

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※樟芝安全性、抗基因毒性及抗過敏性之評估※

※The safety, anti-genotoxic and anti-allergic effects of *Antrodia cinamomea* Chang & Chow※

計畫類別：個別型計畫    整合型計畫

計畫編號：NSC 89-2316-B-039-003

執行期間：89年8月1日至90年7月31日

計畫主持人：江素瑛助理教授 中國醫藥學院中國醫學研究所

共同主持人：吳焜裕助理教授 中國醫藥學院職業安全衛生學系

高尚德副教授 中國醫藥學院中國醫學研究所

研究人員：魏逸杰研究生、王秋萍助理 中國醫藥學院中醫所

執行單位：中國醫藥學院    中國醫學研究所

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 89-2316-B-039-003-

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：江素瑛助理教授 中國醫藥學院中國醫學研究所

共同主持人：吳焜裕助理教授 中國醫藥學院職業安全衛生學系  
高尚德副教授 中國醫藥學院中國醫學研究所

研究人員：魏逸杰研究生、王秋萍助理 中國醫藥學院環醫所與中醫所

## 一、中文摘要

樟芝為台灣所特有之一種食、藥兩用高等真菌，傳統上用於治療腹痛、高血壓、皮膚癢與肝癌，但樟芝的生理活性與安全性目前仍缺乏系統性與科學性的評估。本研究計劃中我們探討樟芝之安全性及抗基因毒性，首先以樟芝暴露人類淋巴母細胞 TK6 細胞 15 小時，以 300 $\mu$ g/ml 與 200 $\mu$ g/ml 濃度之樟芝處理 TK6 細胞，其細胞相對存活率分別為 68% 與 85%。在 300 $\mu$ g/ml 濃度所引發 tk 基因的突變率為  $2 \times 10^{-6}$ ，並沒有顯著高於陰性對照組，而陽性對照組環氧苯乙烯(styrene oxide)引發 tk 基因的突變率為  $25 \times 10^{-6}$ 。加入代謝活化系統(S9 混和物)進行 tk 基因毒性分析，樟芝所引發 tk 基因的突變率也並沒有顯著高於陰性對照組。進一步確認樟芝在活體是否具有致突變性，以強迫胃管餵食雄性小鼠，投與 300 mg/kg 1000 mg/kg 和 3000 mg/kg 劑量的樟芝(每天一次共 15 次)，觀察並無體重減輕現象。以 T-cell cloning 方法計算脾臟淋巴細胞 *hprt* 基因的突變機率，化學致癌物乙基亞硝酸基尿素 (N-ethyl N-nitrosourea) (30mg/kg) 處理老鼠為陽性對照組，脾臟淋巴細胞之 *hprt* 突變率為  $26 \pm 7 \times 10^{-6}$ ，顯著高於陰性對照組老鼠的  $2.0 \pm 0.3 \times 10^{-6}$  (P<0.001)。而以 300 mg/kg 1000 mg/kg 和 3000 mg/kg 樟芝連續餵食老鼠 15 天，平均 *hprt* 突變率與陰性對照組老鼠比較並無顯著差異，顯示樟芝於本實驗所使用之劑量對老鼠並不具致突變性。並研究樟芝是

否對化學致癌物誘發的 DNA 損傷有保護作用。體內 DNA 損傷試驗以小鼠經腹腔注射化學致癌物(dacarbazine, DAC) (70mg/kg) 作為陽性對照組，另外老鼠預飼不同劑量的樟芝，連續給于 15 天後，翌日再投于 DAC。老鼠在投于 DAC 後之第 5 小時犧牲，取出肝臟以萃取 DNA，用新發展完成之高敏感度與專屬性的氣相層析儀加質譜儀 (GC/MS) 方法定量分析 DAC 誘發的 DNA 傷害的指標 7-methylguanine (7-MG)。結果顯示 70 mg/kg DAC 處理組老鼠肝臟組織的 7-MG 約為陰性對照組老鼠的 6-7 倍。若以 300 mg/kg 與 1000 mg/kg 樟芝前處理老鼠，其肝臟組織的 7-MG 明顯低於 DAC 處理組老鼠，約為陽性對照組老鼠的 3-4 倍。此結果顯示樟芝對 DAC 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：**樟芝、安全性、抗基因毒性、DNA 鍵結物、突變機率

## Abstract

*Antrodia cinnamomea* Chang & Chou is a new, rare and expensive fungus first identified in 1994 in Taiwan. *Antrodia cinnamomea* is used to treat abdominal pain, hypertension, skin itches and liver cancer in Chinese folk medicine. No biological activities have been published so far. Our grant proposal examined the safety and anti-genotoxic effects of *Antrodia*

*cinnamomea*. We determined the genotoxicity of *Antrodia cinnamomea* using *hprt* gene mutation assays with TK6 mammalian cells *in vitro*. The potential genotoxicity of *Antrodia cinnamomea* *in vivo* was further examined using an established *hprt* gene mutation assay in mice. There is no statistically significant increase of mutation frequency induced by *Antrodia cinnamomea* *in vitro* and *in vivo*, as compared to control. The anti-genotoxic effect of *Antrodia cinnamomea* in mice was examined by using the chemical-induced DNA adducts 7-methylguanine as biomarkers of genotoxic damage. Our data showed that *Antrodia cinnamomea* possess the anti-genotoxic activities from its protective effects against chemical-induced DNA damage.

Keywords : *Antrodia cinnamomea* Chang & Chou, safety, anti-genotoxic, DNA adducts, mutant frequency, anti-allergic, asthma

## 二、緣由與目的

樟芝又名牛樟菇(“Zhan Ku”, “Zhan Chih”, 學名為 *Antrodia cinnamomea* Chang & Chou, 1995), 無摺菌目多孔菌科(Polyporaceae), 為台灣所特有之多年生蕈菌類, 著生於老牛樟樹幹洞內壁, 其子實體具有濃郁的黃樟樹氣味, 為優良之驅蟲殺蟲劑、解毒劑與抗癬劑(1)。樟芝為一種食、藥兩用高等真菌, 傳統上用於治療腹痛、高血壓、皮膚癢與肝癌, 但目前缺乏系統性與科學性的研究評估。

目前有關樟芝成分與藥理活性的資料寥寥無幾, 在 SCI 文獻中僅有幾篇文章研究樟芝成分的分離與確認(2-8), 而僅有一篇文章用相當簡單的方法測試其藥理活性, 指出樟芝可能具有顯著毒殺老鼠血癌細胞的作用與微弱的抗膽鹼的作用(3)。鑒於樟芝可能具有的生物藥理活性與其潛在的臨床應用價值, 樟芝已日益受人們所重視而服用。

樟芝價格非常昂貴, 近來樟芝菌絲體人工培養已被發展完成可大量製造樟芝, 如此促成樟芝有發展為健康食品的潛力, 在此研究計劃中我們採用樟芝菌絲體人工培養的液體或其乾燥物為研究材料。目前樟芝缺乏完整的毒理學安全性的學術報告及曾供食之紀錄, 同時樟芝的菌絲體培養液或濃縮液為非通常加工食品形式供食者, 依據健康食品法之規定, 此類非一般加工食品形式的擬上市健康食品, 必須進行安全性評估項目中的“基因毒性測試”, 期望能瞭解其毒性劑量、先兆、及解毒方法等, 以提供作為一般用量及禁忌症之參考, 並維護消費者的健康。

又已知中藥如漢防己和馬兜鈴均含有馬兜鈴酸(aristolochic acid), 馬兜鈴酸為直接致突變物(9), 在大鼠是一很強的致癌物質(10), 最近於中草藥腎病變症(Chinese herbs nephropathy)患者之腎臟組織中偵測得馬兜鈴酸與 DNA 之鍵結物, 可能與馬兜鈴酸之致突變與致癌作用有相關(11)。這例子進一步彰顯對樟芝進行安全性評估之重要性。

樟芝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。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, 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。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。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。

本計畫以科學實驗方法來確認樟芝之安全性, 我們進行樟芝致突變性之毒理測試, 來評估樟芝直接或間接誘發基因突變之可能性及程度, 並評估其是否有減少基因傷害的功效。

### 三、研究方法

我們採用購自新竹食品工業研究所的樟芝菌絲體人工培養的液體為研究材料。

#### 1: 樟芝於人類淋巴細胞之致基因突變性

進行包含或不包含代謝活化系統(S9 混和物)之體外人類淋巴細胞 tk 基因毒性分析,將分別以 benzo(a)pyrene 或環氧苯乙烯(styrene oxide)為陽性對照組,以不同濃度(300, 200, 100ug/ml)樟芝分別處理細胞 4 小時或 15 小時後,離心去除樟芝,細胞繼續培養或接種於 96 孔培養盤以決定其存活率。細胞繼續培養 3-4 天後,培養於含 trifluorothymidine (TFT)培養液中,以測定樟芝致 tk 基因突變數量,此值除以形成細胞群落效率(cloning efficiency)則得到致 tk 基因突變機率(mutant frequency)。

##### a. 細胞來源與細胞培養

人類 TK6 淋巴母細胞株購自新竹食品研究所菌種保存中心,培養在含抗生素、HEPES buffer、與 9% 馬血清的 RPMI-1640 培養基中。

##### b. PE (plateing efficiency)與 MF (Mutant frequency)測試

###### PE(plateing efficiency) 測試

以指數期生長之細胞經樟芝暴露 15 小時之細胞,以連續稀釋之方法,將細胞轉置到 96 孔的平板中(96 well plate)培養,細胞濃度控制在 2 cells/well,且每個 well 有 150  $\mu$ l。將已種好的 plate 放到 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培養 12~14 天,以肉眼觀察未生成細胞群之 well 個數。

###### MF(Mutant frequency) 測試

樟芝處理過之細胞,培養 3-4 天後接種(2000 cell/well, 150  $\mu$ l/well)於含 1ug/ml TFT 培養機的 96 孔平板中(96 well plate),於 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 10~12 天,以肉眼觀察未形成細胞群(colony)之 well 個數,以求得 tk 基因的突變機率。

#### 2: 樟芝於活體老鼠體內之致基因突變性

將以強迫胃管餵食雄性小鼠,投與 3g/kg, 1g/kg and 0.3g/kg 劑量的樟芝(每天一次共 15 次),觀察並無體重減輕現象。

於投藥後 4 週犧牲老鼠,取出脾臟分離淋巴細胞,培養在選擇性試劑中,以計算 *hprt* 基因的突變機率。

a. 脾臟淋巴細胞之分離: 在無菌下取出老鼠脾臟,並置於細胞培養基(RPMI-1640)中,然後將個別的脾臟以鑷子擠碎,再用針筒以 25 號針管吸取三次,即是單一懸浮細胞液(single cell suspension)。經用 Percoll 密度梯度離心後(density gradient centrifugation),回收脾臟淋巴單核細胞。

b. 脾臟淋巴細胞之培養: 脾臟淋巴單核細胞( $1 \times 10^6$  /ml)調配於內含 10% 胎牛血清之細胞培養基(RPMI-1640)中,加入白鳳豆素(Concanavalin A)當作分裂原(mitogen)與 T-細胞生長因子(interleukin-2)來刺激細胞增殖,於培養箱中培養二天。

c. *hprt* 突變率量測: 二天後,再培養脾臟淋巴細胞在含有選擇試劑(6-thioguanine)之培養基中( $5 \times 10^5$  cells/ml),于 96 孔之培養皿中,每孔加入 100  $\mu$ l 之細胞,將細胞培養十二天後,計算突變細胞窟隆數以決定突變頻率(Skopek, 1992)。

#### 3: 樟芝對誘變劑 DAC 誘發老鼠體內 DNA 損傷(DNA adducts)的抑制作用

a. 體內 DNA 損傷試驗以老鼠經腹腔注射 DAC (70mg/kg)作對照組,另外老鼠為預飼樟芝 15 天後再投于 DAC。老鼠在投于 DAC 後之第 5 小時犧牲,取出肝臟以萃取 DNA,使用此 GC/MS 方法,定量分析 7-MG,以作為探討樟芝抑制 DNA 傷害的指標。

b. 使用氣相層析儀加質譜儀(GC/MS)分析 7-methylguanine (7-MG),以合成 <sup>4</sup>C<sub>13</sub>-7-MG 作為內標準品以定量樣品中之 7-MG,首先以 7-MG 對 <sup>4</sup>C<sub>13</sub>-7-MG 作檢量線,其線性非常好(R<sup>2</sup>=0.99)。這種方法又稱為同位素稀釋法,其優點在於使用一不具放射性之同位素標示的 7-MG 作內標準品,因其物理化學性質完全相同,故在氣相層析儀的管柱中滯留時間完全相同,各有一滯留時

間為 20.5 分鐘的峰，兩者同時出現，此方法的另一好處為自動校正樣品在前處理中的損失。將肝臟取出以 phenol/chloroform 方法萃取 DNA，定量後取 100  $\mu$ g 的 DNA 以分析 7-MG。樣品在 100°C 下煮二十分鐘，使用冷酸離心方法將 DNA 鹼基回收，經冷硝化反應後，再與五氟苯基溴反應二十小時。將反應物中的雜質除去，樣品經氣相層析儀加質譜儀分析，在負化學離子化法下，可得到一 GC/MS 圖形，可由  $m/z = 345$  代表 DAC 所誘發的 7-MG 與  $m/z = 349$  代表所加入的  $^{13}\text{C}_3$ -7-MG 內標準品，7-MG 的含量可由  $m/z = 345$  圖譜峰面積比  $m/z = 349$  圖譜峰面積在乘上所加入  $^{13}\text{C}_3$ -7-MG 的量在除上樣品中 guanine 的量而得。

#### 四. 結果與討論

本計畫以科學實驗方法來確認樟芝之安全性，我們進行樟芝致突變性之毒理測試，來評估樟芝直接或間接誘發基因突變之可能性及其程度，並評估其是否有減少基因傷害的功效。

首先進行體外哺乳類細胞基因突變測試，使用體外培養的 TK6 人類淋巴母細胞，測量樟芝誘發的細胞毒性與 *hprt* 基因突變機率。實驗結果顯示以樟芝暴露 TK6 細胞 15 小時，對 TK6 細胞有致細胞毒性，以 300 $\mu$ g/ml 與 200 $\mu$ g/ml 濃度之樟芝處理 TK6 細胞，其細胞相對存活率分別為 68% 與 85%。在 300 $\mu$ g/ml 濃度所引發 *hprt* 基因的突變率為  $2 \times 10^{-6}$ ，並沒有顯著高於陰性對照組。以化學致癌物環氧苯乙烯(styrene oxide)為陽性對照組，所引發 *hprt* 基因的突變率為  $25 \times 10^{-6}$ 。

進一步確認樟芝在活體是否具有致突變性，以強迫胃管餵食雄性小鼠，投與 300 mg/kg 1000 mg/kg 和 3000 mg/kg 劑量的樟芝(每天一次共 15 次)，觀察並無體重減輕現象。老鼠在投于樟芝之一個月後犧牲，取出脾臟分離淋巴細胞，以 T-cell cloning 方法培養在選擇性試劑(6-thioguanine)中十

天，以計算 *hprt* 基因的突變機率。化學致癌物乙基亞硝酸基尿素 (N-ethyl N-nitrosourea, ENU) (30mg/kg)處理老鼠為陽性對照組，脾臟淋巴細胞之 *hprt* 突變率分別為  $36 \pm 15 \times 10^{-6}$ ，顯著高於陰性對照組老鼠的  $2.0 \pm 0.3 \times 10^{-6}$  ( $P < 0.001$ )。而以 300 mg/kg 1000 mg/kg 和 3000 mg/kg 樟芝連續餵食老鼠 15 天，平均 *hprt* 突變率與陰性對照組老鼠比較並無顯著差異，顯示樟芝於本實驗所使用之劑量對老鼠並不具致突變性。

過去的研究已證實基因致癌物或其代謝活化物可與 DNA 結合成 DNA 共價鍵結物(DNA adduct)，其若未能及時為 DNA 修補酵素修復，可能誘發基因突變，進而逐漸發展為癌細胞。本計畫利用已建立的化學致癌物誘發 DNA 損傷與基因突變之動物模式，研究樟芝是否能有效抑制化學致癌物誘發的 DNA 損傷與基因突變，以確認樟芝是否為一有效化學預防劑。

利用實驗室已建立的化學致癌物(dacarbazine, DAC)誘發老鼠基因傷害模式，以致癌機轉中早期的 DNA 損傷為指標，餵食樟芝進行活體老鼠體內基因傷害測試。體內 DNA 損傷試驗以小鼠經腹腔注射化學致癌物 DAC(70mg/kg)作為陽性對照組，另外老鼠預飼不同劑量的樟芝，連續給于 15 天後，翌日再投于 DAC。老鼠在投于 DAC 後之第 5 小時犧牲，取出肝臟以萃取 DNA，用新發展完成之高敏感度與專屬性的氣相層析儀加質譜儀 (GC/MS) 方法定量分析 DAC 誘發的 DNA adduct 7-methylguanine (7-MG)，以作為探討樟芝抑制 DNA 傷害的指標。結果顯示 70 mg/kg DAC 處理組老鼠肝臟組織的 7-MG 約為陰性對照組老鼠的 6-7 倍。若以 300 mg/kg 與 1000 mg/kg 樟芝前處理老鼠，其肝臟組織的 7-MG 明顯低於 DAC 處理組老鼠，約為陽性對照組老鼠的 3-4 倍。此結果顯示樟芝對 DAC 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，對化學致癌物誘發的 DNA 損傷有保護作用。

## 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。鑑於樟芝已日益受人們所重視而服用，目前當務之急為對樟芝的安全性進行有系統的科學研究，以確保大眾的健康。我們進行樟芝致基因毒性測試，顯示樟芝於本實驗所使用之劑量對老鼠與體外細胞並不具致突變性，同時發現樟芝對化學致癌物誘發的DNA損傷有保護作用。

樟芝目前缺乏完整的毒理學安全性的學術報告，為了開發藥用資源與確保民眾用藥安全，將來將需要進行更長期基因毒性的測試，希望能瞭解其毒性劑量及先兆等，以提供作為一般用量及禁忌症之參考，並維護消費者的健康。只要一旦樟芝的安全性被接受，則一般人在正常情況下攝取樟芝，應不致對人體造成危害。

## 六、重要參考文獻：

1. 臧穆、蘇慶華：我國台灣產靈芝屬一新種---樟芝。雲南植物研究。12(4):395-396, 1990
2. Chang, T .T. and Chou, W. N. *Antrodia cinnamomea* sp. nov. on *Cinnamomum kanehirai* in Taiwan. *Mycological Research*. 99(6):756-758, 1995.
3. Chen, C.H., Yang, S.W. and Shen, Y.C. New steroid acids from *Antrodia cinnamomea*, a fungal parasite of *Cinnamomum micranthum*. *Journal of Natural Products*. 58(11):1655-61, 1995
4. Cherng I.H., Chiang H.C. ,Cheng M.C. and Wang Y. Three new triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*. *Journal of Natural Products*. 58(3): 365-371, 1995.
5. Cherng ,I.H., Wu, D.P. and Chiang, H.C. Triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*. *Phytochemistry*. 41(1): 263-267,1996.
6. Chiang, H.C., Wu, D.P.,Cherng, I.W. and Ueng, C.H. A sesquiterpene lactone, phenyl and biphenyl compounds from *Antrodia cinnamomea*. *Phytochemistry*. 39(3):613-616, 1995.
7. Shen, Y.C., Yang, S.W., Lin, C.S., Chen, C.H., Kuo, Y.H. and Chen, C.F. A new metabolite from a formosan fungus *Antrodia cinnamomea*. *Planta Medica*. 63(1): 86-88, 1997.
8. Yang, S.W., Shen, Y.C. and Chen, C.H. Steroids and triterpenoids of *Antrodia cinnamomea*-A fungus parasitic on *Cinnamomum micranthum*. *Phytochemistry*. 41(5): 1389-1392, 1996..
9. Robisch G. Schimmer O. Goggelmann W. Aristolochic acid is a direct mutagen in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research*. 105(4):201-4, 1982
10. Mengs U. On the histopathogenesis of rat forestomach carcinoma caused by aristolochic acid. *Archives of Toxicology*. 52(3):209-20, 1983
11. Schmeiser HH. Bieler CA. Wiessler M. van Ypersele de Strihou C. Cosyns JP. Detection of DNA adducts formed by aristolochic acid in renal tissue from patients with Chinese herbs nephropathy. *Cancer Research*, 56(9):2025-8, 1996