

臺灣金線連水粗萃取物對大鼠 90 天餵食毒性作用

林文川¹ 施純青² 吳岳文¹ 陳臆如² 張惠玲¹ 許朝添³

中國醫藥學院¹ 藥理學科

² 中國藥學研究所

³ 病理學科

簡題：臺灣金線連對大鼠的毒性作用

聯絡人：林文川

台中市學士路 91 號 中國醫藥學院藥理學科

TEL: (04) 2053366 Ext. 8306

FAX: (04) 2053764

本實驗主要探討臺灣金線連水粗萃取物連續經口投與 90 天對大鼠的毒性作用。臺灣金線連水粗萃取物使用的劑量為每天投與 0.5 g/kg 或 2.0 g/kg。雄性大鼠 2.0 g/kg 組體重減輕。血液學檢查：雌性大鼠 2.0 g/kg 組出現中性球減少情形。血清生化學檢查：雌性大鼠 2.0 g/kg 組的乳酸去氫 活性及鈣、磷濃度下降。尿液分析：雄性大鼠 2.0 g/kg 組出現輕微酮尿。臟器重量：雌性大鼠 2.0 g/kg 組的腦下垂體、腎臟、肝臟增重，子宮減重，但並無實質上的病理組織變化。大鼠長期投與臺灣金線連水粗萃取物，安全劑量在 0.5 g/kg 以下。

關鍵詞：臺灣金線連、亞急性毒性

前 言

臺灣金線連 (*Anoectochilus formosanus* Hayata) 為蘭科 (Orchidaceae) 金線連屬 (*Anoectochilus* Blume) 多年生草本植物，在臺灣主要分佈於環繞中央山脈整個廣大中高海拔之闊葉森林內¹。

臺灣金線連為臺灣極為名貴之民間藥材，全草供為滋養強壯劑，有清涼退火、涼血固肺、祛傷解鬱、及開中氣之功效，主治肺病、高血壓、蛇傷、腎虧、小兒發育不良²。

目前野生臺灣金線連採收不易，市場上的臺灣金線連大都為人工栽培。為應我國加入世界貿易組織，對國內農業可能產生的衝擊，往高價值作物發展為農政單位努力的方向。臺灣金線連之栽培研究與保健作用之開發被農政單位列為首要目標之一。雖然如此，有關臺灣金線連生理活性之研究極為缺乏，少數論文提到臺灣金線連具有抗發炎³、保肝³、抑制血小板中前列凝素合成和促進動脈內皮組織中前列環素產生⁴、降血糖及降血脂作用⁵。

保健植物之開發與利用其安全性評估相當重要，劉新裕等人的報告指出臺灣金線連之急性毒性試驗，以大鼠一次經口投與 5 g/kg 沒有死亡的情形，也沒有明顯臨床症狀⁶。連續投與的安全性尚未見報告。

本研究主要探討臺灣金線連水粗萃取物，經口連續投與 90 天對大鼠的毒性作用，以瞭解高劑量長期投與的安全性。

材料與方法

一、臺灣金線連水粗萃取物製備方法

所使用之臺灣金線連約一年生，於 1998 年八月間購自埔里蓮園栽培場，並經本校中國藥學研究所生藥學組鑑定，標本也存放於該所。鮮品每 10 公斤加 200 公升的水煎煮四小時，二次，煎煮液過濾後，在 60⁰C 下經減壓濃縮至濃度 280 mg/ml，而後存放於-20⁰C 備用。煎煮濃縮委由世華天然食品股份有限公司辦理，抽出率為 3 %。急性毒性試驗除外，臨用時以大鼠體重每 100 公克投與 1 ml 為準，將濃縮液稀釋至適當濃度使用。

二、動物

急性毒性試驗使用 Wistar 大鼠，雌、雄體重分別約為 185 公克及 235 公克。亞急性毒性試驗使用 5 週齡之雄性 & 雌性 Wistar 大鼠。體重分別約為 185 公克及 165 公克。購自國科會動物中心。飼養室溫度控制在 24⁰C，明、暗各十二小時的環境。使用福壽牌大鼠飼料，飲水經過逆滲透處理。

三、急性毒性試驗

雌、雄分開，每組大鼠十隻，實驗前絕食一晚，但不絕水。經口投與一次臺灣金線連水粗萃取物，最高劑量為 10 g/kg，投與體積為 3.6 ml / 100 g body weight。觀察中毒症狀及記錄十四天內體重變化和死亡情形。投藥後 24 小時內置放於代謝籠 (Harvard metabolic cage 52-6707; UK) 收集尿液，使用尿液檢驗試紙(Ames reagent strips for urinalysis; N-multistix SG-L; Japan) 檢測之外，使用鈉 / 鉀 / 氯離子測定儀(Shimadzu clinical ion meter CIN-104A) 測定尿中鈉、鉀、氯離子含量。

四、連續投與試驗

雌、雄大鼠各分成三組，每組各十隻，分別經口投與臺灣金線連水粗萃物 0.5 g/kg、2 g/kg、及飲水，投與體積為 1 ml/100g，90 天後將動物犧牲。

投藥期間每天觀察動物兩次，每週稱體重一次，於投藥終了前以代謝籠收集 20 小時尿液作尿液分析。投藥終了，經一晚絕食後，在乙醚麻醉下，由腹腔動脈採血，供血液學及血清生化學檢查。取出主要臟器如腦、腦下垂體、胸腺、心臟、肝臟、肺臟、脾臟、腎臟、腎上腺、精囊、睪丸、前列腺、子宮、卵巢等，以冰冷生理食鹽水洗淨，吸乾水分稱重。主要臟器浸於 10%福馬林溶液，以供病理切片檢查用。

五、血液學檢查

使用全自動血液分析儀 (Sysmex F-800, Japan), 檢測項目含紅血球計數、血紅素、血球容積、平均紅血球容積 (MCV), 平均紅血球血紅素濃度 (MCHC), 平均紅血球血紅素量 (MCH)、血小板計數、白血球計數及分類、凝血酵素時間、活化部分凝血活時間 (APTT)。

六、血清生化學檢查

使用生化自動分析儀 (Ciba-corning 550, USA) 測定，檢測項目包含麩氨酸草乙酸轉氨酵素 (GOT)、麩氨酸丙氨基轉氨酵素 (GPT)、乳酸去氫酵素 (LDH)、 γ -麩氨醯轉移酵素 (γ -GT)、總膽固醇 (T-CHO)、三酸甘油酯、總蛋白、白蛋白、球蛋白、總膽紅素 (T-BIL)、葡萄糖、血中尿素氮 (BUN)、肌酸甘、尿酸、鈉、鉀、氯、鈣、磷。

七、尿液分析

使用尿液檢驗試紙((Ames reagent strips for urinalysis; N-multistix SG-L; Japan), 測定

酸鹼度、比重、蛋白質、尿膽素原、潛血、酮體、膽紅素、尿糖。另使用鈉 / 鉀 / 氯離子測定儀 (Shimadzu clinical ion meter CIN-104A; Japan) 測定尿中鈉、鉀、氯離子含量。

八、病理組織學檢查

臟器摘出後浸於 10 % 中性福馬林溶液，對重量異常臟器固定後進行石臘包埋及切片製作，以蘇木青與伊紅染色法(Hematoxylin and eosin stain)染色，供病理檢查。

九、統計方法

本實驗所得之數據，均以單尾變異數分析(one-way analysis of variance)，並進行 Dunnet 測試，以 P 值小於 0.05 認為有顯著差異。

結果與討論

栽培的臺灣金線連價格昂貴，鮮品市價一斤(600 公克)約 3000 元左右，而水抽出率才百分之三，限於經費，僅能使用兩種劑量。臺灣金線連粗萃取物 10 g/kg、0.5 g/kg 及 2.0 g/kg 分別相當於鮮品 333.5 g/kg、16.7 g/kg 及 66.7 g/kg。臺灣金線連於民間的用量通常為鮮重 4 - 40 公克²。

急性毒性試驗：雌、雄大鼠各十隻，經口一次投與臺灣金線連水粗萃取物最高劑量為 10 g/kg，未有特殊症狀產生，也未見死亡情形，記錄 14 天體重也沒有明顯變變化，此結果顯示臺灣金線連水粗萃取物的一半致死劑量(LD50)大於 10 g/kg。投藥後收集 24 小時的尿液，以尿液試紙檢驗沒有顯著變化。但大鼠投與臺灣金線連粗萃取物 10 g/kg，尿中排出的鈉、鉀離子總量明顯較對照組高(表一)。鈉、鉀離子總量增加應來自臺灣金

線連水粗萃取物本身所含的鈉、鉀離子，其(200 mg/ml)所含鈉、鉀離子濃度分別約為 625.5 mMol / L、414.2 mMol / L，水所含鈉、鉀離子濃度分別約為 2.7 mMol / L、10.0 mMol / L。

在臺灣金線連水粗萃取物 90 天經口投與期間，雌性大鼠無死亡情形，雄性大鼠控制組及 2.0 g/kg 組各有兩隻死亡，剖檢結果確認控制組及 2.0 g/kg 組各一隻不明原因死亡，餘二隻為藥物誤投引起死亡。

一、體重

如圖一所示，臺灣金線連水粗萃取物連續經口投與 90 天，對雌性大鼠體重變化無影響。雄性大鼠 2.0g/kg 組第三週後體重明顯低於控制組。

二、血液學檢查

如表二所示，臺灣金線連水粗萃取物連續經口投與 90 天，雄性大鼠血液學檢查皆無變化。雌性大鼠 2.0 g/kg 組雖然白血球總數沒有變化，但淋巴球比率增加、中性球比率減少；若以血球數計，淋巴球數目沒有增加，控制組、0.5 g/kg 組、2.0 g/kg 組，分別為 3.5 ± 0.3 、 2.6 ± 0.3 、 4.0 ± 0.4 ($10^3/\mu\text{L}$)；中性球數目明顯減少，控制組、0.5 g/kg 組、2.0 g/kg 組，分別為 1.9 ± 0.1 、 1.4 ± 0.2 、 $1.1 \pm 0.1^{**}$ ($10^3/\mu\text{L}$ ； $^{**}p<0.01$)。雌性大鼠因所抽取的血液不足，缺凝血酵素時間數據。

三、血清生化學檢查

如表三所示，臺灣金線連水粗萃取物連續經口投與 90 天，雌性大鼠 2.0g/kg 組的乳酸去氫酶活性下降。乳酸去氫酶存在於體內幾種組織，包括心臟、腎臟、骨骼肌、紅血球等，組織受損之後血中乳酸去氫酶的值會升高⁷，臺灣金線連粗萃取物能降低血中乳酸去氫酶的活性，顯示其可能抑制血中乳酸去氫酶的釋出。另雌性大鼠 2.0 g/kg 組血中

鈣及磷有輕微減少情形。雄性大鼠因血清不夠缺鈣和磷的數據。

四、尿液分析

如表四所示，臺灣金線連水粗萃取物連續經口投與 90 天，雄性大鼠 2.0 g/kg 組尿中酮體有輕微增加情形，酮體為脂肪酸的代謝產物⁸，雄性大鼠體重減輕是否與促進脂肪酸代謝有關有待進一步探討。雄性大鼠 2.0 g/kg 組出現蛋白尿隻數也有增加的傾向。

五、臟器重量

如表五所示，臺灣金線連水粗萃取物連續經口投與 90 天，雄性大鼠主要臟器的絕對重量沒有影響，但若以相對重量計則 2.0 g/kg 組的腦部、腦下垂體、心臟有增重情形。雌性大鼠 0.5 g/kg 組的腎臟絕對重量有增重情形，但以相對重量計則沒有差異。雌性大鼠 2.0 g/kg 組的肝臟、腎臟、腦下垂體以絕對重量及相對重量計皆有明顯增加情形，子宮重量以絕對重量及相對重量計皆有明顯減輕情形，肺臟及腦部相對重量減少，但以絕對重量計則無差異。臺灣金線連粗萃取物使雌性大鼠腦下垂體明顯增重(約增加 80 %)，子宮重量明顯減輕(約減輕 30 %)，此結果顯示臺灣金線連可能含有雌性激素相關的成分或影響雌性激素釋放的作用^{9,10}，有待進一步探討。

六、病理組織學檢查

臺灣金線連水粗萃取物連續經口投與 90 天後，臟器重量變化較大的如雌性大鼠 2.0 g/kg 組的腦下垂體、子宮、腎臟、肝臟，經病理切片，以一般染色檢查並未發現有實質病變產生。

結 論

臺灣金線連水粗萃取物急性毒性大於 10 g/kg。連續經口投與 90 天，雄性大鼠 2.0 g/kg

組出現體重減輕、酮尿。雌性大鼠 2.0 g/kg 組出現中性球減少、血清中乳酸去氫 活性降低，及腦下垂體、腎臟、肝臟增重，子宮減重的情形。大鼠長期投與臺灣金線連水粗萃取物，安全劑量在 0.5 g/kg 以下。

誌 謝

本研究蒙國科會補助經費(NSC88-2317-B039-001)，特此誌謝。

參考資料

1. 臺灣植物誌編輯委員會，臺灣植物誌，vol 5, pp.874 - 879，1978。
2. 甘偉松，藥用植物學，國立中國醫藥研究所出版，台北，pp.647，1979。
3. 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 *Gynostemma pentaphyllum* in rats. Am J Chin Med 21:59-69, 1993.
4. Huang DD, Law RCS, Mak OT. Effects of tissue-cultured *Anoectochilus formosanus* Hay. extracts on the arachidonate metabolism. Bot Bull Academia Sinica 32:113-119, 1991.
5. Takeshita T, Tago H, Nakamura M, Muraoka S, Yoshizawa T. Hypoglycemics and lipid metabolism-improving agents containing 3-glucosyloxy-4-hydroxybutyric acid or its derivatives from plant. Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 76:522, 1995.
6. 劉新裕、張同吳、王昭月、張愛華、王順成，金線連之品種特性與及毒性研究，中華農業研究 47:242-258, 1998。
7. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. In. Harper's Biochemistry. Lange

Medical Publications, East Norwalk, pp.656, 1988.

8. Mayes, PA. Regulation of lipid metabolism and tissue fuels. In: Harper's Biochemistry.

Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (eds). Lange Medical Publications, East

Norwalk, pp. 253-263, 1988.

9. Van Nesselrooij JH, Szeverenyi NM, Ruocco MJ. Magnetic resonance imaging of estrogen-induced pituitary hypertrophy in rats. Magn Reson Med. 11:161-171, 1989.

10. Branham WS, Zehr DR, Sheehan DM. Differential sensitivity of rat uterine growth and epithelium hypertrophy to estrogen and antiestrogens. Proc Soc Exp Biol Med 203:297-303,

1993.

Table 1. Urine analysis of rats after single administration of crude aqueous extracts of *Anoectochilus formosanus*.

Dose (g/kg)	Sex	Volume (ml / 24 hr)	Na ⁺ (mMol / 24 hr)	K ⁺ (mMol / 24 hr)	Cl ⁻ (mMol / 24 hr)
Control	M	21.4 ± 3.4	2.8 ± 0.1	3.1± 0.1	3.2 ± 0.1
10	M	20.7 ± 2.0	4.5 ± 0.2**	4.4 ± 0.2**	3.2 ± 0.2
Control	F	23.8 ± 1.9	2.1 ± 0.1	1.8 ± 0.6	2.4 ± 0.2
10	F	24.4 ± 2.6	3.2 ± 0.3**	3.4 ± 0.2**	2.4 ± 0.2

M; male; F: female

All values are means ± S.E. **p<0.01 compared with control group.

Table 2. Hematological findings in rats treated orally with crude aqueous extracts of *Anoectochilus formosanus* for 90 days

Parameters		g/kg/day		
		0	0.5	2.0
Erythrocytes ($10^6/\mu\text{L}$)	M	8.8 $\pm$ 1.0	7.9 $\pm$ 0.2	7.9 $\pm$ 0.3
	F	9.7 $\pm$ 0.6	8.9 $\pm$ 0.4	8.3 $\pm$ 0.3
Hemoglobin (g/dL)	M	17.1 $\pm$ 1.3	16.2 $\pm$ 0.1	16.0 $\pm$ 0.3
	F	15.6 $\pm$ 0.3	15.4 $\pm$ 0.1	15.2 $\pm$ 0.2
Hematocrit (%)	M	51.1 $\pm$ 3.8	53.6 $\pm$ 0.5	53.0 $\pm$ 1.0
	F	50.1 $\pm$ 3.1	46.3 $\pm$ 2.2	43.7 $\pm$ 1.5
MCV (μ^3)	M	61.2 $\pm$ 3.3	67.7 $\pm$ 1.0	67.7 $\pm$ 1.3
	F	51.5 $\pm$ 0.5	51.6 $\pm$ 0.4	52.3 $\pm$ 0.6
MCH (pg)	M	20.6 $\pm$ 0.8	20.4 $\pm$ 0.3	20.4 $\pm$ 0.4
	F	16.4 $\pm$ 0.9	17.3 $\pm$ 0.7	18.5 $\pm$ 0.5
MCHC (%)	M	35.1 $\pm$ 0.7	35.5 $\pm$ 0.2	35.6 $\pm$ 0.2
	F	31.9 $\pm$ 1.7	33.6 $\pm$ 1.2	34.5 $\pm$ 1.2
Platelets ($10^4/\text{mL}$)	M	99.5 $\pm$ 10.7	118.5 $\pm$ 11.4	121.9 $\pm$ 16.3
	F	122.6 $\pm$ 4.9	120.0 $\pm$ 10.0	121.3 $\pm$ 7.5
Leukocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	M	8.8 $\pm$ 0.6	8.2 $\pm$ 0.8	8.0 $\pm$ 0.4
	F	5.6 $\pm$ 0.4	4.3 $\pm$ 0.4	5.6 $\pm$ 0.5
Lymphocytes (%)	M	75.3 $\pm$ 2.9	78.0 $\pm$ 1.5	68.2 $\pm$ 3.0
	F	61.9 $\pm$ 1.2	62.0 $\pm$ 2.8	71.4 $\pm$ 2.7*
Seg.Neu (%)	M	24.7 $\pm$ 2.9	22.0 $\pm$ 1.5	31.8 $\pm$ 3.0
	F	34.3 $\pm$ 1.1	33.2 $\pm$ 3.0	22.0 $\pm$ 2.5**
PT (sec)	M	13.7 $\pm$ 0.6	14.7 $\pm$ 0.7	13.6 $\pm$ 0.3
	F			
APTT (sec)	M	17.4 $\pm$ 1.1	27.6 $\pm$ 5.5	26.3 $\pm$ 4.0
	F	14.3 $\pm$ 0.5	14.1 $\pm$ 0.4	14.1 $\pm$ 0.4

All values are means $\pm$ S.E. *p<0.05, **p<0.01 compared with control group.

M: male; F: female ; Seg. Neu: segmented neutrophil

Table 3. Blood chemistry in rats treated orally with crude aqueous extracts of *Anoectochilus formosanus* for 90 days

Parameters		g/kg/day		
		0	0.5	2.0
GOT	M	67.3 ± 3.5	56.9 ± 3.5	61.9 ± 8.4
(U/L)	F	61.3 ± 4.3	53.9 ± 3.1	61.1 ± 8.6
GPT	M	48.1 ± 2.3	39.6 ± 3.0	43.7 ± 6.1
(U/L)	F	38.4 ± 3.1	37.3 ± 2.1	42.0 ± 5.6
LDH	M	1491 ± 52	1368 ± 18	1353 ± 35
(U/L)	F	1349 ± 125	1135 ± 108	676 ± 64**
γ-GT	M	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
(IU/L)	F	0.39 ± 0.03	0.28 ± 0.04	0.36 ± 0.04
T-CHO	M	45.9 ± 2.8	54.6 ± 2.5	50.9 ± 2.8
(mg/dL)	F	68.1 ± 4.4	65.0 ± 3.0	72.4 ± 3.9
Triglycerides	M	80.3 ± 12.2	73.9 ± 5.9	62.6 ± 7.3
(mg/dL)	F	55.9 ± 3.5	52.8 ± 2.6	63.4 ± 4.0
Total protein	M	6.8 ± 0.5	6.9 ± 0.9	6.8 ± 1.0
(g/dL)	F	6.6 ± 0.3	7.0 ± 0.2	7.5 ± 0.2
Albumin	M	3.8 ± 0.7	3.8 ± 0.6	3.7 ± 0.8
(g/dL)	F	3.8 ± 0.6	4.0 ± 0.7	4.3 ± 0.9
Globulin	M	3.0 ± 0.6	3.1 ± 0.9	3.2 ± 0.8
(g/dL)	O	3.2 ± 1.0	3.0 ± 1.4	3.2 ± 1.3
T-BIL	M	0.13 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.19 ± 0.03
(mg/dL)	F	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.01
Glucose	M	92.1 ± 3.4	89.0 ± 2.7	85.6 ± 5.2
(mg/dL)	F	90.3 ± 4.3	94.2 ± 5.0	102.1 ± 3.3
BUN	M	19.7 ± 1.4	22.6 ± 1.0	21.6 ± 1.3
(mg/dL)	F	21.5 ± 1.2	20.5 ± 1.0	21.9 ± 0.9

Table 3 (continued)

Parameters		g/kg/day		
		0	0.5	2.0
Creatinine (mg/dL)	M	0.51 ± 0.03	0.60 ± 0.02	0.57 ± 0.02
	F	0.64 ± 0.02	0.69 ± 0.03	0.67 ± 0.02
Uric acid (mg/dL)	M	5.0 ± 0.3	5.1 ± 0.2	4.6 ± 0.3
	F	2.4 ± 0.3	1.9 ± 0.1	1.7 ± 0.2
Sodium (mEq/dL)	M	148.3 ± 0.4	149.1 ± 0.6	148.4 ± 0.6
	F	145.3 ± 0.4	144.6 ± 0.9	143.4 ± 0.8
Potassium (mEq/dL)	M	4.9 ± 0.1	4.8 ± 0.1	5.2 ± 0.2
	F	5.2 ± 0.2	4.8 ± 0.1	4.8 ± 0.1
Chloride (mEq/dL)	M	109.4 ± 0.6	111.0 ± 0.7	111.0 ± 0.4
	F	112.2 ± 0.8	110.8 ± 1.1	109.4 ± 0.8
Calcium (mg/dL)	M			
	F	10.0 ± 0.1	9.6 ± 0.1	9.5 ± 0.1**
Phosphorus (mg/dL)	M			
	F	9.2 ± 0.1	9.0 ± 0.1	8.8 ± 0.1*

All values are means ± S.E. *p<0.05, **p<0.01 compared with control group.

M: male; F: female

Table 4. Urinary finding in rats treated orally with crude aqueous extracts of *Anoectochilus formosanus* for 90 days

Dose (g/kg/day)	Volume (ml/20 hr)	Na ⁺ (mMol/20hr)	K ⁺ (mMol/20hr)	Cl ⁻ (mMol/20hr)	pH	Specific gravity
Male rats						
Control	38.0 ± 8.2	3.0 ± 0.2	3.5 ± 0.2	3.8 ± 0.2	7.5 ± 0.1	1.018 ± 0.001
0.5	30.7 ± 4.9	3.3 ± 0.8	4.2 ± 0.3	4.1 ± 0.5	7.7 ± 0.1	1.018 ± 0.001
2.0	25.0 ± 2.7	3.8 ± 1.6	4.1 ± 0.5	4.1 ± 0.4	7.7 ± 0.1	1.018 ± 0.001
Female rats						
Control	28.9 ± 3.4	3.1 ± 0.4	4.0 ± 0.4	3.1 ± 0.4	7.6 ± 0.1	1.017 ± 0.003
0.5	27.4 ± 4.1	2.8 ± 0.4	3.6 ± 0.6	2.9 ± 0.4	7.7 ± 0.1	1.018 ± 0.003
2.0	28.6 ± 4.9	3.0 ± 0.3	3.6 ± 0.2	2.7 ± 0.2	7.6 ± 0.2	1.016 ± 0.003

All values are means ± S.E.

Table 4 (continued)

Dose (g/kg/day)	Urobilinogen (Ehrlich U / dL)				Protein (mg / dL)						Occult blood				
					–	±	+	++	+++	++++	–	±	+	++	+++
	0.1	1	2	4	30 100 300 1000										
Male rats															
Control	4	4	0	0	0	0	7	1	0	0	8	0	0	0	0
0.5	3	7	0	0	0	4	6	0	0	0	10	0	0	0	0
2.0	0	8	0	0	0	0	2	4	1	1	8	0	0	0	0
Female rats															
Control	10	0	0	0	0	6	4	0	0	0	10	0	0	0	0
0.5	10	0	0	0	0	5	4	1	0	0	10	0	0	0	0
2.0	10	0	0	0	0	4	6	0	0	0	10	0	0	0	0

Table 4 (continued)

Dose (g/kg)	Ketones (mg / dL)						Bilirubin				Glucose (g /dL)					
	–	±	+	++	+++	++++	–	+	++	+++	–	±	+	++	+++	++++
	5	15	40	80	160						0.1	0.25	0.5	1	2	
Male rats																
Control	8	0	0	0	0	0	8	0	0	0	8	0	0	0	0	0
0.5	8	2	0	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	0	0
2.0	0	8	0	0	0	0	8	0	0	0	8	0	0	0	0	0
Female rats																
Control	10	0	0	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	0	0
0.5	10	0	0	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	0	0
2.0	10	0	0	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	0	0

Table 5. Absolute and relative organ weights in rats treated orally with crude aqueous extracts of *Anoectochilus formosanus* for 90 days

Item		g/kg/day		
		0	0.5	2.0
Brain (g)	M	1.93 ± 0.06	1.89 ± 0.02	1.92 ± 0.04
(g / 100 g b.w.)		(0.43 ± 0.01)	(0.46 ± 0.01)	(0.51 ± 0.02**)
	F	1.79 ± 0.02	1.86 ± 0.02	1.77 ± 0.02
		(0.66 ± 0.02)	(0.61 ± 0.02)	(0.60 ± 0.02*)
Pituitary (mg)	M	14.61 ± 0.72	12.92 ± 0.75	14.53 ± 0.68
(mg / 100 g b.w.)		(3.27 ± 0.12)	(3.14 ± 0.08)	(3.80 ± 0.10**)
	F	14.92 ± 1.03	16.45 ± 0.64	26.90 ± 1.23**
		(5.51 ± 0.36)	(5.42 ± 0.24)	(9.07 ± 0.53**)
Thymus (g)	M	0.29 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.29 ± 0.02
(g / 100 g b.w.)		(0.07 ± 0.01)	(0.07 ± 0.01)	(0.08 ± 0.01)
	F	0.31 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.34 ± 0.02
		(0.11 ± 0.01)	(0.12 ± 0.01)	(0.11 ± 0.01)
Heart (g)	M	1.19 ± 0.05	1.19 ± 0.04	1.20 ± 0.03
(g / 100 g b.w.)		(0.27 ± 0.01)	(0.29 ± 0.01)	(0.32 ± 0.01**)
	F	0.80 ± 0.02	0.89 ± 0.03	0.89 ± 0.02
		(0.29 ± 0.01)	(0.29 ± 0.01)	(0.30 ± 0.01)
Lung (L;g)	M	1.04 ± 0.02	1.23 ± 0.07	1.89 ± 0.60
(g / 100 g b.w.)		(0.23 ± 0.01)	(0.30 ± 0.02)	(0.55 ± 0.22)
	F	0.84 ± 0.04	0.85 ± 0.03	0.78 ± 0.02
		(0.31 ± 0.01)	(0.28 ± 0.01)	(0.26 ± 0.01*)
Lung (R;g)	M	0.57 ± 0.02	0.60 ± 0.04	1.82 ± 0.75
(g / 100 g b.w.)		(0.13 ± 0.01)	(0.15 ± 0.01)	(0.55 ± 0.27)
	F	0.47 ± 0.04	0.45 ± 0.02	0.41 ± 0.01
		(0.18 ± 0.01)	(0.15 ± 0.01)	(0.14 ± 0.01*)

Table 5. (continued)

Item		g/kg/day		
		0	0.5	2.0
Liver (g)	M	12.7 ± 1.02	10.5 ± 0.32	10.7 ± 0.64
(g / 100 g b.w.)		(2.85 ± 0.17)	(2.55 ± 0.04)	(2.80 ± 0.09)
	O	6.50 ± 0.21	7.10 ± 0.20	7.65 ± 0.31**
		(2.39 ± 0.04)	(2.33 ± 0.04)	(2.55 ± 0.05*)
Spleen (g)	M	0.95 ± 0.03	0.93 ± 0.04	0.96 ± 0.05
(g / 100 g b.w.)		(0.21 ± 0.01)	(0.23 ± 0.01)	(0.26 ± 0.02)
	F	0.64 ± 0.02	0.66 ± 0.04	0.67 ± 0.02
		(0.24 ± 0.01)	(0.22 ± 0.01)	(0.23 ± 0.01)
Kidney (L; g)	M	1.64 ± 0.09	1.58 ± 0.06	1.60 ± 0.10
(g / 100 g b.w.)		(0.37 ± 0.02)	(0.38 ± 0.01)	(0.42 ± 0.01)
	F	0.83 ± 0.02	0.94 ± 0.03*	1.03 ± 0.03**
		(0.31 ± 0.01)	(0.31 ± 0.01)	(0.34 ± 0.01**)
Kidney (R;g)	M	1.56 ± 0.08	1.45 ± 0.05	1.55 ± 0.10
(g / 100 g b.w.)		(0.35 ± 0.02)	(0.35 ± 0.01)	(0.40 ± 0.01)
	F	0.80 ± 0.02	0.91 ± 0.03*	1.00 ± 0.03**
		(0.29 ± 0.01)	(0.30 ± 0.01)	(0.33 ± 0.01**)
Adrenal (L; mg)	M	25.82 ± 1.35	26.15 ± 2.62	26.01 ± 2.09
(mg / 100 g b.w.)		(5.79 ± 0.22)	(6.28 ± 0.57)	(6.93 ± 0.64)
	F	37.74 ± 3.20	42.15 ± 1.68	39.82 ± 1.27
		(13.80 ± 0.93)	(13.94 ± 0.68)	(13.35 ± 0.35)
Adrenal (R;mg)	M	29.13 ± 1.93	29.45 ± 1.46	28.06 ± 1.95
(g / 100 g b.w.)		(6.53 ± 0.37)	(7.11 ± 0.30)	(7.40 ± 0.53)
	F	41.05 ± 2.82	40.95 ± 1.48	40.62 ± 1.07
		(15.1 ± 0.86)	(16.0 ± 0.37)	(13.6 ± 0.31)

Table 5 (continued)

Item		g/kg/day		
		0	0.5	2.0
Testis (L; g)	M	1.74 ± 0.02	1.74 ± 0.06	1.73 ± 0.05
(g / 100 g b.w.)		(0.41 ± 0.02)	(0.44 ± 0.02)	(0.42 ± 0.01)
(R;g)	M	1.75 ± 0.03	1.75 ± 0.05	1.75 ± 0.04
(g / 100 g b.w.)		(0.41 ± 0.02)	(0.45 ± 0.02)	(0.42 ± 0.01)
Prostate	M	0.71 ± 0.05	0.61 ± 0.04	0.60 ± 0.07
(g / 100 g b.w.)		(0.16 ± 0.01)	(0.15 ± 0.01)	(0.16 ± 0.02)
Seminal vesicle	M	1.07 ± 0.13	0.98 ± 0.09	0.85 ± 0.07
(g / 100 g b.w.)		(0.24 ± 0.02)	(0.24 ± 0.02)	(0.22 ± 0.01)
Uterus (L; g)	F	0.31 ± 0.04	0.25 ± 0.01	0.21 ± 0.01**
(g / 100 g b.w.)		(0.12 ± 0.01)	(0.09 ± 0.01)	(0.07 ± 0.01**)
(R; g)	F	0.30 ± 0.03	0.26 ± 0.02	0.22 ± 0.02*
(g / 100 g b.w.)		(0.11 ± 0.01)	(0.09 ± 0.01)	(0.07 ± 0.01**)
Ovary (L; mg)	F	68.20 ± 6.26	72.95 ± 3.04	61.83 ± 5.99
(mg / 100 g b.w.)		(25.51 ± 2.55)	(24.26 ± 1.48)	(20.68 ± 1.71)
(R; mg)	F	69.87 ± 3.81	73.64 ± 4.33	64.16 ± 5.94
(mg / 100 g b.w.)		(25.73 ± 1.09)	(24.49 ± 1.75)	(21.36 ± 1.66)

(): relative weight; M: male; F: female; b.w.: body weight

All values are means ± S.E. *p<0.05, p**<0.01 compared with control group.

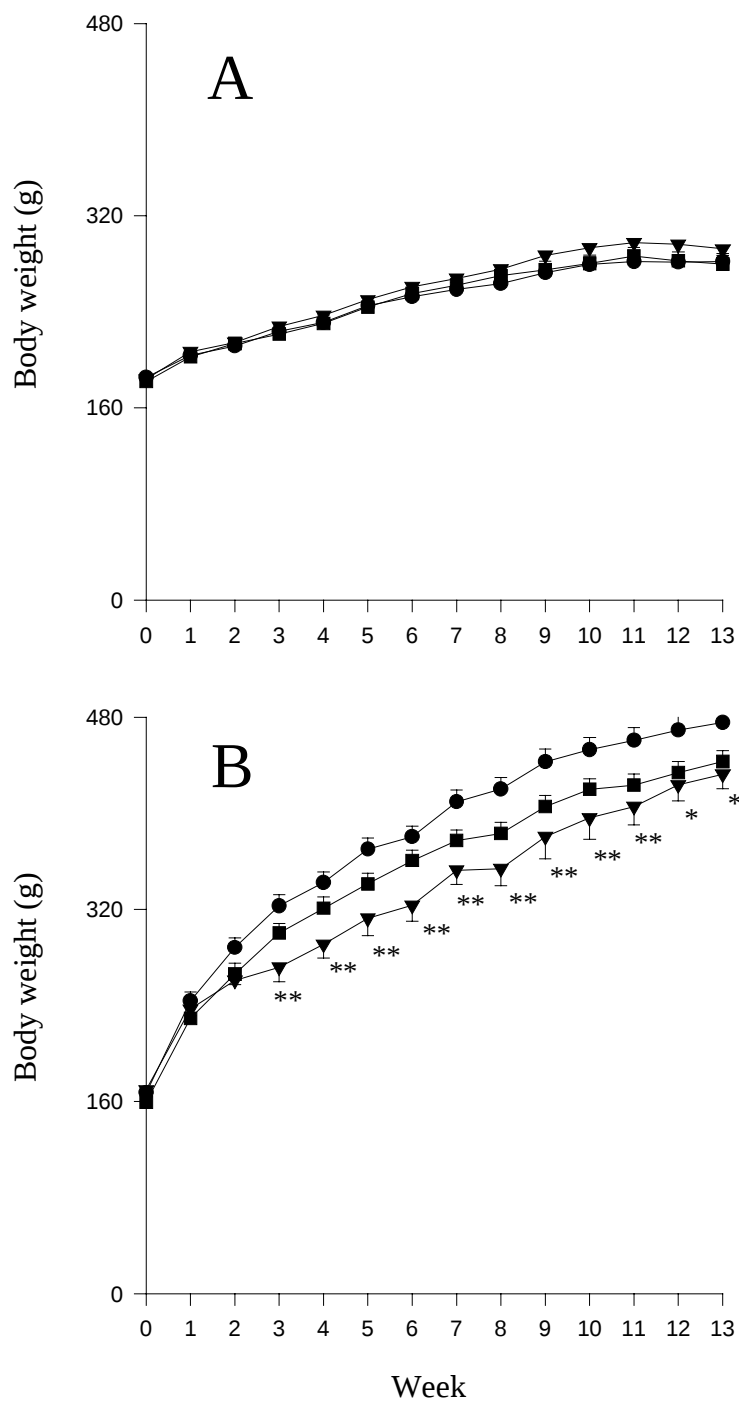


Fig. 1. Body weight changes in rats orally treated with crude aqueous extracts of *Anoectochilus formosanus* (AAF) for 90 days. A panel: female; Bpanel: male; ● :control ; ■ : AAF 0.5 g/kg ; ▼ : : AAF 2.0 g/kg. All values are means $\pm$ S.E. *p<0.05, **p<0.01 compared with control group.

NINETY-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF CRUDE AQUEOUS EXTRACTS OF *Anoectochilus formosanus* Hayata IN RATS

Wen-Chuan Lin¹, Chun-Ching Shih², Yueh-Wern Wu¹, I-Ju Chen², Huei-Ling Chang¹,
Chao-Tien Hsu³

¹Department of Pharmacology, ²Graduate Institute of Chinese Pharmaceutical Sciences, and
³Department of pathology, China Medical College, Taichung, Taiwan

The 90-day repeated oral dose toxicity study of a crude aqueous extracts of *Anoectochilus formosanus* Hayata (AAF) was evaluated in rats. AAF was conducted at once-daily doses of 0, 0.5 and 2.0, g/kg. Inhibition of body weight gain was noted in the male group at 2.0 g/kg. In hematology, decreased amount of segmented neutrophil was observed in females of the 2.0 g/kg dose groups. In blood chemistry, a decrease in lactate dehydrogenase activity was observed in females of the 2.0 g/kg dose group. In addition, females given 2.0 g/kg showed a slight decrease in calcium and phosphorus levels. Urinalysis showed a slight increase in ketones in males of the 2.0 g/kg dose group. Increases in weight of pituitary, liver and kidney in the females of 2.0 g/kg dose group were observed, with no histopathological changes. In conclusion, the toxicological no-observed levels in rats were thought to be 0.5 g/kg or below.

Key words: *Anoectochilus formosanus* Hayata; Subacute toxicity