

科技部補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計 畫 *
* : 薯蕷皂甘素對雄性老化大鼠模型生殖功能之保護效應 *
* 名 稱 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 林旻瑤
學生計畫編號： NSC 102-2815-C-040-047-B
研究期間： 102年07月01日至103年02月28日止，計8個月
指導教授： 余青翰

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學系生理學科

中華民國 103年03月31日

薯蕷皂甘素對雄性老化大鼠模型生殖功能之保護效應

(一)摘要

中文摘要:過多的活性氧化物質 (reactive oxygen species, ROS)常常是身體與器官受到傷害與老化的主要原因。在男性生殖方面,老化造成精細胞死亡、精子減少、精子活動力下降及睪丸萎縮等現象。山藥富含多種重要成分如抗氧化酵素、黏多糖體及薯蕷皂甘素 (diosgenin)等,其中具生理功能的主要成分是一種類似固醇類賀爾蒙化學結構的皂素生物鹼--薯蕷皂甘素,為合成固醇類荷爾蒙的前驅物,可被用來抗癌症、抗氧化、降血脂、抗纖維蛋白酶、調節免疫和具雌激素活性。本實驗將探討,薯蕷皂甘素對於抵抗老化大鼠過多活性氧化物質的保護效應。將利用 Western blot、EIA 和 TUNEL 檢測,觀察薯蕷皂甘素對老化大鼠模型在生殖方面的老化現象有何改善。本實驗利用兩種老化大鼠模型,D-galactose 處理大鼠及 OXYS 大鼠,餵食薯蕷皂甘素 10 和 50 mg/kg/day 8 週觀察對於兩種老化大鼠模型的保護的作用。另外,以萊氏細胞培養薯蕷皂甘素濃度 0.1 到 50 M 或者與人絨性促素 (hCG, 0.05 IU/ml)方式處理 1 小時,觀察薯蕷皂甘素對於萊氏細胞分泌睪固酮素的直接作用。TUNEL 檢測老化大鼠曲細精管中細胞核 DNA 斷裂。結果顯示,一般大鼠萊氏細胞培養在高劑量薯蕷皂甘素後,有助於睪固酮的分泌,而 LH 接受器和 StAR 的蛋白表現量沒有明顯的差異。D-galactose 大鼠以餵食薯蕷皂甘素方式處理,血漿中睪固酮濃度相較於一般大鼠明顯下降,此兩種不同結果,說明薯蕷皂甘素短期或長期處理對於萊氏細胞可能有不同的成效。此外,經由餵食薯蕷皂甘素處理,精子活動力有明顯的回復現象。陰莖蛋白表現,CD31 在高劑量餵食薯蕷皂甘素後,有明顯回升的現象,但是 alpha-actin 在一般大鼠及老化大鼠間沒有明顯差異。OXYS 大鼠,經由薯蕷皂甘素處理,曲細精管細胞凋亡情況,明顯有減少的現象,陰莖蛋白部分,CD31 在經由薯蕷皂甘素處理後,並沒有改善的現象,而 alpha-actin 在一般大鼠及老化大鼠間沒有明顯差異。此實驗結果說明,薯蕷皂甘素對於老化大鼠生殖功能可能具有保護的效應,特別是在於精子存活的部分。

關鍵字:活性氧化物質、老化、薯蕷皂甘素、D-半乳糖、OXYS 大鼠

英文摘要：Excessive reactive oxygen species (ROS) are often the main reason for injuries and aging of cells and organs. In male reproductive system, aging causes the death of sperm cells, reduces sperm, decreases sperm motility and results in testicular atrophy. Yams are rich in a variety of important ingredients such as antioxidant enzymes, polysaccharides and diosgenin. Diosgenin, a chemical structure that is similar to steroidal saponin alkaloid, is a precursor for steroid hormone synthesis. Recently, diosgenin also showed the anti-cancer, anti-oxidation, lipid-lowering, anti-fibrin enzymes, immune regulation and estrogenic activities. In the present study, protective effect of diosgenin against ROS in aging rat model will be investigated. This study used Western blot, EIA, and TUNEL assay to examine how diosgenin improve reproductive functions. This study used both D-galactose-induced aging rat models and OXYS rat models. Diosgenin at the doses of 10 or 50 mg/kg/day was given for 8 weeks to observe its protective role on two different kinds of aging rat models. In another experiment, diosgenin was given to primary cultured Leydig cells at the doses of 0.1 to 50 mM or with hCG to find out the direct effect of diosgenin on testosterone secretion. In TUNEL assay, testicular tissue sections were collected to detect the DNA fragmentation in aging animal models. In D-galactose induced aging rat models, testosterone concentration was decreased after the oral feeding of diosgenin at the doses of 10 or 50 mg/kg/day for 8 weeks. However, direct treatment of diosgenin at the concentration of 10 or 50 M for 1-hr on normal Leydig cell showed the increase of testosterone secretion. This result might suggest that diosgenin resulted in diverse effect in normal and aging Leydig cells. In addition, sperm motility and expression of endothelial cells in penis were decreased in D-galactose induced animal models. Furthermore, the sperm motility was significantly recovered after the treatment of diosgenin. The content of endothelial cell in rat penis was also recovered at high doses diosgenin treatment group. However, the content of smooth muscle in rat penis wasn't change in four groups. In the experiments of another aging model, OXYS rats, excessive reactive oxygen species might be the cause of apoptosis in testicular sections. CD31 expression in the penis of OXYS rats was also decreased. After the treatment of diosgenin on OXYS rats for 8 weeks, cell apoptosis in seminiferous tubules was significantly recovered, but the content endothelial cells in penis was not improved. These results suggested that diosgenin might show the protective role on male reproductive system in aging rat models, especially on the survival of sperm.

Key words: reactive oxygen species 、 aging 、 diosgenin 、 D-galactose 、 OXYS rat

目錄

前言	1
研究目的	1
文獻討論	2
研究方法	
薯蕷皂甘素對於大鼠睪固酮合成的影響	3
薯蕷皂甘素對 D-galactose 誘導老化大鼠睪固酮合成的影響	5
薯蕷皂甘素對 OXYS 誘導老化大鼠睪固酮合成的影響	6
結果與討論	8
參考文獻	9
研究成果發表資料	11
附錄	12

(一)前言

過多的活性氧化物質 (reactive oxygen species, ROS)常常是身體與器官受到傷害與老化的主要原因 (Poli et al., 2004), ROS 屬於自由基的一種, 其電子軌域上含有一個或多個不成對電子, 因此相當具有反應性, 會攻擊體內生物分子, 包括蛋白質、脂質及核酸等, 為造成身體氧化傷害相關疾病 (癌症、心肌梗塞、動脈硬化、老化、及神經退化疾病) 的主要原因, 而氧與衍生的氧化物質會誘發 ROS 生成增加, 導致氧化傷害的發生 (Aitken et al., 1987; Beckman et al., 1979; Iwasaki et al., 1992; Sikka et al., 1995)。在生殖方面, 老化造成女性的陰道會變的狹窄且缺乏彈性 陰道分泌物減少及性交時反應慢; 男性有精細胞死亡 (Samanta and Chainy, 1997)、精子減少、精子活動力下降 (Hsu et al., 1997; Marchlewicz et al., 2007)、睪丸萎縮 (Hardin, 1983)。已知雌激素在多數細胞會經由雌激素受體調控細胞增生及抑制細胞凋亡 (隋佳菱.2000), 山藥中富含薯蕷皂甘素 (diosgenin)是合成黃體激素的前驅物 (Marker., 1940), 可被用來抗癌症、抗氧化、降血脂、抗纖維蛋白酶、調節免疫和具雌激素活性。本實驗將探討薯蕷皂甘素 (diosgenin) 對於老化雄性大鼠生殖模型是否具有保護效應。

(二)研究目的

在生物學及醫學上, 老化是生命隨時間而惡化的現象。氧的新陳代謝機制對生命而言雖然至關重要, 但卻因為部分還原含氧物種的形成而對細胞造成潛在威脅 (Fridovich et al., 1986; McCord et al., 1988)。

雌激素在人體內是重要的固醇類荷爾蒙, 其中 17 β -estradiol (E2)為人體內表現量最多的一種雌激素, 已知雌激素在多數細胞會經由雌激素受體調控細胞增生及抑制細胞凋亡 (隋佳菱.2000)。山藥為常見之保健食品或藥用材料, 其含有同屬固醇類之薯蕷皂甘素 (diosgenin)與植物固醇 (phytosterols)兩類重要活性物質 (呂廷璋 2005), 由於它的結構式與體內某些荷爾蒙如黃體素類似, 所以會有部分生理效應與這些荷爾蒙類似, 山藥常被用來作為解痙、消炎的作用, 主要應用於月經來時的疼痛症狀、懷孕當中子宮的收縮可能造成孕程的不穩定、腹絞痛、泌尿道疼痛、關節炎等的緩解作用。近年來, 科學家開始著手研究關於薯蕷皂甘素的臨床生理活性, 希望能將山藥的傳統保健效果科學化。其中山藥的功能有: 降血脂, 預防心血管疾病的效果、抗發炎的效果、性荷爾蒙的相關效應以及保肝作用。本研究的目的主要是探討, 薯蕷皂甘素是否可以改善老化老鼠模型的生殖功能, 將進行下列實驗分析。

- (1) 利用 TUNEL 觀察薯蕷皂甘素是否可以改善老化大鼠生殖相關細胞的計畫性死亡。
- (2) 利用 Western blot 觀察經由薯蕷皂甘素處理後老化大鼠陰莖的血管內皮細胞、平滑肌細胞以及睪丸萊氏細胞 LHR 以及 StAR 含量的變化。
- (3) 利用 EIA 配合酵素呈色反應, 利用呈色之深淺進行定量分析, 分析老

化大鼠經由薯蕷皂甘素處理後血漿中睪固酮含量的改變。

- (4) 觀察經由薯蕷皂甘素處理的老化大鼠睪丸的型態以及精子活動力的改變。

(三) 文獻探討

氧的新陳代謝機制對生命而言雖然至關重要，但卻因為部分還原含氧物種的形成而對細胞造成潛在威脅 (Fridovich et al., 1986; McCord et al., 1988)。氧的單電子還原會產生超氧化物，而雙電子環原則產生過氧化氫。因此從氧原子流出的電子是利用像粒腺體電子傳輸鏈、黃素蛋白 (flavoprotein)、P450 和氧化酵素等細胞色素這樣的過程，而且配合得十分緊密以避免部分氧化發生 (Freeman et al., 1982)。

過多的活性氧化物質 (reactive oxygen species, ROS) 常常是身體與器官受到傷害與老化的主要原因 (Poli et al., 2004)。ROS 屬於自由基的一種，其電子軌域上含有一個或多個不成對電子，因此相當具有反應性，會攻擊體內生物分子，包括蛋白質、脂質及核酸等，為造成身體氧化傷害相關疾病（癌症、心肌梗塞、動脈硬化、老化、及神經退化疾病）的主要原因，而氧與衍生的氧化物質會誘發 ROS 生成增加，導致氧化傷害的發生 (Aitken et al., 1987; Beckman et al., 1979; Iwasaki et al., 1992; Sikka et al., 1995)。

造成老化的原因可以有以下兩種：(1) 端粒子，每次細胞分裂時消耗一些，因此正常細胞只能分裂一定的代數，因為當端粒子的結構被消耗殆盡時細胞就會停止生長而呈現老化的狀態；(2) 氧化壓力：生命的維持需要從外界攝取食物，食物在細胞裡燃燒，產生能量來維持內部的結構及生命的運作。但在食物燃燒過程中所產生的高能量電子會不慎與氧接觸而產生氧的自由基等副產品，這些氧的自由基會不斷對細胞的分子像 DNA 或細胞膜產生傷害。如果細胞修補能力不足，這些傷害就會隨著年歲的增長而累積，最後導致個體的老化。

在生殖方面，老化造成女性的陰道會變的狹窄且缺乏彈性 陰道分泌物減少及性交時反應慢；男性有精細胞死亡 (Samanta and Chainy, 1997)、精子減少、精子活動力下降 (Hsu et al., 1997; Marchlewicz et al., 2007)、睪丸萎縮 (Hardin, 1983)。

本實驗將使用兩種方式誘導老化的大鼠模型：(1) D-半乳糖 (D-galactose)；(2) OXYS rats。

(1) D-galactose:

高劑量的 D-galactose 會被半乳糖氧化酶氧化成乙醛和過氧化氫 (Ho et al., 2003)，並且會增加導致阿茲海默症的因素和造成神經功能缺損 (Hsieh et al., 2009; Cui et al., 2006; Zhang et al., 2005.)。

(2) OXYS:

OxyS是一小段未編碼的RNA，可以誘導大腸桿菌產生氧化壓力，越來越嚴重的粒線體障礙，被認為可能是加速OXYS老鼠老化的原因，增加活化氧化壓力產物的來源可能來自這些動物的組織當中 (Shabalina et al., 1995; Kolosova et al., 2003; Marsili et al., 2004)。OXYS大鼠的養育，是將Wistar大鼠給予多量的D-galactose，造成大鼠有白內障的現象，再將這些易產生白內障的大鼠挑選出來繼續繁殖，最後生產出剛出生體內就有高度氧化壓力的大鼠品系。OXYS大鼠的腦中有高程度的氧化脂質 (LPO) (Kolosova et al. 2003)，這種氧化壓力可以造成大鼠記憶力缺失以及用來做於老化大鼠模型。

山藥是中藥常用之一，富含多種重要成分如抗氧化酵素、黏多醣體及薯蕷皂苷素等，具有增強免疫、抗腫瘤與關節炎之功能，可又生干擾素與增生T淋巴細胞，另具消除蛋白尿、抑制細胞突變及降低膽固醇等作用。山藥中具生理效應的主要成分是一種類似固醇類荷爾蒙化學結構的皂素生物鹼--薯蕷皂苷素，是合成固醇類荷爾蒙的前驅物，可被用來抗癌症、抗氧化、降血脂、抗纖維蛋白酶、免疫調節和雌激素活性。

植物性雌激素其化學結構與功能和雌激素很類似，能調節女性體內荷爾蒙、預防骨質疏鬆、抑制腫瘤細胞微血管增生進而抑制腫瘤、預防血栓、預防心血管疾病…等。植物性雌激素中又以大豆異黃酮 (soy isoflavones)最受人矚目。本實驗所用的薯蕷皂苷素具有 (1)降血脂、減少膽固醇再吸收、降低LDL (壞的膽固醇)、增加HDL (好的膽固醇)，可被用來預防心血管疾病；(2)增加肝細胞的磷脂質及膽固醇濃度，強化肝細胞的介面活性效果，增加抵抗毒素能力；(3)在抗老化方面，由前人實驗薯蕷皂苷素處理在心肌細胞的實驗中得知，凋亡相關路徑蛋白表現量下降，存活訊息傳遞路徑蛋白表現量上升，纖維化訊息傳遞路徑蛋白表現量下降；(4)促進乳腺生長；(5)調節皮膚老化，減少皮膚纖維母細胞經UVA照射所產生的基質金屬蛋白酶 (MMP-1)之表現量，增加膠原蛋白的生成量 (吳逸舒. 2011)。

本實驗目的是探討薯蕷皂苷素是否可以藉由抗氧化路徑改善老化老鼠模型的生殖功能。

(四)研究方法

主題一：薯蕷皂苷素對於大鼠睪固酮合成的影響

實驗一、薯蕷皂苷素對大鼠萊氏細胞分泌睪固酮之影響。

目的：觀察山藥萃取物 diosgenin，是否作用於萊氏細胞影響睪固酮之合成與分泌。

方法：將酵解並以 percoll 純化之控制組和給予薯蕷皂苷素之大鼠萊氏細胞培養液與人絨性促素 (hCG, 0.05 IU/ml)，於 34°C 培養一小時後，收集細

胞培養液，以 EIA 技術，分析睪固酮的分泌量。分組處理如下，薯蕷皂甘素的使用劑量為參考前人已發表論文換算而得：

- 第 1 組：控制組(未經藥物處理的細胞)
 - 第 2 組：給予 diosgenin (0.1 g/ml)
 - 第 3 組：給予 diosgenin (1 g/ml)
 - 第 4 組：給予 diosgenin (10 g/ml)
 - 第 5 組：給予 diosgenin (20 g/ml)
 - 第 6 組：給予 diosgenin (30 g/ml)
 - 第 7 組：給予 diosgenin (40 g/ml)
 - 第 8 組：給予 diosgenin (50 g/ml)
 - 第 9 組：給予人絨性促素處理 (hCG=0.05 IU/ml)
 - 第 10 組：給予 diosgenin (0.1 g/ml) +人絨性促素處理 (hCG=0.05 IU/ml)
 - 第 11 組：給予 diosgenin (1 g/ml) +人絨性促素處理 (hCG=0.05 IU/ml)
 - 第 12 組：給予 diosgenin (10 g/ml) +人絨性促素處理 (hCG=0.05 IU/ml)
 - 第 13 組：給予 diosgenin (20 g/ml) +人絨性促素處理 (hCG=0.05 IU/ml)
 - 第 14 組：給予 diosgenin (30 g/ml) +人絨性促素處理 (hCG=0.05 IU/ml)
 - 第 15 組：給予 diosgenin (40 g/ml) +人絨性促素處理 (hCG=0.05 IU/ml)
 - 第 16 組：給予 diosgenin (50 g/ml) +人絨性促素處理 (hCG=0.05 IU/ml)
- 培養一小時後，收集培養液保存於-20°C，待日後以酵素免疫測定法檢測睪固酮濃度。

實驗二、薯蕷皂甘素對大鼠萊氏細胞中 LHR 和 StAR 表現之效應。

目的：觀察山藥萃取物 diosgenin，是否作用於萊氏細胞藉改變 LHR 及/或 StAR 蛋白表現而影響睪酮之合成與分泌。

方法：將酵解並以 percoll 純化之控制組和給予薯蕷皂甘素之大鼠萊氏細胞培養液與人絨性促素 (Western blot)技術，分析 StAR 和 LHR 蛋白表現。分組處理如下：

- 第 1 組：控制組(未經藥物處理的細胞)
- 第 2 組：給予 diosgenin (10 g/ml)
- 第 3 組：給予 diosgenin (20 g/ml)
- 第 4 組：給予 diosgenin (30 g/ml)
- 第 5 組：給予人絨性促素處理 (hCG=0.05 IU/ml)
- 第 6 組：給予 diosgenin (10 g/ml) +人絨性促素處理 (hCG=0.05 IU/ml)
- 第 7 組：給予 diosgenin (20 g/ml) +人絨性促素處理 (hCG=0.05 IU/ml)

主題二：薯蕷皂甘素對 D-galactose 誘導老化大鼠睪固酮合成的影響

實驗三、D-galactose 餵食後給予 diosgenin 處理對大鼠萊氏細胞睪固酮合成之影響。

目的：觀察餵食 D-galactose 造成氧化壓力後，再補充山藥萃取物 diosgenin 是否會改變大鼠萊氏細胞分泌睪固酮之能力。

方法：將控制組、餵食 D-galactose 大鼠及 D-galactose 大鼠餵食 diosgenin 這三種組別，分離大鼠萊氏細胞，在 34°C 下培養一小時，分組處理如下：

第 1 組：控制組(不加入任何試藥)

第 2 組：D-galactose 餵食組

第 3 組：D-galactose 餵食組+diosgenin (10 mg/kg)

第 4 組：D-galactose 餵食組+diosgenin (50 mg/kg)

一小時後，收集培養液保存於-20°C，待日後以酵素免疫測定法檢測睪固酮濃度。

實驗四、D-galactose 餵食後給予 diosgenin 處理對大鼠精子活動力之影響。

目的：觀察餵食 D-galactose 造成神經退化後，再補充山藥萃取物 diosgenin，是否藉由改變精子活動力而降低大鼠受孕力。

方法：大鼠犧牲後，將輸精管置放於含有培養液 (0.5% BSA-M199 medium) 之培養皿中，以解剖刀刀片將輸精管切開數段，每段約 0.5~1 公分，在 37°C 下培養 30 分鐘，可立即將其滴在計算盤上，顯微觀察其活動力或將其培養一小時後再進行活動力評估，以作為精子之耐久性指標。精子活動百分比 (%) 計算如下： $\text{會移動之精蟲數} \div \text{全部之精蟲數} \times 100$ 。活動性分析方法如下：先顯微鏡檢於顯微鏡中不會移動之精子數目，之後將樣本以 10% 中性福馬林固定後，再計算全部之精子數目並以油鏡進行精子型態檢查。

第 1 組：對照組 (未加任何刺激物或藥物)

第 2 組：D-galactose 處理組

第 3 組：D-galactose 餵食組給予 diosgenin (10 mg/kg)

第 4 組：D-galactose 餵食組給予 diosgenin (50 mg/kg)

實驗五、D-galactose 餵食後給予 diosgenin 處理對大鼠陰莖內 CD31 和 alpha-actin 蛋白表現量之影響。

目的：觀察餵食 D-galactose 造成神經退化後，再補充山藥萃取物 diosgenin，是否改變大鼠陰莖內 CD31 和 alpha-actin 蛋白表現量。

方法：將控制組、餵食 D-galactose 大鼠及 D-galactose 大鼠餵食 diosgenin 這三組大鼠犧牲後，收集陰莖組織，均質化後萃取蛋白，以西方點墨 (Western

blot)技術，分析 CD31 和 alpha-actin 蛋白表現。分組處理如下：

- 第 1 組：對照組 (未加任何刺激物或藥物)
- 第 2 組：D-galactose 餵食組
- 第 3 組：D-galactose 餵食組給予 diosgenin (10 mg/kg)
- 第 4 組：D-galactose 餵食組給予 diosgenin (50 mg/kg)

主題三：薯蕷皂甘素對 OXYS 誘導老化大鼠睪固酮合成的影響

實驗六、OXYS 品系大鼠睪丸曲細精管中細胞凋亡指標之變化。

目的：探討 OXYS 品系大鼠體內的氧化壓力，是否會造成大鼠曲細精管中精母細胞和精原細胞 DNA 斷裂之效應。

方法：將由俄國學者收集並固定的 OXYS 大鼠睪丸製作成冷凍切片，再以丙酮固定。隨後加入 80 μ l 之平衡緩衝液 (200 mM potassium cacodylate; 25 mM Tris-HCl; 0.2 mM dithiothreitol DTT; 0.25 mg/ml bovine serum albumin; 2.5 mM cobalt chloride) 在室溫下反應 5 分鐘，後換成 50 μ l 之 TdT 反應緩衝溶液混合物。此混合物內含有平衡緩衝液、核苷酸混合物 (50 μ M fluorescein-12-dUTP, 100 μ M dATP, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA,) 以及 1 μ l TdT 酵素 (25 IU)。在 37°C 避光反應 60 分鐘之後，加入含有 20 mM EDTA 之 PBS 終止反應，移除溶液後加入含有 0.1% Triton X100, 及 5 mg/ml 牛蛋白血清之 PBS 清洗兩次，最後加入 0.5 ml 含有 5 mg/ml propidium iodide 及 250 mg RNase 之 PBS 避光環境之下作用 30 分鐘，以共軛焦顯微鏡觀察螢光的表現。

- 第 1 組：OXYS rat
- 第 2 組：OXYS rat 給予 diosgenin (10 mg/kg)
- 第 3 組：OXYS rat 給予 diosgenin (50 mg/kg)

實驗七、OXYS 品系大鼠給予 diosgenin 處理對大鼠陰莖內 CD31 和 alpha-actin 蛋白表現量之影響。

目的：探討 OXYS 品系大鼠體內的氧化壓力，再補充山藥萃取物 diosgenin，是否改變大鼠陰莖內 CD31 和 alpha-actin 蛋白表現量。

方法：將控制組、OXYS 品系大鼠以及 OXYS 品系大鼠餵食 diosgenin 這三組大鼠犧牲後，收集陰莖組織，均質化後萃取蛋白，以西方點墨 (Western blot) 技術，分析 CD31 和 alpha-actin 蛋白表現。分組處理如下：

- 第 1 組：對照組 (未加任何刺激物或藥物)
- 第 2 組：OXYS rat

第 3 組：OXYS rat 給予 diosgenin (10 mg/kg)

第 4 組：OXYS rat 給予 diosgenin (50 mg/kg)

實驗八、OXYS 品系大鼠前列腺的重量變化

目的：前人研究指出老化會造成前列腺增生，尤其在旁側，因此探討 OXYS 品系大鼠不同部位前列腺的重量變化。

方法：將 OXYS 品系大鼠的前列腺分為(1)Dorsal ; (2)Ventral ; (3) Lateral，分別取下秤重。

一、間隙細胞及萊氏細胞的製備

參考前人所建立之方法(Chiao et al., 2002; Cudicini et al., 1997; Huang et al., 2001)，將睪丸組織置於內含 5 毫升培養液 (1% BSA-HBSS，1% bovine serum albumin, BSA，25 mM HEPES，100 U/ml penicillin G，50 g/ml streptomycin，2550 USP U/ml heparin，in Hank's balanced salt solution)的離心管中，每管同時加入 1.4 mg 的 collagenase，置於 34°C 的水浴箱中，以每分鐘 100 cycles 的速度震盪作用 15 分鐘。作用結束後每管加入 40 毫升冰冷的 1% BSA-HBSS，停止酵解作用。置於冰上 10 分鐘，待曲細精管沉降後，再以尼龍布 (nylon mesh)過濾。將濾液離心 (200 × g，10 分鐘)，丟棄上清液，進行 hypotonic shock 之步驟。將細胞團塊加入 9 毫升的去離子水，以塑膠吸管反覆抽吸數次後，加入 1 毫升 10 倍濃度的 HBSS，混合均勻，以恢復溶液張力，此步驟可除去紅血球。離心 (200 × g，10 分鐘)後丟棄上清液，加入 5 毫升的培養液 (1% BSA-Medium 199)，充分混合後即可得到睪丸間質細胞 (testicular interstitial cells, TIC)懸浮液。如此製備的睪丸間質細胞懸浮液可得到純度約 20% 的萊氏細胞 (Tsai et al., 1996)。

將睪丸間質細胞懸浮液緩慢的加入內含 percoll 的高速離心管中，使細胞懸浮液層位於 percoll 培養液層上方，兩者間有清楚的介面。percoll 培養液是將 percoll (Pharmacia, Turku, Finland)與培養液 (1% BSA-Medium 199)以 9：11 的比例混合均勻，調整 pH 值至 7.3-7.4，取 20 毫升置於超高速離心管 (Nalge Company, Rochester, NY, USA)中離心 (L-90K, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA; Rotor:SW-28, 2000 × g, 60 分鐘, 4°C)。離心後的 percoll 培養液，成為比重從上往下遞增的連續濃度梯度溶液。將細胞懸浮液小心加入後再離心 (400 × g, RC-5B, Du Pont, Newtown, CT, USA)，即可將各群細胞依濃度密度分離，而萊氏細胞則位於超高速離心管底層往上約 3-5 毫升處。以吸管吸掉不需要的細胞層，保留萊氏細胞層，利用 1 % BSA-Medium 199 培養液清洗細胞 (200 × g，10 分鐘)，丟棄上清液，避免 percoll 殘留傷害細胞，這樣即可獲得高純度的萊氏細胞。依上述方法製備的萊氏細胞純度可達 90% 以上(Chiao et al., 2002)。之後使用血球計數器 (hemacytometer)計算細胞數。隨後將細胞配成每毫升有 2×10^5 細胞之溶液，取 0.5 毫升於塑膠試管中，

即將分離得到之萊氏細胞(1×10^5 cells/tube)放置於 34°C 水浴槽中，並充以 95 % 氧氣及 5% 二氧化碳之混合氣進行基礎培養，以進行實驗。

(五)結果與討論

實驗結果發現，一般大鼠萊氏細胞培養於薯蕷皂甘素一個小時，在高劑量的處理情況下，有助於萊氏細胞分泌睪固酮素的分泌(圖一)；然而在萊氏細胞上 LH 接受器及 StAR 的蛋白表現，給予薯蕷皂甘素後，沒有顯著的差異(圖二)。在 D-galactose 大鼠的部分，老化大鼠睪固酮分泌量較一般大鼠低，而在餵食 10 或 50 mg/kg/day 8 週後，發現沒有顯著的回復情況(圖三)，此結果與主題一實驗結果相比較，推測薯蕷皂甘素對於萊氏細胞有不同的成效，需在之後利用相同品系大鼠及相同處理方式觀察。另外，老化大鼠精子活動力相較於一般大鼠低，在經由餵食薯蕷皂甘素後，精子活動力有顯著性改善(圖四)；此外，CD31 為血管內皮細胞的標示蛋白，老化大鼠陰莖的 CD31 蛋白相較於一般大鼠表現量低，經由高劑量薯蕷皂甘素餵食後，CD31 表現量有回復的現象(圖五)，另外，alpha-actin 為平滑肌的標示蛋白，alpha-actin 表現量在老化大鼠及一般大鼠之間，沒有顯著的差異(圖五)。在 OXYS 大鼠部分，老化大鼠曲細精管細胞凋亡情況較一般大鼠嚴重，在經由薯蕷皂甘素處理之後，細胞凋亡情況有顯著性的降低(圖六)，另外，在陰莖蛋白表現，老化大鼠 CD31 的表現量較一般大鼠低，但是經由薯蕷皂甘素處理之後沒有顯著性的改善(圖七)，而 alpha-actin 的表現量在一般大鼠及老化大鼠間沒有明顯差異(圖七)。此外，前列腺的重量，背側及腹側的重量沒有明顯變化，而旁側的部分在經由薯蕷皂甘素處理後，重量有明顯的降低(圖八)。

這些結果顯示，萊氏細胞給予高劑量薯蕷皂甘素，會增加睪固酮的分泌，而精子的形成取決於睪固酮的作用 (Sharpe., 1988)，老化會造成男性精細胞死亡 (Samanta and Chainy, 1997)、精子減少、精子活動力下降 (Hsu et al., 1997; Marchlewicz et al., 2007)，實驗給予老化大鼠薯蕷皂甘素處理後，能夠回復精子活動力、減少曲細精管細胞凋亡。此外，文獻中顯示，氧化低脂蛋白 (oxLDL)、促發炎因子以及活性氧化物質會誘導內皮細胞的死亡 (Dimmeler et al., 1997)，研究發現老化大鼠 CD31 表現量低於一般大鼠。再者，文獻中提及，過度分泌泌乳素可能伴隨著男性性腺功能降低和陽萎，這些過量的泌乳素可作用在中樞神經系統來控制促性腺素分泌以及性行為 (De Rosa., 2003)，在高泌乳症的病患中發現，前列腺旁側的重量會增加，而背側及腹側則沒有變化 (Fabien, 2001)，本實驗結果顯示，老化雄性大鼠的前列腺旁側重量也有增加的現象。

(六) 參考文獻

1. Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 81: 459-469, 1987.
2. Beckman JK, Coniglio JG. A comparative study of the lipid composition of isolated rat sertoli and germ cells. *Lipids* 14: 262-267, 1979.
3. Cui AL, Zhao L, Li LM, Qiao JT, Zhang C, Sheng Li. Recent progress in neuroprotection of humanin against Alzheimer's disease-relevant neurotoxicity. *Ke Xue Jin Zhan* 37: 302-306, 2006.
4. Chiao YC, Cho WL, Wang PS. Inhibition of testosterone production by propylthiouracil in rat Leydig cells. *Biol. Reprod* 67: 416-422, 2002.
5. Cudicini C, Lejeune H, Gomez E, Bosmans E, Ballet F, Saez J, Jegou B. Human Leydig cells and Sertoli cells are producers of interleukins-1 and -6. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 1426-1433, 1997.
6. De Rosa M, Zarrilli S, Di Sarno A, Milano N, Gaccione M, Boggia B, Lombardi G, Colao A. Hyperprolactinemia in men: clinical and biochemical features and response to treatment. *Endocrine* 20: 75-82, 2003.
7. Dimmeler S, Haendeler J, Galle J, Zeiher AM. Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases: a mechanistic clue to the response to injury hypothesis. *Circulation* 95: 1760-1763, 1997.
8. Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ Res* 81: 970-976, 1997.
9. Fridovich I. Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 247: 1-11, 1986.
10. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47: 412-426, 1982.
11. Hsu PC, Liu MY, Hsu CC, Chen LY, Guo YL. Lead exposure causes generation of reactive oxygen species and functional impairment in rat sperm. *Toxicology* 122: 133-143, 1997.
12. Hardin BD, Niemeier RW, Sikov MR, Hackett PL. Reproductive-toxicologic assessment of the epoxides ethylene oxide, propylene oxide, butylene oxide, and styrene oxide. *Scand J Work Environ Health* 9: 94-102, 1983.
13. Ho SC, Liu JH, Wu RY. Establishment of the mimetic aging effect in mice caused by D-galactose. *Biogerontology* 4: 15-18, 2003.

14. Hsieh HM, Wu WM, Hu ML. Soy isoflavones attenuate oxidative stress and improve parameters related to aging and Alzheimer's disease in C57BL/6J mice treated with D-galactose. *Food Chem Toxicol* 47: 625-632, 2009.
15. Huang WJ, Yeh JY, Kan SF, Chang LS, Wang PS. Effects of hyperprolactinemia on testosterone production in rat Leydig cells. *J Cell Biochem* 80: 313-320, 2001.
16. Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril* 57: 409-416, 1992.
17. Kolosova NG, Shcheglova TV, Amstislavskaya TG, Loskutova LV. Comparative analysis of LPO products in brain structures of Wistar and OXYS rats of different age. *Bull Exp Biol Med* 135: 593-596, 2003.
18. Kolosova NG, Aidagulova SV, Nepomnyashchikh GI, Shabalina IG, Shalbueva NI. Dynamics of structural and functional changes in hepatocyte mitochondria of senescence-accelerated OXYS rats. *Bull Exp Biol Med* 132: 814-819, 2001.
19. McCord JM, Fridovich I. Superoxide Dismutase: The First Twenty Years (1968-1988). *Free Radic Biol Med* 5: 363-369, 1988.
20. Marchlewicz M, Wiszniewska B, Gonet B, Baranowska-Bosiacka I, Safranow K, Kolasa A, Gębowski W, Kurzawa R, Jakubowska K, Ra ME. Increased lipid peroxidation and ascorbic Acid utilization in testis and epididymis of rats chronically exposed to lead. *Biometals* 20: 13-19, 2007.
21. Marsili S, Salganik RI, Albright CD, Freel CD, Johnsen S, Peiffer RL, Costello MJ. Cataract formation in a strain of rats selected for high oxidative stress. *Exp Eye Res* 79: 595-612, 2004.
22. Marker RE, Krueger J. Sterols. CXII. Sapogenins. XLI. The Preparation of Trillin and its Conversion to Progesterone. *J Am Chem. Soc* 62: 3349-3350, 1940.
23. Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarotto E. Oxidative stress and cell signalling. *Curr Med Chem* 11: 1163-1182, 2004.
24. Sikka SC, Rajasekaran M, Hellstrom WJ. Role of oxidative stress and antioxidant in male infertility. *J Androl* 16: 464-468, 1995.
25. Samanta L, Chainy GB. Comparison of hexachlorocyclohexane-induced oxidative stress in the testis of immature and adult rats. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 118: 319-327, 1997.
26. Shabalina IG, Kolosova NG, Grishanova AIu, Solov'ev VN, Salganik RI, Solov'eva NA. Oxidative phosphorylation activity, F₀F₁-ATPase and level of liver mitochondrial cytochromes in rats with congenitally increased ability for free radical formation. *Biokhimiia* 60: 2045-2052, 1995.

27. Sharpe RM, Donachie K & Cooper I. Re-evaluation of the intratesticular level of testosterone required for quantitative maintenance of spermatogenesis in the rat. *J Endocrinol* 117: 19-26, 1988.
28. Tsai CC, Collins SH, Swanger SJ. Ovarian Sertoli-Leydig cell tumor in an amenorrheic hirsute patient. *Changgeng Yi Xue Za Zhi* 19: 191-195, 1996.
29. Zhang Q, Li X, Cui X, Zuo P. D-Galactose injured neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *Neurol Res* 27: 552-556, 2005.
30. 呂廷璋. Development of simultaneous methods for diosgenin and phytosterols analysis in yam. 臺灣大學：食品科技研究所(2005)
31. 隋佳菱. High-dose 17 β -estradiol induces cellular apoptosis through modulating the expression of KLF10 in mammalian testicular cells. 成功大學：生命科學系碩博士班(2000)
32. 吳逸舒. Protection of photo-aged skin by nano/submicron yam peel. 臺灣大學：食品科技研究所學位論文(2011)

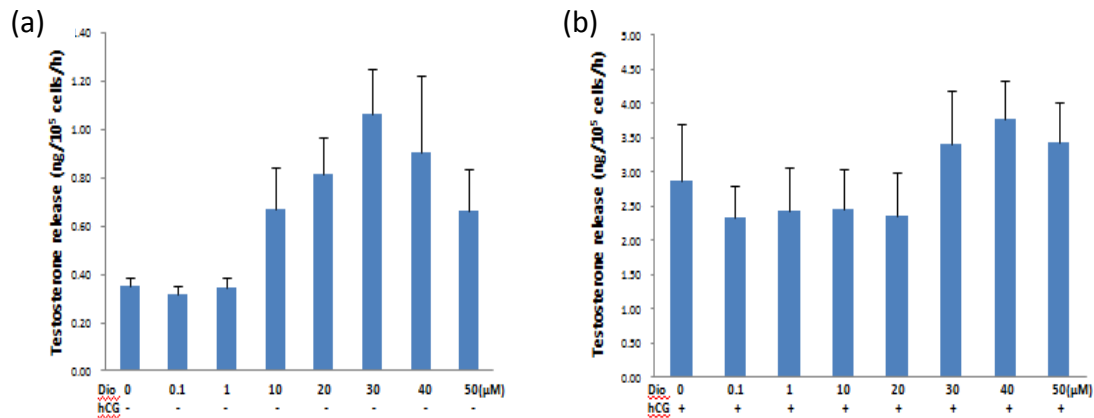
(七) 研究成果發表資料

Lin MY, Ho YJ, Yu CH. Protective Effect of Male Reproductive Function in Aging Rat Models After Treatment of Diosgenin. Program and Abstract of the 29th Joint Annual Conference of Biomedical Science. Taipei, Taiwan, 15-16 Mar. (Poster Session, Program # 718).

(八) 附錄

主題一：

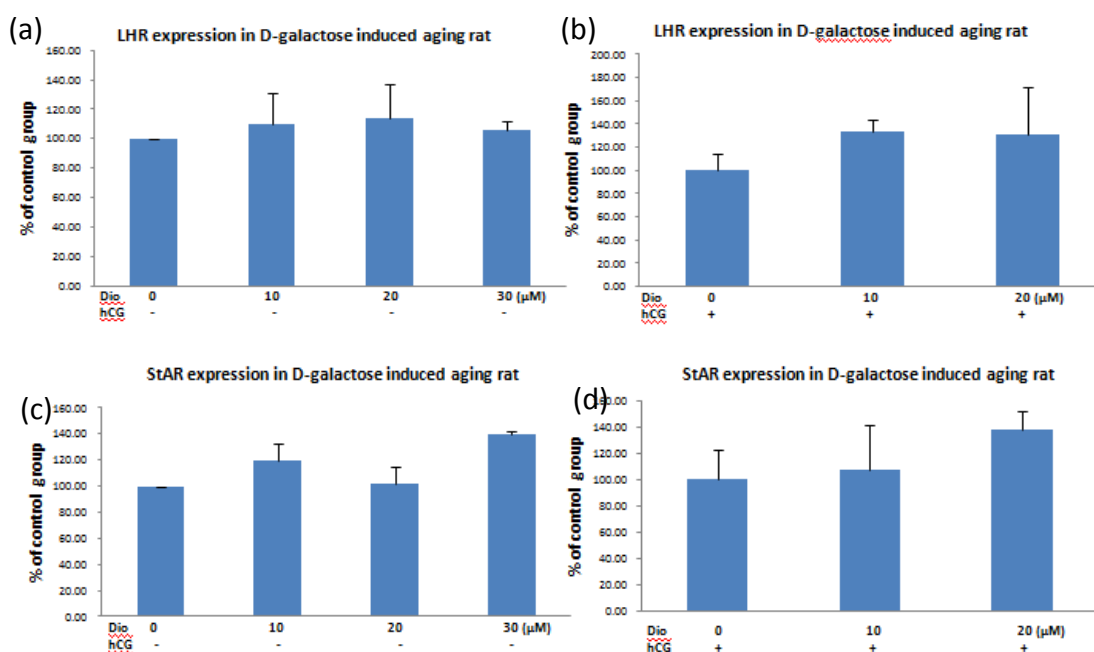
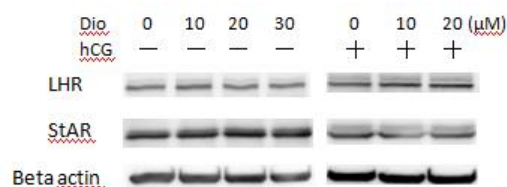
Testosterone release of leydig cells



(圖一) 薯蓣皂甘素對於一般大鼠萊氏細胞分泌睪固酮能力的影響

利用 EIA 測得睪固酮分泌濃度。此結果顯示，一般大鼠的萊氏細胞經由高濃度薯蓣皂甘素處理之後，萊氏細胞分泌睪固酮素濃度有上升的現象。另外，給予人絨性促素處理，提高萊氏細胞分泌睪固酮的能力，觀察薯蓣皂甘素處理萊氏細胞分泌睪固酮素的能力是否有抑制的影響，實驗發現薯蓣皂甘素沒有抑制萊氏細胞分泌睪固酮素的能力。(a)萊氏細胞給予薯蓣皂甘素濃度 0.1 到 50 μM，(b) 萊氏細胞給予人絨性促素以及薯蓣皂甘素濃度 0.1 到 50 μM。(圖表顯示 mean± SEM)

The Expressions of LH Receptor and StAR Protein in Rat Leydig Cells

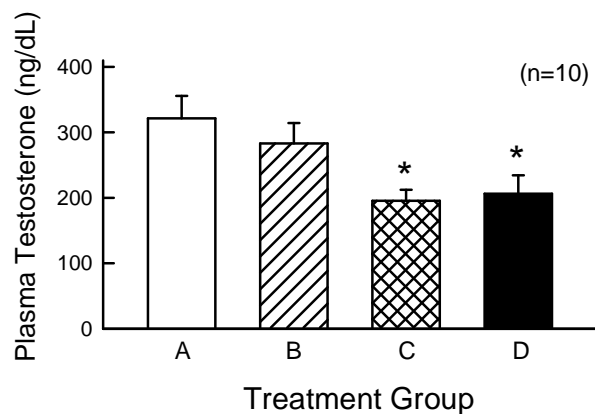


(圖二) 薯蓣皂甘素對於一般大鼠萊氏細胞蛋白表現的影響

圖表中顯示，一般大鼠萊氏細胞黃體激素接受器 (LH receptor) 以及類固醇急性調節蛋白 (StAR) 在接受薯蓣皂甘素處理後，與未處理的萊氏細胞之間沒有顯著的差異。(a) 萊氏細胞給予薯蓣皂甘素處理濃度 10 到 30 μ M，黃體激素接受器蛋白表現，(b) 萊氏細胞給予給予人絨性促素以及薯蓣皂甘素處理濃度 10 到 20 μ M，黃體激素接受器蛋白表現，(c) 萊氏細胞給予薯蓣皂甘素處理濃度 10 到 30 μ M，類固醇急性調節蛋白表現，(d) 萊氏細胞給予人絨性促素以及薯蓣皂甘素處理濃度 10 到 20 μ M，類固醇急性調節蛋白表現。(圖表顯示 mean \pm SEM)

主題二：

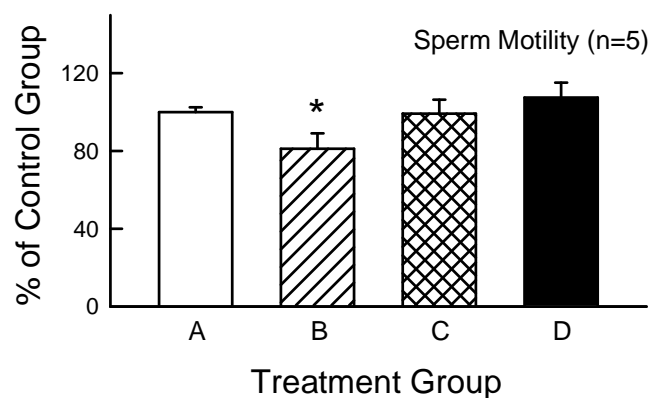
Plasma testosterone



(圖三) 薯蕷皂甘素對於老化大鼠分泌睪固酮能力的影響

觀察睪固酮的實驗中發現，老化大鼠的血漿中睪固酮濃度確實有下降的趨勢再經由薯蕷皂甘素處理過後，睪固酮並沒有回升的傾向。(A)一般大鼠，(B) D-galactose 誘導老化大鼠，(C) D-galactose 誘導老化大鼠給予薯蕷皂甘素 10 mg/kg/day 8 週，(D) D-galactose 誘導老化大鼠給予薯蕷皂甘素 50 mg/kg/day 8 週。(圖表顯示 mean±SEM)

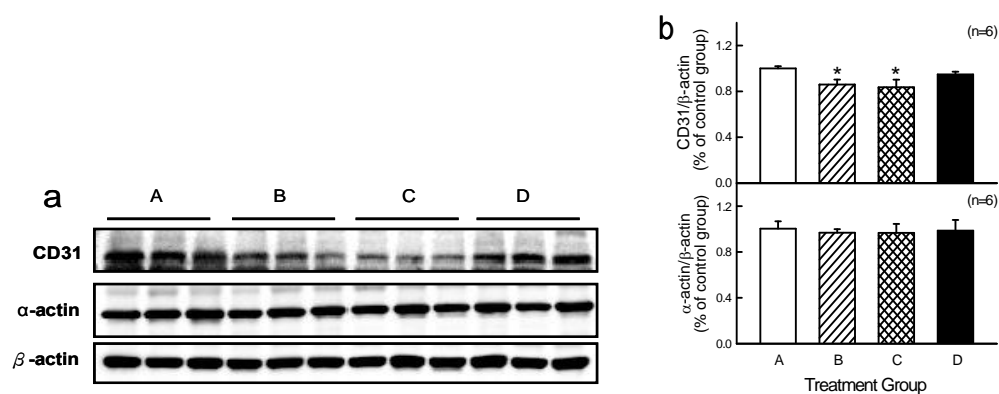
Sperm Motility



(圖四) 薯蕷皂甘素對於老化大鼠精子活動力的影響

老化大鼠的精子活動力確實有下降的趨勢再經由薯蕷皂甘素處理過後，精子活動力有明顯回復的情況。(A)一般大鼠，(B) D-galactose 誘導老化大鼠，(C) D-galactose 誘導老化大鼠給予薯蕷皂甘素 10 mg/kg/day 8 週，(D) D-galactose 誘導老化大鼠給予薯蕷皂甘素 50 mg/kg/day 8 週。(圖表顯示 mean±SEM)

The Expressions of CD31 and α -actin in Rat Penis

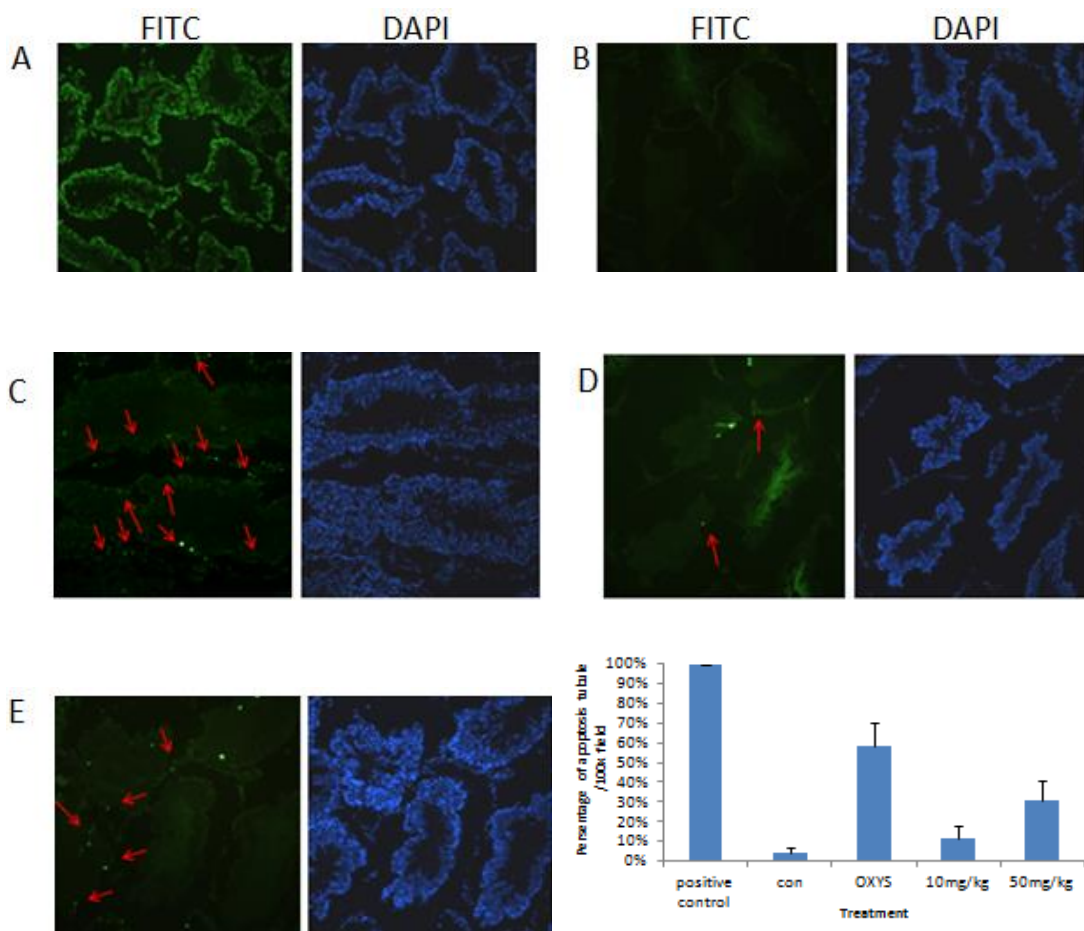


(圖五) 薯蓣皂甘素的處理，對於老化大鼠陰莖蛋白表現的影響

CD31 為血管內皮因子的標示蛋白，在圖表中得知，老化的大鼠 CD31 的量有減少的情況，而經由低濃度的薯蓣皂甘素處理後的老化大鼠，CD31 的量沒有顯著的回升，但是經由高濃度的薯蓣皂甘素處理後的老化大鼠，CD31 的量有回升的情況； α -actin 為平滑肌的標示蛋白，在圖表中得知， α -actin 在一般大鼠及老化大鼠之間沒有顯著性改變。(A)一般大鼠，(B) D-galactose 誘導老化大鼠，(C) D-galactose 誘導老化大鼠給予薯蓣皂甘素 10 mg/kg/day 8 週，(D) D-galactose 誘導老化大鼠給予薯蓣皂甘素 50 mg/kg/day 8 週。(圖表顯示 mean \pm SEM)

主題三：

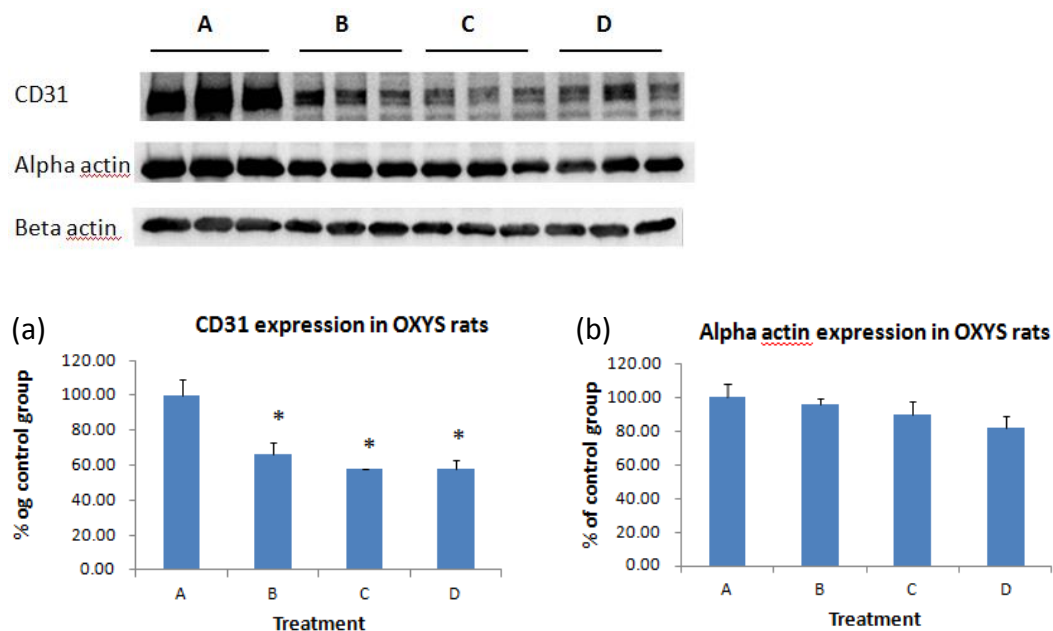
Apoptosis



(圖六) 薯蕷皂甘素的處理，對於老化大鼠曲細精管細胞凋亡的影響

利用 TUNEL 的方式觀察老化大鼠曲細精管細胞凋亡情況。FITC 與細胞核中的斷裂 DNA 結合發出綠色螢光；DAPI 染上細胞核，確認細胞核位置。圖表中顯示，老化大鼠曲細精管細胞凋亡的情況相較於一般大鼠嚴重，老化大鼠經由餵食薯蕷皂甘素後，曲細精管細胞凋亡情況明顯改善。(A)正控制組，加入 DNase 使細胞核中 DNA 斷裂，確認實驗過程中的準確性，(B)一般大鼠，(C) OXYS 大鼠，(D) OXY 大鼠給予薯蕷皂甘素 10 mg/kg/day 8 週，(E) OXYS 大鼠給予薯蕷皂甘素 50 mg/kg/day 8 週。(圖表顯示 mean±SEM)

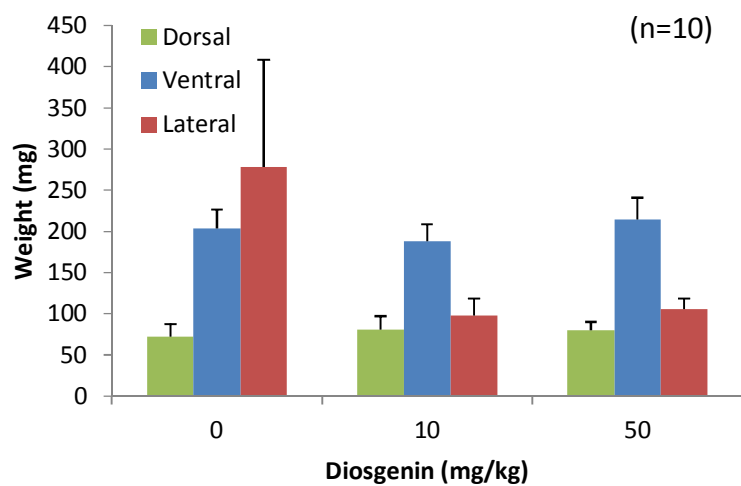
The Expressions of CD31 and α -actin in Rat Penis



(圖七) 薯蕷皂甘素的處理，對於老化大鼠陰莖蛋白表現的影響

CD31為血管內皮因子的標示蛋白，在圖表中得知，老化的大鼠CD31的量有減少的情況，而經由薯蕷皂甘素處理後的老化大鼠，CD31的量沒有顯著的回升；alpha-actin為平滑肌的標示蛋白，在圖表中得知，alpha-actin在一般大鼠及老化大鼠之間並無顯著性改變。(A)一般大鼠，(B) OXYS大鼠，(C) OXYS大鼠給予薯蕷皂甘素10 mg/kg/day 8週，(D) OXYS大鼠給予薯蕷皂甘素50 mg/kg/day 8週。(圖表顯示mean±SEM)

Weight of prostate



(圖八) 薯蕷皂甘素的處理，對於老化大鼠前列腺重量的影響

前人研究指出老化會造成前列腺增生，圖表中得知，老化大鼠餵食薯蕷皂甘素 10 和 50 mg/kg/day 8 週後，背側及腹側重量沒有顯著差異，然而，在旁側部份重量有顯著下降的情況。(圖表顯示 mean±SEM)