

猴頭菌發酵產物對巨噬細胞免疫調節之影響

林玉婷¹、鄭永祥²、陳淑德^{1*}

¹ 國立宜蘭大學食品科學系

² 國立宜蘭大學生物技術與動物科學系

猴頭菇可調節免疫力，對消化系統的癌變、潰瘍均有顯著療效。本研究之目的為評估猴頭菌液態發酵米漿和猴頭菇子實體的熱水萃取物，分別對巨噬細胞株存活率、NO 產生及細胞激素包括 TNF- α 、IL-4 及 IL-10 生成量的影響。結果顯示，低濃度(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)猴頭菌液態發酵米漿熱水萃取物未造成巨噬細胞株傷害，存活率超過 100%。猴頭菌液態發酵米漿及猴頭菇的熱水萃取物濃度為 5 及 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 均可促使巨噬細胞增加 NO、TNF- α 、IL-4 及 IL-10 的生成量，故猴頭菌發酵米漿及猴頭菇子實體皆具有調節免疫之效果。

關鍵字: 猴頭菌，發酵米漿，萃取物，免疫調節

1

2 **Effects of *Hericium erinaceus* Fermented Products on Macrophage**

3 **Immunomodulation**

4 Yu-Ting Lin¹ Yeong-Hsiang Cheng² Su-Der Chen^{1*}

5 ¹Department of Food Science, National Ilan University, I-Lan, Taiwan

6 ²Department of Biotechnology and Animal Science, National Ilan University, I-Lan,
7 Taiwan

8 *Hericium erinaceus* can enhance immunity and has remarkable treatment ability
9 on gastric cancer and gastric ulcer. The objectives of this study were to evaluate the
10 hot water extracts from *Hericium erinaceus* fermented rice milk and fruiting body,
11 respectively, on macrophage proliferation and NO, TNF- α , IL-4 and IL-10 secretion.
12 The results showed that low levels at 10 $\mu\text{g/mL}$ hot water extract from *Hericium*
13 *erinaceus* fermented rice milk did not cause harm macrophages, the survival ratio
14 was over 100%. The hot water extract at 5 $\mu\text{g/mL}$ and 50 $\mu\text{g/mL}$ from *Hericium*
15 *erinaceus* fermented rice milk and fruiting body could significant induce
16 macrophages to secrete NO, TNF- α , IL-4 and IL-10. Therefore, the water extracts
17 from *Hericium erinaceus* fermented rice product and fruiting body had competence
18 of immune modulation ability.

19 **Key words:** *Hericium erinaceus*, fermented rice milk, extract,
20 immunomodulatory.

21 * Corresponding author E-mail: sdchen@niu.edu.tw

22

前 言

猴頭菇子實體培養至少需要 2-3 個月，但若將猴頭菌以液態培養，並給予充足之氧氣與營養，使菌絲生長、繁殖並產生活性物質，一般需要 4-5 天即可收瓶⁽¹⁾，且經臨床醫學研究證實，猴頭菌的菌絲體與猴頭菇子實體的效果相同，故發展出人工大量栽培菌絲體，其生產成本低、操作便利又省時⁽²⁾，若能開發出具有保健功能的猴頭菌發酵米漿必有助於未來米食產品的推廣。

猴頭菇子實體或菌絲體中萃取物，經分析後發現含有多醣類^(3, 4)、猴頭素(erinacines)^(5~8)、猴頭酮(hericenones)^(9, 10)、胺基酸、蛋白質及微量元素；其中猴頭素及猴頭酮可促進神經生長因子(nerve growth factors, NGF)的合成⁽¹¹⁾，而此 NGF 可治療智力衰退、神經衰弱及抗阿茲海默症等疾病^(5, 6, 8)，而多醣體具有抗腫瘤^(3, 12)、降血壓血脂^(4, 13)、抗潰瘍及治療慢性胃炎^(14~16)及免疫調節^(3, 12, 17~19)等功效。

猴頭菌可有效提高總 T-cells、CD4⁺cells、CD8⁺cells 和巨噬細胞的數量，具有免疫調節的能力^(3, 19)。Son 等⁽¹⁷⁾以 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 猴頭菇水萃物培養 RAW 264.7 巨噬細胞，可誘導 NO、介白素 IL-1- β 的表現，此經由 NF- κ B 的路徑，以達到免疫調節之功效。另外 Yim 等⁽¹⁸⁾以 10 及 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 猴頭菇水萃物可增進脾臟細胞的活性，誘導 IFN- γ 、IL-12 的表現，進而活化 NK 細胞，而達到免疫調節功效。

巨噬細胞是由造血幹細胞(hematopoietic stem cell)經過一連串刺激分化而來，可吞噬被感染的細胞，並將抗原呈現給 T 細胞和 B 細胞^(20, 21)。而脂多醣體(lipopolysaccharide ; LPS)是屬於內毒素的一種，來自革蘭氏陰性菌外膜，低劑

1 量的 LPS 有利於宿主細胞的防禦，但高劑量時，LPS 會引起敗血性休克，且會
2 增加人體體溫、心跳。當巨噬細胞受到 LPS 刺激時，則會生成許多發炎相關物
3 質，如：反應性氮中間產物如：一氧化氮 (NO)，細胞激素如：介白素-1
4 (interleukin-1, IL-1)、腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等進行免疫
5 反應⁽²²⁾，此外亦會經由生成過氧化物，對抗入侵病原菌，減低對身體的危害。

6 人類後天性免疫反應有兩種：第一種是體液免疫反應，藉由刺激 B 細胞產生
7 抗體以對抗細胞外病原體；第二種是細胞性免疫是利用毒殺性 T 細胞與巨噬細
8 胞，攻擊細胞內病原體，而輔助形 T 細胞則是調節這兩種免疫反應。輔助形 T
9 細胞可分為兩種亞型：第一型輔助形 T 細胞(Th1)及第二型輔助形 T 細胞(Th2)。
10 Th1 細胞會生成 TNF- α ，IFN- γ 及 IL-2 等細胞激素，調控巨噬細胞的活化，而
11 Th2 細胞則生成出數種介白素 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 及 IL-13 等細胞激素，
12 調控 B 細胞、肥胖細胞(mast cell)及嗜酸性白血球(eosinophils)等細胞的活化，當
13 感染發生時引發體內免疫系統產生出正確的 Th1 及 Th2 免疫反應對疾病的抵
14 抗極為重要⁽²³⁾。

15 在動物實驗部分，Wang 等⁽³⁾以猴頭菇多醣萃取物注入免疫正常(ICR)的老鼠
16 可有效降低腫瘤細胞生長，使得原本 11%腫瘤細胞量降低至 4%腫瘤細胞量，並
17 減緩老鼠體重下降。另外猴頭菇多醣可增加胃液分泌量，能有效地促進潰瘍的
18 癒合⁽¹⁶⁾，且所激發產生的 IL-1 細胞激素，促進胰島素分泌，降低血糖之功效，
19 因此猴頭菇多醣亦已普遍用來緩解糖尿病患之惡化⁽¹²⁾。

20 本研究目的為以猴頭菌發酵米漿及猴頭菇子實體經熱水萃取後，以不同濃

1 度萃取液對小鼠巨噬細胞株 RAW264.7 存活率進行評估。再經 LPS 和猴頭菌發
2 酵米漿、猴頭菇熱水萃取物對巨噬細胞所誘發 NO、TNF- α 、IL-4 及 IL-10 的表
3 現，以評估猴頭菌發酵米漿和猴頭菇熱水萃取物的免疫調節效果。

4 材料與方法

5 一、菌株之培養與活化

6 猴頭菌 *Hericium erinaceus* (BCRC 36470) 置於 PDA 平板培養基，在 25°C 培
7 養箱中培養，每個月繼代培養，然後再將菌絲移至 pH 6 的 5% 葡萄糖培養液中
8 進行搖瓶培養 5 天以預活化猴頭菌。

9 二、猴頭菌發酵米漿之製備

10 上述培養液 150 mL 置於 500 mL 的搖瓶中，並以 1% 葡萄糖並加入 7% 蓬萊
11 米穀粉作為主要的培養基，再添加 0.1% 酵母萃取物、0.1% 磷酸氫二鉀和 0.05%
12 硫酸鎂，及接入 3% 已預活化猴頭菌，進行搖瓶培養 5 天，即為猴頭菌發酵米漿。

13 三、猴頭菌發酵米漿及猴頭菇子實體的熱水萃取物之製備

14 將猴頭菌發酵米漿經 121°C 殺菌，此同時進行熱水萃取 20 min，另將新鮮猴
15 頭菇子實體凍乾磨粉，取 3 g 粉末加 40 mL 蒸餾水經 121°C 進行熱水萃取 20 min，
16 皆以 5000 x g (Kubota 6930) 離心 15 min，取其上清液進行冷凍乾燥，再配製 100
17 $\mu\text{g/mL}$ 的猴頭菌(菇)熱水萃取物備用。

18 四、粗多醣的酚硫法分析⁽²⁴⁾

1 將培養液離心去除菌體後，取 0.3 mL 上層液加入四倍體積的 95% 酒精，使
2 多醣體由培養液沉澱出來，收集沉澱物用 1.2 mL 95% 酒精洗滌兩次，再加 1 mL 1
3 N 氫氧化鈉以溶解多醣。利用酚硫法分析，取 1 mL 的 200 倍樣品稀釋液，加入
4 1 mL 5% 酚溶液和 5 mL 濃硫酸，冰浴冷卻 2 min，於 488 nm 下測定吸光值，並
5 先配製 0、10、25 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 葡萄糖溶液以製作葡萄糖標準曲線，以決定粗多
6 醣含量，其線性迴歸方程式為 $y = 0.0094x + 0.0026$ ， $R^2 = 0.9998$ 。

7 五、 β -(1,3)葡聚糖之螢光測定分析⁽²⁵⁾

8 以純的 β -(1,3)葡聚糖 curdlan 當作標準品，配製 0、10、25 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 標準
9 溶液，分別測其螢光強度，其標準曲線的線性方程式為 $y = 12.482x + 51.793$
10 ($R^2 = 0.9927$)。同時與猴頭菌發酵產物萃取出來的多醣使用 1 N NaOH 當溶劑稀
11 釋，之後分別將標準品與多醣稀釋液各取 0.3 mL 置入玻璃小管，再加入 30 μL 6N
12 NaOH，馬上置入 80°C 水浴槽反應 30 min，以破壞葡聚糖的三級結構，冰浴後
13 加入 aniline blue 染劑於 50°C 反應 30 min，取出後於室溫下冷卻 30 min，最後以
14 激發光 398 nm 及放射光 502 nm 偵測其螢光強度，以決定 β -(1,3)葡聚糖含量。

15 六、巨噬細胞存活率測定⁽²⁶⁾

16 取 RAW264.7 巨噬細胞 1×10^4 cell/mL 細胞量培養於 96 well plate 中，於
17 37°C、5% CO₂ 培養箱中培養 24 小時後，將 96 well plate 中培養液吸掉，加入 100
18 μL LPBS 清洗後吸除，實驗組加入猴頭菌發酵米漿及猴頭菇子實體的熱水萃取
19 物，以 DMEM 調整濃度為 1、5、10、20、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 於 37°C，5% CO₂ 培

1 養箱中培養 48 小時後，將培養液去除，並以 100 μL PBS 清洗，去除血清蛋白，
2 避免背景值影響其實驗結果，每 well 加入 100 μL 的 1 mg/mL MTT，於 37°C
3 反應 3 小時後，除去 MTT 試劑，加入 100 μL DMSO 於 37°C 反應 10 min，以
4 ELISA reader 於 590 nm 下測其吸光值，即可算出實驗組與對照組之間的細胞中
5 粒線體酵素代謝活性的相對值。其計算公式如下：

$$6 \quad \text{細胞存活率}(\%) = \frac{\text{樣品吸光值}}{\text{對照組(培養液)吸光值}} \times 100\%$$

7 七、細胞激素生成量之分析

8 1. Nitrite 分析

9 收取細胞培養液於離心後，取 40 μL 細胞培養液在加入 40 μL Assay buffer
10 及 NaNO_2 標準品(0, 10, 50 mg/mL)，在各加入 10 μL 的 Nitrate reductase cofactor
11 mixture 及 Nitrate reductase enzyme mixture 於 96 孔盤中，蓋上蓋子於室溫下靜
12 置 1 小時，在分別加入 50 μL Griess reagent R1 和 Griess reagent R2，不加蓋於室
13 溫靜置 10 min 呈色，在波長 540 nm 測吸光。空白組則加入 200 μL Assay buffer
14 即可測吸光，將上述結果代入以 0、10、50 和 100 (mg/mL) NaNO_2 標準溶液所
15 測的吸光值，再換算濃度，此線性迴歸方程式為 $y=0.0108x + 0.0018$ ，($R^2=0.9995$)。

16 2. TNF- α , IL-4 及 IL-10 分析

17 採用酵素連結免疫分析法(ELISA)，於 96 well plate 加入含有細胞激素單株抗
18 體的 Coating buffer 100 μL /well，室溫下放置過夜備用，隔夜以 300 μL /well 的
19 PBST buffer 沖洗 4 次，再加入 Blocking solution 300 μL /well 以減少非特異性結

1 合，室溫靜置 1 小時，以 PBST buffer 洗 4 次再加入樣品或 TNF- α , IL-4 及 IL-10
2 標準品(0, 0.25, 0.5, 1 ng/mL) 100 μ L/well，室溫反應 2 小時；以 300 μ L/well PBST
3 buffer 洗 4 次，再加入抗細胞激素二級抗體 100 μ L/well，室溫反應 2 小時；再
4 以 300 μ L/well PBST buffer 洗 4 次，加入 Avidin-peroxidase 100 μ L/well，室溫反
5 應 30 min；以 300 μ L/well PBST buffer 洗 4 次，再與 100 μ L/well 受質 ABTS 反
6 應，待適當時的作用呈色，以 405 nm 偵測顏色變化，650 nm 校正，每 5 min 偵
7 測 1 次，總偵測時間為 1 小時，並選擇在反應 30 min 作出 TNF- α , IL-4 及 IL-10
8 標準品的標準曲線，以決定細胞激素生成量。

9 八、統計分析

10 試驗結果三重複，並以平均值 \pm 標準偏差表示，所得之數據使用 Statistical
11 Package for Social Science (SPSS, SPSS INC. 宏德國際軟體諮詢顧問股份有限公
12 司) 14.0 版統計套裝軟體進行統計分析，以多元全距檢定分析 (Duncan's Multiple
13 Range Test)，以顯著水準為 $\alpha=0.05$ ，比較其差異之顯著性。

14 結 果 與 討 論

15 一、猴頭菌發酵米漿及子實體熱水萃取物之成分及對巨噬細胞的增生率影響

16 取猴頭菌發酵 0 天和 5 天的蓬萊米漿熱水萃取液，在不同濃度下(1、5、10、
17 20、50 及 100 μ g/mL)分析其巨噬細胞(RAW 264.7)存活率，由表一顯示猴頭菌發
18 酵米漿熱水萃取液比未發酵之米漿熱水萃取液對細胞存活率顯著增加，未發酵
19 之米漿熱水萃取液細胞存活率約為 107.48–111.22%，然而發酵 5 天的猴頭菌米

1 漿熱水萃取液，在低濃度下(1、5 及 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)達 176.19–178.50%，其餘濃度也
2 均達 163.55% 以上之效果，且此無劑量依賴性 ($p > 0.05$)；然而猴頭菇子實體熱
3 水萃取物則需要在較高的濃度(50 及 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)方可達細胞存活率 169%。

4 針對猴頭菌液態發酵米漿及猴頭菇子實體之萃取率、粗多醣和 β -葡聚醣的含
5 量(表二)，猴頭菌液態發酵米漿之萃取率佔 7.4%，凍乾熱水萃取物中粗多醣含
6 量為 45.58%，換算出粗多醣量為 3.37%， β -葡聚醣僅含 0.07%；猴頭菇子實體部
7 分萃取率物只佔 2.51%，凍乾熱水萃取物中粗多醣量為 17.89%，換算後猴頭菇
8 子實體粗多醣量為 0.45%， β -葡聚醣為 0.33%。由於猴頭菌發酵產物之多醣量為
9 45.58%，猴頭菇子實體多醣量為 17.89%，故在後續進行巨噬細胞作用的濃度以
10 5 及 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之兩種熱水萃取物濃度中，猴頭菌發酵產物中多醣濃度約為 2.38
11 及 23.79 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，猴頭菇子實體中多醣濃度較少約為 0.89 及 8.95 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

12 二、猴頭菌發酵米漿及子實體熱水萃取物對巨噬細胞 NO 濃度之影響

13 圖一(A)為猴頭菌液態發酵蓬萊米漿熱水萃取物對巨噬細胞 NO 濃度之影
14 響，單純以培養液組其 NO 濃度為 55.65 μM ，以 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 對細胞進行刺激
15 其 NO 濃度可達 79.88 μM ，若添加猴頭菌液態發酵米漿熱水萃取物濃度為 5 及
16 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，NO 含量分別為 74.63 及 75.86 μM ，故猴頭菌發酵產物可使 NO 濃
17 度顯著提升，至於低劑量 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及高劑量 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之間並無顯著差異(p
18 >0.05)；另一組則是以猴頭菌液態發酵蓬萊米漿熱水萃取物濃度為 5 及 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
19 並和 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 進行共同培養巨噬細胞，可產生 94.23 及 111.82 μM 的 NO，
20 且以 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 可產生較多的 NO 含量。

1 另外由圖一(B)猴頭菇子實體熱水萃取物進行比較對巨噬細胞產生 NO 之影
2 響，可發現添加猴頭菇子實體熱水萃取物濃度在 5 及 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，可顯著提升
3 NO 含量，分別為 74.78 及 74.40 μM ，濃度間亦無顯著差異 ($p > 0.05$)；另以
4 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 猴頭菇子實體熱水萃取物和 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 進行共同培養巨噬
5 細胞，可發現 NO 生成量介於 83.58-87.90 μM ，但故二者並無顯著差異 ($p >$
6 0.05)，此亦得知猴頭菌發酵米漿及猴頭菇子實體熱水萃取物確實皆具有促進 NO
7 生成之能力。

8 由於 Nitric oxide (NO) 是一個半衰期很短的自由基，在體內參與許多生理及
9 病理的反應，如神經、心血管系統的調節以及有關宿主防禦功能，然而過多的
10 NO 也會誘發敗血性休克、中風及高血壓等疾病^(22, 27, 28)。L-arginine 透過一氧化
11 氮合成酶(NO synthase, NOS)的催化作用即可合成 NO⁽²⁹⁾，而 NO 的合成受到如
12 TNF- α 、IL-1 及 γ (interferon- γ , IFN- γ) 等多種細胞激素及內毒素 LPS 的影響⁽³⁰⁾。

13 Son 等⁽¹⁷⁾分析猴頭菇子實體水萃物中含有 28% 多醣，發現濃度在 0.1-100
14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 猴頭菇子實體水萃物可誘導 RAW 264.7 巨噬細胞產生 NO，且隨著劑量
15 的增加 NO 量也隨之增高，NO 量最高可達到 40 μM ，而熱水萃物濃度在 1-10
16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 下對 iNOS 亦可見有向上調節作用，若與 LPS 共培養，隨著劑量的增加亦
17 能有助於產生 NO，且證實此猴頭菇子實體水萃物是經由 NF- κB 的路徑，以達
18 到免疫調節功效，且猴頭菇子實體水萃物濃度為 1-10 mg/L 即可誘導 IL-1 β 表現
19 量，故此子實體水萃物促使 NO 生成的結果和本研究的結果相似。

20 三、猴頭菌發酵米漿及子實體熱水萃取物對巨噬細胞生成細胞激素之影響

1 由於在急性發炎反應，IL-1、TNF- α 及 IFN- γ 這三種細胞激素會增加血管通
2 透性，此為發炎反應之主要調節者，可持續刺激活化巨噬細胞以生成更多促進
3 發炎的細胞激素^(31, 32)。發炎反應中 NF- κ B 為重要的細胞核轉錄因子，它會調節
4 各種基因的表現，包括誘導型一氧化氮酶(induce nitric oxide synthase, iNOS)、環
5 氧合酶(cyclooxygenase-2, COX-2)和 TNF- α 。

6 圖二(A)為猴頭菌液態發酵蓬萊米漿熱水萃取物對巨噬細胞生成TNF- α 量之
7 影響，正對照組是以培養液進行巨噬細胞培養，則TNF- α 生成量極低僅0.003
8 ng/mL，若添加猴頭菌液態發酵蓬萊米漿熱水萃取物濃度5及50 μ g/mL時，其
9 TNF- α 生成量分別為0.06及0.19 ng/mL，則以高劑量的50 μ g/mL效果較好 (p
10 <0.05)，可顯著提升TNF- α 產量，表示猴頭菌液態發酵蓬萊米漿熱水萃取物會直
11 接增加巨噬細胞的吞噬作用，且可走Th1的免疫調節路徑。另外以1 μ g/mL LPS
12 對巨噬細胞進行刺激，則其TNF- α 生成量可達0.35 ng/mL，實驗組以猴頭菌液態
13 發酵蓬萊米漿熱水萃取物濃度為5 及50 μ g/mL並和1 μ g/mL LPS進行共同培養巨
14 噬細胞，則TNF- α 生成量分別為0.36及0.51 ng/mL，在劑量上以50 μ g/mL可促進
15 TNF- α 的生成量為最高($p <0.05$)。

16 另外圖二(B)猴頭菇子實體熱水萃取物進行比較，結果顯示添加猴頭菇熱水
17 萃取物濃度為5 及50 μ g/mL，有助於提升TNF- α 含量，分別為0.03及0.01 ng/mL，
18 以5 μ g/mL產生TNF- α 顯著較高 ($p <0.05$)。以猴頭菇熱水萃取物5 及50 μ g/mL分別
19 和1 μ g/mL LPS進行共同培養巨噬細胞，則猴頭菇熱水萃取物對巨噬細胞之
20 TNF- α 生成量分別為0.35及0.33 ng/mL，二者無劑量的依賴性($p > 0.05$)。經由統

1 計分析得知猴頭菌發酵米漿及猴頭菇子實體熱水萃取物對促使巨噬細胞TNF- α
2 生成量並無顯著差異($p > 0.05$)，猴頭菌液態發酵蓬萊米漿熱水萃取物皆可顯著
3 提升TNF- α 生成量。

4 張和徐⁽³³⁾亦以猴頭菇多醣體刺激巨噬細胞 RAW 264.7 生成 TNF- α 。猴頭菇
5 水萃物濃度於 10 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度時可增進脾臟細胞活性，誘導 IFN- γ 、IL-12
6 的表現，進而活化 NK 細胞，達到免疫調節功效⁽¹⁸⁾。猴頭菌也可有效提高總 T
7 細胞、CD4⁺細胞、CD8⁺細胞和巨噬細胞含量^(3, 19)。

8 分析添加猴頭菌液態發酵蓬萊米漿熱水萃取物對巨噬細胞IL-4及IL-10生成
9 量之影響，正對照組是以培養液進行巨噬細胞培養，其IL-4生成量極低僅0.03
10 ng/mL ，若添加猴頭菌液態發酵蓬萊米漿熱水萃取物濃度5及50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，其IL-4
11 生成量會增加為 0.1及 0.11 ng/mL (圖三A)，但此兩種劑量上並無顯著差異 (p
12 >0.05)；在IL-10部分，所測得培養液中IL-10生成量為0.04 ng/mL ，相同的添加猴
13 頭菌液態發酵蓬萊米漿熱水萃取物5 及50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的濃度，其巨噬細胞的IL-10生成
14 量分別僅為0.03及0.06 ng/mL (圖四A)，並未顯著增加IL-10的生成量。而與猴頭
15 菇熱水萃取物進行比較亦然，由圖三B可發現添加猴頭菇熱水萃取物濃度為5 及
16 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，可提升巨噬細胞生成IL-4含量，分別為0.14及0.16 ng/mL ，但卻只生
17 成0.03 ng/mL IL-10 (圖四B)。故單獨以猴頭菌發酵米漿及猴頭菇子實體熱水萃取
18 物培養巨噬細胞，此時生成IL-4和IL-10的量均偏低，無法導向Th2 免疫分化。

19 另外以1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 對細胞進行刺激其IL-4及IL-10生成量可高達0.66–0.68
20 ng/mL ，實驗組以猴頭菌液態發酵蓬萊米漿熱水萃取物濃度為5及50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 分別

1 和1 $\mu\text{g/mL}$ LPS進行共同培養巨噬細胞，則IL-4生成量比LPS單獨培養降低，分別
2 為0.30及0.36 ng/mL (圖三A)，而IL-10生成量分別為0.52及0.53 ng/mL (圖四A)。另
3 外以5 及50 $\mu\text{g/mL}$ 的猴頭菇熱水萃取物和1 $\mu\text{g/mL}$ LPS進行共培養巨噬細胞，此
4 時巨噬細胞之IL-4生成量分別為0.47及0.52 ng/mL (圖三B)，而IL-10的生成量為
5 0.53–0.54 ng/mL (圖四B)，此說明和LPS共同培養時所生成的IL-4和IL-10細胞激
6 素含量均顯著較LPS單獨培養時低($p < 0.05$)，故猴頭菌發酵米漿及子實體熱水萃
7 取物具有減緩發炎效果，顯現免疫調節功效。

8 Lin and Zhang⁽³³⁾及Wasser⁽³⁵⁾也指出真菌多醣中的 β -葡聚醣能透過活化巨噬
9 細胞進而增加巨噬細胞的吞噬能力或生成細胞激素，達到活化NK細胞或T細
10 胞，同時具有明顯的抗腫瘤活性及免疫調節功能，而 β -葡聚醣可透過單核/巨噬
11 細胞、嗜中性球及樹突狀細胞上專一性的受體Dectin-1結合，激活吞噬活性進行
12 與產生細胞激素及細胞趨化因子(chemokines)生成⁽³⁶⁾。

13 在後天性免疫反應中的輔助型 T 細胞則是調節體液和細胞性這兩種免疫反
14 應⁽³⁶⁾。Th1 細胞會生成 TNF- α ，IFN- γ 及 IL-2 等細胞激素，此調節巨噬細胞的
15 活化，而 Th2 細胞則生成 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 及 IL-13 等細胞激素，使得
16 B 淋巴細胞等細胞的活化，當感染發生時引發體內免疫系統，會產生出 Th1 及
17 Th2 免疫反應對抗疾病及促進痊癒⁽²³⁾。因猴頭菌發酵米漿或是猴頭菇子實體之
18 熱水萃取物均能調控巨噬細胞於 LPS 挑戰時，可藉由生成 TNF- α 、IL-4 及 IL-10
19 細胞激素產生，以同步調控 Th1 及 Th2 細胞分化。

20 結 論

1 猴頭菌液態發酵米漿及猴頭菇子實體熱水萃取物皆能刺激巨噬細胞增生，猴
2 頭菌發酵米漿熱水萃取物在低劑量(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)增生效果可達138-176%，然而猴頭
3 菇子實體的熱水萃取物則需要在較高的濃度(50及100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)方可使細胞增生率
4 達169%。5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 猴頭菌液態發酵米漿和猴頭菇子實體熱水萃取物均
5 可促進NO的產生。而5及50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 猴頭菌發酵米漿和猴頭菇子實體熱水萃取物在
6 和LPS共同培養巨噬細胞時，則TNF- α 生成量在高濃度50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時會增加，但IL-4
7 及IL-10生成量會顯著較單獨以LPS刺激時為低，故猴頭菌發酵米漿及猴頭菇子
8 實體皆可調控Th1及Th2細胞，以達到雙向免疫調節之效果。

9 誌 謝

10 感謝農委會農糧署的 98 農科-3.1.3-糧-Z1(6)計畫經費支持，使本研究可順利
11 完成。

12 參 考 文 獻

- 13 (1) 樂超銀、邵佛、劉慶剛、郭慶華：猴頭菌液體發酵條件的研究。《中國食用菌》，
14 18(3): 32-34 (1999)。
- 15 (2) 王伯徹、陳啟楨、華傑：食藥用菇類的培養與應用。《食品工業發展研究所》，
16 115 (1998)。
- 17 (3) J. C. Wang, S. H. Hu, C. H. Su and T. M. Lee: Antitumor and
18 immunoenhancing activities of polysaccharide from culture broth of *Hericiium*
19 spp. *Kaohsiung J. Med. Sci.*, 17: 461-467(2001).
- 20 (4) B. K. Yang, J. B. Park and C. H. Song: Hypolipidemic effect of exo-biopolymer
21 produced from a submerged mycelial culture of *Hericiium erinaceus*. *Biosci.*

- 1 *Biotech. Bioch.*, **67**(6): 1292-1298 (2003).
- 2 (5) H. Kawagishi, A. Shimada, S. Hosokawa, H. Mori, H. Sakamoto, Y. Ishiguro, S.
3 Sakemi, J. Bordner, N. Kojima and S. Furukawa: Erinacines E, F, and G,
4 stimulators of nerve growth factor (NGF) synthesis, from the mycelia of
5 *Hericium erinaceum*. *Tetrahedron Lett.*, **37**(41): 7399-7402 (1996).
- 6 (6) H. Kenmoku, T. Sassa and N. Kato: Isolation of erinacine P, a new parental
7 metabolite of cyathane-xylosides, from *Hericium erinaceum* and its biomimetic
8 conversion into erinacines A and B. *Tetrahedron Lett.*, **41**: 4389-4393 (2000).
- 9 (7) H. Kawagishi, A. Masui, S. Tokuyama and T. Nakamura: Erinacines J and K from
10 the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Tetrahedron*, **62**: 8463-8466 (2006).
- 11 (8) M. Shimbo, H. Kawagishi and H. Yokogoshi: Erinacine A increases
12 catecholamine and nerve growth factor content in the central nervous system of
13 rats. *Nutr. Res.*, **25**: 617-623 (2005).
- 14 (9) A. Arnoner, R. Cardillo, G. Nasini and O. Vajna-de-pava: Secondary mold
15 metabolites: part 46. hericenones A-C and erinapyrone C, new metabolites produced
16 by the fungus *Hericium erinaceus*. *J. Nat. Prod.*, **57**(5): 602-606 (1994).
- 17 (10) E. W. Lee, K. Shizuki, S. Hosokawa, M. Suzuki, H. Suganuma, T. Inakuma, J. Li,
18 M. Ohnishi-Kameyama, T. Nagata, S. Furukawa and H. Kawagishi: Two novel
19 diterpenoids, erinacines H and I from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Biosci.*
20 *Biotech. Bioch.*, **64**(11): 2402-2405 (2000).
- 21 (11) 何純誼、陳淑德、呂宛儒、王楨翔、張永鍾、鄭永祥、賴裕順：猴頭菌固態
22 發酵小麥的萃取物對神經細胞生長的影響。《食品與營養科學》，**4**: 1-10 (2015)。
- 23 (12) 吳云艷、宋慧、馬福：猴頭菌屬(*Hericium*)真菌多糖的研究進展。《吉林農業
24 大學學報》，**27**(6): 621-626 (2005)。
- 25 (13) J. C. Wang, S. H. Hu, J. T. Wang, K. S. Chen and Y. C. Chia: Hypoglycemic

- 1 effect of extract of *Hericium erinaceus*. *J. Sci. Food Agr.*, **85**: 641-646 (2005).
- 2 (14) 孫紅斌、劉梅森、陳海晏：猴頭菌的藥用價值概述。《中國食用菌》，**18**(1): 24-25
- 3 (1988)。
- 4 (15) 楊焱、嚴慧芳、陸宏琪：猴頭菌提取物對大鼠胃粘膜損傷保護的研究。《食用
- 5 菌學報》，**6**(1): 14-17 (1999)。
- 6 (16) L. Lu, J. Li and Y. H. Cang: PCR-based sensitive detection of medicinal fungi
- 7 *Hericium* species from ribosomal internal transcribed spacer (ITS) sequences.
- 8 *Biol. Pharm. Bull.*, **25**(8): 975-980 (2002).
- 9 (17) C. G. Son, J. W. Shin, J. H. Cho, C. Cho, C. H. Yun, W. Chung, and S. H. Han:
- 10 Macrophage activation and nitric oxide production by water soluble components
- 11 of *Hericium erinaceum*. *Int. Immun.*, **6**: 1363-1369 (2006).
- 12 (18) M. H. Yim, J. W. Shin, J. Y. Son, S. M. Oh, S. H. Han, J. H. Cho, C. K. Cho, H.
- 13 S. Yoo, Y. W. Lee and C. G. Son: Soluble components of *Hericium erinaceum*
- 14 induce NK cell activation via production of interleukin-12 in mice splenocytes.
- 15 *Acta Pharmacol. Sin.*, **28**(6): 901-907 (2007).
- 16 (19) 楊焱、周昌艷、王晨光：猴頭菌多糖調節機能免疫功能的研究。《食用菌學報》，
- 17 **7**(1): 19-22 (2000)。
- 18 (20) R. D. Stout and J. Suttles: T cell signaling of macrophage function in
- 19 inflammatory disease. *Front Biosci.*, **2**: 197-206 (1997).
- 20 (21) N. Morrissette, E. Gold and A. Aderem: The macrophage- a cell for all seasons.
- 21 *Trends Cell Biol.*, **9**: 199-201 (1999).
- 22 (22) J. B. Jr Hibbs, R. R. Taintor, and Z. Vavrin: Macrophage cytotoxicity: role for
- 23 L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Sci.*, **235**: 473-476
- 24 (1987).
- 25 (23) A. K. Abbas, K. M. Murphy and A. Sher: Functional diversity of helper T

- 1 lymphocytes. *Nature*, **383**: 787-793 (1996).
- 2 (24) M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith: Colorimetric
3 method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**(3):
4 350-356 (1956).
- 5 (25) Y. T. Ko and Y. L. Lin: 1,3-beta-glucan quantification by a fluorescence
6 microassay and analysis of its distribution in foods. *J. Agric. Food Chem.*, **52**:
7 3313-3318 (2004).
- 8 (26) T. Mosmann: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:
9 application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**:
10 55-63 (1983).
- 11 (27) S. Moncada and A. Higgs: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.*,
12 **329**: 2002-201 (1993).
- 13 (28) L. Salerno, V. Sorrenti, C. Di Giacomo, G. Romeo and M. A. Siracusa: Progress
14 in the development of selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitors. *MA. Curr*
15 *Pharm Des.*, **8**: 177-200 (2002).
- 16 (29) J. B. Jr Hibbs, R. R. Taintor, Z. Vavrin, D. L. Granger, J. C. Drapier, I. J. Amber
17 and L. R. Lancaster: Synthesis of nitric oxide from a terminal guanidine nitrogen
18 atom of L-arginine: a molecular mechanism regulating cellular proliferation that
19 target intracellular iron. In: Nitric oxide from L-arginine: abioregulatory system.
20 (Moncada S, Higgs EA, Eds.) pp 198-223. Elsevier, The Netherlands (1990).
- 21 (30) R. D. Stout and J. Suttles: T cell signaling of macrophage function in
22 inflammatory disease. *Front Biosci.*, **2**: 197-206 (1997)..
- 23 (31) S. C. Weng, C. J. Chou, L. C. Lin, W. J. Tsai and Y. C. Kuo: Immunomodulatory
24 functions of extracts from the Chinese medicinal fungus *Cordyceps cicadae*. *J.*
25 *Ethnopharmacol.*, **83**: 79-85 (2002).
- 26 (32) 梁佳玟、賴怡君、朱燕華：中草藥對於促發炎細胞激素生成之影響。 *中醫雜*
27 *誌*，**15**(4): 293-304 (2004)。

- 1 (33) 張志強、徐敬衡：探討有機溶劑前處理對熱水萃取猴頭菇多醣之回收率及抗
2 腫瘤活性之影響。國立中央大學化學工程與材料工程學系第七屆生化工學研
3 討會論文集 (2002)。
- 4 (34) Z. B. Lin and H. N. Zhang: Anti-tumor and immunoregulatory activities of
5 *Ganoderma lucidum* and its possible mechanisms. *Acta Pharm. Sinic.*, **25**:
6 1387-1395 (2004).
- 7 (35) S. P. Wasser: Medicinal mushrooms as a source of antitumor and
8 immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biot.*, **60**: 258-274 (2002).
- 9 (36) G. D. Brown and S. Gordon: fungal beta-glucans and mammalian immunity.
10 *Immunity*, **19**: 311-315 (2003).
- 11 (37) T. R. Mosmann and R. L. Coffman: TH1 and TH2 cells: different patterns of
12 lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.*,
13 **7**:145 (1989).
14

1 表一、猴頭菌發酵米漿及子實體熱水萃取物對巨噬細胞增生的影響

2 Table 1. Effect of hot water extracts from *H. erinaceus* fermented rice milks and
3 fruiting body on the cell proliferation of macrophage at 48 *hr* cultivation

Water extract concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Unfermented rice milk	Fermented rice milk	Fruiting body
1	107.47 \pm 7.72 ^c	177.10 \pm 19.44 ^a	138.32 \pm 14.86 ^b
5	109.35 \pm 11.21 ^c	178.50 \pm 11.42 ^a	142.52 \pm 8.57 ^b
10	109.81 \pm 11.24 ^c	176.17 \pm 16.72 ^a	155.14 \pm 17.64 ^b
20	111.22 \pm 2.92 ^b	169.63 \pm 7.81 ^a	159.81 \pm 17.57 ^a
50	109.35 \pm 9.81 ^b	166.36 \pm 17.75 ^a	169.16 \pm 9.54 ^a
100	108.88 \pm 10.33 ^b	163.55 \pm 5.31 ^a	169.63 \pm 14.77 ^a

4 * Data are expressed as mean \pm S.D. (n=3). ^{a-c} Means with different superscript letters
5 in the same row are significantly different ($p < 0.05$).

6

1

2 表二、猴頭菌液態發酵米漿及猴頭菇水萃取率、粗多醣及β-葡聚醣含量

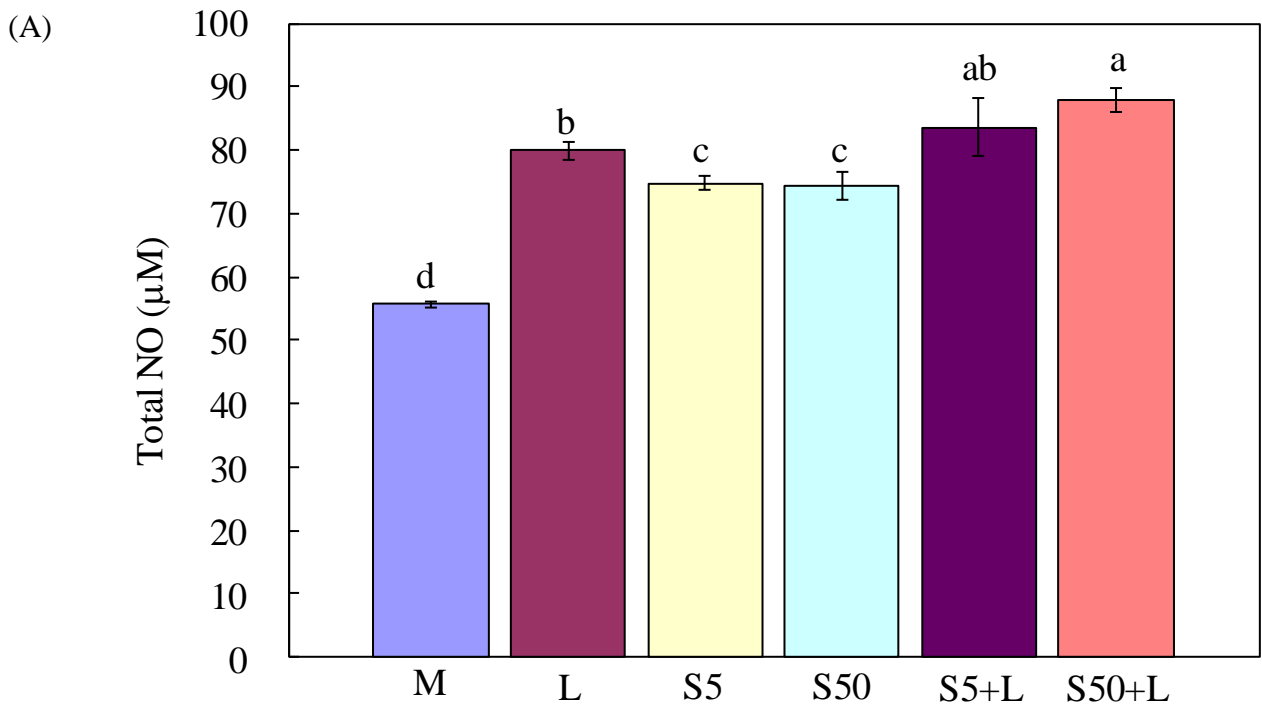
3 Table 2. Water extract yield, crude polysaccharide and β-glucan content in extract
4 from dried *H. erinaceus* rice fermented products and fruiting body

5

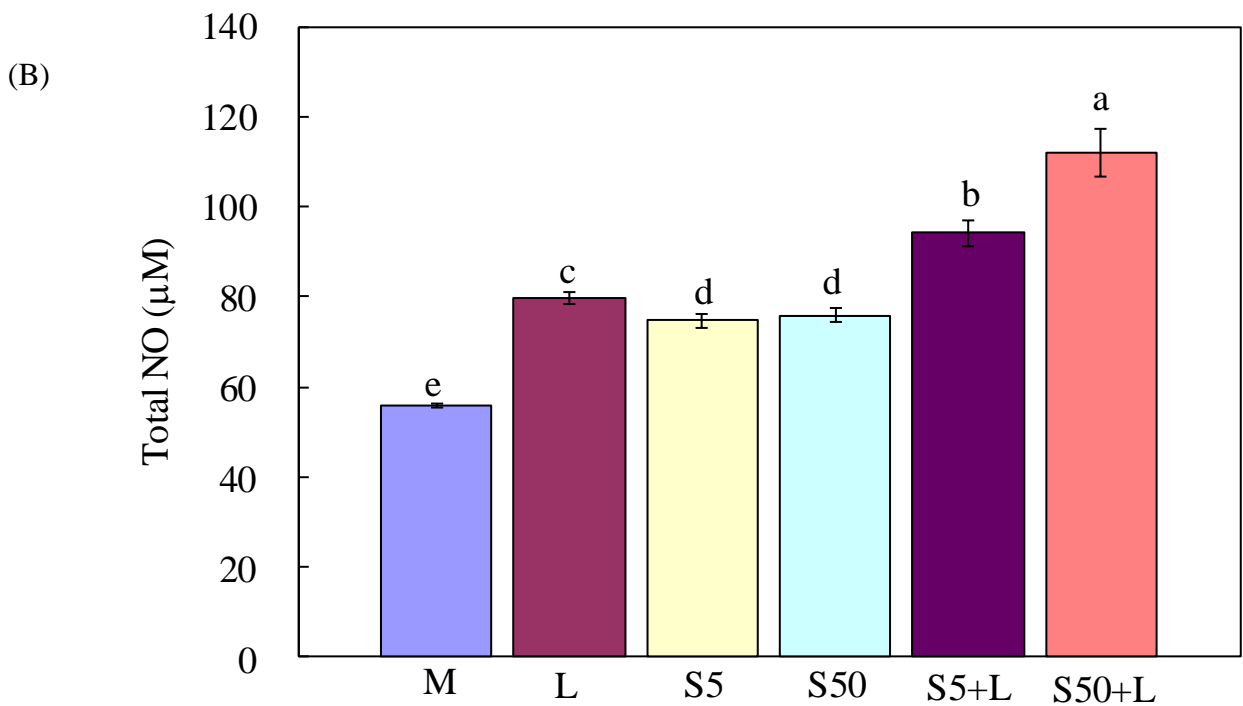
	Fermented product	Fruiting body
Hot water extract (%)	7.40 ± 0.74*	2.51 ± 0.34
Crude polysaccharide (%)	3.37± 0.15*	0.45± 0.04
β-glucan (%)	0.07± 0.01*	0.33± 0.01

6 * Data are expressed as mean ± S.D. (n=3) and means with * in the same row are
7 significantly different ($p < 0.05$).

8



1



2

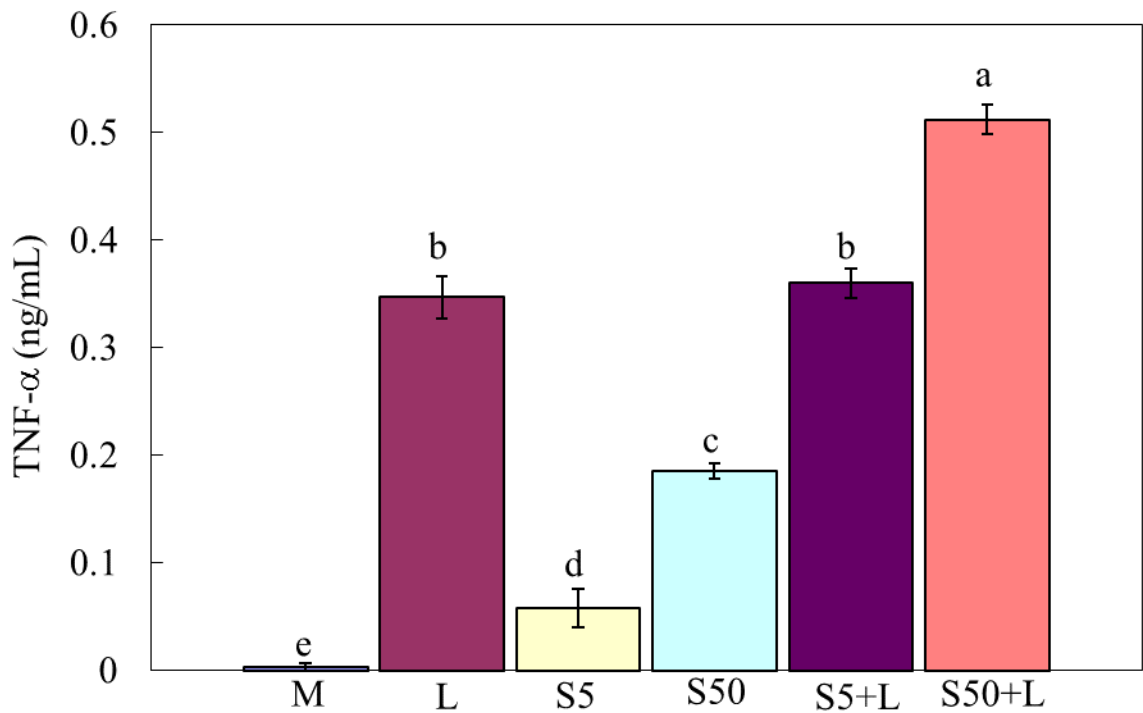
3 圖一、(A)猴頭菌液態發酵蓬萊米漿和(B)猴頭菇子實體熱水萃取物對巨噬細胞
4 NO 濃度之影響。

5 Fig. 1. Effect of hot water extract from (A) *H. erinaceus* fermented japonica rice milk
6 and (B) fruiting body on the NO concentration of macrophage at 24 hr cultivation.
7 (M: medium, L: LPS, S5: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ japonica rice products or fruiting body, S50: 50

1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ japonica rice products or fruiting body, S5+L: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ japonica rice products
2 or fruiting body + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS, S50+L: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ japonica rice products or fruiting
3 + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS). Data are expressed as mean \pm S.D. (n = 3). ^{a-e} Means with different
4 letters are significantly different ($p < 0.05$).

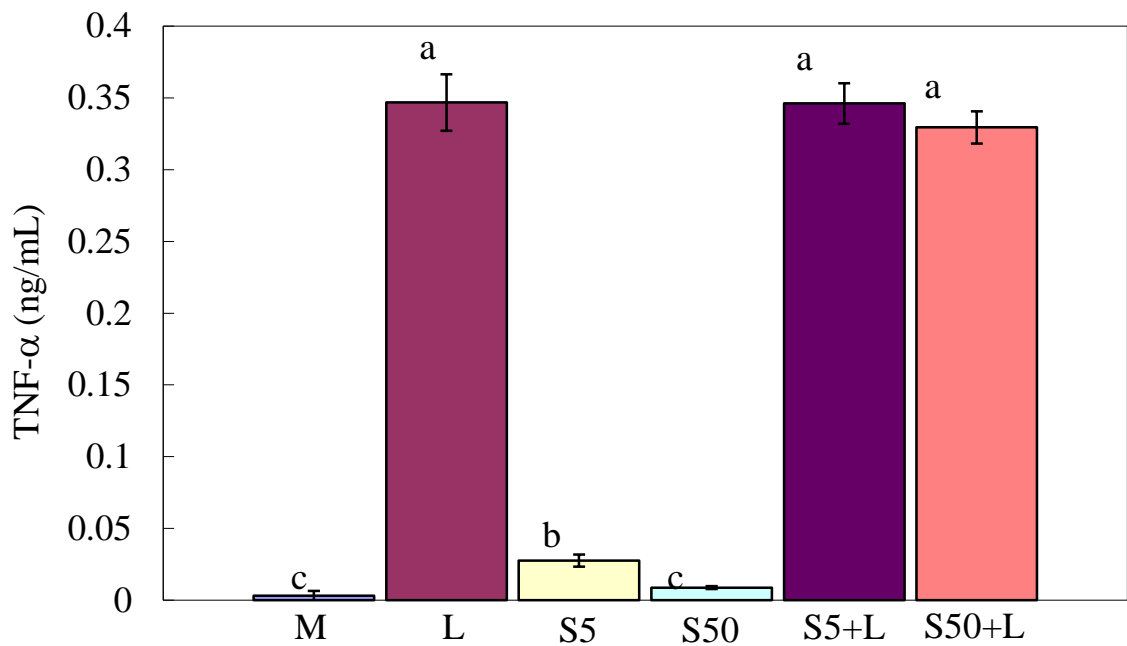
5

1
(A)



2

(B)



3

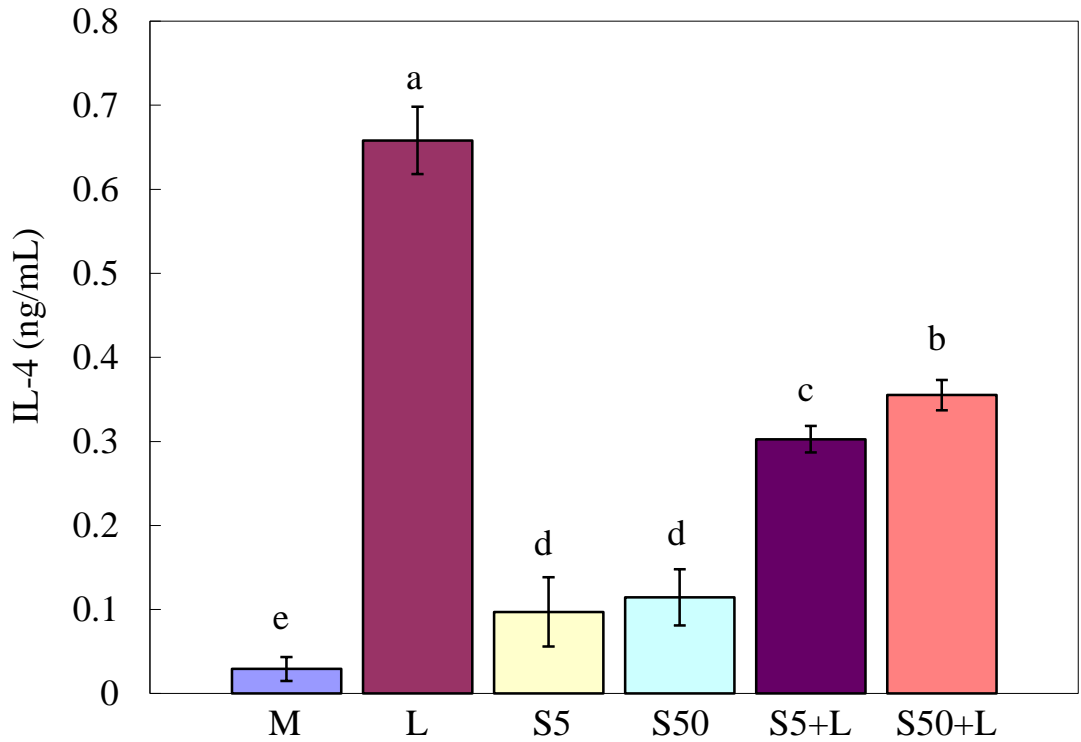
4 圖二、(A)猴頭菌液態發酵蓬萊米漿和(B)子實體熱水萃取物對巨噬細胞 TNF- α
5 生成之影響。

6 Fig. 2. Effect of hot water extract from (A) *H. erinaceus* fermented japonica rice milk
7 (B) fruiting body on the TNF- α secretion of macrophage at 24 hr cultivation. (M:

1 medium, L: LPS, S5: 5 $\mu\text{g/mL}$ japonica rice products or fruiting body, S50: 50 $\mu\text{g/mL}$
2 japonica rice products or fruiting body, S5 + L: 5 $\mu\text{g/mL}$ japonica rice products or
3 fruiting body + 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS, S50+L: 50 $\mu\text{g/mL}$ japonica rice products or fruiting
4 body + 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS). Data are expressed as mean \pm S.D. (n = 3). Means with
5 different letters are significantly different ($p < 0.05$).

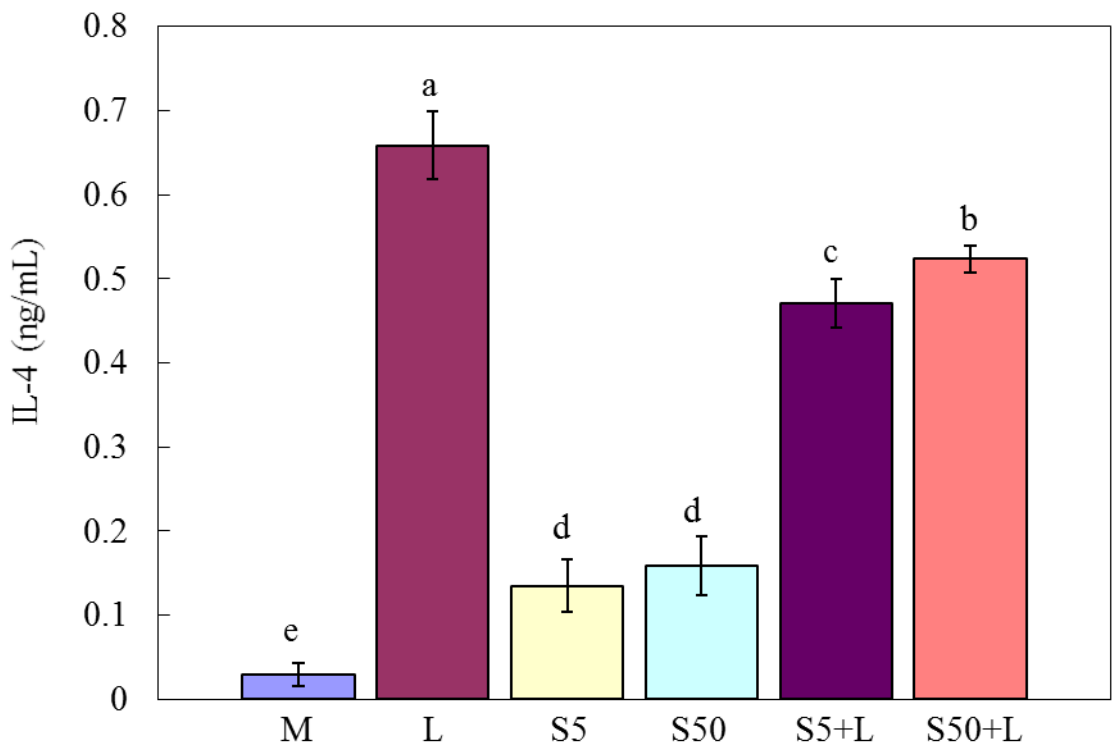
6

(A)



1

(B)



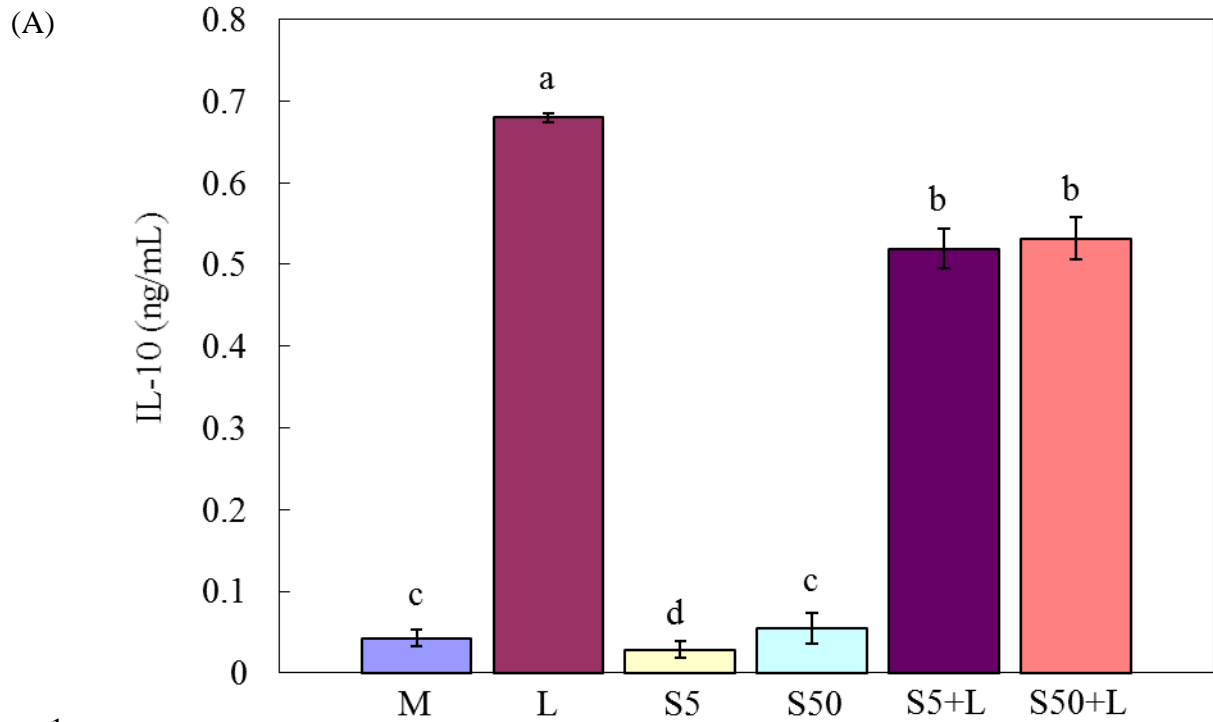
2

3 圖三、(A)猴頭菌液態發酵蓬萊米漿和(B)猴頭菇熱水萃取物對巨噬細胞 IL-4 生
4 成之影響。

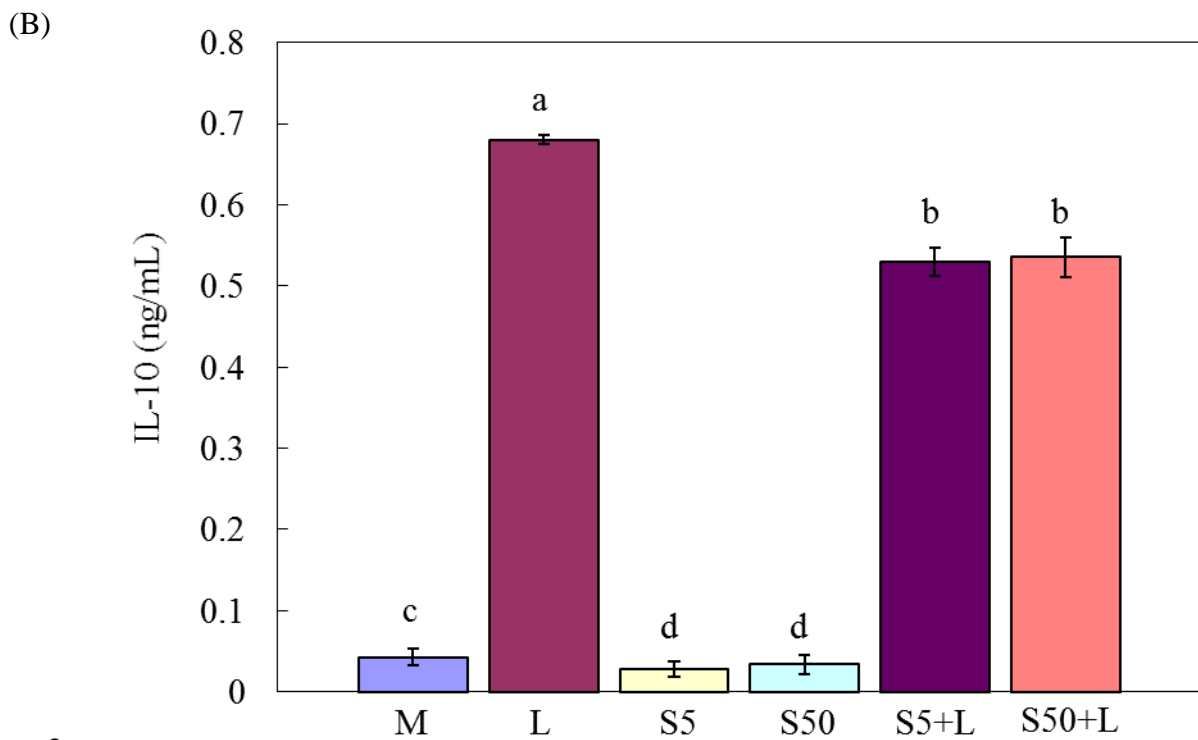
5 Fig. 3. Effect of hot water extract from (A) *H. erinaceus* fermented japonica rice milk

1 and (B) fruiting body on the IL-4 secretion of macrophage at 24 *hr* cultivation. (M:
2 medium, L: LPS, S5: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ japonica rice products or fruiting body, S50: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
3 japonica rice products or fruiting body, S5 + L: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ japonica rice products or
4 fruiting body + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS, S50+L: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ japonica rice products or fruiting
5 body + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS). Data are expressed as mean \pm S.D. (n = 3). ^{a-e} Means with
6 different letters are significantly different ($p < 0.05$).

7



1



2

3 圖四、(A)猴頭菌液態發酵蓬萊米漿和(B)子實體熱水萃提取物對巨噬細胞 IL-10 生
4 成之影響。

5 Fig. 4. Effect of hot water extract from (A) *H. erinaceus* fermented japonica rice milk

1 and (B) fruiting body on the IL-10 secretion of macrophage at 24 *hr* cultivation. (M:
2 medium, L: LPS, S5: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ japonica rice products or fruiting body, S50: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
3 japonica rice products or fruiting body, S5 + L: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ japonica rice products or
4 fruiting body + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS, S50+L: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ japonica rice products or fruiting
5 body + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS). Data are expressed as mean \pm S.D. (n = 3). ^{a-e} Means with
6 different letters are significantly different ($p < 0.05$).