



國立台灣大學醫學院暨工學院醫學工程學研究所

碩士論文

Institute of Biomedical Engineering

College of Medicine and College of Engineering

National Taiwan University

Master Thesis

Hs68 與 HaCaT 懸浮共培養的形態分析

Morphology Analysis of Suspension co-culture of Hs68 &  
HaCaT Cells

趙志豪

Chao, Chih-Hao

指導教授：楊台鴻 博士

Advisor: Young, Tai-Horng, Ph.D.

中華民國 102 年 7 月

July, 2013

## 誌謝

感謝恩師 楊台鴻教授在這兩年的研究生活給予細心指導與教誨，並且於研究上所碰到的問題提供專業的想法，也感謝王至弘醫師、李玫樺教授口試時給予的教導及指證，讓論文的内容更趨完善。

感謝實驗室亦宸、阿信、泳沖學長和韶軒、壩子學姊在生活及實驗上的照應。感謝旭賢在實驗上不吝惜提供專業的意見讓我在實驗上能夠順利的進行。

感謝學長浩緯及學姊宛榛、亞璇，在實驗上及生活各方面的照應及幫助讓我還在懵懂的碩一時能夠快速且順利的步上軌道。

感謝同學靜雯、明宏在這兩年的陪伴與鼓勵，讓我在最煎熬的時刻能夠順利渡過。感謝哲寬、聖典、煒智學弟和芝維學妹，因為有你們在日常生活上的陪伴、鼓勵及相助，讓我的碩班生活增添了不少色彩。感謝所有曾經幫助過我的人，因為有你們的幫助才得以讓我實驗順利的進行。

最後在這邊也要感謝家人對我的包容、信任及支持，讓我在這兩年間能無後顧之憂安心的求學。



## 摘要



我們發展出一種共培養方法，主要是利用懸浮培養的方式進行共培養，有別於傳統作法，這種方式培養出的細胞會聚合成球，形成立體的構型，而比起其他類似的系統，譬如說懸滴培養法，或是水膠培養法，我們的方法更簡便，而且可以支持長時間的培養。

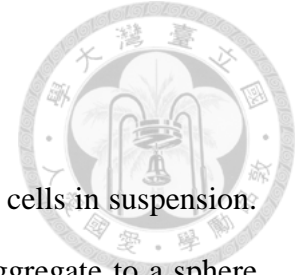
本研究採用的細胞是纖維母細胞與角質細胞的共培養，纖維母細胞使用的是 Hs68 細胞系，角質細胞使用的則是 HaCaT 細胞系。這兩株細胞系皆來自成年男性的包皮，並且也被證實此兩種細胞有交互作用發生。

由於 Hs68 和 HaCaT 有懸浮在幾丁聚醣塗佈的細胞培養盤上的特性，我們利用這點發展成一個懸浮共培養方法，在這個系統下，可以很簡單的利用曠時攝影的方式觀察細胞的聚集。本研究討論了 Hs68 和 HaCaT 於懸浮共培養下細胞的聚集模式，並利用了簡單的模擬去分析。目前在實際操作中的已經有了初步的效果。

而學理上，我們採用了鈣黏蛋白的不同去解釋我們模型的設計，所以，我們也做了有關細胞凝聚力的分析，用來支持我們的模型。

關鍵字：纖維母細胞、角質細胞、幾丁聚醣、共培養、模擬、鈣黏蛋白。

# Abstract



We developed a new co-culture method mainly in co-culturing cells in suspension. Unlike the traditional method, cells cultured by this method will aggregate to a sphere and form a 3D structure, which compared to other systems like the hanging drop method and the hydrogel method, our system is simple, easy and good in long term culture.

Our research used fibroblast and keratinocyte in co-culture, and we adopted Hs68 cell line from fibroblast and HaCaT cell line from keratinocyte. These cells are both from mature male foreskin, and the interaction existing between the two cells have been confirmed.

We used the shared characteristics of Hs68 and HaCaT, that both will suspend in chitosan coated plate, to perform a suspension co-culture method. In this system, we can easily observe how each cells aggregate in time-lapse photography. This paper also discussed the aggregation process in suspension co-culture system, which was analyzed by a simple simulation. We've got a first step results in hands-on practice at present.

Academically, we also adopted the theory about cadherin to explain our model design, thus we conducted some experiments in measuring cell-cell cohesion force to support our model.

Keywords: Fibroblast, Keratinocyte, chitosan, co-culture, simulation, cadherin.

# 目錄



摘要.....	i
Abstract .....	ii
目錄.....	iii
圖目錄.....	vi
第一章 序論.....	1
第二章 文獻回顧.....	2
2.1 共培養系統 (co-culture system) .....	2
2.1.1 trans-well method(構造如圖 2-1 所示).....	2
2.1.2 hydrogel method.....	2
2.1.3 hanging drop method.....	3
2.2 纖維母細胞與角質細胞 (Fibroblast & Keratinocyte) .....	3
2.2.1 纖維母細胞 (Fibroblast) .....	3
2.2.2 角質細胞 (Keratinocyte) .....	4
2.2.3 纖維母細胞與角質細胞共培養.....	4
2.3 細胞聚集因子 (Cell aggregation factor) .....	4
2.4 幾丁聚糖 (chitosan) .....	5
第三章 實驗材料與方法.....	6
3.1 實驗架構.....	6



3.2	實驗材料.....	7
3.3	儀器.....	9
3.4	試劑配製.....	14
3.5	實驗方法.....	16
3.5.1	細胞培養 (cell culture) 和繼代 (passage) .....	16
3.5.2	幾丁聚醣基材製備.....	16
3.5.3	細胞活體螢光標定 (fluorescent cell tracking) .....	17
3.5.4	懸浮共培養 (suspension Co-culture) .....	18
3.5.5	共軛焦攝影 (confocal).....	19
3.5.6	曠時攝影 (time-lapse).....	19
3.5.7	細胞凝聚力測定 (cell cohesion force test).....	20
3.5.8	模擬方法 (simulation method).....	21
第四章	實驗結果.....	23
4.1	懸浮共培養形態觀察.....	23
4.1.1	比例控制.....	23
4.1.2	種植順序控制.....	23
4.2	共軛焦攝影 .....	23
4.3	曠時攝影 .....	23

4.4	細胞凝聚力測定.....	23
4.5	模擬.....	24
第五章	討論.....	26
5.1.	懸浮共培養形態觀察.....	26
5.2.	細胞凝聚力測定.....	26
5.3.	模擬.....	27
第六章	結論.....	30
第七章	參考文獻.....	31
第八章	圖表.....	34



## 圖目錄



圖 2-1 trans-well 的構造。.....	2
圖 2-2 皮膚的構造。.....	4
圖 2-3 幾丁聚醣的合成及結構。.....	5
圖 3-1 實驗流程示意圖。.....	6
圖 3-2 懸浮共培養實驗示意圖。.....	19
圖 4-1 不同比例 Hs68 與 HaCaT 懸浮共培養，經過三個天期的結果。.....	34
圖 4-2 等比例 Hs68 與 HaCaT 懸浮共培養，改變種細胞順序經過三個天期的結果。 .....	35
圖 4-3 等比例 Hs68 與 HaCaT 懸浮共培養下，三個天期的共軛焦顯微鏡攝影結果。 .....	36
圖 4-4 等比例 Hs68 與 HaCaT 懸浮共培養下，曠時攝影一日的結果。.....	37
圖 4-5 等比例 Hs68 與 HaCaT 懸浮共培養下，曠時攝影二日(第三日、第四日)的結 果。.....	38
圖 4-6 等比例 Hs68 與 HaCaT 懸浮共培養下，曠時攝影二日(第四日、第五日)的結 果。.....	39
圖 4-7 對細胞使用超音波，Hs68 與 HaCaT 細胞團面積的變化。.....	40
圖 4-8 震盪控制分布結果。.....	41
圖 4-9 單種類細胞懸浮培養，本身聚合力之結果。.....	42





圖 4-10 等比例 Hs68 與 HaCaT 懸浮共培養下，經一日後，又曠時攝影 12 小時的結果。 ..... 43

圖 4-11 模擬方法一，固定居等機率。 ..... 44

圖 4-12 模擬方法一，變動不定機率。 ..... 45

圖 4-13 模擬方法二，自由運動模擬。 ..... 46

# 第一章 序論



在細胞培養的研究裡，常用各種環境控制來影響細胞的行為表現，像是表面改質的 ECM 處理、培養基的改良、藥物的添加.....等，時至今日，對於體外培養能夠模擬人體環境的要求一直在提高，也因此發展出了共培養(co-culture)的研究體系，而共培養系統最大的好處在於細胞間存在的交互作用[1]，這使得共培養提供了一個更高的擬真環境，比起單純的藥物添加，細胞本身旁泌作用提供了長期穩定的刺激，並且可以期待交互作用[2]的回饋調控發生，這對我們進一步的研究細胞行為很有幫助。

然而，共培養的複雜度也遠遠大於傳統的細胞培養，為此，科學家們設計了不同的實驗系統，以期能夠應對不同的實驗需求，例如 trans-well 專注於旁泌作用[3]的回饋交流，傳統培養方式則可以觀察到細胞的平面排列狀況，hydrogel[4][5]方式與 hanging drop 方式[6]則是可以研究細胞的立體構型排列和 migration 方式，其中 hydrogel 方式有可進行長期培養的優點，hanging drop 方式則是易於實驗操作。

而我們的主要目標是提供一個新式的共培養系統，並以此系統建立一個簡易的觀察模式並探討其結果。本實驗利用幾丁聚醣創造懸浮培養環境，所選用的共培養細胞則是 Hs68 與 HaCaT 兩株 cell line。

## 第二章 文獻回顧



### 2.1 共培養系統 (co-culture system)

近年來，隨著體外(in vitro)培養的發展，對於細胞環境的模擬需求也漸增，從而發展出許多新實驗方法來，在這之中，共培養系統被視為是一種有效的改變細胞環境的方式[7]。

共培養現已常見於各種領域，像是腫瘤學[8]、幹細胞研究[9]、傷口修復[10]、肝功能細胞研究[11].....等，我們從這些已知的研究中整理出下列3組常見的共培養系統。

#### 2.1.1 trans-well method(構造如圖 2-1 所示)

##### (1) 方法：

透過雙層培養系統的建立，兩層的細胞藉由半透膜交換化學物質。

##### (2) 特色：

此法細胞間並無接觸，又稱之為間接共培養，故而能單純的觀察旁泌作用對細胞表現的影響，並排除細胞外間質(ECM)堆積等其他可能的偏差。



圖 2-1 trans-well 的構造(圖片來源：corning)

#### 2.1.2 hydrogel method



(1) 方法：

透過 hydrogel 製成一個高通透性的多孔支架，使細胞能夠進行三維移動的自由組合。

(2) 特色：

此法為一種直接共培養的方式，讓細胞在 3D 培養基中構型，常見於幹細胞研究中，可觀察幹細胞交互是否形成特定排列，有無形成 niche[12]--一種幹細胞需要特殊微環境來維持的現象。

### 2.1.3 hanging drop method

(1) 方法：

透過懸浮液滴的方式培養細胞，使細胞沒有能夠貼附的位置，成為一種懸浮式培養。

(2) 特色：

此法為一種直接共培養的方式，目的在於使細胞無法貼壁，使細胞聚合成球形的細胞團，此法常見於胚胎發育的研究中[13]，主要用來研究球型細胞團的行為表現。

## 2.2 纖維母細胞與角質細胞 (Fibroblast & Keratinocyte)

### 2.2.1 纖維母細胞 (Fibroblast)

纖維母細胞是一種結締組織，胚胎學上由中胚層發育而來。外觀與間葉細胞相似，成尖細形，是一種常見的基質細胞，能夠合成膠原蛋白(collagen)等細胞外基質(ECM)。在傷口修復上扮演關鍵腳色。[14]



## 2.2.2 角質細胞 (Keratinocyte)

角質細胞是上皮細胞的一種主要類型，與纖維母細胞同樣由中胚層發育。外觀為扁平層狀，主要是形成人體的皮膚最外層，可以抵抗一些病菌、熱還有紫外線。[15]

## 2.2.3 纖維母細胞與角質細胞共培養

纖維母細胞與角質細胞構成了人類皮膚的表皮層與真皮層(皮膚構造如圖 2-2)，文獻指出這兩者之間有許多的訊號交流，例如 TGF-beta，也有文獻提到纖維母細胞在共培養系統對角質細胞有正面的作用[16]，這兩株細胞是共培養的良好素材，我們最後選擇了這兩株細胞應用在我們的系統上。

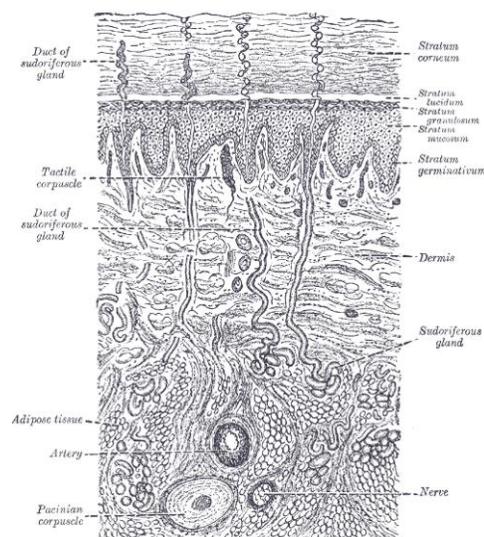


圖 2-2 皮膚的構造(圖片來源：Gray's Anatomy)

## 2.3 細胞聚集因子 (Cell aggregation factor)

細胞在懸浮培養的情況下會聚合成球形。然而細胞聚集的主要調控則來自於兩大類蛋白：組合蛋白(Integrin)和Cadherin。Integrin控制細胞的貼壁，主要控制



細胞與材料的鍵結。而Cadherin則控制細胞間的鍵結，在我們的實驗裡，這可能是一個比較主要的因子。

鈣黏蛋白是一個龐大的蛋白質家族，其中E-cadherin與N-cadherin又是比較主要的分支，鈣黏蛋白顧名思義需要鈣離子來完成其功能。而不同的鈣黏蛋白互相之間也有鍵結，這些差異可能導致細胞聚合有不同的排列[17]。

在我們所選用的細胞裡，文獻提到Fibroblast會表現N-cadherin[18、19]而Keratinocyte則主要表現E-cadherin[20、21]。

## 2.4 幾丁聚醣 (chitosan)

幾丁聚醣是一生物可分解且有很高的生物可相容性的多醣類[22、23]，並通過美國食品藥物管理局的許可，可用於生醫材料商業使用。幾丁聚醣的來源由幾丁質去乙醯後得到，一般從蝦蟹殼中採集得來，此外，蕈類也富含豐富的幾丁質。其結構是一種線性多醣組成的隨機分佈的 $\beta$ -(1-4)鏈結D-氨基葡萄糖(乙醯單位)和N-乙醯-D-氨基葡萄糖(乙醯單位)[24](圖2-3)。通常幾丁質與幾丁聚醣在去乙醯程度並無明顯的定義劃分，一般來說，總氮含量佔聚合物70%以上者為幾丁聚醣。在我們的系統裡，就細胞培養而言，幾丁聚醣是一種不易貼附的材料[25]，可拿來設計懸浮培養的環境。

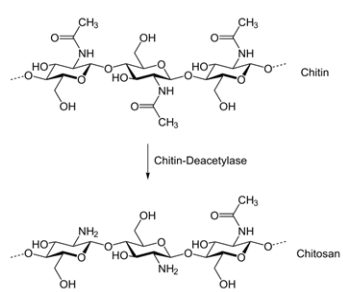


圖 2-3 幾丁聚醣的合成及結構(圖片來源：朱拉隆功，幾丁-幾丁聚醣材料中心)

### 第三章 實驗材料與方法



#### 3.1 實驗架構

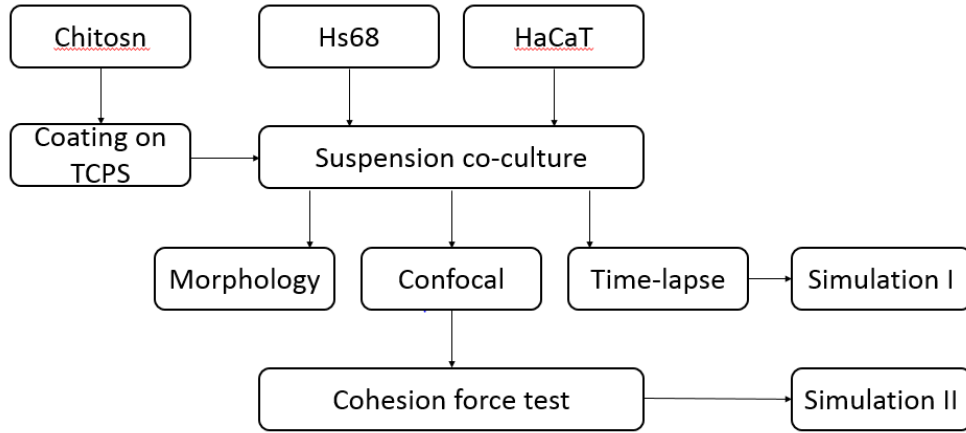


圖 3-1 實驗流程示意圖

## 3.2 實驗材料



1. 幾丁聚醣 Chitosan (from crab shells): 75% deacetylated, Sigma, USA
2. 無菌水 : 自製
3. 培養基 Dulbecco's Modified Eagle Medium [DMEM] : Gibco
4. 胎牛血清 Fetal bovine serum [FBS] : Biological industries
5. 三合一抗生素 PEN-STREP-AMPHO SOL. : Biological industries
6. 胰蛋白酶 Trypsin (Type II from porcine pancreas) : Sigma, USA
7. Ethylenediaminetetra-acetic acid [EDTA] 99% : Sigma, USA
8. 碳酸氫鈉 Sodium hydrogen carbonate [ $\text{NaHCO}_3$ ] : Sigma, USA
9. 二甲基亞砜 Dimethyl sulphoxide [DMSO] : Sigma, USA
10. 異丙醇 Isopropanol [IPA]: Mallinckodt, USA
11. 氫氧化鈉 Sodium hydroxide [NaOH] : Sigma, USA
12. 氯化鈉 Sodium chloride [NaCl] : Sigma, USA
13. 氯化鉀 Potassium chloride [KCl] : Sigma, USA
14. 磷酸氫二鈉 Sodium phosphate dibasic anhydrous [ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ] : Sigma, USA
15. 磷酸二氫鉀 Potassium Dihydrogenphosphate [ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ] : Sigma, USA
16. 纖維母細胞細胞系 Hs68 : ATCC



17. 角質細胞細胞系 HaCaT : CLS





### 3.3 儀器

1. 倒立式螢光顯微鏡 ( Inverted Fluorescence Microscope )

廠牌：LEICA, USA

型號：DMI 6000

台大醫工所

2. 光學顯微鏡 ( Inverted microscope )

廠牌：Olympus, Japan

型號：IX71

台大醫工所

3. 離心機 ( Centrifuge )

廠牌：Beckman, Germany

型號：GS-15R

台大醫工所

4. 微量離心機 (small type micro centrifuge)

廠牌：Tomy, USA

型號：HF-120

台大醫工所



5. 全自動高壓蒸氣滅菌器 (Autoclave)

廠牌：台灣三豐公司

型號：EA-652

台大醫工所

6. 冰箱 (Refrigerator)

廠牌：台灣三洋公司

型號：Medicool MPR-411F

台大醫工所

7. 烘箱 (Oven)

廠牌：台灣超技儀器公司

型號：HT-SI-45A

台大醫工所

8. 磁石攪拌器 (Stirrer/Hotplate)

廠牌：Costar, USA

型號：PC-320

台大醫工所

9. 振盪器 (Shaker)

廠牌：Lab. Rotator, USA



型號：2800A

台大醫工所

10. 迴轉式恆溫振盪水槽 (Shaking bath)

廠牌：Firstek scientific, USA

型號：B601

台大醫工所

11. 二氧化碳生長培養箱 (CO<sub>2</sub>-incubator)

廠牌：Nuair

型號：Water jacketed US autoflow automatic CO<sub>2</sub> incubator

台大醫工所

12. 電子微量天平 (electronic microbalance)

廠牌：Precisa, Switzerland

型號：205A

台大醫工所

13. 去離子水製造機 (Reverse Osmosis system)

廠牌：天祥儀器有限公司, 台灣

型號：RDI

台大醫工所



14. 酸鹼度計 (pH meter)

廠牌：SUNTEX, Taiwan

型號：SP-701

台大醫工所

15. 超音波振盪洗滌器 (Ultrasonic cleaner)

廠牌：NEY

型號：Ultrasonik 57H

台大醫工所

16. 血球計數盤 (Hemocytometer)

廠牌：Hausser scientific, USA

型號：Bright line

台大醫工所

17. 電源供應器(Power Supply)

廠牌：京士敦, 台灣

型號：MP-250

台大醫工所

18. 共軛焦螢光顯微鏡 (Confocal Fluorescence Microscope)

廠牌：LEICA, USA

型號：TCS SP5

台大醫院第一共同研究室





### 3.4 試劑配製

#### 1. 磷酸緩衝溶液 (Phosphate Buffer Solution) [PBS]

NaCl	8.00 g
KCl	0.20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.20 g

將上列藥品以 1000 ml 的二次水溶解，並用 NaOH 或 HCl 將溶液的 pH 值調至 7.3-7.5，利用高溫高壓滅菌器滅菌後使用。

#### 2. 培養液 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

DMEM	13.4g
NaHCO <sub>3</sub>	3.7g
Antibiotics	10ml
FBS	100ml

將上列試藥溶於 900 ml 的二次水中，同時以攪拌子攪拌均勻使其完全溶解，並用 NaHCO<sub>3</sub> 將培養基的 pH 值調至 7.3-7.5。使用滅過菌的 0.22 μm PVDF 膜利用抽氣過濾的方式過濾培養基，並添加 10 ml 的三合一抗生素和 100 ml 的胎牛血清(FBS)[胎牛血清需先置於 56°C 環境中 30 分鐘以去活化，冷藏於 4°C 的黑暗中。

### 3. Trypsin-EDTA 溶液

Trypsin (0.05%)      0.25 g

EDTA (0.53mM)      0.1g

秤取 0.25 g trypsin 及 0.1 g 的 EDTA 並將其溶於磷酸緩衝溶液(PBS)中，

溶解後使用滅過菌的 0.22  $\mu\text{m}$  PVDF 膜以針筒過濾滅菌方式過濾，冷藏於 4°C 的環境中保存。







## 3.5 實驗方法

### 3.5.1 細胞培養 (cell culture) 和繼代 (passage)

本實驗的細胞來自購買得到的 cell line 細胞。

#### (1) 纖維母細胞：

a. 培養：我們使用的培養液為 DMEM 加上 10% 的 FBS 與 1% 的抗生素 (PEN-STREP-AMPHO)。

b. 繼代：滿盤狀態下先使用含有 0.1% EDTA 與 0.05% 胰蛋白酶的 PBS 溶液將細胞打下，一盤約分為 3~5 盤。最後至於 5% 二氧化碳、37°C 二氧化碳細胞培養箱中培養。使用代數為 25~35 代。

#### (2) 角質細胞：

a. 培養：我們使用的培養液為 DMEM 加上 10% 的 FBS 與 1% 的抗生素。

b. 繼代：滿盤狀態下先使用含有 0.1% EDTA 與 0.05% 胰蛋白酶的 PBS 溶液將細胞打下，一盤約分為 3~5 盤。最後至於 5% 二氧化碳、37°C 11. 二氧化碳生長培養箱中培養。使用代數為 50~100 代。

### 3.5.2 幾丁聚醣基材製備

我們使用 0.5M 的冰醋酸 (acetic acid) 將幾丁聚醣高分子溶解，配置成 1% (w/v) 的幾丁聚醣溶液。將幾丁聚醣高溶液塗佈 (coating) 在 TCPS plate，放入烘箱，溫度設定在 60°C。約半天後醋酸會完全蒸發，再以 0.5N NaOH 中和材料電

性。待 30 分鐘後，將 NaOH 溶液移除並以清水沖洗，之後以酒精水溶液滅菌並將 plate 放置在 UV 燈下照射 45 分鐘。



### 3.5.3 細胞活體螢光標定 (fluorescent cell tracking)

#### (1) Sigma hoechst 33258 :

可標記出 DNA，因此被用來觀察活細胞細胞核，受到接近 UV 光 (350 nm) 的激發會激發出 450 nm 波長之藍光。

- a. 配製濃度為 1.25 $\mu$ g/ml 的 Hoechst 於 DMEM 培養液中
- b. 加入欲標定的細胞且置於 37 $^{\circ}$ C 細胞培養箱 45 分鐘。
- c. 將已螢光標定的細胞以 PBS 洗 3 次後回種於材料上。

#### (2) CellTracker™ Green CMFDA

以擴散穿膜方式進入細胞，與 GHS 結合後可放出螢光，螢光分布遍及整顆細胞，受到 500 nm 光的激發會激發出 520 nm 波長之綠光。

- a. 配製濃度為 10  $\mu$ M 的於無血清的 DMEM 培養液中
- b. 加入欲螢光標定的細胞且置於 37 $^{\circ}$ C 細胞培養箱 45 分鐘。
- c. 將螢光標定後的細胞以 PBS 洗 3 次後回種於材料上。

#### (3) CellTracker™ Orange CMRA

以擴散穿膜方式進入細胞，螢光僅分布於細胞質，受到 545 nm 光的激發會激發出 585 nm 波長之橘光。

- a. 配製濃度為 10  $\mu$ M 的於無血清的 DMEM 培養液中



b. 加入欲螢光標定的細胞鐘且置於 37°C 細胞培養箱 45 分鐘。

c. 將螢光標定後的細胞以 PBS 洗 3 次後回種於材料上。

### 3.5.4 懸浮共培養 (suspension Co-culture)

在直接共培養前，為了能區分出兩種不同的細胞，先將 Hs68 與 HaCaT 利用 CMFDA 與 CMRA 活染標定，隨後將 Hs68 與 HaCaT 種植於幾丁聚醣基材上。共培養的培養液為含有 10% FBS 與 1% 抗生素之 DMEM。如圖 3-2 所示。

(1) 細胞比例控制：

將以 CMFDA(綠色)標定之 Hs68 與以 CMRA(橘色)標定之 HaCaT，計數總細胞 3,6000 顆，分別以 1:1、1:2、2:1 三種比例種在塗佈幾丁聚醣之 24-well plate 上，培養三天並觀察其形態表現。

(2) 種植順序控制：

a. Hs68 先種，HaCaT 後種：

將以 CMFDA(綠色)標定之 Hs68，計數 1,8000 顆細胞，種在塗佈幾丁聚醣之 24-well plate 上。

培養一天後，以 CMRA(橘色)標定之 HaCaT，計數 1,8000 顆細胞，種在已經培養一天之 Hs68 的 well 中共培養兩天並觀察其形態表現。

b. HaCaT 先種，Hs68 後種：

將以 CMRA(橘色)標定之 HaCaT，計數 1,8000 顆細胞，種在塗佈幾丁聚醣之 24-well plate 上。



培養一天後，以 CMFDA(綠色)標定之 Hs68，計數 1,8000 顆細胞，種在已經培養一天之 Hs68 的 well 中共培養兩天並觀察其形態表現。

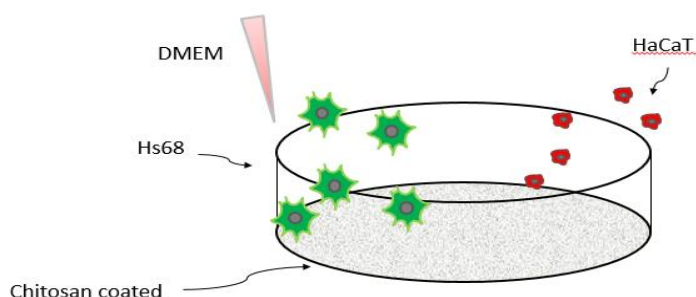


圖 3-2 懸浮共培養實驗示意圖

### 3.5.5 共軛焦攝影 (confocal)

此方法透過顯微鏡加裝針孔光圈，將非聚焦面的光排除開，使其可以針對物體內的平面聚焦，用來觀察內部橫切面的構造，因為使用的是穿透光，所以共軛焦也只適用於半透明的物質，在觀察細胞上有很好的表現。

我們以 CMFDA(綠色)標定 Hs68 與 CMRA(橘色)標定 HaCaT，兩種細胞同樣以 hoechst 33258 染核(藍色)，細胞以總數 3,6000 顆，比例 1:1 方式進行懸浮共培養(3.5.4)，分別在第一天、第二天、第三天利用共軛焦攝影觀察其形態表現。

### 3.5.6 曠時攝影 (time-lapse)

曠時攝影是萊卡顯微鏡 DMI6000 具備的功能之一，可以進行長時間的定點拍照，對於觀察細胞的長期表現，譬如爬行、生長、型態變化，都有很好的表現。



我們用 CMFDA(綠色)標定之 Hs68 與 CMRA(橘色)標定之 HaCaT，細胞以總數 3,6000 顆，比例 1：1 方式進行懸浮共培養(實驗 3.5.4)，分別在三段時間做曠時攝影：第一日、第三日與第四日、第四日與第五日。

### 3.5.7 細胞凝聚力測定 (cell cohesion force test)

#### (1) 施加外力方式：

##### a. 超音波方式：

我們分別將 Hs68 與 HaCaT 單獨進行懸浮培養，待凝聚成球後，置入含有 3C.C.培養液的 6cm dish 中，再將 dish 置入超音波洗淨機中施以 1 小時的超音波，觀察細胞團對外力的抵抗能力。

##### b. 震盪方式(shaking)：

在同樣足夠大的外力干擾下，細胞團越大碰撞機率越高，我們先將 CMRA(橘色)標定之 HaCaT 懸浮培養一天，再加入 CMFDA(綠色)標定之 Hs68，最後以 40rpm 的速度對其震盪，控制出 Hs68 環繞 HaCaT 的狀態。

以顯微鏡分別觀察震盪前、震盪後、震盪後一天的細胞形態。

#### (2) 單細胞懸浮培養方式：

##### a. Hs68：

以 CMFDA(綠色)標定之 Hs68 先懸浮培養一天，第二天再加入 CMRA(橘色)標定之 Hs68，觀察同樣細胞不同天期種入的細胞聚和情形。

##### b. HaCaT：

以 CMFDA(綠色)標定之 HaCaT 先懸浮培養一天，第二天再加入 CMRA(橘色)標定之 HaCaT，觀察同樣細胞不同天期種入的細胞聚和情形。



c. time-lapse 觀察：

我們先以懸浮共培養系統形成細胞團，並找出 Hs68 細胞團與 HaCaT 細胞團互相黏合的情形，對其用 time-lapse 進行觀察。

### 3.5.8 模擬方法 (simulation method)

(1) 方法一：

a. 在空白網格紙中選擇一個任意聚集點。

b. 以順時鐘順序，從中心點開始填滿代表細胞的方格，Hs68 使用綠色填滿，HaCaT 使用紅色填滿，一圈圈的填入顏色，第一圈僅有 1 顆細胞，第二圈填入 8 顆，第三圈填入 16 顆，以此類推。

c. 填入細胞種類以機率決定，我們假定不同細胞有不同的結合能力，而不同的結合能力反映在填入細胞出現的機率上。

d. 調整機率的變化，使其能夠與觀察結果相符合。

(2) 方法二：

a. 在長寬各 10 格共 100 格的空白網格紙中，隨機選中 25 個點為 Hs68(標記為綠色)，選中 25 個點為 HaCaT(標記為紅色)。

b. 將每個代表細胞的格子按順序編號，按編號移動細胞。

c. 移動規則：

(a) 移動方向：移動方向分為四個象限，每個象限有三個移動方向。判定移動象限後，象限中的三種方向以隨機方式決定。

(b) 移動判定規則：以準備移動細胞為中心，向外數三圈細胞，以得分最大象限為移動方向，其中得分的判定為，最內圈 3 分、中圈 2 分、外圈 1 分。同分則往合力方向移動，合力為零則原地不動。其中，Hs68 只計算 Hs68 的吸引力，忽視 HaCaT 的得分，而 HaCaT 則同時計入 Hs68 與 HaCaT 之得分。

(c) 細胞聚集判定：若同一位置，有超過一顆細胞要移動到此處，則那些細胞聚集成團，若細胞中有 Hs68，Hs68 優先佔據位置，之後以原先相對位置聚集，若無 Hs68，則順序先者優先佔據位置。

(d) 聚集成團後的細胞判定規則，同(a)(b)(c)三點，但細胞團會一起移動。

## 第四章 實驗結果



### 4.1 懸浮共培養形態觀察

#### 4.1.1 比例控制

由圖 4-1 可觀察到，不同比例的細胞，隨著天期增加，漸漸的有趨向 HaCaT 在外，Hs68 在內的細胞排列。不同比例只在前天產生影響，到了第三天，細胞排列趨向一致。

#### 4.1.2 種植順序控制

觀察圖片 4-2 可以發現，HaCaT 先成球的條件下，也會形成 HaCaT 在外，Hs68 在內的細胞排列，只是在時間上比 Hs68 先成球的條件慢了一些。

### 4.2 共軛焦攝影

由圖片 4-3 可以得知，Hs68 與 HaCaT 共培養下，HaCaT 會包覆在 Hs68 外，形成層結構，類似核殼包覆(core-shell)的形態，而隨著天期增加，我們可以漸漸觀察到多核球的產生。

### 4.3 曠時攝影

圖片 4-4 為我們在第一日與第二日的攝影中，觀察到核殼包覆的初期形成狀態。圖片 4-5 是第三日與第四日、圖片 4-6 是第四日與第五日，其中我們觀察到核殼包覆的細胞有相互融合的現象。

### 4.4 細胞凝聚力測定





(1) 超音波方式：

我們可以由圖片 4-7 觀察到，前 30 分鐘 Hs68 細胞團無明顯變化，直到 1 小時時候才有細微的崩解發生。而 HaCaT 細胞團，30 分鐘開始細胞鍵結變弱，細胞團脹大，到了 1 小時則觀察到細胞團的崩解。

(2) 震盪方式：

由圖片 4-8 觀察，施以震盪後，我們可以得到以 HaCaT 為核心，Hs68 圍繞在周圍的細胞分布，而在二氧化碳生長培養箱中培養 30 小時後，我們觀察到 Hs68 凝聚成團的現象，但沒有發現 Hs68 包覆 HaCaT 的情況。

(3) 單細胞懸浮培養：

由圖片 4-9 我們觀察到，不同時間點加入細胞，Hs68 相對 HaCaT 有較佳的凝聚現象。

(4) time-lapse：

由圖 4-10 可觀察到，當核殼包覆的細胞團產生凝聚時，互相貼附的 Hs68 細胞團與 HaCaT 細胞團卻沒有遷移(migration)的現象發生，依舊是各自凝聚的狀態。而同時，core-shell 型態的細胞卻明顯得有融合現象。

## 4.5 模擬

(1) 方法一：如圖 4-11 所示，我們先以最公平的 50%的機率給予 Hs68 與 HaCaT 成核，可以觀察到結果呈現亂數分布的形態，無法形成核殼包覆。

如圖 4-12 當我們調整機率，使 Hs68 由 90%逐步下降至 10%，而相對的，HaCaT 由 10%上升至 90%，此時我們可以得到核殼包覆的細胞組合。

(2) 方法二：如圖 4-13 所示，我們給與 Hs68 與 HaCaT 不同的碰撞規則後，我們模擬了細胞的自由運動，並聚集成 core-shell 的型態。



## 第五章 討論



### 5.1. 懸浮共培養形態觀察


我們使用的共培養採取了以高分子塗佈方式建立懸浮系統，此系統可以做到 hydrogel 方式提供的三維方向自由運動，所以它也可以成為一個幹細胞共培養，用來研究 niche 的一個平台，而在操作上，我們的系統顯得更為簡易，細胞也可以從培養積中輕易轉移，此外，雖然 hanging drop 方式是更為容易的系統，但卻無法支持長時間的培養與觀察，我們的系統有效的克服了此一問題。

初步的系統測試，我們使用了容易繼代，且共用同一種培養液的 cell line 細胞：Hs68 與 HaCaT，這兩株細胞在原來的人體中，位置本來就是一起的，是皮膚的主要構成，也有許多訊號的交流，是測是共培養的良好素材。

本實驗由懸浮共培養和共軛焦攝影的結果，我們可以觀察到 Hs68 與 HaCaT 進行懸浮共培養後，細胞排列會有形成核殼包覆的趨勢，而且核必定由 Hs68 形成，殼則是由 HaCaT 構成，而這種趨勢透過物理手段調整(改變細胞比例與種植順序)是無法改變的。我們發現，在研究懸浮系統的細胞組合的文獻裡，細胞排列與 Cadherin 的黏合能力呈現高度的相關[26]，而在我們的研究中，Hs68 與 HaCaT 表現的 Cadherin 也是不同的，所以我們從這方面著手，利用細胞黏合發生機率設計了模擬系統。

另外，Hs68 與 HaCaT 的核殼包覆狀態，與其在人體中原始的位置亦有其相似之處，在人體皮膚上，Hs68 被夾在血管內皮與皮膚上皮細胞之間，也是呈現一個被包覆的形態。

### 5.2. 細胞凝聚力測定



在文獻中，只有非常少針對細胞間黏合力做出測量，大都以測量蛋白質為主，不過也並非沒有，但需要特殊的儀器，譬如用光子夾去移動細胞[27]。而我們的系統考慮的是整顆細胞，表面的 cadherin 呈現多樣化，我們只好以間接的方式測定細胞間黏合力。

考量到生化反應的複雜性，我們採取以物理方式直接作用細胞的模式，其結果，我們設計了施加超音波外力的實驗，實驗結果發現，Hs68 對外力有較強的忍受力，因此，我們也認為 Hs68 細胞間結合力是較強的。

之後，我們又設計了以震盪方式改變細胞分佈的實驗，透過震盪，我們可以營造有利於 Hs68 包覆 HaCaT 的細胞分佈，而其結果是，Hs68 還是傾向於自我凝聚在一起，很值觀的證明了 Hs68 本身高度的聚合性。

而在單細胞懸浮培養方面，我們發現形成細胞團的細胞聚合力是有所下降的，一顆顆的細胞團，不會輕易的融合在一起，比較而言，Hs68 比 HaCaT 能夠進行細胞融合，以此結果為條件，我們考慮了細胞融合的狀況，在曠時攝影實驗裡，核殼包覆的細胞團會產生融合，這導致了多核和大核的核殼包覆細胞團的發生，融合方式就觀察來看，不外乎 HaCaT 向外爬出，或是 Hs68 向內聚合，當然，最可能的是兩種同時發生。

為了辨別到底是 HaCaT 向外爬出，或是 Hs68 向內聚合哪一個現象是主要的，我們觀察了互相黏合的 HaCaT 細胞團和 Hs68 細胞團，發現 HaCaT 並不會爬出包覆 Hs68，與此同時，核殼包覆細胞團卻迅速的發生融合，所以我們認為，Hs68 的存在是融合發生很大的誘因。

### 5.3. 模擬



模擬方面，我們採取的是一種亂數形式的隨機模擬方式。亂數模擬也常見於各式的蒙地卡羅處理中，是一種頗為有效的方法。

我們做了兩種模擬，方法一的模擬是基於共培養得到的核殼包覆，此模擬並未對兩種細胞進行任何描述，是以純粹的機率動態變化來表現我們的實驗結果。


我們嘗試了幾個機率變化，發現要得到核殼包覆的排列，有兩個條件，其一是 Hs68 在形成核的初期有著較高的機率，其二，隨著細胞團形成，Hs68 貼上細胞團的機率也隨之往下掉。

這個結果很有趣，因為它引導出了一個問題，Hs68 貼覆的機率何以下降？這有很多可能，而根據文獻，cadherin 的表現與細胞團的排列組合有相關性，我們以此著手，設計了有關細胞凝聚力的實驗。實驗結果是，Hs68 有著高度的凝聚力也有較強的融合特性。

在模型引入了細胞凝聚力的差異後，我們得以解釋 Hs68 貼覆機率的下降問題，而簡單的描述就是：在 Hs68 的附近有其他 Hs68 與 HaCaT 時，Hs68 優先與 Hs68 結合。在模擬方法一中，Hs68 有很多的機會可以貼上細胞團，但比起貼附於 HaCaT 上，Hs68 選擇了移動到旁邊尚未被 HaCaT 包覆的 Hs68 處接合，這也就是我們給出的 Hs68 貼覆率下降的理由。

在模擬方法二中，我們引進了此一概念進行模擬，比起模擬方法一，方法二的優點是可以模擬自由移動的狀態，但描述上就顯得複雜的多。

主要概念為：HaCaT 會受到兩種細胞的吸引而移動，而 Hs68 只會被 Hs68 吸引，此外在競爭位置中，Hs68 也是較為佔優。最後，方法二的也做到了一個核殼包覆的模擬結果。



在學理方面，Fibroblast 在細胞間結合上，多表現 N-cadherin，Keratinocyte 則是表現 E-cadherin，有文獻指出，N-cadherin 間的鍵結力大於 N-cadherin 與 E-cadherin，E-cadherin 間的鍵結力則是最小[28]，這與我們的結果不謀而合，所以 Hs68 的聚合力可能由 N-cadherin 提供，且 Hs68 體積也較大，這造成了 Hs68 的高聚合力。

## 第六章 結論



在本研究中，我們測試了一個新型的共培養系統，並驗證了此系統培養球形細胞團的有效性，比起類似的 hydrogel 操作更為容易，也比懸滴培養法能夠支持長天期大量培養。

接著，我們證實了 Hs68 與 HaCaT 兩支 cell line 共培養會形成核殼包覆的排列方式，此外，有部分肝細胞與幹細胞的研究指出，細胞的排列分布可能與其功能發生有關連性，這也是我們未來可能探討的方向之一。


最後，我們試圖用簡單的模擬方式解釋細胞為何會形成固定的排列。從實驗結果觀察，我們發現 Hs68 與 HaCaT 兩細胞形成凝聚的能力是不同的。而這就造成兩種細胞在聚合時能夠成功鍵結的機率不同，透過調整機率，我們可以嘗試著做出 core-shell 的排列模式，並最終模擬了一個自由運動核殼包覆的發生。

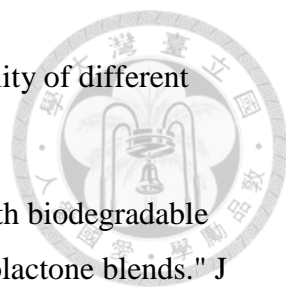
## 第七章 參考文獻



- [1] Bermudez-Brito, M., et al. (2013). "In vitro cell and tissue models for studying host-microbe interactions: a review." *Br J Nutr* 109 Suppl 2: S27-34.
- [2] Werner, S., et al. (2007). "Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing." *J Invest Dermatol* 127(5): 998-1008.
- [3] Karrer, S., et al. (2004). "Keratinocyte-derived cytokines after photodynamic therapy and their paracrine induction of matrix metalloproteinases in fibroblasts." *Br J Dermatol* 151(4): 776-783.
- [4] Kirkpatrick, C. J., et al. (2011). "Co-culture systems for vascularization--learning from nature." *Adv Drug Deliv Rev* 63(4-5): 291-299.
- [5] Sharma, M. B., et al. (2012). "Mimicking the functional hematopoietic stem cell niche in vitro: recapitulation of marrow physiology by hydrogel-based three-dimensional cultures of mesenchymal stromal cells." *Haematologica* 97(5): 651-660.
- [6] Fennema, E., et al. (2013). "Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues." *Trends Biotechnol* 31(2): 108-115.
- [7] Miki, Y., et al. (2012). "The advantages of co-culture over mono cell culture in simulating in vivo environment." *J Steroid Biochem Mol Biol* 131(3-5): 68-75.
- [8] Kalluri, R. and M. Zeisberg (2006). "Fibroblasts in cancer." *Nat Rev Cancer* 6(5): 392-401.
- [9] Richard J. Gilbertson and Jeremy N. Rich (2007). "Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche." *Nat Rev Cancer* 7(10): 733-736.
- [10] Sato, Takashi., et al. (1997). "The Co-Culture of Dermal Fibroblasts with Human Epidermal Keratinocytes Induces Increased Prostaglandin E2 Production and Cyclooxygenase 2 Activity in Fibroblasts." *J Investig Dermatol* 109(3): 334-339.



- 
- [11] Ho, C. T., et al. (2013). "Liver-cell patterning Lab Chip: mimicking the morphology of liver lobule tissue." *Lab Chip*.
- [12] de Souza, N. (2012). "In vitro niches." *Nature Methods* 10(1): 37-37.
- [13] Valli, A., et al. (2010). "Embryoid body formation of human amniotic fluid stem cells depends on mTOR." *Oncogene* 29(7): 966-977.
- [14] McDougall, S., et al. (2006). "Fibroblast migration and collagen deposition during dermal wound healing: mathematical modelling and clinical implications." *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 364(1843): 1385-1405.
- [15] ALIBARDI Lorenzo., et al. (2009). "Wound keratins involved in mucous granule extrusion during differentiation of amphibian keratinocytes." *Belg. J. Zool.*, 139 (1) : 58-69.
- [16] Wang, Z., et al. (2012). "Enhanced keratinocyte proliferation and migration in co-culture with fibroblasts." *PLoS One* 7(7): e40951.
- [17] Halbleib, J. M. and W. J. Nelson (2006). "Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis." *Genes Dev* 20(23): 3199-3214.
- [18] Mary, S., et al. (2002). "Biogenesis of N-cadherin-dependent cell-cell contacts in living fibroblasts is a microtubule-dependent kinesin-driven mechanism." *Mol Biol Cell* 13(1): 285-301.
- [19] K.S. Ko., et al. (2001) "Cell-cell adhesion in human fibroblasts requires calcium signaling." *Cell Sci.*, 126(14): 1155-1167.
- [20] Charest, J. L., et al. (2009). "Cadherin-mediated cell-cell contact regulates keratinocyte differentiation." *J Invest Dermatol* 129(3): 564-572.
- [21] Owens, D. W., et al. (2000). "E-cadherin at the cell periphery is a determinant of keratinocyte differentiation in vitro." *Biochem Biophys Res Commun* 269(2): 369-376.
- [22] VandeVord, P. J., et al. (2002). "Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice." *J Biomed Mater Res* 59(3): 585-590.

- 
- [23] Berscht, P.C., et al. (1995) " In vitro evaluation of biocompatibility of different wound dressing materials. " *J Mater Sci: Mater Med.*, 6(4): 201-205.
- [24] Garcia Cruz, D. M., et al. (2008). "Blending polysaccharides with biodegradable polymers. II. Structure and biological response of chitosan/polycaprolactone blends." *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 87(2): 544-554.
- [25] Duguay, Duke., et al. (2003) " Cadherin-mediated cell adhesion and tissue segregation: qualitative and quantitative determinants." *Developmental Biology.*, 253(2): 309-323.
- [26] Shao, H. J., et al. (2010). "Modulation of gene expression and collagen production of anterior cruciate ligament cells through cell shape changes on polycaprolactone/chitosan blends." *Biomaterials* 31(17): 4695-4705.
- [27] Zhang, H. and K. K. Liu (2008). "Optical tweezers for single cells." *J R Soc Interface* 5(24): 671-690.
- [28] Katsamba, P., et al. (2009). "Linking molecular affinity and cellular specificity in cadherin-mediated adhesion." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(28): 11594-11599.

## 第八章 圖表



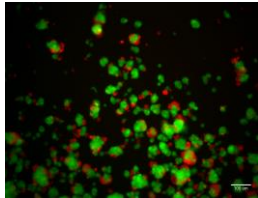
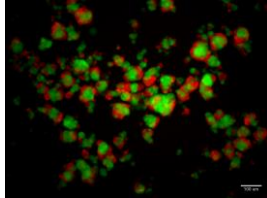
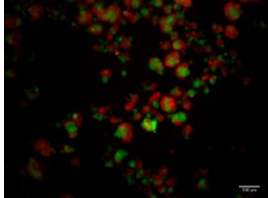
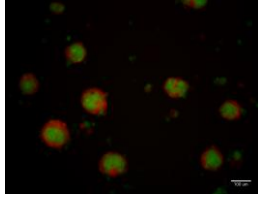
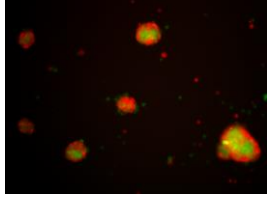
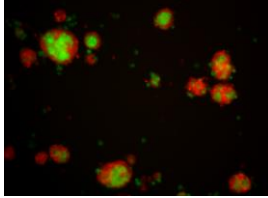
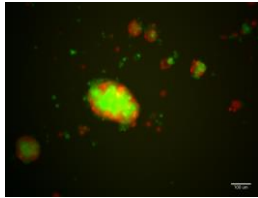
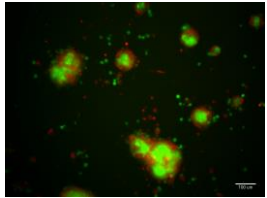
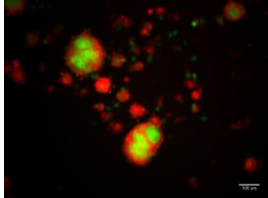
Hs68 : HaCaT 天期	2 : 1  Hs68 為綠色套色  HaCaT 為紅色套色	1 : 1  Hs68 為綠色套色  HaCaT 為紅色套色	1 : 2  Hs68 為綠色套色  HaCaT 為紅色套色
Day1	(a) 	(b) 	(c) 
Day2	(d) 	(e) 	(f) 
Day3	(g) 	(h) 	(i) 

圖 4-1 不同比例 Hs68 與 HaCaT 懸浮共培養，經過三個天期的結果，其中 Hs68 以 CMFDA 染成綠色，HaCaT 以 CMRA 染成橘色。(a)(b)(c)分別為 Hs68 與 HaCaT 比例在 2 比 1、1 比 1、1 比 2 下，第一天的結果；(d)(e)(f)分別為 Hs68 與 HaCaT 比例在 2 比 1、1 比 1、1 比 2 下，第二天的結果；(g)(h)(i)分別為 Hs68 與 HaCaT 比例在 2 比 1、1 比 1、1 比 2 下，第三天的結果。

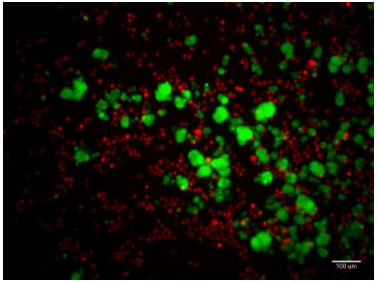
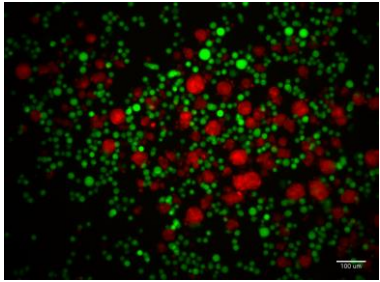
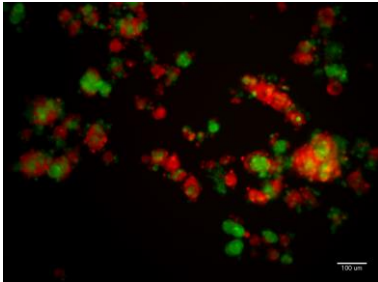
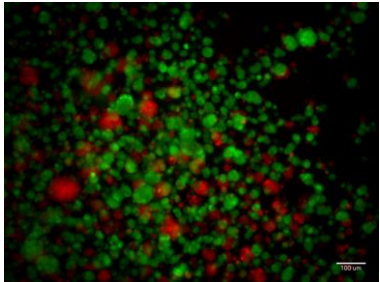
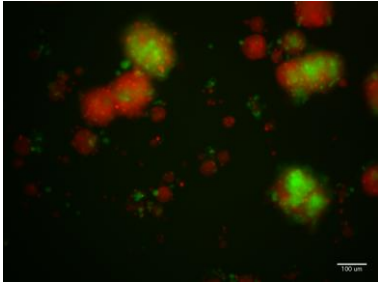
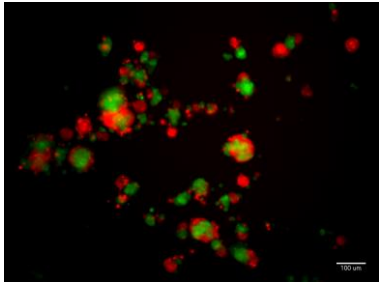
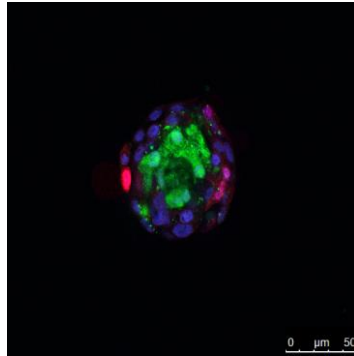
天期 \ 種植細胞順序	Hs68(綠色套色)先種 HaCaT(紅色套色)後種	HaCaT(紅色套色)先種 Hs68(綠色套色)後種
Day1	(a) 	(b) 
Day2	(c) 	(d) 
Day3	(e) 	(f) 

圖 4-2

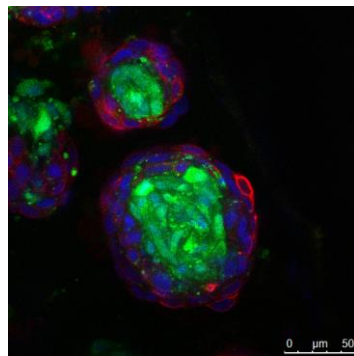
等比例 Hs68 與 HaCaT 懸浮共培養，改變種細胞順序經過三個天期的結果，其中 Hs68 以 CMFDA 染成綠色，HaCaT 以 CMRA 染成橘色。(a)(b)分別為 Hs68 先種一天與 HaCaT 先種一天，第一天的結果；(c)(d)分別為 Hs68 先種一天與 HaCaT 先種一天，第二天的結果；(e)(f)分別為 Hs68 先種一天與 HaCaT 先種一天，第三天的結果。



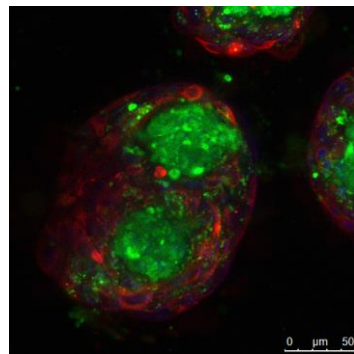
(a)



(b)



(c)



**圖 4-3**

等比例 Hs68 與 HaCaT 懸浮共培養下，三個天期的共軛焦顯微鏡攝影結果。其中 Hs68 以 CMFDA 染成綠色，HaCaT 以 CMRA 染成橘色(圖片由紅色套色)，兩者的細胞核皆以 Hoechst 染成藍色。(a)(b)(c)分別為第一天、第二天與第三天的結果。

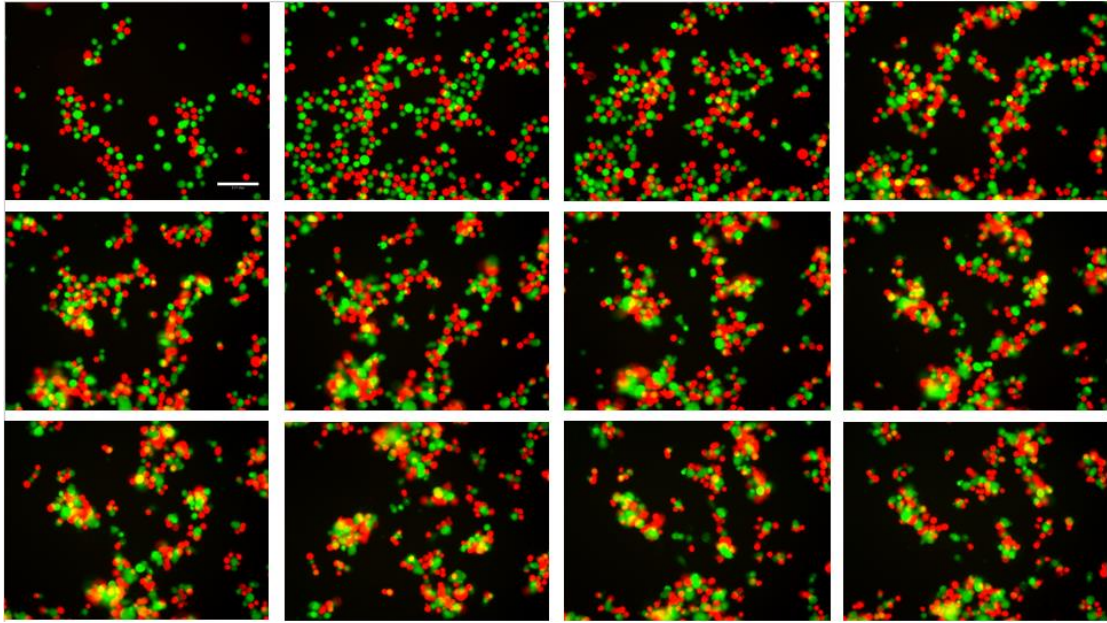


圖 4-4

等比例 Hs68 與 HaCaT 懸浮共培養下，曠時攝影一日的結果，其中 Hs68 以 CMFDA 染成綠色，HaCaT 以 CMRA 染成橘色(圖片由紅色套色)，圖序為從左至右，從上至下，每張圖間隔 2 個小時。

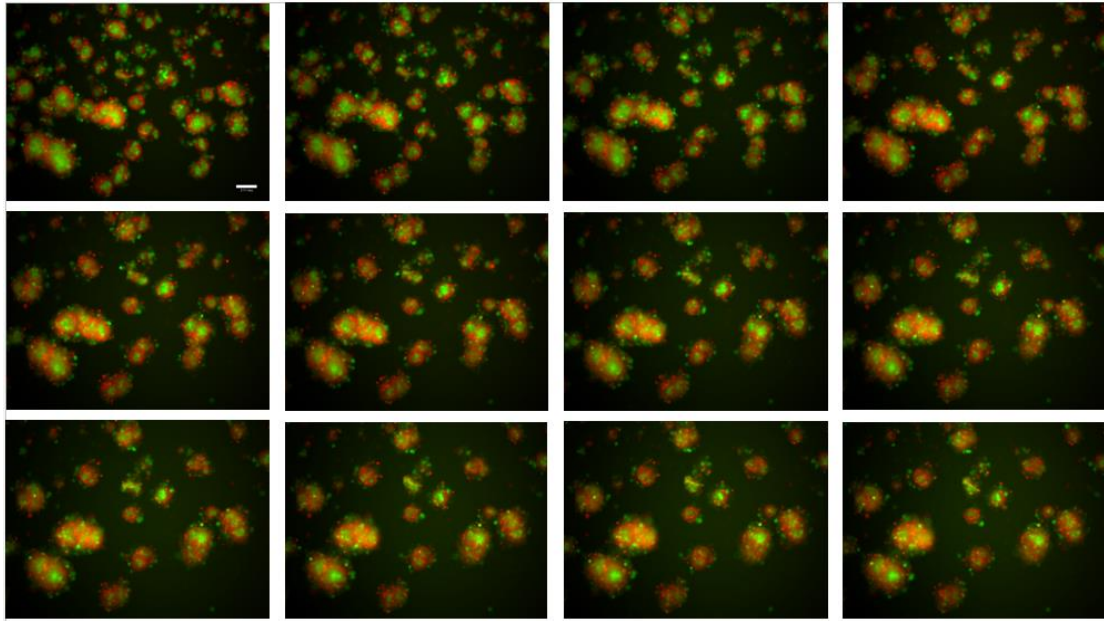


圖 4-5

等比例 Hs68 與 HaCaT 懸浮共培養下，曠時攝影二日(第三日、第四日)的結果，其中 Hs68 以 CMFDA 染成綠色，HaCaT 以 CMRA 染成橘色(圖片由紅色套色)，圖序為從左至右，從上至下，每張圖間隔 4 個小時。



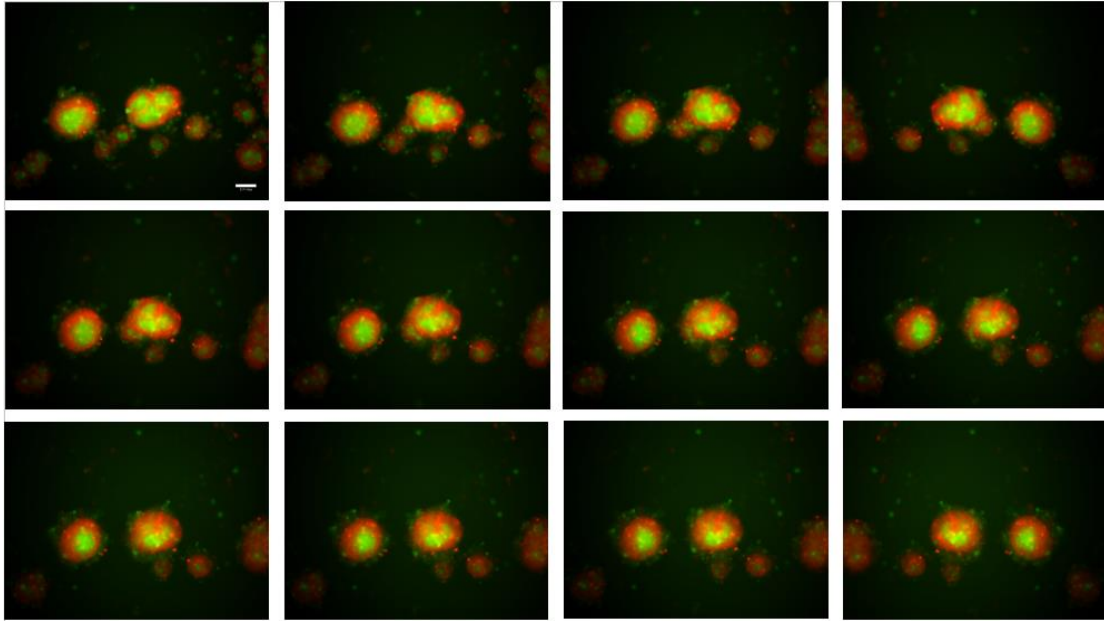


圖 4-6

等比例 Hs68 與 HaCaT 懸浮共培養下，曠時攝影二日(第四日、第五日)的結果，其中 Hs68 以 CMFDA 染成綠色，HaCaT 以 CMRA 染成橘色(圖片由紅色套色)，圖序為從左至右，從上至下，每張圖間隔 4 個小時。



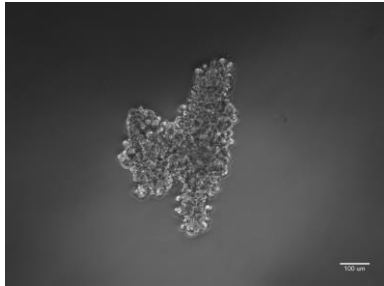
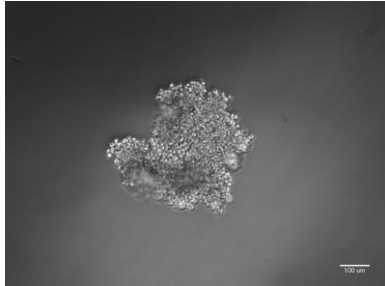

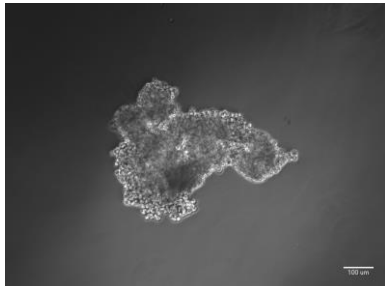
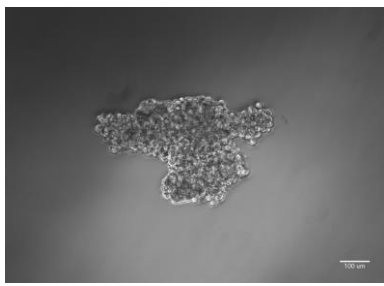
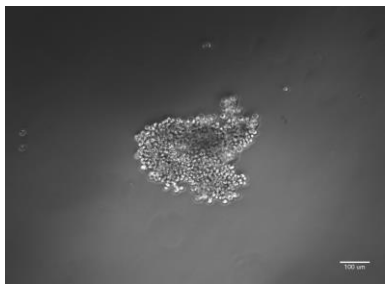
細胞種類 時間	Hs68	HaCaT
0 分鐘	(a) 	(b) 
	面積：132800 微米平方	面積：136700 微米平方
30 分鐘	(c) 	(d) 
	面積：128600 微米平方	面積：157100 微米平方
60 分鐘	(e) 	(f) 
	面積：135400 微米平方	面積：93800 微米平方

圖 4-7 分別對 Hs68 與 HaCaT 細胞使用超音波，(a)(c)(e)為 Hs68 在 0 分鐘、30 分鐘、60 分鐘，細胞團面積的變化；(b)(d)(f)為 HaCaT8 在 0 分鐘、30 分鐘、60 分鐘，細胞團面積的變化。



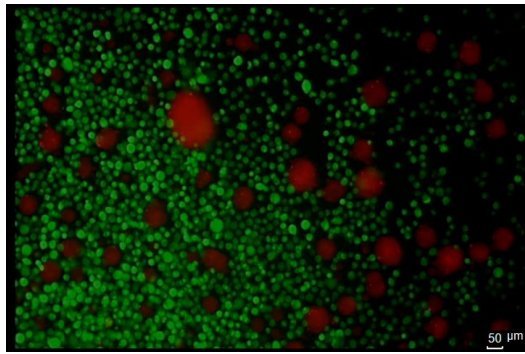
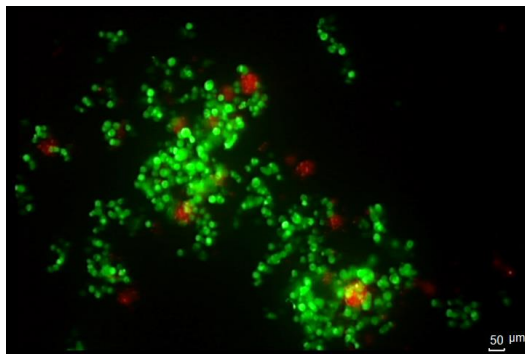
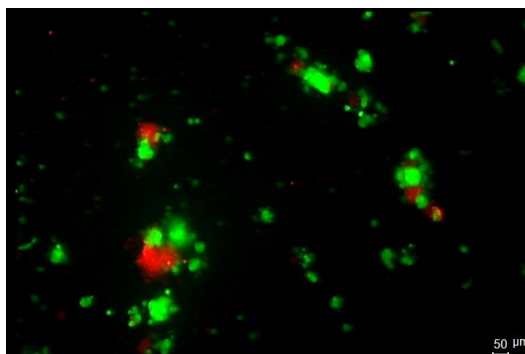
細胞種類	Hs68 染綠色與 HaCaT 染橘色，以等比例混合。
時間	
24 小時	(a) 
42 小時	(b) 
72 小時	(c) 

圖 4-8 (a)圖為預先懸浮培養一天的 HaCaT 與 Hs68 混合；(b)圖為共培養經過 18 小時 40rpm 的震盪的結果；(c)圖為震盪後又進入二氧化碳細胞培養箱培養 30 小時候的結果。

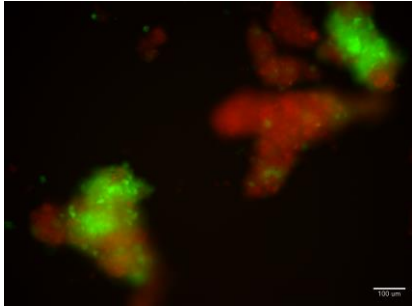
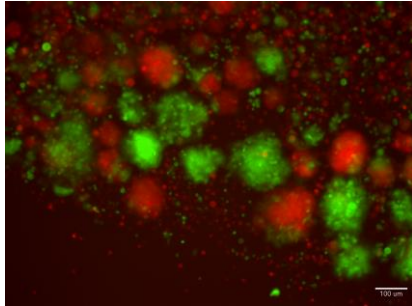
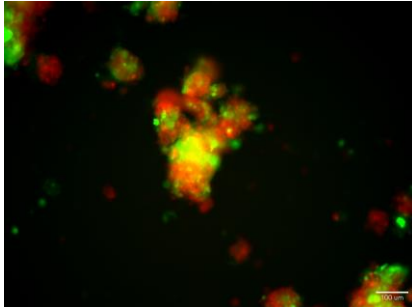
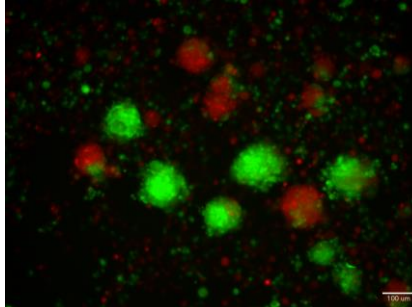
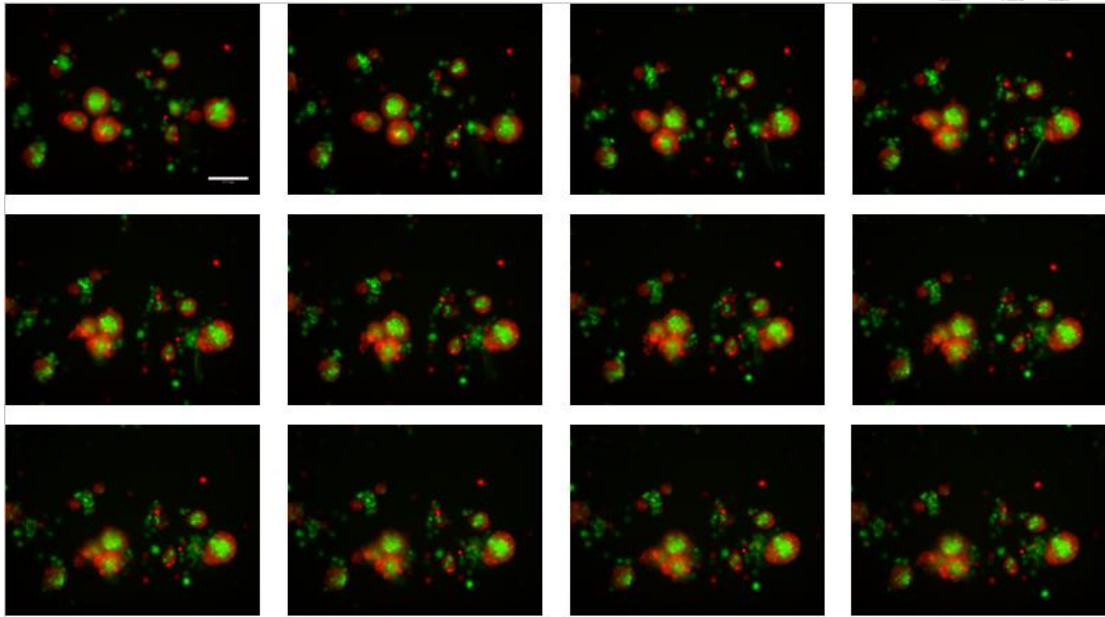
細胞種類 天期	Hs68 第一天加入的細胞染綠色 第二天加入的細胞染橘色	HaCaT 第一天加入的細胞染綠色 第二天加入的細胞染橘色
Day 4	(a) 	(b) 
Day 5	(c) 	(d) 

圖 4-9

(a)(c)兩圖皆只有 Hs68 單一細胞，綠色為第一天加入的細胞，紅色則是第二天加入的，觀察了第四天與第五天的結果；(b)(d)兩圖皆只有 HsCaT 單一細胞，綠色為第一天加入的細胞，紅色則是第二天加入的，觀察了第四天與第五天的結果。



**圖 4-10**

等比例 Hs68 與 HaCaT 懸浮共培養下，經一日後，又曠時攝影 12 小時的結果，其中 Hs68 以 CMFDA 染成綠色，HaCaT 以 CMRA 染成橘色，圖序為從左至右，從上至下，每張圖間隔 1 個小時。

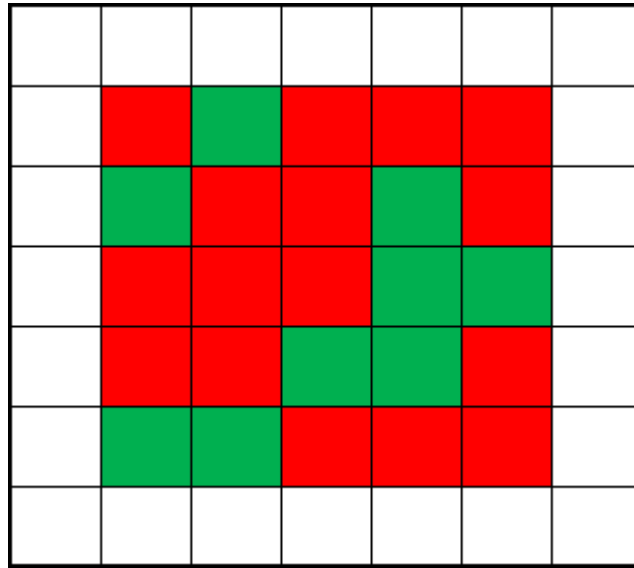


圖 4-11

使用模擬方法一，以綠色代表 Hs68 細胞，紅色代表 HaCaT 細胞，圍繞中心進行順序聚集，其中 Hs68 與 HaCaT 填入的機率各為固定的 50%。

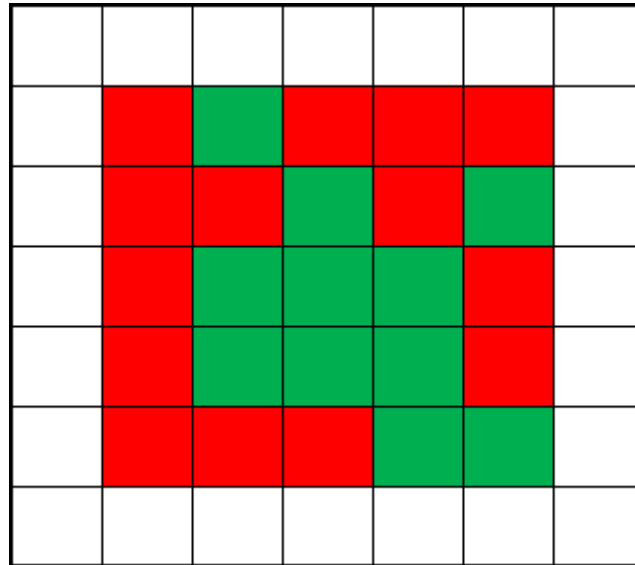


圖 4-12

使用模擬方法一，以綠色代表 Hs68 細胞，紅色代表 HaCaT 細胞，圍繞中心進行順序聚集，機率變化為：1~5 顆，Hs68 填入的機率為 90%，6~10 顆 Hs68 填入的機率為 70%，11~15 顆 Hs68 填入的機率為 50%，16~20 顆 Hs68 填入的機率為 30%，21~25 顆 Hs68 填入的機率為 10%。

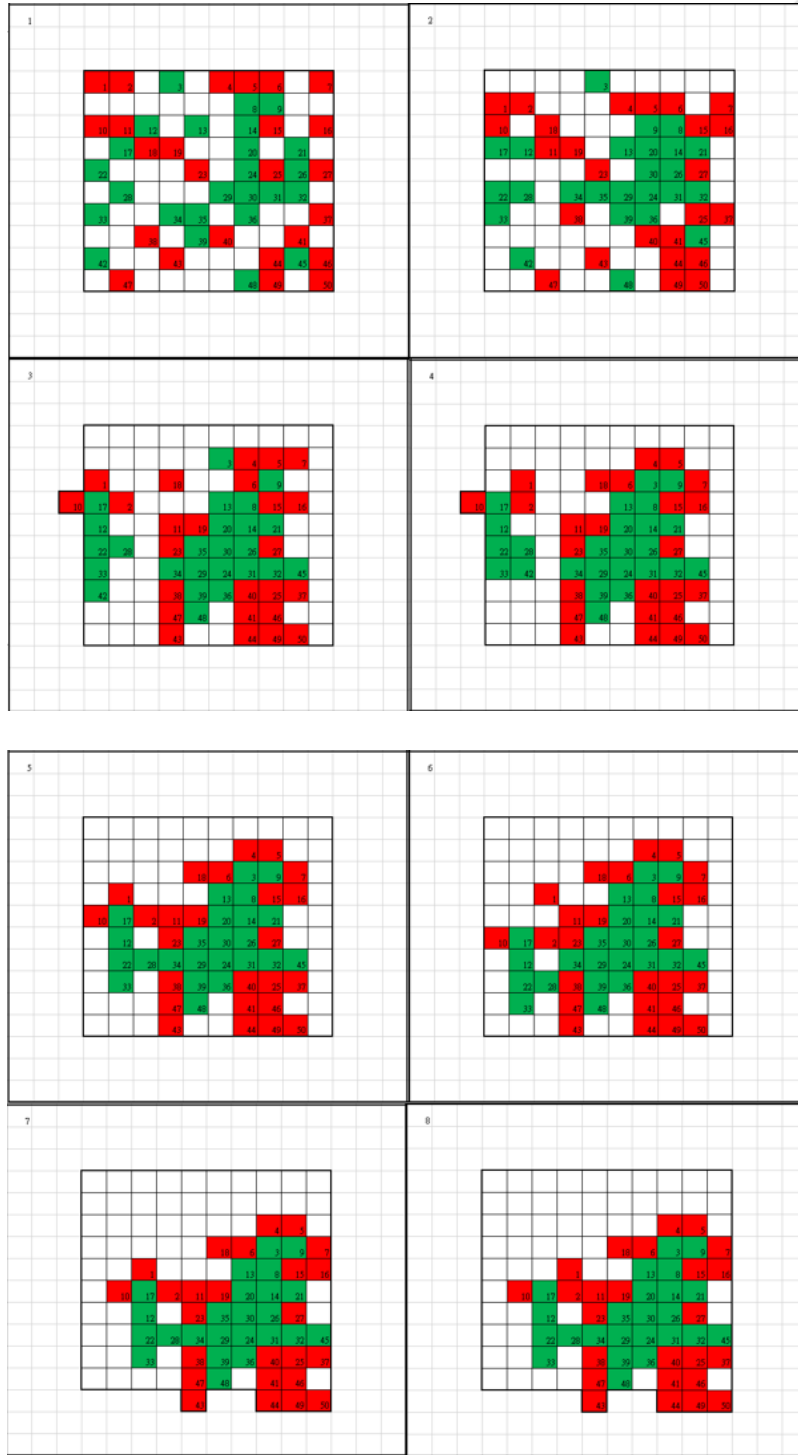


圖 4-13

使用模擬方法二，以綠色代表 Hs68 細胞，紅色代表 HaCaT 細胞，模擬細胞受到吸引聚合的情形，發生順序為從左至右、從上至下。