

原 著

以牛樟芝餵食小鼠 28 天亞急性毒性試驗之組織病理與生化分析

吳銘芳^{1*} 李美慧^{2*} 黃韶顏³ 劉嘉又⁴ 鍾明燈⁵ 常傳訓^{6,7,9} 敖曼冠⁸

廖年捷⁴ 薛樹清⁴ 呂旭峰^{3,4}

¹台灣大學醫學院動物中心、²彰化基督教醫院遺傳諮詢中心、³輔仁大學民生學院餐旅管理系
振興醫療財團法人振興醫院 ⁴臨床病理科、⁵解剖病理科、⁶腫瘤外科、⁷營養治療科、⁸骨科、
⁹台北醫學大學保健營養系

在台灣，非處方之中草藥常被用來治療腹痛、高血壓與肝腫瘤，並逐漸被全世界所採用。在東方世界，這些中草藥之中又以牛樟芝為最有名的調理聖品，因此提供毒理檢查已確定食品安全性有其必要。本研究建立小鼠(BALB/c mice)28天口服亞急性毒性分析模式，在每組十隻老鼠且雌雄分別下，以16.7、833.3與1666.7毫克/公斤/天三種劑量連續28天口服餵食，觀察其亞急性毒性反應。各組老鼠在實驗最後仍皆存活，且實驗組老鼠之血液與生化檢驗結果皆與對照組無統計學差異，進一部的肝臟、腎臟及脾臟的組織切片分析顯示各組皆未有明顯的病理與毒理變化。因此，從此實驗結果可瞭解到未觀察到毒性的劑量至少為1666.7 mg/kg/天。

關鍵詞：

前 言

牛樟芝(*Antrodia cinnamomea*)，又稱樟芝、牛樟菇或紅樟芝等，屬於非褶菌目(Aphyllloporales)、多孔菌科(Polyporaceae)之多年生蕈菌類，為台灣特有種真菌，僅生長於台灣保育類樹種－牛樟樹(*Cinnamoum kanehirai Hay*)之中空腐朽心材內壁上。由於牛樟樹分布數量極為稀少，加上人為的盜伐，使得寄生於其中方能生長之野生牛樟芝數量更形稀少，且由於其子實體生長相當緩慢，生長期亦僅在六月至十月之間，因此價格非常昂貴。牛樟芝之子實體為多年生，無柄，呈木栓質至木質，其具強烈之樟樹香氣，且形態多變化，有板狀、鐘狀、馬蹄狀或塔狀。初生時為扁平型並呈鮮紅色，之後其周邊會呈現放射反捲狀，並向四周擴展生長，顏色亦轉變為淡紅褐色或淡黃褐色，並有許多細孔，且其係為牛樟芝之藥用價值最豐富的部位[1]。

在台灣民俗醫學上，牛樟芝具有解毒、減輕腹瀉

症狀、消炎、治療肝臟相關疾病及抗癌等功用。牛樟芝如同一般食藥用之蕈菇類，具有許多複雜的成分，已知的生理活性成分中，包括：三萜類化合物(triterpenoids)、多醣體(polysaccharides，如 β -D-葡聚醣)、腺苷(adenosine)、維生素(如維生素 B、菸鹼酸)、蛋白質(含免疫球蛋白)、超氧歧化酵素(superoxide dismutase, SOD)、微量元素(如：鈣、磷、鎳)、核酸、固醇類以及血壓穩定物質(如 antodiaacid)等，此些生理活性成分被認為具有抗肝癌、血癌與胰臟癌[2-7]，此外亦有報導可增加免疫能力、抗過敏、抗病菌[8-10]、抗高血壓、降血糖及降膽固醇[11-13]等多種功效。

衛生署於 1999 年日公告『健康食品法規』，其中安全性評估法規乃針對以往長期食用及製造加工之安全性作考量，將健康食品之安全評估分為四個類別。第一類食品：產品之原料為傳統食用且以通常加工食品形式供食者產品具有完整之毒理學安全性學術文獻報告及曾供食用之紀錄，且其原料組成成分及製造過程與所提具之學術文獻報告完全相符者免再進行毒性測試。第二類食品：產品之原料為傳統食用

收稿日期：100 年 6 月 8 日 修稿日期：100 年 8 月 5 日 接受日期：100 年 8 月 23 日

吳銘芳、李美慧具相等貢獻度

通訊作者：呂旭峰與薛樹清

聯絡地址：振興醫療財團法人振興醫院臨床病理科 112 台北市北投區振興街 45 號

電話：886-(02)28264400 轉 5850 E-mail address：ch1835@chgh.org.tw

牛樟芝餵食小鼠毒性試驗

而非以通常加工食品形式供食者，應檢具基因毒性試驗與 28 天餵食毒性試驗之毒性測試資料。第三類食品：產品之原料非屬傳統食用者，應檢具基因毒性試驗、90 天餵食毒性試驗與致畸胎試驗之毒性測試資料。第四類食品：產品之原料非屬傳統食用且含有致癌物之類似物者，應檢具基因毒性試驗、90 天餵食毒性試驗、致畸胎試驗、致癌性試驗與繁殖試驗之毒性測試資料。牛樟芝安全評估列為第二類，遺傳毒性分析與 28 天餵食毒性試驗為第二類健康食品必須之審核資料。本試驗之主要目的在了解人體每日牛樟芝建議攝取劑量(16.7mg/kg/day)、50 倍(833.3 mg/kg/day)與 100 倍(1666.7 mg/kg/day)下，是否對小鼠之肝、脾、腎內臟器官產生外觀或病理組織的改變，透過牛樟菇膠囊對動物之重複劑量 28 天餵食，輔以生化與血液常規檢驗，觀察毒性是否產生。

材料與方法

供試動物

參考衛生署 28 天餵食毒性試驗之規範，選用台灣大學醫學院實驗動物中心生產之無特定病原菌 Balb/c 小鼠雄雌各 40 隻，於 4 週齡時購入。馴化 2 週，至 6 週齡或以上才開始作試驗。

動物飼育管理

飼育環境為 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 、濕度 $75\% \pm 15\%$ 、照明 12 小時的乾淨動物房。飼育盒尺寸為長 260mm*寬 160mm*高 120mm 的 PC 飼育盒，每個飼育盒在馴化期原則上各飼養 10 隻。分組之後的動物依照編號每個飼育盒 5 隻，然後每個飼育盒貼上標籤紙註明試驗物質名稱、劑量組別、動物種、性別、動物編號。木屑墊料原則上每週更換 2 回。更換墊料時同時進行飼育盒籠位的調換，以提供全體動物平均的光照射量，調換時將上一層的飼育盒往下一層移動，以此類推移動所有飼育盒後，最下一層的飼育盒調動至最上一層。飼料是使用市售 PMI®Nutrition International 所生產的 Laboratory Rodent Diet 5001。並定期作飼料微生物監測。台北市自來水公司所提供之自來水直接提供動物自由飲用並定期作水中微生物監測。飲水瓶每週以鹽酸浸泡後，用水沖洗，再以 0.5% 高力士清洗一

次。水瓶頭以超音波機以熱水加高力士泡洗 15 分鐘。

動物的分組

以亂數表分成對照組 10 隻、牛樟菇膠囊(長庚生物技術公司所製造)依不同劑量(低、中、高)每組各 10 隻。以苦味酸溶液塗擦動物被毛進行個體標示。牛樟菇膠囊給予劑量：低劑量為 16.7 毫克/公斤/日、中劑量為 833.3 毫克/公斤/日、高劑量為 1666.7 毫克/公斤/日，用餵食管給予，以每日一次口服 0.3 c.c.的方式，連續給藥 28 天。雄、雌性動物各 40 隻分成完全不給任何處理的對照組(只服用 0.3cc 滅菌水)10 隻以及給予三種不同劑量牛樟菇膠囊的實驗組每組各 10 隻。每日觀察動物的活動力及毛色。試驗期間每週至少實施一次觸診。如果動物開始有出現臨床症狀時，詳細記錄其發現症狀的時間、種類、程度以及持續的時間。

血液學的檢查

28 天連續投與終了後，所有動物以眼窩採血實施血液學檢查。利用含有 EDTA 的毛細管採取一部份全血(約 $20 \mu\text{L}$)，並以瑞典 Boule Medical AB 公司製 MEDONIC CA530 動物自動血球計數分析儀來測定。檢測項目包括 WBC(白血球計數)、RBC(紅血球計數)、HCT(血容比)、HGB(血色素量)、RDW%(紅血球體積分布寬度)、MCV(平均紅血球容積)、MCH(平均紅血球血色素量)、MCHC(平均紅血球血色素濃度)、PLT(血小板)、DC(白血球分類)。

血清生化標記分析

28 天連續投與終了後，所有動物實施生化學檢查。將利用心臟採血所得之血液靜置後以 3,000rpm 離心 5 分鐘後，取其血清，以日本京都市 ARKRAY 公司所製造的 SPOTCHEN SP-4410 生化自動分析儀檢測常規項目包括天門冬胺酸轉胺酶(AST; aspartate aminotransferase)、丙胺酸轉胺酶(ALT; alanine aminotransferase)、總膽紅素(T-Bil; total bilirubin)、尿素氮(BUN; blood urea nitrogen)、肌酸酐(CRE; creatinine)、總膽固醇(T-Cho; total cholesterol)、葡萄糖(Glu; glucose)、總蛋白(T-Pro; total serum protein)與白蛋白(Alb; Albumin)。

剖檢並採取臟器組織

試驗期間死亡的動物須儘快進行解剖，肉眼檢查器官與組織之變化。若許可，肝、腎、脾分別進行組織病理檢查，以尋求死亡的原因及毒性變化的性質(如嚴重程度)。為獲得更充足的毒性資料，垂死的動物均行安樂死。動物在犧牲之前須記錄臨床觀察之結果。動物進行屍體解剖，以肉眼觀察其器官與組織，並進行組織病理檢驗，以五解毒性變化的嚴重程度。實驗結束，全部存活的動物行安樂死後，屍體解剖時，肉眼觀察及記錄動物的器官與組織之變化。以光學顯微鏡觀察 H&E 染色切片標本並由台大動物中心研發組判讀結果。

統計分析

實驗數據以平均值±標準差(standard error of mean)表示。生化與血液常規檢查實驗結果以單向變異數分析(one-way analysis of variance, one-way ANOVA)來決定多組間差異，顯著性以 p 值小於 0.05 表示。當 p 值小於 0.001 時，不同治療劑量的兩組間的差異則以學生氏(Student's) t 值之統計方式分析組間差異的顯著性。雄性與雌性組別之間不互相比較。

結果

外觀而言，實驗組與對照組比較，體重持續增加，

食物耗用量正常，活動力並沒有特別的差異，毛髮色澤也沒有明顯地變化，動物外觀非常正常，未觀察到動物有任何虛弱的表現。從實驗開始到結束都沒有動物死亡。無論是實驗組的高、中或低劑量組別的小鼠，糞便偶有觀察到棕色，但數天即消逝。28 天連續投與終了後，所有動物以眼窩採血實施血液學檢查，心臟採血執行生化檢查，最後執行解剖觀察肝、脾、腎內臟器官病理組織的改變。給予牛樟芝的實驗組在血液學檢查，經與對照組相較，隨著劑量的增強，紅血球計數、血色素量、血容比、平均紅血球容積、平均紅血球血色素量、平均紅血球血色素濃度、白血球計數、紅血球體積分布寬度、血小板計數、白血球分類(淋巴球與顆粒球)均未見到明顯的變化(表 1 與 2)。唯有白血球計數似乎隨著劑量增加雄鼠與雌鼠皆有減少的趨勢，但因爲組內差異過大，因此並無統計學差異($p>0.001$)。

給予牛樟芝的實驗組，經牛樟芝餵食後，檢測雄鼠與雌鼠之血清生化常規，透過與對照組的數據比較，發現隨著劑量的增強，天門冬胺轉胺酶、丙胺酸轉胺酶、總膽紅素、尿素氮、肌酸酐、總膽固醇、葡萄糖、總蛋白與白蛋白均未見到明顯的升高或下降(表 3 與 4)。

肝、脾、腎內臟器官經獸醫師肉眼觀察外觀無任何異常，因此更進一步以 H&E 染色，執行病理組織的觀察。肝細胞排列整齊，並無粥狀壞死和纖維化，因此推估並未有任何門脈的慢性發炎現象，肝小葉中未有任何局部小範圍的壞死細胞，因此沒有慢性小葉性肝炎，更無發炎細胞超過門脈外圍的限制板所造成粥狀壞死之慢性活動性肝炎，因此肝臟組織完全無任

表 1 六週齡 BALB/c 雄鼠餵食不同劑量牛樟芝，28 天後血液常規檢測結果

檢驗項目	劑量	控制組	低劑量 (16.7 毫克/公斤/日)	中劑量 (833.3 毫克/公斤/日)	高劑量 (1666.7 毫克/公斤/日)
紅血球計數($10^6/\text{mm}^3$)		11.07±0.60	10.72±0.40	10.92±0.38	11.22±0.56
血色素量(g/dl)		16.73±0.76	16.11±0.42	16.45±0.56	16.89±0.65
血容比(%)		50.64±2.54	48.34±1.63	49.48±1.66	51.62±2.44
平均紅血球容積(μm^3)		45.76±0.72	45.07±0.57	45.27±0.28	46.00±0.94
平均紅血球血色素量(pg)		15.09±0.35	15.03±0.27	15.05±0.22	15.05±0.41
平均紅血球血色素濃度(g/dl)		33.03±0.41	33.34±0.46	33.28±0.35	32.75±0.48
紅血球體積分布寬度(%)		16.66±0.41	16.15±0.48	16.28±0.36	16.56±0.47
血小板計數($10^3/\text{mm}^3$)		594.4±240.7	569.1±77.9	607.1±77.2	568.3±108.2
白血球計數($10^3/\text{mm}^3$)		8.20±2.13	7.94±1.23	6.98±1.57	6.76±1.44
白血球分類之淋巴球 (%)		13±1	9±3	12±5	13±3
白血球分類之顆粒球 (%)		77±2	86±7	79±9	77±6

牛樟芝餵食小鼠毒性試驗

表 2 六週齡 BALB/c 雌鼠餵食不同劑量牛樟芝，28 天後血液常規檢測結果

檢驗項目	劑量	控制組	低劑量 (16.7 毫克/公斤/日)	中劑量 (833.3 毫克/公斤/日)	高劑量 (1666.7 毫克/公斤/日)
紅血球計數($10^6/\text{mm}^3$)		11.76±0.94	11.35±0.96	11.76±0.78	11.79±1.00
血色素量(g/dl)		17.21±1.21	16.50±1.26	16.96±1.24	17.21±1.58
血容比(%)		53.66±4.36	51.97±4.28	53.54±4.06	54.09±5.22
平均紅血球容積(μm^3)		38.82±0.83	33.71±0.82	33.34±1.03	33.81±1.27
平均紅血球血色素量(pg)		14.64±0.22	14.56±0.34	14.35±0.21	14.56±0.28
平均紅血球血色素濃度(g/dl)		32.11±0.45	31.80±0.45	31.68±0.33	31.82±0.33
紅血球體積分布寬度(%)		16.49±0.58	16.04±0.49	15.90±0.61	16.17±0.72
血小板計數($10^3/\text{mm}^3$)		481.8±152.12	480.30±96.72	507.6±98.47	535.7±114.34
白血球計數($10^3/\text{mm}^3$)		7.78±1.64	6.43±1.60	5.56±1.65	5.92±1.20
白血球分類之淋巴球 (%)		14±3	16±4	14±5	14±5
白血球分類之顆粒球 (%)		77±5	74±6	78±9	77±8

表 3 六週齡 BALB/c 雄鼠餵食不同劑量牛樟芝，28 天後血清生化常規檢測結果

檢驗項目	劑量	控制組	低劑量 (16.7 毫克/公斤/日)	中劑量 (833.3 毫克/公斤/日)	高劑量 (1666.7 毫克/公斤/日)
天門冬胺酸轉胺酶 IU/L)		219±162	162±78	164±76	171±54
丙胺酸轉胺酶(IU/L)		62±19	52±16	65±21	60±26
總膽紅素(mg/dL)		0.90±0.46	0.76±0.21	0.91±0.20	0.84±0.17
尿素氮(mg/dL)		30.6±3.8	25.9±6.0	24.7±3.5	22.3±3.4
肌酸酐(mg/dL)		0.61±0.27	0.51±0.10	0.57±0.08	0.53±0.09
總膽固醇(mg/dL)		87.8±7.1	71.5±6.2	80.4±6.5	83.3±5.9
葡萄糖(mg/dL)		152.2±17.0	138.2±16.3	132.7±28.5	144.6±34.4
總蛋白(g/dL)		5.23±0.36	4.60±0.19	4.91±0.30	4.90±0.18
白蛋白(g/dL)		2.41±0.24	2.42±0.14	2.55±0.16	2.58±0.15

表 3 六週齡 BALB/c 雌鼠餵食不同劑量牛樟芝，28 天後血清生化常規檢測結果

檢驗項目	劑量	控制組	低劑量 (16.7 毫克/公斤/日)	中劑量 (833.3 毫克/公斤/日)	高劑量 (1666.7 毫克/公斤/日)
天門冬胺酸轉胺酶(IU/L)		333±176	266±92	320±100	341±121
丙胺酸轉胺酶(IU/L)		150±7	106±42	132±29	130±51
總膽紅素(mg/dL)		2.46±0.74	1.86±0.65	1.64±0.53	1.46±0.80
尿素氮(mg/dL)		24.7±3.2	23.3±2.5	25.9±4.1	24.0±4.6
肌酸酐(mg/dL)		0.55±0.14	0.28±0.07	0.27±0.20	0.27±0.22
總膽固醇(mg/dL)		68.1±4.5	70.2±5.3	73.8±7.3	76.4±9.3
葡萄糖(mg/dL)		120.8±18.6	117.9±25.5	107.6±16.1	110.4±20.7
總蛋白(g/dL)		5.91±0.45	5.74±0.46	5.72±0.29	5.50±0.50
白蛋白(g/dL)		2.48±0.13	2.33±0.18	2.35±0.13	2.23±0.13

何病變，代表未發現門脈的慢性發炎、慢性小葉性肝炎與慢性活動性肝炎(圖 1)。對照組與實驗組的脾臟未增大，脾臟的切面、濾泡、小梁和紅髓清晰可見，無肉眼可見結節，無任何高度異型性的惡性內皮細胞沿脾血竇增生擴展，亦未發現任何電狀多核巨細胞浸

潤與肉芽腫性病變(圖 1)。對照組與實驗組均未觀察到腎小球纖維化或代償性肥大，亦未發現電性腎小球萎縮。腎包膜無任何皺褶，在皮髓交界處腎單位未破壞，不具任何間質炎細胞浸潤或纖維化，腎小管亦無萎縮或擴張(圖 1)。

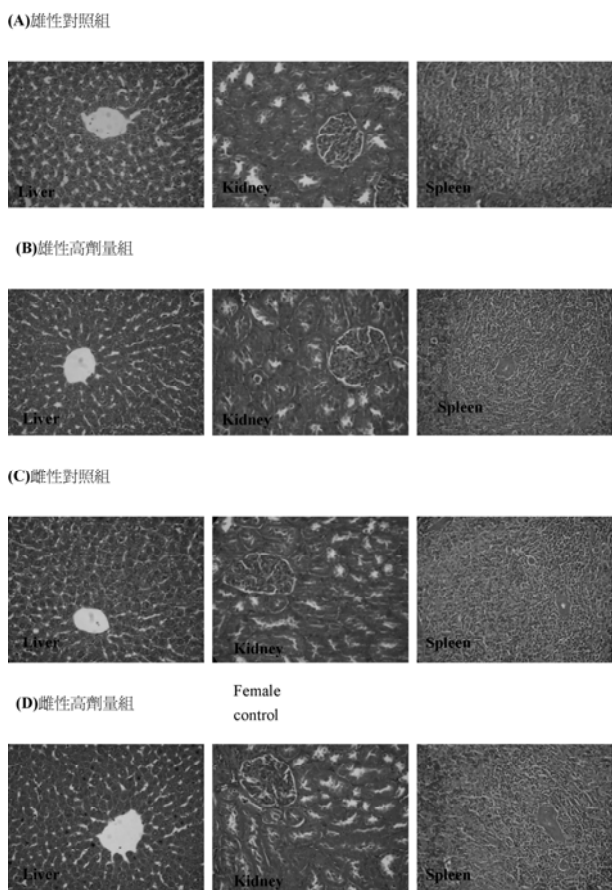


圖 1 高劑量實驗組與對照組之肝、腎與脾臟切片經 H&E 染色 200 倍照片。透過高劑量牛樟芝餵食，肝臟切片顯示肝細胞排列相當整齊，中央靜脈無任何充血，亦無粥狀壞死和纖維化等慢性發炎現象，更無發炎細胞超過門脈外圍的限制板所造成粥狀壞死之慢性活動性肝炎，因此肝臟組織完全無任何病變。實驗組腎臟腎元之腎小管與腎小球排列正常，均未觀察到腎小球纖維化或代償性肥大。對照組與實驗組的脾臟未增大，脾臟的切面、濾泡、小梁和紅髓清晰可見，無肉眼可見結節

討 論

牛樟芝屬於重要傳統醫學的良方，主治肝病與腫瘤[3]，由於牛樟芝必須以寄生型態生長，且生長緩慢，因此大量野生生長有其困難度，因此以各種技術進行人工繁殖，產生各種突變種，同時製成各種市售產品，良莠不齊。牛樟芝被定位為第二類健康食品，第二類健康食品安全評估內容包括基因毒性試驗及 28 天亞急性毒性試驗。基因毒性試驗(Genotoxicity study)則包括(1)體外試驗：微生物基因突變分析與哺乳類細胞基因毒性分析。(2)體內試驗：動物體內基因毒性分析。體外微生物基因突變分析(Ames test)則是

利用 *S. typhimurium* TA98、*S. typhimurium* TA100、*S. typhimurium* TA1535、*S. typhimurium* TA1537、TA97、或 TA97a、*S. typhimurium* TA102、*E. coli* WP2 uvr A、或 *E. coli* WP2 uvr A (pKM101)等之不同基因特性篩選受測物是否會造成這些菌種基因突變之毒性現象。體外哺乳類細胞基因毒性分析包括(1)染色體異常分析法(*In vitro* Chromosomal aberration test with mammalian cells in culture)：觀察受測物是否會造成細胞之染色體斷裂、重組交換之傷害。動物活體內基因毒性分析可由下列三種方法擇一進行，其中包括：(1)嚙齒類骨髓細胞染色體異常測試法(*Chromosomal aberrations in bone marrow cells of rodents*)：觀察受測物是否會造成嚙齒動物體內細胞之染色體斷裂、重組交換之傷害。或(2)嚙齒類骨髓細胞之微核測試法(*Micronuclei in bone marrow cells of rodents*)：測定受測物對動物腿骨髓內細胞之微核增加之影響。或(3)嚙齒類周邊血液之微核測試法(*Micronuclei in peripheral blood of rodents*)：受測物經餵食實驗動物後，經 24-76 小時，採取動物體內血液，可以 Acridine orange 螢光染料處理，再以螢光顯微鏡計數，即可分辨正常之對照組，與網狀紅血球比例明顯減少，微核比例增加之致突變現象。或是將固定好之紅血球，使用兩種不同螢光染料處理，再以流式細胞儀計數，便可分辨受測物對基因所造成之致突變大小。評估此三種方法之方便與明確性，其中以嚙齒類周邊血液之微核測試法毒性物質引發之症狀較明顯，也易操作，若以致突變物餵食老鼠，在螢光顯微鏡下觀察，則此陽性對照組老鼠血液內具微核之網狀紅血球佔全部網狀紅血球之比例，由 5/1000 以下之正常數增加至 20-90/1000，明顯表示出實驗動物經致突變物餵食後，其基因斷裂之異常現象，同時血液內網狀紅血球佔全部紅血球之比例亦會由 2.1%左右之正常數值降低至 0.1%附近值，代表紅血球代謝過程被致突變物所影響。本團隊先將長庚生技公司所生產的牛樟芝膠囊以體外艾姆測試(Ames test)與體外中國倉鼠卵巢 CHO 細胞株染色體異常分析，先確立正常表現[14]。之後本團隊再以小鼠周邊紅血球進行微核分析，結果每 1000 顆紅血球只有 1.0-1.3 顆具有微核[15]，遠小於陽性對照組 24.3 顆。再加上本次研究 28 天亞急性試驗，確立生化、血液與肝、脾、腎內臟器官皆無病理組織的改變，包括浸潤、壞死與纖維化等病灶。至於牛樟芝的較長期餵食的 90 天毒性反應，亦未發現任何毒性[5]。代表本團隊證明長庚生物科技公司所生產的牛樟芝膠

牛樟芝餵食小鼠毒性試驗

囊符合第二類健康食品所訂定的標準。

保健食品廣告玲瓏滿目，誤導現象的確頻傳，廠商為強調其產品功效，往往在廣告上加油添醋，或者未加警語及未針對其不同族群之提出建議用量，甚至將動物實驗結果過度延伸為人體試驗結果，這些都會造成消費者有形及無形之傷害。保健食品、藥品與毒物僅一線之隔，在保健食品正確使用與誤用之間，須耗花心力與財力去研究了解，尤其當國內保健食品與中草藥方興未艾之際，安全評估更是當前最重要的課題。保健食品需完善法規制度，除功能安全之驗證法規改進外，同時也應建立傷害救濟法與產品責任保險法，以彌補消費者服用保健食品發生不明原因之傷害。本研究與過去一系列的研究只能建議即使食用劑量的 100 倍仍未發現任何負面結果，但是否會致畸胎或影響生育，仍需進一步試驗。

參考文獻

1. Chang TT, Chou WN. *Antrodia cinnamomea* sp. nov. on *Cinnamomum kanehirai* in Taiwan. *Mycol Res* 1995; 99: 756-758.
2. Chen CH, Yang SW, Shen YC. New steroid acids from *Antrodia cinnamomea*, a fungal parasite of *Cinnamomum micranthum*. *J Nat Prod* 1995; 58: 1655-1661.
3. Han HF, Nakamura N, Zuo F, Hirakawa A, Yokozawa T, Hattori M. Protective effects of a neutral polysaccharide isolated from the mycelium of *Antrodia cinnamomea* on *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide induced hepatic injury in mice. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2006; 54: 496-500.
4. Hsiao G, Shen MY, Lin KH, Lan MH, Wu LY, Chou DS, Lin CH, Su CH, Sheu JR. Antioxidative and hepatoprotective effects of *Antrodia camphorata* extract. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 3302-3308.
5. Chen TI, Chen CC, Lin TW, Tsai YT, Nam MK. A 90-day subchronic toxicological assessment of *Antrodia cinnamomea* in Sprague-Dawley rats. *Food Chem Toxicol* 2011; 49:429-433.
6. Chu YC, Yang RM, Chang TT, Chou JC. Fructification of *Antrodia cinnamomea* was strain dependent in malt extract media and involved specific gene expression. *J Agric Food Chem* 2010; 58: 257-261.
7. Chen YJ, Chou CJ, Chang TT. Compound MMH01 possesses toxicity against human leukemia and pancreatic cancer cells. *Toxicol In Vitro* 2009; 23: 418-424.
8. Pelley RP, Strickland FM. Plants, polysaccharides, and the treatment and prevention of neoplasia. *Crit Rev Oncog* 2000; 11: 189-225.
9. Lull C, Wichers HJ, Savelkoul HF. Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators Inflamm* 2005; 2005: 63-80.
10. Chan GC, Chan WK, Sze DM. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *J Hematol Oncol* 2009; 2: 25.
11. Anderson JW, Smith BM, Gustafson NJ. Health benefits and practical aspects of high-fiber diets. *Am J Clin Nutr* 1994;59:1242S-1247S.
12. Weickert MO, Pfeiffer AF. Metabolic effects of dietary fiber consumption and prevention of diabetes. *J Nutr* 2008;138: 439-442.
13. Estruch R, Martinez-Gonzalez MA, Corella D, Basora-Gallisa J, Ruiz-Gutierrez V, Covas MI. et al. Effects of dietary fibre intake on risk factors for cardiovascular disease in subjects at high risk. *J Epidemiol Community Health* 2009;63: 582-588.
14. Wu MF, Peng FC, Chen YL, Lee CS, Yang YY, Yeh MY, Liu CM, Chang JB, Wu RS, Yu CC, Lu HF, Chung JG. Evaluation of Genotoxicity of *Antrodia cinnamomea* in the Ames Test and the In Vitro Chromosomal Aberration Test. *In Vivo* 2011; 25: 419-423.
15. Chen YL, Wu MF, Hung FM, Peng FC, Lee CS, Lee MH, Au MK, Lien JC, Chang SJ, Chen YY, Lu HF, Chung JG. Assessment of Chromosome Aberration of *Antrodia cinnamomea* Extracts by Employing In Vivo Micronucleus Test in Male Mice. *The Journal of International Medical Research* 2011; 39 in press.

Histopathology and Biochemistry Analysis in a 28-day Subacute Toxicological Assessment of *Antrodia Cinnamomea* in BALB/c Mice

Ming-Fang Wu^{1*}, Mei-Hui Lee^{2*}, Shau-Yen Huang³, Jia-You Liu⁴, Ming-Teng Chung⁵,
Chuan-Hsun Chang^{6,7,9}, Man-Kuan Au⁸, Nien-Chieh Liao⁴, Shu-Ching Hsueh⁴, Hsu-Feng Lu^{3,4}

¹National Taiwan University College of Medicine, Animal Medicine Center, Taipei,

²Department of Genetic Counseling Center, Changhua Christian Hospital, Changhua,

³Department of Restaurant, Hotel and Institutional Management, Fu-Jen Catholic University, Taipei,

⁴Department of Clinical Pathology, ⁵Anatomical Pathology, ⁶Surgical Oncology, ⁷Nutrition Therapy, ⁸Orthopaedics,
Cheng Hsin General Hospital, Taipei;

⁹School of Nutrition and Health Sciences, Taipei Medical University, Taipei; Taiwan

Objective: Non-prescriptional use of medicinal herbs is highly prevalent to treat abdominal pain, hypertension and hepatocellular carcinoma in Taiwan and increasing worldwide. Among them, *Antrodia cinnamomea* was the most famous modalities being consumed especially among Oriental. Since the use of *Antrodia cinnamomea* in herbal medicines is increased, toxicity studies are warranted to confirm the safe use of *Antrodia cinnamomea*. Based on the 28-day subacute oral toxicity studies of *Antrodia cinnamomea* extract in male and female BALB/c mice, the extract at doses of 16.7, 833.3, and 1666.7 mg/kg/day were administered by oral gavage to groups of mice (10 mice/dose) for 28 consecutive days and sterile water was used as control. All animals survived to the end of the study. No significant differences were found in hematology and serum biochemistry parameters among the control and treatment groups. Further histological examination in liver, kidney and spleen showed no pathological changes among all groups. These results suggest that the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) of the extract for male and female mice is considered to be 1666.7 mg/kg/day.

Key words:

Received: June 8, 2011 Revised: August 5, 2011 Accepted: August 23, 2011

Correspondence to: Hsu-Feng Lu and Shu-Ching Hsueh, Department of Clinical Pathology, Cheng-Hsin General Hospital, Taipei; Taiwan, R.O.C. No.45, Cheng Hsin St., Pai-Tou, Taipei, Taiwan, R.O.C.

Tel: +886 228264400 ext 5850; Fax: +886 228264517, e-mail: ch1835@chgh.org.tw