

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(2/3)

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：97 年 8 月 1 日至 98 年 7 月 31 日

計畫主持人：杜平惠有

共同主持人：王柏森

計畫參與人員：陳潔云

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 98 年 5 月 27 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。第二年計畫為探討北冬蟲夏草 (*Cordyceps militaris*) 於體內試驗之護肝效應。試驗大鼠預先餵食北冬蟲夏草 (0.1-0.5 g/kg) 連續28 天，並於犧牲前一天腹腔注射四氯化碳(0.5mmol/kg)，再進行血清與肝臟生化值之測定與病理切片。結果顯示未經四氯化碳處理之大鼠餵食高劑量北冬蟲夏草(0.5g/kg)28天，並無顯著肝毒性。而不同劑量北冬蟲夏草(0.1-0.5 g/kg)對四氯化碳誘發大鼠肝損傷與四氯化碳傷害組比較，由GOT 與GTP 之表現而言，顯示不同劑量北冬蟲夏草可顯著抑制四氯化碳誘發肝損傷，且預先處理北冬蟲夏草可顯著減輕四氯化碳誘發 glutathione (GSH)含量下降之現象。另外，根據肝臟病理切片結果也顯示不同劑量北冬蟲夏草有輕度抑制四氯化碳肝毒性反應之效益。綜合本試驗結果，顯示北冬蟲夏草具有輕微保護肝臟效應，而其作用機制與其降低肝臟氧化壓力之有很大關連性。

關鍵字：北冬蟲夏草，護肝效應，氧化壓力

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 second year is to study the protective effects of *Cordyceps militaris* on liver damage in vivo According to the data, *Cordyceps militaris* (0.5 g/kg) did not

exhibit obvious hepatotoxicity in vivo. On the other hand, The oral pretreatment of *Cordyceps militaris* (0.1-0.5 g/kg) for consecutive 28 days before a single dose of CCl₄ (0.5 mmol/kg, ip) exhibited a significant protective effect by lowering the values of GOT and GPT, and increased the contents of glutathione (GSH). In addition, based on pathological nomenclatures, *Cordyceps militaris* also exhibited hepatoprotective activity in vivo. These results implied that *Cordyceps militaris* showed hepatoprotection which may be attributed to decrease oxidative stress in liver.

Keywords: *Cordyceps militaris*,
hepatoprotection, oxidative
stress

前言

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，由於取得不易，民間販售價格十分昂貴。而蛹蟲草(*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。坊間盛傳北冬蟲夏草具有特殊療效，過去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；但兩者對 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，根據第一年試驗結果可知 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 caspase-3 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。而本次第二年計畫則進一步探討北冬蟲夏草(*Cordyceps militaris*)於體內試驗之護肝效應，以期瞭解北冬蟲夏草完整的機能特性，並作為醫藥食品界之應用參考。

結果與討論

一、北冬蟲夏草對四氯化碳氧化性肝損傷之影響

表一為預先餵食北冬蟲夏草(0.1-0.5 g/kg)之大鼠對四氯化碳誘發大鼠肝損傷之血清生化值影響，結果顯示大鼠於第28天腹腔注射四氯化碳(0.5 mmol/kg)，會明顯增加大鼠血清中肝損傷指標 GOT 與 GPT 值，而北冬蟲夏草可降低血清之 GOT、GPT 值，顯示北冬蟲夏草可抑制四氯化碳誘發肝臟損傷。表二為北冬蟲夏草對四氯化碳誘發大鼠之肝臟中 GSH 含量之影響，結果顯示腹腔注射四氯化碳(0.5 mmol/kg)，會顯著降低 GSH 含量，惟北冬蟲夏草可減緩 GSH 含量下降，顯示北冬蟲夏草可抑制四氯化碳誘發降低 GSH 含量，進而減緩肝臟氧化損傷。另有關北冬蟲夏草對四氯化碳誘發大鼠之肝臟中酵素活性之影響，目前正試驗中，俟有正式數據，再予以整理呈現。

二、北冬蟲夏草對四氯化碳誘發大鼠肝損傷之病理切片

圖一至圖七是將肝組織切片以 Hematoxylin & Eosin (H&E) 染色，於光

學顯微鏡(BX51, Olympus, Tokyo, Japan)觀察肝臟之組織病理變化。圖一為控制組，圖二為四氯化碳組，圖三是餵食Silymarin與四氯化碳傷害組，圖四至圖六為分別餵食0.1，0.3與0.5g/kg北冬蟲夏草與四氯化碳傷害組，圖七為北冬蟲夏草高劑量組。其中，根據圖一與圖二可知，大鼠給予四氯化碳24小時後，肝組織會出現嚴重瀰漫性肝小葉中心性急性細胞腫脹，脂肪變性及局部細胞凋亡。而餵食Silymarin與四氯化碳傷害組，肝組織則出現輕度至中度肝小葉中心性急性細胞腫脹，脂肪變性壞死及膽管增生。而餵食不同劑量之北冬蟲夏草與四氯化碳傷害組，肝組織則出現輕度至中度肝小葉中心性急性細胞腫脹，脂肪變性，局部壞死及膽管增生。此結果顯示四氯化碳組，Silymarin與四氯化碳組，北冬蟲夏草與四氯化碳傷害組，均可見不同程度的肝小葉中心性急性細胞腫脹、脂肪變性及細胞壞死。進一步綜合病理檢查評估標準，分數越高，表示傷害越嚴重，表四結果顯示，四氯化碳經腹腔注射後，對雄大鼠毒性反應相關

之病理係造成肝臟嚴重性，瀰漫性肝小葉中心性急性細胞腫脹，脂肪變性及細胞壞死等變化，傷害分數為9，而Silymarin與四氯化碳組傷害分數為5，而不同劑量北冬蟲夏草有極輕度抑制毒性反應之效益，傷害分數減少為5，高劑量北冬蟲夏草對肝臟無毒性反應傷害分數為0。

結論

根據上述已整理出之結果，可知北冬蟲夏草對四氯化碳所引發之肝毒性具有氧化保護之機能作用，而其保護機轉可能與北冬蟲夏草可正向條調整肝臟GSH表現，進而減緩氧化傷害有關。

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)

表一 北冬蟲夏草對四氯化碳誘發大鼠肝損傷之血清生化值影響

Table 1 Effects of *Cordyceps militaris* on serum GOT and GPT in rats treated with CCl₄

Treatment	GOT(U/L)	GPT(U/L)	BUN(mg/dL)	CRE(mg/dL)
Control	111±17	28±3	25.08±2.19	0.77±0.05
CCl ₄	1363±391 ^b	373±166 ^b	25.00±23.32 ^a	0.66±0.15 ^a
Silymarin 0.2 g/kg + CCl ₄	691±331 ^a	138±48 ^a	28.40±3.30 ^a	0.69±0.06 ^{ab}
北冬蟲夏草 0.1 g/kg + CCl ₄	731±362 ^a	248±172 ^{ab}	27.00±3.73 ^a	0.81±0.08 ^{ab}
北冬蟲夏草 0.3 g/kg + CCl ₄	590±148 ^a	110±42 ^a	33.08±13.17 ^a	0.85±0.19 ^b
北冬蟲夏草 0.5 g/kg + CCl ₄	706±164 ^a	152±108 ^a	25.74±2.93 ^a	0.72±0.02 ^{ab}
北冬蟲夏草 0.5 g/kg	100±42	28.30±15.47	19.33±1.27	0.83±0.10

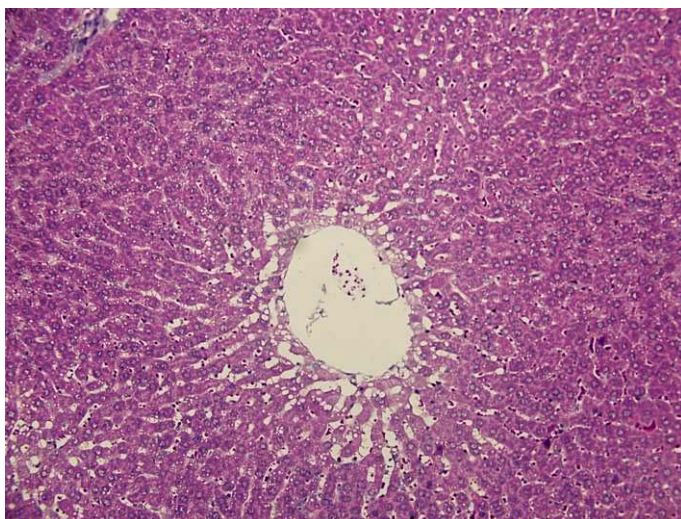
Each value is expressed as mean ± SD from 6-10 rats. ^a Significant difference from the group treated with CCl₄ alone, $p<0.05$. ^b Significant difference from the control, $p<0.05$. GOT: glutamic oxaloacetic transaminase, GPT: glutamic pyruvic transaminase, BUN: blood urea nitrogen, CRE: creatinine.

表二 北冬蟲夏草對四氯化碳誘發大鼠之肝臟中 GSH 之影響

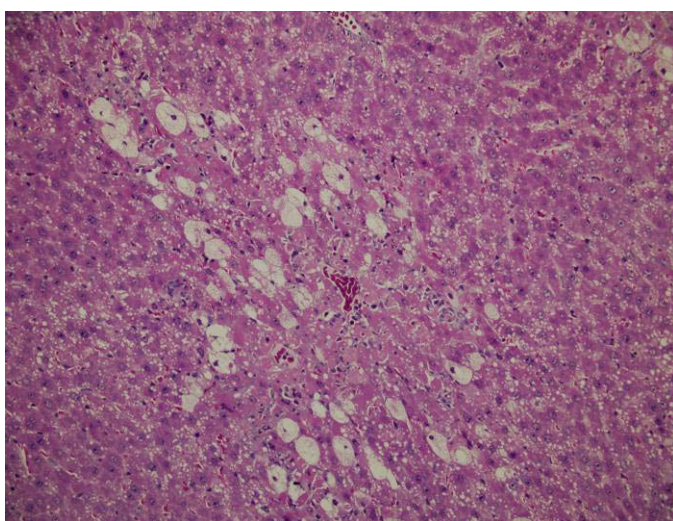
Table 2 Effects of *Cordyceps militaris* on the content of GSH in rats treated with CCl₄

Treatment	GSH (nmole/g)
Control	78.00±13.74
CCl ₄	44.75±6.80 ^b
Silymarin 0.2 g/kg + CCl ₄	68.00±10.23 ^a
北冬蟲夏草 0.1 g/kg + CCl ₄	79.67±6.51 ^a
北冬蟲夏草 0.3 g/kg + CCl ₄	67.25±9.95 ^a
北冬蟲夏草 0.5 g/kg + CCl ₄	65.00±11.97 ^a
北冬蟲夏草 0.5 g/kg	114.00±25.07

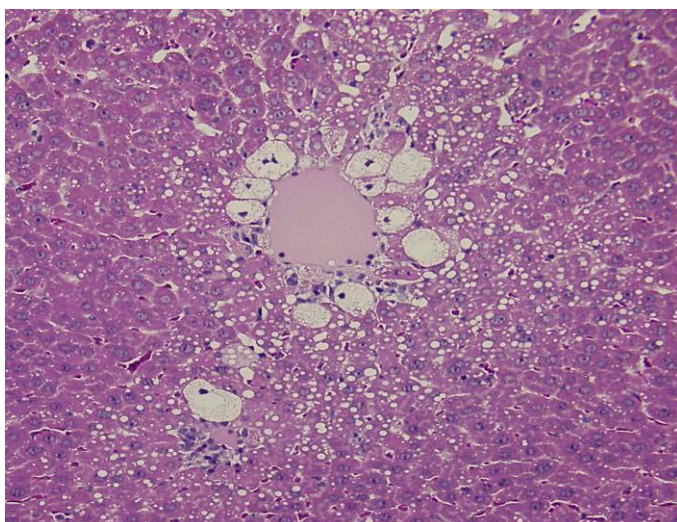
Each value is expressed as mean ± SD from 6-10 rats. ^a Significant difference from the group treated with CCl₄ alone, $p<0.05$. ^b Significant difference from the control, $p<0.05$.



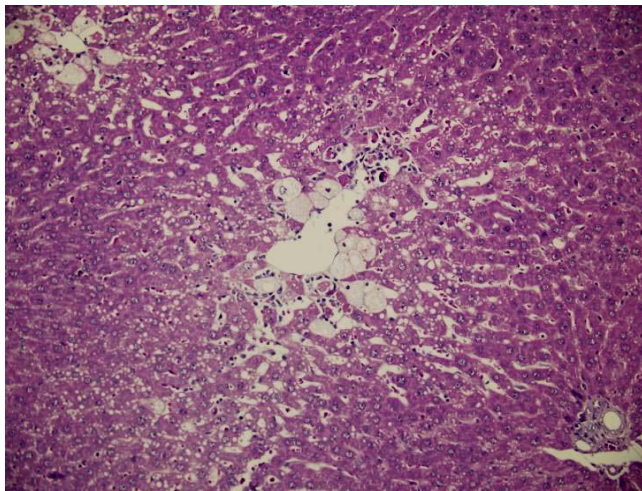
圖一. 試驗大鼠控制組肝臟組織切片(H&E stain, 250X)。



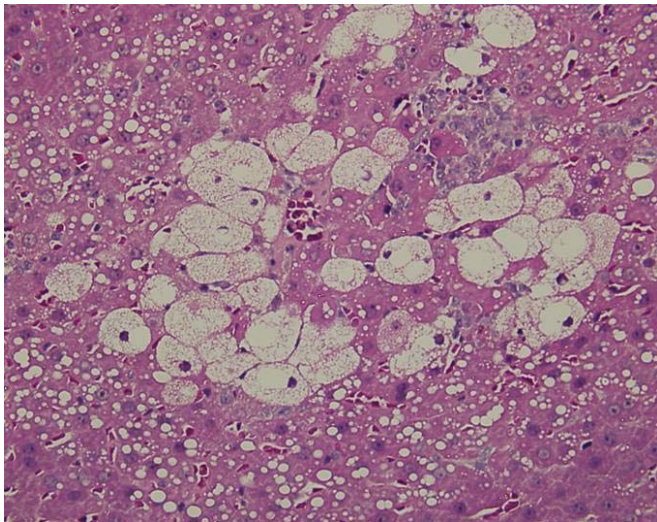
圖二. 試驗大鼠四氯化碳組肝臟組織切片(H&E stain, 250x)。



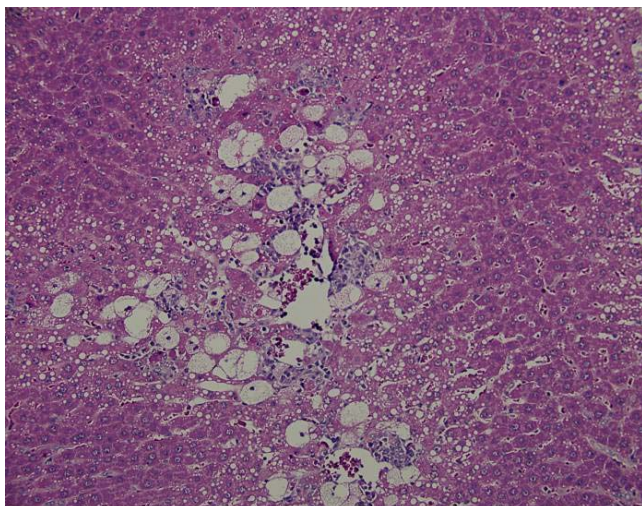
圖三. 試驗大鼠餵食 Silymarin (0.2 g/kg) 與四氯化碳組肝臟組織切片(H&E stain, 250x)。



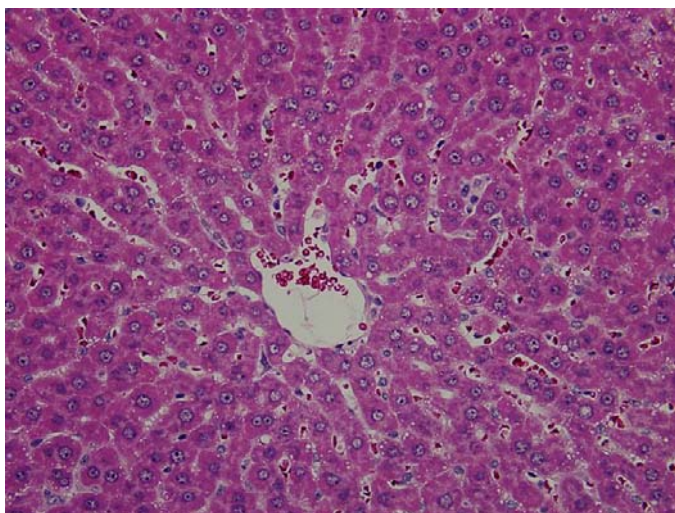
圖四. 試驗大鼠餵食低劑量北冬蟲夏草 (0.1 g/kg) 與四氯化碳組肝臟組織切片(H&E stain, 250x)。



圖五. 試驗大鼠餵食中劑量北冬蟲夏草 (0.3 g/kg) 與四氯化碳組肝臟組織切片(H&E stain, 250x)。



圖六. 試驗大鼠餵食高劑量北冬蟲夏草 (0.5 g/kg) 與四氯化碳組肝臟組織切片(H&E stain, 250x)。



圖七. 試驗大鼠餵食北冬蟲夏草 (0.5 g/kg) 組肝臟組織切片 (H&E stain, 250x)。

表三 北冬蟲夏草對四氯化碳誘發大鼠之肝臟病理檢查評估

Table 3 Histological injury score of liver under *Cordyceps militaris* in rats treated with CCl₄

Treatment	Injury Score			Total
	Fatty change	Acute cell swollen	Necrosis, focal	
Control	1	0	0	1
CCl ₄	3	4	2	9
Silymarin 0.2 g/kg + CCl ₄	2	2	1	5
? 北冬蟲夏草 0.1 g/kg + CCl ₄	2	2	1	5
北冬蟲夏草 0.3 g/kg + CCl ₄	2	2	1	5
北冬蟲夏草 0.5 g/kg + CCl ₄	2	2	1	5
北冬蟲夏草 0.5 g/kg	0	0	0	0

Livers were scored for hepatic injury via light microscopy.

可供推廣之研發成果資料表

☐ 可申請專利

☐ 可技術移轉

日期：98 年 5 月 24 日

國科會補助計畫	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(2/3) 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
技術/創作名稱	
發明人/創作人	
技術說明	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。第二年計畫為探討北冬蟲夏草 (<i>Cordyceps militaris</i>) 於體內試驗之護肝效應及其對抗氧化酵素系統表現之調控性。試驗大鼠預先餵食北冬蟲夏草 (0.1-0.5 g/kg) 連續28 天, 並於犧牲前一天腹腔注射四氯化碳(0.5mmol/kg), 再進行血清與肝臟生化值之測定與病理切片。結果顯示未經四氯化碳處理之大鼠餵食高劑量北冬蟲夏草(0.5g/kg)28天, 並無顯著肝毒性。而不同劑量北冬蟲夏草(0.1-0.5 g/kg)對四氯化碳誘發大鼠肝損傷與四氯化碳傷害組比較, 由GOT 與GTP 之表現, 顯示不同劑量北冬蟲夏草可顯著抑制四氯化碳誘發肝損傷, 且預先處理北冬蟲夏草可顯著減輕四氯化碳誘發glutathione (GSH)含量下降之現象。另外, 根據肝臟病理切片結果也顯示不同劑量北冬蟲夏草有輕度抑制四氯化碳肝毒性反應之效益。綜合本試驗結果, 顯示北冬蟲夏草具有輕微保護肝臟效應, 而其作用機制與其抑制肝臟氧化壓力之有很大關連性。 (100~500 字)

	英文： In this three-year project, the major purpose is to investigate of the bioactivities of <i>Cordyceps militaris</i> in vivo and in vitro. The major goal of the second year is to study the protective effects of <i>Cordyceps militaris</i> on liver damage in vivo and the investigation of modulating the expression of antioxidant enzyme systems were studied. According to the data, <i>Cordyceps militaris</i> (0.5 g/kg) did not exhibit obvious hepatotoxicity in vivo. On the other hand, The oral pretreatment of <i>Cordyceps militaris</i> (0.1-0.5 g/kg) for consecutive 28 days before a single dose of CCl₄ (0.5 mmol/kg, ip) exhibited a significant protective effect by lowering GOT and GPT, and increased the glutathione (GSH) formation. According to pathological nomenclatures, <i>Cordyceps militaris</i> also exhibited hepatoprotective activity in vivo. These results implied that <i>Cordyceps militaris</i> showed hepatoprotection which may be attributed to decrease oxidative stress in liver.
可利用之產業 及 可開發之產品	食品工業；健康食品
技術特點	護肝之動物試驗技術之操作