

中華民國第 59 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學科

052006

蜂膠是自由基的剋星嗎？

學校名稱：桃園市立內壢高級中等學校

作者： 高二 陳倩儀	指導老師： 楊璧如
-------------------	------------------

關鍵詞：蜂膠、活性氧化物質(ROS)、同源重組

摘要

蜂膠 (Propolis) 常作為健康食品，但目前科學文獻中均未提供充分證據證明食用蜂膠是否可保護人類細胞 DNA 免於氧化性損傷，故本專題目的是探討添加蜂膠是否能保護人類 HepG2 細胞免於 DNA 氧化性損傷。以細胞存活率分析 (MTT assay) 得知添加蜂膠可增加細胞存活率，並以細胞內活性氧物質之測定法 (intracellular reactive oxygen species, ROS) 得知蜂膠可降低 HepG2 細胞因 H_2O_2 傷害所產生的 ROS 量。再以單細胞凝膠電泳實驗 (Single Cell Gel Electrophoresis assay, Comet assay) 發現蜂膠減緩 H_2O_2 對細胞所造成的雙股斷裂損傷；最後從同源重組活性測試 (Homologous Recombination Assay Kit, HR) 觀察到細胞單獨以蜂膠處理，HR 活性未明顯增加。

因此，推測蜂膠可能對於 H_2O_2 所導致的氧化性 DNA 損傷具保護機制，但不具修復 DNA 損傷之作用，主要可能因蜂膠具抗氧化性而抑制肝臟內 cytochrome P450 酵素活性，因而無法產生 ROS 有關。

壹、研究動機

人體在代謝過程或是經紫外線輻射照射後都可能會產生自由基造成細胞受損，因而造成 DNA 損傷或是細胞突變。而食用蜂膠有益身體健康，所以蜂膠常被作為膠囊、滴劑等健康食品。蜂膠內主要成分為黃酮類化合物 (flavonoid)，具有抗氧化、抗炎的作用，可以清除自由基，亦能調節血糖、血脂和降血壓，也具抗菌和提高機體免疫力等功能。(Pasupulefi 2017, Sforcin 2016, Kamiya 2012, Tsai 2011, Barlak 2011, Pereira 2008) 故本研究在探討蜂膠是否能保護人類細胞在加入自由基後使 DNA 免於氧化性損傷，查詢後發現目前科學文獻紀錄中均未提供充分證據證明食用蜂膠可保護人類細胞 DNA 免於氧化性損傷；而再查詢一些蜂膠修復 DNA 的相關文獻，發現有一篇的文獻指出蜂膠中的類黃酮可促進前列腺癌細胞氧化性 DNA 之修補酵素活性，以防止細胞突變 (Gao, 2006)；但有另一篇文獻中說以蜂膠處理後的纖維細胞並未促進氧化性 DNA 的修補酵素表現 (Turan, 2015)，這也使我想要了解蜂膠到底是否能修復已受損的人類細胞 DNA。

因此，本實驗中最主要是探討 HepG2 細胞經過蜂膠前處理後，蜂膠是否能保護 DNA 免於氧化性損傷的功能，並促進 DNA 修復；以及探討蜂膠對於 HepG2 細胞 DNA 修復之影響和保護機制。

貳、研究目的

我們現在還無法完全了解蜂膠對於 DNA 保護與修復機制中的作用，所以這項研究主要是探討添加蜂膠是否可以減緩 H_2O_2 對人類 HepG2 細胞所造成的 DNA 氧化和 DNA 修復之影響。

一、研究蜂膠對於 H_2O_2 處理之 HepG2 細胞存活率的影響

我們利用細胞存活率分析實驗測定細胞先經蜂膠前處理後再添加 H_2O_2 和單獨以 H_2O_2 處理細胞存活率的影響，探討在蜂膠前處理下是否能提升在 H_2O_2 存在的情況下 HepG2 細胞的存活率。

二、研究蜂膠前處理是否能夠抑制 ROS 產生

我們以細胞內活性氧物質之測定法用 H2 DCFDA 染色檢測有蜂膠處理與沒有蜂膠處理的 HepG2 細胞經過 H_2O_2 處理後所產生的 ROS 量。

三、研究蜂膠前處理是否可以降低在 H_2O_2 處理下導致的 DNA 損傷

利用單細胞凝膠電泳實驗的中性實驗，檢測細胞損傷程度並確認 HepG2 細胞在有蜂膠處理下，是否能減少細胞損傷和雙股斷裂情形。

四、探討蜂膠對 H_2O_2 基因毒性的保護作用的機制

為了探討蜂膠保護細胞免於氧化劑 H_2O_2 所造成細胞 DNA 損傷的機制，以同源重組活性測試檢測蜂膠前處理對 H_2O_2 導致 HepG2 細胞同源重組是否有影響，而同源重組已被文獻證明可保護 DNA 雙股斷裂損傷。

參、研究設備器材

一、研究器材

名稱	備註
離心機	購自 Thermo Fisher Scientific
細胞培養箱	購自 Thermo Fisher Scientific
光學顯微鏡	購自 聖川光學儀器公司
螢光顯微鏡	購自 聖川光學儀器公司
無菌操作台	購自 力明儀器有限公司
電泳槽	購自 Bio-Rad Laboratories
96 格孔盤、24 格孔盤、6 格孔盤	
直徑 6cm 培養皿、直徑 13cm 培養皿	
離心管	
電磁加熱攪拌器	
數值式吸管	
微量分注器 (Pipette)	
微量天平	
量筒	
稱量紙	
試管	
純水製造機	
-80°C 冰箱	
4°C 冰箱	
搖晃盤	
酵素免疫分析測讀儀	

載玻片	
黑色盒子	
刮杓	
微波爐	
酒精燈	
電腦	
冰塊	

二、藥品試劑及細胞

名稱	備註
Alkaline buffer	自行配置
Lysis buffer	自行配置
Agarose (Low Melting Agarose)	購自 Life Technologies
Agarose-AG050 (Normal Melting Agarose)	購自 Life Technologies
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	購自 Sigma
Methanol	購自 景明化工有限公司
Homologous Recombination Assay Kit	購自 Norgen
Octyl phenol ethoxylate (Triton X-100)	購自 J.T. baker
SYBR Green 染劑	購自 QIAGEN
蜂膠 (Propolis)	廠牌 ICN Biomedicals
肝癌細胞株 (Hep G2)	購自 食品工業發展研究所生物資源保存 及研究中心
Trypan blue solution	
Trypsin-EDTA	

PBS (Phosphate buffered saline) MTT MEM (Minimum Essential Medium) Tris buffer 酒精 無菌二次水 小牛血清	
--	--

(一)Alkaline buffer (pH>13)

藥品	備註
EDTA	0.3724g
NaOH	12g
無菌二次水	定量至 1L (冷藏 12 小時後再調整 pH)

(二)Lysis buffer (pH=8~10)

藥品	備註
1M Tris-HCl	2ml
5M NaCl	100ml
0.5M EDTA	40ml
Triton-X100	2ml
無菌二次水	56ml

三、輔助軟體

(一) Graphpad prism 軟體

一種統計作圖的軟體，多用於生物統計以及醫學數據分析，可以直接輸入實驗的原始數據，此軟體就會自動進行基本的生物統計，再選擇我們所需要的圖表類型，就會繪出此數據的科學圖表。

(二) Comets score 軟體

一種彗星評分系統，用以測量及評估來確定 DNA 損傷的程度，而 DNA 損傷是以慧頭和彗尾的位置來進行分析，尾部的 DNA 百分比含量 (%DNA tail) 和尾部瞬間 (tail moment) 兩者是分析結果的重要參數，樣本中我分析 100 個細胞，在 DNA 損傷圖中標註尾部瞬間 (tail moment) 圖出來，可以再和 DNA 位移進行對比，然後來計算結果。

1. 尾部 DNA 的百分比 (%DNA tail)：

尾部總強度和彗星總強度 (頭尾一起) 比值。(尾部的 %DNA = 尾部的總強度 / 彗星的總強度 X 100)

2. 尾距：

定義為尾長和尾部 DNA 百分比的乘積。(尾距 = 尾巴長度 X %DNA 尾巴)

肆、實驗步驟

一、研究方法步驟

(一) 細胞培養

1. 解凍 HepG2 細胞

從液態氮取出 HepG2 細胞後，將細胞冷凍管放置於 37°C 的水浴槽進行回溫，之後再種入培養皿中，將細胞培養於 10% PBS 和 1% 的 MEM 培養基中，並置於 37°C 含 5% CO₂ 的恆溫培養箱中，當細胞生長到高密度狀態時，需要收集細胞並分殖至新的培養皿中進行細胞繼代。

2. 繼代及培養 HepG2 細胞

- (1) 吸掉原先培養皿上舊的細胞培養液，以 PBS 5ml 清洗 2 次，除去殘留的培養液。
- (2) 各培養皿加入 1ml 0.25% Trypsin-EDTA，之後放置 37°C 培養箱作用 3 分鐘，使原本貼附於底盤的細胞懸浮。
- (3) 加入適量含血清蛋白之新鮮培養液終止 Trypsin-EDTA 對細胞作用，並將細胞懸浮液移置離心管中，離心 1000rpm，5 分鐘。
- (4) 去除離心後的上清液，加入 3ml 的培養液，並打散沉澱細胞。
- (5) 將細胞均勻打散後，取 10ul 的細胞液並加入 10ul 0.4% Trypan blue solution 染色並混和均勻，再將總共 20ul 之混和液，加至血球計數盤中，以顯微鏡觀察並計數細胞量。
- (6) 接種細胞至新的 10cm³ 的培養皿中，水平搖晃使細胞均勻分布，再放回 37°C 培養箱。

(二)細胞存活率分析

用於生物活性因子的活性檢測、大規模的抗腫瘤藥物篩選、細胞毒性試驗以及腫瘤放射敏感性測定等。

1. 原理

MTT 是一種黃色化合物，可作用於活細胞粒線體中，其中粒線體中的琥珀酸去氫酶 (Succinic acid dehydrogenase ; SDH) 具有切斷 MTT 結構上之四氮唑環 (tetrazolium ring)使它裂開，再將其代謝轉化為非水溶性藍紫色的甲臞 (Formazan) 結晶，並沉澱在細胞之中，再以 DMSO 溶液溶解細胞中的甲臞，之後再用酵素免疫分析測讀儀 (ELISA reader)測定其吸光值，就可知道活細胞的數量。死細胞不會有上述反應，也就是說，正常的細胞 SDH 表現量會增加，產生相對數量的甲臞，只要將甲臞溶出並測定其含量，即可得知細胞的存活率。

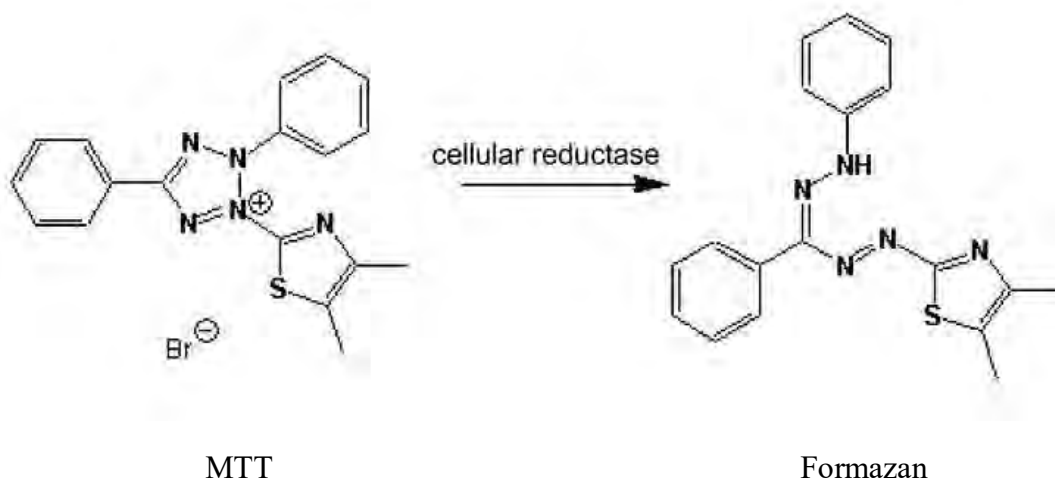


圖 1.MTT Reduction

2. 步驟

(三) 細胞內活性氧化物質測定

DCFH-DA 進入細胞後會先被細胞質內的酯解酶 (Esterase) 水解，形成 2',7'-dichlorofluorescein DCFH (Dichlorodihydrofluorescein)，然後再與細胞內的 H_2O_2 作反應而被還原成具螢光的 2',7'-dichlorofluorescein DCF (Dichlorofluorescein)，利用螢光定量儀 (VersaFluor Fluorometer System) 激發光 485 nm，散發光 535 nm 的條件下可測定其吸光值，偵測到的螢光強度越強，表示細胞內 H_2O_2 的產量也越多。

2. 步驟

(1) DCFH-DA solution 配置:

- a. 秤取 DCFH-DA 40mg 以 1ml DMSO 溶解
- b. 再以 PBS 稀釋 10 倍
- c. 避光 4°C，儲存

(2) 以 2×10^5 /ml 之細胞數接種於 24 孔盤培養皿，細胞培養 12 小時。

(3) 去除上清液，加入 1x PBS 清洗 2 次。

(4) 取 0.1 ml 之 DCFH-DA solution 加至每個孔盤中，放置於 37 °C 細胞培養箱 (避光 30 分鐘)。

(5) 1x PBS 清洗 2 次，利用 0.25% Trypsin 將細胞切下。

(6) 移至 15ml 離心管中離心，1000 rpm 5 分鐘。

(7) 懸浮取至 1.5ml Eppendorf。

(8) 分別加入 Control、100uM H_2O_2 、10ug/ml propolis 和 100uM H_2O_2 + 10ug/ml propolis，且每管均有加入 DMSO，並分別在 15、30、60、90、120 分鐘下作用。

(9) 去上清，再以 1ml 1x PBS 清洗，重複 2 次後。

(10) 最後加入 1 ml 1x PBS 回溶細胞並打散使細胞懸浮。

(11) 利用螢光定量儀檢測其吸光值 (條件為激發光 485 nm，散發光 535 nm)。

(四) 單細胞凝膠電泳實驗

又稱彗星試驗，廣泛地應用於 DNA 放射損傷、DNA 剪切損傷、DNA 交聯的檢測、藥物的遺傳毒性評價和細胞凋亡鑒定等工作中。

1.原理

在細胞裂解液作用下，細胞 DNA 受到損傷產生斷裂，其結構也就會變得十分鬆散使細胞內的 RNA、蛋白質及其他成分進入凝膠中，只剩核 DNA 仍在剩餘的核骨架上，此時利用 DNA 帶負電的原理，由負極往正極移動，在強鹼溶液進行電泳實驗，而受到損傷而斷裂的 DNA 片段就會容易被電泳拖離細胞核，最後再加入 SYBR Green 染劑與 DNA 結合，經染色後帶有綠色光，在螢光顯微鏡下觀察和分析，判定細胞 DNA 損傷之程度。

2. 步驟

(1) 收細胞

(2) 製作下層膠

取 60ul(LMA+NMA) 混合液，加入彗星試驗專用玻片 (comet slide well) 中，盡快把蓋玻片蓋上混合液，避免其快速冷卻而造成下膠不均勻，後放置冰塊上，使其凝固。

(3) 上膠 LMA 與細胞混合

將 10ul 細胞與 55ul LMA 上膠混合，先將原先蓋於下膠的玻片輕輕拿起，再滴入混和溶液，並再蓋上蓋玻片，待其凝固。

(4) 裂解與電泳分離斷裂 DNA

- 將彗星試驗專用玻片整齊擺放於黑色盒子中，加入 Lysis buffer (pH=7.0)，淹沒玻片為準，反應時間 4℃ 60 分鐘。
- 取出彗星試驗專用玻片，拿起玻片並以二次水輕輕沖洗，避免沖毀上下膠
- 準備電泳槽在冰盒中，並加入中性緩衝液，把彗星試驗專用玻片整齊擺放在電泳槽中央檯子上，靜置 40 分鐘。 電泳條件: 30 分鐘 300 mA 15V 兩電極間距
- 跑完中性電泳實驗後要用 1ml tris-HCl 覆蓋住膠，反應時間 5 分鐘，再用水清洗，再以 PBS 沖洗，每隔 5 分鐘 1 輪，要輪 3 次，最後用甲醇 (methanol) 滴到彗星試驗專用玻片上再用二次水沖過 1 遍。

(5) SYBR Green 染色

拿出彗星試驗專用玻片放在吸水紙上加入已稀釋 1000 倍 SYBR Green 30ul，蓋上玻片 (避光)。利用螢光顯微鏡觀察 DNA 拖尾現象。

(6) 以 Comets score 軟體進行分析

(五) 同源重組活性測試

常被應用在人工分子生物學的技術中，以此方法了解並建構遺傳工程生物體等用途。

1.原理

真核細胞發生 DNA 損傷時，會啟動自身 DNA 損傷反應，而同源重組是發生於 DNA 雙股斷裂時其中一種 DNA 修補的形式之一。實驗套組中的陽性對照質粒 (Positive Control plasmid) 帶有完整的半乳糖苷酶基因序列 (*lacZ*)，dl-1與 dl-2 質體 (plasmid) 則是 *lacZ* 序列中不同位置的基因突變，待轉染至細胞中，若具有同源重組性則會將 dl-1 與 dl-2 進行同源互換，最後形成兩種型態的質體，一種為一個質體但具有兩個變異位置，另一種為沒有變異並且帶有完整序列之 *lacZ*，因此在實驗組別設計上，陽性對照正控制組只需要轉染陽性對照質粒、NC 負控制組轉染 dl-1 或 dl-2 其中一組質體、其他實驗組別則是轉染 dl-1 及 dl-2 兩種質體 DNA，轉染和細胞處理完畢後，抽出質體 DNA 後，利用套組提供之引子測定 (assay primer) 設計去放大 *lacZ* 基因，進行 PCR 分析。

2.步驟

- (1) 準備 HepG2 細胞或轉染試劑
- (2) 細胞計數 2×10^5 cell/ml，接種於 24 孔盤培養皿，以 37°C 培養一整晚
- (3) 依照不同實驗設計處理細胞 (以 10ug / ml 蜂膠預處理 HepG2 細胞 1 小時，再以 H₂O₂ 培養 24 小時)，實驗組分別為樣本、陽性對照組 (PC)、陰性對照組 (NC) 和加藥處理組

- a. 樣本: 使用 0.5ug (10ul) 的 dl 質體 (dl-1 和 dl-2) +1ul 轉染試劑並在轉染整個混合物之前充分混合。
- b. 陽性對照樣品: 使用 0.5ug (10ul) dl 質體 + 1ul 轉染試劑陽性對照質體。
- c. 陰性對照: 分別使用 0.5ug(10ul) dl 質體 + 1ul 轉染試劑的 dl 質體在單獨的轉染中。

(4) 轉染時間 (最短 12 小時)

(5) 轉染和細胞處理完畢後，抽出質體 DNA

(6) 利用 kit 提供之 assay primer 設計去放大基因 *lacZ*

(7) 聚合酶連鎖反應 (PCR) 分析

95°C 預變性 3 分鐘，然後 95°C 15 秒，61°C 30 秒，72°C 1 分鐘，重複 35 個循環，最後在 72°C 延伸 5 分鐘。

(六) 生物統計

1. t 檢定

t 檢定是最常用來判斷差異的統計方法，以理論來推斷差異發生的概率，要比較兩組資料和平均數是否具有顯著差異。

伍、實驗結果與討論

一、研究蜂膠預處理是否可以提升以 H₂O₂ 處理 HepG2 肝細胞後之活力

(一)以細胞存活率分析測定蜂膠前處理下是否會影響 HepG2 細胞的存活率

分別以 0ug/ml、2.5 ug/ml、5 ug/ml、10 ug/m、20 ug/ml 蜂膠前處理 HepG2 細胞，其結果可知 (圖 1)，HepG2 細胞在 10 ug/ml 以下蜂膠處理下的存活率與控制組 (不加蜂膠) 比較，並無顯著差異 ($p > 0.05$)，表示 HepG2 細胞在這些蜂膠濃度處理下，對細胞無毒性。而我主要選擇以 10ug/ml 的蜂膠進行以下實驗。

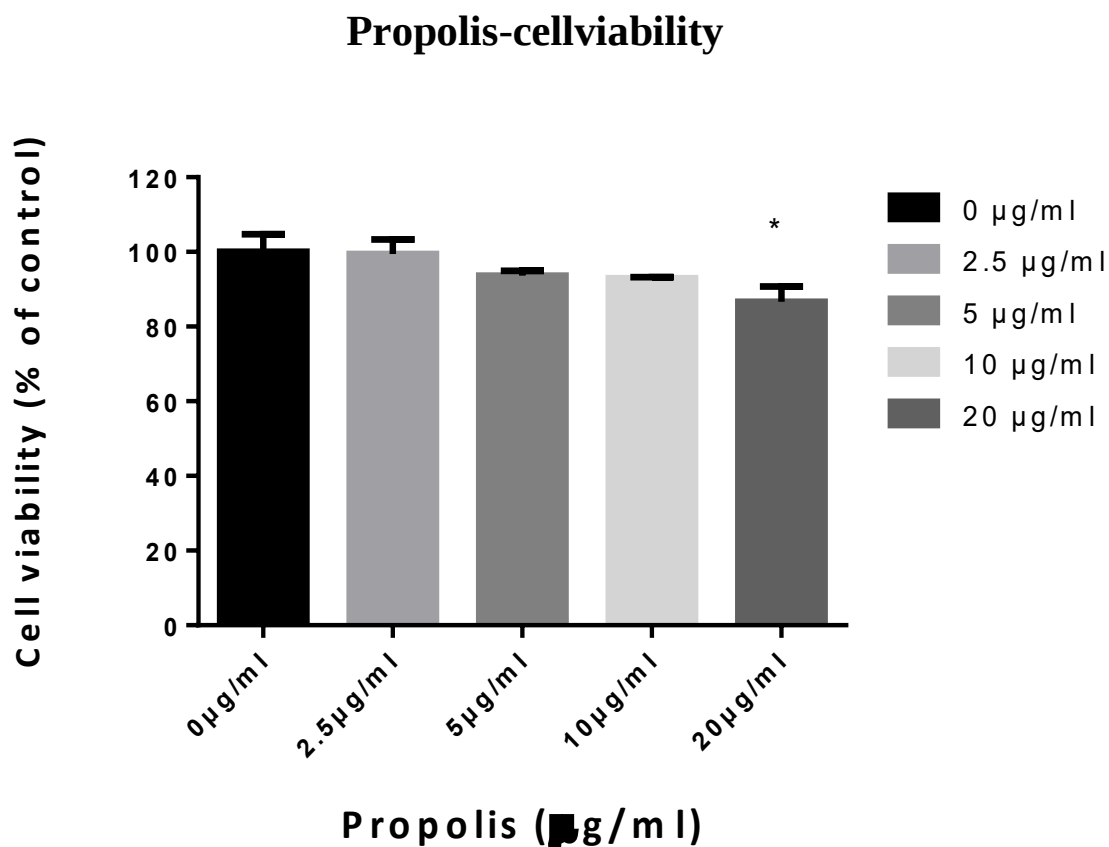


圖 1. 蜂膠對 HepG2 細胞存活率的影響

經 MTT 測定法測量，以不同濃度蜂膠處理 HepG2 細胞實驗設計下培養 24 小時之存活率。所有值均為三次獨立實驗中獲得的結果的平均值±SD。* p < 0.001

(二)研究蜂膠對 H₂O₂ 所導致 HepG2 細胞毒性的保護作用

我選擇使用 H₂O₂ 是因為 H₂O₂ 除了平時作為生活中的氧化劑，可用於殺菌及外用的醫療用途外，在人體代謝中會產生 H₂O₂ 等自由基與活性氧，而如果產生過多的自由基時，就會對人體進行氧化傷害。而且 H₂O₂ 比其他氧化物更為穩定，常作為實驗用途。圖示以 Control 訂為 100%，其餘實驗組為相對應百分比表示。實驗分別有 Control、10ug/ml 蜂膠、100uM H₂O₂ 和 10ug/ml 蜂膠和 100uM H₂O₂ 共同處理四組，由圖 2 可以發現，只有用 100uM H₂O₂ 下，細胞活存率明顯降低，但可以明顯觀察到在 10ug/ml 蜂膠預先處理細胞後，確實可以減少 H₂O₂ 對 HepG2 細胞的損傷。該結果使我們了解蜂膠具有可降低 H₂O₂ 造成 HepG2 細胞的毒性之保護作用。

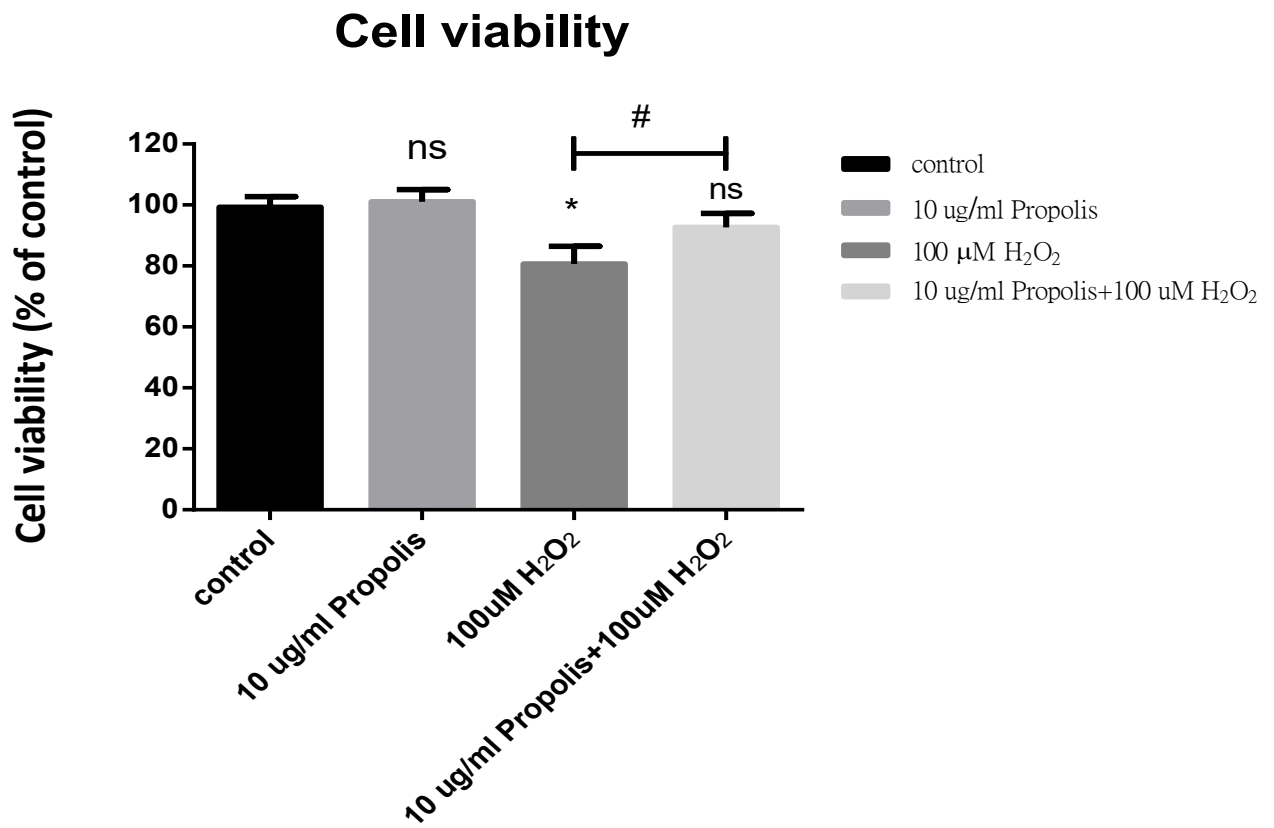


圖 2. 蜂膠對 H₂O₂ 誘導細胞毒性的影響

通過 MTT 測定法測量 HepG2 細胞的細胞存活率，以 10ug/ml 蜂膠預處理 HepG2 細胞 1 小時，再以 H₂O₂ 培養 24 小時。所有值均為三次相同實驗的平均值±SD。ns 表示與控制組相比無差異，* p < 0.001，# p < 0.001, H₂O₂ 與 propolis + H₂O₂

二、研究蜂膠預處理是否可以抑制 H₂O₂ 暴露期間所造成 HepG2 細胞的 ROS 產生

我們以細胞內活性氧物質之測定法研究有蜂膠和無蜂膠處理的 HepG2 細胞經 H₂O₂ 誘導所產生 ROS 的量。以 Control、100uM H₂O₂、10ug/ml propolis 和 100uM H₂O₂ + 10ug/ml propolis 四組實驗作為比較（圖 3），可以發現控制組和 10ug/ml propolis 這兩組，有添加蜂膠可以減少 ROS 產生；而我們也可以發現 100uM H₂O₂ 和 10ug/ml propolis + 100uM H₂O₂ 這兩組，添加蜂膠明顯可以抑制 H₂O₂ 對細胞所產生的 ROS 量。我觀察到只要有添加 10ug/ml propolis 的實驗組，不管在 15、30、60、90 和 120 分鐘皆能抑制 HepG2

細胞在 H_2O_2 下所產生的 ROS，這些結果提供了蜂膠可以抑制 ROS 升高的證據，有報導指出蜂膠成分之一為多酚 (polyphenol)，具有抗氧化作用 (Turan, 2015)，推測蜂膠可以清除 H_2O_2 ，降低對細胞毒性影響。

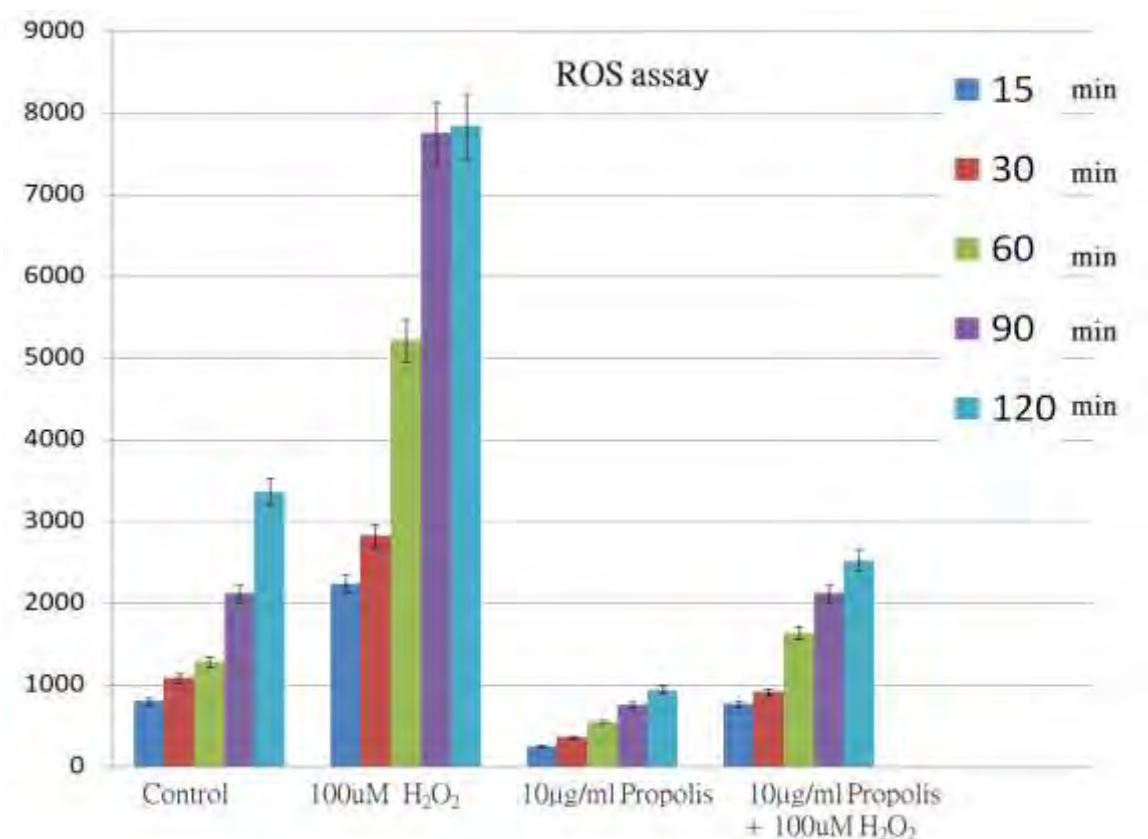


圖 3. 蜂膠前處理對 H_2O_2 造成 HepG2 細胞產生 ROS 之影響

使用 DCFDA 對 HepG2 細胞評估 ROS 量。在用與不用蜂膠前處理下，以 Control、100uM H_2O_2 、10ug/ml propolis 和 10ug/ml propolis + 100uM H_2O_2 四組實驗設計分別以 15、30、60、90 和 120 分鐘處理細胞。所有值均為進行的三次相同實驗的平均值 $\pm$ SD。

三、研究蜂膠前處理是否可以降低 HepG2 細胞在 H_2O_2 處理後導致之雙股 DNA 損傷

(一)蜂膠前處理 HepG2 細胞是否可以降低在 H_2O_2 下導致的雙股 DNA 損傷，以及其損傷程度
彗星試驗已被常用來檢測待測物質是否具有基因毒性，為一種具有高度準確性，快速性和成本低方法 (Glei, 2016)。所得結果以 %DNA tail 也就是指尾部的總強度/彗星的總強度的百分比，或是彗尾 DNA 的光密度和細胞 DNA 的光密度比值表示。以 Control、10ug/ml Propolis、100uM H_2O_2 、和 10ug/ml propolis + 100uM H_2O_2 四組實驗作為比較，而

由圖4可以看到，以 100 μ M H₂O₂ 處理後細胞的 %DNA tail 百分比最多，代表拖尾的現象最為嚴重。而拖尾情形越嚴重，尾部的總強度 (彗尾 DNA 的光密度) 也就愈大，表示過氧化氫對 HepG2 細胞的損傷十分嚴重。而在 Control 和只有 10 μ g/ml Propolis 處理之下，對 HepG2 細胞的影響不大，因為其 %DNA tail 都在 5% 以內，表示拖尾情形輕。從 10 μ g/ml Propolis +100 μ M H₂O₂ 與 100 μ M H₂O₂ 比較中，可以清楚看到 %DNA tail 的差距明顯，蜂膠確實減少了 H₂O₂ 對細胞的損傷。

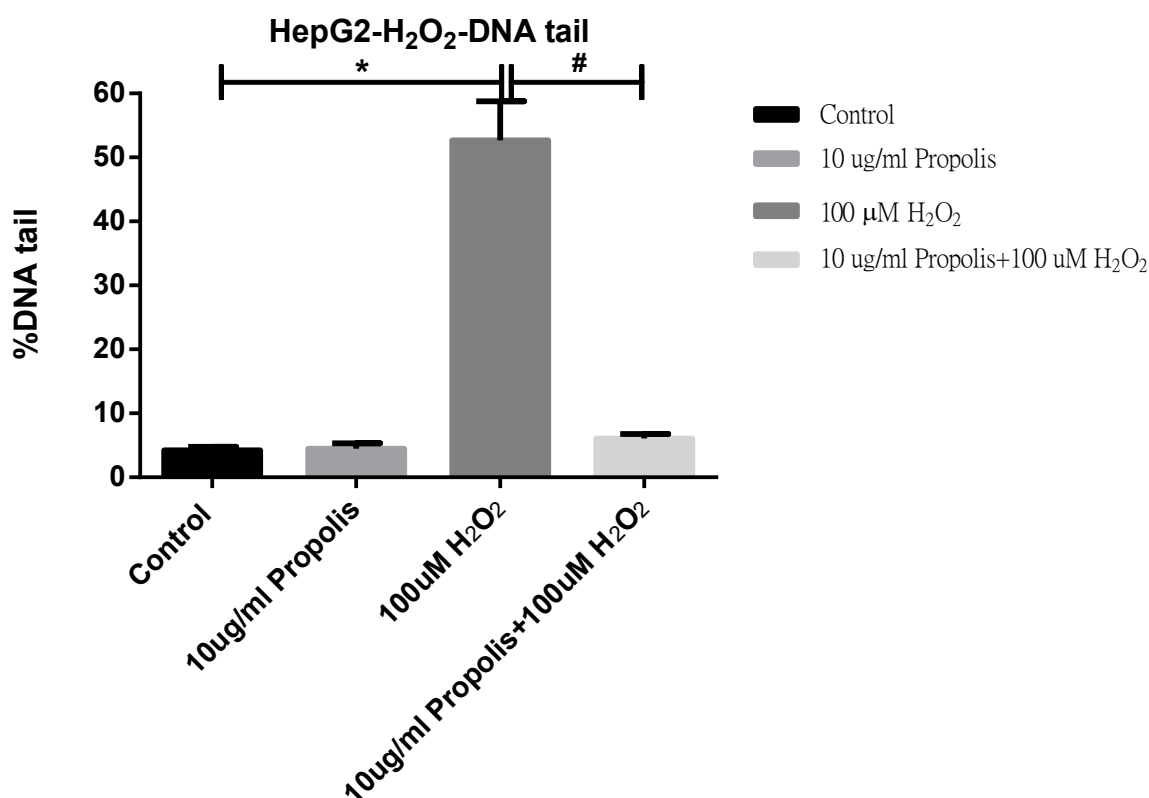


圖 4. 蜂膠前處理對 H₂O₂ 造成 HepG2 細胞彗星試驗 %DNA tail 的影響

在彗星試驗的樣本中每一次分析 100 個細胞，在 DNA 損傷圖中標註尾部拖尾的距離，然後再來計算 HepG2 細胞在各個實驗組的 %DNA tail 結果。所有值均為進行的三次相同實驗的平均值 $\pm$ SD。* $p < 0.001$ 與對照相比，# $p < 0.001$, H₂O₂ 與 propolis + H₂O₂

彗星試驗的 tail moment (尾距) 也就是 %DNA tail 和尾巴長度的乘積，數值越大，表示損傷情形越嚴重，因此可以看到 100 μ M H₂O₂ 百分比依然為最高 (圖5)，而 Control 和 10 μ g/ml

Propolis 處理之下，對 HepG2 細胞的影響亦不明顯。最後，比較 100uM H₂O₂ 與 10ug/ml Propolis+100uM H₂O₂，也可以明顯觀察到，添加蜂膠會使 tail moment 的百分比降低，雖然還無法到達完全無損傷的狀況，但從圖中可以知道蜂膠能夠幫助細胞減輕受損的情形。從 (圖 4) 和 (圖 5) 中觀察的結果得知蜂膠確實具有抗氧化之功效，可以保護 HepG2 細胞免於 H₂O₂ 所導致的基因損傷。

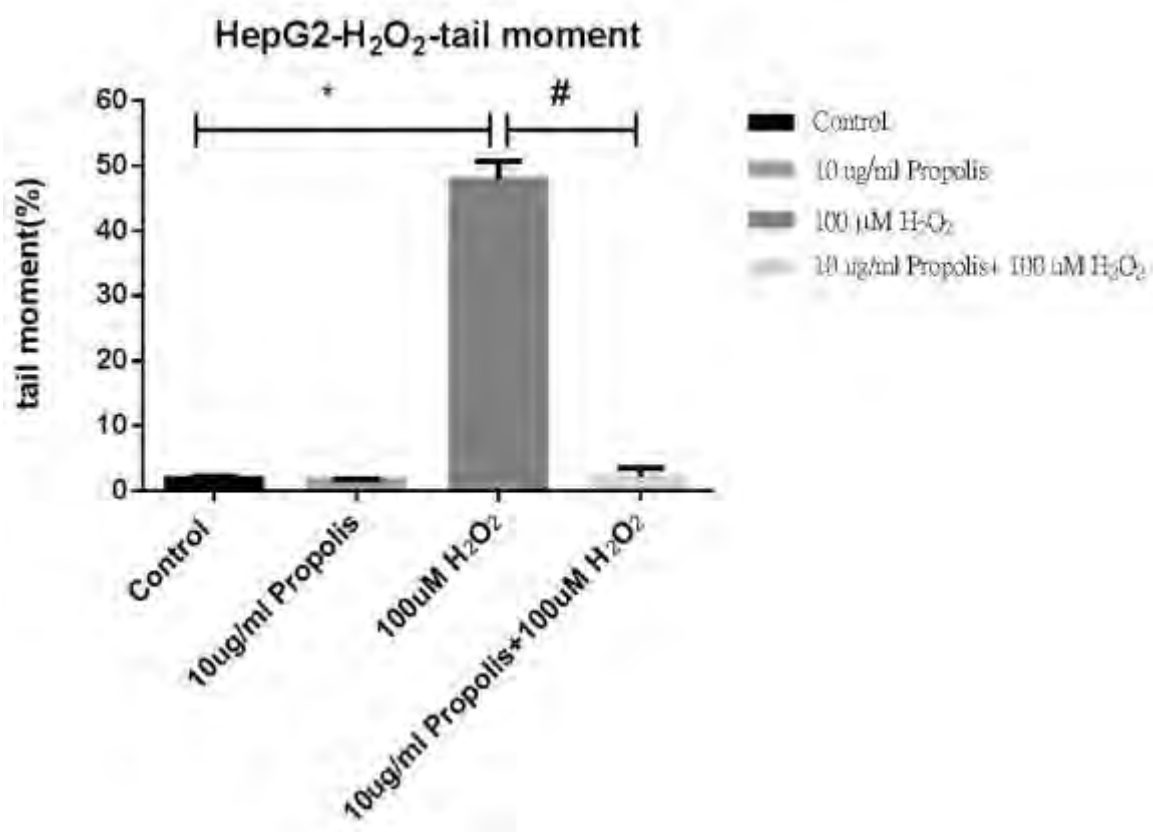


圖 5. 蜂膠前處理對 H₂O₂ 造成 HepG2 細胞彗星試驗 tail moment 的影響

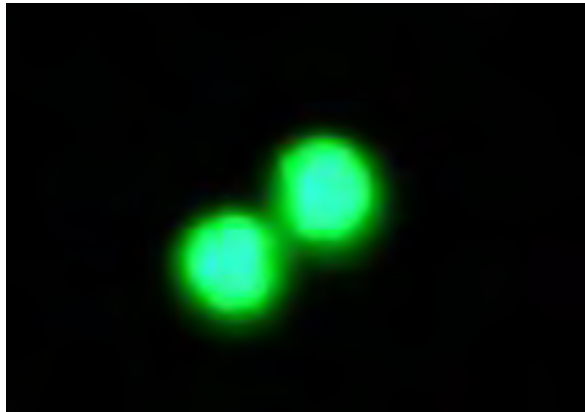
在彗星試驗的樣本中每一次分析 100 個細胞，在 DNA 損傷圖中標註尾部瞬間 (tail moment) 圖出來，之後和 DNA 位移進行對比，再來計算 HepG2 細胞在各個實驗組的 tail moment 結果。所有值均為進行的三次相同實驗的平均值±SD。*p < 0.001 與對照相比，# p < 0.001, H₂O₂ 與 propolis + H₂O₂

以上的這些結果提供了蜂膠可以降低 DNA 損傷的證據，其也提供了針對抑制 H₂O₂ 對細胞造成損害可能的保護機制。

(二)確定蜂膠在 H₂O₂ 誘導的氧化性 DNA 損傷中所扮演的角色

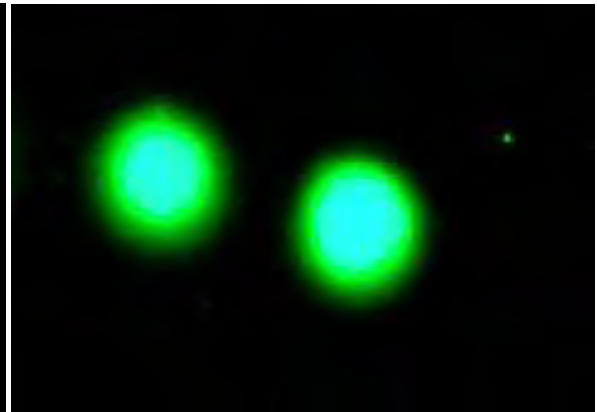
研究在有和沒有蜂膠先前處理 1 小時的情況下，分別用 H_2O_2 處理 HepG2 細胞 24hr 後，觀察並比較 DNA 雙股斷裂情形。以 10ug/ml 的蜂膠添加至 HepG2 細胞進行彗星試驗，以 Control、10ug/ml Propolis、100uM H_2O_2 、和 10ug/ml propolis + 100uM H_2O_2 四組實驗作為比較，由圖 6a 與圖 6c 做比較，可以清楚觀察到圖 6c 只添加 H_2O_2 ，實驗結果有嚴重的拖尾情況，表示 HepG2 細胞內的 DNA 有明顯損傷。再以圖 6a 和圖 6b 做比較時，可以發現圖 6b 中 HepG2 細胞在 10ug/ml 蜂膠的處理下，並不會造成細胞 DNA 受損。最後圖 6d 是以蜂膠 10ug/ml 預處理之後再添加 H_2O_2 培養 24 小時，所得結果指出蜂膠能有效減少 H_2O_2 對於 HepG2 細胞的損傷情形，雖和圖 6b 對比之下還無法達到 DNA 完全無損傷的狀況，但與圖 6c 對照可清楚發現 HepG2 細胞拖尾情形已大幅改善。

(a)



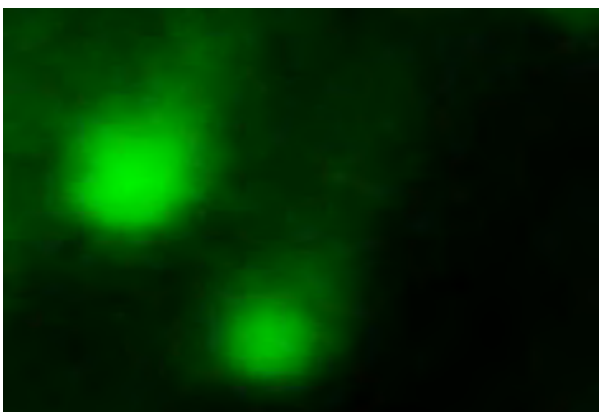
Control 組

(b)



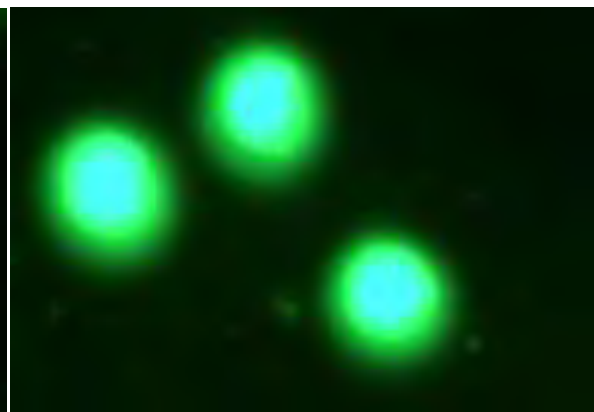
10ug/ml Propolis

(c)



100uM H_2O_2

(d)



10ug/ml Propolis+100uM H_2O_2

圖 6. (a)HepG2 細胞的 Control 組 (b)添加 10ug/ml Propolis 的 HepG2 細胞(c)添加 100uM H₂O₂ 的 HepG2 細胞 24 小時 (d)添加 10ug/ml Propolis+100uM H₂O₂ 的 HepG2 細胞

蜂膠除了具有抗氧化特性外，蜂膠中的類黃酮可促進前列腺癌細胞氧化性 DNA 之修補酵素 (base-excision repair, 屬 DNA 單股斷裂修補酵素) 活性，以及防止細胞突變 (Gao, 2006)。但 Turan 等人 (2015) 發現以蜂膠處理後的纖維細胞 (fiboblast) 並未促進氧化性 DNA 的修補酵素表現，所以蜂膠是否會影響 DNA 修補酵素現在仍不清楚。再者，雙股斷裂較 DNA 單股斷裂嚴重，而 DNA 雙股斷裂修復方式有兩種型式為主：DNA 雙股同源重組 (homologous recombination repair) 和非同源末端連接 (nonhomologous end joining)。本研究主要先探討添加蜂膠在 HepG2 細胞對於 DNA 雙股同源重組是否有影響。

四、研究蜂膠前處理後是否可以提升同源重組活性

以同源重組活性測試檢測蜂膠前處理對 H₂O₂ 導致 HepG2 細胞損傷之同源重組活性的影響。其判讀結果在有蜂膠的情況下，在 420 鹼基對長度 (base pairs length) 形成之條帶 (band) 深淺得知，band 愈深，代表 HR 活性愈高，經由基因重組後，可形成一完整酵素基因片段 (420 bp)。以 Control、10ug/ml Propolis、100uM H₂O₂、10ug/ml propolis + 100uM H₂O₂ 和四組實驗，由四組實驗中可以發現控制組和只添加蜂膠的實驗組相比 (圖 7、圖 8)，單獨以蜂膠處理 HepG2 細胞，並沒有明顯增加同源重組活性 ($p>0.05$)。而 100uM H₂O₂ 與 10ug/ml propolis + 100uM H₂O₂ 兩組相較之下，蜂膠可降低 DNA 斷裂的情形。因此，推測蜂膠可降低 H₂O₂ 對細胞存活率和基因毒性的影響。值得注意的是蜂膠已被證實可抑制人類肝臟微粒體 (microsomes) 內 cytochrome P450 多種酵素 (Ryu, 2016)，該酵素可參與許多藥物或化學物質代謝，一些化學物質經由 cytochrome P450 活化後，可產生活性氧化物 (Kuroda, 1999)。所以對於蜂膠保護 HepG2 細胞免於 H₂O₂ 所造成的損傷的可能機制為蜂膠抑制了 cytochrome P450 此酵素的活性，因而無法產生足夠 ROS，所以不會對細胞產生毒性。

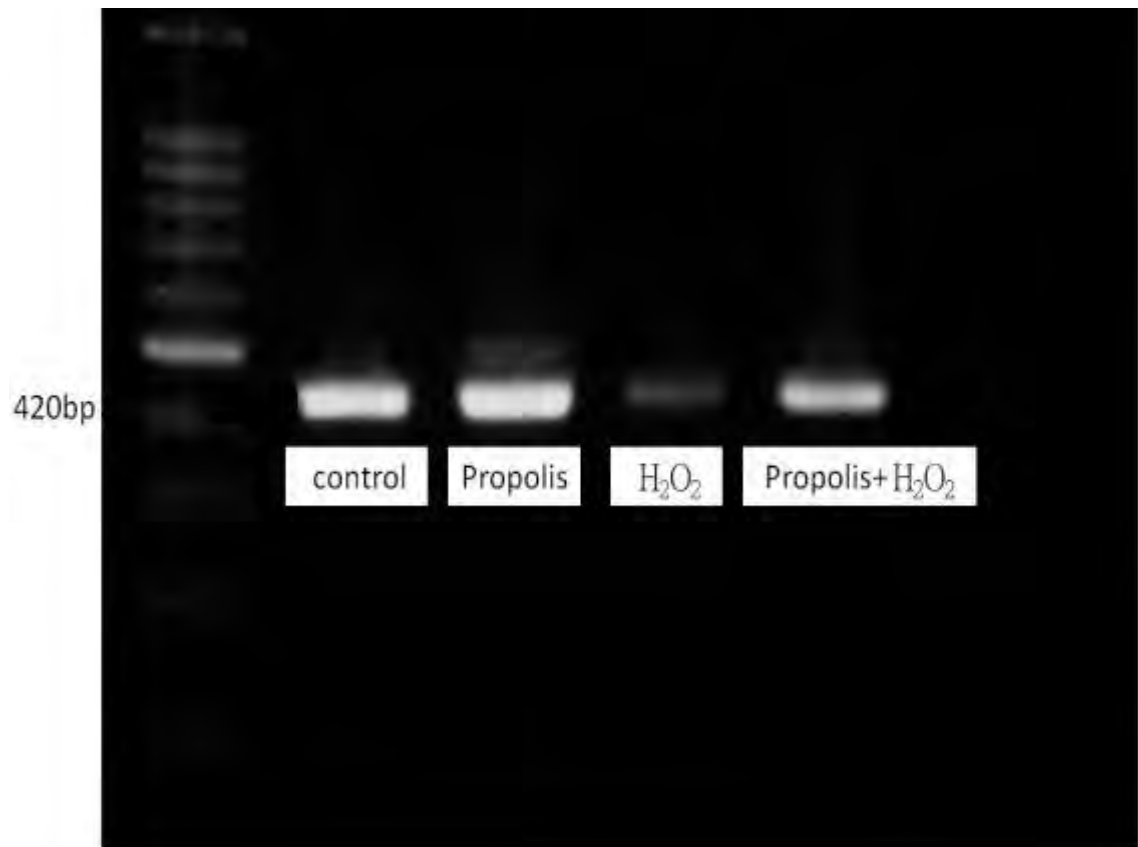


圖 7. 蜂膠預處理 HepG2 細胞在 H₂O₂ 處理後同源重組活性實驗電泳圖

通過同源重組活性測試測量 HepG2 細胞在 Control、10ug/ml Propolis、100uM H₂O₂、和 10ug/ml Propolis +100uM H₂O₂ 四組實驗的同源重組活性。

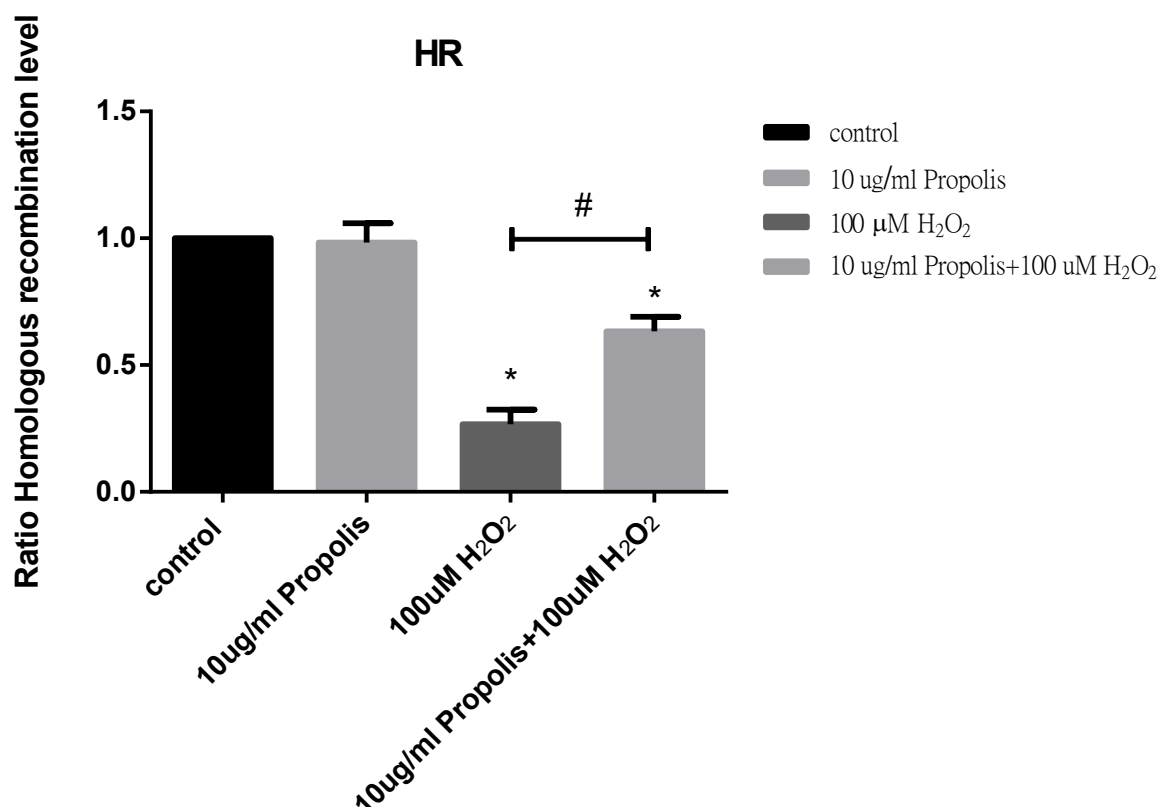


圖 8. 蜂膠預處理 HepG2 肝細胞在 H₂O₂ 處理後同源重組活性的影響

HepG2 細胞在 Control、10ug/ml Propolis、100uM H₂O₂、和 10ug/ml propolis +100uM H₂O₂ 的同源重組活性測量。所有值均為三次相同實驗的平均值±SD。* p < 0.001 與 control 相比，# p < 0.001, H₂O₂ 與 propolis +H₂O₂

陸、結論

由細胞存活率分析結果得知，蜂膠在 10ug/ml 濃度之內對 HepG2 細胞無毒性，也可得知蜂膠前處理可減輕 H₂O₂ 對 HepG2 細胞的損傷，我們推測蜂膠對 H₂O₂ 所造成 HepG2 細胞的毒性具有潛在保護作用。蜂膠可抑制 ROS 升高，蜂膠也能有效地減少 H₂O₂ 對 HepG2 細胞的損傷，顯示出蜂膠確實具抗氧化之功效，亦可減緩 H₂O₂ 導致的 DNA 損傷。以同源重組活性測試，其結果顯示僅以蜂膠處理 HepG2 細胞並未使細胞內的同源染色重組互補活性增加，但有 H₂O₂ 存在的情況下，若經蜂膠前處理則 HepG2 細胞同源染色重組互

補活性增加，故推測此現象可能與肝臟內 cytochrome P450 酵素活性被蜂膠抑制，因而無法產生 ROS 有關。

柒、未來展望

- 一、本研究只針對蜂膠可能有助於促使 DNA 同源重組雙股斷裂修復的能力作為探討，未來希望可在進一步了解蜂膠對於非同源末端連接 (nonhomologous end joining) 雙股斷裂修復方式之影響。
- 二、本實驗使用 HepG2 細胞作為實驗對象，未來有機會希望能以其他細胞再做研究，了解蜂膠對於不同細胞是否有不同影響。
- 三、若以上項目皆研究完畢，希望能進行動物實驗，確定蜂膠對於生物體的保護作用及機制反應。

捌、參考資料

一、文獻

1. Gao, K., Henning, S.M., Niu, Y., Youssefian, A.A., Seeram, N.P., Xu, A., Heber, D., 2006. The citrus flavonoid naringenin stimulates DNA repair in prostate cancer cells. *J Nutr Biochem* 17, 89-95.
2. Gleij, M., Schneider, T., Schlormann, W., 2016. Comet assay: an essential tool in toxicological research. *Arch Toxicol* 90, 2315-2336.
3. Kamiya, T., Izumi, M., Hara, H., Adachi, T., 2012. Propolis suppresses CdCl₂-induced cytotoxicity of COS7 cells through the prevention of intracellular reactive oxygen species accumulation. *Biol Pharm Bull* 35, 1126-1131.
4. Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W.W., Hoelzl, C., Bichler, J., Majer, B.J., 2004. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology* 198, 315-328.
5. Kuroda, Y., Hara, Y., 1999. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols.

Mutat Res 436, 69-97.

6. Pasupuleti, V.R., Sammugam, L., Ramesh, N., Gan, S.H., 2017. Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxidative Medicine & Cellular Longevity* 2017, 1259510.
7. Pereira, A.D., de Andrade, S.F., de Oliveira Swerts, M.S., Maistro, E.L., 2008. First in vivo evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test. *Food Chem Toxicol* 46, 2580-2584.
8. Ryu, C.S., Oh, S.J., Oh, J.M., Lee, J.Y., Lee, S.Y., Chae, J.W., Kwon, K.I., Kim, S.K., 2016. Inhibition of Cytochrome P450 by Propolis in Human Liver Microsomes. *Toxicol Res* 32, 207-213.
9. Sforcin, J.M., 2016. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phytother Res* 30, 894-905.
10. Turan, I., Deger, O., Aliyazicioglu, Y., Demir, S., Kilinc, K., Sumer, A., 2015. Effects of Turkish propolis on expression of hOGG-1 and NEIL-1. *Turk J Med Sci* 45, 804-811.

二、圖片

1. 維基百科 MTT Reduction 圖

<https://zh.wikipedia.org/wiki/MTT%E8%A9%A6%E9%A9%97>

【評語】 052006

實驗以 HepG2 細胞經過蜂膠前處理後，蜂膠是否能保護 DNA 免於氧化性損傷的功能，並促進 DNA 修復，亦同時探討蜂膠對於 HepG2 細胞 DNA 修復之影響和保護機制。實驗結果顯示蜂膠預先處理細胞後，可以減少 H_2O_2 對 HepG2 細胞的損傷，添加蜂膠可以抑制 H_2O_2 對細胞所產生的 ROS 量，彗星試驗也顯示蜂膠具保護 HepG2 細胞免於 H_2O_2 所導致的基因損傷，但單獨以蜂膠處理 HepG2 細胞，並沒有明顯增加同源重組活性，雖然未能深入探討其分子機制，但實驗探究精神值得嘉許，建議未來除了比較與其他研究之差異性外，亦可再深入研究蜂膠分子成分對保護人類細胞 DNA 免於氧化性損傷之影響。

摘要

蜂膠 (Propolis) 常作為健康食品，但目前科學文獻中均未提供充分證據證明食用蜂膠是否可保護人類細胞 DNA 免於氧化性損傷，故本專題目的是探討添加蜂膠是否能保護人類 HepG2 細胞免於 DNA 氧化性損傷。以細胞存活率分析 (MTT assay) 得知添加蜂膠可增加細胞存活率，並以細胞內活性氧物質之測定法 (intracellular reactive oxygen species, ROS) 得知蜂膠可降低 HepG2 細胞因 H₂O₂ 傷害所產生的 ROS 量。再以單細胞凝膠電泳實驗 (Single Cell Gel Electrophoresis assay, Comet assay) 發現蜂膠減緩 H₂O₂ 對細胞所造成的雙股斷裂損傷；最後從同源重組活性測試 (Homologous Recombination Assay Kit, HR) 觀察到細胞單獨以蜂膠處理，HR 活性未明顯增加。

因此，推測蜂膠可能對於 H₂O₂ 所導致的氧化性 DNA 損傷具保護機制，但不具修復DNA損傷之作用，主要可能因蜂膠具抗氧化性而抑制肝臟內 cytochrome P450 酵素活性，因而無法產生 ROS有關。

研究動機

人體在代謝過程或是經紫外線照射後都可能會產生自由基造成細胞受損，因而造成 DNA 損傷或是細胞突變。蜂膠內主要成分為黃酮類化合物 (flavonoid)，具有抗氧化、抗炎的作用，可以清除自由基，亦能調節血糖、血脂和降血壓，也具抗菌和提高機體免疫力等功能(Pasupulefi 2017, Sforcin 2016, Kamiya 2012, Tsai 2011, Barlak 2011, Pereira 2008)，所以蜂膠常被作為膠囊、滴劑等健康食品。。故本研究在探討蜂膠是否能保護人類細胞DNA 免於自由基所造成的氧化性損傷，查詢後發現目前科學文獻紀錄中均未提供充分證據證明食用蜂膠可保護人類細胞 DNA 免於氧化性損傷；而再查詢一些蜂膠修復 DNA 的相關文獻，發現有一篇的文獻指出蜂膠中的類黃酮可促進前列腺癌細胞氧化性 DNA 之修補酵素活性，以防止細胞突變 (Gao, 2006)；但有另一篇文獻中說以蜂膠處理後的纖維細胞並未促進氧化性 DNA 的修補酵素表現 (Turan, 2015)，這也使我想要了解蜂膠到底是否能修復已受損的人類細胞 DNA。因此，本實驗中最主要是探討 HepG2 細胞經過蜂膠前處理後，蜂膠是否能保護 DNA 免於氧化性損傷的功能，並促進 DNA 修復；以及探討蜂膠對於 HepG2 細胞 DNA 修復之影響和保護機制。

研究目的

我們現在還無法完全了解蜂膠對於 DNA 保護與修復機制中的作用，所以這項研究主要是探討添加蜂膠是否可以減緩 H₂O₂ 對人類 HepG2 細胞所造成的 DNA 氧化和 DNA 修復之影響。

- 一、研究蜂膠對於 H₂O₂ 處理之 HepG2 細胞存活率的影響
- 二、研究蜂膠前處理是否能夠抑制 ROS 產生
- 三、研究蜂膠前處理是否可以降低在 H₂O₂ 處理下導致的 DNA 損傷
- 四、探討蜂膠對 H₂O₂ 基因毒性的保護作用的機制

研究設備及器材

細胞存活率分析(MTT assay)、細胞內活性氧物質之測定法(intracellular reactive oxygen species; ROS)、單細胞凝膠電泳實驗(Single Cell Gel Electrophoresis assay ; Comet assay)、同源重組活性測試(Homologous Recombination Assay Kit ; HR)、離心機和螢光顯微鏡等相關基本設備及藥品。

研究過程及方法

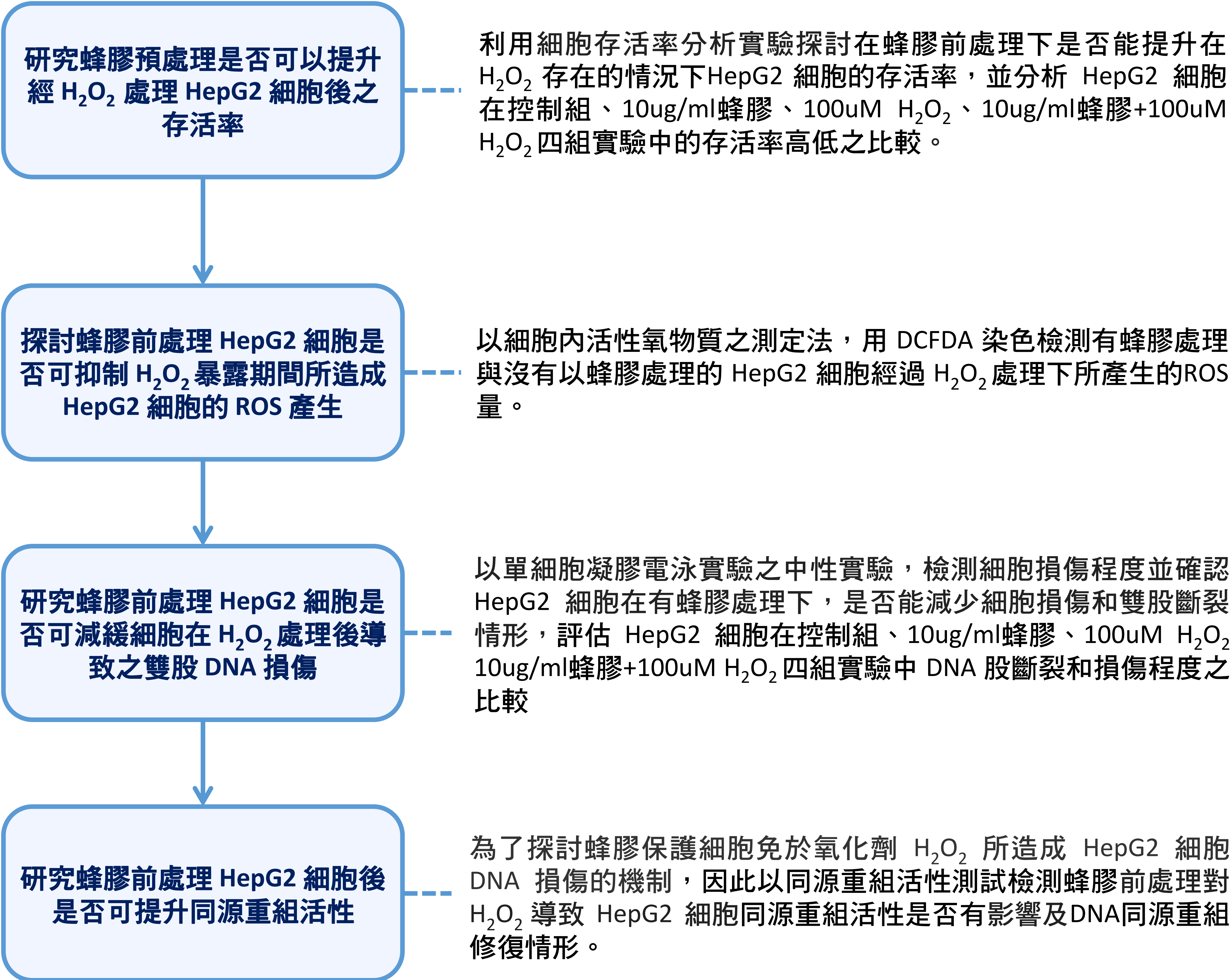


圖1.研究架構

研究結果與討論

一、研究蜂膠預處理是否可以提升經 H₂O₂ 處理 HepG2 細胞後之存活率

(一)以細胞存活率分析測定蜂膠前處理下是否會影響 HepG2 細胞的存活率(圖1)

結果可知 HepG2 細胞分別在0ug/ml、2.5ug/ml、5ug/ml、10ug/ml蜂膠處理下的存活率與控制組比較，並無顯著影響 (p > 0.05)，表示 HepG2 細胞在這些蜂膠濃度處理下對細胞無毒性。我主要以 10ug/ml 蜂膠進行之後實驗。

(二)評估蜂膠對 H₂O₂ 所導致 HepG2 細胞毒性的保護作用(圖2)

圖中可明顯發現，在Control與100uM H₂O₂ 相比， 100uM H₂O₂ 的實驗組細胞存活率下降很多，表示 H₂O₂ 對細胞傷害很大，而 10ug/ml propolis +100uM H₂O₂的實驗組存活率有提升，且與Control相比並無顯著差異，表示蜂膠確實可減少 H₂O₂ 對細胞的損傷，該結果使我們了解蜂膠具有可降低 H₂O₂ 造成 HepG2 細胞的毒性之保護作用。ns 表示與控制組相比無差異。圖示以 Control 訂為 100%，其餘實驗組為相對應百分比表示。

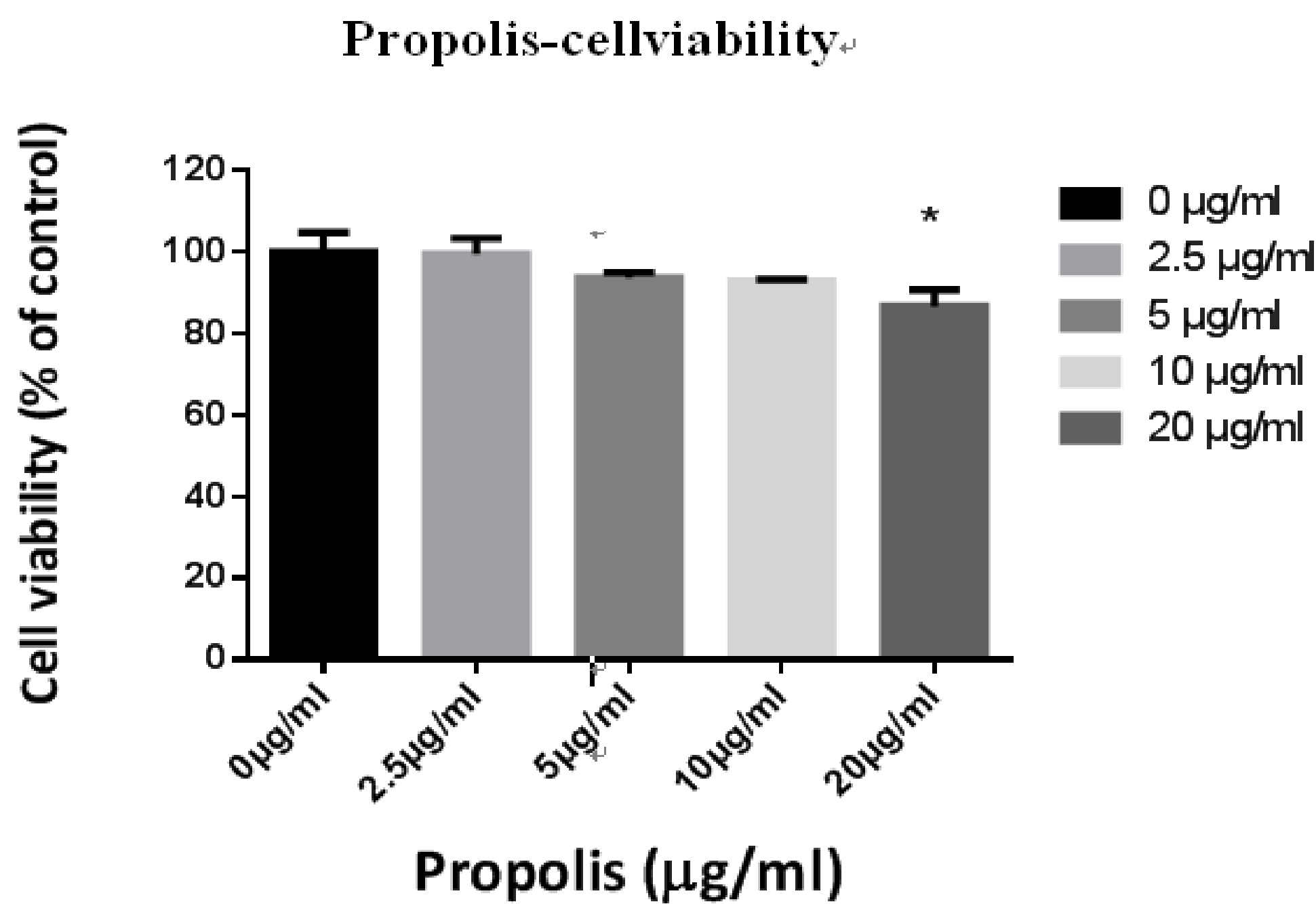


圖1. 蜂膠對 HepG2 細胞存活率的影響

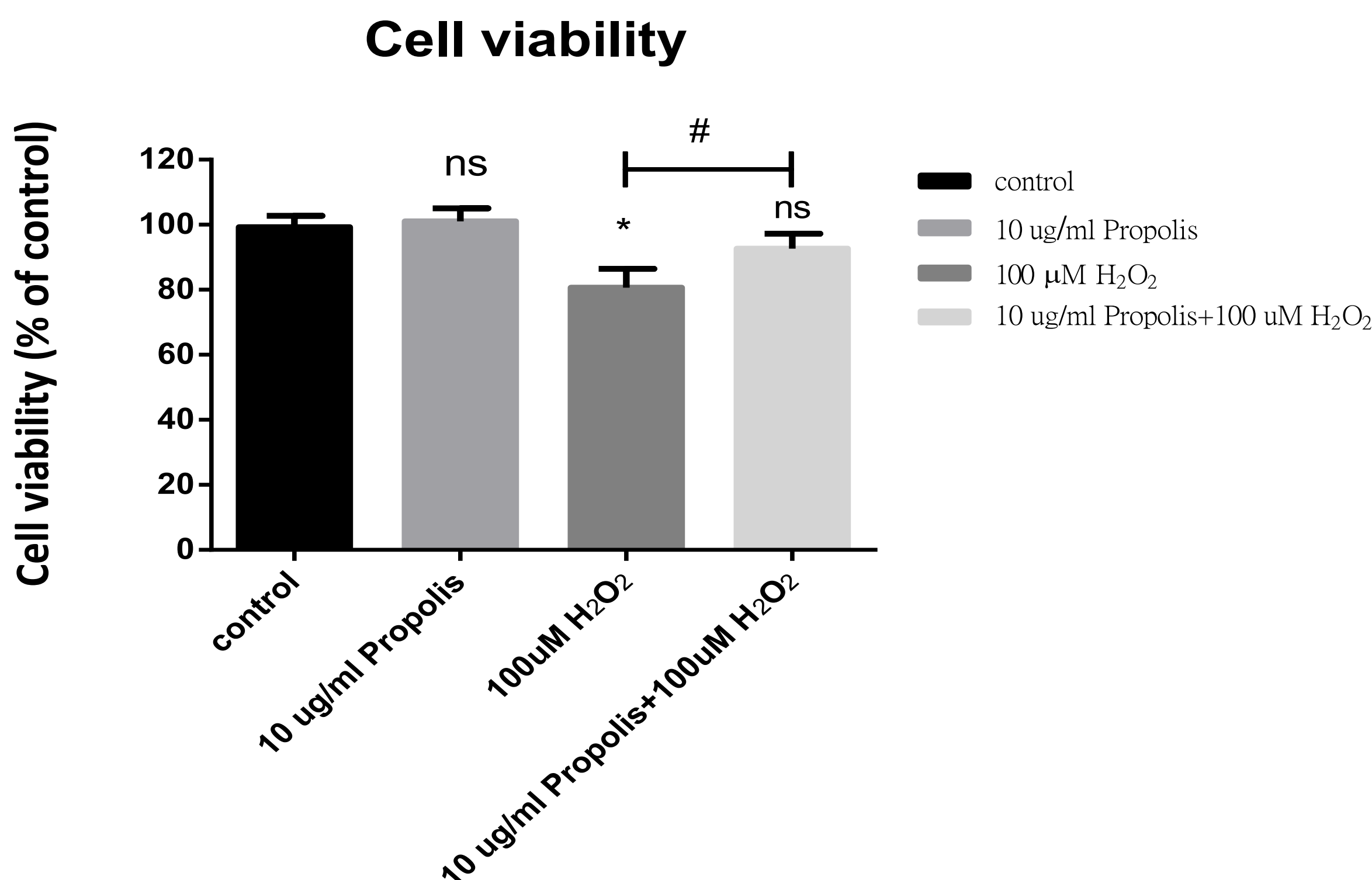


圖2. 蜂膠對 H₂O₂ 誘導細胞毒性的影響

二、探討蜂膠前處理 HepG2 細胞是否可抑制 H₂O₂ 暴露期間所造成 HepG2 細胞的 ROS 產生

(一)以細胞內活性氧物質之測定法研究有蜂膠和無蜂膠處理的 HepG2 細胞經 H₂O₂ 誘導所產生 ROS 的量(圖3)

由圖中觀察可知，在Control與100uM H₂O₂實驗組相比，100uM H₂O₂ 實驗組的 ROS 量大幅上升，表示 H₂O₂ 會對細胞產生大量的自由基，造成細胞損傷，也可發現 100uM H₂O₂ 和 10ug/ml propolis + 100uM H₂O₂ 這兩組，添加蜂膠明顯可抑制 H₂O₂ 對細胞所產生的 ROS 量，無論在15、30、60、90和120分鐘皆能抑制 HepG2 細胞在 H₂O₂ 下所產生的 ROS，此結果提供了蜂膠可抑制 ROS 升高的證據，有報導指出蜂膠成分之一為多酚(polyphenol)，具有抗氧化作用(Turan et al 2015)，推測可以清除 H₂O₂，降低對細胞毒性影響。

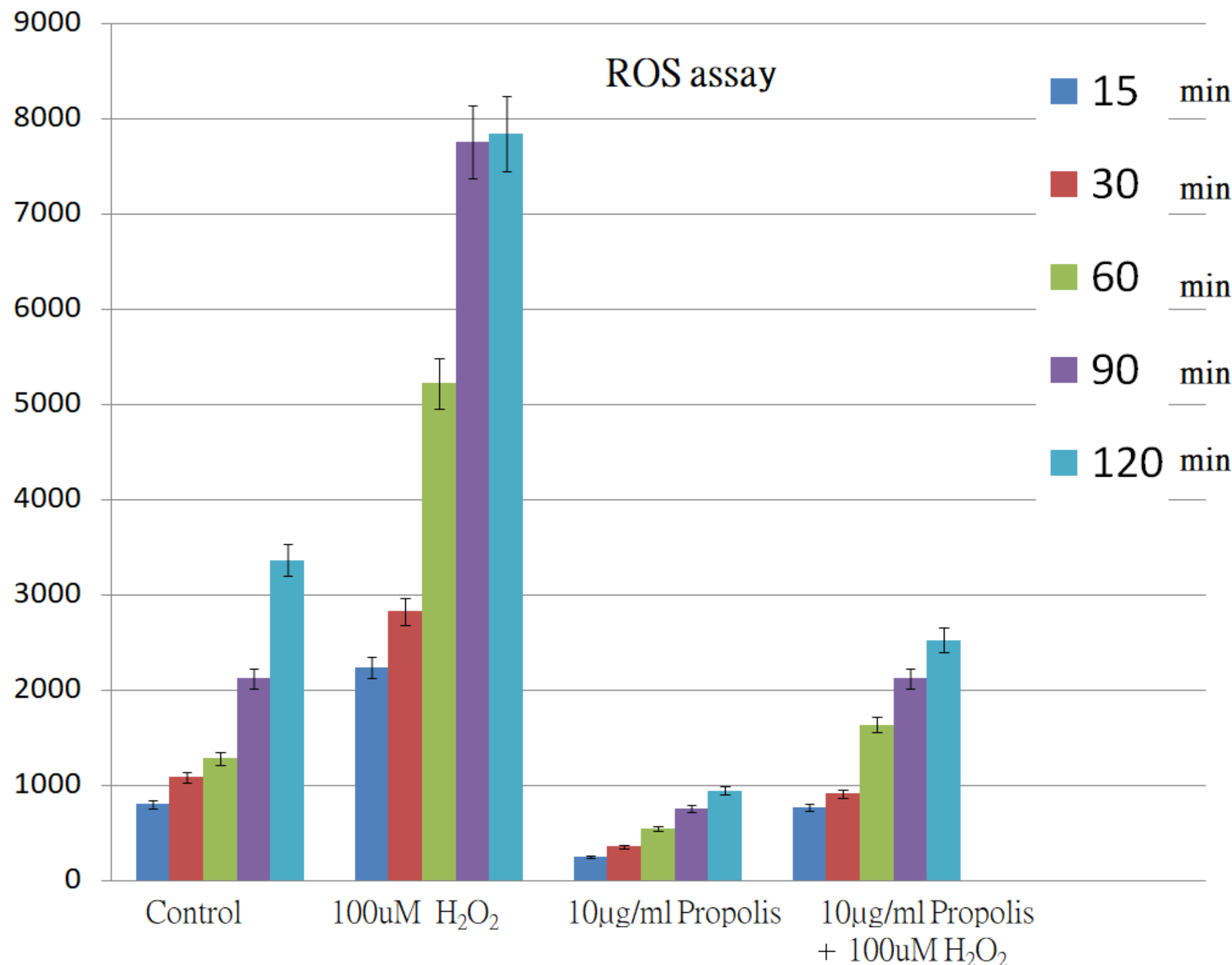


圖3. 蜂膠前處理對 H₂O₂ 造成 HepG2 細胞產生 ROS 之影響

三、研究蜂膠前處理 HepG2 細胞是否可減緩細胞在 H₂O₂ 處理後導致之雙股 DNA 損傷

(一)蜂膠前處理 HepG2 細胞是否可以降低在 H₂O₂ 下導致的雙股 DNA 損傷，以及其損傷程度(圖4、圖5)

從圖4和圖5中可以觀察到，以 100uM H₂O₂ 處理後細胞的 %DNA tail 百分比最多，拖尾的現象最為嚴重，表示 H₂O₂ 對 HepG2 細胞的損傷十分嚴重，在 Control 和只以10ug/ml Propolis 處理下，其 %DNA tail和 tail moment 都在 5% 以內，表示拖尾情形輕，而在10ug/ml propolis + 100uM H₂O₂ 實驗組可發現有先以蜂膠前處理會使 %DNA tail 和 tail moment 的百分比降低，能減緩 H₂O₂ 對 HepG2 細胞的影響，使拖尾情形減輕，此結果證明蜂膠確實可減少 H₂O₂ 對細胞的損傷，雖還無法到達完全無損傷的狀況，但從圖中可知蜂膠能幫助細胞減輕受損的情形。

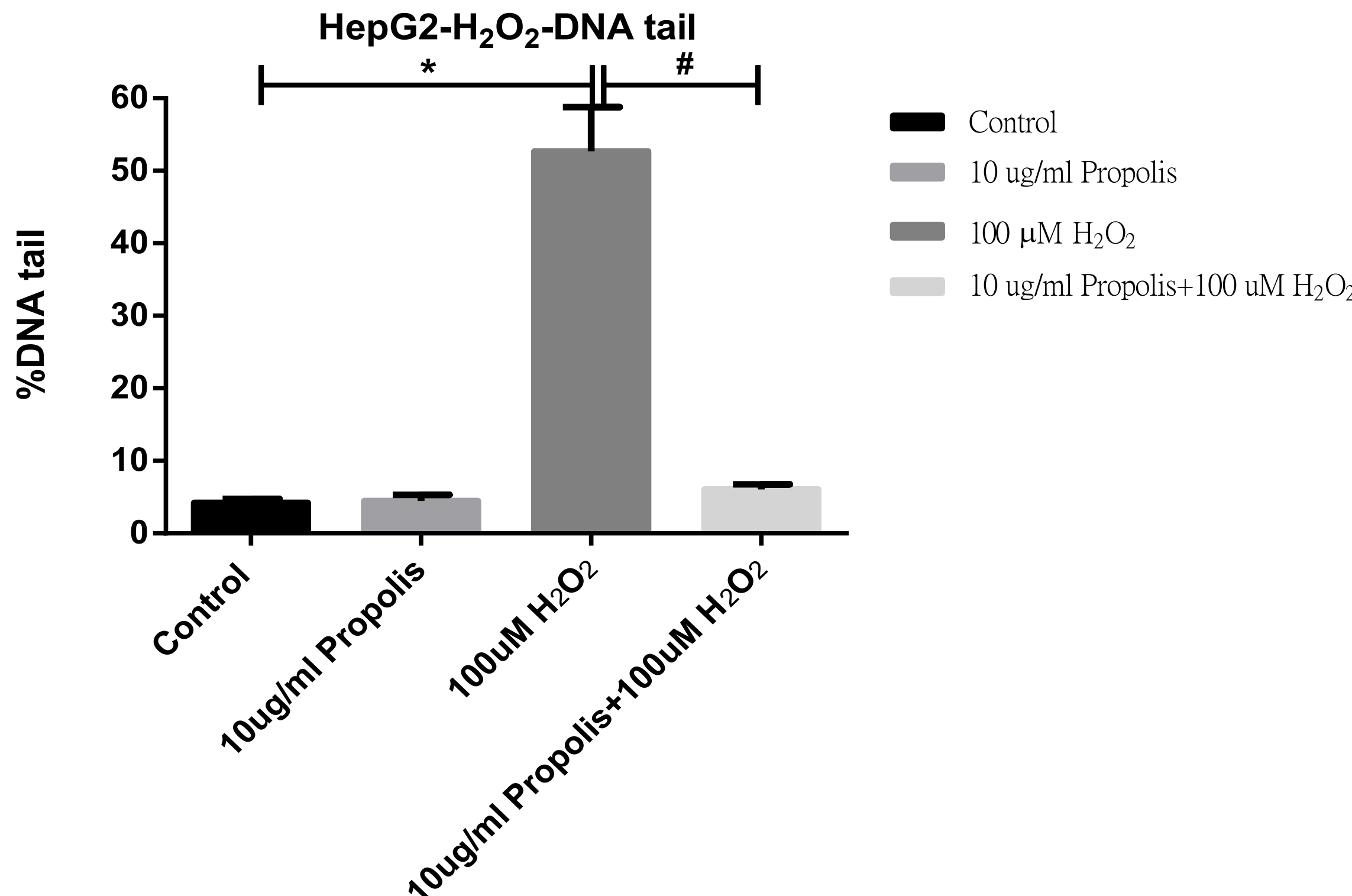


圖4. 蜂膠前處理對 H₂O₂ 造成 HepG2 細胞彗星試驗 %DNA tail 的影響

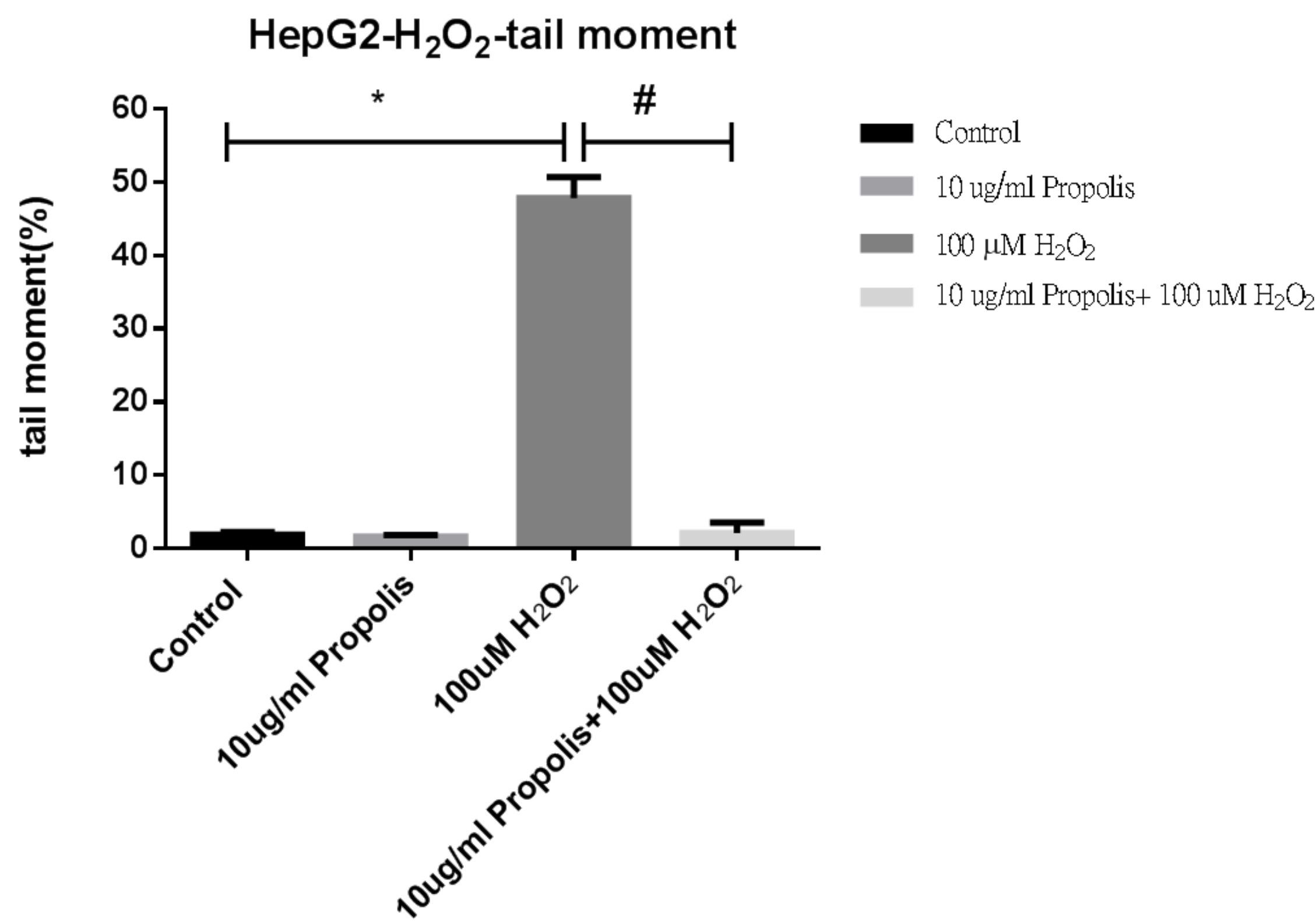
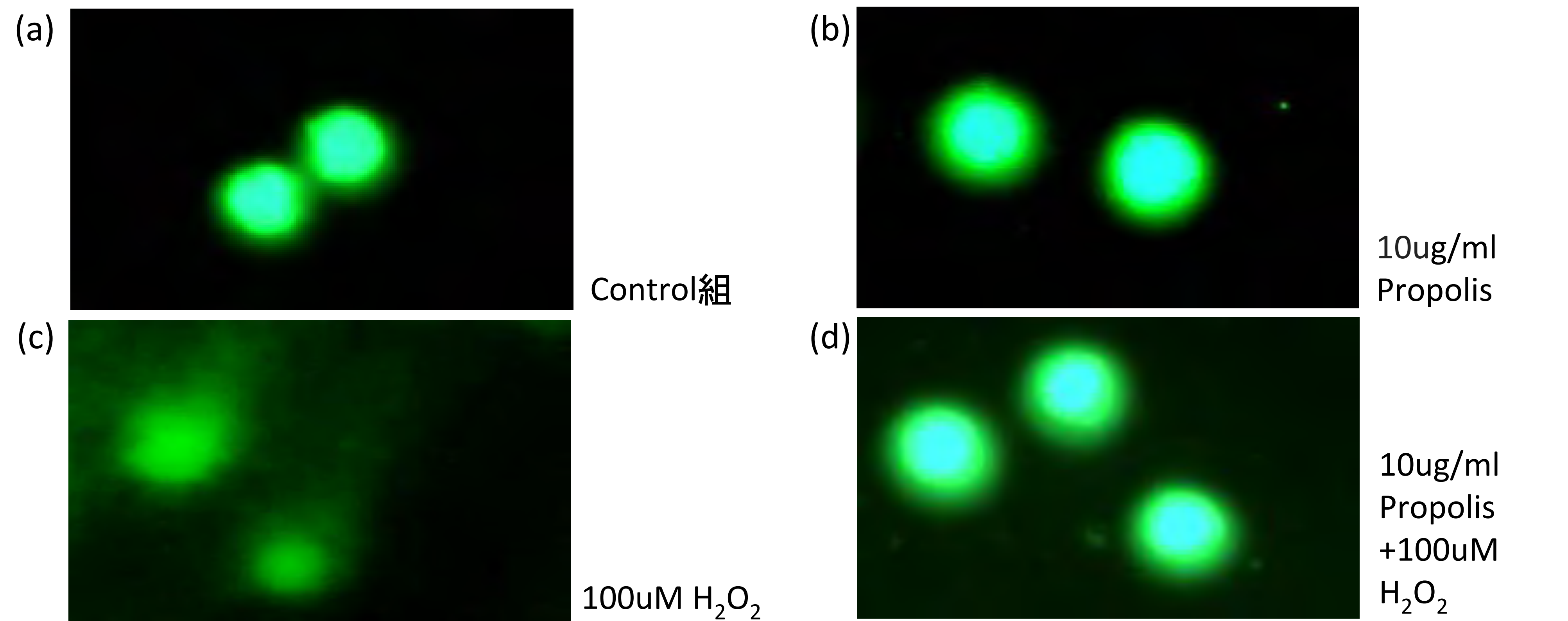


圖5. 蜂膠前處理對 H₂O₂ 造成 HepG2 細胞彗星試驗 tail moment 的影響

(二)確定蜂膠在 H₂O₂ 誘導的氧化性 DNA 損傷中所扮演的角色(圖6c、圖6d)

由圖6a與圖6c做比較，可清楚觀察到圖6c只添加 H₂O₂ 的實驗結果有嚴重拖尾情況，表示 HepG2 細胞內的DNA 有明顯損傷，再以圖6a和圖6b做比較時，可發現圖6b中 HepG2 細胞在10ug/ml 蜂膠的處理下，並不會造成細胞DNA受損，最後圖6d是以蜂膠10ug/ml預處理之後再添加H₂O₂ 培養24小時，所得結果指出蜂膠能有效減少H₂O₂ 對於HepG2 細胞的損傷情形，雖和圖6b對比之下還無法達到DNA完全無損傷的狀況，但與圖6c對照可清楚發現 HepG2 細胞拖尾情形已大幅改善，從這些結果得知蜂膠可降低 DNA 損傷，可保護 HepG2 細胞免於 H₂O₂ 所導致的基因損傷。



四、研究蜂膠前處理 HepG2 細胞後是否可以提升同源重組活性

(一)以同源重組活性測試檢測蜂膠前處理對 H₂O₂ 導致 HepG2 細胞損傷之影響(圖7、圖8)

在圖7的 Control 與100uM H₂O₂ 相比，100uM H₂O₂ band的顏色十分淺，表示對細胞並未促進同源重組活性，而在圖7和圖8中發現，100uM H₂O₂ 與 10ug/ml propolis + 100uM H₂O₂ 兩組相較之下，蜂膠可以降低 DNA 斷裂情形並提升同源重組活性，因此得知蜂膠可清除 H₂O₂ 以降低 H₂O₂ 對細胞存活率和基因毒性的影響，但在圖8中發現Control 和10ug/ml propolis 實驗組相比，只以蜂膠處理 HepG2 細胞時，並沒有明顯增加同源重組活性 (p>0.05)，而值得注意的是蜂膠已被證實可抑制人類肝臟微粒體內 cytochrome P450 多種酵素 (Ryu et al 2016)，所以對於蜂膠保護 HepG2 細胞免於 H₂O₂ 所造成的損傷的可能機制為蜂膠抑制了 cytochrome P450 此酵素的活性，因而無法產生足夠 ROS，所以不會對細胞產生毒性。

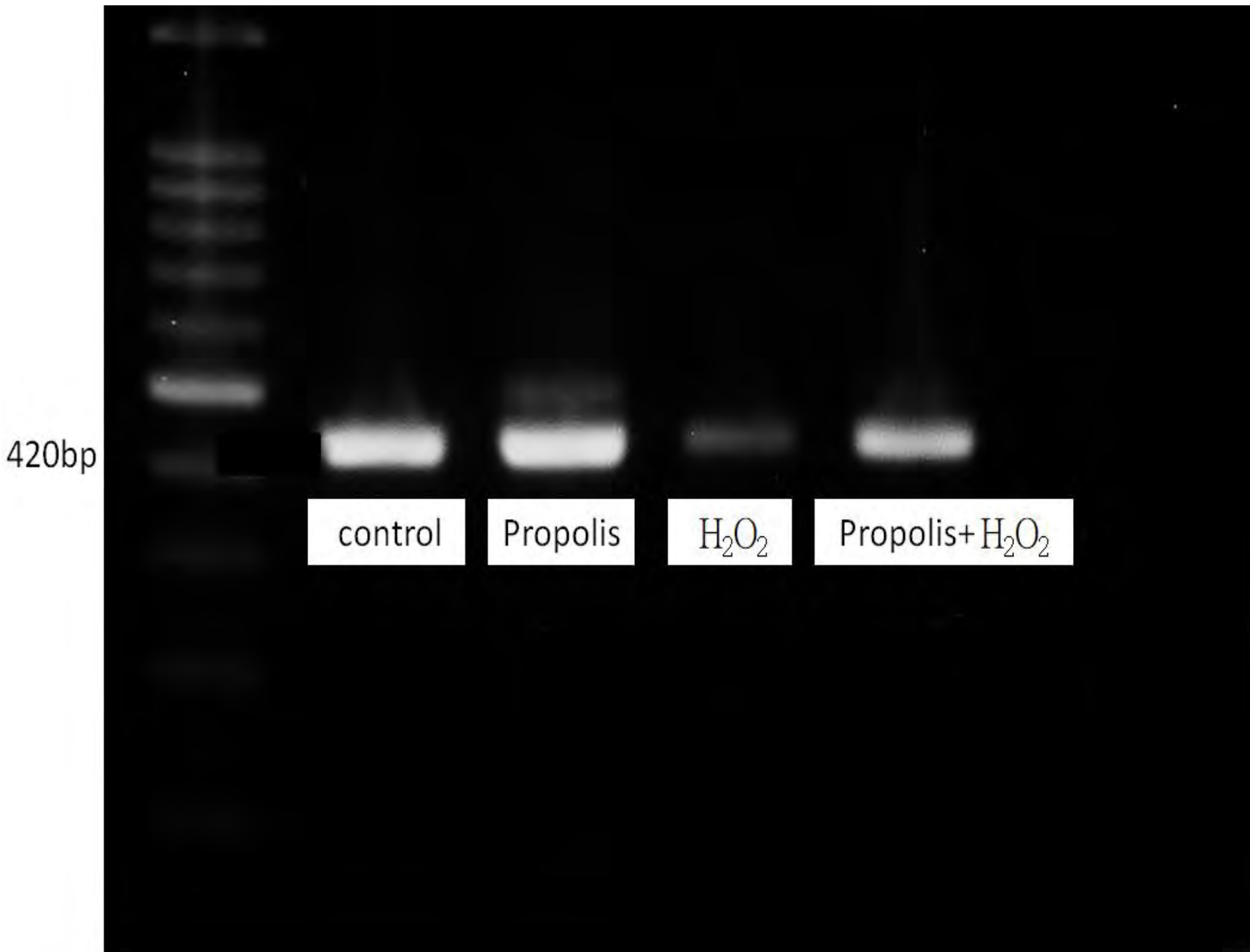


圖7. 蜂膠預處理 HepG2 細胞在 H₂O₂ 處理後同源重組活性實驗電泳圖

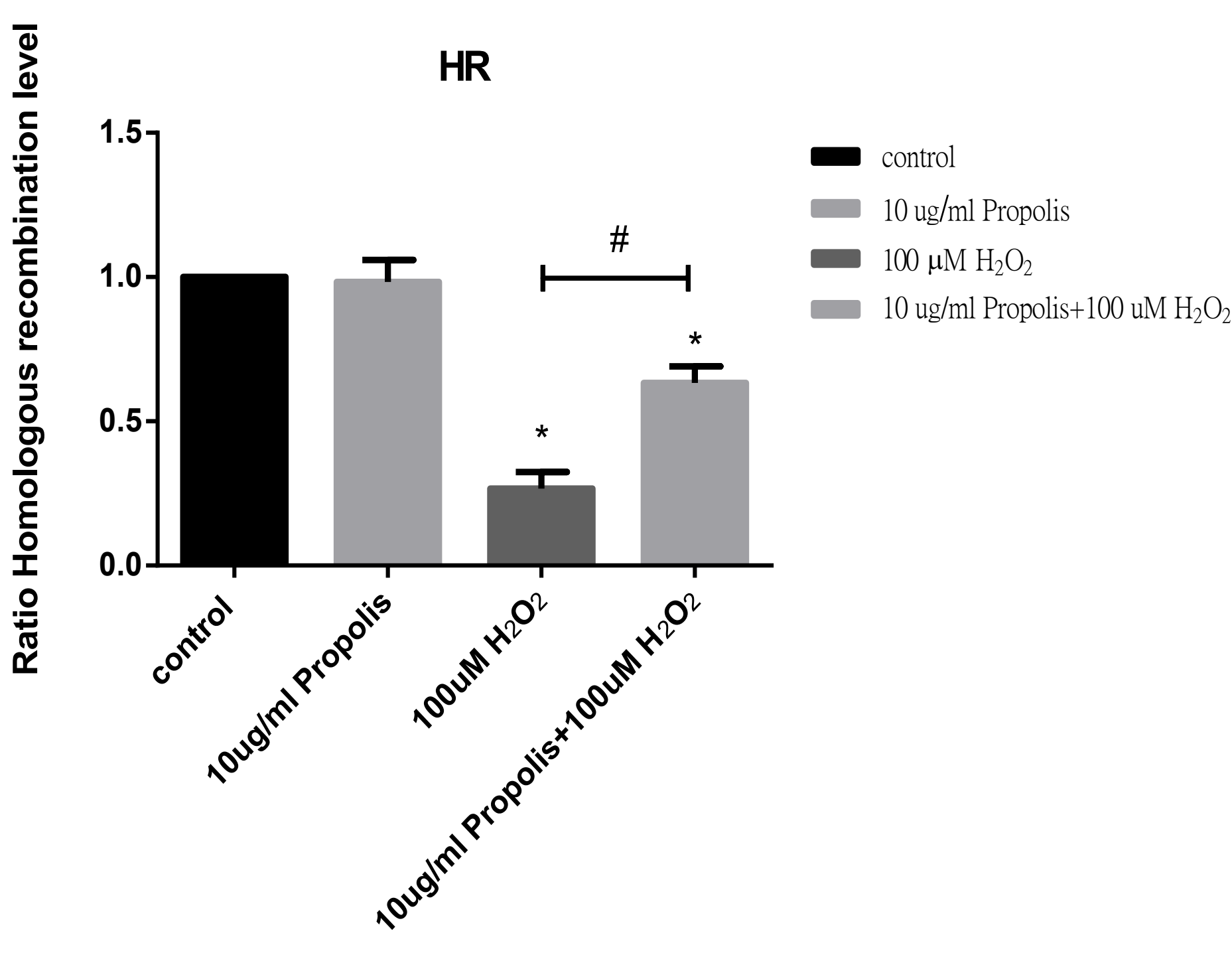
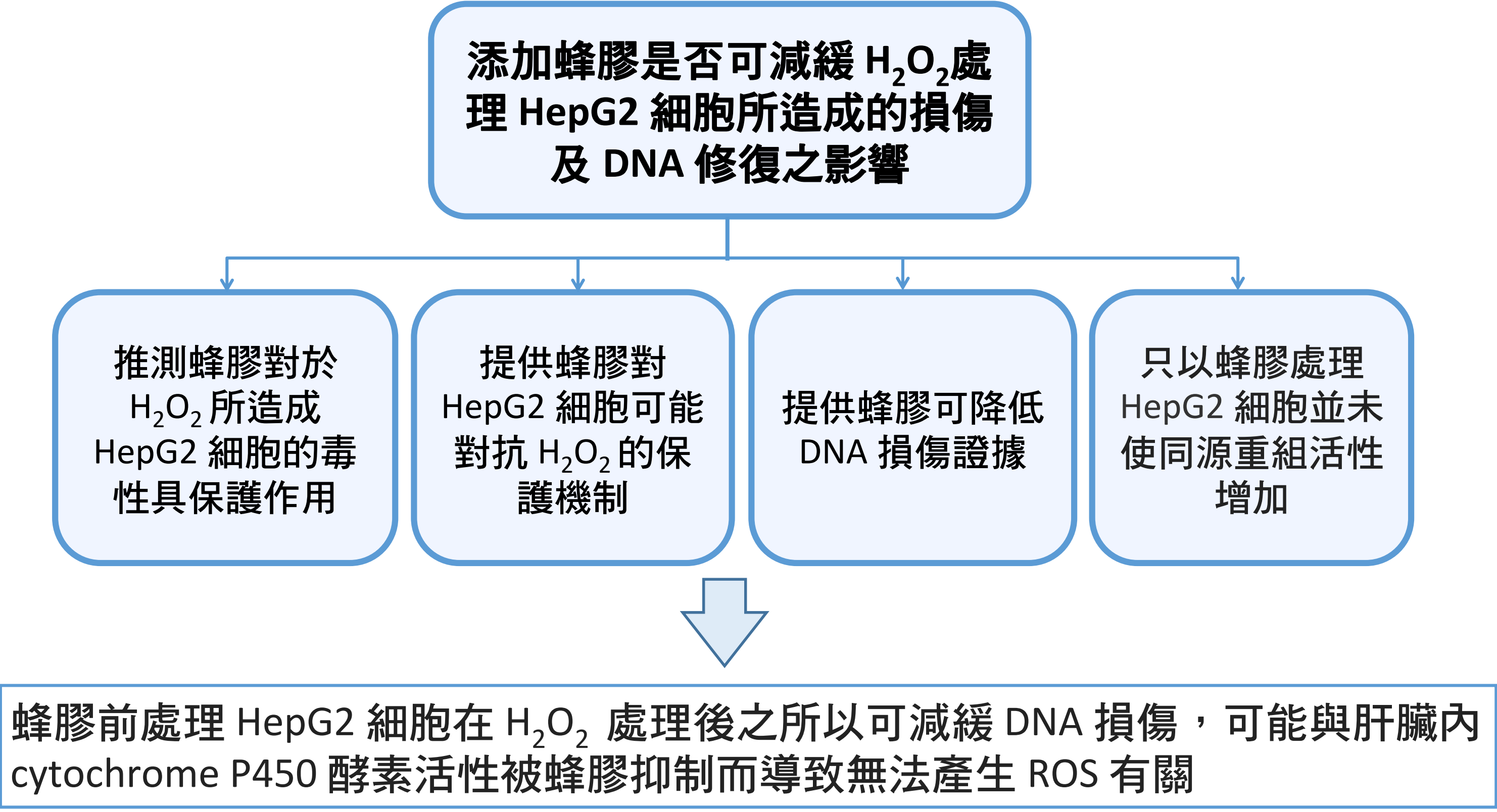


圖8. 蜂膠預處理 HepG2 細胞在 H₂O₂ 處理後同源重組活性的影響

結論



未來展望

- 一、本研究只針對蜂膠以 DNA 同源重組雙股斷裂修復的方式作為探討，未來希望可在進一步了解蜂膠對於非同源末端連接 (nonhomologous end joining) 雙股斷裂修復方式之影響。
- 二、本專題結論推測蜂膠與cytochrome P450 酵素活性被抑制有關，希望未來能更深入探討蜂膠與 cytochrome P450 酵素之間的相關機制
- 三、本實驗使用 HepG2 細胞作為實驗對象，未來有機會希望能以其他細胞再做研究，了解蜂膠對不同細胞是否有不同影響。
- 四、若以上項目皆研究完畢，希望能進行動物實驗，確定蜂膠對於生物體的保護作用及機制反應。