

中華民國第 58 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高級中等學校組 環境學科

第二名

052608

「莓」你不行-果蠅模式探討莓類萃取物對於奈米銀造成的細胞毒性抑制研究

學校名稱：國立臺南女子高級中學

作者： 高二 林鈺芬 高二 莊詠筑	指導老師： 李碧芬
---------------------------------	------------------

關鍵詞：pterostilbene、resveratrol、細胞凋亡

摘要

現今人們利用奈米銀的殺菌功力，然而奈米銀粒子的毒性卻可能引發氧化壓力、細胞凋亡、DNA 損傷，甚至死亡。為此，我們利用生活中常見的莓果類，如藍莓內所含的 Pterostilbene(紫檀芪)、葡萄內所含的 Resveratrol(白藜蘆醇)，探討兩種化合物對於奈米銀引發細胞毒性的抑制效果。

首先證實高濃度奈米銀影響果蠅的發育，且誘發細胞凋亡。接著發現加入 Pterostilbene 和 Resveratrol 的組別會減緩奈米銀所導致的果蠅發育障礙，且果蠅被奈米銀減少的壽命亦有回升的效果，而 Pterostilbene 之效果又較 Resveratrol 佳。雖假設化合物是透過抗氧化途徑去抑制奈米銀造成的果蠅氧化壓力增加，前述實驗中兩者也皆可抑制果蠅的發育遲緩，但抗氧化基因表現的實驗中卻發現只有加入 Resveratrol 的組別抗氧化基因表現量有明顯上升趨勢，值得深入探討。

壹、研究動機

一、研究動機

奈米銀具有強殺菌功效，因此生活中常作為清潔用品的添加劑，殊不知奈米銀竟可能促發細胞自噬及凋亡?!為此，我們利用生活中常見的植物萃取物作為解決之道-藍莓和紅酒都是生活中平常的食品-因此更可說是「小兵立大功」!我們從許多文獻上得知藍莓萃取物 Pterostilbene 及紅酒萃取物 Resveratrol 對於抗老化有一定的影響，可減緩活性氧化物質的作用。我們希望由去年新的研究結果－暴露於奈米銀會引發果蠅發育遲緩當作實驗樣本，分別控制不同的變因去探討兩種化合物其中機制。

本研究透過果蠅模式來探討藍莓萃取物-Pterostilbene 和葡萄酒中的萃取物-Resveratrol 對於奈米銀導致的果蠅發育遲緩之抑制作用，並驗證過去文獻中主張「Pterostilbene 較 Resveratrol 作用效果佳」真實性。

首先驗證前人的研究成果-奈米銀顆粒與細胞毒性密切相關，通過奈米銀誘導活性氧化物質(ROS，氧化壓力)時，觀察其長期影響包括對個體老化的影響，短期影響包括 DNA 損壞、細胞自噬、細胞凋亡等作用。

接著利用果蠅模式 w^{1118} (野生型)進行實驗。實驗過程中使用由 2 種莓果類萃取出的純化樣品進行比較，探討兩化合物對果蠅模式細胞毒性的抑制作用並比較，且觀察抗氧化基因的表現，將研究結果加以延伸應用。

二、文獻探討

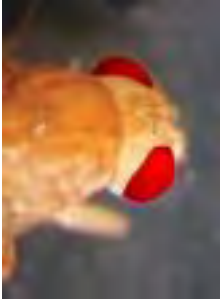

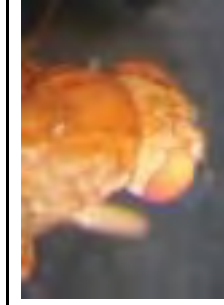
(一)果蠅

Drosophila melanogaster，黑腹果蠅、黑尾果蠅，易於培養、繁殖期短，果蠅包含四對染色體(含一對性染色體)，能顯示多種遺傳變異，可作為模式生物，果蠅作為模式生物的研究已經被證明對一般植物、動物(包括人類)都是有效的。根據文獻，約 60%~75%的人類致病基因在果蠅基因體中有同源基因，超過一半的蛋白質與我們相同，幾乎大部分和癌症、代謝、老化相關的訊息傳遞路徑在果蠅中也存在。利用果蠅各種訊息傳遞路徑突變株研究不明功能的致病基因，能篩檢某疾病之致病基因是否透過調節特定訊息傳遞路徑而影響病情。

野生的果蠅本多為紅眼，但在自發性的突變下產生不同眼色的種類，如早期發現的白眼果蠅，這樣的突變稱為 *white*，產生白眼特徵的遺傳基因也被稱為 *white*。除外還有白眼紅點、淡橙色等其他突變種類。因為有許多不同的等位基因，且雌性果蠅往往不止和一個雄性果蠅交配，為確保實驗準確性，避免導致基因混合的後代，使用處女果蠅與純種(特定品種)雄果蠅交配是必要的步驟。

研究中使用的果蠅為 W^{1118} ，是白眼果蠅的一種，白眼不影響其視覺， W^{1118} 只是缺少使眼睛呈深紅色的色素。而一般的 $W^{wildtype}$ 為紅眼，黃棕色身體和直翅。其他還有 Curly(Cyo，捲翅)、Ebony(e，較深色身體)、Dumpty(dp，短肢短翅)等突變類型。

下表為 $W^{wildtype}$ 和 2 種常見果蠅突變類型(W^{1118} 、 $W^{apricot}$):

3 Alleles of <i>white</i>			
Phenotypes of flies homozygous for each allele			
Description of phenotype	wildtype	white	light-orange
Name of allele	<i>white</i> ⁺	<i>white</i> ¹¹¹⁸	<i>white</i> ^{apricot}
Symbol of allele	W^+	W^{1118}	W^a

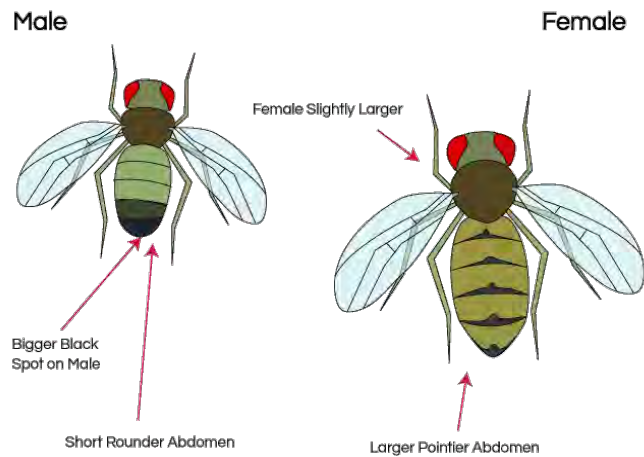
表一:果蠅突變類型(HHMI)



圖一:果蠅 W^{1118}



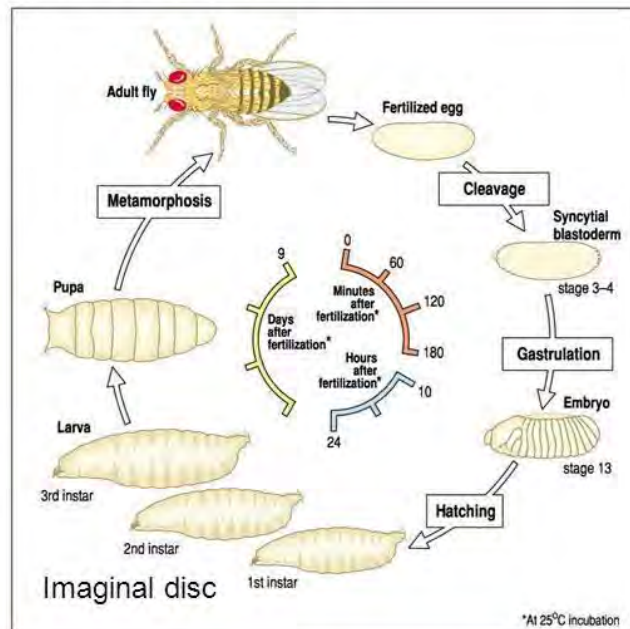
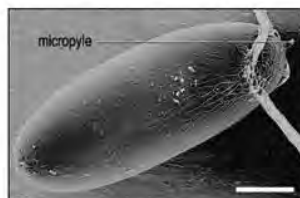
圖二:果蠅 $W^{wildtype}$



圖三:果蠅雌雄差異

Life cycle of *Drosophila* (very short)

4 stages: embryo, larva, pupa, adult



Easily to be cultured , large population

圖四:果蠅生命週期

(二)Pterostilbene 紫檀芪、Resveratrol 白藜蘆醇

1. 芪類

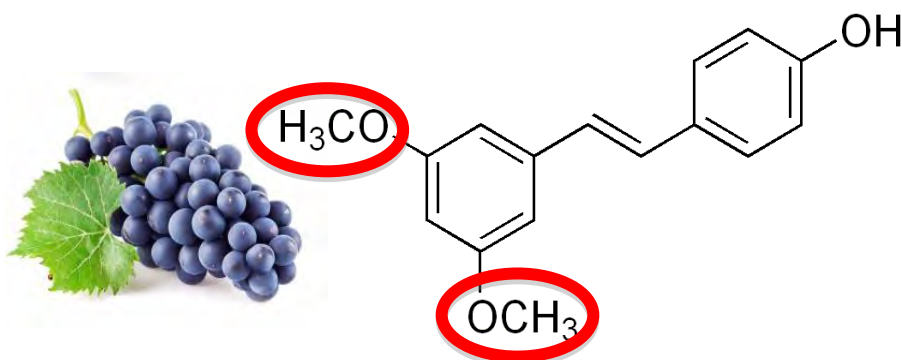
Pterostilbene(紫檀芪)和 Resveratrol(白藜蘆醇)都是芪類化合物，是一種多酚類的亞類化合物，屬於一種植物化學物質，分子量約 200~300 克/莫耳。廣泛發現於葡萄、藍莓、堅果、紅酒或其他藥用植物，主要分佈在植物的薄壁組織內，其中 Ptersotilbene(紫檀芪)、Resveratrol(白藜蘆醇)等都是廣為人知的。主要芪類分為簡單芪類-二苯基乙烯和聚合芪類並具有順式結構和反式結構。

2.Pterostilbene-紫檀芪

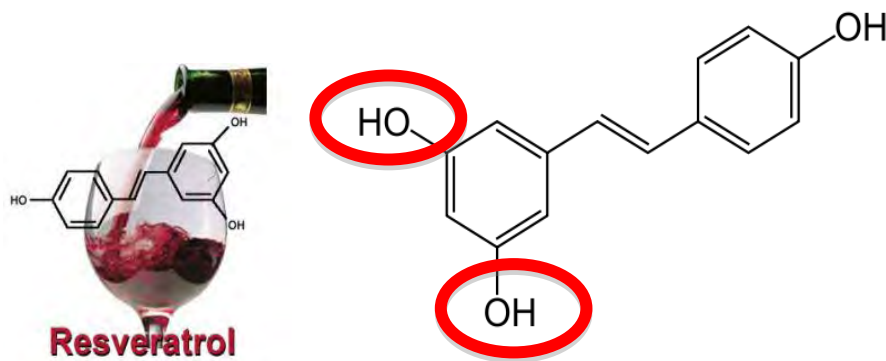
Pterostilbene(紫檀芪)是 Resveratrol(白藜蘆醇)的衍生物，有相似的化學結構，是防禦性的植物抗毒素。研究應用包括能抑制認知能力下降的老化情形。Pterostilbene(紫檀芪)與 Resveratrol(白藜蘆醇)化學結構差異為兩個甲基取代了 Resveratrol(白藜蘆醇)上的羥基。研究顯示 Pterostilbene(紫檀芪)在口服吸收、抗氧化、作為抗癌分子的效果較 Resveratrol(白藜蘆醇)的效果好。

3.Resveratrol-白藜蘆醇

Resveratrol(白藜蘆醇)是一種天然苯酚，是植物在受病原如細菌時所產生的植物抗毒素，多含於紅葡萄皮、紅酒或日本虎杖內。經研究 Resveratrol(白藜蘆醇)的效用包含抗氧化、清除自由基、防止 LDL 低密度脂蛋白氧化、抑制腫瘤生長等效用。



圖五:Pterostilbene



圖六:Resveratrol

(三)奈米銀

直徑小於 10^{-9}m 的粒子稱為奈米微粒。銀的化學性質非常穩定，表面不易氧化;反之，當銀材料小至奈米尺寸時，單位體積的表面積會大幅增加，因此具有較高比率的原子位於材料表面，使其具有高度的化學活性。近年來，奈米銀成為炙手可熱的研發技術，奈米銀粒子常被吹捧為極有效的抗菌劑，然而，許多體外研究已證實奈米銀粒子對大鼠細胞、神經細胞，人肺上皮細胞等具毒性作用，除此之外，奈米銀粒子在水中也具毒性，已從水生生物的毒性反應得到證實。根據研究，奈米銀粒子雖未引起聚合酶抑制性 DNA 損傷，卻可誘導氧化性 DNA 損傷，顯示氧化壓力刺激相關粒線體及 DNA 損傷為奈米銀的毒性潛能。



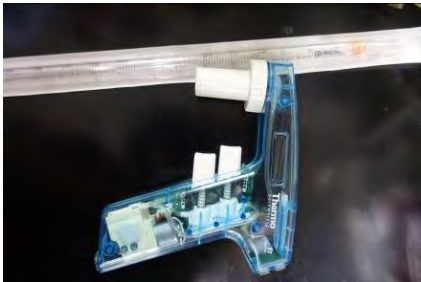



(四)氧化壓力(Reactive oxygen species, ROS)

於生物體正常之有氧代謝過程中會自然形成許多活性氧物質(ROS)，活性氧化物質包括超氧陰離子、過氧化氫、氫氧自由基、單重態氧等，其來源可分為內在和外在兩方面，內在來源包括粒腺體電子傳遞鏈、氧化反應和自我氧化反應等；另外生物體亦可經由傳染、離子幅射、空氣污染、抽煙與毒物之入侵產生活性氧物質；目前為止，包含內在及外在產生活性氧物質之路徑，有部分之機轉仍未完全明瞭。酵素性抗氧化防禦系統主要含有 superoxide dismutase(SOD)、catalase 與 Se-dependent glutathione peroxidase (GSH-Px)等，SOD 會促使超氧陰離子轉化成過氧化氫，以消除超氧陰離子；而過氧化氫會再經由 catalase 或 GSH-Px 還原成水和氧；另外 GSH-Px 亦會還原脂質過氧化物成為無毒害產物。

貳、研究目的

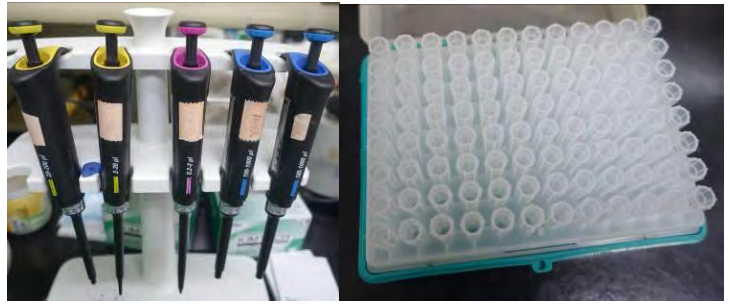
- 一、證實前人研究奈米銀粒子於果蠅模式中誘發果蠅發育遲緩
- 二、探討 Pterostilbene 與 Reveratrol 對於誘發抗氧化基因表現的效果
- 三、探討 Pterostilbene 與 Resveratrol 對於抑制奈米銀使果蠅產生發育遲緩的效果
- 四、探討 Pterostilbene 與 Resveratrol 對於奈米銀造成的細胞凋亡作用之影響效果

參、研究設備及器材

	
圖一:中研院果蠅食物	圖二:振盪盤
	
圖三:吸量管	圖四:離心機
	
圖五:研磨機	圖六:雷射顯微鏡



圖七:自製食物材料



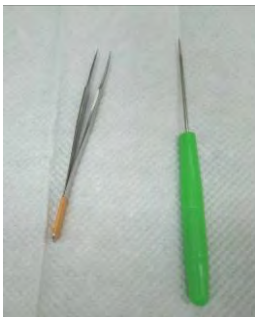
圖八:pipe、tip



圖九:1.5mL 微量離心管(圖右取自網路)



圖十:玻璃珠、鋼珠



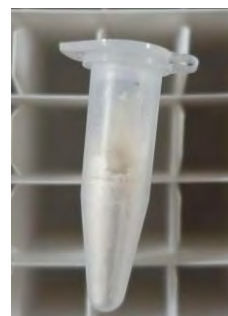
圖十一:鑷子、挑針



圖十二:交配盤



圖十三:加熱盤



圖十四:Pterostilbene(紫檀芪)



圖十五:Resveratrol(白藜蘆醇)



圖十六:AgNPs(奈米銀)



圖十七: 顯微鏡



圖十八:果蠅培養箱



圖十九:-80℃ 冰箱(藥品區)



圖二十:-20℃ 冰箱(樣品存放)



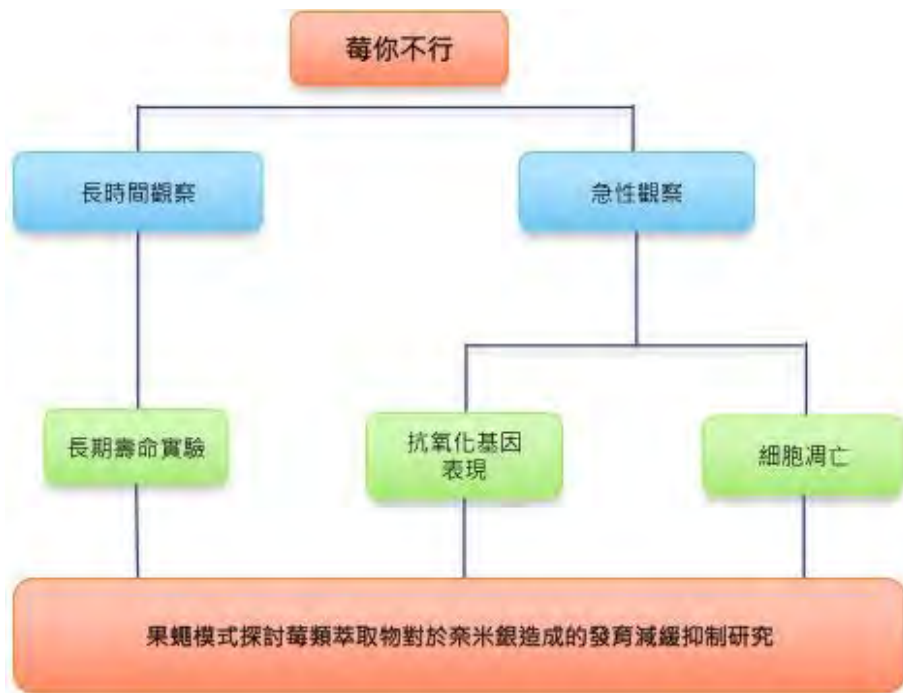
圖二十一:-4℃ 冷房



圖二十二:載玻片

肆、研究過程或方法

一、研究架構:



表一:研究架構

二、實驗材料、儀器準備

(一)暴露於奈米銀的果蠅準備

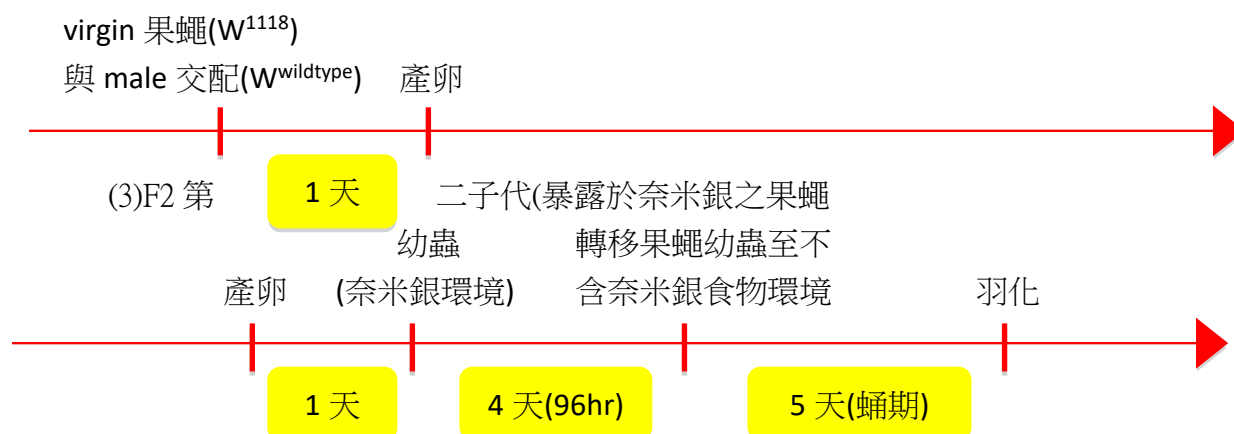
1.果蠅養殖

實驗中使用的果蠅控制為雌果蠅 W^{1118} 和雄果蠅 $W^{wildtype}$ (Oregon R) 交配產下的子代 F2。實驗室溫度控制在 25°C 、濕度 65%，果蠅食物為中研院統一配送洋菜膠。根據文獻此為果蠅最佳生長環境，可得最高的產量和最短世代時間，從卵到成蟲只需 9-10 天。

(1)M 親代



(2)F1 第一子代



2.研究過程食物製作

若實驗中必須自製食物以加入化合物，需參考中研院製作食物之配方，並換算比例製作。

材料	原配方	所需量	實際稱量
BRL agar	200 g	4.2	4.201
葡萄糖	1050 g	22.05	22.055
糖(紅糖)	524 g	11.004	11.029
酵母粉	1200 g	25.2	25.250
玉米粉	909.2 g	19.09	19.101
防腐劑 A	202 ml	4.242	4.250
防腐劑 B	250 ml	5.25	5.25025
Ro 水	19 L	0.4	4.0021

表二:食物配方

(1)配製方法:

以大火(約 540°C)煮至沸騰後，分別以 200°C 1 分鐘及 120°C 5 分鐘的火侯繼續煮，冷卻至 65 度後加入防腐劑 A、B 即可使用(添加所需藥品等)。

3.將果蠅 F2 子代暴露於奈米銀

三、實驗步驟

(一)證實前人研究奈米銀微粒於果蠅模式中誘發果蠅發育遲緩

1.奈米銀對於果蠅蛹化率、羽化率之影響

藉由觀察蛹化率與羽化率的變化，可以探討奈米銀是否影響果蠅發育

(1)分別製作含有 0 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 、30 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 之奈米銀濃度的食物試管。

(2)將一齡幼蟲以 50 隻/管的數量挑入食物試管中。

(3)數天後計算不同試管中的蛹化率、羽化率。

2.長期觀察奈米銀對於果蠅壽命之影響

由奈米銀的作用，探討對果蠅壽命的影響。

(1)分別製作含有 0 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 、20 $\mu\text{g/ml}$ 、30 $\mu\text{g/ml}$ 之奈米銀濃度的食物試管。

(2)將一齡幼蟲以 50 隻/管的數量挑入食物試管中。

(3)待約 13 天(使自由交配)後，將每管食物中之果蠅分成公、母兩類，以公:20 隻/管、母:10 隻/管之數量(由於母果蠅會產卵而易導致食物軟爛，使果蠅黏著於食物，故採 10 隻/管)分裝至一般用食物試管。

(4)每 2 天記錄其存活情形並計算存活率並更換食物試管。

3.以免疫螢光染色方式(staining)觀察其細胞凋亡情形

探討奈米銀的毒性誘導細胞凋亡之情形。

(1)自冰箱取出 paraformaldehyde(PFA)並置於 37°C 水浴槽中解凍後置於冰桶中。

(2)將完成暴露之三齡幼蟲於 PBS 內進行初步肢解(3-5 隻/組)，完成後各自依組別放入 0.5mL PFA 中。

(3)將完成後的樣本置於振盪盤上以振盪盤中速振盪 20 分鐘，使其與 PFA 混合。

(4)以 0.5mL PBS 沖洗樣本 4 次。

(5)將沖洗完的樣本放入 1°抗體(0.15mL/組)中，置於冷房(4°C)中之振盪一晚。

(6)回收 1°抗體，並以 0.3% triton 100-X PBST 沖洗 3 次，10 分/次。

(7)加入 2°抗體後同樣置於冷房中振盪一晚。

(8)以 0.3% triton 100-X PBST 沖洗 3 次，10 分/次。

(9)將樣本置入 0.5mL PBST(暴露過 AgNPs 之組別則置於 0.5mL PBS 中)，保存於 4℃ 冰箱。

(10)進行二次肢解後製成玻片標本保存於 4℃ 冰箱，即可拍照觀察。

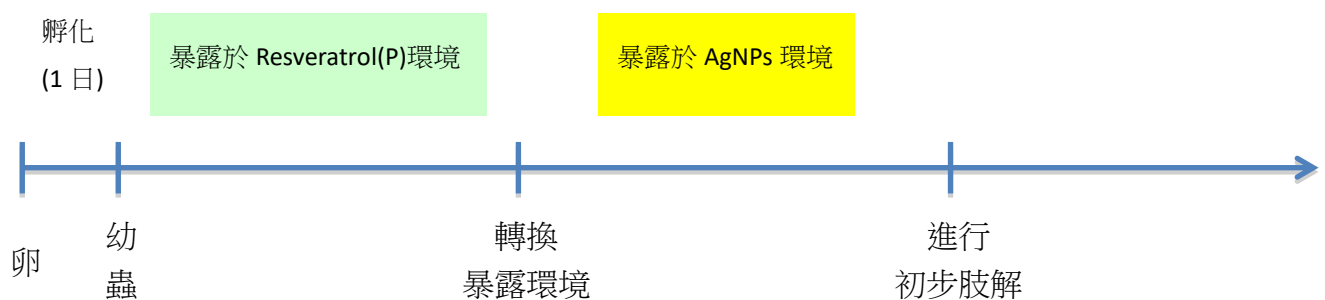
<註>使用之抗體類別:

1°抗體	2°抗體
Rabbit anti cleaved-caspase3 (Cell-signaling) 1:250	Goat anti rabbit 488 1:300

(二)探討 Pterostilbene 與 Resveratrol 對於誘發抗氧化基因表現的效果

1.實驗時間軸:

我們構想以「預防」暴露模式進行實驗，即先暴露 Resveratrol 或 Pterostilbene 後再轉換至 AgNPs 環境中。



2.實驗組別:

- (1) 0 μ M + 0 μ g/ml AgNPs
- (2) Alcohol+0 μ g/ml AgNPs
- (3) 500 μ M Resveratrol + 0 μ g/ml AgNPs
- (4) 500 μ M Pterostilbene+0 μ g/ml AgNPs
- (5) 0 μ M + 50 μ g/ml AgNPs
- (6) Alcohol + 50 μ g/ml AgNPs
- (7) 500 μ M Pterostilbene+50 μ g/ml AgNPs

(8) 500 μ M Resveratrol + 50 μ g/ml AgNPs

(註:由於我們發現 Pterostilbene 及 Resveratrol 兩化合物在水中難溶，無法直接溶於我們製作的食物中。我們經查詢資料得知兩化合物於酒精中的溶解度極大，因此我們先將 Pterostilbene 和 Resveratrol 配置為酒精溶液，再將濃度換算溶於食物中。為使實驗結果與加入酒精的影響區分，因而多加入酒精實驗組作為對照。)

3.聚合酶鏈鎖反應 Real-time PCR

由文獻可知奈米銀造成的細胞毒性是誘發氧化壓力，因此我們欲藉 PCR 實驗，探討 Pterostilbene 與 Resveratrol 對於抗氧化基因促進的作用。

(1)準備上述實驗組別之果蠅暴露。

(2)每組收公母幼蟲分別 10 隻，放入 1.5mL 的微量離心管中，再以液態氮急速冷凍幼蟲使其死亡，樣本放入-80°C 冰箱保存。

(3)在樣本中加入 0.25ml TRIZOL 及玻璃珠，樣本放入研磨機進行組織研磨(每研磨 2 分鐘須將樣本置於冰桶 1 分鐘，避免溫度過高)。

(4)將樣本(細胞溶解液)置於室溫下 5 分鐘，以使 RNA 和蛋白質完全解離。

(5)樣本加入 0.05mL 氯仿，劇烈搖盪 15 秒(手搖)，置於室溫下 2-3 分鐘。

(6)樣本放入離心機，以 4°C 12,000 g(RCF)離心 15 分鐘。

(7)離心後，樣本溶液會分層，RNA 會在上面無色的水層。小心吸取上層 0.08mL(其 4/5 體積)至另一微量離心管。

(8)加入 0.072mLRNA 體積的 Isopropanol，混和均勻後(手搖 15 秒)置於室溫下 10 分鐘，使 RNA 沉澱。

(9)樣本放入離心機，以 4°C 12,000 g 離心 10 分鐘。

(10)小心倒掉上清液，留下底部少量 RNA 白色膠狀沈澱。

(11)加入 0.25 ml 75% 酒精(DEPC 水配製)清洗(手搖混和)。

(12)將 RNA 沉澱放入離心機，以 4°C 7500 g 離心 5 分鐘。倒掉上清液，風乾或真空抽乾殘留的酒精 1-5 mins。(不可過乾，會導致 RNA 失去溶解性)

(13)取 50 λ (20-50 λ) DEPC 水將 RNA 沈澱回溶。

(若 RNA 不易回溶時，可將其置於 55-60°C，10-15 分鐘助其溶解。)

(14)取 DEPC 水適當稀釋，以分光光度計測波長 260 nm 與 280 nm 之吸光值並計算 RNA 之濃度與純度。

(15)將 RNA 1 μ g 加入 MQ 水、dNTP、random hexane，定量至 20mL，靜置待其反轉錄為 cDNA。

(16)將完成之 cDNA 加入 SYBR(放大訊號用)及 primer，放入 qPCR 儀器進行訊號檢測。

(17)記錄結果並繪製成圖表。

(三)探討 Pterostilbene 與 Resveratrol 對於抑制奈米銀使果蠅產生發育遲緩的效果

(實驗組別同前(二))

1.不同濃度之 Resveratrol、Pterostilbene 配方、AgNPs 對於果蠅蛹化率、羽化率之影響

(1)分別製作不同濃度的食物試管(實驗組別同前)。

(2)將一齡幼蟲以 50 隻/管的數量挑入食物試管中，避光靜置 2 天。

(3)以 20%蔗糖水溶液食物使幼蟲浮出食物(濃度梯度原理)後，轉換至奈米銀環境中，避光靜置 2 天。

(4)計算各個食物管之蛹化率、羽化率。

2. 長期觀察不同濃度之 Resveratrol、Pterostilbene 配方、AgNPs 對於果蠅壽命之影響(方法同前)

(四)探討 Pterostilbene 與 Resveratrol 對於奈米銀造成的細胞凋亡作用之影響效果

(實驗組別同前(二))

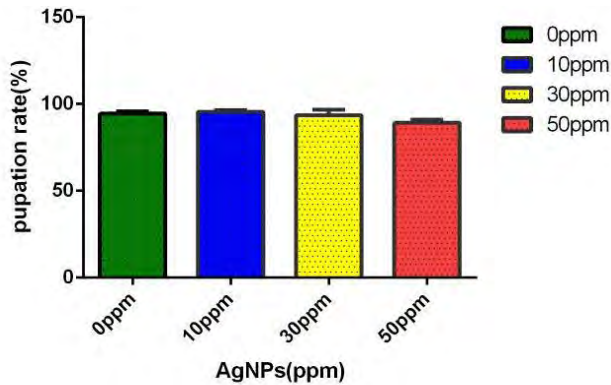
1.以免疫螢光染色方式(staining)觀察其細胞凋亡情形(方法同前(一))

伍、研究結果

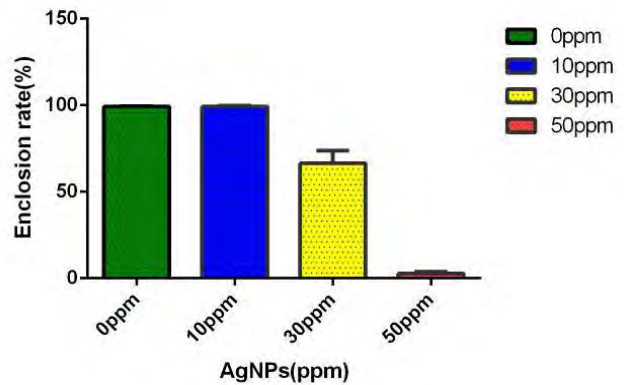
一、證實前人研究奈米銀粒子於果蠅模式中誘發果蠅發育遲緩

(一)奈米銀對於果蠅蛹化率、羽化率之影響

根據圖一、二、三、四可觀察，奈米銀濃度的不同造成的蛹化率差異不顯著，而在羽化率卻有明顯的差異。隨著奈米銀濃度升高(>10 $\mu\text{g/ml}$)，羽化率愈降低。



圖一:蛹化率

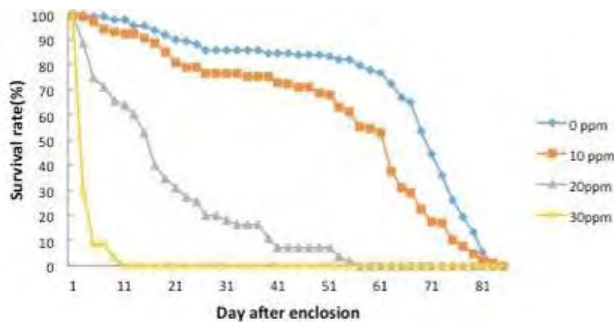


圖二:羽化率

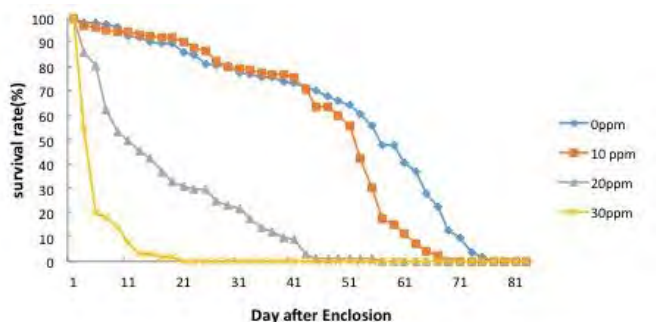
(二)長期觀察奈米銀對於果蠅壽命之影響

根據圖五、六可觀察，隨著奈米銀暴露濃度增高，果蠅壽命會隨之而減少，並且呈現濃度劑量關係。

此外，我們尚在實驗中發現暴露奈米銀的果蠅體色明顯較白。



圖三:公果蠅存活率



圖四:母果蠅存活率

(三)以免疫螢光染色方式(staining)觀察其細胞凋亡情形

<註>

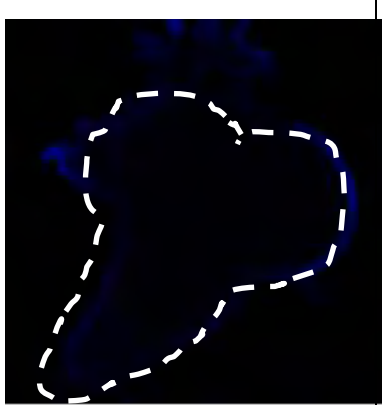
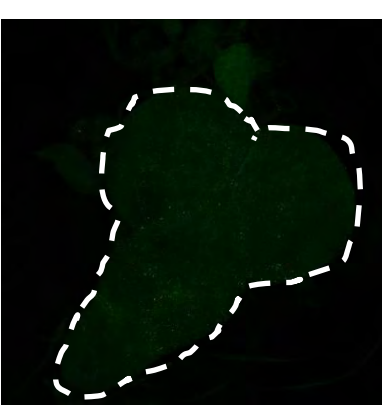
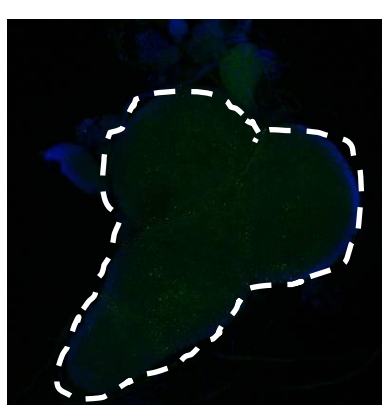
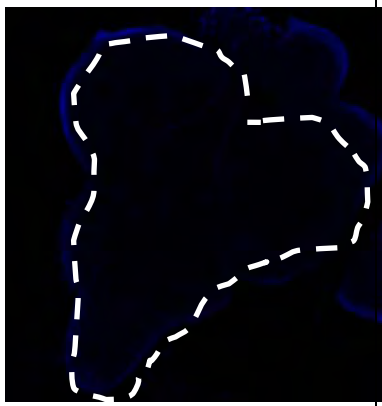
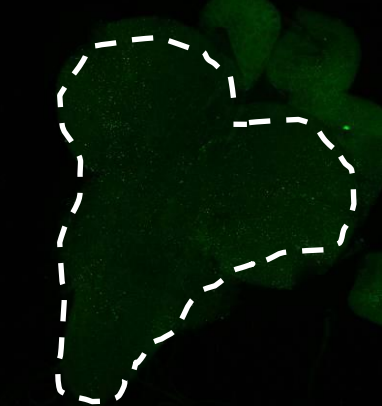
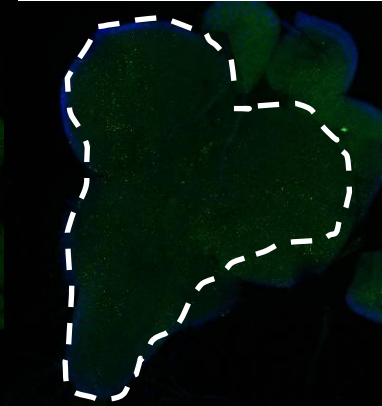
*圖中藍光部分為 DAPI 螢光顯示劑，DAPI 染細胞核可用於定位器官。

**圖中綠光部分為 Caspase 3 染出，一個綠點即表示一個細胞凋亡。

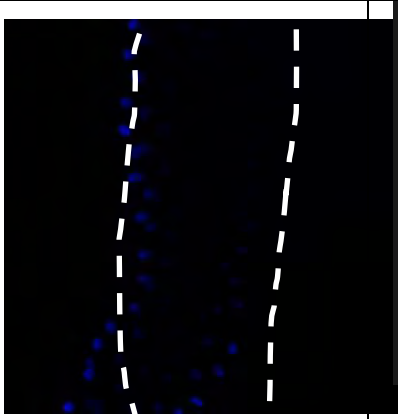
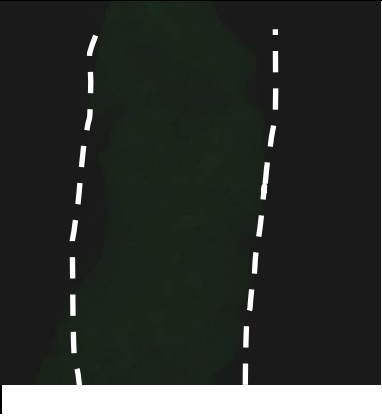
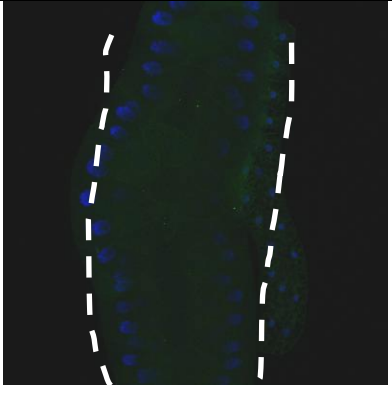
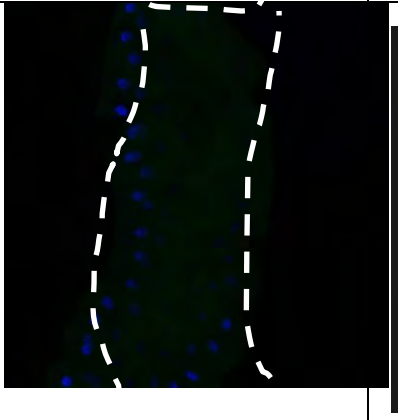
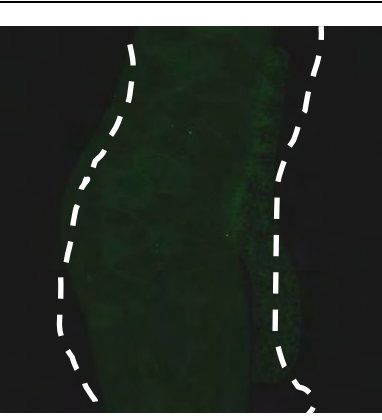

***merged 表 DAPI 和 Caspase 3 混合拍攝

根據圖中可觀察奈米銀濃度愈高，綠點愈多，細胞凋亡愈顯著。

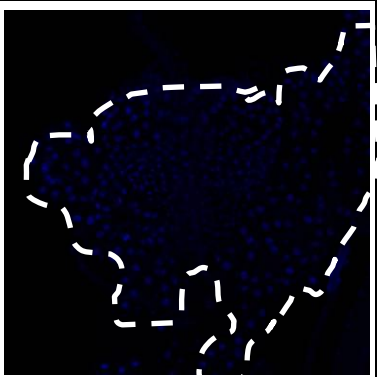
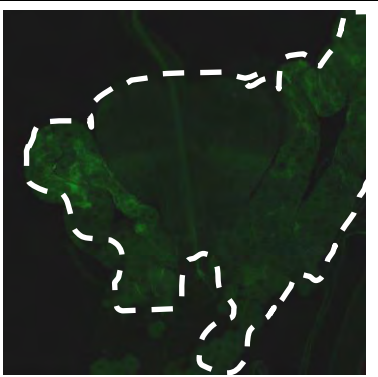
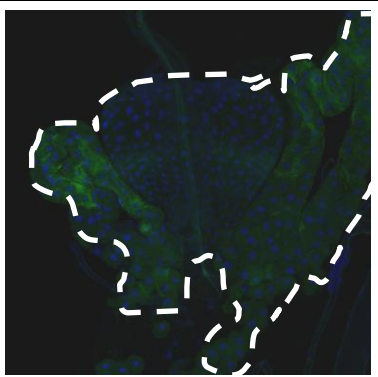

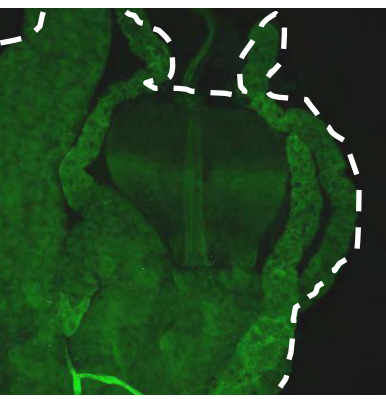
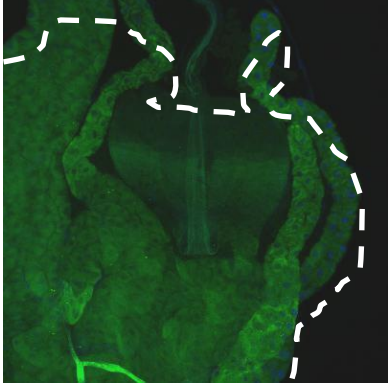
表一、果蠅腦細胞之細胞凋亡結果

AgNPs	DAPI	Caspase 3	merged
0			
50			

表二、果蠅唾腺細胞之細胞凋亡結果

AgNPs	DAPI	Caspase 3	Merged
0			
50			

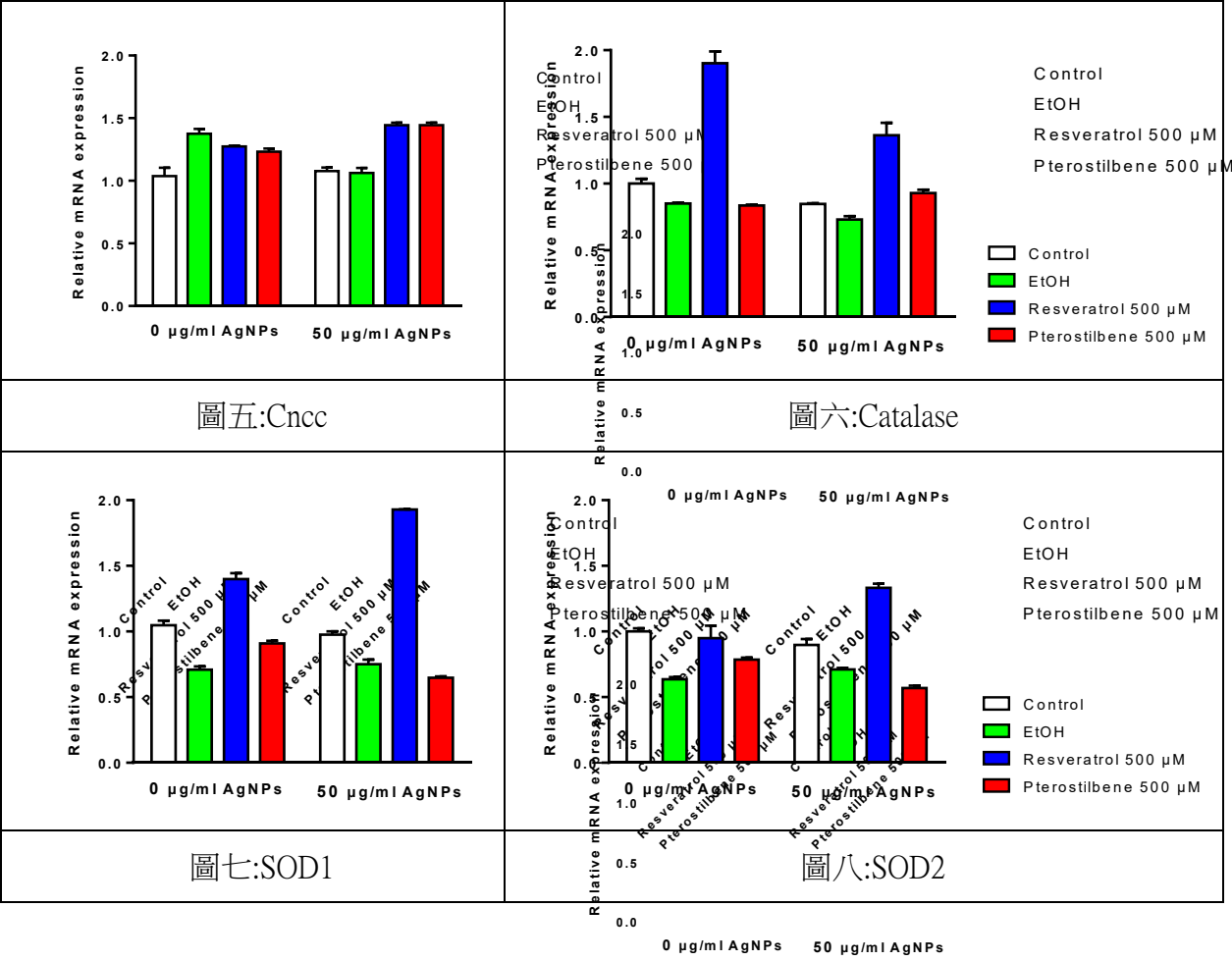
表三、果蠅腸細胞之細胞凋亡結果

AgNPs	DAPI	Caspase 3	Merged
0			
50			

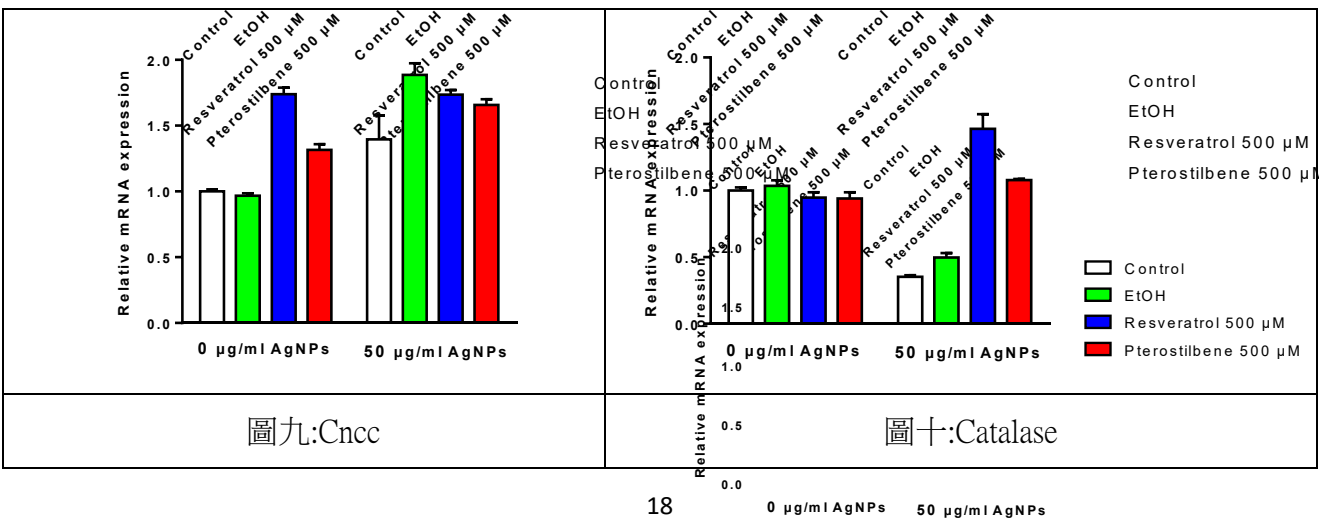
二、探討 Pterostilbene 與 Resveratrol 對於誘發抗氧化基因表現的效果

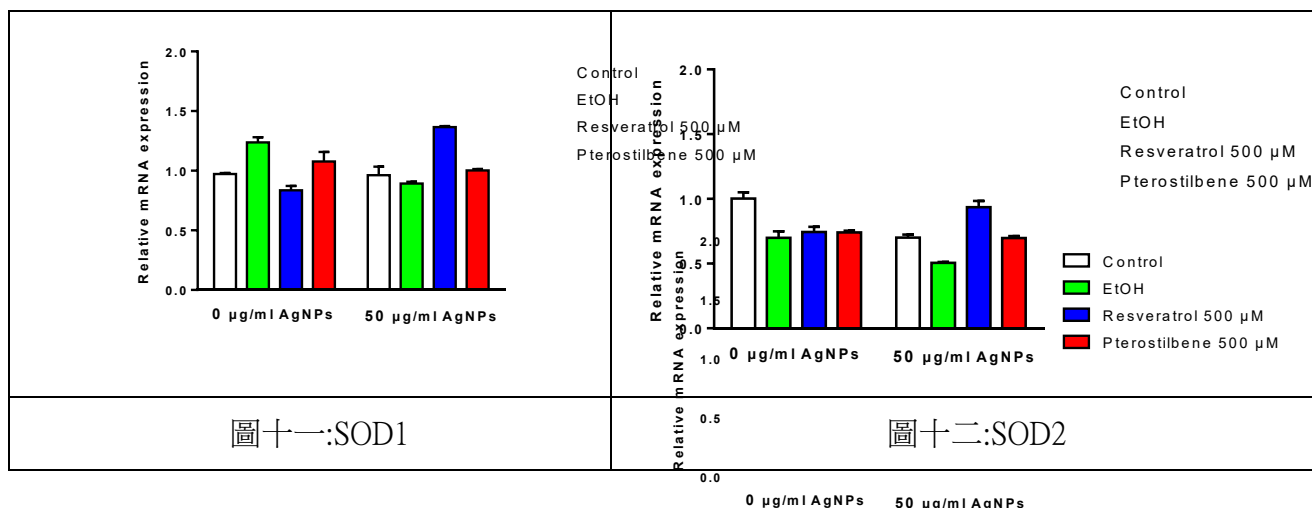
由圖七至圖十雄性果蠅之結果可發現，加入 Resveratrol 且奈米銀濃度較高的組別，基因的表現量皆較高。而在圖十一至圖十四中的雌性果蠅結果可發現亦有相同現象。比較單暴露奈米銀而產生的自身抗氧化基因表現，抗氧化基因表現量明顯增加。

(一) 雄性果蠅之 qPCR 結果



(二) 雌性果蠅之 qPCR 結果

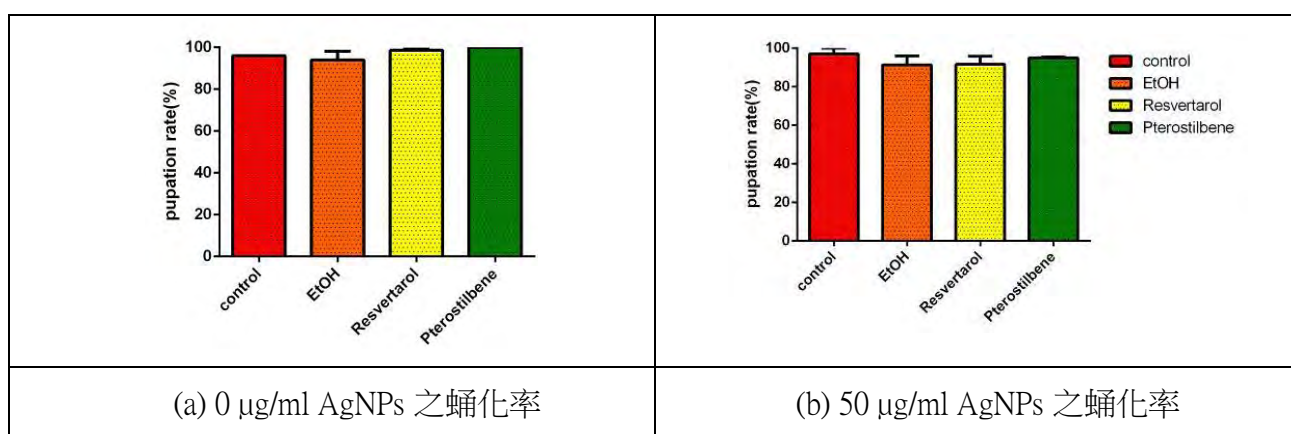




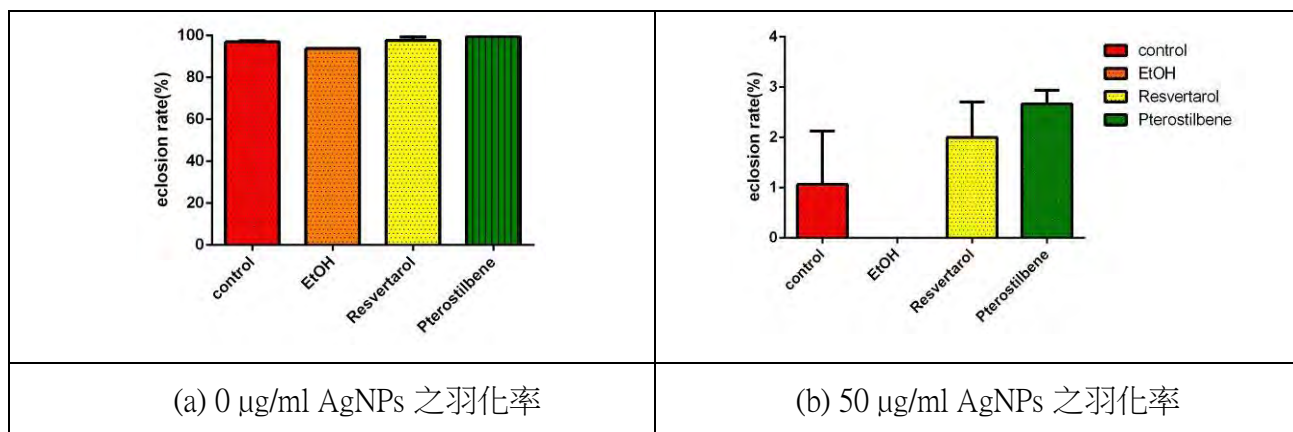
三、探討 Pterostilbene 與 Resveratrol 對於抑制奈米銀使果蠅產生發育遲緩的效果

(一) 蛹化率、羽化率(1、2 分別表第一、二次實驗)

這組實驗暴露的奈米銀濃度為(0、50 µg/ml)，Pterostilbene(紫檀芪)與 Resveratrol(白藜蘆醇)濃度皆為 500uM。由圖七可知在蛹化率上有加入 Pterostilbene、Resveratrol 和奈米銀的果蠅，比照單暴露奈米銀的果蠅有稍微提升之效果。而在羽化率方面加入 Pterostilbene 和 Resveratrol 雖分別有上升，但 Pterostilbene 較明顯，由此證明我們的假設「Pterostilbene 抑制果蠅發育遲緩的能力較 Resveratrol 佳」。



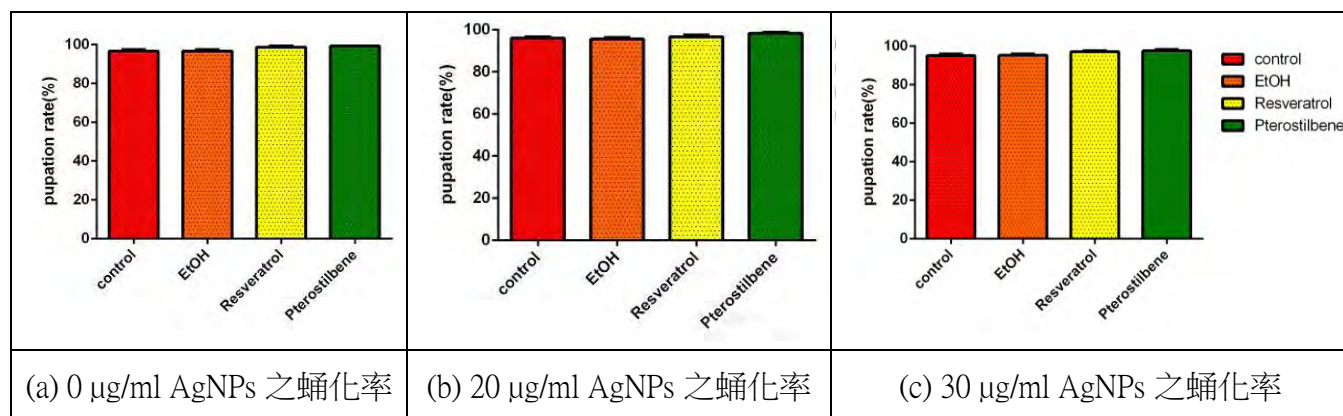
圖十三:暴露於不同條件下的果蠅蛹化率



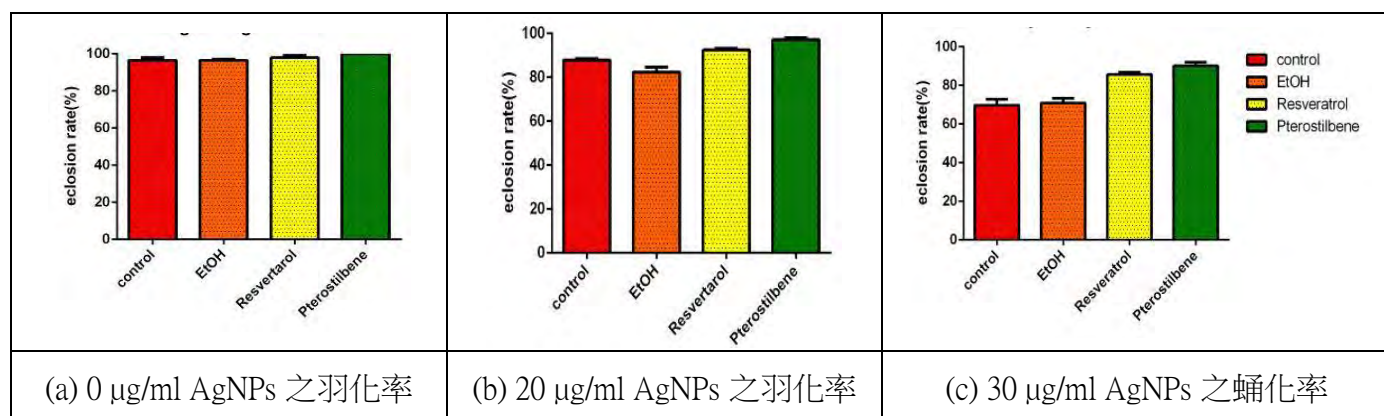
圖十四:暴露於不同條件下的果蠅羽化率

(二) 蛹化率 2、羽化率 2

由於第一次實驗無法明顯表現出 Pterostilbene 和 Resveratrol 的抑制效果，我們推測是由於奈米銀濃度設定過高，因此這次將奈米銀濃度改為 0、20、30 µg/ml。由圖九、十可明顯看到 Pterostilbene 和 Resveratrol 在羽化率上的顯著效果，更可證實我們的假設。



圖十五:暴露不同條件下的果蠅蛹化率

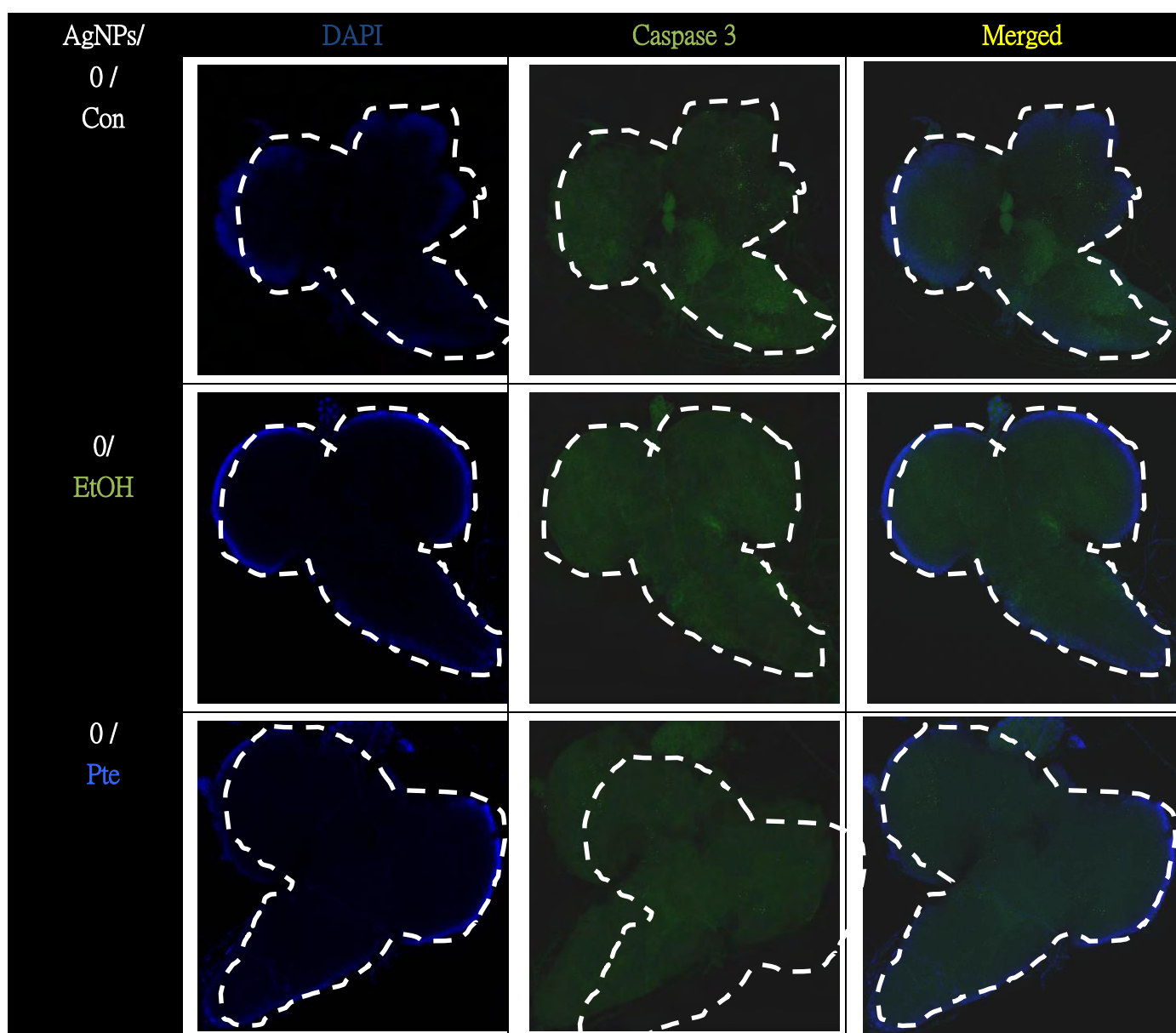


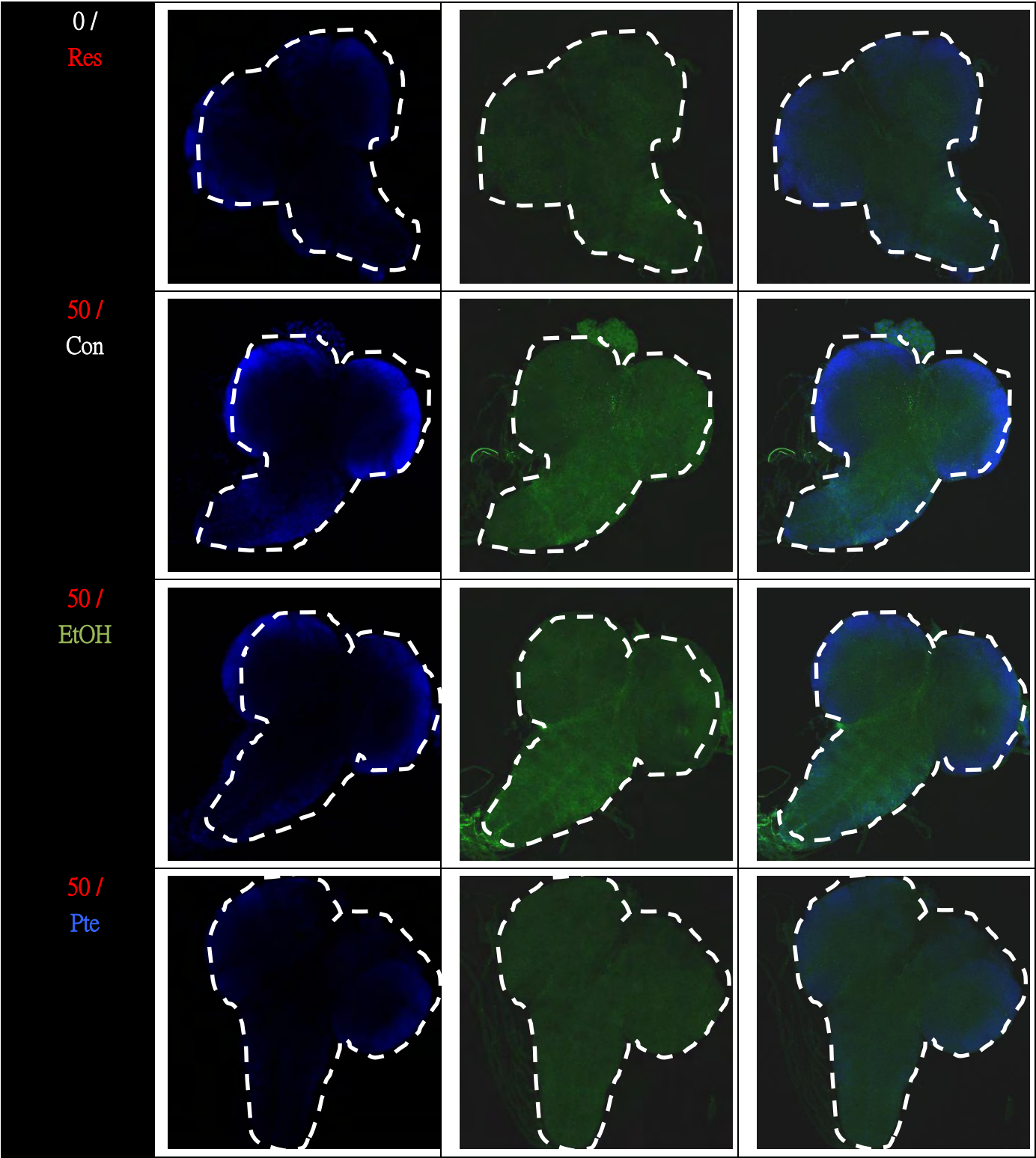
圖十六:暴露不同濃度下的果蠅羽化率

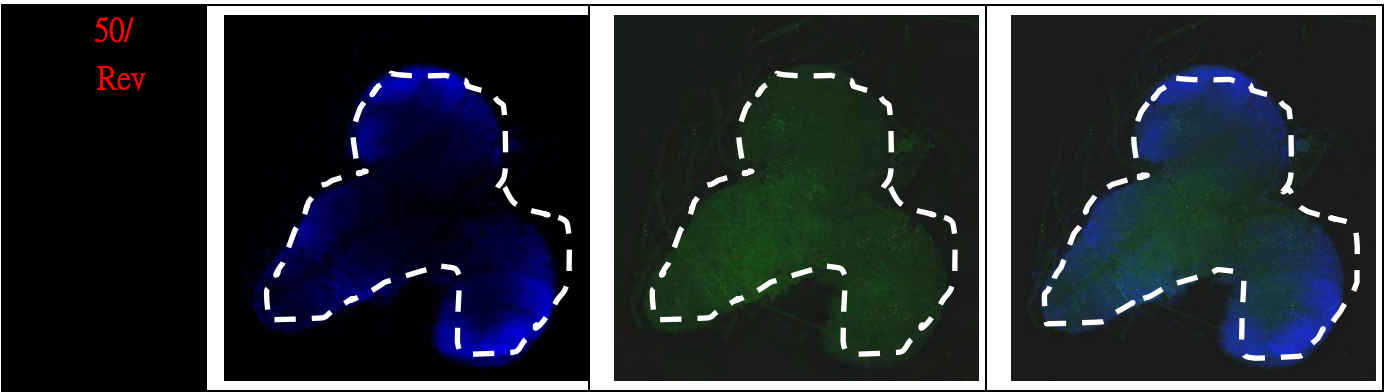
四、探討 Pterostilbene 與 Resveratrol 對於奈米銀造成的細胞凋亡作用之影響效果並比較

藉由實驗一可知在 50 $\mu\text{g/ml}$ AgNPs 細胞凋亡較 0 $\mu\text{g/ml}$ 明顯。根據表四、五、六結果可知，Pterostilbene 在 0 $\mu\text{g/ml}$ 和 50 $\mu\text{g/ml}$ AgNPs 中綠點都較其他三者少，表示 Pterostilbene 有抑制細胞凋亡的現象。而相較於 Resveratrol，Pterostilbene 綠點較 control 和酒精組減少的較不明顯，顯示出在抑制細胞凋亡作用方面 Pterostilbene 效果較 Resveratrol 來的佳。

表四、果蠅腦細胞之細胞凋亡結果

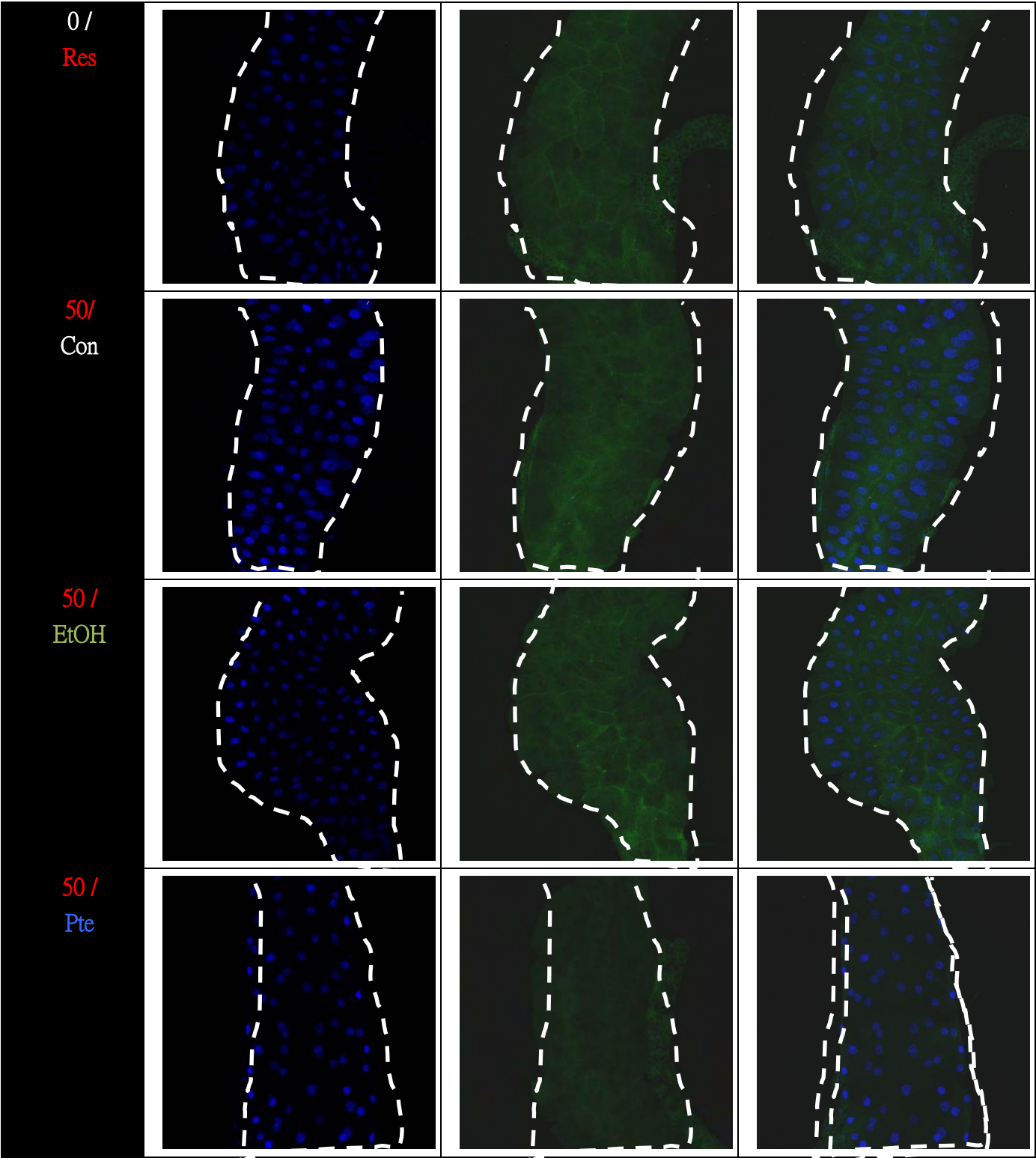


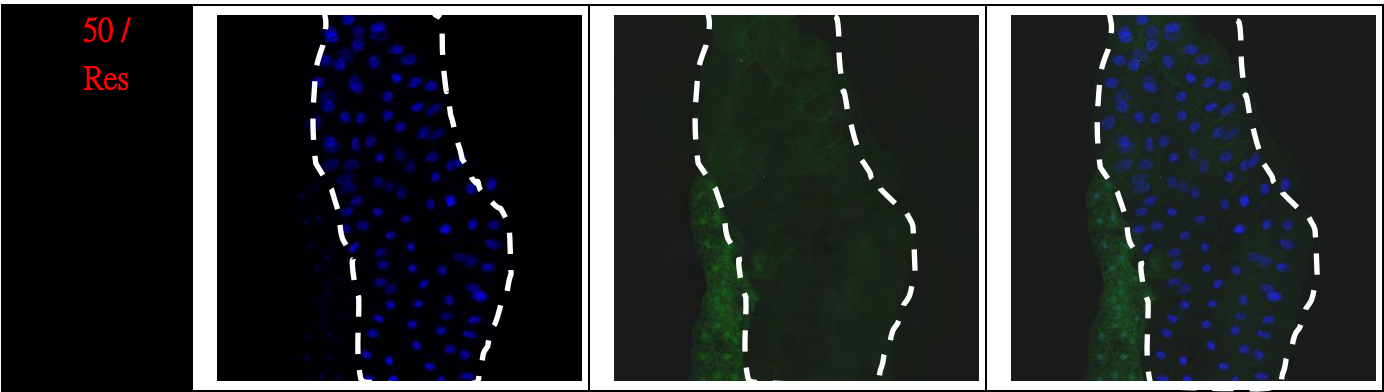




表五、果蠅唾腺細胞之細胞凋亡結果

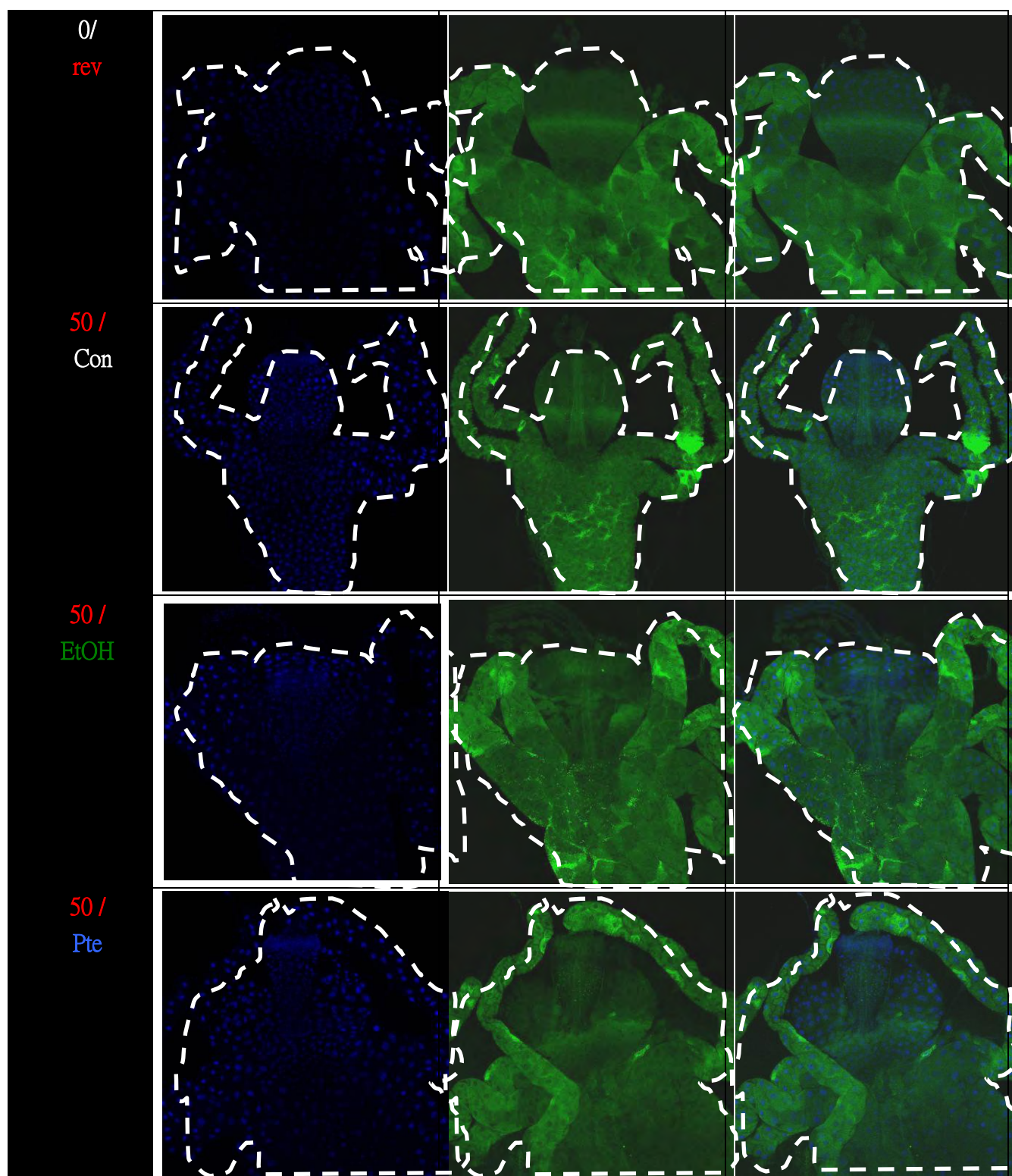
AgNPs/ 0/ Con	DAPI	Caspase 3	Merged
0/ EtOH			
0/ Pte			

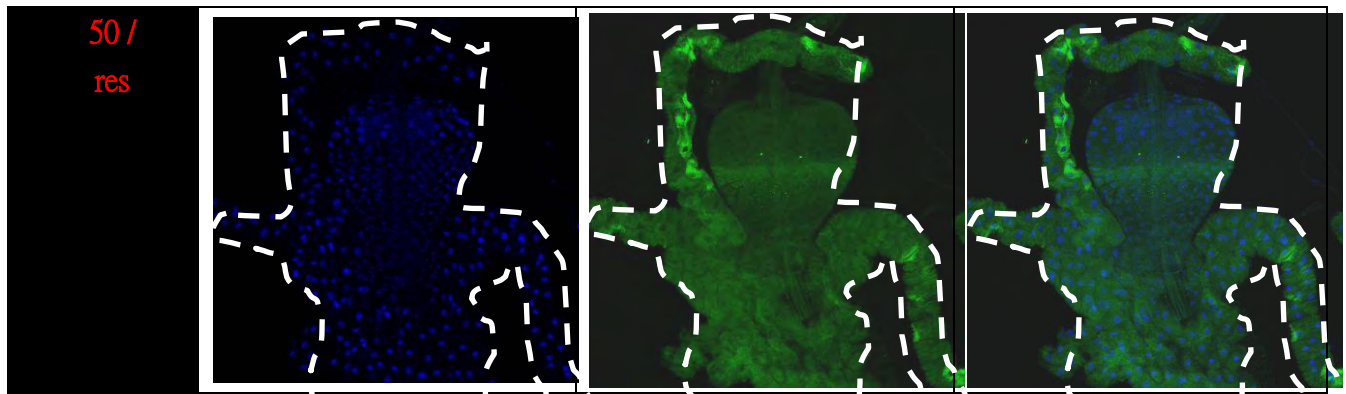




表六、果蠅腸細胞之細胞凋亡結果

AgNPs/ 0/ Con	DAPI	Caspase 3	Merged
0/ EtOH			
0/ Pte			





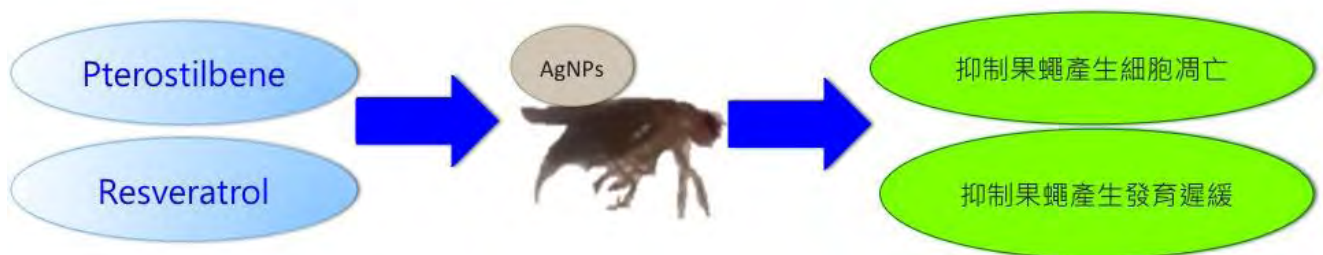
陸、研究討論

- 一、我們在實驗中使用「預防」模式作為暴露設定是因為我們以「預防勝於治療」為發展目標，希望此研究之結果能以「預防」的模式帶來幫助。
- 二、由文獻出處得知奈米銀的毒性機制主要為藉由氧化壓力 ROS，而造成細胞凋亡、DNA 損傷、壽命減短等現象，因此我們推測 Pterostilbene 及 Resveratrol 之所以能造成果蠅壽命延長及細胞凋亡減少是藉由減少氧化壓力的機制對抗。在本研究中我們只證實了 Pterostilbene 之作用較 Resveratrol 佳，因此我們希望在未來能更深入探討其原因。
- 三、由討論二，我們原推測 Pterostilbene(紫檀芪)和 Resveratrol(白藜蘆醇)之所以能抑制果蠅發育遲緩是因為兩化合物可有效活化果蠅中的抗氧化基因，進而造成以氧化途徑造成毒性的奈米銀作用受到抑制。但我們由 pcr 實驗中得知只有 Resveratrol 在抗氧化基因的表現有明顯上升趨勢，可知 Resveratrol 確實是藉由抗氧化途徑抑制奈米銀造成的發育遲緩;我們推測 Pterostilbene 之所以沒有造成抗氧化基因表現量上升可能是因為 Pterostilbene 並非經由抗氧化途徑產生抑制作用，或是 Pterostilbene 並非促進我們所選擇的四種抗氧化基因，是我們未來想再深入探討的問題。
- 四、我們推測在實驗過程中「以 20%蔗糖水溶液濃度梯度原理轉換果蠅幼蟲至其他環境」可能因人為操作而造成誤差，如何去改善這個實驗方法也是我們希望能繼續深入研究的。
- 五、由於在 pcr 實驗中發現 Pterostilbene 對於促發抗氧化基因表現無顯著效果，因此我們推測 Pterostilbene 也許不是藉抗氧化途徑抵抗奈米銀毒性，未來我們想由此為核心延伸研究。
- 六、我們由研究結果中發現暴露奈米銀的果蠅體色明顯較白，推測奈米銀可能抑制黑色素的產生。由文獻(出處)得知知黑色素的產生係與酪胺酸酶的活化有關，酪胺酸酶會形成多巴，而

多巴再轉換為 dopachrome 進而轉變為黑色素，推測奈米銀會與酪胺酸酶的活化中心銅離子進行競爭而影響黑色素的分泌。

柒、結論

- 一、根據第一部份的實驗，可再次得證前人的研究結果，使果蠅幼蟲的羽化率及壽命顯著下降，細胞凋亡亦增加，更觀察到會影響果蠅的體色，使果蠅體色變淡。
- 二、同時暴露奈米銀和 Pterostilbene(紫檀芪)或 Resveratrol(白藜蘆醇)的果蠅組別對照單暴露奈米銀的組別羽化率顯著提升、細胞凋亡減少，顯示兩化合物具有抑制奈米銀使果蠅發育遲緩的效果，且佐證 Pterostilbene(紫檀芪)抑制發育障礙的效果較 Resveratrol(白藜蘆醇)佳。
- 三、經實驗結果得知，Pterostilbene 和 resveratrol 皆可在活體果蠅模式上使 AgNPs 產生之毒性減緩。我們原推測兩化合物皆是經由抗氧化途徑去抑制奈米銀的作用，但只有 Resveratrol 在抗氧化基因的促進上有明顯上升的趨勢，顯示 Resveratrol 是經由抗氧化途徑抑制奈米銀作用。



捌、參考資料及其他

- 一、Common Fruit Fly Phenotypes. *Welcome to the Wonderful World of Fruit Flies*.
From: <http://www.unc.edu/~abcook18/flyphenotypes.html>
- 二、Genetics of the white Locus: An example chosen to illustrate the fundamental nature of dominance by relating genotype and phenotype. From: <http://www.indiana.edu/~oso/lessons/white.htm>
- 三、arrogantscientist(2009). The Genetics of Eye Color. *The Arrogant Scientist*. Retrieved Jan 29, 2009, from: <https://arrogantscientist.wordpress.com/2009/01/29/the-genetics-of-eye-colour/>
- 四、Izabela Sadowska-Bartosz and Grzegorz Bartosz(2014). Effect of Antioxidants Supplementation on Aging and Longevity. *Volume 2014, Article ID 404680, 1-17*. Retrieved Jan 14, 2014,

from: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/404860>

- 五、Hui-Yun Tsai, Chi-Tang Ho and Yu-Kuo Chen(2016).Biological actions and molecular effects of resveratrol, pterostilbene, and 3'-hydroxypterostilbene. *Journal of Food and Drug Analysis* 25(2017), 134-147. Retrieved May 11, 2016, from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2016.07.004>
- 六、Indus Biotech Private Ltd. Resveratrol complex and process for the preparation-Process for obtaining purified pterostilbene and methods of use thereof(2008). Patent application. Retrieved Jan 29, 2009.
- 七、Chang J, Rimando A, Pallas M, Camins A, etc. Low-dose Pterostilbene, but not resveratrol, is a potent neuromodulator in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2012 Sep, 33(9):2062-71. Retrieved Aug 15, 2011, from: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.08.015>
- 八、Josh Mitteldorf, Ph.D. Pterostilbene v.s Resveratrol. Pterostilbene.com.
From: <http://www.pterostilbene.com/pterostilbene-vs-resveratrol/>
- 九、Denise McCormack and David McFadden. A review of pterostilbene Antioxidant Activity and Disease Modification. *Oxid Med Cell Longev* 2013. Retrieved Apr 4, 2013,
from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3649683/>
- 十、李先寬、李赫宇等人。白藜蘆醇研究進展。《中草藥 Chinese Traditional and Herbal Drugs》第 47 卷 14 期。民 105 年 7 月。
取自: http://www.mingdao.edu.tw/mdhsp/biology/pdf/b_p9701.pdf
- 十一、吳佳穎(2008)。超臨界二氧化碳萃取虎杖中之白藜蘆醇。
取自: http://www.mingdao.edu.tw/mdhsp/biology/pdf/b_p9701.pdf
- 十二、郭順宇。漫談白藜蘆醇。《輔英醫訊 Vol 59. 11》。
取自: <http://info.fy.org.tw/59/P11-12.pdf>
- 十三、Deepika Vasudevan and Hyung Don Ryoo. Detection of Cell Death in *Drosophila* Tissues. *Methods Mol Biol.* 2016 ; 1419: 131 – 144. Retrieved May 14, 2016.
- 十四、Khushwant S.Bhullar, Basil P.Hubbard Khus. Lifespan and healthspan extension by resveratrol. *Biochim Biophys Acta.* Retrieved 2015.

【評語】 052608

1. 本作品發現高濃度奈米銀可能影響果蠅的發育，且誘發細胞凋亡。並發現加入紫檀芪(Pterostilbene)與白藜蘆醇(Resveratrol)能減緩奈米銀所導致的果蠅發育障礙，且奈米銀對果蠅所造成之毒性傷害亦有被保護的效果。但抗氧化基因表現的實驗中，卻發現只有加入 Resveratrol 的組別抗氧化基因表現量有明顯上升趨勢，值得後續深入探討。
2. 本作品研究動機與目標明確，研究架構與實驗設計嚴謹，報告寫作科學性佳。
3. 若能清楚說明果蠅幼蟲暴露奈米銀、Pterostilbene 與 Resveratrol 之方法，並進一步釐清奈米銀的最低危害濃度、Pterostilbene 與 Resveratrol 之最低有效劑量或濃度，將更具有環境毒理與功能性食品之應用性。

壹、研究動機

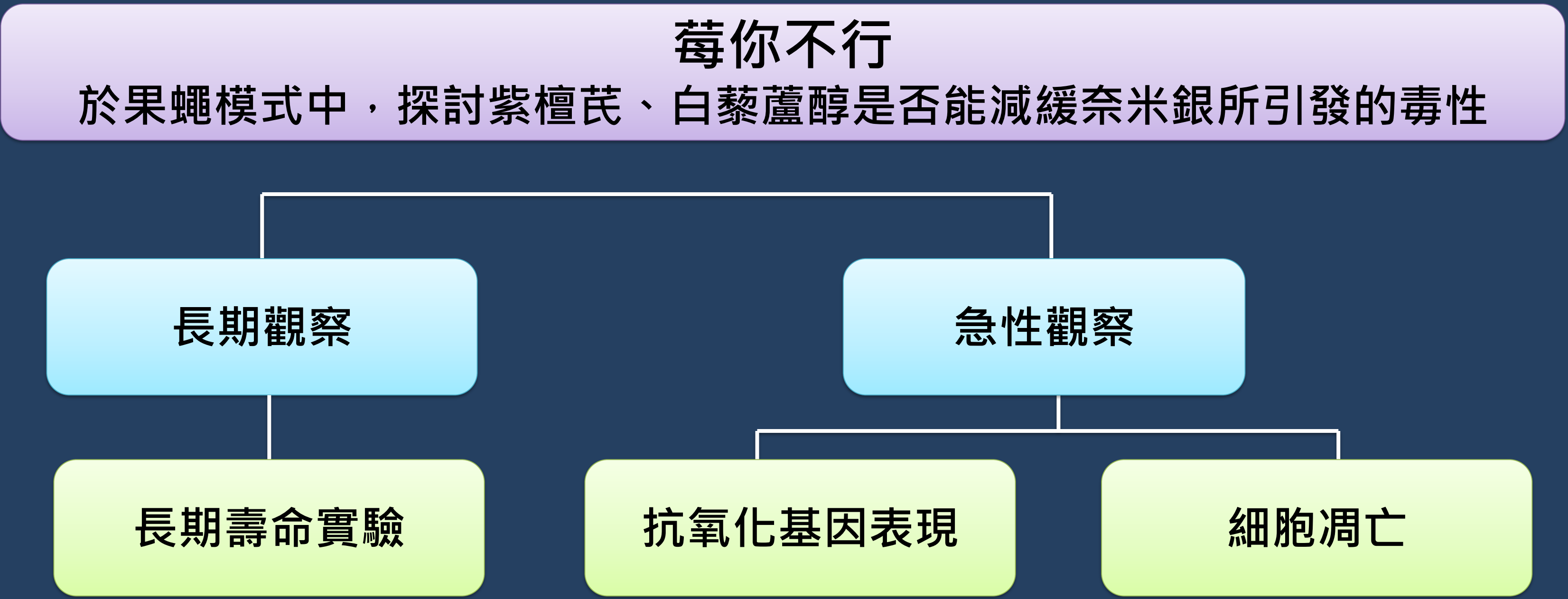
- 一、奈米銀因優異的抗菌能力及具有高度發展潛力可作為藥物載體，目前正被廣泛的應用及積極的開發，然而目前研究顯示，奈米銀粒子會引發細胞毒性，如誘導過量的氧化壓力、細胞凋亡，甚至導致個體死亡。
- 二、這使得我們對於奈米銀的使用存有疑慮，因此若我們可以在應用奈米銀的同時也可以透過健康的天然物來進行預防，這將有助於我們可以好好的使用奈米銀這樣良好的材料。
- 三、我們利用生活中常見的莓果類，如紫檀芪 (Pterostilbene , PT)、白藜蘆醇 (Resveratrol , RV) ，先前的研究中已知紫檀芪、白藜蘆醇會活化身體中主要的抗氧化路徑- Nrf2 路徑。
- 四、欲探討兩種化合物是否能減緩奈米銀所引發的細胞毒性。

貳、研究目的

- 一、探討奈米銀粒子於果蠅模式中是否導致急性毒性反應及減少壽命。
- 二、探討 PT與 RV 是否能**預防**奈米銀所導致的毒性及壽命的減短。
- 三、探討 PT 與 RV減緩奈米銀所導致的毒性是否是透過活化抗氧化基因表現。

參、研究過程或方法

- 一、研究架構：



- 二、實驗材料準備

(一)果蠅養殖 (二)研究過程食物製作 (三)將果蠅F2子代暴露於奈米銀

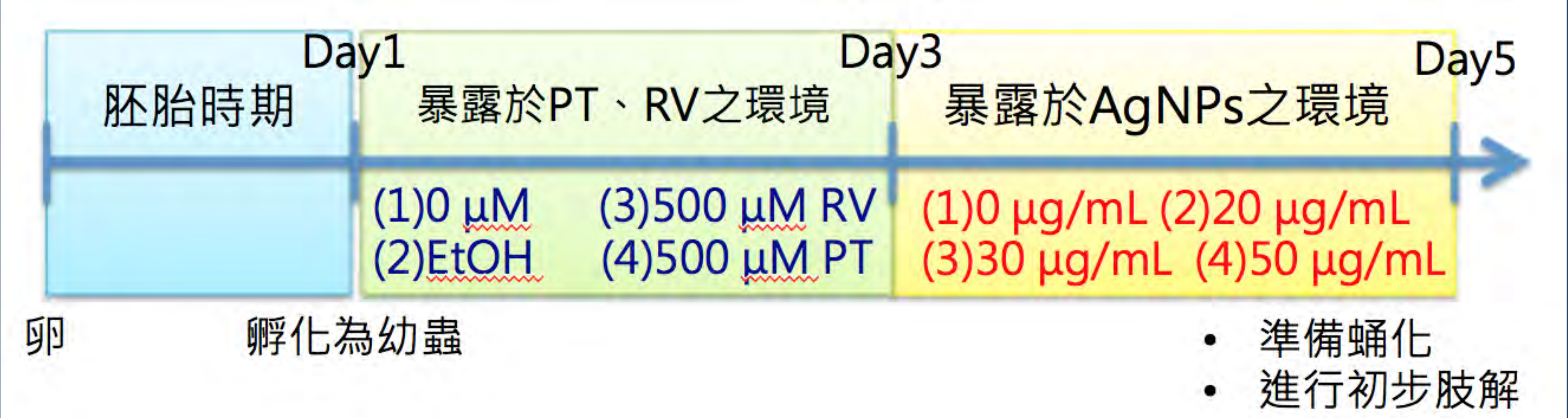
- 三、實驗

(一)探討奈米銀粒子於果蠅模式中是否導致急性毒性反應及減少壽命。

- 1.奈米銀對於果蠅蛹化率、羽化率之影響
- 2.長期觀察奈米銀對於果蠅壽命之影響
- 3.以免疫螢光染色方式(staining)觀察其細胞凋亡情形

(二)探討 PT與 RV 是否能預防奈米銀所導致的毒性及壽命的減短。

- 1.實驗時間軸:



- 2.實驗組別:

- (1) 0 μM + 0 μg/ml AgNPs
- (2) EtOH + 0 μg/ml AgNPs
- (3) 500 μM RV + 0 μg/ml AgNPs
- (4) 500 μM PT + 0 μg/ml AgNPs
- (5) 0 μM + 50μg/ml AgNPs
- (6) EtOH + 50μg/ml AgNPs
- (7) 500 μM PT + 50μg/ml AgNPs
- (8) 500 μM RV + 50μg/ml AgNPs

- 3. 不同濃度之RV、PT 配方、AgNPs對於果蠅蛹化率、羽化率之影響
- 4.長期觀察不同濃度之 RV、PT 配方、AgNPs對於果蠅壽命之影響(方法同前)
- 5.以免疫螢光染色方式觀察其細胞凋亡情形(方法同前)

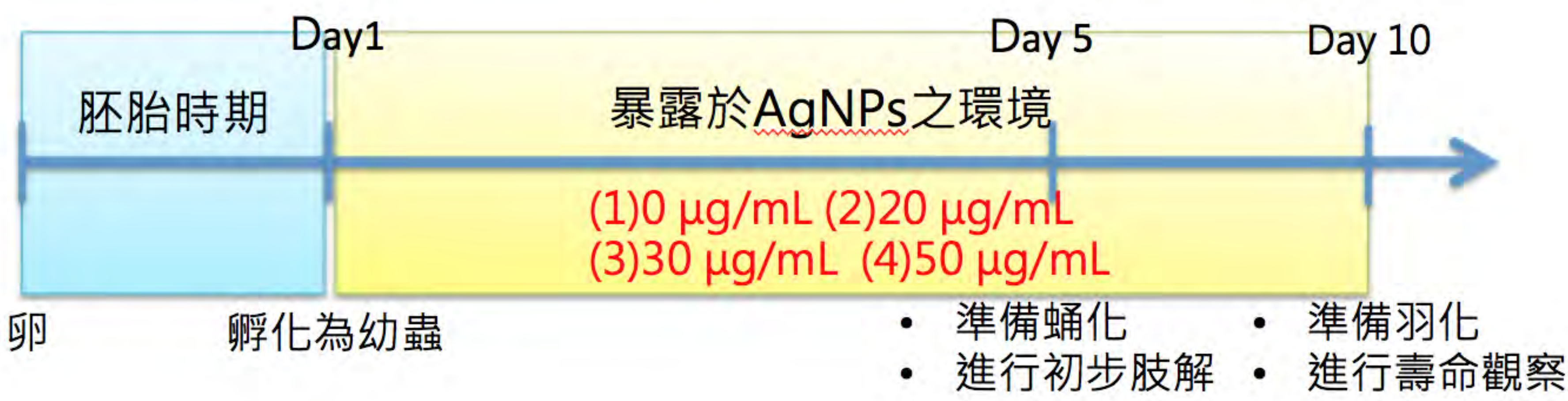
(三)探討 PT 與 RV減緩奈米銀所導致的毒性是否是透過活化抗氧化基因表現。

- 1.聚合酶鏈鎖反應Real-time PCR

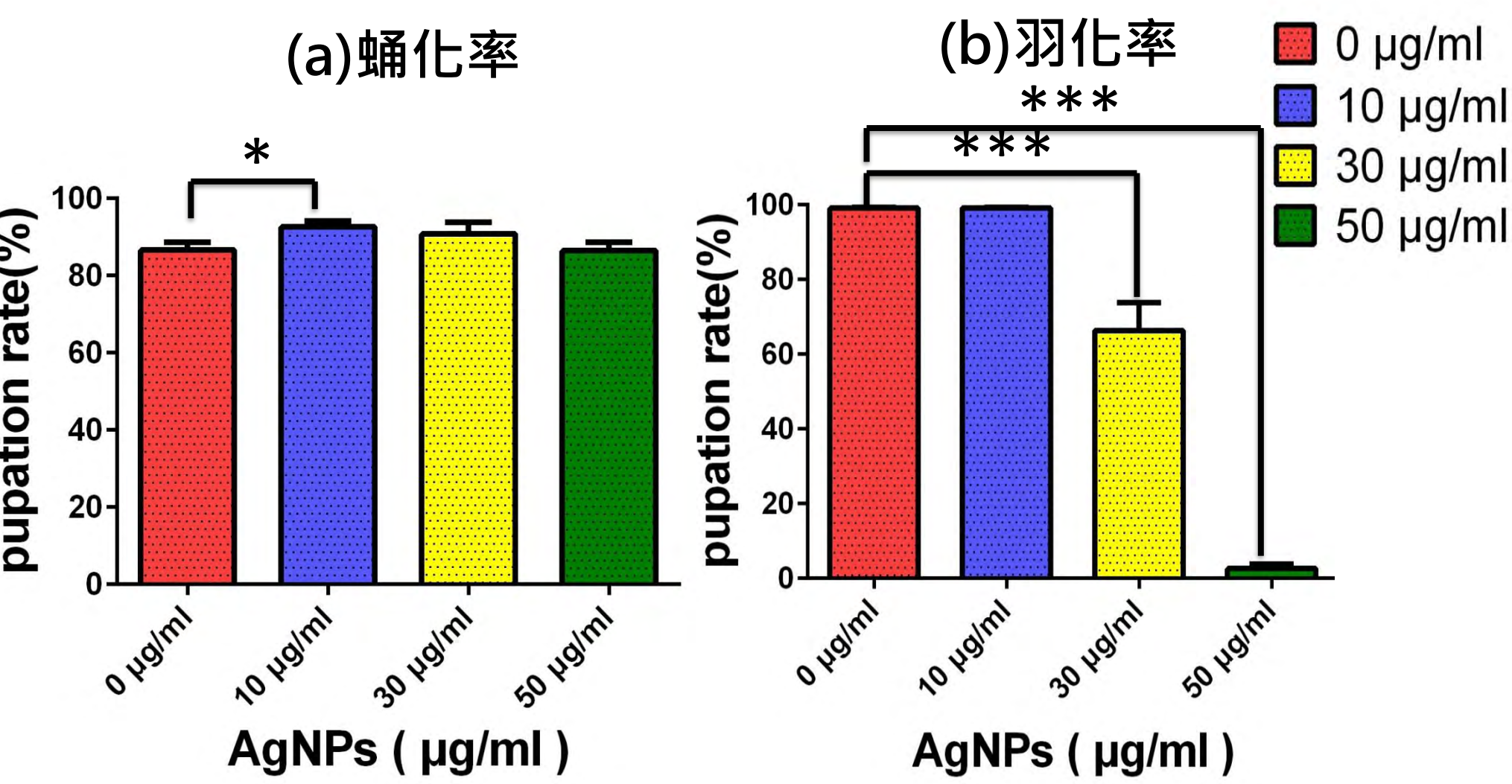
肆、研究結果

一、奈米銀粒子導致急性毒性反應及減少壽命。

(一)實驗時間軸

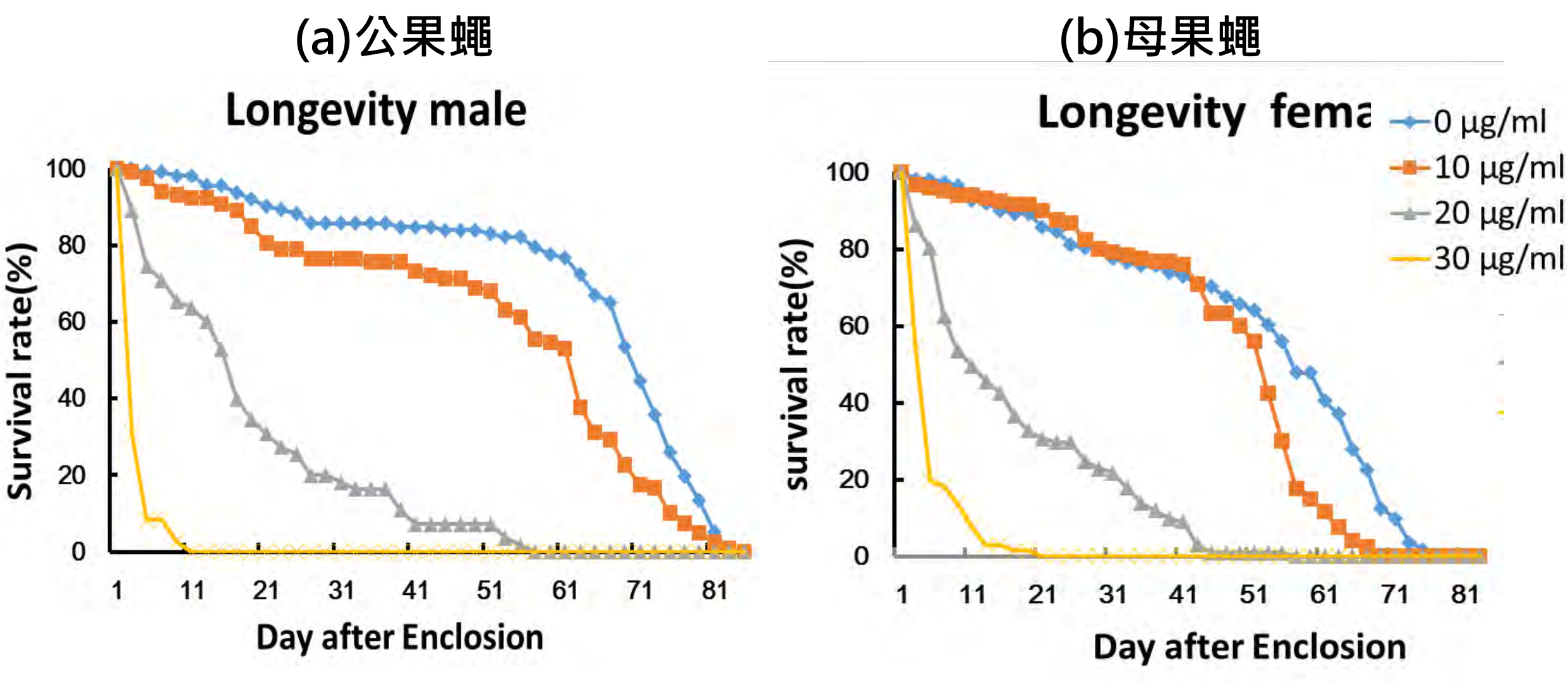


(二)奈米銀對於果蠅蛹化率、羽化率之影響



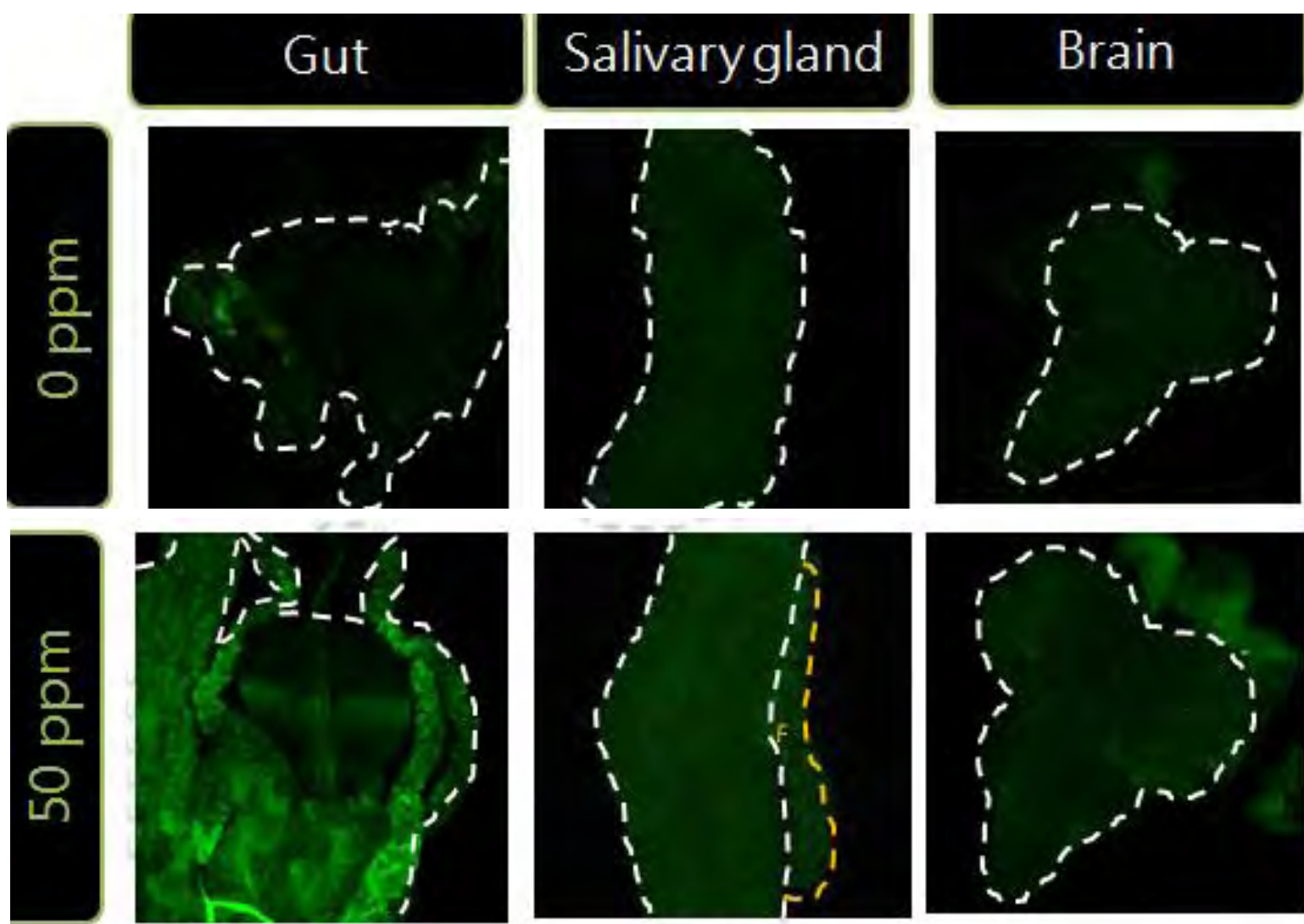
圖一、暴露於不同濃度奈米銀之果蠅蛹化、羽化率

(三)長期觀察奈米銀對於果蠅壽命之影響



圖二、暴露於不同濃度奈米銀之果蠅壽命

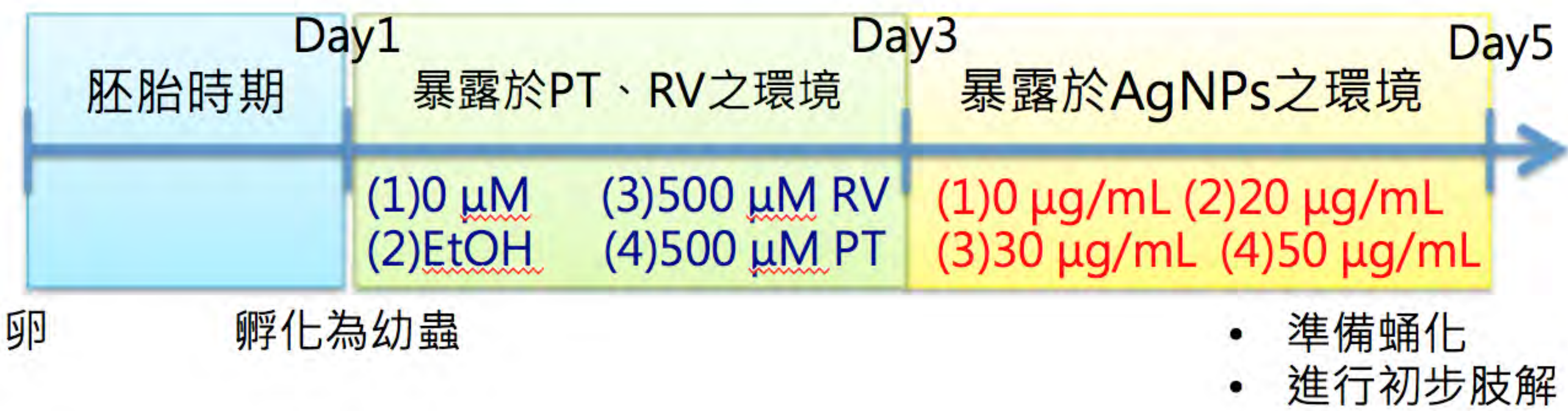
(四)以免疫螢光染色方式觀察暴露於奈米銀之細胞凋亡情形



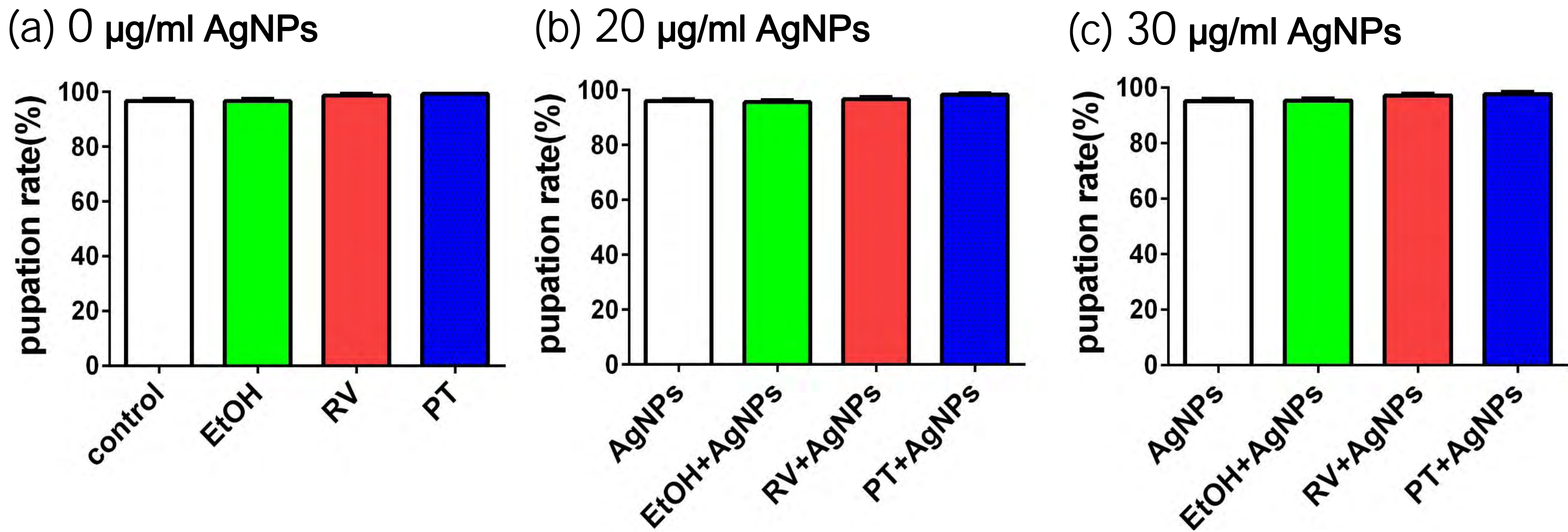
圖三、暴露於不同濃度奈米銀下的果蠅腦、唾腺、腸細胞之細胞凋亡情形

二、PT 與 RV 能預防奈米銀所導致的毒性及壽命的減短。

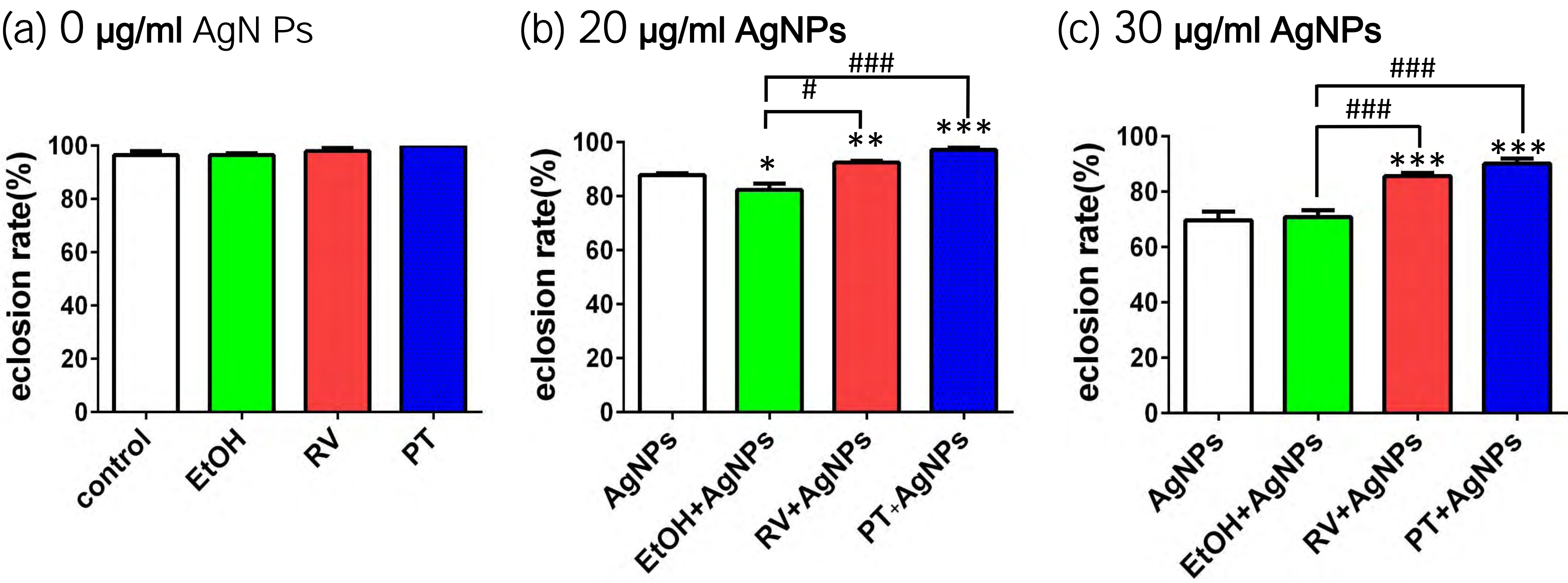
(一) 實驗時間軸



(二) PT 與 RV 能促使蛹化率、羽化率的回升

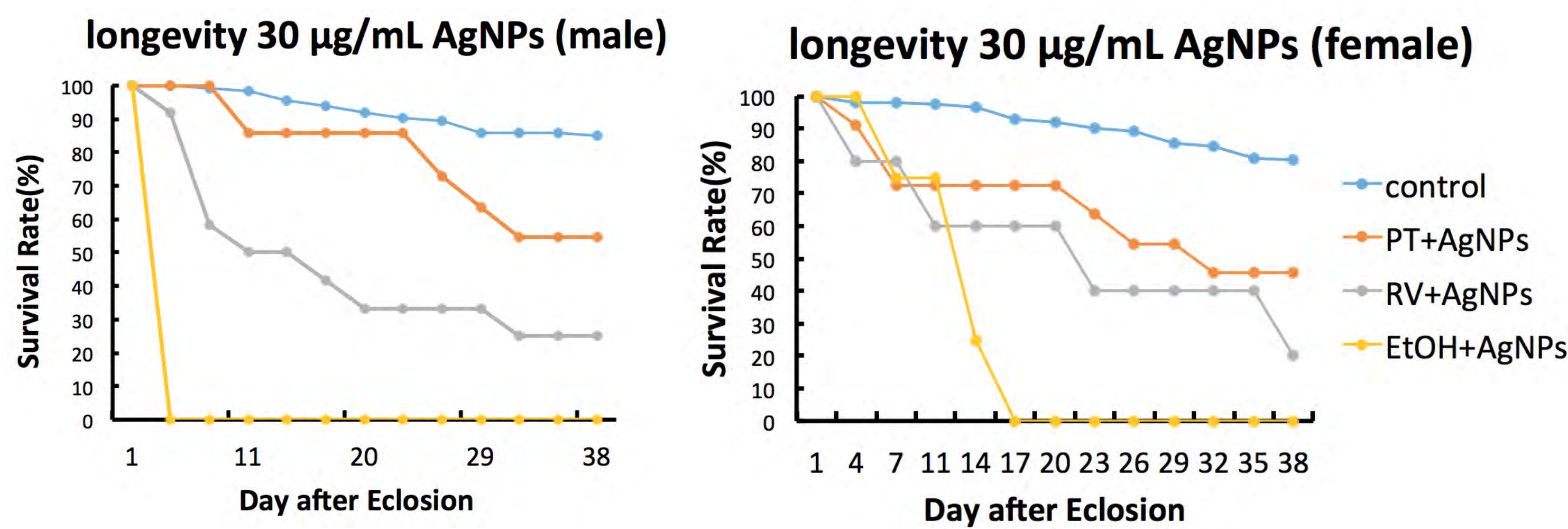


圖四、蛹化率



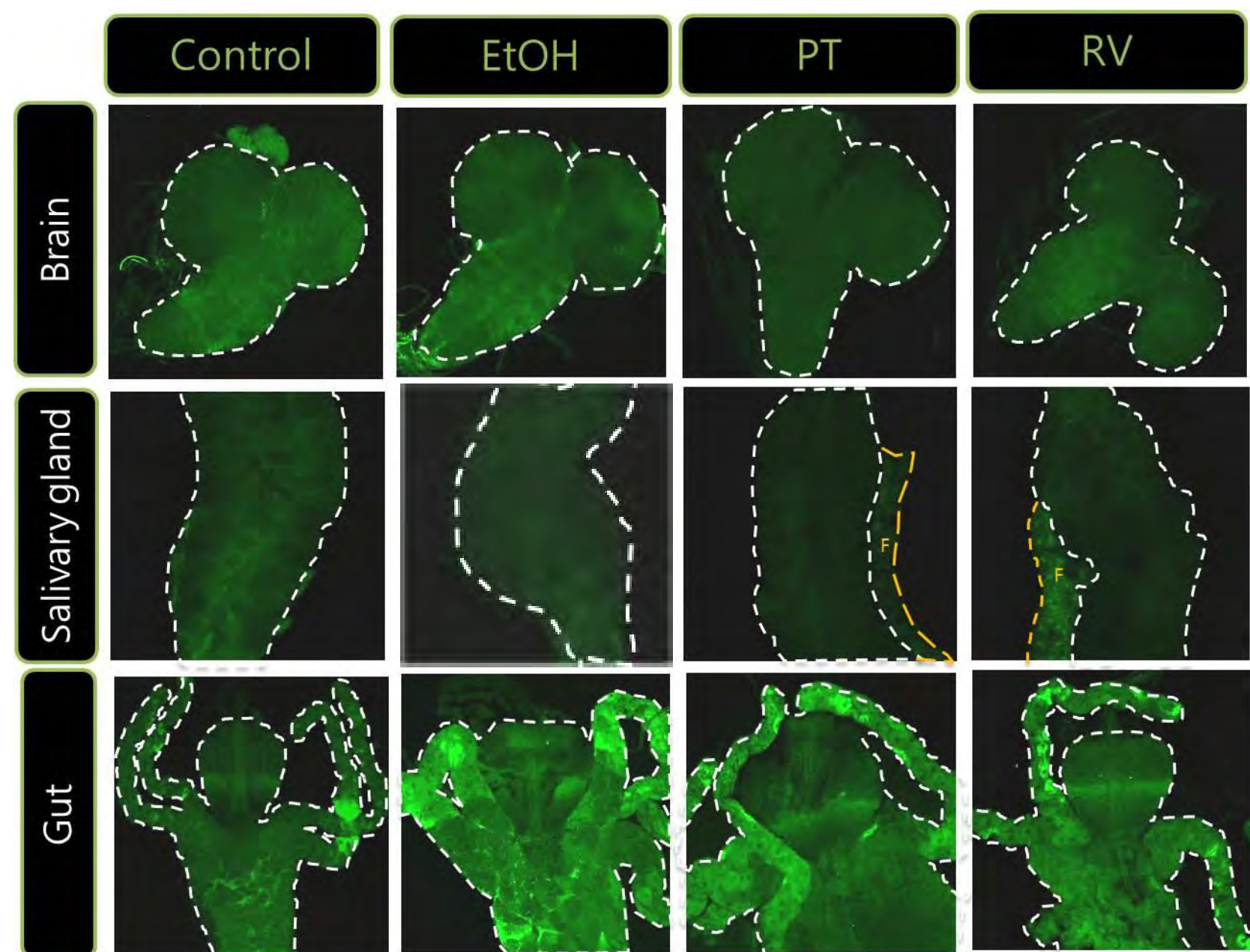
圖五、羽化率

(三)觀察PT 與 RV 能抑制暴露於30 µg/ml AgNPs果蠅壽命的減少



圖六、暴露於30µg/ml奈米銀且不同條件下的果蠅壽命

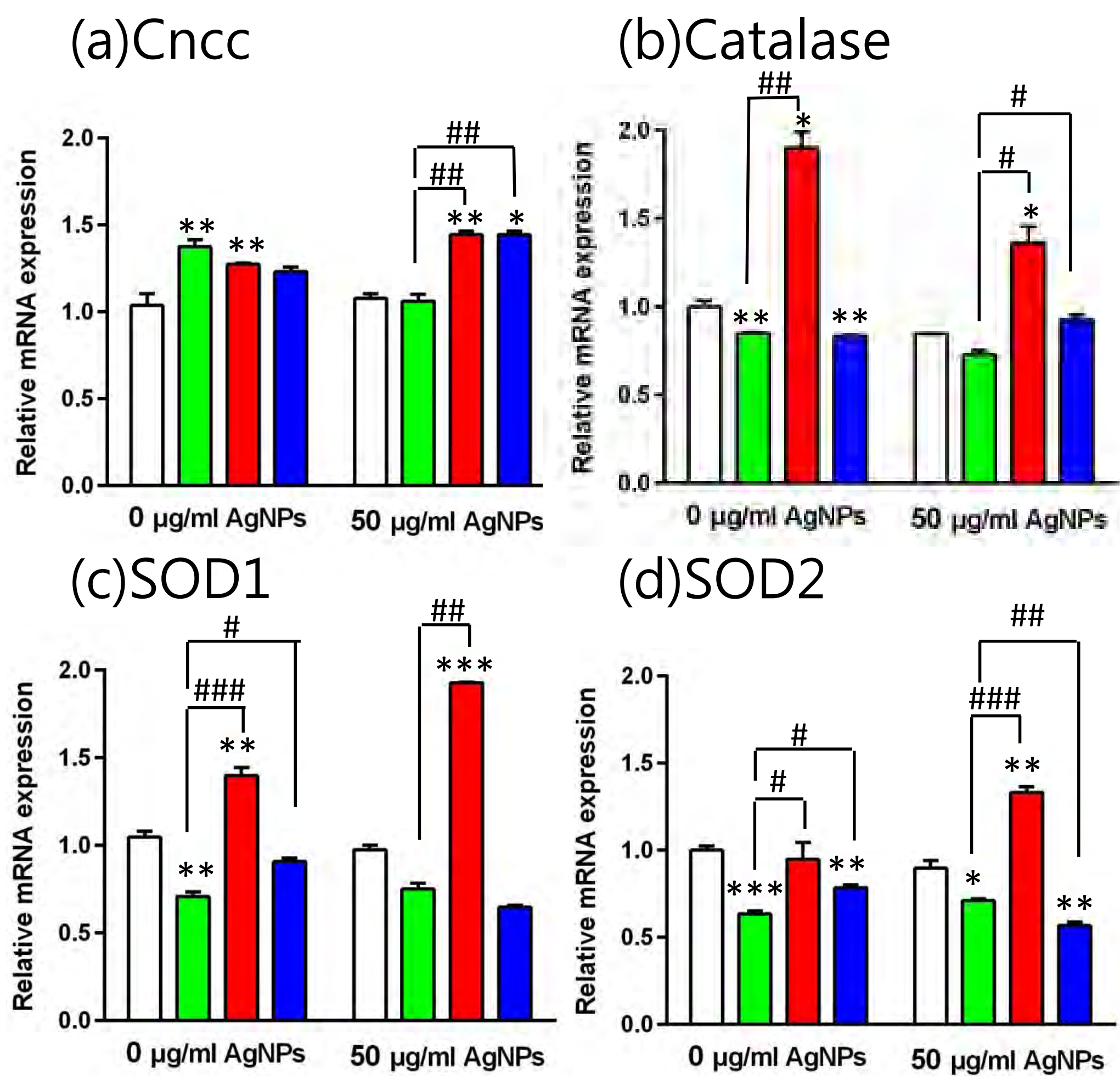
(四)PT 與 RV 會減緩奈米銀造成的細胞凋亡



圖七、暴露於50µg/ml奈米銀且不同條件下的果蠅各細胞之細胞凋亡情形

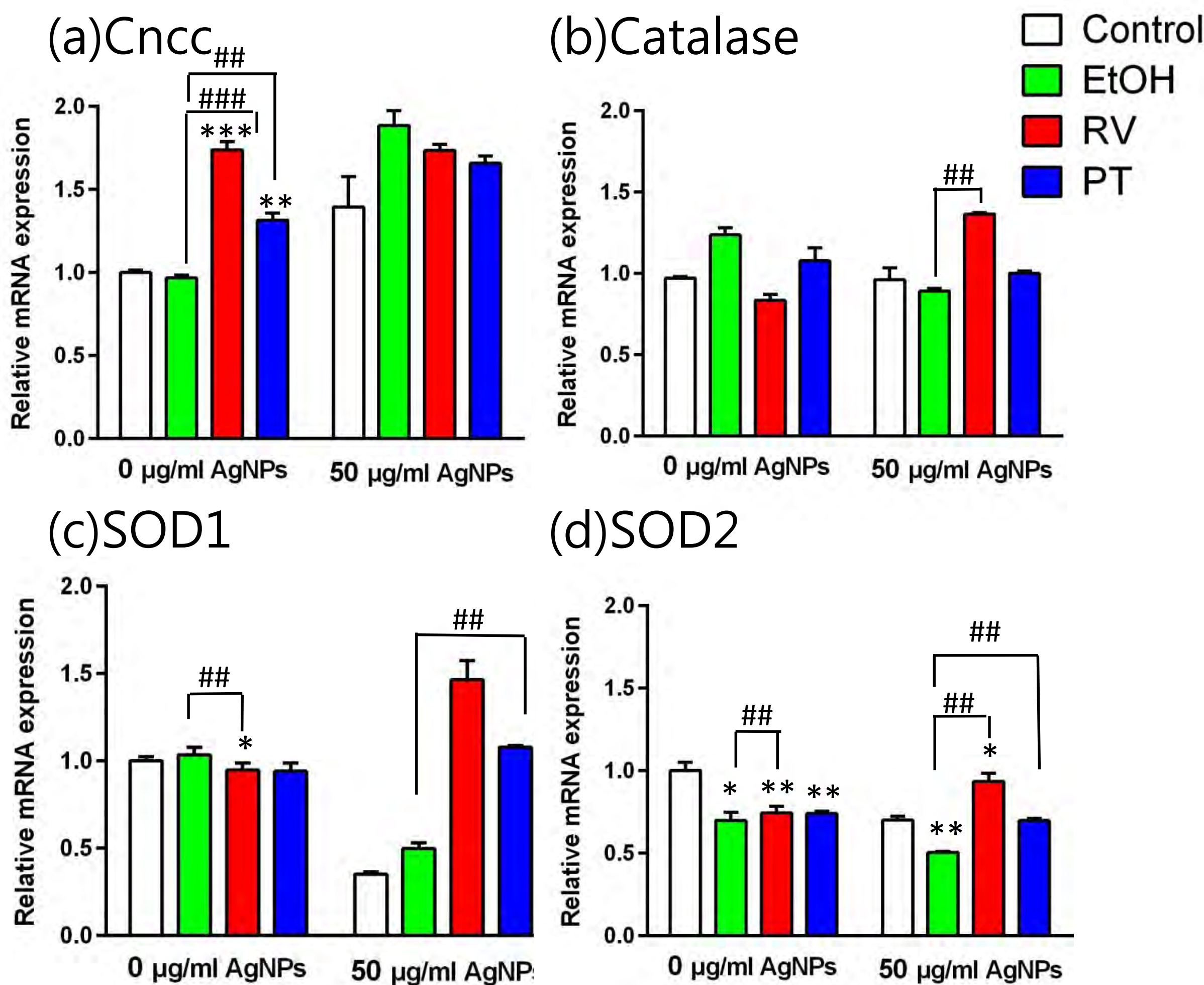
三、 RV 透過活化抗氧化基因表現減緩奈米銀所導致的毒性。

(一)公果蠅之實驗結果



圖八、公果蠅組別

(二)母果蠅之實驗結果



圖九、母果蠅組別

伍、研究討論

- 一、由文獻得知 PT、RV 會活化抗氧化路徑，因此我們推測 PT 及 RV 是藉由減少氧化壓力使得果蠅壽命延長及減少細胞凋亡的現象。在本研究中我們證實了 PT 之作用較 RV 佳，因此我們希望在未來能更深入探討其原因。
- 二、原推測 PT 和 RV 是透過活化抗氧化路徑來減緩奈米銀所導致的毒性，而於我們的研究中，RV 在抗氧化基因的表現有明顯上升趨勢，可知 RV 藉由抗氧化途徑抑制奈米銀造成的發育遲緩;我們推測 PT 之所以沒有造成抗氧化基因表現量上升可能是因為 PT 並非經由抗氧化途徑產生抑制作用，或是 PT 並非促進我們所選擇的四種抗氧化基因，是未來想再深入探討的問題。

陸、結論

- 一、奈米銀粒子於果蠅模式中誘發果蠅細胞毒性，並且誘發細胞凋亡現象。
- 二、同時暴露奈米銀和紫檀芪(Pterostilbene)或白藜蘆醇(Resveratrol)的果蠅組別對照單暴露奈米銀的組別羽化率顯著提升、細胞凋亡減少，顯示兩化合物具有減緩奈米銀細胞毒性的效果，且佐證 Pterstilbene 抑制細胞毒性的效果較 Resveratrol 佳。
- 三、經實驗結果得知，Pterostilbene 和 Resveratrol 皆可在活體果蠅模式上使AgNPs產生之毒性減緩。我們發現只有Resveratrol 在抗氧化基因的促進上有明顯上升的趨勢，顯示 Resveratrol 是經由抗氧化途徑抑制奈米銀作用。

