



國立臺灣大學生物資源暨農學院動物科學技術學研究所

碩士論文

Department of Animal Science and Technology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

根黴菌發酵萃取出物與藻油對於異位性皮膚炎之影響

Effect of *Rhizopus* Fermentation Extract and Microalgae

Oil on Atopic Dermatitis

黃淳珮

Chun-Pei Huang


指導教授：林美峰 博士

Advisor: Mei-Fong Lin, Ph.D.

中華民國 108 年 7 月

July 2019

謝 誌




回首大學四年及碩士兩年，從一個對於學術研究一知半解的我走到今日得以完成這本論文，一路上獲得許多人幫助，常想著如果沒有這些支持與陪伴，我或許已在茫茫學海中迷失方向，研究從來不是一個人埋頭苦幹就能完成的事情，而是透過和他人連結與合作一起達成的。首先要感謝的是我的指導教授 林美峰老師，給予我的研究許多自我發揮的空間，但同時又給我許多寶貴的指導與建議，平時的照顧及關懷有如家人一般，老師一直是我碩士兩年期間強大的後盾。感謝擔任口試委員的 劉嘉睿老師及 黃志宏老師，謝謝老師們指出研究及論文不足之處，使我人生的第一本著作可以更完整。

感謝動物產品研究室、動物生殖科技研究室及分子生物研究室提供我進行細胞、動物試驗的場所及儀器借用，同時也謝謝這些研究室的同伴及學長姐指導細胞及動物試驗的相關操作，在需要時提供即時的幫忙與關心，讓我感受到自己並不是孤軍奮戰。再來要感謝的是研究室的學長姐小波、鈺登和雪羚，在剛踏進實驗室時，指導我熟悉實驗室的儀器與事物，並在推甄的時候提供幫助與建議。感謝一路走來的好夥伴佳琪，兩年來許多酸甜苦辣的時光都陪著我一起度過。感謝世欣、茹靜和禹奐在最難熬、崩潰的動物試驗給予無數幫助與鼓勵，另外也感謝小恒、毓晏、米粒和茗硯參與試驗的犧牲，沒有你們我無法完成我的研究。

最後感謝我的家人、朋友和昱成，除了一起分享我的喜悅外，也和我一起承擔許多挫折和壓力，讓我的喜怒哀樂有宣洩的出口。一步一腳印地走到今天，欣慰之餘也體認到自己有多麼幸運，未來遭遇挫折缺乏勇氣的時候，想起碩士兩年的點滴將會支持著我繼續前行。

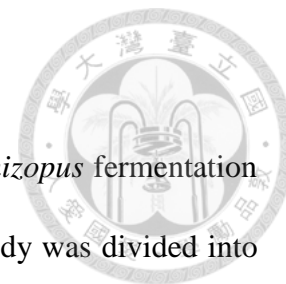
摘要



本研究旨在探討根黴菌發酵萃取物 (*Rhizopus* fermentation extract, RE) 及藻油 (microalgae oil, MO) 對於異位性皮膚炎 (atopic dermatitis, AD) 之影響，分別以細胞試驗及動物試驗探討之。細胞試驗用於評估根黴菌發酵萃取物及藻油對於 RBL-2H3 細胞株去顆粒化作用 (degranulation) 之影響，將根黴菌發酵萃取物或藻油與 RBL-2H3 培養 24 小時後，誘導去顆粒化作用，細胞試驗結果顯示根黴菌發酵萃取物處理組或藻油處理組去顆粒化程度與對照組沒有顯著差異。動物試驗則是探討根黴菌發酵萃取物及藻油對塵蟎皮膚致敏誘導異位性皮膚炎之影響，將八十隻 BALB/c 小鼠分為八組，分別為未致敏之負對照組、塵蟎致敏之正對照組、根黴菌發酵萃取物處理組低劑量 (L-RE)、中劑量 (M-RE)、高劑量組 (H-RE)、藻油處理組低劑量 (L-MO)、中劑量 (M-MO) 及高劑量組 (H-MO)。動物試驗結果顯示，第八週試驗結束後，給予根黴菌發酵萃取物或藻油可顯著降低塵蟎致敏造成的表皮層增生 (hyperplasia) 與血清中總 Immunoglobulin E (IgE) 濃度 ($P < 0.05$)，真皮層免疫細胞數目及血清相關細胞激素濃度則未達顯著差異水準。綜而言之，雖然根黴菌發酵萃取物及藻油在細胞試驗中無法降低去顆粒化程度，減少發炎介質釋放，但在動物試驗中可以減緩塵蟎致敏造成的表皮層增生並降低血清中總 IgE 濃度，具有抗過敏之潛力。

關鍵字：過敏、異位性皮膚炎、根黴菌發酵萃取物、藻油、去顆粒化、家塵蟎

ABSTRACT



The objective of this study was to investigate the effect of *Rhizopus* fermentation extract (RE) and microalgae oil (MO) on atopic dermatitis. The study was divided into two parts: in vitro and in vivo. In vitro study aimed at evaluating the effect of *Rhizopus* fermentation extract and microalgae oil on the extent of degranulation of RBL-2H3. After incubated with RE and MO for 24 hours, RBL-2H3 was induced to degranulate by IgE and antigen. The result showed there was no significant difference between treatment groups and control group. In vivo study aimed at evaluating the effects of RE and MO on house-dust-mite-skin-sensitized BALB/c mice. There were eight groups in this study: negative control, positive control, RE-L, RE-M, RE-H, MO-L, MO-M and MO-H. The result showed RE and MO significantly reduced the epidermal hyperplasia and concentration of total serum IgE ($P < 0.05$). However, dermal immune cell count and concentration of serum relative cytokines showed no significant difference between control groups and treatment groups. To sum up, although RE and MO could not reduce the extent of degranulation in in vitro study, they could reduce epidermal hyperplasia and concentration of total serum IgE. In conclusion, this study showed RE and MO possess anti-allergic potential.

Keywords: Allergy, Atopic dermatitis, *Rhizopus* fermentation extract, Microalgae oil, Degranulation, House dust mite

目 錄



謝 誌	I
摘 要	II
ABSTRACT	III
目 錄	IV
圖 次	VII
表 次	VIII
緒 言	1
壹、文獻回顧	2
一、皮膚之功能及構造	2
(一) 功能	2
(二) 解剖構造	3
二、異位性皮膚炎	7
(一) 過敏反應	7
(二) 異位性皮膚炎簡介	9
(三) 異位性皮膚炎致病機轉	9
(四) 臨床上治療異位性皮膚炎之方法	13
(五) 異位性皮膚炎之實驗動物模式	15
三、根黴菌發酵萃取物 (Rhizopus fermentation extract, RE) 簡介.....	18
(一) 根黴菌屬 (Rhizopus spp.) 簡介	18
(二) 根黴菌發酵萃取物之機能性	18



(三) 根黴菌發酵萃取物之有效物質	20
四、裂壺藻 (Schizochytrium sp.) 油	22
(一) 裂壺藻簡介	22
(二) 裂壺藻油之用途	22
(三) 裂壺藻油之有效物質	23
貳、材料與方法	26
一、抗發炎細胞模式試驗	26
(一) 試驗設計	26
(二) 試驗材料及方法	26
(三) 測定項目及分析方法	27
二、異位性皮膚炎動物模式試驗	30
(一) 試驗設計	30
(二) 試驗材料與方法	31
(三) 試驗動物飼養管理	31
(四) 測定項目及分析方法	32
三、統計分析	35
參、結果	36
一、抗發炎細胞模式試驗	36
(一) 細胞存活率	36
(二) 細胞去顆粒化程度	37
二、異位性皮膚炎動物模式試驗	38
(一) 皮膚表觀評分	38



(二) 內臟重量相對體重百分比	41
(三) 血清總 IgE 濃度	43
(四) 表皮層厚度	45
(五) 真皮層免疫細胞數目	48
(五) 血清相關細胞激素濃度	51
肆、討論	54
一、抗發炎細胞模式試驗	54
(一) 細胞存活率	54
(二) 細胞去顆粒化程度	54
二、異位性皮膚炎動物模式試驗	56
(一) 皮膚表觀評分	56
(二) 內臟重量相對體重百分比	56
(三) 血清總 IgE 濃度	56
(三) 表皮層厚度	57
(四) 真皮層免疫細胞數目	58
(五) 血清相關細胞激素濃度	58
伍、結論	60
參考文獻	61
附錄	68
小傳	70

圖次

圖 1、人類皮膚之分層與構造.....	3
圖 2、異位性皮膚炎之致病機轉.....	12
圖 3、試驗組別與流程圖.....	30
圖 4、不同濃度的根黴菌發酵萃取物或藻油對 RBL-2H3 存活率之影響.....	36
圖 5、根黴菌發酵萃取物或藻油對 RBL-2H3 去顆粒化程度之影響.....	37
圖 6、試驗第三週各組誘導異位性皮膚炎之症狀.....	39
圖 7、根黴菌發酵萃取物或藻油對第三週皮膚表觀評分之影響.....	40
圖 8、根黴菌發酵萃取物或藻油對第三週及第八週血清總 IgE 濃度之影響.....	44
圖 9、試驗第八週各組表皮層厚度.....	46
圖 10、根黴菌發酵萃取物或藻油對表皮層厚度之影響.....	47
圖 11、試驗第八週各組真皮層免疫細胞浸潤.....	49
圖 12、根黴菌發酵萃取物或藻油對真皮層免疫細胞數目之影響.....	50
圖 13、根黴菌發酵萃取物或藻油對血清中 IL-6 及 TNF 之影響.....	51
圖 14、根黴菌發酵萃取物或藻油對血清中 IL-4 及 IL-17A 之影響.....	52
圖 15、根黴菌發酵萃取物或藻油對血清中 IL-2 及 IFN- γ 之影響.....	53

表 次

表 1、過敏反應之分類.....	8
表 2、根黴菌發酵萃取物或藻油對內臟重量相對體重百分比之影響 ¹	42



緒 言

罹患過敏性疾病的人口大約佔全球人口的三分之一，其中異位性皮膚炎為常見的過敏性皮膚疾病，好發於小孩及伴侶動物中的犬隻，盛行率分別約為 20% 及 10%，異位性皮膚炎主要受到遺傳及環境因子交互作用之影響，造成皮膚乾燥、搔癢，在不斷地搔抓下造成皮膚脫皮、紅腫，傷口甚至可能引發微生物二次感染，嚴重影響患者的生活品質。

目前異位性皮膚炎尚未有完善的治療方法，常見的控制藥物葡萄糖皮質素 (glucocorticoids) 能迅速改善異位性皮膚炎的症狀，但是長期且過量使用會造成許多副作用，其他的治療方法如減敏療法 (allergen specific immunotherapy, ASIT)、抗組織胺 (antihistamine) 及環孢素 (cyclosporin) 等亦有使用上的限制，因此目前許多研究仍積極地尋找能減緩異位性皮膚炎的物質，除了減緩症狀外亦能減少葡萄糖皮質素的用量，降低副作用發生。

本研究的目的主要是評估兩種抗過敏潛力物質—根黴菌發酵萃取物及藻油對於誘導異位性皮膚炎之影響，期兩種潛力物質能透過調控免疫反應減緩過敏症狀，並在將來可開發為膳食補充或輔佐異位性皮膚炎之治療。

壹、文獻回顧



一、皮膚之功能及構造

(一) 功能

皮膚為身體最大的器官，由許多細胞類型組成並提供各種不同的功能，使個體能自我調節以適應外界環境的變化。皮膚提供之功能如下 (Pawlina and Ross, 2018)：

1. 作為個體屏障 (barrier)，保護個體免於環境因子 (如物理、化學及生物性因子) 的危害。
2. 皮膚中的免疫細胞可將外來物之抗原 (antigen) 部位呈現給免疫系統的效應細胞 (effector cell) 並啟動免疫反應，使個體免於外來物之傷害。
3. 協助維持個體恆定 (homeostasis)，如哺乳動物體溫的恆定。
4. 傳遞外在感覺信息 (sensory information) 給神經系統，使個體能產生即時反應，避免受到傷害。
5. 分泌內泌素、細胞激素 (cytokine) 及生長因子參與體內生理反應，如人類皮膚細胞可分泌類胰島素生長因子 (insulin-like growth factors, IGF)、前腦啡黑細胞促素皮促素 (proopiomelanocortin, POMC)、兒茶酚胺 (catecholamines) 及固醇類內泌素等 (Zouboulis, 2000)。
6. 少數動物 (如人、馬等) 皮膚具有排泄 (excretion) 功能，可以外泌汗水排除水分、鹽分。

由於皮膚提供不同重要的功能，保護個體並維持體內恆定，因此為重要器官之一，以下將進一步介紹人類皮膚之分層及構造。



(二) 解剖構造

人體皮膚的結構主要分為三層，由外而內分為表皮層 (epidermis)、真皮層 (dermis) 及皮下組織 (hypodermis)，其中還包含皮膚的附屬構造 (skin appendages)，包括：毛髮、毛囊、汗腺及皮脂腺，以下將介紹皮膚各層結構與重要的附屬構造 (Pawlina and Ross, 2018)。

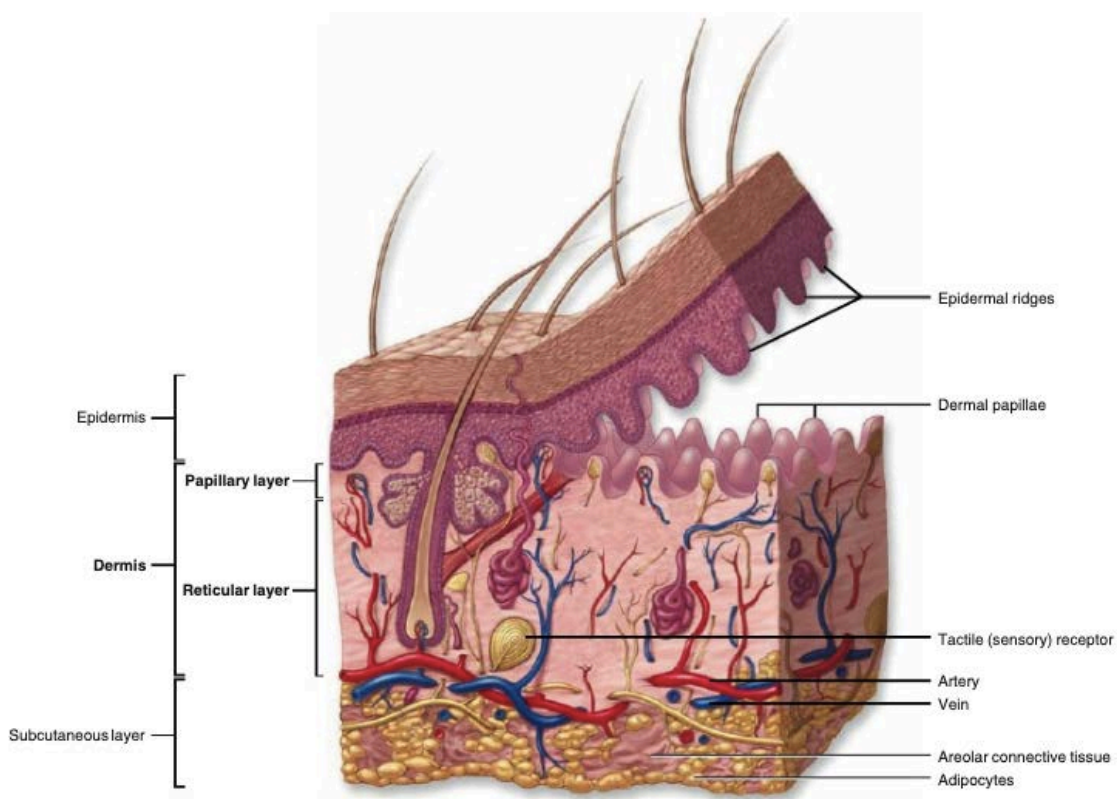


圖 1、人類皮膚之分層與構造

Figure 1. Layers and appendages of human skin.

(Junqueira and Mescher, 2013)



1. 表皮層

表皮層為複層扁平上皮 (stratified squamous epithelium)，主要分為四層，由內而外分別由基底層 (stratum basale)、棘狀層 (stratum spinosum)、顆粒層 (stratum granulosum) 及角質層 (stratum corneum) 構成，在表皮層較厚的皮膚 (thick skin) 中，角質層又另外區分出一層構造稱為透明層 (stratum lucidum)，以下將由內而外介紹表皮層之分層。

(1) 基底層

位於基底膜上的單層細胞，其細胞型態小且為立方狀或矮柱狀，基底層又稱為表皮之生殖層 (stratum germinativum)，因為此層多由幹細胞以及分裂旺盛的角質細胞 (keratinocyte) 構成，可以持續補充角質層脫落的細胞，以維持表皮層的厚度。

(2) 棘狀層

棘狀層的角質細胞較基底層大，此層因可在顯微鏡下觀察到細胞呈現棘狀 (spine) 突出的型態而得其名，與周圍細胞以胞橋小體 (desmosomes) 相連，當角質細胞開始成熟並且被往外推擠時，細胞會開始變大且扁平，細胞核的型態也會由原本的卵圓形轉變為細長形。

(3) 顆粒層

此層的角質細胞中有許多角質透明顆粒 (keratohyalin granule)，顆粒中含有富含胱胺酸 (cystine) 及組胺酸 (histidine) 的蛋白質，為絲聚蛋白 (filaggrin) 的前驅物，絲聚蛋白會幫助聚集角質蛋白絲 (keratin filament) 並出現於角質層的角化細胞 (cornified cell)，由於顆粒層富含嗜鹼性顆粒，組織染色後在顯微鏡下容易觀察到構造。



(4) 透明層

主要在厚皮膚的組織切片中可以觀察到，屬於角質層分層之一，由完全角化且緻密的角質細胞構成，其特色為具折射光性 (refractile appearance) 且不易染色，在完全角化的區域含有嗜酸性白血球 (eosinophil)，此處角質細胞之細胞核及胞器逐漸消失且由角蛋白 (keratin) 填充。

(5) 角質層

角質層是皮膚構造中的最外層，也是厚度變化最大的一層，主要影響表皮層的厚度，角質層的細胞分化最為完全，不具細胞核以及胞器，主要由角蛋白絲所填充，完全角質化 (keratinized) 的細胞構成角質層的表面，會因摩擦而逐漸脫落，內層則是由富含脂質的胞外基質 (extracellular matrix) 構成，為表皮層中主要的防水層 (water barrier)。

2. 真皮層

表皮層之下為真皮層，主要分為兩層，由外而內分別為乳頭狀真皮層 (papillary layer) 以及網狀真皮層 (reticular layer)。

(1) 乳頭狀真皮層

位於表皮層下方，真皮層的表層部位，主要由疏鬆性結締組織構成，此處的膠原纖維較網狀真皮層細緻。乳頭狀真皮層有豐富的血管通過，但不會進入表皮層中，亦有神經纖維分佈其中，此處神經纖維則可延伸進入表皮層，因此乳頭狀真皮層在顯微鏡下可以觀察到血管與神經的分佈。

(2) 網狀真皮層

位於真皮層較深層的部位，主要由較粗且不規則的膠原纖維束及彈性蛋白構成，網狀真皮層在身體各部位的厚度不依，但通常都較乳頭狀真皮層厚。



3. 皮下組織

在網狀真皮層的下方通常為脂肪組織以及肌肉組織，厚度不一，皮下脂肪組織主要為絕緣及儲存能量的區域，在緯度較高的地方，動物體的皮下脂肪組織通常較厚。此處的平滑肌形成豎毛肌（arrector pili muscles）可延伸附著於毛囊上，收縮時可以使皮膚表面毛髮站立，具有調節體溫的功能

4. 附屬構造

皮膚的附屬構造包括毛囊(hair follicles)及其衍生物:毛髮、皮脂腺(sebaceous glands) 以及汗腺 (sweat glands) 。

隨著環境衛生進步，過敏性疾病日益盛行，其中異位性皮膚炎為常見的過敏性皮膚疾病，不斷地搔抓下除了破壞皮膚的功能及完整性外，亦嚴重影響患者的生活品質。接下來將介紹異位性皮膚炎之致病機轉、常見治療方法及實驗動物模式。



二、異位性皮膚炎

(一) 過敏反應

過敏 (hypersensitivity) 為動物體之免疫系統對於環境中無害的物質產生過度反應，例如：動物皮膚、花粉及特定食物等，過敏依據作用機制之不同分為四型 (表 1)，其中第一型過敏反應 (type 1 hypersensitivity reaction)，因其在接觸過敏原後產生之過敏反應相當迅速，故又稱立即性過敏 (immediate hypersensitivity)。第一型過敏反應由抗體 IgE (immunoglobulin E) 所調控，組織發炎細胞表面之 IgE 與抗原產生交叉鏈結 (crosslink) 時，可以活化發炎細胞，產生發炎物質及細胞激素，此種機制原本是用來保護個體免於寄生蟲感染，在寄生蟲入侵能夠迅速反應排除危害，但是隨著環境衛生改善，接觸寄生蟲的機會減少，少數個體會因 IgE 和抗原過度活化組織之發炎細胞破壞周邊組織進而引發過敏症狀。此型過敏反應會因發生的部位不同，而出現不同的症狀，例如造成呼吸困難的氣喘 (asthma)、造成鼻塞、流鼻水的過敏性鼻炎 (allergic rhinitis) 以及造成皮膚紅腫、搔癢的異位性皮膚炎 (atopic dermatitis) 等，過敏反應症狀輕微時，可能只是打噴嚏、流鼻水，但若過敏原進入到血液循環當中，引發全身性過敏反應 (systemic anaphylaxis) 則有可能會造成血壓下降，呼吸道平滑肌收縮引發呼吸困難，進而休克、死亡 (Parham, 2009)。



表 1、過敏反應之分類

Table 1. Four type of hypersensitivity reactions.

	Type I	Type II		Type III	Type IV		
Immune reactant	IgE	IgG		IgG	T _H 1 cells	T _H 2 cells	CTL
Antigen	Soluble antigen	Cell-or matrix-associated antigen	Cell-surface receptor	Soluble antigen	Soluble antigen	Soluble antigen	Cell-or matrix-associated antigen
Effector mechanism	Mast-cell activation	Complement, FcR ⁺ cells (phagocytes, NK cells)	Antibody alters signaling	Complement phagocytes	Macrophage activation	Eosinophil activation	Cytotoxicity
Example of hypersensitivity reaction	Allergic rhinitis, asthma, systemic anaphylaxis	Some drug allergies (e.g., penicillin)	Chronic urticaria (antibody to FcεRIα)	Serum sickness, arthus reaction	Contact dermatitis, tuberculin reaction	Chronic asthma, chronic allergic rhinitis	Contact dermatitis

(Parham, 2009)




(二) 異位性皮膚炎簡介

異位性皮膚炎 (atopic dermatitis, AD) 屬於第一型過敏反應，好發於孩童以及伴侶動物中的犬隻，其盛行率分別為 20% (Nutten, 2015) 與 10% (Hillier and Griffin, 2001)，其症狀在孩童好發於臉部、手背及關節彎曲處 (flexural folds)，犬隻則好發於面部、腹部以及四肢等部位，主要的臨床症狀為皮膚乾燥 (dryness)、搔癢 (pruritic) 與紅腫 (erythema)，在不停地搔抓下不僅會產生皮屑，還可能進一步惡化造成皮膚結痂 (scaling)、苔蘚化 (lichenification)、色素沈澱 (pigmentation) 及微生物二次感染 (secondary infection) 等症狀。

(三) 異位性皮膚炎致病機轉

基因、環境以及免疫因子的交互作用參與異位性皮膚炎之發病與進程，其致病因子多且複雜，皮膚屏障失調 (skin barrier dysfunction) 伴隨著環境中的過敏因子以及免疫系統的改變造成皮膚紅腫搔癢，並出現異位性皮膚炎的症狀 (圖 2)。皮膚屏障失調導致環境中的過敏原容易由皮膚組織間隙進入到組織中，存在於皮膚組織的抗原呈現細胞如蘭格罕細胞 (langerhans cell) 或樹突細胞 (dendritic cell) 會將入侵的過敏原吞噬 (phagocytosis)、降解，過敏原之抗原部位會與抗原呈現細胞的主要組織相容複合體 II (major histocompatibility II, MHC II) 結合並呈現於細胞表面，抗原呈現細胞會將此複合體呈現給 Naive T 細胞，使 Naive T 細胞活化並傾向分化為 T 輔助細胞第二型 (T helper cell type 2, Th2)，Th2 會開始分泌許多細胞激素：interleukin-4 (IL-4)、IL-5 及 IL-13 等，同時也會促使 B 細胞活化及抗體類型轉換 (isotype switching)，使 B 細胞開始分泌 IgE，IgE 可以經由循環系統結合到肥大細胞 (mast cell) 及嗜鹼性白血球 (basophil) 表面的 IgE 受體，肥大細胞及嗜鹼性白血球在過敏反應中扮演重要的角色，其主要特徵為細胞質中有許多分泌顆粒 (secretory granule)，這些



分泌顆粒包含不同的發炎介質，如組織胺(histamine)、蛋白聚醣(proteoglycan)、蛋白酶(proteases)及水解酶(hydrolases)。當個體再次接觸過敏原時，過敏原會與肥大細胞及嗜鹼性白血球上的 IgE 產生交叉鏈結，使得肥大細胞或嗜鹼性白血球去顆粒化(degranulation)，釋放發炎物質、前列腺素(prostaglandin)及白三烯素(leukotriene)等，造成皮膚血管擴張，產生紅腫、搔癢的症狀，此外亦會合成發炎細胞激素如 IL-4、IL-6 及 TNF- α 等，除了產生發炎反應外，也會幫助 Th2 細胞分化及存活，維持 Th2 調控的過敏反應。以下將探討調控異位性皮膚炎相關因子 (Peng and Novak, 2015)。

1. 皮膚屏障 (skin barrier)

皮膚屏障失調被認為是造成異位性皮膚炎的主因，造成皮膚屏障失調的原因有許多種，其中以絲聚蛋白分泌失調廣受討論，絲聚蛋白幫助聚集角蛋白絲成束且會調節皮膚顆粒層中角質細胞的組成，絲聚蛋白分泌量減少會改變皮膚的 pH 值以及保水性 (Thyssen and Kezic, 2014)，當 pH 值增加時，皮膚組織中蛋白酶活性會增加，分解角質細胞間的附著蛋白，同時也會減少神經醯胺(ceramide)的合成，這些機制會加劇 Th2 的免疫反應，亦會使過敏原更容易進入到皮膚組織中。導致絲聚蛋白分泌失調的原因有 filaggrin (FLG) 基因突變、皮膚刺激或機械性損傷以及皮膚組織中細胞激素的調控等，皆會影響絲聚蛋白的合成。除了絲聚蛋白外，其他亦會影響皮膚屏障失調的因素包括皮膚脂質分泌不足、皮膚緊密連接蛋白(tight junction)表現不足、皮膚組織細胞激素表現失調及皮膚表面微生物等，皆會影響到皮膚屏障的完整性



2. 免疫細胞及物質

有許多免疫細胞及物質參與在異位性皮膚炎的致病機轉中，以下簡單介紹其相關研究。

(1) 抗原呈現細胞

皮膚組織中抗原呈現細胞包括蘭格罕細胞及樹突細胞，蘭格罕細胞分佈於較接近表層的表皮組織中，其細胞突觸可以穿過緊密連接蛋白，偵測外來過敏原；樹突細胞則分佈於較內層，為啟動 Th2 免疫反應的重要細胞，被過敏原活化之樹突細胞亦可表現發炎細胞激素 (proinflammatory cytokines) 以及趨化因子 (chemokine) 如 CCL17、CCL22，吸引更多免疫細胞及 T 細胞進入皮膚組織中，這是在異位性皮膚炎患者的皮膚組織切片中可以觀察到過敏原專一性 T 細胞浸潤的原因之一。研究指出異位性皮膚炎患者皮膚組織中之樹突細胞表面表現高親和性的 IgE 受體且其受體數目與症狀之嚴重程度有相關性 (Novak, 2012)，可能較多的受體使患者對於過敏原的感受性較高。

(2) 肥大細胞

除了抗原呈現細胞外，皮膚組織中的肥大細胞在調控第一型過敏反應亦扮演重要的角色，肥大細胞表面有 IgE 受體，當受到 IgE 與抗原活化時，會釋放發炎物質促進發炎反應。研究指出在異位性皮膚炎患者的皮膚組織可以觀察到較多的肥大細胞 (Ando et al., 2013)，可能會增加肥大細胞活化的機率。

(3) 自體免疫反應 IgE (autoreactive IgE, auto-IgE)

前人研究指出，大約有 38.2% 的異位性皮膚炎病患對於皮膚角質細胞產生 auto-IgE (Tang et al., 2014)，auto-IgE 的產生與外來過敏原結構和體內



蛋白質結構相似有關，但是產生的原因、時間點以及其對於異位性皮膚炎的
影響則有待研究進一步探討。

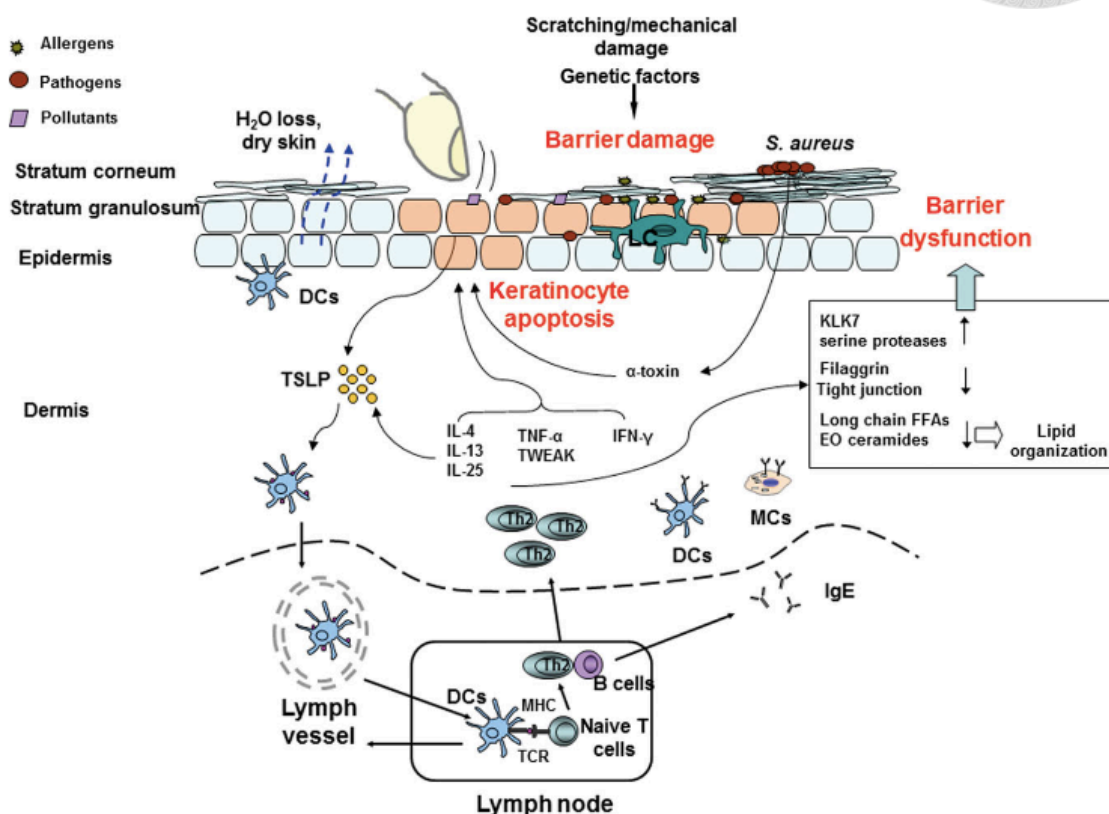


圖 2、異位性皮膚炎之致病機轉

Figure 2. Pathogenesis of atopic dermatitis.

(Peng and Novak, 2015)



(四) 臨床上治療異位性皮膚炎之方法

改善異位性皮膚炎症狀的方法主要分為兩大類，分別是針對特定過敏原的標靶療法 (target therapy) 及抑制免疫與發炎反應的對症治療 (symptomatic treatment)，標靶療法需要透過過敏原檢測才能夠針對特定過敏原進行治療，然而目前尚未發現能有效控制異位性皮膚炎的治療方式，大多是結合不同的方法來改善其症狀並減少副作用產生。以下將針對常見的兩大類改善方式進行介紹 (Saridomichelakis and Olivry, 2016)。

1. 標靶療法

標靶療法又分為兩種，分別是減少接觸過敏原以及減敏療法 (allergen-specific immunotherapy, ASIT)，減少接觸過敏原包括：改善生活習慣、環境、利用物理性或化學性的方法減少環境中的過敏原等，對於環境過敏原引起異位性皮膚炎的病患有很大的幫助，但是在大部分的情況下無法完全避免接觸過敏原，因此大多會搭配其他的治療方法來改善症狀。減敏療法是在進行過敏原檢測後，將過敏原以逐漸增量且規律的方式注射至病患體內，達到改善異位性皮膚炎症狀的效果，此法可以促進體內調節型 T 細胞 (regulatory T cell, Treg) 產生細胞激素 IL-10 及 β -轉化生長因子 (transforming growth factor β , TGF- β)，可以調節抑制 Th2 免疫反應，但其詳細的調控機制有待研究更進一步探討。減敏療法安全且可以根據病患症狀調整療程，但價格昂貴且產生效果所需時間較長，使用時機大多是病患無法減少過敏原接觸或是對症治療效果不佳時，搭配其他療法進行治療。

2. 對症治療

對症治療主要是透過抑制免疫反應、減少發炎細胞的活化及發炎物質的釋放來減緩症狀，但不能完全根治異位性皮膚炎，下列為常見的治療藥物。



(1) 抗組織胺

抗組織胺屬於組織胺受體拮抗劑 (histamine receptor antagonists)，肥大細胞去顆粒化後釋放發炎物質是造成第一型過敏反應的主因，其所釋放的組織胺與周邊細胞之組織胺受體 (histamine receptor) 結合時，會使血管擴張並調控紅腫及搔癢反應。透過組織胺受體拮抗劑與組織胺競爭受體結合可以減少組織胺造成的發炎反應，抗組織胺的效果快速、安全且便宜，但由於組織胺在異位性皮膚炎機轉中不是主要的調控物質，故效果有限，不適合用於急性症狀，大多結合其他療法，以減少其他藥物的使用量，常用的抗組織胺藥物有 cetirizine、diphenhydramine 及 hydroxyzine 等

(2) 葡萄糖皮質素 (glucocorticoids)

葡萄糖皮質素的作用主要是透過與細胞質內的受體結合，進而調控細胞核內的基因表現，葡萄糖皮質素可減少發炎細胞數目及發炎物質產生，可以有效地控制急性與慢性的皮膚發炎及搔癢，效果快速且便宜，但長期或高劑量使用會伴隨許多副作用，包括多食、多渴、多尿、肥胖、肌肉萎縮等，此外由於免疫抑制作用，容易產生細菌、真菌感染，因此較適合短期、減量服用或以外用方式塗抹於患處，常用的葡萄糖皮質素包括：prednisone、prednisolone 及 methylprednisolone 等

(3) 環孢素 (cyclosporin)

屬於免疫抑制劑，可以抑制轉錄因子 nuclear factor of activated T cells (NF-AT) 進入細胞核調控基因表現，因此可以透過減少發炎細胞激素的產生如 IL-2, IFN- γ 降低發炎反應。環孢素的效果與葡萄糖皮質素相當且副作用少，適用於長期症狀控制，但效果較緩慢且價格昂貴，不適用於急性症狀，且初次服用仍會有副作用產生，包括暈眩、嘔吐、下痢等。



(五) 異位性皮膚炎之實驗動物模式

至今異位性皮膚炎的致病機轉仍有尚未明確之處且沒有完善的治療方式，因此有待更多的研究投入，異位性皮膚炎之動物模式是讓我們更深入了解相關機轉的方法，目前的有犬、老鼠及天竺鼠可以作為異位性皮膚炎的動物模式，但是實驗動物仍以老鼠的動物模式為主，其原因為操作方便、成本較低及基因較穩定，以下將介紹以老鼠作為異位性皮膚炎之動物模式，分別包括皮膚致敏誘導模式、食物致敏誘導模式、轉基因誘導模式以及自發性產生異位性皮膚炎的模式 (Jin et al., 2009)。

1. 皮膚致敏誘導模式

皮膚致敏誘導模式依致敏劑不同分述如下：

(1) 卵清蛋白 (ovalbumin, OVA) 致敏劑

將 BALB/c 或 C57BL/6 品系小鼠的背部毛髮剔除後以 3M 膠帶黏貼模擬搔癢造成之皮膚損傷，再將含有卵清蛋白的紗布固定於小鼠背部，可以將小鼠誘導出異位性皮膚炎的症狀，如搔癢行為增加，在皮膚組織方面，可以觀察到表皮層與真皮層的厚度增加及免疫細胞 CD4⁺ T 細胞、嗜酸性白血球浸潤，T 輔助細胞第二型的細胞激素，如 IL-4, IL-5 及 IL-13 的表現量也會增加，血清中卵清蛋白專一性抗體 IgE 與 IgG1 量亦有提升，此外經過卵清蛋白致敏的小鼠在卵清蛋白刺激的吸入性試驗中也會增加氣管收縮，可作為氣喘動物誘導模式 (Spergel et al., 1998)。

(2) 家塵蟎 (house dust mite, HDM) 致敏劑

臨床研究顯示家塵蟎過敏原與異位性皮膚炎有關，將 BALB/c 品系小鼠皮膚塗抹重組塵蟎過敏原 (recombinant mite allergen) Der p8 會造成皮膚表皮層增厚 (epidermal hyperplasia)，免疫細胞 CD4⁺與 CD8⁺ T 細胞浸潤，



體內 T 輔助細胞第二型的免疫反應也會增加 (Huang et al., 2003) , 此結果與使用卵清蛋白致敏劑的結果相似。

(3) 半抗原 (hapten) 致敏劑

半抗原例如 唑酮(oxazolone, Ox)以及三硝氯苯(Trinitrochlorobenzene, TCNB)大多用來誘導接觸性皮膚炎 (allergic contact dermatitis) , 主要誘導 T 輔助細胞第一型免疫反應, 但是長時間利用 唑酮及三硝氯苯多次刺激無毛老鼠之皮膚可以由 T 輔助細胞第一型主導之發炎反應轉為 T 輔助細胞第二型之發炎反應 (Matsumoto et al., 2004) , 利用半抗原誘導之老鼠皮膚切片中可觀察到表皮層增厚以及 T 輔助細胞第二型免疫細胞浸潤, 真皮層 IL-4 表現量增加, 維持皮膚屏障之蛋白質以及神經醯胺 (ceramide) 表現量減少等, 類似於異位性皮膚炎之症狀。由於再現性高、成本低以及誘導快速, 有許多研究會利用半抗原作為誘導模式。

(4) 超級抗原 (superantigen) 致敏劑

金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 感染是造成異位性皮膚炎惡化的常見原因, 由病變皮膚分離出的金黃色葡萄球菌有大約 65% 會分泌具有超級抗原特性的外毒素 (exotoxin) , 可以非專一性的活化 T 細胞並導致大量細胞激素釋放, 將由膠帶模擬損傷之皮膚上塗抹金黃色葡萄球菌可以產生 T 輔助細胞第二型的皮膚發炎反應 (Laouini et al., 2003) 。

2. 食物致敏誘導模式

臨床研究指出, 食物過敏是造成異位性皮膚炎的原因之一, 重複餵食 C3H/HeJ 老鼠混合霍亂菌毒素 (cholera toxin) 的牛奶或花生, 會造成 35% 的老鼠毛髮脫落、搔癢以及類似於異位性皮膚炎的皮膚病變, 血液中的 IgE 以及嗜酸性白血球亦有上升 (Li et al., 2001) 。



3. 轉基因誘導模式

藉由過度表現特定基因而產生類似異位性皮膚炎的症狀，例如 IL-4 轉基因老鼠、IL-31 轉基因小鼠、胸腺基質淋巴生成素 (thymic stromal lymphopoietin, TSLP) 轉基因老鼠、Caspase-1 及 IL-18 轉基因小鼠、角質層胰凝乳蛋白酶 (stratum corneum chymotryptic enzyme) 轉基因小鼠以及脫輔基脂蛋白質 C1 (Apolipoprotein C1) 轉基因小鼠。亦可藉由剔除特定基因來誘導類似異位性皮膚炎的症狀，例如 RelB (Barton et al., 2000) 基因剔除小鼠以及組織蛋白酶 (cathepsin) 基因剔除小鼠 (Tsukuba et al., 2003)。

4. 自發性產生異位性皮膚炎模式

目前會自發性產生異位性皮膚炎的小鼠包括 Nc/Nga 小鼠、NOA 小鼠以及 DS-Ng 小鼠，其中 Nc/Nga 小鼠屬於近親品系，由於第九條染色體發生突變導致 IgE 以及 T 助細胞第二型的免疫反應增加 (Kohara et al., 2001)，當 Nc/Nga 小鼠飼養於一般環境中，接觸空氣中的過敏原，約 6 至 8 週後小鼠會開始出現搔癢症狀，而後在臉、耳、脖以及背部出現紅腫及出血之皮膚病變，由皮膚切片亦可觀察到過度不完全角化 (hyperparakeratosis)、表皮層增厚、海綿樣水腫 (spongiosis) 等，真皮層中亦可觀察到許多嗜酸性白血球及單核細胞 (mononuclear cell) 浸潤 (Vestergaard et al., 1999)。

由於異位性皮膚炎目前尚未有完善的治療方法，許多研究仍在尋找抗過敏物質以減緩異位性皮膚炎，以下將介紹本試驗中的抗過敏潛力物質—根黴菌發酵萃取物及裂壺藻油。



三、根黴菌發酵萃取物 (*Rhizopus fermentation extract*, RE) 簡介

(一) 根黴菌屬 (*Rhizopus spp.*) 簡介

根黴菌屬於真菌界 (*Fungi*) 毛黴門 (*Phycomycetes*) 毛黴目 (*Mucorales*) 毛黴科 (*Mucoraceae*) 的根黴菌屬 (*Rhizopus*)，為自然界中常見的真菌，其會產生白色菌絲及深色孢子，生長快速且常見於土壤、糞便以及腐敗之動植物中，根黴菌屬包括十種真菌，例如造成植物腐敗的少根根黴 (*Rhizopus arrizus*)、*Rhizopus artocarti*、製造發酵食品的 *Rhizopus oligosporus* 及米根黴 (*Rhizopus oryzae*)。由於根黴菌可以產生多種酵素例如：澱粉酶 (amylase)、蛋白酶 (proteinase) 及解酯酶 (lipase) 分解養分增加生物可利用性，亦可產生許多次級代謝物增加食品風味及營養，再加上容易培養的特性，常利用於製作發酵食品例如天貝 (tempeh)、醬油及酒。

(二) 根黴菌發酵萃取物之機能性

根黴菌發酵萃取物是將根黴菌屬接種於混合穀物中，例如：小麥、麩皮、玉米、豆類等，發酵後再連同菌體以熱水萃取，萃取液濃縮乾燥後即得最終產物，其中包含根黴菌體、根黴菌之代謝產物及混合穀經發酵後的衍生物，目前已有許多研究證實根黴菌發酵萃取物的機能性，包括促進生長及性腺發育、改善免疫力以及護肝的功能，在臨床研究中也發現其能改善伴侶動物的皮膚疾病如脫毛症 (alopecia)、異位性皮膚炎及脂漏性皮膚炎 (seborrheic dermatitis) 等，以下將探討根黴菌發酵萃取物的機能性。

1. 促進生長

於鮭魚飼糧中添加根黴菌發酵萃取物之研究結果指出，添加 0.02% 根黴菌發酵萃取物的組別其體重及體長都顯著高於對照組，其中促進生長之有效成分可能為根黴菌發酵萃取物中所含之異白胺酸 (isoleucine) 及精胺酸 (arginine)，



精胺酸除作為肌肉生長所需外，亦可刺激腦垂腺分泌生長激素（growth hormone, GH），藉由生長激素促使肝臟分泌類胰島素生長因子（insulin-like growth factor, IGF-1）促進動物體生長（Bhandari et al., 2002）。

2. 促進性腺發育


於鮭魚飼料中添加根黴菌發酵萃取物可使雄性鮭魚提早排放精子（spermiation），並顯著提升雄性激素（androgen）的濃度，其可能原因為根黴菌發酵萃取物參與刺激性成熟的內分泌素 $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one（DHP）之合成相關。在家禽方面，於公日本鵪鶉之飼料中添加 0.2% 的根黴菌發酵萃取物可以提升早期睪丸發育、泄殖腺面積與分泌能力及睪丸組織精子數，對日本鵪鶉的繁殖能力具有正面之影響（藍與林，2017）。

3. 護肝功效

Suzuki et al（2015）給予大鼠 10 mg/kg 與 100 mg/kg 的根黴菌發酵萃取物，再利用四氯化碳（ CCl_4 ）誘導大鼠肝損傷，結果發現給予根黴菌發酵萃取物可以顯著降低血漿中四氯化碳誘導產生之乳酸去氫酶（lactate dehydrogenase, LDH）、丙胺酸轉胺酶（alanine aminotransferase, ALT）及天冬胺酸轉胺酶（aspartate aminotransferase, AST），在組織切片中亦可觀察到給予根黴菌發酵萃取物可以減少四氯化碳誘導的肝損傷，進一步分析肝細胞生長因子（hepatocyte growth factor, HGF）及胰島素生長因子基因表現也有提升，由此可推測根黴菌發酵萃取物可能透過 GH-IGF 的軸線增加胰島素生長因子的分泌刺激肝細胞增生，減緩四氯化碳誘導的肝損傷。

4. 調節免疫

Suzuki et al（2007）給予大鼠 10 mg/kg 的根黴菌發酵萃取物九日後，餵飼大鼠腸炎沙門氏菌（*Salmonella enteritidis*）觀察大鼠受感染的情形，結果發現



給予根黴菌發酵萃取物的組別肝臟中腸炎沙門氏菌的感染數目較正對照組少，周邊單核球（peripheral blood monocyte）的吞噬能力高出正對照組約 4.5 倍，T 輔助細胞第一型的細胞數目也較正對照組多且 T 輔助細胞第一型與第二型的比例與負對照組相當，顯示給予根黴菌發酵萃取物可以透過提升單核球的吞噬能力以及 T 輔助細胞第一型的免疫反應來減少大數腸炎沙門氏菌的感染，同時也能調節 T 輔助細胞第一型與第二型的平衡。


（三）根黴菌發酵萃取物之有效物質

根黴菌發酵萃取物為複雜的混合物質，包含根黴菌體、菌體代謝產物以及穀物經發酵後的衍生物，不同物質可能對動物體產生不同功效，不同功效亦有可能是不同物質綜合作用下的結果，但目前研究尚未明確提出根黴菌發酵萃取物確切的有效成分，以下將透過各研究鑑定萃取物內的成分來推估可能產生之功效。

1. 醣類

根黴菌發酵萃取物之成分主要為水溶性物質，以蛋白質沈澱劑沈澱後，發現沈澱物中含有許多非蛋白質類的物質，推測可能為醣類物質，例如：多醣類、醣蛋白（glycoprotein）或葡萄糖苷（glycoside）等。利用苯酚-硫酸法（phenol-sulfuric acid assay）及咔唑-硫酸法（carbazole-sulfuric acid assay）測定萃取物內中性糖及酸性的成分，發現萃取物中有高達 90% 以上之糖類，且單醣組成主要為阿拉伯糖（arabinose）、木糖（xylose）以及葡萄糖（堂々綺等，2001），這些糖類可能來自根黴菌體細胞壁富含之醣類物質，大分子醣類可以抑制大腸桿菌在腸細胞上附著，達到抗菌的效果，而醣類物質進入動物體內亦可活化免疫系統達到調節免疫的功能。

2. 胺基酸



根黴菌發酵萃取物中包含多種胺基酸，Bhandari et al (2002) 提出在根黴菌發酵萃取物中促進鮭魚生長的主要成分可能為胺基酸，經由高效液相層析法 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 分析根黴菌發酵萃取物含有的異白胺酸及精胺酸，可提供鮭魚肌肉生長所需之胺基酸，其中精胺酸亦可透過 GH-IGF 的軸線刺激類胰島素生長因子第一型分泌來促進生長作用。

由於根黴菌發酵萃取物具有調節免疫系統，促進 Th1 及 Th2 反應平衡之功能，在臨床試驗中亦可改善伴侶動物的皮膚疾病，推測根黴菌發酵萃取物或許能透過調節免疫反應，減緩異位性皮膚炎之症狀。



四、裂壺藻 (*Schizochytrium* sp.) 油

(一) 裂壺藻簡介

裂壺藻又稱裂殖壺菌屬於原藻界(*Chromista*)網黏菌門(*Labyrinthulomycota*)網黏菌綱 (*Labyrinthulomycetes*) 破囊壺菌目 (*Thraustochytriales*) 破囊壺菌科 (*Thraustochytriaceae*) 裂壺菌屬 (*Schizochytrium*)。裂壺藻為破囊壺菌之一員，破囊壺菌為異營原生生物 (heterotrophic protists) 常見於海洋或是其他鹹水區，其食性可為腐食 (detritivores)、食菌 (bacterivores) 及寄生蟲，起初在分類上接近於真菌，但目前分類則較接近於不等鞭毛藻 (heterokont algae)，例如矽藻 (diatoms) 及褐藻 (brown algae)，破囊壺菌具有可以合成多種 ω 3 長鏈多元不飽和脂肪酸 (ω 3 long chain poly unsaturated fatty acid, LC-PUFA)，例如二十二碳六烯 (docosahexaenoic acid, DHA) 與二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid, EPA) 的能力 (Miller et al., 2007)。

(二) 裂壺藻油之用途

由於裂壺藻可以生產高比例的 ω 3 長鏈多元不飽和脂肪酸，其被用來作為水產養殖之飼料，挑選適合的菌種及飼養環境可使 DHA 產量高達 60%，目前可用來飼養輪蟲 (rotifer) 及豐年蝦 (brine shrimp) 以作為稚魚飼料 (Miller et al., 2007)，亦有研究將裂壺藻油取代魚油添加至鮭魚的飼糧中來提升鮭魚肌肉中 DHA 的含量 (Carter et al., 2003)，此外裂壺藻也被添加到乳牛的飼糧中，增加乳汁中不飽和脂肪酸的含量 (Franklin et al., 1999)。



(三) 裂壺藻油之有效物質

由於裂壺藻可生產的 $\omega 3$ 脂肪酸 DHA 及 EPA，因此常被添加至動物飼糧中，用於增加動物產品之機能性。 $\omega 3$ 脂肪酸是維持健康及身體運作的重要脂肪酸，可參與神經系統的發育、減少心血管疾病以及減緩發炎反應等，以下將著重探討 $\omega 3$ 脂肪酸如何調節免疫系統以減緩發炎反應 (Calder, 2013)。

1. 競爭抑制花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 產生之類二十碳酸 (eicosanoids)

類二十碳酸是由多元不飽和脂肪酸合成之具有生理活性的脂質調節物，常見的有花生四烯酸合成的類二十碳酸，類二十碳酸參與體內免疫及發炎反應，主要是利用磷脂質解脂酶 (phospholipase A_2) 將細胞膜上之脂肪酸釋放出來，經由環氧合酶 (cyclooxygenase, COX)、脂氧合酶 (lipoxygenase) 及細胞色素 P_{450} (cytochrome P_{450}) 等作用產出的。所產生之前列腺素、白三烯素及羥基二十烷四烯酸 (12-hydroxyeicosatetraenoic acid, 12-HETE) 等之類二十碳酸，參與調節發炎與免疫反應。在正常的生理狀態下，磷脂質解脂酶會釋放細胞膜上花生四烯酸，使環氧合酶及脂氧合酶合成二系前列腺素及四系白三烯素如 PGE_2 及 LTB_4 ，其生理活性較強，參與調節免疫系統之發炎反應；增加細胞膜 $\omega 3$ 脂肪酸的比例，可與花生四烯酸競爭環氧合酶及脂氧合酶的合成作用，由 EPA 合成之類二十碳酸如 PGE_3 及 LTB_5 具有較花生四烯酸之 PGE_2 及 LTB_4 為低的生理活性，可能的原因為 EPA 合成之類二十碳酸對於受體的親和性較差因而會引發較弱的發炎反應 (Wada et al., 2007)，此外在體外試驗也證實 PGD_3 也可以抑制花生四烯酸或 PGD_2 造成嗜中性白血球穿越血管內皮的現象 (Tull et al., 2009)，因此補充 $\omega 3$ 脂肪酸可以與花生四烯酸產生之類二十碳酸競爭達到降低發炎反應的效果。



2. 增加止炎素 (resolvins) 與保護素 (protectins) 產生


止炎素及保護素是 ω 3 脂肪酸生成之脂質調節產物，能夠減少發炎反應並促進受損組織修復，由 EPA 生成的止炎素為 E-series，由 DHA 生成的止炎素則為 D-series，止炎素可以透過抑制 LTB₄ 受體來降低 LTB₄ 或 12-HETE 的促發炎反應 (Qu et al., 2015)；保護素則具有抗發炎的效果。止炎素 D1、E1 及保護素 D1 可以抑制嗜中性白血球穿越血管內皮及抑制其浸潤至組織中引發發炎反應，止炎素 D1 可以抑制促發炎細胞激素 IL-1 β 的生成，保護素 D1 則可以抑制 IL-1 β 及 TNF 的生成 (Serhan et al., 2008)，止炎素與保護素之作用皆可解釋 ω 3 脂肪酸的抗發炎功效。

3. 減少發炎激素生成

許多體外試驗及動物實驗證實 EPA 及 DHA 可以減少發炎細胞激素產生，例如：TNF、IL-1 β 及 IL-6 等 (Kang and Weylandt, 2008)，其作用是透過抑制發炎之轉錄因子 NF- κ B 來調控，NF- κ B 位於細胞質中，當接收到外界發炎刺激後，經過一系列的訊息傳遞，使與 NF- κ B 結合的抑制分子 I κ B 磷酸化，I κ B 脫離後活化 NF- κ B，使 NF- κ B 可以進入細胞核調控發炎細胞激素的基因表現，促使發炎細胞激素開始產生，EPA 及 DHA 可能是透過減少 I κ B 磷酸化或誘導抗發炎轉錄因子 PPAR γ 來抑制 NF- κ B 的活化，進而減少發炎細胞激素產生 (Kong et al., 2011)。

4. 降低 T 細胞的反應

EPA 及 DHA 可以減少 T 細胞的增生與活化來減少免疫系統過度反應，可能是透過干擾 T 細胞細胞膜的脂膜筏 (lipid raft) 來降低 T 細胞增生與活化的訊息傳遞。脂膜筏是細胞膜表面具有特殊組成及構造的区域，此區較細胞膜其他區域具有較多的神經鞘脂類 (sphingolipids) 及膽固醇 (cholesterol) 及飽和脂



肪酸，脂膜筏的流動性相對較差，但卻匯聚許多重要訊息傳遞分子，使得訊息傳遞更有效率，然而當細胞膜上 $\omega 3$ 脂肪酸的比例相對增加時，會增加脂膜筏的流動性，使許多重要訊息傳遞分子較為分散，訊息傳遞效率差，造成 T 細胞接受活化訊息無法被傳遞，進而降低 T 細胞的反應，EPA 及 DHA 透過增加 T 細胞或其他免疫細胞脂膜筏的流動性，來降低免疫細胞的反應活性 (Stulnig and Zeyda, 2004)。

綜而言之，異位性皮膚炎是一種常見的過敏性皮膚疾病，好發於小孩及伴侶動物中的犬隻，然而目前尚未有完善的治療方法。因此本研究以細胞實驗探討根黴菌發酵萃取物或藻油是否能減緩發炎反應，並以動物實驗探討兩種物質是否減緩誘導之異位性皮膚炎，以評估兩種物質抗過敏之潛力。

貳、材料與方法



一、抗發炎細胞模式試驗

(一) 試驗設計

本試驗利用與肥大細胞相似的 RBL-2H3 細胞株做為細胞模式，觀察 RBL-2H3 與根黴菌發酵萃取物或藻油培養後，以 IgE 及抗原誘導去顆粒化作用，觀察兩種物質是否能降低由 FcεRI 調控的去顆粒化作用，探討是否有減緩發炎反應的效果。

(二) 試驗材料及方法

1. 根黴菌發酵萃取物

根黴菌發酵萃取物為購自市售之凍乾原粉（合台生化股份有限公司），其製作流程簡述如下：以小麥、麩皮、玉米以及豆類等混合穀物做為根黴菌發酵基質，發酵後將基質連同菌體以熱水進行粗萃、濃縮及乾燥後即為最終產物。

2. 藻油（附錄-表 1）


藻油萃取自裂壺菌屬之微藻。

3. 細胞種類及來源

本試驗使用大鼠嗜鹼性白血球細胞株 RBL-2H3 購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心（Bioresource collection and research center, BCRC）

4. 培養方式

將 RBL-2H3 培養於含 15% FBS（heated- inactivated fetal bovine serum）及 2% 抗生素溶液（penicillin/streptomycin solution）的 MEM（minimum essential medium, Corning®）之 T-75 flask 中，移至培養溫度 37 °C、二氧化碳濃度 5% 之培養箱。每兩天繼代培養（subculture）一次，由於 RBL-2H3 屬於附著型細胞



(adherent cell)，因此採用附著型細胞繼代培養方式。首先吸除舊的培養基，再利用約 5 ml 的磷酸鹽緩衝溶液 (phosphate buffered saline, PBS) 清洗細胞並吸除 PBS，重複清洗步驟三次，再加入 3 ml 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸 (trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid, trypsin-EDTA) 溶液，輕搖使溶液均勻覆蓋細胞後，置於 37 °C 培養箱培養三分鐘，等待細胞脫落後，加入 6 ml 含血清之新鮮培養基以終止反應，將 T-75 flask 內的細胞懸浮液移至 15 ml 離心管，利用離心機以 1500 rpm 之轉速離心五分鐘，吸除上清液後，再添加新鮮的培養基將細胞稀釋至 10^6 RBL-2H3 cell/ml 的細胞懸浮液，吸取 1 ml 的細胞懸浮液至含有 14 ml 新鮮培養基的 T-75 flask 中，輕搖使細胞分布均勻，最後將細胞培養於培養箱中，兩天後重複繼代步驟。

(三) 測定項目及分析方法

1. 細胞存活率試驗

本試驗利用噻唑藍 (thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT) (Glod biotechnology) 分析不同處理濃度之細胞存活率。試驗方法為將 100 μ l 細胞濃度為 10^5 RBL-2H3 cell/ml 的懸浮液種植至 96 孔盤中，培養隔夜使細胞貼附，再將根黴菌發酵萃取物及藻油以不同濃度回溶至新鮮的培養基，不同處理包括 0 μ g/ml (對照組)、根黴菌發酵萃取物 25、50、100、200、400 μ g/ml、藻油 25、50、100、200、400 μ g/ml，將不同處理溶液以 0.22 過濾器 (filter) 過膜後，吸除舊的培養基並添加 100 μ l 至不同處理的孔洞 (well) 中，於 37 °C 培養箱培養 24 小時後開始進行 MTT assay。步驟首先為吸除不同處理的舊培養基，加入 100 μ l 新鮮培養基後，將 0.5 mg 的 MTT 回溶至 10 ml PBS 溶液中，以 0.22 filter 過膜，再將 10 μ l 的 MTT 溶液加入每個 well，於 37 °C 培養箱培養三小時後，吸除含 MTT 之培養基，加入 100 μ l 之二甲基亞砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO)，利

用吸管 (pipette) 混合均勻，放入 37 °C 培養箱培養十五分鐘，利用全光譜光學定量儀 (Epoch 2, Bio Tek) 測定 540 nm 吸光值，並以對照組存活率當作 100%，依照不同處理相對於對照組之吸光值來計算不同處理濃度下的存活率。

2. 細胞去顆粒化程度試驗

本試驗測定細胞顆粒之 β -己糖胺酶 (β -hexosaminidase) 由細胞內釋放至細胞外之比例作為去顆粒化程度。試驗方法為將 200 μ l 細胞濃度為 2×10^5 RBL-2H3 cell/ml 的懸浮液種植至 96 孔盤中，培養隔夜使細胞貼附，吸除舊的培養基後再以細胞存活率達 80% 以上的處理濃度包括 0 μ g/ml (對照組)、根黴菌發酵萃取物 25、50 μ g/ml、藻油 25、50、100、200、400 μ g/ml 與細胞培養，且每個處理濃度下又包含不同組別，包括未經抗原刺激 (spontaneous) 組、抗原刺激 (stimulated) 組、破細胞 (total content) 組，每個 well 加入 200 μ l 不同的處理並於 37 °C 培養箱培養 24 小時後進行去顆粒化試驗。步驟為首先吸除不同處理濃度的舊培養基，再將含有 0.5 mg/ml 抗 2, 4-二硝基苯酚免疫球蛋白 E (anti-dinitrophenyl IgE, anti-DNP IgE) (Sigma-Aldrich) 之培養基 200 μ l 加入每個 well 中並於 37 °C 培養箱培養一小時，使 IgE 與細胞表面受體結合，再利用離心機以 300 g 之轉速離心五分鐘，吸除培養基並加入 200 μ l 的 Tyrode 氏緩衝液 (Tyrode's buffer) 清洗細胞，同樣以 300 g 之轉速離心五分鐘，吸除上清液，重複清洗步驟共兩次，清除未結合至細胞的 IgE，吸除殘餘液體後，加入 100 μ l 濃度為 30 ng/ml 的 Dinitrophenol conjugated to human serum albumin (DNP₃₆-HSA) (Sigma Aldrich) 至不同處理濃度之抗原刺激組及破細胞組，未經抗原刺激組則加入 100 μ l 的 Tyrode's buffer，於 37 °C 培養箱培養四十五分鐘後，將 96 孔盤置於冰上停止反應並在不同處理濃度之破細胞組加入 5 μ l 濃度為 10% 的 Triton X-100，於室溫培養五分鐘，以轉速 300 g 4 °C 離心十分鐘後，吸取 25 μ l 的細胞上清液加

入含 50 μl 對-硝基苯基-乙酰基-D-氨基葡萄糖苷 (*p*-nitrophenyl acetyl-D-glucosamine, pNAG) (Sigma-Aldrich) 之 96 孔盤中，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 培養箱培養九十分鐘，最後加入 150 μl 碳酸氫鹽緩衝液 (carbonate buffer) 停止反應。利用全光譜光學定量儀測定 405 及 630 nm 吸光值後，計算去顆粒化之比例。

去顆粒化比例計算 (net specific release,%)

$$\frac{\beta\text{-hexosaminidase}_{\text{stimulated}} - \beta\text{-hexosaminidase}_{\text{spontaneous}}}{\beta\text{-hexosaminidase}_{\text{total}} - \beta\text{-hexosaminidase}_{\text{spontaneous}}}$$



二、異位性皮膚炎動物模式試驗

(一) 試驗設計

本試驗以家塵蟎 (house dust mite, HDM) 皮膚致敏誘導異位性皮膚炎之 BALB/c 小鼠作為動物模式，試驗分為八組，分別是未經皮膚致敏之負對照組與塵蟎皮膚致敏之正對照組、根黴菌發酵萃取物低劑量組 (RE-L)、根黴菌發酵萃取物中劑量組 (RE-M)、根黴菌發酵萃取物高劑量組 (RE-H)、藻油低劑量組 (MO-L)、藻油中劑量組 (MO-M) 及藻油高劑量組 (MO-H)。試驗期間對照組皆給予管餵 PBS 溶液 150 μ l，處理組則依照組別給予不同劑量之根黴菌發酵萃取物或藻油 150 μ l。試驗第三、六、八週進行塵蟎溶液腹腔注射與皮膚致敏誘導異位性皮膚炎，並以臉頰採血的方式測定血清總 IgE 濃度，第八週試驗結束後進行犧牲，分析內臟相對體重百分比、皮膚組織切片、血清總 IgE 濃度及相關細胞激素濃度，評估兩種物質是否具有抗過敏及減緩誘導異位性皮膚炎之能力。

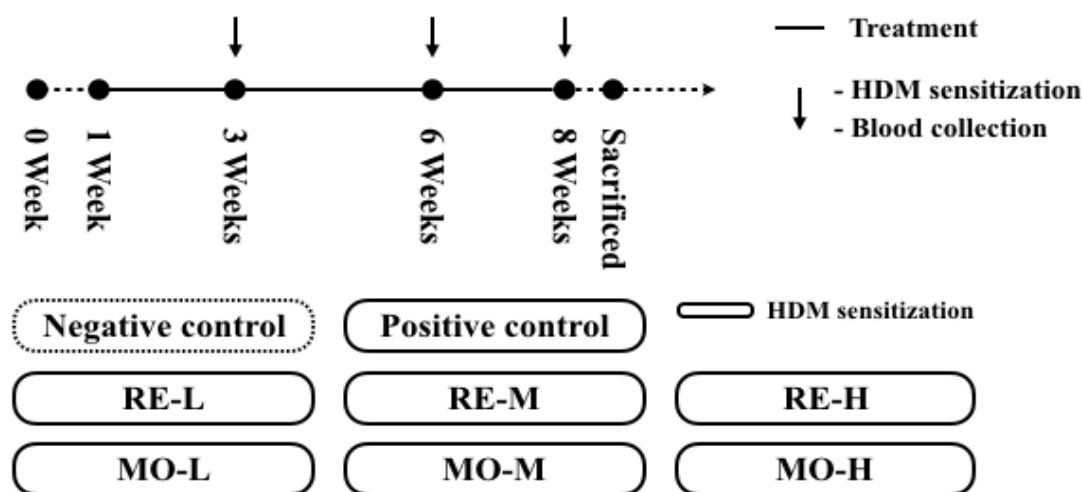


圖 3、試驗組別與流程圖

Figure 3. Experimental group and flow chart.



(二) 試驗材料與方法

1. 根黴菌發酵萃取物

同抗發炎細胞模式試驗之試驗材料。

2. 藻油

同抗發炎細胞模式試驗之試驗材料。

3. 歐洲塵蟎 (*Dermatophagoides pteronyssinus*) 萃取物粉末, Stallergenes Greer USA。

4. 動物來源及品系

本試驗所使用八十隻五週齡之 BALB/c 母鼠皆購自樂斯科生物科技股份有限公司。

(三) 試驗動物飼養管理

1. 動物處理及飼養方式

八十隻 BALB/c 小鼠隨機分成八組，分別為無致敏之負對照組及給予致敏之正對照組、根黴菌發酵萃取物低劑量組、根黴菌發酵萃取物中劑量組、根黴菌發酵萃取物高劑量組、藻油低劑量組、藻油中劑量組、藻油高劑量組，每組十隻小鼠分為兩籠，每籠五隻。每籠皆以標準飼糧採任飼之方式進行飼養，並給予足夠的飲用水，飼養環境為溫度 22-25°C、濕度 55-65% 且設有自動光照循環週期之動物房。試驗前給予小鼠一週適應期，於小鼠六週齡開始進行試驗，試驗為期八週。結束後即進行犧牲，犧牲前先以眼窩採血的方式採集血液樣本，隨後以頸椎脫臼犧牲小鼠，採集樣本包括血清、心臟、肝臟、脾臟、腎臟及皮膚組織。

2. 小鼠致敏模式

試驗利用環境中常見之過敏源塵蟎做為致敏劑誘導異位性皮膚炎。



(1) 腹腔注射

皮膚致敏前天會先給予小鼠體積 200 μ l、濃度為 430 μ g/ml 之塵蟎溶液腹腔注射。配置方式為將塵蟎萃取物粉末回溶於滅菌之 PBS 溶液中，並添加 1 mg/ml 之氫氧化鋁 ($\text{Al}(\text{OH})_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich) 作為佐劑，分裝後儲存於 -80°C 冰箱中。

(2) 皮膚致敏

致敏前先以電動剃毛刀剃除小鼠背部毛髮，並以棉棒塗抹脫毛膏 (Hor Chen fast removal hair cream) 於背部，停留約十分鐘後抹去脫毛膏，利用乾淨的棉棒沾取 PBS 溶液清洗背部再以擦手紙拭淨。去除背部毛髮後，以 3 x 3 公分的 3MTM 防水透氣敷料 (TegadermTM) 在背部重複黏貼十次，模擬異位性皮膚炎之皮膚損傷，再以手術記號筆於背部畫出 1 x 1 公分的方形，最後將含有 50 μ l、濃度為 17.4 mg/ml 塵蟎溶液的紗布以 3MTM 防水透氣敷料固定於背部標記處，再纏繞 3M 通氣膠帶 (NexcareTM) 避免小鼠抓咬。皮膚致敏之塵蟎溶液配置方式為將塵蟎萃取物粉末回溶於滅菌 PBS 溶液中，分裝後儲存於 -80°C 冰箱中。

(四) 測定項目及分析方法

1. 皮膚表觀評分

本試驗以濕疹面積與嚴重程度指數 (Eczema Area and Severity Index, EASI score) 評估小鼠背部誘導異位性皮膚炎之程度，評分症狀包括紅斑 (erythema)、浮腫 (edema)、脫皮 (excoriation) 及苔蘚化 (lichenification)，每個症狀會進行嚴重程度評分，分別為 0 分 (無症狀)、1 分 (輕微)、2 分 (中度) 及 3 分 (嚴重)，評分後再乘上症狀影響之面積係數 (附錄-表 2)，將四個症狀分數加總後即為表觀評分。



2. 血清總 IgE 濃度

(1) 血清製備

第三、六、八週以 4 mm 採血針進行臉頰採血，每隻老鼠收集約 50 μ l 血液至血清微量採血管，將血液靜置於室溫 30 分鐘以上，使血液凝集，再利用離心機以 2000 rpm 之轉速離心 10 分鐘後，抽取血清至 1.5 ml 離心管中，血清樣品保存於 -80°C 冰箱以待日後進行血清總 IgE 濃度分析。

(2) 血清總 IgE 濃度分析

試驗以酵素免疫分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 進行血清總 IgE 濃度分析，使用之商業套組為 IgE mouse uncoated ELISA kit, Invitrogen。分析方法依照套組提供之實驗流程，將 100 μ l 稀釋後的 mouse IgE capture antibody 加入待測 96 孔盤中，置於 4°C 冰箱培養隔夜後，以清洗緩衝液 (wash buffer) 清洗兩次，清除殘餘液體後，將 250 μ l 之阻斷緩衝液 (blocking buffer) 加入待測 well 中，同樣於 4°C 冰箱培養隔夜，再以 wash buffer 清洗兩次，清除殘餘液體後，加入 100 μ l 經稀釋的標準品及血清樣品，培養於室溫兩小時，再以 wash buffer 清洗四次後，加入 100 μ l 的檢測抗體 (detection antibody)，培養於室溫一小時，重複清洗步驟，再加入 100 μ l 經稀釋的辣根過氧化物酶標記鏈黴親和素 (streptavidin-horseradish peroxidase, streptavidin-HRP)，培養於室溫半小時，重複清洗步驟，加入 100 μ l 的反應受質 (substrate)，培養於室溫十五分鐘，最後加入 100 μ l 的終止液 (stop solution) 終止反應，以全光譜光學定量儀測定 450 及 570 nm 吸光值，繪製標準曲線，並依照標準曲線回推樣本總 IgE 之濃度。



3. 皮膚組織切片

第八週小鼠犧牲後，在每隻小鼠背部以手術記號筆標註約 1 x 1 cm 大小的正方形，利用鑷子小心提取皮膚組織，並沿著標註的部位剪下，再將組織平鋪於濾紙上，避免組織樣本捲曲，最後將樣本連同濾紙放入含有 10% 福馬林溶液的 15 ml 離心管固定組織，並製作石蠟切片。

(1) 表皮層厚度

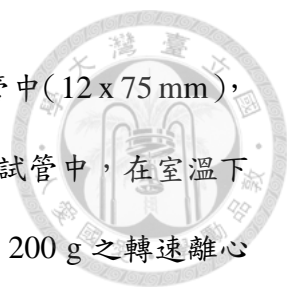
將每個樣本的石蠟空白片進行蘇木素-伊紅染色 (hematoxylin and eosin, H&E stain)，並在光學顯微鏡 200 倍的視野下，每個樣本隨機選取十個視野，測定視野下表皮層最厚的部位，將十個測量值平均為一樣本數據。

(2) 真皮層免疫細胞數目

將同樣以蘇木素-伊紅染色的皮膚組織切片在光學顯微鏡 400 倍的視野下，每個樣本隨機選取十個視野，計算視野下真皮層中免疫細胞浸潤的數目，將十個測量值平均為一樣本數據。

4. 血清相關細胞激素濃度

本試驗利用 BD™ cytometric bead array (CBA) 之商業套組 mouse Th1/Th2/Th17 kit 同時分析血清中多種細胞激素之濃度，包括 IL-2, IL-4, IL6, IFN- γ , TNF, IL-17A 及 IL-10。其定量原理與 ELISA 相似，都是利用三明治 (sandwich) 法來偵測樣品細胞激素濃度，但不同的是 CBA 利用大小相同、螢光強度不同且帶有專一性辨識細胞激素的抗體 (capture antibody) 之微球，來辨識樣品中不同細胞激素，再與 PE 螢光抗體 (detection antibody) 作用，便可藉由流式細胞分析儀偵測各種微珠表現的 PE 平均螢光強度，利用標準品所得到的 PE 平均螢光強度數值便可回推樣品中的細胞激素濃度。分析方法依照套組提供之標準實驗流程，先將標準品以分析稀釋液 (assay diluent) 序列稀釋後，將 50 μ l 不同濃度



之標準品與血清樣品加入含有 50 μ l 混合微珠的 5 ml 圓底試管中(12 x 75 mm)，再將 50 μ l 的 PE 檢測試劑 (PE detection reagent) 加入各圓底試管中，在室溫下避光培養兩小時後，加入 1 ml 的 wash buffer，利用離心機以 200 g 之轉速離心五分鐘後，吸除上清液，再加入 300 μ l 的 wash buffer 並以 pipette 均勻混合後，即可利用流式細胞分析儀 (TCX-LS04) 進行微珠分群，分析不同微珠的 PE 平均螢光強度，所得之數據再利用 CBA 分析軟體 FCAP array 進行分析並計算各樣品中不同細胞激素的濃度。

三、統計分析

本試驗數據以 Prism 6 進行統計分析，採用單向變方分析 (one-way analysis of variance)，並以特其公正顯著差異法 (Tukey's honest significant difference, HSD) 比較各平均值之差異 ($\alpha = 0.05$)。

參、結果



一、抗發炎細胞模式試驗

(一) 細胞存活率

不同濃度的根黴菌發酵萃取物或藻油對於 RBL-2H3 存活率之影響如圖 4 所示。將不同濃度的根黴菌發酵萃取物或藻油分別與 RBL-2H3 培養 24 小時，結果顯示濃度 25 $\mu\text{g/ml}$ 與 50 $\mu\text{g/ml}$ 的根黴菌發酵萃取物與細胞培養 24 小時後，細胞存活率可達 80% 以上；濃度 25 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 、200 $\mu\text{g/ml}$ 與 400 $\mu\text{g/ml}$ 的藻油與細胞培養 24 小時則皆可達 80% 以上的細胞存活率。

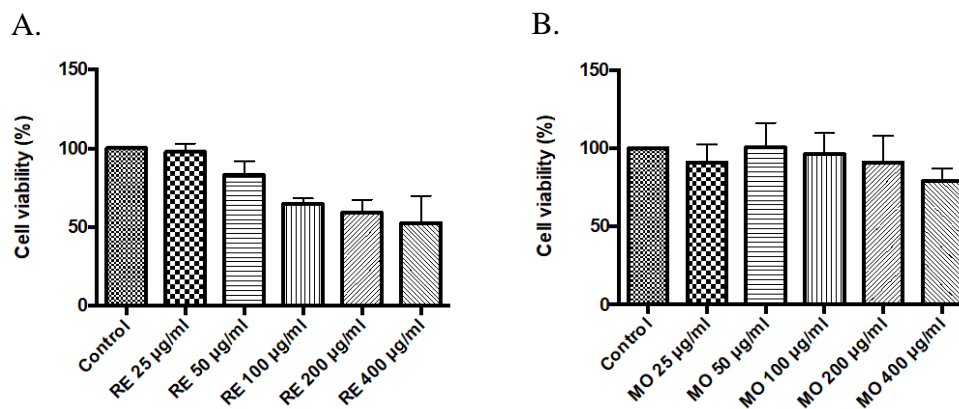
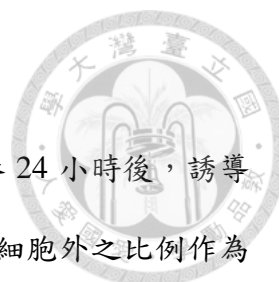


圖 4、不同濃度的根黴菌發酵萃取物或藻油對 RBL-2H3 存活率之影響

Figure 4. Cell viability of RBL-2H3 treated with different concentration of *Rhizopus* fermentation extract (A) or microalgae oil (B) for 24 hours. Mean \pm SEM. (n=3)



(二) 細胞去顆粒化程度

將不同濃度之根黴菌發酵萃取物或藻油與 RBL-2H3 培養 24 小時後，誘導去顆粒化作用，並以酵素 β -hexosaminidase 由細胞內釋放至細胞外之比例作為去顆粒化程度。結果顯示 RBL-2H3 與 25 $\mu\text{g/ml}$ 及 50 $\mu\text{g/ml}$ 的根黴菌發酵萃取物培養 24 小時後，去顆粒化的程度與對照組相比並無顯著差異；RBL-2H3 與 25 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 、200 $\mu\text{g/ml}$ 及 400 $\mu\text{g/ml}$ 的藻油培養 24 小時後，與對照組相比仍無顯著差異（圖 5）。

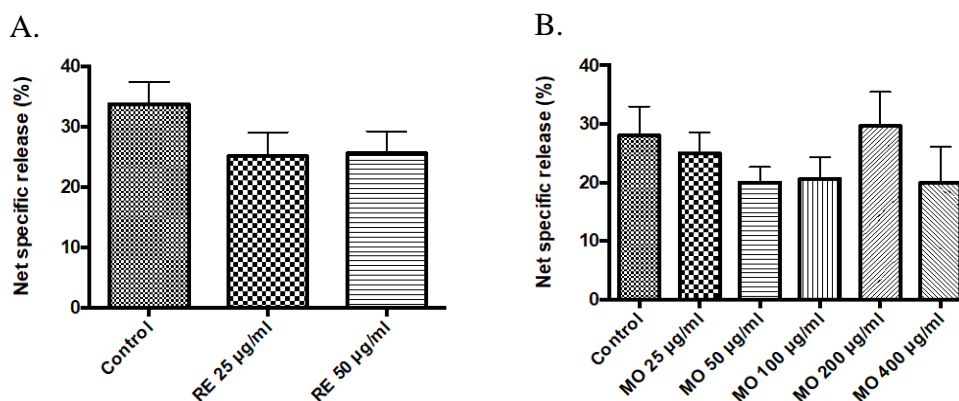


圖 5、根黴菌發酵萃取物或藻油對 RBL-2H3 去顆粒化程度之影響

Figure 5. β -hexosaminidase net specific release of RBL-2H3 treated with different concentration of *Rhizopus* fermentation extract (A) or microalgae oil (B) for 24 hours. Mean \pm SEM. (n=3)



二、異位性皮膚炎動物模式試驗

(一) 皮膚表觀評分

以肉眼觀察小鼠背部皮膚，在試驗第三週塵蟎皮膚致敏後，致敏之正對照組其皮膚較未經致敏之負對照組明顯出現紅腫及結痂，然而給予根黴菌發酵萃取物或藻油後，皮膚紅腫及結痂的狀況有減緩的現象(圖 6)。皮膚表觀評分的結果顯示，正對照組、RE-L 組、RE-M 組及 RE-H 組皮膚症狀嚴重程度顯著高於負對照組，但是 RE-H 組的嚴重程度低於正對照組 ($P < 0.05$) (圖 7-A)；藻油的結果則顯示正對照組、MO-L 組、MO-M 組及 MO-H 組嚴重程度都顯著高於負對照組，然而 MO-L 組的嚴重程度低於正對照組 ($P < 0.05$) (圖 7-B)。由肉眼觀察小鼠背部發現給予根黴菌發酵萃取物或藻油可以降低塵蟎皮膚致敏誘導之症狀。

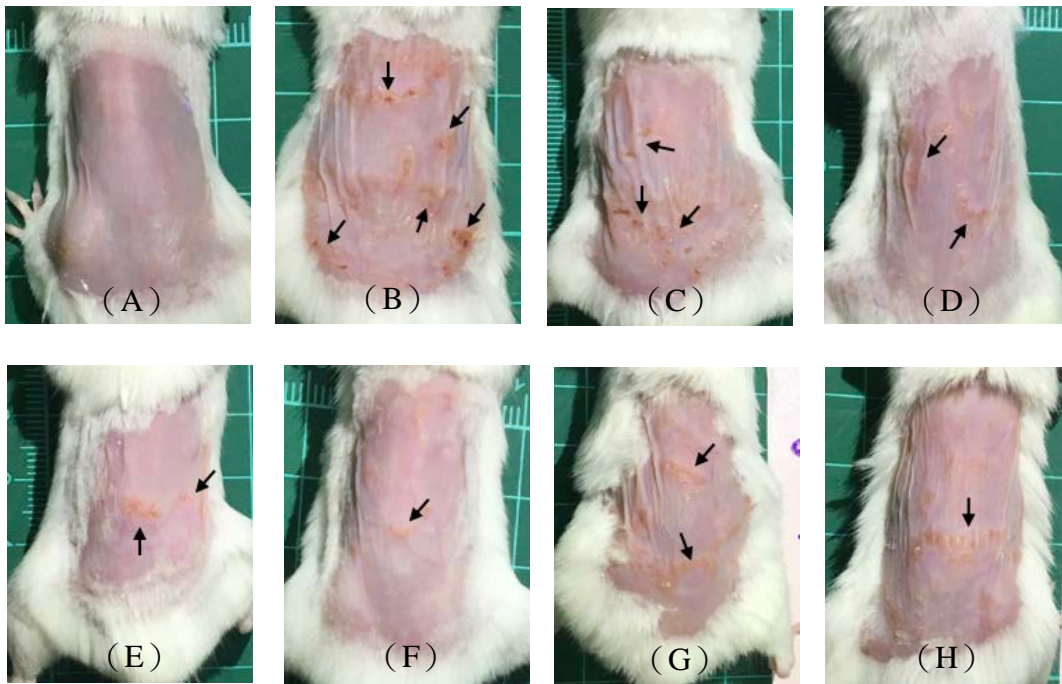


圖 6、試驗第三週各組誘導異位性皮膚炎之症狀

Figure 6. Symptom of induced atopic dermatitis of negative control group (A), positive control group (B), RE-L group (C), RE-M group (D), RE-H group (E), MO-L group (F), MO-M group (G) and MO-H group (H) at 3rd weeks of experiment.

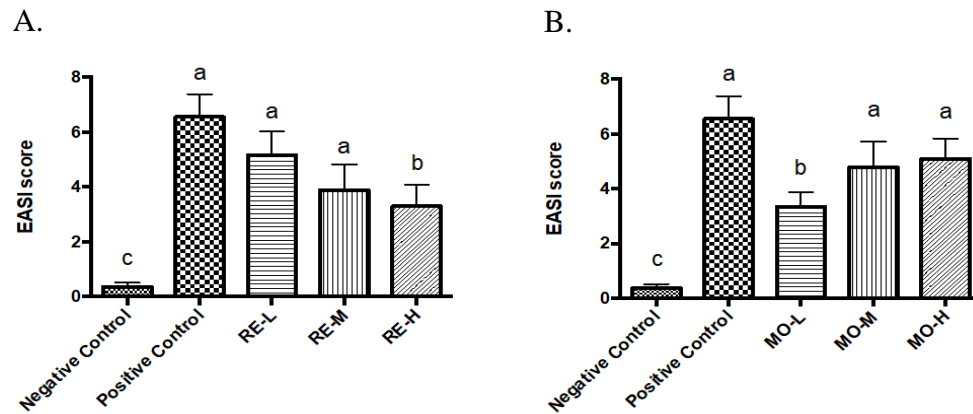


圖 7、根黴菌發酵萃取物或藻油對第三週皮膚表觀評分之影響

Figure 7. Effect of *Rhizopus* fermentation extract (A) or microalgae oil (B) on EASI score of HDM sensitized BALB/c mice at 3rd weeks of experiment. ^{a, b} Means within groups without a common superscript differ significantly ($P < 0.05$). Mean \pm SEM. (n=10)



(二) 內臟重量相對體重百分比

試驗第八週犧牲後，各組心臟、肝臟、脾臟與腎臟重量相對體重百分比，列於表 2。除了腎臟重量相對體重百分比在各組間沒有顯著差異外，心臟、肝臟與脾臟重量相對體重百分比在各組間有顯著差異 ($P < 0.05$)。給予根黴菌發酵萃取物之結果顯示 (表 2-A)，皮膚致敏之正對照組、RE-L 組、RE-M 組及 RE-H 組其肝臟重量相對體重百分比顯著高於未經皮膚致敏之負對照組，正對照組與根黴菌發酵萃取物處理組間則無顯著差異。脾臟重量相對體重百分比也有相似的结果，正對照組及 RE-L 組其脾臟重量相對體重百分比顯著高於負對照組，RE-M 組、RE-H 組與負對照組則沒有顯著差異。給予藻油之結果 (表 2-B) 顯示正對照組肝臟重量相對體重百分比顯著高於負對照組及藻油處理組，負對照組與藻油處理組間則無顯著差異。脾臟重量相對體重百分比則是正對照組及 MO-H 組顯著高於負對照組，MO-L 組、MO-M 組則與負對照組則沒有顯著差異。

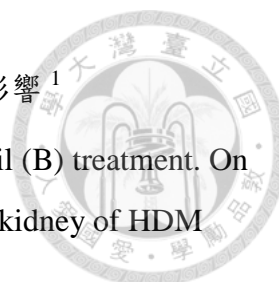


表 2、根黴菌發酵萃取物或藻油對內臟重量相對體重百分比之影響¹

Table 2. Effect of *Rhizopus* fermentation extract (A) or microalgae oil (B) treatment. On relative weights (% body weight) of heart, liver, spleen and kidney of HDM sensitized BALB/c mice.

A.

Organ	Treatment					P-value
	Negative control	Positive control	RE-L	RE-M	RE-H	
Heart	0.55 ^b ± 0.01	0.66 ^a ± 0.02	0.70 ^a ± 0.04	0.65 ^{ab} ± 0.02	0.70 ^a ± 0.03	0.0006
Liver	4.51 ^b ± 0.08	5.34 ^a ± 0.13	5.18 ^a ± 0.14	5.09 ^a ± 0.20	5.09 ^a ± 0.14	0.0016
Spleen	0.39 ^b ± 0.02	0.69 ^a ± 0.03	0.62 ^a ± 0.05	0.58 ^{ab} ± 0.09	0.56 ^{ab} ± 0.05	0.0020
Kidney	1.41 ± 0.02	1.47 ± 0.04	1.5 ± 0.03	1.54 ± 0.05	1.48 ± 0.01	0.1240

B.

Organ	Treatment					P-value
	Negative control	Positive control	MO-L	MO-M	MO-H	
Heart	0.55 ^b ± 0.01	0.66 ^{ab} ± 0.02	0.67 ^{ab} ± 0.03	0.73 ^a ± 0.06	0.72 ^a ± 0.04	0.0030
Liver	4.51 ^b ± 0.08	5.34 ^a ± 0.13	4.74 ^b ± 0.10	4.75 ^b ± 0.16	4.77 ^b ± 0.14	0.0002
Spleen	0.39 ^b ± 0.02	0.69 ^a ± 0.03	0.57 ^{ab} ± 0.03	0.62 ^{ab} ± 0.10	0.75 ^a ± 0.10	0.0012
Kidney	1.41 ± 0.02	1.47 ± 0.04	1.45 ± 0.04	1.50 ± 0.03	1.51 ± 0.04	0.4080

¹ Mean ± SD n=10

^{a, b} Means within groups without a common superscript differ significantly ($P < 0.05$).



(三) 血清總 IgE 濃度

致敏後，以臉頰採血蒐集並製備各組血清測定總 IgE 濃度，結果顯示第三週的血清總 IgE 濃度在負對照組、正對照組及根黴菌發酵萃取物處理組間並無顯著差異（圖 8-A）；然除 MO-L 組及 MO-H 組之血清總 IgE 濃度顯著低於正對照組外，其他處理組間亦無顯著差異（圖 8-B）。第八週的血清總 IgE 濃度結果顯示正對照組血清總 IgE 濃度顯著高於負對照組、根黴菌發酵萃取物處理組及藻油處理組，負對照組、根黴菌發酵萃取物處理組及藻油處理組間則無顯著差異（圖 8-C, D）。

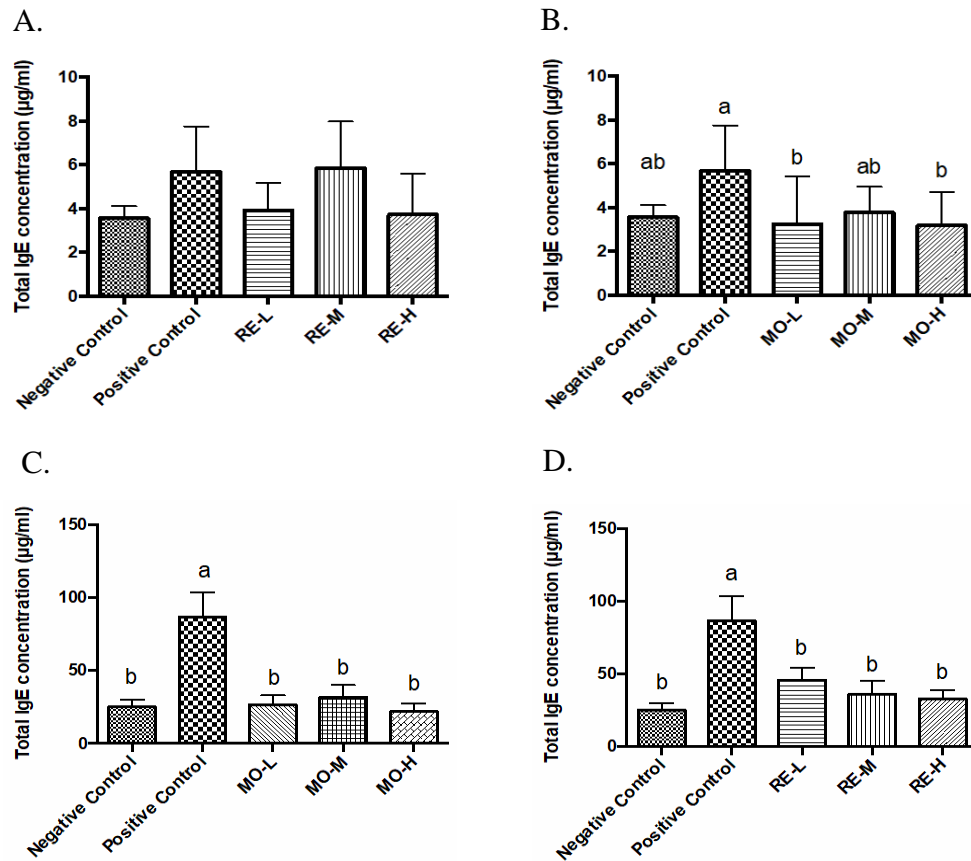


圖 8、根黴菌發酵萃取物或藻油對第三週及第八週血清總 IgE 濃度之影響

Figure 8. Effect of *Rhizopus* fermentation extract or microalgae oil on serum total IgE concentration of HDM sensitized BALB/c mice at 3rd weeks (A, B) and 8th weeks (C, D) of experiment. ^{a, b} Means within groups without a common superscript differ significantly ($P < 0.05$). Mean \pm SEM. (n=10)



(四) 表皮層厚度

根黴菌發酵萃取物或藻油處理對 BALB/c 小鼠表皮層厚度的影響如圖 9 所示，將皮膚組織切片進行蘇木素-伊紅染色，於顯微鏡 200 倍的視野下觀察，以肉眼可見正對照組表皮層較負對照組厚，給予小鼠根黴菌發酵萃取物或藻油後，各處理組表皮層厚度有減少的情形。

在顯微鏡 200 倍的視野下，計算表皮層厚度之結果顯示正對照組與 RE-L 組的表皮層厚度顯著高於負對照組，但是 RE-M 組、RE-H 組表皮層厚度顯著低於正對照組，且 RE-M 組的表皮層厚度與負對照組沒有顯著差異(圖 10-A)；MO-L 組、MO-M 組、MO-H 組表皮層厚度顯著低於正對照組，MO-M 組的表皮層厚度與負對照組也沒有顯著差異(圖 10-B)。

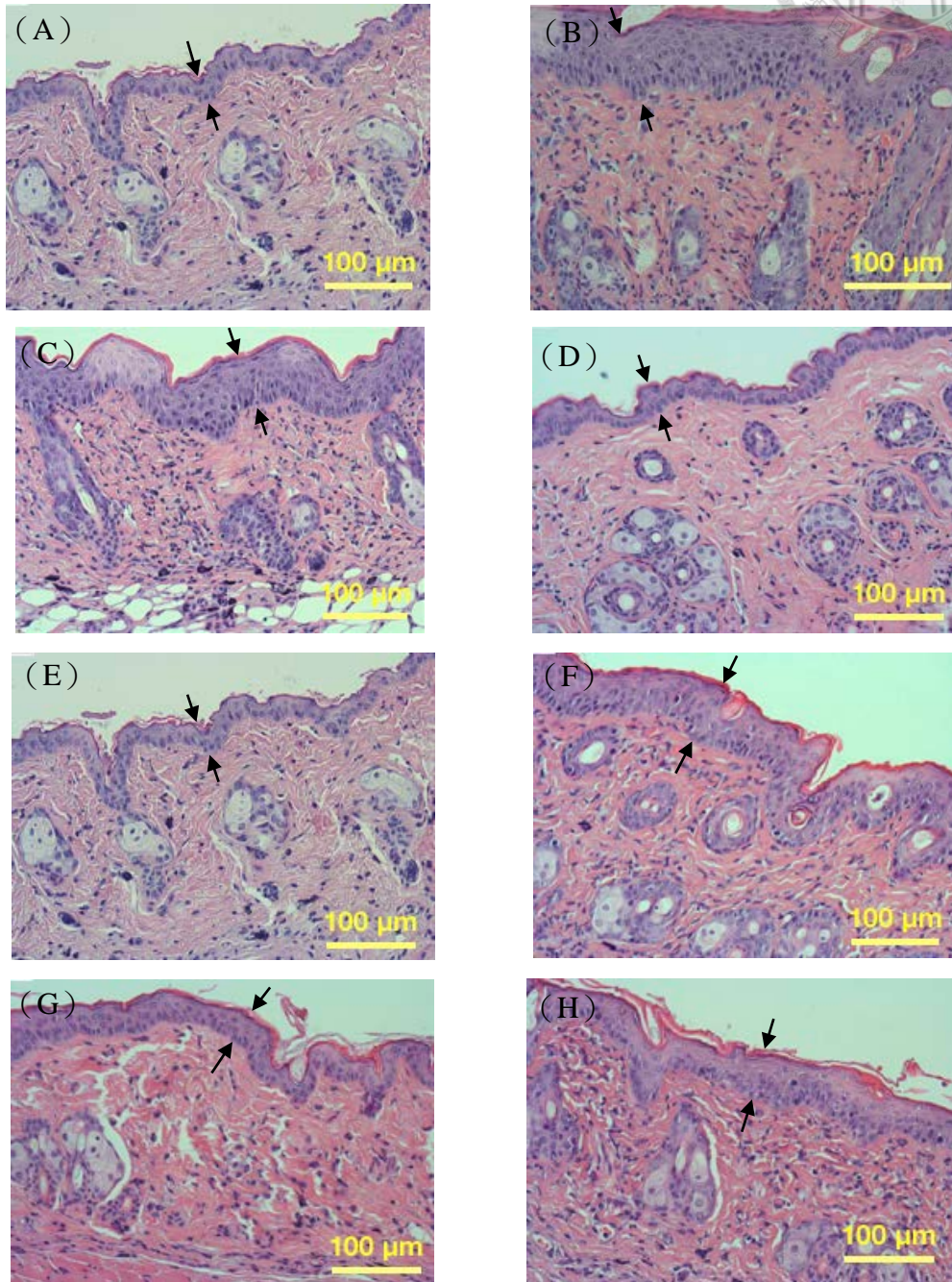
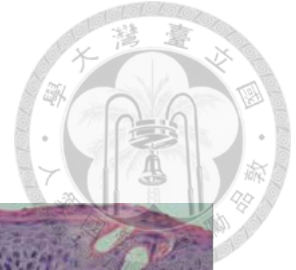


圖 9、試驗第八週各組表皮層厚度

Figure 9. Epidermis thickness of BALB/c mice at 8th weeks of experiment. Negative control group (A), positive control group (B), RE-L group (C), RE-M group (D), RE-H group (E), MO-L group (F), MO-M group (G) and MO-H group (H).

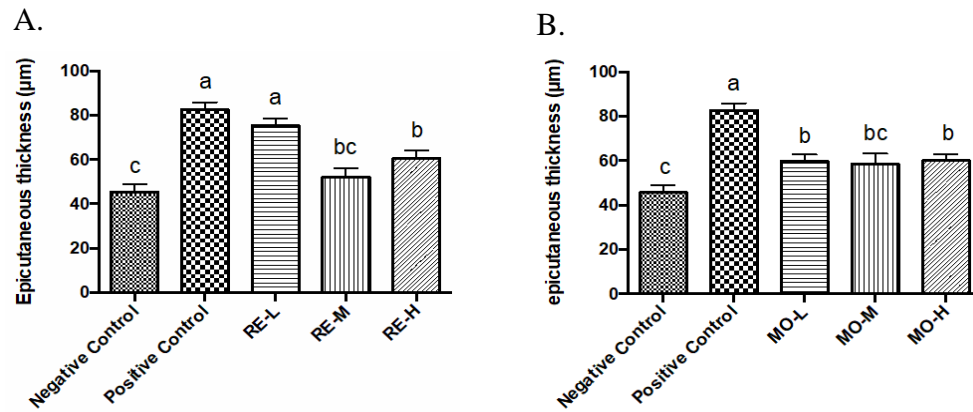


圖 10、根黴菌發酵萃取物或藻油對表皮層厚度之影響

Figure 10. Effect of *Rhizopus* fermentation extract (A) or microalgae oil (B) on epidermis thickness of HDM sensitized BALB/c mice. ^{a, b} Means within groups without a common superscript differ significantly ($P < 0.05$). Mean \pm SEM. (n=10)



(五) 真皮層免疫細胞數目

根黴菌發酵萃取物或藻油處理對 BALB/c 小鼠真皮層免疫細胞數目的影響，以顯微鏡 400 倍的視野下肉眼觀察蘇木素-伊紅染色之皮膚組織切片時，發現正對照組之細胞密度較負對照組密集，給予小鼠根黴菌發酵萃取物或藻油後，除 MO-M 組的細胞密度有較少的現象外，各處理組細胞密度與正對照組並無差異（圖 11）。

在顯微鏡 400 倍的視野下，計算真皮層中免疫細胞數目，結果顯示正對照組與根黴菌發酵萃取物處理組的真皮層免疫細胞數顯著高於負對照組，正對照組與根黴菌發酵萃取物處理組則無顯著差異（圖 12-A）；藻油處理亦得到相似的结果，正對照組與藻油處理組的真皮層免疫細胞數顯著高於負對照組，但是正對照組與藻油處理組則沒有顯著差異（圖 12-B）。

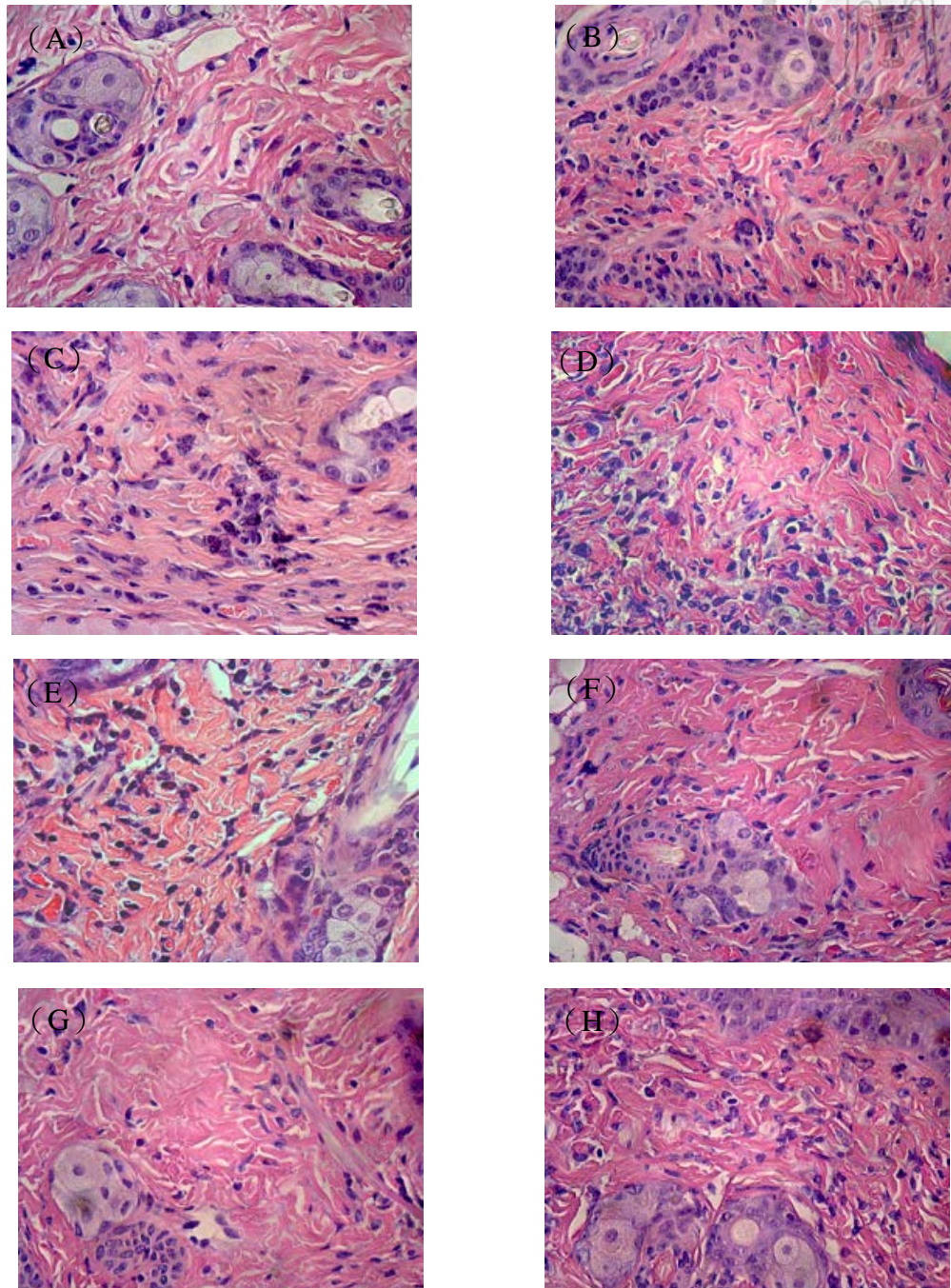


圖 11、試驗第八週各組真皮層免疫細胞浸潤

Figure 11. Immune cell infiltration of dermis of BALB/c mice at 8th weeks of experiment. Negative control group (A), positive control group (B), RE-L group (C), RE-M group (D), RE-H group (E), MO-L group (F), MO-M group (G) and MO-H group (H).

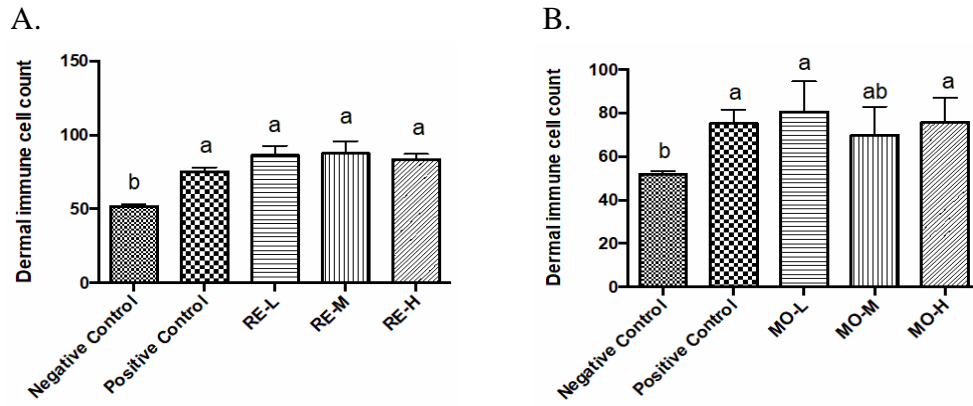


圖 12、根黴菌發酵萃取物或藻油對真皮層免疫細胞數目之影響

Figure 12. Effect of *Rhizopus* fermentation extract (A) or microalgae oil (B) on dermal immune cell count (cell/high power microscopic field) of HDM sensitized BALB/c mice. ^{a, b} Means within groups without a common superscript differ significantly ($P < 0.05$). Mean \pm SEM. (n=10)



(五) 血清相關細胞激素濃度

第八週犧牲採樣測定各組血清中發炎細胞激素、Th2 細胞激素及 Th1 細胞激素的濃度。血清發炎細胞激素包括 IL-6 及 TNF 之濃度，結果顯示負對照組、正對照組及根黴菌發酵萃取物處理組血清中 IL-6 濃度沒有顯著差異（圖 13-A）；然而正對照組的 TNF 濃度顯著高於負對照組，根黴菌發酵萃取物處理組與正對照組及負對照組則沒有顯著差異（圖 13-C）。圖 13-B, D 結果顯示負對照組、正對照組及藻油處理組血清中 IL-6 與 TNF 濃度皆無顯著差異。

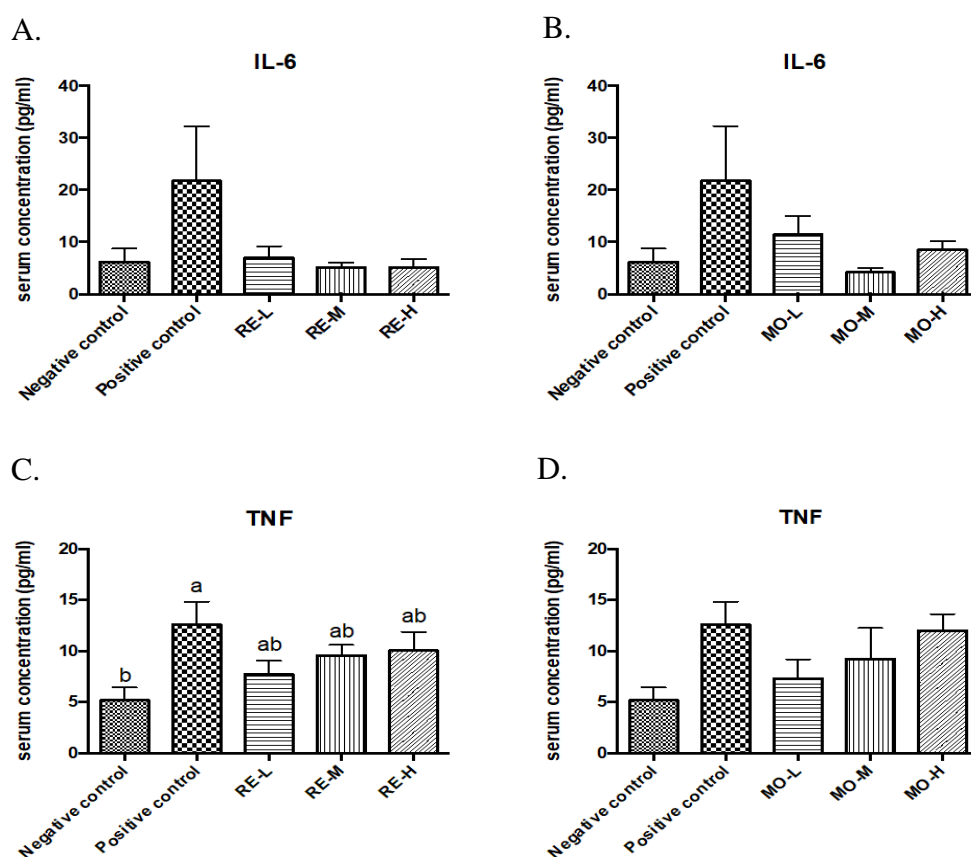


圖 13、根黴菌發酵萃取物或藻油對血清中 IL-6 及 TNF 之影響

Figure 13. Effect of *Rhizopus* fermentation extract or microalgae oil on IL-6 (A) (B) and TNF (C) (D). ^{a, b} Means within groups without a common superscript differ significantly ($P < 0.05$). Mean \pm SEM. (n=10)

測定之 Th2 相關細胞激素包括 IL-4 及 IL-17A，負對照組、正對照組及根黴菌發酵萃取物處理組血清中 IL-4 及 IL-17A 濃度沒有顯著差異（圖 14-A,C）；由圖 14（B,D）結果同樣顯示負對照組、正對照組及藻油處理組血清中 IL-4 及 IL-17 濃度皆無顯著差異。

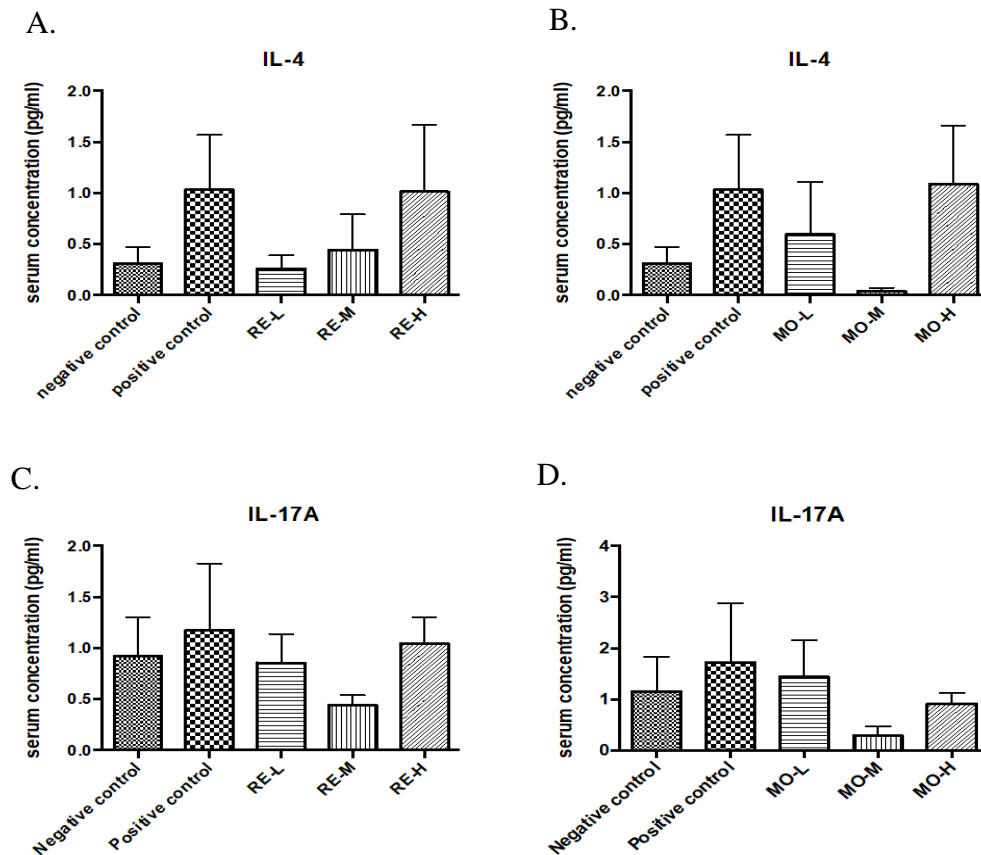


圖 14、根黴菌發酵萃取物或藻油對血清中 IL-4 及 IL-17A 之影響

Figure 14. Effect of *Rhizopus* fermentation extract or microalgae oil on IL-4 (A) (B) and IL-17A (C) (D). ^{a, b} Means within groups without a common superscript differ significantly ($P < 0.05$). Mean \pm SEM. (n=10)

測定之 Th1 相關細胞激素包括 IL-2 及 IFN- γ ，負對照組、正對照組及根黴菌發酵萃取物處理組血清中 IL-2 及 IFN- γ 濃度皆無顯著差異（圖 15-A, C）；藻油的結果則顯示負對照組、正對照組及藻油處理組血清中 IL-2 濃度並無顯著差異（圖 15-B），但是由圖 15（D）可以觀察到 MO-M 組血清中 IFN- γ 濃度顯著低於正對照組，然而負對照組、正對照組、MO-L 組及 MO-H 組血清中 IFN- γ 濃度皆無顯著差異。

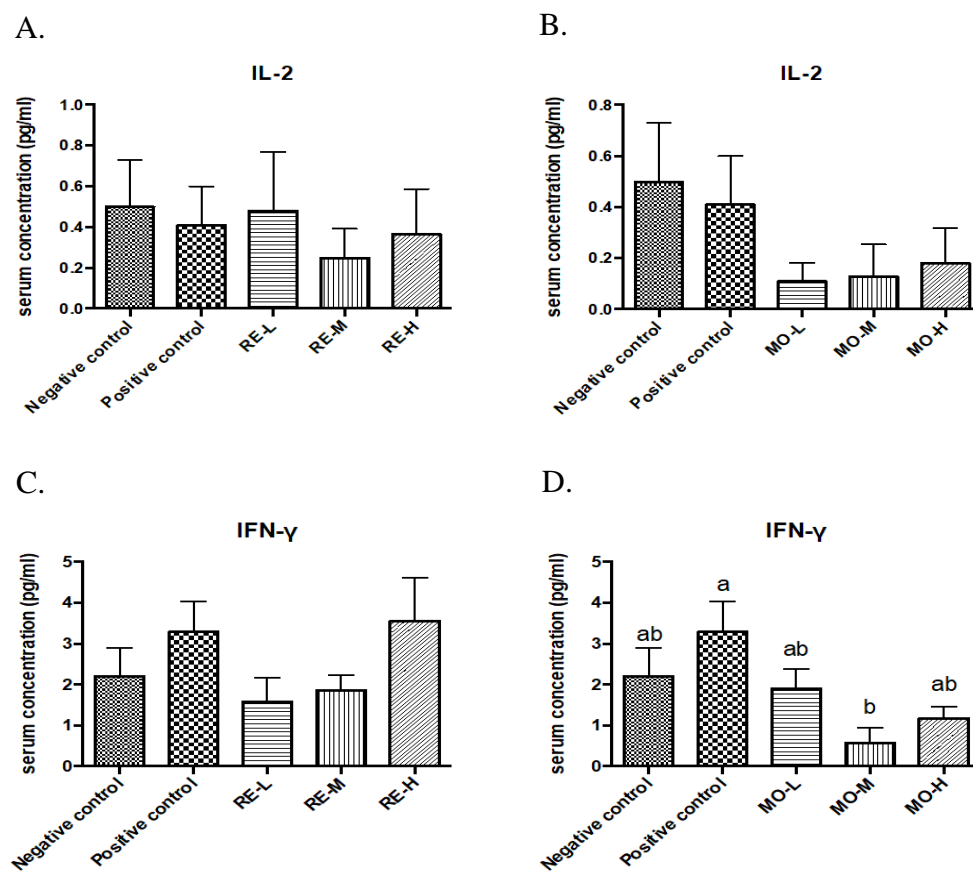


圖 15、根黴菌發酵萃取物或藻油對血清中 IL-2 及 IFN- γ 之影響

Figure 15. Effect of *Rhizopus* fermentation extract or microalgae oil on IL-2 (A) (B) and IFN- γ (C) (D). ^{a, b} Means within groups without a common superscript differ significantly ($P < 0.05$). Mean \pm SEM. (n=10)

肆、討論




一、抗發炎細胞模式試驗

(一) 細胞存活率

根據 ISO (international organization for standardization) 10993-5 (2009) 對於細胞毒性標準之界定，對細胞進行不同處理時，細胞存活率高於 80% 表示處理並未產生細胞毒性 (non cytotoxicity)，存活率介於 80-60% 則表示處理會產生微毒性 (weak cytotoxicity)，存活率介於 60-40% 則具有中等毒性 (moderate cytotoxicity)，存活率在 40% 以下則是具有強烈毒性 (strong cytotoxicity)。本試驗以細胞存活率 80% 作為標準，試驗結果顯示濃度為 25 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 的根黴菌發酵萃取物或 25 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 、200 $\mu\text{g/ml}$ 、400 $\mu\text{g/ml}$ 的藻油與細胞培養 24 小時皆可達 80% 以上的細胞存活率，表示這些處理濃度示並不會造成細胞毒性。

(二) 細胞去顆粒化程度

在不影響 RBL-2H3 細胞存活率的處理濃度下，以濃度 25 $\mu\text{g/ml}$ 及 50 $\mu\text{g/ml}$ 的根黴菌發酵萃取物與細胞培養 24 小時後誘導去顆粒化作用，經過兩種濃度的根黴菌發酵萃取物處理後，細胞去顆粒化的比例與對照組沒有差異，顯示根黴菌發酵萃取物對於 RBL-2H3 經由 Fc ϵ RI 活化之去顆粒化作用並沒有抑制的效果。以 25 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 、200 $\mu\text{g/ml}$ 及 400 $\mu\text{g/ml}$ 的藻油同樣與細胞培養後誘導去顆粒化作用，結果顯示各組細胞去顆粒化程度仍無顯著差異，推測細胞無法以三酸甘油酯的形式利用藻油中的脂肪酸，因此後續使用藻油中主要的脂肪酸 DHA 進行試驗 (附錄-圖 1)，雖然以四種濃度的 DHA 處理後，細胞去顆粒化的比例與對照組沒有差異，但是可以觀察到隨著 DHA 的濃度上升，去顆粒化的比例有下降的趨勢 ($P < 0.1$)，顯示 DHA 或許可以降低 RBL-



2H3 經由 FcεRI 活化的去顆粒化作用，減少發炎介質釋放並減緩發炎反應。過去的研究指出 ω3 多元不飽和脂肪酸可以抑制肥大細胞發炎介質的釋放，如 EPA 能夠抑制人類臍帶源肥大細胞 human primary umbilical cord-derived mast cells 之 PGD₂ 產生 (Obata et al., 1999)，EPA 及 DHA 能夠減少 MC/9 mouse mast cells 之 LTB₄、LTC₄ 以及組織胺釋放 (Ishihara et al., 1998)，雖然文獻中並沒有特別探討肥大細胞細胞膜脂肪酸組成的改變，但是推測 ω3 多元不飽和脂肪酸可以合併至肥大細胞的細胞膜中，改變細胞膜的流動性，干擾肥大細胞表面受體 FcεRI 的活化，減少發炎介質釋放 (Calder, 2013)



二、異位性皮膚炎動物模式試驗

(一) 皮膚表觀評分


試驗第三週進行第一次塵蟎皮膚致敏後，以濕疹面積與嚴重程度指數進行皮膚症狀評分，未經致敏的負對照組症狀評分顯著低於經過致敏的正對照組，顯示以皮膚致敏成功誘導出異位性皮膚炎的症狀。結果顯示根黴菌發酵萃取物處理組其症狀評分有隨著給予劑量增加而有下降的趨勢，RE-H 組症狀評分顯著低於正對照組；藻油的結果則顯示，給予低劑量的藻油能顯著降低症狀評分。由此可以初步推測給予根黴菌發酵萃取物及藻油具有減緩症狀的潛力。

(二) 內臟重量相對體重百分比

內臟重量相對體重百分比的結果顯示，除了腎臟重量相對體重百分比沒有顯著差異外，心臟、肝臟及脾臟重量相對體重百分比在各組間有顯著差異。結果顯示經皮膚致敏的正對照組其免疫器官包括肝臟及脾臟相對體重百分比皆顯著高於未經皮膚致敏的負對照組 ($P < 0.05$)，較高的免疫器官相對體重百分比可能代表有較多的抗原進入體內活化免疫反應 (Zhong et al., 2018)，給予根黴菌發酵萃取物的小鼠雖然肝臟及脾臟重量相對體重百分比與正對照組沒有顯著差異，但是數值有隨處理劑量增加而下降的現象；藻油的結果顯示藻油處理組肝臟相對體重百分比都顯著低於正對照組且與負對照組沒有差異，MO-L 組及 MO-M 組脾臟相對體重百分比與負對照組亦沒有差異。正對照組、根黴菌發酵萃取物及藻油處理組雖然給予相同劑量的塵蟎致敏，但由免疫器官相對體重百分比結果可以推論測予根黴菌發酵萃取物或藻油或許可以減少過敏原活化免疫反應。

(三) 血清總 IgE 濃度


重複給予塵蟎皮膚致敏會提升 BALB/c 小鼠血清總 IgE 濃度



(Matsuoka et al., 2003)。試驗第三週致敏後小鼠血清總 IgE 濃度在各組間沒有顯著差異，到了第八週可以觀察到，經皮膚致敏的正對照組血清總 IgE 濃度顯著高於未經致敏的負對照組，顯示以塵蟎皮膚致敏成功活化 Th2 免疫反應，進而活化 B 細胞產生抗體類型轉換，分泌 IgE 引發過敏反應。然而給予小鼠低、中、高劑量的根黴菌發酵萃取物或藻油後，試驗第八週血清總 IgE 濃度皆顯著低於正對照組，且與負對照沒有顯著差異，顯示根黴菌發酵萃取物或藻油可以抑制 B 細胞產生 IgE。B 細胞產生 IgE 前需要經過 T 細胞及微環境中 IL-4 的活化 (Geha et al., 2003)，研究顯示 DHA 可以抑制 T 細胞及 IL-4 活化人類初代 B 細胞的訊息傳遞路徑，使 B 細胞無法被活化產生抗體類型轉換分泌 IgE (Weise et al., 2011)，由於藻油中含豐富的 DHA，因此推測 DHA 可能為抑制 IgE 產生的有效成分，然而根黴菌發酵萃取物抑制 IgE 產生的有效物質及作用機制仍有待研究探討。

(三) 表皮層厚度

異位性皮膚炎患者皮膚組織切片中可以觀察到表皮層增厚的情形，接觸過敏源會活化 Th2 反應，產生 Th2 細胞激素包括 IL-4 及 IL-13，細胞激素會促使皮膚成纖維細胞 (fibroblast) 產生胞外蛋白質 periostin (Izuhara et al., 2017)，角質細胞也會分泌 IL-1 β ，periostin 及 IL-1 β 會作用於皮膚成纖維細胞，使成纖維細胞分泌 IL-6 促使角質細胞的分化與增生，造成表皮層增厚 (Arima et al., 2015)。塗抹塵蟎過敏源於 BALB/c 小鼠皮膚上可使表皮層增厚 (Huang et al., 2003)，模擬異位性皮膚炎的症狀。第八週犧牲後，採取小鼠背部皮膚組織，在顯微鏡 200 倍的視野下觀察計算表皮層的厚度，結果顯示經皮膚致敏的正對照組表皮層厚度顯著高於負對照組，顯示塵蟎皮膚致敏成功誘導出異位性皮膚炎的症狀。給予小鼠低、中、高劑量的根黴菌發酵萃取物或藻油後，除了 RE-L 組




之表皮層厚度與正對照組沒有顯著差異外，其他處理組表皮層厚度皆顯著低於正對照組 ($P < 0.05$)，由此推論給予根黴菌發酵萃取物或藻油或許可以透過調節細胞激素或 periostin 的產生減緩誘導異位性皮膚炎的表皮層增生。

(四) 真皮層免疫細胞數目

異位性皮膚炎患者的皮膚切片中可以觀察到真皮層免疫細胞浸潤，異位性皮膚機械性損傷及皮膚組織缺陷促使皮膚組織合成促發炎因子如 IL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α ，趨化因子 (chemokine) 如 CCL2、CCL5、CCL17 等，這些細胞激素或趨化因子可以增加血管內皮細胞對於血液中免疫細胞的黏著與通透性，使免疫細胞如巨噬細胞、嗜酸性球、嗜鹼性球、嗜中性球、CD4+ 及 CD8+ T 細胞等可以穿越血管內皮浸潤到組織中，加劇組織發炎反應 (Werfel, 2009)。塗抹塵蟎過敏原於 BALB/c 小鼠同樣也能觀察到真皮層免疫細胞的浸潤 (Huang et al., 2003)，模擬異位性皮膚炎的症狀。小鼠皮膚組織在顯微鏡 400 倍的視野下觀察計算真皮層免疫細胞的數目，結果顯示經皮膚致敏的正對照組真皮層免疫細胞數目顯著高於未經致敏的負對照組 ($P < 0.05$)，但是給予根黴菌發酵萃取物或藻油的組別其真皮層免疫細胞數目與正對照組沒有顯著差異，然而研究指出 $\omega 3$ 多元不飽和脂肪酸 EPA 及 DHA 可以降低血管內皮細胞黏著蛋白表現與巨噬細胞、嗜中性球及 T 細胞趨化性 (chemotaxis)，減少免疫細胞浸潤至皮膚 (Calder, 2013)，與本試驗的研究結果不符，推測本研究使用蘇木素-伊紅染色的部位為整體的免疫細胞，無法準確計算不同類型免疫細胞的數目的多寡，以整體真皮層免疫細胞的數目計算可能較不準確。

(五) 血清相關細胞激素濃度

當過敏原進入組織中，會誘發組織內的抗原呈現細胞及發炎細胞如肥大細胞、嗜酸性球、嗜鹼性球釋放發炎細胞激素，加劇組織的發炎反應並招集更多



免疫細胞進入組織中。發炎細胞激素的結果可以觀察到血清中 IL-6 的濃度在各組間沒有顯著差異，但是正對照組的濃度數值偏高，正對照組 TNF 的濃度則顯著高於負對照組，顯示給予塵蟎萃取物會促進體內的發炎反應，然而各處理組的濃度數值雖然較低，但與正對照組相比仍無顯著差異。Th2 免疫反應在異位性皮膚炎的致病機轉也扮演重要的角色，接觸過敏原後會產生傾向於 Th2 的免疫反應，分泌 Th2 相關細胞激素如 IL-4、IL-5、IL-13 及 IL-17A 等，幫助 Th2 的分化及維持並促使 B 細胞活化。由 Th2 相關細胞激素結果中可以觀察到各組別血清 IL-4 與 IL17A 濃度沒有顯著差異，但是正對照組的 IL-4 與 IL-17A 的濃度數值與負對照組相比都偏高，顯示給予塵蟎萃取物皮膚致敏可能有誘導出 Th2 免疫反應，但是由於各組別之標準誤高無法計算出差異。由於異位性皮膚炎傾向於 Th2 免疫反應，因此會出現 Th1 及 Th2 免疫失衡的情形，導致 Th1 細胞激素受到抑制，但是由結果可以看到正對照組與負對照組血清中 Th1 相關細胞激素 IL-2 及 IFN γ 濃度沒有顯著差異，根據研究指出異位性皮膚炎患者在後期亦會產生 Th1 免疫反應 (Bieber, 2008)，導致相關細胞激素濃度上升，這可能是造成正對照組及負對照組 Th1 相關細胞激素沒有差異的原因，由處理組的結果可以觀察到給予根黴菌發酵萃取物對於血清中 Th1 相關細胞激素的濃度沒有顯著差異；給予藻油的組別其 Th1 相關細胞激素的濃度與對照組雖然沒有顯著差異，但是 IL-2 的濃度與對照組相比數值偏低，此結果與前人的研究結果相似，DHA 可以抑制 T 細胞增生及 Th1 細胞激素 IL-2 產生 (McMurray et al., 2000)，然而在試驗中由於各組別標準誤高無法計算出差異性。

伍、結論


本試驗以細胞試驗及動物試驗檢測根黴菌發酵萃取物及藻油對於過敏性疾病異位性皮膚炎的影響，細胞實驗顯示根黴菌發酵萃取物及藻油未能有效抑制去顆粒化作用，然動物試驗的結果顯示給予根黴菌發酵萃取物及藻油可顯著降低小鼠在第八週血清總 IgE 的濃度以及表皮層增生 ($P < 0.05$)。

由上述結果顯示，根黴菌發酵萃取物及藻油具有抗過敏的潛力，可以開發作為膳食補充或添加至伴侶動物飼料中，用於日常皮膚保健或輔佐異位性皮膚炎之治療。

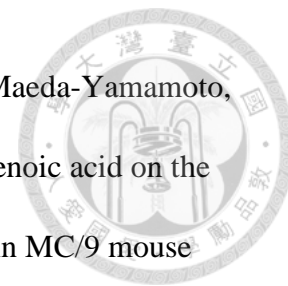
参考文献



- 堂ヶ崎知格、福岡秀雄、牛越設男、牛越建治。2001。マイトジェン活性を発見する生理活性物質。日本公開特許公報 特開 2001-78796。
- 藍鈺登、林美峰。2017。根黴菌發酵萃取出物對公日本鵝鶉性徵表現之影響。中畜會誌。46(4)：343-360。
- Ando, T., K. Matsumoto, S. Namiranian, H. Yamashita, H. Glatthorn, M. Kimura, B. R. Dolan, J. J. Lee, S. J. Galli, and Y. Kawakami. 2013. Mast cells are required for full expression of allergen/SEB-induced skin inflammation. *J Invest Dermatol.* 133(12) :2695-2705.
- Arima, K., S. Ohta, A. Takagi, H. Shiraishi, M. Masuoka, K. Ontsuka, H. Suto, S. Suzuki, K. Yamamoto, M. Ogawa, O. Simmons, Y. Yamaguchi, S. Toda, M. Aihara, S. Conway, S. Ikeda and K. Izuhara. 2015. Periostin contributes to epidermal hyperplasia in psoriasis common to atopic dermatitis. *Allergol Int.* 64(1):41-48.
- Barton, D., H. HogenEsch, and F. Weih. 2000. Mice lacking the transcription factor RelB develop T cell-dependent skin lesions similar to human atopic dermatitis. *Eur J Immunol.* 30(8):2323-2332.
- Bieber, T. 2008. Atopic dermatitis. *N Engl J Med.* 358(14):1483-1494. Doi: 10.1056/NEJMra074081.
- Bhandari, R. K., I. Ushikoshi, H. Fukuoka, N. Koide, K. Yamauchi, and H. Ueda. 2002. Effects of *Rhizopus* extract administration on somatic growth and sexual maturation in lacustrine sockeye salmon *Oncorhynchus nerka*. *Fisheries Sci.* 68(4):776-782.

- 
- Calder, P. C. 2013. N-3 fatty acids, inflammation and immunity: new mechanisms to explain old actions. *Proc Nutr Soc.* 72(3):326-336.
- Carter, C. G., M. P. Bransden, T. E. Lewis, and P. D. Nichols. 2003. Potential of thraustochytrids to partially replace fish oil in Atlantic salmon feeds. *Mar Biotechnol.* 5(5):480-492.
- Franklin, S. T., K. R. Martin, R. J. Baer, D. J. Schingoethe, and A. R. Hippen. 1999. Dietary marine algae (*Schizochytrium* sp.) increases concentrations of conjugated linoleic, docosahexaenoic and transvaccenic acids in milk of dairy cows. *J Nutr.* 129(11):2048-2054.
- Geha, R. S., H. H. Jabara, and S. R. Brodeur. 2003. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat Rev Immunol.* 3(9):721-732.
- Matsuoka, H., N. Maki, S. Yoshida, M. Arai, J. Wang, Y. Oikawa, T. Ikeda, N. Hirota, H. Nakagawa, and A. Ishii. 2003. A mouse model of the atopic eczema/dermatitis syndrome by repeated application of a crude extract of house-dust mite *Dermatophagoides farinae*. *Allergy* 58(2):139-145.
- Hillier, A., and C. E. Griffin. 2001. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): incidence and prevalence. *Vet Immunol Immunop.* 81(3-4):147-151.
- Huang, C. H., I. C. Kuo, H. Xu, K. Y. Chua, and Y. S. Lee. 2003. Mite allergen induces allergic dermatitis with concomitant neurogenic inflammation in mouse. *J Invest Dermatol.* 121(2):289-293.
- International organization of standard. 2009. Biological evaluation of medical devices- part 5: tests for in vitro cytotoxicity. ISO 10993-5. 3rd ed. ISO copyright offices, Switzerland.

Ishihara, K., M. Murata, M. Kaneniwa, H. Saito, K. Shinohara, M. Maeda-Yamamoto, K. Kawasaki, and T. Ooizumi. 1998. Effect of tetracosahexaenoic acid on the content and release of histamine, and eicosanoid production in MC/9 mouse mast cell. *Lipids*. 33(11):1107-1114.



Izuhara, K., S. Nunomura, Y. Nanri, M. Ogawa, J. Ono, Y. Mitamura, and T. Yoshihara. 2017. Periostin in inflammation and allergy. *Cell Mol Life Sci*. 74(23):4293-4303.

Jin, H., R. He, M. Oyoshi, and R. S. Geha. 2009. Animal models of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 129(1):31-40.

Junqueira, L. C., and A. L. Mescher. 2013. *Junqueira's basic histology: text & atlas*. Page 806. 13th ed. McGraw Hill Medical, New York.

Kang, J. X., and K. H. Weylandt. 2008. Modulation of inflammatory cytokines by omega-3 fatty acids. Page 133-143 in *Lipids in Health Disease*. Subcellular Biochemistry, vol 49. P. J. Quinn and X. Wang ed. Springer Science+Business Media B.V.

Kohara, Y., K. Tanabe, K. Matsuoka, N. Kanda, H. Matsuda, H. Karasuyama, and H. Yonekawa. 2001. A major determinant quantitative-trait locus responsible for atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice is located on Chromosome 9. *Immunogenetics*. 53(1):15-21.

Kong, W., J.-H. Yen, and D. Ganea. 2011. Docosahexaenoic acid prevents dendritic cell maturation, inhibits antigen-specific Th1/Th17 differentiation and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun*. 25(5):872-882.



Laouini, D., S. Kawamoto, A. Yalcindag, P. Bryce, E. Mizoguchi, H. Oettgen, and R. S.

Geha. 2003. Epicutaneous sensitization with superantigen induces allergic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 112(5):981-987.

Li, X.-M., G. Kleiner, C.-K. Huang, S. Y. Lee, B. Schofield, N. A. Soter, and H. A.

Sampson. 2001. Murine model of atopic dermatitis associated with food hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol.* 107(4):693-702.

Matsumoto, K., K. Mizukoshi, M. Oyobikawa, H. Ohshima, and H. Tagami. 2004.

Establishment of an atopic dermatitis-like skin model in a hairless mouse by repeated elicitation of contact hypersensitivity that enables to conduct functional analyses of the stratum corneum with various non-invasive biophysical instruments. *Skin Res Technol.* 10(2):122-129.

McMurray, D. N., C. A. Jolly, and R. S. Chapkin. 2000. Effects of dietary n-3 fatty

acids on T cell activation and T cell receptor-mediated signaling in a murine model. *J Infect Dis.* 182(Suppl. 1):S103-S107.

Miller, M. R., P. D. Nichols, and C. G. Carter. 2007. Replacement of fish oil with

thraustochytrid *Schizochytrium* sp. L oil in Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L) diets. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 148(2):382-392.

Novak, N. 2012. An update on the role of human dendritic cells in patients with atopic

dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 129(4):879-886.

Nutten, S. 2015. Atopic dermatitis: global epidemiology and risk factors. *Ann Nutr*

Metab. 66(Suppl. 1):8-16.

Obata, T., T. Nagakura, T. Masaki, K. Maekawa, and K. Yamashita. 1999.

Eicosapentaenoic acid inhibits prostaglandin D2 generation by inhibiting cyclo-oxygenase-2 in cultured human mast cells. *Clin Exp Allergy*. 29(8):1129-1135.

Parham, P. 2009. *The Immune System*. Page 1-28. 4th ed. Garland Science.

Peng, W., and N. Novak. 2015. Pathogenesis of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy*. 45(3):566-574.

Qu, Q., W. Xuan, and G. H. Fan. 2015. Roles of resolvins in the resolution of acute inflammation. *Cell Biol Int*. 39(1):3-22.

Ross, M. H., and W. Pawlina. 2006. *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. Page 443-446. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins.

Saridomichelakis, M. N., and T. Olivry. 2016. An update on the treatment of canine atopic dermatitis. *Vet J*. 207:29-37.

Serhan, C. N., N. Chiang, and T. E. Van Dyke. 2008. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol*. 8(5):349-361. Doi: 10.1038/nri2294.

Spergel, J. M., E. Mizoguchi, J. P. Brewer, T. R. Martin, A. K. Bhan, and R. S. Geha. 1998. Epicutaneous sensitization with protein antigen induces localized allergic dermatitis and hyperresponsiveness to methacholine after single exposure to aerosolized antigen in mice. *J Clin Invest*. 101(8):1614-1622.

Stulnig, T. M., and M. Zeyda. 2004. Immunomodulation by polyunsaturated fatty acids: impact on T-cell signaling. *Lipids*. 39(12):1171-1175.



Suzuki, T., H. Fukuoka, S. Ushikoshi, and H. Morita. 2007. Potency of water extracts of *Rhizopus oryzae* on the Salmonella infection rat. *Food Sci Technol Res.*

13(3):235-240

Suzuki, T., H. Fukuoka, S. Ushikoshi, R. Sato, H. Morita, and T. Takizawa. 2015.

Protective effect of aqueous extracts from *Rhizopus oryzae* on liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Animal Sci. J.* 86(5):532-540. Doi:

10.1111/asj.12328.

Tang, T. S., T. Bieber, and H. C. Williams. 2014. Are the concepts of induction of remission and treatment of subclinical inflammation in atopic dermatitis clinically useful? *J Allergy Clin Immunol.* 133(6):1615-1625.

Thyssen, J. P., and S. Kezic. 2014. Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.*

134(4):792-799.

Tsukuba, T., K. Okamoto, Y. Okamoto, M. Yanagawa, K. Kohmura, Y. Yasuda, H.

Uchi, T. Nakahara, M. Furue, and K. Nakayama. 2003. Association of cathepsin E deficiency with development of atopic dermatitis. *J. Biochem.* 134(6):893-

902.

Tull, S. P., C. M. Yates, B. H. Maskrey, V. B. O'Donnell, J. Madden, R. F. Grimble, P.

C. Calder, G. B. Nash, and G. E. Rainger. 2009. Omega-3 Fatty acids and inflammation: novel interactions reveal a new step in neutrophil recruitment.

PloS Biol. 7(8):e1000177. Doi: 10.1371/journal.pbio.1000177.

Vestergaard, C., H. Yoneyama, M. Murai, K. Nakamura, K. Tamaki, Y. Terashima, T.

Imai, O. Yoshie, T. Irimura, H. Mizutani and K. Matsushina. 1999.

Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *J Clin Invest.* 104(8):1097-1105.

Wada, M., C. J. DeLong, Y. H. Hong, C. J. Rieke, I. Song, R. S. Sidhu, C. Yuan, M.

Warnock, A. H. Schmaier, C. Yokoyama, E. M. Smyth, S. J. Wilson, G. A.

FitzGerald, R. M. Garavito, D. X. Sui, J. W. Regan, and W. L. Smith. 2007.

Enzymes and receptors of prostaglandin pathways with arachidonic acid-derived *versus* eicosapentaenoic acid-derived substrates and products. *J Biol Chem.* 282(31):22254-22266.

Weise, C., K. Hilt, M. Milovanovic, D. Ernst, R. Rühl, and M. Worm. 2011. Inhibition of IgE production by docosahexaenoic acid is mediated by direct interference with STAT6 and NFκB pathway in human B cells. *J Nutr Biochem.* 22(3):269-275.

Werfel, T. 2009. The role of leukocytes, keratinocytes, and allergen-specific IgE in the development of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 129(8):1878-1891.

Zouboulis, C. C. 2000. Human skin: an independent peripheral endocrine organ. *Horm Res Paediatr.* 54(5-6):230-242.

Zhong, Y., X. Zhang, X. Hu, and Y. Li. 2018. Effects of repeated lipopolysaccharide treatment on growth performance, immune organ index, and blood parameters of Sprague-Dawley rats. *J Vet Res.* 62(3):341-346.

附 錄



附表 1、藻油脂肪酸比例

Appendix 1. Fatty acid composition of microalgae oil.

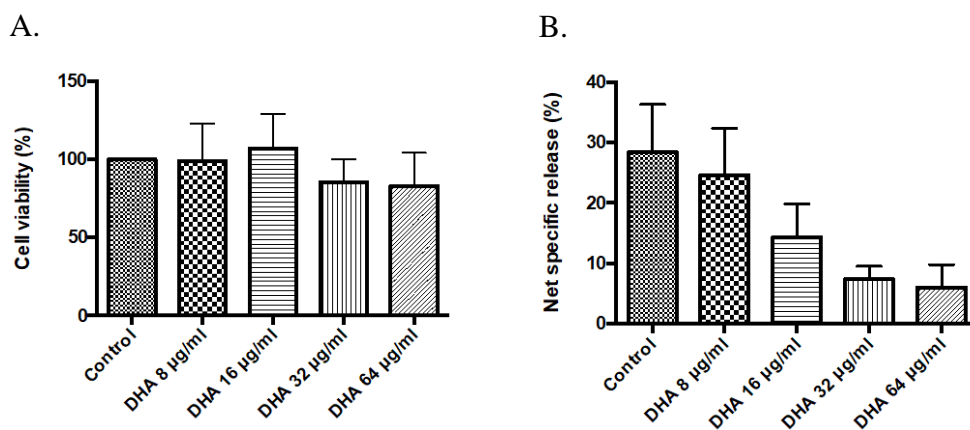
脂肪酸 (Fatty acid)	比例 (%)
月桂酸 (Lauric acid)	0.11
十四酸 (Myristic acid)	2.41
十五脂酸 (Pentadecanoic acid)	0.13
棕櫚酸 (Palmitic acid)	25.38
棕櫚油酸 (Palmitoleic acid)	0.20
硬脂酸 (Stearic acid)	1.19
6-trans-Octadecenoic acid	0.24
油酸 (9-cis-Oleic acid)	0.45
次亞麻油酸 (9,12,15-cis-Alpha-Linolenic acid)	0.27
8,11,14-cis-Eicosatrienoic acid	0.21
11,14,17-cis-Eicosatrienoic acid	0.88
花生油酸 (5,8,11,14-cis-Arachidonic acid)	0.26
Tricosanoic acid	0.85
二十碳五烯酸 (5,8,11,14,17-cis-Eicosapentaenoic acid, EPA)	1.13
4,7,10,13,16,19-cis-Docosapentaenoic acid	12.26
二十二碳六烯酸 (4,7,10,13,16,19-cis-Docosahexaenoic acid, DHA)	54.04



附表 2、症狀影響面積係數

Appendix 2. Score of extent of eczema in the body region.

Area %	0	1-9	10-29	20-49	50-69	70-89	90-100
Score	0	1	2	3	4	5	6



附圖 3、不同濃度 DHA 對 RBL-2H3 存活率與去顆粒化程度之影響

Appendix 3. Cell viability (A) and β -hexosaminidase net specific release (B) of RBL-2H3 treated. with different concentration of DHA.

小 傳

本文作者黃淳珮，民國 83 年 1 月 27 日出生於新北市，先後畢業於新北市景新國小、台北市南門國中及師大附中。於民國 102 年考取國立臺灣大學動物科學技術學系，並於民國 106 年考取國立臺灣大學動物科學技術學研究所。在學期間承蒙恩師 林美峰博士之悉心指導，於民國 108 完成此論文。

