

# 銀耳多醣產品毒理及致突變性評估<sup>1</sup>

楊淑惠<sup>2,5</sup> 陳鯤兆<sup>3</sup> 吳昭慧<sup>3</sup> 廖俊旺<sup>4</sup>

## 摘要

楊淑惠、陳鯤兆、吳昭慧、廖俊旺。2008。銀耳多醣產品毒理及致突變性評估。台灣農業研究 57:243–255。

古籍記載，銀耳性味甘、平具有滋陰潤肺、養胃生津之功效。我們的研究顯示，從銀耳子實體萃取而得之銀耳多醣，可以有效改善便秘症狀，為確保長期大量食用銀耳多醣的安全性，進而執行本次安全性實驗。安全性試驗乃依據衛生署食品安全性評估規範。首先進行銀耳多醣對大鼠 (SD 品系) 之口服急毒性試驗，依體重經口單次餵食大鼠最高測試劑量 5 g/kg 體重，之後連續觀察 14 天。分析血液學、白血球分類及體內重要臟器變化結果顯示，全部供試大鼠均無中毒症狀或死亡，且均無出現與試驗物質有關之肉眼及組織病理變化，顯示銀耳多醣對大鼠之口服急毒性 LD<sub>50</sub> 值為大於 5 g/kg 體重。銀耳多醣並進行 Ames 試驗，對五株組胺酸缺乏之沙門氏菌 TA98、TA100、TA102、TA1535 及 TA1537 進行回復突變之致變異性實驗。試驗顯示銀耳多醣不論未經或經 S9 作用後與各菌株共同培養，各濃度銀耳多醣的細菌回復突變菌數與陰性對照組相比均無顯著差異，顯示銀耳多醣對供試沙門菌株並不具有致變異性，對細菌基因回復突變測試為陰性反應。顯示銀耳多醣為一安全性的物質。

**關鍵詞：**銀耳、多醣、大鼠、口服急毒性、沙門菌株、Ames 試驗。

## 前言

銀耳 (*Tremella fuciformis* Berk)，俗稱白木耳 (white jelly fungi)，屬真菌中擔子菌 (basidiomycetes)，銀耳科 (Tremellaceae)；可食用部份為子實體。古籍記載，銀耳性味甘、平具有滋陰潤肺、養胃生津之功效，自古被視為能延年益壽的藥膳珍品。其活性成分銀耳多醣的化學結構為  $\alpha$ -1,3-甘露聚醣 (mannan)，屬於酸性異質多醣 (acidic heteropolysaccharide) (Kakuta 1979; Yui 1995; Baets 2001)。研究證實，銀耳多醣具有降低小鼠血中之血糖 (Kiho *et al.* 1994) 與低密度膽固

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2333 號。接受日期：97 年 10 月 23 日。
2. 本所鳳山熱帶園藝試驗分所經營利用系助理研究員。台灣 高雄縣。
3. 中興大學動物疾病診斷中心助理。台灣 台中市。
4. 中興大學獸醫病理生物學研究所副教授。台灣 台中市。
5. 通訊作者，電子郵件：debbie@fthes-tari.gov.tw；傳真：(07)7315590。

醇含量 (Cheung 1996) 之功能。另外，並具有抗發炎 (Ukai *et al.* 1983)、促進淋巴球增生與血小板細胞活性及增加脾臟巨噬細胞的活性 (Ma & Lin 1992)，及誘導人體產生致腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor, TNF) (Gao 1997, 1996; Ukai *et al.* 1992)，能提升人體免疫力 (Xia & Lin 1989) 等功能。

我們的研究顯示，從銀耳子實體萃取而得銀耳多醣溶液，在 10–80°C 之溫度範圍中具有相當好之黏稠性，在 pH 3–10 之酸鹼值範圍中亦相當穩定且無明顯的稀化 (thining) 現象。將 1 g 的銀耳多醣粉末，以 200 mL 之液體進行復水，復水之多醣溶液經離心機以 10,000 rpm 離心，無離水現象，展現了良好的保水力。有便秘之苦的自願者試用顯示，每日攝食 2–5 g 的多醣粉末 (溶於 300 mL 之液體後食用)，自願者可每日正常排便，有效改善便秘症狀 (新用途專利申請中)。惟自願者在停止食用銀耳多醣的第二至三天，其排便情形會回到未攝食前的便秘狀態，意即便秘患者需每日食用適量銀耳多醣才能持續順利排便。為確保長期大量食用銀耳多醣的安全性，而進行本次實驗。

## 材料與方法

### 銀耳多醣萃取

銀耳子實體乾品原料，復水後以熱萃取方式進行萃取，經離心、過濾，收集萃取液為粗銀耳多醣，再經烘乾，打粉，於室溫貯存備用。供試驗用銀耳多醣為黃白色乾燥粉末，水份含量 13%，灰分含量 0.4%，總醣量 93% (Phenol sulfuric acid method)，微量蛋白含量 0.69% (Lowry's method)，分子量大於  $2 \times 10^6$  Dalton (GPC method)，其單糖組成以甘露糖 (mannose) 為主，包括木糖 (xylose)、葡萄糖 (glucose) 及少量葡萄糖醛酸 (glucuronic acid) (Baets & Vandamme 2001)。

### 銀耳多醣對大鼠之口服急毒性試驗

供試動物：(1) 4 週齡大鼠 (SD 品系) 購自樂斯科生技園區實驗動物培育及研發中心 (宜蘭，台灣)，動物房溫度為 20–22°C 及 12 h 光/12 h 暗之光照週期。(2) 以鼠專用粒狀飼料 (LabDiet® 5001 Rodent diet, Purina Mills LLC, St. Louis, MO, USA) 為正常飼料及逆滲透水供應，經 1 週適應期後進行試驗。(3) 實驗動物之使用與操作均依據中華實驗動物學會之「實驗動物管理與使用指南」規範進行 (Yu *et al.* 2005)。

**試驗步驟：**(1) 口服急毒性試驗分為 5 g/kg body weight 劑量組及對照組，每組 10 隻大鼠 (雌雄各半)，編號以飽和苦味酸染劑於背部作標識，試驗時以 Polyethylene glycerol 配置銀耳多醣，配置試驗濃度皆為 0.5 g/mL。(2) 以不鏽鋼胃管，依體重經口餵食投予體積量為 10 mL/kg，處理後每日觀察並每週稱體重 1 次，至處理後第 14 天止。(3) 試驗結束時，大鼠以氣體麻醉 (2% Isoflurane, Halocarbon Laboratories, South Carolina, USA) 後經腹主動脈採血，並達完全放血後犧牲，進行大體解剖，檢查體內臟器之肉眼及組織病理變化。

**血液學檢查：**(1) 大鼠以 Isoflurane 麻醉，自腹主動脈採集全血放入含 EDTA 抗凝血劑試管 (K3 EDTA syringes, Vacutainer, NJ, USA)，於血球計數儀 (Sysmex K-4500, Toa Medical Electronics Co., Ltd., Kobe, Japan) 檢測血液相 (complete blood count, CBC)。(2) 紅血球數 (red blood cell count, RBC count)、血紅素 (hemoglobin, Hb)、血球容積比 (hematocrit, Hct)、平均紅血球體積 (mean corpuscular volume, MCV)、平均血紅素 (mean corpuscular hemoglobin, MCH)、平均血紅素濃度 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC) 及血小板 (platelet) 等項目。白血球分類

(differential leukocyte count) 以血液抹片，經 Weigert's Iron Hematoxylin Stain Kit (A. J. P. Scientific Inc., NJ., USA) 染色後，於光學顯微鏡 400 倍下，計算白血球中，淋巴球、嗜中性球、單核球、嗜酸性球及嗜鹼性球等百分率 (%) 等。

**血清生化檢查：**大鼠以 2% Isoflurane 麻醉，自腹主動脈採集全血放入含 EDTA 全血於離心機 (Kubota 2010, Tokyo, Japan)，以 3000 rpm 離心 15 min，取上清液血漿 (plasma)，以血清生化儀 (Chiron Diagnostics Corporation, Oberlin, OH, USA) 檢測肝腎血清酵素值，包括天門冬酸轉胺酶 (aspartate aminotransferase, AST)、氨基丙酸轉胺酶 (alanine aminotransferase, ALT)、尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、肌胺酸 (creatinine) 等項目。

**臟器病理檢查：**(1) 秤大鼠腦、心、肝、腎、脾、胸腺、腎上腺，睪丸及卵巢等臟器重量 (g) 並以最後一週之最終體重 (g)，作為體內臟器重量比率 (%) 之計算基準。(2) 觀察肉眼病理變化，取臟器浸泡於 10% 中性福馬林溶液中固定 1 週，經組織粗修與石臘包埋，以石臘組織切片機 (Leica RM 2145, Nussloch, Germany) 製成 2  $\mu$ m 厚度之組織切片，經 Hematoxylin & Eosin (H & E) 染色後，於光學顯微鏡觀察組織病理變化。依據 Shackelford 等人 (2002) 方法進行組織病理變化描述及病理評估，標準為 4 等級：1 = minimal (< 1%)；2 = slight (1–25%)；3 = moderate (26–50%)；4 = moderate/severe (51–75%)；5 = severe/high (76–100%)。

#### 銀耳多醣體對沙門菌回復突變之 Ames 試驗

**樣品配製：**將銀耳多醣體以 10、20、30、40 及 50 mg/mL 濃度溶於 DMSO，收取上清液測定溶解度曲線。結果銀耳多醣體在 30 mg/mL 呈現最高溶解度。因此配置 30 mg/mL 銀耳多醣體溶液為最高試驗濃度，收取其上清液經 0.45  $\mu$ m 濾膜濾過為儲存濃度。

**供試菌株：**本實驗所使用之 *Salmonella typhimurium* TA98，TA100 組胺酸 (histidine) 需求型變異株 (His-) 菌株購自新竹食品工業研究所 (Food Industry Research and Development Institute, Hsinchu) 生物資源保存及研究中心 (Bioresources Collection and Research Center, BCRC)。*Salmonella typhimurium* 之 TA102、TA1535、TA1537 購自 Discovery Partners International (DPI, California, USA)。試驗前均進行菌株基因型確認試驗。

**培養基配製：**(1) 液體營養培養基 (Nutrient broth, NB)，以 Difco® bacto nutrient broth (BD, USA) 及添加 0.5% NaCl 配製，高壓滅菌，室溫凝固，放入 4°C 保存備用。(2) 固體全營養培養基 (Nutrient agar plate, NA)，以 Difco® Agar (BD, USA) 溶於 NB 營養液，高壓滅菌，於 45°C 時分裝至培養皿，待凝固後放入 4°C 保存備用。(3) 50 $\times$  Vogel-Bonner Salts 儲存液，依序加入 10 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、100 g Citric acid、monohydrate、500 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 及 175 g NaH<sub>2</sub>NH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O，定量至 1,000 mL，高壓滅菌，冷凝後放入 4°C 保存備用。(4) 固體最低營養需求培養基 (Minimal glucose agar plate, MA)，取 15 g Agar 加入 930 mL 逆滲透水，經高壓滅菌後，待溶液降溫至 50°C，加入 20 mL 無菌 50 $\times$  VB salt、50 mL 無菌 40% 葡萄糖及 3.15 mL 無菌 Ampicillin，混合均勻後分裝至培養皿，冷凝後放入 4°C 保存備用。(5) 軟性瓊脂培養基 (Soft agar or Top agar)，以 0.75% Agar 與 0.5% NaCl 混合均勻，分裝倒入試管，經高壓滅菌，冷凝後放入 4°C 保存。使用前再加熱溶解。

**細菌毒性測試：**(1) 銀耳多醣最高濃度 3 mg/plate，以逆滲透水配製 3 個測試樣品操作濃度 (working solution) 為 1.2、6 及 30 mg/mL。(2) 取於 37°C 震盪培養箱培養 18 h 後之菌液，以無菌 PBS 緩衝液連續 10 倍稀釋成 10<sup>-6</sup> 倍及 10<sup>-7</sup> 倍。(3) 取 100  $\mu$ L 各濃度測試樣品及菌液 100  $\mu$ L，加入

2 mL soft agar, vortex 震盪均勻後, 置於 NA plate 上, 多向性搖晃至 soft agar 平鋪。銀耳多醣體最高濃度 3 mg/plate, 以逆滲透水配製 3 個測試樣品操作濃度 (working solution) 為 0.12、0.6 及 3 mg/mL。對照組最終濃度含 1% DMSO。(4) Soft agar 凝固後, 將 NA 培養皿倒置於 37°C 震盪培養箱, 經隔夜培養後取出計算菌落及記錄。若選取之三個測試濃度具有毒性, 則再向下稀釋樣品濃度, 求取最高無細菌毒性之濃度。

**肝臟活化酵素之製備:** (1) S9 混合液 (Lot#1452, Aroclor 1254-induced rat liver, Moltax<sup>TM</sup>, USA) 由森森大自然科技有限公司購入, 該產品 S9 蛋白質含量為 36.5 mg/mL。(2) 試驗前新鮮配製 S9 混合液與測試藥劑反應, 每毫升 S9 混合液內含 100  $\mu$ L S9 肝臟酵素抽出液、4  $\mu$ mole nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (sodium salt)、5  $\mu$ mole glucose-6-phosphate (mono sodium salt)、8  $\mu$ mole  $MgCl_2$ 、33  $\mu$ mole KCl 及 100  $\mu$ mole sodium phosphate buffer (pH 7.4)。

**致變異性測試:** 陽性藥劑對照組: 不加肝臟活化酵素直接處理試驗菌株之陽性對照組為 TA98: 2.5  $\mu$ g/plate 4-nitroquinoline-N-oxide (4-NQO) (Sigma-Aldrich Co., USA); TA100: 5  $\mu$ g/plate Sodium azide (SA) (Sigma-Aldrich Co., USA); TA102: 0.5  $\mu$ g/plate Mitomycin C (MMC) (Sigma-Aldrich Co., USA); TA1535: 5  $\mu$ g/plate Sodium azide (SA) (Sigma-Aldrich Co., USA); TA1537: 50  $\mu$ g/plate 9-aminoacridine (9-AA) (Sigma-Aldrich Co., USA); 經 S9 活化代謝之陽性對照組所有菌株皆為 5  $\mu$ g/plate 2-aminoanthracene (2-AA) (Sigma-Aldrich Co., USA)。(2) 藥劑劑量: 取最高無毒性濃度為最高測試濃度, 並向下連續兩倍稀釋取 4 個濃度, 銀耳多醣體對照組為無菌 DMSO。取 100  $\mu$ L 之銀耳多醣體加入 0.2 mL 之 0.5 mM histidine (Merck, kGaA, Germany) 與 0.5 mM biotin (Sigma-Aldrich Co., USA) 混合液及 100  $\mu$ L 菌液, 加肝臟活化酵素處理者, 另加 200  $\mu$ L S9 混合液, 再混入 45°C 之 2 mL 0.75 % 軟性瓊脂內含 0.5 % NaCl, 混合後倒入 MA 培養皿待室溫凝固後, 倒置於 37°C 培養箱中培養 48 h。計算培養皿之回復突變菌落數, 各劑量組為 3 個重覆數。

**統計分析:** (1) 試驗期間各組之體重變化, 依體重 (g) 或增重 (g 或%) 變化, 以統計分析軟體 Microsoft Excel 進行 pair Student's t-test, 或以單向變方分析法 (One-way ANOVA) 之 Duncan's test 分析進行組間比較分析, 其組間之顯著差異水準為  $p < 0.05$ 。(2) Ames test 結果判讀, 分析各劑量組與細菌回復突變數增加之相關性 (dose-response relationship)。不論測試樣品是否經肝臟酵素 (S9) 活化處理, 有 2 個以上劑量組之細菌回復突變數, 高於無藥劑對照組 2 倍以上者, 以及各劑量組與回復突變數有顯著之線性相關者, 可判定該供試樣品之致變異性結果為陽性反應。

## 結 果

### 銀耳多醣對大鼠之口服急毒性

依據衛生署健康食品安全性評估規範進行對大鼠 (SD 品系) 之口服急毒性試驗。試驗時銀耳多醣以去離子水配製成溶液濃度 0.5 g/mL。每隻大鼠灌食體積量為 10 mL/kg body weight, 當日依體重經口強迫灌食大鼠 1 次, 最終投予劑量總計為 5 g/kg body weight, 投予後連續觀察 14 天。結果顯示, 以銀耳多醣口服投予大鼠後, 全部鼠隻無中毒症狀或死亡, 顯示測試樣品對大鼠之口服急毒性 LD<sub>50</sub> 值皆大於 5 g/kg body weight。銀耳多醣處理組雄、雌鼠第 0、7 及 14 天時體重及增重亦無顯著影響 ( $p > 0.05$ )。

試驗結束後，檢查血液值 (complete blood count, CBC) 變化，白血球總數 (WBC count)、紅血球總數 (RBC count)、血紅素 (Hb)、血球容積比 (Hct)、平均紅血球體積 (MCV)、平均血紅素 (MCH) 及平均血紅素濃度 (MCHC) 及白血球分類等均無明顯差異 (表 1)。而在白血球分類方面，銀耳多醣處理組雄鼠之淋巴球比例和單核球比例 ( $85.2 \pm 1.2\%$  及  $4.4 \pm 1.6\%$ ) 與對照組相比為高 ( $78.8 \pm 4.4\%$  及  $7.4 \pm 1.4\%$ ) 相比較高。但淋巴球與單核球在正常大鼠比例分別為 70–90% 以及 0–10% (Zeng 1994)，因此在臨床上並無明顯病理意義 (表 2)。

**表 1.** 銀耳多醣口服急毒性試驗之大鼠血液學變化

**Table 1.** Changes in hematological parameters of rats after orally administered by gavage with *Tremella* polysaccharides in the acute oral toxicity test<sup>z</sup>

Dose (g/kg)	WBC <sup>y</sup> (10 <sup>3</sup> /μL)	RBC (10 <sup>6</sup> /μL)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	PLT (10 <sup>3</sup> /μL)
Male								
Control	9.7 ± 4.5 <sup>*x</sup>	5.7 ± 2.2	15.3 ± 0.4	35.0 ± 12.8	61.5 ± 1.9	39.0 ± 33.2	62.1 ± 50.4	882.4 ± 317.1
5	9.1 ± 3.5	8.1 ± 1.6	17.9 ± 2.6	50.0 ± 8.6	61.7 ± 2.6	22.3 ± 1.7	36.1 ± 3.1	732.0 ± 153.4
Female								
Control	12.4 ± 6.5	8.2 ± 1.7	18.4 ± 3.4	48.9 ± 10.0	59.8 ± 2.0	22.5 ± 0.5	37.7 ± 1.1	1014.8 ± 208.6
5	14.3 ± 2.0	7.9 ± 0.8	19.5 ± 2.2	49.4 ± 4.1	62.6 ± 2.2	24.7 ± 1.2	39.5 ± 1.7	1015.6 ± 156.5

<sup>z</sup> Blood samples were removed from rats at 14 days after gavaged with *Tremella* polysaccharides.

<sup>y</sup> WBC: white blood count; RBC: red blood cell; Hb: hemoglobin; Hct: hematocrit; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; PLT: platelets.

<sup>x</sup> Data are expressed as the mean ± SD (n = 5).

<sup>\*</sup> Significant difference between the control and treated groups at  $p < 0.05$ .

**表 2.** 銀耳多醣口服急毒性試驗之大鼠白血球分類變化

**Table 2.** Changes in white blood cells of rats after orally administered by gavage with *Tremella* polysaccharides in the acute oral toxicity test<sup>z</sup>

Dose (g/kg)	WBC (10 <sup>3</sup> /μL)	Lymph (%)	Neutrophil (%)		Monocyte (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)
			Band	Segment			
Male							
Control	9.7 ± 4.5 <sup>y</sup>	78.8 ± 4.4	0.4 ± 0.8	13.2 ± 4.9	7.4 ± 1.4	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4
5	9.1 ± 3.5	89.0 ± 3.5 <sup>*x</sup>	0.0 ± 0.0	6.8 ± 1.7 <sup>*</sup>	4.4 ± 1.6 <sup>*</sup>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Female							
Control	12.4 ± 6.5	77.2 ± 8.8	0.0 ± 0.0	13.4 ± 7.7	5.4 ± 1.7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
5	14.3 ± 2.0	84.8 ± 4.8	0.4 ± 0.8	9.0 ± 3.9	5.8 ± 1.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

<sup>z</sup> Blood samples were removed from rats at 14 days after gavaged with *Tremella* polysaccharides.

<sup>y</sup> Data are expressed as the mean ± SD (n = 5).

<sup>\*\*</sup> Significant difference between the control and treated groups at  $p < 0.05$ .

在肝腎血清酵素值方面，銀耳多醣處理組雌鼠之天門冬酸轉胺酶 (AST) ( $94.6 \pm 14.0$  mg/dL) 較對照組雌鼠 ( $154.6 \pm 21.5$  mg/dL) 低 ( $p < 0.05$ )，但仍位於正常值 80.86–194.14 mg/dL 範圍內，在臨床上並無明顯病理意義 (Charles River laboratories, 2005)。而氨基丙酸轉胺酶 (ALT)、及肌胺酸 (creatinine) 及尿素氮 (BUN) 值等項目均無與試驗物質有關之影響 (表 3)。

體內臟器重量包括腦、心、肝、腎臟、脾臟、胸腺、腎上腺、睪丸及卵巢重量及百分比與對照組比較均無明顯差異。檢查體內臟器，結果顯示對照組與處理組之腦、心、肝、腎臟、脾臟、胸腺、腎上腺、睪丸及卵巢等重要臟器均無因試驗物質引起之肉眼病理變化 (圖 1)。

組織病理檢查在對照組與處理組均出現散發性之局部極微肝細胞變性/壞死等非特異性病變，對照組雌雄鼠發生率為 2/5 及 2/5，銀耳多醣處理組雄鼠發生率為 1/5；雌鼠則為 2/5 (圖 2)，為一自發性之非特異性變化，亦常見於無特定病原 (specific pathogen free) 大鼠，與試驗物質無關。

### 銀耳多醣對沙門氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 菌株之回復突變致變異性 Ames 試驗

**細菌毒性測試：**將銀耳多醣 30 mg/mL 的儲存濃度以蒸餾水稀釋，最終濃度為 0.12、0.6 及 3 mg/plate，與 TA98、TA100、TA102、TA1535 及 TA1537 (Ames 1971; Ames *et al.* 1975) 各菌株作用 18 hrs。結果如表 4 所示，銀耳多醣在 3 mg/plate 以下之不同濃度對 TA98、TA100、TA102、TA1535 及 TA1537 各株細菌皆無顯著細菌毒性。

**Ames 測試：**由銀耳多醣最高無毒性濃度向下連續 2 倍稀釋，共選取 0.1875、0.375、0.75、1.5 及 3 mg/plate 各 5 個濃度作為 Ames 正式試驗，分為直接作用於各菌株，並以大鼠肝臟活化酵素抽出液 (S9) 與上述銀耳多醣各濃度溶液共同作用 48 h，藉以模擬銀耳多醣經動物體內肝臟酵素 (S9) 代謝後之代謝產物對細菌之基因致變異性。

**TA98 菌株：**各濃度銀耳多醣直接對 TA98 之細菌回復突變試驗中，對照組為  $29.3 \pm 1.5$  (colony, CFU/plate)，陽性對照藥劑 (4-NQO, 2.5  $\mu$ g/plate) 之細菌回復突變菌數為  $150.3 \pm 3.8$ ，銀耳多醣各處理組則分別為： $30.7 \pm 3.5$ 、 $31.7 \pm 5.5$ 、 $29.7 \pm 5.5$ 、 $26.7 \pm 4.0$  及  $29.3 \pm 4.6$ 。各濃度銀耳多醣與 S9 作用後，對 TA98 之細菌回復突變菌數之對照組為  $29.7 \pm 5.1$ ，陽性對照藥劑 (2-AA, 5  $\mu$ g /plate)

表 3. 銀耳多醣口服急毒性試驗之大鼠血清肝及腎臟功能指數變化

Table 3. Serum biochemistry changes in liver and renal function of rats after orally administered by gavage with *Tremella* polysaccharides in the acute oral toxicity test

Dose (g/kg)	AST (U/L) <sup>z</sup>	ALT (U/L)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
Male				
Control	$138.1 \pm 23.5$ <sup>y</sup>	$31.5 \pm 4.7$	$9.6 \pm 1.0$	$0.4 \pm 0.0$
5	$114.3 \pm 36.0$	$33.0 \pm 10.0$	$7.8 \pm 2.4$	$0.5 \pm 0.1$
Female				
Control	$154.6 \pm 21.5$	$22.9 \pm 1.8$	$14.1 \pm 2.2$	$0.5 \pm 0.0$
5	$94.6 \pm 14.0$	$20.6 \pm 2.6$	$9.8 \pm 1.8$	$0.5 \pm 0.1$

<sup>z</sup> AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; BUN: blood urea nitrogen.

<sup>y</sup> Data are expressed as the mean  $\pm$  SD (n = 5).

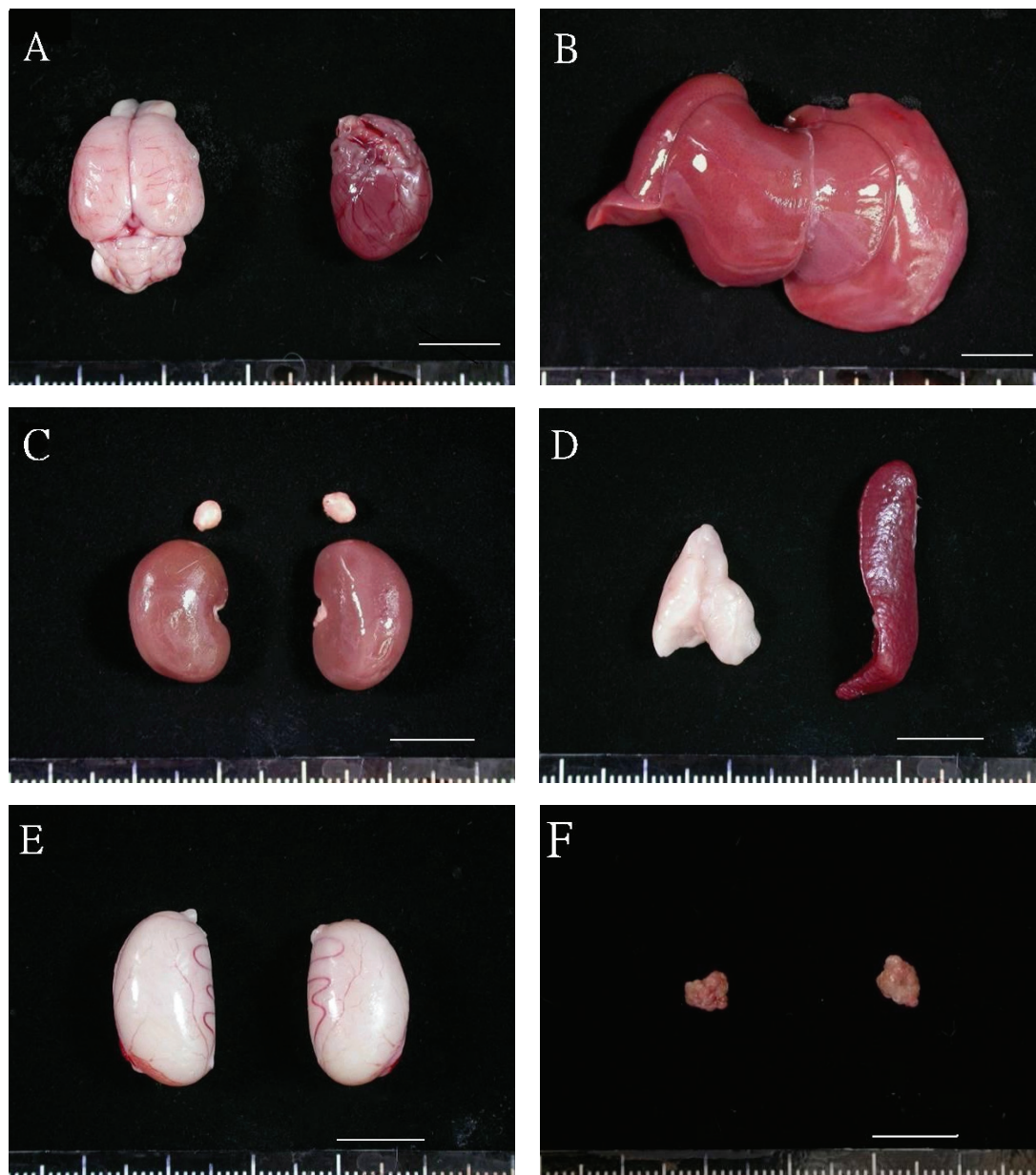
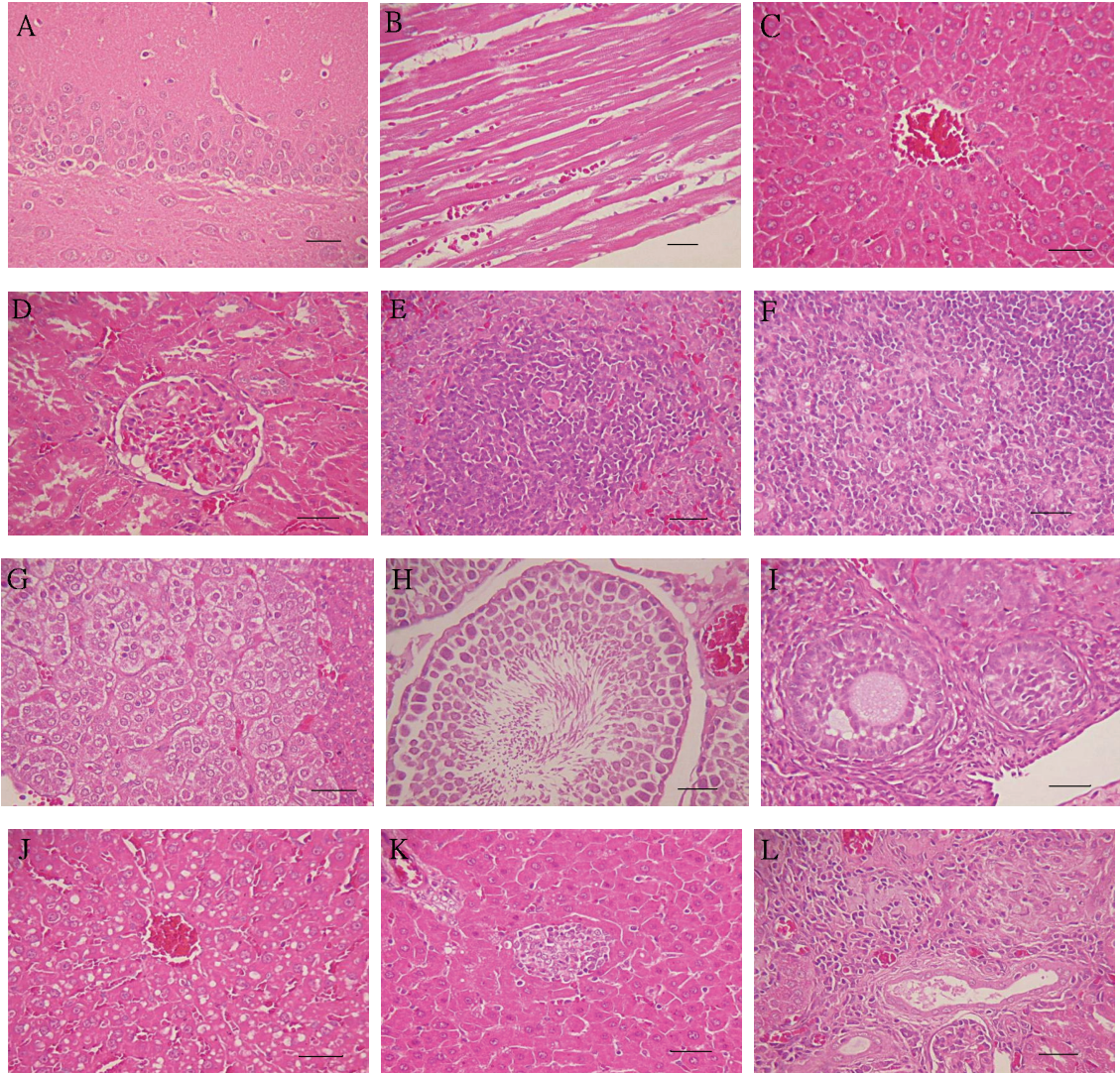


圖 1. 銀耳多醣口服急毒性試驗處理組大鼠體內臟器之內眼病理觀察。(A) 腦及心；(B) 肝；(C) 腎及腎上腺、(D) 胸腺及脾；(E) 睪丸；(F) 卵巢 (animal ID. 401 and 406) 等重要臟器均無明顯肉眼病理變化。(尺標 = 1.0 cm)

**Fig. 1.** Organs removed from rats at 14 days after gavaged with *Tremella* polysaccharides showing no visible symptoms or lesions. (A) brain (left) and heart (right), (B) liver, (C) kidney (bottom) and adrenal gland (top), (D) thymus (left) and spleen (right), (E) testes, (F) ovary. Aanimal ID. 401 and 406 group. (bar = 1.0 cm)



**圖 2.** 銀耳多醣口服急毒性試驗處理組大鼠體內臟器之組織病理觀察。(A) 大鼠腦；(B) 心臟；(C) 肝臟；(D) 腎臟；(E) 脾臟；(F) 胸腺；(G) 腎上腺；(H) 睪丸(動物編號：201)、卵巢 (I) (動物編號：310) 等重要臟器均無明顯組織病理變化。各處理組僅少數大出現輕微；(J) 肝壞死及；(K) 細胞空泡化；一隻雌鼠發生間質性腎炎；(L) (動物編號：209)，為自發性病變 (H&E stain, 200 $\times$ )。(尺標 = 1.0 cm)

**Fig. 2.** Histopathology of *Tremella* polysaccharides treated rats in the acute oral toxicity test showing no lesions on brain (A), heart (B), liver (C), kidney (D), spleen (E), thymus (F), adrenal gland (G), testes (H) (animal ID. 201), and ovary (I) (animal ID. 310). Few rats showed minimal necrosis, (J) and hepatic vacuolization, (K) in liver. Only one female rat (animal ID. 209) shows slight interstitial nephritis, (L) (Hematoxylin & Eosin stain, 200 $\times$ ). (bar = 1.0 cm)

表 4. 銀耳多醣粉末對沙門菌之細菌毒性試驗

Table 4. Toxicity of *Tremella polysaccharides* (TP) on *Salmonella typhimurium* mutant strains

Tester strains	Bacterial concentration	TP Conc. (mg/plate)/No. of revertanted (colony, CFU/plate)			
		0 <sup>y*</sup>	0.12 <sup>*</sup>	0.6 <sup>*</sup>	3 <sup>*</sup>
TA98	10 <sup>-6</sup>	196.0 ± 9.3 <sup>z</sup>	191.7 ± 6.9	191.3 ± 10.7	187.3 ± 8.3
	10 <sup>-7</sup>	18.3 ± 2.6	21.0 ± 1.4	19.3 ± 3.9	18.0 ± 3.6
TA100	10 <sup>-6</sup>	98.0 ± 6.5	104.7 ± 7.9	103.7 ± 9.0	96.3 ± 6.5
	10 <sup>-7</sup>	11.7 ± 2.6	10.3 ± 0.9	9.7 ± 1.2	13.3 ± 1.7
TA102	10 <sup>-6</sup>	221.7 ± 7.5	227.7 ± 3.4	234.7 ± 16.2	226.0 ± 2.2
	10 <sup>-7</sup>	24.7 ± 2.9	26.0 ± 2.2	25.0 ± 0.8	23.7 ± 3.1
TA1535	10 <sup>-6</sup>	169.7 ± 2.1	166.7 ± 3.4	168.0 ± 2.2	163.3 ± 1.9
	10 <sup>-7</sup>	16.7 ± 1.2	15.7 ± 0.5	17.7 ± 0.9	16.0 ± 1.6
TA1537	10 <sup>-6</sup>	114.0 ± 0.8	116.3 ± 1.7	115.0 ± 1.4	116.0 ± 2.2
	10 <sup>-7</sup>	15.7 ± 2.1	15.0 ± 0.8	15.7 ± 1.9	15.3 ± 0.9

<sup>z</sup> Data are expressed as the mean ± SD ( $n = 3$ ).

<sup>y\*</sup> Significant difference between the blank control and treated groups at  $p < 0.05$ .

之細菌回復突變菌數為  $135.3 \pm 9.7$ ，約為對照組增加 4 倍以上。銀耳多醣在各處理組則分別為： $30.7 \pm 2.5$ 、 $30.0 \pm 4.4$ 、 $32.7 \pm 3.1$ 、 $33.0 \pm 4.6$  及  $30.7 \pm 0.6$ 。結果顯示，銀耳多醣對 TA98 菌株並無明顯致變異性 (表 5)。

**TA100 菌株：**各濃度銀耳多醣直接對 TA100 進行細菌回復突變試驗，對照組為  $123.3 \pm 17.8$  (colony, CFU/plate)，陽性對照藥劑 (Sodium azide, 5  $\mu\text{g}/\text{plate}$ ) 之細菌回復突變菌數為  $1838.0 \pm 53.3$ ，而銀耳多醣各處理組則分別為： $132.7 \pm 13.7$ 、 $125.3 \pm 17.2$ 、 $138.0 \pm 6.2$ 、 $115.3 \pm 3.5$  及  $125.0 \pm 8.7$ 。各濃度銀耳多醣與 S9 作用後，對 TA100 之細菌回復突變菌數之對照組為  $135.0 \pm 8.2$ ，陽性對照藥劑 (2-AA, 5  $\mu\text{g}/\text{plate}$ ) 之細菌回復突變菌數為  $730.0 \pm 32.0$ ，銀耳多醣在各處理組則分別為： $132.7 \pm 3.5$ 、 $141.7 \pm 9.1$ 、 $123.3 \pm 3.2$ 、 $125.7 \pm 5.0$  及  $129.0 \pm 6.1$ 。結果顯示，銀耳多醣對 TA100 菌株並無明顯致變異性 (表 5)。

**TA102 菌株：**各濃度銀耳多醣直接對 TA102 進行細菌回復突變試驗，對照組為  $336.0 \pm 23.6$  (colony, CFU/plate)，陽性對照藥劑 (Mitomycin C, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$ ) 之細菌回復突變菌數為  $1012.3 \pm 90.5$ ，銀耳多醣各處理組則分別為： $341.7 \pm 24.1$ 、 $360.7 \pm 15.5$ 、 $335.0 \pm 9.5$ 、 $342.3 \pm 18.7$  及  $347.7 \pm 18.8$ 。各濃度銀耳多醣與 S9 作用後，對 TA102 之細菌回復突變菌數之對照組為  $382.7 \pm 18.4$ ，陽性對照藥劑 (2-AA, 5  $\mu\text{g}/\text{plate}$ ) 之細菌回復突變菌數為  $1295.3 \pm 85.2$ ，銀耳多醣各處理組則分別為： $392.0 \pm 14.4$ 、 $386.0 \pm 7.2$ 、 $381.3 \pm 27.7$ 、 $382.7 \pm 20.4$  及  $400.0 \pm 12.1$ 。結果顯示，銀耳多醣對 TA102 菌株並無明顯致變異性 (表 5)。

**TA1535 菌株：**各濃度銀耳多醣直接對 TA1535 進行細菌回復突變試驗，對照組為  $9.0 \pm 1.7$  (colony, CFU/plate)，陽性對照藥劑 (Sodium azide, 5  $\mu\text{g}/\text{plate}$ ) 之細菌回復突變菌數為  $468.7 \pm 7.6$ ，銀耳多醣各處理組則分別為： $9.3 \pm 2.1$ 、 $9.0 \pm 1.0$ 、 $8.3 \pm 0.6$ 、 $9.0 \pm 1.7$  及  $9.7 \pm 1.5$ 。各濃度銀耳多

表 5. 銀耳多醣粉末對沙門菌菌株之致突變試驗

Table 5. Mutagenicity of *Tremella polysaccharides* (TP) on *Salmonella typhimurium* mutant strains

Tester strains	Liver microsomal enzymes	Conc. (mg/plate)/Number of revertants (colony, CFU/plate)						
		NC <sup>z</sup>	PC <sup>y</sup>	0.1875	0.375	0.75	1.5	3
TA98	- S9	29 ± 2 <sup>x</sup>	150 ± 4 <sup>w*</sup>	31 ± 4	32 ± 6	30 ± 6	27 ± 4	29 ± 5
	+ S9	30 ± 5	135 ± 10 <sup>*</sup>	31 ± 3	30 ± 4	33 ± 3	33 ± 5	31 ± 1
TA100	- S9	123 ± 18	1838 ± 53 <sup>*</sup>	133 ± 14	125 ± 17	138 ± 6	115 ± 4	125 ± 9
	+ S9	135 ± 8	730 ± 32 <sup>*</sup>	133 ± 4	142 ± 9	123 ± 3	126 ± 5	129 ± 6
TA102	- S9	336 ± 24	1012 ± 90 <sup>*</sup>	342 ± 24	361 ± 16	335 ± 10	342 ± 19	348 ± 19
	+ S9	383 ± 18	1295 ± 85 <sup>*</sup>	392 ± 14	386 ± 7	381 ± 28	383 ± 20	400 ± 12
TA1535	- S9	9 ± 2	469 ± 8 <sup>*</sup>	9 ± 2	9 ± 1	8 ± 1	9 ± 2	10 ± 2
	+ S9	9 ± 1	79 ± 4 <sup>*</sup>	9 ± 2	9 ± 2	8 ± 1	10 ± 2	9 ± 3
TA1537	- S9	6 ± 1	469 ± 5 <sup>*</sup>	7 ± 1	5 ± 0	6 ± 1	6 ± 0	5 ± 1
	+ S9	9 ± 1	77 ± 5 <sup>*</sup>	9 ± 3	10 ± 3	9 ± 2	10 ± 2	8 ± 1

<sup>z</sup> Negative control was sterile dimethyl sulfoxide.

<sup>y</sup> Positive reagents without S-9 mix reactions were 2.5 µg/plate 4-nitroquinoline-N-oxide for TA98, 5 µg/plate sodium azide for TA100 and TA1535, 0.5 µg/plate mitomycin C for TA102, and 50 µg/plate 9-aminoacridine for TA1537; positive reagent with S-9 mixture was 2-aminoanthracene for all *Salmonella typhimurium* strains.

<sup>x</sup> Data was presented as mean ± SD.

<sup>w\*</sup> Significant difference in number of colonies for more than two folds between blank control and TP treated group at  $p < 0.05$ .

醣與 S9 作用後，對 TA1535 之細菌回復突變菌數之對照組為  $9.0 \pm 1.0$ ，陽性對照藥劑 (2-AA, 5 µg/plate) 之細菌回復突變菌數為  $179.3 \pm 3.5$ ，銀耳多醣各處理組則分別為： $9.3 \pm 1.5$ 、 $8.7 \pm 1.5$ 、 $8.0 \pm 1.0$ 、 $9.7 \pm 2.1$  及  $9.3 \pm 3.2$ 。結果顯示，銀耳多醣對 TA1535 菌株並無明顯致變異性 (表 5)。

**TA1537 菌株：**各銀耳多醣濃度直接對 TA1537 進行細菌回復突變試驗中，在對照組為  $5.7 \pm 0.6$  (colony, CFU/plate)，陽性對照藥劑 (9-aminoacridine, 50 µg/plate) 之細菌回復突變菌數為  $469.3 \pm 4.9$ ，銀耳多醣各處理組則分別為： $7.0 \pm 1.0$ 、 $5.0 \pm 0.0$ 、 $6.3 \pm 0.6$ 、 $6.0 \pm 0.0$  及  $5.3 \pm 0.6$ 。各濃度銀耳多醣與 S9 作用後，對 TA1537 之細菌回復突變菌數之對照組為  $9.0 \pm 1.0$ ，陽性對照藥劑 (2-AA, 5 µg/plate) 之細菌回復突變菌數為  $77.0 \pm 4.6$ ，銀耳多醣在 0.1875、0.375、0.75、1.5 及 3 mg/plate 各處理組則分別為： $9.3 \pm 3.2$ 、 $10.3 \pm 3.2$ 、 $9.0 \pm 2.0$ 、 $9.7 \pm 2.1$  及  $8.0 \pm 1.0$ 。結果顯示，銀耳多醣對 TA1537 菌株並無明顯致變異性 (表 5)。

## 討 論

銀耳子實體為衛生署公告 203 種「可食用中藥材」之一，研究顯示銀耳多醣具有提升免疫力 (Gao *et al.* 1996; Xia *et al.* 1989)，降低肝臟肝糖及血漿中膽固醇含量 (Kiho *et al.* 1994)，之功效，口服試驗劑量為 50–300 mg/kg。市場上已有銀耳多醣相關產品販售，惟顯少對於大量、長期食用之安全性報告。本商品化銀耳多醣產品，其毒理安全性評估試驗顯示，銀耳多醣對大鼠之血液值，體

內臟器重量包括腦、心、肝、腎臟、脾臟、胸腺、腎上腺、睪丸及卵巢重量及百分比等均無與試驗物質有關之影響，口服急毒性 LD<sub>50</sub> 值為大於 5 g/kg body weight。研究顯示人蔘多醣 (Ivanova *et al.* 2006) 具有預防副射引發之基因突變之作用，桑黃多醣及柳松菇多醣 (Shon *et al.* 2001) 對直接或間接誘發之突變劑均具有抗突變之作用，銀耳多醣產品之 Ames 試驗結果顯示，不論添加 S9 與否，對沙門菌 (TA98、TA100、TA102、TA1535 及 TA1537) 菌株均不具有致變異性，對細菌基因突變測試結果為陰性反應，由以上試驗結果可知銀耳多醣為高安全性的物質。

### 引用文獻 (Literature cited)

- Ames, B. N. 1971. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. p.267–282. *in*: Chemical Mutagens: Principles and Methods for Their Detection. Vol. 1. (Hollander, A., ed.) Plenum Press. New York and London.
- Ames, B. N., J. McCann, and E. Yamasaki. 1975. Method for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31:347–364.
- Baets, S. De and E. J. Vandamme. 2001. Extracellular *Tremella* polysaccharides: structure, properties and applications. *Biotech. Lett.* 23:1361–1366.
- Chan, P. K. and A. W. Hayes. 1994. Acute toxicity and eye irritancy. p.579–648. *in*: Principles and Methods of Toxicology (Hayes, A. W., ed.) 3<sup>rd</sup> ed. Raven Press. New York.
- Copplestone, J. F. 1988. The development of the WHO recommended classification of pesticides by hazard. *Bull. W. H. O.* 66:545–551.
- Gao, Q. P., R. Z. Jiang, H. Q. Chen, E. Jensen, and R. Seljelid. 1996. Characterization and cytokine stimulating activities of heteroglycans from *Tremella fuciformis*. *Planta Med.* 62:297–302.
- Gosselin, R. E., R. P. Smith, and H. C. Hodge. 1984. Ingredient Index. p.1–5. *in*: Clinical Toxicology of Commercial Products, Acute Poisoning, Section II. 5<sup>th</sup> ed. Baltimore: Williams and Wilkins Company.
- Ivanova, T., Y. Han, H. J. Son, Y. S. Yun, and J. Y. Song. 2006. Antimutagenic effect of polysaccharide ginsan extracted from *Panax ginseng*. *Food Chem. Toxicol.* 44(4):517–521.
- Kiho, T., Y. Tsujimura, M. Sakushima, S. Usui, and S. Ukai. 1994. Polysaccharides in fungi. XXXIII. Hypoglycemic activity of an acidic polysaccharide (AC) from *Tremella fuciformis*. *Yakugaku Zasshi* 114(5):308–315.
- Japanese Ministry of Health and Welfare. 1997. Guidelines for toxicity studies of drugs. p.272–290. *in*: Japanese Technical Requirements for New Drug Registration, with Relevant Japanese and ICH Guidelines Collected in Appendix, Appendix (21) S4 (ICH). Yakuji Nippo, Ltd. Tokyo.
- Liang, C. T., M. H. Chang, C. C. Hong, and K. J. Huang. 1999. Establishing the blood chemistry reference values for SPF rats and mice. *J. Chin. Soc. Sci.* 25:55–68.

- Maron, D. M. and B. N. Ames. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113:173–215.
- Mortelmans, K. and E. Zeiger. 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res.* 455(1-2):29–60.
- Shackelford, C., G. Long, J. Wolf, C. Okerberg, and R. Herbert. 2002. Qualitative and quantitative analysis of nonneoplastic lesions in toxicology studies. *Toxicol. Pathol.* 30:93–96.
- Shon, Y. H. and K. S. Nam. 2001. Antimutagenicity and induction of anticarcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes. *J. Ethnopharmacol.* 7(1):103–109.
- Xia, D. and Z. B. Lin. 1989. Effects of *Tremella* polysaccharides on immune function in mice. *Acta Pharmacol. Sin.* 10:453–457. (in Chinese)
- You, B. Y. 1987. Short-Term Tests for the Detection of Chemical Genotoxicity: I. *Salmonella* /Microsome Reversion Assay, Ames test. *ATD Tech. Bull. No.1. TACTRI. Taichung.* 15 pp. (in Chinese)
- Yu, J. Y. L., C. K. Cheng, B. J. Chen, M. J. Cheng, H. H. Cheng, W. J. Chang, H. C. Chen, C. C. Hong, P. J. Lee, S. C. Liang, K. S. Sheu, Y. Y. Sung, C. N. Weng, C. W. Tsai, C. S. Wang, M. H. Wang, L. S. Yen, C. K. Yu, and J. Y. L. Yu. 2005. *A Guideline for the Care and Use of Laboratory Animals.* 3<sup>rd</sup> ed. Chinese Society for the Laboratory Animal Science Pub. Taipei, Taiwan. 207 pp. (in Chinese)
- Zeng, C. L. 1994. *Zeng Shih Veterinarian Hematology.* Yi Hsien Publishing Co., Ltd. Taipei, Taiwan, 520 pp. (in Chinese)

# Evaluation for Toxicology and Mutagenicity of *Tremella* Polysaccharide Extracted from *Tremella fuciformis*, Berk<sup>1</sup>

Shu-Hui Yang<sup>2,5</sup>, Kun-Chao Chen<sup>3</sup>, Jhaol-Huei Wu<sup>3</sup>, and Jiunn-Wang Liao<sup>4</sup>

## Abstract

Yang, S. H., K. C. Chen, J. H. Wu, and J. W. Liao. 2008. Evaluation for toxicology and mutagenicity of *Tremella* polysaccharide extracted from *Tremella fuciformis*, Berk. J. Taiwan Agric. Res. 57:243–255.

According to the Chinese medicine records, *Tremella fuciformis* possesses some beneficial effects to lungs and stomach. Our previous study has showed that *Tremella* polysaccharides (TP) extracted from fruiting bodies of *T. fuciformis* were effective in relieving symptoms of constipation. Present study was conducted to determine TP for toxicity in rats using acute oral toxicity test and mutagenesis in bacterial cultures of *Salmonella typhimurium*, using Ames test. Each rat (SD strain) was gavaged with TP at a dose of 5 g/kg body weight and then observed daily for a period of 14 days. Results showed that, compared to controls, all TP-treated rats survived after 14 days and no significant difference in body weight between treated and controls. There was no significant difference between control and TP-treated rats in hematological and biochemistry parameters, white blood cell and pathology of main internal organs. The rat feeding trial suggests that the acute oral LD<sub>50</sub> value of TP is greater than 5 g/kg body weight. Furthermore, Ames test of TP on *Salmonella typhimurium* strains TA98, TA100, TA102, TA1535 and TA1537 showed that, either in the presence or absence of S9 TP treatment caused no reverse mutagenicity in all five strains tested, compared to negative control. In conclusion, *Tremella* polysaccharides are safe based on the evidence of no acute oral toxicity on rats and no reverse mutation of strains of *Salmonella typhimurium*.

**Key words:** *Tremella fuciformis*, Polysaccharides, Rats, Acute oral toxicity, *Salmonella typhimurium*, Ames test.

- 
1. Contribution No. 2333 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: October 23, 2008.
  2. Assistant Researcher, Department of Management and Utilization, Fengshan Tropical Horticultural Experimental Station, ARI, Kaohsiung, Taiwan, ROC.
  3. Assistants, Animal Disease Diagnostic Center, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.
  4. Associate Professor, Graduate Institute of Veterinary Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.
  5. Corresponding author, e-mail: debbbie@fthes-tari.gov.tw; Fax: (07)7315590.