



# 長松藻酵素水解萃取物抑制脂肪 生成效果之細胞試驗

林慧秋、邱韻霖、廖紫嫻、許雅筑 / 水產試驗所澎湖漁業生物研究中心

## 前言

長松藻 (*Codium cylindricum*) (圖 1) 為澎湖地區常見藻類，文獻指出其硫酸鹽多醣 (sulfate polysaccharide) 及虹吸黃質 (siphonaxanthin) 具有抗凝血及抗肥胖功效 (Sugawara et al., 2014; Li et al., 2018; Li et al., 2020)。長松藻高脂飲食誘導肥胖小鼠中的抗肥胖特性研究顯示，補充富含虹吸黃質的長松藻具有抗肥胖作用。長松藻飼料通過調節脂肪組織中的脂質代謝和抑制脂質吸收，降低了

WAT (白色脂肪組織) 的重量，並改善了血漿脂質和肝脂質的分布。這些結果表明，富含虹吸黃質的長松藻可以用作預防和控制肥胖的有效食品 (Li et al., 2018)。

本計畫擬利用酵素水解及水萃取方式，將其水解物進行體外抗肥胖細胞試驗，將其研究成果做為後續開發澎湖特色海藻產品之參考。試驗中加入長莖葡萄蕨藻水萃取物 (CLW) 做為比較，原因為 CLW 亦含有虹吸黃質成分，作為實驗參考。以市售褐藻醣膠作為對照組原因為文獻指出褐藻醣膠有抗肥胖功效 (Hu et



圖 1 澎湖海域長松藻 (*Codium cylindricum*)



al., 2012; Ha et al., 2013; Nakazono et al., 2016)。長松藻在國外有食用歷史，但因目前長松藻尚未列入食藥署可食用海藻名錄，如能解決長松藻列入食藥署可食用名錄問題，或許能開發更多長松藻機能性食品，使長松藻利用更為多元化。

## ■ 材料與方法

### 一、材料

長松藻採集自澎湖縣西嶼鄉小門村附近海域，經自來水清洗及脫水機脫水後，以熱風乾燥機 70°C 乾燥。乾燥海藻以粉碎機粉碎，即得乾燥藻體粉末。長松藻乾燥粉末以酵素及水萃取，萃取完成後離心及過濾，經冷凍乾燥後進行後續實驗。

### 二、萃取方法

長松藻依比例加入 RO 水，使用 Viscozyme 及水萃取，離心及過濾去除殘渣。再經冷凍乾燥過程，待試驗時回溶於蒸餾水。

### 三、分析方法

海藻萃取物之凍乾品以去離子水配製成 50、100、200、300 mg/ml，進行抑制脂肪生成 (lipogenesis) 能力分析。

#### (一) 細胞培養

##### 1、3T3-L1 前脂肪細胞株培養條件

將小鼠前脂肪細胞株 (3T3-L1) 細胞培養於 10 cm 培養皿中，以含 10% fetal bovin serum (FBS) 之 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 進行培養，且置於 37°C 含 5% CO<sub>2</sub> 之培養箱中培養。

##### 2、細胞冷凍保存

培養皿中細胞生長至 9 分滿時，以 1x PBS 清洗細胞 2 次後，加入胰蛋白酶 (0.25% trypsin/EDTA) 於室溫下作用，約 30 秒後拍盤，加入 DMEM 沖洗細胞，並將細胞液收集至離心管中，以 1,000 × g 離心 2 分鐘，利用血球計數器計算細胞數為  $1 \times 10^6$  個細胞，再加入 1 ml DMEM (含有 1% dimethylsulfoxide, DMSO) 之培養液中使其充分混勻後，移至冷凍管中放置於 -80°C 冷凍庫中，24 小時後再移至液態氮桶中保存。

##### 3、冷凍細胞活化

將冷凍小管由液態氮桶中取出，立即放入 37°C 水浴槽中快速解凍，將解凍之冷凍小管移入無菌操作台內。將完全解凍之細胞液取出至於含有 DMEM 之離心管中，以 1,000 × g 離心 2 分鐘，去除上清液後，加入新鮮 DMEM 培養液並將細胞充分均勻，再將細胞種入 6 cm 培養皿中並左右輕微搖晃使細胞均勻分散，最後將培養皿置於 37°C 含 5% CO<sub>2</sub> 之培養箱中培養。

##### 4、細胞繼代培養

細胞在培養皿中生長至 9 分滿時，以 1x PBS 清洗細胞兩次後，加入胰蛋白酶 (0.25% trypsin/EDTA) 於室溫下作用，約 30 秒後拍盤，加入 DMEM 懸浮細胞，並將細胞液收集至離心管中，以 1000 × g 離心 2 分鐘，去除上清液，加入新鮮 DMEM 培養液並將細胞充分均勻，再取出所需細胞種入 10 cm 培養皿中並左右輕微搖晃使其細胞均勻分散，最後將培養皿置於 37°C 含 5% CO<sub>2</sub> 之培養箱中培養。

##### 5、細胞分化

前脂肪細胞的分化過程可分為 4 個階

段：(1) 生長停整 (growth arrest)；(2) 有絲分裂擴增 (mitotic clonal expansion, MCE)；(3) 分化早期及基因表現；(4) 分化末期及分化終止 (Gregoire et al., 1998)。在脂肪細胞分化早期，至少有兩種轉錄因子家族被誘發表現，C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) 與 PPAR (peroxisome proliferators-activated receptor) (Gregoire et al., 1998)。PPAR $\gamma$  為脂肪細胞主要的特異基因，在前脂肪細胞中即有其微量的表現；當受到荷爾蒙所誘發的分化後，PPAR $\gamma$  表現量迅速的增加；在 3T3-L1 脂肪細胞分化第 2 天，PPAR $\gamma$  表現量明顯增加，且在成熟脂肪細胞中表現量達最高 (Brun et al., 1996)。C/EBP $\beta$  與 C/EBP $\delta$  在 PPAR $\gamma$  開始大量表現前有短暫性的增加 (Brun et al., 1996)，在細胞分化早期至中期階段下降，且同時誘發 PPAR $\gamma$  與 C/EBP $\alpha$  表現 (Clarke et al., 1997)；接著，PPAR $\gamma$  與 C/EBP $\alpha$  開始調控下游與分化及代謝相關之基因 (Cornelius et al., 1994)，促使細胞開始堆積脂質，並表現脂肪細胞之特徵 (圖 2)。

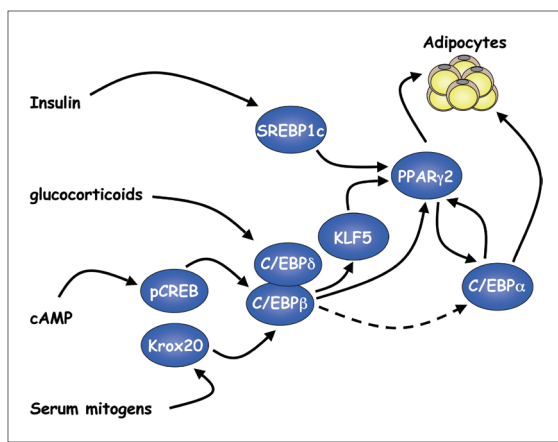


圖 2 脂質新生作用轉錄因子訊息傳導過程 (圖片來源：Farmer, 2006)

以直徑 3.5 cm 之培養皿中種植  $1 \times 10^4$  個 3T3-L1 前脂肪細胞株，以含 10% FBS 之 DMEM 培養液進行培養，培養 2 天後更換為含有 50、100、200、300 mg/ml 海藻萃取物的分化培養液，以含 DMEM 之分化培養液為對照組。分化期間使用之分化培養液，分別敘述如下：於分化第 1 天至第 2 天給予含有 1  $\mu$ M Dexamethasone (Dex)、0.5 mM 3-isobutyl-methylxanthine (IBMX)、10  $\mu$ g/ml insulin、10% FBS 之 DMEM 培養液；於分化第 3 天至第 6 天給予含有 10  $\mu$ g/ml insulin、10% Fetal Calf Serum (FCS) 之 DMEM 培養液，且每 2 天更換 1 次培養液；於分化第 7 天至第 8 天給予含 10% FCS 之 DMEM 培養液。3T3-L1 前脂肪細胞經過 2 天培養及 8 天分化後，便完成細胞分化並進行採樣分析 (Kim et al., 2010; Park et al., 2011; 何, 2008)。

## (二) 脂質堆積程度分析

### 1、原理

油紅 (Oil red O) 是一種脂溶性的染料，可以將脂肪細胞中的三酸甘油脂、油滴染成紅色。染色後以顯微鏡觀察並以影像做記錄；以異丙醇 (isopropanol) 將染劑溶出後在波長 510 nm 下測定吸光值，若測得的吸光值越高表示細胞中脂質含量越多。

### 2、方法

3T3-L1 前脂肪細胞經樣品處理後吸除培養液，以 1x PBS 清洗細胞 2 次，每盤加入 1 ml 10% formaldehyde (37% formaldehyde 以 PBS 稀釋) 於室溫下靜置 30 分鐘固定細胞，再以滅菌水清洗。先配置油紅原液，以 98% 100 ml 異丙醇加 0.5 g 油紅粉末，再將油紅原

液用無菌水稀釋 (油紅原液: 無菌水為 6:4), 取 1 ml 稀釋液染色 15 分鐘, 去除染色液後以無菌水潤洗細胞 2 次, 移至顯微鏡下觀察, 即可看出分化後細胞有明顯紅色脂肪球狀。染色後細胞可保持在適量滅菌水中, 也可待完全乾燥後拍照存檔與染劑定量。拍照完的細胞加入 1 ml 的異丙醇, 輕晃培養皿, 使染劑被萃取出來並收集至 1.5 ml 的離心管中, 各取 200  $\mu$ l 細胞染劑, 三重覆注入 96 well 盤中, 使用 abcam Leptin mouse ELISA kit 以 ELISA reader 測定波長 510 nm 之吸光值。換算實驗組與對照組之吸光比值, 以得知相對脂質累積量之變化。

### 3、相對脂質累積量計算公式如下:

相對脂質累積量 (%) = 樣品之吸光值 / 對照組之吸光值  $\times$  100%

## (三) 細胞內 PPAR、C/EBP 及脂肪生成

### 1、原理

過氧化體增殖劑活化受器 (peroxisome proliferators-activated receptor, PPAR), 是固醇核受器的成員。PPAR 有  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  三種 isoform, 其中 PPAR $\alpha$  與 PPAR $\gamma$  分別對脂肪代謝、運輸、生合成、儲存與血糖恆定具有調節作用。

在 C/EBP family 的成員中, C/EBP $\alpha$ 、C/EBP $\beta$  及 C/EBP $\delta$  在脂肪細胞分化過程扮演重要的角色。首先, 在前脂肪細胞開始誘導分化時, 初期會先引發 C/EBP $\beta$  及 C/EBP $\delta$  mRNA 開始的表現, 其中分化劑包含的 DEX 及 IBMX 能分別活化 C/EBP $\beta$  及 C/EBP $\delta$  的表現, 且在移除分化劑後, C/EBP $\delta$  於 48 小時內表現量快速下降, 而 C/EBP $\beta$  則在 8 天內逐步降低 (Ntambi and Kim, 2000) 脂肪生成主要

指脂肪酸及三酸甘油酯 (Triglyceride) 合成, lipogenesis 在肝臟及脂肪細胞中皆會進行 (Kersten, 2001)。目前已知 lipogenic genes 包含 adipocyte fatty acid-binding protein 4 (AP2, FABP4)、fatty acid synthase (FAS)、stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1)、acetyl-CoA carboxylase-1 and -2 (ACC) 等, 其中 FAS 主要參與脂質的合成作用; AP2 則與 fatty acid 具有高度的親和性, 在脂肪組織中為運送細胞內和代謝脂肪酸的重要介質。

細胞內 PPAR 蛋白質表現分析乃係利用 SDS-聚丙稀醯胺板膠電泳法 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 配合西方墨點法 (western blot) 進行酵素蛋白質分析。蛋白質定量分析以 Lowry 等 (1951) 方法進行。SDS-PAGE 是利用過硫酸銨 (ammonium persulfate) 使得四甲基二乙胺 (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine, TEMED) 形成未配對電子, 因 SDS-PAGE 本身帶有負電荷, 可與蛋白質結合, 故電泳進行時, 蛋白質由負極向正極移動, 分子大之蛋白質移動較慢, 較靠近負極, 分子小之蛋白質移動較快, 較靠近正極, 所以依蛋白質分子量大小可得知其相對位置。

### 2、方法

測定細胞蛋白質濃度, 計算蛋白質濃度後, 加入等量體積 (1/1=v/v) 的樣品染劑 (sample dye), 將樣品之蛋白質濃度進行調整。於 95°C 下加熱 5 分鐘製成電泳樣品 (Lowry et al., 1951)。

配製 15% 厚度為 1.5 mm 之 SDS-PAGE 膠片, 下膠 (separating gel) 含 7.5 ml 30%





雙丙烯醯胺 (acrylamide/bis)、3.8 ml 1.5 M 三鹽酸 (Tri-HCl)、150  $\mu$ l 10% 十二烷基硫酸鈉 (sodium dodecyl sulfate, SDS)、7.5  $\mu$ l 四甲基二乙胺、150  $\mu$ l 10% 過硫酸銨 (ammonium persulfate)；上膠 (stacking gel) 含 (1.3 ml 30% acrylamide/bis、2.5 ml 0.5 M Tri-HCl、100  $\mu$ l 10% SDS、10  $\mu$ l TEMED、100  $\mu$ l 10% ammonium persulfate)。將蛋白質標識 (protein marker) 以及各樣品依序注入膠體的孔槽中，並加足 running buffer，電壓設定 180 V，進行 75 分鐘電泳分離。

完成西方墨點法分析後之 SDS-PAGE，以濕式轉漬設備將 SDS-PAGE 上之蛋白質轉漬到 PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜上，其 PVDF 膜需先甲醇浸泡活化後再使用。以 100 V，進行轉漬 90 分鐘。轉漬完成後取出 PVDF 膜，為減少 PVDF 膜上之非特異性鍵結位置，先用 blocking buffer (0.5% non-fat milk/TBS buffer)，於室溫下進行 1 小時的 blocking。之後以 TBST 清洗 6 次 (5 分鐘 / 次)，分別加入一級抗體 (PPAR $\gamma$ 、 $\beta$ -actin)， $\beta$ -actin 於室溫中震盪 1 小時，PPAR $\gamma$  置於 4°C 冰箱中震盪一夜。隔天取出 PVDF 膜，用 TBST 清洗 6 次 (5 分鐘 / 次) 以清除未結合的一級抗體。接著加入二級抗體，於室溫下震盪 1 小時，再用 TBST 清洗 6 次 (5 分鐘 / 次) 以清除未結合的二級抗體。PVDF 以冷光儀 (Bio-Rad Co., USA) 進行冷光呈色及定量後，PVDF 加入呈色劑 (3, 3'-diaminobenzidine, Dab) 呈色並晾乾。

## 四、統計分析方法

各試驗結果以 SPSS 套裝軟體 (Version 10.0) 進行單因子變異數分析 (one-way analysis of variance, ANOVA)，若達顯著差異，再以 Duncan's multiple range test 檢定各處理組間是否有顯著差異，所有試驗使用顯著水準為  $p < 0.05$ 。

## 結果與討論

### 一、細胞試驗

#### (一) 油紅染色

3T3-L1 細胞分化試驗：3T3-L1 細胞分化以第 8 天 Leptin (瘦素) 達到最高量 (11,139 pg/ml)，且經油紅染色第 8 天脂肪細胞為最高量，後續將以此細胞濃度做試驗 (圖 3)。

#### (二) 以 Real-time PCR 測定脂肪生成抑制作用

以 MDI (3-isobutyl-1-methylxanthine/dexamethasone/insulin) 誘導 8 天的 3T3-L1 脂肪細胞添加不同樣品 [市售褐藻醣膠 (Control)、長莖葡萄蕨藻水萃取 (CLW)、長松藻水萃取 (CCW) 和長松藻 V 酵素水解 (CCV)] 分別處理 24 及 48 小時，測定脂肪生成標誌物 mRNA (C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\alpha$ 、PPAR $\gamma$ 、FAS、AP2) 表現，結果顯示在處理 24 小時後，CCW 組在 C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\alpha$  及 AP2 具有較低的脂肪生成標誌物，優於其他組及對照組，在 FAS 與對照組相當，在 PPAR $\gamma$  則高於對照組 (圖 4)。

在處理 48 小時後，水萃組在 C/EBP $\beta$  較其他組具有較低的脂肪生成標誌物，而在 C/EBP $\alpha$ 、FAS、AP2 則與對照組相當，在

PPAR $\gamma$  與處理 24 小時一樣高於對照組。整體而言顯示 CCW 組具有較佳的脂肪抑制生成效果 (圖 5)。

### (三) 西方墨點法

在樣品 (CLW、CCW 和 CCV) 加入誘導細胞後 (24 小時和 48 小時)，通過西方墨點法測定的脂肪生成標誌物的表達水平，包括 C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\alpha$  和 AP2。GAPDH (3- 磷酸甘油醛脫氫酶) 用作為對照組，結果顯示長松藻水萃取物有較佳的抑制脂肪生成效果 (圖 6)。

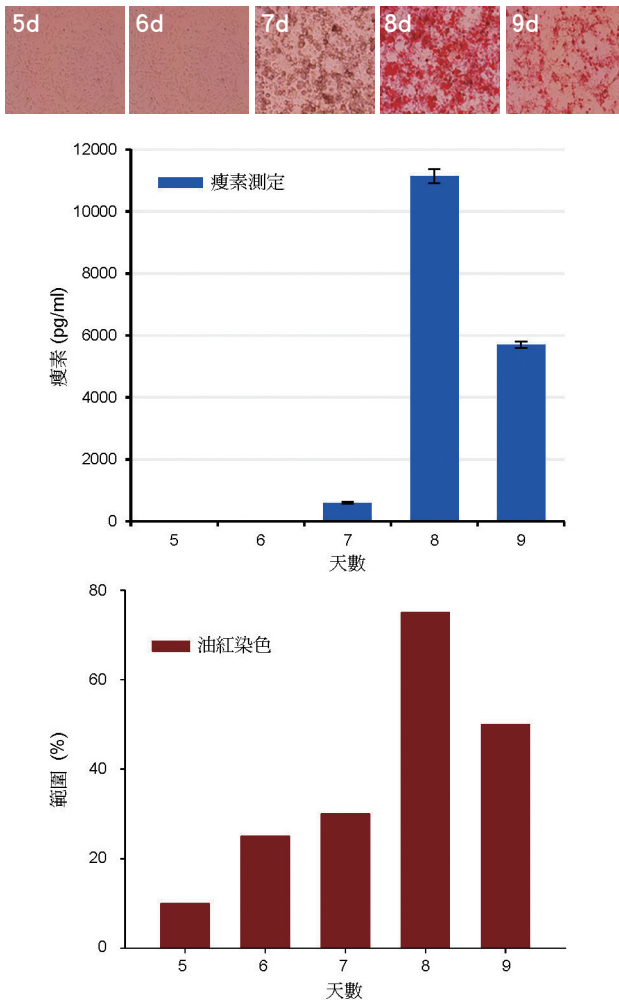


圖 3 培養細胞系 (3T3-L1) 並添加 MDI 培養基以誘導分化。收集脂肪細胞並評估用於後續測定 (5-9d, d 代表天數)

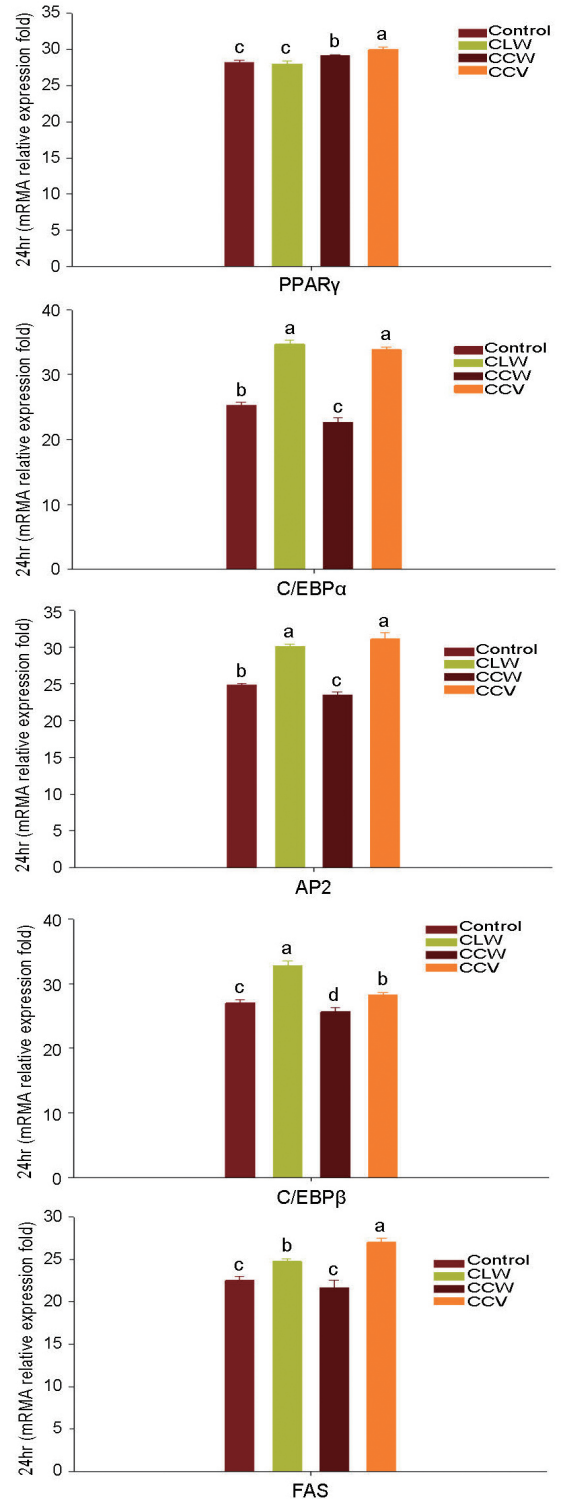


圖 4 通過 Real-time PCR 確定的脂肪生成標誌物。24 小時後用所示的不同樣品 RT-PCR 處理的脂肪細胞 (MDI 誘導 8 天) 中脂肪生成標誌物

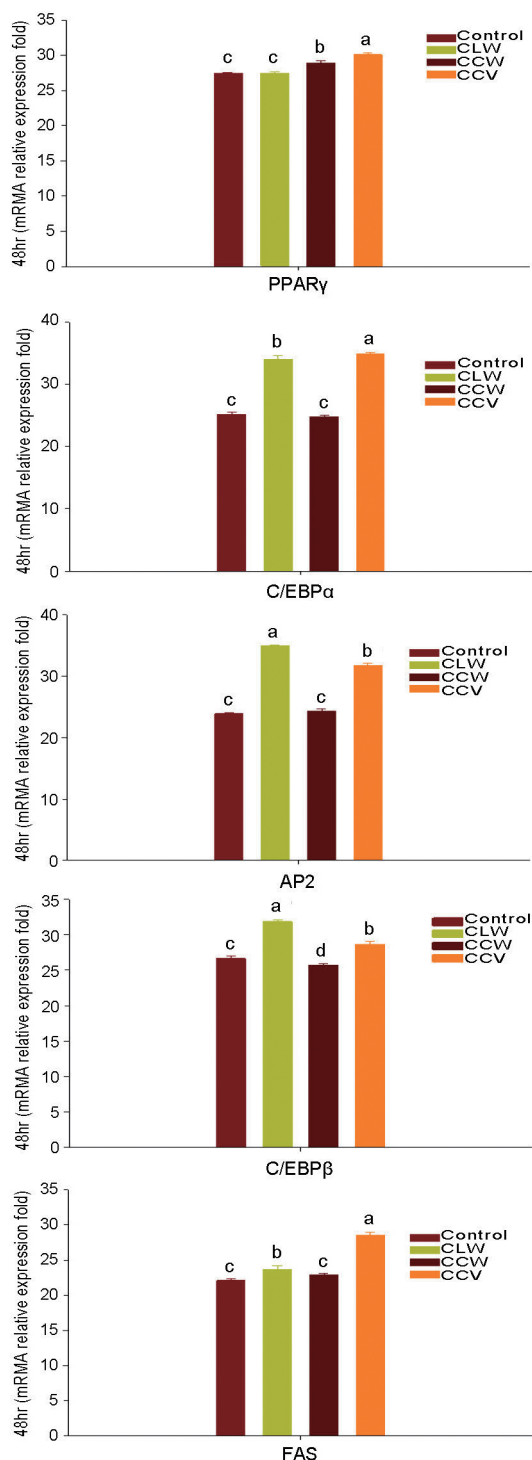


圖 5 通過 Real-time PCR 確定的脂肪生成標誌物。48 小時後用所示的不同樣品 RT-PCR 處理的脂肪細胞 (MDI 誘導 8 天) 中脂肪生成標誌物

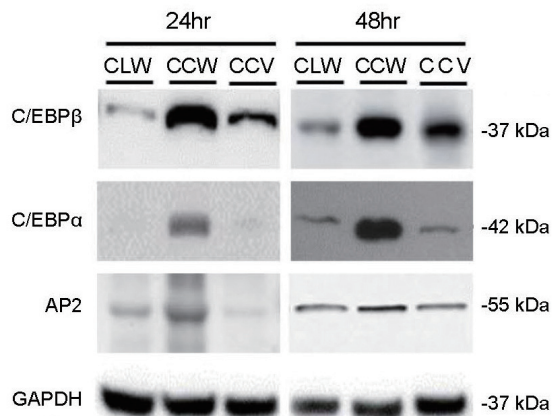


圖 6 樣品加入誘導細胞後，通過西方墨點法測定的脂肪生成標誌物

## 結論與建議

近年來，肥胖人口大幅增加，導致醫療保健負擔增加和預期壽命縮短。因此，具有抗肥胖潛力的天然產品將倍受矚目。虹吸黃質是存在於綠藻中的葉黃素，譬如長松藻，具有抗血管生成和凋亡誘導活性 (Ganesan P. et al., 2010, 2011)。文獻評估富含虹吸黃質的長松藻對飲食誘發的 C57BL/6J 小鼠肥胖的影響，結果證明富含虹吸黃質的長松藻可能有益於預防肥胖和調節脂質代謝 (Li et al., 2018)。另外虹吸黃質亦可有效調節 3T3-L1 細胞和糖尿病 *KK-Ay* 小鼠的脂肪形成 (Li et al., 2015)。

本研究長松藻水萃取物細胞試驗結果亦有降低脂肪生成標誌物效果，與文獻結果相同。本中心目前已分析長松藻硫酸化多醣及其類胡蘿蔔素物質的抗氧化、總酚含量。後續將再進行體內抗肥胖動物試驗，期望能將具有潛力的長松藻活性物質運用於各項保健產品開發。