

庫達海馬萃取物之抗氧化與免疫活性能力

洪郁嵐·黃培安*·高淑雲·吳純衡

行政院農業委員會水產試驗所水產加工組

摘 要

將庫達海馬 (*Hippocampus kuda*) 區分為腹部與其他兩部分，分別以熱水及酒精萃取法處理，評估其抗氧化能力及對免疫細胞活性之影響。抗氧化能力是以四種體外分析法進行，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，結果顯示 40 mg/ml 濃度下，兩種萃取法的腹部萃取物，除螯合亞鐵離子能力不顯著 (均低於 9%) 外，三種抗氧化能力分析法的活性表現，均高於其它部分之萃取物。對免疫細胞活性影響之評估，是以 HB4C5 及 J774.1 二細胞株進行。腹部熱水萃取物 350 $\mu\text{g/ml}$ 濃度，能刺激 HB4C5 細胞增生活性達 155%，IgM 抗體分泌達 140%；此外腹部酒精萃取物在 130 $\mu\text{g/ml}$ 濃度下，亦能刺激細胞增生活性 (142%) 及 IgM 抗體分泌 (130%)。對於 J774.1 細胞活性的影響：腹部熱水萃取物之濃度與細胞增生活性呈現正相關，在 700 $\mu\text{g/ml}$ 濃度下細胞增生活性達 148% 最大值，腹部酒精萃取物在 75~520 $\mu\text{g/ml}$ 濃度範圍間，對細胞增生活性則無顯著差異。

關鍵詞：庫達海馬、抗氧化活性、HB4C5 人類融合瘤細胞株、J774.1 似老鼠巨噬細胞株

前 言

世界衛生組織發表「2002 年至 2005 年世界衛生組織傳統醫學策略」，要求各國政府將傳統醫學發展納入現有醫療政策，並希望藉其策略促進傳統醫藥的安全性、有效性及質量標準研究 (World Health Organization, 2002)，且在 2002 年華盛頓公約組織更通過將所有海馬種類列入第二類保育類動物，進行貿易之監控與管制 (台北野生貿易研究委員會, 2003)。中醫認為海馬具有散結消腫、補腎壯陽、生肌強心、舒筋活絡等療效，所以海馬多被作為中藥材入藥 (蔡, 2003)，但卻鮮有各種相關研究。現今水產中藥單方之功效研究相當少，以及面臨多項藥材被列入保育動物之現況，東亞野生動物貿易研究委員會 (TRAFFIC East Asia) 建議：衛生署中醫藥委員會應積極研究傳統

中藥方劑的有效性，其中海馬被列為首要目標 (台北野生貿易研究委員會, 2007)。

目前在海馬功效的研究中，許等 (1994a) 指出磷脂質具有提高免疫功能、活化神經細胞及促進生殖激素分泌之作用，這些作用可能與中醫所述海馬有散結消腫、補腎壯陽等功效有關，分析 5 種海馬及 3 種海龍中磷脂質為 2.56 ~ 7.82 mg/g。此外亦有文獻指出海馬水萃物具有抑制脂質過氧化作用 (森浦, 1998)，且克氏海馬可抑制小鼠體內 B 型單胺氧化酶 (MAO-B) 之作用，並可減少過氧化脂質含量且可加強小鼠體內超氧歧化酶 (SOD) 的活性，顯示有抗衰老活性 (余和吳, 1988)。海馬酒精萃取物具有鈣離子通道阻斷作用能使血管舒張，推測與中醫論述之壯陽有關 (張等, 1994)。許等 (1994b) 以海馬複方中藥製劑餵食小鼠後，發現能延長小鼠游泳時間由 2.13 min 延長至 4.78 min，同時提昇其耐缺氧能力、血紅蛋白量、紅血球及白血球細胞數量，並可增加肝臟細胞 DNA 及 RNA 含量。在有關免疫及抗腫瘤的文獻中，李和倪 (1999) 指出線紋海馬 (*Hippocampus kelloggi*)

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

萃取物能促進小鼠免疫系統，進而對小鼠 S180 實體腫瘤具有抑制作用；而海馬酒精萃取物亦能抑制乳腺癌和腹腔腫瘤 (張和龔, 1998)。

有鑑於本所已建立庫達海馬 (*H. kuda*) 之繁養殖技術，故可在不破壞生態的前提下，取養殖庫達海馬為材料，以海馬單方中藥配合傳統「水煎」及「酒劑」之萃取方式，進行體外抗氧化活性及免疫細胞株之功能評估，以瞭解海馬之功效性及評估是否具有使用之必要性，進而達到抑止濫捕野生海馬之現況。

材料與方法

一、材料

(一) 養殖庫達海馬

本試驗使用之養殖庫達海馬平均體長為 10.4 ± 2.3 cm、體重為 2.3 ± 0.4 g，係由澎湖海洋生物研究中心提供，海馬經清水洗淨後以 50°C 烘乾至水分為 13% 後備用。

(二) 細胞株

本試驗使用人體融合瘤免疫細胞 HB4C5 (Human-human hybridoma, HB4C5) 及類似老鼠巨噬細胞 J774.1 (Mouse macrophage-like cell, J774.1)，由海洋大學食品科學研究所龔瑞林老師提供。

二、實驗方法

(一) 海馬萃取物之製備

將海馬分作兩部分，自胸鰭至排泄腔之間稱為腹部，其餘則為其他部分。將兩部分以粉碎機粉碎後，分別進行熱水及酒精萃取。

1. 熱水萃取物

取 10 g 海馬粉末加入 100 倍量的去離子水 (v/w)，於 100°C 水浴中加熱 30 mins，冷卻後以 1 號濾紙過濾，將過濾液凍乾成粉末後，取凍乾粉末配製成 40 mg/ml 之溶液，供抗氧化活性及細胞實驗。

2. 酒精萃取物

取 10 g 海馬粉末，加入 100 倍量的 20%

酒精 (v/w)，於室溫下震盪萃取 7 天，而後以 1 號濾紙過濾，將過濾液減壓濃縮至乾後，取乾物配製成 40 mg/ml 之溶液，供抗氧化活性及細胞實驗。

(二) 一般成份分析

參照 A.O.A.C. (1998) 檢驗方法分析，將 50°C 烘乾之庫達海馬進行水分 (Method 952.08)、灰分 (Method 938.08)、粗脂肪 (Method 948.16) 以及粗蛋白 (Method 968.06) 之分析。

(三) 重金屬檢測

參照 A.O.A.C. Method 968.08 及行政院環保署公告檢驗方法 NIEA C304.00B (2001) 分析鋅、銅、鉛、鎳、鎘、鉻及砷等，汞元素則參照 A.O.A.C. Method 971.21 進行分析。秤取樣品約 1~2 g，放入微波消化瓶內，加入 10 ml 濃硝酸 (Nitric Acid)，以漸進式進行微波消化。待樣品冷卻後，開啟消化瓶，加入 2 ml 過氧化氫 (Hydrogen Peroxide) 試劑，再進行消化直至成澄清液為止。待消化冷卻後將消化溶液移至量瓶，以去離子水稀釋至定容體積 25 ml，再利用原子吸收光譜儀分析重金屬的含量。

(四) 總蛋白質含量測定

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。

(五) 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) 比色法。取 1 ml 樣品，加入 1 ml 之 0.1 mM DPPH (溶於 95% 乙醇)，於暗處反應 30 mins 後，以分光光度計於

517 nm 測其吸光值。吸光值愈低表示清除能力愈強。

清除能力 (%) = [(未加樣品之控制組吸光值 - 樣品組吸光值) / 未加樣品之控制組吸光值] × 100%。

以維生素C (L-ascorbic acid) 當做對照組。

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

參照 Yamamoto *et al.* (2003) 以SOD Assay Kit-WST 方法測定。取樣品 0.02 ml, 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) 溶液混合後, 於 37°C 靜置20 mins, 測定 450 nm 之吸光值。

SOD-like 活性 (%) = [(未加樣品之控制組 - 未加樣品之空白組) - (樣品組 - 加樣品之空白組)] / (未加樣品之控制組 - 未加樣品之空白組) × 100%。

以去離子水取代酵素液當做空白組, 維生素C 當做對照組。

3. 還原力測定

參考 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, pH 6.6), 再加入 1 ml 1% 鐵氰化鉀 (Potassium ferricyanide), 於 50 °C 水浴反應 20 mins, 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 蒸餾水及 0.2 ml 0.1% 氯化鐵 (Ferric chloride) 溶液, 混合均勻並於室溫放置 10 mins 後, 測定 700 nm 吸光值。吸光值愈高表示還原力愈強。

還原力 = (樣品組吸光值 - 加樣品之空白組吸光值) - (未加樣品之控制組吸光值 - 未加樣品之空白組吸光值)。

以去離子水當做空白組, 維生素C當做對照組。

4. 螯合亞鐵離子

參考 Boyer and McCleary (1987) 所述的方法加以修改。取 0.25 ml 樣品, 加入 3.7 ml 甲醇及 2 Mm 的氯化亞鐵 (Ferrous chloride) 溶液 0.1 ml, 混合均勻30 secs 後, 再加入0.2 ml 之 5 Mm 菲

洛嗪 (Ferrozine), 反應 10 mins 後, 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。實驗中以 EDTA 作為對照組, 以去離子水做為控制組。

螯合亞鐵離子能力 (%) = [(未加樣品之控制組吸光值 - 樣品組吸光值) / 未加樣品之控制組吸光值] × 100%。

(六) 細胞實驗

1. 動物細胞培養

(1) HB4C5細胞之培養(懸浮型細胞)

將HB4C5細胞以含 5% FBS (Fetal calf serum) 之 eRDF 培養基於 37 °C、5% CO₂ 培養。HB4C5 是一種可產生單株抗體、攻擊人類肺癌細胞的人類融合瘤免疫細胞株 (Ramesh *et al.*, 2002)。

(2) J774.1細胞培養(附著型細胞)

J774.1 細胞以 DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) 及 MEME (Minimum essential medium eagle's) 培養基於 37 °C、5% CO₂ 培養箱。J774.1 是一種類似老鼠巨噬細胞的免疫細胞株 (Masuda *et al.*, 2006)。

2. 細胞活化試驗

參考 Ferrari *et al.* (1990) 之 MTT法。細胞離心收集後, 將細胞調整為 2×10⁵ cell/ml。另將測試樣品以 20 μl/well 量加入 96 well 培養盤中, 並與含細胞之培養液於 37 °C、5% CO₂ 培養 48 hrs 後, 於各 well 分別加入 100 μl YLP (Yolk lipoprotein) MTT 和 (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 等比例之混合物, 置於 37 °C 反應 4 hrs, 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)/不加樣品之控制組吸光值]×100%。其中空白組為不含細胞及不含樣品之培養液。

3. IgM 抗體產量之測定

參考 Shinmoto *et al.* (1982) 所述的方法進行分析。將培養良好之 HB4C5 細胞調整為 5×10⁴ cell/ml。在 96 well 培養盤中, 各 well 加入試樣品以 20 μl 量, 與上述細胞培養液 (100 μl/well) 於 37 °C、5% CO₂ 培養 24 hrs 後, 分別加入 100 μl

Table 1 Proximate composition (%) of *Hippocampus kuda*¹

Moisture	Crude protein	Crude lipid	Ash
13.75 ± 2.56	67.14 ± 0.91	1.39 ± 0.53	17.22 ± 1.08

¹Each value represents the mean ± S.D. of triplicate samples**Table 2** Heavy metal content¹(ppm) of *Hippocampus kuda*

Zn	Cu	Pb	Ni	Cd	Cr	As	Hg
110.04 ± 1.57	1.54 ± 0.02	ND ²	0.75 ± 0.06	0.24 ± 0.03	ND	ND	ND

¹Each value represents the mean ± S.D. of triplicate samples²Not detected.

稀釋 1000 倍之Goat anti-human κ light chain Ab 及 Goat anti-human λ light chain Ab，置於 4 °C 隔夜。以TPBS (含有0.05% Tween 20之磷酸緩衝溶液) 清洗，在各 well 加入 50 μ l 待測液 (前述加入樣品培養 48 hrs後離心之細胞培養上清液) 及稀釋 4000 倍之 Human IgM 加入培養盤內，等倍稀釋後 (以此標準品繪製標準曲線，藉以求出樣品之 IgM濃度)，置於 37 °C 作用1 hr。各 well 分別加入稀釋2500倍之HRPO conjugate goat anti-human IgM 抗體 100 μ l，於 37 °C 放置 1 hr，以TPBS 清洗，再加入 100 μ l ABTS (2,2-Azino-di-[3-ethyl-benethiazolinesulfonate] diammonium salt) 顯色劑，置於 37 °C，反應15 mins 後，分別加入 100 μ l 1.5% 草酸 (oxalic acid) 終止反應，於410 nm 測定吸光值。以不加樣品之控制組IgM抗體產量定為100%，再換算樣品組 IgM 抗體產量百分比。

(七) 統計分析

實驗數據以 SAS (Statistical Analysis System) 套裝GLM (General Linear Model Procedure) 軟體作單項變異數分析 (One-way analysis of variance)，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。

結果與討論

一、一般成分及重金屬含量

取烘乾之庫達海馬進行成分分析。其乾物之

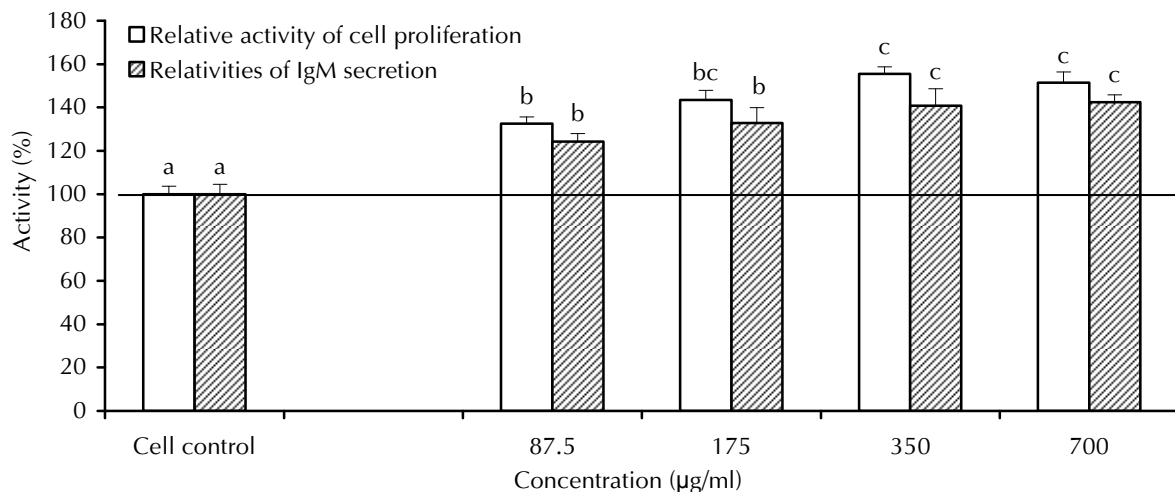
一般成分以粗蛋白含量最高 67.14 ± 0.91%，其次為粗灰分 17.22 ± 1.08%、水分 13.75 ± 2.56%、粗脂肪1.39 ± 0.53%、碳水化合物含量則在1% 以下 (Table 1)，可知蛋白質為其主成分，與張等 (1997) 採用微量凱氏定氮法測定 5 種海馬蛋白質含量為 67.92 ~ 73.56% 之結果相近。在庫達海馬重金屬含量則以鋅含量 110.04 ± 1.57 ppm 為最高；依序為銅 1.54 ± 0.02 ppm、鎳 0.75 ± 0.06 ppm、鎘 0.24 ± 0.03 ppm，其他重金屬含量均在檢測極限以下，顯示養殖庫達海馬無受污染之虞 (Table 2)。賈與姚 (1990) 研究庫達海馬的12 種微量元素，其中以鈣、鎂、鉀、鈉、鐵為主，尚含有較多的銅、錳、鋅。Bagchi *et al.* (1997) 指出鋅具有安定細胞內抗氧化物質超氧歧化酶結構的功能，可保護細胞組織免受超氧根離子的破壞。在免疫細胞方面，鋅缺乏會使抗原呈現細胞誘導T細胞的能力下降，且T細胞增生能力及分泌細胞激素的量也減少 (Shi *et al.*, 1998)。此外巨噬細胞進行吞噬作用時會產生超氧根離子，而鋅可維持巨噬細胞中超氧歧化酶的完整性 (Bagchi *et al.*, 1998)，因此鋅在細胞生長及免疫功能上扮演重要的角色。所以本研究進一步探討海馬萃取物之抗氧化活性及對免疫細胞株功能之影響。

二、熱水與酒精萃取物之抗氧化活性分析

海馬在傳統中醫藥多以研末、酒劑或水煎方式服用。本實驗為貼近傳統中藥之萃取方式，故將「水煎」以熱水萃取表示，「酒劑」以酒精萃取表示。分析庫達海馬腹部及其他部分之熱水及酒精萃取物的可溶性蛋白含量，結果得知：在熱

Table 3 DPPH free radicals scavenging, SOD-like, Fe²⁺ chelating and reducing power of *Hippocampus kuda*

	DPPH free radicals scavenging (%)	SOD-like (%)	reducing power	Fe ²⁺ chelating (%)
Hot-water belly extract (40 mg/ml)	70.59±0.52	62.85±0.14	1.91±0.05	7.67±0.41
Hot-water extract from other portion (40 mg/ml)	53.04±0.36	48.22±0.12	1.42±0.07	4.89±0.53
Ethanol belly extract (40 mg/ml)	70.15±0.48	94.73±0.21	1.98±0.12	8.35±0.05
Ethanol extract from other portion (40 mg/ml)	58.49±0.34	72.19±0.17	0.87±0.04	6.44±0.27
Vit C (0.2 mg/ml)	94.51±0.07	99.59±0.01	2.87±0.19	–
EDTA (0.2 mg/ml)	–	–	–	91.56±0.16

**Fig. 1** Proliferation and IgM secretion assay of the hot-water extract of *Hippocampus kuda* belly on HB4C5 cell (n=3). Mean with different alphabetic letters is significantly different from control ($p < 0.05$).

水萃取物部分，腹部及其他部分萃取物之可溶性蛋白量分別為3.69 mg/ml 及 2.36 mg/ml。而在20% 酒精萃取物部分，則分別為3.17 mg/ml 及 0.74 mg/ml，顯示在熱水及酒精萃取方面，皆以腹部萃取物之可溶性蛋白含量較其他部分含量高。

取經凍乾與減壓濃縮之海馬萃取物粉末配為濃度40 mg/ml 之液體，進行 4 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。庫達海馬腹部熱水萃取物在清除 DPPH 自由基能力、SOD-like 活性及還原力方面分別為70.59 ± 0.52%、62.85 ± 0.14% 及 1.91 ± 0.05；腹部酒精萃取物則為 70.15 ±

0.48%、94.73 ± 0.21% 及 1.98±0.12。其他部分萃取物之抗氧化能力表現上，普遍較腹部萃取物低，但在螯合亞鐵離子的效果上皆不顯著，均在 9% 以下 (Table 3)。在抗氧化能力的研究上，DPPH 自由基經常用來檢測抗氧化劑提供氫原子的能力，而還原力常用來檢測樣品能否做為良好電子供應者(Brand-Williams *et al.*, 1995)。因此推測海馬萃取物在抗氧化活性的表現可能與其能提供氫原子與電子的能力有關，不在於捕捉金屬離子。但由結果顯示，海馬萃取物需要在較高的濃度下才具有抗氧化能力。

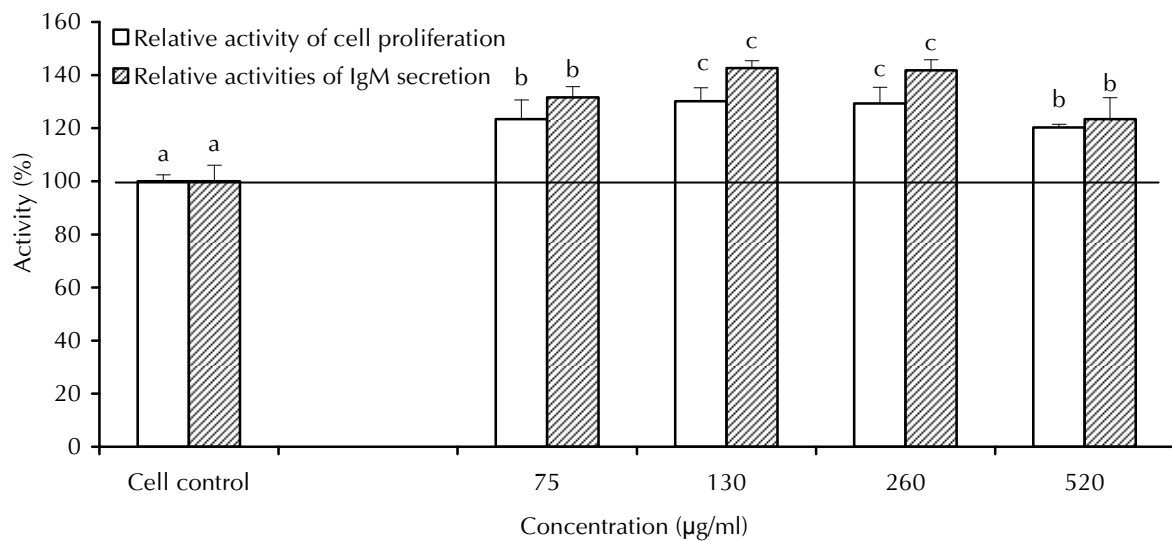


Fig. 2 Proliferation and IgM secretion assay of the ethanol extract of *Hippocampus kuda* belly on HB4C5 cell (n=3). Mean with different alphabetic letters is significantly different from control ($p < 0.05$).

三、熱水與酒精萃取物之體外細胞試驗

免疫力是指生物對入侵物或異己物質，產生辨識所引發一連串的防禦機轉，人體的免疫機能會因各種條件不同而受影響，例如營養不良或是壓力等，因此如何調節生物體的免疫能力是很重要的。一般認為海馬具有抗衰老、抗疲勞之功效，學者推測抗疲勞的可能機制與降低壓力刺激之副作用及增強免疫力有關 (Yu *et al.*, 2002)。故本研究以免疫細胞株作為評估海馬是否具有調節免疫或抗疲勞功效之前期評估。

將庫達海馬腹部與其他部分之熱水及酒精萃取物調整適當濃度後，添加於 HB4C5 免疫細胞中共同培養，結果顯示隨著萃取物濃度增加，對 HB4C5 的增生活性也較高，有劑量依存現象。腹部熱水萃取物在 350 µg/ml 濃度下刺激細胞增生活性為 155%，刺激 IgM 抗體分泌達 140% (Fig. 1)。另在酒精萃取物方面，在 130 µg/ml 濃度下，其細胞增生活性及 IgM 抗體分泌則分別為 142% 及 130% (Fig. 2)。因此初步顯示庫達海馬萃取物在細胞實驗中，除可增加先天性的細胞免疫活性，且具有促進抗體分泌之功能。而在其他部分的細胞增生能力與 IgM 抗體分泌則與控制組無差異 (data not shown)。

另取庫達海馬腹部熱水及酒精萃取物分別添加入 J774.1 巨噬細胞共同培養，結果顯示熱水萃

取物於 350 µg/ml 提升 J774.1 細胞增生活性為 143% (Fig. 3)，而酒精萃取物於 75 µg/ml 提升 J774.1 細胞增生活性為 129% (Fig. 4)，但在吞噬能力則與控制組無差異。因此推測海馬提高免疫細胞作用之機制是以促進免疫細胞增生為主。而酒精萃取物在低濃度即可使細胞具有增生效果，可能為乙醇有親水性 -OH 基團，所以易與生物體中有機化合物的大部份 O 與 N 原子形成氫鍵，且乙醇會提高細胞膜的通透性，使吸收量增加，進而提高對萃取物之利用率和促進機體代謝 (黃等, 1997)。陳等 (1995) 比較海馬水萃取物和酒精萃取物增強免疫功能之能力，結果顯示，水萃取物之增強免疫作用較酒精萃取物強。賈與姚 (1990) 的研究中指出，海馬中含有較多的鋅、銅、錳與精胺酸。本研究發現，海馬熱水萃取物能夠增加 J774.1 細胞株之增生活性，可能是因為熱水萃取物中含有大量的精胺酸，可以經由精胺酸酶途徑，產生多胺，而進一步促進免疫細胞的增生。而鋅經許多研究也證實能夠增強免疫功能，而在缺乏鋅的情況下，也會使 IgM 濃度有下降的現象，所以在本研究中，也發現熱水萃取物能夠使 HB4C5 分泌 IgM 增加，因此推測海馬熱水萃取物能夠增強免疫作用的活性物質可能為精胺酸與鋅。

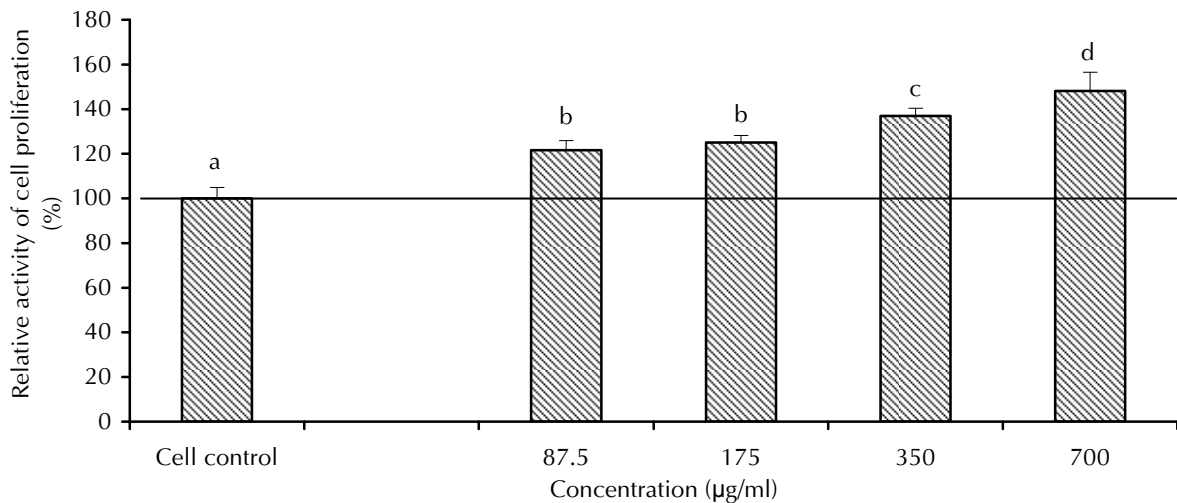


Fig. 3 Proliferation assay of the water extract of *Hippocampus kuda* belly on J774.1 cell (n=3). Mean with different alphabetic letters is significantly different from control ($p < 0.05$).

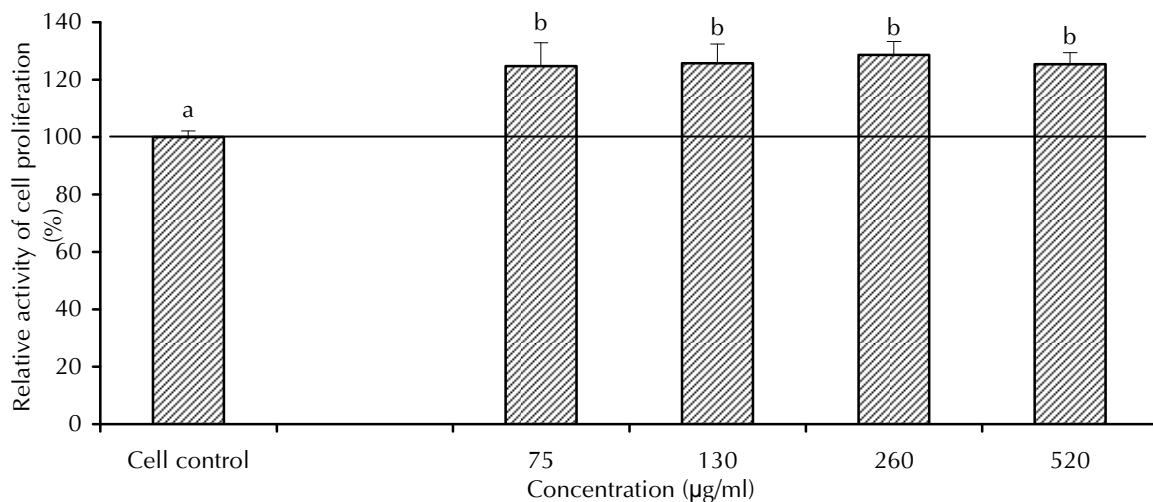


Fig. 4 Proliferation assay of the ethanol extract of *Hippocampus kuda* belly on J774.1 cell (n=3). Mean with different alphabetic letters is significantly different from control ($p < 0.05$).

結 論

由體外試驗評估養殖庫達海馬之抗氧化活性及免疫細胞株試驗，結果顯示養殖庫達海馬具有促進 HB4C5 免疫細胞株增生及抗體分泌之作用。但許多在體外試驗有效之生物活性成分，往往會因生體可利用率低、半衰期短、治療指數低，而在體內試驗中呈現效果不佳或無作用的結果。因此，若要確立海馬對動物體是否具有抗氧化性及增強免疫力之功能，仍需再更進一步以動物試驗證明其功效性。

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

- 台北野生物貿易研究委員會 (2003) 華盛頓公約 (CITES) 第12屆締約國大會 (CoP 12) 特別報導, 18.
- 台北野生物貿易研究委員會 (2007) 中藥方劑資料庫介

- 紹. 東亞野生動物貿易研究委員會(<http://www.wow.org.tw/layout.php?type=page&id=166>).
- 行政院環境保護署環境檢驗所 (2001) 魚介類中鎘、鉻、銅、鎳、鉛及鋅含量檢測方法—電熱式原子吸收光譜法, 90年10月9日環署檢字第 63429 號公告.
- 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.
- 余敏, 吳蘭如 (1988) 海洋生物的抗衰老作用研究簡報. 現代應用醫學, 5: 9.
- 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 pp.
- 張朝輝, 徐國鈞, 王強 (1994) 五種海馬提萃物對 L-Glutamate 致大鼠神經元細胞鈣內流的拮抗作用. 中國海洋藥物, 54: 6.
- 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.
- 許益民, 陳建傳, 郭戊 (1994a) 海馬和海龍中磷脂成分與脂肪酸的分析研究. 中國海洋藥物雜誌, 49: 14-17.
- 許實波, 彭汶鋒, 林鏗 (1994b) 金海馬養生液的營養成分和保健功效. 中山大學學雜誌, 6: 201-205.
- 陳維寧, 許蘭芝, 高爾 (1995) 海馬提取物的藥理實驗研究. 灘坊醫學院學報, 17: 105.
- 森浦俊次 (1998) 動物性生藥及食品的抗疲勞作用. Nat. Med., 52: 195.
- 黃炳權, 艾長榮, 麥其福 (1997) 複方海馬藥酒的研製及其保健價值. 中國海洋藥物, 64: 44-49.
- 賈元印, 姚乾元 (1990) 海咀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.
- 蔡萬生 (2003) 庫達海馬人工養殖之研究. 國立台灣海洋大學環境生物與漁業科學系碩士論文.
- A.O.A.C. (1998) Official Methods of Analysis, (16th edition). Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD.
- Bagchi, D., M. Bagchi, and S. J. Stohs (1997) Comparative *in vitro* oxygen and radical scavenging ability of zinc methionine and selected zinc salts and antioxidants. Gen. Pharmacol., 28: 85-91.
- Bagchi, D., P. J. Vuchetich, M. Bagchi, M. X. Tran, R. L. Krohn, S. D. Ray and S. J. Stohs (1998) Protective effects of zinc salts on TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation, glutathione depletion, DNA damage and peritoneal macrophage activation in mice. Gen. Pharmacol., 30: 43-50.
- 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.
- Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier and C. Berest (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel Wissenschaft und Tech., 28: 25-30.
- 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.
- 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, Y., N. Kodama and H. Nanba (2006) Macrophage J774.1 cell is activated by MZ-Fraction (Klasma-MZ) polysaccharide in *Grifola frondosa*. Mycoscience, 47: 360-366.
- 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.
- Ramesh, H. P., K. Yamaki and T. Tsushida (2002) Effect of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) galactomannan fractions on phagocytosis in rat macrophages and on proliferation and IgM secretion in HB4C5 cells. Carbohydr. Polym., 50: 79-83.
- Shi, H. N., M. E. Scott, M. M. Stevenson and K. G. Koski (1998) Energy restriction and deficiency impair the functions of murine T Cells and Antigen-Presenting Cells during Gastrointestinal Nematode infection. J. Nutr., 128: 20-27.
- 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.
- Shinmoto, H., H. Murakami, S. Dosako, K. Shinohara and H. Omura (1986) Human-human hybridomas secreting IgM-like immunoglobulin with α and μ heavy chains. Agric. Biol. Chem., 50: 2217-2223.
- World Health Organization (2002) WHO Traditional Medicine Strategy 2002-2005. Geneva Switzerland.
- 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.
- Yu, K. W., J. M. Kim, S. H. Oh, U. J. Chang and H. J. Suh (2002) Physiological effects of yeast hydrolysate SCP-20. Food Res. Intern., 35: 879-884.

Antioxidative and Immune Activities of *Hippocampus kuda* Extract

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

Seafood Technology Division, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

Spotted seahorses, *Hippocampus kuda*, were separated into two portions: belly and rest body portion. Antioxidative activity of hot-water and ethanol extract of *Hippocampus kuda* seahorse was evaluated using four different methods, including DPPH free radicals scavenging activity, SOD-like activity, reducing power and Fe^{+2} chelating activity, and immune activity was assessed by using HB4C5 and J774.1 cells. It was found that the antioxidative activities of belly extract were higher than the extract from the rest body portion, but the Fe^{+2} chelating activities were all lower than 9%. The HB4C5 cells showed the maximum relative activities of cell proliferation (155%) and IgM secretion (140%) at 350 $\mu\text{g/ml}$ of hot-water belly extract. The ethanol belly extract at 130 $\mu\text{g/ml}$ under could stimulate cell proliferation (142%) and IgM secretion (130%). At 700 $\mu\text{g/ml}$, the extract showed the maximum relative activities of cell proliferation (148%) of J774.1 cells.

Key words: *Hippocampus kuda*, Antioxidative activity, HB4C5 human-human hybridomas cell line, J774.1 murine macrophage-like cell line

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