

計畫編號： DOH 89-TD-1064

行政院衛生署八十八年下半年即八十九年度

科技研究發展計畫

以巨噬細胞活性作為評估食品免疫機能性之方法探討
Methodology of evaluating the immune effects of the
functional food by the macrophage activity

研 究 報 告

執 行 機 構：台灣大學 農業化學系

計畫主持人：林 璧 鳳 教授

研 究 人 員：陳妙齡、林金源、呂麗琴

執 行 期 限：自 88 年 7 月 1 日至 89 年 6 月 30 日

**** 本研究報告僅供參考，不代表本署意見 ****

目 錄

中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
前言.....	3
材料與方法.....	17
I、非特異性免疫反應.....	17
II、特異性免疫反應.....	22
結果.....	25
I、非特異性免疫反應.....	25
II、特異性免疫反應.....	28
討論.....	32
結果與建議.....	37
參考文獻.....	38

圖表目錄

表 1	實驗動物與人體表面積比等有效劑量換算比率表.....	47
表 2	餵食靈芝對 BALB/c 雌鼠在四個月大犧牲時之體重、攝食量及飼料利用效率的影響.....	48
表 3	餵食靈芝對 BALB/c 雌鼠在四個月大犧牲時之組織重及其相對重量的影響.....	49
表 4	餵食靈芝對 BALB/c 雌鼠血液中顆粒細胞吞噬作用之影響.....	50
表 5	餵食靈芝對 BALB/c 雌鼠腹腔細胞之細胞激素分泌量的影響.....	51
表 6	餵食靈芝對 BALB/c 雌鼠腹腔細胞之前列腺素 E2 分泌量的影響.....	52
表 7	餵食靈芝對 BALB/c 雌鼠脾臟細胞之細胞激素分泌量的影響.....	53
表 8	餵食靈芝對 BALB/c 小鼠腹腔中顆粒細胞(a)和單核細胞(b)吞噬作用之影響.....	54
表 9	餵食靈芝對腹腔注射抗原之 BALB/c 雌鼠在四個月大犧牲時之體重、攝食量及飼料利用效率的影響.....	55
表 10	餵食靈芝對腹腔注射抗原之 BALB/c 雌鼠在四個月大犧牲時之組織重及其相對重量的影響.....	56
表 11	餵食靈芝對腹腔注射抗原之 BALB/c 雌鼠血液中顆粒細胞吞噬作用之影響.....	57
表 12	餵食靈芝對腹腔注射抗原之 BALB/c 雌鼠脾臟細胞 Th1 細胞激素分泌量的影響.....	58
表 13	餵食靈芝對腹腔注射抗原之 BALB/c 雌鼠脾臟細胞 Th2 細胞激素分泌量的影響.....	59
圖 1	餵食靈芝之 BALB/c 雌鼠生長曲線.....	60
圖 2	餵食靈芝對 BALB/c 雌鼠肝臟均質液中 TBARS 含量的影響.....	61
圖 3	餵食靈芝對 BALB/c 雌鼠血清中 IgA、IgG 和 IgM 總含量之影響.....	62
圖 4	餵食靈芝產品對 BALB/c 小鼠腹腔中自然殺手細胞活性之影響.....	63
圖 5	餵食靈芝對腹腔注射抗原之 BALB/c 雌鼠之生長曲線.....	64
圖 6	餵食靈芝對腹腔注射抗原 BALB/c 雌鼠肝臟均質液中 TBARS 含量的影響.....	65
圖 7	餵食靈芝對腹腔注射抗原之 BALB/c 雌鼠血清中 IgA、IgG 和 IgM 總含量之影響.....	66
圖 8	餵食靈芝產品 A 和靈芝產品 B 對腹腔注射抗原之 BALB/c 雌鼠腹腔中自然殺手細胞活性的影響.....	67
圖 9	餵食靈芝對 BALB/c 小鼠脾臟細胞激素 IL-2/IL-4 比值之影響.....	68

摘要

本研究主要探討非特異免疫反應和特異免疫反應的動物模式中，腹腔細胞與自然殺手細胞等自然免疫反應，是否受到飲食因子的影響。本研究是以靈芝為試驗樣品，來餵食 BALB/c 小鼠六週後，比較餵食組與未餵食組在免疫功能相關指標的差異性。本實驗包括非特異性免疫功能評估與特異性免疫功能評估。非特異性免疫功能評估試驗，是在餵食試驗樣品六週後分別測定血清抗體濃度、脾臟細胞激素分泌能力、腹腔細胞細胞激素與媒介物質分泌情形和吞噬細胞活性等。結果顯示，餵食靈芝有顯著較高的血清總抗體 IgG、IgM 和 IgA 濃度，顯著較高的 Th1 細胞激素 IL-2 和 γ IFN、以及 TNF α ，但有顯著較低的 Th2 細胞激素 IL-4 和 IL-10。血液所測得吞噬細胞活性餵食靈芝組也有較高的趨勢，在 PHA 刺激下中劑量組有顯著較高的吞噬細胞活性。在腹腔細胞方面，則在中劑量組有顯著較低的 IL-1 β 和 PGE₂ 的分泌。在特異性免疫功能評估試驗，則是在餵食試驗樣品六週期間，同時以卵蛋白腹腔注射給予卵蛋白特異性免疫後，分別測定血清卵蛋白特異性抗體濃度、脾臟細胞增生能力、脾臟細胞激素分泌能力、自然殺手細胞活性和吞噬細胞活性等。結果顯示，餵食靈芝對卵蛋白特異性抗體 IgG、IgM 和 IgG_{2a} 雖無顯著影響，但有顯著較低的 IgE 和 IgG₁。有顯著較高的脾臟細胞增生能力。有以上結果顯示，餵食靈芝有促進抗體生成、促進免疫細胞增生能力、調節 T 細胞功能、以及促進自然殺手細胞活性等調節免疫功能的作用。

中文關鍵詞：自然殺手細胞，卵蛋白，抗體，靈芝，免疫反應

Abstract

This study is to investigate whether the dietary factor can affect the immune responses of mice either with or without immunization with ovalbumin. The mice were fed AIN76 diet supplemented with Ganoderma product tsuga YK-01 or tsuga YK-07 by tube feeding from the age of 8 weeks old. After 6 weeks' tube feeding with Ganoderma, mice were sacrificed. Blood was collected for antibody detection and phagocytosis assay. Spleen were isolated for proliferation and cytokine assay. Peritoneal cells were also isolated for phagocytosis assay and cytokine measurement. The results showed that supplementation with Ganoderma did not affect body weight and feed efficiency, but mice supplemented with Ganoderma has significantly lower TBARS value compared to the control group in non-immunized model, but not in immunized model. Mice fed with Ganoderma also had significantly higher natural killer cell activity in both non-immunized and immunized models. Serum IgA, IgG and IgM titers were higher in non-immunized mice with Ganoderma, but OVA-specific IgA and IgG were lower, as well as IgE and IgG1. Mice supplement with Ganoderma tended to have higher Th1 cell mediated cytokines, such as IFN and IL-2, and lower Th2 cell mediated cytokines, such as IL-4 and IL-5. In conclusion, Ganoderma supplementation could affect immune response by modulating cytokine secretion and antibody production, and also increase natural killer cells activity, which plays an important role in innate immunity.

Key words: Natural killer cell, Ovalbumin, Antibody, Ganoderma,
Immune response

本 文

(1) 前 言

近年來國人生活型態及飲食習慣的改變，與經濟發展迅速、社會富裕，再加上媒體廣告與資訊的發達，並且，在傳統的中國社會裡，常有「醫食同源」的飲食觀念，在一般草藥植物或中藥材常被國人以保健目的食用。國人對所謂的「健康食品」、「保健食品」或「機能性食品」的需求與購買力增加，使得目前市場上以健康食品名目行銷的產品多不甚舉，已不再是傳統家庭自烹的補品形式，而是以大宗補品方式販賣。而近年來健康食品的買賣糾紛逐漸增加，主要問題在於產品所標榜的效能常有虛偽不實的情形，且產品品質良莠不齊，售價偏高，卻又常未標示有效成份與含量。近年來，世界先進各國正積極推動將所謂的「保健食品」納入管理，我國也因此類產品日益增多，又多在「藥品」與「食品」之間，因而產生許多問題而難以管理。自民國八十八年八月起施行「保健食品管理法」後，行政院衛生署已將這類宣稱「提供特殊成份或具特定保健功效，但非以治療、矯正疾病為目的之食品」的產品納入管理。因此，在實施管理的首要工作，便是定義保健食品所需合乎的條件，此條件為「具有明確的保健功效成份，且其產品的合理攝取量須有科學根據」，或「經科學化的保健功效評估試驗，或醫學裡證明其無害且具明確及穩定的保健作用」。故如何用科學方法評估保健食品之功效為首要的工作，方法確立方能使管理落實。

在西方國家中，美國 FDA 於 1994 年頒佈膳食補充品健康與教育法案，將機能性食品脫離藥品管理範圍，但尚無法具體管理辦法，而現有的市場量已達到 75~90 億美元，預計潛力市場將達 2500 億美元 (Hasler 1996)。另外以健康訴求的有機食品也以每年 20% 成長率，使

市場近約 30 億美元 (Breene 1997)。此外，許多消費者深信藥草的保健效用，藥用草本植物在食品中的應用在西方國家已蔚為風氣，市場可達 25 億美元，且每年以 18% 的速度成長 (McCue 1997)。因此，如何對這些以增進健康、預防疾病的保健食品加以管理或建立適當的認證體系，是世界先進國家正在努力的重要工作，尋求有效管理以維護大眾健康。

目前，許多保健產品多以「增強免疫力」作為產品之機能性訴求，因為免疫系統為人體重要的防禦系統，基本上受到體內各個系統調節而達平衡，何種指標代表「增強免疫力」尚無定論，可能因人的身體健康狀況而異，不可不慎。例如有些植物性膳食營養補品，稱之為營養藥劑 (Nutraceutical) 的最新形態之膳食補品，是將植物中對人體健康有益之化學成份萃取而得，例如：蒜素、辣椒素、甘草素等，而多需稱根據研究有提升免疫力等效能 (Hochwald 1996)。又有報導有些天然之營養補品包括藥用植物如銀杏、人蔘、大蒜、等，若每日食用可提升免疫力，降低致癌危險性、延長壽命等預防疾病功能 (Mayell 1996)。而在美國十大暢銷藥草中，多種植物例如紫錐花 (Echinacea) 宣稱可強化免疫系統，在寒冷季節是被廣用來預防感冒的藥草 (Starr 1996)。

然而這些以「增強免疫力」為訴求之藥草產品多以傳統民間可製感冒等習慣用法為依據，並無完整實驗報告，只有數篇探討其中成份，例如冬蟲夏草的 cordycepin 或 glucan 等對淋巴細胞 DNA 的重組與 sterol 分泌的分子層次調控 (Majone 1985, Krone 1979)。因為免疫系統為人體重要的防禦系統，基本上受到體內各個系統調節而達平衡，何種指標代表「增強免疫力」尚無定論，又宣稱的研究報導在免疫相關實驗上之數據並未完整。免疫相關指標所代表的意義可能因人的身體健康狀況而異，不可不慎。

因此，對於食品如何影響免疫功能，宜建立一套評估免疫相關的指標包括自然免疫反應、後天性免疫力、抗原特異性免疫反應等免疫反應的方法評估。以比較不同的方法檢測時，評估與免疫相關的實驗數據所代表的意義，除建立有系統之評估方法，將來能用以評估保健食品的免疫功效。因此，本年度計劃主要探討腹腔細胞包括巨噬細胞等自然免疫反應的指標評估方法，例如巨噬細胞活性升高代表能快速聚集於受傷部位，有效吞噬外來病原菌與死傷細胞，進而產生發炎反應。在對抗外來病菌是有利，但對自體抗體與過敏不見得有利。因此，巨噬細胞的指標在認定健康食品的免疫機能時更重要。因此，本計劃更需要與自然殺手細胞的數據相對照，已提供完整的資訊，評估以巨噬細胞活性的數據之可靠性。因為在其他的自然殺手細胞等先天性免疫細胞的功能評估較繁雜，若能以巨噬細胞作為代表則深具應用價值。

關於免疫系統，可分為先天性免疫反應與後天性免疫反應，先天性免疫反應又稱為非專一性的免疫反應，此一非專一性的免疫反應包含了身體性、生理性、吞噬性及發炎性四種的防禦方式，其分別說明於下：

1. 身體性 (Anatomic Barriers)：身體本身的結構是為抵禦外來病原 (pathogens) 的第一道防線，此一防線包含了皮膚和消化道、呼吸道等的黏膜；完好的皮膚不僅可以防止病原侵入，還可以抑制大部分微生物的生長；若是皮膚有了傷口，或是感染的病原可通過皮膚及黏膜的屏障，則需其他的防禦方式。
2. 生理性 (Physiologic Barriers)：此一屏障包含了溫度、PH和一些溶解因子(如：lysozyme)，lysozyme等是種水解酵素，其可以溶解細菌的細胞壁，以防止細胞受到感染。

3. 胞飲及吞噬作用 (Endocytic and Phagocytic Barriers) :
endocytic barrier是為胞飲的作用，胞膜凹陷將分子攝入，不需特殊的細胞即可進行此一作用；phagocytic barrier則是為吞噬作用，此作用只有特殊的細胞可進行，如：單核細胞、顆粒細胞等。

4. 發炎反應 (Inflammatory barriers) : 發炎反應是指對於各種刺激感染或是組織受傷所產生的生理反應，又可分為急性發炎反應及慢性發炎反應二種；當受到感染時，淋巴球、單核球等免疫細胞會聚集，此時組織的巨噬細胞受到活化因而分泌 $\text{TNF}\alpha$ 、IL-1 和 IL-6 等細胞激素，而造成 B 細胞及T細胞的活化、血管通透性增加等反應，此即為急性的發炎反應。所謂的慢性發炎反應是指干擾素 (γIFN) 作用於巨噬細胞上，促使巨噬細胞活化表現第二類的 MHC分子(Kuby, 1994)。

而後天性免疫反應包含了淋巴球及抗原呈現細胞兩種細胞。

1. B 淋巴球：B淋巴球在成熟離開骨髓後會表現出專一性的抗接受器，當細胞受到抗原感染後，其會生成抗體且對此特定抗原產生記憶性。
2. T淋巴球：T淋巴球是在胸腺中成熟的，又可分為輔助型T細胞 (T helper cell ; Th cell) 及毒殺型T細胞 (T cytotoxic cell ; Tc cell)，輔助型T細胞又可分為Th1及Th2兩種亞型，主要功能為分泌細胞激素參與體液及細胞免疫反應；毒殺型T細胞則會消除被病毒感染的細胞或是外來的物質。
3. 抗原呈現細胞 (Antigen-present cells) : 此類細胞包含了樹突細胞及巨噬細胞等，當其將抗原攝入後表現於細胞膜上，使T細胞能夠辨認抗原而與之結合。

關於免疫細胞，T 細胞依照分泌淋巴介質的不同，可將 T 輔助型細胞分為第一型 T 輔助型細胞 (Th1) 及第二型 T 輔助型細胞 (Th2)。Th1 細胞主要是接受細菌或病毒等抗原的刺激，分泌的淋巴介質以 IL-2 和 γ -IFN 為主，會促使 B 細胞產生 IgG_{2a} 和 IgM 抗體。而 Th2 細胞則主要是接受過敏原或寄生蟲的刺激，分泌的淋巴介質以 IL-4、IL-5、IL-6 及 IL-10 為主，會促使 B 細胞產生 IgG₁ 和 IgE 抗體。在正常情況下，Th1 和 Th2 維持平衡的狀態，因為這兩型 T 輔助型細胞具有互相拮抗的作用，Th1 細胞分泌的淋巴介質 γ -IFN 具有抑制 Th2 細胞的增生及 IgE 抗體或自體抗體的生成。Th2 細胞分泌的淋巴介質 IL-10 則會抑制 Th1 細胞分泌的淋巴介質，使傾向 Th2 細胞的免疫反應。此外，巨噬細胞亦扮演及重要的調節與活化淋巴細胞的角色，巨噬細胞所分泌的前列腺素E₂ (PGE₂) 會使反應傾向 Th2 系統 (Phipps, 1991)，可能易引發過敏性疾病或自體免疫疾病。PGE₂ 為體內重要的 eicosanoid，廣泛分佈於體內組織中，具有許多生理調控的功能。在免疫系統方面則會抑制 T 細胞的增生、IL-2 的生成及 B 細胞分泌 IgM 抗體的能力 (Schad, 1988 ; Phipps, 1990)。

過敏疾病會使體內 T 輔助型細胞傾向第二型為主的反應，分泌 IL-4 及 IL-5 等 Th2 細胞重要的淋巴介質 (Stam, 1993; Barnes, 1996)，抑制 Th1 淋巴介質 IL-2 和 γ -IFN 生成，而 Th2 淋巴介質 IL-5 有上升的趨勢。IL-5 除了有吸引嗜伊紅性球的能力外，還可以促進以被 IL-4 活化的 B 細胞分泌 IgE 抗體 (Pene, 1988)。一旦身上 IL-4 / γ -IFN 的比值升高，不但會使接下來受刺激的 T 細胞都傾向 Th2 系統方向分化，PGE₂ 會促進 IL-4 induced class switch，抑制 IgM 製造而促進 IgE 及 IgG₁ 抗體的生成 (Roper, 1992)。使在過敏反應發生時，反應會偏向 Th2 系統而產生 IgE 和 IgG₁ 抗體。因

此推論， PGE_2 的分泌量與過敏反應之間有密切的關係。因此，測定營養因子對免疫力的影響時，只測定淋巴細胞的增生或抗體的含量，都無法確實了解此飲食因子對免疫力的利弊，因此，巨噬細胞的 PGE_2 等媒介物的分泌和對免疫細胞活化所扮演的角色，是必須同時探討的問題。

關於吞噬作用的免疫功能，如果微生物一旦穿過上皮細胞，被會受到網狀內皮系統的吞噬細胞，這些吞噬細胞來自骨髓幹細胞，有數種不同類型，包括肝臟的 Kupffer 細胞、滑液腔的滑液 A 細胞、和血液中的嗜中性多核球和單核球，嗜中性多核球和單核球受到刺激則產生反應，由血管移至組織中，不同的是多核球壽命較短，單核球則發育為組織中的巨噬細胞。這些細胞的主要功能是吞噬各種顆粒和病原體。而發炎反應是身體對感染病原入侵等傷害所作的反應，使發炎部位血液供應量增加，內皮細胞的微血管通透性增加，使免疫反應的可溶性物質和巨噬細胞藉著趨化作用迅速達到感染部位，吞噬病原菌。有研究顯示，飲食因子例如乳酸菌和一些植物萃取物有促進吞噬細胞的吞噬作用 (Schiffrin, 1995; Brosche, 1995)。因此本計畫擬探討飲食因子對巨噬細胞的吞噬作用的影響。

在吞噬細胞 (phagocyte) 方面，免疫細胞中，與發炎反應有關之細胞，大多具有吞噬的活性，這些細胞被稱為 inflammatory cell，具吞噬活性的細胞是人體防禦感染的第一道防線，而這些具有吞噬能力的細胞包括顆粒細胞 (granulocyte) 及巨噬細胞 (macrophage)，如同巨噬細胞一樣，顆粒細胞亦會受到 T 細胞分泌的細胞激素或噬菌素的刺激，因而具有吞噬的活性，而顆粒細胞依細胞型態及細胞質染色特性，分別稱為嗜中性球 (neutrophils)、嗜伊紅性球 (eosinophils) 及嗜鹼性球 (basophils)，其中只有嗜中性球與嗜伊紅性球是具吞噬性的，而在週邊血液循環系統的白血球中，嗜中性球占 50~70%，比嗜伊紅

性球的 1~3% 較多 (Kuby, 1994)。嗜中性球是由骨髓中生成，釋放至血液中循環的時間約 10 小時；當受發炎的刺激時，則會轉移到組織，具有作用的時間約為 1~2 天 (Whintrobe et al., 1981)。

嗜中性球在吞噬的過程中是需要消耗能量的，當嗜中性球與外來物 (如：微生物) 接觸時，嗜中性球上之接受器會認識微生物而將其吞噬，在整個吞噬的過程中，嗜中性球會釋放含氧物質，例如：leukotrienes、prostaglandins 等。此時 superoxide 及 hydrogen peroxide 在於殺菌的作用中亦扮演了重要的角色 (Robinson et al., 1998)。如同巨噬細胞一樣，嗜中性球也是活化之吞噬細胞，其吞噬過程與巨噬細胞相似。除此之外，嗜中性球的吞噬能力則會受到 $\text{TNF}\alpha$ 的影響，嗜中性球所吞噬的微生物則亦會調節 $\text{TNF}\alpha$ 接受器的表現 (Ferrante et al., 1994)。

在自然殺手細胞 (natural killer cells) 方面，周邊血液淋巴球中有一群細胞，稱之為 null cells，這一群細胞無法表現 T 或 B 細胞之胞膜分子及抗原之結合接受器，即缺乏了免疫專一性及記憶性；在 null cells 中有一群稱為自然殺手細胞 (natural killer cells; NK cells) 是大顆粒性的淋巴球，占人體周邊血液淋巴球的 5~10%。自然殺手細胞是藉由與 CTL 過程相似的方式，以殺死癌細胞或受病毒感染的細胞，當自然殺手細胞粘附到目標細胞上後，穿孔素的顆粒即會進行顆粒化作用，而進行標的細胞的破壞作用，而更以計劃性細胞死亡 (apoptosis) 作用來調節目標細胞之解體。

關於發炎免疫反應，巨噬細胞所分泌的淋巴介質 IL-6 和媒介物 NO , PGE_2 等可繼續引起後續的發炎免疫反應。而飲食因子對發炎媒介物分泌的影響，增加發炎媒介物可能刺激吞噬細胞的趨化作用，促進吞噬作用，但飲食因子若引起過度的發炎反應，則可能不利於過敏疾病或自體免疫疾病，因此發炎媒介物分泌多寡的利弊，則是值得探

討的問題。此外，巨噬細胞是抗原呈獻細胞，將吞噬後的抗原呈現給抗原敏感性淋巴細胞，活化 T 細胞，再由 T 細胞活化 B 細胞，使產生抗體，對抗外來病原菌 (Roitt 1993)。已研究指出營養狀況會影響淋巴介質之分泌、發炎反應和免疫細胞活化與抗體生成 (Klasing 1988, Chandrasekar 1994, Alarcon-Riquelme 1993)。因此總而言之，巨噬細胞的活性，意即吞噬作用、免疫細胞活化和發炎反應，是探討飲食因子對免疫功能影響的重要指標。

在發炎反應中，顆粒細胞、單核細胞及巨噬細胞等免疫細胞均扮演了重要的角色，這些細胞則被稱為 inflammatory cell；在免疫反應中，許多刺激會活化巨噬細胞，首先是細胞吞噬特定的抗原，活化 Th 細胞分泌細胞激素，其所分泌的細胞激素可當作發炎反應的媒介物；此時巨噬細胞會受到 T 細胞所分泌的細胞的影響，進而分泌 IL-1、IL-6、TNF α 及 PGE₂ 等發炎介質。一般而言，在受到外來物感染後，會發生紅腫等發炎反應，在發炎的過程中，所產生的發炎介質有很多，例如：histamine、serotonin、prostaglandins 等，依其分泌的時間又可分為二個階段，第一階段主要的發炎介質是以 histamine 及 serotonin 的釋放為主；第二階則主要是以 protease、prostaglandins 及 lysosome 等的生成為主 (Vinegar et al., 1969; Ferreira et al., 1974)。

中性白血球 (neutrophil) 通常出現於急性的發炎反應，多核型式中性白血球於吞噬作用和細胞膜受刺激後及釋出 prostaglandins 和 thromboxanes (Goldstein et al., 1977)。單核球吞噬細胞於慢性發炎反應中扮演一重要角色 (Davies & Allison, 1976)，當給予發炎刺激時，其會釋出 arachidonic acid 的氧化產物，另外也有許多研究指出，巨噬細胞所生成的 arachidonic acid 代謝產物主要是 PGE₂ 和 6-keto-PGF₁ α (Gordon et al., 1976; Humes et al., 1977)。

而在發炎反應中的重要媒介物前列腺素 (Prostanoids) 包括：prostaglandins、prostacyclins 和 thromboxanes，eicosanoid 在體內的合成路徑主要有二，當花生四烯酸 (arachidonic acid; AA) 經由 cyclooxygenase pathway，則氧化形成帶有 endoperoxide 和 hydroperoxide 構造的 PGG (Prostaglandin G)，PGG 再經 peroxidase 作用形成帶有 hydroperoxide 的 PGH (Prostaglandin H)，PGH 為各種 prostanoid 合成酵素的受質，經各種不同酵素作用形成各種具有不同生物活性的 prostanoids。PGE2 具有抑制免疫反應的作用，當 PGE2 由巨噬細胞或纖維母細胞等分泌時，其會影 Th1 及 Th2 兩種細胞激素之間的平衡 (Phipps et al., 1991)；若在 T 細胞株加入 PGE2 一同培養，則發現 Th1 細胞激素 IL-2 和 γ IFN 的分泌明顯被抑制，但是 Th2 細胞激素 IL-4 及 IL-5 則不受影響 (Betz et al., 1991)；此外，其亦可抑制 IgM 抗體的生成，而促進 IgE 及 IgG1 抗體的生成 (Roper et al., 1992)。此外，亦有研究指出，PGE2 會促進 GM-CSF 的合成 (Quill et al., 1989)，進而間接增加巨噬細胞的抗原呈現能力。

巨噬細胞的功能檢測的可行性，是因為可從腹腔細胞抽取，進而測定有關吞噬作用、免疫細胞活化和發炎有關之免疫指標，因此，是探討食物免疫機能性另外一個不可忽略的指標。但是由於腹腔抽取方法與相關指標的量微和測定方法之困難度較高或方法不斷更新，不及測定抗體含量或脾臟細胞的容易操作，使得在免疫功能評估上被省略。但是由於方法的日益進步更新，巨噬細胞的免疫功能的測定方法日益可行。又因巨噬細胞分泌的淋巴介質或媒介物，會影響 T 細胞的活性，因此本研究將針對巨噬細胞的功能評估法作一探討。也先使用有研究指出可能有免疫促進或抑制作用的靈芝為材料 (Zhu 1990, Chen, 1991, Yamaguchi 1990, Wang 1997)。完成一套更完整的評估

免疫相關的指標，來評估免疫相關的實驗數據所代表的意義，以期將來能用以評估其他保健食品的免疫功效。

已有研究明確的指出，營養素與飲食會影響淋巴介質之分泌、發炎反應、免疫細胞活化和抗體生成等免疫反應 (Klasing et al., 1988 ; Chandrasekar et al., 1994 ; Alarcon-Riquelme et al., 1993)。例如在膳食油脂與腹腔細胞相關的免疫反應方面，當以 PHA、ConA 及 LPS 等刺激肺臟巨噬細胞時，結果發現，給予高度不飽和脂肪酸對於巨噬細胞的吞噬活性具有明顯增強的效果 (Kweon et al., 1994)；脂肪酸中的 linoleic acid、docosahexanoic acid (DHA) 及 eicosapentaenoic acid (EPA) 等具有抑制淋巴細胞增生，抑制 $\text{TNF}\alpha$ 及 IL-2 生成等抗發炎的作用 (Kumar et al., 1992)。此外，亦有研究發現餵食多元不飽和脂肪酸的小鼠，小鼠血清中 IgG1 和 IgG2a 抗體的生成量較餵食飽和脂肪酸的小鼠高 (Erickson et al., 1980)。

在賴氏 (1996) 的研究中指出，高油的攝取會促使腹腔中巨噬細胞分泌較高量的 PGE2，同時高量炸油的飲食油脂則會加劇過敏反應的發生。此外，在本研究室先前的研究亦發現 (Wu, et al. 2000)，以各種不同飽和度之油脂餵食自體免疫鼠，結果發現，魚油較其他膳食油脂顯著抑制對 PGE2 的分泌量。因此，亦發現魚的攝食會降低可引起過敏反應症狀的媒介物，並減緩過敏反應的發生 (程氏，1997)。

在維生素對腹腔細胞免疫反應方面，對於自然殺手細胞活性，維生素C (Vojdani, 1993) 及維生素E (Moriguchi et al., 1993) 並無顯著的影響，但有研究 (Vojdani, 1993) 指出維生素 C 的給予可以加速腫瘤細胞的分解，但是 β -胡蘿蔔素的補充對於自然殺手細胞則具有增加其細胞活性的作用 (Lessard and Dupuis, 1994)；至於維生素 A 的補充對細胞激素方面的影響，則可發現， β -胡蘿蔔素的補充可以增加 $\text{TNF}\alpha$ 的分泌 (Ghada et al., 1993)；而維生素 E 的補充則可降低感染期間

PGE2 的生成量 (Lawrence et al., 1985)。

當維生素缺乏時，除了會出現缺乏症之外，在免疫功能亦有失調的現象；當維生素 C 缺乏時，可發現小鼠的胸腺重及淋巴細胞明顯降低 (Majumder and Abdur-Rahim, 1987)，而當維生素 A 缺乏時，亦有淋巴細胞顯著減少的現象 (Kantha et al., 1992)。根據本研究室的研究結果 (牟, 1998)，維生素 E 的補充可降過敏動物 PGE2 的釋放，而會降低 IgE 與 IgG1 抗體的生成，具有減緩過敏症狀的作用。此外，在方氏 (1998) 及謝氏 (1999) 的研究中則發現，高量的維生素 E 補充顯著降低脾臟細胞 IL-2 的分泌，則對其病情發展反無益處。

在礦物質與免疫反應方面，礦物質的缺乏除了會造成缺乏症之外，亦會造成免疫系的調節失常，如：當鐵營養狀況較差時，自然殺手細胞的活性會降低 (Hallquist et al., 1989)；而鐵及鋅缺乏時，則發現 T 淋巴球數目會較正常狀況為低 (Kemahli et al., 1988)；此外在銅營養狀況失調時，血液中單核細胞的數目會降低，而且抗體及補體的濃度亦會隨之降低 (Cerone et al., 1995)。

在飲食方面，有研究指出，無論在人體或動物體的實驗中，yoghurt 中所含的微生物可活化自然殺手細胞活性 (De Simone et al., 1986)，可促使抗體的生成 (Perdigon et al., 1988)，且有刺激 T 細胞及 B 細胞增生的作用 (Vesely et al., 1985)；此外，亦有研究結果指出，yoghurt 中的微生物會促使血液中的 mononuclear cells 分泌 IL-1 β 、TNF α 及 γ IFN 等細胞激素 (Pereyra et al., 1993)。

亦曾有研究以琉璃苣油 (Borage oil) 進行人體實驗，結果發現，其會促使人體內血小板凝集，提高 Thromboxane A₂ (TXA₂) 與前列腺素 PGE₂ 及 PGE₁ 的合成 (Barre et al., 1993)。而全麥中亦含具有免調節作用的多醣體，此多醣體可進入淋巴系統，進而增強人體的非

特異性免疫反應 (Watzl et al., 1990)。

另有研究以冬蟲夏草萃取出之 *Cordyceps sinensis* 為實驗材料，結果發現，其可增加 T 輔助細胞的數目，亦可提高脾臟重量，吞噬細胞的數目及吞噬細胞的活性 (Chen et al., 1991 ; Tsei et al., 1982)；除此之外，其亦有抗發炎、抗腫瘤、抗感染等多種的免疫調節功能 (Sun, 1985 ; Jiang, 1982 ; Chen et al., 1985)。

也有研究以 *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel 的熱水萃取物 PSK 對免疫反應的影響結果中亦可發現，此一多醣體具有抑腫瘤活性 (Tsukagoshi et al., 1984) 及抗微生物感染 (Harada et al., 1989 ; Sakagami et al., 1990) 的作用；此外，PSK 亦可刺激 TNF 及 IFN 的生物活性 (Sakagami et al., 1989 ; Kim et al., 1990)，以及刺激人類血液中單核球釋放 IL-1 (Sakagami et al., 1993 ; Kurakata et al., 1991)。

此外，國內亦有從事靈芝功效之相關研究，靈芝為真菌中的一類，靈芝是屬於真菌界 (Myceteae) 無鞭毛菌門 (Amastigomycota) 擔子菌綱 (Basidiomycetes) 無萼褶目 (Aphyllorphorales) 多孔菌科 (Polyporaceae) 中的靈芝屬 (*Ganoderma*)，在此屬中台灣較常見的約有 8 種，分別為樹舌靈芝 (*Ganoderma applanatum*)、台灣紫芝 (*Ganoderma formosanum*)、拱狀靈芝 (*Ganoderma fornicatum*)、靈芝 (*Ganoderma lucidum*)、新日本靈芝 (*Ganoderma neo-japonicum*)、熱帶靈芝 (*Ganoderma tropicum*)、松杉靈芝 (*Ganoderma gsugae*) 和小孢子靈芝 (*Ganoderma microsporum*)，其中以 *Ganoderma lucidum* 為此屬的代表種 (許，1993)。

靈芝是東方國家長久以來經常使用於滋補強身，在中醫治療上被認為可調和脈象 (Wang et al., 1994)，此外亦可能有治療肝病、腎

炎、高血壓、關節炎、氣喘.....等疾病的效果，此外，近幾年來亦有研究更進一步指出，靈芝具有抗腫瘤活性的效用。而靈芝屬中較具有效的成分為 ganoderic acids、ganolecidic acids、ganoderans、lucidenic acids 及 lucidones 等 triterpenes 類的物質 (Miyazaki and Nishijima, 1981；Shimazu et al., 1985)。

靈芝對高血壓的影響方面，以靈芝粉末餵食自發性高血壓的大鼠，結果發現大鼠的收縮壓可明顯的被抑制 (Kabir et al., 1988)。亦有以兔子作為實驗動物，結果發現，靈芝 (*G. lucidum*) 的抽出物有明顯降低兔子的收縮壓及舒張壓的作用 (Lee et al., 1990)，靈芝具有明顯降低血壓的作用，其可能的機制為抑制腎臟交感神經的活性。

靈芝對血脂質的影響方面，以靈芝粉末餵食自發性高血壓的大鼠，結果發現大鼠血漿中的總膽固醇濃度明顯較控制組低，而肝臟中的膽固醇及三酸甘油酯含量亦顯著較低，此外，膽固醇脂的比例亦顯著較低 (Kabir et al., 1988)；此原因可能是靈芝中的成份抑制了膽固醇的生合成或加速膽固醇的代謝。Komoda等人 (1989) 的研究指出，靈芝含有與膽固醇的結構相似的成分，可抑制 24,25-dihydrolanosterol 轉換成 cholesterol 的作用，可能是因為靈芝中的成分會阻礙酵素的作用。

靈芝對發炎反應的影響，有研究以 carrageenan 來引發小鼠的 paw edema，而同時以靈芝 (*Ganoderma lucidum*) 皮下注射處理小鼠，結果發現，注射靈芝的小鼠，其水腫的狀況明顯較輕微 (Lin et al., 1993)。此外，將靈芝的 chloroform 抽出物 oleic acid、linoleic acid 及 linolenic acid 等以大鼠中分離出之 mast cell 進行體外培養的實驗，結果發現，其脂溶性抽出物可明顯的抑制 histamine 的釋放 (Tasaka et al., 1988a)；其亦有另一脂溶性抽出物--cyclooctasulfur，其亦可強烈的抑制 histamine 的釋放 (Tasaka et al., 1988b)；除此之

外，可抑制 histamine 釋放的成分亦包含 ganoderic acid 及其衍生物 (Kohda et al., 1985)。而自靈芝中萃取出的 ganoderic acid 除了具有抑制 histamine 釋放的作用外，其亦可抑制 phospholipase A2 的酵素活性 (Cuellar et al., 1996)。因此，靈芝中的成分可能具有明顯抑制體內及體外發炎反應的作用。

靈芝對吞噬細胞活性的影響，曾有研究以靈芝萃取液培養小鼠分離出的單核細胞，其單核細胞的吞噬作用活性會明顯的增加 (Lieu et al., 1992)。

靈芝對自然殺手細胞活性的影響，在人體實驗中，曾經有研究以口服的方式補充靈芝抽出物給予受試者，結果發現，人體內的自然殺手細胞數目顯著的增加 (鄭, 1985a, 1985b)。在動物體的實驗中也發現，靈芝的萃取物無論以口服或是注射的方式給予，都可增加干擾素之產生及活化脾臟中自然殺手細胞的功能 (Won et al., 1989, 1992)；當以腹腔注射的方式注射靈芝 (*G. tsugae*) 抽出物時，則發現其 IFN 的表現會增加，但並非只是 γ IFN 等單一型式的干擾素的增加 (Won et al., 1992)。

因此，靈芝可能有抑制發炎、增強自然殺手細胞及吞噬細胞活性等的功效。但其大多是為體外的實驗，對於體內的實驗較少，本研究先以靈芝作為材料，分別以管餵的方式補充三種不同劑量的靈芝製劑，以非特異性免疫及抗原特異性免疫的二種動物模式進行免疫反應實驗，而分別測定其顆粒細胞的吞噬能力，巨噬細胞分泌 PGE2、IL-1b 及 IL-6 等淋巴介質的情形，以及免疫細胞活性，以探討如何以腹腔細胞的免疫細胞評估飲食因子對免疫反應的影響。

(2) 材料與方法

I. 非特異性免疫反應

一、動物飼養

自台大動物中心購進六週大的 BALB/c 雌鼠及雄鼠，每隻小鼠分別飼養於不鏽鋼籠中，室溫控制於 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ，光暗循環時間各為 12 小時，自由攝食飲水及飼料，購入後先給予 chow diet 適應環境；小鼠八週大時則依體重隨機分組，並開始以管餵方式額外給予兩種靈芝產品，*Ganoderma tsuga* YK-01 和 *Ganoderma tsuga* YK-07 (某公司提供)，每週六天，每週記錄攝食量及體重二次，隔週以眼窩採血一次；管餵七週後則進行犧牲。

二、管餵劑量之計算

根據該公司先前實驗以每天 10 顆的劑量在短時間呈現效果為參考，靈芝 YK-01 的建議攝取量則為每天 $0.45 \text{ g} \times 10 \text{ 顆} = 4.5 \text{ g/day}$ 時，靈芝 YK-01 管餵劑量，是依據實驗動物與人體表面積比等效劑量換算比率表所計算的。

小鼠與人體表面積比值為 0.0026，換算成每隻小鼠每天 0.01g，

小鼠之靈芝 YK-01 給予量 $= 4.5 \text{ (g/day)} \times 0.0026 = 0.01 \text{ (g/day)}$

即相當於每公斤體重需要 0.585 g，以此劑量為 1 倍之劑量，即為中劑量組，在非特異性免疫試驗中先以 1 倍之劑量的中劑量組，和另外有 5 倍建議量的高劑量組，而在特異性免疫試驗中多增加一組 0.5 倍建議量的低劑量組。

小鼠之靈芝 YK-07 給予量 $= 7.58 \text{ (g/day)} \times 0.0026 = 0.02 \text{ (g/day)}$

即相當於每公斤體重需要 0.985 g，以此劑量為 1 倍之劑量，即為中劑量組，在非特異性免疫試驗中先以 1 倍之劑量的中劑量組，和另

外有 5 倍建議量的高劑量組，而在特異性免疫試驗中多增加一組 0.5 倍建議量的低劑量組，和高劑量組為調整為 3 倍建議量。

三、血樣的收集

自小鼠開始管餵起，每隔兩週進行眼窩採血，利用乙醚使小鼠昏迷，以長頸玻璃滴管自眼窩處採血，血樣以轉速 $12,000 \times g$ 離心 20 分鐘，收集血清，貯存於 -80°C ，待日後分析。

週邊血液中顆粒細胞之吞噬活性所需之血樣，是在犧牲前自眼窩採得之全血置於含有 heparin 之採血管中，當天進行顆粒細胞之吞噬活性分析。

四、分析項目

1. 血液中吞噬細胞活性之分析

實驗用之試管預先置於冰浴中，血樣混勻後各取 $50\ \mu\text{L}$ 加至 control 及 test 試管底部，冰浴 10 分鐘，加入混勻的 E. coli-FITC opsonized $10\ \mu\text{L}$ 震盪均勻；control 管置於冰浴中，test 管置於 37°C 水浴 30 分鐘後移至冰浴中。加入混合均勻的 quenching solution $50\ \text{mL}$ 震盪均勻，再加入 washing solution $1.5\ \text{mL}$ 震盪均勻後， $250\ \mu\text{g}$ 離心 10 分鐘倒掉上清液，以此方式清洗二次；加入 lysing solution $1\ \text{mL}$ 混合均勻後，在室溫靜置 20 分鐘，以 $250 \times g$ 離心 10 分鐘倒掉上清液，再以 washing solution $1.5\ \text{mL}$ 清洗一次，加入 DNA staining solution $100\ \mu\text{L}$ 混勻後，置於冰浴中避光反應 10 分鐘，並在 60 分鐘內以 Flow cytometer 分析完畢。

2. 血清中非特異性抗體之測定

血清中免疫球蛋白之濃度是利用 radial immunodiffusion (RID) 法，將小鼠血清以 7% 之 BSA 適當的稀釋 (IgG, 10 倍；IgM, 2

倍；IgA, 2倍)，取適當稀釋之血清及標準品 5 μ L 放入免疫擴散套組（Radial Immunodiffusion kit）之培養孔中，室溫靜置反應 24 小時後，測量樣品槽中沈澱環直徑之大小，以直徑之平方值代入標準曲線中即可求得血清中免疫球蛋白之濃度。

3. 腹腔細胞之收集與樣品之取得

小鼠犧牲時以 CO₂ 法使其窒息死亡，以 75% 酒精噴腹面後，剪開外側皮毛使露出腹膜，以針筒緩緩打入 HBSS buffer，均勻晃動鼠體後再將腹腔細胞懸浮液抽出，取得的細胞懸浮液經 350 $\times$ g 離心 10 分鐘去除上清液，再加入 1 mL 之 TCM medium 使細胞懸浮；利用 trypan blue (Sigma) 染色法計算細胞總數，並調整細胞數目至 3×10^6 cells/mL。於 24 well 培養盤中注入 0.5 mL 之細胞液及培養液或含裂殖素之培養液，在 5% CO₂，37°C 之條件下培養 48 小時後，收取其上清液貯存於 -80°C，待日後進行 IL-1 β 、IL-6 及 PGE₂ 含量之分析。

4. PGE₂ 分泌量之測定

腹腔細胞培養所收集之上清液中 PGE₂ 含量的測定，是以 competitive immunoassay 的方法，採用 Correlate-EIA prostaglandin E₂ kit（Assay 90001, MI, USA）進行分析。即利用 PGE₂ 與已知固定濃度的 alkaline phosphatase PGE₂ conjugate 競爭有限的 PGE₂ 單株抗體，於室溫下反應 2 小時，使 PGE₂ 單株抗體與連結在 plate 底部的 goat anti-mouse IgG Fc antibody 結合；洗去未結合的物質後，加入基質 p-Npp（p-nitrophenyl phosphate）進行呈色反應，90 分鐘後讀取 405 nm 吸光值。

5. 脾臟細胞之收集與樣品之取得

在無菌操作下取出脾臟，置於含適量 TCM medium 的 20 mm patch dish 內，以無菌針筒的尾端將脾臟磨碎，使成細胞之懸浮液；靜置 5 分鐘後取出上清液，以 $350\times g$ 離心 7 分鐘，留取細胞 pellet，輕輕拍散細胞後加入 5 mL 之 RBC lysis buffer 靜置 2 分鐘，再加入 5 mL 之 HBSS buffer，離心去除 buffer；取得之細胞 pellet 以 HBSS buffer 洗三次，去除殘存之 RBC lysis buffer，以 TCM medium 使細胞成懸浮液；計算細胞總數後調整細胞數至 1×10^7 cells/mL，於 24 well 培養盤中注入 0.5 mL 之細胞懸浮液及培養液或含裂殖素之培養液，5% CO₂，37°C 之條件下培養 48 小時後，收取其上清液貯存於 -80°C，待日後進行 IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、及 γ IFN、TNF α 等細胞激素之分析。此外並以 MTT 法進行脾臟細胞增生能力之測試。

6. 脾臟細胞增生能力測定

MTT法：MTT是一種活細胞染色法，其原理是利用細胞粒線體中的 dehydrogenase 將 MTT 之 tetrazolium 環打斷，形成 formazan，使 MTT 變為深藍色，利用生成顏色的深淺代表細胞數目的多寡，以測定脾臟細胞之增生能力。實驗步驟為：將 2×10^6 cells/well 之脾臟細胞 100 μ L/well 培養 72 小時後，直接加入 10 μ L 之 MTT solution，培養 3 小時後離心去除培養液，加入 0.04 N 之 isopropanol 100 μ L/well，震盪 30 分鐘後測量 540 nm 之吸光值。

7. 細胞激素分泌量之分析

採用酵素連結免疫分析法（ELISA），於 96 well plate（Nunc-Immuno plate）加入含有適量之細胞激素單株抗體的 coating buffer 100 μ L/well，靜置於 4°C；隔夜以 PBST buffer 洗 4 次沖去未結合之單株抗體，加入 blocking solution 200 μ L/well 以減少非特異

性的結合，室溫反應 30 分鐘；以 PBST buffer 洗 5 次再加入樣品或標準品 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ ，室溫反應 2 小時；以 PBST buffer 洗 6 次，再加入適當濃度連結生物素的抗細胞激素二級抗體 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ ，室溫反應 1 小時；以 PBST buffer 洗 7 次，加入 avidin-peroxidase 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ ，室溫反應 30 分鐘；以 PBST buffer 洗 8 次，再與 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 受質 ABTS 反應，待適當時的作用呈色，以 5% SDS 終止反應，測定 415 nm 之吸光值。

8. TBARS之測定

當組織中的不飽和脂肪酸過氧化時會生成 MDA (malondialdehyde) 等過氧化物，而 MDA 此一過氧化物會與 TBA (thiobarbituric acid) 結合，形成粉紅色的產物，測此產物的濃度即可知脂質受氧化的程度。

實驗步驟為，取下約 0.4 g 的肝臟加入冰冷的 0.01 M K-P buffer，以組織均質機均質成 25% (w/v) 之均質液。取 1 mL 之均質液加入 1 mL 10% TCA 震盪均勻， $1500\times g$ 離心 10 分鐘以去除蛋白質，取 1 mL 上清液或各濃度標準溶液 (TMP solution)，加入 1 mL TBA solution 及 0.1 mL BHT solution 震盪均勻，於 50°C 水浴反應 1 小時，待冷卻後再加入 2 mL isobutanol (Hayashi) 混合均勻，以 $1500\times g$ 離心 10 分鐘，取上清以螢光光度計 (Hitachi F-2000, Tokyo, Japan) 測定，excitation 515 nm 及 emission 550 nm 之值。

9. 自然殺手細胞活性分析

將已培養好的標的細胞，YAC-1 細胞株 1×10^6 cells/well 先與 100 μCi Cr^{51} 一起培養約 4 小時後，將殘餘之 Cr^{51} 移除，於 U 型底之 96 well plate 中加入 1×10^4 cells/well 再加入 4×10^6 cells/well

(E/T ratio 40) 及 8×10^6 cells/well (E/T ratio 80) 之腹腔細胞與標有 Cr^{51} 之標的細胞一起培養 4 小時後，以 12 N 之 HCl 破壞細胞，使 Cr^{51} 釋出達最高釋放值，收集其上清液，放入 γ -counter 內計算 Cr^{51} 的最高釋放值，並以一般培養液培養標的細胞，作為背景值。最後結果以 Cr^{51} 釋出%來表示。

$$\text{活性 \%} = (\text{實驗值} - \text{背景值}) / (\text{最高釋放值} - \text{背景值}) \times 100$$

I. 非特異性免疫反應

一、動物飼養

自台大動物中心購進六週大的 BALB/c 雌鼠，每隻小鼠分別飼養於不鏽鋼籠中，室溫控制於 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ，光暗循環時間各為 12 小時，自由攝食飲水及飼料，每週記錄攝食量及體重二次；小鼠入週大時則隨機分組，並開始以管餵方式額外給予靈芝 YK-01 和靈芝 YK-07，每週六天；對 OVA 具特異性免疫反應之小鼠則是於鼠齡第 8 週、第 10 週及第 12 週進行腹腔注射抗原，並於注射抗原前及注射抗原隔週採血，以便進行分析特異性抗體生成之變化；管餵七週後則進行犧牲，犧牲前四天以腹腔注射 3% thioglycollate 以聚集腹腔細胞。

二、致敏模式

本實驗之特異性免疫反應是以腹腔注射抗原的模式進行，採用卵蛋白(ovalbumin) 作為抗原，而以 CFA 作為佐劑 (adjuvant)，在注射抗原前及注射抗原一週後以眼窩採血，取得血清進行抗體之分析。致敏試劑所用抗原為卵蛋白 (ovalbumin, OVA, albumin chicken egg, Sigma) 以 PBS buffer 配製成濃度 $200 \mu\text{g/mL}$ 及 600mg/mL 貯存於 -20°C 。佐劑採用 CFA (complete Freund's Adjuvant, Sigma F-5881)。致敏方式為第一次注射抗原：每隻小鼠的使用劑量為 $2 \mu\text{g}$ OVA。將 $200 \mu\text{g/mL}$ 之 stock 稀釋 10 倍，使濃度為 $20 \mu\text{g/mL}$ ，取

100 mL 注入小鼠腹腔中。第二次注射抗原：每隻小鼠的使用劑量為 6 μg OVA。將 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之 stock 稀釋 10 倍，使濃度為 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，取 100 mL 注入小鼠腹腔中。第三次注射抗原：每隻小鼠的使用劑量為 6 μg OVA。稀釋方法同第二次致敏。

血樣的收集、TBARS之測定、血液中吞噬細胞活性之分析、脾臟細胞之收集與樣品之取得等實驗步驟與非特異性免疫反應部分敘述相同。

三、血清中特異性抗體之測定

於 96 well plate 中 coating 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OVA，200 $\mu\text{L}/\text{well}$ ，於 4°C 靜置；隔夜以 PBS buffer 洗三次沖掉未結合的 OVA，加入 blocking solution 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ 以減少非特異性的結合，室溫下反應 2 小時；以 PBST buffer 洗三次後，加入適當稀釋之待測血清 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ ，於 4°C 靜置反應；隔夜以 PBST buffer 洗五次，加入生物素連結之二級抗體 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ ，室溫下反應 2 小時；以 PBST buffer 洗六次，加入適當濃度之 avidin-conjugated alkaline phosphate 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ ，室溫反應 2 小時後，以 PBST buffer 洗六次，加入受質 pNpp 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ ，待作用呈色之後，測 405 nm 之吸光值。以具有較高吸光值的注射抗原鼠的血清為 positive control。以 ELISA unit 作為表示之方法。
$$\text{ELISA unit} = (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{positive}} - A_{\text{blank}})$$

四、腹腔細胞之收集與樣品之分析

以 3% 之 thioglycollate 溶液進行腹腔注射，4 天後收集腹腔細胞，收集方法同非特異性免疫，調整細胞濃度為 8×10^6 cells/well，將此腹腔細胞進行自然殺手細胞之活性分析。

五、自然殺手細胞活性分析

將已培養好的標的細胞，YAC-1 細胞株 1×10^6 cells/well 先與 $100 \mu\text{Ci Cr}^{51}$ 一起培養約 4 小時後，將殘餘之 Cr^{51} 移除，於 U 型底之 96 well plate 中加入 1×10^4 cells/well 再加入 4×10^6 cells/well (E/T ratio 40) 及 8×10^6 cells/well (E/T ratio 80) 之腹腔細胞與標有 Cr^{51} 之標的細胞一起培養 4 小時後，以 12 N 之 HCl 破壞細胞，使 Cr^{51} 釋出達最高釋放值，收集其上清液，放入 γ -counter 內計算 Cr^{51} 的最高釋放值，並以一般培養液培養標的細胞，作為背景值。最後結果以 Cr^{51} 釋出%來表示。

$$\text{活性}\% = (\text{實驗值} - \text{背景值}) / (\text{最高釋放值} - \text{背景值}) \times 100$$

六、脾臟細胞增生能力測定

本實驗多進行一項 ^3H -thymidine incorporation 法，將 2×10^6 cells/well 之脾臟細胞培養 48 小時後，加入 $1 \mu\text{Ci/well } ^3\text{H}$ -thymidine，繼續培養 18 小時後，以 cell harvester 收集細胞於 nitrocellulose 濾紙上，濾紙風乾後以閃爍計數儀測 ^3H -thymidine 含量。以 S.I. (stimulation index) 來表示細胞增生之能力。

$$\text{S. I.} = (S_{\text{cpm}} - B_{\text{cpm}}) / (C_{\text{cpm}} - B_{\text{cpm}})$$

S_{cpm} 為細胞在刺激物刺激下增生所攝入 ^3H -thymidine β 射線強度。

B_{cpm} 為僅有 TCM 培養液所測得的 ^3H -thymidine β 射線強度。

C_{cpm} 為僅加入細胞但無刺激物所測得的 ^3H -thymidine β 射線強度。

III. 統計方法

實驗結果是以平均值 $\pm$ 標準偏差 (mean $\pm$ SD) 表示，數據之統計分析是以 Duncan's multiple range test 或 Student t-test 之統計方法分析各組差異之顯著性。以 SAS windows 6.12 版 (1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.) 之統計分析軟體進行數據之分析。

(3) 結 果

I. 非特異性免疫反應

一、靈芝對小鼠生長狀況的影響

1. 體重變化

小鼠在管餵靈芝實驗過程中之體重變化情形如圖 1 所示，靈芝的額外添加餵食對小鼠並無顯著的影響，其生長情形在鼠齡九週大開始進行管餵靈芝，結果可發現，開始管餵食時，小鼠需先適應，適應期間小鼠體重有降低的現象，適應以後則體重維持平穩的增加；此外，因眼窩採血對小鼠造成的壓力很大，所以在採血後秤量小鼠體重均可發現生長較為平緩的現象。

2. 攝食利用效率

如表 2 所示，小鼠在飼養期間的攝食量平均為 2~3 公克，而額外補充中劑量靈芝 YK-01 之小鼠，攝食量顯著較低，但在換算成攝食利用效率時，則額外補充靈芝的組別與控制組間並無顯著的差異，由此可知，補充不同劑量之靈芝，並不會影響正常小鼠之攝食利用效率。

3. 組織重量

由表 3 的結果中可知，餵食靈芝之小鼠，其肝臟之絕對重量及相對重量百分比均顯著較高；腎臟重方面，餵食高劑量靈芝 YK-07 之小鼠顯著比控制組重，但在相對重量百分比上，則無顯著的差異；在脾臟、心臟及肺臟之組織絕對重量方面，各組間並無顯著差異；但餵食中劑量靈芝 YK-07 之小鼠，其心臟及肺臟之相對重量百分比顯著較低，而餵食靈芝 YK-01 之小鼠，其肺臟相對重量百分比亦顯著較低。

4. 靈芝對 BALB/c 小鼠氧化壓力之影響

在小鼠體內氧化壓力的測定上，則以肝臟中 TBARS 含量作為脂質氧化的指標。由圖 2 可知，餵食靈芝 YK-01 及 YK-07 的 TBARS 含量均顯著降低；由此結果可知，靈芝可降低小鼠體內之脂質氧化程度。

二、靈芝對 BALB/c 小鼠血清抗體含量之影響

如圖 3 所示，餵食靈芝 YK-07 之小鼠，血清中 IgA 及 IgG 含量均顯著較控制組高，而對於血清中 IgM 含量則無明顯的影響；此外，餵食靈芝 YK-01 對小鼠血清中 IgM 含量則具有顯著增加的作用，但在 IgA 及 IgG 含量上，則除了餵高劑量小鼠其血清中 IgG 顯著較高外，其餘並無差異。

三、靈芝對 BALB/c 小鼠血液中顆粒細胞活性之影響

由表 4 結果可知，額外以管餵方式給予靈芝產品的小鼠，其血液中顆粒細胞的百分比較控制組高；而血液中顆粒細胞的吞噬活性雖有較高的現象。

四、靈芝對 BALB/c 小鼠細胞激素分泌之影響

1. 腹腔細胞

在腹腔細胞之細胞激素分泌量方面如表 5 所示，餵食靈芝 YK-07 之小鼠其腹腔細胞所分泌的 IL-6，無論有無 LPS 的刺激其與控制組間並無差異；但餵食靈芝 YK-01 小鼠之腹腔細胞經 48 小時培養後，其 IL-1 β 的分泌量則顯著低於控制組，而靈芝 YK-07 對於 IL-1 β 的分泌量則無抑制的作用。於中劑量組自發性分泌量有升高的現象；除此之外，補充靈芝之小鼠腹腔細胞，無論有無 LPS 的刺激，如表 6 所示，其 PGE2 分泌量在統計上與控制組間並無顯著的

差異，但由表中可知，在 LPS 的刺激之下，PGE2 的分泌量有略低於控制組的現象。

2. 脾臟細胞

在脾臟細胞細胞激素之分泌量方面則表示於表 7，當未添加任何 mitogen 時，中劑量二種靈芝的額外補充會顯著增加細胞激素 IL-2、 γ IFN 及 TNF α 的自發性分泌量，而高劑量靈芝 YK-01 的補充只有促使 IL-2 和 TNF α 分泌量增加，而對於 IL-4 的分泌量方面，補充高劑量的二種靈芝及中劑量的靈芝 YK-07，則是可以使 IL-4 的分泌量降低。

以 PHA 作為 mitogen 刺激脾臟細胞時，以管餵方式補充靈芝則是可以使 IL-2 及 TNF α 的分泌量增加，其餘的除了補充高劑量靈芝 YK-01 可使 IL-4 之分泌量顯著降低外，靈芝的補充對於 BALB/c 小鼠脾臟細胞 IL-4 和 γ IFN 的分泌量並無顯著的影響。

當以 LPS 刺激 BALB/c 小鼠之脾臟細胞時，補充靈芝之小鼠 IL-2 及 TNF α 分泌量均顯著的比控制組高；而對於 IL-4 的分泌量方面，額外給予靈芝則可顯著的降低其分泌量；但對於 γ IFN 的分泌量方面，額外以管餵方式給予靈芝產品並無顯著的影響。

另外採用中劑量之靈芝餵食 BALB/c 小鼠，於犧牲前 4 天在腹腔中注射 3% 之 thioglycollate 以聚集腹腔細胞，收集腹腔細胞以進行自然殺手細胞之活性分析及腹腔中吞噬細胞之活性分析。

五、靈芝對 BALB/c 小鼠腹腔中自然殺手細胞活性之影響

非特異性小鼠腹腔中自然殺手細胞之活性分析結果表示於圖 4，由圖中之結果可知，餵食靈芝 YK-01 之小鼠，其腹腔中自然殺手細胞之活性顯著高於控制組；由此可知，額外補充靈芝可增加自然殺手細胞的活性，

六、靈芝對 BALB/c 小鼠腹腔中吞噬細胞活性之影響

由表 8 的結果可知，對於腹腔中顆粒細胞與單核細胞之吞噬活性而言，額外餵食靈芝 YK-01 及 YK-07 並不會增加小鼠腹腔中顆粒細胞及單核細胞之吞噬活性；但是本實驗的 FASC 數據染色並不理想，補充靈芝對於小鼠腹腔中吞噬細胞活性是否有影響，仍須再次確認。

II. 特異性免疫反應

一、靈芝對注射抗原之 BALB/c 小鼠攝食及生長狀況之影響

1. 體重變化

圖 5 為以 OVA 為抗原進行腹腔注射之小鼠生長情況，由此圖之結果可知，額外管餵補充靈芝對於小鼠之生長情形並無顯著的影響，小鼠在第七週後即開始進行管餵靈芝，而第 9、11 及 13 週進行腹腔注射抗原，在注射抗原之後小鼠的生長較為平緩，而一週後回復正常的生長情形。

2. 攝食利用效率

由表 9 可知，腹腔注射抗原之小鼠攝食量平均為 3 克，額外補充靈芝的小鼠攝食量與控制組間並無顯著的差異；而在換算成攝食利用效率後，無論補充靈芝與否，各組小鼠之攝食利用效率並無差異。

3. 組織重量

由此表 10 的結果可知，餵食靈芝對於腹腔注射抗原之小鼠脾臟與腎臟的實際重量及相對重量，與控制組並無顯著的影響，而餵食中劑量靈芝 YK-07 小鼠的肝臟相對重量顯著較控制組低，其餘組別

則無差異；而補充靈芝之小鼠其心臟及肺臟之實際重量顯著較控制組低，心臟相對重量上，只有給予低劑量之靈芝 YK-01 與中劑量、低劑量之靈芝 YK-07 之小鼠顯著較低，其餘組別均無差異，此外，在肺臟相對重量方面，給予靈芝之小鼠均顯著低於控制組

4. 靈芝對注射抗原之 BALB/c 小鼠氧化壓力之影響

由 TBARS 的結果圖 6 可知，補充靈芝與否，對於小鼠肝臟均質液中 TBARS 含量均無顯著的影響，由此可知，對於 OVA 抗原免疫的小鼠，靈芝並不會改變肝臟中脂質氧化所造成的氧化壓力對小鼠的影響。

二、靈芝對注射抗原之 BALB/c 小鼠抗體生成之影響

如圖 7 所示，餵食靈芝的小鼠，其血清中 IgA 之釋放量會顯著的低於控制組；在 IgG 的釋放量方面，給予靈芝的小鼠，其 IgG 的分泌量亦顯著的低於控制組；但在 IgM 的分泌量方面，補充高劑量靈芝 YK-01 之小鼠則顯著高於控制組，而其他小鼠 IgM 之分泌量則不會受到給予靈芝的影響。

三、靈芝產品對注射抗原之 BALB/c 小鼠吞噬細胞之影響

由表 11 可知顯示，靈芝的補充對於腹腔注射抗原之小鼠血液中顆粒細胞的活性及其細胞數量無顯著的影響。

四、靈芝對注射抗原之 BALB/c 小鼠自然殺手細胞活性之影響

自然殺手細胞之活性與體內抗腫瘤的活性有關，所以經常以 ^{51}Cr 放射線之釋放量來檢測自然殺手細胞的活性，以作為抗腫瘤活性的指標。由圖 8 的結果可知，額外補充低劑量及中劑量之靈芝產

品A可顯著的增加自然殺手細胞的活性，且其活性約增加了 50%，但其他的組別則無顯著的影響。

五、靈芝產品對注射抗原之BALB/c小鼠細胞激素分泌之影響

1. Th1 細胞激素

由表 12 的結果可知，BALB/c 小鼠在腹腔注射抗原並以管餵方式額外給予靈芝 YK-01 後，其 Th1 之細胞激素分泌較控制組為低；而小鼠之脾臟細胞在經由 LPS 的刺激之下，餵食靈芝 YK-01 之 IL-2 分泌量顯著較控制組低，而給予靈芝 YK-07 之小鼠 IL-2 釋放量只有在低劑量時才有顯著低於控制組；此外， γ IFN 之分泌量亦只有在給予低劑量靈芝時才有顯著低於控制組。PHA 對脾臟細胞的刺激之下，給予高劑量靈芝 YK-01 對於 IL-2 之分泌量有顯著降低的作用，其餘組別的 IL-2 和 γ IFN 的釋放則不會受攝取靈芝的影響。對於抗原的反應上，只有在於餵食中劑量之靈芝 YK-01 時，其 IL-2 之分泌量顯著的降低；而在補充高劑量靈芝 YK-07 之小鼠 γ IFN 釋放會顯著較高；其餘組別在 OVA 刺激時之 Th1 細胞激素分泌量並不會顯著受給予靈芝與否的影響

2. Th2 細胞激素

Th2 細胞激素的分泌量結果如表 13 所示，由此可得知，IL-4、IL-5 的分泌量會因為靈芝的補充而降低；在 PHA 的刺激之下，給予低劑量之 YK-01 與高劑量之 YK-07 會使 IL-4 的分泌量顯著降低，但低劑量靈芝 YK-07 的給予則會使 IL-4 的釋放顯著上升，而 IL-5 的分泌量上則只有高劑量的 YK-01 才具有顯著的降低作用。在 LPS 的刺激之下，除了補充高劑量靈芝 YK-07 可顯著降低 IL-4 分泌量外，其餘組別之小鼠 IL-4 分泌量並不會受靈芝給予的影響；IL-5 的分泌量方面，補充高劑量 YK-01 可顯著降低其分泌量，而中

劑量 YK-07 之給予則可使 IL-5 的分泌量顯著增加，其餘組別則無顯著的影響。至於抗原 OVA/CFA 對於 IL-5 的分泌量則無明顯的影響，但在給予低劑量及高劑量之靈芝 YK-07 則可明顯的增加 IL-4 的分泌量。

3. Th1/Th2 ratio

圖 9 為各組 Th1 細胞激素與 Th2 細胞激素比值之結果表示，由此可發現，餵食高劑量靈芝 YK-07 之小鼠在 PHA 及 LPS 的刺激下，其 IL-2/IL-4 比值顯著較控制組高，但在 OVA 刺激之下則有降低的現象；其餘餵食中劑量 YK-01 及低劑量 YK-07 之小鼠在 LPS 刺激之下，IL-2/IL-4 的比值顯著較低，而在 OVA 刺激之下，餵靈之小鼠 IL-2/IL-4 比值均低於控制組。

(4) 討 論

本研究在特異性免疫反應是以 OVA 作為特定的抗原，而以 CFA 作為致敏的佐劑，模擬病毒、微生物或外來物質感染的模式。一般而言，當受到病毒、微生物或外來物質感染時，抗原呈現細胞及巨噬細胞等免疫細胞會被活化，使整個體內的免疫反應傾向 Th1 免疫反應 (Romagnani et al., 1992)，而在先前的研究中發現，當以 CFA 作為佐劑進行皮下或腹腔注射時，脾臟細胞所分泌的細胞激素 γ IFN 會大量增加，而 IL-5 的分泌量則未見增加的現象，除此之外，IgG2a 抗體亦大量的生成 (Yip et al., 1999)。

由此可知，本研究中以 CFA 作為佐劑進行 OVA 抗原的注射，在特異性的免疫反應上是預期得到 Th1 免疫反應的表現，利用此一感染模式以觀察靈芝對於感染之小鼠免疫反應的影響。

一、攝食量及生長狀況

在非特異性免疫模式中，體重及攝食量的結果，除了餵食中劑量YK-01的小鼠攝食量均輕低，餵食高劑量 YK-07 的小鼠體重平均較高，其餘各組無論餵食靈芝與否，其體重及攝食量，均不受影響，而餵食兩種靈芝的小鼠，其攝食利用效率在各組間亦均無差異，此結果與 Kabir 等人 (1988) 以靈芝粉末餵食大鼠的研究結果相同。

如同非特異免疫反應及先前的研究 (Kabir et al., 1988)，靈芝的餵食對於腹腔注射抗之 BALB/c 小鼠的體重、攝食量及攝食利用效率均無明顯的影響。而小鼠的體重變化量方面，在腹腔注射抗原時，如同小鼠受到感染，其所承受的壓力大，因此造成了生長較為平緩的狀況，此一狀況於隔週即會恢復正常的生長情形。

在非特異性免疫模式中，組織重量方面，肝臟的實際重量及相對重量，在額外補充靈芝，的小鼠均顯著的高於控制組，此結果與之前以靈芝粉末餵食大鼠的結果不相符合 (Kabir et al., 1988)；但是在 Liu 等人 (1989) 的研究中，其以 ^{14}C 標幟靈芝培養液後再餵食小鼠，結果發現，肝臟中 ^{14}C 的放射性活性升高迅速且比其他組織之放射性活性高，而且滯留時間較長，作者認為其可能與肝組織之網狀內皮系統有關；因此本研究中，肝臟重量顯著較高亦可能是因為肝臟對於靈芝的吸收速率快，且滯留時間長所造成的結果。

在特異性免疫模式中，在組織重量方面，靈芝的餵食並未見肝臟實際重量與相對重量有明顯較高的現象，此結果與非特異性免疫反應並不相同；然而在此特異性免疫研究當中，卻可發現餵食靈芝的小鼠心臟及肺臟的重量顯著較輕。

此研究的結果中，在非特異性免疫模式中，靈芝具有降低小鼠脂質氧化程度的效果，由此可知，靈芝具有抗氧化的效果，在先前的研究中，發現維生素E等抗氧化的營養素具有調節免疫功能的作用 (Lawrence et al., 1985； Vojdani et al., 1993； 牟氏， 1998)，也許靈芝亦是經由抗脂質氧化的方式，進而調節小鼠體內之免疫反應。

但在特異性免疫模式中，由 TBARS 含量結果可知，靈芝不會影響 OVA 抗原的脂質氧化程度。當小鼠受到感染時，免疫細胞會藉由含氧的物質來進行清除異物的工作 (Robinson et al., 1998)，由此可知，此時體內是處於一高氧化壓力的狀況之下，對於飲食上靈芝的攝取則無法明顯的降低小鼠的氧化壓力。

二、抗體生成

在非特異性免疫模式中，餵食靈芝之小鼠，其血清中 IgA、IgG 和 IgM 抗體的總含量均顯著較高，由此可知，靈芝在小鼠體內可活

化 B 細胞，進而促使抗體的生成。

由此特異性免疫的研究結果得知，靈芝具有降低 IgA 及 IgG 抗體總生成量的作用，此一現象則與非特異性免疫反應相反。

三、自然殺手細胞

在本研究中，在非特異性免疫模式中，因脾臟細胞中 $\text{TNF}\alpha$ 的分泌量顯著的受到靈芝的刺激，所以進行自然殺手細胞活性之分析，結果發現靈芝可刺激自然殺手細胞的活化，此結果與脾臟細胞分泌的 $\text{TNF}\alpha$ 及 IL-2 等結果一致。而先前的人體及動物實驗結果，靈芝的餵食可明顯的促進自然殺手細胞的數目及活性的增加（鄭等人，1985a；鄭等人，1985b；Won et al., 1989；Won et al., 1992）結果相符合。

在特異性免疫模式中，腹腔注射特異性抗原的研究中，抗原的注射造成了小鼠體內自然的免疫反應，促使免疫細胞的聚集，其中亦包含了自然殺手細胞；在鄭等人 (1985) 及 Won 等人 (1989；1992) 的研究中指出，靈芝的給予可顯著的增加自然殺手細胞活性。在本研究中，靈芝對注射抗原之小鼠腹腔自然殺手細胞活性的影響結果得知，靈芝對於特異性免疫反應確實有增加自然殺手細胞活性的作用。因此由非特異性免疫反應及特異性免疫反應的研究結果可得知，靈芝確實具有增加自然殺手細胞活性的作用。

四、細胞激素

在非特異性免疫模式中，在腹腔細胞中，佔大多數為巨噬細胞，所以所分泌的細胞是為以 IL-1 及 IL-6 等主，由本實驗的結果中發現，靈芝對於巨噬細胞所分泌的 IL- 1β 具有抑制的作用，而對 IL-6 並無影響。在之前體外培養研究中發現，小鼠腹腔中的巨噬細胞會

透過其表面的接受器與靈芝培養液中的多醣體結合 (Liu et al., 1989)，而靈芝的多醣體被認為具有調節免疫的功能 (Cheng et al., 1985 ; Cheng et al., 1988 ; Xie et al., 1985)，但在本研究中，並未發現靈芝對巨噬細胞所分泌的細胞具有調節的作用；而在腹腔中巨噬所分泌 PGE2 方面，靈芝的餵食對於 PGE2 的分泌量亦無明顯的影響，PGE2 為發炎反應的指標之一，由此結果得知，餵食靈芝並不會顯著的影響發炎反應。

以上結果的可能原因是為，餵食的劑量對巨噬細胞分泌的細胞並無調節的作用，亦可能是因為口服的方式給予靈芝，經消化道的酵素處理後，靈芝具有調節免疫功能的多醣體受到破壞，因此無法有效達到如同體外實驗中所得的結果。

在脾臟細胞所分泌的細胞方面，在非特異性免疫模式中，靈芝的餵食可明顯的增加 IL-2 及自發性 γ IFN 的分泌量，而對於 IL-4 的生成量則有明顯的抑制作用。由此結果可知，靈芝可促進 Th1 細胞激素的分泌，而且會抑制 Th2 細胞激素分泌。此結果與先前的研究中，靈芝萃取物的餵食可增加脾臟細胞 IL-2 的釋放結果相符 (Cheng et al., 1988)。除此之外，本實驗中餵食靈芝的小鼠脾臟中 TNF α 的分泌量顯著增加。當以單核細胞與靈芝進行體外培養時，結果發現，TNF α 的分泌量亦會顯著較高 (Lieu et al., 1992 ; Wang et al., 1997)，此結果與本實驗之結果相同。

由以上細胞激素分泌量之結果中可知，在非特異性免疫模式中，靈芝可促進 IL-2、 γ IFN 及 TNF α 等細胞激素的分泌，而 IL-2 與 γ IFN 同樣具有活化自然殺手細胞的作用 (Henney et al., 1981 ; Minato et al., 1981)，除此之外，TNF α 亦被認為具有抑制腫瘤生長的作用。由此可知，餵食靈芝的小鼠，其脾臟細胞 IL-2 及 TNF α 分泌量升高，可能會進而影響自然殺手細胞的活性。

由以上結果可知，靈芝對於非特異性免疫反應之調控作用，主要是在於刺激 B 細胞促進 IgA、IgG 和 IgM 等抗體的生成，以及促進 IL-2 及 TNF α 等細胞激素的分泌，而且活化自然殺手細胞的細胞活性，其中靈芝可活化自然殺手細胞可能是藉由 IL-2 及 TNF α 等細胞激素的刺激。

在特異性免疫模式中，在 Th1 細胞激素方面，靈芝的餵食對於自發性 IL-2 及 γ IFN 的分泌均具有抑制的作用。而在 Th1 細胞激素方面，靈芝的餵食亦有抑制自發性 IL-4 及 IL-5 分泌的作用。

但是以 PHA、LPS 及 OVA 等 mitogen 刺激脾臟細胞，由其細胞激素分泌量的結果可得知，在 mitogen 的刺激之下，IL-2 及 IL-4 細胞激素的分泌約只有自發性分泌量的 1~1.5 倍，並未明顯的因 mitogen 的添加而造成細胞激素的分泌量增加，此可能的原因：一為培養的時間不恰當，本研究中培養的時間為 48 小時，培養的時間已經過久。二為 mitogen 的刺激效果不佳，即可為 mitogen 的使用濃度不恰當。

在先前的研究結果，以 CFA 作為佐劑可造成 Th2 免疫反應的表現 (Yip et al., 1999)，而由此研究結果得知，在靈芝的餵食之下，以 OVA/CFA 作為抗原進行腹腔注射，並未明顯的看到 Th1 細胞激素的分泌量增加，由圖 9 的結果中亦可得知，靈芝的餵食對於 Th1/Th2 細胞激素的平衡狀況，並沒有一致的調節效果。一般而言，餵食 YK-01 會抑制 Th1 免疫反應的表現，而餵食 YK-07 則具有促進 Th1 細胞傾向的細胞激素分泌的作用。以上不一致的現象，可能是為以 OVA/CFA 作為抗原模擬微生物入侵的模式可行性低；另一可能原因為，靈芝餵食的劑量並不恰當。因此對於特異性免疫反應的研究模式仍有待進一步的探討。

結 論 與 建 議

就攝食利用效率方面，靈芝的餵食無論是在於非特異性免疫反應或注射抗原的特異性免疫反應，靈芝均不會影響小鼠的攝食利用效率。就小鼠的脂質過氧化狀況而言，靈芝的餵食可明顯的降低非特異性免疫反應小鼠的氧化壓力；但對於注射特異抗原的小鼠，則無法影響其氧化的壓力。

就自然殺手細胞活性而言，無論注射抗原與否，靈芝的餵食確實可以增加自然殺手細胞的活性；而在非特異性的細胞激素方面，靈芝可增加 IL-2 及 TNF α 等細胞激素的分泌量。因此可推論，靈芝對於自然殺手細胞的活化，可能透過對於 IL-2 及 TNF α 等細胞激素的調控。

本研究中特異性的免疫反應，在此所採用的致敏方式並不恰當，而造成自飲食中額外攝取靈芝對於免疫反應並未達調節的效果，對於此一模式，仍有待改善。

無論是非特異性或特異性免疫反應，靈芝的餵食可確實的活化自然殺手細胞。此外，在非特異性免疫反應中，亦可增加 IL-2 及 TNF α 等細胞激素的分泌及抗體的生成。此外，腹腔細胞的免疫指標與脾臟的細胞激素分泌有相關性，本研究的數據整理仍在進行中。

建議衛生署不宜在計畫期間未完成就要求繳交報告，不合理也無法寫好報告，應比照國科會的結帳與報告繳交期限才能有完整的報告。

(6) 參考文獻

- 李旭生、廖英明、劉玲、魏耀揮、陳光耀 (1987a) 靈芝菌絲體與子實體萃取物抗腫瘤效應之比較。中華癌症會刊。3：38。
- 李旭生、張琳、柯立文、陳介甫 (1987b) 細胞培養分析法探討靈芝抗癌成分及作用之研究。中華癌症會刊。3：38-39。
- 許瑞祥。1993。靈芝概論。
- 郭明德、王文音、董大成 (1982) 人工液體培養之靈芝萃取物抗老鼠S-180肉瘤生長的作用。中華民國癌醫會刊。3：35-40。
- 黃大為、黃禳基、李旭生 (1991) 靈芝對體外培養之口腔癌細胞的毒殺效應。中華醫誌。48：54-58。
- 鄭惠華、董一致、董大成 (1985a) 人工栽培之靈芝萃取物之抗腫瘤作用，II. 口服靈芝萃取液對於S-180 肉瘤生長之抑制作用。中華癌醫會誌。1:6。
- 鄭惠華、董一致、董大成 (1985b) 人工栽培之靈芝萃取物之抗腫瘤作用，III. 口服靈芝萃取液對人體內T細胞亞群之影響。中華癌醫會誌。1:10。
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pober, J. S. (1994) Cellular and molecular immunology.
- Alarcon-Riquelme, M. E., Moller, G. and Fernandez, C. (1993) Macrophage depletion decreases IgG anti-DNA on cultures from (NZB/NZW) F1 spleen cells by eliminating the main source of IL-6. Clin. Exp. Immunol. 91:220-225.
- Betz, M. and Fox, B. S. (1991) Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphocytes. J.Immunol. 146: 108-113.
- Barre, D. E., Holub, B. J. and Chapkin, R. S. (1993) The effect of Borage oil supplementation on human platelet aggregation, Thromboxane B2, Prostaglandin E1 and E2 formation. Nutr. Res. 13:739-751.
- Borofsky, M.A., Zurier, R. B., Rosenbaum, H., Weiner, D. B. and Williams, W. V. (1992) Effects of polyunsaturated fatty acids on interleukin-2-dependent T cell growth. Immunol. Res. 11: 154-164.

- Buttke, T. M. and Cuchens, M. A. (1994) Inhibition of lymphocyte proliferation by free fatty acids. II. Toxicity of stearic acid towards phytohaemagglutinin-activated T cells. *Immunology* 53: 507-514.
- Calder, P. C., Bond, J. A. and Newsholme, E. A. (1990) Fatty acid inhibition of lipopolysaccharide-stimulated B lymphocyte proliferation. *Biochem. Soc. Trans.* 18: 904-905.
- Cerone, S., Sansinanea, A. and Auza, N. (1995) Copper deficiency alters the immune response of bovine. *Nutr. Res.* 15:1333-1341.
- Chandrasekar, B. and Fernandes, G. (1994) Decreased pro-inflammatory cytokines and increased antioxidant enzyme gene expression by n-3 lipids in murine lupus nephritis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 200:893-898.
- Chen, D. M. (1985) Study of the influence of *Cordyceps sinensis* nad its cultured mycelia on the immunologic function of murine monocyte-macrophage system. *J. Combinted Trad. Chin. West. Med.* 1985:5:42
- Chen, W. C., Hau, D. M., Wang, C. C., Lin, I. H. and Lee, S. S. (1995a) Effects of *Ganoderma lucidum* and krestin on subset T-cell in spleen of γ -irradiated mice. *American J. Chinese Medicine.* 23:289-298.
- Chen, W. C., Hau, D. M. and Lee, S. S. (1995b) Effects of *Ganoderma lucidum* and krestin on cellular immunocompetence in γ -ray-irradiated mice. *American J. Chinese Medicine* 23:71-80.
- Chen, G. Z., Chen, G. L., Tsieh, S., Hsieh, G. C. and Henshall, J. M. (1991) Effects of *Cordyceps sinensis* on murine T lymphocyte subsets. *Chinese Med. J.* 104:4-8.
- Cheng, H. H., Hsieh, K. H., Tung, Y. C. and Tung, T. C. (1988) Effect of *Ganoderma lucidum* extract on interleukin-2 production in mice. *J Chinese Oncol. Soc.* 4:13-22.
- Cuellar, M. J., Giner, R. M., Recio, M. C., Just, M. J., Manez, S. and Rios, L. (1996) Tow fungal lanostane derivatives as phospholipase A2 inhibitors. *J. Nat. Prod.* 59:977-979.
- Davies, P., Allison, A. C. (1976) Secretion of macrophage enzymes in relation to the pathogenesis of chronic inflammation. Nelson D S (ed) *Immunobiology of the macrophage.*
- De Simone, C., Bianchi, S. B., Negri, R., Ferrazi, M., Baldinelli, L. and Vesely, R. (1986) The adjuvant effect of yoghurt on production of gammainterferon by Con A stimulated human peripheral blood

lymphocytes. *Nutr. Reports Int.* 33:419-433.

Djeu, J. Y., Heinbaugh, J. A. Holden, H. T. and Herberman, R. B. (1979) Augmentation of mouse natural killer cell activity by interferon and interferon inducers. *J. Immunol.* 122:175-181.

Falk, L. A., Wahl, L. M. and Vogel, S. N. (1988) Analysis of Ia antigen expression in macrophages derived factor or macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol.* 140: 2652-2660.

Ferrante, A., Martin, A. J. and Bates, E. J. (1994) Interaction of *Staphylococcus aureus* with human neutrophils and the down-regulation of TNF-receptor. *J. Immunol.* 152:3998-4004.

Ferreira, S. H., Moncako, M., Parsons, M. and Vane, J. R. (1979) The concomitant release of bradykinin and prostaglandin in the inflammatory response to carrageenan. *Br. J. of Pharmacol.* 52:108-109.

Fischer, H. G., Frosch, S., Reske, K. and Reske-Kune A. B. (1988) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activates macrophages derived from bone marrow cultures to synthesis of MHC class II molecules and to augmented antigen presentation function. *J. Immunol.* 144: 3882-3888.

Gan, K. H., Fann, Y. F., Hsu, S. H., Kuo, K. W. and Lin, C. N. (1998) Mediation of the cytotoxicity of lanostanoids and steroids of *Ganoderma tsugae* through apoptosis and cell cycle. *J. Nat. Prod.* 61:485-487.

Ghada, A. F., Watzl, B., Huang, D. and Watson, R. R. (1993) Beta-carotene in vitro stimulates tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 alpha secretion by peripheral blood mononuclear cells. *Nutr. Res.* 13:863-871.

Gordon, D., Bray, M. A., Morley, J. (1976) Control of lymphokine production by prostaglandin. *Nature* 262:401-402.

Hallquist, N. A. and Sherman, A. R. (1989) Effect of iron deficiency on the stimulation of natural killer cells by macrophage-produced interferon. *Nutr. Res.* 9:283-292.

Harada, H., Sakagami, H., Konno, K., Sato, T., Osawa, N., Fujimaki, M. and Komatsu, N. (1989) Antimicrobial activity induction by PSK subfractions : Dependence on molecular weight. *Infection* 17:38-39

Henney, C. S., Kuribayashi, K., Kern, D. E. and Gillis, S. (1981) Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature* 291:335-338.

- Humes, J. L., Bonney, R. J., Pelus, L., Dahlgren, M. E., Kuehl, F. L. A., Davies, P. (1977) Macrophages synthesize and release prostaglandins in response to inflammatory stimuli. *Nature* 269:149-151
- Jiang, P. (1982) A study of anti-neoplastic actions of *Cordyceps sinensis* in animals. *Qinghai. Med.* 3:18.
- Kabir, Y., Kimura, S. and Tamura, T. (1988) Dietary effect of *Ganoderma lucidum* mushroom on blood pressure and lipid levels in spontaneously hypertensive rats. (SHR). *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 34:433-438.
- Kantha, S. S., Taylor, C. E. and Ross, A. C. (1992) The impact of vitamin A deficiency and repletion with retinol and beta-carotene on concanavalin A-induced lymphocyte proliferation. *Nutr. Res.* 12:1527-1539.
- Kasiske, B. L. and Keane, W. F. (1991) The role of lipid peroxidation in the inhibition of mononuclear cell proliferation by normal lipoprotein. *J. Lipid Res.* 32: 775-781.
- Kemahli, A. S., Babacan, E. and Cavder, A. O. (1988) Cell mediated immune responses in children with iron deficiency and combined iron and zinc deficiency. *Nutr. Res.* 8:129-136.
- Kim, F., Sakagami, H., Tanuma, S. and Konno, K. (1990) Stimulation of interferon- γ -induced human myelogenous leukemic cell differentiation by high molecular weight PSK subfraction. *Anticancer Res.* 10:55-58.
- Klasing, K. C. (1988) Nutritional aspects of leukocytic cytokines. *J. Nutr.* 118:1436-1446.
- Komoda, Y., Shimizu, M., Sonoda, Y. and Sato, Y. (1989) Ganoderic acid and its derivatives as cholesterol synthesis inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.* 37:531-533.
- Kohda, H., Tokumoto, W., Sakamoto, K., Fujii, M., Hirai, Y., Yamasaki, K., Komoda, Y., Nakamura, H., Ishihara, S. and Uchida, M. (1985) The biologically active constituents of *Ganoderma lucidum* (Fr.) KARST. Histamine release-inhibitory triterpenes. *Chem. Pharm. Bull.* 33:1367-1374.
- Kurakata, Y., Sakagami, H., Sato, A., Kikuchi, K., Takeda, M., Asano, K. and Sato, Y. (1991) Functional maturation of monocytes / macrophages induced by PSK subfractions. *Anticancer Res.* 11:1767-

1772.

- Kumar, G. S., Das, U. N., Kumar, K. V., Madhavi, N., Das, N. P. and Tan, B. K. H. (1992) Effects of n-3 and n-6 fatty acids on the proliferation of human lymphocytes and their secretion on TNF α and Il-2 in vitro. *Nutr. Res.* 12:815-823.
- Kweon, M. N., Sakai, K., Kohro, T. and Kishino, Y. (1994) Effects of high fat diets on the immune responses of Peyer's patch-immunized rats. *Nutr. Res.* 14:59-71.
- Lawrence, L. M., Mathias, M. M., Nockels, C. F. and Tengerdy, R. P. (1985) The effect of vitamin E on prostaglandin levels in the immune organs of chicks during the course of an *E. coli* infection. *Nutr. Res.* 5:497-509.
- Lee, S. Y. and Rhee, H. M. (1990) Cardiovascular effects of mycelium extract of *Ganoderma lucidum* : inhibition of sympathetic outflow as a mechanism of its hypotensive action. *Chem.Pharm. Bull.* 38:1359-1364.
- Lessard, M. and Dupuis, M. (1994) Differential modulation of chicken lymphocyte blastogenesis and cytotoxic activity of natural killer cells in vitro by retinol, retinoic acid and beta-carotene. *Nutr. Res.* 14:1201-1217.
- Lieu, C. H., Lee, S. S. and Wang, S.Y. (1992) The effect of *Ganoderma lucidum* on induction of differentiation in leukemic U937 cells. *Anticancer Research.* 12:1211-1216.
- Lin, J. M., Lin, C. C., Chiu, H. F., Yang, J. J. and Lee, S. G. (1993) Evaluation of the anti-inflammatory and liver-protective effects of *Aneectochilus formosanus*, *Ganoderma lucidum* and *Gynostemma pentaphyllum* in rats. *American J. Chin. Med.* 21:59-69.
- Majumder, M. S. I. and Abdur-Rahim, A. T. M. (1987) Cell-mediated immune response of scorbutic guinea pigs. *Nutr. Res.* 7:611-616.
- McCue, N. (1997) The botanical boost. *Prepared Food.* 166:45-48.
- Mekkawy, S., Meselhy, M. R., Nakamura, N., Tezuka, Y., Hattori, M., Kakiuchi, N., Shimotohno, K., Kawahata, T. and Otake, T. (1998) Anti-HIV-1 and anti-HIV-1-protease substances from *Canoderma lucidum*. *Phytochem.* 49:1651-1657.
- Minato, N., Reid, L. and Bloom, B. R. (1981) On the heterogeneity of murine natural killer cells. *J. Exp. Med.* 154:750-762.

- Miyazaki, T. and Nishijima, M. (1981) Studies on fungal polysaccharides XXVII. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. Chem. Pharm. Bull. 29:3611-3616.
- Moriguchi, S. Maekawa, K, Miwa, H. and Kishino, Y. (1993) Effect of vitamin E supplementation on cellular immune functions decreased with aging in spontaneously hypertensive rats. Nutr. Res. 13:1039-1051.
- Nakashima, S., Umeda, Y. and Kanada, T. (1979) Effect of polysaccharides from *Ganoderma applanatum* on immune responses. Microbiol. Immunol. 23:501-513.
- Perdigon, G. de Macias MEN., Alvares, S., Oliver, G., Ruiz. and A. P. (1988) Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milk with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. Immunology 63:17-29
- Pereyra, B. S. and Leminnier, D. (1993) Induction of human cytokines by bacteria used in dairy foods. Nutr. Res. 13:1127-1140.
- Pene, J., Rousset, F., Briere, F., Chretien, I., Wideman, J., Bonnefoy, J. Y. and Vries, J. E. (1988) Interleukin 5 enhance interleukin 4-induced IgE production by normal human B cells. The role of CD23 antigen. Eur. J.Immuno. 18:929-935.
- Phipps, R. P., Stein, S. H. and Roper, R. L. (1991) A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. Immunol. Today 12:349-352.
- Quill, H., Gaur, A. and Phipps, R. P. (1989) Prostaglandin E2-dependent induction of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secretion by cloned murine helper T cells. J. Immunol. 142:813-818.
- Robinson, J. P. et al. (1998) Phagocyte function : a guide for research and clinical evaluation.
- Romagnani, S. (1992) Induction of Th1 and Th2 responses : a key role for the "natural" immune response ? Immunol. Today 13:379-381.
- Roper, R. L. and Phipps, R. P. (1992) Prostaglandin E2 and cAMP inhibit B lymphocyte activation and simultaneously promote IgE and IgG1 synthesis. J. Immunol. 149: 2984-2991.
- Rotondo, D., Earl, C. R., Laing, K. J. and Kaimakamis, D. (1994) Inhibition of cytokine-stimulated thymic lymphocyte proliferation by

- fatty acids: the role of eicosanoids. *Biochim. Biophys. Acta.* 1233: 185-194.
- Sakagami, H., Ikeda, M. and Konno, K. (1989) Stimulation of tumor necrosis factor-induced human myelogenous leukemia cell differentiation by high molecular weight PSK subfraction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162:597-603.
- Sakagami, H., Konno, K., Kurakata, Y., Takeda, M., Sato, T., Harada, H., Ohsawa, N., Fujimaki, M. and Komatsu, N. (1990) Effects of pretreatment with PSK, a protein-bound polysaccharide, on *Escherichia coli* infection on mice. *Showa. Univ. J. Med. Sci.* 2:7-10.
- Sakagami, H., Sugaya, K., Utsumi, A., Fujimaki, S., Sato, T. and Takeda, M. (1993) Stimulation by PSK of Interleukin-1 production by human peripheral blood mononuclear cells. *Anticancer Res.* 13:671-676.
- Schiffrin, E. J., Rochat, F., Link-Amster, H., Aeschliman, J. M. and Donnet-Hughes, A. (1995) Immunomodulation of human blood cells following ingestion of lactic bacteria. *J Dairy Sci.*
- Shimizu, A., Yano, T., Saito, Y. and Inada, Y. (1985) Isolation of an inhibitor of platelet aggregation from a fungus, *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* 33:3012-3015.
- Sun, Y. H. (1985) Current status of research in *Cordyceps sinensis* and its mycelia. *Bull. Chin. Drugs.* 10:35.
- Tasaka, K., Akagi, M., Miyoshi, K., Mio, M. and Makino, T. (1988a) Anti-allergic constituents in the culture medium of *Ganoderma lucidum*. (I) Inhibitory effect of oleic acid on histamine release. *Agents and Actions* 23:153-156.
- Tasaka, K., Mio, M., Izushi, K., Akagi, M. and Makino, T. (1988b) Anti-allergic constituents in the culture medium of *Ganoderma lucidum*. (II) The inhibitory effect of cyclooctasulfur on histamine release. *Agents and Actions* 23:157-160.
- Toth, J. O., Luu, B. and Ourisson, G. (1983) Les acides Ganoderiques T a Z : Triterpenes cytotoxiques de *Ganoderma lucidum* (polyporacee). *Tetra. Letters* 24:1081-1084.
- Tse, Z. G., (1982) Pharmacologic study of *Cordyceps sinensis* and its cultured mycelia. I. The influence on phagocytic activity of monocyte macrophage system. *Chin. Herbs* 13:17.

- Tsukagoshi, S., Hashimoto, Y., Fujii, G., Kobayashi, H., Nomoto, K. and Orita, K. (1984) Krdstin (PSK). *Cancer Treat. Rev.* 11:131-155.
- Vesely, R., Negri, R., Bianchi, S. B., Lavezzari, D. and De Simone, C. (1985) Influence of a diet addditioned with yoghurt on the mouse immune system. *J. Immunol. Immunopharmacol.* 5:30-35.
- Vinegar, R., Schreiber, W. and Hugo, R. (1969) Biphasic development of carrageenan edema in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 166:96-103.
- Vojdani, A. and Ghoneum, M. (1993) In vivo effect of ascorbic acid on enhancement of human natural killer cell activity. *Nutr. Res.* 13:753-764.
- Wang, W. K., Chen, H. L., Hsu, T. L. and Wang-Lin, Y. Y. (1994) Alteration of pulse in human subjects by three Chinese herbs. *American J. Chinese Medicine.* 22:197-203.
- Wang, S. Y., Hsu, M. L., Hsu, H. C., Tzeng, C. H., Lee, S. S., Shiao, M. S. and Ho, C.K. (1997) The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines relased from activated macrophage and T lymphocytes. *Int. J. Cancer.* 70:699-705.
- Watzl, B., Feyll, K., Ruhl, H. and Leitzmann, C. (1990) Impact of wheat on the non-specific immune response of man. II. Whole wheat. *Nutr. Res.* 10:137-143.
- Whintrobe, M. M. (1981) *Clinical Hematology.*
- Won, S. J., Lee, S. S., Ke, Y. H. and Lin, M. T. (1989) Engancement of splenic NK cytotoxic activity by extracts of *ganoderma lucidum* mycelium in mice. *J. Biomed. Lab. Sci.* 2:201-213.
- Won, S. J., Lin, M. T. and Wu, W. L. (1992) *Ganoderma tsugae* mycellium enhances splenic natural killer cell activity and serum interferon production in mice. *Japan. J. Pharmacol.* 59: 171-176.
- Wu, W.-M., Chiang, B.-L., Chang, S.-C. and Lin, B.-F. (2000). Late feeding of dietary fish oil alleviates disease severity and affects macrophage function in autoimmune NZB/W F1 mice. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection.* (in press)
- Xie, D., Wu, Q., Zhang, H., Chen, W., Li, R. and He, Y. (1985) Effect of the polysaccharide compeonent BN 3C from *Ganodermas* and a-matrine on murine T lymphocytes. *Zhonghua Weishengwuxue He Mianyixue Zazhi* 5:8-13.

- Yamashita, N., Yokoyama, A., Hamazaki, T. and Tano, S. (1986) Inhibition of natural killer cell activity of human lymphocytes by eicosapentaenoic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138: 1058-1067.
- Yamashita, N., Maruyama, M., Yamazaki, T. and Yano, S. (1991) Effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid on natural killer cell activity in human peripheral blood lymphocytes. *Clin. Immunol. Immunopath.* 59: 335-345.
- Yip, H. C., Karulin, A. Y., Tary-Lehmann, M., Hesse, M. D., Radeke, H., Heeger, P. S., Trezza, R. P., Heinzl, F. P., Forsthuber, T. and Lehmann, P. V. (1999) Adjuvant-guided type-1 and type-2 immunity : Infectious / noninfectious dichotomy defines the class of response. *J. Immunol.* 162:3942-3949.

表 1. 實驗動物與人體表面積比等效劑量換算比率表

	小鼠	大鼠	豚鼠	兔	貓	猴	狗	人
	20g	200g	400g	1.5Kg	2.0Kg	4.0Kg	12Kg	70Kg
小鼠 20g	1.0	7.0	12.25	27.8	29.7	64.1	124.2	387.9
大鼠 200g	0.14	1.0	1.74	3.9	4.2	9.2	17.8	56.0
豚鼠 400g	0.08	0.57	1.0	2.25	2.4	5.2	4.2	31.5
兔 1.5Kg	0.04	0.25	0.44	1.0	1.08	2.4	4.5	14.2
貓 2.0Kg	0.03	0.23	0.41	0.92	1.0	2.2	4.1	13.0
猴 4.0Kg	0.016	0.11	0.19	0.42	0.45	1.0	1.9	6.1
狗 12Kg	0.008	0.06	0.10	0.22	0.23	0.52	1.0	3.1
人 70Kg	0.0026	0.018	0.031	0.07	0.078	0.16	0.32	1.0

小鼠之靈芝 YK-01 給予量 = $4.5 \text{ (g/day)} \times 0.0026 = 0.01 \text{ (g/day)}$

小鼠之靈芝 YK-07 給予量 = $7.58 \text{ (g/day)} \times 0.0026 = 0.02 \text{ (g/day)}$

表 2. 餵食靈芝對 BALB/c 雌鼠在四個月大犧牲時之體重、攝食量及飼料利用效率的影響

Table 2. The effect of tube feeding with different dose of *Ganoderma tsuga* on body weight gain、food intake and feed efficiency of female BALB/c mice

Group	N	Initial BW (g)	Final BW (g)	Food intake (g/day)	Feed efficiency
Control	12	16.1±1.4	19.3±1.3	2.81±0.31	2.46±1.08
YK01-M	12	16.0±1.4	19.4±1.4	2.58±0.25*	2.64±0.63
YK01-H	11	16.0±1.4	20.2±1.3	2.78±0.16	3.08±1.04
YK07-M	12	16.1±1.4	20.0±1.3	2.76±0.20	2.96±1.08
YK07-H	13	16.1±1.4	20.4±0.6*	2.85±0.20	3.16±1.20

1. YK01-M : middle dose of *Ganoderma tsuga*、YK01-H : high dose of *Ganoderma tsuga*。YK07-M : middle dose of *Ganoderma tsuga*、YK07-H : high dose of *Ganoderma tsuga*。
2. Each value are presented as Mean± SD.
3. Values analyzed by student's t-test. * significant different at the 0.05 level compared with control.
4. Feed efficiency (%) = [Body weight gain (g/day) / food intake (g/day)] × 100%

表 3. 餵食靈芝對 BALB/c 雌鼠在四個月大犧牲時之組織重及其相對重量的影響

Table 3. The effect of tube feeding with different dose of *Ganoderma tsuga* on the tissue weight and their relative weight of female BALB/c mice

Groups	N	Tissue Weight (g)				
		Spleen	Liver	Kidney	Heart	Lung
C	12	0.06±0.05	0.85±0.11	0.24±0.03	0.10±0.01	0.14±0.02
YK01-M	12	0.06±0.04	0.96±0.11*	0.23±0.03	0.09±0.01	0.13±0.02
YK01-H	11	0.09±0.11	1.06±0.09*	0.24±0.02	0.10±0.01	0.14±0.01
YK07-M	12	0.06±0.02	1.00±0.07*	0.24±0.02	0.09±0.01	0.13±0.01
YK07-H	13	0.07±0.02	1.06±0.07*	0.26±0.03*	0.10±0.02	0.14±0.01
Relative tissue weight (%)						
C	12	0.31±0.23	4.45±0.34	1.26±0.13	0.50±0.06	0.73±0.10
YK01-M	12	0.29±0.22	4.82±0.36*	1.16±0.12	0.47±0.05	0.65±0.06
YK01-H	11	0.46±0.57	5.17±0.29*	1.19±0.10	0.47±0.06	0.67±0.05
YK07-M	12	0.29±0.08	4.87±0.22*	1.19±0.08	0.44±0.06*	0.64±0.06
YK07-H	13	0.33±0.12	5.16±0.30*	1.27±0.10	0.47±0.08	0.67±0.06

1. YK01-M : middle dose of *Ganoderma tsuga* 、 YK01-H : high dose of *Ganoderma tsuga* 。 YK07-M : middle dose of *Ganoderma tsuga* 、 YK07-H : high dose of *Ganoderma tsuga* 。
2. Each value are presented as Mean± SD.
3. Values analyzed by student's t-test. * significant different at the 0.05 level compared with control.
4. Relative tissue weight (%) = [organ weight (g) / Body weight (g)]×100%

表 4. 餵食靈芝對 BALB/c 雌鼠血液中顆粒細胞吞噬作用之影響

Table 4. The effect of tube feeding with different dose of *Ganoderma tsuga* on phagocytosis of granulocyte in the blood of female BALB/c mice

Group	n	Granulocyte %	Phagocytic activity
		37°C	
Control	10	12.37±6.54	10.35±5.20
YK01-M	10	13.79±6.76	11.06±4.22
YK01-H	10	14.20±8.64	10.86±5.92
YK07-M	10	11.91±5.79	10.78±4.02
YK07-H	10	17.55±7.64	14.24±4.21

1. YK01-M : middle dose of *Ganoderma tsuga* 、 YK01-H : high dose of *Ganoderma tsuga* 。 YK07-M : middle dose of *Ganoderma tsuga* 、 YK07-H : high dose of *Ganoderma tsuga* 。
2. Each value are presented as Mean± SD.
3. Values analyzed by student's t-test. * significant different at the 0.05 level compared with control.
4. Granulocyte % were gate% from FACSscan data ; phagocytic activity were FITC-mean, there was came from FACSscan data.

表 5. 餵食靈芝對 BALB/c 雌鼠腹腔細胞之細胞激素分泌量的影響

Table 5. The effect of tube feeding with different dose of *Ganoderma tsuga* on the amount of cytokine released by peritoneal cells of female BALB/c mice

Group	n	Spontaneous	LPS+ IFN
		IL-1 (pg/10 ⁶ cells)	
Control	10	44.89±26.32	362.22±219.88
YK01-M	10	20.55±18.28*	198.13±103.67*
YK01-H	10	22.89±12.78*	364.07±109.71
YK07-M	10	60.89±53.90*	260.37±48.75
YK07-H	10	45.05±29.18	254.22±112.48
		IL-6 (ng/10 ⁶ cells)	
Control	10	0.09±0.08	1.35±0.61
YK01-M	10	0.06±0.07	1.24±0.54
YK01-H	10	0.08±0.06	1.16±0.70
YK07-M	10	0.20±0.16*	1.25±0.62
YK07-H	10	0.21±0.16	1.19±0.60

1. YK01-M : middle dose of *Ganoderma tsuga* 、 YK01-H : high dose of *Ganoderma tsuga* 。 YK07-M : middle dose of *Ganoderma tsuga* 、 YK07-H : high dose of *Ganoderma tsuga* 。
2. Each value are presented as Mean± SD.
3. Values analyzed by student's t-test. * significant different at the 0.05 level compared with control.
4. The peritoneal cell from mice were cultured for 48hrs in absence (spontaneous) or presence of LPS 10 g/mL plus I FN 50 U/mL.

表 6. 餵食靈芝對 BALB/c 雌鼠腹腔細胞之前列腺素 E2 分泌量的影響

Table 6. The effect of tube feeding with different dose of *Ganoderma tsuga* on the amount of PGE2 released by peritoneal cells of female BALB/c mice

Group	n	Spontaneous	LPS+IFN
		PGE2 (g/10 ⁶ cells)	
Control	10	0.68±0.35	79.30±47.01
YK01-M	10	0.52±0.13	53.89±30.01
YK01-H	10	0.82±0.37	59.10±35.58
YK07-M	10	1.14±0.95	63.55±39.37
YK07-H	10	0.99±0.69	64.23±38.32

1. YK01-M : middle dose of *Ganoderma tsuga* 、 YK01-H : high dose of *Ganoderma tsuga* 。 YK07-M : middle dose of *Ganoderma tsuga* 、 YK07-H : high dose of *Ganoderma tsuga* 。
2. Each value are presented as Mean± SD.
3. Values analyzed by student's t-test. * significant different at the 0.05 level compared with control.
4. The peritoneal cell from mice were cultured for 48hrs in absence (spontaneous) or presence of LPS 10 g/mL plus I FN 50 U/mL.

表 7. 餵食靈芝對 BALB/c 雌鼠脾臟細胞之細胞激素分泌量的影響

Table 7. The effect of tube feeding with different dose of *Ganoderma tsuga* on the amount of cytokine released by spleen cells of female BALB/c mice

Group	n	Mitogen addotion		
		Spontaneous	PHA	LPS
IL-2 (unit/10 ⁶ cells)				
Control	10	0.90±0.09	1.68±0.36	0.93±0.13
YK01-M	10	1.00±0.14*	1.99±1.12	0.87±0.05
YK01-H	10	1.12±0.10*	2.28±0.60*	1.16±0.07*
YK07-M	10	1.07±0.17*	2.85±1.34*	1.61±0.07*
YK07-H	10	0.89±0.10	2.55±0.64*	1.07±0.15*
γIFN (unit/10 ⁶ cells)				
Control	10	0.44±0.04	1.09±0.16	1.66±0.64
YK01-M	10	0.54±0.08*	1.49±0.94	2.24±1.65
YK01-H	10	0.60±0.42	1.25±0.91	1.62±0.62
YK07-M	10	0.49±0.04*	1.28±0.35	1.62±1.04
YK07-H	10	0.46±0.07	1.09±0.16	1.55±0.64
IL-4 (pg/10 ⁶ cells)				
Control	10	4.46±0.24	7.40±1.13	5.00±0.20
YK01-M	10	4.30±0.68	7.50±1.81	4.24±0.27*
YK01-H	10	3.80±0.44*	5.06±1.06*	3.76±0.21*
YK07-M	10	4.12±0.50*	9.34±4.22	4.28±0.38*
YK07-H	10	4.02±0.20*	7.08±1.49	4.68±0.27*
TNFα (pg/10 ⁶ cells)				
Control	10	563±68	552±55	679±74
YK01-M	10	983±111*	1054±83*	1017±97*
YK01-H	10	764±61*	799±58*	856±40*
YK07-M	10	756±49*	753±108*	805±79*
YK07-H	10	608±52	650±73*	618±41*

1. YK01-M : middle dose of *Ganoderma tsuga* 、 YK01-H : high dose of *Ganoderma tsuga* 。 YK07-M : middle dose of *Ganoderma tsuga* 、 YK07-H : high dose of *Ganoderma tsuga* 。
2. Each value are presented as Mean± SD.
3. Values analyzed by student's t-test. * significant different at the 0.05 level compared with control.

表 8. 餵食靈芝對 BALB/c 小鼠腹腔中顆粒細胞 (a) 和單核細胞 (b) 吞噬作用之影響

Table 8. The effect of tube feeding with different dose of *Ganoderma tsuga* on phagocytosis of granulocytes (a) and monocytes (b) in the peritoneal of female BALB/c mice

(a)

Group	N	Granulocyte %	Phagocytic activity
Control	9	9.87±5.37	3.45±1.20
YK01-M	9	7.52±4.10	2.68±1.09
YK07-M	10	10.47±8.60	3.35±1.44

(b)

Group	N	Monocyte %	Phagocytic activity
Control	9	7.22±4.38	2.16±0.77
YK01-M	9	6.12±3.31	1.93±0.65
YK07-M	10	8.03±7.88	2.06±0.86

1. YK01-M : middle dose of *Ganoderma tsuga* 、 YK01-H : high dose of *Ganoderma tsuga* 。 YK07-M : middle dose of *Ganoderma tsuga* 、 YK07-H : high dose of *Ganoderma tsuga* 。
2. Each value are presented as Mean± SD.
3. Values analyzed by student's t-test. * significant different at the 0.05 level compared with control.
4. Granulocyte % were gate% from FACSscan data ; phagocytic activity were FITC-mean, there was came from FACSscan data.

表 9. 餵食靈芝對腹腔注射抗原之 BALB/c 雌鼠在四個月大犧牲時之體重、攝食量及飼料利用效率的影響

Table 9. The effect of tube feeding with different dose of *Ganoderma tsuga* on body weight gain、food intake and feed efficiency of female BALB/c mice immunized with OVA.

Group	n	Initial BW (g)	Final BW (g)	Food intake (g/day)	Feed efficiency (%)
Control	12	17.34±1.49	21.81±1.49	3.14±0.24	2.73±0.90
YK01-L	11	17.29±1.04	21.50±1.74	3.15±0.24	2.53±0.80
YK01-M	12	17.31±0.79	21.19±2.04	3.14±0.23	2.30±0.85
YK01-H	11	18.05±1.28	22.24±1.54	3.21±0.26	2.45±0.65
YK07-L	11	17.38±1.21	21.11±2.44	3.20±0.35	2.23±0.90
YK07-M	11	17.45±1.39	22.07±1.45	3.22±0.24	2.73±0.88
YK07-H	11	17.09±1.08	21.17±1.98	3.07±0.19	2.50±1.00

1. YK01-L : low dose of *Ganoderma tsuga*、YK01-M : middle dose of *Ganoderma tsuga*、YK01-H : high dose of *Ganoderma tsuga*。YK07-L : low dose of *Ganoderma tsuga*、YK07-M : middle dose of *Ganoderma tsuga*、YK07-H : high dose of *Ganoderma tsuga*。BW : body weight。
2. Each value are presented as Mean± SD.
3. Values analyzed by student's t-test .*, significant different at the 0.05 level compared with control.
4. Feed efficiency (%) = [Body weight gain (g/day) / Food intake (g/day)]×100%

表 10. 餵食靈芝對腹腔注射抗原之 BALB/c 雌鼠在四個月大犧牲時之組織

重及其相對重量的影響

Table 10. The effect of tube feeding with different dose of *Ganoderma tsuga* on the tissue weight and their relative weight of female BALB/c mice immunized with OVA.

Groups	n	Tissue Weight (g)				
		Spleen	Liver	Kidney	Heart	Lung
Control	12	0.26±0.08	1.13±0.19	0.31±0.03	0.13±0.02	0.17±0.02
YK01-L	11	0.25±0.10	1.00±0.17	0.29±0.05	0.10±0.01*	0.12±0.03
YK01-M	11	0.24±0.13	1.02±0.17	0.29±0.03	0.11±0.01*	0.12±0.02
YK01-H	11	0.23±0.10	1.10±0.16	0.30±0.05	0.11±0.02*	0.13±0.03
YK07-L	11	0.23±0.14	1.00±0.23	0.30±0.06	0.10±0.02*	0.14±0.02
YK07-M	11	0.26±0.15	0.99±0.18	0.30±0.05	0.10±0.02*	0.14±0.03
YK07-H	10	0.27±0.09	1.01±0.23	0.32±0.04	0.11±0.03	0.14±0.02
Relative tissue weight (%)						
Control	12	1.20±0.33	5.12±0.65	1.42±0.10	0.57±0.08	0.79±0.12
YK01-L	11	1.14±0.38	4.59±0.50	1.32±0.11	0.45±0.09*	0.55±0.10
YK01-M	11	1.10±0.62	4.42±1.56	1.30±0.44	0.49±0.19	0.54±0.20
YK01-H	11	1.02±0.62	4.90±0.64	1.35±0.15	0.48±0.11	0.57±0.11
YK07-L	11	1.04±0.56	4.67±0.71	1.39±0.21	0.49±0.08*	0.68±0.09
YK07-M	11	1.17±0.61	4.52±0.63*	1.36±0.15	0.49±0.07*	0.65±0.14
YK07-H	10	1.20±0.36	4.61±0.77	1.47±0.16	0.50±0.13	0.65±0.11

1. YK01-L : low dose of *Ganoderma tsuga* 、YK01-M : middle dose of *Ganoderma tsuga* 、YK01-H : high dose of *Ganoderma tsuga* 。YK07-L : low dose of *Ganoderma tsuga* 、YK07-M : middle dose of *Ganoderma tsuga* 、YK07-H : high dose of *Ganoderma tsuga* 。
2. Each value are presented as Mean± SD.
3. Values analyzed by student's t-test .*, significant different at the 0.05 level compared with control.
4. Relative tissue weight (%) = [organ weight (g) / body weight (g)]×100%

表 11. 餵食靈芝對腹腔注射抗原之 BALB/c 雌鼠血液中顆粒細胞吞噬作用
之影響

Table 11. The effect of tube feeding with different dose of *Ganoderma tsuga* on phagocytosis of granulocyte in the blood of female BALB/c mice

Group	n	Granulocyte %	Phagocytic activity
Control	12	49.41±19.11	10.09±5.95
YK01-L	8	47.28±22.70	8.87±5.08
YK01-M	11	58.64±23.63	11.39±5.00
YK01-H	11	43.36±18.86	7.49±3.89
YK07-L	12	50.70±19.61	9.61±5.22
YK07-M	11	44.39±19.37	8.22±4.90
YK07-H	11	52.02±18.73	10.18±6.12

1. YK01-L : low dose of *Ganoderma tsuga* 、YK01-M : middle dose of *Ganoderma tsuga* 、YK01-H : high dose of *Ganoderma tsuga* 。YK07-L : low dose of *Ganoderma tsuga* 、YK07-M : middle dose of *Ganoderma tsuga* 、YK07-H : high dose of *Ganoderma tsuga* 。
2. Each value are presented as Mean± SD.
3. Values analyzed by student's t-test .*, significant different at the 0.05 level compared with control.
4. Granulocyte % were gate% from FACSscan data ; phagocytic activity were FITC-mean, there was came from FACSscan data.

表 12. 餵食靈芝對腹腔注射抗原之 BALB/c 雌鼠脾臟細胞 Th1 細胞激素分泌量的影響

Table 12. The effect of tube feeding with different dose of *Ganoderma tsuga* on the amount of Th1 cytokine released by spleen cells of female BALB/c mice immunized with OVA.

Group	N	Mitogen addition			
		Spontaneou	PHA	LPS	OVA
		IL-2 (unit/10 ⁶ cells)			
Control	12	0.53±0.04	0.62±0.04	0.46±0.05	0.73±0.09
YK01-L	11	0.42±0.06*	0.52±0.12	0.39±0.05*	0.82±0.15
YK01-M	11	0.37±0.06*	0.59±0.35	0.34±0.04*	0.56±0.12*
YK01-H	11	0.41±0.09*	0.48±0.10*	0.37±0.05*	0.67±0.21
YK07-L	12	0.45±0.07*	0.55±0.17	0.37±0.02*	0.66±0.12
YK07-M	11	0.47±0.09	0.57±0.15	0.42±0.05	0.65±0.13
YK07-H	11	0.58±0.11	0.60±0.10	0.46±0.06	0.66±0.14
		γIFN (unit/10 ⁶ cells)			
Control	10	0.16±0.02	0.43±0.11	0.30±0.18	0.23±0.07
YK01-L	11	0.08±0.01*	0.56±0.19	0.21±0.12	0.26±0.12
YK01-M	12	0.10±0.02*	0.51±0.29	0.29±0.23	0.35±0.34
YK01-H	11	0.10±0.01*	0.52±0.14	0.32±0.18	0.37±0.30
YK07-L	12	0.13±0.01*	0.55±0.17	0.52±0.37*	0.62±0.66*
YK07-M	11	0.15±0.02*	0.60±0.31	0.47±0.23	0.42±0.30
YK07-H	11	0.13±0.02*	0.43±0.16	0.31±0.18	0.26±0.11

1. YK01-L : low dose of *Ganoderma tsuga* 、YK01-M : middle dose of *Ganoderma tsuga* 、YK01-H : high dose of *Ganoderma tsuga* 。YK07-L : low dose of *Ganoderma tsuga* 、YK07-M : middle dose of *Ganoderma tsuga* 、YK07-H : high dose of *Ganoderma tsuga* 。
2. Each value are presented as Mean± SD.
3. Values analyzed by student's t-test .*, significant different at the 0.05 level compared with control.

表 13. 餵食靈芝對腹腔注射抗原之 BALB/c 雌鼠脾臟細胞 Th2 細胞激素分泌量的影響

Table 13. The effect of tube feeding with different dose of *Ganoderma tsuga* on the amount of Th2 cytokine released by spleen cells of female BALB/c mice immunized with OVA.

Group	N	Mitogen addition			
		Spontaneou	PHA	LPS	OVA
		IL-4 (pg/10 ⁶ cells)			
Control	12	2.21±0.34	2.45±0.28	2.07±0.25	2.22±0.45
YK01-L	11	1.72±0.23*	2.32±0.54*	1.55±0.19	2.52±0.38
YK01-M	11	2.23±0.23	2.50±0.33	2.39±0.45	2.03±0.16
YK01-H	11	1.80±0.26*	2.08±0.26	1.90±0.21	2.08±0.25
YK07-L	11	1.84±0.14*	2.74±0.62*	2.46±0.37	2.66±0.69*
YK07-M	11	2.07±0.23	2.30±0.20	2.03±0.24	2.12±0.35
YK07-H	11	1.63±0.27*	1.83±0.50*	1.44±0.20*	2.73±0.29*
		IL-5 (pg/10 ⁶ cells)			
Control	11	27.65±1.53	41.29±4.46	29.28±3.12	44.26±9.06
YK01-L	11	25.14±1.03	45.67±12.8	27.69±1.39	40.68±6.08
YK01-M	11	27.22±1.63	40.15±8.97	28.97±2.36	41.04±9.31
YK01-H	11	22.79±1.31	29.76±3.25	25.38±2.43	37.34±8.28
YK07-L	11	30.06±1.50	38.45±6.23	30.26±5.39	46.71±10.2
YK07-M	11	29.42±1.52	44.79±11.4	31.57±2.13	46.09±14.8
YK07-H	11	26.53±1.91	43.14±10.0	27.94±1.42	47.96±13.7

1. YK01-L : low dose of *Ganoderma tsuga* 、YK01-M : middle dose of *Ganoderma tsuga* 、YK01-H : high dose of *Ganoderma tsuga* 。YK07-L : low dose of *Ganoderma tsuga* 、YK07-M : middle dose of *Ganoderma tsuga* 、YK07-H : high dose of *Ganoderma tsuga* 。
2. Each value are presented as Mean± SD.
3. Values analyzed by student's t-test .*, significant different at the 0.05 level compared with control.

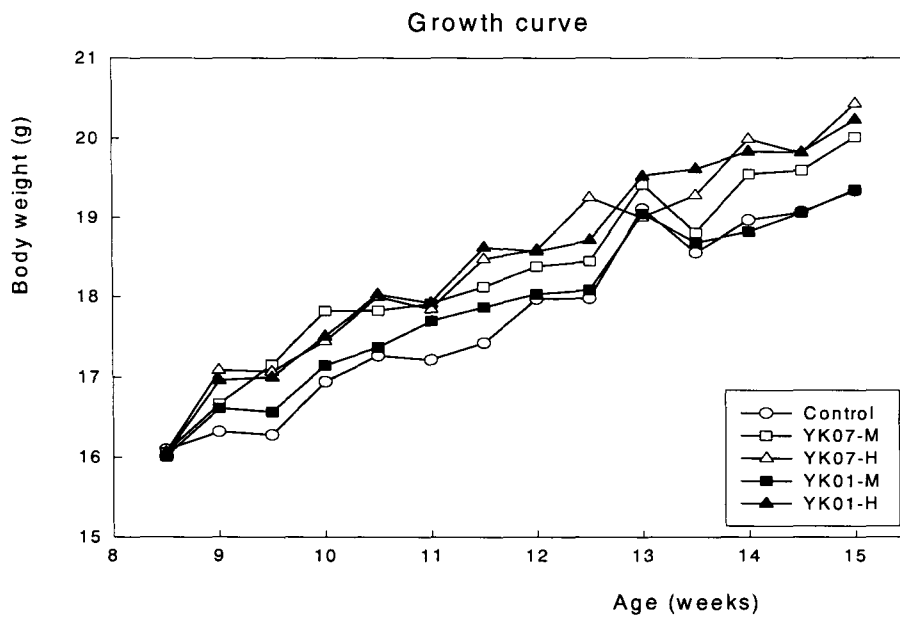


圖 1. 餵食靈芝之 BALB/c 雌鼠生長曲線

Figure 1. The growth curve of mice supplemented with different dose of *Ganoderma tsuga*

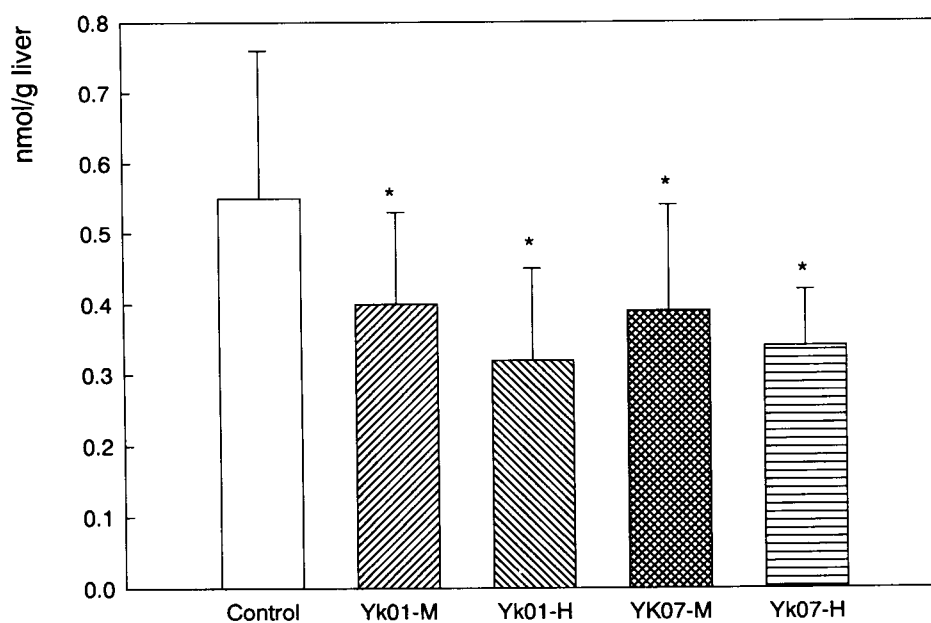


圖 2. 餵食靈芝對 BALB/c 雌鼠肝臟均質液中 TBARS 含量的影響

Figure 2. The effect of tube feeding with different dose of *Ganoderma tsuga* on TBARS content in liver homogenate of female BALB/c mice. Each value are presented as mean $\pm$ SD, n=12~13. Values analyzed by student's t-test, * significant different at the 0.05 level compared with control.

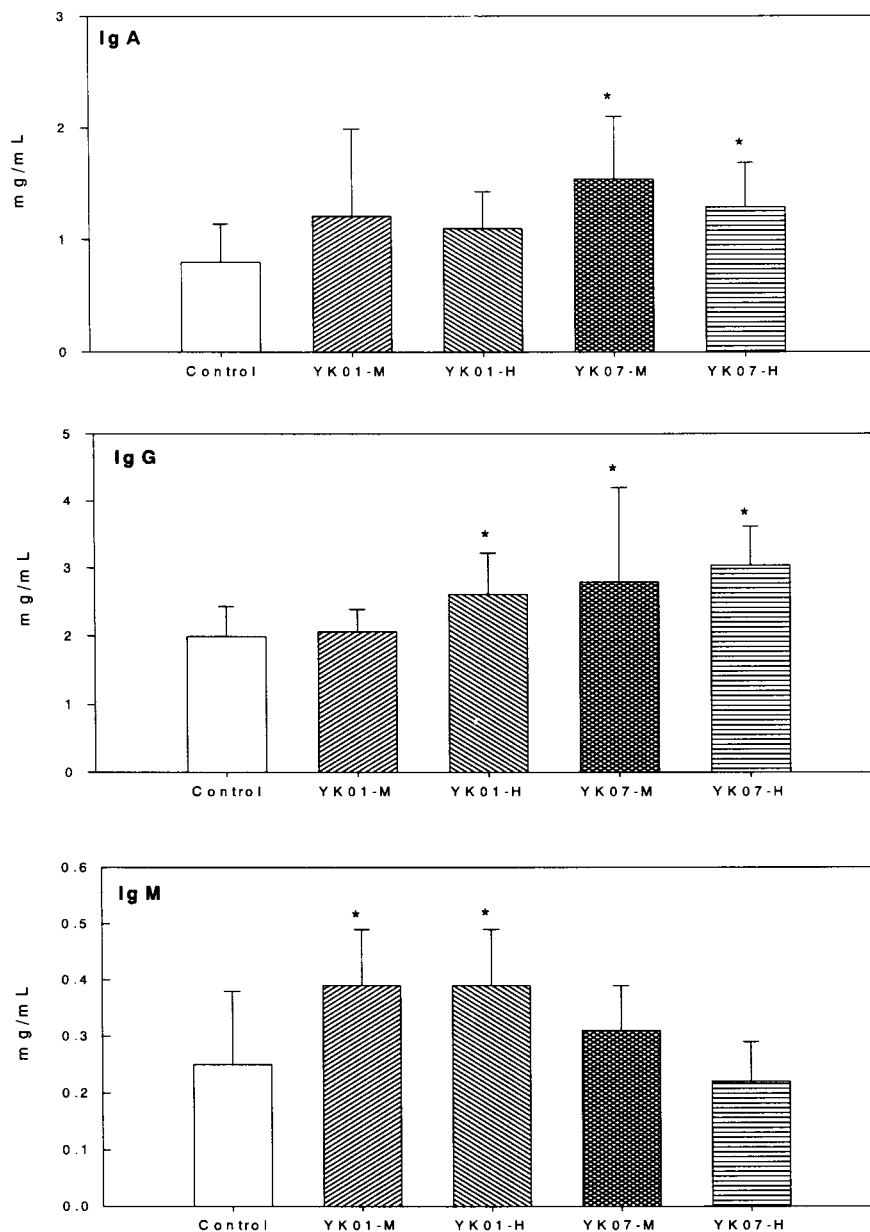


圖 3. 餵食靈芝對 BALB/c 雌鼠血清中 IgA、IgG 和 IgM 總含量之影響

Figure 3. The effect of tube feeding with different dose of *Ganoderma tsuga* on serum total IgA、IgG and IgM antibody content of female BALB/c mice. Each value are presented as mean $\pm$ SD, n=12~13. Value analyzed by student's t-test. * significant different at the 0.05 level compared with control.

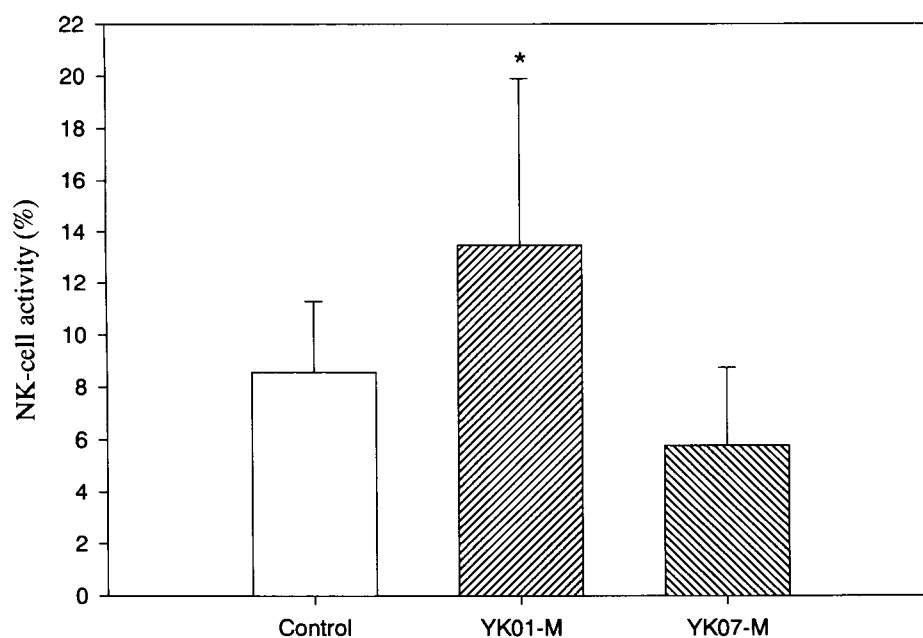


圖 4. 餵食靈芝產品對 BALB/c 小鼠腹腔中自然殺手細胞活性之影響

Figure 4. The effect of tube feeding with *Ganoderma lucidum* product on the activity of natural killer cells in the peritoneal. E/T=100. Each value are presented as mean $\pm$ SD, n=10. Value analyzed by student's t-test. * significant different at the 0.05 level compared with control.

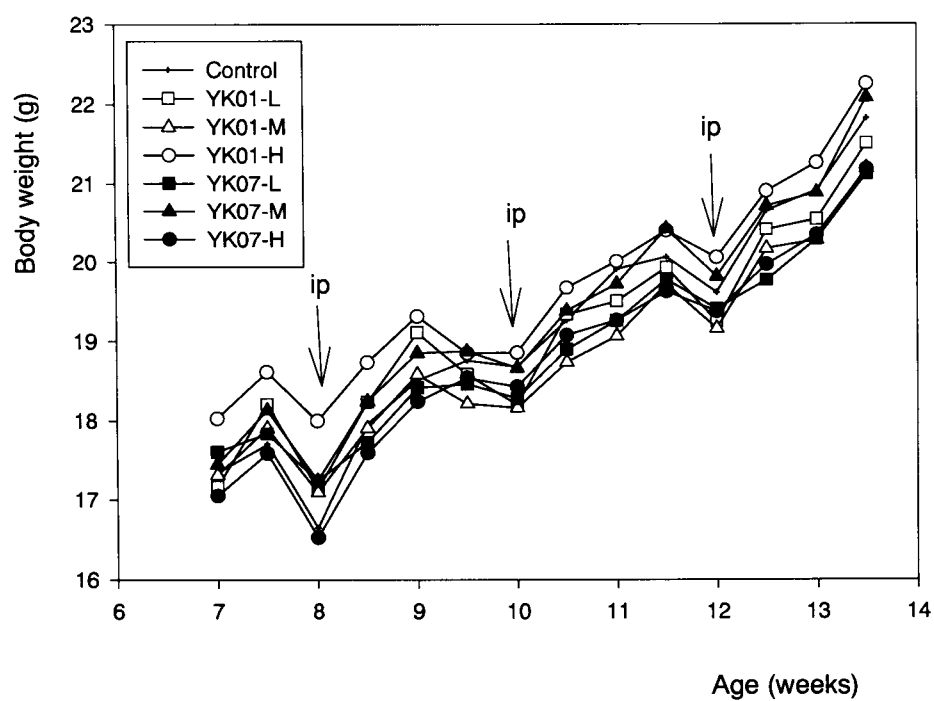


圖 5. 餵食靈芝對腹腔注射抗原之 BALB/c 雌鼠之生長曲線

Figure 5. The growth curve of mice supplemented with different dose of *Ganoderma tsuga* during the period of immunized experiment.

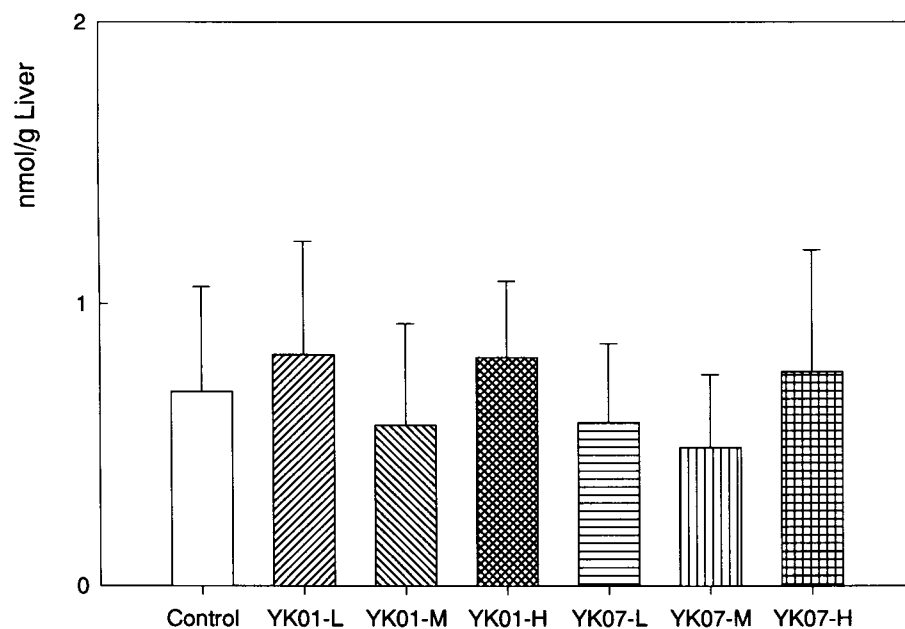


圖 6. 餵食靈芝對對腹腔注射抗原 BALB/c 雌鼠肝臟均質液中 TBARS 含量的影響

Figure 6. The effect of tube feeding with different dose of *Ganoderma tsuga* on TBARS content in liver homogenate of female BALB/c mice. Each value are presented as mean $\pm$ SD, n=10~12. Values analyzed by student's t-test .*, significant different at the 0.05 level compared with control.

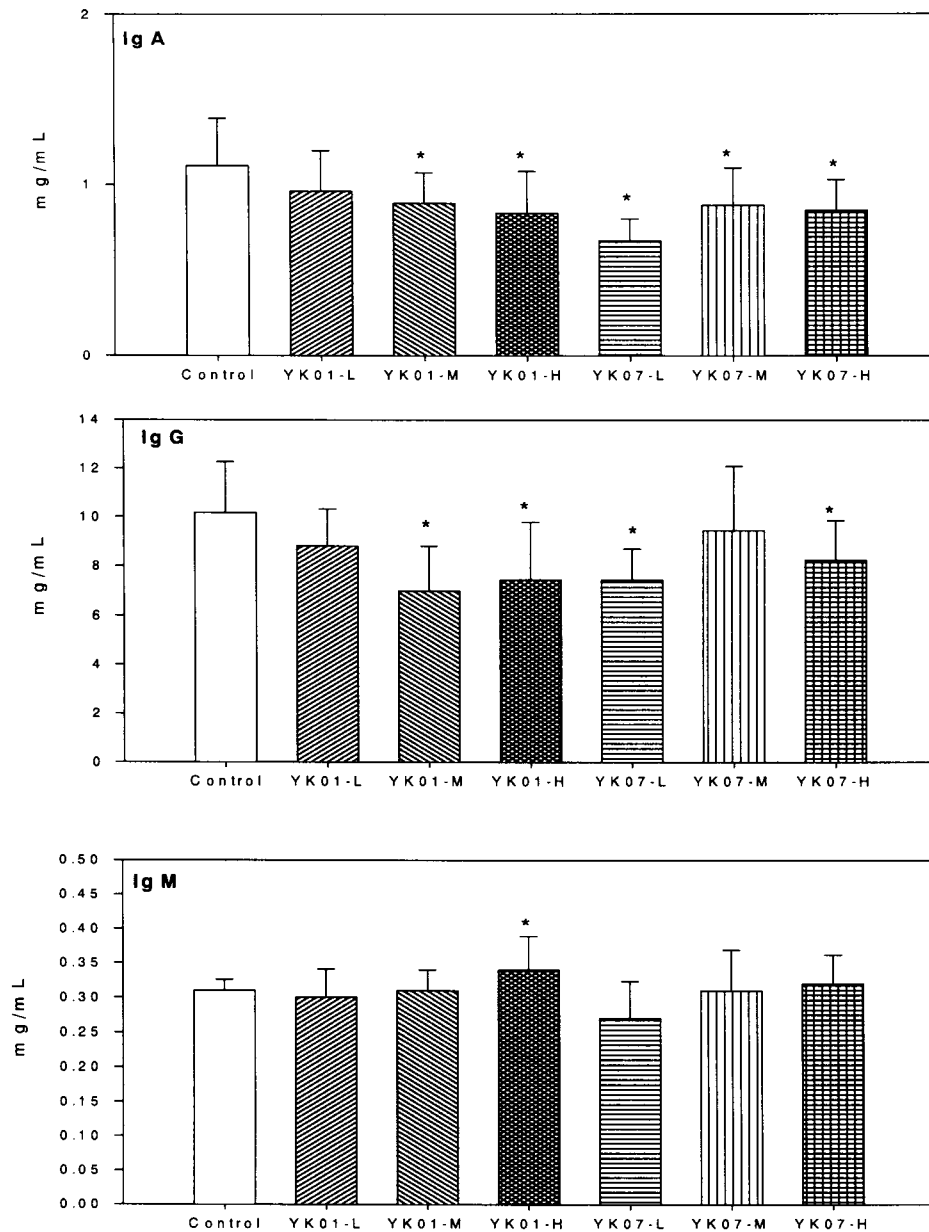


圖 7. 餵食靈芝對腹腔注射抗原之 BALB/c 雌鼠血清中 IgA、IgG 和 IgM 總含量之影響

Figure 7. The effect of tube feeding with different dose of *Ganoderma tsuga* on serum total IgA、IgG and IgM antibody content of female BALB/c mice immunized with OVA. Each value are presented as mean $\pm$ SD, n=11~12. Values analyzed by student's t-test. *, significant different at the 0.05 level compared with control.

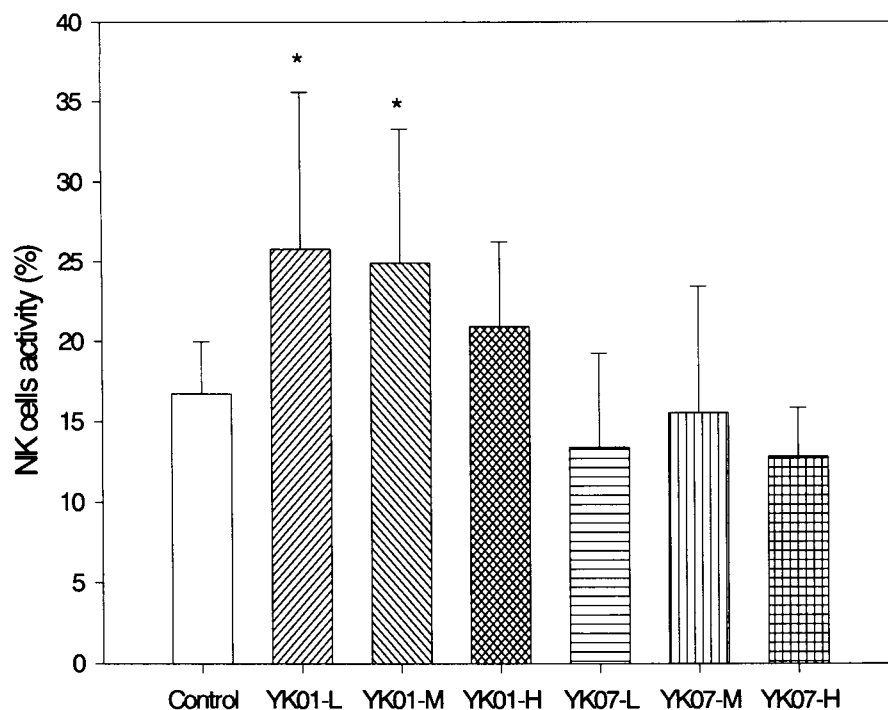


圖 8. 餵食靈芝產品 A 和靈芝產品 B 對腹腔注射抗原之 BALB/c 雌鼠腹腔中自然殺手細胞活性的影響

Figure 8. The effect of tube feeding with different dose of *Ganoderma lucidum* product on the activity of natural killer cells in the peritoneal. E/T = 80. Each value are presented as mean $\pm$ SD, n>10. Values analyzed by student's t-test, comparisons with control group, significant at the 0.05 level are indicated by *.

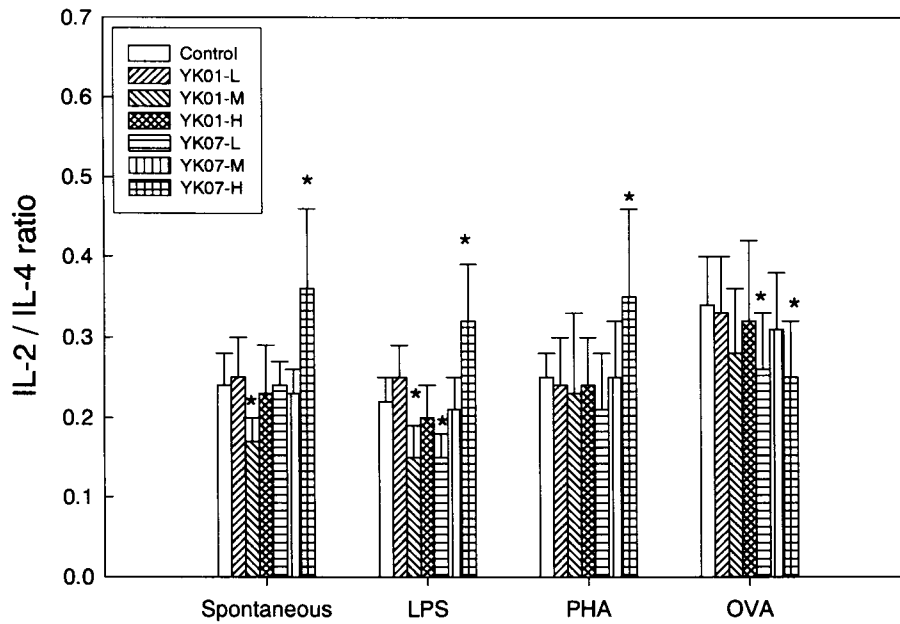


圖 9. 餵食靈芝對 BALB/c 小鼠脾臟細胞激素 IL-2/IL-4 比值之影響

Figure 8. The effect of tube feeding with different dose of *Ganoderma tsuga* on the ratio of Th1/Th2 cytokine of BALB/c mice immunized with OVA.