

大蟬花菌種分離、鑑定及其液態培養菌絲體之基因毒性評估

徐瑞霞¹，葉淑幸¹，黃維茜²，陳勁初^{1,3-5*}

葡萄王生技股份有限公司，桃園市¹；葡眾企業股份有限公司，台北市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物學系，台北市⁴；新竹教育大學應用科學系，新竹市⁵，台灣

摘要

大蟬花(*Cordyceps cicadae*)是傳統中藥材，具有多樣生理活性，其成分及功效與冬蟲夏草相似，菌絲體可工業化大量生產。本研究以自台灣山區所採集、分離之大蟬花為樣品，經鑑定確認後公開寄存，並以深層發酵培養菌絲體，再以三項基因毒性試驗來探討大蟬花菌絲體發酵液凍乾粉之安全性。結果顯示，在沙門氏桿菌回復突變測試中，不論在有無 S9 代謝活化的條件下，在最高劑量 5 mg/plate 以下各劑量組，均與陰性對照組不具顯著差異，顯示其對沙門氏菌不具致突變性。體外哺乳類細胞染色體結構異常試驗結果顯示，在三小時處理（含或不含 S9 代謝活化混合物）以及十八小時處理（不含 S9 代謝活化混合物）組別，所觀察到具染色體變異之細胞數，相較於陰性對照組皆無顯著差異，顯示在 5 mg/mL 及其以下各濃度，對哺乳類細胞 CHO-K1 不具有致染色體變異之基因毒性。在生體內哺乳類動物細胞微核測試結果亦顯示在 5,000 mg/kg b.w. 及其以下各濃度組，皆不具誘發小鼠周邊血球細胞產生微核之能力；此外，所有測試劑量組的多染性紅血球比例和陰性對照組相較下皆無明顯差異，顯示試驗物質不會抑制小鼠之造血功能。綜合上述指出大蟬花菌絲體發酵液凍乾粉不具有基因毒性。

關鍵字：蟬花、鑑定、沙門氏桿菌回復突變試驗、體外哺乳類細胞染色體結構異常試驗、嚙齒類週邊血液微核試驗

前言

蟬花又名蟲花、蟬草、胡蟬、蟬菌、蟬蛹草、金蟬花、蟬茸或蠶茸等，為子囊菌亞門(*Ascomycotina*)、麥角菌目(*Claricipiyales*)、麥角菌科(*Clavicipitaceae*)、蟲草屬(*Cordyceps*)真菌，感染蟬蛹或蟬科山蟬(*Cicada flammate*)、螻蛄(*Platypleura kaempferi*)、黑蚱(*Crytotympana pustulata*)及竹蟬(*Platylomia pieli*)等幼蟲後，利用蟲體做為養分生長菌絲後使其死亡，再於蟬蟲體頭部形成花蕾狀子座而成，故名蟬

花，為一種菌蟲複合體。蟬花可依不同的寄主及感染菌種分類為大蟬花(*Cordyceps cicadae*)、小蟬花(*Cordyceps sobolifera*)及蟬草或蟬生蟲草(*Cordyceps cicadicola*)三種^[1]。蟬花多產於長江以南熱帶和亞熱帶地區，分佈在中國、日本、韓國、東南亞、及北美等地，在台灣北部山區竹林亦有野生大蟬花子實體蹤跡，野生小蟬花則現蹤於花蓮瑞穗、光復、玉里之文旦園中等地。

蟬花為名貴傳統中藥材，入藥已有一千多年歷史，歷史記載比冬蟲夏草早了 800 年，古籍中記載豐富，蟬花之名最早見於南北朝劉宋時代之《雷公炮炙論》（雷斅著），其中記載：「凡使蟬花要白花全者。收得後於屋下懸乾，去甲土後用漿水煮一日，至夜焙

*通訊地址：葡萄王生技股份有限公司
桃園市中壢區龍岡路三段 60 號 陳勁初
電話：(03)4572121 ext. 234
E-mail address: gkbioeng@grapeking.com.tw

乾，研細用之。」。

《本草綱目》記載其性寒、味甘、無毒，曬乾後可入藥，有散風熱、鎮驚、明目、退翳障、透疹之功效，主治小兒天吊、驚癇、心悸、夜啼。現代藥理學實驗也表明，天然蟬花或其人工培養物具有明顯的護眼^[2-5]、調節免疫力^[6]、護腎^[7-9]、抗腫瘤^[10-13]、降血糖^[14]、鎮靜^[15]、鎮痛解熱^[15]、抗輻射^[16]以及抗疲勞^[17]等功效。

臨床上已有蟬花複方在治療眼疾方面的研究。1986年田開偉等以《太平惠民和劑局方》中的「蟬花無比散」治療急性結膜炎、慢性瞼緣炎、慢性淚囊炎、翼狀胬肉等四例外障眼疾，皆獲痊癒^[2]；1994年彭廣華等以「生液散」和「蟬花五味散」配合，可治療眼壓，有效率占46.67%^[3]；2001年王洪泉等人以「自擬蟬花湯」治療單純性皰疹結膜炎取得良好療效^[4]；2010年徐大梅等以《原機啟微》中的「萬應蟬花散」治療春季結膜炎，結果顯示可減輕結膜充血，降低復發率，功效顯著^[5]。其它亦有臨床治療腎病及肺炎咳嗽等報導^[18,19]。

其它傳統常用方劑如「蟬花明目方」及「蟬花清熱方」等皆可見於《中華藥物大全》及《中華藥海》記載。

目前已有研究顯示可人工培養蟬花子實體^[20]，雖人工培養之子實體已可大量生產並已在中國浙江溫州市上市供應餐廳宴客，但其栽培方式需費大量人工且需一個月之培養期，採收時不易發現汙染造成管困難等缺點。而液態發酵培養，在1%接種量下僅須三天即可生長完成，製程完全在無菌環境中且能均勻取樣控管品質，故在工業化量產時，再現性佳。人工蟬花子實體或液態發酵的蟬花人工培養物其主要生物活性成分、藥理學作用均和天然蟬花相似或超出天然蟬花^[20-25]。

蟲草種類繁多容易混淆，一般野外採集者較不易區分菌種類別，過去在中國曾有誤

食中毒報導^[26]，由於野生採集易誤採或採到已長黴或細菌而產生氨味之腐敗品（曬乾後氨味消失），且會造成資源匱乏，因此以液體發酵生產成為可行之替代方案。

以人工液態發酵方式培養菌絲體可能會因培養手段不同而誘導產生不同產物或代謝物，因此仍有進行安全性試驗的必要性。本研究乃以台灣山區採集之野生大蟬花為菌種來源分離出菌絲體，經基因序列鑑定後，再以液態發酵方式培養大蟬花菌絲體為樣品，進行三項基因毒性試驗，以做為日後產品開發供人體食用安全劑量之參考依據。

材料與方法

大蟬花菌種來源

大蟬花樣品為暮春時採集於新北市三峽滿月圓山區之野生大蟬花，包含蟲體子座及其子實體（圖1）。將其蟲體子座切開後分離其菌絲體，並接種培養於馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基(potato dextrose agar, PDA)及麥芽萃取物培養基(malt extract agar, MEA)上。20日後採其平板上菌絲，以不同引子對進行PCR反應並與基因庫資料比對鑑定。

菌種鑑定

以光學顯微鏡檢視培養於PDA培養基之無性繁殖構造；序列分析依據rDNA ITS1-5.8S-ITS2、SSU rDNA及 β -tubulin之片段定序分析結果進行比對鑑定。選用一般通用之引子對（V9G/LR1引子對）進行PCR反應，增幅ITS1-5.8S-ITS2序列，序列總長為733 bp，並與NCBI GenBank基因庫資料比對。另外進行SSU rDNA部分序列分析，以NS1/NS4當引子對，直接進行PCR反應，序列總長為1,058 bp，並與NCBI GenBank基因庫資料比對。另外進行 β -tubulin部分序列分析，以Bt2a/Bt2b當引子對，直接進行PCR反應，序列總長為332 bp，並與NCBI GenBank基



圖 1. 臺北三峽滿月圓山區採集之大蟬花(*Cordyceps cicadae*)。上圖為野生蟬花被發現時呈現的狀態，蟲體子座埋入土中，僅露出頭部及長滿分生孢子之子實體之部分。下圖為出土後實際比例情形。

因庫資料比對。

樣品製備

取馬鈴薯葡萄糖洋菜平板培養基上菌絲體接種於內含 1 L 培養基 (2% 葡萄糖、1% 酵母萃出物、1% 黃豆粉、pH 6.0) 的 2 L 燒瓶中，在 25°C 下以轉速 120 rpm 培養三天，至發酵液呈亮紫色。培養出之菌絲體發酵液再接種至 500 L 內含 400 L 相同培養基發酵槽中，在 25°C 下培養三天後，再接種到 50 噸發酵槽中 (含 40 噸相同培養基)，25°C 下培養三天後加熱至 100°C 三小時，萃出其多糖，再收取其菌絲體發酵液，於 55°C 下減壓濃縮，經冷凍乾燥及磨粉後，保存於 4°C 備用。

高效能液相層析

將大蟬花菌絲體發酵液凍乾粉以 20 倍體積乙醇萃取，以 120 rpm 轉速震盪萃取 12 小時，離心後取上清液，以 0.45 μm 濾膜過濾。使用高效能液相層析儀 (HPLC, HITACHI L-5000 Series) 以 UV 波長 254 nm 偵測，使用逆相分離管柱 (Inertsil®, ODS-2, 4.6 x 250 mm, 5 μm)，移動相 A 為二次去離子水，B 為 acetonitrile，分析時間 100 分鐘，梯度 0-15 min 100% A，15-40 min 100%~80% A，40-55 min 80%~50% A，55-75 min 50%~0% A，75-90 min 0% A，90-91 min 0%~100% A，91-100 min 100% A，流速 1.0 mL/min，進樣量 10 μL。

所得圖譜峰柱與標準品 Adenosine (Sigma-aldrich, USA) 及 N⁶-(2'-hydroxyethyl)-adenosine (HEA; Sigma-Aldrich, USA) 進行比對。

實驗動物和飼養

生體內哺乳類動物細胞微核試驗使用 7 周齡 ICR 品系小鼠，購自於樂斯科生物科技股份有限公司（宜蘭，台灣），動物先於飼育室中經 7 天隔離檢疫與適應後始進行試驗。動物飼養於經國際實驗動物管理評估及認證協會 (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, International, AAALAC) 認證之 SPF 等級動物房，提供通風良好之飼養環境，溫度維持在 21±2 °C，室內相對溼度 55±20%，每天恆定 12 小時光照循環；每籠飼養 5 隻小鼠，使用飼料為經滅菌後之 LabDiet 5010 (PMI[®] Nutrition International, LLC. Richmond, Indiana, USA)，試驗期間不限食，飲水為經高壓蒸氣滅菌處理的 RO 水，並每週更換墊料 (Aspen Chips, Northeastern Products Corp., USA)。

沙門氏桿菌回復突變測試

本試驗依循經濟合作暨發展組織 (OECD) 之良好作業規範 Test No. 471 進行操作，使用五株沙門氏桿菌 (*Salmonella typhimurium*) TA98、TA100、TA102、TA1535 及 TA1537 (Moltox Inc., USA)，以沙門氏桿菌回復突變法評估大蟬花菌絲體發酵液凍乾粉是否對微生物具有致突變性 (mutagenicity)^[27,28]。

試驗物質大蟬花菌絲體發酵液凍乾粉以 5、2.5、1.25、0.625 及 0.313 mg/plate 為測試劑量，先利用沙門氏桿菌 TA100 菌株進行劑量範圍測試。試驗利用五株沙門氏桿菌，以平板混合測試法 (Plate incorporation method)，在有無大鼠肝臟提取混合物 S9 存在的條件下，進行沙門氏桿菌回復突變測試。

試驗所使用之 S9 是購自 Moltox (Aroclor 1254-induced; Moltox, BOONE, USA)。進行代謝活化測試時，需在反應物中加入 S9 和 cofactor，用以模擬代謝情形，最終 S9 代謝活化混合物濃度為 1.89% (v/v)。試驗時先加入 0.05 mL 的測試樣品（試驗物質、陰性或陽性對照物質），接著加入 37±1°C 隔夜培養之菌液 0.1 mL 至每一試管內，於 37°C 下反應 24 小時後，再加入含 0.5 mM Histidine/biotin solution 的 top agar 2 mL，混合均勻後，倒在 minimal glucose agar plate 上，並均勻鋪平。待 top agar 凝固後，將培養皿倒置於 37±1°C 培養箱中避光培養 482 小時後，計算每個培養皿中突變菌落的數量。陰性對照組使用無菌水；而每一種菌株皆用各自不同種類及劑量的致變劑，並在添加及不添加 S9 混合物作用下處理，作為各項試驗之陽性對照組，各菌株使用之致突變劑 (Sigma-Aldrich, MO, USA) 及劑量如表 1。

每組劑量做三重複，計算試驗物質、陰性及陽性對照組之平均值及標準差和個別試驗的變異係數。陽性對照組的自發性回復突變數 TA98、TA100、TA102 必須達陰性對照組的 2 倍以上；TA1535、TA1537 必須達陰性對照組的 3 倍以上。

哺乳類細胞染色體變異試驗

體外染色體變異測試法乃依循經濟合作暨發展組織 (OECD) 之良好作業規範 Test No. 473 相關規定執行^[27,29]，測試大蟬花菌絲體發酵液凍乾粉是否具誘發哺乳類細胞染色體變異之能力來評估其基因毒性。哺乳類細胞株選用中國倉鼠卵巢細胞株 (Chinese Hamster Ovary; CHO-K1 cell line, BCRC 60006)，其細胞型態類似於上皮細胞，染色體數目為 20±2。試驗開始時，先以細胞培養液將大蟬花菌絲體發酵液凍乾粉製成 10 mg/mL 之溶液，經 0.2 μm 濾膜過濾後，再以細胞培養液

表 1. 沙門氏菌各菌株陽性對照使用的致突變劑劑量

Strain	S9	Positive control,	µg/plate
TA98		2-nitrofluorene (2-NF)	1
TA100		Sodium azide (SA)	1
TA102	-	Mitomycin C (MMC)	0.2
TA1535		SA	1
TA1537		9-aminoacridine (9-AA)	50
TA98		2-aminoanthracene (2-AA)	1
TA100		Benzo[a]pyrene (BP)	1
TA102	+	2-AA	5
TA1535		2-AA	5
TA1537		2-AA	5

9-AA、SA 及 MMC 使用之溶劑為無菌水。

2-NF、2-AA 及 BP 使用之溶劑為 DMSO。

(或含 S9 代謝活化混合物之細胞培養液) 進行兩倍稀釋成 5 mg/mL 做為最高測試劑量，並兩倍序列稀釋往下取四個濃度，共計使用 5、2.5、1.25、0.625 及 0.313 mg/mL 五個測試劑量。代謝活化物 S9 為經由 Aroclor 1254 處裡之大白鼠肝臟萃取液(Moltox, Boone, NC, USA)。S9 代謝活化混合物最終反應濃度為 1%。CHO-K1 細胞株使用對數生長期之細胞進行試驗，試驗前進行分盤，每孔植入 3×10^5 細胞/孔。每組進行二重複試驗，培養 24 ± 3 小時後投予試驗物質。試驗使用之陽性對照組為 benzo(a)pyrene 25 µg/mL (添加 S9) 及 mitomycin C 0.5 µg/mL (未添加 S9)。陰性對照組為細胞培養液 (添加及未添加 S9)。處理時間為 3-6 小時 (添加或不添加 S9 代謝混合物) 及 18-22 小時 (不添加 S9 代謝混合物)。細胞毒性測試部分，以 5、2.5、1.25、0.625 及 0.313 mg/mL 等做為五個測試劑量。細胞加入新鮮配置之試驗物質、陰性或陽性對照組後，在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ， $5 \pm 1\%$ CO_2 之條件依指定時間培養。每個試驗組進行二重複試驗，並以 MTT (methyl thiazolyl tetrazolium) 比色法測量細胞存活率。在體外染色體變異測試部分，以在毒性測試中細胞存活率大於 50%

之最高劑量做為體外染色體變異測試最高測試劑量，並以兩倍稀釋依序往下取兩個劑量進行染色體變異測試。試驗細胞經處理後以染劑進行染色再以光學顯微鏡觀察染色體的結構變異種類及數量與變異細胞之頻率並加以記錄與統計分析。每個試驗組觀察細胞數總數為 200 顆。

生體內哺乳類動物細胞微核試驗

生體內哺乳類動物細胞微核試驗依循經濟合作暨發展組織(OECD)之良好作業規範 Test No.474 之評估方法進行^[27,30]。測試大蟬花菌絲體發酵液凍乾粉是否具誘發哺乳類動物周邊血球細胞產生微核之能力及是否抑制造血功能以評估其基因毒性。

以無菌水配製試驗物質為懸浮液後經口服途徑餵食 ICR 小鼠，測試劑量分別為 1,250、2,500 及 5,000 mg/kg b.w。本試驗使用口服無菌水為陰性對照組(25 mL/kg b.w.)，腹腔注射 cyclophosphamide 為陽性對照組(80 mg/kg b.w.)。陰性對照組及試驗物質組於六小時內投藥兩次，第一次投予 15 mL/kg b.w.，第二次投予 10 mL/kg b.w.，以達日投予劑量 25 mL/kg b.w.。

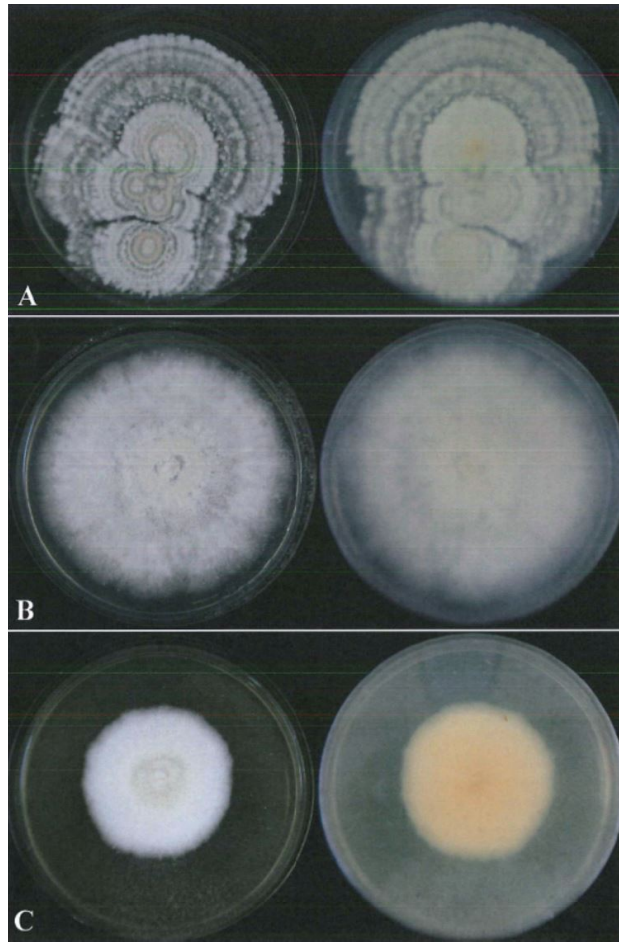


圖 2. 菌落特徵(A)樣品之原始菌落；(B)培養於PDA 20天之菌落正面及背面；(C)培養於MEA 20天之菌落正面及背面。

於試驗物質第一次投予後 48 ± 2 與 72 ± 2 小時，由小鼠尾靜脈收集 2-3 μL 血液製備抹片標本，陽性對照組僅採集 48 小時之血液樣本。血液樣本將置於以 acridine orange 預染之載玻片上製作血液抹片，室溫避光靜置 2-3 小時後，以螢光顯微鏡進行觀察。在每個採血時間點觀察至少 1,000 顆之紅血球，計算多染性紅血球 (polychromatic erythrocytes; PCE) 在所有紅血球中所占之比例 (PCE%)。至少觀察 2,000 顆之多染性紅血球 (PCE)，計算每千顆多染性紅血球 (PCE) 中微核 (micro-nucleus ; MN) 出現之機率 (MN% PCE)。

統計分析

在沙門氏桿菌回復突變試驗中，需進行 ANOVA 分析，並做 Dunnett's test，若 $p < 0.05$ 則視為具有統計上的顯著差異，需進一步進行劑量-效應分析統計。

在哺乳類細胞染色體變異試驗中，試驗數據依卜瓦松 (Poisson) 分佈進行統計分析。 $p < 0.05$ 時視為具有顯著差異。陽性對照組染色體產生變異之細胞數和陰性對照組相較之下必須有顯著差異。若試驗物質有 2 個以上的試驗劑量組染色體產生變異之細胞數和對照組 (陰性或溶劑) 相較之下有顯著差異，則判定試驗物質會造成 CHO-K1 細胞染色體

變異。若試驗物質僅有 1 組試驗劑量組有顯著差異，則需以 Cochran-Armitage trend test 分析是否有劑量-效應之相關性。

在生體內哺乳類動物細胞微核試驗中，以卜瓦松(Poisson)分佈分析試驗組與陰性對照組間微核發生率的統計差異。若 $p < 0.05$ 時則視為具有顯著差異。當試驗組與陰性對照組間出現顯著差異時，則需進一步以 Cochran-Armitage trend test 分析是否有劑量-效應之相關性。另外，若試驗組動物的多染紅血球比例低於陰性對照組達 20% 以上，表示試驗物質對造血系統具有抑制效果。

結 果

菌種型態分析及基因鑑定

將菌株接種於 PDA 及 MEA 培養基，於 25°C 黑暗中培養 20 天後，在 PDA 平板上菌

落直徑約 70-75 mm，菌落由內至外呈淡黃色至白色，氣生菌絲高低起伏，菌絲呈棉絮狀，菌落外緣均勻，背面呈白色；在 MEA 平板上菌落直徑約達 40-45 mm，菌落由內至外呈淡黃色至白色，氣生菌絲隆起，菌絲呈棉絮狀，菌落外緣均勻，背面呈白色（圖 2）。

以光學顯微鏡檢視培養於 PDA 培養基之無性繁殖構造（圖 3），其分生孢子柄呈輪生分枝排列，在每個分支點常會形成 1 至 3 個瓶狀產孢細胞(Phialides)；瓶狀產孢細胞長約(6-)8-15(-24) μm ，其基部至頂端漸細，基部膨大，寬約(3-)3.5-4.5(-5.5) μm ，頂端寬約(0.7-)1-1.5(-2) μm ；分生孢子串生，分生孢子呈橢圓形至長橢圓形、單孢、外壁平滑，透明，大小約為(6-)7-10(-21) \times 3-4(-5) μm 。

將大蟬花繼代後之菌絲體以 ITS 基因序列鑑定後結果為真菌菌絲體，依據該樣品於

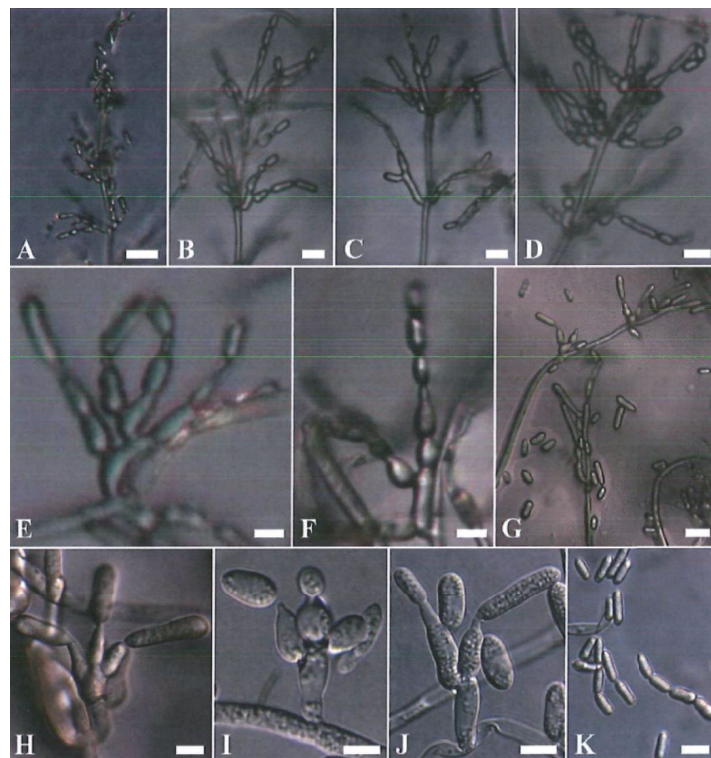


圖 3. 左圖(A-F)在解剖顯微鏡下的產孢細胞及分生孢子；(G-J)在光學顯微鏡下的產孢細胞及分生孢子；(K)分生孢子。Bar scales : A=20 μm , B-D,G,K = 10 μm , E-F, H-J = 5 μm

PDA 培養基上無性世代之菌落及產孢構造等形態特徵和 ITS1-5.8S-ITS2、SSU rDNA 及 β -tubulin 片段定序分析結果，比對 NCBI GenBank 基因資料庫，鑑定結果為 *Isaria cicadae*（有性世代為 *Cordyceps cicadae*）。此菌株現已公開寄存於財團法人食品工業發展研究所之生物資源研究中心(BCRC)，寄存編號 MU30106。

高效能液相層析

分析大蟬花發酵液凍乾粉酒精粗萃取物之指紋圖譜，在特定分析條件下，HPLC 分析圖譜顯示 Adenosine 及 HEA 分別出現在滯留時間 30 min 及 32.5min，其含量分別為 Adenosine 0.312 mg/g 及 HEA 1.340 mg/g。

沙門氏桿菌回復突變測試

於劑量範圍測試結果顯示，所有測試劑量之大蟬花菌絲體發酵液凍乾粉對 TA100 菌株皆不具細胞毒性(non-cytotoxic)及致突變性(non-mutagenic)，因此以 5 mg/plate 作為最高測試劑量，進行回復突變測試主試驗，並以兩倍序列稀釋取得其它四個測試劑量，分別為 2.5、1.25、0.625 及 0.313 mg/plate。於陽性對照組引起的回復突變菌落數，在 TA98、TA100、TA102 個菌株達陰性對照組的 2 倍以上；在 TA1535、TA1537 達陰性對照組的 3 倍以上（表 2）。

無論有無添加 S9 代謝活化物的條件下，所有測試劑量之大蟬花菌絲體發酵液凍乾粉回復突變菌落數，均未達陰性對照組的兩倍或三倍以上，顯示大蟬花菌絲體發酵液凍乾粉不具致突變效果。

哺乳類細胞染色體變異試驗

細胞毒性測定中，在不含 S9 處理 3 小時條件下，各劑量組之細胞存活率為 93.99±2.11%-110.61±2.55%。在含 S9 處理 3 小時條件下，各劑量組之細胞存活率為 101.20±1.01%-106.54±4.49%。因此染色體

變異測試依毒性測試結果，在 3 小時（含或不含 S9 代謝活化混合物）及 18 小時處理（不含 S9 代謝活化混合物）選用之試驗劑量皆為 5、2.5 及 1.25 mg/mL。

陽性對照組觀察到之染色體變異細胞數在 3 小時處理（不含或含 S9 代謝活化混合物）之條件下分別為 14 顆及 18 顆，與陰性對照組相較之下具有顯著差異($P<0.05$)。

在不含 S9 代謝活化混合物，處理 3 小時的條件下，5、2.5 及 1.25 mg/mL 之試驗物質觀察到的染色體變異細胞數分別為 1 顆、2 顆及 1 顆；在含有 S9 代謝活化混合物，處理 3 小時的條件下，5、2.5 及 1.25 mg/mL 之試驗物質觀察到的染色體變異細胞數分別為 2 顆、1 顆及 1 顆；而在不含 S9 代謝活化混合物，處理 18 小時的條件下，5、2.5 及 1.25 mg/mL 之試驗物質觀察到的染色體變異細胞數分別為 4 顆、2 顆及 0 顆（表 3）。

各組別染色體變異細胞數經卜瓦松分佈進行統計分析，結果顯示不論是 3 小時（含或不含 S9 代謝活化混合物）或 18 小時處理組別（不含 S9 代謝活化混合物），其染色體變異之細胞數與陰性對照組相較下皆無顯著差異($p>0.05$)，不會引起 CHO-K1 細胞產生染色體變異。

生體內哺乳類動物細胞微核試驗

各試驗組死亡率為 0%，且未觀察到異常臨床反應。動物體重變化經 *t*-test 分析後與陰性對照組相較均無顯著差異，顯示試驗物質並未影響動物體重變化。

多染性紅血球比例分析結果如表 4。陽性對照組於投予試驗物質 48 小時，多染性紅血球比例和陰性對照組相較下明顯下降，顯示 cyclophosphamide 具有抑制造血機能的效果。大蟬花菌絲體發酵液凍乾粉各試驗組別投予試驗物質 48 及 72 小時，不論雄鼠或雌鼠其多染性紅血球比例與陰性對照組比較下

表 2. 試驗物質蟬花菌絲體發酵液凍乾粉的沙門氏菌回復突變基因毒性分析結果

劑量 (mg/plate)	回復突變數/plate (不添加 S9 activator, Mean S.D., n=3)				
	TA98	TA100	TA102	TA1535	TA1537
Negative control ^a	38.0±2.6	139.3±7.4	378.7±38.5	13.3±1.5	14.3±2.9
Positive control ^b	262.7±4.0*	624.7±8.3*	3762.7±238.7*	584.0±41.8*	196.7±20.1*
5	28.0±2.0	155.3±17.2	420±4.0	17.0±3.5	15.3±3.8
2.5	33.3±7.2	149.3±2.5	418.3±2.9	17.0±3.0	11.7±2.9
1.25	40.3±5.5	156.7±17.2	392.0±22.3	12.7±3.5	14.7±3.2
0.625	46.0±1.7	156.3±4.6	398.3±21.8	15.0±4.4	13.7±1.5
0.313	44.7±1.2	150.0±7.0	436.0±9.2	11.0±2.5	12.7±3.1
劑量 (mg/plate)	回復突變數/plate (添加 S9 activator, Mean S.D., n=3)				
	TA98	TA100	TA102	TA1535	TA1537
Negative control ^a	40.7±9.3	118.3±3.8	366.3±21.6	13.3±2.5	9.0±2.6
Positive control ^c	766.0±49.0*	513.3±49.6*	1326.7±120.4*	245.3±33.4*	442.0±17.0#*
5	36.0±6.1	127.7±12.7	378.0±36.4	14.0±1.7	18.3±3.8
2.5	36.7±7.4	136.7±8.3	345.7±24.8	15.7±1.5	17.7±4.6
1.25	49.0±5.3	144.0±1.7	428.0±7.2	15.3±3.8	17.7±4.0
0.625	44.3±5.0	135.0±21.0	361.0±39.6	12.7±2.3	16.7±4.2
0.313	46.7±4.2	124.0±12.3	418.7±17.2	13.7±1.2	16.3±3.2

此表指出在各實驗條件下沙門氏菌落回復突變的菌落數(Mean ± S.D., n=3)。測試菌株TA98, TA100, TA102, TA1535和TA1537分別試驗代謝前(不添加S9)與模擬代謝後(添加S9)的致突變性。

^a無菌水；^{b,c}陽性對照組。

*表示陽性反應，即試驗物質劑量組之突變數平均值達陰性對照組的2倍或3倍以上。

#：n=2

均無顯著差異，顯示大蟬花菌絲體發酵液凍乾粉不會抑制小鼠之造血機能。

微核發生頻率分析分析結果如表5。經卜瓦松分佈統計分析後結果顯示，不論是雄鼠或雌鼠，各測試劑量組在投予大蟬花菌絲體發酵液凍乾粉48及72小時，其周邊血球細胞之微核發生率和陰性對照組相較下皆無顯著差異。而陽性對照組之微核發生率高於陰性對照組兩倍以上。因此判定此試驗為有效試驗，且大蟬花菌絲體發酵液凍乾粉不具誘發小鼠周邊血球細胞產生微核之能力。

討 論

自然界中蟲草菌株多樣且豐富，其中蟬花又分成諸多種類，不同菌株的藥理作用及生物活性物質含量仍有差異。因此，菌株的

分離及鑑定是研究的關鍵步驟。據文獻報導，江蘇省句容市天王鎮磨盤山^[31]、貴陽森林公園^[32]以及鎮江杭州^[33]所採集到的蟬花，經菌落型態觀察及基因序列分析，結果皆為蟬擬青黴(*Paecilomyces cicadae*，又名蟬棒束孢 *Isaria cicadae*)，為大蟬花(*C. cicadae*)的無性型，鑑定結果皆與本研究之大蟬花菌株相同。可見其分佈廣泛，且多以無性型之形態存在，並推測仍有諸多產區未發掘。此外，若更深入進行分離培養，其中成分及活性功效則會依培養條件改變而不同。

天然蟬花子實體毒性低，自中國魏晉南北朝以來已有食用的紀錄。然大蟬花菌絲體發酵液的安全性文獻甚少，且不同的發酵培養方式會使成分略有差異，因此需評估其安全性並以HPLC做指標成份分析並控管含量。

表 3. 蟬花菌絲體發酵液凍乾粉對體外 CHO-K1 細胞染色體變異頻率分析

劑量	S9 mixture	ctb	cte	csb	cse	Other	AF	p value
Short-term treatment								
Negative control ^a	--	2	0	0	0	0	2/200	--
Positive control ^b	--	11	2	0	0	2	14/200	0.0001*
5 mg/mL	--	1	0	0	0	0	1/200	0.9197
2.5 mg/mL	--	1	0	0	0	1	2/200	0.6767
1.25 mg/mL	--	1	0	0	0	0	1/200	0.9197
long-term treatment								
Negative control ^a	--	0	0	0	0	0	0/200	--
5 mg/mL	--	2	1	0	0	1	4/200	0.0916
2.5 mg/mL	--	2	0	0	0	0	2/200	0.4060
1.25 mg/mL	--	0	0	0	0	0	0/200	1.0000

^a細胞培養液；^b mitomycin C (0.5 µg/mL)；^c benzo (a) pyrene (25 µg/mL)；AF, 變異頻率(aberration frequency)，細胞分裂中期時染色體變異的細胞數(n/200)。

*與陰性對照組比較有顯著差異, p<0.05。縮寫：ctb, chromatid breakage; cte, chromatid exchange; csb, chromosome breakage; cse, chromosome exchange; other, other abnormalities.

表 4. 蟬花菌絲體發酵液凍乾粉對體內哺乳類動物細胞周邊血液中「多染性紅血球」發生頻率之影響

Dose (mg/kg b.w.)	PCE% ^a , mean ± SD, n=5			
	雄鼠		雌鼠	
	48h	72h	48h	72h
Negative control(sterile water)	3.74±0.32	3.52±0.04	3.58±0.31	3.50±0.00
Positive control (Cyclophosphamide)	1.12±0.32	--	1.02±0.45	--
1,250	3.68±0.18	3.54±0.05	3.66±0.29	3.58±0.04
2,500	3.56±0.31	3.48±0.04	3.56±0.27	3.46±0.05
5,000	3.54±0.29	3.48±0.08	3.58±0.20	3.56±0.09

^a每隻動物至少觀察 1,000 顆紅血球，多染性紅血球之比例(PCE%)以平均值±標準差(mean±SD)呈現。

在大蟬花菌絲體發酵液的乙醇粗萃取物中含有 adenosine 及 HEA 兩種核苷類成分，皆是蟲草品質優劣的指標性成份。腺苷(adenosine)是一種嘌呤核苷，在美國 adenosine 已是被核准的藥品，使用在抗心律不整，目前只核

准於成人的使用。FDA 建議每日注射量為 0.14 mg/kg，換算成一般成人(60 kg)為 8.4 mg/人/日^[34]。而 adenosine 亦是衡量蟲草品質好壞的重要標的。溫魯等人研究發現，大蟬花菌絲體中的 adenosine 含量最高者為 1.90

表 5. 蟬花菌絲體發酵液凍乾粉對體內哺乳類動物細胞周邊血液中「微核生成」發生頻率之影響

Dose (mg/kg b.w.)	MN %PCE ^a , mean ± SD, n=5			
	雄鼠		雌鼠	
	48h	72h	48h	72h
Negative control (sterile water)	0.40±0.42	0.40±0.42	0.30±0.27	0.10±0.22
Positive control (Cyclophosphamide)	10.50±6.59*	--	7.60±3.21*	--
1,250	0.20±0.27	0.40±0.42	0.30±0.45	0.40±0.42
2,500	0.20±0.27	0.40±0.55	0.20±0.27	0.30±0.27
5,000	0.50±0.00	0.30±0.27	0.20±0.27	0.20±0.27

^a 每隻動物觀察 2,000 顆多染性紅血球(PCE)產生微核之數量。微核發生率以每千顆 PCE 產生微核的數量計算(MN %PCE)，微核發生率以平均值±標準差(mean±SD)呈現。

*經卜瓦松分佈統計分析與陰性對照組間具有顯著差異(p<0.05)。

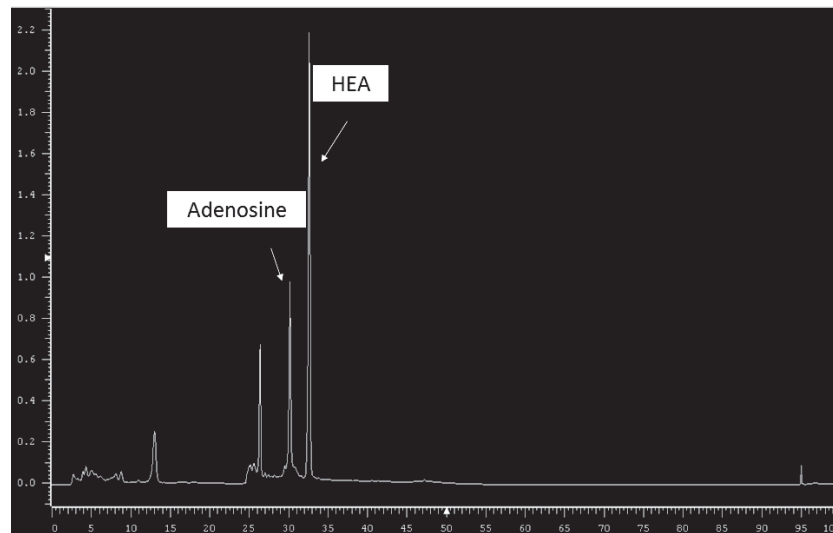


圖 4. 大蟬花菌絲體發酵液凍乾粉乙醇萃取液之液相層析指紋圖譜，Adenosine 及 HEA 滯留時間分別為 30 min 及 32.5 min。

mg/g，約為冬蟲夏草 0.48 mg/g 的四倍^[23]。本案 adenosine 含量則僅為 0.312 mg/g，約僅其 1/6，可見不同的培養方式其產物之差距甚大。另外本文所製備樣品為發酵全液凍乾品，除菌絲體外尚有培養液中成分，造成稀釋所致。Adenosine 還可調節中樞神經系統^[35]，可擴張冠狀動脈及周圍血管、增加冠狀動脈血流量、降低血壓、減慢心率等^[36]，可能對心律失常、心肌缺血、心絞痛、血栓等

心血管系統疾病有治療作用，還具有抗血小板聚集、抗輻射和抗腫瘤等作用^[37]。

化合物 N⁶-(2'-hydroxyethyl)-adenosine (HEA)，為 adenosine 的衍生物，可作為蟲草製品的品質控制指標之一，具有鎮痛作用，效果比嗎啡還強^[38]，未來若用於癌症病人治療，極具商業價值。此外，HEA 可與 α 受體結合，抑制了神經遞質釋放而產生鎮痛作用，且該化合物屬於非鴉片類藥物且鎮痛機制不

同，故無成癮性，使用上較為安全；對正常體溫的大鼠，或人工致熱的大鼠體溫有明顯的降溫和解熱作用^[25]。在小白鼠身上試驗，發現其鎮痛率可高達 99%^[38]；另外有研究指出其具鈣離子拮抗作用，與肌肉收縮活性，可能對心律失常、心肌缺血、心絞痛、高血壓、血栓等有助益^[39]。在蟬生蟲草(*Cordyceps cicadicola*)、高雄山蟲草(*Cordyceps takaoomontana*)及粉被蟲草(*Cordyceps pruinosa*)上亦曾發現 HEA^[40]。

2012 年劉波等人測試了液態培養大蟬花中腺苷類成分的最佳提取法及含量測定^[41]，結果指出以水為溶劑搭配超音波提取 30 min 提取率最高，其中 adenosine 及 HEA 含量分別為 0.6949 mg/g 及 0.3617 mg/g，分別為本研究含量的 2 倍及 1/3 倍，可明顯見到本案培養方式偏向 HEA 之產生。

由於 HEA 為 Adenosine 之類似物(analog)，有可能被攝入(incorporate) DNA 中而造成點突變(point mutation)，但本文使用三種基因毒評估中，皆未見其毒性。以凍乾品 5 mg/mL 計算，乃以 6.7 µg/mL HEA 含量處裡 CHO-K1 細胞，結果並不會造成毒性危害。而在本試驗物質中，並未測得蟲草素(Cordycepin)，與劉波等人研究相符。

大蟬花經 50 噸發酵槽（發酵體積 40 噸）液態發酵培養生產大蟬花菌絲體，其菌絲體發酵液凍乾粉可收 260 公斤。在大蟬花菌絲體粗成分分析中，粗蛋白含 25.38%，粗纖維 8.32%，粗脂肪 7.72%，灰分 4.87%，水分 8.92%^[42]；重金屬方面，大蟬花菌絲體發酵液中其砷、鉛、汞、鎘含量皆低於天然蟬花^[42]，可能因蟬吸食植物汁液，植物吸收土壤養分，使天然蟬花之金屬含量較液態發酵菌絲體高，而土質不同則會影響天然蟬花之重金屬含量，品質不易掌控。

人工液態培養之菌絲體與天然蟬花的成分相似，且菌種來源穩定，汙染少，生產週

期短，更可提高產能及確保有效成分的再現性。

另外亦有以不同蟲體子座進行大蟬花菌絲感染的研究，韓國曾以家蠶培養大蟬花子實體並製成保健品及飲品，並於 2001 年生產上市^[43]；而 Jeong 等人^[44]以感染大蟬花菌絲之蠶體培養子實體，並評估其安全性。試驗以含高達 5% 的子實體粉飼料餵養老鼠 13 周，並專注其對腎的損傷，結果發現血清中之 BUN、creatinine 及腎損傷指標，均未見異狀，但若以更靈敏的指標，如 KIM-1、TIMP-1、Osteopontin、Cystatin C 等來分析，則可見到一些對腎小管或過濾功能的傷害。但由於不同培養方式其產生的代謝物並不相同，韓國人以蠶培育子實體之方式在台灣尚未見有人使用，且劑量高達每日食物量的 5%，其目的在瞭解安全使用範圍。

綜合上述各項研究結果顯示，大蟬花菌絲體發酵液凍乾粉不具有基因毒性的疑慮，但仍須進一步探討連續餵食 28 天亞急毒性、90 天亞慢毒性試驗以及致畸胎試驗，才能更完整評估其安全性。

參考文獻

1. 陳勁初。南方蟲草之后蟬花，初版。2012:22-46。元氣齋出版社有限公司，臺北。
2. 田開偉。蟬花無比散治外障眼疾。四川中醫。1986; 12:36-7。
3. 彭廣華，張黎。中藥生液散和蟬花五味散配合西藥治療外傷性低眼壓。中西醫結合眼科雜誌。1994; 3: 173-4。
4. 王洪泉，趙展，張莉。自擬蟬花湯治療單純疱疹性角膜炎 50 例。中醫藥資訊。2001; 4:35-5。
5. 徐大梅。萬應蟬花散治療春季結膜炎 100 例臨床觀察。中國中醫眼科雜誌。2010; 20:172-3。
6. Weng SC, Chou CJ, Lin LC *et al.* Immunomodulatory functions of extracts from the Chinese medicinal fungus *Cordyceps cicadae*. J Ethnopharmacol 2002; 83:79-85.
7. 彭秀秀，柴一秋，朱碧純等。蟬花蟲草提取物 N6-(2-羥乙基)腺苷對小鼠腎臟缺血再灌注損傷的保護作用。菌物學報。2015; 34:311-20。

8. 劉玉甯, 陳以平, 王立紅等。蟬花菌絲抗大鼠腎小管間質纖維化的實驗研究。中國中西醫結合腎病雜誌。2011; 12:243-5。
9. Zhu R, Chen YP, Deng YY *et al.* *Cordyceps cicadae* extracts ameliorate renal malfunction in a remnant kidney model. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)* 2011; 12:1024-33.
10. 陳安徽, 邵穎, 李繼武等。人工培育蟬花抗腫瘤活性研究。食品科學。2014。網路出版
11. 蔡菊芬, 姜志明, 盧紅陽等。蟬擬青黴不同純化組分對體外抗腫瘤作用的基礎研究。中華中醫藥學刊。2010; 28:760-3。
12. 陳柏坤, 楊介鑽, 卓佳等。蟬擬青黴多糖對人外周血單個核細胞及白血病細胞株U937、K562增殖的調節作用。溫州醫學院學報。2006; 36:341-4。
13. 蘆柏震, 姜志明, 牟瀚舟等。蟬花粗提物對肺癌細胞作用的實驗研究。中國中醫藥科技。2006; 13: 328-9。
14. 宋捷民, 忻家礎, 朱英。蟬花對小鼠血糖及造血功能影響。中華中醫藥學刊。2007; 25:1144-5。
15. 王海穎, 陳以平。陳以平教授巧用蟬花經驗。中國中醫藥信息雜誌。2000; 7:71。
16. 陳萬群, 陳古榮。冬蟲夏草代用品研究進展。中草藥。1994; 255:269。
17. 王硯, 趙小京, 唐法娣。蟬花藥理作用初步探討。浙江中醫雜誌。2001; 36:219。
18. 金周慧, 陳以平。蟬花湯延緩慢性腎功能衰竭進展的臨床觀察。中醫藥學刊。2006; 24:1457-9。
19. 葉穎, 吳錫添。蟬花二陳湯治療小兒支氣管肺炎43例療效觀察。基層醫學論壇。2007; 11:533-4。
20. 胡海燕, 鄒曉, 羅力等。傳統中藥蟬花的活體家蠶人工培養。中國中藥雜誌。2009; 34:2140-3。
21. 劉廣玉, 胡菽英。天然蟬花與人工培養品的鎮靜鎮痛作用的比較。現代應用藥學。1991; 8:5-8。
22. 劉森琴, 溫魯, 夏敏等。人工培育蟬花的活性成分含量測定。安徽農業科學。2008; 36:429, 467。
23. 溫魯, 唐玉玲, 張平。蟬花與有關蟲草活性成份檢測比較。江蘇中草藥。2006; 27:45-6。
24. 葛飛, 夏成潤, 李春如等。蟬擬青黴菌絲體與天然蟬花中化學成分的比較分析。菌物學報。2007; 26: 68-75。
25. 陳祝安, 劉廣玉, 胡菽英。蟬花的人工培養及其藥理作用研究。真菌學報。1993; 12:138-44。
26. 宋培光, 劉昕, 卓勤儉。誤食蟬花中毒4例。新消化病學雜誌。1997; 5:22。
27. 行政院衛生署藥物食品檢驗局。健康食品安全性評估方法。衛署食字第88037803號公告, 1999。行政院衛生署, 台灣。
28. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test. 1997. OECD.
29. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Test No. 473: *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test. 1997. OECD.
30. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. 1997. OECD.
31. 張傳博, 王豔麗及易萌等。江蘇省天王鎮磨盤山金蟬花分離菌株鑒定及系統發育分析。廣東農業科學。2013; 15:152-4。
32. 衛亞麗, 楊茂發及鄒曉等。一株蟬棒束孢菌的分離鑒定及其脂肪酸組成分析。2013年中國藥學大會暨第十三屆中國藥師周論文集。2013。
33. 程東慶, 丁志山及林美愛等。蟬花真菌的分離及液體發酵培養。中藥材。2006; 29:99-101。
34. Chen JF, Eltzhig HK, Fredholm BB. Adenosine receptors as drug targets - what are the challenges? *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12:265-86.
35. Gomes CV, Kaster, MP, Tome AR *et al.* Adenosine receptors and brain disease : Neuroprotection and neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1808:1380-99.
36. 朱文玲。腺苷在心血管病診治中的應用前景。中華心血管病雜誌。2004; 10:948-51。
37. 于金貴, 應詩選, 劉國明。腺苷控制性降壓的實驗研究。中華麻醉學雜誌。1991; 11:259-61。
38. 柴一秋, 韋忠民, 陳祝安等。N6-(2-羥乙基)腺苷在製備鎮痛藥中的作用。2006, 中國, CN1283778C。
39. Furuya T, Hirotani M, Matsuzawa M. N6-(2-hydroxyethyl) adenosine, a biologically active compound from cultured mycelia of *Cordyceps* and *Isaria* Species. *Phytochem* 1983; 22:2509-12.
40. 胡豐林, 李增智。蟲草及相關真菌的次生代謝產物及其活性。菌物學報。2007; 26:607-32。
41. 劉波, 康冀川, 雷幫星等。五種蟲草無性型菌株產腺苷類物質的分析。菌物學報。2012; 31:405-12。
42. 葛飛, 夏成潤, 李春如等。蟬擬青黴菌絲體與天然蟬花中化學成分的比較分析。菌物學報。2007; 26: 68-75。
43. Kwack SJ, Lee BM. Subacute oral toxicity study of a new type of *Cordyceps*, *Paecilomyces sinclairii*, in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Res* 2009; 25:101-6.
44. Jeong M, Kim YW, Min JR *et al.* Kidney toxicity induced by 13 weeks exposure to the fruiting body of *Paecilomyces sinclairii* in rats. *Toxicol Res* 2012; 28:179-85.

Isolation, Identification and Genotoxicity Test of *Cordyceps cicadae* mycelium

Jui-Hsia Hsu¹, Shu-Hsing Yeh¹, Wei-Chien Huang², Chin-Chu Chen^{1,3,4,5}

Bioengineering Center of Grape King Bio Ltd, Taoyuan County¹, Pro-partner Ltd., Taipei City²; Institute of food science and technology, National Taiwan University, Taipei City³; Department of Food Science, Nutrition, and Nutraceutical Biotechnology, Shin Chien University, Taipei City⁴; Department of Applied science, National Hsin-Chu University of Education, Hsinchu City⁵, Taiwan

Abstract

Cordyceps cicadae is an edible and traditional medicinal mushroom that possess multiple bio-activities. It has long been used as a desirable alternative for natural *Ophiocordyceps sinensis* and has therefore been mass reproduced for the increased market demand. In this research, we collected *C. cicadae* samples from the mountains of New Taipei City in Taiwan. These specimens were then sequenced, deposited at Bioresource Collection and Research Center at Food Industry Research and Development Institute and analyzed for genotoxicity using three standard battery of tests (Ames, chromosomal aberration, and bone marrow cell micronucleus tests). Results showed no cytotoxic or mutagenic potential in the Ames test at levels of up to 5 mg/plate. In the chromosomal aberration test, *C. cicadae* mycelium also showed no genetic toxicology when exposed

to the CHO-K1 cells in the presence and absence of a metabolic activation system derived from rat liver S9 mix at levels of up to 5 mg/ml. Moreover, no statistically significant *C. cicadae* mycelium-related increase was observed in the bone marrow cell micronucleus test at levels of up to 5,000 mg/kg b.w.. Additionally, *C. cicadae* mycelium did not interfere with mouse bone marrow hematopoiesis evidenced by a no significant difference in the proportion of polychromatic erythrocytes in the peripheral blood. These results conclude that *C. cicadae* mycelium does not provoke mutagenicity and genotoxicity in these systems.

Keywords: *Cordyceps cicadae*; strain identification; Ames test; chromosomal aberration test; bone marrow cell micronucleus test.

