

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 應用萊吉氏細胞篩選中草藥之促性腺有效成分(2/2)

計畫編號：NSC 90-2313-B-002-301

執行期限：90年8月1日至91年7月31日

主持人：林仁壽 台灣大學畜產學系

### 一、摘要

本實驗之目的旨在建立一個穩定的小鼠睪丸萊吉氏細胞(Leydig cell)分離及培養系統，並探討刺蒺藜與桂枝對萊吉氏細胞的睪固酮分泌機制。

利用取自性成熟公 ICR 小鼠的睪丸，經由酵素(collagenase)與機械性解離後取得的精間細胞，使用 Percoll 溶液產生的不連續相濃度梯度(discontinuous gradients)離心法分離細胞，將取得的萊吉氏細胞培養於 M199 中，同時添加不同劑量的中草藥粗萃取液，於培養後收集不同時程的培養液，並以酵素免疫分析法測定培養液中睪固酮(testosterone)含量。實驗結果如下：

1. 使用 10、20、30、40 及 50% 的不連續相 Percoll 濃度梯度分離細胞，將回收的每層細胞利用排卵素(LH)刺激與 3 $\beta$ -HSD 染色法，結果證實萊吉氏細胞主要是位於 50% Percoll 層中，而回收的萊吉氏細胞對不同的外源刺激物(LH、cAMP 等)具有良好的睪固酮分泌反應性。由此結果顯示小鼠萊吉氏細胞分離及培養系統已建立。
2. 利用上述的培養方式，發現刺蒺藜萃取物(H13)在培養 24 小時後具有刺激小鼠萊吉氏細胞分泌睪固酮的效果，同時具有劑量反應。經由不同訊息傳遞之相關試劑處理的結果，顯示 H13 透過胞內 PKA 與 PKC 之激活而傳遞其刺激類固醇合成的路徑，並同時涉及到胞內蛋白質的轉錄與轉譯。
3. 利用上述的培養方式，發現桂枝萃取物在培養 4 小時後具有抑制基礎與 oLH 的刺激睪固酮的分泌量，經由添

加訊息傳遞的活化物質包括 CTX、FSK、cAMP、PMA 與 A23187 與類固醇合成的中間受質包括：膽固醇、22R-OHC、P<sub>5</sub>、P<sub>4</sub>、17 $\alpha$ -OH-P<sub>4</sub> 與 andostenedione 均無抑制效果表示桂枝的抑制效果是在類固醇合成以外的路徑。

關鍵詞：萊吉氏細胞、睪固酮、中藥、刺蒺藜、桂枝

### Abstract

The purpose of this study was firstly to isolate purified mice Leydig cells and use enzyme immunoassay (EIA) for testosterone production. Selected Chinese medicinal herbs extracted by hot water extraction procedure were co-cultured with the isolated cells and their effect on testosterone secretion vis a vis basal and stimulants were investigated.

Testis were obtained from mature ICR mouse of 6-8 weeks age, decapsulated and finely minced before dissociating with collagenase. The digested tissue is then sieved and Percoll discontinuous gradients method applied to separate the Leydig cells. The harvested Leydig cells were then incubated in M199 in a 48 well culture plate, different doses of Chinese medicinal herbs extracts, various stimulants and signal transducer inhibitors were added to the Leydig cells culture system. The medium was then collected at different time periods and assayed using EIA technique. The results and findings of our present work can be summarized as follows:

1. Investigating for 10, 20, 30, 40 and 50 % Percoll discontinuous gradients and

using LH stimulation and 3 $\beta$ -HSD staining it was revealed that 50% Percoll gradients has better results. The Leydig cells when stimulated (LH, cAMP) had good testosterone production both at dose and time response indicating the successful establishment of mouse Leydig cells *in vitro* cell culture system.

2. *Tribulus terrestris* L. hot water extracts (H13) stimulated testosterone secretion of mouse Leydig cells, in 100  $\mu$ g/ml dose almost double to that of basal. It also showed time course (24 and 48 hour) and dose response (1, 10 and 100 $\mu$ g/ml). It also revealed that the H13 mediated stimulation via PKA and PKC activation leading to protein transcription and translation.
3. *Cinnamomum cassia* Presl extracted by hot water extraction (10 and 100  $\mu$ g/ml) showed decrease in testosterone production over the basal and LH stimulated secretion of mouse Leydig cells in 4 and 24 hour time course. From our data by addition of signal transduction agents, it was suggested that *Cinnamomum cassia* Presl decrease LH stimulated testosterone secretion function without acting on the steroidogenesis pathway.

**Keywords:** Leydig cells, testosterone, Chinese herbs, *Tribulus terrestris* L, *Cinnamomum cassia* Presl.

## 二、緣由與目的：

在雄性生殖系統中，睪丸(testis)是同時具有分泌睪固酮(testosterone)與產生精子的器官。睪固酮是位於睪丸組織中的萊吉氏細胞(Leydig cell)所分泌，其在生殖系統的生長與第二性徵的出現與維持上，扮演相當重要的角色。萊吉氏細胞中睪固酮的合成與分泌，主要是受下視丘分泌的排卵素釋放素(luteinizing hormone release hormone LHRH)經由誘發腦垂體分泌排卵素(luteinizing hormone LH)所調節，在活體中(*in vivo*)排卵素可經由血液循環運送到萊吉氏細胞，進而促使睪固酮的合成與分泌。排卵素透過萊吉氏細胞膜上的受

器(receptor)活化胞內特定的訊息傳遞因子，並藉著這些訊息傳遞因子與訊息轉換中形成的中間產物，引發一連串的化學反應，使細胞能對外來的特定生物分子訊號有所反應。

中草藥在東方醫學上具有相當重要的地位，同時在西方醫學遇到瓶頸的時候更顯出它的重要性。利用活體進行中草藥的活性實驗，雖然可以實際的觀察到動物的生理反應，但是受限於體內諸多因子的影響，因此不易掌握及瞭解其正確的藥理作用機轉。而以體外(*in vitro*)細胞培養模式研究中草藥的藥理活性，其結果雖不一定與活體實驗相同，但仍然具有相當大的參考價值，同時還具有下列活體實驗所沒有的優點：1. 體外細胞培養的環境容易監控，2. 許多藥物對細胞的影響，在體內較不易測定，但在體外培養卻相當容易，3. 減少實驗誤差，因此體外培養模式有利於針對特定的組織細胞，來篩選具有特定生物活性的中草藥。

基於上述的理由，本實驗室利用小鼠萊吉氏細胞體外培養系統對傳統中藥的粗萃取物進行篩選，由篩選的結果發現刺蒺藜(*Tribulus terrestris* L.)的 100 °C 熱水萃取物(H13)具有激性腺的功能桂枝(*Cinnamomum cassia* Presl) 的熱水萃取物具有抑制性腺的功能。進一步利用小鼠萊吉氏細胞體外培養系統，配合鞣固酮酵素免疫分析法，輔以細胞內訊息傳導與類固醇生成的相關之調節試劑，探討 H13 與桂枝對小鼠萊吉氏細胞鞣固酮分泌的影響及其所涉及的細胞內機轉。

## 三、結果與討論：

實驗結果顯示，藉由外源性的添加激性腺物質，以活化胞內的訊息傳遞路徑，發現無論是激活 PKA 路徑的 FSK、CTX 與 cAMP 或是激活 PKC 路徑的 PMA 與 A23187 對於萊吉氏細胞的鞣固酮合成的能力都有很顯著的劑量反應與時程反應，顯示利用不連續相的 Percoll-M199 分離細胞方式所得的萊吉氏細胞不僅具有鞣固酮合成的能力，同時表示細胞內的訊息傳導路徑並未受到損害，同時經由不同訊息傳導路徑刺激物的添加發現 PKA 路徑的刺激鞣固酮分泌效果不論是在劑

量反應與時程反應都明顯優於 PKC 路徑的刺激效果，而這結果也與多數的研究者的結果相同(Dufau and Catt, 1978)。並經由外源性的添加類固醇生成中的各種基質，皆能顯著的上升睪固酮產量，表示類固醇生成中的酵素活性都具有顯著的劑量反應與時程反應，顯示利用不連續相的 Percoll-M199 分離細胞方式所取得的萊吉氏細胞，不僅具有睪固酮生合成的能力，同時表示細胞內的類固醇生成酵素的活性並未受到損害。

利用上述建立的萊吉氏細胞培養系統，進行 14 種中草藥的篩選，並分析睪固酮的分泌效果，藉以探討是否具有激性腺的效果。結果顯示刺蒺藜(H13)與桂枝在培養 24 小時後，具有顯著的刺激萊吉氏細胞分泌睪固酮的效果，因此進一步探討兩者刺激萊吉氏細胞分泌睪固酮的細胞機制。

刺蒺藜(*Tribulus terrestris* L.) 的熱水粗萃取液(H13)具有刺激新鮮的小鼠萊吉氏細胞睪固酮分泌的作用，當使用 100  $\mu$ g/ml 作用 24 小時後，具有基礎值的 2 倍刺激量，同時呈現時程反應(24 及 48 小時)與劑量反應(1、10 及 100  $\mu$ g/ml)。利用 N-(2-[p-bromocinnamylamino]ethyl)-5-isoquinolinesulfonamide (H89)抑制胞內的蛋白質激酶 A (protein kinase A, PKA)活性，顯示 H13 係激活 PKA 發軔後續的睪固酮生合成。利用 D-sphingosine 經由抑制胞內的蛋白質激酶 C (protein kinase C, PKC)活性，顯示 H13 亦激活 PKC 發軔後續的睪固酮生合成。經由 actinomycin D 及 cycloheximide 與 H13 共同處理，顯示 actinomycin D 及 cycloheximide 皆會抑制 H13 刺激睪固酮分泌的效果，暗示 H13 刺激睪固酮的分泌效果除了涉及到胞內的 PKA 與 PKC 的活化，同時還牽涉到胞內蛋白質的轉錄與轉譯。

桂枝(*Cinnamomum cassia* Presl)的熱水粗萃取液(10 與 100  $\mu$ g/ml)在處理 4 小時後，具有抑制小鼠萊吉氏細胞睪固酮基礎與受排卵素刺激的分泌作用；對排卵素刺激作用之抑制效果更可以持續至 24 小時。此外，桂枝無法抑制由 cAMP、forskolin 及 cholera toxin 刺激之睪固酮分泌。藉由添加不同睪固酮合成受質，以探討桂枝可能抑制的類固醇酵素生成位

置，結果顯示桂枝並無法抑制以 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone、progesterone 與 pregnenolone 作為受質之睪固酮合成作用，顯示桂枝具有抑制排卵素刺激睪固酮生成的作用，為其主要的的作用機制與有效成份仍需進一步研究。

#### 四、計畫成果自評：

本計畫總共花費兩年時間完成，第一年主要建立睪固酮的酵素免疫分析法及小鼠的萊吉氏細胞培養系統；第二年利用上述系統篩選具激睪固酮能力之中草藥，並初步探討其中刺蒺藜與桂枝影響睪固酮分泌之作用機制，也獲得初步之成果。而其中以刺蒺藜之效果最具潛力，未來將繼續分離其有效成分之外，也希望能利用活體試驗來驗證其效果。

#### 五、References

1. 黃政淳。2000。激黃體作用之中草藥研究。台北醫學大學藥學研究所碩士論文，台北。
2. 蕭士翔。2001。絞股藍萃取物對牛黃體細胞孕酮分泌影響之細胞內機轉。國立台灣大學畜產學研究所碩士論文，台北。
3. Anita, H. P. and G. L. Youngblood. 1995. Regulation of expression of steroidogenic enzyme in Leydig cell. *Biol. Reprod.* 52: 217-225.
4. Conn, P. M., T. Tsuruhara, M. Dufau and K. J. Catt. 1977. Isolation of highly purified Leydig cell by density gradient centrifugation. *Endocrinology.* 101:639-642.
5. Cooke, B. A. 1999. Signal transduction involving AMP-dependent and cyclic AMP-independent mechanisms in the control of steroidogenesis. *Mol. Cell Endocrinol.* 151:25-35.
6. Dufau, M. L. and K. J. Catt. 1978. Gonadotropin stimulation of interstitial cell function of the rat testes *in vitro*. In: *Methods in Enzymology.* Vol. 39, edited by J. G.

- hardman and B. W. Malley.  
Academic Press. N. Y. pp:252-271.
7. Payne, A. H. and G. L. Youngblood.  
1995. Regulation of expression of  
steroidogenic enzymes in Leydig  
cells. *Biol. Reproduct.* 52:217-225.
  8. Risbridger, G. P. and P. H. Mark.  
1992. Adult rat Leydig cell culture:  
minimum requirements for  
maintenance of luteinizing hormone  
responsiveness and testosterone  
production. *Mol. Cell.  
Endocrinol.* 83: 125-132.
  9. Stocco, D. M. and J. Clark. 1996.  
Regulation of the acute production  
of steroids in steroidogenic cells.  
*Endocr. Rev.* 17(3):221-244.
  10. Stocco, D. M. and M. W. Kilgore.  
1988. Induction of mitochondrial  
proteins in MA-10 Leydig tumor  
cells with human  
choriogonadotropin. *Biochem J*  
249:95-103.