

蝙蝠蛾擬青黴菌絲體萃取物對 cisplatin 誘導之小鼠腎毒性具有保護效果

林宜瑾¹，陳彥博¹，周柏誼¹，黃冠中²，陳勁初^{1,3-5*}

葡萄王生技股份有限公司，桃園市¹；中國醫藥大學中國藥學暨中藥資源學系，台中市²；台灣大學食品科技研究所，台北市³；實踐大學食品營養與保健生技學系，台北市⁴；中原大學生物技術系，桃園市⁵，台灣

摘要

順鉑(cisplatin)為目前常用的化療藥物之一，對多種癌症都有顯著療效，臨床應用廣泛，但本身也有強烈副作用包括噁心、嘔吐、腎毒性等。本研究利用 cisplatin 進行誘導腎損傷，以評估蝙蝠蛾擬青黴菌絲體萃取物是否具有預防性保護作用。試驗分為五組，每組 8 隻 ICR 雄性小鼠每日投予劑量分別為對照組 5 ml/kg bw 的生理食鹽水、誘導藥物組 20 mg/kg bw 的 cisplatin、正對照組為 200 mg/kg bw 的 Amifostine、酒萃物組 500 mg/kg bw 的蝙蝠蛾擬青黴菌絲體酒萃物、水萃物組 500 mg/kg bw 的蝙蝠蛾擬青黴菌絲體水萃物，各分別配合 20 mg/kg bw 的 cisplatin。投予試藥 10 天，投藥後第七天注射 cisplatin 進行誘導，誘導 96 小時後犧牲。結果顯示，蝙蝠蛾擬青黴菌絲體酒萃物與水萃物組均可以降低 BUN 和 creatinine 的含量、對 cisplatin 誘導的腎毒性之腎臟指數均下降、並顯著降低由 cisplatin 誘導的腎組織中之組織病理學變化。且在細胞實驗中發現合併使用蝙蝠蛾擬青黴菌絲體萃取物與 cisplatin 處理癌細胞，對於癌細胞存活率並無影響，顯示蝙蝠蛾擬青黴菌絲體萃取物並不影響化療藥物 cisplatin 抑制癌細胞生長的效果。總之，本研究的結果證實蝙蝠蛾擬青黴菌絲體兩種萃取物對 cisplatin 誘導的小鼠腎毒性有保護作用。

關鍵字：蝙蝠蛾擬青黴菌絲體萃取物、冬蟲夏草、cisplatin 誘導、腎毒性保護作用

前言

急性腎損傷(Acute kidney injury, AKI)其病因是多方面的，通常發生主因為腎組織損壞造成的結果，其起因為腎小球濾過率(glomerular filtration rate, GFR)降低，導致由腎動脈血流減少引起的氮質血症或腎臟不能產生足夠的尿液，以及腎損傷、發炎或阻塞。藥物性腎損傷是指暴露於具有毒性或者潛在毒性藥物之後，導致腎臟受到不同程度的損傷，其臨床表現為尿液成分檢查異常、腎病

理結構異常和腎功能異常等。

順鉑(cisplatin)是一種廣泛使用的抗癌藥物，對幾乎所有身體部位的癌症都有效。Cisplatin 在 1965 年首次被確定為細胞週期的抑制劑，並且其治療功效已被廣泛研究。儘管其具有化學治療活性，但先前報導該分子在人體的幾個重要器官中的毒性，包括心臟，肝臟，腦，脾等，尤其在腎組織中具有最顯著的傷害。然而，直到目前為止，cisplatin 依然是幾種癌症的唯一藥物選擇。由 cisplatin 給藥引起的腎功能不全或腎毒性可以通過多種方式進行分類，其中發現超過 30% 的接受治療患者罹患急性腎損傷(AKI)^[1,2]。

蝙蝠蛾擬青黴(*Paecilomyces hepiali*)是

*通訊地址：葡萄王生技股份有限公司

桃園市龍潭區龍園一路 68 號 陳勁初

電話：(03)4993093 ext.5813

E-mail: gkbioeng@grapeking.com.tw

從冬蟲夏草中分離出的伴生菌株之一^[3]，其命名始於中國中醫科學院中藥研究所於1982年採集冬蟲夏草中分離獲得菌株，並對菌株進行培養和型態學研究，經鑑定命名為蝙蝠蛾擬青黴^[4]，屬於叢梗孢科(*Moniliaceae*)擬青黴屬(*Paecilomyces*)^[5]。研究結果證實其對人體功效有護腎^[6]、抗疲勞^[7]、降血脂^[8]、抗腫瘤^[9]等功效，而在菌絲體成分分析已知含有多醣、D-甘露醇、麥角甾類、腺苷^[10]等。

衛生福利部食品藥物管理署已公告「冬蟲夏草菌絲體食品標示相關規定」，若食品品名標示為「冬蟲夏草菌絲體」時，其使用之菌株須為中華被毛孢(*Hirsutella sinensis*)，或分離自冬蟲夏草之蟲草相關菌株，使用中華被毛孢以外菌株為食品原料時，應將相關文件送食品藥物管理署備查^[11]。本研究發酵生產之蝙蝠蛾擬青黴菌絲體發酵液凍乾粉已進行多項安全性試驗，試驗顯示其無基因毒性^[12]及無亞急性毒性作用^[13]，顯示具有相當的食用安全性。而在中國已有許多冬蟲夏草對於護腎相關的研究，但對於冬蟲夏草菌絲體的報告較少，且針對於蝙蝠蛾擬青黴菌絲體的研究就更少，因此利用cisplatin引起動物腎損傷模式，評估對蝙蝠蛾擬青黴菌絲體護腎的功效。

材料與方法

試驗物質

以葡萄王生技股份有限公司液態發酵生產之蝙蝠蛾擬青黴菌絲體發酵液乾燥粉萃取物作為試驗物質，本次試驗分為水萃物及酒萃物兩種萃取物；1.蝙蝠蛾擬青黴菌絲體發酵液乾燥粉加入10倍體積純水，於121°C加熱30分鐘，離心取上清液，經凍乾磨粉得到蝙蝠蛾擬青黴菌絲體水萃物。2.將蝙蝠蛾擬青黴菌絲體乾燥粉加入10倍體積95%酒精，置於振盪器轉速120 rpm隔夜，以濾紙過濾後取上清液，經減壓濃縮得到蝙蝠蛾擬青黴菌絲體酒萃物；本菌株經財團法人食品工業

發展研究所生物資源保存及研究中心〔Bio-resource Collection and Research Center (BCRC), Food Industry Research and Development Institute (FIRDI), 新竹市, 台灣〕，依其菌株型特徵、顯微構造及rDNA ITS1-5.8S-ITS2片段定序而進行鑑定確認為蝙蝠蛾擬青黴。

實驗動物

雄性ICR小鼠50隻，SPF級，體重32~33g，購自樂斯科公司，台灣。動物飼養條件符合實驗動物3R原則，小鼠自由飲食（動物飼料為LabDiet® 5001 Rodent diet, Purina Mills LLC, St. Louis, MO, USA）飲水（RO水），室溫23.0~25.0°C，濕度55%~65%，明暗交替12小時的環境中適應性飼養，每天更換墊料，適應性飼養1周。

研究設計

試驗共分五組，每組8隻小鼠。對照組為每日管餵投予劑量5 ml/kg bw的生理食鹽水(0.9% NaCl)、誘導藥物組經腹腔注射劑量20 mg/kg bw的cisplatin、正對照組為每日管餵投予劑量200 mg/kg bw的Amifostine，酒萃物及水萃物組各為經口每日管餵投予劑量500 mg/kg bw；除對照組外，另外四個組別在投藥後第七天腹腔注射劑量20 mg/kg bw的cisplatin進行誘導。除對照組外，另外四個組分別在投藥後第七天腹腔注射劑量20 mg/kg bw的cisplatin進行誘導，都是只有單次誘導。誘導後96小時（第11天）後犧牲。試驗期間每日進行臨床觀察並記錄動物體重變化，實驗終止後，以CO₂犧牲，觀察外觀、胸腹內組織器官並且紀錄，採集血液與腎臟。

血清尿素氮(Blood urea nitrogen, BUN)和肌酸酐(creatinine)的含量分析

評估血清尿素氮有助於評估急性腎損傷，表示腎臟健康。與BUN一樣，血清肌酸酐也

是腎臟功能的另一個主要指標。肌酸酐是通過肌肉代謝產生的，主要通過腎小球濾過從血液中除去。從每隻動物收集的血清中定量血清尿素氮和肌酸酐，並使用商業套組 RAN-DOX 試劑盒（台塑生醫科技股份有限公司，台灣）進行含量分析。

組織學檢查

各組實驗動物中分離腎組織，將其固定在福馬林緩衝液(10%)中並包埋在石蠟中。利用切片機製備大約 5 μm 的切片並將其貼附在載玻片上，然後以蘇木精和曙紅[hematoxylin and eosin (H&E) stain]進行染色。在光學顯微鏡下以 400 倍的放大率進行組織檢查。

人類癌細胞株培養與存活測試

於 96 孔平底細胞培養盤之每一孔加入 100

μL 培養基，其內含有 5×10^4 個細胞，於 5% 二氧化碳與 37°C 環境中培養 24 小時，使細胞貼覆於培養盤上；用以檢測蝙蝠蛾擬青黴菌絲體活性物質對人類子宮頸癌 HeLa 細胞經化療藥物 cisplatin 處理後存活率的影響。蝙蝠蛾擬青黴菌絲體萃取物溶解於二甲基亞石楓(dimethyl sulfoxide, DMSO)中，檢測時 DMSO 之濃度不超過 0.1% 以避免其毒性影響細胞生長；細胞以蝙蝠蛾擬青黴菌絲體萃取物處理一天後，加入化療藥物 cisplatin，共同處理 24 小時後，以 MTT assay 測量其存活率^[14]。

統計分析

數據以實驗結果之平均值(Mean) \pm 標準誤差(SD)表示。統計分析方法採用 Student's t-test，檢驗試驗物質組與對照組之間的差異， $p < 0.05$ 表示顯著差異。

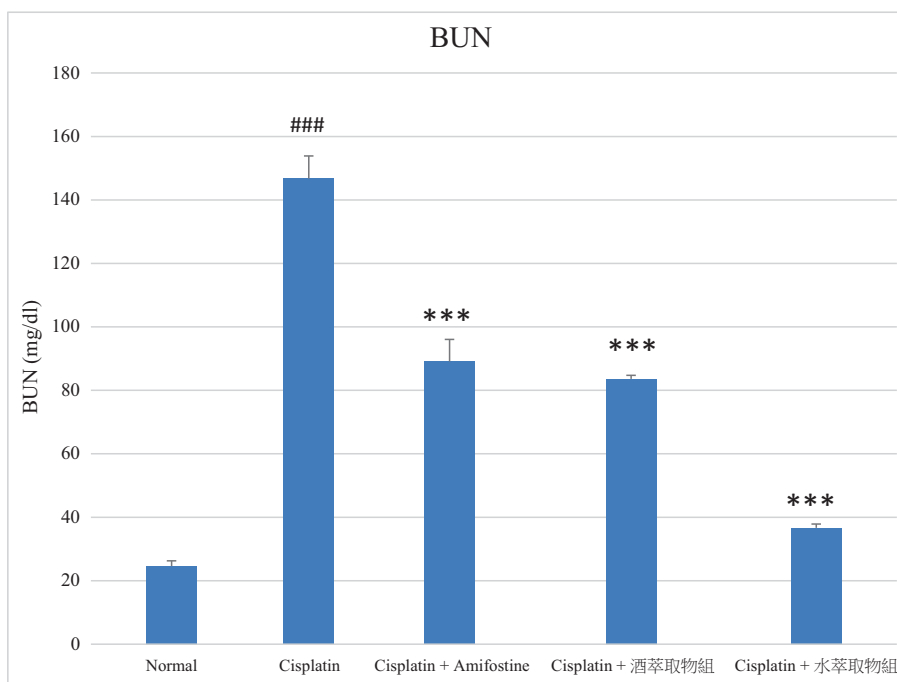


圖 1. 蝙蝠蛾擬青黴菌絲體之不同萃取物組別明顯降低 cisplatin 所引起小鼠血清中尿素氮(BUN)的含量

數據皆以平均值 \pm 標準差(mean \pm SD)呈現，n = 8。

表示與對照組比較具有顯著差異($p < 0.001$)。

*** 表示與 cisplatin 組比較具有顯著差異($p < 0.001$)。

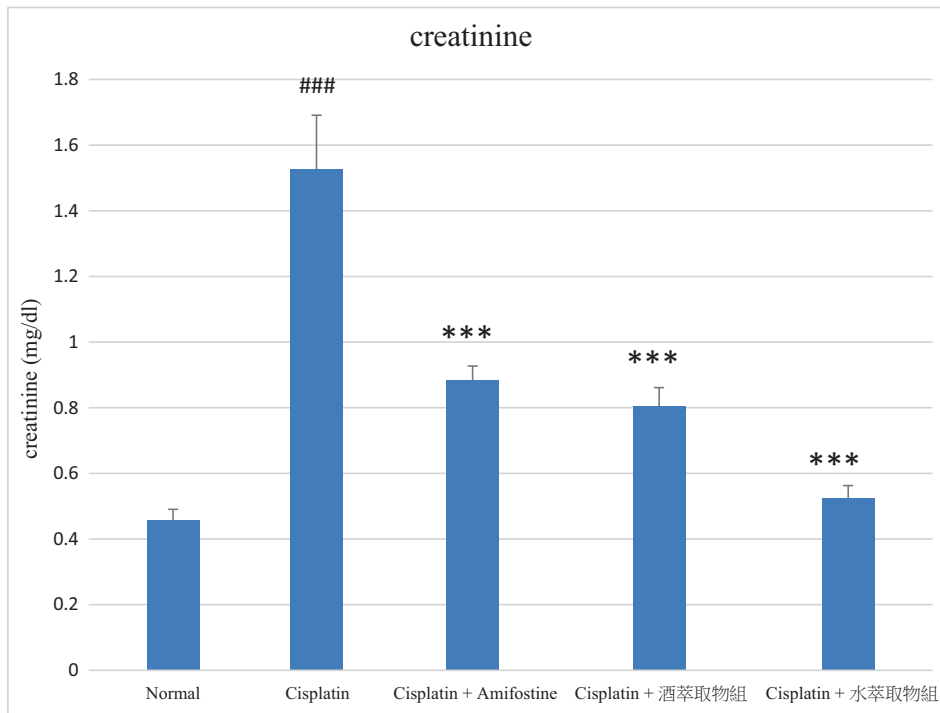


圖 2. 蝙蝠蛾擬青黴菌絲體之不同萃取物組別明顯降低cisplatin所引起小鼠血清中肌酐(creatinine)的含量

數據皆以平均值±標準差(mean ± SD)呈現, n =8。

表示與對照組比較具有顯著差異($p < 0.001$)。

*** 表示與 cisplatin 組比較具有顯著差異($p < 0.001$)。

結 果

血清尿素氮(BUN)和肌酐(creatinine)的含量

測量實驗動物血清中血清尿素氮(BUN)和肌酐(creatinine)的含量來分析蝙蝠蛾擬青黴菌絲體萃取物是否對於 cisplatin 誘導腎毒性有保護作用。由實驗結果顯示與僅給予 cisplatin 的組別相比, 蝙蝠蛾擬青黴菌絲體水萃物與酒萃物組, 兩組血清中BUN和creatinine的含量均顯著較低($p < 0.05$), 甚至比正對照組(cisplatin + amifostine)均更低, 其中水萃物組又優於酒萃組, 其BUN和creatinine數值與正常對照組近乎相同(圖1與圖2)。其中顯示, 蝙蝠蛾擬青黴菌絲體水萃物對 cisplatin 誘導的腎毒性具有顯著的預防保護效果。

腎臟指數

實驗結束時犧牲動物並記錄了動物的體重和腎重量。與對照組動物相比, cisplatin 組動物的體重顯著減輕($p < 0.05$), 且腎臟有腫大的趨勢, 其腎臟指數 [(腎重/體重) × 100] 顯著較其他組別高($p < 0.05$) (表1)。而正對照組與蝙蝠蛾擬青黴菌絲體萃取物組(500 mg/kg), 腎臟無腫大現象, 且腎臟指數顯著的下降, 與對照組相近, 可見蝙蝠蛾擬青黴菌絲體萃取物可顯著預防 cisplatin 引起的腎腫大, 而在體重部分, 可以觀察到 cisplatin 組動物後測體重明顯減輕($p < 0.05$), 而正對照組與蝙蝠蛾擬青黴菌絲體萃取物組體重與對照組接近, 其中以水萃物組保護效果最佳。

表 1. 蝙蝠蛾擬青黴菌絲體萃取物之不同組別改善 cisplatin 誘導腎腫大所獲得的腎臟指數

	Initial body mass/g	Final body mass/g	Renal mass/g	Kidney index
Normal	33.1±1.1	35.7±1.5	0.49±0.03	1.36
Cisplatin	33.3±0.8	28.2±1.1 [#]	0.75±0.03	2.56 ^{###}
Cisplatin + Amifostine	33.0±1.6	31.3±1.9	0.49±0.02	1.55 ^{***}
Cisplatin + 酒萃物組	33.2±1.3	32.3±1.7	0.48±0.01	1.46 ^{***}
Cisplatin + 水萃物組	33.5±1.8	35.1±1.5	0.50±0.02	1.38 ^{***}

數據皆以平均值±標準差(mean ± SD)呈現，n = 8。

^{###} 表示與對照組比較具有顯著差異($p < 0.001$)。

[#] 表示($p < 0.05$)。

^{***} 表示與 cisplatin 組比較具有顯著差異($p < 0.001$)。

腎組織切片

在組織病理學檢查中，可清楚地觀察到，口服 10 天的蝙蝠蛾擬青黴菌絲體萃取物後，可以降低由 cisplatin 誘導的腎組織的病變（圖 3）。在圖 3 中，與對照動物相比，組織病理學顯微照片顯示給予 cisplatin 的動物，其腎組織中腎臟近端小管積聚的多灶性腎小管壞

死顯著增加。而正對照組(amifostine)，組織病理學顯微照片沒有腎組織損傷。蝙蝠蛾擬青黴菌絲體水萃物組與酒萃物組，腎組織切片亦幾無病變，顯示蝙蝠蛾擬青黴菌絲體水或酒萃物組對 cisplatin 引起的腎臟組織病變有保護作用，又以蝙蝠蛾擬青黴菌絲體水萃物效果較佳。

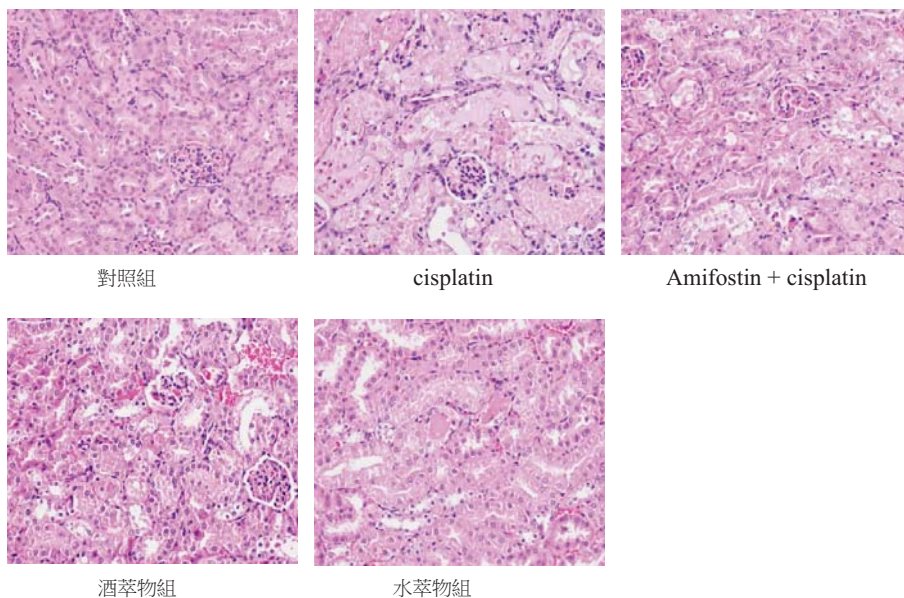


圖 3. 蝙蝠蛾擬青黴菌絲體之不同萃取物組別對 cisplatin 誘導的腎毒性的腎組織病理變化情形。說明：Cisplatin 腹腔注射處理後小鼠腎臟的組織病理學發現腎臟近端小管積聚的多灶性腎小管顯著壞死，正對照組含 amifostine 之 cisplatin 的組織病理學顯微照片沒有腎組織損傷，而蝙蝠蛾擬青黴萃取物組之組織損傷有顯著減輕情形。

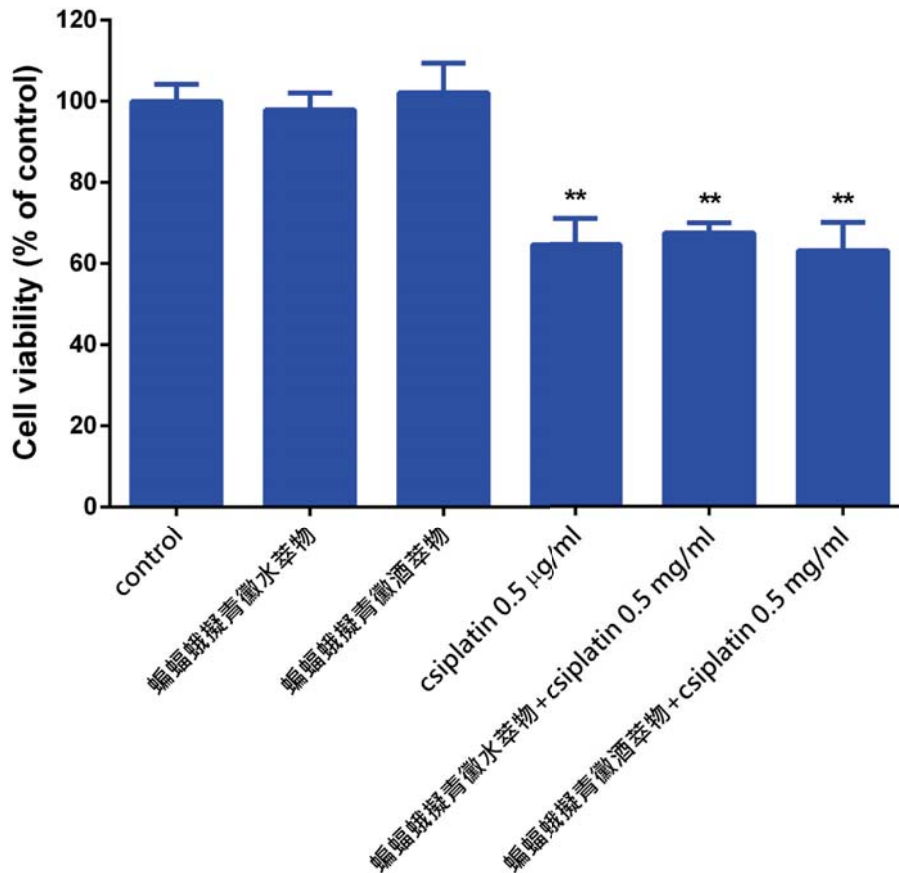


圖 4. 蝙蝠蛾擬青黴菌絲體之不同萃取物組別均不影響 cisplatin 抑制癌細胞的效果
數據皆以平均值±標準差(mean ± SD)呈現，n =3。
**與對照組比較具有顯著差異($p < 0.01$)。

蝙蝠蛾擬青黴菌絲體萃取物對 cisplatin 抑制癌細胞生長的影响

探討蝙蝠蛾擬青黴菌絲體萃取物對 cisplatin 抑制人類子宮頸癌 HeLa 細胞生長的影响，先以蝙蝠蛾擬青黴菌絲體萃取物處理 HeLa 細胞 1 天，再以 cisplatin 處理細胞 24 小時；結果如圖 4 所示，單獨水萃物或醇萃物處理並不會顯著影响($p > 0.05$) HeLa 細胞存活率，但水萃物或醇萃物合併 cisplatin 處理，HeLa 細胞後，細胞存活率量則可顯著降低($p < 0.05$)，但與單獨使用 cisplatin 組相比並無差異，顯示其細胞毒殺性完全來自 cisplatin，而蝠蛾擬青黴菌絲體萃取物並不影响化療藥物 cisplatin 抑制癌細胞生長的效果。

討論

Cisplatin 為化療常用藥物，其對於腎毒性的病理機制主要分為兩方面：一是減少腎小球濾過率，造成血清中肌酐 creatinine 和 BUN 含量升高；二是腎近端小管上皮細胞缺血甚至壞死。組織病理學分析發現，cisplatin 能夠嚴重損害腎組織結構，出現大面積壞死區域，細胞排列疏鬆，刷狀緣消失，腎小球出現明顯萎縮，腎小管空泡變性等^[15-17]。而本實驗中正對照組所用藥物 amifostine 為一種細胞保護劑，主要可用於舒緩治療期間的腎、神經毒性及血小板下降的程度，能使癌症病患減少併發症的發生，台灣衛生福利部於 2001 年八月核准 amifostine 上市，適用症

為卵巢癌或非小細胞肺癌病患接受 cisplatin 高劑量給藥所引起的累積性腎毒性，可見其對於減緩腎毒性的效益。

由本實驗蝙蝠蛾擬青黴菌絲體萃取物對於 cisplatin 誘導腎毒性保護作用試驗，可以發現蝙蝠蛾擬青黴菌絲體萃取物確實具有保護腎臟功能，尤其是蝙蝠蛾擬青黴菌絲體水萃物效果最好，可以達到抑制腎臟損傷的產生，且在腎臟指數數據中也能觀察到 cisplatin 會使動物體重減輕，而在肌少症動物模式中常會利用 cisplatin 來造症，在後測體重中可看見 cisplatin 組動物體重明顯降低（表 1），而蝙蝠蛾擬青黴菌絲體水萃物組跟對照組幾無差異，也許在後續實驗能在探討蝙蝠蛾擬青黴菌絲體對肌少症效益。除保護腎臟作用外，因本實驗利用 cisplatin 進行腎損傷的造症，而 cisplatin 為常用化療藥物，主要作用在消滅癌細胞，蝙蝠蛾擬青黴菌絲體萃取物可降低其對腎之損傷，是否亦同時降低其化療效果？故藉由體外細胞試驗來評估，結果發現蝙蝠蛾擬青黴菌絲體兩種萃取物皆不影響化療藥物 cisplatin 抑制癌細胞生長的效果。未來可以在 *in vivo* 進一步的確定其影響或對慢性腎衰竭模式加以探討，此將對於食品新功能的開發應有很大的助益。

參考文獻

- Tomar A, Vasisth S, Khan SI, Malik S, Nag TC, Arya DS, Bhatia J. Galangin ameliorates cisplatin induced nephrotoxicity *in vivo* by modulation of oxidative stress, apoptosis and inflammation through interplay of MAPK signaling cascade. *Phytomedicine* 2017; 34:154-61.
- Yan W, Xu Y, Yuan Y, Tian L, Wang Q, Xie Y, Shao X, Zhang M, Ni Z, Mou S. Renoprotective mechanisms of astragaloside IV in cisplatin-induced acute kidney injury. *Free Radic Res* 2017; 51:669-83.
- 戴如琴，蘭江麗，陳偉華。蝙蝠蛾擬青黴新種的研究。北京農業大學學報 1989; 15:221-5。
- 陽丹，黃婷婷，陳成，馬雲淑。蝙蝠蛾擬青黴菌絲體研究現狀。中國中醫藥信息雜誌 2015; 5:129-31。
- 蔣毅，姚一建。冬蟲夏草無性型研究概況。菌物系統 2003; 22:161-76。
- 倪潔珊，胡臻，吳笑英等。蝙蝠蛾擬青黴 Cs-4 菌粉輔助治療糖尿病腎病的臨床觀察。中華中醫藥學刊 2013; 31:1974-6。
- 席昭雁，趙起華，向前等。蝙蝠蛾擬青黴菌絲體抗疲勞功能實驗研究。中國自然醫學雜誌 2006; 8:143-5。
- Wang J, Teng L, Liu Y *et al.* Studies on the antidiabetic and antinephritic activities of *Paecilomyces hepialid* water extract in diet-streptozotocin-induced diabetic sprague dawley rats. *J Diabetes Res* 2016; 1:1-10.
- Wu Z, Lu J, Wang X *et al.* Optimization for production of exopolysaccharides with antitumor activity *in vitro* from *Paecilomyces hepialid*. *Carbohydr Polym* 2014; 99:226-34.
- 洪志來，王文宣，熊娟等。蝙蝠蛾擬青黴菌發酵菌絲體的化學成分研究。中草藥 2013; 44:947-50。
- 衛生福利部食品藥物管理署。訂定「冬蟲夏草菌絲體食品標示相關規定」。https://www.fda.gov.tw/Tc/newsContent.aspx?cid=3&id=8346。2012.2.9
- 吳思穎，葉淑幸，蔡岳廷等。蝙蝠蛾擬青黴(*Paecilomyces hepialid*)菌絲體發酵液之基因毒性及急性毒性探討。檢驗及品保雜誌 2015; 4:67-77。
- 盛莉莎，葉淑幸，方惟正等。蝙蝠蛾擬青黴菌發酵液凍乾粉之大鼠 28 天重複劑量亞急性毒性評估。檢驗及品保雜誌 2016; 5:111-21。
- Twentyman PR, Luscombe M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br J Cancer* 1987; 56:279-85.
- Qi ZL, Wang Z, Li W, Hou JG, Liu Y, Li XD, Li HP, Wang YP. Nephroprotective effects of anthocyanin from the fruits of *Panax ginseng* (GFA) on cisplatin-induced acute kidney injury in mice. *Phytother Res* 2017; 31:1400-9.
- Qu X, Gao H, Tao L, Zhang Y, Zhai J, Sun J, Song Y, Zhang S. Astragaloside IV protects against cisplatin-induced liver and kidney injury via autophagy-mediated inhibition of NLRP3 in rats. *J Toxicol Sci* 2019; 44:167-75.
- Park CH, Lee AY, Kim JH, Seong SH, Cho EJ, Choi JS, Kim MJ, Yang S, Yokozawa T, Shin YS. Protective effects of serotonin and its derivatives, N-feruloylserotonin and N-(p-coumaroyl) serotonin, against cisplatin-induced renal damage in mice. *Am J Chin Med* 2019; 47:369-83.

Protection of Cisplatin-induced Nephrotoxicity in Mice by *Paecilomyces hepiali* Mycelium Extracts

Yi-Chin Lin¹, Yen-Po Chen¹, Bo-Yi Jhou¹, Guan-Jhong Huang², Chin-Chu Chen^{1,3-5*}

¹Bioengineering Center of Grape King Bio Ltd., Taoyuan City ; ²Department of Chinese Pharmaceutical Sciences and Chinese Medicine Resources, China Medical University, Taichung City ; ³Institute of Food Science and Technology, National Taiwan University, Taipei ; ⁴Department of Food Science, Nutrition, and Nutraceutical Biotechnology, Shih Chien University, Taipei ; ⁵Department of Bioscience Technology, Chung Yuan Christian University, Taoyuan City, Taiwan

Abstract

Cisplatin is a chemotherapy drug used to treat a number of cancers. Common side effects of cisplatin include nausea, vomiting, and nephrotoxicity. The aim of the present study was to investigate the protective effect of *Paecilomyces hepiali* mycelium extracts against cisplatin-induced nephrotoxicity. Mice were randomly divided into five groups, and orally administered with saline (negative control), 200 mg/kg bw amifostine (positive control), 500 mg/kg bw *P. hepiali* mycelium water extract, or 500 mg/kg bw *P. hepiali* mycelium ethanol extract every day for 11 days. Cisplatin (200 mg/kg bw) was administered by intraperitoneal injection on day 7. Clinical symptoms and the body weight of each mouse was recorded daily. At the end of the study, all mice were sacrificed, and blood and organs were collected for clinical chemistry and histopathological examinations. Results showed that the mean BUN and creatinine levels

in mice pretreated with water or ethanol extract of *P. hepiali* mycelium were significantly lower than those without the pretreatment, suggesting that pretreatment of mice with *P. hepiali* mycelium extracts alleviated cisplatin-induced kidney damage. In addition, treatment of cisplatin with *P. hepiali* mycelium extracts did not affect the effect of cisplatin on the proliferation of cancer cells *in vitro*, suggesting that *P. hepiali* mycelium extracts have no effect on the antitumor activity of cisplatin. In summary, results of this study demonstrated protective effect of *P. hepiali* mycelium extracts on cisplatin-induced kidney injury in mice.

Keywords: *Paecilomyces hepiali* mycelium extracts, *Cordyceps sinensis*, cisplatin-induced, renal protective effect