

海馬熱水萃取物對於抗疲勞與免疫調節功能之評估

簡世勇·洪郁嵐·黃培安*·吳純衡

行政院農業委員會水產試驗所水產加工組

摘要

海馬在亞洲地區廣泛地作為中藥材之用，中醫認為海馬之功效主在提升精力及抗疲勞。而本研究旨在利用動物模式瞭解傳統中藥-海馬之功能性，以作為中藥科學化之基礎數據。將養殖庫達海馬與野生棘海馬之熱水萃取物餵食小鼠，6週後進行抗疲勞與免疫調節之功能評估。抗疲勞功能評估為偵測小鼠游泳時間、血乳酸 (Serum lactate)、肌酸激酶 (Creatine kinase) 與尿素氮 (Blood urea nitrogen) 等生化值；免疫調節評估以偵測脾臟細胞增生能力 (spleen cells proliferation)、脾臟淋巴細胞亞群分佈 (Lymphocyte subpopulation of spleen cells)、自然殺手細胞活性 (Natural killer cell activity) 與吞噬細胞活性 (Phagocyte activity) 等指標。抗疲勞評估方面，給予小鼠養殖庫達海馬與野生棘海馬之熱水萃取物，皆能延長動物游泳時間及降低血中肌酸激酶與尿素氮的含量。而在免疫調節評估方面，給予小鼠上述2種海馬之熱水萃取物，則是對於四項免疫功能指標皆無造成任何影響。顯示養殖庫達海馬與野生棘海馬之熱水萃取物對於小鼠具有抗疲勞之功效，但對免疫調節則無功效表現。所以，養殖庫達海馬與野生棘海馬之熱水萃取物皆具有抗疲勞之功效性且無顯著差異，站在生態保育的角度上，養殖庫達海馬具有取代野生棘海馬之可行性。

關鍵詞：海馬、抗疲勞、免疫調節、熱水萃取物

前言

海馬是一種高經濟價值的藥用魚類，在華人世界係屬名貴中藥材，自古以來民間素有「北方人參，南方海馬」之說，中醫認為：海馬性味甘、溫，有補腎壯陽，溫通血脈，鎮靜安神，舒筋活絡，散結消腫，止咳平喘之功效 (伍等, 1977)。據中醫師表示，海馬用於醫治呼吸系統失調 (如哮喘)、性功能失調 (如陽痿) 及不孕、嗜眠症和體力衰竭、喉嚨感染、皮膚病和難產等症 (梁, 2004)。

傳統中醫藥雖長期利用海馬，但在化學成分和藥理活性的研究尚不多見。近代國內外的研究報告中，發現海馬化學成分中含有許多固醇類化合物，如：刺海馬 (*Hippocampus histrix*) 經 95% 乙醇提取，再經乙醚萃取的脂溶性部分，含有膽

固醇、膽固醇硬脂酸酯 (Cholesteryl stearate) 與膽固-5-烯-3,7-二醇 (Cholesta-5-ene-3,7-diol) 等成分 (王等, 1998)。而在海馬脂肪酸組成方面主要以棕櫚酸、油酸、亞麻油酸和二十二碳六烯酸 (DHA) 為主 (張和龔, 1998)。利用原子吸收法與電感耦合等離子發射光譜法 (ICP) 進行微量元素測定，則發現海馬體中微量元素以 Cu、Mn、Zn 的含量相對較高 (賈和姚, 1990; 張等, 1997)。另一方面，海馬藥理活性由研究證實，其具有性激素促進作用：將克氏海馬 (*H. kelloggi*) 乙醇萃取物以每日 3 g/kg 劑量灌灌雄性小鼠連續 21 天，結果顯示能增加小鼠精子數和精子活存率 (張等, 1995)。腦內單胺類神經調節作用下降與單胺氧化酶 B (Monoamine oxidase-B) 活性上升，是引起腦部衰老的原因之一，而在庫達海馬 (*H. kuda*) 萃取物進行抗衰老實驗研究中，發現庫達海馬萃取物能增加小鼠耐氧性，減少單胺氧化酶 B 的活性，降低過氧化脂質體在體內的含量，顯示海馬萃取物具有抗衰老活性 (余和吳, 1988)。

* 通訊作者 / 基隆市和一路 199 號, TEL: (02) 2462-2101; FAX: (02) 2463-2677; E-mail: pahwang@mail.tfrin.gov.tw

海馬萃取物除了上述作用之外，中醫也認為海馬具有溫通血脈、散結消腫的功效，在經過科學化研究後發現，以三斑海馬 (*H. trimaculatus*) 甲醇萃取物，給予大鼠腹腔注射，能顯著抑制大鼠頸總動脈到頸外靜脈血流旁路血栓形成，而對大鼠腦血栓的形成也有顯著抑制作用，隨劑量增加其抑制作用加強 (許和許, 1995, 1997)。另外，海馬的乙醇萃取物能抑制乳腺癌和腹腔腫瘤 (張等, 1998)；克氏海馬 (*H. kelloggi*) 萃取物對小鼠 S180 實體腫瘤的抑制作用與其促進免疫功能有關 (李和倪, 1999)。

中醫藥以海洋動植物入藥已有兩千多年的歷史，其重要性不言而喻。然而，過度開採海洋中醫藥用物種會威脅這些動植物的存活，長遠而言對中醫藥同樣不利。長久以來，海馬雖廣泛的應用於中醫藥系統，卻少有各種相關性質的研究，而且在 2002 年華盛頓公約中，已將所有海馬種類列入第二列保育類動物，顯示海馬有瀕臨絕種之危機。然而，市售海馬種類以棘海馬 (*H. errinaceus*) 較常見，其中藥裡屬於上品。因此，本研究主要利用養殖的庫達海馬與市售的棘海馬之水萃取物來進行動物實驗，藉此評估海馬萃取物對於動物之生理活性，且探討利用養殖之庫達海馬做為未來替代野生海馬在中醫藥使用的可行性，以供未來開發醫藥與保健食品等利用之參考。

材料與方法

一、材料

(一) 實驗材料

本研究所使用之庫達海馬 (養殖) 係由澎湖海洋生物研究中心提供。將庫達海馬經清水洗淨後，以 50°C 烘乾後備用。棘海馬 (野生) 則購自台北中藥行。YAC-1 細胞株 (BCRC number: 60147) 來自小鼠淋巴瘤細胞，購自食品工業發展研究所。

(二) 實驗動物

由台灣大學動物中心購入週齡 4 週大之 C₃H/HeN 雄性小鼠，寄養於台灣海洋大學實驗動物中心。將小鼠依體重隨機分組，分別為管灌蒸餾水的控制組，與管灌庫達海馬及棘海馬之熱水萃取物等三組，每組 6 隻小鼠。每日分別管灌小

鼠蒸餾水、庫達海馬及棘海馬之熱水萃取物一次，每隻小鼠管灌 0.5 ml。小鼠經由動物中心檢疫 (檢疫項目有黴漿菌、小鼠冠狀病毒、蟯蟲及肉眼觀察) 後，飼養於有吹塵式無菌籠架設備之動物房中，動物房內維持室溫控制在 22 ± 2°C，相對濕度 50 ~ 60%，每日定時 12 hr 循環光照與黑暗。飼養期間提供小鼠滅菌處理之墊料、自由攝食飼料與飲用蒸餾水，並確保實驗動物能在無病原菌之環境中健康生長。

(三) 化學藥品

RPMI-1640 培養基、HEPES sodium salts、Glucose、Phosphate-buffered saline (PBS)、Sodium bicarbonate (NaHCO₃)、Sodium pyruvate、Hank's balanced salts solution (HBSS)、Dimethyl sulfoxide (DMSO) 購自 Sigma 化學公司 (St. Louis, MO, USA)。Fetal bovine serum (FBS) 購自 Gibco (St. NY, Grand island, USA)。

(四) 實驗試劑

Fluorescein isothiocyanate (FITC) anti-mouse CD3e、Phycoerythrin (PE) anti-mouse CD19 購自 Becton Dickinson (St. NJ, Franklin Lakes, USA)；Phagocytosis assay Kit 購自晶研生物科技；LIVE/DEAD cell-mediated Cytotoxicity Kit 購自 Molecular Probes (St. Oregon, Eugene, USA)；Bio-Rad DC Protein Assay kit 購自 Bio-Rad (St. California, Hercules, USA)。

(五) 海馬萃取物之製備

將海馬以粉碎機粉碎成粉末後，以 1:100 (海馬粉末:水) 之比例進行 100 °C、30 min 之熱水萃取，而後以 1 號濾紙過濾，取其過濾液即為海馬之熱水萃取物。庫達海馬熱水萃取物之可溶性蛋白質含量為 8.38 mg/ml，而棘海馬熱水萃取物之可溶性蛋白質含量則為 9.07 mg/ml。

二、方法

(一) 可溶性蛋白含量測定

兩種海馬熱水萃取物凍乾後經一般成分分析其粗蛋白含量最高，故分析過濾液之可溶性蛋白質含量，作為餵食動物劑量之依據。依 Lowry *et al.*

(1951) 原理，採用 Bio-Rad DC Protein Assay kit 分析。利用 Lowry 反應分析蛋白質，此法是雙縮尿 (Biuret) 步驟的延伸。第一步驟乃在鹼性溶液中形成銅-蛋白質複合物，之後複合物會把磷鉬酸-磷鎢酸(Phosphomolybdic-phosphotungstate) 試劑-斐林 (Folin's) 試劑還原成深藍色，以 750 nm 測其吸光值，並由牛血清蛋白 (Bovine serum albumin) 所得之標準檢量線換算成蛋白質含量，單位為 mg/ml。

(二) 動物採血及犧牲

小鼠經連續餵食海馬熱水萃取物 6 週，於末次餵食 30 min 後，在溫度為 30 °C 的水中不負重游泳 90 min，休息 60 min 後以乙醚麻醉小鼠後，眼窩採血以收集犧牲前全血並加入肝素，以供吞噬細胞活性試驗，另外將全血以 3000 rpm、4 °C、15 min 離心後收集血漿，以供後續血尿素氮、血乳酸與肌酸激酶等試驗。同樣以乙醚麻醉小鼠後，將實驗組及對照組的小鼠以頸椎脫臼犧牲。小鼠犧牲後，將小鼠全身噴灑 70 % 酒精，移至無菌操作台內操作。以解剖剪剪開腹膜並去除脾臟周圍多餘的結締組織，取出脾臟以供後續脾臟淋巴細胞增生能力、脾臟細胞中淋巴細胞亞群數目與自然殺手細胞活性等試驗。

(三) 抗疲勞功能試驗

1. 游泳運動能力測定

依據衛生署健康食品之抗疲勞功能評估方法 (2004)，實驗前一週，在餵食 30 min 後，先進行游泳適應。小鼠經連續餵食海馬熱水萃取物 6 週，於末次餵食 30 min 後，將小鼠放入直徑 15 cm、水深 20 cm、水溫 27 ± 1 °C 的玻璃水缸中，強迫小鼠進行游泳，直到體力消耗殆盡下沉溺死為止，計算自落水開始至鼻孔沉入水中的死亡時間即為游泳時間。也可記錄小鼠入水至頭部全部入水持續 8 sec 不能浮出水面為止的時間。

2. 血尿素氮試驗 (Blood urea nitrogen)

利用比色測定之原理，於定量的血漿中加入 Urase 反應後再加入 Ammonia 為呈色劑，作用後產生紅色化合物，於 660 nm 波長下測定其吸光度，再換算得血尿素氮的濃度。

3. 血乳酸試驗 (Serum lactate)

利用酵素作用及比色測定之原理，於定量的血漿中加入 Lactate oxidase 反應後，再加入 4-Aminoantipyrine 及 1,7-Dihydroxynaphthalene，經 Peroxidase 作用後產生紅色化合物，於 540 nm 波長下測定其吸光度，再換算得乳酸之濃度。

4. 肌酸激酶 (Creatine kinase)

利用酵素作用及比色測定之原理，於定量的血漿中加入 Creatine phosphate glucose oxidase 反應後，再加入 4-Aminoantipyrine 及 1,7-Dihydroxynaphthalene，經 Peroxidase 作用後產生白色化合物，於 680 nm 波長下測定其吸光度，再換算得其濃度。

(四) 免疫調節功能試驗

1. 脾臟細胞懸浮液製備

依據衛生署健康食品之免疫調節功能評估方法 (1999)，將已犧牲之小鼠脾臟置入含 HBSS 溶液的 Petri-dish 中，以無菌操作方式研磨脾臟得細胞溶液，磨至脾臟為白色結締組織時，再以無菌吸管吸出細胞懸浮液，收集至 15 ml 離心管中，待重力沉澱 5 min 後，可看到離心管底部有白色物質沉澱，取上層液並注入另一隻 15 ml 離心管，將上層液於 1500 rpm、5 min、4 °C 條件下離心，取離心管底部的細胞，再加入 2 ml 紅血球溶解緩衝液避光作用 15 min 後，再以 1500 rpm、5 min、4 °C 條件下離心。離心後取底部細胞，加入 10 ml RPMI-1640 培養基後離心，重複上述步驟兩次，以沖洗掉被漲破的紅血球，最後一次離心，加入 5 ml RPMI-1640 培養基拍散離心管底部的細胞，將離心管置於冰中待細胞計數與後續實驗。

2. 脾臟淋巴細胞增生試驗 (MTT assay)

MTT assay 是一種快速的呈色法，其主要依賴細胞粒線體中琥珀酸去氫酶之作用，將 MTT 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) 之 tetrazolium 打斷，轉為藍色之產物 MTT formazan。MTT 之轉變僅在存活的細胞中進行，並堆積在細胞內，所以加入 DMSO 溶解細胞膜後，可由波長約 570 nm 之吸光測量並定量，且 MTT formazan 形成量與數目呈正比。因此細胞還

原 MTT 的能力，代表了細胞粒腺體的活性，並可做為細胞存活率的一個指標。

將餵食蒸餾水、庫達海馬及棘海馬熱水萃取物之小鼠脾臟細胞懸浮液，調整為 2×10^5 cells/ml。在 96 孔圓底細胞培養盤中，每孔注入 100 μ l 脾臟細胞懸浮液，並分別添加 0.175 mg/ml、0.35 mg/ml、0.7 mg/ml 之海馬熱水萃取物 100 μ l 將 96 孔圓底細胞培養盤靜置於 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 之細胞培養箱中 48 hr 後，再於每個 well 中加入 20 μ l 的 MTT 溶液 (MTT 溶液 5 mg/ml 以 PBS 溶)，置於 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 之細胞培養箱中與細胞作用 4 hr，最後加入 100 μ l 的 DMSO 溶解細胞膜，並均勻混和以確保藍紫色結晶完全溶解，待靜置 1 hr 後，以 ELISA reader 讀取波長 570 nm 的吸光值。細胞存活率(%) = [(樣品組吸光值 - 空白組吸光值) / 不加樣品之控制組吸光值] \times 100%。其中空白組為不含細胞及不含樣品之培養液。

3. 脾臟細胞中淋巴細胞亞群數目之分析

將餵食蒸餾水、庫達海馬及棘海馬熱水萃取物之小鼠脾臟細胞懸浮液，將其調整為 10^6 cell/ml，再取出 100 μ l 至 Falcon 管中，於每管中加入 1 μ l 以 FITC/PE 雙螢光標定之各抗體，均勻混合後，靜置室溫下避光 30 min，染色完成後，加 1 ml 的 PBS buffer，以 1500 rpm、5 min、4 $^{\circ}$ C 條件離心，將未結合的抗體洗去，再加入 1 ml 的 PBS buffer，利用流式細胞儀 (Becton Dickinson FACScan)，其設定條件為前向散射 (Forward scatter; FSC) E00 伏特，側向散射 (Side scatter; SSC) 356 伏特進行分析。

4. 自然殺手細胞活性之分析

將 YAC-1 細胞株以螢光染劑 (DioC₁₈) 染色 30 min，再以 PBS 洗二次後，將細胞數目調成 1×10^6 cells/ml，置於 37 $^{\circ}$ C 培養箱中，保持細胞存活率達 90% 以上，將其作為標靶細胞 (Target cell)。將餵食蒸餾水、庫達海馬及棘海馬熱水萃取物之小鼠脾臟細胞數目調成 1×10^7 cells/ml 懸浮於 RPMI-1640 培養液中作為效應細胞 (Effect cell)，分別將 10 μ l 染色後的 YAC-1 細胞加入 100 μ l 脾臟細胞，並加入 130 μ l 的 PI (0.1 mg/ml) 染色，以 800 rpm、1 min 條件下離心後，培養於 37 $^{\circ}$ C 培養箱中 4 小時，以流式細胞儀計算

自然殺手細胞活性，先計算綠色螢光的 YAC-1 細胞數目，再計算綠色細胞中有多少細胞因為被自然殺手細胞所破壞，使其細胞膜不完整，故為綠中帶紅的細胞，計算綠色細胞中有多少百分比為帶有紅色細胞即為自然殺手細胞活性。

5. 吞噬細胞活性之分析

每試管中加入 100 μ l 含肝素 (Heparin) 之全血，每一檢體各做兩管 (1 管為試驗管，1 管為陰性對照管)，冰浴 10 min。暗室中，將各管加入 20 μ l 的目標細胞 (FITC-labeled *E. coli*)，震盪混勻。試驗管置於 37 $^{\circ}$ C 水浴槽中、10 min；陰性對照組則置於 4 $^{\circ}$ C 冰浴中 10 min，進行吞噬作用。吞噬作用終了立刻置於冰上，並於各管加入 100 μ l Quenching solution 混勻，藉由低溫來終止吞噬作用，並用 Quenching solution 排除未吞入而沾附於細胞表面的目標細胞。接著，加入 3 ml 冰冷的 Washing solution 清洗，以 1500 rpm、5 min、4 $^{\circ}$ C 條件離心，去除上清液，並重複清洗步驟一次。各管加入 2 ml 稀釋 1 倍的 Lysing solution 溶解紅血球，室溫下作用 20 min 後，以 1500 rpm、5 min、4 $^{\circ}$ C 條件離心，吸除上清液。加入 200 μ l DNA Staining Solution，混合冰浴 10 min，藉此染出白血球，用以避免未被吞噬之 *E. coli* 的干擾。最後利用流式細胞儀，分析多核球 (Granulocytes) 與單核球 (Monocytes) 的吞噬能力。

結果與討論

一、海馬熱水萃取物之抗疲勞功效評估

(一) 游泳運動能力

在抗疲勞功效評估方面，最直接顯而易見的方法就是游泳運動能力的測試，是觀察實驗物質是否具有抗疲勞效果的有效方法。控制組、庫達海馬組、棘海馬 3 組之游泳時間分別為 24 ± 30 、 316 ± 18 、 324 ± 23 min (Fig. 1)，其中海馬熱水萃取物能延長小鼠的游泳時間達 60 min 以上。結果顯示，庫達與棘海馬熱水萃取物的確具有抗疲勞之功效。

Fig. 1 The effect of orally administered with SWE (Seahorse hot water extract) on chronic swimming time of mice. Data express mean \pm S.D. of 6 mice in an each group. Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

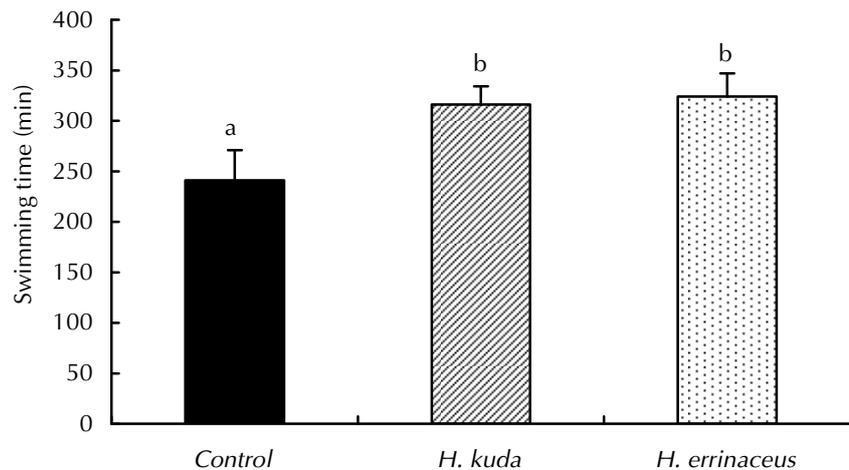


Table 1 Effect of orally administered with SWE on serum lactate, creatine kinase and urinary urea nitrogen of mice

	Control	<i>H. kuda</i>	<i>H. errinaceus</i>
Serum lactate (mM)	94.11 \pm 13.50 ^a	87.97 \pm 10.51 ^a	87.68 \pm 9.19 ^a
Creatine kinase (mg/dl)	1.32 \pm 0.08 ^b	0.87 \pm 0.05 ^a	0.88 \pm 0.06 ^a
Blood urea nitrogen (mg/dl)	10.37 \pm 1.64 ^b	5.65 \pm 2.01 ^a	6.29 \pm 1.23 ^a

Data express mean \pm S.D of 6 mice in an each group. Means of each row with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

(二) 生化值測定 – 血乳酸、肌酸激酶、血尿素氮

海馬熱水萃取物對於血液生化值之影響如 Table 1 所示。激烈運動時，由於氧的需求不平衡，缺氧的醣解作用成為供應能量的大部分來源，就會造成血乳酸的大量堆積。而血乳酸堆積會干擾肌肉的收縮、神經衝動的傳導及能量的利用，因而導致疲勞的出現 (Stamford *et al.*, 1981)。在餵食海馬熱水萃取物後，不論是庫達海馬組或棘海馬組與控制組相比較，均沒有顯著差異，沒有使小鼠的血乳酸值下降，這表示不論是餵食庫達海馬組或棘海馬組之萃取液，都不會提升小鼠排除乳酸的代謝率，顯示海馬熱水萃取物抗疲勞之功能，並不是經由加速血乳酸排除而達到。

骨骼肌、心肌、腦及前列腺等器官均會有肌酸激酶，其中以骨骼肌含量最豐富，占全身總量 96% 之多，運動會使血清肌酸激酶濃度增高，其原因是因為運動時缺氧，代謝產物堆積，功能相對不足等原因引起肌細胞膜通透性增高，或肌細

胞膜受到損傷，促使肌酸激酶進入血液循環，因此若能降低血液中肌酸激酶的含量，則具有抗疲勞的效果。而在本研究中，不論是餵食庫達或棘海馬萃取液之小鼠，其運動後肌酸激酶濃度分別為 0.87 \pm 0.05 mg/dl 及 0.88 \pm 0.06 mg/dl，與控制組運動後濃度為 1.32 \pm 0.08 mg/dl 相比較下，皆有下降的現象。顯示餵食海馬熱水萃取物可以降低小鼠肌酸激酶的濃度，幫助小鼠肌酸激酶的移除，進而達到抗疲勞的效果。

一般而言，長達 30 min 以上的運動，骨骼肌中的支鏈胺基酸開始脫胺基，碳鏈被氧化，胺基酸與丙酮發生反應生成丙酮酸，經由血流丙酮酸在肝臟中再脫胺基而生成尿素，如此蛋白質和胺基酸大量參與分解代謝，引起血尿素上升 (Hubner-Wozniak *et al.*, 1993; Maddali *et al.*, 1998)。通常長期時間的運動會使血尿素氮的濃度上升，使其達到疲勞閾值，而運動後的血尿素氮含量變化與恢復狀況有關 (劉, 1989)。在本研究中，也觀察到餵食庫達或棘海馬熱水萃取物之小鼠，其運動後血尿素氮濃度分別為 5.65 \pm 2.01

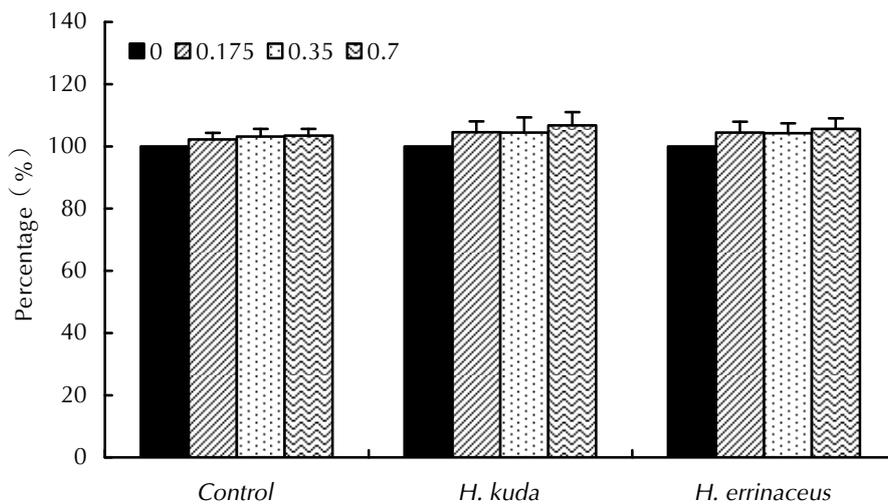


Fig. 2 The proliferation of primary spleen cell of oral administered SWE mice after stimulating by SWE for 24 hr. All tests were no significant difference from control ($p < 0.05$).

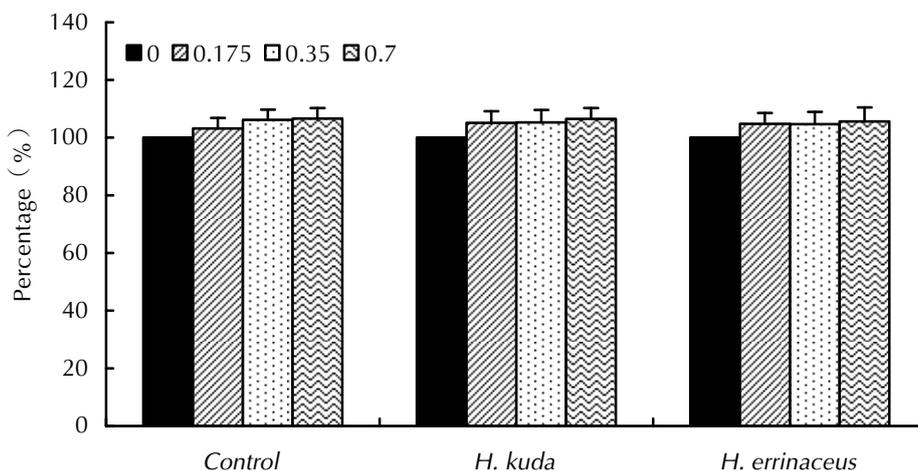


Fig. 3 The proliferation of primary spleen cell of oral administered SWE mice after stimulating by SWE for 48 hr. All tests were no significant difference from control ($p < 0.05$).

mg/dl 及 6.29 ± 1.23 mg/dl 與控制組 10.37 ± 1.64 mg/dl 相比較，皆有下降的現象。因此推測海馬熱水萃取物可能增加血液中的蛋白質濃度，而減少肌肉中的胺基酸分解，使血尿素氮與肌酸激酶濃度下降，來達到抗疲勞的效果。

二、海馬萃取物之免疫調節功效評估

(一) 初代脾臟淋巴細胞增殖反應與脾臟中淋巴細胞亞群之分布

脾臟是身體重要的免疫器官，它是屬於次級淋巴器官 (Secondary lymphoid organ)，在脾臟中

充滿著 T 細胞、B 細胞及自然殺手細胞，當有病菌入侵時，這些淋巴細胞即被活化以抵禦及消滅外來的侵入者。本次研究中，餵食蒸餾水、庫達海馬及棘海馬熱水萃取物之小鼠脾臟細胞經過不同濃度海馬熱水萃取物處理 24 與 48 hr 後，結果由 Fig. 2 與 Fig. 3 所示，庫達海馬與棘海馬組脾臟細胞之增生能力與控制組脾臟細胞比較下，無明顯之差異。這表示在經口給予海馬熱水萃取物，並未使脾臟中的淋巴細胞有記憶效應，能夠快速反應。將餵食 6 週之小鼠犧牲後，偵測脾臟中淋巴細胞亞群之分布，結果由 Fig. 4 所示，在庫達海馬組與棘海馬組之小鼠，不論是 T 細胞或

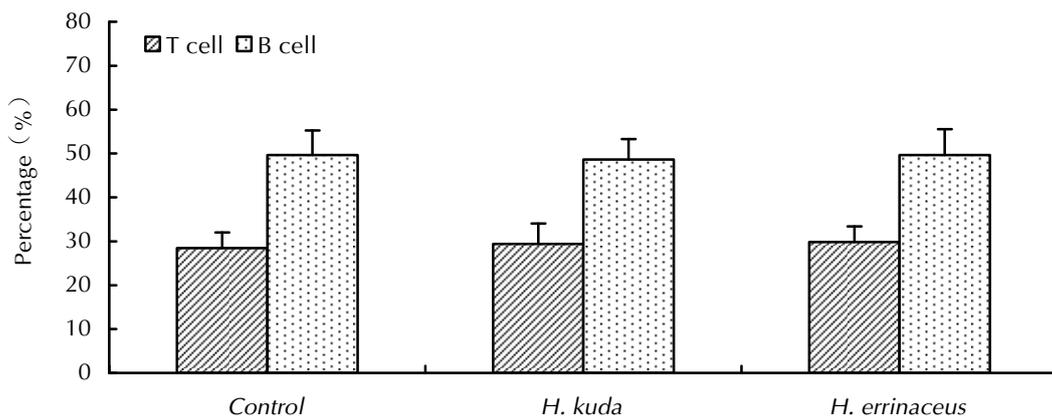


Fig. 4 The effect of orally administered with SWE on T/B cell of mice spleen. Data were mean \pm S.D (n = 6). All tests were no significant difference from control ($p < 0.05$).

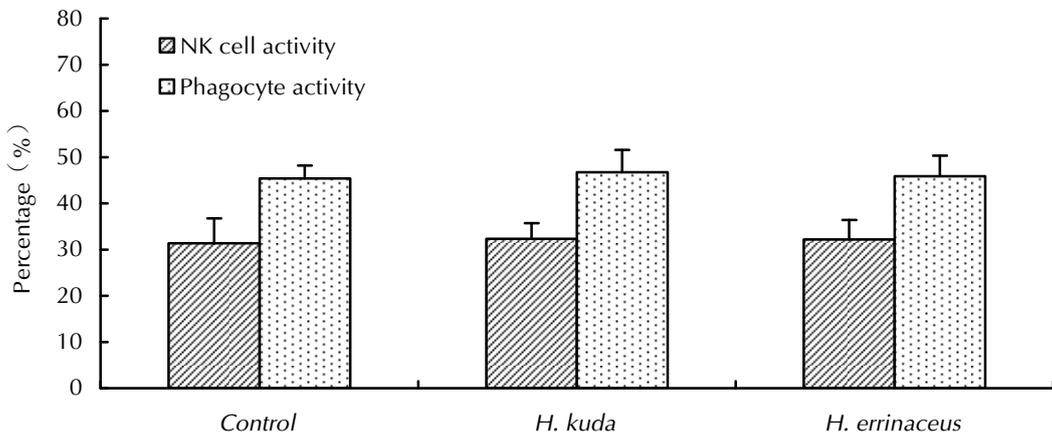


Fig. 5 The effect of orally administered with SWE on NK cell activity/macrophage activity. Data were mean \pm S.D (n = 6). All tests were no significant difference from control ($p < 0.05$).

B 細胞與控制組相比較時均無顯著差異。

海馬含有豐富的人體所必需的多種胺基酸，其中含量較多的為精胺酸、甘胺酸與麩胺酸等，另外尚含有藥用價值較高的牛磺酸（賈和姚, 1990）。麩胺酸雖非人體的必需胺基酸，卻為細胞增生時重要的營養素，亦為內皮細胞及發炎性細胞的能量代謝來源。因此，麩胺酸對免疫細胞的增生與分化皆有所影響 (Parry *et al.*, 1990)。而精胺酸對免疫細胞的影響，可能透過精胺酸酶的途徑產生多胺，而促進淋巴細胞的增生 (Klein and Morris, 1978)。此外長時間高強度的運動，反而會造成免疫功能下降 (Shore *et al.*, 1999)。在本研究中，兩種海馬熱水萃取物，對於初代脾臟淋巴細

胞增殖反應與脾臟中淋巴細胞亞群均無顯著差異，這可能是這兩種胺基酸的濃度尚未達到影響淋巴細胞的濃度，或者是因為小鼠劇烈運動後，影響了淋巴細胞的增生能力。

(二) 自然殺手細胞之毒殺能力

由 Fig. 5 可以看出庫達海馬與棘海馬組的自然殺手細胞活性與控制組相比，皆未呈現升高之現象。顯示此兩種海馬熱水萃取物，不會影響自然殺手細胞對抗外侵入者的活性。甘胺酸對於免疫細胞，如中性白血球、巨噬細胞及淋巴球皆有抑制活性之效果 (Erich, 2007)。而劇烈運動也會造成免疫細胞活性下降。兩種海馬萃取物及運動後

對自然殺手細胞活性，並沒有達到抑制的情形，其原因可能因為海馬萃取物中的促進免疫活性其他機能性成分所造成的結果。

(三) 全血中吞噬細胞之吞噬能力

通常血液中的吞噬細胞為單核球與嗜中性白血球，為非專一性免疫反應的一部份。如 Fig. 5 所示，在餵食6週後，庫達海馬組與棘海馬組之吞噬細胞吞噬能力相較於控制組都呈現未顯著變化之現象。由此可知，海馬熱水萃取物並不能夠增加吞噬細胞的活性，以提升非專一性免疫的能力與效果。海馬萃取物中含有牛磺酸，而補充牛磺酸可以恢復大鼠中性白血球的活性(Masuda *et al.*, 1986)。但可能是因為小鼠長時間運動消耗牛磺酸，而且長時間運動也會使免疫功能下降，所以這也許是海馬萃取物造成吞噬細胞活性沒有顯著改變的可能原因。

本研究以抗疲勞與免疫調節評估海馬熱水萃取物之機能性，發現海馬熱水萃取物可以降低血液中的血尿素氮與肌酸激酶，以及延長小鼠游泳時間，藉此達到抗疲勞功效，這可能與萃取物中含有大量的支鏈胺基酸有關，但因為本研究並未探究海馬萃取物之胺基酸組成，無法確定是否是因為此原因，未來將針對此部分進行探討。而且在養殖庫達海馬與野生棘海馬的功效上，在本研究中證實，此兩物種的功效性並沒有任何的差別，因此以養殖庫達海馬來取代野生棘海馬當做中醫藥用途是可行的，對於生態保育與中醫藥的永續發展不外是一大福音。

另外，海馬熱水萃取物對於免疫功能在本研究中是沒有任何影響的，探究其原因可能是萃取物本身，並未含有任何可以刺激免疫系統之成分，或者是因為其成分還未達到能夠有效調節免疫系統之劑量，或者是因為在小鼠長時間運動過後，造成短暫的免疫功能下降，也有可能是因為本研究評估免疫功能的指標，皆為需長時間觀察的指標，然而這都需要更進一步的探討。因此，我們希望本篇報告能作為評斷海馬中藥科學化之基礎數據，一方面避免野生海馬之濫捕，並尋求替代物種。另一方面，考量海馬是否有入藥之必要性，為生態保育盡一份心力。

結 論

由動物試驗評估養殖庫達海馬與野生棘海馬熱水萃取物的抗疲勞活性，以及免疫功能調節。結果顯示養殖庫達海馬與野生棘海馬之熱水萃取物，皆能使血中肌酸激酶與血尿素氮下降而達到抗疲勞之作用。但在免疫功能調節，卻無任何影響，其原因仍有待後續研究探討。然而，在本研究中並未確認熱水萃取物中之有效生物活性成分，因此也需後續相關研究，進一步證明其功效性。

謝 辭

本研究得以順利完成，承蒙本所澎湖海洋生物研究中心蔡主任萬生及其同仁提供樣本材料，特此致謝。

參考文獻

- 王強, 張朝暉, 臧學新 (1998) 刺海馬化學成分研究. 中國藥科大學學報, 29:24-25.
- 伍漢霖, 金鑫波, 倪勇 (1977) 中國有毒魚類和藥用魚類. 上海科學技術出版社, 上海, 240-245.
- 余敏, 吳蘭如 (1988) 海洋生物抗衰老作用簡報. 現代應用藥學, 5: 9-10.
- 李文琪, 倪慶桂 (1999) 海馬對小鼠 S180 實體腫瘤的抑制作用. 安徽醫學, 20: 6.
- 許東暉, 許實波 (1995) 三斑海馬提取物抗血栓藥理作用研究. 中藥材, 18: 573.
- 許東暉, 許實波 (1997) 三斑海馬提取物抗大鼠血栓形成的作用及成分分析. 中國海洋藥物, 61: 11.
- 張朝暉, 徐國鈞, 徐珞珊 (1995) 海龍類乙醇提取物的激素樣作用. 中藥材, 18: 197.
- 張朝暉, 徐國鈞, 徐珞珊 (1997) 海龍科藥用動物的理化分析. 中藥材, 20: 140-143.
- 張朝暉, 徐國鈞, 徐珞珊 (1998) 尖海龍中脂溶性成分的GC/MS分析. 中國藥科大學學報, 29: 24-25.
- 張民慶, 龔惠民 (1998) 抗腫瘤中藥的臨床應用. 人民衛生出版社, 北京, 402.
- 賈元印、姚乾元 (1990) 海馬與大海馬微量元素和胺基酸的比較分析. 中國海洋藥物, 9:13-15.
- 梁世村 (2004) 不同種海馬之膽固醇與脂肪酸含量分析. 國立臺灣海洋大學環境生物與漁業科學研究所 碩士論文, 1.

- 劉丹 (1989) 不同訓練負荷對足球運動員血尿的影響. 體育科學, 9: 42-44.
- 行政院衛生署 (1999) 健康食品之免疫調節功能評估方法. 衛署食字第 88037803 號公告.
- 行政院衛生署 (2004) 健康食品之抗疲勞功能評估方法. 衛署食字第 0920401629 號公告.
- Erich, R. (2007) Immune and cell modulation by amino acids. *Clin. Nut.*, 26: 535-544.
- Hubner-Wozniak, B., K. Lerczak and W. Sendcki (1993) Effects of marathon run on changes in some biochemical variables in some biochemical variables in plasma of amateur long-distance runners. *Biol. Sport.*, 10: 173-181.
- Klein, D. and R. D. Morris (1978) Increased arginase activity during lymphocyte mitogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 81: 199-204.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, F. A. Lewis and R. J. Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Masuda, M., K. Horisaka and T. Koeda (1986) Effects of taurine on neutrophil function in hyperlipidemic rats. *Japan J. Pharmacol.*, 40: 478-480.
- Maddali, S., S. A. Rodeo, R. Barnes, R. F. Warren and G. A. C. Murrell (1998) Postexercise increase in nitric oxide in football players with muscle. *Am. J. Sports. Med.*, 26: 820-824.
- Parry, B. M., J. Evans and P. C. Calder (1990) Dose glutamine contribute to immunosuppression after burns. *Lancet.*, 336: 523-525.
- Shore, S., S. Shinkai, S. Rhind and R. J. Shephard (1999) Immune responses to training: how critical is training volume? *J. Sports. Med. Phys. Fitness.*, 39: 1-11.
- Stamford, B. A., A. Weltman, R. Moffatt and S. Sady (1981) Exercise recovery above and below the anaerobic threshold following maximal work. *J. Appl. Physiol.*, 51: 840-844.

Antifatigue and Immunomodulatory Effects of Hot Water Extracts of Seahorse

Shih-Yung Chien, Yu-Lan Hung, Pai-An Hwang* and Chwen-Herng Wu

Seafood Technology Division, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

The seahorse has been used extensively in Asia as a traditional medicine whose functions may be enhance energy and fatigue resistance. The effects of hot water extracts from cultured seahorse *Hippocampus kuda* and wild seahorse *H. enrinace* on antifatigue and immune were compared. Two kinds of extracts were separately fed to mice for six weeks. The duration of swimming time, serum lactate, creatine kinase, blood urea nitrogen, spleen cells proliferation, lymphocyte subpopulation of spleen cells, natural killer cell activity and phagocyte activity on forced swimming stressed mice were analyzed. Both extracts significantly extended the swimming time and reduced creatine kinase and blood urea nitrogen in plasma. The spleen cells proliferation, lymphocyte subpopulation of spleen cells, natural killer cell activity and phagocyte activity of two extracts were no significantly different from control. Therefore, it suggested that the two extracts might have an effect on the antifatigue action.

Key words: seahorse, antifatigue, immunomodulation, hot water extract

*Correspondence: 199, Hou-lh Rd., Keelung 202, Taiwan, TEL: (02) 2462-2101; Fax: (02) 2462-3306; E-mail: pahwang@mail.tfrin.gov.tw