

**科技部補助**  
**大專學生研究計畫研究成果報告**

計 畫 名 稱	： 探討 Glyphosate引發巨噬細胞株 RAW 264.7 cells細胞自噬及細胞凋亡路徑機制之研究
------------	--

執行計畫學生：李明維

學生計畫編號：MOST 106-2813-C-040-031-B

研究期間：106年07月01日至107年02月28日止，計8個月

指導教授：李宣信

處理方式：本計畫可公開查詢

執行單位：中山醫學大學公共衛生學系（所）

中華民國 107年05月25日

## 目錄

目錄.....	I
中文摘要.....	II
英文摘要.....	III
前言.....	1
研究目的.....	1
文獻探討與回顧.....	1
研究方法及步驟.....	4
結果與討論.....	7
參考文獻.....	13

## 中文摘要

含 Glyphosate 的除草劑是世界上最常用的農藥，特別是轉基因植物。根據流行病學研究，動物研究和體外研究，世界衛生組織國際癌症研究機構將 Glyphosate 分類為“可能對人類致癌（第 2A 組）”。一些研究表明，攝入大量 Glyphosate 除草劑的患者有心律失常，呼吸衰竭，精神惡化和發展低血壓的風險。至今並無文獻提出 Glyphosate 對巨噬細胞引發細胞自噬及凋亡的機制探討。

本研究通過 MTT 測定細胞存活率，DCFH-DA 測定和 JC-1 測定，Annexin-V/PI 測定，Caspase 測定，Sub G-1 測定，MN 測定來評估細胞內活性氧、粒線體膜電位、細胞凋亡及壞死、Caspase 家族、基因毒性。再通過 AO、Cyto-id、Fas 測定法評估細胞內自噬和自噬溶酶體的活化情形及凋亡與自噬相關性。最後通過西方墨點法探討潛在機制。結果顯示 Glyphosate 可以造成細胞凋亡及促使細胞自噬反應的進行。

關鍵字：Glyphosate，細胞凋亡，細胞自噬

## 英文摘要

Glyphosate-containing herbicides are the most used agrochemicals in the world, particularly on genetically modified plants. In March 2015 the World Health Organization's International Agency for Research on Cancer classified Glyphosate as "probably carcinogenic to humans (Group 2A)" based on epidemiological studies, animal studies, and in vitro studies. Some studies show that patients who ingest large volumes of Glyphosate herbicides are at risk of arrhythmia, respiratory failure, mental deterioration, and developing hypotension. In order to find out whether Glyphosate could induce apoptosis and autophagy in RAW264.7 cells.

The cellular viability, intracellular reactive oxygen species, mitochondrial membrane potential, apoptosis, caspase family and genotoxicity were assessed by MTT assay, DCFH-DA assay, and JC-1 assay, Annexin-V & Propidium iodide assay, Caspase assay, Sub G-1 assay, MN assay. Respectively, Activation of autophagosome, autolysosome and apoptosis interact with autophagy were assessed by Acridine orange assay, Cyto-ID assay, Fas assay. The potential mechanism was detected by western blot. These results show that Glyphosate could induce apoptosis and autophagy in RAW264.7 cells.

關鍵字：Glyphosate, Apoptosis, Autophagy

## (一) 前言

Glyphosate 中文名為嘉磷塞，為一種廣效型的有機磷除草劑，屬於非選擇性吸入傳導型莖葉處理除草劑，含有磷酸酯有機磷化合物。過去的研究中指出 Glyphosate 能影響神經細胞的發育、粒線體膜電位破壞導致的小鼠心肌細胞凋亡及壞死。更有研究指出 Glyphosate 對小鼠具有基因毒性。至今為止，無明確的文獻提出 Glyphosate 對巨噬細胞引發細胞自噬及凋亡的機制。

## (二) 研究目的

**Glyphosate** 對於神經細胞的發育的影響 [1]及小鼠心肌細胞凋亡 [2]已被證實，但細胞自噬及細胞凋亡路徑機制的研究是較少見的。在本研究將利用小鼠巨噬細胞株 (RAW 264.7 cells) 與不同濃度 Glyphosate (0, 4, 10, 20, 30 ppm) 共處理不同時間 (0.5, 1, 2, 3, 6, 24 h)，進行 Glyphosate 對 RAW 264.7 cells 死亡率的分析，以檢測 Glyphosate 是否引發細胞毒性。更進一步，將選用適當濃度與時間的 Glyphosate 處理細胞，進行更深入導致細胞毒性相關機制的研究，包括有 (1) **Glyphosate** 是否引發細胞產生基因毒性；(2) **Glyphosate** 是否會引發細胞凋亡；(3) **Glyphosate** 是否會引發超氧自由基；(4) **Glyphosate** 是否會破壞細胞的粒線體完整性；(5) **Glyphosate** 是否會引發細胞活化 **Caspase-3, -8, -9** 的活性；(6) **Glyphosate** 是否會引發細胞自噬。

## (三) 文獻回顧與探討

### 3-1. Glyphosate 的相關介紹

Glyphosate，天然胺基酸甘氨酸的氨基磷類似物，化學式是 N-(phosphonomethyl)glycine，廣泛流行於市面上的有機磷族草劑。Glyphosate 主要是阻礙芳香胺基酸的生物合成，即苯丙胺酸、色胺酸及酪胺酸通過莽草酸途徑的合成。對 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase 有抑制作用，該酶可以催化 shikimate-3-phosphate 和 phosphoenolpyruvate、5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate, (EPSP) 的轉化 [3]，藉由干擾這一類生物合成的酶促反應，使莽草酸在植物體內的積累，達到抑制植物生長的效果。

在其他學者的研究中，於神經細胞的實驗中，已有文獻指出 Glyphosate 可經由 CaMKII 下調的作用，導致非典型 Wnt pathway 表現量下降，進而影響神經細胞上的生長錐肌動蛋白神經細胞的發育 [1]；於經過 Glyphosate 處理過後的小鼠心肌細胞中，可觀察到粒線體膜電位不穩定時，會釋放細胞色素 C，從而導致 Bcl-2 蛋白的表現量會減少、Bax 蛋白表現量上升，進而導致細胞凋亡 [2]；於動物實驗中，文獻顯示 Glyphosate 對於小鼠具有基因毒性 [4]。綜合上述，可推論 Glyphosate 能影響神經細胞的發育、藉由粒線體膜電位變化引發小鼠心肌細胞的凋亡作用及對於小鼠具有基因毒性。

### 3-2. 巨噬細胞 (RAW 264.7 cells)的相關介紹

RAW 264.7 cells 是一種小鼠的巨噬細胞，在免疫反應中扮演相當重要的角色。活化的巨噬細胞會產生趨化、吞噬與胞葬作用，並釋放出促發炎的物質。趨化作用 (chemotaxis) 即是細胞沿著可溶性物質濃度梯度增加的方向移動，主要是由黏附分子來調控單核球經由滾動、黏附、轉移，進而移往內皮細胞的受損處。吞噬作用 (phagocytosis) 能夠非專一性地吞噬多種侵入性的外來抗原，當侵入性的病原菌與巨噬細胞直接接觸之後，就會使 RhoA 表現量大增導致胞內的細胞骨架聚合後形成 stress fiber。進而將胞外的病原菌吞入胞內並形成吞噬小體，並釋放出殺菌物質，如活性氧代謝物 (reactive oxygen species, ROS)、活性氮代謝物 (reactive nitrogen species, RNS)、蛋白質酶等，最後引起侵入性的病原菌受到破壞與死亡。而胞葬作用 (efferocytosis) 則是運用已吞噬病原菌之巨噬細胞，但此時巨噬細胞並無法有效殺死或清除病原菌，則會形成凋亡性的細胞 (apoptotic cells)。巨噬細胞是聯結第一道天然免疫防線和第二道特異性免疫防線的關鍵性細胞，可以說巨噬細胞是開啟人類自體免疫反應的鑰匙 [5]。巨噬細胞也是一群組成複雜 (heterogeneous) 的細胞，其活化牽涉到複雜的步驟，它的作用與活化程度、本身的狀態和活化的細胞激素種類及刺激本身都有關。當細胞被藥物誘導而導致死亡時可能影響上述之功能，故本實驗以巨噬細胞進行研究 [6]。

### 3-3. RAW 264.7 cells 死亡與 DNA 損傷反應的相關介紹

細胞死亡的發生有兩種不同的機制，細胞凋亡 (apoptosis) 及壞死 (necrosis)，通常是細胞暴露在一些物理或化學傷害，而造成生理狀況急遽發生改變時出現。壞死開始是細胞失去維持體內平衡的能力，造成水及細胞外離子流入細胞內，接著最明顯的是細胞內的粒線體及整個細胞膨脹，之後細胞破裂，因為細胞膜破裂，細胞質內物質包括微粒分解酶都會被釋出到細胞外的體液中，造成周圍組織嚴重的發炎反應 [7]。

相反的，細胞凋亡的發生是在一個正常的生理狀況，細胞參與自己的死亡過程，通常在生物體中為了維持正常的功能及型態，細胞凋亡的程序不斷的在進行中。近年來，於活體外的研究中指出，許多化學製品、放射性物質照射、藥物、活性氧等，皆會引起細胞凋亡。凋亡細胞體積減小而密度增加，接著染色體開始凝聚於核膜周圍，此時會活化去氧核糖核酸內切酶而導致 DNA 呈現 180~200 bp

或其倍數的 DNA 片段，最後細胞逐漸形成不規則外型而分離成為含有部分胞器的較小單位，稱為凋亡小體在生物體內，則可被鄰近的細胞所辨認並加以吞噬。細胞自噬主要是位於真核細胞中發生的降解途徑。作用於回收細胞質、在刺激條件下產生大分子結構單元和能量，去除多餘和受損的細胞器，以適應不斷變化的營養條件和維持細胞內環境穩定。在發育和營養刺激期間穩定能量來源並且在包括癌症的各種疾病中起到存活或細胞殺傷的雙重作用是必要的，而胞器去除的反應具有選擇性。

### 3-4. DNA 損傷反應與 reactive oxygen species 的相關介紹

ROS 的過度產生，會任意的攻擊、破壞細胞結構並造成 DNA、蛋白質損傷，引起細胞質的氧化作用和脂質的過氧化，使生物體產生衰老現象或產生疾病 [8]。另有相關研究指出，ROS 會藉由調控 Bcl-2 家族誘使粒線體膜電位改變，繼而活化半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (cysteine-aspartic proteases, caspases)，造成細胞、DNA 病變，最終導致細胞凋亡 [9、10]。目前已知自由基對生物體造成的危害有發炎、神經性疾及其他相關的疾病等。ROS 包含以下數種，其中可能是化學物質在體內氧化還原所導致的結果，包括超氧陰離子 (superoxide,  $O_2^-$ )、氫氧自由基 (hydroxide,  $OH^\cdot$ )、NO 及一些非自由基的氧化基 [11]。正常生物體內都含有微量的 ROS，適量的 ROS 可以使生物體免於受到微生物或細菌的危害，因此，ROS 在生物體的免疫系統中扮演著重要的角色，但相對來說，外來化學物質可能會促使生物體內的 ROS 產生過量，當其活性高時，會破壞體內微生物、細菌甚至是對生物體組織、細胞及 DNA 造成傷害。

### 3-5. 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶路徑 (Cysteine-aspartic proteases, caspases) 的相關介紹

Caspases 是一種主要存在於細胞質中的蛋白質，當死亡訊號與細胞表面上專一受器結合時會引發細胞凋亡 [12]。由 caspases 路徑引發的細胞凋亡分為兩大路徑：一種是經粒線體所引發的內源性路徑 (intrinsic pathway)，一種是透過死亡受體所引發的外源性路徑 (extrinsic pathway) [13]。在外源性路徑中，死亡受器會與 procaspases-8 結合，使 caspases-8 活化，進而激活下游的 caspase-3 後會促進脫氧核糖核酸酶的活化，使 DNA 受到損傷而片段化，並摧毀蛋白質，誘導細胞凋亡 [14]。內源性路徑 (intrinsic pathway) 是由於粒線體膜電位產生變化所引發的一種細胞凋亡路徑。在內源性的細胞凋亡中，粒線體主要是經由 Bcl-2 家族

來進行調控，使細胞色素 C ( cytochrome c ) 被釋放出來 [15]。當去氧腺苷三磷酸存在時，Cytochrome c 會與凋亡蛋白酶活化因子 1 ( apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1 ) 結合形成多聚體，並與 caspases-9 結合形成凋亡小體，進而激活 caspases-3，誘導細胞凋亡 [14]。Caspases-3 是細胞凋亡過程中非常重要的分子，無論是外源性或內源性路徑最終都會活化 caspases-3，被活化的 caspases-3 可以更進一步作用於其下游分子，如 DNA 修復有關蛋白，由於這些蛋白被抑制，使細胞的生長受阻並於最終誘導細胞凋亡 [16]。

### 3-6. P53 、Bcl-2 、Bax 、PARP-1 、LC3 相關介紹

p53 為腫瘤抑制蛋白，屬於最早發現的腫瘤抑制基因或抑癌基因之一。p53 蛋白能調節細胞週期和避免細胞癌變發生。凋亡相關蛋白中的 Bcl-2 家族是細胞凋亡的關鍵調節因子，其抗凋亡( Bcl-2)和促凋亡成員 ( Bax ) 協同作用，發揮著細胞凋亡開關的作用。兩者在細胞凋亡中相互作用，從而調控細胞凋亡。PARP-1 為一種酶，主要功能為 DNA 修復，可用來觀察 Glyphosate 造成的 DNA 損傷。LC3 為自噬作用中調節自噬囊泡體形成的關鍵蛋白，其表現與自噬反應高度相關。

#### (四) 研究方法及步驟

##### 4-1-1. 細胞培養

巨噬細胞 RAW 264.7 於食品工業研究所購得。細胞培養於含 10 % 胎牛血清與 1 % streptomycin 和 penicillin 之 DMEM 培養基，於 37 °C, 5% 二氧化碳之培養箱內培養，待細胞長滿後以  $5 \times 10^5$  濃度分裝到 24 well 中，或以  $5 \times 10^5$ 、 $10^6$  濃度分裝到 6 well 中，隔日進行後續的加藥試驗分析。

4-1-2. 藥物處理流程將 RAW 264.7 cells 培養於 24 well 或 6 well 中，加入已回溫至室溫的 PBS 清洗細胞兩次，再加入 0.5% FBS 之 DMEM 後，在各個 well 中分別加入 0, 4, 10, 20, 30 ppm 的 Glyphosate，分別作用 0, 0.5, 1, 2, 3, 6, 24 h 後，保留上清液於 -80°C 冰箱，並使用 PBS 清洗細胞兩次，再加入 1 ml PBS，利用微量吸管反覆沖洗細胞，使其脫離培養皿。

##### 4-2. 細胞存活分析 (MTT assay)

MTT 為一種黃色染劑，它會被活細胞所吸收，然後經由粒線體中的脫氫酵素 (succinate dehydrogenase) 還原形成藍色的 formazan，藉由吸光值的測量來評估藥物對細胞生長的影響，常用來當作檢測細胞存活與生長的指標。加藥前一天將



$5 \times 10^6$  的細胞種於 24 well。待細胞貼壁後，移除培養液，用 PBS 沖洗兩次，加入 0.5 % FBS 的培養液後便開始加藥，加藥時間結束後。接著去除上清液，加入 100 $\mu$ l MTT，置入培養箱 2 小時後取出，再加入 100 $\mu$ l Triton X-100，將藍色結晶溶解，最後利用 microplate reader 以 570 nm 測吸光值，以對照組的吸光值為 100 %，實驗組與對照組的比值即為相對的細胞存活率 [17]。

#### 4-3. 細胞死亡及凋亡路徑 (Annexin-V & Propidium iodide) 測定

RAW264.7 cells 經藥物處理後，使用 PBS 清洗細胞兩次，再加入 1 ml PBS，利用微量吸管反覆沖洗細胞，使其脫離培養皿，裝入 BD Flow 小管中。以 4 $^{\circ}$ C、500g 離心 5 分鐘，移除上清液，加入 100 $\mu$ l Annexin-V Binding Buffer，並將沉澱打散，加入 Annexin-V 及 PI 各 1  $\mu$ l，置於冰箱避光儲存 1 h，使用冰的 PBS 清洗兩次，移除上清液後，加入 500  $\mu$ l 冰的 PBS，以流式細胞儀上機測試，並利用 BD accouri C6 軟體分析細胞凋亡及細胞壞死的細胞數。第三象限為 AnnexinV<sup>-</sup> PI<sup>-</sup>，定義為存活的細胞；第四象限為 Annexin V<sup>+</sup> PI<sup>-</sup>，定義為早期凋亡的細胞；第一象限為 Annexin V<sup>+</sup> PI<sup>+</sup>，定義為晚期凋亡的細胞；第二象限為 Annexin V<sup>-</sup> PI<sup>+</sup>，定義為壞死的細胞 [18]。

#### 4-4. 細胞 G1 前期延長 (Sub G-1 表面抗原) 測定

RAW264.7 cells 經藥物處理後，使用 PBS 清洗細胞兩次，再加入 1 ml PBS，利用微量吸管反覆沖洗細胞，使其脫離培養皿，裝入 BD Flow 小管中。以 4 $^{\circ}$ C、2000 rpm 離心 5 分鐘，移除上清液，並緩緩加入冰 75%酒精 1ml，並保存於 4 $^{\circ}$ C 冰箱 30 分鐘~1 週，再以 4 $^{\circ}$ C、2000 rpm 離心 5 分鐘，移除上清液，使用冰的 PBS wash 一次，並加入冰的 PBS 500 $\mu$ l，加入 RNase 10 $\mu$ l，置於室溫或 37 $^{\circ}$ C 中 15 分鐘。以流式細胞儀上機測試，並利用 BD accouri C6 軟體觀察細胞狀態。

#### 4-5. 細胞微小核試驗 (Micronucleus Assay ; MN)

RAW264.7 cells 經藥物及秋水仙素處理後，使用 PBS 清洗細胞兩次，再加入 1000 $\mu$ l PBS，利用微量吸管反覆沖洗細胞，使其脫離培養皿，裝入 BD Flow 小管中。以 4 $^{\circ}$ C 600g 離心 5 分鐘並去除上清液後，加入 300 $\mu$ l EMA dye solution，並置於可見光源置於距細胞懸浮液 10-30cm 上方 30 分鐘。加入 500  $\mu$ l 冰 PBS，以 4 $^{\circ}$ C 600g 離心 5 分鐘後約留 50 $\mu$ l 液體於 tube 中，沿壁加入 500 $\mu$ l Lysis Solution 1 並混勻，室溫避光等待一個小時，再加入 500 $\mu$ l Lysis Solution 2 混勻，

室溫下避光等待 30 分鐘。以流式細胞儀上機測試，並利用 BD accouri C6 軟體觀察細胞狀態。

#### **4-6. Reactive oxygen species (ROS) 測定**

藥物處理結束前一個小時，加入 1.5  $\mu$ l DCFH-DA (2 $\mu$ M)，藥物處理結束後，收下細胞。以流式細胞儀上機測試，並利用 BD accouri C6 軟體觀察細胞狀態。

#### **4-7. 細胞內粒線體膜電位 (mitochondrial membrane potential) 分析**

藥物處理時間結束前一個小時，加入 1.5  $\mu$ l JC-1 (1 mg/ml) 並混合均勻。藥物處理時間結束後，收下細胞。以流式細胞儀上機測試，並利用 BD accouri C6 軟體觀察細胞狀態。

#### **4-8. Caspases 活性測定**

RAW 264.7 cells 經藥物處理後，使用 PBS 清洗細胞兩次，再加入 1 ml PBS，利用微量吸管反覆沖洗細胞，使其脫離培養皿，裝入 1.5 ml 離心管中，在細胞中加入 50  $\mu$ l lysis buffer，均勻攪拌後置於冰上 1~2 小時。加入 50  $\mu$ l 含 1% DTT 的 2X reaction buffer，均勻攪拌後加入 5  $\mu$ l substrate，均勻攪拌後置於 37°C 培養箱 1 至 2 h。攪拌均勻後在黑盤 96 well 內加入每格 100  $\mu$ l 的細胞懸浮液，使用五合一機器，以激發光螢光波長 400 nm 及發射光螢光波 505 nm 讀取並分析結果 [19]。

#### **4-9. Fas 表現量測定**

細胞經藥物處理後，收下細胞，加入 1  $\mu$ l Fas (0.5 mg/ml)，室溫靜置 30~60 分鐘。使用 PBS 清洗細胞一次，再加入 1 ml PBS。以流式細胞儀上機測試，並利用 BD accouri C6 軟體觀察細胞狀態。

#### **4-10. Lysosome 表現量測定**

細胞經藥物處理後，收下細胞，加入含有 CYTO-ID 試劑的樣品小管中，室溫靜置三十分鐘至一小時後離心，使用 PBS 清洗細胞一次，再加入 1 ml PBS。以流式細胞儀上機測試，並利用 BD accouri C6 軟體觀察細胞狀態。

#### **4-11. Autophagosome 表現量測定**

藥物處理結束前一個小時，加入 1.5  $\mu$ l Acridine orange (1mg/ml)，藥物處理結束後，收下細胞。以流式細胞儀上機測試，並利用 BD accouri C6 軟體觀察細胞狀態。

#### 4-12. Western blot 蛋白表現量測定

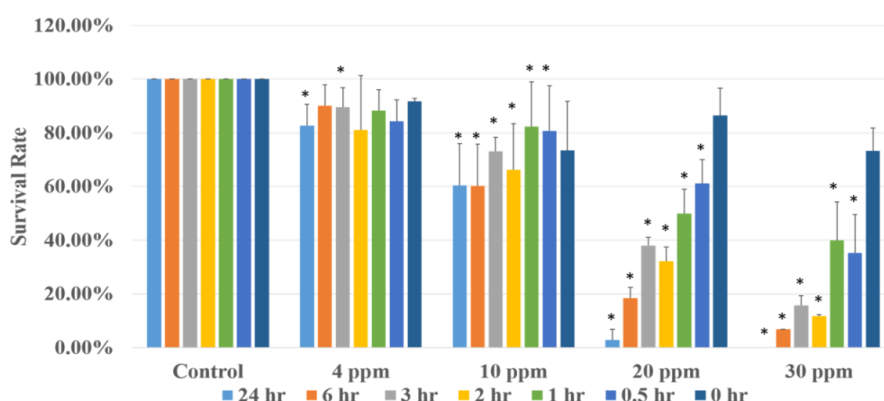
細胞經藥物處理後，加入 RIPA buffer (50mM Tris- HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 2mM EDTA, 1% Nonidet P40, 0.1% SDS)，並測定蛋白質濃度。再以 SDS-PAGE 展開蛋白質，將蛋白質轉至 PVDF 膜以脫脂奶粉處理 1 h，取出 PVDF 膜，以 wash buffer 清洗 3 次，加入一級抗體 (Bcl2、Bax、PARP-1、LC3)，清洗 3 次，再加入含二級抗體 (Bcl-2、Bax、P53、PARP-1、LC3)，接著使用 enhanced luminal reagent 進行呈色，利用迷你型冷光成像分析系統及其軟體 LANE 1DTM 進行拍照和影像分析。

#### 4-13. 統計方法

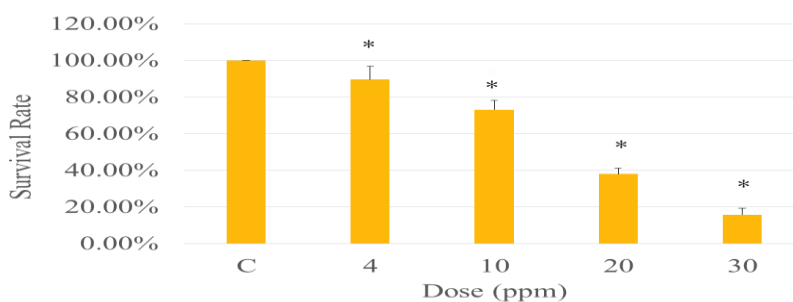
實驗數據皆以 Mean  $\pm$  standard deviation (SD) 表示，統計以 one-way ANOVA 進行分析，並以 LSD-test 事後檢定比較各組差異，分析結果若  $p$  小於 0.05，視為具有統計上的顯著意義。

#### (五) 結果與討論

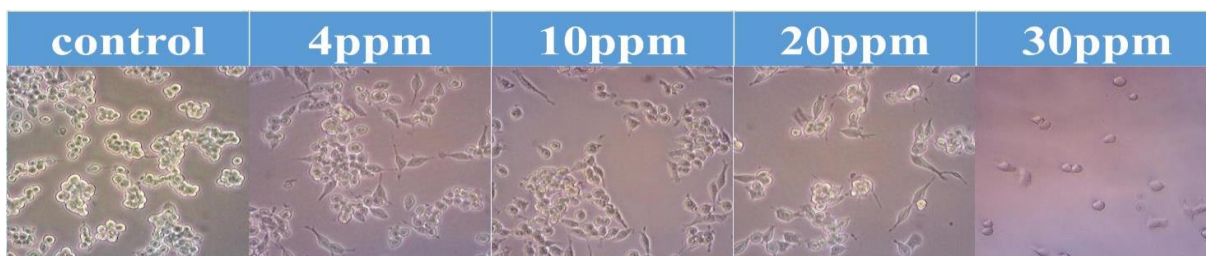
5-1. 利用 MTT 的方式，進行以不同 Glyphosate 濃度 (0, 4, 10, 20, 30 ppm) 在不同時間加藥的方法，分析 RAW264.7 cells 暴露於 Glyphosate 的時間與濃度依存性。



圖一、在 RAW 264.7 cells 中，當 Glyphosate 處理 24 h、6h、3h、2h、1h、0.5h 後，會使細胞死亡率上升。但 3h 的 Glyphosate 濃度趨勢與其他時間相對下降的較穩定。故後續實驗優先採用 3h。

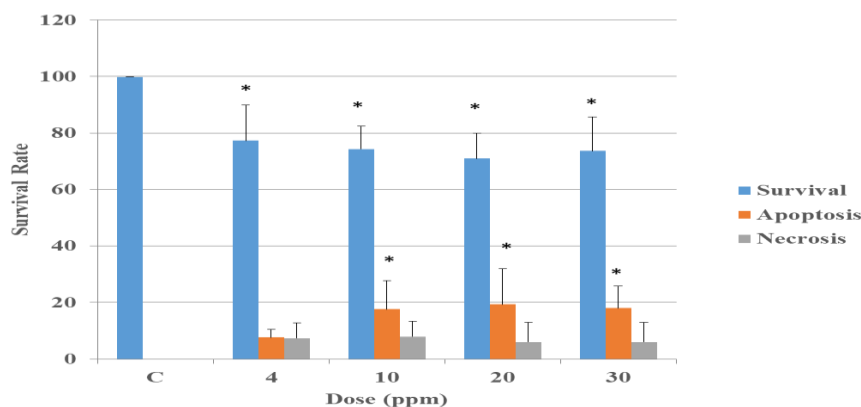


圖二、在 RAW 264.7 cells 中，當 Glyphosate 處理 3 h，其存活率的量化圖。可推論隨著濃度提升，存活率也隨之下降。



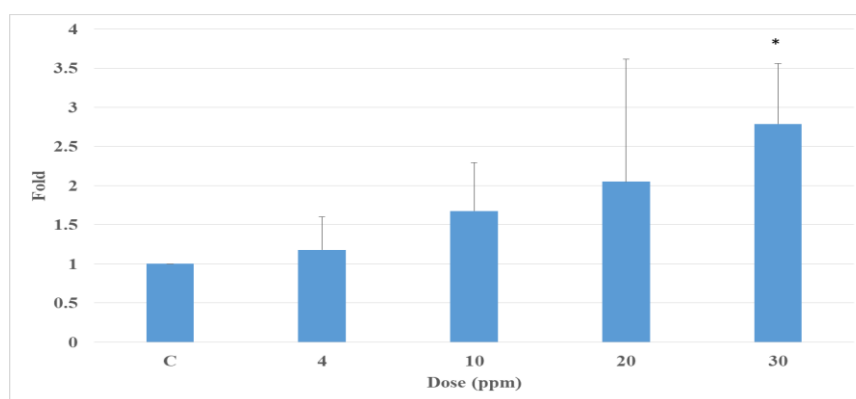
圖三、為 RAW 264.7 cells 接受藥物處理 3h 後的照片檔。

5-2. 利用 Flow Cytometry 測定 Annexin-V & Propidium iodide，進行以不同 Glyphosate 濃度 (0, 4, 10, 20, 30 ppm) 在 3h 加藥的方式，分析 RAW 264.7 cells 暴露於 Glyphosate 的細胞死亡情形



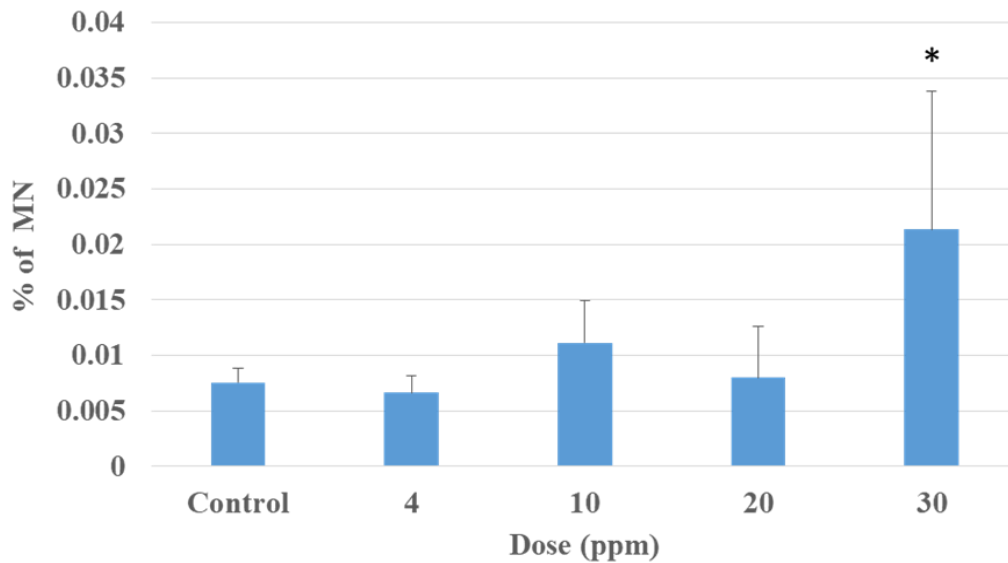
圖四、為細胞經藥物處理後，細胞存活、早期凋亡、晚期凋亡、壞死的情形。可從圖表推論經過藥物處理後，凋亡、壞死逐漸呈現上升的趨勢。

5-3. 利用 Flow Cytometry 測定 Sub G1，進行以不同 Glyphosate 濃度 (0, 4, 10, 20, 30 ppm) 在 3h 加藥的方式，分析 RAW 264.7 cells 暴露於 Glyphosate 的細胞 G1 前期延長趨勢。



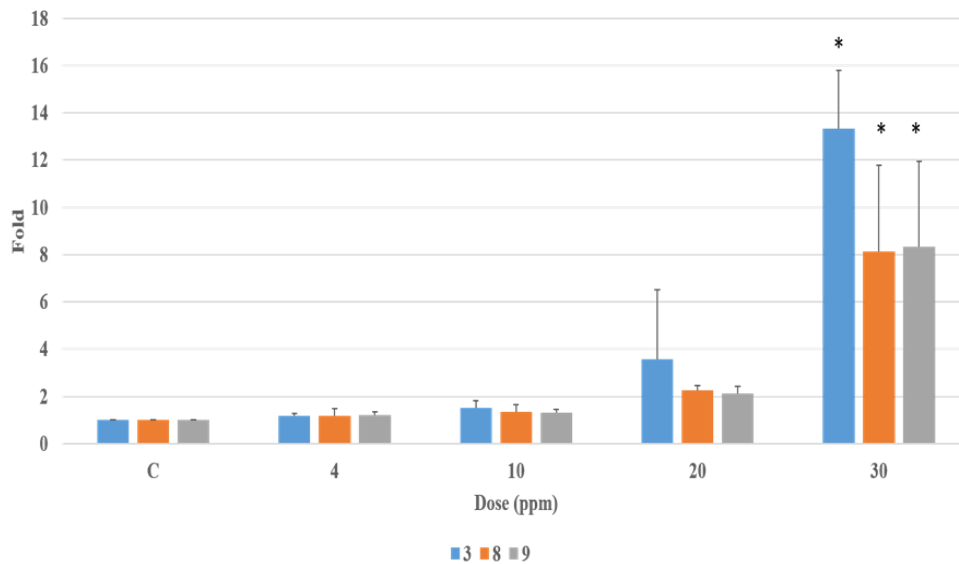
圖五、暴露於 Glyphosate 的 RAW 264.7 cells，明顯發現 G1 的趨勢上升。可推論 Glyphosate 能延長細胞週期。

5-4. 利用 Flow Cytometry 測定 MN，進行以不同 Glyphosate 濃度 (0, 4, 10, 20, 30 ppm) 在 3h 加藥的方式，分析 RAW 264.7 cells 暴露於 Glyphosate 的細胞微小核產生趨勢。



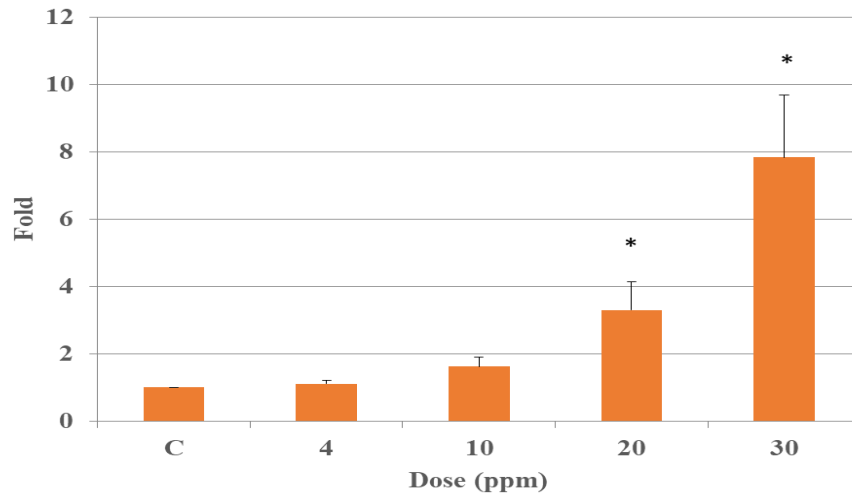
圖六、暴露於 Glyphosate 的 RAW 264.7 cells，明顯發現 MN 的趨勢上升。可推論 Glyphosate 能引發基因毒性

5-5. 下圖為利用 Caspases assay，進行以不同 Glyphosate 濃度 (0, 4, 10, 20, 30 ppm) 在 3h 加藥方式。



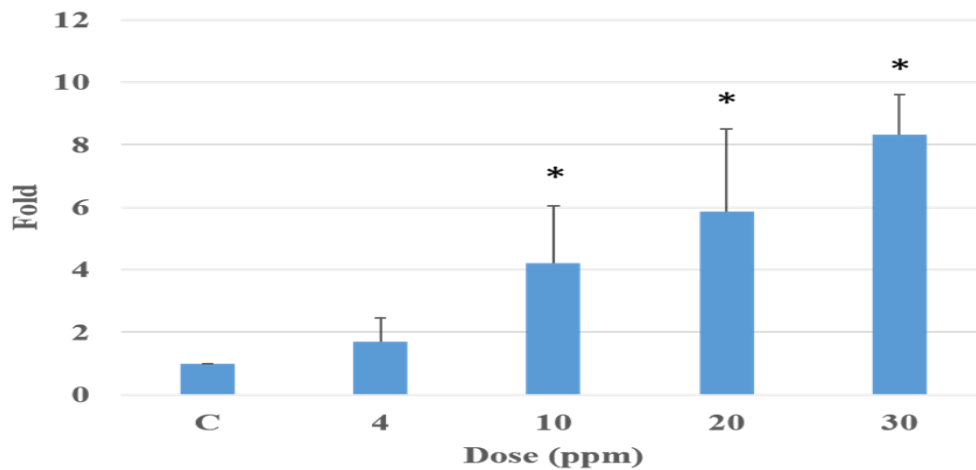
圖七、可從圖表推論中高濃度時，有引發的跡象。

5-6. 利用 Flow Cytometry 測定 Jc-1 ，進行以不同 Glyphosate 濃度 (0, 4, 10, 20, 30 ppm) 在 3h 加藥的方式，分析 RAW 264.7 cells 暴露於 Glyphosate 的細胞內粒線體膜電位變化趨勢。



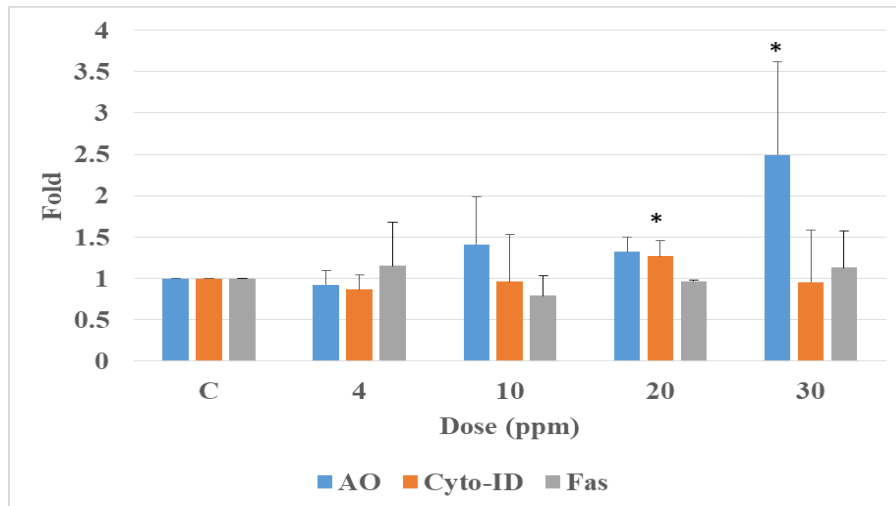
圖八、可推論低濃度時，粒線體膜電位無明顯變化，中高濃度時，有明顯的上升趨勢。

5-7. 利用 Flow Cytometry 測定 ROS，進行以不同 Glyphosate 濃度 (0, 4, 10, 20, 30 ppm) 在 3h 加藥的方式。



圖九、可從圖表推論中高濃度時，有引發的跡象。

5-8. 利用 Flow Cytometry 測定 Acridine orange 、Cyto-ID 、Fas，觀察不同 Glyphosate 濃度 (0, 4, 10, 20, 30 ppm) 處理細胞 1h、0.5h、3h 加藥的方式，分析細胞暴露於 Glyphosate 的細胞自噬中的 autophagosome 、lysosome 變化趨勢及細胞凋亡、自噬中 Fas 的變化趨勢。



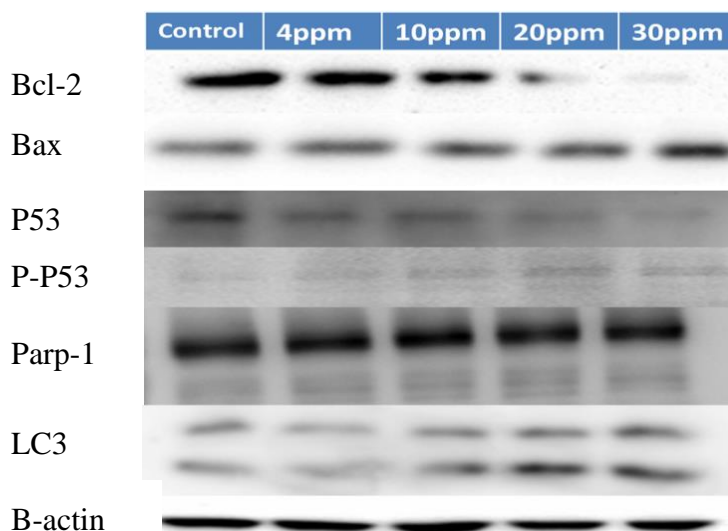
圖十

(1) 藍色長條為細胞經藥物處理 1h 後，autophagosome 的表現趨勢，可推論低濃度時，無明顯變化，中高濃度時，有明顯的上升趨勢。

(2) 橘色長條為細胞經藥物處理 0.5h 後，autolysosome 的表現趨勢，可推論 20 ppm 傷害有誘發少量 autolysosome 的可能性。

(3) 灰色長條為細胞經藥物處理 3h 後，Fas 的表現趨勢，可推論藥物並無明顯影響細胞 Fas 的表現。

**5-9.** 利用 Western blot 測定 Bcl2、Bax、P53、PARP-1、LC3，觀察不同 Glyphosate 濃度 (0, 4, 10, 20, 30 ppm) 處理細胞 1h、3h 加藥的方式，分析細胞暴露於 Glyphosate 的細胞，其促凋亡、抗凋亡、凋亡、DNA 損傷、自噬蛋白表現情形。

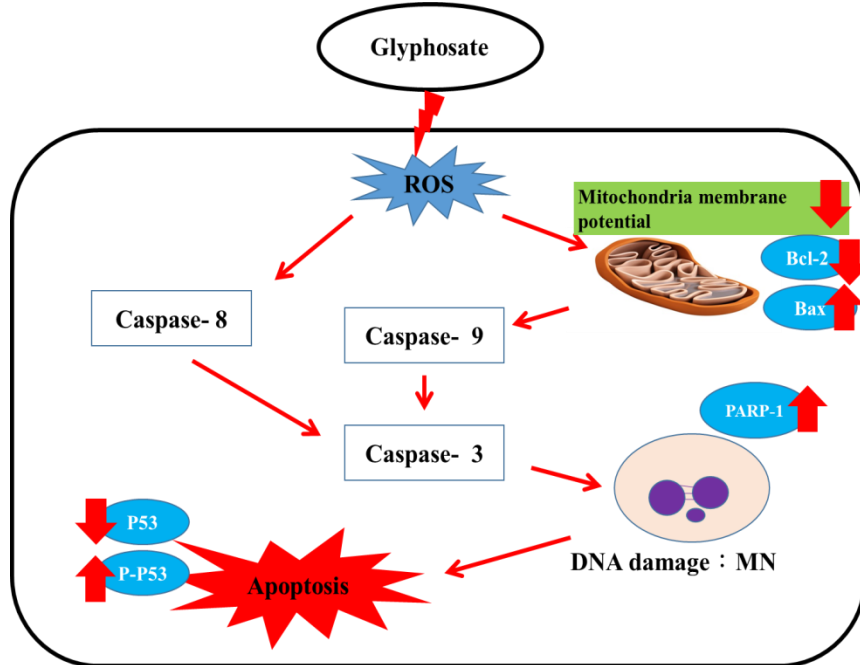


圖十一

- (1) Bcl-2 蛋白隨著藥物濃度的上升，表現量呈現下降的趨勢； Bax 蛋白隨著藥物濃度的上升，表現量呈現上升的趨勢。可進一步判定 Glyphosate 能通過 Bcl-2 Family 誘發細胞凋亡。
- (2) P53 蛋白隨著藥物濃度的上升，表現量呈現下降的趨勢。P-P53 蛋白隨著藥物濃度的上升，表現量呈現上升的趨勢。可進一步判定 Glyphosate 能通過 P53 調控細胞凋亡。
- (3) PARP-1 蛋白隨著藥物濃度的上升，降解表現量呈現上升的趨勢，可推論 PARP-1 的活化與 Glyphosate 引發的基因毒性有相關性。
- (4) LC3 蛋白隨著藥物濃度的上升，表現量呈現上升的趨勢。可進一步判定 Glyphosate 於短時間時，能通過活化 LC3 誘發 autophagosome、lysosome，促使細胞自噬的進行。

從上述一系列的實驗結果，可以推論：

Glyphosate 於 3 小時的藥物處理時間時，可以造成 ROS 引發之氧化壓力的損傷，並進一步造成粒線體膜電位的損傷，一系列的損傷反應表明 Glyphosate 誘發的 ROS 可通過影響 Bcl-2 家族表現，誘使粒線體膜電位改變，繼而活化半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (caspases 3,8,9)，引發 MN 及活化 PARP-1，造成 DNA 的損傷，影響 P53 蛋白的表現。最終導致細胞凋亡。

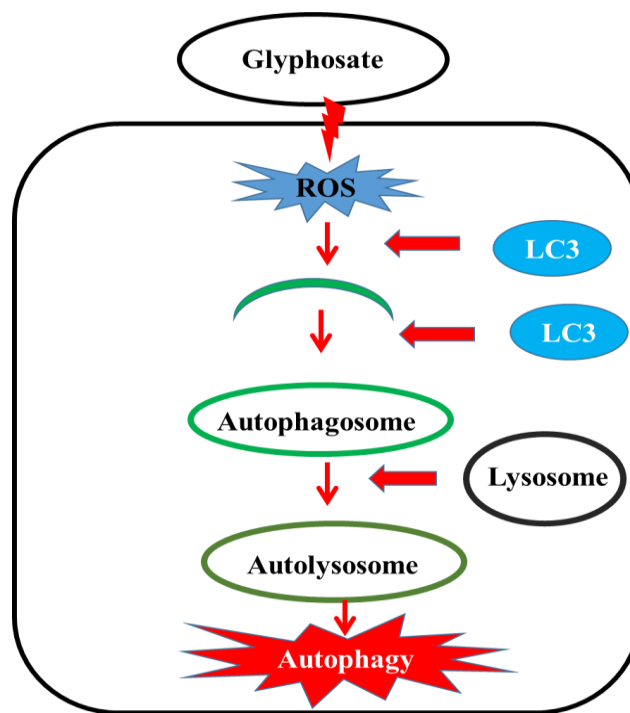


圖十二、為 Glyphosate 誘發細胞凋亡路徑圖。

Glyphosate 於 1 小時的藥物處理時間時，可通過 ROS 活化細胞自噬關鍵蛋白 LC3 進而促使 autophagosome 及 lysosome 的產生，促使細胞自噬反應的進行。



於本篇研究中，我與指導老師多方討論後，推論 3 小時的藥物處理時間，相較於 1 小時傷害時間，3 小時的藥物處理時間過久引發的傷害過大，導致細胞直接走向細胞凋亡，無法準確觀察到細胞自噬的反應，故細胞自噬的實驗操作，藥物處理時間皆採用 1 小時進行實驗操作。



圖十三、為 Glyphosate 誘發細胞自噬路徑圖。

#### (六) 參考文獻

1. Coullery RP, Ferrari ME, Rosso SB. Neuronal development and axon growth are altered by glyphosate through a WNT non-canonical signaling pathway. *Neurotoxicology*. 2016; 52: 150-61.
2. Kim YH, Hong JR, Gil HW, Song HY, Hong SY. Mixtures of glyphosate and surfactant TN20 accelerate cell death via mitochondrial damage-induced apoptosis and necrosis. *Toxicology in Vitro*. 2013 Feb;27(1):191-7.
3. Ernst Schönbrunn, Susanne Eschenburg, Wendy A. Shuttleworth, John V. Schloss\*, Nikolaus Amrhein, Jeremy N. S. Evans, and Wolfgang Kabsch. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001 Feb 13;98(4):1376-80.

4. Mañas F, Peralta L, Raviolo J, Ovando HG, Weyers A, Ugnia L, Cid MG, Larripa I, Gorla N. Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2009 Jul;28(1):37-41.
5. O'Neill LA, Pearce EJ. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *Journal Of Experimental Medicine*. 2016; 213: 15-23.
6. Murakami A, Ohigashi H. Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: chemoprevention using food phytochemicals. *Int J Cancer*. 2007; 121: 2357-63.
7. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation*. 2012; 45: 487-98.
8. Nikitaki Z, Hellweg CE, Georgakilas AG, Ravanat JL. Stress-induced DNA damage biomarkers: applications and limitations. *Front Chem*. 2015; 2: 3-35.
9. Hassen W, Ayed-Boussema I, Oscoz AA, Lopez Ade C, Bacha H. The role of oxidative stress in zearalenone-mediated toxicity in Hep G2 cells: oxidative DNA damage, glutathione depletion and stress proteins induction. *Toxicology*. 2007; 232: 294–302.
10. Pourova J, Kottova M, Voprsalova M, Pour M. Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. *Acta Physiologica*. 2010; 198: 15–35.
11. Winterbourn CC, Hampton MB. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radical Biology and Medicine*. 2008; 45: 549–561.
12. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2015; 7.
13. Rossi D, Gaidano G. Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica*. 2003; 88: 212-218.
14. Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death & Differentiation*. 2004; 11: 372-380.
15. Kook SH, Son YO, Chung SW, Lee SA, Kim JG, Jeon YM, Lee JC. Caspase-independent death of human osteosarcoma cells by flavonoids is driven by

- p53-mediated mitochondrial stress and nuclear translocation of AIF and endonuclease G. *Apoptosis*. 2007; 12: 1289-98.
16. Fischer U, Jänicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death And Differentiation*. 2003; 10: 76-100.
  17. Li YC, Kuan YH, Lee SS, Huang FM, Chang YC. Cytotoxicity and genotoxicity of chlorhexidine on macrophages in vitro. *Environmental Toxicology*. 2014; 29: 452-8.
  18. Krifka S, Petzel C, Hiller KA, Frank EM, Bosl C, Spagnuolo G, Reichl FX, Schmalz G, Schweikl H. Resin monomer-induced differential activation of MAP kinases and apoptosis in mouse macrophages and human pulp cells. *Biomaterials*. 2010; 31: 2964-75.
  19. Yu FS, Huang AC, Yang JS, Yu CS, Lu CC, Chiang JH, Chiu CF, Chung JG. Safrole induces cell death in human tongue squamous cancer SCC-4 cells through mitochondria-dependent caspase activation cascade apoptotic signaling pathways. *Environmental Toxicology*. 2012; 7: 433-444.

## 科技部補助專題研究計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：RT-PCR 實驗部分，嘗試多次，未有理想結果，與老師討論過後，放棄RT-PCR，改在Western blot 實驗部分加入其他路徑的關鍵蛋白（例如： Bax ， LC3 ），以完善潛在機制的探討，充實實驗結果。

Lyso-Green 實驗部分由於結果不顯著，改採用 Cyto-ID 探討自噬反應。

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形(請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊)

論文：已發表未發表之文稿撰寫中無

專利：已獲得申請中無

技轉：已技轉洽談中

無

其他：（以200字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以500字為限）。

嘉磷賽的應用，於歐洲是頗具爭議的，期望本篇研究能協助釐清部分使用上的爭議。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值：否是，建議提供機關\_\_\_\_\_

(勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關)

本研究具影響公共利益之重大發現：否是

說明：(以150字為限)