

菇蕈類水萃物

抑制血管新生評估 - 斑馬魚模式

農試所鳳山分所 楊淑惠 洪千雅

植病組 陳美杏

高雄醫學大學 劉旺達

一、前言

血管新生是指從現有的血管中長出新血管的過程，它同時由促進血管新生因子和抑制血管新生因子兩者相互拮抗嚴密控制，除了在胚胎發育，創傷癒合和女性生殖循環中出現外，正常人體中並不會發生。然而，許多疾病的成因都與不正常的血管新生現象有關，如腫瘤的發生、糖尿病性視網膜病變等等，皆與過度的血管新生有關。

斑馬魚為小型脊椎動物，其特點為胚胎為體外發育且十分透明，容易觀察藥物對活體胚胎內部組織、器官的作用。*TG(fli1:EGFP)* 轉基因斑馬魚，能在血管內皮細胞 (ECs, endothelial cells) 表達綠色螢光蛋白 (GFP, Green Fluorescent Protein)，在特定波長的螢光下，*Fli-1*斑馬魚身體的血管會發出綠色的螢光，有利於血管新生的研究觀察。

菇蕈類因其獨特的口感和微妙的香氣而被視為美食，也是微型製藥工廠，能產生多種具有生物學特性的成分，中醫方劑亦有關促進健康和增加活力上的使用，功效也獲得科學研究的支持。近年來，菇蕈產品更已經成為現代人的營養保健品，許多正在進行的研究顯示，菇蕈類可能是新一代“生物治療藥物”的重要來源。本研究利用 *TG(fli1:EGFP)* 轉基因斑馬魚快篩模式篩選國產菇蕈類水萃物對抑制血管新生之效果評估，期能得到具功能性農業素材供後續應用之參考。

二、研究方法與材料

選用國內常見菇類共24種，如表一，稱取適量乾燥菇品，加10倍RO水，復水16小時後進行熱萃取，經過濾，收集濾液，冷凍乾燥後備用。菇類水萃物成分分析及斑馬魚試驗樣品濃度為 20 mg mL^{-1} 。基因轉殖斑馬魚 *TG(fli1:EGFP)*，在光週期開始時進行斑馬魚交配產卵，收集受精卵移入培養皿中於 28°C 恆溫培養。胚胎培養至10hpf (受精後10小時) 後開始浸泡於經稀釋2000倍之萃取物中。於24hpf利用解剖顯微鏡進行拍照觀察，將胚胎採取頭部朝左背部朝上的姿勢固定於1% cellulose中，利用CCD進行影像

作者：楊淑惠副研究員兼系主任
連絡電話：07-7310191-408

攝影。選擇主幹區間血管 (intersegmental vessel, ISV) 的部分進行分析，轉換成8 bits的 tif圖檔，利用ImageJ進行ISV的長度計算。接著進行ISV長度差異的分析，統計ISV缺陷的魚體數目，比較萃取出處理後的差異，以及將幼魚的ISV長度/體節的寬度的百分比輸入至Excel進行量化統計，比較與控制組之間的顯著差異與否。

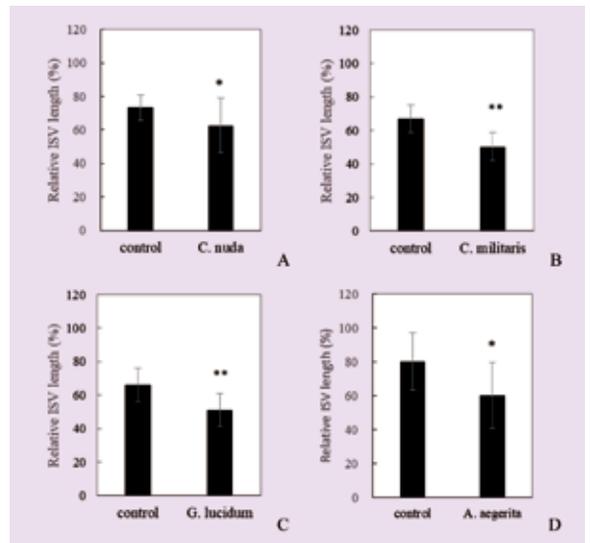
三、抑制斑馬魚血管新生測試結果

研究顯示在試驗的24種菇類萃取出物中有紫丁香蘑 (*Clitocybe nuda*)，北蟲草 (*Cordyceps militaris*)，靈芝 (*Ganoderma lucidum*)及柳松菇 (*Agrocybe aegerita*) 具有抑制斑馬魚胚胎血管新生現象，新生血管長度/體節寬度分別為63%±17%，50%±12%，51%±12% 及61%±20%，如圖一所示。與控制組比較，添加北蟲草、靈芝萃取出液，ISV的長度/體節的寬度分別減少17% 及15% 量化統計顯示為極顯著 ($P < 0.001$)，添加紫丁香蘑、柳松菇萃取出液，ISV的長度/體節的寬度

分別減少11% 及20% 血管新生抑制率量化統計顯示為顯著 ($P < 0.05$)。圖二為北蟲草水萃液對斑馬魚胚胎主幹區間血管生長的影响，ISV生長被抑制，與控制組比較血管長度相對不足。

四、討論

研究文獻顯示菇類的酚酸化合物具有抑制血管新生之生理活性，菌核鮑魚菇 (*Pleurotus tuber-regium*) 萃取出物富含綠原酸 (Chlorogenic acid) 及丁香



圖一、不同菇類水萃物對斑馬魚胚胎存活率與血管新生之影響。

A=紫丁香蘑；B=北蟲草；C=靈芝；D=柳松菇

表一、用於試驗的菇類品種

秀珍菇 <i>Pleurotus ostreatus</i>	鴻喜菇 <i>Hypsizygu tessellatus</i>	美白菇 <i>Hypsizygu marmoreus</i>	白精靈 <i>Hypsizygu marmoreus</i>	鮑魚菇 <i>Pleurotus cystidiosus</i>
洋菇 <i>Agaricus bisporus</i>	草菇 <i>Volvariella volvacea</i>	珊瑚菇 <i>Pleurotus citrinopileatus</i>	木耳 <i>Auricularia polytricha</i>	銀耳 <i>Trmella fuciformis</i>
杏鮑菇 <i>Pleurotus eryngii</i>	花臉香蘑 <i>Lepista sordida</i>	紫丁香蘑 <i>Clitocybe nuda</i>	舞菇 <i>Grifola foindosa</i>	巴西蘑菇 <i>Agaricus blazei</i>
蜜環菌 <i>Armillaria mellea</i>	桑黃 <i>Phellinus linteus</i>	北蟲草 <i>Cordyceps militaris</i>	茯苓 <i>Wolfporia extensa</i>	靈芝 <i>Ganoderma lucidum</i>
金針菇 <i>Flammulina velutipes</i>	柳松菇 <i>Agrocybe aegerita</i>	香菇 <i>Lentinula edodes</i>	猴頭菇 <i>Hericium erinaceus</i>	====

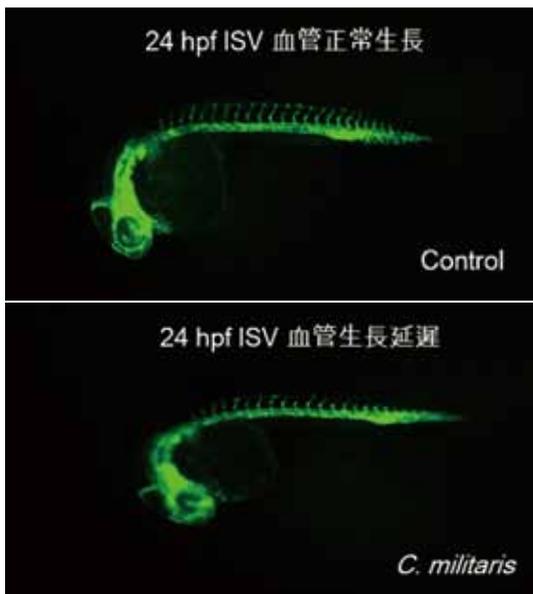
酸 (Syringic acid)，以人類臍靜脈內皮細胞 (Human umbilical vein endothelial cells; HUVEC) 進行體外研究顯示，可以顯著抑制血管內皮生長因子 (Vascular endothelial growth factor; VEGF) 誘導的增殖，遷移和管形成 (Lin *et al.* 2015)。茶樹菇 (*Agrocybe aegerita*) 水萃液富含酚酸類物質，以濃度 5mM L^{-1} 的沒食子酸 (Gallic acid)、咖啡酸 (Caffeic acid) 及原兒茶酸 (p-Catechuic acid) 進行體外研究顯示，能顯著降低由VEGF誘導的HUVEC的增生、遷移和管狀結構形成 ($P < 0.05$) (Ching 2012)。鞣花酸 (Ellagic acid) 則可顯著抑制一系列VEGF誘導的內皮細胞的增殖，遷移和血管生成過程 (Wang *et al.* 2012)。

初步分析顯示，菇類水萃物酚酸包括鞣花酸、沒食子酸、原兒茶素 (p-Catechin)、綠原酸、丁香酸及香豆

酸 (Coumaric acid) 等，惟抑制斑馬魚胚胎血管新生功效與酚酸總量並無顯著線性關係，即並非含量愈高效果愈強。菇類水萃物除酚酸外也含有多醣 (Polysaccharides)，麥角固醇 (Ergosterols) 衍生物及三萜類 (Triterpenes) 等等成分，抑制血管新生功效與各小分子酚酸及各成分間比例關係，有待後續探討。

五、參考文獻

- Beedie, S. L., A. J. Diamond, L. R. Fraga, W. D. Figg, and N. Vargessona. 2017. Vertebrate embryos as tools for anti-angiogenic drug screening and function. *Reproductive Toxicol.* 70:49–59.
- Lin, S., L. T. Ching, J. Chen, and Peter C. K. Cheung. 2015. Antioxidant and anti-angiogenic effects of mushroom phenolics-rich fractions. *J. Functional Foods.* 17:802–815.
- Ching, LAI Tsz. 2012. In vitro Antioxidant and Anti-angiogenic Effects of Mushroom Water Extracts. A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Philosophy in Food and Nutritional Sciences. Pp.158.
- Wang, N., Z. Y. Wang, S. L. Mo, T. Y. Loo, D. M. Wang, H. B. Luo, D. P. Yang, Y. L. Chen, J. G. Shen, and J. P. Chen. 2012. Ellagic acid, a phenolic compound, exerts anti-angiogenesis effects via VEGFR-2 signaling pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 134(3): 943–955.



圖二、北蟲草水萃物對 *Tg(fli1:EGFP)* 斑馬魚胚胎ISV生長的影響。