

2017 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 090006

參展科別 醫學與健康科學

作品名稱 幾丁寡糖對藍光 LED 造成視網膜色素上皮
細胞傷害的保護作用 The protective effect
of chitosan oligosaccharide on blue light
LED induced retinal pigment epithelial cell
damage

得獎獎項 大會獎：一等獎

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 楊長豪、陳怡旻

作者姓名 黃筱涵

關鍵字 視網膜色素上皮細胞(retinal pigment
epithelial cell)、藍光(blue light)、轉錄因子
NF- κ B (transcription factor nuclear factor-
 κ B)

作者簡介



我是黃筱涵，我很開心自己能夠進入實驗室做研究，一窺生物的奧秘，過程中雖然跌跌撞撞，但我從一次次的實驗中學習到永不放棄的精神，以及實驗操作的技能及精髓，讓我大開眼界且獲益良多。我真的很謝謝這一路上幫助我的楊長豪教授還有學長姐們，以及永遠支持我的爸媽。

摘要

3C 產品及 LED 燈多以藍光照明，長期照射易導致視網膜黃斑部病變。其作用機轉是藍光引起視網膜細胞過氧化物 (ROS) 增加，造成細胞的氧化壓力進而引發細胞凋亡。幾丁寡糖 (Chitosan oligosaccharides, COS) 藉由減少自由基產生和抑制轉錄因子 NF- κ B 傳導路徑而有抗氧化及抗凋亡的作用。

本研究以 ARPE-19 細胞株，在添加不同濃度的 COS 下，經照射 LED 藍光處理後，分析色素上皮細胞活性、ROS 表現量及細胞凋亡情形，並透過 PCR、西方墨點法、JC-1 及免疫螢光染色分析作用機轉。實驗證實 COS 能抑制過氧化物 (ROS) 的產生，減少視網膜色素上皮細胞因藍光所造成的細胞凋亡。PCR 和西方墨點法的結果顯示 COS 可以抑制發炎介質 HO-1、iNOS、Caspase-3、Bcl-2、ERK，及基因 *iNOS*、*MCP-1* 的產生。免疫螢光染色顯示 COS 能抑制 NF- κ B 核易位。總結來說，COS 能藉由抑制 NF- κ B 的活性，減少其下游基因的表現量，降低細胞氧化壓力和發炎反應來避免視網膜色素上皮細胞損傷。COS 在臨床上有潛力成為一種預防 LED 藍光造成視網膜傷害的有效保健食品。

Abstract

Long-term exposure to blue light from smartphones and LEDs may lead to eye diseases like macular degeneration. However, the possible mechanism of how blue light-induced generation of reactive oxygen species (ROS) affects retina cells lead to cell apoptosis is currently unknown. Chitosan oligosaccharides (COS) have been reported to have antioxidant and anti-apoptosis effect by decreasing free radicals formation and inhibition of transcription factor nuclear factor- κ B (NF- κ B). The purpose of this study is to investigate whether COS could protect the retinal pigment epithelial (RPE) cells from LED light injury, also to analyze its underlying mechanism. The cell viability, ROS expression and cell apoptosis in ARPE-19 cell line after LED blue light irradiation were analyzed after adding various concentrations of COS. Furthermore, polymerase chain reaction (PCR), Western blot, Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (JC-1) and immunofluorescence staining were used to analyze the mechanism of action. COS inhibited ROS production thus prevented RPE cells from cellular apoptosis and death. Notably, COS could inhibit the expression of inflammatory mediators at RNA or protein levels, such as HO-1, iNOS, Caspase-3, Bcl-2, ERK, iNOS, and MCP-1. The nuclear translocation of NF- κ B was inhibited by COS addition detected by Immunofluorescence stain. Taken together, the data demonstrated that COS could prevent RPE cell damage by decreasing cellular oxidative stress and inflammatory reaction to protect cells through inhibiting NF- κ B activation. Clinically, COS could be a useful nutritional supplement for preventing blue light LED induced retinal damage.

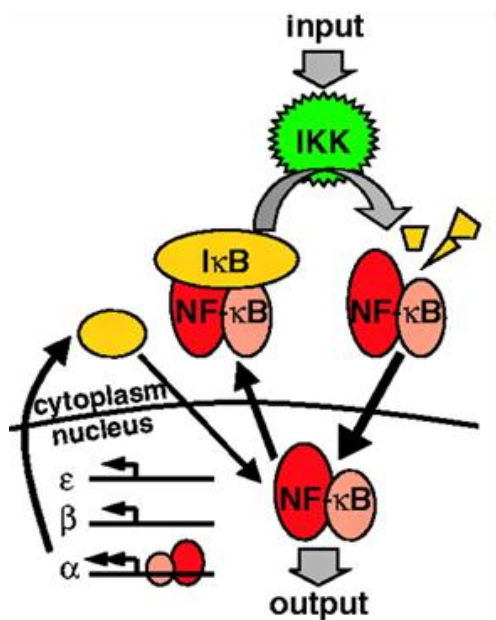
壹、研究動機

3C 產品、LED 燈日益普及使我們的生活更便利，但它們使用高能短波長的藍光作為照明，若長時間過量照射，容易導致眼睛視網膜細胞產生大量自由基，而使視網膜色素上皮細胞層 (retinal pigment epithelial cells, RPE) 的過氧化物質 (reactive oxygen species, ROS) 增加 (Roehlecke, et al., 2009; Shang, et al., 2014)。過多的 ROS 會對視網膜細胞造成氧化壓力，並啟動細胞凋亡機制 (Sparrow, et al., 2001)，引起視網膜色素上皮細胞及感光細胞的凋亡。除此之外，有些殘餘之細胞代謝產物會被排到細胞外(例如視網膜之 Bruch's 膜中)，進而引起發炎反應。這些因素可能導致視網膜黃斑部病變，而黃斑部病變是中老年人失明的主要原因。所以如何預防藍光對視網膜的傷害是未來防治黃斑部病變的重要議題。

若在光刺激前給予適當的抗氧化藥物，便可以減輕細胞的氧化壓力。現在有許多合成的抗氧化劑，如丁基化羥基苯甲醚、丁基羥基甲苯、叔丁基氫醌和棊酸丙酯，已被用來消除活性氧和保護細胞免受 ROS 的毒性作用，然而部分報告表明，這些合成抗氧化劑若長期大量攝入恐怕會有致癌的風險 (Zhang, et al., 2012)。幾丁寡醣 (Chitosan oligosaccharides, COS) 是天然的抗氧化藥物，它是由 Chitosan (幾丁聚醣) 轉化而來，高中選修生物上冊醣類單元中提到：幾丁聚醣多存在於蝦、蟹等外骨骼中，它們是漁業加工的廢棄物，世界各國正積極研究幾丁聚醣的功能，以生產高附加價值的物質。因此我又查詢了它們的功能與特性：它們無毒性可以生物降解，並且在水中具有良好的溶解度 (Marcin et al., 2002)，也能使傷口癒合加快、具有降低膽固醇活性、抗腫瘤、抗菌、增強免疫、抗凋亡以及抗氧化的功能 (田, 2001; Fang et al., 2013)。COS 有較短的鍵結，與大分子的幾丁聚醣相比，COS 分子小較容易被人體吸收 (Shang et al., 2014; Ahn et al., 2012)。相較於其他藥物，COS 容易取得且價格便宜，因此在本實驗中選用 COS 作為實驗藥物，以測試它是否能有效預防藍光對眼睛所造成的氧化傷害。

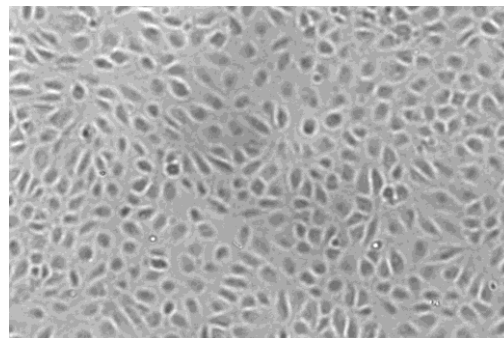
過去有文獻指出，在老鼠玻璃體內注射氧化劑 paraquat (PQ) 會導致 ROS 增加，而 COS 可以有效減低視網膜的氧化壓力，其機轉是減少自由基產生並且抑制轉錄因子 NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) 傳導路徑 (Shang et al., 2014; Fang et al., 2014)。NF- κ B 是由兩個次分子 (p50 及 p65) 組成，是一種控制 DNA 轉錄的蛋白複合體。NF- κ B 傳導路徑是細胞在面臨氧化壓力時的訊息傳遞與活化路徑，它會調控許多與發炎反應、細胞

凋亡相關的基因 (Chen et al., 1999)。在正常狀態的細胞中，NF- κ B 位在細胞質裡和其抑制蛋白 I κ B 形成蛋白二聚體；而在細胞受到氧化刺激的情況下，I κ B kinase (IKK) 會被活化，使 I κ B 和 NF- κ B 分離，NF- κ B 則會轉移到細胞核中，活化 NF- κ B 下游基因 (圖一)，如 *iNOS*、*MCP-1* 等 (Baldwin AS, 1996)，這些基因經轉錄後影響 ROS 的產生，而 ROS 的表現量也可以調控 NF- κ B 的活性 (Morgan et al., 2011)，兩者密切相關。雖然 COS 在老鼠活體實驗中可以減少視網膜的氧化壓力並抑制發炎反應，但關於 COS 在細胞層次對視網膜細胞避免光傷害的保護效果，目前尚未有相關研究。我們擬以人類視網膜色素上皮細胞 ARPE-19 細胞株 (圖二) 做深入研究，以確定 COS 在細胞層次的影響及作用機轉。



圖一、I κ B-NF- κ B 路徑

(Hoffmann et al., 2002)



圖二、ARPE-19 細胞株

貳、研究目的

- 一、COS 是否能減少藍光 LED 光源對 ARPE-19 細胞之氧化傷害。
- 二、若 COS 有保護作用，是否可透過抑制 NF- κ B 傳導路徑以降低氧化傷害所造成的發炎反應與細胞凋亡。

參、研究設備及器材

一、藥品試劑及細胞

ARPE-19 細胞株、Chitosan oligosaccharides、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、FBS (Fetal bovine serum, 胎牛血清)、P/S (Penicillin & Streptomycin)、PBS (Phosphate buffered saline)、TE (Trypsin-EDTA)、DMSO (Cell culture freezing medium, 細胞冷凍保存液)、Alamar blue BUF012B、二次去離子水、冰塊、binding buffer、Annexin V-FITC、PI (Propidium iodide)、DCFH-DA (Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate)、Trypan Blue 染劑、radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (Tris-HCl + NaCl+ deoxycholic acid+ NP-40+ EDTA)、BCA Reagent A、BCA Reagent B、蛋白標準液、TG-SDS Buffer (0.025M Tris+ 0.192M Glycin+ 0.1% SDS)、10X TG Buffer (Tris 250mM+ Glycine 1.92M)、甲醇、脫脂奶粉、TBS Buffer (Tris-base+ NaCl + Tween20)、抗體、protein loading dye、Lysis Solution、乙醇、Wash Buffer、Reaction Buffer、Enzyme mix、iQTM SYBR® Green supermix (antibody-mediated hot-start iTaq DNA polymerase、dNTPs、MGC12、SYBR® Green I dye、enhancers、stabilizers、fluorescein)、Forward and reserve primers、丙烯醯胺、過硫酸銨、4X Lower Gel Buffer (pH8.8)、4X Upper Gel Buffer (pH6.8)、APS (10%)、TEMED (Tetramethylethylenediamine)、iriton X 100、paraformaldehyde、Horse serum、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)、JC-1 Staining Solution

二、器材

振盪器、24 格孔盤、96 格孔盤、ELISA reader、電動吸管(pipette aid)、微量吸管分注器 (Pipette)、真空吸取器、離心管、離心機、細胞培養箱、照光箱(細胞培養箱底部鋪滿藍 LED 燈)、無菌操作台、直徑 10cm 培養皿、直徑 6cm 培養皿、恆溫水浴槽、電子天平、量筒、稱量紙、刮杓、試管、燒杯、玻璃瓶、細胞計數器、顯微鏡、酒精燈、流式細胞儀、650µl tube、Mini Shearing Column、TRE Mini Column、Elution tube、微量離心管、反轉錄聚合酶連鎖反應機器、8-tube stirp、即時定量聚合酶連鎖反應機器、電腦、-80°C 冰箱、4°C 冰箱、搖晃盤、光度計、鑄膠套件(含電泳玻片及氧化鋁片)、間隔條、玻璃板、樣本梳、垂直電泳槽、電源供應器、微量針管、螢光顯微鏡

肆、研究過程與方法

一、細胞培養

實驗細胞 (ARPE-19)購自 American Type Culture Collection 公司 (Manassas, VA, USA)。由於液態氮中剛解凍的細胞尚不穩定，因此需先經過繼代培養至第 3 代之後才能開始使用，我們使用的細胞是第 4 代以後的細胞。細胞培養在直徑 10cm 的培養皿內，用含有 10%FBS (Fetal bovine serum, 胎牛血清) + 1%P/S (Penicillin & Streptomycin)的 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)培養，培養液約每 2、3 天更換一次，置於 37°C、5%二氧化碳濃度的培養箱內培養。

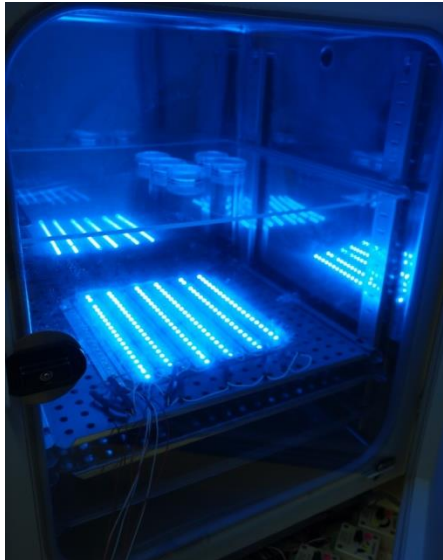
實驗前一到二天，將細胞轉移至直徑 6cm 的培養皿內，分別加入 1.5ml 含有 FBS 的 DMEM、1ml 的細胞液，每盤約 2×10^5 個細胞，搖晃均勻並放入培養箱內。

進行 Alamar Blue assay、JC-1、免疫螢光染色等實驗時，實驗前一到二天，需將細胞移到 24 格的孔盤內，分別加入 0.5ml 的培養液，每孔約加入 5×10^4 個細胞，搖晃均勻並放入培養箱內。

二、以 COS 及藍光處理 ARPE-19 細胞

直到細胞大約長到八分滿時，取出培養皿並吸掉培養液，每盤加入 2ml 的 DMEM (24 格孔盤，每孔加入 0.5ml 的 DMEM)，對照組不加入 COS，實驗組加入 COS，在培養箱內放置一小時，濃度則配合結果呈現。

從培養箱取出經藥物處理的細胞，吸掉培養液及藥物後，加入 2ml 的 DMEM (24 格孔盤，每孔加入 0.5ml 的 DMEM)，實驗組放入照光箱內照射 2500lux、平均波長約 460nm 的 LED 藍光(圖三)，照光時間於下列實驗再行詳細描述，控制組則不照光。



圖三、以藍光處理 ARPE-19 細胞

三、以 Alamar Blue assay 進行細胞毒性的動力學分析

細胞內粒線體的輔酶 NADH 可將原本深藍色無螢光性的 Alamar Blue 還原成粉紅色高螢光性的 resorufin，透過偵測螢光或吸光值即可記錄反應結果。若還原的 resorufin 量越多，則代表存活的細胞活性越高。由於 Alamar Blue 無細胞毒性，可以同時加入細胞培養液中，適合進行藥物對細胞毒性的分析 (陳等，2008)。

為了確保適量的 COS 對 ARPE-19 細胞無害，在 24 格孔盤中的每孔細胞分別加入 25、50、100、400 μ M 的 COS，放入培養箱中一小時後，將 24 格孔盤取出。另外，為了瞭解在 COS 對 ARPE-19 細胞抗藍光損傷的效果，我們在每孔的細胞中分別加入 25、50、100、400 μ M 的 COS，放入培養箱中一小時，將培養液吸掉換成 DMEM，再放入照光箱中，照射 2500lux 的藍光 24 小時後，將 24 格孔盤取出。

用 PBS 配製 alamar Blue 工作液 (Alamar blue BUF012B, AbD serotec)將原液稀釋 10x。將 24 格孔盤孔內的培養液及藥物吸除，以 PBS 清洗。在 24 格孔盤中，每孔各加入 500 μ l 的工作液，置入培養箱作用 2 到 3 小時後，取 200 μ l 的樣本放入 96 格孔盤中，使用 ELISA reader 測量 570nm 及 600 nm 的吸光值。結果如圖五及圖六。

四、流式細胞儀分析

(一)、細胞凋亡分析

以流式細胞儀偵測細胞膜上磷脂絲氨酸 (Phosphatidyl Serine) 是否外露來進行細胞凋亡分析。健康的細胞膜有一不對稱性，即磷脂絲氨酸只存在胞膜內層而不外露，此不對稱性之維持，需借助一套酶系與能量 ATP；而凋亡細胞的早期變化是停止產能作用，故無法維持此不對稱性，而使得磷脂絲氨酸外露。流式細胞技術可以 Annexin V-FITC 標記失去對稱性的細胞或壞死細胞，再配合 PI (Propidium iodine) 染色區別失去能量的凋亡細胞 (PI-)、以及壞死細胞 (PI+)。

1. ARPE-19 細胞照射多久的藍光才會明顯受損

為了瞭解 ARPE-19 細胞在照射多久的藍光才會明顯受損，我們參考幾篇論文 (Yoshiki et al., 2014; Kenjiro et al., 2014)，決定使細胞照射 2500lux 的藍光 16、24、48、72 小時後取出。

將處理後的細胞用 0.5%TE 取下，放入離心管中，以 800rpm 離心 2 分鐘後，移除上清液，以 PBS 清洗兩次，加入 100 μ l binding buffer 和 5 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l PI，在室溫下避光作用 15 分鐘，再將樣品以流式細胞儀進行分析。結果如圖四。

2. COS 對 ARPE-19 細胞抗藍光損傷的效果

為了瞭解 COS 對 ARPE-19 細胞抗藍光損傷的效果，我們在每盤細胞中加入 50、100、200、400 μ M 的 COS，放入培養箱中一小時，將培養液吸掉換成 DMEM，再放入照光箱中，照射 2500lux 的藍光 24 小時後取出。

將處理後的細胞用 0.5%TE 取下，放入離心管中，以 800rpm 離心 2 分鐘後，移除上清液，以 PBS 清洗兩次，加入 100 μ l binding buffer 和 5 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l PE，在室溫下避光作用 15 分鐘，再將樣品以流式細胞儀進行分析。結果如圖八。

(二)、ROS 分析

當 DCFH-DA (Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate) 進入細胞後，會與細胞內的 ROS 產生裂解與氫化反應 (cleaved and oxidized)，而形成帶有綠色螢光的 DCF (dichlorofluorescein) 產物，其波長得以在 488~530nm 下偵測 (曾，2008)，故可使用流式細胞儀進行 ROS 的定量分析。

為了瞭解 COS 對 ARPE-19 細胞抗藍光損傷的效果，我們在每盤細胞中加入 25、100、400 μ M 的 COS，放入培養箱中一小時，將培養液吸掉換成 DMEM，再放入照光箱中，照射 2500lux 的藍光 48 小時後取出，於直徑 6 cm 培養皿中，加入 5 μ M DCFH-DA，於 37 $^{\circ}$ C 培養箱作用 30 分鐘後，以 TE 將細胞收下，離心 800 rpm 2 分鐘，移除上清液後，以 PBS 清洗兩次，再以流式細胞儀進行分析。結果如圖七。

五、以 JC-1 染色測量粒線體膜電位變化

因細胞凋亡可以分為外源性凋亡途徑 (extrinsic apoptosis pathway) 與內源性凋亡途徑 (intrinsic apoptosis pathway)，其中內源性凋亡途徑是經粒線體調控，故我想了解因藍光造成的細胞凋亡是否與粒線體的損壞有關。

利用親脂性、些微帶正電、極低毒性的螢光染劑 JC-1 來偵測粒線體的膜電位變化。在健康的細胞裡，帶正電的 JC-1 分子會進到帶負電的粒線體內，且聚集成多體 (J-aggregates)，此時 JC-1 發紅色螢光，代表這是健康的粒線體。當膜電位下降，也就是細胞進行細胞凋亡的早期，JC-1 會變成單體 (monomer)，發出綠色螢光。

24 格孔盤中，每孔細胞中分別加入 50、100、200、400 μ M 的 COS，放入培養箱中一小時，將培養液吸掉換成 DMEM，再放入照光箱中，照射 2500lux 的藍光 24 小時後，將 24 格孔盤取出。每孔加入培養液 1/10 體積的 JC-1 染劑，將培養盤放入 37 $^{\circ}$ C 培養箱作用 30 分鐘，取出後放在螢光顯微鏡上，偵測波長 570nm (紅光) 與波長 535nm (綠光) 觀察。結果如圖九。

六、蛋白質萃取和定量

為了瞭解 COS 對 ARPE-19 細胞抗藍光損傷的效果，我們在每盤細胞中分別加入 50、100、200、400 μ M 的 COS，放入培養箱中一小時，將培養液吸掉換成 DMEM，再放入照光箱中，照射 2500lux 的藍光 24 小時後取出。

用 PBS 沖洗細胞並收集。加入 radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer [0.5 M Tris-HCl (pH 7.4)、1.5 M NaCl、2.5% deoxycholic acid、10% NP-40、10 mM EDTA] 將細胞溶解。溶解物置於冰上 30 分鐘後以 12000 rpm 4 $^{\circ}$ C 離心 2 分鐘。

根據標準品和樣品的數量，將 BCA Reagent A : BCA Reagent B 按 50 : 1 的體積配製工作液，充分混合均勻。將 2000 μ g/ml 的蛋白標準液加二次水稀釋至 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 μ g/ml。將稀釋後的標準液及樣品各取 25 μ l 分別加到 96 孔盤中，各孔再加入 200 μ l BCA 工作液，混合均勻，37 $^{\circ}$ C 放置 30 分鐘。用分光光度計測定 570nm 吸光值，並繪製標準直線，計算樣品中的蛋白濃度。

七、西方墨點法 (Western blotting)

以 SDS-PAGE (聚丙烯醯胺凝膠電泳) 分析樣品中的 HO-1、iNOS、Caspase-3、Bcl-2、ERK、 β -actin 含量。

HO-1 屬於誘發型，在細胞遭受刺激時，例如氧化壓力、發炎反應與局部缺血，才會被大量誘發出來。iNOS 在正常狀態下不存在於大多數種類的細胞中，當細胞受到刺激，例如環境中物理或化學性刺激、汙染物、病原體，會誘發出 iNOS 的表現，當細胞持續增加 iNOS 的表現，並製造出大量的 NO 時，會引起細胞毒性及低血壓休克等現象，故一般認為，iNOS 與發炎症狀的產生有關。當細胞受到 ROS 的刺激，可以抑制凋亡的 Bcl-2 表現量會上升。當細胞受到生長因子、細胞因子或神經遞質刺激時會活化 ERK，接著活化其下游的轉錄因子如 Elk-1、c-Fos、c-Myc、c-Myb、Stat3/5 等，故 ERK 能調控細胞生長、增生、分化與凋亡等作用。

取已定量的蛋白質，加入 5 倍 protein loading dye，加熱至 95 $^{\circ}$ C 5 分鐘使蛋白質變性後，將管壁上水氣離下。將夾有 12% SDS-PAGE 的玻璃板固定於電泳槽內，並於槽內

注滿 1 X Running Buffer [10X TG-SDS Buffer (0.025M Tris+ 0.192M Glycine+ 0.1% SDS) 以二次去離子水稀釋至 1X]，以 90 伏特進行電泳兩小時直至蛋白質染劑至膠體底部，同時將 PVDF 轉印膜浸泡於 100% 甲醇中以活化。

接下來以負極到正極的順序將海綿、兩張 3M 圖畫紙、膠體、轉印膜、兩張 3M 圖畫紙、海綿放置於轉漬槽中，並加入 Transfer buffer [1L transfer buffer : 800ml 1X TG、200ml 甲醇，其中 10X TG (Tris 250mM+ Glycine 1.92M)以二次去離子水稀釋為 1X 後使用]，以 90 伏特電壓轉漬 90 分鐘。將轉印膜以 5% 脫脂牛奶進行 blocking，溶劑為 TBST [1X TBS Buffer (Tris-base 2M+NaCl 1M):Tween20=1000:1]，室溫作用 1 小時。

Blocking 完成後，加入一級抗體，於 4°C 作用隔夜，隔天以 TBST 清洗三次，每次 15 分鐘，加入二級抗體，室溫下作用 1 小時，再以 TBST 清洗 3 次，每次 15 分鐘。轉印膜加入 ECL substrate solution 作用 5 分鐘後顯影於底片上，結果如圖十。抗體的名稱、稀釋比例及廠牌如表一。

表一、抗體的名稱、稀釋比例及廠牌

一級抗體		
抗體名稱	稀釋比例	廠牌
Mouse -β-actin	1:4000	Sigma
Rabbit-iNOS	1:400	Abcam
Rabbit-HO-1	1:2000	Abcam
Mouse-ICAM-1	1:3000	Abcam
Rabbit-ERK	1:1000	Cell signaling
二級抗體		
Antigen	Dilution	Supplier
Rabbit-HRP	1:4000	Sigma

八、RNA 萃取及定量

為了瞭解 COS 對 ARPE-19 細胞抗藍光損傷的效果，我們在每盤細胞中加入 50、100、200、400 μ M 的 COS，放入培養箱中一小時，將培養液吸掉換成 DMEM，再放入照光箱中，照射 2500lux 的藍光 24 小時後取出。

用 PBS 清洗處理過的細胞後，加入 350 μ l 的 Lysis Solution，輕輕搖晃培養皿五分鐘，將內容物吸起放入離心管中，再加入 100% 乙醇，蓋緊蓋子用 Vortex 震盪均勻約 10 秒鐘。吸取 650 μ l 離心管中的液體，加入 Mini Shearing Column (Mini Shearing Column 裝入 Collection tube)。丟棄 Mini Shearing Column，留下 Collection tube 中的液體，將 Collection tube 內的全部液體倒入 TRE Mini Column (TRE Mini Column 裝入 Collection tube) 中，離心 3500rpm 一分鐘。將 Collection tube 中的液體倒入廢液桶後裝回原處。在 TRE Mini Column 中加入 400 μ l Wash Buffer，離心 14000 rpm 一分鐘，重複加入 400 μ l Wash Buffer 離心 14000 rpm 一分鐘兩次，將 Collection tube 中的液體倒入廢液桶再裝回 TRE Mini Column，並離心 14000rpm 兩分鐘使它乾燥。取出後丟棄 Collection tube，將 TRE Mini Column 移至 Elution tube 中，加入 50 μ l 的二次去離子水於膜的中心位置，離心 200rpm 兩分鐘再離心 14000rpm 一分鐘，移除 TRE Mini Column，Elution tube 中的液體即為樣本 RNA，將它放入 -80 °C 冰箱保存。

吸取 1 μ l 的 sample 放在 nano drop (超微量分光光度計) 上，測其 260nm 及 280 nm 的吸光值，將每管濃度紀錄，並加入二次水定量。

九、反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (reverse-transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

此實驗是要將萃取出來的 RNA 利用反轉錄酵素進行反轉錄作用以合成 cDNA。將分離出的 RNA 分別取 24 μ l 放置於微量離心管中，並加入 5X Reaction Buffer 24 μ l、二次去離子水 60 μ l、Enzyme mix 12 μ l，總體積共 98 μ l。震盪均勻，再用小型離心機離心幾秒。放入機器中加熱到 42 °C 一小時，再加熱到 95 °C 五分鐘，冷卻到 4 °C 五分鐘。最後從機器中取出 cDNA，再放入 4 °C 冰箱保存。

十、即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction, 簡稱 Q-PCR)

取出 8-tube strip, 在每管內加入 iQTM SYBR® Green supermix (antibody-mediated hot-start iTaq DNA polymerase、dNTPs、MgCl₂、SYBR® Green I dye、enhancers、stabilizers、fluorescein) 10 μ l、Forward and reserve primers 0.8 μ l、DNA sample 4 μ l、二次去離子水 5.2 μ l, 取出封膜蓋於 96 孔盤上。qPCR 循環溫度如下: Step 1 95 °C 30 秒。Step 2 95 °C 10 秒、60 °C 20 秒、72 °C 10 秒, 循環 45 次。Step 3 95 °C 5 秒、65 °C 1 分鐘、65 °C-97 °C (連續地升溫, 0.11 °C/s)。Step 4 40 °C 30 秒。結果如圖十二、圖十三。

十一、以免疫螢光染色法分析 NF- κ B 的 p65 蛋白由細胞質轉移到細胞核的情形

免疫螢光染色法是指在抗體上結合螢光, 利用免疫學原理中抗原和抗體專一性的結合反應, 檢測細胞或組織中是否有目標抗原的存在, 此方式不只可以用來測知抗原的表現量也可觀察抗原所表現的位置。

在 24 格孔盤中的每孔細胞分別加入 50、100、200、400 μ M 的 COS, 放入培養箱中一小時, 將培養液吸掉換成 DMEM, 再放入照光箱中, 照射 2500lux 的藍光 24 小時後, 將 24 格孔盤取出。吸去培養液, 每孔加入 4 % paraformaldehyde 500 μ l 使細胞固定, 再用 PBS 洗三次, 每次 5 分鐘。每孔加入 0.1 % Triton X 100 使細胞膜破洞, 和 5 % 血清(Horse serum) 20 分鐘。將 100 % 甲醇放入 -20 °C 預冷, 再加入細胞內作用 10 分鐘, 每格加入 500 μ l 使細胞膜溶解。以 PBS 清洗三次, 每次 5 分鐘。加入一級抗體和 5 % 血清, 放在 4°C 過夜, 取出後以 PBS 清洗三次, 每次 5 分鐘。加入二級抗體, 在室溫作用 1 小時, 取出後以 PBS 清洗三次, 每次 5 分鐘。避光加入三級抗體, 在室溫作用 1 小時, 以 PBS 清洗三次, 每次 5 分鐘。將液體吸去, 加入 DAPI 染細胞核, 再以螢光顯微鏡觀察, 結果如圖十四。抗體的名稱、稀釋比例及廠牌如表二。

表二、抗體的名稱、稀釋比例及廠牌

一級抗體

抗體名稱	稀釋比例	廠牌
Rabbit-anti-NF- κ B p65	1:200	ROCKLAND

二級抗體

抗體名稱	稀釋比例	廠牌
Biotinylated-goat anti rabbit IGG	1:200	VECTOR

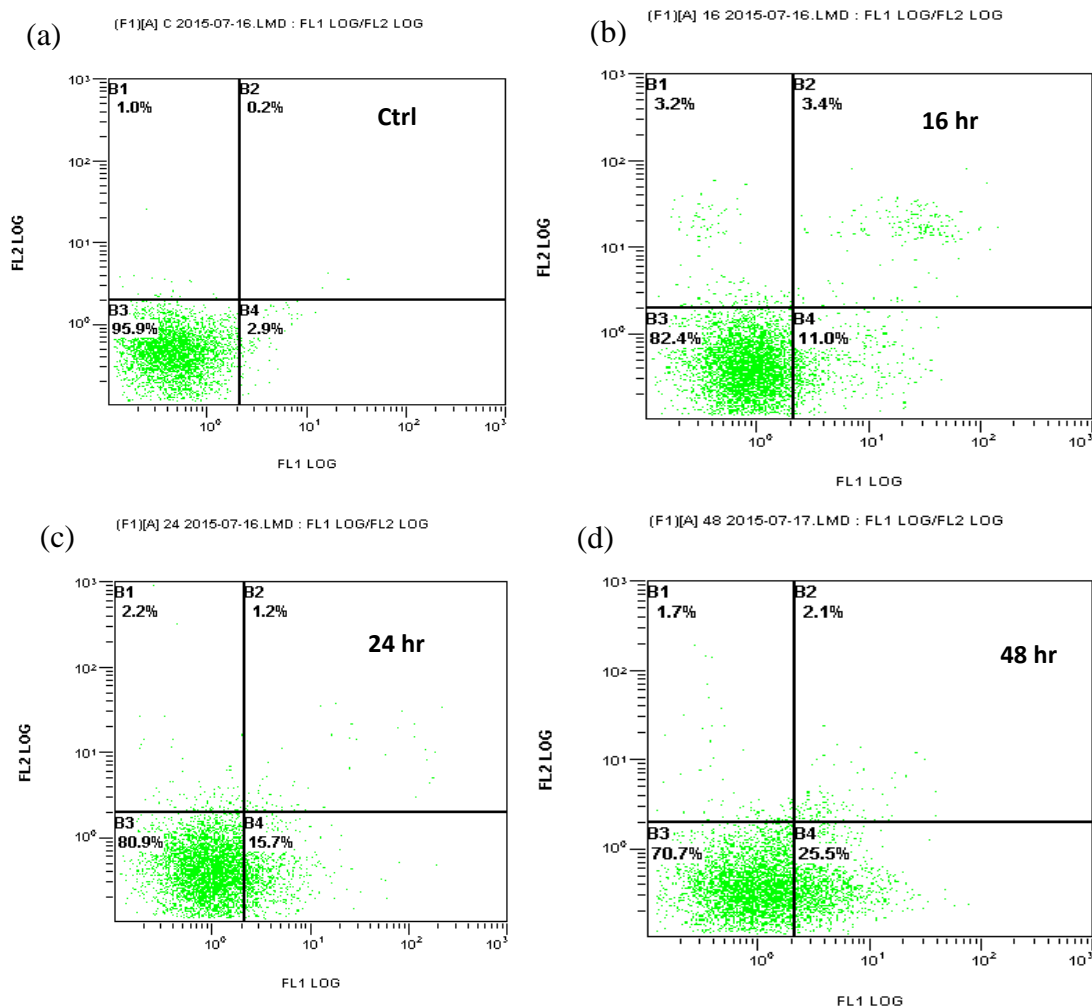
三級抗體

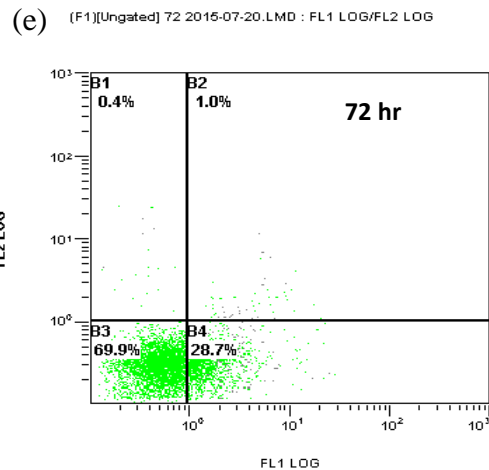
抗體名稱	稀釋比例	廠牌
Avidin D-FITC	1:200	VECTOR

伍、研究結果與討論

一、測試造成 ARPE-19 細胞明顯受損所需的照射藍光時間

以流式細胞儀分析細胞凋亡比率，結果如圖四。以流式細胞儀分析後的圖有四個象限：第三象限為健康細胞，第四象限為凋亡初期的細胞，第一象限為凋亡中、後期的細胞，第二象限為壞死的細胞。將控制組 (a)與對照組 (b、c、d、e)相比，由圖四 (c)、圖四 (d)可看出，照射 24 小時 (凋亡比率：16.9%)和 48 小時 (凋亡比率：27.6%)的細胞有較明顯的凋亡；而由圖四 (e)看出，照光 72 小時處理的細胞 (凋亡比率：29.7%)因死亡率太高導致細胞殘破不全，無法貼附於培養皿底部，吸掉培養液時也會一併吸光細胞碎片，所以沒辦法進行需要樣本數量較多的實驗。另外，LED 燈若長期高功率照射易衰化，光度會下降，因此後續的實驗不採用以 72 小時照光處理的細胞，而採用 24 小時和 48 小時進行探討。



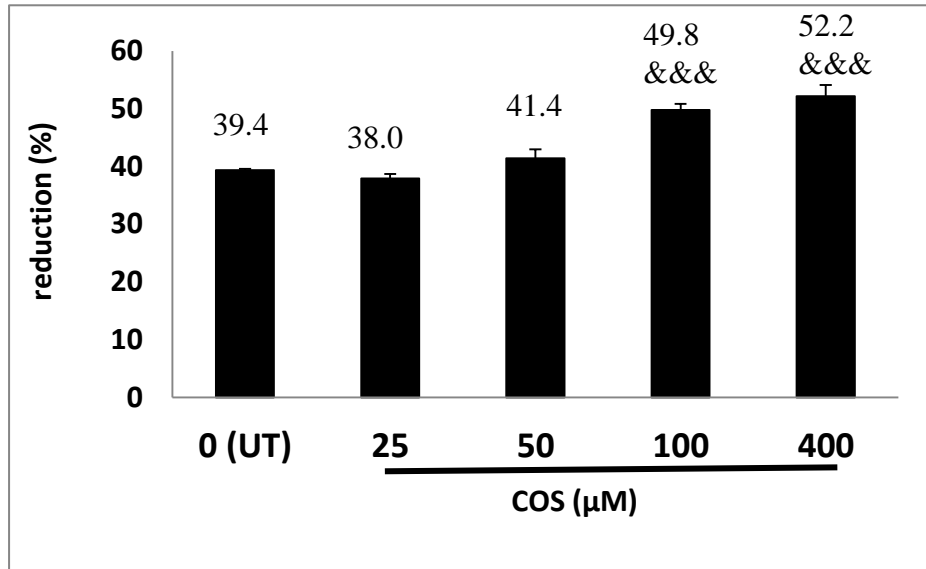


圖四、以流式細胞儀分析細胞照射不同時間藍光的凋亡程度(橫軸是 Annexin V-FITC 的螢光訊號強度，縱軸是 PI 的螢光訊號強度。依照光時間可以分為：圖 a 為未照光未加 COS 的控制組、圖 b 為照光 16 小時處理、圖 c 為照光 24 小時處理、圖 d 為照光 48 小時處理、圖 e 為照光 72 小時處理)

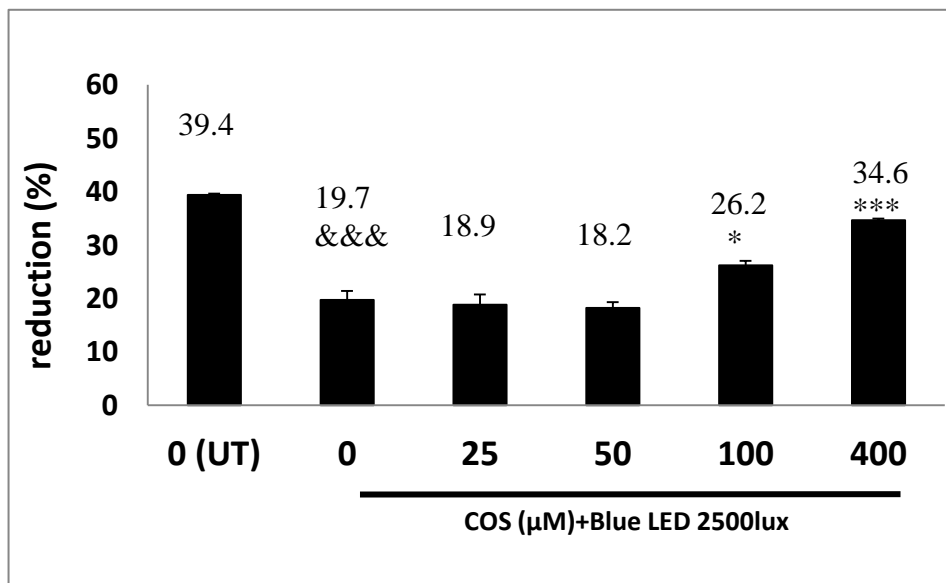
二、以 Alamar Blue Assay 測量細胞活性

以 Alamar Blue Assay 分析細胞活性。經藥物處理的 ARPE-19 細胞，與控制組 (UT) 細胞相比，細胞活性並無減少，顯示無論是 25、50、100、400 μ M 的 COS 均對細胞無害 (圖五)。

而圖六中可以看到經過藍光照射 24 小時後，只照光未加 COS 的細胞(0)和控制組 (UT)相比有下降趨勢，表示照光確實降低了細胞活性。而以不同濃度 COS 處理過後，發現 50 μ M 以下濃度對細胞保護作用不顯著，直到 100 μ g/ml 和 400 μ g/ml 的組別，才觀察到 reduction rate 有顯著上升。表示 COS 確實有效，但需使用較高濃度才能對藍光 LED 所造成的光傷害具有顯著的保護作用。



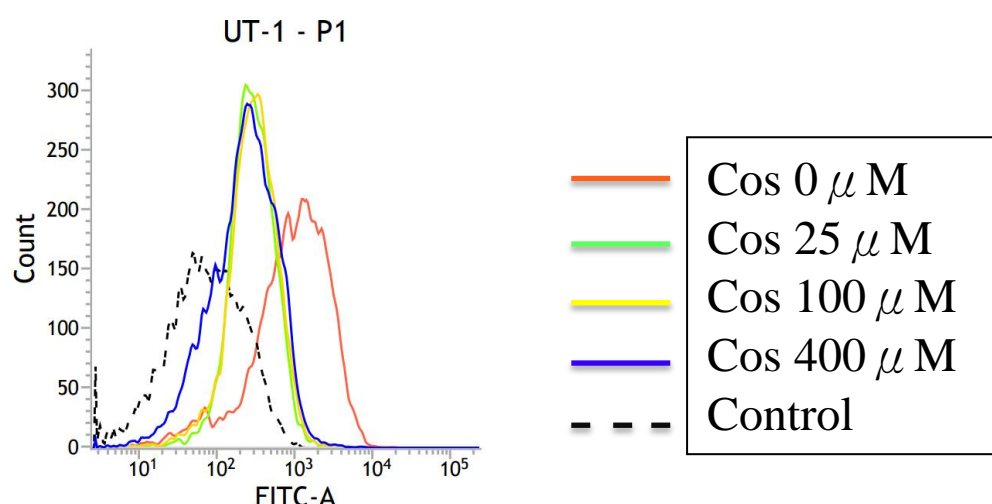
圖五、ARPE-19 細胞加入不同濃度 COS 處理一小時的細胞活性 (橫軸代表經不同濃度 COS 處理的細胞，縱軸代表細胞還原 resorufin 的百分比。(&：與 UT 相比 P 值<0.05，&&：與 UT 相比 P 值<0.01，&&&：與 UT 相比 P 值<0.001)



圖六、ARPE-19 細胞加入不同濃度 COS 一小時再照光 2500lux 24hr 的細胞活性 (橫軸代表經不同處理的細胞，縱軸代表細胞還原 resorufin 的百分比。&：與 UT 相比 P 值<0.05，&&：與 UT 相比 P 值<0.01，&&&：與 UT 相比 P 值<0.001。*：與 0 μM 相比 P 值<0.05，**：與 0 μM 相比 P 值<0.01，***與 0 μM 相比 P 值<0.001)

三、以流式細胞儀測量 ROS 表現量

以流式細胞儀進行 ROS 的定量分析，結果顯示 (圖七)只照光但未經 COS 處理的細胞 (0)與控制組 (Control)比較，ROS 表現量明顯上升，而經 COS 處理的細胞 ROS 的表現量明顯減少，但以不同濃度處理後，ROS 的表現量則相差不大，所以只要 25 μ M 以上的 COS 處理即可減少 ARPE-19 因照射藍光而產生的 ROS 量。

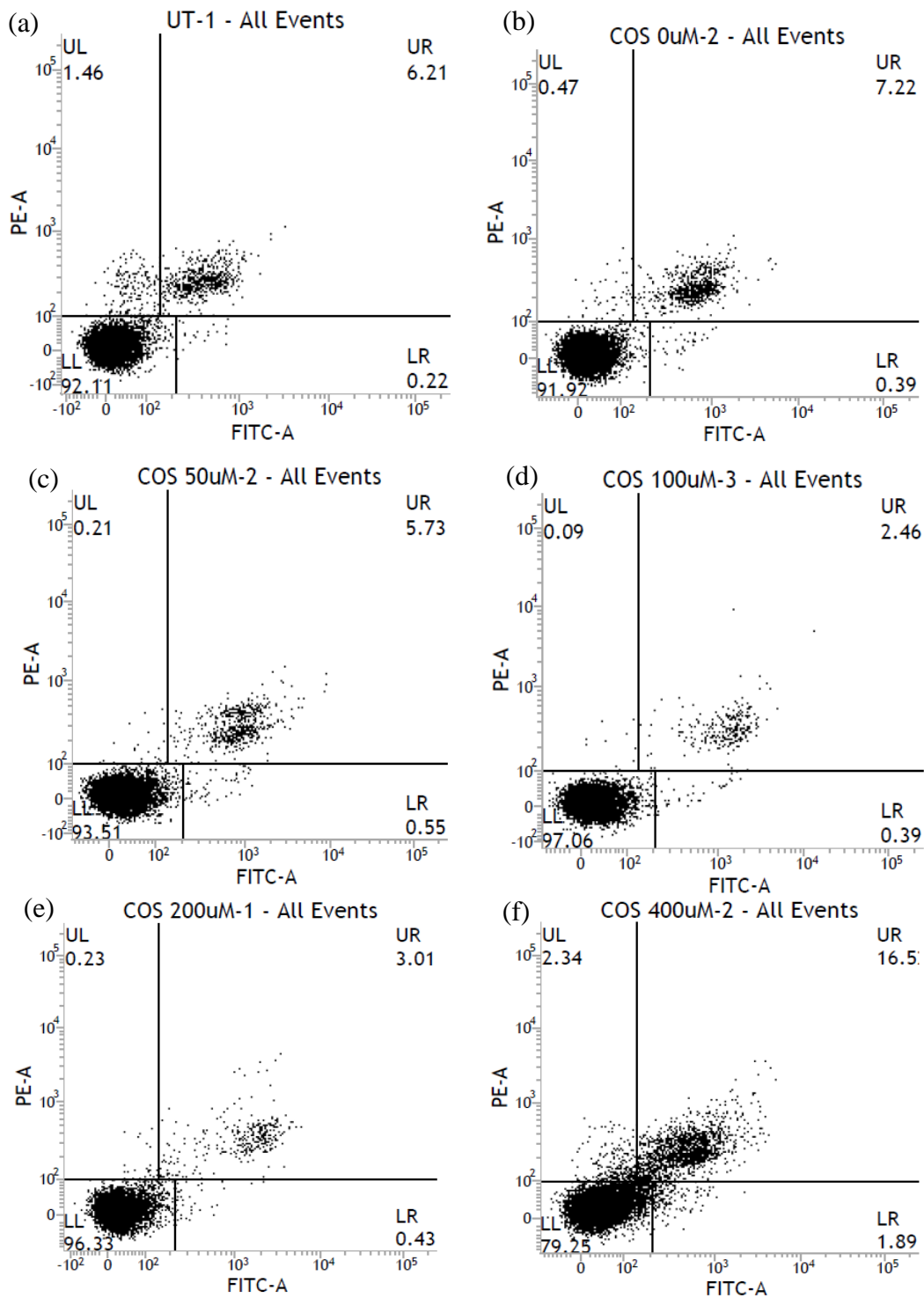


圖七、ARPE-19 細胞加入不同濃度 COS 一小時再照光 2500 lux 24hr ROS 含量

(橫軸代表與 ROS 反應的 DCF 產物表現量，縱軸代表細胞數)

四、以流式細胞儀測量細胞凋亡比率

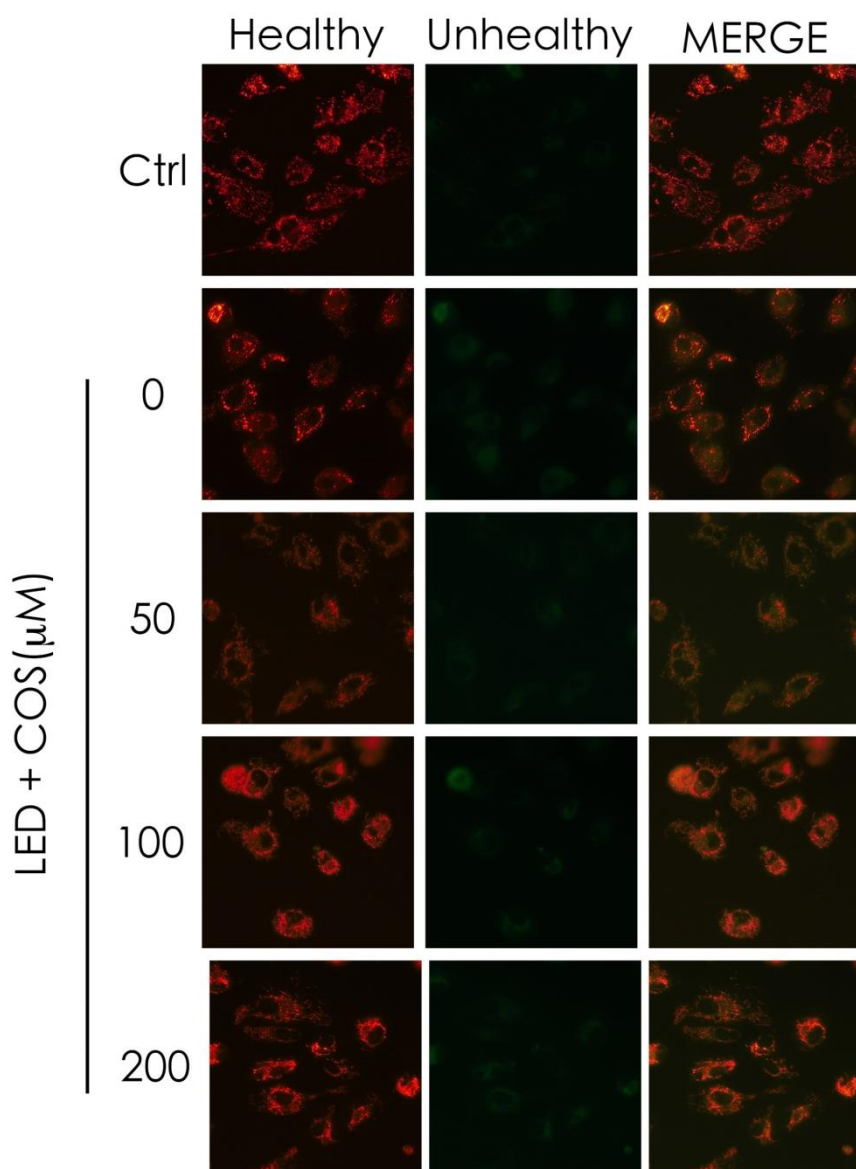
以流式細胞儀分析細胞凋亡的結果如圖八。只照光不加 COS 的細胞 (b, 凋亡比率: 7.61%)與控制組 (a, 凋亡比率: 6.43%)相比，凋亡的比例有稍微增加，但差異很小，不過加了 COS 50、100、200 μ M 後，明顯減少了細胞凋亡 (c: 6.28%、d: 2.85%、e: 3.44%)，但 400 μ M 的 COS (f: 18.39%)有較高的細胞凋亡比率。但在圖六 400 μ M COS 的組卻呈現高細胞活性，兩者看似矛盾之處，探討其原因可能是文獻中曾描述適量的 COS 會刺激細胞增生 (Cheng et al.,2012)，加了 400 μ M COS 的組別細胞數量較多，雖然 400 μ M 的 COS 有較高的細胞凋亡比率，但整體存活的細胞數目仍然較其他組高，因此可測得較高的細胞活性(圖六)。



圖八、ARPE-19 細胞加入不同濃度 COS 一小時再照光 2500lux 24hr 的凋亡程度(橫軸是 Annexin V-FITC 的螢光訊號強度，縱軸是 PI 的螢光訊號強度。a 圖：未照光未加 COS 的控制組、b 圖：只照光不加 COS、c 圖：照光並經 COS 50 μ M 處理、d 圖：照光並經 COS 100 μ M 處理、e 圖：照光並經 COS 200 μ M 處理、f 圖：照光並經 COS 400 μ M 處理)

五、以 JC-1 染色測量粒線體膜電位變化

細胞照射藍光之後，立刻取出以 JC-1 染色測量粒線體膜電位變化情形，結果如圖九。紅光代表健康的粒線體，綠光代表膜電位減少的粒線體，圖九顯示 ARPE-19 細胞剛照射完藍光之後，對它的粒線體影響不大，未來將持續探討因藍光照射所造成 ARPE-19 細胞的凋亡與粒線體的損壞之時間關連性。



圖九、ARPE-19 細胞加入不同濃度 COS 一小時再照光處理的粒線體膜電位變化情形。

六、以 Western Blot 測量與細胞凋亡相關的蛋白質

以 Western Blot 分析細胞中的 HO-1、iNOS、Caspase-3、Bcl-2、ERK 含量，這些蛋白質皆是細胞受到刺激時才會大量表現，且都與發炎反應及細胞凋亡有密切關聯，以 β -actin 作為 internal control，結果如圖十。以 imageJ 軟體分析灰階，繪成相對表現量，如圖十一。

HO-1 的表現量在 0 μ M COS 組比控制組明顯高出許多，加了 COS 會降低 HO-1 的表現量，但是 50 μ M COS 因濃度太低而效果不彰，反之，400 μ M COS 濃度太高亦效果不彰。

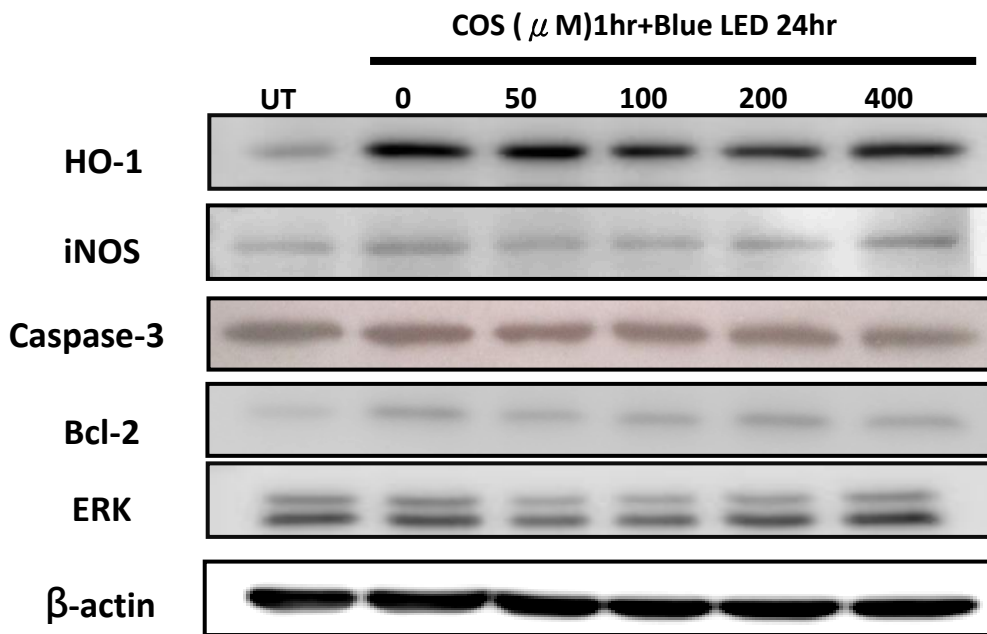
iNOS 的表現量在 0 μ M COS 組比控制組高，而 50、100、200 μ M COS 則會降低 iNOS 的表現量，但 400 μ M COS 效果亦不彰。

細胞凋亡酶 Caspase-3 的表現量在各濃度處理中差異不大，但可以看出其表現量仍有差異，在 0 μ M COS 組比控制組稍微高一點，有加 COS 的組別表現量隨 COS 的濃度上升而下降，400 μ M COS 表現量最低，效果是最顯著的。

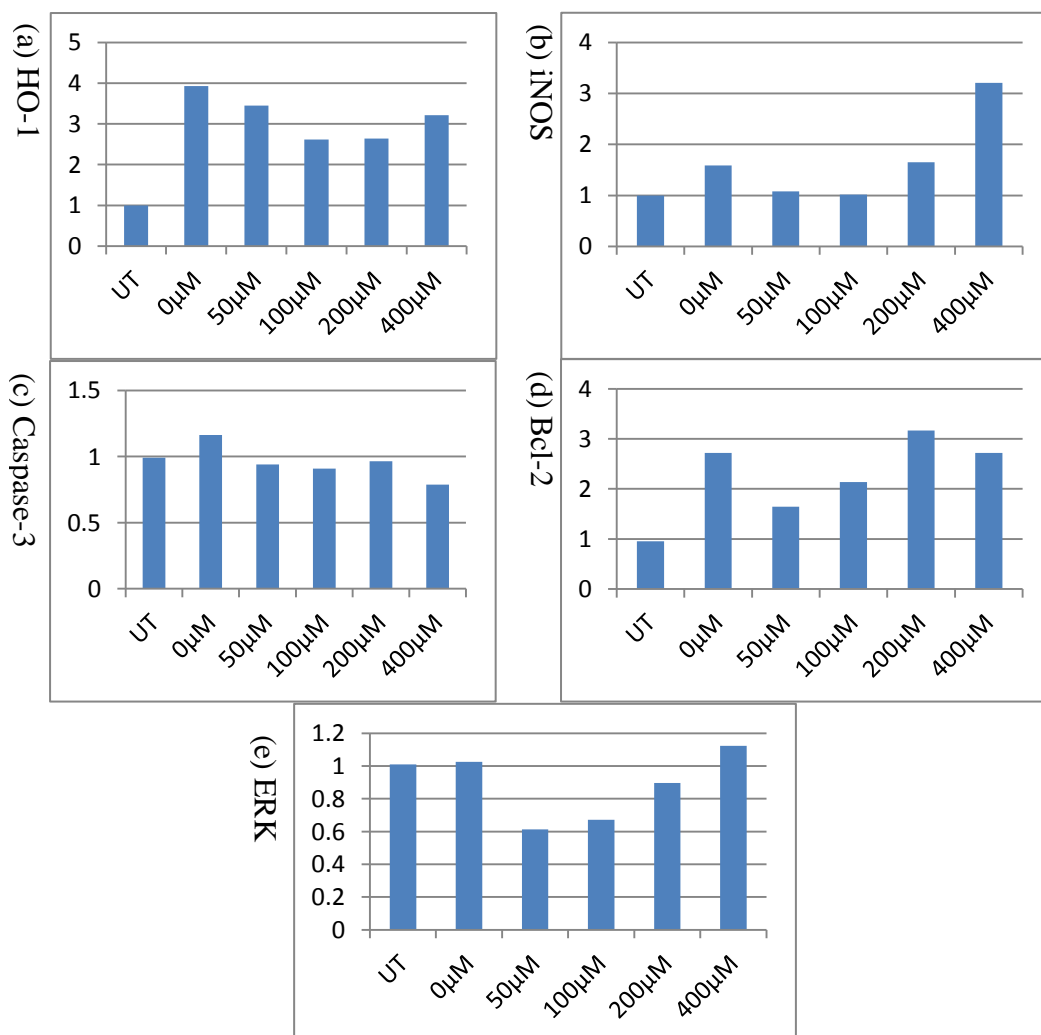
Bcl-2 的表現量在 0 μ M COS 組明顯比控制組高，50、100 μ M COS 明顯降低了 Bcl-2 的表現量，但 200、400 μ M COS 則未見明顯的保護效果。

ERK 的表現量在 0 μ M COS 組比控制組稍微高一點，50、100 μ M COS 明顯降低了 ERK 的表現量，但 200、400 μ M COS 保護效果也不明顯。

總而言之，適當濃度的 COS 會讓許多種調控發炎反應與細胞凋亡的蛋白質表現量下降，證實 COS 可以減少藍光對 ARPE-19 細胞的傷害。雖說每種蛋白質表現量最低時的 COS 濃度不盡相同，但我們知道過猶不及，400 μ M COS 仍會和只照光的細胞一樣，讓許多種蛋白質的表現量上升，可能已超出 ARPE-19 細胞的生理負荷，是不適合的實驗濃度。



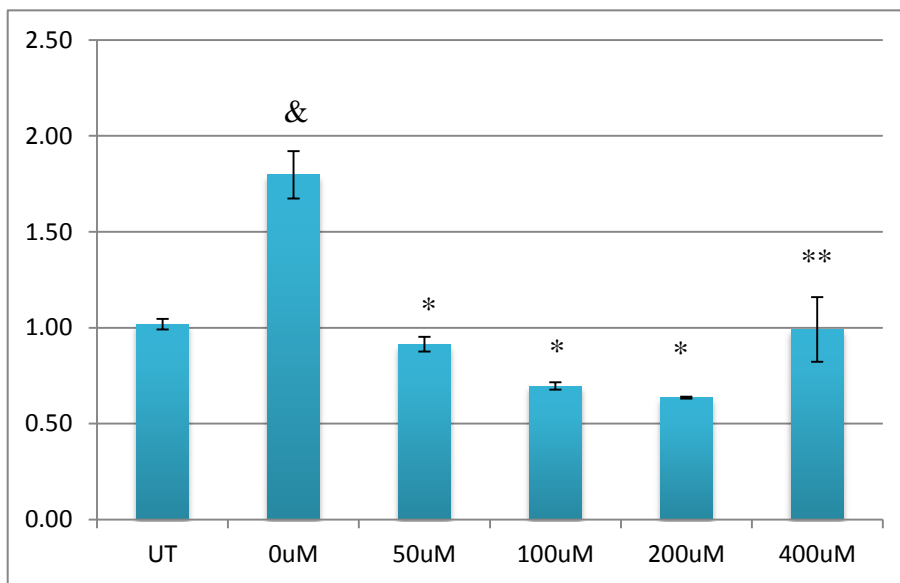
圖十、ARPE-19 細胞加入不同濃度 COS 一小時再照光 2500lux 24hr 的不同蛋白質表現量



圖十一、以 imageJ 軟體分析 HO-1(a)、iNOS(b)、Caspase-3(c)、Bcl-2(d)、ERK(e)相對表現量

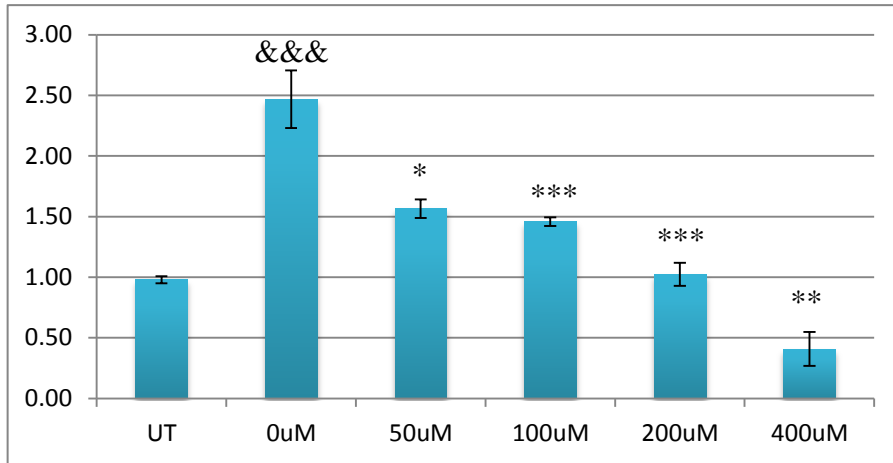
七、以 qPCR 測量 DNA 表現量

以 qPCR 比較 NF- κ B 傳導路徑下游基因 *iNOS* 及 *MCP-1* 的表現量，以 GAPDH 做校正後的結果如圖十二、圖十三。*iNOS* 與發炎症狀的產生有關，只照光不加 COS 的細胞 (0 μ M) 與控制組 (UT) 相比，*iNOS* 表現量明顯上升，而經 COS 處理後，*iNOS* 表現量降低，其中以 200 μ M 處理最為顯著。



圖十二、ARPE-19 細胞加入不同濃度 COS 一小時再照光 2500lux 24hr 的 *iNOS* 相對表現量(&：與 UT 相比 P 值<0.05。*：與 0 μ M 相比 P 值<0.05，**：與 0 μ M 相比 P 值<0.01)

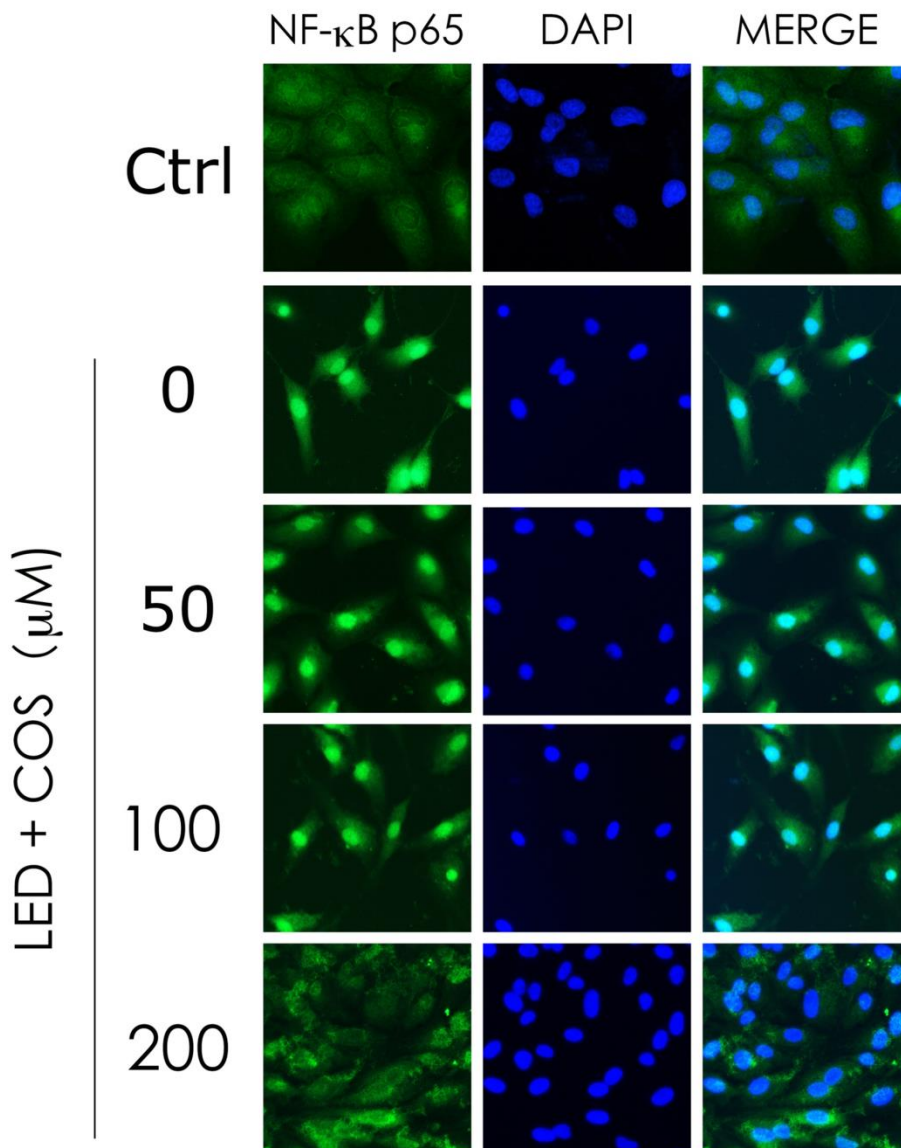
MCP-1 是一種趨化素，當細胞發炎時，它會趨化單核球、記憶型 T 細胞、自然殺手細胞到反應位置，故細胞受到刺激時 *MCP-1* 才會大量表現。只照光不加 COS 的細胞 (0 μ M) 與控制組 (UT) 相比，*MCP-1* 表現量明顯上升。與只照光不加 COS 的細胞(0 μ M)相比，經 COS 處理後的 *MCP-1* 表現量降低，且 COS 濃度愈高，*MCP-1* 表現量愈低，所以 COS 會減少細胞受藍光的刺激。



圖十三、ARPE-19 細胞加入不同濃度 COS 一小時再照光 2500lux 24hr 的 *MCP-1* 表現量(& : 與 UT 相比 P 值<0.05, && : 與 UT 相比 P 值<0.01, &&& : 與 UT 相比 P 值<0.001。 * : 與 0 μ M 相比 P 值<0.05, ** : 與 0 μ M 相比 P 值<0.01, ***與 0 μ M 相比 P 值<0.001)

八、以免疫螢光染色分析 NF- κ B 的 p65 蛋白由細胞質轉移到細胞核的情形

以免疫螢光染色分析 NF- κ B 的 p65 蛋白由細胞質轉移到細胞核的情形，結果如圖十四。細胞受藍光刺激時，p65 會由細胞質轉移到細胞核內，在低濃度 (50,100 μ M) COS 組轉移情形與 0 μ M COS 的組別相似，但加了 200 μ M COS 的細胞，p65 轉移情形趨緩，可見 200 μ M COS 可以抑制 NF- κ B 的活化，阻止它的傳遞路徑而保護 ARPE-19 細胞。



圖十四、ARPE-19 細胞加入不同濃度 COS 再照光處理的 NF- κ B p65 蛋白由細胞質轉移到細胞核的情形。

陸、結論

藍光會對視網膜色素上皮細胞造成明顯的損害，ARPE-19 細胞經過藍光照射後，不但使過氧化物 ROS 的產生量增加，凋亡及發炎相關的基因 (*iNOS*、*MCP-1*)和蛋白質 (HO-1、*iNOS*、Caspase-3、Bcl-2、ERK)表現也增加，因而使細胞凋亡比率增加，且凋亡比率隨著藍光照射的時間增加而上升。

具抗氧化作用的幾丁寡醣 COS 則可減少藍光對 ARPE-19 細胞的傷害。本實驗顯示 100 μ M、200 μ M COS 處理的細胞凋亡比率減少較明顯。在以 NADH 還原性作用為基準的細胞活性檢測上，則發現 100 μ M 以上的 COS 處理後，可明顯增加 ARPE-19 細胞照射藍光後的細胞活性。經過 COS 處理的細胞 ROS 含量減少。經低濃度 COS (50 μ M、100 μ M、200 μ M)處理後的細胞，發炎及凋亡相關基因 (*iNOS*、*MCP-1*)和蛋白質 (HO-1、*iNOS*、Caspase-3、Bcl-2、ERK)表現量也呈下降趨勢。另外，低濃度的 COS (50 μ M、100 μ M、200 μ M)可以減少 NF- κ B 的下游基因 (*iNOS*、*MCP-1*)表現量，且 200 μ M 的 COS 可以抑制 NF- κ B 的活化，使之不轉移到細胞核中活化其下游基因。因此適當濃度的 COS 對於藍光對 ARPE-19 細胞所造成之傷害確實具有一定的保護作用，且其作用機轉應與抑制 NF- κ B 傳導路徑相關。

在臨床應用方面，適當濃度的 COS 對人體無害，且有抗氧化的效果，COS 目前已被應用於健康食品中，但對於眼睛的保護作用則少有研究，而進一步研究 COS 抗光傷害的效果與機轉，亦可提供將來臨床上醫療的參考，以預防罹患黃斑部病變。

柒、參考資料

- 田依靜 (2001)。甲殼素抗脂質過氧化作用之研究。碩士論文。臺北：國立臺灣大學生化科學研究所。
- 曾若雯 (2008)。Tyloxapol 與各種細胞之交互作用。碩士論文。臺南：嘉南藥理科技大學藥物科技研究所。
- 陳冠任，李景欽 (2008)。高速篩選系統的建立與新藥物開發。化學，16(4)，269-277。
- Ahn, B.N., Kim, J.A., Himaya, S.W.A., Bak, S.S., Kong, C.S. & Kim, S.K. (2012). Chitooligosaccharides attenuate UVB-induced damages in human dermal fibroblasts. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 385(1), 95-102.
- Baldwin, A.S. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*, 14, 649-683.
- Chen, F., Castranova, V., Shi, X. & Demers, L.M. (1999). New insights into the role of nuclear factor-kappa B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of disease. *Clin Chem*, 4, 7-17.
- Cheng, N.C., Wang, S. & Young, T.H. (2012). The influence of spheroid formation of human adipose-derived stem cells on chitosan films on stemness and differentiation capabilities. *Biomaterials*, 33,1748-1758.
- Fang, I.M., Yang, C.H., Yang, C.M. & Chen, M.S. (2013). Chitosan Oligosaccharides Attenuates Oxidative-Stress Related Retinal Degeneration in Rats. *PLoS One*, 8(10).
- Fang, I.M., Yang, C.H. & Yang, C.M. (2014). Chitosan oligosaccharides prevented retinal ischemia and reperfusion injury via reduced oxidative stress and inflammation in rats. *Exp Eye Res*, 130, 38-50.
- Fang, I.M., Yang, C.H. & Yang, C.M. (2014). Chitosan oligosaccharides attenuate ocular inflammation in rats with experimental autoimmune anterior uveitis. *Mediators of Inflammation*, 2014, 1-15.
- Fang, I.M., Yang, C.H., Chiou, S.H. & Yang, C.M. (2014). Induced pluripotent stem cells without

- c-Myc ameliorate retinal oxidative damage via paracrine effects and reduced oxidative stress in rats. *J Ocul Pharmacol Ther*, 30(9), 757-770.
- Hoffmann, A., Levchenko, A., Scott, M.L. & Baltimore, D. (2002). The I κ B-NF- κ B signaling module: temporal control and selective gene. *Activation Science*, 298(5596),1241-1245.
- Kenjiro, O., Yoshiki, K., Kazuhiro, T., Saori, K., Masamitsu, S. & Hideaki, H. (2014) Protective effects of bilberry and lingonberry extracts against blue light-emitting diode light-induced retinal photoreceptor cell damage in vitro. *BMC Complementary and Alternative Medicine*,14,120.
- Marcin, H., Struszczyk. (2002). Chitin and chitosan. *POLIMERY*, 47(5), 316-325.
- Morgan, M.J. & Liu, Z.G. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res*, 21,103-115.
- Roehlecke, C., Schaller, A., Knels, L. & Richard, H.W. (2009). The influence of sublethal blue light exposure on human RPE cells. *Mol Vis*, 15,1929–1938.
- Shang, Y.M., Wang, G.S. & Yang, C.H. (2014). White Light–Emitting Diodes (LEDs) at Domestic Lighting Levels and Retinal Injury in a Rat Model. *Environmental Health Perspectives*, 122(3), 269-276.
- Sparrow, J.R. & Cai, B. (2001). Blue light-induced apoptosis of A2E-containing RPE: involvement of caspase-3 and protection by Bcl-2. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42, 1356–1362.
- Yoshiki, K., Kenjiro, O., Kazuhiro, T., Masamitsu, S. & Hideaki, H. (2014). Damage of photoreceptor-derived cells in culture induced by light emitting diode-derived blue light. *Sci Rep*, 4, 5223.
- Zhang, X., Geng, X., Jiang, H., Li, J. & Huang, J. (2012). Synthesis and characteristics of chitin and chitosan with the (2-hydroxyl-3-trimethyl ammonium) propyl functionality, and evaluation of their antioxidant activity in vitro. *Carbohydrate Polymers*, 89(2), 486–491.

【評語】 090006

此研究工作是探討幾丁寡醣 (chitosan oligosaccharide) 對受到藍光 LED 所造成傷害的效果。此研究工作創意高，也有相當多的實驗資料，對未來受到紫外光傷害的眼睛的治療可能有相當的幫助，然而所用的 LED 強度過高，非一般人會碰到的情況，以後可以試較弱的強度但較強的照射時間。另外 chitosan oligosaccharide 所含有的寡醣究竟有多少種也值得探討。