

香菇柄水萃物改善糖尿病降低阿茲海默氏症罹病風險初探

楊淑惠^{1,*} 楊惠婷² 蔣淑琦³

摘要

楊淑惠、楊惠婷、蔣淑琦。2018。香菇柄水萃物改善糖尿病降低阿茲海默氏症罹病風險初探。台灣農業研究 67(4):355–364。

阿茲海默氏症 (Alzheimer's disease; AD) 為慢性神經性退化疾病，本研究以糖尿病 (diabetes mellitus; DM) 誘發 AD 之動物模式，探討攝食香菇柄水萃物對 AD 危險因子的改善功效。研究顯示，大鼠攝食高脂飲食和注射低劑量 Streptozotocin，確實造成類似糖尿病，多食、多喝及體重減輕的病徵，也引發 AD 危險因子數量的增加。DM 大鼠攝食高劑量香菇柄水萃物，可以有效改善血液生化值，增加胰島素分泌及腦部胰島素接受器的含量 ($P < 0.05$)，而顯著降低腦部 AD 危險因子類澱粉前驅蛋白 (amyloid precursor proteins; APP)、 β -類澱粉蛋白-42 (β -amyloid-42; A β 42)、 β -分泌酶 (β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1; BACE1)、糖化終產物 (advanced glycation endproducts; AGEs)、腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor- α ; TNF- α) 含量 ($P < 0.05$)。攝食香菇柄水萃物 DM 大鼠，進入十字迷宮開放手臂區和中心區的時間顯著增加 ($P < 0.05$)。由以上結果顯示，糖尿病動物攝食香菇柄水萃物可以改善糖尿病的生化代謝，進而降低 AD 罹病機率，或延緩後續病程發生。

關鍵詞：香菇柄水萃物、糖尿病、阿茲海默氏症、胰島素、舉臂式十字迷宮。

前言

阿茲海默氏症 (Alzheimer's disease; AD) 為慢性神經性退化疾病，患者臨床病理特徵為腦部神經纖維糾結 (neurofibrillary tangles; NFTs) 和大腦皮質及海馬迴會有大量的 β -類澱粉蛋白 (β -amyloid; A β) 沉澱而形成斑塊 (senile plaques)，進而導致腦神經細胞營養不足，造成突觸功能喪失、神經元死亡；腦部顳葉內側漸漸萎縮 (Gibson *et al.* 2003; Selkoe *et al.* 2004)。正子放射斷層攝影，發現 AD 患者腦部皮層的葡萄糖代謝速率較健康人緩慢，顯示出腦部葡萄糖攝取與 AD 病程有相關性 (Minoshima *et al.* 1997)。葡萄糖為大腦和神經細胞唯一的能量來源，神經細胞攝入葡萄糖需仰賴細胞膜上的胰島素接受器 (insulin receptor; ISR)，試驗動物處

於醣類代謝異常，會損傷記憶和突觸的可塑性 (Tun *et al.* 1990; Stranahan *et al.* 2008)，在 AD 患者發現，腦部 A β 聚物可直接抑制 insulin/Akt 路徑，並減少樹突突觸的 ISR 的結合能力，對神經元造成胰島素阻抗 (De Felice *et al.* 2009)。糖尿病 (diabetes mellitus; DM) 病程中引發的氧化壓力和長期高血糖、胰島素分泌不足，會使 DM 患罹患 AD 的風險增加 2–3 倍 (Petot *et al.* 2003; Zhao & Townsend 2009)。AD 患者中有 80% 的人患有糖尿病，當體內長期處於高血糖，容易使醛基和胺基產生非酵素性褐變反應 (Maillard reaction) 而形成糖化終產物 (advanced glycation endproducts; AGEs)，堆積在血漿和腦部 (Rodriguez-Mañas *et al.* 2003)。以腹腔注射 Streptozotocin (STZ) 大鼠來誘發高血糖和胰島素異常，發

投稿日期：2018 年 3 月 21 日；接受日期：2018 年 5 月 26 日。

* 通訊作者：debbie@fthes-tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所經營利用系副研究員兼主任。台灣 高雄市。

² 中國醫藥大學營養系副教授。台灣 台中市。

³ 中國醫藥大學營養系研究生。台灣 台中市。

現動物體內 AGEs 和糖化終產物接受器 (receptor for advanced glycation endproducts; RAGE) 含量顯著增加, 使氧化壓力提高; 膜上類澱粉前驅蛋白 (amyloid precursor proteins; APP) 量增加, β -分泌酶 (β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1; BACE1) 表現量增高, 使得體內蓄積大量 $A\beta$ (Ko *et al.* 2010; Cai *et al.* 2011)。焦慮緊張、易怒、注意力不集中、不安定, 也常是 AD 病患在疾病中期出現的精神狀態, 舉臂式十字迷宮 (elevated plus maze tests; EPM) 測試, 是瞭解焦慮狀態常用的動物實驗模式 (Itoh *et al.* 1990; Carvalho *et al.* 2013)。本試驗以 DM 誘發 AD 之動物模式, 探討攝食香菇蕈柄萃取物對 AD 指標因子, 胰島素、血糖變化、AGEs、APP、 β -類澱粉蛋白-42 (β -amyloid-42; $A\beta$ 42)、BACE1 等的改善效果, 期待能對延緩 AD 病程有助益。

材料與方法

試驗動物

試驗動物為六週齡雄性 Wistar 大鼠共 60 隻 (購自樂斯科生物科技股份有限公司), 飼養於環境溫度 $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 濕度 40–60%, 12 h 光暗循環的不銹鋼籠, 經 1 wk 適應期後進行試驗。試驗動物分為兩大組: 正常組和糖尿病誘發 AD 的 DM 組。正常組食用 Laboratory rodent diet 5001 (Purina Co., MO, USA)。DM 組餵食高脂飲食 (表 1) 及腹腔注射 $40 \text{ mg kg B.W.}^{-1}$ 劑量 Streptozotocin (STZ) 誘發糖尿病, 誘導 AD 發生。餵食香菇蕈柄萃取物為 DM 試驗組, 口服低 (DM + L)、中 (DM + M)、高 (DM + H) 劑量香菇蕈柄萃取物 (劑量 0.16 、 0.48 、 $0.96 \text{ g kg B.W.}^{-1}$), 試驗期 6 wk。試驗期間記錄大鼠攝食量、飲水量、體重及血糖值、胰島素變化, 犧牲前禁食 12 h, 犧牲後取大動脈血液及腦部組織, 進行後續分析。

香菇柄萃取 (Lentinus edodes stipe extracts; LedoStE)

取適量乾燥香菇蕈柄 (購於台中市新社區阿亮香菇園), 加樣品量 5 倍水, 冷藏復水 8 h, 以高壓方式 (121°C) 進行 30 min 萃取, 收集萃取液, 冷凍乾燥後冷藏備用。

舉臂式十字迷宮 (Elevated plus-maze; EPM)

犧牲前對大鼠施行 EPM 試驗, 十字迷宮為壓克力製成, 試驗器材離地 50 cm, 具有兩支開放手臂 (open arms; 走道旁無壓克力壁) 和兩支封閉手臂 (close arms; 走道旁有壓克力壁 35.5 cm), 兩兩手臂交會出一個中心空間 12 cm, 其空間長 59 cm、寬 9 cm。試驗開始, 將大鼠放置在離中心位置 15 cm 的開放手臂上, 利用高空攝影機記錄老鼠進入中心位置、開放手臂與封閉手臂的次數和時間, 整個試驗過程 5 min, 將影像傳輸至電腦, 利用動物行為觀察軟體 (Ethovision[®] XT Version 8.0, Noldus, Wageningen, The Netherlands) 進行分析。

血液分析

空腹血糖 (fasting blood glucose): 以乙醚迷昏採集尾巴血液, 利用 EasiCheck 血糖試紙及血糖機測得血糖值。

血漿胰島素 (insulin): 使用 Rat Insulin kit ELISA (cat#10-1250-01, Mercodia AB, Uppsala, Sweden), 加入含有胰島素之血漿, 胰島素與抗體結合形成抗體-抗原-酶標抗體複合物, 洗滌後加 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) 顯色。TMB 在 Horseradish peroxidase (HRP) 的催化下轉化成藍色, 並在酸的作用下轉化成黃色。ELISA reader 於 $OD_{450\text{nm}}$ 測定吸光度, 以

表 1. Laboratory rodent diet 5001 與高脂飲食之成分比例。

Table 1. Composition of laboratory rodent diet 5001 and high fat diet.

Group	Laboratory rodent diet 5001	High fat diet
Carbohydrate (%)	58	52
Fat (%)	13	30
Protein (%)	29	18

標準曲線計算胰島素濃度。

血漿麩胺酸苯醋酸轉氨酶 (**glutamate oxaloacetate transaminase; GOT**)、血漿麩胺酸丙酮酸轉氨酶 (**glutamate pyruvate transaminase; GPT**)：採用 RANDOX Laboratories (Antrum, Northern Ireland) 公司之商業試劑組進行分析，以自動分析儀檢測 GOT 及 GPT。

總膽固醇 (**Total cholesterol; TC**)：使用商業試劑組 (cat#CH7201, RANDOX Laboratories, Antrum, Northern Ireland) 分析，以分光光度計 OD_{500nm} (Hitachi, Tokyo, Japan) 測量吸光值，換算 TC 濃度。三酸甘油酯 (Triglyceride; TG)，使用商業試劑組 (cat#TR213, RANDOX Laboratories, Antrum, Northern Ireland) 分析，以分光光度計 OD_{550nm} 測量吸光值，換算 TG 濃度。

腦部組織分析

APP、A β 42、AGEs 及 ISR 測定，使用 Enzyme-lined Immunosorbent assay kit 分別為 USCNK, cat#E91020Ra、cat#E90946Ra、cat#E91353Ge 及 cat#E0895Ra，於 96 孔盤接上生物素標記的多細胞繁殖特定抗體。將含有特定抗體之試樣、標準品與各別之抗體結合，加入 HRP 標記的抗生物素蛋白後，加入 TMB 顯色以 ELISA reader 於 OD_{450nm} 測定吸光度，以各別之標準曲線計算其含量。

脂質過氧化 (丙二醛 malonaldehyde; MDA) 分析

取 100 μ L 試樣混合 4 mL 0.2% H₂SO₄、0.5 mL 10% Phosphotungstic acid 和 1 mL 0.67% Thiobarbituric acid (溶於 H₂O : acetic acid = 1 : 1)，95°C 水浴加熱。降溫後加入 Butanol 進行萃取，以 2,860 \times g 轉速離心取出 200 μ L 上層液於螢光光度計 Ex515 nm/Em555 nm 測脂質過氧化值。

腫瘤壞死因子- α (Tumor necrosis factor- α ; TNF- α)

使用 Enzyme-lined Immunosorbent assay kit (cat#ET2010-1, ASSAYPRO, St Charles, MO, USA)，以 ELISA reader 於 OD_{450nm} 測定吸光度，以標準

曲線計算 TNF- α 含量。

BACE1 之西方墨點法

試樣進行蛋白質定量，調整蛋白質濃度到 8 μ g μ L⁻¹，取 10 μ L 樣品並加入等量放射免疫沉澱法緩衝液 (radioimmunoprecipitation assay buffer; RIPA buffer)，乾熱器加熱。將樣品液轉移到 10% Acrylamide gel 電泳槽進行分離。完成後，切除 Stacking gel，取下 Separating gel 並浸泡在轉印緩衝液 (transfer buffer)；裁取相同大小的轉印模 (polyvinylidene difluoride membrane; PVDF) 泡於 99% Ethanol，依序放在三明治夾式塑膠板固定，放入濕式轉印槽，以 300 mA 進行轉印。完成轉印，取出 PVDF 膜以緩衝液沖洗；接續浸泡於 Blocking solution，沖洗後於 4°C 浸泡初級抗體至隔夜；沖洗後以 2 級抗體室溫壓 1 h，沖洗後加入 ECL solution (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, UK) 呈色，以冷光螢光數位照相系統 (LAS-4000 mini, Fujifilm, Tokyo, Japan) 拍照。

α -生育醇 (α -tocopherol)

取 1 mL 腦組織均質液，先加入 600 μ L 含 50 μ g mL⁻¹ α -tocopheryl acetate (cat#58957, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 的甲醇溶液震盪萃取 1 min，再加入 2 mL Hexane 震盪萃取 1 min，於 4°C、2,860 \times g 離心 30 min。收集上層液至另一微量離心管，抽乾溶劑後用 350 μ L 甲醇回溶，並以真空過濾裝置用 0.45 μ m 濾膜過濾，將過濾液收集於微量離心管中，抽取 80 μ L 以高效液相層析儀 (high performance liquid chromatography; HPLC) 分析 α -生育醇含量。以標準曲線所得到的斜率，換算 α -生育醇濃度 (μ g g⁻¹ 腦重量)。

統計分析

試驗數據以平均值標準偏差 (mean \pm SEM) 表示，採用 SPSS 12.0 軟體分析。試驗結果以單因子變異分析 (one-way analysis of variance; ANOVA) 進行分析，若達到顯著差異時，再以 Duncan's multiple range test 進行組間差異確認， $P < 0.05$ 代表有顯著差異。

結果

試驗期間 DM 大鼠攝取香菇柄水萃物於攝食量、飲水量、體重及血糖的影響

大鼠攝取高脂飲食及注射低劑量 STZ 確實誘發糖尿病 (DM) 發生，如表 2 所示。DM 組大鼠的攝食量顯著高於正常組 2-3 倍；飲水量顯著高於正常組 4-5 倍；但體重卻不增反減，成長率呈現正負值，惟攝取高劑量香菇柄水萃物組 (DM + H) 體重正成長 0.54%。試驗期間正常組的血糖值 $97.9 \pm 3.4 \text{ mg dL}^{-1}$ – $119.4 \pm 1.5 \text{ mg dL}^{-1}$ ，DM 組的血糖值 $394.5 \pm 13.6 \text{ mg dL}^{-1}$ – $406.1 \pm 10.9 \text{ mg dL}^{-1}$ ，顯著性高於正常組 (表 3)。DM 試驗組攝取 LedoStE 第 2 週，DM + M 及 DM + H 組的血糖值均下降至低於 DM 組；繼續攝食至第 3 週，血糖值 $349.8 \pm 15.8 \text{ mg dL}^{-1}$ – $364.2 \pm 25.6 \text{ mg dL}^{-1}$ 均低於 DM 組而達顯著差異 ($P < 0.05$)。如表 4 所

示，試驗期間正常組胰島素量 $1.37 \pm 0.07 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ – $2.63 \pm 0.28 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ，DM 組胰島素量 $0.18 \pm 0.06 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ – $0.65 \pm 0.06 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ，顯著低於正常組。DM 試驗組攝食 LedoStE 第 3 週，胰島素量 $1.31 \pm 0.05 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ – $1.66 \pm 0.26 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ，均高於 DM 組而達顯著差異 ($P < 0.05$)；至第 6 週 DM + H 組胰島素量 $1.71 \pm 0.58 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ，與正常組無顯著差異 ($P > 0.05$)，顯示攝食 LedoStE 對糖尿病動物有正向影響。

DM 大鼠攝取香菇柄水萃物對 EPM 表現的影響

EPM 為 AD 藥物篩選常用的動物評估模式 (Belzung & Griebel 2001; Cheng *et al.* 2007; Harris *et al.* 2010; Webster *et al.* 2013)。EPM 總觀察時間為 301 s，DM 組在封閉手臂區的時間 $193.43 \pm 75.82 \text{ s}$ ，占總觀察時間的 $64.24 \pm 25.18\%$ ，高於正常組 $17.49 \pm 12.05\%$ ；而在開放

表 2. DM 大鼠攝取香菇柄水萃物的攝食量、飲水量、體重的影響。

Table 2. Effects of eating stipe extracts of *Lentinus edodes* on food intake, water intake and body weight of DM rat.

Item	NC ^z	DM	DM + L	DM + M	DM + H
Initial body Weight (g)	443.60 ± 11.40 a ^y	426.90 ± 11.60 a	411.00 ± 11.60 a	398.00 ± 5.80 a	405.90 ± 17.70 a
Final body weight (g)	468.90 ± 12.00 a	405.00 ± 17.30 b	406.40 ± 10.50 b	396.80 ± 10.70 b	414.00 ± 17.40 b
Growth rate (%)	1.00 ± 1.00	-1.13 ± 0.49	-0.22 ± 1.24	-0.07 ± 1.43	0.54 ± 1.49
Food intake (g d ⁻¹)	24.90 ± 3.10 b	53.71 ± 4.43 a	56.42 ± 7.71 a	60.60 ± 5.35 a	52.14 ± 5.71 a
Water intake (mL d ⁻¹)	49.06 ± 10.45 b	251.20 ± 51.13 a	254.10 ± 51.50 a	243.00 ± 87.80 a	232.20 ± 33.50 a

^z NC: normal control rat; DM: diabetes mellitus rat; DM + L: DM rate with 0.16 g kg⁻¹ B.W. LedoStE; DM + M: DM rate with 0.48 g kg⁻¹ B.W. LedoStE; DM + H: DM rate with 0.96 g kg⁻¹ B.W. LedoStE.

^y Values are presented as mean ± SEM. Values with different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

表 3. DM 大鼠攝取香菇柄水萃物對血糖值的影響。

Table 3. Effects of eating stipe extracts of *Lentinus edodes* on blood glucose of DM rat.

Item	NC ^z	DM	DM + L	DM + M	DM + H
Initial experiment	119.4 ± 1.5 c ^y	400.8 ± 25.4 a	399.2 ± 18.1 a	406.1 ± 10.9 a	394.5 ± 13.6 a
Week 1	97.9 ± 3.4 c	392.3 ± 22.2 a	346.9 ± 17.1 a	378.9 ± 24.0 a	346.3 ± 15.0 a
Week 2	102.9 ± 2.2 c	445.8 ± 25.4 a	385.3 ± 19.6 ab	339.7 ± 30.2 b	343.9 ± 20.7 b
Week 3	104.6 ± 4.3 c	428.4 ± 8.3 a	364.2 ± 25.6 b	361.8 ± 25.9 b	349.8 ± 15.8 b
Week 4	99.6 ± 4.6 c	418.5 ± 7.5 a	347.5 ± 25.5 b	331.1 ± 28.4 b	337.4 ± 22.6 b
Week 5	109.1 ± 3.9 c	435.1 ± 10.9 a	343.6 ± 24.2 b	341.1 ± 14.9 b	343.4 ± 17.8 b
Week 6	104.4 ± 3.0 c	400.0 ± 7.5 a	317.0 ± 18.1 b	318.4 ± 23.2 b	304.8 ± 16.9 b

^z NC: normal control rat; DM: diabetes mellitus rat; DM + L: DM rate with 0.16 g kg⁻¹ B.W. LedoStE; DM + M: DM rate with 0.48 g kg⁻¹ B.W. LedoStE; DM + H: DM rate with 0.96 g kg⁻¹ B.W. LedoStE.

^y Values are presented as mean ± SEM. Values with different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

表 4. DM 大鼠攝取香菇柄水萃物的胰島素含量的影響。

Table 4. Effects of eating stipe extracts of *Lentinus edodes* on insulin of DM rat.

Item	NC ^z	DM	DM + L	DM + M	DM + H
Initial experiment	1.37 ± 0.07 a ^y	0.47 ± 0.01 b	0.50 ± 0.01 b	0.49 ± 0.02 b	0.52 ± 0.04 b
Week 1	2.19 ± 0.40 a	0.65 ± 0.02 b	0.75 ± 0.10 b	0.87 ± 0.21 b	0.82 ± 0.10 b
Week 2	1.60 ± 0.47 a	0.41 ± 0.05 b	0.46 ± 0.07 b	0.71 ± 0.20 b	0.82 ± 0.16 ab
Week 3	2.36 ± 0.23 a	0.18 ± 0.06 c	1.45 ± 0.11 b	1.31 ± 0.05 b	1.66 ± 0.26 b
Week 4	2.44 ± 0.25 a	0.42 ± 0.17 c	1.43 ± 0.25 b	1.45 ± 0.18 b	1.84 ± 0.45 a
Week 5	2.24 ± 0.35 a	0.47 ± 0.06 c	1.39 ± 0.17 b	1.60 ± 0.13 b	1.66 ± 0.35 b
Week 6	2.63 ± 0.28 a	0.57 ± 0.02 c	1.03 ± 0.04 b	1.44 ± 0.49 b	1.71 ± 0.58 a

^z NC: normal control rat; DM: diabetes mellitus rat; DM + L: DM rate with 0.16 g kg⁻¹ B.W. LedoStE; DM + M: DM rate with 0.48 g kg⁻¹ B.W. LedoStE; DM + H: DM rate with 0.96 g kg⁻¹ B.W. LedoStE.

^y Values are presented as mean ± SEM. Values with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

手臂區及中心區的時間分別為 21.79 ± 20.76% 及 13.96 ± 8.37%，則低於正常組 54.47 ± 12.06% 及 28.04 ± 8.31%，DM 組 EPM 表現相對焦慮。DM 試驗組攝食不同劑量 LedoStE 6 wk，在開放手臂區的時間占總觀察時間的 44.19 ± 8.88%–50.88 ± 21.3% 及在中心區的時間 27.82 ± 16.39%–34.21 ± 24.76%，均顯著高於 DM 組 ($P < 0.05$)，而與正常組無顯著差異 ($P > 0.05$)。如表 5 所示，顯示 DM 組的活動力獲得改善。

DM 大鼠攝取香菇柄水萃物對血液值的影響

DM 大鼠血液生化值，如表 6 所示，Aspartate transaminase (AST)、Alanine transaminase

(ALT) 值高於正常組 2–3 倍；TC、TG 值高於正常組 1.5–4.5 倍；AGEs 量高於正常組 5 倍，數值顯示 DM 大鼠體內發炎、脂質及過氧化物含量過高，AGEs 大量累積，及 ISR 含量不足的狀態。DM 大鼠攝食不同劑量 LedoStE 6 wk，血液生化值均顯著改善，DM + H 組 TC 值 59.00 ± 9.17 mg dL⁻¹，MDA 值 9.11 ± 0.61 μM 及 ISR 值 17.32 ± 2.03 ng dL⁻¹，則與正常組則無顯著差異 ($P > 0.05$)，顯示糖尿病動物生化代謝獲得改善。

DM 大鼠攝取香菇柄水萃物對腦部誘發 AD 危險因子的影響

大鼠攝取高脂飲食及注射低劑量 STZ 確實誘發 DM，並誘導 AD 危險因子顯著增加。如表 7 所

表 5. DM 大鼠攝取香菇柄水萃物的十字迷宮表現的影響。

Table 5. Effects of eating stipe extracts of *Lentinus edodes* on elevated plus-maze performance of DM rat.

Item	NC ^z	DM	DM + L	DM + M	DM + H
Close arms					
Time (s) ^y	52.67 ± 36.28 b ^x	193.43 ± 75.82 a	64.12 ± 74.47 b	72.01 ± 29.68 b	54.80 ± 43.26 b
Time (%)	17.49 ± 12.05 b	64.24 ± 25.18 a	21.30 ± 24.73 b	23.92 ± 9.86 b	18.20 ± 14.37 b
Open arms					
Time (s)	164.00 ± 36.30 a	65.61 ± 62.51 b	153.21 ± 64.26 a	133.06 ± 26.75 a	143.27 ± 63.79 a
Time (%)	54.47 ± 12.06 a	21.79 ± 20.76 b	50.88 ± 21.34 a	44.19 ± 8.88 a	47.58 ± 21.19 a
Center					
Time (s)	84.42 ± 25.02 a	42.03 ± 25.19 b	83.77 ± 49.36 a	96.03 ± 27.07 a	103.01 ± 74.56 a
Time (%)	28.04 ± 8.31 a	13.96 ± 8.37 b	27.82 ± 16.39 a	31.89 ± 8.99 a	34.21 ± 24.76 a

^z NC: normal control rat; DM: diabetes mellitus rat; DM + L: DM rate with 0.16 g kg⁻¹ B.W. LedoStE; DM + M: DM rate with 0.48 g kg⁻¹ B.W. LedoStE; DM + H: DM rate with 0.96 g kg⁻¹ B.W. LedoStE.

^y Total time (s) = 301.1

^x Values are presented as mean ± SEM. Values with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

表 6. DM 大鼠攝取香菇柄水萃物對血液生化值的影響。

Table 6. Effects of eating stipe extracts of *Lentinus edodes* on blood parameter of DM rat.

Item	NC ^z	DM	DM + L	DM + M	DM + H
AST (U L ⁻¹)	65.75 ± 5.37 c ^y	157.30 ± 24.85 a	114.90 ± 11.50 b	101.30 ± 10.50 b	104.20 ± 7.80 b
ALT (U L ⁻¹)	42.13 ± 2.57 c	139.60 ± 20.90 a	110.00 ± 12.90 a	113.40 ± 10.30 a	92.75 ± 9.87 b
TC (mg dL ⁻¹)	60.00 ± 4.57 c	94.13 ± 7.46 a	87.30 ± 5.52 a	71.00 ± 5.04 b	59.00 ± 9.17 c
TG (mg dL ⁻¹)	51.00 ± 4.08 c	227.00 ± 29.40 a	131.90 ± 15.00 b	136.90 ± 17.90 b	120.20 ± 27.90 b
MDA (μM)	10.06 ± 0.37 b	13.15 ± 0.64 a	10.97 ± 0.49 b	10.26 ± 0.77 b	9.11 ± 0.61 b
AGEs (ng mL ⁻¹)	20.48 ± 2.68 b	98.29 ± 29.56 a	51.71 ± 10.24 b	47.87 ± 8.58 b	41.40 ± 6.46 b
ISR (ng dL ⁻¹)	15.37 ± 1.25 a	8.22 ± 1.64 c	15.74 ± 1.51 b	16.49 ± 2.90 a	17.32 ± 2.03 a

^z NC: normal control rat; DM: diabetes mellitus rat; DM + L: DM rate with 0.16 g kg⁻¹ B.W. LedoStE; DM + M: DM rate with 0.48 g kg⁻¹ B.W. LedoStE; DM + H: DM rate with 0.96 g kg⁻¹ B.W. LedoStE; AST: Aspartate transaminase; ALT: Alanine transaminase; TC: total cholesterol; TG: Triglyceride; MDA: malonaldehyde; AGEs: advanced glycation endproducts; ISR: insulin receptor.

^y Values are presented as mean ± SEM. Values with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

表 7. DM 大鼠攝取香菇柄水萃物對腦部 AD 危險因子的影響。

Table 7. Effects of eating stipe extracts of *Lentinus edodes* on AD risk factor in brain of DM rat.

Item	NC ^z	DM	DM + L	DM + M	DM + H
APP (ng mg ⁻¹ protein)	2.79 ± 0.13 b ^y	3.68 ± 0.15 a	3.30 ± 0.16 a	3.33 ± 0.12 a	2.67 ± 0.09 b
Aβ42 (pg mg ⁻¹ protein)	4.18 ± 0.88 c	12.61 ± 1.33 a	8.40 ± 0.70 b	8.87 ± 0.71 b	7.29 ± 1.16 b
AGEs (ng mg ⁻¹ protein)	98.70 ± 16.40 b	281.00 ± 61.70 a	127.70 ± 26.00 b	113.20 ± 12.60 b	110.80 ± 26.10 b
TNF-α (pg mg ⁻¹)	5.95 ± 0.39 c	9.20 ± 0.79 a	7.62 ± 0.48 b	7.04 ± 0.48 bc	6.82 ± 0.27 bc
MDA (μg g ⁻¹)	241.70 ± 6.50 c	322.70 ± 13.80 a	261.60 ± 7.60 b	270.30 ± 6.40 b	270.40 ± 7.90 b
α-tocopherol (μg mg ⁻¹)	0.70 ± 0.06 a	0.28 ± 0.03 b	0.55 ± 0.04 a	0.53 ± 0.06 a	0.61 ± 0.06 a
ISR (ng mg ⁻¹ protein)	1.26 ± 0.29 a	0.54 ± 0.17 c	0.97 ± 0.15 b	1.11 ± 0.09 a	1.15 ± 0.19 a

^z NC: normal control rat; DM: diabetes mellitus rat; DM + L: DM rate with 0.16 g kg⁻¹ B.W. LedoStE; DM + M: DM rate with 0.48 g kg⁻¹ B.W. LedoStE; DM + H: DM rate with 0.96 g kg⁻¹ B.W. LedoStE; APP: amyloid precursor proteins; Aβ42: β-amyloid-42; AGEs: advanced glycation endproducts; TNF-α: tumor necrosis factor-α; MDA: malonaldehyde; ISR: insulin receptor.

^y Values are presented as mean ± SEM. Values with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

示, DM 組 APP 含量 $3.68 \pm 0.15 \text{ ng mg protein}^{-1}$, 顯著高於正常組 $2.79 \pm 0.13 \text{ ng mg protein}^{-1}$, DM + H 組 APP 量 $2.67 \pm 0.09 \text{ ng mg protein}^{-1}$ 與正常組無顯著差異 ($P > 0.05$)。DM 組 Aβ42 含量 $12.61 \pm 1.33 \text{ pg mg protein}^{-1}$, 高於正常組 $4.18 \pm 0.88 \text{ pg mg protein}^{-1}$ 近 3 倍, 攝食 LedoStE 各試驗組 Aβ42 量 $7.29 \pm 1.16 \text{ pg mg protein}^{-1}$ – $8.87 \pm 0.71 \text{ pg mg protein}^{-1}$, 均低於 DM 組, 惟不同攝食劑量間差異不顯著 ($P > 0.05$)。DM 組 AGEs 量 $281.0 \pm 61.7 \text{ ng mg protein}^{-1}$ 顯著高於正常組 $98.70 \pm 16.4 \text{ ng mg protein}^{-1}$ 近 3.5 倍, 攝食 LedoStE 各試驗組 AGEs 量 $110.8 \pm 26.1 \text{ ng mg protein}^{-1}$ – $127.7 \pm 26.0 \text{ ng mg protein}^{-1}$ 均顯著低於 DM 組 ($P < 0.05$), 而與正常組無顯著差異 ($P > 0.05$), 惟不同攝食劑量間差異不顯著。DM 組 TNF-α 量

$9.20 \pm 0.79 \text{ pg mg}^{-1}$ 顯著高於正常組 $5.95 \pm 0.39 \text{ pg mg}^{-1}$, DM + M、DM + H 組腦部 TNF-α 量分別為 $7.04 \pm 0.48 \text{ pg mg}^{-1}$ 及 $6.82 \pm 0.27 \text{ pg mg}^{-1}$ 均顯著低於 DM 組 ($P < 0.05$), 與正常組則無顯著差異 ($P > 0.05$)。DM 組 BACE1 量 1.150 ± 0.030 顯著高於正常組 1.000 ± 0.001 , 如圖 1 所示。DM 試驗組攝食不同劑量 LedoStE 6 wk, 腦部 BACE1 量 1.020 ± 0.020 – 1.054 ± 0.050 均低於 DM 組; DM + H 組則與正常組則無顯著差異 ($P > 0.05$), 顯示誘發 AD 危險因子顯著下降。

DM 大鼠腦部脂質過氧化 (MDA)

MDA 為脂質過氧化指標, 正常組大鼠腦部 MDA 含量 $241.7 \pm 6.5 \text{ μg g}^{-1}$, 顯著低於 DM 組 $322.7 \pm 13.8 \text{ μg g}^{-1}$ (表 7)。攝食 LedoStE 各試驗

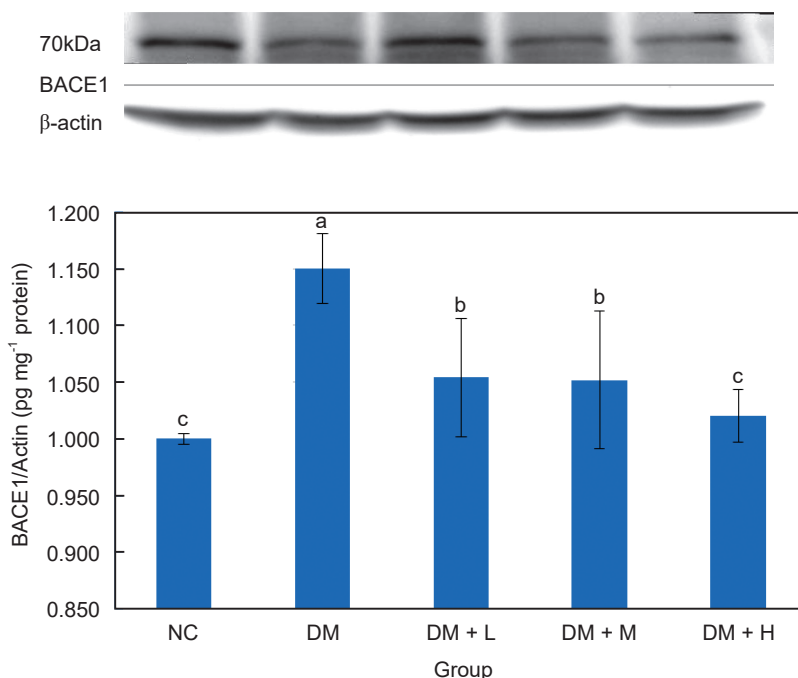


圖 1. DM 大鼠攝食菇柄水萃物對腦部 BACE1 因子的影響。

Fig. 1. Effects of eating stipe extracts of *Lentinus edodes* on β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1) factor in brain of diabetes mellitus (DM) rat. NC: normal control rat; DM: diabetes mellitus rat; DM + L: DM rate with 0.16 g kg⁻¹ B.W. LedoStE; DM + M: DM rate with 0.48 g kg⁻¹ B.W. LedoStE; DM + H: DM rate with 0.96 g kg⁻¹ B.W. LedoStE. Values are presented as mean \pm SEM. Values with different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

組 MDA 含量 $261.6 \pm 7.6 \mu\text{g g}^{-1}$ – $270.4 \pm 7.9 \mu\text{g g}^{-1}$ 均低於 DM 組，脂質過氧化情形下降，惟不同攝食劑量間差異不顯著 ($P > 0.05$)。

α -生育醇

α -生育醇含量為抗氧化正相指標，正常組大鼠腦部 α -生育醇含量 $0.70 \pm 0.06 \mu\text{g mg}^{-1}$ ，顯著高於 DM 組 $0.28 \pm 0.03 \mu\text{g mg}^{-1}$ 近 3.5 倍 (表 7)。攝食 LedoStE 各試驗組 α -生育醇含量 $0.53 \pm 0.06 \mu\text{g mg}^{-1}$ – $0.61 \pm 0.06 \mu\text{g mg}^{-1}$ 均高於 DM 組，與正常組則無顯著差異 ($P > 0.05$)，顯示抗氧化力增加，惟不同攝食劑量間差異不顯著。

ISR

ISR 含量為正向指標，正常組大鼠腦部 ISR 含量 $1.26 \pm 0.29 \text{ ng mg protein}^{-1}$ ，顯著高於 DM 組 $0.54 \pm 0.17 \text{ ng mg protein}^{-1}$ 近 2 倍 (表 7)。攝食 LedoStE 各試驗組腦部 ISR 含量 $0.97 \pm 0.15 \text{ ng mg protein}^{-1}$ – $1.15 \pm 0.19 \text{ ng mg protein}^{-1}$ 均高

於 DM 組；DM + M、DM + H 組則與正常組則無顯著差異 ($P > 0.05$)，顯示 ISR 含量增加。

討論

大鼠攝取高脂飲食和注射低劑量 STZ，確實誘發造成類似糖尿病多食、多喝及體重減輕的病徵，也引發 AD 危險因子含量的增加。DM 大鼠攝食高劑量香菇蕈柄水萃物，可以有效改善脂質過高、發炎現象，並降低氧化傷害，改善血糖值及胰島素分泌；也顯著降低誘發 AD 危險因子 APP、A β 42、BACE1、AGEs、TNF- α 及脂質過氧化質的含量。而增加 α -生育醇、ISR 的含量及大鼠的活動力。文獻顯示，攝食香菇多醣 (lentinan)，可顯著增加大鼠血清 Superoxide dismutase (SOD)、Glutathione peroxidase (GSH-Px) 並且降低 Interleukin-1 β (IL-1 β)、TNF- α 和減少潰瘍面積 (Yu *et al.* 2009)。香菇多醣物質，可提高整體抗氧化活性及降低化學

物質誘發的肝臟發炎現象 (Akamatsu *et al.* 2004; Choi *et al.* 2006)；香菇嘌呤 (eritadenine) 可調節 $\Delta 6$ -Desaturase 活性，使體內脂質顯著降低至恆定，減少所攝食油脂轉成三酸甘油酯 (Shimada *et al.* 2002)；麥角硫因 (ergothioneine) 可以有效抑制 Nuclear factor- κ B (NF- κ B) 的活性，減少發炎現象 (Rahman *et al.* 2003)；報告顯示 AD 患者腦部的膽固醇含量及 β -secretase、 γ -secretase 活性顯著高於正常組，N2a 細胞試驗顯示，高膽固醇含量與 β -secretase 活性及 A β 分泌增加有關。麥角固醇 (ergosterol) 用量在 20–80 μ M 時，可稍微降低 β -secretase 活性；用量增加為 40 μ M 時會強烈抑制 γ -secretase 活性 (Xiong *et al.* 2008)。

香菇柄水萃物成分分析顯示含有許多生物活性成分，包括類黃酮 (flavonoid)、酚酸化合物 (phenolic acid)、香菇多醣 (lentinan)、香菇嘌呤、麥角硫因、三萜類 (triterpen)、肌醇 (inositol)、麥角固醇等，如表 8 所示，均可能有助於改善糖尿病動物的生化代謝病程，進而降低 AD 罹病機率，或延緩後續病程的發生。惟香菇柄水萃物的有效萃取指標成分尚有待確立；攝取水萃物對糖尿病動物的血液生化指標有改善，但截至實驗結束，對糖尿病動物多食、多喝及體重減輕病徵的改善不顯著；改善焦慮情緒是否也有助於記憶損傷的減緩等均有待進一步探討。

表 8. 香菇柄水萃物成分。

Table 8. The composition of *Lentinus edodes* stipe extracts.

Item	T-phenol equ. gallic	Flavonoid equ. quercetin	Triterpene	Ergothioneine	Ergosterol	Eritadenine
mg g ⁻¹ ext	8.51 ± 0.00	3.29 ± 0.05	9.90 ± 0.17	1.14 ± 0.02	31.20 ± 0.13	5.97 ± 0.05

引用文獻

- Akamatsu, S., A. Watanabe, M. Tamesada, R. Nakamura, S. Hayashi, D. Kodama, M. Kawase, and K. Yagi. 2004. Hepatoprotective effect of extracts from *Lentinus edodes* mycelia on dimethylnitrosamine-induced liver injury. *Biol. Pharm. Bull.* 27:1957–1960.
- Belzung, C. and G. Griebel. 2001. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: A review. *Behav. Brain Res.* 125:141–149.
- Cai, Z., Y. Zhao, S. Yao, and B. Zhao. 2011. Increases in β -amyloid protein in the hippocampus caused by diabetic metabolic disorder are blocked by minocycline through inhibition of NF- κ B pathway activation. *Pharmacol. Rep.* 63:381–391.
- Carvalho, C., N. Machado, P. C. Mota, S. C. Correia, S. Cardoso, R. X. Santos, M. S. Santos, C. R. Oliveira, and P. I. Moreira. 2013. Type 2 diabetic and Alzheimer's disease mice present similar behavioral, cognitive, and vascular anomalies. *J. Alzheimers Dis.* 35:623–635.
- Cheng, I. H., K. Scarce-Levie, J. Legleiter, J. J. Palop, H. Gerstein, N. Bien-Ly, J. Puoliväli, S. Lesné, K. H. Ashe, P. J. Muchowski, and L. Mucke. 2007. Accelerating amyloid- β fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models. *J. Biol. Chem.* 282:23818–23828.
- Choi, Y., S. M. Lee, J. Chun, H. B. Lee, and J. Lee. 2006. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chem.* 99:381–387.
- De Felice, F. G., M. N. Vieira, T. R. Bomfim, H. Decker, P. T. Velasco, M. P. Lambert, K. L. Viola, W. Q. Zhao, S. T. Ferreira, and W. L. Klein. 2009. Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: Insulin signaling prevents the pathogenic binding of A β oligomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:1971–1976.
- Gibson, W. W., G. P. Eckert, U. Igbavboa, and W. E. Müller. 2003. Amyloid beta-protein interactions with membranes and cholesterol: Causes or casualties of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1610:281–290.
- Harris, J. A., N. Devidze, B. Halabisky, I. Lo, M. T. Thwin, G. Q. Yu, D. E. Bredesen, E. Masliah, and L. Mucke. 2010. Many neuronal and behavioral impairments in transgenic mouse models of Alzheimer's disease are independent of caspase cleavage of the amyloid precursor protein. *J. Neurosci.* 30:372–381.
- Itoh, J., T. Nabeshima, and T. Kameyama. 1990. Utility of an elevated plus-maze for the evaluation of memory in mice: Effects of nootropics, scopolamine and electroconvulsive shock. *Psychopharmacology (Berl.)* 101:27–33.

- Ko, S. Y., Y. P. Lin, Y. S. Lin, and S. S. Chang. 2010. Advanced glycation end products enhance amyloid precursor protein expression by inducing reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 49:474–480.
- Minoshima, S., B. Giordani, S. Berent, K. A. Frey, N. L. Foster, and D. E. Kuhl. 1997. Metabolic reduction in the posterior cingulate cortex in very early Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 42:85–94.
- Petot, G. J., F. Traore, S. M. Debanne, A. J. Lerner, K. A. Smyth, and R. P. Friedland. 2003. Interactions of apolipoprotein E genotype and dietary fat intake of healthy older persons during mid-adult life. *Metabolism* 52:279–281.
- Rahman, I., P. S. Gilmour, L. A. Jimenez, S. K. Biswas, F. Antonicelli, and O. I. Aruoma. 2003. Ergothioneine inhibits oxidative stress- and TNF- α -induced NF- κ B activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302:860–864.
- Rodriguez-Mañas, L., J. Angulo, S. Vallejo, C. Peiró, A. Sánchez-Ferrer, E. Cercas, P. López-Dóriga, and C. F. Sánchez-Ferrer. 2003. Early and intermediate Amadori glycosylation adducts, oxidative stress, and endothelial dysfunction in the streptozotocin-induced diabetic rats vasculature. *Diabetologia* 46:556–566.
- Selkoe, D. J., American College of Physicians, and American Physiological Society. 2004. Alzheimer disease: Mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann. Intern. Med.* 140:627–638.
- Shimada, Y., T. Morita, and K. Sugiyama. 2002. Effects of dietary eritadenine on $\Delta 6$ -desaturase activity and fatty acid profiles of several lipids in rats fed different fats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66:1605–1609.
- Stranahan, A. M., T. V. Arumugam, R. G. Cutler, K. Lee, J. M. Egan, and M. P. Mattson. 2008. Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. *Nat. Neurosci.* 11:309–317.
- Tun, P. A., D. M. Nathan, and L. C. Perlmutter. 1990. Cognitive and affective disorders in elderly diabetics. *Clin. Geriatr. Med.* 6:731–746.
- Webster, S. J., A. D. Bachstetter, and L. J. Van Eldik. 2013. Comprehensive behavioral characterization of an APP/PS-1 double knock-in mouse model of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.* 5:28.
- Xiong, H., D. Callaghan, A. Jones, D. G. Walker, L. F. Lue, T. G. Beach, L. I. Sue, J. Woulf, H. Xu, D. B. Stanimirovic, and W. Zhang. 2008. Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high β - and γ -secretase activities and A β production. *Neurobiol. Dis.* 29:422–437.
- Yu, Z. H., L. H. Yin, Y. Qian, and L. Yan. 2009. Effect of *Lentinus edodes* polysaccharide on oxidative stress, immunity activity and oral ulceration of rats stimulated by phenol. *Carbohydr. Polym.* 75:115–118.
- Zhao, W. Q. and M. Townsend. 2009. Insulin resistance and amyloidogenesis as common molecular foundation for type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1792:482–496.

Preliminary Study of *Lentinus edodes* Stipe Extracts on Reducing the Risk of Alzheimer's Disease in Diabetic Animal Model

Shu-Hui Yang^{1,*}, Hui-Ting Yang², and Shu-Chi Chiang³

Abstract

Yang, S. H., H. T. Yang, and S. C. Chiang. 2018. Preliminary study of *Lentinus edodes* stipe extracts on reducing the risk of Alzheimer's disease in diabetic animal model. *J. Taiwan Agric. Res.* 67(4):355–364.

Alzheimer's disease (AD) is a chronic neurodegenerative disease. In this study, animal model of diabetes induced AD was studied to investigate the effect of *Lentinus edodes* stipe extracts (LedoStE) on improving the risk factors of AD. Resultss showed that rats fed a high-fat diet and injected low-dose streptozotocin did cause diabetes-like symptoms-eating more, drinking more and weight loss, and also led to increase of AD risk factors. Diabetes mellitus (DM) rats fed with high-dose LedoStE can effectively improve the blood parameter as well as increase insulin secretion and insulin receptor content of brain ($P < 0.05$), while significantly decreased the levels of AD risk factors sash as amyloid precursor proteins (APP), β -amyloid-42 (A β 42), β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1), advanced glycation endproducts (AGEs), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) ($P < 0.05$) in brain. It also significantly increased the time ($P < 0.05$) to enter the open and central areas of the elevated plus-maze in DM rats taking LedoStE. From the above results, it shows that diabetic animals intake LedoStE can improve the biochemical metabolism of diabetes, which may reduce the risk of Alzheimer's disease or delay the AD onset.

Key words: *Lentinus edodes* stipe extracts, Diabetes mellitus, Alzheimer's disease, Insulin, Elevated plus-maze.

Received: March 21, 2018; Accepted: May 26, 2018.

* Corresponding author, e-mail: debbie@fthes-tari.gov.tw

¹ Associate Research Fellow and Head, Department of Management and Utilization, Fengshan Tropical Horticultural Experimental Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

² Associate Professor, Department of Nutrition, China Medical University, Taichung, Taiwan, ROC.

³ Graduate Student, Department of Nutrition, China Medical University, Taichung, Taiwan, ROC.