

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計 畫 *
* : 馬兜鈴酸所誘發的氧化壓力對於哺乳類細胞株的影響 *
* 名 稱 *
* ***** *

執行計畫學生： 郝先柔
學生計畫編號： NSC 98-2815-C-040-049-B
研究期間： 98年07月01日至99年02月28日止，計8個月
指導教授： 劉秉慧

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 99年03月30日

目錄

	頁數
序論	
馬兜鈴酸簡介	4
GSH 簡介	4
活性氧分子簡介	5
實驗動機與目的	6
材料與方法	
試劑	7
細胞培養與處理	7
細胞毒性分析(MTT assay)	7
細胞氧化壓力分析(Reactive Oxygen Species, ROS)	8
彗星分析法/單一細胞膠體電泳(comet assay)	9
細胞凋亡蛋白酵素 3 活性分析(Caspase 3 assay)	10
脂質過氧化測定(lipid peroxidation, TBARS assay)	10
實驗結果	
1. 馬兜鈴酸所引起 LLC-PK1 細胞株之細胞毒性	12
2. 馬兜鈴酸所引起 HK-2 細胞株之細胞毒性	12
3. 馬兜鈴酸所引起 HK-2 細胞株中活性氧分子 ROS 的生成	12
4. 馬兜鈴酸刺激活性氧分子 ROS 的產生，而抗氧化劑 GSH 可抑制馬兜鈴酸所誘發的 ROS 生成	13
5. 馬兜鈴酸所引起的活性氧分子並不會對 HL-60 細胞造成脂 質過氧化反應	13
6. 馬兜鈴酸對腎臟細胞 HK-2 造成 DNA 傷害	14

7. 馬兜鈴酸對 HK-2 細胞造成 DNA 傷害，而抗氧化劑 GSH 無法有效抑制馬兜鈴酸造成的 DNA 損傷	14
8. 馬兜鈴酸誘發細胞凋亡蛋白 Caspase3 的生成	15
9. 馬兜鈴酸誘發細胞凋亡蛋白Caspase3的生成，而抗氧化劑 GSH無法抑制馬兜鈴酸所活化的Caspase3	15
討論	16
參考文獻	30

圖表

圖表一、馬兜鈴酸 Aristolochic acid I (AAI) 結構式	18
圖表二、麩胱甘肽 (Glutathione, 簡稱 GSH) 其化學式	18
圖表三、GSH 的氧化還原反應	19
圖表四、麩胱甘肽 GSH 與活性氧分子 ROS 之關係圖。	19
圖表五、脂質過氧化之整合產物	19
圖表六、馬兜鈴酸所引起 LLC-PK1 細胞株之細胞毒性	20
圖表七、馬兜鈴酸所引起 HK-2 細胞株之細胞毒性	21
圖表八、馬兜鈴酸所引起 HK-2 細胞株中活性氧分子 ROS 的生成	22
圖表九、馬兜鈴酸刺激活性氧分子 ROS 的產生，而抗氧化劑 GSH 可抑制馬兜鈴酸所誘發的 ROS 生成	23
圖表十、馬兜鈴酸所引起的活性氧分子並不會對 HL-60 細胞造成脂質過氧化反應	24
圖表十一、馬兜鈴酸的加入造成細胞的 DNA 傷害破損，使細胞在電泳後的圖像出現像是彗星一樣的拖尾現象	25
圖表十二、馬兜鈴酸對腎臟細胞 HK-2 造成 DNA 傷害	26
圖表十三、馬兜鈴酸對 HK-2 細胞造成 DNA 傷害，而抗氧化劑 GSH 無法有效抑制馬兜鈴酸造成的 DNA 損傷	27
圖表十四、馬兜鈴酸誘發細胞凋亡蛋白 Caspase3 的生成	28
圖表十五、馬兜鈴酸誘發細胞凋亡蛋白 Caspase3 的生成，而抗氧化劑 GSH 無法抑制馬兜鈴酸所活化的 Caspase3	29

序論

馬兜鈴酸(Aristolochic acid)簡介

馬兜鈴酸 (Aristolochic acid, 簡稱AA)是種從馬兜鈴科植物(Aristolochia species)中萃取出來的天然毒素, 其包括了Aristolochic acid I 和Aristolochic acid II兩種成分, 而AA I與AAII之間則有一個官能基不同, 馬兜鈴酸所造成的致毒性也多由Aristolochic acid I(圖表一)所引起。Aristolochic acid I會與腺嘌呤(Adenine)形成核酸鍵結物(AA-DNA adduct)並對細胞造成鹼基置換(transversion), 使得細胞內腺嘌呤(Adenine)置換成胸腺嘧啶(Thymidine)而引發突變產生。早期馬兜鈴酸廣泛含於中草藥中被使用來治療疾病像是關節炎跟痛風, 然而近期研究發現馬兜鈴酸會跟細胞內蛋白質與DNA作用反應, 具有基因毒性以及細胞毒性, 並會對人類造成基因突變以及腎臟纖維化進而引發腎衰竭與腎癌(Chen et al., 2006)。而這種因為服用含有馬兜鈴酸所造成特殊的急性腎纖維化疾病, 則被稱為馬兜鈴酸腎臟病變(aristolochic acid nephropathy), 有文獻顯示馬兜鈴酸除了容易造成腎臟方面的傷害, 也易引起腫瘤的生成, 並且經由臨床研究與實驗, 馬兜鈴酸在國際上已被公認為人類的致癌物(Cosyns et al., 1999, Nortier et al., 2000), 因此馬兜鈴酸對細胞造成的傷害跟致毒性是我們探討的重點。

麩胱甘肽(Glutathione)簡介

麩胱甘肽(Glutathione, 簡稱GSH)是由三種胺基酸所組合而成, 包括了L-g-glutamyl-L-cysteinyl-glycine(圖表二), 總分子量為 307, 在植物和動物生物體中構成主要的低分子巯基基團(thiol, -SH)。麩胱甘肽GSH在人體內之氧化還原機構中對巯基酶的賦活、醱解、解毒作用等擔任重要的角色, 且對帶有

sulfhydryl group -S的蛋白質有穩定的作用。因著GSH的高還原性，GSH同時具有毒物抵抗性(Drug resistance) (Larsson, A., et al.)，能夠利用將自己還原態的GSH轉換成氧化態的GSSH而將過氧化氫(H_2O_2)還原成水(H_2O) (圖表三)而有效保護細胞對抗毒物所誘發的活性氧分子(ROS)和自由基反應(圖表四)

活性氧分子(Reactive Oxygen Species, ROS)

在一般生物體中，活性氧分子(Reactive Oxygen Species，簡稱ROS)像是超氧陰離子自由基($O_2^{\cdot-}$)、羥基(OH^{\cdot})、過氧化氫(H_2O_2) 都是平常代謝作用有氧呼吸的產物(Klaunig et al. 2004)，平時在沒有氧化壓力的情況下生物體內的內生性氧化物會跟抗氧化物達到平衡，而不使ROS傷害到生物本身，不過當在生物體中的抗氧化物減少、活性氧增加時則會造成氧化壓力(Chen et al., 1998)，外在環境的毒素、離子輻射和空氣汙染、抽菸、藥物也會誘發ROS自由基的生成；而這些ROS自由基都有可能對生物體內的其他分子造成傷害。其中細胞的蛋白質、醣類、脂質、DNA都會是自由基攻擊的主要目標(Chen et al., 1998)進而影響到酵素活性和細胞膜的功能。同樣也有研究顯示活性氧分子ROS在癌症的初期容易被誘發生成(Dreher and Junod, 1996; Marnett, 2000; Droge, 2002)。

實驗動機背景與目的

長久以來亞洲地區利用中草藥來治病已經有很長的歷史，但近幾年來曾傳出因服用含有馬兜鈴酸(aristolochic acid，簡稱AA)的藥物導致腎臟衰竭或癌症的病人出現，後來經由臨床研究與實驗結果得知馬兜鈴酸已在國際上被公認為人類的致癌物。由於許多研究中指出馬兜鈴酸容易導致腎臟方面的病變，因此在本實驗計畫中利用人類近曲小管上皮細胞株(HK-2)、豬腎臟近曲小管上皮細胞(LLC-PK1)與人類急性前骨髓白血病細胞株(HL-60)和老鼠的腎臟組織作為研究材料。為了要探討馬兜鈴酸所造成的致毒傷害和影響，我們利用細胞和組織觀察馬兜鈴酸造成的脂質過氧化程度，及以單一細胞電泳偵測DNA斷裂的產生，並以誘發Caspase3生成作為細胞走向凋亡(apoptosis)的指標，來觀察馬兜鈴酸對細胞與組織造成的氧化壓力影響。

由於我們得知馬兜鈴酸可能造成ROS誘發生成，於本計劃中我們目的將探討這些由馬兜鈴酸誘發生成的ROS自由基可能對生物體造成的危害與損傷，因此我們將未來的實驗計畫初步分為下列五個子目標【子目標一】馬兜鈴酸是否會誘發細胞中活性氧分子ROS的生成；【子目標二】馬兜鈴酸是否會造成細胞與腎臟組織的脂質過氧化(lipid peroxidation)；【子目標三】馬兜鈴酸是否對腎臟細胞造成DNA傷害；【子目標四】馬兜鈴酸造成的氧化壓力，是否導致細胞凋亡(apoptosis)；【子目標五】利用ROS抑制劑來探討馬兜鈴酸所誘發之DNA傷害和細胞凋亡是否與ROS有直接關連。

材料與方法

試劑

DMEM 培養基、F12 培養基、199 培養基、胎牛血清與抗生素(penicillin 與 streptomycin)皆購自 GIBCO(Grand Island, NY)、馬兜鈴酸(AAI)與麩胱甘肽(GSH)及其它化學藥品則購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)。老鼠腎臟組織則由林明忠老師實驗室提供。

細胞培養與處理

人類近曲小管上皮細胞株(HK-2)、人類急性前骨髓白血病細胞株(HL-60)與豬腎臟近曲小管上皮細胞(LLC-PK1)皆購自食品發業發展研究所菌種中心。人類近曲小管上皮細胞株(HK-2)培養在一比一混和的 DMEM 與 F12 培養基中、含有 10%胎牛血清、1% penicillin 與 streptomycin；人類急性前骨髓白血病細胞株(HL-60)則培養在 RPMI-1640 培養基中、含有 10%胎牛血清、1% penicillin 與 streptomycin；豬腎臟近曲小管上皮細胞(LLC-PK1)使用了 DMEM 培養基、3%胎牛血清、1% penicillin 與 streptomycin。以上皆置入 37°C，含有 5% 二氧化碳的培養箱中培養觀察。

細胞毒性分析(MTT assay)

MTT (3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay 是一種普遍運用於毒理學中測試毒物對細胞毒性強弱的方法，原理是由於活細胞中粒線體內所含有的琥珀酸去氫酶(Succinate dehydrogenase)可將化學藥品基質 MTT 轉化成為吸收光可定量的藍紫色 formazan，然而死亡的細胞卻不具有此酵素活性與轉化能力。因此可以利用 96 孔盤大量培養細胞，施以不同濃度的毒素或抑制劑進行處理，再以 ELISA 測定儀(Molecular Devices Emax precision

microplate reader)測得其吸光值而定量。將細胞均勻分布在 96 孔盤(Falcon, Frank Lake, NJ)，使每孔含(8000/100 μ l)個細胞並培養於 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂之培養箱。依實驗時加入不同濃度的馬兜鈴酸、控制組DMSO，置於培養箱培養 24 小時，24 小時候設計的反應時間結束，以 0.5mg/ml MTT培養基替換原本的培養液，再度置於 37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳之培養箱培養 4 小時，之後移除含MTT培養基，加入異丙醇 (isopropanol) 均勻溶解紫色fomazan，最後將溶解出來的紫色液體移置離心管中離心 13000rpm 10 分鐘，將同一濃度做三重復再 96 孔盤中，以波長 570nm 讀取吸光值而定量。

細胞氧化壓力分析(Reactive Oxygen Species, ROS)

DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) assay 是一種普遍運用於偵測活性氧分子 ROS 的方法。DCFH-DA 為對活性氧分子 ROS 敏感的螢光物質，本身並不會發出螢光，不過一旦進入細胞，細胞內的 esterase 便會先行將 DCFH-DA 水解成為 DCFH，其後在遭受細胞內的 reactive oxygen species 氧化形成 DCF，因而發出綠色螢光。我們借由偵測 DCF 螢光的強度來推知細胞活性氧分子被誘發生成的多寡。將(8000/100 μ l)個 HK-2 細胞於 96 孔盤培養細胞，並以 10 μ M DCFH-DA 試劑 (以 KRH buffer 稀釋) 前處理 30 分鐘，再加入不同濃度之馬兜鈴酸反應 18 小時，最後以多孔式螢光測定儀分析螢光強度，激發光 485nm、吸收光 535nm。再借由測定 DCFH 發出的綠色螢光，我們便可以從螢光的強度推知活性氧分子(reactive oxygen species)的增加或減少以及其含量多寡。若是進行抑制劑實驗，則在加入不同濃度 AAI 的培養基之前，先加入不同的氧化抑制劑 NAC(10mM)、Tiron(5mM)與麩胱甘肽 GSH(10mM)等前處理作用 2 小時，其於步驟皆同。

彗星分析法/單一細胞膠體電泳(comet assay/ single cell gel electrophoresis)

彗星分析法/單一細胞膠體電泳(comet assay/ single cell gel electrophoresis)是設計用來評估單一個細胞DNA受損的情形，若DNA受到傷害而斷成片斷，即可由此種實驗方法得知結果當尾部動量 (tail moment, TM)的數值得知。首先在35 mm盤中培養(2×10^5 /ml)個HK-2 細胞，置入培養箱培養至少 18 小時以後。接著以含有不同濃度AAI 的培養基持續培養 24 小時。實驗一開始以 0.25 % Trypsin-EDTA將細胞切下並以 0.01 M PBS將細胞沖離細胞盤到微量離心管中，取 10 μ l細胞液與低熔點膠(low melting gel，簡稱LMA)混合並塗抹在玻片上，完成後將玻片放置於 4 $^{\circ}$ C、15 分鐘等待膠體凝結和固定細胞，之後浸入lysis solution (300 mM NaOH、17.5 mM Tris-base、100 mM EDTA、2.5 M NaCl、1% SLS、10% DMSO、1% Triton X-100) 4 $^{\circ}$ C、一小時以去除細胞膜、核膜極大部分的蛋白質。接下來將玻片放入強鹼的電泳液當中(Alkali Electrophoresis)靜置 20 分鐘，使DNA雙股斷裂展開形成單股斷裂而DNA unwinding，如此一來電泳時DNA單股可因為電泳槽中電極的驅使而使DNA片段受正極吸引後被拖引出來，電泳條件設置為電壓 18 V、電流 300 mA、30 分鐘，電泳後依序將玻片浸泡於甲醇，70%乙醇當中各五分鐘後，再浸泡於PH值 7.5、0.5M Tris10 分鐘重複 2 次。經由SYBR(1:2500 稀釋)染劑染色之後，在螢光顯微鏡下即可看到長得很像彗星的影像，最終利用機器進行影像分析與計算其尾部動量 (tail moment, TM) =尾部長度百分比 \times 尾部亮度百分比。一般研究實驗標準隨機取 50 個細胞進行分析統計，我們在此打算隨機選取 80 個細胞來進行實驗統計。若是進行抑制劑實驗，則在加入不同濃度AAI的培養基之前，先加入抑制劑前處理作用 2 小時，其於步驟皆同。

細胞凋亡蛋白酵素 3 活性分析(Caspase 3 assay)

Caspase3 是走向細胞凋亡路徑中最後的一個細胞凋亡蛋白，在此我們利用測量Caspase3 的誘發程度來觀察馬兜鈴酸在細胞株中使否有誘發Caspase 3 生成的能力，進而帶領細胞走向細胞凋亡。其實驗原理則是因螢光染劑ACDEVD-AFC結構中的DEVD會與AFC共價鍵結，而在共價鍵結時AFC無法發出螢光，但若細胞內含有caspase 3 活性其則可以藉由辨識特定蛋白序列專一切割DEVD與AFC的鍵結區域，釋放出的AFC則可以被激發而產生螢光，我們在藉由定量螢光產生的量來得知caspase 3 在細胞內的多寡。將每盤含有約 20 萬/1ml個HK-2 細胞種在培養皿中，培養於 37°C、5% CO₂之培養箱，培養至少 18 小時後。再加入不同濃度的馬兜鈴酸後置於培養箱培養 24 小時，在實驗 24 小時結束後，將每盤去除培養液且各加入 80μl assay buffer(1 % sucrose、0.2 mM DTT、0.1 % CHAPS、100 mM HEPES PH 7.4)，用 assay buffer將細胞從細胞盤面上刮下，移到新的微量離心管當中，接著在冰上sonicate超音波震盪將細胞完全破除，離心後取上清，然後加入substrate (assay buffer& AC-DEVD-AFC) ，放置 37°C 水浴一小時避光，一小時後移到 96 孔盤中做兩重複測吸光值，以多孔式螢光測定儀分析螢光強度，激發光 405nm、吸收光 535nm。若是進行抑制劑實驗，則在加入不同濃度AAI的培養基之前，先加入抑制劑前處理作用 2 小時，其於步驟皆同。

脂質過氧化測定(lipid peroxidation, TBARS assay)

脂質過氧化反應的Malondialdehyde (MDA) 和thiobarbituric acid (TBA) 螯合之後會產生粉紅色的最終產物，一分子的Malondialdehyde (MDA)能夠和兩分子thiobarbituric acid (TBA)螯合，最終產物如(圖表五)表示。我們可以藉由螢光測定儀來偵測最後產物的多寡，來推論脂質過氧化的程度，而MDA的高低也可間接反應有機體細胞受自由基攻擊的嚴重程度。

1. 標準品: 目前使用了 MDA 標準試劑 1,1,3,3-tetraethoxy propane (TEP) 來做 TBARS assay 標準品的配製，一開始將濃度為 4.2M 的 1,1,3,3-tetraethoxy propane (TEP) 序列稀釋到 0.01M 的 PBS 中，讓最後標準品的濃度分別為 (4 μ M, 2 μ M, 0.8 μ M, 0.4 μ M, 0.2 μ M, 0 μ M)，接下來依照 TBARS assay 的實驗步驟加入 10% TCA(Trichloroacetic acid)、 0.7% TBA (thiobarbituric acid)、 4% BHT (80mgBHT 溶在 2ml 99% ethanol)將標準品煮沸後離心，最後以多孔式螢光測定儀分析螢光強度，激發光 535nm、吸收光 585nm，如此來完成標準品濃度梯度的訂定。我們進行組織和細胞以及測量標準品皆可利用 TBARS 測量方法，將未知濃度的樣品測其 TBARS 後的螢光值，而後使用數學方法內插到標準品的數值當中進而得知未知的濃度為何，並觀察其受到脂質過氧化的程度。

2. 細胞實驗: 當進行細胞實驗時，我們將人類急性前骨髓白血病細胞株 (HL-60) 細胞以 (100 萬/100 μ l) 平均培養在 96 孔盤當中，以馬兜鈴酸處理後，依序加入 10% TCA、0.7% TBA、4% BHT，小心混合之後將微量離心管放入沸水中加熱直到變色，接著靜置於冰上 5 分鐘後離心，最後分別將樣品置於 96 孔盤中，以多孔式螢光測定儀分析螢光強度，再將讀取後的數值分析並與標準品做比較，如此推知組織 MDA 的濃度和其受到脂質過氧化的程度。

3. 組織實驗: 當對老鼠的腎臟組織進行實驗，為了萃取組織原液，一開始將老鼠腎臟取出後加入 PBS 剪碎，並以組織均質機 (homogenizer) 處理腎臟組織，離心後取上清液以 PBS 稀釋 10 倍。最後再以馬兜鈴酸處理組織，並依序加入 10% TCA、0.7% TBA、4% BHT，且重複與上述細胞實驗相同的步驟，將螢光測定儀讀取後的數值做分析，並觀察組織受到脂質過氧化的程度。

實驗結果

1. 馬兜鈴酸所引起 LLC-PK1 細胞株之細胞毒性

由於馬兜鈴酸容易對腎臟組織造成傷害，因此在本實驗初步研究中，我們針對 LLC-PK1 (豬腎臟近曲小管上皮細胞) 進行細胞毒性分析 (MTT assay)，在加入馬兜鈴酸處理後的 LLC-PK1 細胞中可以發現隨著馬兜鈴酸濃度的增高，細胞存活率有下降的趨勢出現(圖表六) 而在馬兜鈴酸(AAI)50 μ M 的劑量處理下就可造成 50%的細胞毒性。

2. 馬兜鈴酸所引起 HK-2 細胞株之細胞毒性

在初步研究結果中可以得知馬兜鈴酸對 LLC-PK1 (豬腎臟近曲小管上皮細胞) 造成細胞毒性，然而為了進一步觀察馬兜鈴酸對人類細胞的致毒性，我們於本次實驗計畫使用了人類近曲小管上皮細胞株(HK-2) 進行細胞毒性分析 (MTT assay) 來觀察此結果的再現性。處理過馬兜鈴酸後的 HK-2 細胞株中可以發現隨著馬兜鈴酸濃度的提高，細胞存活率有些微下降的趨勢，由其以 AAI 200 μ M 與 500 μ M 處理最為顯著(圖表七)。

3. 馬兜鈴酸所引起 HK-2 細胞株中活性氧分子 ROS 的生成

經由結果 1 與結果 2 顯現，馬兜鈴酸確實會對細胞造成毒性。但馬兜鈴酸如何造成細胞毒性的致毒機轉仍不完善，因此於本次實驗中我們推測馬兜鈴酸會經由誘發活性氧分子 ROS 來展現其毒性。利用 DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) 螢光染劑的參與我們可以偵測活性氧分子 ROS 的生成與細胞氧化壓力大小，實驗結果發現隨著馬兜鈴酸濃度的提高，細胞內的活性氧分子 ROS 的生成量也跟著上升。(圖表八)

4. 馬兜鈴酸刺激活性氧分子 ROS 的產生，而抗氧化劑 GSH 可抑制馬兜鈴酸所誘發的 ROS 生成

為了更進一步探討馬兜鈴酸所造成的細胞毒性與 ROS 之間的關係，我們欲加入三種不同抗氧化劑來觀察其是否可抑制 ROS 的生成。實驗中分別使用了 NAC(10mM)、Tiron(5mM)與麩胱甘肽 GSH(10mM)等抗氧化劑，在實驗前各以不同的氧化抑制劑前處理細胞 2 小時，接著以馬兜鈴酸 200 μ M 共同處理培養 18 小時，然後以 DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) 螢光染劑偵測。實驗結果發現唯獨以麩胱甘肽 GSH 氧化抑制劑處理下，可以降低因馬兜鈴酸所誘發的活性氧分子 ROS。(圖表九)

5. 馬兜鈴酸所引起的活性氧分子並不會對 HL-60 細胞造成脂質過氧化反應

由研究結果 3 我們得知馬兜鈴酸造成 ROS 誘發生成，也由於活性氧分子 ROS 容易去攻擊細胞中的核酸、蛋白質甚至細胞膜的不飽和脂肪酸造成細胞損傷，因此我們想探討經過馬兜鈴酸誘導產生的活性氧分子 ROS，會不會去攻擊在細胞膜上的不飽和脂肪酸，進一步造成脂質的過氧化現象(Lipid peroxidation)。

2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)。我們使用 TBARS assay 來檢測脂質過氧化的程度(可解釋為每多少單位的蛋白中其脂質過氧化的程度)，此實驗同時可以被視為脂質氧化壓力(oxidative stress)的指標。由於人類急性前骨髓白血病細胞株(HL-60)的敏感性較一般細胞株較高，因此在本實驗中我們同時使用人類急性前骨髓白血病細胞株(HL-60)細胞及老鼠腎臟組織來觀察馬兜鈴酸是否造成脂質的過氧化現象。實驗結果發現，不管在處理馬兜鈴酸 100 μ M 或是 200 μ M 的濃度下皆不會造成 HL-60 細胞與老鼠腎臟組織的脂質過氧化反應產生。(圖表十)

6. 馬兜鈴酸對腎臟細胞 HK-2 造成 DNA 傷害

由於文獻指出馬兜鈴酸會引發鹼基置換造成突變使其具有基因毒性，因此為了瞭解馬兜鈴酸對細胞遺傳物質 DNA 的影響，我們欲利用 Comet assay 來偵測馬兜鈴酸對細胞 DNA 所造成的傷害。彗星分析法/單一細胞膠體電泳(comet assay/ single cell gel electrophoresis)是設計用來評估單一個細胞 DNA 受損的情形，若 DNA 受到傷害而斷成片斷，即可由此種實驗方法得知結果當尾部動量 (tail moment, TM)的數值得知。實驗經過 Comet assay 分析 DNA 傷害之後，我們可以看出馬兜鈴酸的加入造成細胞的 DNA 傷害破損，使細胞在電泳後的圖像出現像是彗星一樣的拖尾現象(圖表十一)。實驗結果顯示，依照馬兜鈴酸處理的濃度上升(25 μ M、50 μ M、100 μ M、200 μ M)，去氧核糖核酸 DNA 所遭受的傷害也隨之提高。(圖表十二)

7. 馬兜鈴酸對 HK-2 細胞造成 DNA 傷害，而抗氧化劑 GSH 無法有效抑制馬兜鈴酸造成的 DNA 損傷

我們可以從前人研究得知活性氧分子 ROS 生成後會以攻擊細胞內遺傳物質 DNA 為目標，產生基因變異而引發許多疾病的產生。因此我們推測若加入抗氧化劑 GSH 即可抑制馬兜鈴酸所誘發 ROS 去攻擊細胞內 DNA，而降低其造成的 DNA 傷害。實驗中我們預先加入氧化抑制劑麩胱甘肽 GSH 處理 HK-2 細胞 2 小時，再以馬兜鈴酸(25 μ M 到 200 μ M)處理 24 小時，最後利用彗星分析法/單一細胞膠體電泳(comet assay/ single cell gel electrophoresis)同樣來觀察細胞 DNA 遭受的損傷。實驗結果我們可以發現，氧化抑制劑 GSH 的加入可以些微減少因馬兜鈴酸造成的 DNA 傷害，但此研究結果在統計上卻不具顯著差異。(圖表十三)

8. 馬兜鈴酸誘發細胞凋亡蛋白 Caspase3 的生成

從結果 2 可知腎臟細胞 HK-2 因著馬兜鈴酸的加入而造成細胞毒性，使細胞隨馬兜鈴酸濃度上升而死亡，因此我們想要深入探討，這些因馬兜鈴酸處理而死亡的 HK-2 細胞是否正走向細胞凋亡(apoptosis)。實驗中我們將細胞處理不同濃度的馬兜鈴酸(100 μ M 到 500 μ M)培養 24 小時，接著打破細胞萃取出蛋白，再利用螢光染劑 AC-DEVD-AFC 來偵測細胞內的 Caspase3 活性。實驗結果發現，以馬兜鈴酸 200 μ M 與 500 μ M 處理之下，細胞內的 Caspase3 有顯著的上升，並且依著馬兜鈴酸濃度梯度的升高，HK-2 細胞內的 Caspase3 活性上升更加明顯(圖表十四)，綜合以上我們也可以得知馬兜鈴酸可藉著誘發 Caspase3 生成而引領細胞會走向計畫性的死亡、細胞凋亡(apoptosis)路徑。

9. 馬兜鈴酸誘發細胞凋亡蛋白Caspase3的生成，而抗氧化劑GSH無法抑制馬兜鈴酸所活化的Caspase3

我們由結果 2 與結果 3 可以得知腎臟細胞 HK-2 因著馬兜鈴酸的加入引發細胞毒性並誘發活性氧分子 ROS 生成，我們可以發現細胞將馬兜鈴酸視為外界的氧化壓力，使細胞隨馬兜鈴酸濃度上升而死亡。因此我們實驗利用抗氧化劑 GSH 的加入與馬兜鈴酸共同培養，想要深入探討活性氧分子 ROS 產生的氧化壓力與細胞凋亡之間的關係。實驗中我們以 GSH 前處理 HK-2 細胞兩小時後，接著以濃度 200 μ M 與 500 μ M 的馬兜鈴酸處理混合培養 24 小時後，最後利用螢光染劑 AC-DEVD-AFC 來偵測 Caspase 3 的活性。實驗結果發現若同時以 AA 和抑制劑 GSH 處理後，馬兜鈴酸濃度 200 μ M 與 GSH 共同培養下會使 Caspase3 的活性提高，然而以馬兜鈴酸濃度 500 μ M 與 GSH 共同培養後則會有些微降低 Caspase3 的活性表現。綜合以上結果我們可以推論，抗氧化劑 GSH 無法有效的抑制馬兜鈴酸所誘發的 Caspase 3 活化反應，也就是抗氧化劑無法抑制馬兜鈴酸誘導細胞走向細胞凋亡(apoptosis)路徑。(圖表十五)

討論

【子目標一】馬兜鈴酸是否會誘發細胞中活性氧分子 ROS 的生成

在使用DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) assay來偵測活性氧分子時，我們在加入不等濃度的馬兜鈴酸於細胞當中之後，發現馬兜鈴酸會有誘發 reactive oxygen species (ROS)生成的情形發生，然而HK-2細胞內的ROS也隨著馬兜鈴酸劑量的提升而增加，我們因而推論馬兜鈴酸確實會又發細胞中活性氧分子的生成，並且會依照其劑量升高，而刺激活性氧分子ROS的生成增加。

【子目標二】馬兜鈴酸是否會造成細胞與腎臟組織的脂質過氧化(lipid peroxidation)

根據文獻記載 ROS 會攻擊細胞中的許多分子，我們利用 TBARS assay 來特定檢測細胞膜上的不飽和脂肪酸，會不會因加入馬兜鈴酸之後而受到 ROS 攻擊產生脂質過氧化的反應。我們在加入馬兜鈴酸的 HL-60 細胞跟老鼠腎臟組織樣品中，沒有發現脂質過氧化反應產生，因而可推知，馬兜鈴酸刺激產生的 ROS 並不會以攻擊細胞膜上的不飽和脂肪酸為目標。

【子目標三】馬兜鈴酸是否對腎臟細胞造成 DNA 傷害

在經過 TBARS assay 檢測後可以得知，馬兜鈴誘發產生的活性氧分子 ROS 並不會以細胞膜上的不飽和脂肪酸為主要的攻擊目標。由於文獻也曾指出 ROS 會以細胞內的 DNA 為攻擊目標，所以我們想要觀察經過 Comet assay 分析後細胞 DNA 是否會受到損傷。我們在實驗結果可以看見馬兜鈴酸的加入確實造成細胞的 DNA 傷害破損，使細胞在電泳後的圖像出現像是彗星一樣的拖尾現象。

【子目標四】馬兜鈴酸造成的氧化壓力，是否導致細胞凋亡(apoptosis)

在進行 Caspase3 assay 之後可以發現馬兜鈴酸能誘發 Caspase3 生成，證明馬兜鈴酸的加入將會是使細胞會走向計畫性的死亡(apoptosis)，而非細胞壞死(necrosis)所造成細胞死亡。然而，在馬兜鈴酸劑量僅為 100 μ M 時卻無法明顯觀察到此現象，當馬兜鈴酸劑量提高到 200 μ M 以上，我們才可以見到 HK-2 細胞因馬兜鈴酸的加入而走像細胞凋亡。

【子目標五】利用 ROS 抑制劑來探討馬兜鈴酸所誘發之 DNA 傷害和細胞凋亡是否與 ROS 有直接關連。

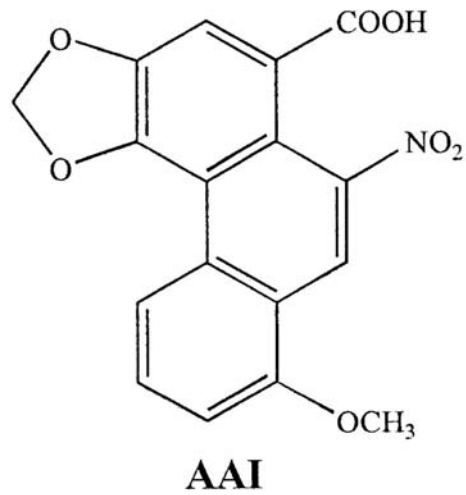
將細胞先分別處理以不同的氧化抑制劑NAC(10mM)、Tiron(5mM)與麩胱甘肽GSH(10mM)，再加入馬兜鈴酸共同培養，我們可以看到細胞中的活性氧分子ROS將會因抑制劑的加入而降低馬兜鈴酸造成的自由基；除此之外，因在抗氧化劑GSH的處理之下，過氧化氫可以因著GSH的高還原性，在還原態的GSH轉換成氧化態的GSSH時因而從過氧化氫(H₂O₂)還原成不具毒性的水分子(H₂O)。我們也可以推論出馬兜鈴酸所誘發的活性氧分子ROS主要是會造成細胞內過氧化氫的增加與堆積。

在ROS抑制劑(GSH)的參與能夠降低DNA受到的氧化壓力傷害，但是在統計上仍未具有顯著的差異，因此我們推測馬兜鈴酸尚會引發其他路徑造成DNA傷害，而非只經由馬兜鈴酸所誘導的活性氧分子ROS來造成細胞DNA損傷。

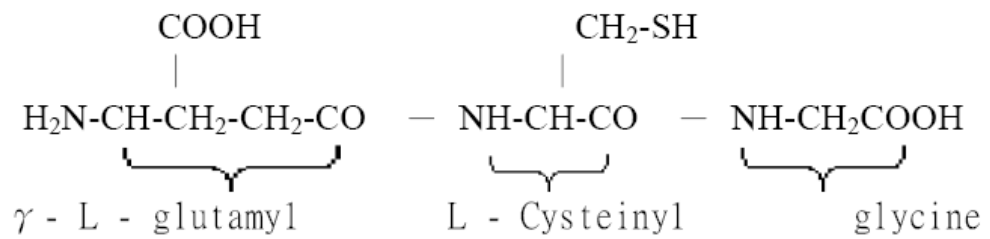
在使用抗氧化劑(GSH)觀察活性氧分子ROS與細胞凋亡的關係中，我們觀察到馬兜鈴酸誘發之ROS對DNA傷害和細胞凋亡之間沒有直接的影響。因細胞凋亡蛋白Caspase3並不會直接受到麩胱甘肽GSH的影響而改變。

圖表

圖表一、馬兜鈴酸 Aristolochic acid I (AAI) 結構式



圖表二、麩胱甘肽 (Glutathione, 簡稱 GSH) 其化學式



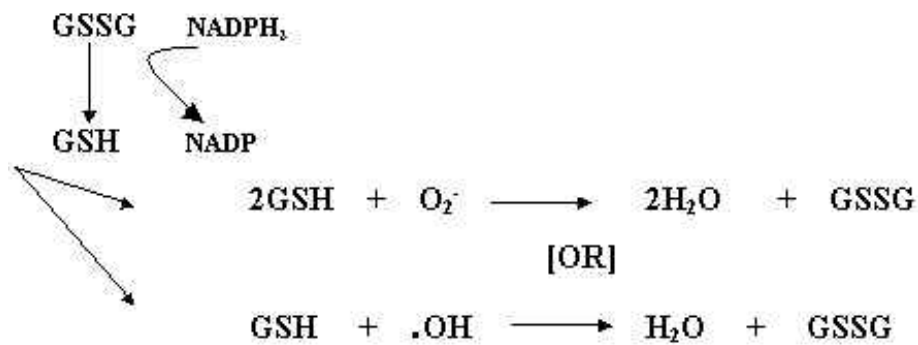
(圖二) 麩胱甘肽 (Glutathione, 簡稱 GSH) L-g-glutamyl-L-cysteinyl-glycine 三種胜肽所組合而成。

圖表三、GSH 的氧化還原反應



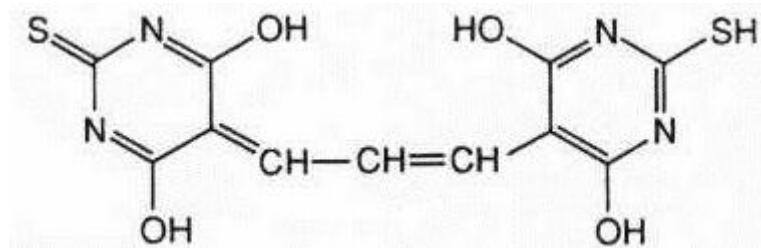
(圖三)還原態的GSH轉換成氧化態的GSSH而將過氧化氫(H₂O₂)還原成水(H₂O)。

圖表四、麩胱甘肽 GSH 與活性氧分子 ROS 之關係圖。



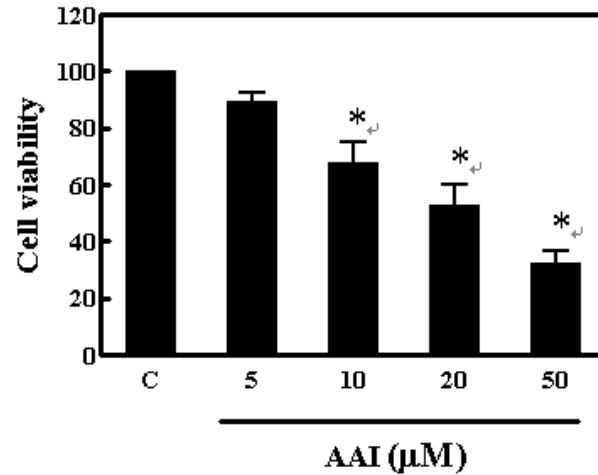
(圖四) 麩胱甘肽 GSH 與活性氧分子 ROS 之關係圖。

圖表五、脂質過氧化之螯合產物



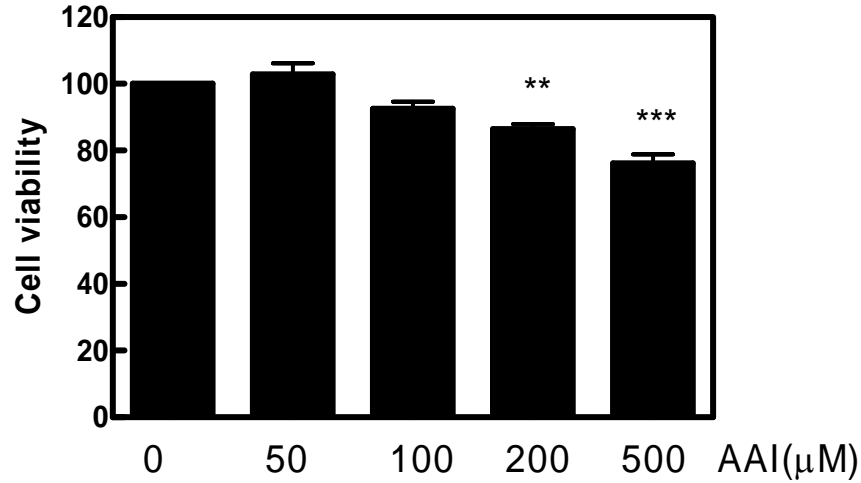
(圖五)一分子的 Malondialdehyde (MDA)和兩分子 thiobarbituric acid (TBA)螯合之粉紅色產物。

圖表六、馬兜鈴酸所引起 LLC-PK1 細胞株之細胞毒性



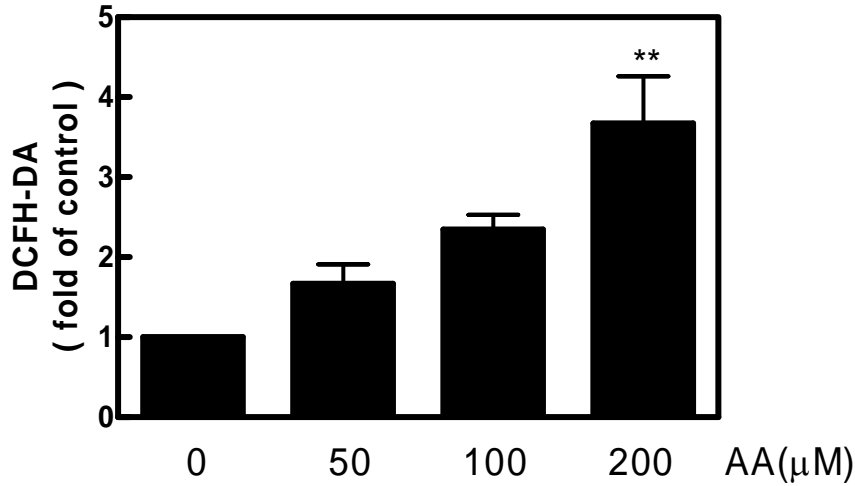
(圖六)不同濃度的馬兜鈴酸對豬腎臟近曲小管上皮細胞(LLC-PK1)細胞株的細胞存活率分析。初步實驗藉由 MTT assay 來探討 LLC-PK1 細胞株經由不同濃度之馬兜鈴酸處理 24 小時後所造成的細胞毒性。我們將 DMSO 溶劑對照組設定為存活率 100%，而分別與其他馬兜鈴酸濃度加藥組別相互比較。從實驗結果得知，細胞的存活率會隨著馬兜鈴濃度的增加而下降。由此可以確定馬兜鈴酸在 LLC-PK1 細胞株中，50 μM 的馬兜鈴酸就可以造成細胞毒性。實驗數據為 3 次實驗所取得的平均值。*代表與對照組(DMSO)相比具有顯著性的差異 (n=3, * p < 0.01)。

圖表七、馬兜鈴酸所引起 HK-2 細胞株之細胞毒性



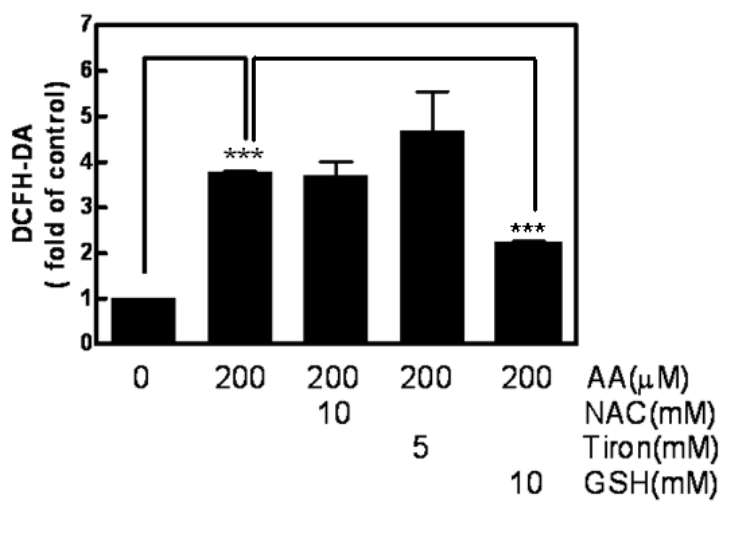
(圖七) 不同濃度的馬兜鈴酸對人類近曲小管上皮細胞株(HK-2)存活率分析。初步實驗藉由 MTT assay 來探討 HK-2 細胞株經由不同濃度之馬兜鈴酸處理 24 小時後所造成的細胞毒性。我們將 DMSO 溶劑對照組設定為存活率 100%，而分別與其他馬兜鈴酸濃度加藥組別相互比較。從實驗結果得知，細胞的存活率會隨著馬兜鈴濃度的增加而下降，且可以得知馬兜鈴酸在 HK-2 細胞株中，濃度 200 μM 的馬兜鈴酸就可以造成細胞存活率明顯下降 (** $p < 0.01$)，而 500 μM 的馬兜鈴酸處理後細胞毒性則更加顯著 (** $p < 0.001$)。實驗數據為 3 次實驗所取得的平均值。*代表與對照組(DMSO)相比具有顯著性的差異。

圖表八、馬兜鈴酸所引起 HK-2 細胞株中活性氧分子 ROS 的生成



(圖八) HK-2 細胞株以 $10\mu\text{M}$ DCFH-DA(2',7'-dichlorofluorescein diacetate)試劑 (以 KRH buffer 稀釋) 處理 30 分鐘後，加入 DMSO 與不同馬兜鈴酸濃度 $50\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$ 、 $200\mu\text{M}$ 處理培養 18 小時，最後以多孔式螢光測定儀分析螢光強度，激發光 485nm 、吸收光 535nm 。我們以處理溶劑 DMSO 為對照組，並將所測到的 ROS 生成量設定為 1，進而與實驗加予不同馬兜鈴酸劑量的組別互相比較。結果發現，隨著馬兜鈴酸濃度的提高，細胞內的活性氧分子 ROS 也跟著增加。由其在馬兜鈴酸濃度 $200\mu\text{M}$ 處理下最為顯著。實驗數據為 3 次實驗所取得的平均值。(n=3, p<0.01)

圖表九、馬兜鈴酸刺激活性氧分子 ROS 的產生，而抗氧化劑 GSH 可抑制馬兜鈴酸所誘發的 ROS 生成



(圖九) 將 HK-2 細胞株以 10 μ M DCFH-DA(2',7'-dichlorofluorescein diacetate) 試劑 (以 KRH buffer 稀釋) 處理 30 分鐘，然後分別以不同的氧化抑制劑 NAC(10mM)、Tiron(5mM) 與麩胱甘肽 GSH(10mM)，前處理細胞 2 小時，接著再以馬兜鈴酸 200 μ M 共同處理培養 18 小時，最後以多孔式螢光測定儀分析螢光強度，激發光 485nm、吸收光 535nm。我們以處理溶劑 DMSO 為對照組，並將所測到的 ROS 生成量設定為 1，進而與實驗加予不同抗氧化劑(NAC、Tiron、GSH)的組別互相比較。結果顯示，馬兜鈴酸 200 μ M 刺激 HK-2 細胞株中 ROS 的產生，而抗氧化劑 NAC、Tiron 無法抑制馬兜鈴酸所誘發的 ROS 生成，只有 GSH 可抑制降低 ROS 生成。實驗數據為 3 次實驗所取得的平均值 (n=3，*** p<0.001)

圖表十、馬兜鈴酸所引起的活性氧分子並不會對 HL-60 細胞造成脂質過氧化反應

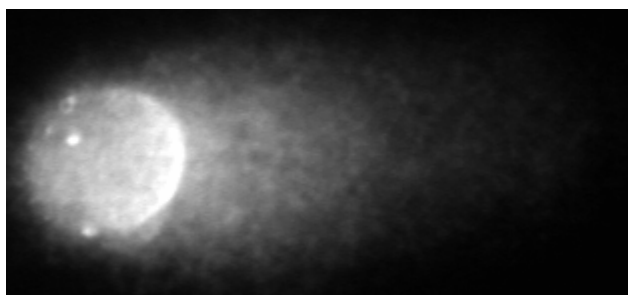
(μM)	MDA level mean. n=3 (n mole/mg protien)
HL-60	
AA100	-0.084
AA200	-0.103
Patulin200	1.82 * ($p < 0.001$)
Kidney tissue	
AA50	-1.327
AA100	-2.54
AA200	-2.125
FeSO ₄ + <u>VitC</u>	12.08 * ($p < 0.05$)

(圖十)TBARS assay馬兜鈴酸對HL-60 細胞和小鼠腎臟組織產生的MDA數值。在分別處理馬兜鈴酸 50 μM 到 200 μM 後並無誘發腎臟組織或是HL-60 細胞產生脂質過氧化(lipid peroxidation)。細胞實驗中，使用patulin200 μM 作為positive control；而腎臟組織的實驗當中使用了FeSO₄與Asorbic acid混合液作為positive control。在除以蛋白含量以及標準化MDA數值後，脂質過氧化MDA單位為(n mole/ mg protien)。實驗數據為 3 次實驗所取得的平均值(n=3)

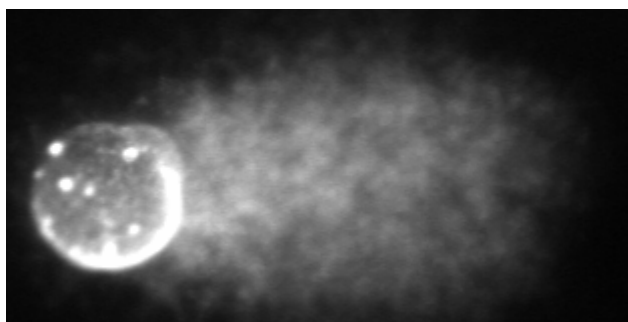
圖表十一、馬兜鈴酸的加入造成細胞的 DNA 傷害破損，使細胞在電泳後的圖像出現像是彗星一樣的拖尾現象



(圖十一、A)以馬兜鈴酸 25 μ M 處理 24 小時，細胞電泳圖像。

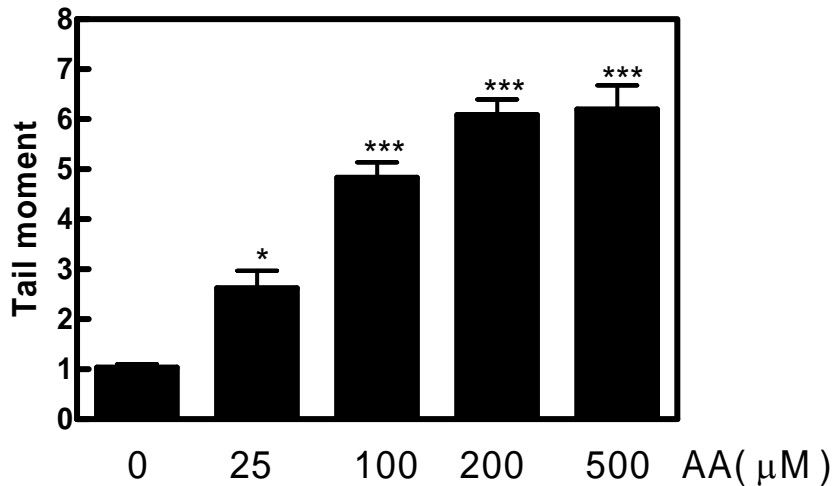


(圖十一、B)以馬兜鈴酸 100 μ M 處理 24 小時，細胞電泳圖像。



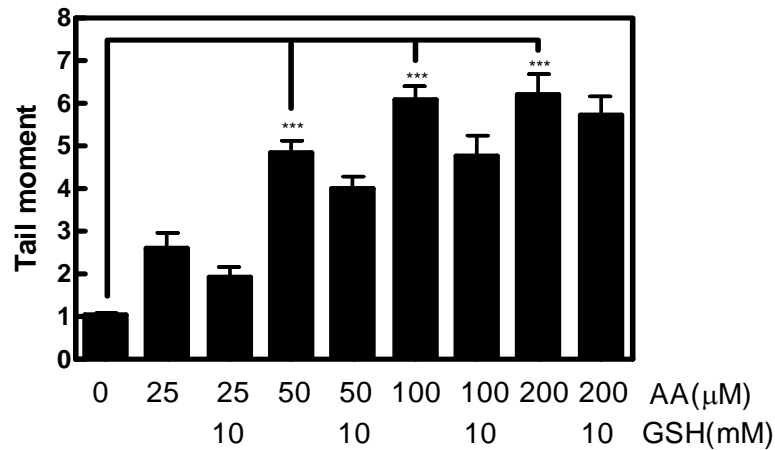
(圖十一、C)以馬兜鈴酸 200 μ M 處理 24 小時，細胞電泳圖像。

圖表十二、馬兜鈴酸對腎臟細胞 HK-2 造成 DNA 傷害



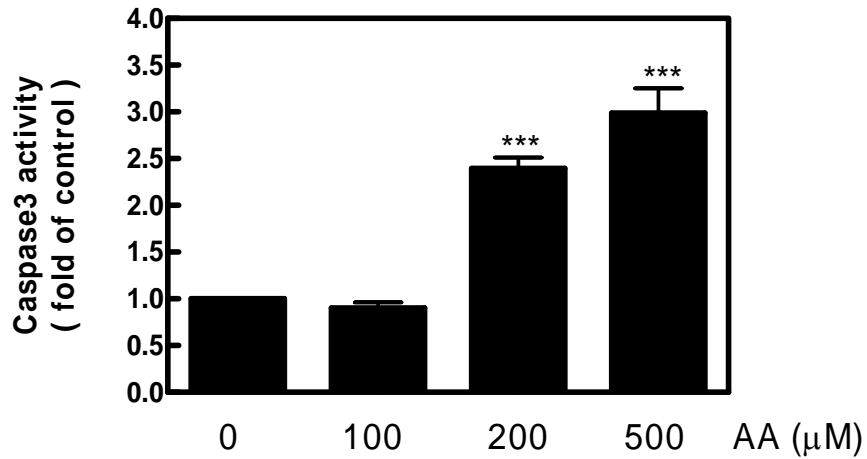
(圖十二)以 DMSO 與馬兜鈴酸 25 μ M、100 μ M、200 μ M、500 μ M 分別處理 HK-2 細胞株 24 小時後，利用彗星分析法/單一細胞膠體電泳(comet assay/ single cell gel electrophoresis)來分析細胞 DNA 損傷程度，最後使用螢光顯微鏡配合 Comet assayIII 分析軟體進行尾部動量(tail moment)的定量。以處理溶劑 DMSO 為對照組，並將所測到的尾部動量(tail moment)設定為 1，進而以馬兜鈴酸處理的實驗組相互比較。實驗結果發現，隨著馬兜鈴酸濃度梯度上升，細胞尾部動量也跟之提高，因而造成 HK-2 細胞 DNA 的損傷。實驗數據為 3 次實驗所取得的平均值(n=3, * p<0.05, ***p<0.001)

圖表十三、馬兜鈴酸對 HK-2 細胞造成 DNA 傷害，而抗氧化劑 GSH 無法有效抑制馬兜鈴酸造成的 DNA 損傷



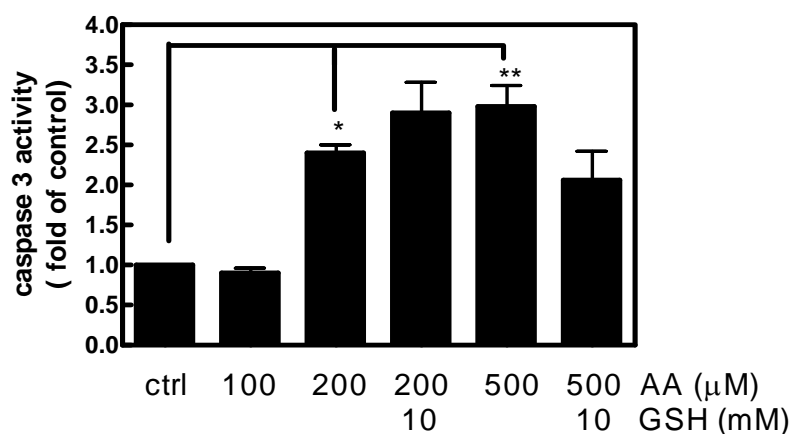
(圖十三)分別以 10μM GSH 前處理 HK-2 細胞兩小時後，接著以不同濃度的馬兜鈴酸處理(25μM 到 200μM)混合著 10μM GSH 培養 24 小時，利用單一細胞膠體電泳來分析 HK-2 細胞的 DNA 損傷，最後以螢光顯微鏡配合 Comet III 軟體觀察定量其 tail moment，實驗每次共收集了各實驗組 80 次的結果後取平均值。實驗結果可以發現 DNA 損傷隨著 AA 有濃度梯度上升的趨勢，而在抗氧化劑 GSH 處理後損傷也漸於趨緩而微微下降，但卻未具有統計上意義。實驗數據為 3 次實驗所取得的平均值(n=3)

圖表十四、馬兜鈴酸誘發細胞凋亡蛋白 Caspase3 的生成



(圖十四)分別以馬兜鈴酸濃度 100 μ M、200 μ M、500 μ M 處理 HK-2 細胞株並培養 24 小時，接著打破細胞萃取出蛋白，再利用多孔式螢光測定儀分析其螢光強度，激發光 405nm、吸收光 535nm，來偵測 Caspase 3 的活性。實驗結果發現，當馬兜鈴酸 100 μ M 處理過後並沒有明顯誘發細胞內 Caspase3 活性，但以馬兜鈴酸 200 μ M 與 500 μ M 處理之下，細胞內的 Caspase3 有顯著的上升($p < 0.001$)。如此我們可以得知，隨著馬兜鈴酸濃度梯度的升高，HK-2 細胞內的 Caspase3 活性上升得也愈加明顯。實驗數據為 3 次實驗所取得的平均值($n=3$)

圖表十五、馬兜鈴酸誘發細胞凋亡蛋白Caspase3的生成，而抗氧化劑GSH無法抑制馬兜鈴酸所活化的Caspase3



(圖十五)分別以 10 μ M GSH 前處理 HK-2 細胞兩小時後，接著以不同濃度的馬兜鈴酸處理(100 μ M 到 500 μ M)混合著 10 μ M GSH 培養 24 小時，最後以多孔式螢光測定儀分析其螢光強度，激發光 405nm、吸收光 535nm，來偵測 Caspase 3 的活性。我們發現當以低劑量 AA100 μ M 處理時沒有明顯誘發 Caspase 3 活性，但以 AA200 μ M 和 500 μ M 處理 Caspase3 則有明顯的梯度上升。若同時以 AA 和抑制劑 GSH 處理，發現其無法有效的抑制馬兜鈴酸所誘發的 Caspase 3 反應，也就是抗氧化劑無法抑制馬兜鈴酸所誘發的細胞凋亡反應。實驗數據為 3 次實驗所取得的平均值。(n=3)

參考文獻

Bartsch, H., Nair. J., 2004, Oxidative stress and lipid peroxidation-derived DNA-lesions in inflammation driven carcinogenesis. *Cancer Detect Prev* 28: 385–391.

Chen, T., Guo, L., Zhang, L., Shi, L., Fang, H., Sun, Y., Fuscoe, J.C., Mei, N., 2006. Gene expression profiles distinguish the carcinogenic effects of aristolochic acid in target (kidney) and non-target (liver) tissues in rats. *BMC Bioinformatics* 26, S20, Suppl 2.

Chen, H.Y., Yen, G.C. 1998. Free Radicals, Antioxidant Defenses and Human Health. *Nutrition Science Journal* 23. 1: 105-121.

Cosyns, J.P., Jadoul, M., Squifflet, J.P., Wese, F.X., van Ypersele de, S.C., 1999. Urothelial lesions in Chinese-herb nephropathy. *Am. J. Kidney Dis.* 33: 1011-1017.

Dreher, D., Junod, A.F., 1996. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer* 32: 30-38.

Droge, W., 2002. Free radicals in physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47–95.

Geesin, J.C., Gorden, J.S., Berg, R.A., 1990. Retinoids affect collagen synthesis through inhibition of ascorbate-induced lipid peroxidation in cultured human dermal fibroblasts. *Arch Biochem Biophys*, 278: 350-355.

Hwang, E.S., Kim, G.H., 2007. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. *Toxicology*. 229: 1–10.

Kassie, F., Parzefall, W., Knasmuller, S., 2000. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutation Research*. 463: 13-31.

Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J., Ahnstrom, G., 1996. The comet assay:

mechanisms and technical considerations. *Mutation Research*. 363: 89-96.

Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M., 2004. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:29–67.

Marnett, L.J., 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21:361–370.

Nortier, J.L., Martinez, M.C., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Bieler, C.A., Petein, M., Depierreux, M.F., De, P.L., Abramowicz, D., Vereerstraeten, P., Vanherweghem, J.L., 2000. Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia fangchi*). *N. Engl. J. Med.* 342, 1686–1692.

Ostling, O., Johanson, K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 123: 194-191.

Singh, N.T., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 175: 184-91.