

## 以艾姆氏測試法評估破壁靈芝基因毒性

陳筠臻<sup>1\*</sup> 吳銘芳<sup>2\*</sup> 施勇綸<sup>1</sup> 李慶孝<sup>3</sup> 賴珊瑚<sup>3</sup> 周建聖<sup>4</sup> 周育如<sup>5</sup> 常傳訓<sup>5,6,8</sup> 呂旭峰<sup>7</sup>新光吳火獅紀念醫院病理檢驗科<sup>1</sup> 台灣大學醫學院動物中心<sup>2</sup>  
仁德醫護專科管理學校<sup>3</sup> 振興醫療財團法人振興醫院解剖病理科<sup>4</sup>  
營養治療科<sup>5</sup>、腫瘤外科<sup>6</sup>、臨床病理科<sup>7</sup>、臺北醫學大學保健營養系<sup>8</sup>

本研究是以長庚生物科技公司所生產的破壁靈芝孢子樣品，藉由沙門氏菌基因逆突變測試其突變性。測試濃度共五種，分別為3 mg/ml，6 mg/ml，12 mg/ml，25 mg/ml，50 mg/ml。在兩種不同條件下(有或無S9的催化)，以plate incorporation方法對五種菌株(TA97、TA98、TA100、TA102、TA1535)進行逆突變測試，實驗皆三重複。結果計算每一個培養基所含菌落數。不含S9之非活化組，陽性組之致變物濃度為1µg/plate 4-nitroquinoline-N-oxide (TA97及TA98)，濃度為8µg/plate mitomycin c (TA102)，以及濃度為1µg/plate sodium azide (TA100及TA1535)。含S9之活化組，陽性組之致變物分別濃度為2µg/plate Benzo[a]pyrene (TA98及TA102)與濃度為8µg/plate 2-aminoanthracene (TA97、TA100及TA1535)。無論是否經過S9處理，五種細菌生長結果皆不受影響，且菌落數與濃度不呈劑量依賴性。破壁靈芝孢子在代謝活化前後處理下，對TA97、TA98、TA100、TA102及TA1535所引發之基因毒性並無顯著之增加。

**關鍵字：**破壁靈芝孢子、沙門氏菌基因逆突變

## 前 言

自古以來靈芝為中國、日本與韓國的珍貴藥材，又名瑞草、萬年葷、吉祥茸、神芝、福草等。靈芝文字記載的歷史始於「神農本草經」，歷經明代李時珍(1590年)所著「本草綱目」[1]，至今已超過四千多年，被認為上等藥材，可久食輕身不老，延年神仙。依其色澤以六芝標名，分別為丹芝(赤芝)、玄芝(黑芝)、龍芝(青芝)、玉芝(白芝)、金芝(黃芝)以及木芝(紫芝)，且針對它們的氣味、味道、性能及功效進行詳細的描述。

靈芝(學名 *Gonoderma lucidum* (Fr.) Krast)，現代分類學上，則將靈芝歸類為菌類界、真菌門(Eumycota)、擔子菌亞門(Basidiomycotina)、層菌綱(Hymenomycetes)、非褶菌目(Aphyllophorales)、靈芝菌科(Ganodermataceae)、靈芝屬(*Ganoderma*) [2]，稱其

子實體(fruiting body)為靈芝。外觀上靈芝有菌柄，菌蓋表面有漆樣光澤，與其他多孔菌最大之不同在於其擔孢子(basidiospore)具有雙層壁，內壁呈黃褐色，有疣狀突起小刺，而外層較薄呈透明狀[3]。由於野生的靈芝非常罕見，又大多生長在深山、森林中等人跡罕至之處，更顯得其珍貴。

靈芝作為中藥被收錄在最新版的中國藥典(2000年)，雖然大多中草藥有成分不明、缺乏實驗證據證實其療效等缺點，然而在近幾年的醫學研究中，許多學者、專家以及醫藥界人士對其積極進行研究探討，目前已知的有效成分，便多達150種以上，包括多醣體、三萜類(triterpenoids)、蛋白質、核酸、固醇類、有機鎂、膽鹼、氨基酸、腺苷、維生素、脂肪酸及微量元素等。其中多醣體是被探討最多的有效成份，主體已證實為一種β-(1→3)-D-葡萄糖的多醣體。這些多醣體與以往的抗癌劑(化學療法)不同，對寄主全然無毒性或副作用，它是強化寄主免疫功能無毒性或副作用而顯示療效，包括促進干擾素的形成及活化自然殺手

收稿日期：102年7月4日 修稿日期：102年7月31日 接受日期：102年8月14日

聯絡地址：振興醫療財團法人振興醫院臨床病理科

112 臺北市北投區振興街45號 呂旭峰與常傳訓

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

\*陳筠臻與吳銘芳具相同貢獻度

細胞(NK)，對此多醣作為新型抗癌劑(免疫療法)實用化寄予極大期望，同時證實口服、腹腔內注射與靜脈注射給藥都有效，而且呈現良好的劑藥反應與時程反應關係[4-7]。除多醣體之外，靈芝還含有苦味萜類化合物，例如三萜類(Triterpenoids)，又稱「靈芝酸」，可促進造血功能及抑制人血癌細胞(HL-60)增殖[8-9]。靈芝與其他菇類同樣含有腺苷(adenosine)、5'-GMP、5'-XMP、RNA等鹽基成分，從含水乙醇提取物中被提煉出，具有抑制血小板凝集作用(抗血栓作用)，因此可預防冠狀動脈疾病[10]。以離體心臟實驗發現具有強心作用使心室收縮增強，並可降低血中油脂，如膽固醇，三甘油酯、 $\beta$ -脂蛋白[11]，靈芝的熱水提取液中添加乙醇時，所沉澱的高分子成分，運用柱層析法純化取得的兩種多醣-蛋白質複合體 ganoderanB 與 C，發現給雄性小白鼠腹腔注射時，有明顯降低血糖活性[12]。此外，最近逐步證實，靈芝含有降血壓、降血糖[13-14]、解毒、保肝[15]、鎮靜、消炎、止痛、治療肝炎[14]等。

靈芝的諸多用途與功效，使其需求量龐大，目前多利用人工栽培方式大量生產，主要可區分為子實體固態培養及菌絲體液態培養兩種方式。前者約 180 天可以採收，後者僅需一至二週，兩者中所含已知有效成份(如：三萜類、多醣體等)幾乎一致，但含量有明顯差異，因此可依所需之目的產物選擇栽培方式。其中菌絲體的液態培養，可操作變因相當多，包括碳源、氮源等必要培養基種類、濃度、培養之溫度、攪拌、通氣條件等，有許多相關的研究[16-18]。近來，因環境污染因素，利用真菌類進行處理之文獻也有發表[19-20]。

對於保健食品廣告之誤導現象的確較容易產生，廠商往往為了強調其產品功效，在廣告上多加油添醋形容的過當，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，所以消費者在服用這類保健食品則應當自我謹慎小心。保健食品與藥品僅一線之隔，藥品與毒物也僅一線之隔，在保健食品正確使用與誤用之間，是必須花心力去研究瞭解，尤其當國內大力發展保健食品與中草藥之際，安全評估是極重要之工作。

國內衛生署已於88年8月2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。鑒於第三類與第四類健康食品所需之人力、財力甚多，於目前開發不易，故一般多建議開發產品仍以第二類健康食品為主。

靈芝種類繁多，製成過程複雜，再加上添加物多樣化，至少應該執行第二類健康食品的安全性評估。本研究以第二類健康食品安全評估體外基因毒性試驗(Genotoxicity study)，利用微生物基因突變法，分析無毒性最高觀察劑量。評估食物安全性首先以艾姆逆突變法廣泛偵測所含成分是否會造成基因損傷導致基因突變，儘管偽陽性與偽陰性不勝枚舉，艾姆逆突變法目前仍然是偵測與評估潛在致癌物最快的方法。

## 材料與方法

- (一)本次測試採用了 TA97, TA98, TA100, TA102 及 TA1535 五菌系：每一株菌株含有不同的組胺酸操縱子。菌株 TA97, TA98, TA100 及 TA1535 具  $\Delta$ uvrB 特性，其 DNA 切除修護系統上具有缺陷使得 DNA 受損現象易於表現出來。TA97、TA98, TA100, TA102、TA1535 五種菌株均具 rfa 特性，即菌株之細胞壁上之脂多醣層有部分缺失，會增加大分子化學物質對細菌之滲透性。TA97, TA98, TA100、TA102 四種菌株均有導入 pkM101 質體可使菌種表現出修護錯誤傾向，致使受損 DNA 不易被修補好，因而更具敏感性。
- (二)老鼠肝臟活化酵素之製備：採用  $\beta$ -naphthoflavone 誘發老鼠肝臟產生多量的微粒體活化酵素。解剖之肝臟秤重後，經緩衝液清洗，將肝臟剪碎，再磨碎後，以 9000g 離心，取上層液(S9)分裝於冷凍試管中(2mL/tube)，置於-70°C 保存。
- (三)破壁靈芝膠囊溶液之製備：取長庚生物科技公司

生產批號 0J03M22 的靈芝 500 mg，加入 10 ml DMSO，充分混合後即成 50 mg/ml 之靈芝破壁孢子溶液。其他測試濃度組(3 mg/ml，6 mg/ml，12 mg/ml，25 mg/ml 靈芝破壁孢子)：以最高濃度組濾液以 DMSO 依序稀釋而成。

- (四)對照組：對照組包含陰性對照組及陽性對照組。含有 0.1% DMSO (v/v) 的細胞培養液做為陰性對照組。靈芝破壁孢子在 S9 的代謝活化下，陽性致變物分別為 Benzo[a]pyrene (TA98 及 TA102，濃度為 2µg/plate)，2-aminoanthracene (TA97、TA100 及 TA1535，濃度為 8µg/plate)。靈芝破壁孢子在不含 S9 的代謝活化下致變物分別為 4-nitroquinoline-N-oxide (TA97 及 TA98，濃度為 1µg/plate)，mitomycin c (TA102，濃度為 8µg/plate)，sodium azide (TA100 及 TA1535，濃度為 1µg/plate)。
- (五)突變試驗採用平板混合測試(plate incorporation assay)：取 0.1 mL 供試藥劑溶液與 16 小時培養之菌液 0.1mL，之外再加 0.5 ml S9 溶液，將含 0.2mL 0.5M histidine/biotin 之 45°C 的 2 mL 軟性瓊脂加入管中，混合後倒在 minimal glucose agar plate 上，待凝固後倒置培養皿於 37°C 溫箱中培養 48 小時後計數回復突變數。

## 結 果

此試驗所使用的 *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA100, TA102, and TA1535，各自帶有數個突變

基因，使它們成為篩選致變異原的有效工具。它們全帶有缺乏組胺酸的突變，因此生長條件中如果不含有組胺酸即無法生長(組胺酸需求性，表 1)。它們也全部都帶有 rfa 突變，因此脂多醣層(Lipopolysaccharide layer)較薄弱，容易被外來的化學物質侵入。除了 TA102 以外，這些測試菌株帶有 uvrB 缺失突變，造成 DNA 修補機制的缺陷。最後，除了 TA1535 之外，其他菌株都帶有 pKM101 質體，可增加易出錯的 DNA 重組修復、提高 DNA 突變的可能性，而且這個質體帶有 ampicillin 抗藥性，因此可以用 ampicillin 來檢測這個質體的存在。如表 1 所示，經測試後，此五菌株的基因型(genotype)皆確認無誤。

由於初步測試中試驗物質並沒有對測試菌株產生明顯的毒性或殺傷力，因此符合衛生署「健康食品安全性評估方法」建議的最高劑量無毒性。在平板混和測試中，當任何一個試驗組的劑量引發的回復突變數達到陰性對照組的兩倍以上，且具有劑量反應關係(dose-dependent response)時，即定義為陽性反應。如表 2 與 3 所示，相對於陰性對照組，所有的陽性對照組皆引發兩倍以上、顯著差異的回復突變數，故為陽性反應。然而，即使是試驗物質的最高劑量，仍未引起顯著的突變數增加。另外，為測試物質的代謝物是否有基因毒性，富含各種分解代謝酵素的大鼠肝臟微粒體混和液(S-9)也添加在試驗物質中，模擬試驗物質的代謝過程，但在這樣的實驗條件下仍然沒有引發陽性反應。因此實驗結果顯示該試驗物質與其代謝後的物質對測試菌株並不具有致變異性。由於沒有任一濃度組比陰性對照組有顯著之增加，因此無須進行濃度-反應趨勢分析，亦可判定結果為陰性反應。

表 1、五種 *Salmonella typhimurium* 試驗菌株之基因型

測試菌株	Histidine requirement	$\Delta$ uvrB mutation	rfa mutation	Ampicillin resistance
TA97	+	+	+	+
TA98	+	+	+	+
TA100	+	+	+	+
TA102	+	-	+	+
TA1535	+	+	+	-

+ 具有此特性；- 不具有此特性

表 2、靈芝破壁孢子在 S9 的代謝活化下進行微生物基因突變分析測試結果

	TA97	TA98	TA100	TA102	TA1535
陽性對照組	612±24	348±16	784±23	884±22	914±24
50 mg/ml	146±12	34±6	184±15	266±19	22±2
25 mg/ml	143±17	35±7	183±18	265±11	18±3
12 mg/ml	148±13	36±2	184±13	268±17	18±1
6 mg/ml	144±16	37±9	182±12	265±14	15±2
3 mg/ml	144±18	32±6	182±16	268±11	13±2
陰性對照組	145±15	34±7	186±13	265±18	13±4

致變物分別為 Benzo[a]pyrene (TA98 及 TA102, 濃度為 2µg/plate) ; 2-aminoanthracene (TA97、TA100 及 TA1535, 濃度為 8µg/plate)

表 3、靈芝破壁孢子在不含 S9 的代謝活化下進行微生物基因突變分析測試結果

	TA97	TA98	TA100	TA102	TA1535
陽性對照組	586±13	288±15	756±10	856±24	922±28
50 mg/ml	132±13	36±3	178±5	234±17	13±2
25 mg/ml	135±8	35±5	176±11	236±14	15±3
12 mg/ml	136±12	33±4	174±16	236±17	13±2
6 mg/ml	137±14	32±5	176±14	233±13	16±3
3 mg/ml	134±14	34±6	177±12	237±8	14±4
陰性對照組	128±11	35±3	178±14	234±12	15±3

致變物分別為 4-nitroquinoline-N-oxide (TA97 及 TA98, 濃度為 1µg/plate) ; mitomycin c (TA102, 濃度為 8µg/plate) ; sodium azide (TA100 及 TA1535, 濃度為 1µg/plate)

## 討 論

基因毒性試驗可分為活體與體外測試，其目的為偵測化合物直接或間接引發的基因傷害，並測定其對基因的傷害程度。一般基因突變、廣泛性的染色體損害、重組、或染色體數量改變等基因損害可能會導致遺傳疾病或體細胞之變性，若試驗物質會導致上述傷害，則該試驗物質可能為人體致癌物或致突變原，可能會導致癌症或遺傳缺陷。一般基因毒性試驗不僅能預測試驗物質的致癌性，且其試驗結果有助於致癌性試驗的結果分析。

一般試驗物質須進行三種以上的基因毒性測試，以評估其基因毒性，標準的綜合基因毒性試驗為(1)微生物基因突變分析(2)體外哺乳類細胞遺傳毒性分析(3)動物活體基因毒性分析。基因毒性綜合測試法(包括體外與活體)因實驗條件會導致假陰性或假陽性反應，所以即使基因毒性試驗結果呈陽性反應，不一定表示試驗物質會對人體產生基因毒性或致癌性(反之亦然)。目前的測試方法還不能完全排除把沒有遺傳毒

性的物質誤認為有毒(假陽性)和把有毒性的物質誤認為無毒(假陰性)，因此如何進一步設計採用性細胞(例如中國倉鼠卵巢細胞)為材料等方法，消除離體和活體測試結果的差別，提高精確度，研究各種食品所含物質相互作用關係和作用時相對遺傳效應的影響等，都是食品安全性評估面臨的研究課題。儘管本研究使用艾姆試驗(沙門氏菌逆突變)會有許多偽陰性或偽陽性，但仍然並認為最簡單與最省成本的方法。

吾輩審視 2008 迄今之研究共 459 篇有關靈芝的研究，相關研究最多的是抗癌症與免疫提升機轉的探討，然而食品安全的探討闕如，給小鼠口服靈芝孢子粉，LD50 大於 10.0 g/kg，屬實際無毒級，三項致突變實驗(艾姆、微核、精子畸形實驗)結果均為陰性[21]，證明靈芝孢子無致突變作用、無細胞毒性作用及對生殖細胞無致突變作用。亦有研究指出，靈芝孢子對大鼠生長發育無不良影響，各劑量組受測大鼠的血液常規和生化指標均正常，肝、腎、胃和脾等器官病理學檢查未見明顯特异性改變[22]，此兩篇研究皆認為靈芝孢子可以作為安全的保健食品原料，不過畢竟皆非國際文獻。因此本團隊就靈芝的食品安全進行一系列評估，包括本研究沙門氏菌逆突變，另外尚包

括中國倉鼠卵巢細胞試驗、微核試驗與 28 天亞急性試驗進行評估，初步結果顯示，動物生長體重、飼料消耗、血液常規、生化常規與病理結果似乎無異常。儘管未發現異常，但任何廠牌靈芝出廠銷售前仍然需進行上述評估，主因靈芝基因型種類繁多，再加上培養環境不一定能完全掌控，例如即使土壤含金屬濃度不高，蘑菇類真菌會累積金屬含量，因而對人體產生不良影響，亦或被空氣中重金屬(金、銀、砷、鎘、銅、汞、鎳、鉛)或放射線污染[23-25]。有些儲存環境受污染亦屢見不鮮[23]。

靈芝在中華文化裡，無論從稗官野史中起死回生的仙草，到歷代官方文書中加官晉爵的太上之藥，皆顯示中華民族與靈芝深厚的淵源。從西元前一世紀的《神農本草經》到明朝李時珍的《本草綱目》，一千六百年間不斷修正補充有關靈芝的分類、氣味、藥性和主治功效等的論述，奠定了靈芝是扶正固本、滋補強壯珍貴藥材的理論基礎[26]。

1950 年代開始靈芝的大量人工栽培後，為靈芝的科研及產品開發提供了充足的原料。1970 年代中國大陸地區所發表臨床報告指出靈芝製劑對慢性支氣管炎、哮喘、冠心病、心絞痛、高脂血症、神經衰弱、肝炎、白血球減少症等有很好的療效，此結果證實了古籍所述對靈芝的藥用價值，也引發現代醫藥學界對靈芝進行化學組成與藥理研究的高度興趣。經過三十年的藥理研究結果確認靈芝的萃取物中，具有鎮靜、鎮痛、鎮咳、強心、保肝、降血壓、降血脂、降血糖、降膽固醇、抗過敏、抗發炎、抗腫瘤、抗病毒、抗氧化與免疫調節功能等的活性成分，而廣受各國的重視[3,26]。根據 2005 年張樹庭教授的估計，全球靈芝產品的年產值超過 25 億美元，市場主要集中在中國、日本、韓國、台灣等國家地區 [27]。

1980 年代台灣開始靈芝子實體的大量栽培，除了供應日本所需的原料外，也帶動了國內靈芝研究的風氣，1987 年國科會主導推動靈芝大型研究計畫後，不但引爆了台灣靈芝研究的熱潮，也開創了靈芝市場在台灣的黃金歲月，1990 年代，靈芝相關產品的營業額估計已達新台幣六十億以上，成為當時健康食品的代表。1999 年的健康食品管理法公佈實施後，健康食品由一般名詞成為法定名詞後，結束了昔日百家爭鳴的局面，為台灣靈芝市場提供可以標示功效的健康食品，也為業界提供產業升級的空間。中國是全球靈芝產品最多元的地區，除了藥品級的針劑、錠劑、膠囊、蜜丸和糖漿等，與保健食品級的膠囊、口服液和沖劑

外，亦有食品或化妝品添加靈芝者。2000 年版的《中華人民共和國藥典》中，收載了靈芝作為法定中藥材。中國衛生部也批准靈芝作為食品新資源，從中國法律的立場確認靈芝為藥食兼用的地位[3]。

千萬年來靈芝一直與人類共存於世，扮演生態環境中分解者的角色。它可分解植物殘體中的纖維素和木質素，促進碳元素循環。雖然在過去百年間，東西方科學家以嚴謹的態度研究靈芝，卻因分類指標不夠明確，忽略了彼此使用材料的差異，因而影響了對靈芝研究結果的整理和評價。生物科技與分子生物技術相結合進行的靈芝系統化研究，已經可以彼此校正過去使用的靈芝菌株間種源的差異性。現在的靈芝已進入全面開發應用時候，不但菌體要完整的充分利用，靈芝來源的特殊基因將開啓另一波功能性基因體與蛋白質體研究的熱潮。以靈芝為表達系統，作為生產特定蛋白質的分子農場，將帶動靈芝產業與市場無限提升的可能。

## 參考文獻

1. 李時珍(1578)，本草綱目，商務印書(1955)。
2. Ainsworth, G. C. Sparrow, F. K., and Sussman, A. S., the Fungi. Vol. IVB. A Taxonomic Review with keys: Basidiomycetes and Lower Fungi. Academic Press, Inc. New York (1973).
3. 林志彬，靈芝的現代研究／特性、栽培、成份、藥理、應用，北京醫科大學／中國協和醫科大學聯合出版社，北京(1996)。
4. Wang, S. H., Hsu, M. L., Feng, C. H., Lee, S. S., Shiao, M. S., and Ho, C. K., The antitumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. Intl. J. Cancer 1997; 70: 699-705。
5. 水野卓·川合正允原著，賴慶亮譯，菇類的化學、生化學，國立編譯館，1997。
6. Gao P, Hirano T, Chen Z, Yasuhara T, Nakata Y, Sugimoto A. Isolation and identification of C-19 fatty acids with anti-tumor activity from the spores of *Ganoderma lucidum* (reishi mushroom). Fitoterapia. 2012 ;83: 490-499.
7. Sone, S., Lopez-Berestein, G., and Fidler, I. J. (1985). Kinetics and function of tumor cytotoxic factor(s) produced by human blood monocytes activated to the tumoricidal state. J Natl Cancer Inst 74, 583-590.
8. Lee MK, Hung TM, Cuong TD, Na M, Kim JC, Kim EJ, Park HS, Choi JS, Lee I, Bae K, Hattori M, Min BS. Ergosta-7, 22-diene-2 $\beta$ ,3 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -triol from the fruit bodies of *Ganoderma lucidum* induces apoptosis in human myelocytic HL-60 cells. Phytother Res. 2011; 25: 1579-1585.

9. Wang JH, Zhou YJ, Zhang M, Kan L, He P. Active lipids of *Ganoderma lucidum* spores-induced apoptosis in human leukemia THP-1 cells via MAPK and PI3K pathways. J Ethnopharmacol. 2012; 139: 582-589.
10. Lee, S. Y., and Rhee, H. M.. Cardiovascular effects of mycelium extract of *Ganoderma lucidum*: inhibition of sympathetic outflow as a mechanism of its hypotensive action. Chem Pharm Bull (Tokyo) 1990; 38: 1359-1364.
11. Kim SD. Isolation and structure determination of a cholesterol esterase inhibitor from *Ganoderma lucidum*. J Microbiol Biotechnol 2010; 20: 1521-1523.
12. Teng BS, Wang CD, Zhang D, Wu JS, Pan D, Pan LF, Yang HJ, Zhou P. Hypoglycemic effect and mechanism of a proteoglycan from *ganoderma lucidum* on streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2012; 16: 166-175.
13. Hikino, H., and Mizuno, T.. Hypoglycemic actions of some heteroglycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. Planta Med 1989; 55: 385.
14. Kino K, Yamashita A, Yamaoka K, Watanabe J, Tanaka S, Ko K, Shimizu K, Tsunoo H. Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8), from *Ganoderma lucidum*. J Biol Chem. 1989;264: 472-478.
15. Lin JM, Lin CC, Chiu HF, Yang JJ, Lee SG. Evaluation of the anti-inflammatory and liver-protective effects of anoectochilus formosanus, *ganoderma lucidum* and gynomemma pentaphyllum in rats. Am J Chin Med 1993; 21: 59-69.
16. 趙東旭、楊新林、王幫武、朱鶴孫，靈芝研究的若干進展，食用菌學報 6(3): 59-64 (1999)。
17. Lee, S. S., Wei, Y. H., Chen, C. F., Wang, S. Y., and Chen, K. Y., Antitumor effects of *Ganoderma lucidum*. J Chin Med 1995; 6: 1-12。
18. Kim, H.W. and Kim, B.K. Biomedical triterpenoids of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P Karst. (Aphyllorhizomycetidae). Intl. J. Med. Mushrooms 1: 121-138(1999).
19. 沈旭昇，「利用真菌去除水中重金屬之研究」，國立成功大學環境工程研究所，81 學年度碩士論文(1993)。
20. 邱馨蕙，「顆粒化真菌菌球吸附水中微量鎘離子之研究－菌球大小結構與吸附速率關係之探討」，國立交通大學環境工程研究所，81 學年度碩士論文(1993)。
21. 孫曉明，張衛明，吳素玲，等。靈芝孢子粉食品毒理學安全性評價。中國野生植物資源，2000，19(2)：7-9。
22. 朱培根，陳體強，蔡雲，等。靈芝孢子合劑的安全性毒理學及保健功能評價。食用菌學報，2000，7(3)：37-42。
23. Jerzy Falandysz & Jan Borovička. Macro and trace mineral constituents and radionuclides in mushrooms: health benefits and risks. Appl Microbiol Biotechnol (2013) 97:477–501.
24. Borovička J, Dunn CE, Gryndler M, Mihaljevič M, Jelínek E, Rohovec J, Rohošková M, Řanda Z (2010a) Bioaccumulation of gold in macrofungi and ectomycorrhizae from the vicinity of the Mokrsko gold deposit, Czech Republic. Soil Biol Biochem 42:83–91.
25. Borovička J, Kotrba P, Gryndler M, Mihaljevič M, Řanda Z, Rohovec J, Cajthaml T, Stijve T, Dunn CE (2010b) Bioaccumulation of silver in ectomycorrhizal and saprobic macrofungi from pristine and polluted areas. Sci Total Environ 408:2733–2744.
26. 許瑞祥。1993。靈芝概論。
27. Chang S.T. 2005. *Ganoderma lucidum* A prominent source for the healthcare market in the 21th century. Proceedings of the first Symposium on development of China's medicinal fungi industry. 15-27.

## 致 謝

感謝振興醫療財團法人振興醫院提供編號 102-52 研究經費，使本研究能順利完成。

# Evaluation of Genotoxicity of Wall-broken Spores of *Ganoderma lucidum* in the Ames Test

Yun-Jen Chen<sup>1</sup> Ming-Fang Wu<sup>2</sup> Yung-Luen Shih<sup>1</sup> Ching-Hsiao Lee<sup>3</sup>  
Shan-Hu Lai<sup>3</sup> Jason Chou<sup>4</sup> Yu-Ru Chou<sup>5</sup> Chuan-Hsun Chang<sup>5,6,8</sup> Hsu-Feng Lu<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology and Laboratory Medicine, Shin-Kong, Wu Ho-Su, Memorial Hospital, Taipei, Taiwan, R.O.C..

<sup>2</sup>Animal Medicine Center, College of Medicine, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, R.O.C.;

<sup>3</sup>Jen-The Junior College of Medicine, Nursing and Management, Miaoli County, Taiwan, R.O.C.;

Departments of <sup>4</sup>Anatomical Pathology, <sup>5</sup>Nutrition Therapy, <sup>6</sup>Surgical Oncology,

<sup>7</sup>Clinical Pathology, Cheng Hsin General Hospital, Taipei, Taiwan, R.O.C.;

<sup>8</sup>School of Nutrition and Health Sciences, Taipei Medical University, Taipei; Taiwan, R.O.C.;

This study was conducted in order to assess the safety and tolerability of wall-broken spores of *Ganoderma lucidum* obtained from Chang Gung Biotechnology Corporation, Ltd. in general mutagenicity studies by Ames tests in vitro. For the preparation of *Ganoderma lucidum* dose levels for Ames test, a series of concentrations was prepared from stock solution by dilution, namely 3 mg/ml, 6 mg/ml, 12 mg/ml, 25 mg/ml and 50 mg/ml. Bacterial strains used were *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA100, TA102 and TA1535. The AMES test applied the plate incorporation method, without or with S9 metabolic activation. For a proper estimate of variation, triplicate plating was used at each dose level. After the incubation period, the number of reverting colonies per plate was counted. The positive control without S9 fraction consisted of 1 µg/plate of 4-nitroquinoline-N-oxide for TA97 and TA98 strains; 8 µg/plate of mitomycin C for TA102 strain; and 1 µg/plate of sodium azide for TA100 and TA1535 strain; for any with S9 fraction, 2 µg/plate of benzo[a]pyrene was used for TA98 and TA102 strains, and 8µg/plate 2-aminoanthracene for TA97, TA100 and 1535 strains. Compared to the negative control, the *Ganoderma lucidum* solutions with S9 or without S9 did not affect bacterial growth. There were no dose-dependent increases or decreases in the number of revertant colonies neither with nor without metabolic activation. Generally, mutagenicity was negative in all strains with and without the S9 mix.

**Keywords :** wall-broken spores of *Ganoderma lucidum*, Ames tests