

蛹蟲草發酵液凍乾粉之基因毒性及急毒性分析

劉曉卉¹ 謝逸璇² 陳家榮² 施君翰³ 彭依婷⁴ 陳勁初^{1,5,6*}

葡萄王生技股份有限公司¹，中壢市，麥德凱生科股份有限公司²，新北市，昌達生化科技股份有限公司³，新北市，葡眾企業股份有限公司⁴，台北市，實踐大學食品營養與保健生技學系⁵，台北市，台灣大學食品科技研究所⁶，台北市，台灣

摘要

蛹蟲草(*Cordyceps militaris*)又稱為北冬蟲夏草，是目前研究最多的蟲草之一。目前已有美、中、日、台及韓等國工業化液態發酵產且產品上市，但相關安全性研究文獻稀少，本研究利用液態發酵技術培養蛹蟲草菌絲體，並針對蛹蟲草菌絲發酵液凍乾粉進行三項基因毒性試驗以及單一劑量口服急性毒性試驗，評估蛹蟲草菌絲發酵液凍乾粉之毒性。在沙門氏菌回復突變試驗中，測試樣品以無菌水配置 50 mg/mL，5.0 mg/plate 為最高測試劑量，再以無菌水序列稀釋至 0.3125 mg/plate 等劑量。無論是否經過 S9mix 處理，對 *Salmonella typhimurium* TA97a、TA98、TA100、TA102 及 TA1535 菌株之回復突變菌落數，與負對照組相較，均未達陽性判定標準。在體外哺乳類細胞染色體結構異常試驗中，以哺乳類細胞 CHO-K1 是否具誘導染色體變異的能力來評估基因毒性，在不含 S9 下作用 3 小時、20 小時以及含有 S9 下作用 3 小時之三種方式處理下，均未造成細胞 5 % 以上染色體差異，且與負對照組之間無顯著差異，以最高濃度 5.0 mg/mL 處理下，仍未超過 50 % 細胞死亡之細胞毒性，因此，判定試驗結果為陰性反應。另外，在嚙齒類動物體內週邊血液微核試驗中，以口服途徑餵食 ICR 小鼠，劑量分別為 1,000、2,000 及 3,000 mg/kg b.w.，測試劑量之網狀紅血球的比例(reticulocyte, RET %)及微核率(micronucleus frequency, MN % RET)均與負對照組無顯著差異。在口服急性毒性試驗中，SD 大鼠經口餵食單一高劑量 2000 mg/kg b.w. 後，活動狀況正常。在 7 天試驗期間，體重增長百分率(%)、臨床症狀及解剖肉眼檢查與對照組皆無差異。

關鍵字：蛹蟲草發酵液凍乾粉、口服急性毒性試驗、基因毒性試驗

前言

蛹蟲草(*Cordyceps militaris*)，又名北冬蟲夏草或北蟲草，屬於子囊菌亞門，子囊菌綱，肉座菌目^[1]，由蛹蟲草菌感染昆蟲蛹所形成，是冬蟲夏草屬(*Cordyceps*)之模式種^[2]。對於蛹蟲草的研究，最早記載於中國的【新華本草綱目】一書，『味甘、性平、有益肺腎、補精髓、止血化痰的功能』。【中

華藥海】一書，『性味歸經，入肺腎二經，功能主治健忘不寐、腰膝酸軟、久咳虛喘、勞咳痰血者』。近幾年的研究證實，蛹蟲草有增進免疫系統^[3-5]、降血糖^[6,7]、降血脂^[8]、抗腫瘤^[9]及抗氧化^[10,11]等功效，蛹蟲草具有的生理活性成分包括核苷類如蟲草素(cordycepin)及腺甘(adenosine)、神經醯胺類(ceramide)、酯化合物類和醣類如蟲草多醣(cordycepic polysaccharide)及甘露醇(mannitol)等成分^[12,13]。

蛹蟲草對寄主範圍廣泛，較易栽培及取得，是分離出化合物最多的蟲草屬菌種，蛹蟲草具有與冬蟲夏草相似的活性成分和保健

*通訊地址：葡萄王生技股份有限公司
桃園縣桃園縣中壢市龍岡路三段 60 號 陳勁初
電話：(03) 4572121 ext. 234
Email：gkbioeng@grapeking.com.tw

功效^[14-16]，2009年中國批准蛹蟲草子實體為新資源食品，可普遍應用於食品中且無警語，台灣在2014年公告應標註每日食用限量及標示「不建議嬰幼兒、兒童、孕婦與真菌過敏者使用」警語，亦列為可供食品使用原料。儘管如此，以生物科技發展蛹蟲草作為冬蟲夏草的替代品，仍為現今重要趨勢。與固態發酵相比，以液態發酵方式量產蛹蟲草菌絲體，有能在短時間內即獲得大量的菌絲體、產能較高、不受季節影響及可得到相近的活性成分等優點；但由於相關的安全性研究文獻稀少，且菌絲體目前尚無正面表列。因此，先進行了蛹蟲草菌絲體發酵液凍乾粉的三項基因毒性試驗及單一劑量口服急性毒性試驗，作為日後產品開發之劑量考量依據。

材料方法

試驗物質

蛹蟲草菌絲體發酵液凍乾粉為本次試驗物質，蛹蟲草(*C. militaris*)菌種購自食品工業發展研究所生物資源與保存中心。以馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基(potato dextrose agar, PDA)於平板22°C恆溫培養，每月於無菌操作台進行繼代培養，並密封保存。

液態發酵條件

將蛹蟲草菌絲培養於PDA平板，擷取2×2 cm²菌塊，溫度控制25±2°C，接入2 L三角搖瓶培養四天後(震盪轉速為120 rpm)，接入500 L發酵槽培養四天後(攪拌30 rpm，通氣量0.25 vvm)，再接入50 ton發酵槽培養四天(攪拌30 rpm，通氣量0.05 vvm)，蛹蟲草發酵液經過下游階段固液分離、濃縮、冷凍乾燥及磨粉後，最後即成為蛹蟲草菌絲體發酵液凍乾粉。

成分分析

將蛹蟲草菌絲體發酵液凍乾粉秤取

0.1 g，加入10 mL純水震盪搖勻後，以121°C加熱萃取30 min，離心(5,000 rpm，5 min)，並以0.45 μm濾膜過濾。HPLC (L-5000 Series、Pump L-5110、Auto sampler L-5210、Diode array detector L-5430及Data processor: EZChrom Elite chromatography data system; Hitachi, Japan)的分析條件波長為UV 254 nm，分離管柱為Phenomenex Luna C18 (4.6×250 mm)，移動相為10 mM KH₂PO₄ : acetonitrile = 94 % : 6 %，流速為1.0 ml/min，進樣量為10 μl。

另外，再將蛹蟲草菌絲體發酵液凍乾粉秤取0.2 g，加入10 mL甲醇震盪搖勻後，超音波震盪萃取30 min，離心(5,000 rpm，5 min)，並以0.45 μm濾膜過濾。HPLC分析條件波長為UV 270 nm，分離管柱為Phenomenex Luna C18 (4.6×250 mm)，移動相為methanol: acetonitrile = 95 % : 5 %，流速為1.0 ml/min，進樣量為10 μl。

樣品以HPLC分析條件下進行分析後，前者所得圖譜之各峰柱(peak)與標準品adenosine(Sigma-aldrich, USA)、cordycepin(Sigma-aldrich, USA)及N⁶-(2'-hydroxyethyl)-adenosine (HEA; Sigma-aldrich, USA)進行比對，後者則以標準品 ergosterol(Sigma-aldrich, USA)進行比對。

沙門氏菌回復突變試驗^[17, 18]

本試驗菌株為 *Salmonella typhimurium* TA97a、TA98、TA100、TA102及TA103五株菌株，皆購自Molecular Toxicology, Inc.。試驗物質以無菌水配置濃度50mg/mL的儲存液(stock solution)，5.0 mg/plate為最高測試劑量，經連續稀釋後，取2.5、1.25、0.625和0.3125 mg/plate劑量一同進行試驗。使用平板混合試驗法(plate incorporation method)，於2mL含有0.5 mM histidine (Sigma-Aldrich, USA) / biotin (Sigma-Aldrich, USA) 的軟性

瓊脂，加入 0.1 mL 試驗溶液及 0.1 mL 菌液；依有無需 S9 活化處理，分別加入 0.5 mL 之 S9 混合液，或 0.2 M 磷酸緩衝溶液。混合後，均勻倒在培養基上，將平板正放待凝後，放置於 37°C 培養箱倒置培養 48 小時。每一種菌株使用之致突變劑及劑量（表 1）。

依平均菌落數與標準差為判定依據，當正對照組之自發性回復突變菌落數在 TA97a、TA98、TA100 及 TA102 菌株，為負對照組兩倍以上；TA1535 之回復突變數達 3 倍以上時，並呈現劑量與反應正相關者，則判定試驗物質對測試菌株具有致變異性^[19]。

體外哺乳類細胞染色體結構異常試驗^[17,20]

本試驗所使用的細胞株為中國倉鼠卵巢細胞(Chinese hamster ovary cell, CHO-K1, CCRC 60006)，購自於財團法人食品工業發展研究所。細胞於 5 % 二氧化碳的 37°C 恆溫培養箱中培養。試驗物質以細胞培養液配製濃度為 5.0 mg/mL 的最高處理劑量，經 2 倍連續稀釋後分別為 2.5、1.25、0.625 及 0.3125 mg/mL 等劑量。負對照組為含血清之一般細胞培養液；正對照組依有無含 S9 分別為 80 μM 之環磷醯胺 (cyclophosphamide; Sigma-Aldrich, USA) 及 2 μM 之絲裂黴素 C (mitomycin C; Sigma, USA)。三組處理方式分別為：不含 S9 作用 3 小時、含 S9 作用 3 小

時及不含 S9 作用 20 小時，細胞數為 1.0×10^6 cells/dish，以磷酸鹽緩衝溶液沖洗二次，加入培養液（負對照組）、cyclophosphamide 或 mitomycin C 及試驗物質作用 3 小時，再以磷酸鹽緩衝溶液沖洗二次後，加入一般培養液繼續培養到第 20 小時進行評估分析，而不含 S9 作用 20 小時的組別，則是持續作用 20 小時，再以磷酸鹽緩衝溶液沖洗二次，收集細胞後以染劑染色後評估分析^[21]。

統計方式為觀察 200 顆細胞，計算染色體或染色分體的結構變異種類及數量與變異細胞之頻率。計算各組織細胞存活與死亡百分率(%)，比較試驗組與對照組之存活百分率。

嚙齒類周邊血液微核試驗^[17,22]

試驗動物為 25 隻 6 周齡之雄性 ICR 小鼠，購自於樂斯科生物科技股份有限公司。分別經口投予低、中及高劑量組小鼠 1 g/kg、2 g/kg 及 3 g/kg b.w. 的試驗物質，正對照組 mitomycin C (Sigma, USA) 則以滅菌水配製成 0.05 mg/kg 之濃度進行腹腔注射。負對照組經口投予滅菌水。負對照組及試驗組於物質投予第 48 及 72 小時，由眼眶採血檢測；而正對照組微核數目，則在對照物質投予後第 48 小時採血檢測。取 10 μL 血液，加 1 %

表 1. 在添加與無添加 S9 代謝活化物下，對不同 *Salmonella typhimurium* 菌株的正對照組試藥及劑量

Strain	w/o S9	μg/plate	w/ S9	μg/plate
TA97a	4-nitro-o-phenylenediamine (NPD)	10	2-aminofluorene (2-AF)	4.0
TA98	4-nitro-o-phenylenediamine (NPD)	10	Benzo[α]pyrene (BP)	4.0
TA100	Sodium azide (SA)	0.4	2-aminofluorene (2-AF)	4.0
TA102	Mitomycin C	0.5	2-aminoanthrance (2-AA)	4.0
TA1535	Sodium azide (SA)	0.4	2-aminoanthrance (2-AA)	4.0

brilliant cresyl blue 染色液，混和置於兩片乾淨玻片上，以推片方式做成抹片，於光學顯微鏡下觀察網狀 1,000 顆紅血球中被染成藍色顆粒的網狀紅血球 (RET) 數目。另外，取 5 μm 血液，以 acridine orange 螢光染劑預染之載玻片，製備血液抹片，螢光顯微鏡觀察每 2,000 顆橘紅色螢光的 RET 中，出現黃綠色螢光之 MN 數目^[23]。

依照比例，在每 2,000 顆 RET 中，當負對照組的 MN 數目在 0 至 10 顆範圍內，且正對照高於負對照組，並利用統計軟體於統計上有明顯的差異 (Mann-Whitney test)，則視為有效性的認定。

單一劑量大鼠口服急毒試驗^[17,24]

實驗動物為 10 隻 8-9 週齡之雄性 SD 大鼠，購自於樂斯科生物科技股份有限公司。飼養環境條件為溫度 21 ± 2 $^{\circ}\text{C}$ 、 50 ± 20 % 相對濕度及 12 小時之光暗週期。實驗前 1 天大鼠禁食至少 16 小時，次日試驗組大鼠管餵測試樣品 2,000 mg/Kg b.w.。餵食後每日觀察試驗動物臨床症狀。試驗期間死亡鼠隻立即解剖進行肉眼病理檢查並記錄。試驗結束後，所有鼠隻均以 CO_2 安樂死犧牲，進行解剖肉眼檢查外觀、口腔、胸腔及腹腔內所有組織與器官。

統計方法

實驗數據以平均值 (Mean) \pm 均值標準誤差 (SEM) 來表示，以單尾變異數分析 (one-way analysis of variance)，依 Duncan's multiple range test^[25] 進行統計，若 $p < 0.05$ 時，則視為具有統計上的差異，需進一步進行劑量-效應 (dose-response) 分析統計。

結 果

成分分析

分析蛹蟲草菌絲體的二次代謝物，其水

萃取物及醇萃取物在兩種特定分析條件下，進行 HPLC 分析與標準品比對後，水萃取物圖譜顯示 (圖 1 A) 訊號出現在滯留時間 7.0 min、9.0 min 及 12.1 min，化合物名稱依序為 adenosine、cordycepin 及 N6-(2'-hydroxyethyl)-adenosine，其含量分別為 1.7 mg/g、0.3 mg/g 及 0.1 mg/g。另外，在醇萃取物圖譜顯示 (圖 1 B) 訊號出現在滯留時間 9.5 min，化合物名稱為 ergosterol，含量為 2.2 mg/g。這 4 種活性化合物將來可列為發酵液凍乾粉品管項目。

沙門氏菌回復突變試驗

將測試樣品以無菌水配置 50 mg/mL，5.0 mg/plate 為最高測試劑量，再以無菌水序列稀釋至 0.3125 mg/plate 等劑量下，在添加與無添加 S9 代謝活化物的條件下，對 *S. typhimurium* TA97a、TA98、TA100、TA102 及 TA1535 菌株進行檢測。試驗結果顯示 (表 2)，不論在有無添加 S9 代謝活化物的條件下，每個測試劑量皆未明顯增加五株菌的回復突變菌落數。因此，試驗物質對測試菌株不具致突變性 (mutagenicity)。

體外哺乳類細胞染色體結構異常試驗

在體外哺乳類細胞染色體結構異常試驗中，在不含 S9 下作用 3 小時、20 小時以及含有 S9 下作用 3 小時之三種方式處理下，觀察哺乳類細胞 CHO-K1 是否具誘導染色體變異的能力來評估基因毒性。實驗結果顯示 (表 3)，不論在有無添加 S9 的短時間 (3 小時) 與長時間 (20 小時) 處理下，試驗物質 5.0、2.5、1.25、0.625 及 0.3125 mg/mL，均未造成細胞 5 % 以上染色體差異，且與負對照組之間無顯著差異。以最高濃度 5.0 mg/mL 處理下，其值依序為 25.84 %、30.63 % 以及 18.60 %，仍未具超過 50 % 細胞死亡之細胞毒性。因此判定試驗結果為不具有致染色體

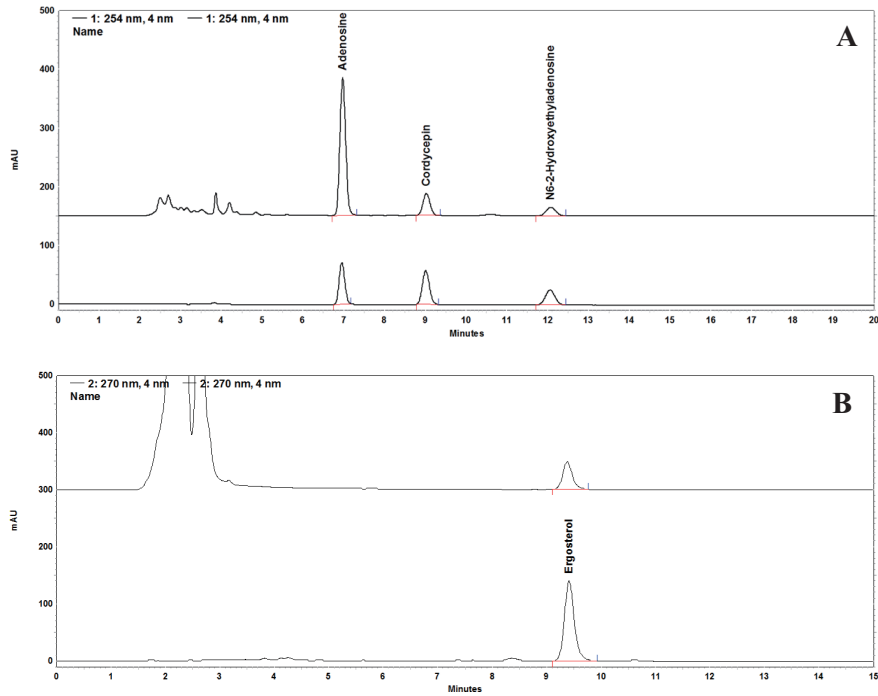


圖 1. 蛹蟲草菌絲發酵液凍乾粉的 HPLC 分析圖譜。A，下圖為 adenosine、cordycepin 及 N6-(2'-hydroxyethyl)-adenosine 標準品，上圖為蛹蟲草菌絲發酵液凍乾粉。B，下圖為 ergosterol 標準品，上圖為蛹蟲草菌絲發酵液凍乾粉。

表 2. 「蛹蟲草菌絲發酵液凍乾粉」之沙門桿菌回復突變試驗結果

Group (mg/plate)	Number of revertants/plate (Mean ± S.D., n=3)				
	TA97a	TA98	TA100	TA102	TA1535
w/o S9					
5	129.7 ± 11.9	34.0 ± 4.4	150.0 ± 8.9	288.0 ± 21.2	16.3 ± 3.2
2.5	166.0 ± 8.2	35.0 ± 2.6	160.3 ± 7.5	456.7 ± 4.2	18.0 ± 4.4
1.25	162.7 ± 9.3	22.7 ± 2.9	145.0 ± 6.2	604.0 ± 33.0	16.3 ± 2.1
0.625	147.0 ± 11.3	23.0 ± 1.0	150.3 ± 5.7	552.0 ± 23.1	18.0 ± 5.0
0.315	178.3 ± 9.1	28.3 ± 3.8	141.0 ± 25.9	682.7 ± 27.2	12.7 ± 3.8
Positive control	166.7 ± 21.8	23.0 ± 3.6	112.7 ± 1.5	496.0 ± 16.4	17.7 ± 6.0
Negative control (sterile water)	773.0 ± 59.0*	723.3 ± 66.6*	571.3 ± 14.2*	1271.3 ± 117.6*	303.3 ± 11.1*
w/ S9					
5	125.0 ± 15.7	29.0 ± 6.0	178.7 ± 14.8	524.7 ± 20.4	16.7 ± 5.9
2.5	152.0 ± 16.4	28.3 ± 3.8	113.3 ± 11.1	614.0 ± 74.0	15.0 ± 5.3
1.25	165.0 ± 12.3	41.7 ± 4.2	126.7 ± 8.5	689.3 ± 27.2	15.3 ± 3.1
0.625	194.3 ± 13.5	36.3 ± 2.5	148.3 ± 15.0	492.0 ± 30.3	23.0 ± 3.6
0.315	175.0 ± 26.9	37.0 ± 7.8	143.0 ± 7.0	510.7 ± 40.8	15.0 ± 2.0
Positive control	174.0 ± 13.2	31.0 ± 7.0	151.3 ± 5.5	539.3 ± 34.9	20.0 ± 3.6
Negative control (sterile water)	761.7 ± 49.2*	124.7 ± 12.3*	574.7 ± 34.9*	2145.3 ± 145.9*	137.7 ± 18.6*

*回復突變平均菌落數為負對照組兩倍以上。

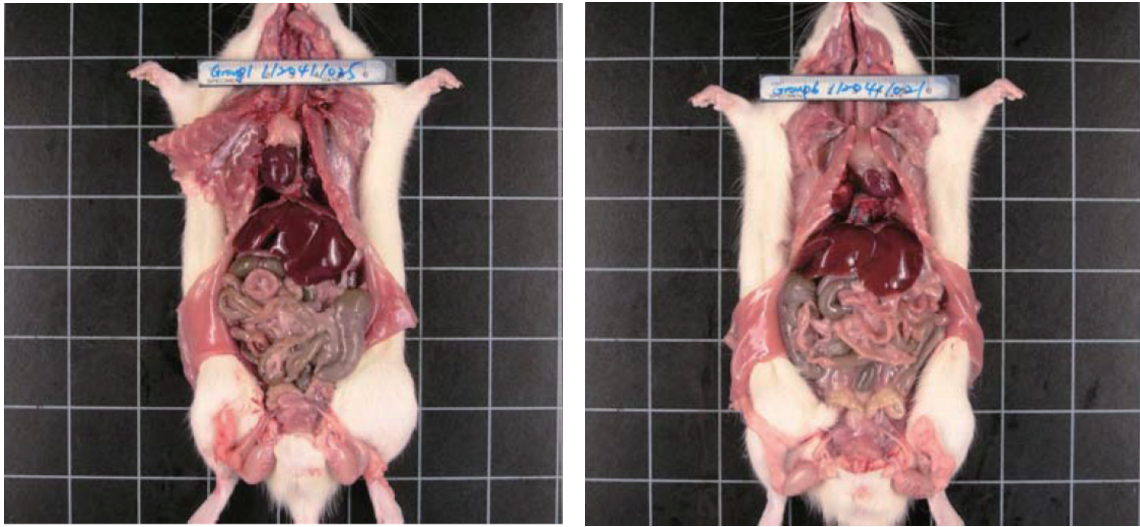


圖 2. 屍體解剖與肉眼觀察。A，對照組。B，實驗組。餵食蛹蟲草菌絲發酵液凍乾粉 SD 大鼠屍體解剖與肉眼觀察結果未發現有相關的病變。

表 3. 「蛹蟲草菌絲發酵液凍乾粉」對體外 CHO-K1 細胞之染色體變異試驗結果

Time	S9 mixture	Group (mg/mL)	AF ^d	Cytotoxicity ^e (%)
3 hr	w/o S9	5	5/200	25.84
		2.5	3/200	8.01
		1.25	0/200	4.13
		Negative control ^a	0/200	0
		Positive control (Mitomycin C) ^b	37/200*	25.06
	w/S9	5	7/200	18.6
		2.5	5/200	12.32
		1.25	3/200	9.66
		Negative control ^a	2/200	0
		Positive control (Cyclophosphamide monohydrate) ^c	25/200*	22.71
20 hr	w/o S9	5	0/200	30.63
		2.5	3/200	6.02
		1.25	3/200	4.97
		Negative control ^a	2/200	0
		Positive control (Mitomycin C) ^b	29/200*	24.08

^a 含血清之一般細胞培養

^b 致變劑為 2 μ M mitomycin C

^c 致變劑為 80 μ M cyclophosphamide monohydrate

^d AF，變異頻率(Aberration frequency)為觀察 200 個分裂中期的細胞中，含有染色體變異的細胞數，一個異常細胞可能包含多個異常種類，以 n/200 表示之。

^e Cytotoxicity，細胞毒性(%)=100%-細胞存活百分率(%)

* 表示和負對照組具有顯著性差異

變異之基因毒性。

嚙齒類周邊血液微核試驗

測試樣品以無菌水配置，口服途徑餵食 ICR 小鼠，劑量分別為 1,000、2,000 及 3,000 mg/kg b.w.，在測試樣品投予後第 48 及 72 小

時，觀察測試劑量之多染性紅血球的比例 (Reticulocyte, RET %) 及微核率 (micronucleus frequency, MN % RET)。結果顯示 (表 4)，在測試樣品投予後第 48 小時，負對照組之網狀紅血球比例為 32.2±2.4 %，微核率為 0.6±0.9 %；正對照組之網狀紅血球比例下降至 9.4±3.0

表 4. 餵食「蛹蟲草菌絲發酵液凍乾粉」後 48 及 72 小時，對 ICR 小鼠網狀紅血球比例與微核率之影響。

Group (mg/kg b.w.)	Time (h)	(RET%, Mean ± S.D., n=5) ^a	(MN % RET, Mean ± S.D., n=5) ^b
1,000	48	35.2 ± 2.6	0.8 ± 0.8
	72	36.4 ± 1.7	0.6 ± 0.5
2,000	48	33.4 ± 1.9	0.4 ± 0.9
	72	30.2 ± 3.4	0.4 ± 0.5
3,000	48	33.6 ± 3.2	0.6 ± 0.5
	72	32.4 ± 3.6	0.6 ± 0.9
Negative control (sterile water)	48	32.2 ± 2.4	0.6 ± 0.9
	72	31.6 ± 3.2	1.0 ± 0.7
Positive control (mitomycin C)	48	9.4 ± 3.0	24.6 ± 3.9*
	72	13.8 ± 1.9	—

^a 每隻小鼠至少觀察 1000 顆紅血球，計算網狀紅血球比例 (RET/1000RBC)。RET: 網狀紅血球；RBC: 紅血球

^b 每隻小鼠至少觀察 2000 顆網狀紅血球 (RET) 產生微核的數量，微核率指網狀紅血球中微核發生的數目，以千分率表示 (MN % RET)。MN: 微核。

* 表示和負對照組具有顯著性差異 (p<0.05)

表 5. 餵食「蛹蟲草菌絲發酵液凍乾粉」對 SD 大鼠血清生化之影響

Group (mg/kg b.w.)	Alanine aminotransferase (ALT, U/L, Mean ± S.D., n=5)	Aspartate aminotransferase (AST, U/L, Mean ± S.D., n=5)	Blood urea nitrogen (BUN, mg/dL, Mean ± S.D., n=5)
2000	43.6 ± 7.2	109.8 ± 28.8	17.54 ± 3.09
Control (sterile water)	43.4 ± 3.6	91.6 ± 20.7	20.16 ± 1.26

* : p < 0.05

表 6. 餵食「蛹蟲草菌絲發酵液凍乾粉」對 SD 大鼠體重及體重增長百分率之影響

Group (mg/kg b.w.)	體重(g, Mean ± SD., n=5)		
	D1	D8	Body weight gains (%)
2,000	249.0 ± 11.2	305.0 ± 16.8	56.0 ± 8.1
Control (sterile water)	249.8 ± 11.4	303.8 ± 11.3	54.0 ± 2.9

* : p < 0.05

%，影響了紅血球成熟過程的代謝機制，且增加了微核發生率比例達到 24.6 ± 3.9 %。另外，測試樣品在低、中及高劑量下，網狀紅血球比例分別為 35.2 ± 2.6 %、 33.4 ± 1.9 %及 33.6 ± 3.2 %，與負對照組皆無顯著差異，而在微核率方面，分別為 0.8 ± 0.8 %、 0.4 ± 0.9 %及 0.6 ± 0.5 %，與負對照組亦皆無顯著差異。

單一劑量大鼠口服急毒試驗

試驗物質 2000 mg/kg b.w. 餵食 SD 大鼠後，在 7 天觀察期均未見動物死亡。大鼠血清生化分析（表 5）、平均體重及體重變化（表 6），試驗組與對照組之間均無顯著性差異。試驗組餵食後 7 天之肉眼觀察（圖 2）及組織病理鏡檢（資料未提供），雄鼠無明顯病理變化。口服急性毒性試驗結果顯示，試驗組與對照組之間均無明顯差異。對雄性大鼠之口服急性毒性 LD_{50} 值大於 2,000 mg/kg b.w.。

討 論

蛹蟲草(*C. militaris*)與冬蟲夏草(*C. sinensis*)同屬於蟲草屬，由於冬蟲夏草自古即被視為珍貴滋補的中藥材，有滋肺補腎的功能，但因濫採亂挖使其產量逐年遞減且價格飆漲，故人們開始尋找與冬蟲夏草具有相同活性的替代品。蛹蟲草為蟲草屬的模式種，分布廣泛，取得容易，已成功發展蛹蟲草的人工培養技術，且含有蟲草素和蟲草多醣等貢獻獨特的藥理作用，因此蛹蟲草已逐漸取代冬蟲夏草，產學各界也積極的對蛹蟲草栽培及保健功效等進行研究，目前各國法規中，僅台灣對子實體部分有規範，至於蛹蟲草醱酵液和菌絲體凍乾粉末目前則尚無規範，所製成的膠囊和機能性飲料等相關產品則在美、中、日、台及韓等國皆有見到產品販售^[26]。

有鑑於蛹蟲草發酵液菌絲體相關安全性研究文獻稀少，且各家培養條件不同，成分

略有差異，因此進行成分分析以對受測樣品有所界定，並評估蛹蟲草菌絲發酵液凍乾粉的安全性試驗，是否具有開發食用原料的潛力。液體發酵最大的優點是菌種來源穩定，製程時間縮短、產能放大及確保有效成分再現性。經 HPLC 進行蛹蟲草菌絲體凍乾品成分分析，Adenosine、cordycepin 及 N6-(2'-hydroxyethyl)-adenosine 的含量分別為 1.7 mg/g、0.3 mg/g 及 0.1 mg/g，Ergosterol 含量為 2.2 mg/g，皆與子實體有相似活性成分，但人工培養之子實體含 cordycepin 甚高，可高達 15.37 mg/g^[27]。Cordycepin 為腺嘌呤核苷的結構類似物，因此可與許多作用於腺苷的酵素或蛋白質反應，進而去干擾 DNA 和 RNA 的合成^[28]，抑制不正常的細胞分裂，故有潛力成為化療藥物，目前 cordycepin 已成為候選之抗白血病藥物，已進入臨床試驗^[29,30]。但 cordycepin 快速脫氨(deamination)使其單獨用於體內試驗時，產生很大的侷限性，當 cordycepin 與腺苷脫氨酶(adenosine deaminase, ADA)酵素的抑制劑(inhibitor)存在時，因為穩定了 cordycepin 的結構，使 cordycepin 的效能提高。但有文獻指出^[31]，若 cordycepin 與 2'-deoxycoformycin (dCF，一種 ADA inhibitor)結合，會產生腸胃毒性（如體重減少、嘔吐、腹瀉、食慾下降和腸胃道壞死）和骨髓毒性（淋巴球下降和胸腺淋巴消耗）等相關症狀，在 Beagle dogs 模式下，Cordycepin 與 dCF 結合最大耐受劑量為三天，8 mg/kg/day。研究指出^[32]，黃耆乙醇萃取物即具有抑制 ADA 酵素之活性， IC_{50} 約為 0.16 mg/mL，其他具 ADA inhibition 活性的物質（如天然植化素、植物萃取物成分、植物酚類及三萜類）^[33,34]及食物（如大蒜和洋蔥）^[35]亦可能出現在我們日常生活中，故可推測若高濃度的 cordycepin 與能抑制 ADA 酵素的藥物或食品併用，可能也會產生相關毒性。

菌絲體由於菌絲未分化，能產生之二級代謝物的種類較少，且含量較低，所以cordycepin 含量亦低於子實體很多（約 1/10），可較不擔心其危害，但仍須先建立其安全性資料，以供評量之依據。故進行三項基因毒性試驗及單一劑量大鼠口服急毒試驗，本實驗依據衛福部食藥署健康食品安全性評估方法並依循國際經濟合作暨開發組織(OECD)之規範所進行。安氏(Ames)基因突變分析法為利用一系列本身不能合成組氨酸的組氨酸缺陷型試驗菌株(*Salmonella typhimurium*)，只能在補充組氨酸的培養基上生長，而在缺乏組氨酸的培養基上，則不能生長。若受到致突變物刺激時，則組氨酸缺陷型試驗菌株則可逆突變成可自行合成組氨酸的原型。藉由此特性的變化，可以測試試驗物質有無致突變作用。實驗結果顯示，不論在有無添加S9代謝活化物的條件下，每個測試劑量皆未明顯增加五株菌的回復突變菌落數，TA97a、TA98、TA100及TA102株菌之平均回復突變菌落數均未達負對照組之兩倍（0.71、0.93、1.18及0.97倍），且TA1535亦未達三倍（0.84倍）。

體外哺乳類細胞的染色體異常分析法系利用倉鼠卵巢細胞 CHO-K1，評估試驗物質是否會引發染色體結構之異常。染色體結構異常主要原因為DNA發生中斷(discontinuities)或斷裂(break)所造成，若斷裂無法再結合(reunion)，則會造成缺失(deletion)，而錯誤之reunion則造成交換(exchange)。藉由觀察200顆處於細胞分裂中期的細胞，計算染色體或染色分體的結構變異種類及數量與變異細胞之頻率，來鑑別試驗物質是否具有毒性。實驗結果顯示，不論在有無S9的短時間（3小時）與長時間（20小時）處理下，各劑量之試驗物質均未造成細胞5%以上染色體差異，且與負對照組之間無顯著差異，顯示具染色體變異之細胞數與測試劑量間不具有劑量-效

應之相關性。

微核是染色體斷裂或紡錘絲受損時，在細胞有絲分裂後期滯留在細胞核外的遺傳物質。嚙齒類周邊血液微核試驗是藉由小鼠周邊血液微核測試，檢測活體動物在試驗物質處理後，周邊血或骨髓中是否會增加微核發生率，進一步判斷測試物質之基因毒性。實驗結果顯示，測試樣品在低、中及高劑量下，與負對照組皆無顯著差異，顯示試驗物質不會抑制ICR小鼠之造血功能，而在微核發生率方面，與負對照組亦皆無顯著差異，顯示試驗物質不具誘發小鼠週邊血球細胞產生微核的能力。

單一劑量口服急性毒性試驗，乃以單劑量高濃度試驗物質餵食實驗動物，觀察其對實驗動物影響，檢測項目包括動物之死亡及肉眼檢查外觀、口腔、胸腔及腹腔內所有器官，肝臟和腎臟組織毒性病變等。本試驗觀察期為7天而非14天，是為了要快速地知道，單劑量的高濃度試驗物質在大鼠內的影響，避免時間過長，大鼠已在體內做相關修復的機制。口服急性毒性試驗結果顯示，對雄性大鼠之口服急性毒性LD₅₀值大於2,000 mg/kg b.w.。

根據文獻指出^[36]，蟲草可降低慢性腎功能不全大鼠的死亡率，改善貧血狀況，降低血清尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)濃度，本試驗結果顯示，BUN 的值(17.54±3.09)有下降趨勢，與文獻結果相吻合。有關此點將在28天亞急性毒性試驗中，再進一步確認。另有文獻指出^[37]，在小鼠急性肝損傷試驗下，蛹蟲草發酵液凍乾粉有效降低AST和ALT，LD₅₀大於15 g/kg，屬於無毒級別。

綜合上述各項研究結果，顯示蛹蟲草發酵液凍乾粉不具有基因毒性及口服急毒性的疑慮，但是仍須進一步進行28天亞急性毒性試驗以及90天亞慢性毒性試驗，才能更完整評估其安全。

參考文獻

- 林樹前。中國藥用菌生產與產品開發。2000:401。中國農業出版社。
- 敬一兵、陸魯生。蟲草。1986:74。雲南科技出版社。
- Kuo CF, Chen CC, Lin CF *et al.* Abrogation of streptococcal pyrogenic exotoxin B-mediated suppression of phagocytosis in U937 cells by *Cordyceps sinensis* mycelium via production of cytokines. *Food Chem Toxicol* 2007; 45: 278-85.
- Won SY, Park EH. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *J Ethnopharmacol* 2005; 96:555-61.
- Kim HG, Shrestha B, Lim SY *et al.* *Cordycepin* inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of NF- κ B through Akt and p38 inhibition in RAW 264.7 macrophage cells. *Eur J Pharmacol* 2006; 545:192-9.
- Li SP, Zhang GH, Zeng Q *et al.* Hypoglycemic activity of polysaccharide, with antioxidation, isolated from cultured *Cordyceps* mycelia. *Phytomedicine* 2006; 13:428-33.
- Kiho T, Hui JI, Yamane A *et al.* Polysaccharides in fungi XXXII. Hypoglycemic activity and chemical properties of a polysaccharides from the cultural mycelium of *Cordyceps sinensis*. *Biol Pharm Bull* 1993; 16:1291-3.
- Koh JH, Kim JM, Chang UJ *et al.* Hypocholesterolemic effect of hot-water extract from mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Biol Pharmacol Bull* 2003; 26:84-7.
- Lin YW, Chiang BH. Anti-tumor activity of the fermentation broth of *Cordyceps militaris* cultured in the medium of *Radix astragali*. *Process Biochem* 2008; 43:244-50.
- Yamaguchi Y, Kagota S, Nakamura K *et al.* Antioxidant activity of the extracts from fruiting bodies of cultured *Cordyceps sinensis*. *Phytother Res* 2000; 14:647-9.
- Yu HM, Wang BS, Huang SC *et al.* Comparison of protective effects between cultured *Cordyceps militaris* and natural *Cordyceps sinensis* against oxidative damage. *J Agric Food Chem* 2006; 54:3132-8.
- Russell R, Paterson M. Cordyceps -A traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory? *Review Phytochemistry* 2008; 69:1469-95.
- 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。
- 溫魯、張平、唐玉玲。蛹蟲草孢子粉活性成分分析。江蘇農業學報 2005; 21:139-40。
- 溫魯、尹起范、唐玉玲。蛹蟲草與有關蟲草活性成分檢測比較。食品科學 2004; 25:155-7。
- 張平、朱述鈞、錢大順、蔣孫、李建軍。北冬蟲夏草功能成分及保健作用分析。江蘇農業科學 2003; 6: 105-7。
- 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。
- Donald C, Caspary W, Kirby PE *et al.* Guide for performing the mouse lymphoma assay for mammalian cell mutagenicity. *Mutation Res* 1987; 189:143-56.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Test No. 471: Bacterial reverse mutation test. 1997. OECD.
- Galloway SM, Aardema MJ, Motoi I *et al.* International workshop on standardization of genotoxicity test procedures. Report from working group on in vitro tests for chromosomal aberrations. *Mutation Res* 1994; 312: 241-61.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Test No. 473: In vitro mammalian chromosome aberration test. 1997. OECD.
- David JK. Statistical evaluation of mutagenicity test data: Recommendation of the U.K. Environmental Mutagen Society, *Environ Health Perspect* 1994; 1:43-7.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Test No. 474: Mammalian erythrocyte micronucleus test. 1997. OECD.
- FDA. Single Dose Acute Toxicity Testing for Pharmaceuticals. 1996. U.S.A.
- Ramírez JH, Palacios M, Tamayo O *et al.* Gutiérrez O Acute and subacute toxicity of *Salvia scutellarioides* in mice and rats. *J Ethnopharmacol* 2007; 109:348-53.
- Nutrastar International Inc. <http://www.nutrastarintl.com/>.
- 郭濤、張龍、王兵、申鴻。不同培養基培育蛹蟲草中的蟲草素和腺甘含量測定。蠶業科學 2011; 37: 1117-122。
- 柴建萍、白興榮、謝道燕。蛹蟲草主要有效成分及其藥理功效。雲南製藥科技 2003; 4:22-3。
- 都興范、李應杰、王林華等。北冬蟲夏草抗的研究發展現狀。遼寧農業科學 2003; 26-8。
- 李邵平、季暉、季萍等。冬蟲夏草抗腫瘤作用研究發展。中草藥 2001; 32:373-4。
- Larry ER, Daniel RF, John MC *et al.* Toxicity of cordycepin in combination with the adenosine deaminase inhibitor 2'-Deoxycoformycin in Beagle Dogs. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 147:39-45.
- 賴彩瑩。探討黃耆中抑制腺甘脫氨酶活性之成份。2013。國立台灣大學食品科學系碩士論文，台灣。
- Koch HP, Jäger W, Groh U *et al.* In vitro inhibition of

- adenosine deaminase by flavonoids and related compounds. new insight into the mechanism of action of plant phenolics. *Meth Find Exp Clin Pharmacol* 1992; 14:413-7.
34. Heinrich PK, Andrea A, Bernd B *et al.* *In vitro* inhibition of adenosine deaminase by a group of steroid and triterpenoid compounds. *Phytother Res* 1994; 8:109 – 11.
35. Koch HP, Jäger W, Hysek J *et al.* Garlic and onion extracts. *In vitro* inhibition of adenosine deaminase. *Phytother Res* 1992; 6:50 – 52.
36. 鄭豐、田勁、黎磊石。冬蟲夏草對腎毒性急性腎功能衰竭得療效及機制探討。中國中西醫結合雜誌 1992; 12(5):288-91。
37. 侯金鑫、張金秀、趙曉靜、段碩楠、劉紅霞、管振龍、王立安。蛹蟲草液體發酵產物凍乾粉的抗氧化活性及保肝作用。藥物評論研究 2014; 37:25-9。

Genotoxicity Test and Acute Oral Toxicity Test of *Cordyceps militaris* mycelium

Hsiao-Hui Liu¹, Yi-Xuan Xie², Jia-Rong Chen², Chun-Han Shih³,
Yi-Ting Peng⁴, Chin-Chu Chen^{1,5,6*}

¹Bioengineering Center of Grape King Bio Ltd., Zhong-Li City; ²MedGaea Life Sciences Institute, New Taipei City;
³QPS Taiwan Bio Ltd, New Taipei City; ⁴Pro-partner Ltd., New Taipei City; ⁵Shih Chien University, Taipei City;
⁶National Taiwan University, Taipei City, Taiwan

Abstract

Cordyceps militaris, also known as north Chinese caterpillar fungus, is currently one of the most studies of Cordyceps. Though liquid fermentation for the industrial production has been proven successful to market in the United States, China, Japan, Taiwan, South Korea and other countries, there are few documents of genotoxicity safety researches. In this study, we focus on the three genotoxicity safety tests and single dose oral acute toxicity of freeze-dried *Cordyceps militaris* mycelium powder which is produced by liquid fermentation technology to define its toxicity. *In vitro* bacterial testing method of gene mutation, test samples were prepared as 50 mg/mL stock solution with sterile water and sequence from 5.0 mg/plate (highest testing dosage) to 0.3125 mg/plate. It's shown no significant differences between treatment and the negative control group when we tested with *Salmonella typhimurium* TA97a, TA98, TA100, TA102 and TA1535 strains with or without metabolic activation system (S9 mixture). *In vitro* chromosomal aberration test is to identify the incidence of structural chromosomal aberrations ability in cultured mammalian cells

(CHO-K1). The results shown less than 5 % chromosome mutated in the three metabolic systems (3 hrs w/ S9, 3 hrs w/o S9 and 20 hrs w/o S9) and no significant difference with control group. Even the highest concentration of 5.0 mg / mL treatment, there are more than 50 % of CHO-K1 cells remain. *In vivo* micronucleus testing of rodent peripheral blood, we studied the ICR mice and monitored their reticulocyte proportion (RET %) and micro-nuclear frequency (MN %_{RET}) by treating different oral dosage with 1000, 2000 and 3,000 mg/kg (b.w.) The result has shown no difference between treatment and control group. Acute oral toxicity study, after oral feeding a single high dose of 2,000 mg / kg (b.w.) in SD rats, rats activity status is normal. The results showed that there is no difference between the control group on body weight gains (%)、clinical symptoms and observations on the gross necropsy during continuous observation of seven days.

Keywords: freeze-dried *Cordyceps militaris* mycelium powder, oral acute toxicity, genotoxicity test