

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

北冬蟲夏草對細胞之造精能力與抗氧化功能評估之研究

子計畫(1)：北冬蟲夏草對小鼠睪丸之萊氏細胞 TM3 中睪固酮生合成之影響

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNPH94-03

執行期間：94 年 1 月 1 日至 94 年 12 月 31 日

計畫總主持人：王四切 副教授

計畫主持人：王四切 副教授

計畫參與人員：陳秋蘭 助理教授；石成展

執行單位：藥學系

中華民國 95 年 2 月 27 日

前言

冬蟲夏草在中國傳統醫藥中用來當作滋補草藥已經有段相當久時間，有許多研究發現它具有重要藥理活性。根據傳統醫書記載：冬蟲夏草味甘、性溫、補益腎肺。在中醫學上它被用來當作益腎補陽的功用上，增加性慾及性功能。最近，成功大學醫學院副教授黃步敏的研究報告中冬蟲夏草菌絲體在小白鼠體內及體外培養細胞均有促進睪固酮生合成作用。

冬蟲夏草又稱蟲草、中華蟲草，屬於麥角菌目、麥角菌科、蟲草屬，屬於真菌，是菌類與昆蟲的結合。主產於四川、青海、西藏等地。冬蟲夏草寄生於蝙蝠蛾科昆蟲綠蝙蝠蛾幼蟲上，並吸收幼蟲的營養，而快速繁殖，稱為蟲草真菌。當菌絲慢慢成長的同時，幼蟲也隨著慢慢長大，而鑽出地面。直到菌絲繁殖至充滿蟲體，幼蟲就會死亡，此時正好是冬天，就是所謂的冬蟲。而當氣溫回升後，菌絲體就會從冬蟲的頭部慢慢萌發，長出像草一般的真菌子座，稱為夏草。當子囊成熟時，孢子會散出，再次尋找蝙蝠蛾的幼蟲作為寄主，這就是冬蟲夏草的循環。野生冬蟲夏草的子實體下端會附有昆蟲幼蟲的乾枯外殼，外殼內實為於存的菌絲體。外殼內的菌絲體會逐漸退化，因此自古以來認為冬蟲夏草的價值來自於子實體。所含主要成份有蟲草多醣體(cordycepic polysaccharide)、蟲草素(cordycepin)、蟲草酸(cordycepic acid)、腺苷酸(adenosine)腺嘌呤(adenine)、次黃嘌呤(hypoxanthine)等，且在冬蟲夏草與北冬蟲夏草所佔的比例不同(1)。

冬蟲夏草與北冬蟲夏草是少數中國中草藥確認具有功效者。但在價格上北蟲草比冬蟲夏草便宜許多。

北冬蟲夏草來自於東北的長白山上，不同於冬蟲夏草。與冬蟲夏草皆屬於真菌。北冬蟲夏草是由菌類與昆蟲之蛹發育而成，故又稱北蟲草。

冬蟲夏草在許多文獻上刊載具有許多重要的藥理活性功能(2)：成功大學醫學院副教授黃步敏在研究報告中顯示，男性性功能與體內雄性激素有關，雄性激素是由睪丸中的萊氏細胞所分泌出，在實驗中，以未成熟小鼠為實驗對象，觀察冬蟲夏草對雄性激素的影響，實驗中發現在低濃度時會有刺激雄性激素的分泌量的增加，但濃度稍高之後，雄性激素分泌量反而降低(2-6)，冬蟲夏草增加生殖活性功能且具有恢復受損的生殖功能(4)；具有降低血糖功能(1)；治療腎功能障礙及腎衰竭(1)；可以抑制腫瘤細胞的生長(7, 8)；具有抗氧化功能(9, 10)；調整免疫反應之功能(11, 12)；具有降低血壓與血管擴張的活性(13)；增加肝臟活性(14, 15)等。

冬蟲夏草在文獻的刊載中，以未成熟與成熟實驗小鼠為對象，觀察冬蟲夏草對於睪固酮(testosterone)濃度變化及小鼠睪丸(testis)重量的影響，在實驗中發現，未成熟小鼠睪固酮(testosterone)濃度變化明顯地比成熟小鼠增加；但是冬蟲夏草對於小鼠睪丸重量並無顯明的作用。

睪固酮(testosterone)是主要的雄性激素，是由睪丸(testis)、卵巢(ovary)、腎上腺皮質(adrenal cortex)所合成而來；負責男性第二性徵的發育與維持，也具有重要蛋白質的合成代謝與促進生長作用；血漿中睪固酮(testosterone)含量用來評估男性生殖腺低落與荷爾蒙補充治療；也當作女性體內雄性素過高的指標。

在生理學的角度，睪固酮(testosterone)對於男性性功能方面具有重要影響：(1) 在細精管中進入賽氏細胞，透過賽氏細胞促進精子的生成；(2)引發男性附屬生殖器官的分化，並維持其功能；(3)產生性慾，並可能加強侵略性。

行為。所以睪固酮含量增加，相對的精子數量也會增加，也表示著睪丸造精能力增加。

睪固酮的生合成是受到下視丘及腦下垂體所前葉調控。下視丘會釋放促性腺激素釋放荷爾蒙(GnRH)作用在腦下垂體前葉，腦下垂體前葉釋放黃體激素(LH)作用在萊氏細胞(Leydig cell)，萊氏細胞製造並分泌睪固酮至血中。當血中睪固酮含量過高時，會啟動負回饋調控機制，會抑制下視丘及腦下垂體所前葉，使GnRH、LH無法釋放出來，使睪固酮可以恢復到正常值。

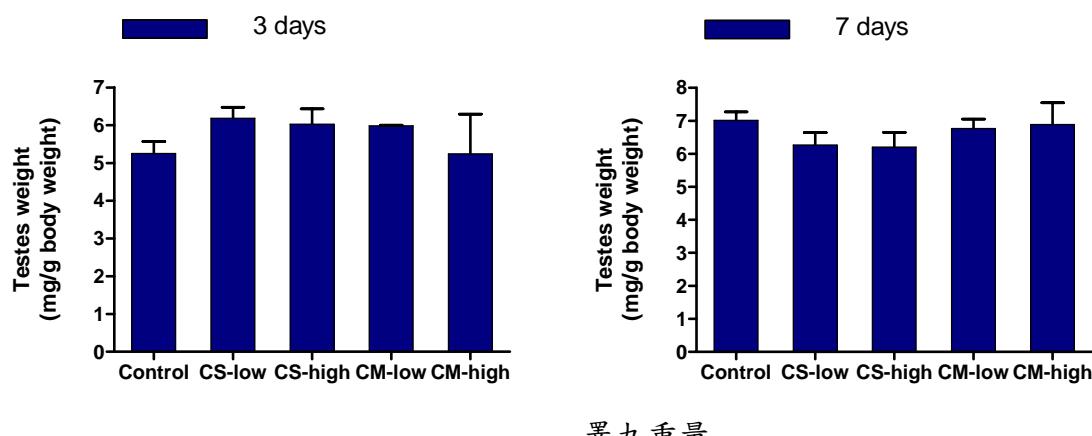
北冬蟲夏草與冬蟲夏草雖產地不同，但其主成分再經過分析後並無明顯差異(1, 16)，最近有利用人工栽培方式培養出北冬蟲夏草子實體，因此計畫研究北冬蟲夏草對於男性性功能及抗氧化功能方面的影響。利用人工培養的北蟲夏草的子實體測試其對小鼠的精原細胞 GC-1 spg 的影響。首先，先看其對精原細胞是否具有毒殺作用；若無，則看其對精原細胞是否有促進增生的能力。

實驗方法

萃取睪固酮-取適當量的小鼠血清，加入乙醚，混合均勻，取上層有機液，再將有機液至放在抽器櫃內靜置揮發，待揮發完全只剩下無色殘留物。再將 diluted extract buffer 加入，振搖，使其能與殘留物充分混合均勻。這個方法是以 enzyme conjugate 與未知濃度的睪固酮檢品在具有抗體附著的 plate 中去競爭固定結合位置的操作準則。首先，將檢品或標準溶液加入在 microplate，之後再加入 diluted enzyme conjugate 反應，在室溫下利用振搖機混合培養一小時，在培養過程中，內部正在進行競爭結合位置。用 diluted wash buffer 來清洗全部未結合物質，重複三次，結合的 diluted enzyme conjugate 在 substrate 加入後三十分鐘，發現理想的顏色-藍色。定量測驗結果，是經由每個 well 和標準溶液在 630nm 吸光值的 ELISA 測量比較而得。結果中，顏色發展的範圍，與檢品中的睪固酮或標準品的數量呈反比。例如：檢品中睪固酮不存在，會產生明顯的藍色；反之，睪固酮存在，會產生淡藍色或無顏色反應。

結果與討論

由於 TM3 所釋放出之睪固酮含量過低，低過偵測靈敏度，因此改採以小鼠為實驗對象。在第七天顯示北冬蟲夏草在高劑量有明顯抑制的效果，其可能是血中睪固酮含量過高時，會啟動負迴饋調控機制，使睪固酮分泌量也隨之降低所致。在睪丸重量與睪固酮含量並無明顯關聯性。



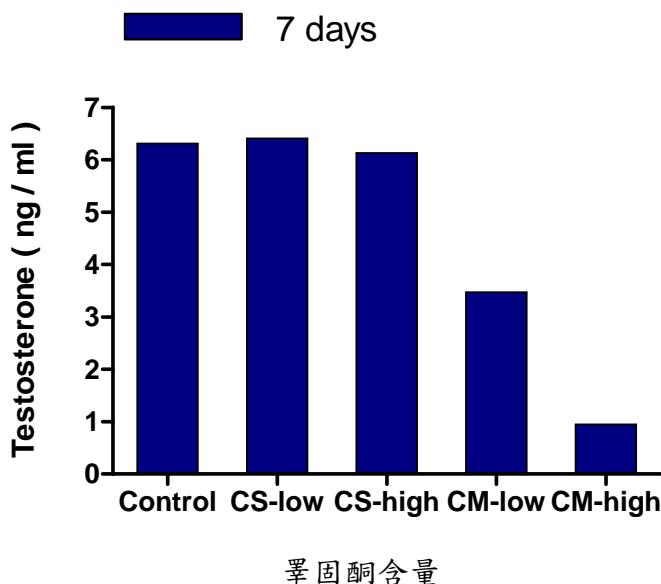
Control: 對照組

CS-low: 中華蟲草低劑量(0.02mg/g)

CS-high: 中華蟲草高劑量(0.2mg/g)

CM-low: 北蟲草低劑量(0.02mg/g)

CM-high: 北蟲草高劑量(0.2mg/g)



參考文獻

- Huang LF, Liang YZ, Guo FQ, Zhou ZF, Cheng BM. Simultaneous separation and determination of active components in *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris* by LC/ESI-MS. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 33(5):1155-62, 2003.
- Huang YL, Leu SF, Liu BC, Sheu CC, Huang BM. In vivo stimulatory effect of *Cordyceps sinensis* mycelium and its fractions on reproductive functions in male mouse. *Life Sciences*. 75(9):1051-62, 2004.
- Hsu CC, Huang YL, Tsai SJ, Sheu CC, Huang BM. In vivo and in vitro stimulatory effects of *Cordyceps sinensis* on testosterone production in mouse Leydig cells. *Life Sciences*. 73(16):2127-36, 2003.
- Hsu CC, Tsai SJ, Huang YL, Huang BM. Regulatory mechanism of *Cordyceps sinensis* mycelium on mouse Leydig cell steroidogenesis. *FEBS Letters*. 543(1-3):140-3, 2003.
- Chen YC, Huang YL, Huang BM. *Cordyceps sinensis* mycelium activates PKA and PKC signal pathways to stimulate steroidogenesis in MA-10 mouse Leydig tumor cells. *Internat. J. Biochemi. Cell Biol.*, 37(1):214-23, 2005.
- Huang BM, Hsiao KY, Chuang PC, Wu MH, Pan HA, Tsai SJ. Upregulation of steroidogenic enzymes and ovarian 17beta-estradiol in human granulosa-lutein cells by *Cordyceps sinensis* mycelium. *Biol. Reproduct.* 70(5):1358-64, 2004.
- Shin KH, Lim SS, Lee S, Lee YS, Jung SH, Cho SY. Anti-tumour and immuno-stimulating activities of the fruiting bodies of *Paecilomyces japonica*, a new type of *Cordyceps* spp. *Phytother. Res.* 17(7):830-3, 2003.
- Yoshikawa N, Nakamura K, Yamaguchi Yu, Kagota S, Shinozuka K, Kunitomo M. Antitumor activity of cordycepin in mice. *Clin. Exper. Pharmacol. Physio.*, 31 (Supplement 2):S51-S53.
- Li SP, Su ZR, Dong TT, Tsim KW. The fruiting body and its caterpillar host of *Cordyceps sinensis* show close resemblance in main constituents and anti-oxidation activity. *Phytomedicine*. 9(4):319-24, 2002.
- Li SP, Zhao KJ, Ji ZN, Song ZH, Dong TT, Lo CK, Cheung JK, Zhu SQ, Tsim KW. A polysaccharide isolated from *Cordyceps sinensis*, a traditional Chinese medicine, protects PC12 cells against hydrogen peroxide-induced

injury. *Life Sciences*. 73(19):2503-13, 2003.

11. Kuo YC, Tsai WJ, Shiao MS, Chen CF, Liu CY. Cordyceps sinensis as an immunomodulatory agent. *Am. J. Chin. Med.*, 24 (2): 111-125, 1996.
12. Yang LY, Huang WJ, Hsieh HG, Lin, Ching Y. H1-A extracted from Cordyceps sinensis suppresses the proliferation of human mesangial cells and promotes apoptosis, probably by inhibiting the tyrosine phosphorylation of Bcl-2 and Bcl-XL. *J. Labora. Clin. Med.*, 141(1):74-83, 2003.
13. Chiou WF, Chang PC, Chou CJ, Chen CF. Protein constituent contributes to the hypotensive and vasorelaxant activities of Cordyceps sinensis. *Life Sciences*. 66(14):1369-76, 2000.
14. Wang BE. Treatment of chronic liver diseases with traditional Chinese medicine. *J. Gastroentero. Hepato.*, 15 Supplement:E67-E70, 2000.
15. Nan JX, Park EJ, Yang BK, Song CH, Ko G, Sohn DH. Antifibrotic effect of extracellular biopolymer from submerged mycelial cultures of Cordyceps militaris on liver fibrosis induced by bile duct ligation and scission in rats. *Arch. Pharmacal. Res.*, 24(4):327-32, 2001.
16. Yu R, Wang L, Zhang H, Zhou C, Zhao Y. Isolation, purification and identification of polysaccharides from cultured Cordyceps militaris. *Fitoterapia*. 75(7-8):662-6, 2004.
17. Jiao H, Soejima Y, Ohe Y, Saijo NA. A new MTT assay for examining the cytotoxicity of activated macrophages towards the nonadherent P388 leukemia cell line. *J. Immnol. Methods*, 153: 265-266, 1992.