

2010年臺灣國際科學展覽會

優勝作品專輯

編號：080001-01

作品名稱

在過氧化緊迫下，粒線體的變化與細胞凋亡的關係

**The relativity between mitochondrial morphology
and apoptosis under oxidative stress**

得獎獎項

生物化學科大會獎三等獎

學校名稱：私立磐石高級中學

作者姓名：郭泊維

指導老師：吳弘毅老師、林佳穎老師

關鍵詞：粒線體、人類胎盤滋養層細胞、共軛焦顯微鏡

作者簡介



我是郭泊維，喜歡音樂和參加科學活動的學生，而且從小就對生物非常有興趣，尤其是關於人體方面，國小就開始畫人體解剖圖，國中開始看醫學原文書，也參加奧林匹亞科學競賽和北醫醫學營，並曾因國樂絲竹樂團代表新竹市到美國姊妹市-達拉斯進行文化交流，到了高二則參加遠哲科學競賽，並奪得全國第二名。

高中時剛好遇到一位生物老師能指導我參加生物科展，於是我高一就參加 49 屆中小學生物科展，在做實驗中得到許多課內所不知道的知識和寶貴的經驗後，在加上有比賽的經驗，所以決定來參加國際科展。

摘要

因為在我們高中所學到的細胞中，粒線體是提供細胞能量的重要胞器，所以細胞凋亡時，粒線體一定也參其中。

本研究發現 200 μ M 過氧化氫(H_2O_2)作用 6 小時後存活率就低於 50%，而誘發細胞死亡的過程中，我們發現細胞質內的粒線體有變的越來越稀疏情況，且集中在細胞核四周的粒線體也減少許多，其結構也變的鬆散不完整。最後在細胞核出現 DNA 被切成小片段時，粒線體的型態及結構完全消失，粒線體的量減少到極微量，這致使細胞完全沒有能量供給而死亡。

結論告訴我們細胞的死亡跟粒線體的功能喪失及形態破壞有極大的關係。

Abstract

We learned the cell structure and function in the biology of senior high school. The mitochondrion is the important organelle of providing energy. So we suspected when the apoptosis was started, the mitochondrion must be participated in it.

In our study, 200 μ M hydrogen peroxide (H₂O₂) reacted after 6 hours and then the survival rate will less than 50%. In the process of oxidative stress-induced apoptosis, we founded that the mitochondrion turned to sparseness and even the mitochondrion around nucleus also decreased. The structure of cell became incompleteness. When the DNA was cut into small fragments in the nucleus, the morphology and the structure of mitochondrion completely vanished. The less of mitochondrion led to cell death because the mitochondrion could not provide the energy for cells.

In conclusion, the oxidative stress-induced cell death was relationship with the mitochondrion lost function and damaged structure.

壹、研究動機

在高一上學期生物課的時候，老師在上到粒線體時，說粒線體是細胞的能量工廠，因為這句話讓我們對粒線體的這個東西產生了極大興趣，又因為老師讓我們看了細胞凋亡的影片，讓我們對細胞和粒線體之間的關係有了疑問，如果沒有粒線體的話細胞會產生什麼反應，以及在粒線體受損或消失的情況下細胞是否會死亡。

貳、研究目的

1. 探討粒線體對細胞的影響。
2. 探討正常粒線體對細胞死亡的影響。
3. 探討正常粒線體在細胞內的分佈。
4. 比較細胞內粒線體在正常和邁入死亡的結構，找出其相關性。

參、研究設備與器材

一、實驗器材

35mm² 細胞培養盤、恆溫培養箱、培養皿、50ml 滴管、1.5ml 微量試管、微量吸管(micropipette)、微吸管頭(Micro Pipettor tip)、血清瓶、微量天平、秤量紙、藥匙、複式顯微鏡、載玻片、5 mL, 10 mL 巴士德無菌吸管、37°C 恆溫水浴槽、自動吸取器、倒立式顯微鏡、共軛焦顯微鏡、15 mL 無菌離心管、T25 (25 mm²) 培養盒。

二、實驗藥品與配方

1. 200 μ M 過氧化氫(H_2O_2) 以 PBS 配製
2. 4% 聚甲醛：4g 聚甲醛加 100ml PBS
3. PBST:以 PBS 配製 0.05% Tween-20
4. 以 PBS 配製 0.5% Triton-X100
5. 2 μ M Mitotracker(是一種粒線體螢光探針)以滅菌之二次去離子水配製
6. 50nM DAPI 以 PBS 配製 (DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole)
是一種能夠與 DNA 強力結合的螢光染料，常用與螢光觀察細胞核
7. Trypsin-EDTA (胰蛋白酶) solution (0.05% trypsin-0.53 mM EDTA 4Na)：使用前放在37°C水槽回溫，避免回溫過久，使酵素失去活性。
8. 封片液：10% 甘油 (Glycerol加二次去離子水稀釋)
9. DMEM +10% FBS + Penicillin/Streptomycin
培養基：基本培養基(DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
血清：胎牛血清 (FBS, Fetal Bovine Serum) 在基本培養基中加入血清，可以提供細胞生長增殖所需的養分。
抗生素：在基本培養基中加入抗生素，可以預防細菌生長，常用抗生素有Penicillin、Streptomycin。



10.磷酸鹽緩衝液(PBS, Phosphate Buffered Saline):



NaCl	8g
KCl	0.4g
Na ₂ HPO ₄	2.88g
KH ₂ PO ₄	0.48g
蒸餾水	1000ml

肆、研究方法與過程

一、細胞繼代


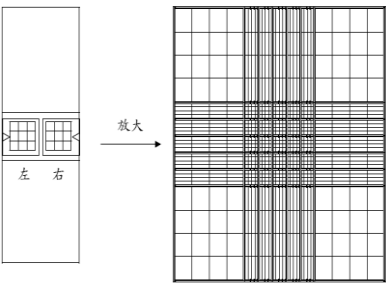
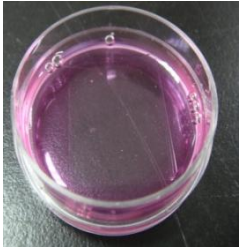
1. 將取得自食品工業研究所的「人類胎盤滋養層細胞」(3A-sub-E)進行繼代
2. 取一盤已經長滿細胞培養皿的細胞株，將其上清液用電動吸取器取出，在加入生理食鹽水(PBS)5ml，清洗細胞後取出，此步驟重複兩次。
3. 加入 0.5%胰蛋白酶(0.5% Trypsin)來回搖動直至完全覆蓋後，放入 37°C 恆溫培養箱作用 3 分鐘。
4. 取出細胞後，加入 10ml 含 10% 胎牛血清的細胞培養液(10% FBS + DMEM)。
5. 用電動吸取器來回打散細胞呈單顆細胞(不能聚成團狀)。
6. 再將其種入實驗所要的培養盤。

	
取出長滿細胞培養皿的細胞株。	取一盤已經長滿細胞培養皿的細胞株，將其上清液用電動吸取器取出，在加入生理食鹽水，清洗細胞兩次後取出。

	
<p>加入 0.5%胰蛋白酶(0.5%Trypsin)來回搖動直至完全覆蓋後，放入 37℃ 培養箱作用 3 分鐘。</p>	<p>取出細胞後，加入 10ml 細胞培養液(10%FBS + DMEM)，用電動吸取器來回打散細胞，再將其種入培養盤。</p>

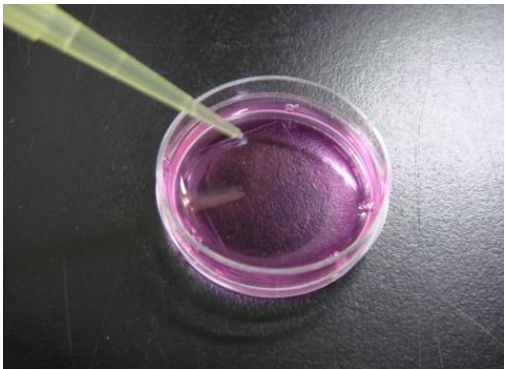
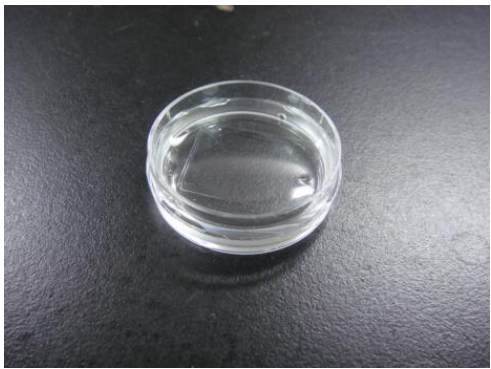
二、細胞計數

- 1.用 Trypan Blue 10 μ l 加入 10 μ l 的細胞中，再取出細胞放入細胞計數盤
- 2.用計數器一一數個數，再用公式算出每 ml 細胞數
- 3.再將 2 $\times 10^4$ 個細胞放入放有蓋玻片之 3.5 cm 直徑的圓形培養盤
- 4.培養 16 小時後，作為實驗使用

		
<p>用 Trypan Blue 加入細胞中，再取出細胞放入細胞計數盤。</p>	<p>用計數器一一數個數，用公式算出每 ml 細胞數。</p>	<p>將細胞放入有蓋玻片之培養盤。</p>

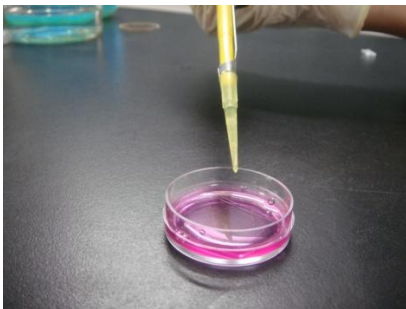
三、細胞加入 H_2O_2 讓細胞凋亡

1. 在種好細胞 16 小時的 3.5cm 直徑培養盤中，加入 H_2O_2 ，使培養液(10% FBS + DMEM)含有 $200\mu\text{H}_2\text{O}_2$
2. 將加有 H_2O_2 的細胞放回 37°C 細胞培養箱，作用 8 個小時，等待細胞凋亡
3. 對照組只加入滅菌的去離子水，作用 8 小時：

	
在 3.5cm 直徑培養盤中加入 H_2O_2 ，讓培養液 10%FBS (DMEM)含有 $200\mu\text{H}_2\text{O}_2$ 。	對照組只加入滅菌的去離子水。


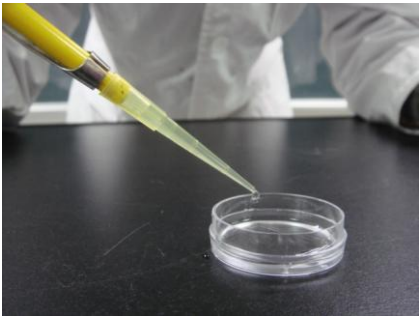
四、細胞體內粒線體染色

1. 8 小時後，加入 $2\mu\text{M}$ mitotraker $10\mu\text{l}$ 至 2ml 的培養液中，使其最後濃度為 10nM ，作用 15 分鐘，使粒線體染色


加入 Mitotraker，作用 15 分鐘，使粒線體染色。

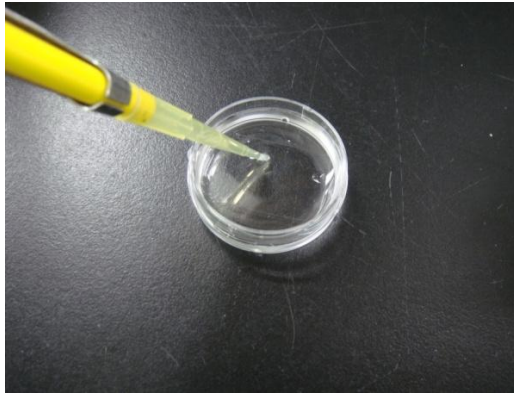

五、固定細胞

- 1.作用 15 分鐘後，吸掉培養液，加入 1ml 含有 4% 聚甲醛的 PBS，作用 20 分鐘，以固定細胞型態
- 2.吸掉固定液後，加入 PBS，1ml 清洗，重覆此步驟兩次

	
吸掉培養液，加入含有 4% 聚甲醛，作用 20 分鐘，以固定細胞型態。	吸掉固定液後，加入 PBS 清洗，重覆此步驟兩次。

六、細胞核染色

- 1.在固定的細胞中，加入 1ml 含有 0.5% Triton-X100 的 PBS，作用 20 分鐘，將細胞膜穿孔，以利染色劑進入
- 2.二十分鐘後吸掉上清液，再加入 1ml PBS 清洗(重複兩次)
- 3.在加入 50nM 的 DAPI 1ml 作用 20 分鐘(需避光)
- 4.二十分鐘後，用 PBS 1ml 清洗，重覆此步驟兩次
- 5.最後用二次去離子水 1ml 清洗 2 次

	
<p>在已固定的細胞中，加入 1ml 含有 0.5% Triton-X100 的 PBS 作用 20 分鐘，將細胞膜穿孔，以利染色劑進入。</p>	<p>接著加入 DAPI 作用 20 分鐘後(要避光)，用 PBS 清洗，最後用二次去離子水 1ml 清洗 2 次。</p>

七、封片

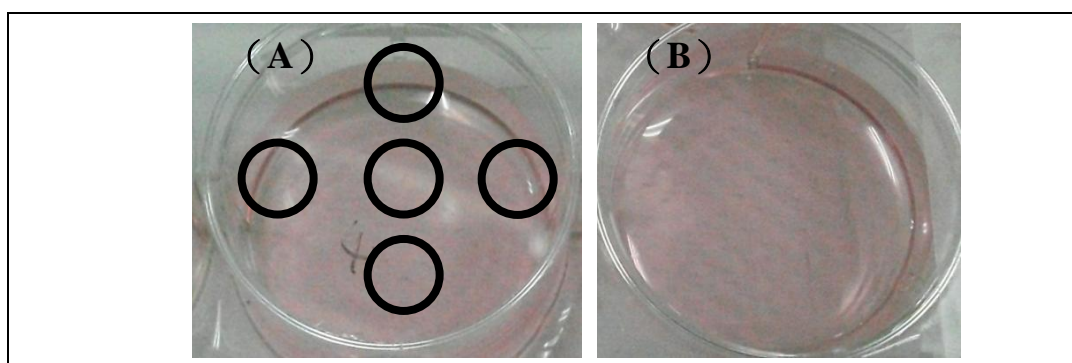
1. 用封片液滴在載玻片上，再將蓋玻片 45 度慢慢放下(用筆尖，去除氣泡)
- 2 準備用共軛焦顯微鏡拍照。

	
<p>用封片液滴在載玻片上，再將蓋玻片放下。</p>	<p>用共軛焦顯微鏡拍照。</p>

伍、結果與討論

1. H_2O_2 誘導細胞死亡的情形

將細胞處理 $200\mu\text{M}$ 的 H_2O_2 後，分別作用 0、2、6、4、8 小時會看到細胞隨時間死亡，在圖一黑圈圈的五個位置以倒立式顯微鏡 (40 倍的倍數) 數其存活細胞數後求其平均值，由表一、二發現存活下來的細胞愈來愈少，細胞因為過氧化物的作用，形成很多氧自由基($\cdot\text{O}_2^-$)



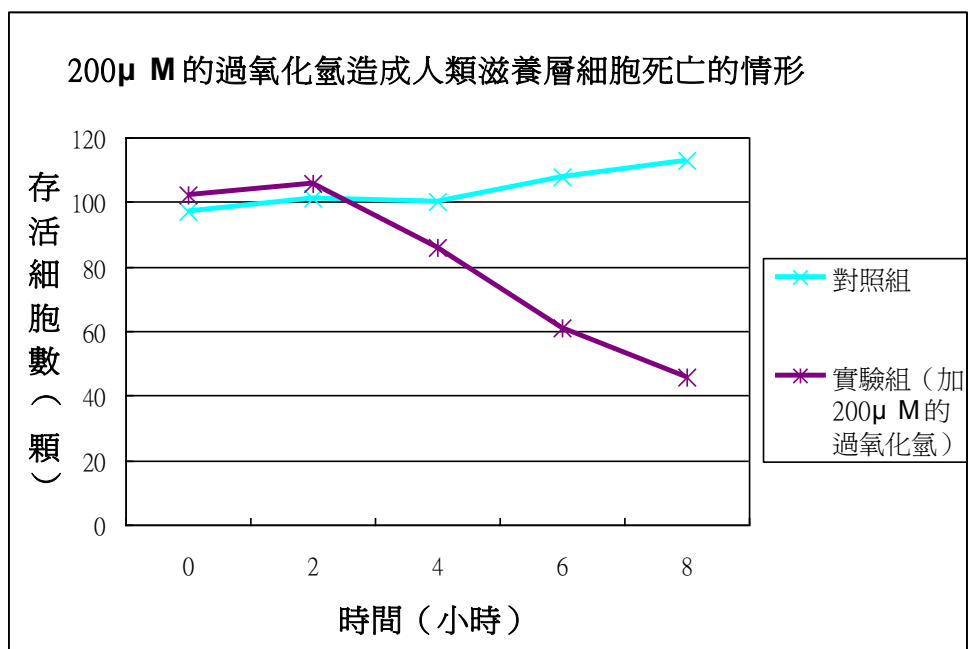
(圖一)


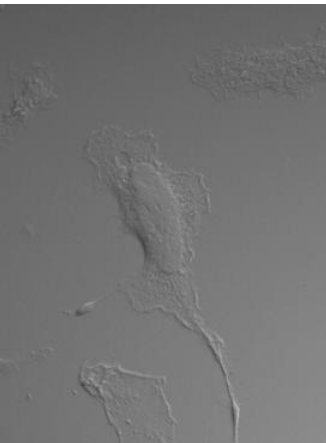
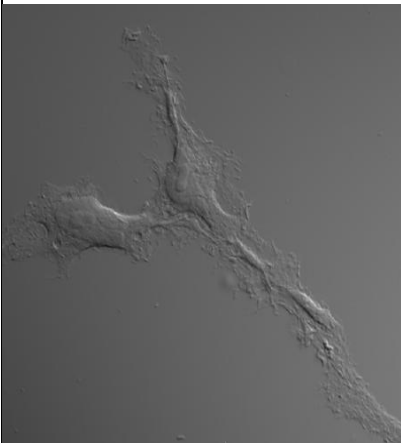
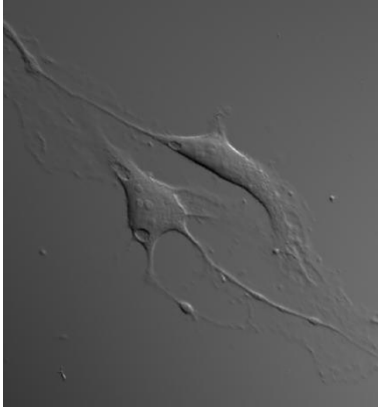
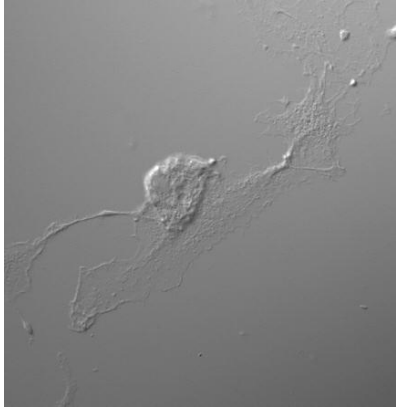
圖一、(A) 實驗組分別加入 $200\mu\text{M}$ 的 H_2O_2 後，分別作用 0、2、6、4、8 小時，在「黑圈圈」的這五個位置以倒立式顯微鏡 (40 倍的倍數) 數其存活細胞數 (細胞死後會漂浮在培養液裡，無法被數到)，平均得到我們所呈現的值。(B) 對照組 (只加滅菌後的二次去離子水)。

表一、200 μ M 的過氧化氫作用後，人類滋養層細胞存活數(數據)

		人類滋養層細胞存活數 (顆)	
200 μ M 的過氧化氫作用時間	(小時)	對照組	實驗組 (加 200 μ M 的過氧化氫)
	0	97	102
	2	101	106
	4	100	86
	6	108	61
	8	113	46

表二、200 μ M 的過氧化氫作用後，人類滋養層細胞存活數(折線圖)

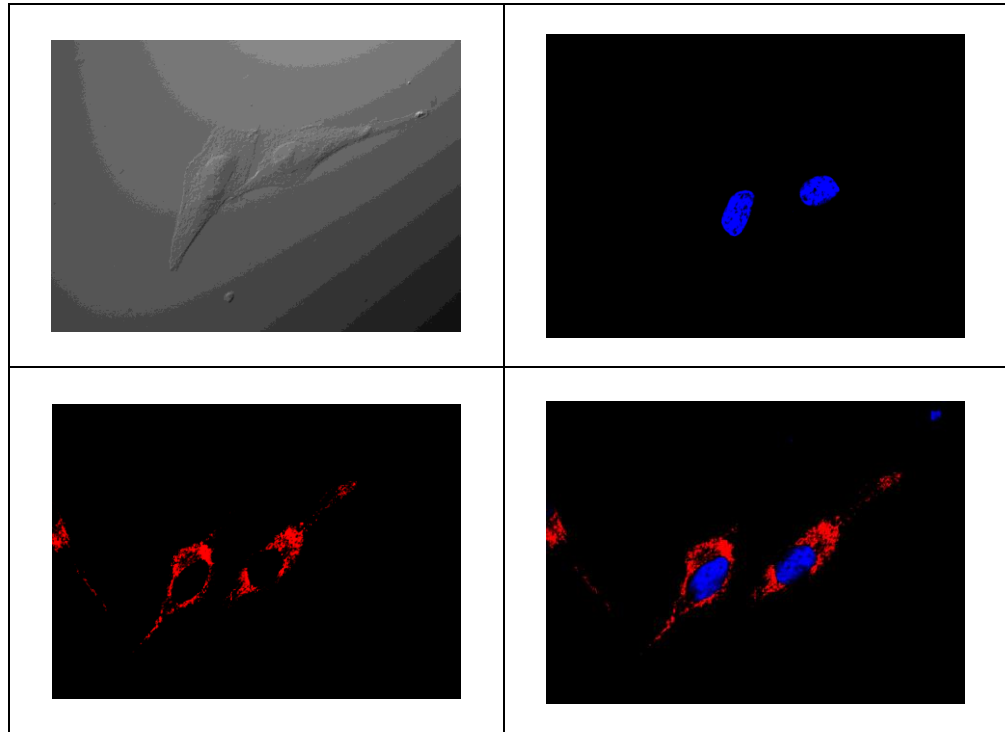


		
正常細胞均勻平貼，向四周延伸。	H ₂ O ₂ 誘導死亡兩小時 周圍細胞質開始向細胞核收縮。	H ₂ O ₂ 誘導死亡四小時 收縮情況加劇，周圍變稀疏。
		
H ₂ O ₂ 誘導死亡六小時 周圍細胞質繼續收縮。	H ₂ O ₂ 誘導死亡八小時 細胞質幾乎消失，全部集中在細胞核周圍。	

圖二：用共軛焦顯微鏡放大 400 倍的觀察的結果，我們發現細胞加入 200 μ M 的 H₂O₂ 0、2、4、6、8 小時後，細胞凋亡的情形。

2. H_2O_2 誘導前觀察細胞內粒線體、細胞外觀及細胞核的型態

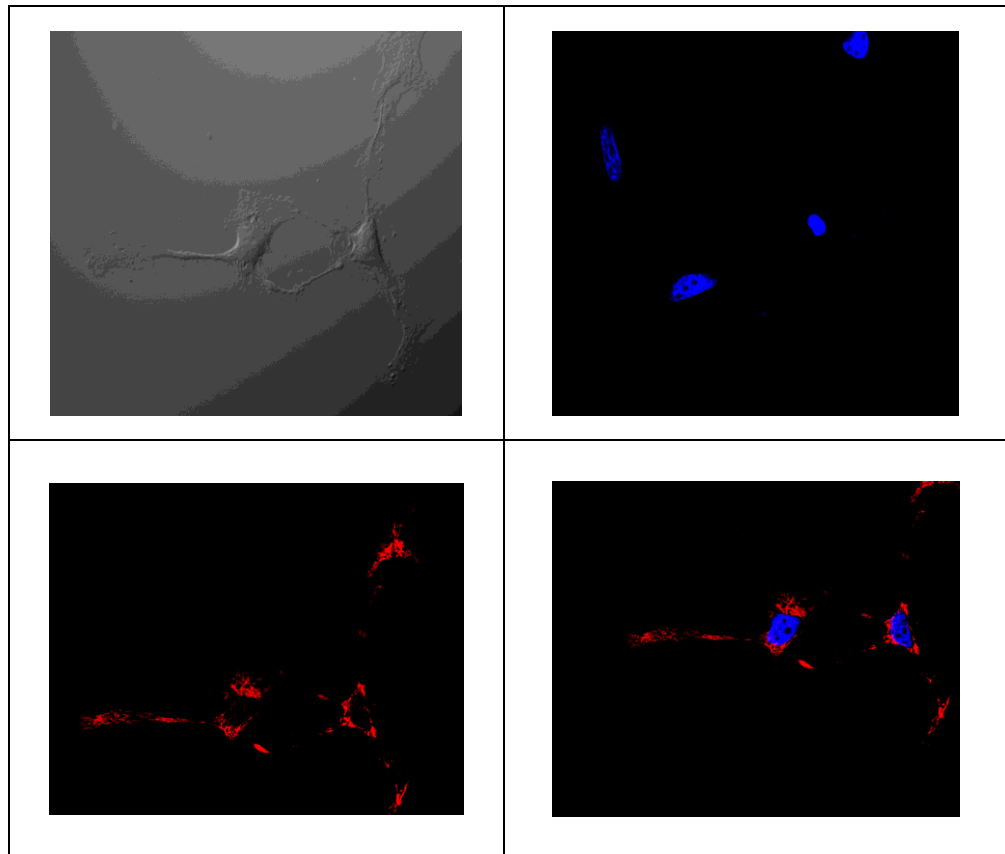
我們觀察到粒線體，正常的形態是呈現網狀由細胞核周圍密集處，向細胞膜周圍延伸，愈來愈稀疏，這可以瞭解到細胞需要較多能量(ATP)的地方是細胞的中樞-細胞核，所以大部分粒線體都集中在核周圍。



圖三：用共軛焦顯微鏡放大 400 倍的觀察的結果，我們發現細胞加入 $200\mu\text{M}$ 的 H_2O_2 誘導前觀察細胞內粒線體、細胞外觀及細胞核的正常型態

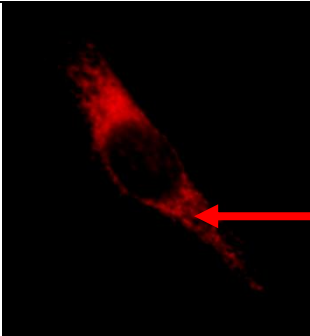


3. H_2O_2 誘導後觀察細胞內粒線體的型態

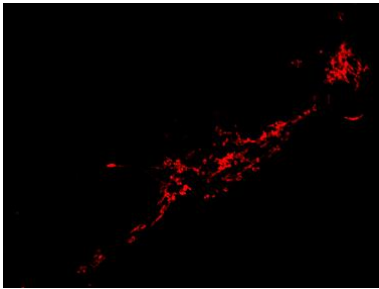
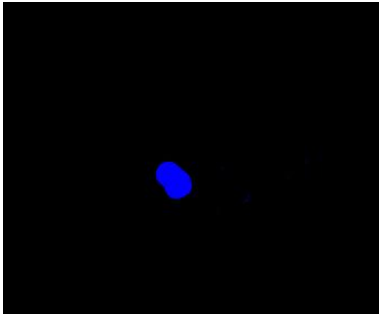
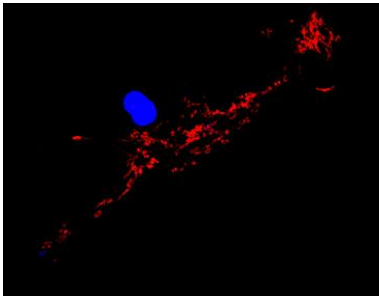
粒線體會隨著死亡過程，漸漸失去網狀的分佈，而隨著細胞的縮小，跟著往細胞核集中，粒線體的量也隨著減少，也就是紅色 mitotracker 細胞中的量愈來愈少，這代表著細胞中的能量工廠-粒線體，供給能量(ATP)的電子傳遞鏈漸漸失去作用，細胞沒有能量供給，當然也漸漸邁向死亡。

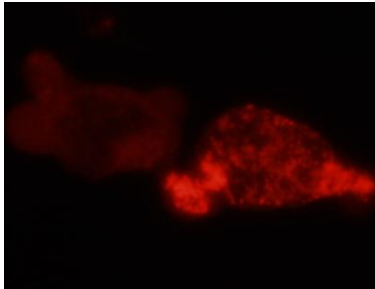
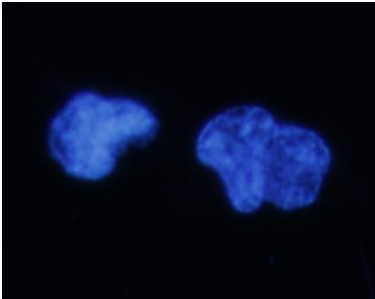
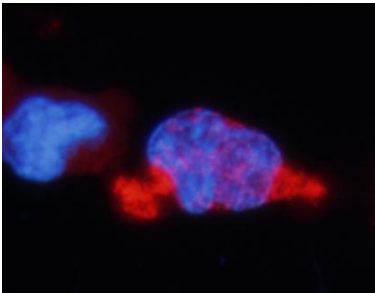


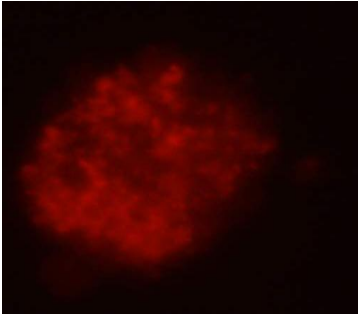
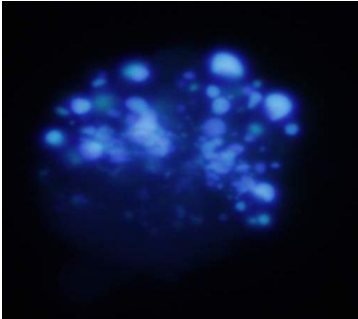
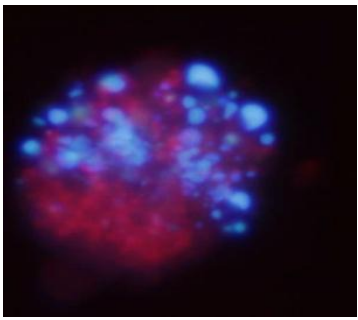
圖四：用共軛焦顯微鏡放大 400 倍的觀察的結果，我們發現細胞加入 200 μ M 的 H_2O_2 8 小時後誘導後，觀察細胞內粒線體、細胞外觀及細胞核的細胞凋亡型態。

4. 比較細胞內粒線體在正常和邁入死亡的結構

	細胞	型態描述
正常細胞		1. 粒線體成紡錘狀向兩側攤開。
		2. 細胞核成正常完整均勻的橢圓。
		3. 細胞質均勻平貼，向四周延伸。 4. 粒線體由較密集的核周圍向四周網狀散開呈現較稀疏。

<p>凋 亡 初 期 細 胞</p>	  	<ol style="list-style-type: none"> 1. 粒線體呈紡錘狀但已有部分收縮，沒有完全攤開貼平。 2. 細胞核依然正常，呈橢圓狀藍色螢光。 3. 細胞質有部份縮回，沒有完全攤平。 4. 粒線體已沒有聚集在核周圍，且分佈在細胞質的稠狀，結構已有部分消失，塗色螢光分佈不同色光。
--	--	---

<p>凋 亡 中 期 細 胞</p>	  	<p>1.粒線體整體外觀向中心聚集，成不規則狀。</p> <p>2.細胞核呈不規則，彎曲失去原有形狀，也有聚集的現象。</p> <p>3.細胞質向中心縮回，沒有平貼。</p> <p>4.粒線體已沒有稠狀的型態，全聚集在已收縮的細胞質內呈現聚集狀的紅色螢光，但細胞核聚集處還是不會有粒線體分佈。</p>
--	--	--

<p>凋 亡 後 期 細 胞</p>	  	<p>1.粒線體呈圓形。</p> <p>2.完整細胞核被分成一顆顆圓形聚集。</p> <p>3.粒線體向中心收縮。</p> <p>4.粒線體已減少，且在細胞內包括細胞質和細胞核都有紅色螢光分佈。</p>
--	--	---

柒、結論

1. H_2O_2 在作用 6 小時後，就會造成 50% 以上的細胞死亡。
2. 正常細胞中的粒線體分佈，是愈靠近細胞核，其數量愈多。
3. 在死亡細胞中，粒線體分佈會隨細胞縮小而漸往細胞核集中，而且也失去其網狀的結構。
4. 在比較細胞凋亡的過程中，我們發現粒線體也是跟著細胞核、細胞質的變化，逐漸邁向死亡。

捌、參考文獻

- 1.陳虹惠，粒線體異常，台大醫院網站，2005 年 11 月 23 日。取自：
http://www.genes-at-taiwan.com.tw/genehelp/database/case/record_19.htm
- 2.粒線體，維基百科網站，2009 年 3 月 12 日。取自：
<http://zh-yue.wikipedia.org/wiki/%E7%B2%92%E7%B7%9A%E9%AB%94>
- 3.Apoptosis. 維基百科網站，2009 年 3 月 12 日。取自：
<http://en.wikipedia.org/wiki/Apoptosis>
- 4.Catherine Brenner. (2000). APOPTOSIS:Mitochondria--the Death Signal Integrators. *Science* , 289 (5482), 1150 – 1151
- 5.Douglas R. Green. (2000). Mitochondria and Apoptosis. *Science* , 281 (5381), 1309 – 1312