

# 魚油對葡聚糖硫酸鈉誘發腸道發炎 小鼠睪丸功能之影響

曹智惟<sup>1</sup> 張裕隆<sup>2</sup> 邱琬淳<sup>3,4,5</sup> 張庭嘉<sup>6</sup> 陳怡雯<sup>6</sup> 劉沁瑜<sup>6\*</sup>

## Effects of fish oil on testicular function in mice with dextran sulfate sodium-induced intestinal inflammation

Chih-Wei Tsao<sup>1</sup>, Yu-Lung Chang<sup>2</sup>, Wan-Chun Chiu<sup>3,4,5</sup>, Ting-Chia Chang<sup>6</sup>, Yi-Wen Chen<sup>6</sup>,  
Chin-Yu Liu<sup>6\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Urology, Department of Surgery, Tri-Service General Hospital, National Defense Medical Center, Taipei, Taiwan

<sup>2</sup>Department of Urology, Taoyuan General Hospital, Ministry of Health and Welfare, Taoyuan, Taiwan

<sup>3</sup>School of Nutrition and Health Sciences, College of Nutrition, Taipei Medical University, Taipei, Taiwan

<sup>4</sup>Research Center of Geriatric Nutrition, College of Nutrition, Taipei Medical University, Taipei, Taiwan

<sup>5</sup>Department of Nutrition, Wan Fang Hospital, Taipei Medical University, Taipei, Taiwan

<sup>6</sup>Department of Nutritional Science, Fu Jen Catholic University, New Taipei City, Taiwan

(Received: September 05, 2023. Accepted: November 06, 2023.)

**Abstract** The incidence of inflammatory bowel disease (IBD) has been increasing, and it is more common in adults between 20-39 years old. Few studies have investigated the effects of intestinal inflammation on reproductive function. Fish oil is rich in n-3 fatty acid, which can modulate inflammatory responses. Therefore, this study aimed to investigate the effects of fish oil on testicular function in mice with intestinal inflammation induced by dextran sulfate sodium (DSS). C57BL/6 mice were randomly divided into the control, DSS-induced intestinal inflammation, intestinal inflammation with low content and high content fish oil groups. After 2 weeks of treatment, the intestinal inflammation groups received drinking water containing 2% DSS for 5 days, and mice were sacrificed after having normal water for another 5 days. The results showed that mice with intestinal inflammation resulted in increased levels of proinflammatory cytokine in colon lavage fluid (CLF), poor testicular spermatogenesis, downregulated protein expressions of enzymes responsible for testosterone biosynthesis, lower GPx activity and upregulated expressions of Bax, Bcl-xl, Caspase 3, IL-6 and NF- $\kappa$ B. Fish oil supplementation significantly decreased proinflammatory cytokine levels in CLF. Despite having no effect on spermatogenesis, testosterone biosynthesis enzymes were upregulated; however, expressions of apoptosis and inflammation proteins didn't differ significantly. In conclusion, mice with intestinal inflammation have elevated intestinal inflammatory mediator production, impaired testicular function, increased testicular oxidative stress, apoptosis and inflammation. Fish oil supplementation significantly reduced intestinal inflammatory mediator production, and slightly alleviated testicular function.

**Key words:** DSS, intestinal inflammation, testicular function, fish oil

\* Corresponding author: Chin-Yu Liu

Address: No.510, Zhongzheng Rd., Xinzhuang Dist., New Taipei City  
242062, Taiwan  
Tel: 02-29053147  
E-mail : nf351.lab@gmail.com

## 前 言

發炎性腸道疾病 (Inflammatory bowel disease) 是一種消化道的慢性發炎疾病，可分為潰瘍性結腸

炎 (Ulcerative colitis) 及克隆氏症 (Crohn's disease)。流行病學調查指出, 2019 年全球已有約 490 萬人患有發炎性腸道疾病, 相較於 1990 年的 332 萬人, 增加近 48%, 其中患病人數最多的國家是中國及美國 (分別是每十萬人口 66.9 人及 245.3 人)<sup>(1)</sup>。因衛生環境改善和生活型態及飲食西化, 近年新興工業化國家發炎性腸道疾病的發生率及患病率逐漸上升, 一基於台灣健保資料庫的回溯性研究發現, 發炎性腸道疾病的盛行率由 2001 年的每十萬人口 2.7 人增加至 2015 年的 16.7 人, 好發於 20-39 歲成人且男性患者比率高於女性<sup>(2)</sup>。

發炎性腸道疾病的致病原因及機轉仍不清楚, 可能與基因、飲食、環境、腸菌相及免疫系統失衡等多因素有關<sup>(3)</sup>。近來氧化壓力被認為和發炎性腸道疾病的病程發展有關, 氧化壓力上升造成黏膜上皮細胞脂質、蛋白質與 DNA 氧化損傷, 增加細胞凋亡使黏膜層受損而增加腸通透性造成細菌入侵 (invasion), 腸黏膜損傷也會活化免疫細胞而產生大量促發炎細胞激素、蛋白酶 (proteases) 與活性氧物種, 共同促使腸道長期發炎<sup>(4,6)</sup>。同時, 氧化壓力、細胞凋亡與發炎反應也是造成睪丸及精子脂質、蛋白質與 DNA 氧化損傷而導致不孕的主要機轉<sup>(7)</sup>。Toole 等人回顧 12 篇有關發炎性腸道疾病及男性性功能的研究, 結果指出 10-50% 的發炎性腸道疾病患者合併有性功能障礙, 且其病況嚴重度對於性慾及性行為具有顯著影響<sup>(8)</sup>。Szathmári 等人發現高達 4 成發炎性腸道疾病患者血睪固酮濃度低於正常濃度 (<10 nmol/l)<sup>(9)</sup>。此外, Nasser 等人追蹤 106 位克隆氏症男性患者 7 年, 其中 92 位同時接受睪固酮替代療法, 結果發現, 和追蹤前相比, 補充睪固酮的患者克隆氏症活動指數顯著降低, C 反應蛋白濃度及白血球數量亦明顯減少<sup>(10)</sup>。2018 年一篇文獻回顧認為睪固酮可能透過調節發炎反應細胞激素及功能而緩解發炎反應<sup>(11)</sup>。睪固酮為睪丸萊氏細胞 (Leydig cell) 分泌並受神經內分泌調控, 膽固醇經類固醇合成急性調控蛋白 (steroidogenic acute regulatory protein, StAR)、膽固醇側鏈解離酶 (cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 enzyme, CYP11A1)、羥基類固醇脫氫酶 (hydroxysteroid dehydrogenases, HSDs) 與類固醇 17 $\alpha$ -單加氧酶 (steroid 17 $\alpha$ -monooxygenase, CYP17A1) 合成睪固酮<sup>(12)</sup>。

魚油含有高濃度的 n-3 多元不飽和脂肪酸 (n-3

polyunsaturated fatty acid, n-3 PUFA), 即二十碳五烯酸 (Eicosatetraenoic acid, EPA) 及二十二碳六烯酸 (Docosahexaenoic acid, DHA), 可藉由調節免疫細胞如白血球及 T 細胞作用、類二十碳酸 (eicosanoid)、促發炎細胞激素與止炎素 (resolvin) 生成以達到抗發炎功效<sup>(13)</sup>。2019 年一篇文獻回顧指出, n-3 不飽和脂肪酸可透過降低發炎性腸道疾病患者促發炎細胞激素生成而減緩腸道發炎、降低疾病活動度、誘導及維持疾病緩解 (remission) 並提升生活品質<sup>(14)</sup>。動物實驗顯示, 事前補充低及高劑量 EPA 或 DHA 的小鼠在誘發潰瘍性結腸炎時, 細胞激素生成、發炎細胞浸潤與疾病活動度均顯著降低<sup>(15)</sup>; 另一實驗同樣先給予小鼠低劑量 (100 mg/kgBW) 及高劑量 (400 mg/kgBW) 的 EPA 或 DHA 後再誘發潰瘍性結腸炎, 結果發現, n-3 脂肪酸可強化黏膜層屏障, 降低細胞激素生成與發炎反應而改善潰瘍性結腸炎<sup>(16)</sup>。此外, 臨床試驗給予不孕男性 32 週每天 1.84 克 EPA 及 DHA 補充, 結果發現精液 EPA 及 DHA 濃度與精子功能指標均顯著改善, 且 n-3 脂肪酸濃度與精子功能指標為正相關<sup>(17)</sup>; 動物實驗亦發現, 給予順鉑 (cisplatin) 誘發生殖功能損傷大鼠腹腔注射連續 14 天魚油 (7 mg/kgBW) 補充可改善精子及睪丸功能<sup>(18)</sup>。因此, 本研究欲探討魚油補充對於 DSS 誘發腸道發炎小鼠睪丸型態、睪固酮合成酵素蛋白質表現、抗氧化酵素活性、細胞凋亡與發炎反應相關調控因子的蛋白質表現之影響。

## 材料與方法

### 一、實驗動物及分組

本實驗經輔仁大學實驗動物照護及使用委員會核准 (編號: A10250), 採用 7 週齡 C57BL/6 雄性小鼠, 購自國家動物中心 (台北市, 台灣), 飼養於溫度 20-26°C、相對濕度 30-37%、12 小時光照/12 小時黑夜循環與每小時 10-15 次換氣頻率的環境, 實驗期間小鼠可自由攝食及飲水。24 隻小鼠經適應期後依體重隨機分為控制組 (Control, C 組)、腸發炎組 (DSS-induced intestinal inflammation, SI 組)、腸發炎給予高劑量魚油組 (DSS-induced intestinal inflammation receiving high n-6/n-3 PUFA ratio, SHF 組)、腸發炎給予低劑量魚油組

(DSS-induced intestinal inflammation receiving low n-6/n-3 PUFA ratio, SLF 組)，C 及 SI 組餵食半純化飼料 AIN-93G；SHF 及 SLF 組給予同樣飼料但以魚油部分取代大豆油（n-6/n-3 多元不飽和脂肪酸比例分別為 2:1 及 4:1），實驗飼料組成如表一所示。飲食介入連續 2 週後於腸炎組之飲用水中添加 2% 葡聚糖硫酸鈉（DSS; 160110, MP Biomedicals Inc., Ohio, USA）連續 5 天，再換回一般飲用水 5 天同時給予飲食介入，之後犧牲收集結腸灌洗液（colon lavage fluid）及睪丸組織保存於-80°C 以進行後續分析。

## 二、結腸灌洗液 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 與 MCP-1 濃度分析

取下整段結腸並以 2 mL 磷酸鹽緩衝生理鹽水（phosphate-buffered saline）灌洗，收集灌洗液並於 4°C 高速離心 10 分鐘後取上清液，並以市售試劑組（ICL, Oregon, USA）分析 TNF- $\alpha$ （tumor necrosis factor- $\alpha$ ）、IL-6（interleukin-6）、IL-1 $\beta$ （interleukin-1 $\beta$ ）與 MCP-1（Monocyte chemoattractant pro-

tein-1）濃度。

## 三、睪丸型態分析

使用高碘酸鈉-賴胺酸-多聚甲醛固定液（periodate-lysine-paraformaldehyde fixative）固定睪丸，脫水後浸入石蠟並包埋保存於石蠟中，利用半自動石蠟切片機（RM2245, Leica, Wetzlar, Germany）以厚度 4  $\mu\text{m}$  進行切片，將切片貼於玻片後放入烘箱烘乾水分，再利用自動染色機以蘇木精（hematoxylin）及伊紅（eosin）試劑進行染色，於光學顯微鏡（DM1000, Leica, Wetzlar, Germany）下觀察各組睪丸型態。

## 四、睪丸超氧化物歧化酶及麩胱甘肽過氧化物酶活性分析

定量睪丸於 RIPA 細胞裂解液（89900, Thermo Scientific, Massachusetts, USA）、蛋白酶抑制劑（78430, Thermo Scientific, Massachusetts, USA）和磷酸酶抑制劑（78420, Thermo Scientific, Massachusetts, USA）混合液中均質，於 4°C 高速離心

表一 各組飼料組成表

Table 1. Dietary composition of each group (g/kg)

Ingredients	C/SI	SHF	SLF
Corn starch	549.5	549.5	549.5
Sucrose	100.0	100.0	100.0
Casein	200.0	200.0	200.0
Cystine	3.0	3.0	3.0
Methyl cellulose	50.0	50.0	50.0
Mineral mixture <sup>a</sup>	35.0	35.0	35.0
Vitamin mixture <sup>b</sup>	10.0	10.0	10.0
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5
Soybean oil	50.0	46.9	40.5
Fish oil	0.0	9.5	3.1
TBHQ	0.014	0.014	0.014
n-6/n-3 ratio	—	2:1	4:1

C: control group; SI, DSS-induced intestinal inflammation with soybean oil group; SHF, DSS-induced intestinal inflammation with high n-3PUFA content (n-6/n-3 ratio: 2:1) group; SLF, DSS-induced intestinal inflammation with low n-3PUFA content (n-6/n-3 ratio: 4:1) group.

<sup>a</sup> Mineral mixture composition per gram of diet: 500 mg calcium phosphate dibasic, 74 mg sodium chloride, 52 mg potassium sulfate, 24 mg magnesium oxide, 20 mg potassium citrate monohydrate, 6 mg ferric citrate, 3.5 mg manganese carbonate, 1.6 mg zinc carbonate, 0.5 mg chromium potassium sulfate, 0.3 mg cupric carbonate, 0.01 mg potassium iodate, and 0.01 mg sodium selenite.

<sup>b</sup> Vitamin mixture composition per gram of diet: 20 mg DL- $\alpha$ -tocopherol acetate, 3 mg nicotinic acid, 1.6 mg calcium pantothenate, 1.6 mg retinyl palmitate, 0.7 mg pyridoxine hydrochloride, 0.6 mg thiamin hydrochloride, 0.6 mg riboflavin, 0.25 mg cholecalciferol, 0.05 mg D-biotin, 0.005 mg menaquinone and 0.001 mg cyanocobalamin.

後取上清液，再以市售試劑組（706002, Cayman, Michigan, USA; 703102, Cayman, Michigan, USA）進行分析，檢測特定波長下之吸光值，帶入標準曲線以計算羧基超氧化物歧化酶（Superoxide dismutase, SOD）及麩胱甘肽過氧化物酶（Glutathione peroxidase, GPx）活性。

## 五、睪丸 StAR、CYP11A1、3 $\beta$ -HSD 與 CYP17A1 的蛋白質表現

如前段敘述之睪丸蛋白質萃取方法，取適量蛋白質以 Bradford 蛋白質定量法測定濃度並配置樣品，將樣品注入 10% 之 SDS-PAGE 中進行電泳，轉印（transfer）至 PVDF 膜上後進行封閉（blocking），經一級抗體：StAR（sc-25806, Santa Cruz, Texas, USA）、CYP11A1（sc-292456, Santa Cruz, Texas, USA）、3 $\beta$ -HSD（sc-28206, Santa Cruz, Texas, USA）與 CYP17A1（sc-66850, Santa Cruz, Texas, USA）及相對應之二級抗體：Goat anti-mouse IgG-HRP（sc-2005, Santa Cruz, Texas, USA）及 Goat anti-rabbit IgG-HRP（sc-2054, Santa Cruz, Texas, USA）反應後，加入適量 ECL 呈色劑（1705061, Bio-Rad, Taipei, Taiwan），以冷光分析儀（Xplorer, Diagnostic）偵測蛋白質訊號並使用 Image J 軟體定量其訊號強度。

## 六、睪丸 Bax、Bcl-xL、Caspase 3 與 PARP 的蛋白質表現

取適量蛋白質萃取液配置樣品，樣品經膠體電泳分離、轉印與封閉後，經一級抗體：Bax（2772, Cell Signaling, Massachusetts, USA）、Bcl-xL（ab32370, Abcam, Massachusetts, USA）、Caspase 3（9662, Cell Signaling, Massachusetts, USA）與 PARP（3542, Cell Signaling, Massachusetts, USA）及二級抗體（Goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2005, Santa Cruz, Texas, USA; Goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2054, Santa Cruz, Texas, USA）反應後，加入 ECL 呈色劑（1705061, Bio-Rad, Taipei, Taiwan），以冷光分析儀偵測蛋白質訊號並使用 Image J 軟體定量其訊號強度。

## 七、睪丸 IL-6 及 NF- $\kappa$ B 的蛋白質表現

取適量蛋白質萃取液配置樣品，樣品經膠體電

泳分離、轉印與封閉後，經一級抗體（IL-6: sc-57315, Santa Cruz, Texas, USA; NF- $\kappa$ B: E381, Abcam, Massachusetts, USA）及二級抗體（Goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2005, Santa Cruz, Texas, USA; Goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2054, Santa Cruz, Texas, USA）反應後，加入 ECL 呈色劑（1705061, Bio-Rad, Taipei, Taiwan），以冷光分析儀偵測蛋白質訊號並使用 Image J 軟體定量其訊號強度。

## 八、統計方法

實驗數據以 mean  $\pm$  SD 呈現，使用 GraphPad Prism 軟體（California, USA）進行統計分析。以 Student's t test、單因子變異數分析（One-way ANOVA）與 Fisher's LSD 比較各變數平均值差異， $p < 0.05$  表示達統計意義上的顯著差異。

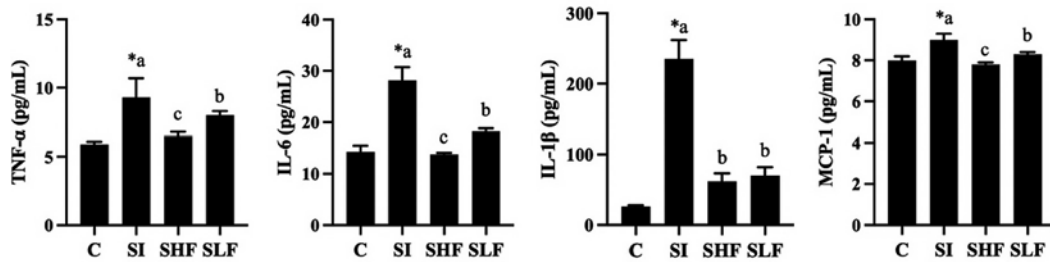
# 結 果

## 一、結腸灌洗液 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 與 MCP-1 濃度

由圖一可知，DSS 誘發腸發炎小鼠（SI 組）結腸灌洗液之 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  與 MCP-1 濃度顯著上升，兩種劑量的魚油介入皆可明顯降低 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  與 MCP-1 濃度，其中高劑量魚油介入（SHF 組）之 TNF- $\alpha$ 、IL-6 與 MCP-1 濃度顯著低於低劑量魚油介入（SLF 組）。

## 二、睪丸型態

睪丸的主要功能為分泌性荷爾蒙及製造精子，精子生成（spermatogenesis）發生於睪丸曲細精管，精子生成始自曲細精管基底層的精原細胞（spermatogonia）經有絲分裂後形成精母細胞（spermatocyte），精母細胞經兩次減數分裂形成精細胞（spermatid），精細胞會由圓形分化成長形，最後形成精子（spermatozoa）<sup>(19)</sup>。如圖二所示，可見數個圓形或橢圓形構造的曲細精管，所有腸發炎組（SI、SHF 與 SLF 組）的曲細精管內生殖細胞排列較不整齊、精細胞及精子數量少且有空泡化（vacuolation）的情形，又以 SHF 組最為明顯。



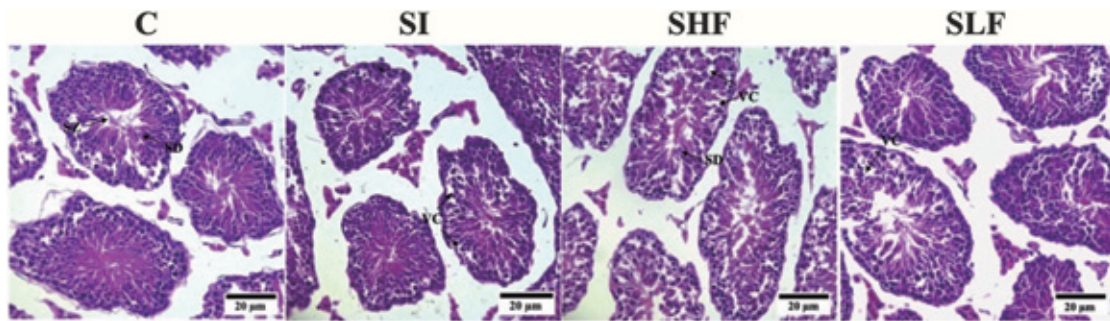
圖一 結腸灌洗液 TNF-α、IL-6、IL-1β與 MCP-1 濃度

**Figure 1.** TNF-α、IL-6、IL-1β and MCP-1 levels in colon lavage fluid.

C: control group; SI, DSS-induced intestinal inflammation with soybean oil group; SHF, DSS-induced intestinal inflammation with high n-3PUFA content (n-6/n-3 ratio: 2:1) group; SLF, DSS-induced intestinal inflammation with low n-3PUFA content (n-6/n-3 ratio: 4:1) group; TNF-α: tumor necrosis factor-α, IL6: interleukin-6, IL-1β: interleukin-1β and MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1.

Data are presented as mean ± SD ( $n = 6$  per group).

\*: Significant different compared with the C group ( $p < 0.05$ , Student's t test); <sup>a-c</sup>: Bars not sharing the same letter are statistically significant ( $p < 0.05$ , One-way ANOVA with LSD).



圖二 睪丸型態

**Figure 2.** Testicular histology (scale bar = 20 μm,  $n = 6$  per group)

C: control group; SI, DSS-induced intestinal inflammation with soybean oil group; SHF, DSS-induced intestinal inflammation with high n-3PUFA content (n-6/n-3 ratio: 2:1) group; SLF, DSS-induced intestinal inflammation with low n-3PUFA content (n-6/n-3 ratio: 4:1) group; SZ: spermatozoa, SD: spermatid and VC: vacuole.

睪丸經石蠟包埋及製成切片後經 H&E 染色於光學顯微鏡下觀察，圖片放大倍率為 400 倍。

The testes were embedded in paraffin, sectioned and stained with hematoxylin and eosin for observation under an optical microscope with a magnification of 400x.

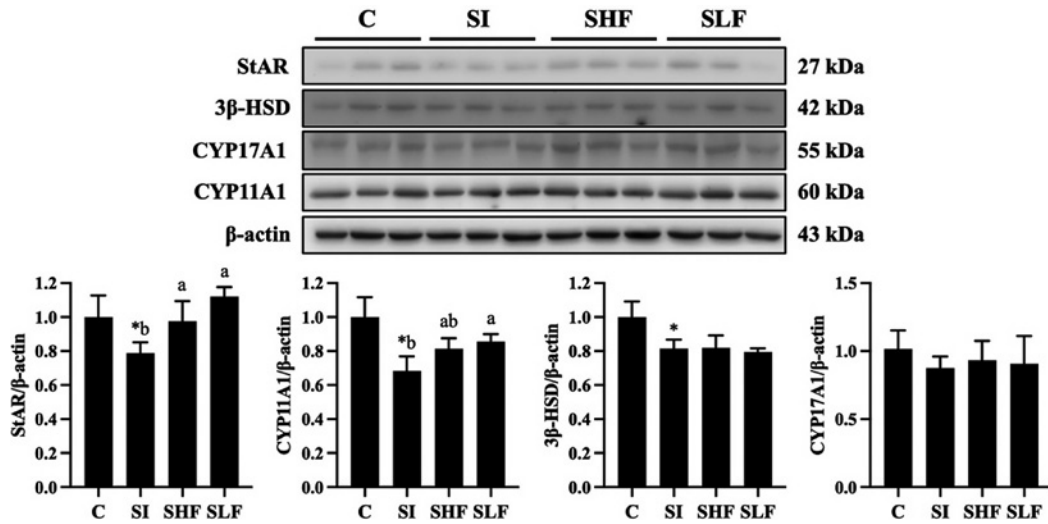
### 三、睪丸 StAR、CYP11A1、3β-HSD 與 CYP17A1 的蛋白質表現

睪丸製造睪固酮會受下視丘及腦下垂體分泌的荷爾蒙調控，荷爾蒙作用於睪丸萊氏細胞 (Leydig cells) 而活化下游睪固酮合成酵素<sup>(20,21)</sup>。由圖三可知，DSS 誘發腸發炎小鼠 (SI 組) 的睪丸 StAR、CYP11A1 與 3β-HSD 蛋白質表現均顯著低於控制組。兩種劑量的魚油介入皆可明顯增加 StAR 表現量，但對 3β-HSD 則無顯著影響；低劑量魚油介入 (SLF 組) 的小鼠 CYP11A1 表現量亦顯著高於 SI 組，高劑量魚油介入 (SHF 組) 則有增加的趨勢。

此外，所有組別的 CYP17A1 蛋白質表現無顯著差異。

### 四、睪丸 SOD 及 GPx 活性

活性氧物質與精子獲能、頂體反應及精子超活化等精子功能有關，但過量活性氧物質無法被睪丸自由基清除者及抗氧化物還原時會導致氧化還原失衡，形成氧化壓力而損傷精子功能，其中，SOD 及 GPx 是睪丸主要的抗氧化酵素<sup>(22,23)</sup>。圖四顯示，C 組及 SI 組的 SOD 活性無顯著差異，但高劑量魚油介入 (SHF 組) 之 DSS 誘發腸發炎小鼠 SOD 活性



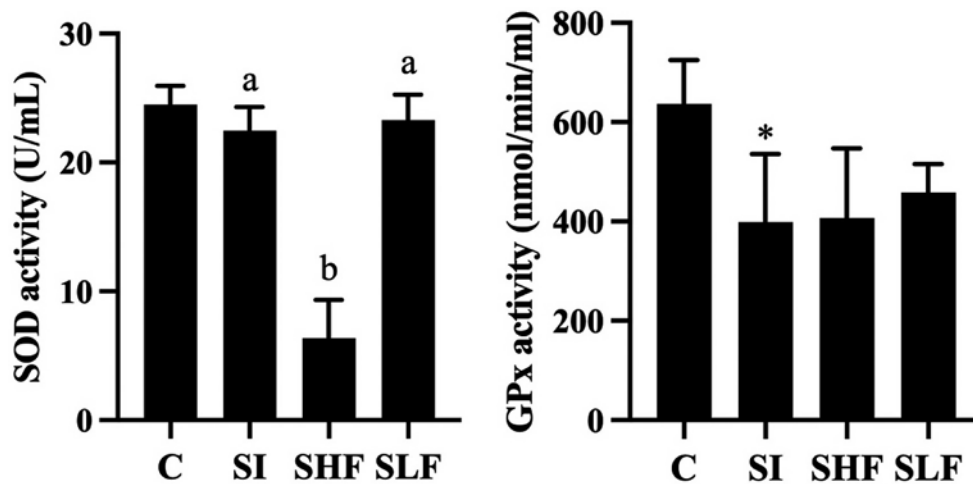
圖三 睪丸 StAR、CYP11A1、3β-HSD 與 CYP17A1 的蛋白質表現

Figure 3. Protein expressions of testicular StAR, CYP11A1, 3β-HSD and CYP17A1.

C: control group; SI, DSS-induced intestinal inflammation with soybean oil group; SHF, DSS-induced intestinal inflammation with high n-3PUFA content (n-6/n-3 ratio: 2:1) group; SLF, DSS-induced intestinal inflammation with low n-3PUFA content (n-6/n-3 ratio: 4:1) group; StAR: steroidogenic acute regulatory protein, CYP11A1: cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 enzyme, 3β-HSD: 3β-hydroxysteroid dehydrogenases and CYP17A1: steroid 17α-monooxygenase.

Data are presented as mean ± SD (n = 6 per group).

\*: Significant different compared with the C group (p < 0.05, Student's t test); <sup>a,b</sup>: Bars not sharing the same letter are statistically significant (p < 0.05, One-way ANOVA with LSD).



圖四 睪丸 SOD 及 GPx 活性

Figure 4. Activities of testicular SOD and GPx.

C: control group; SI, DSS-induced intestinal inflammation with soybean oil group; SHF, DSS-induced intestinal inflammation with high n-3PUFA content (n-6/n-3 ratio: 2:1) group; SLF, DSS-induced intestinal inflammation with low n-3PUFA content (n-6/n-3 ratio: 4:1) group; SOD: superoxide dismutase and GPx: glutathione peroxidase.

Data are presented as mean ± SD (n = 6 per group).

\*: Significant different compared with the C group (p < 0.05, Student's t test); <sup>a,b</sup>: Bars not sharing the same letter are statistically significant (p < 0.05, One-way ANOVA with LSD).

顯著低於無魚油介入 (SI 組) 及低劑量魚油介入 (SLF 組)。另外, SI 組的 GPx 活性顯著低於 C 組, 但兩種劑量的魚油介入無明顯影響。

## 五、睪丸 Bax、Bcl-xL、Caspase 3 與 PARP 的蛋白質表現

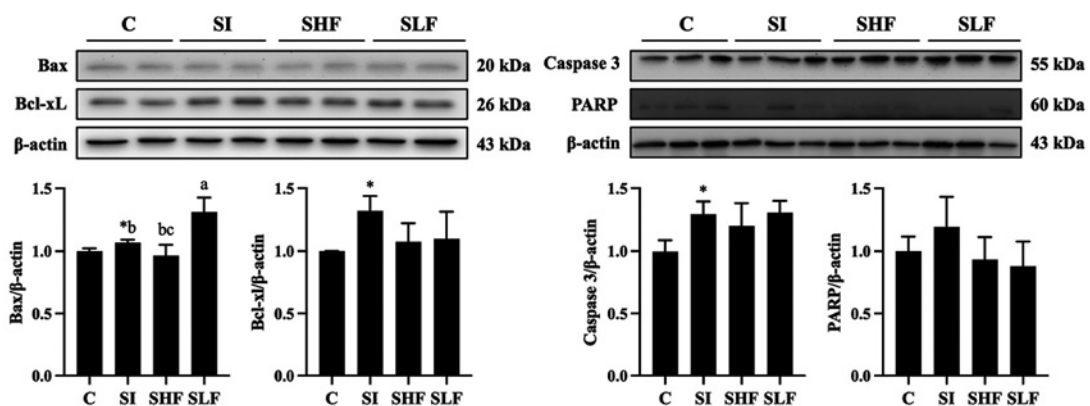
過量活性氧物質會增加氧化壓力, 引發細胞凋亡及發炎反應, 進而損傷睪丸功能<sup>(7)</sup>。由圖五可知, DSS 誘發腸發炎小鼠 (SI 組) 的 Bax、Bcl-xL 與 Caspase 3 蛋白質表現量顯著高於控制組。高劑量魚油介入 (SHF 組) 的促凋亡蛋白 Bax 表現量有降低的趨勢; 高劑量魚油介入 (SHF 組) 的 Bax 表現量則明顯高於 SI 及 SLF 組; 兩種劑量的魚油介入不影響 Bcl-xL 及 Caspase 3 表現量。此外, 有無誘發腸道發炎及魚油介入對 PARP 無顯著影響。

## 六、睪丸 IL-6 及 NF- $\kappa$ B 的蛋白質表現

如圖六所示, DSS 誘發腸發炎小鼠 (SI 組) 的睪丸 IL-6 及 NF- $\kappa$ B 蛋白質表現顯著高於控制組。然而, 雖然高劑量魚油介入 (SHF 組) 對 IL6 表現量和低劑量魚油介入 (SLF 組) 對 NF- $\kappa$ B 表現量皆有降低的趨勢, 兩種劑量的魚油介入對 IL-6 及 NF- $\kappa$ B 表現量無顯著影響。

## 討 論

葡聚糖硫酸鈉因造成之症狀、病變部位與病理表現和結腸炎患者類似且動物死亡率低, 而被廣泛應用於腸炎模式建立, 透過其對腸黏膜上皮細胞之毒性, 破壞腸黏膜層且合併體重減輕、腹瀉與糞便潛血等症狀<sup>(24)</sup>。本實驗使用 2% DSS 誘發 C57BL/6 小鼠腸道發炎, 且在誘發腸道發炎前 14 天開始魚油介入並在誘發後 5 天持續給予魚油, 探討魚油於急性腸道發炎之預防作用, 結果發現腸發炎小鼠結腸灌洗液之促發炎細胞激素濃度顯著上升, 和先前研究結果相似<sup>(15,25)</sup>。免疫細胞分泌之 TNF- $\alpha$ 、IL-6 與 IL-1 $\beta$  可加劇腸黏膜屏障損傷, MCP-1 則會聚集發炎細胞至損傷部位而促使發炎反應上升<sup>(6)</sup>。此外, 腸發炎小鼠之睪丸精子生成受損且睪固酮生成合成酵素 StAR、CYP11A1 與 3 $\beta$ -HSD 蛋白質表現顯著降低, 與先前研究結果相似<sup>(26,27)</sup>。StAR 促進膽固醇進入粒線體內膜, 此過程是睪固酮生成的速率限制步驟; CYP11A1 催化睪固酮生成的起始步驟, 將膽固醇轉換成孕烯醇酮 (pregnenolone); 3 $\beta$ -HSD 將孕烯醇酮轉換成孕酮 (progesterone) 且會參與其他固醇類荷爾蒙生成<sup>(21)</sup>。Parmar 等人的研究發現腸發炎小鼠的睪丸組織睪固酮有降低趨勢<sup>(26)</sup>。此外, 研究指出睪固酮會透過維持血睪障壁 (blood-testis bar-



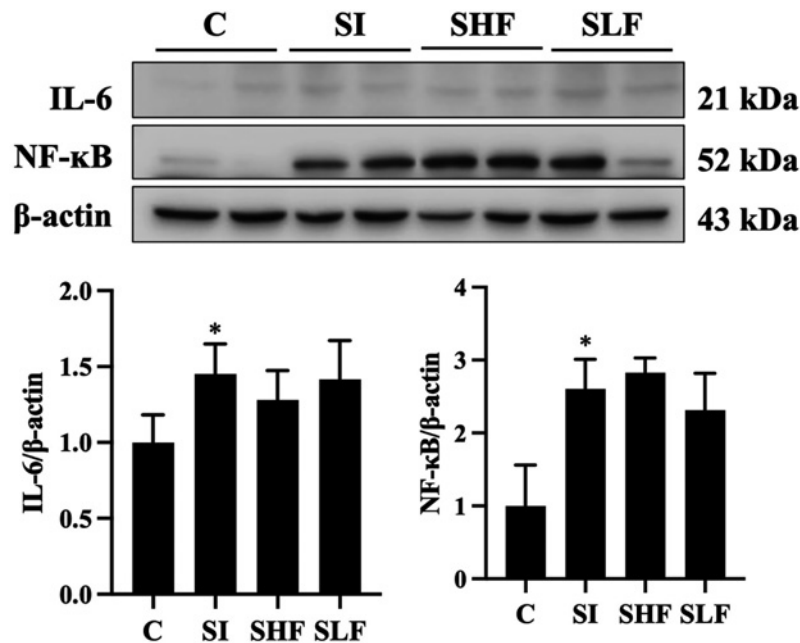
圖五 睪丸 Bax、Bcl-xL、Caspase 3 與 PARP 的蛋白質表現

Figure 5. Protein expressions of testicular Bax, Bcl-xL, Caspase 3 and PARP.

C: control group; SI, DSS-induced intestinal inflammation with soybean oil group; SHF, DSS-induced intestinal inflammation with high n-3PUFA content (n-6/n-3 ratio: 2:1) group; SLF, DSS-induced intestinal inflammation with low n-3PUFA content (n-6/n-3 ratio: 4:1) group; PARP: poly (ADP-ribose) polymerase.

Data are presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 6$  per group).

\*: Significant different compared with the C group ( $p < 0.05$ , Student's t test); <sup>a-c</sup>: Bars not sharing the same letter are statistically significant ( $p < 0.05$ , One-way ANOVA with LSD).



圖六 睪丸 IL-6 及 NF- $\kappa$ B 的蛋白質表現

**Figure 6.** Protein expressions of testicular IL-6 and NF- $\kappa$ B.

C: control group; SI, DSS-induced intestinal inflammation with soybean oil group; SHF, DSS-induced intestinal inflammation with high n-3PUFA content (n-6/n-3 ratio: 2:1) group; SLF, DSS-induced intestinal inflammation with low n-3PUFA content (n-6/n-3 ratio: 4:1) group; IL-6: interleukin-6 and NF- $\kappa$ B: nuclear factor- $\kappa$ B.

Data are presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 6$  per group).

\*: Significant different compared with the C group ( $p < 0.05$ , Student's  $t$  test); <sup>a,b</sup>: Bars not sharing the same letter are statistically significant ( $p < 0.05$ , One-way ANOVA with LSD)

rier)、參與精母細胞減數分裂、長形精細胞黏附於支持細胞與成熟精子釋放以促進精子生成<sup>(19)</sup>，說明睪固酮合成酵素的減少可能藉由降低睪固酮生成而影響精子生成。

發炎反應會生成活性氧物質，正常情況下抗氧化物 (antioxidants) 能維持活性氧物質生成及清除的動態平衡，但抗氧化物不足時活性氧物質持續增加，氧化壓力活化促發炎細胞激素及趨化激素 (chemokines)，增加巨噬細胞活化，引發持續性發炎反應<sup>(28)</sup>。此外，精子為了增加動能會於精子形成 (spermiogenesis) 時移除多餘細胞質而缺乏抗氧化物，且精子細胞膜含有大量不飽和脂肪酸，使其更易受到活性氧物質攻擊<sup>(22)</sup>。本實驗結果發現，腸發炎小鼠睪丸抗氧化酵素 GPx 活性降低，抗細胞凋亡蛋白 Bcl-xL、促細胞凋亡蛋白 Bax 及 Caspase3 與促發炎細胞激素 NF- $\kappa$ B 及 IL-6 的蛋白質表現顯著上調。葡聚糖硫酸鈉誘發之小鼠腸道發炎不僅損傷腸道，腸道免疫細胞活化後增加活性氧物質生成，

引發免疫細胞浸潤 (infiltration)，釋放大量促發炎細胞激素進入血液循環，經肝門靜脈或淋巴系統運送至睪丸動脈，造成睪丸損傷；促發炎細胞激素及浸潤性免疫細胞也會破壞睪丸血睪障壁完整性。此外，此種睪丸損傷源於腸道發炎的繼發作用 (secondary effect) 而非葡聚糖硫酸鈉本身，因葡聚糖硫酸鈉是一帶負電之大分子，無法通過血睪障壁<sup>(26)</sup>，顯示葡聚糖硫酸鈉誘發之小鼠腸道發炎會引發小鼠睪丸發炎反應、氧化還原失衡與細胞凋亡。

由實驗結果可知，兩種劑量魚油介入可顯著降低結腸灌洗液之促發炎細胞激素濃度，和先前研究結果相似<sup>(15,25)</sup>。然而在生殖功能相關指標，儘管低劑量魚油介入可上調睪丸合成酵素 StAR 及 CYP11A1 表現量，高劑量魚油介入則可增加 StAR 表現量，兩種劑量魚油介入的精子生成並無明顯改善效果，由前段敘述可知膽固醇會經 StAR 及 CYP11A1 作用而生成孕烯醇酮，然而魚油介入小鼠 3 $\beta$ -HSD 表現量無顯著提升進而影響孕烯醇酮轉換



成具有活性之固醇類荷爾蒙；此外，睪丸及精子功能除了受睪固酮調節，也會因氧化壓力、細胞凋亡與發炎反應而損傷<sup>(7)</sup>，且兩種劑量魚油介入對於睪丸抗氧化酵素活性的改善效果，促凋亡蛋白及促發炎細胞激素表現量的抑制效果均不明顯，推測可能與魚油使用劑量或魚油 EPA 及 DHA 比例有關，在其他動物實驗結果發現，EPA 能透過調節氧化物及抗氧化物的動態平衡並降低促發炎細胞激素的生成，強化腸黏膜屏障，對於結腸炎的保護效果優於 DHA<sup>(15, 16, 29)</sup>；Rohwer 等人的實驗結果指出，相較於野生型腸炎小鼠，表現 fat-1 基因轉殖腸炎小鼠因內源性產生 n-3 PUFA，其肝臟氧化損傷及發炎顯著降低<sup>(30)</sup>，因此若調整劑量及 EPA 佔比，或許會有較為顯著的抑制效果。

## 結 論

葡聚糖硫酸鈉誘發之腸道發炎會增加結腸灌洗液發炎介質的生成、降低小鼠睪丸精子生成及睪固酮生成相關酵素表現量，可能與氧化壓力、發炎反應與細胞凋亡有關。魚油介入能降低發炎介質產生並改善睪固酮生成相關酵素表現，推測魚油對睪丸功能有輕微保護效果。

## 聲 明

### 一、致謝

不適用

### 二、資金

衛生福利部桃園醫院計畫 PTH10338

### 三、作者的貢獻

研究設計、計畫撰寫及數據統計分析：劉沁瑜、曹智惟和張裕隆

動物實驗與分析執行：張庭嘉、陳怡雯、邱琬淳

病理判讀：曹智惟

### 四、倫理審查並同意參與

不適用

## 五、利益衝突

本文作者聲明無利益衝突

## 參考文獻

1. Wang R, Li Z, Liu S, Zhang D. Global, regional and national burden of inflammatory bowel disease in 204 countries and territories from 1990 to 2019: a systematic analysis based on the Global Burden of Disease Study 2019. *BMJ Open*. 2023; 13: e065186.
2. Yen HH, Weng MT, Tung CC, et al. Epidemiological trend in inflammatory bowel disease in Taiwan from 2001 to 2015: a nationwide populationbased study. *Intest Res*. 2019; 17: 54-62.
3. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Genes and environment: how will our concepts on the pathophysiology of IBD develop in the future? *Dig Dis*. 2010; 28: 395-405.
4. Tian T, Wang Z, Zhang J. Pathomechanisms of oxidative stress in inflammatory bowel disease and potential anti-oxidant therapies. *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 2017: 4535194.
5. Garcia-Carbonell R, Yao SJ, Das S, Guma M. Dysregulation of intestinal epithelial cell RIPK pathways promotes chronic inflammation in the IBD gut. *Front Immunol*. 2019; 10: 1094.
6. Saez A, Herrero-Fernandez B, Gomez-Bris R, Sánchez-Martinez H, Gonzalez-Granado JM. Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease: Innate Immune System. *Int J Mol Sci*. 2023; 24: 1526.
7. Dutta S, Sengupta P, Slama P, Roychoudhury S. Oxidative stress, testicular inflammatory pathways, and male reproduction. *Int J Mol Sci*. 2021; 22: 10043.
8. O' Toole A, Winter D, Friedman S. Review article: the psychosexual impact of inflammatory bowel disease in male patients. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014; 39: 1085-1094.
9. Szathmári M, Vásárhelyi B, Treszl A, Tulassay T, Tulassay Z. Association of dehydroepiandrosterone sulfate and testosterone deficiency with bone turnover in men with inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis*. 2002; 17: 63-66.
10. Nasser M, Haider A, Saad F, Kurtz W, Doros G, Fijak M, Vignozzi L, Gooren L. Testosterone therapy in men with Crohn's disease improves the clinical course of the disease: data from long-term observational registry study. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2015; 22: 111-7.
11. Traish A, Bolanos J, Nair S, Saad F, Morgentaler A. Do Androgens Modulate the Pathophysiological Pathways of Inflammation? Appraising the Contemporary Evidence. *J Clin Med*. 2018;7: 549.
12. Ayaz O, Howlett SE. Testosterone modulates cardiac contraction and calcium homeostasis: cellular and molecular mechanisms. *Biol Sex Differ*. 2015; 6: 9.

13. Calder PC. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br J Clin Pharmacol.* 2013; 75: 645-62.
14. Marton LT, Goulart RA, Carvalho ACA, Barbalho SM. Omega Fatty Acids and Inflammatory Bowel Diseases: An Overview. *Int J Mol Sci.* 2019; 20: 4851.
15. Zhang Z, Xue Z, Yang H, Zhao F, Liu C, Chen J, Lu S, Zou Z, Zhou Y, Zhang X. Differential effects of EPA and DHA on DSS-induced colitis in mice and possible mechanisms involved. *Food Funct.* 2021; 12: 1803-1817.
16. Fang J, Zhang Z, Cheng Y, Yang H, Zhang H, Xue Z, Lu S, Dong Y, Song C, Zhang X, Zhou Y. EPA and DHA differentially coordinate the crosstalk between host and gut microbiota and block DSS-induced colitis in mice by a reinforced colonic mucus barrier. *Food Funct.* 2022; 13: 4399-4420.
17. Safarinejad MR. Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on semen profile and enzymatic anti-oxidant capacity of seminal plasma in infertile men with idiopathic oligoasthenoteratospermia: a double-blind, placebo-controlled, randomised study. *Andrologia.* 2011; 43:38-47.
18. Ciftci O, Cetin A, Aydin M, Kaya K, Oguz F. Fish oil, contained in eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid, attenuates testicular and spermatological damage induced by cisplatin in rats. *Andrologia.* 2014; 46: 1161-8.
19. Smith LB, Walker WH. The regulation of spermatogenesis by androgens. *Semin Cell Dev Biol.* 2014; 30: 2-13.
20. Corradi PF, Corradi RB, Greene LW. Physiology of the hypothalamic pituitary gonadal axis in the male. *Urol Clin North Am.* 2016; 43: 151-62.
21. Ayaz O, Howlett SE. Testosterone modulates cardiac contraction and calcium homeostasis: cellular and molecular mechanisms. *Biol Sex Differ.* 2015; 6: 9.
22. Ribas-Maynou J, Yeste M. Oxidative stress in male infertility: causes, effects in assisted reproductive techniques, and protective support of antioxidants. *Biology (Basel).* 2020; 9: 77.
23. Ayad B, Omolayo TS, Louw N, et al. Oxidative stress and male infertility: Evidence from a research perspective. *Front Reprod Health.* 2022; 4: 822257.
24. Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol.* 2014; 104: 15.25.1-14.
25. Xu Z, Tang H, Huang F, Qiao Z, Wang X, Yang C, Deng Q. Algal Oil Rich in n-3 PUFA Alleviates DSS-Induced Colitis via Regulation of Gut Microbiota and Restoration of Intestinal Barrier. *Front Microbiol.* 2020; 11: 615404.
26. Parmar AR, Trivedi PP, Jena GB. Dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis leads to testicular toxicity in mice: Role of inflammation, oxidative stress and DNA damage. *Reprod Toxicol.* 2014; 49: 171-84.
27. Xiao Y, Xu B, Bordiga M, Li H, Travaglia F, Bai S, Chen J, Bai W. Cyanidin-3-O-Glucoside supplement improves sperm quality and spermatogenesis in a mice model of ulcerative colitis. *Nutrients.* 2022; 14: 984.
28. Li L, Peng P, Ding N, Jia W, Huang C, Tang Y. Oxidative stress, inflammation, gut dysbiosis: What can polyphenols do in inflammatory bowel disease? *Antioxidants.* 2023; 12: 967.
29. El Mahdy RN, Nader MA, Helal MG, Abu-Risha SE, Abdelmageed ME. Eicosapentaenoic acid mitigates ulcerative colitis-induced by acetic acid through modulation of NF- $\kappa$ B and TGF- $\beta$ /EGFR signaling pathways. *Life Sci.* 2023; 327: 121820.
30. Rohwer N, Jelleschitz J, Höhn A, Weber D, Kühl AA, Wang C, Ohno RI, Kampschulte N, Pietzner A, Schebb NH, Weylandt KH, Grune T. Prevention of colitis-induced liver oxidative stress and inflammation in a transgenic mouse model with increased omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Redox Biol.* 2023; 64: 102803.

# 魚油對葡聚糖硫酸鈉誘發腸道發炎 小鼠睪丸功能之影響

曹智惟<sup>1</sup> 張裕隆<sup>2</sup> 邱琬淳<sup>3,4,5</sup> 張庭嘉<sup>6</sup> 陳怡雯<sup>6</sup> 劉沁瑜<sup>6\*</sup>

<sup>1</sup>三軍總醫院外科部泌尿外科

<sup>2</sup>衛生福利部桃園醫院泌尿外科

<sup>3</sup>臺北醫學大學保健營養學系

<sup>4</sup>臺北醫學大學高齡營養研究中心

<sup>5</sup>臺北市市立萬芳醫院營養室

<sup>6</sup>輔仁大學營養科學系

(收稿日期：112 年 09 月 05 日。接受日期：112 年 11 月 6 日)

**摘要** 發炎性腸道疾病發生率逐年增加，且好發於 20-39 歲成人，然而少有研究探討腸道發炎反應對於生殖功能之影響。魚油富含 n-3 脂肪酸，可調節發炎反應，因此本研究探討魚油補充對葡聚糖硫酸鈉誘發腸道發炎小鼠睪丸功能的影響及調節機轉。小鼠隨機分為控制組、腸發炎組、腸發炎補充低劑量魚油組與腸發炎補充高劑量魚油組。魚油補充 2 週後，連續 5 天於小鼠飲用水添加 2% 葡聚糖硫酸鈉誘發腸道發炎，換回一般飲用水 5 天後犧牲。結果顯示，腸發炎小鼠結腸灌洗液的促發炎細胞激素濃度增加，精子生成受損且睪固酮合成相關酵素蛋白質表現顯著降低，睪丸 GPx 活性減少且 Bax、Bcl-xl、Caspase 3、IL-6 與 NF-κB 表現量顯著增加。補充低劑量及高劑量魚油可顯著降低促發炎細胞激素濃度，雖對精子生成無顯著影響，但可上調睪固酮合成相關酵素表現量，然而對細胞凋亡及發炎反應相關因子表現量無顯著效果，僅有降低趨勢。綜上所述，腸發炎小鼠腸道內發炎介質生成增加，睪丸功能受損，且睪丸氧化壓力、細胞凋亡與發炎反應增加，而補充魚油可減少腸道內發炎介質產生並輕微減緩睪丸功能損傷。

**關鍵字：**葡聚糖硫酸鈉、腸道發炎、睪丸功能、魚油

\* 通訊作者：劉沁瑜

通訊地址：新北市新莊區中正路 510 號

電話：02-29053147

電子郵件：nf351.lab@gmail.com