

元培醫事科技大學

生物科技暨製藥技術系碩士班

碩士論文

不同熟米麴萃取物抗發炎活性的探討

Investigation on Anti-Inflammatory Properties of
Different Extracts of Cooked Rice Koji

研 究 生：劉軍廷

指導教授：莊路德 教授

中 華 民 國 109 年 7 月

元培醫事科技大學 碩士學位

論文口試委員審定書

生物科技暨製藥技術系 學系 劉軍廷 君所提之
碩士班

論文

題目：

不同熟米麴萃取物抗發炎活性的探討

(英文)

Investigation on anti-inflammatory properties of
different extracts of cooked rice koji

經本委員會審議，認定符合碩士資格標準。

學位考試委員會 召集人 黃文程 (簽章)

委員 侯建維 (簽章)

委員 莊路遠 (簽章)

委員 _____ (簽章)

中 華 民 國 1 0 9 年 0 7 月 1 6 日

誌 謝

一眨眼的功夫三年就過去了。在這邊先感謝我的家人把我養這麼大，還沒有走偏，讓我順利進入到探討學術的殿堂。還記得剛進碩士班時，什麼都不會的情況，只有懷抱著對細胞實驗的熱情和對未來的憧憬，只是進實驗室後沒多久後就深刻的體悟到「福無雙至，禍不單行。」這句話的意思。先是接二連三的親屬過世，還有實驗的不順利，讓我產生的失落感與自我懷疑，對於自己是誰，該去哪裡都顯得非常迷茫。但隨著時間的流逝與家人和大學的朋友 林芷萱 的陪伴，讓我漸漸走出陰霾，讓我生活漸漸回到正軌，但只有回歸正軌是不夠的，我離我期望的未來還很遙遠，我的學術知識與實驗能力還不夠，多虧我的指導教授 莊路德 老師，細心的指導，不止讓我學會了很多實驗，也讓我思考與反省在實驗上的錯誤與如何改正。

感謝油脂生化實驗室畢業的學長姊們，多虧了 文程 學長讓我的論文找到方向，感謝 政諺 學長在細胞問題上的解惑，感謝 芮榆 學姊在實驗技術上的傳授與實驗室的管理盡心盡力。感謝實驗室學弟妹們（文鴻、佳竑、華倩、昱樺、玟秀）的幫忙，在油脂生化實驗室中的回憶我會好好珍惜。

感謝其他實驗室在我們實驗室遇到困難時，支援與幫助我們，讓我們實驗得以順利進行。

最後感謝元培提供良好的研究環境。電影在好終會結束，但這部電影的結局讓我能走向這部電影的續集，我會帶著在這部名為我的人生-碩士階段的劇情，讓我在未來的每個續集能接續下去。

劉軍廷 謹識

于元培醫事科技大學 生物技術暨製藥技術系碩士班

中華民國一百零九年

不同熟米麴萃取物抗發炎活性的探討

研究生：劉軍廷

指導教授：莊路德 教授

元培醫事科技大學生物科技暨製藥技術系碩士班

摘 要

麴是糧食作物經麴黴菌類發酵後的產物，包括米麴、紅麴、小麴等。米麴是以根黴菌 (*Rhizopus* spp.) 或米麴菌 (*Aspergillus* spp.) 進行發酵，更可分為以根黴菌發酵的生米麴、熟米麴和甜酒麴，也有用米麴菌發酵的米麴。一般而言，熟米麴在國內常被用來釀製白酒，對熟米麴所含成分的生物活性並不瞭解，因此想探討熟米麴萃取物的抗發炎活性。本研究是利用乙醇將根黴菌為主的熟米麴進行萃取，其萃取物再分別以正己烷、乙酸乙酯、丁醇和水依序進行萃取、減壓濃縮和凍乾機萃取。再以小鼠巨噬細胞模型進行熟米麴乙醇萃取物與其分萃物抗發炎活性的檢測與探討。

實驗結果證實熟米麴的乙醇萃取物在濃度超過 400 $\mu\text{g/mL}$ 時會影響細胞的增殖，而濃度 400 $\mu\text{g/mL}$ 以下的乙醇萃取物與其正己烷、乙酸乙酯、丁醇與水分萃物對脂多醣體刺激的細胞存活率影響不大。熟米麴的乙醇萃取物與其分萃物可抑制一氧化氮、介白素-6、腫瘤壞死因子- α 和前列腺素 E_2 的生成與第二型環氧化酶的表現。其中以乙酸乙酯分萃物對各項發炎介質的抑制效果最好。雖然熟米麴乙醇萃取物以及相關分萃物具有清除自由基的能力，其中又以乙醇萃取物，以及乙酸乙酯與丁醇分萃物具有較高的清除能力。不過萃取物的抗氧化能力與抗發炎無關。此外，各萃取物可調整細胞磷脂質脂肪酸組成，其與抗發炎活性的關聯還有待研究。總而言之，

熟米麴的乙醇萃取物與其四種分萃物皆能抑制發炎介質的生成，其中以乙酸乙酯的熟米麴分萃物的效果最佳。未來可利用熟米麴相關萃取物進行生技製藥相關產品的開發。

關鍵詞：熟米麴、萃取、發炎反應、乙酸乙酯、小鼠巨噬細胞



Investigation on anti-inflammatory properties of different extracts of cooked rice koji

Student: Jyun-Ting Liou

Advisor: Lu-Te Chuang, Ph.D.

Biotechnology and Pharmaceutical Technology

Yuanpei University of Medical Technology

Abstract

Koji is one of fermented products originally from food crops by koji molds, such as koji rice, red yeast rice, etc. Koji rice is divided into two categories. One is fermented mainly by *Rhizopus* spp., such as raw rice koji, cooked rice koji and sweet wine koji. The other is called as koji rice, which is fermented by *Aspergillus* spp. Generally speaking, cooked rice koji is used to make wine. No research has been conducted to determine functional ingredients of cooked rice koji, and to further investigate potential bioactivities to date. To this end, we first extracted cooked rice koji (CRK) with ethanol through combined techniques of liquid extraction, vacuum-evaporation and freeze-drying. Subsequently, we obtained four sub-fractions after the ethanol extract of CRK was extracted with hexane, followed by ethyl acetate, butanol and water, respectively. Using murine RAW264.7 macrophage cells, we further determined whether ethanolic CRK extract and its sub-fractions would exert anti-inflammatory properties.

Our results showed that ethanolic CRK extract affected cell proliferation when the concentration was greater than 400 $\mu\text{g/mL}$. However, when incubated lipopolysaccharide (LPS)-stimulated cells with ethanolic CRK extract or its four sub-fractions (400 $\mu\text{g/mL}$ or lower), no negative effect on cell viability was observed. Ethanol extract of CRK or its four sub-fractions significantly suppressed LPS-stimulated nitric oxide (NO), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and prostaglandin E_2 (PGE_2) production, and type II

cyclooxygenase (COX-2) expression. Among them, the ethyl acetate sub-fraction is the most potent fraction to suppress production or expression of most pro-inflammatory mediators. We demonstrated that ethanol, ethyl acetate and butanol extracts were three free radical scavengers, however, the antioxidant activities was unrelated to the potent anti-inflammatory properties. Furthermore, our results showed that all extracts altered cellular phospholipid fatty acid compositions, and future investigation focusing on fatty acid composition and anti-inflammatory properties is needed. In summary, ethanolic CRK extract and its four sub-fractions suppressed production of pro-inflammatory mediators, and the ethyl acetate fraction is the most potent agent. Results of this study provide better understandings of bioactive CRK extracts, and useful information for the future development of medical uses and nutritional supplementation.

Keywords: Cooked rice koji (CRK), Extract, Inflammation, Ethyl acetate, RAW264.7

目 錄

	頁次
口試委員審定書	I
誌謝	II
中文摘要	III
英文摘要	V
目錄	VII
圖目錄	X
表目錄	XII
 第一章 前言	 1
1.1. 熟米麴	1
1.1.1 白麴的種類	1
1.1.2 根黴菌的介紹	3
1.2. 免疫反應	4
1.2.1 發炎反應	4
1.2.2 巨噬細胞	5
1.2.3 脂多醣體	6
1.2.4 促發炎細胞介質	6
1.2.4.1 自由基	6
1.2.4.1.1 一氧化氮合成酶與一氧化氮	7
1.2.4.2 細胞激素	7
1.2.4.2.1 介白素-6	7
1.2.4.2.2 腫瘤壞死因子- α	8
1.2.4.3 脂質衍生物	8
1.2.4.3.1 前列腺素	8
1.3 脂肪酸	9
1.4 研究動機與目的	10
1.5 實驗架構	11

第二章 材料與方法	12
2.1.1 儀器設備	12
2.1.2 藥品與有機溶劑	14
2.1.3 免疫試劑套組	15
2.1.4 西方墨點法所使用的抗體	15
2.2 實驗樣品與細胞	15
2.2.1 實驗樣品	15
2.2.2 實驗細胞株	15
2.3 實驗樣品製備與細胞培養	16
2.3.1 實驗樣品製備	16
2.3.2 細胞培養的條件	17
2.3.3 細胞活化	18
2.3.4 細胞繼代	18
2.3.5 細胞凍管	19
2.3.6 細胞計數	19
2.4 自由基清除率檢測	20
2.5 細胞實驗	22
2.5.1 細胞存活率檢測	22
2.5.2 一氧化氮檢測	23
2.5.3 介白素-6 檢測 (IL-6 assay)	25
2.5.4 腫瘤壞死因子- α 檢測 (TNF- α assay)	28
2.5.5 前列腺素 E ₂ 檢測 (PGE ₂ assay)	31
2.5.6 西方墨點法 (Western Blot)	35
2.6 脂肪酸成份分析	40
2.7 統計分析	44
第三章 結果與討論	45
3.1 樣品回收率	45
3.2 細胞存活率	45

3.3 一氧化氮生成量檢測	49
3.4 介白素-6 生成量檢測.....	53
3.5 腫瘤壞死因子- α 生成量檢測	57
3.6 前列腺素 E2 生成量檢測	61
3.7 自由基清除能力之檢測.....	62
3.8 脂肪酸分析	64
3.9 第二型環氧化酶生成量檢測.....	66
 第四章 結論	 67
英文參考文獻.....	68
中文參考文獻.....	70



圖 目 錄

頁次

圖 1-1	白麴的分類.....	1
圖 2-1	小鼠巨噬細胞 RAW264.7 外觀	16
圖 2-2	血球計數器與細胞計數儀拍攝範圍	20
圖 2-3	前列腺素 E ₂ 分析套組平盤標記圖	33
圖 3-1	乙醇萃取物對細胞存活率之影響	46
圖 3-2	乙醇萃取物對活化的巨噬細胞之細胞存活率的影響	46
圖 3-3	正己烷萃取物對活化的巨噬細胞之細胞存活率的影響	47
圖 3-4	乙酸乙酯萃取物對活化的巨噬細胞之細胞存活率的影響	47
圖 3-5	丁醇萃取物對活化的巨噬細胞之細胞存活率的影響	48
圖 3-6	水萃取物對活化的巨噬細胞之細胞存活率的影響	48
圖 3-7	乙醇萃取物對巨噬細胞產生的一氧化氮之影響	49
圖 3-8	正己烷萃取物對巨噬細胞產生的一氧化氮之影響	50
圖 3-9	乙酸乙酯萃取物對巨噬細胞產生的一氧化氮之影響	50
圖 3-10	丁醇萃取物對巨噬細胞產生的一氧化氮之影響	51
圖 3-11	水萃取物對巨噬細胞產生的一氧化氮之影響	51
圖 3-12	乙醇萃取物與其分萃物對一氧化氮生成之影響	52
圖 3-13	乙醇萃取物對介白素-6 的影響	54
圖 3-14	正己烷萃取物對介白素-6 的影響	54

圖 3-15 乙酸乙酯萃取物對介白素-6 的影響	55
圖 3-16 丁醇萃取物對介白素-6 的影響	55
圖 3-17 水萃取物對介白素-6 的影響	56
圖 3-18 濃度在 200 μ g/mL 時各萃取物對介白素-6 的影響	57
圖 3-19 乙醇萃取物對腫瘤壞死因子- α 的影響	57
圖 3-20 正己烷萃取物對腫瘤壞死因子- α 的影響	58
圖 3-21 乙酸乙酯萃取物對腫瘤壞死因子- α 的影響	58
圖 3-22 丁醇萃取物對腫瘤壞死因子- α 的影響	59
圖 3-23 水萃取物對腫瘤壞死因子- α 的影響	59
圖 3-24 濃度在 200 μ g/mL 時各萃取物對腫瘤壞死因子- α 的影響	60
圖 3-25 濃度在 200 μ g/mL 時各萃取物對前列腺素 E2 的影響	61
圖 3-26 濃度在 200 μ g/mL 時各萃取物對第二型環氧化酶的影響	66

表 目 錄

頁次

表 1-1 米麴、熟米麴、生米麴與甜酒麴之間的比較	3
表 2-1 前列腺素 E ₂ 對應位置試劑添加一覽表	34
表 2-2 電泳膠配置流程.....	38
表 2-3 蛋白質定量與計算配方公式	39
表 3-1 不同萃取物對自由基清除率之影響	63
表 3-2 脂肪酸成份分析之結果.....	65



第一章 前言

1.1 熟米麴

1.1.1 白麴的種類與效果

麴是糧食作物經由麴黴菌類的微生物進行發酵產生出來的物品。麴有很多種類，大家最耳熟能詳的白麴、紅麴、鹽麴、黑麴和黃麴...等。而其中白麴又可細分為使用根黴菌 (*Rhizopus* spp.) 為主發酵後的熟米麴、生米麴和甜酒麴，以及米麴菌 (*Aspergillus oryzae*) 為主發酵的米麴 (邱，2002)。熟米麴、生米麴與甜酒麴雖然都是使用根黴菌 (*Rhizopus* spp.)，卻是由生理特徵有些微差異的不同的根黴菌發酵，也導致這些白麴之間的差異(表 1-1)。

由米麴菌與根黴菌釀製的白麴其最大差異是在兩者培養後的型態。米麴菌發酵培養後，米的形態會顆粒分明，根黴菌發酵培養後，米的型態會黏在一起；所以在使用米麴菌培養時大多使用米培養，根黴菌的培養會使用米研磨後的粉去培養(林，2002)。米麴的英文為 Koji rice，意思為發酵的米，米麴需要使用蒸煮過後的澱粉米去發酵生產，目前已知經米麴菌發酵後的糙米或米糠產物具有抗發炎、抗氧化與抗癌的效果 (Onuma *et al.*, 2015)。

熟米麴與米麴一樣需要使用蒸煮過的澱粉米粉去發酵生產，是種傳統釀造白酒所使用的酒麴。熟米麴其共生菌種比生米麴與甜酒麴還要複雜，在發酵的過程中產生獨特的香氣，又因為也是以蒸煮的澱粉為培養基，常被誤認是米麴。生米麴是為了追求生產效率，而從熟米麴改進出來的產物。生米麴與熟米麴不同之處，在於生米麴使用生澱粉進行發酵生產，不需要經過蒸煮加熱就可直接將生澱粉水解產生葡萄糖跟酒精。因為減少蒸煮的

時間加上操作步驟簡單，所以大多數商家都會選擇以生米麴來釀酒，不過它的香氣遠不如熟米麴。甜酒麴則是用於製造甜酒釀。甜酒麴的發酵與熟米麴一樣使用根黴菌，但因其與熟米麴的菌株特性較為不同，甜酒麴發酵出的酒釀甜度較高，酒精含量較低。使用以甜酒麴發酵糯米後產生的酒釀有促進血液循環與減緩風濕性關節炎的功能（卉子，2013）。



圖1-1 白麴的分類 A. 米麴 B. 生米麴 C. 熟米麴 D. 甜酒麴

表1-1 米麴、熟米麴、生米麴與甜酒麴之間的比較

統稱	白麴			
市面名稱	米麴	熟米麴	生米麴	甜酒麴
英文名稱	Koji rice	Cooked rice koji	Raw rice koji	Sweet wine koji
主要菌種	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Rhizopus</i> spp.
培養基	蒸煮過後的米	蒸煮過後的米粉	未蒸煮的米	蒸煮過後的米粉
特點	日本釀製清酒，具抗發炎效果。	台灣傳統釀酒，香氣獨特。	可以使用生澱粉，進行發酵。	酒味較甜，酒精濃度低。

1.1.2 根黴菌的介紹

根黴菌在分類學上是屬於真菌界毛黴門毛黴目毛黴科根黴屬的菌，在種類上有非常多種，其中以米根黴菌 (*Rhizopus oryzae*)、寡孢根黴菌(*Rhizopus oligosporus*)和小孢根黴菌(*Rhizopus microspores*) 等較為常見(Robert Nout & Kiers., 2005)。根黴菌的適合溫度 30-37°C、微酸與氧氣充足的環境下生長，氧氣不足時會影響生長 (胡，2014)。根黴菌比米麴菌含有更豐富的糖化型澱粉酶，可將高比例的澱粉轉化至可發酵性糖，接近於完全轉化；但其液化型澱粉酶含量較少，導致糖化反應速度較慢。根黴菌還內含酒化黴，使其能在糖化時進行發酵，所以發酵的較為徹底；將澱粉轉化為酒的效率較為完全，酒精出產率也能進一步的提高 (劉，2017)。此外，根黴菌能產生出乳酸、脂肪酶和延胡索酸等 (Rauch *et al.*, 1950)。不過根黴菌為條件致病菌，在一定條件下平衡產生變化時，原本不會致病的菌變化為致

病菌，會導致澱粉類的食品發黴使其變質(Hiol *et al.*, 2000)。

1.2 免疫反應

1.2.1 發炎反應

人體內的免疫系統分為先天性免疫與後天性免疫，其中的差異除了參與細胞不同，後天性免疫系統更具有專一性與記憶性的特質，先天性的免疫系統則無。發炎反應是屬於先天性免疫系統的一部分。當外來物質入侵，經過黏膜與皮膚進入體內，免疫系統為了抵禦異物入侵，白血球會開始移動到患處，並在清除外來物的過程會產生紅、腫、熱、痛的免疫反應(Jane way *et al.*, 2001)。

免疫系統中的白血球，依種類分為專職吞噬細胞 (Professional phagocytes) 和非專職吞噬細胞 (Non-professional phagocytes)，專職吞噬細胞可分為肥大細胞 (Mast cells)、樹突細胞 (Dendritic cells)、巨噬細胞(Macrophages)、嗜中性球 (Neutrophils)等，非專職吞噬細胞則有漿細胞(Plasma cells) (Hazenbos & Brown, 2006)。

當外來物入侵時，肥大細胞會釋放組織胺，使微血管通透性增加，讓白血球進入微血管。白血球因為趨化性的引導會移動到外來物入侵的位置，當血管通透性增加時身體會產生紅的反應(Mehta *et al.*, 2014)。而白血球抵達入侵處時則會產生腫脹的現象，同時分泌發炎物質與自由基。當發炎介質產生後並將訊息傳遞至大腦發燒的現象，並且會刺激末梢神經而產生疼痛感(司，2015)。

發炎反應是為了防禦外來物入侵的機制，當入侵因子被排除後，體內免疫系統持續進行修復，使發炎反應消退。適度的發炎反應有助於組織結

構與功能的修復，不過當環境、病原體或其他因素導致體內長期處於發炎時，將可能轉變為慢性發炎，反而對組織造成傷害，嚴重時將使功能喪失 (Pahwa *et al.*, 2020)。

1.2.2 巨噬細胞

骨髓中的單核球的先驅細胞顆粒球 (Granulocytes) 會分化成前單核球 (Promonocytes)，當前單核球進入到血液後會進一步的分化變成單核球 (Monocytes)(Furth & Beekhuizen, 1998)。當單核球成熟後進入到不同組織、器官時會在分化成各種巨噬細胞，名稱也大不相同。在淋巴結與脾臟內發現的通稱為巨噬細胞。巨噬細胞也可分為只出現在特定器官的固定型巨噬細胞，以及以阿米巴方式進行遊走的遊走型巨噬細胞 (王 等，2014)。

巨噬細胞可經由免疫反應中的各種刺激而進行活化。例如，巨噬細胞被細胞激素 (Cytokines) 或細菌細胞壁上的結構刺激後，將使其吞噬功能被活化。當微生物入侵時，巨噬細胞會因為趨化作用前往入侵處，活化後的巨噬細胞會利用細胞膜會形成偽足，並將微生物吞噬。為了將吞噬後的微生物消滅，巨噬細胞會利用兩種機制。一、氧依賴性毒殺機制：利用活化後產生的活性氧中間產物或活性氮中間產物，將微生物的細胞膜結構破壞、DNA 長鏈打斷，並使蛋白質變性。二、非氧依賴性毒殺機制：利用吞噬微生物產生的吞噬小體，再與溶小體結合成「吞噬溶小體」，吞噬溶小體富含水解酶和溶解酶，可進行消化作用來分解微生物 (王 等，2014)。抗原經過消化作用後會活化輔助者 T 細胞 (Helper T cells)，被活化的輔助者 T 細胞會進一步活化細胞毒性 T 細胞 (Cytotoxic T cells)，細胞毒性 T 細胞會毒殺抗原，這時輔助者 T 細胞會將特定的細胞毒性 T 細胞轉變為記憶 T 細胞 (Memory T cells)，當下次相同的抗原入侵時，可以快速辨識，

並且記憶 T 細胞會立刻活化細胞毒性 T 細胞，使其快速清除抗原（呂，2011）。

1.2.3 脂多醣體

脂多醣體是格蘭氏陰性細菌細胞壁上的成份，當細菌死亡、溶解後才會被釋出(Silhavy *et al.*, 2010)。脂多醣體可引發全身性的發炎反應，嚴重時將導致全身性敗血性休克(Bosmann & Ward, 2012)。脂多醣體的結構可分為 O-抗原、核心多糖、與 Lipid A，其中 O-抗原是抗原決定分子，其結構的變化非常多；Lipid A 結構變化較少，不過，Lipid A 是脂多醣體的主要毒性成分(YL Tzeng *et al.*, 2002)。巨噬細胞辨識脂多醣體的主要受器為 TLR4 (Toll-like receptor 4)，但 TLR4 無法直接識別脂多醣體，所以透過巨噬細胞分泌出 CD14 蛋白 (cluster of differentiation 14)，脂多醣體的 Lipid A 連接著與脂多醣體結合蛋白的胺基端結合，而脂多醣體結合蛋白的羧基端會與 CD14 結合，CD14 通過醣醯磷脂醯肌醇 (Glycosylphosphatidylinositol) 錨定於細胞膜上 (Simmons, 1989)。TLR4 利用其是 CD14 的信號共受體來識別脂多醣體，並傳遞信號路徑 (Arroyo-Espliguero *et al.*, 2004)。在有關發炎研究的實驗設計裡常使用脂多醣體當刺激物去刺激細胞。

1.2.4 促發炎介質

當巨噬細胞受到脂多醣體或其他物質刺激時會產生三大類的發炎介質，分別為活性氧物質 (Reactive oxygen species; ROS) 或活性氮物質 (Reactive nitrogen species; RNS)、脂質衍生物 Eicosanoids 和細胞激素 (梁 等，2004)。

1.2.4.1 自由基

任何分子只要含有單一或多個不成對的電子即為自由基，因為有不穩定的電子，很容易與其他外圍帶單電子的分子產生反應或搶奪其他分子的電子(林，2011)。自由基大致可分為兩類，第一類為活性氧物質，這類物質包含超氧游離基 (Superoxide anion) 和過氧化氫 (Hydrogen peroxide) 等，活性氧物質會使細胞與組織損傷，使膜磷脂質過氧化 (廖 等，2008)。第二類為活性氮物質，當高濃度的一氧化氮 (Nitric oxide; NO) 在細胞膜上，導致其與氧產生反應，形成各種中間產物，這些中間產物會在細胞膜上產生大量的的自由基，自由基會使細胞膜損傷 (Patel *et al.*, 1999)。

當外來物質入侵時，巨噬細胞開始活化，在吞噬微生物後，為了消滅微生物，巨噬細胞會產生自由基。自由基在適量的情況下可以抵禦微生物的入侵，但自由基也會進行無差別的破壞；但人體體內有一些抗氧化劑能攔截一部份的攻擊，造成的損傷可以進行修補(劉，2016)。當身體持續產生發炎反應，巨噬細胞過量生成自由基時，平衡被破壞，人體的修復速度趕不上自由基連鎖反應的破壞時，傷害持續的造成，導致出現器官老化、皮膚呈現鬆弛、免疫力開始降低，更嚴重可能產生癌症 (金 等，2010)。

1.2.4.1.1 一氧化氮合酶與一氧化氮

在一般情況時，體內內皮細胞與神經元細胞分別會利用內皮型一氧化氮合酶 (Endothelial nitric oxide synthase; eNOS) 和神經型一氧化氮合酶 (Neuronal nitric oxide synthase; nNOS) 與精氨酸 (Arginine) 反應生成一氧化氮(Sharma *et al.*, 2007)。一氧化氮對人體的幫助非常大，其具有擴張血管、改善性功能、抵抗外來物入侵等功能 (林，1997)。在人體因外來物入侵產生發炎反應時，免疫細胞內的誘導型一氧化氮合酶 (Inducible nitric

oxide synthase; iNOS) 經過誘導後高度的活化，並產生大量一氧化氮，導致血管過度的擴張與放鬆，器官局部缺血(Xue *et al.*, 2018)。當過量的一氧化氮長期產生，容易造成正常細胞的損傷，並讓急性發炎逐漸轉為慢性發炎。

1.2.4.2 細胞激素

1.2.4.2.1 介白素-6

細胞受到外來物刺激後，為了抵禦外來物入侵，巨噬細胞會將微生物吞噬與消化，過程中將會分泌的細胞激素。細胞激素具有讓細胞活化、細胞增生與細胞分化的功能 (王 等，2014)。介白素-6 (Interleukin-6; IL-6) 與腫瘤壞死因子- α (Tumor necrosis factor- α ; TNF- α) 都具有提高體溫的作用，體溫的提升，導致微生物的複製能力下降 (王 等，2014)。

1.2.4.2.2 腫瘤壞死因子- α

人體中的腫瘤壞死因子具有提升 T 細胞與 B 細胞的生成、分化與抗體的產生，根據其分泌的細胞分為兩類，第一類為巨噬細胞所分泌的腫瘤壞死因子- α ，第二類為經過活化後的 T 細胞所產生。腫瘤壞死因子- α 是種多功能的細胞激素具有提高發炎反應的功效、刺激肝細胞使其產生急性期蛋白並促進細胞凋亡 (王 等，2014)，在調控脂質代謝的功能 (連，2008)。從病理的角度上，哮喘、類風濕性關節炎和感染性休克皆與腫瘤壞死因子- α 有關(Berry *et al.*, 2007)。當脂多醣體刺激巨噬細胞產生過量的腫瘤壞死因子- α ，將可能引起心臟損害和呼吸道衰竭，更嚴重可能到致死亡 (王 等，

2014)。

1.2.4.3 脂質衍生物

花生四烯酸在經由環氧化酶的作用會產生前列腺素 (Prostaglandin)、白三烯 (Leukotriene) 與血栓素 (Thromboxane)(Smith.,1989)。

1.2.4.3.1 前列腺素

當身體受到刺激時可以在受刺激部位發現大量環氧化酶-2 (Cyclooxygenase-2; COX-2) 的表現。花生四烯酸 (Arachidonic acid; AA) 主要存在於細胞膜結構的磷脂質裡 (許 等, 2001), 經由環氧化酶催化生成 Prostaglandin G_2 (PGG_2), 接著 Prostaglandin G_2 再氧化成 Prostaglandin H_2 , Prostaglandin H_2 因不同的酵素轉換成 Prostaglandin E_2 、Prostaglandin D_2 和 Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (林, 2015)。前列腺素 E_2 會促使血管的通透性增加 (許, 2001), 並且誘導發炎反應的產生 (Kuehl & Egan, 1980)。

1.3 脂肪酸

脂肪酸通常含有偶數的碳原子, 其中十六碳和十八碳較為常見。一般脂肪酸可分為飽和脂肪酸和不飽和脂肪酸這兩類, 在不飽和脂肪酸中又分為單元不飽和脂肪酸與多元不飽和脂肪酸。多元不飽和脂肪酸為必需脂肪酸, 單元不飽和脂肪酸為非必需脂肪酸。必需脂肪酸中的 Omega-3 和 Omega-6 無法依靠體內自行合成, 需要依靠飲食進行攝取。Omega-3 多元不飽和脂肪酸的 Eicosapentaenoic acid (EPA) 與 Docosahexaenoic Acid (DHA) 具有透過抑制花生四烯酸 (Arachidonic acid; AA) 代謝成前列腺素 (Prostag

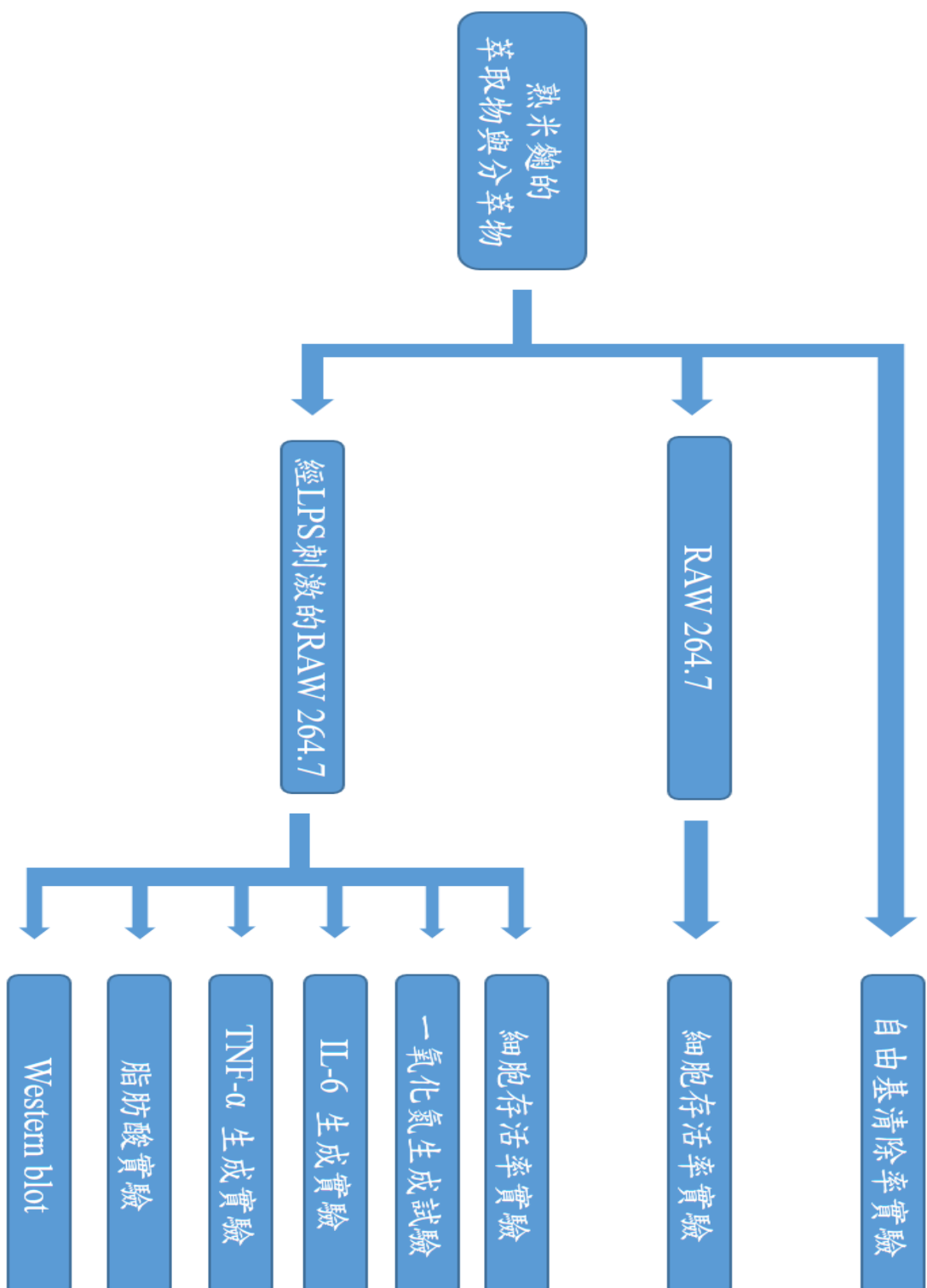
landin)，降低發炎反應 (Basch *et al.*, 2006)。Omega-6 多元不飽和脂肪酸的 Gamma Linolenic acid (GLA) 會進一步代謝為 Dihomogamma linolenic acid (DGLA)，DGLA 通過環氧化酶(Cyclooxygenase; COX)和脂氧化酶(Lipoxygenases; LOX) 進行氧化代謝，產生具有抗發炎作用的類二十酸(Eicosanoids)(Kapoor & Huang, 2006)。Omega-6 多元不飽和脂肪酸的花生四烯酸對於發炎具有促進的效果 (Cranmer-Byng *et al.*, 2015)。

1.4 研究動機與目的

在這個大家對健康越來越重視的時代，有很多健康食品的誕生，而紅麴與米麴在某段時間非常的出名。紅麴與米麴之前都用於釀酒的產業上，不過在日本人發現這兩個麴菌可能會生成對人體有益的成份時，學術界對這兩者在人體的相關實驗也就越來越多。當提到「麴」時，大眾最先想到的是紅麴，再來是白麴，但本研究所聚集的白麴是大眾印象最深的米麴，然而同被稱為白麴的熟米麴、生米麴與甜酒麴，鮮為人知；更時常被搞混。目前在應用上，米麴因具有美白與抗氧化的特性，目前市面上有較多相關萃取物製作的保養品。甜酒麴具有促進血液循環與減緩風濕性關節炎的功能，所以市面上也有販售甜酒麴粉。生米麴的特性是可用生澱粉進行發酵，是釀酒工廠的首選。熟米麴具有獨特的香氣，但在效率上輸於生米麴。同為釀酒的紅麴與米麴皆發現具有抗發炎的功效，所以推測熟米麴、生米麴與甜酒麴也可能具有抗發炎的能力。本研究使用熟米麴作為萃取樣品是因為熟米麴比其他兩者的共生菌還要多，相對可能有更多的代謝物。

本研究使用小鼠巨噬細胞作為基礎模型，以脂多醣作為刺激條件，來探討熟米麴萃取物對發炎反應的影響，以及探討其相關發炎機制。

1.5 實驗架構



第二章 材料與方法

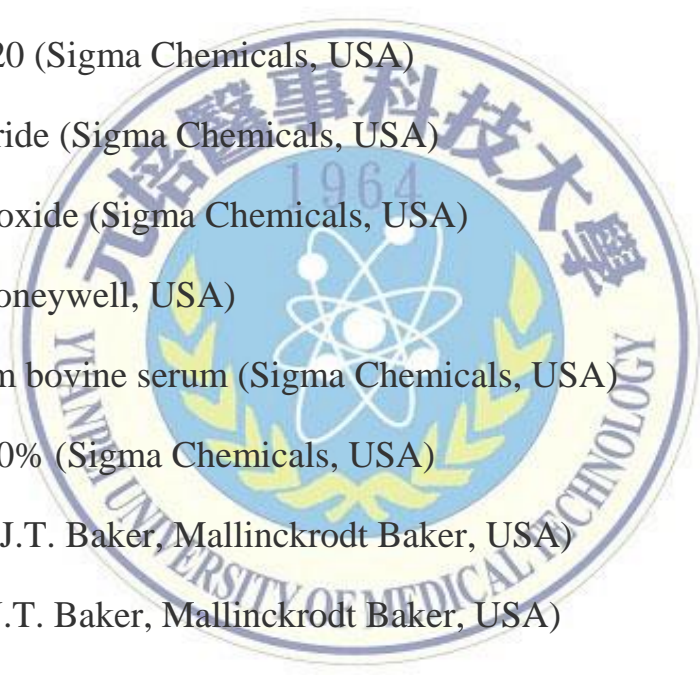
2.1.1 儀器設備

- (1) 電子天平 (PL3002, Mettler Toledo, Swiss)
- (2) 超音波震盪機 (Elma, T710DH, Germany)
- (3) 吸管輔助器 (Pipet-Aid XP, Drummond, USA)
- (4) 斜式真空減壓旋轉濃縮機 (N-1000S, Eyela, Japan)
- (5) 水流抽氣機 (AS-3, New Lab, USA)
- (6) 桌上型冷凍離心機 (Universal 320R, Andreas Hettich GmbH & CO. KG, Germany)
- (7) 桌上型冷凍迷你微量離心機 (Microfuge 22R, Beckmen Coulter, USA)
- (8) 無菌操作台 (Yuan Chiao, Taiwan)
- (9) 二氧化碳恆溫培養箱 (MCO-18AC, Sanyo Electric Co., Ltd., Japan)
- (10) 血球計數儀 (6749, Corning, Netherlands)
- (11) 恆溫水浴槽 (830-S1, Hotech, Taiwan)
- (12) 微盤酵素免疫分析儀 (Multiskan Sky, ThermoFisher, USA)
- (13) 倒立相位差顯微鏡 (TS100, Nikon, Japan)
- (14) 吸引器 (Rocker 300, Today's, Taiwan)
- (15) 烘箱 (DOS45, Dengyng, Taiwan)
- (16) 冷凍乾燥機 (FD-5N, Eyela, Japan)
- (17) 乾式試管加熱器 (DB16525, Thermo-Fisher Scientific, USA)
- (18) 試管震盪器 (Vortex Genie II, Scientific Industries, USA)
- (19) 翹翹板式震盪器 (MS-NRK-30, Major Science, USA)

- (20) 酸鹼測定儀 (SP-701, Suntex, Taiwan)
- (21) 電磁加熱攪拌器 (PC-320, Corning, USA)
- (22) 紫外線觀察箱 (C-70G, Analytik Jena, Germany)
- (23) 蛋白質垂直電泳槽 (VE-180, Tanon, China)
- (24) 冷螢光影像擷取分析儀 (Cheni BIO RAD, France)
- (25) 濕式蛋白質轉印器 (MEBM10, Saratoga, USA)
- (26) 氣相層析質譜儀 (Agilent Technologies, USA)

2.1.2 藥品與有機溶劑

- (1) Ethanol (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, USA)
- (2) n-Hexane (Macron Fine Chemicals™, USA)
- (3) Ethyl acetate (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, USA)
- (4) 1-Butanol (Duksan, Korea)
- (5) Acetic acid (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, USA)
- (6) Trypan blue stain (Gibco, USA)
- (7) Lipopolysaccharide (Sigma Chemicals, USA)
- (8) Isopropanol (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, USA)
- (9) Dulbecco's Modified of Eagle's Medium (Corning, USA)
- (10) Dimethyl sulfoxide (Sigma Chemicals, USA)
- (11) Fetal bovine serum (Gibco, USA)
- (12) 3-[45-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-terazolium bromide (Sigma Chemicals, USA)
- (13) Phosphoric acid (Sigma Chemicals, USA)

- 
- (14) Sulfanilamide (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, USA)
- (15) Sulfuric acid (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, USA)
- (16) Phosphate buffered saline (Gibco, USA)
- (17) Lysis buffer (Sigma Chemicals, USA)
- (18) Tris-base (Sigma Chemicals, USA)
- (19) Polysorbate 20 (Sigma Chemicals, USA)
- (20) Sodium chloride (Sigma Chemicals, USA)
- (21) Sodium hydroxide (Sigma Chemicals, USA)
- (22) Methanol (Honeywell, USA)
- (23) Albumin from bovine serum (Sigma Chemicals, USA)
- (24) Acryamide 30% (Sigma Chemicals, USA)
- (25) Chloroform (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, USA)
- (26) Ethyl ether (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, USA)
- (27) Glycine (Sigma Chemicals, USA)
- (28) Hydrochloric acid (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, USA)
- (29) Lipopolysaccharides (Sigma Chemicals, USA)
- (30) Lysis buffer (Sigma Chemicals, USA)
- (31) N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (Sigma Chemicals, USA)
- (32) Sodium dodecyl sulfate (Sigma Chemicals, USA)
- (33) 2,7-Dichlorofluorescein (Sigma Chemicals, USA)
- (34) *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (Matrix Scientific, USA)
- (35) Pyridine (Showa Chemical Co. Ltd, Japan)

2.1.3 免疫試劑套組

- (1) Elisa Max™ Deluxe Set Mouse IL-6 (BioLegend, USA)
- (2) Elisa Max™ Deluxe Set Mouse TNF- α (BioLegend, USA)
- (3) Prostaglandin E₂ ELISA kit-Monoclonal (Cayman Chemical, USA)

2.1.4 西方墨點法所使用的抗體

- (1) Beta Tubulin antibody (iReal Biotechnology, Taiwan)
- (2) COX-2 antibody (iReal Biotechnology, Taiwan)
- (3) iNOS / NOS2 antibody (iReal Biotechnology, Taiwan)

2.2 實驗樣品與細胞

2.2.1 實驗樣品

市售熟米麩 (金漢國際有限公司，台灣)。

2.2.2 實驗細胞株

細胞株為小鼠巨噬細胞 RAW264.7 (ATCC Number: TIB-71)(圖 2-1)。

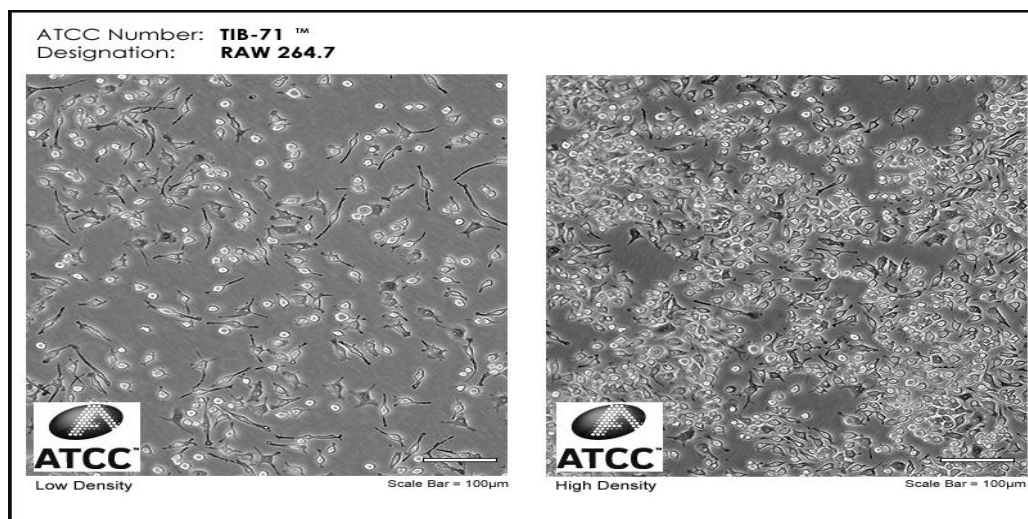


圖 2-1 小鼠巨噬細胞 RAW 264.7 外觀 (ATCC® TIB-71™)

2.3 實驗樣品製備與細胞培養

製備方式參考(黃，2015)

2.3.1 實驗樣品製備

1. 秤取 40 g 熟米麴置入 1000 mL 的 95% 酒精當中。
2. 進行超音波震盪 2 小時，靜置 16 小時。
3. 接著在 65°C 的條件下進行減壓濃縮，萃取完後收集樣品。
4. 使用氮氣吹至黏稠後秤重計算回收率。
5. 取 5 g 的乙醇萃取物回溶在 250 mL 的正己烷，並加入 250 mL 的去離子水，上下震盪混合 15 分鐘。
6. 混合後放入分液漏斗等待分層，收集正己烷層。

7. 在 65°C 的條件下進行減壓濃縮，萃取完後收集樣品。
 8. 使用氮氣吹至黏稠後秤重計算回收率。
 9. 剩下的水層加入等量的乙酸乙酯，上下震盪混合 15 分鐘。
 10. 混合後放入分液漏斗等待分層，收集乙酸乙酯層。
 11. 在 72°C 的條件下進行減壓濃縮，萃取完後收集樣品。
 12. 使用氮氣吹至黏稠後秤重計算回收率。
 13. 剩餘水層加入等量的丁醇，上下震盪混合 15 分鐘。
 14. 混合後放入分液漏斗等待分層。
 15. 收集丁醇層，在 100°C 的條件下進行減壓濃縮，因水浴槽溫度最高到 95°C，所以需要在水浴槽上蓋鋁箔紙，萃取完後收集樣品。
 16. 使用氮氣吹至黏稠後秤重計算回收率。
 17. 剩餘水層進行冷凍乾燥，秤重計算回收率。
- * 以上萃取的樣品皆儲存於 -20°C 冰箱

2.3.2 細胞培養條件

使用的培養基為含 10% 胎牛血清 (Fetal bovine serum; FBS) 的 High Glucose Medium (DMEM) 培養基。培養環境為 5% CO₂，37°C 的恆溫培養箱。

2.3.3 細胞活化

1. 將 8 mL 的含有胎牛血清的培養基置入 10 公分的培養皿。
2. 接著在 37°C 的水浴中槽中解凍小鼠巨噬細胞，等細胞液完全解凍。
3. 以 10 mL/分鐘的速度把細胞液緩緩的加入到有培養皿中。
4. 緩緩搖晃，使其均勻分布，等待 4 小時。
5. 把含有 DMSO 的培養基移除，取乾淨的培養基 8 mL 加入至培養皿。

2.3.4 細胞繼代

1. 移除舊的培養基，吸取含有胎牛血清的培養基 1 mL 沖洗黏貼在培養皿上的小鼠巨噬細胞，沖洗乾淨。
 2. 將含有細胞的培養基移至 1.5 mL 微量離心管。
 3. 將離心管以 1000 rpm，25°C 的條件下離心 3 分鐘。
 4. 移除上清液，將 1 mL 的培養基回溶細胞，混合均勻。
 5. 在依生長速度與細胞量，取 150 μ L 至 250 μ L 細胞液移至新的培養基中。
 6. 緩緩搖晃，使其均勻分布。
 7. 放入恆溫培養箱進行培養。
- * 細胞長至超過七分滿即可繼代，時間為 2 至 3 天一次。

2.3.5 細胞凍管

1. 先配置含有 10% DMSO 的培養基，
 2. DMSO 加到培養基時會產生放熱反應，需等待 5 至 10 分鐘，以避免傷害細胞。
 3. 依細胞繼代的條件進行離心，移除上清液。
 4. 將放熱反應結束的含有 DMSO 培養基緩慢的加入，混合均勻
 5. 將其移至冷凍小管中，並把冷凍小管放進預冷的漸凍盒。
 6. 先儲存於 -80°C 冰箱，等待 16 小時。
 7. 把冷凍管轉移至液態氮中進行保存。
- * 細胞長至超過七分滿時即可進行凍管。

2.3.6 細胞計數

1. 依細胞繼代的方法與條件收集細胞和離心。
2. 移除上清液，回溶 1 mL 含有胎牛血清的培養基，混合均勻。
3. 取 20 μL 將其用 1 倍的 PBS 稀釋 30 倍。
4. 為了將細胞進行染色，使用 Trypan blue 以 1 : 1 的比例加入。
5. 在血球計數器的兩個方格之中各注入 12 μL 以染色的細胞稀釋液。
6. 使用細胞計數儀進行拍攝計數。

* 計數儀拍攝範圍如圖 2-2。

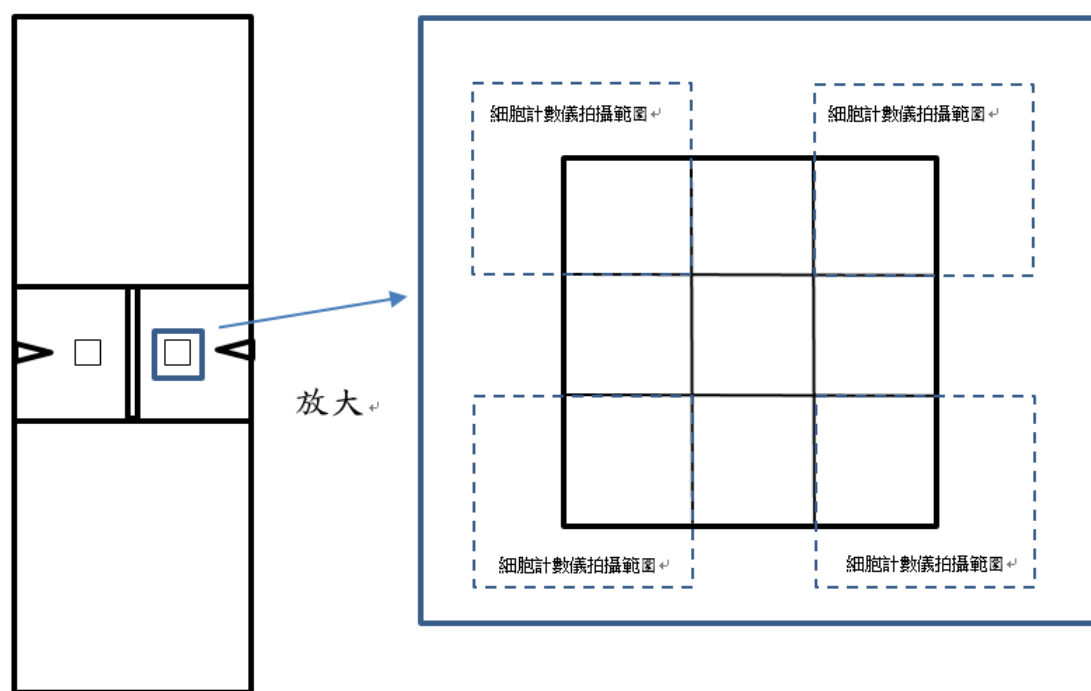


圖 2-2 血球計數器與細胞計數儀拍攝範圍

2.4 自由基清除率檢測

(1) 原理

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 是一種穩定的自由基，其溶於甲醇或乙醇時會呈現紫紅色，在 515 nm - 520 nm 的範圍內其吸收波峰為最大值。DPPH 結構裡的一個氮原子具有一個孤對電子。當 DPPH 加入具有清

除自由基能力的物質時，該孤對電子會產生配對，呈紫紅色的自由基會還原成黃色的非自由基物質。顏色越黃代表配對的電子越多，但吸光值會越低，所以吸光值與自由基清除率越呈反比。

(2) 實驗所需配置的試劑

1. DPPH 試劑：將 DPPH 回溶至甲醇當中，將其稀釋至 0.5 mM 的濃度。
2. 1 mg/mL 兒茶素：秤取兒茶素用去離子水進行回溶，使其濃度變為 1 mg/mL。

(3) 實驗步驟

1. 各種有機溶劑萃取的熟米麴溶於水中，並稀釋呈不同濃度。
2. 將水、兒茶素與不同濃度的各種有機溶劑萃取的熟米麴取 50 mL/well 加至 96 孔盤。
3. 將 DPPH 100 mL/well 加至 96 孔盤。
4. 每 20 分鐘進行檢測，檢測 3 次，後面皆為每 1 小時進行檢測，檢測 2 次，每次檢測皆在 520 nm 的條件下檢測其吸光值，讀取吸光值期間須維持在黑暗中。
5. 測出的吸光值經由公式換算成自由基清除率，再換算出 Inhibitory Concentration 50 (IC₅₀) 的值。



2.5 細胞實驗

2.5.1 各種熟米麴萃取物對細胞存活率的影響

(1) 原理

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 是一種用於檢測細胞存活率的水溶性黃色鹽類染料。其經由胞飲作用進入細胞，粒線體裡的琥珀酸脫氫酶會使 Tetrazolium Ring 結構因為還原而破壞，並因為細胞色素 C 而產生甲臍 (Formazan) 並堆積於細胞內，甲臍的顏色為藍紫色，其不溶於水。因為琥珀酸脫氫酶只會出現在活細胞內，而細胞死亡後琥珀酸脫氫酶會消失，所以甲臍的生成量與活細胞成正比，吸光值越高，細胞的存活率越高。

(2) 實驗所需配置的試劑

1. MTT 試劑：MTT 粉末溶於 1 倍的 PBS，濃度配置成 5 mg/mL，以 0.22 μ m 無菌濾膜過濾，儲存於 -20°C 冰箱，將其儲存器皿外包覆一層鋁箔紙避免其受到光照。
2. 0.04 N HCl/Isopropanol 溶液：將鹽酸用異丙醇 (Isopropanol) 稀釋至 0.04 N。

(3) 實驗步驟

1. 計數 1×10^6 cells/well 的細胞放入 96 孔盤內。
2. 等待其貼附 24 小時。
3. 移除上清液，加入不同濃度 (50、100、200 或 400 $\mu\text{g/mL}$) 的各種有機溶劑萃取的熟米麴萃取物。
4. 經 20 小時培養後，吸取上清液。
5. 加入含 10 % MTT 試劑的培養基，反應 1.5 小時。
6. 移除上清液，加入 0.04 N 的 HCl/Isopropanol 溶液，搖晃 20 分鐘。
7. 使用微盤免疫酵素分析儀以 545 nm 的條件檢測其吸光值。

2.5.2 各種熟米麴萃取物對一氧化氮產生的影響

(1) 原理

一氧化氮是由一氧化氮合成酶將 L-精胺酸轉化為瓜胺酸的過程中所形成的。一氧化氮合成酶有三種，其中一種為誘導型一氧化氮合成酶，其只會在細胞受到外來物或微生物入侵時產生刺激而被激活，從而產生一氧化氮。一氧化氮帶有不配對的電子，不太穩定，容易氧化成硝酸鹽或亞硝酸鹽，因此亞硝酸鹽與一氧化氮的產生成正比。利用 Griess 試劑與亞硝酸鹽產生反應時會變為粉紅色，亞硝酸鹽量越多顏色越深，所以吸光值越高代表亞硝酸鹽含量越高。

(2) 實驗所需配置的試劑

1. Griess 試劑：Griess A 試劑與 Griess B 試劑，以 1:1 比例混合。
2. Griess A 試劑：0.1% N-(-1-Naphthyl)ethylenediamine 溶在 dd H₂O。
3. Griess B 試劑：1% Sulfanilamide 溶於 5% Phosphoric acid (H₃PO₄)
4. 5% Phosphoric acid：5.9 mL Phosphoric acid (85%) 溶於 dd H₂O 定量至 100 mL。
5. NO 標準品: Sodium nitrite 2 mM 溶於 dd H₂O。

(3) 實驗步驟

1. 計數 1×10^6 cells/well 的細胞放入 96 孔盤內。
2. 等待其貼附 24 小時後，移除上清液。
3. 加入不同濃度(50、100、200 或 400 $\mu\text{g/mL}$) 的各種有機溶劑萃取的熟米麴萃取物與負控制組 (培養基) 和正控制組 (含 0.1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 的培養基)。每個萃取物均含有 0.1 $\mu\text{g/mL}$ LPS。
4. 培養 16 小時，取 50 μL 的上清液移到新的 96 孔盤。
5. 將 NO 標準品稀釋成不同濃度 (25、50、100、150 和 200 $\mu\text{g/mL}$)，各濃度的標準品取 50 μL 加入到 96 孔盤剩餘的孔中。
6. 加入 Griess 試劑 50 $\mu\text{L/well}$ 。
7. 以微盤免疫酵素分析儀於 545 nm 的條件檢測其吸光值。

8. 將吸光值扣除背景值後，帶入檢量線回推 NO 的生成量。

2.5.3 介白素-6 (Interleukin-6 ; IL-6) 檢測

(1) 原理

此分析套組使用三明治法 (Sandwich immunoassay) 的方式。利用抗原-抗體之間的專一鍵結特性，使免疫抗體與培養基內細胞分泌出的 IL-6 結合，在配合特定染劑進行呈色反應來檢測其吸光值，依稀釋的標準品製作出檢量線回推細胞分泌出的 IL-6 含量。

(2) 實驗所需配置的試劑

1. Coating Buffer A：使用二次去離子水將 5 倍的 Coating Buffer A 稀釋至 1 倍。
2. Capture Antibody：使用配置好的 1 倍 Coating Buffer A 將 200 倍的 Capture Antibody 稀釋成 1 倍。
3. Assay Buffer：使用 PBS 將 5 倍的 Assay buffer 稀釋至 1 倍。
4. Wash Buffer：使用去離子水將 25 倍的 Wash buffer 稀釋至 1 倍。
5. IL-6 Standard：取配置好的 Assay buffer 回溶 14 ng 的 IL-6 Standard，濃度稀釋至 500 pg/mL。
6. Detection Antibody：使用配置好的 Assay Buffer 將 200 倍的 Detection

Antibody 稀釋至 1 倍。

7. Avidin-HRP：使用配置好的 Assay Buffer 將 1000 倍的 Avidin-HRP 稀釋至 1 倍。

8. Stop soluthin：36 N 硫酸以二次去離子水稀釋至 2N。

(3) 實驗前處理

1. 計數 2×10^5 cells/well 加到 24 孔盤中。
2. 放置恆溫培養箱，等其貼附 24 小時。
3. 移除上清液，將不同濃度 (50、100、200 或 400 $\mu\text{g/mL}$) 的各種有機溶劑萃取的熟米麴萃取物與負控制組(培養基)和正控制組以 1 mL/well 加至 24 孔盤，每個樣品均含有 0.1 $\mu\text{g/mL}$ LPS。
4. 在恆溫培養箱培養 16 小時。
5. 取上清液轉移至 1.5 mL 的微量離心管，並做記號。

* 不是當天進行實驗需冰到 -20°C 冰箱進行儲存。

(4) 實驗步驟

1. 將配置好的 Capture Antibody 以 100 $\mu\text{L/well}$ 加至 ELISA 的 96 孔盤，冰在 4°C 冰箱，等待 16 小時。
2. 拍乾 Capture Antibody。

3. 將 Wash Buffer 300 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加至 96 孔盤中，浸洗 4 次，浸洗完後拍乾。
4. 加入 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ 的 Assay Buffer。
5. 在室溫下以 500 rpm 的條件下搖晃 1 小時，進行 Blocking。
6. 將 Assay Buffer 拍乾。
7. 在依前面浸洗的條件浸洗 4 次，浸洗完後拍乾。
8. 將樣品稀釋 100 倍，並將配置好的 IL-6 Standard 以 Assay Buffer 稀釋成不同濃度(500、250、125、62.5、31.25、15.625、7.8 和 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。
9. 將稀釋後的樣品與 8 個濃度 IL-6 Standard 以 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 依序加入 96 孔盤。
10. 在室溫下以 500 rpm 的條件下搖晃 2 小時。
11. 在依前面浸洗的條件浸洗 4 次，浸洗完後拍乾。
12. 加入 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 的 Detection Antibody。
13. 在室溫下以 500 rpm 的條件下搖晃 1 小時。
14. 在依前面浸洗的條件浸洗 4 次，浸洗完後拍乾。
15. 加入 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 的 Avidin-HRP。
16. 在室溫下以 500 rpm 的條件下搖晃 30 分鐘。
17. 將 Wash Buffer 300 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加至 96 孔盤中，浸洗 5 次，每次加完 Wash Buffer 需等待 0.5 至 1 分鐘，浸洗完後拍乾。

18. 在暗房加入 100 μL /well 的 TMB 。
19. 在黑暗中的室溫下以 500 rpm 的條件下搖晃 20 分鐘。
20. 加入 100 μL /well 的 Stop solution，終止反應。
21. 使用微盤免疫酵素分析儀，將波長設定在 450 nm 讀取吸光值，並以標準品的吸光值製作檢量線回推樣品中 IL-6 的濃度。

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

(1) 原理

此分析套組使用三明治法 (Sandwich immunoassay) 的方式。利用抗原-抗體之間的專一鍵結特性，使免疫抗體與培養基內細胞分泌出的 TNF- α 結合，在配合特定染劑進行呈色反應來檢測其吸光值，依稀釋的標準品製作出檢量線回推細胞分泌出的 TNF- α 含量。

(2) 實驗所需配置的試劑

1. Coating Buffer A：使用二次去離子水將 5 倍的 Coating Buffer A 稀釋至 1 倍。
2. Capture Antibody：使用配置好的 1 倍 Coating Buffer A 將 200 倍的 Capture Antibody 稀釋成 1 倍。
3. Assay Buffer：使用 PBS 將 5 倍的 Assay buffer 稀釋至 1 倍。

4. Wash Buffer：使用去離子水將 25 倍的 Wash buffer 稀釋至 1 倍。
5. TNF- α Standard：取配置好的 Assay buffer 回溶 13.7 ng 的 TNF- α ，濃度稀釋至 500 pg/mL。
6. Detection Antibody：使用配置好的 Assay Buffer 將 200 倍的 Detection Antibody 稀釋至 1 倍。
7. Avidin-HRP：使用配置好的 Assay Buffer 將 1000 倍的 Avidin-HRP 稀釋至 1 倍。
8. Stop soluthin：36 N 硫酸以二次去離子水稀釋至 2N。

(3) 實驗前處理

1. 計數 2×10^5 cells/well 加到 24 孔盤中。
2. 放置恆溫培養箱，等其貼附 24 小時。
3. 移除上清液，將不同濃度 (50、100、200 或 400 $\mu\text{g/mL}$) 的各種有機溶劑萃取的熟米麴萃取物與負控制組(培養基)和正控制組以 1 mL/well 加至 24 孔盤，每個樣品均含有 0.1 $\mu\text{g/mL}$ LPS。
4. 在恆溫培養箱培養 16 小時。
5. 取上清液轉移至 1.5 mL 的微量離心管，並做記號。

* 不是當天進行實驗需冰到 -20°C 冰箱進行儲存。

(4) 實驗步驟

1. 將配置好的 Capture Antibody 以 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加至 ELISA 的 96 孔盤，冰在 4°C 冰箱，等待 16 小時。
2. 拍乾 Capture Antibody 。
3. 將 Wash Buffer 300 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加至 96 孔盤中，浸洗 4 次，浸洗完後拍乾。
4. 加入 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ 的 Assay Buffer 。
5. 在室溫下以 500 rpm 的條件下搖晃 1 小時，進行 Blocking 。
6. 將 Assay Buffer 拍乾。
7. 在依前面浸洗的條件浸洗 4 次，浸洗完後拍乾。
8. 將樣品稀釋 100 倍，並將配置好的 TNF- α Standard 以 Assay Buffer 稀釋成不同濃度(500、250、125、62.5、31.25、15.625、7.8 和 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。
9. 將稀釋後的樣品與 8 個濃度 TNF- α Standard 以 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 依序加入 96 孔盤。
10. 在室溫下以 500 rpm 的條件下搖晃 2 小時。
11. 在依前面浸洗的條件浸洗 4 次，浸洗完後拍乾。
12. 加入 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 的 Detection Antibody 。
13. 在室溫下以 500 rpm 的條件下搖晃 1 小時。
14. 在依前面浸洗的條件浸洗 4 次，浸洗完後拍乾。
15. 加入 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 的 Avidin-HRP 。

16. 在室溫下以 500 rpm 的條件下搖晃 30 分鐘。
17. 將 Wash Buffer 300 μL /well 加至 96 孔盤中，浸洗 5 次，每次加完 Wash Buffer 需等待 0.5 至 1 分鐘，浸洗完後拍乾。
18. 在暗房加入 100 μL /well 的 TMB 。
19. 在黑暗中的室溫下以 500 rpm 的條件下搖晃 20 分鐘。
20. 加入 100 μL /well 的 Stop solution，終止反應。
21. 使用微盤免疫酵素分析儀，將波長設定在 450 nm 讀取吸光值，並以標準品的吸光值製作檢量線回推樣品中 IL-6 的濃度。

2.5.5 前列腺素E₂ 檢測 (PGE₂ assay)

(1) 原理

本實驗所用的分析套組為 Cayman Chemical 的 Prostaglandin E₂ EIA Kit，其利用競爭法 (Competitive immunoassay) 的方式進行檢測。分析套組內所提供的平盤內皆有塗抹 goat anti-mouse IgG 的抗體，其會與反應中的 PGE₂ monoclonal antibody 結合，含有細胞所分泌的 PGE₂ 之上清液會和 A ChE Tracer 競爭，為了避免影響，反應完後把沒有結合的試劑洗掉。利用 Ellman's reagent 的原理，使其反應完畢會產生黃色的物質。最後在 410 nm 的波長下檢測吸光值，吸光值與 PGE₂ 的含量成反比。

(2) 實驗所需配置的試劑

1. ELISA 緩衝液：用 UltraPure 稀釋 10 倍的濃縮 ELISA 緩衝液，需完全沖洗掉沉澱於底部的鹽類結晶。
2. 洗滌緩衝液：用 UltraPure 稀釋 400 倍的濃縮洗滌緩衝液，稀釋完後加入 Tween 20。
3. AChE Tracer：用 ELISA 緩衝液回溶 AChE Tracer，依所做的孔盤來調整所需的 ELISA 緩衝液。
4. PGE₂ monoclonal antibody：用 ELISA 緩衝液回溶 PGE₂ monoclonal antibody，依所做的孔盤來調整所需的 ELISA 緩衝液。
5. PGE₂ Standard：用 ELISA 緩衝液回溶 PGE₂ Standard，將其稀釋至 10 ng/mL。
6. Ellman's reagent：用 UltraPure 回溶整瓶 Ellman's reagent，因其不太穩定，所以在其儲存器皿外包覆一層鋁箔紙避免其受到光照。

(3) 實驗前處理

1. 計數 2×10^5 cells/well 加到 24 孔盤中。
2. 放置恆溫培養箱，等其貼附 24 小時。
3. 移除上清液，將不同濃度 (50、100、200 或 400 $\mu\text{g/mL}$) 的各種有機溶劑萃取的熟米麴萃取物與負控制組(培養基)和正控制組以 1 mL/well 加至 24 孔盤，每個樣品均含有 0.1 $\mu\text{g/mL}$ LPS。
4. 在恆溫培養箱培養 16 小時。

5. 取上清液轉移至 1.5 mL 的微量離心管，並做記號。

* 不是當天進行實驗需冰到 -20°C 冰箱進行儲存。

(4) 實驗步驟

1. 取出 PGE₂ 分析套組中所附的平盤 (圖 2-3)。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk	S1	S1	1	1	1	9	9	9	17	17	17
B	Blk	S2	S2	2	2	2	10	10	10	18	18	18
C	NSB	S3	S3	3	3	3	11	11	11	19	19	19
D	NSB	S4	S4	4	4	4	12	12	12	20	20	20
E	B ₀	S5	S5	5	5	5	13	13	13	21	21	21
F	B ₀	S6	S6	6	6	6	14	14	14	22	22	22
G	B ₀	S7	S7	7	7	7	15	15	15	23	23	23
H	TA	S8	S8	8	8	8	16	16	16	24	24	24

Blk - Blank
 TA - Total Activity
 NSB - Non-Specific Binding
 B₀ - Maximum Binding
 S1-S8 - Standards 1-8
 1-24 - Samples

圖 2-3 PGE₂ 分析套組中平盤的標記圖

2. 將樣品稀釋 100 倍，並將配置好的 PGE₂ Standard 先稀釋 10 倍放置第 1 個微量離心管，再從第 1 個微量離心管取一半的 PGE₂ Standard，進行對半稀釋，重覆動作 7 次，這樣會有 8 個濃度的標準品。

3. 依表 2-1 中的順序將試劑、樣品與標準品加到所標記的孔中。

表 2-1 孔裡所需試劑一覽表

Well name	ELISA 緩衝液	標準品/樣品	AChE Tracer	antibody
Blank				
TA				
NSB	100 μ L		50 μ L	
B ₀	50 μ L		50 μ L	50 μ L
Standard		50 μ L	50 μ L	50 μ L
Sample		50 μ L	50 μ L	50 μ L

4. 用 PGE₂ 分析套組中所附的薄膜覆蓋已使用的孔，以避免試劑揮發影響讀值。
5. 在 4°C 的條件下培養 18 小時。
6. 清空孔裡面的液體。
7. 將洗滌緩衝液 300 μ L/well 加至 96 孔盤中，浸洗 5 次，浸洗完後拍乾。
8. 將 Ellman's reagent 200 μ L/well 加至 96 孔盤中。
9. 將 5 μ L 的 AChE Tracer 加置 TA 的孔中。
10. 貼上 PGE₂ 分析套組中所附的薄膜。
11. 在黑暗中以室溫和 500 rpm 的條件下搖晃 1 小時到 1.5 小時。
12. 在 410 nm 的波長下檢測吸光值。
13. 將吸光值複製到 PGE₂ 分析套組中所附的程式，回推出 PGE₂ 的濃度。

2.5.6 西方墨點法

(1) 原理

此實驗是藉由聚丙烯醯胺膠體電泳，利用蛋白質之間分子量大小不一，來分離出蛋白質，再利用蛋白質大小確認特定的蛋白質。再利用電流讓在膠體上已經分離完畢的蛋白質轉印到硝酸纖維膜上。最後利用抗原-抗體之間的專一鍵結特性來結合特定的蛋白質，再利用呈色劑使其呈色，回推特定蛋白質的含量。

(2) 實驗所需配置的試劑

1. 10 % SDS：依所需的量裝取二次去離子水，再依二次去離子水的量加入適量的 SDS，使其最終濃度變為 10 % SDS。
2. 蛋白質 Standard：秤取白蛋白，使用二次去離子水回溶至 4 mg/mL。
3. Running buffer：秤取 Tris base 3.03 g 與 Glycine 13.73 g 回溶至二次去離子水使其定量到 990 mL，加入 10 % SDS 10 mL，使其總量變為 1000 mL。
4. Transfer buffer：秤取 Tris base 3 g 與 Glycine 14.26 g 回溶至二次去離子水，使其定量到 800 mL，加入 200 mL 的甲醇，使其總量變為 1000mL。
5. 1 M Tris base (pH 6.8)：秤取 Tris base 12.1 g 回溶至 100 mL 二次去離子水，加入鹽酸，使其 pH 值變為 6.8。

6. 1.5 M Tris base (pH 8.8)：秤取 Tris base 36.3 g 回溶至 200 mL 二次去離子水，加入氫氧化鈉，使其 pH 值變為 8.8
7. 1 倍 PBS：用二次去離子水回溶 10 倍 PBS 使其稀釋至 1 倍。
8. TBST：秤取 Tris base 12.114 g 與氯化鈉 43.83 g 回溶至二次去離子水，使其定量到 500 mL。
9. 10% APS：依所需的量裝取二次去離子水，再依二次去離子水的量加入適量的 APS，使其最終濃度變為 10 % APS。
10. 5% 脫脂奶粉：依 Lysis buffer 的量去秤取脫脂奶粉所需的量。

(3) 實驗前處理

1. 計數 1×10^6 cells/well 加到 10 公分細胞培養皿中。
2. 放置恆溫培養箱，等其貼附 24 小時。
3. 移除上清液，將濃度 200 $\mu\text{g/mL}$ 的各種有機溶劑萃取的熟米麴萃取物與負控制組（只有培養基）和正控制組（含 0.1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 的培養基）以 8 mL/dish 加至細胞培養皿，每個樣品均含有 0.1 $\mu\text{g/mL}$ LPS。
4. 在恆溫培養箱培養 16 小時。
5. 用 PBS 洗細胞 2 次，移除廢液。
6. 用 1 mL 的 PBS 將細胞沖下來，放置到 1.5 mL 微量離心管中。
7. 以 1000 rpm，25°C 的條件下離心 3 分鐘。

8. 吸取上清液，假如當天沒做將其儲存至 -20°C 冰箱。

(4) 電泳膠配製

1. 依所需的膠體軟硬度，參照表 2-2 的順序配製電泳膠

2. 配製完後，假如不是當天實驗需將電泳膠保存至 Running buffer 中，並儲存於 4°C 冰箱。

(5) 實驗步驟

1. 將細胞加入 1 mL 的 Lysis buffer。
2. 在冰上把細胞破碎，並等待 10 分鐘，使細胞裡的蛋白質能完釋放。
3. 以 12000 rpm， 4°C 的條件下離心 10 分鐘。
4. 吸取含有蛋白質的上清液。
5. 取蛋白質 Standard 的原液將其連續對半稀釋，配置 8 個濃度，分別為 (4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625 mg/mL)。
6. 將蛋白質 Standard 每次稀釋後的濃度與樣品的蛋白質，各取 5 μL 下到 96 孔盤中。
7. 將 Coomassie Protein Assay 以 200 μL /well 加到 96 孔盤之中，等其呈色。
8. 在 570 nm 的條件下讀取其吸光值，依標準曲線回推蛋白質濃度。



表 2-2 電泳膠配製流程。

分離膠體 (Running gel)		8%	10%
	二次去離子水	4.6 mL	4 mL
	1.5 M Tris base (pH8.8)	2.5 mL	
	10 % SDS	0.1 mL	
	30% Acrylamide	2.7 mL	3.3 mL
	10% APS	0.1 mL	
	TEMED	6 μL	4 μL
	以上藥劑混合均勻後，進行鑄膠		
	用 95% 酒精壓膠，等其凝固		
4% 焦集膠體 (Stacking gel)	分離膠體凝固後，去除酒精		
	二次去離子水	3.4 mL	
	1 M Tris base (pH6.8)	0.63 mL	
	10 % SDS	0.05 mL	
	30% Acrylamide	0.83 mL	
	10% APS	0.05 mL	
	TEMED	5 μL	
	以上藥劑混合均勻後，進行鑄膠		
	插入尺梳，趕走氣泡		
	等其凝固後，拔掉尺梳		

9. 依表 2-3 裡的公式計算出 Loading buffer 所需的量與 Lysis buffer 所需補足的量。

表 2-3 蛋白質定量與計算配方的公式。

蛋白質濃度	所需的濃度	1000 μ L 變為 200 μ L	5 X Loading buffer	Lysis buffer	最終濃度
(A)	(C)	(D)	(E)	(F)	(B)
A	A/B	C/1000/200	D/5	C-D-E-200	2

10. 使用加熱攪拌器，讓水沸騰，把樣品放入，等待 10 min。
11. 在等待期間將配置好的電泳膠放到電泳槽，將 Running buffer 倒入。
12. 將 Marker 和加熱好的樣品下到電泳膠。
13. 開始跑膠，上膠以 80 V 跑 20 分鐘，下膠以 140 V 跑 50 分鐘。
14. 在跑膠期間使用 Transfer buffer 將菜瓜布與濾紙浸泡，並使用甲醇將硝酸纖維膜活化，時間大約 1 分鐘。
15. 將跑好的膠片切除空白與上膠的部分。
16. 依序將濕式蛋白質轉印器裝好，以 90 V 的條件下跑 100 分鐘。
17. 轉印結束後對照 Marker 的位置對硝酸纖維膜進行裁切。
18. 使用 5% 的脫脂奶粉進行 Blocking。
19. 在 4°C 的條件下放置在翹翹板式震盪器上搖晃 1 小時。
20. 加入第一抗體與內標準品。
21. 4°C 的條件下放置在翹翹板式震盪器上搖晃 18 小時。
22. 倒掉第一抗體，用 TBST 進行沖洗 4 次，每次沖洗需放置在翹翹板式

震盪器上搖晃 5 分鐘。

23. 將第二抗體加入到 5% 的脫脂奶粉中。

24. 將硝酸纖維膜浸泡在含有第二抗體的 5% 脫脂奶粉中。

25. 在 4°C 的條件下放置在翹翹板式震盪器上搖晃 2 小時。

26. 倒掉第二抗體，使用 TBST 進行沖洗 4 次，每次沖洗需放置在翹翹板式震盪器上搖晃 5 分鐘。

27. 使用顯影劑，進行冷光顯影，使用儀器進行照膠。

2.6 脂肪酸成份分析

(1) 原理

脂質具有易溶於非極性有機溶劑的特質，例如氯仿、正己烷、乙醚等。利用這種特性並以非極性質有機溶劑將樣品裡的脂質被萃取出，再將有機溶劑去除，殘留物即為粗脂質，粗脂質內含磷脂質、膽固醇、三酸甘油酯和游離脂肪酸等。粗脂質或其他組成經由皂化、水解與甲基酯化後，粗脂質或其成份內脂肪酸會轉化為脂肪酸甲酯。將脂肪酸轉化為脂肪酸甲酯後沸點會降低而揮發性會提高，以利於後續氣相層析儀分析。

(2) 實驗所需配置的試劑

1. 展開液：將正己烷、乙醚和冰醋酸以 70:30:1 的比例進行配置。

2. 2,7-Dichlorofluorescein 指示劑：秤取 1 g 的 2,7-Dichlorofluorescein 回溶於 500 mL 的絕對酒精。

3. 0.9%生理食鹽水：使用去離子水回溶氯化鈉，使其濃度稀釋至 0.9%。

(3) 實驗前處理

1. 計數 1×10^6 cells/well 加到 10 公分細胞培養皿中。
2. 放置恆溫培養箱，等其貼附 24 小時。
3. 移除上清液，將不同濃度 200 μ g/mL 的各種有機溶劑萃取的熟米麴萃取物與負控制組（只有培養基）和正控制組（含 0.1 μ g/mL LPS 的培養基）以 8 mL/dish 加至細胞培養皿，每個樣品均含有 0.1 μ g/mL LPS。
4. 在恆溫培養箱培養 16 小時。
5. 移除上清液，使用乾淨的培養基沖洗細胞，放置到 1.5 mL 微量離心管。
6. 以 1000 rpm，25°C 的條件下離心 3 分鐘。
7. 移除上清液，使用 PBS 回溶細胞。
8. 以 1000 rpm，25°C 的條件下離心 3 分鐘。
9. 移除上清液，並將細胞儲存於 -20°C 冰箱。

(4) 實驗步驟

1. 使用 0.5 mL 的二次去離子水將細胞混和均勻，將其放入 50 mL 螺旋試管。
2. 加入 6.6 mL 的甲醇，搖晃均勻。
3. 加入 13.2 mL 的氯仿，振盪 1 分鐘，使其均勻。
4. 靜置 1 小時。
5. 加入 4 mL 生理食鹽水，振盪 1 分鐘，使其均勻。
6. 以 1500 rpm 的條件下離心 3 分鐘，使其上下明顯分層。
7. 將氯仿層轉移至 15 mL 螺旋試管，並在 50°C 的條件，使用氮氣將氯仿吹到完全揮發，裡面殘留物為萃取出來的總脂質。
8. 將萃取出來的總脂質用 100 μ L 的氯仿回溶，並使用氮氣使試管內的空氣除去，將試管鎖緊。
9. 將配置的展開液倒入展開槽，並將濾紙浸入展開液中。
10. 使用 100 μ L 的氣密式注射針吸取總脂質，將其注射在 TLC 板上，畫出約 2.5 cm 的線，在 TLC 板從底部上方約 2 公分的位置。
11. 取 10 μ L 的 TLC 參照用標準品，點於第一個樣品旁 2 公分的位置。
12. 將用好的 TLC 板垂直豎立的放置在展開槽中。
13. 在跑展開液期間將內標準品置入乾淨的 15 mL 螺旋試管中，並在 50°C 的條件，使用氮氣將其吹乾。
13. 當展開液展開到 TLC 板頂部下方 1 公分的位置後，將 TLC 板取出

，放置抽氣櫃等展開液揮發。

14. 將揮發完的 TLC 板使用 2,7-Dichlorofluorescin 指試劑均勻噴灑，等其乾燥後，放入紫外燈觀察箱中。
15. 與參照用標準品對照後，將總磷脂質的螢光顯色帶標記，並將其切下，置入於含有內標準品的試管中。
16. 將含有內標準品的試管加入 2 mL 的三氟化硼-甲醇溶液，使用氮氣使試管內的空氣除去，將試管鎖緊後，使用試管震盪器震盪 30 秒。
17. 在 95°C 的乾式加熱板上加熱 20 分鐘。
18. 將試管冷卻至室溫後，加入 2 mL 的生理食鹽水，並震盪 30 秒。
19. 震盪完後加入 4 mL 的正己烷，搖晃 1 分鐘。
20. 以 1500 rpm 的條件下離心 3 分鐘，使其上下分層明顯。
21. 將正己烷層轉移至乾淨試管當中，並使用氮氣將其吹乾。
22. 使用 1 mL 的正己烷回溶，將其轉移至 GC 樣品瓶中，旋緊蓋子，進行 GC 分析。

(5) 分析條件設定

1. 使用管柱名稱與規格：Omegawax 320™ capillary，30 m × 320 μm × 0.25 μm。
2. 火焰離子偵測器 (Flame ionization detector; FID) 溫度：235°C。

3. 樣品注入口溫度：205°C。

4. 烘箱 (Oven) 溫度程式設定：

第一階段：140°C 的條件下維持一分鐘。

第二階段：以每分鐘上升 6°C 的速度升溫至 205°C，當達到條間溫度時，
需維持該溫度 18 分鐘。

第三階段：Post run 階段升溫至 240°C，以該溫度維持 5 分鐘。

2.7 統計分析

本研究中的所有實驗數據皆是獨立實驗三次後所得到的結果。實驗數據的結果皆以平均值 \pm 標準差 (Mean \pm SD) 呈現。實驗所得數據皆是使用 SPSS 17.0 軟體中的 ANOVA 單因子變異分析與 Duncan's 多重比較法，來比較實驗數據有無顯著差異。

第三章 結果與討論

3.1 樣品回收率

40 g 的熟米麴經由乙醇進行萃取，最後收取 2.42 ± 0.12 g 的乙醇萃取物。5 g 的乙醇萃取物經由正己烷、乙酸乙酯、丁醇和水的分離並萃取。最後回收了正己烷 0.99 ± 0.07 g，乙酸乙酯 0.78 ± 0.06 g，丁醇 0.86 ± 0.09 g 和水 1.83 ± 0.08 g。

3.1 細胞存活率

為了檢測熟米麴乙醇萃取物是否對小鼠巨噬細胞的增殖造成影響，我們先使用 5、25、50、100、200、400 和 800 $\mu\text{g/mL}$ 這七種濃度進行細胞存活率試驗。依圖 3-1 結果所示濃度 800 $\mu\text{g/mL}$ 的乙醇萃取物會影響細胞增殖，在 5 $\mu\text{g/mL}$ 的濃度並沒有顯著影響，而濃度在 25 到 400 $\mu\text{g/mL}$ 之間會稍微促進細胞增生。實驗最終選定以不高於 400 $\mu\text{g/mL}$ 的濃度進行。

接下來實驗是將細胞培養在含有 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的脂多糖體並添加 4 種濃度 (50、100、200 與 400 $\mu\text{g/mL}$) 的不同萃取物。NC 是對照組，PC 為含有脂多糖體的正對照組，實驗組則為含有 LPS 與不同濃度的樣品。結果發現脂多糖體會對與細胞存活率稍有影響，不過還在可接受範圍內。

雖然每種樣品組與 PC 組比細胞存活率沒有降低，但是在乙酸乙酯萃取物 (50、100、200 $\mu\text{g/mL}$) 和水萃取物的 (400 $\mu\text{g/mL}$) 的處理下，細胞存活率皆有明顯的提升 (圖 3-4 與 3-6); 任何濃度的正己烷萃取物和丁醇萃取物皆與 PC 組無顯著差異 (圖 3-3 與 3-5)。為了降低細胞存活率對實驗的影響，後續的細胞實驗，每次皆會進行細胞存活率檢測，並且將實驗的數據進行標準化 (Normalize)。

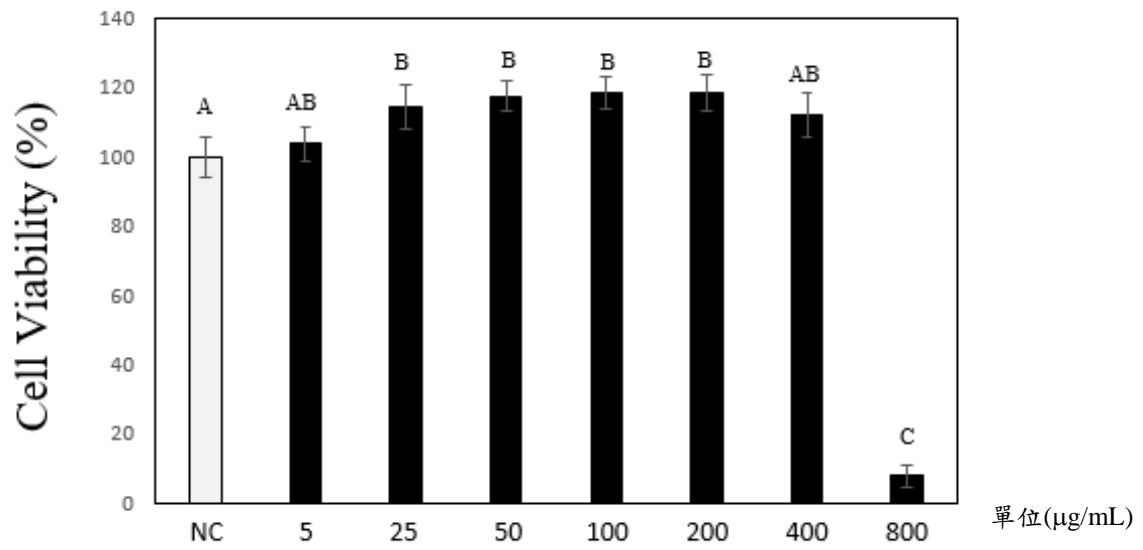


圖 3-1 乙醇萃取物對細胞存活率的影響

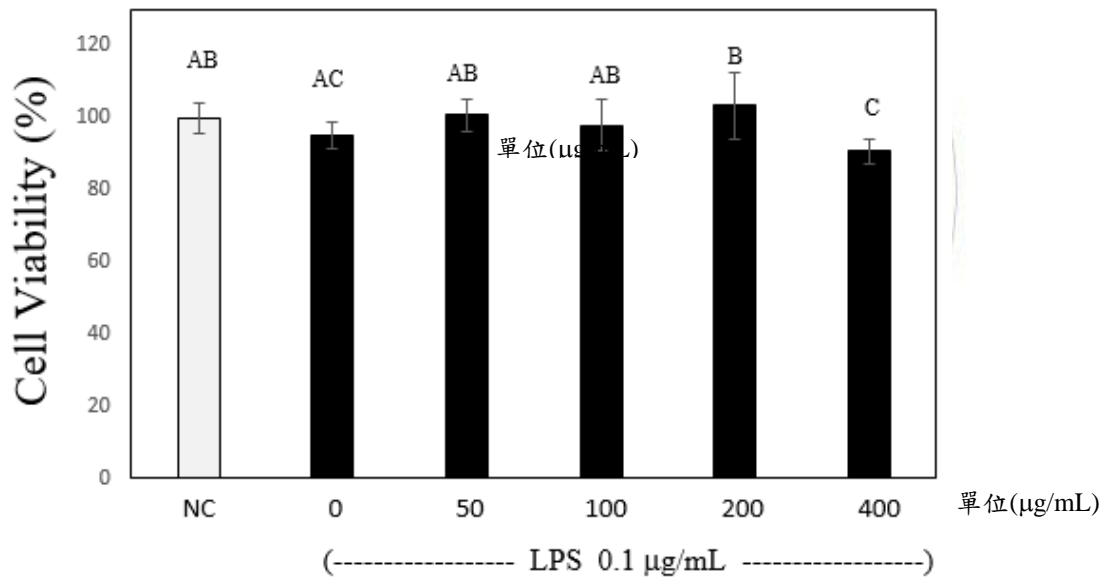


圖 3-2 乙醇萃取物對經刺激後巨噬細胞的存活率之影響

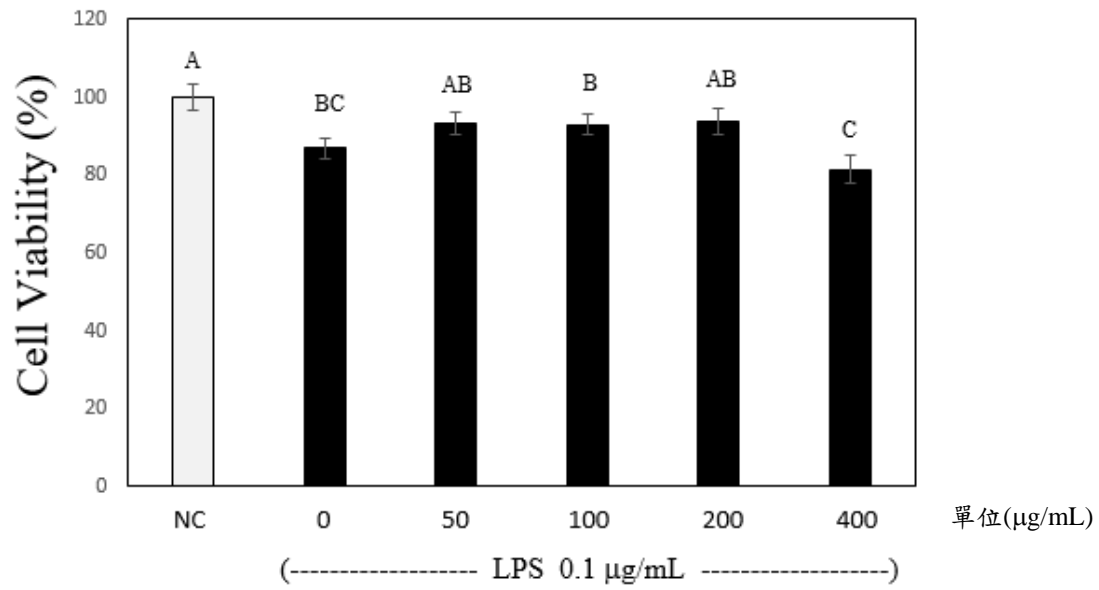


圖 3-3 正己烷萃取物對經刺激後巨噬細胞的存活率之影響

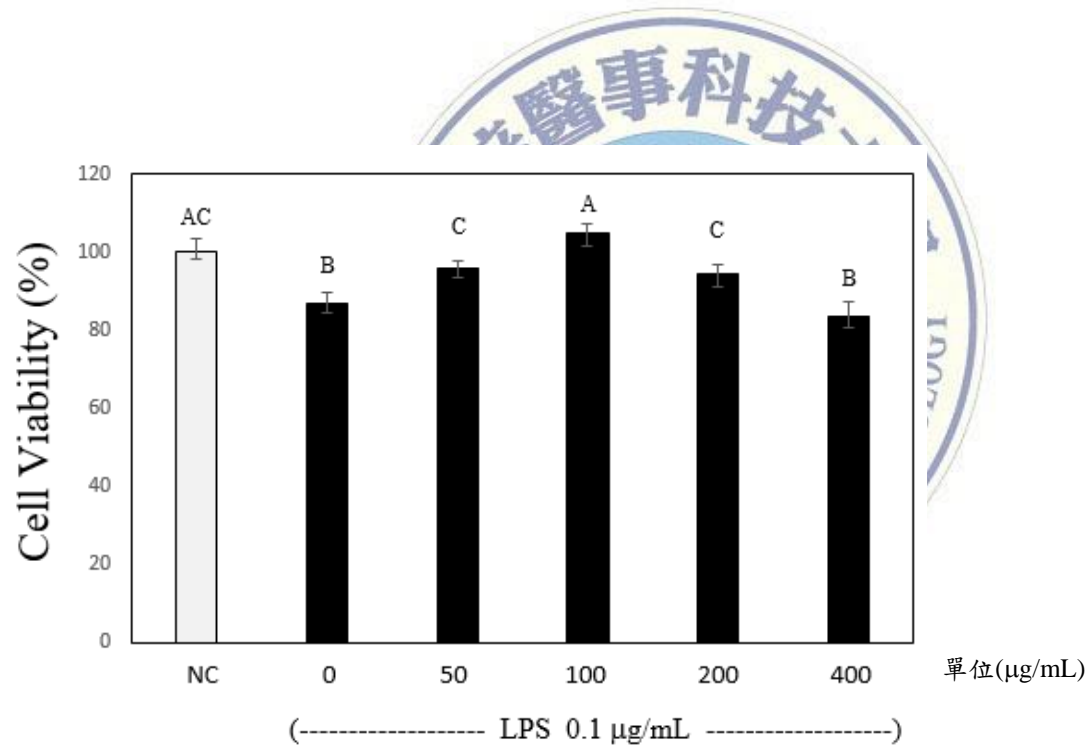


圖 3-4 乙酸乙酯萃取物對經刺激後巨噬細胞的存活率之影響

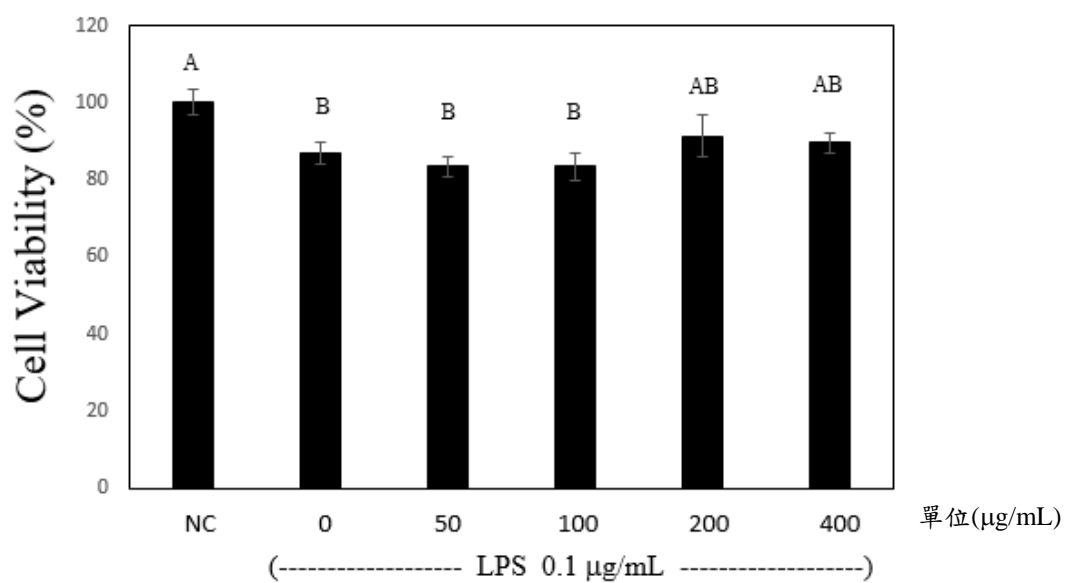


圖 3-5 丁醇萃取物對經刺激後巨噬細胞的存活率之影響

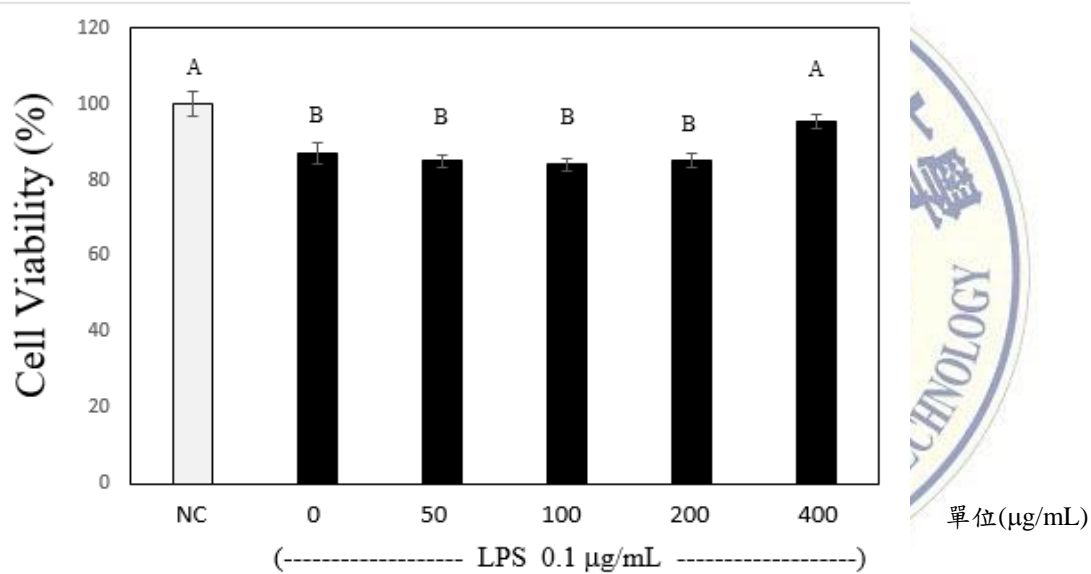


圖 3-6 水萃取物對經刺激後巨噬細胞的存活率之影響

3.2 一氧化氮生成量檢測

將定量細胞 (1×10^6 cells/mL) 放置於含培養基的 96 孔盤中，經 24 小時培養後，再注入由不同濃度 (50、100、200 或 400 $\mu\text{g/mL}$) 的各種萃取樣品分別與 LPS (0.1 $\mu\text{g/mL}$) 混合的培養基；培養 16 小時後，再進行一氧化氮的檢測。結果顯示 PC 組的一氧化氮產量顯著的比 NC 組的量來的高，代表脂多醣體能顯著刺激巨噬細胞。其中乙醇萃取物 (圖 3-7)、正己烷萃取物 (圖 3-8) 和乙酸乙酯萃取物 (圖 3-9) 在 50 $\mu\text{g/mL}$ 就有顯著抑制一氧化氮的產生；丁醇萃取物則要到 100 $\mu\text{g/mL}$ 開始才有顯著的抑制效果 (圖 3-10)，而水萃取物要 400 $\mu\text{g/mL}$ 才能顯著抑制 (圖 3-11)。當比較五種萃取物對一氧化氮的抑制效果，我們發現萃取物在 200 $\mu\text{g/mL}$ 與 400 $\mu\text{g/mL}$ 濃度時，乙酸乙酯萃取物 > 乙醇萃取物 > 丁醇萃取物 > 正己烷萃取物 > 水萃取物 (圖 3-12)。

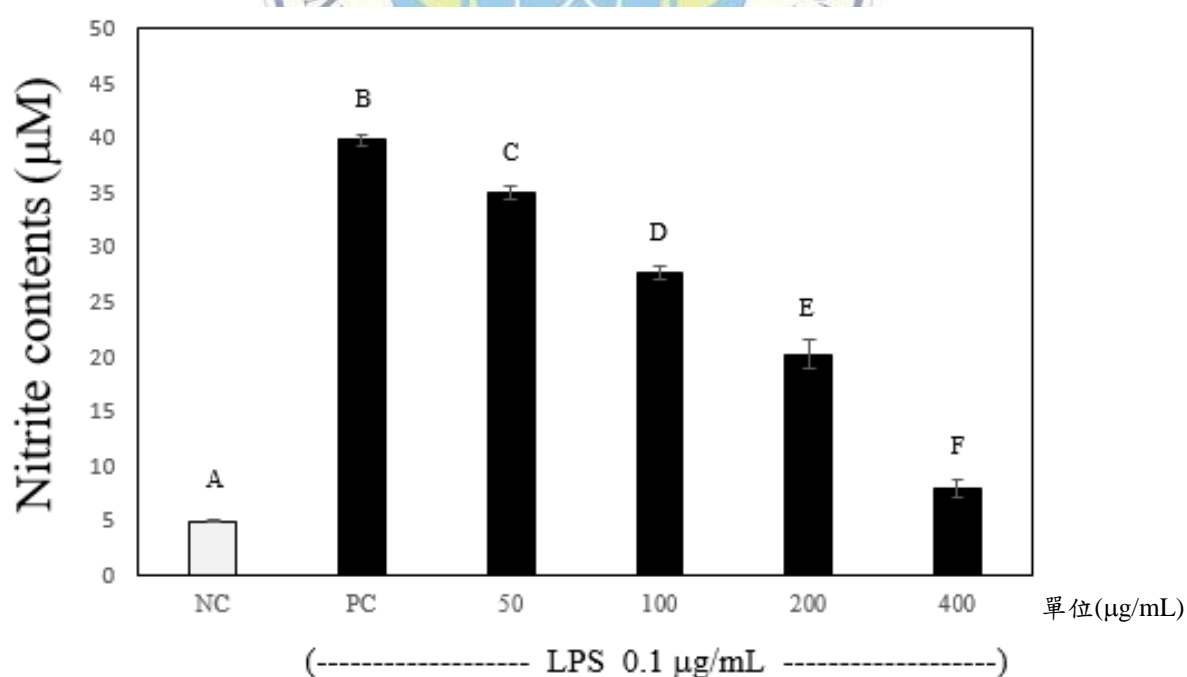


圖 3-7 乙醇萃取物對巨噬細胞產生的一氧化氮之影響

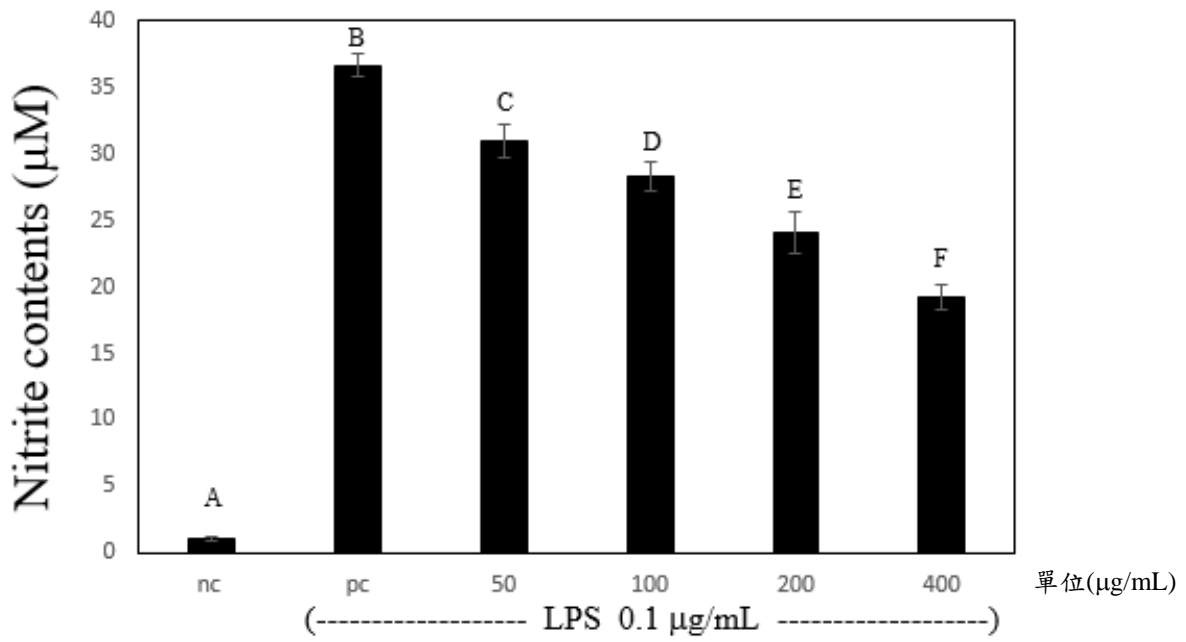


圖 3-8 正己烷萃取物對巨噬細胞產生的一氧化氮之影響

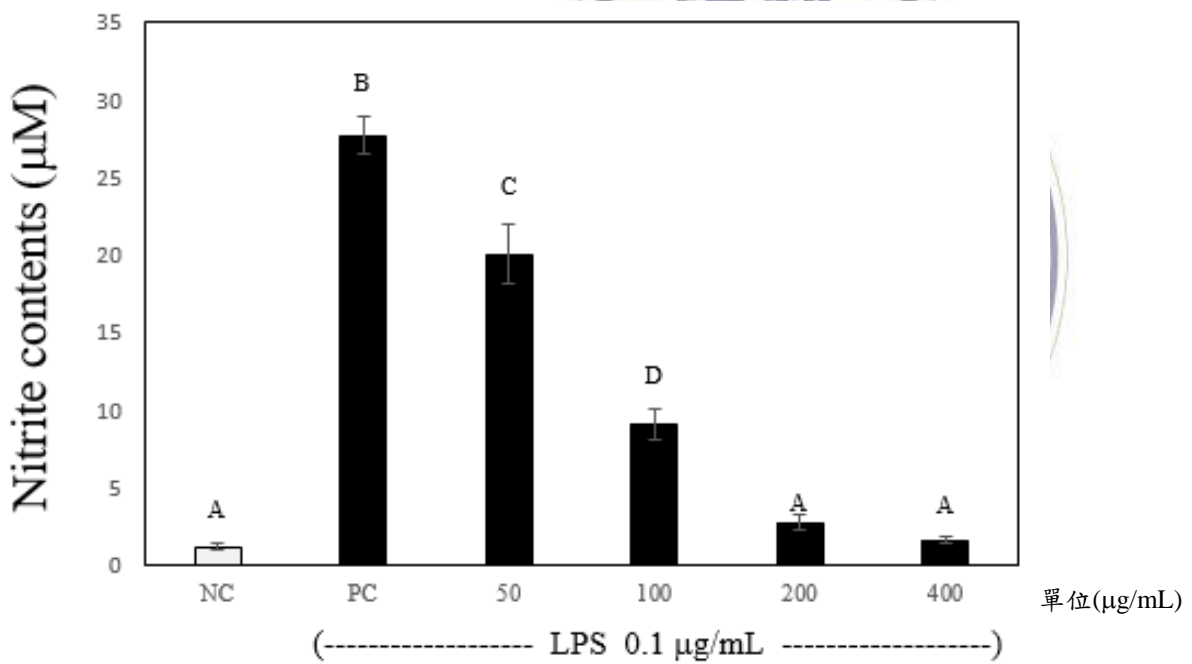


圖 3-9 乙酸乙酯萃取物對巨噬細胞產生的一氧化氮之影響

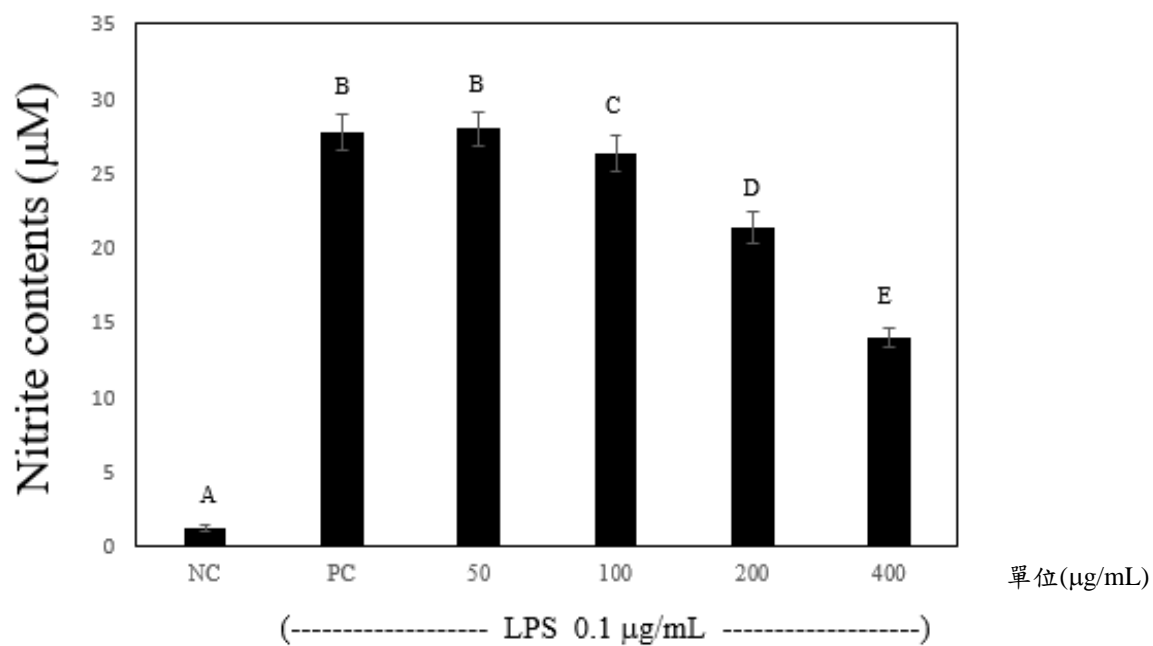


圖 3-10 丁醇萃取物對巨噬細胞產生的一氧化氮之影響

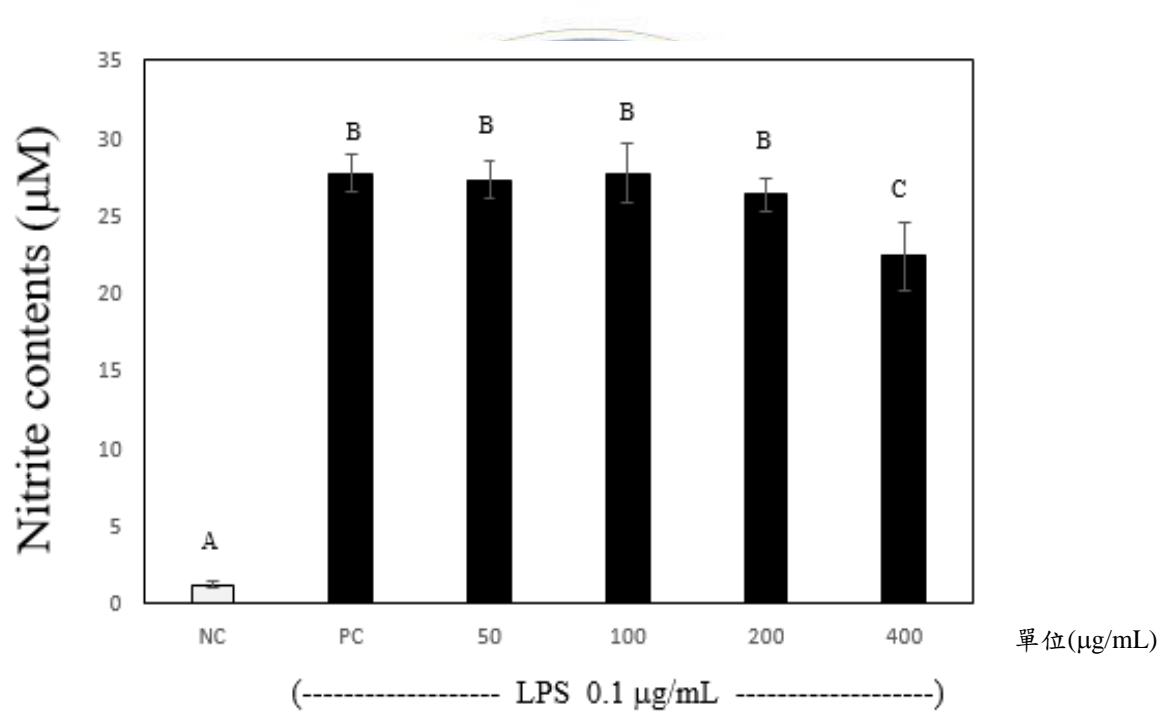


圖 3-11 水萃取物對巨噬細胞產生的一氧化氮之影響

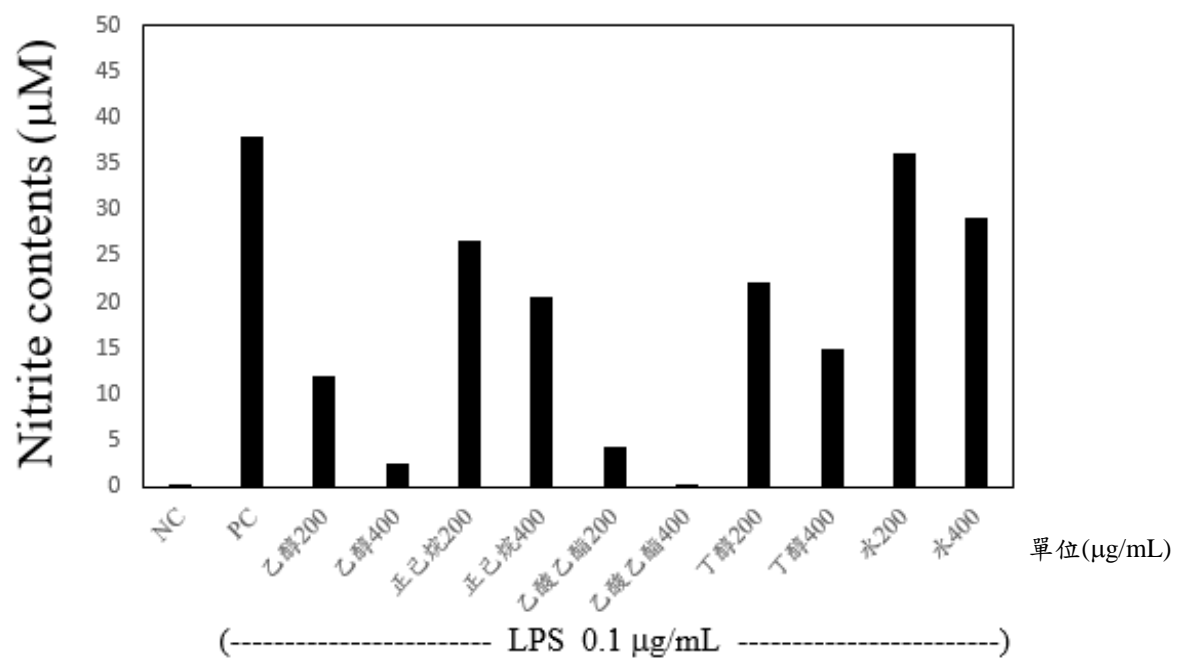


圖 3-12 乙醇萃取物與其分萃物對一氧化氮生成之影響

3.3 介白素-6生成量檢測

為了探討五種熟米麴萃取物是否也能抑制介白素-6 的生成，先將濃度為 2×10^5 cells/mL 的細胞培養於 24 孔盤中，24 小時後更換成含有不同濃度萃取物與 LPS ($0.1 \mu\text{g/mL}$) 的培養基。再經 16 小時 LPS 的刺激下，收集細胞上清液，並以 ELISA 試劑組進行介白素-6 的檢測。當檢視不同萃取物對介白素-6 生成的影響，各萃取物對介白素-6 的抑制程度不同 (圖 3-13 至圖 3-17)。除了水草物之外，其他萃取物在 $50 \mu\text{g/mL}$ 的濃度下，就有超過 40% 的抑制。其中以乙酸乙酯萃取物的抑制效果最為明顯， $200 \mu\text{g/mL}$ 可抑制達 95% 以上， $400 \mu\text{g/mL}$ 更抑制介白素-6 的生成，且這萃取物抑制介白素-6 生成有濃度依賴性 (dose-dependent) 的現象。

當比較五種萃取物 $200 \mu\text{g/mL}$ 濃度下對介白素-6 生成的影響，我們發現 LPS 確實能刺激介白素-6 的生成，各萃取物也顯著降低細胞釋出介白素-6 的濃度。介白素-6 抑制百分比分別為。乙酸乙酯萃取物 (98%)，丁醇萃取物 (64%)，正己烷萃取物 (60%)，乙醇萃取物 (52%)，以及水草萃取物 (18%)(圖 3-18)。

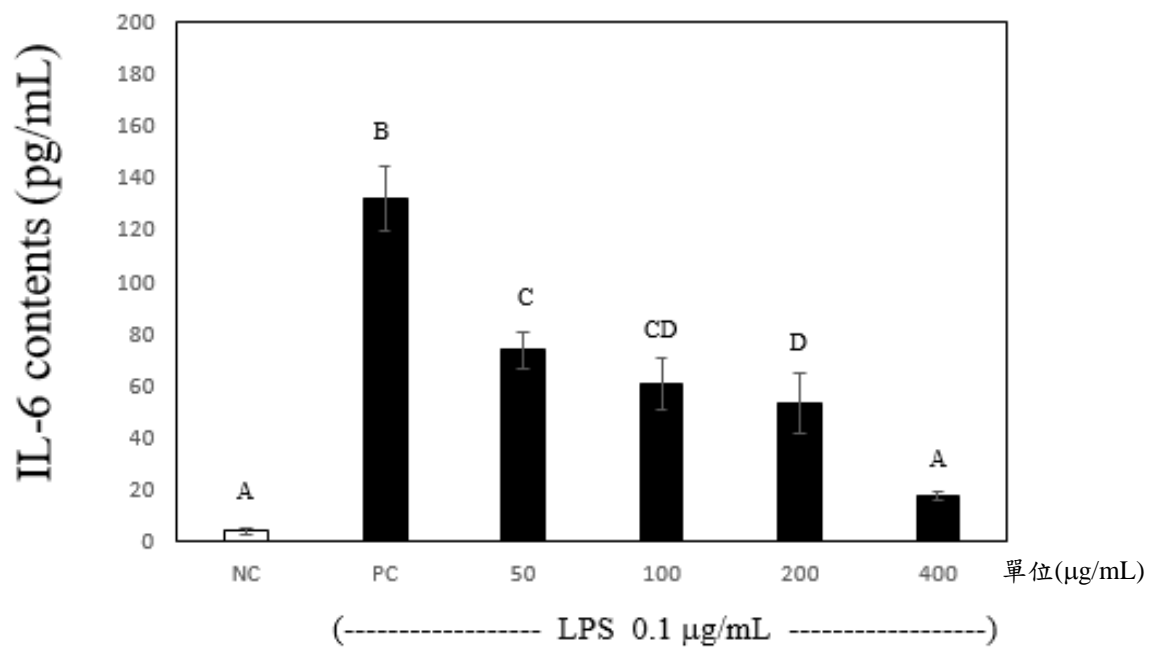


圖 3-13 乙醇萃取物對介白素-6的影響

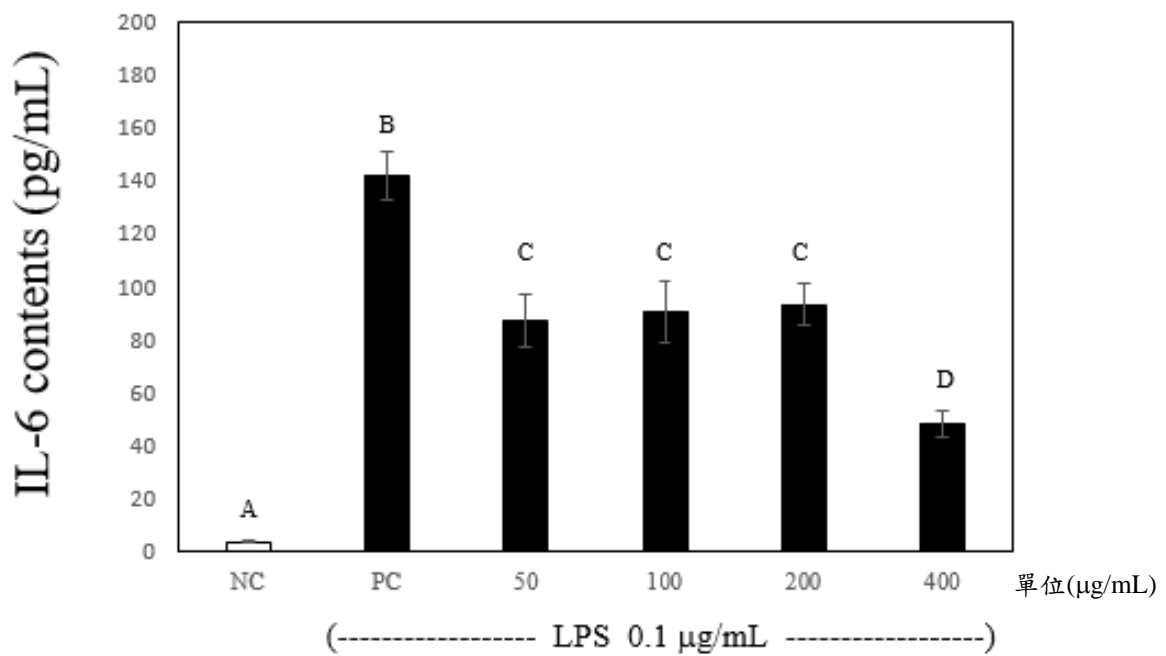


圖 3-14 正己烷萃取物對介白素-6的影響

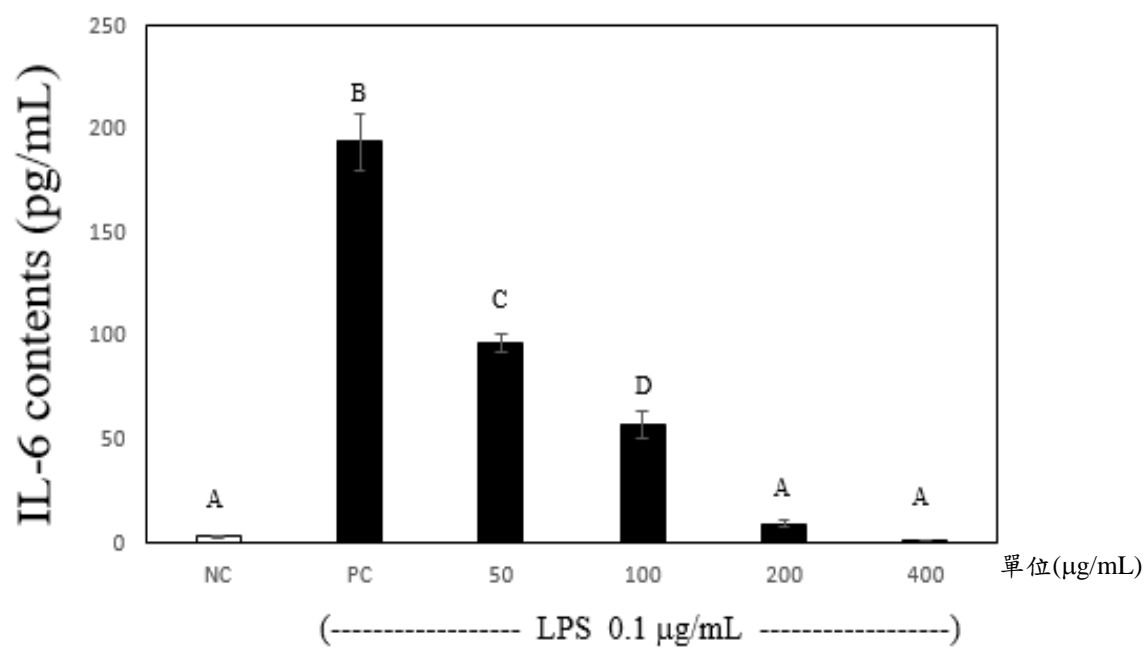


圖 3-15 乙酸乙酯萃取物對介白素-6的影響

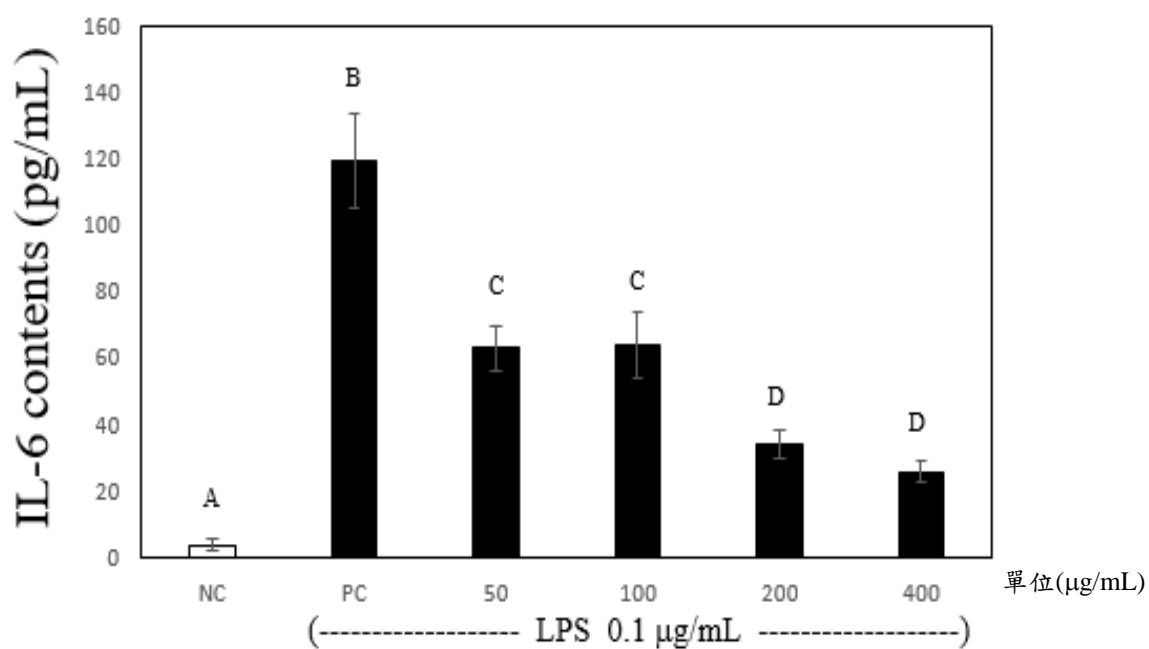


圖 3-16 丁醇萃取物對介白素-6的影響

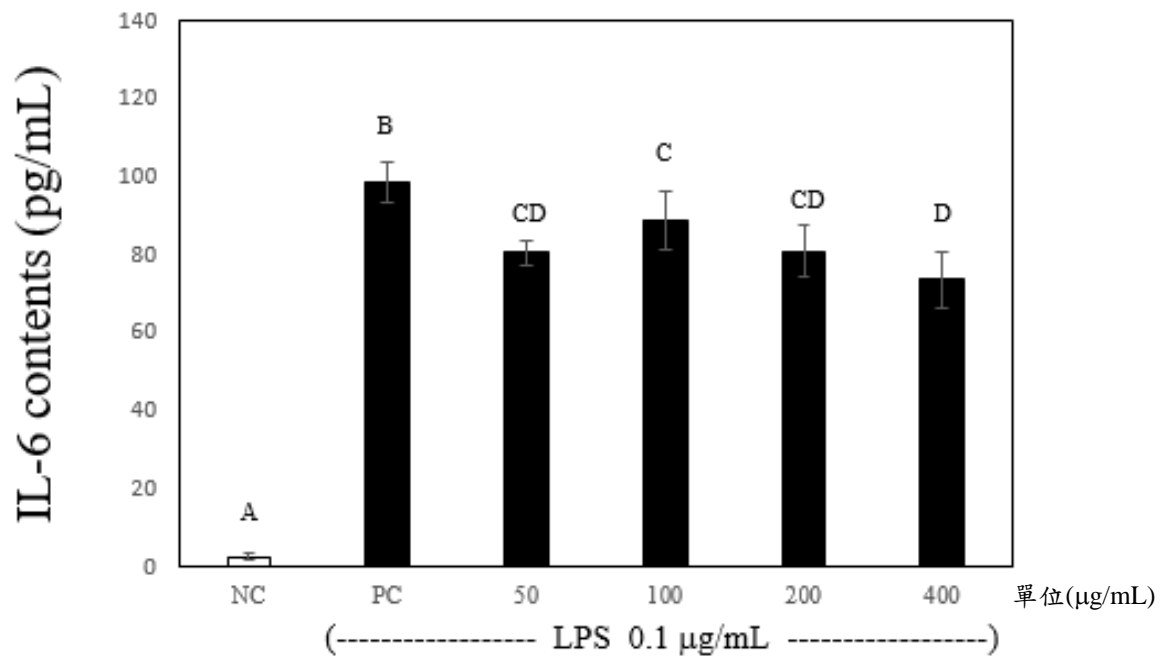


圖 3-17 水萃取物對介白素-6的影響

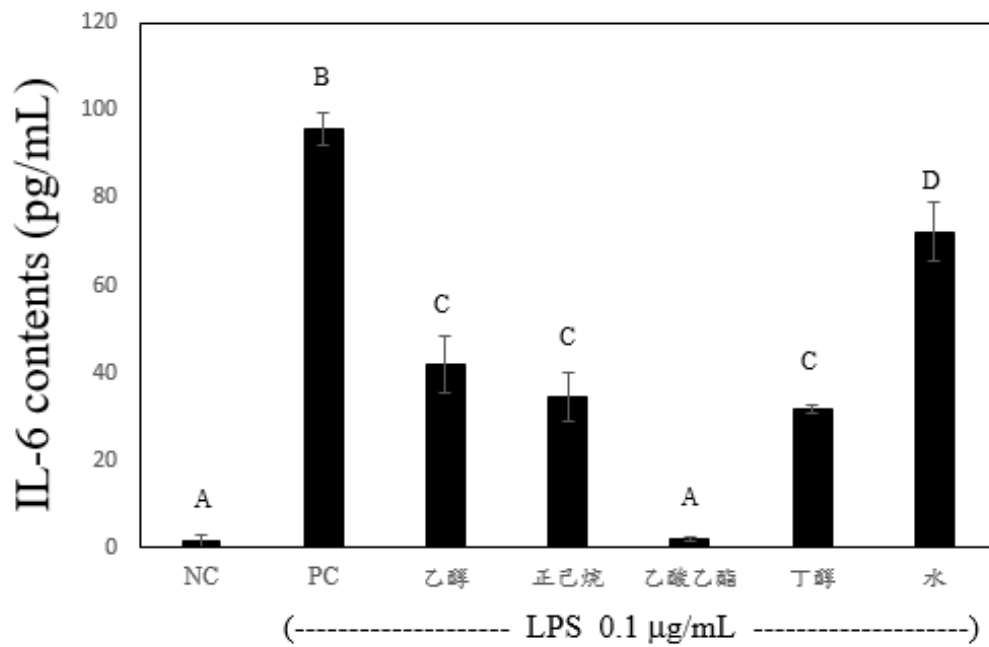


圖 3-18 濃度在200 µg/mL時各萃取物對介白素-6的影響

3.4 腫瘤壞死因子- α 生成量檢測

在探討抗發炎的研究中，腫瘤壞死因子- α 是另一個促發炎細胞激素，不過與介白素-6 的發炎訊號路徑不相同。為了探討各種熟米麴萃取物對於 TNF- α 生成，我們用上述 IL-6 測試中的樣品來檢測 TNF- α 的含量。結果顯示五種熟米麴萃取物皆也抑制 TNF- α 生成的效果(圖 3-19 至 3-23)，而且濃度 50 $\mu\text{g/mL}$ 的任一萃取物即有 20~30% 的效果；最高濃度 400 $\mu\text{g/mL}$ 也大約抑制 40 – 45% TNF- α 的生成。當檢視與比較 200 $\mu\text{g/mL}$ 的五種萃取物對 TNF- α 的抑制效果，我們發現丁醇萃取物 (55%) 與乙醇萃取物 (52%) 的效果最佳，其次是乙酸乙酯萃取物 (39%)，正己烷萃取物 (38%)，以及水萃取物 (30%)(圖 3-24)。

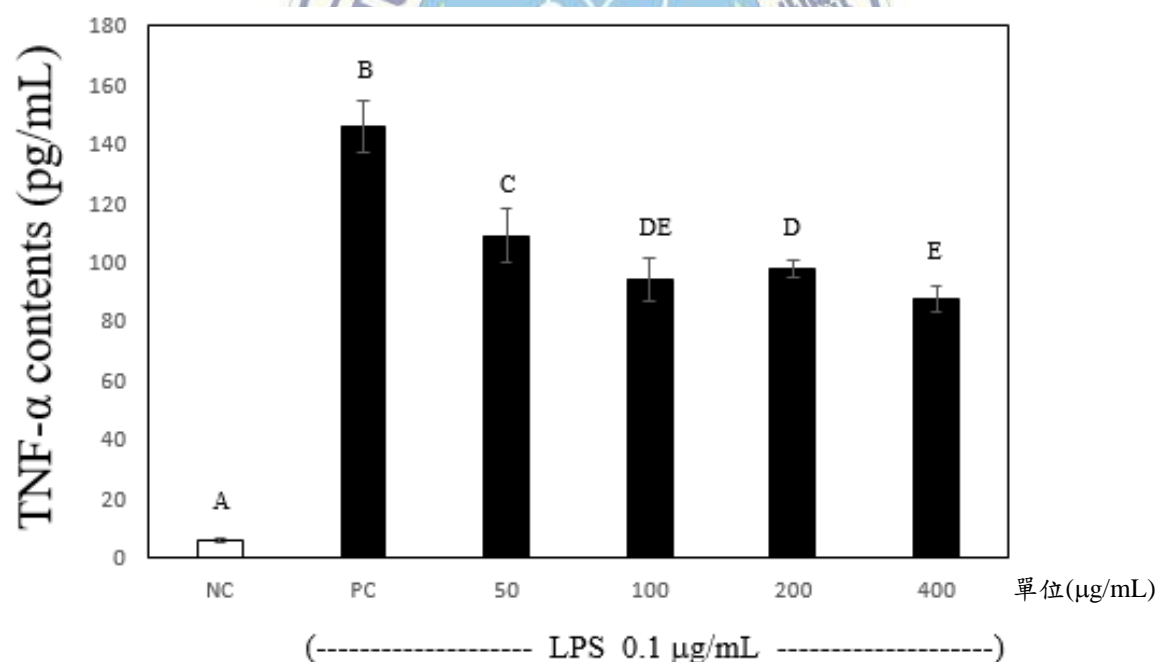


圖 3-19 乙醇萃取物對腫瘤壞死因子- α 的影響

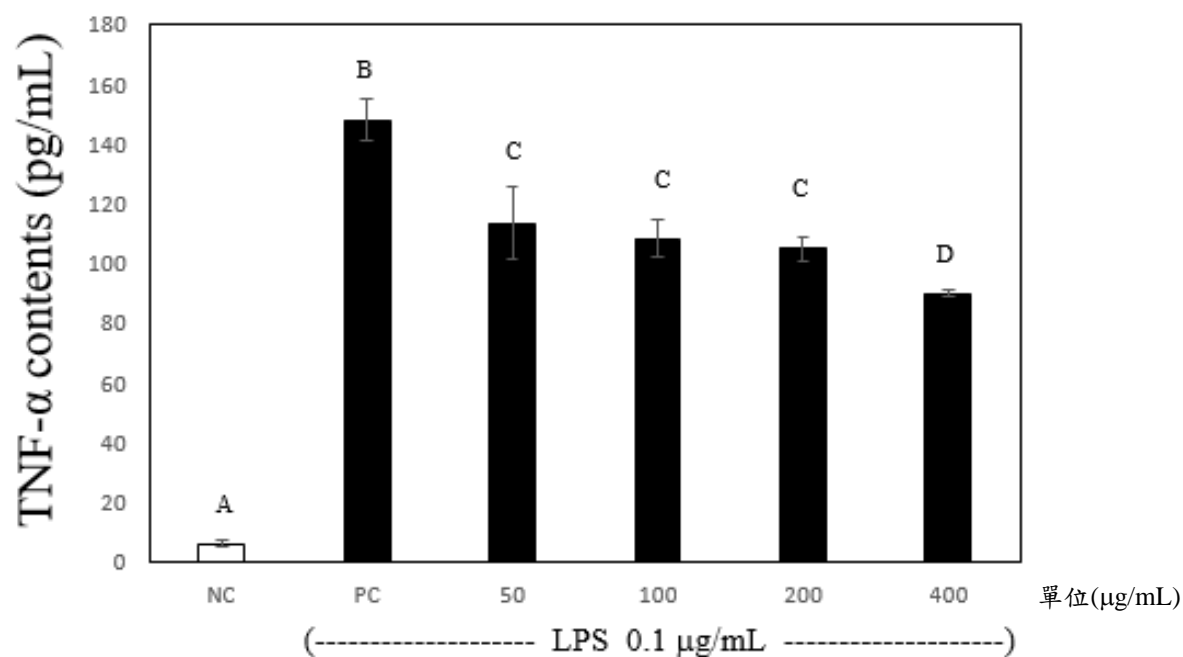


圖 3-20 正己烷萃取物對腫瘤壞死因子- α 的影響

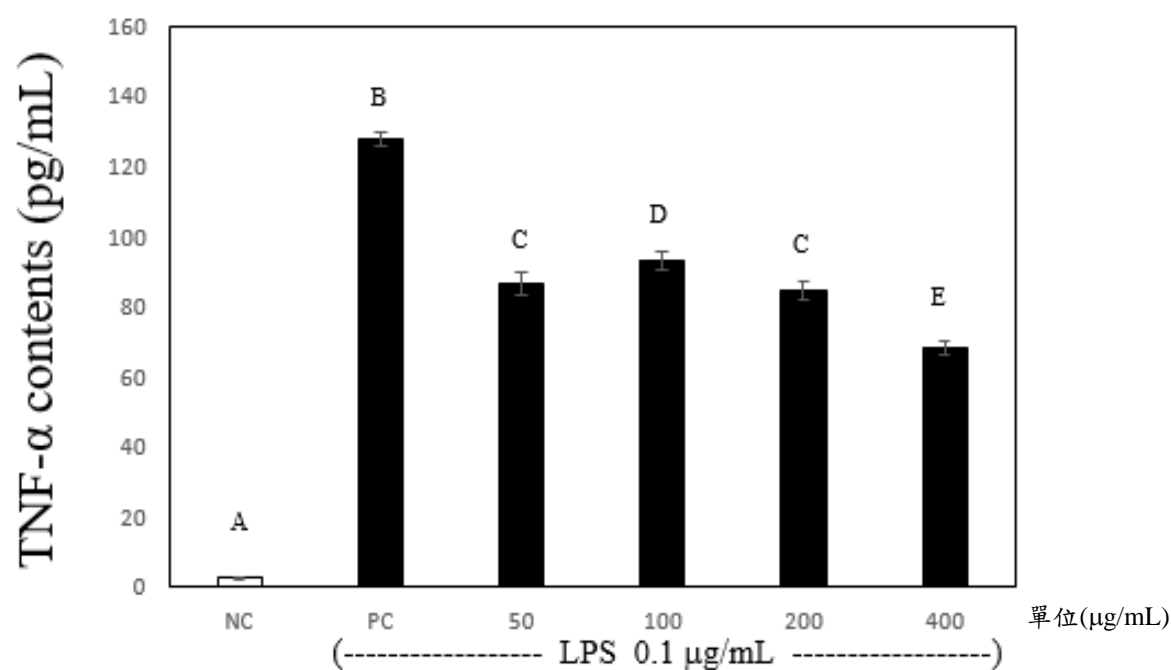


圖 3-21 乙酸乙酯萃取物對腫瘤壞死因子- α 的影響

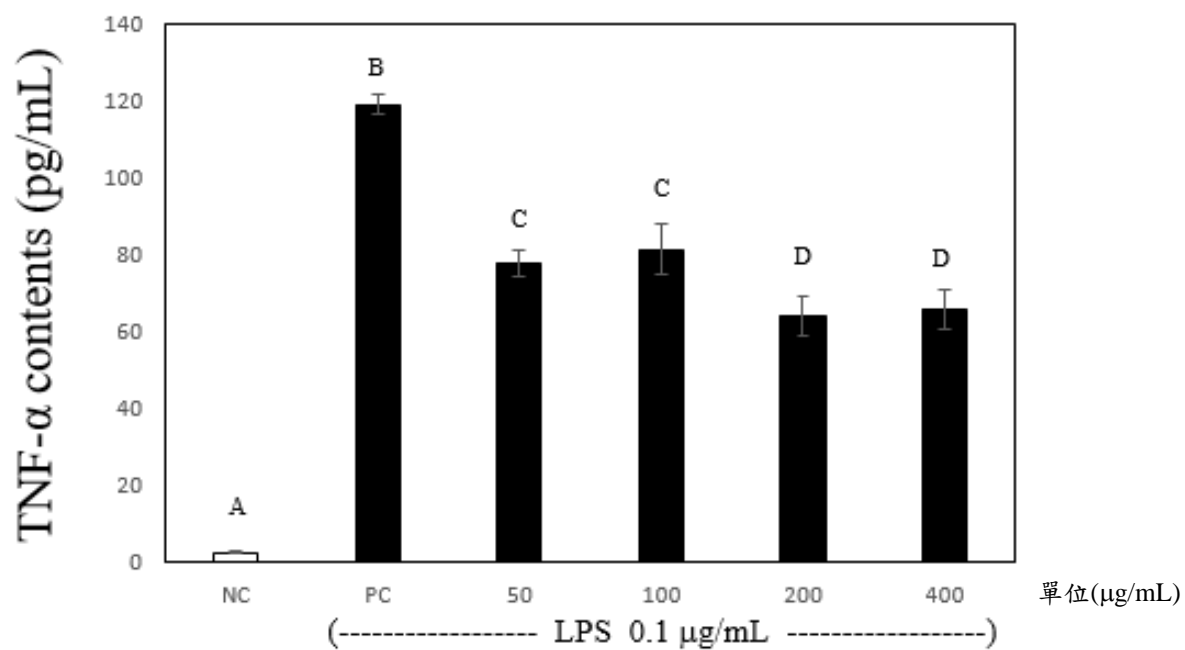


圖 3-22 丁醇萃取物對腫瘤壞死因子- α 的影響

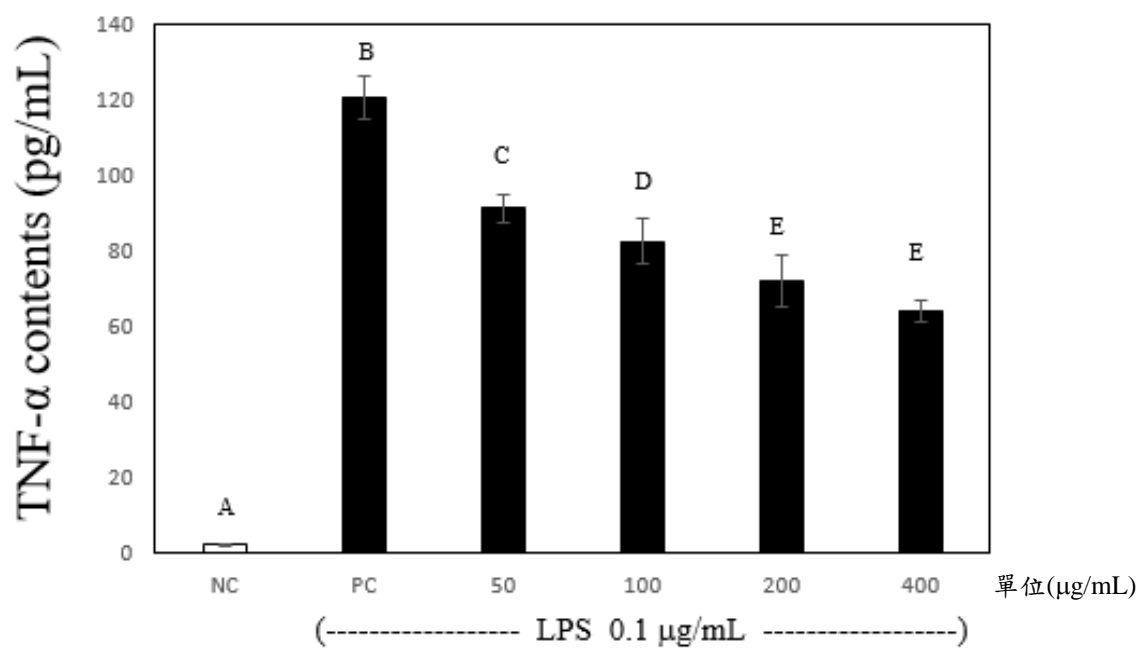


圖 3-23 水萃取物對腫瘤壞死因子- α 的影響

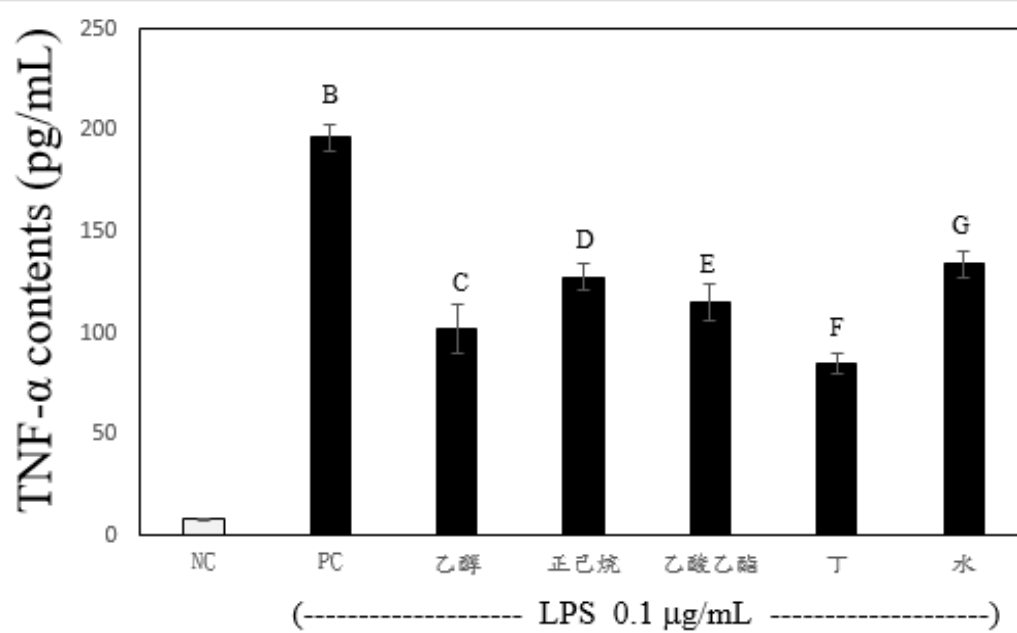


圖 3-24 在相同濃度的各種有機溶劑萃取物對腫瘤壞死因子- α 的影響

3.5 PGE₂ 生成量檢測

在檢視各萃取物抑制 IL-6 與 TNF- α 的功效後，我們進一步判討五種熟米麴萃取物抑制發炎性脂質代謝產物 PGE₂ 的功效。LPS (0.1 $\mu\text{g/mL}$) 能顯著刺激巨噬細胞大量製造與釋放 PGE₂，當與 200 $\mu\text{g/mL}$ 的不同萃取物共同培養時，乙酸乙酯萃取物可抑制 93% 的 PGE₂ 生成，其次為丁醇萃取物 (52%)、乙醇萃取物 (30%)、水萃取物 (17%)，以及幾乎沒有抑制效果的正己烷萃取物 (5%)(圖 3-25)。

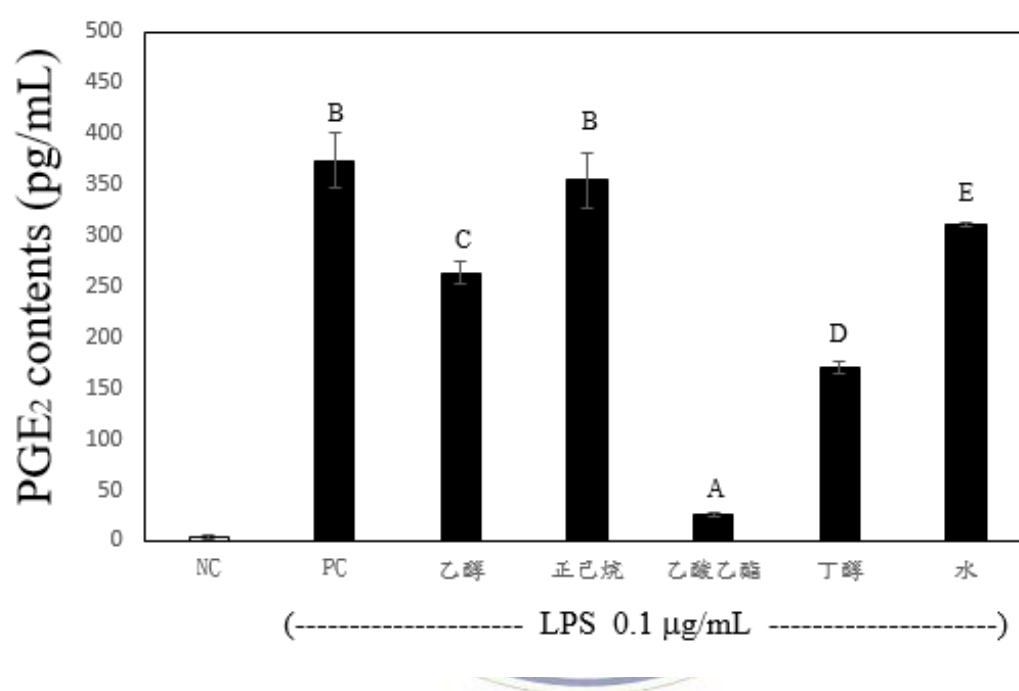


圖 3-25 濃度在200 $\mu\text{g/mL}$ 時各萃取物對前列腺素E2的影響

3.6 自由基清除能力之檢測

為了探討各式熟米麴萃取物的抗發炎效果是否與抗氧化能力有關，我們進行 DPPH 自由基清除的實驗。從表 3-1 可以發現不管是何種萃取物其清除自由基的能力會隨著反應時間跟濃度的增加而提高。不過，當與知名抗氧化劑兒茶素 (Catechin) 進行比較時，我們發現濃度為 1 mg/mL 的兒茶素加入 DPPH 試劑後，其清除能力可即時抵達 90%，這樣的結果表示所有的熟米麴萃取物都不是很強的抗氧化劑，不過濃度高的樣品也有清除自由基的功效。其中以乙酸乙酯萃取物、乙醇萃取物與丁醇萃取物的自由基清除效果最佳，其 IC₅₀ 的值分別為 4.86 ± 0.58 、 5.75 ± 0.82 與 6.75 ± 1.35 ，相比之下水萃取物與正己烷萃取物的效果較差。此外，從結果中也可看出，乙醇萃取物中具有抗氧化劑的成份，多存留在極性/非極性適中的乙酸乙酯萃取物與丁醇萃取物之間，而不在正己烷或水萃物內，可能與他們的結構有關。

當比較五種萃取物的抗發炎能力與抗氧化特性，我們認為這兩種能力之間並無直接關聯性。

表 3-1 自由基清除率

樣品	等待時間	1 mg/mL	2 mg/mL	10 mg/mL	20 mg/mL	IC 50
乙醇	20 分鐘	4.49 ± 2.67	15.37 ± 1.02	56.03 ± 10.31	81.81 ± 4.36	
	40 分鐘	7.22 ± 3.10	19.92 ± 1.18	66.96 ± 6.60	86.25 ± 2.74	
	60 分鐘	8.57 ± 3.43	21.71 ± 1.03	72.54 ± 6.13	87.81 ± 1.59	6.75 ± 1.35 ^a
	120 分鐘	8.09 ± 3.19	23.89 ± 2.37	80.36 ± 3.30	88.90 ± 0.74	
	180 分鐘	8.45 ± 1.22	23.45 ± 4.41	83.61 ± 3.54	89.25 ± 0.72	
正 乙 烷	20 分鐘	-4.56 ± 0.24	-3.70 ± 0.79	1.77 ± 0.33	9.65 ± 1.74	
	40 分鐘	-2.81 ± 1.0	-2.6 ± 0.38	4.29 ± 0.75	12.8 ± 3.62	
	60 分鐘	-2.51 ± 0.38	2.32 ± 0.61	5.11 ± 1.46	15.49 ± 3.33	50.63 ± 12.77 ^c
	120 分鐘	-3.93 ± 4.00	-2.82 ± 2.40	6.66 ± 1.59	16.91 ± 3.55	
	180 分鐘	-9.93 ± 4.79	-8.92 ± 6.14	6.90 ± 2.23	20.93 ± 3.82	
乙酸乙酯	20 分鐘	10.72 ± 2.49	23.47 ± 1.47	74.09 ± 1.53	87.22 ± 0.38	
	40 分鐘	13.87 ± 2.99	26.86 ± 1.51	80.14 ± 1.28	89.53 ± 0.22	
	60 分鐘	14.60 ± 2.35	29.20 ± 1.48	83.24 ± 1.37	90.06 ± 0.11	4.86 ± 0.58 ^a
	120 分鐘	16.21 ± 5.03	31.25 ± 2.56	86.52 ± 0.86	90.80 ± 0.05	
	180 分鐘	16.33 ± 1.25	33.94 ± 0.66	89.06 ± 0.72	91.14 ± 0.05	
丁 醇	20 分鐘	9.81 ± 2.52	18.82 ± 1.34	67.64 ± 4.38	85.16 ± 0.72	
	40 分鐘	12.99 ± 2.22	22.82 ± 1.77	74.72 ± 3.85	86.44 ± 0.47	
	60 分鐘	13.68 ± 2.34	25.71 ± 1.37	77.24 ± 2.18	86.70 ± 0.36	5.75 ± 0.82 ^a
	120 分鐘	13.42 ± 3.83	27.70 ± 2.52	83.12 ± 1.89	86.83 ± 0.38	
	180 分鐘	16.80 ± 1.15	31.52 ± 1.04	86.67 ± 0.25	87.08 ± 0.36	
水	20 分鐘	-2.31 ± 0.62	-0.95 ± 1.29	18.54 ± 2.62	39.54 ± 2.46	
	40 分鐘	-0.91 ± 0.76	1.13 ± 1.37	21.50 ± 2.37	45.65 ± 2.03	
	60 分鐘	-0.03 ± 0.44	1.33 ± 1.91	24.67 ± 3.12	50.13 ± 2.36	22.42 ± 2.82 ^b
	120 分鐘	-2.79 ± 0.25	-0.44 ± 5.38	26.43 ± 2.71	53.11 ± 1.98	
	180 分鐘	0.72 ± 0.84	1.70 ± 1.40	28.99 ± 1.80	57.96 ± 2.56	

* abcde 字母不同為有顯著差異，P<0.05

3.7 脂肪酸分析

細胞膜磷脂質脂肪酸組成與膜的流動性、硬度有關，相對也會影響膜蛋白，各種受器的移動性。表 3-2 的結果指出當細胞以 LPS 刺激後，細胞的脂肪酸組成將受到影響，飽和脂肪酸總量會上升 (39.5% 上升至 48.8%)，其中又以比例最高的棕櫚酸 (Palmitic acid; C16:0) (22.5% 上升至 26.6%) 與硬脂酸 (Stearic acid; C18:0) (14.3% 升至 18.2%) 最為明顯。相對地，單元不飽和脂肪酸則顯著地從 47.8% 降至 38.3%。其中又以油酸 (Oleic acid; C18:1n-9) 下降的幅度最為明顯，從 28.9% 降至 24.1%。此外，n-6 或 n-3 多元不飽和脂肪酸的比例並沒有太大的變化。

當加入乙醇萃取物與其分萃物後，脂肪酸組成也分別被調整。不過，經檢視與比較各脂肪酸的比例，單從脂肪酸的變化，似乎不易看出脂肪酸的變化與抗發炎作用的關聯性。



表 3-2 各萃取物對細胞磷脂質組成的影響

	NC	PC	乙醇	正己烷	乙酸乙酯	丁醇	水
C14:0	1.91±0.12 ^a	2.78±0.37 ^b	2.85±0.15 ^{bc}	1.86±0.25 ^a	3.3±0.59 ^{bc}	3.73±0.99 ^c	3.16±0.35 ^{bc}
C15:0	0.38±0.03 ^a	0.47±0.07 ^{ab}	0.83±0.07 ^c	1.09±0.07 ^d	1.07±0.04 ^d	0.57±0.08 ^b	0.54±0.04 ^b
C16:0	22.47±0.13 ^a	26.55±0.57 ^b	23.33±0.42 ^a	22.75±0.24 ^a	26.13±1.15 ^b	26.83±0.71 ^b	28.36±1.58 ^c
C16:1n-7	8.45±0.43 ^a	5.63±0.11 ^{bd}	4.66±0.03 ^{bc}	3.71±0.23 ^c	5.7±0.89 ^{bd}	7.06±1.88 ^{ad}	6.44±0.48 ^d
C18:0	14.27±1.01 ^{ac}	18.15±1.15 ^b	14.96±0.3 ^{ae}	11.25±0.22 ^d	12.89±0.87 ^a	16.11±1.19 ^e	16.33±0.96 ^e
C18:1n-9	28.91±0.44 ^a	24.11±0.42 ^b	27.93±0.21 ^{ac}	31.08±0.42 ^e	26.68±1.24 ^c	22.01±1.66 ^d	23.5±0.82 ^{bd}
C18:1n-7	9.46±0.37 ^a	7.8±0.19 ^b	7.41±0.06 ^{bc}	5.5±0.19 ^e	6.33±0.18 ^d	6.66±0.87 ^{cd}	7.02±0.75 ^{bcd}
C18:2n-6	1.47±0.06 ^a	1.97±0.43 ^b	5.13±0.17 ^c	10.12±0.21 ^d	5.43±0.14 ^c	2.33±0.3 ^b	1.91±0.14 ^b
C18:3n-6	0.13±0.01 ^a	0.13±0.01 ^a	0.3±0.02 ^b	0.49±0.03 ^c	0.25±0.01 ^d	0.16±0.03 ^e	0.14±0.01 ^a
C18:3n-3	0.06±0.02 ^{ab}	0.05±0.03 ^a	0.11±0.06 ^b	0.11±0.02 ^b	0.03±0.01 ^a	0.08±0.02 ^{ab}	0.04±0.02 ^a
C20:0	0.13±0.03 ^a	0.22±0.04 ^{ab}	0.17±0.01 ^{ab}	0.09±0.01 ^a	0.14±0.01 ^{ab}	0.21±0.04 ^{ab}	0.29±0.2 ^b
C20:1	0.65±0.02	0.47±0.05	0.55±0.03	0.43±0.02	0.51±0.08	0.43±0.12	0.59±0.37
C20:2n-6	0.27±0.39 ^a	0.11±0.12 ^b	0.13±0.03 ^c	0.28±0.06 ^d	0.17±0.03 ^c	0.24±0.18 ^b	0.08±0.05 ^b
C20:3n-6	0.68±0.03 ^a	0.93±0.04 ^b	1.35±0.02 ^c	1.69±0.03 ^d	1.1±0.05 ^e	0.97±0.17 ^{be}	0.91±0.1 ^b
C20:4n-6	6.61±0.54 ^a	5.28±0.4 ^b	4.77±0.15 ^{bc}	4.18±0.12 ^c	5.03±0.34 ^b	6.73±0.56 ^a	5.41±0.69 ^b
C20:5n-5	0.13±0.01 ^a	0.09±0.02 ^b	0.07±0.00 ^b	0.06±0.02 ^b	0.06±0.02 ^b	0.1±0.04 ^b	0.09±0.01 ^b
C22:0	0.09±0.01	0.18±0.01	0.13±0.01	0.21±0.01	0.15±0.04	0.11±0.04	0.38±0.52
C22:1	0.14±0.06 ^a	0.14±0.03 ^{ab}	0.14±0.06 ^{ab}	0.11±0.03 ^{ab}	0.06±0.01 ^b	0.09±0.04 ^{ab}	0.09±0.03 ^{ab}
C22:4n-6	1.07±0.04 ^a	1.35±0.13 ^b	1.77±0.08 ^c	1.92±0.05 ^c	2.0±0.21 ^c	1.47±0.12 ^b	1.24±0.18 ^{ab}
C22:5n-6	0.35±0.01 ^a	0.44±0.06 ^{ab}	0.48±0.02 ^b	0.45±0.03 ^b	0.35±0.02 ^a	0.47±0.08 ^b	0.41±0.07 ^{ab}
C22:5n-3	0.85±0.07 ^a	1.13±0.12 ^b	1.11±0.08 ^{ab}	0.95±0.03 ^a	0.86±0.03 ^a	1.36±0.27 ^b	1.0±0.21 ^a
C24:0	0.22±0.1	0.41±0.08	0.29±0.05	0.34±0.02	0.4±0.06	0.4±0.12	0.33±0.24
C22:6n-3	1.16±0.09 ^a	1.45±0.12 ^{bc}	1.35±0.06 ^{abc}	1.22±0.03 ^{ab}	1.16±0.04 ^a	1.72±0.16 ^d	1.53±0.26 ^{cd}
C24:1	0.13±0.06	0.17±0.03	0.19±0.07	0.11±0.01	0.18±0.02	0.16±0.04	0.18±0.12

*此表內的數據皆為三重複所得之平均值與±標準差，單位為百分比(%)

* abcde 字母不同為有顯著差異，P<0.05

3.8 第二型環氧化酶生成量檢測

PGE₂ 是花生四烯酸 (Arachidonic acid; AA) 經多種酵素轉化而生成，其中第二型環氧化酶 (COX-2) 是其主要的合成酵素，因此在檢視熟米麴乙醇萃取物與其四種分萃物對 PGE₂ 的影響後，我們更進一步探討熟米麴乙醇萃取物與其分萃物對 COX-2 的影響。圖 3-26 的結果顯示 LPS (0.1 µg/mL) 能顯著刺激巨噬細胞 COX-2 的大量表現，當與 200 µg/mL 的不同萃取物共同培養時，COX-2 的表現可分別被抑制；其中乙醇的抑制效果為 (52.9%)、正己烷 (64.1%)、乙酸乙酯 (56.2%)、丁醇 (30.5%)與水 (20.6%)(圖 3-26)。

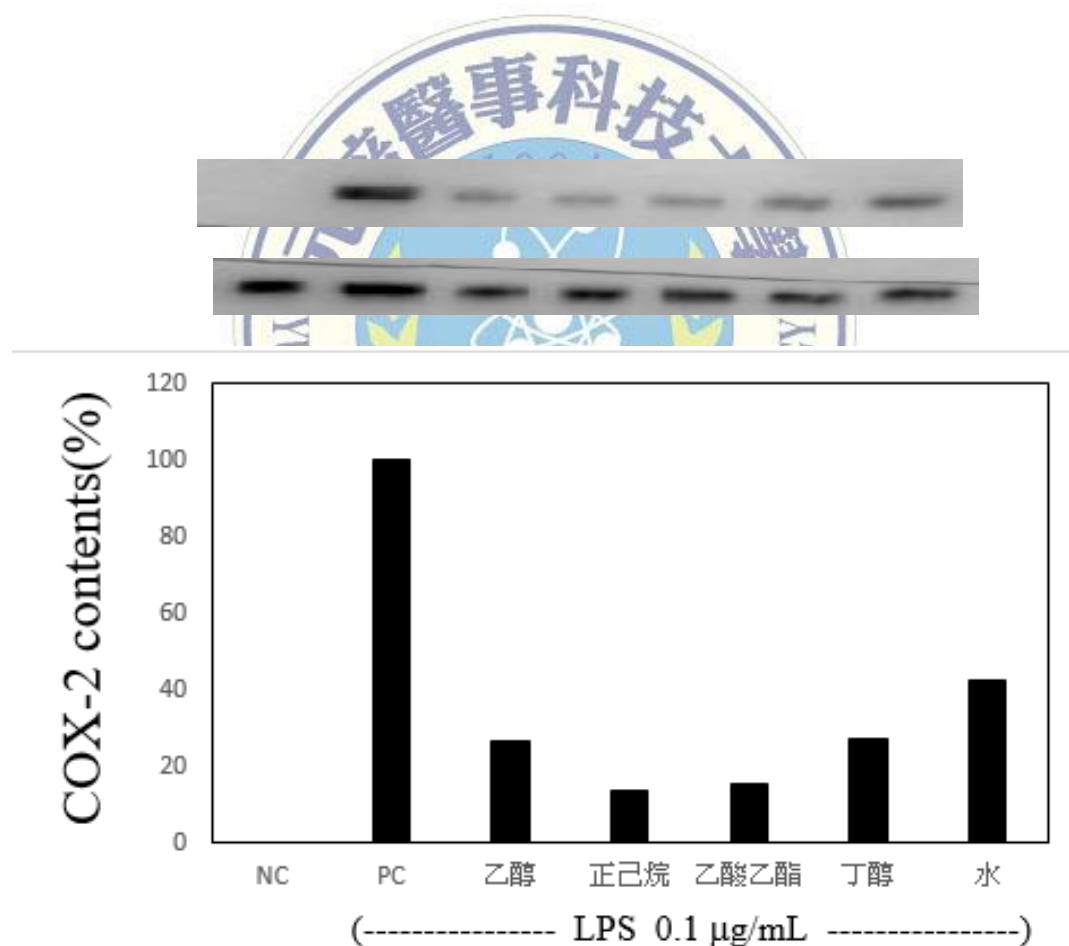


圖 3-26 濃度在200 µg/mL時各萃取物對第二型環氧化酶的影響

第四章 結論

本研究的主要目的是為了探討熟米麴經過萃取後其各式的萃取物，對發炎反應可能的影響。我們使用 RAW264.7 小鼠巨噬細胞當作模型，並以脂多醣作為其發炎反應的刺激。

實驗結果證實熟米麴的乙醇萃取物在濃度超過 400 $\mu\text{g/mL}$ 時會影響細胞的增殖，而濃度 400 $\mu\text{g/mL}$ 以下的乙醇萃取物與其分萃物對脂多醣體刺激的細胞存活率影響不大，僅乙醇、乙酸乙酯和水萃取的分萃物在特定的濃度會稍微促進細胞增殖。

在抗發炎活性上，熟米麴的乙醇萃取物與其分萃物，可透過抑制一氧化氮、介白素-6、腫瘤壞死因子- α 和前列腺素 E_2 這些發炎介質的生成，來顯示具抗發炎的作用。這些萃取物在濃度上或抑制率上都有很大的不同，其中以乙酸乙酯的分萃物，在各項發炎介質的抑制上都有不錯的結果。

接著檢視熟米麴乙醇萃取物以及相關分萃物清除自由基的能力，發現乙醇萃取物，以及乙酸乙酯與丁醇分萃物具有較高的清除能力。不過當比較各萃取物抗發炎的作用與抗氧化活性的有效濃度，我們發現萃取物的抗氧化能力與抗發炎活性無關。

此外，各萃取物可調整細胞磷脂質脂肪酸組成，不過與抗發炎活性的關聯還有待研究。

總而言之，熟米麴的乙醇萃取物能顯著抑制發炎介質的生成，同時，其中四種分萃物皆具有抗發炎的功效。其中以乙酸乙酯的熟米麴分萃物的效果最佳。未來可進一步探討熟米麴乙醇萃取物或其分萃物中，是以何種成分抑制發炎介質的生成。熟米麴是傳統釀酒會用到的麴菌，將其應用在生技製藥產品的開發具有可能性。

參考文獻

一、英文部分

1. **A Hiol., MD Jonzo., N Rugani., D Druet., L Sarda & LC Comeau.,** (2000) “Purification and Characterization of an Extracellular Lipase From a Thermophilic *Rhizopus Oryzae* Strain Isolated From Palm Fruit”, *Enzyme and Microbial Technology*, 26(5): 421-430.
2. **CA Janeway Jr., P Travers., M Walport.,** (2001) “Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition.”, *Garland Science*.
3. **DL Simmons., S Tan., DG Tenen., A Nicholson-Weller & B Seed.,** (1989) “Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein”, *Blood*, 73(1): 284-289
4. **E Basch., S Bent., C Ulbrich., M Smith., P Szapary., P Hammerness & S Axentsev.,** (2006) “Omega-3 fatty acids, fish oil, alpha-linolenic acid”, *Medline Plus*.
5. **FA Kuehl & RW Egan.,** (1980) “Prostaglandins, arachidonic acid, and inflammation”, *Science*, 210(4473), 978-984.
6. **HM Mehta., T Glaubach & SJ Corey.,** (2014) “Systems Approach to Phagocyte Production and Activation: Neutrophils and Monocytes”, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 844: 99-113.
7. **JN Sharma., AA Omaran & SS Parvathy.,** (2007) “Role of nitric oxide in inflammatory diseases”, *Springer Link Inflammopharmacology*, 15: 252-259.
8. **J Rauch., JN Miksch., RM Miksch & K Bernhauer.,** (1950) “On acid formation by *Rhizopus* varieties: fumaric acid fermentation in submerged culture”, *Biochem Z*, 320(4): 390-397.
9. **K Onuma., Y Kanda., SS Ikeda., R Sakaki., T Nonomura., M Kobayashi., M Osaki., M Shikanai., H Kobayashi & F Okada.,** (2015) “Fermented Brown Rice and Rice Bran with *Aspergillus oryzae* (FBRA) Prevents Inflammation-Related Carcinogenesis in Mice, through Inhibition of Inflammatory Cell Infiltration”, *Nutrients*, 7 (12): 10237-10250.
10. **M Berry., C Brightling., I Pavord & A Wardlaw.,**(2007) “TNF-alpha in asthma”, *urrent Opinion in Pharmacology*, 7 (3): 279-282
11. **M Bosmann & PA Ward.,**(2012) “The Inflammatory Response in Sepsis”, *Trends Immunology.*, 34(3): 129-136.
12. **MM Cranmer-Byng., DM Liddle., AA De Boer., JM Monk & LE Robinson.,** (2015) “Proinflammatory Effects of Arachidonic Acid in a Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Microenvironment in 3T3-L1

- Adipocytes in Vitro”, *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 40 (2): 142-154
13. **Q Xue., Y Yan., R Zhang & H Xiong.,** (2018) “Regulation of iNOS on Immune Cells and Its Role in Diseases”, *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12): 3805.
 14. **R Nout & Kiers.,** (2005) “Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millenium”, *Journal of Applied Microbiology*, 98: 789-805.
 15. **R Kapoor & YS Huang.,** (2006) “Gamma Linolenic Acid: An Antiinflammatory omega-6 Fatty Acid”, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, (7): 531-534.
 16. **R Arroyo-Espliguero., P Avanzas., S Jeffery & JC Kaski.,** (2004) “CD14 and toll-like receptor 4: a link between infection and acute coronary events? ”, *British Medical Journal of Heart*, 90(9): 983-988.
 17. **RP Patel., J McAndrew., H Sellak., CR White., H Jo., BA Freeman & VM Darley-USmar.,** (1999) “Biological Aspects of Reactive Nitrogen Species ”, *Biochimicaet Biophysica Acta*, 1411(2-3): 385-400.
 18. **R Pahwa., A Goyal., P Bansal & I Jialal.,** (2020) “Chronic Inflammation ”, *StatPearls*.
 19. **RV Furth & H Beekhuizen.,** (1998) “Monocytes express molecules which play a dominant or accessory role in the adhesion to platelets, lymphocytes and other cells, e.g. endothelial cells, or to a subcellular matrix.”, *Encyclopedia of Immunology*.
 20. **TJ Silhavy, D Kahne, & S Walker.,** (2010) “The Bacterial Cell Envelope”, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
 21. **WL. SMITH.,** (1989) “The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action”, *biochem journal*, 259: 315-324.
 22. **WLW Hazenbos & EJ. Brown.,** (2006) “CHAPTER 2 Phagocytosis: receptors and biology”, *Cambridge University Press*, 7-10.
 23. **YL Tzeng., Anup Datta., V Kumar Kolli, RW Carlson., & DS Stephens.,** (2002) “Endotoxin of Neisseria meningitidis Composed Only of Intact Lipid A: Inactivation of the Meningococcal 3-Deoxy-d-Manno-Octulosonic Acid Transferase”, *Journal of Bacteriology*, 184(9): 2379-2388.

二、中文部分

1. 王政光、李英中、李慶孝、洪小芳、陳佳禧、張芸潔、楊舒如、蕭欣杰、賴麗娟、賴志河、張章裕(2014)。免疫學第四版。新文京開發出版股份有限公司。
2. 卉子(2013)。養身最佳健康食品(下)。丹陽文化。
3. 司艷紅(2015)。病理生理學。北京大學醫學出版社。6，82-97。
4. 呂怡貞(2011)。保衛人體健康的免疫大軍。科學人雜誌-醫學。
5. 邱佳玉(2002)。民間傳統酒麴（白麴）的製作與討論。苗栗區農業專訊，第 17 期。
6. 金小玲、楊汝婷、尚亞靖、戴芳、錢益平、程利俠、週波、劉中立(2010)。羥基肉桂酸衍生物的氧化偶聯及其相關產物清除自由基的活性。科學通報，第 24 期，2466。
7. 林天送(2011)。一氧化氮醫學。科學發展，第 461 期，72-75 頁。
8. 林廷燦(1997)。一氧化氮路徑：從基礎到臨床應用。屏東市國仁醫院內科部，第 39 期，287-324。
9. 林紹為(2015)。以小鼠 RAW264.7 巨噬細胞研究罕見脂肪酸 Juniperonic acid 的抗發炎活性。元培醫事科技大學生物科技暨製藥技術研究所。
10. 林讚峰(2002)。白麴的妙用。世貿出版社。
11. 胡普信(2014)。黃酒釀造技術。中國輕工業出版社。
12. 連之嬋(2008)。腫瘤壞死因子- α 誘導 3T3-L1 脂肪細胞脂肪分解之調控機轉。國立陽明大學生理學研究所。
13. 黃文程(2015)。生物活性導向分離鑑定山苦瓜緩解痤瘡丙酸桿菌誘導發炎反應之活性成分。國立臺灣師範大學人類發展與家庭學研究所。
14. 許百睿、李聰亮(2001)。前列腺素之合成與作用機轉。台灣醫界，第 44 期。
15. 梁佳玟、賴怡君、朱燕華(2004)。中草藥對於促發炎細胞激素生成之影響。食品工業研究所，15(4)，293-304。
16. 廖文進、吳錦楨、何善台和王志中(2008)。自由基與敗血症：超氧歧化酶的角色。中華民國重症醫學雜誌。9，10-19。
17. 劉冠廷(2016)。評估多種魚腥草萃取物的生物效應。元培醫事科技大學生物科技暨製藥技術研究所。
18. 劉升華(2017)。重慶小麴生產技術。中國輕工業出版社。