

2023 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號	090008
參展科別	醫學與健康科學
作品名稱	以粒線體轉移治療動脈血管內皮細胞功能失調 及動脈粥狀硬化疾病
得獎獎項	二等獎 土耳其音樂科學工程博覽會(Buca IMSEF)代 表 義大利科學博覽會(FAST)代表
就讀學校	臺北市立第一女子高級中學
指導教師	楊鎧鍵、孫譽真
作者姓名	李昀臻、趙曼甯
關鍵詞	<u>血管內皮細胞、粒線體轉移、動脈粥狀硬化效應</u>

作者簡介



我們是李昀臻和趙曼甯，目前就讀北一女中數資班二年級。透過數資班，學習更深入的科學知識、接觸科學研究，選擇充滿興趣的生物領域進行專題研究。在跌撞撞專題研究過程中，謝謝專題老師的建議與指教、指導教授與我們討論數據與指引方向，更感謝學長姐們熱情解答我們實驗中的疑問。希望未來能繼續在科學領域中學習和探索。

摘要

動脈粥狀硬化疾病的風險因子及血管擾流會造成血管內皮細胞內的粒線體失去功能，導致內皮細胞功能失調，進而引起動脈粥狀硬化疾病的後續病程，如斑塊形成。本研究主要探討粒線體轉移療法，是否能改善受到擾流影響的血管內皮細胞功能失調。首先，我們分別觀察並比較擾流與順流下的人類動脈血管內皮細胞，兩者細胞形態與內皮相關功能基因表現量的差異。其次，我們從順流處理的細胞中分離取得健康的粒線體，轉移入擾流處理的細胞中。接著以生物能量代謝分析儀，檢測轉移粒線體後內皮細胞呼吸鏈與代謝的功能是否隨粒線體的轉移而有所改善。實驗結果確認，粒線體轉移處理可改善擾流組細胞的呼吸鏈功能，細胞的有氧呼吸與產能代謝皆有改善。本先驅性研究希望有助於開創以粒線體轉移技術作為心血管疾病治療的創新療法。

Abstract

Mitochondria are the crucial powerhouse for cellular metabolism and hold great potential for clinical therapies. Atherosclerosis is associated with oxidative stress and endothelial dysfunction by the disturbed blood flow at arterial bifurcations. We aim to examine whether mitochondria transfer could ameliorate deleterious effects of disturbed flow. First, we compared the morphology and gene expressions of endothelia under unidirectional flow (UF) and disturbed flow (DF), respectively. Secondly, we obtained the mitochondria from UF cells using a mitochondrial isolation kit and transferred the UF-mitochondria into DF cells. Thirdly, we examined cell metabolism and respiratory burst of post-mitochondria transfer DF cells by Seahorse XF Cell Mito Stress Test. Our results revealed that mitochondria transfer ameliorated endothelial dysfunction of respiratory chain and glycolysis caused by disturbed flow. Our preliminary data shed a light on the potential of mitochondria transfer as a novel therapy for atherosclerosis.

壹、前言

一、文獻回顧與動機

(一)動脈粥狀硬化疾病的重要性

心臟疾病與腦血管疾病名列國人十大死因的第二、四位（2021 年衛福部統計處），而動脈粥狀硬化是導致動脈血管病變的主要成因。當動脈粥狀硬化進行到末期，斑塊破裂，產生血栓，容易引發急性心肌梗塞或缺血性腦中風。針對動脈粥狀硬化的學理研究，將有助於預防或治療動脈粥狀硬化，進一步減少國人受致命疾病所害。

(二)受損的內皮細胞會引發動脈粥狀硬化

目前學界對於動脈粥狀硬化的致病機轉有許多不同的觀點，其中多項證據支持，動脈粥狀硬化疾病是由受損的血管內皮細胞引發。細胞受損的原因各不相同，但可能與以下因素相關：高血糖、高血脂、發炎反應（關節炎、紅斑狼瘡或腸道相關的免疫疾病）、以及血管壁受到機械性傷害（高血壓、或血管分支處的擾流）。（Chiu & Chien, 2011）

(三)血管受力對內皮細胞的影響

血液的流動會對血管壁產生垂直或平行的力。由於血管具有彈性，並非鋼體，因此隨著心臟每次搏動血液的輸出，血管會些微的舒張或收縮。同時，血液對血管壁施以法線方向的作用力。由於血流的黏滯性，血管壁也非光滑，血液在經過血管壁的過程中會產生摩擦力，微觀而言，就是水分子和內皮細胞表面的分子間作用力。平行於作用表面的力，稱為剪力；單位面積受到的剪力，則稱作「剪應力」。在順流或擾流血管都會有剪力的產生，但是由於在順流的血管，血液流速較快，因此順流的血管壁上受到的剪應力比擾流的血管大。在血管分叉或彎曲處，血液會出現紊流（turbulence），流場中出現許多小漩渦。除了血流撞擊血管壁施加的正向力之外，紊流也會對血管壁造成的「侵蝕」。

目前已知血管發炎（vascular inflammation）常發生在動脈血流低剪應力（low shear force）類的擾流（disturbed blood flow, DF）區域，例如動脈血管分支或彎曲處。這些血管發炎最終將

演變為動脈粥狀硬化病變。(D. Wu et al., 2017)在動脈的血流順流 (unidirectional blood flow, UF) 區域，如筆直的動脈血管，較大的剪應力會促使內皮細胞緊緊密合生長，較不容易發炎，因而較少發生動脈粥狀硬化。

(四)緊密性連接 (tight junction) 受到破壞

擾流作用下，受損細胞之間的緊密性連接 (tight junction) 受到破壞，使血管壁的通透性增加。因此，血液中的低密度脂蛋白膽固醇 (LDL-C) 逐漸在血管壁中堆積，並被血管壁的氧化物質氧化。氧化的膽固醇會引發免疫反應，吸引白血球。膽固醇與白血球的聚集，使內皮細胞釋放發炎因子，製造出發炎微環境，使細胞中的活性氧自由基 (ROS) 增加。同時，受損的內皮細胞表面會分泌醣蛋白，如：VCAM-1、ICAM-1 等，與血液中單核球和 T 淋巴球的受器結合，使白血球附著在內皮細胞表面，更進一步移至內皮細胞下的空間吞噬低密度脂蛋白膽固醇，造成持續發炎反應。(Jiang, Ding, Huang, & Wang, 2022)

(五)基因表現改變

剪應力也影響基因表現。Dai G et al. (2004) 提出，順流與擾流對內皮細胞造成的影響，主要發生在細胞訊息傳遞 (signal transduction)、轉錄調控 (transcriptional regulation)、發炎 (inflammation)、血管新生 (angiogenesis)、凝血 (coagulation) 以及脂肪代謝 (lipid metabolism) 等方面。(Dai et al., 2004)

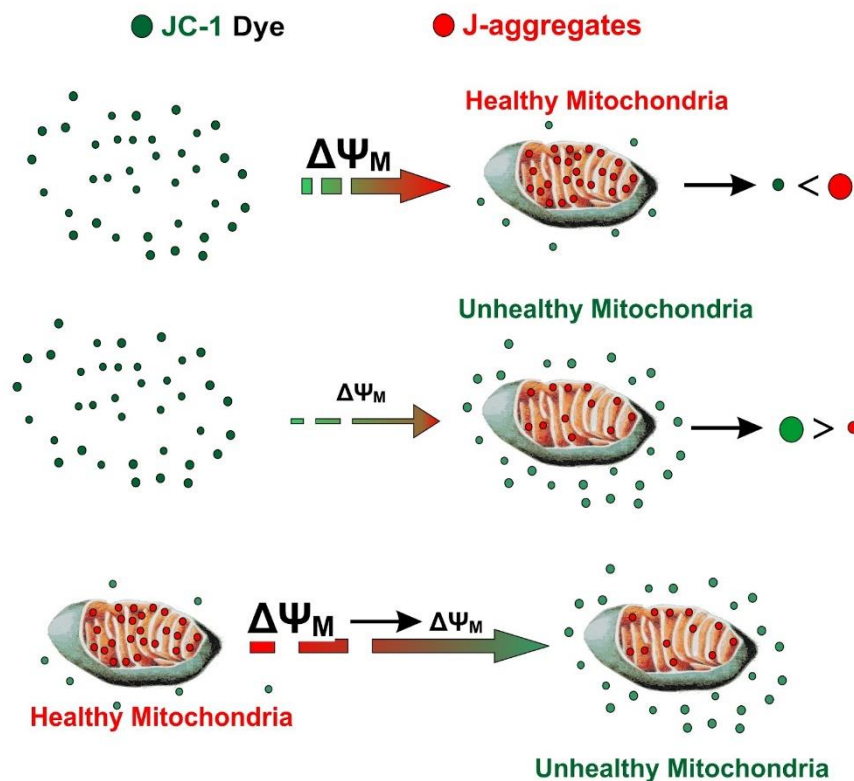
有些訊息傳遞因子可以保護細胞，使細胞免於產生動脈粥狀硬化的病徵。Yeh CF (2022) 研究認為，擾流會使保護性訊息傳遞因子表現量降低，例如 Kruppel-like factor 2 (KLF2), KLF4, NOS3 等，而破壞性的訊息傳遞因子表現量則增加，例如 C-X-C motif chemokine receptor 4 (CXCR4), NADPH oxidase 4 (NOX4)。(Yeh et al., 2022)

二、粒線體功能的測量方法

(一) 以 JC-1 測量粒線體內膜內外的電位差

正常的粒線體內膜外側的膜間腔 (Intermembrane space) 和內側的基質 (Mitochondrial matrix) 具有氫離子梯度，驅動 ATP 合成酶合成 ATP。由於氫離子帶正電，粒線體內膜外正內負，約有 250mV/5~10nm 的電位差，此狀態稱為極化。當細胞凋亡發生或粒線體遭到損傷時，內膜破損，氫離子梯度消失，稱為去極化。去極化的粒線體無法正常合成 ATP。

JC-1 染劑幫助我們判讀粒線體的膜電位正常與否，進而判斷粒線體的健康狀況。正常極化狀態下，JC-1 染劑會累積於內膜而成為聚合狀態，發出紅光。當粒線體發生異常時，膜電位減弱，JC-1 將從內膜中擴散到細胞質內，恢復為單體狀態，發出綠光。在螢光顯微鏡下，當紅光/綠光面積的比值愈大，粒線體被認為越健康，也代表細胞能量代謝狀態越健康。(Figure adopted from: Sivandzade et. al., (2019). Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe, Bio-protocol 9 (1): e3128. DOI: 10.21769/BioProtoc.3128.) (Sivandzade, Bhalerao, & Cucullo, 2019)



（二）、以海馬生物能量測定儀測量細胞的耗氧量

由於粒線體的透過氧化磷酸化產生 ATP 時，以氧氣作為電子傳遞鏈最後的電子接受者；而當供氧量不足時，糖解作用生成的丙酮酸將會被還原為乳酸鹽（lactate），排出細胞外之後解離，增加環境中的氫離子濃度。

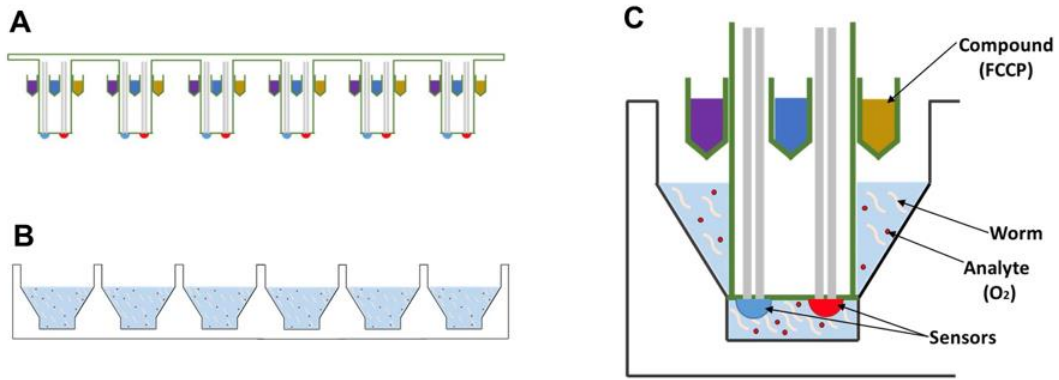
海馬能量測定儀創造封閉的培養環境給一群細胞，偵測細胞周圍環境的溶氧量或氫離子濃度變化，來推算細胞的有氧呼吸效率或糖解呼吸效率。定量的細胞培養於 24 well 的特製培養盤底部。上機後，帶有偵測器的探針每 5 至 8 分鐘會有一回合的偵測，固態的探針下降，浸入培養基中，直到其與培養盤底部的細胞形成一個封閉的空腔，以測定溶氧和氫離子排出量。

當一回合的測量結束，探針會向上抬升，離開培養液。機器會以大體積的培養液來使細胞附近的微環境回到基準狀態（baseline）。此時，培養液中可以注入藥物，來改變細胞執行各個代謝步驟的能力，以獲取針對細胞不同的代謝階段更精確的數據。

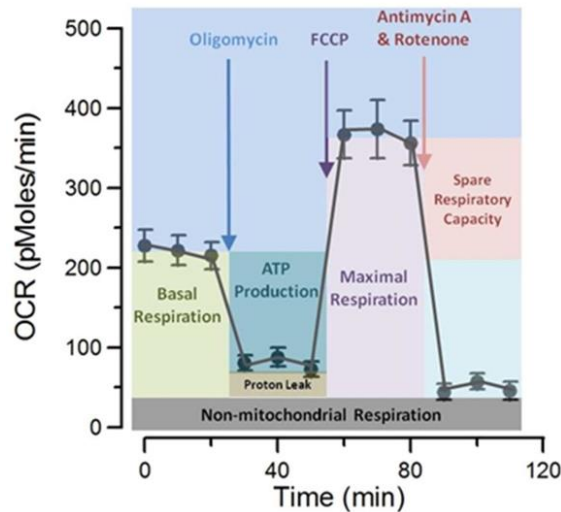
在第一階段測定細胞的基礎代謝率後，機器將依序注入 Oligomycin, FCCP, Antimycin A 三種藥劑。

Oligomycin 為 ATP 合成酶的抑制劑。加藥後，由於 ATP 合成酶未消耗氫離子梯度，只剩解偶聯蛋白（uncoupler）在消耗，電子傳遞鏈將會因此降速。因此，在這個階段測出的氧氣代謝速率可與第一階段的基礎代謝率做比較，其變化量即為 ATP 合成酶在細胞正常情況下的氧氣消耗率。

FCCP 為解偶聯劑，可使氫離子在用於有氧呼吸前被放生，藉此給予細胞代謝壓力，使粒線體到達極限運作效率。抗黴素 A（Antimycin A）是電子傳遞鏈的抑制劑。加入 Antimycin A 後，電子傳遞鏈完全停止，因此可得粒線體完全沒有作用下的細胞有氧呼吸效率。



(Figure adopted from: Haroon and Vermulst, (2019). Oxygen Consumption Measurements in *Caenorhabditis elegans* Using the Seahorse XF24, *Bio-protocol* 9 (13): e3288. DOI: 10.21769/BioProtoc.3288.) (Haroon & Vermulst, 2019)



(Figure adopted from: SPIE Proceedings Volume 8941, Optical Interactions with Tissue and Cells XXV; and Terahertz for Biomedical Applications;89411S (2014)<https://doi.org/10.1117/12.2041981>)

綜上所述，最終圖表的第一階段（0~20 分鐘）評估粒線體在基礎狀態的耗氧效率，加入 Oligomycin 後，第二階段（20~60 分鐘）可計算得 ATP 合成酶的耗氧效率。在第三階段加入 FCCP 後(60~80 分鐘)，可測得細胞粒線體的極限運作效率。最後，第四階段（80 分鐘後）藉由加入 Antimycin A 抑制電子傳遞鏈，求得細胞中粒線體以外的耗氧效率。

三、粒線體轉移的臨床治療初露曙光

細胞內溶小體 (lysosome) 和受損的粒線體結合，可以清除受損的粒線體，稱為粒線體自噬 (Mitophagy)。已知粒線體自噬可以減少氧化壓力造成的粒線體分裂與細胞凋亡反應 (D. Wu, Ji, Du, Ren, & Qian, 2022; Zhou et al., 2018)。這些研究發現暗示以粒線體介入動脈粥狀硬化病程，可能開啟創新的臨床治療機會。

將功能良好的粒線體轉移進入粒線體功能受損的細胞內，改善受損細胞的代謝能力 (Torralba, Baixauli, & Sanchez-Madrid, 2016)，稱為粒線體轉移 (Mitochondrial transfer)。由於受損細胞不能沒有粒線體的能量供應，因此以粒線體轉移策略改變細胞的粒線體群體組成，能有效率的治療受損細胞 (Liu et al., 2021)。藉由提高氧化磷酸化效率，減少醣解作用，增加細胞 ATP 產率，強化細胞抗氧化功能，減少細胞凋亡。粒線體轉移自然發生在哺乳類的細胞之間，藉由相鄰細胞之間的奈米隧道管 (tunneling nanotubes) 將正常粒線體由供應者細胞 (donor) 傳送至粒線體失去功能的細胞。根據 2021 年 Delin Liu 的整理，目前最熱門的粒線體供應者細胞 (donor) 是間質幹細胞 (Mesenchymal stem cell)，且先前只有很少研究使用與目標細胞同款的供應者細胞。(Liu et al., 2021)

四、研究目的

(一) 比較順流或擾流處理下的人類血管內皮細胞的細胞形態和粒線體膜電位，證明順流處理的細胞健康狀態是否較佳

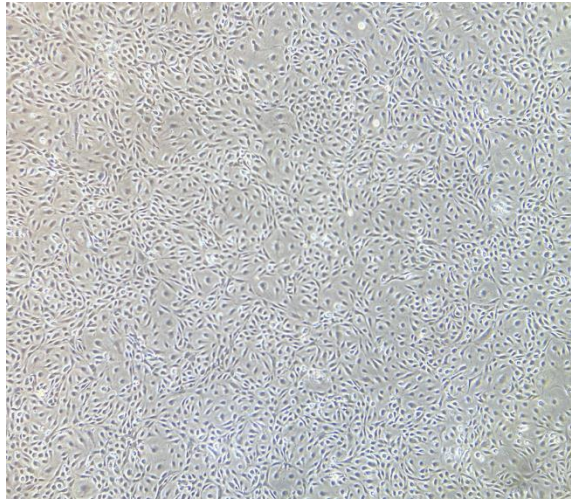
(二) 藉由比較動脈粥狀硬化相關基因核酸與蛋白表現量的差異，證明 cone flow device 的擾流處理將誘發細胞產生促動脈粥狀硬化效應

(三) 以能量角度探討粒線體轉移，能否減少血流擾流對血管內皮細胞造成的促動脈粥狀硬化效應。

貳、研究設備及器材

一、細胞培養

(一) 細胞株：人類血管內皮細胞 Human Aortic Endothelial Cells (HAEC)



圖一、顯微鏡下人類血管內皮細胞(10x)

(二) 培養液：HAEC 細胞培養液 Endothelial Cell Medium (ECM, SC-1001)

(三) 其他：細胞培養盤 (10cm dish, 6 well plate)、二氧化碳培養箱、無菌操作臺、胰蛋白酶 (0.05% trypsin)、PBS、微量滴管、離心管、離心機、光學顯微鏡

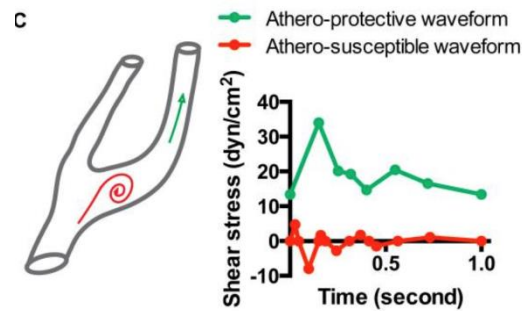
二、順流或擾流環境模擬

(一) 上機特製培養基：96%的 HAEC 細胞培養液 Endothelial Cell Medium (ECM, SC-1001)
加入 4%的 Dextran 葡聚糖粉末

(二) 模擬頸動脈血流的流體力學系統 (cone flow device)

本研究使用模擬頸動脈血流的流體力學系統，其模擬血管內皮細胞在頸動脈不同部位中，受到兩種不同的環境刺激：在血管筆直處的單一方向流(Unidirectional Flow, UF) (以下稱為順流) 剪應力，或在血管分叉處因紊流引發的擾流(Disturbed Flow, DF)剪應力。

由於研究指出，緩慢擾動的流體，比起快速的單一方向流動，更容易使內皮細胞發生促動脈粥狀硬化效應(proatherogenic effect) (C. Wu et al., 2015)。因此，我們藉由控制培養液流動的方向和速度，以 UF 環境培養 48 小時的內皮細胞，定義為正常的血管內皮細胞；DF 環境培養 48 小時的內皮細胞，定義為促動脈粥狀硬化病徵的異常血管內皮細胞。



圖二、此圖顯示 UF(圖中 Athero-protective waveform)與 DF(圖中 Athero-susceptible waveform)剪應力差異，UF 剪應力方向單一，但 DF 剪應力方向不一致。(C. Wu et al., 2015)



圖三、本實驗所使用的 cone flow device，透過調整速度與方向對時間的參數，可以給予細胞 UF 或 DF 剪應力。

三、粒線體的分離與轉移

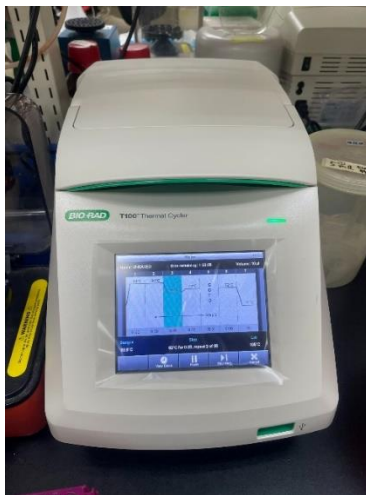
(一) 試劑：Mitochondria Isolation Kit for Mammalian Cells (Thermo Scientific)

(二) 儀器：可定溫之離心機

四、反轉錄聚合酶連鎖反應(Reverse transcriptase polymerase chain reaction , RT-PCR)

(一) 試劑：TRIzol Reagent、chloroform、isopropanol、75%乙醇、RNase free H₂O、5X Reaction Mix、Maxima Enzyme Mix

(二) 儀器：T100 Thermal Cycler

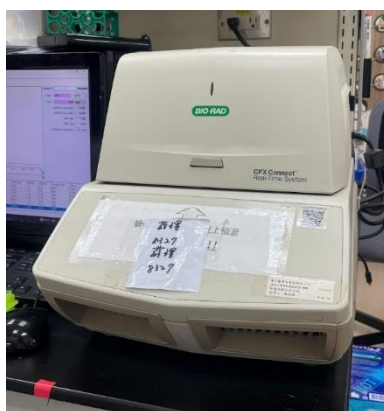


圖四、T100 Thermal Cycler

五、定量即時聚合酶連鎖反應(Quantitative real-time polymerase chain reaction , Q-PCR)

(一) 試劑：SYBR Green Master Mix、RNase free H₂O、forward and reverse primer

(二) 儀器：CFX Connect Real-Time System



圖五、CFX Connect Real-Time System

六、海馬即時生物能量分析(Seahorse Real-Time Cell Metabolic Analysis)

(一) 試劑：XF cell mito stress kit (Oligomycin, FCCP, Rotenone / Antimycin A)

(二) 儀器：Seahorse XF 24

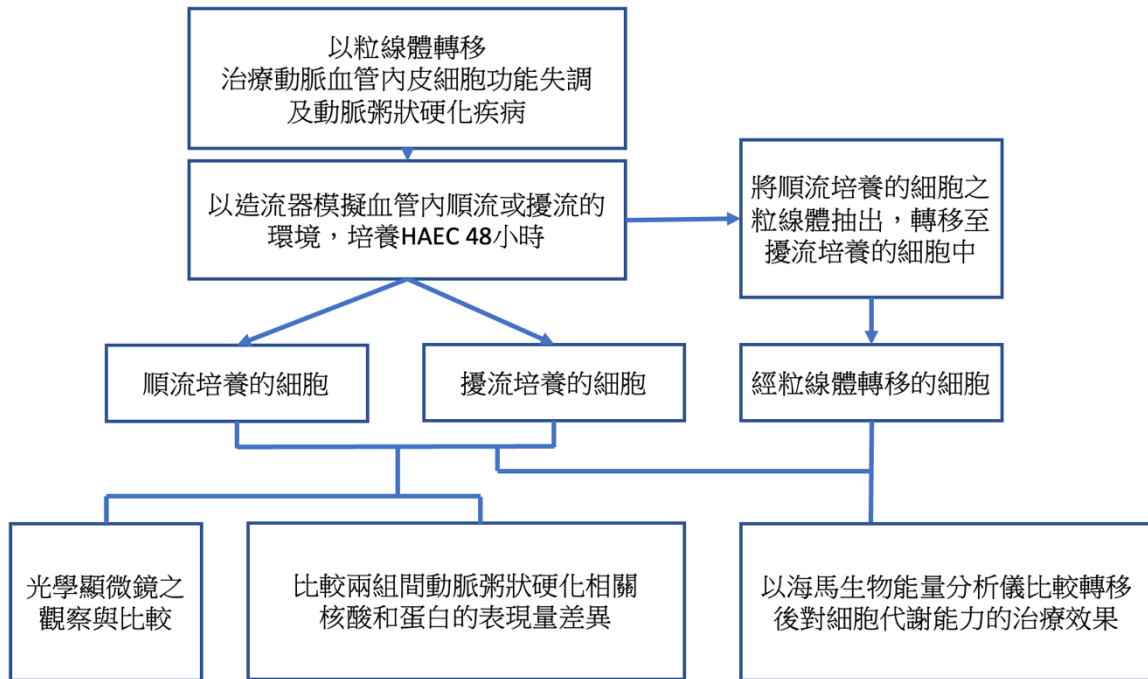
七、西方墨點法(Western Blotting)

(一) 試劑：Protease Inhibitor Cocktail(EDTA-Free)、BCA Protein Assay Kit、Protein Sample Dye、BSA (胎牛血清蛋白)、1.5M Tris-Cl (pH 8.8)、1M Tris-Cl (pH 6.8)、30% Acrylamide mix、10% SDS、TEMED、10% APS(ammonium persulfate)、95% EtOH、100% 甲醇(MeOH)、Running Buffer、Transfer buffer、一級抗體、二級抗體、ECL substrate solution、HRP(horseradish peroxidase)、TBST、Stripping buffer

(二) 儀器：ChemiDoc XRS+ System

參、研究過程與方法

一、研究架構圖



二、細胞培養

本研究使用的細胞材料為人類血管內皮細胞 Human Aortic Endothelial Cells (HAEC)。實驗室購買的 HAEC 為取自人類血管內皮組織的 primary cell，經過繼代培養後作為實驗材料。

三、細胞繼代

吸除舊的細胞培養液，以 PBS 清洗。加入 1.5ml trypsin，放入二氧化碳培養箱中五分鐘等待細胞懸浮。輕拍培養盤側邊使細胞完全懸浮後，加入 2.5 ml 培養液中中和 trypsin 並取出細胞懸浮液加入離心管中，離心(1000rpm, 3min)。

四、造流機製造細胞培養環境

(一) 製備上機用培養液

1.6 g Dextran 葡聚糖粉末與 35ml 的 HAEC 細胞培養液均勻混合，vortex 至粉末散開。放在 4 度 C 冰箱隔夜。隔天將 HAEC 細胞培養液補滿，以小飛碟(filter)菌操作台裡過濾。

(二) 造流機參數設定 ((Dai et al., 2004; Yeh et al., 2022))

Unidirectional Flow (UF)		
Time (mSec)	Speed	Shear stress (dyn./cm ²)
0	2954	13.424
150	7481	34
251	4428	20.125
317	4229	19.221
400	3226	14.663
550	4507	20.485
720	3643	16.559
1000	2954	13.424

Disturbed Flow (DF)		
Time (mSec)	Speed	Shear stress (dyn./cm ²)
0	0	0
26	1042	4.738
46	0	0

97	-1760	-8
150	0	0
160	367	1.67
186	0	0
242	-616	-2.799
310	0	0
369	375	1.706
413	0	0
451	-330	-1.5
564	0	0
732	234	1.064
1000	0	0

(三) 細胞製備

將滿盤的 10 公分 plate 細胞分至四個 6 well dish，每盤皆只種一格。放置在 37°C 二氧化碳培養箱培養隔夜。上機前將培養液吸除，加入 5 ml 上機用培養液。

(四) 細胞上機

將轉柄 (cone) 及孔蓋在無菌操作台中以酒精充分消毒，並充分乾燥。轉柄組裝上機器，接著種細胞的那一格置於轉柄正下方，旋轉調鈕下降轉柄。轉柄接觸到細胞盤面後，調鈕刻

度往回 30 格。蓋上特製的 6 well dish 上蓋，將整個機器放進 37°C 二氧化碳培養箱中，培養 48 小時。

(五) 收機

培養 48 小時後，旋轉調鈕升起轉柄，將細胞換回原來的蓋子，放入 37°C 培養箱中預備。

五、反轉錄聚合酶連鎖反應(Reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)

(一) RNA 萃取

將分別以順流與擾流處理完的細胞，吸掉培養基溶液並以 PBS 清洗，加入 800 μ L TRIzol Reagent 將細胞溶解，吸取溶解液至 15 μ l tube 後，加入 160 μ l chloroform 混合均勻，以 4°C、14000 rpm 離心 15 分鐘。離心後，下層為蛋白質，上層為 RNA，吸取上層 RNA 加入等體積 isopropanol 混合均勻，以 4°C、14000rpm 離心 15 分鐘，去除上清液並加入 75%乙醇洗滌，再以 4°C、14000 rpm 離心 10 分鐘，離心後將酒精倒掉，並將殘留液體風乾，依 RNA 多寡加入適當體積之無酶無菌水 (RNase free H₂O)，以分光光度計測波長 260nm/280nm 之吸光值，用以定量 RNA 濃度及純度。

(二) RNA 反轉錄 (Reverse transcription) 成 complimentary DNA (cDNA)

將萃取的 RNA 取出 500ng，加入 2 μ l 5X Reaction Mix、1 μ l Maxima Enzyme Mix，再加入無酶無菌水使其總體積為 10 μ l，置於 T100 Thermal Cycler 中，於 25°C 作用 10 分鐘，再於 50°C 作用 30 分鐘 (DNA polymerization)，於 85°C 作用 5 分鐘 (enzyme deactivation)，最後於 12°C 降溫，此時得到由 mRNA 反轉錄出之 cDNA。

六、定量即時聚合酶連鎖反應 (Quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)

取 $2\ \mu\text{l}$ cDNA、 $5\ \mu\text{l}$ SYBR Green Master Mix (2 X)、 $1\ \mu\text{l}$ RNase free H₂O 與各式基因之 forward and reverse primer 各 $1\ \mu\text{l}$ 均勻混合。置於 Real-Time PCR System 進行 qPCR。藉由分析 Cycle threshold (Ct)，以 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 方式求得基因表現差異。

七、西方墨點法 (Western blotting)

(一)蛋白質萃取與染色

細胞中加入裂解液(detergent)破壞細胞膜，並一同加入蛋白抑制劑，收集蛋白質。再透過離心去掉細胞碎片(12000 g, 10 min)。使用 4x Protein Sample Dye，以 95°C 處理五分鐘，冷卻後儲存於-20°C。

(二)配膠

上膠：分別依比例加入 H₂O、30% acrylamide mix、Tris-Cl(1.0 M, pH 6.8)、SDS(10%)、ammonium persulfate(10%)，最後加入 TEMED。

10%下膠：分別依比例加入 H₂O、30% acrylamide mix、Tris-Cl(1.5 M, pH 8.8)、SDS(10%)、ammonium persulfate(10%)，最後加入 TEMED。

將下膠加到整體約 2/3，以 75%酒精壓平表面，待凝固後倒入上膠並插入齒梳待膠完全凝固。

(三)跑膠(running)

60~90 V 進行聚集(20~40 min)，調高電壓到 100~140 V 分離不同大小的蛋白質(60~120 min)。

(四)轉印(transfer)

PVDF(polyvinylidene-Fluoride)先以 transfer buffer(內含甲醇)活化表面正電基團，以 130 V 跑 90 min。

(五)封閉(blocking)

配製 5% BSA/TBST 加入後放在室溫 1 小時，封閉膜上蛋白質以外的空白區域，避免背景值增加。

(六)一級抗體反應(primary antibody incubation)

加入一級抗體偵測目標蛋白質，放於 4°C 隔夜。以 TBST 洗滌四次。

(七)二級抗體反應(secondary antibody incubation)

使用 TBST 配製適當濃度之二抗，室溫反應 1 小時。以 TBST 清洗四次。

(八)照相

於膜上加入 ECL-HRP 使蛋白質呈色，並照相。

(九)轉印膜抗體剝離再生(stripping)

若要重複使用此膜看其他蛋白質，加入 stripping buffer 透過強酸和高鹽破壞抗體和抗原之間的交互作用，約 5~10 分鐘，即可再次一級抗體反應。

八、粒線體膜電位測定劑 JC-1

以 2ml PBS 清洗細胞兩次，加入 JC-1 染劑(10ug/ml)，置於 37°C 培養箱 10 分鐘。更換為乾淨的培養液後於螢光顯微鏡觀察與照相。以 ImageJ 分析紅色與綠色分別所佔的面積。

九、粒線體的分離與轉移

(一) 粒線體的分離

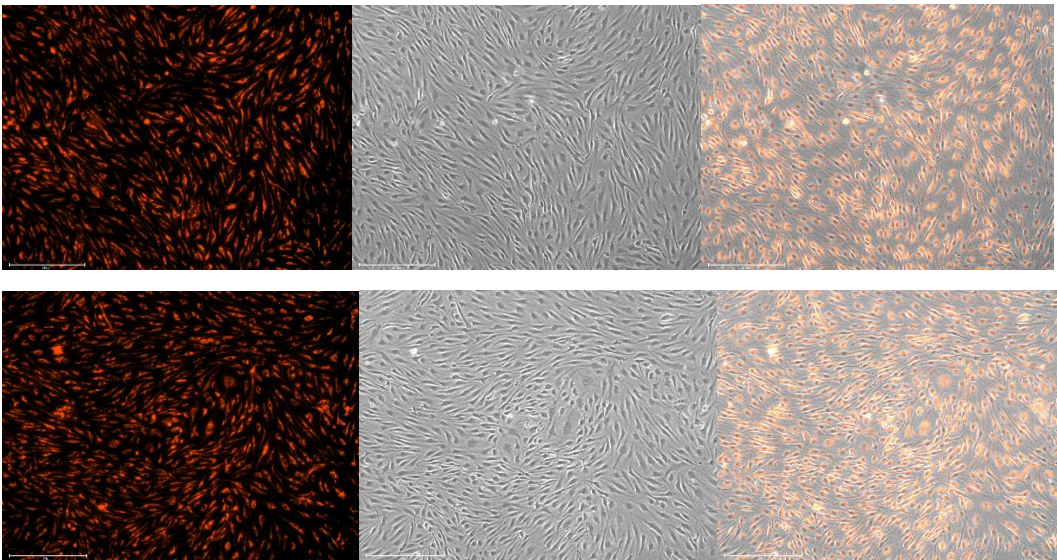
吸除舊細胞培養液，以 PBS 清洗三次(1ml, 0.5ml, 0.5ml)，並在第一次加入 PBS 時靜置五分鐘。加入 1ml trypsin，放入二氧化碳培養箱中五分鐘等待細胞懸浮。輕拍培養盤側邊使細胞

完全懸浮後，加入 1.5 ml 培養液中和 trypsin 並取出細胞懸浮液加入離心管中，離心(1000rpm, 3min)。

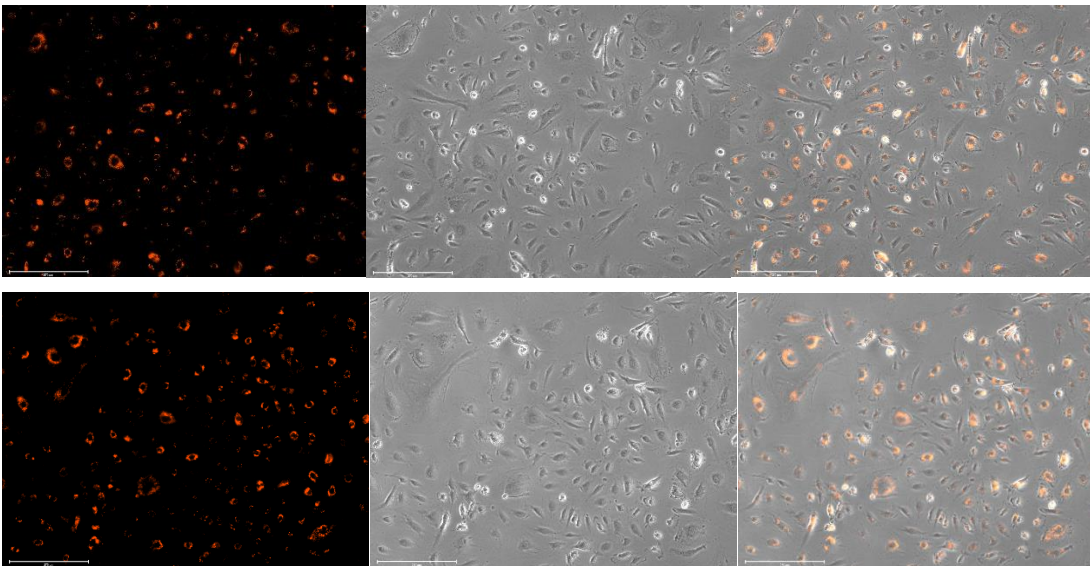
吸除離心管之上清液，並加入 Mitochondria Isolation Kit for Mammalian Cells (Thermo Scientific) 的 Reagent A 800 ul，置於冰上 2min，加入 Reagent B，置於冰上並每分鐘 vortex。加入 Reagent C 800 ul 後，離心（700g, 10 min, 4°C），取其上清液並再次離心（12000g, 15 min, 4°C）。取其沈澱物，並以 500 ul Reagent C 清洗。最後再離心（12000g, 5 min, 4°C）並將上清液乾淨。

（二）粒線體的轉移

以 500 ul 培養液回溶粒線體 pellet，混合均勻再加入擾流細胞的培養盤中。最後，一格 6 well plate 以培養液補至 2.5ml。離心兩次（1500g, 15 min, 4°C），間隔兩個小時後，再次離心（1500g, 15 min, 4°C）。



圖六、將粒線體染紅螢光，並將染色螢光圖與可見光細胞圖疊合，得到最左邊的圖，確認粒線體分布於細胞內。



圖七、粒線體轉移後，以顯微鏡觀察送入粒線體的擾流細胞，疊合粒線體紅螢光圖與可見光細胞圖，確認粒線體順利送入擾流細胞。

十、生物能量分析儀

(一) 活化探針

生物能量分析儀專用的 24well 細胞培養盤共有三層結構。上機前一天，先在 24well 細胞培養盤加入 1ml 校正液，其上放置粉紅色的 Hydro Booster，再放上螢光探針。保持避光並放在 37°C，無二氧化碳的環境隔夜。

(二) 種細胞

上機當天，除了四格只加入培養液的背景校正外，在每一格裝入 4×10^4 個細胞，一格的體積共是 200 μ l。放回培養箱等待四個小時，使細胞貼附底部。在上機前一小時更換成上機用的培養基，並培養於 37°C 無氧環境。

(三) 注藥槽的藥物製備

以培養基分別稀釋 Oligomycin (1mM)、FCCP (1mM)、Antimycin A (0.5mM) 並加入 24well 細胞培養盤最上層的藥物注入槽內。最後在放入機器前移除粉紅色的 Hydro Booster。

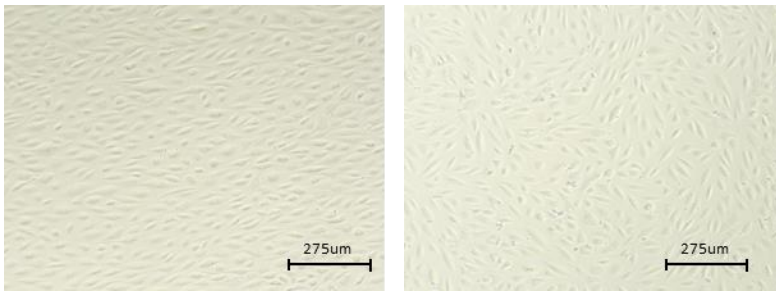
肆、研究結果

一、比較順流處理的細胞與擾流處理的細胞的差異

(一) 以共軛焦顯微鏡觀察內皮細胞外觀

透過觀察細胞的外部形態，可得知細胞大致狀態與健康情形，因此我們首先利用共軛焦顯微鏡觀察血管內皮細胞的排列與外部形態。

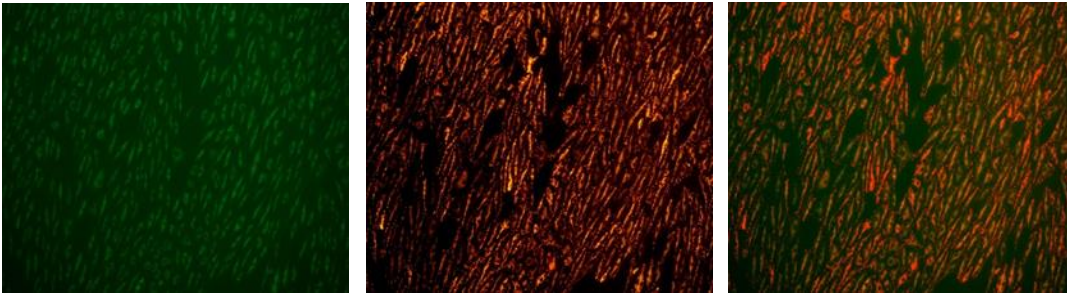
在顯微鏡下可以發現，經過順流處理的血管內皮細胞順著順流方向排列整齊、細胞完整。相較之下，經過擾流處理的血管內皮細胞排列雜亂且有些細胞破碎，甚至看到一些小泡沫，暗示其正在細胞凋亡。



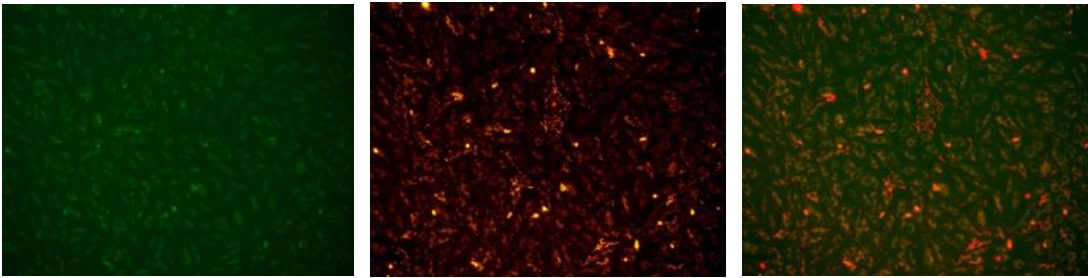
圖八、HAEC cells exposed to laminar flow (left panel) / disturbed flow (right panel) for 24 hours (10X magnification)

(二) 以 JC-1 染劑偵測粒線體的膜電位

我們分別將細胞以 cone flow device 的順流或擾流環境培養 24 小時，藉由 JC-1 染劑螢光圖的紅色/綠色面積比值，證明培養於順流環境下的內皮細胞，其粒線體的膜電位健康程度較培養相同時間的擾流環境內皮細胞為佳。



HAEC treated in unidirectional flow for 24 hrs , stained with JC-1 (10×)



HAEC treated in disturbed flow for 24 hrs , stained with JC-1 (10×)

圖九、將經過順流或逆流處理的血管內皮細胞染 JC-1 染劑後，分別在紅光、綠光下拍攝螢光照片。JC-1 染劑可以使具正常膜電位差之健康的粒線體發紅光；若發綠光，代表粒線體膜電位差變小，是細胞凋亡的前兆(Brand & Nicholls, 2011)。如圖，經順流處理的血管內皮細胞的健康粒線體比例顯著較經擾流處理血管內皮細胞高。

二、比較基因的 qPCR 表現量與西方墨點法蛋白表現量

先前動脈粥狀硬化相關研究中，發現許多分子參與調控細胞內動脈粥狀硬化系列變化的促動脈粥狀硬化機轉，或是保護細胞免於發生動脈粥狀硬化。其中，我們感興趣的分子包括轉錄因子(KLF2, KLF4) 、有調節功能的大分子 (Sirtuin-1) 、酶 (eNOS, NOX4) 、發炎因子 (ICAM-1, VCAM-1) 等。我們以 qPCR 技術偵測細胞內 mRNA 量，分別估算基因表現量，進一步推論該基因在順流細胞、擾流細胞的相對表現量是否符合我們的預期。

KLF2 為轉錄因子，可控制細胞屏障 (cellular barrier) 的功能，並發現會被發炎因子 (inflammatory cytokine) interleukin-1 β 抑制。

KLF4 和 KLF2 為同一家族的轉錄因子，其廣泛調控血管內皮細胞的基因表現。調控的相關功能包括：血管反應活性（vasoreactivity）、血管的穿透性（permeability）、免疫細胞在血管上的附著（immune cell adhesion）以及血栓（thrombosis）。

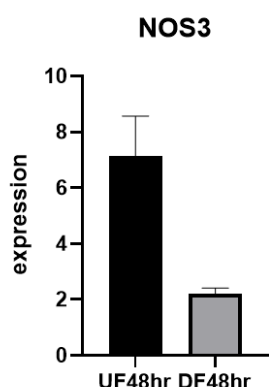
我們的實驗數據顯示，DF 處理 48 小時後 KLF2 的基因表現相對 UF 下降。因此，我們推論 DF 使內皮細胞釋放發炎因子，抑制 KLF2 和 KLF4 表現。

Sirtuin-1 透過調節各種蛋白質和分子(如 eNOS)，保護血管(Man, Li, & Xia, 2019)。透過防止內皮細胞衰老(endothelial senescence)、促進血管新生(endothelial angiogenesis)、增強依賴內皮的血管擴張(endothelium-dependent vasodilation)並抑制泡沫細胞(foam cell)形成，避免血管發炎。(Kubo, Rector, Bank, Williams, & Heifetz, 1991)

實驗數據顯示，DF 處理 48 小時後 Sirtuin-1 表現下降。因此我們推論 DF 會抑制對血管保護有重要功能的 Sirtuin-1。

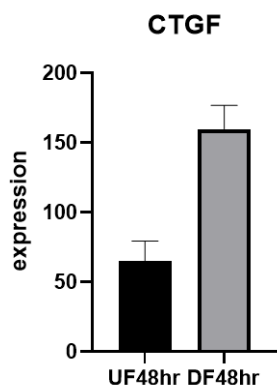
NOS3(eNOS)為一氧化氮合成酶，透過合成 NO、抑制 O₂-的合成，維持氧化壓力恆定。其合成的一氧化氮可維持內皮細胞功能、調節血管緊張性(vascular tone)、白血球黏附性(leukocyte adhesion)、平滑肌增生與血小板的凝集(platelet aggregation)，進而避免動脈粥狀硬化與保護血管。(Durand & Guttermann, 2013) (Forstermann, 2010)

我們的實驗數據顯示，DF 處理 48 小時後 NOS3 表現下降。因此我們推論 DF 會抑制調節內皮細胞平衡的 NOS3。



NOX4 被視為 NADPH 氧化酶的複合物和 oxygen sensor，可以保護血管免於發炎的壓力，因此推測在易引起細胞發炎的 DF 作用下，內皮細胞會增加其表現量。(Schurmann et al., 2015)

CTGF 又被稱為 CCN2，為結締組織生長因子(connective tissue growth factor)，CYGF 在調節血管內皮細胞功能與血管新生(angiogenesis)皆有重要的角色，且 in vitro 時，CTGF 的產量與表現會影響內皮細胞增殖(proliferation)和遷移(migration)。(Brigstock, 2002)



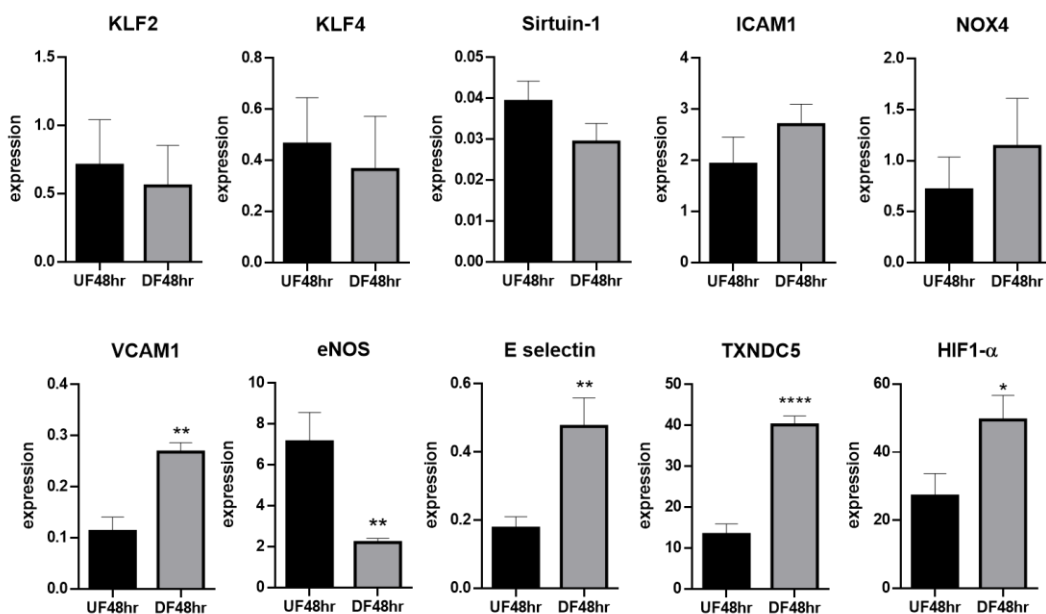
CYR61(cysteine-rich 61)為 CNN 家族的一員，作用與 CTGF 類似。其在血管內皮細胞的基因表現型，可調節內皮細胞中各種分子的動態平衡，並參與血管新生。

HIF1- α (hypoxia-inducible factor-1 α) 受到擾流誘導而表現。

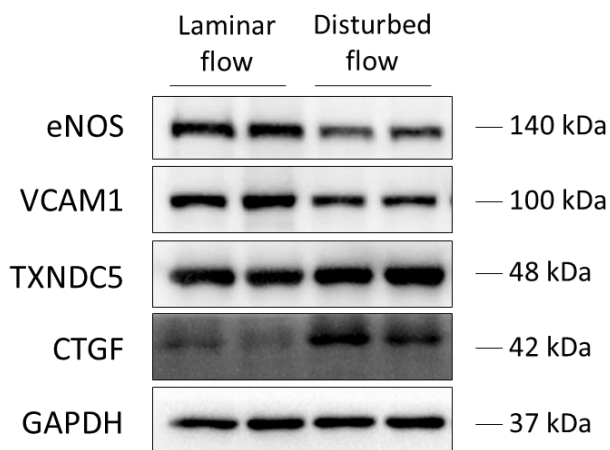
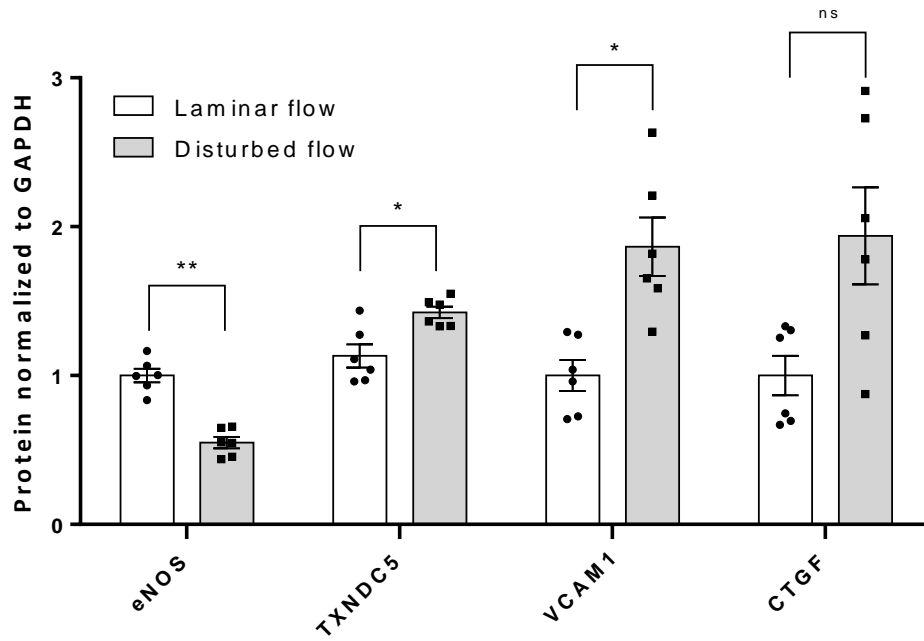
ICAM-1 與 VCAM-1 為發炎因子，會吸引發炎細胞黏到血管內皮細胞的表皮上。

E selectin 在 cytokine-stimulated endothelial cells 中被發現，藉由調節細胞在血管內壁排列的附著性，在發炎位置聚集白血球。

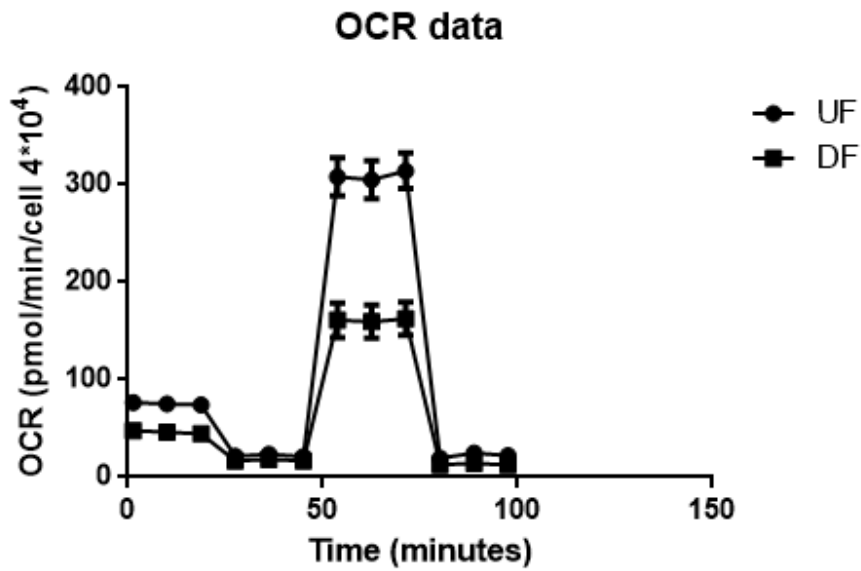
Selectin 家族為細胞黏附分子(cell adhesion molecules)，而細胞黏附分子參與白血球與內皮細胞的交互作用，並發現與動脈粥狀硬化的發生有關。



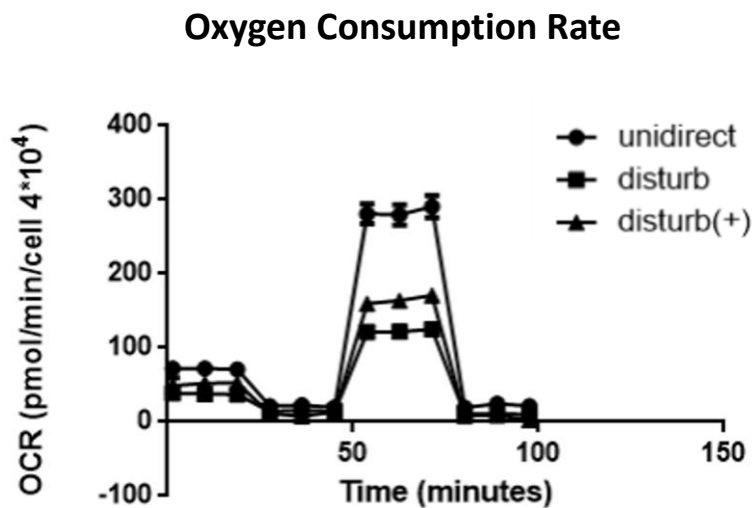
下圖顯示以西方墨點法定量轉譯之蛋白表現量（eNOS、TXNDC5、VCAM1、CTGF），發現與前述基因 qPCR 結果類似，順流組 eNOS 表現量高，擾流組 TXNDC5、VCAM1、CTGF 表現量高。



三、以能量角度探討粒線體轉移對於擾流細胞的治療效果



在圖表中，0~20 分鐘評估粒線體在基礎狀態的耗氧效率，60~80 分鐘評估粒線體的極限運作效率。經順流(UF)處理血管內皮細胞粒線體的基礎耗氧效率與極限運作效率皆較經擾流(DF)處理血管內皮細胞粒線體為高。



上圖顯示經粒線體轉移後的擾流組細胞 (DF, disturb(+)) 之基礎耗氧效率與極限運作效率，相較於擾流組細胞，均獲得改善。但是仍未達順流組細胞之水準。

伍、討論

本研究證明透過 cone flow device 的擾流模式，可以誘導 HAEC 表現 pro-atherogenesis 的基因表徵。當內皮細胞暴露在動脈粥狀硬化的風險因子下時，內皮細胞內的過氧化物 (ROS) 產量會增加，進而活化促血栓 (prothrombotic) 和促發炎 (proinflammatory) 的訊息路徑，使細胞內的脂質、蛋白和核酸更容易被氧化，進而導致內皮細胞失調 (endothelial dysfunction)。當細胞內ROS氧化壓力增加，一氧化氮將更容易與過氧化物結合。一方面，消耗一氧化氮將減弱一氧化氮本身對內皮細胞的保護效果，並增加細胞面對的氧化壓力；另一方面，前述反應的過氧硝酸根 (peroxynitrite) 將間接使一氧化氮合成酶 (eNOS) 解偶聯，失去功能。這將使ROS氧化壓力愈發增加，惡性循環。

本實驗中，調控一氧化氮表現的 sirtuin-1 和 eNOS在 DF 組表現量較低，代表一氧化氮在DF組中表現量較低；調控細胞內ROS氧化壓力的TXNDC5 和 NOX4 表現量較高，代表DF組細胞內的ROS氧化壓力較大。實驗結果符合理論，故可知相較於UF處理，DF處理誘發細胞表現趨向 endothelial dysfunction 的狀態。未來可能可以藉由偵測內皮細胞內的一氧化氮濃度，來進一步證實擾流對細胞內一氧化氮的影響。

VCAM-1 和 ICAM-1 是內皮細胞膜上的分子，可以被免疫細胞上的接合蛋白辨識，調控免疫細胞對內皮細胞的附著 (attachment) 或鑽入 (invasion)；KLF4則能夠保護內皮細胞免於被免疫細胞黏附。這三種分子與endothelial dysfunction 病程後續的動脈粥狀斑塊形成有關，因此可以作為pro-atherogenic effects 的指標。實驗中VCAM-1 和 ICAM-1在DF組細胞表現量較高，KLF4在DF組表現量較低，故可以說明內皮細胞受擾流誘導而出現 pro-atherogenic effects。

文獻指出，內皮細胞依賴醣解作用作為能量來源，因此調控醣解酵素的基因對內皮細胞的能量代謝有極大的影響力。HIF 家族受擾流造成的低剪應力誘導而表現，負責調控細胞內醣解酵素的產生；而 KLF2 則是受順流伴隨的高剪應力而活化，負責抑制細胞內醣解酵素，以及抑制葡萄糖的吸收 (uptake)。實驗中 HIF1- α 在 DF 組表現量較高，而 KLF2 在 DF 組表現量較低，符合理論預期，因此可證明擾流對內皮細胞確實會造成刺激。

本研究證明以順流細胞的粒線體轉移入擾流處理的血管內皮細胞中，可以透過代謝重組，使細胞的有氧呼吸效率優於未轉移的擾流細胞。然而，轉移後的細胞之有氧呼吸效率仍舊低

於順流細胞的有氧呼吸效率。可能是因為粒線體轉移效率不理想、轉移粒線體個數的不足、轉移到測試的反應時間不足，粒線體尚未對細胞造成較大的影響；也可能是在粒線體轉移的過程中，實驗操作步驟會對原本健康的粒線體造成損傷等等，這些因素有待未來進一步實驗來釐清。

本實驗的特殊之處是粒線體的來源。許多已發表的粒線體轉移動物實驗乃是從粒線體密度很高的後腿肌肉組織來分離粒線體，做為不同種類的組織之間的粒線體轉移。而本實驗是從內皮細胞的粒線體轉移到內皮細胞中，屬於相同種類組織之間的粒線體轉移。除此之外，我們的粒線體是取自體外培養的細胞，因此在理想情況下，可能不受粒線體供應量的限制。

但本研究仍有所侷限。第一，本研究的粒線體轉移效率尚無法定量，目前只透過螢光顯色的多寡來判斷成功轉移的粒線體有多少。第二，礙於實驗中粒線體轉移是以一格細胞（約9平方公分）為單位，在整格細胞一同離心的情況下，無法控制每一格內，不同區域的細胞接收到的粒線體量是否均勻。第三，本實驗以順流處理的細胞作為粒線體供應來源，因此，粒線體的來源量會受到cone flow device 的機器數量限制，並無法無限增加來源量，來彌補轉移效率不彰的問題。第四，實驗中以化學試劑分離粒線體的過程，以及透過離心將粒線體送入細胞的過程，都有可能對粒線體本身和接受粒線體的細胞造成傷害。

未來的研究目標是，我們將在穩定粒線體轉移的效率後，比較擾流細胞與接受轉移的細胞的 pro-atherogenesis RNA 表現量，以及進一步探討粒線體轉移後，對於細胞內分子調控機制的影響。

陸、結論

(一)比較順流或擾流處理下的人類血管內皮細胞的細胞形態和粒線體膜電位，證明順流處理的細胞健康狀態較佳。

(二) 抗動脈粥狀硬化的基因與蛋白表現量 KLF2、KLF4、Sirtuin-1、eNOS、NOX4 在擾流細胞中，表現量較低。促動脈粥狀硬化的基因與蛋白表現量 CTGF、HIF1- α 、ICAM-1、VCAM-

1、與 TXNDC-5 在擾流細胞中，表現量較高。故證明 cone flow device 的擾流處理可以誘發細胞產生促動脈粥狀硬化效應。

(三) 粒線體轉移後，細胞的有氧呼吸效率較轉移前的組別更高，故證明粒線體轉移可以改善細胞的有氧呼吸效率。

柒、參考文獻

- Brand, M. D., & Nicholls, D. G. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J*, 435(2), 297-312. doi:10.1042/BJ20110162
- Brigstock, D. R. (2002). Regulation of angiogenesis and endothelial cell function by connective tissue growth factor (CTGF) and cysteine-rich 61 (CYR61). *Angiogenesis*, 5(3), 153-165. doi:10.1023/a:1023823803510
- Chiu, J. J., & Chien, S. (2011). Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev*, 91(1), 327-387. doi:10.1152/physrev.00047.2009
- Dai, G., Kaazempur-Mofrad, M. R., Natarajan, S., Zhang, Y., Vaughn, S., Blackman, B. R., . . . Gimbrone, M. A., Jr. (2004). Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(41), 14871-14876. doi:10.1073/pnas.0406073101
- Durand, M. J., & Gutterman, D. D. (2013). Diversity in mechanisms of endothelium-dependent vasodilation in health and disease. *Microcirculation*, 20(3), 239-247. doi:10.1111/micc.12040
- Estlack LE, Roth CC, Cerna CZ, Wilmlink GJ, Ibey BL. Investigation of a direct effect of nanosecond pulse electric fields on Mitochondria. SPIE Proceedings 2014;8941:295-303.
- Forstermann, U. (2010). Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch*, 459(6), 923-939. doi:10.1007/s00424-010-0808-2
- Haroon, S., & Vermulst, M. (2019). Oxygen Consumption Measurements in *Caenorhabditis elegans* Using the Seahorse XF24. *Bio Protoc*, 9(13), e3288. doi:10.21769/BioProtoc.3288
- Jiang, M., Ding, H., Huang, Y., & Wang, L. (2022). Shear Stress and Metabolic Disorders-Two Sides of the Same Plaque. *Antioxid Redox Signal*, 37(10-12), 820-841. doi:10.1089/ars.2021.0126
- Kubo, S. H., Rector, T. S., Bank, A. J., Williams, R. E., & Heifetz, S. M. (1991). Endothelium-dependent vasodilation is attenuated in patients with heart failure. *Circulation*, 84(4), 1589-1596. doi:10.1161/01.cir.84.4.1589
- Liu, D., Gao, Y., Liu, J., Huang, Y., Yin, J., Feng, Y., . . . Gao, J. (2021). Intercellular mitochondrial transfer as a means of tissue revitalization. *Signal Transduct Target Ther*, 6(1), 65. doi:10.1038/s41392-020-00440-z
- Man, A. W. C., Li, H., & Xia, N. (2019). The Role of Sirtuin1 in Regulating Endothelial Function, Arterial Remodeling and Vascular Aging. *Front Physiol*, 10, 1173. doi:10.3389/fphys.2019.01173

- Schurmann, C., Rezende, F., Kruse, C., Yasar, Y., Lowe, O., Fork, C., . . . Schroder, K. (2015). The NADPH oxidase Nox4 has anti-atherosclerotic functions. *Eur Heart J*, *36*(48), 3447-3456. doi:10.1093/eurheartj/ehv460
- Sivandzade, F., Bhalerao, A., & Cucullo, L. (2019). Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. *Bio Protoc*, *9*(1). doi:10.21769/BioProtoc.3128
- Torralba, D., Baixauli, F., & Sanchez-Madrid, F. (2016). Mitochondria Know No Boundaries: Mechanisms and Functions of Intercellular Mitochondrial Transfer. *Front Cell Dev Biol*, *4*, 107. doi:10.3389/fcell.2016.00107
- Wu, C., Huang, R. T., Kuo, C. H., Kumar, S., Kim, C. W., Lin, Y. C., . . . Fang, Y. (2015). Mechanosensitive PPAP2B Regulates Endothelial Responses to Atherorelevant Hemodynamic Forces. *Circ Res*, *117*(4), e41-e53. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.306457
- Wu, D., Huang, R. T., Hamanaka, R. B., Krause, M., Oh, M. J., Kuo, C. H., . . . Mutlu, G. M. (2017). HIF-1alpha is required for disturbed flow-induced metabolic reprogramming in human and porcine vascular endothelium. *Elife*, *6*. doi:10.7554/eLife.25217
- Wu, D., Ji, H., Du, W., Ren, L., & Qian, G. (2022). Mitophagy alleviates ischemia/reperfusion-induced microvascular damage through improving mitochondrial quality control. *Bioengineered*, *13*(2), 3596-3607. doi:10.1080/21655979.2022.2027065
- Yeh, C. F., Cheng, S. H., Lin, Y. S., Shentu, T. P., Huang, R. T., Zhu, J., . . . Yang, K. C. (2022). Targeting mechanosensitive endothelial TXNDC5 to stabilize eNOS and reduce atherosclerosis in vivo. *Sci Adv*, *8*(3), eabl8096. doi:10.1126/sciadv.abl8096
- Zhou, H., Wang, J., Zhu, P., Zhu, H., Toan, S., Hu, S., . . . Chen, Y. (2018). NR4A1 aggravates the cardiac microvascular ischemia reperfusion injury through suppressing FUNDC1-mediated mitophagy and promoting Mff-required mitochondrial fission by CK2alpha. *Basic Res Cardiol*, *113*(4), 23. doi:10.1007/s00395-018-0682-1

【評語】 090008

優點：內容有趣且有清楚了解致病機轉，因此在實驗設計上看
得出巧思/ 缺點：在應用層面上仍須考量，因為對於 atherosclerosis
的成因來說，血液是流動的，要如何使血管內皮細胞獲得這些功能
良好的粒線體是有難度的。

建議有統計結果的圖需要加上 p value/ 圖片標號 可能需要
確認粒線體是否有成功進入內皮細胞才有功能，又或是因為物理性
分離的粒線體分泌的抗發炎物質而造成這樣的結果。