

# 2015 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

- 作品編號** 080003
- 參展科別** 生物化學
- 作品名稱** CYP11A1 導致非類固醇生成細胞的粒線體形變 CYP11A1 Changes Mitochondrial Morphology in Nonsteroidogenic Cells
- 得獎獎項** 大會獎：一等獎  
美國 ISEF 正選代表：美國第 66 屆國際科技展覽會  
英特爾傑出青年女性科學家獎
- 就讀學校** 臺北市立第一女子高級中學
- 指導教師** 鍾邦柱、許一懿
- 作者姓名** 李瓊芸
- 關鍵字** CYP11A1、粒線體形變

## 作者簡介



我是李瓊芸，就讀北一女中數理資優班高三，從高一寒假開始在中研院分生所做專題研究。在這一年半的研究過程中，我學習到各種分生實驗技術，也培養了科學家的邏輯思維與研究精神。泡實驗室的生活雖然有時很辛苦，但更多時候是有趣的，當終於有成果時，那種成就感也令人興奮。一路走來，真的很感謝鍾老師、簡瑜學姐和一懿老師的支持與幫助！

## 摘要

一般認為粒線體形變與神經細胞的細胞凋亡有關，但其實粒線體形變也發生在類固醇生成細胞，如卵巢與腎上腺皮質的分化過程中，且伴隨著類固醇製造酵素 CYP11A1 的大量表現。

因此，我們提出以下的假說：第一，CYP11A1 會使粒線體發生形變；第二，粒線體形變參與類固醇賀爾蒙的製造；第三，粒線體形變能導致細胞某種程度上的分化：由不適合製造類固醇轉變為適合，並降低其代謝率。

我們觀察 CYP11A1 內生與否的細胞株的粒線體外形及其內褶膜，發現內生 CYP11A1 的細胞具有球形粒線體與拱狀內褶膜。接著我以 CYP11A1 表現質體轉染 COS-1 細胞，觀察其粒線體並測量其 ATP 產率，證實了外送 CYP11A1 能使粒線體發生形變，同時改變細胞的代謝率。這個發現對粒線體形變的研究具有突破性的影響。

## **Abstract**

It has been known that the change of mitochondrial morphology is related to apoptosis in some cells such as neuron. However, previous research shows that mitochondrial shapes are changed and that cristal structures are remodeled during the differentiation of steroidogenic cells in ovary and adrenal cortex, accompanied by abundant expression of steroidogenic enzyme, CYP11A1.

Therefore, we propose the following hypotheses: 1. CYP11A1 changes mitochondrial morphology (in both steroidogenic and nonsteroidogenic cells). 2. The changes of mitochondrial morphology play a part in the production of steroid hormone. 3. The changes of mitochondrial morphology can, to some extent, lead to cell differentiation. Nonsteroidogenic cells become competent to produce steroid and have lower metabolic rate when being transfected with exogenous CYP11A1.

We found that Y1 cells with endogenous CYP11A1 contain spherical mitochondria with arched cristae, while cells without endogenous CYP11A1 such as NIH-3T3 and COS-1 have elongated mitochondria with lamellar cristae. By transfecting COS-1 cells with CYP11A1-expressing plasmids, observing mitochondrial morphology, and measuring ATP production rate, I confirmed that CYP11A1 changes mitochondrial morphology in nonsteroidogenic cells and regulates the ATP synthesis. This discovery is an important breakthrough and may have a profound influence on the research of mitochondrial morphology.

# CYP11A1 導致非類固醇生成細胞的粒線體形變

## 壹、前言

### 一、粒線體形變

粒線體(mitochondria)是細胞的能量工廠，負責製造 ATP。粒線體是動態的胞器，藉由不斷地融合 (fusion; 由 MFN1、MFN2、OPA1 等調控) 和分裂 (fission; 由 FIS1、DRP1 等調控) 控制其形狀、大小和數量，其他相關調控因子如圖 1。在一般狀態下，融合和分裂的速度會保持平衡，使粒線體維持長條形(elongated; 圖 2)。但在某些細胞中，粒線體形狀可能發生轉變——分裂的速度若比融合快，則粒線體的長度會縮短而呈現球形(spherical; 圖 3.4)。

本研究中，定義粒線體長寬比大於 3:1 者為長條形、小於 2:1 者為球形，而介於兩者之間為橢圓形(oval)。

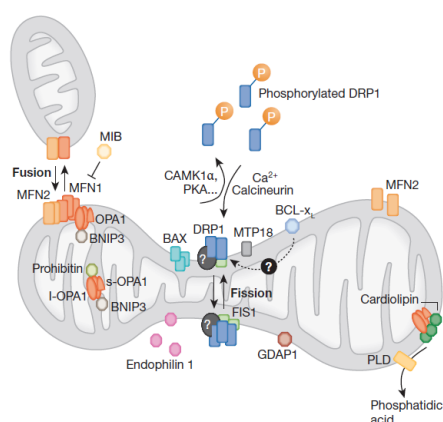


圖 1 粒線體融合及分裂的調控因子

(取自 EMBO Rep. 2010 Sep;11(9):678-84.)

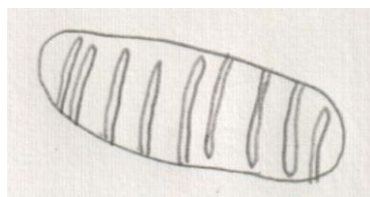


圖 2 長條形粒線體與板層狀內褶膜

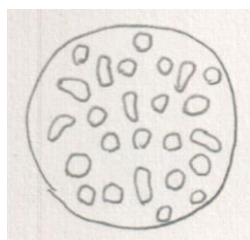


圖 3 球形粒線體與管囊狀內褶膜

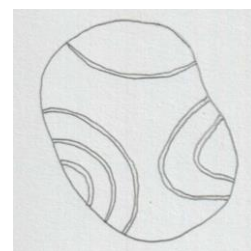


圖 4 拱形內褶膜

內褶膜(mitochondrial cristae)是粒線體內膜向基質內褶形成的一種結構。在不同種類的細胞中，內褶膜的數目、形態和排列方式可能有較大差別，其中主要有兩種形態，分別稱為「板層狀」(lamellar；圖 2 及圖 5 左)與「管囊狀」(tubular-vesicular；圖 3 及圖 5 右)。另外本研究中亦有觀察到「拱形」(arched；圖 4)內褶膜。

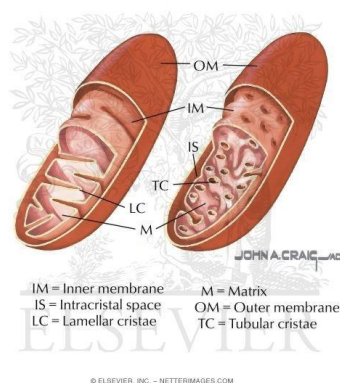


圖 5 粒線體內褶膜的立體結構

(取自網路：<http://www.netterimages.com/image/12983.htm>)

關於粒線體形變在生理、病理上意義的研究至今發展約莫十年。已有許多研究發現，粒線體的功能不再只局限於產生 ATP、提供能量等細胞代謝的範疇；此胞器的形狀、大小與數量的改變對於細胞凋亡、自噬等現象亦有調控作用。亦有論文指出，代謝極為活躍的神經元高度依賴粒線體的融合、裂變與傳輸，其粒線體的形變現象與神經退化性疾病有關，例如帕金森氏症與阿茲海默症皆攸關於粒線體的形變，若能適當調節其粒線體的融合與分裂作用便可以改善其症狀。但粒線體形變對於細胞發育分化及類固醇荷爾蒙的關係的研究甚少，因此我們將深入探討其重要性。

## 二、CYP11A1

CYP11A1(P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme)是一種位於粒線體內膜的酵素，負責催化膽固醇(cholesterol)轉換為孕烯醇酮(pregnenolone)，是類固醇荷爾蒙生成代謝過程的第一步（詳見第三點「類固醇荷爾蒙」）。CYP11A1 主要表現在腎上腺皮質層與卵巢中的黃體及卵巢膜細胞還有睪丸的萊氏細胞。

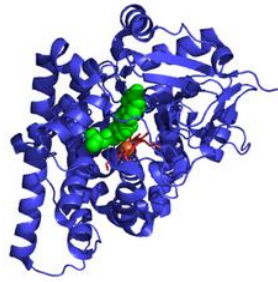


圖 6 與膽固醇結合的人類 CYP11A1

(取自維基百科：[http://en.wikipedia.org/wiki/P450\\_scc](http://en.wikipedia.org/wiki/P450_scc))

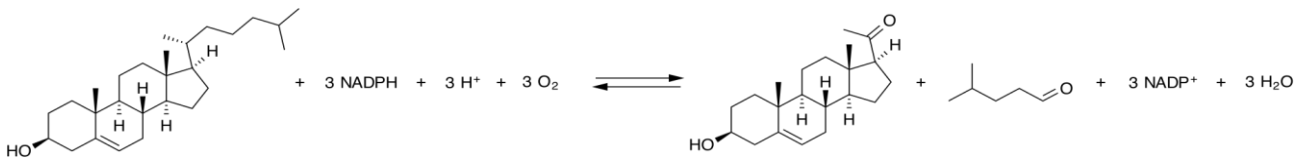


圖 7 CYP11A1 催化的反應

(取自維基百科：[http://en.wikipedia.org/wiki/P450\\_scc](http://en.wikipedia.org/wiki/P450_scc))

CYP11A1 作用時需要來自電子傳遞鏈的電子(圖 7),由鐵氧還蛋白(adrenodoxin)與鐵氧還蛋白還原酶(adrenodoxin reductase)從 NADPH 傳遞給 CYP11A1,因此細胞必須同時具有這三種蛋白質的表現,CYP11A1 才具有作用活性。我們從 Dr. Walter L. Miller 的實驗室取得 F2 及 VE 質體:F2 質體帶有 CYP11A1、鐵氧還蛋白與鐵氧還蛋白還原酶,並以實驗證實具有最大活性的排列順序排列(圖 8)。VE 質體則是將 F2 質體上的 CYP11A1 突變掉巰胺酸成為穀胺酸而來,其 CYP11A1 不具有活性,可作為 F2 的對照組。

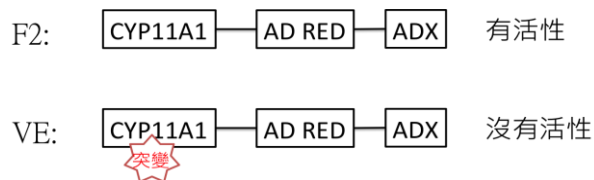


圖 8 F2 及 VE 質體(資料來源:參考文獻(六))



### 三、類固醇荷爾蒙

類固醇荷爾蒙是人體生理所需的微量激素，可分為雄激素(androgens)、雌激素(estrogens)、孕激素(progestogens)、皮質類固醇(corticosteroids)等四類，由膽固醇(cholesterol)經不同酵素、不同途徑製造而來(圖 9)，由內分泌器官如腎上腺(adrenal gland)及性腺(gonads)分泌，再經由血液傳送全身，調節體內的糖分、鹽分、水分、礦物質等重要元素及許多生理反應。其分泌量受下視丘、腦下垂體控制，過多或過少都將引起生物體的病症。

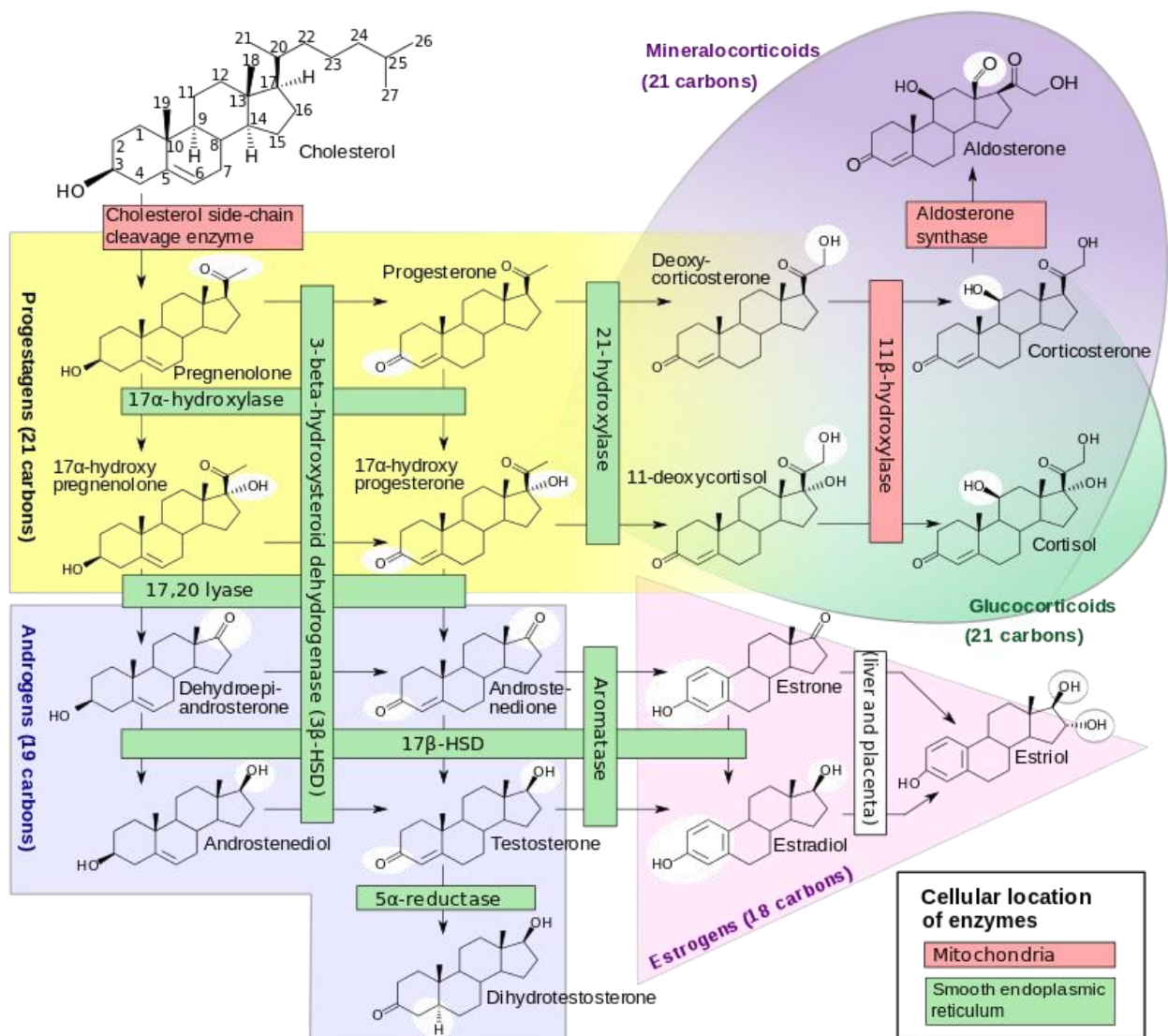


圖 9 人類類固醇賀爾蒙製造途徑

(取自維基百科：<http://en.wikipedia.org/wiki/Steroid>)



## 貳、 研究動機

目前關於粒線體形變的研究大多是以神經、心臟和肌肉細胞為材料，發現粒線體形變常意味著細胞即將凋亡，因而衍生相關疾病。之前本實驗室發現（參考文獻(二)）在小鼠懷孕期間卵巢黃體的成熟過程中伴隨著粒線體形變（由濾泡顆粒細胞的長條形、板層狀內褶膜(圖 10 右上)，變為黃體細胞的球形、管囊狀內褶膜(圖 10 左上))，而且在分化過程中，參與黃體製造助孕酮過程的一個酵素「CYP11A1」表現量也會增加(圖 11)，而且它不正常的表現量也會對粒線體形變產生影響：在 CYP11A1 過量表現的基因轉殖小鼠，濾泡細胞分化為黃體細胞時，粒線體形變不完全，呈現長條形的外形與管囊狀內褶膜(圖 10 左下)，CYP11A1 下游產物助孕酮的產量也減少。

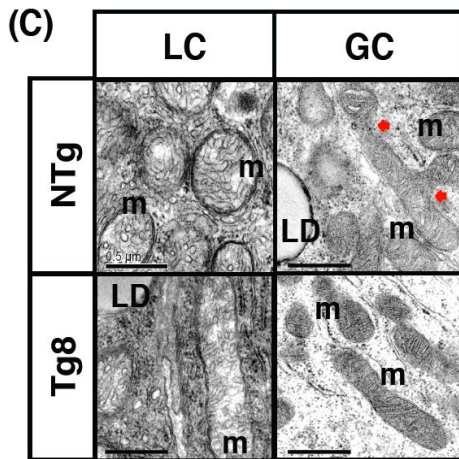


圖 10 小鼠懷孕期間黃體(LC)與顆粒細胞(GC)的粒線體

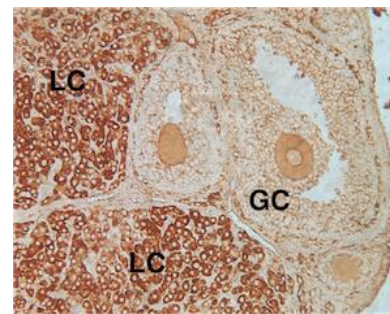


圖 11 小鼠卵巢 IHC 染色圖。圖中顏色越深處表現越大量的 CYP11A1。

(取自 *Biology of reproduction*, 89(4), 91. 2013)

這引發了我們好奇，粒線體的形變是不是由 CYP11A1 調控的？如果讓非類固醇生成細胞表現 CYP11A1，粒線體會不會因此形變？粒線體形變會不會影響細胞的代謝？

## 參、 研究目的

- 一、 觀察：比較具備 CYP11A1 表現與否的細胞株的粒線體形態。
- 二、 提出假設：CYP11A1 是否會使粒線體發生形變。
- 三、 設計實驗：轉染 CYP11A1 表現質體至細胞中並觀察是否會使粒線體發生形變。
- 四、 了解粒線體形變與細胞代謝的關係：測量轉染前後細胞的 ATP 產率。

## 肆、 研究設備與器材

### 一、 基本器材：

微量滴管、吸量分注器、Tip、實驗手套、實驗衣、50 c. c. 離心管、15 c. c. 離心管、1.5 c. c. 微量離心管、試管架、桌上型離心機、去離子蒸餾水(ddH<sub>2</sub>O)、酒精、PBS 緩衝溶液、電子天平、恆溫水浴槽

### 二、 細胞培養：

10-cm 培養皿、玻璃滴管、10c. c. 滴管、細胞培養箱、無菌操作台、水浴槽、複式顯微鏡、DMEM/F12 培養液(DMEM/F12 + P/S + 10% FBS)、DMEM 培養液(DMEM + P/S + 10% FBS)、Y1 cell、NIH-3T3 cell、COS1 cell、Trypsin-EDTA、液態氮

### 三、 製備穿透式電子顯微鏡樣本：

6 well 培養皿、Embedding film、4°C 冷房、緩衝溶液(0.1M cacodylate buffer, pH 7.2/ 4% sucrose)、固定液(2.5% glutaraldehyde/ 0.1M cacodylate buffer, pH7.2)、固定液(1% OsO<sub>4</sub>/ 0.1M cacodylate buffer, pH7.2)、染色液 1% uranyl acetate、酒精、spurr、烘箱

#### 四、 製備 CYP11A1 表現質體：

##### (一)CYP11A1 基因片段、pEGFP-N1 載體

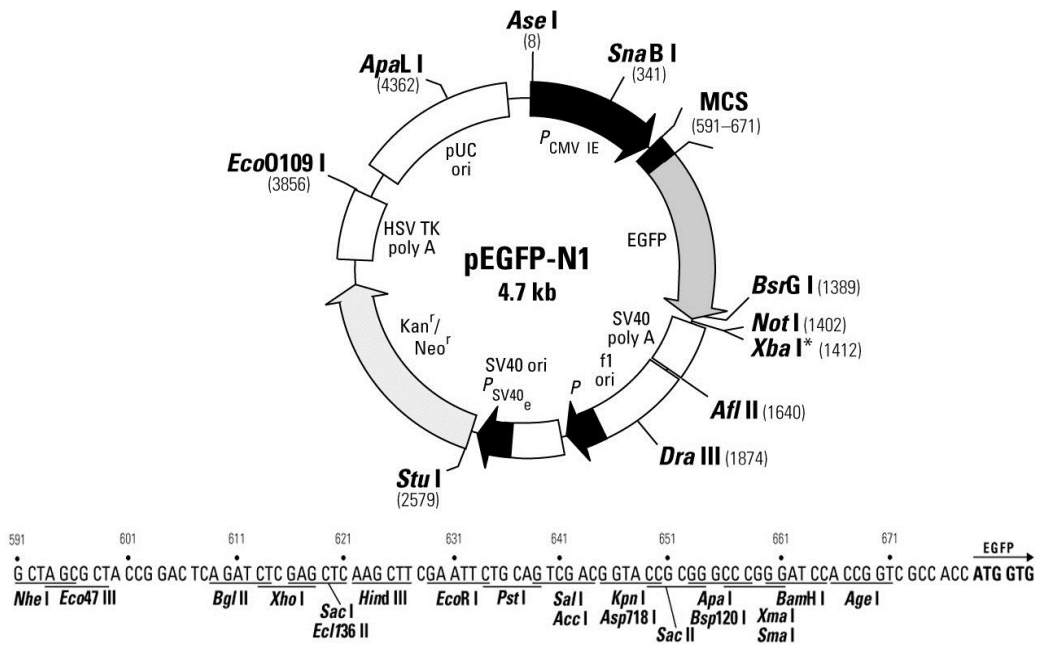


圖 12 pEGFP-N1 載體的基因圖譜 取自 <https://www.addgene.org/18870/>

##### (二)聚合酶鏈鎖反應(PCR)：PCR buffer、dNTP、引子、PCR 儀器

##### (三)膠體電泳：Agarose、50X TAE buffer、錐形瓶、微波爐、製膠模型、6x DNA Loading Dye、10x Taq buffer、1K DNA Ladder marker、電泳槽、EtBr、UV 箱

##### (四)限制酶(XhoI、EcroRI)、10X digest buffer

##### (五)T4 DNA ligase、10X ligase buffer

##### (六)細菌轉型、養菌：HIT competent cell、LB 培養基、LB agar 養菌盤、養菌管、錐形瓶、抗生素 Kanamycin 及 Ampicillin、三角玻棒、酒精燈、37°C 暖房、震盪器

##### (七)質體純化：高速離心機、Qiagen kit

##### (八)細胞轉染：Trans-LTI Transfection Reagent、Opti-MEM

## 伍、 研究過程與方法

### 一、 細胞培養：

#### (一)細胞株種類：

1. Y1：小鼠腎上腺皮質癌細胞，內生 CYP11A1。
2. COS1：猴腎臟細胞，不內生 CYP11A1。
3. NIH-3T3：胚胎纖維母細胞，不內生 CYP11A1。

#### (二)培養環境：恆溫攝氏 37 度、二氧化碳濃度 5%。

#### (三)培養容器：直徑 10 公分培養皿。

#### (四)配製培養液：DMEM/F12 + P/S + 10% FBS(用於 Y1)與 DMEM + P/S + 10% FBS(用於 COS-1、NIH-3T3)

1. 將 DMEM/F12 或 DMEM 培養液粉末一包、ddH<sub>2</sub>O 890mL、P/S(抗生素) 10mL、FBS(胎牛血清) 100 mL 加入已滅菌的燒杯，並置於電磁加熱攪拌器由磁攪拌子攪拌。
2. 加入 NaHCO<sub>3</sub>(DMEM/F12：2.4g，DMEM：3.7g)，持續攪拌。
3. 利用酸鹼度計測酸鹼值，並以鹽酸與氫氧化鈉調其 pH 值至約 7.2~7.4。
4. 利用抽氣過濾套組過濾培養液。

## 二、 製備穿透式電子顯微鏡樣本：

- (一) 種植細胞：準備 12 洞培養皿，在每一洞放置塑膠薄片(Aclar embedding film)。細胞培養數代後，種植  $1 \times 10^5$  細胞於培養皿中，使細胞密度達九成以上。
- (二) 去除培養液後以緩衝溶液(0.1M cacodylate buffer, pH 7.2/ 4% sucrose/ 0.05%  $\text{CaCl}_2$ )潤洗細胞。
- (三) 以固定液(2.5% glutaraldehyde/ 0.1M cacodylate buffer, pH7.2) 在 4 °C 固定 1 小時。
- (四) 在 4°C 以緩衝溶液潤洗細胞 3 次，每次 5 分鐘。
- (五) 以固定液(1%  $\text{OsO}_4$ / 0.1M cacodylate buffer, pH7.2) 在 4°C 固定 1 小時。
- (六) 在 4°C 以 ddH<sub>2</sub>O 潤洗細胞 3 次，每次 5 分鐘。
- (七) 以染色液 1% uranyl acetate 在 4°C 染色 1 小時。
- (八) 在 4°C 以 ddH<sub>2</sub>O 潤洗細胞 3 次，每次 5 分鐘。
- (九) 在室溫以酒精脫水：依序浸泡在 50%(7 分鐘)、70%(7 分鐘)、90%(7 分鐘) 酒精各一次及 100%無水酒精(5 分鐘)三次。
- (十) 在室溫以酒精/spurr(樹脂)混合溶液滲透細胞樣本：依序浸泡在酒精:spurr=1:1(30 分鐘)、1:2(40 分鐘)各一次及純 spurr(1 小時)三次。
- (十一) 置於 70°C 烘箱中包埋 20 小時。

### 三、 CYP11A1 表現質體製備與確認：

(一) 利用聚合酶鏈鎖反應(PCR)技術，以設計好的不同引子分別取得表現 CYP11A1 的全長 DNA 片段，及不包含「粒線體標的序列」的 CYP11A1 DNA 片段。引子上包含限制酶 EcoR1 與 Xho1 能作用的切點序列。

1. 聚合酶鏈鎖反應:取 1.5mL 微量離心管加入下表所列溶液並混合均勻。將其置於 PCR 儀器，PCR 反應條件為：enzyme activation 95°C 10 分鐘; 95°C 30 秒(denature)、55°C 1 分鐘(anneal)、72°C 1 分 30 秒(extend) 共 30 個循環；72°C 5 分鐘、4°C 暫停。

	<u>1X</u>
2X PCR buffer	25 $\mu$ L
2mM dNTP	10 $\mu$ L
10 $\mu$ M Forward Primer	1.5 $\mu$ L
10 $\mu$ M Reverse Primer	1.5 $\mu$ L
DNA	1 $\mu$ L
KODFX	1 $\mu$ L
<u>ddH<sub>2</sub>O</u>	<u>10 <math>\mu</math> L</u>
	50 $\mu$ L

2. 純化 PCR 產物 (PCR purification) :使用 QIAquick PCR purification kit。加入 PCR 產物體積五倍的 PB(酸性試劑)，混合均勻。若呈現橙色或紫色，加 10  $\mu$  L 3M 硫酸鈉。將液體移至離心管中，並且高速離心一分鐘，將下方離心液倒出。接著加 750  $\mu$  L PE(酒精)，混合均勻在高速離心一分鐘，將下方離心液倒出。將離心管置於 1.5 mL 微量離心管上方，並加 50  $\mu$  L EB(復溶劑)或去離子純水，高速離心一分鐘。
3. 測定 DNA 濃度：樣品在 260 nm 及 280 nm 吸光值之比較，以判定 DNA 的純度及濃度。

(二) 利用限制酶 EcoRI、XhoI 切割 CYP11A1 (插入段) 及 pEGFP-N1 載體 DNA：

取 1.5mL 微量離心，加入下表所列溶液並混合均勻。接著至於 37°C 恆溫水浴槽作用 20 分鐘。

4 $\mu$ g pEGFP-N1(依照測得濃度加適當體積)	
XhoI	5 $\mu$ L
EcoRI	5 $\mu$ L
10X digestion buffer	10 $\mu$ L
<u>ddH<sub>2</sub>O(依載體溶液體積調整，使總體積為 100 <math>\mu</math>L)</u>	
	100 $\mu$ L

- (三) 利用膠體電泳分離 pEGFP-N1 載體的大小片段，僅保留將與插入段接合的片段。再利用 QIAquick Gel Extraction 萃取 DNA。
- (四) 利用接合酶接合 CYP11A1 與 pEGFP-N1 的 DNA 片段：載體與插入段的莫耳數比例為 1:3，載體 DNA 總量為 100 ng，並取 0.6mL 微量離心管加入下表所列溶液並混合均勻。置於 4°C 反應過夜。此步驟所得為環狀的質體 DNA。

pEGFP-N1	20 $\mu$ L
insert	8.4 $\mu$ L
10X ligation buffer	4 $\mu$ L
T4 DNA ligase	2 $\mu$ L
<u>ddH<sub>2</sub>O</u>	<u>5.6 <math>\mu</math>L</u>
	40 $\mu$ L

- (五) 利用 non-heatshock 轉型(Transformation)細胞，將質體 DNA 引入勝任細胞(competent cell)，以達大量複製 DNA 的目的：在 DNA 混合液中加入卡納黴素(kanamycin)以及 HIT mixture。接著將接合溶液均勻抹平在 LB agar plate 上，置於 37°C 烘箱培養 16~18 小時。以微量滴管挑單一菌落，在離心管震盪培養 16~18 小時以小量培養，接著在錐形瓶中震盪培養 16~18 小時以大量培養。
- (六) 質體純化(Plasmid DNA midi-preparation)：將菌液倒入離心瓶中，並使用天平使每一離心瓶重量相等。以 6000g 離心 10 分鐘後，倒掉上清液，加



入 8c. c. RES buffer，上下沖洗使之混合均勻。加 8c. c. LYS buffer，緩緩上下搖晃靜置 5 分鐘。將濾管架在試管架上，並以加 12c. c. EQU buffer 潤濕管壁。加 8c. c. NEV buffer，慢慢上下搖晃 10~15 次，應出現棉絮狀物質。把液體倒入濾管，加 8c. c. Wash buffer，移至 50c. c. 離心管上。加 5c. c. ELV buffer 與 3.5mL 異丙醇，震盪均勻，靜置 2 分鐘。將液體倒入特製過濾針筒中，慢慢把液體壓出，加 2c. c. 70%酒精，重複 3 次。加 0. 2c. c. ddH<sub>2</sub>O，將液體壓入 1. 5c. c. 離心管。測 DNA 濃度。

(七) 取一部分質體樣本再次以限制酶切割、跑膠，以確認製作出的質體是否正確。

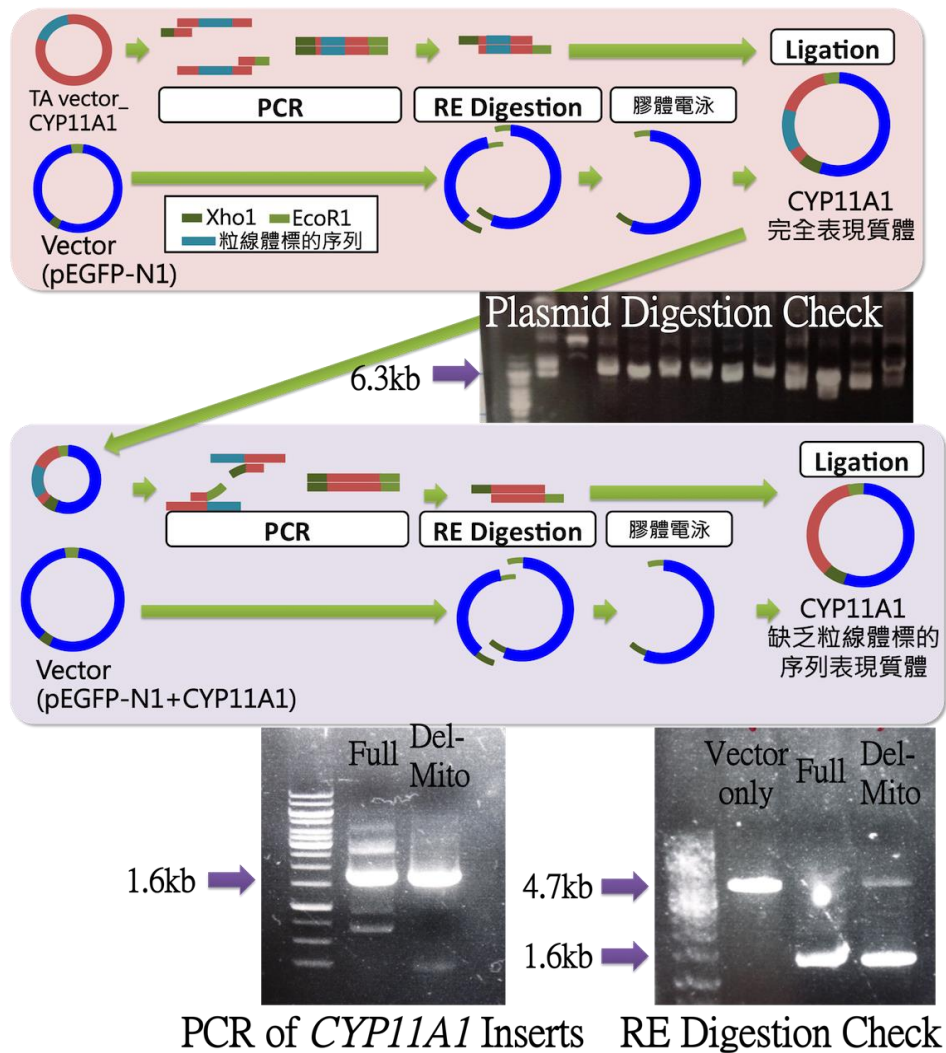


圖 13 CYP11A1 表現質體製備與確認過程示意圖

#### 四、 脂質體轉染法：

轉染前使細胞在 10 cm 培養皿長到約五至七成滿，並更換成不含抗生素的培養液。將下表所列溶液依序加入 1.5 mL 微量離心管，輕輕用微量滴管混合均勻。靜置於室溫 25 分鐘。最後，將混合液加入 COS-1 細胞的培養液中，輕輕搖晃混合均勻，使其作用隔夜後更換回原培養液並再隔一天才開始做實驗以讓細胞恢復穩定。

Opti-MEM	1.5mL
DNA	15 $\mu$ g
TransIT-LTI Reagent	45 $\mu$ L

#### 五、 施加膽固醇：

在轉染 F2 及 VE 質體的實驗中，另區分是否施加膽固醇兩種組別。施加膽固醇的組別條件為：添加 5  $\mu$ M 20  $\alpha$ -hydroxycholesterol，作用 4 小時。此種膽固醇不需 StAR 運送到粒線體內膜，可以直接作為 CYP11A1 的受質，使 CYP11A1 作用產生下游產物孕烯醇酮(P5)。

#### 六、 測量 ATP 產率：

- (一) 用 Trypsin-EDTA 使細胞自培養皿上脫落，離心 3000rpm、5 分鐘收集細胞。
- (二) 用細胞計數盤數細胞，記錄細胞密度。
- (三) 取  $3 \times 10^4$  細胞置於 1.5c.c. 離心管中，離心 3000rpm、5 分鐘後丟棄上清液。
- (四) 加 300  $\mu$ L lysis buffer 於室溫作用 5 分鐘，將細胞裂解，釋放 ATP。
- (五) 加 300  $\mu$ L diluent buffer 稀釋。
- (六) 離心 10000rpm、1 分鐘，使細胞的其他成分沈澱。
- (七) 取出上清液置於新的離心管中，暫時放在冰上保存。
- (八) 分別配製 10<sup>-1</sup>~10<sup>-6</sup>mM 的 ATP 溶液作為標準樣品。

- (九) 將實驗樣本及標準樣本裝入專用的黑色孔盤中，每孔  $50\mu\text{L}$ 。
- (十) 避光取適量 luciferase 呈色劑（能與 ATP 結合並呈色），帶到專用儀器操作區。
- (十一) 儀器會自動添加 luciferase 並記錄吸光值。
- (十二) 取得吸光值資料後，用 excel 根據標準樣品的吸光值畫出標準曲線，便能推得實驗樣品的 ATP 濃度。

## 陸、 研究結果與討論

實驗一：以穿透式顯微鏡觀察內生及不內生 CYP11A1 的粒線體形態：

內生 CYP11A1 的細胞具有球形粒線體與拱形內褶膜，而不內生 CYP11A1 的細胞具有長條形粒線體與板層狀內褶膜。

### 一、 電子顯微鏡照片

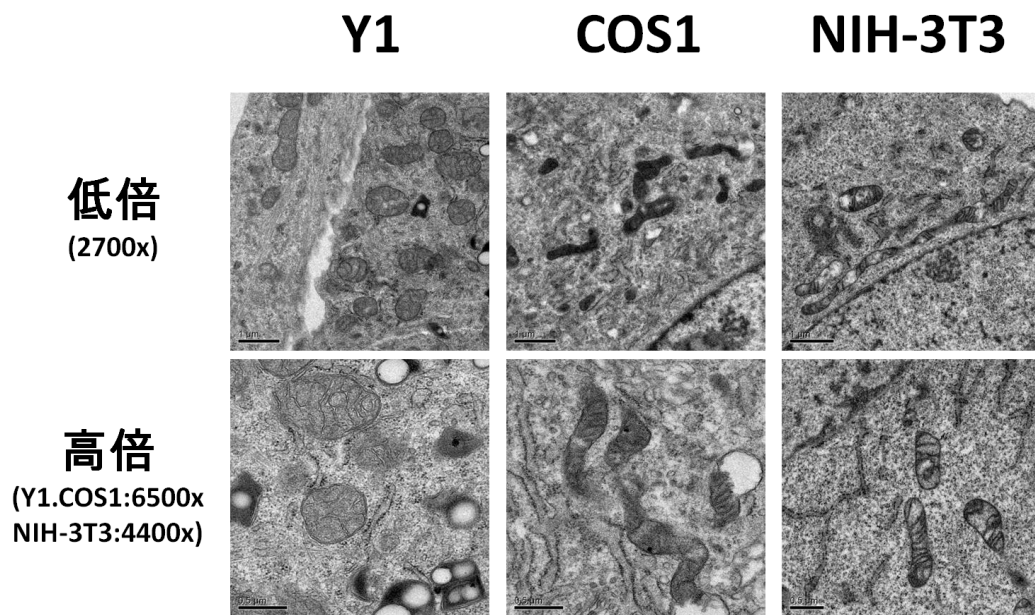


圖 14 不同倍率下 Y1、COS1 與 NIH-3T3 細胞粒線體形態的比較。圖中可見內生 CYP11A1 的 Y1 細胞粒線體呈球形且內褶膜為拱形，而不內生 CYP11A1 的 COS1 與 NIH-3T3 細胞粒線體都呈長條形且內褶膜為板層狀，如同一般常見的細胞。

### 二、 結果整理

表 1 不同細胞株是否內生 CYP11A1 與其粒線體形態的比較

細胞株種類	是否內生 CYP11A1	粒線體外形	粒線體內膜形態
Y1	內生且有活性	球形	拱形
COS1	不內生	長條形	板層狀
NIH-3T3	不內生	長條形	板層狀

**實驗二：製作 CYP11A1 完全表現質體以及缺乏粒線體標的基因序列的 CYP11A1 表現質體，轉染至 COS-1 細胞後以螢光顯微鏡及電子顯微鏡觀察。**

螢光顯微鏡觀察發現缺乏粒線體標的序列會使 CYP11A1 散布在整個細胞質中，全長基因則能使 CYP11A1 只表現在粒線體。

電子顯微鏡觀察結果顯示，外送 CYP11A1 能使 COS-1 細胞的長條形粒線體與板狀內褶膜形變為球形粒線體與管囊狀內褶膜。

一、以螢光顯微鏡觀察經質體轉染後的 COS-1 細胞：

pEGFP-N1 所帶有的綠螢光基因能使細胞轉譯出的插入段蛋白質(CYP11A1)發出綠色螢光，因此能以螢光顯微鏡觀察 CYP11A1 分布位置。轉染不帶有插入段的 pEGFP-N1 的 COS-1 細胞中，幾乎整顆細胞都發出綠色螢光；轉染 pEGFP-N1-Cyp11a1(全長)的 COS-1 細胞中，綠色螢光的分布散佈在細胞質，呈現點狀、顆粒狀，可以初步推斷 CYP11A1 只分布在粒線體中；轉染 pEGFP-N1-Cyp11a1(缺乏粒線體標的序列)的 COS-1 細胞中，綠色螢光均勻分布於細胞質中。另外，轉染缺乏粒線體標的序列 Cyp11a1 的細胞很容易死亡，因此沒有繼續做後續的電顯觀察。

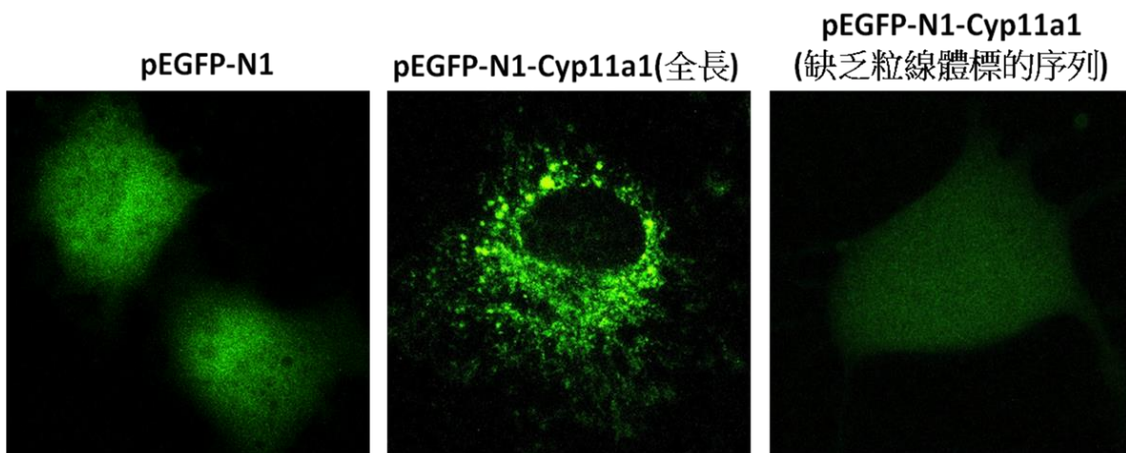


圖 15 轉染質體的 COS-1 細胞螢光顯微照片。pEGFP-N1 載體能使轉譯出的插入段蛋白質(CYP11A1)帶有綠螢光，因此能以螢光顯微鏡觀察 CYP11A1 分布位置。圖中轉染 pEGFP-N1 的 COS-1 細胞中，綠色螢光散布在整顆細胞；轉染 pEGFP-N1-Cyp11a1 (全長)的 COS-1 細胞中，綠色螢光的分布呈現點狀、顆粒狀；轉染 pEGFP-N1-Cyp11a1 (缺乏粒線體標的序列)的 COS-1 細胞中，綠色螢光均勻分布於細胞質中，螢光較為黯淡。

二、以電子顯微鏡觀察經質體轉染後的 COS-1 細胞：

未經過質體轉染的 COS-1 細胞以及轉染了未插入 Cyp11a1 基因的 pEGFP-N1 載體的細胞中，粒線體多數為長條形，並具有板狀內褶膜；轉染 pEGFP-N1-Cyp11a1(全長)的 COS-1 細胞中，大部分粒線體呈現球形，並具有管囊狀內褶膜。

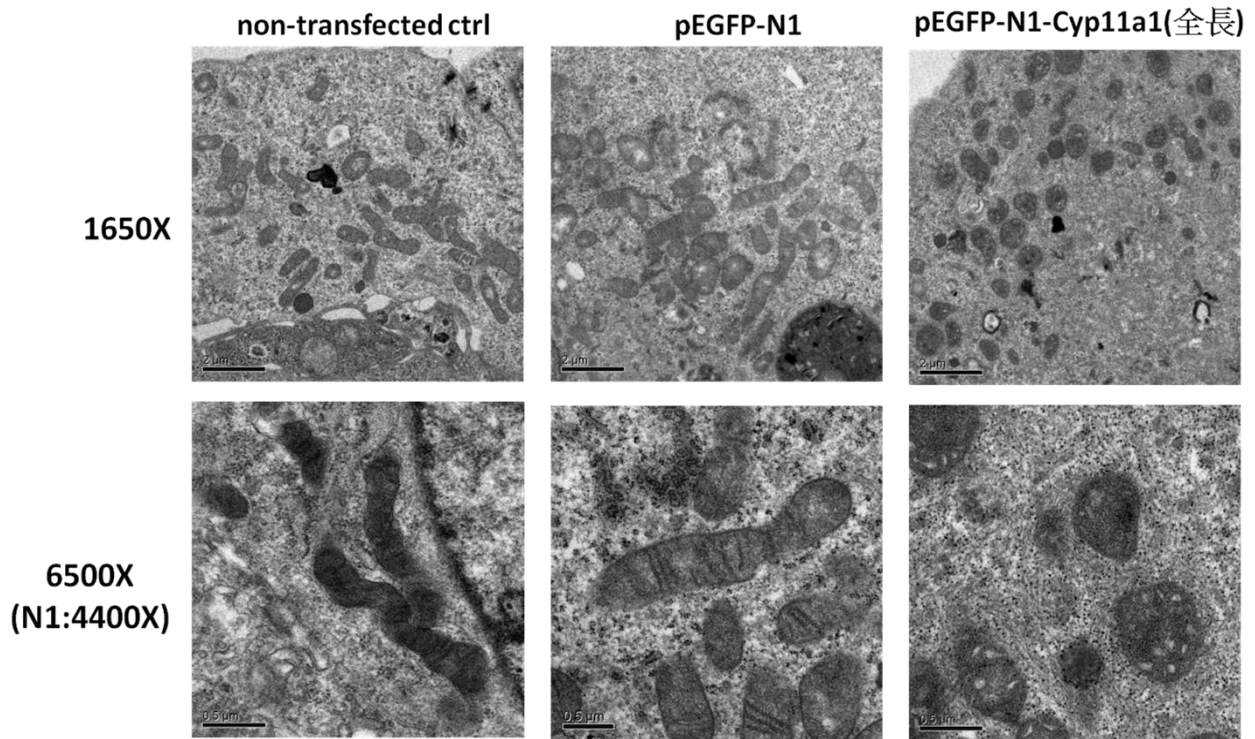


圖 16 未轉染、轉染 pEGFP-N1 及 pEGFP-N1-Cyp11a1(全長)的 COS-1 細胞電子顯微鏡照片。外送 CYP11A1 能使 COS-1 細胞的長條形粒線體與板狀內褶膜形變為球形粒線體與管囊狀內褶膜。

三、針對粒線體形態（球形粒線體的比例）進行統計：

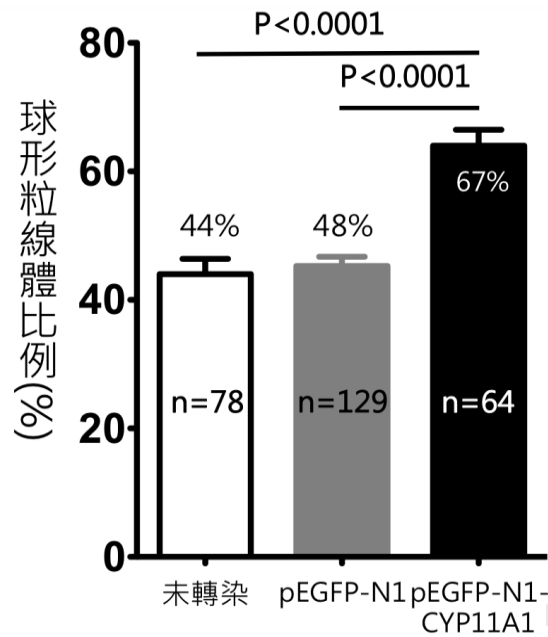


圖 17 未轉染、轉染 pEGFP-N1 及 pEGFP-N1-Cyp11a1(全長)的 COS-1 細胞中球形粒線體所佔的比例。圖中 n 值為所計算的細胞數量。由圖可知，轉染 Cyp11a1 後細胞中的球形粒線體增加了。由於電顯切片的角度不同，長條形的粒線體也可能切出圓形的截面，因此未轉染及僅轉染載體的細胞仍有一定比例的「球形粒線體」，實為實驗無法避免的誤差。而質體的轉染成功率也尚無法達到百分之百，因此轉染 Cyp11a1 的細胞球形粒線體比例不到 100%。但整體而言，實驗組與對照組之間仍有達到統計上的顯著差異。



實驗三：將具有 CYP11A1 作用活性的 F2 質體及經突變而不具活性的 VE 質體轉染至 COS-1 細胞後以電子顯微鏡觀察。

一、電子顯微鏡照片

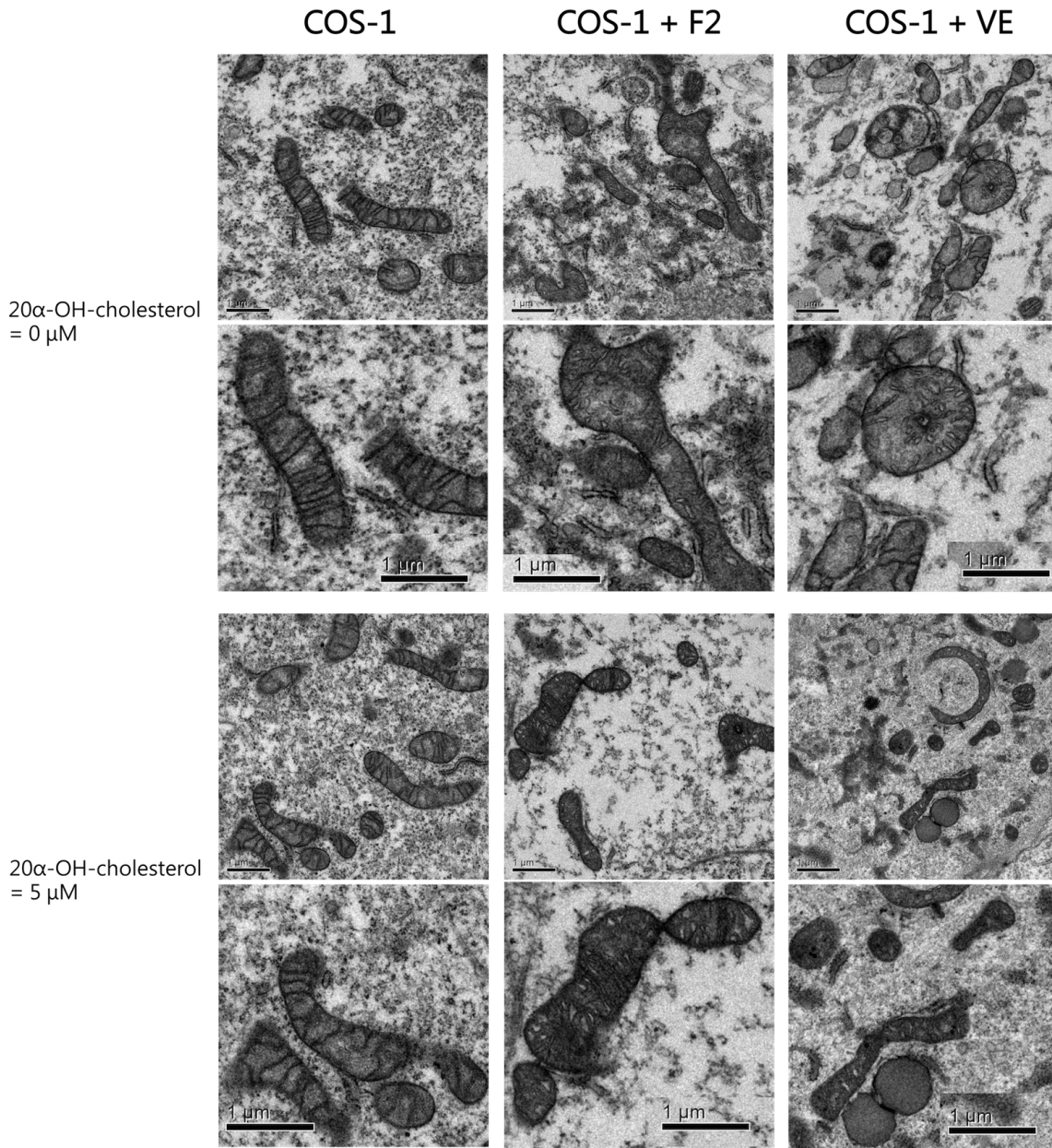


圖 18 未轉染及轉染 F2 或 VE 質體的細胞粒線體形態。由圖可見，轉染 F2 和 VE 的細胞，粒線體出現明顯的管囊狀內褶膜。

二、針對粒線體外形與內褶膜形態進行分類統計，並撰寫程式分析資料

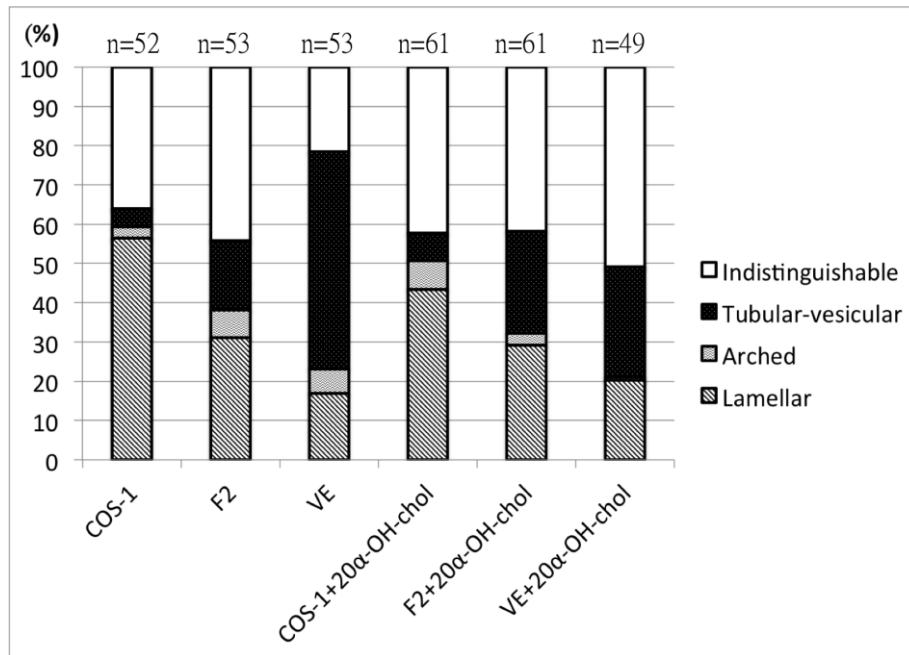


圖 19 未轉染及轉染 F2 或 VE 質體的細胞粒線體內褶膜形態統計。由圖可見，轉染 F2 或 VE 質體均能使細胞粒線體管囊狀(Tubular-vesicular)內褶膜增加、板層狀(Lamellar)內褶膜減少，顯示不論 CYP11A1 是否具有活性，都能改變細胞的粒線體內褶膜形態。

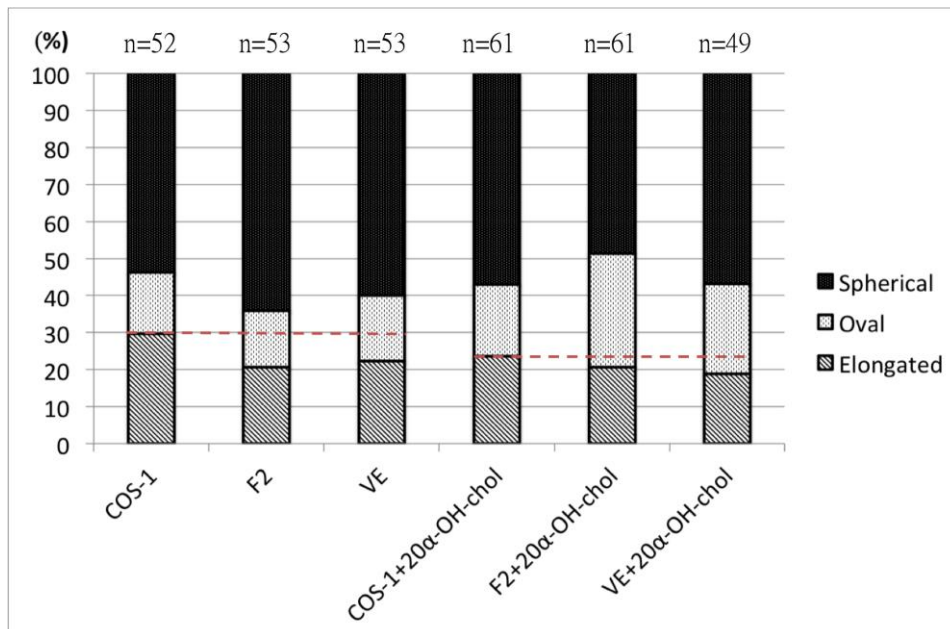


圖 20 未轉染及轉染 F2 或 VE 質體的細胞粒線體外形統計。由圖可見，轉染 F2 或 VE 質體後，細胞中長條形粒線體的比例降低了。

#### 實驗四：測量轉染質體前後細胞的 ATP 產率。

##### 一、自製的 CYP11A1 完全表現質體與其對照組 pEGFP-N1 載體

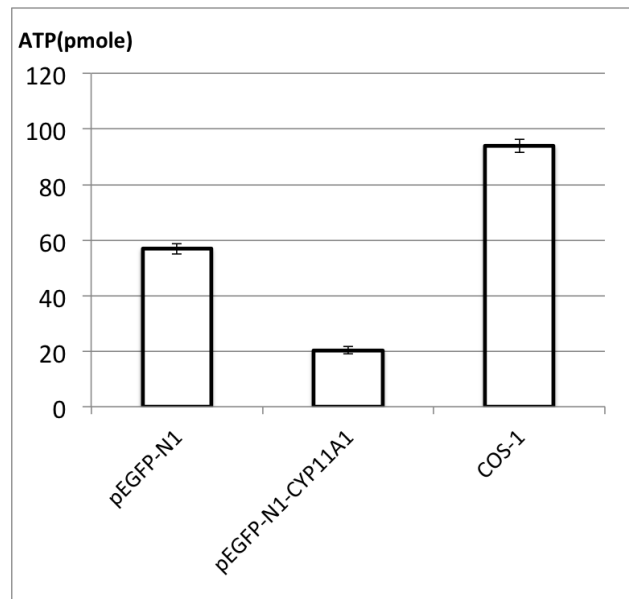


圖 21 轉染載體或 CYP11A1 完全表現質體的細胞 ATP 產率。由圖可見，轉染 CYP11A1 的細胞，ATP 產率僅為轉染載體的 1/3，顯示粒線體形變會降低細胞的代謝率。轉染載體的組別 ATP 產率較未轉染組低，可能是因為綠螢光蛋白發光會消耗細胞的 ATP。

## 二、具有作用活性的 F2 質體與其對照組 VE 質體

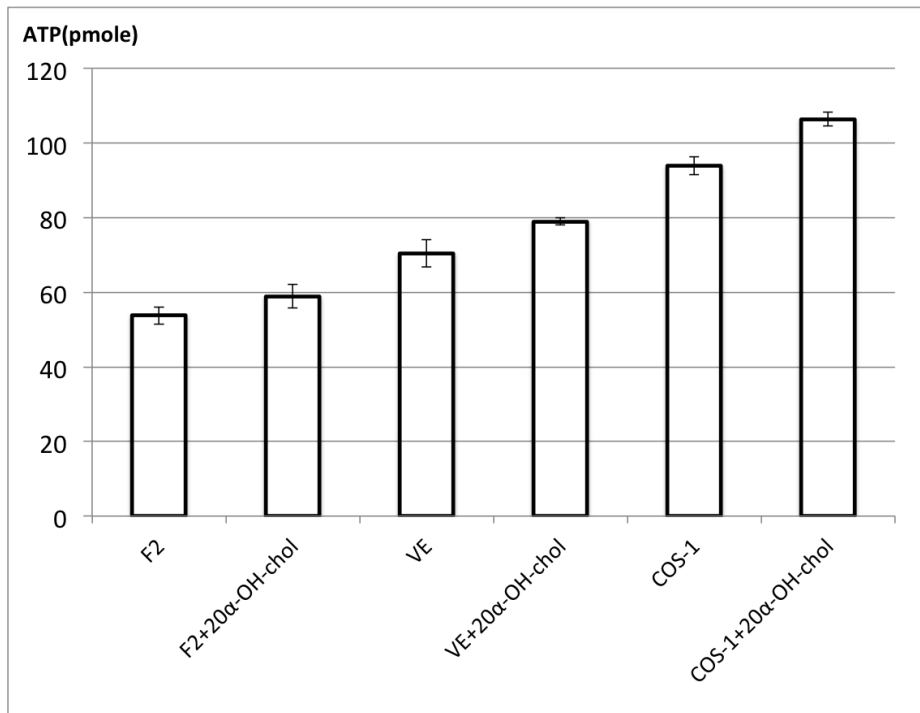


圖 22 轉染 F2 或 VE 質體及是否施加膽固醇，細胞 ATP 產率的比較。由圖可見，轉染 F2 或 VE 質體均使細胞 ATP 產率下降，顯示粒線體形變會降低細胞的代謝率。施加膽固醇的組別 ATP 產率均較高，可能是因為膽固醇也能作為細胞的營養來源。

## 柒、 結論

- 一、內生 CYP11A1 的細胞(如 Y1)具有球形粒線體與拱狀內褶膜，而不內生 CYP11A1 的細胞(如 COS1 及 NIH-3T3)具有長條形粒線體與板狀內褶膜。
- 二、外送 CYP11A1 能使長條形粒線體與板狀內褶膜形變為球形粒線體與拱狀或管囊狀內褶膜，證實 CYP11A1 能使粒線體發生形變。此作用不論 CYP11A1 是否具有作用活性都會發生。
- 三、粒線體形變為球形、拱狀或管囊狀內褶膜後，會減緩細胞的呼吸作用，ATP 產率下降。

## 捌、 未來展望

本研究為粒線體形變的研究開啟了新的局面，顛覆了粒線體形變代表細胞凋亡的觀念，證實了 CYP11A1 會使粒線體發生形變，而其原因可能是為了提高它製造類固醇賀爾蒙的能力。在動物體內，粒線體形變是伴隨在類固醇生成細胞的分化過程中的重要事件，是細胞分化為具有製造類固醇賀爾蒙能力的標誌。本研究中已經成功藉由轉染 F2 質體至非類固醇生成細胞，而使粒線體形變並製造孕烯醇酮，並改變細胞的代謝率，某種程度上可以解釋為粒線體形變造成的細胞分化。未來希望藉由動物類固醇生成細胞的原代培養(primary culture)來更進一步證明粒線體形變與細胞分化的關係。

另外，關於 CYP11A1 使粒線體形變的機制，目前已知與 CYP11A1 本身的作用活性無關，未來可藉由轉染不同片段的 CYP11A1 質體來篩選出造成粒線體形變的關鍵蛋白質構造。

## 玖、 參考文獻

- 一、 Campello, S., Scorrano, L. (2010) Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology. *EMBO Rep.*, 11(9):678-84.
- 二、 Chien Yu, et al. (2013) Misregulated progesterone secretion and impaired pregnancy in Cyp11a1 transgenic mice. *Biology of reproduction*, 89(4), 91.
- 三、 Hu, M.C., et al. (2002) Steroid deficiency syndromes in mice with targeted disruption of Cyp11a1. *Molecular Endocrinology*, 20(4):930.
- 四、 Itoh, K., et al. (2013) Mitochondrial dynamics in neurodegeneration. *Trends Cell Biology*, 23(2):64-71.

- 五、 Miller, W.L., et al. (2011) The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Review*, 32(4):579.
- 六、 Harikrishna, J.A., Black, S.M., et al. (1993) Construction and function of fusion enzymes of the human cytochrome P450scc system. *DNA and cell biology*, 12(5):371-9.
- 七、 Huang, M.C., Miller, W.L. (2001) Creation and activity of COS-1 cells stably expressing the F2 fusion of the human cholesterol side-chain cleavage enzyme system. *Endocrinology*, 142(6):2569-76.

## 【評語】 080003

觀察 CYP11A1 與粒線體發生形變的關係，發現內生 CYP11A1 的細胞具有球型粒線體與拱狀內摺膜也證實外選 CYP11A1 的使粒線體發生形變，對未來實驗提供可行的方向，值得進行後續的實驗。