

金門縣農業試驗所 105 年度研究計畫

金門一條根萃取應用於減緩焦慮功效之評估
結案報告（修正版）



計畫主持人：吳一德 博士

吳民聰 博士

協同主持人：歐陽儀雄 先生

李明忠 博士

執行期間：105 年 6 月中旬至 105 年 12 月 15 日

執行單位：國立金門大學體育室

中 華 民 國 一 〇 五 年 1 2 月

結案報告審查會議意見及回覆

委員綜合意見	意見回覆
1. 實驗(一)的目標為制訂金門一條根萃取物製備的標準化流程,但材料與研究方法中並未為詳細說明,且實驗結果也未呈現各方法實際操作之比較。	報告中根據委員提供之意見進行了內容的修改。刪除實驗(一)的原標題,並修改為“比較 Balb/c 與 C57BL/6 小鼠的焦慮反應”。
2. 欠缺實驗(三)的分組說明。	已修正。
3. 研究成果 3-2 的敘述中,應將結論敘明清楚。	已修正。
4. 報告中應附上行為實驗操作的照片。	已在附件(三)中補充資料。
5. 報告中應附上各項實驗結果的原始數據,以便能掌握更多相關的研究資訊。	已在附件(四)中補充資料。
6. 在 P7 的分組說明中, GTE1000 和組別 8, 是否為誤植請更正。	已修正。
7. 實驗中,各組的小鼠數量是多少?	已在附件(四)中補充資料。
8. 一條根萃取物中除了異黃酮成份意以外, 是否還有其他的微量成份?	本次研究中只有針對異黃酮以及水溶性多醣體進行檢驗, 根據這兩項有效成份的佔比, 不排除還有其他生物有效成份的存在, 例如存在於豆科植物中具抗氧化作用的皂素。
9. 生產一條根萃取物的成本若高於黃豆萃取物, 一條根萃取物的優勢何在?	一條根的原料成本雖然高於黃豆, 但兩者的生物功效或許不同。先前的文獻指出, 在相同的異黃酮劑量下, 豆腐的抗氧化效果優於黃豆萃取物, 作者推論是因為豆腐中含有其他的有效成份能夠協同異黃酮的抗氧化作用 (<i>J. Agric. Food Chem.</i> , 2005 , 53 (6), pp 2333–2340)。一條根萃物是複方成份, 其所具有的生物功效, 或許會比黃豆萃取物來的有效。因此, 唯有透過實驗比較一條根與黃豆的功效, 才更能掌握一條根萃取的優勢。

目錄

壹、研究計畫之背景及目的1
貳、研究材料與方法6
參、研究成果10
肆、討論15
伍、未來展望17
陸、參考資料18
柒、附件21

摘要

本研究利用高架十字迷宮(elevated plus-maze)以及開放式空間探索(open-field)，探討長期口服一條根水萃取物對於高度焦慮的小鼠品系 Balb/c 是否具有降低焦慮情緒的作用。此外，透過冷螢光儀檢測小鼠全血的超氧離子濃度，進一步檢驗一條根萃取物的生化功效。行為實驗的結果顯示，口服 1500mg/kg 劑量的 GTE1500 組別，能有效降低小鼠的焦慮情緒；而口服劑量為 500mg/kg 的 GTE500 組別，則沒有達到生物統計的顯著差異。因此，行為實驗證明了一條根萃取物的抗焦慮作用具有劑量依存性 (dose-dependent)。生化實驗的結果顯示，GTE500 和 GTE1500 組別的小鼠全血中，由 Lipopolysaccharide (LPS, 1.0mg/kg) 所誘發血液內超氧離子(superoxide)的生成作用受到抑制，證明了一條根萃取物具有降低體內氧化壓力的作用。

綜合上述結果，長期口服一條根水萃取物能降低動物體內氧化壓力，並改善動物的焦慮情緒。推估金門一條根水萃取物能夠進一步發展成為維持身體與身心健康的健康食品。

壹、 研究計畫之背景及目的

(1)情緒疾病

根據聯合國世界衛生組織發表的研究報告指出，情緒疾病如焦慮症、憂鬱症以及恐慌症等將會是本世紀影響全球人們健康的重大疾病之一。現今的生活型態與社會壓力容易導致情緒疾病的發生，中央研究院生醫所學者在 2013 年的研究報告指出，從 1990 到 2010 的 20 年間，全台患有焦慮性和憂鬱性情緒疾病的人口約為 246 萬人，即每四到五個人中就有一人患病（Fu et al., 2013）。

當一個人面臨危險時，短暫的焦慮反應有助於人們遠離危險，這是一種正常的本能反應。倘若焦慮和恐懼情緒持續的時間過久，甚至愈趨嚴重，則會引起焦慮症的發生。許多的心理性疾病常伴隨焦慮症狀的發生，例如憂鬱症(Depression)、廣泛性焦慮症(Generalized anxiety disorder)、恐慌症(Panic attacks)、恐懼症(Phobias)、強迫症(Obsessive-compulsive disorder, OCD)以及創傷後壓力症候群(post-traumatic stress disorder, PTSD)等。對疾病患者而言，負面情緒不只影響了他們的生活適應能力、人與人之間的社交互動、學業以及工作等能力外，也影響了個人的健康，更徒增了社會上醫療成本的支出。

臨床上，常用於治療病患焦慮症狀的藥物可分為兩大類。第一類以增進腦部丙胺基丁酸（GABA）作用為主，例如苯並二氮卓類（Benzodiazepines，BZDs），這類藥物可活化 GABA A 型受體，幫助安眠以及舒緩焦慮。但，長期服用會增加患者對藥物的依賴性以及耐藥性，甚至影響認知行為等副作用。第二類則是以促進血清素作用，例如丁螺環酮(buspirone)以及血清素回收抑制劑（SSRIs）可增強腦部血清素持續作用的時間。SSRIs 類的藥物雖為治療焦慮症的第一線用藥，但對病患仍產生了許多明顯的副作用，例如高血壓、嚴重噁心嚴重失眠以及頭痛等。現今醫界所推崇的目標是“預防勝於治療”的理念，相較於對症下藥，預防情緒障礙疾病如焦慮症的發生，才能真正提升國家社會與全民生活的福祉。

現代人忙碌的生活步調以及不健康的飲食習慣，不但弱化了人體自然的免疫

功能，也加重人體細胞內對抗氧化壓力的負擔，進而引起細胞的受損以及生理系統失調的情況。活性氧(reactive oxygen species, ROS) 是人體細胞正常有氧代謝的產物，其中包括了超氧自由基 (O_2^-)、過氧化氫 (H_2O_2)、氫氧自由基等。ROS 濃度是反應細胞內氧化壓力的指標，在正常環境下，ROS 的產生和清除是保持平衡狀態的。但當細胞產生過量的活性氧而來不及清除時，就會引起脂質、蛋白質以及 DNA 受到自由基的傷害 (Bouayed et al., 2009)。細胞氧化壓力的增加，會使得中樞神經系統內的神經細胞以及大腦的運作受到負面的影響。例如科學家利用小鼠實驗的觀察，證實了小鼠焦慮行為的表現與血液中、海馬迴以及小腦的神經細胞中 ROS 濃度上升有關 (Rammal et al. 2010)。臨床報告更指出，焦慮症病患的血液檢體中，細胞素 IL-6 以及干擾素 TNF-alpha 等發炎因子有顯著性的升高 (Vogelzangs et al., 2016)。當這些發炎因子大量出現時，也意味著病患體內的細胞處於氧化壓力增大的情況。因此，體內氧化壓力的失衡現象是引起焦慮症以及和情緒相關神經退化性疾病的重要因子之一 (Hovatta et al., 2010)。

在人類及其他脊椎動物體內，雄性素與雌性素除了扮演著性別分化以及第二性徵發育外，另一項重要的功能就是負責調控大腦的情緒反應，例如兩性在憂鬱以及焦慮行為的影響 (Walf and Frye, 2006 ; Weiser et al., 2008)。更年期的婦女容易出現情緒低落、焦慮不安等生理與心理的不適，是由於卵巢功能逐漸退化，使得血液中動情素的濃度偏低所引起。治療婦女更年期障礙，可適時從飲食中補充雌激素調節劑，其中以植物類雌激素的療效較為理想。

(2)金門一條根

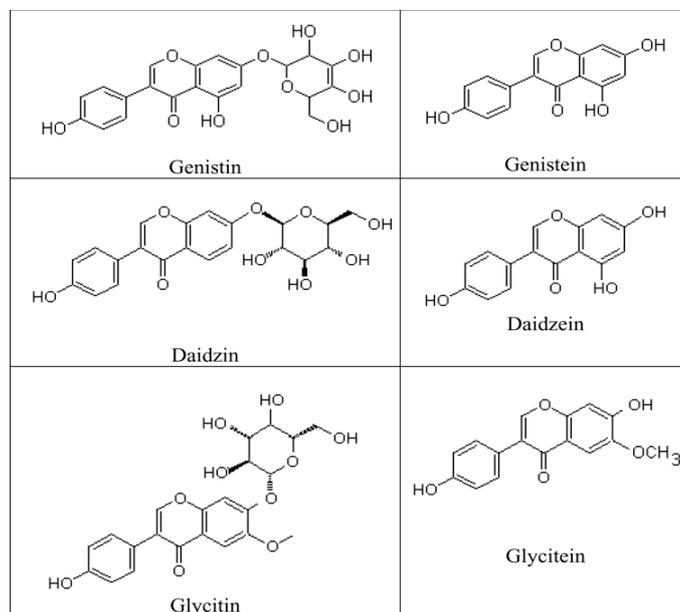
金門的一條根種類共有三種，分別為闊葉大豆、澎湖大豆和蔓草蟲豆，其中又以闊葉大豆(*Glycine tomentella* Hayata)是金門縣農業試驗所重點輔導農民種植以及推廣的品種。根據中草藥典籍之記載，飲用金門一條根具有補氣血、活血通絡之功效。近年來「一條根」成為金門特有之明星伴手禮，商品有痠痛藥膏、貼

布和茶包等形式，雖然其民俗藥用傳統頗受肯定，但其藥理特性之敘述仍不夠詳實。

(3) 一條根與異黃酮(isoflavones)之成分

異黃酮是一種化學結構類似於動情素的天然植物性化合物，俗稱植物類雌激素，廣泛存在於豆科植物中。異黃酮依據醣基型態分為「去醣基」與「配醣基」兩種(圖一)，主要的差別在於前者將官能基醣基去除，減少其分子量並提高吸收率，化學定量分析出 Daidzein、Genistein 和 Glycitein 成分。而常見的配醣基型異黃酮則有 Daidzin、Genistin 和 Glycitin 三種，皆為水溶性成分，且經酵素作用後，亦可轉換為去醣基型異黃酮(Kim et al.,2005; Micke et al.,2006; Munro et al.,2003)。位在細胞膜上能與動情素結合的蛋白質，稱之為動情素受體 (Estrogen receptor,ER)，並分為 alpha 型以及 beta 型兩類。動情素受體活化後會啟動一系列的訊息傳遞，可間接或直接影響基因的表達。動物實驗證實，動情素(estrogen)能藉由活化動情素 β 型受體(ER β)，達到抗焦慮的效果。反之，若將 ER β 基因剔除，則會增強動物的焦慮反應，且無性別之差異(Krezel et al., 2001)。異黃酮中的 Daidzein 經代謝作用轉變成雌馬酚(Equal)後，能進一步活化動情素受體(Setchell et al., 2002)。目前，異黃酮可應用於緩解更年期婦女的生理與心理障礙，如更年期熱潮紅、失眠、躁動、憂鬱、無力、骨質疏鬆、肌肉疼痛、心悸等症狀，且副作用較動物性雌激素化合物來得低，並可抑制乳癌細胞的生長，可作為治療更年期障礙的新選擇 (Varinska et al.,2015)。化學分析發現，大豆屬一條根根部含有豐富的異黃酮，利用水煮或是 95%乙醇萃取皆可將之萃取出，其中以 Daidzein 和 Daidzin 為主要的成分，其他還包含少量的 Genistein 以及 Genistin (Wang et al.,2012; Chen et al.,2005)。由於異黃酮的化學結構與動情素相似，因此，異黃酮可藉由活化動情素受體進而保護細胞免於氧化壓力以及發炎反應的傷害 (Tikkanen et al., 1998)。近年的研究報告指出，一條根之粗萃取物具有降低血

液黏度、抗發炎、消除引起細胞傷害的氧化壓力以及抑制過量自由基產生等功效 (Chuang and Pan, 2011; Wang et al., 2012)。綜合上述文獻資料，一條根萃取物的活性成分對於預防及舒緩焦慮症狀的功效具有相當大的開發潛力。



圖一、配糖基型與去糖基型異黃酮的化學結構

(4) 小鼠焦慮症動物模式

開放式空間探索(open-field)以及高架十字迷宮(elevated plus-maze)是常用於檢視小鼠焦慮反應的行為模式。研究證實，讓小鼠服用抗焦慮藥物 Benzodiazepam 能有效降低動物的焦慮反應，故運用小鼠的焦慮症動物模式對於治療焦慮症藥物的開發有著重要的意義。近年來，探究中草藥用以治療焦慮症的研究正在全球發酵，其原因在於 Benzodiazepam 類的抗焦慮藥物雖然效果顯著，但同時也具有嗜睡、運動失調、藥物成癮等嚴重副作用。相較於 Benzodiazepam，中草藥萃取物則具有較溫和且複方的藥理作用，例如，印度的香根草(*Vetiveria zizanioides roots*) (Nirwane et al., 2015)、摩洛哥的歐蕁麻(*Urtica Urens*) (Doukkali et al., 2016)等。對此，為發展金門一條根的產業價值，本研究以小鼠焦慮症行為模式探討金門一條根是否具有抗焦慮的藥效。

(5)研究目的

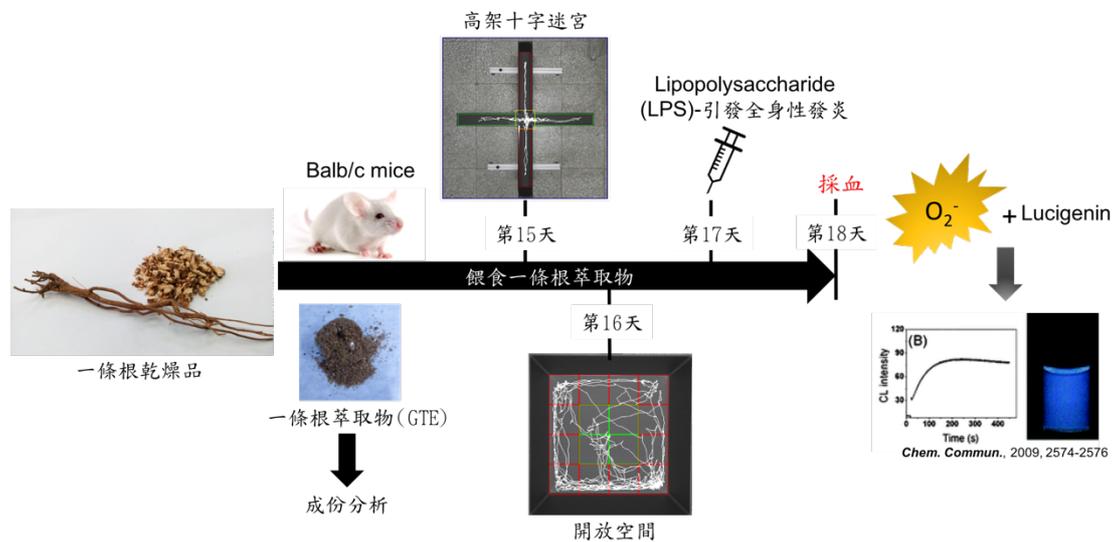
金門一條根具有豐富的異黃酮成分，過去的研究大多探討其抗氧化壓力以及抗發炎之特性。但，對於金門一條根是否具有穩定情緒、紓解緊張之功效則並無相關科學報導。因此，本研究希望利用小鼠的實驗，深入探討金門一條根對於情緒反應之影響，並為後續的動物實驗提供有力的研究基礎，以推升金門一條根在保健與醫療領域的應用潛力。

為達成本研究之目的，實驗分為三階段進行。

實驗（一）比較 Balb/c 與 C57BL/6 小鼠的焦慮反應。

實驗（二）探討連續口服金門一條根萃取液對 Balb/c 小鼠焦慮行為之影響。

實驗（三）探討連續口服金門一條根萃取液對 Balb/c 小鼠血液內活性氧之影響。



圖二、實驗流程圖。

貳、 研究材料與方法

(1) 實驗動物

本實驗所使用的小鼠是購自台灣樂斯科公司，8 週齡的 Balb/c 以及 C57BL/6 小鼠，體重約 20-30 克。實驗動物的飼養地點為國立台灣師範大學實驗動物中心，飼養密度為每籠 5 隻動物。動物房採 24 小時自動溫濕調控，維持室溫 25~27 °C，照明週期為白天夜晚 12/12 小時，動物可自由取用水及飼料。所有實驗進行皆配合動物光週期，研究方法經國立台灣師範大學實驗動物管理委員會認可，實驗動物的照顧使用均依農委會所訂定之規章。

(2) 金門一條根

本研究所使用的金門一條根為金門農業試驗所推廣之闊葉大豆屬，二年生之乾燥主根，長度為 28-32 公分，由金門王大夫業者所提供。

(3) 一條根水粗萃取物(*Glycine Tomentella* Extract, GTE)之製備

本次研究委託台超萃公司，將一條根根部樣品進行超音波萃取處理。方法是將金門一條根根部經粉碎後，秤重 2000 克，以一條根與純水 1:4 的比例進行超音波萃取，萃取溫度設定為 80°C，處理 3 小時。濾液收集後再以冷凍乾燥去除水分，最終所得之乾燥粉末即為本實驗用之一條根水萃取物 GTE，並保存於-80°C 冰箱中備用。

(4) GTE 之 HPLC 化學分析

GTE 內的異黃酮成分檢測是委託國立嘉義大學檢驗分析及技術推廣服務中心進行成分分析，分析 Daidzin、Genistin、Glycitin、Daidzein、Genistein 以及 Glycitein 等六種異黃酮成分。另外，GTE 內的多醣體總量檢驗則是委託環虹錕騰科技股份有限公司進行分析。

(5) 實驗分組

實驗（一）比較 Balb/c 與 C57BL/6 小鼠的焦慮反應。

Balb/c 和 C57BL/6 是常用於生物研究的小鼠品系，為了選定何者較適用於本研究，實驗中比較了兩者在高架十字迷宮的表現。

實驗（二）探討連續口服金門一條根萃取液對 Balb/c 小鼠焦慮行為之影響。

將動物隨機分成 4 組，各組為 6-10 隻小鼠。實驗組共計為 2 組以口服方法餵食 GTE，劑量分別為 500mg 以及 1500mg。口服劑量是依據（林，2000）所發表之結果來訂定；而對照組則為單純口服生理食鹽水。各組動物的口服量為每 10 克動物體重餵食 0.1ml 溶液體積；另 Valproate (100mg/kg) 組為抗焦慮反應參考組（參考表一）。對照組以及實驗組小鼠連續兩週口服生理食鹽水或一條根萃取物後，第 15 天進行焦慮行為觀察實驗；Valproate 則是在行為實驗開始前 30 分鐘以腹腔注射。動物的焦慮行為以開放式空間探索以及高架十字迷宮進行觀察。

分組說明：

1. 對照組：每天以口服生理食鹽水(溶劑)
2. GTE500：每天以口服一條根根部萃取液,劑量為 500mg/kg
3. GTE1500：每天以口服一條根根部萃取液,劑量為 1500mg/kg
4. Valproate：為抗焦慮行為參考組，行為實驗進行前 30 分鐘以腹腔注射，劑量為 100mg/kg。

表一，實驗動物分組設計

組別	1	2	3	4
處理	對照組	GTE		Valproate
劑量 (mg/kg)	0	500	1500	100

實驗流程：



實驗(三)探討連續口服金門一條根萃取液對 Balb/c 小鼠血液內活性氧之影響。

分組說明:

Control：正常健康的小鼠。

Saline：每天以口服生理食鹽水(溶劑)。

GTE500：每天以口服一條根根部萃取液,劑量為 500mg/kg。

GTE1500：每天以口服一條根根部萃取液,劑量為 1500mg/kg。

表二，實驗動物分組設計

組別	1	2	3	4
處理	Control	Saline	GTE	
劑量 (mg/kg)	0	0	500	1500
LPS (1.0mg / kg)		+	+	+

實驗流程：



(6) 高架十字迷宮

高架十字迷宮是根據小鼠懼高的習性設計，並廣泛用於測量動物的焦慮行為。高架十字迷宮為一距地面高度 50 cm、臂寬 10 cm、單臂長 40 cm 的黑色壓克力平台,四臂路徑延伸似中文「十」字,相對兩臂分別為開放臂 (open arms) 及封閉臂 (closed arms),其中封閉臂有 50 cm 高的壓克力牆,行為箱上方有小型直立式攝影機拍攝。實驗以 Panlab (Smart 3.0) 軟體計算小鼠 5 鐘內在開放臂及封閉臂內停留的相對時間比。若小鼠花費長時間待在開放臂，顯示動物的焦慮程度愈低。

(7)開放式空間探索 (Open-field)

開放式空間探索行為箱是一個長寬高為 42x42x36 公分的黑色壓克力箱，中心區域佔 25%，外圍區域佔 75%。將動物放置於行為箱後，動物的運動狀態會立即由上方小型直立式攝影機攝影，再經由 Panlab (Smart 3.0) 軟體同步運算。小鼠在 10 分鐘內的水平移動總距離可呈現出動物的基礎運動，而在中心區域所待時間之長短則代表其焦慮反應，即動物處在中心區域的時間愈長，焦慮狀態愈低。

(8) 全血超氧離子 (superoxide) 檢測方法

口服餵食生理食鹽水或 GTE 第 18 天，在餵食結束 1 小時後，以腹腔注射一劑 LPS (1.0mg/kg)，以誘導小鼠體內免疫法反應的發生。LPS 注射 24 小時後，小鼠會進行採血操作。每隻動物會採集 0.5 mL 的血液，並將血液保存在含有 Heparin 的試管內儲存於 -80°C 冷凍櫃內。全血超氧離子檢測方法參考自 (Huang et al., 2009)。原理是利用化學冷螢光量化系統 (CLD-110, Tohoku Electronic Industrial, Sendai, Japan) 進行分析。首先，將血液樣本放置於螢光測量平台上，先記錄血液樣本中的背景螢光值 (baseline)。60 秒後，小心地將反應物 lucigenin (Sigma, St Louis, MO, USA) 添加於血液樣本內，當 lucigenin 和超氧離子接觸反應後就會激發出螢光。實驗所測得的螢光強度與超氧離子含量成正相關，既超氧離子越多，螢光表現越強。實驗數據的呈現為每 10 秒一次的螢光量 (Count/10sec)，總紀錄時數為 300 秒。每一個樣本的結果是由全部 count 面積扣除 baseline 面積而得。

(9) 統計方法

本研究所得之數據，均以單尾變異數分析(one-way analysis of variance)，並進行post-hoc Tukey HSD (Honestly Significant Difference)測試，以p 值小於0.05 認定為顯著差異。所有數據的呈現皆為平均值± 標準差。

參、 研究成果

3-1 一條根萃取物成分分析

A. 大豆異黃酮

大豆異黃酮是一條根根部重要的生物活性成分之一。本實驗委託國立嘉義大學檢驗分析及技術推廣服務中心利用HPLC方法，對超音波水萃一條根萃取物進行6項大豆異黃酮成份的檢驗。檢測結果與過去的文獻一致，Daidzein 和 Daidzin是一條根水萃取物中含量最多大豆異黃酮種類。(圖三，附件一)

樣品代號 Sample code	檢驗項目 Items	檢驗結果 Result	單位 Unit	檢驗方法 Method
	異黃酮			HPLC
	Daidzin	2.95	mg/g 乾燥樣品	
	Glycitin	0.43	mg/g 乾燥樣品	
GTE powder	Genistin	0.45	mg/g 乾燥樣品	
	Daidzein	9.19	mg/g 乾燥樣品	
	Glycitein	0.52	mg/g 乾燥樣品	
	Genistein	0.15	mg/g 乾燥樣品	

圖三、金門一條根水萃取物中六種大豆異黃酮之含量。

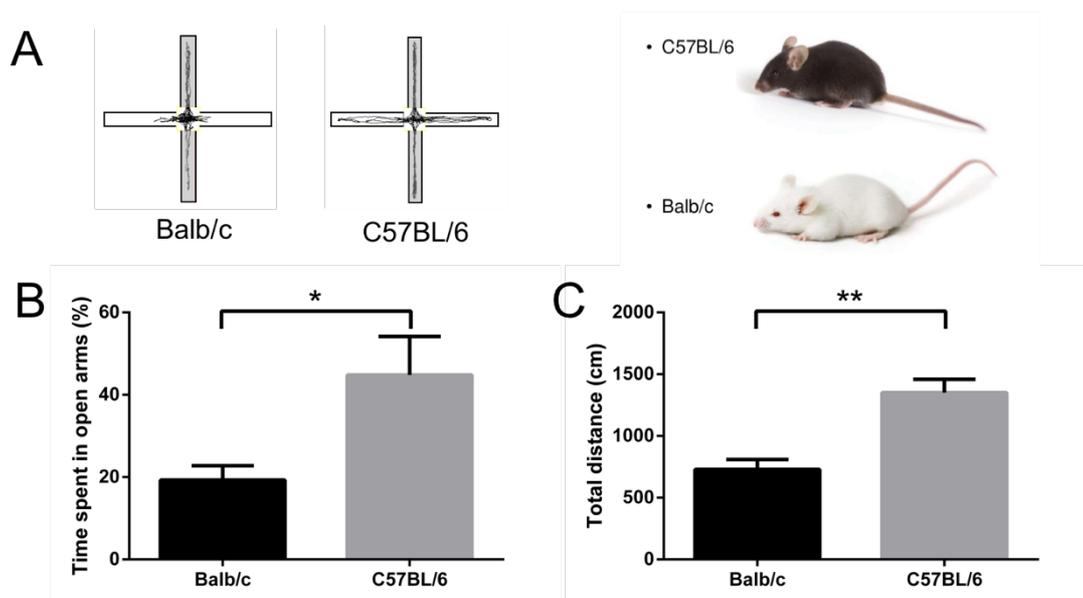
B. 水溶性多醣體

水溶性多醣體是中草藥中具促進人體免疫功能的成份。本實驗委託環虹錕騰科技股份有限公司利用比色方法，對超音波水萃一條根萃取物進行水溶性多醣體含量的檢定。檢驗結果顯示，每1g萃取物中含有36.3mg的水溶性多醣體。

(附件二)

3-2 Balb/c 小鼠可適用於研究藥物的抗焦慮特性

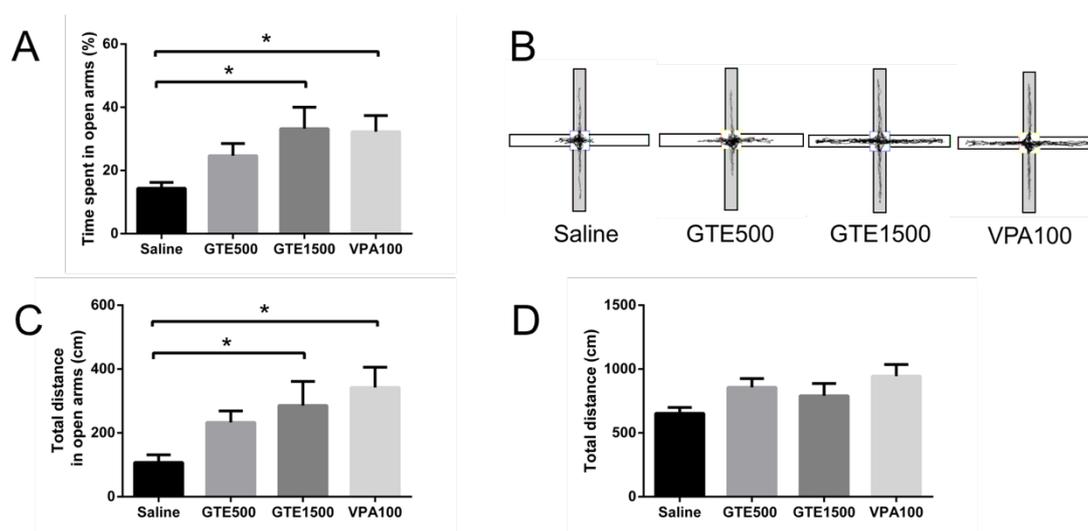
本研究目的是為了探討一條根水萃取物是否具有穩定情緒的功效，故需要選擇屬於高焦慮的小鼠品系為實驗動物。本實驗利用高架十字迷宮，比較了兩種常見的小鼠品系，Balb/c 以及C57BL/6的焦慮行為。實驗結果顯示，相較於C57BL/6小鼠，Balb/c小鼠在十字迷宮中，明顯花費較少的時間待在開放臂。另外，Balb/c小鼠在十字迷宮中的探索時間也比C57BL/6小鼠來的少（圖四）。推知，Balb/c小鼠的焦慮反應明顯大於C57BL/6小鼠，故Balb/c小鼠適用於本研究用以探討一條根萃取物對於減緩焦慮之功效。



圖四、Balb/c以及C57BL/6小鼠在高架十字迷宮的表現。(A) 動物在高架十字迷宮的行走軌跡圖。灰色透明區代表封閉臂(closed arms)，白色區代表開放臂(open arms)。(B) 兩種品系小鼠在開放臂所花費的時間百分比。(C) 兩種品系小鼠在十字迷宮中的總行走距離，以公分 (cm) 表示。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

3-3 一條根水萃取物對Balb/c小鼠在高架十字迷宮焦慮情緒之影響

根據zeng 等人在2010年所發表的研究指出，連續30天餵食balb/c小鼠大豆異黃酮中的Daidzein，能有效降低小鼠的焦慮情緒 (Zeng et al., 2010)。Daidzein是一條根萃取物中含量最多的大豆異黃酮成份，因此，本研究推估長期服用一條根水萃取物可能也具有穩定情緒的功效。結果顯示，Balb/c小鼠連續餵食劑量為1500mg / kg (GTE1500) 的一條根萃取物14天後，小鼠在高架十字迷宮的開放臂中會花費較長的時間以及較遠的行走距離探索環境，顯示一條根萃取物具有能降低小鼠焦慮情緒的作用。餵食劑量為500mg/kg (GTE500) 的動物，經one way ANOVA統計分析顯示，與saline對照組並無顯著差異。腹腔注射抗焦慮藥物Valproate為本實驗參考組 (圖五A、B、C)。各組動物在迷宮中的總移動距離經統計分析後，並未達到顯著之差異，顯示長期口服一條根萃取物不會對動物的運動功能造成影響 (圖五D)。

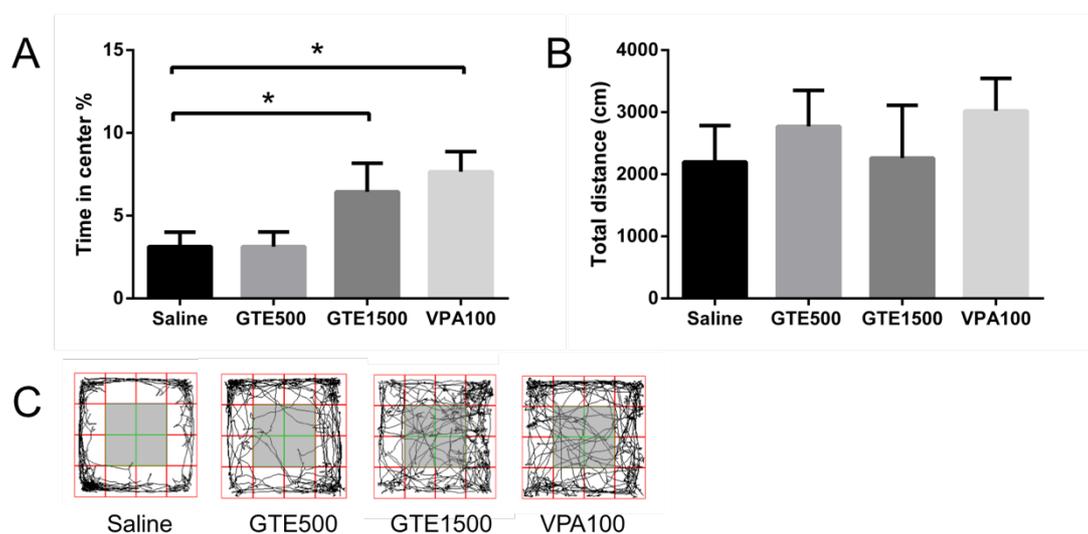


圖五、長期服用一條根水萃取物對Balb/c小鼠在高架十字迷宮中焦慮情緒之影響。

(A) 動物在開放臂所花費的時間百分比。(B) 動物在高架十字迷宮的行走軌跡圖。灰色透明區代表封閉臂(closed arms)，白色區代表開放臂(open arms)。(C) 動物在開放臂的移動距離，以公分(cm)表示。(D) 動物在迷宮中的總移動距離，以公分(cm)表示。*P<0.05

3-4 一條根水萃取物對Balb/c小鼠在開放空間焦慮情緒之影響

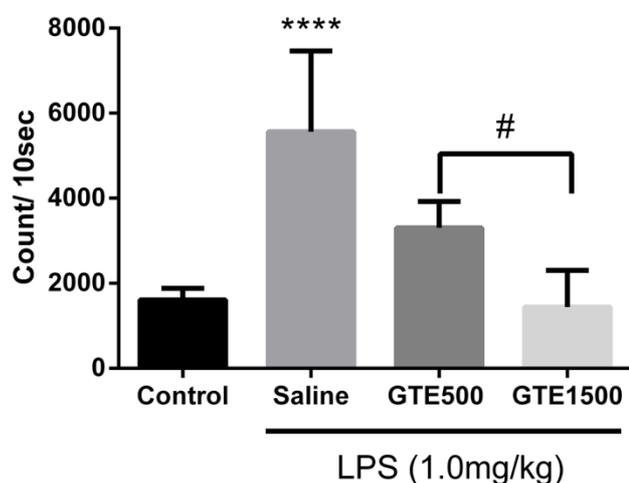
觀察動物在開放空間的移動狀態，是本研究的第二種觀察動物焦慮反應的行為實驗。結果顯示，GTE1500的Balb/c小鼠連續餵食一條根萃取物15天後，動物花費較長的時間對開放空間行為箱的中央區域進行探索，顯示一條根萃取物具有能降低小鼠焦慮情緒的作用。組別為GTE500的動物，經one way ANOVA統計分析顯示，與saline對照組並無顯著差異。腹腔注射抗焦慮藥物Valproate為本實驗參考組（圖六A、C）。各組動物在迷宮中的總移動距離經統計分析後，並未達到顯著之差異，顯示長期口服一條根萃取物不會對動物的運動功能造成影響（圖六B）。



圖六、長期服用一條根水萃取物對Balb/c小鼠開放空間中焦慮情緒之影響。(A) 動物在中央區域所花費的時間百分比。(B) 動物在開放空間行為箱中的總移動距離，以公分(cm)表示。(C) 動物在開放空間中的移動軌跡圖。圖中灰色透明表示處代表中央區域。*P<0.05

3-5 一條根水萃取物具有降低血液中超氧離子濃度的功效。

有許多的文獻報告指出，活性氧（ROS）是引起焦慮、憂鬱等情緒疾病發生的致病因子之一。Lipopolysaccharide（LPS）是革蘭氏陰性細菌外膜的主要組成部分，亦是一種細菌內毒素。當LPS進入動物的血液循環系統後，會引起動物全身性的發炎反應，造成免疫細胞產生大量的發炎因子，例如細胞素IL-6、IL-1B以及干擾素TNF-alpha等，並產生大量的ROS，其中包括超氧離子。此外，動物經LPS注射後，由於大量的發炎因子以及細胞內氧化壓力的失衡，亦會造成動物產生高度焦慮以及憂鬱的情緒障礙。因此，探討一條根萃取物對於LPS所誘發大量超氧離子之影響，有助於進一步釐清一條根萃取物具穩定小鼠焦慮情緒之原因。實驗結果顯示，無論是口服500mg/kg或1500mg/kg劑量的一條根萃取物，皆可顯著降低LPS誘發所產生大量的超氧離子（圖七）。但比較GTE500以及GTE1500，可發現口服1500mg / kg劑量能更顯著的降低超氧離子之形成。



圖七、一條根水萃取物具有降低血液中超氧離子濃度的功效。利用冷光儀測量的小鼠全血中超氧離子的含量。腹腔注射一劑LPS能顯著提高血液內超氧離子濃度，然而，口服一條根萃取物可有效減少超氧離子之形成，其中以GTE1500組效果最佳。（**** P<0.001，Saline vs Control ；#P<0.05，GTE500 vs GTE1500），

肆、 討論

本研究發現，超音波水萃處理的金門一條根萃取物，連續14天口服後（劑量在1500mg/kg），具有降低Balb/c小鼠焦慮情緒的功效。並且，能顯著減少血液由LPS誘發所產生大量的超氧離子，有效降低小鼠體內的氧化壓力。此外，觀察小鼠在高架十字迷宮以及開放空間等兩項的行為實驗中，各組間的總移動距離並沒有明顯差異，顯示連續15天口服一條根萃取物並不會對動物的運動功能產生影響。

4.1 超音波萃取能優化金門一條根的水萃條件。

近年來的研究報告顯示，在製備中草藥萃取物的標準化過程中，超音波萃取技術已逐漸取代高溫水煮技術。超音波萃取技術除了能提高有效成份的回收率之外，還能保持中草藥的活性物質，讓人體更容易吸收。有文獻指出，中草藥的萃取條件若設定為水溫80°C、萃取時間3小時，能促進大豆異黃酮（Kwun et al., 2009）以及水溶性多醣體（Liu et al., 2014）的萃取。因此，本研究依據相同的作法建立優化的金門一條根水萃條件。針對本實驗一條根萃取物中Daidzein以及Daidzin的含量與Wang在2012年發表的成份進行比較，結果為Daidzein (mg/g): 2.95比1.34；Daidzin (mg/g): 9.19比4.23，明顯可見本研究的優化效果。此外，我們也發現了一條根萃取物中具有水溶性多醣體的存在，約佔萃取物重量的3.63%。

4-2 一條根的水萃物能降低Balb/c小鼠的焦慮情緒。

實驗組小鼠分別餵食500mg/kg（GTE500）以及1500mg/kg（GTE1500）劑量的一條根萃取物。結果顯示了一條根萃取物的抗焦慮作用具有劑量依存性（dose-dependent），也就是藥效與藥物劑量成正相關。GTE500與GTE1500組別的小鼠在高架十字迷宮以及開放空間等兩項的行為實驗中，皆呈現一致的行為結果。其中，

GTE1500具有生物統計上的顯著意義，證明一條根萃物能降低小鼠的焦慮情緒。先前的研究證實連續餵食提煉自黃豆中的Daidzein30天，能降低Balb/c小鼠的焦慮情緒（Zeng et al., 2010）。而闊葉大豆（一條根）也和黃豆一樣同屬豆科植物，因此，推論一條根萃取物中的Daidzein對於降低小鼠的焦慮情緒扮演者關鍵的角色。

4-3 一條根的水萃物具有抑制超氧離子形成的作用。

人體內的氧化壓力對於焦慮症的致病原因扮演著關鍵的角色。大量自由基的形成會引起細胞傷害，進而造成中樞神經系統中神經傳遞物質失去正常功能（Salim, 2011; Hovatta et al., 2010）。人體血液中氧化壓力的增加與焦慮情緒有高度相關，例如當學生面臨考試壓力而出現焦慮狀態時，血液內的氧化壓力生物指標會升高，並引起蛋白質以及DNA的受損（Nakhaee et al., 2013; Irie et al., 2001）。對此，我們進一步探討了一條根萃取物是否具有抗氧化壓力（oxidative stress）的作用。實驗結果顯示一條根萃取物具有抑制血液內超氧離子形成的作用，保護身體免於超氧離子的傷害。結果與過去的報導相似，皆證實一條根水萃取具有抗氧化壓力的作用（Lu et al., 2007）。此外，根據一條根萃取物中的大豆異黃酮以及水溶性多醣體的生物作用，推測上述兩者參與了抑制LPS產生大量超氧離子的作用。

伍、 未來展望

人體內的慢性發炎現象是讓身體健康亮起紅燈的元兇之一，適時從飲食中攝取能提升身體免疫力以及對抗細胞氧化壓力的保健食品，是照顧身體健康的簡單方式。無論是體外的細胞實驗，亦或是動物實驗，都一再證明了一條根萃取物具有抗發炎、抗氧化壓力的功用。本研究之成果除持續驗證上述功效外，也首次證實長期服用一條根萃取物，對於穩定焦慮情緒具有一定的功效。因此，開發一條根萃取物之保健食品是強化一條根產品價值的策略之一。未來的產學合作除了要持續一條根的基礎研究外，若能與 GMP 藥廠合作，將能加速人體實驗方面的進程。一條根是金門的亮點產業，透過縣府單位、產業以及學界間的密切合作，必能夠產生巨大的動能以推升金門一條根的產業發展。

陸、 參考資料

- Bouayed J, Rammal H, Soulimani R (2009) Oxidative stress and anxiety: relationship and cellular pathways. *Oxid Med Cell Longev* 2:63–67
- Chen TY, Shiao MS, Pan BS (2005) inhibition of 12- and 15-lipoxygenase activities and protection of human and tilapia low density lipoprotein oxidation by I-Tiao-Gung (Glycine Tomentella). *Lipids*. 40(11):1171-74
- Chuang WL and Pan BS (2011) Anti-stress effects of Glycine tomentell Hayata in tilapia: inhibiting COX-2 expression and enhancing EPA synthesis in erythrocyte membrane and fish growth. *J Agric Food Cheml*. 59(17):9532-41
- Doukkali Z, Taghzouti K, Boudida EH, Kamal R, Nadjmouddine M, Cherrah Y, Alaoui K (2016) Anxiety behavior is reduced in the Balb/C mice that trated by methanolic extract of urtica urens: an elevated plus maze and open field analysis. *Electronic Journal of Biology*.
- Fu TS, Lee CS, Gunnell D, Lee WC, Cheng AT (2013) Changing trends in the prevalence of common mental disorders in Taiwan: a 20-year repeated cross-sectional survey. *Lancet*. 381(9862):235-41.
- Hovatta I, Juhila J, Donner J (2010) Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. *Neurosci Res* 68:261-75.
- Huang SC, Lee FT, Kuo TY, Yang JH, Chien CT (2009) Attenuation of long-term Rhodiola rosea supplementation on exhaustive swimming-evoked oxidative stress in the rat. *Chinese Journal of Physiology*. 52(5):316-324.
- Irie M, Asami S, Nagata S, Ikeda M, Miyata M, Kasai H (2001) Psychosocial factors as a potential trigger of oxidative DNA damage in human leukocytes. *Jpn J Cancer Res*. **92**: 367–376.
- Kim JH, Lim HA, Lee JS, Sung MK, Kim YK, Yu RN, Kim JS (2005) Effect of low dose of genistein and equal on protein expression profile in MCF-7 cells. *Food Sci. Biotechnol*. 14: 854-859
- Kwun KH, Kim GJ, Shin HJ (2009) Ultrasonication assistance increases the efficiency of isoflavones extraction from Kudzu (*Pueraria lobate Ohwi*) Roots Waste. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 14:345-348
- Krezel W, Dupont S, Krust A, Chambon P, Chapman PF (2001) Increased anxiety and synaptic plasticity in estrogen receptor beta-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98(21):12278-82
- Liu CJ, Liu Q, Sun JD (2014) Extraction of water-soluble polysaccharide and the antioxidant activity from Semen cassia. *Journal of Food and Drug Analysis*. 22(4):492-499.

- Lu TC, Ko YZ, Huang HW, Hung YC, Lin YC, Peng WH (2007) Analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous extract from *Glycine tomentella* root in mice. *J Ethnopharmacol.* 113(1):142-8.
- Micke G, Fujiya N, Tonin F, DeOliveiraCosta A, Tavares M (2006) Method development and validation for isoflavones in soy germ pharmaceutical capsules using micellar electrokinetic chromatography. *J Pharmaceut Biomed.* 41: 1625-1632
- Munro, I.C., Harwood, M., Hlywka, J.J., Stephen, A.M., Doull, J., Flamm, W.G., Adlercreutz, H., 2003. Soy isoflavones: a safety review. *Nutr. Rev.* 61, 1–33
- Nakhaee A, Shahabizadeh F, Erfani M (2013) Protein and lipid oxidative damage in healthy students during and after exam stress. *Physiology Behavior.* 118:118-121.
- Nirwane AM, Gupta PV, Shet JH, Patil SB (2015) Anxiolytic and nootropic activity of *Vetiveria zizanioides* roots in mice. *J Ayurveda Integr Med.* 6(3):158-164
- Rammal H, Bouayed J, Soulimani R (2010) A direct relationship between aggressive behavior in the resident/intruder test and cell oxidative status in adult male mice. *Eur J Pharmacol* 627:173–176
- Salim S. (2011) Oxidative stress in anxiety: Implications for pharmacotherapy. *Am J Integr Med* 1:11-21.
- Setchell KDR, Brown NM, Lydeking OE (2002) The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *Journal of Nutrition.* 132:3577-84.
- Tikkanen MJ, Wahala K, Ojala S, Vihma V, and Adlercreutz H (1998) Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(6):3106–3110.
- Varinska L, Gal P, Mojzisova G, Mirossay L, Mojzis J (2015) Soy and breast cancer: focus on angiogenesis. *Int J Mol Sci.* 16(5):11728-49.
- Vogelzangs N, de Jonge P, Smit JH, Bahn S, Penninx BW (2016) Cytokine production capacity in depression and anxiety. *Transl Psychiatry.* 6(5):e825
- Walf AA and Frye CA (2006) A Review and Update of Mechanisms of Estrogen in the Hippocampus and Amygdala for Anxiety and Depression Behavior. *Neuropsychopharmacology.* 31:1097–1111.
- Wang BS, Juang LJ, Yang JJ, Chen LY, Tai HM, Huang MH (2012) Antioxidant and antityrosinase activity of *flemingia macrophylla* and *glycine tomentell* roots. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012:431081.
- Weiser MJ, Wu TJ, Handa RJ (2009) Estrogen receptor-beta agonist diarylpropionitrile: biological activities of R- and S-enantiomers on behavior and hormonal response to stress. *Endocrinology.* 150(4):1817-25.
- Zeng SY, Tai FD, Zhai PY, Yuan AF, Jia R, Zhang X (2010) Effect of daidzein on anxiety,

social behavior and spatial learning in male Balb/cJ mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 96:16-23.

林文川、柯裕仁、吳岳文 (2000) • 闊葉大豆(金門產一條根)水粗萃取物對大鼠 28 天餵食毒性作用 • *J Chin Med* 11(4) , 205-215 。

柒、 附件

附件 (一)



國立嘉義大學生命科學院
檢驗分析及技術推廣服務中心
食品檢驗組

檢驗報告

TEST REPORT

委託單位: Client	國立嘉義大學生化科技學系 楊奕玲	報告編號: Report No.	20160809-01
樣品名稱: Sample name	GTE powder	報告日期: Report Issued	2016/9/6
收樣日期: Date Received	2016/8/9	頁數: Page	1 OF 2

樣品代號 Sample code	檢驗項目 Items	檢驗結果 Result	單位 Unit	檢驗方法 Method	備註 Remark
	異黃酮			HPLC	
	Daidzin	2.95	mg/g 乾燥樣品		
	Glycitin	0.43	mg/g 乾燥樣品		
GTE powder	Genistin	0.45	mg/g 乾燥樣品		
	Daidzein	9.19	mg/g 乾燥樣品		
	Glycitein	0.52	mg/g 乾燥樣品		
	Genistein	0.15	mg/g 乾燥樣品		

<以下空白>

備註:

- 1.報告所記載事項僅作參考資料，不得作為廣告、公證或商業推銷之用。
- 2.報告所用樣品與名稱係由委方提供，本中心僅負責試驗分析。
- 3.本檢驗報告未涉及樣品抽樣，報告書僅對該送驗樣品負責。如對檢驗結果有疑問時，請於七日內提出。
- 4.檢驗報告僅就委託者之委託事項提供檢驗結果，不對產品合法性做判斷。
- 5.檢驗報告數據更正者無效。
- 6.報告未經本中心書面同意不得摘錄複製，但全部複製除外。
- 7.檢驗項目標示(*)者，指該項目經財團法人全國認證基金會(TAF)認可。
- 8.報告保存期限 三年 五年 十年 其他()。

報告簽署人：**羅至佑** 食品檢驗組核章：



表格編號：ATSC-C009-01-1.3

附件 (二)



環虹鋇騰科技股份有限公司
Hyper Quantum Technologies, Ltd.

檢驗報告
Analysis Report

報告編號: 161102-001-001-A
報告日期: 2016/11/14

樣品名稱: 一條根萃取液
樣品資訊: 散裝(離心管)
委託者: 國立金門大學
委託者地址: 89344 金門縣金城鎮珠浦西路6巷3弄6號9樓
委託日期: 2016/11/02
分析日期: 2016/11/02~2016/11/14
檢驗項目: 水溶性多醣體[#]
檢驗方法: 1. 靈芝中水溶性粗多醣分析方法之研究。台灣農業化學與食品科學 (2001): 39 (2), 153-161。
2. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem. (1956): 28, 350-356. (註1)

檢驗項目 (單位: µg/mL, ppm)		
檢驗結果:	Water-soluble polysaccharides 水溶性多醣體	726.69
	-以下空白-	



報告簽署人: *Ehn-Chuan Hsiao*
Technical Manager signed for and on behalf of
Hyper Quantum Technologies, Ltd.

備註:
1. 方法之定量極限為50 µg/g, 低於定量極限之檢驗結果以未檢出 (N.D.) 表示。
2. #表示該檢驗項目係委由外包單位執行分析。
3. 本檢驗報告樣品是由顧客送樣, 且由顧客聲稱並經確認, 本檢驗報告僅對本樣品負責, 有效期限為3年。
4. 本檢驗報告所記載事項, 僅供作參考資料, 不得做為廣告之用。未經本公司實驗室書面同意不得摘錄、複製, 但全部複製除外。

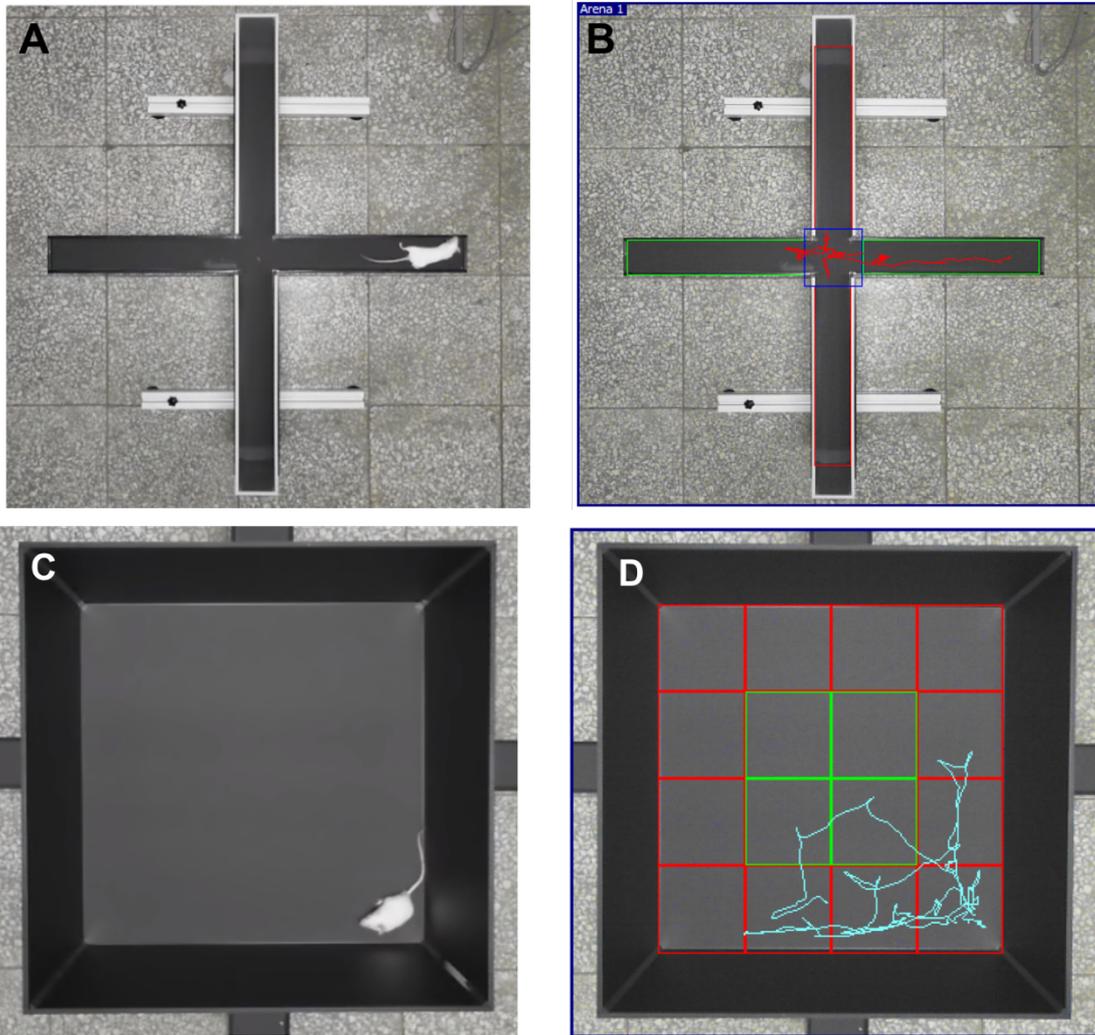
本檢驗報告僅就委託者之委託事項提供檢驗結果, 不對產品合法性做判斷

環虹鋇騰科技股份有限公司 / 新速食檢測定中心: 高雄市806前鎮區新街路286號之8號7樓之1 / 統一編號 CID: 5463 5888
Hyper Quantum Technologies, Ltd. / 7F-1, No. 286-8, Xinya Rd., Qianzhen Dist., Kaohsiung City 806, Taiwan, R.O.C.
Tel.: +886 7 815 2100 / Fax.: +886 7 815 2110 / Email: service@hyperquantum.com.tw / Website: www.hqtfast.com

第1頁 / 共2頁

報告格式生效日期: 2016/11/14

附件 (三)



- A. Balb/c 小鼠在高架十字迷宮中的活動照片。
- B. 行為分析軟體 (Smart 3.0) 中，動物的活動軌跡的顯示圖。綠色框內為開放臂；紅色框內為封閉臂；藍色框內為中央區域。動物在迷宮中的活動軌跡為紅色的追蹤線。
- C. Balb/c 小鼠在開放式空間中的活動照片。
- D. 行為分析軟體 (Smart 3.0) 中，動物的活動軌跡的顯示圖。綠色框內為中央區；紅色框內為外圍區。動物在迷宮中的活動軌跡為淺藍色的追蹤線。

附件（四）

表一、一條根水萃取物對 Balb/c 小鼠在高架十字迷宮中焦慮情緒之影響。

Number of mice	Saline	GTE500	GTE1500	VPA100
1	19.7	14.1	11.0	30.5
2	5.9	32.5	36.7	28.8
3	9.7	26.4	52.5	15.8
4	10.5	25.8	15.4	43.9
5	19.4	17.4	60.9	42.3
6	6.4	9.3	23.5	38.9
7	20.8	29.8	16.6	
8	15.3		49.3	
9	20.1			
10	16.2			
Mean	14.39	22.16	33.23	33.36
Std. Error of Mean	1.842	3.272	6.798	4.31

數據所代表的是每一隻動物在開放臂所花費時間的百分比。

表二、一條根水萃取物對 Balb/c 小鼠在高架十字迷宮中焦慮情緒之影響。

Number of mice	Saline	GTE500	GTE1500	VPA100
1	238.1	131.1	98.4	394.0
2	33.0	281.9	369.2	329.5
3	63.6	234.5	547.6	147.6
4	72.2	284.3	121.8	536.6
5	130.8	148.3	540.7	304.6
6	50.6	69.1	216.5	358.5
7	154.5	253.9	105.5	
8	115.7		339.9	
9	212.2			
10	142.6			
Mean	121.3	200.4	292.5	345.1
Std. Error of Mean	21.63	31.8	65.78	51.68

數據所代表的是每一隻動物在開放臂移動的距離，單位為公分。

表三、一條根水萃取物對 Balb/c 小鼠在高架十字迷宮中焦慮情緒之影響。

Number of mice	Saline	GTE500	GTE1500	VPA100
1	920.8	684.1	618.6	1108.8
2	660.2	964.5	873.9	1046.7
3	655.3	814.0	1179.1	779.4
4	545.7	966.9	501.4	1115.0
5	510.1	982.2	1067.6	669.4
6	675.7	816.9	659.9	815.1
7	708.4	699.6	633.8	
8	551.3		670.2	
9	718.4			
10	633.1			
Mean	657.9	846.9	775.5	922.4
Std. Error of Mean	36.82	47.99	84.74	78.16

數據所代表的是每一隻動物在高架十字迷宮中的總移動距離，單位為公分。

表四、一條根水萃取物對 Balb/c 小鼠在開放空間中焦慮情緒之影響。

Number of mice	Saline	GTE500	GTE1500	VPA100
1	6.4	2.3	6.9	5.1
2	7.0	0.0	8.4	12.3
3	0.1	2.0	0.0	7.1
4	3.9	1.2	0.7	6.8
5	3.6	6.0	6.7	7.0
6	0.1	5.1	10.3	10.0
7	4.7	1.6	12.1	
8	1.9		10.5	
9	0.5			
10	0.0			
Mean	2.816	2.58	6.943	8.043
Std. Error of Mean	0.8476	0.812	1.577	1.065

數據所代表的是每一隻動物在中央區域所花費時間的百分比。

表五、一條根水萃取物對 Balb/c 小鼠在開放空間中焦慮情緒之影響。

Number of mice	Saline	GTE500	GTE1500	VPA100
1	2694.0	2464.6	1594.2	2973.9
2	2106.9	1988.8	2315.2	3399.6
3	1038.7	2503.1	1637.1	2986.6
4	2555.4	2825.1	1046.7	3547.8
5	2899.9	3177.0	3180.6	2199.4
6	2178.9	3616.4	3180.6	2714.6
7	2662.5	2216.9	2865.9	
8	1944.1		867.6	
9	1707.4			
10	275.5			
Mean	2006	2685	2086	2970
Std. Error of Mean	259.7	213.5	329.1	198.1

數據所代表的是每一隻動物在高架十字迷宮中的總移動距離，單位為公分。

表六、一條根水萃取物具有降低血液中超氧離子濃度的作用

Number of mice	Control	Saline+LPS	GTE500+LPS	GTE1500+LPS
1	1663	5635	3335	435
2	1868	4588	3255	1985
3	1218	4853	2647	-167
4	1685	3748	3753	1729
5	779	5115	3740	1361
6	1572	5421	3855	1848
7		10053	3706	2016
8		5075	2122	2317
Mean	1464	5561	3302	1441
Std. Error of Mean	162.6	673.1	219.1	306.1

數據所代表的是每一隻動物的血液樣本與 lucigenin 混合後的冷光強度值。