中華民國第 57 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組　動物與醫學學科

052013

「粒」竿「線」影

—探討市售常見止痛藥對粒線體的影響

學校名稱：國立新竹女子高級中學

作者：	指導老師：
高二 林予璿 高二 鍾孟諭 高二 林又綠	劉宜昀

關鍵詞：粒線體、止痛藥、海拉細胞

摘要

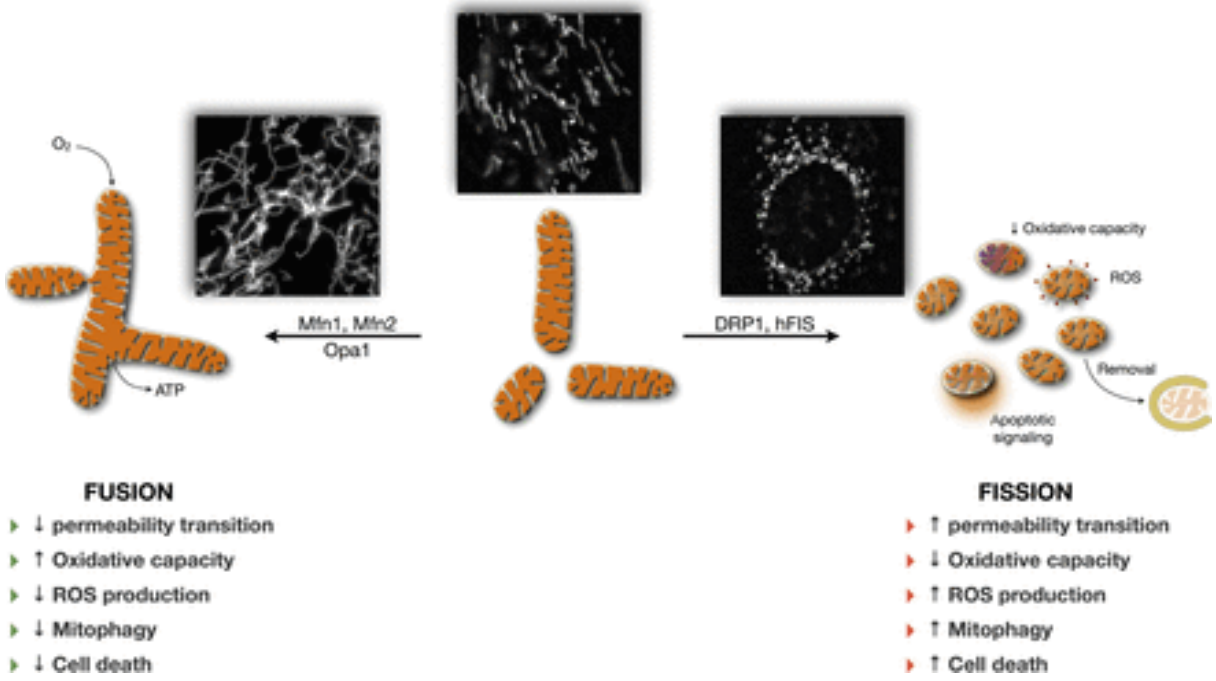
影響粒線體型態的原因很多，如自由基、溫度、藥物等等，而我們選擇對海拉細胞施以幾種市售 NSAID 止痛藥主要成分：Aspirin、Acetaminophen 及 Mefenamic Acid，並觀察其對粒線體形態和功能的影響。第一部分實驗中，我們得到了粒線體長度會隨著施加藥物濃度的提高而減少，且向細胞核方向聚集的結果。接著，以相同的藥物及細胞種類進行 MTT 細胞活性測定， 和 Trypan Blue 細胞染色實驗，發現粒線體的呼吸作用效率及細胞存活率會隨著藥物濃度提高 而下降。三種藥物中，Mefenamic Acid 的效果最為明顯，於是對其進行了第二部份的實驗：將 Mefenamic Acid 的濃度固定，改變作用於細胞的時間。透過實驗證實了增加藥物作用時間和提高藥物作用濃度對粒線體的影響趨勢相似。

壹、　研究動機

止痛藥的發現在人類歷史上扮演了極其重要的角色，早在幾千萬年前，人類便曉得模仿動物嚼食特定植物葉片以減輕疼痛；到了 16 世紀，鴉片酊，一種以酒精調製罌粟萃取物的止痛藥便已進入生活。直至今日，能做為止痛藥的物質愈來愈多，然而止痛藥固然方便有效，但其隱含的危害卻時常被忽略，因為過度用藥以致出現的副作用包括 MOH（medication overuse headache）、戒斷（abstinence）等（摘自文獻１）。

而相關研究文獻指出，止痛藥中的非類固醇性抗發炎藥物（Nonsteroidal anti-inflammatory drugs，NSAIDs）對粒線體的型態及細胞膜通透性有一定影響，會加劇粒線體滲透作用（mitochondria permeability transition，簡稱 MPT，指分子量小於 1500 Da 的溶質增加粒線體膜通透性的現象，被認為形成於粒線體內外膜之間的接觸部位，目的為讓細胞質與線粒體基質之間的化學或溶質得以達到平衡並去極化，使粒線體腫脹與外膜破裂，進而導致細胞凋亡或壞死），粒線體又是生物細胞中不可或缺的能量及氧自由基製造工廠，若出現異常，將嚴重影響生理，造成衰老、退化等現象，重要性不言而喻（摘自文獻２）。

近年來，粒線體相關研究蓬勃發展，因為形態為判斷粒線體狀態的重要依據，而成為研究重點之一。我們從文獻得知，正常的粒線體會從細胞核開始呈放射狀細絲均勻分布在細胞質 中，當 MPT 或氧化壓力加劇，粒線體將分裂成數小塊並集中至細胞核附近，以製造健康的粒線體並淘汰已損壞者，為明顯的細胞凋亡特徵（摘自文獻３）。圖一簡單介紹了粒線體分裂及融合時粒線體之形態及對細胞之影響。



圖一、粒線體分裂與融合簡介，*Picard, Shirihai, Gentil, and Burelle*，2012（摘自文獻 4）

於是，我們設計了一系列實驗，透過 MTT 細胞活性測定，Trypan Blue（錐蟲藍染劑）細胞染色及共軛焦顯微鏡觀察，希望經由實驗呈現，明白不同 NSAID 藥物對粒線體的影響差異。

貳、 研究目的

一、比較三種 NSAID 藥物在不同作用濃度，相同作用時間下對粒線體的影響

實驗一　MTT 細胞活性測定，觀察粒線體呼吸作用效率。

實驗二　Trypan blue 細胞染色實驗，計算細胞活性。

實驗三　共軛焦顯微鏡下觀察粒線體分布和型態變化。

二、比較 Mefenamic Acid 在相同濃度，不同作用時間下對粒線體的影響

實驗四　MTT 細胞活性測定，觀察粒線體呼吸作用效率。

實驗五　Trypan blue 細胞染色實驗，計算細胞活性。

實驗六　共軛焦顯微鏡下觀察粒線體分布和型態變化。

參、　研究器材與設備

一、細胞 海拉細胞：是生物學與醫學研究中使用的一種細胞，源自一位美國婦女海莉耶塔· 拉克斯（Henrietta Lacks）的子宮頸癌細胞的細胞系。HeLa 細胞系被視為「不死」，因細胞株不會衰老致死，並可以無限分裂下去，跟其他細胞只能分裂約 40～50 次相比，增殖異常迅速（摘自文獻５）。

圖二、海拉細胞

二、設備

表一、實驗器材及設備

	數量	設備	數量
Olympus 共軛焦顯微鏡	一臺	Hitachi U-3010 UV-可見光分光光度計	一臺
無菌無塵操作台(生物安全櫃)	一臺	NuAire NU5810E 氣套式二氧化碳培養箱	一臺
Eppendorf 5415D 小型高速離心機	一臺	DIGISYSTEM Vortex Mixer Model MV-1000	一臺
YIHDER BU420 水浴槽	一臺	Thermo 數位式加熱攪拌器	一臺
YIHDER Hybridization incubator OH-800	一臺	智勤熱風循環烘箱	一臺
電子秤	一臺	AutoClave AS1080L 高壓滅菌釜	一臺
微量滴管(20μl、100μl、200μl、1000μl)	數支	載玻片、蓋玻片	數片
透明指甲油	一罐	離心管	數支

圖三、共軛焦顯微鏡

三、化學藥劑與藥物

1. Culture Medium（以下簡稱 medium）：Dulbecco's Modified EagleCulture Medium：Gibco, 11879- 020, FBS, Penicillin, Streptomycin
2. 0.01M Phosphate Buffered Solution（PBS）
3. 2.5% Trypsin：Hyclone, J140043
4. 3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)- 2,5 Diphenyltetrazolium bromide（MTT）K2387450SC）
5. Fixed Solution：PBS 100ml, NaOH 1N, Paraformaldehyde powder 4g
6. 0.4% Trypan Blue Solution：Sigma, RNBF4954
7. 99.7% Dimethyl Sulfoxide（DMSO）：Sigma, RNBF1550
8. Acetylsalicylic Acid Crystalline（Aspirin）：Sigma, M160402
9. Acetaminophen（APAP）：Sigma, M161229
10. Mefenamic Acid：Sigma, MNSW0660V
11. 螢光染劑 ：1mM Mitotracker
12. Mounting solution：Fluoromount-G 螢光封片劑

四、使用止痛藥介紹

1.Aspirin（乙醯柳酸）

阿斯匹靈為現今世上最老牌且廣為人知的止痛藥。其所屬之水楊酸類止痛藥作用機制為：水楊酸能抑制前列腺素分泌，減緩發炎、疼痛的情況。阿斯匹靈不僅能有效緩解疼痛，低劑量服用更可以作為心血管疾病藥物。但研究顯示阿斯匹靈易造成腸胃潰瘍，目前市售止痛藥物中已較少看到。（摘自文獻 6）

2.Acetaminophen（乙醯胺酚）

乙醯胺酚為臺灣最大宗止痛藥：「普拿疼」，的主成份。其作用機制為：乙醯胺酚會抑制中樞神經，減少疼痛。過量服用乙醯胺酚將造成肝病變。（摘自文獻 6）

3.Mefenamic Acid（甲芬那酸）

甲芬那酸為常見經痛止痛藥：「寶速達爾」，之主成分，其與阿斯匹靈同屬水楊酸類藥物。值得一提的是，甲芬那酸在一般研究較少使用。（摘自文獻 6）

綜合以上，我們認為比較這三種藥物除了可以化解大眾對於常見止痛藥的迷思，更可以做出有別於一般研究的結果。

肆、　研究過程或方法

一、 細胞培養技術

（一）細胞培養

1.在水浴槽中回溫 medium、PBS 及 trypsin。

2.將細胞母盤的培養液抽掉，以 PBS 清洗 2 次，每次約 3000 μl。

3.加入 1000~2000 μl 的 trypsin，靜置於培養箱中反應約 5 分鐘。

4.輕輕拍打培養盤使細胞完全懸浮後，加入兩倍體積的 medium 中和。

5.新培養盤加入適量 medium，從母盤抽取少許細胞液至新培養盤，完成繼代。

6.母盤再加入適量 medium，和新培養盤一起放回培養箱。

（二）細胞種盤

1. 水浴槽中回溫 medium、PBS 及 trypsin。

2.選擇適當格數的培養盤，注入適量 medium。

3. 母盤中細胞以 trypsin 懸浮完成，加入 medium 中和，並抽取適量細胞液加入培養盤。

（三）細胞計數

1. 懸浮培養盤中細胞後，將液體全數吸出加入離心管，放入離心機離心。

2. 去除上清液，並使細胞於離心管內平均散開，加入 medium 1000 μl。

3. 以 10 μl 微量滴管反覆輕輕吸取使細胞和液體混合均勻，取 5 μl 液體滴於血球計數器。

4. 計算四個角落大格內的細胞數。

5. 取四格平均後乘以 9，再除以 0.01，得到平均細胞數。

（四）共軛焦顯微鏡觀察

1.更換六孔培養盤中每一格的 medium，並各加入５ μl 的 mitotracker 染色，在培養箱裡靜置 15 分鐘。

2.抽出液體，以 PBS 沖洗一次後加入 fixed solution 500 μl，在培養箱裡靜置 15 分鐘。

3.抽出液體，加入 500 μl PBS 後以鋁箔紙包裹整個培養盤，放入 shaker，慢速搖動清

洗 15 分鐘，此步驟重複三次。

4.抽出液體，夾出蓋玻片，面朝下置於滴了 mounting 液的載玻片上，兩片一組，載明組別，幾分鐘後以透明指甲油塗抹於蓋玻片四周封片。

5.置於共軛焦顯微鏡下觀察。

二、實驗步驟

（一）藥物濃度對粒線體形態及功能的影響：以 0、0.25、0.5、1.0mM 的藥物反應 20 小時

實驗一：MTT 細胞活性測定實驗，觀察不同濃度藥物對粒線體呼吸作用效率的影響

1.細胞加入 500 μl MTT 溶液。

2.培養皿放置於培養箱內，使其反應滿 3 小時(反應後應有藍紫色沉澱)。

3.培養皿加入 500 μl DMSO 。

4.抽取適量液體至石英管內，放入分光光度儀，以波段 490nm 的光照射。

5.紀錄 OD 值，即物質在特定波長及固定距離下對光源的吸收程度。

實驗二：Trypan blue 染色，測定細胞存活率

1.將 12-well 中的細胞取出，置入 1000 μl 離心管中以 1.8 krpm 的速度離心 10 分鐘。

2.離心完畢後丟棄上清液，並使離心管底部的細胞體平均分散 。

3.加入 500 μl 的 medium。

4.加入 500 μl 0.2M 的 Trypan Blue 溶液，染色 5 分鐘， 死亡的細胞會被染成藍色。

5.計算未染色的細胞與總細胞數，(未染色細胞／總細胞數)為細胞存活率 。

實驗三：共軛焦顯微鏡，觀察不同濃度藥物對細胞形狀、粒線體分佈及型態的影響

1.~5.重複細胞培養基本技術（四）步驟 1.～5.。

6.氣泡擠出後使用透明指甲油封片，置於螢光顯微鏡下觀察。

7.觀察並比較細胞外型之差異。

8.使用影像分析軟體 image j，計算各個細胞內被染色粒線體的長度。

（二）固定藥物濃度、改變反應時間

只使用對細胞活性影響最顯著的 Mefenamic Acid，改變處理時間分別為 0、4、8 及 12 小時，實驗四~六的步驟與實驗一~三相同。

四、統計分析

實驗一：MTT 細胞活性測定實驗，觀察不同濃度藥物對粒線體呼吸作用效率的影響

1.使用數據分析軟體 Excel 計算每組數據的平均 od 值

2. 使用 T. Test 求出 p-value，p-value < 0.05 視為具顯著差異以*表示，p-value < 0.01 視為具極顯著差異以**表示，p-value < 0.001 視為非常顯著差異以***表示。

3.繪製圖表。

實驗二：Trypan blue 染色，測定細胞結構的完整性

1.使用數據分析軟體 Excel 計算(未染色細胞／總細胞數)值，為細胞存活率

2.計算出每組數據的平均細胞存活率

3. 使用 T. Test 求出 p-value，p-value < 0.05 視為具顯著差異以*表示，p-value < 0.01 視為具極顯著差異以**表示，p-value < 0.001 視為非常顯著差異以***表示。

4. 繪製圖表。

實驗三：共軛焦顯微鏡，觀察不同濃度藥物對細胞形狀、粒線體分佈及型態的影響

1.使用圖片分析工具 image J ，以 20 μm 的比例尺定義圖片中的長度。

2.用直線工具測量完整細胞中被染色的粒線體長度。

3.使用數據分析軟體 Excel，將粒線體的長度分為四個級距：

I — 0 μm~0.99 μm

II— μm~1.99 μm

III— μm~2.99 μm

IV —3 μm 以上

並分別計算級距中的樣本數。

4.計算出平均每個細胞中 I、II、III、IV 級距分別占的比例。

5.使用 Chi-square Test 求出 p-value，p-value < 0.05 視為具顯著差異以*表示，p-value < 0.01 視為具很顯著差異以**表示，p-value < 0.001 視為非常顯著差異以***表示 。

6. 繪製圖表。

伍、　研究結果

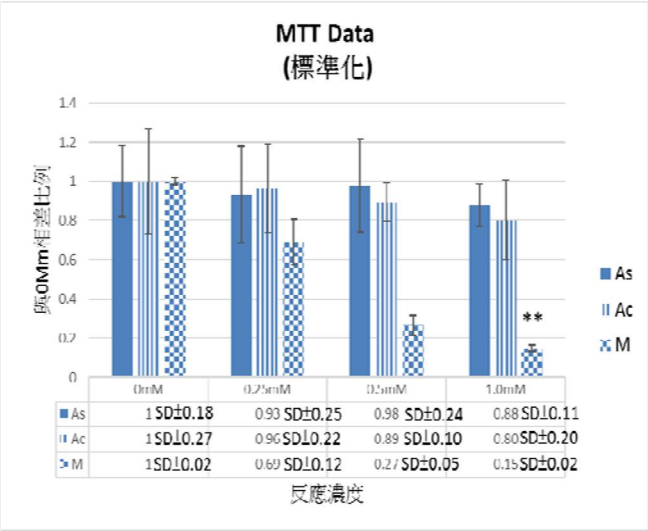
一、固定反應時間並改變不同藥物濃度： 在參照多份文獻中實驗的作用濃度與時間後，我們決定以 0、0.25、0.5、1.0mM 的藥物反應 20 小時，觀察細胞的改變。

實驗一、MTT 細胞活性測定實驗

粒線體最主要功能之一是掌管細胞的呼吸作用，其功能是否受到影響，我們將透過 MTT 細胞活性測定窺知一二。

MTT assay 的作用原理為：細胞內存在於粒腺體內膜中的琥珀酸去氫酶（succinate dehydrogenase）能充分將 MTT 黃色水溶液還原為紫色結晶顆粒；而還原能力的強弱可代表琥 珀酸去氫酶的活性，也就是粒線體的生理狀況。粒線體是細胞中對於環境因素最為敏感的胞器，因此足以代表細胞的生理狀況。當琥珀酸去氫酶的還原能力強，表示克氏循環（Kreb’ s cycle）進行速率快，可產生較多的能量供細胞代謝，故可以代表細胞的存活情形（摘自文獻 7）。

以下圖表內數據來自分光光度計之 OD 值經標準化後的比例，並以 As 代表 Aspirin、Ac 代表 Acetaminophen、M 代表 Mefenamic Acid



圖四、經標準化後以 0、0.25、0.5、1.0mM 的三種藥物處理 20h 後細胞之 MTT 數據

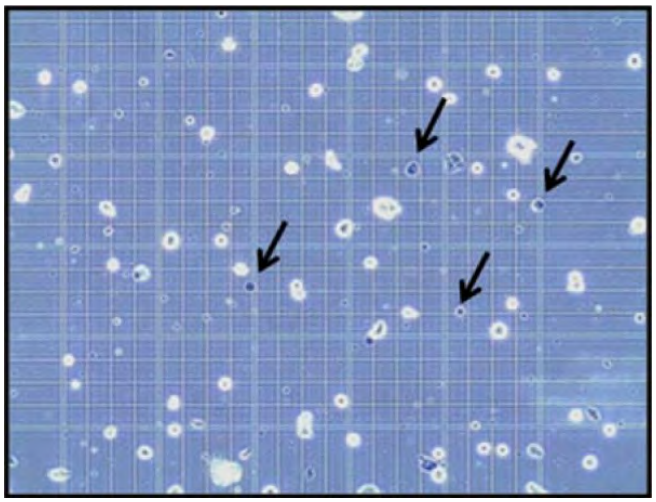
我們將三組數據標準化，以未經作用的細胞數據為基準，繪製柱狀圖。圖四實驗結果顯示， 三種藥物都有使粒線體呼吸效率下降的趨勢，且逐步下降的幅度穩定。圖表中可以看出經 Aspirin 和 Acetaminophen 作用後的粒線體呼吸效率相仿，更可以看出 Mefenamic Acid 和前兩者相比，在 1mM 時與 0mM 達到顯著差異。

具體而言，Mefenamic Acid 不但使粒線體呼吸效率大幅減弱，且濃度愈高，和 0mM 時的細胞活性差異愈明顯，甚至將呼吸效率降到了原本的 20%以下，這是前兩種藥物所無法做到的。

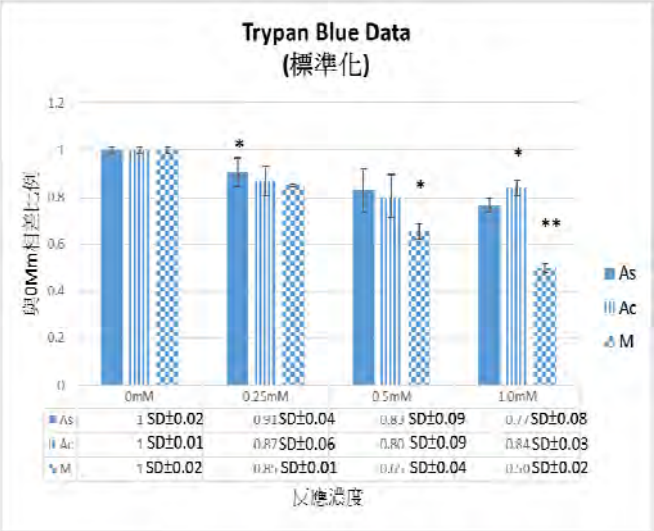
實驗二、Trypan blue 細胞染色實驗

接著，為了瞭解粒線體呼吸作用效率和細胞存活率之間的關係，我們以 Trypan blue 染色細胞，並計算出經藥物作用後的細胞存活率。

Trypan blue 染色法的作用機制為：存活的細胞其細胞膜有能力將染劑排出細胞體，使其不被染色，也可以說，細胞膜沒有被破壞的狀況下，細胞不會被染色，相對的，在顯微鏡下可觀察到的藍色細胞即為細胞膜被破壞者，我們將其定義為死亡。



圖五、經 Trypan Blue 染色的細胞，*Hong etc.*，2011（摘自文獻 8）



圖六、經標準化後以 0、0.25、0.5、1.0mM 的三種藥物處理 20hr 後細胞之 Trypan Blue 數據

在圖六中，可以看出藥物濃度的提高會降低細胞存活率，使藍色細胞比例愈來愈高，此處 p-value 為各藥物不同濃度作用後，和 0mM 時的結果比較而得的差異性。

經 Aspirin 作用後，存活率下降，並在 0.25mM 時出現和未經作用的數據差異性大的狀況，然而濃度繼續提高後，差異性不顯著，似乎和實驗一結果不完全相符。

另一方面，從 Acetaminophen 的數據中，也可以看出細胞存活率逐步下降的趨勢，當濃度來到 1.0mM 時，竟出現了和實驗一中 Aspirin 相似的突增現象，且 p-value 小於 0.05，出現差異。

經 Mefenamic Acid 作用後，細胞依然有存活率逐步下降之勢，且當藥物濃度提高至 0.5mM 和 1.0mM 時出現了 p-value 小於 0.05 甚至 0.01 的情形，和 0mM 時的結果比較，意味其差異十分明顯，但和實驗一的 MTT 數據相比，下降幅度卻較小。

總括而言，三種藥物的濃度提高都有使細胞存活率下降的情形，且濃度愈高，差異性愈明顯，僅管 Aspirin 和 Acetaminophen 的效果並不如 Mefenamic Acid 來的大。

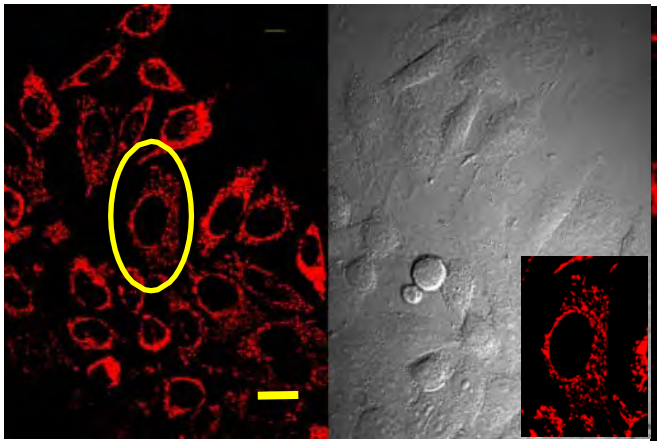
以上各點我們將在討論中進一步推論原因。

實驗三、共軛焦顯微鏡觀察

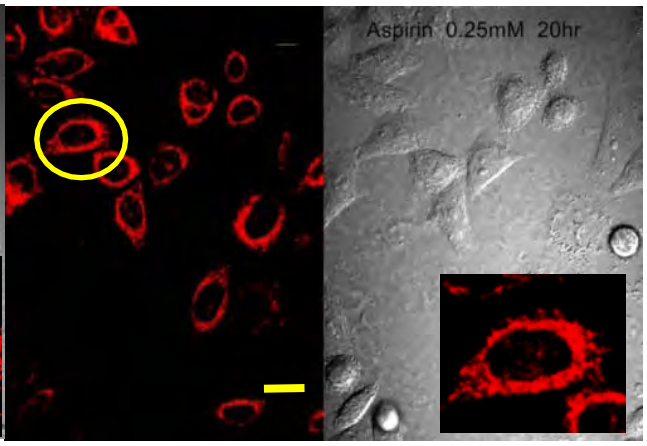
（一）顯微鏡照片觀察

未經藥物作用前，海拉細胞呈飽滿紡錘狀，在螢光顯微鏡下的粒線體分布平均而分散，一旦受到藥物影響，粒線體即有彼此靠近，向細胞核聚集情形，死亡而呈圓形的細胞數也隨之增加。圖中的比例尺皆代表 20 μm。

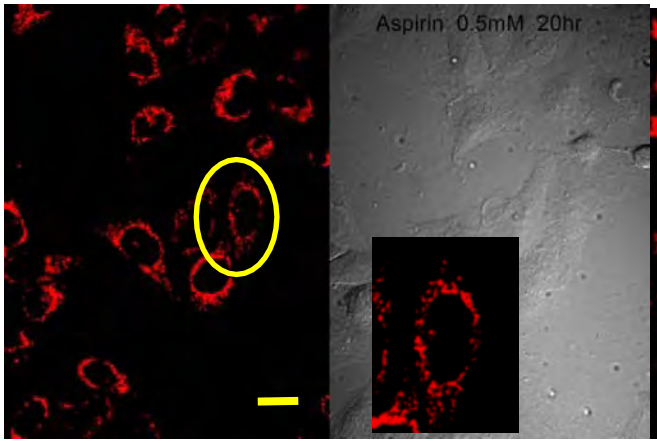
1.Aspirin



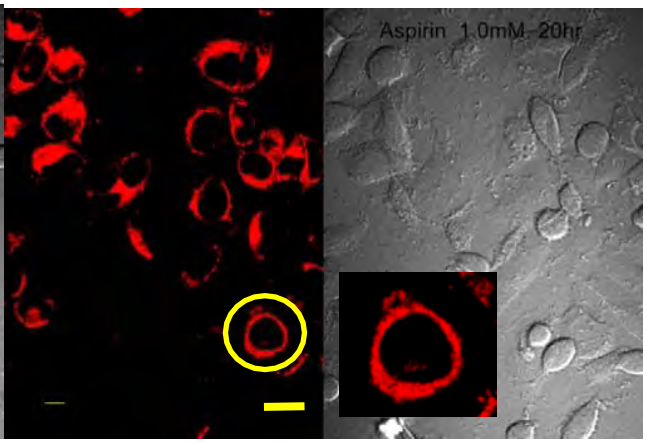
圖七 a、未經處理的細胞



圖七 b、經 0.25mM 的 Aspirin 處理 20hr 後



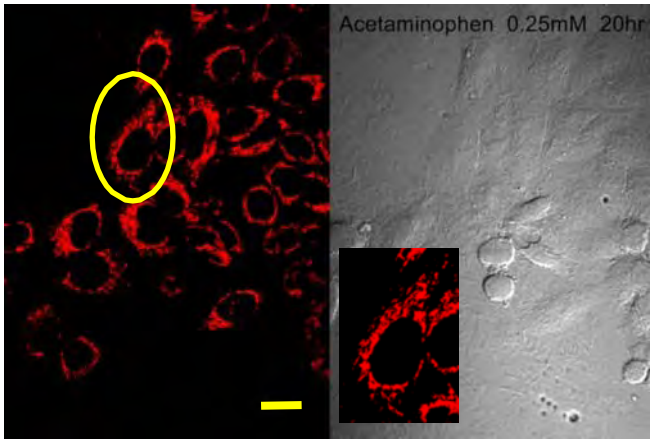
圖七 c、經 0.5mM 的 Aspirin 處理 20hr後的細胞



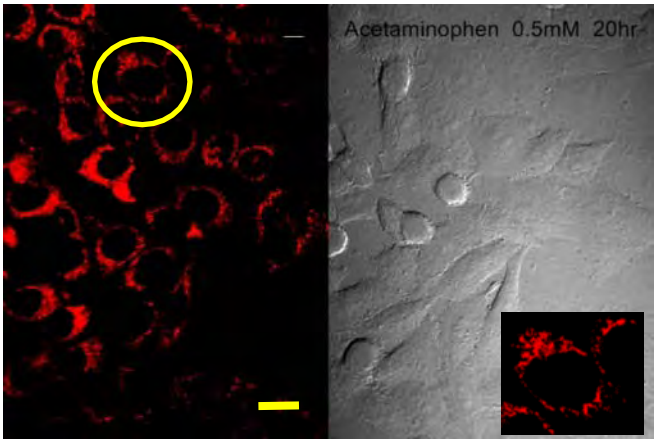
圖七 d、經 1.0mM 的 Aspirin 處理 20hr 後的細胞

圖七 b、七 c 的細胞在白光圖中呈飽滿狀，但其粒線體已稍微向細胞核集中。由圖七 d 可看出，作用在海拉細胞上的藥物濃度到達 1.0mM 時細胞形狀不像圖七 a 那般飽滿，代表細 胞質萎縮，且粒線體已聚集成塊塊紅斑。（圖七 a～d）

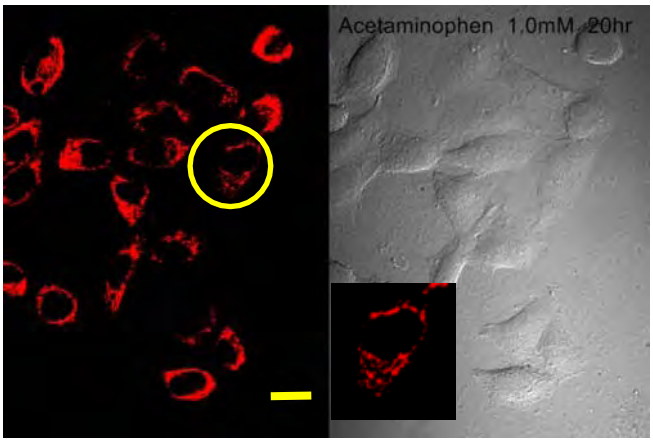
2.Acetaminophen （細胞原始狀態參考圖七 a）



圖八 a、經 0.25mM 的 Acetaminophen 處理 20hr 後的細胞



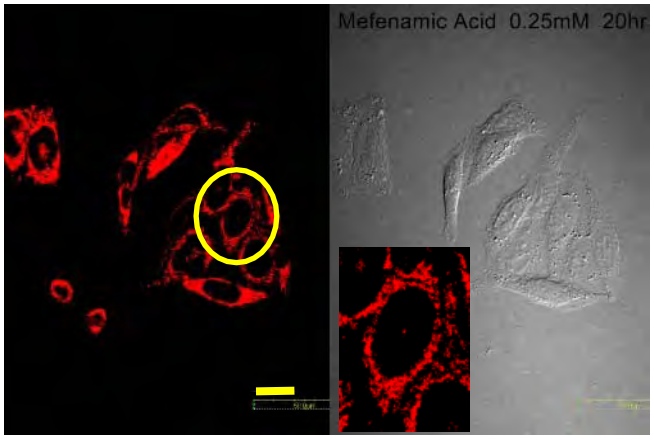
圖八 b、經 0.5mM 的 Acetaminophen 處理 20hr 後的細胞



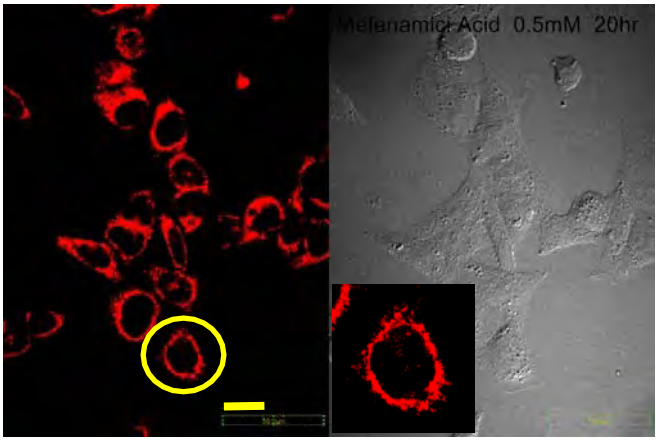
圖八 c、經 1.0Mm 的 Acetaminophen 處理 20hr 後的細胞

由白光影像中可看出，細胞形狀並未有太顯著變化，而在螢光顯微照片下，粒線體分布隨著藥物濃度提高愈發密集。惟效果和 Aspirin 相似，濃度提高至 1.0mM 時方有較顯著差異。（圖八 a～c）

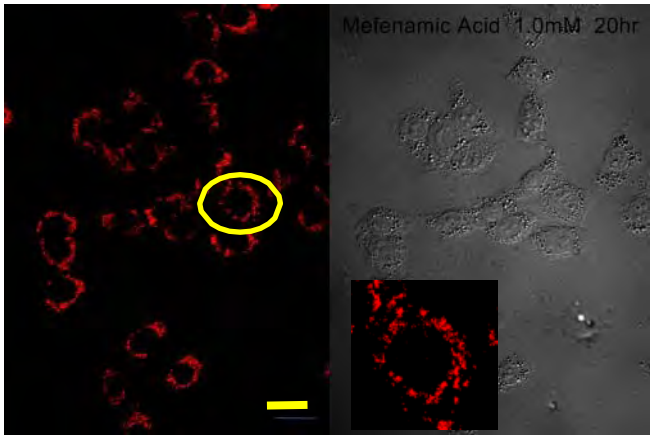
3.Mefenamic Acid（細胞原始狀態參考圖七 a）



圖九 a、經 0.25mM 的 Mefenamic Acid 處理 20hr 後的細胞



圖九 b、經 0.5mM 的 Mefenamic Acid 處理 20hr 後的細胞



圖九 c、經 1.0mM 的 Mefenamic Acid 處理 20hr 後的細胞

由圖九 a 可發現，細胞的形狀變得細長，圖九 c 中又萎縮成圓形，且由螢光顯微圖可進一步發現：粒線體的分布不但有群聚情形（圖九 b），且不斷往細胞核方向靠近。相較於前兩種藥物，Mefenamic Acid 的作用效果比較顯著。

（二）測量粒線體長度

細胞照片提供的資訊並不足以使我們客觀判斷藥物對粒線體作用的效果，為了更一步探討粒線體受到藥物作用所發生的變化，我們將照片一一放大，配合比例尺，測量細胞中粒線體的長度。經由歸納多篇論文，我們發現粒線體長度隨著凋亡過程愈來愈短，於是我們將粒線體長度分為四個級距：I — 0~0.99 μm、II — 1~1.99 μm、III — 2~2.99 μm、IV —>3 μm，將每 一個級距的粒線體數量除上粒線體數量總和，計算各長度粒線體在一個細胞中佔的百分比， 藉此代表粒線體受損程度。每組數據平均皆統計了二十個以上的細胞。

統計算式如下：

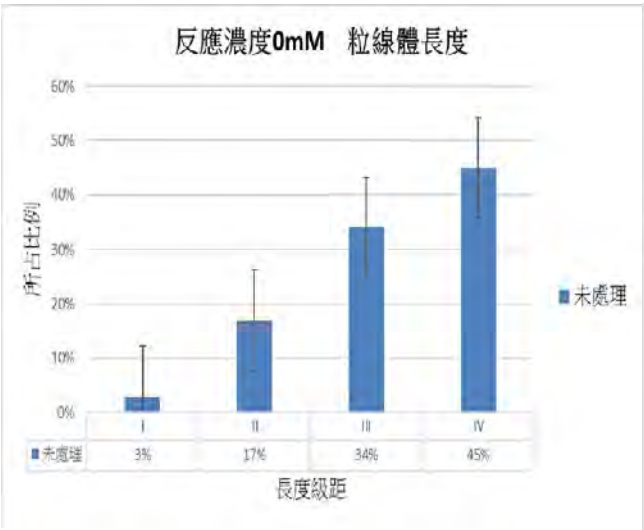
$$\frac{\text{同級距之粒線體總數}}{\text{總細胞數}\times\text{平均粒線體總數}}\times 100\% = \text{同級距粒線體在細胞中所占比例}$$

表二、利用卡方檢測求出藥物之不同濃度的 p-value。

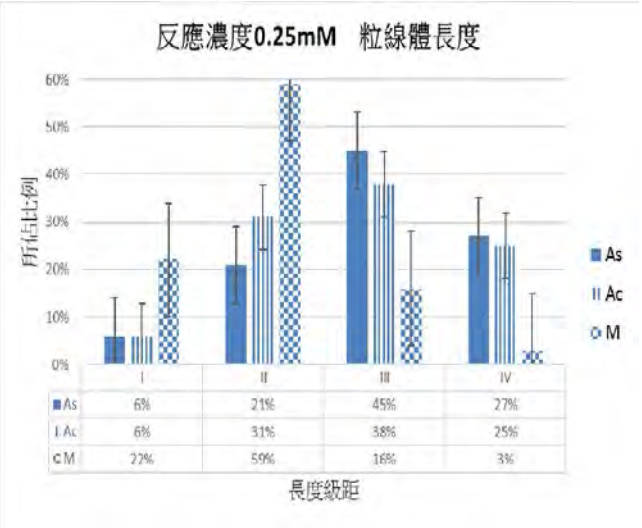
藥物 / 藥物濃度	Aspirin	Acetaminophen	Mefenamic Acid
0.25mMv. s. 0mM	***($6.6*10^{-177}$)	***($1.26709*10^{-79}$)	***($4.0191*10^{-286}$)
0.5mM v. s. 0mM	***($5.994*10^{-143}$)	***($1.4907*10^{-139}$)	***(≒0)
1.0mM v. s. 0mM	***($1.8855*10^{-280}$)	***($2.5095*10^{-205}$)	***(≒0)

〔註 :Mefenamic Acid0.5mM 及 1.0mM 之 p-value 數值因太小而趨近於零〕

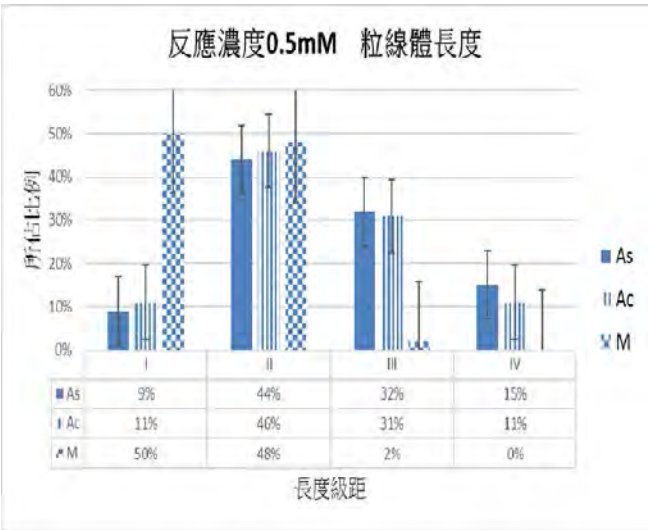
從表二中數據顯示，經過這一系列藥物作用後，粒線體長度有顯著差異，且 Mefenamic Acid 的 p-value 在三種藥物中，不論何種濃度下，都是最小的。之後我們又進一步比較不同藥物在同一濃度下的粒線體長度，結果如圖十 a~d。



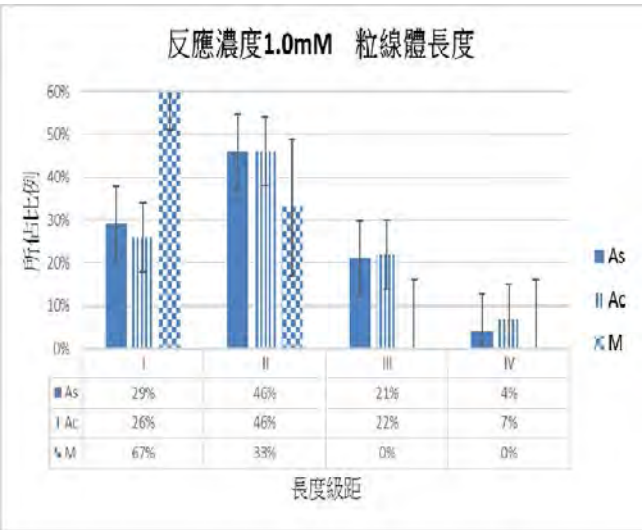
圖十 a、未經處理之細胞之粒線體長度



圖十 b、經 0.25mM 的不同藥物處理後細胞之粒線體長度



圖十 c、經 0.5mM 的不同藥物處理後細胞之粒線體長度



圖十 d、經 1.0mM 的不同藥物處理後細胞之粒線體長度

從上方四張條狀圖中我們可以讀出，不論何種藥物，都使長度較短的粒線體數量佔整個細胞的百分比隨著作用藥物濃度提高而漸漸增加，且在 0.25mM 藥物作用的圖中可發現 Mefenamic Acid 對粒線體的影響遠大於另外兩者，而相比較之下，Aspirin 和 Acetaminophen 趨勢曲線非常接近。

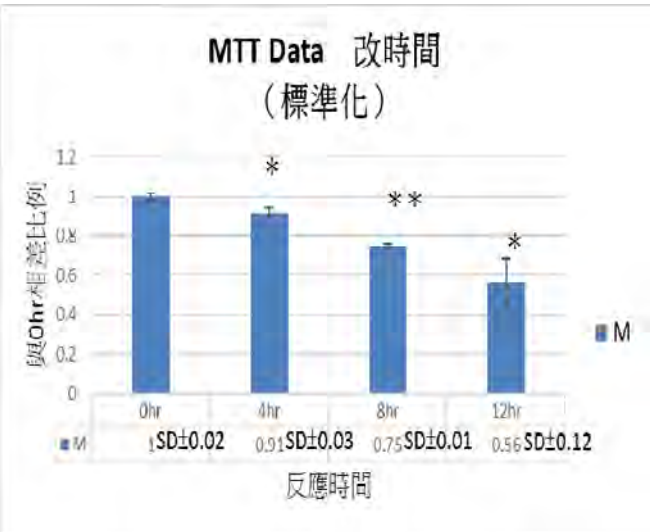
以 Aspirin 和 Acetaminophen 來說，長度較長的粒線體數量隨藥物濃度提高而穩定下降，粒線體平均長度亦跟著減少，此兩種藥物造成的影響是較緩和的。

至於 Mefenamic Acid 在濃度為 0.25mM 時造成的粒線體長度急遽縮短，是在另外兩種藥 物上所沒有觀察到的，由此可推論，Mefenamic Acid 對粒線體的影響確實較快也較大。值得關注的是，在上方柱狀圖中經其作用後的粒線體長度縮短幅度很大，且有一定規律可循。

二、固定濃度、改變反應時間:

根據上述實驗結果，我們判斷 Mefenamic Acid 對海拉細胞的活性影響最大，也最具規律性。因此，以下實驗我們將針對此種藥物做進一步探討，並將操縱變因改為藥物作用時間， 固定藥物濃度。又，比對幾篇相關論文和作品後，我們發現藥物反應四小時後對細胞較有明顯影響，加上我們在前述實驗中觀察到，藥物濃度於 1.0mM 時對細胞影響最為明顯，故我們選擇的時間間隔為四個小時，藥物濃度為 1.0mM。

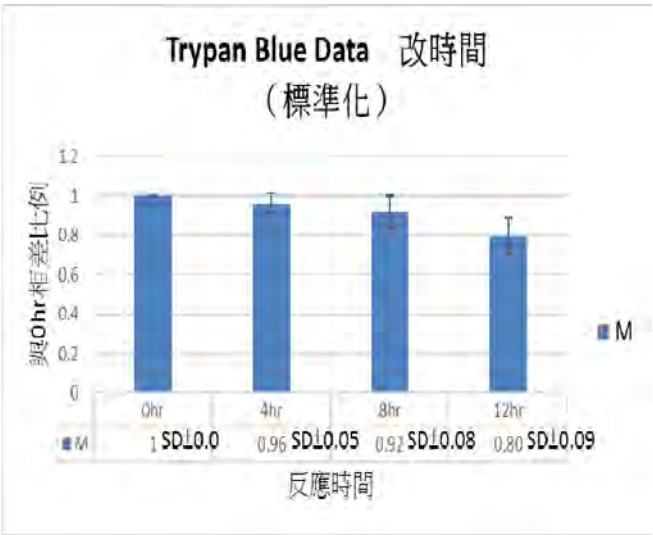
實驗四：MTT 活性測定實驗：



圖十一、經標準化後以 1mM 的 Mefenamic Acid 處理 0、4、8、12 小時後細胞之 MTT 數據

進行 MTT 細胞活性測定後，我們觀察到具一定規律性的遞減趨勢，證明隨著藥物作用時間增加，粒線體呼吸作用的效率受到影響而下降，且時間愈長，呼吸效率下降的幅度也愈大，然而此影響仍不若提高藥物濃度。（圖十一）

實驗五：Trypan Blue 細胞染色實驗

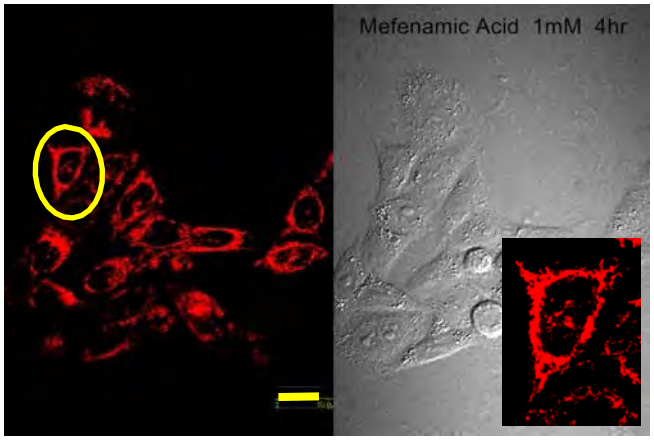


圖十二、經標準化後以 1mM 處理 0、4、8、12 小時後細胞之 Trypan Blue 數據

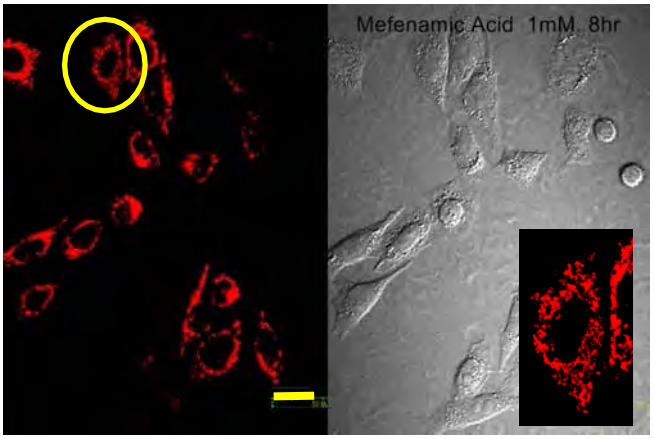
在 Trypan Blue assay 中，我們發現細胞存活率下降的幅度不大，和未經藥物作用的細胞 相比，差異性也不明顯，直到時間拉長至 12 小時，影響便增大了，也就是說，作用時間愈長，藥物對細胞的影響就愈大。（圖十二）

實驗六：

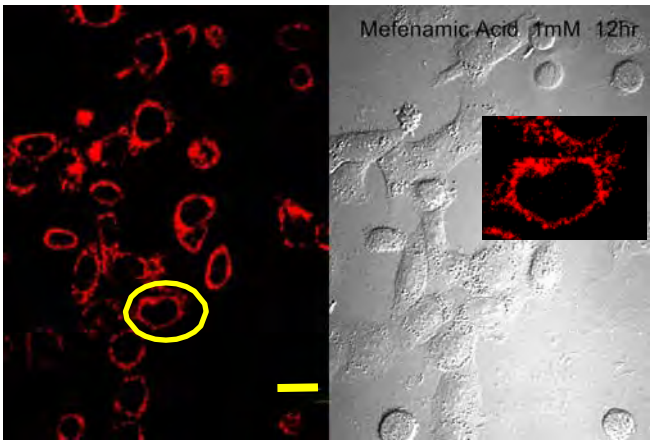
（三）螢光顯微鏡照片（細胞原始狀態參照圖七 a ）



圖十三 a、經 1mM 的 Mefenamic Acid 處理 4hr 後的細胞



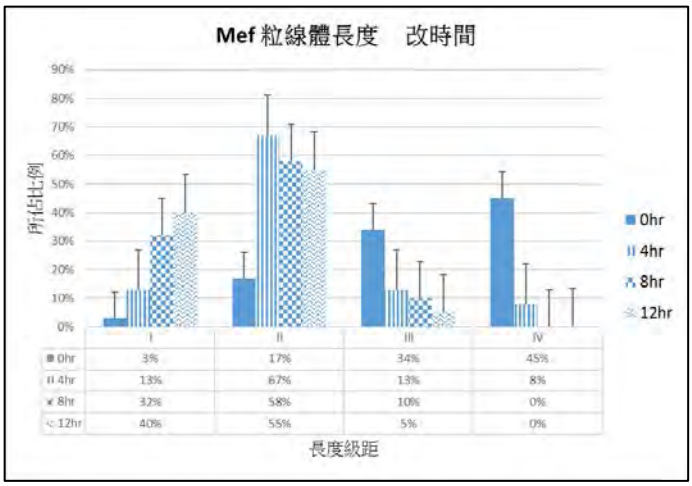
圖十三 b、經 1mM 的 Mefenamic Acid 處理 8hr 後的細胞



圖十三 c、經 1mM 的 Mefenamic Acid 處理 12hr 後的細胞

由圖十三 a~c 可看出粒線體有漸趨縮短且向細胞核集中的趨勢，但其改變程度並未如經 改變濃度的 Mefenamic Acid 的細胞那般劇烈。

（二）粒線體長度比較



圖十四、以 1.0mMMefenamic acid 處裡 0、4、8、12 小時後粒線體長度

將各組數據和原始未經藥物作用的細胞相比，由柱狀圖可以發現，Mefenamic Acid 作用的時間愈長，粒線體長度有減少的現象，惟顯著程度不如先前實驗一～三中，提高藥物濃度時來的大。

陸、　討論

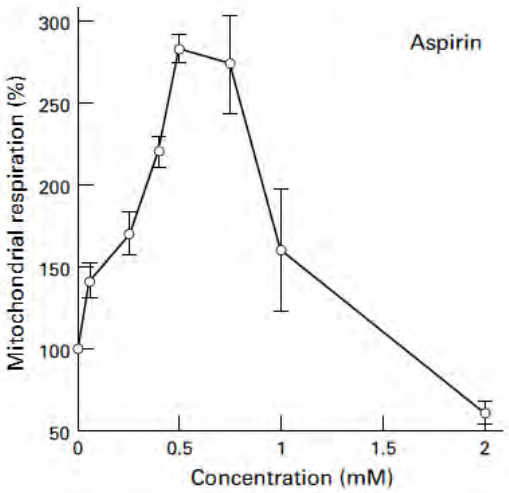
一、比較實驗所用之藥物濃度與臨床服用劑量之差別

表三、老鼠、人類常見使用藥物劑量及實驗使用劑量

對象＼藥物	Aspirin	Acetaminophen	Mefenamic Acid
細胞	0.25~1mM	0.25~1mM	0.25~1mM
老鼠	5~30mg/kg	5~30mg/kg	5~30mg/kg
人類	500mg	500mg	500mg

二、改變濃度　MTT 數據比較

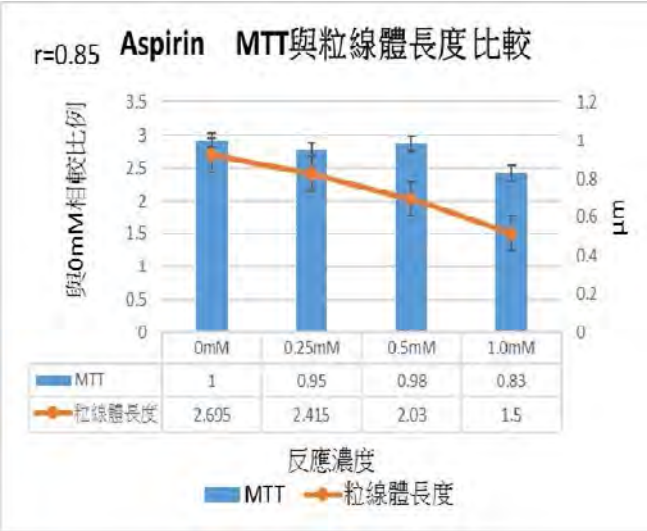
在一連串數據中，我們發現 Aspirin 的趨勢有項十分有趣的特徵：在 0.5mM 藥物作用下呼 吸作用效率會回升。經查閱文獻 8 後，我們發現類似的數據亦有出現（圖十五）。



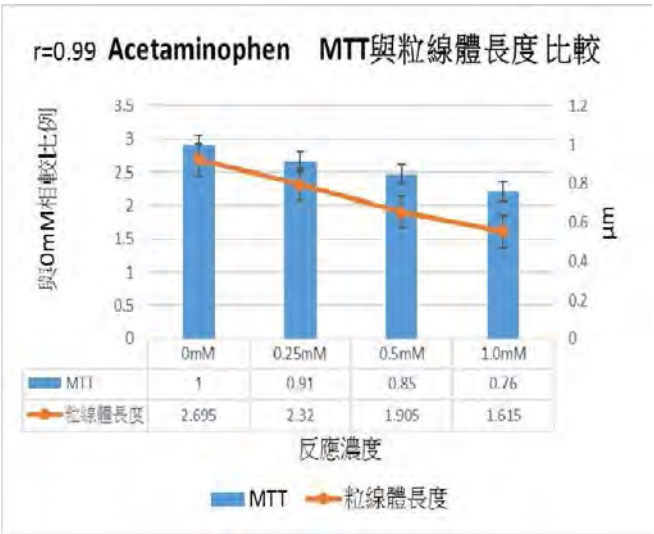
圖十五、不同濃度 Aspirin 處理下呼吸作用效率，*Somasundaram etc.*，1997（摘自文獻 8）

我們推測這個回升很可能因為在粒線體滲透作用初期，粒線體膜上的通道蛋白開啟、離子進出速率增快，使得呼吸作用效率提高，卻尚未對粒線體造成傷害。

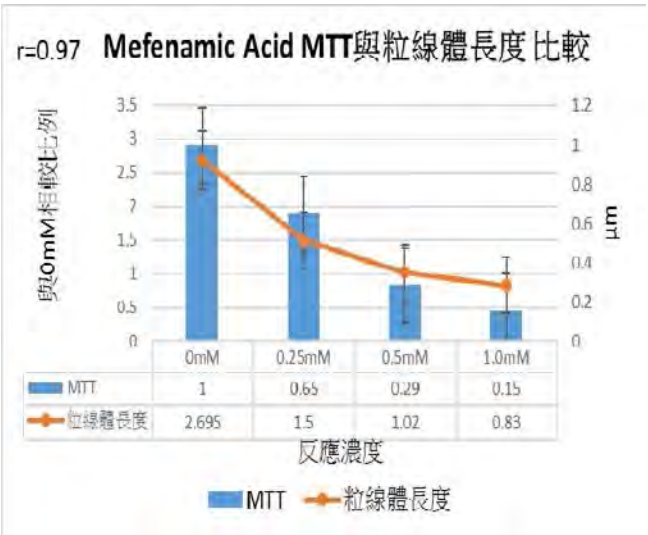
為了再次證明粒線體長度縮短與呼吸作用效率下降有關，我們將粒線體長度的數據與 MTT 的數據做疊圖比較，並求出粒線體長度的數據與 MTT 相關係數（r）。



圖十六 a、Aspirin 的 MTT 與粒線體長度數據疊圖（r=0.85）



圖十六 b、Acetaminophen 的 MTT 與粒線體長度數據疊圖（r=0.99）

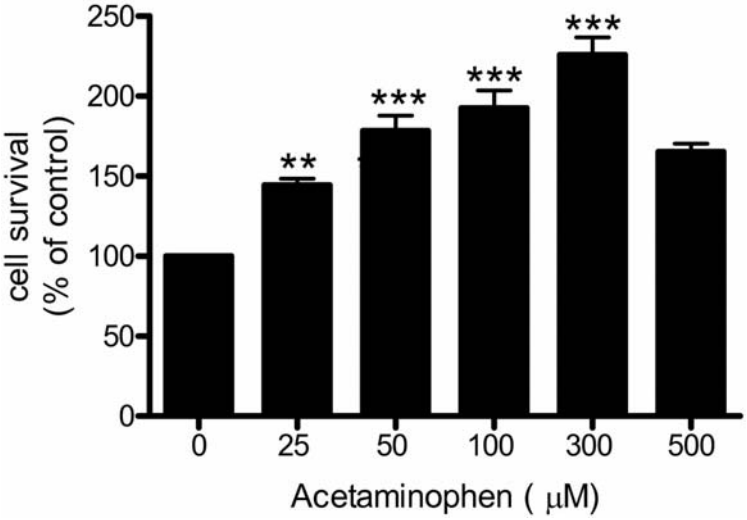


圖十六 c、Mefenamic Acid 的 MTT 與粒線體長度數據疊圖（r=0.97）

比較三圖可看出，除圖十六 a 兩數據間的相關係數略低外，圖十六 b、c 兩數據間的相關係數皆逼近 1，顯示粒線體長度與呼吸作用效率有密切關聯。

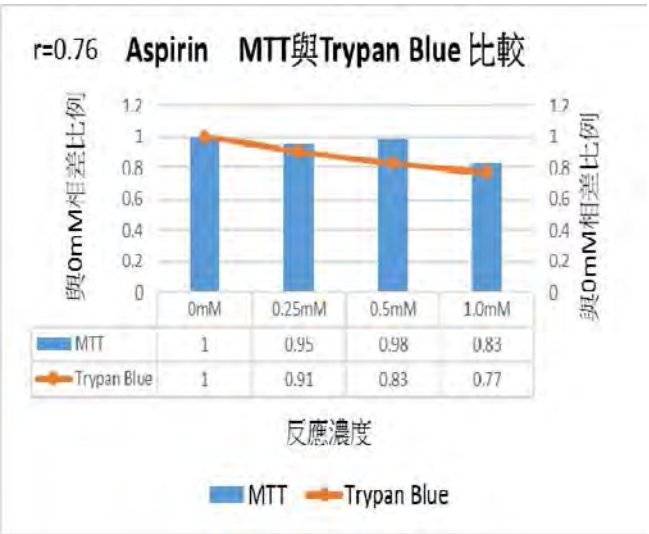
三、改變濃度　Trypan Blue 數據比較

在上述數據中，我們發現 Acetaminophen 的趨勢亦有和 Aspirin 相似的回升特徵：在 1mM 藥物作用下，粒線體存活率略高於 0.5mM 時。目前尚未找到與我們的實驗數據完全吻合的資料，但從文獻 9 中可得知 Acetaminophen 與 Aspirin 相同，在低濃度下細胞活性皆有回升之現象，如圖十七所示。

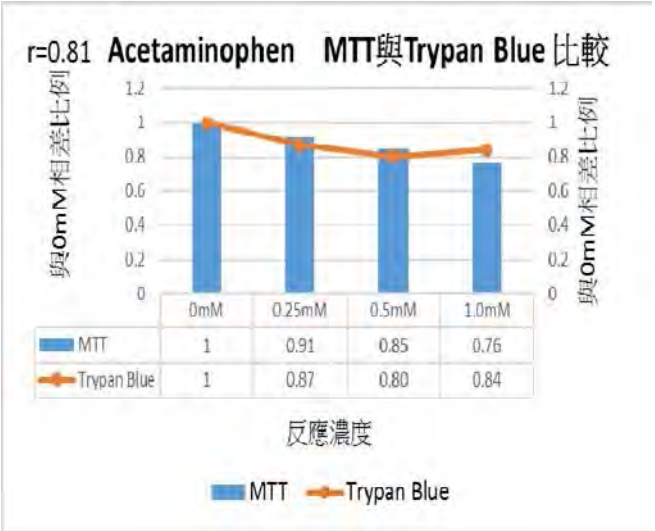


圖十七、不同濃度 Acetaminophen 處理下細胞存活率，Tripathyand Grammas，2009（摘自文獻 9）

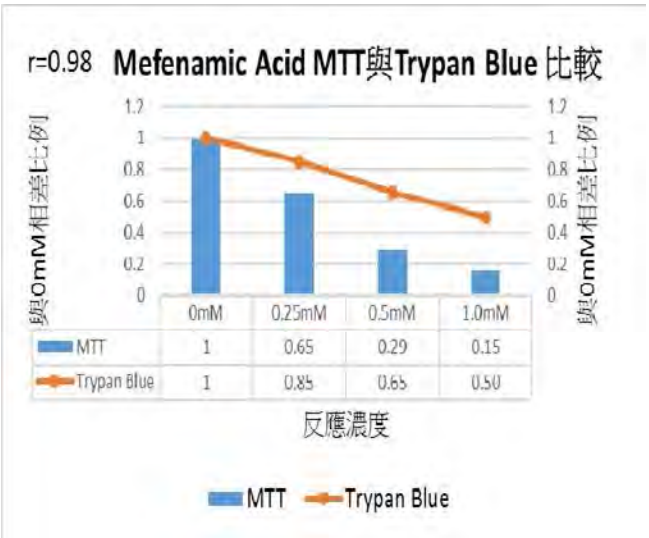
為了比較 MTT 與 Trypan Blue 的數據有無關聯性，我們將兩者數據疊圖做比較，並求出 Trypan Blue 的數據與 MTT 相關係數（r）。



圖十八 a、Aspirin 的 MTT 與 Trypan Blue 數據疊圖（r=0.76）



圖十八 b、Acetaminophen 的 MTT 與 Trypan Blue 數據疊圖（r=0.81）



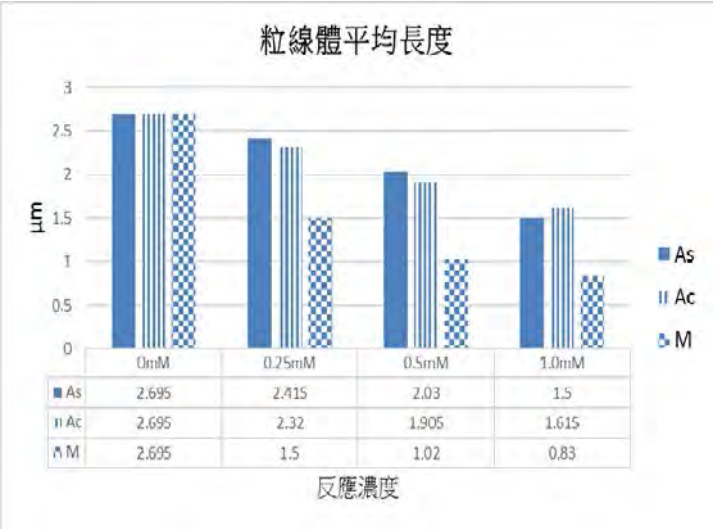
圖十八 c、Mefenamic Acid 的 MTT 與 Trypan Blue 數據疊圖（r=0.98）

觀察上方圖表，可以發現圖十八 a、b 兩數據間的相關係數遠低於圖十七a~c。我們認為這是因為細胞內呼吸效率降低並不代表細胞已死亡，故在細胞膜破損卻未死亡階段的細胞在 MTT 活性測定中被視為活細胞，於 Trypan Blue 染色實驗中細胞卻因被染色而視為死亡，使得 Trypan Blue 數據的曲線較 MTT 數據的曲線下降幅度較平緩。但圖十八 c 中兩數據間的相關係數卻十分高，更證明了 Mefenamic Acid對細胞傷害較劇，且影響趨勢較明顯。

四、改變濃度　比較粒線體長度

為了更清楚的比較出不同條件下粒線體的長度，我們將長度級距的中間值乘以該級距在細胞中所占百分比，再將各值加總，最後求得的值定義為該組的平均粒線體長度。 算式如下：

0.5× 級距 I 比例+1.5× 級距 II 比例+2.5× 級距 III 比例+3.5× 級距 IV 比例=平均粒線體長度



圖十九、不同藥物在 0、0.25、0.5、1.0Mm 處理下細胞之平均粒線體長度

參考文獻 10 後，我們發現未進行分裂或融合的粒線體平均長度為 2μm。因此，我們可由圖十九看出：細胞經 Aspirin 及 Acetaminophen 在濃度 0mM 至 0.5mM 作用下皆無明顯的分裂現象，長度變化不大，意謂細胞中的氧化壓力尚不甚大。反觀 Mefenamic Acid 在濃度 0.25mM 時作用在細胞上即開始使其有分裂之趨勢，長度明顯縮短，代表其大幅增加了細胞內的氧化壓力。

五、藥物作用長時間後數據比較

表四、藥物作用長時間後數據比較

MefenamicAcid	以 1mM 的藥物作用 12 小時	以 1mM 的藥物作用 20 小時
MTT（OD 值）	0.56	0.15
Trypan Blue（存活率）	80%	50%
粒線體長度（μm）	1.15	0.83

綜合了我們所有實驗中，Mefenamic acid 作用時間最長的兩組數據相比較後，可以看出作用時間大幅提高，對粒線體的影響非常顯著，其活性、長度和細胞存活率都大規模降低。

柒、 結論

一、在本次實驗中我們選用的藥物有三種，分別為 Aspirin、Acetaminophen、和 Mefenamic Acid，而在這三種藥物中，效果最顯著者為 Mefenamic Acid，市售之寶速達爾所含的主要止痛成分。

二、不論何種藥物，提高作用濃度皆會使細胞型態變化，並損壞細胞膜，造成粒線體分布往中心聚集，長度縮短，更進一步降低其呼吸作用效率，造成細胞凋亡。

三、實驗結果證明，粒線體長度縮短對其呼吸作用及細胞存活率皆有影響，其內部蛋白質的分裂造成長度減短，因應了細胞所面臨的環境氧化壓力較大。

四、提高藥物濃度和增加藥物作用時間皆會使粒線體長度縮短，呼吸效率下降，並對細胞膜造成損壞以至於降低細胞存活率。且濃度愈高，時間愈長，對粒線體的傷害愈大。

捌、　參考資料與其他

1. 傅中玲、王署君（2001 ）• 頭痛不見了 • 臺北市：文經社
2. H.AP, What is the mitochondrial permeability transition pore?, *J Mol Cell Cardiol*, 10.1016, 821-31, 2009, from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19265700
3. A.M, V. Bliek, Q. Shen, S. Kawajiri, Mechanisms of Mitochondrialfission and fusion, *Cold Spring Harbor Laboratory Press,* 10.1011, 2013, from http://cshperspectives.cshlp.org/content/5/6/a011072.long
4. M. Picard, O. S., S. Shirihai, B. J. Gentil, Y. Burelle, Mitochondrial Morphology transitions and functions：implications for retrograde signaling？, *American Journal of Physiology*, 10.1152, 2012, fromhttp://ajpregu.physiology.org/content/304/6/R393
5. A. Carpio, The Good, The Bad, And The HeLa, *Berkeley Science Review*, 2014, from http://berkeleysciencereview.com/article/good-bad-hela/
6. 葉宏軒，止痛藥與疼痛，臺灣疼痛治療資訊網，摘自 www. pain-manage.org.tw/normal/p69.htm
7. C. Hong, J. Lee, H. Zheng, C. Lee, Porous Silicon Nanoparticles For Cancer Photothermotherapy, *Nanoscale Research Letters*, 10.1186, 6(1)321, 2011, from https://www.researchgate.net/figure/51450741_fig4_Trypan-blue-staining-Optical-microscopic- images-of-the-CT-26-cells-treated-with-a
8. S. Somasundaram, S. Rafi, J. Hayllar, G. Sigthorsson, M. Jacob, A. B. Price, A. Macpherson, T. Mahmod, D. Scott, J. M. Wrigglesworth, I. Bjarnason , Mitochondrial damage: a possible mechanism of the “topical” phase of NSAID induced injury to the rat intestine , *Gut*, 41, 344－353, 1997
9. Tripathy and Grammas, Acetaminophen inhibits neuronal inflammation and protects neurons from oxidative stress, *Journal of Neuroinflammation*, 10.1186, 1742-2094, 6-10, 16 March, 2009
10. M. Cagalinec, etc., Principles of the mitochondrial fusion and fission cycle in neurons, *Journal of Cell Science*, 126, 2187-2197, 2013, from http://jcs.biologists.org/content/126/10/2187

【評語】052013

本計畫探討市售止痛藥 Aspirin、Acetaminophen 及 Mefenamic Acid 對細胞 mitochondria 之功能影響。三種藥物使粒線體長度與藥物濃度成反比，並往細胞核集中，以 MTT 及 Trypan Blue 分析三種藥物濃度高使其細胞存活力下降，及粒線體呼吸作用減少，三種藥物中以 Mefenamic Acid 效果最高，如能分析 cytochrome C 及 caspase 活性影響，則更佳。內容撰寫完整、實驗設計符合邏輯，然而市面上常見的止痛藥對粒線體之影響，數十年來已有多篇國外學術期刊深入探討，因此題目與結果較為缺少創新性。僅觀察粒線體形態和功能的影響是不足的，宜再探討相關蛋白之變化。另外，此外需注意此篇作品是以 cervical cancer Hela cells 作為模式，止痛藥於此癌細胞粒線體影響之結果，是否能延伸至正常細胞，這點有待商榷。綜合而言，創新度較不足，研究成果的意義性較弱。

作品海報

➢ 研究動機

止痛藥的發現在人類歷史上扮演了極其重要的角色。然而止痛藥固然方便有效，但其隱含的危害卻時常被忽略。

研究文獻指出，止痛藥中的非類固醇性抗發炎藥物（Nonsteroidal anti-inflammatory drugs，NSAIDs）會影響粒線體型態並加劇其膜狀構造的滲透作用。粒線體是生物細胞中不可或缺的能量及氧自由基製造工廠，若出現異常，將嚴重影響生理，造成衰老、退化等現象。

近年來，粒線體相關研究蓬勃發展。而形態為判斷粒線體狀態的重要依據，故成為研究重點之一。此即為本組研究之主要方向。

➢ 實驗目的

對定量細胞施以不同濃度（0mM ,0.25mM ,0.5mM ,1.0mM）的三種藥物，反應20小時

- Aspirin → MTT 活性測定
- Acetaminophen → Trypan Blue 細胞染色
- Mefenamic Acid → 粒線體分布及細胞型態

對定量細胞施以1.0mM的藥物，改變反應時間為0,4,8,12小時

- Mefenamic Acid → MTT 活性測定
- Trypan Blue 細胞染色
- 粒線體分布及細胞型態

➢ 主要實驗材料與器材

◆ 海拉細胞（ HeLa cell）

生物學與醫學研究中常用的一種細胞，源自一位美國婦女海莉耶塔拉克・斯（Henrietta Lacks）子宮頸癌細胞的細胞系。

其細胞株不會衰老致死，並可以無限分裂下去。跟其他細胞只能分裂約40～50次相比，其增殖速率異常快速。

分光光度計	一臺	共軛焦顯微鏡	一臺
無菌無塵生物安全櫃	一臺	血球計數器	一個

➢ 實驗結果

一、固定反應時間並改變不同藥物濃度：

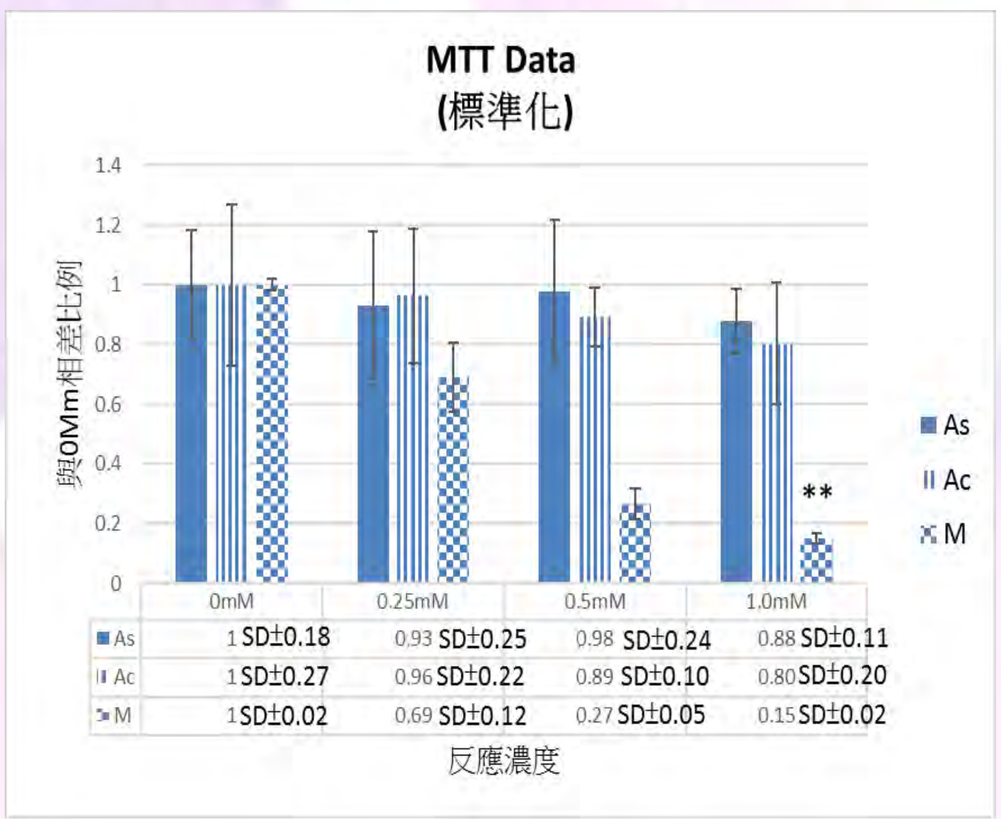
在參照多份文獻中實驗的作用濃度與時間後，我們決定以0、0.25、0.5、1.0mM的藥物反應20小時，進行觀察。

以下各圖表中，均以＊標示p value＜0.05，＊＊標示p value＜0.01者，代表差異極大，並以As代表Aspirin、Ac代表Acetaminophen、M代表Mefenamic Acid。

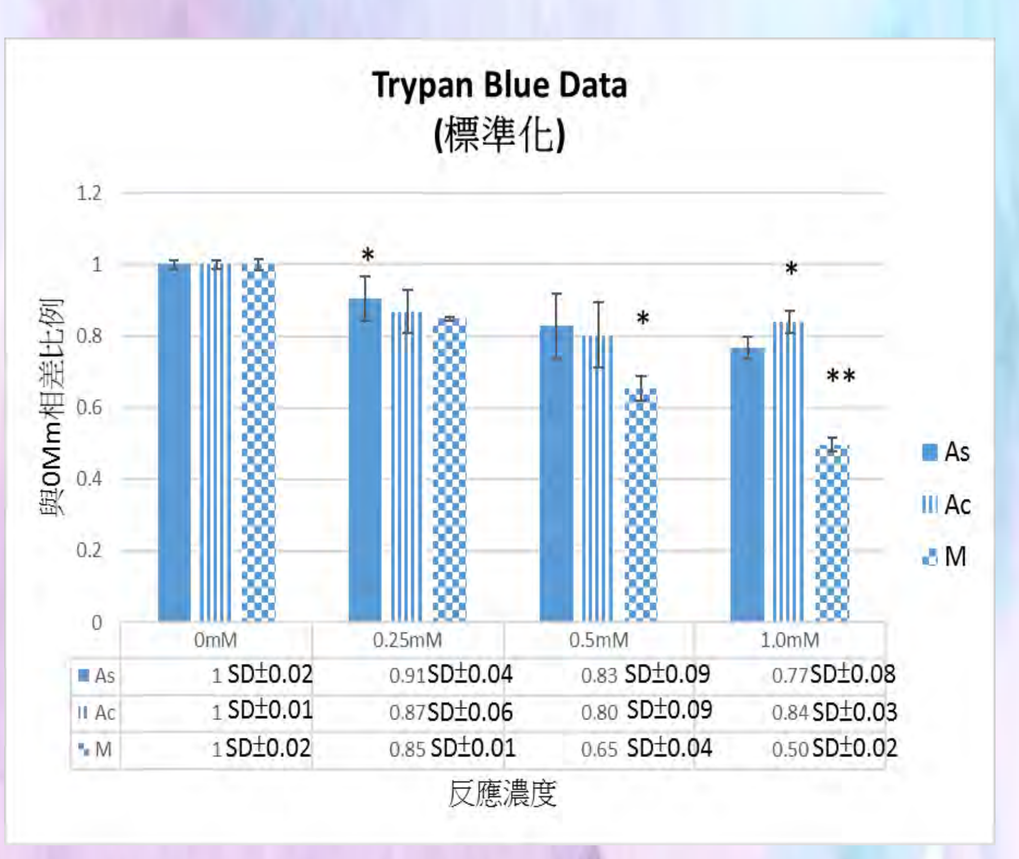
◆ 實驗一與二、MTT細胞活性測定與Trypan Blue細胞染色

圖左中數據來自分光光度計之OD值經標準化後的比例，以未經作用的細胞數據為基準，繪製柱狀圖。

為了瞭解粒線體呼吸作用效率和細胞存活率之間的關係，我們以Trypan blue染色細胞，計算未被染色的細胞數及視野下細胞總數，並定義(未染色細胞／總細胞數)為細胞存活率，圖右中數據來自細胞存活率經標準化後的比例，以未經作用的細胞數據為基準，繪製柱狀圖。



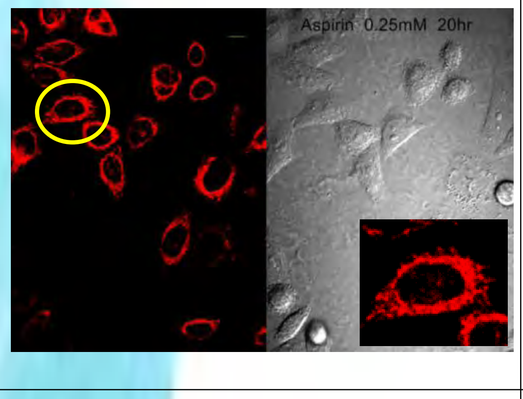
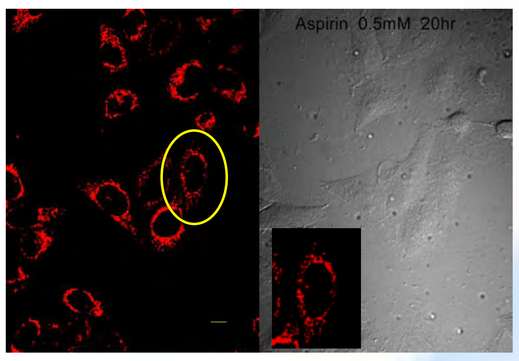
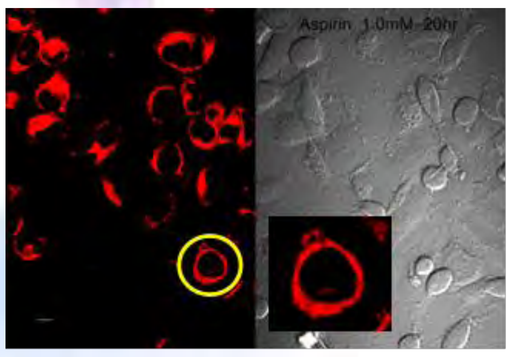
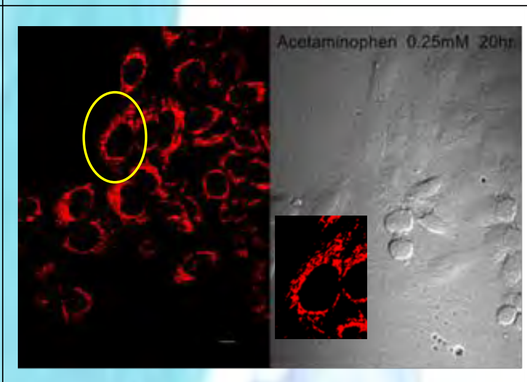
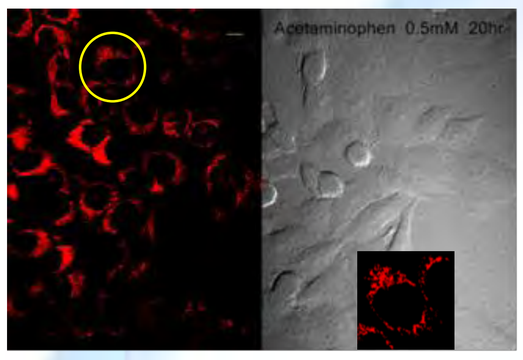
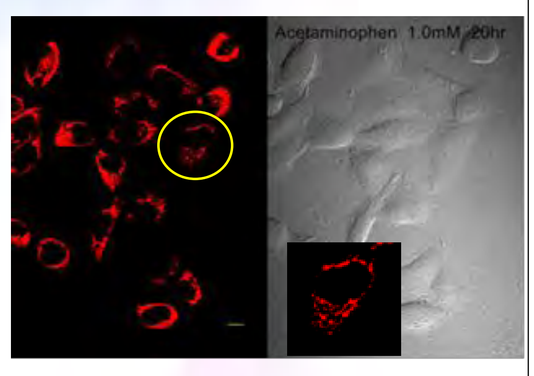
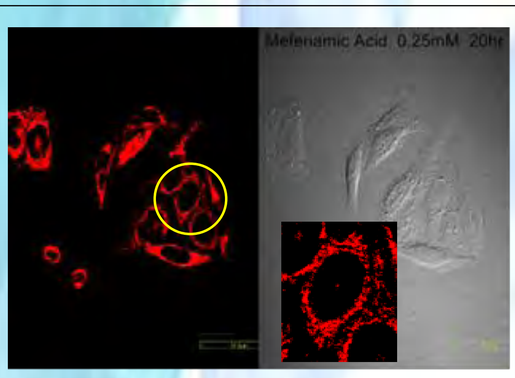
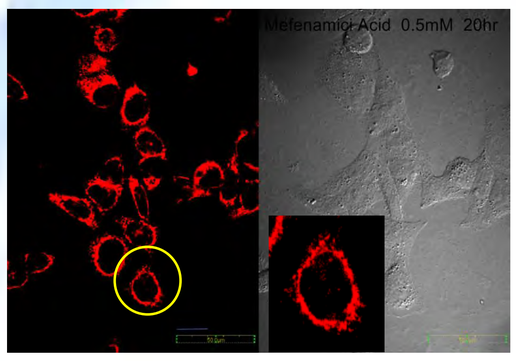
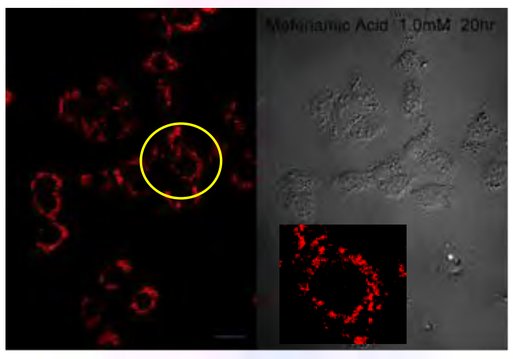
以0、0.25、0.5、1.0mM藥物處理20hr後之MTT數據



以0、0.25、0.5、1.0mM藥物處理20hr後之Trypan Blue數據

◆實驗三、共軛焦顯微鏡觀察

1.細胞照片觀察

	0mM	0.25mM	0.5mM	1.0mM
Aspirin				
Acetaminophen	參照Aspirin 0mM 之圖片			
Mefenamic Acid	參照Aspirin 0mM 之圖片			

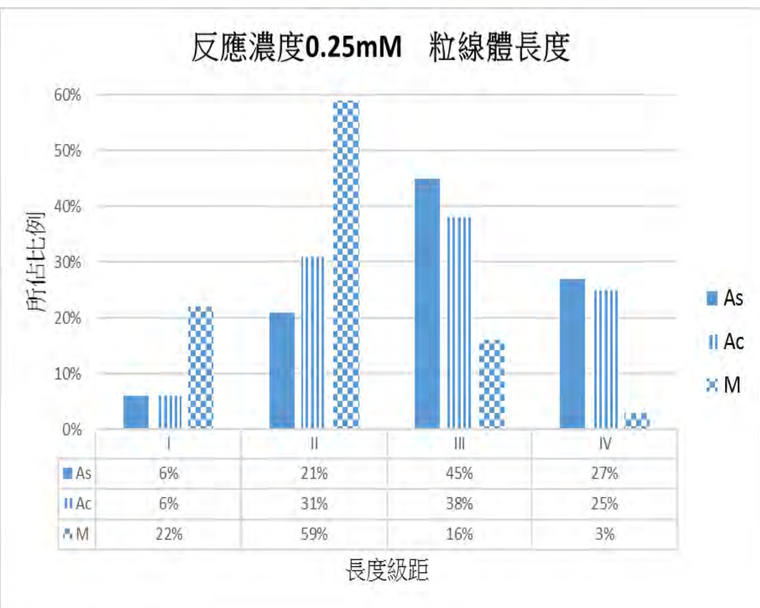
2.粒線體長度測量

長度分為四個級距：I — 0~0.99μm、II — 1~1.99μm、III — 2~2.99μm、IV — >3μm，將每一個級距的粒線體數量除上粒線體數量總和，計算各長度粒線體在一個細胞中佔的百分比，藉此代表粒線體受損程度。每組數據平均皆統計了二十個以上的細胞。

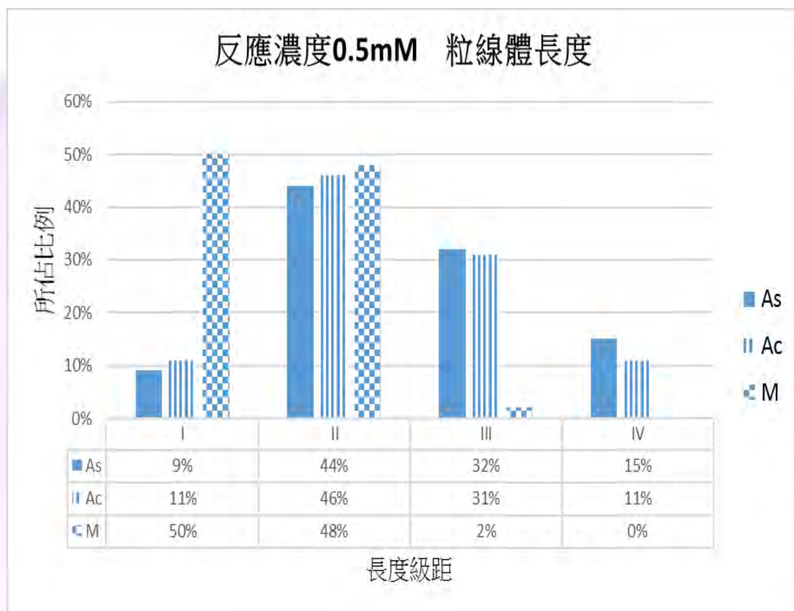
統計算式如下：

$$\frac{\text{同級距粒線體總數}}{\text{總細胞數}\times\text{平均粒線體總數}}\times 100\% = \text{同級距粒線體在細胞中所佔的比例}$$

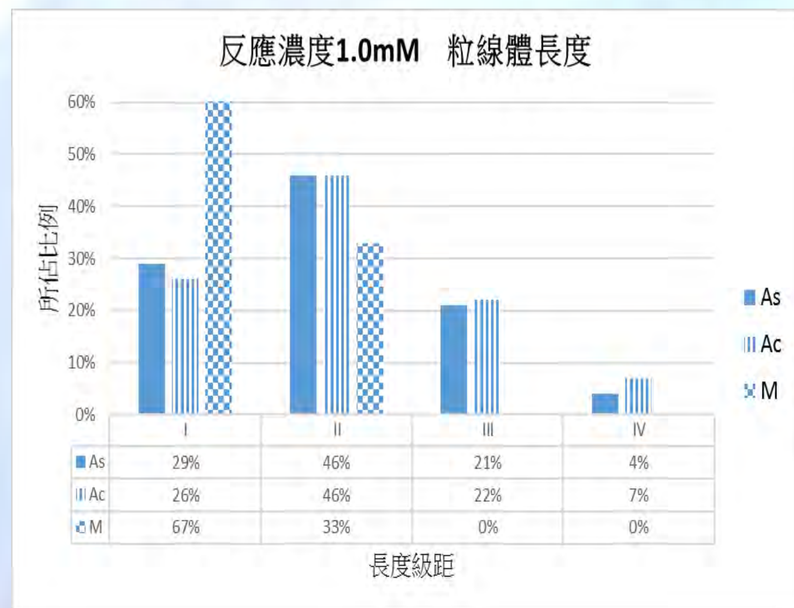
進一步比較不同藥物在同一濃度下的粒線體長度後，以原始未經作用的粒線體長度為基準標準化，繪製成柱狀圖如下圖。



經0.25mM藥物處理20小時後之粒線體長度

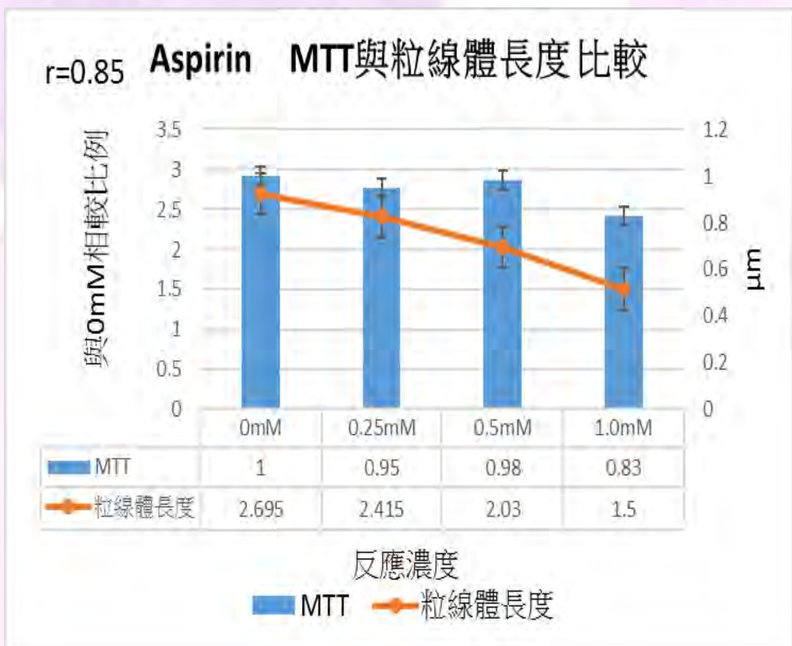


經0.5mM藥物處理20小時後之粒線體長度

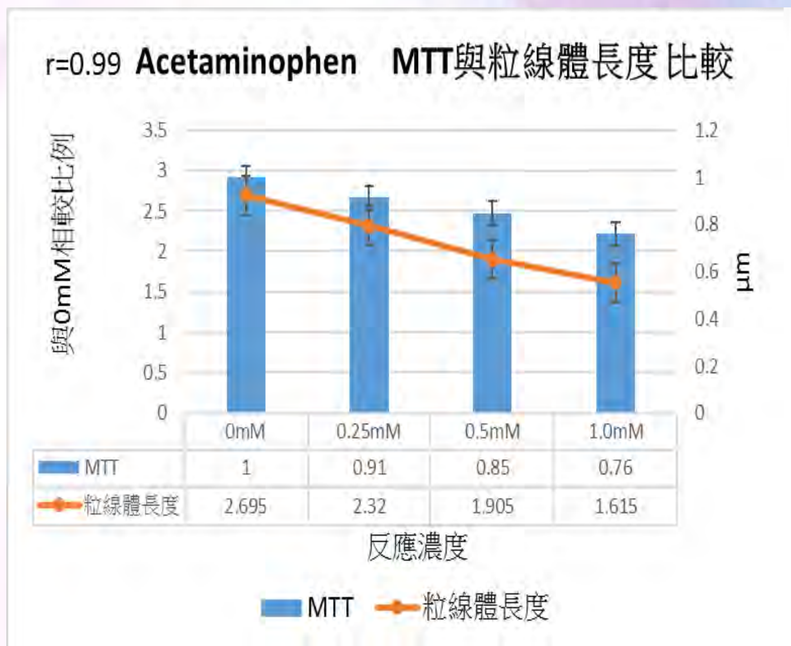


經1.0mM藥物處理20小時後之粒線體長度

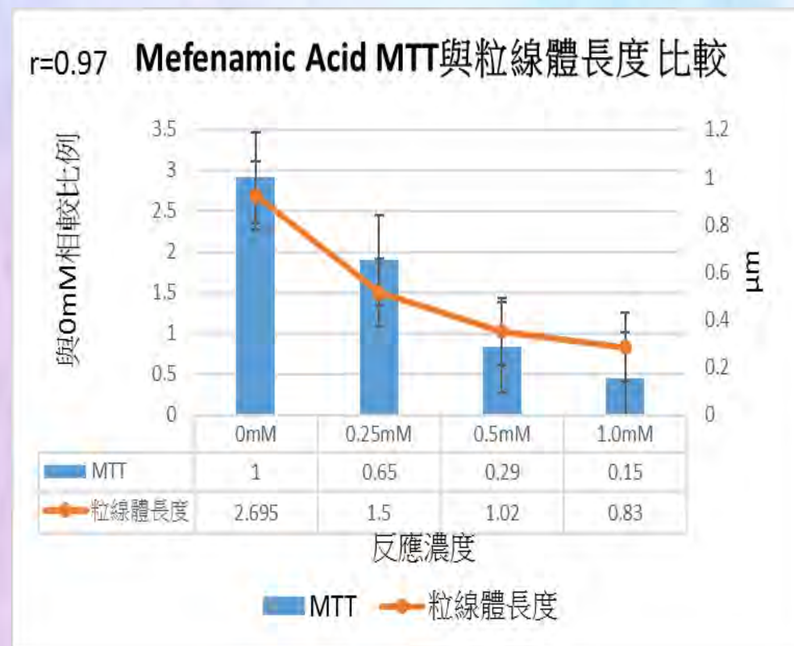
◆粒線體長度的數據與MTT的數據疊圖比較



以不同濃度Aspirin處理20小時後之粒線體長度與MTT數據比較



以不同濃度Acetaminophen處理20小時後之粒線體長度與MTT數據比較



以不同濃度Mefenamic Acid處理20小時後之粒線體長度與MTT數據比較

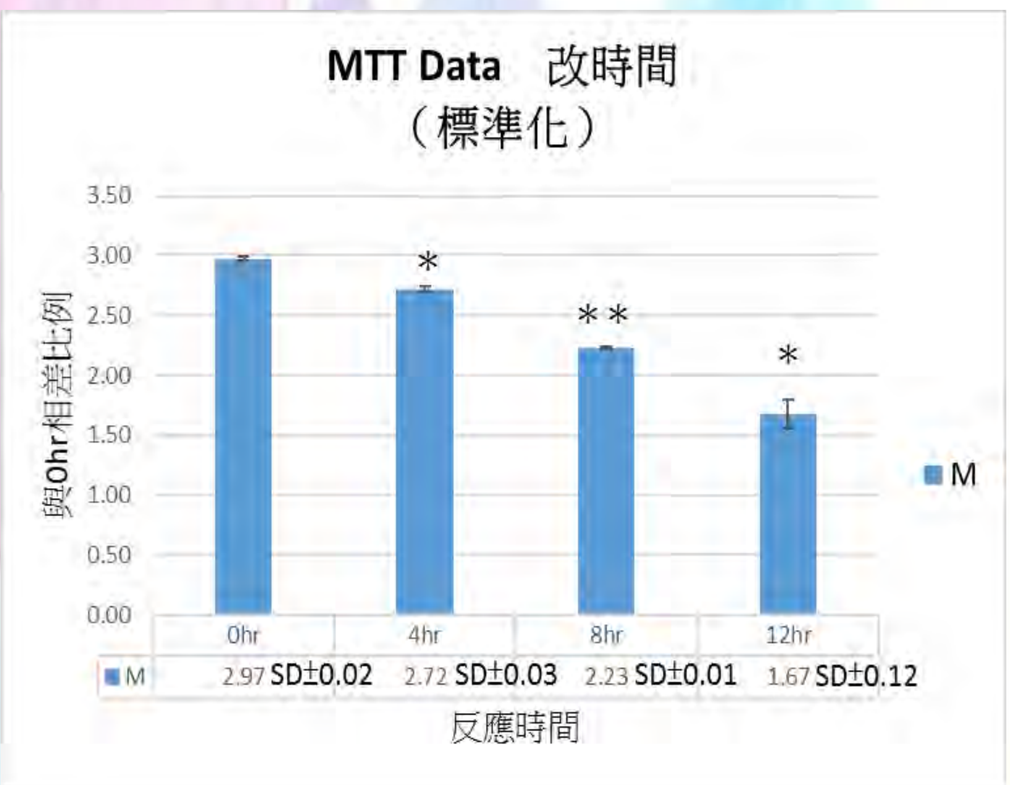
比較三圖可看出，除圖左兩數據間的相關係數略低外，圖中、右數據間的相關係數皆逼近1，顯示粒線體長度與呼吸作用效率有密切關聯。

二、固定濃度、改變反應時間：

根據上述實驗結果，我們判斷Mefenamic Acid對海拉細胞的活性影響最大，也最具規律性。

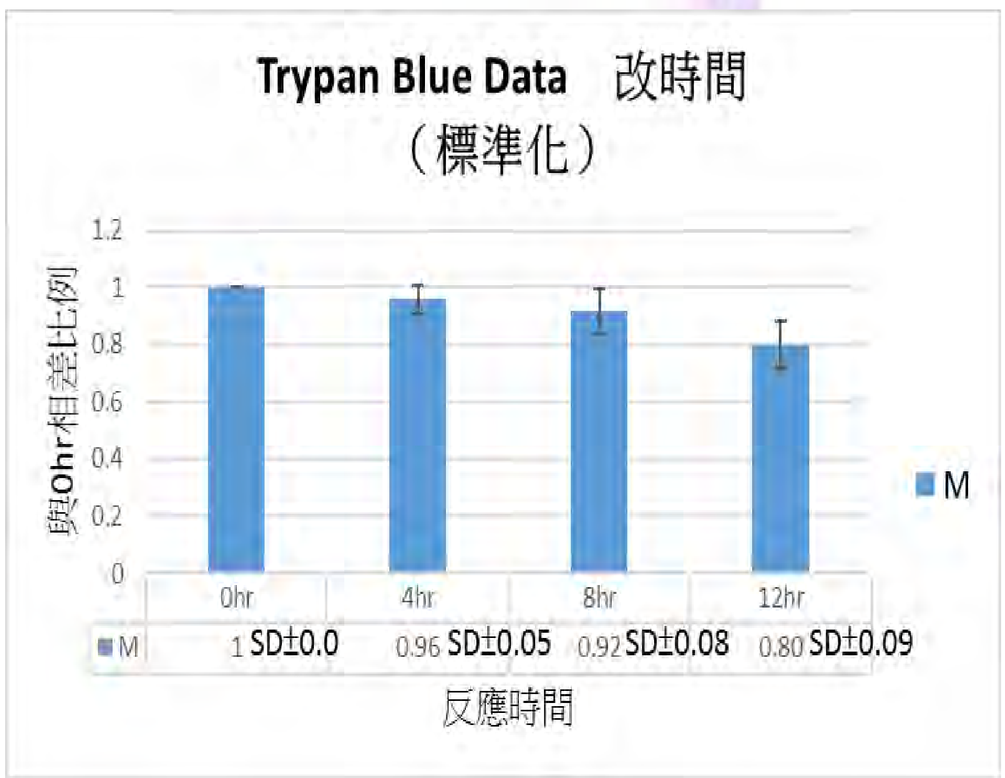
因此，以下實驗我們將針對此種藥物做進一步探討，並將操縱變因改為藥物作用時間，固定藥物濃度。

◆實驗四：MTT活性測定



以20mM藥物處理0、4、8、12小時後之MTT數據

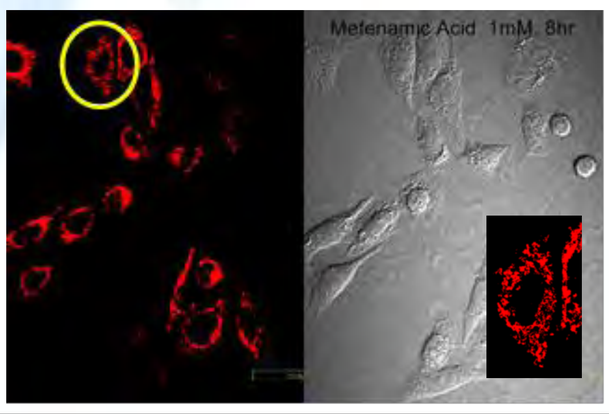
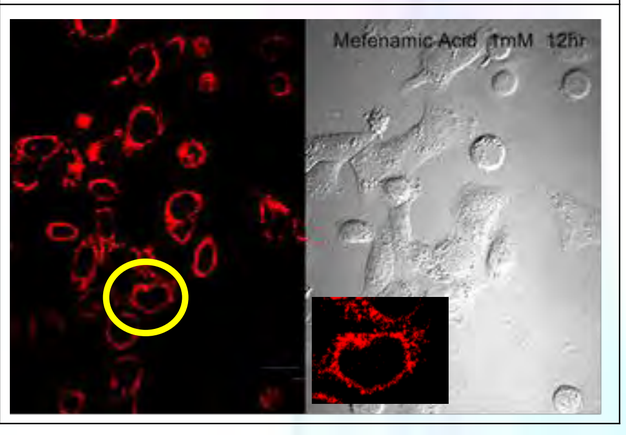
◆實驗五：Trypan Blue細胞染色



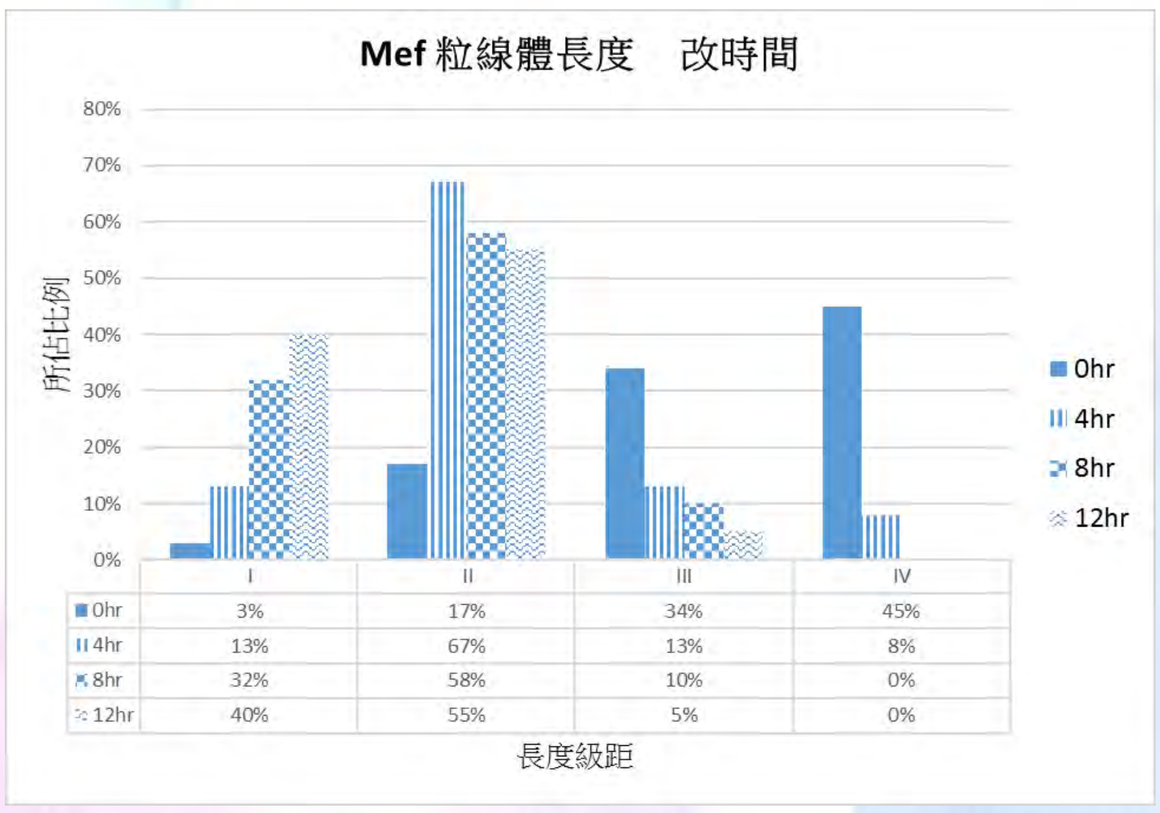
以20mM藥物處理0、4、8、12小時後之Trypan Blue數據

◆實驗六：共軛焦顯微鏡觀察

1.細胞照片觀察

	0hr	4hr	8hr	12hr
Mefenamic Acid	參照Aspirin 0mM之圖片			

2.粒線體長度測量



以20mM藥物處理0、4、8、12小時後之粒線體長度

➢ 結論與比較

◆在本次實驗中我們選用的藥物有三種，分別為Aspirin、Acetaminophen、和Mefenamic Acid，而在這三種藥物中，效果最顯著者為Mefenamic Acid，市售之寶速達爾所含的主要止痛成分。

◆不論何種藥物，提高作用濃度皆會使細胞型態變化，並損壞細胞膜，造成粒線體分布往中心聚集，長度縮短，更進一步降低其呼吸作用效率，造成細胞凋亡。

◆實驗結果證明，粒線體長度縮短對其呼吸作用及細胞存活率皆有影響，其內部蛋白質的分裂造成長度減短，因應了細胞所面臨的環境氧化壓力較大。

◆提高藥物濃度和增加藥物作用時間皆會使粒線體長度縮短，呼吸效率下降，並對細胞膜造成損壞以至於降低細胞存活率。且濃度愈高，時間愈長，對粒線體的傷害愈大。

➢ 參考資料

◆ H.AP, What is the mitochondrial permeability transition pore?, J Mol Cell Cardiol, 10.1016, 821-31, 2009, from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19265700

◆ A.M, V. Bliek, Q. Shen, S. Kawajiri, Mechanisms of Mitochondrial fission and fusion, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 10.1011, 2013, from http://cshperspectives.cshlp.org/content/5/6/a011072.long

◆ M. Picard, O. S., S. Shirihai, B. J. Gentil, Y. Burelle, Mitochondrial Morphology transitions and functions：implications for retrograde signaling？, American Journal of Physiology, 10.1152, 2012, from http://ajpregu.physiology.org/content/304/6/R393

◆ M. Cagalinec, etc., Principles of the mitochondrial fusion and fission cycle in neurons, Journal of Cell Science, 126, 2187-2197, 2013, from http://jcs.biologists.org/content/126/10/2187