

科技部補助  
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫  
名 稱 : 薯蕷皂苷對於大鼠萊氏細胞功能與精子品質的影響

執行計畫學生：唐筱茜  
學生計畫編號：MOST 108-2813-C-040-051-B  
研究期間：108年07月01日至109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 109年04月06日

## I. 摘要

因應台灣近幾年的低生育率問題以及講求養生的飲食習慣，本計劃使用與生育相關的山藥活性成分薯蕷皂苷 (diosgenin) 作為主要研究材料。薯蕷皂苷已被證實能保護心血管、神經以及皮膚，更具有抗癌、抗糖尿病以及調節免疫等多種功效，而作為植物性雌激素的薯蕷皂苷對於男性生殖會帶來什麼影響便是本計劃所探討的主要問題。本計劃以大鼠做為實驗動物分成5組進行，包含控制組 (control)、正控制組 (estrogen, 0.1 µg/kg) 和薯蕷皂苷組 (25, 50 and 100 mg/kg)，並每日以管灌方式進行餵食10週，後續主要檢測項目包含：血清分析、生殖相關軸線激素分泌的能力、萊氏細胞合成睪固酮途徑中的蛋白表現以及精子品質的各項檢驗。結果顯示：薯蕷皂苷會使血清中睪固酮總量與游離態濃度下降，由於下視丘 (mediobasal hypothalamus, MBH) -腦下垂體 (anterior pituitary, AP) -性腺 (testis) 的負回饋減少而使促性腺激素釋放激素 (gonadotropin-releasing hormone, GnRH) 與黃體促素 (luteinizing hormone, LH) 濃度增加，但另一方面薯蕷皂苷藉由增加萊氏細胞合成睪固酮途徑中的酵素活性與重要蛋白 [例如黃體促素受器 (LH receptor, LHR) 和類固醇生成急性調控蛋白 (steroidogenic acute regulatory protein, StAR)] 表現量，反而提升初代培養的萊氏細胞獨立分泌睪固酮的能力；另外，薯蕷皂苷能增加精子總數並降低精子頂體的不完整度，但會使精子細胞膜的完整度下降。此研究計畫結果有助於了解薯蕷皂苷在激素分泌與精子功能上的作用成效，並可作為未來男性挑選保健食品的重要參考。

## II. 研究動機與研究問題

依照我國內政部戶政司統計，2018年台灣生育率為1.13，全球排名倒數第三，且近年來生育率逐年下降，其中不孕比例的大幅上升就是主要的原因，更有研究指出，在全球有40~50%的不孕症是由男性的不育與低生育力而導致[1]，因此，具有影響男性生育力的物質與相關機轉是現今重要的研究標的。

現代人們越來越講求養生，不但重視健康飲食，也提倡攝取保健食品，其中，山藥就是大家所熟知的營養食材，其主要活性成分也常被製成保健食品。但在服用山藥的同時也代表著攝取了額外的植物性雌激素，對於男性生育力而言，山藥中的植物性雌激素會給予正面幫助還是造成負面影響，便是本計劃將探討的主題。

### III. 文獻回顧與探討

本計劃使用之薯蕷皂苷 (diosgenin) 是一種植物性雌激素，可以從山藥 (yams)、葫蘆巴 (fenugreek) 和閉鞘姜 (Costus speciosus) 的萃取物中分離取得，也是山藥主要的活性成分[2]，在固醇類激素的製藥工業中是重要的天然素材，也是生產類固醇藥物的主要前驅原料，還可以做為奈米製劑[3]。已發表的文獻指出，薯蕷皂苷可藉由誘導細胞凋亡、抑制惡性轉移、減少氧化壓力、預防發炎反應、調節T 細胞免疫反應以及促進細胞分化來達到許多功效[2]，其中包括：抗癌[4]、調節脂質代謝[5]、調節免疫、抗糖尿病以及保護皮膚、神經與心血管等[2]。

在雌激素 (estrogen) 影響男性生殖系統的文獻中指出：雌激素掌控著許多組織的細胞生長、分化、增生以及凋亡，而對於睪丸細胞的調控則同時具有正面刺激與負面抑制的效果[6]。生殖細胞為雌激素的主要來源以及標的物，並被證實在發育、生殖功能以及生育能力中扮演著重要的角色[7, 8]。其中，雌激素接受器 (estrogen receptor, ESR) 的信號傳導對未成熟男性賽氏細胞 (Sertoli cell) 的功能及數量來說非常重要[9]，由於單一賽氏細胞能滋養的生殖細胞數量為30-50個[10]，因此賽氏細胞數量將限制睪丸製造精子的能力，並決定成熟男性的生育力[11]；除此之外，賽氏細胞會受到下視丘 (mediobasal hypothalamus, MBH) -腦下垂體 (anterior pituitary, AP) -性腺 (testis) 的激素分泌軸線刺激，合成具有負回饋調控濾泡刺激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) 功能以及與精子成熟和數量相關的抑制素 (inhibin-B, INH-B) [12]，同時濾泡刺激素與抑制素也是檢測男性性腺疾病與精子品質的重要檢測項目[12, 13]。另外，在萊氏細胞 (Leydig cell) 的發育時期，雌二醇 (estrodial) 的作用可誘導許多不同程度的變化[14]，且萊氏細胞為男性睪固酮 (testosterone, T) 的主要來源，與雄性素 (androgen) 的分泌和性成熟男性的生育能力有著重要的關係[15]。但在另一方面，雌激素與穿膜接受器 (GPR 30) 結合而導致的快速反應，能調控細胞週期蛋白 (cyclins) 與促細胞凋亡因子 (proapoptotic factors)，影響生殖細胞的週期進程以及凋亡作用[8]。而在薯蕷皂苷對男性生殖功能影響的文獻中指出，其擁有可激活steroid receptor coactivator (SRC) -ESR和extracellular regulated protein kinase (ERK) / protein kinase B (Akt) -ESR的轉錄活性、刺激ESR路徑和增加ESR調控基因表現，進而使賽氏細胞增生並抑制細胞凋亡，達到生殖細胞數目增殖的效果[16]。另外，

薯蕷皂苷已被證實具有活化雌激素路徑的效應，還可透過細胞膜上類固醇結合受器，來調控男性的生殖功能[17]。

整體而言，雌激素對於男性生殖功能不可或缺，否則賽氏細胞及萊氏細胞都將受到發展的限制，進而影響精子的生成與雄性素的分泌，導致男性不育；但雌激素的含量若過高，生殖細胞也可能因細胞週期的改變與促細胞凋亡因子的作用產生功能上的問題，包括提前導致細胞凋亡等風險。具有類似雌激素作用的薯蕷皂苷對男性生殖將帶來何種影響，便是本計劃設計實驗的重點。

#### IV. 研究方法及步驟

##### 1. 實驗動物與材料

本計劃採用Sprague Dawley (SD) 品系之大鼠為實驗動物，自樂斯科生物科技公司購入，依照動物保護法與藥品非臨床試驗規範進行照顧與實驗，並獲得中山醫學院大學實驗動物照護與使用委員會的審查同意 (編號2170)。實驗材料所用之薯蕷皂苷以及作為正控制組的雌激素皆購自Sigma (St. Louis, MO, USA)，用以檢測對於精子品質與萊氏細胞合成睪固酮能力的影響。

實驗所用20隻大鼠將隨機分為5組 [ control, estrogen (0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) and diosgenin (25, 50 and 100  $\text{mg}/\text{kg}$ ) ]，使用之劑量是參考過去研究中，薯蕷皂苷在活體動物中產生抗骨質疏鬆效應的有效劑量，也是服用保健食品可能達到的劑量[18]，利用管灌方式每天灌食一次持續10週，經二氧化碳進行動物犧牲後執行後續實驗。

##### 2. 血清數值分析檢測

本實驗於動物犧牲後收集血液，離心後收血清供後續檢測與睪固酮分泌相關之激素，包含：下視丘分泌之促性腺激素釋放激素 (gonadotropin-releasing hormone, GnRH)、腦下垂體分泌之黃體促素 (luteinizing hormone, LH) 與濾泡刺激素 (FSH)、睪丸分泌之抑制素 (INH-B) 與睪固酮以及血液中的游離態睪固酮 (free-testosterone, Free-TESTO) 等激素。

##### 3. 下視丘 - 腦下垂體 - 性腺獨力分泌能力檢測

本實驗於動物犧牲後取出下視丘、腦下垂體與兩側睪丸，下視丘與腦下垂體分別放入含0.5 c.c. G-PBS (phosphate buffered saline with 1% gelatin) 試管中，在

34°C水浴槽內搖晃反應1小時，隨後取出下視丘與腦下垂體培養、秤重並收集上清液供後續檢測GnRH、LH與FSH。睪丸於取出處理過後先進行萊氏細胞的分離與純化，所得之萊氏細胞將以basal（無加藥）與drug challenge [ human chorionic gonadotropin (hCG) 0.05 IU/ml、forskolin  $10^{-5}$  M、25-hydroxycholesterol (25-OHC)  $10^{-5}$  M ] 方式，在34°C水浴槽內搖晃反應1小時，隨後離心並分別收集上清液供後續檢測睪固酮[19]。

#### 4. 萊氏細胞之純化

實驗所檢測之萊氏細胞取自於大鼠睪丸，睪丸取出後需剝離鞘膜，置於含150  $\mu$ l collagenase (20 mg/ml) 的5 ml 1% bovine serum albumin-Hanks' balanced salt solution (BSA HBSS) 離心管中，在34°C水浴槽內搖晃反應30分鐘後（模擬細胞在人體的溫度），以冰浴10分鐘終止反應，過濾細精管後所得之溶液經由低張處理以去除紅血球，再利用Percoll gradient純化萊氏細胞[20, 21]。

#### 5. 萊氏細胞合成睪固酮之能力檢測與分析

萊氏細胞合成睪固酮途徑中的蛋白表現 [ 例如：黃體促素受器 (LH receptor, LHR) ，類固醇生成急性調控蛋白 (steroidogenic acute regulatory protein, StAR) ] 將以Western blot做檢測，並利用Image Quant TL做定量分析。而萊氏細胞所分泌的睪固酮濃度則由enzyme immunoassay (EIA) kit (Enzo, Farmingdale, NY, USA) 檢測，檢測方式參照手冊進行，最後以4 parameter logistic curve fitting program分析結果。

#### 6. 精子製備

實驗所檢測之精子取自於大鼠副睪與輸精管，取出的副睪與輸精管需置於生理鹽水中去除周圍脂肪以及剪切成小塊，並立即置於含有5 ml 室溫的1% BSA HBSS離心管裡，在34°C水浴槽內搖晃反應30分鐘（模擬細胞在人體的溫度），使精子從副睪與輸精管中游離出來，最後取出離心管中副睪與輸精管片段，並以同樣34°C的1% BSA HBSS做稀釋供後續檢測用。

#### 7. 精子檢測

##### (A) 精子數量檢測

本實驗使用相位差顯微鏡 (phase contrast microscope) 以400放大倍率做觀察

計算，利用配製於生理鹽水的0.4% trypan blue (Sigma) 做精子染色，每次取6.7  $\mu$ l 輸精管精子液利用iSperm (Aidmics Biotechnology, Taipei, ROC) 做檢測，分別計算上下左右四個視野，重複2次。

#### (B) 精子活動力檢測

本實驗使用iSperm做觀察計算，利用配製於生理鹽水的0.4% trypan blue (Sigma) 做精子染色，每次取6.7  $\mu$ l做檢測，分別計算上下左右四個視野，重複2次。

精子活動力將分為三個等級，分別為PR：可向前游動的精子、NP：可扭動但無法向前游動的精子，以及IM：不會扭動也無法向前游動的精子，並進一步計算精子活動力  $(PR + NP / \text{total sperm})$  [22]。

#### (C) 精子細胞膜完整度檢測

本實驗將副睪精子分別置於低張容液 (7.35 g sodium citrate. 2H<sub>2</sub>O + 13.51 g fructose mixed with 1 L distilled H<sub>2</sub>O) 中，在34°C水浴槽內搖晃反應45分鐘 (模擬細胞在人體的溫度)，隨後使用相位差顯微鏡以400放大倍率做計算。

細胞膜完整者尾部會腫脹而呈現蜷曲狀[23]，以此計算細胞膜完整的精子比例，每隻動物樣本至少計算200個精子，重複2次。

#### (D) 精子頂體完整度檢測

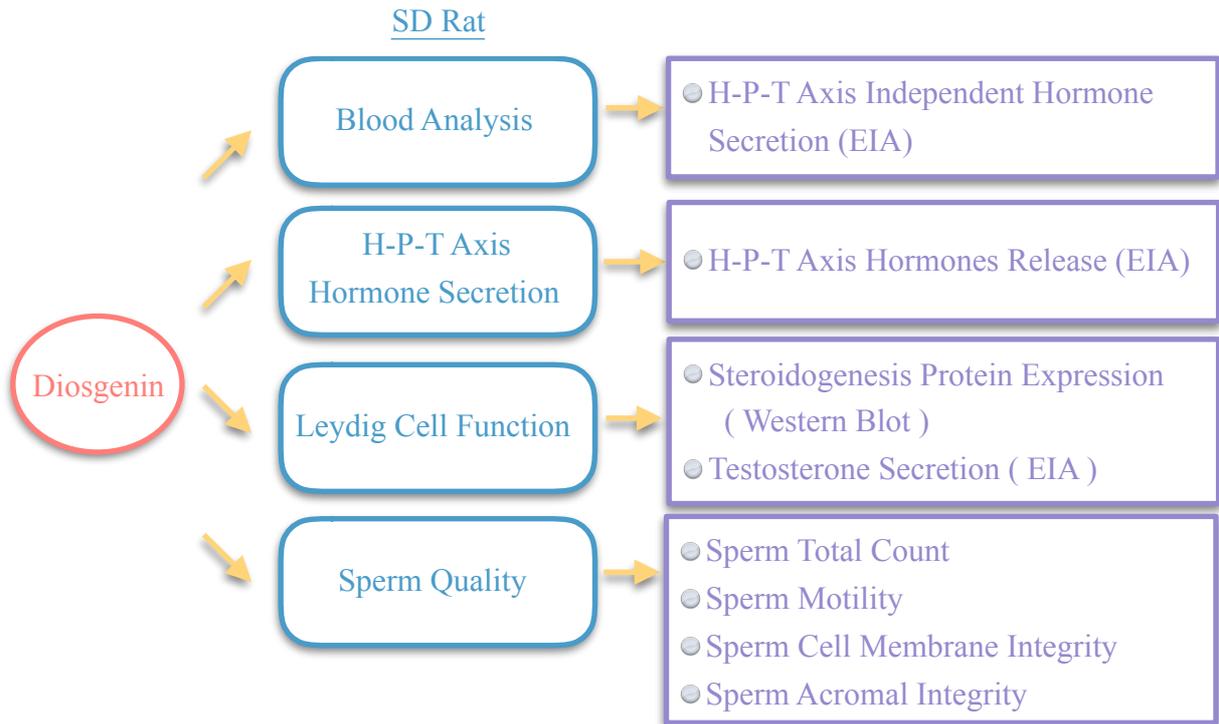
本實驗將附睪精子分別置於載玻片上刮平風乾，並以配製於生理鹽水的4% paraformaldehyde (Sigma) 固定15分鐘，隨後以PBS沖洗，再利用0.25% coomassie brilliant blue R-250 (Sigma) 與10% glacial acetic acid (Sigma) 和 25% methanol (Sigma) 配製做染色，染色後精子以水清洗，使用封片膠封片，再以正立螢光顯微鏡觀察計算。

精子頭部尖端內側與圓弧背測有被染色者屬於頂體完整之精子，以此計算頂體完整的精子比例[24]，每片計算200隻精子，重複2次。

### 8. 統計分析

本實驗所得之結果將以mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) 表示，並以單因子變異數分析法 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA) 中的事後比較檢定杜凱確實差異 (post-hoc Tukey Honestly Significant Difference, post-hoc Tukey HSD) 分析，檢測統計上的顯著差異 (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01)。

## 9. 實驗流程圖



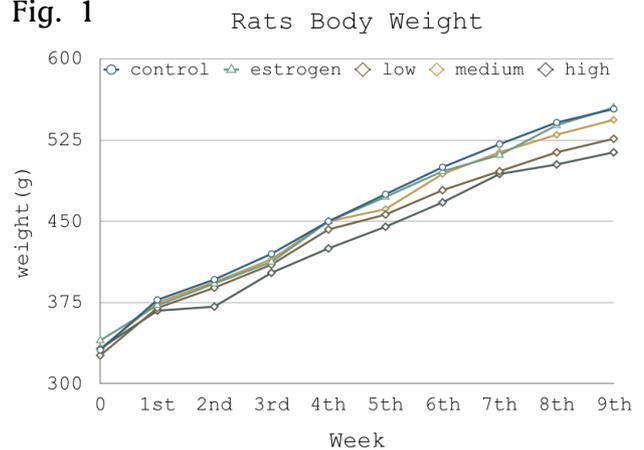
## V. 結果與討論

### 1. 大鼠體重追蹤

• Fig. 1 結果顯示：在飲食處理下，大鼠體重均隨時間增加而上升，其中薯蕷皂苷處理組體重較控制組來的低，又以高劑量組最為明顯，但無統計上的顯著差異。

Fig. 1 大鼠體重追蹤表。每週進行1次體重測量，橫軸為實驗週數，縱軸為體重克數。第0週為大鼠初始體重，飲食處理開始為第1週，並於第10週進行犧牲 (n=4)。

Fig. 1



\*推論：以往文獻曾指出薯蕷皂苷能減少大鼠肝臟中三酸甘油脂含量以及腹腔內臟的脂肪，並且明顯提升大鼠大腿肌肉的骨骼肌纖維直徑與面積[25]。由此可解釋餵食薯蕷皂苷，尤其在高劑量組別的大鼠體重較低並非不健康的瘦弱，而是藉由薯蕷皂苷減少其內臟脂肪的結果。

## 2. 大鼠血清分析

• Fig. 2A 結果顯示：大鼠血液中下視丘分泌之促性腺釋放激素 (GnRH) 在雌激素與薯蕷皂苷的長期處理下，濃度與控制組相比均有增加的趨勢，並在中劑量組有統計上的顯著差異。

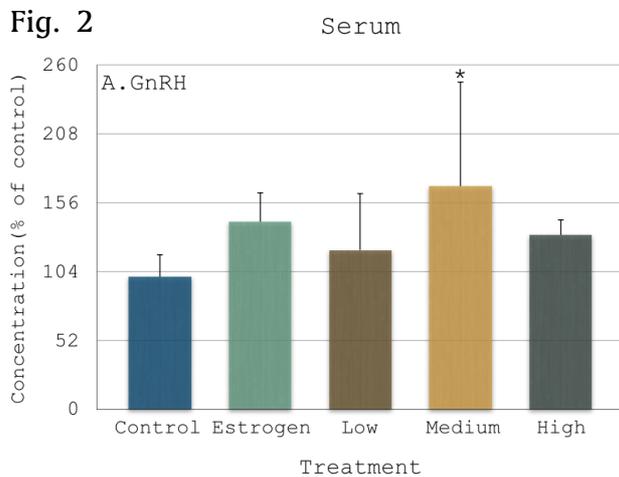
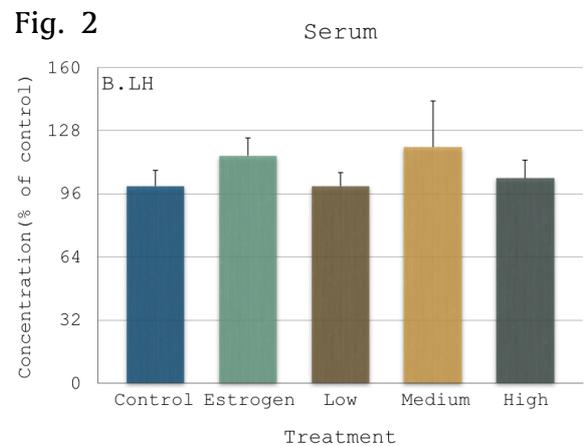


Fig. 2A 大鼠血清分析之GnRH濃度。橫軸為處理方式，縱軸為與控制組相比之濃度百分比。圖表呈現mean + SEM，統計分析採用one-way ANOVA中post-hoc Tukey HSD test，\* $p < 0.05$  (n=4)。

• Fig. 2B 結果顯示：大鼠血液中腦下垂體分泌之黃體促素 (LH) 在雌激素與薯蕷皂苷的長期處理下，濃度與控制組相比雌激素組與薯蕷皂苷中劑量組有增加的趨勢，但無統計上的顯著差異。

Fig. 2B 大鼠血清分析之LH濃度。橫軸為處理方式，縱軸為與控制組相比之濃度百分比。圖表呈現mean + SEM，統計分析採用one-way ANOVA中post-hoc Tukey HSD test (n=4)。



• Fig. 2C 結果顯示：大鼠血液中腦下垂體分泌之濾泡刺激素 (FSH) 在所有組別均無明顯的增加或減少，統計上也無顯著差異。

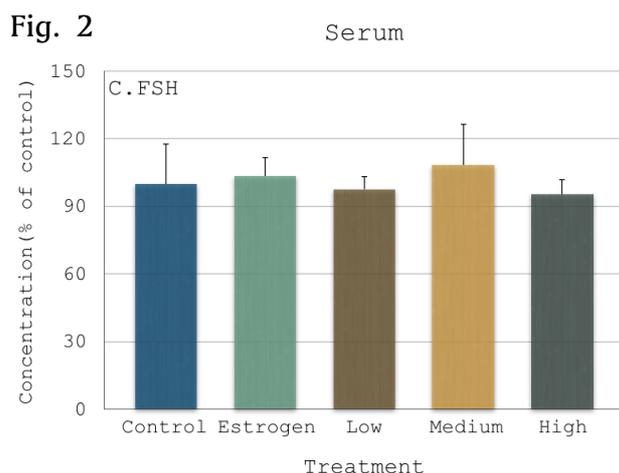
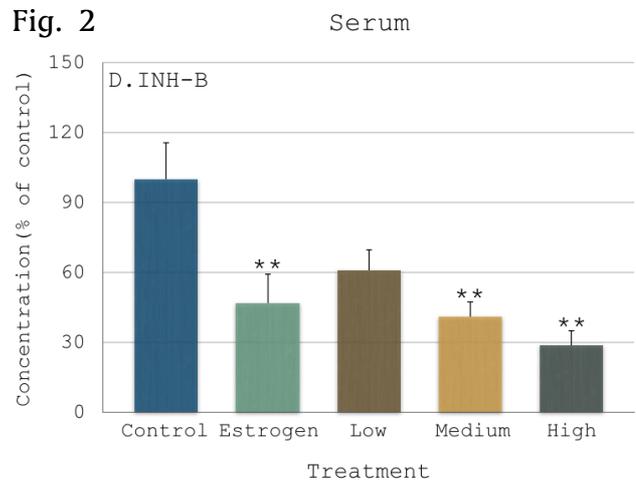


Fig. 2C 大鼠血清分析之FSH濃度。橫軸為處理方式，縱軸為與控制組相比之濃度百分比。圖表呈現mean + SEM，統計分析採用one-way ANOVA中post-hoc Tukey HSD test (n=4)。

• Fig. 2D 結果顯示：大鼠血液中睪丸裡賽氏細胞分泌之抑制素 (INH-B) 在雌激素與薯蕷皂苷的長期處理下，濃度與控制組相比均有下降的趨勢，且除了低劑量組，其他組別都有統計上的顯著差異。

Fig. 2D 大鼠血清分析之INH-B濃度。橫軸為處理方式，縱軸為與控制組相比之濃度百分比。圖表呈現mean + SEM，統計分析採用one-way ANOVA中post-hoc Tukey HSD test，\*\*p < 0.01 (n=4)。



• Fig. 2E 結果顯示：大鼠血液中睪丸分泌之睪固酮游離態 (Free-TESTO) 在雌激素與薯蕷皂苷的長期處理下，濃度與控制組相比均有明顯下降的趨勢，並在雌激素組有統計上的顯著差異。

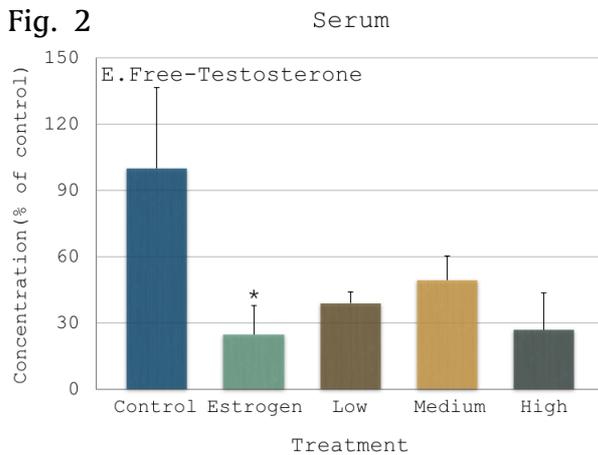
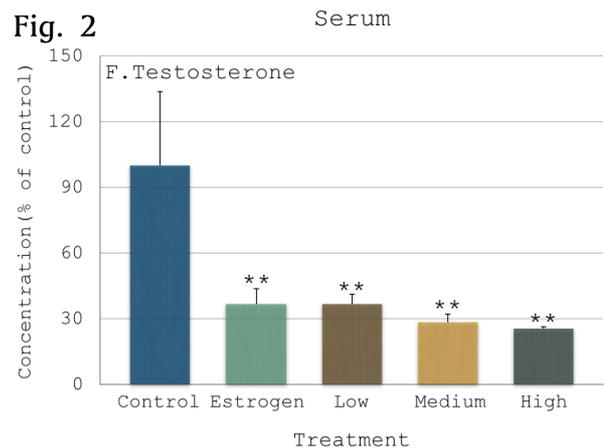


Fig. 2E 大鼠血清分析之Free-TESTO濃度。橫軸為處理方式，縱軸為與控制組相比之濃度百分比。圖表呈現mean + SEM，統計分析採用one-way ANOVA中 post-hoc Tukey HSD test，\*p < 0.05 (n=4)。

• Fig. 2F 結果顯示：大鼠血液中睪丸分泌之睪固酮 (T) 在雌激素與薯蕷皂苷的長期處理下，濃度與控制組相比均有明顯下降的趨勢，且所有組別均有統計上的顯著差異。

Fig. 2F 大鼠血清分析之T濃度。橫軸為處理方式，縱軸為與控制組相比之濃度百分比。圖表呈現mean + SEM，統計分析採用one-way ANOVA中post-hoc Tukey HSD test，\*\*p < 0.01 (n=4)。



\*推論：從大鼠下視丘 (GnRH) - 腦下垂體 (LH/FSH) - 性腺 (T/Free-TESTO/INH-B) 的軸線激素分泌來看，雌激素與薯蕷皂苷會降低血清中T，Free-TESTO與INH-B的濃度，睪丸分泌的低濃度激素使得負回饋抑制調控受限，血清中GnRH與LH濃度便因而增加。另外，在有關睪固酮的文獻中曾說到：口服雌激素會增加肝臟合成sex hormone-binding globulin (SHBG) [26]，而SHBG的增加會使游離態的睪固酮濃度下降[27]；因此結果中血清游離態的睪固酮濃度受到雌激素與薯蕷皂苷影響明顯下降，應是經由SHBG的增加而導致的結果。

### 3. 下視丘 - 腦下垂體 - 性腺獨力分泌能力

• Fig. 3A 結果顯示：大鼠在長期處理雌激素與薯蕷皂苷下，取出下視丘 (MBH) 培養1小時後，單獨分泌GnRH的能力與控制組相比可以看出有上升的趨勢，但無統計上的顯著差異。

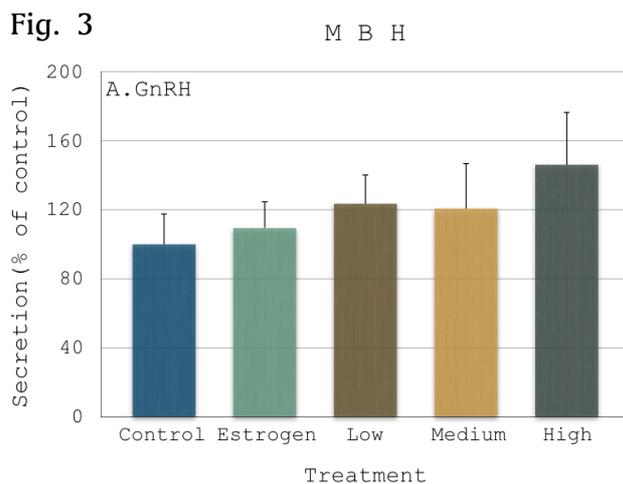


Fig. 3A 大鼠下視丘獨立分泌GnRH之能力。橫軸為處理方式，縱軸為與控制組相比之分泌量百分比。圖表呈現mean + SEM，統計分析採用one-way ANOVA中 post-hoc Tukey HSD test (n=4)。

• Fig. 3B 結果顯示：大鼠在長期處理雌激素與薯蕷皂苷下，取出腦下垂體 (AP) 培養1小時後，單獨分泌LH的能力與控制組相比，薯蕷皂苷低劑量組有較為明顯的增加，其他組別則無太大差異，並都無統計上的顯著差異。

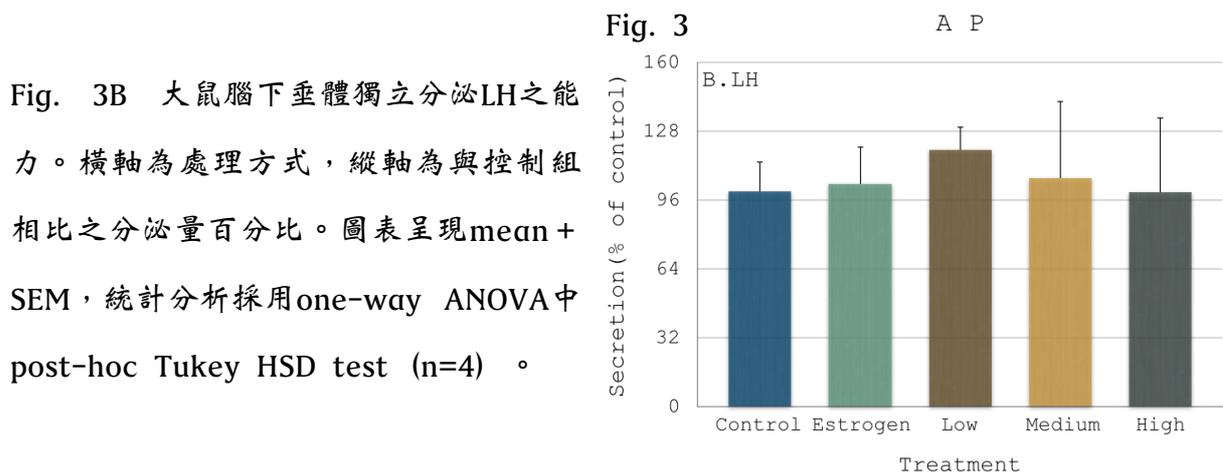
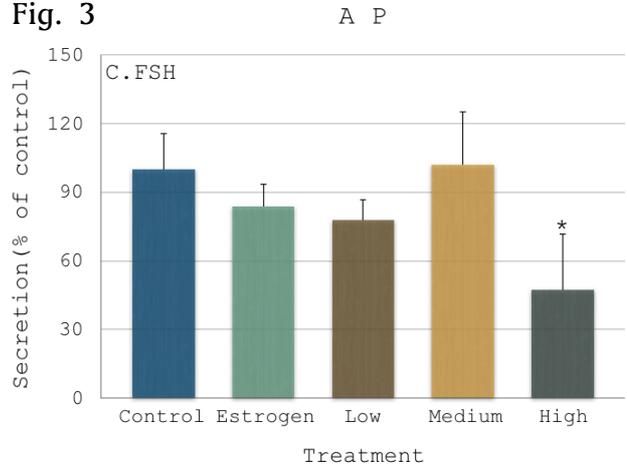


Fig. 3B 大鼠腦下垂體獨立分泌LH之能力。橫軸為處理方式，縱軸為與控制組相比之分泌量百分比。圖表呈現mean + SEM，統計分析採用one-way ANOVA中 post-hoc Tukey HSD test (n=4)。

• Fig. 3C 結果顯示：大鼠在長期處理雌激素與薯蕷皂苷下，取出腦下垂體培養1小時後，單獨分泌FSH的能力與控制組相比，除了中劑量組，其他組別均較控制組低，且高劑量組有統計上的顯著差異。

Fig. 3C 大鼠腦下垂體獨立分泌FSH之能力。橫軸為處理方式，縱軸為與控制組相比之分泌量百分比。圖表呈現mean + SEM，統計分析採用one-way ANOVA 中post-hoc Tukey HSD test, \*p<0.05 (n=4)。

Fig. 3



• Fig. 3D 結果顯示：大鼠在長期處理雌激素與薯蕷皂苷下，純化出的萊氏細胞以basal (無加藥) 與drug challenge (hCG 0.05 IU/ml, forskolin  $10^{-5}$  M, 25-OHC  $10^{-5}$  M) 培養1小時後，從縱軸的刻度便可看出在經過各種加藥的刺激，萊氏細胞單獨分泌睪固酮的能力都被提升許多，其中又以給予睪固酮合成前驅物25-OHC的組別最為明顯；此外，藉由hCG與25-OHC衝高睪固酮濃度後，可從圖中看出雌激素組與低劑量組比起控制組，對於萊氏細胞合成睪固酮的能力是有抑制效果的，但抑制的程度能被中高劑量的薯蕷皂苷回復甚至轉為提升。

Fig. 3

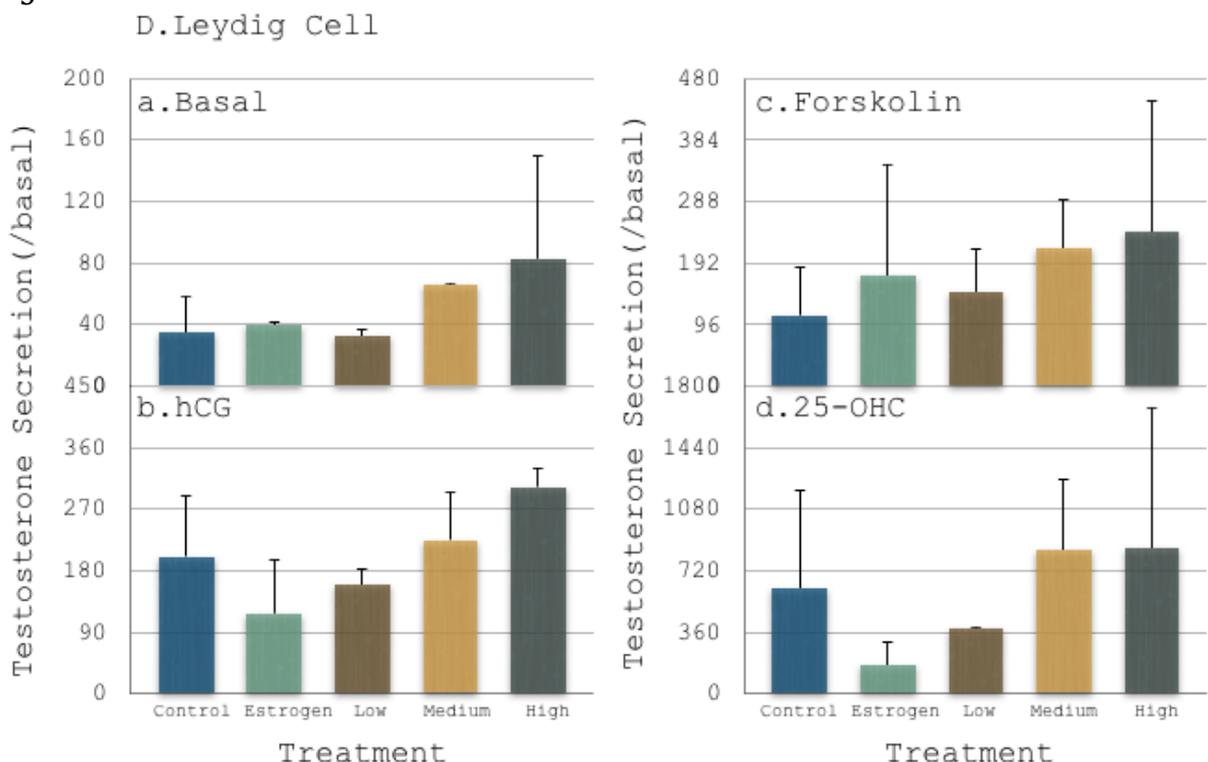
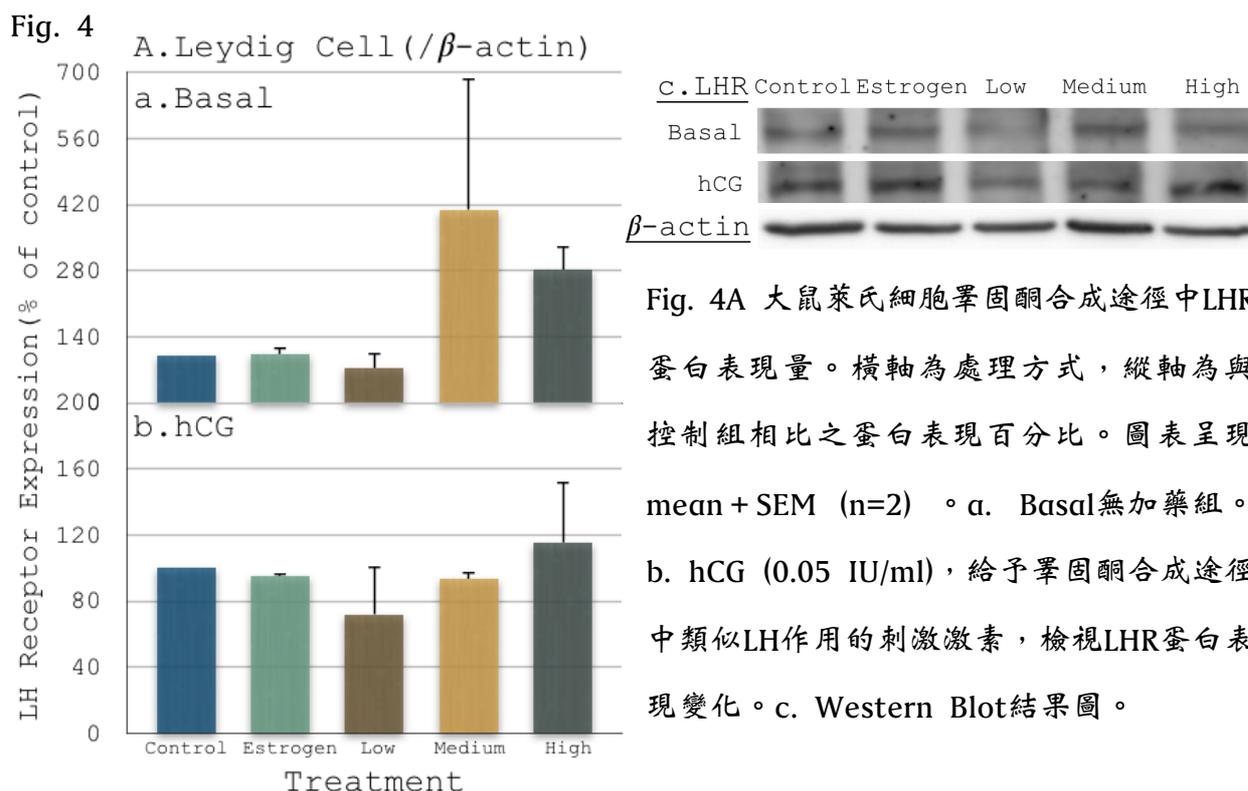


Fig. 3C 大鼠萊氏細胞獨立分泌睪固酮之能力。橫軸為處理方式，縱軸為與basal（無加藥）相除之睪固酮分泌量，圖表呈現mean + SEM (n=2)。a. Basal無加藥組。b. hCG (0.05 IU/ml)，給予睪固酮合成途徑中類似LH作用的刺激激素，檢視其下游變化。c. Forskolin ( $10^{-5}$  M)，給予可活化酵素adenylyl cyclase，增加睪固酮合成途徑中活化protein kinase A (PKA) 的重要二級傳訊者cAMP水平，檢視其下游變化。d. 25-OHC ( $10^{-5}$  M)，給予不需運輸蛋白 (StAR) 協助，便可自行進入萊氏細胞粒線體，進行睪固酮合成的前驅物，檢視其下游變化。

\*推論：在大鼠萊氏細胞獨立分泌睪固酮能力的結果中，薯蕷皂苷中高劑量組在所有加藥處理下均可維持甚至增加睪固酮的分泌量，而藉由不同加藥反應出合成途徑不同區段的變化，可推論中高劑量的薯蕷皂苷可能經由增加途徑中LH下游、cAMP下游以及粒線體內的酵素活性，達到回復以及提升睪固酮分泌的能力。

#### 4. 萊氏細胞合成睪固酮途徑中的蛋白表現

• Fig. 4A 結果顯示：大鼠萊氏細胞內睪固酮合成途徑中的重要蛋白LH Receptor (LHR)，經過長期雌激素與薯蕷皂苷處理後，在basal（無加藥）狀態下，低劑量組有些微抑制蛋白表現的結果，且經過hCG刺激拉高蛋白表現量後更為明顯，但抑制的程度能被中高劑量的薯蕷皂苷回復甚至提升。



• Fig. 4B 結果顯示：大鼠萊氏細胞內睪固酮合成途徑中的關鍵蛋白StAR，經過長期雌激素與薯蕷皂苷處理後，薯蕷皂苷處理組在所有加藥狀態下均可提升StAR的蛋白表現量，從Western Blot的結果圖也可明顯看到薯蕷皂苷處理組的蛋白量都較控制組與雌激素組來的多；另外，雌激素組在經過hCG刺激拉高蛋白表現量後，也可看出有抑制StAR蛋白表現的效果。

Fig. 4

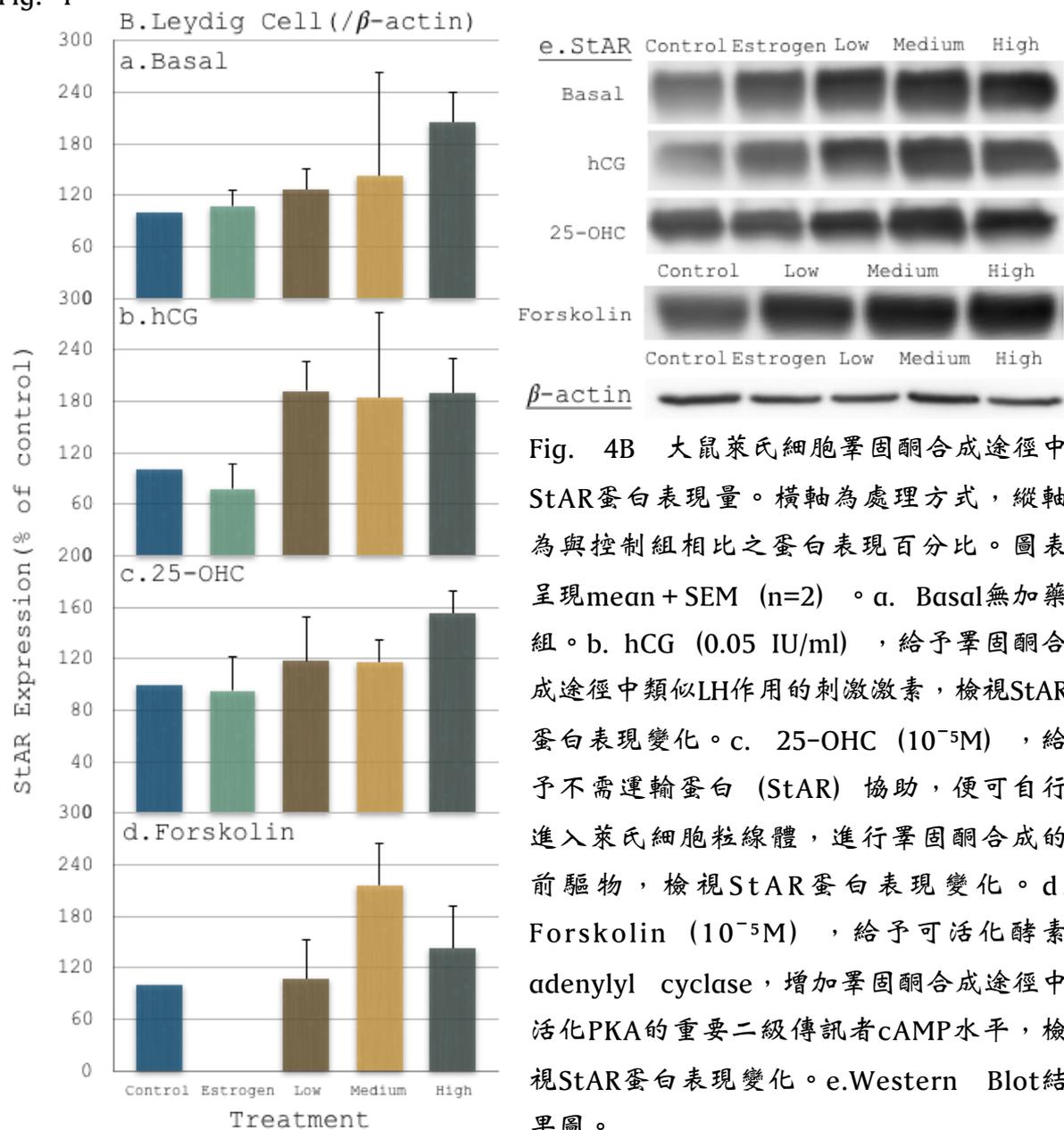


Fig. 4B 大鼠萊氏細胞睪固酮合成途徑中StAR蛋白表現量。橫軸為處理方式，縱軸為與控制組相比之蛋白表現百分比。圖表呈現mean + SEM (n=2)。a. Basal無加藥組。b. hCG (0.05 IU/ml)，給予睪固酮合成途徑中類似LH作用的刺激激素，檢視StAR蛋白表現變化。c. 25-OHC ( $10^{-5}$ M)，給予不需運輸蛋白 (StAR) 協助，便可自行進入萊氏細胞粒線體，進行睪固酮合成的前驅物，檢視StAR蛋白表現變化。d. Forskolin ( $10^{-5}$ M)，給予可活化酵素adenylyl cyclase，增加睪固酮合成途徑中活化PKA的重要二級傳訊者cAMP水平，檢視StAR蛋白表現變化。e. Western Blot結果圖。

\*推論：從大鼠萊氏細胞合成睪固酮途徑中的蛋白表現檢測結果中，我們得知低劑量的薯蕷皂苷會對LHR蛋白表現造成抑制的效果，但中高劑量的薯蕷皂苷可以改善抑制，甚至轉而提升其表現量。而薯蕷皂苷對於合成睪固酮途徑中的關鍵蛋白StAR，則是可以帶來正面的效果，且經過不同加藥處理可看出其提升效果依然顯著。

## 5. 大鼠精子品質

• Fig. 5A 結果顯示：大鼠經過長期雌激素與薯蕷皂苷處理後，薯蕷皂苷處理組與控制組相比，精子總數隨著薯蕷皂苷劑量的增加而跟著提升，並在高劑量組最為明顯，但無統計上的顯著差異。

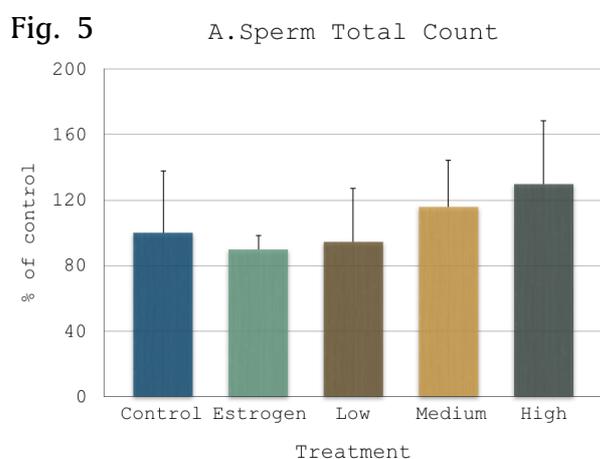
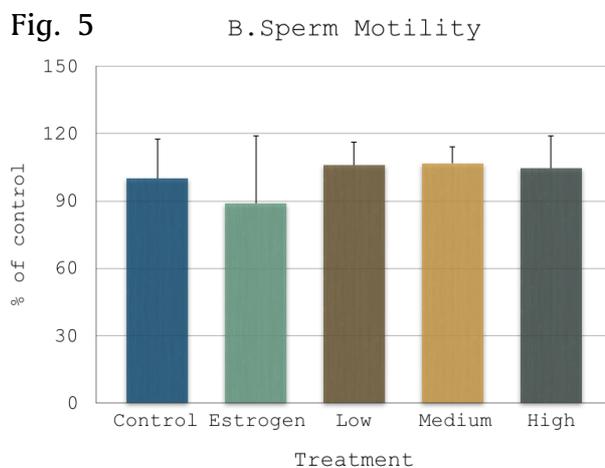


Fig. 5A 大鼠精子總數。橫軸為處理方式，縱軸為與控制組相比之數量百分比。圖表呈現mean + SEM (n=4)。

• Fig. 5B 結果顯示：大鼠精子活動力經過長期雌激素與薯蕷皂苷處理後，薯蕷皂苷處理組與控制組相比無明顯差異，而雌激素組比起控制組的精子活動力稍差，但都無統計上的顯著差異。

Fig. 5B 大鼠精子活動力。橫軸為處理方式，縱軸為與控制組相比之活動力百分比。圖表呈現mean + SEM (n=4)。



• Fig. 5C 結果顯示：大鼠精子細胞膜完整度經過長期雌激素與薯蕷皂苷處理後，薯蕷皂苷處理組與控制組相比明顯細胞膜完整度有下降趨勢，且隨著劑量增加下降越明顯，但無統計上的顯著差異。

Fig. 5 C.Sperm Cell Membrane Integrity

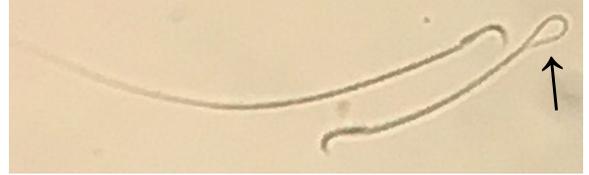
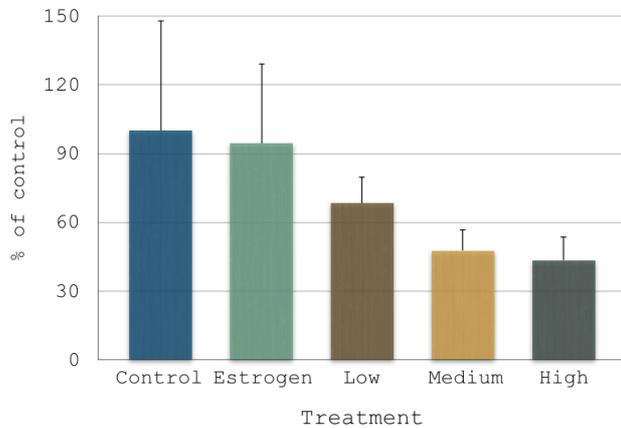


Fig. 5C 大鼠精子細胞膜完整度。橫軸為處理方式，縱軸為與控制組相比之完整度百分比。圖表呈現mean + SEM (n=4)。照片為大鼠細胞膜完整之精子，其尾部會腫脹而呈現蜷曲狀。

• Fig. 5D 結果顯示：大鼠經過長期雌激素與薯蕷皂苷處理後，在精子頂體完整度的部分雌激素和薯蕷皂苷組與控制組相比均無明顯差異，而在精子頂體不完整度的部分，則可明顯看到薯蕷皂苷組與控制組相比有下降的趨勢，但無統計上的顯著差異。

Fig. 5 D.Sperm Acrosomal Integrity

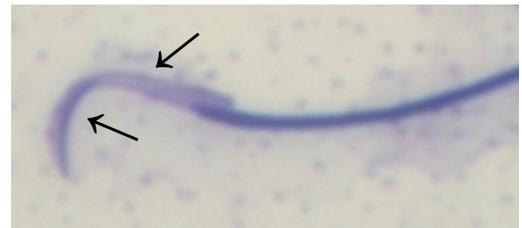
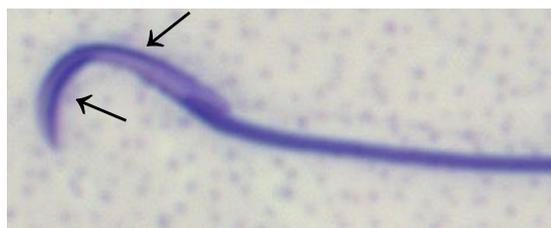
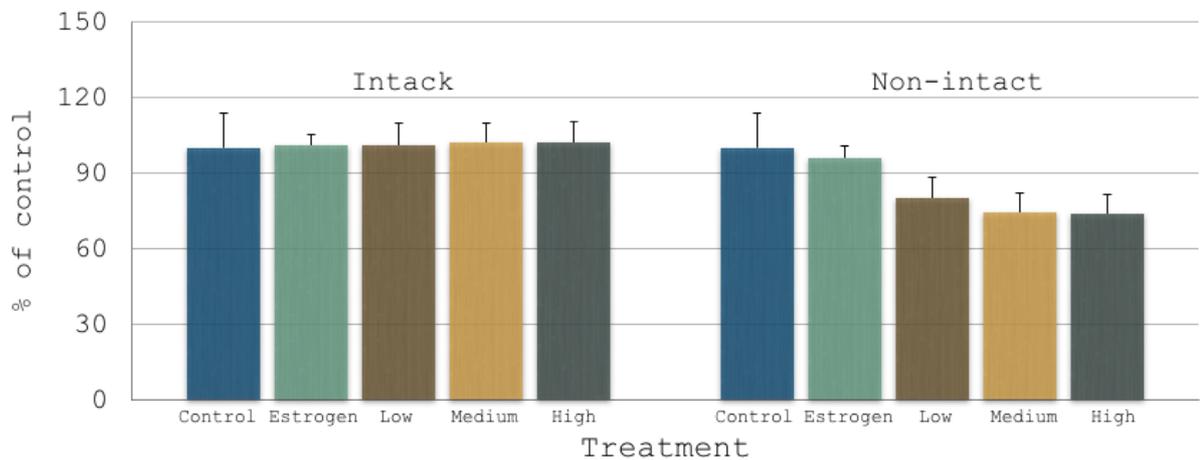


Fig. 5D 大鼠精子頂體完整度與不完整度。橫軸為處理方式，縱軸為與控制組相比之完整度百分比。圖表呈現mean + SEM (n=4)。左照片為大鼠頂體完整之精子，其頭部尖端內側與圓弧背側均有被成功染色；右照片為大鼠頂體不完整之精子，其圓弧背側為透明狀，只有頭部尖端內側有被成功染色。

\*推論：從精子品質檢測的結果總結來說，薯蕷皂苷可以提升精子的總數並降低頂體的不完整度，先前的文獻指出，雌激素接受器的信號傳導對未成熟男性賽氏細胞的功能及數量來說非常重要[9]，且賽氏細胞數量將限制睪丸製造精子的能力[11]，由此推論，作為植物性雌激素的薯蕷皂苷，可以藉由增強雌激素接受器的信號傳導來增加賽氏細胞的數量，進而增強睪丸製造精子的能力使精子總數提升。但另一方面，薯蕷皂苷會對精子細胞膜造成破壞，推論與所測得的低INH-B濃度有關；文獻曾指出：INH-B可作為賽氏細胞功能的直接生物標記 (biomarker) 以及精子生成的間接標記，且INH-B的減少與賽氏細胞的功能障礙有關[28]，由此可推論低INH-B可能造成賽氏細胞的功能障礙，使得精子在製造成熟時受到影響並反映在細胞膜的完整度上。

## VI. 結論

本計劃的總結果為：薯蕷皂苷會藉由刺激下視丘(GnRH) - 腦下垂體(LH) - 性腺(T)激素分泌能力、增加萊氏細胞合成睪固酮途徑中的酵素活性與重要蛋白(LHR, StAR)表現量來提升萊氏細胞獨立分泌睪固酮的能力；但另一方面，可能因為植物性雌激素之特性而增加SHBG合成量，導致血清中睪固酮游離態濃度下降。而在精子品質的部分，薯蕷皂苷能增加精子總數並降低精子頂體的不完整度，但由於薯蕷皂苷造成賽氏細胞分泌INH-B的低下，影響精子的製造與成熟過程而降低精子細胞膜的完整度。

本計劃的限制在於實驗動物的隻數較少，加上動物的個體差異，使得結果資料的誤差值較大，也較難呈現出統計上的顯著差異。另外，對於薯蕷皂苷造成男性生殖影響的深入研究，還需設計更多實驗才能得到詳細完整的答案，而目前所知薯蕷皂苷在激素分泌與精子功能上的作用成效，以及往後所得的更多結果都可以作為未來男性挑選保健食品時的重要參考。

## VII. 參考文獻

- [1] P. Jacobo, V.A. Guazzone, M.S. Theas, L. Lustig, Testicular autoimmunity, *Autoimmunity reviews* 10(4) (2011) 201-4.
- [2] Y. Chen, Y.M. Tang, S.L. Yu, Y.W. Han, J.P. Kou, B.L. Liu, B.Y. Yu, Advances in the pharmacological activities and mechanisms of diosgenin, *Chinese journal of natural medicines* 13(8) (2015) 578-87.
- [3] G. Sethi, M.K. Shanmugam, S. Warriar, M. Merarchi, F. Arfuso, A.P. Kumar, A. Bishayee, Pro-apoptotic and anti-cancer properties of diosgenin: a comprehensive and critical review, *Nutrients* 10(5) (2018) 645.
- [4] S. Moalic, B. Liagre, C. Corbiere, A. Bianchi, M. Dauca, K. Bordji, J.L. Beneytout, A plant steroid, diosgenin, induces apoptosis, cell cycle arrest and COX activity in osteosarcoma cells, *FEBS letters* 506(3) (2001) 225-30.
- [5] I.D. Roman, A. Thewles, R. Coleman, Fractionation of livers following diosgenin treatment to elevate biliary cholesterol, *Biochimica et biophysica acta* 1255(1) (1995) 77-81.
- [6] R. Barakat, O. Oakley, H. Kim, J. Jin, C.J. Ko, Extra-gonadal sites of estrogen biosynthesis and function, *BMB reports* 49(9) (2016) 488-96.
- [7] L. O'Donnell, K.M. Robertson, M.E. Jones, E.R. Simpson, Estrogen and spermatogenesis, *Endocrine reviews* 22(3) (2001) 289-318.
- [8] S. Carreau, H. Bouraima-Lelong, C. Delalande, Estrogens in male germ cells, *Spermatogenesis* 1(2) (2011) 90-4.
- [9] M.F. Lazari, T.F. Lucas, F. Yasuhara, G.R. Gomes, E.R. Siu, C. Royer, S.A. Fernandes, C.S. Porto, Estrogen receptors and function in the male reproductive system, *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia* 53(8) (2009) 923-33.
- [10] C.Y. Cheng, E.W. Wong, H.H. Yan, D.D. Mruk, Regulation of spermatogenesis in the microenvironment of the seminiferous epithelium: new insights and advances, *Molecular and cellular endocrinology* 315(1-2) (2010) 49-56.
- [11] J.M. Orth, G.L. Gunsalus, A.A. Lamperti, Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development, *Endocrinology* 122(3) (1988) 787-94.
- [12] A.L. Barbotin, C. Ballot, J. Sigala, N. Ramdane, A. Duhamel, F. Marcelli, J.M. Rigot, D. Dewailly, P. Pigny, V. Mitchell, The serum inhibin B concentration and reference ranges in normozoospermia, *European journal of endocrinology* 172(6) (2015) 669-76.
- [13] V. Mitchell, G. Robin, F. Boitrelle, P. Massart, C. Marchetti, F. Marcelli, J.M.

- Rigot, Correlation between testicular sperm extraction outcomes and clinical, endocrine and testicular histology parameters in 120 azoospermic men with normal serum FSH levels, *International journal of andrology* 34(4) (2011) 299-305
- [14] T.O. Abney, The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: a review, *Steroids* 64(9) (1999) 610-7.
- [15] S.G. Haider, Cell biology of leydig cells in the testis, *International review of cytology* 233 (2004) 181-241.
- [16] L. Wu, H. Dong, J. Zhao, Y. Wang, Q. Yang, C. Jia, J. Ma, Diosgenin stimulates rat TM4 cell proliferation through activating plasma membrane translocation and transcriptional activity of estrogen receptors, *Biology of reproduction* 92(1) (2015) 24.
- [17] T.K. Jensen, B.L. Heitmann, M. Blomberg Jensen, T.I. Halldorsson, A.M. Andersson, N.E. Skakkebaek, U.N. Joensen, M.P. Lauritsen, P. Christiansen, C. Dalgard, T.H. Lassen, N. Jorgensen, High dietary intake of saturated fat is associated with reduced semen quality among 701 young Danish men from the general population, *The American journal of clinical nutrition* 97(2) (2013) 411-8.
- [18] S. Zhao, F. Niu, C.Y. Xu, Y. Liu, L. Ye, G.B. Bi, L. Chen, G. Tian, T.H. Nie, Diosgenin prevents bone loss on retinoic acid-induced osteoporosis in rats, *Irish journal of medical science* 185(3) (2016) 581-7.
- [19] H.C. Liu, D. Zhu, C. Wang, H. Guan, S. Li, C. Hu, Z. Chen, Y. Hu, H. Lin, Q.Q. Lian, R.S. Ge, Effects of etomidate on the steroidogenesis of rat immature leydig cells, *PloS one* 10(11) (2015) e0139311.
- [20] A.H. Payne, K.L. Wong, M.M. Vega, Differential effects of single and repeated administrations of gonadotropins on luteinizing hormone receptors and testosterone synthesis in two populations of Leydig cells, *The Journal of biological chemistry* 255(15) (1980) 7118-22.
- [21] R.S. Ge, M.P. Hardy, Variation in the end products of androgen biosynthesis and metabolism during postnatal differentiation of rat Leydig cells, *Endocrinology* 139(9) (1998) 3787-95.
- [22] S. Retana-Marquez, L. Juarez-Rojas, A. Hernandez, C. Romero, G. Lopez, L. Miranda, A. Guerrero-Aguilera, F. Solano, E. Hernandez, P. Chemineau, M. Keller, J.A. Delgadillo, Comparison of the effects of mesquite pod and *Leucaena* extracts with phytoestrogens on the reproductive physiology and sexual behavior in the male rat, *Physiology & behavior* 164(Pt A) (2016) 1-10.
- [23] S. Ramu, R.S. Jeyendran, The hypo-osmotic swelling test for evaluation of

sperm membrane integrity, *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 927 (2013) 21-5.

[24] J. Roh, Y.S. Lim, M.Y. Seo, Y. Choi, J.S. Ryu, The secretory products of *Trichomonas vaginalis* decrease fertilizing capacity of mice sperm in vitro, *Asian journal of andrology* 17(2) (2015) 319-23.

[25] Y. Kusano, N. Tsujihara, H. Masui, T. Shibata, K. Uchida, W. Takeuchi, Diosgenin supplementation prevents lipid accumulation and induces skeletal muscle-fiber hypertrophy in rats, *Journal of nutritional science and vitaminology* 65(5) (2019) 421-9.

[26] A. Ropponen, K. Aittomaki, V. Vihma, M.J. Tikkanen, O. Ylikorkala, Effects of oral and transdermal estradiol administration on levels of sex hormone-binding globulin in postmenopausal women with and without a history of intrahepatic cholestasis of pregnancy, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90(6) (2005) 3431-4.

[27] S.M. Harman, E.J. Metter, J.D. Tobin, J. Pearson, M.R. Blackman, Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. Baltimore Longitudinal Study of Aging, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86(2) (2001) 724-31.

[28] D.M. Robertson, J. Sullivan, M. Watson, N. Cahir, Inhibin forms in human plasma, *Journal of Endocrinology* 144(2) (1995) 261-9.