

# 應用數種動物模式於機能性食品及傳統藥物之效能及安全評估

王順成、廖俊旺

行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

## 摘要

本文主要介紹數種重要動物模式，包括介紹應用於機能性食品及傳統藥物糖尿病效能評估之 Black Kaliss(C57BLKS/J)小鼠，和以 streptozotcin (STZ)與 nicotinamide 誘導之非胰島素依賴型(NIDDM)大鼠及以 STZ 誘導之胰島素依賴型(IDDM)錢鼠(musk shrew mouse)等三種糖尿病效能測試之動物模式。另對延緩老化症之效能評估用之 SAMP8 型動物模式之特性、開發及應用，作一系統說明。最後說明以部分切肝術(partial hepatectomy)所快速誘導肝癌之 Wistar 動物模式，並其對機能性食品及傳統藥物之效能及安全評估，作一系列之介紹，希冀利用動物模式協助提升國內生物科技之發展，並提供政府對機能性食品及傳統藥物做適當管理。

## 緒言

機能性食品 (functional food) 與傳統藥物 (traditional medicine) 之開發，已漸成為國內頗具發展潛力之生物科技產業。但近年來，由於市場上對兩類產品需求快速增加，導致大部分產品發展方向分歧而雜亂，致管理困難。因此衛生署乃於八十八年二月，針對健康食品之開發，制定了“健康食品法”，此法可說對大部分機能性食品的開發與管理，奠定良好基礎。唯機能性食品或傳統藥物的開發，牽涉兩項重要的問題，即效能(effect)及安全性(safety)的評估。一般而言，效能及安全性評估之主要程序中，以動物實驗佔最重要位置。藥物或食品開發前，均需先進行動物實驗後，才可進行人體臨床試驗。唯人體臨床試驗有時受環境條件的限制，或開發產品狀況不同，可減少或免除。衛生署已公告部分健康食品在效能及安全性評估項目、準則及規範，並陸續研訂其他保健功效評估的項目，希望傳統藥物在短期內，亦將比照進行。如此，傳統藥物開發及應用將可有一番前景。

本文僅就機能性食品及傳統藥物之效能及安全性評估，所遭遇動物模式的困難，及就本實驗室所發展或引用數種動物模式做一簡略的介紹，俾供國內外的專家或學者參酌或應用。

### 調節血糖效能之動物模式

目前糖尿病動物模式大致可分為：基因遺傳及以藥物或飲食誘發糖尿病等三大類(羅等, 2001)<sup>2</sup>。本實驗室則以下列幾種動物模式做為糖尿病之效能檢測之指標。

1. 遺傳自發性血糖小鼠 Black Kaliss : C57 BL/KS 或稱為 C57 Kaliss。此小鼠是由 Diabetes (Lepr<sup>db</sup>)及 Obse 肥胖小鼠(Lep<sup>ob</sup>)，經由近親交配(inbred)繁殖而得。此種小鼠具有遺傳性自發性高血糖，其血液血糖濃度高(280~350 mg/dL vs.115± 5 mg/dL 對照組)，此型小鼠適於糖尿病第二型—非胰島素依賴型(NIDDM)實驗，但此種動物模式繁殖鼠隻後代，其帶遺傳自發高血糖鼠隻比例僅約 30%左右。
2. 化學物誘導糖尿病動物模式，此可分為兩種方式：
  - 1) 衛生署公告之 streptozotcin (STZ)注射加上 nicotinamide 誘導方式，適合非胰島素依賴型第二型糖尿病效能評估模式，此方法之詳細內容可為參照衛生署公告健康食品調整血糖效能評估方法(羅等, 2001 及 Masiello 等)<sup>2,9</sup>進行，由本實驗 Table 1 之結果可與其他動物模式之結果相佐證。

Table 1. Body weight and basal glucose in no fasting Sprague-Dawley rats after administration of STZ and nicotinamide

| Observed item          | Control | STZ    | STZ + 2.3 mg/kg<br>nicotinamide |
|------------------------|---------|--------|---------------------------------|
| Body weight (g)        | 285±3   | 267±4  | 280±5                           |
| Plasma glucose (mg/dl) | 125±6   | 328±16 | 185±5*                          |

STZ: streptozotcin.

Data are mean±SD of 10 observations

\*P<0.05 vs. control value

- 2) 以 strptozotocin (STZ)誘導錢鼠(musk shrew)之動物模式。以單一劑量 75 mg/kg BW，以 STZ 利用腹腔注射(ip)方式，注射於非空腹(non fasted)之錢鼠經 10 天後，可百分之百誘發高血糖鼠(血糖濃度≥300mg/dL)及含低濃度胰島素(較對照組少 30%)。該動物模式是由 Ohno 等(1998)<sup>10</sup>提出，此動物模式之優點為，此動物保留靈長類演化過程之特性，因此其特性與人類之差距較小，且誘發方式簡單，誘發率在雄性動物可高達 100% (Figure 1)。此動物模式有助於 IDDM 及他其類型糖尿病之研究，本實驗室正著力建立此動物之模式中。

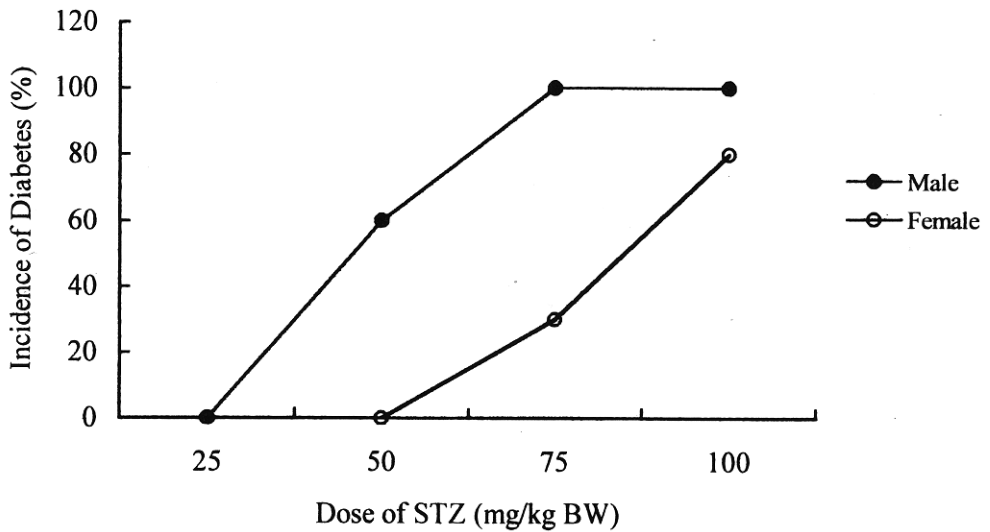


Figure 1. Incidence of diabetes musk shrew following a single injection of various doses of STZ at 10 days after administration. • male; o: female

#### 延緩老化之效能評估動物模式

目前衛生署已公告之保健功效項目共七項，而延緩老化的保健效能的項目並未列名其中(潘，2001)<sup>1</sup>。潘等<sup>1</sup>認為國內保健食品工業具發展潛力之項目中，延緩老化是其中相當重要項目。因此本實驗利用日本 Iciro, Ingram 和 Takeda 等<sup>3,4,6</sup>所發展之 SAM (senescence-accelerated mouse) 建立延緩老化效能之動物評估模式。在 SAM 系列之小鼠中以 SAMP8 最具特色，其具嚴重的腦幹海綿體退化和海馬區含 PGS(PAS- positive granular structure)(Table 2 和 Figure 2)，其中最重要的老化指標即為腦幹海綿體退化(spongiform degeneration)，在其出生 5-8 個月 SAMP8 之鼠，其海綿狀病變大小及數目均達到最高峰，而在 11 個月齡時，此時海綿空泡數目不再增加，且可擴充至腦其他區。因此建議對延緩老化有效之健康食品或傳統藥物，可依其海綿狀空泡數目多寡，作為效能評估之指標。至於類澱粉(Amyloid)之沉積，因目前之研究分析尚未十分清楚，若作為評估之指標，顯然尚有困難。

Table 2. Pathological changes in SAM-P/8 mice

1. Atrophy of the piriform cortex
2. Reduction of dentritic spine of hippocampal pyramidal neurons
3. Lipopigmentation and spongiform degeneration in brain stem
4. Thalamic neuronal inclusion
5. Astrocytosis and axonal dystrophy
6. PAS-positive granular structures in hippocampus

From: Takeda et al., 1991.

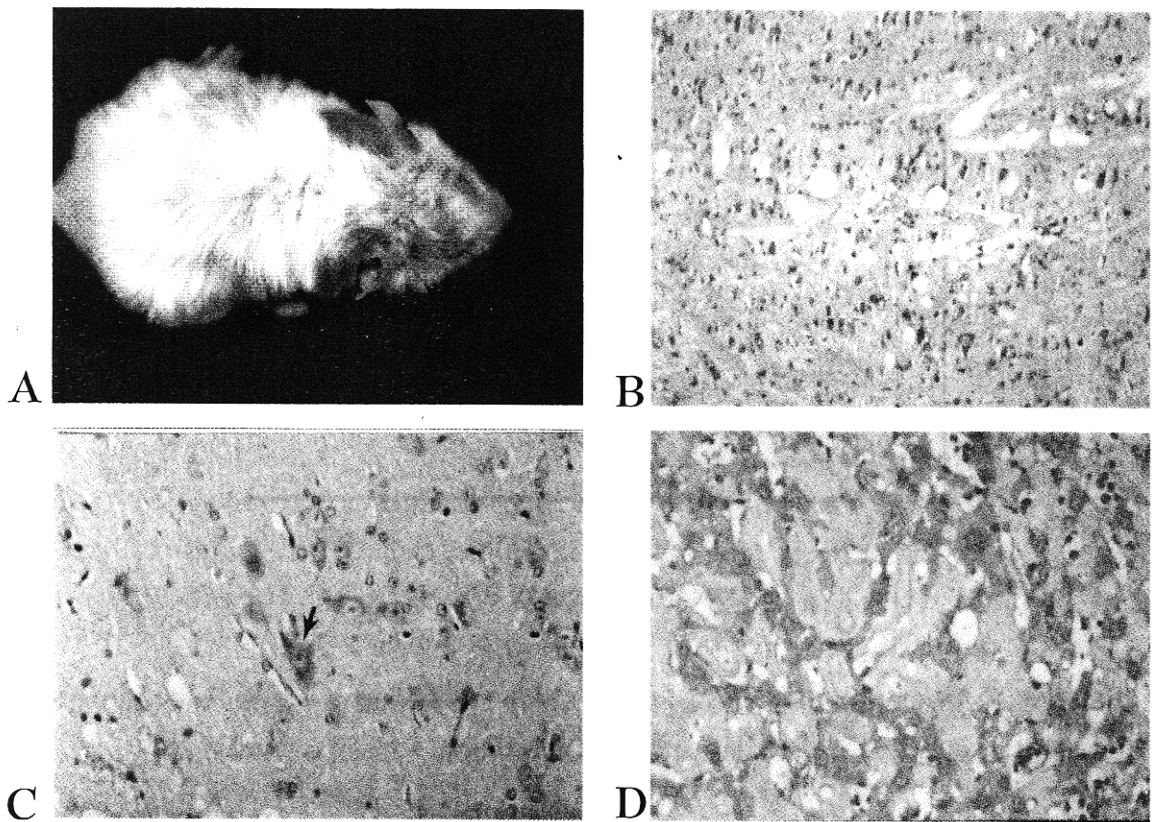


Figure 2. Morphological changes and histopathological findings in the SAM-P8 mice. A. Loss hair; B. Spongy degeneration in the brain stem; C: Lipofusin deposition in the neurons; D: Amyloidosis in the hepatic sinusoid.

### 抑制腫瘤及致癌性之動物模式

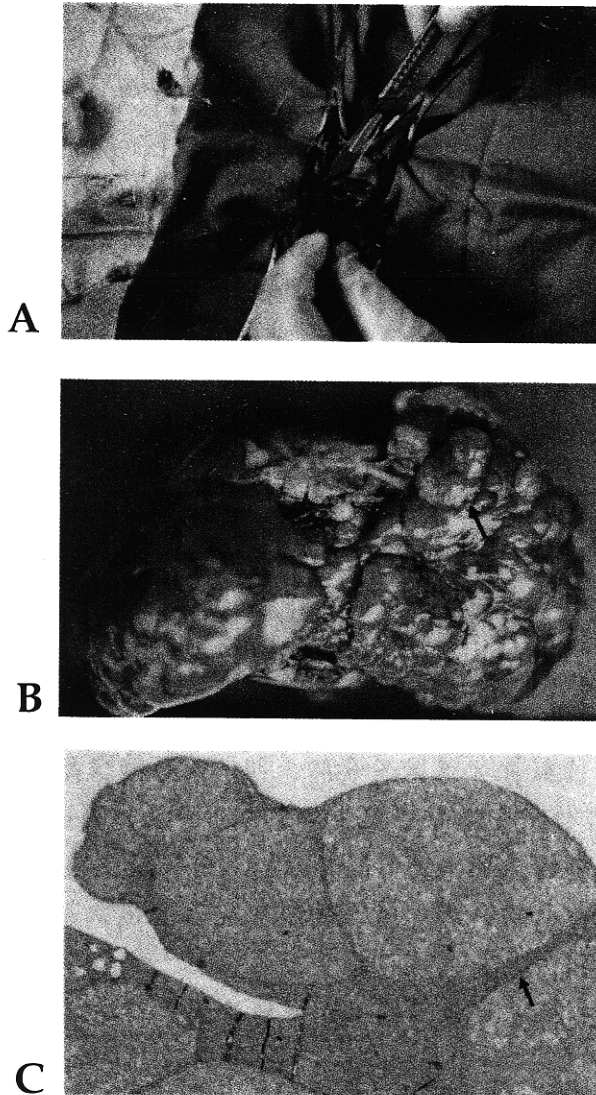
現階段國內對於健康食品及傳統藥物之開發，許多專學者均認為在效能測試上，短中期為優先發展之技術，需偏重於調節血脂、抑制腫瘤、免疫調節及減肥效果之評估。而在安全性之毒理評估上對急毒性、亞慢毒性、致變異性及致癌性之技術，需加速發展。因此抑制腫瘤及致癌性研究，無論在效能及安全評估均相當重要。往昔此類研究大都集中利用動物之組織、器官等癌細胞株之探討。由於細胞株與活體間之關連性，結果相差太大，其結果難與動物研究結果取得良好相關性。因此，動物實驗結果成為不可或缺。但癌症動物實驗，需花費長達二年時間，費時、費力。因此，對食品或傳統藥物之開發造成極大之障礙。本實驗室在1989年首度引入快速誘導致肝癌法(rapid bioassay for hepatocarcinogenesis)<sup>5,7,8</sup>，利用肝部份切除術(partial hepatectomy)及2-AAF(2-acetylaminofluorene)在短期內(8-12週)可誘導Wistar rat產生不同程度之肝病變及腫瘤，如Table 3、4及Figure 3。

Table 3. Biochemical changes of GPT, GOT, and  $\gamma$ -GT in rats treated with 2-AAF via drinking water after 4, 6, 8, 10, and 12 weeks in a rapid bioassay of carcinogenesis

| Chemical | Week | Dose (mg/L) | GPT           | GOT           | $\gamma$ -GT     |
|----------|------|-------------|---------------|---------------|------------------|
| 2-AAF    | 4    | 0           | 67 $\pm$ 8    | 131 $\pm$ 10  | 0.1 $\pm$ 0.3    |
|          |      | 200         | 124 $\pm$ 38* | 216 $\pm$ 96* | 7.7 $\pm$ 16.5*  |
|          | 6    | 0           | 82 $\pm$ 14   | 137 $\pm$ 10  | 3.2 $\pm$ 2.9    |
|          |      | 200         | 115 $\pm$ 38* | 137 $\pm$ 9.9 | 19.0 $\pm$ 21.1* |
|          | 8    | 0           | 76 $\pm$ 15   | 127 $\pm$ 30  | 0.7 $\pm$ 0.8    |
|          |      | 200         | 107 $\pm$ 19* | 149 $\pm$ 33* | 8.4 $\pm$ 6.6*   |
|          | 10   | 0           | 99 $\pm$ 21   | 147 $\pm$ 33  | 0.2 $\pm$ 0.6    |
|          |      | 200         | 107 $\pm$ 24  | 139 $\pm$ 23  | 15.2 $\pm$ 9.8*  |
|          | 12   | 0           | 91 $\pm$ 12   | 152 $\pm$ 48  | 0.6 $\pm$ 0.5    |
|          |      | 200         | 89 $\pm$ 15   | 123 $\pm$ 10  | 15.7 $\pm$ 14.2* |

Data are mean $\pm$ SD of 10 observations

\* $P$ <0.05 vs. control value at each experiment



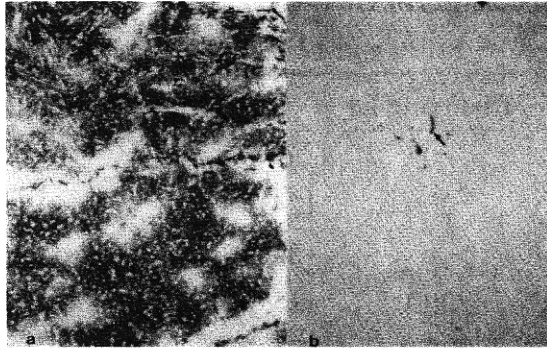


Figure 3. Rapid bioassay for chemical-induced hepatocarcinogenesis in rats. (A) Partial hepatectomy; (B) Hepatoma induced by 2-AAF in gross (B) and histopathological examination (C) from a male rat; (D) GGT histochemistry showed positive staining in the 2-AAF-induced hepatoma (a) and negative (b) in the control group.

Table 4. Histopathological evaluations of liver in rats treated with 2-AAF via drinking water after 4, 6, 8, 10, and 12 weeks in a rapid bioassay of carcinogenesis

| Week | Animal Number | Sex | Bile duct hyperplasia |                 |     | Regeneration nodule | Fibrosis | Hepatoma |
|------|---------------|-----|-----------------------|-----------------|-----|---------------------|----------|----------|
|      |               |     | +                     | ++              | +++ |                     |          |          |
| 4    | 3             | M   | -                     | 2 <sup>1)</sup> | 1   | 3                   | -        | -        |
|      | 4             | F   | 3                     | -               | -   | 3                   | -        | -        |
| 6    | 4             | M   | -                     | -               | -   | 3                   | 3        | 3        |
|      | 4             | F   | -                     | -               | -   | -                   | -        | -        |
| 8    | 4             | M   | -                     | -               | -   | 4                   | 4        | 4        |
|      | 4             | F   | -                     | -               | -   | -                   | -        | -        |
| 10   | 5             | M   | -                     | -               | -   | 5                   | 5        | 5        |
|      | 4             | F   | -                     | -               | -   | 1                   | 1        | 1        |
| 12   | 4             | M   | -                     | -               | -   | 4                   | 4        | 4        |
|      | 5             | F   | -                     | -               | -   | -                   | -        | -        |

M: Male rats; F: Female rats; +: Mild; ++: Moderate; +++: Remarkable

<sup>1)</sup>Affected number of treated rats

從 Table3、4 及 Fig.3 可發現經肝部份切除術之動物，其 Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT)、Glutamic pyruvic transaminase (GPT) 及  $\gamma$ -glutamino-trans-peptidase ( $\gamma$ -GT) 在初期均顯著增加，第 10 及 12 週後並產生明顯小結節(nodule)及肝腫瘤(hepatoma)，顯示此動物模式誘導之成功性。由於本實驗動物模式，經物理性及化學性處理後所誘發雄鼠肝腫病變之機率为百之之百，是十分良好之動物模式。加上除物理性處理為外加傷害外，其餘老鼠均與自然狀態下之老鼠相似，具良好之免疫系統此也與人類正常狀況相似。因此，此模式進行機能性食品及傳統藥物之效能及安全性評估，具相當實用價值。

### 結語

由於機能性食品及傳統藥物開發，勢必成為明日生技最耀眼的產業。因此，如何開發有效的動物模式，以配合其效能性之前導研究或安全性之評估工作，益增重要。目前國內在效能性動物模式之開發上，因國外動物模式發展迅速，大抵有跡可循；但在安全評估動物模式，則大部分停留較容易進行之急性及亞急性毒理動物模式。至於在致癌性、致畸胎性及致生殖毒性之安全評估，目前均少進行。因此很多產品均被限制在安全評估上，無法開發。此現象對於傳統藥物在安全評估，尤其顯著，因此建議政府當局宜速建立規範，否則以目前傳統藥物開發之需求，將無法配合其上市之速度，這是相當令人扼腕。總之，動物模式建立及動物實驗之快速發展，為推動生技產業之原動力，其技術發展應加速進行，如此，國內之生技產業才可能與國際並駕其驅。

# **Application of serial animal models for effect and safety evaluation of functional food and traditional medicine**

Shun-Cheng Wang and Jiunn-wang Liao

Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute,  
Council of Agriculture, Executive Yuan

## **Summary**

This paper emphasizes on serial animal models for effect and safety evaluation of functional food and traditional medicine. Among them, three models are for effect evaluation of Diabetes Mellitus (DM). They are Black Kaliss (C57 BL/KS) mouse, streptozotocin (STZ)-induced musk shrew mouse, and STZ and nicotinamide-induced rat, respectively. C57 BL/KS mice are mutant strain derived from Diabetes (*Lepr<sup>db</sup>*) and obese (*Lrp<sup>ob</sup>*). Musk shrew mouse caused hyperglycemia after a single dose STZ administration. Other animal rats were administrated STZ plus nicotinamide. It was developed a similar animal model to human Independent Insulin Diabetes Mellitus (NIDDM). Senescence-accelerated mouse (SAM) model for the effect evaluation of age-resistant of functional food and traditional medicine was established, too. Finally, the model of hepatocarcinogenesis in rat was also set up. The Wistar rats administrated 2-acetylaminofluorene (2-AAF) first, following partial hepatectomy treated. Such Wistar rats revealed clear carcinogenic syndrome.

In conclusion, all information from these animal models may provide a particularly advantageous tool for development and management of biotechnological product by researcher and government.

## Reference

1. 潘子明。2001。機能性醱酵製品總論。機能性發酵製品研討會文集。pp.1-66.
2. 羅慧珍、林素貞。2001。機能性醱酵製品總論：調節血糖效能評估。機能性發酵製品研討會論文。pp. 191-206.
3. Ichiro. A., M. Hideo, M. Veno, T. Talemura, N. Kitabayash, N. Seriu, T. Kawamata, S. Niagara, A. Shimed and T. Takeda. 1994. Age related morphological changes in the bain of senescence-accelerated mouse (SAMP8). Elsevier Science B.V. The SAM Model of Senescence Toshio Takeda. pp. 67-72.
4. Ingram, D.K., H. Kuo., J. Hengemible, A. Shimada, M. Tian and M. Jacker. 1994. Elsevier Science. B.V. The SAM Model of Senescence Toshio. Takeda. pp.73-82
5. Ito, N., T. Inoue, Y. Tagawa, T. Aoki and M. Kagawa. 1986. Development of new rapid bioassay for carcinogen to predict the results of long-term carcinogenicity test. *Carcinogenesis*. 90:601-61.
6. Takeda, T. and Hosokawa, M. 1991. Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of accelerated senescence. *JAGS*. 39: 911-919.
7. Liao, J.W. and S. C. Wang. 1991. The rapid bioassay method for hepato-carcinogenesis on rat. *J. Chinese Soc. Vet. Sci.* 17:133-140.
8. Liao, J.W, S.C.Wang and C.I. Liu. 1993. Effect of concentration on response in rapid bioassay for hepatocarcinogenesis in rat. *J. Chinese Soc. Vet. Sci.* 19: 259-267.
9. Masiello, P., C. Broca, R. Gross, M. Roye, M. Manteghett, P. Hillaire-Bys, M. Novella and G. Ribes. 1998. Development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes*. 49:224-229.
10. Ohno T., J. Kitoh, K. Yamashita, Y. Ichikawa, F. Horio, M. Terada, A. S. Tanaka and T. Namikawa. 1998. Toxin-induced IDDM (Insulin Dependent Diabetes Mellitus) in the musk shrew. *Life Science*. 63:455-462.