

乳酸菌合併蛹蟲草用於改善老年寵物代謝相關疾病與腸道菌群之保健產品開發

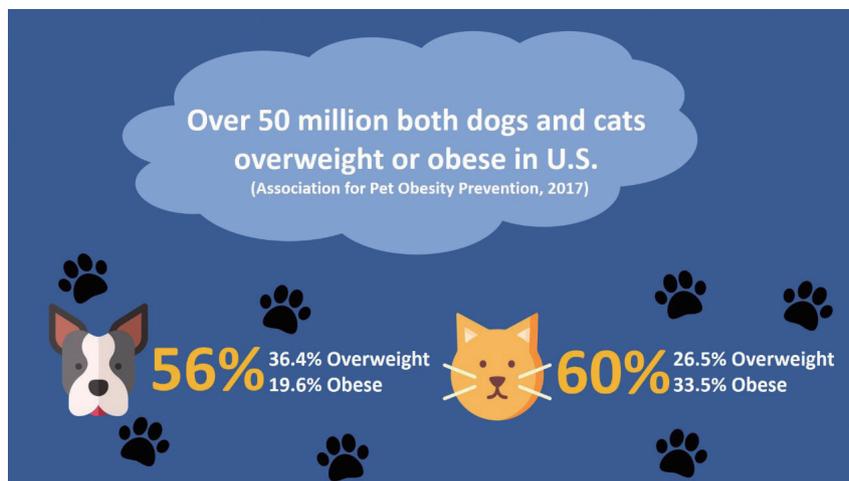
撰文/徐瑋萱·吳佩庭

寵物過胖與疾病發展相關

美國寵物肥胖預防協會 (Association for Pet Obesity Prevention) 日前公布美國地區有 56% 的寵物犬及 60% 的寵物貓屬於過重或肥胖，預估過胖的伴侶動物超過 5 千萬隻 (圖一)；而台灣亦有 6 成犬貓有過胖情形，由於動物肥胖會引起許多健康問題，美國寵物食品協會 (Pet Food Institute, PFI) 於 2017 年的調查中發現，台灣有 60.6% 的寵物有減肥空間，其中更有 29.5% 的貓咪體脂肪達 36% 以上，屬中度風險以上等級。這類寵物罹患肥胖相關疾病

的機會相對高，如：代謝症候群的脂肪肝、糖尿病及關節炎等。寵物可能因體型變大，供氧負擔增加，導致呼吸循環系統相關慢性問題。因此，許多飼主已開始對伴侶動物的健康有程度上的關注，除低熱量的飼料外，相關輔助品或保健品具有市場潛力。

肥胖起因於能量代謝不平衡，當個體攝取之熱量多於所需時，多餘的能量便以三酸甘油酯 (triglyceride, TG) 之形式儲存於脂肪細胞中。脂肪組織不僅是調節能量恆定之重鎮，脂肪組織也是體內重要的內分泌器官，可分泌多種生理活性物質，調控



資料來源：美國寵物肥胖預防協會 (Association for Pet Obesity Prevention)，本計畫團隊繪製。

圖一 犬貓伴侶動物過胖情形

免疫系統、代謝作用與發炎反應 (Tilg and Moschen, 2006; Ahima and Flier, 2000)。當脂肪組織因為能量過剩而增大時，體內代謝作用與免疫系統將會受到干擾，因此肥胖者往往也是許多疾病之高危險群，如糖尿病、心血管疾病及癌症等 (Bray, 2004)。高血脂與高膽固醇皆為促成胰島素阻抗的主要因素，富含脂質的飲食會使脂肪組織增加且釋放出大量的游離脂肪酸，經血液運送到肝臟與肌肉組織，進而抑制胰島素調節細胞對葡萄糖的攝取與利用，並增加三酸甘油脂的囤積於脂肪與胰島周邊組織，甚至引起發炎反應而使胰島素阻抗的情形持續惡化。

代謝症候群包含高胰島素血症、肥胖、高血壓、血脂異常，只要同時具有高胰島素血症及其他任二項病症，即為代謝症候群，將增加罹患心血管疾病與第二型糖尿病之風險 (Eckel *et al.*, 2005)。約有三分之二的第二型糖尿病患者，皆患有體重過重之情形，其中以腹部性肥胖者更是此類代謝疾病之高危險群。腹部肥胖之成因包含了皮下及內臟周圍之脂肪堆積。美國護士健康研究與健康專業人員追蹤研究顯示，身體質量指數增加將提高罹患糖尿病及心血管疾病之風險，而藉由適當減重則能有效控制血糖、血脂及血壓 (Anderson *et al.*, 2003; Bray, 2004)。而以伴侶動物而言，隨著年齡增加或過度攝食，會有過多的脂肪累積於脂肪細胞中，而造成寵物犬或貓的慢性發炎，引起代謝及內分泌相關疾病、皮膚疾病、呼吸道疾病、腎臟功能失調、骨關節疾病，甚至是癌症的發生，最終造成壽命縮減。

腸道菌相失衡與代謝症候群

腸道微生物菌相 (gut microbiota) 的組成及變化與動物體健康狀態相關，全世界相繼投入相關研究。2016 年美國宣布啟動國家微生物相 (microbiome) 計畫，五年內投入超過五億美元，腸道菌相研究之重要性已被科學界用以與登月、網際網路發展等並列，顯示對腸道菌相影響宿主健康具高度期待。現階段並已有許多相關新創事業，著力於微生物相應用於人類健康。目前人類基因體經解碼發現，只確

立 26,600 個可編碼蛋白質的基因，此被認為不足以詳盡調控人類的生長、發育、疾病與死亡。而直至近年，研究發現生物體菌相對人體健康與疾病的調控具有一定程度上的地位 (Qin *et al.*, 2010)。人體存在有數種微生物菌群，包含皮膚、呼吸道、生殖系統、口腔與腸胃道等，在腸道中有超過至少 1,000 個以上不同的微生物菌種 (species) (Backhed *et al.*, 2005)，這些菌相在腸道中構成了特定的微環境，已有研究指出，不同的微生物生態會影響人體的生化功能、遺傳及疾病發生 (Aziz *et al.*, 2013)。腸道微生物已被發現具有 4,000,000 個可編碼蛋白質的基因，並對人體造成生物反應 (Human Microbiome Project Consortium, 2012)。

在生物體腸道中，小腸被認為所含的微生物數量最多 (多數為厭氧或兼性厭氧菌)、菌相種類最為複雜且容易受外來營養物質或飲食狀態而改變，而大腸則分佈大量的厭氧性微生物 (Liu *et al.*, 2016)。由於這些腸道菌相與生物體疾病的發生具高度相關性，因此透過這些腸道菌相的變化或可實現精準醫療的目標。

近年來已有多項研究發現腸道菌相與肥胖之間具有相關性，腸道環境中的微生物群原本有一個平衡的菌相組成，高脂或高蛋白質飲食會增加腸道中 *Bacteroides* 門的微生物；而 *Prevotella* 門的微生物則會因飲食中含大量的碳水化合物、植物性多醣而在腸道中被大量增加，顯示腸道菌相會影響腸道細胞的活性及生理功能 (Arumugam *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011)。已有證據顯示，Firmicutes/Bacteroidetes 比例高的腸道菌相會導致腸道發炎，而益生菌則能降低 Firmicutes 門及增加 Bacteroidetes 門的細菌生長 (Cowan *et al.*, 2014)。這些結果也反映出肥胖與糖尿病患者的腸道菌相均為 Firmicutes/Bacteroidetes 高比例之菌相，容易出現代謝疾病 (Hu *et al.*, 2016)。

肥胖與代謝症候群之發生與腸道菌相失衡相關，犬或貓的腸道菌相失衡，將造成腸漏症 (leaky gut) 現象，除引發腸道發炎等腸胃道疾病，亦可能引

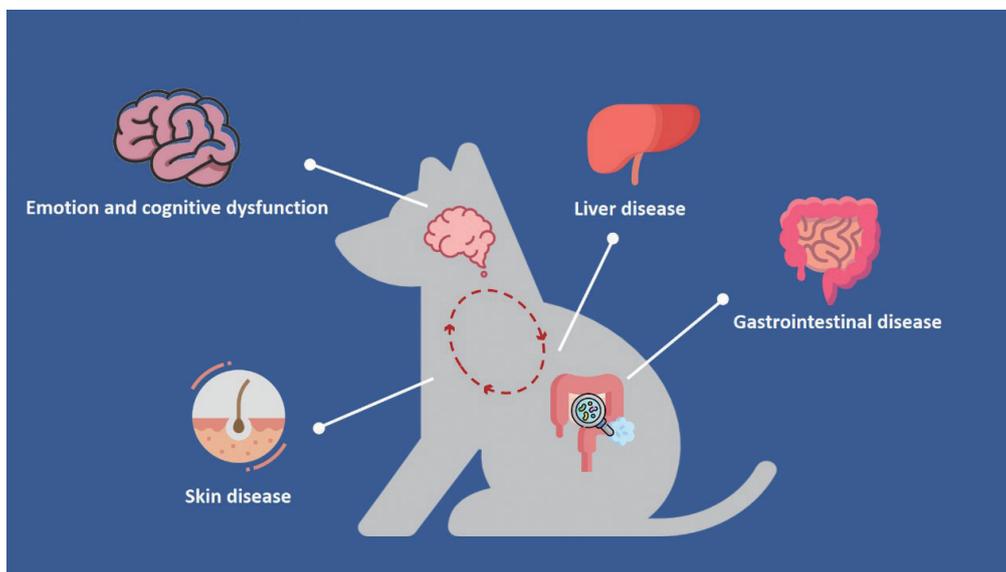
致過敏等皮膚疾病、肝臟的壓力，並可能透過腦腸軸 (gut-brain axis) 影響寵物的情緒與認知功能 (圖二)；而某些腸道菌可產生短鏈脂肪酸 (short-chain fatty acids, SCFA)，SCFA 可保護寵物免於心血管疾病及肥胖，亦能調整免疫功能以避免過敏等皮膚疾病 (Inness *et al.*, 2007; Carabotti *et al.*, 2015)。

益生菌與食用真菌應用於改善代謝症候群之潛力

蟲草 (*Cordyceps species*) 為高價之藥用真菌，具擴張氣管、鎮靜、抗心律失常、降血壓、抗病原微生物、抗惡性腫瘤等多種藥理活性 (Wang *et al.*, 2017)。蟲草菌為兼性寄生菌，其生長基質及生態環境較一般食用菌特殊，固態培育困難度增高，且在產量和品質上較不穩定 (梁, 2007)。綜合許多學者的研究發現，中華冬蟲夏草內含有超過十種以上的核苷成分，包括 adenine、adenosine、guanine、guanosine、inosine、hypoxanthine、thymine、uridine 及蟲草素 (cordycepin，即 3'-Dexyadenosine) 等。此

外，冬蟲夏草內亦含有麥角醇、蟲草酸 (cordycepic acid) 及蟲草多醣體等成分 (Li *et al.*, 2006)。其中，蟲草素被認為是主要活性成分，且蟲草素能因人工培養方式而增加，此外，麥角固醇是大部分真菌的菌絲細胞上所含的主要固醇類成分，亦是蟲草的成份指標。

蛹蟲草是常見的中華冬蟲夏草替代品，蛹蟲草真菌對寄生的宿主挑選較不嚴苛，可寄生於鱗翅目或鞘翅目的幼蟲上，因此產量較多，價格相對較便宜。蛹蟲草相較冬蟲夏草具有其優勢：(1) 蛹蟲草為蟲草屬的模式種，分佈廣泛，為世界各國學者所認識和接受，且為臺灣法規正面表列之微生物原料；(2) 蛹蟲草已在人工條件下育成完整子實體栽培；(3) 蛹蟲草含有蟲草素。學者曾比較人工培養的蛹蟲草與天然中華冬蟲夏草之間活性成分及抗氧化能力的差異，結果證實人工培養的蛹蟲草子實體亦含 adenine、adenosine 及 cordycepin 等核苷成分，且含量高於天然的冬蟲夏草 (Huang *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2004)。



資料來源：本計畫團隊繪製。

圖二 犬貓伴侶動物腸道菌群失衡與肥胖及數種疾病之發生相關

老年寵物代謝症候群之保健產品開發

本研究團隊建立蛹蟲草菌絲體及子實體之培養最適化條件，藉由調整不同營養源、溫度、光照、通氣等發酵參數，以及篩選不同固態發酵培養基質，可提升蟲草素等有效成分之含量、並縮短培養所需時間 (Lin *et al.*, 2018)。團隊建立一乳酸菌合併蛹蟲草之複方配方，於臨床研究上，伴侶動物將給予膠囊樣品。研究團隊與國立嘉義大學獸醫學院附設動物醫院合作進行動物實驗，受試者以不限品種之寵物犬為對象，經獸醫師評估具肥胖 (body condition score 分數等於或大於 7 分者)、高血糖 (檢測值超過 143 mg/dL)、高血脂 (檢測值超過 100 mg/dL) 或高膽固醇 (檢測值超過 320 mg/dL) 之代謝症候群症狀者即可列入評估對象，不限定動物性別、年齡，但以大於 7 歲之高齡犬為研究對象，並排除受試前 2 個月內曾服用抗生素或藥物治療者。蛹蟲草合併乳酸菌之複方樣品以小鼠動物實驗之劑量換算體重給予，為期 4 週。動物飼養由各受試動物之飼主自行負責，並於給予受試樣品之前及之後各一次至國立嘉義大學獸醫學院附設動物醫院，由獸醫師進行血液採集，並於給予受試樣品之前及之後各一次由飼主協助以糞便保存管採集糞便並寄回。

試驗結果顯示，各受試伴侶動物之血清總膽固醇含量方面，一隻 body condition score (BCS) 被獸醫師判定為 8 分的過胖寵物犬，受試前的總膽固醇達 233 mg/dL，經口服樣品 4 週後，總膽固醇降低至 206 mg/dL，降低達 11.6%。在血糖方面，一隻被獸醫師判定具糖尿病的過胖寵物犬，經口服樣品 4 週後，血糖值自 421 mg/dL 下降至 291 mg/dL，降低達 30.9%。在體重方面，受試寵物犬之體重於受試前後並未有顯著變化，一隻 BCS 被獸醫師判定為 7 分的過胖寵物犬，經口服樣品 4 週後，體重由 13 公斤下降至 12.45 公斤，約降低 3.6%。

而試驗結果發現，乳酸菌合併蛹蟲草樣品主要調控作用在於三酸甘油酯，約 50% 的受試伴侶動物在口服樣品 4 週後，血液三酸甘油酯數值有

顯著下降，其中一位被獸醫師判定具糖尿病的寵物犬，血液三酸甘油酯數值自 326 mg/dL 下降至 280 mg/dL，降低達 14.1%。另一位被獸醫師判定具糖尿病且三酸甘油酯過高的寵物犬，血液三酸甘油酯數值自原先超過可測值下降至 1,895 mg/dL。對於健康受試者亦可些微下降血液三酸甘油酯數值自 52 mg/dL 至 39 mg/dL，降低達 25.0%。

透過腸道菌群調節以改善老年寵物之肥胖相關代謝疾病

研究團隊建立受試寵物犬之糞便收集與微生物 DNA 抽取流程，進行 16S 擴增子定序 (16S amplicon sequencing) 並比對序列資料庫，試驗結果發現，無論是健康態或是疾病態的寵物犬，在口服樣品 4 週後，其腸道微生物物種多樣性皆會提升，顯示乳酸菌合併蛹蟲草樣品之給予能促進腸道菌種的多樣性，以增進腸道健康。而根據聚類分析結果，受試犬的腸道菌種在口服樣品前後並無太大差異，顯示乳酸菌合併蛹蟲草樣品之給予並不會造成腸道微生物有劇烈的物種變化，而是基於同物種之數量進行調整。

本研究分析物種相對豐度以表示腸道微生物種分布情況。根據物種注釋結果，與受試前相比，受試寵物犬腸道中之毛螺菌科 (Lachnospiraceae)、梭桿菌科 (Fusobacteriaceae)、以及腸桿菌科 (Enterobacteriaceae) 的微生物相對數量顯著下降。其中，毛螺菌科細菌被認為與發炎、肥胖、糖尿病等代謝症候群之發生顯著相關；而梭桿菌科細菌則被認為與腸道疾病如大腸癌之發生呈現正相關；腸桿菌科的許多細菌會導致腸道感染與發炎，如大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 與沙門氏菌 (*Salmonella* spp.)。顯示乳酸菌合併蛹蟲草之給予可調整寵物犬腸道菌相，並降低與腸道疾病 (如：腹瀉) 及與代謝相關疾病 (如：肥胖、糖尿病) 等有關的腸道微生物數量，乳酸菌合併蛹蟲草具潛力改善腸道功能，並具潛力減少肥胖等代謝相關疾病之症狀。此外，乳酸菌合併蛹蟲草樣品之口服給予 4 週後，寵物犬

腸道中之益生菌如乳酸菌屬 (*Lactobacillus*) 含量顯著增加，而與腹瀉相關的腸道致病菌 *Escherichia Shigella* 則顯著減少。透過主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA) 與主座標分析 (Principal Co-ordinates Analysis, PCoA)，可觀察樣品的群落組成之差異性，若樣品間微生物菌種組成越相似，則於 PCA/PCoA 圖中的距離則越接近。試驗結果顯示，與受試前相比，寵物犬腸道微生物菌群與受試前皆有距離變化，且與健康態的伴侶動物相較，過胖、糖尿病、高血脂或高膽固醇的疾病態伴侶動物的腸道微生物菌群於受試後又較受試前變化距離更大，顯示乳酸菌合併蛹蟲草之給予可調整健康態與疾病態之伴侶動物腸道菌群，其中又以改變疾病態之寵物犬腸道菌群更為顯著。

而由問卷調查結果顯示，75% 飼主認為樣品之嗜口性佳，受試犬隻願意主動攝食，80% 飼主認為樣品具改善寵物犬排便次數之作用，包含增加排便次數或減少排便次數，如腹瀉症狀之改善。此外 80% 飼主認為受試犬在服用膠囊 4 週後，糞便臭味降低，且糞便成形度較佳。同時，100% 的飼主表

示，服用膠囊 4 週後，未改變伴侶動物食慾或皮膚外觀狀態，顯示此乳酸菌合併蛹蟲草之複方樣品具有良好之安全性。

總結而言，本團隊已建立寵物犬糞便之採集與微生物 DNA 抽取方法及流程，並衍生建立一功效驗證平台，可提供廠商或學研單位進行齧齒類動物或伴侶動物腸道菌群之分析以及改善動物肥胖與代謝疾病之可行性分析。經伴侶動物臨床研究，確立乳酸菌合併蛹蟲草樣品經口服 4 週後，可有效改善肥胖、糖尿病或高血脂寵物犬之體重、血糖與血脂，並能改善伴侶動物腸道菌相之組成，降低腸道伺機菌之比例，提升腸道益生菌之含量。由問卷調查發現受試之伴侶動物在口服複方樣品後，其排便情況有顯著改善，包含排便次數之改善以及糞便臭味降低、糞便成形度較佳等效果。由以上試驗結果證實乳酸菌合併蛹蟲草樣品於改善寵物犬之代謝相關疾病具有良好功效性與安全性，且已獲得臨床上之功效驗證，將以研究成果開發作為寵物保健食品或醫療輔助品。

AgBIO

徐璋萱 國立成功大學 食品安全衛生暨風險管理研究所
助理教授
吳佩庭 國立成功大學 食品安全衛生暨風險管理研究所
研究助理

參考文獻

- Ahima, R. S., Flier, J. S. 2000. *Adipose tissue as an endocrine organ*. Trends Endocrinol. Metab. 11: 327-332.
- Anderson, J. W., Kendall, C. W. C., Jenkins, D. J. A. 2003. *Importance of weight management in type 2 diabetes: Review with meta-analysis of clinical studies*. J. Am. Coll. Nutr. 22: 331-339.
- Arumugam, M., et al., 2011. *Enterotypes of the human gut microbiome*. Nature 473: 174-180.
- Aziz, Q., et al., 2013. *Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions*. Neurogastroenterol. Motil. 25: 4-15.
- Backhed, F., et al., 2005. *Host-bacterial mutualism in the human intestine*. Science 307: 1915-1920.
- Bray, G. A. 2004. *Medical consequences of obesity*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 89: 2583-2589.
- Carabotti, M., Scirocco, A., Maselli, M. A., Severi, C. 2015. *The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems*. Ann. Gastroenterol. 28: 203-209.
- Cowan T. E. 2014. *Chronic coffee consumption in the diet-induced obese rat: impact on gut microbiota and serum metabolomics*. J Nutr Biochem 25: 489-495.
- Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z. 2005. *The metabolic syndrome*. Lancet. 365: 1415-1428.
- Hu X, et al., 2016. *Alzheimer's disease and gut microbiota*. Sci China Life Sci 59: 1006-1023.

參考文獻

11. Huang, L. F., Liang, Y. Z., Guo, F. Q., Zhou, Z. F., Cheng, B. M. 2003. *Simultaneous separation and determination of active components in Cordyceps sinensis and Cordyceps militaris by LC/ESI-MS*. J. Pharm. Biomed. Anal. 33: 1155-1162.
12. Human Microbiome Project Consortium. 2012. *A framework for human microbiome research*. Nature 486: 215-221.
13. Inness, V. L., McCartney, A. L., Khoo, C., Gross, K. L., Gibson, G. R. 2007. *Molecular characterisation of the gut microflora of healthy and inflammatory bowel disease cats using fluorescence in situ hybridisation with special reference to Desulfovibrio spp.* J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl) 91: 48-53.
14. Li, S. P., Yang, F. Q., Tsim, K. W. K. 2006. *Quality control of Cordyceps sinensis, a valued traditional Chinese medicine*. J. Pharm. Biomed. Anal. 41: 1571-1584.
15. Lin, L. T., Lai, Y. J., Wu, S. C., Hsu, W. H., Tai, C. J., *Optimal conditions for cordycepin production in surface liquidcultured Cordyceps militaris treated with porcine liver extracts for suppression of oral cancer*. J. Food Drug Anal. 26: 135-144, 2018.
16. Liu, S., et al., 2016. *The host shapes the gut microbiota via fecal microRNA*. Cell Host Microbe 19: 32-43.
17. Qin, J., et al., 2010. *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing*. Nature 464: 59-65.
18. Tilg, H., Moschen, A.R. 2006. *Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity*. Nat. Rev. Imm. 6: 772-782.
19. Wang, C.W., Hsu, W. H., and Tai, C. J. 2017. *Antimetastatic effects of cordycepin mediated by the inhibition of mitochondrial activity and estrogen-related receptor α in human ovarian carcinoma cells*. Oncotarget 8: 3049-3058.
20. Wu, G. D., et al., 2011. *Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes*. Science 334: 105-108.
21. Yu, R., Song, L., Zhao, Y., Bin, W., Wang, L., Zhang, H., Wu, Y., Ye, W., Yao, X. 2004. *Isolation and biological properties of polysaccharide CPS-1 from cultured Cordyceps militaris*. Fitoterapia 75: 465-472.
22. 梁宗琦。中國真菌志：第三十二卷蟲草屬，科學出版社，北京。2007。