

國立成功大學產學合作計畫

抗憂鬱珍珠製作及功效測試結果報告

計畫主持人

姓名：	吳意珣	服務單位：	國立成功大學化學工程系
職稱：	教授	Email：	yswu@mail.ncku.edu.tw
電話：	0952224200	傳真：	(06) 2344496

執行單位：國立成功大學化工系

委託單位：全瑩生技股份有限公司

執行期限：2022 年 02 月 01 日 ~ 2022 年 5 月 31 日

(一) 計畫成果

本計畫包含三項實驗，分別是牛磺酸穩定度、牛磺酸細胞毒性測試以及牛磺酸功效，以下為計畫各項實驗的成果。牛磺酸穩定度，驗證了牛磺酸耐熱的穩定特性，此結果能確保在烹煮珍珠時牛磺酸的安全性。牛磺酸細胞毒性測試歸納出在 0 ~ 15 mM 牛磺酸濃度能維持高細胞存活率(>90%)，此結果能說明食用牛磺酸的適合濃度範圍。

(二) 計畫內容

2.1 實驗設計

1. 牛磺酸穩定度: 本實驗旨在測量牛磺酸在高溫處下的活性和穩定度變化。
2. 牛磺酸細胞毒性測試: 本實驗旨在透過培養 HFL1 (人肺成纖維細胞) 並加入不同濃度的牛磺酸，以 CCK-8 (一種比色法進行細胞存活率、細胞增生及毒性測試的高靈敏度分析套組) 做為檢測試劑，利用多功能多波段螢光及冷光儀 (Spectra Max i3x) 分析細胞 OD₄₅₀ 的數值，來探討牛磺酸對人體細胞毒性的影響。
3. 牛磺酸功效: 本實驗旨在利用由隔離引起的類憂鬱現象(isolation-induced depressive-like)果蠅(2U (W1118))的動物模式來證明牛磺酸的確對憂鬱症狀具有舒緩效果。本實驗將分為分成五個組別進行果蠅運動行為活性(locomotor activity)的測試，分別是野生型果蠅、經隔離處理之果蠅、經 5mM 牛磺酸處理過之隔離處理果蠅、經 10mM 牛磺酸處理過之隔離處理果蠅和經 20mM 牛磺酸處理過之隔離處理果蠅。牛磺酸將在經歷完整 isolation 過程後添加至果蠅飼料，以期觀察果蠅後續反應。

4. 牛磺酸珍珠製造: 已委託承恩食品製造，目前已生產含 2%牛磺酸，半徑 0.8 cm 大小的白珍珠乙箱。

2.2 實驗方法-牛磺酸穩定度

1. 配置 10 g/L 牛磺酸溶液：取 0.1g 牛磺酸粉末溶解至 1 mL ddH₂O。
2. 牛磺酸降解：分別取 0.5 mL 的牛磺酸溶液，以 100°C分別加熱 10 分鐘或 40 分鐘。

3. HPLC 樣品衍生化

- (1) 衍生體系：混合 680 μ L 50 mM 硼酸溶液 (pH 9)、480 μ L 100% 甲醇、30 μ L 200 mM diethyl ethoxymethylenemalonate (DEEMM)及 12 μ L of 樣品 (<0.1 M)。

- (2) 以 70 度加熱 2 小時

4. HPLC 分析

- (1) 分析管柱：C18 column (YMC-C18 column, 4.6 \times 250 mm, 5-mm particle size)。
- (2) 流動相：A 為 25 mM 醋酸鈉溶液及 B 為 100%甲醇
- (3) 流速：1 mL/min
- (4) 梯度：0–2 min 為 80%–75% A；2–30 min 為 75%–40% A；30–35 min 為 40%–80% A。
- (5) 偵測器：以 UV 偵測器設定於 284 nm。

2.3 實驗方法-牛磺酸細胞毒性測試

1. 牛磺酸濃度配置：

將 0.1 g 牛磺酸回溶至 1 ml PBS (Phosphate buffered saline) , 取溶液原始濃度 0.8 M。接著再配置實驗所需要的 7.5 mM、10 mM、15 mM、30 mM、75 mM 與 150 mM 等牛磺酸濃度。

2. 細胞培養：

- (1) 在平板中實驗的孔植入 HFL1 (Human Fetal Lung Fibroblast Cell Lines)細胞液、f12k 培養液以及不同濃度的牛磺酸；此外，每次實驗都需要額外做一行/列只有植入 HFL1 細胞液與 f12k 培養液的孔，以作為後續計算細胞存活率的基準。
- (2) 平板上要再額外注入只有 f12k 培養液作為空白孔的吸光度；此外，為了確認牛磺酸是否會影響培養液的背景吸光度，在實驗中，會注入 f12k 與 75 mM 牛磺酸作為實驗組，如果經過分析後實驗組所造成吸光度影響不大，則在日後的實驗中，只需做空白孔吸光度即可。
- (3) 做三重複試驗。
- (4) 在 37°C、5%CO₂ 的培養箱中培養 24 個小時。

3. 添加 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 試劑：

- (1) 在無菌操作台裡，將平板中每個孔加入 10 ul 的 CCK-8 溶液。
- (2) 放入 37°C、5%CO₂ 的培養箱中一個小時。

4. 儀器分析：

使用多功能多波段螢光及冷光儀(Spectra Max i3x) 測量細胞在 450 nm 的吸光度 (OD₄₅₀)。

5. 細胞存活率計算：

計算並比較在不同濃度的牛磺酸當中，細胞的存活率，以尋找對細胞產生

低毒性的最適合牛磺酸濃度區間。

細胞存活率 (%) = [(有添加牛磺酸的吸光值平均-背景吸光值平均)/(無添加牛磺酸的吸光值平均-背景吸光值平均)]*100%。

2.4 實驗方法-牛磺酸功效

1. 準備隔離處理的果蠅 *Drosophila melanogaster*:

從果蠅庫存挑選了約百隻果蠅幼蟲，使之分別置入獨立小管，並且待羽化成成蟲後 (大約需要五天時間)，再進行為期 3 天的成蟲隔離 (Isolation)。為求實驗數據準確度，我們希望每一組至少有十五隻 (n>15) 以上的果蠅成蟲。

2. 牛磺酸飼料配置方法

(1) 幼蟲食物主要成分是酵母粉。

(2) 計算實驗所需的濃度和藥量後，微波新食物管，並將牛磺酸粉倒入燒杯，並同時在加熱器上持續加熱攪拌均勻，將每個獨立小管加入 500ul 牛磺酸飼料液，最終放入冰箱冷卻。

3. 牛磺酸濃度選擇

根據文獻的實驗方法[2]，我們將論文中採取的牛磺酸重量百分濃度 0.05%、

0.1%、0.2%和 0.4%進行轉換，可得相對應的牛磺酸莫爾濃度為 4mM、

8mM、16mM 和 32mM。我們在考慮安全性和細胞毒性數據，決定配置三種

不同的濃度：5mM、10mM 和 20mM。

4. 果蠅隔離處理後的行為模式測量

(1) 五組果蠅分別依序放入培養皿，將培養皿開口向下，置放在每秒 25 幀攝影機下，觀察果蠅的運動情形 5 分鐘。

(2) 使用 Python 程式擷取果蠅動態影像，分析經由牛磺酸餵食後的果蠅 (3 組)，野生型果蠅以及經隔離處理但未餵食牛磺酸的果蠅在移動速度和路徑是否有落差。進一步驗證經牛磺酸餵食的果蠅是否有現改善 isolation-induced depressive-like 的現象。

2.5 參考文獻

1. Timbrell JA, Seabra V, Waterfield CJ. The *in vivo* and *in vitro* protective properties of taurine. *General Pharmacology: The Vascular System*. 1995;26(3):453-462. doi:10.1016/0306-3623(94)00203-y
2. Araujo SM, Poetini MR, Bortolotto VC, et al. Chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behavior and dysregulation of brain levels of biogenic amines in *Drosophila melanogaster*. *Behavioural Brain Research*. 2018;351:104-113. doi:10.1016/j.bbr.2018.05.016
3. Kim, S., Hong, KB., Kim, S. *et al.* Creatine and taurine mixtures alleviate depressive-like behaviour in *Drosophila melanogaster* and mice via regulating Akt and ERK/BDNF pathways. *Sci Rep* **10**, 11370 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68424-1>

(三) 實驗成果

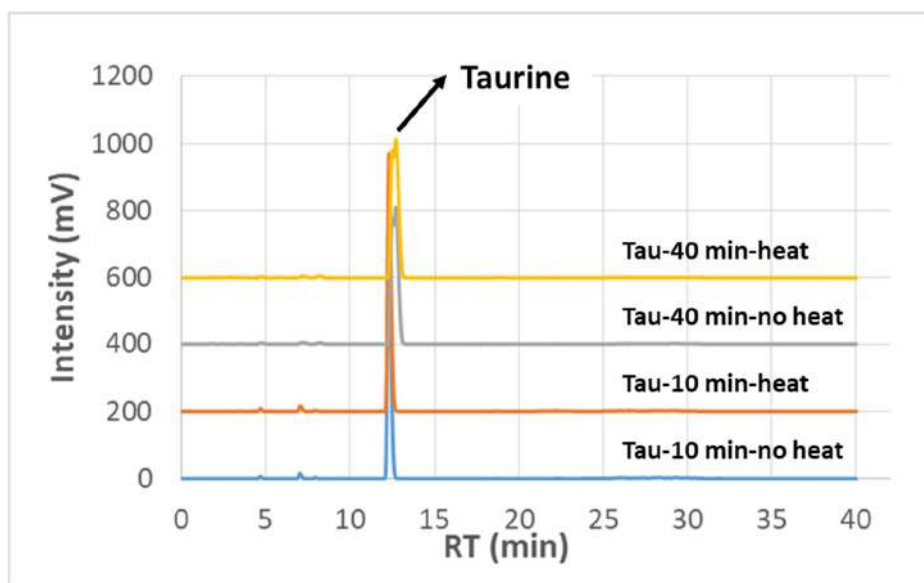
3.1 含牛磺酸珍珠產品



圖一：委託代工的珍珠。Size 2.3 (0.8 mm)

3.2 牛磺酸穩定度

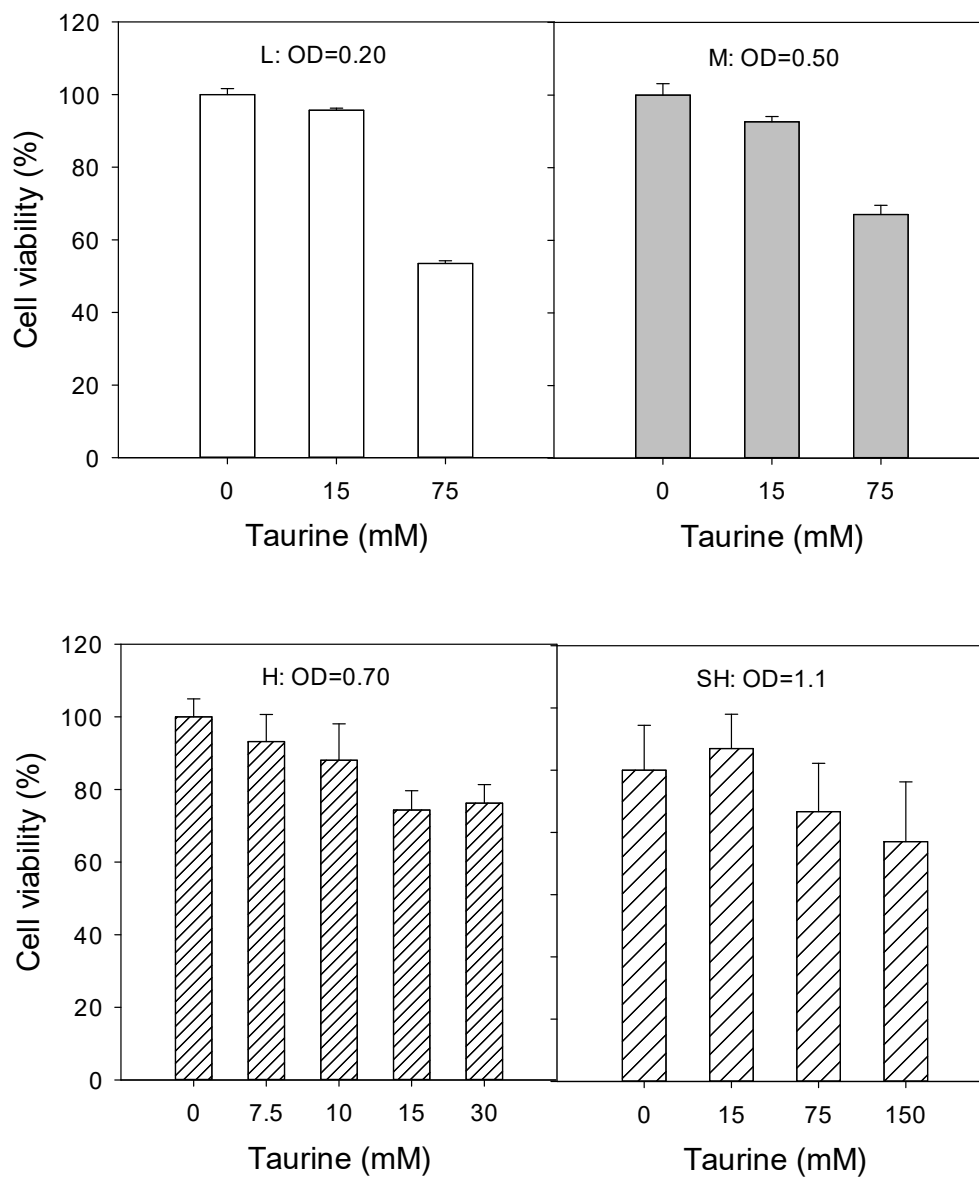
在分析牛磺酸穩定性的實驗裡，我們將溫度與加熱時長作為實驗的操縱變因，並分別探討其對牛磺酸穩定度的影響。從圖二的波形圖可以得知，四種情形下(無加熱 10 分鐘、加熱 10 分鐘、無加熱 40 分鐘以及加熱至 100 度 40 分鐘)，牛磺酸的波形沒有太大的變異，因此，可以驗證出牛磺酸具有耐熱的高穩定度性質。



圖二：透過 HPLC 分析牛磺酸分別在無加熱 10 分鐘、加熱 10 分鐘、無加熱 40 分鐘以及加熱 40 分鐘的穩定性波形圖

3.3 細胞毒性分析

在毒性分析實驗過程中，我們分別測試不同 HFL1 細胞數量(OD=0.20、OD=0.50、OD=0.70、OD=1.1)與不同牛磺酸濃度(7.5 mM、10 mM、15 mM、30 mM、75 mM、150 mM)的毒性反應，以探討牛磺酸對細胞的毒性影響。從圖三的數據圖可以得知，HFL1 在 0 ~ 15 mM 濃度的牛磺酸添加後，其細胞存活率能夠維持 90%以上，因此，可以歸納出 0 ~ 15 mM 濃度為適合使用的牛磺酸濃度區間。



圖三：在不同 HFL1 數量的情形下，HFL1 於各種牛磺酸濃度中的生存率

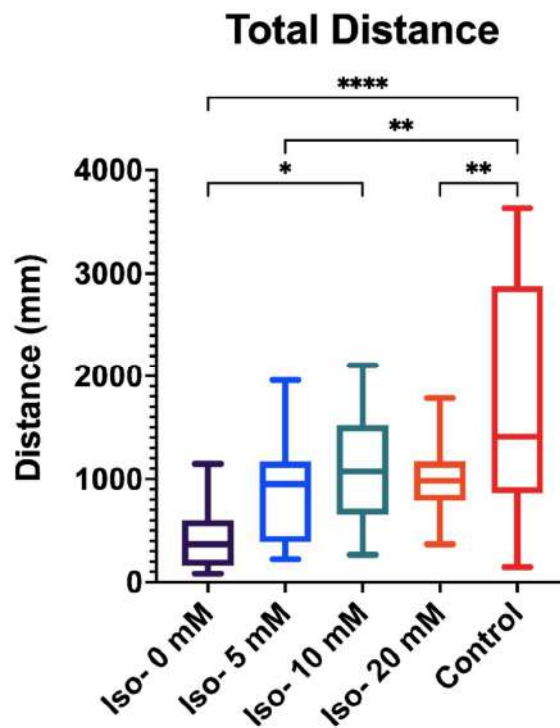
3.4 牛磺酸功效

各項名詞之定義：

名詞	Control	Iso-XmM
定義	控制組	經隔離處理，並餵食 X 濃度的牛磺酸

在牛磺酸功效實驗中，我們以 5 分鐘的果蠅活動影片進行了**總移動路徑**、**活動時間佔比**與**移動速度**此三項資料的分析。

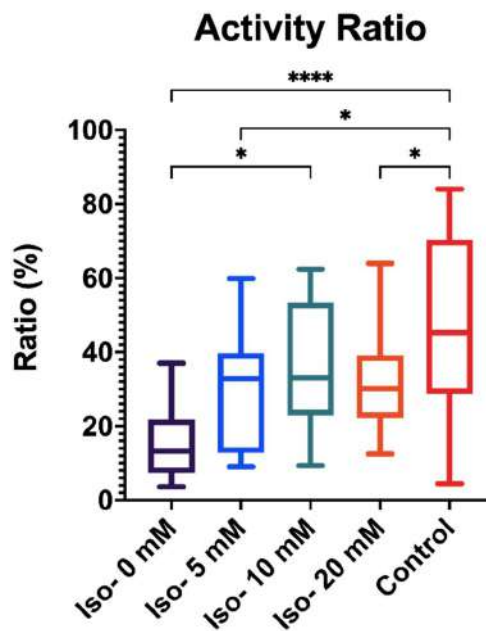
首先，在總移動路徑的部分 (圖四)，結果顯示控制組的果蠅 (n=17, Mean=1745) 的總移動路徑顯著地較經隔離處理而未食用牛磺酸之果蠅 (Iso-0mM, n=15, Mean=402.3) 長，代表透過隔離能夠處理成功引發果蠅活動力下降的類憂鬱症狀。而在三組經隔離並分別以 5mM, 10mM, 20mM 牛磺酸進行培養之果蠅中，在 10mM 條件下，果蠅總移動路徑 (n=14, Mean=1106) 相較 Iso-0mM 有**顯著較多**的移動路徑，且與控制組果蠅的移動路徑相差無幾。但 5mM 與 20mM 的條件下，總移動距離與 Iso-0mM 果蠅則無顯著差異。



圖四：為在不同組別果蠅的總移動路徑長

針對果蠅活動時間佔比 (圖五)，此資料的定義為有在移動之影片分析片

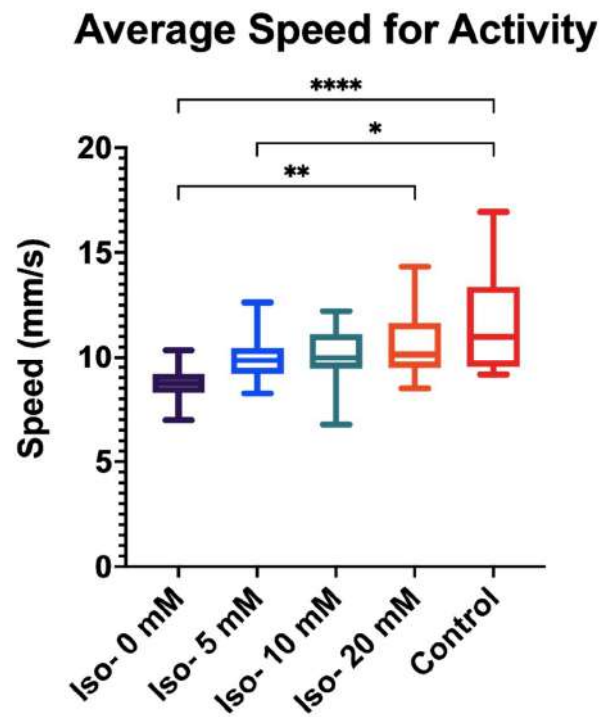
段次數與影片總分析片段次數之比值，每一片段為 2/25 秒。同樣，結果顯示控制組果蠅 (n=17, Mean=48.17) 的活動時間佔比顯著地較 Iso-0mM (n=15, Mean=13.05) 高。而在三組經牛磺酸培養之條件中，同樣是在 10mM 的組別 (n=14, Mean=35.79) 其活動時間佔比與 Iso-0mM 有顯著進步的差異，且與控制組無顯著差異。



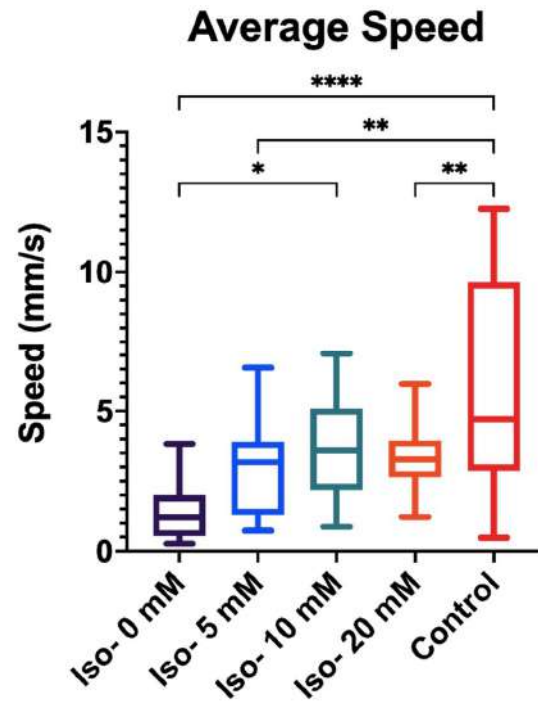
圖五：不同組別果蠅果蠅活動時間佔比比較

最後，在果蠅移動速度方面，我們進行了兩種層面的分析 - 其一為在果蠅移動時間期間內，其平均移動速率 (Average speed of activity，詳見圖六，)，另一則為在總時間下的平均速率 (Average speed，詳見圖七)。前者果蠅移動期間，其平均移動速率的結果，顯示 20mM 條件下之果蠅相較經隔離處理而未食用牛磺酸之果蠅顯著較快，且與控制組無顯著差異。而 10mM 之組別則是與其他組別均無顯著差異。但就總時間的平均速率而言，其結果則是與果蠅活動時間佔比和總移動距離相類似，控制組果蠅 (n=17, Mean=5.846) 的移動速率顯著

地較 Iso-0mM 之果蠅 (n=15, Mean=1.343)快。而在三組經牛磺酸培養之條件中，同樣是在 **10mM** 的組別 (n=14, Mean=3.7) 其移動速率與經隔離處理而未食用牛磺酸之果蠅有顯著變快的差異，並與控制組無顯著差異。依據兩種層面速率分析結果可以推論 20mM 條件下相較於 10mM 時，果蠅屬於移動時移動較快但比較傾向不隨便移動，有較為極端之活動現象。



圖六：不同組別果蠅移動期間內，其平均移動速率比較圖



圖七：不同組別果蠅總移動期間內的平均速率

綜合上述總移動路徑、活動時間佔比與移動速率此三項資料的分析結果，**10mM** 條件下在總移動路徑、活動時間佔比與移動速率均有顯著改善經隔離處理而未食用牛磺酸果蠅之活動行為表現。本實驗證實牛磺酸確實有改善憂鬱行為之功效，且具最佳效果的牛磺酸濃度並非越高越適當，就本實驗結果而言，**10mM** 為三者中最為適切之濃度。