

中華民國第 65 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學科

052015

“肝”阿捏！LPS 如何“肝”擾粒線體自噬？

學校名稱：桃園市立武陵高級中等學校

作者： 高二 何昀蓁 高二 黃榆喬	指導老師： 張明娟
---------------------------------	------------------

關鍵詞：脂多醣(LPS)、選擇性細胞自噬(selective autophagy)、粒線體自噬(mitophagy)

摘要

脂多醣 (Lipopolysacchatide, LPS)是由格蘭氏陰性細菌所產生的一種內毒素，存在於細菌莢膜中，即細胞膜的最外層，在細菌死亡後，細胞壁被破壞，LPS才會被釋出。其具有維持細菌外膜以及誘發宿主細胞產生免疫發炎反應的功能；此外，近年來的研究也指出脂多醣會影響宿主細胞內的粒線體生合成，且與許多人類疾病的發生有關係，例如敗血症、神經退行性疾病、代謝失調、和肝臟疾病。

本研究將探討脂多醣和肝臟疾病的關係，透過研究經建立表達不同粒線體自噬相關報導基因之人類肝癌細胞株(Huh-7)，了解脂多醣對肝臟細胞內粒線體自噬機制的影響，以及該影響與引發肝臟相關疾病的關係。希望本研究可為失調性粒線體自噬引發之肝臟疾病的治療開闢嶄新的方法。

壹、研究動機

在高一的生物課程中，老師在講解細胞學時曾補充介紹「細胞自噬」這個主題，這讓我們對細胞自噬產生了濃厚的興趣。後來，我們利用專題研究的時間主動尋找相關領域的實驗室，希望能更深入了解細胞自噬的機制，以及它在現實生活中可能帶來的影響與應用價值。有幸獲得機會參與實驗室的研究，我們進一步學習了藥物處理對自噬作用的影響，並理解這些變化可能與某些疾病的發生有關。透過這次研究，我們希望不僅能了解細胞自噬在細胞生理中的重要角色，也能探索其在疾病發展與治療上的潛在應用。藉由實際參與實驗與資料分析，我們希望能將課堂所學與真實研究接軌。

貳、研究目的

- 一、探討脂多醣如何引起肝臟細胞的粒線體自噬作用
- 二、研究脂多醣活化肝臟細胞中粒線體自噬作用之分子調控機制

參、研究設備及器材

一、實驗材料

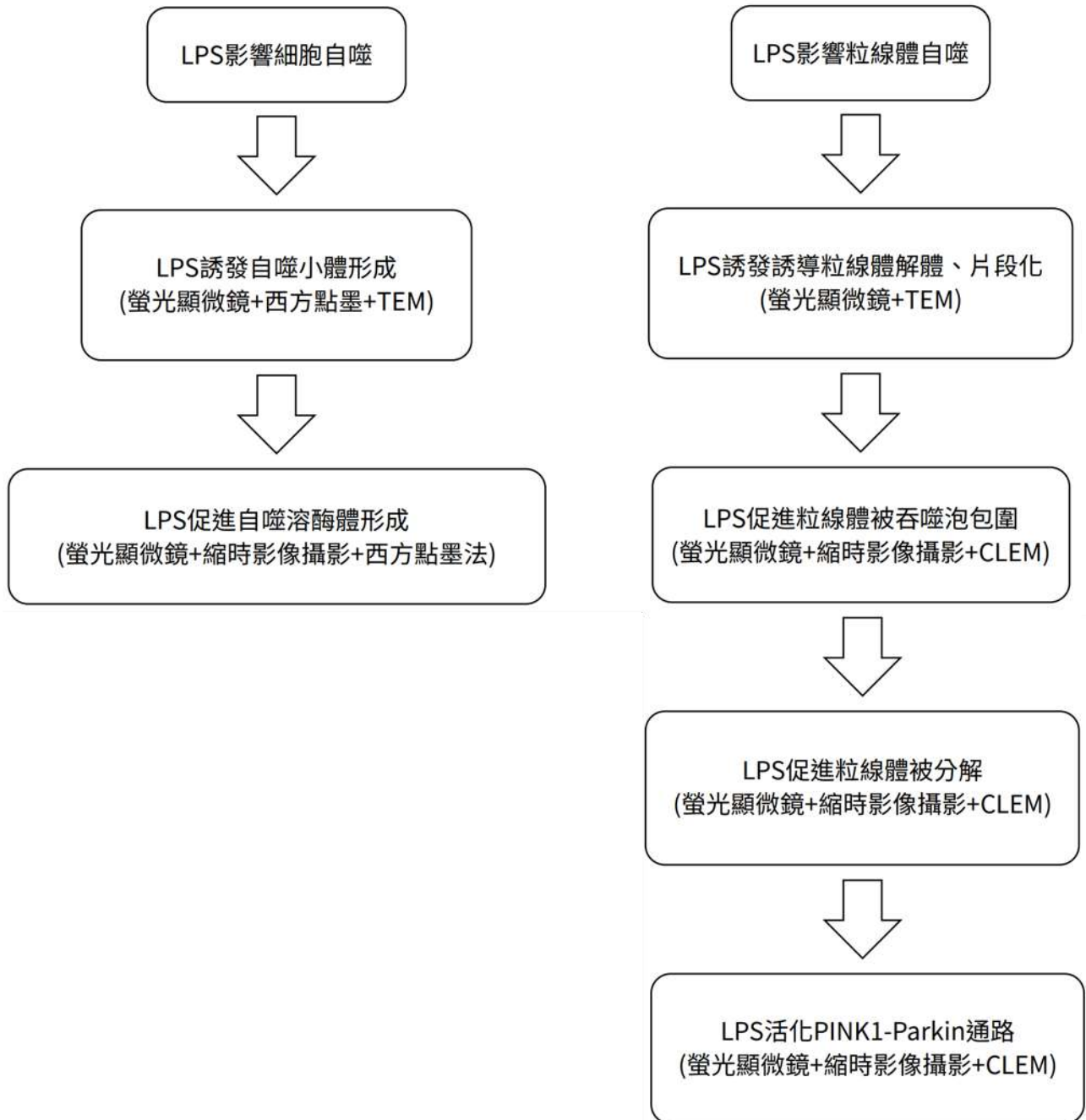
名稱		備註
Huh7/ Huh7.5-1 (肝癌細胞株)		
脂多醣(LPS)		購自 Selleckchem
DMEM		購 自 Gibico
100XTrypsin-EDTA		
10X PBS		
FBS		
MEAA		
Microscope Slide		購 自 DGS
1.2mm coverglass,circle		購 自 marienfeild
Mouse-abti-HSP60 antibody (1:200)		購 自 santa cruz
名稱	名稱	名稱
無菌水(ddH2O)	葡萄糖(glucose)	乙二胺四乙酸(EDTA)
氫氧化鈉(NaOH)	十二烷基硫酸鈉(SDS)	抗生素
油鏡專用油(immerision oil)	酚	

二、實驗器材

名稱		備註
細胞培養箱		購自 NuAire
病毒高速冷凍離心機		購自 Beckman Coulter
多用途試管振盪器(Vortex Genie 2)		購自 Scientific Industries
螢光顯微鏡		購自 Nikon
轉漬台		購自 Bio-Rad
名稱	名稱	名稱
定量吸量管(pipette)	刮杓	照膠系統
離心管	冰塊	黑盒
乾浴槽	恆溫水浴槽	瓊脂平板
4°C/-20°C 冰箱	電磁加熱攪拌器	三角玻棒
濾紙	載玻片	手套
培養皿	微波爐	迷你離心機
量筒	電腦	吸水紙
電子秤	壓片滾輪	鑷子
黑盒	迴轉式振盪器	迴轉式振盪恆溫培養箱
片夾	無菌操作台	光學顯微鏡
滴管	錐形瓶	暗房用具
底片	裁紙器	掃描機

肆、研究過程及方法

一、研究架構



二、文獻探討

細胞自噬是維持細胞穩定中重要的一環，基本機制包括最初隔離膜/吞噬泡(phagophore)的延長和閉合形成自噬小體(autophagosome)，隨後自噬小體與溶酶體(lysosome)融合後形成自噬溶酶體(autolysosome)。

而”選擇性細胞自噬(selective autophagy)”為細胞自噬的其中一種，透過降解細胞質中的特定物質，例如異常堆疊的蛋白質、入侵的病原體和受損的胞器等，來維持細胞內穩態。選擇性細胞自噬必須確保能有效的辨認和隔離目標物，要達成這個目的便需要能連結目標物和吞噬泡的自噬受體³。這就要牽涉到兩個重要的分子:LC3和泛素。LC3是一種類泛素蛋白，其介導吞噬泡膜的連結與半融合，並對自噬小體的形成具有無可取代的重要性。其在人體中有三種異構型:LC3A、LC3B、LC3C，目前學界主要以LC3B作為主要觀察自噬流(autophagic flux)的分子標定物。LC3合成後，LC3會被半胱氨酸蛋白酶ATG4切割，暴露出C端的甘氨酸殘基形成游離的LC3-I。自噬啟動後，LC3-I會通過UBL蛋白質修飾系統與磷脂酰乙醇胺(PE)結合，形成結合在自噬小體膜上的LC3-II⁴。而LC3-II會使吞噬泡膜的延長並閉合，令吞噬泡成為自噬小體。因此，我們可透過觀察LC3的變化判斷當下的自噬階段。另外，由於選擇性細胞自噬需要準確定位目標物質才可有效進行，所以”泛素化”也在其中扮演重要的角色。泛素(ubiquitin)是一種存在於真核生物體內的小型蛋白質，結構包括一個緊密摺疊的 β 夾層和一條C端尾部，其C端含有一個活性基，可通過肽鍵和目標蛋白的賴氨酸殘基或另一個泛素分子相連形成泛素化或泛素鏈，主要功能是依序透過泛素活化酶(E1)、泛素結合酶(E2)、泛素連接酶(E3)將其共價附著在目標物上，形成蛋白酶體(proteasome)，以標記目標物⁶。而先前提到的自噬受體(如p62/SQSTM1、NDP52、OPTN)皆擁有能分別與LC3-II結合的區域LIR(LC3-Interactin Region)和與泛素結合的區域UBA(Ubiquitin-Associated domain)，這使得自噬受體能讓吞噬泡精準包覆目標物進行選擇性細胞自噬⁷。另外，自噬受體的特定定位點被磷酸化後，穩定性、結合能力都可以提升，使其能更容易精準的執行選擇性細胞自噬。例如，TBK1可磷酸化(phosphorylation)p62/SQSTM1的S403位點和OPTN的S177、S473和S513位點，增強其與泛素的結合能力⁸。

除此之外，一些自噬相關基因(autophagy-related genes,ATGs)也有參與選擇性自噬。

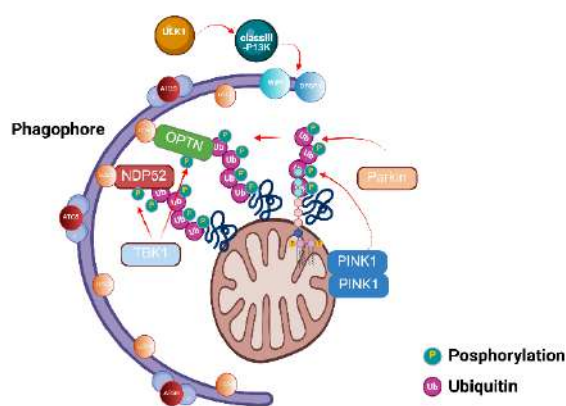
ULK複合體(ULK1/2-ATG13-FIP200-ATG101)可以磷酸化自噬受體，使自噬能有效啟動；自噬受

體也可以透過FIR和FIP200結合，將ULK1複合體招募(recruit)至目標物。在缺乏營養的壓力下，mTORC1的活性會下降，解除對ULK1複合體的抑制，啟動自噬。接著ULK1複合體會引導class III-PI3K複合體(PI3K-Vsp15-Bec1(ATG6)-ATG14，又稱VSP34)轉移至內質網，使其招募下游蛋白質和促進PI3P的合成，讓PI3P從內質網招募能推動吞噬泡形成的DFCPI和WIPI家族蛋白。WIPI經兩個UBL蛋白修飾系統:首先，ATG7(類似E1)和ATG10(類似E2)會使ATG5和ATG12共軛。接著，ATG5-ATG12會與ATG7和ATG3共同作用，將LC3(ATG8)與PE共軛形成會結合在吞噬泡上的LC3-II，使吞噬泡形成自噬小體⁹。最後，ATG14會促進自噬小體與溶酶體融合，形成自噬溶酶體，完成分解。

本研究主要探討針對粒線體(mitochondria)進行清除的選擇性細胞自噬——“粒線體自噬(mitophagy)”，而粒線體自噬以是否依賴泛素分為兩種。

依賴泛素的自噬通路中較典型的一種為E3泛素連接酶Parkin與粒線體外膜蛋白PINK1介導的粒線體自噬，稱為” PINK1/Parkin 信號通路(PINK1/Parkin signaling pathway)”。此通路為本研究中關注的對象之一。正常情況下，PINK1會不斷轉移至粒線體內膜，並被粒線體蛋白酶PARL切割，隨後被清除，因此含量極低。但當粒線體損傷時，大量PINK1會穩定於外膜上進而招募並磷酸化Parkin的S65位點使其進一步活化，促使粒線體表面蛋白泛素化。接著，自噬受體如p62/SQSTM1、NDP52和OPTN，便會被招募至泛素化的粒線體表面蛋白上，引發後續的自噬¹⁰。另外，這些受體會透過TBK1使其磷酸化(phosphorylation)，以增強結合能力⁸(圖1-1)。

綜上所述，粒線體自噬是粒線體更替 (mitochondrial turnover) 的一環，透過清除受損粒線體維持功能穩定。當細胞受到壓力刺激時，此機制可幫助調節；反之，若失衡，則可能導致疾病。



1-1.PINK1/Parkin通路圖解(作者自繪)

三、實驗原理

本研究探討LPS是否影響自噬，並利用螢光標定、西方點墨、TEM和CLEM等技術，從不同層面觀察並印證推論。

(一)自噬相關分子的標記

1.GFP-LC3、RFP-LC3、RFP-GFP-LC3

本研究使用GFP、RFP螢光蛋白和RFP-GFP融合蛋白標記來觀察LC3在粒線體自噬過程中的變化，利用GFP在酸性環境下會失去訊號，而RFP則相對穩定的特性，判斷當下LC3所處環境。

2.GFP-NDP52、GFP-OPTN、GFP-TBK1

上述分子分別為自噬受體和活化自噬受體的蛋白，標記後可觀察粒線體自噬狀況

3.YFP-Parkin/MitoRFP、RFP-Parkin/MitoGFP

我們使用有RFP-Parkin表現且粒線體經GFP標記的Huh7細胞、YFP-Parkin表現且粒線體經RFP標記的Huh7細胞，觀察兩者共定位，以了解Parkin轉移到粒線體上的狀況。

4.PINK1-miRFP670

miRFP670為一種近紅外光蛋白，可和其他螢光蛋白組合多色標記，適合多重螢光實驗。我們利用miRFP670標記PINK1可同時觀察其和多種其他標記分子的共定位況。

(二)粒線體相關分子的標記

1.GFP-MitoRFP、RFP-MitoGFP

由於GFP在酸性環境下會失去訊號，於是使用GFP-MitoRFP(以GFP標記LC3；RFP標記粒線體)及RFP-MitoGFP(以RFP標記LC3；GFP標記粒線體)的方式染色，可利用GFP和RFP是否共定位計算自噬小體的數量，以確定LPS是否會促進自噬。

2.Mito-miRFP670

在本研究中，此染色用於和多種其他分子的共定位觀察，以便確認分子間的作用。

3.RFP-LC3/HSP60

HSP60是粒線體基質中的一種熱休克蛋白，可作為粒線體損傷的指標。透過RFP-LC3和HSP60的共定位，我們可以判斷LPS是否影響粒線體的選擇性降解。

4.RFP-LC3/TOM20

TOM20是粒線體的外膜蛋白，常在抗體染色中作為粒線體的標誌蛋白，利用其與LC3的共定位可觀察自噬狀況。

5.Mito-QC

以RFP-GFP融合蛋白標記粒線體外膜蛋白FIS1，RFP、GFP的共定位與否，判斷粒線體所處環境。

6.MT-Kemia

Kemia是一種特殊的螢光蛋白，其中性環境下需要用波長為488nm的光激發；在酸性環境下則需要波長為561nm的光激發，而螢光顯微鏡軟體分別以綠色和紅色訊號呈現。經由這個特性，我們可利用561/488nm的比值得知粒線體自噬進行的程度。

(三)西方點墨法

可計算LC3-II/LC3-I的比值，可以更直觀的觀察LPS是否會影響LC3結合到吞噬泡上。研究中有分別用到Huh7、HepG2和J7這3種細胞以得到更具廣泛性的結論。

(四)TEM(穿透式電子顯微鏡)

利用TEM觀察超微結構(粒線體分解、自噬體形成)解析度高，但只能看到結構，無法辨認特定蛋白。

(五)CLEM(Correlative Light and Electron Microscopy，螢光-電子顯微鏡對照)

將螢光訊號對應到電子顯微鏡下的超微結構上，解析度沒有TEM高，但可以辨認特定蛋白。

四、實驗步驟與過程

(一)細胞染色

1.細胞收集

- (1)準備 10cm 的培養皿
- (2)添加 3ml PBS進行PBS wash
- (3)添加 1ml TE (使用胰蛋白酶Trysin/ EDTA)
- (4)添加 2 ml D-2 (2%FBS / DMEM)，終止胰蛋白酶反應
- (5)將細胞懸液轉移到 15ml 的離心管中
- (6)以 1,100rpm 離心 3min
- (7)移除上清液。留下細胞沉澱
- (8)放入 D-10 (10%FBS / DMEM)重新懸浮細胞沉澱
- (9)進行細胞計數

2.細胞培養

- (1)準備密度 1×10^5 或 5×10^4 的 Huh7 細胞懸浮液
- (2)種至細胞組織培養盤D-2(2%FBS/DMEM)，靜置2~6hr(讓細胞附著在培養盤上)
- (3)更換培養盤D-10(10%FBS/DMEM)，靜置12hr
- (4)添加0.5ml 5 μ g/ml LPS到 D-2，靜置6hr
- (5)PBS wash 2 次
- (6)加入0.5ml 4% PFA 固定細胞 1，靜置 30min
- (7)用0.1% Triton X-100 或 PBS 透化細胞，靜置 15min
- (8)PBS wash 2 次

3.細胞核染色

(1)DAPI(1:2000)/PBS 染色，靜置 30min

(2)PBS wash 2 次後封片

4.免疫染色

(1)用 2% FBS/PBS 封閉 30min

(2)添加一級抗體(1°Ab)，在室溫下靜置 1hr，並且放至 4°C 隔夜

(3)PBS wash 3 次

(4)添加 2°Ab (Alexa 488、561、647/DAPI)

(5)PBS wash 後封片

(二)TEM樣本製備流程

1.0.1 M CAB wash 2 次 (在細胞房)

2.固定條件: 加 1ml 以上的固定液 (4% PFA 和 0.1% GA 溶於 0.1 M CAB)

在細胞培養室於 37°C 下靜置 20min

3.吸去固定液，0.1M CAB wash 5 分鐘，三次

4.加入 ddH₂O wash 5 分鐘，三次

5.加 0.4% UA/ ddH₂O, 4°C，1hr (要現配，過 0.22 um fliter,每個樣品加 350~500 μ l)，ddH₂O wash，5 分鐘，三次

6.依序以 50%、70%、95%、100%酒精脫水(100% 酒精要 2 次)，每次 5 分鐘

7.將玻片移到 15ml 離心管上，加入未稀釋的 Resin，浸泡 2hr 以上

8. 將裝有玻片和 Resin 的容器放進 70°C 的真空烘箱中進行聚合反應(24hr)

*玻片要倒扣，離心管要先抽真空 10~15 分鐘。蓋玻片前要先撥掉氣泡，從 45°緩緩蓋下

(三)縮時影像攝影(LSM 780)

1.CO₂鋼瓶打開到指針處

2.操作介面按到 incubator 的區域

3.CO₂濃度: 5% 溫度設定: 37°C

4.血清瓶裝滅過菌的二次水量紅線的範圍之間

5.換成 LIVE Image 使用的載物台

6.等到溫度跟 CO₂ 到達設定條件

7.軟體設定:

1024X1024, bit: 12 speed:6 (2048X2048,bit:12, speed:7)

Time打勾

Define focus: on

拍攝間隔時間設30秒

一般設720張(大約6小時)

8.拍攝過程要定期到機器前確認拍攝情況，拍攝完後，如果檔案比較大的情況，存檔要等一段時間，並且開資料夾確認是否有存檔成功

9.關機前要先把溫度降回 25°C，等回到 25 度時可以把溫度設成 OFF

10. CO₂ 鋼瓶打關上到指針處，操作介面的 CO₂ 設定設成 OFF

11.血清瓶中的滅菌水倒掉

(四)西方點墨法

1.分離膠(12.5%)

無菌水(ddH ₂ O)	9.5 ml
1.5M Tris-HCl pH8.8	7.5 ml
30%丙烯醯胺/雙丙烯醯胺溶液 (29:1)	12.5 ml
10% SDS	300 µl
10% APS (過硫酸銨)	130 µl
TEMED	15 µl
總量	30 ml

凝固時間：約 1 小時

2.疊膠(3%)

無菌水(ddH ₂ O)	9.8 ml
1.5M Tris-HCl pH8.8	1.6 ml
30%丙烯醯胺/雙丙烯醯胺溶液 (29:1)	1.6 ml
10% SDS	130 µl
10% APS (過硫酸銨)	200 µl
TEMED	15 µl
總量	13 ml

凝固時間：約 30 小時、每孔加樣30µg

3.跑膠

60V 1小時> 100V 1小時> 120V 2.5小時

4.半乾式轉膜(Semi-dry transfer):15V 1小時

*PVDF 膜使用前需先浸泡在甲醇中活化，然後再放入轉膜緩衝液中

5.封膜(Blocking): 使用 3% 脫脂奶粉/TBS-T (含 0.2% Tween-20 / 1X TBS) : 30分鐘

6.與一抗反應:室溫反應 1 小時，接著 4℃ 冷藏反應 16 小時

7.洗膜(第一次):使用 TBS-T 洗 3 次，每次 5 分鐘

8.與二抗反應:室溫反應 1 小時

9.洗膜(第二次):使用 TBS-T 洗 3 次，每次 5 分鐘

10.清水沖洗:使用無菌水(ddH₂O)沖洗 3 次

11.ECL 顯影反應:使用化學發光底物(ECL substrate)反應 1 分鐘

12.黑暗中轉膜至顯影盒中

13.X 光片曝光、顯影、水洗與定影

(1)將膜與 X 光片接觸，根據訊號強度曝光不同時間

(2)使用顯影液顯影

(3)水洗後再使用定影液固定影像

伍.研究成果與討論

一、脂多醣(LPS)誘發自噬小體 (autophagosome)的形成

此實驗主軸為觀察脂多醣 (LPS) 是否促進自噬小體形成，由於 LC3 在自噬活化時會聚集在自噬小體膜上，因此 LC3 puncta 數量可作為自噬小體形成的指標。首先，我們透過不同螢光染劑標記 LC3 蛋白，透過螢光顯微鏡來觀察 LPS 處理後自噬小體數量的變化。由於此實驗使用的螢光染劑 (RFP 及 GFP) 各有其限制，RFP 容易自身聚合，因而無法分辨自噬小體及自身聚合的螢光蛋白，而 GFP 在酸性條件下會發生螢光淬滅(即螢光訊號消失)，若自噬小體和溶酶體融合後，訊號將因溶酶體中的酸性環境導致螢光強度降低。因此分別用上述兩種螢光蛋白來標記 LC3，進行交叉驗證，以確認 LPS 確實可促進自噬小體的形成。

使用有 GFP-LC3 及RFP-LC3表現的 Huh7 細胞，以 5 μ g/ml 的 LPS 處理 6 小時後將細胞核以 DAPI 染色，以螢光顯微鏡觀察細胞後拍攝 10 張照片並計算 GFP-LC3 puncta 的數量。實驗結果分別為圖5-1A、圖5-1B。右方統計圖即為自噬小體的數量中挑選接近平均值的 10 顆細胞作圖。

經過前兩次的結果可發現，經LPS 處理的細胞 GFP-LC3 puncta 及 RFP-LC3 puncta 的數量皆多於未處理者，因此可推論 LPS 會促進自噬小體的形成。

上階段的實驗僅採用 Huh7 細胞一種細胞株，為了觀察其他細胞株對 LPS 的反應，我們利用西方點墨法(western blot)觀察 LPS 處理 4 小時後 Huh7 細胞、HepG2 細胞、J7 細胞 LC3B-II/LC3B-I 比值的變化，並選擇其中所有真核細胞中皆有的肌動蛋白(β -actin)作為內參考蛋白 (loading control)，其中 LC3B-I 為細胞質中的游離型，LC3B-II 則是經酯化後嵌合於自噬小體膜上的形式，LC3B-II/LC3B-I 比值可反映自噬活性的變化。圖 5-1C 為西方點墨法的結果。

由結果可發現，經過 LPS 處理後，各個細胞中 LC3B-II / LC3B-I 比值皆較未處理者大，這表示 LPS 處理會促進游離在細胞質中的 LC3B 轉移到自噬小體膜上，也代表 LPS 會促進自噬小體的形成。由於各組結果中實驗組及對照組中作為內參的 β -actin 表現穩定，因此可以排除蛋白加樣量干擾。而結果也顯示 LPS 處理對 Huh7 細胞、HepG2 細胞、J7 細胞皆有類似的影響，促進自噬小體的形成，但 Huh7 細胞產生的影響又為三者中最明顯。

接著，我們利用穿透式電子顯微鏡(TEM)觀察 LPS 處理後 Huh7 細胞內部的變化，實驗結

果如圖 5-1D。

我們發現 LPS 處理後的細胞產生了膜狀構造，即白色箭頭指向之處。由於膜內有不同密度的結構，形態與典型自噬小體一致，因此我們推論觀察到的構造為包裹了不同胞器的自噬小體。相較之下，在未處理組別則沒有觀察到此構造。此結果支持 LPS 可促進自噬小體形成，與先前螢光與蛋白質分析結果一致。綜合以上三種實驗結果，我們確認 LPS 處理可促進自噬小體的形成。

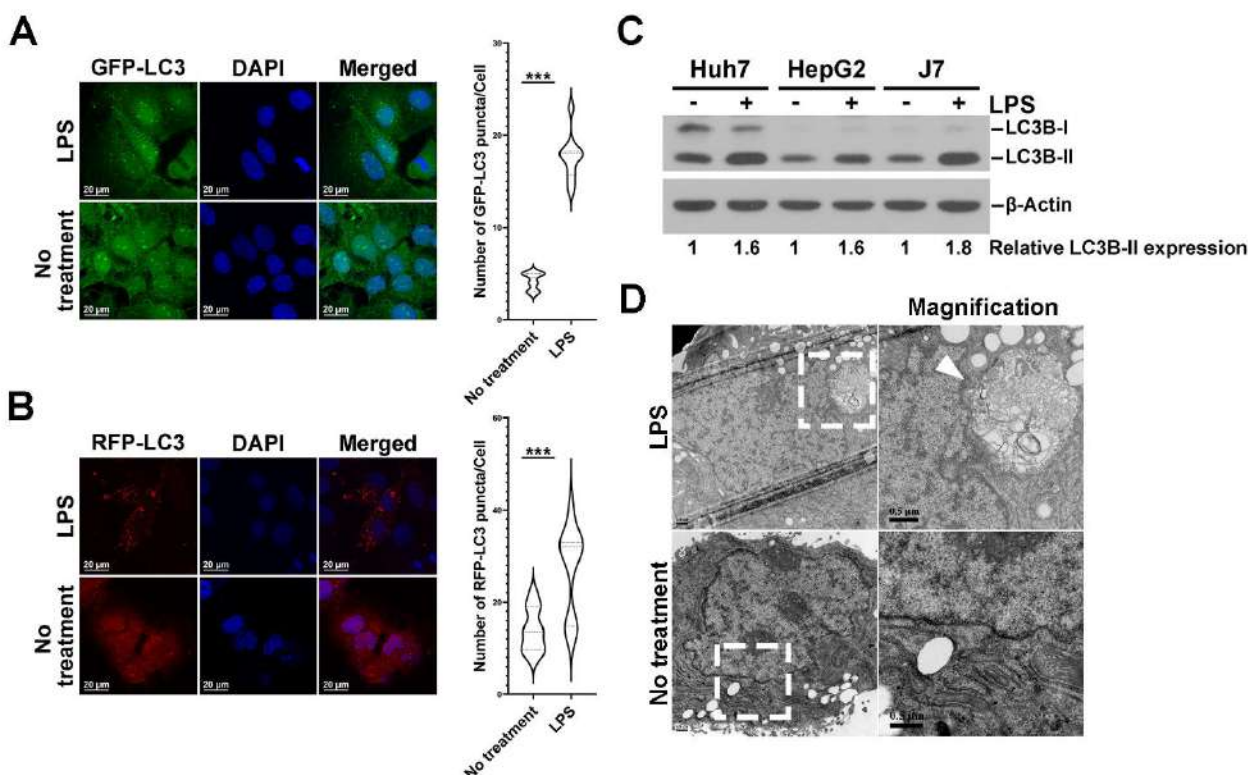


圖 5-1. LPS 誘發自噬小體形成 (A)螢光顯微觀察結果。(P<0.001)。(B)螢光顯微觀察結果。(P<0.001)。(C)西方點墨法結果。(D)電子顯微鏡觀察結果。(A、B、C 圖為作者自行拍攝製作，D 圖由實驗室協助)。

二、脂多醣(LPS)促進自噬溶酶體(autolysosome)成熟

經過實驗一的證實，LPS確實會誘發自噬小體的形成，而此實驗將進一步觀察LPS是否會刺激自噬小體和溶酶體融合，形成自噬溶酶體。我們使用被 RFP-GFP 融合蛋白標記 LC3 的 Huh7 細胞，透過 GFP 在酸性條件下會發生螢光淬滅，而RFP 維持不變的特性，自噬小體會表現RFP⁺/GFP⁺的 puncta，而自噬溶酶體因酸性環境導致 GFP 螢光強度降低，於是會表現RFP⁺/GFP⁻的 puncta。將細胞以 5μg/ml 的 LPS 處理 6 小時後將細胞核以 DAPI 染色，以螢光顯微鏡觀察細胞，拍攝 10 張照片後計算RFP⁺/GFP⁺的 puncta(自噬溶酶體)及 RFP⁺/GFP⁺的 puncta(自噬小體)數量。實驗結果如圖5-2A，右方的統計圖分別為自

噬溶酶體及自噬小體的數量中挑選接近平均值的 10 顆細胞作圖。

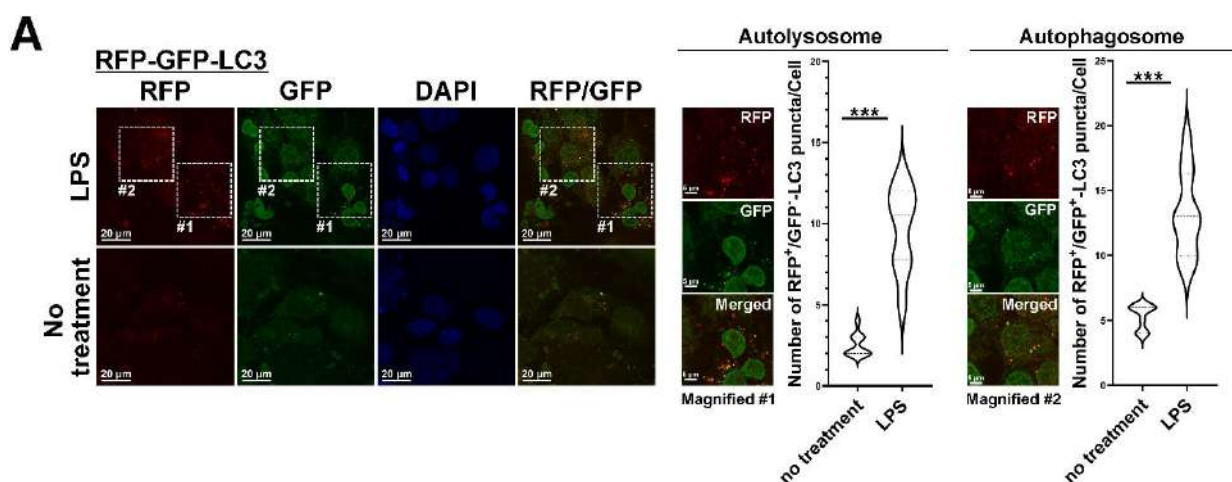
從統計圖可觀察到經LPS處理的細胞，自噬小體及自噬溶酶體puncta的數量都多於未經處理者，因此證實LPS會促進自噬溶酶體的形成。

接著，為了瞭解細胞內自噬作用的動態，我們採用縮時影像攝影（time-lapse imaging）來觀察自噬溶酶體的形成過程。我們使用被 RFP-GFP 融合蛋白標記 LC3 的 Huh7.5-1 細胞，加入 LPS 後，利用共軛焦顯微鏡拍攝連續影像，挑選八個時間點，並將其中兩顆 puncta 用白色箭頭標示出來以追蹤其動態，觀察自噬溶酶體形成的過程。實驗結果為圖 5-2B。

從圖中可以看到，0 分鐘的其中一顆 RFP⁺/GFP⁺ puncta，在紀錄的這段時間中 GFP 螢光訊號逐漸減弱，顯示自噬溶酶體的形成。而另一顆 puncta，在中間的時間點 GFP 螢光訊號逐漸變弱，在 30 分鐘時只剩 RFP 螢光訊號，最後在 32 分鐘時 RFP 螢光訊號也消失，顯示其內容物已被降解，代表自噬作用的完成。

再來，我們探討 LPS 對自噬通量（autophagic flux）的影響，並使用了另外一種藥物，巴弗洛黴素(Bafilomycin A1，簡稱 BafA1)。這次我們觀察 LC3B-II / LC3B-I 比值在加入 LPS 後的變化，但自噬完成後 LC3B-II 會被分解，因此無法推論 LC3B-II 累積是自噬作用活化抑或自噬作用停滯(僅形成自噬小體)。由於 BafA1 可以抑制溶酶體酸化，降低其中的水解酵素活性，避免 LC3B-II 被分解。因此，我們使用肌動蛋白(β -actin)作為內參考蛋白，接著，在 LPS(5 μ g/ml)處理組與未處理組中，皆設計加入(50nM)與未加入 BafA1 的組別，實驗結果如圖 5-2C。

由圖 5-2C 可以發現不管有沒有加入 BafA1，LPS 處理後的細胞中 LC3B-II / LC3B-I 比值皆比未處理者大，但加入 BafA1 後，該比值進一步上升，因此可以推論 LPS 可以活化完整的自噬作用，而不是只促進自噬小體的形成。



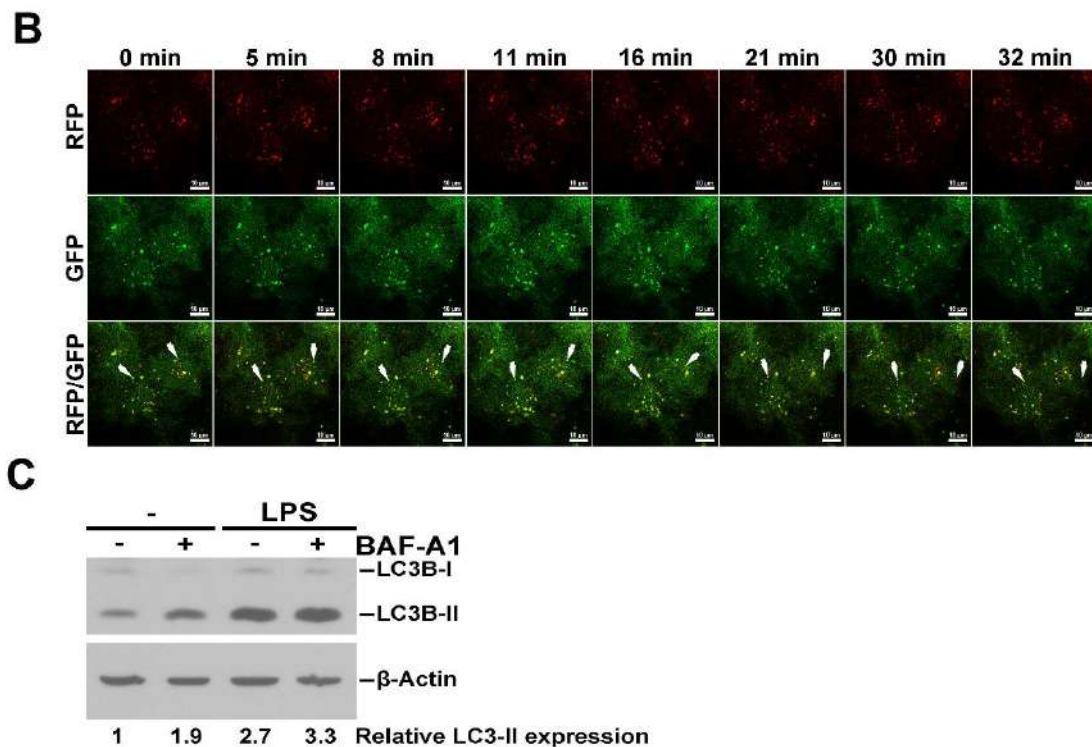


圖 5-2. LPS 促進自噬溶酶體成熟 (A) 螢光顯微觀察結果。(P<0.001)。(B) 縮時攝影結果。(C) 西方點墨法結果。

(A、C 圖為作者自行拍攝製作，B 圖由實驗室協助)。

三、脂多醣(LPS)對粒線體自噬作用(mitophagy)的影響

(一) 脂多醣(LPS)誘導粒線體型態改變

由於自噬作用有分解受損胞器的功能，本實驗目的在觀察脂多醣(LPS)是否會造成粒線體變形或片段化，進而誘發粒線體自噬作用。實驗結果如圖5-3，其中A圖為有Mito-RFP表現的Huh7細胞，以5μg/ml的LPS處理6小時後將細胞核以DAPI染色，透過顯微鏡觀察LPS對粒線體型態的影響。而B圖則為Mito-GFP表現的Huh7細胞，其餘處理條件不變。

由A圖及B圖皆可發現未處理的細胞中的粒線體維持線型結構，但經LPS的細胞中的粒線體則分裂成片段。因此可以發現 LPS 會誘導粒線體片段化。

接著，我們利用TEM來觀察LPS處理對粒線體型態影響。實驗結果如圖5-3C。

我們在5μg/ml LPS處理後的細胞觀察到把粒線體包圍的膜狀結構，且膜中粒線體有變形的現象，即被白框圍住的部分。相較之下，未處理的細胞內則觀察不到此膜狀結構，且粒線體呈長條狀的型態。由這兩個實驗可以推論LPS會使粒線體變形，影響粒線體的型態。

(二) 脂多醣(LPS)促進粒線體被吞噬泡包圍

為了觀察 LPS是否會促進吞噬泡包圍粒線體，我們使用有RFP-LC3表現的Huh7細胞，

以5 μ g/ml的 LPS處理 6 小時後將細胞核以 DAPI 染色，並分別對粒線體基質中的HSP(Heat Shock Protein)及粒線體外膜上的 TOM20 蛋白進行抗體染色。以螢光顯微鏡觀察細胞，拍攝10張照片後計算LC3和粒線體共定位的puncta(自噬小體)數量。實驗結果分別為圖5-3D及圖5-3E，白色箭頭指向其中五顆自噬小體。右方統計圖為挑選接近平平均值的10顆細胞作圖。

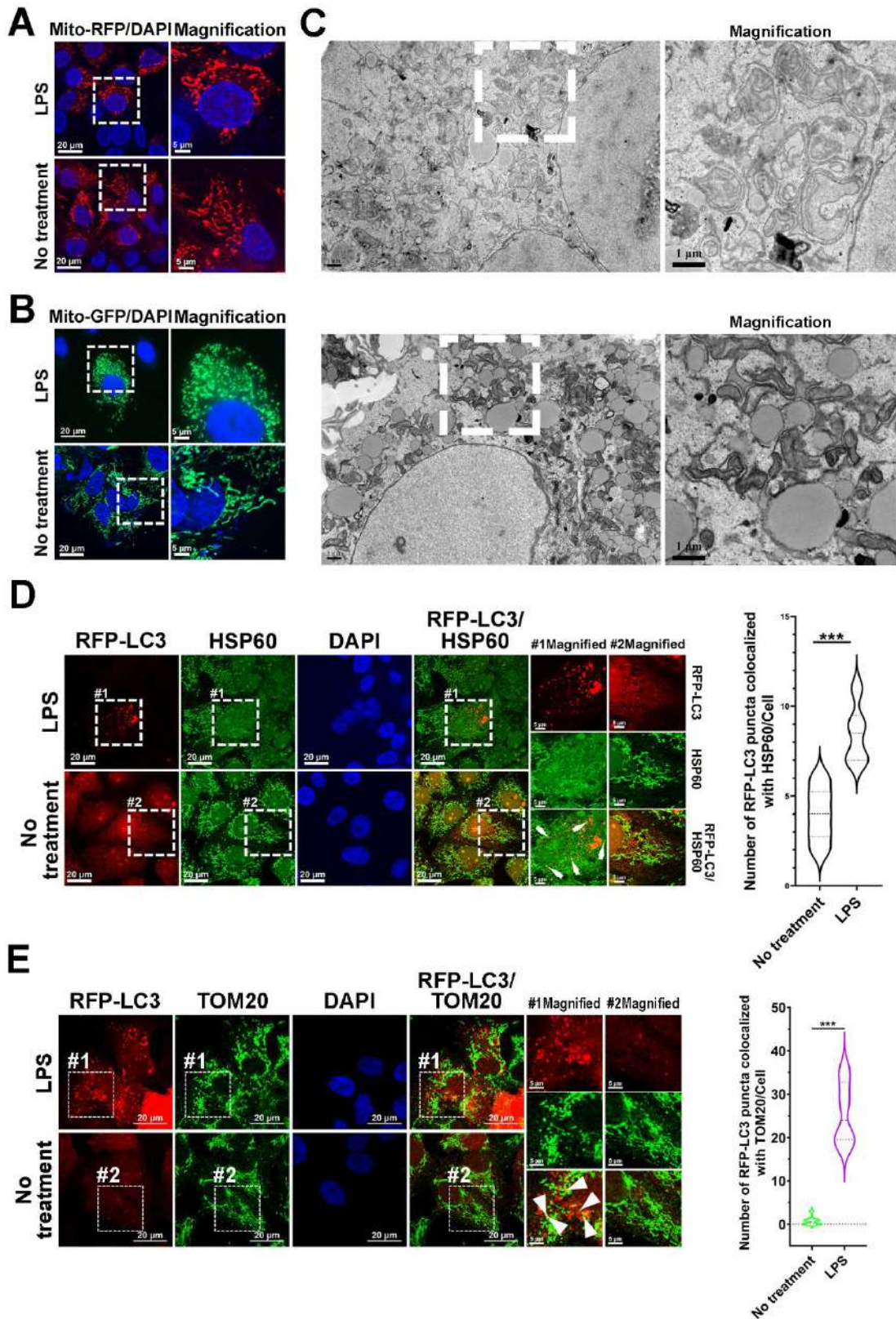
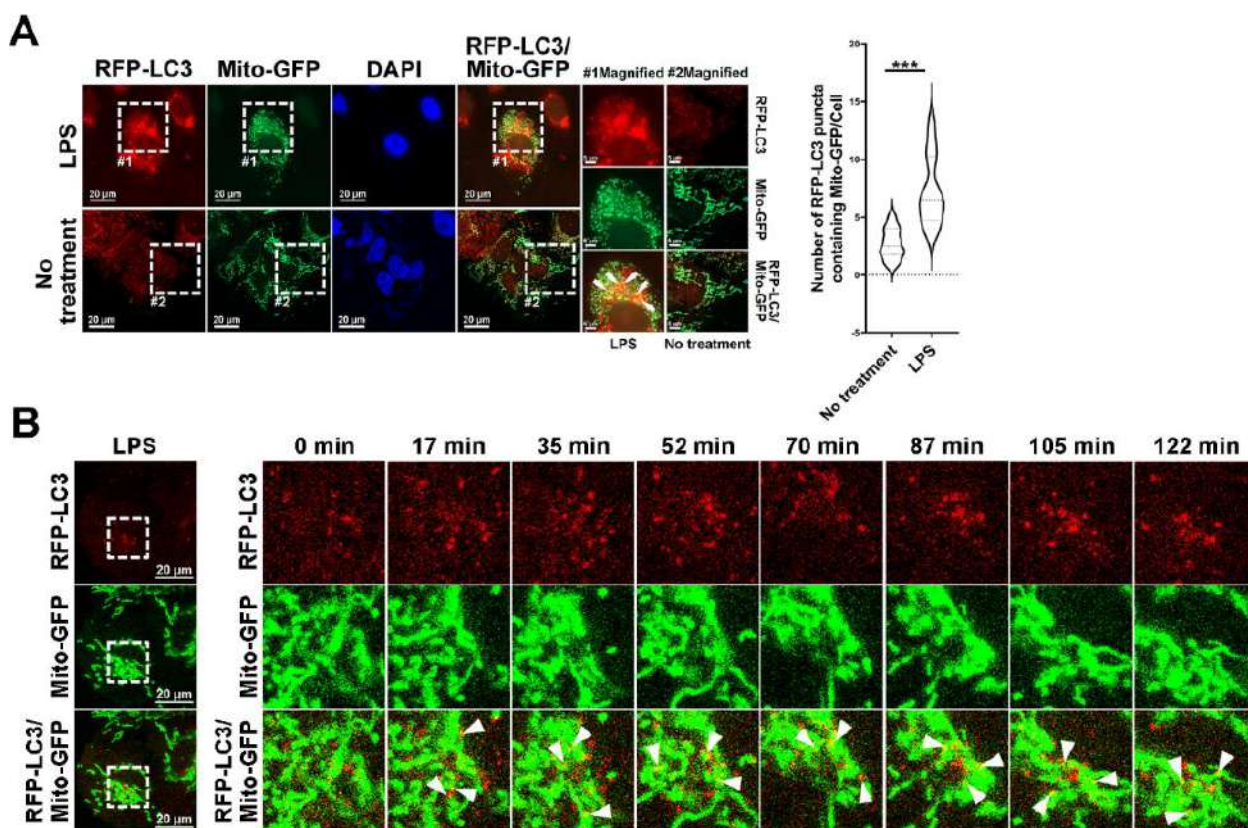


圖5-3. LPS誘導粒線體型態改變、促進吞噬泡包圍粒線體 (A)螢光顯微觀察結果。(B)螢光顯微觀察結果。(C)電子顯微鏡觀察結果。(D)螢光顯微觀察結果。(P<0.001)。(E)螢光顯微觀察結果。(P<0.001)。(A、B、D、E圖為作者自行拍攝製作，C圖由實驗室協助)。

由於進行抗體染色細胞會被通透化 (Permeabilization)，因此無法觀察細胞的動態，螢光染色則不會有此限制。因此我們將利用螢光染色驗證此結果。使用有 RFP-LC3 表現且粒線體經 GFP 標記的 Huh7 細胞，並用有 GFP-LC3 表現且粒線體經 RFP 標記的 Huh7 細胞進行交叉標記，以 5 μ g/ml 的 LPS 處理 6 小時後將細胞核以 DAPI 染色後用螢光顯微鏡觀察細胞，拍攝 10 張照片後計算 LC3 和粒線體共定位的 puncta (自噬小體) 數量，實驗結果分別如圖 5-4A 及圖 5-4C，白色箭頭指向其中五顆自噬小體，右方統計圖為挑選接近平均值的 10 顆細胞作圖。

接著採用縮時影像攝影追蹤具有 RFP-LC3 表現且粒線體經 GFP 標記的 Huh7.5-1 細胞，加入 LPS 後拍攝連續影像，挑選 8 個時間點並用白色箭頭標示其中 3 顆 puncta。圖 5-4B 為實驗結果。

由抗體染色(圖 5-3D 圖 5-3E)及螢光染色(圖 5-4A 圖 5-4C)結果皆可知經過 LPS 處理後的細胞表現出的共定位訊號較無處理的細胞多，代表 LPS 處理會增加自噬小體的數量。從動態影像結果(圖 5-4B)可以看到，粒線體和吞噬泡的共定位訊號隨著時間越來越強，顯示粒線體逐漸被吞噬泡包圍。因此可確認 LPS 會誘發吞噬泡包圍粒線體。



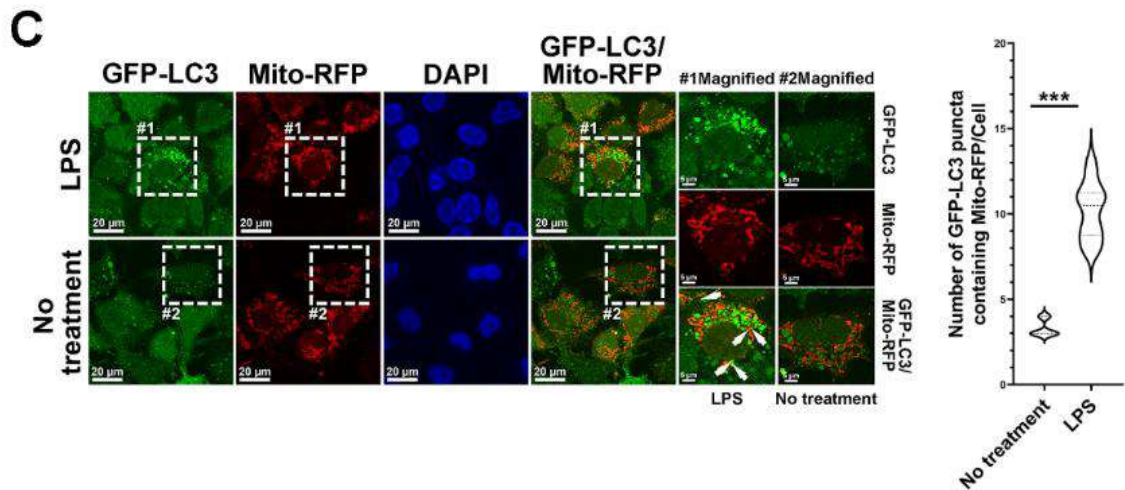
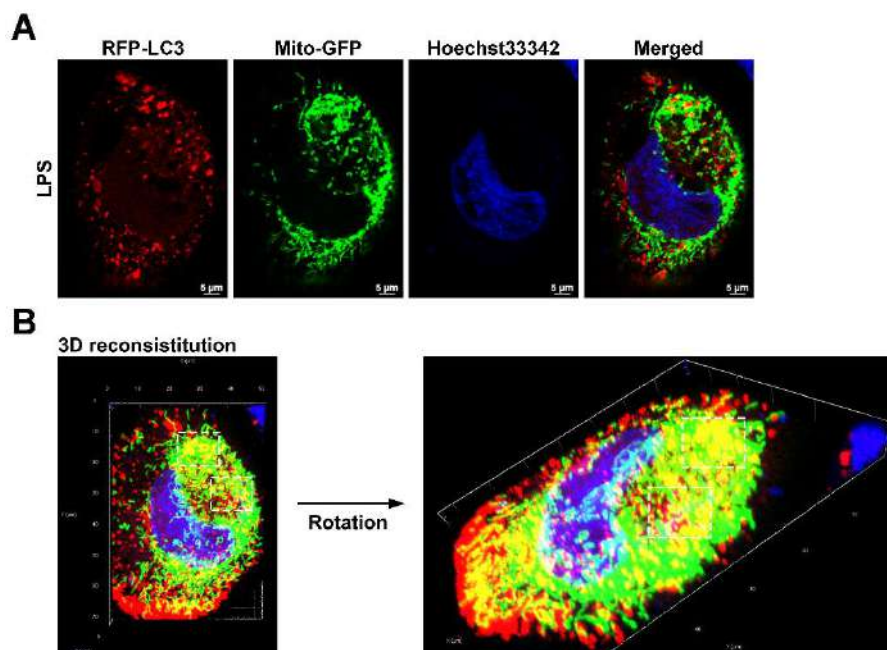


圖5-4.LPS促進吞噬泡包圍粒線體 (A)螢光顯微觀察結果。(P<0.001)。(B)縮時攝影結果。(C)螢光顯微觀察結果。(P<0.001)。(A、C圖為作者自行拍攝製作，B圖由實驗室協助)。

為了得到更準確的影像，我們採用了 CLEM (Correlative Light and Electron Microscopy)。

觀察結果如圖5-5所示。A圖為利用共軛焦螢光顯微鏡觀察 LC3 用 RFP，粒線體用 GFP，細胞核用 Hoechst33342 標記且經過 5 μ g/ml 的 LPS 處理 6 小時的 Huh7.5 細胞。B 圖左圖為拍攝 Z 軸的多張切片後，利用 3D 重建獲得的結果，右圖為旋轉後的視角圖。C 圖中的左圖為 B 圖和 TEM 照片疊合的結果，右圖則為左圖其中兩部分的局部放大圖。

從疊圖結果可以發現吞噬泡和粒線體螢光訊號共定位處，從TEM也可以看到把粒線體包圍的膜狀結構。顯示共定位訊號代表的的確是自噬小體。



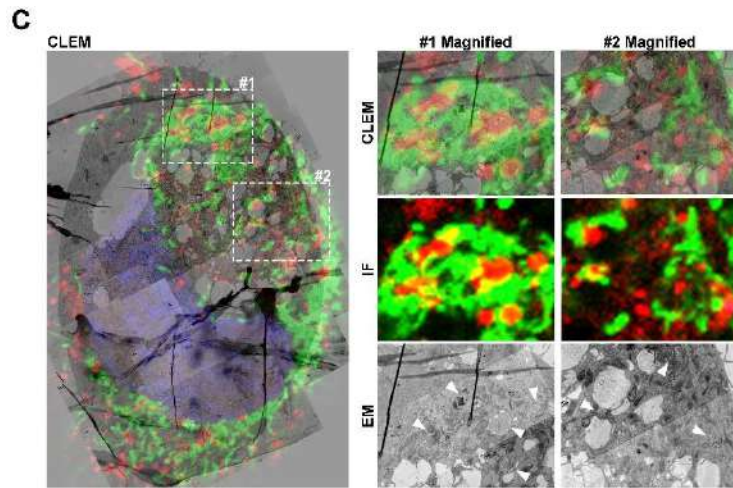


圖5-5. LPS促進吞噬泡包圍粒線體(A)共軛焦螢光顯微鏡觀察結果。(B)多張Z軸切片經過3D重建的結果。(C)B圖和TEM照片疊合的結果。(A、B、C圖由實驗室協助)。

(三)脂多醣(LPS)促進粒線體被分解

上一個實驗證實 LPS 會促進含有粒線體的自噬小體產生，此實驗著重於觀察 LPS 是否會促使自噬小體和溶小體融合，形成自噬溶酶體，使粒線體被分解。我們使用Huh7 細胞，其粒線體外膜的 FIS1 蛋白被RFP-GFP 融合蛋白標記。因在酸性條件下 GFP 酸性環境下會發生螢光淬滅，而 RFP 維持不變，因此一開始粒線體呈黃色共定位訊號，但在自噬小體和溶小體融合後，因溶小體的酸性環境導致 GFP 螢光強度降低，其後將呈紅色，此方法被稱為 Mito-QC，利用這個原理可以確認粒線體已被分解。

使用有 Mito-QC 標記的 Huh7 細胞，5 μ g/ml LPS 處理 6 小時後將細胞核以 DAPI 染色。以螢光顯微鏡觀察細胞，拍攝 10 張照片後計算自噬溶酶體RFP⁺/GFP⁺ 的數量，挑選接近平均值的 10 顆細胞作圖。實驗結果如圖5-6A，白色箭頭指向其中五顆自噬溶酶體。右方的統計圖可發現LPS 處理後的細胞，紅色puncta的數量多於未處理者。

為了瞭解細胞形成自噬溶酶體的動態，我們採用縮時影像攝影來觀察形成過程。我們使用被 Mito-QC 標記的 Huh7.5-1 細胞，加入 LPS 後，利用共軛焦顯微鏡拍攝連續影像，挑選 8 個時間點並將其中三顆 puncta 用白色箭頭標示出來。實驗結果如圖 5-6B。

從圖中可以看到，0 分鐘的 RFP⁺/GFP⁺的 puncta，在到 42 分鐘的這段時間 GFP 螢光訊號逐漸變弱，最後只剩 RFP 螢光訊號，最後在 137 分鐘時 RFP 螢光訊號也消失，顯示其內容物已被降解，代表自噬作用的完成。

上一階段的結果顯示LPS會誘發自噬小體進入溶小體的酸性環境，接著我們用了另一

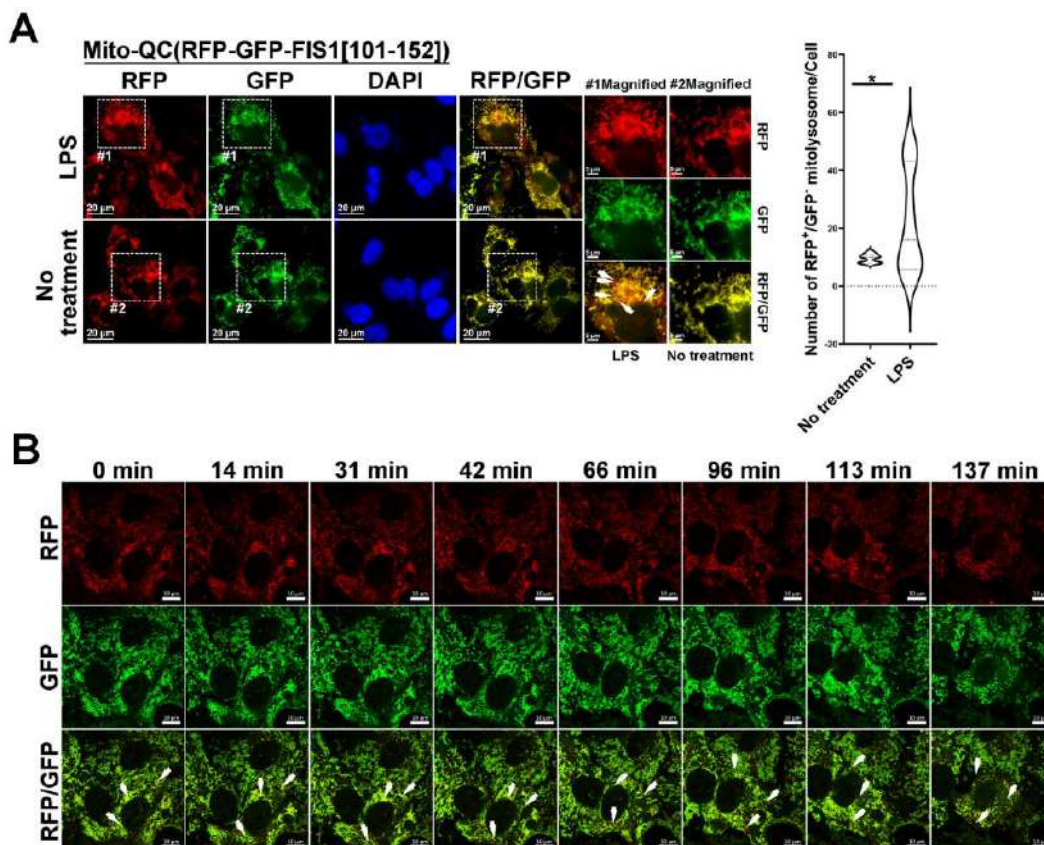
種pH敏感蛋白-Kemia，來標記粒線體的基質。當粒線體從中性環境到酸性環境時，Kemia之發光波長會從488nm轉為561nm，可以利用此特性來判斷粒線體所在的環境。

使用有 Kemia 標記的 Huh7 細胞，以 5 μ g/ml 的 LPS 處理 6 小時。以螢光顯微鏡觀察細胞，拍攝 10 張照片後計算每張視野下粒線體表現紅色螢光訊號細胞佔視野下總細胞數的百分比。圖5-6C為實驗結果。由右方統計圖可發現經過 LPS 處理的組別，含有表現紅色螢光的Kemia的細胞比例，明顯多於未處理組，這代表LPS處理會增加進入酸性環境的粒線體數量，也就是有較多自噬溶酶體產生。

接著，我們使用縮時影像攝影觀察自噬溶酶體的形成，我們使用被Kemia標記的 Huh7.5-1 細胞，加入LPS後，利用共軛焦顯微鏡拍攝連續影像，挑選8個時間點並用白色箭頭標示其中四顆puncta。實驗結果為圖5-6D。

從圖中可以看到，0 分鐘表現綠色訊號的四顆 puncta，在紀錄的時間中紅色螢光訊號逐漸增強，形成由紅色及綠色螢光訊號疊合訊號。到 190 分鐘時，4 顆 puncta 皆表現紅色訊號，顯示 Kemia 處在酸性環境，代表自噬溶酶體的形成。

從兩個實驗皆可發現 LPS 處理後自噬溶酶體形成的數量、比例皆比未處理組還要多，而從動態影像也觀察到自噬溶酶體的形成。因此可以推論 LPS 處理會促進自噬溶酶體形成。



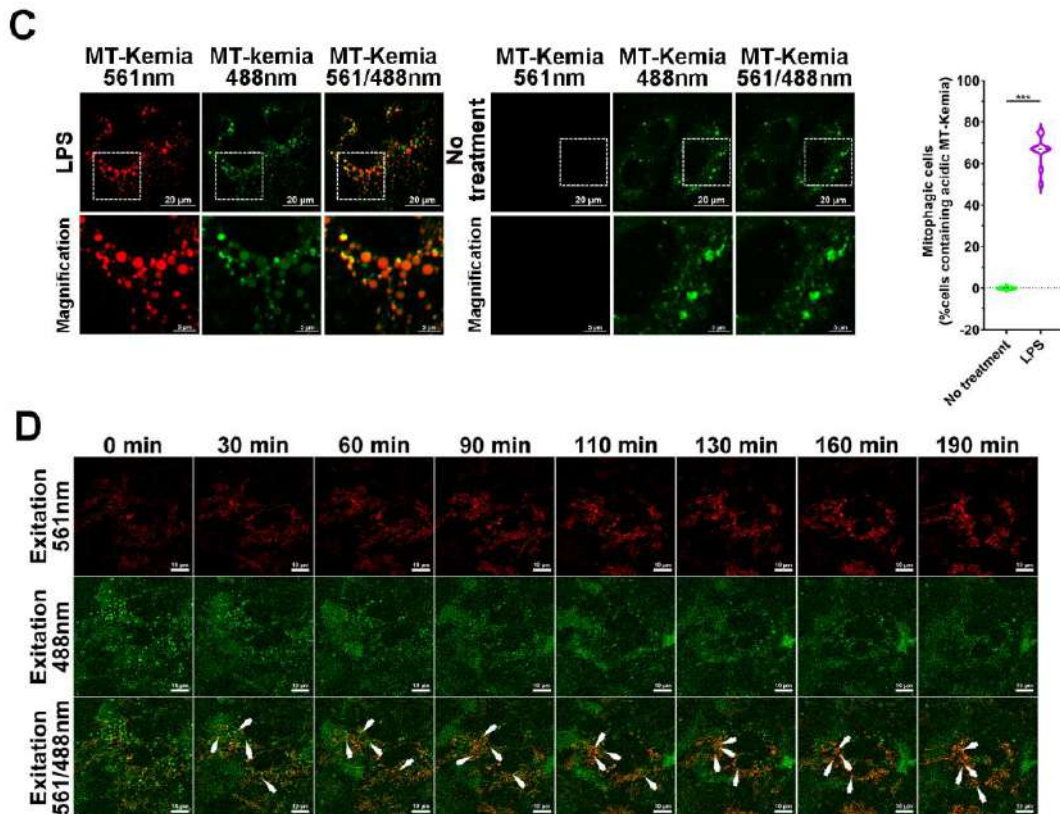
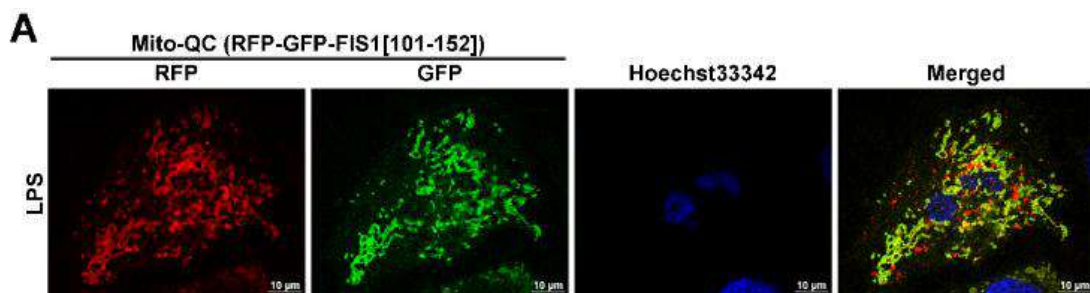


圖 5-6. LPS 促進粒線體被分解 (A) 螢光顯微觀察結果。(P=0.029)。(B) 縮時攝影結果。(C) 螢光顯微觀察結果。(P<0.001)。(D) 縮時攝影結果。(A、C 圖為作者自行拍攝製作，B、D 由實驗室協助)。

為了得到更準確的結果，我們使用了 CLEM 觀察 FIS1 蛋白用 RFP-GFP，細胞核用 Hoechst33342 標記且經過 5 μ g/ml 的 LPS 處理 6 小時的 Huh7.5 細胞。觀察結果如圖 5-7。其中 A 圖為利用共軛焦螢光顯微鏡觀察後的結果。B 圖左圖為拍攝 Z 軸的多張切片後，利用 3D 重建獲得的影像，右圖則為旋轉後的視角圖。C 圖中的左圖為 B 圖和 TEM 照片疊合的結果，右圖則為左圖其中三個部分的局部放大圖。

從 B 圖可以觀察到紅色螢光訊號分布於細胞質內部，顯示這些訊號來自細胞內部，而非細胞表面。而 C 圖右側的 TEM 影像中，白色箭頭標示出被吞噬泡包覆的粒線體，或是正與溶酶體融合的自噬體，進一步證實自噬溶酶體的形成與粒線體自噬的進行。



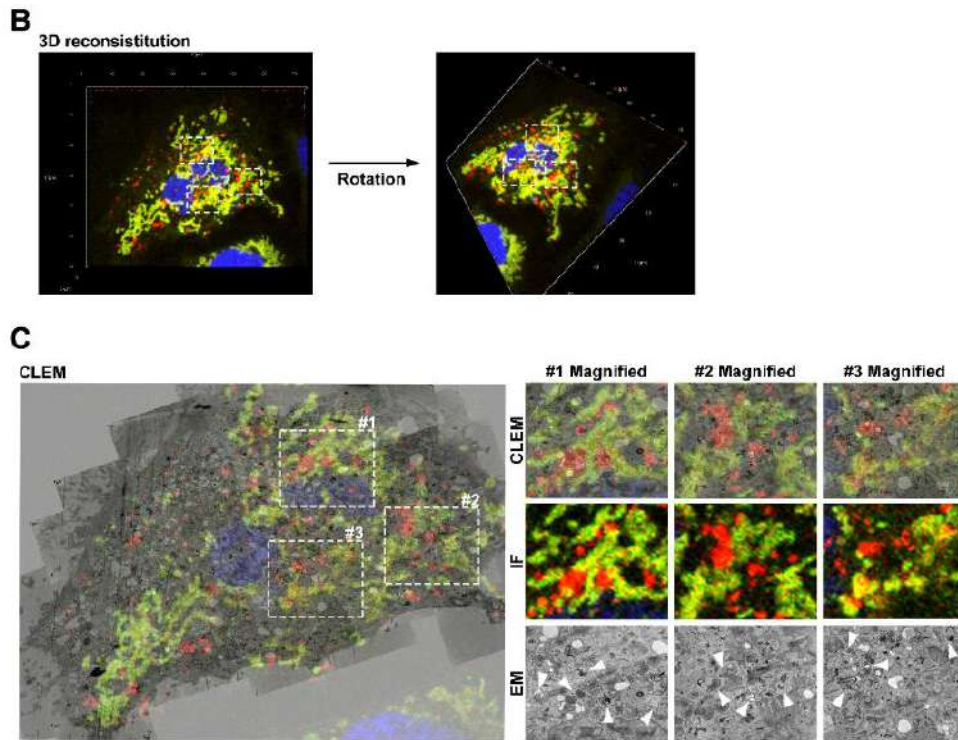


圖 5-7. LPS 促進粒線體被分解 (A)共軛焦顯微鏡觀察結果(B)多張 Z 軸切片經過 3D 重建的結果。(C)B 圖和 TEM 照片疊合的結果。(A、B、C 圖由實驗室協助)。

(四) 脂多醣(LPS)活化 PINK1-Parkin 通路

由實驗(二)及(三)可得知 LPS 會活化粒線體自噬作用，接著我們將用螢光蛋白標記自噬相關蛋白，探討其中的重要機制-PINK1-Parkin 通路。此通路中，當粒線體受損時，PINK1 累積在粒線體外膜上，進一步招募 Parkin 到膜上，而 Parkin 為啟動自噬作用的重要蛋白之一，可促使受損胞器泛素化。此實驗將利用螢光蛋白標記此兩種分子，以探討 LPS 與此通路的關係。

首先，我們觀察 LPS 是否會刺激 Parkin 轉移到受損粒線體。我們分別使用有 RFP-Parkin 表現且粒線體經 GFP 標記和有 YFP-Parkin 表現且粒線體經 RFP 標記的 Huh7 細胞，以 5 μ g/ml 的 LPS 處理 6 小時後將細胞核用 DAPI 染色。以螢光顯微鏡觀察細胞，拍攝 10 張照片後計算共定位的 puncta 數量。實驗結果如圖 5-8A 及圖 5-8B。白色箭頭指向其中五顆共定位的 puncta。右方統計圖為挑選接近平均值的 10 顆細胞作圖。

由 A 圖及 B 圖皆可發現 LPS 處理後的細胞共定位現象明顯多於未處理者，證實 LPS 會間接促使 Parkin 被招募到粒線體。因此可確定 LPS 會誘發 Parkin 轉移到粒線體。

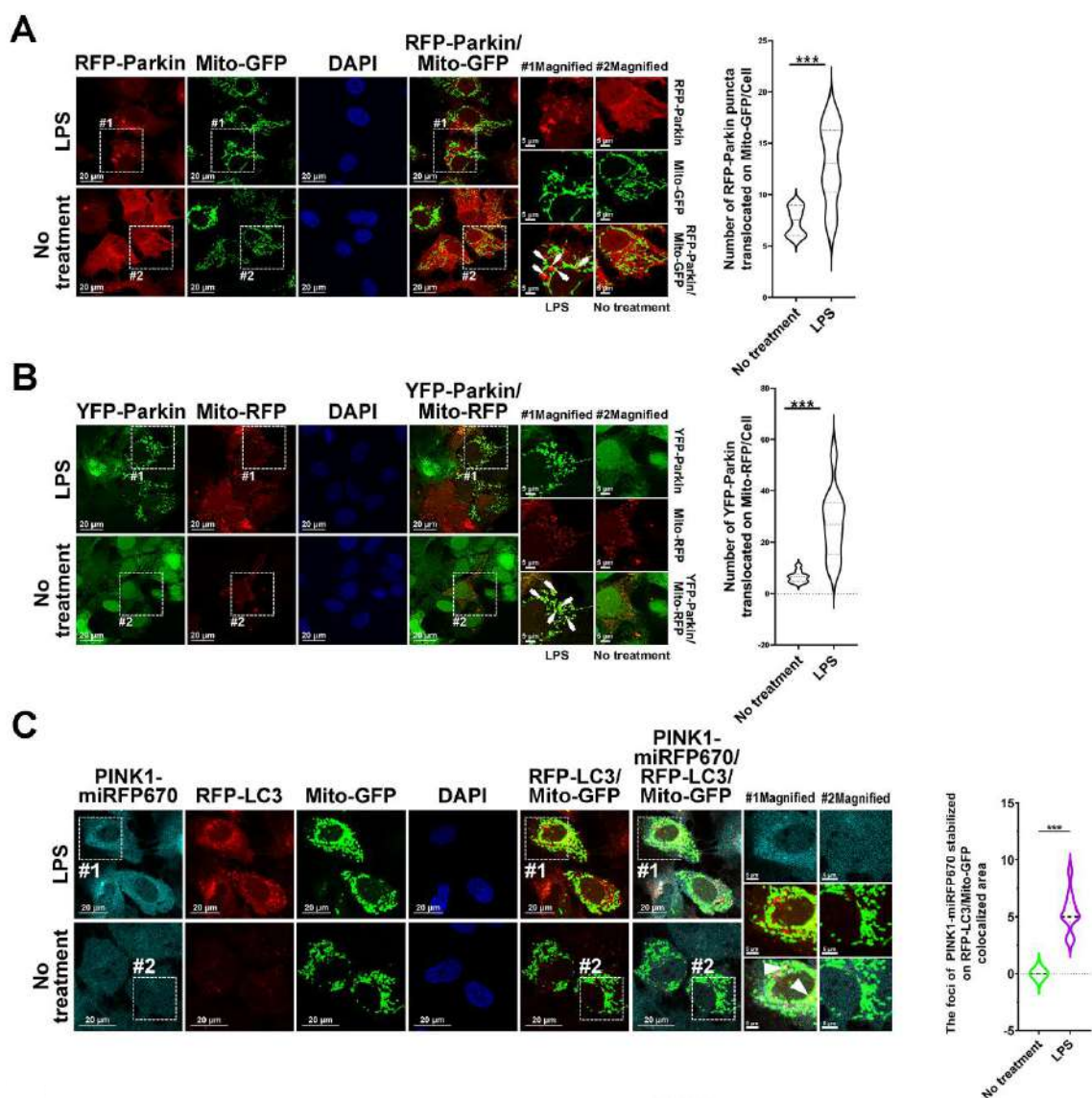
接著，觀察 LPS 是否會誘導 PINK1 累積於粒線體。使用有 miRFP670-PINK1 表現且 LC3 經 RFP 標記、粒線體經 GFP 標記的 Huh7 細胞，5 μ g/ml 的 LPS 處理 6 小時後將細胞核以 DAPI 染色。以螢光顯微鏡觀察細胞，拍攝 10 張照片後計算三者共定位的 puncta 數量，此

可視為被 PINK1 標記，被吞噬泡包圍的粒線體數量。實驗結果如圖 5-8C，其中白色箭頭指向共定位的 puncta。右方統計圖為挑選接近平均值的 10 顆細胞作圖。

從 C 圖右方的統計圖可發現，經 LPS 處理的組別中，共定位訊號數量比未處理組多，顯示 LPS 可能促使 PINK1 累積於粒線體膜，進一步誘發粒線體自噬機制的啟動。

接著，我們將觀察 LPS 是否會促進 PINK1、Parkin 定位到粒線體上。使用有 miRFP670-PINK1 表現且 Parkin 經 RFP 標記、粒線體經 GFP 標記的 Huh7 細胞，以 5 μ g/ml 的 LPS 處理 6 小時後將細胞核用 DAPI 染色。螢光顯微鏡觀察細胞，拍攝 10 張照片後計算三者共定位的 puncta 數量。實驗結果如圖 5-8D，其中白色箭頭指向其中 4 顆共定位的 puncta。右方統計圖為挑選接近平平均值的 10 顆細胞作圖。

從 D 圖可知 LPS 處理後被 PINK1 及 Parkin 同時標記的粒線體數量明顯比未處理組高。整體而言，這些結果皆支持 LPS 透過調節 PINK1 - Parkin 路徑參與粒線體自噬的調控。



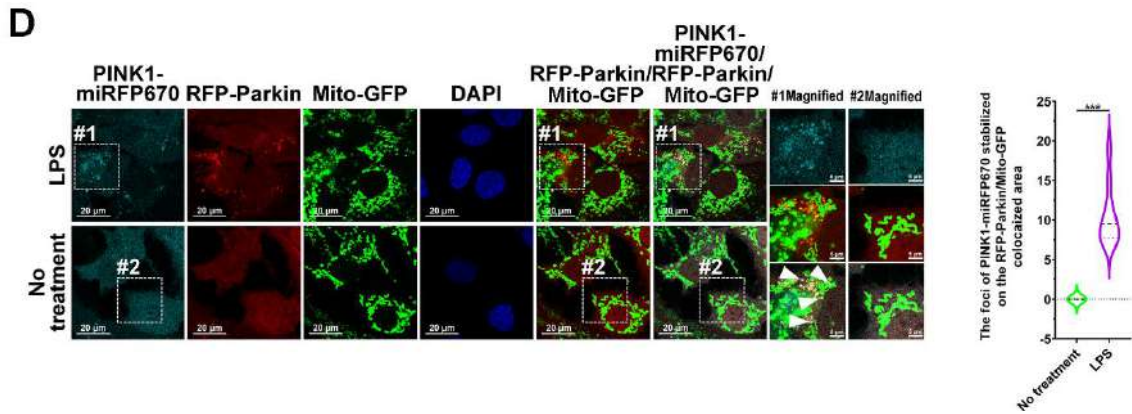
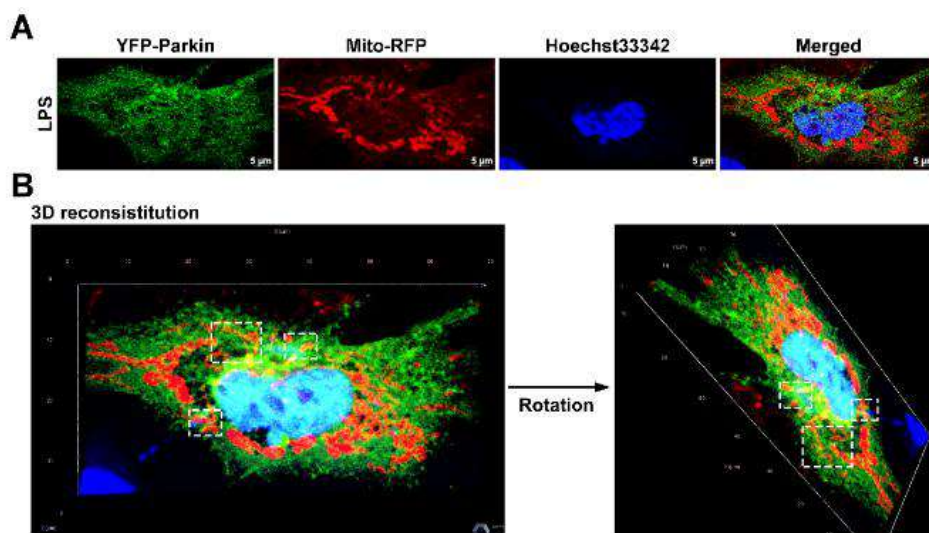


圖 5-8. LPS 促進 PINK1 和 Parkin 的轉移 (A) 螢光顯微觀察結果。(P<0.001)。(B) 螢光顯微觀察結果。(P<0.001)。(C) 螢光顯微觀察結果。(P<0.001)。(D) 螢光顯微觀察結果。(P<0.001)。(A、B、C、D 圖為作者自行拍攝製作)。

為了驗證螢光共定位是否真實反映 PINK1 – Parkin 活化粒線體自噬過程，我們利用 CLEM 分析有 YFP-Parkin 表現、粒線體經 RFP 標記，細胞核用 Hoechst33342 標記且經 5 μ g/ml LPS 處理 6 小時的 Huh7.5 細胞。觀察結果如圖 5-9。其中 A 圖為利用共軛焦螢光顯微鏡觀察後的結果。B 圖左圖為拍攝 Z 軸的多張切片後，利用 3D 重建獲得的影像，右圖則為旋轉後的視角圖。C 圖中的左圖為 B 圖和 TEM 照片疊合結果，下圖則為右圖其中三個部分的局部放大圖。

C 圖中白色箭頭指出被包圍的粒線體，而其位置與共定位的螢光訊號位置高度對應。而 B 圖中的立體旋轉圖，解決了前述實驗僅能觀察平面構造的限制，有效補強前述僅以螢光顯微鏡所觀察的結果，進一步支持 Parkin 在粒線體自噬中的功能角色。



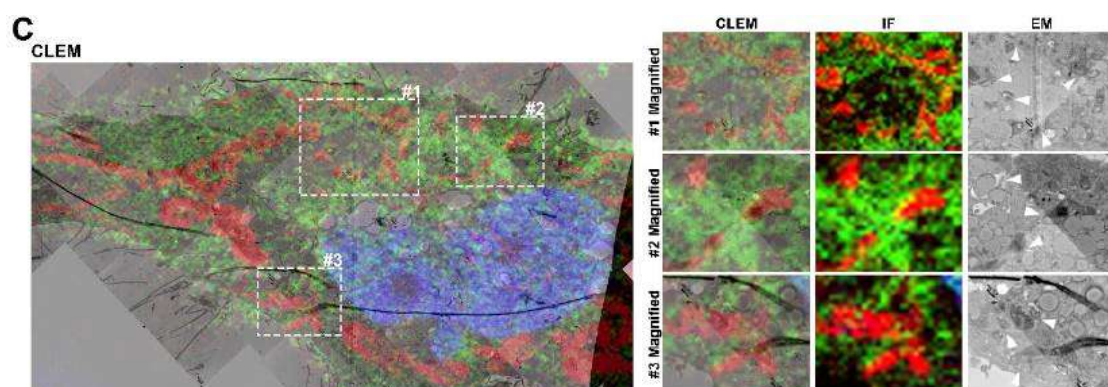


圖 5-9. LPS 活化 PINK1-Parkin 通路 (A)共軛焦顯微鏡觀察結果(B)多張 Z 軸切片經過 3D 重建的結果。(C)B 圖和 TEM 照片疊合的結果。(A、B、C 圖由實驗室協助)。

接著，我們將觀察 TBK1，一種能活化自噬受體的重要蛋白，在 LPS 處理是否會被誘導聚集到自噬相關結構。使用有 RFP-LC3、GFP-TBK1 表現且粒線體經 miRFP670 標記的 Huh7 細胞，另外還使用有 RFP-Parkin、GFP-TBK1 且粒線體經 miRFP670 標記的 Huh7 細胞。兩者皆以 5 μ g/ml 的 LPS 處理 6 小時後將細胞核以 Hoechst33342 染色。以螢光顯微鏡觀察細胞，接著拍攝 10 張照片並計算 LC3 和 TBK1 共定位的 puncta 數量。實驗結果如圖 5-10A。另外計算 Parkin 和 TBK1 的共定位。實驗結果如圖 5-10B。圖中白色箭頭指向其中五顆共定位的 puncta。右方統計圖為挑選接近平平均值的 10 顆細胞作圖。

從結果可觀察到，LPS 處理後，TBK1 與 LC3 和 Parkin 的共定位 puncta 數量皆顯著增加，顯示 LPS 能促進 TBK1 聚集至自噬相關結構並可能參與選擇性自噬調控。

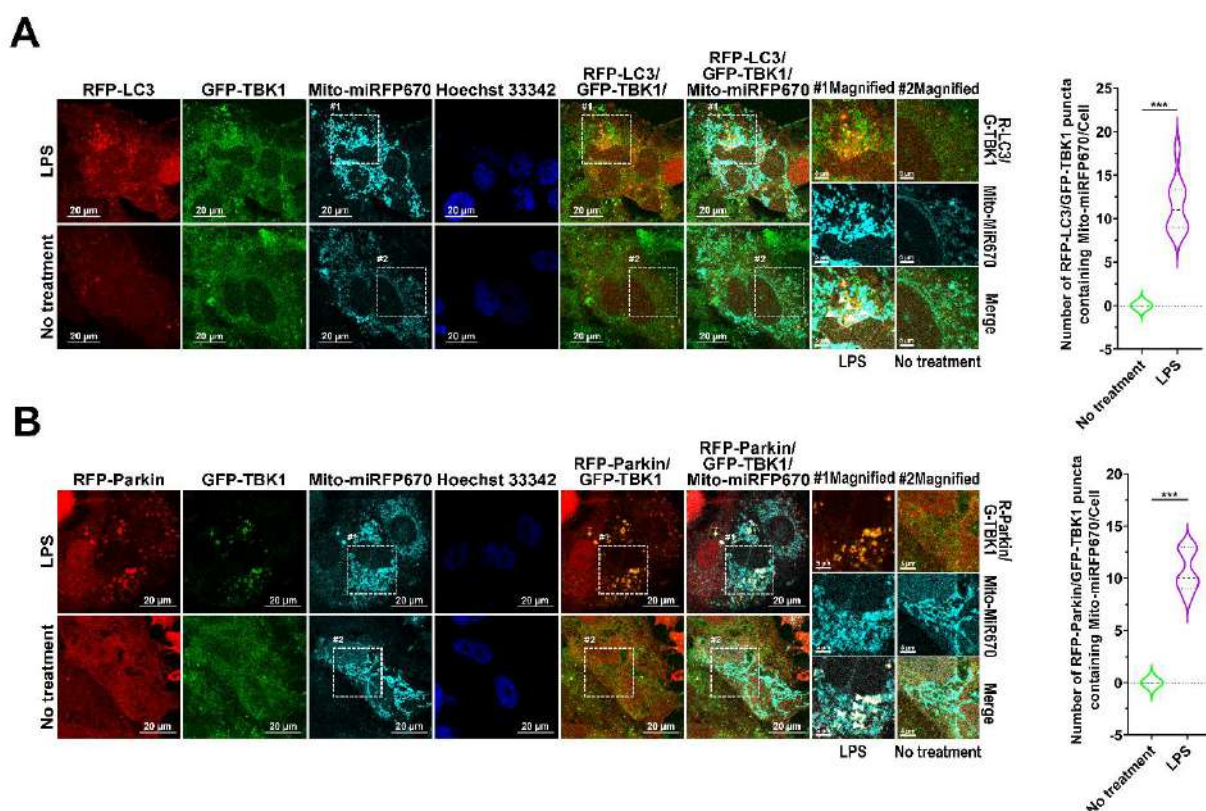


圖 5-10. LPS 促進 TBK1 聚集 (A)螢光顯微觀察結果。(P<0.001)。(B)螢光顯微觀察結果。(P<0.001)。(A、B 圖為作者自行拍攝製作)。

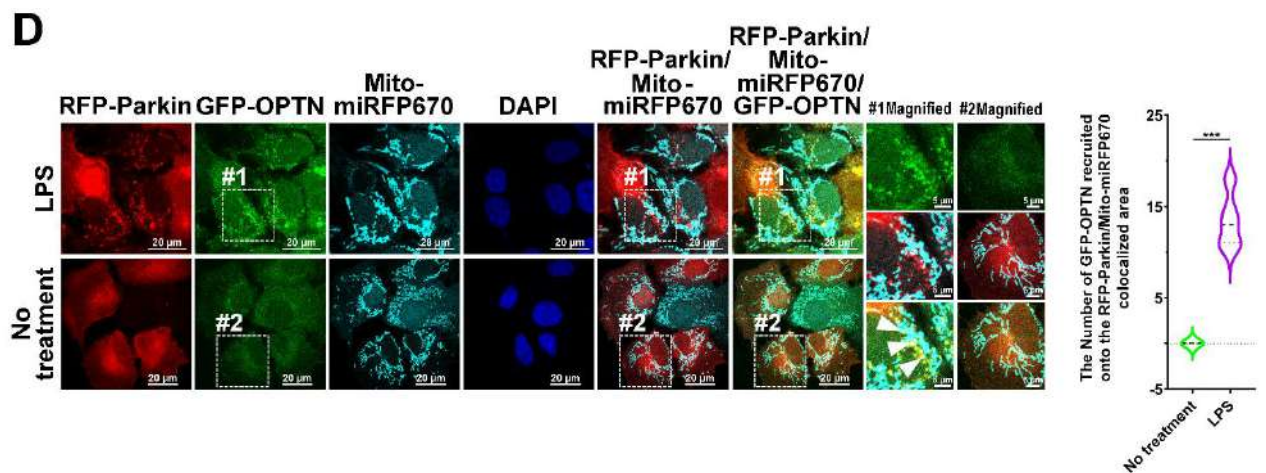
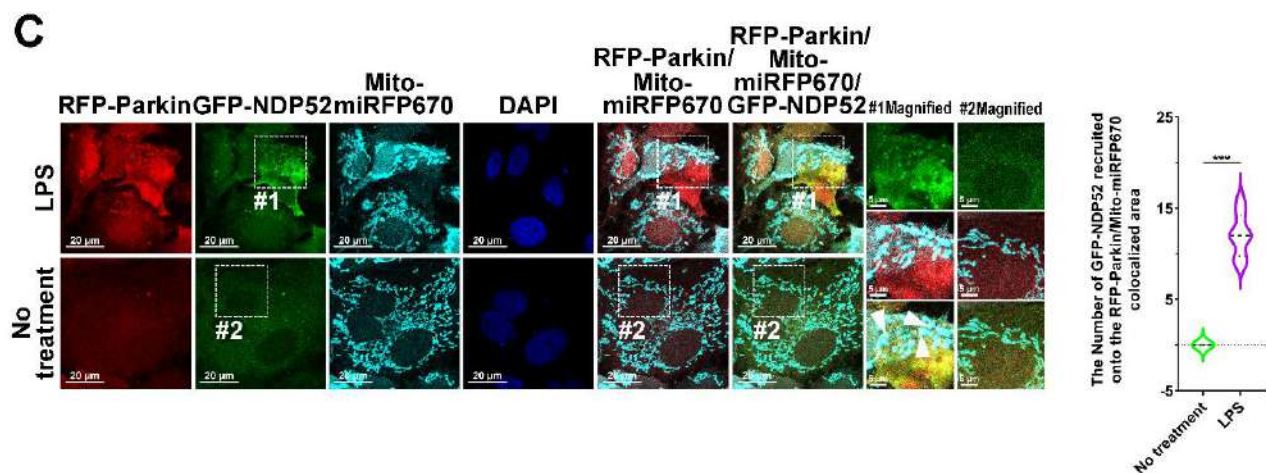
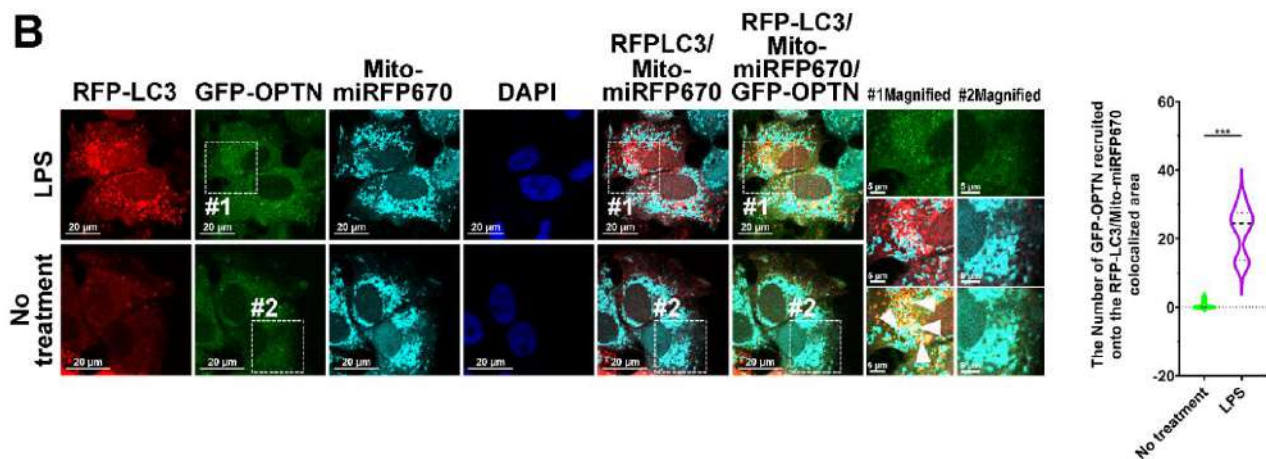
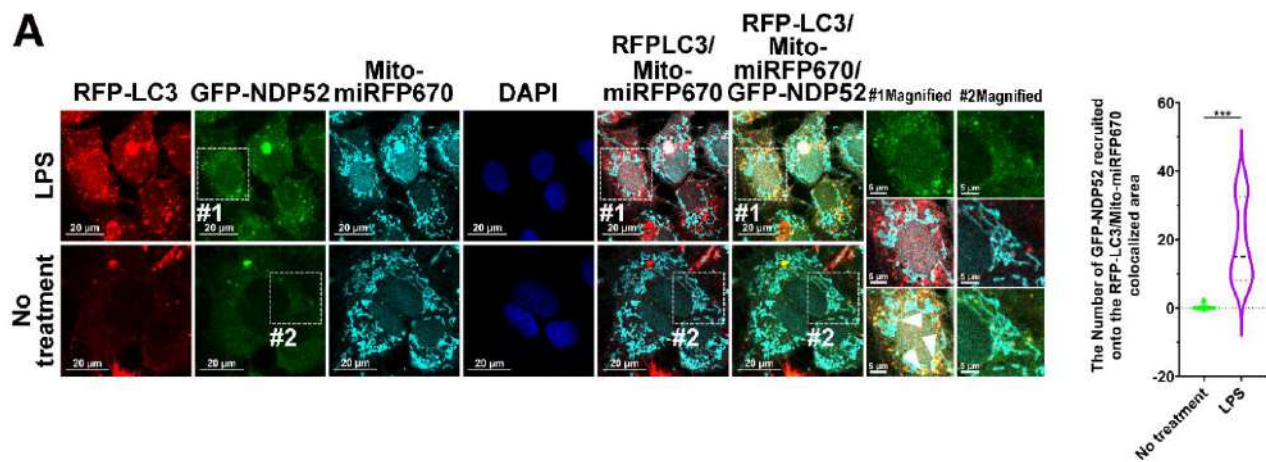
確認 LPS 會誘導 TBK1 聚集後，我們要探討 LPS 是否會促使自噬受體的招募。分別用 GFP 標記 NDP52、OPTN 兩種自噬受體。使用有 RFP-LC3、GFP-NDP52 表現且粒線體經 miRFP670 標記的 Huh7 細胞和有 RFP-LC3、GFP-OPTN 表現且粒線體經 miRFP670 標記的 Huh7 細胞。皆以 5 μ g/ml 的 LPS 處理 6 小時後將細胞核以 DAPI 染色。以螢光顯微鏡觀察細胞後拍攝 10 張照片。實驗結果如圖 5-11。A 圖為計算 NDP52、LC3 和粒線體共定位的 puncta 數量結果。B 圖為計算 OPTN、LC3 和粒線體共定位的 puncta 數量的結果。其中白色箭頭指向其中五顆共定位的 puncta。右方的統計圖為挑選接近平均值的 10 顆細胞作圖。

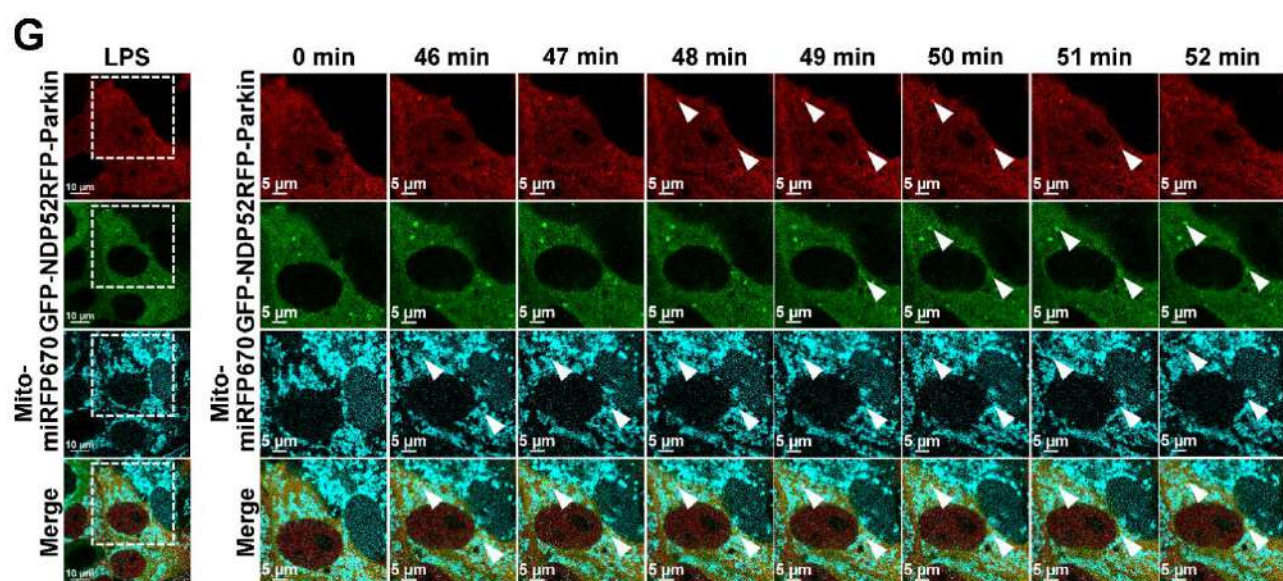
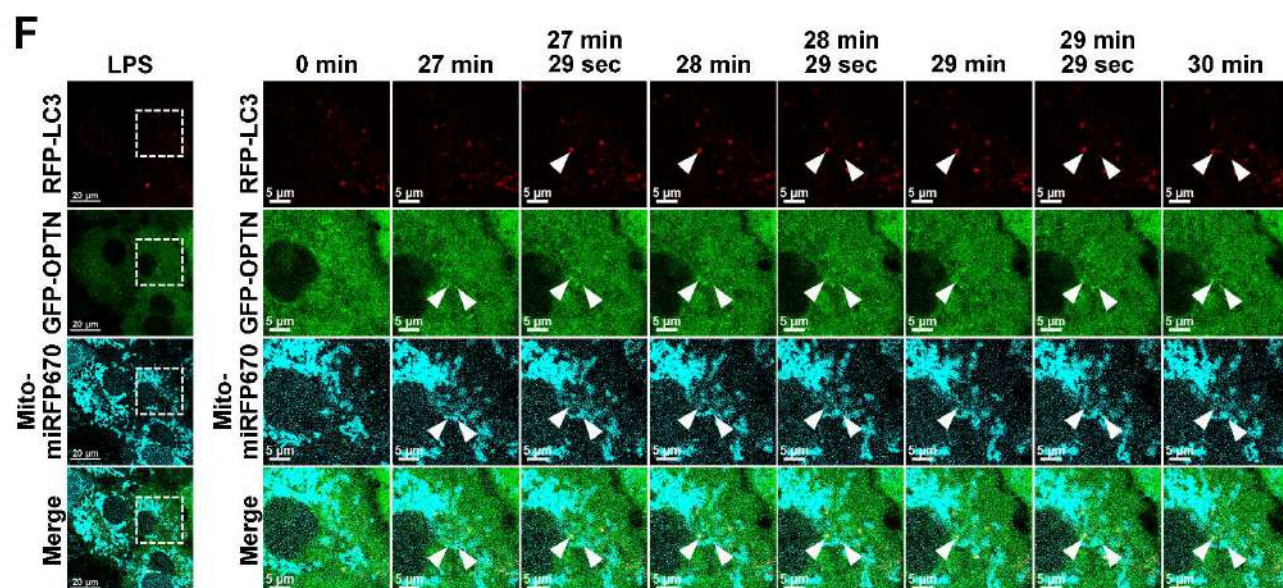
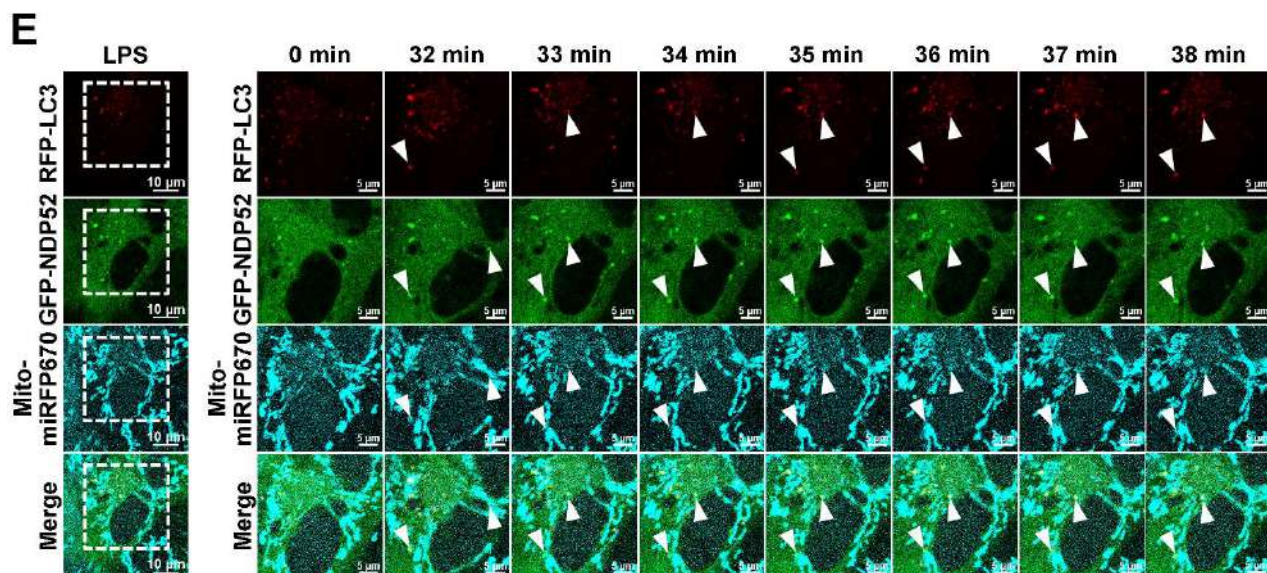
從結果可發現 LPS 處理後自噬受體和 LC3 及粒線體的共定位訊號數量顯著上升，顯示 LPS 會促進自噬小體的招募。

接下來，我們要觀察 LPS 對自噬受體的影響，自噬受體(如 p62/SQSTM1、NDP52、OPTN)皆擁有能分別與 LC3-II 結合的區域 LIR 和與泛素結合的區域 UBA，這使得自噬受體能結合吞噬泡和被泛素化的粒線體，使粒線體自噬可以精準水解目標粒線體。另外，自噬受體的特定定位點被磷酸化後，穩定性、結合能力都可以提升，使其能更容易精準的執行選擇性細胞自噬。而先前觀察的 TBK1 就是其中一個可以磷酸化自噬受體的分子。

我們使用有 RFP-Parkin、GFP-NDP52 表現且粒線體經 miRFP670 標記的 Huh7 細胞和有 RFP-Parkin、GFP-OPTN 表現且粒線體經 miRFP670 標記的 Huh7 細胞，同時觀察 Parkin 移轉到粒線體上的狀況和自噬受體結合到粒線體上的狀況，兩者皆以 5 μ g/ml 的 LPS 處理 6 小時後將細胞核以 DAPI 染色。以螢光顯微鏡觀察細胞，接著利用 apotome 拍攝 10 張照片。圖 5-11C 為計算 NDP52、Parkin 和粒線體共定位的 puncta 數量的結果。圖 5-11D 為計算 OPTN、Parkin 和粒線體共定位的 puncta 數量的結果。兩圖中白色箭頭指向其中三顆共定位的 puncta。右方的統計圖為挑選接近平均值的 10 顆細胞作圖。

接著，我們採用縮時影像攝影分別觀察經上述 4 種方式標記的 Huh7.5-1 細胞，加入 LPS 後，利用共軛焦顯微鏡拍攝連續影像，挑選 8 個時間點並追蹤三種螢光標記共定位的 puncta，用白色箭頭標示出來。另外，還有分別用白色箭頭標示出 puncta 對應的各個螢光標記。圖 5-11 中的 E、F、G、H 圖分別為四種標記的縮時攝影結果。





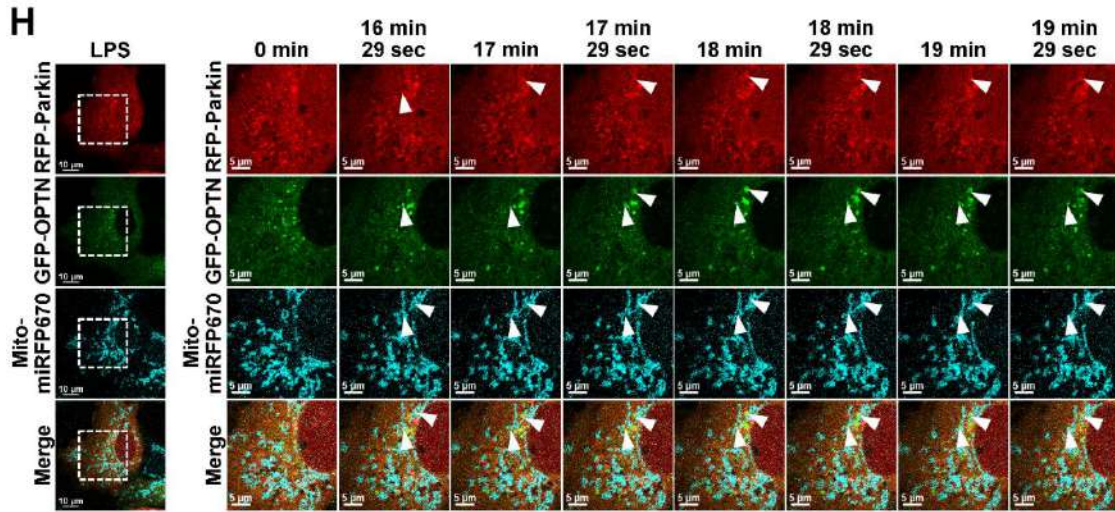


圖 5-11. LPS 促進自噬受體的招募 (A) 螢光顯微觀察結果。(P<0.001)。(B) 螢光顯微觀察結果。(P<0.001)。(C) 螢光顯微觀察結果。(P<0.001)。(D) 螢光顯微觀察結果。(P<0.001)。(E) 縮時攝影結果。(F) 縮時攝影結果。(G) 縮時攝影結果。(H) 縮時攝影結果。(A、B、C、D 圖為作者自行拍攝製作，E、F、G、H 由實驗室協助。)

接下來，我們使用敲除 NDP52、OPTN 基因的細胞，觀察其對細胞的影響。我們分別用 RFP-LC3/Mito-GFP/DAPI、Mito-QC、MT-Kemia 這 3 種方式染色，分別計算 RFP-LC3 和 Mito-GFP 共定位、RFP⁺/GFP、紅色訊號的 puncta，以此種方式探討 LPS 是否能影響 PINK1/Parkin 通路。結果分別為圖十二中的 A、B、C 圖。

從三個結果皆可以發現分別將兩種基因敲除後，不管是否經 LPS 處理的細胞形成的自噬小體皆明顯減少，顯示此兩種基因參與了自噬小體的形成。而未基因敲除的組別中，LPS 處理的細胞形成的自噬小體也顯著較多，代表 LPS 會誘導此自噬反應。

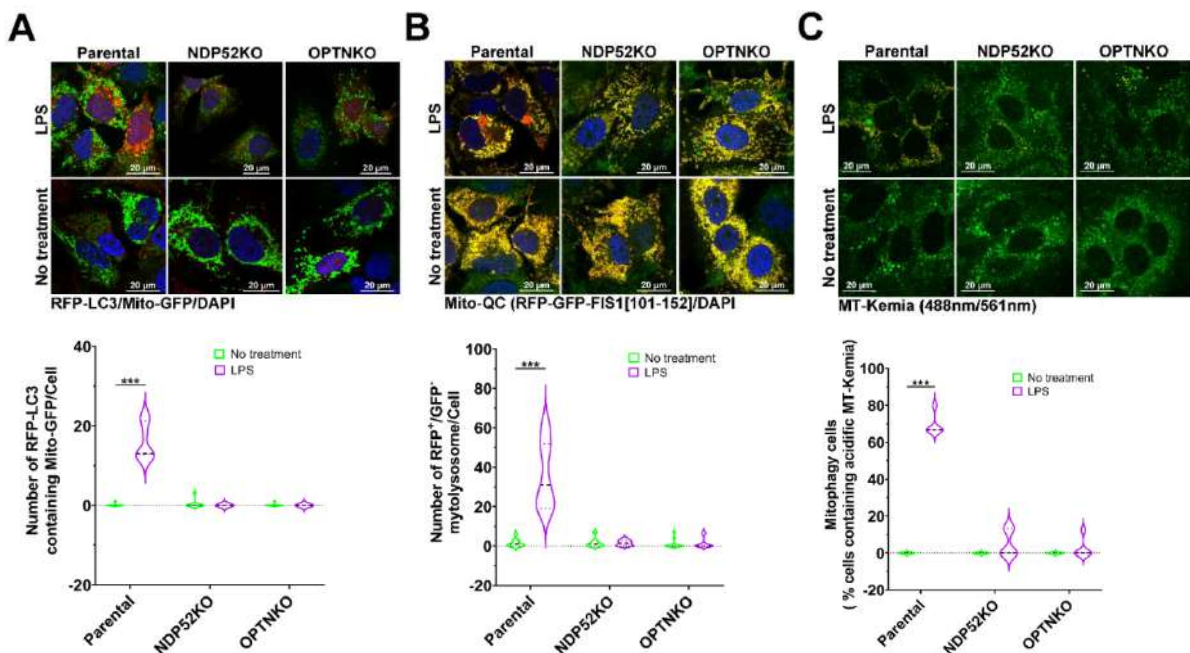


圖 5-12. LPS 處理和敲除 NDP52、OPTN 基因對細胞的影響 (A) 螢光顯微觀察結果。(P<0.001)。(B) 螢光顯微觀察結果。(P<0.001)。(C) 螢光顯微觀察結果。(P<0.001)。(A、B、C 由實驗室協助。)

陸、結論

一、脂多醣(LPS)對自噬作用的影響

(一)透過螢光顯微觀察(圖 5-1A、圖 5-1B)、西方點墨法(圖 5-1C)、穿透式電子顯微鏡

(圖 5-1D)發現**脂多醣(LPS)會促進自噬小體(autophagosome)的形成。**

(二) 透過螢光顯微觀察(圖5-2A)、縮時影像攝影(圖5-2B)、西方點墨法

(圖5-2C)發現**脂多醣(LPS)會促進自噬溶酶體(autolysosome)成熟。**

二、LPS對粒線體自噬作用的影響

(一)透過螢光顯微觀察(圖5-3A 圖5-3B)、穿透式電子顯微鏡(圖5-3C)發現**脂多醣(LPS)會誘導粒線體型態改變。**

(二)透過螢光顯微觀察(圖5-3D、圖5-3E、圖5-4A、圖5-4C)、縮時影像攝影(圖5-4B)、CLEM(圖5-5)發現**脂多醣(LPS)會促使自噬泡包圍粒線體。**

(三)透過螢光顯微觀察(圖5-6A、圖5-6C)、縮時影像攝影(圖5-6B、圖5-6D)、CLEM(圖5-7)發現**脂多醣(LPS)會促使自噬溶酶體的形成。**

(四)透過螢光顯微觀察(圖5-8、圖5-10、圖5-11A~D、圖5-12)、CLEM(圖5-9)、縮時影像攝影(圖5-11E~H)發現**脂多醣(LPS)可活化PINK1-Parkin通路。**

綜上所述，我們在實驗中發現脂多醣(LPS)可以促進完整的自噬作用，因此可推論脂多醣(LPS)和肝臟粒線體的自噬作用有緊密關聯，此結論和以往研究提出的脂多醣(LPS)會引起粒線體更替相符。

柒、未來展望

一、探討 LPS 對自噬受體的影響

二、用螢光染色觀察其他細胞株觀察其和 Huh7 差別

三、探討粒線體自噬受影響和肝臟疾病之間的關聯

希望未來能研究其中間的完整機制，將更多種細胞株引入實驗，並確定脂多醣(LPS)對多種肝臟疾病的病理機制，使此研究更加完善。期望這些結論能提供將來開發藥物作參考。

捌、參考文獻

1. 酯多醣 維基百科 取自<https://zh.wikipedia.org/zh-tw/%E8%84%82%E5%A4%9A%E7%B3%96>
2. Metformin對肝臟細胞選擇性粒線體自噬作用之活化機制探討--- 2024年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯
3. Gabriele Zaffagnini, Sascha Martens Mechanisms of Selective Autophagy *PMID: 26876603*
4. Isei Tanida, Takashi Ueno, Eiki Kominami LC3 and Autophagy *PMID: 18425443*
5. Trond Lamark, Terje johansen Mechanisms of Selective Autophagy *Annu Rev Cell Dev Biol. 2021;37:143 - 169.*
6. Ruey-Hwa Chen, Yu-Hsuan Cheny, Tzu-Yu Huang Ubiwuitin-mediated regulation of autophagy *PMID:31630678*
7. Byeong-Won Kim, Do hoon Kwon, Hyun Kyu Song Structure biology of selective autophagy receptors *PMID:26698872*
8. Benjamin Richter, Danielle A. Sleter, Lina Herhaus, Ivan Dikic Phosphorylation of OPEN by TBK1 enhances its binding to Ub chains asnd promotes selective autophagy of damaged mitochondria *PNAS, 2016*
9. Mohammad Omar Faruk, Yoshinobu Ichimura, Masaaki Komatsu Selective autophagy *Cancer Science. Volume 112, Issue 10/pp.3972-3978*
10. Jin-Mi Heo, Alban Ordureau, Joao A. Paulo The PINK1-Parkin Mitochondrial Ubiquitylation Pathway Drives a Program of OPTN/NDP52 Recruitment and TBK1 Activation to Promote Mitophagy *PMID: 26365381.*

【評語】 052015

本研究聚焦於脂多醣（LPS）與肝臟疾病的關係，特別是透過粒線體自噬（mitophagy）機制。研究採用了經建立表達不同粒線體自噬相關報導基因的人類肝癌細胞株（Huh-7），深入探討了 LPS 如何影響肝臟細胞內粒線體自噬機制。結果證明 LPS 可積極促使自噬及粒線體自噬，有助於解釋其在肝臟相關疾病及粒線體穩定性的重要性。本研究議題切入現代醫學前沿，但仍有一些意見與建議如下：

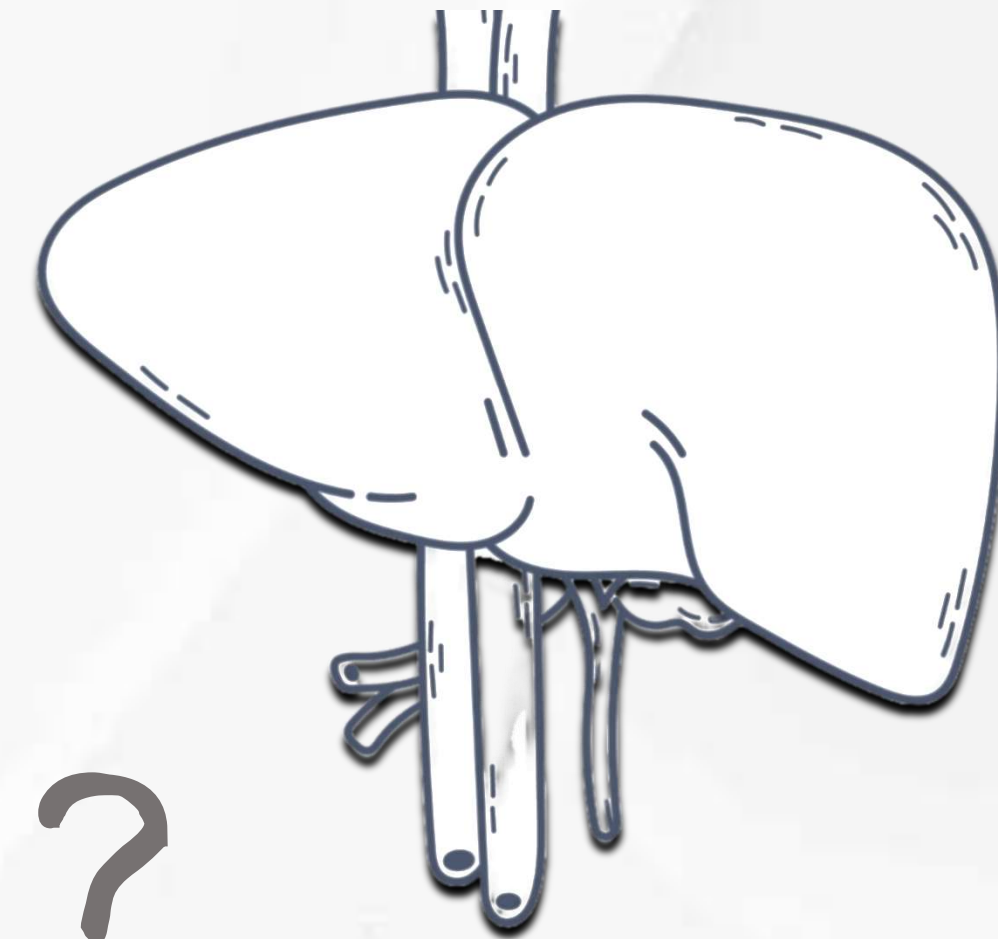
1. 本研究探索了粒線體自噬與 LPS 的疾病連結具趨勢性，與感染、發炎、組織損傷及代謝失調等相關，展現將細胞分子生物學與臨床應用對接的視野。
2. 本研究方法多元且層層驗證：涵蓋螢光/電子顯微鏡、蛋白點墨與即時動態攝影，並檢證多種分子 marker 與結構特徵，做到「定性」、「定量」、「動態」的交叉佐證。
3. 雖有納入 HepG2 與 J7 作部分驗證，但大部分染色實驗仍集中於 Huh7，結果的普遍性仍可進一步強化。
4. 若能使用小鼠肝臟模型或肝細胞移植模型，可大幅提升至臨床疾病的可信度。

5. 可再設計抑制 PINK1/Parkin、TBK1、OPTN 的實驗，進一步證明其在路徑中的必須性。
6. 部分統計 n 數未明確揭露，部分圖說仍可再補充（例如統計分析方法、樣本數、標注意義）。
7. 功能性結果（粒線體功能、細胞命運）未進一步驗證：如呼吸能力、能量生成、凋亡或其他下游路徑改變。
8. 僅以定性、部分定量影像為主，少見根據功能指標的測量（如 mROS、ATP 水準）。
9. 過多數據、影像資料得自他人協助。

作品海報



“肝”阿捏！
LPS如何“肝”擾粒線體自噬？



壹、研究動機

脂多醣 (LPS)是由格蘭氏陰性細菌所產生的一種內毒素，存在於細菌莢膜中，即細胞膜的最外層，在細菌死亡後，細胞壁被破壞，LPS才會被釋出。其具有維持細菌外膜以及誘發宿主細胞產生免疫發炎反應的功能；此外，近年來的研究也指出LPS會**影響宿主細胞內的粒線體生合成**，且與許多人類疾病的發生有關係，例如肝臟疾病。

本研究將探討脂多醣和肝臟疾病的關係，透過研究肝臟相關細胞株(如:Huh-7、HepG2、J7)，**了解脂多醣對肝臟細胞內粒線體自噬機制的影響**，以及該影響與引發肝臟相關疾病的關係。希望本研究可為失調性粒線體自噬引發之肝臟疾病的治療開闢嶄新的方法。

貳、研究目的

- 一、探討脂多醣如何引起肝臟細胞的粒線體自噬作用
- 二、研究脂多醣活化肝臟細胞中粒線體自噬作用之分子調控機制

參、研究原理及方法

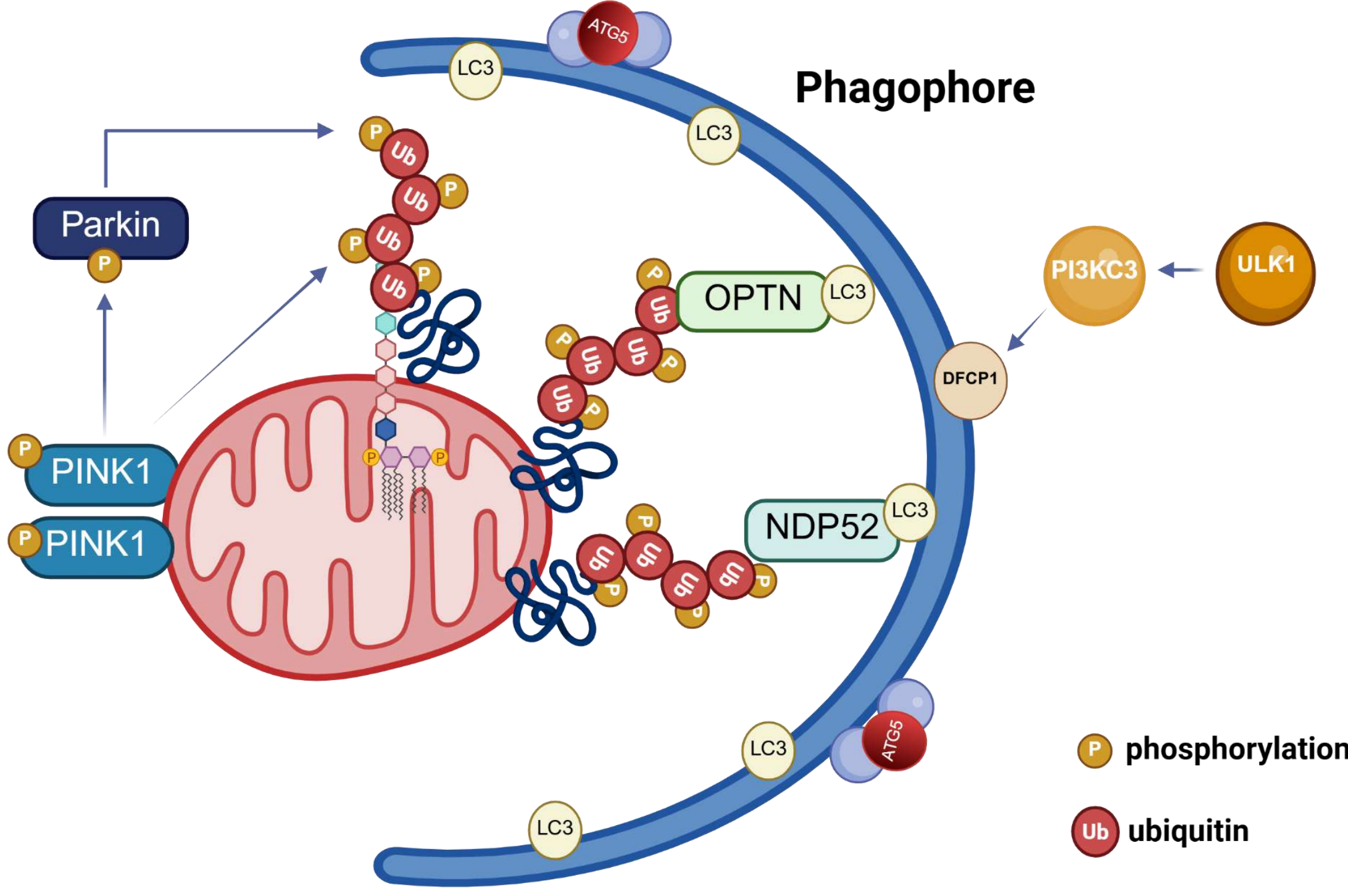
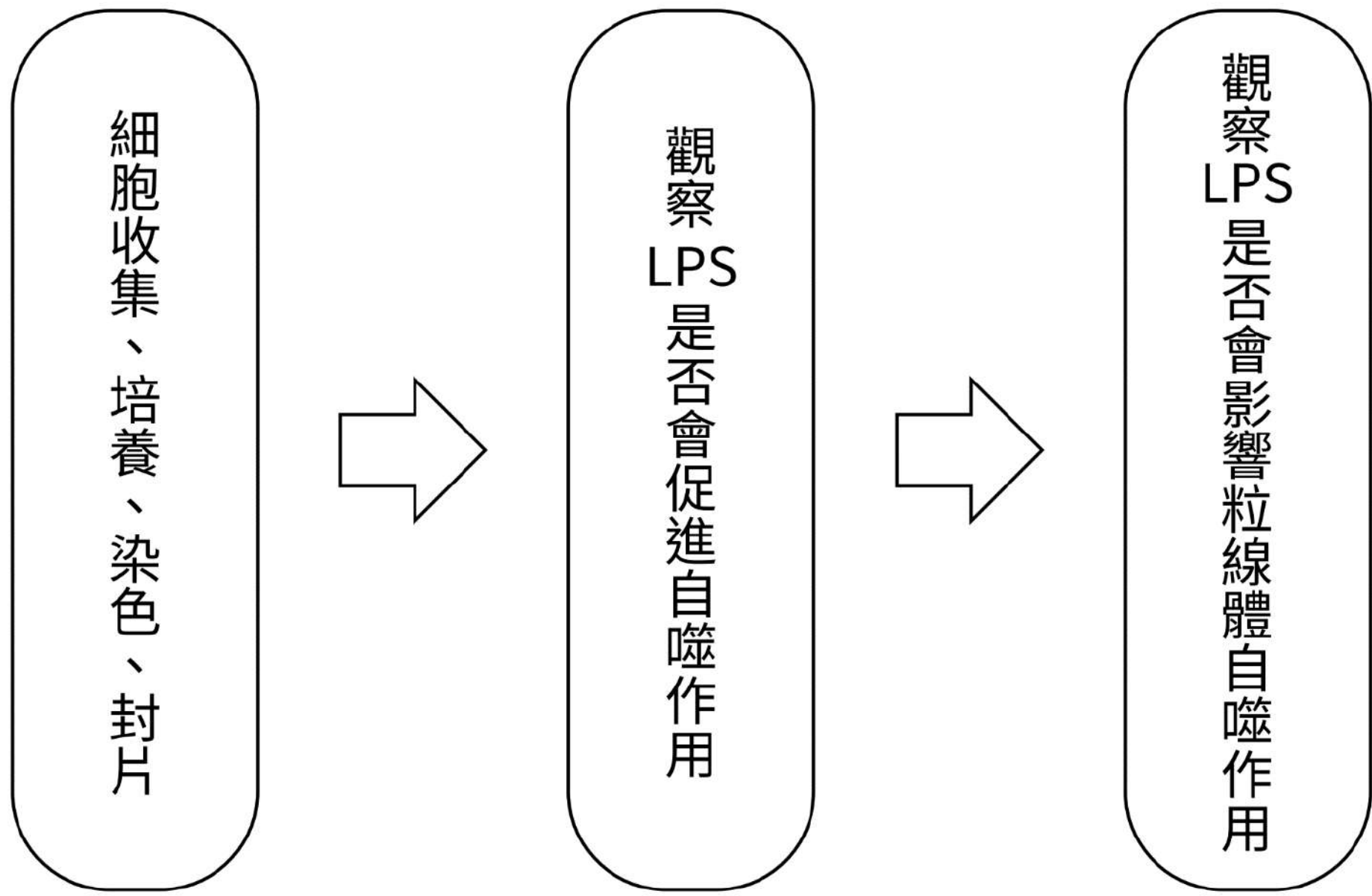
一、文獻探討

細胞自噬是維持細胞穩定中重要的一環。其中有一種小規模、選擇性的細胞自噬，稱為”選擇性細胞自噬(selective autophagy)”。而**粒線體自噬作用(mitophagy)**為一種選擇性自噬，可分解受損的粒線體、調節粒線體更替，即粒線體維持正常功能的更新過程(包含粒線體的生成和降解)。而當此平衡失調時，就會引起疾病。本實驗研究旨在觀察脂多醣(LPS)對肝臟細胞中粒線體自噬作用的影響。本研究主要在探討針對粒線體的選擇性細胞自噬—”粒線體自噬(mitophagy)”，其典型通路如圖一。

二、實驗原理

本研究探討LPS是否影響自噬，並利用螢光標記、西方點墨、TEM和CLEM等技術，從不同層面觀察並印證推論。

三、實驗流程

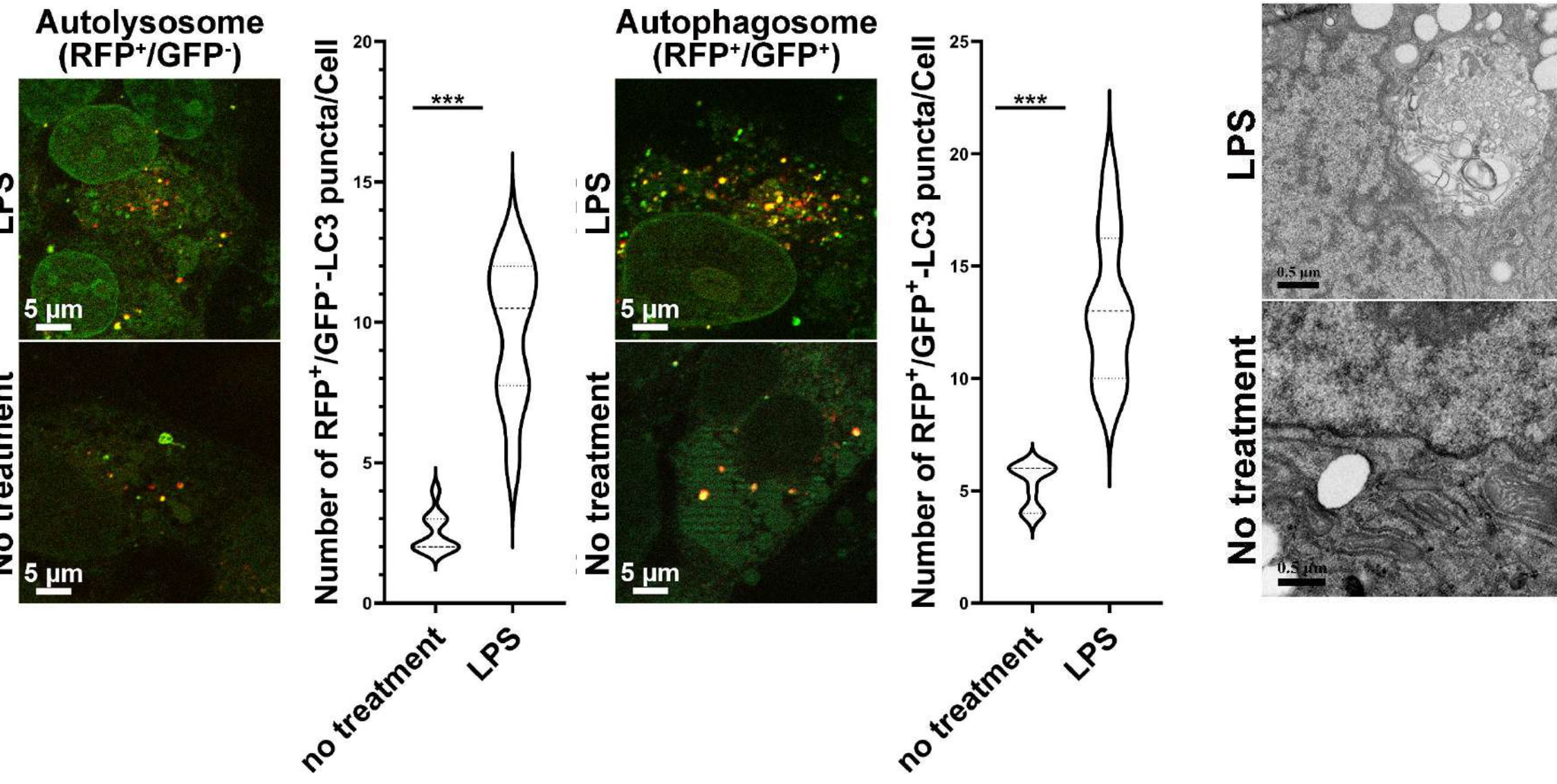


圖一.PINK1/Parkin通路圖解(作者自繪)

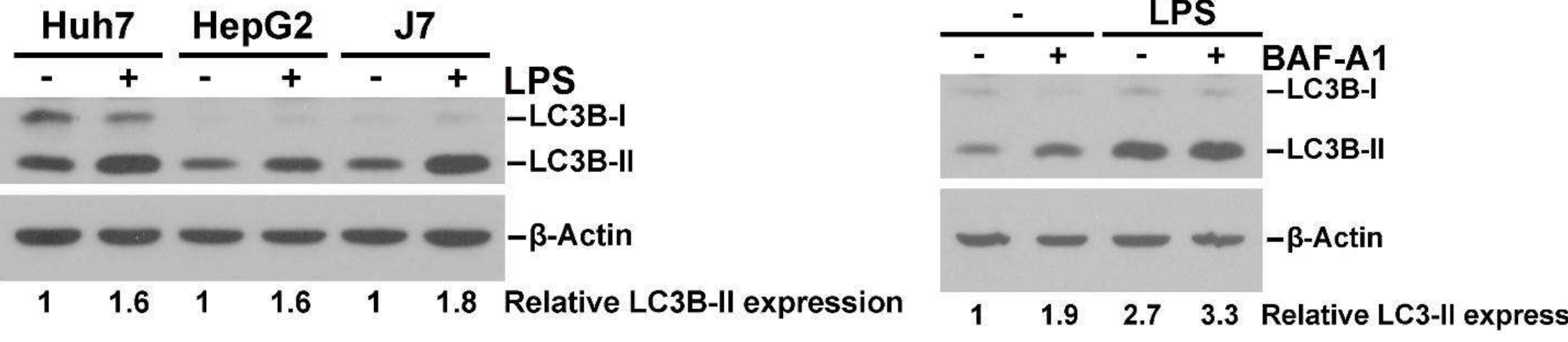
肆、研究結果與討論

一、脂多醣(LPS)促進自噬作用

(一)螢光顯微觀察



(二)TEM



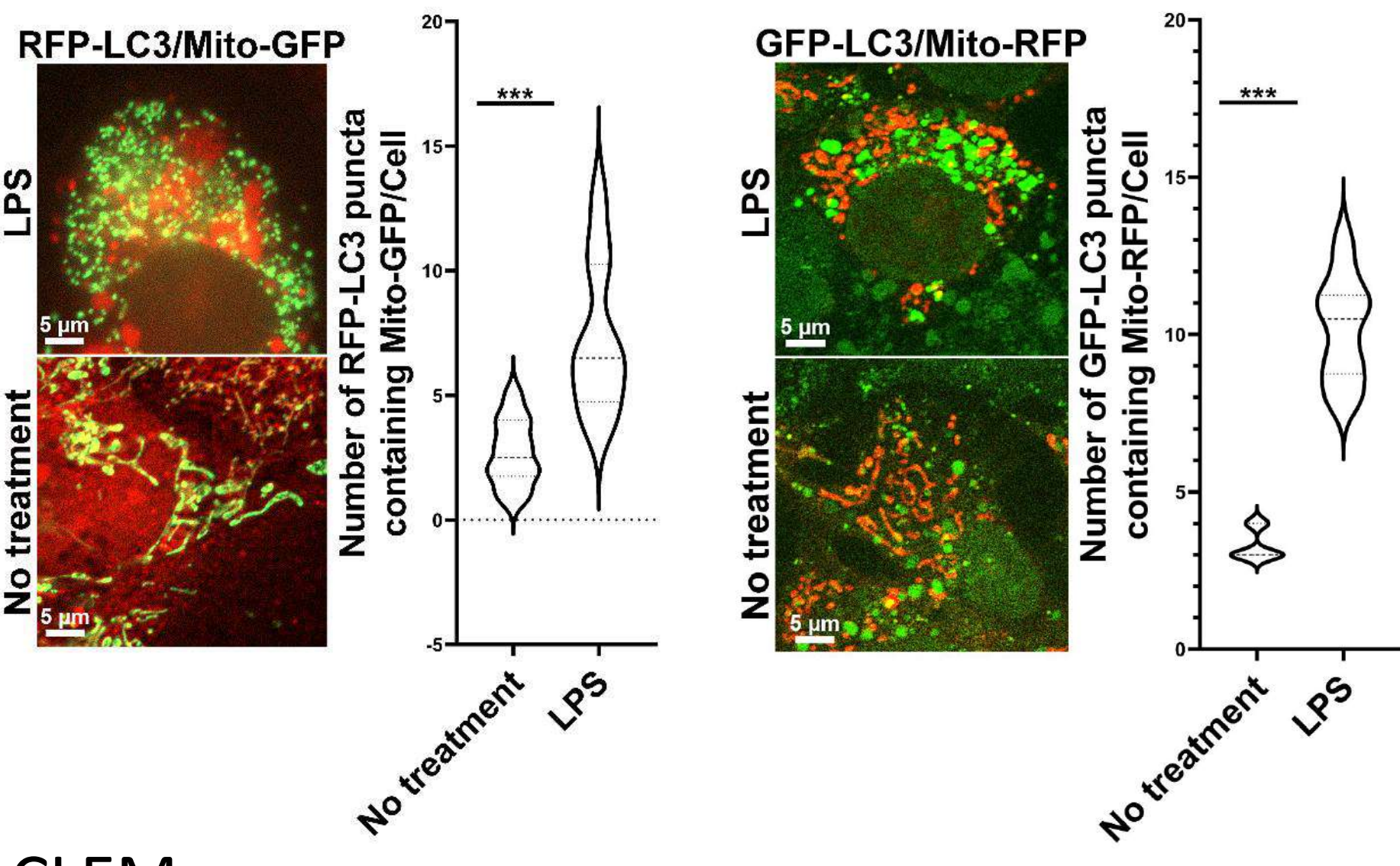
(三)西方點墨法



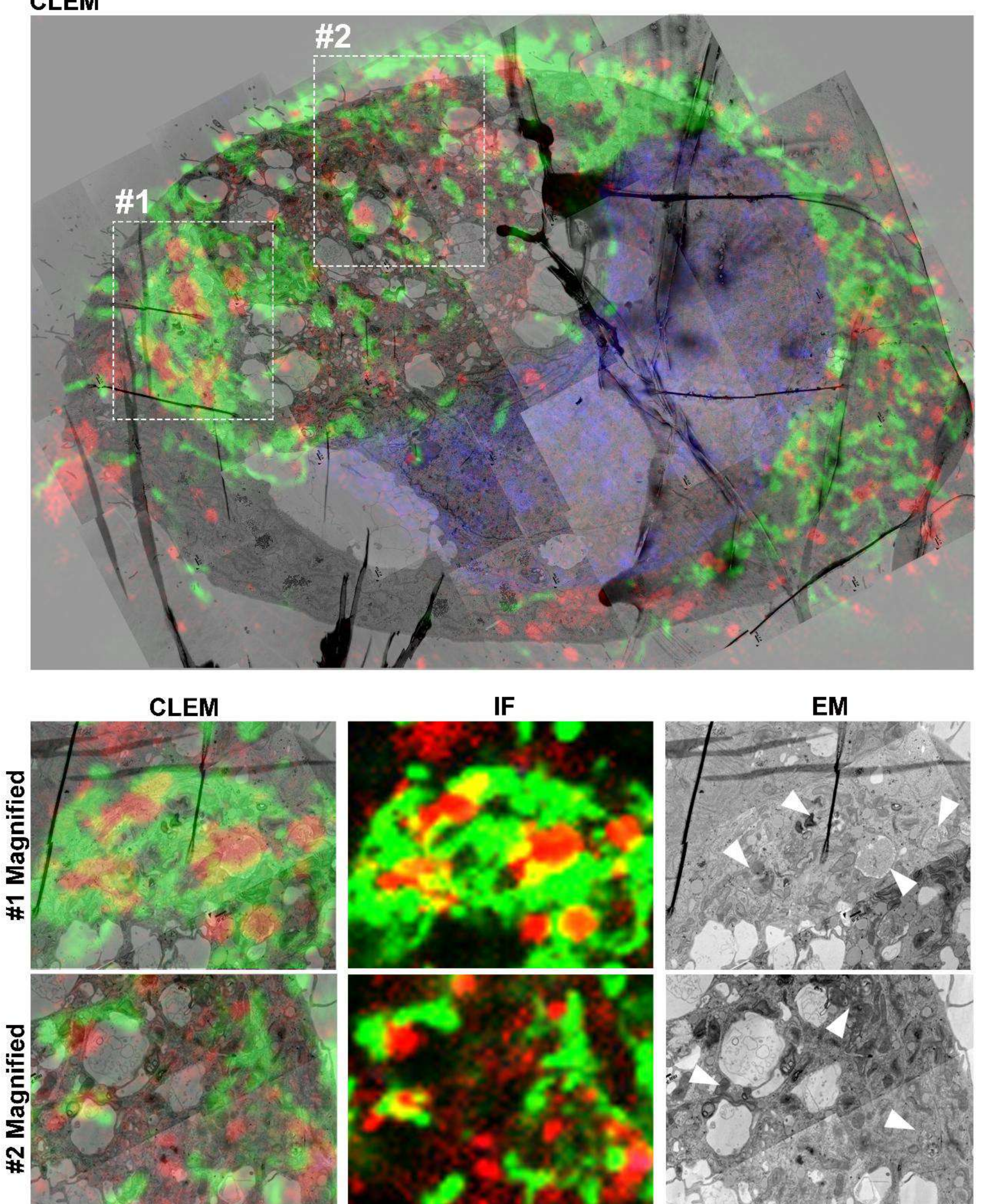
※ (一)由作者自行拍攝。(二)、(三)由實驗室協助拍攝

三、脂多醣(LPS)促進粒線體被吞噬泡包圍

(一)螢光顯微觀察



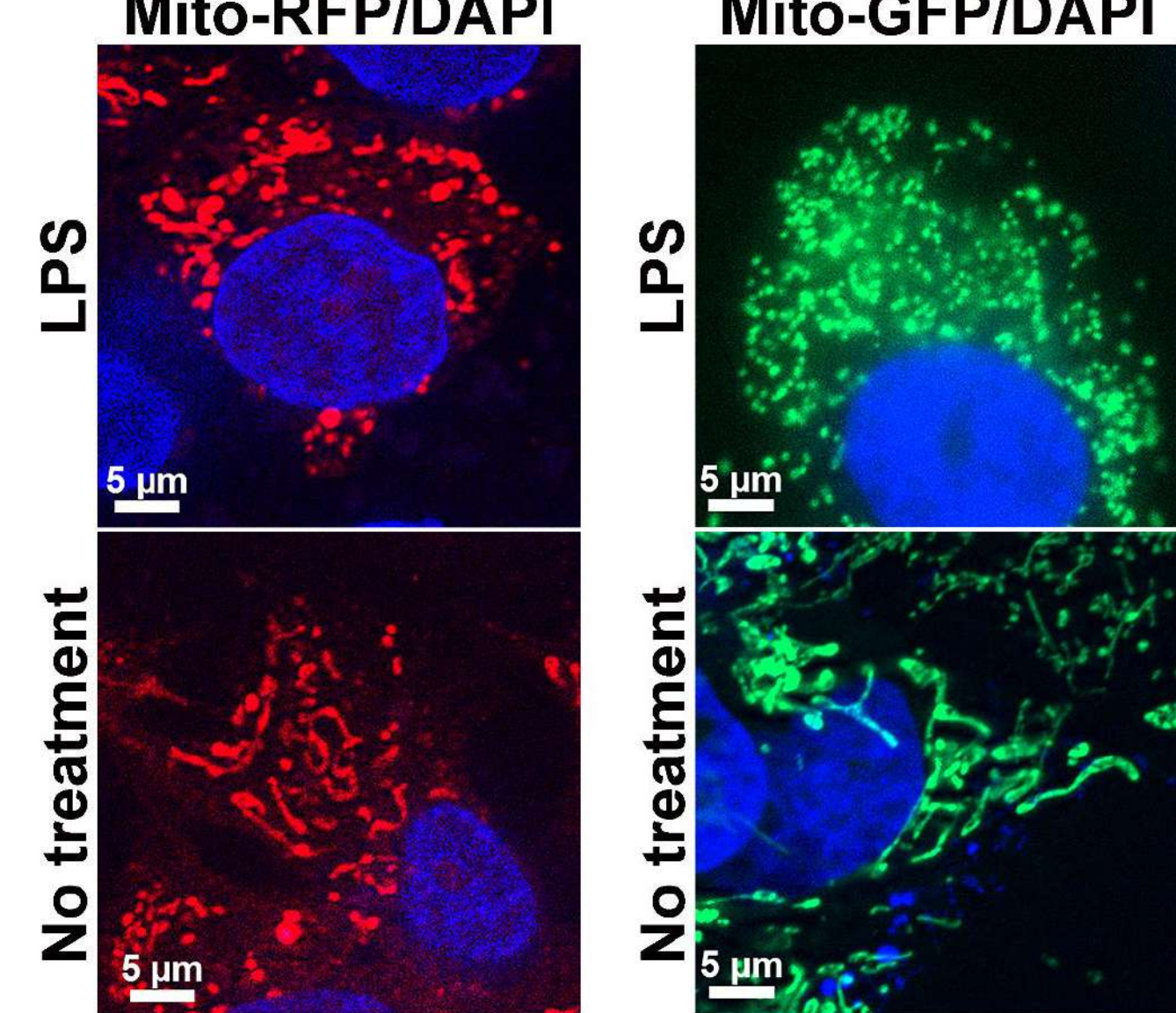
(二) CLEM(LC3以RFP, 粒線體以GFP, 細胞核以Hoechst33342 標記)



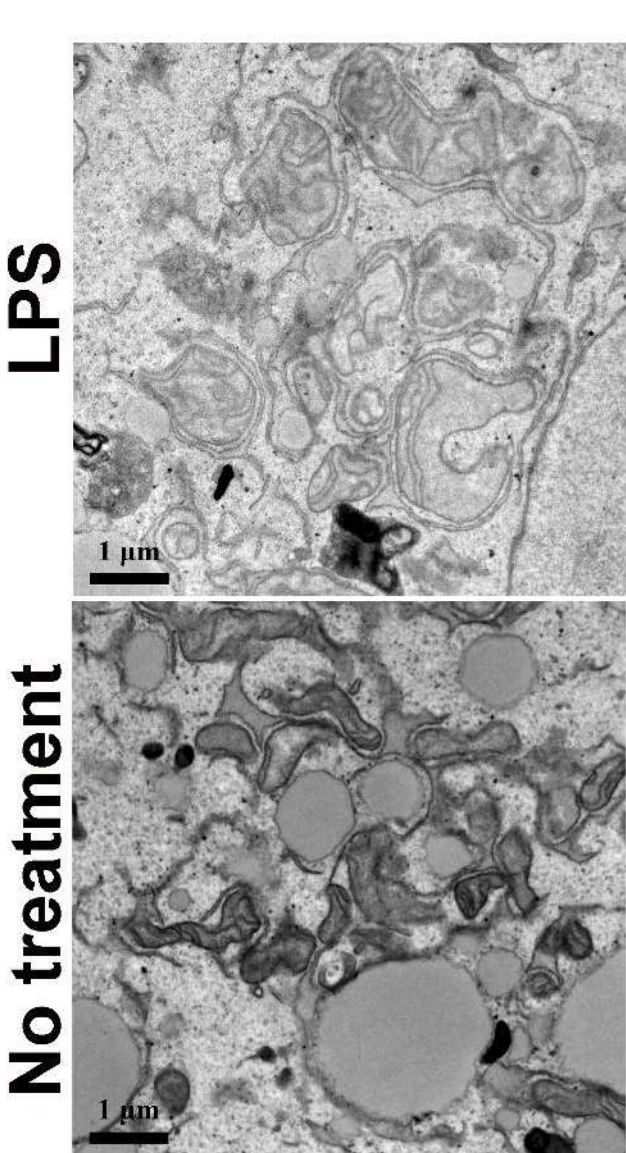
※ (一)由作者自行拍攝。(二)由實驗室協助拍攝

二、脂多醣(LPS)誘導粒線體解體、片段化

(一)螢光顯微觀察



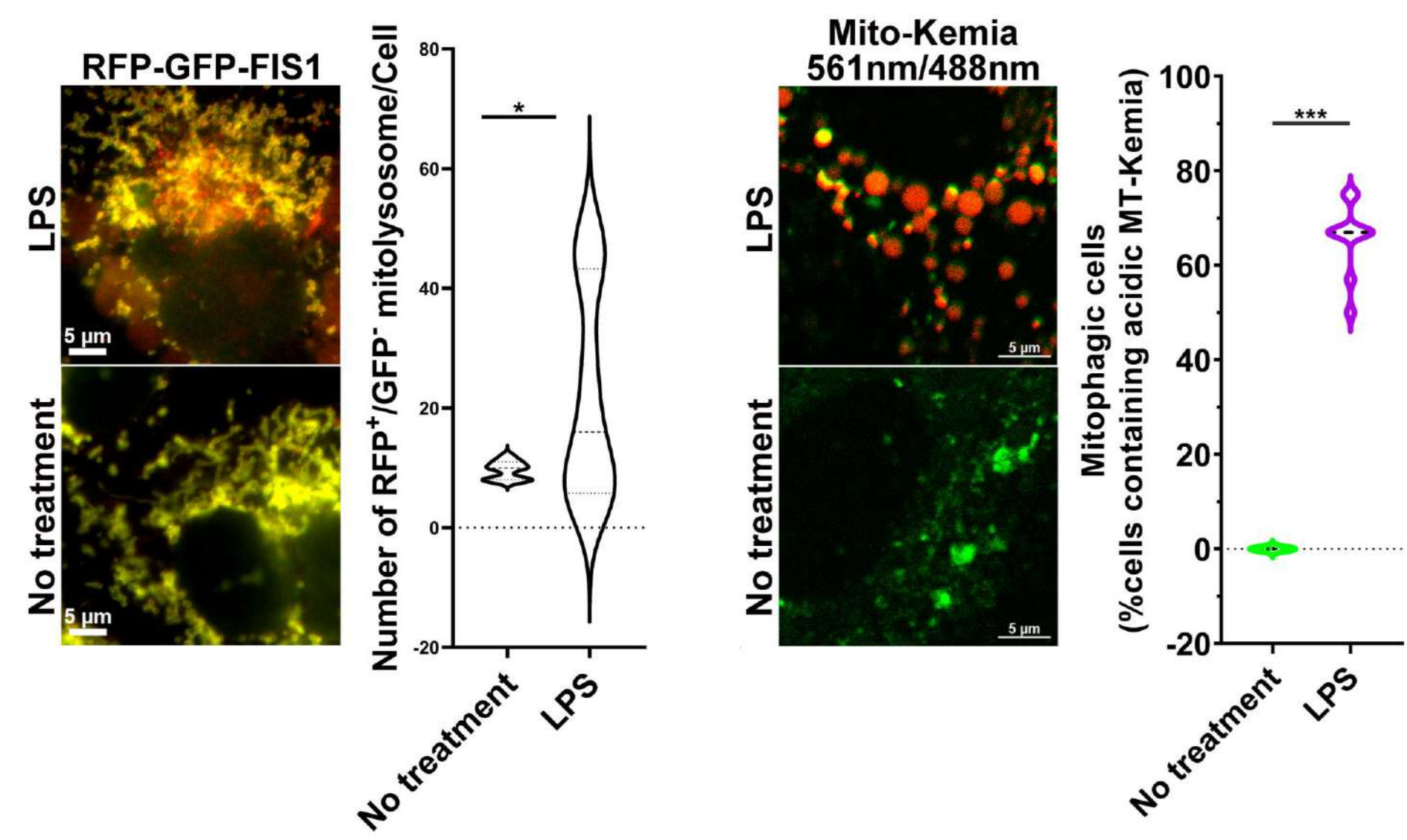
(二)TEM



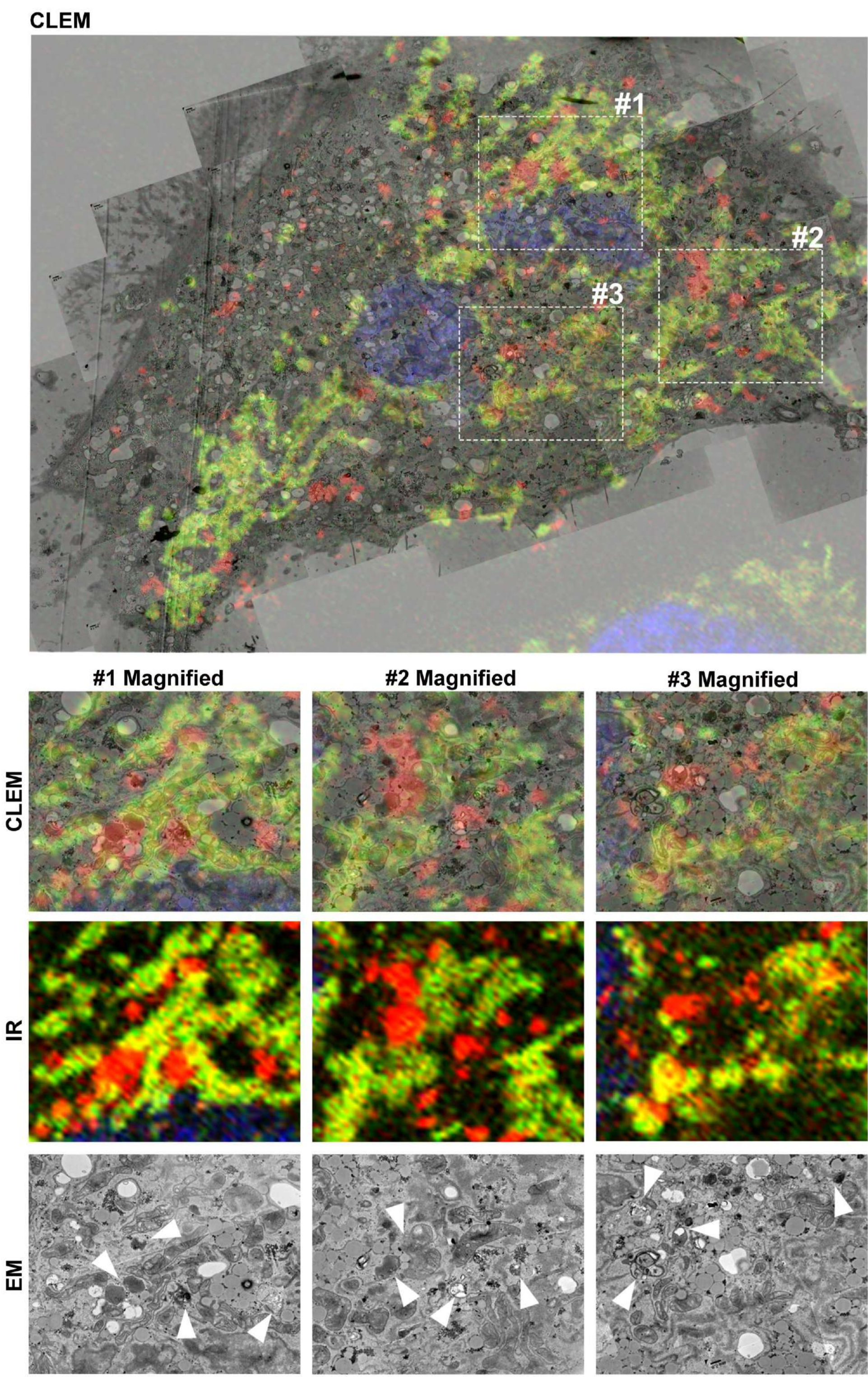
※ (一)由作者自行拍攝。(二)由實驗室協助拍攝

四、脂多醣(LPS)促進粒線體被分解

(一) 螢光顯微觀察



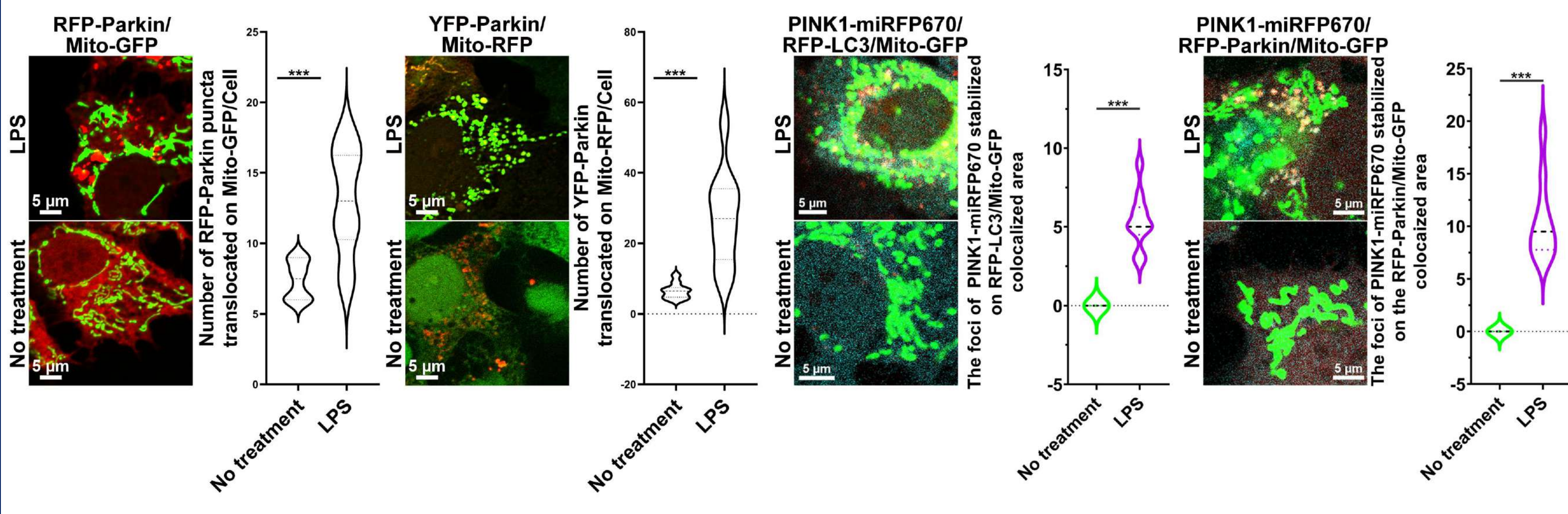
(二) CLEM (FIS1以RFP-GFP標記，細胞核以Hoechst33342標記)



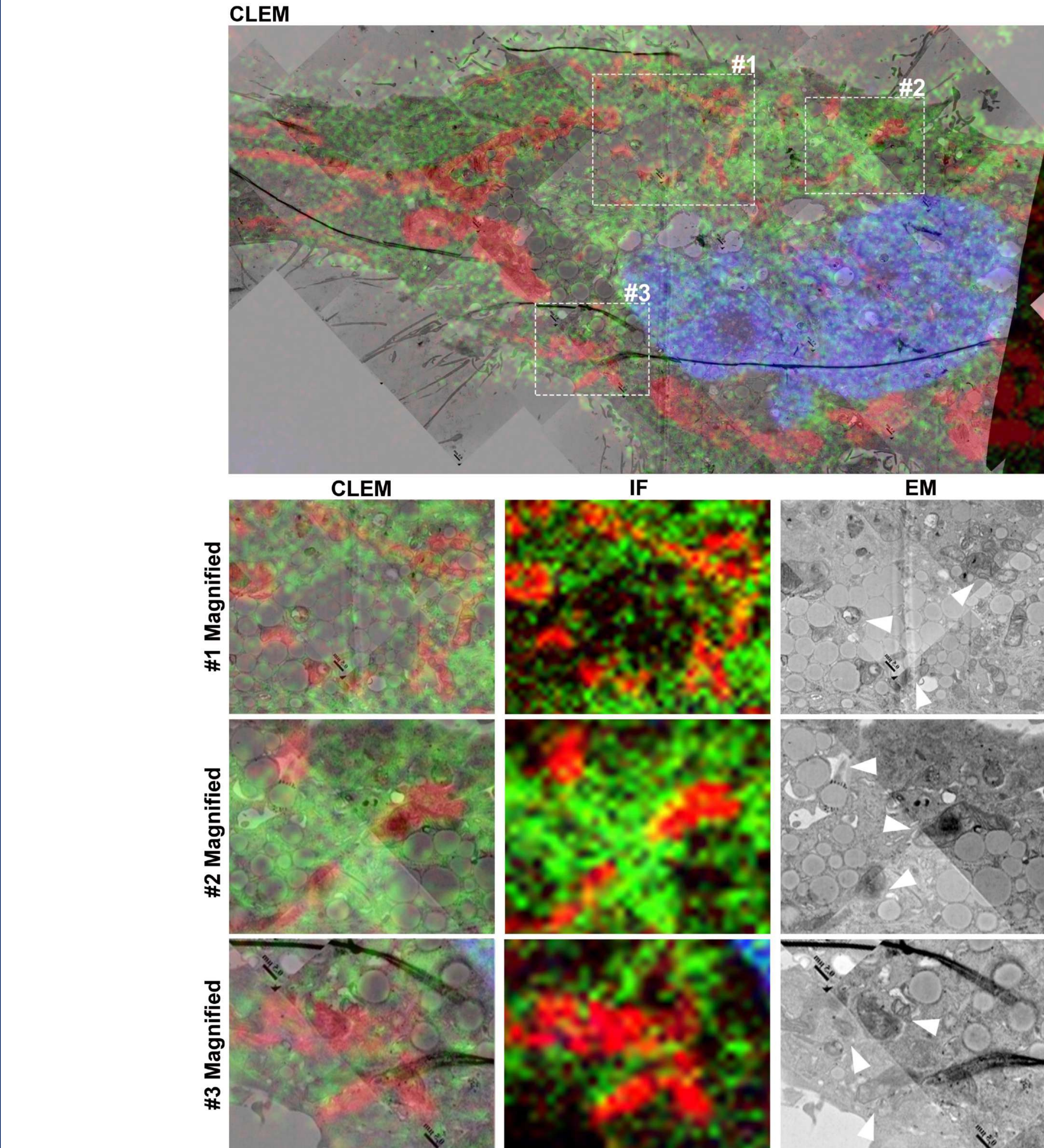
※(一)左圖由作者自行拍攝。(一)右圖、(二)由實驗室協助拍攝

五、脂多醣(LPS)活化PINK1-Parkin通路：促進PINK1、Parkin轉移

(一) 螢光顯微觀察



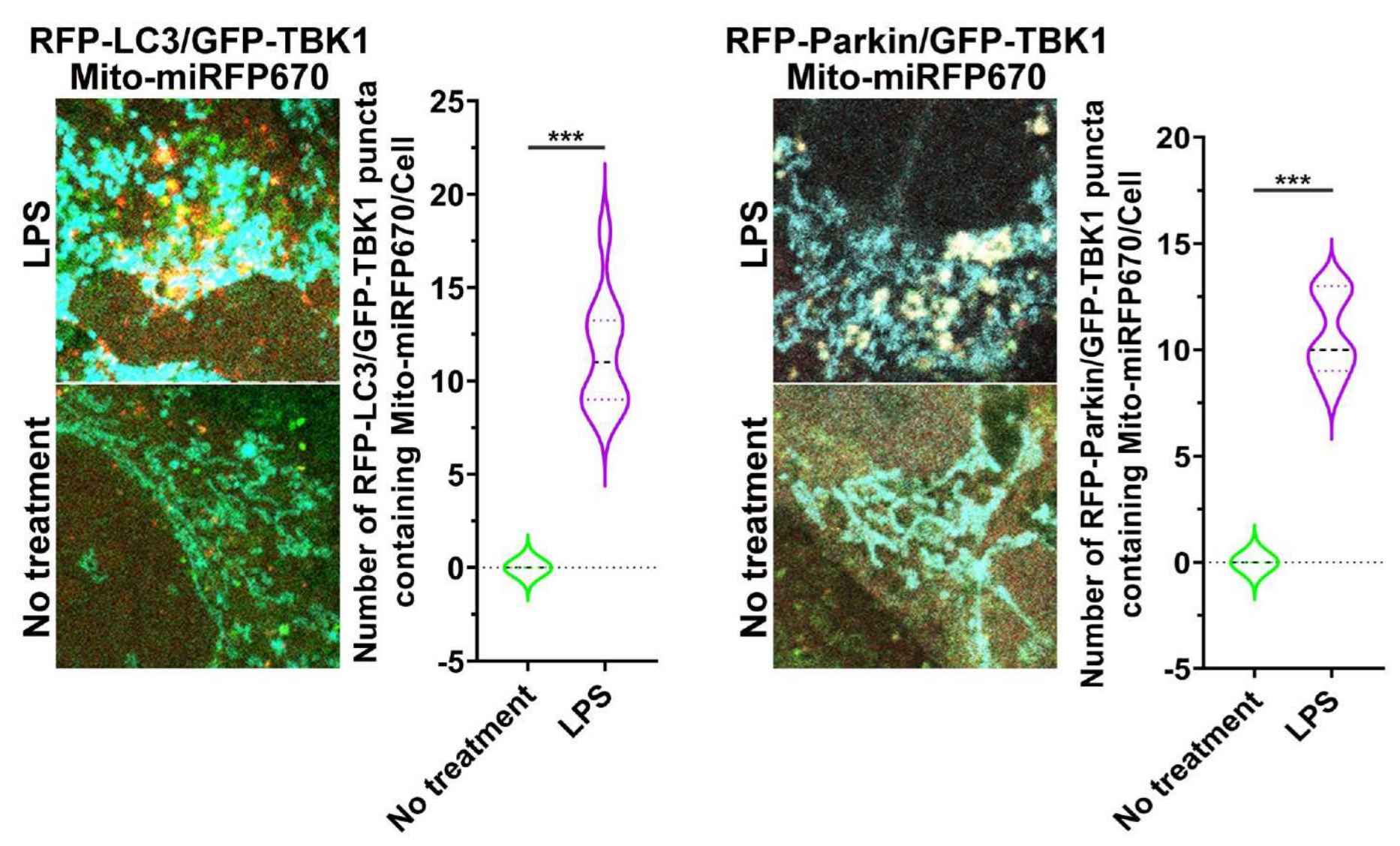
(二) CLEM (Parkin以YFP標記，粒線體以RFP，細胞核以Hoechst33342標記)



※(一)由作者自行拍攝。(二)由實驗室協助拍攝

五、脂多醣(LPS)活化PINK1-Parkin通路：TBK1轉移

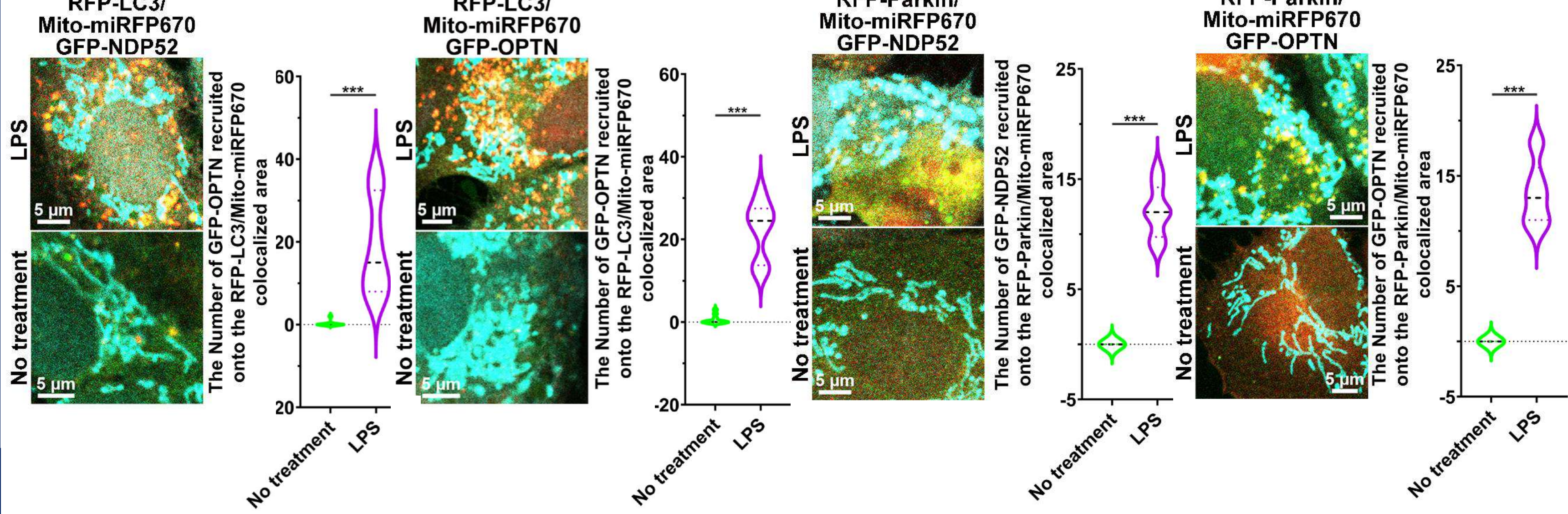
(一) 螢光顯微觀察



※(一)由實驗室協助拍攝

五、脂多醣(LPS)活化PINK1-Parkin通路：促進自噬受體轉移

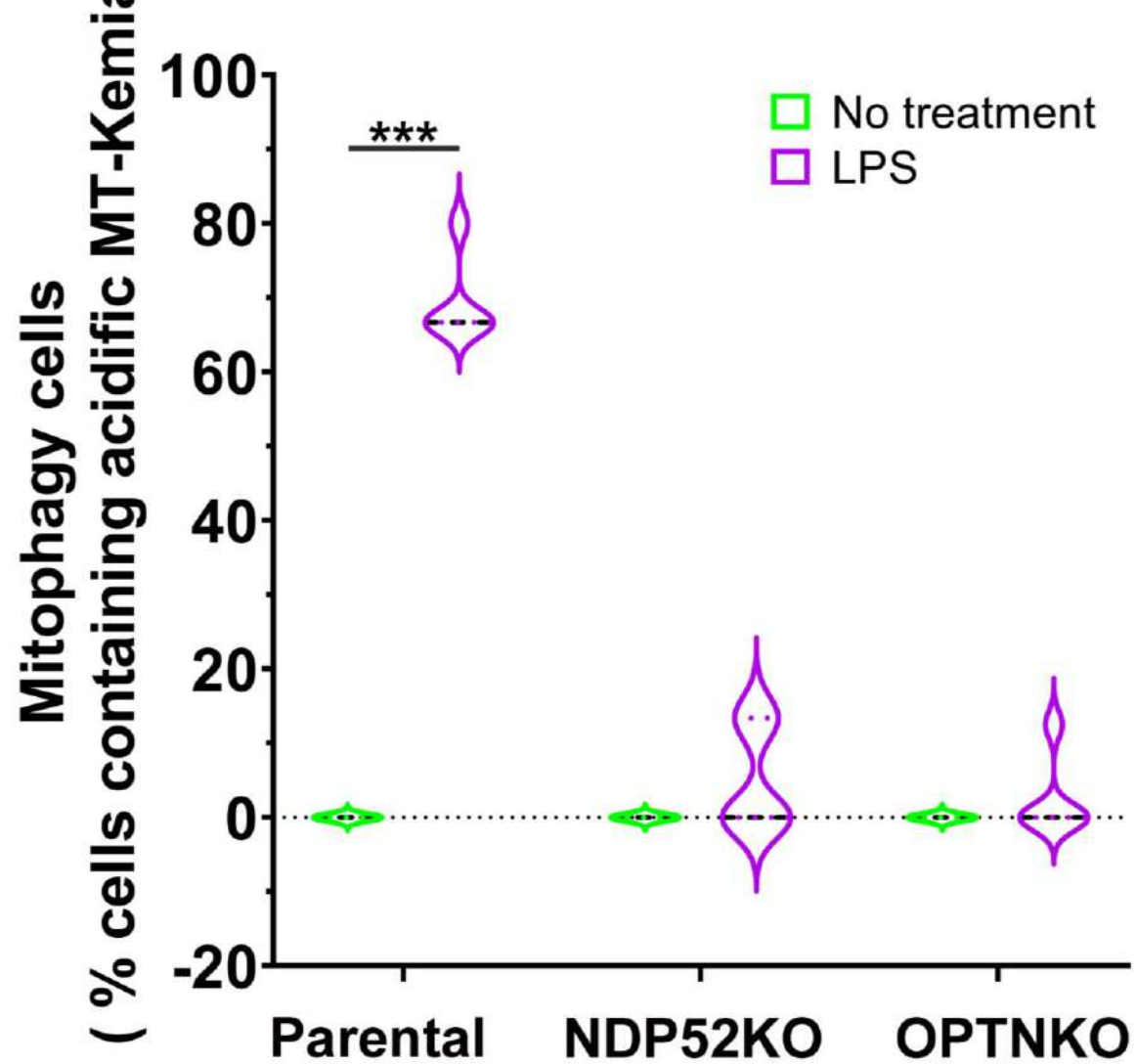
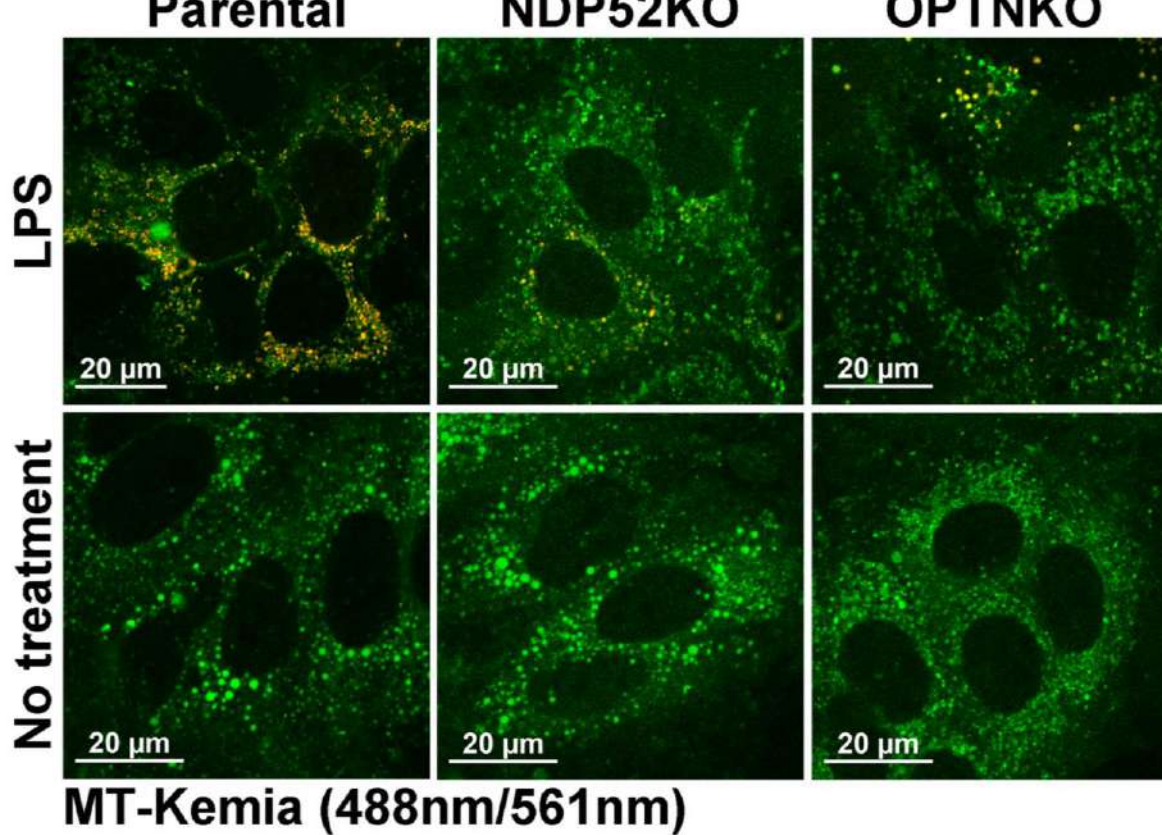
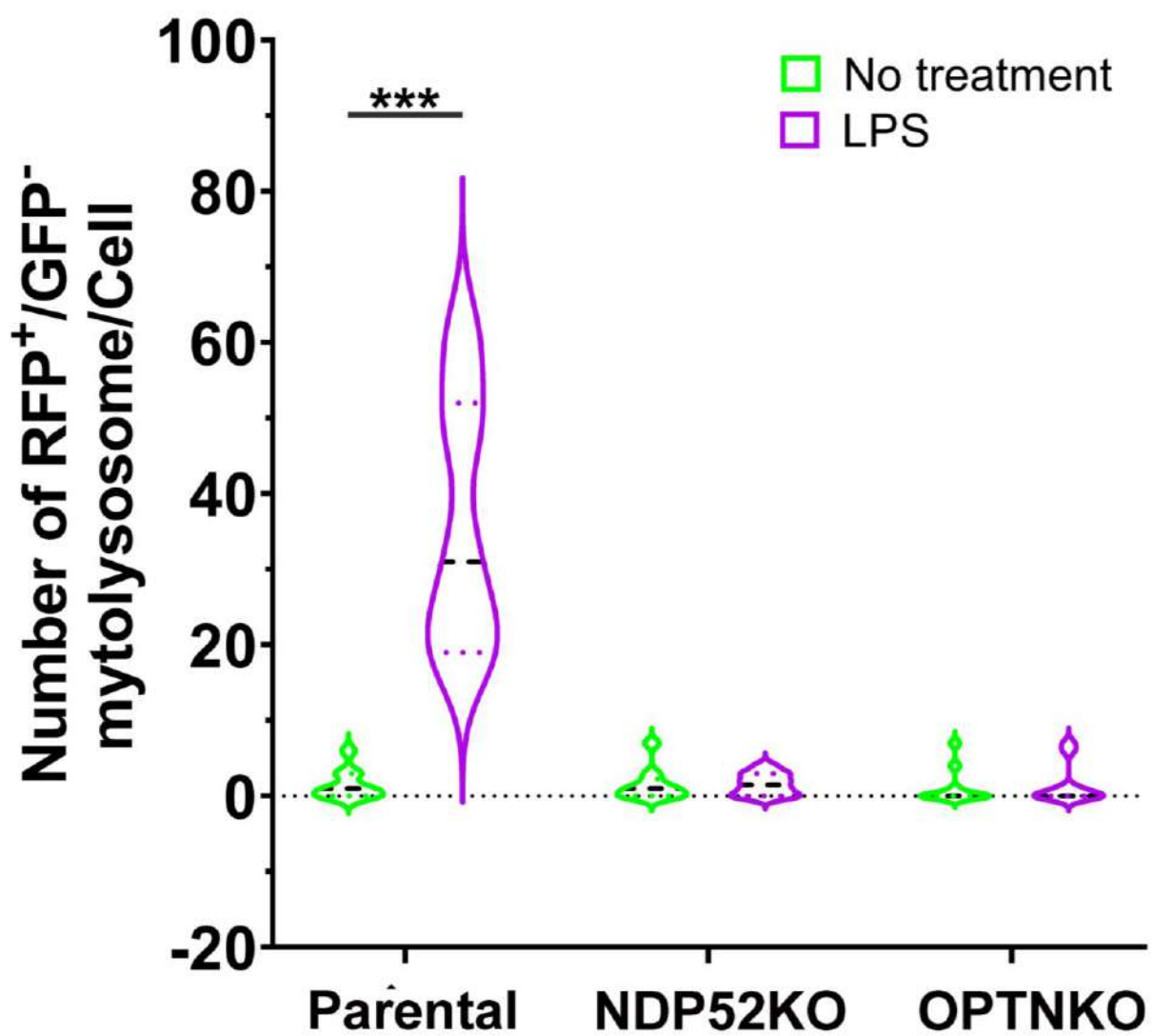
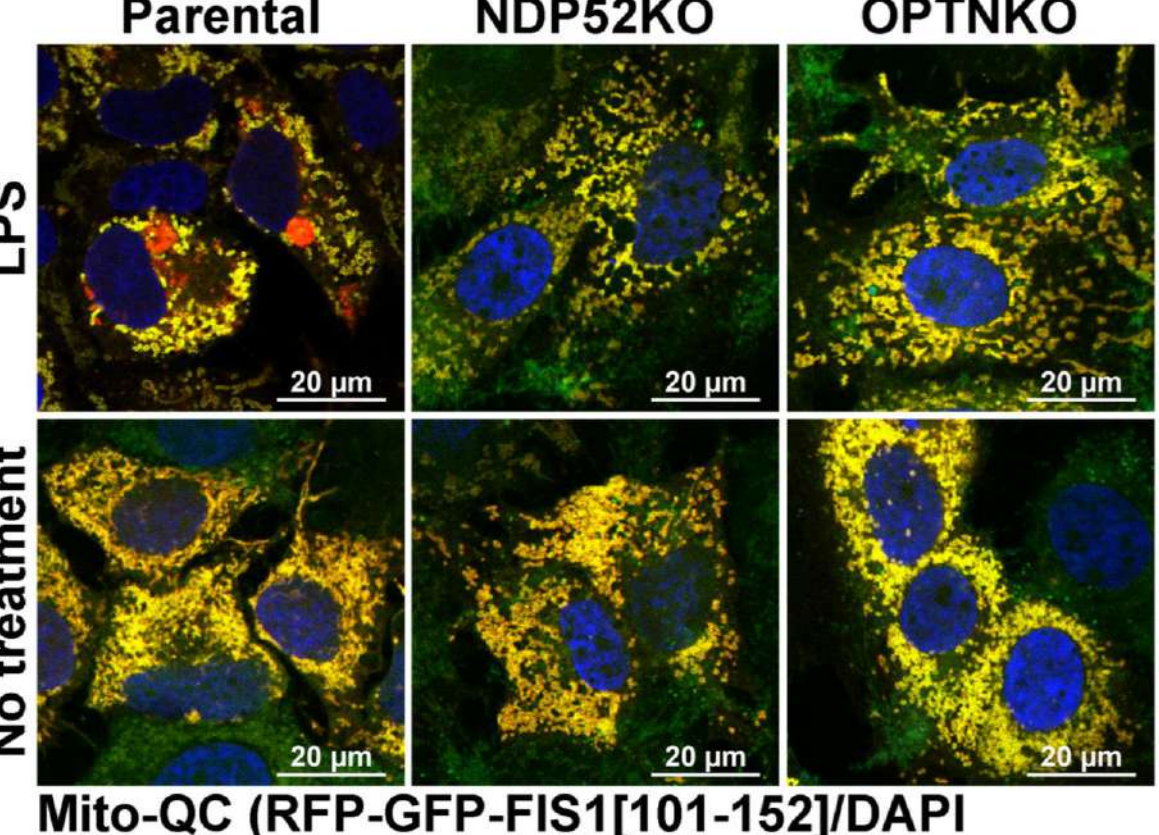
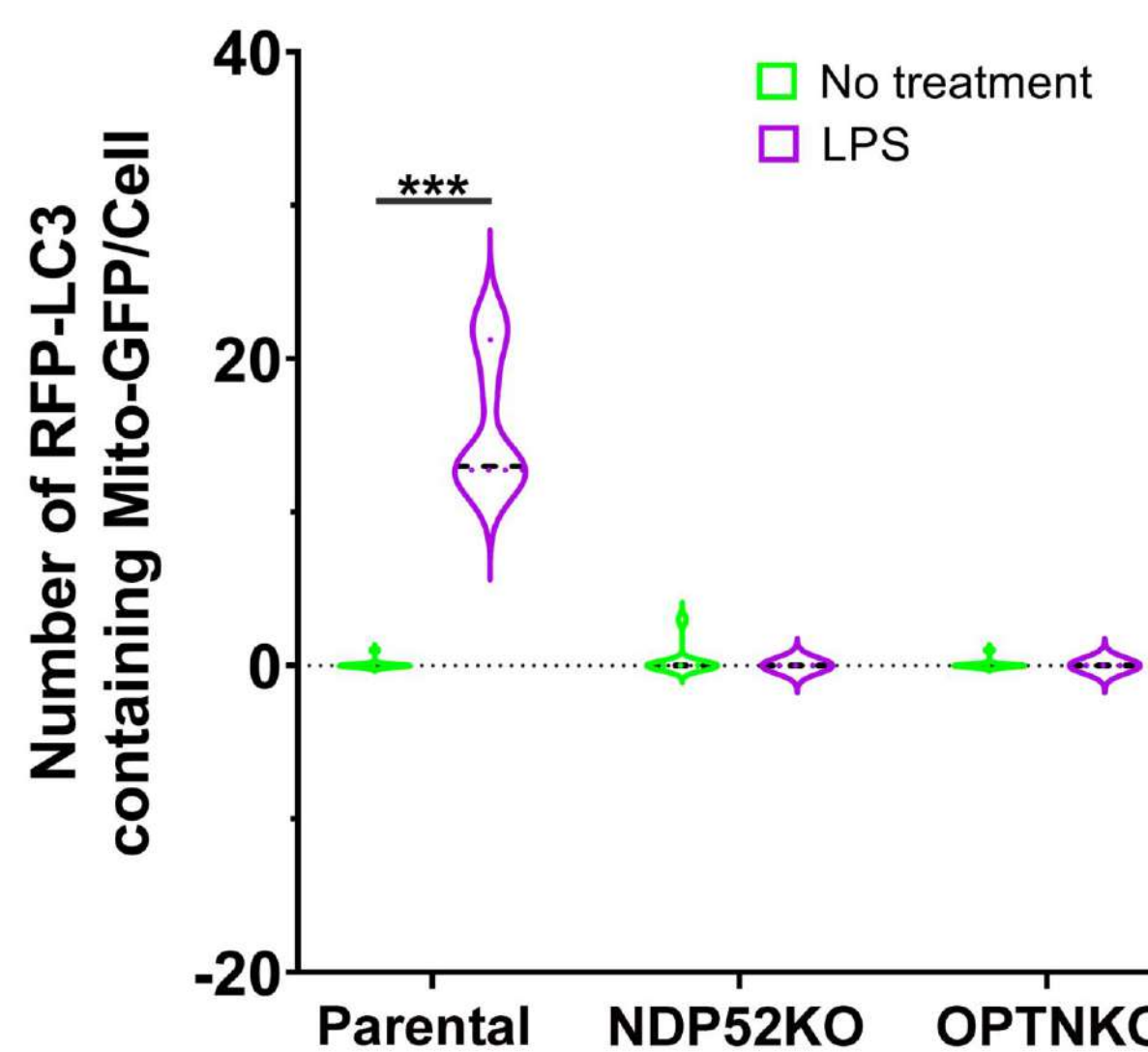
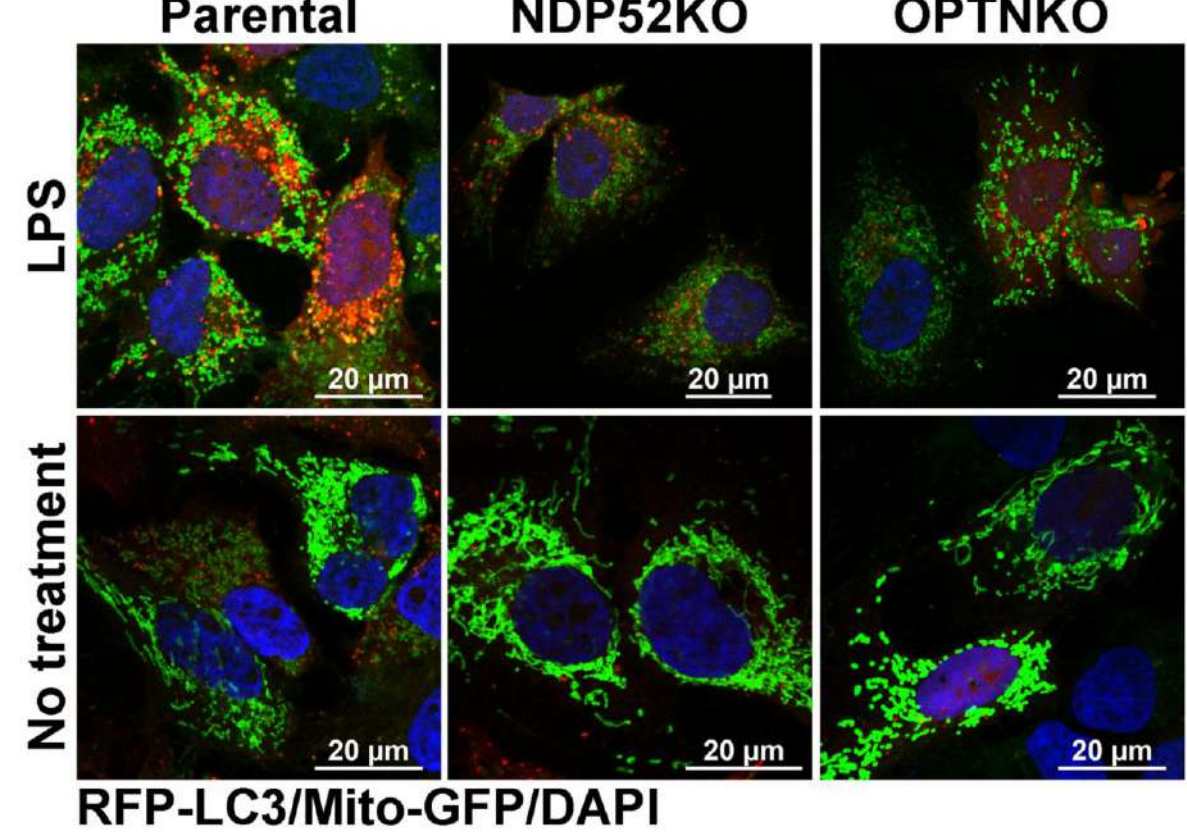
(一) 螢光顯微觀察



※(一)由實驗室協助拍攝

五、脂多醣(LPS)活化PINK1-Parkin通路：促進自噬受體轉移

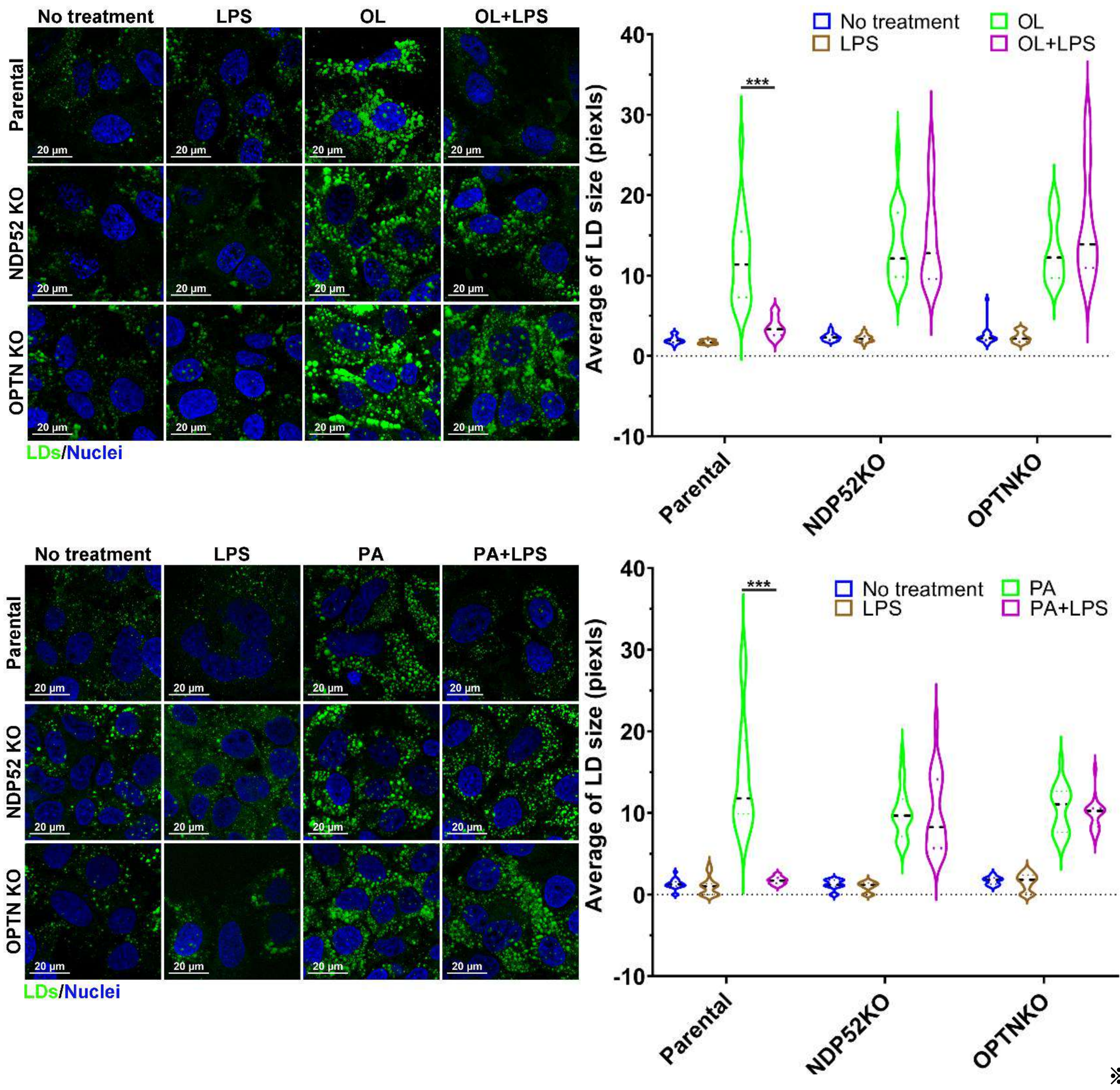
(一) 螢光顯微觀察



※(一)由實驗室協助拍攝

六、脂多醣(LPS)透過自噬受體調控油滴形成

(一)螢光顯微觀察



陸、結論

本研究從多角度探討脂多醣（LPS）對肝臟細胞中粒線體自噬作用的影響。透過螢光顯微鏡、縮時影像攝影、CLEM、TEM與西方點墨等技術，觀察到LPS對肝臟細胞的影響包含：

- 1.促進自噬作用：自噬小體增加、自噬溶酶體增加
- 2.破壞粒線體：粒線體形變、粒線體被分解
- 3.活化PINK1-Parkin通路：PINK1轉移、Parkin轉移、TBK1轉移、自噬受體轉移
- 4.調控油滴形成

粒線體更替(mitochondrial turnover)是透過維持粒線體正常汰換來使細胞代謝能夠平衡的重要機制，而上述LPS對細胞的影響可能會透過干擾粒線體自噬來破壞此機制，最後使肝臟細胞無法正常運作，進而導致肝臟疾病引發。然而以上僅是初步推論，於是未來會設計相關實驗以了解自噬被干擾和肝臟疾病間更確切的關聯。

柒、未來展望

由於目前實驗主要集中在特定細胞株，為了更全面掌握LPS在肝臟不同細胞中的作用機制，未來將進一步拓展研究對象，如HepG2與J7等常見的肝臟相關細胞株，透過螢光顯微鏡觀察其在LPS處理下的變化，以了解此現象是否具普遍性，或是否受到細胞類型特異性調控。

此外，未來也希望能探討粒線體自噬異常是否可能成為肝臟疾病的誘因之一，或可作為早期診斷與治療判斷依據。

最後，本研究亦初步觀察到LPS可能透過自噬受體參與脂滴的形成，因此未來將針對LPS調控油滴形成的分子路徑與時間動態進行研究，並評估此現象是否與能量代謝或細胞壓力反應相關。

綜上所述，我們期望藉由擴大研究層面與深度，補足目前的研究限制，並為未來開發針對粒線體自噬失調之肝臟疾病的治療藥物，提供更具體的理論與實驗依據

捌、參考文獻

- 1.Metformin對肝臟細胞選擇性粒線體自噬作用之活化機制探討- 2024年臺灣國際科學展覽會優勝作品專輯
- 2.Gabriele Zaffagnini, Sascha Martens Mechanisms of Selective Autophagy *PMID: 26876603*
- 3.Isei Tanida, Takashi Ueno, Eiki Kominami LC3 and Autophagy *PMID: 18425443*
- 4.Ruey-Hwa Chen, Yu-Hsuan Chen, Tzu-Yu Huang Ubiquitin-mediated regulation of autophagy *PMID:31630678*
- 5.Byeong-Won Kim, Do hoon Kwon, Hyun Kyu Song Structure biology of selective autophagy receptors *PMID:26698872*
- 6.Benjamin Richter, Danielle A. Sletter, Lina Herhaus, Ivan Dikic Phosphorylation of OPTN by TBK1 enhances its binding to Ub chains and promotes selective autophagy of damaged mitochondria *PNAS, 2016Mitophagy PMID: 26365381.*
- 7.Jin-Mi Heo, Alban Ordureau, Joao A. Paulo The PINK1-Parkin Mitochondrial Ubiquitylation Pathway Drives a Program of OPTN/NDP52 Recruitment and TBK1 Activation to Promote Mitophagy *PMID: 26365381.*