

# 香椿對雄性老化促進小鼠精子品質之影響

王銘富<sup>1</sup> 徐雯敏<sup>1</sup> 許勝光<sup>2</sup> 廖俊旺<sup>3</sup> 詹吟菁<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 靜宜大學食品營養學系

<sup>2</sup> 高雄醫學大學生理學科

<sup>3</sup> 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

(接受刊載日期: 中華民國九十三年十月二十七日)

本研究目的在探討香椿萃取物對雄性老化促進小鼠精子品質之影響。試驗以三月齡雄性老化促進小鼠 (senescence accelerated mice; SAMP8) 為對象, 將其分為對照組、1%香椿葉、1%香椿根皮及 1%香椿樹皮組, 餵食 12 週。試驗期間採自由攝食及飲水的方式, 記錄其體重、攝食量, 動物犧牲後稱其臟器重量並觀察精子活動力、濃度及畸形率。結果顯示在體重、攝食量及臟器重量四組間並無顯著差異; 在睪丸及副睪相對重量方面, 四組間亦無顯著差異。添加不同部位的香椿萃取物組, 與對照組比均有較佳的精子活動力及濃度 ( $p < 0.05$ ), 但香椿萃取物三組間則無顯著差異。另香椿萃取物組之精子畸形率與控制組比並無顯著不同。綜合以上結果顯示, 香椿萃取物可增進小鼠精子活動率及濃度。

關鍵字: 香椿, 老化促進小鼠, 精子活動力, 精子濃度。

## Effects of *Toona sinensis* Roemor Extracts on the Sperm Quality in Male Senescence Accelerated Mice

Ming-Fu Wang<sup>1</sup>, Wen-Min Hsu<sup>1</sup>, Hseng-Kuang Hsu<sup>2</sup>, Jiunn-Wang Liao<sup>3</sup> and Yin-Ching Chan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Food and Nutrition, Providence University, Taichung, Taiwan

<sup>2</sup> Department of Physiology school of Technology for Medical Sciences and Department of Internal Medicine Kaohsiung Medical University, Kaohsiung, Taiwan

<sup>3</sup> Division of Applied Toxicology, Taiwan Agricultural Chemical and Toxic Substances Research Institute, Taichung, Taiwan

(Accepted for publication: October 27, 2004)

The objective of this study was to investigate the effects of *Toona sinensis* Roem. extracts on the quality of spermatozoa in senescence accelerated mice prone-8 (SAMP8). Three-month-old male SAMP8 mice were divided into control group and three experimental groups supplemented with 1% *Toona sinensis* Roem. leave extracts (TS-L), 1% *Toona sinensis* Roem. root extracts (TS-R) or 1% *Toona sinensis* Roem. bark extracts (TS-B) for 12 weeks. Body weight, food intake and organ weights were measured, and the motility, concentration, abnormality of spermatozoa were also evaluated after sacrificed. The results showed that the body weight, food intake and organ weights of TS diet groups were not significantly different with the ones of control diet group, and the relative weights of the testes and epididymis did not differ among four groups. The spermatozoa of TS diet groups had significantly better motility and higher concentration than the ones of control group ( $p < 0.05$ ), whereas they did not differ among the three TS-treated groups. The spermatozoa abnormality of TS diet groups did not differ from the control group. In summary, the supplement of *Toona sinensis* Roem. extracts might promote the sperm motility and concentration of mice.

Key words: *Toona sinensis* Roemor, Senescence accelerated mice, Sperm motility, Sperm concentration.

### 前 言

健康男性的精液品質, 包括精液含量、精

子濃度及活動力和形態正常精子的比例, 在過去的數十年來有逐漸惡化的現象<sup>(1)</sup>。已知生活習慣、環境、生理狀態及基因皆會影響精子功

\* Corresponding author. E-mail: ycchan@pu.edu.tw

能而可能導致男性的不孕<sup>(2,3)</sup>；另外，長時間處於過度氧化之環境會導致精子生成過多的反應性氧化物(reactive oxygen species; ROS)，因此，精子受到過度氧化傷害亦可能是造成男性不孕症的原因之一<sup>(4,6)</sup>。精子的細胞膜上富含多元不飽和脂肪酸，易受 ROS 攻擊使得脂質過氧化，產生過多的脂質氧化產物-丙二醛(malondialdehyde; MDA)，及染色體氧化使其 DNA 受損，致使精子活動力衰退<sup>(7)</sup>，ATP 生成下降及粒線體膜電位降低<sup>(8)</sup>，造成精子與卵結合能力下降<sup>(9)</sup>。Fraga 等人<sup>(10)</sup>指出，維生素 C 能有效保護精子 DNA 之受損，當飲食中維生素 C 攝取量由 250 mg/day 降至 5 mg/day 時，精液中維生素 C 含量會下降約 50%，DNA 中的氧化產物指標 8-羥基去氧鳥糞嘌呤核苷酸(8-hydroxydeoxyguanosine; 8-OHdG)之濃度則相對增加 91%；反之，若是連續 28 天飲食中維生素 C 攝取量從 5 mg/day 增加至 60 mg/day 時，可減少 36% 之 8-OHdG 濃度。Fraga 等人並且推測乃因維生素 C 具有之抗氧化能力，進而減少 ROS 傷害精子細胞，顯示抗氧化劑有助於提升精子功能<sup>(10)</sup>。

香椿(*Toona sinensis* Roemor; TS)為楝科(Meliaceae)，多年生落葉大喬木，原產中國大陸。香椿各部位均有其保健或治療之功能，如香椿葉有香氣無味，主治女子血崩，小兒疳痢；根皮可收斂、止痛及滑精；樹皮可澀腸止血，去燥熱，為經濟價值極高之植物<sup>(11-13)</sup>。研究顯示香椿葉 50%酒精萃取物會增加 3T3-L1 脂肪細胞對葡萄糖的攝取量<sup>(14)</sup>及促進 3T3-L1 脂肪細胞的脂肪分解作用<sup>(15)</sup>。Chang 等人<sup>(16)</sup>發現香椿葉水萃取液對人類肺癌細胞株(A549)具有抑制癌細胞生長，並有促進癌細胞凋亡(apoptosis)的效果。王<sup>(17)</sup>發現香椿水萃取液可增加脂肪組織細胞膜上之 glucose transporter 4 (GLUT4)蛋白質及其 mRNA 表現量，增加其葡萄糖耐受性，降低由 alloxan 所誘發糖尿病鼠的血糖。Park 等人<sup>(18)</sup>發現香椿葉可用以治療腸炎、皮癬。此外，香椿亦具有良好的清除及抑制超氧陰離子的能力，並可抑制脂質過氧化的作用<sup>(19)</sup>。Hsu 等人<sup>(20)</sup>研究顯示，香椿葉萃取物可減少老化促進小鼠腦部脂質过氧化物的堆積及降低脂褐質與  $\beta$ -類澱粉蛋白之比例，推測可能與香椿具抗氧化能力有關。楊<sup>(21)</sup>利用體外試驗方式，發現香椿葉分層萃取液(5-4R)可顯著降低人類精子胞內 ROS 含量，保護染色體結構之完整性，並可使精子活動速度回升，而改善精子的活動力，但在活體試驗則尚無相關研究報告。

賈<sup>(22)</sup>曾針對香椿葉的加以分析，結果發現其有效成分含有大量的酚類化合物，包括沒食子酸(gallic acid)、槲黃素(queracetin)、兒茶素(+)-catechin 及(-)-epicatechin、類黃酮(flavonoids)和芸香素(rutin)；Patel 等人<sup>(23)</sup>指出樹皮含川棟素(toosendanin)及兒茶酚(catechol)，但關於香椿根皮其所含的抗氧化物種類則尚無相關研究。我們曾利用體外 DPPH 試驗測試比較香椿不同部位的抗氧化力，發現香椿葉、根皮及樹皮萃取物清除 DPPH 自由基之效力，其 IC<sub>50</sub>分別為  $2.09 \times 10^{-1}$  mg/mL、 $2.85 \times 10^{-1}$  mg/mL 及  $2.77 \times 10^{-1}$  mg/mL，三種萃取物均於 0.625 mg/mL 達到平衡，且其清除效力均達 80% 以上，推斷香椿三部位之萃取物均具有良好的清除活性氧物質能力。由於目前為止多數研究大多只針對香椿葉各種生理機能加以探討，因此，本研究除了香椿葉外，亦進一步探討香椿的其餘部分是否亦具有良好的生理功能。

SAMP8 (senescence accelerated mice prone-8)小鼠係由日本京都大學所研發出來之老化促進品系之老鼠，早期即停止體重增加、毛髮脫落及體內器官類澱粉蛋白沉積增加<sup>(24)</sup>，為一適合老化相關研究之動物試驗模式。本研究利用此老化動物模式，於飲食中添加香椿葉、根皮或樹皮之萃取物，觀察長期餵食後對 SAMP8 小鼠精子活動力、濃度及畸形率之影響。

## 材料與方法

### 一、試驗動物

老化促進小白鼠 SAMP8 品系為促進老化品 P 系中之一分支，此品系小白鼠是由日本京都大學結核胸部疾患研究所(The Department of Pathology, Chest Disease Research Institute, Kyoto University)所研究開發之動物試驗模型，基於共同研究之關係，提供本研究室繁殖飼育。本試驗以三個月齡雄性 SAMP8 小鼠為試驗對象，飼養在 30(W) × 20(D) × 10(H) cm 之透明飼育盒中，動物室之溫度維持在  $25 \pm 2$  °C、相對濕度在  $65 \pm 5\%$ ，為一無塵自動控制室。並以自動定時器控制光照週期 12 小時明暗，07:00-19:00 屬於光照期，19:00-07:00 屬於黑暗期。

### 二、飼料配置

試驗以不添加香椿萃取物之 blank 為對照組，另外以分別添加 1% 的香椿葉、香椿根皮或

香椿樹皮萃取物為試驗組。飼料組成如表一所示，成分包含 20% casein、1% vitamin mixture (AIN-93G vitamin mixture)、5% mineral mixture (AIN-93G mineral mixture)、2% cellulose powder、5% corn oil 及 0.25% choline，試驗組添加 1% 之香椿萃取物，其餘部分為玉米澱粉及蔗糖以 2:1 之比例組合。

### 三、香椿之萃取

將 1 kg 香椿嫩葉 (*Toona sinensis* Roemor leave; TSL) 加水 4 L 煮沸 30 分鐘，1 kg 香椿根皮 (*Toona sinensis* Roemor root; TSR) 或 1 kg 香椿樹皮 (*Toona sinensis* Roemor bark; TSB) 則加水 4 L 煮沸四小時後，取出香椿各部位，以 70 mesh 濾網過濾，分別將不同部位之萃取液以冷凍乾燥法得到粉狀(固體狀)物。經由上計算得知，香椿葉、根皮及樹皮萃取產率分別為 6、9 及 10%。

### 四、試驗流程

本試驗使用 40 隻離乳後雄性 SAMP8 品系小白鼠，以固形飼料飼養至三月齡後，採隨機方式分為對照組、1%香椿葉、1%香椿根皮及 1%香椿樹皮組，每組 10 隻小鼠，餵食不同試驗飼料 12 週。試驗期間採自由攝食及飲水的方式，

每週記錄各組小白鼠體重變化及攝食量。試驗結束後將動物犧牲，稱其臟器重量並觀察精子活動力、濃度及畸形率。

#### 1. 精子活動力之評估

(a) 精蟲培養液製備：取 600 mL 蒸餾水，加入 61.68 g 蔗糖 (Sigma Co., MO, USA) 混合均勻，之後加入 60  $\mu$ L HEPES buffer (Sigma Co., MO, USA)，放入磁石加熱至 37  $^{\circ}$ C，並調整 pH 至 7.4。

(b) 試驗流程：取右側副睪尾端 (cauda epididymis)，置放於 3.5 cm Petri-dish (NUNC, Roskilde, Denmark) 內，以剪刀尖端剪開副睪，擠壓出精蟲，之後加入預熱至 37  $^{\circ}$ C 4 mL 之精蟲培養液加以混合，並將其放入 37  $^{\circ}$ C 水浴中培養 20 分鐘，讓精蟲游動散開均勻後，取一滴含精蟲培養液滴於凹槽玻片並蓋上蓋玻片，於一般光學顯微鏡暗視野下觀察其活動力 (motility)。每一玻片檢體需觀察 200-300 隻精蟲，活動力之計算即以培養 20 分鐘後具有運動力精蟲數佔全部計算精蟲總數之比率 (%) <sup>(22)</sup>。

#### 2. 精子濃度之評估

取 1 mL 精蟲培養液置入 60  $^{\circ}$ C 水浴槽三至五分鐘，經過熱處理後之精蟲不具運動力，從中取一滴精蟲培養液置入精蟲計數盤內，計數精蟲總數 <sup>(25)</sup>。

表一 試驗飼料組成

Table 1. Composition of the experimental diets

Ingredient (g/kg diet)	Group			
	A <sup>5</sup>	B	C	D
Casein <sup>1</sup>	200.0	200.0	200.0	200.0
$\alpha$ -Starch <sup>2</sup>	445.0	438.3	438.3	438.3
Sucrose <sup>2</sup>	222.5	219.2	219.2	219.2
Vitamin mixture <sup>3,4</sup>	10.0	10.0	10.0	10.0
Mineral mixture <sup>3,4</sup>	50.0	50.0	50.0	50.0
Cellulose	20.0	20.0	20.0	20.0
Corn oil	50.0	50.0	50.0	50.0
Choline	2.5	2.5	2.5	2.5
<i>Toona sinensis</i> Roemor extracts	0.0	10.0	10.0	10.0

1 Casein (92% crude protein) was purchased from Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan.

2  $\alpha$ -starch:sucrose, 2 : 1 ratio.

3 Compositions of AIN-93G vitamin and mineral mixtures are given in *J. Nutr.* (1997) 127: 838S-841S <sup>(51)</sup>.

4 ICN Pharmaceuticals Inc., Costa Mesa, CA, Japan.

5 A = blank.

B = 1% *Toona sinensis* Roemor leave extract.

C = 1% *Toona sinensis* Roemor root extract.

D = 1% *Toona sinensis* Roemor bark extract.

### 3. 精子畸形率

取一滴精蟲培養液滴於玻片上並蓋上蓋玻片，於一般光學顯微鏡暗視野下觀察精蟲形態。精蟲形態之評估標準乃依據 Wyrobek 和 Bruce 方法<sup>(26)</sup>，由小鼠精蟲尖體(acrosome)、頭部(head)、軸絲(axoneme)及尾部(tail)形態判定是否正常，每隻小鼠觀察 1,000 隻精蟲及計算精蟲畸形率(%)。

## 五、統計分析

試驗結果數值以平均值 ± 平均標準誤差(mean ± S.E.M.)表示。體重、攝食量、組織器官重量、精子活動力、濃度及畸形率是利用單因子變異數分析(one-way analysis of variance; one-way ANOVA)，以檢定多組之間之差異。當有差異時再進一步以 Duncan's multiple test 比較任二組間是否有差異， $p < 0.05$  表示具有顯著性差異。

## 結果與討論

### 一、香椿對食物攝食量、體重及器官重量之影響

表二為三月齡雄性 SAMP8 小鼠經長期餵食 Blank (對照組)或添加 1%香椿葉、香椿根皮或香椿樹皮(試驗組)飲食 12 週後，各組間體重及攝食量之變化。由表二可知餵食 1%香椿各部位萃取物之試驗組與對照組間，試驗前後之體重及每日平均攝食量皆無顯著差異。此結果顯示香椿各部位萃取物的添加並不會對其生長及攝食量有任何不良的影響。另外，四組小白鼠

表二 三月齡雄性 SAMP8 小鼠餵食不同飼料 12 週體重及攝食量變化<sup>1</sup>

Table 2. Body weight changes and food intakes of three months old male SAMP8 mice fed with different diets for 12 weeks<sup>1</sup>

Group	N	Body weight		Food intake (g/day)
		Initial (g)	Final (g)	
A <sup>3</sup>	10	28.8 ± 0.7 <sup>a2</sup>	33.8 ± 0.8 <sup>b</sup>	5.4 ± 0.2
B	10	28.1 ± 0.5 <sup>a</sup>	33.4 ± 0.6 <sup>b</sup>	5.3 ± 0.2
C	10	28.0 ± 0.6 <sup>a</sup>	34.3 ± 0.8 <sup>b</sup>	5.6 ± 0.3
D	10	27.9 ± 1.1 <sup>a</sup>	34.6 ± 0.9 <sup>b</sup>	5.3 ± 0.2

1 Values were mean ± S.E.M. and analyzed by one-way ANOVA.

2 Data with different superscripts are significantly different at  $p < 0.05$ .

3 A = blank.

B = 1% *Toona sinensis* Roemor leaf extract.

C = 1% *Toona sinensis* Roemor root extract.

D = 1% *Toona sinensis* Roemor bark extract.

之末體重皆顯著較初體重大，推測其原因可能為四組小鼠皆由三月齡起飼養、六月齡時犧牲，歷經三個月的長期飼養，而犧牲時小鼠仍處於中壯年的狀況，因此，體重有上升之趨勢。Nishitama 等人<sup>(27)</sup>也發現 SAMP8 小鼠的攝食量在二至八月齡呈現逐漸上升的情形。表三則為三月齡雄性 SAMP8 小鼠餵食不同部位香椿萃取物 12 週後，其器官重量之變化情形。由結果可知，餵食香椿各部位萃取物之試驗組在腦、心臟、肺臟、肝臟、脾臟、腎臟、睪丸及副睪方面與對照組間均無顯著差異。曾等人<sup>(25)</sup>以 ICR 小鼠腹腔注射毒性物質醋酸鉛 25 及 50 mg/kg bw 後，發現睪丸及副睪之相對重量顯著增加。而本試驗結果發現，睪丸及副睪相對重量於四組

表三 三月齡雄性 SAMP8 小鼠餵食不同飼料 12 週之器官重量<sup>1</sup>

Table 3. Organ weights of three months old male SAMP8 mice fed with different diets for 12 weeks<sup>1</sup>

Group	N	Relative organ weights (g/100 g body weight)							
		Brain	Heart	Lung	Liver	Spleen	Kidney	Testis	Epididymis
A <sup>2</sup>	10	1.39 ± 0.04	0.53 ± 0.01	0.70 ± 0.03	4.26 ± 0.23	0.31 ± 0.02	1.40 ± 0.06	0.26 ± 0.01	0.05 ± 0.00
B	10	1.42 ± 0.03	0.53 ± 0.03	0.71 ± 0.03	4.38 ± 0.31	0.34 ± 0.02	1.32 ± 0.05	0.26 ± 0.01	0.05 ± 0.00
C	10	1.39 ± 0.03	0.53 ± 0.02	0.67 ± 0.03	4.05 ± 0.16	0.33 ± 0.02	1.30 ± 0.04	0.25 ± 0.01	0.05 ± 0.00
D	10	1.37 ± 0.04	0.52 ± 0.02	0.63 ± 0.03	3.96 ± 0.67	0.34 ± 0.02	1.31 ± 0.07	0.24 ± 0.01	0.05 ± 0.00

1 Values were mean ± S.E.M. and analyzed by one-way ANOVA.

2 A = blank.

B = 1% *Toona sinensis* Roemor leaf extract.

C = 1% *Toona sinensis* Roemor root extract.

D = 1% *Toona sinensis* Roemor bark extract.

問並無顯著差異，因此，推測香椿萃取物對於 SAMP8 小鼠之精子功能並未造成影響。

## 二、香椿對精子活動力之影響

表四為三月齡雄性 SAMP8 小鼠餵食不同部位香椿萃取物 12 週後對精子活動力之影響。結果發現，餵食 1% 香椿各部位萃取物組之精子活動力均較對照組高 ( $p < 0.05$ )，但餵食香椿萃取物各組之間並無顯著差異。已知 ROS 會誘導精子功能損傷，包括精蟲頂體膜脂質過氧化而失去膜完整性，粒線體基質與膜氧化而使 ATP 生成量降低<sup>(28-30)</sup>，染色體氧化而使 DNA 單股或雙股螺旋斷裂或去濃縮<sup>(31)</sup>，因而導致精子活動力下降<sup>(32-34)</sup>，以及精子受精過程中，訊息傳導路徑障礙導致精卵結合能力下降<sup>(35)</sup>。由上可知，精子胞內 ROS 過高會誘發精子粒線體膜電位 (mitochondrial membrane potential; MMP) 下降，導致精子活動能力降低。查<sup>(36)</sup> 研究發現，隨著  $H_2O_2$  暴露濃度的增加，大鼠精子染色體 DNA 異常的百分比呈現增加的趨勢，證實  $H_2O_2$  的暴露會對大鼠精子染色體 DNA 造成損害，且此損害呈現劑量關係。在人類精子預先外加抗氧化劑維生素 C 後，則能減少因  $H_2O_2$  暴露所誘導的精子 DNA 損傷<sup>(36)</sup>；補充維生素 E 具有延緩衰老及避免性功能衰退的作用，且對精子的生成及提高精子的活動力均具有良好的效果，而維生素 C 對性功能之維護也有積極之作用<sup>(37)</sup>。以體外外加 catalase 或 glutathione peroxidase/reductase 處理過之精子，可提高人工生殖技術的成功率<sup>(38)</sup>。因此，適量給予抗氧化劑或許有助於提升精子功能。

近年來許多中草藥及天然植物萃取液對男性生殖功能之研究愈來愈受到重視。山茱萸 (*Cornus officinalis*) 為中國藥草之一，以水萃取所得之萃取液  $0.5 \text{ mg/mL}$  處理人類精子，可使精子活動力從  $25.8 \pm 7.7\%$  增加至  $42.8 \pm 10.3\%$ <sup>(39)</sup>。 $10 \text{ mg/mL}$  之北黃耆 (*Astragalus membranaceus*) 水萃取液可刺激精子活動力提升 1.4 倍<sup>(40)</sup>。陳等人<sup>(41)</sup> 研究則顯示人蔘皂酶 Rb2 (ginseng saponin Rb2; G-Rb2) 及人蔘皂酶 Rc (ginseng saponin Rc; G-Rc) 可增強人類精子活動力及精子游動速率。

本研究中所使用之香椿各部位之抗氧化成分目前尚未有完整文獻提出。賈<sup>(22)</sup> 於目前初步成分分析中發現香椿葉之有效成分含有大量的酚類化合物，包括沒食子酸、槲黃素、兒茶素 (+)-catechin 及 (-)-epicatechin、類黃酮和芸香素。方<sup>(19)</sup> 利用 cytochrome C 還原比色法及 xanthine oxidase inhibition 測試香椿葉清除與抑制自由基的能力，結果顯示香椿葉具有清除及抑制  $O_2^{\cdot-}$  自由基的能力；另外，利用氯化亞鐵-抗壞血酸 (ascorbic acid) 誘發脂質過氧化試驗中，顯示香椿葉可抑制脂質過氧化的作用活性<sup>(19)</sup>。Patel 等人<sup>(23)</sup> 指出香椿樹皮含川棟素及兒茶酚，但關於香椿根皮其所含的抗氧化物種類則尚無相關研究。我們利用體外 DPPH 試驗測試比較香椿葉、根皮及樹皮萃取物清除 DPPH 自由基之效力，三種萃取物均於  $0.625 \text{ mg/mL}$  達到平衡，且其清除效力均達 80% 以上，顯示香椿葉、根皮及樹皮均具有良好之抗氧化能力。楊<sup>(21)</sup> 以體外試驗方式利用  $0.2 \text{ mM}$  的  $H_2O_2$  誘導人類精子產生氧化壓力後，發現  $0.5$  及  $1 \text{ mg/mL}$  的香椿葉分層萃取液 (5-4R) 可顯著降低人類精子胞內 ROS 含量，因而促使粒線體膜電

表四 三月齡雄性 SAMP8 小鼠餵食不同飼料 12 週之精子品質狀態

Table 4. Quality of spermatozoa in three months old male SAMP8 mice fed with different diets for 12 weeks<sup>1</sup>

Group	N	Motility of Spermatozoa (%)	Concentration of Spermatozoa ( $\times 10^4/\text{mL}$ )	Abnormality of Spermatozoa (%)
A <sup>3</sup>	10	$35.56 \pm 3.23$ <sup>a2</sup>	$143.50 \pm 22.26$ <sup>a</sup>	$23.60 \pm 0.88$ <sup>a</sup>
B	10	$56.47 \pm 2.37$ <sup>a</sup>	$217.90 \pm 21.56$ <sup>b</sup>	$20.75 \pm 1.44$ <sup>a</sup>
C	10	$57.91 \pm 2.05$ <sup>a</sup>	$229.50 \pm 28.33$ <sup>b</sup>	$20.65 \pm 1.49$ <sup>a</sup>
D	10	$58.76 \pm 1.83$ <sup>a</sup>	$214.30 \pm 15.09$ <sup>b</sup>	$20.55 \pm 1.50$ <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Values were mean  $\pm$  S.E.M.

<sup>2</sup> Data with different superscripts in the same column are significantly different at  $p < 0.05$ .

<sup>3</sup> A = blank.

B = 1% *Toona sinensis* Roemor leaf extract.

C = 1% *Toona sinensis* Roemor root extract.

D = 1% *Toona sinensis* Roemor bark extract.

位及 ATP 含量增加，保護染色質結構之完整性，並可使精子活動速度回升，而改善精子的活動力。本次體內試驗結果亦發現餵食香椿葉、根皮或樹皮萃取物之 SAMP8 小鼠精子活動力均顯著較對照組高，此結果與楊<sup>(21)</sup>之人類精蟲體外試驗相似，但香椿萃取物葉、根皮及樹皮之間並無統計上的顯著差異。

### 三、香椿對精子濃度之影響

表四為三月齡雄性 SAMP8 小鼠餵食不同部位香椿萃取物 12 週後對精子濃度之影響。結果發現，餵食 1% 香椿各部位萃取物之精子濃度均顯著較對照組高 ( $p < 0.05$ )，而餵食香椿萃取物各組之間則未見顯著差異。生活習慣、環境、生理狀態、基因及老化皆會影響精子功能，有可能導致男性的不孕。而隨年齡增加可能使精子濃度變少，其原因推測與老化造成精子基因出現損傷有關<sup>(2,3)</sup>。由 Brzezinska-Slebodzinska 等人<sup>(42)</sup>研究得知，補充維生素 E 可增加精子之濃度。給予不孕症患者服用 60 天的生薑後，顯著提升精子濃度，並且使 78% 參與試驗的不孕夫婦懷孕<sup>(43)</sup>。此外，給予不孕症患者人蔘、黃耆、地黃等複方，都具有提高精子濃度之作用<sup>(44-46)</sup>。由於本試驗中 SAMP8 小鼠經過長期餵食後，於犧牲時已達六月齡，逐漸步入中老年時期，可能因老化而造成精子之基因出現損傷增加。在給予香椿葉、根皮及樹皮萃取物後，與控制組相比能顯著增加精子濃度分別為 51.84%、59.93% 及 49.33%，推測可能因香椿所含有的抗氧化成分而延緩了老化所造成的精子損傷，因而有較多的精子形成。

### 四、香椿對精子畸形率之影響

表四為三月齡雄性 SAMP8 小鼠餵食不同部位香椿萃取物 12 週後對精子畸形率之影響。結果發現，餵食香椿各部位萃取物組與對照組間精子畸形率並沒有差異。Saleh 等人<sup>(47)</sup>之研究指出，抽菸者精液中的 ROS 含量比健康男性增加 1.07 倍，且抗氧化能力下降，精子形態異常百分比亦高於不抽菸者<sup>(48)</sup>。另不孕症患者中酗酒者之精子形態異常顯著比不喝酒者多<sup>(49)</sup>。Thiele 等人<sup>(50)</sup>以高效液相層析儀 (high performance liquid chromatography; HPLC) 分析不孕症患者精液，結果發現不孕症患者精液中維生素 C 濃度顯著低於健康男性，而維生素 C 濃度與形態正常精子的百分比呈顯著正相關，且與

ROS 含量呈負相關。由此可知，ROS 亦會增加精子畸形的比例，抗氧化劑則可減少其異常的比例。但本研究結果顯示，長期餵食 1% 香椿萃取物後並不會對 SAMP8 小鼠精子之畸形率有所影響，可能因香椿劑量不足所致，而此有待更進一步的研究。

## 結 論

綜合以上結果顯示，香椿葉、根皮及樹皮萃取物的添加可使 SAMP8 小鼠精子活動力及精子濃度顯著的增加，推測可能因香椿葉、根皮及樹皮萃取物含有的抗氧化能力所致。而香椿各部位萃取物對於精子影響之機轉及不同部位所含的抗氧化物種類，則有待進一步探討。

## 參 考 文 獻

- (1) J. Auger, J. M. Kunstmann, F. Czyblik and P. Jouannet: Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N. Engl. J. Med.*, **332**: 281-285 (1995).
- (2) E. Carlsen, A. Giwercman, N. Keiding and N. E. Skakkebaek: Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *B. M. J.*, **305**: 609-613 (1992).
- (3) J. M. Cummins, A. M. Jequier and R. Kan: Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics, and oxidative stress? *Mol. Reprod. Dev.*, **37**: 345-362 (1994).
- (4) J. Aitken and H. Fisher: Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioassays*, **16**: 259-267 (1994).
- (5) E. de Lamirande and C. Gagnon: Reactive oxygen species (ROS) and reproduction. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **366**: 185-197 (1994).
- (6) R. K. Sharm and A. Agarwal: Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, **48**: 835-850 (1996).
- (7) C. S. Chen, H. T. Chao, R. L. Pan and Y. H. Wei: Hydroxyl radical-induced decline in motility and increase in lipid peroxidation and DNA modification in human sperm. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **43**: 291-303 (1997).
- (8) J. S. Armstrong, M. Rajasekaran, W. Chamulitrat, P. Gatti, W. J. Hellstrom and S. C. Sikka: Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radic. Biol. Med.*, **26**: 869-880 (1999).
- (9) J. G. Kim and S. Parthasarathy: Oxidation and the spermatozoa. *Semin. Reprod. Endocrinol.*, **16**: 235-239 (1998).
- (10) C. G. Fraga, P. A. Motchnik, M. K. Shigenaga, H. J. Helbock, R. A. Jacob and B. N. Ames: Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 11003-11006 (1991).
- (11) N. Y. Chiu and K. H. Chang: *Toona sinensis* (A. Juss.) Roem. In: *The illustrated medicinal plants of Taiwan*. S.M.C. Publishing. Inc., Taipei, Taiwan, Vol. 1, pp. 131-132 (1995).
- (12) J. M. Edmonds and M. Staniforth: *Toona sinensis*

(Meliaceae). *Curtis's Botanical Magazine*, **15**: 186-193 (1998).

- (13) J. C. Park, Y. B. Yu, J. H. Lee, J. S. Chol and K. D. Ok: Phenolic compounds from the Rachis of *Cedrela sinensis*. *Kor. J. Pharmacogn.*, **27**: 219-223 (1996).
- (14) 楊玉嬌、許勝光、黃佳惠、洪秀貞：香椿葉抽出物增加 3T3-L1 脂肪細胞對葡萄糖攝取之研究。高雄醫學科學雜誌，**19**: 327-333 (2003)。
- (15) 許勝光、楊玉嬌、黃佳惠、洪秀貞：探討香椿葉萃取物對 3T3-L1 脂肪細胞脂肪分解的作用。高雄醫學科學雜誌，**19**: 385-390 (2003)。
- (16) H. C. Chang, W. C. Hung, M. S. Huang and H. K. Hsu: Extract from the leaves of *Toona sinensis Roemor* exerts potent antiproliferative effect on human lung cancer cells. *Am. J. Chin. Med.*, **30**: 307-314 (2001).
- (17) 王佩德：椿葉水萃取液在 *Alloxan* 所誘發的糖尿病鼠中降血糖作用之研究。高雄醫學大學醫學研究所碩士論文 (2000)。
- (18) J. C. Park, Y. B. Yu, J. H. Lee and N. J. Kim: Anti-inflammatory and analgesic effect of the components from some edible plants. *Han'guk. Youguang. Siklyong. Hakhoechi.*, **23**: 671-674 (1994). (in Korean)
- (19) 方博正：台灣產生藥之抗氧化及抗胞疹病毒活性資源開發研究。高雄醫學大學天然藥物研究所碩士論文，高雄，台灣 (2000)。
- (20) P. C. Hsu, H. K. Hsu, M. F. Wang, J. W. Liao and Y.C. Chan: Effects of *Toona sinensis Roemor* leave extracts on brain oxidant status and aging pathological changes in senescence accelerated mice. *Taiwanese J. Agri. Chem. Food Sci.*, **42**: 200-208 (2004).
- (21) 楊馥瑜：香椿對人類精子生理功能之探討。國立成功大學生物學系碩士論文，台南，台灣 (2003)。
- (22) 賈宜琛：香椿葉部生物活性成分的研究。台灣保健食品學會第二屆第二次年會論文摘要，台北，台灣，p. 71 (2002)。
- (23) T. Patel, G. J. Gores and S. H. Kaufmann: The role of proteases during apoptosis. *FASEB J.*, **10**: 587-597 (1996).
- (24) A. Ichiro and Y. Hideo: Age related morphological changes in the brain of senescence-accelerated mouse (SAMP8). In: *The SAM Model of Senescence* (T. Takeda ed.), pp.67-72, Excerpta Medica Ltd., Amsterdam, the Netherlands (1994).
- (25) 曾麗娟、賴俊雄、廖俊旺、王順成：鉛對雄性 ICR 小鼠睪丸之毒害。中華獸醫雜誌，**27**: 113-121 (2001)。
- (26) A. Wyrobek and W. R. Bruce: The induction of sperm-shape in mice and humans. In: *Chemical mutagens principles and methods for their detection*. (C.A. Hollanender ed.), pp. 257-280. Raven Press, New York, USA (1978).
- (27) N. Nishitama, T. Moriguchi, Y. X. Zhang and T. Saito: Comprehensive studies in learning disability in senescence accelerated mouse prone 8. In: *The SAM model of Senescence*. (T. Takeda ed.), pp. 385-388, Excerpta Medica Ltd., Amsterdam, the Netherlands (1994).
- (28) J. G. Alvarez, J. C. Touchstone, L. Blasco and B.T. Storey: Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J. Androl.*, **8**: 338-348 (1987).
- (29) J. S. Armstrong, M. Rajasekaran, W. Chamulitrat, P. Gatti, W. J. Hellstrom and S. C. Sikka: Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radic. Biol. Med.*, **26**: 869-880 (1999).
- (30) D. Mortimer, I. J. Pandya and R. S. Sawers: Relationship between human sperm motility characteristics and sperm penetration into human cervical mucus in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, **78**: 93-102 (1986).
- (31) K. D. Namilk, M. Mahmood and O. Sergio: Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Reprod. Biol.*, **74**: 1200-1207 (2000).
- (32) 翁筱晶：磷酸吡哆醛對過氧化氫誘發人類精子損傷之研究。成功大學生物學系碩士論文，台南，台灣 (2002)。
- (33) E. de Lamirande and C. Gagnon: Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J. Androl.*, **13**: 368-378 (1992).
- (34) N. Esfandiari, R. A. Saleh, A. P. Blaut, R. K. Sharma, D. R. Nelson, A. J. Jr. Thomas, T. Falcone and A. Agarwal: Effects of temperature on sperm motion characteristics and reactive oxygen species. *Int. J. Fertil. Womens. Med.*, **47**: 227-233 (2002).
- (35) M. L. Hu, Y. K. Chen and Y. F. Lin: The antioxidant and pro-oxidant activity of some B vitamins and vitamin-like component. *Chem. Biol. Interact.*, **97**: 63-73 (1995).
- (36) 查英佑：過氧化氫的暴露影響大鼠精子染色體 DNA 完整性之研究；維生素 C 過氧化氫引起人類精子染色體 DNA 損傷之研究。高雄第一科技大學環境與安全衛生工所碩士論文，高雄，台灣 (2002)。
- (37) P. C. Hsu, M. Y. Liu, C. C. Hsu, L. Y. Chen and Y. L. L. Guo: Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in the rat sperm. *Toxicology*, **128**: 169-179 (1998).
- (38) J. F. Griveau and D. Le Lannou: Reactive oxygen species and spermatozoa: physiology and pathology. *Int. J. Androl.*, **20**: 61-69 (1997).
- (39) H. Jeng, C. M. Wu, S. J. Su and W. C. Chang: A substance isolated from *Cornus officinalis* enhances the motility of human sperm. *Am. J. Chin. Med.*, **25**: 301-306 (1997).
- (40) C. Y. Hong, J. Ku and P. Wu: *Astragalus membranaceus* stimulates human sperm motility in vitro. *Am. J. Chin. Med.*, **20**: 289-294 (1992).
- (41) 陳榮洲、陳立德、曹偉、蔡金川、陳必誠、陳膺仁：人參皂甘 Rb2 對人類精子活動力的體外效應。中國醫藥學院雜誌，**7**: 55-60 (1998)。
- (42) E. Brzezinska-Slebodzinska, A. B. Slebozinski, B. Pietras and G. Wiczorek: Antioxidant effect of Vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biol. Trace Elem. Res.*, **47**: 69-74. (1995).
- (43) R. Chen and H. Wen: Clinical treatment of male infertility with sheng jing pill. *Int. J. Orient. Med.*, **21**: 144-147 (1996).
- (44) H. Y. Hsu: Infertility. Treatment with Chinese herbal preparations based on presenting conformations. *Int. J. Orient. Med.*, **22**: 144-147 (1997).
- (45) D. J. Li, C. J. Li and Y. Zhu: Treatment of immunological infertility with Chinese medicinal herbs of aiyin jianghuo. *中國中西醫結合雜誌*，**15**: 3-5 (1995)。
- (46) X. D. Liu: Effect of Chinese medicinal herbs on sperm membrane of infertile male. *中西醫結合雜誌*，**10**: 519-521 (1990)。
- (47) R. A. Saleh, A. Agarwal, R. K. Sharma, D. R. Nelson and Jr. A. J. Thomas: Effect of cigarette smoking on

- levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertil. Steril.*, **78**: 491-499 (2002).
- (48) W. Y. Wong, C. M. Thomas, H. M. Merkus, G. A. Zielhuis, W. H. Doesburg and R. P. Steegers-Theunissen: Cigarette smoking and the risk of male factor subfertility: minor association between cotinine in seminal plasma and semen morphology. *Fertil. Steril.*, **74**: 930-935 (2000).
- (49) H. J. Goverde, H. S. Dekker, H. J. Janssen, B. A. Bastiaans, R. Rolland and G. A. Zielhuis: Semen quality and frequency of smoking and alcohol consumption-an explorative study. *Int. J. Fertil. Menopausal Stud.*, **40**: 135-138 (1995).
- (50) J. J. Thiele, H. J. Friesleben, J. Fuchs and F. R. Ochsendorf: Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. *Hum. Reprod.*, **10**: 110-115 (1995).
- (51) P. G. Reeves: Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J. Nutr.*, **127**: 838S-841S (1997).