

以睪丸間質細胞株評估庫達海馬酒精萃取物之生理功效

林慧秋、廖紫嫻、許鐘鋼

水產試驗所澎湖海洋生物研究中心

前言

海馬用途極廣，可作為保健醫藥、裝飾標本以及觀賞水族。在保健醫藥部分，海馬一般不當作海鮮食品，我們常在中藥行見到曬乾的海馬乾，大部分為已除去內臟的身體。

海馬屬珍稀海水硬骨魚，是華人社會名貴的中藥材之一，自古即有「北方人參，南方海馬」之說 (梁，2004)。本中心目前已建立數種海馬繁養殖技術並技轉多家廠商，相信海馬之量產及其產業發展指日可待，因此海馬所具有的生理活性物質，值得我們深入探討。本研究利用睪丸間質細胞 (萊氏細胞, Leydig TM3 cell) 實驗，來評估添加本所養殖海馬之酒精萃取物對 TM3 細胞合成睪固酮 (testosterone) 之影響。

材料與方法

庫達海馬 (*Hippocampus kuda*) (圖 1) 取自本中心青灣種原庫，以酒精萃取再經減壓濃縮後冷凍乾燥，即為庫達海馬酒精萃取物 (*Hippocampus kuda* ethanol extracts, 以下簡稱 HKEE)，再配製成不同濃度供試驗分析用。



圖 1 澎湖海洋生物研究中心養殖之庫達海馬

一、分析方法

(一) HKEE 之膽固醇含量分析

參考梁 (2004) 等人的研究，並修改其研究方法，將 HKEE 以 0.45 μm 濾膜過濾後，利用 HPLC (Hitachi HPLC-UV 5410) 進行分析，所使用管柱為 Mightysil RP-18，以 UV detector 在 205 nm 下偵測，並利用膽固醇 (cholesterol) 配製 4 個標準溶液 (100、125、250、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)，並進行檢量線分析。

(二) 添加 HKEE 對 TM3 產製睪固酮之影響

1. TM3 培養方法

(1) 細胞株來源

TM3 (BCRC 編號 60475) 購自新竹食品工業發展研究所菌種保存及開發中心。

(2) 細胞株解凍與培養

將冷凍的 TM3 細胞株取出後，立刻置於 37°C 水浴槽中，持續輕搖冷凍管 1-3 分鐘使其完全溶化，吸取已解凍的細胞懸浮液，以 4,000 rpm，3 分鐘離心，去除二甲基亞砜 (Dimethyl sulfoxide)，再加入 92.5% 的 1:1 DMEM/F12 的細胞培養液 (含 4.5 g/L glucose, 2.5 mM L-glutamine, 0.5 mM sodium pyruvate, 1.2 g/L sodium bicarbonate, 15 mM HEPES 及 5% 馬血清與 2.5% 胎牛血清)，混合均勻後置於 37°C、5% CO₂ 的培養箱培養。

2. 睪固酮測定

TM3 細胞處理同前，在培養盤中加上不同濃度 (同上) 的 HKEE，培養 24 小時後，吸取培養液進行睪固酮含量測定，試驗使用 Cayman-Testosterone EIA Kit。

二、統計分析方法

各試驗結果以 SPSS 套裝軟體 (Version 12.0) 進行變異數 (one way analysis of variance, ANOVA)，若達顯著差異，再以 Duncan's multiple range test 檢試各處理組間是否有顯著差異，所有試驗使用顯著水準為 $p < 0.05$ 。

結果與討論

ÖZDEMİR 和 Fatma (2018) 在研究野生海馬的生化組成中指出，無論是公海馬還是母海馬，膽固醇是最主要的固醇類之一。因此本研究首先分析 HKEE 中的膽固醇含量。將 HKEE 經過 HPLC 分離後，和膽固醇標準品進行比對，海馬膽固醇的波峰約在 35 分鐘時出現 (圖 2)。將不同濃度膽固醇標準品 (X

軸) 與層析峰面積 (Y 軸) 迴歸求得檢量線： $y = 5186.4x + 359468$ ，迴歸係數 $R^2 = 0.9954$ ，顯示兩者呈現良好的線性關係 (圖 3)。經線性迴歸後，求得每 1 g 的 HKEE 中之膽固醇化合物含量約為 28.51 mg。

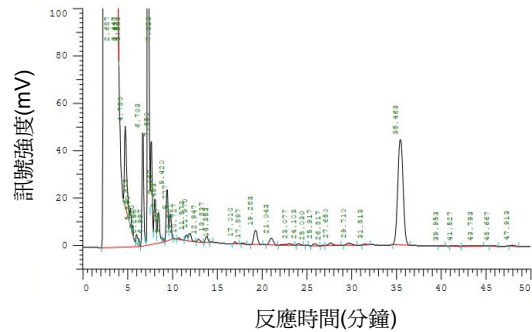


圖 2 以 HPLC 分析庫達海馬酒精萃取物樣品

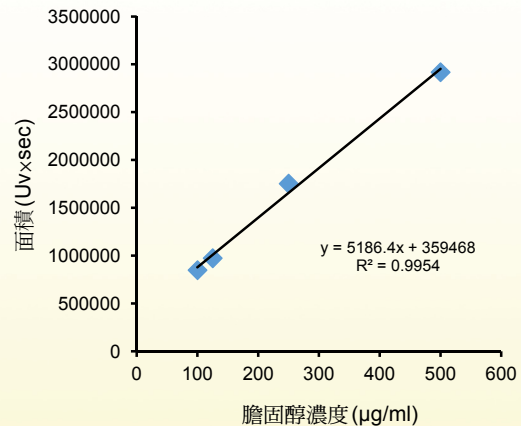


圖 3 膽固醇標準品線性迴歸係數

膽固醇是固醇類賀爾蒙合成最重要的基質，其中睪固酮 (又稱睪酮、睪丸素、睪丸酮、睪甾酮或睪脂酮) 是一種類固醇激素，主要由男性的睪丸或女性的卵巢分泌，具重要之生理機能。本研究進一步將含有不同濃度 HKEE 之培養基與 TM3 睪丸間質細胞共培養 24 小時後，再利用專一性酵素連結免疫

吸附試驗，分析細胞上清液中，TM3 細胞合成睪固酮的含量，結果顯示，添加 1–4 mg/ml 之 HKEE 可顯著提升 TM3 細胞合成睪固酮 ($p < 0.05$) (圖 4)，並具有劑量依存關係。睪丸間質細胞合成睪固酮的路徑與腎上腺及卵巢相似，皆利用膽固醇進行轉換 (曾，2003)。睪固酮在正常生理所扮演的重要的生理機能，包含促進性慾、調節情緒、自信 (作用在腦部)、促肌肉增生、增加肌力、增加耐力 (男性比較強壯)、提升骨密度 (男性比較高大)，還有增強性器官表徵 (製造精子、勃起功能、前列腺生長) 及促進毛髮與膠原蛋白生長等功能 (圖 5)。另外，在流行病學研究結果則顯示，遲發性睪固酮低下症 (late-onset hypogonadism, LOH) 與心血管疾風險的增加有關 (Liao, 2015)。在本研究的細胞實驗中，添加 HKEE 能有效提升 TM3 睪丸間質細胞合成睪固酮，顯示 HKEE 可能有助於維持上述生理機能。

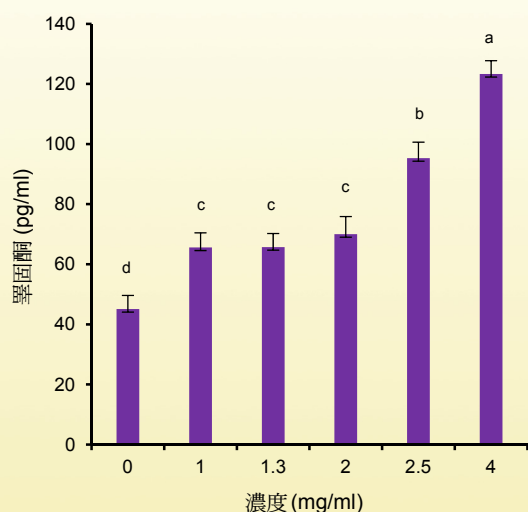


圖 4 不同濃度的庫達海馬酒精萃取物與 TM3 共同培養 24 小時後，培養液之睪固酮含量變化

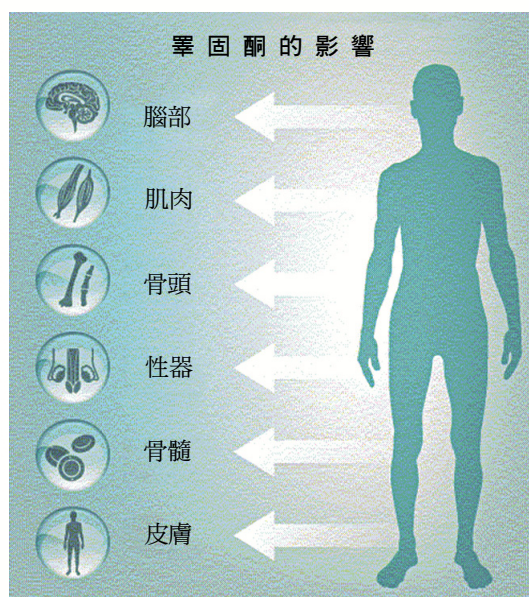


圖 5 男性性激素及其在人體中的作用(引用自 <https://3sr051217ihe1u4u613nqp53-wpengine.netdna-ssl.com/wp-content/uploads/2018/11/iStock-851849330.jpg>)

結語

海馬是一種廣泛應用於中藥材的海洋動物，具有雄性孵卵產子的生物特性 (Koldewey and Martin-Smith, 2010)。依據藥理研究證明，海馬萃取物具有抗血栓作用，同時也能增強性功能和補益腎氣，並具有促進血液循環效果 (Xu and Xu, 1997; Xu et al., 2000; Mei et al., 2005)。本試驗以本所人工養殖的庫達海馬為原料，利用酒精萃取機能性固醇類，並利用細胞確效試驗證實添加 HKEE 有助於 TM3 睪丸間質細胞合成睪固酮。睪固酮無論在維持生理正常機能或預防心血管保健上的功效都已被證實，因此本研究結果不僅有助於國內人工海馬養殖產業鏈之發展，更重要的是提供海馬加工作為中藥材之科學實證參考。