

半葉馬尾藻酒精萃取物對過氧化氫誘導 3T3-L1 脂肪細胞 氧化損傷之抗氧化活性評估

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

本研究係評估半葉馬尾藻 (*Sargassum hemiphyllum*) 酒精萃取物的抗氧化活性及探討萃取物對過氧化氫 (Hydrogen peroxide, H₂O₂) 誘發 3T3-L1 脂肪細胞氧化損傷之影響。半葉馬尾藻酒精萃取物的總酚含量為 22.35±1.41 mg/g 乾藻, 其抗氧化活性以還原力、清除 α, α -Diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) 自由基能力、螯合亞鐵離子能力及 Superoxide dismutase-like (SOD-like) 活性四項方法測定, 結果顯示: 半葉馬尾藻酒精萃取物在清除 DPPH 自由基能力及 SOD-like 活性方面具有較好的能力。此外, 半葉馬尾藻酒精萃取物可以降低 H₂O₂ 對 3T3-L1 脂肪細胞的氧化損傷, 及減少胞內活性氧分子 (Reactive oxygen species, ROS) 的量, 進而提升細胞的存活率。在半葉馬尾藻酒精萃取物 1.5 及 2.0 mg/ml 濃度下, 其可提升 3T3-L1 氧化損傷細胞中的麩胱甘肽過氧化酶 (Glutathione peroxidase, GPx)、過氧化氫酶 (Catalase, CAT) 與超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 活性, 及抑制氧化酵素 gp91^{phox} 及 p67^{phox} 的 mRNA 表現量。從上述結果得知, 半葉馬尾藻酒精萃取物可能藉由多酚物質之抗氧化能力先清除胞外自由基, 進而減少胞內的 ROS 產生, 進而藉由提升抗氧化酵素活性及抑制氧化酵素 mRNA 表現量, 達到減緩 H₂O₂ 對 3T3-L1 脂肪細胞所造成的氧化損傷。

關鍵詞: 半葉馬尾藻、3T3-L1 脂肪細胞、氧化壓力、抗氧化活性

前 言

隨著經濟發展與物質生活水準的提升, 肥胖在現今是一個嚴重的健康問題, 而以細胞的角度來看, 肥胖起因於脂肪細胞數目增加、體積變大或是兩者兼具。研究顯示在前脂肪細胞 (preadipocytes) 分化成脂肪細胞 (adipocytes) 的過程中, 會產生活性氧分子 (Reactive oxygen species, ROS) 進而使胞內的氧化壓力上升 (Arita *et al.*, 1999)。ROS 主要是由氧分子在新陳代謝過程中轉變形成, 如單旋氧 (Singlet oxygen, ¹O₂)、過氧化氫 (Hydrogen peroxide, H₂O₂)、氫氧自由基 (Hydroxyl radical, \cdot OH)、超氧陰離子自由基 (Superoxide anion, \cdot O₂⁻) 及過氧化

脂質 (Lipidhydroperoxide, LOOH) 等 (Halliwell, 1994)。一般認為肥胖引起的 ROS 異常增加, 是引發代謝症候群的重要原因之一。ROS 產生過多時會造成組織傷害, 因而發生慢性發炎反應 (Houstis *et al.*, 2006)。此外, Van Gaal *et al.* (1998) 發現在脂肪細胞中, 脂質的堆積及抗氧化能力的下降會使細胞內的 ROS 產生量增加, 也證實了脂肪的堆積與氧化壓力有密切的關係。

研究指出攝食多酚化合物等抗氧化物可以減少氧化壓力的產生, 多酚化合物廣泛存在於植物組織中, 同時已被證實其抗氧化活性, 能夠調控發炎反應、抗動脈粥狀硬化作用、防護輻射傷害的效果等 (Perron and Brumaghim, 2009)。而海藻內也富含有多酚化合物、類胡蘿蔔素、維生素 C 及維生素 E 等生物活性複合物 (Bioactive compounds), 故可以藉著直接清除自由基而達到調節氧化壓力的作用 (Hsu and Yen, 2006)。近年來

*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

的研究發現，匍枝馬尾藻 (*Sargassum polycystum*)、裂葉馬尾藻 (*S. siliquastrum*)、鈍凹頂藻 (*Laurencia obtuse*) 及羊栖菜 (*Hizikia fusifome*) 的萃取物不僅具有清除 DPPH 自由基能力、抑制脂質過氧化，也具有清除過氧化自由基及超氧自由基的效果 (Anggadiredja *et al.*, 1997; Lim *et al.*, 2002; Nagai and Yukimoto, 2003)。此外，存在於褐藻中的褐藻多酚 (Phlorotannins) 及藻褐素 (Fucoxanthin) 具有極佳的抗氧化活性，可以減緩外界環境對細胞所造成的氧化損傷。如：鵝掌菜 (*Ecklonia cava*) 萃取而得的褐藻多酚可以提升倉鼠肺纖維母細胞 (V79-4 cell) 中的抗氧化酵素活性，保護細胞避免受到 H₂O₂ 的傷害。另外也可以減緩 UVB 對纖維母細胞的光氧化傷害，同時提升纖維母細胞之存活率 (Heo *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2005a)。將裂葉馬尾藻萃取而得的藻褐素與猴子腎臟纖維母細胞 (Vero cell) 及 H₂O₂ 進行共培養，發現其可以降低 H₂O₂ 對細胞 DNA 的損傷，提升細胞存活率 (Heo *et al.*, 2008)。

褐藻萃取物對 3T3-L1 脂肪細胞的相關研究，則多著重在抑制 3T3-L1 前脂肪細胞的分化及抑制脂質堆積的探討，如：Kim *et al.* (2009) 於 3T3-L1 前脂肪細胞分化成脂肪細胞的過程中添加褐藻糖膠 (Fucoidan)，發現其可抑制 3T3-L1 前脂肪細胞的分化，並降低細胞中脂質的堆積。Maeda *et al.* (2006) 同樣在 3T3-L1 前脂肪細胞分化過程中，添加萃取自裙帶菜 (*Undaria pinnatifida*) 的藻褐素，結果顯示能顯著降低細胞的脂肪堆積。而於第二型糖尿病鼠 (KKAy mice) 飼料中添加 0.2% 由裙帶菜萃取而得的藻褐素，發現可顯著降低大鼠腹部白色脂肪的重量 (Maeda *et al.*, 2005)。雖然在體外或體內均有研究證實褐藻萃取物可以抑制脂質堆積，然目前僅 Lee *et al.* (2011) 提到褐藻酒精萃取物對 3T3-L1 脂肪細胞與 ROS 產生之間的關連性，該學者表示褐藻酒精萃取物對 3T3-L1 脂質堆積抑制率越高時，其胞內的 ROS 量就越少，但並無探討褐藻酒精萃取物對細胞內抗氧化酵素或 NADPH 氧化酵素活性的影響。

在傳統中醫藥之藥材多以研末、酒劑或水煎方式服用，而先前筆者等已證實台灣半葉馬尾藻 (*Sargassum hemiphyllum*) 水萃物於體外試驗中具有良好的抗氧化能力，且可調節免疫力 (Hwang *et al.*, 2010) 及抗發炎 (Hwang *et al.*, 2011)。本試驗

換以酒劑對半葉馬尾藻進行萃取，分析其酒精萃取物的總酚含量及抗氧化能力。並在 3T3-L1 前脂肪細胞分化成脂肪細胞的過程中添加半葉馬尾藻酒精萃取物，探討半葉馬尾藻酒精萃取物是否可以減緩 H₂O₂ 對 3T3-L1 脂肪細胞所造成的氧化傷害，及其對胞內抗氧化酵素及氧化酵素之影響。以期能有效利用半葉馬尾藻機能性成分，了解褐藻開發作為醫藥或保健食品之可行性。

材料與方法

一、材料

(一) 半葉馬尾藻酒精萃取物製備

本研究所使用之半葉馬尾藻係採自台灣澎湖 (Hwang *et al.*, 2010)。半葉馬尾藻經清水洗淨後以烘箱 (RISEN Co., LTD, RHD-602D) 50°C 乾燥，後以粉碎機 (D3V-10, YOUQI, Taiwan) 進行粉碎，再經 0.5 mm 孔徑篩網篩選備用。取 100 g 半葉馬尾藻粉末加入 20 倍量的 95% 乙醇 (v/w)，於 50°C 加熱 6 h，後以 5500 rpm、10 min 離心，將上清液以濃縮機 (BUCHI, Rotavapor R-114) 濃縮至乾予以備用。接著取半葉馬尾藻酒精萃取物先以二甲基亞砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 配置成 100 mg/ml 濃度後，再以 95% 乙醇配製 2.5、5.0、10.0 和 20.0 mg/ml 等濃度，供抗氧化分析使用。另以細胞培養液配製 0.5、1.0、1.5 和 2.0 mg/ml 等濃度，供細胞實驗使用。

(二) 細胞株

本試驗所使用之老鼠 3T3-L1 前脂肪細胞 (3T3-L1 preadipocytes)，購自新竹食品工業研究所菌種中心。

(三) 試藥

化學分析藥品購自 Sigma (St. Louis, USA)，細胞試驗藥品購自 GIBCO BRL (Grand Island, N. Y., USA)，反轉錄聚合酶鏈反應 (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR) 試驗藥品購自波仕特生物科技公司 (Taipei, Taiwan)。

二、實驗方法

(一) 總酚含量分析

參考 Simonetti *et al.* (1997) 之試驗方法：取 500 μ l 樣品，加入 0.5 ml 之 1N 磷鉬酸酚試劑 (Folin-Ciocalteu's phenol reagent) 及 1.5 ml 20% 碳酸鈉溶液後混合均勻，於 40°C 熱水浴中反應 20 min，迅速冰浴冷卻後，以 3000 rpm 離心 8 min，取上層澄清液以紫外光/可見光光譜儀 (UV-2001 Spectrophotometer, HITACHI) 測其 755 nm 吸光值，吸光值越高表示其總酚化合物越多。總酚含量之計算方式是以沒食子酸 (Gallic acid) 之標準曲線作為對照，計算出樣品中沒食子酸之相對量，並以此表示樣品中總酚類化合物之含量。

(二) 抗氧化活性測定

1. 還原力測定

參照 Oyaizu (1988) 比色法。取 1 ml 樣品溶於 1 ml 0.2 M 磷酸緩衝溶液 (Phosphate buffer saline, PBS, pH 6.6)，再加入 1 ml 1% 鐵氰化鉀 (Potassium ferricyanide)，於 50°C 水浴反應 20 min，迅速冷卻後，再加入 1 ml 10% 三氯醋酸 (Trichloroacetic acid) 溶液均勻混合。而後取出 1 ml 混合液，加入 1 ml 去離子水及 0.2 ml 0.1% 氯化鐵 (Ferric chloride) 溶液，混合均勻並於室溫放置 10 min 後測定 700 nm 吸光值。吸光值愈高表示還原力愈強。以 100 ppm 維生素 E (α -Tocopherol) 作為對照組，以去離子水取代樣品作為控制組。

2. 清除 α, α -Diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) 自由基能力測定

參照 Shimada *et al.* (1992) 比色法。取 1 ml 樣品，加入 1 ml 0.1 mM DPPH (溶於 95% 乙醇)，避光反應 30 min 後測定 517 nm 吸光值。吸光值愈低表示清除能力愈強。清除能力 (%) = [(控制組吸光值 - 樣品組吸光值) / 控制組吸光值] \times 100%。以 100 ppm 維生素 E 作為對照組，以去離子水取代樣品作為控制組。

3. 螯合亞鐵離子測定

參照 Boyer 和 McCleary (1987) 方法加以修改。取 0.25 ml 樣品，加入 3.7 ml 甲醇及 0.1 ml 2

mM 的氯化亞鐵 (Ferrous chloride) 溶液，混合均勻 30 sec 後，再加入 0.2 ml 5 mM 菲洛嗪 (Ferrozine)，反應 10 min 後測定 562 nm 吸光值，吸光值越低表示樣品螯合亞鐵的能力越強。螯合亞鐵離子能力 (%) = [(控制組吸光值 - 樣品組吸光值) / 控制組吸光值] \times 100%。以 100 ppm Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA) 作為對照組，以去離子水取代樣品作為控制組。

4. Superoxide dismutase-like (SOD-like) 活性測定

參照 Yamamoto *et al.* (2003) 以 SOD Assay Kit-Water-soluble tetrazolium salt (WST) 方法測定。取 0.02 ml 樣品，加入 0.02 ml 去離子水或 0.02 ml Enzyme working solution，及 0.2 ml WST 混合後，於 37°C 靜置 20 min 測定 450 nm 吸光值。SOD-like 活性 (%) = [(A_h - A₀) - (A_s - A_b)] / (A_h - A₀) \times 100%。以 100 ppm 維生素 E 作為對照組，以去離子水取代樣品作為控制組。

A_h 為控制組 (不含樣品，含 Enzyme working solution) 之吸光值

A₀ 為空白組 (不含樣品及 Enzyme working solution) 之吸光值

A_s 為樣品組 (含樣品及 Enzyme working solution) 之吸光值

A_b 為空白組 (含樣品，不含 Enzyme working solution) 之吸光值

(三) 細胞實驗

1. 細胞培養

(1) 3T3-L1 前脂肪細胞培養

3T3-L1 前脂肪細胞以 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培養液外加 10% 的胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) 培養於 37°C，5% CO₂ 濃度下，細胞株以倒立式顯微鏡觀察，當細胞長滿為單層時，即可進行繼代培養 (Maeda *et al.*, 2006)。

(2) 3T3-L1 脂肪細胞之分化培養

3T3-L1 前脂肪細胞離心收集後調整為 4×10^4

cells/ml，以 500 μ l/well 加入 24 well 培養盤中，置於 37°C 及 5% CO₂ 培養箱培養。待細胞接近長滿，視為第零天，此時更換含分化劑 I (10 μ g/ml Insulin、1 μ M Dexamethasone 及 0.5 μ M Isobutyl-methylxantine) 之 10% FBS DMEM 培養液，培養 48 h。而後更換含分化劑 II (10 μ g/ml Insulin) 之 10% FBS DMEM 培養液，每兩天更換一次培養液，持續八天，前脂肪細胞即逐漸分化成脂肪細胞 (Maeda *et al.*, 2006)。

2. 細胞存活率試驗

參照 Ferrari *et al.* (1990) 方法測定。將 3T3-L1 前脂肪細胞離心收集後調整為 4×10^4 cells/ml，以 100 μ l/well 加入 96 well 培養盤中。將其分為負控制組 (Negative control): 不添加半葉馬尾藻酒精萃取物及 H₂O₂，分化成熟後，接續培養 24 h；正控制組 (Positive control): 分化劑 II 培養液中不添加半葉馬尾藻酒精萃取物，於分化成熟後添加 1.25 mM H₂O₂，接續培養 24 h；及樣品組：在分化劑 II 培養液中添加 0.5、1.0、1.5 和 2.0 mg/ml 半葉馬尾藻酒精萃取物，並於分化成熟後添加 1.25 mM H₂O₂，接續培養 24 h。完成上述培養後，吸去培養液，於各 well 分別加入 50 μ l 含有 1 mg/ml 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 的 PBS，置於 37°C 反應 4 h，將上清液吸去，加入 100 μ l DMSO 使細胞破裂釋放出 Formazan 結晶，於 570 nm 測定吸光值。細胞存活率 (Cell survivability) (%) = [(正控制組或樣品組吸光值 - 空白組吸光值) / 負控制組吸光值] \times 100%。將負控制組視為 100%，另空白組為不含細胞及樣品之培養液。

3. 吞噬球呼吸爆 (Respiratory burst) Nitro blue tetrazolium (NBT) 還原分析

取上述負控制組、正控制組及樣品組三組細胞，參考 Furukawa *et al.* (2004) 方法，進行吞噬球呼吸爆 NBT 還原分析。將上述各組分化成熟之 3T3-L1 脂肪細胞吸去培養液，收集細胞後，調整為 1×10^6 cells/ependroff，加入 0.3 ml PBS，接著加入 0.3 ml 反應試劑 (0.1 mg/ml NBT、5% FCS 及 0.13 ml DMSO 溶於 10 ml 培養基中) 於 37°C，5% CO₂ 下培養 1 h 後，加入 50 μ l 2 N HCl 終止反

應，再以 5000 rpm 離心 3 min 除去上清液，加入 200 μ l DMSO 溶解細胞內的 Formazan 結晶，振盪 1min，吸出 100 μ l 於 96 well 中，測吸光值 570 nm，吸光值愈高表示 ROS 含量越高。

4. 細胞抗氧化活性分析

取上述負控制組、正控制組及樣品組三組細胞，進行以下試驗。將上述各組分化成熟後之 3T3-L1 脂肪細胞吸去培養液後，加入均質液，待溶破細胞膜後，在 4°C，5500 rpm 離心 15 min，取上清液進行抗氧化酵素活性分析。以下抗氧化酵素測定方法，皆參考 Park *et al.* (2011) 之方法測定。

(1) 超氧化歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 活性測定

以 SOD Assay Kit (Cayman, Ann. Arbor, MI, USA) 進行檢測。取 200 μ l 自由基偵測劑 (Radical detector) 與 20 μ l 細胞上清液混合均勻後，加入 20 μ l 黃嘌呤氧化酶 (Xanthine oxidase)，測 450 nm 吸光值，並以內插法分析出 SOD 活性。

(2) 麩胱甘肽過氧化酶 (Glutathion peroxidase, GPx) 活性測定

以 GPx Assay Kit (Cayman, Ann. Arbor, MI, USA) 進行檢測。取上述 5 μ l 細胞上清液及 95 μ l 20 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 7.0)，加入 0.8 ml 100 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 7.0) 之反應混合液 [含 1 mM EDTA、1 mM NaN₃、0.2 mM Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen (NADPH)、1 U/ml 麩胱甘肽還原酶 (Glutathione reductase, GRd) 及 1 mM 抗氧化物質麩胱甘肽 (glutathione, GSH)]，在室溫下靜置 5 min，再加入 100 μ l 2.5 mM H₂O₂ 後，在 25°C 下測 340 nm 吸光值 3 min，計算 NADPH 減少之速率，藉此分析 GPx 活性。

(3) 過氧化氫酶 (Catalase, CAT) 活性測定

以 CAT Assay Kit (Cayman, Ann. Arbor, MI, USA) 進行檢測。取 100 μ l 緩衝液 (Assay buffer) 並加入 30 μ l 甲醇及 20 μ l 細胞上清液，再加入 20 μ l H₂O₂ 振搖 20 min，加入 30 μ l 氫氧化鉀 (Potassium

hydroxide) 與 30 μ l 呈色劑 (Purpald) 振搖 10 min, 再加入 10 μ l 過氧化鉀 (Potassium peroxidate), 反應 5 min 後, 測 540 nm 吸光值, 藉此分析 CAT 活性。

5. 反轉錄聚合酶鏈反應

以下 RT-PCR 測定方法, 皆參考 Furukawa *et al.* (2004)。

(1) 抽取 3T3-L1 脂肪細胞 total RNA

取上述負控制組、正控制組及樣品組三組細胞, 進行 total RNA 抽取。將上述各組細胞吸去培養液, 以 PBS 清洗細胞, 約每 10^6 個細胞加入 1 ml TRIZOL 試劑溶解細胞, 於室溫下放置 5 min, 加入 0.3 ml 的氯仿 (Chloroform) 混合均勻, 以 12000 rpm 於 4 $^{\circ}$ C 下離心 15 min 取上層液, 加入等體積之異丙醇 (Isopropanol), 置於室溫下 10 min 後, 移至 -80 $^{\circ}$ C 30 min, 再以 12,000 rpm 離心 5 min 除去上清液, 接以 1 ml 的 75% 乙醇洗滌, 以 7500 rpm 離心 5 min。將離心管自然風乾, 最後以 20 μ l Diethylpyrocarbonate (DEPC) 溶解 RNA。最後取 2.5 μ l total RNA 加入 497.5 μ l DEPC, 於 260 及 280 nm 測定吸光值, RNA 在 260 nm 下吸光值為 1.0 時其濃度相當於 40 μ g/ml, A260/A280 的比值以 1.8~2.0 為最佳。

(2) 反轉錄反應 (Reverse transcription, RT)

取 3 μ g total RNA 於 RNAase-free 離心管中當模板, 加入 0.5 μ g/ml oligo dT, 以 DEPC 將體積補至 10 μ l, 於 68 $^{\circ}$ C 下反應 10 min, 冰浴 5 min 後再加入 3 μ l RT buffer、1 μ l 10 mM dNTP 及 1 μ l MMLV-RT, 42 $^{\circ}$ C 反應 75 min, 70 $^{\circ}$ C 反應 10 min, 即可得到互補 DNA (Complementary DNA, cDNA)。

(3) 聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

於 PCR 管中依序加入 5 μ l 10 \times Taq buffer (含 200 mM Tris-HCl 及 200 mM KCl)、2 μ l 50 mM MgCl₂、1 μ l 10 mM dNTP mixture、1 μ l 5'-primer、1 μ l 3'-primer、5 μ l cDNA 及 0.3 μ l Taq DNA polymerase (5 U/ μ l), 最後以 DEPC 將體積補至 50

μ l, 再依不同 primers 進行 PCR 反應。gp91^{phox} 反應條件為先以 95 $^{\circ}$ C 變性作用 (Denaturation) 1 min, 59.9 $^{\circ}$ C 黏合作用 (Annealing) 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延長作用 (Extension) 1 min, 接著進行 35 個循環的 94.0 $^{\circ}$ C 1 min, 59.9 $^{\circ}$ C 1 min, 72.0 $^{\circ}$ C 1 min, 最後以 72.0 $^{\circ}$ C 15 min 終止反應, 保存於 4.0 $^{\circ}$ C。p67^{phox} 反應條件為先以 95.0 $^{\circ}$ C 變性作用 1 min, 59.0 $^{\circ}$ C 黏合作用 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延長作用 1 min, 接著進行 35 個循環的 94.0 $^{\circ}$ C 1 min, 59.0 $^{\circ}$ C 1 min, 72.0 $^{\circ}$ C 1 min, 最後以 72.0 $^{\circ}$ C 15 min 終止反應, 保存於 4.0 $^{\circ}$ C。 β -actin 反應條件為先以 95 $^{\circ}$ C 變性作用 1 min, 58.0 $^{\circ}$ C 黏合作用 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延長作用 1 min, 接著進行 35 個循環的 94.0 $^{\circ}$ C 1 min, 58.0 $^{\circ}$ C 1 min, 72.0 $^{\circ}$ C 1 min, 最後以 72.0 $^{\circ}$ C 15 min 終止反應, 保存於 4.0 $^{\circ}$ C。PCR 反應所使用的正股 (Sense) 與反股 (Antisense) primer 分述如下: gp91^{phox} 為 5'-TTGGGTCAGCACTGGCTCTG-3' 及 5'-TGGC GGTGTGCAGTGCTATC-3'; p67^{phox} 為 5'-CTGGC TGAGGCCATCAGACT-3' 及 5'-AGGCCACTGC AGAGTGCTTG-3'; β -actin 為 5'-TGTCCTGTGA TGCCTCTGGT-3' 及 5'-CTCTTTGATGTCACGC ACGA-3'。所得產物再經由 DNA 電泳分析。

(4) DNA 電泳分析

以 0.5 \times TBE (Tris/Borate/EDTA) buffer 製備 2% 洋菜膠體。將凝固的洋菜膠體放入電泳槽, 加入適量的 0.5 \times TBE buffer, 並注入 5 μ l 已與追蹤染劑均勻混合的樣品 DNA 與 DNA marker, 以 100 伏特電壓進行 DNA 電泳, 30 min 後關掉電源並將膠體放入含 0.005% 溴化乙錠 (Ethidium bromide, EtBr) 的 TBE buffer 染色, 退染後將膠片膠片經 UV 照射後, 將影像擷取, 利用 TotalLab Quant (TotalLab, Newcastle, UK) 軟體進行各基因表現之量化分析, 將所得到之各基因表現量化數值分別除上 β -actin 之量化數值後, 所得之數據則為各基因之相對表現量。

(四) 統計分析

實驗數據以 SPSS 12.0 套裝軟體進行單因子變異係數分析, 並以鄧肯式多變域測驗 (Duncan's multiple range test) 測定各處理組間之差異, 顯著水準訂為 0.05。

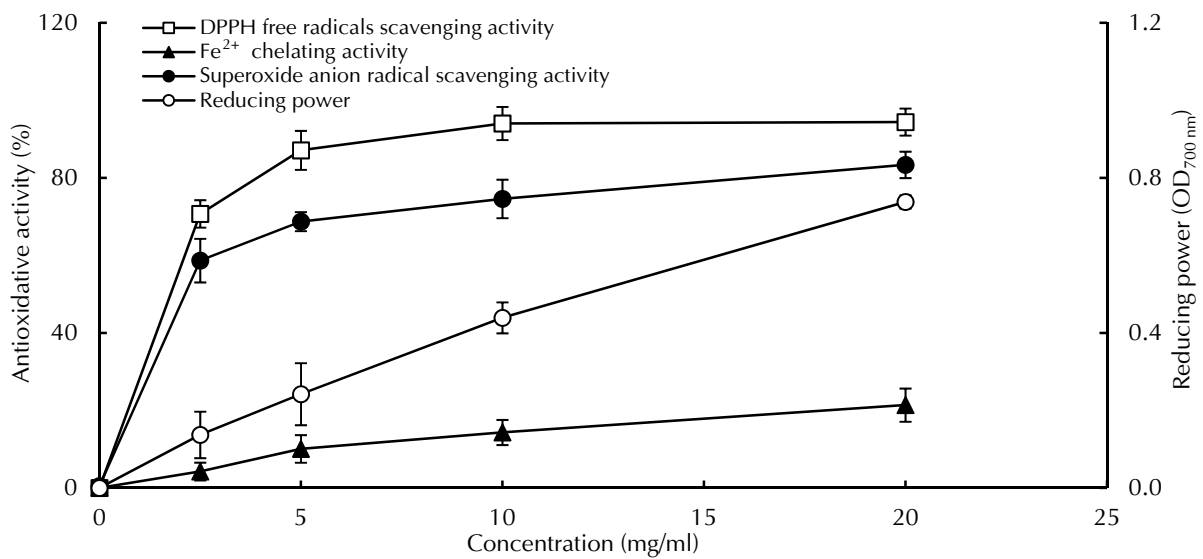


Fig. 1 The dose-related antioxidant activities of *S. hemiphyllum* ethanolic extract determined by the DPPH free radicals scavenging, Fe²⁺ chelating, superoxide anion radical scavenging and reducing power activity tests. Each value was expressed as mean \pm SEM from triplicate independent experiments.

結果與討論

一、半葉馬尾藻酒精萃取物多酚含量及抗氧化能力測定

植物化學物質 (Phytochemical) 如花青素、類黃酮、類胡蘿蔔素或其他多酚化合物，具有很強的抗氧化能力，近年來研究指出褐藻內含有豐富的多酚化合物及類胡蘿蔔素，因此褐藻被認為是新的抗氧化物質來源 (Koivikko *et al.*, 2007)。褐藻中的多酚化合物主要結構是間苯三酚衍生物，統稱為褐藻多酚，具有抗氧化 (Lee *et al.*, 1996)、抑制酪氨酸酶活性 (Park *et al.*, 2000) 和抗致突變性 (Han *et al.*, 2000) 等功能。而褐藻所含的類胡蘿蔔素則以藻褐素被研究的較為透徹，藻褐素為褐藻特有的黃褐色色素，具有抗肥胖 (Maeda *et al.*, 2005)、抗氧化 (Sachindra *et al.*, 2007)、抗致癌性 (Kim *et al.*, 1998) 和調節血壓 (Ikeda *et al.*, 2003) 等生理活性。Heo *et al.* (2005a) 於 70°C 水浴以甲醇萃取 *S. coreanum*、裂葉馬尾藻 (*S. siliquastrum*)、鼠尾藻 (*S. thunbergii*) 及球囊馬尾藻 (*S. piluliferum*)，其總酚含量分別為 88.36、50.30、16.98 及 2.31 mg/g。若以水萃取，則其總酚含量分別為 2.35、1.70、15.52 與 18.15 mg/g，顯示以甲醇可有效萃取出較多量的多酚化合物。

而有鑑於食用安全性之考量，所以於本試驗中改用乙醇進行萃取，並先分析半葉馬尾藻酒精萃取物總酚含量，結果顯示半葉馬尾藻酒精萃取物總酚含量為 22.35 ± 1.41 mg/g。

Nakai *et al.* (2006) 分析半葉馬尾藻總酚含量為 37.3 mg/g，鋸齒馬尾藻 (*S. ringgoldianum*) 的總酚含量則高達 383.0 mg/g，而銅藻 (*S. horneri*) 的總酚含量僅含 8.2 mg/g，其中鋸齒馬尾藻的褐藻多酚具有極佳的抗氧化能力。且文獻也指出褐藻多酚會由不同結構、不同單位數量與不同連接方式所組成，形成複雜的化合物，且其性質和含量會受藻種、生長環境與季節變化而有差異 (Glombitza and Schmidt, 1999)。Heo *et al.* (2005a, b) 實驗發現，以酒精能有效萃取出馬尾藻 (*Sargassum* sp.) 的抗氧化物質，且多酚化合物含量與抗氧化活性具有正相關性，而褐藻經蛋白酶或醣解酶水解後，會使多酚含量增加，並可提昇其抗氧化能力。有鑑於本試驗所使用的半葉馬尾藻產自於台灣澎湖海域，先前並無相關報告探討其多酚化合物之抗氧化力，故進行以下分析。

將半葉馬尾藻酒精萃取物進行四項抗氧化能力分析，包括清除 DPPH 自由基能力、SOD-like 活性、還原力及螯合亞鐵離子能力。由 Fig. 1 得知，2.5 mg/ml 濃度下，其清除 DPPH 自由基能力及 SOD-like 活性即大於 IC₅₀，分別為 $70.72 \pm 3.54\%$

及 $58.67 \pm 2.62\%$ 。於 10 mg/ml 以上濃度，其變化均趨緩，而於 20 mg/ml 濃度下，其清除 DPPH 自由基能力及 SOD-like 活性分別可達 $94.41 \pm 1.49\%$ 及 $83.37 \pm 1.40\%$ 。在還原力方面，於 2.5 mg/ml 濃度下，半葉馬尾藻酒精萃取物的還原力僅有 0.14 ± 0.06 ，隨著樣品的濃度增加，其還原力雖有增大的趨勢，然並不顯著，於 20 mg/ml 濃度下僅為 0.74 ± 0.02 。對照組 100 ppm 維生素 E 之清除 DPPH 自由基能力、SOD-like 活性及還原力分別為 $99.81 \pm 0.77\%$ 、 $100.75 \pm 3.64\%$ 及 2.82 ± 0.04 。在螯合亞鐵離子能力方面，半葉馬尾藻酒精萃取物的螯合效果不佳，於 20 mg/ml 濃度下該能力僅有 $21.38 \pm 2.29\%$ (Fig. 1)。對照組 100 ppm EDTA 之螯合亞鐵離子能力為 $95.25 \pm 0.53\%$ 。由抗氧化能力分析可知半葉馬尾藻酒精萃取物在清除 DPPH 自由基能力及 SOD-like 活性方面具有較好的能力。

Heo *et al.* (2005b) 研究指出，在 2.0 mg/ml 濃度下，裂葉馬尾藻、鼠尾藻及球囊馬尾藻酒精萃取物的清除 DPPH 自由基能力分別為 94%、91% 及 89%。而在清除超氧自由基能力則分別為 89%、97% 及 90%。Nakai *et al.* (2006) 探討鋸齒馬尾藻及海蒿子 (*S. confusum*) 酒精萃取液清除 H_2O_2 能力，在 100 $\mu\text{g/ml}$ 濃度下，其清除能力分別為 88%、及 78%，顯示馬尾藻屬酒精萃取物具有良好的抗氧化活性。學者進一步分離出鋸齒馬尾藻酒精萃取物中的褐藻多酚，再分析其酒精萃取物及褐藻多酚清除超氧自由基的 IC_{50} 值，分別為 5.1 及 1.0 $\mu\text{g/ml}$ (Nakai *et al.*, 2006)，且 Yan *et al.* (1999) 自海黍子 (*S. kjellmanianum*) 萃取而得的褐藻多酚，在抑制魚油酸敗的抗氧化作用上，其效率較 BHT 高 2.6 倍，因此學者認為褐藻多酚可能是影響馬尾藻酒精萃取物抗氧化能力的關鍵要素之一。另，研究指出由銅藻酒精萃取液中含有的藻褐素亦具有良好的清除 DPPH 自由基 ($IC_{50} = 164.60 \mu\text{M}$) 及 ABTS 自由基 ($IC_{50} = 8.94 \mu\text{M}$) 的能力，且其清除氫氧自由基的能力則高於維生素 E 13.5 倍 (Sachindra *et al.*, 2007)。而 Airanthi *et al.* (2011) 發現於抑制微脂粒 (Liposome) 氧化試驗中，若單獨使用褐藻多酚或藻褐素，其抑制能力較維生素 E 差，但若將褐藻多酚及藻褐素混合使用，其抑制能力優於維生素 E，顯示兩者共同使用時，其抗氧化能力具有加成作用。因此我們推測

半葉馬尾藻酒精萃取物具有強抗氧化力，可能與其酒精萃取物中的抗氧化物質有關。

二、半葉馬尾藻酒精萃取物對 3T3-L1 脂肪細胞存活率及胞內 ROS 含量之影響

由於氧化壓力與許多疾病的發展有關，因此學者認為代謝症候群應與氧化壓力有密切關係。Araki *et al.* (2006) 以腫瘤壞死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α) 刺激 3T3-L1 脂肪細胞造成細胞氧化壓力上升，進而使細胞激素表現失調。但若於培養液中同時添加抗氧化劑 N-乙酰基半胱氨酸 (N-acetylcysteine, NAC)，則可使細胞激素的表現量回復，改善脂肪細胞中因氧化-抗氧化酵素失衡 (Oxidant-antioxidant imbalance) 所產生的代謝異常。而 Furukawa *et al.* (2004) 於臨床研究中也發現，腹部肥胖者體內的氧化壓力會較正常者高，且脂肪細胞激素的分泌量會產生異常。因此本實驗以 H_2O_2 做為氧化傷害之誘導劑，對 3T3-L1 脂肪細胞進行氧化損傷，以評估半葉馬尾藻酒精萃取物是否可減緩 H_2O_2 對 3T3-L1 脂肪細胞所造成的氧化傷害。

單純以 1.25 mM H_2O_2 對 3T3-L1 脂肪細胞進行損傷時，其細胞存活率會降至 $48.66 \pm 6.04\%$ 。但若在細胞分化過程中添加 0.5、1.0、1.5 和 2.0 mg/ml 半葉馬尾藻酒精萃取物，其細胞存活率會分別上升至 74.41 ± 6.26 、 87.09 ± 5.79 、 95.94 ± 10.10 和 $96.78 \pm 5.66\%$ (Fig. 2)。由上述結果得知，隨著半葉馬尾藻酒精萃取物濃度的增加，3T3-L1 脂肪細胞的存活率就隨之增加，呈現劑量依賴效應。文獻指出鵝掌菜多酚粗萃物可減緩 H_2O_2 對小鼠巨噬細胞 (RAW 264.7 cell) 及中國倉鼠卵巢細胞 (CHO cell) 的氧化傷害，並提升細胞的存活率。進一步自鵝掌菜多酚粗萃物中純化出 Triphloretol-A、Eckol 及 Phloroglucinol 褐藻多酚與 H_2O_2 和倉鼠纖維母細胞共同培養，結果顯示上述三種褐藻多酚皆可減緩 H_2O_2 對細胞的氧化傷害，並且使細胞存活率由 30% 上升至 60% (Kang *et al.*, 2005a, b; 2006)。由此我們推測半葉馬尾藻酒精萃取物中的抗氧化物質能夠降低 H_2O_2 對 3T3-L1 脂肪細胞的傷害，同時顯著提升 3T3-L1 脂肪細胞之存活率。

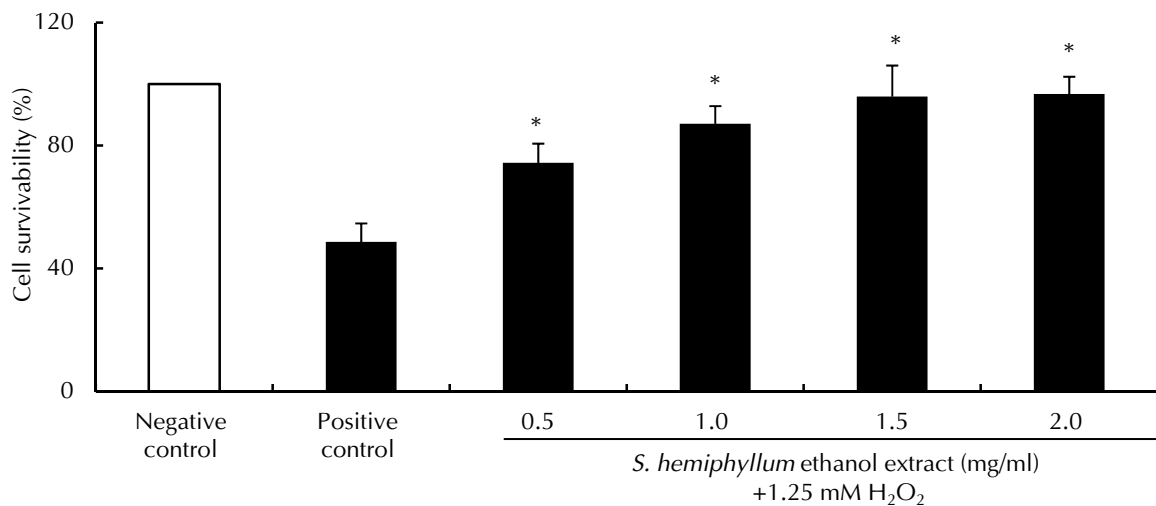


Fig. 2 Effect of *S. hemiphyllum* ethanolic extract on the cell survivability by 1.25 mM H₂O₂-stimulated 3T3-L1 adipocytes for 24 h. Each value was expressed as mean \pm SEM from triplicate independent experiments. *Compared with positive control at a significant level of $p < 0.05$.

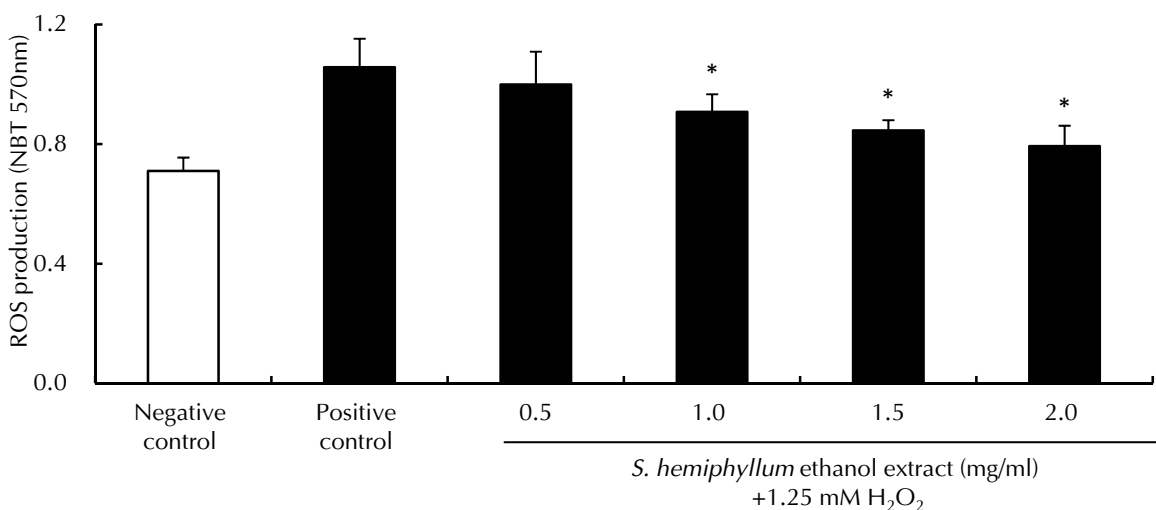


Fig. 3 Effect of *S. hemiphyllum* ethanolic extract on ROS production by 1.25 mM H₂O₂-stimulated 3T3-L1 adipocytes for 24 h. Each value was expressed as mean \pm SEM from triplicate independent experiments. *Compared with positive control at a significant level of $p < 0.05$.

Talior *et al.* (2004) 發現當 3T3-L1 脂肪細胞暴露於氧化壓力下會使細胞內的 ROS 量上升，導致粒線體膜電位降低，並造成細胞存活率下降。因此進一步探討於氧化壓力下，不同濃度之半葉馬尾藻酒精萃取物對於 3T3-L1 脂肪細胞內 ROS 生成之影響。將 3T3-L1 脂肪細胞分為負控制組、正控制組及樣品組，觀察其對 3T3-L1 脂肪細胞內 ROS 生成之影響，結果顯示以 1.25 mM H₂O₂ 傷害 3T3-L1 脂肪細胞時，細胞內 ROS 的含量由 0.71 ± 0.045 (負控制組) 上升至 1.06 ± 0.096 (正控制

組)，但當添加 0.5、1.0、1.5 和 2.0 mg/ml 半葉馬尾藻酒精萃取物時，其細胞內 ROS 的含量會分別降至 1.00 ± 0.11 、 0.91 ± 0.06 、 0.85 ± 0.03 和 0.79 ± 0.07 (Fig. 3)，ROS 的含量與半葉馬尾藻酒精萃取物濃度的添加呈現負相關，顯示半葉馬尾藻酒精萃取物能抑制 3T3-L1 脂肪細胞內的 ROS 生成。

Lee *et al.* (2011) 指出當 3T3-L1 脂肪細胞中的脂質堆積增加時，其胞內 ROS 的含量也會增加，若添加 *S. micracanthum* 酒精萃取物共同培養，則會減少胞內脂質堆積且 ROS 的含量也相

對會減少。而研究指出褐藻多酚具有良好的清除 DPPH 自由基、氫氧自由基及超氧自由基的能力，且可減少 H_2O_2 對細胞所造成的 DNA 損傷 (Ahn *et al.*, 2007)。另將從裂葉馬尾藻純化而得的藻褐素與 H_2O_2 和纖維母細胞進行共培養，也可減少細胞內 ROS 的含量，進而降低 H_2O_2 對細胞 DNA 損傷而增加細胞存活率 (Heo *et al.*, 2008)，所以我們推測半葉馬尾藻酒精萃取物可能因含有良好抗氧化活性的多酚物質能先清除胞外氧化物，降低 H_2O_2 對 3T3-L1 脂肪細胞的損傷，及減少胞內 ROS 的量，進而提升細胞的存活率。

雖然 ROS 是正常生理反應的產物，但是一旦累積過多而無法正常地被清除時，即會造成氧化壓力，且會藉由破壞細胞內重要分子如核酸、蛋白質與脂質，使細胞無法進行正常代謝，造成細胞死亡進而讓組織受損。因此除了可以利用抗氧化物質清除胞外的 ROS，細胞內也含有抗氧化系統可以將 ROS 轉變成毒性較弱或無害的物質 (Floyd and Carney, 1992)。而 Tirosh *et al.* (1999) 研究發現將 3T3-L1 脂肪細胞暴露於氧化壓力下會影響胰島素接受器下游訊號傳遞的 Angiotensin II，進而活化 NADPH 氧化酵素，加速氧化壓力增加。若能降低 NADPH 氧化酵素的表現，則可減緩氧化壓力對 3T3-L1 脂肪細胞的氧化傷害 (Ogihara *et al.*, 2002)。因此，接下來探討半葉馬尾藻酒精萃取物是否能藉由調節 3T3-L1 脂肪細胞內抗氧化酵素的活性及氧化酵素的表現量，來減緩細胞受到氧化壓力的傷害。

三、半葉馬尾藻酒精萃取物對 3T3-L1 脂肪細胞內抗氧化酵素活性之影響

一般情況下，體內的抗氧化系統可以把 ROS 清除，其中酵素性抗氧化防禦系統包括：SOD、GPx 及 CAT。其中 SOD 可捕捉超氧自由基，GPx 可以催化 GSH 與自由基反應，而 CAT 活性提升則直接對 H_2O_2 進行降解，以減少氧化傷害的衝擊 (Hochstein and Atallah, 1988)。

本實驗將脂肪細胞分為負控制組、正控制組及樣品組，並測其細胞中 SOD、GPx 及 CAT 之活性。結果顯示，以 1.25 mM H_2O_2 處理 3T3-L1 脂肪細胞時，細胞中的 SOD、GPx 及 CAT 活性分別

由 2.56 ± 0.21 U/ml、 40.12 ± 2.32 nmol/min/ml 及 30.27 ± 1.14 nmol/min/ml (負控制組)，下降至 1.55 ± 0.27 U/ml、 28.60 ± 3.72 nmol/min/ml 及 24.04 ± 0.74 nmol/min/ml (正控制組)。而以 0.5 及 1.0 mg/ml 半葉馬尾藻酒精萃取物處理的 3T3-L1 脂肪細胞，對於胞內的 SOD、GPx 及 CAT 活性無顯著性之影響。然當濃度增加到 1.5 及 2.0 mg/ml 時，與正控制組相較之下皆能顯著提升胞內的 SOD (2.43 ± 0.38 及 2.73 ± 0.33 U/ml)、GPx (39.48 ± 3.03 及 39.22 ± 3.49 nmol/min/ml) 與 CAT (29.44 ± 1.53 及 31.76 ± 1.03 nmol/min/ml) 活性 (Fig. 4, 5)。因此推測半葉馬尾藻酒精萃取物能藉由提升 3T3-L1 脂肪細胞的抗氧化酵素活性，降低胞內 ROS 的含量，而達到降低 H_2O_2 損傷的作用。

文獻指出多酚化合物、類胡蘿蔔素及維生素 E 等抗氧化劑可清除細胞內的 ROS 含量並提升抗氧化酵素的活性，來維持細胞內氧化及還原之間的平衡 (Fang *et al.*, 2002)。Kang *et al.* (2005a) 將鵝掌菜褐藻多酚與 H_2O_2 及倉鼠肺纖維母細胞共同培養，顯示其可以藉著提升胞內 SOD、GPx 及 CAT 的活性，將 H_2O_2 轉換成氧分子和水，降低 H_2O_2 對細胞所造成的氧化傷害。此外，由 *P. tetrastromatica* 萃取而得的藻褐素也被證實可以通過抑制脂質過氧化作用，及提升 CAT 和 GST 的活性，進而降低視黃醇缺陷老鼠 (Retinol deficiency rat) 體內所造成的氧化傷害，試驗中也發現 *P. tetrastromatica* 藻褐素對老鼠的抗氧化效果較合成的 β -胡蘿蔔素佳，認為這是因為褐藻素是天然的極性物質，所以較易存在於細胞膜中，進而抑制氧化傷害的產生 (Sangeetha *et al.*, 2009)。由上述可知，細胞內抗氧化酵素的表現高低，對細胞損傷有深遠影響。而天然抗氧化活性成分，除了直接捕捉自由基之功能外，也被認為可調節細胞內源性抗氧化酵素系統。反之，若能有效抑制氧化酵素的表現，也能提升細胞存活率 (Halliwell, 1994)，因此進一步了解半葉馬尾藻酒精萃取物是否亦可以減緩氧化酵素的表現量，故利用 RT-PCR 之方式測定 NADPH 氧化酵素 (gp91^{phox} 及 p67^{phox}) 之 mRNA 表現量。

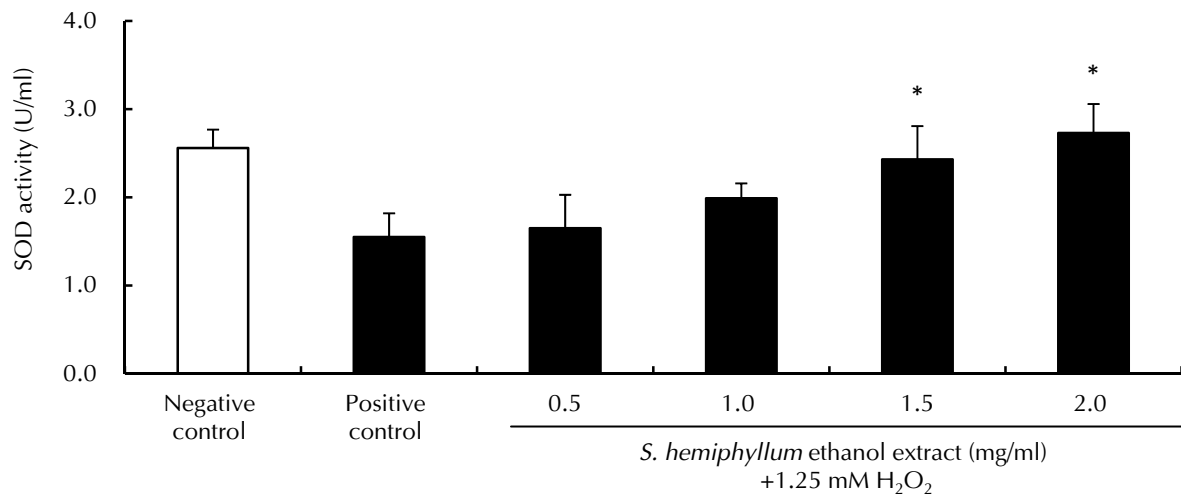


Fig. 4 Effect of *S. hemiphyllum* ethanolic extract on SOD activity by 1.25 mM H_2O_2 -stimulated 3T3-L1 adipocytes for 24 h. Each value was expressed as mean \pm SEM from triplicate independent experiments. *Compared with positive control at a significant level of $p < 0.05$.

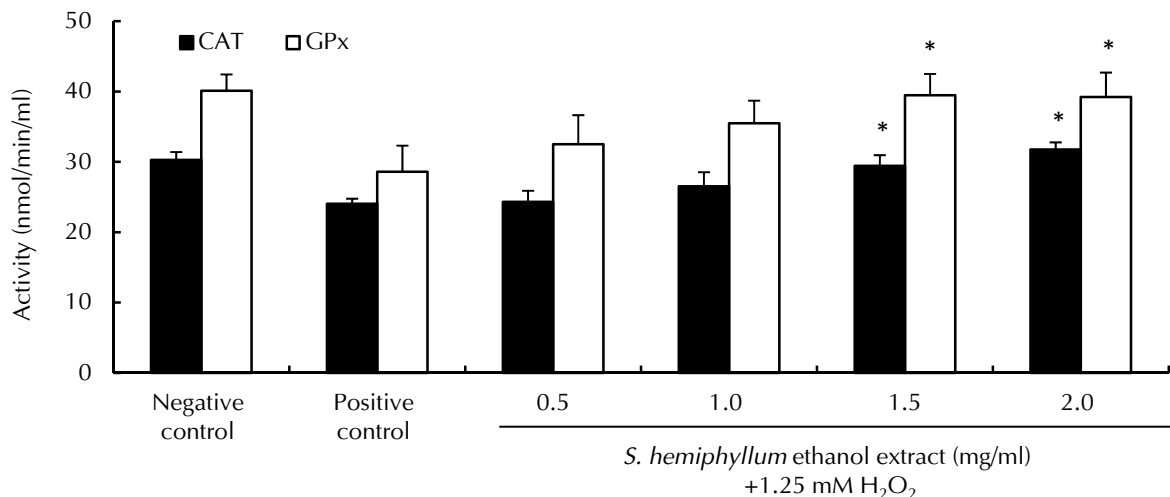


Fig. 5 Effect of *S. hemiphyllum* ethanolic extract on CAT and GPx activities by 1.25 mM H_2O_2 -stimulated 3T3-L1 adipocytes for 24 h. Each value was expressed as mean \pm SEM from triplicate independent experiments. *Compared with positive control at a significant level of $p < 0.05$.

四、半葉馬尾藻酒精萃取物對 3T3-L1 脂肪細胞內氧化酵素 mRNA 表現量之影響

人體內有許多產生 ROS 的酵素，其中 NADPH 氧化酵素 (NADPH oxidase) 是人體內一個產生 ROS 的重要酵素。NADPH 氧化酵素主要包含細胞膜嵌合蛋白質分子 (gp91^{phox} 及 p22^{phox})，以及位在細胞質內的蛋白質分子 (p67^{phox}、p47^{phox} 及 p40^{phox}) (Madamanchi *et al.*, 2005)。近期研究顯示在肥胖小鼠的白色脂肪中，其 NADPH 氧化酵素的表現量

皆顯著的較其他組織為高，而當脂質堆積增加時，會使 NADPH 氧化酵素的表現量升高並且導致 ROS 的產生，因此脂肪細胞中的 NADPH 氧化酵素在產生氧化壓力的過程中占了重要的角色 (Furukawa *et al.*, 2004)。因此在本實驗中主要探討在氧化壓力下，半葉馬尾藻酒精萃取物對 NADPH 氧化酵素中的 gp91^{phox} 及 p67^{phox} 之 mRNA 表現量影響。

本實驗將脂肪細胞分為負控制組、正控制組及樣品組，並以 RT-PCR 之方式測定 gp91^{phox} 及 p67^{phox} 表現量。結果顯示，直接以 H_2O_2 誘導氧化

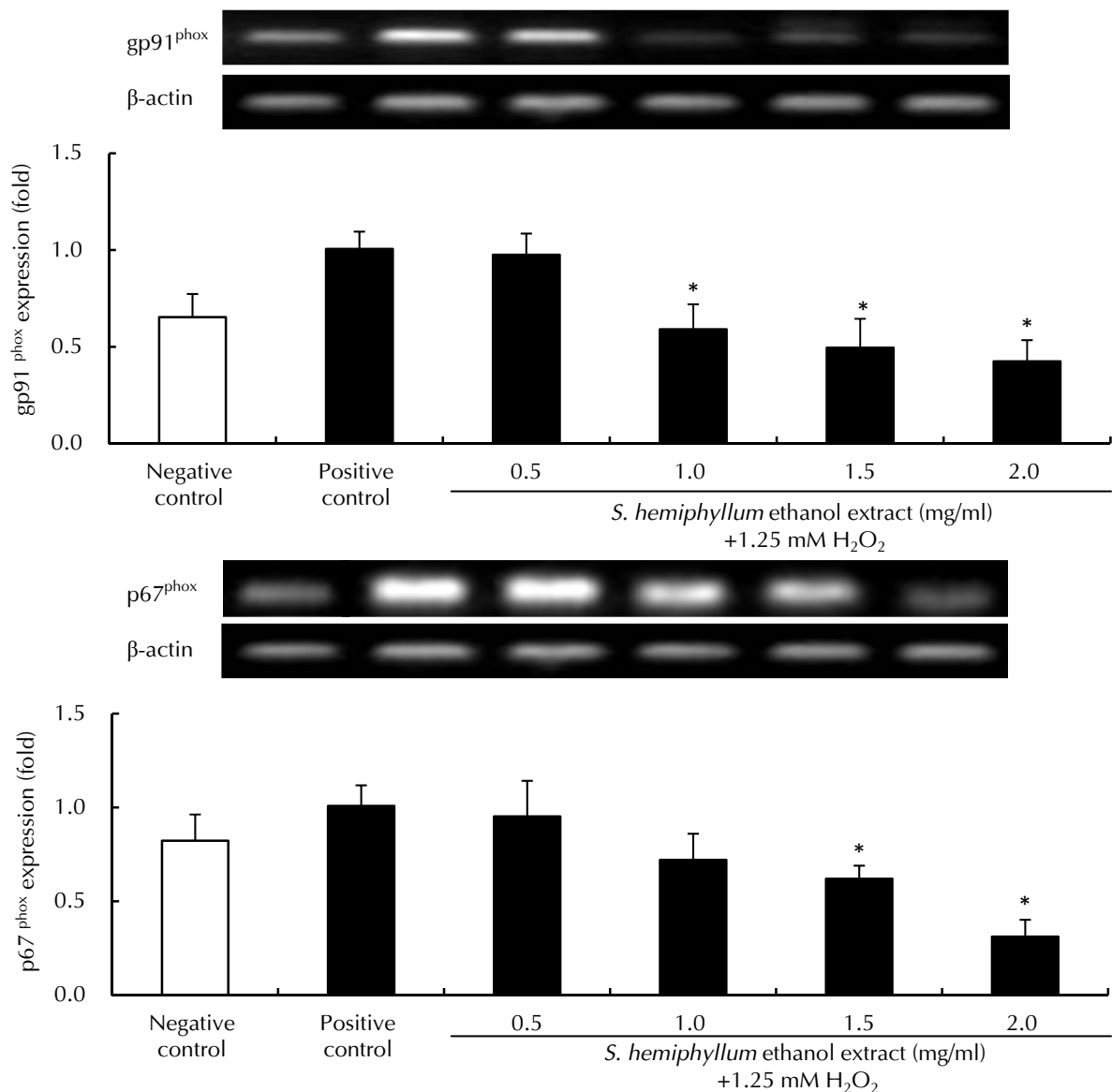


Fig. 6 Effect of *S. hemiphyllum* ethanolic extract on the mRNA expression of (A) gp91^{phox} and (B) p67^{phox} of NADPH oxidase subunits by 1.25 mM H₂O₂-stimulated 3T3-L1 adipocytes for 24 h. *Compared with positive control at a significant level of $p < 0.05$.

損傷後 (正控制組), 其 gp91^{phox} 及 p67^{phox} mRNA 表現量與負控制組相較之下有上升的趨勢。然添加 1.0、1.5 及 2.0 mg/ml 的半葉馬尾藻酒精萃取物後, 其可以抑制胞內 gp91^{phox} mRNA 表現量 (Fig. 6A)。而添加 1.5 及 2.0 mg/ml 的半葉馬尾藻酒精萃取物後, 才能抑制胞內 p67^{phox} mRNA 表現量 (Fig. 6B)。綜合以上結果顯示, 以濃度 1.5 mg/ml 以上的半葉馬尾藻酒精萃取物處理 3T3-L1 脂肪細胞, 可以藉由降低氧化酵素 mRNA 表現量, 以減緩細胞受到氧化壓力所造成的傷害。

學者指出脂肪中的氧化壓力增加時, 會導致脂肪細胞的細胞激素分泌異常, 進而影響正常代謝 (Iwaki *et al.*, 2003; Rudich *et al.* 1998)。若餵食第二型糖尿病鼠 (KK-Ay mice) NADPH 氧化酵素抑制劑 -- 香菸蘭乙酮 (Apocynin), 則會降低其白色脂肪中的氧化壓力並減少脂肪組織中 ROS 的產生量, 進而改善高胰島素血症、高血糖及高血酯症, 顯示抑制 NADPH 氧化酵素能改善相關代謝疾病 (Furukawa *et al.*, 2004)。因此推測半葉馬尾藻酒精萃取物可能藉由多酚物質之抗氧化能力

先消除外來的自由基，進而減少胞內的 ROS 產生。且也可以藉由提升抗氧化酵素的活性及抑制 NADPH 氧化酵素 mRNA 表現量之作用，降低胞內 ROS 的過多累積，減緩氧化壓力對 3T3-L1 脂肪細胞所造成的損傷，增加細胞的存活率。

結 論

脂肪組織中的 ROS 含量增加會導致體內的氧化壓力上升，進而引起與肥胖相關的代謝症候群。細胞內有各種防禦系統可以抵抗可能造成的氧化傷害，然而即使如此，仍有許多活性氧不能被清除，因此造成細胞受到氧化傷害。所以攝取富含抗氧化能力的食物將成為現代人膳食的新參考依據。我們已初步確定：半葉馬尾藻萃取物可降低以 H₂O₂ 誘導 3T3-L1 脂肪細胞之氧化損傷，能減緩 H₂O₂ 引起之細胞死亡，並提高 3T3-L1 脂肪細胞內抗氧化酵素活性及抑制 NADPH 氧化酵素 mRNA 表現量。從這些結果發現：半葉馬尾藻酒精萃取物在 3T3-L1 脂肪細胞的抗氧化作用上具有極大的潛力。然而在動物實驗中是否亦具有同樣的效果，仍待進一步研究證實。

參考文獻

- Ahn, G. N., K. N. Kim, S. H. Cha, C. B. Song, J. Lee, M. S. Heo, I. K. Yeo, N. H. Lee, Y. H. Jee, J. S. Kim, M. S. Heu and Y. J. Jeon (2007) Antioxidant activities of phlorotannins purified from *Ecklonia cava* on free radical scavenging using ESR and H₂O₂-mediated DNA damage. *Eur. Food Res. Technol.*, 226: 71-79.
- Airanthi, M. K., W. A. M. Hosokawa and K. Miyashita (2011) Comparative antioxidant activity of edible Japanese brown seaweeds. *J. Food Sci.*, 76: 104-111.
- Anggadiredja, J., R. Andyani, Hayati and Muawanah (1997) Antioxidant activity of *Sargassum polycystum* (Phaeophyta) and *Laurencia obtusa* (Rhodophyta) from Seribu Islands. *J. Appl. Phycol.*, 9: 477-479.
- Araki, S., K. Dobashi, K. Kubo, Y. Yamamoto, K. Asayama and A. Shirahata (2006) *N*-acetylcysteine attenuates TNF- α induced changes in secretion of interleukin-6, plasminogen activator inhibitor-1 and adiponectin from 3T3-L1 adipocytes. *Life Sci.*, 79: 2405-2412.
- Arita, Y., S. Kihara, N. Ouchi, M. Takahashi, K. Maeda, J. Miyagawa, K. Hotta, I. Shimomura, T. Nakamura and K. Miyaoka (1999) Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 257: 79-83.
- Boyer, R. F. and C. J. McCleary (1987) Superoxide ion as a primary reductant in ascorbate-mediated ferritin iron release. *Free Radic. Biol. Med.*, 3: 389-395.
- Fang, Y. Z., S. Yang and G. Wu (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18: 872-879.
- Ferrari, M., M. C. Fornasiero and A. M. Isetta (1990) MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J. Immunol. Methods*, 131: 165-172.
- Floyd, R. A. and J. M. Carney (1992) Free radical damage to protein and DNA: Mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann. Neurol.*, 32: S22-S27.
- Furukawa, S., T. Fujita, M. Shimabukuro, M. Iwaki, Y. Yamada, Y. Nakajima, O. Nakayama, M. Makishima, M. Matsuda and I. Shimomura (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.*, 114: 1752-1761.
- Glombitza, K. W. and A. Schmidt (1999) Trihydroxyphlorethols from the brown alga *Carpophyllum angustifolium*. *Phytochemistry*, 51: 1095-1100.
- Halliwell, B. (1994) Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev.*, 52: 253-65.
- Han, E. S., J. W. Kim, M. O. Eom, I. H. Kang, H. J. Kang, J. S. Choi, K. W. Ha and H. Y. Oh (2000) Inhibitory effects of *Ecklonia stolonifera* on gene mutation on mouse lymphoma tk \pm locus in L5178Y-3.7.2C cell and bone marrow micronuclei formation in ddY mice. *Environ. Mutagen. Carcinogen.*, 20: 104-111.
- Heo, S. J., E. J. Park, K. W. Lee and Y. J. Jeon (2005a) Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresour. Technol.*, 96: 1613-1623.
- Heo, S. J., S. H. Cha, K. W. Lee, S. K. Cho and Y. J. Jeon (2005b) Antioxidant activities of Chlorophyta and Phaeophyta from Jeju Island. *Algae*, 20: 251-260.
- Heo, S. J., S. C. Ko, S. M. Kang, H. S. Kang, J. P. Kim, S. H. Kim, K. W. Lee, M. G. Cho and Y. J. Jeon (2008) Cytoprotective effect of fucoxanthin isolated from

- brown algae *Sargassum siliquastrum* against H₂O₂-induced cell damage. Eur. Food Res. Technol., 228: 145-151.
- Heo, S. J., S. C. Ko, S. H. Cha, D. H. Kang, H. S. Park, Y. U. Choi, D. Kim, W. K. Jung and Y. J. Jeon (2009) Effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on melanogenesis and their protective effect against photo-oxidative stress induced by UV-B radiation. Toxicol. In Vitro, 23: 1123-1130.
- Hochstein, P and A. S. Atallah (1988) The nature of oxidants and antioxidant systems in the inhibition of mutation and canaer. Mutat. Res., 202: 363-375.
- Houstis, N., E. D. Rosen and E. S. Lander (2006) Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. Nature, 440: 944-948.
- Hsu, C. L. and G. C. Yen (2006) Induction of cell apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocytes by flavonoids is associated with their antioxidant activity. Mol. Nutr. Food Res., 50: 1072-1079.
- Hwang, P. A., C. H. Wu, S. Y. Gau, S. Y. Chien and D. F. Hwang (2010) Antioxidant and immune-stimulating activities of hot-water extract from seaweed *Sargassum hemiphyllum*. J. Mar. Sci. Tech., 18: 41-46.
- Hwang, P. A., S. Y. Chien, Y. L. Chan, M. K. Lu, C. H. Wu, Z. L. Kong and C. J. Wu (2011) Inhibition of lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses by *Sargassum hemiphyllum* sulfated polysaccharide extract in RAW 264.7 macrophage cells. J. Agric. Food Chem., 59: 2062-2068.
- Ikeda, K., A. Kitamura, H. Machida, M. Watanabe, H. Negishi, J. Hiraoka and T. Nakano (2003) Effect of *Undaria pinnatifida* (Wakame) on the development of cerebrovascular diseases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 30: 44-48.
- Iwaki, M., M. Matsuda, N. Maeda, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, M. Makishima and I. Shimomura (2003) Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. Diabetes, 52: 1655-1663.
- Kang, K. A., K. H. Lee, S. Chae, Y. S. Koh, B. S. Yoo, J. H. Kim, Y. M. Ham, J. S. Baik, N. H. Lee and J. W. Hyun (2005a) Triphlorethol-A from *Ecklonia cava* protects V79-4 lung fibroblast against hydrogen peroxide induced cell damage. Free Radic. Res., 39: 883-892.
- Kang, K. A., K. H. Lee, S. Chae, R. Zhang, M. S. Jung, Y. Lee, S. Y. Kim, H. S. Kim, H. G. Joo and J. W. Park (2005b) Eckol isolated from *Ecklonia cava* attenuates oxidative stress induced cell damage in lung fibroblast cells. FEBS Letters, 579: 6295-6304.
- Kang, K. A., K. H. Lee, S. Chae, R. Zhang, M. S. Jung, Y. M. Ham, J. S. Baik, N. H. Lee and J. W. Hyun (2006) Cytoprotective effect of phloroglucinol on oxidative stress induced cell damage via catalase activation. J. Cell Biochem., 97: 609-620.
- Kim, J. M., S. Araki, D. J. Kim, C. B. Park, N. Takakusa, H. Baba-Toriyama, T. Ota, Z. Nir, F. Khachik and N. Shimidzu (1998) Chemopreventive effects of carotenoids and curcumins on mouse colon carcinogenesis after 1,2-dimethylhydrazine initiation. Carcinogenesis, 19: 81-85.
- Kim, M. J., U. J. Chang and J. S. Lee (2009) Inhibitory effects of fucoxanthin in 3T3-L1 adipocyte differentiation. Mar. Biotechnol., 11: 557-562.
- Koivikko, R., J. Lojonen, K. Pihlaja and V. Jormalainen (2007) High performance liquid chromatographic analysis of phlorotannins from the brown alga *Fucus vesiculosus*. Phytochem. Anal., 18: 326-332.
- Lee, J. H., J. C. Park and J. S. Choi (1996) The antioxidant activity of *Ecklonia stolonifera*. Arch. Pharm. Res., 19: 223-227.
- Lee, O. H., K. Y. Yoon, K. J. Kim, S. G. You and B. Y. Lee (2011) Seaweed extracts as a potential tool for the attenuation of oxidative damage in obesity related pathologies. J. Phycol., 47: 1-9.
- Lim, S. N., P. C. Cheung, A. E. Ooi and P. O. Ang (2002) Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. J. Agric. Food Chem., 50: 3862-3866.
- Madamanchi, N. R., A. Vendrov and M. S. Runge (2005) Oxidative stress and vascular disease. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 25: 29-38.
- Maeda, H., M. Hosokawa, T. Sashima, K. Funayama and K. Miyashita (2005) Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. Biochem. Biophys. Res. Commun., 332: 392-397.
- Maeda, H., M. Hosokawa, T. Sashima, N. Takahashi, T. Kawada and K. Miyashita (2006) Fucoxanthin and its metabolite, fucoxanthinol, suppress adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. Int. J. Mol. Med., 18: 147-152.
- Nagai, T. and T. Yukimoto (2003) Preparation and functional properties of beverages made from sea

- algae. *Food Chem.*, 81: 327-332.
- Nakai, M., N. Kageyama, K. Nakahara and W. Miki (2006) Phlorotannins as radical scavengers from the extract of *Sargassum ringgoldianum*. *Mar. Biotechnol.*, 8: 409-414.
- Ogihara, T., T. Asano, K. Ando, Y. Chiba, H. Sakoda, M. Anai, N. Shojima, H. Ono, Y. Onishi, M. Fujishiro, H. Katagiri, Y. Fukushima, M. Kikuchi, N. Noguchi, H. Aburatani, I. Komuro and T. Fujita (2002) Angiotensin II-induced insulin resistance is associated with enhanced insulin signaling. *Hypertension*, 40: 872-879.
- Oyaizu, M. (1988) Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 35: 771-775.
- Park, D. C., C. I. Ji, S. H. Kim, K. J. Jung, T. G. Lee, I. S. Kim, Y. H. Park and S. B. Kim (2000) Characteristics of tyrosinase inhibitory extract from *Ecklonia stolonifera*. *J. Fish. Sci. Tech.*, 3: 195-199.
- Park, H. J., D. A. Dinatale, M. Y. Chung, Y. K. Park, J. Y. Lee, S. I. Koo, M. O'Connor, J. E. Manautou and R. S. Bruno (2011) Green tea extract attenuates hepatic steatosis by decreasing adipose lipogenesis and enhancing hepatic antioxidant defenses in ob/ob mice. *J. Nutr. Biochem.*, 4: 393-400.
- Perron, N. R. and J. L. Brumaghim (2009) A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem. Biophys.*, 53: 75-100.
- Rudich, A., A. Tirosh, R. Potashnik, R. Hemi, H. Kanety and N. Bashan (1998) Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes*, 47: 1562-1569.
- Sachindra, N. M., E. Sato, H. Maeda, M. Hosokawa, Y. Niwano, M. Kohno and K. Miyashita (2007) Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 8516-8522.
- Sangeetha, R. K., A. N. Bhaskar and A. V. Baskaran (2009) Comparative effects of β -carotene and fucoxanthin on retinol deficiency induced oxidative stress in rats. *Mol. Cell Biochem.*, 331: 59-67.
- Shimada, K., K. Fujikawa, K. Yahara and T. Nakamura (1992) Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.*, 40: 945-948.
- Simonetti, P., P. Pietta and G. Testolin (1997) Polyphenol content and total antioxidant potential of selected Italian wines. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 1152-1155.
- Talior, I., T. Tennenbaum, T. Kuroki and H. Eldar-Finkelman (2004) PKC- δ -dependent activation of oxidative stress in adipocytes of obese and insulin-resistant mice: role for NADPH oxidase. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 288: E405-E411.
- Tirosh, A., R. Potashnik, N. Bashan and A. Rudich (1999) Oxidative stress disrupts insulin-induced cellular redistribution of insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. A putative cellular mechanism for impaired protein kinase B activation and GLUT4 translocation. *J. Biol. Chem.*, 274: 10595-10602.
- Van Gaal, L. F., I. L. Mertens and C. E. De Block (1998) Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*, 444: 875-880.
- Yamamoto, T., S. Hsu, J. Lewis, J. Wataha, D. Dickinson, B. Singh, W. B. Bollag, P. Lockwood, E. Ueta, T. Osaki and G. Schuster (2003) Green tea polyphenol causes differential oxidative environments in tumor versus normal epithelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 307: 230-236.
- Yan, X. J., G. M. Fang and Q. X. Lou (1999) Studies on free radical scavenging activity in Chinese seaweed. *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, 17: 240-246.

Evaluation of Antioxidative Activity of *Sargassum hemiphyllum* Ethanolic Extract Against Hydrogen Peroxide-induced Injury in 3T3-L1 Adipocytes

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

Seafood Technology Division, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

In this study, the antioxidative and cytoprotective effect of *Sargassum hemiphyllum* ethanolic extract against hydrogen peroxide (H₂O₂)-stimulated 3T3-L1 adipocytes was investigated. The amount of total phenolic compounds in *S. hemiphyllum* ethanolic extract was 22.35 ± 1.41 mg/g dry seaweed. The antioxidative activity of *S. hemiphyllum* ethanolic extract was evaluated using four different methods, including reducing power, DPPH free radicals scavenging activity, Fe⁺² chelating activity and SOD-like activity. The results showed that *S. hemiphyllum* ethanolic extract had the potential DPPH free radicals scavenging and SOD-like activities. The *S. hemiphyllum* ethanolic extract significantly reduced the intracellular reactive oxygen species (ROS) that produced by H₂O₂ stimulating, and it also raised cell survivability. At 1.5 and 2.0 mg/ml, *S. hemiphyllum* ethanolic extract increased the activities of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT), and decreased its mRNA expression of gp91^{phox} and p67^{phox} of NADPH oxidase subunits. Thus, it is suggested that *S. hemiphyllum* ethanolic extract increasingly protected 3T3-L1 adipocytes against oxidative damage by the cellular antioxidant activity and inhibited oxidase mRNA expression.

Key words: *Sargassum hemiphyllum*, 3T3-L1 adipocytes, oxidative stress, antioxidative activity

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