

探討蜂王乳對肝細胞株-Hep G2 抗氧化之保護效益

The Antioxidant Effects of Royal Jelly on the Hep G2 Liver Cell line

林文傑¹ Wen-Chieh Lin 施科念² Shih-Ko Nien
林育興³ Yu-Hsing Lin 鄭偉奇⁴ Wei-Chi Cheng
廖美華^{5*} May-Hua Liao

¹元培醫事科技大學 視光系

²元培醫事科技大學 醫學影像暨放射技術系

³元培醫事科技大學 護理系

⁴元培醫事科技大學 觀光系

⁵元培醫事科技大學 生物醫學工程系 *通訊作者

¹Department of optometry, Yuanpei University of Medical University

²Department of Medical Imaging and Radiological Technology, Yuanpei University of Medical University

³Department of nursing, Yuanpei University of Medical University

⁴Department of Tourism and Leisure Management, Yuanpei University of Medical University

⁵Department of Biomedical Engineering, Yuanpei University of Medical University

摘要：自由基帶來的氧化壓力，往往是導致人體慢性疾病之重要誘因，因此抗氧化已成為保健不可或缺的重要策略。民間常用蜂王乳具有青春永駐及延年益壽的保健作用，也具備逆轉氧化性傷害之潛力，然其抗氧化方式尚不清楚，有待進一步探討。本研究探討人類肝細胞株-HepG2受到氧化性傷害時，蜂王乳是否能提供保護效益，以及一步確認其保護效益是否與自由基清除效率相關。結果顯示，對肝細胞給予1 mM H₂O₂的氧化刺激，讓細胞存活率下降至57±8%；但氧化刺激同時給予細胞蜂王乳10 μg/ml之添加，細胞存活率卻可提升為79±6%(圖一)，並且將與氧化傷害組之細胞與蜂王乳添加組細胞比較，蜂王乳添加組細胞形態較趨近控制組細胞形態。由結果可知蜂王乳對肝細胞的氧化性傷害應具有保護效益，但檢測蜂王乳自由基清除效率卻發現蜂王乳清除自由基效率微弱，表示蜂王乳逆轉肝細胞氧化性傷害的機制可能是透過細胞修復或其它機制達成。

關鍵字：自由基 (free radical)，蜂王乳 (royal jelly)，氧化傷害 (oxidative damage)



Abstract : How to prevent free radicals from being oxidized is an important issue in healthcare since it has been hypothesized that some human illnesses or chronic diseases are exacerbated by the process of oxidation. One popular health supplement, Royal Jelly, has often been claimed to be beneficial to health and longevity, most likely because of its potential to reverse oxidative damage. It is unknown, as yet, how Royal Jelly produces this antioxidant effect and thus is an important area for investigation and research. The current study has been done to examine whether Royal Jelly is capable of offering protection to human a liver cell line, the Hep G2, and to investigate whether it may function as a free radical scavenger. The results show that when liver cells are oxidized by 1 mM of H_2O_2 cell viability is decreased to $57 \pm 8\%$; whereas cell viability is increased to $79 \pm 6\%$ (Figure 1) when cells are exposed to oxidation by a concentration of $10\mu g/ml$ of Royal Jelly. Moreover, when comparing the cells damaged by oxidation, the group of cells exposed to the concentration of Royal Jelly remain morphologically more similar to that of the control group. These results provide evidence in support of the claim that Royal Jelly can function to protect liver cells from oxidation although its ability to neutralize the free radicals was lower than expected. This would suggest that the mechanism Royal Jelly uses to reverse oxidative cell damage might be more effective by using other approaches.

Key Words: Free radicals, royal jelly, oxidative damage

1. 背景介紹

人體之疾病、老化與氧化壓力密切相關，氧化壓力來自於人體生化反應產生的自由基，自由基在體內的含量取決於氧化物與抗氧化物兩項因素間的平衡，生物體內常見的抗氧化物可幫忙清除自由基，包括超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、過氧化氫酶 (catalase, CAT)及穀胱甘肽轉移酶 (glutathione- S-transferase, GST)。正常情況下，細胞生化反應產生的自由基可由體內抗氧化物除去，但是當身體受到外來毒素或器官病變使自由基產量超過負荷時，抗氧化物質含量將不足以除去自由基，而引起「自由基連鎖反應」而產生更多的自由基，自由基易搶奪人體內蛋白質、碳水化合物或脂質等物質的電子，使得這些有機化合物構造改變而失去正常的生理功能，長期由自由基引發的氧化壓力將導致多種慢性疾病(Jagetia, 2004)。因此抗氧化已是促進保健不可或缺的重要策略。

現已知除了人體本身具備消弭自由基的抗氧化物之外，許多天然物也含有相當的抗氧化物質。相傳民間常用保健聖品-蜂王乳(royal jelly)，有青春永駐及延年益壽的效用，近年有少數文獻披露蜂王乳可能具有逆轉氧化性傷害的潛力(Li,2013)。蜂王乳是蜜蜂族群飼養蜂王的珍貴物品，其外觀如奶油狀，略帶酸辣味，蜂王每日食用蜂王乳，不僅使其保有高產卵(1500-2000粒/天)能力，也讓蜂王壽命比一般工蜂長達20倍。基於蜂王乳的養生奇效，近年科學界逐一驗證其內含成分。蜂王乳內含成分十分豐富，它包含了RJP、維生素B群、微量元素及多種胺基酸如癸烯酸(Decenoic Acid)、肌醇(Inositol)、乙醯膽鹼(Acetyl-choline)、甲硫胺酸(Methionine)、離胺酸(Lysine)、纈胺酸(Valine)……等。隨著蜂王乳成分一一被分析出來後，許多研究開始進一步探討蜂王乳的生理或藥理活性機轉，蜂王乳逐漸由食品的地位提升為醫藥之輔劑。Han(2014)研究指出蜂王乳的多種蜂王乳蛋白質(royal jelly protein, RJP)具抗菌效果；Kashima (2014)觀察到RJP-1可能是對人體產



生降血脂的重要物質；Watanabe(2013) 嘗試將蜂王乳作為化學藥物(5-FU)治療患者的保健劑，動物模式顯示含有蜂王乳貼片顯著改善因5-FU引起之口腔潰爛傷口。另外，在肝臟保護研究也顯示，食用蜂王乳也能防止免疫抑制劑-azathioprine在老鼠身上引發之肝臟傷害，蜂王乳防止該藥物引起老鼠血清肝指數的升高及脂肪氧化現象。Ferreira(2013)則在魚的動物實驗中，證實蜂王乳能逆轉fungicide tebuconazole在魚的肝、腎及腦組織所誘發之氧化性傷害。

前述 這些研究充分說明蜂王乳對氧化性傷害的改善潛力，可惜尚無法釐清蜂王乳對氧化性傷害之保護機制，是透過促進組織修復，或是透過消除自由基的作用來達成其保護作用。本研究中，我們希望能針對人類肝細胞株-HepG2受到氧化性傷害時，蜂王乳是否能提供良好之保護效益，並確認其效益與自由基之清除效率是否直接相關。

2. 材料與方法

2.1 化學藥品

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH,Sigma) , Vit C(Sigma) , DMEM (Invitrogen) , 胎牛血清 (Invitrogen) , H₂O₂(Sigma) , Dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma) , tetrazolium salt 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma) , 蜂王乳(千花育公司) , 蜂王乳/樟芝之混合物(千花育公司)。

2.2 蜂王乳清除自由基之檢測

這項檢測方式依據Gyamfi (1999)的DPPH分析方法，其程序是分別將維他命C (Vit C) 亟待測樣品與定量的自由基(1,1-diphenyl-2- picrylhydrazyl,DPPH)混合均勻後，避光反應30分鐘後，再將反應溶液在517 nm的波長下量測其吸光值，將吸光值與控制組(加入DPPH但無蜂王乳)之吸光值比較，即能得到各項物質清除DPPH效率。Vit C的清除效率是測試樣品對自由基清除能力的參考指標。自由基清除率計算方式如下：

DPPH 自由基清除率 (%) = $\frac{[\text{未加樣品吸光值} - \text{試樣去除本身與清DPPH吸光值}]}{[\text{未加樣品吸光值}]} \times 100\%$

2.3 細胞培養

HepG2為購自ATCC的人類肝細胞株。細胞以DMEM培養液添加10%胎牛血清及抗生素，在5%CO₂及37°C的條件下培養。

2.4 抗氧化試驗

將H₂O₂ 添加至細胞培養液中，來產生對細胞的氧化性傷害。H₂O₂ 俗稱雙氧水會引起細胞內粒線體內鈉離子過度負荷，接著引起cytochrome c(細胞色素 C)的釋放以及caspase-3 的活化，cytochrome c及caspase-3 的活化會引發一連串細胞凋亡反應。

抗氧化實驗進行時，細胞給與蜂王乳或蜂王乳/樟芝後，立即加入 1 mM H₂O₂ 的氧化性刺激；



經過24小時收取細胞，接著將細胞形態變化以顯微鏡觀察及記錄，並以細胞增殖活性(MTT)試驗進行細胞存活性分析，及。以細胞形態及細胞存活比例的比較結果，用於評估蜂王乳及蜂王乳/樟芝是否具有對氧化性傷害具有保護作用。

2.5 細胞增殖活性(MTT assay)檢測

MTT assay是最常用於評估細胞生長活之測試，其原理為MTT(Sigma)這種藥物，以5mg/ml MTT給藥，讓細胞進行吞噬MTT 3小時，MTT可以被活細胞吞入被其內含之粒線體中的脫氫酶，還原生成結晶狀的深紫色產物formazan。再利用DMSO把前述細胞溶解，可將深紫色產物formazan完全釋出，再利用570nm測定其吸光值，若吸光值愈強，則表示被測試之活細胞數愈多，細胞增殖活性愈好。

2.6 統計分析

所有的實驗數據都是以三次實驗結果的平均值± S.E.M.表示，各組實驗值之顯著性比較則以one-way ANOVA 方式表示，圖形上的顯著性以 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 表示之。

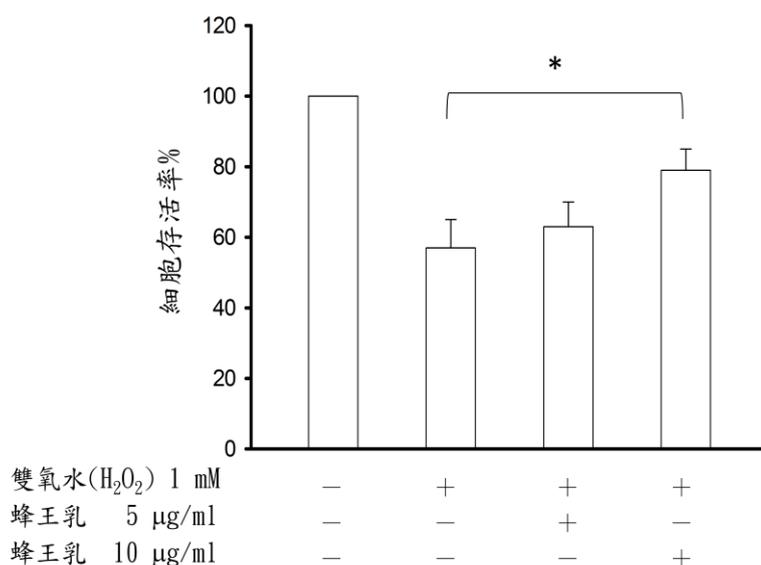
3. 結果與討論

3.1 蜂王乳對氧化性傷害的保護效益

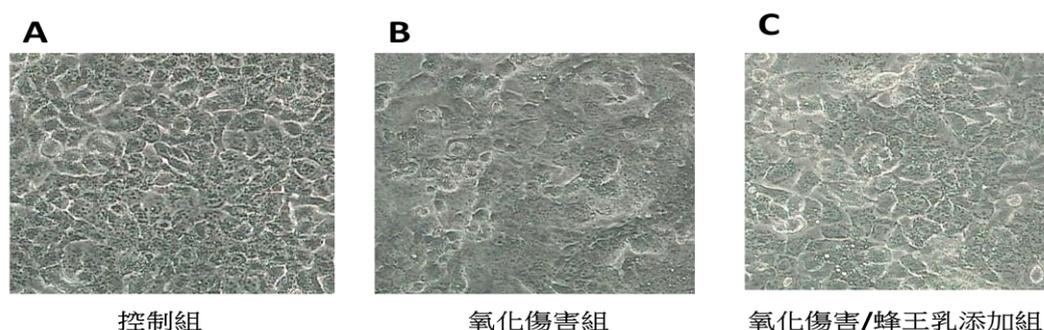
在此實驗中，以 H_2O_2 作為氧化性傷害之刺激劑，比較細胞添加蜂王乳與否，其對細胞抵抗氧化性傷害之差異性。實驗條件及結果依組別為：

控制組:本研究中以未給予任何處理之細胞為控制組別，並將其細胞存活率當作100%(圖一)，並且拍攝其細胞型態作為其它處理組別對照之用，細胞輪廓清晰(圖二A)。**氧化傷害組:**接受 H_2O_2 刺激的細胞組別為氧化傷害組。將細胞給予0.5 mM H_2O_2 刺激24 小時後，細胞並無明顯死亡，但會出現脹大的細胞形態(此數據未顯示於此處，僅列在實驗室紀錄)。但給予1 mM H_2O_2 刺激24 小時後， H_2O_2 會對細胞造成氧化性傷害，部分細胞死亡。與控制組細胞存活率比較，其存活率下降 $57 \pm 8\%$ (圖一)，並且細胞型態觀察亦可見許多細胞的輪廓邊界模糊或消失(圖二B)，也顯示出細胞因氧化傷害而死亡的現象。**氧化傷害/蜂王乳添加組:**細胞接受1 mM H_2O_2 刺激24 小時期間，在此時期內添加蜂王乳5及 $10 \mu g/ml$ 至細胞培養液。結果顯示，細胞存活率在 $10 \mu g/ml$ 添加組別，可顯著提高為 $79 \pm 6\%$ (圖一)，表示蜂王乳 $10 \mu g/ml$ 之添加劑量地逆轉細胞之氧化性傷害，可讓被氧化刺激細胞的存活率提升約22%。除此之外，將有添加 $10 \mu g/ml$ 蜂王乳的細胞組別與氧化傷害組之細胞形態比較，氧化傷害組細胞邊界模糊或消失，但蜂王乳添加組細胞型態則較趨近控制組織細胞形態(圖二)。因此由細胞活性及細胞形態的比較結果，可知蜂王乳對肝細胞的氧化性傷害應具有保護效益。





圖一、細胞以 MTT 試驗檢測各組細胞存活率之變化。



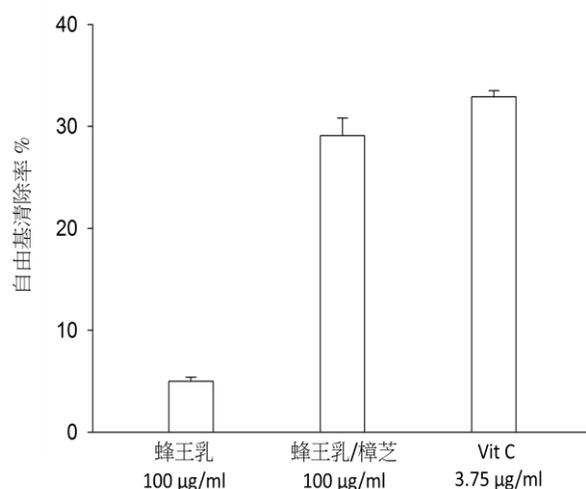
圖二、細胞形態以光學顯微鏡100X拍攝其影像。**控制組**:未接受任何刺激之細胞，**氧化傷害組**:接受1 mM H₂O₂ 24 小時之細胞，**氧化傷害/蜂王乳添加組**:同時接受1 mM H₂O₂及蜂王乳10 µg/ml 24 小時之細胞。

3.2 蜂王乳的抗氧化能力與清除自由基機制無關

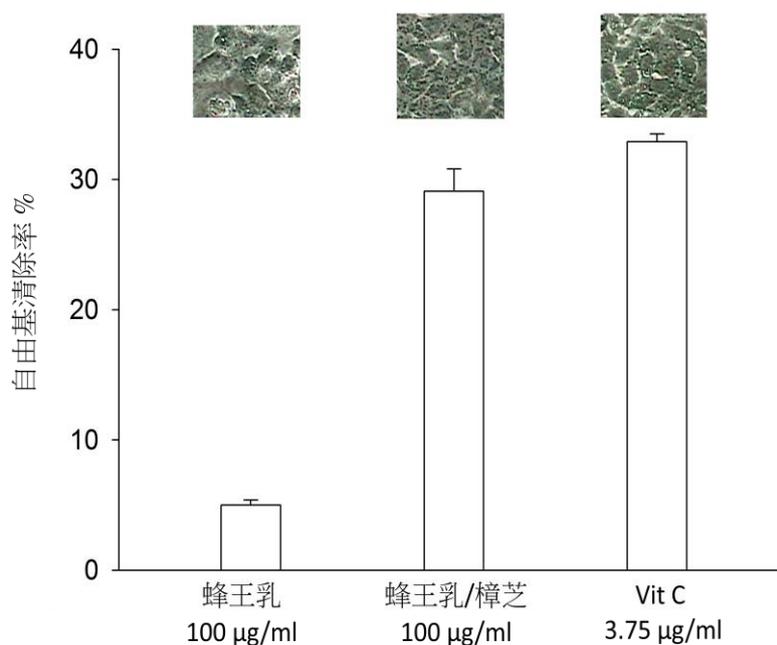
已知保護細胞受到自由基傷害的方式，可利用自由基清除劑或是提高細胞的修復能力兩種途徑達成。為確定蜂王乳的抗氧化之保護作用係透過何途徑，首先測試蜂王乳的自由基清除能力。本研究以DPPH檢測方法作為蜂王乳自由基清除能力之測試，測試結果以Vit C自由基清除率作為比對標準，其中蜂王乳的自由基清除能力微弱，每100 µg蜂王乳僅相當於1.4±0.1 µg 的Vit C(圖三)，顯示蜂王乳對細胞氧化之保護作用，與清除自由基效率應無密切相關性；接著我們將具有清除自由基能力的樟芝(*Antrodia cinnamomea*)(Wu, 2011)萃取物與蜂王乳混合(蜂王乳/樟芝)，



兩者混合比例為1:1，其自由由基清除能力則相當於 $3.5 \pm 0.3 \mu\text{g}$ 的Vit C，其清除自由基效率是蜂王乳本身的2.45倍；接著比較蜂王乳與蜂王乳/樟芝混合物進行細胞抗氧化試驗。結果如圖四顯示，若測試對氧化性傷害的作用，以接受氧化(H_2O_2 1mM)刺激之細胞存活率為100%，蜂王乳/樟芝 $5 \mu\text{g/ml}$ 添加組別對細胞活率之提升($46 \pm 5\%$)亦高於蜂王乳 $10 \mu\text{g/ml}$ 添加組($37 \pm 8\%$)。此外，由細胞形態的變化判斷亦顯示蜂王乳/樟芝 $5 \mu\text{g/ml}$ 添加組細胞型態，較蜂王乳 $10 \mu\text{g/ml}$ 添加組更趨近控制組之細胞形態(圖五)。



圖三、比較添加蜂王乳與添加蜂王乳/樟芝混合物清除自由基之效率。以 Vit C 之自由基清除率為其比對標準。



圖四、比較添加蜂王乳與添加蜂王乳/樟芝混合物對細胞氧化刺激之保護效率。

4. 討論



我們選取人類肝細胞株為實驗對象，以添加H₂O₂誘發肝細胞氧化傷害的模式下，用於確認蜂王乳的逆轉肝細胞氧化性傷害效益，以及釐清蜂王乳的抗氧化性傷害是否與其清除自由基能力相關。雖然Nakajima(2009)及Kuwabara(1996)等研究，測得蜂王乳具備高效能自由基清除能力，但因其測試之蜂王乳為高濃度，與本研究施於細胞抗氧化之濃度相差千百倍，本研究顯示蜂王乳對肝細胞氧化性傷害之保護效益，其有效濃度僅為10 μ g/ml，而加入具清除自由基的樟芝萃取物混合後，以混合比例計算可知蜂王乳/樟芝內含之蜂王乳含量為2.5 μ g/ml，即能達到超過10 μ g/ml蜂王乳之保護效益。由這些證據顯示，蜂王乳的氧化傷害之保護作用與清除自由基的機制相關性微弱。

現有許多研究也指出蜂王乳對組織細胞的抗氧化作用並非完全透過清除自由基的機制，與，例如：Watanabe(2013)在蜂王乳對口腔發炎的研究中即指出，蜂王乳可顯著降低發炎激素包括：TNF- α 、IL-1及 IL-6之釋放，顯示其抗發炎效率卓著，這對受損細胞之修復有促進效益。另外，最新的蜂王乳抗氧化研究由Honda (2015)提出，他們的團隊證實蜂王乳的脂性主成分10-Hydroxy-2-decenoic acid(10-HAD)，可防止秀麗隱桿線蟲(*Caenorhabditis elegans*)受到巴拉刈的氧化性傷害，其抗氧化機制也非透過清除自由基的機制，而是透過TOR (target of rapamycin)訊息途徑

綜合本研究實驗數據及現有報導文獻推論，蜂王乳對肝細胞氧化性傷害應具有保護作用，但其機制與清除自由基效率相關性微弱，其保護作用應可透過其它機制達成，如抑制免疫引發發炎反應或是提高細胞修能力來達成，其精確的保護機制也是本研究未來需努力探討的重要方向。

參考文獻

- [1] Ferreira, D., Rocha, H. C., Kreutz, L. C., Loro, V. L., Marqueze, A., Koakoski, G., da Rosa, J. G., Gusso, D., Oliveira, T. A., de Abreu, M. S., Barcellos, L. J. 『Bee products prevent agrichemical-induced oxidative damage in fish』 PLoS One., Vol. 8, No. 10, 2013, pp.74499-74510.
- [2] Gyamfi, M. A., Yonamine, M., Aniya, Y 『Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana *Thonningia sanguinea* on experimentally-induce liver injuries』Gen. Pharmacol, Vol. 32, 1999, pp.661-667.
- [3] Jagetia, G. C., Reddy, T. K., Venkatesha, V. A., Kedlaya, R.. 『Influence of naringin on ferric iron induced oxidative damage in vitro』 Clinica Chimica Acta, Vol. 347, No. 1-2, 2004, pp. 189-197.
- [4] Han, B., Fang, Y., Feng, M., Lu, X., Huo, X., Meng, L., Wu, B., Li, J. 『In-depth Phosphoproteomic Analysis of Royal Jelly Derived from Western and Eastern Honeybee Species』 J Proteome Res, Vol. 13, No. 12, 2014, pp.5928-5943.
- [5] Honda, Y., Araki, Y., Hata, T., Ichihara, K., Ito, M., Tanaka, M., Honda, S. 『10-Hydroxy-2-decenoic Acid, the Major Lipid Component of Royal Jelly, Extends the Lifespan of *Caenorhabditis elegans* through Dietary Restriction and Target of Rapamycin Signaling』 J Aging Res, Vol. 2015, 2015, pp.425261-425268.
- [6] Kashima, Y., Kanematsu, S., Asai, S., Kusada, M., Watanabe, S., Kawashima, T., Nakamura, T., Shimada, M., Goto, T., Nagaoka, S. 『Identification of a novel hypocholesterolemic protein, major royal jelly protein 1, derived from royal jelly』 PLoS One, Vol. 9, 2014, pp.105073-105086.



- [7] Kuwabara, Y., Hori, Y., Yoneda, T., Ikeda, Y. 『The antioxidant properties of royal jelly』 .Jpn Pharmacol Ther, Vol. 24, 1996, pp.63-67.
- [8] Li, X., Huang, C. and Xue, Y. 『Contribution of lipids in honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly to health.』 J Med Food, Vol. 16, No. 2, 2013, pp.96-102.
- [9] Nakajima, Y., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Mishima, S., Hara, H. 『Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities』 BMC Complement Altern Med, Vol. 9, 2009, pp.4-13.
- [10] Watanabe, S., Suemaru, K., Takechi, K., Kaji, H., Imai, K., Araki, H. 『Oral mucosal adhesive films containing royal jelly accelerate recovery from 5-fluorouracil-induced oral mucositis』 J Pharmacol Sci, Vol. 121, 2013, pp.110-118.
- [11] Wu, M. D. , Cheng, M. J., Wang, W. Y., Huang, H. C., Yuan, G. F., Chen, J. J., Chen, I. S., Wang, B. C, 『Antioxidant activities of extracts and metabolites isolated from the fungus *Antrodia cinnamomea*』 Nat Prod Res, Vol. 25, No. 16, 2011, pp.1488-1496.
- [12] Lyles, M. A., 『Formulating Strategic Problems: Empirical Analysis and Model Development,』 Strategic Management Journal, Vol. 2, No. 3, 1981, pp.61-75.

