

延緩衰老功能性驗證平台與機能性菇類研究評估

王銘富¹、陳英茹²、陳美杏³

¹ 靜宜大學食品營養系、國際加齡產業研究發展中心。特聘教授。電子郵件：mfwang@pu.edu.tw；傳真：04-26530006

² 靜宜大學食品營養系。助理教授。

³ 農業試驗所植物病理組

摘 要

隨著醫療科技之進步，民生保健意識抬頭，現代人對健康觀念亦越來越重視下，台灣食品產業朝向以優質、具健康特色等利基開發兼具美味與健康概念的食品。老齡化社會及出生率降低影響台灣人口結構呈現快速老化的趨勢，延緩衰老及銀髮相關健康照護產業成為最具發展潛力的新領域。阿茲海默症、老年失智症等為常見之腦部退化性疾病，透過營養科學角度探討健康食品素材對延緩衰老及改善學習能力退化，為目前世人所關注的健康課題。延緩衰老驗證平台採用國際認可之老化模型動物，老化促進小鼠(senescence accelerated mice; SAMP8)進行相關研究。透過行為活動力、老化指數、主動及被動學習記憶測試、血液生化分析、老化生物活性指標測定、抗氧化生化指標測定、腦部病理判讀及存活期試驗等驗證，可協助業者開發具市場競爭力的多元化保健食品。國內菇類產業蓬勃發展，本研究以香菇、猴頭菇、桑黃、靈芝等進行一系列延緩衰老及學習記憶能力之相關研究探討。未來可研發具有調節人體生理功能、適合食用的保健營養品，以提高國產農特產品的新價值鏈。

關鍵字：延緩衰老、學習記憶、老化促進小鼠、保健食品素材

緒 言

隨著社會進步、醫藥發達，出生率及死亡率逐年降低，加上國人平均壽命的延長，台灣老年人口的比例正亦隨著逐年增加，2018 年，台灣 65 歲以上老年人口比率將達 14.36%，正式邁入國際慣稱的「高齡社會」；到了 2025 年，台灣更將走入每 4 到 5 人當中就有一位老人的「超高齡社會」，顯示台灣高齡化速度來得又急又快。調查顯示，「身體健康」為國內 65 歲以上老人對於未來最為擔心的問題，其次是「經濟來源」及生病時的「照顧問題」，顯示出目前老人最重要的需求為健康與經濟。因此相對地，銀髮族相關產品與服務需求將湧現。例如：健康養生、老人用品、老人醫療照顧與安養等，將是未來極具市場潛力的新興產業。

台灣農特產品向來具有品質優良之國際聲譽，而隨著生活水準日漸提高，消費者除了要求口感、優質及安全之外，更期望具有保健營養等功能。觀察國內近年來保健食品市場的年成長率約為 9%，整體產值亦高達 681 億元。因此面對高齡社會的來臨，以及慢性病管理與預防觀點的健康管理需求，行政院農委會提出了抗老化、抗憂鬱、視力保健、抗代謝症候群及外用產品五大範疇之農特產品機能性及保健功效新興計畫。目前台灣健康食品共有十三項保健功效，其中延緩衰老更是亞洲地區台灣獨有的保健功能，透過老化狀態、學習記憶、體內抗氧化能力與腦部病理觀測等驗證，開發延緩老化保健食品素材。

國內菇類產業蓬勃發展，依據農糧署的統計，民國 102 年鮮菇的總產量達 146541 公噸，年產值超過 120 億元。菇類除了作為餐桌上的食物之外，還富含多醣體、三萜類、腺苷、麥角固醇、多酚化合物等功效成分，對於抗氧化、抗發炎與修復神經元細胞具有良好功效，過去在傳統醫學上，菇類一直被當作養生保健的聖品。近年來菇蕈類保健食品在台灣的接受度逐漸提高，在健康食品認證方面也逐年提高，該類型之產品劑型最多為膠囊，價格比一般市面上子實體便宜，符合一般民眾需求，因此要如何才能擴大產品供應鏈及價值鏈，提高該類型之保健食品整體產值，尤其以相關性功能評估驗證，成為目前重要之課題。

老化與學習記憶

老化現象是一種普遍性(universal)、進行性(progressive)、累積性(cumulative)及傷害性(deleterious)之內外因素所引發之分子、細胞及系統方面的效應改變。年齡是多疾病主要的危險因子，例如：糖尿病、癌症、各種退化性疾病，包括阿茲海默症(Alzheimer's disease)、杭丁頓氏舞蹈症(Huntington's disease)及帕金森氏症(Parkinson's disease)。隨著年齡造成的生理功能衰退，有兩種情形，一為純粹與年齡增長有關之功能衰退(age-related physiologic deterioration)，另一為出現伴隨年齡增長之疾病(age-associated disease)，但兩者往往共同存在。

關於老化的原因，迄今已提出的學說和意見不勝枚舉。其中最具信賴性的學說為自由基學說(free radical theory)。一旦體內自由基的數量超出人體天然防禦的範圍，造成氧化壓力(oxidative stress)，則各種疾病與老化便接踵而至。因此，當自由基形成後就會造成連鎖反應，促使細胞物質氧化，造成過氧化物的堆積，進而破壞體內細胞，使生理功能逐漸消失，產生疾病。若能增加生物體內抗氧化防禦系統，分解活性氧物質，則能減少細胞傷害，延緩生物體的衰老與死亡。

隨著增齡，大腦會出現生理性老化或病理性功能衰退，存在著智力減退，尤其是知覺整合能力、近事記憶力、思維敏捷度等減退明顯，臨床上表現出健忘、反應遲鈍、動作不協調等症狀，甚至喪失社會活動能力，生活不能自理。衛福部調查顯示，台灣 65 歲以上老人中輕微認知障礙(Mild cognitive impairment, MCI)佔 18.58%；失智症人口佔 8.09%。流行病學調查亦表示，年紀愈大失智症盛行率愈高，且有每五歲盛行率即倍增之趨勢。伴隨著高齡人口數攀升，如何維護高齡生活的品質與尊嚴，保持健康體態與認知能力，是目前人類要共同面對的新課題，因此延緩老化的相關研究刻不容緩。



圖一、老化促進小鼠之照片(左圖：老化指數低；右圖：老化指數高)

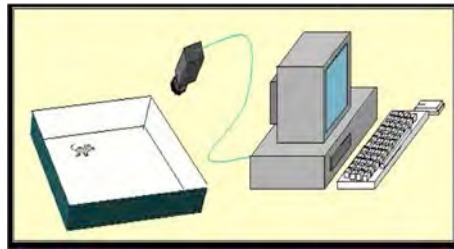
Fig. 1. Senescence-accelerated mice, SAMP8

延緩衰老功能性驗證平台

一、實驗動物模型介紹

進行延緩衰老評估需選用適合之老化動物作為實驗動物模式，一般可選用長期飼養至老化年齡的老齡動物模式、基因遺傳型老化動物模式、誘導型老化動物模式。

老化促進小鼠(senescence-accelerated mice, SAMP8)為國際認可之基因遺傳型老化動物模式，係由日本京都大學以 AKR/J 系小鼠採同胞兄妹互相交配繁殖，培育出來之加速老化動物模型。其主要老化特徵包括生命期短(10~17 個月)、外觀毛色缺乏光澤且粗糙、毛髮脫落、活動力降低、眼睛周圍發炎及脊椎彎曲等(圖一)。因 SAMP8 體內粒線體功能異常及高度氧化壓力狀態，進而引起學習及記憶能力缺損和快速老化的特性，且腦部會產生大量的類澱粉前驅蛋白(amyloid precursor protein, APP)與類澱粉蛋白(β -amyloid protein, A β)，被認為是研究阿茲海默症的良好動物模式，亦適合探討老化現象、學習記憶能力及體內生理變化等多方面之議題。



圖二、活動量裝置圖示

Fig. 2. The apparatus of open field activity test system.

二、老化外觀的評估—老化指數評估法(aging score)

老化指數系統是為了評估老化促進小鼠的衰老程度而制定的，評估 8 個與老化有關的特徵項目，包括有行為(behavior)方面：探索反應(reactivity)及逃避反應(passivity)；外表方面(appearance)方面：毛髮光澤度(glossiness)、粗糙度(coarseness)、毛髮稀疏脫落程度(hair loss)及皮膚潰瘍狀態(skin ulcer)；眼睛周圍紅腫發炎程度；脊柱前後彎曲程度(lordokyphosis)。每一個項目分為 5 等級計分(grades)，每一個項目的等級均有清楚的定義明列，並且根據

動物本身的老化強度(intensity)來區分的。老化等級與發生率及老化指數的總分，會伴隨年齡的增長而增加。

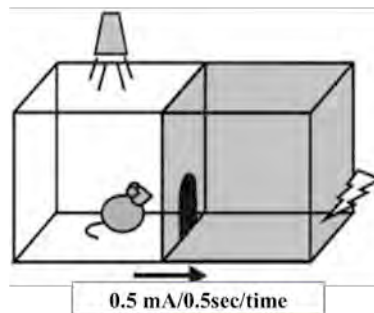
三、活動量測定法(open field activity test)

由於學習記憶測試法為平面移動之行為表現，因此監測平面移動量目的在了解小鼠平面步態移動之情形，作為活動量是否異常之評估依據。將小鼠放置於箱型裝置之正中央(圖二)，並在光線微弱且寂靜的環境下進行測試，紀錄下小鼠每 5 分鐘內的活動情形(locomotion; sec / 5 mins)。

四、學習及記憶能力測定

(一)單次被動迴避試驗(single-trial passive avoidance test)

藉由古典制約原理及小鼠趨暗之特性，判定試驗素材對小鼠學習記憶能力之影響。採用專屬之 shuttle cage，分成明室及暗室，其中央有一小閘門相隔並可相通，箱底設有間隔 1 cm 平行排列的金屬桿，並接上電流器(圖三)。測試時先將小鼠置於明室且打開閘門，使其自由探索，若小鼠進入暗室，隨即關上閘門並給予 0.5 微安培 0.5 秒之電擊(shock)，此為學習訓練。完成訓練後之 24 小時、48 小時及 72 小時的記憶能力，測試時採同樣方法操作，但此時不再給予任何電擊，記錄其在明室中滯留的時間，每次測試時間最大期限為 180 秒。滯留明室的時間越長，表示小鼠記憶能力越佳。



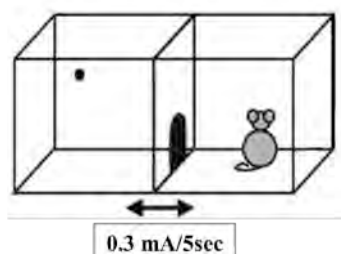
圖三、單次被動迴避試驗裝置圖示

Fig. 3. The apparatus of single-trial passive avoidance test.

(二)主動迴避試驗(active shuttle avoidance test)

藉由古典制約原理及小鼠厭惡聲光刺激之特性，判定試驗素材對

小鼠學習記憶能力之影響。建議於活動量試驗後，才進行主動迴避試驗。採用專屬之 shuttle cage，分成兩個箱室，其中央有一小閘門相隔並可相通，箱底設有接上點流器之間隔 1 cm 平行排列的金屬桿，實驗流程全由電腦程式設計控制時間、聲光及電擊(圖四)。先給予小鼠 10 秒鐘的光及聲音的刺激 (conditioned stimulus; CS)，若小鼠無迴避 CS 之反應，系統則給予電擊(unconditioned stimulus; UCS)；若小鼠迴避了 CS，則不給予電擊。試驗動物將接受連續 4 天，每天 4 次，每次 5 回的 CS/UCS 測試。此測試探討於 CS 系統下迴避反應的次數，判定小鼠學習記憶能力之影響。



圖四、主動迴避試驗裝置圖示

Fig. 4. The apparatus of active shuttle avoidance test.

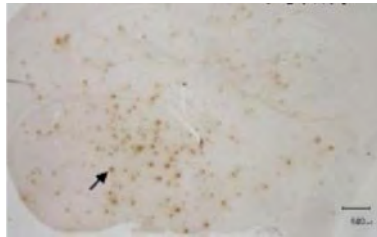
五、抗氧化能力測定

細胞會利用氧分子作為能量的來源，但為了避免活性氧物質對細胞造成氧化傷害，而產生了一套抗氧化防禦機制來保護自己，這套抗氧化防禦系統包括酵素性及非酵素性防禦系統。酵素系統包含了超氧歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、觸酶(catalase)、谷胱甘肽過氧化酶(glutathione peroxidase, GPx)等。藉由測定體內相關抗氧化酵素活性及等相關氧化指標及 8 羥基-2'-去氧鳥嘌呤核苷 (8-hydroxy-2'- deoxyguanosine, 8-OHdG)、氧化修飾後蛋白羰基功能基含量、腦內多巴胺含量等生物指標分析，來評定體內的抗氧化及抗衰老的狀態。

六、腦部病理組織測定法

隨著老化所引發之老年失智(senile dementia)為當前備受關注，類澱粉蛋白(β -amyloid protein, A β)是形成阿茲海默症的危險因子之一，A β 會在大腦皮質及海馬迴中過度分泌且大量堆積，導致神經元損傷產生老年斑塊及

神經糾結的現象，此為阿茲海默症之病理特徵(Flood *et al.*, 1991)。A β 於腦部中快速沈積，會導致記憶學習與行為認知的降低與不足。可藉由腦部病理切片進一步評估實驗動物腦部海馬迴組織中之 A β 沈積情形，褐色斑塊為經免疫染色後的 A β (圖五)。受試物若明顯降低海馬迴組織中 A β 沈積，表示改善阿茲海默症效果顯著。



圖五、腦部免疫染色之 A β 病理切片(箭頭處為 A β 之蓄積)

Fig. 5. The β -amyloid deposits in the brain.

七、存活期試驗

小鼠 6 月齡開始進行實驗，每天觀察及紀錄死亡月齡，直至全部自然死亡。實驗結果比較試驗組與對照組的平均壽命和最高壽命，畫出生存曲線圖，計算半數動物死亡的天數。

菇類與延緩衰老保健食品的開發

由於生活品質不斷提升，人類對延緩老化的需求是共同了心聲。透過健康照護，固然可以延長醫療的成效，但最根本的就是透過食療方式獲得更好的健康條件，各國科學家也陸續開發能延緩衰老的各種保健食材。舉凡具特定成分，能調節生理機能之食品皆稱為保健食品，包括特殊營養食品、機能性食品、膳食補充食品及健康食品。

自 20 世紀初期，日本人將香菇栽種技術引進台灣後，隨即開啟了發展菇類的產業，除了歸功於得天獨厚的菇蕈生長氣候，農民們勤奮的栽培亦功不可沒，再加上政府機關輔導相助，於 1950 年成功栽培自美國引入的菇類菌種，我國的菇類產業即進入另外一個新的時代，並具有「菇類王國」的美譽。。

菇類含有人體必需胺基酸、礦物質、維生素 B 群、維生素 D、低脂肪

且富含膳食纖維是現今最流行的保健食品。隨著菇類的開發與深入研究，菇類食品與人體健康密切關係越來越受到人們的關注。因此，對於菇類所具生理活性物質的功能及特性，已成為新興的研究重點。

靈芝自古為我國傳統醫學中滋補強壯、扶正固本的珍貴藥材，並有久食輕身不老的記載。文獻指出靈芝具有抑制腫瘤生長 (Liu *et al.*, 2012)、免疫調節作用及提升抗氧化與清除活性氧物種的能力(Pan *et al.*, 2013)，另有研究發現，靈芝能促進神經祖原細胞增殖及分化的活性並可延長果蠅壽命(蔡 1998)。因此，靈芝在抗老化作用更進一步的被證實。

此外，本研究室也與行政院農業委員會農業試驗所合作，利用在地生產的香菇、猴頭菇及桑黃進行具延緩衰老的菇類保健機能性產品之開發。

香菇屬真菌類，為食用菌類孢子植物，由於味道鮮美、營養豐富，並能藥食兩用，所以又有"菇中之秀，菌中之王"美稱。由香菇菌絲體產生的 α -葡聚糖 (Active Hexose Correlated Compound, AHCC) 在許多癌症中顯示出正面的效果(Hangai *et al.*, 2013)，能活化巨噬細胞、T 細胞，促進抗體的產生。另外，從香菇子實體分離出一種降血清膽固醇物質 lentinacin，能加速膽固醇之排出及代謝分解(Coates *et al.*, 2005)。

猴頭菇的生理活性包含抗菌、抗腫瘤活性、抗氧化、免疫調節，等功能，近年來猴頭菇與神經系統、認知障礙有密切地研究。猴頭菇具有能夠刺激神經生長因子 (NGF) 的能力(Kawagishi *et al.*, 1996) 又被稱為「大自然的神經元營養素」。在動物實驗中，給予大鼠猴頭菇水草物能快速恢復神經損傷，促進早期階段的神經再生(Lai *et al.*, 2013)。

桑黃是一種傳統使用的藥用真菌，中國使用的菌種為 *Phellinus igniarius* 或 *Phellinus baumii*，日本、韓國使用的菌種為 *Phellinus linteus*，雖然這些菌株的子實體外觀相似，但是菌種不同，生理活性也可能有所差異。桑黃主要的活性成分是多醣與 hispidin 類的多酚化合物，研究顯示桑黃具有抑制腫瘤細胞生長、調節免疫、清除自由基(Yuan *et al.*, 2009)等生理活性。

經初步研究顯示，以小鼠巨噬細胞株 RAW264.7 為模式進行抗發炎評估，猴頭菇和桑黃具有降低細胞中促發炎細胞激素及一氧化氮的生成能力，並抑制脂多醣(Lipopolysaccharides, LPS)刺激後 cyclooxygenase-2 (COX-2)發炎蛋白的表現。以 H₂O₂ 誘導氧化損傷之 PC12 神經細胞進行神經保護活性評估，桑黃能降低活性氧自由基，減少 H₂O₂ 造成的 DNA 損傷，並增加細

胞內抗氧化物質，對於 H₂O₂ 誘發 PC12 細胞損傷有神經保護的功能。綜合上述，猴頭菇及桑黃具有較佳的抗發炎作用，桑黃之神經保護效果最好，此成果可進一步的透過動物實驗進行延緩衰老及改善學習記憶能力驗證評估，作為延緩衰老健康食品開發之依據。

結 語

食品已從單純提供人類營養機能及美味可口機能，進一步發展成具人體健康之調節機能，可以提供改善防禦功能、調節體能、延緩老化、預防疾病、回復疾病等功能。面臨人口結構高齡化，我國各行政體系及醫學研究機構日漸重視老化相關議題。因此藉由營養科學的角度，建立了延緩衰老之健康食品素材驗證平台，提供延緩衰老及改善學習能力退化之保健功效，開發更多種有益健康的機能成分，增加食品更多對健康有益的訴求功能，使得能在平均餘命不變下，能壓縮疾病期或臥床時間，積極的提升老年期健康生活品質，降低政府對因老化所衍生健康保險及社會成本的負擔與壓力，同時也為食品生技相關產業提供了升級的空間。

引用文獻

1. 2014 年食品產業年鑑。2014。食品工業發展研究所
2. 內政部主計處。國民生命表。
3. 衛生福利部統計處。臺閩地區老人狀況調查分析報告。
4. 蔡勝發。1998。中藥靈芝抗老化及抗癌作用之研究。國立陽明大學生物藥學研究所碩士論文。
5. Coates P. M., P. M. Coates, M. Blackman, M. R. Blackman, G. M. Cragg, M. Levine, J. D. White, J. Moss, and M. A. Levine, 2005. Shiitake (*Lentinus edodes*), S. P. Wasser. Encyclopedia of Dietary Supplements.
6. Flood, J. F., J. E. Morley, and E. Roberts. 1991. Amnestic effects in mice of four synthetic peptides homologous to amyloid beta protein from patients with Alzheimer disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 88:3363-66.
7. Hangai S., S. Iwase, T. Kawaguchi, Y. Kogure, T. Miyaji, T. Matsunaga, Y. Nagumo, and T. Yamaguchi. 2013. Effect of active hexose-correlated

- compound in women receiving adjuvant chemotherapy for breast cancer: a retrospective study. *J. Altern Complement Med.* 19:905-10.
8. Kawagishi, H., A. Shimada, S. Hosokawa, H. Mori, H. Sakamoto, Y. Ishiguro, S. Sakemi, J. Bordner, N. Kojima, and S. Furukawa. 1996. Erinacines E, F, and G, Stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Tetra. Lett.* 37:7399-402.
 9. Lai, P. L., M. Naidu, V. Sabaratnam, K. H. Wong, R. P. David, U. R. Kuppusamy, N. Abdullah, and S. N. Malek. 2013. Neurotrophic properties of the Lion's mane medicinal mushroom, *Hericium erinaceus* (Higher Basidiomycetes) from Malaysia. *Int. J. Med. Mushrooms* 15:539-54.
 10. Liu, Y. J., J. Shen, Y. M. Xia, J. Zhang, and H. S. Park 2012. The polysaccharides from *Ganoderma lucidum*: Are they always inhibitors on human hepatocarcinoma cells? *Carbohydr Polym.* 90:1210-5.
 11. Pan, K, Q. Jiang, G. Liu, X. Miao, and D. Zhong 2013. Optimization extraction of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its immunity and antioxidant activities. *Int. J. Biol. Macromol.* 55:301-6.
 12. Yuan, C, X. Huang, L. Cheng, Y. Bu, G. Liu, F. Yi, Z. Yang, and F. Song 2009. Evaluation of antioxidant and immune activity of *Phellinus ribis* glucan in mice. *Food Chem.* 115:581-4.