

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

靈芝和巴西洋菇發酵液之肝臟保健功效評估及其作用機轉 之探討(2/3)

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC93-2321-B-002-010-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：國立臺灣大學食品科技研究所

計畫主持人：沈立言

計畫參與人員：蘇正元、陳與國、童熾臻、趙丹平

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 6 月 1 日

一、摘要

本計畫研究之目的乃在探討「靈芝-豆科」(GL)或「巴西洋菇-豆科」(AB)發酵產物之抑制肝癌活性與護肝功能，並分析其所含三萜類(triterpenoids)活性成分與抑制肝癌活性之相關性，以及探討抑制肝癌之作用機轉。計畫至目前為止，於「靈芝-豆科」發酵產物方面，以前一年度計畫所決定之最佳抑制肝癌活性之靈芝(菌種皆為 BCRC 36123)發酵條件，進行大量發酵(200 L 發酵槽)後所得之發酵產物與小量發酵(5 L 發酵槽)所得發酵產物相較下，二者菌絲體乙醇萃取物中三萜類之 HPLC 圖譜甚為相似，然而大量發酵產物之菌絲體乙醇萃取率(9.9 g/100 g dry matter)較低，但 Hep 3B 肝癌細胞經此大量發酵產物(100 µg/mL)處理後之生存率為 31.9±7.1% of control，所以其亦具有不錯的抑制肝癌活性。另外，以子計畫三於前一年度所決定之最佳抗氧化肝癌活性之靈芝發酵條件，生產大量發酵產物(GL-93-12-21) (200 L 發酵槽)，與小量發酵產物(GL-92-10-22) (5 L 發酵槽)相較下，GL-93-12-21 菌絲體具有較低的乙醇萃取率(17.1 g/100 g dry matter)，但 Hep 3B 肝癌細胞經 GL-93-12-21 菌絲體乙醇萃取物(100 µg/mL)處理後之生存率為 24.5±0.6% of control，故其亦具有不錯的抑制肝癌活性。於「巴西洋菇-豆科」發酵產物方面，分析最新生產的小量發酵產物，結果顯示 AB-93-10-19 (菌種為 NCUC AB001)的菌絲體乙醇萃取率為 16.4 g/100 g dry matter，較高於 AB-93-12-4 與 AB-94-2-1 (菌種皆為 BCRC 36814)，但抑制肝癌細胞活性最佳者為 AB-93-12-4 菌絲體乙醇萃取物(IC₅₀ 為 13.5 µg/mL)，其發酵基質中含 20 g/L 黑豆和 4 g/L 黃耆，發酵溫度為 28°C，攪拌速率為 250 rpm，通氣量為 0.05 vvm，發酵天數為 35 天。再者，在「巴西洋菇-豆科」大量發酵產物方面，目前已有二批不同條件之樣品，經分析後結果顯示，AB-94-3-17-GF3 菌絲體具有較低的乙醇萃取率(17.1 g/100 g dry matter)，但卻有較佳的抑制肝癌細胞活性(IC₅₀ 為 5.5 µg/mL)，其發酵條件與 AB-94-3-10-GF 相較下，相異處在於此樣品之發酵條件為兩階段發酵模式。此外，建立『具最佳抑制肝癌細胞活性之「靈芝-豆科」或「巴西洋菇-豆科」發酵產物對四氯化碳誘導大白鼠正常初代肝細胞損傷之影響』之試驗模式，並分析日前具最佳抑制肝癌細胞活性之樣品(GL-92-10-3 與 AB-93-3-17 菌絲體乙醇萃取物)，當二種樣品濃度分別為 100 µg/mL 時，可有效減緩四氯化碳所誘導的大白鼠正常初代肝細胞損傷。

關鍵詞：靈芝、巴西洋菇、肝癌細胞、三萜類、四氯化碳、大白鼠初代肝細胞

二、計畫緣由與目的

肝臟為代謝、解毒和抗氧化器官，而當肝功能損傷時則會導致代謝障礙，並影響其他臟器功能，嚴重則危及生命。依據行政院衛生署統計，民國 92 年中華民國台灣地區十大死亡原因第六位為慢性肝病及肝硬化；肝癌為十大癌症主要死亡原因的第一名⁽¹⁾，所以肝病之防治的確是台灣重要的課題。

靈芝(*Ganoderma lucidum*)含有種類極多的三萜類二次代謝產物，其在機能性上的研究，已證實具有抗腫瘤、保護肝臟、抑制血小板凝集、抗高血壓、降低血膽固醇及抗 HIV 病毒活性等能力^(2, 3, 4, 5, 6)。

巴西洋菇(*Agaricus blazei*)又稱巴西磨菇、柏氏磨菇或小松菇等。研究報告顯示巴西洋菇具有抗腫瘤活性，其抗腫瘤機制除了具有傳統多醣體的活化宿主免疫系統外，能直接誘使腫瘤細胞發生細胞凋亡(apoptosis)而抑制腫瘤細胞生長^(7, 8)。

黑豆(Black bean)屬於蝶形花科(*Papilionaceae*)，其內含有維生素 E、異黃酮類(isoflavone)、皂素(saponin)與 GSH 等抗氧化物質，以及抗氧化酵素；但黑豆種皮中的抗氧化物質則有花青素及類胡蘿蔔素等^(9, 10)。近年來亦發現在大豆、黑豆中含有更豐富的植物性雌激素 genistein，此成分具有抑癌作用^(11, 12)。

市售中藥的黃耆，為豆科植物黃耆(*Astragalus membranaceus*)的乾燥根，亦稱之為黃芪。黃耆的化學成分主要含有胺基酸、微量元素、黃酮類化合物、黃耆皂苷(*Astragaloside*) (為一種 cycloartane triterpene glycosides)、多醣、含氮化合物、維生素、其他有機物及多種微量元素⁽¹³⁾。近年來的研究發現黃耆具有保肝作用，且推測「黃耆皂苷」及「黃耆多醣」可能為其主要活性成分之一。

本整合型計畫擬以豆科植物(黑豆、黃耆)作為發酵基質，乃因為豆科植物營養成分比較齊全，還含有大豆皂苷、大豆多肽、大豆異黃酮等具生物活性和保健功效之物質，故希望在發酵過程中能提供保健菌種之生長所需外，也期望菌種與豆科植物的保健功效能有互補或加乘作用，甚至藉由菌種在發酵程序中分泌酵素來活化部分生理活性成分，例如類黃酮醣苷鍵的分解，或多醣體的合成(或降解)等可能交互反應之結果。

本研究將採用由子計畫一(蔣丙煌教授)和子計畫二(徐敬衡副教授)自行發酵生產所得之「靈芝-豆科」或「巴西洋菇-豆科」發酵產物為實驗樣品，探討「靈芝-豆科」或「巴西洋菇-豆科」發酵產物之抑癌活性與護肝功能，並分析其所含三萜類化合物與抑制肝癌活性之相關性，以及探討抑制肝癌作用之機轉。本研究擬分三年進行，而本年度(第二年)探討方向為：

1. 藉由四氯化碳(CCl₄)誘導大白鼠慢性肝損傷的實驗模式，探討不同發酵條件下「靈芝-豆科」或「巴西洋菇-豆科」發酵產物之護肝功能特性，並深入探討發酵產物對於肝臟抗氧化與解毒代謝系統之作用機轉；

2. 以第一年建立之篩選平台探討「靈芝-豆科」或「巴西洋菇-豆科」發酵產物的不同區分物之抑制肝癌活性；
3. 深入探討具有抑制肝癌活性之發酵產物區分物對大白鼠正常初代肝細胞之影響。

三、材料與方法

(一) 材料

本報告提及之「靈芝-豆科」與「巴西洋菇-豆科」發酵產物之發酵條件分別列於表一、表二與表三。

(二) 方法

1. 樣品前處理

針對「靈芝-豆科」(縮寫為「GL」)或「巴西洋菇-豆科」(縮寫為「AB」)發酵產物，區分為發酵濾液與菌絲體(mycelium；縮寫為「m」)等兩部分分別進行分析。菌絲體經冷凍乾燥並磨粉後，分別以重量(g)的20倍體積(mL)之95%乙醇混合後，於30°C恆溫水浴槽中進行萃取24小時，所得萃取液再經冷凍乾燥後得萃取物(縮寫為「E」)，所得萃取物再經乾燥後備用，並計算萃取率。此外，AB-94-3-10-GF為發酵濾液與菌絲體混合並經冷凍乾燥、粉碎而得乾燥粉末(縮寫為「p」)，其萃取條件與上述同。

2. 靈芝及巴西洋菇發酵液抑制肝癌細胞活性之探討

參考洪⁽¹⁴⁾方法，協同 lovastatin 與發酵產物處理 Hep3B 細胞，以 MTT assay 分析細胞生存率。

3. 三萜類活性成分之分析

參考 Chyr and Shiao⁽¹⁵⁾方法，針對不同發酵條件下發酵濾液與菌絲體，進行三萜類化合物(triterpenoids)之分析。以甲醇配製菌絲體乙醇萃取物成濃度為20 mg/mL之溶液後，進行 HPLC 分析。所得之層析圖譜，藉由與參考文獻的層析圖譜比對鑑定各個波峰位置，推測三萜類化合物可能組成與相對含量。

4. 本年度額外探討具最佳抑制肝癌細胞活性之「靈芝-豆科」或「巴西洋菇-豆科」發酵產物對四氯化碳誘導大白鼠正常初代肝細胞損傷之影響

(1) 實驗動物飼養

由國科會購進6~8週齡之雄性 Sprague-Dawley 大白鼠。飼養環境控制在12小時 light/dark 循環條件下，任其隨意進食進水，並於8週齡時進行實驗。

(2) 肝細胞之分離及培養

肝細胞分離乃依據 Berry and Friend⁽¹⁶⁾與 Bonney 等⁽¹⁷⁾所發表肝灌注之方法，並加以適度修正。最終所得細胞懸浮液的密度為 0.5×10^6 cells/mL，並分注2 mL到已預先經 collagen 處理的35 mm 培養皿中，如此每一培養皿約有 1×10^6 個肝細胞，置於37°C之培養箱中培養。

(3) 發酵產物對四氯化碳誘導大白鼠初代肝細胞損傷之生存力及形態變化之影響

大白鼠初代肝細胞於分盤後經24小時培養，更換新的培養基，其培養基中含有10 mM CCl₄/ethanol 與不同濃度之「靈芝-豆科」或「巴西洋菇-豆科」菌絲體乙醇萃取物(溶於DMSO中，DMSO最終濃度為0.5%)，再經1 hr 培養後，以倒立式位相差顯微鏡觀察細胞之生長狀態、測定細胞內外之LDH(lactate dehydrogenase)酵素活性與利用 MTT assay 分析細胞存活率，以瞭解細胞生存力及形態變化。LDH之測定是採用 Moldeus 等⁽¹⁸⁾所發表之方法。MTT assay 是採用 Hansen 等⁽¹⁹⁾所發表之方法。

(4) 發酵產物對四氯化碳誘導大白鼠初代肝細胞損傷中脂質過氧化(lipid peroxidation)之影響

脂質過氧化分析乃參考 Fraga 等⁽²⁰⁾。TBARS 值以每 mg 蛋白質產生多少 nmole MDA 來表示。蛋白質定量分析以 Lowry 等⁽²¹⁾方法進行。

(5) 發酵產物對四氯化碳誘導大白鼠初代肝細胞中 GSH 相關抗氧化與解毒代謝系統之影響

GPx 活性之測定是採用 Lawrence and Burk⁽²²⁾所發表之方法。GrD 活性之測定是採用 Bellomo 等⁽²³⁾所發表之方法。GST 活性之測定是採用 Habig 等⁽²⁴⁾所發表之方法。GSH/GSSG 值之測定是採用 Reed 等⁽²⁵⁾所發表之方法。細胞蛋白質含量之測定是採用 Lowry 等⁽²¹⁾所發表之方法。

5. 統計分析

實驗所得到之實驗數據，將採用 SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 電腦統計套裝軟體中之變異數分析 (analysis of variance, 簡稱 ANOVA) 配合 Duncan's new multiple range test 進行統計分析，以測試不同處理間是否達到顯著性差異 ($P < 0.05$)。

四、執行進度及成果

(一) 抑制肝癌細胞活性之測定與三萜類活性成分之分析

1. 「靈芝-豆科」發酵產物

GL-93-10-6 (200L 發酵槽) 為 GL-92-10-3 (5L 發酵槽) 之條件下放大發酵所得之發酵產物，為子計畫四於前一年度計畫中所決定具最佳抑制肝癌細胞活性之靈芝發酵條件 (表一)。分析結果顯示，在菌絲體乙醇萃取率方面，GL-93-10-6 之萃取率為 9.9 g/100 g dry matter，較低於 GL-92-10-3 之萃取率 (22.8 g/100 g dry matter) (表四)。於抑制肝癌活性方面，經 GL-93-10-6 菌絲體乙醇萃取物 (GL-93-10-6-m-E) 與 GL-92-10-3 菌絲體乙醇萃取物 (GL-92-10-3-m-E) 處理過之 Hep 3B 細胞生存率分別為 31.9 ± 7.1 與 $13.7 \pm 2.2\%$ of control，所以二者產物均具有不錯之抑制肝癌活性 (表四)。此外，此二者樣品中三萜類 HPLC 分析圖譜顯示，其萃取物中所含三萜類含量與種類大致類似 (圖一)。

GL-93-12-21 (200L 發酵槽) 為 GL-92-10-22 (5L 發酵槽) 之條件下放大發酵所得之發酵產物，為子計畫三於前一年度計畫中所決定具最佳抗氧化活性之靈芝發酵條件 (表一)。分析結果顯示，在菌絲體乙醇萃取率方面，GL-93-12-21 之萃取率為 17.1 g/100 g dry matter，較低於 GL-92-10-22 之萃取率 (23.5 g/100 g dry matter) (表四)。於抑制肝癌細胞活性方面，經 GL-92-10-22-m-E 與 GL-93-12-21-m-E 處理過之 Hep 3B 細胞生存率分別為 31.1 ± 6.4 與 $24.5 \pm 0.6\%$ of control，所以二者產物均具有不錯之抑制肝癌細胞活性 (表四)。此外，此二者樣品中三萜類 HPLC 分析圖譜顯示，其萃取物中所含三萜類含量與種類略有不同 (圖一)。

2. 「巴西洋菇-豆科」發酵產物

在小型發酵槽 (5L) 生產發酵產物方面，分析由子計畫二所提供的最新三批樣品，其發酵條件如表二所示，主要差別在於 AB-93-10-19 之菌種為 NCUC AB001，而 AB-93-12-4 與 AB-94-2-1 菌種為 BCRC 36814。此外，AB-93-12-4 與 AB-94-2-1 的培養基中分別含有 4 和 8 g/L 黃耆，發酵天數分別為 35 和 50 天，其餘條件相同。分析結果顯示，在菌絲體乙醇萃取率方面，AB-93-10-19 之萃取率為 16.4 g/100 g dry matter，較高於 AB-93-12-4 (10.8 g/100 g dry matter) 與 AB-94-2-1 (7.1 g/100 g dry matter) (表五)。於抑制肝癌細胞活性方面，AB-93-12-4-m-E 具有最佳的抑制肝癌細胞活性 (IC_{50} 為 13.5 $\mu\text{g/mL}$) (表六)。再者，此三批樣品乙醇萃取物中三萜類分析圖譜如圖二所示，顯示不同菌種或不同發酵條件都可能導致可能為三萜類之種類與含量有所不同。

此外，「巴西洋菇-豆科」發酵產物目前已生產二批大量 (500 L 發酵槽) 發酵產物，分別為 AB-94-3-10-GF 與 AB-94-3-17-GF3，其發酵條件 (表三) 主要差異在於發酵模式之不同。AB-94-3-10-GF 為一階段發酵，使用培養基為 medium A (主要含有 20 g/L 黃豆)，DO (dissolved oxygen) ≥ 50 。而 AB-94-3-17-GF3 為二階段發酵，使用培養基除了 medium A 外，於第六天補充 medium B (主要含有 10 g/L 黑豆)，DO 調整為 10。於乙醇萃取率方面，AB-94-3-10-GF 之萃取率為 20.3 g/100 g dry matter，較高於 AB-94-3-17-GF3 之萃取率 (4.7 g/100 g dry matter) (表七)。由於 AB-94-3-10-GF 為發酵濾液與菌絲體混合粉末，其萃取物中含有來自發酵濾液的物質，可能為萃取率較高之緣故。於抑制肝癌細胞活性方面，GF-94-3-10-GF-p-E 與 GF-94-3-17-GF-m-E 之 IC_{50} 分別為 32.8 和 5.5 $\mu\text{g/mL}$ (表八)，顯示 GF-94-3-17-GF-m-E 具有較佳的抑制肝癌細胞活性。至於此二者樣品中可能為三萜類成分分析目前正進行中。

(二) 具最佳抑制肝癌細胞活性之「靈芝-豆科」或「巴西洋菇-豆科」發酵產物對四氯化碳誘導大白鼠正常初代肝細胞損傷之影響

針對上年度所得具最佳抑制肝癌細胞活性之發酵產物，進一步建立「四氯化碳誘導大白鼠初代肝細胞損傷」模式，期能以離體試驗 (ex vivo) 探討發酵產物對四氯化碳誘導大白鼠初代肝細胞損傷之影響。初步結果如表九所示，與控制組相較下，培養基中含 10 mM 四氯化碳可以使大白鼠初代肝細胞中乳酸去氫酶滲漏率增加至 31.4%，而細胞存活率僅剩下 39.2%，顯示四氯化碳降低大白鼠初代肝細胞生存力。而當有發酵產物 (GL-92-10-3-m-E 或 AB-93-3-17-m-E) 共同處理下，可使乳酸去氫酶滲透率減少，細胞存活率增加，除了有劑量效應外，AB-93-3-17-m-E 的效果似乎較佳於 GL-92-10-3-m-E。上述之結果反應於細胞形態變化上 (圖三)。

此外，另有初步結果如表十所示，與控制組相較下，培養基中含 10 mM 四氯化碳可以使大白鼠初代肝細胞內 TBARS 值增加、還原態麩胱甘肽 (GSH) 含量下降，以及麩胱甘肽過氧化酶 (GPx)、麩胱甘肽還原

酶(GRd)與麩胱甘肽硫轉移酶(GST)等酵素活性降低。此外，當有發酵產物共同處理初代肝細胞時，可以使 TBARS 值減少，並提升 GSH 含量與 GSH 相關酵素(GPx、GRd 和 GST)活性，除了有劑量效應外，AB-93-3-17-m-E 的效果似乎較佳於 GL-92-10-3-m-E，這些結果與乳酸去氫酶滲透率和細胞存活率相呼應，故推測發酵產物可能透過提升或維持 GSH 相關酵素(GPx、GRd 和 GST)的活性，使細胞內 GSH 含量增加，進而使脂質過氧化程度降低，亦即減緩四氯化碳對大白鼠初代肝細胞所誘導的氧化壓力，以維持細胞存活力。故或許能透過此試驗模式之結果，篩選具護肝功效之樣品，並以此細胞模式之有效劑量評估動物試驗之試驗劑量，將會是具有效益的途徑。

五、計畫成果自評

本計畫正努力進行第二年之研究工作，針對計畫進度，綜合評估如下：

1. 本計畫研究內容與原計畫探討方向相符，且依目標正在積極執行中。
2. 針對子計畫三所需大量發酵之「靈芝-豆科」發酵產物進行分析，並將其數據提供各子計畫參考，有助於群體計畫之進行。
3. 「巴西洋菇-豆科」發酵產物方面，已完成日前由子計畫二所提供之小量發酵之產物。大量發酵產物目前正由子計畫二陸續生產中，且本子計畫也持續進行各項分析，待一旦決定最佳抑癌活性之發酵產物，便可馬上進入動物試驗與生理活性指標之分析。
4. 透過『具最佳抑制肝癌細胞活性之「靈芝-豆科」或「巴西洋菇-豆科」發酵產物對四氯化碳誘導大白鼠正常初代肝細胞損傷之影響』之試驗結果，可供動物試驗「四氯化碳誘導大白鼠慢性肝損傷」之劑量參考。
5. 由於各樣品之大量發酵產物正在積極生產中，故目前正建立護肝功能特性評估之動物模式「四氯化碳誘導大白鼠慢性肝損傷」，以便順利進行發酵產物之護肝功能特性之探討。
6. 目前正在建立「發酵產物抑制肝癌細胞之機轉」之分析方法，以探討發酵產物之抑癌機轉。

六、參考文獻

1. 行政院衛生署統計室，台灣地區死因統計結果摘要(民國九十二年)，2004。
2. Konopleva M, Tsao T, Ruvoilo P, Stiouf I, Estrov Z, Leysath CE, Zhao S, Harris D, Chang S, Jackson CE, Munsell M, Suh N, Gribble G, Hond T, May WS, Sporn MB, Andreeff M. 2002. Novel triterpenoid CDDO-Me is a potent inducer of apoptosis and differentiation in acute myelogenous leukemia. *Blood* 99:326-335.
3. Min BS, Gao JJ, Nakamura N, Hattori M. 2000. Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against Meth-A and LLC tumor cells. *Chem Pharm Bull* 48:1026-1033.
4. Toth JO, Luu B, Ourisson G. 1983. Cytotoxic triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Tetrahedron Lett* 24:1081-1084.
5. Wang SY, Hsu ML, Hsu HC, Tzeng CH, Lee SS, Shiao MS, Ho CK. 1997. The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages. *Int J Cancer* 70:699-705.
6. Mahato SB, Sen S. 1997. Advances in triterpenoid research, 1990-1994. *Phytochem* 44:1185-1236.
7. Fujimiya Y, Suzuki Y, Oshiman K, Kobori H, Moriguchi K, Nakashima H, Matumoto Y, Takahara S, Ebina T, Katakura R. 1998. Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis. *Cancer Immunol Immunother* 46:147-159.
8. Mizuno M, Morimoto KM, Tsuchida H. 1998. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 62:434-437.
9. 楊棋明、楊智旭、趙璧玉。1999。市售黑豆與黃豆抗氧化力之灰預測比較。中華民國營養學會雜誌。24:201-214。
10. 戴文禎、胡雪萍、趙璧玉。1996。黑豆的抗氧化物質含量。中華民國營養學會雜誌。21:216。
11. Aklyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y. 1987. Genistein a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 262:5592-5595.
12. Okura A, Arakawa H, Oka H, Yoshinai T, Monden Y. 1988. Effect of genistein on topoisomerase active and the growth of [val 12] Ha-ras-transformed NIH 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 157:183-189.
13. 王浴生、鄧文龍、薛春生。1998。中藥藥理與應用。人民衛生出版社。北京。P. 982-1004。
14. 洪淑敏。靈芝促進人類肝癌細胞凋亡之研究。2000。國立台灣大學食品科技研究碩士論文。台北。
15. Chyr R, Shiao MS. 1991. Liquid chromatographic characterization of the triterpenoid patterns in *Ganoderma lucidum* and related species. *J Chromato* 542:327-336.
16. Berry MN, Friend DS. 1973. High yield production of isolated rat liver parenchymal cells: A biochemical and fine structural study. *J Biol Chem* 59: 722-734.
17. Bonney VR, Becker JE, Walker PR, Potter VR. 1974. Primary monolayer cultures of rat liver parenchymal cells suitable for study of regulation of enzyme synthesis. *In Vitro* 9: 399-413.
18. Moldeus P, Hogberg J, Orrenius S. 1978. Isolation and use of liver cells. *Methods Enzymol* 52: 60-71.
19. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 119(2):203-210.

20. Fraga CG, Leibovitz BE, Tappel AL. 1988. Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substance in tissue slices: characterization and comparison between homogenates and microsomes. *Free Rad Biol Med* 4: 155-161.
21. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
22. Lawrence RA, Burk RF. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71: 952-958.
23. Bellomo G, Mirabelli F, DiMonte D, Richelmi P, Thor H, Orrenius C, Orrenius S. 1987. Formation and reduction of glutathione-protein mixed disulfides during oxidative stress. *Biochem Pharma* 36: 1313-1320.
24. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferase: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130-7139.
25. Reed DJ, Babson JR, Beatty PW, Brodie AE, Ellis WW, Potter DW. 1980. High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Anal Biochem* 106: 55-62.

表一 「靈芝-豆科」發酵產物之發酵條件(由子計畫一提供)

Table 1 Fermentation conditions of the fermentation products produced by using black bean and *Astragalus membranaceus* as part of the liquid fermentation medium of *Ganoderma lucidum*

Sample ^a	Fermentation conditions							
	Fermentation system (L)	BB ^c (g/L)	AM ^d (g/L)	Glucose (g/L)	Temperature (°C)	Agitation (rpm)	Aeration (vvm)	Fermentation time (day)
GL-92-10-3 ^b	5	50	20	20	24	50	0.75	11
GL-92-10-3	200	50	20	20	24	50	0.75	11
GL-92-10-22	5	50	20	20	30	50	0.75	11
GL-93-12-21	200	50	20	20	30	50	0.75	11

^a The samples were obtained from Been-Huang Chiang, Professor of Graduate Institute of Food Science and Technology, National Taiwan University.

^b GL: *Ganoderma lucidum*; numbers: the date when the samples were obtained.

^c BB: black bean.

^d AM: *Astragalus membranaceus*

表二 「巴西洋菇-豆科」發酵產物之發酵條件(由子計畫二提供)

Table 2 Fermentation conditions of the fermentation products produced by using black bean and *Astragalus membranaceus* as part of the liquid fermentation medium of *Agaricus blazei*

Sample ^a	Fermentation conditions								
	Fermentation system (L)	BB ^c (g/L)	AM ^d (g/L)	Glucose (g/L)	Temperature (°C)	Final pH	Agitation (rpm)	Aeration (vvm)	Fermentation time (day)
AB-93-10-19 ^b (NCUC AB001)	5	20	—	10	28	4.0	250	0.05	30
AB-93-12-4 (BCRC 36814)	5	20	4	10	28	4.0	250	0.05	35
AB-94-2-1 (BCRC 36814)	5	20	8	10	28	4.0	250	0.05	50

^a The samples were obtained from Chin-Hang Shu, Associate Professor of Department of Chemical and Materials Engineering, National Central University.

^b AB: *Agaricus blazei*; the numbers: the date when the samples were obtained.

^c BB: black bean.

^d AM: *Astragalus membranaceus*.

表三 「巴西洋菇-豆科」發酵產物(大量發酵)之發酵條件(由子計畫二提供)

Table 3 Fermentation conditions of the fermentation products produced by using soybean or black bean as part of the liquid fermentation medium of *Agaricus blazei*

Sample	Fermentation conditions					
	Fermentation system (L)	Fermentation mode	Temperature (°C)	Medium	DO (Dissolved Oxygen)	Fermentation time (day)
AB-94-3-10-GF (GeneFerm)	500	One stage	28	Medium A ^b	DO≥50	7
AB-94-3-17-GF3 (NCUC AB001)	500	Two stages ^a	28	The first stage: medium A The second stage: medium B ^c	The first stage: DO≥50 The second stage: DO=10	17

^a Two stage: The first stage: 1~5 day. The second stage: 6~14 day.

^b Medium A: Fructose 5 g/L, Sucrose 15 g/L, soybean 20 g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L.

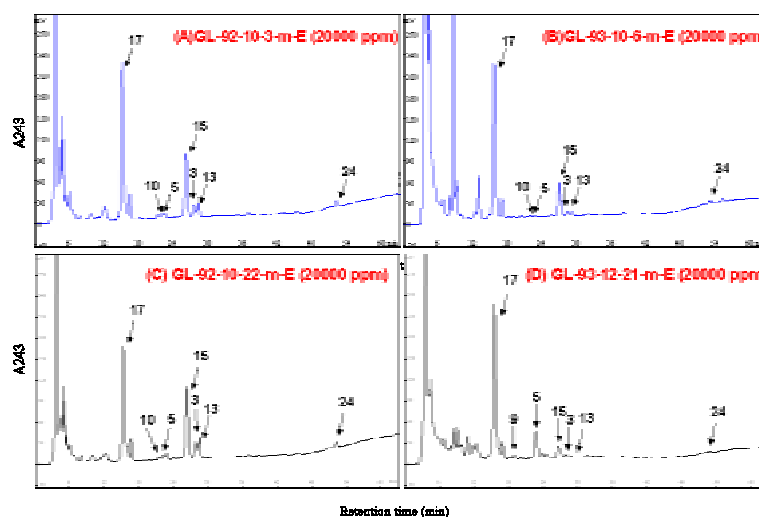
^c Medium B: Glucose 5 g/L, Malt extract 1.5 g/L, black bean 10 g/L, KH₂PO₄ 1.5 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L, vitamin B₁ 0.05 g/L.

表四 不同發酵條件所得之「靈芝-豆科」菌絲體之乙醇萃取率，以及其對經由lovastatin處理48小時之Hep 3B細胞存活率之影響

Table 4 Yields of ethanolic extracts of different *Ganoderma lucidum* mycelium, and the effects of ethanolic extracts on the growth of Hep 3B cells after 48 h lovastatin treatment

Sample (Fermentation system)	GL-92-10-3-m-E (5 L)	GL-93-10-6-m-E (200 L)	GL-92-10-22-m-E (5 L)	GL-93-12-21-m-E (200 L)
Yield (g/100 g dry matter)	22.8	9.9	23.5	17.1
Cell viability (% of control) ¹	13.7±2.2	31.9±7.1	31.1 ± 6.4	24.5 ± 0.6

¹ The concentration of samples are 100 µg/mL.



圖一 GL-92-10-3-m-E (A)、GL-93-10-6-m-E (B)、GL-92-10-22-m-E (C)與 GL-93-12-21-m-E (D) 中三萜類之 HPLC 圖譜。

Figure 1 HPLC chromatograms of triterpenoids in GL-92-10-3-m-E (A), GL-93-10-6-m-E (B), GL-92-10-22-m-E (C) and GL-93-12-21-m-E (D).

表五 不同發酵條件所得之「巴西洋菇-豆科」菌絲體之乙醇萃取率

Table 5 Yields of ethanolic extracts of different *Agaricus blazei* (AB) mycelium (5 L fermentation system)

Sample (stain)	AB-93-10-19-m-E (NCUC AB001)	AB-93-12-4-m-E (BCRC 36814)	AB-94-2-1-m-E (BCRC 36814)
Yield (g/100 g dry matter)	16.4	10.8	7.1

表六 「巴西洋菇-豆科」菌絲體之乙醇萃取物對經由lovastatin處理48小時之Hep 3B細胞存活率之影響

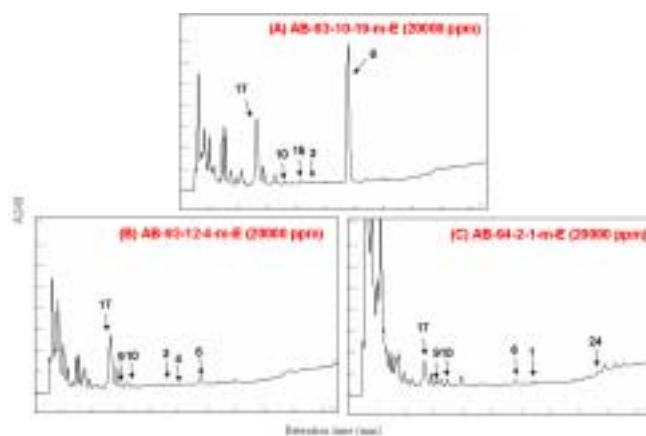
Table 6 Effect of ethanolic extracts of *Agaricus blazei* (AB) mycelia on the growth of Hep 3B cells pre-treated with lovastatin

Concentration (µg/mL)	Cell viability (% of control) ^{1,2,3}		
	AB-93-10-19-m-E	AB-93-12-4-m-E	AB-94-2-1-m-E
12.5	61.8 ± 2.3 ^a	59.7 ± 7.5 ^a	69.5 ± 9.1 ^a
25	45.9 ± 6.5 ^b	25.9 ± 8.0 ^b	59.5 ± 7.9 ^a
50	26.6 ± 8.3 ^c	19.4 ± 1.1 ^b	21.8 ± 7.2 ^b
100	15.5 ± 5.0 ^c	17.0 ± 1.8 ^b	12.2 ± 7.1 ^b
IC ₅₀	23.4	13.5	29.4

¹ Hep 3B cells were treated with ethanolic extracts of *A. blazei* mycelia for 48 hours.

² Each data represents mean±SD (n=3).

³ Data with different superscripts in the column were significantly different ($p < 0.05$).



圖二 AB-93-10-19-m-E (A)、AB-93-12-4-m-E (B)與 AB-94-2-1-m-E (C) 中三萜類之 HPLC 圖譜。

Figure 2 HPLC chromatograms of triterpenoids in AB-93-10-19-m-E (A), AB-93-12-4-m-E (B) and AB-94-2-1-m-E (C).

表七 不同發酵條件所得之「巴西洋菇-豆科」菌絲體之乙醇萃取率
Table 7 Yields of ethanolic extracts of different *Agaricus blazei* (AB) mycelium
(500 L fermentation system)

Sample (Fermentation mode)	AB-94-3-10-GF-p-E (One stage)	AB-94-3-17-GF3-m-E (Two stages)
Yield (g/100 g dry matter)	20.3	4.7

表八 「巴西洋菇-豆科」菌絲體之乙醇萃取物對經由 lovastatin 處理 48 小時之 Hep 3B
細胞存活率之影響

Table 8 Effect of ethanolic extracts of *Agaricus blazei* (AB) mycelia on the growth of
Hep 3B cells pre-treated with lovastatin

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell viability (% of control) ^{1,2,3}	
	AB-94-3-10-GF-p-E	AB-94-3-17-GF3-m-E
12.5	68.5 \pm 21.7 ^a	42.9 \pm 10.9 ^a
25	57.9 \pm 17.3 ^{ab}	34.1 \pm 9.4 ^a
50	33.8 \pm 11.5 ^{bc}	10.3 \pm 6.1 ^b
100	8.4 \pm 3.3 ^c	7.7 \pm 3.8 ^b
IC ₅₀	32.8	5.5

¹ Hep 3B cells were treated with ethanolic extracts of *A. blazei* mycelia for 48 hours.

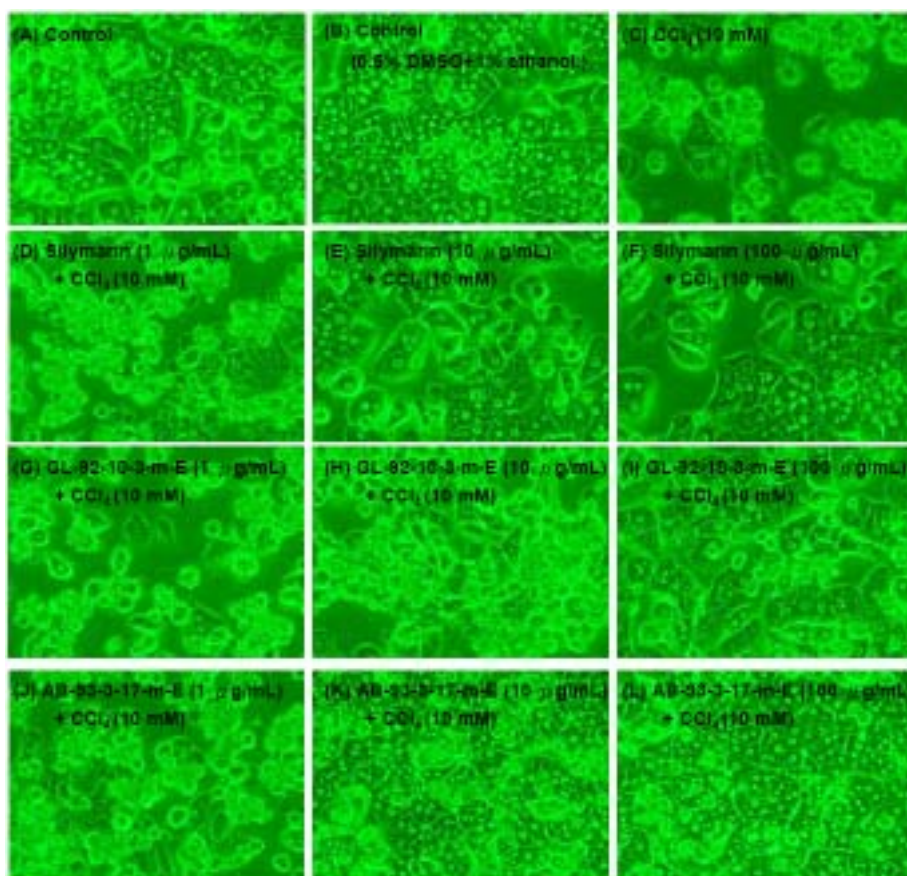
² Each data represents mean \pm SD (n=3).

³ Data with different superscripts in the column were significantly different ($p < 0.05$).

表九 不同濃度之「靈芝-豆科」(GL-92-10-3)或「巴西洋菇-豆科」(AB-93-3-17)菌絲體
乙醇萃取物對四氯化碳誘導大白鼠初代肝細胞損傷中乳酸去氫酶滲漏率與細胞
生存率之影響

Table 9 Effect of culture with the fermentation product of *Ganoderma lucidum*
(GL-92-10-3-m-E) or *Agaricus blazei* (AB-93-3-17-m-E) on the LDH leakage and
cell viability in primary rat hepatocytes damaged by carbon tetrachloride

Groups	LDH leakage	Cell viability
	%	%
Control	0.7	100.0
Control (0.5% DMSO+1% ethanol)	0.5	97.4
10 mM CCl ₄	31.4	39.2
1 $\mu\text{g/mL}$ Silymarin + 10 mM CCl ₄	18.1	42.9
10 $\mu\text{g/mL}$ Silymarin + 10 mM CCl ₄	4.5	74.1
100 $\mu\text{g/mL}$ Silymarin + 10 mM CCl ₄	1.0	108.4
1 $\mu\text{g/mL}$ GL-92-10-3-m-E + 10 mM CCl ₄	31.4	39.5
10 $\mu\text{g/mL}$ GL-92-10-3-m-E + 10 mM CCl ₄	10.7	60.0
100 $\mu\text{g/mL}$ GL-92-10-3-m-E + 10 mM CCl ₄	4.1	83.6
1 $\mu\text{g/mL}$ AB-93-3-17-m-E + 10 mM CCl ₄	18.6	41.0
10 $\mu\text{g/mL}$ AB-93-3-17-m-E + 10 mM CCl ₄	8.2	70.6
100 $\mu\text{g/mL}$ AB-93-3-17-m-E + 10 mM CCl ₄	2.8	94.2



圖三 不同濃度之「靈芝-豆科」(GL-92-10-3)與「巴西洋菇-豆科」(AB-93-3-17)菌絲體乙醇萃取物四氯化碳誘導大白鼠初代肝細胞損傷形態之影響。

Figure 3 Effect of various concentrations of GL-92-10-3-m-E and AB-93-3-17-m-E on the morphology of primary rat hepatocytes damaged by carbon tetrachloride.

表十 不同濃度之「靈芝-豆科」(GL-92-10-3)或「巴西洋菇-豆科」(AB-93-3-17)菌絲體乙醇萃取物對四氯化碳誘導大白鼠初代肝細胞損傷中脂質過氧化、還原態麩胱甘肽與氧化態麩胱甘肽含量，以及麩胱甘肽過氧化酶、麩胱甘肽還原酶與麩胱甘肽硫轉移酶活性之影響
Table 10 Effect of culture with the fermentation product of *Ganoderma lucidum* (GL-92-10-3-m-E) or *Agaricus blazei* (AB-93-3-17-m-E) on the TBARS level, GSH and GSSG levels, and the activities of GSH peroxidase (GPx), GSH reductase (GRd), and GSH S-transferase (GST) in primary rat hepatocytes damaged by carbon tetrachloride

Groups	TBARS	GSH	GSSG	GPx	GRd	GST
	nmol/mg protein	nmol/mg protein		nmol/min/mg protein		
Control	0.63	39.5	2.6	167.8	48.2	560.2
Control (0.5% DMSO+1% ethanol)	0.53	40.3	1.8	156.6	43.5	536.2
10 mM CCl ₄	1.00	23.1	1.8	119.7	32.7	365.8
1 μg/mL Silymarin + 10 mM CCl ₄	1.08	24.1	2.2	113.0	37.4	366.5
10 μg/mL Silymarin + 10 mM CCl ₄	0.98	27.9	1.8	138.8	40.9	386.1
100 μg/mL Silymarin + 10 mM CCl ₄	0.66	41.3	1.9	161.4	42.8	417.9
1 μg/mL GL-92-10-3-m-E + 10 mM CCl ₄	1.02	28.3	2.3	109.9	29.2	308.4
10 μg/mL GL-92-10-3-m-E + 10 mM CCl ₄	0.94	30.5	1.9	141.6	40.5	408.1
100 μg/mL GL-92-10-3-m-E + 10 mM CCl ₄	0.67	32.2	2.5	151.6	44.8	431.2
1 μg/mL AB-93-3-17-m-E + 10 mM CCl ₄	1.21	28.5	2.5	129.7	36.3	403.4
10 μg/mL AB-93-3-17-m-E + 10 mM CCl ₄	0.92	31.3	2.0	145.1	47.7	422.5
100 μg/mL AB-93-3-17-m-E + 10 mM CCl ₄	0.60	34.4	2.4	167.3	51.7	476.9