

脂質對誘導分化的P19細胞存活率與突觸生長的影響

邱亭維^{a, #}, 黃焜璋^b, 李香君^{c, *}

- a. 高雄醫學大學醫學院醫學系
- b. 高雄醫學大學醫學院生理學科
- c. 高雄醫學大學醫學院醫學系內科學科

Introduction

我們設計的實驗一共需時8天，前四天用於將P19 cell分化為神經細胞，在medium中加入retinoic acid (RA)，並放入incubator，隔兩天換一次medium。分化完成後以poly-L-lysine將P19 cell固定在96-well plate，並在實驗第六天加入脂質和AraC，脂質濃度分別為25 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL。第八天，透過MTT assay測量吸光值，並比較不同濃度條件和control的差異。脂質為purified very-low-density lipoprotein (VLDL)、Lysophosphatidylcholine (LPC)，文獻報告對中樞神經的髓鞘促進巨噬細胞破壞與Lysophosphatidylethanolamine (LPE，可加強中樞神經的生長)。觀察重點在於，不同濃度條件下VLDL、LPC以及AraC分別對P19 cell存活與分化(突觸生長)所產生的影響。

Materials & Methods

細胞的受損我們以細胞存活率及吸光值來表示，實驗用分化後的P19 cell當作model觀察不同脂質各濃度對於細胞的影響。脂質對神經細胞損傷的相關性不盡相同，我們以純化脂質(LPC、LPE)對神經細胞存活率的影響當作研究主題，並和純化程度較低的脂質(VLDL)作對比。Lysophosphatidylcholine會造成中樞神經的髓鞘被巨噬細胞破壞，正常生理情況下有lysophospholipase和LPC-acyltransferase酵素快速分解以控制細胞內的Lysophosphatidylcholine濃度；lysophosphatidylethanolamine可以加強中樞神經的生長，並保護神經元。

此計畫中，我們設計兩種純化脂質(LPC、LPE)及VLDL在固定的細胞數量下參與實驗，並比較各自和AraC一起作用的結果，找出最容易影響P19 cell存活率的脂質，其對應濃度以及AraC使用與否、AraC加入時機的影響。實驗所需的細胞來源為P19 cell繼代，吸光值的測定依靠MTT assay。

Process of cell culture & differentiation

細胞繼代：
P19 cell以medium (PH = 7.4, 25 mM NaHCO₃, 10% FBS) 培養，放於37°C, 5% CO₂條件下的incubator。細胞分裂至九分滿時(大約種細胞的兩天之後)，更換培養液。繼代時，將培養皿的P19 cell medium吸取並丟棄，以1 mL DPBS清洗；吸掉DPBS後加入1 mL 0.05% trypsin-EDTA放在incubator中2 minutes；待trypsin作用完全，將培養皿從incubator拿出，加入5 mL medium和P19 cell均勻混合；將trypsin、medium和P19 cell的混合液加入15 mL tube，300 xg離心5 minutes；吸掉上清液，加入新的medium，和沉澱的P19 cell均勻混合，取大約400,000顆P19 cell種到加入5 mL medium的6 cm Petri dish中，並放入incubator中。

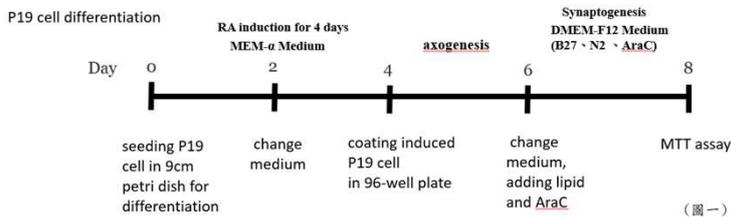
細胞分化(第0天)：
準備一個分化用的9 cm Petri dish，加入8 mL medium和1.6 μL retinoic acid (RA)到其中。RA的濃度為10 mM，用以幫助P19 cell分化為神經細胞；所使用的9 cm Petri dish能夠使P19 cell不貼壁。計數後將800,000顆P19 cell種到9 cm Petri dish中，並放入37°C, 5% CO₂條件下的incubator中。

細胞分化(第2天)：
分化條件和第0天相同，重覆上述步驟，但Petri dish重複利用。

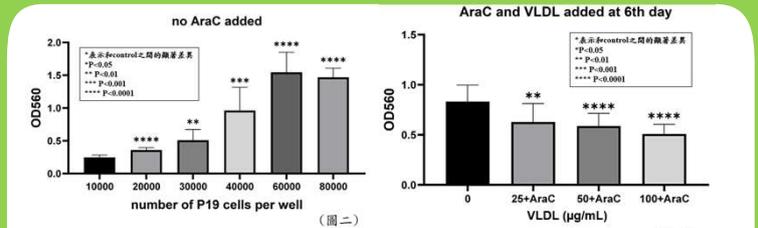
分化完成，固定在盤底(第4天)：
準備96-well plate，在選中的格子中加入50 μL的poly-L-lysine，用以將細胞固定在盤底。加入poly-L-lysine後至少放於室溫之下30 minutes。將分化4天的細胞從incubator中拿出，用dropper把P19 cell吸到15 mL tube當中，以300 xg離心5 minutes。吸掉上清液並加入1 mL的trypsin-EDTA，置於37°C的水浴槽，大約5 minutes後能觀察到細胞聚集在一起、懸浮於medium中，加入5 mL的medium，以300 xg離心5 minutes，並吸掉上清液。用微量吸管將96-well plate盤底的poly-L-lysine移除，每一格加入100 μL的nurite medium。最後取每一格50,000顆的數量加到細胞盤中，放入incubator中兩天。

加入脂質(第6天)：
實驗加入的lipid濃度分別為25 μg/mL, 50 μg/mL, 100 μg/mL；control為0 μg/mL，沒有加入任何lipid。AraC濃度為8 mg/mL，實驗中製備溶液的AraC濃度為8 μg/mL，因此每100 μL nurite medium和lipid混合的溶液要加入0.1 μL的AraC。抽掉舊有的nurite medium，加入上述製備的溶液，每個well加入100 μL，放入incubator中兩天。

檢測細胞加藥之後的存活率(第8天)：
實驗以MTT assay測量細胞的存活率，原理是MTT溶液存在tetrazolium salt，顏色為淡黃色，只有活細胞中存在的cofactor NADH/NADPH能夠使tetrazolium salt轉為紫色的formazan。以solubilizer溶解細胞，並用分光光度計測量吸光值。將細胞盤從incubator拿出，吸掉舊有的nurite medium，各加入15 μL MTT和80 μL nurite medium，放回incubator等待4 hours。在incubator放4 hours後，每個well加入100 μL的solubilizer，於室溫下放1 hour，並將溶液搖勻，之後以分光光度計測量吸光值。

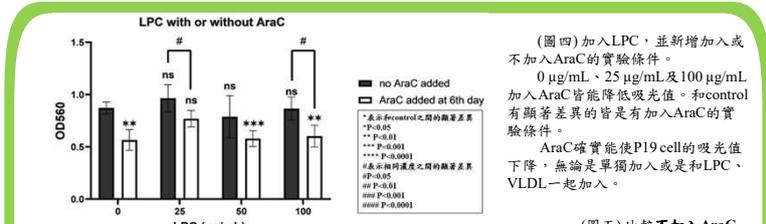


Result

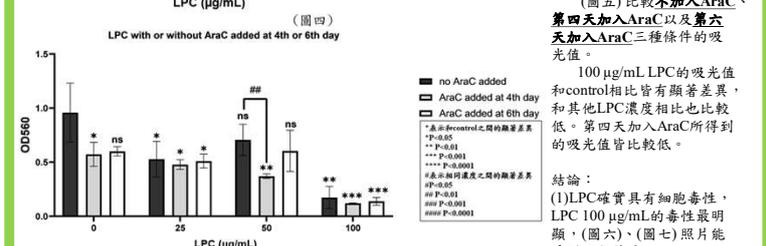


(圖二) 不加入VLDL和AraC，在well中加入不同數量的P19 cell，以確認不同數量的P19 cell是否能夠做出濃度梯度，其中40,000顆和60,000顆的差距最明顯，但超過60,000顆後趨勢又顯得平緩。推測可能跟每個well空間的大小有關，細胞數量增加到一定量後就佔滿整個空間，因此看不出趨勢。之後的實驗以50,000顆P19 cell當作protocol。

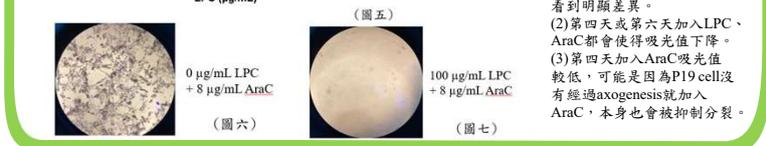
確認50,000顆P19 cell可以做出趨勢後，(圖三)加入VLDL和AraC。各濃度的VLDL加入AraC，與control有顯著差異；control沒有加入VLDL和AraC，且吸光值最高。根據結果，VLDL + AraC的組合具有細胞毒性，但AraC和VLDL個別效果需要再透過實驗確定。



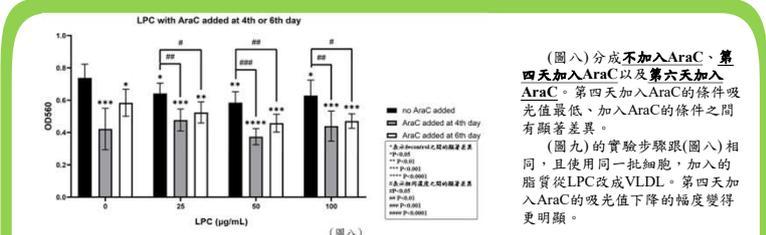
(圖四) 加入LPC，並新增加入或不加入AraC的實驗條件。0 μg/mL、25 μg/mL及100 μg/mL加入AraC皆能降低吸光值。和control有顯著差異的皆是有加入AraC的實驗條件。AraC確實能使P19 cell的吸光值下降，無論是單獨加入或是和LPC、VLDL一起加入。



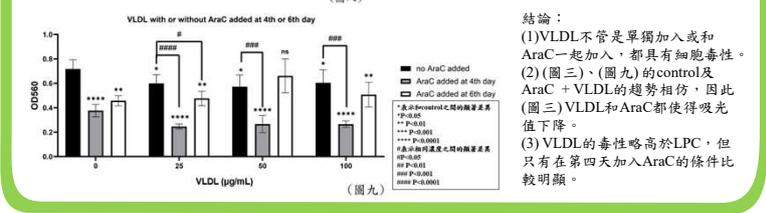
(圖五) 比較不加入AraC、第四天加入AraC以及第六天加入AraC三種條件的吸光值。100 μg/mL LPC的吸光值和control相比皆有顯著差異，和其他LPC濃度相比也比較低。第四天加入AraC所得到的吸光值皆比較低。



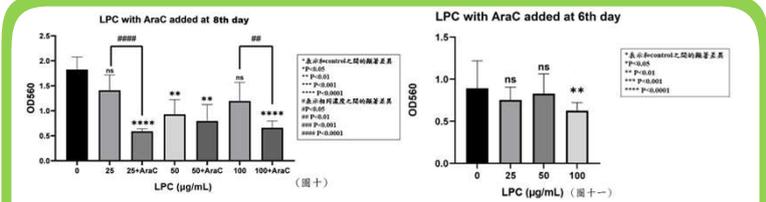
結論：
(1) LPC確實具有細胞毒性，LPC 100 μg/mL的毒性最明顯。(圖六、圖七)照片能看出明顯差異。
(2) 第四天或第六天加入LPC、AraC都會使得吸光值下降。
(3) 第四天加入AraC吸光值較低，可能是因為P19 cell沒有經過axogenesis就加入AraC，本身也會被抑制分裂。



(圖八) 分成不加入AraC、第四天加入AraC以及第六天加入AraC。第四天加入AraC的條件吸光值最低，加入AraC的條件之間有顯著差異。(圖九)的實驗步驟跟(圖八)相同，且使用同一批細胞，加入的脂質從LPC改成VLDL。第四天加入AraC的吸光值下降的幅度變得明顯。



結論：
(1) VLDL不管是單獨加入或和AraC一起加入，都具有細胞毒性。(圖三)、(圖九)的control及AraC + VLDL的趨勢相仿，因此(圖三)VLDL和AraC都使得吸光值下降。
(2) VLDL的毒性略高於LPC，但只有在第四天加入AraC的條件比較明顯。



(圖十) 加入LPC和AraC的時間點都改成第八天，並讓細胞多放兩天，在第十天才測吸光值。50 μg/mL LPC有沒有加入AraC之間並沒有顯著差異；25 μg/mL LPC和100 μg/mL LPC則有顯著差異。變化的趨勢和前面LPC在第四天或第六天加入AraC的實驗相比有不同，更加證明AraC加入的時機影響吸光值的變化。(圖十一)在P19 cell中加入LPC，以0 μg/mL LPC加入AraC當作control。結果顯示在都加入AraC的條件下，LPC只有100 μg/mL有顯著差異。這代表在都加入AraC的情況下，LPC的濃度需要較高才能看出差異。

Conclusion

不同數量的P19 cell能做出吸光值的差異；VLDL和LPC加入P19 cell都有細胞毒性，而AraC的加入也會使吸光值下降。脂質和AraC一起加入時效果會互相疊加，但不同時間點加入AraC、加入不同濃度的脂質都會影響最終結果。**第四天加入AraC**得到的吸光值相較於**第六天加入AraC**、**不加入AraC**比較低；吸光值隨脂質濃度上升而下降。

第八天加入AraC的實驗因為樣本數較少，且沒有和其他加入AraC的條件比較，因此對於吸光值的影響還無法跟**第四天加入AraC**、**第六天加入AraC**做詳細的對比。0 μg/mL的條件加入AraC，和其他濃度的脂質更不容易做出差異。