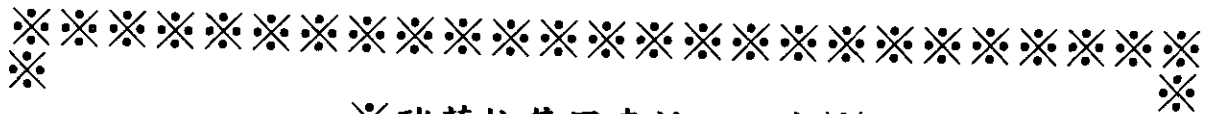




行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告



※豬苓抗基因毒性之研究※

※The antigenotoxic effects of *polyporus umbellatus*※



計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 89-2320-B-039-039

執行期間：89年8月1日至90年7月31日

計畫主持人：黃蕙茶副教授 中國醫學系

共同主持人：江素瑛助理教授 中國醫藥學院中國醫學研究所

吳焜裕助理教授 中國醫藥學院職業安全衛生學系

游智勝副教授 長庚大學中醫學系

林芳仁主任 中國醫藥學院附設醫院放射腫瘤科

研究人員：吳琇卿研究生、裴詩雨助理 中國醫藥學院中醫所

執行單位：中國醫藥學院中國醫學系

中華民國 年 月 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告



計畫編號：NSC 89-2320-B-039-039

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：黃蕙茶副教授 中國醫學系

共同主持人：江素瑛助理教授 中國醫藥學院中國醫學研究所

吳焜裕助理教授 中國醫藥學院職業安全衛生學系

游智勝副教授 長庚大學中醫學系

林芳仁主任 中國醫藥學院附設醫院放射腫瘤科

研究人員：吳琇卿研究生、裴詩雨助理 中國醫藥學院中醫所

一、中文摘要

豬苓是中醫常用藥物之一，傳統臨床上用于清熱利尿，目前被認為對腫瘤治療有效，然其作用機轉尚不清楚。本計畫利用偵測染色體傷害之微核測試法 (Micronucleus Test, MNT)，來探討豬苓多醣對於化學致癌劑及輻射所誘發的染色體傷害是否具有拮抗作用。單獨腹腔注射豬苓多醣之老鼠的周邊血未成熟紅血球微核發生率，與陰性對照組比較並無統計上顯著差異，豬苓多醣對老鼠沒有明顯的染色體遺傳毒性。老鼠經腹腔注射接種化學致癌物乙基亞硝酸尿素 (N-ethylnitrosourea; ENU) (145mg/kg) 以作陽性對照組，28 小時後周邊血中未成熟紅血球 (reticulocytes, RET) 微核 (micronuclei) 的發生率，於 1000 個 RET 中微核平均數為 34.3 個，明顯高於陰性對照組 2.5 個。若是 ENU 給藥前 30 分鐘，預先腹腔注射豬苓多醣 (50mg/kg, 250mg/kg) 可減低 ENU 所誘發的 DNA 損傷，其抑制率約為 30%。進一步利用已發展輻射老鼠體內微核測試模型，來檢測全身輻射老鼠誘發周邊血中未成熟紅血球微核的發生率，6Gy 輻射老鼠 46 小時後其微核的發生率約為陰性對照組的 10 倍。在輻射照射前 0 分及 15 分腹腔注射給與豬苓多醣，豬苓無明顯的抑制作用，若是輻射照射前 30 分鐘投與豬苓多醣，可有

效抑制輻射老鼠周邊血中未成熟紅血球微核的生成，50mg/kg 豬苓多醣之抑制率約為 40%，此結果顯示豬苓多醣對輻射及化學致癌劑所誘發的 DNA 損傷有明顯的拮抗作用，即有抗基因毒性的功能。

關鍵詞：豬苓多醣、抗基因毒性、化學致癌物、輻射、微核

Abstract

Chuling (*Polyporus umbellatus*), one of the commonly used Traditional Chinese medicines, has been reported to possess antitumor effects in experimental tumor-bearing rodents. However, the underlining mechanisms of its antitumor activities are still poorly understood. In this proposal, the anti-genotoxic effects of Chuling in mice was examined by using the chemical- or irradiation-induced chromosome damage (micronuclei) as biomarkers of genotoxic damage. Chuling was given intraperitoneally to mice 30 minutes before intraperitoneal administration of chemical carcinogen ethylnitrosourea (ENU) or X-ray irradiation. Blood samples were collected 28 or 46 hr later, respectively, to examine the frequencies of micronuclei in peripheral

reticulocytes (RET), a marker for chromosome damage. Pretreatment of Chuling at the dose of 50mg/kg and 250mg/kg significantly inhibit the frequencies of micronuclei in peripheral reticulocytes induced by ENU (145mg/kg) and X-ray irradiation (6Gy). The data from this study suggest that the anti-cancer activities of Chuling result, at least in part, from its protective effects against chemical- or radiation-induced DNA damage.

Keywords : Polyporus umbellatus, antigenotoxic, carcinogen, irradiation, micronuclei

二、緣由與目的

豬苓為多孔菌科(Polyporaceae)多孔菌屬植物 *Polyporus umbellatus* (Pers.)的乾燥菌核，是中醫常用藥物之一，傳統臨床上用于清熱利尿。先前研究指出豬苓中所含的多糖類對小鼠腹水型肝癌 H22 有抑制作用，抑癌率為 39 % (1)。曾有研究指出豬苓多糖與化療藥物順鉑伍用可明顯提高順鉑對小鼠移植腫瘤 H22、Lewis 及 S180 三種腫瘤株的抑癌率(2)。並能降低順鉑所引發小鼠白細胞減少、免疫器官萎縮、巨噬細胞吞噬功能降低等毒性副作用(2)。另有研究報告指出豬苓多糖提取物能增強荷瘤小鼠的免疫功能，使單核巨噬細胞系統活性正常，脾臟抗體形成細胞增多，腹腔巨噬細胞吞噬活力提高，並可增強荷瘤小鼠脾淋巴樣細胞對瘤細胞的殺傷作用(3,4)。綜合許多文獻上的記載，豬苓萃物具有抗癌作用且可調節免疫功能，配合化學治療，可提高療效，並減輕化療藥物的毒性副作用(5-8)。

近年來癌症已位居國人死因的首位，已知癌的產生與環境中的某些化學物質與輻射有關(10)，現今人們除了致力減少致癌因子的暴露外，並期望能找尋對化學致癌劑有抑制作用的物質，以供腫瘤高危險人群作為預防用藥。減少基因的損傷或突變可能與預防致癌或老化有密切關係，在

癌的形成過程中，若投于某些有效的阻斷干預因子，可望阻止癌的發生與演進(10, 11, 12)。即以化學預防劑來減少基因損傷或突變，可能可以預防致癌、預防老化、或者是預防癌症的再復發。

豬苓被一般大眾認為對腫瘤的治療有一定療效，然其真正療效與作用機轉仍不清楚，因此亟需進一步作動物研究。我們實驗室先前的結果亦顯示豬苓配合化學劑治療癌症，可提高化療療效，並可減輕化療藥物的毒副作用(9)。本計畫延續我們過去對豬苓抗癌作用的研究，擬利用已建立之化學致癌物與輻射誘發的 DNA 損傷之動物模式，研究豬苓多糖對抗 DNA 損傷之效用，進而了解豬苓多糖在體內作用的機轉。如此不僅建立一個拮抗 DNA 損傷動物測試模式，同時經由對機制的了解，可能會提供一個開發新藥的方向。

三、研究方法

豬苓多糖：購自大陸天津連雲港天晴製藥廠。

動物:ICR 公鼠，週齡 6~8 週，體重 28~36g，由國科會實驗動物研究及繁殖中心提供，每 6 隻一組飼養在籠子內，先讓動物適應于光照與熄燈各 12 小時，並放置標準食物與飲水，由動物們隨意取食，為期一個禮拜。

微核測試步驟

1. 玻片備置

於暗房中在玻片正面做標記(*)，以 95%EtOH rinse，擦拭乾淨後平放於 70°C 加熱平台烤乾，再吸取 2mg/ml 丫啶橙 (Acridine Orange, AO) 滴於載玻片上，以蓋玻片來回推片使塗抹均勻，晾乾後將玻片置入收藏盒避光 4°C 冷藏保存。

2. 採血

以乾淨剪刀剪斷鼠尾末端 0.3-0.5cm，擠出鼠尾使血液成珠，點滴於玻片正中央，每隻老鼠重複採血兩片，輕壓蓋玻片使血液樣本厚度減少，血球散佈更均勻且

成單層，玻片水平放置，塑膠套密封以免乾燥，放入 4°C。

3. 微核玻片觀察

以螢光顯微鏡 488nm (藍光)，400x 來觀察視野中所見單層均勻血球分佈為標準。尋找網狀紅血球(RETs)，計算 RET 佔紅血球比例總數，及計算每 2000 個 RET 中有多少個含有微核的 RET，以千分率表現其出現率。每個有綠色亮點的 RET 即算是出現一次微核，而不計一個 RET 內有幾個微核。同一隻老鼠製作兩片玻片，由兩人各自計算微核率，相加後再平均。

四. 結果與討論

1. 豬苓多糖的安全性

ICR 小鼠連續 5 天腹腔注射 250mg/kg 的豬苓多糖，其結果為每 1000 顆 RET 的微核發生率為千分之 2.5(n=6)，與正常小鼠的微核發生率(約為千分之 0~5)比較並無顯著差異，豬苓多糖對受試動物不會產生基因毒性。

2. 豬苓多糖的化學預防作用

ICR 小鼠在腹腔注射豬苓多糖 (50mg/kg 和 250mg/kg) 後 30 分鐘再腹腔注射 ENU (145mg/kg) 致癌物，利用微核測定法來檢測豬苓胞對於化學傷害的抗誘變作用。老鼠經腹腔注射 ENU，28 小時後周邊血中未成熟紅血球(reticulocytes, RET)微核(micronuclei)的發生率，於 1000 個 RET 中微核平均數為 34.3 個，明顯高於陰性對照組 2.5 個。結果顯示預先 30 分前腹腔注射豬苓多醣(50mg/kg, 250mg/kg)可減低 ENU 所誘發的 DNA 損傷，其抑制率約為 30%。

3. 豬苓多糖的輻射預防作用

陰性對照組 ICR 公鼠由腹腔注射 Milli-Q 無菌水；實驗組經由腹腔注射豬苓多糖 50mg/kg，分別在注射豬苓多糖後 0 分、15 分、30 分及 45 分照射 6Gy 的輻射劑量，並且在照射後 46h 採鼠尾血，全血細胞塗片計數 1000 個 NCE，紀錄含有

微核的嗜多染紅細胞(MN RET)數，計算微核率。

輻射前腹腔注射豬苓多糖的給藥時間對於微核率的影響之結果如表一所示。在豬苓多糖給藥後 0 分及 15 分鐘輻射，豬苓無明顯的抑制作用，到了 30 分鐘時，豬苓對於微核產生的抑制作用達到高峰。由於不同理化刺激所引起的 RET 微核率峰值出現的時間會有所不同，就算是同一種刺激，也會因為劑量和給藥途徑的不同，動物種屬的不同，造成微核率出現的峰值也不同。因此當藥物在體內的吸收後的血中最高濃度尚未確立前，給藥時間點的選取就更加重要了，從實驗結果我們可以看出來，腹腔注射豬苓多糖在體內吸收後的最佳濃度約為給藥後的 30 分鐘。另外對於輻射微核的產生也有降低 39% 的作用，因此對於輻射有明顯的保護作用。

TAB.1 不同給藥時間對於微核率的影響

輻射前豬苓 給藥時間 (min)	N	Mean	
		MN RET /1000RET	微核抑制率 (%)
0min	6	35.2	3.3
15min	6	33.2	7.7
30min	6	23.4	39.0
45min	4	30.4	22.0
Radiation		8	36.5
Negative Control		8	1.8

五、計畫成果自評

本年度的計劃研究成果報告已著手撰寫相關實驗結果的文章準備投稿國外期刊。鑑於豬苓多糖已日益受人們所重視而服用，我們進行豬苓多糖抗基因毒性測試，發現豬苓多糖對化學致癌物與輻射所誘發的 DNA 損傷有保護作用。本計劃的研究結果不僅可建立一個拮抗 DNA 損傷的動物測試模型，並有助於進一步的了解豬苓多醣之抗癌作用機轉，同時經由對機制的了解，可能會提供一個開發新藥的方向。

六、重要參考文獻：

1. 魏群、吳國利：豬苓多糖對荷肝癌 H22 小鼠肝糖原積累、糖異生和分解酵素系的作用。中國藥理學報。4(2): 141-143, 1983
2. 王艷、吳玉波、張永恆：豬苓多糖對順鉑增效作用及其毒性的影響。中醫藥研究。5:60-61, 1996
3. 張昌菊、郭秀：豬苓多糖和硒誘導 LAK 細胞的研究。中國實驗臨床免疫學雜誌。8(1):26-28, 1996
4. Haranaka, K., Satomi, N., Sakurai, A., Haranaka, R., Okada, N. and Kobayashi, M. Antitumor activities and tumor necrosis factor producibility of traditional Chinese medicines and crude drugs. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 20(1):1-5, 1985.
5. You, J.S., Hau, D.M., Chen, K.T. and Huang, H.F. Combined effects of chuling (*Polyporus umbellatus*) extract and mitomycin C on experimental liver cancer. *American Journal of Chinese Medicine*. 22(1):19-28, 1994.
6. 楊德安、李慎勤、李炎唐：豬苓對膀胱腫瘤抑制作用的實驗與臨床研究。中華外科雜誌。29(6):393-395, 1991
7. 楊德安、石炳毅、李貴唐：豬苓、土茯苓和硒對膀胱化學致癌抑制作用的實驗研究。中華醫學雜誌。67(11):622-625, 1987
8. 王艷、吳玉波、張永恆：豬苓多糖與喃氣啞伍用對小鼠抗腫瘤及免疫功能的影響。中成藥。18(9):34-35, 1996
9. You, J.S., Hau, D.M., Chen, K.T. and Huang, H.F. Combined effects of chuling (*Polyporus umbellatus*) extract and mitomycin C on experimental liver cancer. *American Journal of Chinese Medicine*. 22(1):19-28, 1994.
10. Hemminki, K. DNA adducts, mutation, and cancer. *Carcinogenesis*. 14: 2007-2012, 1993.
11. Miller, E.C. and Miller, J.A. Mechanisms of chemical carcinogenesis. *Cancer*, 47: 1055-1064, 1981.
12. Weinberg, R.A.: Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis, *Cancer Res.*, :49: 3713-3721, 1989.