

# Genotoxicity and Acute Toxicity Studies of a Mushroom Mycelia Complex Drink

Hsiaoling Chang, Tingwei Lin, Chinchu Chen

Grape King Bio Co., Ltd, Taoyuan Taiwan  
Email: gkbioeng@grapeking.com.tw

Received: Dec. 15<sup>th</sup>, 2017; accepted: Dec. 28<sup>th</sup>, 2017; published: Jan. 5<sup>th</sup>, 2018

---

## Abstract

Concentrated aqueous extract from *Grifolafrondosa* fruit body (1% v/v), *Agaricusblazai* mycelia (40X), *Phellinus linteus* fruit body (50X) and *Coriolus versicolor* mycelia (40X) was added to the mycelium fermentation broth of *Antrodia cinnamomea* to produce a mushroom mycelia complex drink after the adjustment of the sweet and sour ratio. To better understand the safety of this drink, a battery of three genotoxicity tests and an acute toxicity test in mice were carried out in this study. Results showed that this complex drink did not increase the number of revertant colonies in any of the five test strains when compared with the negative control plates, regardless of the metabolic activation, in contrast to twice or more differences for five positive controls, indicating that the drink present no mutagenic activity. In the chromosome aberration test, neither short-term nor continuous treatment induced higher frequency of aberrations that were significantly different from negative controls. This result demonstrated that the mushroom mycelia complex drink was not genotoxic to CHO-K1 cells. In the mammalian *in vivo* micronucleus test, this drink did not increase the frequency of micronucleated erythrocytes in peripheral blood and had no significant effects on hematopoietic parameters. In the acute toxicity test, a single administration of the drink at dose of 10 ml/kg bw did not cause any morbidity or mortality in both male and female ICR mice.

## Keywords

*Antrodia cinnamomea*, Micronucleus Test, *Salmonella Typhimurium* Reverse Mutation Assay, Chromosome Aberration Test, Acute Toxicity Tes

---

## 菇类菌丝复合性饮品之基因毒性及急性毒性试验探讨

张晓苓, 林定威, 陈劲初

葡萄王生技股份有限公司, 台湾 桃园

Email: gkbioeng@grapeking.com.tw

收稿日期: 2017年12月15日; 录用日期: 2017年12月28日; 发布日期: 2018年1月5日

## 摘要

以樟芝(*Antrodia cinnamomea*)菌丝体发酵液为主另外添加各1% (v/v)舞茸(*Grifola frondosa*)子实体浓缩萃取液、巴西蘑菇(*Agaricus blazei*)菌丝体40倍浓缩发酵滤液、桑黄(*Phellinus linteus*)子实体浓缩萃取液及云芝(*Coriolus versicolor*)菌丝体40倍浓缩发酵滤液再经调整糖酸比而成。为了解其安全性,乃以三项基因毒及小鼠口服急性毒性试验来评估。结果显示,在五株沙门氏杆菌回复突变测试中,不论在有或无S9代谢活化的情况下,每个测试剂量组之回复突变菌落数均未达阴性对照组的两倍以上,显示其不具致突变之性质。体外哺乳类细胞染色体变异测试之结果经卜瓦松分布分析后显示,在短时间处理以及长时间处理各组中,皆未观察到具染色体变异之细胞数,与阴性对照组有显著差异。故对哺乳类细胞CHO-K1不具有致染色体变异之基因毒性。生体内哺乳类动物细胞微核试验,亦未见具诱发小鼠周边血球细胞产生微核的能力,亦不影响其造血机能。口服急性毒性试验结果显示,对ICR雄鼠及雌鼠之口服单一极限急性毒性剂量10 ml/kg bw下,并未发现死亡及临床异常症状。

## 关键词

樟芝, 微核试验, 沙门氏杆菌回复突变, 体细胞染色体变异, 口服急性毒性

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

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

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



Open Access

## 1. 前言

牛樟芝(*Antrodia cinnamomea*), 又名牛樟菇, 为多孔菌科(*Polyporaceae*)薄孔菌属(*Antrodia*)的一种药用真菌, 生长在中、低海拔的常绿阔叶大乔木的牛樟树(*Cinnamomum kanehirae*)上[1]。牛樟芝富含三萜类化合物、超氧歧化酶、腺苷、多醣体、 $\beta$ -D-葡聚糖, 常用于保肝[2]、抗炎[3]、抗癌[4]、抗氧化[5]、抗疲劳[6]及调节免疫系统[7]。在传统疗法, 牛樟芝被喻为是一种“补肝良药”[8]。然而, 由于樟芝只专门寄生于台湾特有的牛樟树, 真菌又生长速度缓慢, 野生子实体牛樟芝正面临被灭绝的危险之中。除了固态培养, 深层液体培养也已经成功大规模生产[9]。目前, 深层培养樟芝菌丝体作为一种功能性食品已经在市场上销售超过16年(注1999年底上市), 并考虑正式作为膳食补充剂。舞茸的食用历史有上千年[10], 由于舞茸独特的香味, 且肉质柔软脆嫩, 加上野生舞茸稀有且体积庞大, 在日本有“菇王”的美誉。舞茸的药用作用最早记载于17世纪日本阪然的《菌谱》中就提到舞茸具有延年益寿的作用, 近来研究更发现舞茸富含大量的多醣体而被认为具有抗肿瘤[11]、强化免疫系统功效[12][13]作用。巴西蘑菇别名姬松茸, 更有“神奇蘑菇”之称, 研究发现, 巴西蘑菇富含多醣体, 尤其是其中的 $\beta$ 葡聚糖, 被视为抗肿瘤、提升免疫的主要成分, 因此在日本, 以巴西蘑菇制成的液状、粉状及提神饮料等保健食品应运而生; 桑黄为一种珍贵之药材, 其子实体热水萃物具有抑制小白鼠肉瘤及艾氏癌的疗效; 云芝对人体各器官机能, 有良好的调节和保护作用, 能明显提高人体免疫能力、调节内分泌、改善肿胀[14]。虽然这些菇类其安全性结果均未观察到任何毒性症状, 但制成复合性饮品并未有任何安全性评价提供依据, 因此本案使用此

复合性饮品作为试验物质。

## 2. 试验物质

樟芝和巴西蘑菇菌丝体为购自食品工业发展研究所生物资源与保存中心(新竹市, 台湾)之 BCRC35398 及 BCRC36814, 菌株经液体发酵而得, 其发酵条件同陈泰伊等(2012) [15]。舞茸子实体萃取液, 舞茸购自好菇道(屏东县, 台湾), 桑黄子实体购自源铭企业有限公司(桃园市, 台湾), 10X 萃取, 加热条件 100℃, 30 分钟。

### 2.1. 沙门氏杆菌回复突变测试

方法同张晓苓等(2016) [16]。每一种菌株皆用各自不同种类及剂量如表 1。(Sigma-Aldrich, MO, USA) 的致变剂, 并在添加及不添加 S9 混合物作用下处理, 作为各项试验之阳性对照组。

### 2.2. 体外哺乳类细胞染色体变异试验

方法同张晓苓等(2016) [16]。本试验使用中国仓鼠卵巢细胞(CHO-K1), 培养液含 10%胎牛血清之 Ham's F-12 培养液(含 1.0 mM L-Glutamine), 调整 pH 值为 7.2~7.4。于含  $5 \pm 1\%$  CO<sub>2</sub> 之  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  培养箱中培养。细胞存活率分析, 观察三种处理方式之试验物质, 于各浓度是否对 CHO-K1 细胞造成毒性, 并以 MTT 定量法分析。细胞存活率% = 阳性对照组或试验组之吸光值/阴性对照组之吸光值 X100%。结果判读标准, 当阳性对照组之染色体异常细胞数目高于 3%, 且阴性对照组之染色体异常细胞数目低于 3%, 本试验数据视为有效。当试验组之染色体异常数目高于 3%, 并且出现浓度趋势反应时, 本试验结果视为阳性反应。

### 2.3. 生体内哺乳类动物细胞微核试验

方法同张晓苓等(2016) [16]。本试验使用口服无菌水为阴性对照组, 腹腔注射 cyclophosphamide 为阳性对照组(80 mL/kg b.w.)。阴性对照组及试验物质组于 2~3 小时内投药两次, 每次各授予 10 mL/kg b.w., 以达日授予剂量 20 mL/kg b.w.。试验结果分析, 计算网状红血球数及微核发生数目, 皆利用统计软件中

**Table 1.** Salmonella mutations in the test group prepared the contents of each group

**表 1.** 沙门氏杆菌回复突变试验各组别配制内容

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

9-AA、SA 及 MMC 使用之溶剂为无菌水; 2-NF、2-AA 及 BP 使用之溶剂为 DMSO

one-way ANOVA 及 Duncan's multiple rang test 进行分析, 当  $p < 0.05$  时, 表示组间具有显著性差异。

## 2.4. 口服急毒性试验

方法同张晓苓等(2016) [16]。以管喂 10 ml/kg bw, 对照组小鼠亦管喂 10 ml/kg bw 对照溶液(RO 过滤水), 血清生化分析: 当喂食第 7 日试验结束时, 进行牺牲。所有动物于牺牲前, 至少需禁食 16 小时。各组动物之体重变化、网状红血球及发生微核网状红血球数皆利用统计软件中 one-way ANOVA 及 Duncan's multiple rang test 进行分析。安全性评估: 肾功能评估是透过血液生化值去评估, 若病理切片有异常, 才会进一步测试。三项基因毒及小鼠口服急性毒性测试皆有通过动物伦理试验。

## 3. 结果

生体内哺乳类动物细胞微核测试, 各组死亡率均为 0%, 试验期间并未观察到异常的临床反应。不论是雄鼠或雌鼠, 各试验组动物体重与阴性对照组相较下均无显著差异。阴性对照组雄鼠于投予对照物质后 48 及 72 小时, 多染性红血球比例分别为  $3.26\% \pm 0.11\%$  及  $3.20\% \pm 0.10\%$ ; 阴性对照组雌鼠则分别为  $3.54\% \pm 0.21\%$  及  $3.36\% \pm 0.34\%$ ; 阳性对照组雄鼠于投予对照物质后 48 及 72 小时, 多染性红血球比例分别为  $1.08\% \pm 0.04\%$ ; 阳性对照组雌鼠则分别为  $1.76\% \pm 0.40\%$ 。阳性对照组在投予试验物质后 48 小时, 其比例即明显下降, 显示 Cyclophosphamide 具有抑制造血机能的效果。但各试验样品组与阴性对照组比较下并未有明显差异, 显示不会抑制小鼠之造血功能。本次试验以 1250、2500 及 5000 ml/kg 为测试剂量, 以口服途径喂食小鼠。藉由观察小鼠外围血球细胞微核发生率, 结果显示, 所有测试剂量组皆不具诱发小鼠外围血球细胞产生微核之能力。综合结果, 试验样品于本试验系统下对于 ICR 小鼠不具有基因毒性。

沙门氏杆菌回复突变测试, 本试验以 5、2.5、1.25、0.625 及 0.313 ml/plate 试验样品五个剂量, 利用五株沙门氏杆菌, 在有无 S9 代谢活化的条件下进行回复突变测试, 结果显示不论在有无 S9 代谢活化的条件下, 所有测试剂量其回复突变菌落数, 均未达阴性组的两倍或三倍以上, 显示其不具致突变之效果。对 *Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA102、TA1535 及 TA1537 等五株菌株不具致突变性。

体外哺乳类细胞染色体变异试验, 在不含 S9 代谢活化混合物, 处理 3 小时的条件下, 2.5、1.25 及 0.625 mg/mL 之复合性饮品观察到的染色体变异细胞数分别为 0 颗、0 颗以及 0 颗; 在含有 S9 代谢活化混合物, 处理 3 小时的条件下, 2.5、1.25 及 0.625 mg/mL 之样品观察到的染色体变异细胞数分别为 1 颗、3 颗以及 1 颗; 而在不含 S9 代谢活化混合物, 处理 18 小时的条件下, 2.5、1.25 及 0.625 mg/mL 之样品观察到的染色体变异细胞数分别为 4 颗、1 颗以及 1 颗。各组别染色体变异细胞数以卜瓦松分布进行统计分析。结果显示不论是 3 小时处理组别(含或不含 S9 代谢活化混合物)或是 18 小时处理组别(不含 S9 代谢活化混合物), 具有染色体变异之细胞数与阴性对照组皆无显著差异, 显示试验样品并不会引起 CHO-K1 细胞产生染色体变异之基因毒性。

口服急毒性试验, 试验期间所有动物均存活, 且未发现任何临床异常症状。在试验期间, 试验物质之体重及体重增长百分率与对照组间无显著性差异。三项血清生化分析, 亦与对照组间不具显著性差异。解剖与肉眼检查、组织病理评估皆未发现相关之病变。因此于 ICR 雄鼠及雌鼠之口服单一极限急性毒性剂量 10 ml/kg bw 并未发现不良反应。

## 4. 讨论

健康食品上市前, 为确保健康食品本身不会因成分或代谢后释出有害物质而伤害人体, 官方定出分类的等级及评估的方法, 基因毒性试验评估即包含沙门氏杆菌回复突变试验、体外哺乳类细胞染色体结构异常试验与啮齿类外围血液微核试验等三种。本文中最高浓度 100 mg/mL 及其以下各浓度的“复合性饮

品”，于添加或未添加 S9 酵素活化处理下，对 TA98、TA100、TA102、TA1535 及 TA1537 五株试验菌株所产生的回复突变菌落数均未达阴性对照组菌落数两倍以上。因此，沙门氏菌回复突变测试之结果判定为阴性反应，TA1535 和 TA100 为点突变(point mutation)造成，而 TA1537 和 TA98 为移码突变(frame-shift)产生，TA102 在 pAQ1(四环霉素+)质体上带有 hisG428 突变，主要有三种突变：1) 小片段的碱基遗失(in-frame deletions)通常为 3 或 6 个碱基对；2) 碱基置换(base substitution)；3) 编码突变 tRNA(ochre)的基因[15] [16]。由于有许多物质本身并不具突变性，但是一旦进入体内经过肝脏酵素代谢活化后就会转化成致突变剂，因此利用从小鼠肝脏提取的 S9 混合物，来模拟试验物质进入体内后，经过肝脏代谢后是否具有突变性。结果显示，在此模式下亦皆不会造成突变。此外，因进行多组浓度，故亦可供左证其再现性。

在染色体结构异常试验结果显示，阳性对照组(mitomycin C 及 cyclophosphamide)之染色体异常细胞数高于 3%，且阴性对照组之染色体异常细胞数在 3% 以下，表示此次试验为有效试验。且在添加 S9 酵素处理 3 小时、未添加 S9 酵素处理 3 小时和 22 小时的试验中，各试验组 3 个剂量之染色体异常细胞数均在 3% 以下。在体外哺乳类细胞染色体结构异常试验中，5 mg/mL 及其以下各浓度亦皆为阴性。S9 处理与否也并不影响其阴性反应结果。嚙齿类外围血液微核试验，5 mg/mL 以下各剂量组小鼠外围血液之网状红血球和网状红血球中微核数目均与阴性对照组皆无显著性差异，试验结果为阴性，综合上述三项结果显示肝脏中之酵素并不会将复合性饮品代谢转换为毒性成分。对于 ICR 雄鼠和雌鼠之口服急毒性毒性试验，测试喂食小鼠后对实验动物体内可能产生之毒性病理变化，作为使用安全参考。小鼠(ICR 品系)10 只，雌雄数各半剂量，其 LD50 10 ml/kg b.w.(动物体重)。实验结束后小鼠均无死亡，故其 LD50 > 10 ml/kg b.w.。此外，小鼠平均体重亦无明显变化，取小鼠体内重要脏器，包括：肾脏、肝脏、脾脏等脏器进行组织病理切片检查，亦均未见与试验物质有关之明显组织病理变化。综合以上结果，90 天慢性毒性试验、致畸试验(尚未发表)，皆无不良反应发生，且此复合性饮品内所添加包含樟芝等 5 种菇菌类素材均已有多食用之文献，因此我们认为此复合性饮品应具有相当的食用安全性。

## 参考文献 (References)

- [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] Ker, Y.B., Peng, C.C., Chang, W.L., et al. (2014) Hepatoprotective Bioactivity of the Glycoprotein, Antrodan, Isolated from *Antrodia cinnamomea* mycelia. *PLoS One*, **9**, e93191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093191>
- [3] Chen, C.C., Liu, Y.W., Ker, Y.B., et al. (2007) Chemical Characterization and Anti-Inflammatory Effect of Polysaccharides Fractionated from Submerge Cultured *Antrodia camphorata* mycelia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 5007-5012. <https://doi.org/10.1021/jf063484c>
- [4] Hsu, Y.L., Kuo, P.L., Cho, C.Y. et al. (2007) *Antrodia cinnamomea* Fruiting Bodies Extract Suppresses the Invasive Potential of Human Liver Cancer Cell Line PLC/PRF/5 through Inhibition of Nuclear Factor Kappab Pathway. *Food and Chemical Toxicology*, **45**, 1249-1257. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.01.005>
- [5] Hsiao, G., Shen, M.Y., Lin, K.H., et al. (2003) Antioxidative and Hepatoprotective Effects of *Antrodia camphorata* Extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 3302-3308. <https://doi.org/10.1021/jf021159t>
- [6] Huang, C.C., Hsu, M.C., Huang, W.C. et al. (2012) Triterpenoid-Rich Extract from *Antrodia camphorata* Improves Physical Fatigue and Exercise Performance in Mice. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 364741.
- [7] Cheng, P.C., Huang, C.C., Chiang, P.F., Lin, C.N., Li, L.L., Lee, T.W., et al. (2014) Radioprotective Effects of *Antrodia cinnamomea* are Enhanced on Immune Cells and Inhibited on Cancer Cells. *International Journal of Radiation Oncology Biology*, 1-12.
- [8] Ao, Z.H., Xu, Z.H., Lu, Z.M., et al. (2009) Niuchangchih (*Antrodia camphorata*) and Its Potential in Treating Liver Diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, **121**, 194-212. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.10.039>
- [9] Liu, D.Z., Liang, H.J., Chen, C.H. et al., (2007) Comparative Anti-Inflammatory Characterization of Wild Fruiting

- Body, Liquid-State Fermentation, and Solid-State Culture of *Taiwanofungus camphoratus* in Microglia and the Mechanism of Its Action. *Journal of Ethnopharmacology*, **113**, 45-53. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.03.037>
- [10] Borchers, A.T., *et al.* (1999) Mushrooms, Tumors, and Immunity. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, **221**, 281-93. <https://doi.org/10.3181/00379727-221-44412>
- [11] Suzuki, I., *et al.* (1984) Antitumor Activity of a Polysaccharide Fraction Extracted from Cultured Fruiting Bodies of *Grifolafrondosa*. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*, **7**, 492-500. <https://doi.org/10.1248/bpb1978.7.492>
- [12] Huyan, T., *et al.* (2014) Protective Effect of Polysaccharides on Simulated Microgravity-Induced Functional Inhibition of Human NK Cells. *Carbohydrate Polymers*, **101**, 819-827. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.021>
- [13] Suzuki, I., *et al.* (1985) Effect of a Polysaccharide Fraction from *Grifolafrondosa* on Immune Response in Mice. *Journal of Ethnopharmacology*, **8**, 217-226.
- [14] 陈启祯. 菇菇的世界[M]. 台南: 南台科技大学生物技术系, 2004: 58.
- [15] 陈泰伊, 林定威. 樟芝菌丝体发酵全液冻干粉长期食用安全性评估[J]. 食用菌学报, 2012, 19(2): 100-105.
- [16] 张晓苓, 陈彦博, 徐瑞霞, 等. 云芝菌丝体发酵液冻干粉之安全性探讨[J]. 澄清医护管理杂志, 2016, 12(3): 10-20.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2161-8976, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [hjbm@hanspub.org](mailto:hjbm@hanspub.org)