

東海大學食品科學系碩士班

Master of Food Science
Tunghai University

食品科技組
Food Technology Section

杏鮑菇子實體對以 $A\beta$ 誘導阿茲海默症 C57BL/6J 小鼠
改善記憶學習能力之研究

The study of *Pleurotus eryngii* fruiting body to
ameliorate memory and learning ability in $A\beta$ -induced
Alzheimer's disease C57BL/6J mice.

黃柏璋
Po-Chang Huang

指導教授： 梁志弘 博士
蔣慎思 博士

Advisor: Chih-Hung Liang, Ph.D.
Shen-Shih Chiang, Ph.D.

中華民國一百零五年六月

JUN., 2016

碩士論文考試委員審定書

食品科學系碩士班食品科技組 黃柏璋 君所提之論文

杏鮑菇子實體對以 A β 誘導阿茲海默症

C57BL/6J 小鼠改善記憶學習能力之研究

The study of *Pleurotus eryngii* fruiting body to ameliorate
memory and learning ability in A β -induced Alzheimer's
disease C57BL/6J mice

經本委員會審定通過，特此證明。

論文考試委員會

委員：

潘子明

國立臺灣大學 生化科技學系 名譽教授

梁志欣

大葉大學 生物資源學系 教授

指導教授：

梁志弘

助理教授

蔣真恩

助理教授

中華民國一零五年四月二十九日

謝誌

首先感謝恩師 梁志弘 博士的教誨，在研究及待人處事上不斷地給予指導、鼓勵及協助，更感謝老師給予我到中興大學 蔣慎思 博士實驗室共同指導的機會。在中興研究期間感謝指導教授 蔣慎思 博士於實驗上不辭辛勞的悉心指導，使我的研究更加嚴謹而完善，以表至萬分謝忱。

文稿初成，承蒙口試委員潘子明 教授及梁志欽 教授撥冗審閱，並於口試期間給予學生寶貴意見，使本論文更加完整及嚴謹。另外，感謝中興森林系王升陽 教授提供儀器設備，使我的研究能順利進行，在此一併至上由衷感謝。

在學期間感謝系上所有老師及助教在實驗上給予協助，也謝謝王姐在學生事務上的幫忙，讓我求學生涯能順利完成。另外，感謝學長姐彥甫、容蓉、盈吟、毓琪、佑珊及珮瑄在實驗上的指導與照顧；感謝金寶、予捷、啟憲、瓊峰、芸禎、懋碩及帥氣冠增的扶持及鼓勵。此外，感謝我的好友咨為、啟弘、萬宇及秉叡在我迷惘無助時，在旁邊給我打氣，讓我有信心繼續面對挑戰。

感謝爸爸、媽媽、姐姐及姐夫在我低潮時，給我最溫暖的支持與鼓勵，讓我撐過研究所種種挑戰，完成學位。最後，謹以此論文獻給所有關心我的親人、師長及朋友，感謝你們陪我度過人生這一段黃金歲月。

黃柏璋 謹致於

東海大學食品科學系

中華民國一百零五年六月

摘要

阿茲海默症 (Alzheimer's disease) 主要為腦內氧化壓力過高造成類澱粉樣胜肽 (amyloid β -peptide, A β) 斑塊堆積及神經纖維糾結 (neurofibrillary tangles, NFTs) 所引發之老年型退化性疾病。杏鮑菇 (*Pleurotus eryngii*) 子實體含多量之麥角硫因 (ergothioneine)、腺苷 (adenosine) 及多酚 (polyphenol) 等抗氧化活性物質,可減緩因體內氧化壓力所造成之老化現象。故本研究針對杏鮑菇子實體之一般成分及機能性成分進行分析,並探討餵食低、中及高劑量之杏鮑菇子實體粉末對於側腦注射 A β_{1-40} 誘導阿茲海默症之 C57BL/6J 小鼠學習與認知功能之改善效果。

研究結果顯示,一般成分分析之水分、乾物重、粗灰分、粗脂質、粗蛋白及碳水化合物含量,分別為 8.34 ± 0.14 、 91.66 ± 0.14 、 5.75 ± 0.02 、 1.55 ± 0.01 、 16.79 ± 0.11 及 67.60 ± 0.26 %;機能性成分方面,麥角硫因、腺苷、總酚及多醣體含量,分別為 1.36 ± 0.05 、 3.07 ± 0.08 、 3.58 ± 0.13 及 223.89 ± 18.39 mg/g (DB)。動物試驗結果顯示,小鼠餵食杏鮑菇子實體粉末六週後,各組間體重增加量及攝食量無明顯差異。血清生化參數及肝腎組織切片結果亦無異常之情形。在腦組織相對重量結果顯示,控制組、褪黑激素及低、中、高劑量組與 A β 組相比均顯著較高 ($p < 0.05$),顯示餵食杏鮑菇子實體粉末可減緩腦部萎縮之情形。在水迷宮參考記憶試驗中,低、中、高劑量組與 A β 組相比,可明顯減少小鼠於泳池中之逃逸時間 (49、80 及 85%) 及逃逸距離 (53、68 及 69%) ($p < 0.05$);在水迷宮空間探索試驗中,於目標象限之徘徊時間、穿梭次數、游泳距離、及游泳速率,各處理組與 A β 組相比,均顯著上升 ($p < 0.05$);T 字迷宮試驗結果亦顯示,不同劑量樣品組能顯著提升尋獲食物之正確率 ($p < 0.05$);另發現餵食杏鮑菇子實體粉末可透過減少腦中氧化壓力損傷,顯著降低磷酸化 τ -蛋白含量 (phosphorylated τ -protein)、A β 斑塊沉積量、丙二醛 (malondialdehyde) 及蛋白質羰基氧化物 (protein carbonyl) 含量 ($p < 0.05$),降低神經細胞受損。

綜上所述，藉由動物行為模式及腦中阿茲海默相關病徵之氧化物含量分析結果，顯示餵食杏鮑菇子實體粉末可改善小鼠記憶學習及認知功能，可應用於開發具延緩與改善阿茲海默症之相關產品。

關鍵字: 阿茲海默症、類澱粉樣蛋白、神經纖維糾結、杏鮑菇



Abstract

Alzheimer's disease (AD) is major caused by highly oxidative stress, which accelerates the amyloid β -peptide ($A\beta$) plaques and neurofibrillary tangles (NFTs) accumulated in brain. *Pleurotus eryngii* (PE) has been known as a rich source of antioxidants including ergothioneine, adenosine and polyphenol, which can reduce the aging phenomenon by oxidative stress in body. The aim of this study was to investigate the proximate compositions and bio-functional compounds in PE and evaluate the cognitive impairment of low (LPE), medium (MPE) and high (HPE) dosages of PE by $A\beta$ induced-Alzheimer's disease model in C57BL/6J mice.

In proximate compositions, the contents of moisture, dry matter, crude ash, crude fat, crude protein and carbohydrate were 8.34 ± 0.14 , 91.66 ± 0.14 , 5.75 ± 0.02 , 1.55 ± 0.01 , 16.79 ± 0.11 and $67.60 \pm 0.26\%$, respectively. Analysis of bio-functional components, the levels of ergothioneine, adenosine, total phenols and polysaccharide were 1.36 ± 0.05 , 3.07 ± 0.08 , 3.58 ± 0.13 and 223.89 ± 18.39 mg/g DB, respectively. The results of Alzheimer's disease model by 6-week feeding of PE was showed that there is no adverse effects on body weight gain, food efficiency, serum biochemical parameters and histopathological examinations of liver and kidney in all dosages. The relative brain weight of $A\beta$ group was significantly lower than that of other groups ($p < 0.05$). It showed that PE could retard the atrophy of brain. In reference memory task, it showed that LPE, MPE and HPE significantly decreased percentage of escape latency (49-85%) and escape distance (53-69%) compared to that of $A\beta$ group ($p < 0.05$). With regards as the results of probe and T maze tasks indicate that PE administration potently ameliorated the memory deficit in mice. By AD pathology index analysis, PE can significantly decrease the contents of phosphorylated τ -protein, depositions of $A\beta$ plaques, values of

malondialdehyde and protein carbonyl in brain. These results suggest that PE can attenuate the memory and learning ability in A β -induced Alzheimer's disease mice and have great benefit to development as functional food on prophylaxis of AD.

Keyword: Alzheimer's disease, amyloid β -peptide, neurofibrillary tangles, *Pleurotus eryngii*

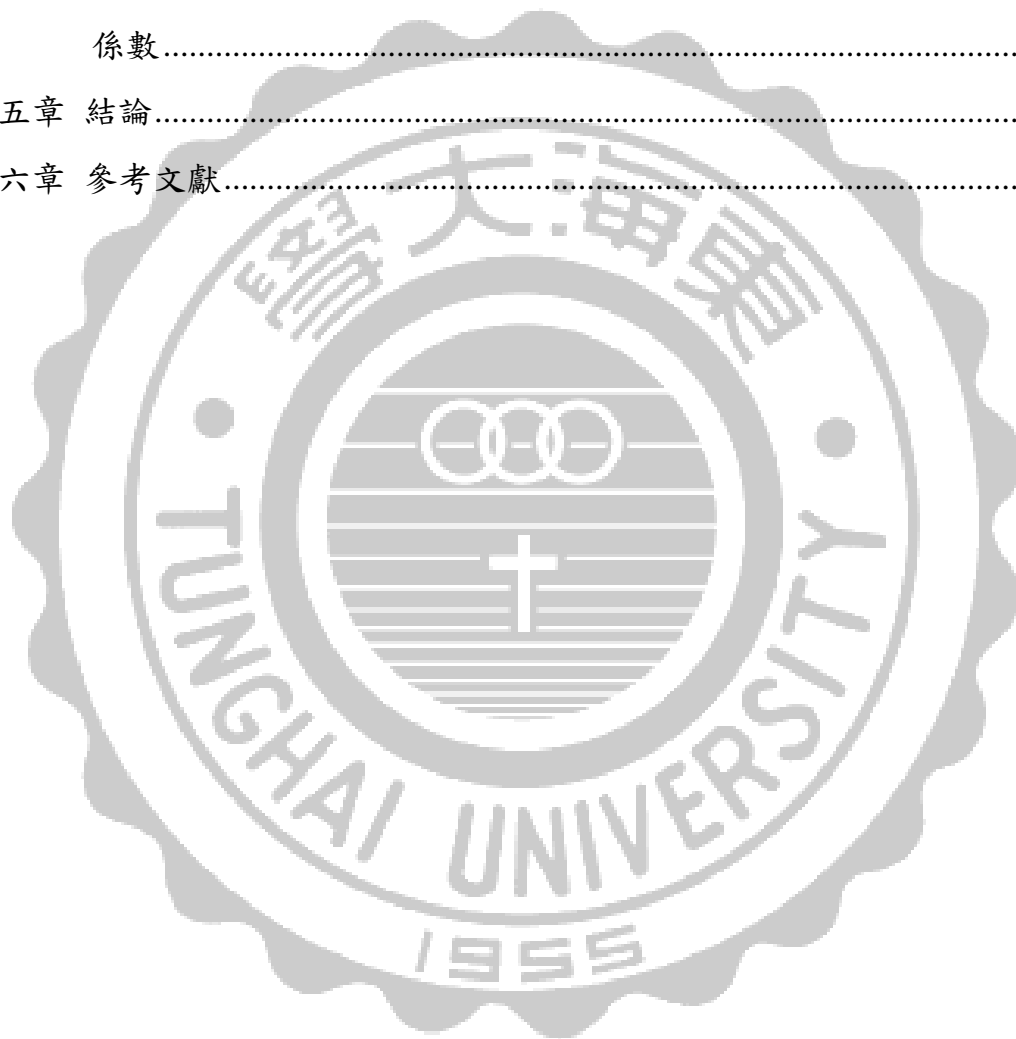


目錄

摘要.....	I
Abstract.....	III
表次.....	VIII
圖次.....	IX
第一章 前言.....	1
第二章 文獻回顧.....	2
壹、失智症 (dementia)	2
貳、阿茲海默症	4
一、阿茲海默症之發現及病徵	4
二、阿茲海默症之病理及成因	4
三、阿茲海默症之相關影響因子	5
四、阿茲海默症之臨床診斷	12
五、阿茲海默症之治療	18
參、杏鮑菇 (<i>Pleurotus eryngii</i>)	22
一、杏鮑菇介紹	22
二、杏鮑菇之營養成分	22
三、杏鮑菇之機能性成分	22
肆、褪黑激素 (melatonin)	32
一、褪黑激素之介紹	32
二、褪黑激素抗氧化機制	34
伍、研究目的與實驗架構	34
第三章 材料與方法.....	37
壹、實驗儀器及藥品	37
一、實驗儀器	37
二、藥品試劑	38
三、酵素免疫分析套組	39

四、實驗材料	39
貳、實驗方法	40
一、杏鮑菇子實體一般成分分析	40
二、杏鮑菇子實體機能性成分分析	42
三、體內動物實驗模式	44
四、皮爾森相關係數 (Pearson correlation coefficient)	56
五、統計分析	56
第四章 結果與討論	57
壹、杏鮑菇子實體粉末之一般成分分析	57
貳、杏鮑菇子實體粉末之機能性成分分析	59
一、麥角硫因含量	59
二、腺苷含量	59
三、總酚含量	61
四、多醣體含量	61
參、杏鮑菇子實體粉末改善阿茲海默症之研究	62
一、 $A\beta_{1-40}$ 注射手術及餵食杏鮑菇子實體粉末對 C57BL/6J 小鼠體重及攝食量之影響	62
二、餵食杏鮑菇子實體粉末對 C57BL/6J 小鼠血清生化參數之影響	62
三、餵食杏鮑菇子實體粉末對 C57BL/6J 小鼠臟器組織相對重量之影響	66
四、餵食杏鮑菇子實體粉末對 C57BL/6J 小鼠腦部組織之影響	68
五、餵食杏鮑菇子實體粉末對 C57BL/6J 小鼠肝腎臟組織之影響	68
六、餵食杏鮑菇子實體粉末對 C57BL/6J 小鼠記憶學習能力之影響	73
七、餵食杏鮑菇子實體粉末對 C57BL/6J 小鼠游泳速率之影響	82
八、餵食杏鮑菇子實體粉末對 C57BL/6J 小鼠於 T 字迷宮試驗之影響	82
九、餵食杏鮑菇子實體粉末對 C57BL/6J 小鼠腦中磷酸化 τ -蛋白之影響	85

十、餵食杏鮑菇子實體粉末對 C57BL/6J 小鼠腦中丙二醛濃度之影響	85
十一、餵食杏鮑菇子實體粉末對 C57BL/6J 小鼠腦中蛋白質羰基氧化物 濃度之影響	88
十二、餵食杏鮑菇子實體粉末對 C57BL/6J 小鼠腦中 A β 斑塊沉積量之 影響	90
十三、餵食杏鮑菇子實體粉末與腦中阿茲海默症病徵及行為能力之相關 係數	93
第五章 結論	96
第六章 參考文獻	99



表次

附表一、經氧自由基氧化之蛋白質胺基酸殘基側鏈及其產物	14
附表二、國家神經與溝通疾患機構暨阿茲海默症相關疾患協會診斷準則	16
附表三、簡易智能狀態檢測表.....	17
附表四、特定食物中麥角硫因含量.....	27
附表五、食藥用菇子實體麥角硫因之含量.....	28
附表六、人類與大鼠紅血球及大鼠其他臟器麥角硫因之含量	29
附表七、杏鮑菇子實體粉末改善 A β 誘導小鼠記憶學習能力試驗之分組	46
表一、杏鮑菇子實體之一般成分.....	58
表二、鮑菇子實體之麥角硫因、腺苷、總酚及多醣體含量	60
表三、杏鮑菇子實體粉末對以 A β 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠增重及攝食量 之影響	63
表四、杏鮑菇子實體粉末對以 A β 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠血清生化值之 影響	64
表五、杏鮑菇子實體粉末對以 A β 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠臟器重量之影 響	67
表六、杏鮑菇子實體對以 A β 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠於參考記憶試驗之 逃逸時間	74
表七、杏鮑菇子實體粉末對以 A β 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠於參考記憶試 驗之游泳距離	76
表八、餵食杏鮑菇子實體粉末與腦中阿茲海默症病徵之皮爾森相關係數	94
表九、餵食杏鮑菇子實體粉末與小鼠行為能力之皮爾森相關係數	95

圖次

附圖一、全球患有失智症人口之原先預估值及上修幅度之比較	3
附圖二、APP 代謝路徑	6
附圖三、細胞內神經元之 τ -蛋白聚集機制	9
附圖四、磷酸化 τ -蛋白造成粒線體功能障礙及神經損傷	10
附圖五、可溶性 $A\beta$ 嵌入細胞脂質雙層產生脂質過氧化產物之過程	13
附圖六、乙醯膽鹼神經傳導系統	19
附圖七、神經突觸之 AMPA 及 NMDA 受體調控機制	21
附圖八、杏鮑菇之 (A) 外觀 (B) 菌柄橫切面與菌傘	23
附圖九、麥角硫因之硫醇結構和硫銅結構	25
附圖十、麥角硫因之生物合成反應	26
附圖十一、腺苷之結構圖	31
附圖十二、阿魏酸之結構圖	33
附圖十三、褪黑激素與羥基自由基結合產生中產物 C3-OHM 及終產物 AFMK 之機制	35
附圖十四、實驗架構圖	36
附圖十五、杏鮑菇子實體粉末改善 $A\beta$ 誘導小鼠記憶學習能力試驗之日程 圖	47
附圖十六、水迷宮區域圖	49
附圖十七、T 字迷宮裝置	51
圖一、杏鮑菇子實體粉末對以 $A\beta$ 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠腦組織之影響 (圖中比例尺大小為 600 μm)	69
圖二、杏鮑菇子實體粉末對以 $A\beta$ 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠腦組織之影響 (圖中比例尺大小為 60 μm)	70
圖三、杏鮑菇子實體粉末對以 $A\beta$ 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠肝組織之影響 (圖中比例尺大小為 60 μm)	71
圖四、杏鮑菇子實體粉末對以 $A\beta$ 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠腎組織之影響	

(圖中比例尺大小為 60 μm)	72
圖五、杏鮑菇子實體粉末對以 $A\beta$ 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠在空間探索試驗之游泳路徑	78
圖六、杏鮑菇子實體粉末對以 $A\beta$ 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠在空間探索試驗於目標象限游泳時間	79
圖七、杏鮑菇子實體粉末對以 $A\beta$ 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠在空間探索試驗之游泳距離百分比	80
圖八、杏鮑菇子實體粉末對以 $A\beta$ 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠在空間探索試驗之目標象限穿梭次數	81
圖九、杏鮑菇子實體對以 $A\beta$ 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠之游泳速率	83
圖十、杏鮑菇子實體粉末對以 $A\beta$ 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠於 T 字迷宮試驗	84
圖十一、杏鮑菇子實體粉末對以 $A\beta$ 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠之腦中磷酸化 τ -蛋白程度	86
圖十二、杏鮑菇子實體粉末對以 $A\beta$ 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠之腦中脂質過氧化程度	87
圖十三、杏鮑菇子實體粉末對以 $A\beta$ 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠之腦中蛋白質羰基氧化物濃度	89
圖十四、杏鮑菇子實體粉末對以 $A\beta$ 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠之腦中 $A\beta$ 斑塊沉積情形	91
圖十五、杏鮑菇子實體粉末對以 $A\beta$ 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠 $A\beta$ 斑塊面積百分比	92
圖十六、杏鮑菇子實體粉末改善阿茲海默症之可能路徑	98

第一章 前言

近年來醫療科技進步及保健觀念提升，使人類平均壽命不斷延長，全球步入高齡化社會，許多退化性疾病 (degenerative diseases) 的發生也隨之增加，其中以失智症 (dementia) 為大眾關注之焦點 (Hung et al, 2010)。它是屬於腦神經系統退化或功能異常之疾病，其分類中又以阿茲海默症 (Alzheimer's disease) 患者佔大多數，主要發病原因為腦內氧化壓力 (oxidative stress) 過高造成類澱粉樣蛋白 (amyloid β -peptide, A β) 斑塊堆積及神經纖維糾結 (neurofibrillary tangles, NFTs)，促使腦神經細胞凋亡，最終使皮質層 (cortex) 及海馬迴 (hippocampus) 萎縮失去記憶功能 (Koudinov et al, 2009 ; Crystal et al, 2014)。

杏鮑菇 (*Pleurotus eryngii*) 是一種常見之食用菇類，別名雪茸或平菇王，屬於擔子菌綱 (Basidiomycetes)，傘菌目 (Agaricales)，口蘑科 (Tricholomataceae)，側耳屬 (*Pleurotus*) (陳, 1993)，富含許多機能性成分，包括麥角硫因 (ergothioneine)、腺苷 (adenosine)、多酚類 (polyphenol) 及多醣體 (polysaccharide) 等 (Lee et al, 2011; Estrada et al, 2011)。有文獻指出麥角硫因、多酚類及多醣體皆有保護腦神經細胞之功效，腺苷則有調節神經元釋放神經傳導物質的功能 (Cunha, 2001 ; Jang et al, 2004 ; Alam et al, 2011 ; Mahmoud et al, 2014)。

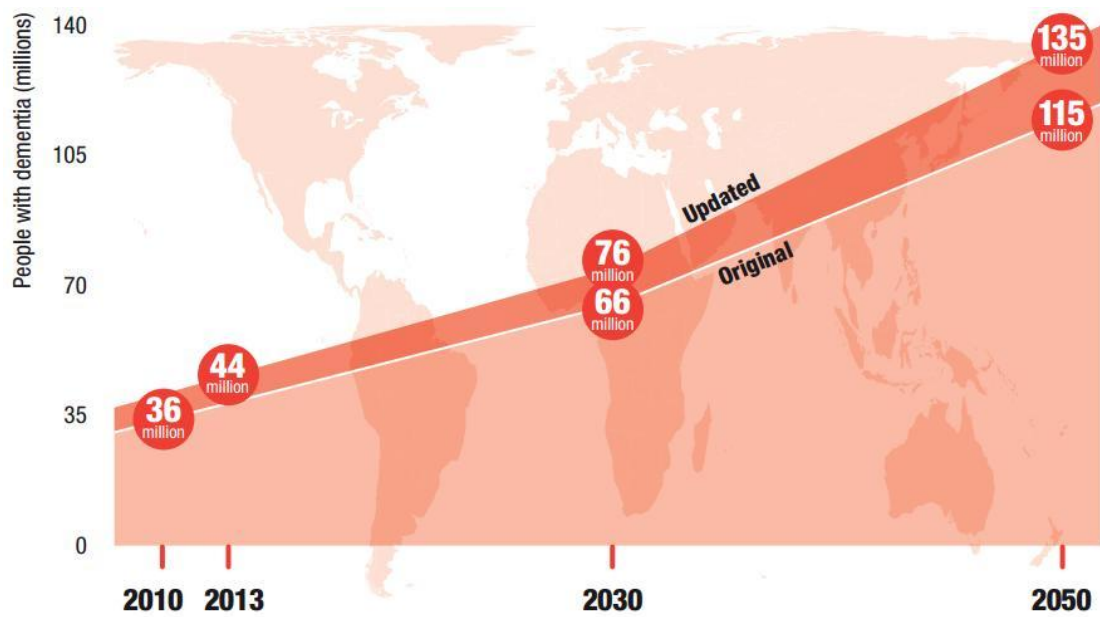
由於阿茲海默症患者日益增加已成為世界各國棘手之醫療問題，故本研究擬以側腦注射 A β ₁₋₄₀ 誘導產生具認知功能障礙阿茲海默症狀之 C57BL/6J 小鼠，再以杏鮑菇子實體粉末餵食六週後，於試驗期間進行水迷宮 (water maze) 與 T 字迷宮 (T maze) 試驗，評估其記憶學習能力之改善，並測定腦中磷酸化 τ -蛋白 (phosphorylated τ -protein)、A β 斑塊 (A β plaques) 沉積量、蛋白質羰基氧化物 (protein carbonyl) 及丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 之含量，探討杏鮑菇子實體粉末是否降低上述阿茲海默症危險因子之表現，具有延緩衰老之功效。

第二章 文獻回顧

壹、失智症 (dementia)

失智症俗稱老人癡呆症，屬於腦神經系統退化性疾病，可分為兩大類，第一類為血管性失智症 (vascular dementia)，主要為腦中風或慢性腦血管病變，使腦細胞死亡進而造成認知力衰退，糖尿病及高血壓患者為主要發生之高危險群 (Venkat et al, 2015)；第二類為退化性失智症 (degenerative dementia)，致病原因為過度氧化壓力對腦神經細胞造成永久性傷害，常見種類為阿茲海默症、路易氏體失智症 (dementia with Lewy bodies)、帕金森氏症 (Parkinson disease) 及亨廷頓氏症 (Huntington's disease) 等疾病 (Klimova & Kuca, 2016)。有研究指出罹患失智症者，其中阿茲海默症患者佔 60-70%、血管性失智症佔 15% 及路易氏體失智症佔 10% (Duthey, 2013)。失智患者之臨床症狀主要包含記憶及語言能力衰退 (memory and expressive language disorder)、認知功能受損 (cognitive impairment)、思維改變 (thinking patterns alter) 及理解與計算能力退化 (comprehending and calculating degeneration) 等 (Dekker et al, 2015)。

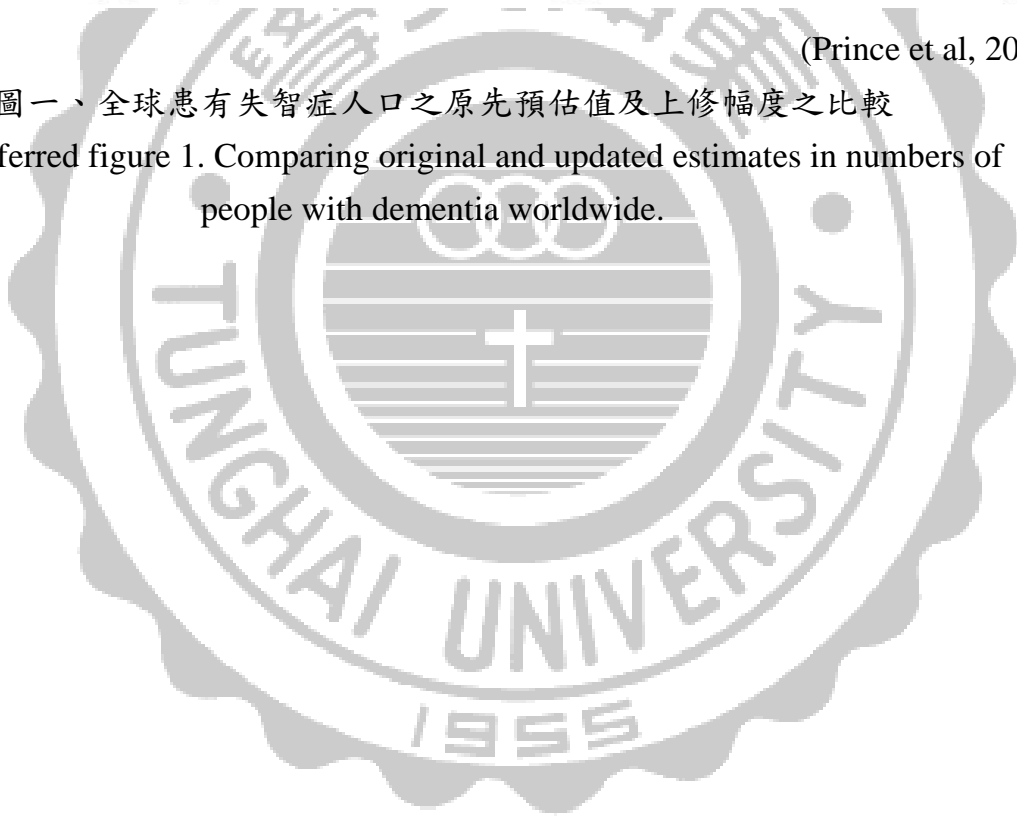
根據國際阿茲海默症協會 (Association of Alzheimer's Disease International, ADI) 於 2013 年調查報告顯示，全球共有 4400 萬人罹患失智症，預估 2030 年失智人口將上升至 7600 萬人，到 2050 年則上升至 1 億 3500 萬人，與 2009 年相比，2030 年失智人口上修幅度達 15%，2050 年則高達 17%，如附圖一所示 (Prince et al, 2013)。2010 年世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 報告指出，全球對失智症之醫療支出為 6040 億美金，隨著失智人口增加，預估 2050 年治療費用將高達 1 兆美金，將造成世界各國龐大的經濟及醫療負擔。台灣衛生福利部 (Taiwan Food and Drug Administration, TFDA) 委託失智症協會於 2011 年調查發現，台灣失智人口約 23 萬人，其年齡層分布率在 65~69 歲為 3.4%、70~74 歲為 3.5%、75~79 歲為 7.2%、80~84 歲為 13.0%、85~89 歲為 21.9% 及 90 歲以上為 30.9%，隨著人口不斷老化，失智症人數亦將不斷攀升。



(Prince et al, 2013)

附圖一、全球患有失智症人口之原先預估值及上修幅度之比較

Referred figure 1. Comparing original and updated estimates in numbers of people with dementia worldwide.



貳、阿茲海默症

一、阿茲海默症之發現及病徵

1906 年德國神經科 Alois Alzheimer 醫生之研究發現，在女性病患之大腦切片皮質層之神經細胞內有神經纖維糾結及不明斑塊沉積；之後其他相關研究亦證實神經纖維糾結是因 τ -蛋白過度磷酸化導致，斑塊沉積物則是因類澱粉樣勝肽在腦中堆積所引起，因此為紀念 Alzheimer 醫生而將此病命名為阿茲海默症 (Sorrention & Bonavita, 2007)。阿茲海默症好發於 65 歲以上之年長者，初期徵狀為短期記憶受損，難以記住剛發生之事物，但長期記憶不受影響；中期徵狀則為短期記憶持續惡化，長期記憶也漸漸喪失，患者需由他人輔佐日常生活活動；晚期徵狀會出現語言溝通及情緒障礙，且行動力受限而完全需依賴照護者協助其生活起居 (Finkel, 2000；Budson & Price, 2005；Braak & Del, 2012)。

二、阿茲海默症之病理及成因

阿茲海默症之致病機制尚未完全明瞭，但目前最被接受之理論為類澱粉樣勝肽假說 (amyloid β hypothesis) (Hardy & Selkoe, 2002)。該假說指出類澱粉樣前驅物蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 受到 β -分泌酶 (β -secretase) 及 γ -分泌酶 (γ -secretase) 切割後，產生 $A\beta$ 單體，此單體會以 α 鍵結聚合，形成有毒之可溶性 $A\beta$ 低聚物 ($A\beta$ oligomers)。載脂蛋白 E4 (apolipoprotein E4, ApoE4) 會加速 $A\beta$ 低聚物以 β 鍵結方式形成，具腦毒性之非可溶 $A\beta$ 纖維，此纖維之間會以氫鍵連結，產生大量斑塊而堆積於神經周圍，阻斷神經傳遞訊息之功能 (Ahmed et al, 2010；Tai et al, 2014)。可溶及非可溶性 $A\beta$ 皆會使腦中 Cu^{2+} 及 Fe^{3+} 還原成 Cu^+ 及 Fe^{2+} 離子，並誘發腦中自由基產生，產生的自由基會破壞腦細胞中蛋白質及脂質，造成氧化壓力上升 (Gong et al, 2003；Querfurth & LaFerla, 2010；Carrillo-Mora et al, 2014)。此外，過高的氧化壓力亦會增加肝糖合成激酶 (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 的活性，促使 τ -蛋白過

度磷酸化，產生神經纖維糾結，並堆積於神經內部造成神經凋亡之現象 (Songin et al, 2007)。

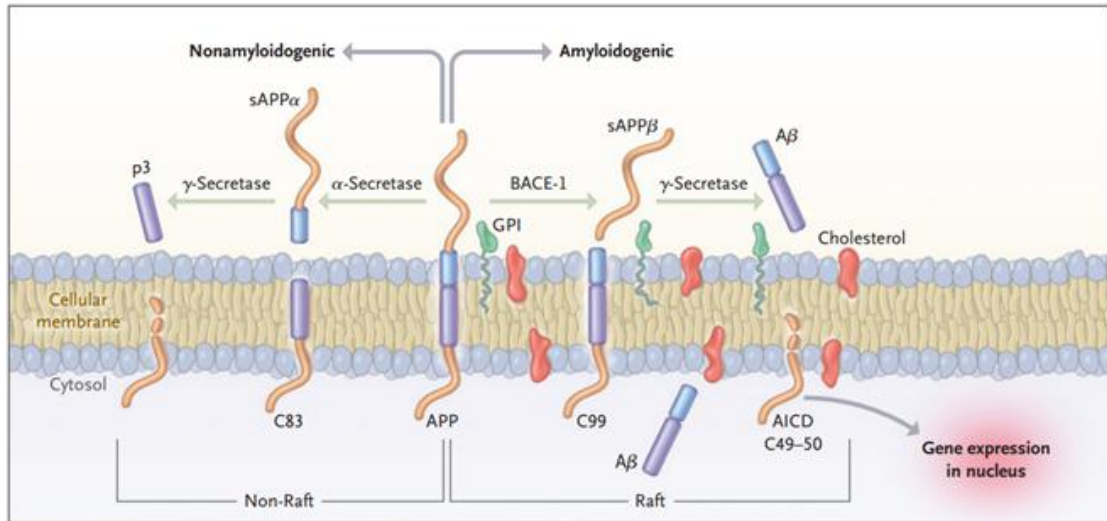
三、阿茲海默症之相關影響因子

阿茲海默症病理機制複雜，主要由數個因子互相影響所致，以下分別就各因子加以說明：

(一) 類澱粉樣前驅物蛋白 (amyloid precursor protein, APP)

APP 基因位於細胞核之第 21 對染色體，轉譯後形成一段長度約 770 胺基酸片段之第一型跨膜蛋白 (type I transmembrane protein)，其多表現於腦神經細胞及中樞神經系統，APP 可與驅動蛋白-1 (kinesin-1) 結合，提升軸突傳遞訊息之速率 (Goate et al, 1991; Selkoe et al, 1997; Kamal et al, 2000; Muresan, 2015)。APP 主要可由 α -分泌酶 (α -secretase) 及 β -secretase 分解進行兩種代謝路徑，第一種為非類澱粉樣蛋白生成 (nonamyloidogenic pathway)，APP 經 α -secretase 切割後，產生長度約 695 胺基酸之 sAPP α (soluble APP alpha) 及 C83 (C 端含 83 個胺基酸) 兩種胜肽片段 (附圖二)；sAPP α 可調節神經傳導物質麩醯胺酸 (glutamate, Gln) 的釋放及促進神經突觸 (synapse) 生長 (Furukawa & Mattson, 1998; Gakhar-Koppole et al, 2008)；C83 則再經由 γ -secretase 切割後，產生 p3 (3 kDa peptide) 及長度約 50 胺基酸之類澱粉前驅物蛋白胞內區塊 (APP intracellular domain, AICD) 片段，其中 AICD 能抑制原癌基因 (cancer-mycophyta, c-Myc) 之表現，以減緩神經細胞凋亡的程度 (Zhou et al, 2012)。

第二種為類澱粉樣蛋白生成 (amyloidogenic pathway)，APP 經由 β -secretase 切割後，形成長度約 670 胺基酸之 sAPP β (soluble APP beta) 及 C99 兩種胜肽片段 (附圖二)；sAPP β 不具有如 sAPP α 之神經保護功能，但可調節細胞內外鈣離子濃度之平衡；C99 則再經由 γ -secretase 切割，產生 AICD 及 A β ₁₋₄₀ 或 A β ₁₋₄₂ 之胜肽片段，其中 A β ₁₋₄₀ 或 A β ₁₋₄₂



(Querfurth & LaFerla, 2010)

附圖二、APP 代謝路徑

Referred figure 2. APP metabolic pathway.



即為造成阿茲海默症患者記憶衰退之主因 (Furukawa et al, 1996)。有文獻指出阿茲海默症患者腦中之 $A\beta_{1-40}$ 較 $A\beta_{1-42}$ 多 90%，為 $A\beta$ 斑塊沉澱之主要型態，但 $A\beta_{1-42}$ 的 C 端疏水性胺基酸較多，纖維化能力較強且毒性高 (Suzuki et al, 1994；Small & Barrow, 2006)。

(二) β -端類澱粉樣前驅物蛋白切割酵素 (β -site APP cleaving enzyme, BACE)

BACE 即 β -secretase，分為 BACE1 及 BACE2 兩種，兩酵素間有 65% 同源性，BACE1 在腦組織含量較多，BACE2 則在腎臟及胰腺含量較高 (Saunders et al, 1999；Bennett et al, 2000)。BACE1 由 501 個胺基酸所組成，需由天門冬胺酸酶活化 (aspartic protease active) 後才具有活性，其活化位置分別為胺基酸側鏈 93-96 及 289-292 兩片段 (Yan et al, 1999；Creemers et al, 2001)。有研究發現當腦中氧化壓力上升或於酸性環境下，會增加雙股 RNA 依賴性激酶 (double-strand RNA activated protein kinase, PKR) 之活性，使 BACE1 大量產生且經由天門冬胺酸酶活化後，會快速切割 APP，進而產生較多 $A\beta$ 斑塊，此情形好發於 65 歲以上老人 (Cole & Vassar, 2007；Mouton-Liger et al, 2012)。

(三) 類澱粉樣胜肽 (amyloid β -peptide, $A\beta$)

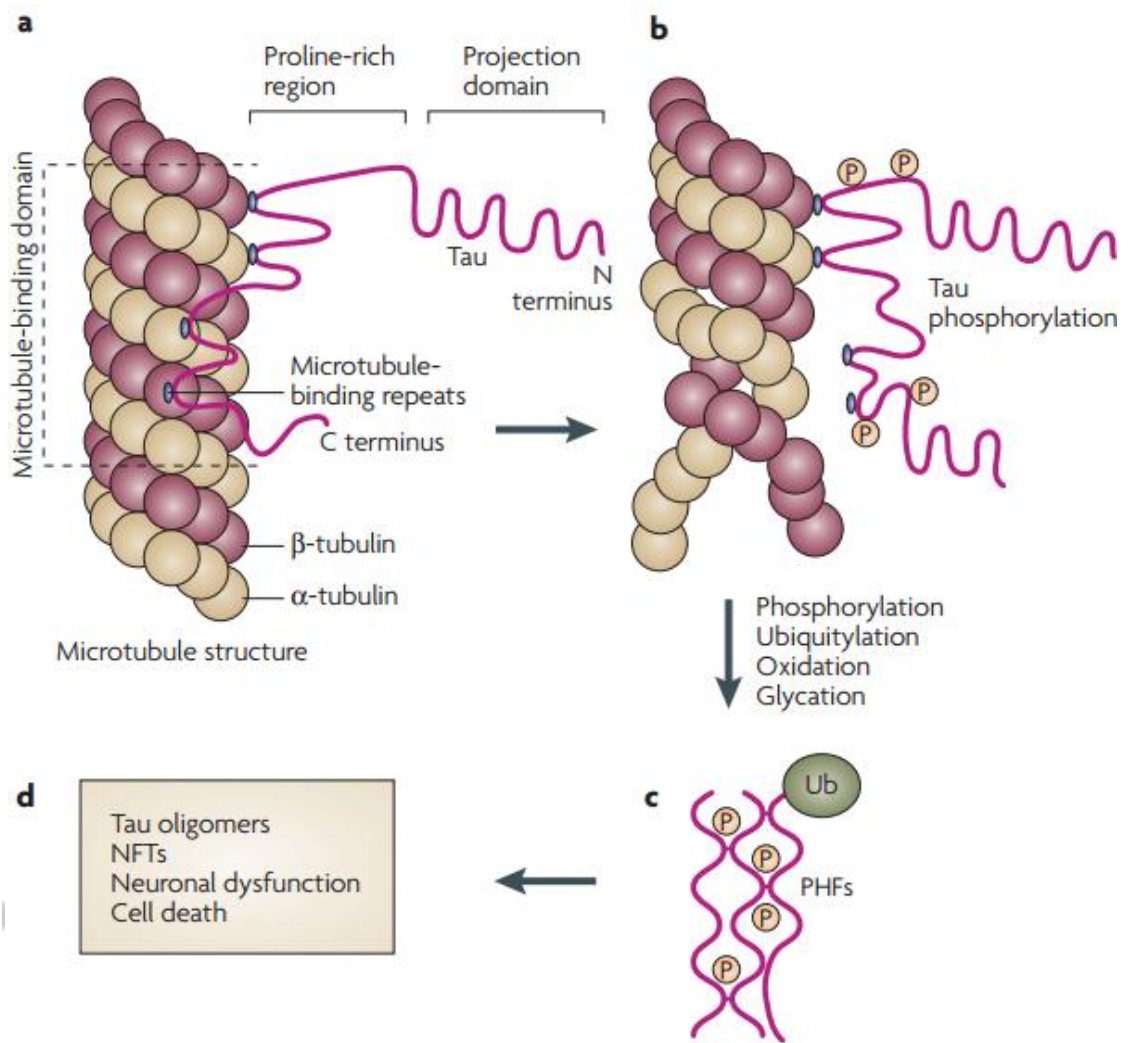
$A\beta$ 為 39-43 個胺基酸所組成之胜肽，初期會以單體 (monomer) 形態存於腦中且不具毒性，當單體受到細胞膜上神經節苷脂 (ganglioside) 以靜電吸附至細胞膜表面，其結構會以 α -helix 鍵結形成可溶性之 $A\beta$ 低聚物，產生神經毒性並破壞神經突觸 (Haass & Selkoe, 2007)。當過多 $A\beta$ 低聚物聚集時，會造成細胞膜側壓上升，引發局部團簇 (raft-like) (Kakio et al, 2002；Bate et al, 2010)。此團簇現象會誘使 $A\beta$ 低聚物第 11-21 和 31-40 胺基酸以 β -strand 方式相互連結並排，以第 22-30 胺基酸為轉折點，使 $A\beta$ 骨架彎曲相互堆疊，進一步形成 β -sheet 結構，於

腦中形成非可溶 A β 斑塊，導致神經無法傳遞訊息而死亡 (Esler & Wolfe, 2001 ; Petkova et al, 2002)。

有研究指出在神經細胞試驗中，可溶或非可溶性 A β 濃度較高時，會造成細胞氧化損傷，進而引起細胞凋亡 (Baruch-Suchodolsky & Fischer, 2009)。在動物試驗中亦發現，A β 斑塊在腦中沉積會造成氧化壓力及發炎反應，使自由基攻擊神經而造成損傷 (Tamagno et al, 2012)。

(四) τ -(tau) 蛋白 (τ -protein)

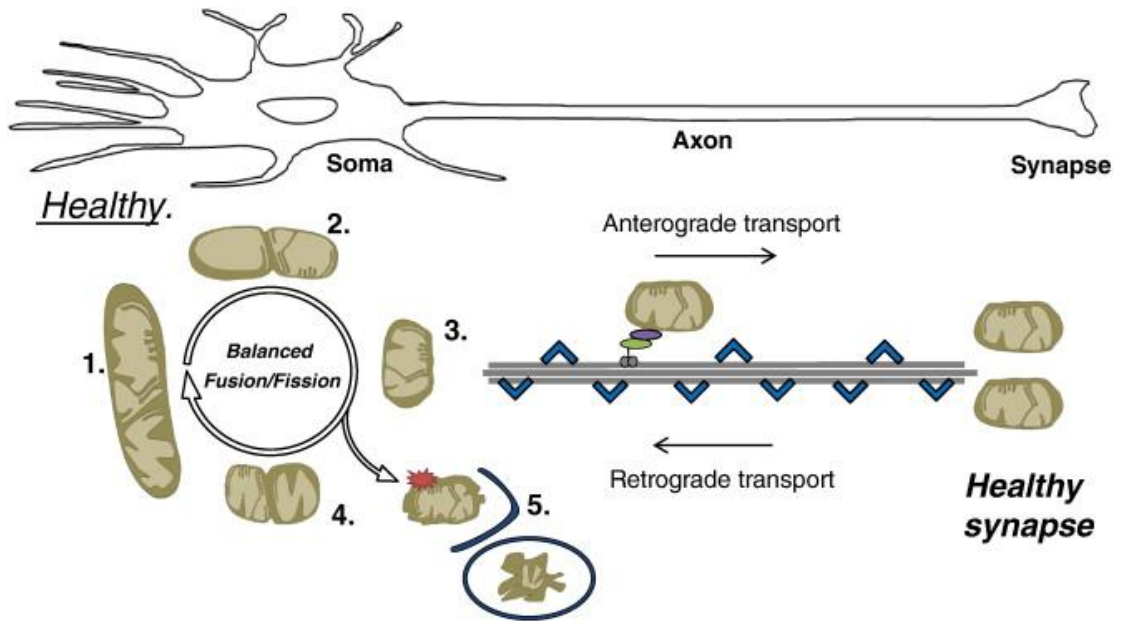
τ -基因位於細胞核之第 17 對染色體上，經轉譯後形成 τ -蛋白，屬神經微管蛋白 (tubulin) 的一種，其功能為維持軸突之穩定及緊密性 (Avila et al, 2004)。增加內源性磷酸酶 (endogenous phosphatases) 及激酶 (kinases) 的活性，可平衡 τ -蛋白與微小管之結合與分離；胞外訊號調節激酶 (extracellular signal-regulated kinase 2, ERK2) 及 GSK3 β 兩個激酶與 τ -蛋白之磷酸化程度有關，當 ERK2 過量存在於神經元時，會降低 τ -蛋白與微小管間親和力，使神經微管穩定性下降 (Drechsel et al, 1992)；另 GSK3 β 則與 τ -蛋白上第 6 及第 17 個胺基酸結合，分別為蘇胺酸 (threonine) 和絲胺酸 (serine)，使 τ -蛋白與微小管分離，形成成對螺旋狀聚合物 (paired helical filaments, PHFs)，此聚合物會導致神經纖維糾結並堆積於神經內部，造成大腦神經微管崩解 (附圖三)，最終使神經元死亡 (Hardy, 2003 ; Goedert, 2004 ; Wallin et al, 2006 ; Ballatore et al, 2007 ; Mazanetz & Fischer, 2007)。有文獻指出磷酸化 τ -蛋白會使粒線體膜電位下降，活性氧化物 (reactive oxygen species, ROS) 大量生成，抑制粒線體電子傳遞鏈 (electron transport chain) 中複合酵素活性，導致粒線體呼吸作用受阻，降低能量 (ATP) 產生，無法供應神經元能量而造成神經損傷 (附圖四) (Eckert et al, 2014)。



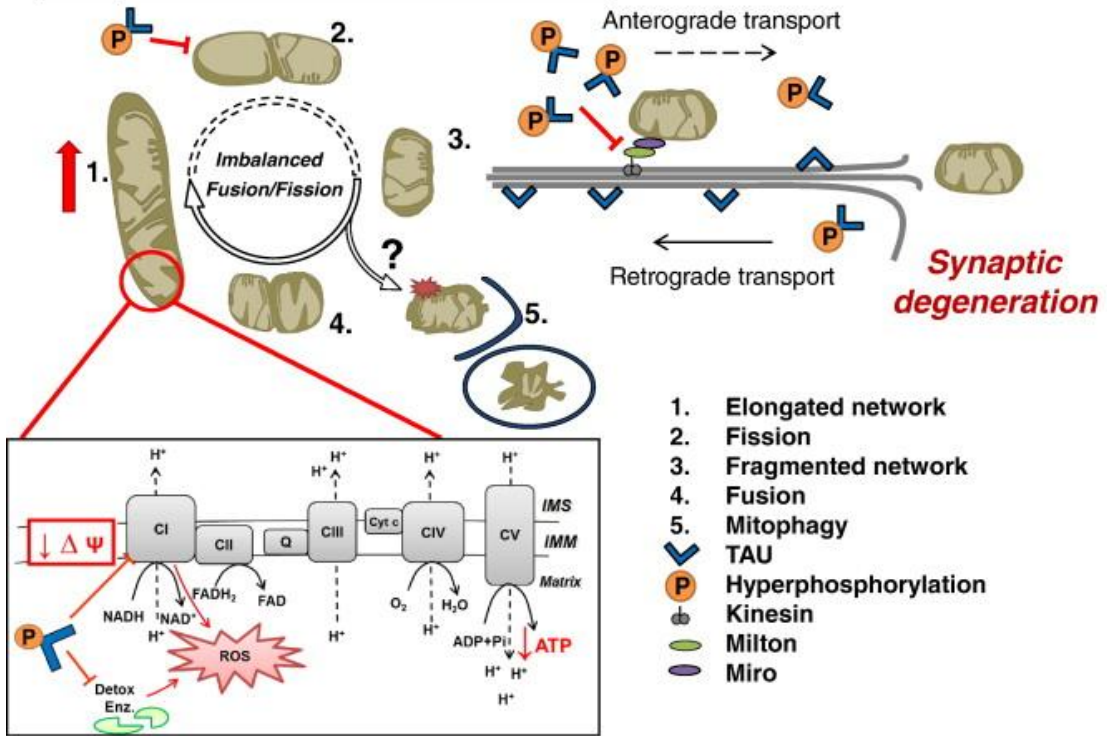
(Mazanetz & Fischer, 2007)

附圖三、細胞內神經元之 τ -蛋白聚集機制

Referred figure 3. Mechanism of intracellular neuronal aggregates in τ -pathies.



Phospho-TAU in Alzheimer's disease.



- 1. Elongated network
- 2. Fission
- 3. Fragmented network
- 4. Fusion
- 5. Mitophagy
- ✓ TAU
- P Hyperphosphorylation
- ⊕ Kinesin
- ⊖ Miro

(Eckert et al, 2014)

附圖四、磷酸化τ-蛋白造成粒線體功能障礙及神經損傷

Referred figure 4. Phosphorylationτ-protein causes abnormal mitochondrial dysfunction and neuronal damage.

(五) 載脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE)

ApoE 基因位於細胞核之第 19 對染色體上，經轉譯後形成 ApoE，此蛋白質分為 ApoE 2、ApoE 3 及 ApoE 4 三型；ApoE 2 和 ApoE 3 負責運輸高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL)，ApoE 4 負責運輸低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL) (Roses & Saunders, 1994；Saito et al, 2004)。正常人腦中之 ApoE 2、ApoE 3 及 ApoE 4 所佔比例分別為 5–10%、60–70% 及 15–20%；但在阿茲海默症患者之 ApoE 4 比例上升至 40% (Roses & Saunders, 1994；Farrer et al, 1997；Mahley et al, 2006)；有文獻指出，阿茲海默症患者 ApoE 4 含量較高之原因為腦中超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 含量較低，因氧化壓力上升，造成 ApoE 基因突變而形成多量 ApoE4 (Ihara et al, 2000；Raber et al, 2004)。ApoE 4 對 A β 低聚物具有高度親和力，其複合物會促進 APP 的類澱粉樣蛋白生成並增加 A β 聚集，且亦會造成神經微管彈性減弱，增加罹患阿茲海默症之風險 (Arendt et al, 1997；White et al, 2001；Naidu et al, 2002；Mattson, 2004)。

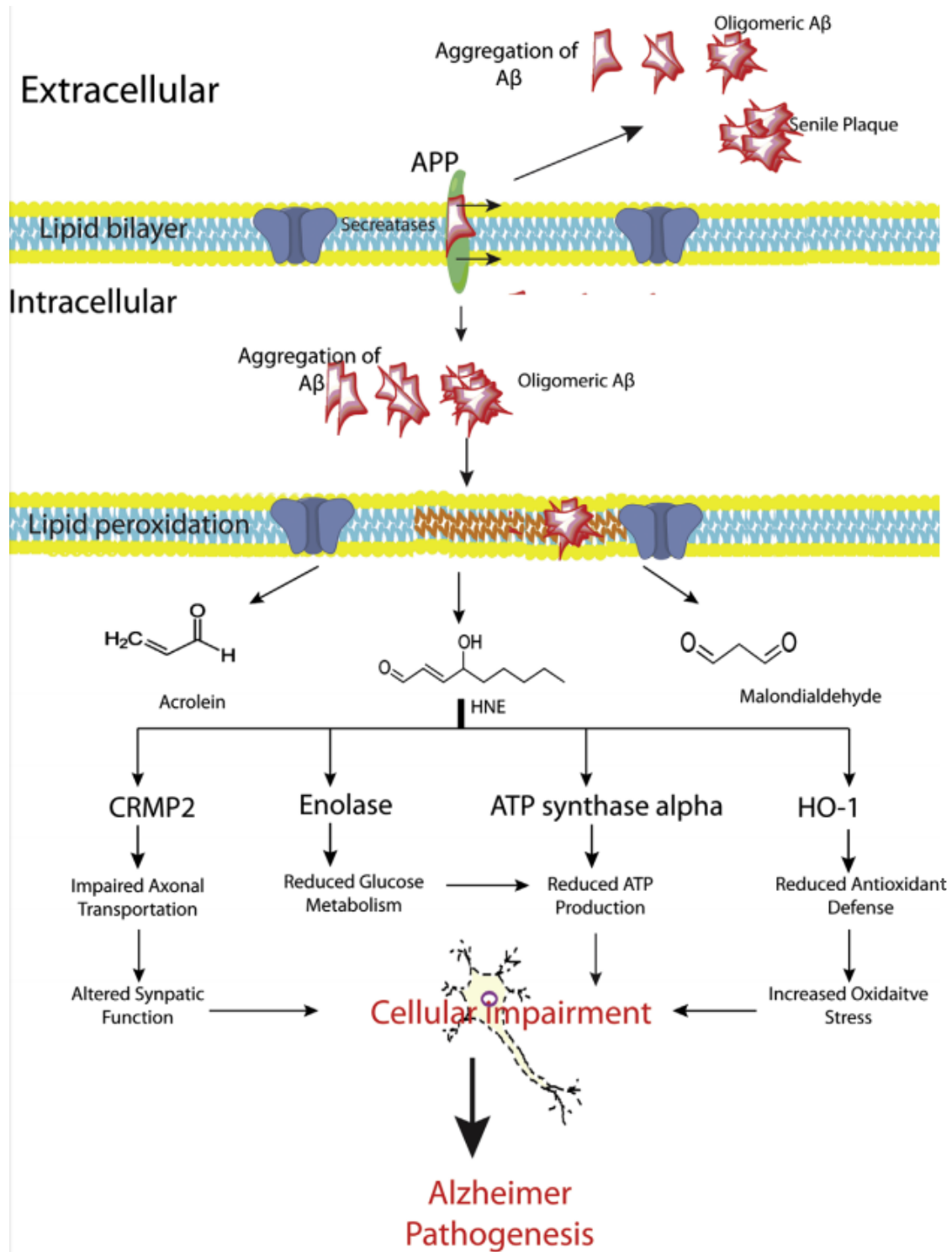
(六) 含氧自由基及氧化壓力

老化 (aging) 歸因於體內大分子物質如核酸、蛋白質及脂質等，被自由基攻擊進行氧化作用而破壞，當此破壞速率高於體內自行修復能力時，造成細胞 DNA 突變、脂質過氧化、體內酵素失去活性及降低免疫功能等老化現象加速進行 (Maccioni et al, 2001；Alvarado et al, 2015)。目前最被接受之老化理論為 1956 年 Harman 所提出之自由基理論，自由基為攜帶一個或多個不成對電子的分子，常經由身體的自然代謝反應、感染、接觸環境毒物及不當生活習慣而大量形成。腦部所消耗氧量佔全身總氧量 20 % 且含高量鐵離子，Lovell 等人 (1998) 研究發現阿茲海默症患者腦中鐵離子含量高出正常人約 185%，故患者腦中更易進行 Fenton/Haber Weiss 反應而生成大量自由基，此自由基會

攻擊腦部脂質及蛋白質等，產生過氧化產物，造成腦細胞死亡 (Halliwell, 1992; Shulman et al, 2004)。腦神經細胞膜所含脂質，易受到自由基及可溶性 A β 攻擊，形成醛類及酮類脂質過氧化物，如 MDA、4-hydroxy-2-nonenal (HNE) 及 acrolein；此類脂質過氧化物會使神經軸突受損，降低神經訊息傳遞，並降低葡萄糖代謝，減少 ATP 分解與能量產生，導致神經細胞損傷，引發阿茲海默症 (附圖五) (Loidl-Stahlhofen et al, 1994; Sultana et al, 2013)。自由基亦會攻擊胺基酸殘基側鏈，如精胺酸 (arginine, Arg)、半胱胺酸 (cysteine, Cys)、組胺酸 (histidine, His) 及脯胺酸 (proline, Pro) 等，形成蛋白質羰基即為蛋白質氧化物 (附表一) (Stadtman & Levine, 2003)。另脂質過氧化物可再與 Arg、Cys、His 及 Gln 結合，形成蛋白質羰基氧化物 (Weber et al, 2015)。許多研究指出於阿茲海默症患者腦中蛋白質氧化現象明顯增加，Evans 等人 (1999) 研究發現阿茲海默症患者腦中之蛋白質羰基氧化物濃度高出正常人約 78%。另有文獻指出蛋白質羰基氧化物會降低神經麩醯胺酸酶 (glutaminase) 活性，使麩醯胺酸分泌過多，進而引發興奮性毒性 (excitotoxicity) 造成神經損傷 (Smith et al, 1997; Markesbery, 1999; Doucet et al, 2015)。此外，Ledesma 等人 (1995) 研究指出，蛋白質羰基氧化物會與 τ -蛋白結合，使 τ -蛋白脫離神經微管形成 PHFs。

四、阿茲海默症之臨床診斷

早期診斷病患是否罹患阿茲海默症，大多藉由患者行為異常或認知能力下降加以判斷，但因阿茲海默症與其他失智症有多種相似病徵，易發生誤判。現今對於阿茲海默症之診斷，除了認知能力檢測外，亦結合大腦影像分析技術，以提高患者篩檢阿茲海默症之準確度。以下就認知能力檢測及大腦影像分析技術加以介紹。



(Sultana et al, 2013)

附圖五、可溶性 Aβ 嵌入細胞脂質雙層產生脂質過氧化產物之過程

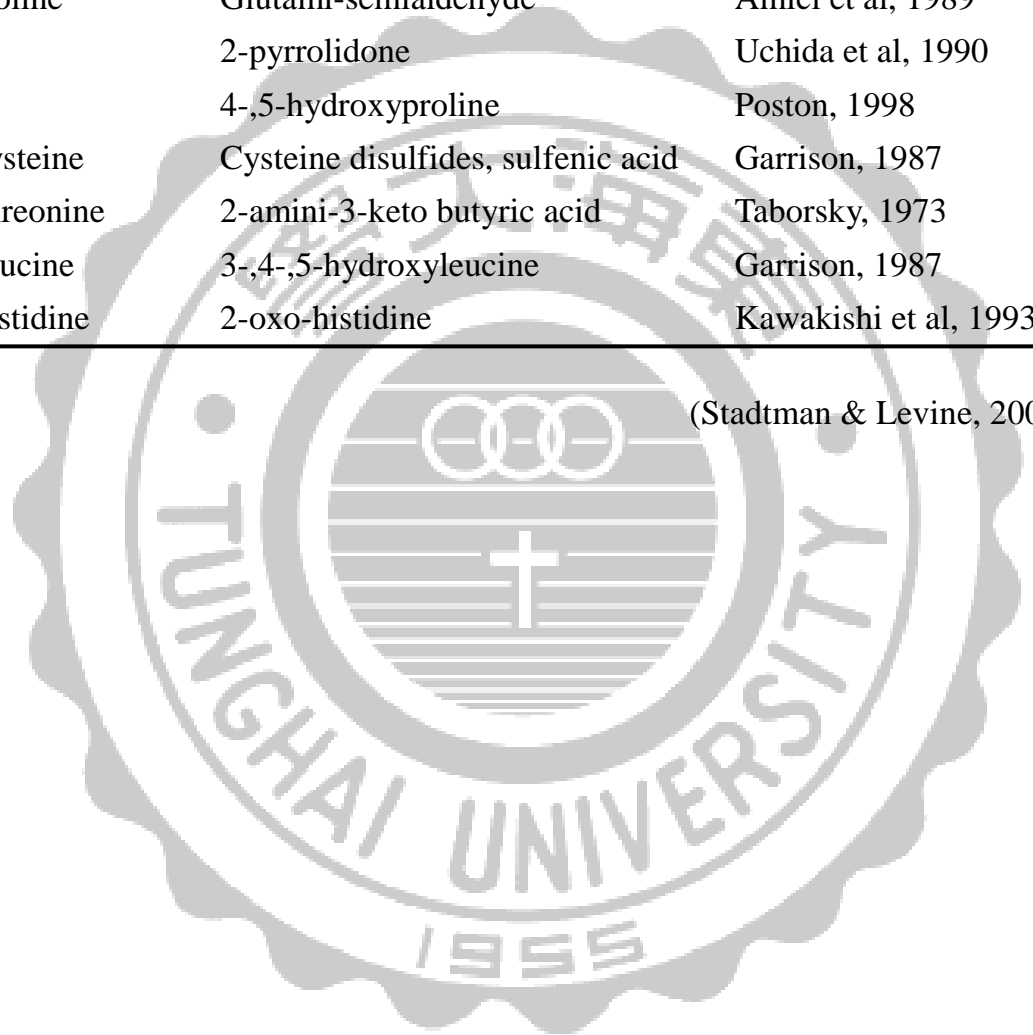
Reference figure 5. Oligomeric Aβ can insert into the lipid bilayer, subsequently initiating the lipid peroxidation process.

附表一、 經氧自由基氧化之蛋白質胺基酸殘基側鏈及其產物

Referred table 1. Oxygen free radical-mediated oxidation of protein amino acid residue side chains.

Amino	Product	Refference
Arginine	Glutamic-emialdehyde	Amici et al, 1989
Lysine	2-Amino-adipic-semiadehyde	Requena et al, 2001
Proline	Glutami-semialdehyde	Amici et al, 1989
	2-pyrrolidone	Uchida et al, 1990
	4-,5-hydroxyproline	Poston, 1998
Cysteine	Cysteine disulfides, sulfenic acid	Garrison, 1987
Threonine	2-amini-3-keto butyric acid	Taborsky, 1973
Leucine	3-,4-,5-hydroxyleucine	Garrison, 1987
Histidine	2-oxo-histidine	Kawakishi et al, 1993

(Stadtman & Levine, 2003)



(一) 認知能力檢測

臨床上最常用來診斷阿茲海默症之初步準則，為國家神經與溝通疾患機構暨阿茲海默症相關疾患協會 (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association, NINCDS/ADRDA) 所訂定之標準 (附表二) (Dawbarn & Allen, 2008)。目前神經科醫生多利用準則初步診斷後，再依據患者填寫簡易智能狀態檢測表 (Mini-Mental State Examination, MMSE) (附表三)，判斷是否有初期阿茲海默症。MMSE 問卷填寫時間為 5-10 分鐘，題目分五大類，包含人時地定向 (10 分)、語言能力 (9 分)、專注及計算能力 (5 分)、複誦三段詞句 (3 分)、回憶 (3 分)，共 11 個問題，滿分為 30 分；患者分數若低於 23 分，可初步判定認知功能有障礙，需再進一步利用大腦影像分析技術，確定患者是否罹患阿茲海默症 (Folstein et al, 1975)。

(二) 大腦影像分析技術

目前影像分析方法主要有磁振造影 (magnetic resonance imaging, MRI) 及正子攝影斷層掃描 (positron emission tomography, PET) 兩種方式，由影像分析結果可判斷大腦是否產生病變。

1. 磁振造影

MRI 是一種判斷是否罹患阿茲海默症之非侵入及非輻射性影像分析方法，主要是利用無線電脈衝使體內水分子之氫核產生共振，並放出能量訊號，經過電腦處理而產生影像；阿茲海默症患者因大腦皮質層及海馬迴發生氧化性神經損傷，造成大腦組織萎縮，故可利用 MRI 之影像來進行診斷 (Nagy et al, 1996)。

2. 正子攝影斷層掃描

PET 是一種非侵入但有輻射性之影像分析法，其判定阿茲海默症

附表二、國家神經與溝通疾患機構暨阿茲海默症相關疾患協會診斷準則

Referred table 2. NINC/ADRDA disorders criteria

Diagnostic criteria

- A Alzheimer's disease is characterized by progressive decline and ultimately loss multiple cognitive functions, including both:
- Memory impairment (impaired ability to learn new information or to recall previously learned information)
 - And at least one of following
 - Loss of word comprehension ability, e.g. inability to respond to 'Your daughter is on the phone' (aphasia)
 - Loss of ability to perfect complex tasks involving muscle coordination, e.g. bathing or dressing (apraxia)
 - Loss of ability to recognize and use familiar objects, e.g. clothing (agnosia)
 - Loss of ability to plan, organize, and execute normal activities, e.g. going shopping
-
- B The problems in A represent a substantial decline from previous abilities and cause significant problems in everyday functioning.
-
- C The problem in A begin slowly and gradually became more severe
-
- D The problem in A are not due to:
- Other conditions that cause progressive cognitive decline, including stroke, Parkinson's disease, Huntington's chorea, brain tumor, etc.
 - Other conditions that cause dementia, including hypothyroidism, HIV infection, syphilis, and deficiencies in niacin, vitamin B12, and folic acid.
-
- E The problem in A are not caused by episodes of delirium
-
- F The problem in A are not caused by another mental illness: depression, schizophrenia, etc.
-

Criteria for diagnosis of probable Alzheimer's disease

- Dementia established by clinical examination, and documented by a standard test of cognitive function (e.g. Mini-Mental State Examination, Blessed Dementia Scale, etc.) and confirmed by neuropsychological tests
 - Significant deficiencies in two or more areas of cognition, e.g. word comprehension and task-completion ability
 - No loss of consciousness
 - Onset from age 40-90, typically after age 65
 - No other diseases or disorders that could account for the loss of memory and cognition
-

A diagnosis of probable Alzheimer's disease is supported by :

- Progressive deterioration of specific cognitive functions : language (aphasia), motor skills (apraxia), and perception (agnosia)
 - Impaired activities of daily living and altered patterns of behavior
 - The following laboratory results :
 - normal cerebrospinal fluid (lumbar puncture test)
 - normal electroencephalogram (EEG) test of brain activity
-

(Dawbarn & Allen, 2008)

附表三、簡易智能狀態檢測表

Referred table 3. Mini-mental state examination, MSSE

The Mini-Mental State Exam Patient _____

Examiner _____ Date _____ Maximum Score _____

Maximum Score

Orientation

- 5 () What is the (year) (season) (date) (day) (month)?
5 () Where are we (state) (country) (town) (hospital) (floor)?

Registration

- 3 () Name 3 objects: 1 second to say each. Then ask the patient all 3 after you have said them. Give 1 point for each correct answer.
Then repeat them until he/she learns all 3. Count trials and record.
Trials _____

Attention and Calculation

- 5 () Serial 7's. 1 point for each correct answer. Stop after 5 answers.
Alternatively spell "world" backward.

Recall

- 3 () Ask for the 3 objects repeated above. Give 1 point for each correct answer.

Language

- 2 () Name a pencil and watch.
1 () Repeat the following "No ifs, ands, or buts"
3 () Follow a 3-stage command: "Take a paper in your hand, fold it in half, and put it on the floor."
1 () Read and obey the following: CLOSE YOUR EYES
1 () Write a sentence.
1 () Copy the design shown

Total Score ASSESS level of consciousness along a continuum

(Folstein et al, 1975)

的原理，主要是利用 [^{11}C] 匹茲堡化合物 B ([^{11}C]-Pittsburgh compound B, [^{11}C]-PIB) 與腦中非溶性 $\text{A}\beta_{1-40}$ 及 $\text{A}\beta_{1-42}$ 結合後，再透過電腦影像分析來觀察腦中 $\text{A}\beta$ 斑塊之沉積量 (Svedberg et al, 2009)。

五、阿茲海默症之治療

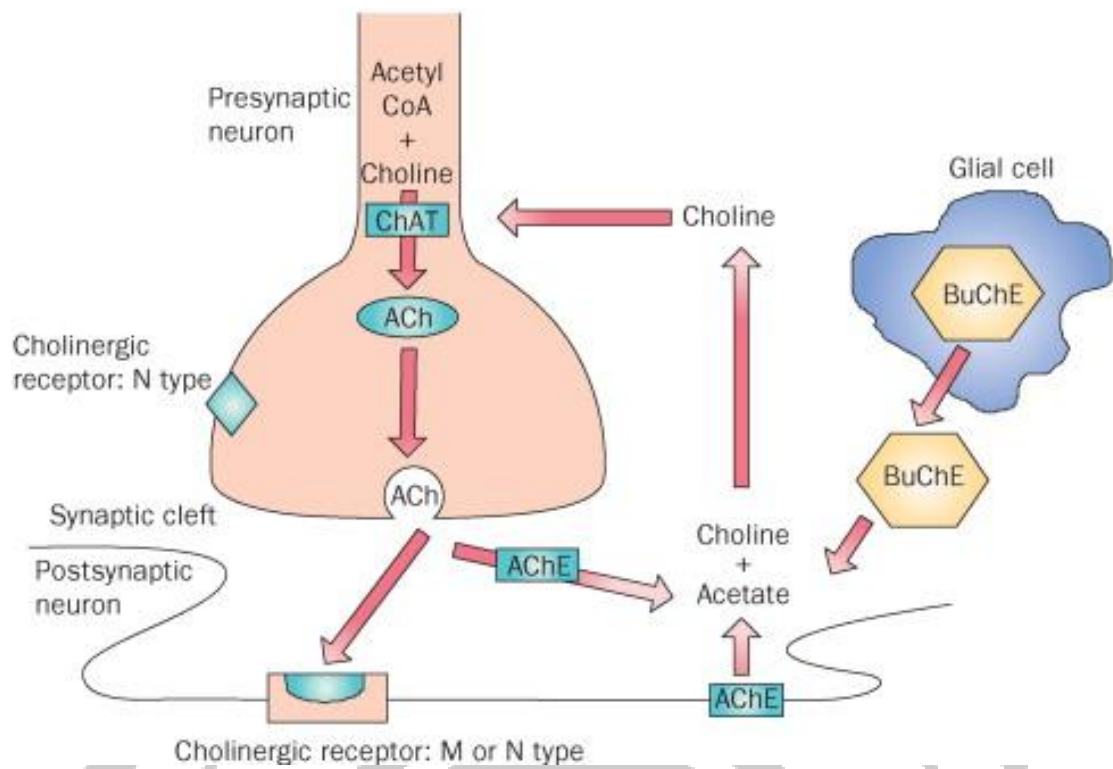
目前阿茲海默症尚無根治之藥物，只能減緩其症狀，市面上核准之藥物主要有乙醯膽鹼酶抑制劑 (acetylcholinesterase inhibitor, AChEI) 及 N-甲基-D-天門冬胺酸拮抗劑 (N-methyl-D-aspartic acid receptor antagonist, NMDAR antagonist) 兩大類，以下分別就這兩類藥物進行說明：

(一) 乙醯膽鹼酶抑制劑

細胞內之乙醯輔酶 A (acetyl-CoA) 在乙醯膽鹼轉移酶 (choline acetyltransferase) 催化下，會與膽鹼 (choline) 形成乙醯膽鹼 (acetylcholine, ACh)；ACh 為神經傳導物質，會與膽鹼受體 (cholinergic receptor) 結合產生神經傳導；另會被乙醯膽鹼酶 (acetylcholinesterase, AChE) 分解，產生醋酸鹽 (acetate) 及膽鹼，膽鹼則可回收再利用 (附圖六) (Scarpini et al, 2003)。阿茲海默症患者腦中之 ACh 含量比正常人低，可透過抑制 AChE 活性，減少 ACh 被分解，使腦中 ACh 含量提高，增加神經訊息之傳遞 (Bowen et al, 1976)。

(二) N-甲基-D-天門冬胺酸受體拮抗劑

麩醯胺酸是哺乳類中樞神經系統 (central nervous system, CNS) 重要神經傳遞物質之一，會與 NMDA 受體結合，此受體是一種麩醯胺酸受體 (glutamate receptor) 存在於 Ca^{2+} 通道上；此通道平時被 Mg^{2+} 阻斷，當神經突觸釋出麩醯胺酸後，活化 Na^+ 通道上之 AMPA 受體 (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor)，促使 Na^+ 通道打開；當 Na^+ 進入細胞會造成細胞膜電位去極化，誘使 Ca^{2+}

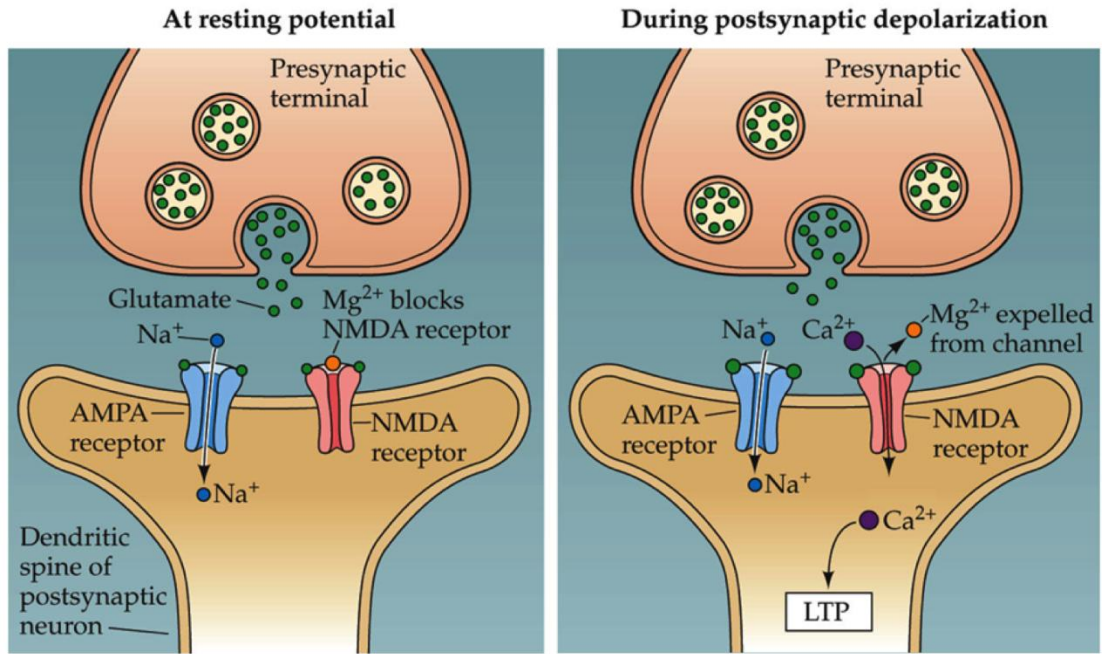


(Scarpini et al, 2003)

附圖六、乙醯膽鹼神經傳導系統

Reference figure 6. Acetylcholine neurotransmission system

通道上的 Mg^{2+} 離開，讓 Ca^{2+} 進入細胞內部，產生長期增益現象 (long-term potentiation, LTP)，此現象為神經突觸可塑性最常見之模式，當 Ca^{2+} 進入神經元，會誘使突觸相關蛋白 (synapse associated protein) 改變而產生記憶 (附圖七) (Bevilaqua et al, 2005；Squire et al, 2013)。當細胞內部 Ca^{2+} 濃度過高時，會產生負回饋，使 NMDA 受體失活，使 Ca^{2+} 不再進入細胞 (Umemiya et al, 2001)。研究指出阿茲海默症患者因 Ca^{2+} 調節發生異常，大量 Ca^{2+} 進入細胞造成內質網 (endoplasmic reticulum) 不完全摺疊蛋白質 (unfold protein) 累積，產生內質網壓力 (endoplasmic reticulum stress)，導致凋亡蛋白酶-9 (caspase-9) 被活化，引發神經突觸凋亡而無法產生長期增益現象 (林，2013)。另 Ota 等人 (2015) 發現 NMDA 拮抗劑，可降低 Ca^{2+} 進入細胞內，減少不完全摺疊蛋白質之產生，降低內質網壓力而增加長期增益現象，此藥物多用於中度及重度阿茲海默症患者。



(Squire et al, 2013)

附圖七、神經突觸之 AMPA 及 NMDA 受體調控機制

Reference figure 7. Regulatory mechanism of AMPA receptors and NMDA receptors in synaptic plasticity.

叁、杏鮑菇 (*Pleurotus eryngii*)

一、杏鮑菇介紹

杏鮑菇別名雪茸或平菇王，屬於擔子菌綱 (Basidiomycetes)，傘菌目 (Agaricales)，口蘑科 (Tricholomataceae)，側耳屬 (*Pleurotus*) (陳，1993)。野生杏鮑菇大多分布於北緯 30 至 50 度，如地中海、歐洲中部、亞洲及伊朗等地，多生長於草原或高山腐木上，菌柄觀長 2-8 公分，直徑 1-3 公分，菌傘直徑為 2-11 公分，表面呈棕色，菌褶為乳白色 (王及陳，1994；Zervakis & Balis, 1996)。目前全球人工栽培側耳屬之食用菇產量為第三高，僅次於香菇 (*Lentinus edodes*) 及洋菇 (*Agaricus bisporus*)，人工栽培杏鮑菇之菌柄長達 14-20 公分，較野生種來得長 (Györfi & Hajdú, 2007)。與其他人工栽培菇類相比較，杏鮑菇生長期較短，當子實體誘導形成後，約 10 至 15 天可採收食用，其外觀如附圖八所示，其質地細膩脆嫩、保存期較長及方便運輸，是頗受市場歡迎之食用菇 (Yildiz et al, 2002；Lin et al, 2014)。

二、杏鮑菇之營養成分

杏鮑菇含有多種營養素，包括碳水化合物、胺基酸、微量元素、酵素及維生素等 (Vamanu, 2012)。若與其他食物相比，具有熱量低、蛋白質及膳食纖維含量高等優點，膳食纖維可減少腸胃脂質之吸收、幫助腸胃蠕動及縮短糞便在腸道之時間 (何，2009)。此外，杏鮑菇亦富含人體八種必需胺基酸，含量約佔總胺基酸之 42%，另維生素 C 含量高達 214 mg/kg，是一種有益健康之食用菇 (俞等，2003)。

三、杏鮑菇之機能性成分

目前研究發現杏鮑菇之機能性成分包括麥角硫因、腺苷、多酚類及多醣體等 (Lee et al, 2011；Estrada et al, 2011)。分述如下：

(A)



(B)



附圖八、杏鮑菇之 (A) 外觀 (B) 菌柄橫切面與菌傘

Referred figure 8. The appearances (A), stipe cross-sections and pileus (B) of *Pleurotus eryngii*.

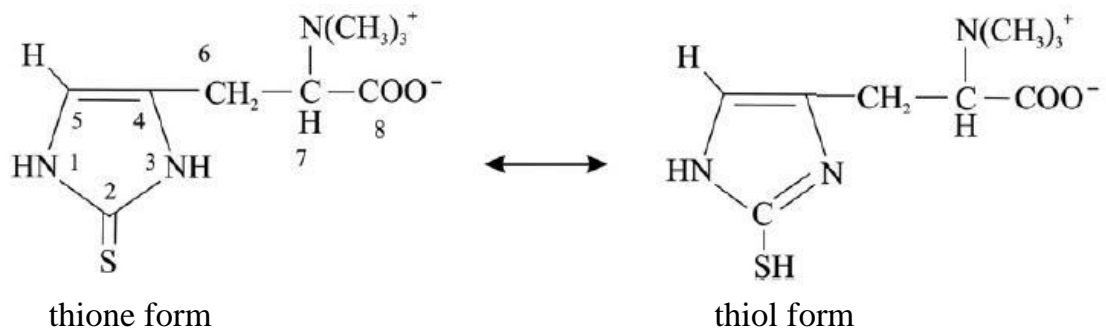
(一) 麥角硫因

1. 麥角硫因介紹

1909 年 Tanret 研究發現在黑麥角菌中分離出含硫化物之結晶，後來鑑定為麥角硫因。麥角硫因是一種無色、無味及低分子量之化合物，其化學式為 $C_9H_{15}N_3O_2S$ ，分子量為 229.30 Da，在鹼性及高溫環境中十分穩定，另在水溶液中溶解度相當高 (0.9 M at 25 °C) (Newton et al, 1926)。麥角硫因在自然界含有硫酮 (thione form) 及硫醇 (thiol form) 兩種形式，環境中主要以硫酮存在，如附圖九所示 (Cheah & Halliwell, 2012)。麥角硫因主要由真菌及細菌類所合成，如 *Neurospora crassa* 可利用 His 與 Cys 或甲硫胺酸 (methionine) 而合成，其生物合成反應如附圖十 (Benedict et al, 1925 ; Melville et al, 1955 ; Askari & Melville, 1962)。一般在高等動物中無法自行合成麥角硫因，必須依靠飲食攝取而獲得，常見含麥角硫因之食物如附表四所示，含量介於 0~13.49 mg/kg (Ey et al, 2007)。菇類麥角硫因含量則遠高於上述食物，是非常良好之獲取來源，其中以杏鮑菇含量最高如附表五 (何, 2009)。此外，麥角硫因被動物腸胃道吸收後，經由有機陽離子/麥角硫因轉運受體 (organic cation transporter/ ergothioneine transporter, OCTN1/ETT) 會將其運輸至特定組織儲存，包括紅血球、肝、腎、眼睛、精液及腦 (附表六) (Shires et al, 1997 ; Gründemann et al, 2005 ; Cheah & Halliwell, 2012)。

2. 麥角硫因之生理功效

麥角硫因是一種強抗氧化劑，具有捕捉單線態氧 (singlet oxygen)、羥基自由基 (hydroxyl radical) 及脂質過氧化物之能力 (Motohashi & Mori, 1986 ; Akanmu et al, 1991 ; Franzoni et al, 2006)。研究指出麥角硫因為銅及鋅離子之螯合劑，可抑制過氧化氫於銅離子環境下轉為羥基自由基 (Hanlon, 1971 ; Motohashi et al, 1976)。Jang 等人 (2004) 發現麥角硫因具有保護神經之功效，可減少大鼠嗜鉻腫

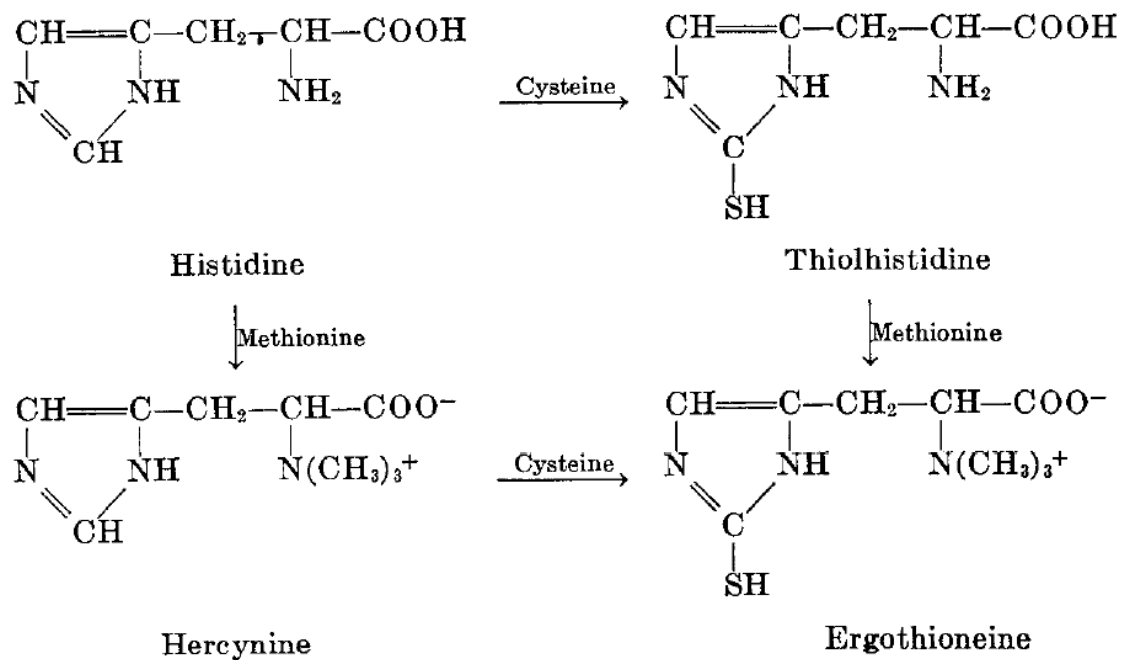


(Cheah & Halliwell, 2012)

附圖九、麥角硫因之硫醇結構和硫銅結構

Referred figure 9. The structure of ergothioneine's thione form and thiol form.





(Askari & Melvill, 1962)

附圖十、麥角硫因之生物合成反應

Referred figure 10. The reaction sequence in ergothioneine biosynthesis.

附表四、特定食物中麥角硫因含量

Referred table 4. Ergothioneine concentration in selected foods.

Food groups with selected food items	Ergothioneine (mg/kg)
Meats	
Chicken, liver	10.78
Pork, liver	8.71
Pork, kidney	7.66
Chicken, breast	1.55
Ham	1.12
Fish and seafood	
Trout	0.07
Salmon and shrimp	b.l.d ^a
Dairy products, eggs	
Egg yolk	4.41
Egg white	1.49
Milk	b.l.d
Grains and grain products, seed	
Oat bran	4.41
Pumpkin seed	1.49
Wheat bran	0.84
Wheat germ	0.63
Vegetables, fruits	
Black turtle bean	13.49
Red kidney bean	4.52
Garlic	3.11
Spinach	0.11

^ab.l.d., below limit of detection. The ESH values of each food are the means from three to five equally pooled samples of different proveniences or brands.

(Ey et al, 2007)

附表五、食藥用菇子實體麥角硫因之含量

Referred table 5. Contents of ergothioneine in fruiting bodies of edible and medical mushrooms.

Sample	Ergothioneine ^a (mg/kg dw of powder)
<i>Agarius bisporus</i>	391.5 ± 2.0 ^F
<i>Flammulina velutipes white</i>	1047.7 ± 55.7 ^B
<i>Hypsizigus marmoreus</i>	11.3 ± 1.1 ^G
<i>Lentinula edodes 271</i>	763.7 ± 14.5 ^{DE}
<i>Pleurotus cystidiosus</i>	879.9 ± 50.6 ^{CD}
<i>Pleurotus eryngii</i>	1521.6 ± 79.6 ^A
<i>Pleurotus ostreatus</i>	1003.2 ± 21.3 ^{BC}
<i>Pleurotus ostreatus gray</i>	725.2 ± 13.7 ^E

^aEach value is expressed as mean ± SD (n=3). Means with different letters within a column are significantly different ($p < 0.05$).

(何, 2009)

附表六、人類與大鼠紅血球及大鼠其他臟器麥角硫因之含量

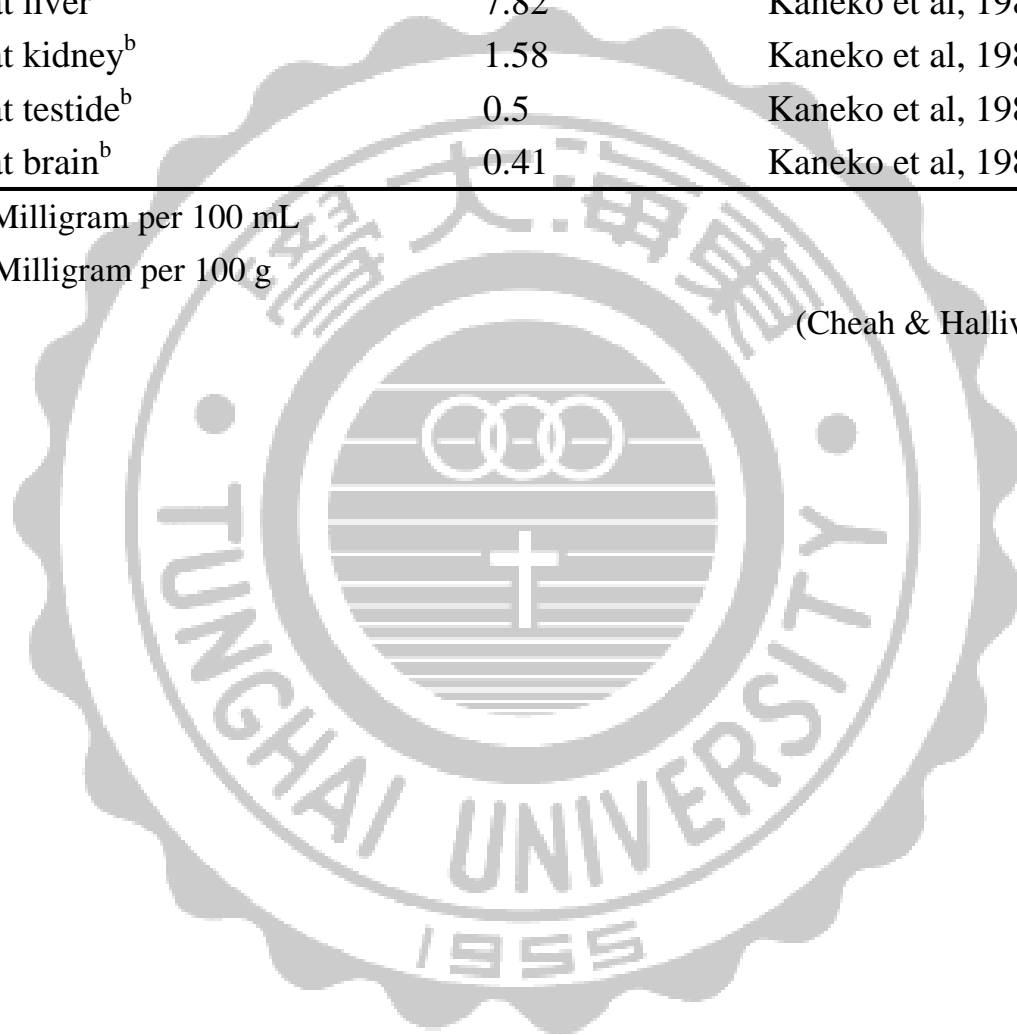
Referred table 6. The concentration of EGT in human, rat blood and selected t

Sample	EGT (mg/100 mL ^a or mg/100 g ^b)	References
Human erythrocytes ^a	1.1-3.2	Carlsson et al, 1974
Rat erythrocytes ^a	0.67	Hama et al, 1988
Rat liver ^b	7.82	Kaneko et al, 1980
Rat kidney ^b	1.58	Kaneko et al, 1980
Rat testide ^b	0.5	Kaneko et al, 1980
Rat brain ^b	0.41	Kaneko et al, 1980

^a Milligram per 100 mL

^b Milligram per 100 g

(Cheah & Halliwell, 2012)



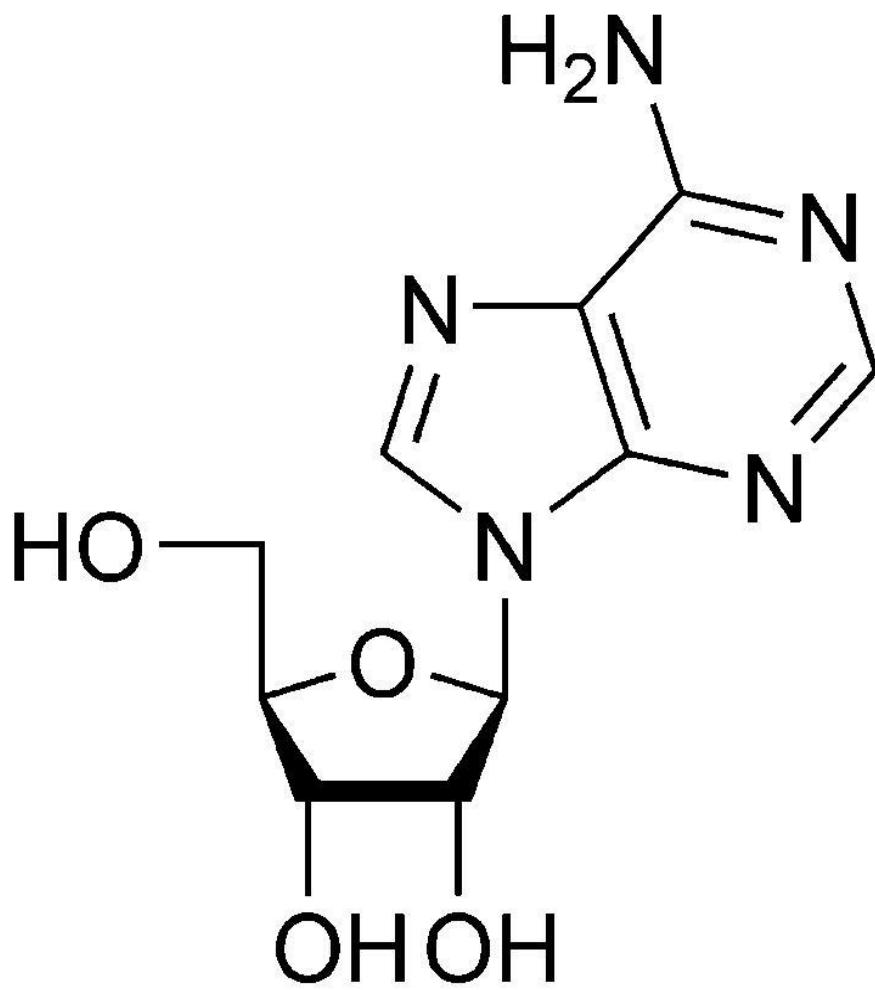
瘤細胞 (pheochromocytoma 12 cell, PC12 cell) 受到 A β 之毒性傷害，而降低凋亡程度進而保護神經細胞。另有文獻指出雄性 Wistar 大鼠餵食麥角硫因後，肝及腎之脂質過氧化物有下降趨勢，並減少 α -生育醇 (α -tocopherol) 及穀胱甘肽 (glutathione) 之消耗 (Deiana et al, 2004)。此外，在 A β 誘導小鼠試驗中，餵食麥角硫因可減少小鼠腦中 MDA 含量，並可增加穀胱甘肽/氧化型穀胱甘肽 (glutathione/glutathione disulfide, GSH/GSSG) 比值及 SOD 活性 (Yang et al, 2012)。

(二) 腺苷

腺苷是一種內源性之嘌呤核苷酸 (purine nucleotide)，由腺嘌呤及核糖經 β -N₉-核苷鍵鍵結而成，結構如附圖十一，其在能量代謝及轉移扮演重要之角色 (Sato et al, 2005; Xiao et al, 2013)。腺苷可調節神經元釋放神經傳導物質，也可刺激神經末梢訊號傳遞與調節血管收縮之功能 (Cunha, 2001; Tabrizchi & Bedi, 2001)。其它生理功效包括可減緩腦部缺血之傷害 (brain ischemia damage) (Gomes et al, 2011)、預防癲癇 (anti-epilepsy) (Vinadé et al, 2003)、改善睡眠品質 (improve sleep quality) (Basheer et al, 2004)、免疫調節 (immunomodulatory) (Ribeiro, 1995) 及預防心臟衰竭 (prevent heart failure) (Kitakaze & Hori, 2000) 等。

(三) 多酚類

多酚類廣泛存在於食物中，包括蔬菜、水果、茶葉及咖啡等 (Huang et al, 1992)。多酚類是由一個或數個羥基及芳香環所組成，範圍可從低分子量如類苯基丙烷 (phenylpropanoids) 及類黃酮 (flavonoids) 到高度聚合之化合物如木質素 (lignin) 及單寧酸 (tannic acid) (Bravo, 1998)。有文獻指出，多酚類具有抑制 A β 斑塊形成及減少可溶性 A β 低聚物之含量 (Ono et al, 2008)。杏鮑菇主要之多酚類為阿魏酸 (ferulic acid)、對羥基苯甲酸 (4-Hydroxybenzoic acid)、*p*-香豆酸 (*p*-Coumaric



(Xiao et al, 2013)

附圖十一、腺苷之結構圖

Referred figure 11. Chemical structure of adenosine.

acid) 及原兒茶酸 (protocatechuic acid) 等 (Gasecka et al, 2016)。其中又以阿魏酸含量最高，化學結構如附圖十二，有研究發現阿魏酸於 PC12 細胞實驗中可提升 SOD 活性，並降低細胞內鈣離子、脂質過氧化物及細胞凋亡程度，以達到神經保護之功效 (Ono et al, 2012；Lin et al, 2015)。此外，在阿茲海默 Tg2576 基因轉殖鼠之研究中，亦發現阿魏酸可降低腦中 A β 斑塊沉積量 (Hamaguchi et al, 2009；Alam et al, 2011)。多酚類其他生理功效包括抗氧化 (anti-oxidants) (Yu et al, 2002)、抗發炎 (anti-inflammation) (Lin et al, 2009) 及抗菌 (anti-bacterial) 等 (Ramanan & Rao, 1987)。

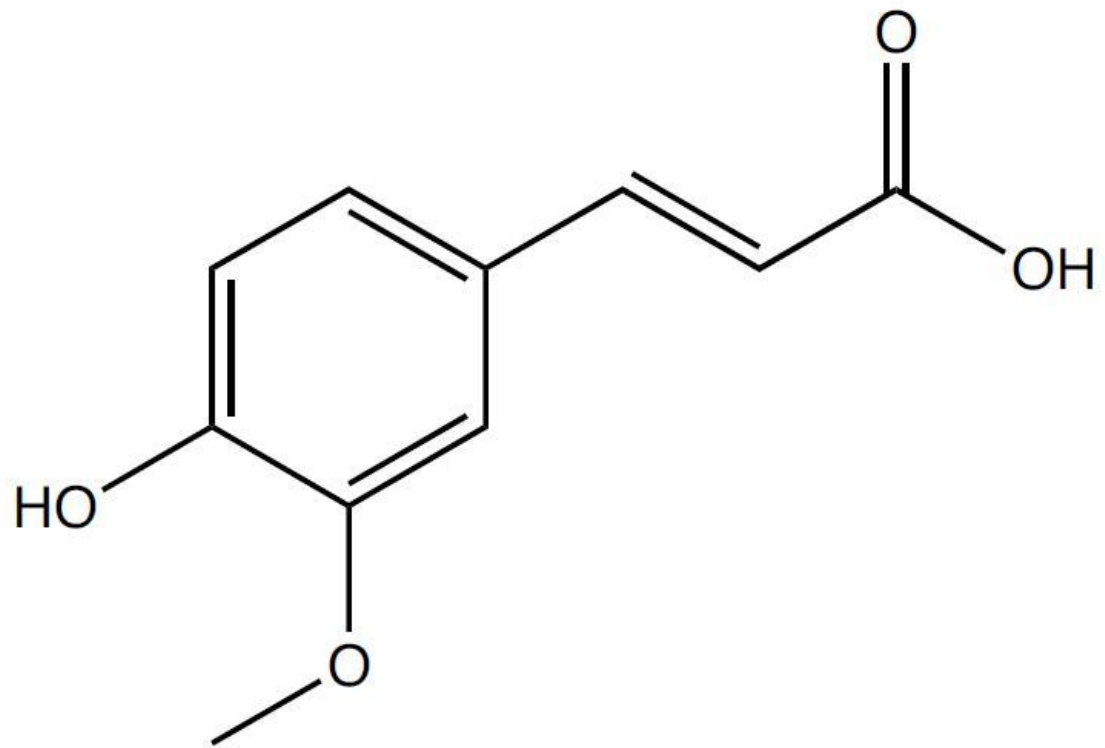
(四) 多醣體

一般菇類多醣體具有生理功效，研究發現杏鮑菇多醣體可清除超氧陰離子 (superoxide) 及羥基自由基能力，以達到抗氧化之功能 (Gonzaga et al, 2005；Li & Shah, 2014)。另在大鼠阿茲海默症研究模式中發現，餵食多醣體之大鼠，可增加腦中 SOD 及過氧化氫酶 (catalase, CAT) 之活性，亦可降低腦中 MDA、過氧化氫 (hydrogen peroxide) 及一氧化氮 (nitric oxide) 之含量 (Mahmoud et al, 2014)。此外，多醣體亦可增加 IL-6 (interleukin-6) 與 IFN- γ (interferon gamma) 合成及 B 細胞增生，以增強免疫力，達到抗腫瘤效果 (anti-tumor) (Kang et al, 2004)。其他生理功效則包括降血脂 (hypolipidemic) 及保肝 (hepatoprotective) 等作用 (Chen et al, 2012)。

肆、褪黑激素 (melatonin)

一、褪黑激素之介紹

1958 年 Lerner 等人從牛腦之松果體萃取出褪黑激素，它是一種內源性神經分泌荷爾蒙，主要由松果體將色胺酸 (L-tryptophan) 轉變為血清素 (serotonin)，再經酵素催化而形成 (Reiter et al, 2007)。褪黑激素為



(Ono et al, 2012)

附圖十二、阿魏酸之結構圖

Referred figure 12. Chemical structure of ferulic acid.

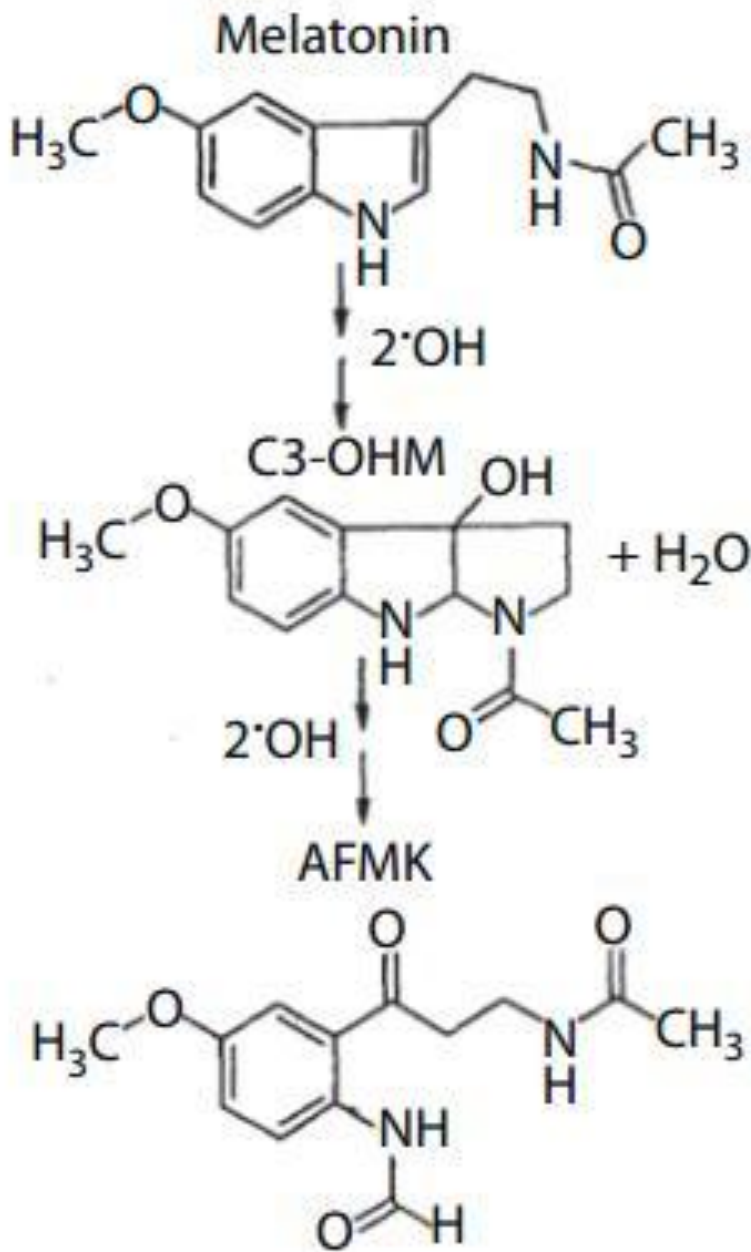
脂溶性及水溶性荷爾蒙，可通過腦血管障壁 (blood-brain barrier) 並運送至腦脊液儲存，其含量為微血管之 20 倍 (Reiter, 1995 ; Tricoire et al, 2002 ; Barron, 2008)。

二、褪黑激素抗氧化機制

褪黑激素為強抗氧化劑，其清除自由基能力是維生素E的7.2倍 (Siu et al, 1998)。褪黑激素通常會與兩個羥基自由基結合，中間產物為 cyclic 3-hydroxymelatonin (C3-OHM)，此化合物會再與兩個羥基自由基結合，產生 N^1 -acetyl- N^2 -formyl-5-methoxy-kynuramine (AFMK) 之終產物 (附圖十三)；AFMK 可降低 DNA 損傷、脂質過氧化物與 A β 毒性及調節神經傳導物質麩醯胺酸含量 (Reiter et al, 2007)。此外，褪黑激素可降低 GSK3- β 激酶活性，減少 τ -蛋白磷酸化之情形，進而減緩神經纖維糾結程度 (Deng et al, 2005 ; Liu & Wang, 2002)。

伍、實驗目的與架構

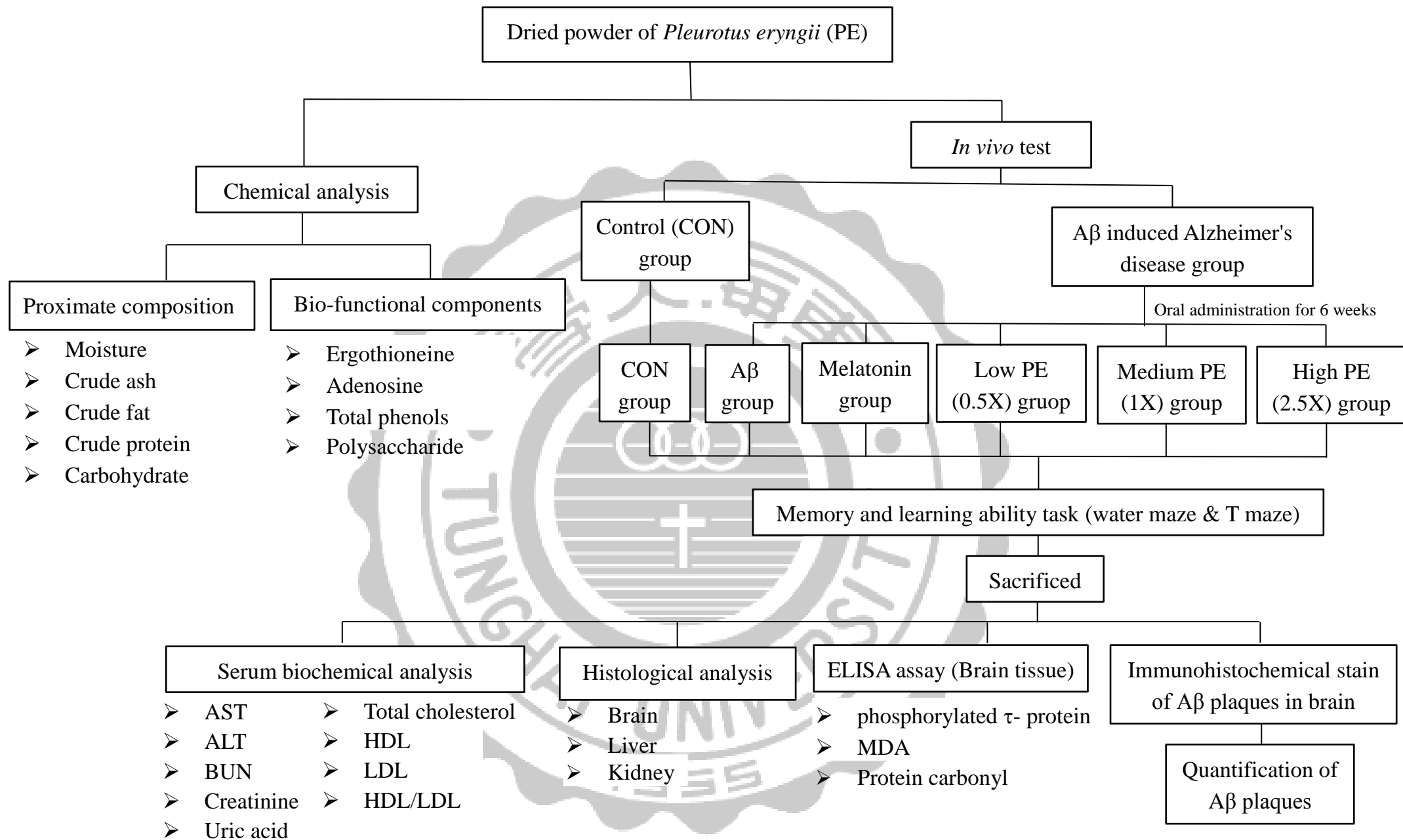
阿茲海默症目前無有效根治方法，僅能透過藥物延緩疾病之惡化，故本研究期盼以食療之方式取代藥物成為更有效之治療策略。本實驗樣品為杏鮑菇子實體，其含有多量之麥角硫因、腺苷、多酚及多醣體等抗氧化活性物質，可減緩因體內氧化壓力所造成之老化現象。實驗架構分為兩部分，如附圖十四所示，第一部分先以化學分析，分析杏鮑菇子實體之一般成分及機能性成分含量；第二部分為體內動物試驗，以側腦注射 A β_{1-40} 誘導小鼠產生認知功能障礙，再以杏鮑菇子實體粉末管餵六週，以水迷宮及 T 字迷宮，評估小鼠是否有改善記憶學習能力。將小鼠犧牲後，分析其血清生化參數與判讀腦及肝腎組織切片，再以 ELISA 及 IHC 染色，分析腦中阿茲海默症相關病徵。期望透過本研究成果，提供天然保健食材，改善阿茲海默症所引起之認知損傷情形。



(Reiter et al, 2007)

附圖十三、褪黑激素與羥基自由基結合產生中產物 C3-OHM 及終產物 AFMK 之機制

Referred figure 13. Mechanism for the formation of C3-OHM and AFMK during the oxidation of melatonin by hydroxyl radicals.



附圖十四、實驗架構圖

Referred figure 14. The conceptual framework of experiments.

第三章 材料與方法

壹、實驗儀器及藥品

一、實驗儀器

1. 純水製造機 (Milli-Q RIOS-5, Millipore Co, Molsheim, France)
2. 恆溫水浴槽 (Model B206, Firstek scientific Co, Taipei, Taiwan)
3. 高效率液相層析儀 (LC-20AT pump, SPD-20A UV-VIS detector, C-R6A chromatopac, Shimadzu Co, Tokyo, Japan ; 1100 series LC chemstation pump, S-3702 UV-VIS detector, Chromatocorder 21, Agilent technologies Co, California, USA)
4. 高速冷凍離心機 (Himac CR22GII, Hitachi Co, Tokyo, Japan)
5. 分光光度計 (Model U-2000, Hitachi Co, Tokyo, Japan)
6. 滅菌釜 (HL-340, Hung Lin medical instrument Co, Taipei, Taiwan)
7. 烘箱 (DK-600D, Yihder technology Co, Taipei, Taiwan)
8. 超音波震盪器 (DL510H, Bandelin electronic GmbH Co, Berlin, Germany)
9. 電子天平 (AB204, Mettler-Toiedo Co, Greifensee, Switzerland)
10. 減壓濃縮機 (RE111, BÜ CHI Co, Essen, Germany)
11. 蠕動幫浦 (323S, Watson-Marlow Co, Wilmington, USA)
12. 高速粉碎機 (RT-04, Rong Tsong precision technology Co, Taichung, Taiwan)
13. 索氏脂肪萃取裝置 (SoxtecTM 2043, Foss analytical A/S Co, Hillerød, Denmark)
14. 凱氏氮分解及蒸餾裝置 (KjeltecTM 2100, Gerhardt Vapodest 20, Foss analytical A/S Co, Hillerød, Denmark)
15. 灰化爐 (DF-303, Deng Yng Co, New Taipei, Taiwan)
16. 數位式單臂立體定位儀 (DST-1, Tansheng Co, Taipei, Taiwan)
17. 微量注射幫浦 (SP-M1, Tansheng Co, Taipei, Taiwan)

18. 麻醉氣體回收機 (GE-01, Tansheng Co, Taipei, Taiwan)
19. 麻醉供氣幫浦 (DC-01, Tansheng Co, Taipei, Taiwan)
20. 小動物氣體麻醉機 (Matrx VIP 3000, Midmark Co, Ohio, USA)
21. 鑽腦器 (MIO, Nakanishi Co, Tochigi-Ken, Japan)
22. 影像分析軟體 (Etho visoin XT, Noldus Co, Leesburg, USA)
23. 顯微鏡 (Semiapo 100x, Olympus Co, New Jersey, USA)
24. 組織均質機 (Nippi-891300, Nippi Co, Tokyo, Japan)
25. 酵素免疫分析儀 (ELX800, BIO-TEK instrument Co, Winooski, USA)

二、藥品試劑

1. Amyloid β -peptide₁₋₄₀、甲基紅 (methyl red)、碳酸鈉 (sodium carbonate)、沒食子酸 (gallic acid)、三氟乙酸 (trifluoroacetic acid)、甲醛 (formaldehyde)、三羥甲基氨基甲烷 (trisaminomethane)、乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、溴甲酚綠 (bromocresol green)、氯化鉀 (potassium chloride) 及氯化鈉 (sodium chloride) 購自 Sigma 公司 (Michigan, USA)
2. 乙醚 (ethyl ether)、鹽酸 (hydrochloric acid)、硼酸 (boric acid)、氫氧化鈉 (sodium hydroxide) 及硫酸 (sulfuric acid) 購自聯工化學股份有限公司 (Hsinchu, Taiwan)
3. 酒石酸鉀鈉 (sodium potassium tartrate)、過氧化氫 (hydrogen peroxide)、磷酸鈉 (sodium phosphate) 及磷酸氫二鈉 (disodium phosphate) 購自和光純藥工業株式會社 (Tokyo, Japan)
4. 甲醇 (methanol) 及乙醇 (ethanol) 購自恩加有限公司 (Taichung, Taiwan)
5. Folin-Ciocalteu's Reagent 及 crystallized phenol 購自 Panreac 公司 (Barcelona, Spain)
6. 磷酸二氫鉀 (potassium dihydrogen phosphate) 購自石津製藥株式會

社 (Osaka, Japan)

7. 磷酸二氫銨 (ammonium phosphate monobasic) 購自 Merck 公司 (Darmstadt, Germany)
8. 乙腈 (acetonitrile) 及 二甲苯 (xylene) 購自 J.T. Baker 公司 (Pennsylvania, USA)
9. 硫酸鉀 (potassium sulfate) 購自 Foss analytical A/S 公司 (Hillerød, Denmark)
10. 麥角硫因 (L-ergothioneine) 購自 Enzo life science 公司 (New York, USA)
11. 異氟醚 (isoflurane) 購自 寶齡富錦生技公司 (Taipei, Taiwan)
12. Purified anti- β -Amyloid₁₇₋₂₄ 購自 Biologend 公司 (San Diego, USA)
13. 蘇木紫染色液 (hematoxylin stain solution) 購自 武騰化學株式會社 (Bunkyo-ku, Tokyo)
14. Dual link system-HRP 購自 Dako 公司 (California, USA)

三、酵素免疫分析套組

1. Phosphorylated τ -protein ELISA kit 購自 沛鑫生物科技公司 (Miaoli, Taiwan)
2. Protein carbonyl colorimetric assay kit 及 TBARS assay kit 購自 Cayman 公司 (Michigan, USA)

四、實驗材料

1. 試驗所用之新鮮杏鮑菇 (*Pleurotus eryngii*) 於 103 年 7 月購至台中天下第一菇
2. 一般實驗動物飼料 (Laboratory Rodent Dient, 5001) 購自 Labdiet PMI[®] Nutrition International 公司 (Missouri, USA)

貳、實驗方法

一、杏鮑菇子實體一般成分分析

(一) 樣品製備

購買之杏鮑菇子實體，將其切片後，置於 50°C 烘箱進行烘乾 2 天，再使用高速粉碎機 (RT-04) 將其磨碎，並以 60 mesh 篩網進行過篩，所得杏鮑菇子實體粉末存放於乾燥箱，以供後續實驗使用。

(二) 水分含量分析

主要參考 AOAC 14.091 (1990) 分析方法，精稱樣品粉末 2 克 (W_1)，放入已恆重之稱量瓶內 (W)，利用常壓加熱乾燥法，於 105°C 烘箱反覆烘乾及冷卻，稱至恆重 (W_2)，由樣品損失之重量除以原樣品重可得該樣品水分含量。樣品粉末水分含量計算公式如下：

$$\text{樣品粉末水分含量 (\%)} = \{ [W_1 - (W_2 - W)] / W_1 \} \times 100$$

(三) 灰分含量分析

主要參考 AOAC 14.103 (1990) 分析方法，精稱樣品粉末 2 克 (W)，放入已恆重之坩鍋 (W_1)，於 105°C 烘箱反覆烘乾及冷卻，除去部分水分，再放入灰化爐 (DF-303) 中進行灰化 (550~600°C)，至樣品粉末成白色後，溫度降至 200°C，再放置玻璃乾燥器皿中冷卻至室溫並稱重 (W_2)。樣品粉末灰分含量計算公式如下：

$$\text{樣品粉末灰分含量 (\%)} = [(W_2 - W_1) / W] \times 100$$

(四) 粗脂質含量分析

主要參考 AOAC 14.093 (1990) 分析方法，精稱樣品粉末 2 克 (W)，置於圓筒濾紙中，脫脂棉蓋於圓筒濾紙上方，於 95~98°C 烘箱內乾燥 3 小時並稱重，圓底燒瓶也放置烘箱內乾燥 3 小時並稱重 (W_1)。將圓筒濾紙放於索氏脂肪萃取裝置 (SoxtecTM 2043) 之萃接管內，圓底燒瓶裝

八分滿之乙醚接於索氏脂肪萃取裝置下方，再將其裝置放於 55°C 恆溫水浴中萃取 16~18 小時。萃取完後取出圓筒濾紙，將剩餘乙醚蒸餾至萃尿管中回收，並將圓底燒瓶放置恆溫水浴槽 (Model B206) 繼續加熱使乙醚完全揮發。最後將其放於 95~98°C 烘箱內烘乾，每間隔半小時稱重一次須達恆重 (W_2)。樣品粉末粗脂質含量計算公式如下：

$$\text{樣品粉末粗脂質含量 (\%)} = [(W_2 - W_1) / W] \times 100$$

(五) 粗蛋白含量分析

主要參考 AOAC 14.108 (1990) 分析方法，精稱樣品粉末 1 克 (W)，置於消化管中，加入 25 mL 硫酸及催化劑硫酸鉀，再將消化管放置凱氏氮分解裝置 (Kjeltec™ 2100) 加熱至 420°C，待樣品完全分解至澄清色溶液，再將消化管裝入凱氏氮蒸餾裝置 (Gerhardt Vapodest 20) 並添加 15 mL 之 35% 氫氧化鈉溶液反應 30 秒，進行蒸餾 10 分鐘，將含有混合指示劑 (bromocresol green 及 methyl red) 之 4% 硼酸溶液 25 mL 放於出口當接收液，最後用 0.1N 之鹽酸進行滴定，使液體顏色轉成粉紅色為止，並記錄其滴定量 (V_1)。做空白組且記錄消耗之鹽酸滴定量 (V_2)。樣品粉末粗蛋白含量計算公式如下：

$$\text{樣品粉末粗蛋白含量 (\%)} = [4.38^* \times 0.014^{\#} \times (V_2 - V_1) \times M/W] \times 100$$

M : Molarity of HCl

* 菇類之含氮係數 (Crisan & Sands, 1978)

[#] 相當於 1mL 之 1N 鹽酸溶液之氮量 (g)

(六) 碳水化合物含量計算

樣品粉末碳水化合物含量計算公式如下：

$$\text{碳水化合物 (\%)} = 100 - (\text{水分} + \text{灰分} + \text{粗脂質} + \text{粗蛋白})$$

二、杏鮑菇子實體機能性成分分析

(一) 麥角硫因含量分析

主要參考 Dubost 等人 (2006) 之分析方法稍作修正，精稱樣品粉末 5 克，置於 250 mL 三角錐形瓶中，並加入 100 mL RO 水，以超音波震盪器 (DL510H) 震盪萃取 40 分鐘，將樣品溶液置入 250 mL 離心瓶以 15,600 x g 轉速離心 10 分鐘，所得上清液移置濃縮瓶，於 50°C 下減壓濃縮至一定量，再以 RO 水定量至 50 mL，經 0.45 μ m 濾膜過濾，最後以高效液相層析儀 (high performance liquid chromatography, HPLC) 進行分析。另以不同濃度之麥角硫因標準品進行相同條件分析，由所得之面積繪出檢量線，計算樣品中麥角硫因之含量，單位以 mg/g, dry base (DB) 杏鮑菇子實體粉末表示。HPLC 分析條件如下：

- (1) 分離管柱: InertSustain 5 μ C18 (4.6 \times 150 mm, GL Sciences)
- (2) 注射量: 10 μ L
- (3) 檢測波長: 254 nm
- (4) 移動相: 20 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$
- (5) 流速: 1 mL/min

(二) 腺苷含量分析

主要參考劉等人 (1994) 之分析方法，精稱樣品粉末 5 克，置於 250 mL 三角錐形瓶中，並加入 100 mL RO 水，以超音波震盪萃取 60 分鐘，將樣品溶液置入 250 mL 離心瓶以 15,600 x g 轉速離心 10 分鐘；所得上清液置於濃縮瓶，於 50°C 下減壓濃縮至一定量後，再以 RO 水定量至 5 mL，經 0.45 μ m 濾膜過濾，最後以 HPLC 進行分析。另以不同濃度之腺苷標準品進行相同條件分析，由所得之面積繪出檢量線，計算樣品中腺苷之含量，單位以 mg/g (DB) 杏鮑菇子實體粉末表示。HPLC 分析條件如下：

- (1) 分離管柱 : Prodigy 5 μ ODS3 100A (250 mm x 4.6 mm, Phenomenex)
- (2) 注射量: 20 μ L
- (3) 檢測波長: 260 nm
- (4) 移動相: methanol : 0.02 M KH_2PO_4 = 15 : 85
- (5) 流速: 1.2 mL/min

(三) 總酚含量分析

主要參考 Taga 等人 (1984) 之分析方法，精稱樣品粉末 0.1 克，置於 250 mL 三角錐形瓶中，加入 5 mL 之 60% 甲醇 (含 0.3% HCl) ，均勻搖晃後。取前述溶液 100 μ L，加入 2 mL 之 2% 碳酸鈉溶液，混勻後於室溫放置 2 分鐘，再加入 100 μ L Folin-Ciocalteu's phenol 試劑，均勻搖晃後，靜置室溫 30 分鐘，再以分光光度計 (Model U-2000) 在波長 735 nm 測定樣品溶液之吸光值。另以不同濃度之沒食子酸 (gallic acid) 所得檢量線換算樣品之總酚含量，單位以 mg/g (DB) 杏鮑菇子實體粉末表示。

(四) 多醣體萃取及含量分析

1. 多醣體之萃取

主要參考李炫璋 (1984) 之萃取方法，精稱樣品粉末 1 g，加入 20 mL RO 水，置於滅菌釜中加熱 1 小時，使多醣溶出，冷卻後置入 250 mL 離心瓶，以 15,600 x g 轉速離心 10 分鐘，所得之上清液即為樣品溶液。利用透析膜 (MWCO 6000~8000) 透析一天，將小分子去除，最後定量至 100 mL 即為樣品多醣體溶液。

2. 多醣體含量分析

主要參考 James (1995) 之分析方法，取樣品多醣體溶液、標準品 (葡萄糖) 及空白組溶液各 0.5 mL，置於試管中並加入 2.5 mL 濃硫酸

及 0.5 mL 5% 酚溶液，靜置 30 分鐘後，以分光光度計於 490 nm 下測定樣品之吸光值，並代入已知濃度標準品之檢量線公式，求得樣品多醣體濃度，單位以 mg/g (DB) 杏鮑菇子實體粉末表示。

三、體內動物實驗模式

(一) 動物模式建立

1. 實驗動物之飼養

實驗動物為 5 週齡之 C57BL/6J 雄性小鼠，共 72 隻，體重約 27 克，購自國家實驗動物中心 (National Laboratory Center, Taiwan, R.O.C)。以一般實驗動物飼料 (Laboratory Rodent Diet 5001) 預養至 16 週齡，飼養環境溫度控制於 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相對溼度 $60 \pm 10\%$ 及各 12 小時光暗循環。待其適應環境後，以耳洞標記並隨機分組，每組 12 隻，採自由飲食方式飼養。

2. 餵食樣品劑量

根據美國食品藥物管理局 (food and drug administration, FDA) 公告麥角硫因成人每日容許攝取量 (acceptable daily intake, ADI) 為 10.5 mg；本實驗杏鮑菇子實體粉末之餵食劑量是以 FDA 公告，成人 60 公斤為基準，乘上小鼠與人體換算係數 12.3 (Ranter, 2005)，再以每隻小鼠平均體重 27 g，換算出小鼠每日之麥角硫因攝食量，再除以杏鮑菇子實體粉末之麥角硫因含量 1.3486 mg/g，得出杏鮑菇子實體粉末餵食劑量為 43 mg/mouse/day，以此為實驗之一倍 (1X) 餵食劑量。小鼠分為控制組 (control, CON)、負控制組 (amyloid β -peptide, A β)、正控制組 (melatonin, MEL)、低劑量杏鮑菇粉末組 [low dosage (0.5X) of *Pleurotus eryngii* powder, LPE]、中劑量杏鮑菇粉末組 [medium dosage (1X) of *Pleurotus eryngii* powder, MPE] 及高劑量杏鮑菇粉末組 [high dosage (2.5X) of *Pleurotus eryngii* powder, HPE]，每組

以直接管餵灌食杏鮑菇子實體粉末，各組餵食劑量如附表七。小鼠連續飼養 6 週，於第 28 天進行水迷宮參考記憶試驗為期三天，第 31 天時進行水迷宮空間探索試驗，第 33 天進行 T 字迷宮試驗，最後於第 42 天予以犧牲，並做後續生化分析，其試驗架構如附圖十五。

3. 以 $A\beta_{1-40}$ 誘導阿茲海默症模式

主要參考 Jhoo 等人 (2004) 之手術方法，小鼠先預養至 16 週齡，進行阿茲海默症誘發手術， $A\beta_{1-40}$ 溶於 35% 乙腈及 0.1% 三氟乙酸 (pH=2.0) 溶液中，濃度為 0.16mM，並將配置完成之 $A\beta_{1-40}$ 溶液充滿整個針筒及針頭 (gauge-26)。小鼠先用異氟醚 (3L/min) 麻醉，再將小鼠置於立體定位儀 (DST-1)，根據 Franklin 及 Paxinos (2005) 之小鼠腦部解剖圖進行海馬迴兩側 CA1 定位。以頭蓋骨 bregma 為原點，左右橫軸 1.8 mm (X 軸 \pm 1.8 mm)，縱軸 2.3 mm (Y 軸 - 2.3 mm) 進行鑽孔，待鑽孔後，將注射針頭沒入腦部深度 1.5 mm，以每邊流速 2.5 μ L/5 min 注射。完成後以生物黏合劑修補頭蓋骨，並用縫合針及縫合器進行縫合，放回飼養籠中照顧，約莫 5 分鐘小鼠便能自由移動，手術後兩天為老鼠恢復期，之後開始餵食以直接管餵灌食杏鮑菇子實體粉末六週。

(二) 生理參數分析

生理參數分析項目主要包含小鼠體重、攝食量及食物利用率，以下分別就各分析項目加以說明：

1. 體重

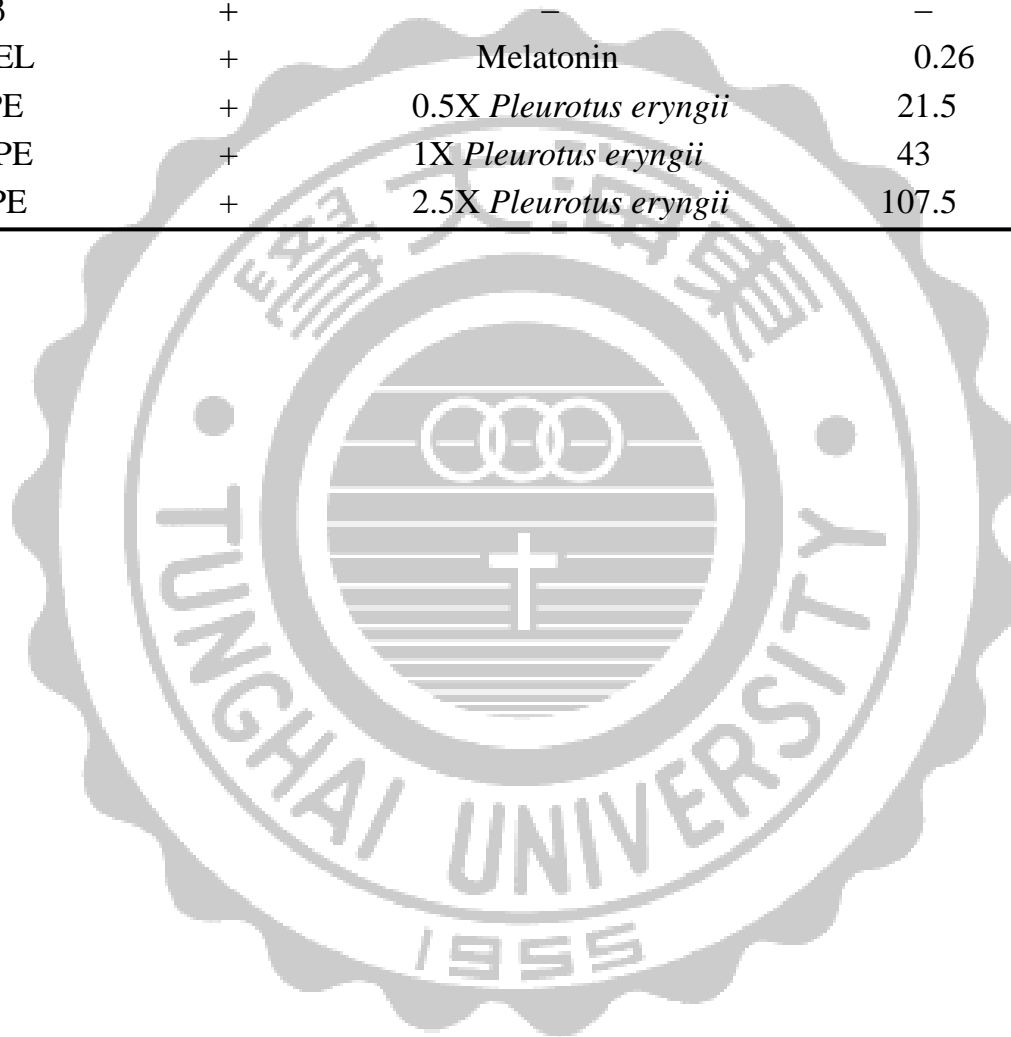
每週測量小鼠體重並記錄，於實驗結束後比較各組間體重變化差異及體重增加量。

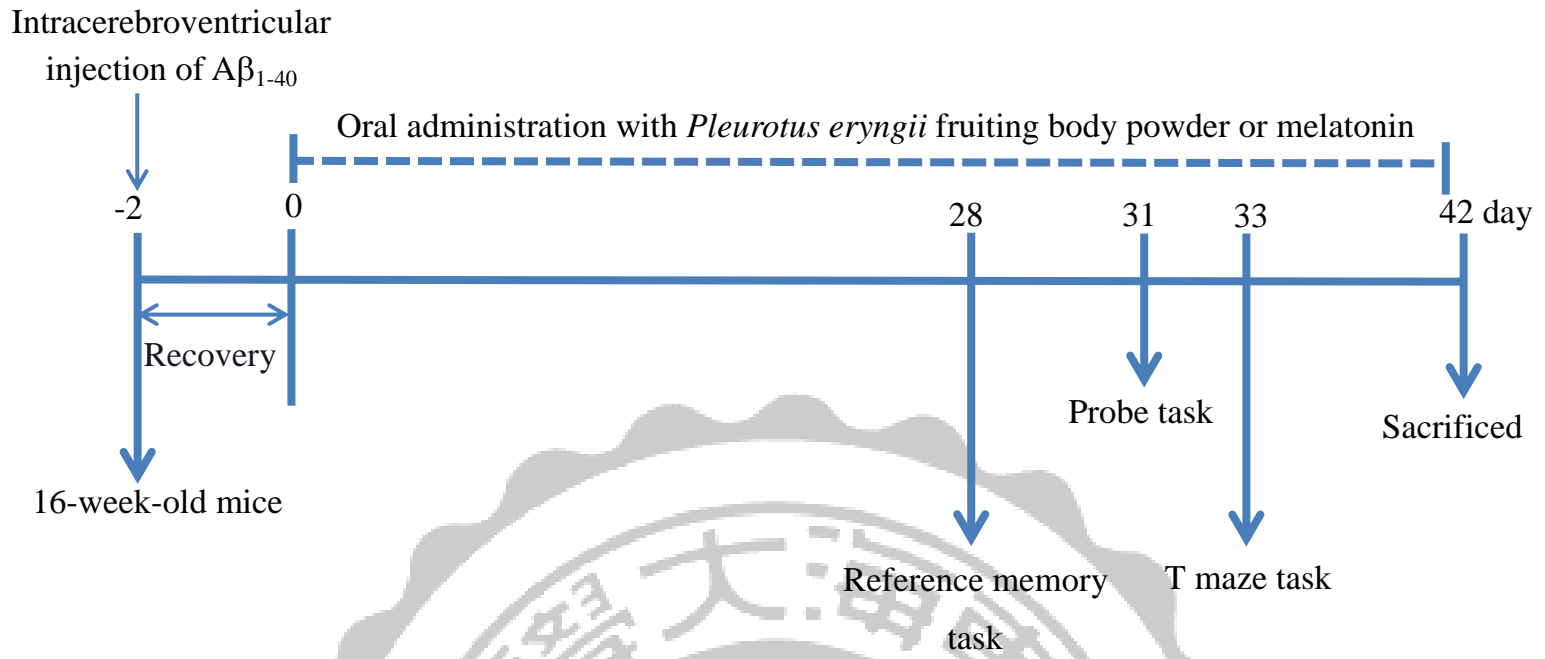
2. 攝食量

每週測量各組飼料攝食量，於實驗結束後作圖比較各組間飼料攝

附表七、杏鮑菇子實體粉末改善 A β 誘導小鼠記憶學習能力試驗之分組
 Referred table 7. The group in the experiment of *Pleurotus eryngii* fruiting
 body powder ameliorates memory and learning ability in A β -induced
 mice.

Group	A β_{1-40} injection	Sample	Dosage (mg/mouse/day)
CON	-	-	-
A β	+	-	-
MEL	+	Melatonin	0.26
LPE	+	0.5X <i>Pleurotus eryngii</i>	21.5
MPE	+	1X <i>Pleurotus eryngii</i>	43
HPE	+	2.5X <i>Pleurotus eryngii</i>	107.5





附圖十五、杏鮑菇子實體粉末改善 $A\beta$ 誘導小鼠記憶學習能力試驗之日程圖

Referred figure 15. The experiment schedule of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder ameliorates memory and learning ability in $A\beta$ -induced mice.

食變化之差異性。

3. 食物利用率:

實驗結束後，將每隻小鼠六週體重增加量除以六週總攝食量。食物利用率計算公式如下:

$$\text{Food efficiency (g gain/kg intake)} = (\text{weight gain/ total food intake})$$

(三) 動物記憶學習能力試驗

小鼠記憶學習能力試驗，主要是利用水迷宮試驗評估，當小鼠進入水迷宮後，因小鼠天性怕水會積極尋找逃逸平台，在尋找過程中牽涉到大腦處理並整合各種訊息，於下次進入水迷宮能夠經由學習及記憶判斷平台之位置 (Reynolds, 2007)。

1. 水迷宮試驗 (water maze task) (Morris, 1984)

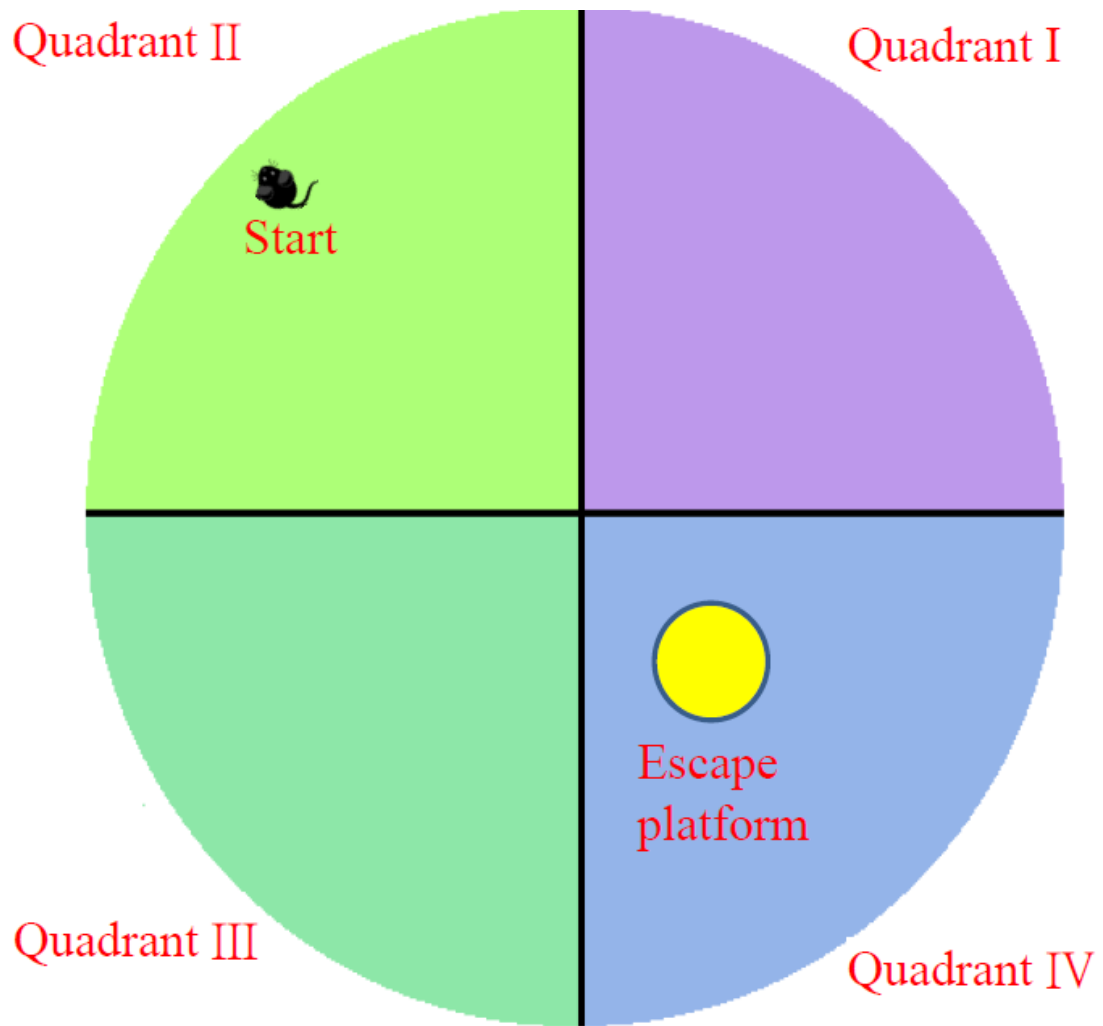
此試驗於餵食杏鮑菇子實體粉末後第 28 天開始進行，分為參考記憶試驗 (reference memory task) 及空間探索試驗 (probe task)，以下分別就各試驗加以說明：

A. 水迷宮試驗裝置

圓形泳池之直徑為 125 公分，高為 45 公分，於泳池第四象限放可移動之逃逸平台，供小鼠休息如附圖十六所示。平台直徑為 12 公分，高度為 25 公分。實驗進行前，泳池需加水高於逃逸平台 2 公分，並於水中添加奶粉使液面混濁，以隱藏平台。試驗期間於泳池上方架設攝影機紀錄小鼠游泳之動態，再以影像分析軟體分析數據。

B. 參考記憶試驗

於餵食杏鮑菇子實體粉末後第 28 至 30 天進行，逃脫平台固定於第四象限之中心點，小鼠頭向外進入第二象限，每次游 90 秒，若小鼠於 90 秒內找到逃逸平台，讓小鼠於平台上休息 30 秒，再放回籠中休息 30 秒，進行下一次試驗；如小鼠未於 90 秒內找到逃逸平



附圖十六、水迷宮區域圖

Referred figure 16. Each area of water maze task.

台，則將小鼠引導至平台上休息 30 秒後，放回籠中休息 30 秒，再進行下一次試驗，每天每隻小鼠進行 4 次，共三天。

C. 空間探測試驗

於餵食杏鮑菇子實體粉末後第 31 天進行，把逃逸平台移出泳池外，將小鼠頭向外進入第二象限，讓小鼠游泳 90 秒，並用影像分析軟體 (Etho Visoin XT) 紀錄小鼠於參考記憶試驗中，逃逸平台所放置之象限停留時間、游泳距離及穿越次數與全程游泳之路徑。

2. T 字迷宮試驗 (T maze task)

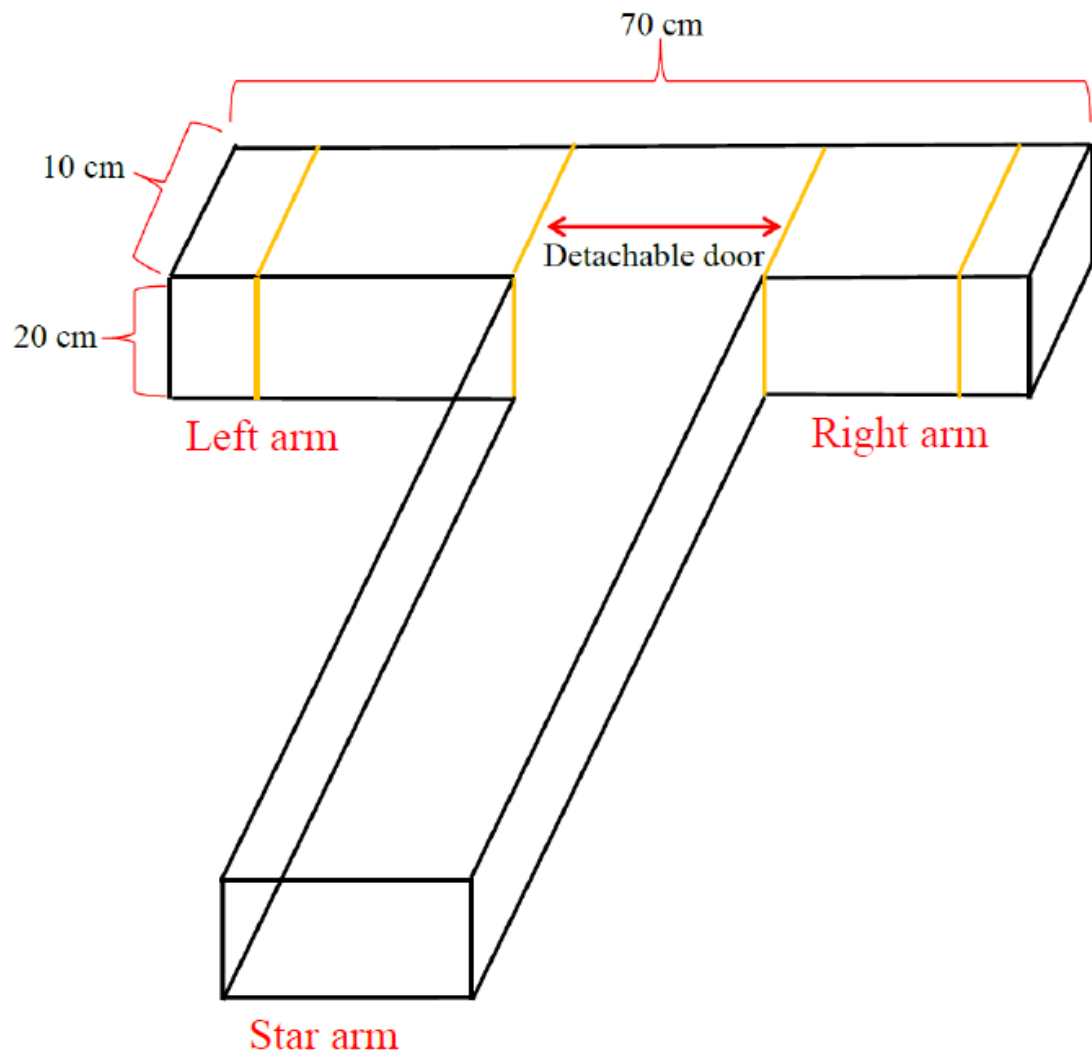
T 字迷宮試驗屬於空間參考記憶試驗，利用獎勵及懲罰方式，神經受到強烈刺激產生深刻印象，加深小鼠對此空間之記憶；有記憶學習能力之小鼠會依據學習經驗正確尋獲食物，避免走錯誤路線而遭受懲罰 (Bower & Miller, 1958)。

A. T 字迷宮試驗裝置

此裝置使用黑色壓克力製作，T 字迷宮裝置包含中間起始通道及左右兩側通道，三臂皆等長、寬及高分別為 70、10 及 20 公分，壓克力厚度為 5 公分，此裝置離地板 50 公分如附圖十七。

B. T 字迷宮試驗方式

主要參考 Deacon 及 Rawlins (2006) 之試驗方法，小鼠於餵食杏鮑菇子實體粉末後第 33 天進行 T 字迷宮試驗，進行前小鼠需禁食 8 小時，增加小鼠對於攝食之動機。第一天於左右側通道 (left and right arm) 底端放置數個乳酪塊，分別將每組小鼠放進起始通道 (star arm) 自由走動及攝食 5 分鐘，再放回籠中休息，當所有組別結束後接續第二次訓練，此目的為讓小鼠熟悉 T 字迷宮之裝置。第二天於右側通道放置數個乳酪塊並將左側通道由隔板阻隔，隨後左右側設置相互交換，每隻小鼠各邊訓練三次，以強迫選擇方式讓小鼠更熟悉 T 字迷宮。第三天設定左側為正確路徑，右側先以隔板阻隔，當小鼠抵達左側即可安全吃到乳酪塊；隨後左側用隔板阻隔，小鼠抵



附圖十七、T字迷宮裝置

Referred figure 17. Instrument of T maze task.

達右側後迅速抽走乳酪塊並用隔板侷限小鼠行動給予十秒懲罰，上述步驟重複進行三次，藉由獎勵及懲罰方式，加深小鼠對於 T 字迷宮之記憶性。第四天設置左側為正確而右側為錯誤路徑，將小鼠放入起始通道自由探索，記錄其抵達正確路徑之百分比，此實驗每隻小鼠共進行五次。

(四) 檢體處理及生化分析

檢體處理主要包含動物犧牲及臟器採集，生化分析則包含血清中肝腎功能指數及腦中阿茲海默症相關病徵。

1. 動物犧牲及臟器採集

各組小鼠犧牲前需禁食 12 小時，二氧化碳將其窒息後犧牲，以 1 mL 針筒採集小鼠血液，收集至 1.5 mL 微量離心管中，於 37°C 培養箱靜置約 2 小時，待血液沉澱分層後進行離心 (3000 x g, 20 min, 4 °C)，取上層血清至另 1.5 mL 微量離心管中並置於 -80°C 冰箱凍存，以供後續分析天門冬胺酸轉胺酶 (aspartate aminotransferase, AST)、胺基丙胺酸轉胺酶 (alanine aminotransferase, ALT)、尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、肌酐酸 (creatinine) 及尿素 (uric acid) 等肝腎功能指標。血液收集後，取下小鼠大腦 (brain)、心臟 (heart)、腎臟 (kidney)、肝臟 (liver)、脾臟 (spleen)、睪丸 (testis) 及副睪 (epididymis) 稱重後紀錄其重量，再將肝臟大葉、右半邊大腦及腎臟置於 10% 福馬林溶液 (formalin solution) 固定 3 天後進行修片，再經由石蠟包埋製作成組織切片，以蘇木紫及伊紅進行染色 (hematoxylin & eosin stain)，並判讀組織病變之情形，其他臟器置於夾鏈袋並凍存於 -80°C。

2. 大腦前處理

小鼠犧牲後將大腦取出，右半邊大腦置於 10 % 福馬林溶液固定，稱取左半邊大腦重量後放入 1.5 mL 微量離心管，加入 10 倍量之 PBS

溶液 (pH=7.4)，以組織均質機 (Nippi-891300) 於冰浴條件磨碎，並冰浴靜置 10 分鐘，待組織沉澱分層後進行離心 (400 x g, 7 min, 4 °C)，取上清液於另一個 1.5 mL 微量離心管，並凍存於-80°C，以供後續測定磷酸化 τ -蛋白、丙二醛及蛋白羰基氧化物含量。

3. 磷酸化 τ -蛋白含量測定

A. 檢測原理

利用沛鑫生物科技公司之 τ -蛋白商業套組 (Cat. No. E93893M, Taiwan) 測定大腦內磷酸化 τ -蛋白之含量，將抗體固定於底盤，再加入大腦組織液，其含有磷酸化 τ -蛋白抗原會與抗體結合，再加入 HRP conjugate，於酸性作用下顏色會由藍色變成黃色，當黃色越深代表磷酸化 τ -蛋白含量越高。

B. 檢測步驟

每孔加入 50 μ L 各濃度之標準品及樣品，再加入 100 μ L HRP conjugate，靜置於 37°C、60 分鐘，再以 wash buffer 清洗五次，每孔加入 50 μ L chromogen solution A 及 chromogen solution B，避光培養於 37°C、15 分鐘，每孔再加入 50 μ L stop solution 終止反應，顏色由藍色轉為黃色。使用 ELISA reader 讀取 450 nm 之吸光值，並將所得之吸光值帶入標準品檢量線中，藉以計算樣品中磷酸化 τ -蛋白之含量。

4. 脂質氧化物丙二醛含量

A. 檢測原理

利用 Cayman 之 TBARS 商業套組 (Cat. No. 10009055, USA) 測定大腦內脂質氧化物丙二醛之含量。脂質受自由基攻擊，會產生過氧化物丙二醛，在高溫 (90-100 °C) 下會與硫代巴比妥酸 (thiobarbituric acid, TBA) 形成紅色複合物，此複合物於 535 nm 下具

有吸光值。

B. 檢測步驟

加入 100 μL 各濃度之標準品及樣品至 10 mL 離心管，再加入 100 μL 十二烷基硫酸鈉 (sodium dodecyl sulfate solution, SDS solution) 震盪均勻後，加入 4 mL *color reagent 並充分搖晃，將離心管置於沸水浴中 1 小時，之後將離心管放於冰浴 10 分鐘，終止反應並進行離心 (1600 x g, 10 min, 4°C)，取出後於室溫靜置 30 分鐘，取上清液 150 μL 至 96 孔盤。使用 ELISA reader 讀取 535 nm 之吸光值，並將所得之吸光值帶入標準品檢量線中，藉以計算樣品中丙二醛之含量。

*color reagent: 530 mg 之 TBA 加入 150 ml TBA acetic acid solution 及 50 ml TBA sodium hydroxide

5. 蛋白羰基氧化物含量測定

A. 檢測原理

利用 Cayman 之 protein carbonyl colorimetric 商業套組 (Cat. No. 10005020, USA) 測定大腦內蛋白羰基氧化物之含量。蛋白質殘基側鏈被自由基攻擊後，氧化形成蛋白質羰基氧化物，其會與 2,4-二硝基代苯肼 (2,4-Dinitrophenyl hydrazine, DNPH) 以 schiff 鍵結，形成 hydrazone 產物，其在 370 nm 下具有吸光值。

B. 檢測步驟

取 100 μL 樣品加入 800 μL 之 #DNPH solution，置入 2 mL 微量離心管中，控制組則加入 800 μL 之 2.5 M HCl，於室溫避光 1 小時，每隔 15 分鐘震盪一次。再加入 1 mL 之 20% 三氯乙酸 (trichloroacetic acid, TCA) 震盪均勻，於冰浴靜置 5 分鐘後進行離心 (10,000 x g, 10 min, 4°C)，將上清液吸除，前述步驟重複一次。再加入 1 mL 之乙醇/乙酸乙酯 (ethanol/ethyl acetate, 1:1, v/v)，震盪均勻進行離心 (10,000 x g, 10 min, 4°C)，上述步驟重複三次。吸除上清液並加入

500 μL 鹽酸胍 (guanidine hydrochloride), 進行離心 (10,000 $\times g$, 10 min, 4°C), 取上清液 220 μL 至 96 孔盤, 以 ELISA reader 讀取 375 nm 之吸光值, 並代入公式求得樣品 protein carbonyl 之含量。計算公式如下:

$$\text{Protein carbonyl (nmol/ml)} = [(*\text{CA}) / (0.011 \mu\text{M}^{-1})] \times (500 \mu\text{L}/200 \mu\text{L})$$

DNPH solution : Dissolve DNPH (10 mM) in 2.5 M HCl.

* Corrected absorbance (CA) = sample 之吸光值 - control 之吸光值

6. 免疫組織化學染色 (immunohistochemistry, IHC)

A. 檢測原理

免疫組織化學染色法是利用免疫反應中抗原和抗體具有專一性, 此抗體與 HRP conjugate 及二氨基聯苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 結合, 可檢測組織中是否有目標抗原之存在, 此方式不只可用來檢測抗原之表現量也可觀察抗原所表現之位置。

B. 檢測步驟

(a) 組織切片脫蠟過程

將大腦之 IHC 組織切片置於二甲苯中脫蠟 40 分鐘, 依序再浸泡於 95、90、75 及 50% 酒精 5 分鐘, 再以 EDTA buffer 浸泡並微波 20 分鐘, 放置室溫冷卻。

(b) 組織切片染色過程

加入 5% H_2O_2 於組織切片上, 阻斷內源性過氧化氫酶干擾產生偽陽性, 15 分鐘後以 PBS 清洗, 利用 5% 山羊血清 (goat serum) 作用 30 分鐘以減少抗體與非特異性蛋白結合, 完成後不須潤洗, 直接以 $\text{A}\beta_{17-24}$ 抗體反應 2 小時, 再以 PBS 清洗, 加上 HRP conjugate 作用 45 分鐘, 以 PBS 清洗, 使用呈色劑 DAB 作用 1 分鐘, 待 $\text{A}\beta$ 斑塊染色後以 PBS 清洗, 用蘇木紫染色溶液 (hematoxylin stain

solution) 將細胞核染色，完畢後放於室溫自然乾燥。

(c) 組織切片封片過程

待乾燥後，用阿拉伯膠及二甲苯將切片封片保存，過程勿有氣泡殘留，以免干擾觀察。

7. 大腦中 A β 斑塊之定量

將已封片之 IHC 組織切片於 40 倍顯微鏡視野下拍攝切片結果，利用分析影像軟體 Image J (pro plus 6.3, MediaCybernetics Inc, USA) 分析大腦 A β 斑塊沉積量之百分比。計算公式如下：

$$\text{A}\beta \text{ 斑塊面積百分比} = (\text{A}\beta \text{ 斑塊面積} / \text{大腦面積}) \times 100 \%$$

四、皮爾森相關係數 (Pearson correlation coefficient)

皮爾森相關係數為描述兩個變數之間線性相關性，此線性相關性之 R 值 (R square value) 需介於 1 和 -1 之間，數值越接近 1 代表兩變數呈現正相關，數值接近 0 代表兩變數關聯性非常薄弱，若數值越接近 -1 則代表兩變數呈現負相關 (Egghe & Leydesdorff, 2009)。皮爾森相關係數之相關程度主要是參照 Evans (1996) 之研究，其相關程度分為微弱相關 (weakly correlated)、輕度相關 (modestly correlated)、中度相關 (moderately correlated)、高度相關 (highly correlated)、極度相關 (extremely correlated)，R 值分別介於 0.0~0.194、0.195~0.394、0.395~0.594、0.595~0.794 及 0.795~1.0。

五、統計分析

本實驗所得之數據以 mean \pm standard deviation (SD) 表示，利用統計軟體為 Statistical Analysis System 9.4 (SAS Institute Inc, 2010) 進行分析，以單因子變方分析 (one-way ANOVA) 方法，再以 Duncan Test 比較不同組別差異性， $p < 0.05$ 表示其在統計學上有顯著差異。

第四章 結果與討論

壹、杏鮑菇子實體粉末之一般成分分析

一般成分分析主要項目，包含水分、乾物重、粗灰分、粗脂質、粗蛋白及碳水化合物；有文獻指出影響菇類之水分含量及乾物重，主要因素為培養環境之溫度及空氣流速 (air velocities)，一般新鮮菇類乾燥後之水分含量約為 5~8%，乾物重則為 82.34~99.76% (Kulshreshtha et al, 2009 ; Kumar et al, 2013 ; Nakalembe et al, 2015)。粗灰分方面，此為菇類中營養素之無機成分，主要以礦物質、維生素 B1、B2 及菸鹼酸等，經由 500°C 高溫燃燒灰化後之殘留物，在一般菇類中，粗灰分含量介於 5~16% (水野卓等, 1997)。粗脂質方面，此為難溶於水但可溶於有機溶劑之化合物或衍生物，包括磷脂質 (phospholipid)、神經鞘脂 (sphingolipid)、固醇類 (sterols) 及三帖類 (triterpenoid) 等，一般菇類之粗脂質含量約為 1.1~8.3% (Crisan & Sands, 1978 ; James, 1995)。粗蛋白方面，此測定是利用凱氏法 (Kjeldahl method)，求得其含氮量再經由氮係數 (nitrogen factor) 換算成粗蛋白含量；然而菇類細胞壁多為幾丁質之 N-acetyl-glucosamine 聚合物，此非蛋白態氮會被計入其中，故菇類使用較一般含氮係數 (6.25) 較低的 4.38 進行粗蛋白之計算 (Crisan & Sands, 1978)。在碳水化合物方面，此為菇類主要成分之一，約占乾物重 40~70% (香川, 2004)。

表一為杏鮑菇子實體之一般成分分析結果，顯示水分含量及乾物重分別為 $8.34 \pm 0.14\%$ 及 $91.66 \pm 0.14\%$ 。粗灰分、粗脂質、粗蛋白及碳水化合物含量方面，分別為 $5.72 \pm 0.02\%$ 、 $1.55 \pm 0.01\%$ 、 $16.79 \pm 0.11\%$ 及 $67.60 \pm 0.26\%$ (DB)。有文獻指出針對台灣產之杏鮑菇子實體粉末測得其水分、乾物重、粗灰分、粗脂質、粗蛋白及碳水化合物含量，分別介於 6.33~9.57%、90.43~93.67%、4.50~5.81%、0.42~1.55%、8.84~16.31% 及 57.41~85.04% (DB) (何, 2009 ; 吳, 2013)。綜合上述文獻與本研究結果相比，發現唯有粗蛋白含量不在文獻所提及範圍內，此可能為培養條件及菌種來源不同所致 (Chang & Hayes, 1978)。

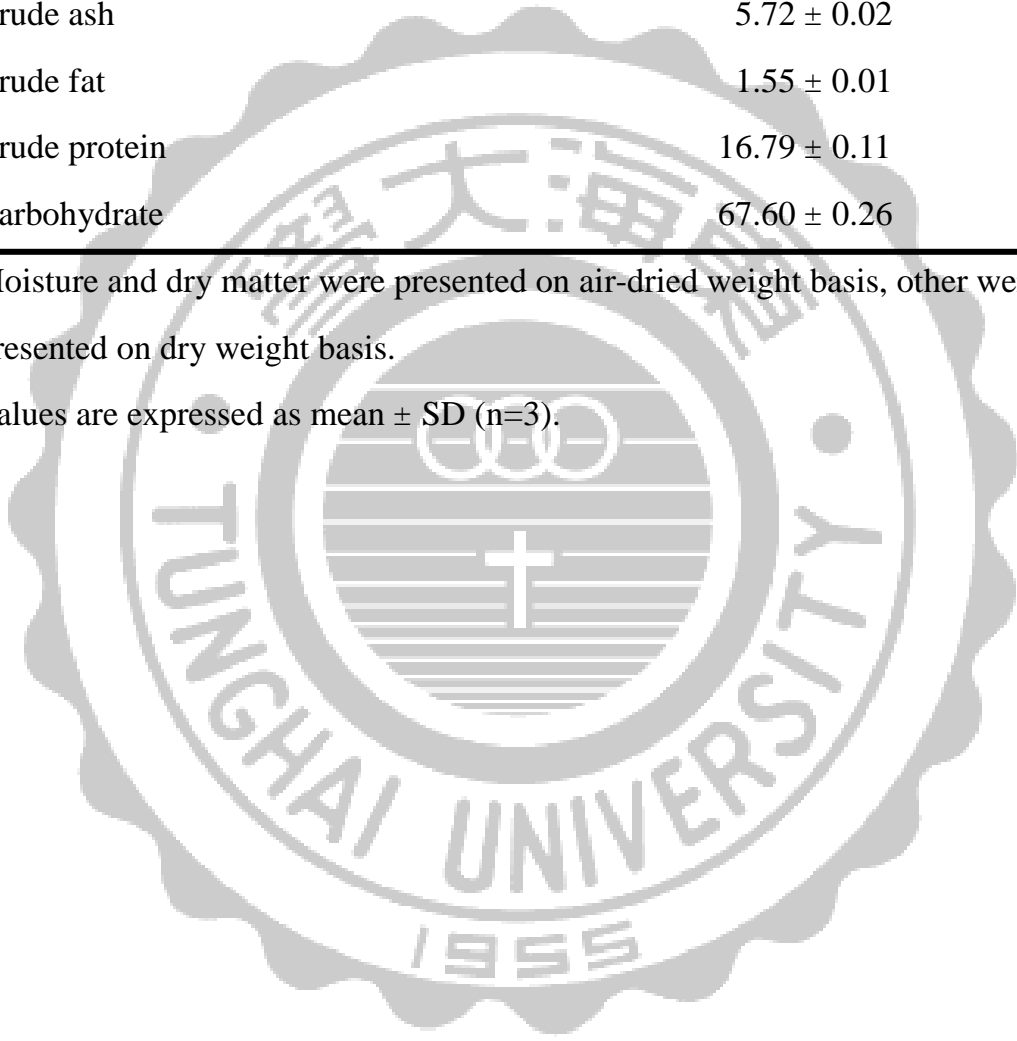
表一、杏鮑菇子實體粉末之一般成分

Table 1. Proximate compositions of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

Composition	Content ^b (%)
Moisture ^a	8.34 ± 0.14
Dry matter	91.66 ± 0.14
Crude ash	5.72 ± 0.02
Crude fat	1.55 ± 0.01
Crude protein	16.79 ± 0.11
Carbohydrate	67.60 ± 0.26

^a Moisture and dry matter were presented on air-dried weight basis, other were presented on dry weight basis.

^b Values are expressed as mean ± SD (n=3).



貳、杏鮑菇子實體粉末之機能性成分分析

表二為杏鮑菇子實體粉末之活性成分分析結果，主要分析項目包含麥角硫因、腺苷、多酚及多醣體，以下就各分析結果加以說明。

一、麥角硫因含量

菇類含有大量麥角硫因，其中又以杏鮑菇含量最高，此含量遠高於蔬菜，是人類攝取麥角硫因最要好之來源 (Ey et al, 2007；何，2009)。有文獻指出麥角硫因具有促進神經之生長、抗氧化、螯合金屬離子及抗發炎等功效 (Briggs, 1972；Rahman et al, 2003；Paul et al, 2010；Zhu et al, 2011)。

由表二結果可知杏鮑菇子實體粉末之麥角硫因含量為 1.36 ± 0.05 mg/g (DB)，與何 (2009) 所提出之台灣產杏鮑菇子實體粉末之麥角硫因含量 (1.44~1.60 mg/g, DB) 相似。若本研究結果與其他常見食藥用菇類相比，麥角硫因含量高低順序為杏鮑菇 (*Pleurotus eryngii*, 1.36 ± 0.05 mg/g, DB) > 金針菇 (*Flammulina velutipes white*, 1.05 ± 0.06 mg/g, DB) > 韓國蠔菇 (*Pleurotus ostreatus*, 1.00 ± 0.02 mg/g, DB) > 香菇 (*Lentinula edodes* 271, 0.76 ± 0.15 mg/g, DB) > 日本蠔菇 (*Pleurotus ostreatus gray*, 0.73 ± 0.14 mg/g, DB) (何，2009)。

二、腺苷含量

腺苷是核苷的一種，於生物體內可促進神經訊息傳遞及刺激自主神經來調節血管收縮之功效 (Tabrizchi & Bedi, 2001；Wei et al, 2010)，其他生理功能則包括降低腦部缺血所造成之傷害、預防癲癇及抗憂鬱等 (Gome et al, 2011；Vinadé et al, 2003；Carlezon et al, 2005)。

由表二結果可知杏鮑菇子實體粉末之腺苷含量為 3.07 ± 0.08 mg/g (DB)，與 Bao 等人 (2013) 利用固態發酵將杏鮑菇菌絲體接種於白米培養 40 天，測得腺苷含量 ($175.64 \mu\text{g/g}$, DB) 相較，其結果遠低於本研究

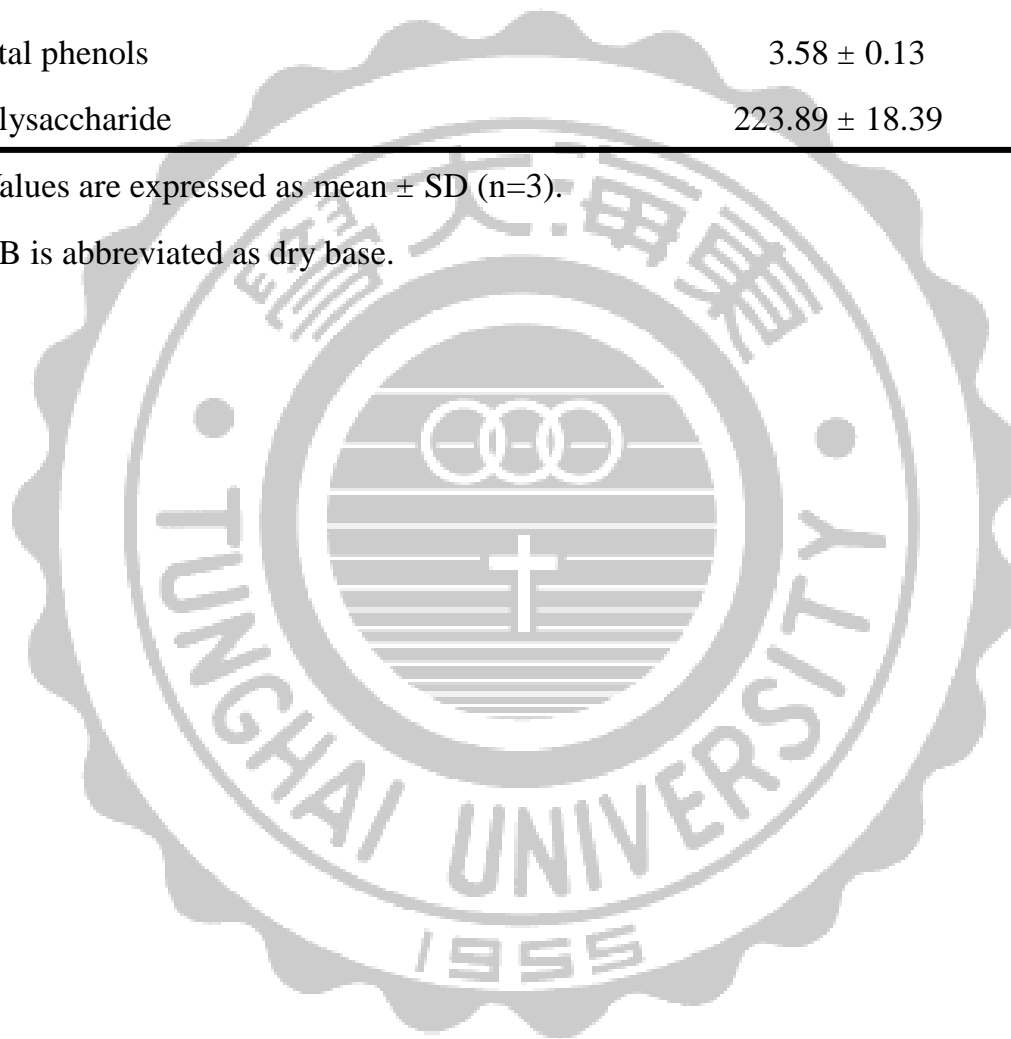
表二、杏鮑菇子實體粉末之麥角硫因、腺苷、總酚及多醣體含量

Table 2. Contents of ergothioneine, adenosine, total phenols, polysaccharide in *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

Functional component	Content ^a (mg/g, DB ^b)
Ergothioneine	1.36 ± 0.05
Adenosine	3.07 ± 0.08
Total phenols	3.58 ± 0.13
Polysaccharide	223.89 ± 18.39

^a Values are expressed as mean ± SD (n=3).

^bDB is abbreviated as dry base.



之腺苷含量；顯示杏鮑菇子實體因培養條件不同，較具備完整生理結構及活性，故腺苷含量與杏鮑菇菌絲體有明顯之差異 ($p < 0.05$)。

三、總酚含量

多酚類是由一個或數個羥基及芳香環所組成，具有抗衰老、抗發炎、保護腦神經細胞及預防心血管疾病等功效 (Halpern et al, 1998 ; Lambert et al, 2005 ; Biesalski et al, 2007 ; Rossi et al, 2008)。

由表二結果可知杏鮑菇子實體粉末之總酚含量為 3.58 ± 0.13 mg/g (DB)，與其他食藥用菇類之總酚含量相比，高低順序為洋菇 (*Agaricus bisporus*) 4.54 ± 0.17 mg/g (DB) > 雞油菇 (*Cantharellus cibarius*) 為 2.39 ± 0.23 mg/g (DB) > 乳牛肝菌 (*Suillus bovinus*) 為 2.16 ± 0.07 mg/g (DB) (Robaszkiewicz et al, 2010)。

四、多醣體

多醣體是生命有機體重要之成分，是由單醣聚集而成的高分子聚合物 (Zisu & Shah, 2003)。研究指出杏鮑菇多醣體具有抗氧化、抗腫瘤、增強免疫力及保肝等功效 (Kang et al, 2004 ; Chen et al, 2012 ; Li & Shah , 2014)。

由表二結果可知杏鮑菇子實體粉末之多醣體含量為 223.89 ± 18.39 mg/g (DB) ; Lee 等人 (2011) 研究指出杏鮑菇子實體粉末之多醣體含量為 341.0 ± 14.5 mg/g (DB)，高於本研究結果；造成此結果原因可能為分析方法不同，Lee 等人研究之萃取方法未經透析膜過濾，分子量較小之醣類未被去除，這可能導致測得之杏鮑菇多醣體含量較多。

叁、杏鮑菇子實體粉末改善阿茲海默症之研究

本研究以側腦注射 $A\beta_{1-40}$ 誘導產生具認知功能障礙阿茲海默症狀之 C57BL/6J 小鼠，再以褪黑激素及不同劑量杏鮑菇子實體粉末管餵六週，探討樣品對於小鼠之體重與攝食量、血清生化參數、組織相對重量、記憶與學習能力、腦中阿茲海默症相關病徵及組織病變之影響；以下就各結果加以說明。

一、 $A\beta_{1-40}$ 注射手術及餵食杏鮑菇子實體粉末對 C57BL/6J 小鼠體重及攝食量之影響

本研究結果發現餵食杏鮑菇子實體粉末前，各組小鼠平均體重介於 25.10 ~ 26.53 g，並無明顯差異 (表三)。小鼠採自由攝食方式飼養，並管餵杏鮑菇子實體粉末六週，體重會隨著週齡而增加，各組小鼠於第六週之平均體重介於 27.07 ~ 28.46 g，各組小鼠平均體重增加量為 1.71~2.50 g，皆無顯著差異。在攝食方面，各組小鼠平均總攝食量為 0.18 ~ 0.21 kg，經計算得平均食物利用率 (food efficiency) 為 8.45 ~ 12.12 g gain/kg intake，皆無顯著差異。由上述結果可知，側腦注射手術不會造成小鼠食慾不佳而產生體重增加或減少之現象；另給予杏鮑菇子實體粉末亦不會影響小鼠之攝食量。

二、餵食杏鮑菇子實體粉末對 C57BL/6J 小鼠血清生化參數之影響

表四為 C57BL/6J 小鼠管餵杏鮑菇子實體粉末 6 週後，血清生化參數分析結果，主要包含肝功能指數、腎功能指數及膽固醇含量。

(一) 肝功能指數

天門冬胺酸轉胺酶 (AST) 及胺基丙胺酸轉胺酶 (ALT) 是存在於肝臟之酵素，在胺基酸代謝上扮演重要之角色，當肝臟受損時，會導致細胞破裂或死亡，細胞質中 AST 及 ALT 被釋放於血液中；因此，可藉由 AST 及 ALT 濃度來評估肝組織發炎及壞死程度 (Gowda et al, 2009)。

表三、杏鮑菇子實體粉末對以 A β 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠增重及攝食量之影響

Table 3. Effects of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder on growth and food intake in A β -induced impairment C57BL/6J mice.

	CON	A β	MEL	LPE	MPE	HPE
Initial body weight (g)	26.53 \pm 1.92 ^A	25.86 \pm 1.36 ^A	26.53 \pm 2.12 ^A	25.50 \pm 1.52 ^A	25.18 \pm 2.11 ^A	25.10 \pm 1.98 ^A
Body weight at week-6 (g)	28.46 \pm 2.32 ^A	28.36 \pm 1.35 ^A	28.14 \pm 2.25 ^A	27.44 \pm 1.74 ^A	27.07 \pm 1.43 ^A	27.70 \pm 1.99 ^A
Weight gain (g/6 weeks)	1.94 \pm 0.82 ^A	2.50 \pm 0.91 ^A	1.71 \pm 0.24 ^A	1.85 \pm 0.68 ^A	2.02 \pm 0.92 ^A	2.19 \pm 0.82 ^A
Food intake (kg/6 weeks)	0.18 \pm 0.03 ^A	0.21 \pm 0.02 ^A	0.20 \pm 0.03 ^A	0.20 \pm 0.02 ^A	0.19 \pm 0.02 ^A	0.21 \pm 0.04 ^A
Food efficiency (g gain/kg intake)	10.51 \pm 4.42 ^A	12.12 \pm 4.39 ^A	8.45 \pm 1.16 ^A	9.24 \pm 3.41 ^A	10.54 \pm 4.79 ^A	10.64 \pm 3.99 ^A

Values are expressed as mean \pm SD (n=8). Means with different superscript letters within a row are significantly different ($p < 0.05$).

CON: control group ; A β : amyloid β -peptide induced group ; MEL: melatonin group ; LPE: low dosage of *Pleurotus eryngii* powder group ; MPE: meddium dosage of *Pleurotus eryngii* powder group ; HPE: high dosage of *Pleurotus eryngii* powder group

表四、杏鮑菇子實體粉末對以 A β 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠血清生化值之影響

Table 4. Effects of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder on serum biochemical values in A β -induced impairment C57BL/6J mice.

Serum parameters	CON	A β	MEL	LPE	MPE	HPE
AST (U/L)	49.43 \pm 6.25 ^B	46.75 \pm 2.60 ^B	48.00 \pm 6.63 ^B	47.50 \pm 4.66 ^B	55.13 \pm 3.64 ^A	55.57 \pm 4.59 ^A
ALT (U/L)	39.38 \pm 6.61 ^C	39.00 \pm 2.88 ^C	37.13 \pm 3.09 ^C	48.13 \pm 7.00 ^B	46.25 \pm 3.96 ^B	53.00 \pm 2.26 ^A
BUN (mg/dl)	32.64 \pm 2.62 ^B	34.84 \pm 5.19 ^B	26.13 \pm 1.43 ^C	33.84 \pm 4.61 ^B	40.98 \pm 1.50 ^A	42.17 \pm 2.40 ^A
Creatinine (mg/dl)	0.27 \pm 0.02 ^B	0.31 \pm 0.02 ^A	0.28 \pm 0.02 ^B	0.27 \pm 0.03 ^B	0.28 \pm 0.02 ^B	0.29 \pm 0.02 ^{AB}
Uric acid (mg/dl)	3.51 \pm 0.47 ^{AB}	3.50 \pm 0.94 ^{AB}	3.56 \pm 0.96 ^{AB}	2.96 \pm 0.49 ^B	3.66 \pm 0.26 ^A	3.49 \pm 0.20 ^{AB}
Cholesterol-total (mg/dl)	87.88 \pm 11.15 ^B	109.63 \pm 5.32 ^A	116.25 \pm 18.50 ^A	105.63 \pm 7.78 ^A	106.13 \pm 8.51 ^A	108.00 \pm 10.06 ^A
HDL-cholesterol (mg/dl)	67.38 \pm 11.45 ^B	81.38 \pm 2.62 ^A	86.63 \pm 4.27 ^A	81.75 \pm 7.27 ^A	86.00 \pm 5.88 ^A	85.71 \pm 9.39 ^A
LDL-cholesterol (mg/dl)	13.50 \pm 1.20 ^C	16.63 \pm 2.20 ^B	22.38 \pm 5.18 ^A	14.13 \pm 1.89 ^{BC}	13.13 \pm 1.25 ^C	13.57 \pm 2.19 ^C
HDL/LDL	4.73 \pm 1.10 ^{BC}	4.69 \pm 0.40 ^{BC}	3.78 \pm 1.12 ^C	5.61 \pm 0.90 ^{AB}	5.86 \pm 0.68 ^A	6.33 \pm 1.11 ^A

Values are expressed as mean \pm SD (n=8). Means with different superscript letters within a row are significantly different ($p < 0.05$).

Abbreviations: symbols represent as in the table 3.

由表四結果可知，當小鼠餵食杏鮑菇子實體粉末後，中劑量 (MPE) 及高劑量 (HPE) 組血清中 AST 明顯高於 CON 組 ($p<0.05$)，ALT 亦有相同結果 ($p<0.05$)；根據 Mazzaccara 等人 (2008) 研究指出，4 至 8 個月 C57BL/6J 小鼠血清中 AST 及 ALT 最高含量為 91 U/L 及 70 U/L，故本實驗餵食中及高劑量杏鮑菇子實體粉末後，小鼠肝功能指數雖有上升，但數值皆在正常範圍內，顯示餵食杏鮑菇子實體粉末對肝臟功能並無造成損傷。

(二) 腎功能指數

腎功能指數主要包括尿素氮 (BUN)、肌酐酸 (creatinine) 和尿酸 (uric acid)。BUN 及 creatinine 為生物體內蛋白質代謝之終產物，uric acid 則為嘌呤 (purine) 之代謝終產物；這些代謝物會被運送至腎臟代謝，經由尿液排出體外；當腎臟損傷會造成腎絲球 (glomerular) 過濾機能降低，使血清中 BUN、creatinine 及 uric acid 濃度過高，故可作為腎損傷之指標 (Musso et al, 2012；Johnson et al, 2013)。

由表四結果顯示 MPE 及 HPE 組之 BUN 與 A β 組之 creatinine 顯著高於 CON 組 ($p<0.05$)，根據 Mazzaccara 等人 (2008) 及梁等人 (2008) 研究指出，C57BL/6J 小鼠血清中 BUN 及 creatinine 最高數值為 69.00 mg/dl 及 0.42 mg/dl，故本實驗各組之小鼠 BUN 及 creatinin 酸數值皆在正常範圍內。另外，各組別小鼠之 uric acid 皆與 CON 組無顯著差異，顯示餵食杏鮑菇子實體粉末對腎臟功能並不會造成損傷。

(三) 膽固醇含量

有文獻指出血清中低密度脂蛋白 (LDL) 增加時，會增加腦中 β -secretase1 活性及 ApoE4 含量，當 β -secretase1 活性增加時，會加快切割 APP 之速率，另 ApoE4 含量提高時，會與 A β 低聚物會形成複合產物，並促進 A β 斑塊形成，沉積於腦中，增加罹患阿茲海默症之風險

(Sjögren & Blennow, 2005; Yoon et al, 2005)。高密度脂蛋白 (HDL) 則能移除膽固醇並運送至肝臟代謝，促使其排出體外，可減低心血管疾病之發生 (Gao & Yuan, 2010)。

表四結果顯示 CON 組之總膽固醇 (cholesterol-total) 含量明顯低於其他組別 ($p < 0.05$)，主要是因其 HDL 及 LDL 含量較低所致。另 LDL 含量方面，MPE 及 HPE 組顯著低於 A β 組 ($p < 0.05$)，顯示餵食杏鮑菇子實體粉末可降低血清中 LDL 含量，減少罹患阿茲海默症之風險。有研究指出，誘發高脂血症之大鼠，餵食杏鮑菇子實體粉末後，可明顯降低大鼠血清中 LDL 含量 (Alam et al, 2011)，本實驗之結果與上述研究相符。此外，HDL 含量方面，雖 LPE、MPE 及 HPE 組與 A β 組並無顯著差異，但因 MPE 及 HPE 組之 LDL 含量較低，使得 HDL/LDL 方面，MPE 及 HPE 組顯著高於 A β 組 ($p < 0.05$)。

三、餵食杏鮑菇子實體粉末對 C57BL/6J 小鼠臟器組織相對重量之影響

Thomann 等人 (2009) 研究指出阿茲海默症患者，因 A β 沉積於腦中及 τ -蛋白過度磷酸化，導致腦部皮質層及海馬迴受損而漸漸萎縮，致腦組織重量減輕。表五結果顯示 A β 組之腦組織相對重量最低 ($1.62 \pm 0.06\%$) 與 CON 組 ($1.75 \pm 0.13\%$)、餵食褪黑激素之 MEL 組 ($1.71 \pm 0.05\%$) 及餵食不同劑量樣品之 LPE、MPE 與 HPE 組 (1.74 ± 0.03 、 1.75 ± 0.08 及 $1.72 \pm 0.09\%$)，相比皆有顯著性差異 ($p < 0.05$)。上述可推測 MEL、LPE、MPE 及 HPE 組腦部並無萎縮之情形發生；原因可能為褪黑激素及杏鮑菇含許多機能性成分，如麥角硫因及多酚類，具有保護腦神經及促進神經元生長之功效，進而減緩腦部萎縮之情形 (Jang et al, 2004; Ono et al, 2008)。此外，其餘臟器如心臟、腎臟、肝臟、睪丸及副睪之重量與體重之百分比，各組別間並無顯著差異，再以肉眼觀察各器官之外觀，亦無發現有腫大及萎縮之情形，臟器顏色也無明顯之差異。此結果顯示餵食褪黑激素及杏鮑菇子實體粉末，並無造成組織之傷害。

表五、杏鮑菇子實體粉末對以 A β 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠臟器重量之影響

Table 5. Effects of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder on relative organ weight in A β -induced impairment C57BL/6J mice.

Organ	Relative organ weight (%)					
	CON	A β	MEL	LPE	MPE	HPE
Brain	1.75 \pm 0.13 ^A	1.62 \pm 0.06 ^B	1.71 \pm 0.05 ^A	1.74 \pm 0.03 ^A	1.75 \pm 0.08 ^A	1.72 \pm 0.09 ^A
Heart	0.45 \pm 0.08 ^A	0.49 \pm 0.10 ^A	0.50 \pm 0.03 ^A	0.44 \pm 0.03 ^A	0.48 \pm 0.05 ^A	0.47 \pm 0.06 ^A
Kidney	1.07 \pm 0.05 ^A	1.04 \pm 0.06 ^A	1.06 \pm 0.02 ^A	1.08 \pm 0.05 ^A	1.07 \pm 0.08 ^A	1.04 \pm 0.02 ^A
Liver	4.12 \pm 0.24 ^A	4.08 \pm 0.15 ^A	4.23 \pm 0.43 ^A	4.42 \pm 0.44 ^A	4.29 \pm 0.43 ^A	4.10 \pm 0.31 ^A
Spleen	0.18 \pm 0.01 ^A	0.19 \pm 0.02 ^A	0.18 \pm 0.03 ^A	0.19 \pm 0.02 ^A	0.19 \pm 0.02 ^A	0.18 \pm 0.02 ^A
Testis	0.63 \pm 0.09 ^A	0.63 \pm 0.05 ^A	0.62 \pm 0.04 ^A	0.62 \pm 0.04 ^A	0.64 \pm 0.06 ^A	0.66 \pm 0.06 ^A
Epididymis	0.14 \pm 0.03 ^A	0.13 \pm 0.04 ^A	0.13 \pm 0.04 ^A	0.12 \pm 0.02 ^A	0.13 \pm 0.02 ^A	0.13 \pm 0.03 ^A

Relative organ weight = (organ weight/body weight) x 100%

Values are expressed as mean \pm SD (n=8). Means with different superscript letters within a row are significantly different ($p < 0.05$).

Abbreviations: symbols represent as in the table 3.

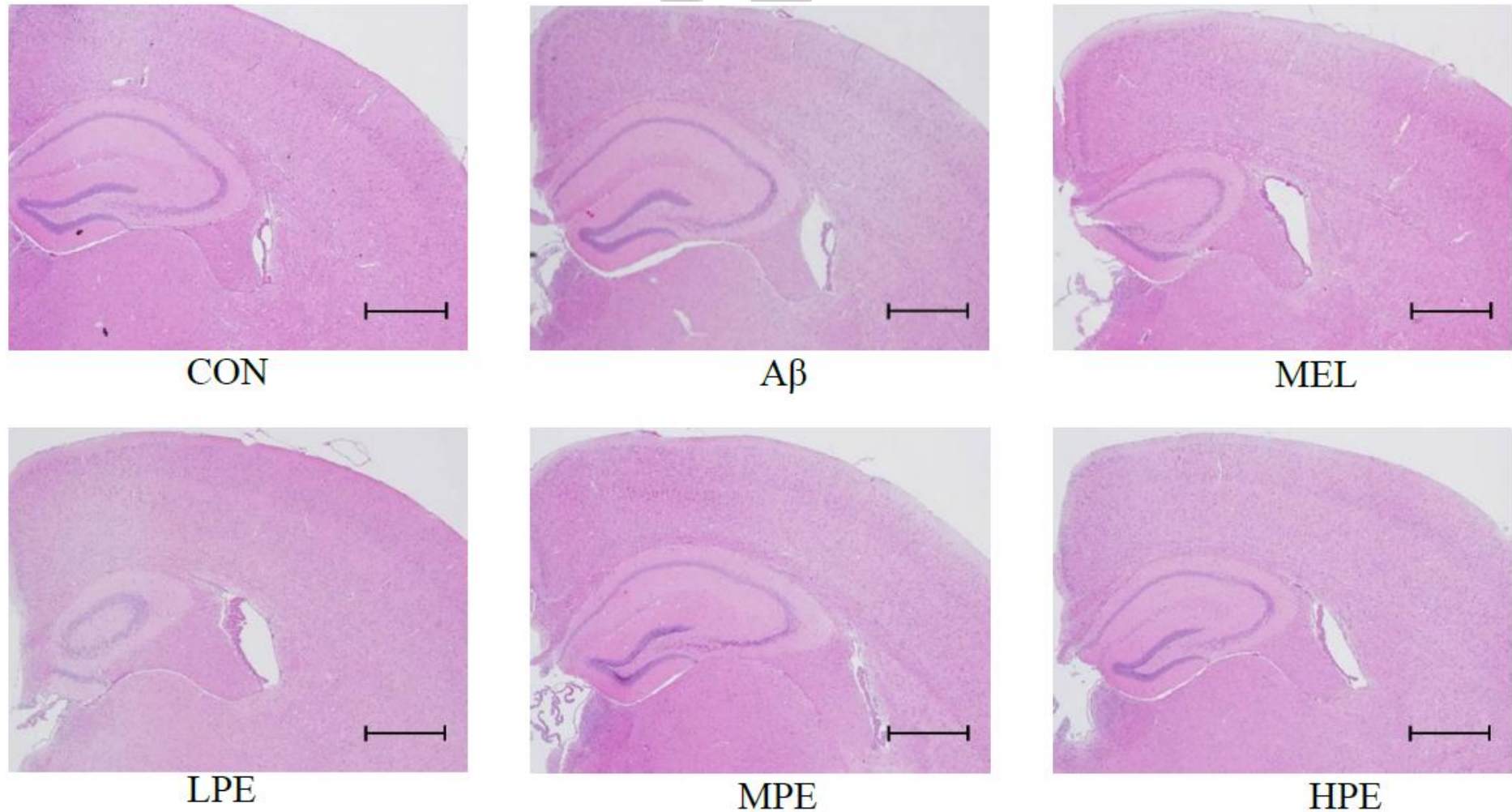
四、餵食杏鮑菇子實體粉末對 C57BL/6J 小鼠腦部組織之影響

Kemppainen 等人 (2015) 研究結果發現，利用側腦注射腦部多巴胺神經營養因子 (cerebral dopamine neurotrophic factor, CNDF) 及 NaCl 六週後，海馬迴及皮質層有明顯針頭插入所造成之外傷。圖一為本研究小鼠腦部 H&E 染色之組織切片圖，可看出腦部利用側腦注射之位置似乎已治癒，顯示手術過程未過度傷害腦部細胞，造成腦部不可逆之損傷。因此，可判定小鼠記憶學習能力之障礙，是由側腦注射 A β ₁₋₄₀ 所引起，並非由側腦注射所造成之傷害所引起。圖二為腦部 400 倍放大之組織切片圖，可看出腦部組織間質中並未發現有任何空泡 (vacuoles) 及炎症細胞浸潤 (inflammatory cell infiltration) 之現象，顯示餵食杏鮑菇子實體粉末不會造成腦部病變。

五、餵食杏鮑菇子實體粉末對 C57BL/6J 小鼠肝腎臟組織之影響

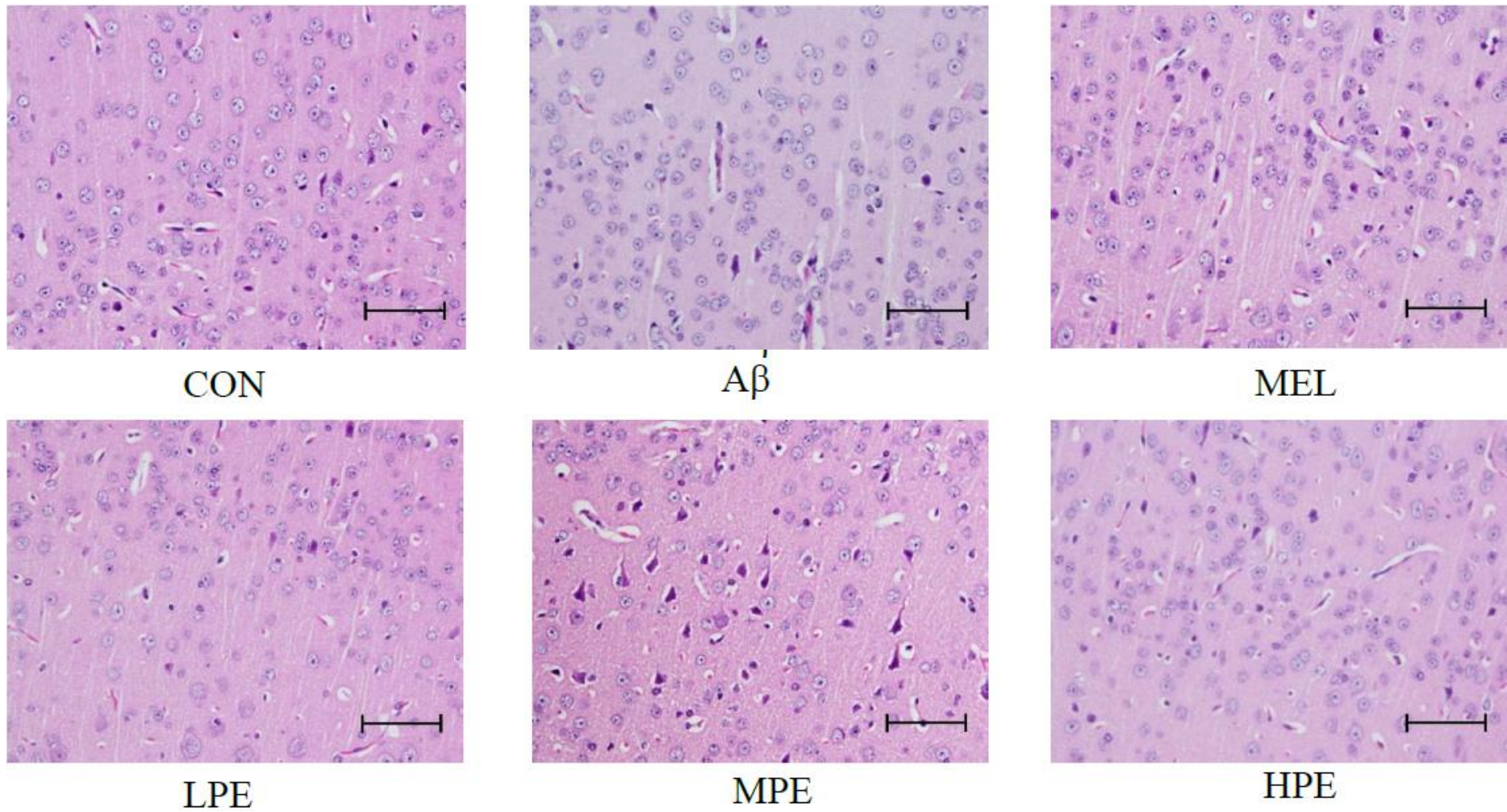
圖三為肝臟組織切片之 H&E 染色結果，可看出肝臟之中央靜脈 (central vein) 周圍之肝臟細胞排列整齊，且無空泡及細胞病變效應 (cytopathic effect, CPE) 之現象。此結果與先前肝功能指標結果相符，顯示餵食杏鮑菇子實體粉末並不會造成肝細胞之損傷。

圖四為腎組織切片之 H&E 染色結果，可見腎小管 (renal tubule) 排列整齊且腎小球基底膜 (glomerular basement membrane, GBM) 完整，組織間未有發現炎症細胞浸潤之現象。此結果與先前腎功能指標結果相符，顯示餵食杏鮑菇子實體粉末不會造成腎功能損傷。



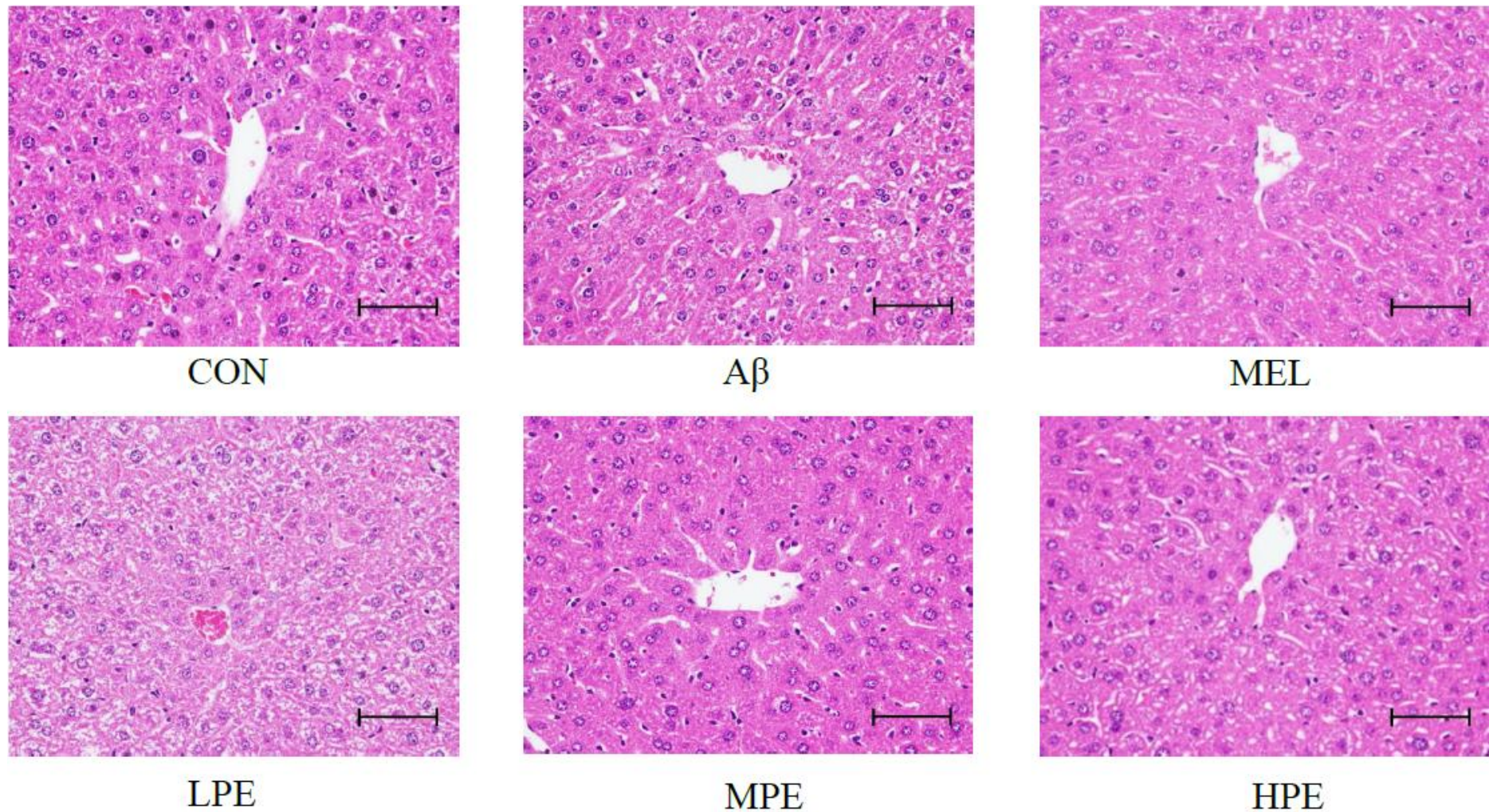
圖一、杏鮑菇子實體粉末對以 A β 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠腦組織之影響 (圖中比例尺大小為 600 μ m)

Fig 1. Effects of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder on histopathological alterations of brain in A β -induced impairment C57BL/6J mice. The images were taken 40X magnification with H&E staining. Scale bars = 600 μ m. Abbreviations: symbols represent as in the table 3.



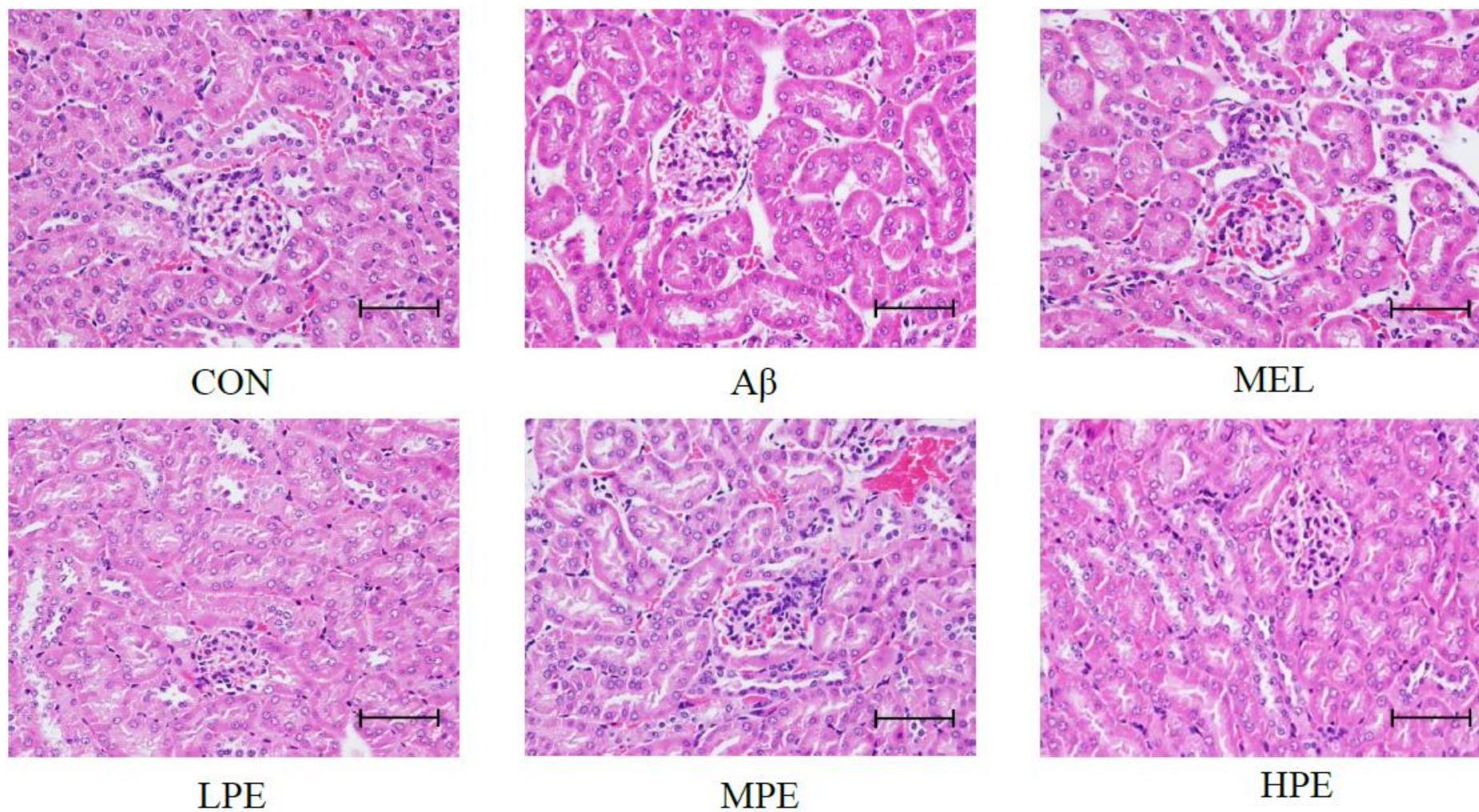
圖二、杏鮑菇子實體粉末對以 A β 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠腦組織之影響 (圖中比例尺大小為 60 μ m)

Fig 2. Effects of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder on histopathological alterations of brain in A β -induced impairment C57BL/6J mice. The images were taken 400X magnification with H&E staining. Scale bars = 60 μ m. Abbreviations: symbols represent as in the table 3.



圖三、杏鮑菇子實體粉末對以 A β 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠肝組織之影響 (圖中比例尺大小為 60 μ m)

Fig 3. Effects of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder on histopathological alterations of liver in A β -induced impairment C57BL/6J mice. The images were taken 400X magnification with H&E staining. Scale bars = 60 μ m. Abbreviations: symbols represent as in the table 3.



圖四、杏鮑菇子實體粉末對以 A β 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠腎組織之影響 (圖中比例尺大小為 60 μ m)

Fig 4. Effects of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder on histopathological alterations of kidney in A β -induced impairment C57BL/6J mice. The images were taken 400X magnification with H&E staining. Scale bars = 60 μ m. Abbreviations: symbols represent as in the table 3.

六、餵食杏鮑菇子實體粉末對 C57BL/6J 小鼠記憶學習能力之影響

小鼠記憶學習能力，主要是利用水迷宮試驗來評估，有文獻指出阿茲海默症小鼠因腦部神經損傷較為嚴重，降低記憶學習能力 (Semar et al, 2013)。故本研究利用水迷宮試驗，評估餵食杏鮑菇子實體粉末後是否能改善小鼠記憶學習能力。

(一) 水迷宮試驗

此實驗是將小鼠放於水迷宮泳池起點 (第二象限)，紀錄小鼠到達逃逸平台之時間及距離，以做為杏鮑菇子實體粉末是否具有改善記憶學習能力之效果。水迷宮試驗包含兩個部分，為期四天；前三天為第一部分—參考記憶試驗，最後一天為第二部分—空間探索試驗。

1. 參考記憶試驗 (reference memory task)

本試驗為 Morris 水迷宮試驗之第一部分，將逃逸平台放置於第四象限，記憶能力較佳之小鼠會隨著練習次數增加，加深逃逸平台所在位置之記憶，於下次參考記憶試驗中，花較少時間搜尋到逃逸平台 (Porte et al, 2008)。

A. 逃逸時間 (escape latency)

表六為各組別小鼠於水迷宮試驗搜尋逃逸平台所花費之時間，結果顯示，第一天時，HPE 組搜尋逃逸平台所花費之時間較短，為 75.15 ± 13.73 秒，明顯低於其他各組 ($p < 0.05$)；MEL、LPE 和 MPE 組次之，分別為 84.92 ± 7.64 、 85.21 ± 5.51 及 84.67 ± 6.87 秒，與 A β 組 (85.67 ± 6.76 秒) 及 CON 組 (87.17 ± 4.57 秒) 並無顯著差異。第二天時，CON 組隨著練習次數增加，搜尋逃逸平台所花費之時間明顯縮短至 18.64 ± 4.84 秒，A β 組則微幅縮短為 83.38 ± 10.28 秒，餵食杏鮑菇子實體粉末之 LPE、MPE 及 HPE 組 (61.29 ± 17.28 、 40.67 ± 7.73 及 40.10 ± 8.28 秒) 皆顯著低於 A β 組 ($p < 0.05$)，分別縮短 26%、51% 及 52%。當第三天時，與 A β 組相較，CON、MEL、LPE、MPE 及 HPE 均有顯著性差異 ($p < 0.05$)，縮短範圍為 32~85%。

表六、杏鮑菇子實體對以 A β 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠於參考記憶試驗之逃逸時間

Table 6. Effects of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder on escape time of reference memory task in A β -induced impairment C57BL/6J mice.

Times ordinal	Escape latency (sec)					
	CON	A β	MEL	LPE	MPE	HPE
First day	^{#a} 87.17 \pm 4.57 ^{A*}	^a 85.67 \pm 6.76 ^A	^a 84.92 \pm 7.64 ^A	^a 85.21 \pm 5.51 ^A	^a 84.67 \pm 6.87 ^A	^a 75.15 \pm 13.73 ^B
Second day	^b 18.64 \pm 4.84 ^D	^a 83.38 \pm 10.28 ^A	^b 64.17 \pm 8.96 ^B	^b 61.29 \pm 17.28 ^B	^b 40.67 \pm 7.73 ^C	^b 40.10 \pm 8.28 ^C
Third day	^b 17.88 \pm 5.83 ^D	^a 88.29 \pm 4.18 ^A	^b 60.08 \pm 3.28 ^B	^b 45.17 \pm 17.10 ^C	^c 17.38 \pm 8.96 ^D	^c 13.25 \pm 5.16 ^D

* Means with different superscript letters within a row are significantly different ($p < 0.05$).

Means with different subscript letters within a column are significantly different ($p < 0.05$).

Values are expressed as mean \pm SD (n=6).

Abbreviations: symbols represent as in the table 3.

若比較各組連續三天之試驗結果，可發現 A β 組搜尋逃逸平台所花費之時間，並不會隨著試驗天數增加而顯著縮短。餵食杏鮑菇子實體粉末之 LPE、MPE 及 HPE 組則隨著試驗天數增加，明顯縮短搜尋逃逸平台之時間 ($p < 0.05$)。由上述結果可知，誘導產生記憶學習障礙之 A β 組小鼠，經餵食杏鮑菇子實體粉末中劑量及高劑量可有效提升記憶學習能力。

B. 逃逸距離 (escape distance)

逃逸距離是指小鼠於水迷宮試驗搜尋逃逸平台時所游泳之距離，此試驗可與上述搜尋逃逸平台所花費之時間一起搭配判斷，如趨勢相同可證實小鼠游泳時間縮短並非其他因素所造成。表七結果顯示，在第一天時，CON 組搜尋逃逸平台所游泳之距離較短，為 9.90 ± 0.59 公尺，明顯低於 MEL、LPE 及 MPE 組 ($11.47 \sim 11.95$ 公尺) ($p < 0.05$)；第二天，除 A β 組 (10.30 ± 1.48 公尺) 外，其餘各組隨著練習次數增加，搜尋逃逸平台所游泳之距離皆有縮短之趨勢 ($3.61 \sim 8.27$ 公尺)；CON、MEL、LPE、MPE 及 HPE 組分別為 3.61 ± 1.28 、 8.27 ± 2.01 、 5.03 ± 1.81 、 7.51 ± 1.87 及 4.78 ± 1.35 公尺，與 A β 組相較有統計上差異 ($p < 0.05$)。第三天時，CON、MEL、LPE、MPE 及 HPE 組 (3.36 ± 0.44 、 7.94 ± 1.68 、 5.23 ± 2.19 、 3.56 ± 1.31 及 3.46 ± 1.78 公尺) 皆顯著低於 A β 組 (11.06 ± 1.12 公尺) ($p < 0.05$)，分別縮短 70%、28%、53%、68% 及 69% 搜尋距離。

若比較各組連續三天之試驗結果，可發現 A β 組搜尋逃逸平台所游泳之距離，並不會隨著試驗天數增加而顯著縮短。餵食杏鮑菇子實體粉末之 LPE、MPE 及 HPE 組則隨著試驗天數之增加，明顯縮短搜尋逃逸平台之距離 ($p < 0.05$)。上述結果顯示，A β 組無法有效記憶逃逸平台之位置，餵食杏鮑菇子實體粉末可有效改善小鼠記憶學習之能力，在搜尋逃逸平台時，會參考周圍之印象，減少尋找之路徑，故搜尋平台所游泳之距離會較短 (Cui et al, 2015)。

表七、杏鮑菇子實體粉末對以 Aβ 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠於參考記憶試驗之游泳距離

Table 7. Effects of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder on swimming distance of reference memory task in Aβ-induced impairment C57BL/6J mice.

Times ordinal	Escape distance (m)					
	CON	Aβ	MEL	LPE	MPE	HPE
First day	^{#a} 9.90 ± 0.59 ^{B*}	^a 10.80 ± 0.51 ^{AB}	^a 11.63 ± 1.54 ^A	^a 11.95 ± 0.92 ^A	^a 11.47 ± 0.86 ^A	^a 10.78 ± 1.34 ^{AB}
Second day	^b 3.61 ± 1.28 ^C	^a 10.30 ± 1.48 ^A	^b 8.27 ± 2.01 ^B	^b 5.03 ± 1.81 ^{BC}	^b 7.51 ± 1.87 ^B	^b 4.78 ± 1.35 ^C
Third day	^b 3.36 ± 0.44 ^D	^a 11.06 ± 1.12 ^A	^b 7.94 ± 1.68 ^B	^b 5.23 ± 2.19 ^C	^c 3.56 ± 1.31 ^D	^b 3.46 ± 1.78 ^D

* Means with different superscript letters within a row are significantly different ($p < 0.05$).

Means with different subscript letters within a column are significantly different ($p < 0.05$).

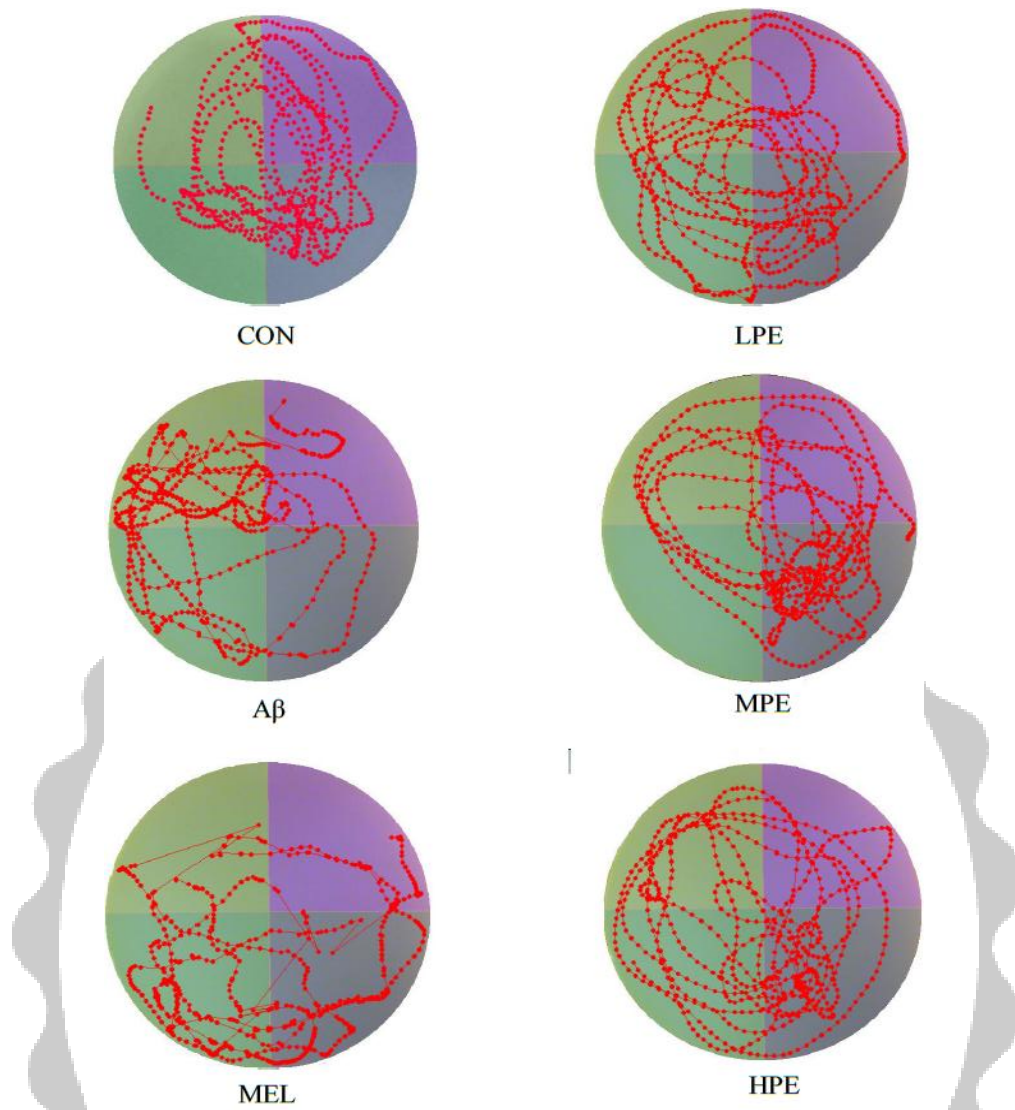
Values are expressed as mean ± SD (n=6).

Abbreviations: symbols represent as in the table 3.

(二)空間探索試驗 (probe task)

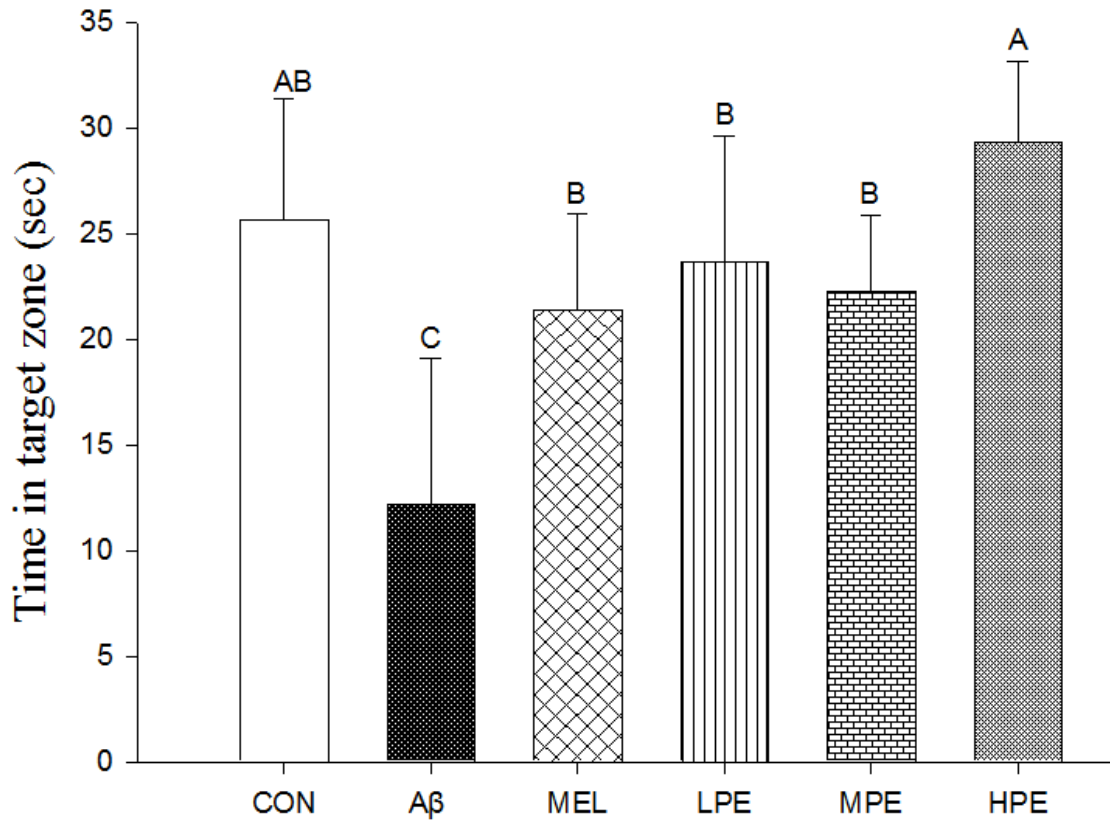
本試驗為 Morris 水迷宮試驗之第二部分，將隱沒於水池之逃逸平台移出，記憶學習能力較佳之小鼠較記得逃逸平台所在位置，且會花較多時間於該象限徘徊搜尋。

本試驗利用 Etho visoin XT (Noldus, Leesburg, USA) 記錄各組別小鼠游泳之路徑，做為各組別小鼠在空間探索試驗記憶學習之影像判斷，結果如圖五所示；A β 組別搜尋逃逸平台之移動軌跡多集中於起始象限(第二象限)，並無明顯之探索目標及方向；MEL 組搜尋逃逸平台之軌跡則集中於第三及第四象限；另餵食杏鮑菇子實體粉末之 LPE、MPE 及 HPE 組，搜尋之軌跡則集中於原先平台所在之第四象限。透過上述各組小鼠之游泳路徑，經由軟體分析各組別於第四象限之游泳時間、距離、穿梭次數及游泳速率。圖六為游泳時間，結果顯示 CON 組於目標象限徘徊時間為 25.70 ± 5.7 秒，明顯高於 A β 組 (12.20 ± 6.9 秒) ($p < 0.05$)，餵食褪黑激素及杏鮑菇子實體粉末之 LPE、MPE 及 HPE 組別，均會增加小鼠在目標象限徘徊時間，分別為 21.43 ± 4.53 、 23.65 ± 5.97 、 22.25 ± 3.62 及 29.33 ± 3.79 秒，亦顯著高於 A β 組 ($p < 0.05$)。圖七為小鼠於目標象限游泳之距離除以總距離之百分比，結果顯示 CON 組 ($26.34 \pm 5.88\%$) 與餵食褪黑激素組 ($22.24 \pm 3.93\%$) 及杏鮑菇子實體粉末 LPE、MPE 及 HPE 組，分別為 27.19 ± 5.60 、 24.30 ± 4.16 及 $28.40 \pm 4.29\%$ 均顯著高於 A β 組 ($13.72 \pm 7.21\%$) ($p < 0.05$)。上述結果顯示，小鼠在目標象限之徘徊時間及游泳距離呈現一致性，故排除小鼠游至目標象限(第四象限)失去搜尋意志不動導致停留時間較長之可能。圖八為各組別小鼠穿梭於目標象限之平均次數，結果顯示 CON、MEL、LPE、MPE 及 HPE 組分別為 7.25 ± 1.16 、 6.38 ± 1.30 、 7.63 ± 2.00 、 7.25 ± 1.06 及 8.50 ± 2.73 次，明顯高於 A β 組 (3.50 ± 2.00 次) ($p < 0.05$)。綜合上述空間探索試驗之結果，可獲知餵食褪黑激素及杏鮑菇子實體粉末具有改善記憶學習能力損傷小鼠之情形。



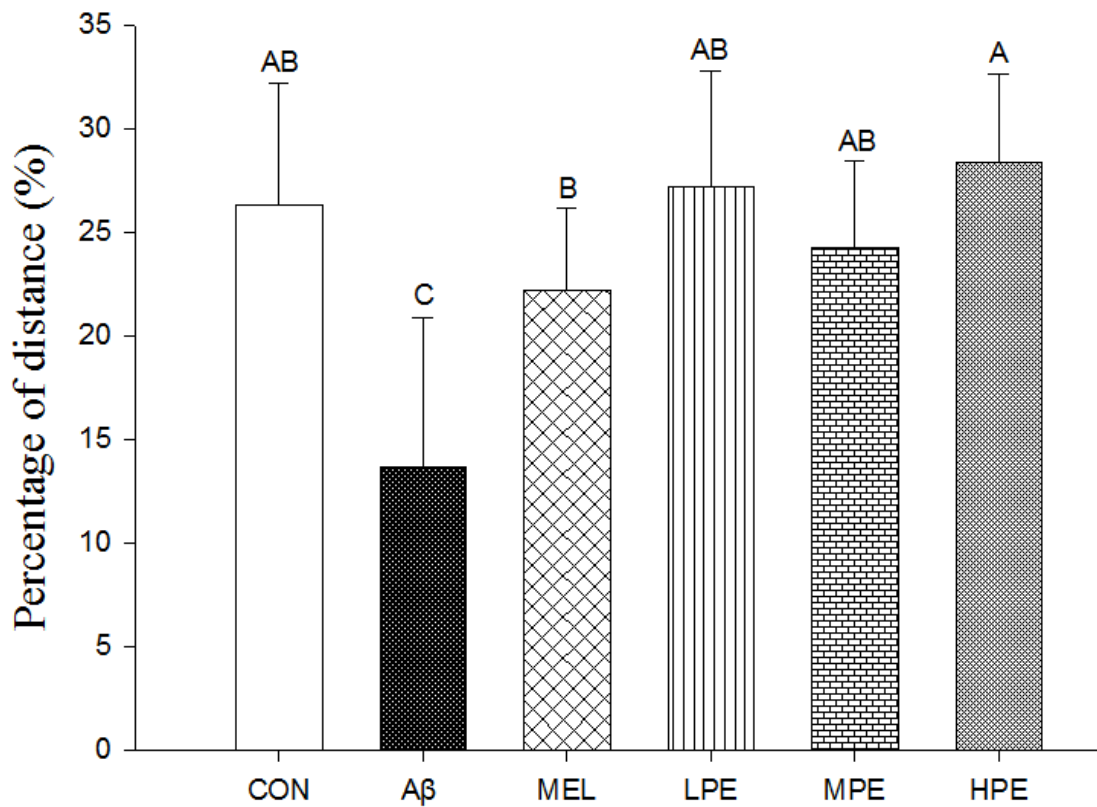
圖五、杏鮑菇子實體粉末對以 A β 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠在空間探索試驗之游泳路徑

Fig 5. Effects of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder on swimming path of probe task in A β -induced impairment C57BL/6J mice.



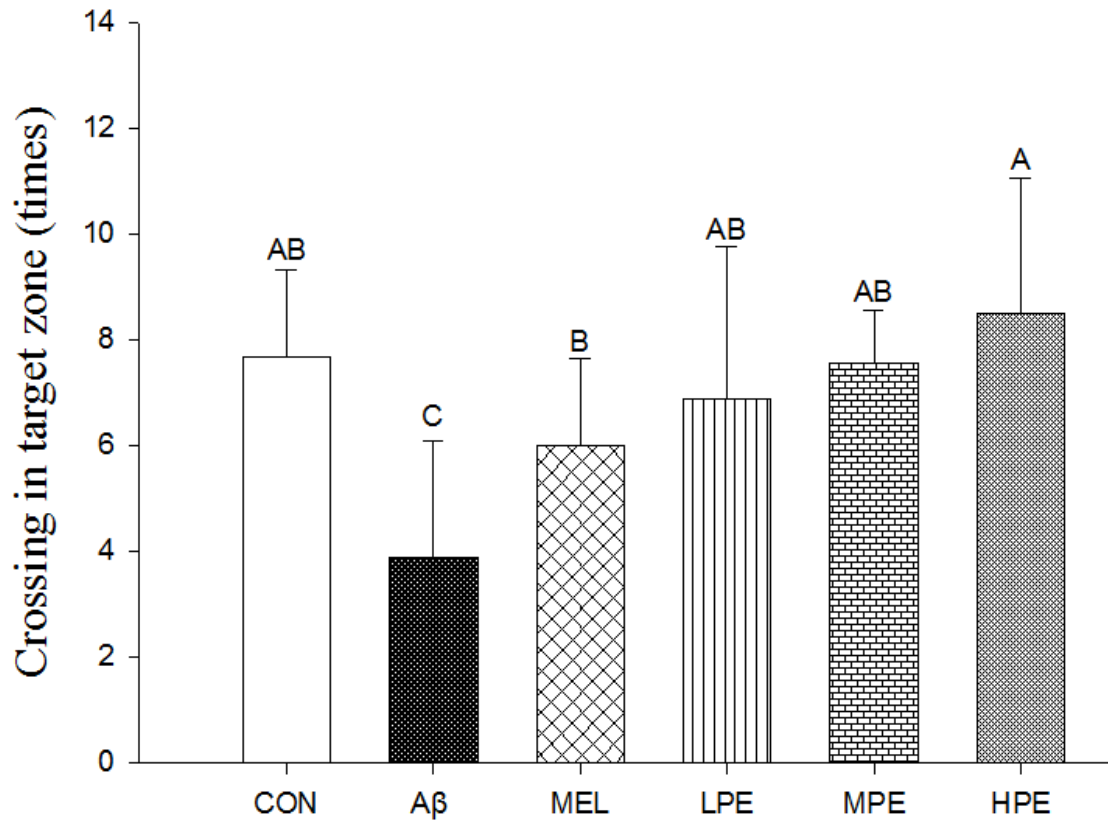
圖六、杏鮑菇子實體粉末對以 A β 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠在空間探索試驗於目標象限游泳時間

Fig 6. Effects of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder on swimming time in target zone during probe task of A β -induced impairment C57BL/6J mice. Values are expressed as mean \pm SD (n=8). Means are significantly different between the groups ($p < 0.05$). Abbreviations: symbols represent as in the table 3.



圖七、杏鮑菇子實體粉末對以 A β 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠在空間探索試驗之游泳距離百分比

Fig 7. Effects of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder on percentage of swimming distance during probe task in A β -induced impairment C57BL/6J mice. Values are expressed as mean \pm SD (n=8). Means are significantly different between the groups ($p < 0.05$). Abbreviations: symbols represent as in the table 3.



圖八、杏鮑菇子實體粉末對以 A β 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠在空間探索試驗之目標象限穿梭次數

Fig 8. Effects of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder on crossing frequency in target zone during probe task of A β -induced impairment C57BL/6J mice. Values are expressed as mean \pm SD (n=9). Means are significantly different between the groups ($p < 0.05$). Abbreviations: symbols represent as in the table 3.

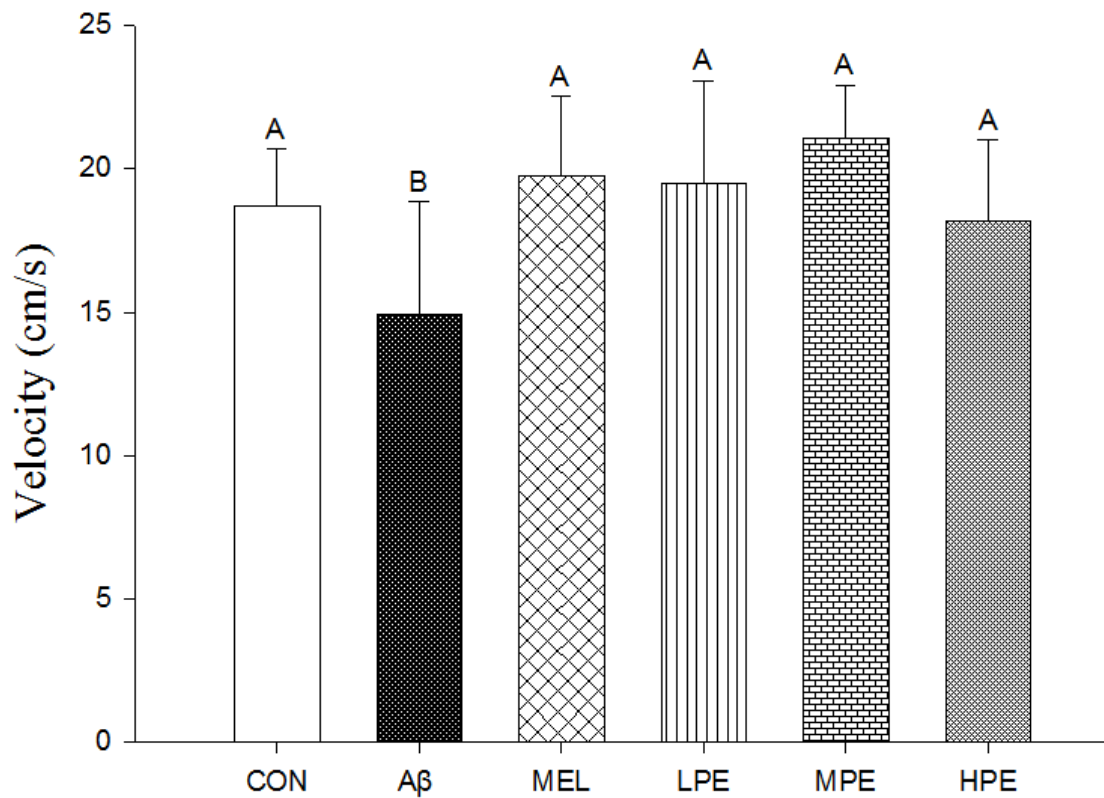
七、 餵食杏鮑菇子實體粉末對 C57BL/6J 小鼠游泳速率之影響

由前述參考記憶試驗結果，獲知小鼠逃逸時間與逃逸距離具有正相關性，故可利用空間探索試驗之游泳速率，作為小鼠搜尋平台之積極性指標。圖九結果顯示，A β 組之游泳速率為 14.95 ± 4.09 cm/s 與 CON 組 (18.68 ± 2.04 cm/s)、餵食褪黑激素之 MEL 組 (19.73 ± 2.78 cm/s) 及餵食不同劑量樣品之 LPE、MPE 與 HPE 組 (19.49 ± 3.60 、 21.07 ± 1.83 及 18.18 ± 2.82 cm/s) 相比，皆有顯著性差異 ($p < 0.05$)。根據 Sonn 等人 (2013) 研究發現，24 週齡之 C57BL/6J 控制組小鼠游泳速率 (12.83 ± 0.43 cm/s) 明顯高於阿茲海默症之基因鼠 (5XFAD; 9.57 ± 0.35 cm/s) ($p < 0.05$)；其原因為阿茲海默症小鼠記憶能力較差，對周遭印象較為薄弱，故無法積極搜尋目標。上述研究發現與本實驗結果相符，餵食杏鮑菇子實體粉末後，可有效提升游泳速率，顯示杏鮑菇子實體粉末具有改善阿茲海默症之功效。

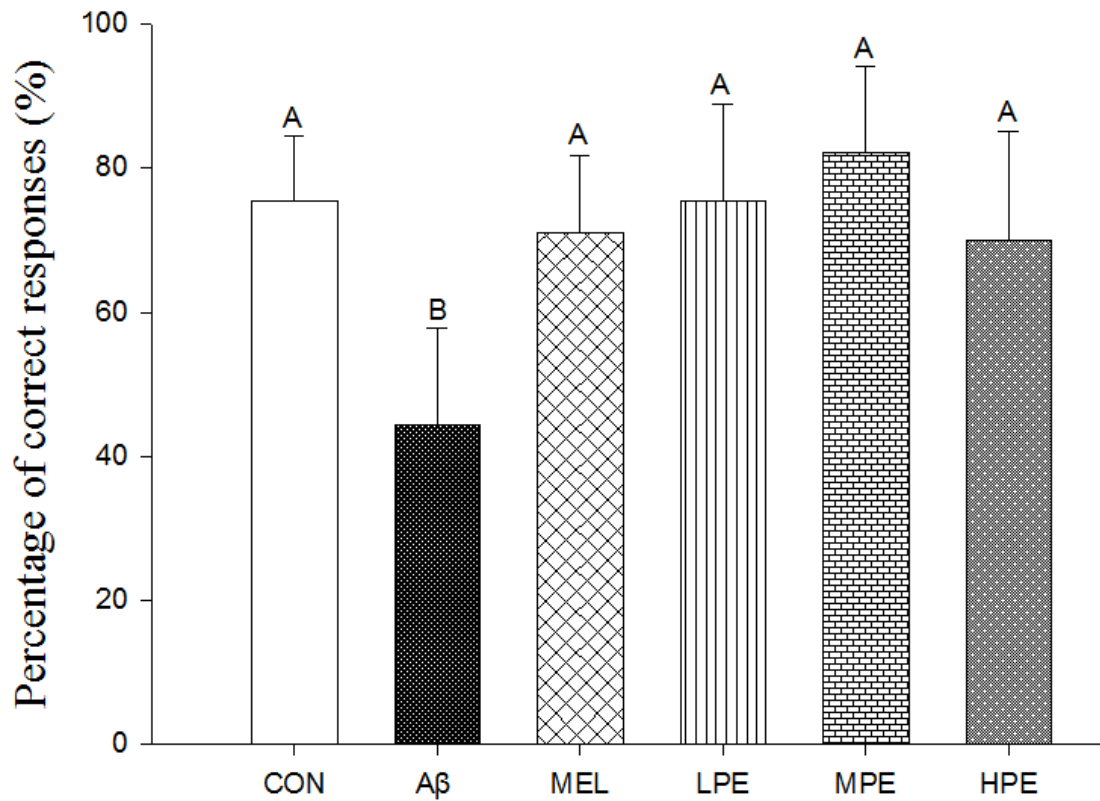
八、 餵食杏鮑菇子實體粉末對 C57BL/6J 小鼠於 T 字迷宮試驗之影響

T 字迷試驗是利用獎懲方式，更加深小鼠對於 T 字迷宮裝置之印象，避免走錯誤路線遭受懲罰 (Bower & Miller, 1958)。

圖十為小鼠在 T 字迷宮試驗正確尋獲食物之百分比，結果顯示 A β 組之尋獲食物之正確率為 $44.44 \pm 13.33\%$ 與 CON 組 ($75.56 \pm 8.82\%$)、餵食褪黑激素之 MEL 組 ($71.11 \pm 10.54\%$) 及餵食不同劑量樣品之 LPE、MPE 與 HPE 組 ($75.65 \pm 13.33\%$ 、 $82.22 \pm 12.02\%$ 及 $70.00 \pm 15.12\%$) 相比，皆有顯著性差異 ($p < 0.05$)。根據 Peng 等人 (2014) 研究發現，C57BL/6J 控制組小鼠於 T 迷宮試驗尋獲食物之正確率，明顯高於阿茲海默症之基因鼠 (APP/PS1) 45%，此發現與本研究結果相符；A β 組因記憶能力較差，即使於高強度刺激下，也不易產生深刻記憶，避免走錯誤路線而遭受懲罰；在餵食杏鮑菇子實體粉末後，可有效提升尋獲食物之正確率，顯示杏鮑菇子實體粉末具有改善阿茲海默症之功效。



圖九、杏鮑菇子實體對以 A β 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠之游泳速率
 Fig 9. Effects of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder on swimming velocity during probe task in A β -induced impairment C57BL/6J mice. Values are expressed as mean \pm SD (n=8). Means are significantly different between the groups ($p < 0.05$). Abbreviations: symbols represent as in the table 3.



圖十、杏鮑菇子實體粉末對以 A β 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠於 T 字迷宮試驗

Fig 10. Effects of *Pleurotus eryngii* fruiting body on T-maze discrimination task in A β -induced impairment C57BL/6J mice. Values are expressed as mean \pm SD (n=9). Means are significantly different between the groups ($p < 0.05$). Abbreviations: symbols represent as in the table 3.

九、 餵食杏鮑菇子實體粉末對 C57BL/6J 小鼠腦中磷酸化 τ -蛋白之影響

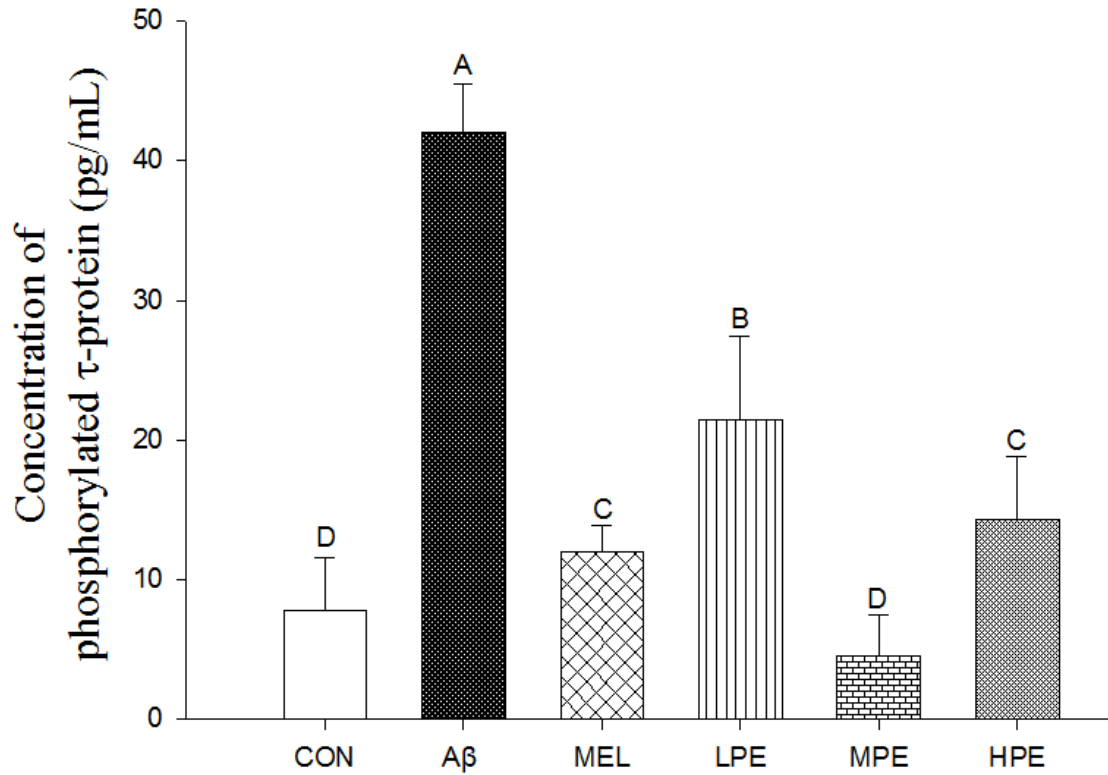
τ -蛋白屬於微管相關蛋白，主要存在於神經元，負責穩定神經微管形狀，使其正常傳遞訊息；當 τ -蛋白過度磷酸化時，則無法與神經微管緊密接合而分離，導致神經崩解失去功能，此為阿茲海默症發病之典型特徵 (Kolarova et al, 2012)。

圖十一結果顯示，A β 組之腦中磷酸化 τ -蛋白濃度為 42.06 ± 3.44 pg/mL 與 CON 組 (7.82 ± 3.78 pg/mL)、餵食褪黑激素之 MEL 組 (11.95 ± 1.92) 及餵食不同劑量樣品之 LPE、MPE 與 HPE 組 (21.46 ± 6.00 、 4.56 ± 2.90 及 14.33 ± 4.50 pg/mL) 相比，皆有顯著性差異 ($p < 0.05$)。根據 Ali 及 Kim (2015) 研究指出，利用 A β_{1-42} 注入小鼠腦中，誘發其產生阿茲海默症，經餵食褪黑激素三週後 (10 mg/kg day) 與 A β 組相比，褪黑激素可促使 GSK-3 β 磷酸化，進而降低腦中磷酸化 τ -蛋白之含量。本研究餵食褪黑激素之小鼠與上述結果相符，另餵食杏鮑菇子實體粉末之小鼠，亦可降低腦中磷酸化 τ -蛋白濃度，但並無劑量效應關係。另文獻指出杏鮑菇子實體粉末可減少腦部氧化壓力，降低 GSK-3 β 活性增加 (Songin et al, 2007; Yildirim et al, 2012)；因此，推測餵食杏鮑菇子實體粉末可降低腦中磷酸化 τ -蛋白濃度，可能是藉由減少腦中氧化壓力，進而降低 GSK-3 β 活性。

十、 餵食杏鮑菇子實體粉末對 C57BL/6J 小鼠腦中丙二醛濃度之影響

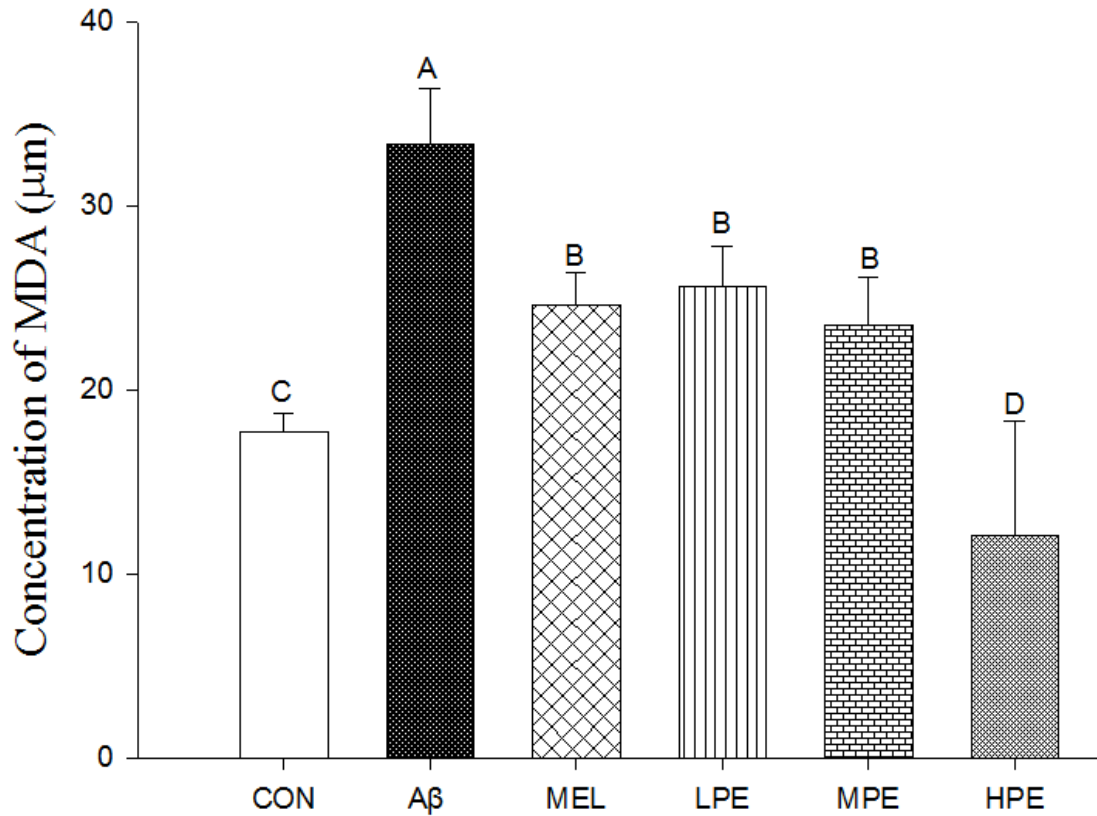
丙二醛 (MDA) 是脂質氧化之產物，可作為體內脂質過氧化之重要指標，當腦中 MDA 濃度越高，代表脂質氧化程度越高，大腦神經損傷越嚴重 (Janero, 1990)。

圖十二結果顯示，A β 組之腦中 MDA 濃度為 33.35 ± 3.04 μ m 與 CON 組 (17.72 ± 1.06 μ m)、餵食褪黑激素之 MEL 組 (24.63 ± 1.77) 及餵食不同劑量樣品之 LPE、MPE 與 HPE 組 (25.63 ± 2.19 、 23.54 ± 2.65 及 12.07 ± 6.27 μ m) 相比，皆有顯著性差異 ($p < 0.05$)。Cetin 及 Dincer (2007) 研



圖十一、杏鮑菇子實體粉末對以 A β 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠之腦中神經糾結程度

Fig 11. Effects of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder on phosphorylated τ -protein level in the brain of A β -induced impairment C57BL/6J mice. Values are expressed as mean \pm SD (n=8). Means were significantly different between the groups ($p < 0.05$). Abbreviations: symbols represent as in the table 3.



圖十二、杏鮑菇子實體粉末對以 A β 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠之腦中脂質過氧化產物濃度

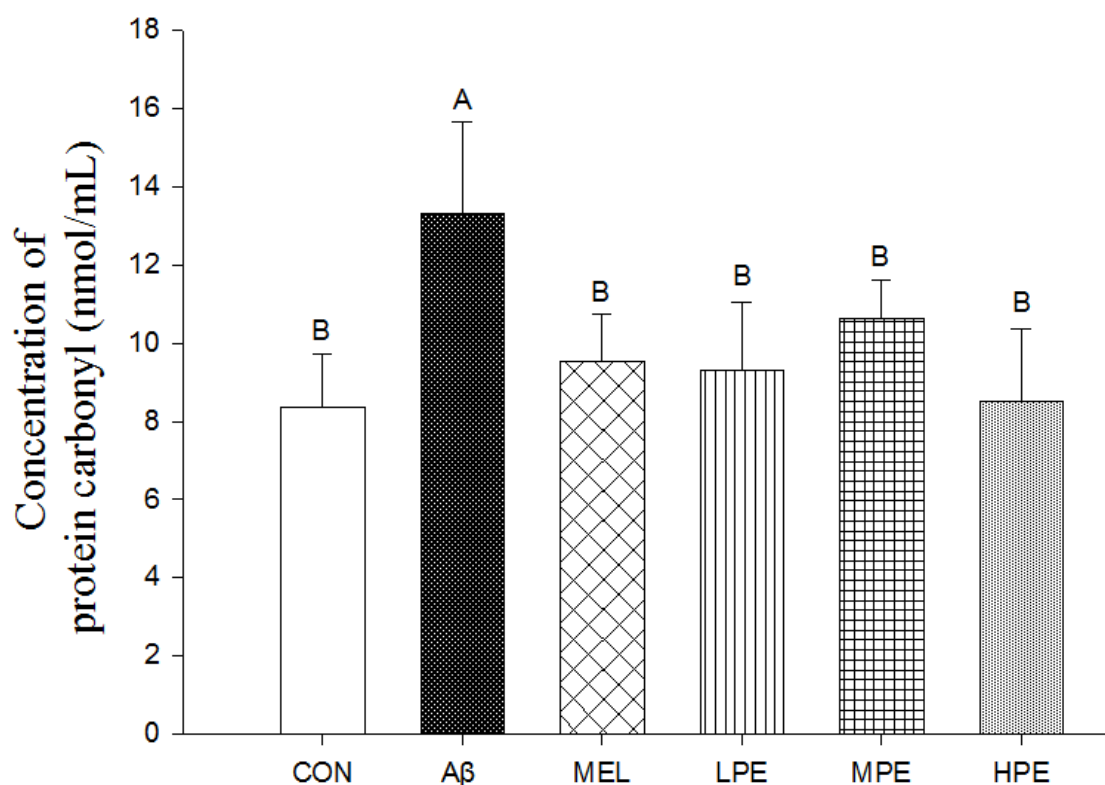
Fig 12. Effects of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder on lipid peroxidation in the brain of A β -induced impairment C57BL/6J mice. Values are expressed as mean \pm SD (n=9). Means were significantly different between the groups ($p < 0.05$). Abbreviations: symbols represent as in the table 3.

究結果發現，利用側腦注射將 $A\beta_{1-42}$ 注入 16 週齡 Wistar 大鼠腦中，注射後十天將其犧牲，分析大腦皮質層之 MDA 濃度，明顯高於 CON 組 ($p<0.05$)；顯示腦中 $A\beta$ 的傷害與脂質過氧化程度有關，此結果與本研究結果相符。此外，陳 (2010) 研究亦發現，利用 cisplatin 誘發小鼠神經細胞傷害，會導致腦中 MDA 濃度增加；餵食褪黑激素 (10mg/kg day) 及麥角硫因 (8 mg/kg/day) 58 天後，小鼠腦中 MDA 濃度明顯下降 ($p<0.05$)，另 GSH/GSSG 之比值亦會顯著上升 ($p<0.05$)；餵食褪黑激素及麥角硫因，主要藉由維持腦中 GSH 含量，以避免脂質受到氧化傷害，產生過多 MDA。本研究結果與上述結果相似，餵食富含麥角硫因之杏鮑菇子實體粉末後，亦可降低小鼠腦中 MDA 濃度，避免脂質受到傷害，造成神經細胞損傷。

十一、 餵食杏鮑菇子實體粉末對 C57BL/6J 小鼠腦中蛋白質羰基氧化物濃度之影響

腦中有許多蛋白質與神經生長及傳遞有關，阿茲海默症患者與正常人相比腦中自由基分子含量較高，其會攻擊蛋白質側鏈，造成結構改變失去功能，進而造成神經細胞受損 (Aksenov et al, 2001)。

圖十三結果顯示， $A\beta$ 組之腦中蛋白質羰基氧化物濃度為 12.92 ± 2.10 nmol/mL 與 CON 組 (8.89 ± 1.62 nmol/mL)、餵食褪黑激素之 MEL 組 (10.11 ± 1.63 nmol/mL) 及餵食不同劑量樣品之 LPE、MPE 與 HPE 組 (9.72 ± 1.71 、 11.03 ± 1.16 及 8.40 ± 1.55 nmol/mL) 相比，皆有顯著性差異 ($p<0.05$)。根據 Okatani 等人 (2002) 研究指出，老化小鼠 (SAMP8) 腦中自由基較多，氧化壓力亦較高，與腦中蛋白質羰基氧化物濃度成正比；老化小鼠經由餵食褪黑激素 ($2 \mu\text{g/mL day}$) 後，與誘導組相比，可明顯降低腦中蛋白質羰基氧化物濃度 ($p<0.05$)，其機制是透過褪黑激素清除自由基，減少其攻擊腦中蛋白質，非直接清除腦中蛋白質羰基氧化物。另外，Song 等人 (2014) 利用 D-半乳糖誘發 C57BL/6J 小鼠產生氧化壓力之老化模式研究結果發現，餵食麥角硫因 88 天後，可降低腦部



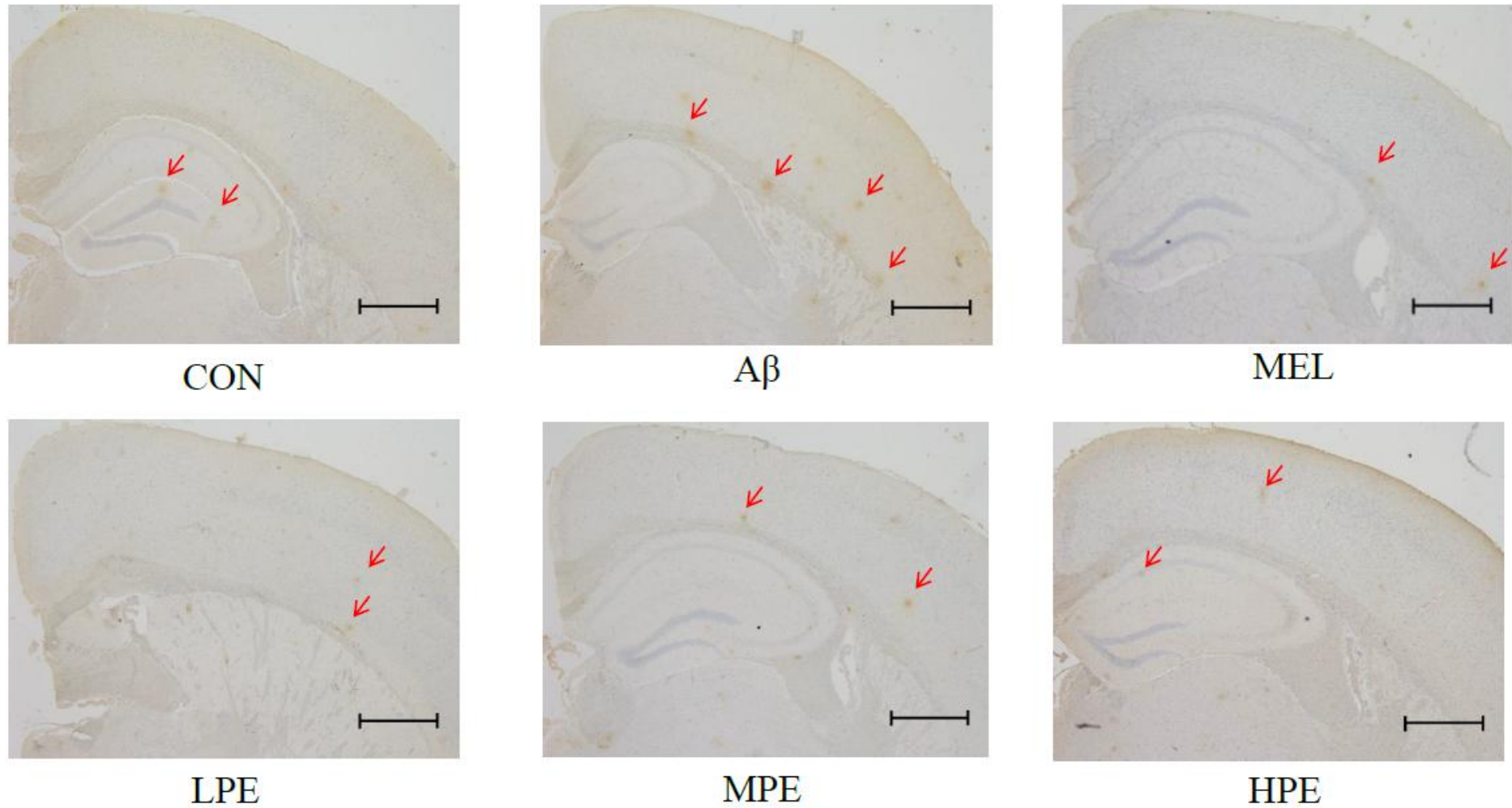
圖十三、杏鮑菇子實體粉末對以 A β 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠之腦中蛋白質羰基氧化物濃度

Fig 13. Effects of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder on protein carbonyl in the brain of A β -induced impairment C57BL/6J mice. Values are expressed as mean \pm SD (n=6). Means were significantly different between the groups ($p < 0.05$). Abbreviations: symbols represent as in the table 3.

氧化壓力及減少自由基分子對蛋白質之損傷。本研究則是利用側腦注射 A β 誘發 C57BL/6J 小鼠老化，再餵食杏鮑菇子實體粉末，研究結果與上述實驗相符。因此，推測杏鮑菇子實體粉末降低腦中蛋白質羰基氧化物濃度，也是經由自由基分子之清除，以減緩腦中蛋白質被攻擊。

十二、 餵食杏鮑菇子實體粉末對 C57BL/6J 小鼠腦中 A β 斑塊沉積量之影響

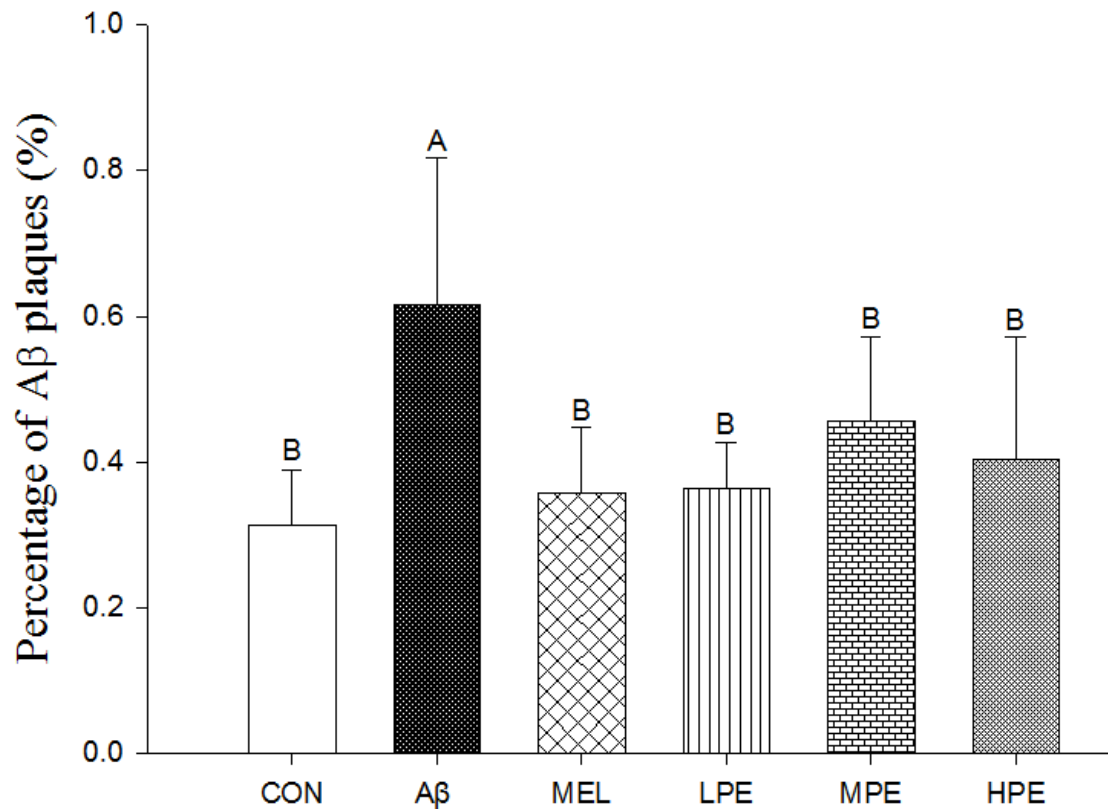
圖十四為 IHC 測定腦中 A β 斑塊沉積之結果，深棕色斑塊即為沉積於腦部之 A β 斑塊；結果發現 A β 組腦中斑塊沉積情形高於 CON 組，經餵食褪黑激素及杏鮑菇子實體粉末後，可明顯降低 A β 斑塊在腦中之沉積。圖十五為各組別腦中 A β 斑塊沉積量化之百分比，結果顯示 A β 組之腦中 A β 斑塊沉積之百分比為 $0.62 \pm 0.20\%$ 與 CON 組 ($0.31 \pm 0.08\%$)、餵食褪黑激素之 MEL 組 ($0.36 \pm 0.09\%$) 及餵食不同劑量樣品之 LPE、MPE 與 HPE 組 ($0.36 \pm 0.06\%$ 、 $0.46 \pm 0.12\%$ 及 $0.40 \pm 0.17\%$) 相比，皆有顯著性差異 ($p < 0.05$)。Yang 等人 (2012) 研究發現，利用側腦注射將 A β_{1-40} 注入 C57BL6J 小鼠腦中，誘發其產生阿茲海默症，再餵食褪黑激素五週後，發現腦部 A β 斑塊有減少之趨勢；其原因為褪黑激素可通過血腦屏障，降低腦部氧化壓力，減少 APP 被 β -secretase 切割產生 A β 斑塊之數量。另 Picone 等人 (2015) 研究結果指出，當氧化壓力上升，造成腦中 APP 大量表現及增加 β -secretase 活性，當大量 APP 被 β -secretase 切割，則會產生較多之 A β 斑塊沉積於腦部。本研究發現餵食杏鮑菇子實體粉末可減少 A β 斑塊沉積量，是因減少腦部氧化壓力，使腦部 APP 表現及 β -secretase 活性降低所致，進而減少 A β 斑塊沉積於腦中。



圖十四、杏鮑菇子實體粉末對以 A β 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠之腦中 A β 斑塊沉積情形 (圖中比例尺大小為 600 μ m)

Fig 14. Effects of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder on A β plaques accumulation in the brain of A β 40-infused C57BL/6J mice.

The images were taken 40X magnification with IHC staining. Scale bars = 600 μ m. Abbreviations: symbols represent as in the table 3.



圖十五、杏鮑菇子實體粉末對以 A β 誘導損傷之 C57BL/6J 小鼠 A β 斑塊面積百分比

Fig 15. Effects of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder on percentage of A β plaques in A β -induced impairment C57BL/6J mice. Values are expressed as mean \pm SD (n=7). Means were significantly different between the groups ($p < 0.05$). Abbreviations: symbols represent as in the table 3.

十三、餵食杏鮑菇子實體粉末與腦中阿茲海默症病徵及行為能力之相關係數

皮爾森相關係數為分析兩變數之關聯性，若相關係數為正值代表兩變數呈正相關，負值則呈負相關，越接近零代表兩變數間之關聯性較為薄弱。

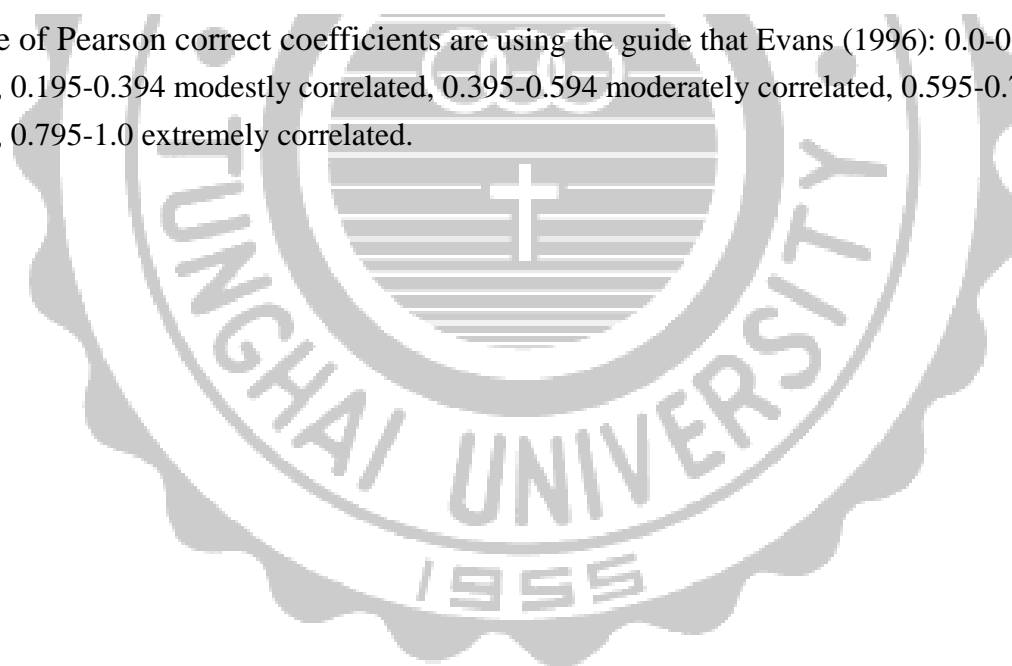
表八結果顯示，小鼠餵食杏鮑菇子實體粉末後，與腦中磷酸化 τ -蛋白、MDA、蛋白質羰基氧化物及 $A\beta$ 斑塊分析結果呈負相關性，相關程度分別為高度、極度、極度及中度相關。另外，腦中MDA及蛋白質羰基氧化物與磷酸化 τ -蛋白及 $A\beta$ 斑塊呈正相關性。表九結果顯示，小鼠餵食杏鮑菇子實體粉末後，於水迷宮參考記憶試驗結果呈負相關性，與水迷宮空間試驗及T字迷宮試驗結果呈正相關。由皮爾森相關係數之結果可得知，小鼠餵食杏鮑菇子實體粉末，可減緩腦中磷酸化 τ -蛋白、MDA、蛋白質羰基氧化物及 $A\beta$ 斑塊之含量，增加小鼠於行為試驗中記憶學習能力，顯示杏鮑菇子實體粉末具有改善阿茲海默症之功效。

表八、餵食杏鮑菇子實體粉末與腦中阿茲海默症病徵之皮爾森相關係數

Table 8. Pearson correct coefficients between administration of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder and Alzheimer's disease pathology in brain.

Correlation	p- τ -protein	MDA	Protein carbonyl	A β plaques
Dosage of <i>Pleurotus eryngii</i> fruiting body powder	-0.608	-0.984	-0.828	-0.541
p- τ -protein		0.678	0.608	0.701
MDA			0.907	0.680
Protein carbonyl				0.890

The range of Pearson correct coefficients are using the guide that Evans (1996): 0.0-0.194 weakly correlated, 0.195-0.394 modestly correlated, 0.395-0.594 moderately correlated, 0.595-0.794 highly correlated, 0.795-1.0 extremely correlated.



表九、餵食杏鮑菇子實體粉末與小鼠行為能力之皮爾森相關係數

Table 9. Pearson correct coefficients between administration of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder and behavior capability in mice.

Correlation	Escape time	Escape distance	Time in target zone	Percentage of distance	Crossing in target zone	Velocity	T maze correct responses
Dosage of <i>Pleurotus eryngii</i> fruiting body powder	-0.780	-0.776	0.865	0.706	0.747	0.180	0.426
Escape time		0.940	-0.834	-0.796	-0.890	-0.741	-0.847
Escape distance			-0.952	-0.955	-0.992	-0.725	-0.896
Time in target zone				0.966	0.965	0.493	0.740
Percentage of distance					0.984	0.629	0.845
Crossing in target zone						0.702	0.890
Velocity							0.947

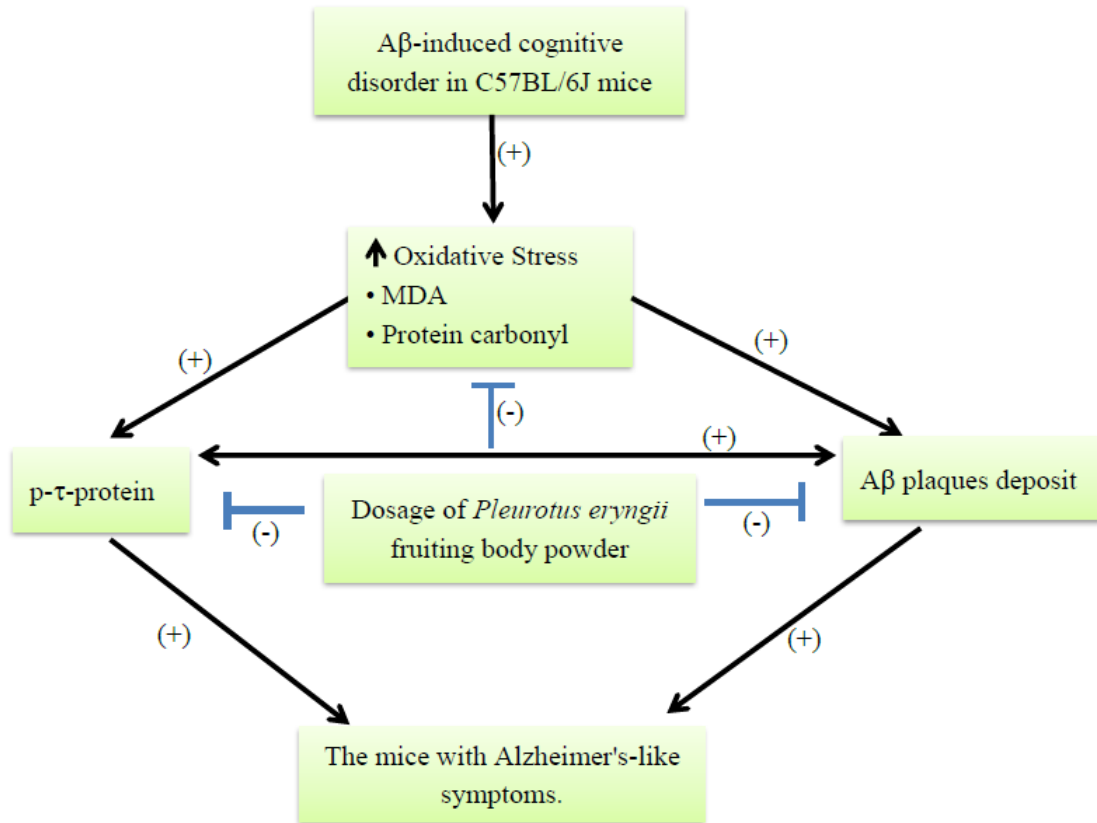
The range of Pearson correct coefficients are using the guide that Evans (1996): 0.0-0.194 weakly correlated, 0.195-0.394 modestly correlated, 0.395-0.594 moderately correlated, 0.595-0.794 highly correlated, 0.795-1.0 extremely correlated.

第五章 結論

1. 杏鮑菇子實體一般成分及機能性成分分析結果顯示，其水分、乾物重、粗灰分、粗脂質、粗蛋白及碳水化合物含量，分別為 8.34 ± 0.14 、 91.66 ± 0.14 、 5.75 ± 0.02 、 1.55 ± 0.01 、 16.79 ± 0.11 及 $67.60 \pm 0.26\%$ 。在機能性成分方面，麥角硫因、腺苷、總酚及多醣體含量，分別為 1.36 ± 0.05 、 3.07 ± 0.08 、 3.58 ± 0.13 及 223.89 ± 18.39 mg/g (DB)。
2. 改善阿茲海默症小鼠記憶學習能力試驗中，餵食杏鮑菇子實體粉末 6 週後，體重增加量及攝食量各組間無明顯變化。血清參數 AST、ALT 及 BUN 含量，MPE 及 HPE 組明顯高於 CON 組 ($p < 0.05$)，但數值皆在可接受範圍內；LDL 方面，MPE 及 HPE 組顯著低於 A β 組 ($p < 0.05$)。在腦部組織相對重量方面，A β 組明顯較其他組別輕 ($p < 0.05$)，顯示腦部有萎縮之情形，經由餵食杏鮑菇子實體粉末後可延緩腦部萎縮。於腦、肝及腎組織病理切片結果，顯示各組組織無明顯之病變發生。此外，在水迷宮參考記憶試驗之逃逸時間結果顯示，低、中、高劑量與 A β 組相較，分別縮短 49%、80% 及 85%；逃逸距離則分別縮短 53%、68% 及 69%。另在空間探索試驗中，包括於目標象限之徘徊時間、游泳距離、穿梭次數及游泳速率，餵食杏鮑菇子實體粉末組與 A β 組相比，皆具有顯著提升 ($p < 0.05$)。T 字迷宮試驗方面，杏鮑菇子實體粉末組別也顯著提升尋獲食物正確率 ($p < 0.05$)；由上述水迷宮及 T 字迷宮試驗結果，可證實杏鮑菇子實體粉末具有改善小鼠記憶學習能力。另外，小鼠腦中磷酸化 τ -蛋白、丙二醛、蛋白質羰基氧化物及 A β 斑塊沉積量，杏鮑菇子實體粉末組與 A β 組相較有顯著降低 ($p < 0.05$)。
3. 綜合小鼠行為模式、腦中阿茲海默症相關病徵及皮爾森相關係數之結果，可推論出杏鮑菇子實體粉末延緩阿茲海默症之可能機制，如圖十

六所示。小鼠經由側腦注射誘導後，腦中自由基分子增加，使脂質及蛋白質受到攻擊，產生 MDA 及蛋白質羰基氧化物，造成氧化壓力上升。氧化壓力會促使腦中磷酸化 τ -蛋白及 A β 斑塊增加，造成腦神經細胞受損，使小鼠認知力衰退。杏鮑菇子實體含有許多機能性成分，具有抗氧化之功效；當小鼠餵食杏鮑菇子實體粉末後，可降低腦部氧化損傷，使腦部阿茲海默症相關病徵下降，進而改善小鼠記憶學習之能力，顯示餵食杏鮑菇子實體粉末可達到延緩阿茲海默之功效。





圖十六、杏鮑菇子實體粉末改善阿茲海默症之可能路徑

Fig 16. The possible mechanism of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder ameliorate Alzheimer's disease.

第六章 參考文獻

- 王伯徹及陳啟楨。1994。夏季鮑魚菇。常見食用菇介紹。食品工業發展研究所。43-45。
- 水野卓、川合正允。賴慶亮譯。1997。菇類的化學、生化學。國立編譯館。台北，台灣。
- 李炫璋。2003。牛樟芝菌絲體之體內保肝功能評估及其熱水草物在體外對基質金屬蛋白水解。國立中興大學食品暨應用生物科技學系碩士論文。台中，台灣。
- 何公瑞。2009。以固態發酵製備高麥角硫因之杏鮑菇穀類及其呈味性質與生理活性。國立中興大學食品暨應用生物科技學系碩士論文。台中，台灣。
- 林孟翰。2013。4-羥基反式 2-壬烯 (4-Hydroxy-trans-2-nonenal) 誘導 PC12 類神經細胞氧化壓力和不完全摺疊蛋白質反應。嘉南藥理科技大學。嘉義，台灣。
- 吳羽婷。2012。國產杏鮑菇之活性成分、抗氧化性及加工產品之研究。弘光科技大學食品科技所。台中，台灣。
- 香川芳子 (監修)。2004。五訂食品成分表。女子營養大學出版部。東京，日本。
- 俞苓、劉民勝及陳有容。2003。杏鮑菇子實體和菌絲體營養成分的比較。食用菌。25(2):7-8。
- 陳啟楨。1993。幾種具開發潛力的新興食用菇介紹。消費者食品資訊。21: 2-6。
- 陳建霖。2000。Ergothioneine 對 cisplatin 誘導小數神經細胞傷害的影響及其作用機制。大葉大學生物產業科技學系碩士論文。彰化縣，台灣。
- 梁鍾鼎、李泔泓、何勝裕、林相汝、吳雅雯、吳長諺、林宗德、余俊強及梁善居。2008。血液生化及血液學參考值。國家實驗動物中心。台北，台灣。
- 劉仲敏、曹友聲及常琴。1994。人工固態發酵培養冬蟲夏草菌絲體的研究。河南科學。12: 335-338。
- Ahmed, M., Davis, J., Aucoin D., Sato, T., Ahuja S., Aimoto S., Elliott, J. I., Nostrand W. V., and Smith, S. (2009) Structural conversion of neurotoxic amyloid- β (1-42) oligomers to fibrils. *Nat Struct Mol Biol.* 17: 561-567.
- Akanmu, D., Cecchini, R., Aruoma, O. I., and Halliwell, B. (1991) The antioxidant action of ergothioneine. *Arch Biochem Biophys.* 288(1): 10-16.
- Aksenov, M. Y., Aksenova, M. V., Butterfield, D. A., Geddes, J. W., and

- Markesbery, W. R. (2001) Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 103(2): 373-383.
- Alam, N., Yoon, K. N., Lee, K. R., Lee, J. S., and Lee, T. S. (2011) Phenolic Compounds Concentration and Appraisal of Antioxidant and Antityrosinase Activities from the Fruiting Bodies of *Pleurotus eryngii*. *Advances Enviro Biol*. 5(6): 1104.
- Alam, N., Yoon, K. N., Lee, J. S., Cho, H. J., Shim, M. J., and Lee, T. S. (2011) Dietary effect of *Pleurotus eryngii* on biochemical function and histology in hypercholesterolemic rats. *Saudi J Biol Sci*. 18(4): 403-409.
- Ali, T., and Kim, M. O. (2015) Melatonin ameliorates amyloid beta-induced memory deficits, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration via PI3/Akt/GSk3 β pathway in the mouse hippocampus. *J Pineal Res*. 59(1): 47-59.
- Alvarado, J.C., Fuentes-Santamaría, V., Melgar-Rojas, P., Valero, M. L., Gabaldón-Ull, M. C., Miller, J. M., and Juiz, J. M. (2015) Synergistic effects of free radical scavengers and cochlear vasodilators: a new otoprotective strategy for age-related hearing loss. *Front Aging Neurosci*. 7: 86.
- AOAC. (1990) Official methods of analysis. 14.091, 14.103, 14.093, 14.111 and 14.108, 15th Ed. Association of official analytical chemist, Washington, D.C.
- Arendt, T., Schindler, C., Brückner, M. K., Eschrich, K., Bigl, V., Zedlick, D., and Marcova, L. (1997) Plastic neuronal remodeling is impaired in patients with Alzheimer's disease carrying apolipoprotein epsilon 4 allele. *J Neurosci*. 17: 516-529.
- Askari, A., and Melville, D. B. (1962) The reaction sequence in ergothioneine biosynthesis: hercynine as an intermediate. *J Biol Chem*. 237: 1615-1618.
- Avila, J., Pérez, M., Lucas J. J., Gómez-Ramos, A., Santa María I., Moreno, F., Smith, M., Perry, G., and Hernández, F. (2004) Assembly in vitro of tau protein and its implications in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 1: 97-101.
- Ballatore, C., Lee, V. M., and Trojanowski, J. Q. (2007) Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci*. 8: 663-672.
- Bao, L., Li, Y., Wang, Q., Han, J., Yang, X., Li, H., Wang, S. Wen, H. Li, S., and Liu, H. (2013) Nutritive and bioactive components in rice fermented with the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Mycology*. 4(2): 96-102.
- Barron, J. (2008) Lessons from the Miracle Doctors: A Step-by-step Guide to

- Optimum Health and Relief from catastrophic illness. Basic health publications, Inc. p. 215.
- Baruch-Suchodolsky, R., and Fischer, B. (2009) Abeta40, either soluble or aggregated, is a remarkably potent antioxidant in cell-free oxidative systems. *Biochemistry*. 48: 4354-4370.
- Basheer, R., Strecker, R. E., Thakkar, M. M., and McCarley, R. W. (2004) Adenosine and sleep-wake regulation. *Prog Neurobiol*. 73(6): 379-396.
- Bate, C., Tayebi, M., and Williams, Alun. (2010) Phospholipase A₂ inhibitors protect against prion and A β mediated synapse degeneration. *Mol Neurodegener*. 5:13.
- Benedict, S. R., Newton, E. B., and Behre, J. A. (1925) A new sulfur-containing compound (thiasine) in the blood. *J Biol Chem*. 67:267–277.
- Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Loeloff, R., Louis, J. C., Curran, E., Citron, M. and Vassar, R. (2000) *J Biol Chem*. 275: 20647-20651.
- Bevilaqua, L. R., Medina, J. H., Izquierdo, I., and Cammarota, M. (2005) Memory consolidation induces N-methyl-D-aspartic acid-receptor- and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent modifications in alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor properties. *Neurosci*. 136: 397-403.
- Biesalski, H. K. (2007) Polyphenols and inflammation: basic interactions. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 10(6): 724-728.
- Borghini, R., Patriarca, S., Traverso, N., Piccini, A., Storace, D., Garuti, A., Gabriella, C., Patrizio, O., and Massimo, T. (2007) The increased activity of BACE1 correlates with oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 28(7): 1009-1014.
- Bower, G. B., and Miller, N. E. (1958). Rewarding and punishing effects from stimulating the same place in the rat's brain. *J Comp Psychol*. 51: 669-674.
- Bergin, D.H., Jing, Y., Zhang, H., and Liu, P. (2015) A single intracerebroventricular A β 25-35 infusion leads to prolonged alterations in arginine metabolism in the rat hippocampus and prefrontal cortex. *Neurosci*. 298: 367-379.
- Bowen, D. M., Smith, C. B., White, P., and Davison, A. N. (1976) Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain*. 99: 459-496.
- Braak, H., and Del, T. K., (2012) Where, when, and in what form does sporadic Alzheimer disease begin? *Curr Opin Neurol*. 25: 708-714.
- Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*. 56(11): 317-333.

- Briggs, I. (1972) Ergothioneine in the central nervous system. *J Neurochem.* 19(1): 27-35.
- Budson, A. E., and Price, B. H. (2005) Memory dysfunction. *N Engl J Med.* 352: 692-699.
- Carlezon, W. A. Jr., Mague, S. D., Parow, A. M., Stoll, A. L., Cohen, B. M., and Renshaw, P. F. (2005) Antidepressant-like effects of uridine and omega-3 fatty acids are potentiated by combined treatment in rats. *Biol Psychiatry.* 57(4): 343-350.
- Carrillo-Mora, P., Luna, R., and Colín-Barenque, L. (2014) Amyloid beta: multiple mechanism of toxicity and only some protective effect? *Oxid Med Cell Longev.* 795375: 15.
- Cetin, F., and Dincer, S. (2007) The effect of intrahippocampal beta amyloid (1-42) peptide injection on oxidant and antioxidant status in rat brain. *Ann N Y Acad Sci.* 1100: 510-517.
- Chang, S. T. and Hayes, W. A. (1978) The biology and cultivation of edible mushrooms. ISBN: 978-0-12-168050-3.
- Cheah, I. K., and Halliwell, B. (2012) Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta.* 1822(5): 784-793.
- Chen, J., Mao, D., Yong, Y., Li, J., Wei, H., and Lu, L. (2012) Hepatoprotective and hypolipidemic effects of water-soluble polysaccharidic extract of *Pleurotus eryngii*. *Food Chem.* 130(3): 687-394.
- Cheng, X., Lee, T., Yao, H., Li, R., and Shen, Y. (2014) High Activities of BACE1 in Brains with Mild Cognitive Impairment. *Am J Pathol.* 184(1): 141-147.
- Cole, S. L. and Vassar, R. (2007) The Basic Biology of BACE1: A Key Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Curr Genomics.* 8(8):509-530.
- Creemers, J. W. M., Dominguez, D. I., Plets, E., Serneels, L., Taylor, N. A., Multhaup, G., Craessaerts, k., Annaert, W., and Strooper, B. D. (2001) Processing of beta-secretase by furin and other members of the proprotein convertase family. *J Biol Chem.* 276: 4211-4217.
- Crisan, E. V., and Sands, A. (1978) In *The Biology and Cultivation of edible mushrooms.* Academic Press, New York. pp. 137-165.
- Crystal, H. A., Schneider, J. A., Bennett, D. A., Leurgans, S., and Levine, S. R. (2014) Associations of cerebrovascular and Alzheimer's disease pathology with brain atrophy. *Curr Alzheimer Res.* 11(4): 309-316.
- Cui, S. Q., Wang, Q., Zheng, Y., Xiao, B., Sun, H. W., Gu, X. L., Zhang, Y. C., Fu, C. H., Dong, P. X., and Wang, X. M. (2015) Puerarin protects

- against damage to spatial learning and memory ability in mice with chronic alcohol poisoning. *Braz J Med Biol Res.* 48(6):515-522.
- Cunha, R. A. (2001) Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem Int.* 38(2): 107-125.
- Dawbarn, D., and Allen, S. J. (2008) *Molecular and cellular neurobiology series: neurobiology of Alzheimer's disease.* 3rd ed. New York. Oxford University Press.
- Deacon, R. M., and Rawlins, J. N. (2006) T-maze alternation in the rodent. *Nat Protoc.* 1(1): 7-12.
- Deiana, M., Rosa, A., Casu, V., Piga, R., Assunta Dessì, M., and Aruoma, O. I. (2004) L-ergothioneine modulates oxidative damage in the kidney and liver of rats in vivo: studies upon the profile of polyunsaturated fatty acids. *Clin Nutr.* 23(2): 183-193.
- Dekker, A. D., Strydom, A., Coppus, A. M., Nizetic, D., Vermeiren, Y., Naudé, P. J., Dam, D. V., Potier, M.C., Fortea, J., and Deyn, P. P. (2015) Behavioral and psychological symptoms of dementia in Down syndrome: Early indicators of clinical Alzheimer's disease? *Cortex.* 73: 36-61.
- Deng, Y. Q., Xu, G. G., Duan, P., Zhang, Q., and Wang, J. Z. (2005) Effects of melatonin on wortmannin-induced tau hyperphosphorylation. *Acta Pharmacol Sin.* 26(5): 519-526.
- Doucet, M. V., O'Toole, E., Connor, T., and Harkin, A. (2015) Small-molecule inhibitors at the PSD-95/nNOS interface protect against glutamate-induced neuronal atrophy in primary cortical neurons. *Neurosci.* 301: 421-438.
- Drechsel, D. N., Hyman, A. A., Cobb, M. H., and Kirschner, M. W. (1992) Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell.* 3: 1141-1154.
- Dubost, N. J., Beelman, R. B., Peterson, D., and Royse, D. J. (2006) Identification and Quantification of Ergothioneine in Cultivated Mushrooms by Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy. *Int J Med Mushrooms.* 8(3): 215-222.
- Duthey, B. (2013) *Alzheimer Disease and other Dementias. A Public Health Approach to Innovation.* 1-74
- Eckert, A., Nisbet, R., Grimm, A., and Götz, J. (2014) March separate, strike together--role of phosphorylated TAU in mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 1842: 1258-1266.
- Esler, W. P., and Wolfe, M. S. (2001) A portrait of Alzheimer secretases--new features and familiar faces. *Science.* 293: 1449-1454.

- Estrada, B., Rodriguez, A. and Daniel, R. (2011) Cultural practices to enhance mushroom (*Pleurotus eryngii*) yield & concentration of the antioxidants selenium & ergothioneine. *Mushroom News*. Feb 1, 2011.
- Evans J.D. (1996) *Straightforward Statistics for the Behavioral Sciences*. Brooks/Cole Publishing; Pacific Grove, Calif.
- Evans, P., Lyras, L., and Halliwell, B. (1999) Measurement of protein carbonyls in human brain tissue. *Methods Enzymol.* 300: 145-156.
- Ey, J., Schömig, E., and Taubert, D. (2007) Dietary Sources and Antioxidant Effects of Ergothioneine. *J Agric Food Chem.*55(16): 6466-6474.
- Farrer, L. A., Cupples, L. A., Haines, J. L., Hyman, B., Kukull, W. A., Mayeux, R., Myers, R. H., Pericak-Vance, M. A., Risch, N., and van Duijn C. M. (1997) Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA.* 278: 1349-1356.
- Finkel, S. (2000) Introduction to behavioural and psychological symptoms of dementia (BPSD). *Int J Geriatr Psychiatry.*1:S2-4.
- Folstein, M. F., Folstein, S. E., and McHugh, P. R. (1975) "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 12: 189-198.
- Franklin, K. B., and Paxinos, G. (2008) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Elsevier Academic, London.
- Franzoni, F., Colognato, R., Galetta, F., Laurenza, I., Barsotti, M., Di Stefano, R., Bocchetti, R., Regoli, F., Carpi, A., Balbarini, A., Migliore, L., and Santoro, G. (2006) An in vitro study on the free radical scavenging capacity of ergothioneine: comparison with reduced glutathione, uric acid and trolox. *Biomed Pharmacother.* 60(8): 456-457.
- Furukawa, K., Barger, S. W., Blalock, E. M., Mattson, M. P. (1996) Activation of K⁺ channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein. *Nature.* 379: 74-78.
- Furukawa, K. and Mattson, M. P (1998) Secreted amyloid precursor protein α selectively suppresses *N*-methyl-D-aspartate currents in hippocampal neurons: involvement of cyclic GMP. *Neurosci.* 83: 429-438.
- Gakhar-Koppole, N., Hundeshagen, P., Mandl, C., Weyer, S. W., Allinquant, B., Müller, U., and Ciccolini, F. (2008) Activity requires soluble amyloid precursor protein alpha to promote neurite outgrowth in neural stem cell derived neurons via activation of the MAPK pathway. *Eur J Neurosci.* 28: 871-872.

- Gao, X., and Yuan, S. (2010) High density lipoproteins-based therapies for cardiovascular disease. *J Cardiovasc Dis Res.* 1(3): 99-103.
- Gasecka, M., Mleczek, M., Siwulski, M., and Niedzielski, P. (2016) Phenolic composition and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* enriched with selenium and zinc. *Eur Food Res Technol.* 242:723-732.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., and James, L. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature.* 349: 704-706.
- Goedert, M. (2004) Tau protein and neurodegeneration. *Semin Cell Dev Biol.* 15 (1): 45–49.
- Gomes, C. V., Kaster, M. P., Tomé, A. R., Agostinho, P. M., and Cunha, R. A. (2011) Adenosine receptors and brain diseases: Neuroprotection and neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta.* 1808(5): 1380-1399.
- Gong, Y., Chang, L., Viola, K. L., Lacor, P. N., Lambert M. P., Finch, C. E., Krafft, G. A., Klein, W. L. (2003) Alzheimer's disease-affected brain: Presence of oligomeric A ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci.* 100: 10417-10422.
- Gonzaga, M. L. C., Ricardo, N. M. P. S., Heatly, F., and Soares, S. A. (2005) Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill. *Carbohydrate Polymers.* 60(1): 43–49.
- Gowda, S., Desai, P. B., Hull, V. V., Math, A. A., Vernekar, S. N., and Kulkarni, S. S. (2009) A review on laboratory liver function tests. *Pan Afr Med J.* 3:17.
- Gründemann, D., Harlfinger, S., Golz, S., Geerts, A., Lazar, A., Berkels, R., Jung, N., Rubbert, A., and Schömig, E. (2005) Discovery of the ergothioneine transporter. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102(14): 5256-5261.
- Gyôrfi, J., and Hajdú, C. S. (2007) Casing-material experiments with *Pleurotus eryngii*. *Int J Horticultural Sci.* 13: 33-36.
- Haass, C., and Selkoe, D. J. (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration : lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8: 101-112.
- Halliwell, B. (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem.* 59(5): 1609-1623.
- Halpern, M. J., Dahlgren A. L., Laakso, I., Seppänen-Laakso, T., Dahlgren, J., and Mcanulty, P.A. (1998) Red-wine polyphenols and inhibition of platelet aggregation: possible mechanisms, and potential use in health

- promotion and disease prevention. *J Int Med Res.* 26(4): 171-180.
- Hamaguchi, T., Ono, K., Murase, A., and Yamada, M. (2009) Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid-beta aggregation pathway. *Am J Pathol.* 175(6): 2557-2565.
- Hanlon, D. P. (1971) Interaction of ergothioneine with metal ions and metalloenzymes. *J Med Chem.* 14(11): 1084-1087.
- Hardy, J., and Selkoe, D. J. (2002) The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science.* 297:353-356.
- Hardy, J. (2003) The relationship between amyloid and tau. *J Mol Neurosci.* 20:203-206.
- Harman, D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 11: 298-300.
- Huang, M. T., Ho, C. T., and Lee, C. Y. (1992) In phenolic compounds in food and their effects on health II. *American Chem Society.* 506: 13-14.
- Huang, S. J. and Mau, J. L. (2007) Antioxidant properties of methanolic extracts from *Antrodia camphorata* with various doses of γ -irradiation. *Food chem.* 105(4): 1702-1710.
- Hung, C. W., Chen, Y. C., Hsieh, W. L., Chiou, S. H., and Kao, C. L. (2010) Ageing and neurodegenerative diseases. *Ageing Res Rev.* 1:36-46.
- Ihara, Y., Hayabara, T., Sasaki, K., Kawada, R., Nakashima, Y., and Kuroda, S. (2000) Relationship between oxidative stress and apoE phenotype in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand.* 102(6): 346-349.
- James, C. S. (1995) *Analytical Chemistry of Foods.* London: Chapman&Hall 124-125.
- Janero, D. R. (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med.* 9(6): 515-540.
- Jang, J. H., Aruoma, O. I., Jen, L. S., Chung, H. Y., and Surh, Y. J. (2004) Ergothioneine rescues PC12 cells from beta-amyloid- induced apoptotic death. *Free Radic Biol Med.* 36(3): 288-299.
- Jhoo, J. H., Kim, H. C., Nabeshima, T., Yamada, K., Shin, E. J., Jhoo, W. K., Kim, W., Kang, K. S., Jo, S. A, and Woo, J. I. (2004) Beta-amyloid (1-42)-induced learning and memory deficits in mice: involvement of oxidative stress in the hippocampus and cerebral cortex. *Behav Brain Res.* 155(2): 85-196.
- Johnson, R. J., Nakagawa, T., Jalal, D., Sánchez-Lozada, L. G., Kang, D. H., and Ritz, E. (2013) Uric acid and chronic kidney disease: which is

- chasing which? *Nephrol Dial Transplant.* 28(9): 2221-2228.
- Kakio, A., Nishimoto, S., Yanagisawa, K., Kozutsumi, Y., and Matsuzaki, K. (2002) Interactions of amyloid beta-protein with various gangliosides in raft-like membranes: importance of GM1 ganglioside-bound form as an endogenous seed for Alzheimer amyloid. *Biochem.* 41(23): 7385-7390.
- Kamal, A., Stokin, G. B., Yang, Z., Xia, C. H., and Goldstein, L. S. (2000) Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron.* 28(2): 449-459.
- Kang, H. I., Seo, K. I., Cho, Y. S., Yee, S. T., Kim, J. Y., Moon, K. D., and Lee, S. D. (2004) Effect of the Crude Polysaccharide of *Pleurotus eryngii* on the Activation of Immune Cells. *J Korean Soci Food Sci Nutr.* 33(7): 1092-1097.
- Kemppainen, S., Lindholm, P., Galli, E., Lahtinen, H. M., Koivisto, H., Hämäläinen, E., Saarma, M., and Tanila, H. (2015) Cerebral dopamine neurotrophic factor improves long-term memory in APP/PS1 transgenic mice modeling Alzheimer's disease as well as in wild-type mice. *Behav Brain Res.* 291: 1-11.
- Kitakaze, M., and Hori, M. (2000) Adenosine therapy: a new approach to chronic heart failure. *Expert Opin Investig Drugs.* 9(11): 2519-1535.
- Klimova, B. and Kuca, K. (2016) Speech and language impairments in dementia. *J Applied Biom.* 14(2): 97-103.
- Kolarova, M., García-Sierra, F., Bartos, A., Rícný, J., and Ripova, D. (2012) Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. *Int J Alzheimers Dis.* 2012: 731526.
- Koudinov, A., Kezlya, E., Koudinova, N., and Berezov, T. (2009) Amyloid-beta, tau protein, and oxidative changes as a physiological compensatory mechanism to maintain CNS plasticity under Alzheimer's disease and other neurodegenerative conditions. *J Alzheimers Dis.* 18(2): 381-400.
- Kulshreshtha, M., Singh, A., and Vipul, D. A. (2009) Effect of drying conditions on mushroom quality. *J Engineering Sci Technol.* 4(1): 90-98.
- Kumar, A., Singh, M., and Singh, G. (2013) Effect of different pretreatments on the quality of mushrooms during solar drying. *J Food Sci and Technol.* 50(1): 165-170.
- Lambert, J. D., Hong, J., Yang, G. Y., Liao, J., and Yang, C. S. (2005) Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am J Clin Nutr.* 81: 284S-291S.

- Ledesma , M. D., Bonay, P., and Avila, J. (1995) Tau protein from Alzheimer's disease patients is glycosylated at its tubulin-binding domain. *J Neurochem.* 65: 1658-1664.
- Lee, T. T., Tian, Y. R., and Yu, B. (2011) Polysaccharide, Adenosine and Crude Triterpenoid Contents of *Pleurotus Eryngii* and Its Immunostimulant Capacity *in vitro*. *J Agric Sci and Technol.* 1: 1166-1169
- Lerner, A. B., Case, J. D., Takahashi, Y., Lee, T. H., and Mori, W. (1958) Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem.* 80(10): 2587-2587.
- Li, S., and Shah, N. P. (2014) Antioxidant and antibacterial activities of sulphated polysaccharides from *Pleurotus eryngii* and *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275. *Food Chem.* 165(15): 262-270.
- Lin, C. Y., Huang, C. S., Huang, C. Y., and Yin, M. C. (2009) Anticoagulatory, antiinflammatory, and antioxidative effects of protocatechuic acid in diabetic mice. *J Agric Food Chem.* 57(15): 6661-6667.
- Lin, J. T., Liu, C. W., Chen, Y. C., Hu, C. C., Juang, L. D., Shiesh, C. C., and Yang, D. J. (2014) Chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory properties for ethanolic extracts from *Pleurotus eryngii* fruiting bodies harvested at different time. *LWT - Food Sci and Technol.* 55: 374-382.
- Lin, W. C., Peng, Y. F., and Hou, C. W. (2015) Ferulic acid protects PC12 neurons against hypoxia by inhibiting the p-MAPKs and COX-2 pathways. *Iran J Basic Med Sci.* 18(5): 478-484.
- Liu, S. J., and Wang, J. Z. (2002) Alzheimer-like tau phosphorylation induced by wortmannin *in vivo* and its attenuation by melatonin. *Acta Pharmacol Sin.* 23(2): 183-187.
- Loidl-Stahlhofen, A., Hannemann, K., and Spiteller, G. (1994) Generation of α -hydroxyaldehydic compounds in the course of lipid peroxidation. *Bio et Biophysica Acta Lipids and Lipid Metabolism.* 1213: 140-148.
- Lovell, M. A., Robertson, J. D., Teesdale, W. J., Campbell, J. L., and Markesbery, W. R. (1998) Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci.* 158(1): 47-52.
- Maccioni, R. B., Muñoz, J. P., and Barbeito, L. (2001) The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res.* 32: 367-381.
- Mahley, R. W., Weisgraber, K. H., and Huang, Y. (2006) Apolipoprotein E4: A causative factor and therapeutic target in neuropathology, including

- Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 103: 5644-5651.
- Mahmoud, M. G., Ibrahim, A. Y., Asker, M. M., and Sayed, O. H. (2014) Therapeutic potential and structural elucidation of a water-soluble polysaccharide of a wild edible mushroom *Agaricus bisporus* against neurodegenerative disease, Alzheimer. Journal Pharmaceutical Sci. ISSN (Print): 2321-3310.
- Markesbery, W. R., and Carney, J. M. (1999) Oxidative alterations in Alzheimer's disease. Brain Pathol. 9: 133-146.
- Mattson, M. P. (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. Nature. 430(7000): 631-639.
- Mazanetz, M. P., and Fischer, P. M. (2007) Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. Nature Rev Drug Discovery. 6: 464-479.
- Mazzaccara, C., Labruna, G., Cito, G., Scarfò, M., Felice, M. D., Pastore, L., and Sacchetti, L. (2008) Age-Related Reference Intervals of the Main Biochemical and Hematological Parameters in C57BL/6J, 129SV/EV and C3H/HeJ Mouse Strains. PLoS ONE. 3(11): e3772.
- Melville, D. B., Otken, C. C., and Kovalenko, V. (1955) on the origin of animal ergothioneine. J Biol Chem. 216(1): 325-331.
- Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J Neurosci Methods. 11(1): 47-60.
- Motohashi, N., Mori, I., and Sugiura, Y. (1976) Complexing of copper ion by ergothioneine. Chem Pharm Bull (Tokyo). 24(10): 2364-2368.
- Motohashi, N., and Mori, I. (1986) Thiol-induced hydroxyl radical formation and scavenger effect of thiocarbamides on hydroxyl radicals. J Inorg Biochem. 26(3): 205-212.
- Mouton-Liger, F., Paquet, C., Dumurgier, J., Bouras, C., Pradier, L., Gray, F., and Hugon, J. (2012) Oxidative stress increases BACE1 protein levels through activation of the PKR-eIF2 α pathway. Biochim Biophys Acta. 1822(6): 885-896.
- Muresann, V., and Muresann, Z. L. (2015) Experimental Cell Research. 334: 45-53.
- Musso, C. G., Alvarez Gregori, J., Jauregui, J. R., Mac ías Núñez J. F. (2012) Creatinine, urea, uric acid, water and electrolytes renal handling in the healthy oldest old. World J Nephrol. 1(5): 126-126.
- Nagy, Z., Jobst, K. A., Esiri, M. M., Morris, J. H., King, E. M., MacDonald, B., Litchfield, S., Barnetson, L., and Smith, A. D. (1996) Hippocampal pathology reflects memory deficit and brain imaging measurements in

- Alzheimer's disease: clinicopathologic correlations using three sets of pathologic diagnostic criteria. *Dementia*. 7: 76-81.
- Naidu, A., Xu, Q., Catalano, R., and Cordell, B. (2002) Secretion of apolipoprotein E by brain glia requires protein prenylation and is suppressed by statins. *Brain Res*. 958: 100-111.
- Nakalembe, I., Kabasa, J. D., and Olila, D. (2015) Comparative nutrient composition of selected wild edible mushrooms from two agro-ecological zones, Uganda. *Springerplus*. 4:433.
- Newton, E. B., Benedict, S. R., and Dakin, H. D. (1926) On Thiasine, its structure and identification with ergothioneine. *J. Biol. Chem*. 72: 367-373.
- Okatani, Y., Wakatsuki, A., Reiter, R. J., Miyahara, Y. (2002) Melatonin reduces oxidative damage of neural lipids and proteins in senescence-accelerated mouse. *Neurobiol Aging*. 23(4): 639-344.
- Ono, K., Condrón, M. M., Ho, L., Wang, J., Zhao, W., Pasinetti, G. M., and Teplow, D. B. (2008) Effects of Grape Seed-derived Polyphenols on Amyloid β -Protein Self-assembly and Cytotoxicity. *J Biol Chem*. 283(47): 32176-32187.
- Ono, K., Li, L., Takamura, Y., Yoshiike, Y., Zhu, L., Han, F., Mao, X., Ikeda, T., Takasaki, J., Nishijo, H., Takashima, A., Teplow, D. B., Zagorski, M. G., and Yamada, M. (2012) Phenolic compounds prevent amyloid β -protein oligomerization and synaptic dysfunction by site-specific binding. *J Biol Chem*. 287(18): 14631-14643.
- Ota, H., Ogawa, S., Ouchi, Y., and Akishita, M. (2015) Protective effects of NMDA receptor antagonist, memantine, against senescence of PC12 cells: A possible role of nNOS and combined effects with donepezil. *Exp Gerontol*. 72: 109-16.
- Paul, B. D., and Snyder, S. H. (2010) The unusual amino acid L-ergothioneine is a physiologic cytoprotectant. *Cell Death Differ*. 17(7): 1134-1140.
- Peng, Y., Liu, J., Tang, Y., Liu, J., Han, T., Han, S., Li, H., Hou, C., Liu, J., and Long, J. (2014) High-Fat-Diet-Induced Weight Gain Ameliorates Bone Loss without Exacerbating A β PP Processing and Cognition in Female APP/PS1 Mice. *Front Cell Neurosci*. 8: 225-239.
- Petkova, A. T., Ishii, Y., Balbach, J. J., Antzutkin, O. N., Leapman, R. D., Delaglio, F., and Tycko, R. (2002) A structural model for Alzheimer's beta-amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 16742-16747.
- Picone, P., Nuzzo, D., Caruana, L., Messina, E., Barera, A., Vasto, S., and Di

- Carlo, M. (2015) Metformin increases APP expression and processing via oxidative stress, mitochondrial dysfunction and NF- κ B activation: Use of insulin to attenuate metformin's effect. *Biochim Biophys Acta*. 1853(5): 1046-1059.
- Porte, Y., Buhot, M. C., and Mons, N. E. (2008) Spatial memory in the Morris water maze and activation of cyclic AMP response element-binding (CREB) protein within the mouse hippocampus. *Learn Mem*. 15(12): 885-894.
- Prince, M., Prina, Matthew., and Guerchet, Maëlen.(2013) Analysis of long-term care for dementia. *J caring*.1-92.
- Querfurth, H. W. and Laferla, F. M. (2010) Alzheimer's Disease. *N Engl J*. 362: 329-344.
- Raber, J., Huang, J., and Ashford, J. W. (2004) ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. *Neurobiol Aging*. 25:641-650.
- Rahman, I., Gilmour, P. S., Jimenez, L. A., Biswas, S. K., Antonicelli, F., and Aruoma, O. I. (2003) Ergothioneine inhibits oxidative stress- and TNF- α -induced NF- κ B activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 302(4): 860-864.
- Ramanan, P. N., and Rao, M. N. (1987) Antimicrobial activity of cinnamic acid derivatives. *Indian J experimental biol*. 25: 42-43.
- Ranter, M. (2005) FDA pharmacogenomics guidance sends clear message to industry. *Nature Rev Drug Discovery*. 4:359.
- Reiter, R. J. (1995) Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: antioxidant protection and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol*. 16(4): 383-415.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Terron, M. P., Flores, L. J., and Czarnecki, Z. (2007) Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochim Pol*. 54(1): 1-9.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., Pilar Terron, M., Flores, L. J., and Koppisepi, S. (2007) Medical implications of melatonin: receptor-mediated and receptor-independent actions. *Adv Med Sci*. 52: 11-28.
- Reynolds, G. (2007) Lobes of Steel. *New York Times*. 1-4.
- Ribeiro, J. A. (1995) Purinergic inhibition of neurotransmitter release in the central nervous system. *Pharmacol Toxicol*. 77(5): 299-305.
- Robaszkiewicz, A., Bartosz, G., Ławrynowicz, M., and Soszynski, M. (2010) The role of polyphenols, β -carotene, and lycopene in the antioxidative action of the extracts of dried, edible mushrooms. *J Nutrition and Metabolism*. 173274: 173283.

- Roses, A. D., and Saunders, A. M. (1994) APOE is a major susceptibility gene for Alzheimer's disease. *Curr Opin Biotechnol.* 5: 663-667.
- Rossi, L., Mazzitelli, S., Arciello, M., Capo, C. R., and Rotilio, G. (2008) Benefits from dietary polyphenols for brain aging and Alzheimer's disease. *Neurochem Res.* 33(12): 2390-2400.
- Saito, M., Eto, M., Nitta, H., Kanda, Y., Shigeto, M., Nakayama, K., Tawaramoto, K., Kawasaki, F., Kamei, S., Kohara, K., Matsuda, M., Matsuki, M., and Kaku, K. (2004) Effect of apolipoprotein E4 allele on plasma LDL cholesterol response to diet therapy in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 27(6): 1276-1280.
- Sato, A., Terata, K., Miura, H., Toyama, K., Loberiza, F. R. Jr., Hatoum, O. A., Saito, T., Sakuma, I., and Gutterman, D. D. (2005) Mechanism of vasodilation to adenosine in coronary arterioles from patients with heart disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288(4): H1633-1640.
- Saunders, A. J., Kim, T. W., Tanzi, R. E., Fan, W., Bennett, B. D., Safura, B. K., Luo, Y., Louis, J. C., McCaleb, M., Citron, M., Vassar, R., and Richards, W. G. (1999) BACE maps to chromosome 11 and a BACE homolog, BACE2, reside in the obligate Down syndrome region of chromosome 21. *Science.* 286:1255.
- Scarpini, E., Scheltens, P., and Feldman, H. (2003) Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives. *Lancet Neurol.* 2: 539-547
- Selkoe, D. J. (1997) Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments. *Science.* 275: 630-631.
- Semar, S., Klotz, M., Letiembre, M., Van Ginneken, C., Braun, A., Jost, V., Bischof, M., Lammers, W. J., Liu, Y., Fassbender, K., Wyss-Coray, T., Kirchhoff, F., and Schäfer K. H. (2013) Changes of the enteric nervous system in amyloid- β protein precursor transgenic mice correlate with disease progression. *J Alzheimers Dis.* 36(1): 7-20.
- Shires, T. K., Brummel, M. C., Pulido, J. S., and Stegink, L. D. (1997) Ergothioneine distribution in bovine and porcine ocular tissues. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 117(1): 117-120.
- Shulman, R. G., Rothman, D. L., Behar, K. L., and Hyder, F. (2004) Energetic basis of brain activity: implications for neuroimaging. *Trends Neurosci.* 27(8): 489-495.
- Siu, A. W., Reiter, R. J., and To, C. H. (1998) The efficacy of vitamin E and melatonin as antioxidants against lipid peroxidation in rat retinal homogenates. *J Pineal Res.* 24(4): 239-244.
- Sjögren, M., and Blennow, K. (2005) The link between cholesterol and

- Alzheimer's disease. *World J Biol Psychiatry*. 6(2): 85-97.
- Small, D. H., and Barrow, C. J. (2006) Abeta peptide and Alzheimer's Disease. *Celebrating a Century of Research*. 1-4.
- Smith, M. A., Sayre, L. M., and Perry, G. (1997) Morphological aspects of oxidative damage in Alzheimer's disease. In Beal, M.F., Bodis-Wollner, I. & Howell, N.(eds), *Mitochondria and Free Radicals in Neurodegenerative Diseases*. pp. 335–342.
- Song, T. Y., Lin, H. C., Chen, C. L., Wu, J. H., Liao, J. W., and Hu, M. L. (2014) Ergothioneine and melatonin attenuate oxidative stress and protect against learning and memory deficits in C57BL/6J mice treated with D-galactose. *Free Radic Res*. 48(9): 1049-1060.
- Songin, M., Ješko, H., Czapski, G., Adamczyk, A., and Strosznajder, R. P. (2007) GSK-3beta and oxidative stress in aged brain. Role of poly (ADP-ribose) polymerase-1. *Folia Neuropathol*. 45: 220-229.
- Sonn, K., Jaako, K., Jain, K. R., and Zharkovsky, A., (2008) 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease: a dissociation between brain pathology and behavioural phenotype. *European Neuropsychopharmacology*. 23(1): S33.
- Sorrention, G., and Bonavita, V. (2007) Neurodegeneration and Alzheimer's disease: the lesson from tauopathies. *Neurol Sci*. 28:63-71.
- Squire, L., Berg, D., Bloom, F., Lac, S. D., Ghosh, A., and Spitzer, N. (2013) *Fundamental neuroscience*. Academic Press is an imprint of Elsevier.
- Stadtman, E. R., and Levine, R. L. (2003) Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acid*. 25: 207-218.
- Sultana, R., Perluigi, M., and Butterfield, D. A. (2013) Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. *Free Radic Biol Med*. 62: 157-169.
- Suzuki, N., Cheung, T. T., Cai, X. D., Odaka, A., Otvos, L. Jr., Eckman, C., Golde, T. E., and Younkin, S. G. (1994) An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science*. 264: 1336-1340.
- Svedberg, M. M., Hall, H., Hellström-Lindahl, E., Estrada, S., Guan, Z., Nordberg, A., and Långström, B. (2009) [11C]PIB-amyloid binding and levels of A β 40 and A β 42 in postmortem brain tissue from Alzheimer patients. *Neurochem Int*. 54: 347-357.
- Tabrizchi, R., and Bedi, S. (2001) Pharmacology of adenosine receptors in the vasculature. *Pharmacol Ther*. 91(2): 133-147.

- Taga, M. S., Miller, E. E., and Pratt, D. E. (1984) Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *J Am Chem Soc.* 61(5): 928-931.
- Tai, L. M., Mehra, S., Shete, V., Estus, S., Rebeck, G. W., Bu, G., and Ladu, M. J., (2014) Soluble apoE/A β complex: mechanism and therapeutic target for APOE4-induced AD risk. *Molecular Neurodegeneration.* 9:2.
- Tamagno, E., Guglielmotto, M., Monteleone, D., Vercelli, A., Tabaton, M. (2012) Transcriptional and post-transcriptional regulation of β -secretase. *IUBMB Life.* 64: 943-950.
- Thomann, P. A., Kaiser, E., Schönknecht, P., Pantel, J., Essig, M., and Schröder, J. (2009) Association of total tau and phosphorylated tau 181 protein levels in cerebrospinal fluid with cerebral atrophy in mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *J Psychiatry Neurosci.* 34: 136-142.
- Tricoire, H., Locatelli, A., Chemineau, P., and Malpoux, B. (2002) Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. *Endocrinology.* 143(1): 84-90.
- Tsai, S. Y., Tsai, H. L., and Mau, J. L. (2007) Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*. *LWT - Food Science and Technology.* 40(8): 1392-1402.
- Umemiya, M., Chen, N., Raymond, L. A., and Murphy, T. H (2001) A Calcium-Dependent Feedback Mechanism Participates in Shaping Single NMDA Miniature EPSCs. *J Neurosci.* 21: 1-9.
- Vamanu, E. (2012) Biological Activities of the Polysaccharides Produced in Submerged Culture of Two Edible *Pleurotus ostreatus* Mushrooms. *J Biomed Biotechnol.* 2012: 565974-565982.
- Venkat, P., Chopp, M., and Chen. J. (2015) Models and mechanisms of vascular dementia. *Exp Neurol.* 272: 97-108.
- Vinadé, E. R., Schmidt, A. P., Frizzo, M. E., Izquierdo, I., Elisabetsky, E., and Souza, D. O. (2003) Chronically administered guanosine is anti-convulsant, amnesic and anxiolytic in mice. *Brain Res.* 977(1): 97-102.
- Wallin, A. K., Blennow, K., Andreasen, N., and Minthon, L. (2006) CSF biomarkers for Alzheimer's Disease: levels of beta-amyloid, tau, phosphorylated tau relate to clinical symptoms and survival. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 21: 131-138.
- Weber, D., Davies, M. J., and Grune, T. (2015) Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: Focus on sample preparation and derivatization conditions. *Redox Biol.* 5: 367-380.

- Wei, C. J., Li, W., and Chen, J. F. (2011) Normal and abnormal functions of adenosine receptors in the central nervous system revealed by genetic knockout studies. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1808: 1358-1379.
- White, F., Nicoll, J. A., Roses, A.D., and Horsburgh. K. (2001) Impaired neuronal plasticity in transgenic mice expressing human apolipoprotein E4 compared to E3 in a model of entorhinal cortex lesion. *Neurobiol Dis*. 8: 611-625.
- Xiao, J. H., Qi, Y., and Xiong, Q. (2013) Nucleosides, a valuable chemical marker for quality control in traditional Chinese medicine Cordyceps. *Recent Pat Biotechnol*. 7(2): 153-166.
- Yan, R., Bienkowski, M. J., Shuck, M. E., Miao, H., Tory, M. C., Pauley, A. M., Brashier, J. R., Stratman, N. C., Mathews, W. R., Buhl, A. E., Carter, D. B., Tomasselli, A. G., Parodi, L. A., Heinrikson, R. L., and Gurney, M. E. (1999) Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature*. 402: 533-537.
- Yang, N. C., Lin, H. C., Wu, J. H., Ou, H. C., Chai, Y. C., Tseng, C. Y., Liao, J. W., and Song, T. Y. (2012) Ergothioneine protects against neuronal injury induced by β -amyloid in mice. *Food Chem Toxicol*. 50(11): 3902-3911.
- Yildirim, N. C., Turkoglu, S., Yildirim, N., and Ince, O. K. (2012) Antioxidant properties of wild edible mushroom *Pleurotus eryngii* collected from tunceli province of Turkey. *Digest J Nanomaterials and Biostructures*. 7(4): 1647-1654.
- Yildiz, S., Yildiz, Ü. C., Gezer, E. D., and Temiz, A. (2002) Some lignocellulosic wastes used as raw material in cultivation of the *Pleurotus ostreatus* culture mushroom. *Pro Biochem*. 38: 301-306.
- Yoon, I. S., Pietrzik, C. U., Kang, D. E., and Koo, E. H. (2005) Sequences from the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) cytoplasmic domain enhance amyloid beta protein production via the beta-secretase pathway without altering amyloid precursor protein/LRP nuclear signaling. *J Biol Chem*. 280(20): 20140-20147
- Yu, L., Haley, S., Perret, J., and Harris, M. (2002) Antioxidant properties of hard winter wheat extracts. *Food Chem*. 78(4): 457-461.
- Zervakis, G., and Balis, C. (1996) A pluralistic approach in the study of *Pleurotus* species with emphasis on compatibility and physiology of the European morphotaxa. *Mycological Res*. 100: 717-731.
- Zhou, F., Gong, K., Song, B., Ma, T., Laar, T. V., Gong, Y., and Zhang, L. (2012) The APP intracellular domain (AICD) inhibits Wnt signalling and promotes neurite outgrowth. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* -

Molecular Cell Res. 8: 1233-1241.

Zhu, B. Z., Mao, L., Fan, R. M., Zhu, J. G., Zhang, Y. N., Wang, J., Kalyanaraman, B., and Frei, B. (2011) Ergothioneine Prevents Copper-Induced Oxidative Damage to DNA and Protein by Forming a Redox-Inactive Ergothioneine–Copper Complex. *Chem Res Toxicol.* 24(1): 30-34.

Zisu, B., and Shah, N. P. (2003) Effects of pH, Temperature, Supplementation with Whey Protein Concentrate, and Adjunct Cultures on the Production of Exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* 1275. *J Dairy Sci.* 86: 3405–3415.

