

樟芝发酵菌丝体及活性成分Antrosterol纯化物之大鼠急性毒性分析

朱心彤¹, 林定威¹, 蔡文城², 郭郁萱³, 赵 敞⁴, 陈劲初^{1,5,6,7*}

¹葡萄王生技股份有限公司, 台湾 桃园

²台美检验科技有限公司, 台湾 新北

³长庚科技大学化妆品应用系, 台湾 桃园

⁴上海葡萄王企业有限公司, 上海

⁵实践大学食品营养与保健生技学系, 台湾 台北

⁶台湾大学食品科技研究所, 台湾 台北

⁷中原大学生物科技学系, 台湾 桃园

Email: *gkbioeng@grapeking.com.tw

收稿日期: 2020年12月4日; 录用日期: 2021年2月16日; 发布日期: 2021年2月24日

摘 要

本实验试验物质为葡萄王生技股份有限公司之樟芝纯化物Antrosterol (AST)及樟芝发酵菌丝体冻干品(AC-1) (AST含量3.0 mg/g)、富含活性成分Antrosterol之樟芝发酵菌丝体冻干品(AC-2) (AST含量8.8 mg/g), 经单次口服投予大鼠后, 评估可能产生之急性毒性反应, 系参考卫生福利部食品药物管理署: 健康食品安全性评估方法(1999)。试验共设置7组, 分别为逆渗透水对照组、橄榄油对照组、试验组I (8 mg/kg bw AST)、试验组II (16 mg/kg bw AST)、试验组III (24 mg/kg bw AST)、试验组IV (2 g/kg bw AC-1)、试验组V (2 g/kg bw AC-2), 以上试验组为AST建议剂量依序之17、34、52、17及42倍, 每组各使用5只雌性Sprague-Dawley (SD)品系大鼠, 以口服管喂方式单次投予试验物质或对照物质, 并进行7天临床观察。试验结束后, 牺牲大鼠并采集血液、肝脏与肾脏进行血清生化分析及病理学检查。临床症状部分, 各组别所有大鼠均无出现异常之症状。动物体重部分, 血清生化结果显示, 对照组与其对应试验组均无显著差异。试验终结进行解剖肉眼检查及组织病理学检查, 所有动物皆未发现任何与试验物质处理相关之病变。综合以上实验结果, 试验物质AC-1、AC-2及AST在本试验条件下, 大鼠均无发现任何与试验物质相关之急性毒性反应, AC-1及AC-2其LD50皆大于2 g/kgbw, AST则大于24 mg/kg bw, 此结果将作为人体使用此产品之安全性参考。

关键词

樟芝菌丝体, Antrosterol, 急性毒性

*通讯作者。

An Acute Toxicity Study of Antrosterol and Antrosterol-Enriched *Antrodia cinnamomea* Mycelium in SD Rats

Hsin-Tung Chu¹, Ting-Wei Lin¹, Wen-Cherng Tsai², Yu-Hsuan Kuo³, Chang Zhao⁴,
Chin-Chu Chen^{1,5,6,7*}

¹Grape King Bio Ltd., Taoyuan Taiwan

²CRO Laboratory, Super Laboratory Co. Ltd., New Taipei Taiwan

³Department of Cosmetic Science, Chang Gung University of Science and Technology, Taoyuan Taiwan

⁴Shanghai Grape King Enterprise Co., Ltd., Shanghai

⁵Department of Food Science, Nutrition, and Nutraceutical Biotechnology, Shih Chien University, Taipei Taiwan

⁶Institute of Food Science and Technology, National Taiwan University, Taipei Taiwan

⁷Bioscience Technology, Chung Yuan Christian University, Taoyuan Taiwan

Email: *gkbioeng@grapeking.com.tw

Received: Dec. 4th, 2020; accepted: Feb. 16th, 2021; published: Feb. 24th, 2021

Abstract

This study was conducted to a single limit dose of acute toxicity assessment in SD rats according to the safety assessment guideline of Health Food announced by Ministry of Health and Welfare, Executive Yuan of Taiwan. The test substances in this experiment are Antrosterol (AST), *Antrodia cinnamomea* (*A. cinnamomea*) mycelium (AC-1) (AST content 3.0 mg/g) and Antrosterol-Enriched *A. cinnamomea* mycelium (AC-2) (AST content 8.8 mg/g) is provided by the Biotechnology Center of Grape King Inc. SD rats were divided into seven groups and were fed with RO water, olive oil, AST 8 (Group I), 16 (Group II), 24 (Group III) mg/kg bw, 2 g/kg bw *A. cinnamomea* powder (AST content 3.0 mg/g) (Group IV) and 2 g/kg bw Antrosterol-Enriched *A. cinnamomea* powder (AST content 8.8 mg/g) (Group V). The above test group is 17, 34, 52, 17 and 42 times the recommended dose of AST. Each group has 5 experiment animals. During the study period, no abnormality occurred in clinical signs and body weight. There was no significant difference in biochemistry parameters between the treatment and control group. Necropsy and histopathological examination showed no treatment-related change. The results of this study provide evidences for the use of *A. cinnamomea* fermentation product as a safe agent in functional food: The LD50 of *A. cinnamomea* powder, its Antrosterol, *A. cinnamomea* powder and Antrosterol-Enriched *A. cinnamomea* powder than 24 mg/kg bw, 2 g/kg bw and 2 g/kg bw in SD rats respectively.

Keywords

Antrodia cinnamomea, Antrosterol, Acute Toxicity

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

樟芝(*Antrodia cinnamomea*)是台湾特有的真菌之一,被认为具有调节免疫、保护肝脏的功能[1]。樟芝主要寄生在牛樟树上,而牛樟树是台湾特有的树木之一,因此樟芝被认为是国宝级的真菌。但牛樟树生长速度缓慢,且遭遇人工滥伐,进而造成野生樟芝子实体面临被灭绝的危险之中[2]。近年来已发展出人工培育樟芝的方法,其中深层发酵是一种快速、清洁卫生、可控制质量的生产方法,并可透过调控发酵条件以产生特定活性物质。樟芝所含的生理活性也逐渐明朗,包括抗发炎、抗癌、增强免疫能力及保护肝脏等功能,深具研究及商业开发价值[3]。其中樟芝特有功效性成分 Antrosterol (ergostatrien-3 β -ol, AST) (图 1)具护肝止痛抗发炎功效,且此纯化物已完成消炎镇痛[4]、保肝(非酒精性肝炎[5]及酒精性肝炎[6])、抑制糖尿病和高血脂症[7],促进伤口愈合[8],抗光损伤[9]以及减轻出血性中风[10]等动物试验。其食用历史已久,显示樟芝具有相当程度的食用安全性;但培养方式不同,其代谢物组成成分亦不同,故目前探讨富含活性成分 AST 之菌丝冻干品及纯化物尚未完善,因此本研究进一步提供大鼠急性毒性试验结果,本研究依照卫生福利部公告的《健康食品安全性评估方法》[11]以评估其之食用安全性。

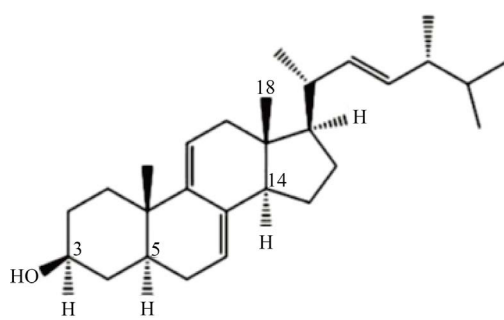


Figure 1. Chemical structure of Antrosterol
图 1. Antrosterol 之化学结构

2. 材料与方法

2.1. 液态发酵菌丝体发酵条件

樟芝(*A. cinnamomea*) (BCRC 35398)菌种购自台湾新竹市食品工业发展研究所生物资源保存及研究中心。在生物安全柜中,将 PDA 平板上长好的樟芝菌丝,取 0.5 cm 大小正方的菌块,接种入 2 L 三角瓶中(内含 1 L 液体培养基),于 25℃、100 rpm 中震荡培养 2 周,后接种入 500 公升级发酵槽,在 90 rpm 的搅拌,0.5 vvm 的通气量、25℃中培养 7 天;经冷冻干燥、磨粉后得樟芝菌丝体发酵全液冻干粉(简称 AC)。液体培养基组成:1.0%葡萄糖、0.5%黄豆粉、0.5%蛋白胨、0.3% (NH₄)₂SO₄、0.1% MgSO₄·7H₂O。AC 再利用 HPLC 进行 AST 定量[12]。

2.2. 纯化物纯化方法

樟芝液态发酵菌丝体粉末利用乙醇萃,萃取液进行减压浓缩,得到棕色萃取物,将其加水(1 升),然后用 1 升乙酸乙酯分配分离共 3 次。乙酸乙酯层萃取物(96 g)在硅胶上进行色谱分离,正己烷和乙酸乙酯作为洗脱剂。用 10%的乙酸乙酯洗脱,然后用乙醇再结晶得到 AST (5.1 g)。

2.3. 试验动物及实验伦理管理声明

8 周龄 Sprague-Dawley (SD)雌性大鼠,购自乐斯科生物科技(BioLASCO Taiwan Co., Ltd. Taipei, Taiwan);饲养条件为 22℃ ± 2℃、55% ± 15%相对湿度、12 小时光照/黑暗交替、饲料 MFG (Oriental Yeast

Co., Ltd., Tokyo, Japan)。本试验所执行之试验程序均经委托机构之动物试验管理委员会审阅。描述于试验报告中之操作程序均以避免并降低试验动物之不适、紧迫、疼痛之方式进行。本试验之实验动物管理委员会核可编号(IACUC NO.)为 109-1ae。

2.4. 分组与剂量

本试验共设置 7 组, 每组 5 只大鼠, 试验组 I、II、III 投予试验物质 AST, 剂量分别为 8 mg/kg bw、16 mg/kg bw 及 24 mg/kg bw, 分别为人体 AST 建议口服剂量(人体 4.5 mg/60 kg bw 之 17 倍、34 倍及 52 倍)。试验组 IV、V 分别投予试验物质 AC-1 (内含 AST 3.0 mg/g)、AC-2 (内含 AST 8.8 mg/g), 剂量皆为 2 g/kg bw, 分别为人体 AST 建议口服剂量之 17 倍及 42 倍。试验组之试验物质皆为粉状, 试验前试验组 I、II、III 之试验物质以橄榄油分别配制成 0.8 mg/mL、1.6 mg/mL、2.4 mg/mL, 试验组 II、III 之试验物质以逆渗透水配制成 200 mg/mL。动物经禁食 16 小时, 以管喂口服投予试验物质或对照物质, 投予一次, 投予体积为 10 mL/kg bw。试验前记录体重。投药 4 小时后给予食物, 并在经过投予试验或对照物质的第 30 分钟、4 小时观察一次, 之后每日观察一次至投药后第 7 天。试验结束时(第 8 天), 将所有存活大鼠以吸入二氧化碳的方式牺牲并进行解剖及肉眼病变检查。

2.5. 试验数据分析

实验数据以平均值(mean)及标准偏差(standard deviation, SD)表示。试验数据利用 SPSS 统计软件中单因子变异数分析(One-Way ANOVA)后, 以 Duncan's multiple range test 进行各组别间数据之差异性分析, 并以 p 值小于 0.05 作为显著差异水平。

3. 结果

3.1. 动物体重及临床观察

体重为试验前及牺牲时(第 8 天)之体重, 试验组与对照组相比皆无统计显著差异($p > 0.05$) (表 1)。详细记录大鼠的毒性症状、发生时间、症状持续时间以及复原状态。对照组及各试验组之大鼠, 于试验期间皆无异常临床症状。试验期间无大鼠之死亡情形。

Table 1. Body weight of rats at the beginning and the end of the study

表 1. 试验期间大鼠体重

组别	体重(g)						
	逆渗透水 对照组	橄榄油 对照组	试验组 I	试验组 II	试验组 III	试验组 IV	试验组 V
试验前	197.4 ± 7.3	201.0 ± 4.1	205.0 ± 4.7	205.4 ± 9.6	207.5 ± 6.3	202.6 ± 9.5	202.7 ± 5.2
第八天	208.7 ± 6.6	214.2 ± 6.4	223.1 ± 6.6	219.8 ± 15.6	222.4 ± 8.9	217.6 ± 11.4	217.2 ± 11.6

Data expressed as mean ± S.D., n = 5. *Significant different from control group ($p < 0.05$).

3.2. 血清生化分析

牺牲后采血, 将血液收集于不含抗凝剂之采血管, 并离心分离血清, 分析血中尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、天门冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)及丙胺酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)。结果显示, 试验组与对照组相比无统计显著差异($p > 0.05$) (表 2)。

3.3. 病理解剖、肉眼病理学及组织病理学检查

试验结束后, 肉眼检查大鼠外观、口腔、颅腔及胸、腹腔内各组织及器官。采集各组之肾脏及肝脏

组织，并将组织以 10% 中性福尔马林溶液进行固定及保存，所有存活大鼠牺牲后进行解剖及肉眼病变检查，结果显示并无任何肉眼病变(图 2)。对照组及试验组之肾脏及肝脏无明显组织病理变化(图 3)。非特异性组织病理判读结果为肝脏混合性炎症细胞浸润，散发，极微(图 3(A))；肝细胞质空泡，大泡性，极微(图 3(B))；肾脏慢性进展性肾病，极微(图 3(C))；肾脏单核炎症细胞浸润，间质，极微(图 3(D))。以上病变严重性均为极微，此病变于各组组间之病变发生率无显著差异。

Table 2. Hematology of rats after 7 days

表 2. 试验结束后血清生化分析

组别	血清生化分析						
	逆渗透水对照组	橄榄油对照组	试验组 I	试验组 II	试验组 III	试验组 IV	试验组 V
BUN (mg/dL)	21.8 ± 3.2	23.2 ± 4.1	28.5 ± 5.8	24.0 ± 3.9	21.7 ± 3.4	22.4 ± 3.8	25.7 ± 2.6
AST (U/L)	96.8 ± 16.0	85.2 ± 6.1	82.4 ± 7.6	90.4 ± 11.2	82.8 ± 7.5	91.4 ± 12.1	88.0 ± 11.9
ALT (U/L)	48.4 ± 8.7	41.6 ± 12.9	51.6 ± 4.7	48.4 ± 9.3	48.4 ± 9.3	45.4 ± 8.3	38.2 ± 3.4

Data expressed as mean ± S.D., n = 5. *Significant different from control group (p < 0.05).

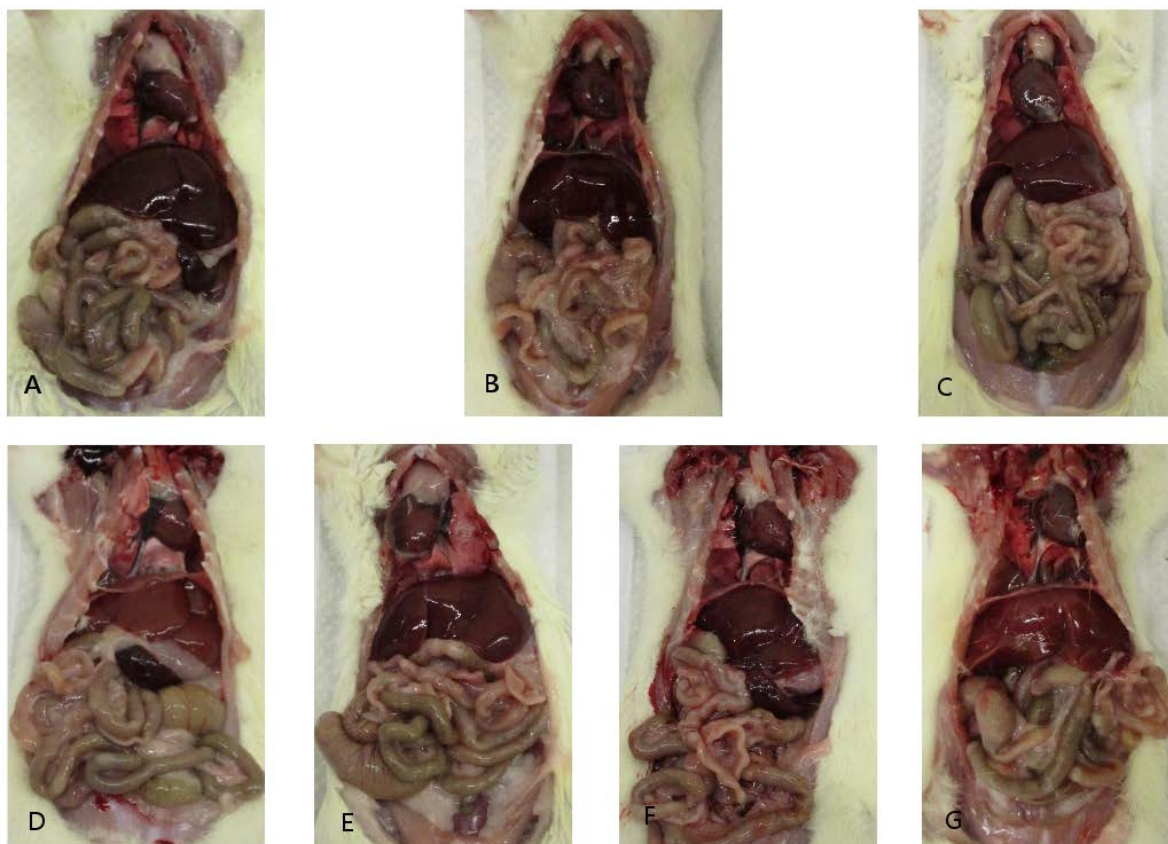


Figure 2. Anatomy examination of rats. A: RO water group; B: Olive oil group; C: Group I; D: Group II; E: Group III; F: Group IV; G: Group V

图 2. 各组大鼠肉眼病变检查剖图。A: 逆渗透水对照组；B: 橄榄油对照组；C: 试验组 I；D: 试验组 II；E: 试验组 III；F: 试验组 IV；G: 试验组 V

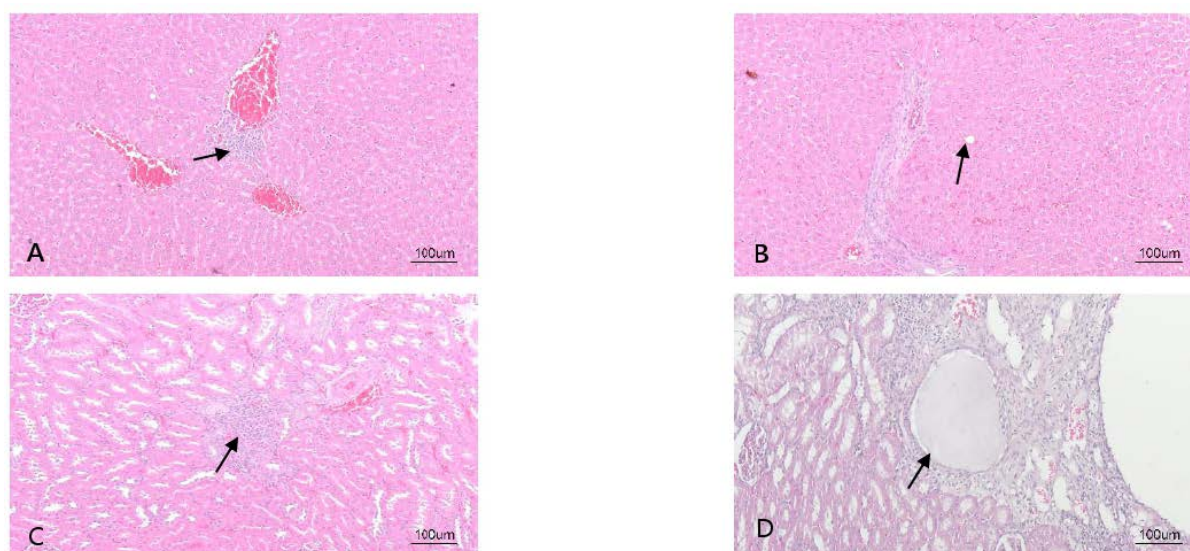


Figure 3. Histopathological changes (non-specific disease) of control and treated rats. Histopathological changes (non-specific disease) of control and treated SD rats in the acute oral toxicity study. (A) Mixed type inflammatory cell infiltration in liver (100×); (B) Hepatocellular cytoplasmic vacuolation in liver (100×); (C) Mononuclear cell infiltration in kidney (100×); (D) Cystic dilation in kidney (100×)

图 3. 非特异性组织病理学变化。A: 肝脏散发混合性炎症细胞浸润(100×); B: 肝脏肝细胞质空泡(100×); C: 肾脏单核炎症细胞浸润(100×); D: 肾脏囊泡(100×)

4. 讨论

试验后, 各组平均正常增重, 试验组体重与对照组相比无统计显著差异, 于临床观察及病理判读无相关病变, 故判定本试验物质对于试验动物体重无不良影响。试验期间各组大鼠均无异常临床症状与死亡等毒性症状, 试验结束后之病理解剖及肉眼病理学检查发现并无任何异常病变, 故判定本试验物质不会对试验动物造成组织肉眼病变。血清生化结果显示, 试验组与对照组相比无统计显著差异。组织病理学检查试验动物肝脏及肾脏, 观察之病变属于此物种常见非特异性病变, 且对照组及试验组间之病变发生率及严重程度亦无显著差异, 应非特异性病变, 与试验物质无关。

5. 结论

试验结果显示, 投予试验物质后, 各组试验大鼠均存活至试验结束, 于动物临床观察、肉眼病变观察无明显异常。各组大鼠试验期间, 各组平均正常增重, 试验组体重与对照组相比无显著差异。血清生化结果中试验组与对照组相比无统计显著差异。于临床观察及组织病理判读无试验物质相关病变, 故判定本试验物质对于试验动物体重及血清生化数值无不良影响。综合以上实验结果, 试验物质 AC-1、AC-2 及 AST 在本试验条件下, 大鼠均无发现任何与试验物质相关之急性毒性反应, AC-1 及 AC-2 其 LD₅₀ 皆大于 2 g/kg bw, AST 则大于 24 mg/kg bw, 此结果可作为毒性试验时剂量参考范围之选择及人体使用此产品之安全性参考。

参考文献

- [1] Chang, T.T. and Chou, W.N. (1995) *Antrodia cinnamomea* sp. nov. on *Cinnamomum kanehirai* in Taiwan. *Mycological Research*, **99**, 756-758. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80541-8](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80541-8)
- [2] 陈劲初. 樟芝为元气之宝最新版[M]. 台北: 元气斋出版社有限公司, 2010.
- [3] Lu, M.C., El-Shazly, M., Wu, T.Y., Du, Y.C., Chang, T.T., Chen, C.F., Hsu, Y.M., Lai, K.H., Chiu, C.P., Chang, F.R.

- and Wu, Y.C. (2013) Recent Research and Development of *Antrodia cinnamomea*. *Pharmacology & Therapeutics*, **139**, 124-156. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.04.001>
- [4] Huang, G.J., Huang, S.S., Lin, S.S., Shao, Y.Y., Chen, C.C., Hou, W.C. and Kuo, Y.H. (2010) Analgesic Effects and the Mechanisms of Anti-Inflammation of Ergostatrien-3 β -ol from *Antrodia camphorata* Submerged Whole Broth in Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **8**, 654-660. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf1013764>
- [5] Huang, G.J., Deng, J.S., Huang, S.S., Shao, Y.Y., Chen, C.C. and Kuo, Y.H. (2012) Protective Effect of Antrosterol from *Antrodia camphorata* Submerged Whole Broth against Carbon Tetrachloride-Induced Acute Liver Injury in Mice. *Food Chemistry*, **132**, 709-716. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.004>
- [6] Chang, Y.Y., Liu, Y.C., Kuo, Y.H., Lin, Y.L., Wu, Y.H.S., Chen, J.W. and Chen, Y.C. (2017) Effects of Antrosterol from *Antrodia camphorata* Submerged Whole Broth on Lipid Homeostasis, Antioxidation, Alcohol Clearance, and Anti-Inflammation in Livers of Chronic-Alcohol Fed Mice. *Journal of Ethnopharmacology*, **202**, 200-207. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.03.003>
- [7] Kuo, K.H., Lin, C.H. and Shih, C.C. (2015) Ergostatrien-3 β -ol from *Antrodia camphorata* Inhibits Diabetes and Hyperlipidemia in High-Fat-Diet Treated Mice via Regulation of Hepatic Related Genes, Glucose Transporter 4, and AMP-Activated Protein Kinase Phosphorylation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **63**, 2479-2489. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00073>
- [8] Tsai, C.T., Tung, Y.T., Kuo, Y.H., Liao, J.W., Tsai, H.C., Chong, K.U., Chen, H.L. and Chen, C.M. (2015) Anti-Inflammatory Effects of *Antrodia camphorata*, a Herbal Medicine, in a Mouse Skin Ischemia Model. *Journal of Ethnopharmacology*, **159**, 113-121. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.11.015>
- [9] Kuo, Y.H., Lin, T.Y., You, H.J., Wen, K.C., Sung, P.J. and Chiang, H.M. (2016) Antiinflammatory and Antiphoto-damaging Effects of Ergostatrien-3-ol, Isolated from *Antrodia camphorata*, on Hairless Mouse Skin. *Molecules*, **21**, 1213-1227. <https://doi.org/10.3390/molecules21091213>
- [10] Wang, Y.H., Chern, C.M., Liou, K.T., Kuo, Y.H. and Shen, Y.C. (2019) Ergostatrien-7,9(11),22-Trien-3 β -ol from *Antrodia camphorata* Ameliorates Ischemic Stroke Brain Injury via Downregulation of p53NF- κ -B and Caspase 3, and Activation of Akt/GSK3/Catenin-Associated Neurogenesis. *Food & Function*, **10**, 4725-4738.
- [11] 行政院卫生署. 健康食品安全性评估方法[S]. 台湾卫署食字第 88037803 号, 1999.
- [12] Tung, Y.T., Tsai, T.C., Kuo, Y.H., Yen, C.C., Sun, J.Y., Chang, W.H., Chen, H.L. and Chen, C.M. (2014) Comparison of Solid-State-Cultured and Wood-Cultured *Antrodia camphorata* in Anti-Inflammatory Effects Using NF- κ B/Luciferase Inducible Transgenic Mice. *Phytomedicine*, **21**, 1708-1716. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.08.011>