

水產複方對前脂肪細胞脂質生成之影響

蔡儀冠、何欣瑀、蔡慧君*

行政院農業委員會水產試驗所水產加工組

摘要

本研究利用石蓴醣溶液複合鮭魚皮酵素水解物以產製高抗氧化能力的水產複方，其清除 DPPH 自由基能力、螯合亞鐵能力、還原力及 SOD-like 活性的 EC₅₀ 值分別為 0.54、4.52、1.61 及 5.98 mg/ml。另以 3T3-L1 前脂肪細胞 (preadipocytes) 評估其對脂質生成之影響，結果顯示水產複方 (2.5、5 及 10 mg/ml) 對 3T3-L1 前脂肪細胞不具細胞毒性，且於 10 mg/ml 濃度下，具有抑制其分化為成熟脂肪細胞 (mature adipocytes) 之能力。在抑制脂肪堆積作用發現：2.5、5 及 10 mg/ml 的水產複方皆能抑制成熟脂肪細胞中脂質的蓄積、降低細胞內三酸甘油酯含量及甘油-3-磷酸去氫酶活性，且隨濃度愈高其抑制能力愈強。綜合上述結果顯示：水產複方具有良好的抑制脂肪細胞分化及降低脂質堆積的作用，應具有作為調節脂質生成之保健素材的發展潛力。

關鍵詞：石蓴、鮭魚皮酵素水解物、水產複方、3T3-L1、脂質生成

前言

根據衛生署統計 2011 年十大死因，其中惡性腫瘤、心臟疾病、腦血管疾病、糖尿病、高血壓及腎臟病等六項疾病皆與肥胖有關。但是，由於脂肪代謝失調而導致肥胖的機轉甚為複雜，因此針對脂肪細胞分化之調控機制研究也愈來愈被重視，然基於預防重於治療的觀點，如何避免脂肪蓄積及開發抗肥胖的活性物質即是目前科學界熱門研究議題之一。

3T3-L1 前脂肪細胞株 (preadipocytes) 係從老鼠的胚胎中分離出來 (Green and Kehinde, 1974)，其特性與人類的白色脂肪組織類似 (張, 2003)，可藉由 IBMX (isobutylmethylxanthine)、DEX (dexamethasone) 及胰島素等荷爾蒙作為分化劑，來刺激前脂肪細胞分化為成熟的脂肪細胞 (Novakofski, 2004)，目前廣泛應用於多種機能性成分對 3T3-L1 脂肪細胞脂質生成作用之影響分析 (Green and Meuth, 1974; Green and Kehinde, 1975;

Brodie *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2008; Ejaz *et al.*, 2009; Jeon *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011; Dave *et al.*, 2012)。

亞洲國家食用海藻已有數千年歷史，尤以日本為最大的生產國及消費國。近期研究指出海藻除供食用外，亦具有保健功效，其中自硬石蓴 (*Ulva rigida*) 萃得的水溶性多醣具有免疫調節的作用 (Leiro *et al.*, 2007)；孔石蓴 (*U. pertusa*) 所萃取的硫酸多醣具有螯合亞鐵、清除自由基及提升還原力等抗氧化能力 (Qi *et al.*, 2005)。然而，台灣四面環海，除水生植物外，水生動物也可藉由酵素水解來萃取出具有生理活性的機能性胜肽，如鮭魚魚骨蛋白 (Je *et al.*, 2007) 及鮭魚皮 (Mendis *et al.*, 2005) 所萃出的胜肽皆具有抗氧化能力。

石蓴 (*U. lactuca*) 的質地較青海菜 (*Monostroma nitidum*) 堅硬，鮮少作為食用，多用於飼料或工業原料的添加劑 (黃, 1989)，屬於應用性及經濟價值較低的海洋資源。此外，根據 2010 年財團法人台灣地區遠洋鮭魚類產銷發展基金會的統計資料顯示：台灣遠洋鮭魚平均每年約有十萬公噸的年產量，而鮭魚在加工過程中約有 35% 廢棄物產生，其中 8 ~ 13% 為鮭魚皮，因其口感

*通訊作者 / 基隆市和一路 199 號; TEL: (02) 2462-2845; FAX: (02) 2462-3306; E-mail: hjchai@mail.tfrin.gov.tw

差所以頗少食用。雖然魷魚皮經乾燥及粉碎後，可作為飼料，但附加價值不高，又因飼料需求量少，導致丟棄量大於使用量，倘若無法妥善處理，可能會衍生環保問題。因此，本研究以石蓴及魷魚皮為原料，分別萃取石蓴醣溶液及魷魚皮酵素水解物，並以適量配比複合成水產複方，探討其對 3T3-L1 前脂肪細胞之分化與脂質生成之影響，期能開發有助於國人健康的保健素材，達到活用低度利用水產資源之目的。

材料與方法

一、材料

(一) 石蓴醣溶液之製備

石蓴係由天和生物股份有限公司提供。將石蓴洗淨、烘乾及磨碎製成石蓴藻粉。將石蓴藻粉以 0.5 M 鹽酸在 121°C 加熱 10 min 製備石蓴醣溶液後，再經凍結乾燥 (freeze drying system, Labcono AST Instruments Corporation, KS, U.S.A.) 成粉末後置於 -20°C 凍藏備用。

(二) 魷魚皮酵素水解物之製備

美洲大刺魷 (*Dosidicus gigas*) 魚皮係由山海冷凍廠提供。魷魚皮以蛋白酵素水解製備酵素水解物 (萃取方法擬進行技術授權，故不揭示萃取條件)，經凍乾後置於 -20°C 凍藏備用。

(三) 水產複方之製備

將石蓴醣溶液及魷魚皮酵素水解物分別以適當配比混合，製成複方 A 與複方 B 供作抗氧化能力測定用。

(四) 細胞株

本研究使用之 3T3-L1 前脂肪細胞株 (mouse 3T3-L1 preadipocytes, BCRC #60159)，購自新竹食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心。

(五) 試藥

化學分析藥品購自 Sigma 公司 (St. Louis, MO, U.S.A.)，細胞試驗藥品購自 Gibco 公司 (Grand Island, NY, U.S.A.)。

二、實驗方法

(一) 石蓴之一般成分測定 (AOAC, 1995)

1. 水分

取 1 g 的石蓴藻粉於恆重的坩堝中，置於 105°C 的烘箱乾燥，每 2 h 取出，再置於乾燥器中放冷後秤重，反覆至恆重而測定之。

2. 粗蛋白質

使用微量凱氏氮法 (micro-Kjeldahl) 進行測定，取 1 g 的石蓴藻粉加入 1 g 的催化劑 ($\text{HgSO}_4 : \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} : \text{K}_2\text{SO}_4 = 0.75 : 1 : 10$) 及 20 ml 的 H_2SO_4 (sulfuric acid)，置於分解瓶中待分解至呈透明無色，再於全氮蒸餾器中蒸餾出氮，並用 0.1 N 的 H_2SO_4 收集之，再以 0.1 N 的 NaOH (sodium hydroxide) 滴定至淡粉紅色，氮係數為 6.25。

3. 粗脂肪

取 5 g 的石蓴藻粉於 105°C 下乾燥 2 h，將水分去除後秤重，置於索氏 (Soxhlet) 萃取器以乙醚迴流 4 h 以上進行萃取。

4. 灰分

取 1 g 的石蓴藻粉經 105°C 恆溫乾燥後，再置於 550°C 灰化爐中進行灰化至恆重後加以測定。

5. 碳水化合物

碳水化合物 (%) = $100\% - [(\text{水分} + \text{粗蛋白質} + \text{粗脂肪} + \text{灰分}) \times 100\%]$ 。

(二) 總醣含量測定

參照 Dubois *et al.* (1956) 方法測定。取 0.2 ml 的標準品或石蓴醣溶液，加入 0.2 ml 的 5% 酚溶液均勻混合後，再加入 1 ml 的硫酸，並於室溫下靜置 20 min，最後於 490 nm 測定吸光值，以標準品鼠李糖 (rhamnose) 所得之標準曲線，換算總醣含量。

(三) 硫酸根含量測定

參照 Dodgson (1961) 方法測定。使用硫酸酯

法進行硫酸根含量測定，最後於 520 nm 測定吸光值，以標準品硫酸鉀 (potassium sulfate) 所得之標準曲線，換算硫酸根含量。

(四) 水產複方之抗氧化活性測定

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

參照 Shimada *et al.* (1992) 方法測定。取 1 ml 樣品，加入 1 ml 的 0.1 mM DPPH (溶於 95% 乙醇)，於暗處反應 30 min 後於 517 nm 測定吸光值，吸光值愈低表示清除能力愈強。本試驗以 100 ppm 之維生素 C 作為控制組，去離子水取代樣品作為控制組。

利用不同濃度的試驗樣品，以濃度為 X 軸、清除率為 Y 軸繪製檢量線，再以迴歸方程式求得半數有效劑量 EC₅₀ 值 (effective concentration of antioxidant substance removing 50% of free radical)。

2. 螯合亞鐵能力測定

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 之 2 mM 的氯化亞鐵 (ferrous chloride) 溶液，混合均勻 30 sec 後，再加入 0.2 ml 的 5 mM 菲洛嗪 (ferrozine)，反應 10 min，測定 562 nm 的吸光值，吸光值越低表示樣品螯合亞鐵的能力越強。以 100 ppm EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt) 作為控制組，以去離子水取代樣品作為控制組。

利用不同濃度的試驗樣品，以濃度為 X 軸、螯合亞鐵能力為 Y 軸繪製檢量線，再以迴歸方程式求得 EC₅₀ 值。

3. 還原力測定

參照 Oyaizu (1988) 方法測定。取 1 ml 樣品溶於 1 ml 的 0.2 M 磷酸緩衝溶液 (pH 6.6)，再加入 1 ml 的 1% 赤血鹽 (potassium ferricyanide)，於 50°C 水浴反應 20 min，迅速冷卻後，再加入 1 ml 的 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 的 0.1% 氯化鐵 (ferric chloride) 溶液，混合均勻並

於室溫反應 10 min 後，測定 700 nm 吸光值，吸光值愈高表示樣品的還原力愈佳。本試驗以 100 ppm 之維生素 C 作為控制組，去離子水取代樣品作為控制組。

利用不同濃度的試驗樣品，以濃度為 X 軸、還原力為 Y 軸繪製檢量線，再以迴歸方程式求得 EC₅₀ 值。

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

參照 Yamamoto *et al.* (2003) 以 SOD Assay Kit-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 (water-soluble tetrazolium salt) 混合後，於 37°C 靜置 20 min，測定 450 nm 吸光值。以 100 ppm 之維生素 C 作為控制組，以去離子水取代樣品作為控制組。

利用不同濃度的試驗樣品，以濃度為 X 軸、SOD-like 活性為 Y 軸繪製檢量線，再以迴歸方程式求得 EC₅₀ 值。

(五) 細胞培養

1. 前脂肪細胞之繼代培養

參照陳 (2002) 方法培養。將 3T3-L1 前脂肪細胞於含有 10% FBS (fetal calf serum) 的 DMEM (dulbecco's modified eagle's medium) 培養基中，在 37°C、5% CO₂ 濃度下，培養 24~48 h 後，以倒立式顯微鏡觀察，當細胞長滿即可進行繼代培養。於無菌操作台內，吸除培養基後以 PBS (phosphate-buffer saline) 沖洗細胞二次，吸除 PBS 並加入 1 ml 胰蛋白酶將貼附於培養盤底層的細胞切下，左右搖混培養盤使胰蛋白酶均勻分佈，再將培養盤至於培養箱 3 min，俟細胞層脫落浮起則再加入 1 ml FBS 終止胰蛋白酶反應，再加入 8 ml PBS，離心 (1,000 × g、5 min) 吸除上層液，加入含 10% FBS 的 DMEM 培養基，並移置新的培養盤內，最後再置於 37°C、5% CO₂ 培養箱中培養。

2. 脂肪細胞之分化培養

參照葉 (2004) 方法培養。使用 6 well/60 mm 培養盤培養，以細胞計數器計算出細胞數後，放置 2×10⁴ 個 3T3-L1 前脂肪細胞，加入含 10%

FBS 的 DMEM 培養基，置於 37°C、5% CO₂ 培養箱進行培養。待細胞長滿，視為第零天，此時添加樣品及更換培養基 (含 10 µg/ml 胰島素、0.5 µM IBMX 及 1 µM DEX)，培養 48 h 後，再次添加樣品及更換含 10 µg/ml 胰島素及 10% FBS 的 DMEM 培養基，每兩天更換一次培養基，持續培養至分化第六天，細胞即分化完成。

(六) 細胞存活率試驗

1. 錐蟲藍 (trypan blue) 試驗法

參照 Dave *et al.* (2012) 方法測定。利用錐蟲藍染色法分辨死細胞與活細胞，將細胞離心收集後調整為 4×10^4 cell/ml，以 100 µl/well 加入 96 well 培養盤中，於 37°C、5% CO₂ 培養 24 h，待細胞貼附長滿後，加入不同濃度 (2.5、5 及 10 mg/ml) 的樣品及分化劑，置於 37°C、5% CO₂ 培養箱進行 24 h 培養，吸除培養液並以胰蛋白酶將貼附於培養盤底層的細胞切下，離心 (1,000 × g、5 min) 吸除上層液，加入 1 ml 培養液 (含 10% FBS 的 DMEM) 使細胞均勻懸浮在其中，取 20 µl 細胞液及錐蟲藍做 1:1 等倍混合，最後以血球計數器計算細胞數。

2. MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 試驗法

參照 Ferrari *et al.* (1990) 之方法測定。MTT 分析是生物學上常用來測定細胞存活率的方法之一，其可被活細胞內的琥珀酸去氫酶 (succinate dehydrogenase) 代謝，當細胞呼吸作用旺盛時則琥珀酸去氫酶活性也越高。將細胞離心收集後調整為 4×10^4 cell/ml，以 100 µl/well 加入 96 well 培養盤中，於 37°C、5% CO₂ 培養 24 h，待細胞長滿視為第零天，接著參照上述脂肪細胞之分化培養步驟，直至第六天分化完成。再加入 100 µl/well 的 MTT 及 YLP (yolk lipoprotein) 之等比例混合溶液，並於 37°C 反應 4 h 後，振盪 2 min，於 570 nm 測定吸光值。細胞存活率(%)=[(樣品組吸光值 - 空白組吸光值) / (控制組吸光值 - 空白組吸光值)] × 100%。本試驗的控制組為含細胞不含樣品之培養液，並視其為 100%，空白組為不含細胞及樣品之培養液。

(七) 脂質蓄積試驗

1. 油紅 O 染色 (oil red O stain)

參照 Kim *et al.* (2001) 方法測定。吸去分化完成的脂肪細胞之培養基，以 PBS 輕輕的沖洗細胞二次，再以 1 ml 10% 的福馬林 (37% formaldehyde solution 溶於 PBS) 固定細胞 1 h，並以 PBS 沖洗細胞二次後，以 1 ml 的 0.5% 油紅染劑 (0.5 g 油紅染劑溶於 100 ml 的異丙醇中) 染色 15 min，並以去離子水洗去多餘的染劑，接著加入異丙醇靜置 5 min 使脂質溶出，於顯微鏡下觀察並拍照存檔，最後於 490 nm 測定吸光值。脂質含量百分比(%)=[(樣品組吸光值 - 空白組吸光值) / (控制組吸光值 - 空白組吸光值)] × 100%。本試驗的控制組為含細胞不含樣品之培養液，並視其為 100%，空白組為不含細胞及樣品之培養液。

2. 三酸甘油酯 (triglyceride, TG) 含量分析

參照 Itoiagawa *et al.* (2011) 以 triglyceride quantification kit (BioVision) 方法測定。利用細胞刮杓將分化完成的脂肪細胞刮離培養盤底，收集至 1.5 ml 的微量離心管內並於 4°C 下進行離心 (12,000 × g、5 min)，除去上層液，加入 1 ml 含 5% Triton-X100 的 PBS，以細胞破碎機微波震盪 1 min 使細胞均質破碎，再次進行離心並除去上層液後，加入 1 ml NP-40 (5%)，即為細胞萃取液。接著利用 triglyceride quantification kit 測定細胞內三酸甘油酯的含量。細胞萃取液以 90°C 水浴加熱 4 min，於室溫下冷卻，再反覆加熱及冷卻的步驟，直至有雲霧狀物體產生，於 4°C 下離心 (12,000 × g、5 min) 後除去上層液，取出 50 µl 的細胞萃取液，再加入 2 µl 的脂解酶並於室溫下反應 20 min，再加入 50 µl 的反應混合液，於室溫下反應 60 min，於 570 nm 測定吸光值。三酸甘油酯含量百分比(%)=[(樣品組吸光值 - 空白組吸光值) / (控制組吸光值 - 空白組吸光值)] × 100%。本試驗的控制組為含細胞不含樣品之培養液，並視其為 100%，空白組為不含細胞及樣品之培養液。

(八) 甘油-3-磷酸去氫酶 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase, GPDH) 活性分析

參照 Sottile and Seuwen (2001) 方法測定。利用細胞刮杓將分化完成的脂肪細胞刮離盤底，收集至 1.5 ml 的微量離心管內並於 4°C 下進行離心 (12,000 × g、5min)，除去上層液，加入 1 ml 含 1 mM EDTA 及 1 mM β-mercaptoethanol 的 20 mM Tris 緩衝溶液 (pH 7.3)，以細胞破碎機微波震盪 1 min 使細胞均質破碎，再次進行離心並收集上層細胞萃取液，並利用 glycerol-3-dehydrogenase activity assay kit (BioVision) 測定細胞內 GPDH 的含量。分析時取出 25 μl 的細胞萃取液，加入 100 μl 的反應混合液於 37°C 下反應 10 min 後，並於 37°C 下以 340 nm 測定吸光值。甘油-3-磷酸去氫酶活性百分比(%) = [(樣品組吸光值 - 空白組吸光值) / (控制組吸光值 - 空白組吸光值)] × 100%。本試驗的控制組為含細胞不含樣品之培養液，並視其為 100%，空白組為不含細胞及樣品之培養液。

(九) 統計分析

實驗數據以 SAS (statistical analysis system) 統計套裝軟體進行單項變異數分析 (one-way analysis of variance)，並以鄧肯氏多變域測驗 (Duncan's multiple range test) 測定各處理組間之差異，顯著水準定為 0.05。

結果與討論

一、水產複方較適配比之探討

取石蓴藻粉進行成分分析，一般成分 (乾物重計) 以碳水化合物含量最高 $61.58 \pm 0.03\%$ ，其次為粗蛋白 $22.72 \pm 0.30\%$ (Table 1)，此與侯 (2007) 指出石蓴類 (*Ulva* spp.) 之蛋白質含量約在 15 ~ 20% 之結果相近。石蓴多醣為含硫酸根的雜聚多醣，由鼠李糖、木糖 (xylose)、葡萄糖 (glucose) 及醣醛酸 (uronic acid) 所組成 (Lahaye and Robic, 2007)。研究指出，硫酸根含量高的石蓴多醣會具有較佳的螯合能力，且海藻多醣中的硫酸根含量亦

會影響其功能性 (Qi *et al.*, 2005)，因此本試驗利用酸 / 熱萃取石蓴醣溶液，並進行總醣及硫酸根含量分析，結果顯示其總醣及硫酸根含量分別為 18.46 ± 0.43 mg/ml 及 2.21 ± 0.47 mg/ml (Table 1)。

Mendis *et al.* (2005) 自美洲大赤魷魚皮萃取出之胜肽 (gelatin peptides) 具有強抗氧化能力，並推測其胜肽即為抗氧化活性的來源。本研究的預試驗結果顯示魷魚皮組成成分係以粗蛋白質為主，約佔乾物總重 70.6%。將魷魚皮以蛋白酶素水解來製備酵素水解物，其組成成分中的可溶性蛋白、胜肽和胺基酸含量分別為： 82.37 ± 5.60 mg/g; 70.79 ± 1.13 mg/g 和 63.23 ± 1.13 mg/g。進一步將酵素水解物以膠過濾層析發現其分子量 (molecular weight, Mw) 以 < 3000 Da 的胜肽為主，約佔總量 80.97%；次為 6500 ~ 3000 Da 和 Mw > 6500 Da 的胜肽，各約佔 17.52% 和 1.51%。

魷魚皮酵素水解物複合石蓴醣溶液以不同配比生產 2 種水產複方 (formula A 和 B)，並比較其抗氧化活性，結果顯示複方 A 在清除 DPPH 自由基能力、螯合亞鐵能力及還原力之 EC₅₀ 值 (清除 50% 自由基的有效濃度) 皆比複方 B 低 (Fig. 1)，表示複方 A 具有較高的抗氧化活性。

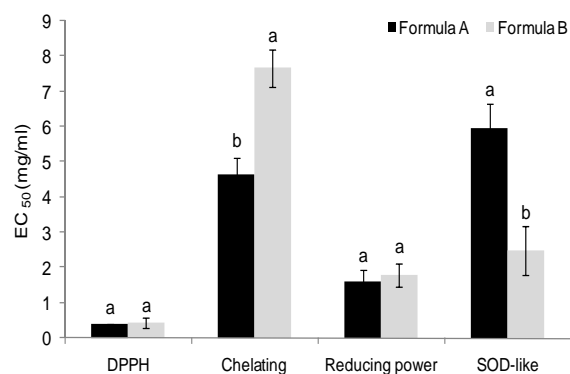


Fig. 1 Comparison of antioxidative activity between the marine formula A and B. Assay for antioxidant activities of marine formula were measured with respect to DPPH scavenging, chelating, reducing power and SOD-like activity. Antioxidant activities were indicated by EC₅₀ value, which represented the concentration (mg/ml) of antioxidant substance removing 50% of free radicals; values are expressed mean ± S.D (n = 3). The data followed by different lowercase letters in the same test are significantly ($p \leq 0.05$) different.

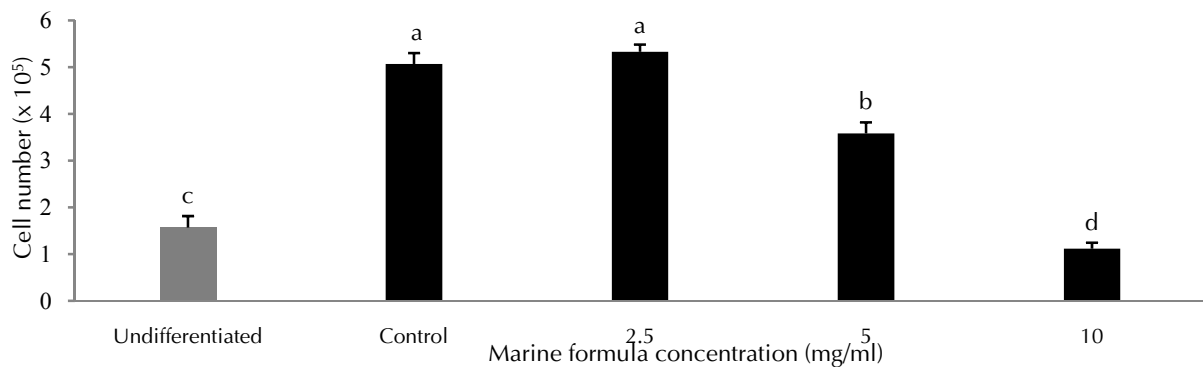


Fig. 2 Differentiation of 3T3-L1 preadipocytes was induced and the cell number was counted in control and marine formula treated cells using a hemacytometer 24 h after induction. Each value represents means \pm SD (n = 3). The data with different letters represent significant difference ($p \leq 0.05$) when compared to the control group.

Table 1 Proximate composition (% dry weight), total sugar and sulfated group of *Ulva lactuca*

Moisture (%)	Crude protein (%)	Crude fat (%)	Ash (%)	Carbohydrate ² (%)	Total sugar (mg/ml)	Sulfated group (mg/ml)
3.05 \pm 0.13 ¹	22.72 \pm 0.30	1.28 \pm 0.05	14.42 \pm 0.38	61.58 \pm 0.03	18.46 \pm 0.43	2.21 \pm 0.47

¹Mean \pm SD (n=3)

²Carbohydrate (%) = 100% - (Moisture% + Protein% + Fat% + Ash%)

有鑑於肥胖與脂肪組織受到氧化壓力刺激有關 (Kim *et al.*, 2011); 而氧化壓力亦與動脈粥狀硬化、糖尿病及高血壓等肥胖相關疾病呈相關性 (Belkowski *et al.*, 2000), 且這些疾病皆與代謝症候群 (metabolic syndrome) 息息相關。研究指出: 脂肪累積會形成肥胖, 而肥胖會誘使體內氧化壓力上升, 故推測脂肪代謝失調可能是代謝症候群的原因之一 (Furukawa *et al.*, 2004)。因此, 本研究係利用抗氧化能力佳的複方 A, 進一步探討其對 3T3-L1 前脂肪細胞之分化與脂質生成的影響。

二、水產複方對細胞存活率之影響

3T3-L1 前脂肪細胞生長至滿盤狀況時, 會進入 G0/G1 期而停止生長。當加入分化劑後, 細胞則開始進行分化 (differentiation) 並增加細胞數, 約培養 2 天細胞則不再增生, 並進入永久性生長停滯期 (permanent growth arrest) (Ntambi and Kim, 2000)。本研究亦發現相同趨勢, 將 3T3-L1 前脂肪細胞加入分化劑, 並與不同濃度 (2.5、5 及 10 mg/ml) 的水產複方共同培養 24 h 以觀察細胞數變化情形, 結果顯示添加分化劑的控制組 (control)

為 5.07×10^5 個細胞數, 相較於未添加分化劑組 (undifferentiated) (1.57×10^5), 其細胞數顯著增加約 2 倍。然而水產複方在 2.5 mg/ml 的濃度下, 其細胞數 (5.33×10^5) 與控制組相比無顯著差異性, 但當試驗濃度高於 5 mg/ml 時, 細胞數則呈現顯著的減少趨勢 (Fig. 2), 此結果顯示水產複方可能可抑制脂肪細胞的分化。

然而, 為了解水產複方是否因細胞毒性而減少分化的脂肪細胞之數量, 故將不同濃度 (2.5、5 及 10 mg/ml) 的水產複方與 3T3-L1 前脂肪細胞共同培養 24 h 後, 再以 MTT 試驗測定細胞存活率, 結果如 Fig. 3 所示: 在無添加分化劑下, 不同濃度的水產複方對 3T3-L1 前脂肪細胞之細胞存活率分別為 $182.09 \pm 27.90\%$ 、 $184.33 \pm 18.78\%$ 及 $117.16 \pm 30.67\%$, 皆高於控制組 (100%)。Kim *et al.* (2011) 亦在無添加分化劑的情況下, 將 3T3-L1 前脂肪細胞與不同濃度 (5、10、15 及 30 μ M) 的薑黃素共同培養 24 h, 其細胞存活率與控制組相當, 此結果與本研究相同, 皆証實試驗樣品對 3T3-L1 前脂肪細胞無毒性。

以 40X 的顯微鏡觀察細胞的型態, 會發現脂肪細胞的外形由紡錘狀漸呈圓形, 則表示前脂肪細胞已分化成為成熟的脂肪細胞。試驗將不同濃

度 (2.5、5 及 10 mg/ml) 的水產複方與 3T3-L1 前脂肪細胞共同培養 6 天，並於培養過程中添加分化劑，使其分化為成熟的脂肪細胞，再進行 MTT 試驗。結果顯示水產複方對細胞的存活率呈現劑量效應，其值分別為 $110.69 \pm 4.62\%$ 、 $91.02 \pm 13.50\%$ 及 $41.68 \pm 7.71\%$ ，且在 10 mg/ml 濃度下，可顯著降低細胞存活率 (Fig. 3)。綜合以上結果推測水產複方對 3T3-L1 前脂肪細胞不具細胞毒性，但卻可抑制其分化為成熟脂肪細胞之作用。

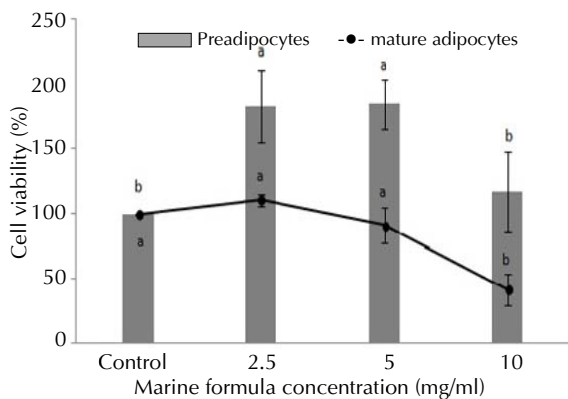


Fig. 3 Effect of marine formula on cell viability for 3T3-L1 preadipocytes and mature adipocytes. MTT colorimetric assay for cell viability of preadipocytes and mature adipocytes were performed after 24 h and 6 day incubation, respectively. Each value represents means \pm SD ($n = 3$). The data with different letters represent significant difference ($p \leq 0.05$) when compared to the control group.

三、水產複方對細胞內脂質生成量之影響

油紅 O 染色是觀察脂肪細胞中脂質堆積情形的一種方法，脂質經過油紅試劑染色後會呈現紅色，脂肪細胞分化末期隨著細胞內脂質合成增加，則脂質含量越多，而染色後的顏色就會越深 (Furukawa *et al.*, 2004)。以水產複方 2.5、5 及 10 mg/ml 之濃度與 3T3-L1 前脂肪細胞共同培養 6 天，使其成為成熟的脂肪細胞。油紅染色結果顯示：隨水產複方濃度的增加則細胞被染紅的程度相較於控制組呈現較淺的趨勢 (Fig. 4 A)，再將油紅染色結果量化如 Fig. 4B，於 2.5、5 及 10 mg/ml 之濃度下，脂肪細胞內的脂質蓄積量相較於控制組，分別下降至 $77.93 \pm 2.69\%$ 、 $68.44 \pm 1.38\%$ 及 $61.20 \pm 3.57\%$ ，因此推測水產複方可於 3T3-L1 前

脂肪細胞的分化過程中抑制脂質之生成。

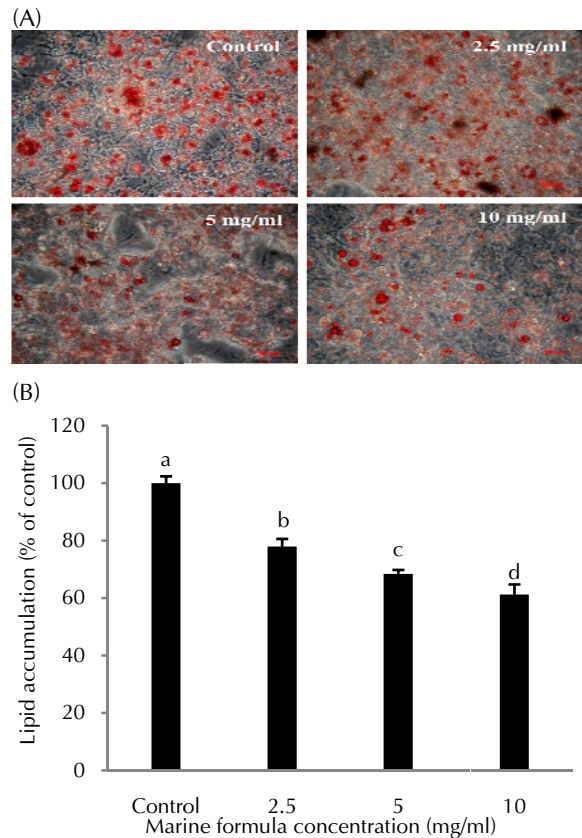


Fig. 4 Effect of marine formula on intracellular lipid accumulation during adipocyte differentiation. One day postconfluent 3T3-L1 preadipocytes were subjected to adipocyte differentiation for 6 days in the presence of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) or various concentrations (2.5-10 mg/ml) of marine formula in DMEM. (A) After 6 days of treatment of 3T3-L1 cells with marine formula, cells were subjected to Oil red O stain. (B) These cells were then subjected to quantitative analysis of intracellular lipid accumulation. Each value represents means \pm SD ($n = 3$). The data with different letters represent significant difference ($p \leq 0.05$) when compared to the control group.

四、水產複方對細胞內三酸甘油酯生成量之影響

利用不同濃度的水產複方來探討其對脂肪細胞內 TG 的抑制作用。當 3T3-L1 前脂肪細胞分化成為成熟的脂肪細胞時，細胞內會開始累積 TG 含量 (Prins and O'Rahilly, 1997)，因此本研究以 2.5、5 及 10 mg/ml 的水產複方與 3T3-L1 前脂肪細胞共

同培養 6 天，使之分化為成熟的脂肪細胞，再測定細胞內 TG 含量。由 Fig. 5 可知，隨著水產複方濃度的增加，脂肪細胞內 TG 含量則分別下降至 $66.97 \pm 3.95\%$ 、 $57.35 \pm 3.69\%$ 及 $47.88 \pm 2.69\%$ ，並呈現劑量效應，此試驗結果與抑制脂質堆積結果之趨勢一致，因此推測水產複方不僅可抑制細胞之脂質生成量，亦可有效降低細胞內 TG 含量。

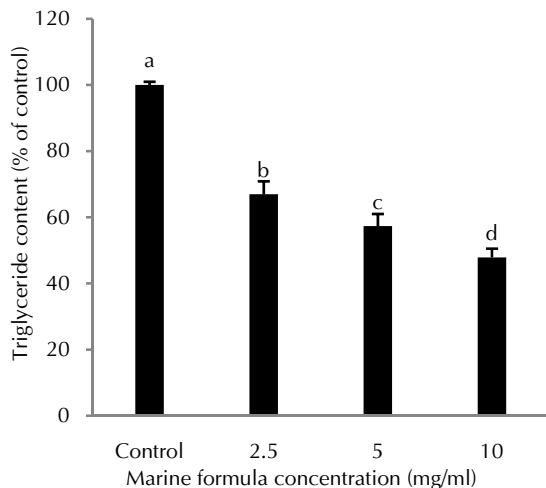


Fig. 5 Effect of marine formula on triglyceride in mature adipocytes cells. One day postconfluent 3T3-L1 preadipocytes (day 0) were treated with the indicated concentrations of marine formula, which was replenished every 2 days along with the relevant medium up to day 6. Cells treated with medium were used as control. The assays were performed on day 6. Triglyceride content was measured with a Triglyceride quantification kit. Each value represents means \pm SD ($n = 3$). The data with different letters represent significant difference ($p \leq 0.05$) when compared to the control group.

五、水產複方對細胞內甘油-3-磷酸去氫酶活性之影響

甘油-3-磷酸去氫酶 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase, GPDH) 是合成三酸甘油酯的重要酵素，會大量表現於成熟的脂肪細胞內並造成油滴 (lipid droplet) 的累積，故 GPDH 酵素活性的是評估脂肪細胞分化的指標之一 (Zhidan *et al.*, 1999; 江, 2011)。將不同濃度 (2.5、5 及 10 mg/ml) 的水產複方與 3T3-L1 前脂肪細胞共同培養 6 天，使之分化成為成熟的脂肪細胞，再測定細胞內 GPDH

之活性。結果顯示添加 2.5、5 及 10 mg/ml 之水產複方，皆可顯著降低脂肪細胞內 GPDH 活性，分別下降至 $85.49 \pm 2.48\%$ 、 $69.41 \pm 0.88\%$ 及 $41.81 \pm 3.08\%$ ，且隨著水產複方的濃度增加則細胞內 GPDH 活性會隨之下降，呈現劑量效應 (Fig. 6)。Maeda *et al.* (2006) 以 3T3-L1 前脂肪細胞為試驗材料，於分化過程中添加 2.5 μ M 及 5.0 μ M 之藻褐素，結果發現藻褐素的處理組別可顯著降低脂肪細胞中的 GPDH 活性，藉此推測藻褐素具有抑制細胞的分化作用，並降低脂肪的堆積，此結果與本研究相似。

藉由本試驗得知水產複方可抑制細胞內 GPDH 活性，且此結果趨勢亦與上述水產複方可降低細胞內脂質生成量及 TG 含量結果一致，因此推測水產複方具有調節脂質生成之可能性。

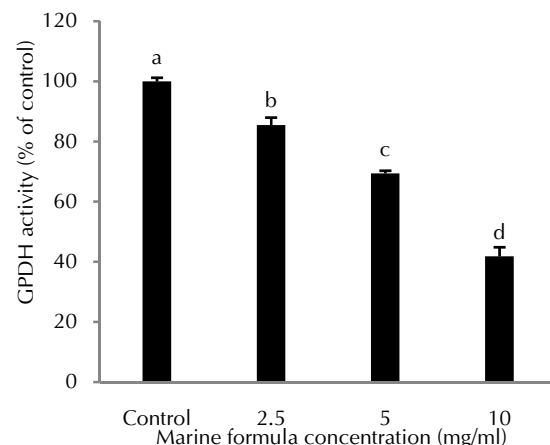


Fig. 6 Effect of marine formula on glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity in mature adipocytes cells. One day postconfluent 3T3-L1 preadipocytes (day 0) were treated with the indicated concentrations of marine formula, which was replenished every 2 days along with the relevant medium up to day 6. Cells treated with medium were used as control. The assays were performed on day 6. GPDH activity was measured with a GPDH activity assay kit. Each value represents means \pm SD ($n = 3$). The data with different letters represented significant difference ($p \leq 0.05$) when compared to the control group.

結 論

石蓴醣溶液複合魷魚皮酵素水解物所產製的高抗氧化能力的水產複方，經細胞試驗證實其對

3T3-L1 前脂肪細胞不具細胞毒性，且可抑制前脂肪細胞分化為成熟的脂肪細胞，進而抑制脂質堆積及降低細胞內 TG 含量及 GPDH 活性，且呈現劑量效應，因此水產複方應具有調節脂質之保健素材的發展潛力，同時本研究也達到活用低度利用水產資源，裨利水產產業永續利用之目的。

參考文獻

- 江芃萱 (2011) Neutrane-大豆蛋白水解物中具有抗脂質新生活性大豆肽之最適生產、純化與定序。私立東海大學食品科學所碩士論文。
- 侯松伯 (2007) 數種台灣可食用性藻類之抗氧化評估。國立臺灣海洋大學食品科學所碩士論文。
- 張欣蕙 (2003) 綠茶兒茶素對於前脂肪細胞分化的影響。國立中央大學生命科學所碩士論文。
- 陳盈臻 (2002) 蔬果成分物質對 3T3-L1 脂肪細胞分化的影響。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文。
- 黃淑芳 (1989) 認識藻類。台灣省立博物館, pp. 1-54.
- 葉怡均 (2004) 共軛亞麻油酸對前脂肪細胞分化之影響。國立臺灣海洋大學食品科學所碩士論文。
- AOAC (1995) Official methods of analysis (16th ed.) Association of Official Analytical Chemist, Arlington, VA.
- Belkowski, J., G. Wójcicka, D. Górny and A. Marciniak (2000) The effect of dietary-induced obesity on lipid peroxidation, antioxidant enzyme and total plasma antioxidant capacity. *J. Physiol. Pharmacol.*, 51(4): 883-896.
- 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.
- Brodie, A. E., V. A. Manning, K. R. Ferguson, D. E. Jewell and C. Y. Hu (1999) Conjugated Linoleic acid inhibits differentiation of pre- and post-confluent 3T3-L1 preadipocytes but inhibits cell proliferation only in pre-confluent cells. *J. Nutr.*, 129: 602-606.
- Dave, S., N. J. Kaur, R. Nanduri, H. K. Dkhar, A. Kumar and P. Gupta (2012) Inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis and lipolysis by stem bromelain in 3T3-L1 adipocytes. *Plos One*, 7(1): 1-12.
- Dodgson, K. S. (1961) Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. *Biochem. J.*, 78: 312-319.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith (1956) Colorimetric method for determination of Sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28: 350-356.
- Ejaz, A., D. Wu, P. Kwan and M. Meydani (2009) Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and angiogenesis and obesity in C57/BL mice. *J. Nutr.*, 139: 919-925.
- 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.
- 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.
- Green, H. and M. Meuth (1974) An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*, 3: 127-133.
- Green, H. and O. Kehinde (1974) Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell*, 1: 113-116.
- Green, H. and O. Kehinde (1975) An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*, 5: 19-27.
- Itoiagawa, Y., K. N. Kishimoto, H. Sano, K. Kaneko and E. Itoi (2011) Molecular mechanism of fatty degeneration in rotator cuff muscle with tendon rupture. *J. Orthop. Res.*, 29: 861-866.
- Je, J. Y., Z. J. Qian, H. G. Byun and S. K. Kim (2007) Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochem.*, 42(5): 840-846.
- Jeon, G., Y. Choi, S. M. Lee, Y. Kim, H. S. Jeong and J. Lee (2010) Anti-obesity activity of methanol extract from hot pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds in 3T3-L1 adipocyte. *Food Sci. Biotechnol.*, 19(4): 1123-1127.
- Kim, C. Y., T. T. Lee, C. Chen, J. X. Cheng and K. H. Kim (2011) Curcumin inhibits adipocyte differentiation through modulation of mitotic clonal expansion. *J. Nutr. Biochem.*, 22: 910-920.
- Kim, K. H., K. Lee, Y. S. Moon and H. S. Su (2001) A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J. Biol.*

- Chem., 276: 11252-11256.
- Lahaye, M. and A. Robic (2007) Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules*, 8: 1765-1774.
- Leiro, J. M., R. Castro, J. A. Arranz and J. Lamas (2007) Immunomodulating activities of acidic sulphated poly saccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. *Int. Immunopharmacol*, 7: 879-888.
- 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.
- Mendis, E., N. Rajapakse, H. G. Byun and S. K. Kim (2005) Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their *in vitro* antioxidant effects. *Life Sci.*, 77(7): 2166-2178.
- Novakofski, J (2004) Adipogenesis: Usefulness of *in vitro* and *in vivo* experimental models. *J. Anim. Sci.*, 82: 905-915.
- Ntambi, J. M. and Y. C. Kim (2000) Adipocyte Differentiation and Gene Expression. *J. Nutr.*, 130: 3122S-3126S.
- Oyaizu, M. (1988) Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *J. Jap. Soc. Food Sci.*, 35: 771-775.
- Prins, J. B. and S. O'Rahilly (1997) Regulation of adipose cell number in man. *Clin. Sci. (Lond)*, 92: 3-11.
- Qi, H., Q. Zhang, T. Zhao, R. Chen, H. Zhang, X. Niu and Z. Li (2005) Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) *in vitro*. *Int. J. Biol. Macromol.*, 37: 195-199.
- 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.
- Sottile, V. and K. Seuwen (2001) A high-capacity screen for adipogenic differentiation. *Anal. Biochem.*, 293: 124-128.
- 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.
- Yang, J. Y., M. A. Della-Fera, S. Rayalam, S. Ambati, D. L. Hartzell, H. J. Park and C. A. Baile (2008) Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin. *Life Sci.*, 82: 1032-1039.
- Zhidan, W., P. Pere and M. S. Bruce (1999) Transcriptional activation of adipogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11: 689-694.

Effect of Lipid Accumulation for Marine Formula in Peradipocytes

Yi-Kuan Tsai, Hsin-Chueh Ho and Huey-Jine Chai*

Seafood Technology Division, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

A marine formula composed of *Ulva lactuca* extraction and enzymatic hydrolysates was extracted from *Dosidicus gigas* skins. *In vitro* assay demonstrated that the marine formula possessed good antioxidative activities, EC₅₀ (effective concentration of antioxidant substance removing 50% of free radicals) on DPPH free radical scavenging activity, chelating activity of Fe²⁺, reducing power and SOD-like activity were 0.54, 4.52, 1.61 and 5.98 mg/ml, respectively. The aim of this study was to evaluate the effect of the marine formula against lipid accumulation by using 3T3-L1 peradipocytes. At 2.5, 5 and 10 mg/ml, the marine formula demonstrated no cytotoxicity to peradipocytes; however, it could inhibit differentiation of mature adipocytes. In terms of lipid accumulation, the results showed that 2.5, 5 and 10 mg/ml of the marine formula could inhibit lipid accumulation, decreasing the triglyceride contents and glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity in a dose-dependent manner.

Key words: Ulva, enzymatic hydrolysates of squid skin, marine formula, 3T3-L1, lipid accumulation

*Correspondence: 199, Hou-lh Rd., Keelung 202, Taiwan, TEL: (02) 2462- 2845; FAX: (02) 2462-3306; E-mail: hjchai@mail. tfrin.gov.tw