

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

佳作

052014

金皇石斛對 UVC 照射的 HaCaT 細胞防護能力
之探討

學校名稱：臺中市立臺中女子高級中等學校

作者： 高二 古騏綺 高二 蒲煦宜	指導老師： 邱伯勤
-------------------------	--------------

關鍵詞：金皇石斛、HaCaT cell、UVC

摘要

皮膚是身體主要的保護器官，以對抗外界環境所造成的傷害，尤其是紫外線會誘導 DNA 斷裂及氧化應激而加速細胞衰老。現今許多防曬霜的成分大多使用 A 酸做為主要用藥，可以預防且修復細胞損傷，但具有刺激性，容易引起皮膚過敏。本研究選用來自農委會種苗場雜交選育出得的金皇石斛 (*Dendrobium taiseed* Tosnobile, DT) 作為實驗對象，金皇石斛的多醣體含量很高，具抗腫瘤及抗老化的功效，生長期短且產量高。本研究使用人體永生角質細胞(HaCaT 細胞) 以不同濃度的金皇石斛萃取物處理後，再照射不同強度的紫外線，利用細胞存活率分析(MTT assay)以及西方墨點法(Western Blot)實驗金皇石斛的防護效果。結果顯示金皇石斛萃取物增加 HaCaT 細胞在照射過 UVC 後的存活率，並防護 UVC 損傷。

壹、研究動機

皮膚是人體最大的器官，不論臉部、軀幹、手腳、頭皮或口腔都有可能產生皮膚癌。根據國民健康署公佈的 102 年資料，皮膚癌雖然在國人癌症死亡率十大排行榜僅佔第十位，但在發生率上升最快的五大癌症之中居亞軍，僅次於乳癌，在美國的統計資料中，東方人皮膚癌的預後較差、也伴隨更多併發症。

紫外線照射為最常見破壞皮膚的環境因素，許多文獻顯示，波長較長的 UVA 及 UVB 會對生物體造成一定的傷害，雖然 UVC 為紫外線中強度最強者，但到達地表之前會被大氣氧及臭氧層吸收，故傷害較小。但近幾年化妝品不斷推陳出新，醫美技術日臻成熟，絕大多數產品標榜具抗 UVB 效果，能改善及預防皮膚老化，也能降低罹患皮膚癌的機率，對人類影響甚鉅。然而人類大量使用氟氯碳化物(CFCs)使臭氧層含量越來越少，我們好奇 UVC 是否會成為潛在的威脅。

現今多以使用 A 酸 (Retinoic Acid, RA) 製作護膚商品，但是 A 酸具刺激性，因此我們也想找出較溫和且具護膚效果的材料。在閱讀文獻時，我們發現一種名為鐵皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo, DP)的蘭科植物，有滋養肌膚

及抗老化之用，被譽為「九大仙草之首」，勾起我們強烈的興趣，但鐵皮石斛生長速度慢且價格昂貴，接著我們找到一種新興石斛品種—金皇石斛，金皇石斛是由金釵石斛及黃花石斛雜交選育而得之，結合高生物鹼及高多糖成分，栽培容易，可適應低海拔環境生長，產量也高，經動物試驗證實，可活化細胞及調節免疫系統，對化療後患者健康有幫助，且具有活化免疫力的多醣體，因此本組決定將金皇石斛作為實驗對象，測試其對照 UVC 後的人體永生化角質細胞(HaCaT cell)的防護效果是否較 A 酸更佳。

貳、研究目的

- 一、確認金皇石斛對 UVC 照射後的 HaCaT cell 的防護效果
- 二、比較 A 酸和金皇石斛的防護能力
- 三、探討金皇石斛的防護機制

參、研究設備及器材

一、實驗器材

實驗儀器	用途
無塵抽氣操作台	避免細胞在進行實驗時被汙染
CO ₂ 恆溫培養箱	培養細胞
桌上小型冷凍離心機	使蛋白質沉澱物與上清液分離
吸光值讀取機	測吸光值
電源供應器	進行西方墨點法及轉漬
搖擺振盪器	充分混勻實驗藥品
電腦	分析數據
恆溫水浴槽	回溫藥品
乾浴槽	將樣本加熱
顯微鏡	觀察細胞
-80°C 冰箱	保存樣本

二、實驗用品

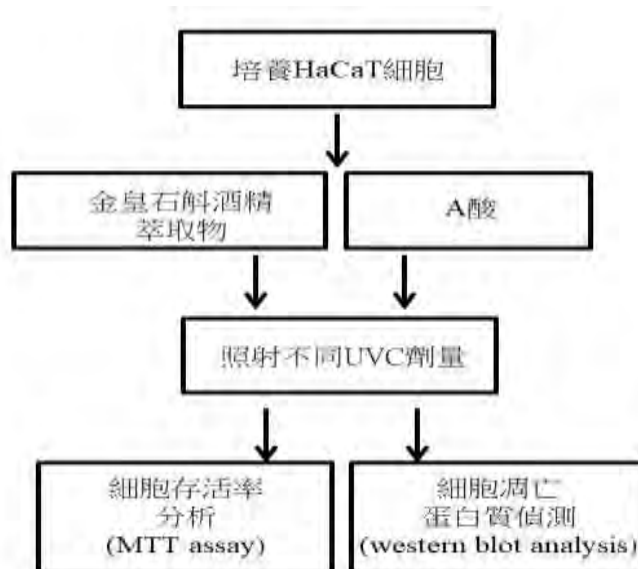
實驗用品	規格
離心管	10ml, 15ml
吸量管	10ml
微量吸管	0.2 μ l, 2 μ l, 10 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l
細胞培養皿	直徑 10cm
Plate template	96 well
真空吸引器	吸廢液

三、實驗藥品

藥品	實驗
金皇石斛酒精萃取物(DT)	細胞培養
A 酸(Retinoic Acid)	細胞培養
trypsin(胰蛋白酶)	細胞培養
PBS(磷酸鹽緩衝生理鹽水)	細胞培養、蛋白質萃取
DMEM	細胞培養
FBS	細胞培養
Tris-base (pH=8.0)	蛋白質萃取
protease inhibitor cocktail	蛋白質萃取
PMSF	蛋白質萃取
SDS	蛋白質萃取、西方墨點法
β -Mercaptoethanol	蛋白質萃取
Bromophenol Blue	蛋白質萃取
DD H ₂ O	西方墨點法
Acrylamide mix	西方墨點法
Tris (PH=6.8)	西方墨點法
TEMED	西方墨點法
Bradford reagent	西方墨點法
Ammonium persulfate	西方墨點法
agarose powder(瓊脂粉末)	凝膠電泳
EtBr	凝膠電泳
DNA Gel Loading Dye (6X)	凝膠電泳

肆、研究過程及方法

一、實驗流程



二、細胞培養

本實驗使用 HaCaT cell (人體永生化角質細胞) 作為主要細胞株，細胞來源由中山醫學大學吳俊錡教授所提供。而 HaCaT 細胞的培養液主要成分為 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)，其培養液均含有 10% Fetal bovine serum (FBS)、1% Penicillin/Streptomycine (P/S)、1% Sodium pyruvate。細胞培養於 37°C、5% CO₂ 的恆溫培養箱中，在細胞培養過程中需進行細胞繼代以確保細胞生長的環境利於細胞存活，且通常依細胞的生長週期不同所需繼代的時間也不同，由於 HaCaT 細胞的 Doubling Time 大約 22~24hr，故須 2~3 天進行細胞繼代。繼代的過程首先將舊的培養基移除，再加入 PBS 將細胞潤洗一次後移除 PBS，接著加入適量 1 倍之 Trypsin/EDTA (T/E) 於 37°C, 5% CO₂ 的恆溫培養箱中反應 10 分鐘，之後加入相同或大於 T/E 之體積的培養液以中止反應。最後將細胞懸浮液收集至 15ml 離心管，離心之後移除上層培養液，而所有細胞將被離心至管底，加入適量新鮮培養液且沖散所有細胞並均勻混合，再以 1:2 - 1:4 的比例將細胞種回培養皿中並均勻搖晃，其目的主要使細胞均勻擴散，以利細胞生長。

三、 UVC 照射

Hoefer UVC500 可應用於 DNA cross-linking、紫外線消毒等，但在本實驗中主要做為模擬紫外線輻射照射強度之工具。首先開啟 UVC 儀器，輸入需要的照射強度，將樣品放入機台內，再按下開始鍵，等到顯示器的數字降為零時，即完成一次照射。此儀器是固定劑量，因此設定不同劑量則照射時間會不同，由於機器本身基本單位為 $100 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ ，故若想設定 $20000 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ ($20 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) 須輸入 200。

四、 DNA 膠體電泳

目的是用來檢測 HaCaT 中黴漿菌(Mycoplasma)的存在，利用 agarose 膠體電泳法將黴漿菌 DNA 片段依大小予以分離。配置方法為秤量 0.5 g Agarose 及 1x TAE buffer 100 ml 加至燒杯中，可利用微波爐加熱至沸騰使 Agarose 溶解，待至溶液冷卻後加入 EtBr 後稍微搖晃瓶身至均勻後倒入膠台，放上齒梳並輕蓋上鋁箔紙等待 30 分鐘凝固，此時可配置樣品及 marker；將 20 μl 樣品加 4 μl loading dye 配置 1/6 的 loading sample。30 分鐘之後確定凝固完成，將齒梳拔起將凝固完成的膠體放入電泳槽並倒入 running buffer 至蓋過膠體，之後 loading sample、marker，確定一切就緒後蓋上蓋子以 100 v 進行跑膠 18 分鐘，至完成後將膠體從電泳槽取出後放入紫外光照台，觀察紅色的 DNA 片段分布，並照相存檔。

五、 蛋白質萃取

為了偵測 HaCaT 細胞在照射 UVC 後之細胞凋亡相關蛋白質的表現，首先先將細胞收集至 1.5 ml 微量離心管中離心 $960 \times g$ 、 4°C 、5 分鐘，去除上清液，再加入含有 1% $\text{Na}_3\text{VO}_4/\text{H}_2\text{O}$ 的 PBS 混合均勻，再離心 $960 \times g$ 、 4°C 、5 分鐘，去除上清液。視細胞多寡加入適量的蛋白質萃取液(Cell Lysis Buffer 0.5% NP-40、150mM NaCl、50mM Tris-base (pH=8.0)、5 mM EDTA、10% protease inhibitor cocktail、2 mM PMSF、1% $\text{Na}_3\text{VO}_4/\text{H}_2\text{O}$)，進行細胞 lysis；每 15 分鐘震盪一次，重複三次，之後將細胞拿去離心 $15400 \times g$ 、 4°C 、20 分鐘離心完畢後，收取上清液至 1.5 ml eppendorf 中，即為蛋白質萃取液。接著從蛋白質萃取液中取出 1 μl

加入二次水稀釋 30 倍，再加入 900 μ l Bradford reagent 混合均勻，放在室溫靜置避光 10 分鐘，再以分光光度計讀取吸光值，利用 BSA 標準曲線(Standard Curve) 計算出濃度後校正至等量濃度，最後加入細胞萃取液總量的五倍 Sample Buffer (60 mM Tris-HCl, pH=8.0、25% Glycerol、2% SDS、14.1 mM β -Mercaptoethanol、0.1% Bromophenol Blue)，充分混勻後放入乾浴槽，以 95~100°C 作用 10 分鐘，讓蛋白質變性(Denaturation)即可將蛋白質萃取液存在-80°C 保存。

六、西方墨點法

(一)、聚丙烯胺膠體電泳法

(SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)

製備 1.5 mm 厚度的不連續膠體(Discontinuous Polyacrylamide gel)，將兩片玻璃以中清潔劑清洗乾淨後，噴 95%酒精，再用拭鏡紙(Kimwipe)擦拭乾淨，放置架膠台後即可開始配置膠體，每次所使用的膠體會依照蛋白質的大小來配置不同%的下膠(Separating gel)，依序加入 ddH₂O、1.5M Tris、10%SDS、10% Ammonium persulfate、30 %Acrylamide / Bis solution、TEMED，混和均勻後，注入玻璃管中，加入異丙醇(Isopropanol)以排除多餘氣泡並使膠體之膠界面平整，室溫靜置 30 分鐘後，用清水將異丙醇去除後，開始配置上膠(Stacking gel)，依序加入 ddH₂O、1.5 M Tris、10 %SDS、10 %Ammonium persulfate、30 %Acrylamide/Bis solution、TEMED，均勻混和後，注入玻璃管中，插入齒梳(comb)，室溫靜置 30 分鐘，將製備好的膠體組合於電泳槽中，內槽及外槽加入一倍的電泳緩衝溶液(1x Running Buffer)，拔出齒梳後將蛋白質萃取液及 protein marker 注入膠體孔槽內，以電壓 55 伏特讓蛋白質樣本通過上膠，之後再將電壓改為 60v~80v。

(二)、蛋白質轉漬法(transfer)

配置一倍轉漬緩衝溶液(1x Transfer Buffer)後，放置 4°C 冰箱備用，接著拿 PVDF 轉漬膜浸泡在甲醇(Methanol)內以活化轉漬膜，再以 ddH₂O 將甲

醇洗淨去除後，浸泡在 ddH₂O 中，置於振盪器上備用。電泳完成後，準備轉漬板(Mini gel holder cassette)依序加入：海綿、三張濾紙、PVDF 膜、電泳膠體、三張濾紙、海綿後，放入含有一倍轉漬緩衝溶液的全溼轉漬槽中(Trans-Blot Cell With Electrodes)依蛋白質分子量大小選擇電壓及轉漬時間。

(三)、Blocking

配置 5%脫脂牛奶在 PBST 中，將轉漬好的膜浸泡在配好的牛奶中，放置振盪器上搖晃一小時以去除背景雜質。

(四)、細胞凋亡相關蛋白質抗體偵測

將 Blocking 完的轉漬膜用 ddH₂O 清洗乾淨後，倒入 PBST 放置震盪器上搖晃清洗十五分鐘，此步驟重複兩次，共三十分鐘。清洗完成後可倒入一級抗體，放置 4°C 振盪器上搖晃 12~16 小時後，回收一級抗體，加入 PBST 放在振盪器上，每 15 分鐘洗一次，此步驟重複 4 次，共 1 小時，接下來淋上冷光呈色系統 ECL(Enhanced Chemiluminescence)；反應後，於暗房利用底片(X-ray film，100NIF)依照蛋白質反應時間來呈色。

一級抗體	
ATM	c-Abl
actin	Tubulin
Bax	Bcl-2

二級抗體	
Goat anti-mouse	Goat anti-rabbit

七、細胞生長分析

將細胞種至 6 well 孔盤中，待細胞貼附兩天後，加入藥物處理 24 小時，即可開始進行細胞計數。以適量 1 倍之 Trypsin/EDTA 將細胞打下，加入細胞培養液終止反應後，放在微量離心管中，離心 960 x g，5 分鐘；最後將上清液去除，加入適量之 PBS，將細胞打散後，即可利用細胞計數器計算細胞數量，一共計數 6 天。

八、細胞存活率分析(MTT)

MTT 為一種氫離子染料，可以和細胞中的粒線體呼吸鏈作用，生成紫色的甲簷結晶，並利用 DMSO 溶出測其吸光值。首先，將細胞根據細胞特性以及實驗需求給予細胞數 3.2×10^5 ，種至 5 盤 3 cm 培養皿中，每個 well 含有 2 ml 的培養液，seeding 完後分別照射強度 0、20、25、50、100 mJ/cm^2 的 UVC，24 小時後將培養液去除，加入 100 μl MTT(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl), 5-diphenyltetrazolium bromide)及 900 μl DMEM，於 37°C 、5 % CO_2 靜置反應 3 小時。待反應後，去除培養液，並加入 100 μl DMSO 溶出紫色甲簷結晶，避光反應 30 分鐘。接著分別種入 96-well 培養盤(plate)，每組各 load 10 well，利用 ELISA reader 以吸光值 O.D. 570 nm 測定。最後將數據輸入 Excel 中計算平均值 (mean value)與標準差(standard error of mean, SEM)，並以統計之平均值作圖。

九、免疫螢光染色(Immunocytochemistry)

首先將 12 mm 之圓形蓋玻片(coverslip)貼上加強圈並用高溫高壓滅菌後，取出一片貼有加強圈之圓形蓋玻片放入 24 well 孔盤中，以 5×10^4 cells/well 之比例種植細胞於蓋玻片上，等待細胞貼覆即可進行免疫螢光染色。將細胞培養液移除後，以 PBS 清洗三次，加入 500 μl 之 fixation buffer (4% paraformaldehyde、2% sucrose)將細胞固定，室溫避光靜置 15 分鐘，再以 PBS 清洗三次，加入 500 μl 之 permeabilization buffer(1% BSA、0.3% Triton X-100)，室溫搖晃 1 分鐘，再以 PBS 清洗三次，加入 500 μl 之 blocking buffer(1%BSA)，室溫搖晃 15 分鐘，再以 PBS 清洗三次加入一級抗體至加強圈正中間，放置 4°C 靜置 12-16 小時。隔天以 PBS 清洗三次後再加入 PBS 室溫搖晃五分鐘，再加入相對應之二級抗體，室溫靜置 1 小時，再以 PBS 清洗三次，即可進行封片，在玻片上滴上約 10 μl 之 mounting medium (Fluoroshield with 1,4-Diazabicyclo{2.2.2} octane)等乾後，再塗上指甲油，即可以正立螢光顯微鏡(Fluoromount microscope)觀察，並拍照紀錄。

十、 量化及統計分析

實驗數據皆以 Image J 軟體進行量化，根據數據的數值不同以及處理組之間的差異進行比較，各組數據皆以平均值(Mean) \pm 誤差值(SEM)表示，若要比較數據之間的差異則以 Student's *t*-test 做雙尾分析。統計結果以*表示，*代表 $P < 0.05$ ，**代表 $P < 0.01$ ，***代表 $P < 0.001$

伍、 研究結果

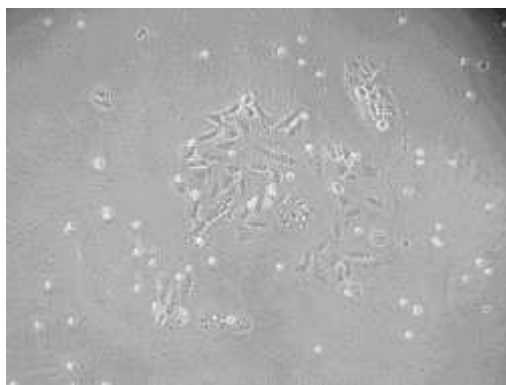
一、 HaCaT cell(人體角質永生形成細胞)培養及測試

(一) 初步細胞測試

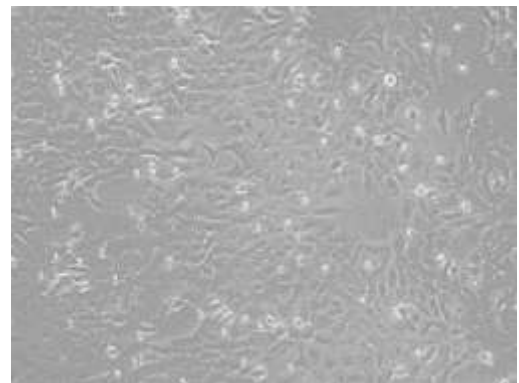
HaCaT cell 是人體永生化角質細胞，為構成皮膚的主要細胞之一，因此我們可透過 HaCaT cell 探討皮膚損傷的情形。本次實驗分別以不同強度的 UVC 照射細胞株進行操作。

(二) HaCaT cell 培養—去除黴漿菌污染

實驗前必須先確定細胞的穩定性，一開始培養 HaCaT cell 發現有嚴重污染的污染現象(圖一)，因此可能導致 HaCaT cell 無法增殖。後來利用 MRA(抑制黴漿菌專用藥物)抑制黴漿菌生成後，可明顯看出 HaCaT cell 的生長具方向性，且細胞排列緊密。



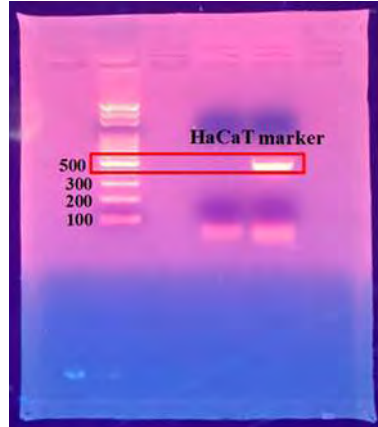
圖一、黴漿菌污染之HaCaT cell



圖二、排除黴漿菌污染之
HaCaT cell

(三) DNA 膠體電泳—確認細胞無汙染

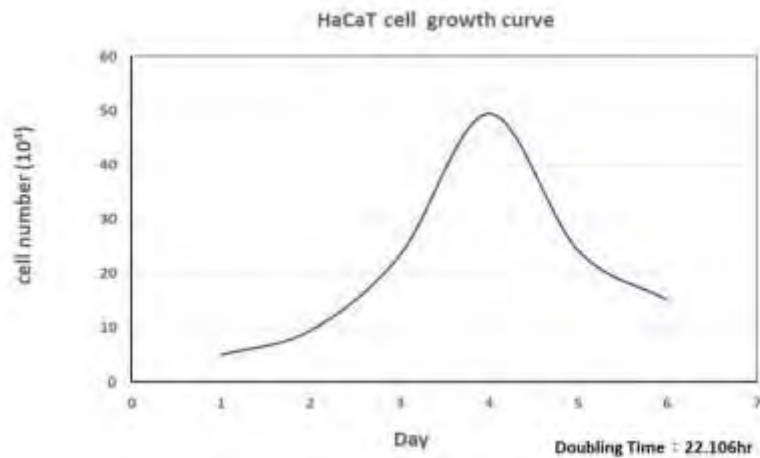
細胞回復穩定後(圖二)，以PCR確認是否有黴漿菌殘留(圖三)。結果如下圖：紅框部分所示，最右邊是黴漿菌的marker，中間則是HaCaT cell，於分子量500b.p.處可看出HaCaT cell無表現，確定無黴漿菌汙染。



圖三、確認HaCaT cell未被黴漿菌汙染

(四) 細胞計數—繪製細胞生長曲線

本組利用細胞計數紀錄HaCaT cell的生長情況。根據實驗結果，細胞在正常生長狀況之下，大約在第4天達到最大量，且細胞的doubling time大約為22小時，故本組在培養細胞時大約2~3天後進行繼代。而由此圖可知，HaCaT cell是一種容易培養且生長狀況良好的細胞。



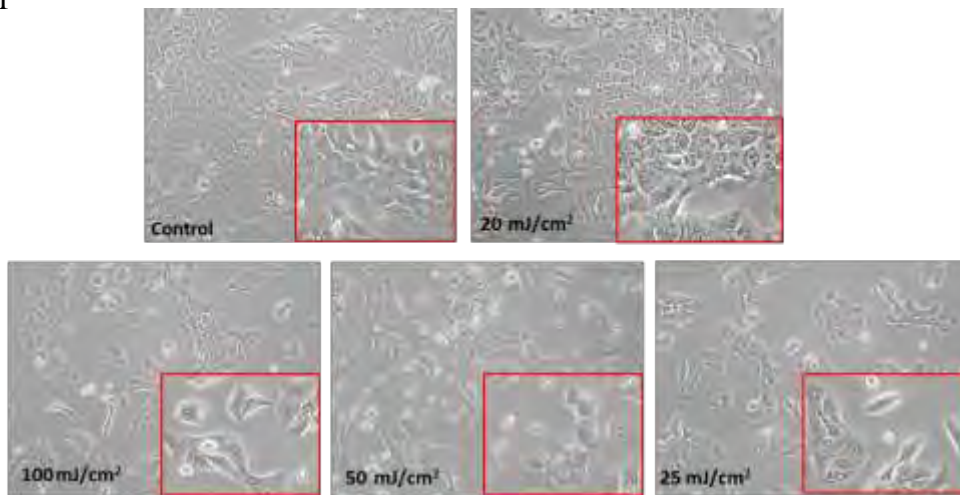
圖四、HaCaT cell 生長曲線

二、UVC 對於 HaCaT cell 人體角質永生形成細胞之影響

(一) 細胞型態圖

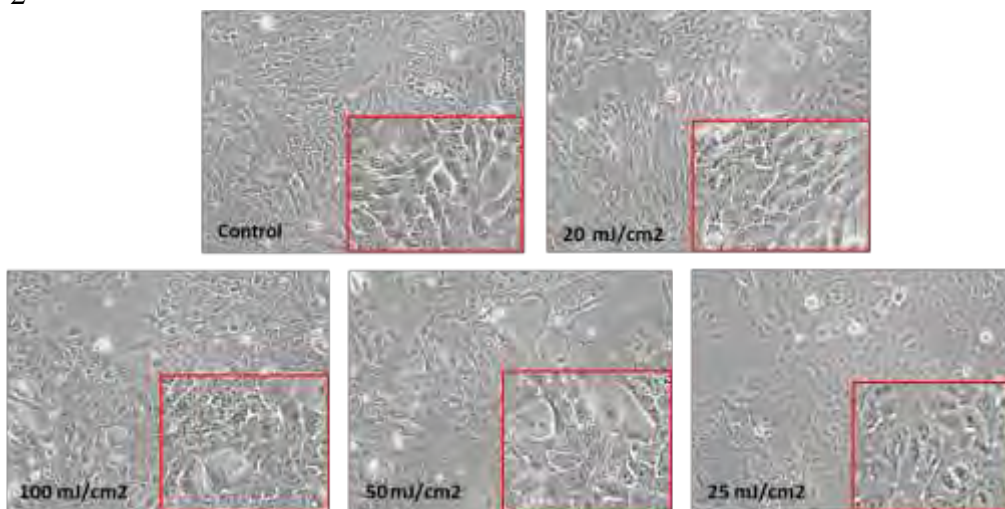
我們透過 UVC 照射 HaCaT cell 模擬紫外線造成皮膚細胞損傷。穩定 HaCaT cell 後，經 20、25、50 和 100 mJ/cm² UVC 照射，UVC 照射經 24 小時後，相對於對照組，細胞有明顯較少，越高劑量的 UVC 照射，傷害情況越嚴重(圖五)；在照射 48 小時後，劑量 50 及 100 mJ/cm² 細胞有恢復情形，而劑量 20、25 mJ/cm² 的修復情形較不明顯(圖六)。

Day 1



圖五、UVC對HaCaT cell型態造成損傷

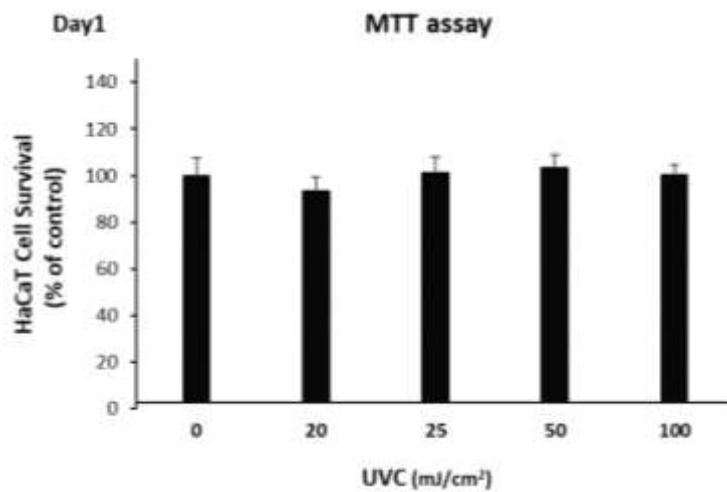
Day 2



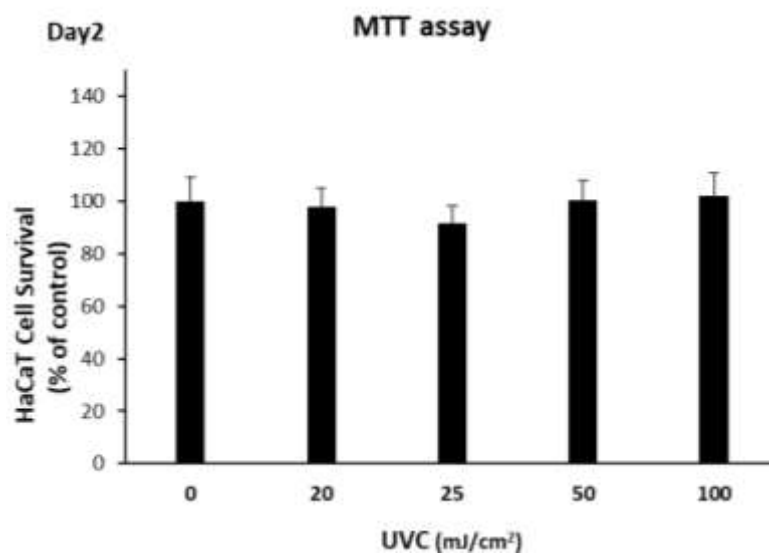
圖六、HaCaT cell回復

(二) MTT—測試 UVC 對細胞毒殺性

在確認 UVC 會造成 HaCaT cell 細胞和染色體型態產生變化後，利用 MTT 觀察 UVC 對 HaCaT cell 毒殺現象並以 Western Blot 觀察細胞凋亡相關生物標記之變化，藉以探討 UVC 誘導 HaCaT cell 細胞凋亡可能之相關分子機制。由下二圖可見，照射強度為 20 mJ/cm^2 在 24 小時後活細胞數相較於對照組有下降，且相對於其他實驗組些微下降，而經 48 小時後，照射劑量為 25 mJ/cm^2 呈下降趨勢。(圖八、九)。



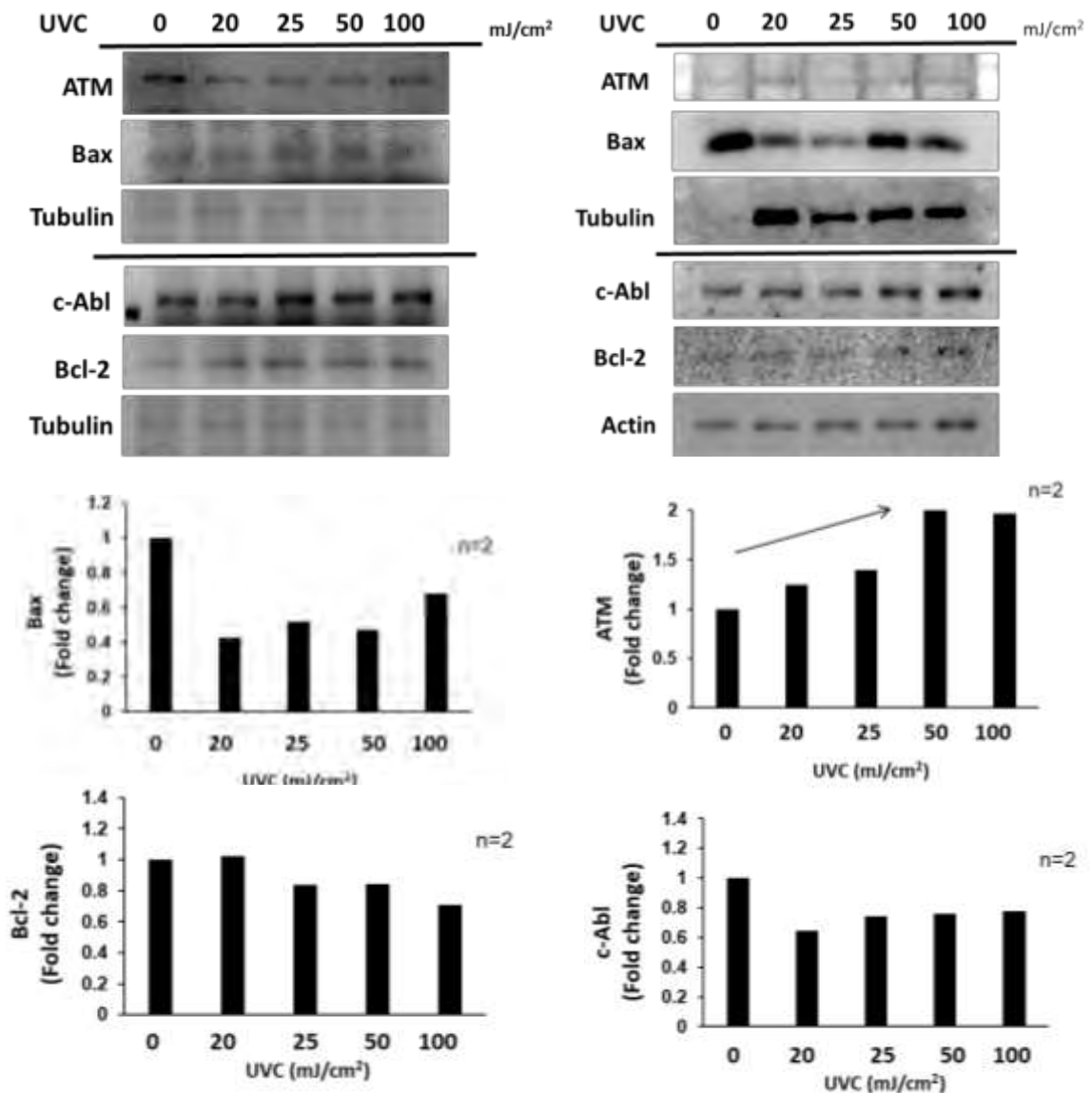
圖八、UVC照射HaCaT cell 24小時



圖九、UVC照射HaCaT cell 48小時

(三) Western Blot—觀察細胞凋亡

根據參考文獻，我們利用UVC造成細胞損傷。誘導細胞凋亡現象劑量是設定在20 mJ/cm²。在不開蓋條件下，經 20、25、50、100 mJ/cm² UVC照射，觀察HaCaT cell 24和48小時細胞凋亡相關生物標記之變化。根據Western Blot和量化的結果(圖十)， ATM及c-Abl皆呈上升趨勢；Bax在低劑量照射的表現量較低，而Bcl-2在低劑量表現較高，兩者可相互印證，並且可由此推論細胞在UVC高劑量照射的損傷會較嚴重，卻可能較早啟動修復機制。

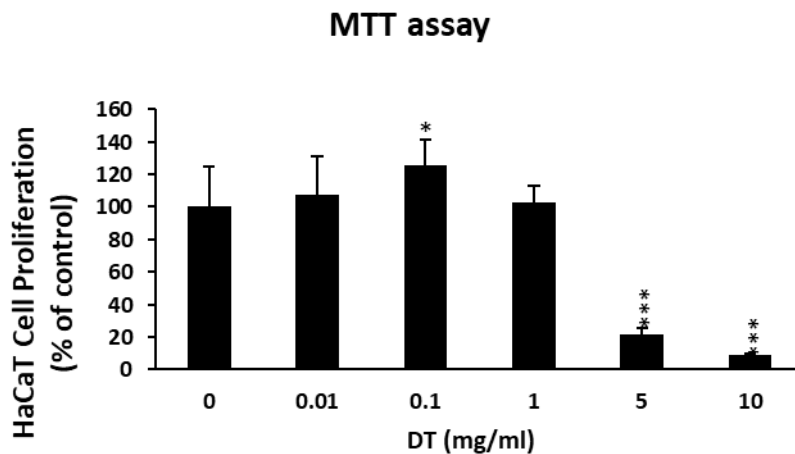


十、Western Blot 結果及量化圖

三、比較金皇石斛和 A 酸對 UVC 照射傷害的防護效果之異同

(一) MTT—測試 DT 對細胞的影響

首先測試 DT 劑量，我們將細胞加入 0、0.01、0.1、1、5、10 mg/ml DT，經 24 小時後再測其細胞存活率。根據圖十一，我們發現加入較低濃度如 0.01、0.1 mg/ml 時，細胞存活率有上升的趨勢。但在加入高濃度如 5、10 mg/ml 時，細胞存活率顯著下降，由此可知，在適當的劑量下，DT 可以幫助細胞生長，但劑量過高則導致細胞死亡。

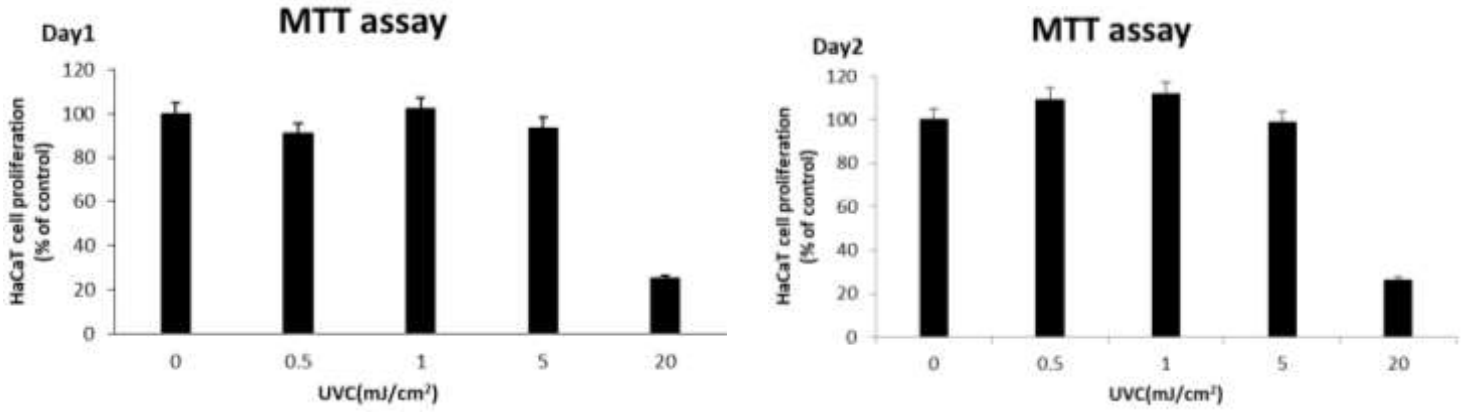


圖十一、DT 對細胞影響測試

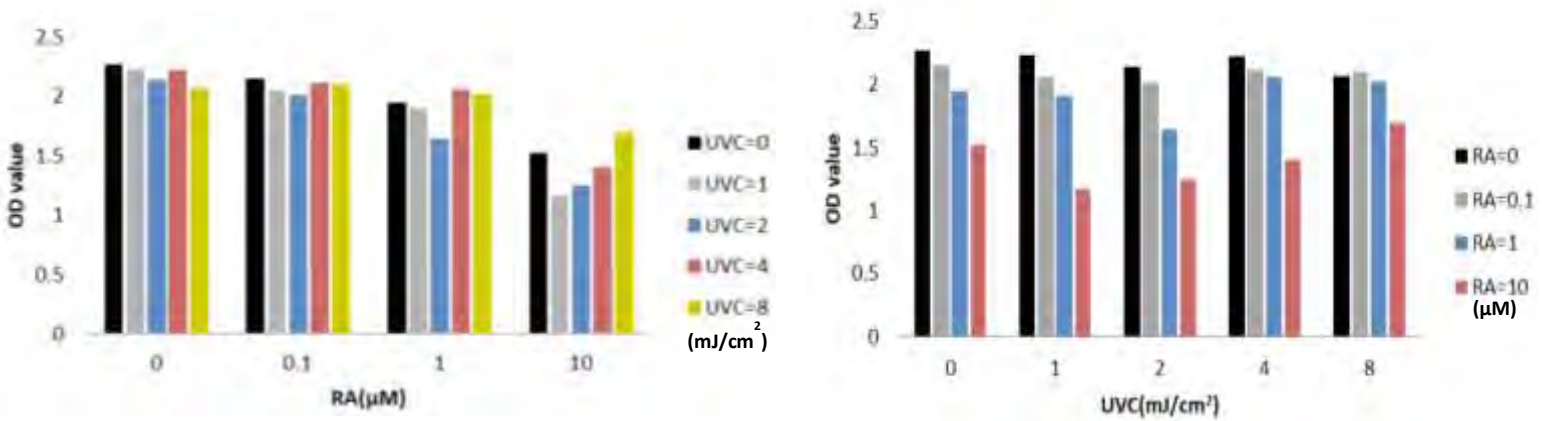
(二) MTT—測試 RA 和 DT 對細胞的防護能力

後續實驗發現開蓋後，只需要極小的UVC強度便可使細胞受到嚴重傷害。為了確定開蓋照射的UVC劑量，參考文獻後本組將照射強度定為0、0.5、1、5、20 mJ/cm²，由圖十一可見在強度為5 mJ/cm²時細胞存活率呈下降趨勢，我們推測最適當的UVC劑量大約落在1至5 mJ/cm²。接著本組進行加藥測試，以RA 作正對照組，參考文獻將RA劑量定為 0、0.1、1、10 μM，待細胞貼附24小時後加入RA，2小時後以UVC強度為0、1、2、4、8 mJ/cm²分別照射。結果顯示當UVC強度越強，細胞存活度呈下降趨勢且對細胞傷害越大。其中發現UVC強度在 4、8 mJ/cm² 時添加RA細胞有回復生長，因此往後實驗以4、8 mJ/cm² 為主。再以DT為實驗組，將劑量定為 0、0.01、0.1

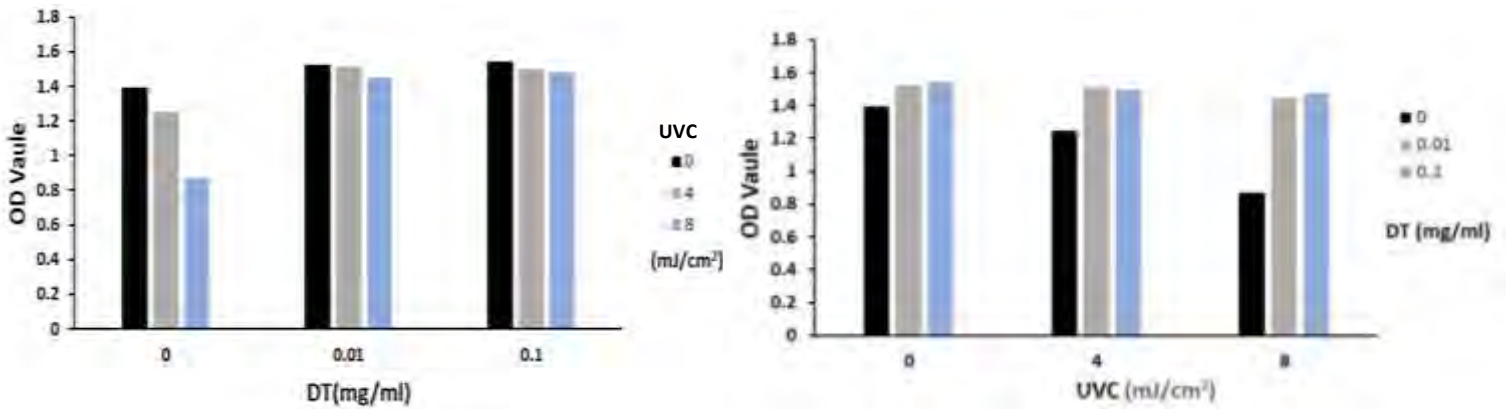
mg/ml，UVC強度定為0、4、8 mJ/cm^2 ，實驗步驟同RA，根據實驗結果，DT對經UVC傷害的HaCaT cell的細胞存活率皆呈上升趨勢(圖十三)，可見DT對HaCaT cell接受UVC照射之傷害具良好防護效果。



圖十一、UVC 劑量測試



圖十二、RA 對 HaCaT cell 防護 UVC 之效果

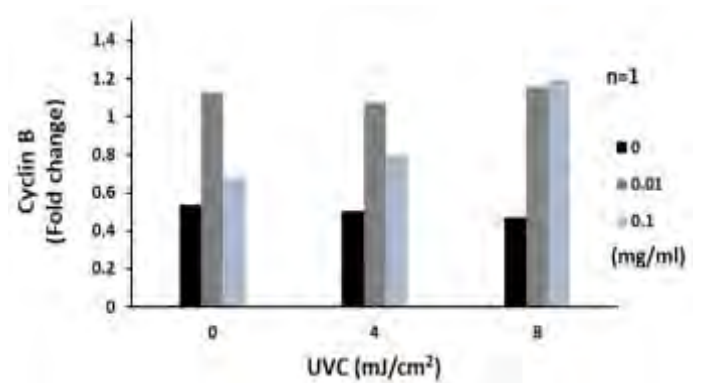
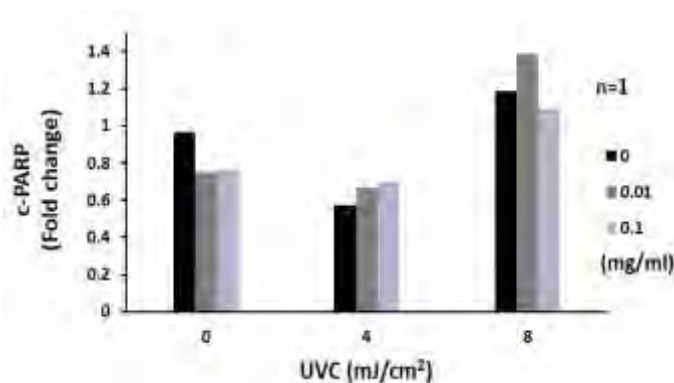
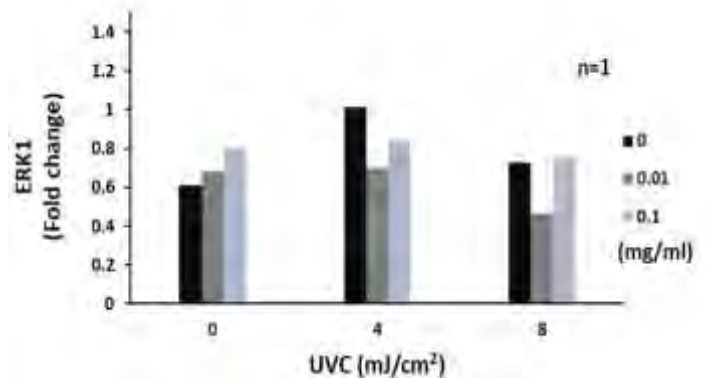
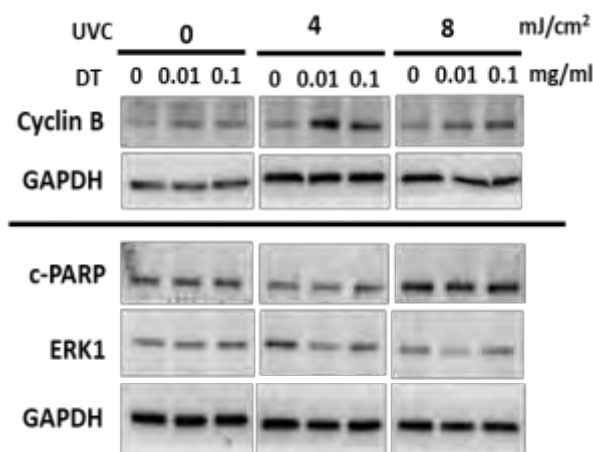


圖十三、DT 對 HaCaT cell 防護 UVC 之效果

四、探討金皇石斛修復 UVC 誘導之細胞傷害的相關機制

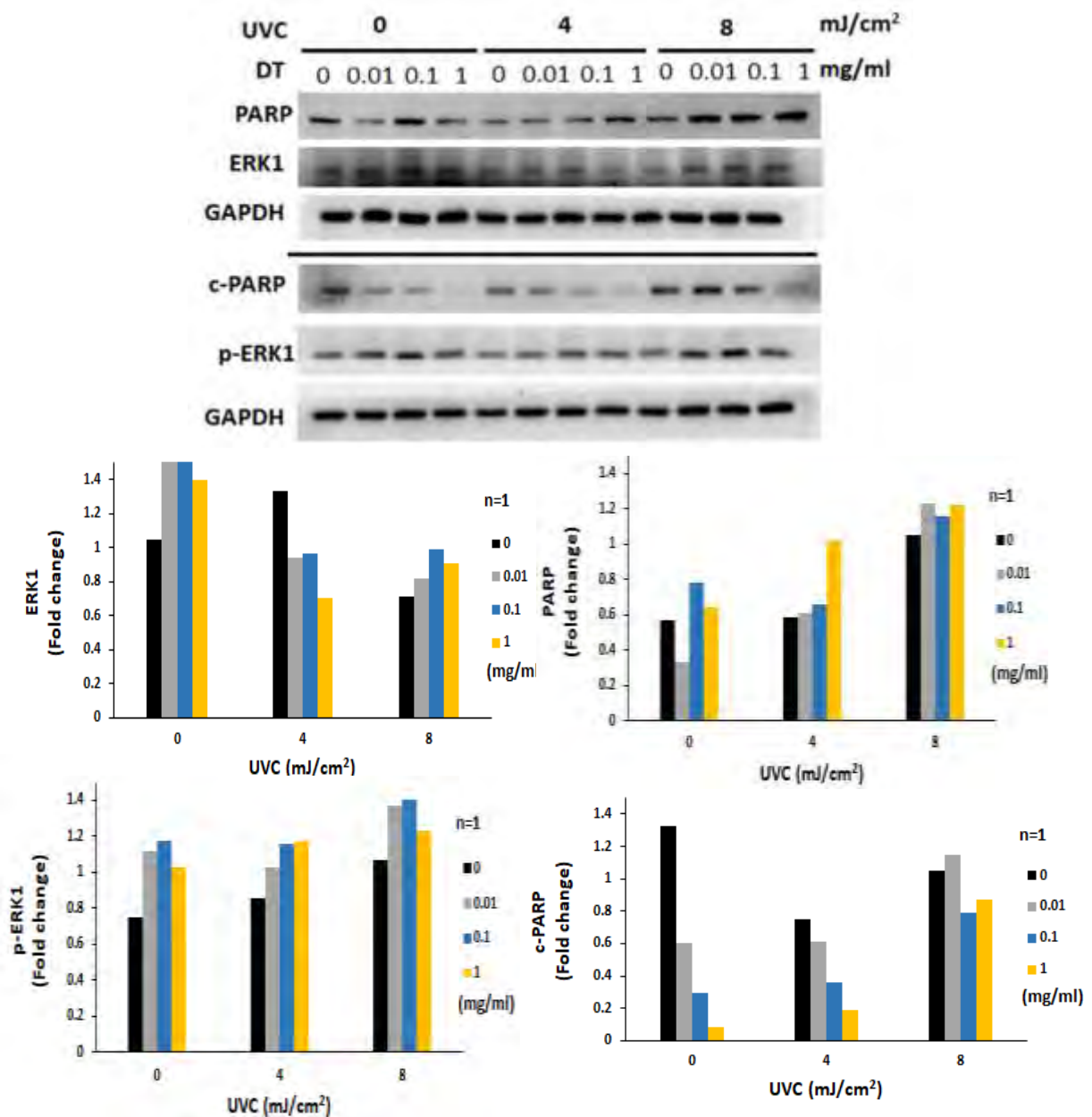
(一) DT 對 HaCaT cell 相關蛋白表現

為了探討 DT 對照射 UVC 後 HaCaT cell 的修復能力，我們觀察了幾個與細胞分裂及凋亡相關的蛋白(圖十四與十五)。Cyclin B 表現越明顯則代表越多細胞停滯在進入 M 期前，但表現量與劑量並無呈現相關性，只能確定加了 DT 後可以停滯細胞週期。c-PARP 是凋亡蛋白，觀察被切斷的片段，表現越明顯則表示細胞所受到的損傷越多，需要修復的細胞越多。ERK1 則是調控細胞生長的蛋白，然而，兩者實驗結果與劑量也無相關性。或許是人為操作上的疏失導致現象不穩定，我們決定重新測試，並以 PARP 進行對照。



圖十四、DT 誘導 HaCaT cell 修復相關生物標記表現及量化

由實驗結果可知，加入越高劑量的 DT 會使 c-PARP 表現量下降，所以能合理推測，DT 可以保護我們的細胞減少 UVC 的傷害。PARP 是修復蛋白，在 UVC 強度為 4 和 8 的組別中，越高劑量的 DT 會使 PARP 表現量增加，可與 c-PARP 相互印證，我們猜想 DT 在細胞受到一定壓力的情況下也可以啟動修復機制。p-ERK1 是分裂蛋白，隨著 DT 劑量越高，蛋白表現量增加，表示 DT 能保護細胞，使細胞能順利分裂。因此，DT 不僅能抵禦 UVC 的傷害，且能幫助 HaCaT cell 增殖。



圖十五、DT 誘導 HaCaT cell 修復相關生物標記表現及量化

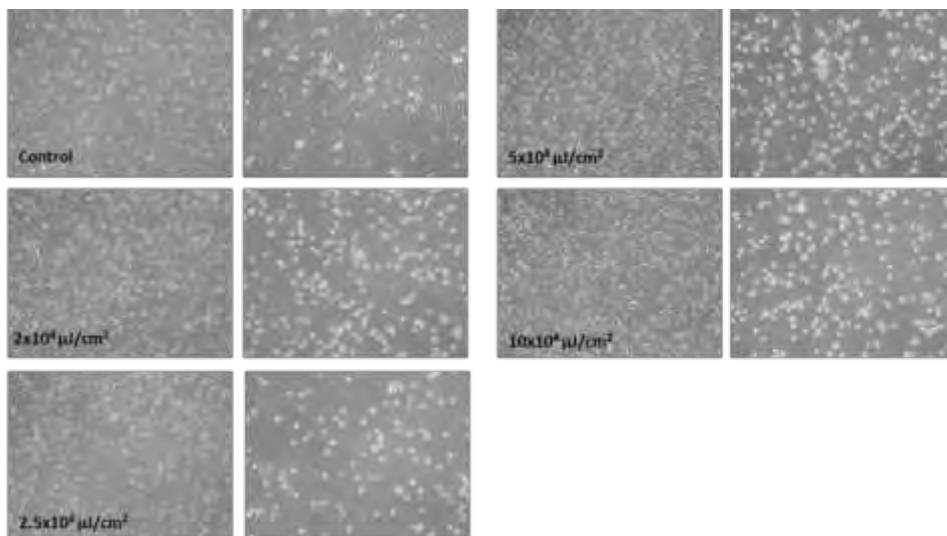
陸、討論

一、更高強度UVC照射HaCaT，卻沒有更大的傷害

在Western Blot與MTT測試中，相較於實驗組20、25 mJ/cm²，50及100 mJ/cm²的損傷較小，細胞存活量也比較多，當UVC強度增強，傷害反而沒有變大。我們推測，高強度UVC照射雖會破壞細胞，但可能已觸發HaCaT的修復機制，恢復力提升，而低強度者劑量不足以觸發修復機制，恢復力會較低，損害程度相對較高。但此一推論仍須在往後的時間內設計更多的實驗去驗證。

二、照射時有無開蓋的差別

為了避免汙染，本組在進行UVC照射時皆無開蓋，我們以為無開蓋並不會對實驗產生太大影響。經過一次開蓋照射，24小時後重新觀察細胞時，最低劑量的20 mJ/cm² 細胞懸浮的情形十分嚴重，更遑論其餘更高劑量的組別，由此可見蓋子具保護效果，確實對實驗產生一定的影響。但是經一段時間後，細胞似乎有慢慢重新貼附，雖然為數不多，卻也可知細胞似乎並沒有全數死亡，若再多培養幾日細胞有長回，由此可以推測只是傷害太強，修復機制較慢啟動。



三、金皇石斛對 UVC 誘導之細胞傷害防護效果

由圖十三的實驗結果推論，DT 具有良好防護效果。我們猜測 DT 粗萃取物中多樣的分子會干擾我們實驗的準確性，若能更了解並純化其內容物，預期在高純度的情況下，其防護效果應能更顯著。

四、金皇石修復 UVC 誘導之細胞傷害的可能分子機制

DT 萃取物中的多醣體(Polysaccharides)是我們推測誘導修復系統啟動原因，但因 DT 為萃取物並無法確定其中濃度，若能利用質譜儀去測定其中多醣體含量多寡，更能進一步確定啟動機轉。

由 UV 光造成的 DNA 損害，因作用位置不同有不同的病變型態產生，所相對應產生的 DNA 修復系統也都不盡相同。以最常見的修復機制 NER (Nucleotide excision repair) 來說，其又區分為 global genomic NER (GG-NER or GGR) 和 transcription coupled NER；另外 recombinational 修復機制也有 homologous recombinational 和 non-homologous end joining 等的分別，這些機制都有特殊的生物標記。我們可以利用 qPCR、Western Blot 等的技術去追蹤 XPC、ERCC1、ATM、KU80 來確定何種細胞修復系統被我們的 DT 所啟動。除了鏡檢觀察細胞型態，我們也可以藉由螢光染色追蹤 lysosome 來看修復以及損傷情形，或使用 Flow cytometry 儀器技術，確實追蹤每個細胞的細胞週期、損傷和修復狀態，能更精確了解 DT 的作用機制。

五、本研究的實驗技術探討與研究設計限制

本組使用 Hoefer UVC500 來模擬我們細胞所受到的紫外光照射。由於無法確定人體暴露在自然界紫外光底下時所受到的確切紫外線強度，因此無法模擬一般人日常的情況。人體皮膚因環境條件不同而有差異，本組實驗設計條件趨於單一，因此我們可能忽略很多其他的外在因素。再者，正常人的細胞會不斷地老化、再更新，但我們的細胞為永生化細胞。鑒於人體角質細胞是一種會不斷更新的細胞，我們所培養並拿來實驗的細胞可能會因老化而造成實驗誤差。

因為實驗環境的限制，我們希望在接下來的後續實驗中，可以挑一株正常會老化的非永生細胞作為我們的實驗材料，在體外更能確立我們的假說；一旦有固定模式後，更希望可以在老鼠上重現我們在細胞上的實驗，對於開發 DT 取代或是混和 RA 的防護有更進一步的發展。

柒、結論

根據文獻探討和實驗結果得知，HaCaT cell 在經過短時間 UVC 照射後，會誘導其發生細胞凋亡使細胞型態改變、老化、損傷和死亡等現象，由研究結果亦可知，低濃度金皇石斛能增強細胞的防護能力，顯示金皇石斛能有效幫助細胞抵抗 UVC 傷害。其中，透過觀察蛋白表現量可以得知，c-PARP 的表現量隨著 DT 劑量越高呈下降趨勢，而 PARP 及 p-ERK1 則呈上升趨勢，表示金皇石斛能抵禦 UVC 損傷，能使細胞順利分裂增殖。因此，金皇石斛能減少紫外線損傷，並能幫助細胞生長，是理想的抗紫外線成分。

捌、參考資料及網頁

- [1] Takasawa R, Nakamura H, Mori T, Tanuma S. (2005) Differential apoptotic pathways in human keratinocyte HaCaT cells exposed to UVB and UVC.
- [2] Mohamed A. El-Mahdy, Qianzheng Zhu, Qi-En Wang, Gulzar Wani, Srinivas Patnaik, Qun Zhao, El-Shaimaa Arafa, Bassant Barakat, Safita N. Mir, and Altaf A. Wani (2008) Naringenin Protects HaCaT Human Keratinocytes Against UVB-induced Apoptosis and Enhances the Removal of Cyclobutane Pyrimidine Dimers from the Genome.
- [3] Domankevich V, Eddini H, Odeh A, Shams I. (2018) Resistance to DNA Damage and Enhanced DNA Repair Capacity in the Hypoxia-Tolerant Blind Mole Rat, Spalax.
- [4] Chen YC, Li CL, Hsiao YY, Duh Y, Yuan HS. (2014) Structure and function of TatD exonuclease in DNA repair.
- [5] Nicoletta Vitale, Annamaria Kisslinger, Simona Paladino, Claudio Procaccini, Giuseppe Matarese, Giovanna Maria Pierantoni, Francesco Paolo Mancini, Donatella Tramontano. (2013) Resveratrol Couples Apoptosis with Autophagy in UVB-Irradiated HaCaT Cells.
- [6] Hye Kyung Kim (2016) Protective Effect of Garlic on Cellular Senescence in UVB-Exposed HaCaT Human Keratinocytes.
- [7] Xiang Lin, Pang-Chui Shaw, Stephen Cho-Wing Sze, Yao Tong, Yanbo Zhang (2018) Dendrobium officinale polysaccharides ameliorate the abnormality of aquaporin 5, pro-inflammatory cytokines and inhibit apoptosis in the experimental Sjögren's syndrome mice.
- [8] Chia-Wei (2013) In vitro effects of citric acid on the induction of cell cycle arrest and apoptosis in human immortalized keratinocyte cell line (HaCaT)

- [9] Hsin-Lien (2009) Effects of Lactic Acid on the Induction of Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Human Immortalized Keratinocyte Cell Line (HaCaT)
- [10] Chih-Hao Chao (2013) Morphology Analysis of Suspension co-culture of Hs68 & HaCaT Cells.
- [11] Thulasi G. Pillai., C.K.K.Nair., K.K.Janardhanan. (2010) Enhancement of repair of radiation induced DNA strand breaks in human cells by *Ganoderma* mushroom polysaccharides. *Food Chemistry*. Volume 119, Issue 3, 1 April 2010, Pages 1040-1043.
- [12] M. T. Mendiola-Cruz., P .Morales-Ramirez. (1999) Repair kinetics of gamma-ray induced DNA damage determined by the single cell gel electrophoresis assay in murine leukocytes in vivo. *Mutation Research/DNA Repair*. Volume 433, Issue 1, 26 January 1999, Pages 45-52.
- [13] Guo Q1, Xu L1, Chen Y1, Ma Q1, Santhanam RK1, Xue Z1, Gao X1, Chen H2. (2019) Structural characterization of corn silk polysaccharides and its effect in H₂O₂ induced oxidative damage in L6 skeletal muscle cells. *Carbohydr Polym*. 2019 Mar 15;208:161-167. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.12.049. Epub 2018 Dec 19.
- [14] Espejel S1, Martín M, Klatt P, Martín-Caballero J, Flores JM, Blasco MA. (2004) Shorter telomeres, accelerated ageing and increased lymphoma in DNA-PKcs-deficient mice. *EMBO Rep*. 2004 May;5(5):503-9. Epub 2004 Apr 23.
- [15] Sun XY1, Wang JM1, Ouyang JM1, Kuang L1. (2018) Antioxidant Activities and Repair Effects on Oxidatively Damaged HK-2 Cells of Tea Polysaccharides with Different Molecular Weights. *Oxid Med Cell Longev*. 2018 Nov 21;2018:5297539. doi: 10.1155/2018/5297539. eCollection 2018.
- [16] 行政院農業委員會種苗改良繁殖場 <https://www.tss.gov.tw/>

【評語】 052014

金皇石斛的多醣體含量很高，具抗腫瘤及抗老化的功效。本研究使用人體永生化角質細胞(HaCaT 細胞) 以不同濃度的金皇石斛萃取物處理後，再照射不同強度的紫外線，利用細胞存活率分析(MTT assay)以及西方墨點法(Western Blot)實驗金皇石斛的防護效果。結果顯示金皇石斛萃取物增加 HaCaT 細胞在照射過 UVC 後的存活率，並防護 UVC 損傷。

1. 跟之間的研究相比較僅多了第 15 個圖，部分的實驗數據僅重作。
2. 僅用一個細胞株 HaCaT 細胞是不夠客觀。
3. 實驗數據看不出 DT 具有保護的效果，宜再加強。
4. 實驗數據還蠻不穩定的，宜再重作。

摘要

本組選用來自農委會種苗場雜交選育而得的台灣特有種—金皇石斛 (*Dendrobium taiseed* Tosnobile, DT)作為實驗對象，金皇石斛的多醣體含量很高，具抗腫瘤及抗老化的功效，生長期短且產量高。在此本實驗使用HaCaT cell (人體永生角質細胞)作為主要細胞株，首先將細胞培養於培養皿中，添加維生素A酸及金皇石斛 (DT)作為防護機制，再照射一定的UVC劑量以模擬皮膚受到的外界傷害，利用細胞存活率分析(MTT assay)以及西方墨點法(Western Blot)實驗金皇石斛的防護效果，並透過流式細胞技術(Flow cytometry)觀察細胞週期。結果顯示金皇石斛萃取物增加HaCaT細胞在照射過UVC後的存活率呈上升趨勢，並且能使細胞順利分裂增殖，能夠減少UVC損傷。

壹、研究動機

紫外線照射為最常見破壞皮膚的環境因素，文獻顯示，不同波長的紫外線光均會對生物體造成一定的傷害。近幾年化妝品不斷推陳出新，醫美技術日臻成熟，絕大多數產品標榜具抗UVB效果，能改善及預防皮膚老化，也能降低罹患皮膚癌的機率，對人類影響甚鉅，但現今多以A酸製作護膚商品，而A酸具刺激性，所以我們想找出較溫和且保護效果的材料。在行政院農業委員會的網站上，我們發現一種名為鐵皮石斛的蘭科植物，有滋養肌膚及抗老化之用，且可活化細胞及調節免疫系統，對化療後患者健康有幫助，被譽為「九大仙草之首」。而行政院農業委員會種苗繁殖場文紀鑾課長研發出一種新興石斛品種—金皇石斛，結合高生物鹼及高多糖成分，栽培容易，產量也高。因此本組決定將金皇石斛作為實驗對象，測試其對照射UVC後的人體角質形成細胞(HaCaT cell)的修復效果。因經證實，金皇石斛對人體有對癌症病人有幫助，我們推測，金皇石斛比A酸更能防護UVC造成的皮膚傷害。

貳、研究目的

- 一、確認金皇石斛對UVC照射後的HaCaT cell的防護效果
- 二、比較A酸和金皇石斛防護能力之異同
- 三、探討金皇石斛的防護機制

參、實驗器材與流程設計

一、實驗藥品

(1) A酸(Retinoic Acid, RA)

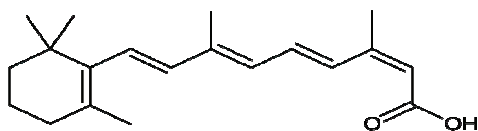
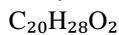


圖1

(<https://goo.gl/Q7Xdy8>)

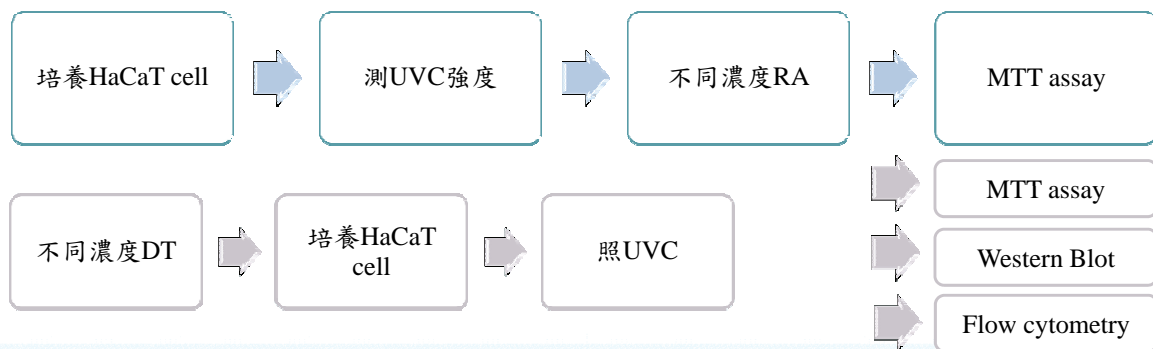
(2) 金皇石斛(來源:行政院農業委員會種苗改良繁殖場)



圖2

(<https://goo.gl/2jQYnN>)

二、研究流程



肆、研究結果

一、UVC對於HaCaT cell之影響

相對於對照組，照射24小時後的細胞明顯隨著照射劑量越高細胞損傷情況越越嚴重。照射48小時後，細胞有回復的現象。

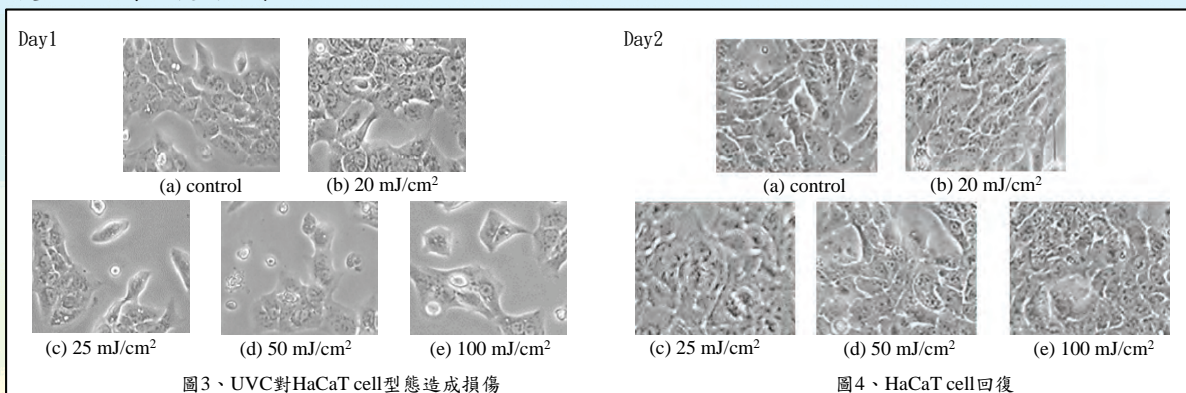


圖3、UVC對HaCaT cell型態造成損傷

圖4、HaCaT cell回復

根據Western Blot細胞凋亡相關生物標記變化結果，ATM及c-Abl皆呈上升趨勢，Bax在低劑量照射的表現量較低，而Bcl-2在低劑量照射下表現較高，兩者可互相印證。由此推論細胞在UVC高劑量照射的損傷會較嚴重，卻可能較早啟動修復機制。

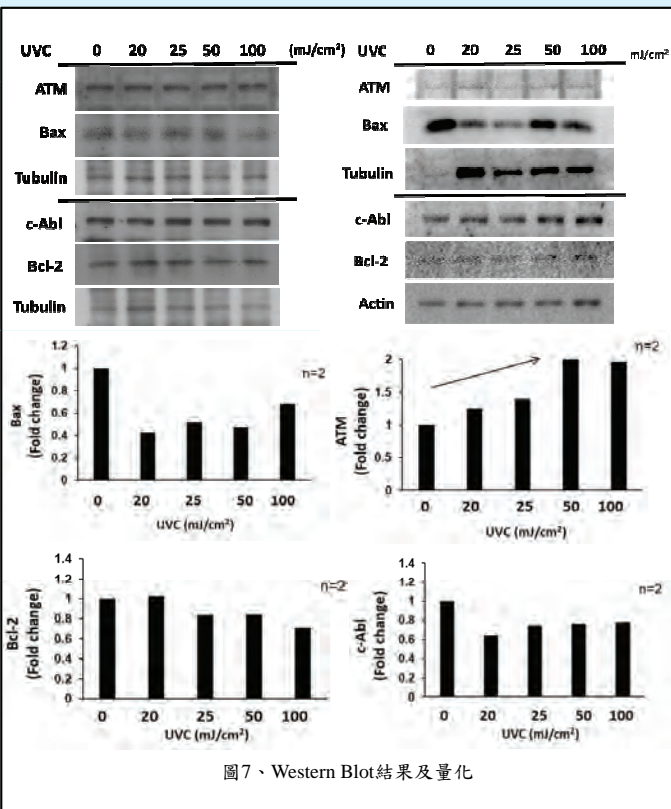


圖7、Western Blot結果及量化

二、比較金皇石斛和A酸防護效果之異同

本實驗主要測試DT對未照射UVC細胞的影響。加入較低濃度時，細胞存活率有上升的趨勢，加入高濃度後，細胞存活率顯著下降，由此可知，在適當的劑量下，DT可以幫助細胞生長，但劑量過高則導致細胞死亡。

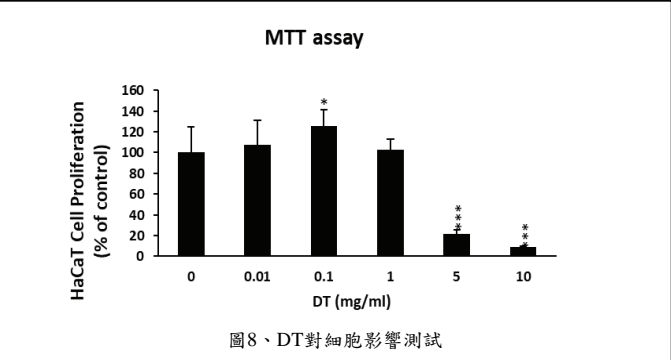


圖8、DT對細胞影響測試

無論在哪一種強度的UVC照射下，加入DT的組別，細胞存活率皆有上升的情形。由此可見，DT具有良好的防護效果。但我們使用的RA劑量卻無法保護細胞，反而對細胞帶來傷害。

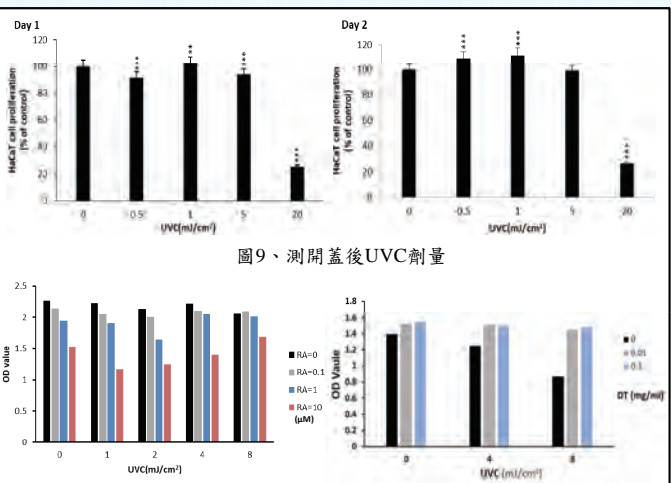


圖9、測開蓋後UVC劑量

圖10、RA抗UVC之效果

圖11、DT抗UVC之效果

三、探討金皇石斛防禦細胞傷害的相關機制

c-PARP表現量隨著DT劑量上升而下降，而p-ERK1則是隨著劑量增加，蛋白表現量也隨之上升。由此我們推測DT可以幫助細胞防護UVC造成的傷害。其中，PARP在UVC強度為4和8的組別中會隨著DT濃度上升而增加。因此我們猜想DT在受到一定程度的外來影響時，也可以啟動修復機制。

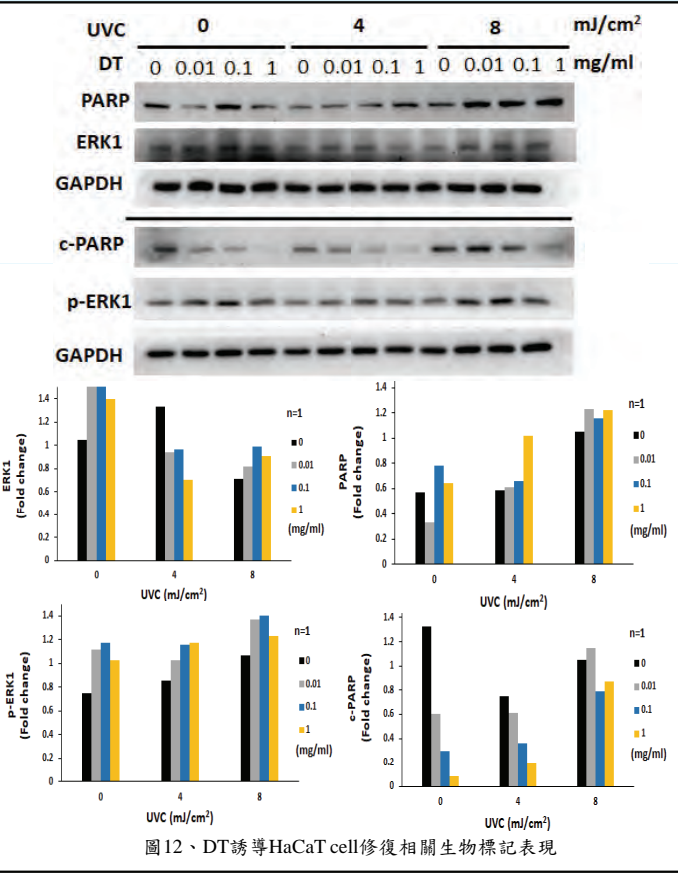


圖12、DT誘導HaCaT cell修復相關生物標記表現

EGFR表現量高表示可抑制細胞凋亡，當DT劑量為0.01時，EGFR的蛋白表現量比起對照組呈上升趨勢，確實可以幫助細胞抵抗UVC的傷害。然而此次DT劑量為0.1的組別結果不如預期，相較之下劑量0.01效果較為穩定。

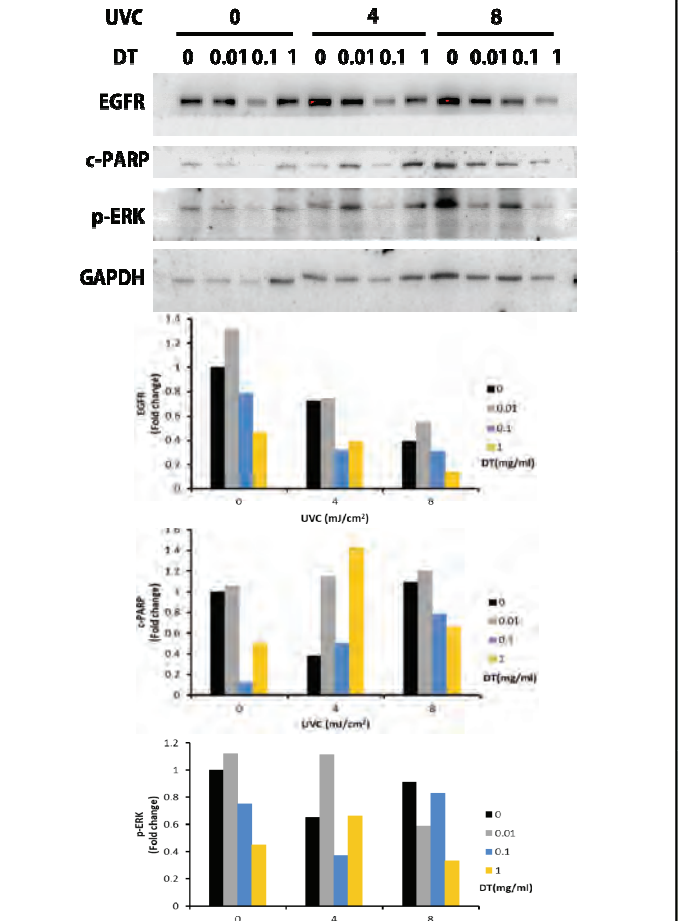


圖13、DT誘導HaCaT cell修復相關生物標記表現

利用流式細胞技術觀察細胞週期停滯時期，經過UVC照射後，可發現G1期的細胞數量減少，表示紫外線可能減緩細胞生長與細胞器複製，而停滯在G2/M期的細胞數量增加。加入DT後，G1期的細胞數量回升，我們推測DT可幫助細胞生長，相較於UVC傷害會使細胞週期停滯在G2/M期，添加DT能使細胞順利分裂不受抑制，顯示DT可以保護HaCaT細胞免於UVC的傷害，並使細胞週期正常進行。

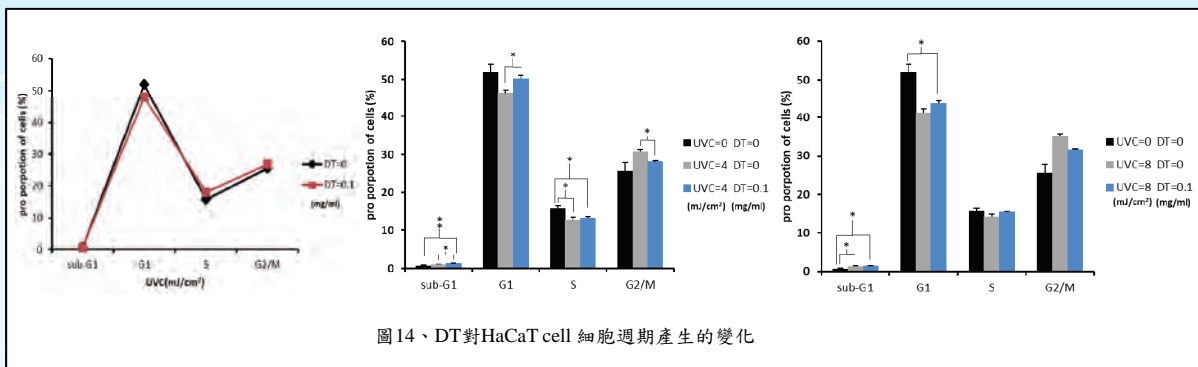


圖 14、DT對HaCaT cell 細胞週期產生的變化

伍、討論

一、金皇石斛和A酸對UVC誘導之細胞傷害防護效果的比較

由實驗結果推論，DT具有良好防護效果，且成效較A酸更為顯著。其中，DT萃取物中的多醣體(Polysaccharides)是我們推測誘導修復系統啟動原因，但因DT為萃取物並無法確定濃度，若能利用質譜儀去測定其中多醣體含量多寡，更能進一步得知啟動機轉。

二、金皇石斛修復UVC誘導之細胞傷害的可能分子機制

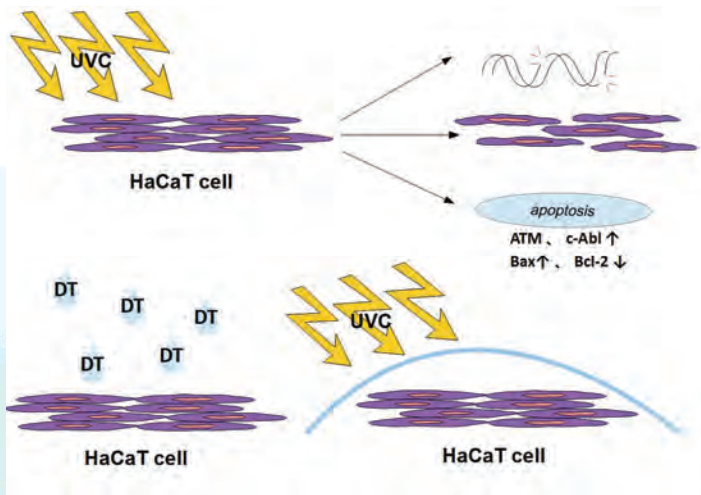
由UV光造成的DNA損害，因作用位置不同有不同的病變型態產生，所相對應產生的DNA修復系統也都不盡相同。我們可以利用qPCR、Western Blot等的技術來確定何種細胞修復系統被DT所啟動，也可以藉由螢光染色追蹤lysosome來看修復以及損傷情形，更能精確了解DT的作用機制。

三、本研究的實驗技術探討與研究設計限制

本組使用Hoefel UVC500來模擬我們細胞所受到的紫外光照射，無法模擬一般人日常的情況，因此我們可能忽略很多其他的外在因素。另外，鑒於人體角質細胞是一種會不斷更新的細胞，我們所培養並拿來實驗的細胞可能會因老化而造成實驗誤差。未來希望可以挑一株正常會老化的非永生細胞作為實驗材料，在體外更能確立我們的假說。

陸、結論

根據文獻探討和實驗結果得知，HaCaT cell 在經過短時間UVC照射後，會誘導其發生細胞凋亡使細胞型態改變、老化、損傷和死亡等現象，由研究結果亦可知，低濃度金皇石斛能增強細胞的防護能力，顯示金皇石斛能有效幫助細胞抵抗UVC傷害。其中，透過觀察蛋白表現量可以得知，c-PARP的表現量隨著DT劑量越高呈下降趨勢，而p-ERK1則呈上升趨勢，EGFR也有較高的蛋白表現量，表示金皇石斛能抵禦UVC損傷，能使細胞順利分裂增殖。再者，流式細胞儀的結果顯示，UVC會使細胞停滯在G2/M期，G1期也呈下降趨勢，而DT可減少在G2/M期的細胞數量，G1期細胞數也有回復情形，證明金皇石斛能具有抵抗UVC傷害之效，使細胞周期正常運行。因此，金皇石斛能減少紫外線損傷，並能幫助細胞生長，是理想的抗紫外線成分。



捌、參考資料

- [1] 行政院農業委員會種苗改良繁殖場 <https://www.tss.gov.tw/>
- [2] Takasawa R, Nakamura H, Mori T, Tanuma S.(2005.10): Differential apoptotic pathways in human keratinocyte HaCaT cells exposed to UVB and UVC.
- [3] Mohamed A. El-Mahdy, Qianzheng Zhu, Naringenin(2008):Protects HaCaT Human Keratinocytes Against UVB-induced Apoptosis and Enhances the Removal of Cyclobutane Pyrimidine Dimers from the Genome.