活化而使 CYP4A 表現增加，而 CYP4A 調節長鏈脂肪酸的氧化作用，增加過氧化氫產生而造成細胞損傷及脂肪肝炎的形成，在 NASH 病人身上也發現會促進 PPAR- $\alpha$  表現[27]，而在 NASH 動物模式上看到 CYP4A 表現量增加[37]，在本實驗餵食高脂飲食組(HFD 組)和 Control 組相比，顯著增加肝臟中 CYP4A 表現量，脂質過氧化程度也同時增加，顯示增加肝臟內的氧化壓力，而給予毛木耳萃取物(HO 及 LO 組)和 HC 組相比，在肝臟 CYP4A 表現量上並沒有看到有顯著降低的效應。

## 十一、毛木耳萃取物對於脂肪酸組成之影響

有許多研究指出，長鏈多元不飽和脂肪酸及其 eicosanoid 產物可直接作用於脂肪酸，降低儲存成三酸甘油酯型式，有利於形成氧化作用，增加葡萄糖轉換成肝糖的形式[181]。增加體內肝臟脂肪細胞的大小和降低肝臟中 C20:5,n-3 比例有關[182]，但在本實驗中給高脂飲食組(HFD 組)並沒有看到此現象。NAFLD 病人顯示會降低肝臟中 PUFA(polyunsaturated fatty acid)含量，可能會擾亂肝臟脂質代謝的能力而造成大量三酸甘油酯積聚在肝臟形成脂肪肝有關[183]，因長鏈多元不飽和脂肪酸會誘導 PPAR- $\alpha$  轉錄而促進脂肪酸的氧化作用[184]。研究顯示有脂肪肝的肥胖病人增加肝臟中三酸甘油酯的積聚和降低 PUFA 有關，尤其是磷脂質上的 n-3 序列，並會降低 C20:4,n-6/C18:2,n-6 及(C20:5,n-3+C22:6,n-3)/C18:3,n-3 比例[183]，在本實驗雖然給予高脂飲食組肝臟中的 PUFA 含量和 Control 組無顯著差異，但給予高劑量的毛木耳萃取物和 HFD 組相比顯著增加肝臟中的 PUFA 含量，並增加了 C20:4,n-6/C18:2,n-6 比例及(C20:5,n-3+C22:6,n-3)/C18:3,n-3 比例，顯示可能是攝取高劑量毛木耳萃取物改善了肝臟中 TG 含量有關，在肝臟切片上也明顯看到降低肝臟脂肪滴泡的含量。和正常人相比，在 NAFLD 病人身上也看到會增加肝臟中 n-6/n-3 的比例，顯示長鏈脂肪中的 n-3 相較於 n-6 更能誘導 PPAR- $\alpha$  的活化促進脂質的氧化作用[185]，在本實驗也看到給予高劑量毛木耳萃取物可以顯著增加肝臟中 n-3 比例，降低肝臟脂質堆積。在末期肝臟疾病(End-stage liver disease)顯示會降低血漿中的長鏈多元不飽和脂肪、C20:4,n-6 含量[186]而肥胖會降低  $\Delta$ -5 desaturases 活性[187]，在本實驗給予高脂飲食誘導的 NASH 動物模式(HFD 組)也觀察到此現象，給予毛木耳萃取物可以增加 C20:4,n-6 含量，雖然和 control 組比無顯著差



異；在 NAFLD 病人身上發現會降低肝臟中多元不飽和脂肪酸 product/precursor 比例和降低形成 n-6 及 n-3 脂肪酸的  $\Delta$ -6、 $\Delta$ -5 desaturases 活性[183]，而用蔗糖誘導成胰島素阻抗的老鼠中顯示會增加肝臟中  $\Delta$ -6、 $\Delta$ -5 及  $\Delta$ -9 的酵素活性[188]，在本實驗高脂飲食誘導的老鼠和 Control 組比起來顯著增加  $\Delta$ -5 及  $\Delta$ -9 的酵素活性，在  $\Delta$ -6 酵素活性上無顯著差異。在血漿結果方面，Sjögren P 作者等人指出在胰島素阻抗病人身上血漿中的  $\Delta$ -6 及  $\Delta$ -9 酵素活性增加，並同時降低了  $\Delta$ -5 的酵素活性[189]，在轉殖基因 NASH 動物模式上也看到會降低血漿中  $\Delta$ -6 酵素活性，增加  $\Delta$ -5 的酵素活性[190]，而在本實驗中和 Control 組相比，HFD 組血漿中卻同時增加  $\Delta$ -6、 $\Delta$ -5 及  $\Delta$ -9 的酵素活性，顯示 desaturases 和胰島素阻抗及肝臟脂肪炎的相關機制並不是很明確，可能和不同的實驗動物模式所產生的胰島素阻抗程度不同有關[191]。





## 十二、 功效成份及劑量討論

雖然膳食纖維降低發炎反應有兩種可能機制已被提出，第一種:膳食纖維可透過降低葡萄糖及脂質氧化作用維持健康腸道狀態，第二種膳食纖維可透過干擾脂肪細胞激素，增加脂質及親脂化合物的腸肝循環[192]。餵食 Zucker 肥胖老鼠 10% $\beta$ -glucan(約 2-3 克/天) 15 週顯示可增加體內的 GSH 含量、降低脂質過氧化作用，但在 TNF- $\alpha$  表現量上卻沒有明顯的降低，在本實驗給予老鼠的毛木耳萃取物纖維質 0.4725g 遠遠少於 10%  $\beta$ -glucan 含量卻具有同時降低血漿及肝臟脂質過氧化作用、肝臟 TNF- $\alpha$  及 IL-6 含量，顯示可能是毛木耳萃取物中的多酚含量作用不僅只是水溶性纖維的效果[193]。

在全國健康暨營養體檢調查(NHANES)顯示攝取纖維質高達 24.7g/day 和攝取低纖維質的(7.7g/day)相比，可降低血漿中的 IL-6 含量 [194]，本實驗 HO 組大鼠攝取的總纖維質換算成 60kg 的人所攝取的纖維質(毛木耳 4.7g+Chow diet 17.58g)為 22.28g，雖然和研究調查的高纖維含量差不多，但相較於本實驗 HC 組所攝取的纖維質(17.85g)只差了四克左右，確有顯著降低肝臟中 TNF- $\alpha$  及 IL-6 含量，另一個人體試驗顯示攝取纖維質高達 25-30 g/day 具有降低 C-反應蛋白[195]，更可證實雖然大量的膳食纖維具有抗發炎的效果，但在本實驗的攝取毛木耳萃取物組纖維含量並沒有超過文獻參考劑量，因此我們可推論不僅僅是高纖維的作用，可能還有多酚、抗氧化物質所作用而得到的結果。

在本實驗室先前研究給予 1.25g/kgBW 毛木耳子實體及 0.5g/kgBW 毛木耳萃取物對於卵巢切除大鼠血中脂質代謝及脂質過氧化作用的影響，毛木耳萃取物可以顯著降低血漿中 TG、TC 及 LDL-C 含量[196]，

而未經萃取的毛木耳子實體雖然可以降血漿中 TG 及 TC 但卻無法達到有效降低血漿中 LDL-C 含量，毛木耳萃取物亦可降低血漿中 MDA，抑制脂質過氧化作用，比較其成分可發現毛木耳萃取物之總多酚含量較子實體( $0.739\pm 0.078\text{mg/g}$ )高於十倍之多，而兩者總多醣含量幾無差異( $302.33\pm 8.79$ )，且經萃取後可測得含有多酚之成分。和先前研究之萃取量比較，發現本實驗所使用之萃取物的多酚含量高於三倍[67, 68]，可知不只多醣，毛木耳萃取物所含的多酚可能也參與調節血脂及脂質過氧化作用。



## 第八章 結論

本實驗利用高脂飲食去誘導 NASH 動物模式，造成胰島素阻抗、血脂及肝臟脂質代謝異常，以及體內抗氧化酵素系統活性降低、增加肝臟中的發炎反應，成功誘導為 NASH 動物模式，在本研究中，給予 NASH 老鼠恢復正常飲食後並額外添加毛木耳萃取物四週後可以顯著降低胰島素阻抗、脂質代謝異常、脂質過氧化程度並提升體內抗氧化防禦系統能力降低肝臟內的發炎反應，顯示具有同時改善”two-hit”假說的效果，在肝損傷程度上也有明顯的改善效果，綜合以上結論，毛木耳萃取物可以有效改善高脂飲食所誘發的 NASH 動物模式所引起的肝損傷程度，未來可做為菇類保肝的保健食品新原料。



表八 餵食實驗飼料飲食 8 週後對大鼠肝指標的影響

Table 8 Effects of high fat diet on rats plasma parameters of liver.

	Control	HFD	HC	HO	LO
AST(U/L)	68.00±3.57 <sup>b</sup>	133.75±16.61 <sup>a</sup>	126.8±23.83 <sup>a</sup>	124.50±19.06 <sup>a</sup>	133.75±8.01 <sup>a</sup>
ALT(U/L)	37.33±0.88 <sup>b</sup>	57.67±4.18 <sup>a</sup>	52.67±2.75 <sup>a</sup>	62.2±3.84 <sup>a</sup>	65.5±7.77 <sup>a</sup>

1. Values are presented as mean ±SEM
2. Values shared with different superscripted letters are significant different from each group (P < 0.05).
3. Control: rats fed with laboratory rodent diet;HFD: rats fed with high fat diet;HC: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed on laboratory rodent diet for 4 weeks;HO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed on laboratory rodent diet supplemented with 1.5% APE;LO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed on laboratory rodent diet supplemented with 0.75% APE

表九 餵食實驗飼料飲食 8 週後對大鼠血脂質的影響

Table 9 Effects of high fat diet on blood lipid profiles in NASH rats

	Control	HFD	HC	HO	LO
Cholesterol(mg/dl)	46.67±2.03 <sup>b</sup>	69.13±6.94 <sup>a</sup>	64.17±2.80 <sup>a</sup>	69.00±2.85 <sup>a</sup>	69.75±5.02 <sup>a</sup>
Triglyceride(mg/dl)	37.33±1.20 <sup>b</sup>	57.75±5.28 <sup>a</sup>	51.50±3.03 <sup>a</sup>	54.20±3.84 <sup>a</sup>	50.83±2.90 <sup>a</sup>
LDL-C(mg/dl)	5.25±0.63 <sup>b</sup>	23.19±4.77 <sup>a</sup>	22.33±3.18 <sup>a</sup>	24.50±4.44 <sup>a</sup>	18.50±3.30 <sup>a</sup>
HDL-C(mg/dl)	14.20±0.66 <sup>a</sup>	6.00±1.14 <sup>b</sup>	7.00±1.00 <sup>b</sup>	7.2±1.39 <sup>b</sup>	7.75±0.75 <sup>b</sup>
VLDL-C(mg/dl)	26.67±1.45 <sup>b</sup>	47.80±5.56 <sup>a</sup>	43.00±2.97 <sup>a</sup>	45.67±4.35 <sup>b</sup>	46.17±6.01 <sup>a</sup>

1. Values are presented as mean ±SEM
2. Values shared with different superscripted letters are significant different from each group (P < 0.05).
3. Control: rats fed with laboratory rodent diet;HFD: rats fed with high fat diet;HC: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed on laboratory rodent diet for 4 weeks;HO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed on laboratory rodent diet supplemented with 1.5% APE;LO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed on laboratory rodent diet supplemented with 0.75% APE



表十 餵食實驗飼料飲食 8 週後對大鼠空腹葡萄糖、游離脂肪酸及脂質過氧化作用的影響

Table 10 Effects of high fat diet on Glucose AC、FFA and MDA in NASH rats

	Control	HFD	HC	HO	LO
Glucose AC(mg/dl)	142.67±4.67 <sup>b</sup>	168.83±4.85 <sup>a</sup>	176.66±8.83 <sup>a</sup>	171.67±4.37 <sup>a</sup>	170.5±12.93 <sup>a</sup>
FFA(nmol/μl)	0.36±0.02 <sup>b</sup>	0.66±0.11 <sup>a</sup>	0.58±0.05 <sup>a</sup>	0.59±0.08 <sup>a</sup>	0.60±0.23 <sup>a</sup>
MDA(μM)	14.86±0.68 <sup>b</sup>	21.49±0.60 <sup>a</sup>	20.59±0.85 <sup>a</sup>	20.82±0.94 <sup>a</sup>	21.10±1.09 <sup>a</sup>

1. Values are presented as mean ±SEM
2. Values shared with different superscripted letters are significant different from each group (P<0.05).
3. Control: rats fed with laboratory rodent diet;HFD: rats fed with high fat diet;HC: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed on laboratory rodent diet for 4 weeks;HO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed on laboratory rodent diet supplemented with 1.5% APE;LO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed on laboratory rodent diet supplemented with 0.75% APE
4. FFA:游離脂肪酸
5. MDA:丙二醛

表十一 毛木耳萃取物一般成分分析

Table 11 General components in *Auricula polytricha* extract (APE)

Ingredient	dry weight basis (%)
Fat	1.36
Fiber	89.77
Protein	5.15
Crude ash	1.92
Carbohydrate	1.80



表十二 毛木耳萃取物中主成分

Table 12 Major components in *Auricularia polytricha* extract (APE)

Ingredient	Total phenol gallic acid (mg/g)	Protein (mg/g)	Total sugar (mg/g)	Total flavone quercetin (mg/g)	Tannin (μg/g)
APE	9.10±0.08	103.70±2.00	332.50±9.50	8.49±0.07	841.70±15.90

1. Values are presented as mean ± SD.
2. APE : *Auricularia polytricha* extract.



表十三 毛木耳萃取物之抗氧化活性

Table 13 Antioxidant status of *Auricularia polytricha* extract (APE)

Antioxidant	DPPH	FRAP	TEAC
	%100 $\mu$ g/ml L-ascorbic acid	$\mu$ M trolox/g extract	$\mu$ M trolox/g extract
APE	45.92 $\pm$ 0.22	87.74 $\pm$ 0.51	127.20 $\pm$ 10.20

1. Values are presented as mean  $\pm$  SD.
2. APE : *Auricularia polytricha* extract.



表十四 毛木耳萃取物之可溶性纖維及不可溶性纖維含量□

Table 14 The soluble and insoluble fiber content in *Auricularia polytricha* extract (APE)

Fiber type	Soluble fiber % (W/W)	Insoluble fiber % (W/W)
APE	73.97±0.27	22.59±2.85

1. APE : *Auricularia polytricha* extract.





表十五 餵食實驗飼料飲食 12 週後對大鼠攝食量、體重、肝重、之影響

Table 15 Effects of APE on body weight, food intake and liver weight in NASH rats.

	Control	HFD	HC	HO	LO
Initial body weight(g)	191.1±2.7 <sup>a</sup>	189.7±2.8 <sup>a</sup>	187.2±4.6 <sup>a</sup>	193.1±1.4 <sup>a</sup>	184.1±2.6 <sup>a</sup>
Final body Weight(g)	427.9±12.0 <sup>b</sup>	496.7±16.0 <sup>a</sup>	458.7±20.0 <sup>ab</sup>	427.5±11.2 <sup>b</sup>	460.3±11.0 <sup>ab</sup>
Food intake(g/d)	37.63±0.26 <sup>a</sup>	35.33±1.15 <sup>a</sup>	35.09±1.92 <sup>a</sup>	35.73±0.80 <sup>a</sup>	36.89±0.72 <sup>a</sup>
Food efficiency(%)	14.26±0.56 <sup>b</sup>	19.09±1.23 <sup>a</sup>	17.69±1.13 <sup>ab</sup>	14.77±1.83 <sup>b</sup>	16.38±0.24 <sup>ab</sup>
Liver weight t(g)	11.40±0.43 <sup>c</sup>	21.98±1.29 <sup>a</sup>	14.57±0.62 <sup>b</sup>	14.86±0.81 <sup>b</sup>	16.98±0.55 <sup>b</sup>
HI	2.63±0.14 <sup>d</sup>	4.40±0.17 <sup>a</sup>	3.24±0.13 <sup>c</sup>	3.39±0.14 <sup>bc</sup>	3.70±0.11 <sup>b</sup>

1. Values are presented as mean ±SEM
2. Values shared with different superscripted letters are significant different from each group (P < 0.05).
3. Control: rats fed with laboratory rodent diet;HFD: rats fed with high fat diet;HC: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed on laboratory rodent diet for 4 weeks;HO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed on laboratory rodent diet supplemented with 1.5% APE;LO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed on laboratory rodent diet supplemented with 0.75% APE
4. HI: Hepatosomatic Index=Liver weight/Body weight×100%
5. Food efficiency=(Daily weight gain/Daily food intake)×100%

表十六 餵食實驗飼料 12 週後對大鼠肝功能指標之影響

Table 16 Effects of APE supplementation on rat plasma parameters of liver.

	Control	HFD	HC	HO	LO
AST(U/L)	71.14±1.16 <sup>b</sup>	113.00±19.10 <sup>a</sup>	87.33±7.95 <sup>ab</sup>	79.20±4.37 <sup>b</sup>	80.14±6.16 <sup>b</sup>
ALT(U/L)	31.43±1.39 <sup>b</sup>	92.88±26.02 <sup>a</sup>	45.80±3.34 <sup>ab</sup>	41.60±5.10 <sup>b</sup>	47.33±5.16 <sup>ab</sup>

1. Values are presented as mean ±SEM

2. Values shared with different superscripted letters are significant different from each group (P < 0.05).

3. Control: rats fed with laboratory rodent diet

HFD: rats fed with high fat diet

HC: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet for 4 weeks

HO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 1.5% APE

LO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 0.75% APE

表十七 餵食實驗飼料飲食 12 週後對大鼠血脂肪指標之影響

Table 17 Effects of APE supplementation on blood lipid profiles in NASH rats

	Control	HFD	HC	HO	LO
Cholesterol(mg/dl)	46.33±3.93 <sup>c</sup>	76.67±2.93 <sup>a</sup>	58.40±3.31 <sup>b</sup>	48.40±3.88 <sup>bc</sup>	49.43±2.43 <sup>bc</sup>
Triglyceride(mg/dl)	21.00±2.31 <sup>b</sup>	40.89±2.84 <sup>a</sup>	38.13±2.77 <sup>a</sup>	23.14±1.37 <sup>b</sup>	27.60±4.34 <sup>b</sup>
LDL-C(mg/dl)	16.14±0.59 <sup>c</sup>	38.00±3.22 <sup>a</sup>	23.60±2.46 <sup>b</sup>	18.40±1.36 <sup>bc</sup>	18.25±2.73 <sup>bc</sup>
HDL-C(mg/dl)	13.00±1.03 <sup>a</sup>	5.20±0.81 <sup>c</sup>	8.29±0.75 <sup>b</sup>	13.20±1.28 <sup>a</sup>	11.25±1.11 <sup>a</sup>
VLDL-C(mg/dl)	16.80±2.52 <sup>c</sup>	29.25±2.66 <sup>a</sup>	24.57±1.57 <sup>ab</sup>	20.43±1.61 <sup>bc</sup>	22.75±1.65 <sup>bc</sup>

1. Values are presented as mean ±SEM

2. Values shared with different superscripted letters are significant different from each group (P < 0.05).

3. Control: rats fed with laboratory rodent diet

HFD: rats fed with high fat diet

HC: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet for 4 weeks

HO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 1.5% APE

LO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 0.75% APE

表十八 餵食實驗飼料飲食 12 週後對大鼠血中餐前血糖、胰島素及 HOMA-IR 指標之影響

Table 18 Effects of APE supplementation on Glucose AC、Insulin concentration and HOMA-IR index in NASH rat

	Control	HFD	HC	HO	LO
Glucose AC(mg/dl)	139.00±7.05 <sup>b</sup>	171.30±5.60 <sup>a</sup>	161.57±8.20 <sup>a</sup>	133.57±7.39 <sup>b</sup>	141.00±2.06 <sup>b</sup>
Insulin(μg/L)	0.21±0.04 <sup>b</sup>	1.2±0.25 <sup>a</sup>	0.38±0.20 <sup>b</sup>	0.22±0.04 <sup>b</sup>	0.29±0.07 <sup>b</sup>
HOMA-IR	1.66±0.39 <sup>b</sup>	7.97±2.41 <sup>a</sup>	4.20±2.48 <sup>ab</sup>	1.91±0.44 <sup>b</sup>	2.52±0.55 <sup>b</sup>

1. Values are presented as mean ±SEM

2. Values shared with different superscripted letters are significant different from each group (P < 0.05).

3. Control: rats fed with laboratory rodent diet

HFD: rats fed with high fat diet

HC: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet for 4 weeks

HO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 1.5% APE

LO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 0.75% APE

4. HOMA-IR index : fasting serum glucose(mmol/L) × fasting serum insulin( μ U/mL)/22.5

表十九 餵食實驗飼料十二週後血漿中脂肪酸組成

Table 19 Plasma fatty acid profile in NASH rats

Fatty acid (wt%)	Control	HFD	HC	HO	LO
PUFA	29.42±1.41 <sup>a</sup>	24.39±0.56 <sup>b</sup>	24.35±0.57 <sup>b</sup>	22.81±0.87 <sup>b</sup>	23.29±0.93 <sup>b</sup>
n-6	26.09±1.18 <sup>a</sup>	22.13±0.52 <sup>b</sup>	22.04±0.45 <sup>b</sup>	21.04±0.78 <sup>b</sup>	21.16±0.80 <sup>b</sup>
n-3	3.33±0.28 <sup>a</sup>	2.26±0.16 <sup>b</sup>	2.32±0.14 <sup>b</sup>	1.77±0.14 <sup>b</sup>	2.13±0.13 <sup>b</sup>
C20:4n6	10.62±0.94 <sup>a</sup>	6.53±0.34 <sup>c</sup>	8.64±0.40 <sup>b</sup>	8.50±0.48 <sup>b</sup>	8.64±0.79 <sup>b</sup>
n-6/n-3	8.01±0.40 <sup>c</sup>	10.17±0.55 <sup>b</sup>	9.71±0.42 <sup>b</sup>	12.24±0.84 <sup>a</sup>	10.02±0.30 <sup>b</sup>
Δ6 desaturase	0.006±0.002 <sup>b</sup>	0.023±0.005 <sup>a</sup>	0.016±0.004 <sup>ab</sup>	0.011±0.002 <sup>ab</sup>	0.011±0.003 <sup>ab</sup>
Δ5 desaturase	0.023±0.003 <sup>b</sup>	0.060±0.008 <sup>a</sup>	0.035±0.003 <sup>b</sup>	0.026±0.003 <sup>b</sup>	0.031±0.003 <sup>b</sup>
Δ9 desaturase	0.073±0.013 <sup>b</sup>	0.119±0.011 <sup>a</sup>	0.088±0.005 <sup>b</sup>	0.090±0.004 <sup>b</sup>	0.075±0.009 <sup>b</sup>

1. Values are presented as mean ±SEM
2. Values shared with different superscripted letters are significant different from each group (P < 0.05).
3. Control: rats fed with laboratory rodent diet;HFD: rats fed with high fat diet;HC: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet for 4 weeks;HO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 1.5% APE;LO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 0.75% APE

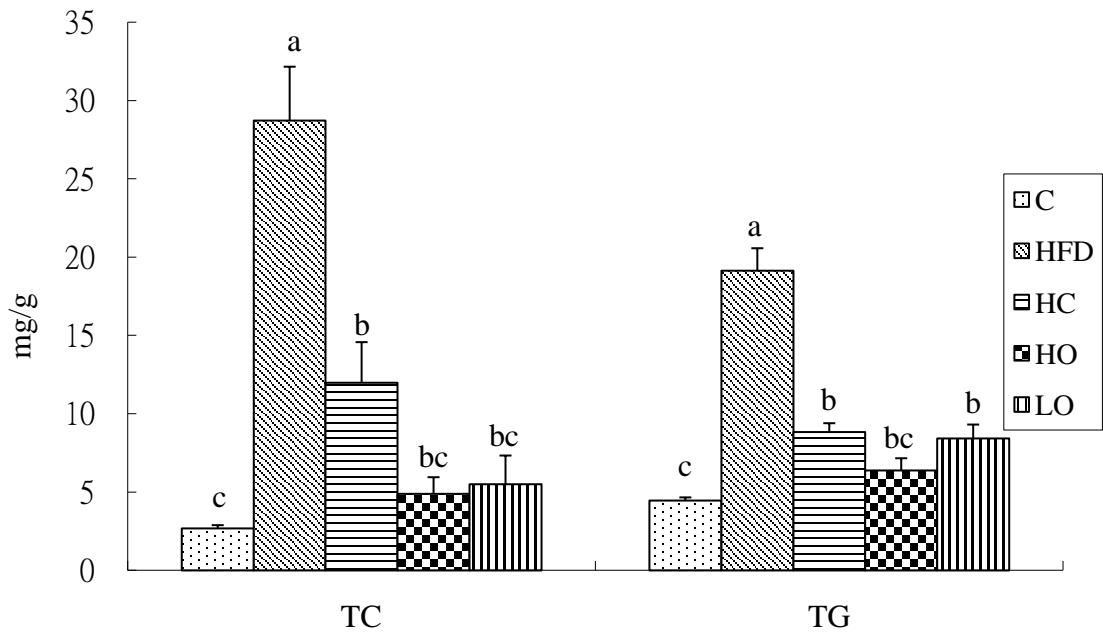


表二十 餵食實驗飼料十二週後肝臟磷脂質中脂肪酸組成

Table 20 Hepatic phospholipids fatty acid profile in NASH rats

Fatty acid (wt%)	Control	HFD	HC	HO	LO
PUFA	41.67±0.91 <sup>b</sup>	40.86±0.61 <sup>b</sup>	42.12±0.63 <sup>b</sup>	49.42±0.28 <sup>a</sup>	42.53±0.39 <sup>b</sup>
(C20:5+C22:6)/C18:3	109.78±19.76 <sup>a</sup>	51.84±11.18 <sup>b</sup>	72.64±7.97 <sup>ab</sup>	80.45±14.59 <sup>ab</sup>	71.87±11.25 <sup>ab</sup>
C20:4 /C18:2	2.67±0.15 <sup>ab</sup>	1.73±0.12 <sup>c</sup>	2.53±0.13 <sup>b</sup>	3.11±0.15 <sup>a</sup>	2.98±0.25 <sup>ab</sup>
n-6/n-3	5.48±0.33 <sup>a</sup>	5.54±0.49 <sup>a</sup>	4.73±0.22 <sup>a</sup>	4.76±0.36 <sup>a</sup>	4.39±0.20 <sup>a</sup>
Δ6 desaturase	0.012±0.001 <sup>a</sup>	0.013±0.002 <sup>a</sup>	0.013±0.001 <sup>a</sup>	0.019±0.001 <sup>a</sup>	0.019±0.004 <sup>a</sup>
Δ5 desaturase	0.013±0.002 <sup>b</sup>	0.035±0.004 <sup>a</sup>	0.020±0.003 <sup>b</sup>	0.023±0.002 <sup>b</sup>	0.022±0.003 <sup>b</sup>
Δ9 desaturase	0.024±0.002 <sup>b</sup>	0.047±0.005 <sup>a</sup>	0.039±0.005 <sup>a</sup>	0.042±0.003 <sup>a</sup>	0.042±0.003 <sup>a</sup>

1. Values are presented as the mean ±SEM
2. Values shared with different superscripted letters are significant different from each group (P < 0.05).
3. Control: rats fed with laboratory rodent diet;HFD: rats fed with high fat diet;HC: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet for 4 weeks;HO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 1.5% APE;LO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 0.75% APE



圖三 餵食實驗飼料 12 週後之肝臟三酸甘油酯及肝臟膽固醇濃度

Figure 3 Liver triglyceride and cholesterol concentration in NASH rats

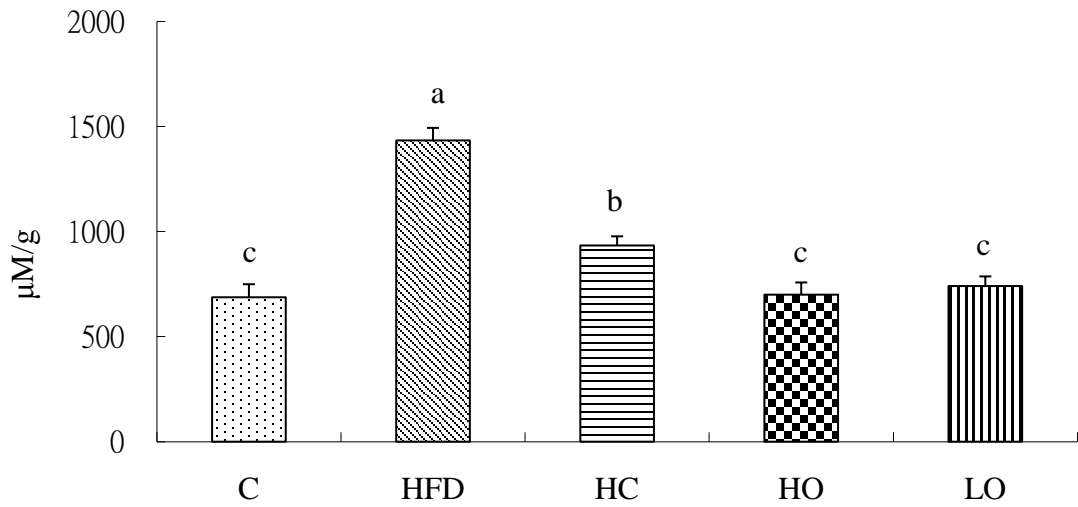
1. Values are presented as mean  $\pm$ SEM
2. Values shared with different superscripted letters are significant different from each group ( $P < 0.05$ ).
3. Triglyceride : 三酸甘油酯、cholesterol : 膽固醇
4. Control: rats fed with laboratory rodent diet

HFD: rats fed with high fat diet

HC: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet for 4 weeks

HO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 1.5% APE

LO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 0.75% APE



圖四 餵食實驗飼料 12 週後之肝臟丙二醛濃度

Figure 4 Liver MDA concentration in NASH rats

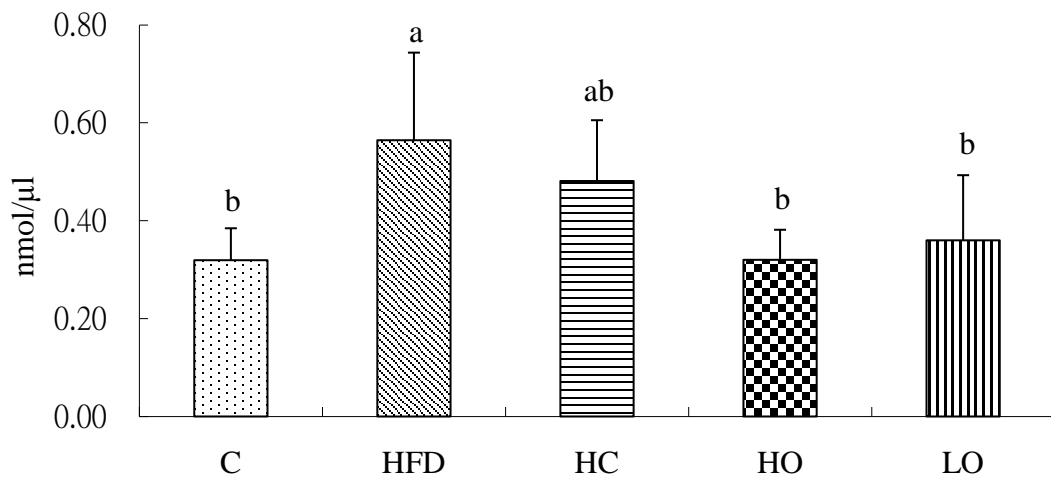
1. Values are presented as mean  $\pm$ SEM
2. Values shared with different superscripted letters are significant differences from each group ( $P < 0.05$ ).
3. MDA: 丙二醛
4. Control: rats fed with laboratory rodent diet

HFD: rats fed with high fat diet

HC: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet for 4 weeks

HO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 1.5% APE

LO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 0.75% APE



圖五 餵食實驗飼料 12 週後之血漿游離脂肪酸濃度

Figure 5 Plasma FFA concentration in NASH rats

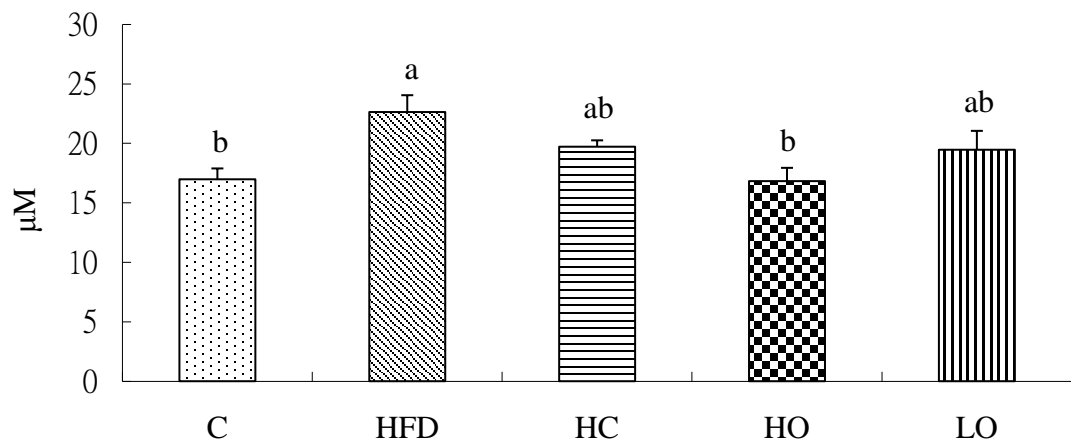
1. Values are presented as mean  $\pm$ SEM
2. Values shared with different superscripted letters are significant different from each group ( $P < 0.05$ ).
3. FFA : 血漿游離脂肪酸
4. Control: rats fed with laboratory rodent diet

HFD: rats fed with high fat diet

HC: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet for 4 weeks

HO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 1.5% APE

LO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 0.75% APE



圖六 餵食實驗飼料 12 週後之血漿丙二醛濃度

Figure 6 Plasma MDA concentration in NASH rats

1. Values are presented as mean  $\pm$ SEM
2. Values shared with different superscripted letters are significant different from each group ( $P < 0.05$ ).
3. MDA: 丙二醛
4. Control: rats fed with laboratory rodent diet

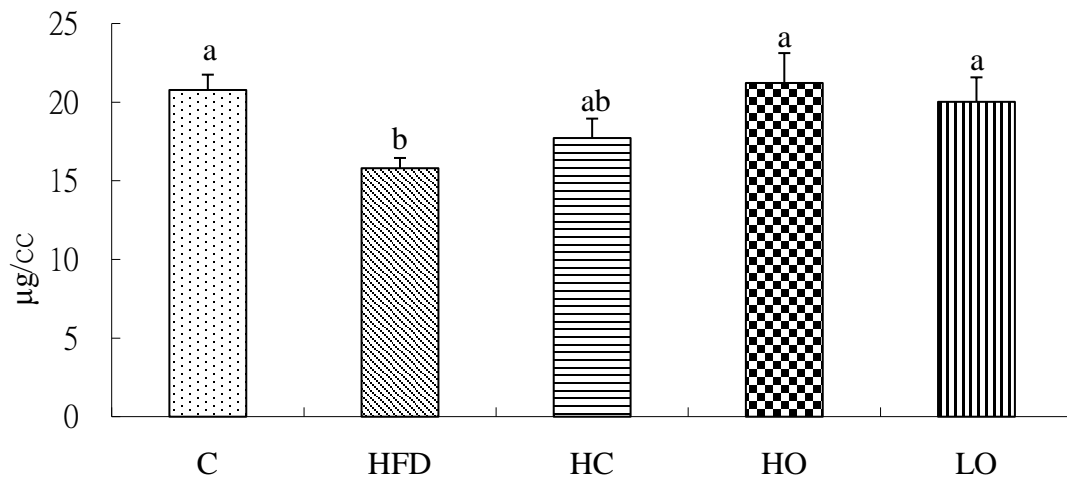
HFD: rats fed with high fat diet

HC: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet for 4 weeks

HO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 1.5% APE

LO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 0.75% APE





圖七 餵食實驗飼料 12 週後之血漿維生素 E 濃度

Figure 7 Plasma vitamin E concentration in NASH rats

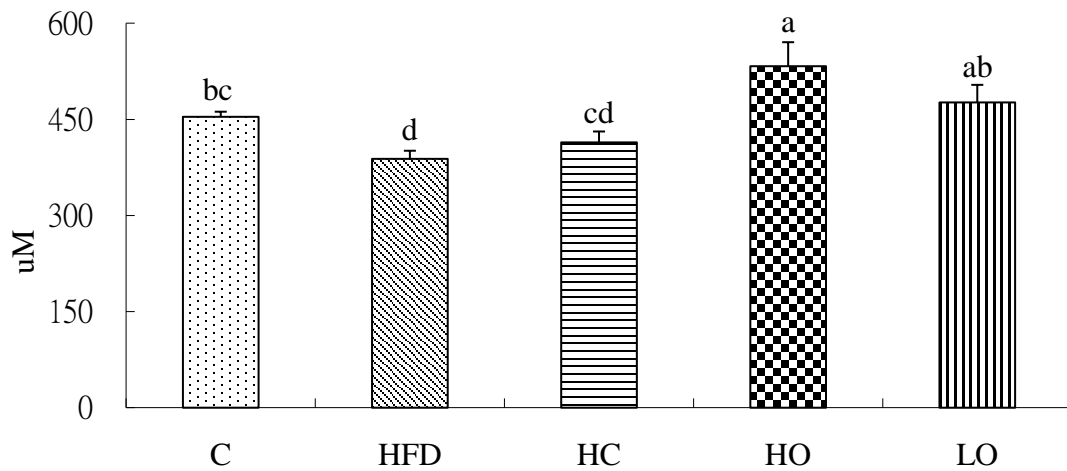
1. Values are presented as mean  $\pm$ SEM
2. Values shared with different superscripted letters are significant different from each group ( $P < 0.05$ ).
3. Control: rats fed with laboratory rodent diet

HFD: rats fed with high fat diet

HC: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet for 4 weeks

HO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 1.5% APE

LO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 0.75% APE



圖八 餵食實驗飼料 12 週後之血漿維生素 C 濃度

Figure 8 Plasma vitamin C concentration in NASH rats

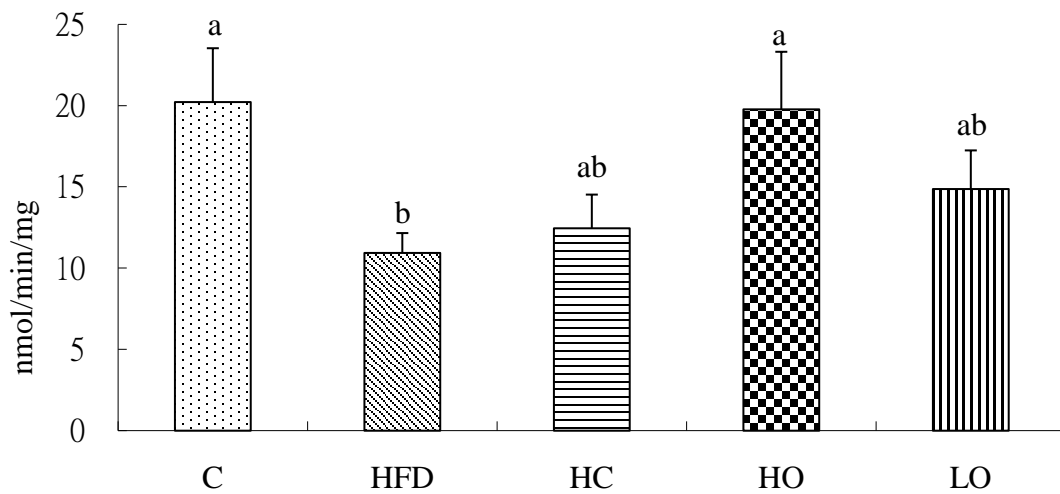
1. Values are presented as mean  $\pm$ SEM
2. Values shared with different superscripted letters are significant different from each group ( $P < 0.05$ ).
3. Control: rats fed with laboratory rodent diet

HFD: rats fed with high fat diet

HC: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet for 4 weeks

HO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 1.5% APE

LO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 0.75% APE



圖九 餵食實驗飼料 12 週後之肝臟 GR 濃度

Figure 9 Liver antioxidant enzyme of GR concentration in rats of different groups

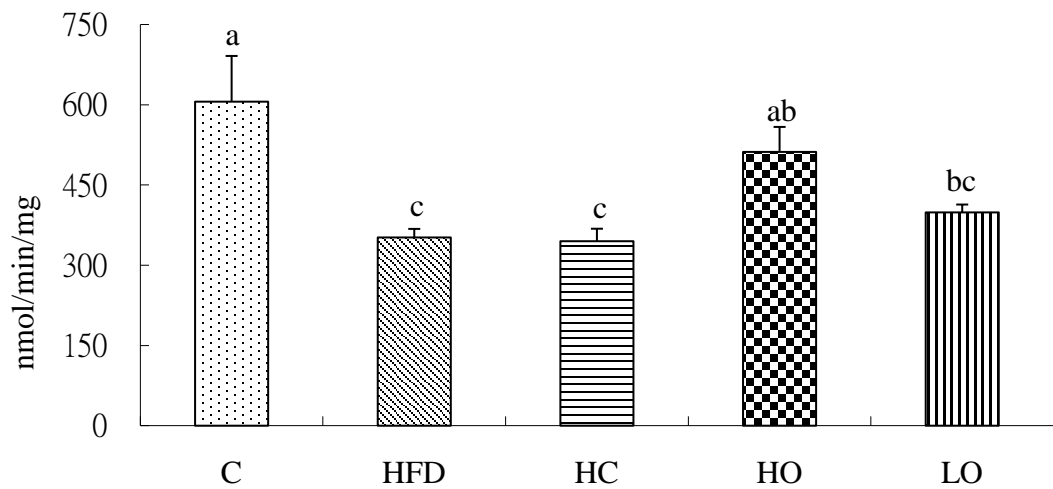
1. Values are presented as mean  $\pm$ SEM
2. Values shared with different superscripted letters are significant differences from each group ( $P < 0.05$ ).
3. GR: Glutathione reductase
4. Control: rats fed with laboratory rodent diet

HFD: rats fed with high fat diet

HC: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet for 4 weeks

HO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 1.5% APE

LO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 0.75% APE



圖十 餵食實驗飼料 12 週後之肝臟 GPx 濃度

Figure 10 Liver antioxidant enzyme of GPx concentration in rats of different groups

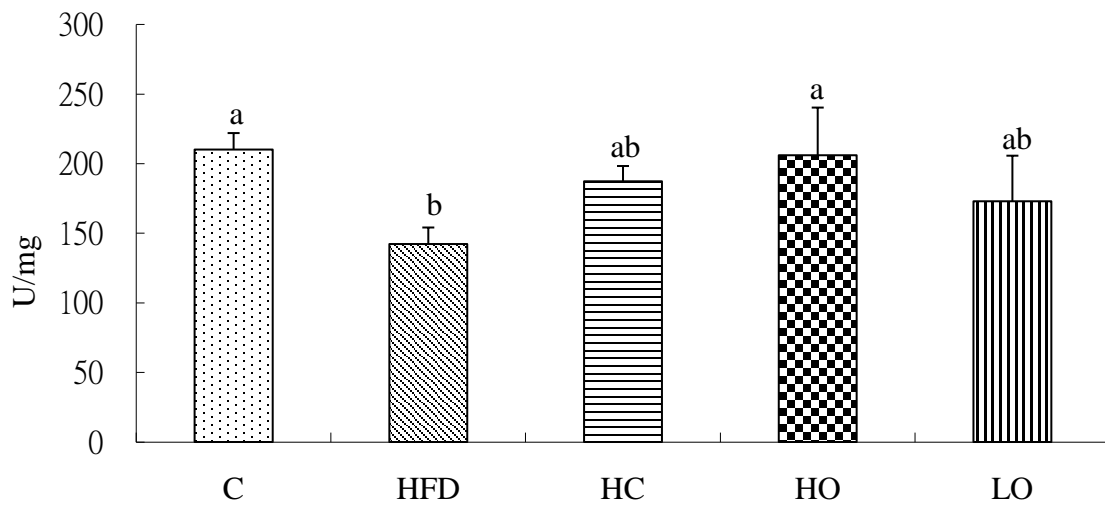
1. Values are presented as the mean  $\pm$ SEM
2. Values shared with different superscripted letters are significant differences from each group ( $P < 0.05$ ).
3. GPx: Glutathione Peroxidase
4. Control: rats fed with laboratory rodent diet

HFD: rats fed with high fat diet

HC: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet for 4 weeks

HO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 1.5% APE

LO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 0.75% APE



圖十一 餵食實驗飼料 12 週後之肝臟超氧歧化酶濃度

Figure 11 Liver SOD concentration in rats of different groups

1. Values are presented as mean  $\pm$ SEM
2. Values shared with different superscripted letters are significant different from each group ( $P < 0.05$ ).
3. SOD : 肝臟超氧歧化酶
4. Control: rats fed with laboratory rodent diet

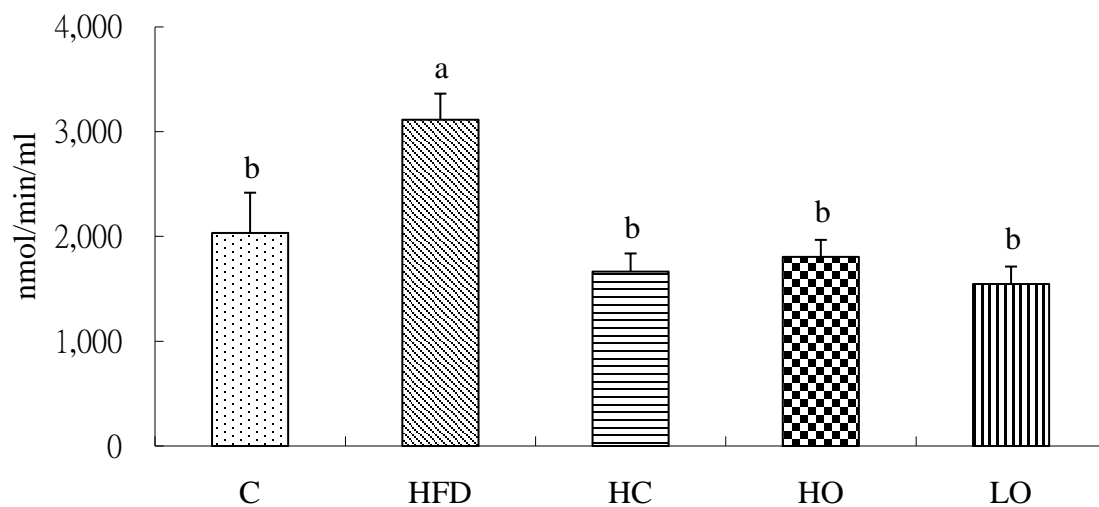
HFD: rats fed with high fat diet

HC: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet for 4 weeks

HO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 1.5% APE

LO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 0.75% APE





圖十二 餵食實驗飼料 12 週後之肝臟 catalase 濃度

Figure 12 Liver catalase concentration in rats of different groups

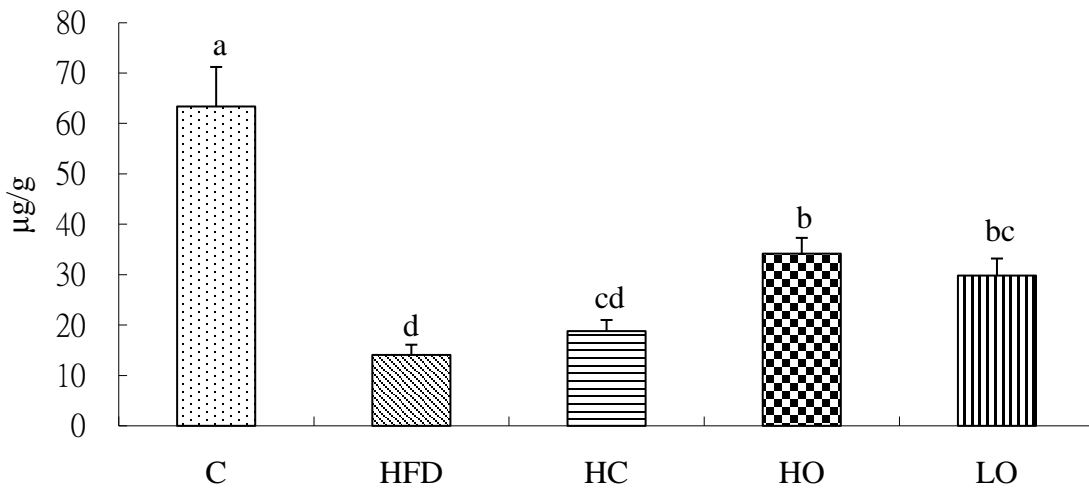
1. Values are presented as mean  $\pm$ SEM
2. Values shared with different superscripted letters are significant differences from each group ( $P < 0.05$ ).
3. Control: rats fed with laboratory rodent diet

HFD: rats fed with high fat diet

HC: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet for 4 weeks

HO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 1.5% APE

LO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 0.75% APE



圖十三 餵食實驗飼料 12 週後之肝臟維生素 E 濃度

Figure 13 Liver vitamin E concentration in rats of different groups

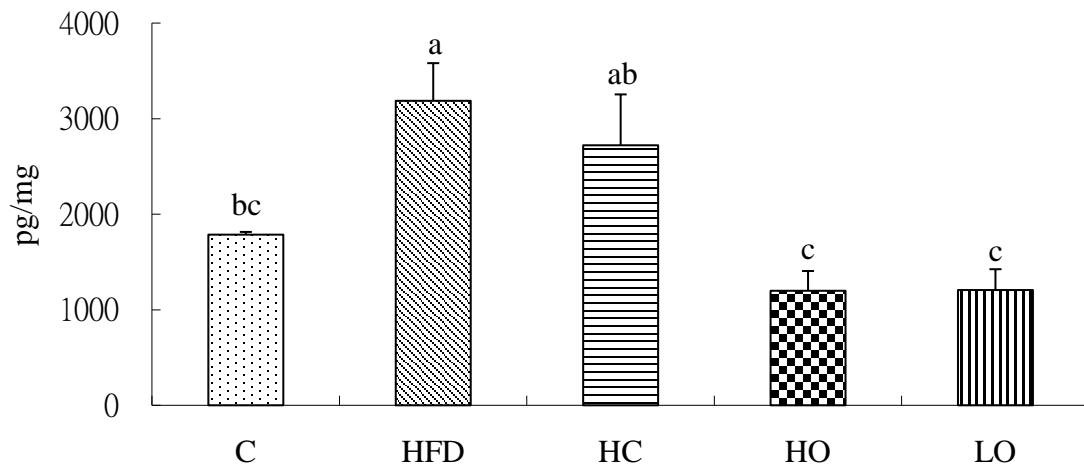
1. Values are presented as mean  $\pm$ SEM
2. Values shared with different superscripted letters are significant different from each group ( $P < 0.05$ ).
3. Control: rats fed with laboratory rodent diet

HFD: rats fed with high fat diet

HC: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet for 4 weeks

HO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 1.5% APE

LO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 0.75% APE



圖十四 餵食實驗飼料 12 週後之肝臟腫瘤壞死因子  $\alpha$  濃度

Figure 14 Hepatic concentrations of TNF- $\alpha$  in rats of different groups

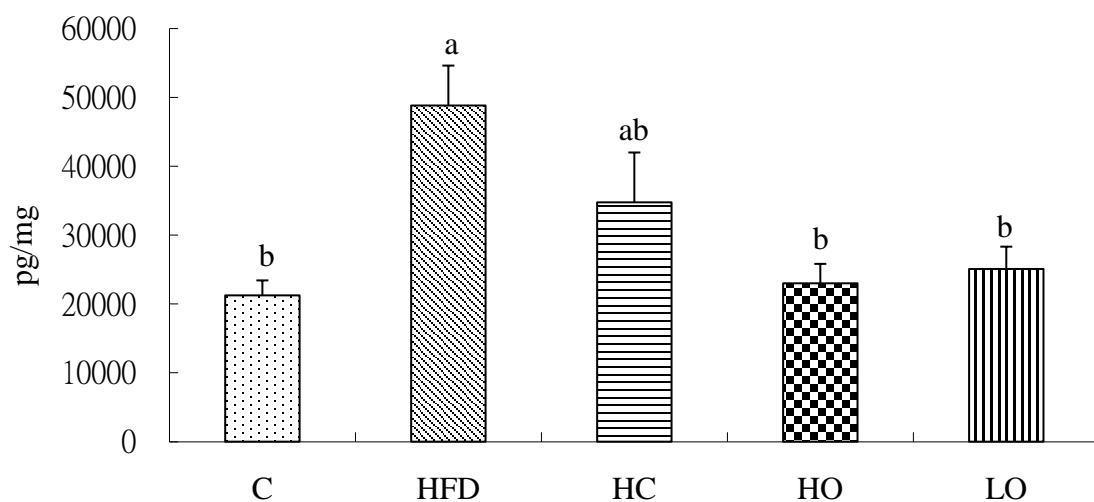
1. Values are presented as mean  $\pm$ SEM
2. Values shared with different superscripted letters are significant differences from each group ( $P < 0.05$ ).
3. TNF- $\alpha$  : 腫瘤壞死因子  $\alpha$
4. Control: rats fed with laboratory rodent diet

HFD: rats fed with high fat diet

HC: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet for 4 weeks

HO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 1.5% APE

LO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 0.75% APE



圖十五 餵食實驗飼料 12 週後之肝臟 IL-6 濃度

Figure 15 Liver IL-6 concentration in rats of different groups

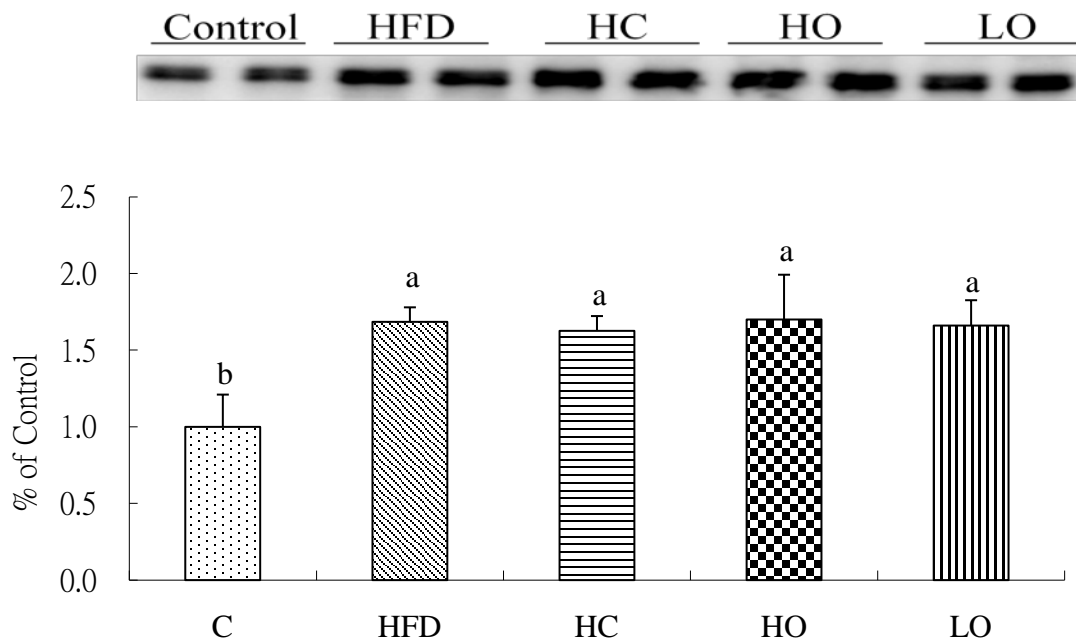
1. Values are presented as mean  $\pm$ SEM
2. Values shared with different superscripted letters are significant different from each group ( $P < 0.05$ ).
3. Control: rats fed with laboratory rodent diet

HFD: rats fed with high fat diet

HC: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet for 4 weeks

HO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 1.5% APE

LO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 0.75% APE



圖十六 餵食實驗飼料 12 週後之肝臟 CYP4A 表現量

Figure 16 Liver microsomal cytochrome P450 4A expression in rats of different groups

1. Values are presented as mean  $\pm$ SEM
2. Values shared with different superscripted letters are significant different from each group ( $P < 0.05$ ).
3. Control: rats fed with laboratory rodent diet

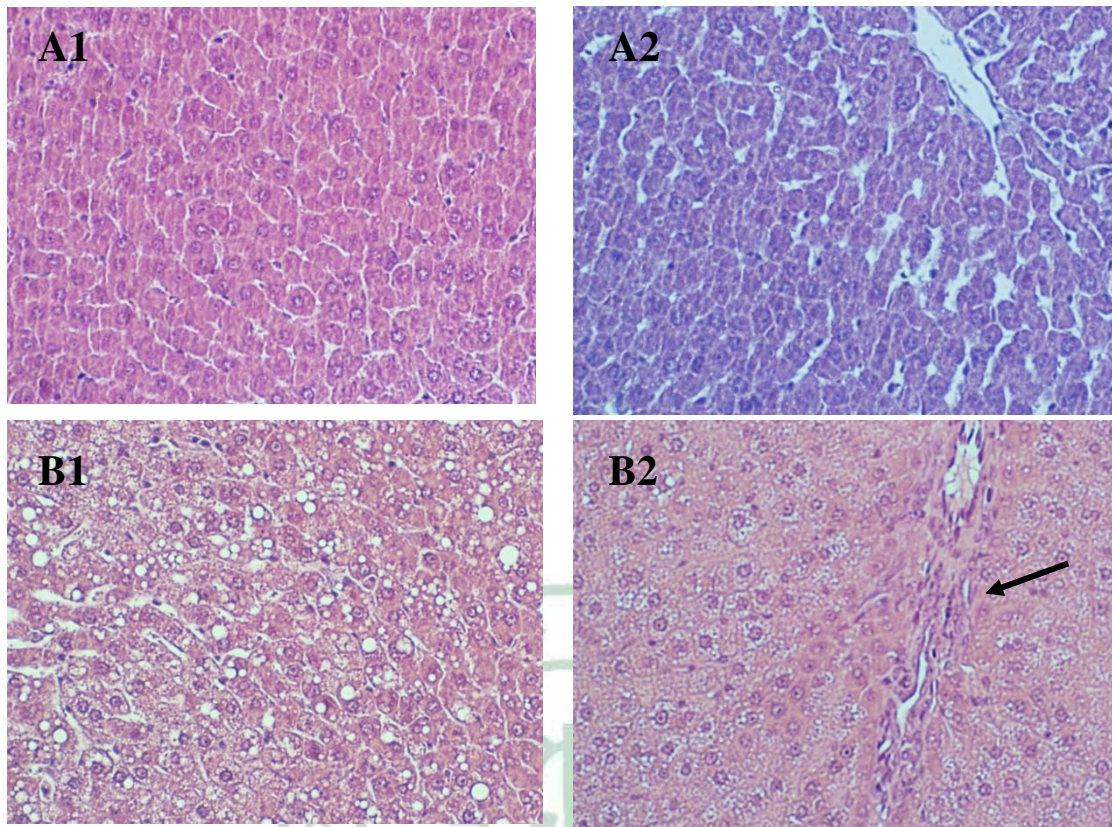
HFD: rats fed with high fat diet

HC: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet for 4 weeks

HO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 1.5% APE

LO: rats fed with high fat diet for 8 weeks then fed with laboratory rodent diet supplemented with 0.75% APE

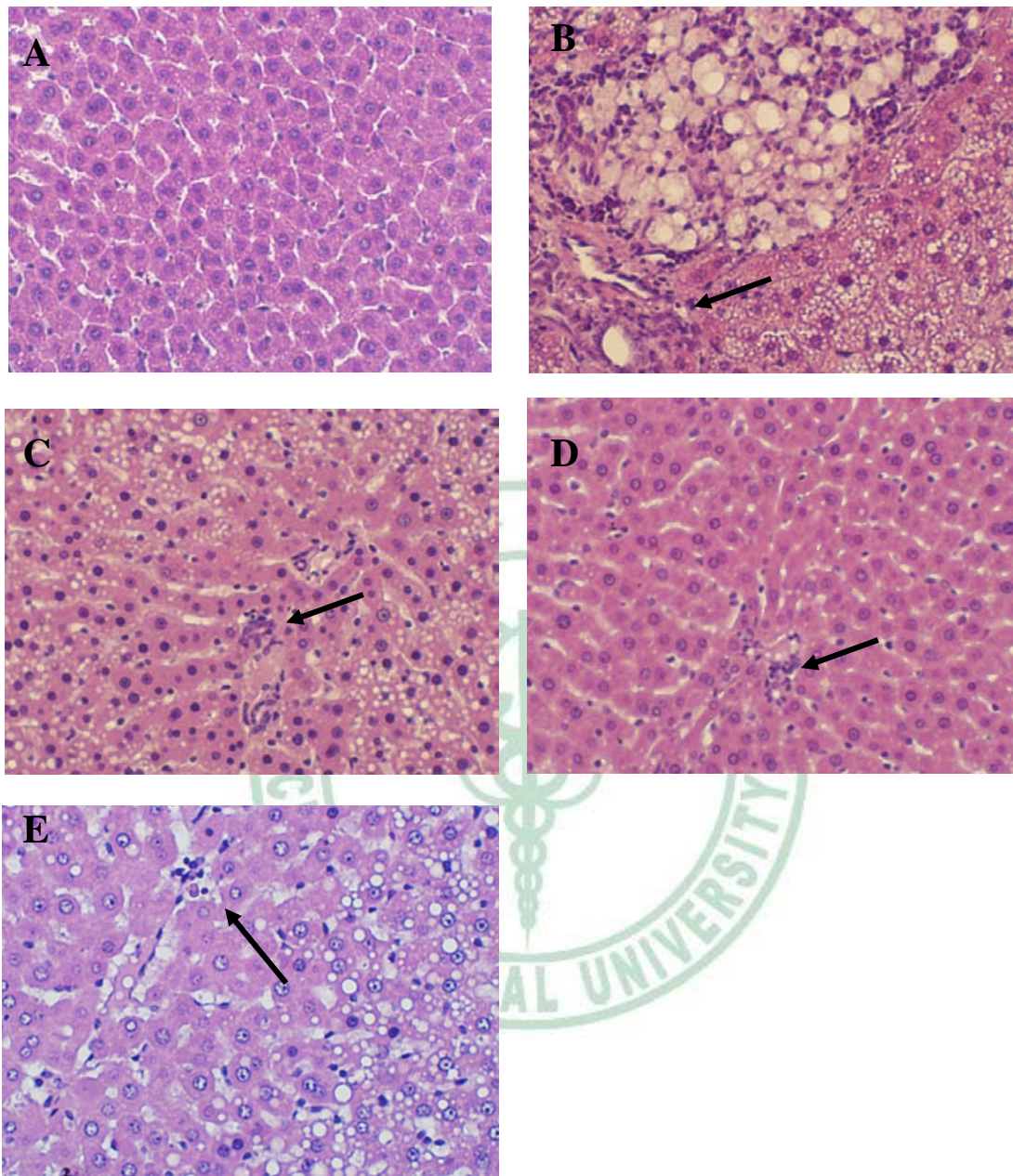




圖十七 預實驗肝臟 H&E 染色病理切片圖

Figure17 Hepatic H&E stain section in rats of different groups

1. Control group(A1、A2),HFD group(B1、B2)
2. Original magnification×400.
3. Arrow：肝臟巨噬細胞又稱 Kuffer cell，細胞形態不規則，有許多板狀或絲狀偽足

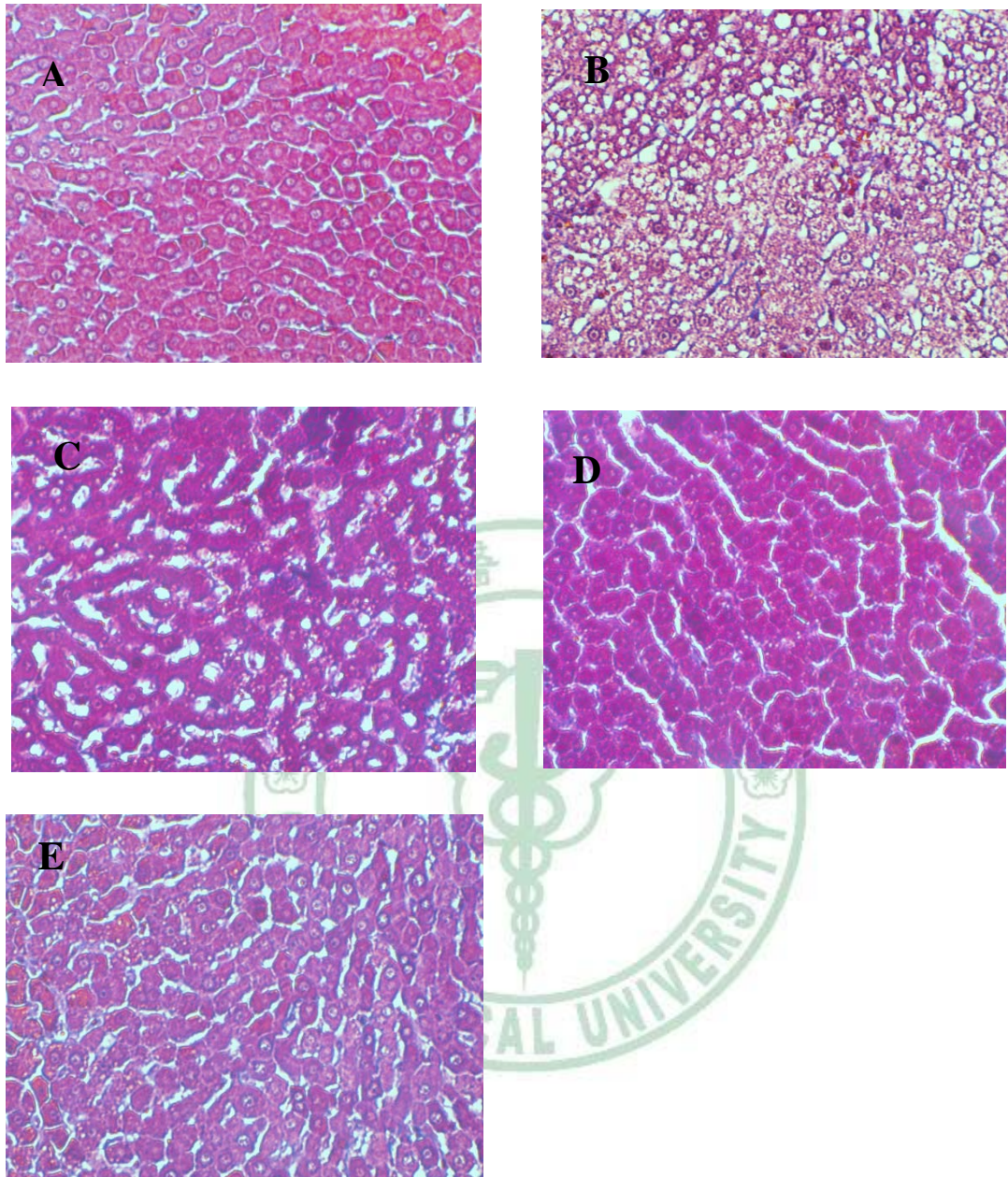


圖十八 肝臟 H&E 染色病理切片圖

Figure18 Hepatic H&E stain section in rats of different groups

1. Control group(A),HFD group(B),HC group(C),HO group(D),LO group(E)
2. Original magnification×400.
3. Arrow：肝臟巨噬細胞又稱 Kuffer cell，細胞形態不規則，有許多板狀或絲狀偽足





圖十九 肝臟 Masson's trichrome 染色病理切片圖

Figure19 Hepatic Masson's trichrome stain section in rats of different groups

1. Control group(A),HFD group(B),HC group(C),HO group(D),LO group(E)
2. Original magnification×400.

## 參考文獻

1. Clark, J.M., F.L. Brancati, and A.M. Diehl, The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol*, 2003. **98**(5): p. 960-967.
2. Zhou, Y.J., et al., Prevalence of fatty liver disease and its risk factors in the population of South China. *World J Gastroenterol*, 2007. **13**(47): p. 6419-6424.
3. Seidell, J.C., Obesity, insulin resistance and diabetes--a worldwide epidemic. *Br J Nutr*, 2000. **83 Suppl 1**: p. S5-S8.
4. Marchesini, G., et al., Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol*, 2005. **16**(4): p. 421-427.
5. Angulo, P., Obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr Rev*, 2007. **65**(6 Pt 2): p. S57-S63.
6. Angulo, P., Nonalcoholic fatty liver disease. *Rev Gastroenterol Mex*, 2005. **70 Suppl 3**: p. 52-60.
7. Ludwig, J., et al., Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc*, 1980. **55**(7): p. 434-480.
8. Lewis, J.R. and S.R. Mohanty, Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. *Dig Dis Sci*, 2010. **55**(3): p. 560-578.
9. Cairns, S.R. and T.J. Peters, Biochemical analysis of hepatic lipid in alcoholic and diabetic and control subjects. *Clin Sci (Lond)*, 1983. **65**(6): p. 645-652.
10. Brunt, E.M., et al., Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol*, 1999. **94**(9): p. 2467-2474.
11. Zeng, M.D., et al., Guidelines for the diagnosis and treatment of nonalcoholic fatty liver diseases. *J Dig Dis*, 2008. **9**(2): p. 108-112.
12. Musso, G., et al., Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 2003. **37**(4): p. 909-916.
13. Westwater, J.O. and D. Fainer, Liver impairment in the obese. *Gastroenterology*, 1958. **34**(4): p. 686-693.
14. McClain, C.J., et al., Mechanisms of non-alcoholic steatohepatitis. *Alcohol*, 2004. **34**(1): p. 67-79.
15. Cortez-Pinto, H., et al., How different is the dietary pattern in non-alcoholic steatohepatitis patients? *Clin Nutr*, 2006. **25**(5): p. 816-823.
16. Omagari, K., et al., Effects of a long-term high-fat diet and switching from a high-fat to low-fat, standard diet on hepatic fat accumulation in Sprague-Dawley

- rats. *Dig Dis Sci*, 2008. **53**(12): p. 3206-3212.
17. Wijendran, V. and K.C. Hayes, Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. *Annu Rev Nutr*, 2004. **24**: p. 597-615.
  18. Castro, I.A., L.P. Barroso, and P. Sinnecker, Functional foods for coronary heart disease risk reduction: a meta-analysis using a multivariate approach. *Am J Clin Nutr*, 2005. **82**(1): p. 32-40.
  19. Huang, M.A., et al., One-year intense nutritional counseling results in histological improvement in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a pilot study. *Am J Gastroenterol*, 2005. **100**(5): p. 1072-1081.
  20. Jou, J., S.S. Choi, and A.M. Diehl, Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis*, 2008. **28**(4): p. 370-390.
  21. Day, C.P. and O.F. James, Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*, 1998. **114**(4): p. 842-850.
  22. Byrne, C.D., Fatty liver: Role of inflammation and fatty acid nutrition. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2010. **82**(4-6): p. 265-271.
  23. Feldstein, A.E., et al., Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- $\alpha$  expression via a lysosomal pathway. *Hepatology*, 2004. **40**(1): p. 185-194.
  24. Reid, A.E., Nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*, 2001. **121**(3): p. 710-723.
  25. Weltman, M.D., et al., Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 1998. **27**(1): p. 128-133.
  26. Sanyal, A., et al., Nonalcoholic steatohepatitis: Association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*, 2001. **120**(5): p. 1183-1192.
  27. Robertson, G., I. Leclercq, and G.C. Farrell, Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001. **281**(5): p. G1135-G1139.
  28. Furukawa, S., et al., Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*, 2004. **114**(12): p. 1752-1761.
  29. Pessayre, D., et al., Mitochondria in steatohepatitis. *Semin Liver Dis*, 2001. **21**(1): p. 57-69.
  30. Raucy, J.L., et al., Induction of cytochrome P450IIE1 in the obese overfed rat. *Mol Pharmacol*, 1991. **39**(3): p. 275-280.
  31. Emery, M., CYP2E1 activity before and after weight loss in morbidly obese subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2003. **38**(2): p. 428-435.



32. Laethem, R.M., et al., Formation of 19(S)-, 19(R)-, and 18(R)-hydroxyeicosatetraenoic acids by alcohol-inducible cytochrome P450 2E1. *J Biol Chem*, 1993. **268**(17): p. 12912-12918.
33. Leclercq, I.A., et al., CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest*, 2000. **105**(8): p. 1067-1075.
34. Chen, Q., M. Galleano, and A.I. Cederbaum, Cytotoxicity and apoptosis produced by arachidonic acid in Hep G2 cells overexpressing human cytochrome P4502E1. *J Biol Chem*, 1997. **272**(23): p. 14532-14541.
35. Lock, E.A., A.M. Mitchell, and C.R. Elcombe, Biochemical mechanisms of induction of hepatic peroxisome proliferation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1989. **29**: p. 145-163.
36. Kroetz, D.L., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor alpha controls the hepatic CYP4A induction adaptive response to starvation and diabetes. *J Biol Chem*, 1998. **273**(47): p. 31581-31589.
37. Baumgardner, J.N., et al., A new model for nonalcoholic steatohepatitis in the rat utilizing total enteral nutrition to overfeed a high-polyunsaturated fat diet. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008. **294**(1): p. G27-G38.
38. Marchesini, G. and G. Bianchi, Nutritional support with amino acids in advanced cirrhosis: a few answers, a lot of questions. *Nutrition*, 1999. **15**(10): p. 799-800.
39. Day, C.P., Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2002. **16**(5): p. 663-678.
40. Brunt, E.M., Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Semin Liver Dis*, 2001. **21**(1): p. 3-16.
41. Yang, S.Q., et al., Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(6): p. 2557-2562.
42. McCullough, A.J., The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis*, 2004. **8**(3): p. 521-533.
43. Miyazaki, Y., et al., Abdominal fat distribution and peripheral and hepatic insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002. **283**(6): p. E1135-E1143.
44. Kojima, H., et al., Difference and similarity between non-alcoholic steatohepatitis and alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*, 2005. **29**(12 Suppl): p. 259S-263S.
45. Cahill, A., et al., Effects of alcohol and oxidative stress on liver pathology: the

- role of the mitochondrion. *Alcohol Clin Exp Res*, 2002. **26**(6): p. 907-915.
46. Arteel, G.E., Oxidants and antioxidants in alcohol-induced liver disease. *Gastroenterology*, 2003. **124**(3): p. 778-790.
  47. McCullough, A., The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *Clinics in Liver Disease*, 2004. **8**(3): p. 521-533.
  48. Bhardwaj, P., et al., Comparative redox status in alcoholic liver disease and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Int*, 2008. **2**(2): p. 202-208.
  49. Xu, Z.J., et al., Characterization of high-fat, diet-induced, non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis in rats. *Dig Dis Sci*, 2010. **55**(4): p. 931-940.
  50. Takayama, F., et al., A Novel Animal Model of Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH): Hypoxemia Enhances the Development of NASH. *J Clin Biochem Nutr*, 2009. **45**(3): p. 335-340.
  51. Tanné, F., et al., Chronic liver injury during obstructive sleep apnea. *Hepatology*, 2005. **41**(6): p. 1290-1296.
  52. Henrion, J., et al., Hypoxic hepatitis caused by severe hypoxemia from obstructive sleep apnea. *J Clin Gastroenterol*, 1997. **24**(4): p. 245-249.
  53. Chalasani, N., Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 2003. **37**(3): p. 544-550.
  54. Gladwin, M.T., et al., The emerging biology of the nitrite anion. *Nat Chem Biol*, 2005. **1**(6): p. 308-314.
  55. Lieber, C.S., et al., Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr*, 2004. **79**(3): p. 502-509.
  56. Larter, C.Z., Not all models of fatty liver are created equal: understanding mechanisms of steatosis development is important. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007. **22**(9): p. 1326-1533.
  57. Deng, Q.G., et al., Steatohepatitis induced by intragastric overfeeding in mice. *Hepatology*, 2005. **42**(4): p. 905-914.
  58. Sheu, F., et al., Isolation and characterization of an immunomodulatory protein (APP) from the Jew's Ear mushroom *Auricularia polytricha*. *Food Chem*, 2004. **87**(4): p. 593-600.
  59. Itoh, A., et al., Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin a-induced liver injury. *Biol Pharm Bull*, 2009. **32**(7): p. 1215-1219.
  60. Jeong, S.C., et al., White button mushroom (*Agaricus bisporus*) lowers blood glucose and cholesterol levels in diabetic and hypercholesterolemic rats. *Nutr Res*, 2010. **30**(1): p. 49-56.
  61. Nagao, K., et al., Mukitake mushroom (*Panellus serotinus*) alleviates nonalcoholic

- fatty liver disease through the suppression of monocyte chemoattractant protein 1 production in db/db mice. *J Nutr Biochem*, 2010. **21**(5): p. 418-423.
62. Ukawa, Y., et al., Effect of Hatakeshimeji (*Lyophyllum decastes* Sing.) Mushroom on serum lipid levels in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 2002. **48**(1): p. 73-76.
63. 水野卓;川和正允;賴慶亮譯, 菇類的化學 生化學. 國立編譯館, 1997: p. 297-303.
64. 杜金池;鄭燮, 台灣之木耳類. 中國園藝, 1975: p. 21,227-233.
65. 陳啟楨, 黑木耳減肥最健康. 元氣齋出版社, 2002.
66. Wasser, S.P. and A.L. Weis, Medicinal Properties of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: Current Perspectives. *Int J of Med Mushrooms*, 1999. **1**(1): p. 47-50.
67. Mau, J.L., G.R. Chao, and K.T. Wu, Antioxidant properties of methanolic extracts from several ear mushrooms. *J Agric Food Chem*, 2001. **49**(11): p. 5461-5467.
68. Puttaraju, N.G., et al., Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. *J Agric Food Chem*, 2006. **54**(26): p. 9764-9772.
69. Chen, G., et al., Hypocholesterolemic effects of *Auricularia auricula* ethanol extract in ICR mice fed a cholesterol-enriched diet. *J Food Sci Technol*, 2010. **47**: p. 1-7.
70. Fan, L., et al., Evaluation of antioxidant property and quality of breads containing *Auricularia auricula* polysaccharide flour. *Food Chemistry*, 2007. **101**(3): p. 1158-1163.
71. Luo, Y., et al., Evaluation of antioxidative and hypolipidemic properties of a novel functional diet formulation of *Auricularia auricula* and Hawthorn. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 2009. **10**(2): p. 215-221.
72. 李維欽, 食用油脂、抗氧化劑與健康食品萃取物在 C57BL/6 小鼠血漿脂質及肝臟抗氧化酵素之影響. 國立陽明大學生命科學院生物化學研究所碩士論文, 2001.
73. 王心芬, 五種黑色食品與其父方組合對血脂及 LDL 氧化之影響. 國立食品科技研究所 碩士論文, 2003.
74. Bor, J.Y., H.Y. Chen, and G.C. Yen, Evaluation of antioxidant activity and inhibitory effect on nitric oxide production of some common vegetables. *J Agric Food Chem*, 2006. **54**(5): p. 1680-1686.
75. Chen, G., et al., Effect of polysaccharide from *Auricularia auricula* on blood lipid metabolism and lipoprotein lipase activity of ICR mice fed a cholesterol-enriched diet. *J Food Sci*, 2008. **73**(6): p. H103-H108.
76. Peter, C.K. and P.D. Cheung, The hypocholesterolemic effect of two edible

- mushrooms *Auricularia auricula* (tree-ear) and *Tremella fuciformis* (white jelly-leaf) in hypercholesterolemic rats. *Nutr Res*, 1996. **16**(10): p. 1721-1725.
77. Ukai, S., et al., Polysaccharides in fungi. XIV. Anti-inflammatory effect of the polysaccharides from the fruit bodies of several fungi. *J Pharmacobiodyn*, 1983. **6**(12): p. 983-990.
  78. Yuan, Z., et al., Hypoglycemic effect of water-soluble polysaccharide from *Auricularia auricula-judae* Quel. on genetically diabetic KK-Ay mice. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998. **62**(10): p. 1898-1903.
  79. 楊新美, 中國食用栽培學. 農業出版社, 1988: p. 584.
  80. Markheja, A.N. and J.M. Bailey, Identification of the antiplatelet substance in chinese black tree fungus. *N Engl J Med*, 1981. **304**(3): p. 175.
  81. Yu, M., et al., Isolation of an anti-tumor polysaccharide from *Auricularia polytricha* (jew's ear) and its effects on macrophage activation. *Eur Food Res Technol* 2008. **228**(3): p. 477-485.
  82. Lowry, O.H., et al., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951. **193**(1): p. 265-275.
  83. Saha, S.K. and C.F. Brewer, Determination of the concentrations of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method. *Carbohydr Res*, 1994. **254**: p. 157-167.
  84. Serafini, M., G. Maiani, and A. Ferro-Luzzi, Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *J Nutr*, 1998. **128**(6): p. 1003-1007.
  85. Shimada, K., et al., Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cycodextrin emulsion. *J Agric Food Chem* 1992. **40**(6): p. 945-948.
  86. Benzie, I.F., W.Y. Chung, and J.J. Strain, "Antioxidant" (reducing) efficiency of ascorbate in plasma is not affected by concentration. *J Nutr Biochem*, 1999. **10**(3): p. 146-150.
  87. Miller, N.J. and C.A. Rice-Evans, The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chem*, 1997. **60**(3): p. 331-337.
  88. Catignani, G.L. and J.G. Bieri, Simultaneous determination of retinol and alpha-tocopherol in serum or plasma by liquid chromatography. *Clin Chem*, 1983. **29**(4): p. 708-712.
  89. Colagar, A.H. and E.T. Marzony, Ascorbic Acid in human seminal plasma: determination and its relationship to sperm quality. *J Clin Biochem Nutr*, 2009. **45**(2): p. 144-149.
  90. Mihara, M. and M. Uchiyama, Determination of malonaldehyde precursor in



- tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*, 1978. **86**(1): p. 271-278.
91. Edwards, R., et al., Omega-3 polyunsaturated fatty acid levels in the diet and in red blood cell membranes of depressed patients. *J Affect Disord*, 1998. **48**(2-3): p. 149-155.
  92. Choi, J.S., et al., Consumption of barley beta-glucan ameliorates fatty liver and insulin resistance in mice fed a high-fat diet. *Mol Nutr Food Res*, 2010. **54**(7): p. 1004-1013.
  93. Tebib, K., et al., Polymeric grape seed tannins prevent plasma cholesterol changes in high-cholesterol-fed rats. *Food Chem*, 1994. **49**(4): p. 403-406
  94. Zhang, H., et al., Purified *Auricularia auricular-judae* polysaccharide (AAP I-a) prevents oxidative stress in an ageing mouse model. *Carbohydr Polym*, 2011. **84**(1): p. 638-648.
  95. H, J., et al., Hypolipidemic Effects of Biopolymers Extracted from Culture Broth, Mycelia, and Fruiting Bodies of *Auricularia auricula-judae* in Dietary-induced Hyperlipidemic Rats. *The Korean Society of Mycology*, 2007. **35**(1): p. 16-20.
  96. Gurr, M.I., J.L. Harwood, and K.N. Frayn, *Lipid Biochemistry: An Introduction*. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK., 1991: p. 163-245 4th.
  97. Yang, B.K., et al., Hypolipidemic effect of an exo-biopolymer produced from submerged mycelial culture of *Auricularia polytricha* in rats *Biotechnol Lett*, 2002. **24**(16): p. 1319-1325.
  98. Kew, M.C., Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage. *Lancet*, 2000. **355**(9204): p. 591-592.
  99. Esteghamati, A., et al., Metabolic syndrome is linked to a mild elevation in liver aminotransferases in diabetic patients with undetectable non-alcoholic fatty liver disease by ultrasound. *Diabetol Metab Syndr*, 2010. **2**(1): p. 65-71.
  100. Hanley, A.J., et al., Elevations in markers of liver injury and risk of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes*, 2004. **53**(10): p. 2623-2632.
  101. Kim, S.-K., et al., Antidiabetic Effect of *Auricularia auricula* Mycelia in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Natural Product Sciences*, 2007. **12**(4): p. 390-393.
  102. Spiegelman, B.M., PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*, 1998. **47**(4): p. 507-514.
  103. Boden, G., Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*, 1997. **46**(1): p. 3-10.
  104. Sridhar, M.G., et al., Bitter gourd (*Momordica charantia*) improves insulin



- sensitivity by increasing skeletal muscle insulin-stimulated IRS-1 tyrosine phosphorylation in high-fat-fed rats. *Br J Nutr*, 2008. **99**(4): p. 806-812.
105. Krebs, M., et al., Free fatty acids inhibit the glucose-stimulated increase of intramuscular glucose-6-phosphate concentration in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. **86**(5): p. 2153-2160.
  106. Ota, T., et al., Insulin resistance accelerates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*, 2007. **132**(1): p. 282-293.
  107. Marchesini, G., et al., Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes*, 2001. **50**(8): p. 1844-1850.
  108. Hwang, H.J., et al., Hypoglycemic effect of crude exopolysaccharides produced by a medicinal mushroom *Phellinus baumii* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci*, 2005. **76**(26): p. 3069-3080.
  109. Wood, P.J., M.U. Beer, and G. Butler, Evaluation of role of concentration and molecular weight of oat beta-glucan in determining effect of viscosity on plasma glucose and insulin following an oral glucose load. *Br J Nutr*, 2000. **84**(1): p. 19-23.
  110. Cho, E.J., et al., Hypoglycemic effects of exopolysaccharides produced by mycelial cultures of two different mushrooms *Tremella fuciformis* and *Phellinus baumii* in ob/ob mice. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007. **75**(6): p. 1257-1265.
  111. Kadowaki, T., et al., The role of PPARgamma in high-fat diet-induced obesity and insulin resistance. *J Diabetes Complications*, 2002. **16**(1): p. 41-45.
  112. Chalkley, S.M., et al., Five-hour fatty acid elevation increases muscle lipids and impairs glycogen synthesis in the rat. *Metabolism*, 1998. **47**(9): p. 1121-1126.
  113. Chen, X., N. Iqbal, and G. Boden, The effects of free fatty acids on gluconeogenesis and glycogenolysis in normal subjects. *J Clin Invest*, 1999. **103**(3): p. 365-372.
  114. Malhi, H. and G.J. Gores, Molecular mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis*, 2008. **28**(4): p. 360-369.
  115. Koruk, M., et al., Serum lipids, lipoproteins and apolipoproteins levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol*, 2003. **37**(2): p. 177-182.
  116. Chen, Z.Y., R. Jiao, and K.Y. Ma, Cholesterol-lowering nutraceuticals and functional foods. *J Agric Food Chem*, 2008. **56**(19): p. 8761-8773.
  117. Berliner, J.A., et al., Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*, 1995. **91**(9): p. 2488-2496.
  118. Grefhorst, A., et al., Acute hepatic steatosis in mice by blocking beta-oxidation does not reduce insulin sensitivity of very-low-density lipoprotein production. *Am*

- J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. **289**(3): p. G592-G598.
119. Ginsberg, H.N., Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest*, 2000. **106**(4): p. 453-458.
  120. Bandsma, R.H., et al., Acute inhibition of glucose-6-phosphate translocator activity leads to increased de novo lipogenesis and development of hepatic steatosis without affecting VLDL production in rats. *Diabetes*, 2001. **50**(11): p. 2591-2597.
  121. Ginsberg, H.N., Y.L. Zhang, and A. Hernandez-Ono, Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Arch Med Res*, 2005. **36**(3): p. 232-240.
  122. Kang, H.J. and Y.S. Song, Dietary fiber and cholesterol metabolism. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 1997. **26**: p. 358-369.
  123. Miettinen, T.A., Dietary fiber and lipids. *Am J Clin Nutr*, 1987. **45**(5 Suppl): p. 1237-1242.
  124. Chen, W.L. and J.W. Anderson, Hypocholesterolemic effects of soluble fibers. *Dietary Fiber; Basic and Clinical Aspects*, 1986: p. 275-286.
  125. Yang, B.K., J.B. Park, and C.H. Song, Hypolipidemic effect of an Exo-biopolymer produced from a submerged mycelial culture of *Herichium erinaceus*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003. **67**(6): p. 1292-1298.
  126. Shen, H., et al., Dietary soluble fiber lowers plasma LDL cholesterol concentrations by altering lipoprotein metabolism in female guinea pigs. *J Nutr*, 1998. **128**(9): p. 1434-1441.
  127. Miettinen, T.A. and H. Gylling, Cholesterol absorption efficiency and sterol metabolism in obesity. *Atherosclerosis*, 2000. **153**(1): p. 241-248.
  128. Simonen, P., et al., Cholesterol synthesis is increased and absorption decreased in non-alcoholic fatty liver disease independent of obesity. *J Hepatol*, 2011. **54**(1): p. 153-159.
  129. Puri, P., et al., A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2007. **46**(4): p. 1081-1090.
  130. Cheung, P.C., Plasma and hepatic cholesterol levels and fecal neutral sterol excretion are altered in hamsters fed straw mushroom diets. *J Nutr*, 1998. **128**(9): p. 1512-1516.
  131. Erkkila, A.T. and A.H. Lichtenstein, Fiber and cardiovascular disease risk: how strong is the evidence? *J Cardiovasc Nurs*, 2006. **21**(1): p. 3-8.
  132. Matheson, H.B. and J.A. Story, Dietary psyllium hydrocolloid and pectin increase bile acid pool size and change bile acid composition in rats. *J Nutr*, 1994. **124**(8):

- p. 1161-1165.
133. Ebihara, K. and B.O. Schneeman, Interaction of bile acids, phospholipids, cholesterol and triglyceride with dietary fibers in the small intestine of rats. *J Nutr*, 1989. **119**(8): p. 1100-1106.
  134. Ikeda, I., Y. Tomari, and M. Sugano, Interrelated effects of dietary fiber and fat on lymphatic cholesterol and triglyceride absorption in rats. *J Nutr*, 1989. **119**(10): p. 1383-1387.
  135. Del Bas, J.M., et al., Grape seed procyanidins improve atherosclerotic risk index and induce liver CYP7A1 and SHP expression in healthy rats. *FASEB J*, 2005. **19**(3): p. 479-481.
  136. Ji, G., et al., Comparison of dietary control and atorvastatin on high fat diet induced hepatic steatosis and hyperlipidemia in rats. *Lipids Health Dis*, 2011. **10**: p. 23-33.
  137. Begriche, K., et al., Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion*, 2006. **6**(1): p. 1-28.
  138. Ahmed, M.H. and C.D. Byrne, Modulation of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) as potential treatments for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Drug Discov Today*, 2007. **12**(17-18): p. 740-747.
  139. Sozio, M.S., S. Liangpunsakul, and D. Crabb, The role of lipid metabolism in the pathogenesis of alcoholic and nonalcoholic hepatic steatosis. *Semin Liver Dis*, 2010. **30**(4): p. 378-390.
  140. Canbay, A., L. Bechmann, and G. Gerken, Lipid metabolism in the liver. *Z Gastroenterol*, 2007. **45**(1): p. 35-41.
  141. Utzschneider, K.M. and S.E. Kahn, The Role of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. **91**(12): p. 4753-4761.
  142. Chen, L. and B.L. Nyomba, Glucose intolerance and resistin expression in rat offspring exposed to ethanol in utero: modulation by postnatal high-fat diet. *Endocrinology*, 2003. **144**(2): p. 500-508.
  143. Choi, S.S. and A.M. Diehl, Hepatic triglyceride synthesis and nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Lipidol*, 2008. **19**(3): p. 295-300.
  144. Yki-Jarvinen, H., Fat in the liver and insulin resistance. *Ann Med*, 2005. **37**(5): p. 347-356.
  145. Wolfrum, C. and M. Stoffel, Coactivation of Foxa2 through Pgc-1beta promotes liver fatty acid oxidation and triglyceride/VLDL secretion. *Cell Metab*, 2006. **3**(2): p. 99-110.

146. Kotronen, A., et al., Effect of liver fat on insulin clearance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007. **293**(6): p. E1709-E1715.
147. Kuo, L.E., et al., Chronic stress, combined with a high-fat/high-sugar diet, shifts sympathetic signaling toward neuropeptide Y and leads to obesity and the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci*, 2008. **1148**: p. 232-237.
148. Bagchi, D., et al., In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology*, 1995. **104**(1-3): p. 129-140.
149. Prasad, K. and J. Kalra, Oxygen free radicals and hypercholesterolemic atherosclerosis: effect of vitamin E. *Am Heart J*, 1993. **125**(4): p. 958-973.
150. Gupta, S., et al., Antidiabetic, antihypercholesterolaemic and antioxidant effect of *Ocimum sanctum* (Linn) seed oil. *Indian J Exp Biol*, 2006. **44**(4): p. 300-304.
151. Unger, R.H., Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med*, 2002. **53**: p. 319-336.
152. Krawczyk, M., L. Bonfrate, and P. Portincasa, Nonalcoholic fatty liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2010. **24**(5): p. 695-708.
153. Acharya, K., et al., Antioxidant and nitric oxide synthase activation properties of *Auricularia auricula*. *Indian J Exp Biol*, 2004. **42**(5): p. 538-540.
154. Chang JS, K.H., Bae JT, Park SH, Kim SE, Kim OM, Inhibition effects of *Auricularia auricula-judae* methanol extract on lipid peroxidation and liver damage in benzo( $\alpha$ )pyrene-treated mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 1998. **27**: p. 712-717.
155. Tappel, A.L., Vitamin E and selenium protection from in vivo lipid peroxidation. *Ann N Y Acad Sci*, 1980. **355**: p. 18-31.
156. Proctor, P.H. and E.S. Reynolds, Free radicals and disease in man. *Physiol Chem Phys Med NMR*, 1984. **16**(3): p. 175-195.
157. van Meeteren, M.E., et al., Antioxidants and polyunsaturated fatty acids in multiple sclerosis. *Eur J Clin Nutr*, 2005. **59**(12): p. 1347-1361.
158. Yesilova, Z., et al., Systemic Markers of Lipid Peroxidation and Antioxidants in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Am J Gastroenterol*, 2005. **100**(4): p. 850-855.
159. Guillamon, E., et al., Edible mushrooms: Role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia*, 2010. **81**(7): p. 715-723.
160. Nosrati, N., S. Aghazadeh, and R. Yazdanparast, Effects of *Teucrium polium* on Insulin Resistance in Nonalcoholic Steatohepatitis. *J Acupunct Meridian Stud*, 2010. **3**(2): p. 104-110.
161. Harris, E.D., Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J*, 1992. **6**(9): p.

- 2675-2683.
162. Letteron, P., et al., Acute and chronic hepatic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice. *J Hepatol*, 1996. **24**(2): p. 200-208.
  163. Pillai, M.G., et al., Influence of dietary fiber from coconut kernel (*Cocos nucifera*) on the 1,2-dimethylhydrazine-induced lipid peroxidation in rats. *J Nutr Biochem*, 1999. **10**(9): p. 555-560.
  164. JoséA. Larrauri, et al., High dietary fibre powders from orange and lime peels: associated polyphenols and antioxidant capacity *Food Res Int*, 1996. **29**(8): p. 757-762.
  165. Lecumberri, E., et al., A diet rich in dietary fiber from cocoa improves lipid profile and reduces malondialdehyde in hypercholesterolemic rats. *Nutrition*, 2007. **23**(4): p. 332-341.
  166. Kaur, C. and H.C. Kapoor, Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium’s health. *Int J Food Sci Tech*, 2001. **36**(7): p. 703-725.
  167. Crespo, J., et al., Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology*, 2001. **34**(6): p. 1158-1163.
  168. Feldstein, A.E., et al., Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. *Hepatology*, 2004. **40**(1): p. 185-94.
  169. Wree, A., et al., Obesity affects the liver - the link between adipocytes and hepatocytes. *Digestion*, 2011. **83**(1-2): p. 124-133.
  170. Diehl, A.M., Lessons from animal models of NASH. *Hepatol Res*, 2005. **33**(2): p. 138-144.
  171. Arkan, M.C., et al., IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med*, 2005. **11**(2): p. 191-198.
  172. Garcia-Ruiz, C., et al., Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor-kappa B: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Mol Pharmacol*, 1995. **48**(5): p. 825-834.
  173. Marra, F. and C. Bertolani, Adipokines in liver diseases. *Hepatology*, 2009. **50**(3): p. 957-969.
  174. Duthie, G.G., S.J. Duthie, and J.A. Kyle, Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutr Res Rev*, 2000. **13**(1): p. 79-106.



175. John, S., Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatment. *Mushrooms Cancer*, 2005.
176. Lin, C.Y., et al., Anticoagulatory, antiinflammatory, and antioxidative effects of protocatechuic acid in diabetic mice. *J Agric Food Chem*, 2009. **57**(15): p. 6661-6667.
177. Souza, S.M., et al., Antiinflammatory and antiulcer properties of tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemao (Anacardiaceae) in rodents. *Phytother Res*, 2007. **21**(3): p. 220-225.
178. Kroes, B.H., et al., Anti-inflammatory activity of gallic acid. *Planta Med*, 1992. **58**(6): p. 499-504.
179. Koteish, A. and A. Mae Diehl, Animal models of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2002. **16**(5): p. 679-690.
180. Fan, C.Y., et al., Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Implications for peroxisome proliferator-activated receptor alpha natural ligand metabolism. *J Biol Chem*, 1998. **273**(25): p. 15639-15645.
181. Clarke, S.D., Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J Nutr*, 2001. **131**(4): p. 1129-1132.
182. Singer, P. and E. Richter-Heinrich, Stress and fatty liver--possible indications for dietary long-chain n-3 fatty acids. *Med Hypotheses*, 1991. **36**(1): p. 90-94.
183. Araya, J., et al., Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n - 6/n - 3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)*, 2004. **106**(6): p. 635-643.
184. Kersten, S., Effects of fatty acids on gene expression: role of peroxisome proliferator-activated receptor alpha, liver X receptor alpha and sterol regulatory element-binding protein-1c. *Proc Nutr Soc*, 2002. **61**(3): p. 371-374.
185. Clarke, S.D., Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. I. Molecular mechanism for polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001. **281**(4): p. G865-G869.
186. Burke, P.A., et al., Conditionally essential fatty acid deficiencies in end-stage liver disease. *Nutrition*, 1999. **15**(4): p. 302-304.
187. Pan, D.A., A.J. Hulbert, and L.H. Storlien, Dietary fats, membrane phospholipids and obesity. *J Nutr*, 1994. **124**(9): p. 1555-1565.
188. Brenner, R.R., et al., Desaturase activities in rat model of insulin resistance induced by a sucrose-rich diet. *Lipids*, 2003. **38**(7): p. 733-742.

189. Sjogren, P., et al., Fatty acid desaturases in human adipose tissue: relationships between gene expression, desaturation indexes and insulin resistance. *Diabetologia*, 2008. **51**(2): p. 328-335.
190. Malinska, H., et al., Increased liver oxidative stress and altered PUFA metabolism precede development of non-alcoholic steatohepatitis in SREBP-1a transgenic spontaneously hypertensive rats with genetic predisposition to hepatic steatosis. *Mol Cell Biochem*, 2010. **335**(1-2): p. 119-125.
191. Vessby, B., et al., Desaturation and elongation of Fatty acids and insulin action. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. **967**: p. 183-195.
192. King, D.E., Dietary fiber, inflammation, and cardiovascular disease. *Mol Nutr Food Res*, 2005. **49**(6): p. 594-600.
193. Sanchez, D., et al., Soluble fiber-enriched diets improve inflammation and oxidative stress biomarkers in Zucker fatty rats. *Pharmacol Res*, 2011. **64**(1): p. 31-35.
194. Nguyen, N.T., et al., Association of hypertension, diabetes, dyslipidemia, and metabolic syndrome with obesity: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999 to 2004. *J Am Coll Surg*, 2008. **207**(6): p. 928-934.
195. King, D.E., et al., Effect of a high-fiber diet vs a fiber-supplemented diet on C-reactive protein level. *Arch Intern Med*, 2007. **167**(5): p. 502-506.
196. 劉虹君, 毛木耳萃取物改善卵巢切除大鼠血脂和骨質代謝及類似憂鬱症動物模式行為表現. 中國醫藥大學健康照護學院營養學系碩士論文, 2010.