

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  期末成果報告

期中報告

北冬蟲夏草體內與體外生物活性：護肝與抗血管氧化傷害之研究(1/3)

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 96-2313-B-041-001-MY3

執行期間：96年8月1日至99年7月31日

計畫主持人：杜平蕙

共同主持人：王柏森

計畫參與人員：游慧美

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、  
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年  二年後可公開查詢

執行單位：嘉南藥理科技大學 食品科技系

中 華 民 國 97 年 5 月 30 日

## 摘要

本研究為探討北冬蟲夏草(蛹蟲草)體內與體外生物活性，分三年完成。第一年計畫為比較北冬蟲夏草水萃物(water extracts of *Cordyceps militaris*; CME)，冬蟲夏草水萃物(water extracts of *Cordyceps sinensis*; CSE)，市售冬蟲夏草水萃物(water extracts of commercial *Cordyceps sinensis*; CCSE)對細胞模式之護肝機能性表現。結果顯示 CME、CSE 與 CCSE 單獨處理對人類肝細胞株 HepG2 並無明顯毒性。CME、CSE 與 CCSE 可以有效抑制 tert-Butylhydroperoxide (t-BHP) 誘發細胞毒性，而 CME 與 CSE 二者的效果在統計上並無差異 ( $P>0.05$ )。同時，CME、CSE 與 CCSE 可以有效抑制 t-BHP 誘發細胞內氧化壓力的產生，且 CSE 之效用仍略高於 CME，但統計上無差異 ( $P>0.05$ )。另一方面，CME、CSE 與 CCSE 也可以有效抑制 t-BHP 誘發細胞內 Caspase 3 活性。以西方墨點分析法分析顯示 CME、CSE 與 CCSE 也可以有效抑制 t-BHP 誘發細胞內 Caspase3 蛋白之表現。綜合上述結果可知 CME、CSE 與 CCSE 對氧化壓力所引發之細胞凋亡具有氧化保護之機能作用，而其機轉可能與其降低胞內活性氧產生及抑制 Caspase3 活性有關。雖然，CME 在本試驗模式效果略低於 CSE，但是統計上並無差異 ( $P>0.05$ )，顯示北冬蟲夏草水萃物對細胞模式具有顯著護肝機能性之表現。

關鍵字：北冬蟲夏草，護肝效應，氧化壓力，凋亡

## Abstract

In this three-year project, the major

purpose is to investigate of the bioactivities of *Cordyceps militaris* in vivo and in vitro. The major goal of the first year is to compare hepatoprotective activities of CME, CSE, and CCSE, respectively, in cellular model. According to the data, CME, CSE, and CCSE did not exhibit obvious cytotoxicity toward HepG2 cells. On the other hand, the oxidative toxicity of t-BHP was decreased in the presence of CME, CSE, and CCSE respectively. No significant difference ( $p>0.05$ ) was found between CME and CSE in protective effects of oxidative toxicity of t-BHP. Meanwhile, the intracellular oxidative stress induced by t-BHP in HepG2 cells was inhibited in the presence of CME, CSE, and CCSE, respectively. Further, the activity of intracellular caspase 3 induced by t-BHP was decreased in the presence of CME, CSE, and CCSE, respectively. By immunoblot, the protein levels of caspase 3 increased by t-BHP was inhibited in the presence of CME. According to the data mentioned above, the apoptosis progression induced by oxidative stress was inhibited by CSE, CME, and CCSE, respectively. The mechanism for the hepatoprotection in vitro may be attributed to decrease of oxidative stress and caspase 3 activity. This study indicated that CME displayed marked hepatoprotection in vitro.

**Keywords:** *Cordyceps militaris*, hepatoprotection, oxidative stress, apoptosis

## 前言

蛹蟲草(*Cordyceps militaris*) 又名北冬蟲夏蟲，是麥角菌科真菌蛹蟲草之菌核及子座，其生長乃由 *Cordyceps militaris* 寄生於半埋伏於林地上土壤中之鱗翅目昆蟲之死蛹上，而冬蟲夏草(*Cordyceps sinensis*) 乃是寄生於蝙蝠蛾科昆蟲蟲草蝙蝠蛾等幼蟲體之複合物。仿間盛傳北冬蟲夏草具有特殊療效，有報告指出北冬蟲夏草具有抗纖維變性(antifibrotic effect)，抑制腎小球環間膜細胞之增生，以及能延長小鼠游泳能力。而本實驗室過去實驗也探討人工培養之北冬蟲夏草與野生之冬蟲夏草在抗氧化壓力之比較(Yu et al., 2006)，實驗結果顯示北冬蟲夏草在抑制蛋白質氧化上稍遜於冬蟲夏草；兩者對 LDL 氧化均有抑制性；而北冬蟲夏草所含之 cordycepin 與 adenosine 之含量均大於冬蟲夏草，惟此二成分均無明顯抗氧化性。由上述結果可知，雖然北冬蟲夏草具有減緩氧化壓力之效果，但上述之化學性試驗模式結果無法完全代表北冬蟲夏草在細胞模式或體內試驗之效用，因此，本計劃第一年為探討比較北冬蟲夏草水萃物 (water extracts of *Cordyceps militaris*; CME)，冬蟲夏草水萃物 (water extracts of *Cordyceps sinensis*; CSE)，市售冬蟲夏草水萃物 (water extracts of commercial *Cordyceps sinensis*; CCSE) 對細胞模式之護肝機能性表現，並探討其機制，以期瞭解北冬蟲夏草完整的機能特性，以作為醫藥食品界之應用參考。

## 結果與討論

### 一、北冬蟲夏草水萃物對細胞氧化作用

### 之影響

圖一為 0-500  $\mu\text{g/ml}$  之 CME，CSE，CCSE 單獨處理對人類肝細胞株 HepG2 之細胞毒性作用。以 500  $\mu\text{g/ml}$  之樣品濃度而言，CME，CSE，CCSE 處理 24h 對 HepG2 之細胞之存活率分別為 98, 103 及 102 %，顯示 CME，CSE，CCSE 對 HepG2 之細胞代謝並無顯著毒性。過去實驗指出北冬蟲夏草與冬蟲夏草具有癌細胞毒殺作用，而此細胞毒殺乃由其生物活性成分蟲草素所貢獻。但是，在本實驗中 CME，CSE，CCSE 並無明顯細胞毒性，推測乃是因本實驗所用水萃方式，對樣本之蟲草素的萃取效力較低所致。

圖二為促氧化劑 t-BHP 在 0-0.5 mM 處理細胞 2-8 小時，對細胞存活率之影響。結果顯示 t-BHP 對 HepG2 細胞有氧化毒殺作用，其毒殺活性隨濃度增加而增加，並有時間依存關係。以 0.5mM t-BHP 而言，在處理細胞 2-8 h 間，細胞存活率分別為 59, 15, 9, 12, 13, 15 %。顯示不同濃度 t-BHP 處理在 2-8 小時內對細胞皆具有相當之毒性。

圖三為 CME，CSE，CCSE 對 t-BHP 氧化傷害作用之影響。給予 50-500  $\mu\text{g/ml}$  之 CME，CSE，CCSE，可以有效抑制 t-BHP 之氧化傷害毒性。以 0.1 mM t-BHP 處理細胞 6 h 可使細胞存活率減少為 36 %，但若分別同時處理 500  $\mu\text{g/ml}$  之 CME，CSE，CCSE，對細胞存活之保護效力可上升達 115, 118, 107 %，顯示 CME，CSE，CCSE 對 t-BHP 有極強之細胞氧化傷害抑制性。雖然 CME 的保護效果略低於 CSE，但在統計上二者間並無差異 ( $p>0.05$ )。

## 二、北冬蟲夏草水萃物對細胞內氧化壓力之影響

圖四為 CME, CSE, CCSE 對 t-BHP 誘發細胞內氧化壓力產生之影響。結果顯示細胞單獨處理 0.2 mM t-BHP 4h 可使細胞內 ROS 產生增加至控制組的 11 倍，若同時處理 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  之 CME, CSE, CCSE, 則可以使細胞內 ROS 產生減少至控制組的 5 倍, 4 倍與 7 倍。此結果暗示 CME, CSE, CCSE 具有顯著清除細胞內 ROS 之能力。同時雖然 CME 的清除效果略低於 CSE, 但在統計上二者間亦無差異( $p>0.05$ ), 藉此可推論 CME 具有良好的細胞內氧化壓力清除作用。

圖五為 CME, CSE, CCSE 對 HepG2 細胞內 caspase 3 活性之影響。結果顯示細胞單獨處理 0.05 mM t-BHP 24h 可使細胞內之 caspase 3 活性增加為控制組之 1.7 倍, 若同時處理 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  之 CME, CSE, CCSE, 則可以使細胞內 caspase 3 活性減少至控制組的 1.3 倍, 1.3 倍與 1.1 倍。雖然 CME 的清除效果略低於 CCSE, 但在統計上二者間亦無差異( $p>0.05$ )。此亦可推論 CME 具有良好的細胞內 caspase 3 活性抑制作用。

圖六顯示 CME 不同劑量對細胞內 caspase 3 活性之影響。CME 在 200-500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  可以抑制 0.05 mM BHP 所增加細胞內之 caspase 3 活性至控制組之 104, 88%, 同時有濃度依存關係。此結果顯示 CME 可以確實抑制氧化壓力誘

導的細胞內 caspase 3 活性增加。

圖七以西方墨點法分析細胞內 caspase 3 蛋白表現。結果顯示, 與控制組相比, 處理 0.05 mM t-BHP 24h 可使細胞內之 caspase 3 蛋白量增加為控制組的 1.34 倍, 若同時處理 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CME 可使 caspase 3 蛋白量下降至控制組 1.07 倍, 此結果顯示 CME 可以有效抑制氧化壓力所增加之細胞內 caspase 3 蛋白量。

## 結論

根據上述結果可知北冬蟲夏草水萃物 (CME) 對氧化壓力所引發之細胞毒性具有氧化保護之機能作用, 而其保護機轉可能與 CME 可降低胞內活性氧產生及抑制 caspase3 活性與蛋白表現有關。雖然, CME 在抗氧化傷害之效果略低於冬蟲夏草水萃物 (CSE), 但 CME 對 caspase 3 活性抑制之效力則與 CSE 一致。此結果與過去本實驗室證實 CME 之抗氧化力略低於 CSE 之結果一致。至於 CME 與 CSE 在細胞模式之護肝機能之其他不同表現, 本實驗仍持續進行分析中。

## 參考文獻

Yu HM, Wang BS, Huang SC, Duh PD. (2006) Comparison of protective effects between cultured *Cordyceps militaris* and natural *Cordyceps sinensis* on oxidative damage. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 3132-3138. (SCI)

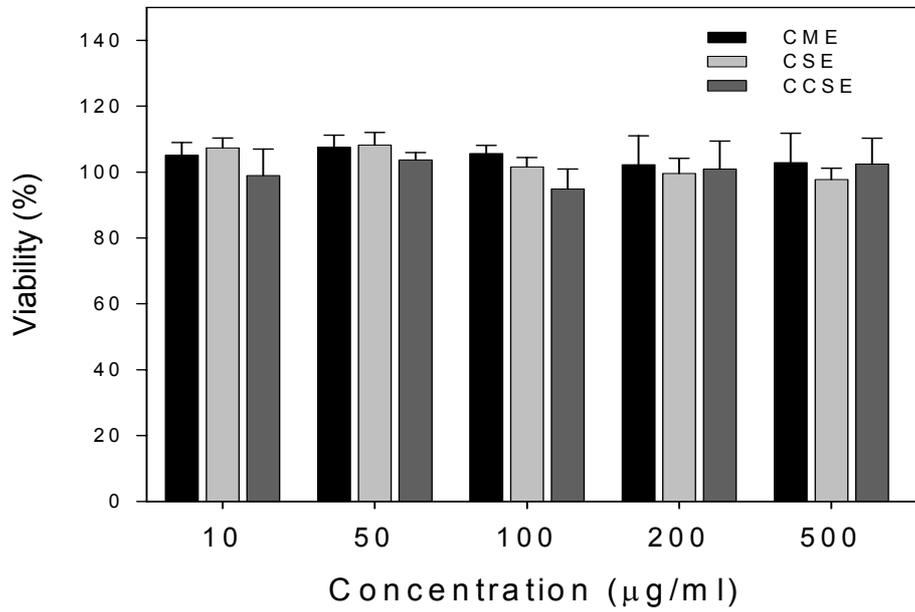


Fig. 1. Effects of CME, CSE and CCSE on HepG2 cell viability.

圖一. CME, CSE, 與 CCSE 對 HepG2 細胞生存之影響。

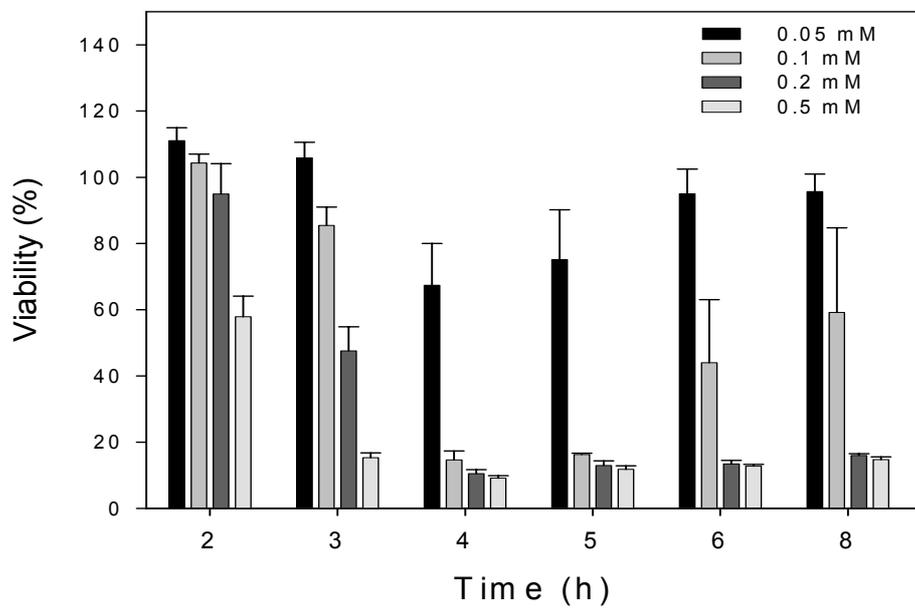


Fig. 2. Effects of t-BHP on HepG2 cell viability.

圖二. t-BHP 對 HepG2 細胞存活之影響。

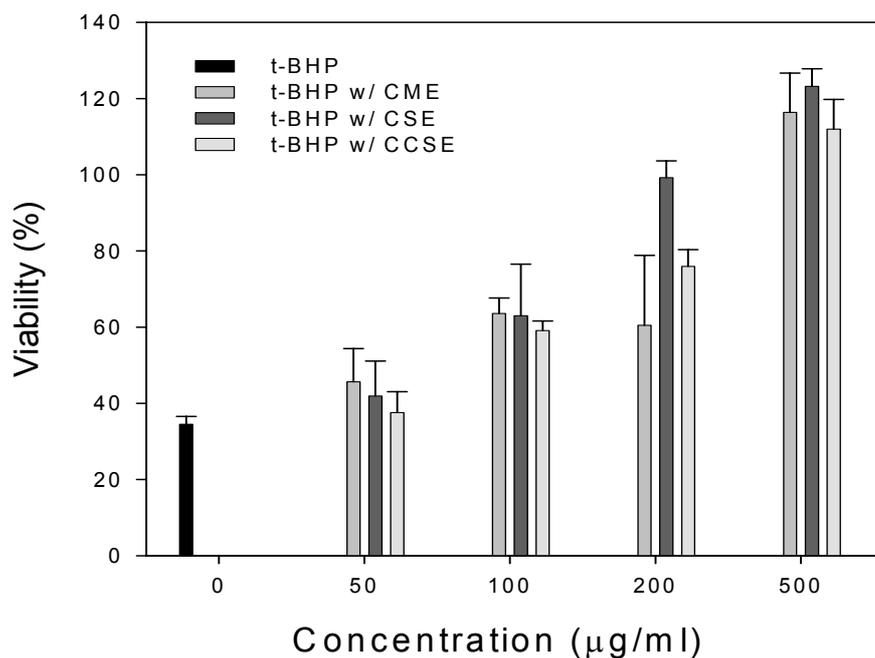


Fig. 3. Effects of CME, CSE and CCSE on HepG2 cell viability induced by 0.1 mM t-BHP.

圖三. CME, CSE, 與 CCSE 對 0.1 mM t-BHP 誘導 HepG2 細胞生存之影響。

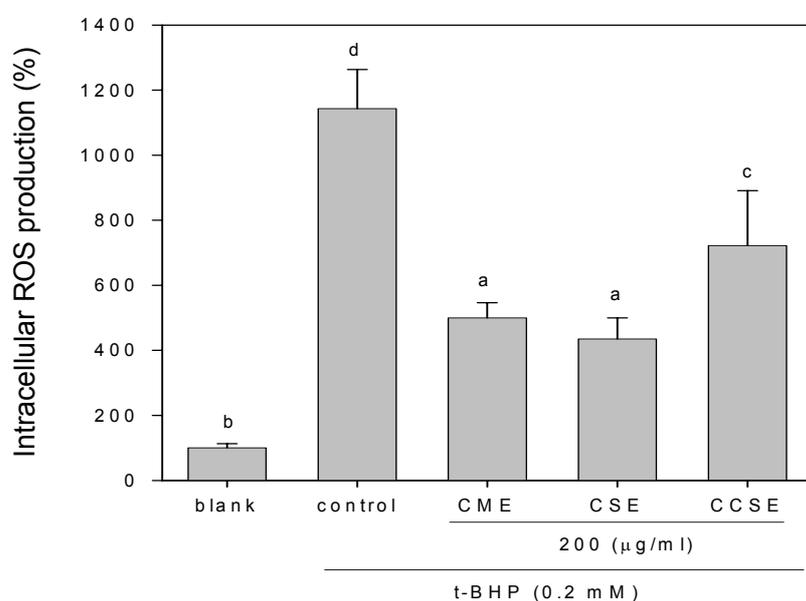


Fig. 4. Effects of CME, CSE and CCSE on 0.2 mM t-BHP induced intracellular ROS production in HepG2 cells ( $p=0.001$ ).

圖四. CME, CSE, 與 CCSE 對 0.2 mM t-BHP 誘導產生細胞內氧化壓力之影響。

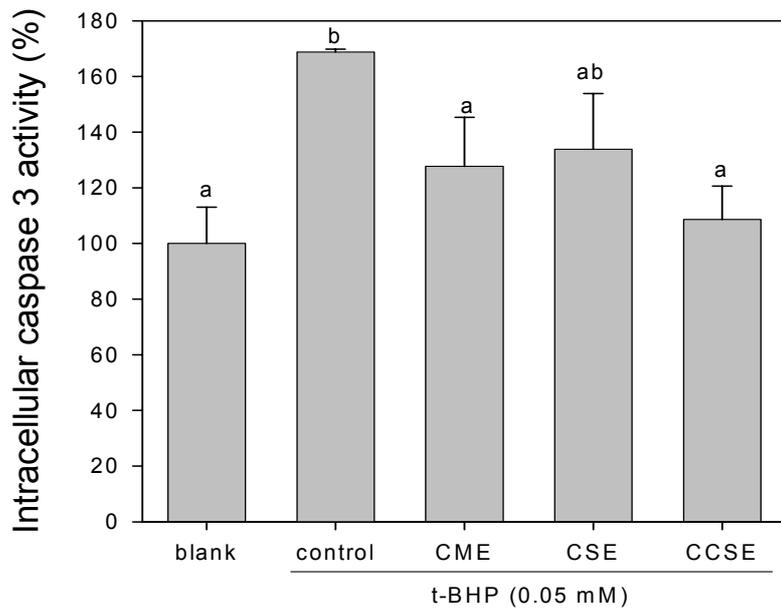


Fig. 5. Effects of CME, CSE and CCSE on 0.05 mM t-BHP induced caspase3 activity in HepG2 cells (p= 0.028).

圖五. CME, CSE, 與 CCSE 對 0.05 mM t-BHP 誘導 HepG2 細胞 caspase3 活性之影響。

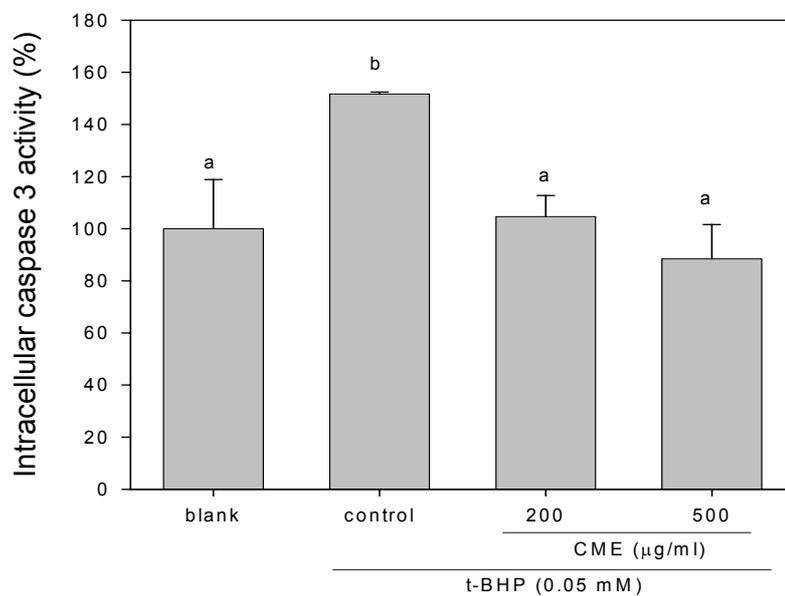


Fig. 6. Effects of CME on 0.05 mM t-BHP induced caspase3 activity in HepG2 cells (p=0.011).

圖六. CME 對 0.05 mM t-BHP 誘導 HepG2 細胞 caspase3 活性之影響。

CME ( $\mu\text{g/ml}$ )	0	0	200
t-BHP (mM)	0	0.05	0.05

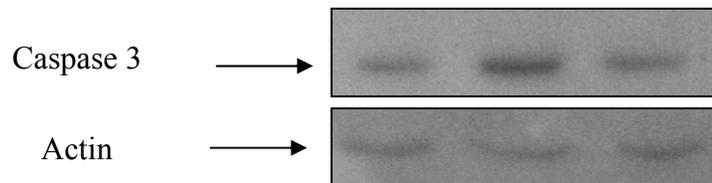


Fig. 7. Effects of CME on the protein levels of caspase3 in HepG2 cells induced by 0.05 mM t-BHP.

圖七. CME 對 0.05 mM t-BHP 誘導 HepG2 細胞 caspase 3 蛋白表現之影響。

## 可供推廣之研發成果資料表

 可申請專利

 可技術移轉

日期：97 年 5 月 30 日

<b>國科會補助計畫</b>	計畫名稱：北冬蟲夏草體內與體外生物活性：護肝與抗血管氧化傷害之研究(1/3) 計畫主持人：杜平惠 計畫編號：NSC 96-2313-B-041-001-MY3 學門領域：食品
<b>技術/創作名稱</b>	
<b>發明人/創作人</b>	
<b>技術說明</b>	中文： 本研究為探討北冬蟲夏草(蛹蟲草)體內與體外生物活性，分三年完成。第一年計畫為比較北冬蟲夏草水草物(water extracts of <i>Cordyceps militaris</i> ; CME)，冬蟲夏草水草物(water extracts of <i>Cordyceps sinensis</i> ; CSE)，市售冬蟲夏草水草物(water extracts of commercial <i>Cordyceps sinensis</i> ; CCSE)對細胞模式之護肝機能性表現。結果顯示 CME、CSE 與 CCSE 單獨處理對人類肝細胞株 HepG2 並無明顯毒性。CME，CSE 與 CCSE 可以有效抑制 tert-Butylhydroperoxide (t-BHP) 誘發細胞毒性，而 CME 與 CSE 二者的效果在統計上並無差異(P>0.05)。同時，CME，CSE 與 CCSE 可以有效抑制 t-BHP 誘發細胞內氧化壓力的產生，且 CSE 之效用仍略高於 CME，但統計上無差異(P>0.05)。另一方面，CME，CSE 與 CCSE 也可以有效抑制 t-BHP 誘發細胞內 Caspase 3 活性。以西方墨點分析法分析顯示 CME，CSE 與 CCSE 也可以有效抑制 t-BHP 誘發細胞內 Caspase3 蛋白之表現。綜合上述結果可知 CME，CSE 與 CCSE 對氧化壓力所引發之細胞凋亡具有氧化保護之機能作用，而其機轉可能與其降低胞內活性氧產生及抑制 Caspase3 活性有關。雖然，CME 在本試驗模式效果略低於 CSE，但是統計上並無差異(P>0.05)，顯示北冬蟲夏草水草物對細胞模式具有顯著護肝機能性之表現。  (100~500 字)

	<p>英文：</p> <p>In this three-year project, the major purpose is to investigate the bioactivities of <i>Cordyceps militaris</i> in vivo and in vitro. The major goal of the first year is to compare hepatoprotective activities of CME, CSE, and CCSE, respectively, in cellular model. According to the data, CME, CSE, and CCSE did not exhibit obvious cytotoxicity toward HepG2 cells. On the other hand, the oxidative toxicity of t-BHP was decreased in the presence of CME, CSE, and CCSE respectively. No significant difference (<math>p&gt;0.05</math>) was found between CME and CSE in protective effects of oxidative toxicity of t-BHP. Meanwhile, the intracellular oxidative stress induced by t-BHP in HepG2 cells was inhibited in the presence of CME, CSE, and CCSE, respectively. Further, the activity of intracellular caspase 3 induced by t-BHP was decreased in the presence of CME, CSE, and CCSE, respectively. By immunoblot, the protein levels of caspase 3 increased by t-BHP was inhibited in the presence of CME. According to the data mentioned above, the apoptosis progression induced by oxidative stress was inhibited by CSE, CME, and CCSE, respectively. The mechanism for the hepatoprotection in vitro may be attributed to decrease of oxidative stress and caspase 3 activity. This study indicated that CME displayed marked hepatoprotection in vitro.</p>
<p>可利用之產業 及 可開發之產品</p>	<p>食品工業；健康食品</p>
<p>技術特點</p>	<p>細胞培養與護肝細胞凋亡技術之操作</p>

<p><b>推廣及運用的價值</b></p>	<p>本計劃之價值如下：</p> <p>本試驗結果證實北冬蟲夏草水萃物，冬蟲夏草水萃物對氧化壓力所引發之細胞凋亡具有氧化保護之機能作用，而其機轉可能與其降低胞內活性氧產生及抑制 Caspase3 活性有關。雖然，北冬蟲夏草水萃物在本試驗模式效果略低於冬蟲夏草水萃物，但是統計上並無差異(<math>P&gt;0.05</math>)，顯示北冬蟲夏草水萃物對細胞模式具有顯著護肝機能性之表現。有關動物方面之相關試驗，本實驗室正準備繼續第二年試驗之以證實其功能性。另一方面，本研究結果可作為消費者、產業界與醫藥界之參考與應用。</p>
------------------------	---

- ※ 1. 每項研發成果請填寫一式二份，一份隨成果報告送繳本會，一份送 貴單位研發成果推廣單位（如技術移轉中心）。
- ※ 2. 本項研發成果若尚未申請專利，請勿揭露可申請專利之主要內容。
- ※ 3. 本表若不敷使用，請自行影印使用。