

國立臺灣大學醫學工程研究所

碩士學位論文

Graduate Institute of Biomedical Engineering

National Taiwan University

Master Thesis

仿聚離胺酸材料對神經細胞培養的研究

The Study of neuron culture on polylysine-like materials



Yu-Shin Wang

指導教授：楊台鴻 博士

Advisor: Tai-Horng Young, Ph.D.

中華民國 98 年 7 月

July, 2009

# 誌謝

首先真的要感謝指導教授楊台鴻老師，我很清楚自己是個很難搞定的學生，我日常的某些行動或是實驗習慣，從正常人的眼光來看可算是怪胎，所以要謝謝老師對我的包容以及在實驗不曉得怎麼進行時所給予的指導。

同時也要感謝錢宗良教授和謝松蒼教授在口試給我的指導，不但清楚的指出我在研究方法和論文寫作上的一些缺點，還給予一些實驗結果的想法和後續實驗的建議，讓計劃的後續發展能更有效率。

此外謝謝錢宗良老師和李明學老師，對於我實驗上用到的許多技術，包括顯微鏡、螢光染色、細胞生物學、immunoblot 等等，讓我發揮更多儀器功能，也幫我省去 trial and error 的時間，增進實驗的效率。

我也要謝謝林泳沖、李亦宸、林俊宏三位朋友，在我實驗上幫了很多忙，像是找資料或經驗技術的傳承，而且在我心情不好的時候偶爾還會被我當成出氣筒，真的很對不起。

感謝鐘易辰、陸瑞男兩位學長在我趕論文被軟體搞的灰頭土臉的時候，能教我重要的軟體操作技術，讓我免於開天窗的地步。當然也要謝謝他們在實驗之餘也會陪我一起哈拉，讓我在實驗的壓力下能調劑身心。

此外也要謝謝陳啟瑞、陳蓉書、邵宏仁、詹彥輝、陳頤欣、陳三太等學長，在我碩班生涯中給予的實驗指導，以及何家齊、陳奕勳、吳文馨、鄭婷云、呂念恩、黃宛榛等同學在平常實驗中的交流和支援。

最後要感謝實驗中犧牲的生命。雖然在科學的發展中，一些生命的犧牲往往無法避免，但希望包括我在內的所有實驗者不要麻木得對這些犧牲視為理所當然，應當以最少的犧牲得到最好的結果，並藉此幫助更多生命。

# 摘要

聚離胺酸(poly-D-lysine)在一般細胞培養上是很常被使用的材料，尤其在神經培養上更是經常當成不同材料間的比較的對照組。由於細胞表面整體是偏負電性，而 poly-D-lysine 在 pH=7.4 的培養環境下，側鏈末端的  $\text{NH}_3^+$  所帶的正電有助神經細胞貼附。

本實驗是選用幾種結構相近於聚離胺酸(poly-D-lysine)的高分子，以及利用體外神經培養的方法，來判斷各種材料的不同官能基對神經表現的差異。目的是要發展新的材料能取代舊有的 poly-D-lysine。另外也想藉此瞭解 poly-D-lysine 的結構是在哪一個部分有助於神經培養，最後也想藉以製造比 poly-D-lysine 更便宜更有效的材料。

神經細胞的表現會由 MTT 和 LDH 進行初步分析，而形態會使用位相差和免疫螢光法分析；細胞的功能性蛋白質表現則使用 immunoblot 確認量的變化；至於活體傳導功能表現則以 glutamate release 和 phospho-synapsin I(Ser603)的定量方式檢驗。

數種材料中還是以類似於 poly-D-lysine 的側鏈 4 個碳會有最高的小鼠顆粒型神經細胞貼附量，但調整塗佈(coating)的量後，大部分材料形態上都會有類似表現。

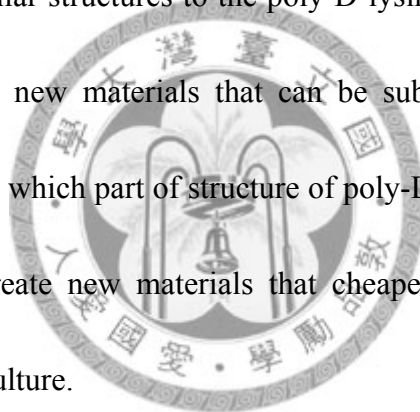
同時我們也發現，當降低塗佈的量時，神經會微量聚集但尚可形成完整的大格子網路結構。如果把功能表現量除掉細胞總量，其單位細胞功能表現量並不會比傳統的單顆貼附形態的效果差。由於體內神經元並非都以分散貼附的方式生長，因此這種形態也可嘗試成為新的培養模式。

關鍵字：聚離胺酸；官能基；電性；網路結構；顆粒型神經細胞

# Abstract

Poly-D-lysine is a material that usually used in cell culture, especially to be deal as control material for other materials test in neural culture. The  $\text{NH}_3^+$  group on poly-D-lysine would be positive charge at  $\text{pH}=7.4$  which is a common conditions in cell culture, and it will be helpful for neuron adherence on material due to the overall negative charge on the cell surface.

The study is to determine the different behaviors of neuron cultured on several materials which have similar structures to the poly-D-lysine by using in vitro neuron culture. We wish to find new materials that can be substitutes for poly-D-lysine. Besides, we want to know which part of structure of poly-D-lysine is useful for neural culture, and finally to create new materials that cheaper and more effective than poly-D-lysine on neural culture.



The behaviors of neurons are determined by LDH and MTT first, and the morphology is checked by using microscope including phase contract and fluorescence. The expression of functional proteins is checked by immunoblotting. And finally, the ability of transmission is determined by measurement of the glutamate release and phosphor-synapsin I(Ser603).

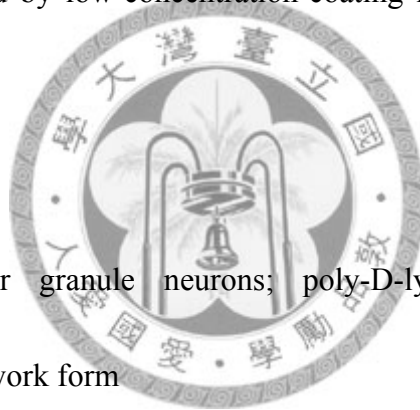
In this study, the structure have four carbon on the residue which is similar to poly-D-lysine is the best one in the numbers of cerebellar granule cells attached on

material. But if we adjust the concentration of coating, neurons can have similar expression on almost all materials.

And we also found that the low concentration of coating will made neurons have a little slide to form a big network without neurites broken. Besides, if we divide the among of functional expression with cell number, the average behaviors of big-network forms are not worse than single-adherent forms.

Although neurons grow in vivo are not always at single-attachment forms, the big-network forms caused by low-concentration-coating might be a new model for neuron culture.

Keyword: cerebellar granule neurons; poly-D-lysine; glutamate release; functional group; big-network form



# 目錄

誌謝.....	ii
摘要.....	iii
目錄.....	vi
圖表目錄.....	viii
第 1 章 緒論.....	1
第 2 章 文獻回顧.....	3
2-1 神經系統簡介.....	3
2-2 神經細胞培養.....	4
2-3 神經細胞突觸之形成.....	4
2-4 培養神經細胞的用途.....	5
2-5 影響神經細胞生長因素.....	6
2-6 神經細胞之電位傳導與神經傳導物質之釋放.....	7
第 3 章 實驗材料與方法.....	11
3-1 實驗架構.....	11
3-2 試藥原料.....	12
3-3 試藥配置.....	15
3-4 神經細胞培養.....	20
3-4-1 塗佈材料.....	20
3-4-2 初代細胞培養(primary cell culture)步驟.....	20
3-5 MTT 測試評估神經細胞生長情形.....	21
3-6 LDH 測試評估細胞存活數目.....	21
3-7 免疫螢光染色 (immunofluorescence stain).....	22
3-8 西方點墨法 (Western blot).....	23

3-9 神經細胞功能測試 .....	24
3-9-1 穀胺酸(Glutamate)釋放和 DNA 定量:.....	25
3-9-2 突觸素 I 蛋白 (Phospho-Synapsin I) 磷酸化程度評估:.....	25
3-10 西方點墨法結果分析 .....	26
第 4 章    結果與討論.....	27
4-1 各材料在不同天期培養下的穩定性 .....	27
4-2 各材料的塗佈飽和臨界點 .....	27
4-3 各材料的免疫螢光照片 .....	28
4-4 各材料的西方墨點法分析蛋白質表現量 .....	30
4-4 神經受刺激後的表現差異 .....	30
第 5 章    結論.....	32
第 6 章    圖表說明.....	33
第 7 章    參考文獻.....	64
第 8 章    附錄.....	66
8-1 儀器詳細資料 .....	66



## 圖表目錄

圖 1-1 “poly-D-lysine” .....	1
圖 1-2 選用的實驗材料 .....	2
圖 2-1 突觸形成(synaptogenesis)(摘自 Arikath et al.,2008 <sup>[7]</sup> ).....	5
圖 2-2 鈣離子通道(摘自王錫崗,人體生理學,2002) .....	9
圖 2-3 囊泡運作原理(modify from Greengard, P. et al.,1993 <sup>[20]</sup> ) .....	10
表 4-1 塗佈操作濃度的代號 .....	33
圖 4-1 各材料在不同天期的 MTT 變化(左右為一組).....	34
圖 4-2 各材料在不同濃度的塗佈時的 MTT 讀值.....	35
圖 4-3 各材料塗佈飽和點附近的 MTT 變化.....	36
圖 4-4 各材料的穿透光顯微鏡照片(8DIV).....	38
表 4-2 由各種材料塗佈效率的變化所決定的操作濃度 .....	39
圖 4-5 所有材料在高濃度塗佈的免疫螢光形態(9DIV) (1).....	40
圖 4-6 所有材料在低濃度塗佈的免疫螢光形態(9DIV) (2).....	41
圖 4-7 所有材料在高濃度塗佈的免疫螢光形態(9DIV) (3).....	42
圖 4-8 所有材料在低濃度塗佈的免疫螢光形態(9DIV) (4).....	43
圖 4-9 所有材料在高濃度塗佈的免疫螢光形態(9DIV) (5).....	44
圖 4-10 所有材料在低濃度塗佈的免疫螢光形態(9DIV) (6).....	45
圖 4-11 所有材料在高濃度塗佈的免疫螢光形態(9DIV) (7).....	46
圖 4-12 所有材料在低濃度塗佈的免疫螢光形態(9DIV) (8).....	47
圖 4-13 沒有任何塗佈的對照組(TCPS)免疫螢光形態(9DIV) .....	48
圖 4-14 低濃度塗佈的免疫螢光形態(9DIV) (1).....	49
圖 4-15 低濃度塗佈的免疫螢光形態(9DIV) (2).....	50
圖 4-16 低濃度塗佈的免疫螢光形態(9DIV) (3).....	51



圖 4-17 低濃度塗佈的免疫螢光形態(9DIV) (4).....	52
圖 4-18 細胞於不同條件塗佈的蛋白質表現量(8DIV) (1).....	53
圖 4-19 細胞於不同條件塗佈的蛋白質表現量(8DIV) (2).....	54
圖 4-20 細胞於不同天期的蛋白質表現量(1).....	55
圖 4-21 細胞於不同天期的蛋白質表現量(2).....	55
圖 4-22 細胞於不同天期的蛋白質表現量(3).....	56
圖 4-23 細胞於不同條件下，鉀離子刺激的蛋白質表現量(8DIV) (1)...	57
圖 4-24 細胞於不同條件下，鉀離子刺激的蛋白質表現量統計(1-1) ....	57
圖 4-25 細胞於不同條件下，鉀離子刺激的蛋白質表現量統計(1-2) ....	58
圖 4-26 細胞於不同條件下，鉀離子刺激的蛋白質表現量統計(1-3) ....	58
圖 4-27 細胞於不同條件下，鉀離子刺激的蛋白質表現量(8DIV) (2)...	59
圖 4-28 細胞於不同條件下，鉀離子刺激的蛋白質表現量統計(2-1) ....	59
圖 4-29 細胞於不同條件下，鉀離子刺激的蛋白質表現量統計(2-2) ....	60
圖 4-30 細胞於不同條件下，鉀離子刺激的蛋白質表現量統計(2-3) ....	60
圖 4-31 初代小腦顆粒型神經細胞動物實驗步驟 .....	62
圖 4-32 LDH 和 MTT 的比較 (1).....	62
圖 4-33 LDH 和 MTT 的比較 (2).....	62
圖 4-34 glutamate release 和 DNA 定量細胞數的比較.....	63
圖 4-35 從圖 4-3 整合到一起的 MTT 讀值 .....	63

# 第1章 緒論

在高等哺乳類生物中，中樞神經系統一旦離開發育期後，負責傳遞訊號的神經細胞就幾乎無法再生。一旦受到損傷，就很有可能變成永久損壞。雖然目前還有陸續發現中樞的神經再生現象<sup>[1]</sup>，但尚無法處理大範圍損傷，故整體來說，靠外移植神經細胞來修復損傷處還是很重要的治療法。此外，隨著人類生命的延長，除了外力傷害，自然老化以及疾病造成的神經傷害的機會也會增加。雖說周邊神經有一定修復力，但對於範圍過大的損傷，自動修復也可能因找不到目標而失敗。如何讓外在移植的細胞或是原本體內存活的細胞能有效分化神經突觸生長，並且正確連接目標，研究適合的培養基材是必要的<sup>[2]</sup>。

一般做神經細胞培養時，常以聚離胺酸(Poly-D-Lysine, PDL) 塗佈在材料上作為培養的前處理，可促進細胞貼附。其結構式如圖 1-1：

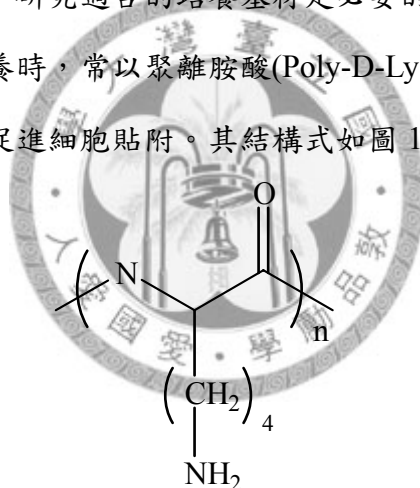


圖 1-1 “poly-D-lysine”

目前普遍認定 PDL 對培養上的貢獻來自於側鏈上的胺基，由於培養環境多設於 pH=7.4，在此 pH 下的胺基會形成 NH<sub>3</sub><sup>+</sup>帶正電，而細胞表面具有很多的 Glycosaminoglycans (GAGs)，其結構上帶有許多的負電。透過正負電相吸引的關係，故 PDL 所形成的聚陽離子層會使帶負電的神經細胞具有較佳的貼附力<sup>[3]</sup>。

本實驗中，為了瞭解在 PDL 結構中主鏈上的肽鍵(peptide bond)及其上面氮的官能基 (NH) 改變是否會影響 PDL 的主要功能，以及加上先前研究高分子薄膜改質時，發現的碳鏈長度也會影響細胞生長，故本實驗選擇的變化主要為：

1:將肽鍵移往側鏈

2:將肽鍵上的 (NH) 改成酯鍵(O)

3:改變側鏈上碳鏈長度

而選擇的材料的結構式有以下五種 (圖 1-2) :

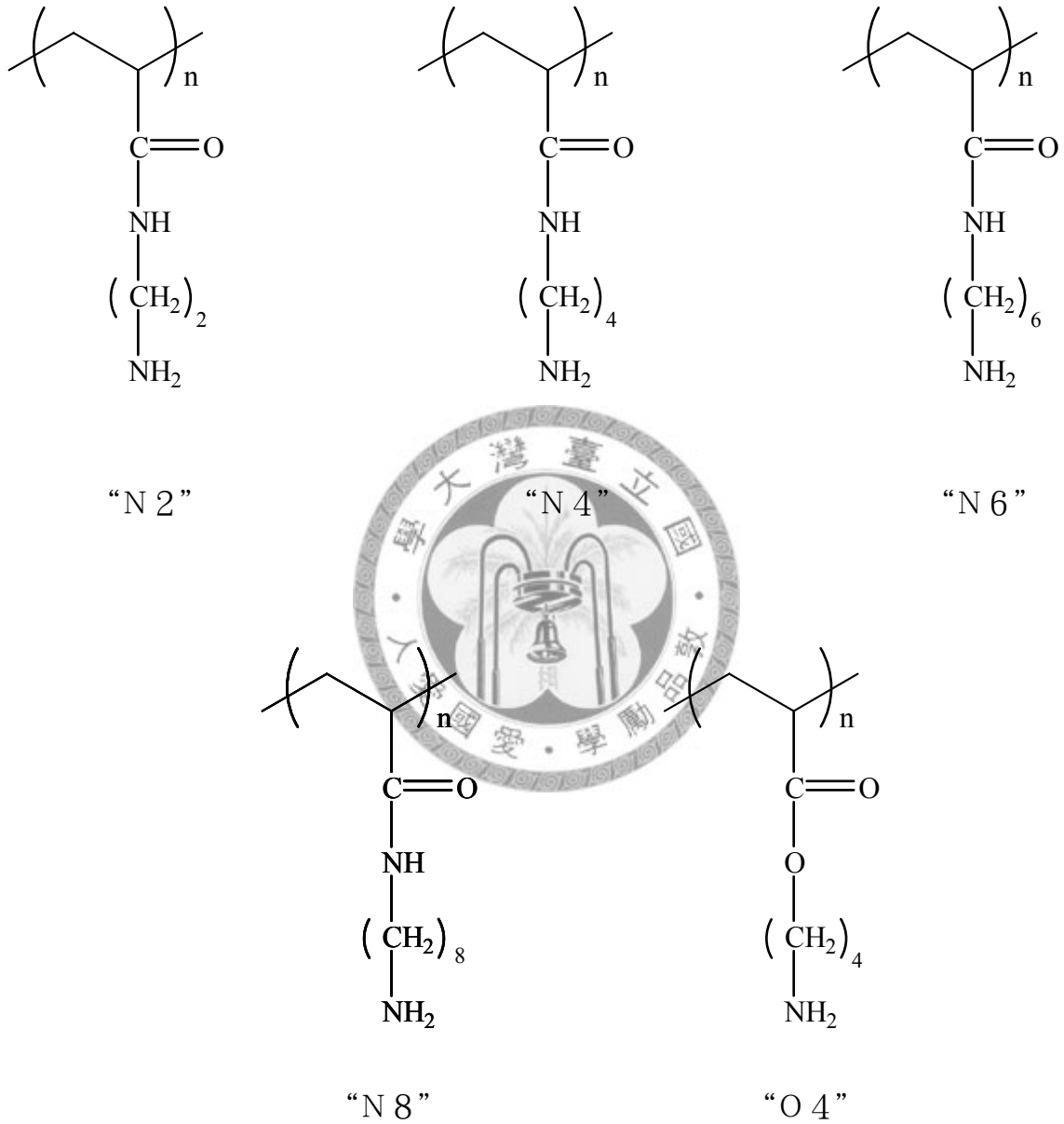


圖 1-2 選用的實驗材料

之後對這些材料就以下方引號內文字稱呼，另外用“P L”代表的 poly-D-lysine 來當作對照組。

## 第2章 文獻回顧

### 2-1 神經系統簡介

神經系統主要可分為兩大類：(1)中樞神經系統(central nervous system, CNS)，包括腦(brain)和脊髓(spinal cord)；(2)周邊神經系統(Peripheral nervous system)，主要由神經突起所形成的神經(nerve)和神經細胞(neurons)聚集所形成的神經節(ganglion)所構成，包括軀體神經系統(somatic nervous system)以及自主神經系統(autonomic nervous system)。軀體神經系統的感覺神經纖維(sensory nerve fibers)可將身體感覺受器所感覺到情報傳送到腦和脊髓，相對的運動神經纖維則將中樞下達的命令傳達到身體的骨骼肌產生對應的動作，整體來說軀體神經系統就是自主意識對“感受→反應”的路徑；而自主神經系統下面又包含交感神經系統(sympathetic nervous system)以及副交感神經系統(parasympathetic nervous system)，主要為調控內臟、平滑肌、內分泌等活動，並不直接受到意識控制<sup>[4]</sup>。

而神經組織的組成中，又可細分為神經元(neuron)和神經膠細胞(glia cells；neuroglia)兩種。神經元可說是神經組織的實質功能部分，其上有許多突起可和其他細胞接觸傳遞訊號，可分為樹突(dendrite)與軸突(axon)兩種；神經膠細胞則偏向輔助角色，包括支持、保護、調節神經元的功能。

神經元可說是功能上的基本單位，大致上可分三個部分：(1)樹突(dendrite)為接受環境傳入刺激的主要部分，內有核糖體(ribosomes)，外在則粗糙且沒有絕緣外鞘；(2)細胞本體(cell body)則是核(nucleus)的所在，是整個神經細胞之營養、能量與蛋白質製造中心；(3)軸突(axon)則是傳出訊號的部分，常為單一之突出，但末端則分枝而形成末端呈樹狀分枝(terminal arborization)，內無核糖體。

神經膠細胞目前分四大類：星狀細胞(astrocyte)、室管膜細胞(ependymal cells)、微神經膠細胞(microglia)及寡樹突細胞(oligodendrocyte)。

而本實驗中所用的神經來自小腦皮質，主要可分為三層。最外面是分子層(molecular layer)，中央是 Purkinje 氏細胞層(Purkinje layer)及內層之顆粒層(granular layer)。其中內層的顆粒層之神經元是最小的（直徑約為 5  $\mu\text{m}$ ），並有著典型神經元的構造，本實驗所取得的初代神經細胞即來自小鼠小腦皮質的顆粒層。

目前雖有中樞神經系統自我生長修復的証據<sup>[1]</sup>，但尚不足以應付臨床上的需求，因此對中樞神經系統的治療還是傾向細胞移植為主。一般神經組織發生損害時，初期可能會局部組織水腫、引發神經元釋放刺激性胺基酸，星狀細胞也會受活化，進而巨噬細胞進入受傷害部位引發發炎反應<sup>[5]</sup>。但這些行為對神經系統修復卻是不利因素，由於傷口癒合機制會使星狀細胞和纖維母細胞會形成一個神經膠質疤(glial scar)的抑制區，這會讓受傷神經原本因修護而啟動的 GAP-43、*bcl-2*、*c-jun* 等表現反而會被抑制，於是新生的生長錐(growth cones)不是退化就是停止在傷口，導致再生不良。

## 2-2 神經細胞培養

細胞培養是生醫研究中不可或缺的一環，包括訊息傳遞和病理機制探討等。細胞培養又分為初代細胞培養(primary cell culture)和細胞株細胞培養(cell line culture)。初代細胞培養是將細胞從活體上取下，經純化處理再進行培養，因此容易受到個體差異干擾，此外還有純化效率上的問題，故會有不同批的細胞品質就不太一樣等問題。此外如果有複製等行為的話，會有端粒酶縮短等老化現象<sup>[6]</sup>，但其結果也比較接近正常體內細胞會有的反應；細胞株細胞培養則通常是使用融合細胞或是基因轉殖，使得所用的細胞不像初代細胞有複製老化的問題，但由於本質上已經和原始細胞有所不同，故在討論正常生理機制時難免會被質疑。

## 2-3 神經細胞突觸之形成

神經細胞突觸(synapse)是神經細胞間具有傳遞訊號能力的間隔，為非對稱結

構，使傳遞為單一向，是神經功能上不可缺少的功能結構。負責送出訊號的細胞為突觸前細胞，軸突末端內有突觸囊泡，其內包含神經傳導物質(neurotransmitter)，包括乙醯膽鹼(acetylcholine)、甘胺酸(glycine)、麩胺酸(glutamate)等等。一旦突觸前細胞收到動作電位就會透過訊息傳遞來胞吐(exocytosis)出囊泡。而接受訊號的突觸後細胞表面會有對應神經傳導物質的受器，一旦結合後會改變膜電位，使得訊息發生傳遞。

突觸的形成和兩邊的細胞的表面分子辨識有密切關係，可由圖 2-1 大致瞭解：

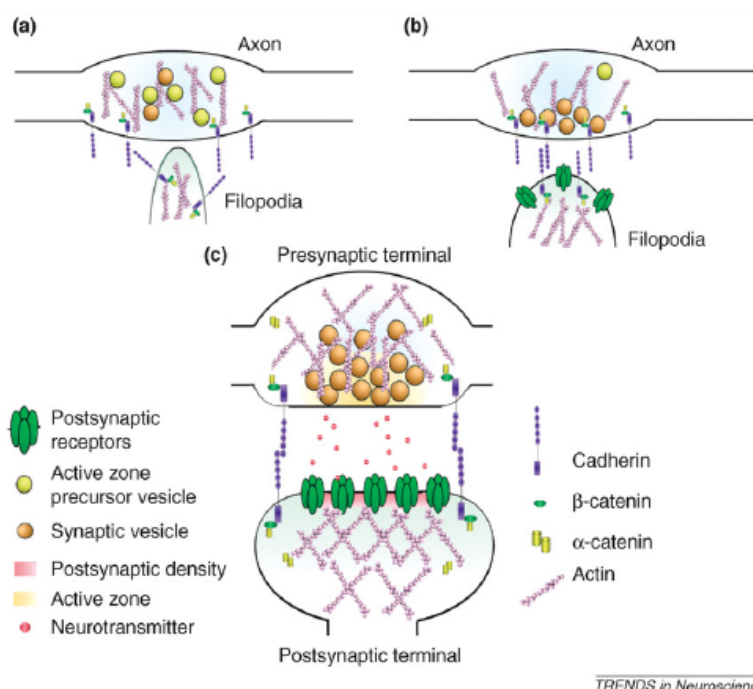


圖 2-1 突觸形成(synaptogenesis)(摘自 Arikath et al.,2008<sup>[7]</sup>)

由(a)可得知突觸形成首先是由突觸後神經細胞的樹突伸出偽足接觸突觸前神經細胞的軸突，兩邊的 N-cadherin 辨認後會成為穩定結構(b)，細胞骨架也會開始形成，雙方對應的神經傳導物質和受器也會開始出現(c)，故 N-cadherin 在神經突觸形成上是重要角色<sup>[8,9]</sup>。

## 2-4 培養神經細胞的用途

神經培養有以下用途：(1)周邊神經的重建，利用生醫材料包覆受損斷裂的神

經，除了可防止其他細胞進入干擾外，也可導引修復生長的方向<sup>[10]</sup>；(2)神經移植，將神經細胞培養在三度空間的多孔生醫基材，移植到個體受損位置，用以彌補功能的缺失<sup>[11]</sup>；(3)生物感測元件(bio sensor)，利用神經對環境敏感的特性，偵測特定環境情報；(4)類神經網路的應用，由於材料可控制神經生長方向，可使神經培養模擬體內狀況，以期達到模擬生物得思考判斷能力。

## 2-5 影響神經細胞生長因素

近年的研究指出，材料培養神經細胞時，會影響生長的因素主要可分為以下四點：(1)材料本身的性質 (2)基材的結構 (3)促進生長的物質 (4)帶電性。

(1) 材料本身的性質：生物相容性是首先考慮的事情，材料移植體內不能發生排斥或是毒性問題，此外是否能自然裂解、劣解產物是否會自然排出、是否產生毒性副反應都必須考慮。目前來說，水膠(hydrogel)<sup>[12]</sup>、洋菜膠(agarose)<sup>[13]</sup>等。其他如：PVDF<sup>[14]</sup>、Poly(D,L-lactide)、Polyurethane(PU)<sup>[15]</sup>等合成高分子已常應用在培養神經細胞方面。

(2) 基材的結構：過去眾多研究中，基材表面透過蝕刻等技術造出(2~5 μm)<sup>[16]</sup>可促進神經突觸延此生長，然而當蝕刻深度過深，達 69 μm 時反而會失去這種引導能力。此外，Yang<sup>[17]</sup>等人則利用電紡絲技術將聚乳酸(poly lactic acid)做成具規則排列與雜亂兩種形式之纖維，之後將神經幹細胞培養在這兩種不同大小與排列方式的纖維上，發現到當纖維具規則排列且大小為奈米等級的纖維時，神經幹細胞就有相當大比例可分化為神經細胞，而且突觸可透過整齊的纖維排列所引導，但雜亂排列的纖維則不具有引導之功能。

整體而言，材料的表面結構在達到微米等級以下甚至是奈米等級時，有可能對神經細胞產生影響。而結構的排列方式也是材料能否引導突

觸的重要關鍵之一。

- (3) 促進生長的物質：如神經生長因子(nerve growth factor)、聚離氨酸(PDL)、維結合蛋白(fibronectin)，層黏連蛋白(laminin)，L1 蛋白等，常於培養神經細胞時當作添加物，除了可幫助貼附外，也有促進突觸生成和軸突延伸等功能，其中又以塗佈 PDL 最常見，但也有實驗指出長天期的培養中，PDL 的懸浮會對神經有不良影響。
- (4) 帶電性：眾多文獻中指出材料電性對細胞生長具有重要影響。一般而言，正電性材料對神經生長有促進效果<sup>[18]</sup>，由於細胞表面常含有大量醣胺多醣(glycosaminoglycans:GAGs)，細胞整體偏帶負電，故透過正負電相互吸引能促使細胞貼附。但並非負電就會對神經有不良影響，Bin Li 等人利用化學改質之方式<sup>[19]</sup>，使羧基以不同密度接到基材表面，使基材形成一個帶有負電梯度帶電性結構，如果將神經細胞透過處理後使其能貼附生長於基材之上，可發現到神經突觸會往帶負電少的區域生長。由類似例子可知基材表面所帶電性會影響細胞貼附。雖說一般而言帶正電性材料會促進神經細胞貼附，但就誘發突觸生長的情況來說，正電卻非唯一選擇，以 Bin Li<sup>[19]</sup>等人的研究可知，負電性材料若是呈現電位梯度，還是能具有引導突觸生長的能力。

## 2-6 神經細胞之電位傳導與神經傳導物質之釋放

神經細胞在體內大部分的功能是感受周圍環境的情報，並適當的傳達給正確目標。以感覺神經元為例，對於光、聲、冷、熱、痛、氣味等，膜受器被誘發後會產生動作電位，訊息會傳達至中樞神經系統進行分析判斷，待其反應後，便將訊息透過運動神經元送到周邊產生適當反應，譬如肌肉活動等等。整體來說，單一神經元的傳遞過程中，可分為下列數個步驟：(1) 接收反應，(2) 產生動作電位，(3) 突觸前神經末端的鈣離子流入與囊泡(vesicle)釋放，(4) 神經傳導物質刺



激突觸後神經元及 (5) 多餘的神經傳導物質回收。

(1) 接收反應：以味覺、嗅覺而言，氣味的分子會和腔室內的細胞表面受器結合，活化的受器會改變形態，可產生訊息傳遞或促使其他膜蛋白的表現改變。而以視覺而言，光的刺激會直接達到視神經內，與細胞內的視紫質 (rhodopsin) 產生氧化還原反應，進而刺激電訊號產生。簡單來說，神經對訊號的接收，就是本身所有的特定分化，並會對特定環境情報敏感並產生可傳遞電位訊號。

(2) 產生動作電位：大多數神經在沒有活化的極化(polarization)期，膜表面內外電位差為-70 mV，但各種離子的分佈比例卻不是單純的正負電位平衡。由於大部分時間，神經表面的鈉-鉀幫浦(sodium-potassium pump) 在 ATP 的能量提供下，會將鈉離子主動往外運輸，而鉀離子主動往內運輸，於此結果下，細胞外的鈉離子會高於內部，而鉀離子則相反。

當神經產生可傳遞的電位訊號時，一旦其強度達到鈉離子通道(sodium channel)的閾值(threshold)時，鈉離子通道會打開，由於原本的電位差和鈉離子的分佈不均，會使鈉離子被動的快速流入，造成局部電位驟升，這種情況又稱做去極化(depolarization)。然而這種局部電位變化卻也會影響附近的鈉離子通道，於是會發生連鎖反應將整個去極化的情況傳遞到整個細胞。

不過鈉離子通道的開起很短暫，所以鈉離子並不會無節制的流入，此外受到去極化的電位影響，鉀離子通道也會隨後開啟。由於鉀離子的平衡電位是-90 mV，所以原本上升的去極化電位很快就會往回降，這個情況叫做再極化(repolarization)。又由於鉀離子通道不像鈉離子通道會立刻停止作用，故甚至有可能使電位降到比原本的-70 mV 更低的情況，這種情況又叫過極化(hyperpolarization)。之後細胞會調節離子分佈，使其達到原本的-70 mV。以上就是整個電位變化的循環。

值得注意的是鈉離子通道的短暫，是由於通道末端有個電位敏感的结构

(channel-inactivating segment)，當電位上升鈉離子流入時，此構造也會堵住 channel。由於這個阻礙並不會立刻解除，故即使有下一次的動作電位流入，鈉離子通道無法讓鈉離子再次流入，故整個動作電位循環就會被終止。在這段阻礙期就被稱為不反應期(refractory period)，期間又可分兩階段，分別是如論多大的電位變化都不啟動的絕對不反應期(absolute refractory period)，以及其後雖然有機會反應，但閾值提高造成不敏感的相對不反應期(relative refractory period)。這兩種機制的存在很重要，可避免一個神經細胞的兩個通道發生來回活化的無限循環，這也是讓神經動作電位傳遞時，會有單一方向的機制之一。

- (3) 突觸前神經末端的鈣離子流入與囊泡釋放：當動作電位向下傳遞到達突觸前端時，會啟動電壓感應開啟式鈣離子通道 (Voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channel) 開啟，如圖 2-2：

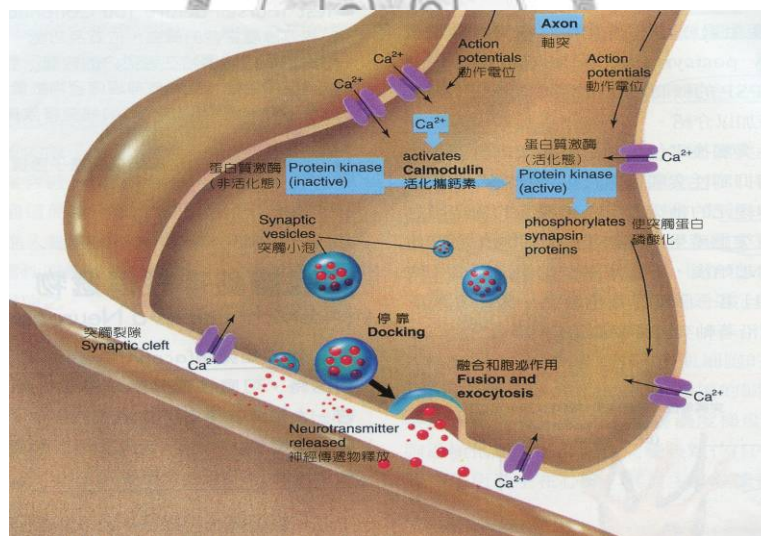


圖 2-2 鈣離子通道(摘自王錫崗,人體生理學,2002)

一旦胞外的鈣離子大量流入細胞，此時攜鈣蛋白(calmodulin)會和鈣離子結合並活化 $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II)，受到活化的CaMK II 會磷酸化突觸素I (synapsin I)。

突觸素I本身為囊泡上大量表現的膜蛋白，無磷酸化時會與細胞骨架(actin)結合，而使得囊泡無法釋出產生訊號傳遞。而當突觸素I磷酸化使得囊泡跟actin的結

合能力下降，囊泡的游離便有機會使囊泡和細胞膜結合，使內部的神經傳導物質有機會透過(exocytosis)放至細胞膜外<sup>[20]</sup>，如圖2-3：

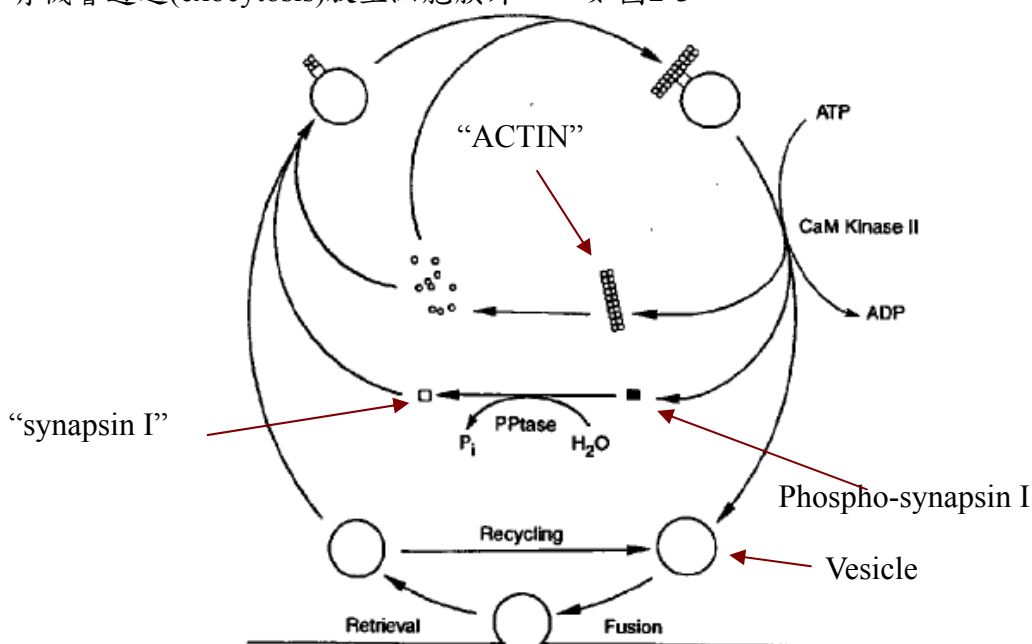


圖 2-3 囊泡運作原理(modify from Greengard, P. et al.,1993<sup>[20]</sup>)

- (4) 神經傳導物質刺激突觸後神經元：當囊泡和細胞膜發生融合，就會產生胞吐作用(exocytosis)，將囊泡內部的神經傳導物質(neurotransmitters)釋放至突觸裂縫(synapse cleft)，此時的神經傳導物質會與突觸後神經元樹突上的受器結合，並進一步引發動作電位，如此便再一次進入下一個神經傳導的機制。
- (5) 多餘的神經傳導物質回收：神經傳導物質釋放出來後並不會就一直留在突觸裂縫之中發生作用，大部分的神經傳導物質會重新回收到細胞內，如此也可避免過度的興奮突觸後神經元。另外過多的神經傳導物質，如glutamate存在於胞外時也會造成神經細胞毒性，因此神經傳導物質在釋放後會被快速回收。

## 第3章 實驗材料與方法

### 3-1 實驗架構

本實驗在材料方面選擇類似聚離胺酸的數種水溶性材料(圖 1-2)。先配好固定濃度後，以 0.22  $\mu\text{m}$  過濾以達無菌標準。之後以 PDL 的重量濃度為塗佈標準，先測出每一種材料對神經細胞的貼附效率。貼附效率會以光學顯微鏡(Microscope)觀察細胞貼附在材料上的情況，並以 MTT 和 LDH 來測試其活性和存活量。

此外會用免疫螢光染色確定神經功能蛋白的表現位置，以及使用西方點墨法(Western blotting)來半定量細胞蛋白質表現量。而神經對外在刺激的反應程度會先以氯化鉀溶液刺激神經，再使用西方點墨法定量 phospho-synapsin I 以及偵測 glutamate release 的方式來進行判斷功能表現。



### 3-2 試藥原料

1. 二次水：自製
2. Cell culture plate(48well), NUNC
3. Cell culture plate(24well), Costar
4. Cell culture plate(6well), Costar
5. Cell culture plate(96well), Costar
6. 甲醇 Methanol :  $[\text{CH}_3\text{OH}]$ , MW=32.04, 99.8%, Wako, Japan
7. 乙醇 Ethanol :  $[\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}]$ , MW=46.07, 99.5%, Showa, Japan
8. 氯化鈉 Sodium Chloride :  $[\text{NaCl}]$ , MW=58.44, Showa, Japan
9. 氯化鉀 Potassium Chloride :  $[\text{KCl}]$ , MW=74.55, Wako, Japan
10. 硫酸鎂 Magnesium Sulfate :  $[\text{MgSO}_4]$ , MW=120.37, Showa, Japan
11. 磷酸氫二鈉 Sodium Phosphate Dibasic Anhydrous :  $[\text{Na}_2\text{HPO}_4]$ ,  
MW=141.96, Tedia, USA
12. 磷酸二氫鉀 Potassium Dihydrogenphosphate :  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$ ,  
MW=136.09, Showa, Japan
13. 碳酸氫鈉 Sodium Hydrogen Carbonate :  $[\text{NaHCO}_3]$ , MW=84.01, Wako, Japan
14. 鹽酸 Hydrogen Chloride :  $[\text{HCl}]$ , MW=36.46, 35.5%, Simmakyu, Japan
15. Ethylenediaminetetra-Acetic Acid(EDTA) : 380.2 , 99%, Sigma, USA
16. 聚離胺酸 Poly-D-Lysine : MW=70000-15000, Hydrobromide, Sigma, USA
17. Tris-[hydroxymethyl]amino- methane:  $[\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3]$ , MW=121.14, J.T.Baker
18. Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane hydrochloride, :  $[\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}]$ ,  
MW=157.60, sigma
19. 胰蛋白酶 Trypsin : From Porcine Pancreas, Sigma, USA
20. 胰蛋白酶抑制劑 Trypsin Inhibitor : Type II-s(Soybean), Sigma, USA
21. 去氧核糖核酸酶 Deoxyribonuclease I, (D4527), Sigma

22. 氯胺酮 Ketamine HCl : Fort Dodge, USA
23. Combelen : Bayer,Germany
24. Basal Medium Eagle(BME) : With Earle's Salts,With L-glutamine,Without Sodium Bicarbonate,GIBCOBRL,New Zealand
25. 白蛋白 Bovine Serum Albumin(BSA) : 99%,Sigma,USA
26. 胎牛血清 Fetal Bovine Serum(FBS) : Approved Origin(South America),GIBCOBRL,New Zealand
27. 三合一抗生素 Antibiotic-Antimycotic(100X) : 10000 units Penecillin,10000  $\mu$ g Streptomycin(Base),& 25  $\mu$ g Amphotericin B/ml, GIBCOBRL,USA
28. Cytosine  $\beta$ -D-Arabinofuranoside(Ara-C) Hydrochloride :  
[C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>],FW=243.2,Sigma,USA
29. 錐蟲藍 Trypan Blue Solution : 0.4%,Sigma,USA
30. 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide(MTT) :  
[C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>5</sub>SBr],FW=414.3,98%,Sigma,USA
31. I-BLOCK, TROPIX
32. Anti-actin primary antibody, Chemicon
33. Anti Synapsin I primary antibody,(611392), BD
34. Anti Phospho-Synapsin primary antibody,(AB13879), ABcam
35. Anti Synaptophysin primary antibody,(611880.), BD
36. Anti GAP-43 primary antibody,(ab50608), ABcam
37. Anti MAP-2 primary antibody,(MAB3418), Chemicon
38. Anti Neurofilament primary antibody,(AB1981), Chemicon
39. Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody #7076, cellsignal
40. Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody #7074, cellsignal
41. FITC-conjugated goat anti-mouse IgG,(AP181F), Chemicon

42. Rhodamine-conjugated goat anti-mouse IgG,(AP182R), Chemicon
43. paraformaldehyde : Sigma
44. triton-X 100 : Sigma
45. DAPI, Sigma
46. Chemiluminescent HRP Substrate,(WBKL S05 00), Millipore
47. 10X TBS, BIO-RAD



### 3-3 試藥配置

#### 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

將上列試藥以 1L 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. BME 培養基 Basal Medium Eagl(BEM Medium)

BME POWDER	9.20 g
NaHCO <sub>3</sub>	2.20 g
KCl	1.864 g



將上列試藥溶於 900 ml 的二次水中，同時以攪拌子攪拌 2-4 小時使其完全溶解，並用 NaOH 或 HCl 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 (100X) 和 100 ml 的胎牛血清(FBS)，冷藏於 4°C 的黑暗中。

#### 3. BME(K-)培養基

BME POWDER	9.20 g
NaHCO <sub>3</sub>	2.20 g

將上列試藥溶於 1000 ml 的二次水中，同時以攪拌子攪拌 2-4 小時使其完全溶解，並用 NaOH 或 HCl 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，冷



藏於 4°C 的黑暗中。

4. Kerb 氏溶液 (Kerb's Modified Solution)

NaCl	7.00 g
KCl	0.373 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.164 g
MgSO <sub>4</sub>	0.296 g
NaHCO <sub>3</sub>	0.164 g
Dextrose	2.34 g
BSA	3.00 g

將上列試藥溶於 1L 的二次水，同時以攪拌子攪拌使其完全溶解，並用 NaOH 或 HCl 將溶液的 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之，並添加 10 ml 的三合一抗生素(100X)，冷藏於 4°C 的黑暗中。

5. 麻醉劑

以 1 ml 的注射針筒吸取等量體積的氯胺酮 (Ketamine-HCl) 及 Combelen，混合均勻後使用。

6. 3.5%胰蛋白酶溶液 (3.5% Trypsin Solution)

Trypsin	0.350 g
Kerb's solution	10.0 ml

秤取 trypsin 0.350g 溶於 100 ml 的 Kerb 氏溶液中，溶解後使用滅過菌的 0.22 μm PVDF 膜以針筒過濾滅菌方式過濾之，冷藏於 4°C 的黑暗中。

7. 3.5%胰蛋白酶抑制劑溶液 (3.5% Trypsin Inhibitor Solution)

Trypsin inhibitor	0.350 g
Kerb's solution	10.0 ml

秤取 trypsin inhibitor 0.350 g 溶於 100 ml 的 Kerb 氏溶液中，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之，冷藏於 4°C 的黑暗中。

8. 去氧核糖核酸酶 Deoxyribonuclease I

Deoxyribonuclease I     10000 U

0.15 M NaCl                2 ml

將 Deoxyribonuclease I 的粉末加入 0.15 M NaCl，使最後濃度為 5000 U/ml，分裝為小管，存於 -20°C，避免重複解凍。

實際使用時，取 100  $\mu\text{L}$  加到 20 mL 的 medium 中，即最終濃度為 25 U/mL。

9. 聚離胺酸溶液(Poly-D-Lysine Solution)

Poly-D-Lysine     100.0 mg

H<sub>2</sub>O                10.0 ml

秤取 Poly-D-Lysine 100.0 mg 溶於 10.0 ml 的二次水中，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之，並分裝之以避免使用時重複的冰凍解凍動作，保存於 -20°C 的冰箱中。

10. Ara-C 溶液(Cytosine  $\beta$ -D-Arabinofuranoside Solution)

Cytosine  $\beta$ -D-Arabinofuranoside     2.43 mg

BME medium                                1 L

秤取 Cytosine  $\beta$ -D-Arabinofuranoside 2.43 mg 溶於 1 L 的 BME 培養液中，溶解後使用滅過菌的 0.22  $\mu\text{m}$  PVDF 膜以抽氣過濾滅菌方式過濾之，冷藏於 4°C 黑暗中。

11. MTT Assay Solution

MTT                250 mg

PBS                50 ml

秤取 MTT 250 mg 溶於 50.0 ml 的磷酸緩衝溶液(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之，冷藏於 4°C 的黑暗中。(配製時需避光)

## 12. HBSS 溶液

NaCl	8.0 g
CaCl <sub>2</sub>	0.14 g
KCl	0.4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.06 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.1 g
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.1 g
NaHCO <sub>3</sub>	0.35 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.048 g
glucose	1.0 g

將上列試藥溶於 1L 的二次水，同時以攪拌子攪拌使其完全溶解。使用滅過菌的 0.22 μm PVDF 膜利用抽氣過濾的方式過濾之，冷藏於 4°C。

## 13. HBSS(K+)

同 HBSS，但 KCl 的量增加到最終 90 mM<sup>[21]</sup>

## 14. Amplex® Red Glutamic Acid/Glutamate Oxidase Assay Kit

AmplexR Red reagent stock solution	50 μL
HRP solution	12.5 μL
Glutamate oxidase solution	80 μL
Glutamate-pyruvate transaminase solution	25 μL
Alanine solution	5 μL
Reaction buffer	4.83 mL

將上述試藥一起混合後，避光儲存於-20°C。

## 15. LDH kit

Catalyst, Diaphorase/NAD <sup>+</sup> mixture	1 ml
Dye solution	45 ml

將Catalyst, Diaphorase/NAD<sup>+</sup> mixture與Dye solution以1:45的比例混和，混和後取出100 μL與100 μL sample黑暗中反應30分鐘

16. 4% paraformaldehyde

取20 g的paraformaldehyde粉末，以500 ml PBS避光攪拌直到溶液澄清

17. 0.1% triton-X 100

取10  $\mu$ l的triton X-100加到10 ml PBS中，混勻

18. TBST

10X TBS      100 ml

H<sub>2</sub>O          900 ml

tween-20      1 ml

混勻即可。

19. Blocking solution

I-BLOCK      3 g

TBST          500 ml

攪拌到完全溶解，冰存於4°C



### 3-4 神經細胞培養

#### 3-4-1 塗佈材料

各材料使用時，應避免照射 UV 燈，並在無菌操作箱下操作。程序如下：

- (1) 先配置好各材料的貯存濃度(stock)，實際操作時，依照條件的不同另外稀釋到最終工作濃度。
- (2) 在每個欲塗佈的 well 以  $0.5 \text{ ml/cm}^2$  的量加入各種材料溶液，在  $37^\circ\text{C}$  靜置隔夜。
- (3) 待材料沉澱後，再將溶液抽離，並在開放狀況下靜置 30 分鐘以上，自然乾燥後即準備完成。

#### 3-4-2 初代細胞培養(primary cell culture)步驟

細胞來源為七天大的 Wistar 大鼠小腦皮質所取得顆粒型神經細胞(cerebellar granule cells)<sup>[22]</sup>，並培養在不同表面形態的基材上。整個實驗過程如下：

- (1) 取得小腦皮質(cerebellar cortex) (流程請參照圖 4-31)

先將手術用具以高溫高壓蒸汽滅菌法滅菌(autoclave)。

將出生七天大的 Wistar 大鼠，以過量的麻醉劑(0.1 ml)麻醉致死，再以酒精擦拭小鼠體表，以避免污染。要取腦部時，先以大剪將頭部和軀幹部分離，再以左手拿鑷子固定約在嘴部，右手拿小剪剪開頭皮及頭殼，再用小鑷將頭殼掀開，此時可以看見完整腦部，將腦部取出置於 Kerb 氏溶液中，並將大腦、橋腦、延腦、小腦等分離，並用鑷子取出小腦，再將小腦髓質與皮質分離，最後仔細清除掉皮質外的腦膜及微血管。

- (2) 純化細胞

將清除腦膜及微血管的小腦皮質置於裝有 9 ml Kerb 氏溶液之燒杯中，以彎頭小剪將小腦皮質組織剪碎至約  $1 \text{ mm}^3$  的大小，吸取小腦皮質碎塊，置於 50 ml 的離心管中，加入 1 ml 的 3.5%胰蛋白酶溶液，置於  $37^\circ\text{C}$  的水浴 30 分鐘以解碎組織。之後再加入 1 ml 的 3.5%胰蛋白酶抑制劑溶液或是 11 ml 以上的 BME 培養液，置於  $37^\circ\text{C}$  的水浴 30 分鐘，以抑制胰蛋白酶繼續對細胞傷害，期間可另外加入去氧

核糖核酸酶溶液，可避免死亡細胞流出的 DNA 纏住其他的細胞。將離心管從水浴取出離心(400 g, 5min)後，移除上層液體，取下層細胞。然後加入 10 ml 的 Kerb 氏溶液，利用 pipet-aid 將細胞輕輕沖散，再以 400 g, 5min 離心，移除上層液體，取下層細胞，最後加入 BME 培養基 10 ml，均勻混合後，使用 hemocytometer 作細胞計數。根據計數結果，將細胞以 BME 稀釋到  $10^6$  cells/ml。

### (3) 接種細胞

將取得的顆粒型神經細胞接種於已塗佈有各材料的培養盤上，使接種細胞的密度最後達到  $5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>，在 18~24 小時後換含有 Ara-C 溶液的 BME 培養基，以抑制會分生的神經膠細胞(glial cells)生長所造成的干擾<sup>[23]</sup>。

### 3-5 MTT 測試評估神經細胞生長情形

MTT 測試<sup>[24,25]</sup>是利用活細胞中的粒線體可以將黃色 MTT 的 tetrazolium ring 還原成藍紫色的 formazan 晶體。此反應結果可用來量化粒腺體的反應活性，藉此來測量細胞的生長情形，其實驗步驟如下(整個過程需避光)：

- (1) 培養盤中的培養基抽出並以 PBS 沖洗，然後在每一個 well 中加入 0.1 ml 的 MTT 溶液，置於二氧化碳生長培養箱中作用 3 小時。
- (2) 每個 well 中加入 0.2 ml(199.1 ml IPA + 30% 0.9 ml HCl)，震盪作用 20 分鐘，以此將藍紫色的 formazan 晶體溶出。
- (3) 在每個 well 中取出 0.1 ml 溶液置於 96-Well 中，以酵素免疫分析自動判讀機(ELISA Reader)讀取波長 570 nm 再扣除 630 nm 的絕對吸光值。

### 3-6 LDH 測試評估細胞存活數目

LDH 測試<sup>[26]</sup>是透過細胞內乳酸脫氫酶(lactate dehydrogenase, LDH)將 LDH kit 的黃色 tetrazolium 代謝成紅色 formazan。一般而言細胞內的乳酸脫氫酶並不會釋放

至培養基中，但當細胞遭到毒殺時細胞膜因為破裂，使LDH被釋放至培養基。因此LDH常被用來測試細胞毒性的一種有效方法之一。

由於 LDH 比較不受細胞活性影響而有劇烈改變，故如果把活細胞用 0.5% triton-X 100 打破的話，LDH 可當成一個細胞數目的參考。

- (1) 把待測試的每格 48-well 抽掉 medium，再用 PBS 洗去殘留的 medium 以避免 medium 的干擾。
- (2) 抽掉 PBS 後，加入 0.2 ml 的 0.5% triton-X 100 溶液，用 shaker 搖 5~20 min 以達有效打破細胞。
- (3) 每個條件取 20  $\mu$ l 加到 80  $\mu$ l 的水內，再按照說明書配製足量的 LDH reagent，每格加 100  $\mu$ l 後，避光於 37<sup>0</sup>C 中反應適當時間(約 30 min)，之後以酵素免疫分析自動判讀機(ELISA Reader)讀取波長 490 nm 再扣除 630 nm 的絕對吸光值。

### 3-7 免疫螢光染色 (immunofluorescence stain)

免疫螢光染色是將細胞的狀況固定後，利用抗體對目標的專一性，使得抗體會停在目標的地方。如果抗體有攜帶螢光物質的話，就可用螢光激發的方式偵測目標的位置或分佈狀況，但要注意的是此方法只能用於定性，而不能定量。實驗步驟簡述如下：

1. 移除培養基後，以 PBS 簡單清洗，加入 140  $\mu$ l 的 4% paraformaldehyde，靜置 5 min (此步驟建議於通風櫃中操作)
2. 抽掉 4% paraformaldehyde 後，改加 140  $\mu$ l 0.1% triton-X 100，同樣靜置 5 min
3. 抽掉 0.1% triton-X 後以 500  $\mu$ l PBS 置換 2 次，每次 5 min
4. 加入 200  $\mu$ l 1% BSA，靜置 30 min~60 min 並於此時配置要用的一抗。抗體濃度分別為:MAP-2 (1:250)、neurofilament (1:2000)、synapsin I (1:2000)、GAP-43 (1:1000)、synaptophysin (1:1000)，以 1% BSA 稀釋配製。

5. 抽掉 1% BSA 後，加入 120  $\mu$ l 的稀釋抗體，在 4<sup>0</sup>C 反應過夜
6. 隔天再抽掉一抗，以 500  $\mu$ l PBS 置換三次，每次 5 min
7. (從此步驟開始需避光操作)。兩種二抗和 DAPI 以 1% BSA 配製稀釋，最終比例皆為 1:100
8. 每格加入 120  $\mu$ l 配製好的二抗，靜置 30~40 min
9. 以 500  $\mu$ l PBS 置換三次，每次 5 min
10. 螢光激發，用顯微鏡觀察。

### 3-8 西方點墨法 (Western blot)

不同蛋白質的分子量大小不同，可藉由膠體來讓不同種類的蛋白質進行分離，西方點墨法用做為進行蛋白質分析時使用。實驗步驟敘述如下：

1. 移除培養基後，使用 PBS 清洗兩次，將細胞置於 4<sup>0</sup>C 冰上加入 lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1:200 dilution of Protease Inhibitor Cocktail II; Calbiochem)，放置 30 分鐘後，使用細胞刮板將細胞取下，在 4<sup>0</sup>C 下離心 14000 rpm、10 分鐘，取上清液進行定量。
2. 配製 10% 的 SDS-PAGE separating gel，快速注入玻璃夾層中約 4/5 的高度，上方加入少量純水使其膠平整。
3. 膠凝固後，倒掉純水，配製 4% stacking gel，快速注入玻璃夾層，插入樣本梳 (15 well)。
4. 膠凝固後，將玻璃夾層裝置於電泳槽，加入足量的 running buffer。
5. 將保存的 sample 取出，加入同體積的 Laemmli sample buffer (62.5 mM Tris, pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 0.01% bromophenol blue, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol) 之後，sample 放置在 95<sup>0</sup>C 加熱 10 分鐘。
6. 根據定量結果，把 sample 加至 stacking gel 的凹槽，使每個 sample 的蛋白質



總量相同。

7. 以 80V 進行電泳 2~3 個小時，待電泳結束後，將 polyacrylamide 膠自玻片拿下，切除 stacking gel 部分，之後即可進行轉漬。
8. 先將 PVDF 膜浸泡於甲醇中，轉印海綿浸潤於 transfer buffer /10% 甲醇中，之後依照轉印綿、PVDF 膜、電泳膠、轉印綿順序放置於半乾式轉漬器中。
9. 以  $1.2 \text{ mA/cm}^2$  進行轉漬 2 個小時，之後將 PVDF 膜取出，放在 blocking solution 內，置於  $4^\circ\text{C}$  一個晚上。
10. 以 blocking solution 配製不同的一級抗體，GAP-43 (1:10000)、 $\beta$ -actin (1:10000)、MAP-2 (1:5000)、Synaptophysin (1:20000)、Neurofilament (1:5000) 和 synapsin I (1:20000)。將特定蛋白質位置的膜裁切下來，放置在一級抗體中，置於  $4^\circ\text{C}$  搖晃過夜或室溫 1 小時。
11. 以 TBST 清洗膜 3 次，每次搖晃清洗 5 分鐘。
12. 配製二級抗體(1:2000)，將膜放置在二級抗體中室溫搖晃 30~60 min。
13. 以 TBST 清洗膜 3 次，每次搖晃清洗 5 分鐘。
14. 配製足量的 ECL(Reagent 1 與 Reagent 2 以 1:1 混合)，將 ECL 均勻滴在膜上，靜置 1~2min 後取出瀝掉多餘的 Reagent，放置於平面上。
15. 以螢冷光影像擷取系統(UVP Biospectrum)進行截取影像，同時定量。

### 3-9 神經細胞功能測試

神經細胞在不同材料上出現的不同形態可能會造成其功能性的差異，因此我們利用穀胺酸(Glutamate)釋放與磷酸化突觸素 I (Phospho-Synapsin I)來進行評估。穀氨酸釋放的部分主要是因為我們的小腦顆粒神經元主要是以穀氨酸(Glutamate)做為神經傳導物質，其為興奮性神經傳導物質，主要功能可透過突觸後神經元的穀氨酸受器來興奮下一個神經元，進而產生神經傳導；而磷酸化突觸素 I 則是神經興奮後釋放囊泡時必經的步驟之一，故我們選用此兩種方式驗證傳導能

力。

### 3-9-1 穀胺酸(Glutamate)釋放和 DNA 定量:

1. 將細胞以  $5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> 的密度接種至材料上培養 7 天。
2. 抽掉培養基，以 HBSS 洗除殘留之培養基。
3. 每 well 內加入 120  $\mu$ l 之 HBSS(K+)溶液刺激神經細胞 1 min。
4. 各個 well 抽出 50 $\mu$ l 之溶液與 50 $\mu$ l Amplex® Red Glutamic Acid/Glutamate Oxidase Assay Kit 作用 30 分鐘，然後以酵素免疫分析自動判讀機(ELISA Reader)進行定量，其激發波長為 540 nm，發散波長為 590 nm。
5. 在 HBSS(K+)刺激完的細胞會加入 0.5N NaOH 0.5ml，將細胞打破後以 260 nm 結果定量 DNA 量。

### 3-9-2 突觸素 I 蛋白 (Phospho-Synapsin I) 磷酸化程度評估:

- (1) 將細胞以  $5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> 的密度接種至材料上培養 7 天。
- (2) 之後先抽掉培養基，置換為 BME(K-)一小時以降低原本 BME 中鉀離子對神經細胞的興奮性。
- (3) 抽掉 BME(K-)後，同樣條件的細胞分為刺激組和對照組。刺激組加入 HBSS(K+)，而對照組則加 HBSS，待所有細胞都接觸溶液後等 20 秒，就立刻置於冰上並吸乾所有溶液。
- (4) 細胞在冰上加入 lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1:200 dilution of Protease Inhibitor Cocktail II; Calbiochem)，放置 30 分鐘後，使用細胞刮板將細胞取下，在 4°C 下離心 14000 rpm、10 分鐘，將上清液取出保存於 -20°C，之後利用西方墨點法來進行評估。

### 3-10 西方點墨法結果分析

西方點墨法的結果透過 UVP 分析後，同一張膜上相同抗體得到的光強度的數值會加總算平均值，而各別 sample 會除以這個平均值，故同一張膜上同一種抗體得到的光強度平均數值會是 1。此外各自 sample 表現量會對同一支 sample 的 GAPDH 或 actin 做 normalization。



## 第4章 結果與討論

由於傳統上，神經細胞培養所用的 PDL 塗佈濃度為 10  $\mu\text{g/ml}$ ，故我們將此重量濃度定為”1X”，而由於我們做不同濃度的塗佈量是序列稀釋所得，每種濃度差都是 2 的倍數，故我們採用下列指數方式表示各種操作濃度(表 4-1)：

### 4-1 各材料在不同天期培養下的穩定性

首先我們從各種濃度培養不同天期，由圖 4-1 可顯示所有的材料，無論是 8 天比 12 天 (圖 4-1 上)，或是 12 天比 20 天 (圖 4-2 中、下)，整體 MTT 讀值趨勢並沒什麼改變。另外根據之前資料，4 天和 8 天比也沒有顯著變化。也就表示整個培養環境，包括塗佈上的材料並不會有突然變化的問題，同時也代表之後的實驗，只要同一次實驗中所有細胞來自同一天期，其變化趨勢可以套用到別的天期，並不需要所有實驗細胞都取自同一天期。

### 4-2 各材料的塗佈飽和臨界點

而圖 4-2 顯示除了 N8 以外，所有材料在  $\{-0\}$  的濃度附近其實表現都很類似，這種現象可以認定為塗佈的量其實已達飽和量。故如果要探討飽和臨界點的話，必須往低濃度找。至於 N8 雖然 MTT 讀值上未達飽和，但根據之前試驗，即使塗佈量提升 10 倍，其結果還是比不上其他材料，故我們認定 N8 已和其他材料有明顯差距。

由上粗估計各材料的塗佈飽和點，之後再做一次詳細的測試，各材料的 MTT 表現則如圖 4-3。由圖 4-3 可知到了某個濃度以下，MTT 會突然明顯變化，換句話說材料的塗佈在那附近會有所改變。由於操作上的變化只有濃度，所以我們認為這個就是脫離飽和的臨界點。

而對照顯微鏡穿透光的照片，可發現和 MTT 結果一樣，所以我們將變化產生的點當成低濃度塗佈，而往上 4 倍的濃度則當作最低已飽和塗佈濃度。

不過從圖 4-3 的 MTT 中會發現，N6 和 PL 分別在{-4}和{-5}就已經有明顯降低的狀況，且其下一個稀釋濃度的塗佈，神經細胞的形態已經和完全沒有塗佈的對照組（圖 4-4 TCPS）一樣都有神經細胞團無法完整相連的狀況，表示塗佈量已經明顯不足，故我們將高低濃度的標準取在原本設定濃度的兩倍。我們後續的操作濃度就如同表 4-2。

### 4-3 各材料的免疫螢光照片

在同樣是高濃度或是低濃度的穿透光照片中，並無法明顯分辨各材料的神經培養有何形態差異，故我們嘗試使用免疫螢光的方式追蹤特定功能蛋白位置，藉此瞭解神經細胞上面是否具有表現該有的蛋白質與功能性結構。我們選擇了 MAP-2( Microtubule-associated protein 2 )、Neurofilament、Synapsin I、synaptophysin、GAP-43 這幾種蛋白質進行染色。MAP-2 本身是神經細胞微管上面的蛋白質，當神經新生時會大量表現，另外它主要會分布在樹突與細胞本體周圍以穩定樹突形狀；Neurofilament 則是神經細胞骨架蛋白，可以讓我們確定我們染到的細胞的確是神經細胞；Synapsin I 則是神經細胞在執行功能時相當重要的蛋白質，它主要是與囊泡結合並將囊泡固定於細胞骨架之上，因此他出現的位置就跟囊泡所在的位置相當接近；synaptophysin 則是位於突觸前細胞膜上，可以調節神經囊泡的膜融合以及其後的神經傳導物質的釋放，也是重要的功能性蛋白；GAP-43 則是位在神經細胞膜表面的生長點，因此代表了生長和可塑性(plasticity)，其存在可表示神經細胞是否還有繼續生長的能力，對修復損傷的角度上也是很重要的蛋白。

圖 4-5 和圖 4-6 為神經細胞培養 9 天後 Synapsin I(綠)與 Neurofilament(紅)的

染色照片。由於 Synapsin I 在 neurites 上方會大量表現，在細胞所在處會有許多綠色小點，這些小點大多數應該就是囊泡所在位置。由此部分的結果可以看到在各材料上培養的神經細胞的確能表現典型的重要蛋白質。

而圖 4-7 和圖 4-8 為 synaptophysin(綠)與 Neurofilament(紅)的染色照片。Synaptophysin 應該是位於突觸前的細胞膜上，但對於高濃度的塗佈來說，神經細胞大多數是處於分散貼附的狀況，到處都會有突觸形成，所以綠色的分佈範圍和 synapsin I 類似都是密密麻麻的。

不過從低濃度塗佈的結果可發現，synaptophysin 會比較集中在細胞團中，也就是 cell body 的位置，推測我們所用的細胞是小腦神經顆粒細胞，本身就是屬於運動神經元，樹突的構造較短，如果有軸突要形成突觸也會集中在 cell body 附近，故細胞團才會比起外面的 neurites 要有綠色集中。

圖 4-9 和圖 4-10 是 MAP-2(綠)與 Neurofilament(紅)，MAP-2 集中在 cell body 的情況更明顯。由於 MAP-2 原本就主要分佈於樹突和 cell body 周圍來穩固樹突的構造，故綠色才會如此分佈。如果把 MAP-2 和 synaptophysin 的結果合在一起，也可以互相映証為什麼低濃度塗佈的結果會集中在細胞團的 cell body 中。

圖 4-11 和圖 4-12 則是 GAP-43(綠)和 Neurofilament(紅)。GAP-43 又稱 Neuromodulin，其代表的功能是生長和可塑性(plasticity)。從圖上可得知所有材料的條件培養的神經都有 GAP-43 的存在，也就是說這些神經也都有再生的能力，對於日後如果要往神經導管等應用發展的話，是很重要的資訊。

到目前為止，所有材料的表現從螢光染色看不出差異，不過由於免疫螢光只能作定性分析，也就是單純看位置上有無目標存在，並不能估計一個位置上有多少目標蛋白，所以我們之後會用西方墨點法來對這些蛋白質加以定量。

#### 4-4 各材料的西方墨點法分析蛋白質表現量

我們將圖 4-4 中的細胞 lysis 掉後跑 western blot 分析，其結果如圖 4-18 和圖 4-19。雖然有一點起伏，但由於西方墨點法的定量有先天上精準度的問題，故所有 sample 的表現量其實沒有顯著差異。

於是我們再嘗試使用不同天期的細胞，比較其功能蛋白的起伏狀況，如圖 4-20~圖 4-22，可以發現所有材料的神經細胞第 1 天(1DIV)時，骨架的 neurofilament 長的量不夠，而功能性的 synapsin I 和 synaptophysin 都幾乎看不見。而到第 6 天，骨架已經增多，且 synapsin I 量開始上升，但 synaptophysin 則是到 6~11 天時才有顯著上升。而 GAP-43 則是從頭到尾都表現固定量，可認為是神經一直都保持一定的生長能力。



#### 4-4 神經受刺激後的表現差異

在六種材料上，含塗佈量共 12 種條件，時間點的變化趨勢全都一樣，表示這應該是神經本身的性質，這幾種材料的條件，不加快但也不抑制這種趨勢。雖然奇怪，但這一點倒是呼應了圖 4-1 對於不同天期的 MTT 趨勢變化不大。

然而不同的塗佈量，形態上本身有明顯變化，功能表現量卻一樣似乎有點奇怪，所以我們再嘗試以高鉀離子刺激細胞，主要想看神經在活化時，synapsin I 會被磷酸化，我們選用其中一種 ser603(site 3)磷酸化形態偵測，其結果如圖 4-23 和圖 4-27。看來有點變化，但變化並不規則，於是同樣條件我們共種三次細胞，以固定操作來取得 protein sample，做完 western blot 後定量並統計，結果如圖 4-25 和圖 4-29，看來有一點改變，但如之前所說，western blot 在定量上並非很準確的方法，如果不是差異極明顯或全有全無的話，無法肯定斷言其有變化，所以這部分還需要額外檢驗，或是改變實驗流程來達到更有可信度的結果。

到目前為止，protein 相關的實驗對所有條件的判斷都是無明顯差異，但形態差距很多，MTT 也有明顯落差，於是我們開始懷疑其實這只是單純細胞數量的造成的假象，由於 western blot 會對 actin 做 normalization，所以單位細胞量表現固定的話，那總量差異其實是來自細胞的”量”，而非”質”。為了確定這一點，我們把同一批神經細胞分別做 MTT 和 LDH。MTT 雖然也可定量，但本身也會受到活性的影響而不能單純認定是數目，所以我們用 LDH 當作另一種模式的定量，因為相同的細胞內的 lactate dehydrogenase 是接近的。

從圖 4-32 和圖 4-33 來看，MTT 的變化趨勢和 LDH 在活細胞(右圖紅色和黑色的 bar)的變化趨勢其實是相近的，也就是說之前 MTT 的任何變化，很可能只是單純來自於細胞貼附量而已，只要能貼到基材上，表現就一樣好。另外就是 LDH 圖中黃色和綠色的 bar 代表死亡的細胞數，雖然我們培養的條件會因為基材吸附力和換 medium 時使得不同組別的細胞數不同，但之後死亡的數量確幾乎一樣，這兩點和之前圖 4-1 的結果發現整體趨勢變化不會隨天期改變而變動一樣，因為死亡數一樣，也不會有哪種條件容易促進細胞死亡。

最後我們利用神經細胞受刺激時會放出神經傳導物質的特性來判斷其功能，我們用的小腦顆粒細胞用的神經傳導物質就是 glutamate。從圖 4-34 可發現，比起高濃度 coating，低濃度 coating 的 DNA 定量明顯較低，但 glutamate release 的量卻較高，換句話說，這種條件下的細胞有可能能發揮更大的訊息傳遞能力。

圖 4-14~圖 4-17 是用低倍物鏡拍低濃度塗佈的細胞形態，可發現所有細胞形成小細胞團後，還會伸出較長的 neurites 和其它細胞團相接，而不會像 TCPS 上(圖 4-4 TCPS)僅聚成團，卻沒辦法彼此完整連繫。由於細胞貼附力不像高濃度 coating 的材料貼那麼緊，加上身體並非所有的神經都是類似飽和塗佈下的單顆貼附形態。如果今天臨床上需要讓神經快速生長並找到正確的目標的話，低濃度的 coating 有可能是一另一種可行的模式。



## 第5章 結論

1. 單就塗佈的效率來說，本實驗所用的幾種新材料以 N4 的表現最好，碳鏈過長過短都會使培養效率下降，這點在 N8 上情況變化尤其明顯，可能來自於分子極性的親疏水影響。如果要開發更便宜更有效的材料取代 PDL 的話，碳鏈長會是重點之一。
2. 對於神經培養來說，本實驗所選用的數種材料，除了 N8 以外，皆有潛力取代現有常用的 PDL 材料。由於傳統上 PDL 的 coating 量都是過量的，故如果要用本實驗中除 N8 以外的材料取代 PDL 的話，各材料 coating 量只要高過表 4-2 所標示的”高濃度”，即  $N4 > 0.3125 \mu\text{g/ml}$ 、 $N2, N6O4 > 1.25 \mu\text{g/ml}$  即可。
3. 雖然不同材料在定義高濃度的絕對值不同，但從分子貼附飽和的角度看，即使濃度再高也不會有任何差異
4. 由 O4 可知 PDL 主鏈上肽鍵的 N 對於神經的貼附和生長並沒有顯著意義，同時肽鍵的存在與否對神經培養的影響上不大。
5. PDL 對神經的良性影響，很可能只是單純電性吸引問題，也就是沒有專一性官能基和膜受器蛋白辨認的問題。
6. 在飽和臨界點下的神經培養會形成大格子的網路結構，雖然形態差距大，但就神經傳導力來說，並不比飽和塗佈的形態差太多，考慮適當的活動力對神經的適應力(plasticity)較有力的話，這種形態有可能成為良好的培養模式，這部分需要後續的研究。

## 第6章 圖表說明

{+1}: 20  $\mu\text{g/ml}$

{-0}: 10  $\mu\text{g/ml}$

{-1}: 5  $\mu\text{g/ml}$

{-2}: 2.5  $\mu\text{g/ml}$

{-3}: 1.25  $\mu\text{g/ml}$

{-4}: 0.625  $\mu\text{g/ml}$

{-5}: 0.3125  $\mu\text{g/ml}$

{-6}: 0.15625  $\mu\text{g/ml}$

{-7}: 0.078125  $\mu\text{g/ml}$

表 4-1 塗佈操作濃度的代號

為了簡潔表示，實驗中會用指數方式表達重量濃度，表 4-1 就是列出會用到的幾種濃度的對照表。

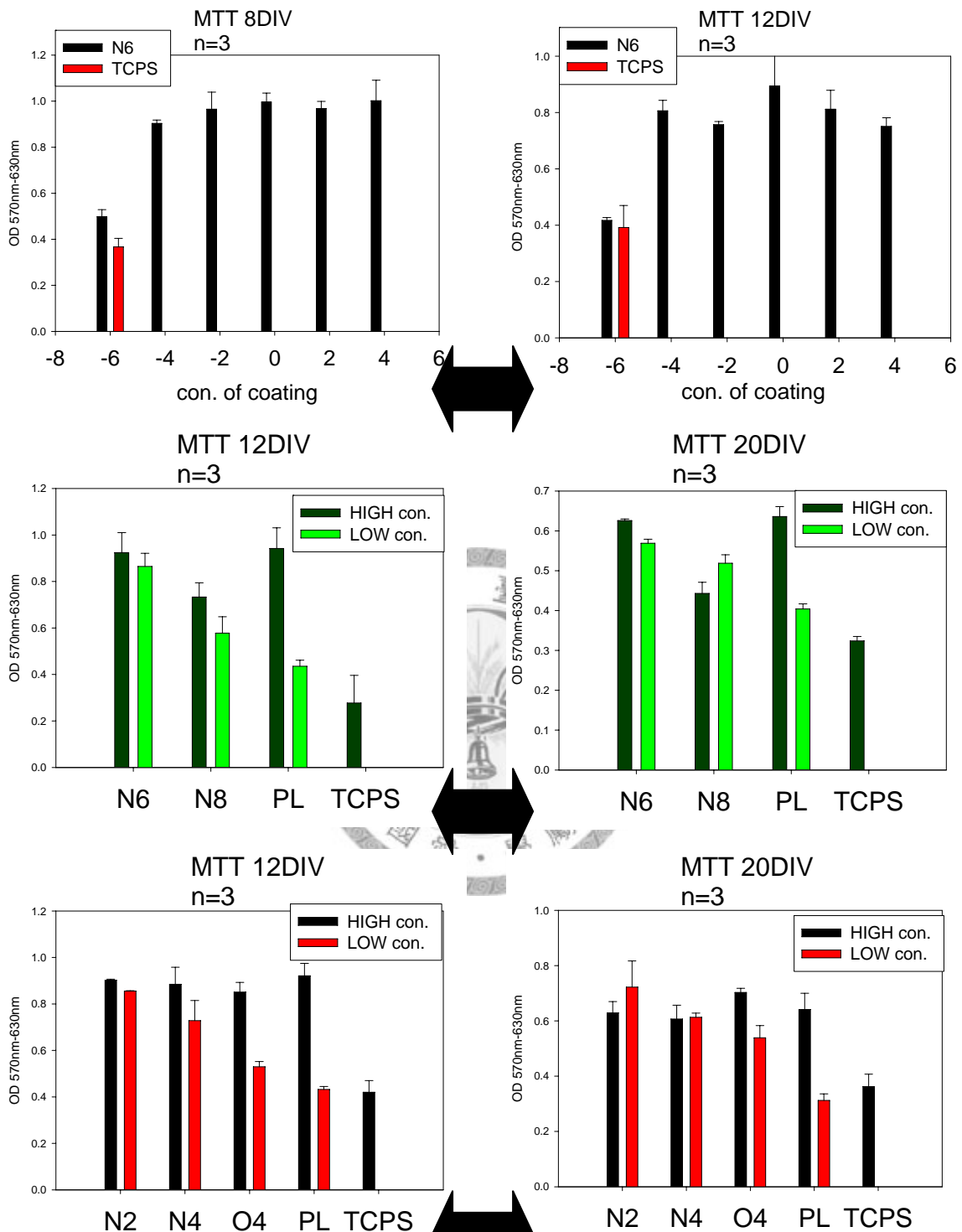


圖 4-1 各材料在不同天期的 MTT 變化(左右為一組)

左邊和右邊的圖是同一批的細胞在不同天期下的結果，可以發現雖然絕對值有改變，但整體的相對趨勢卻沒有太多變化，這表示所有的材料都很穩定，同時整個實驗中，不同實驗的培養天期並不需要完全一樣，因為相對的改變是一致的。最上放兩張圖的濃度表示請參照表 4-1。

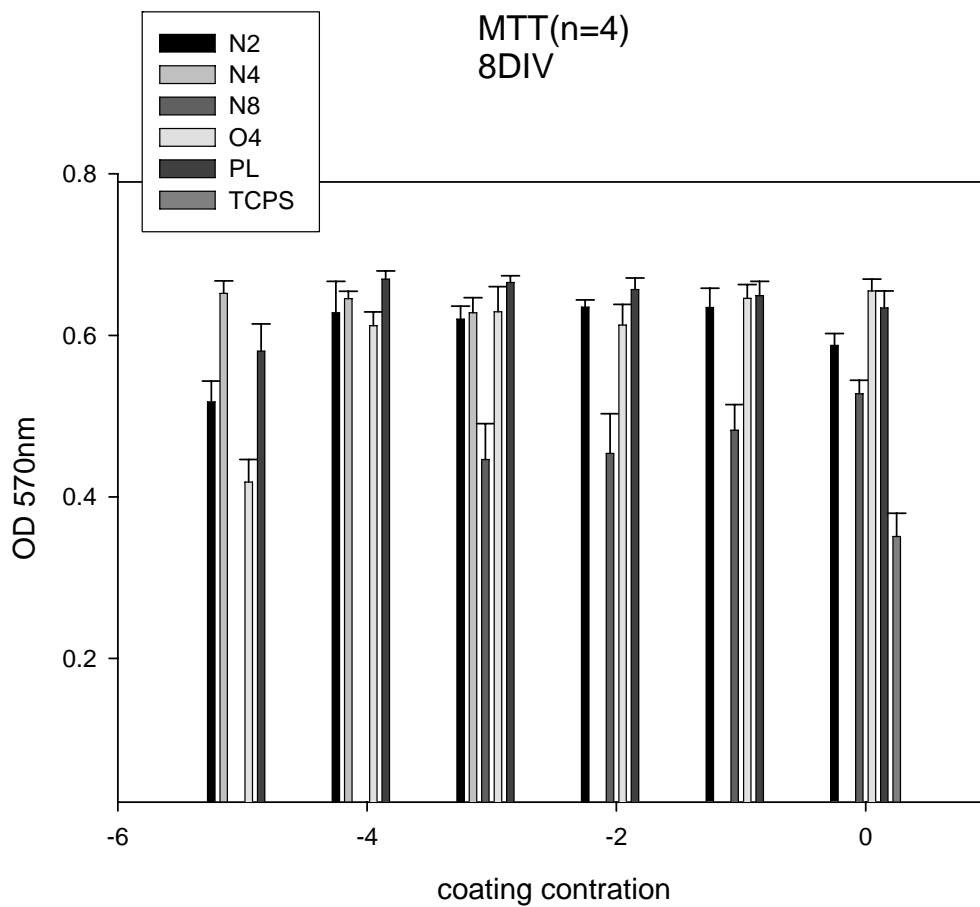


圖 4-2 各材料在不同濃度的塗佈時的 MTT 讀值

下方的濃度表示請參照表 4-1。除了 N8 以外，所有材料只要濃度夠高，MTT 的結果幾乎一樣。由於塗佈(coating)的原理是分子的吸附，所以濃度高到某種程度，吸附就會飽和。N4 從{-3}開始是由於之前的經驗所以從低濃度開始測試，結果稀釋到{-5}還是飽和。相反的，N8 則是濃度在怎麼高都無法和其他材料相比。所以不再往低濃度測。由此可推測 side chain 長度會對細胞培養造成明顯差異。

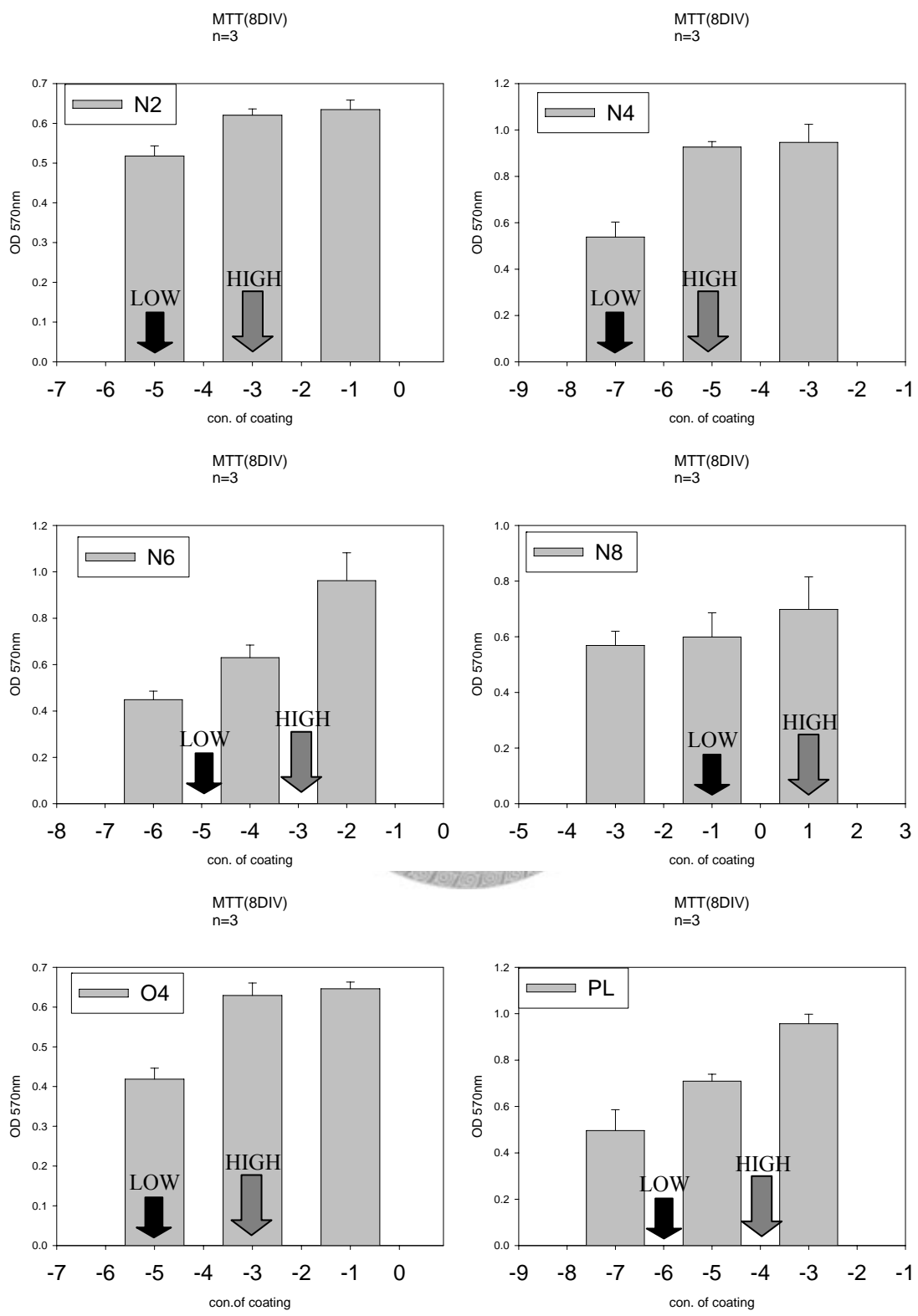
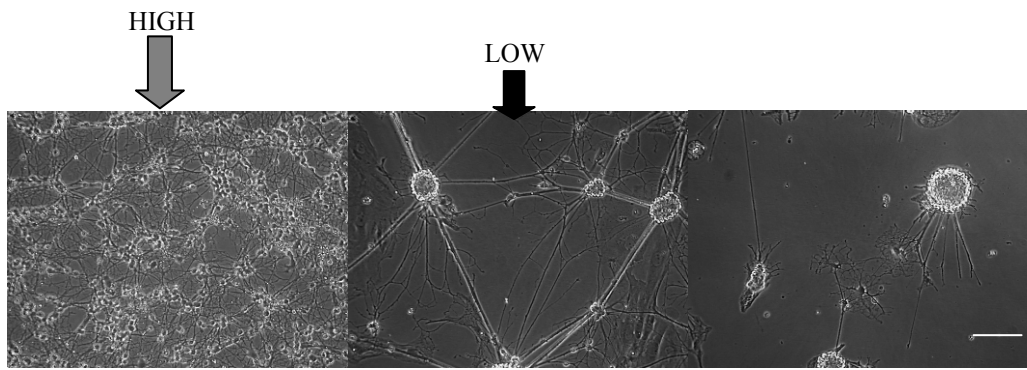


圖 4-3 各材料塗佈飽和點附近的 MTT 變化

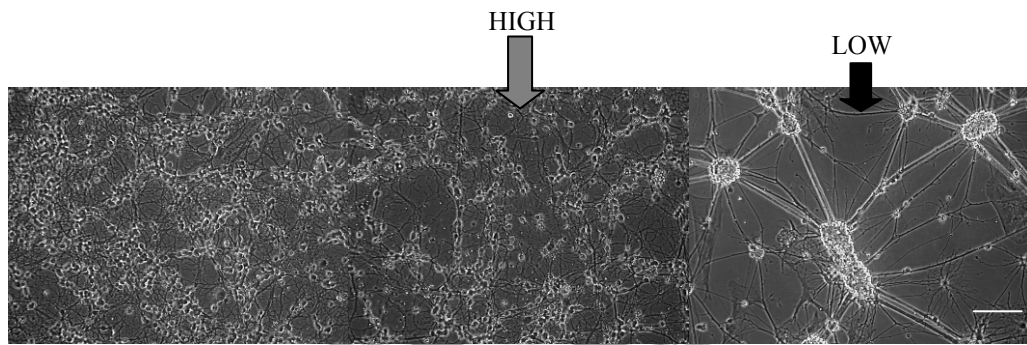
圖下方的濃度表示請參照表 4-1。此圖為根據圖 4-2 另外分開測試的 MTT，主要是為了選擇最低飽合濃度(HIGH)和往下 4 倍稀釋的點當低濃度(LOW)測試。



N2{-3}

N2{-5}

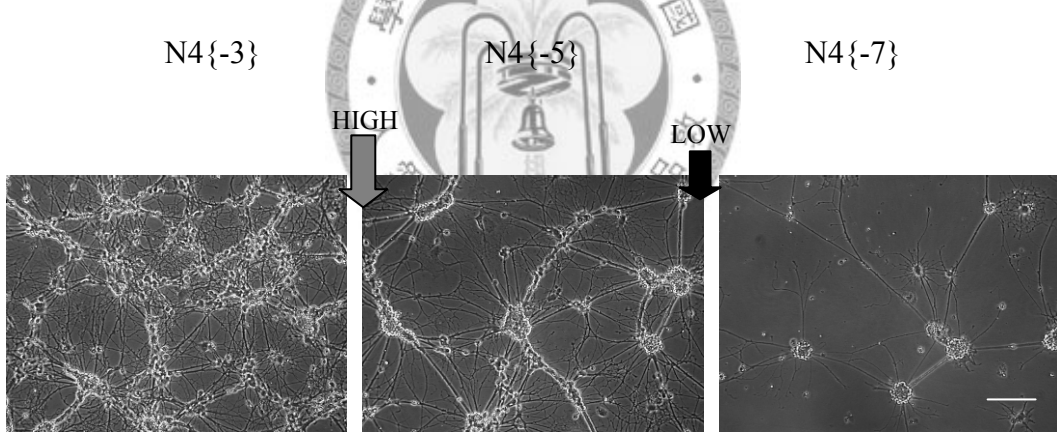
N2{-7}



N4{-3}

N4{-5}

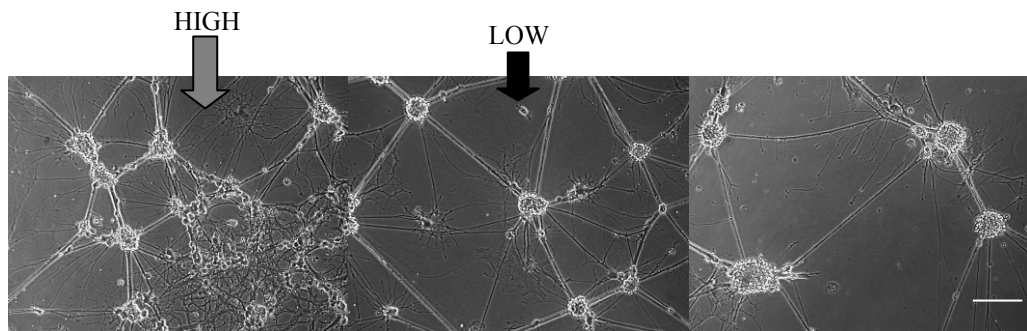
N4{-7}



N6{-2}

N6{-4}

N6{-6}



N8{+1}

N8{-1}

N8{-3}

(接下頁)

(接上頁)

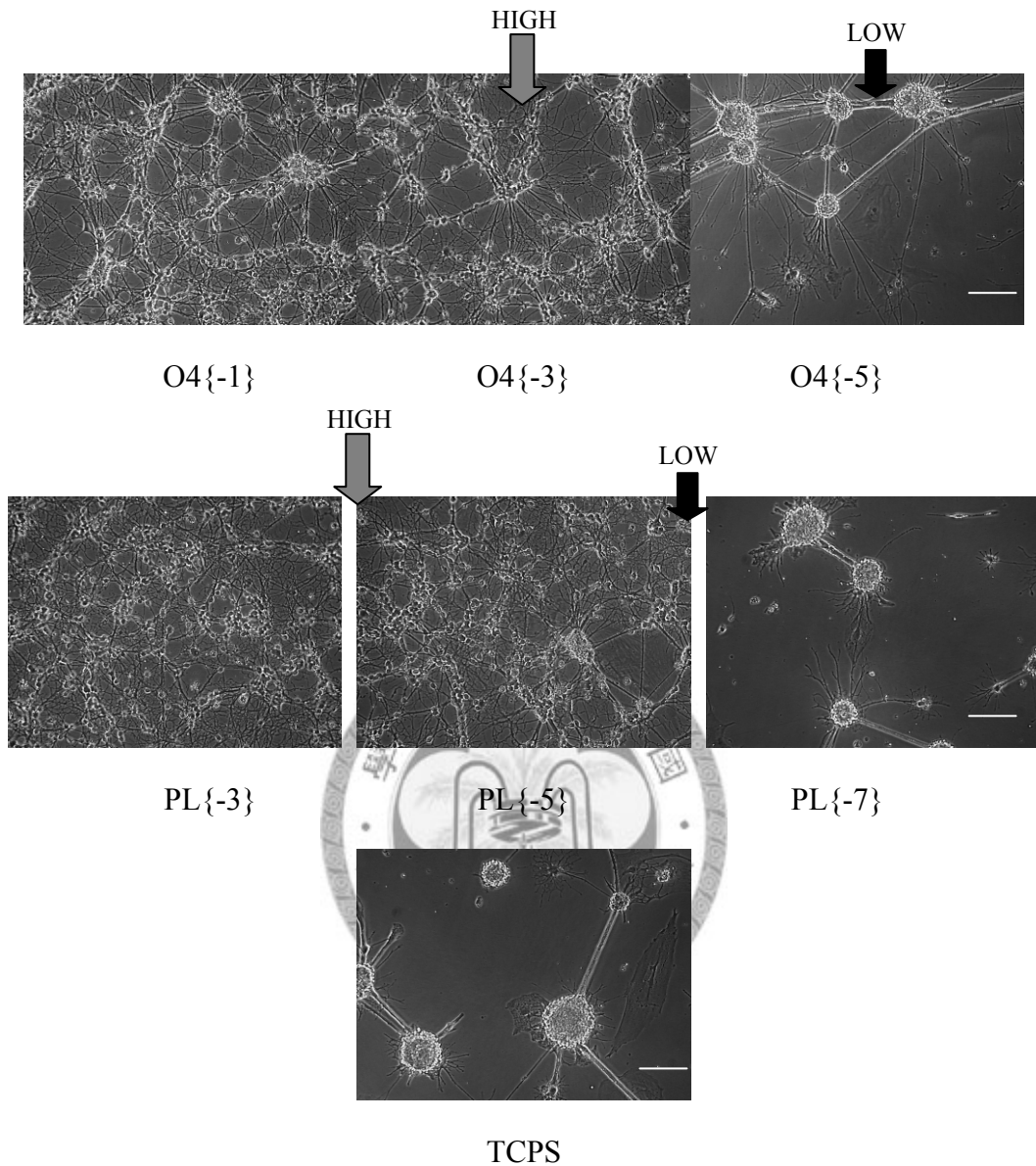


圖 4-4 各材料的穿透光顯微鏡照片(8DIV)

Scale bar: 100  $\mu$ m

圖 4-3 做 MTT 的細胞照片(濃度表示請參照表 4-1)。N8 濃度即使比別的材料高出 16 倍，還是無法形成分散貼附的形態。如果材料過度稀釋，則形態接近 TCPS，也就是神經聚集成球團狀，球團彼此也無法有效連接。藉由圖 4-1、圖 4-3 和圖 4-4 的結果，後續操作的濃度選擇就是表 4-2。

	高濃度	低濃度
N2	{-3} 1.25 µg/ml	{-5} 0.3125 µg/ml
N4	{-5} 0.3125 µg/ml	{-7} 0.078125 µg/ml
N6	{-3} 1.25 µg/ml	{-5} 0.3125 µg/ml
N8	{+1} 20 µg/ml	{-1} 5 µg/ml
O4	{-3} 1.25 µg/ml	{-5} 0.3125 µg/ml
PL	{-4} 0.625 µg/ml	{-6} 0.15625 µg/ml

表 4-2 由各種材料塗佈效率的變化所決定的操作濃度

由包括穿透光形態(圖 4-4)、MTT(圖 4-1、圖 4-3)所決定的操作濃度。濃度表示中，上方數字為表 4-1 所用的指數表示，下面數字則是換算成一般重量濃度的值。



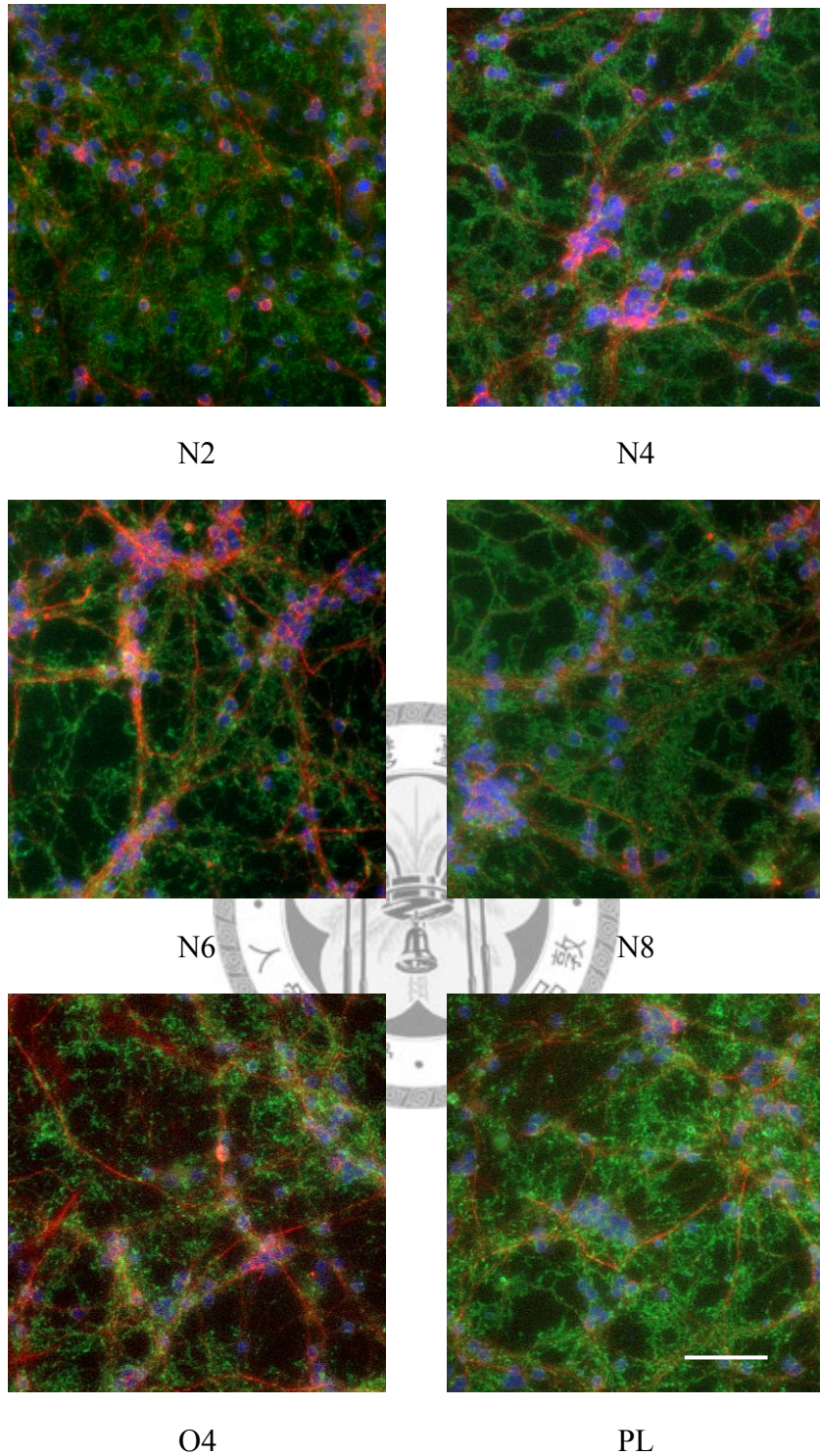


圖 4-5 所有材料在高濃度塗佈的免疫螢光形態(9DIV) (1)

(green : synapsin I 、 red : neurofilament 、 blue:DAPI)

Scale bar:50  $\mu$ m

各材料高濃度的 coating 濃度請參照表 4-2。synapsin I 是神經重要的功能蛋白(圖 2-3)，neurofilament 是分化神經的骨架，DAPI 則是細胞核。由此可知各材料培養下，神經都有功能的表現。

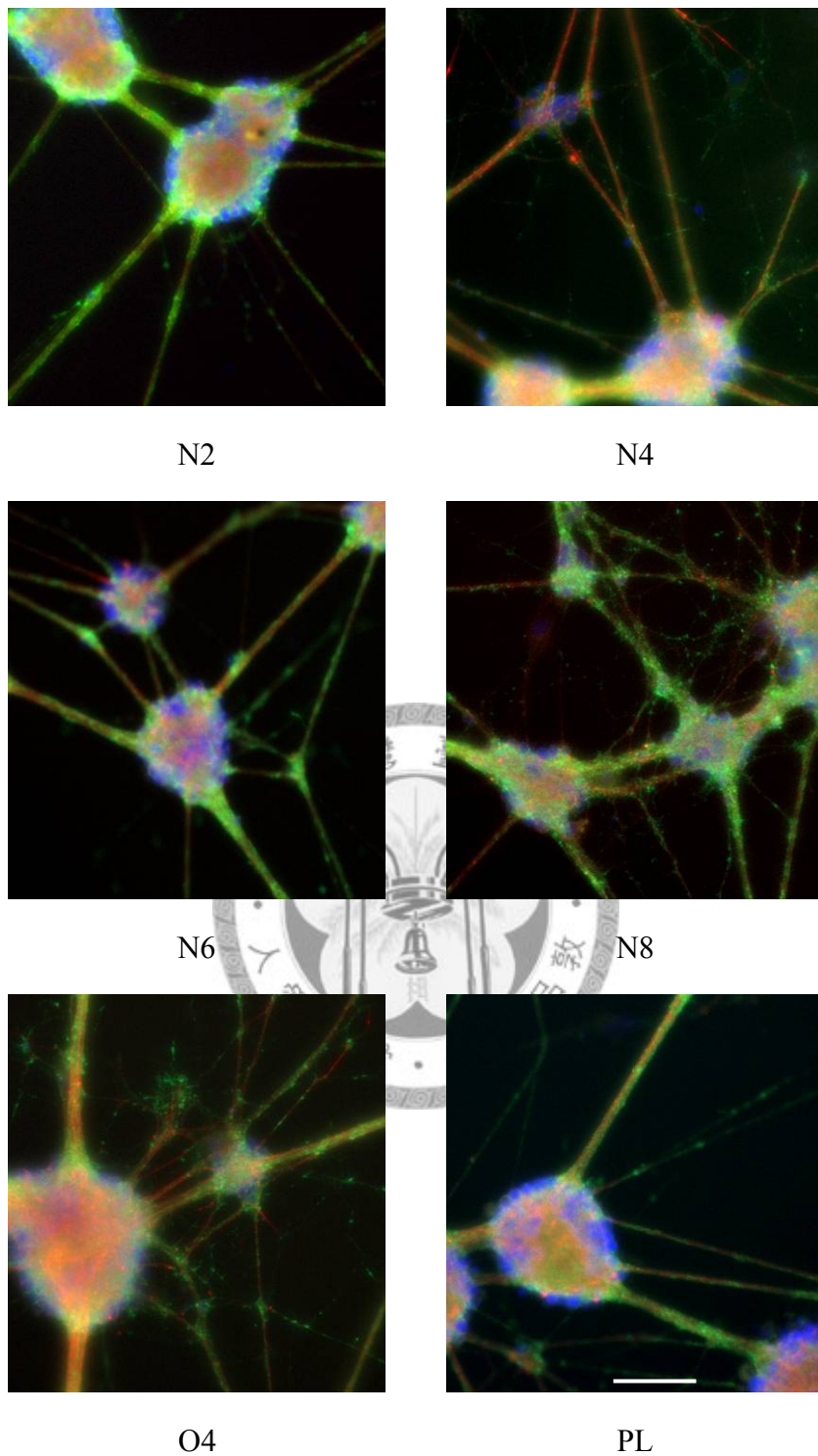


圖 4-6 所有材料在低濃度塗佈的免疫螢光形態(9DIV) (2)

(green : synapsin I、red : neurofilament、blue:DAPI)

Scale bar:50  $\mu$ m

各材料低濃度的 coating 濃度請參照表 4-2。synapsin I 是神經重要的功能蛋白(圖 2-3)，neurofilament 是分化神經的骨架，DAPI 則是細胞核。由此可知即使降低濃度來培養，神經還是有功能的表現。

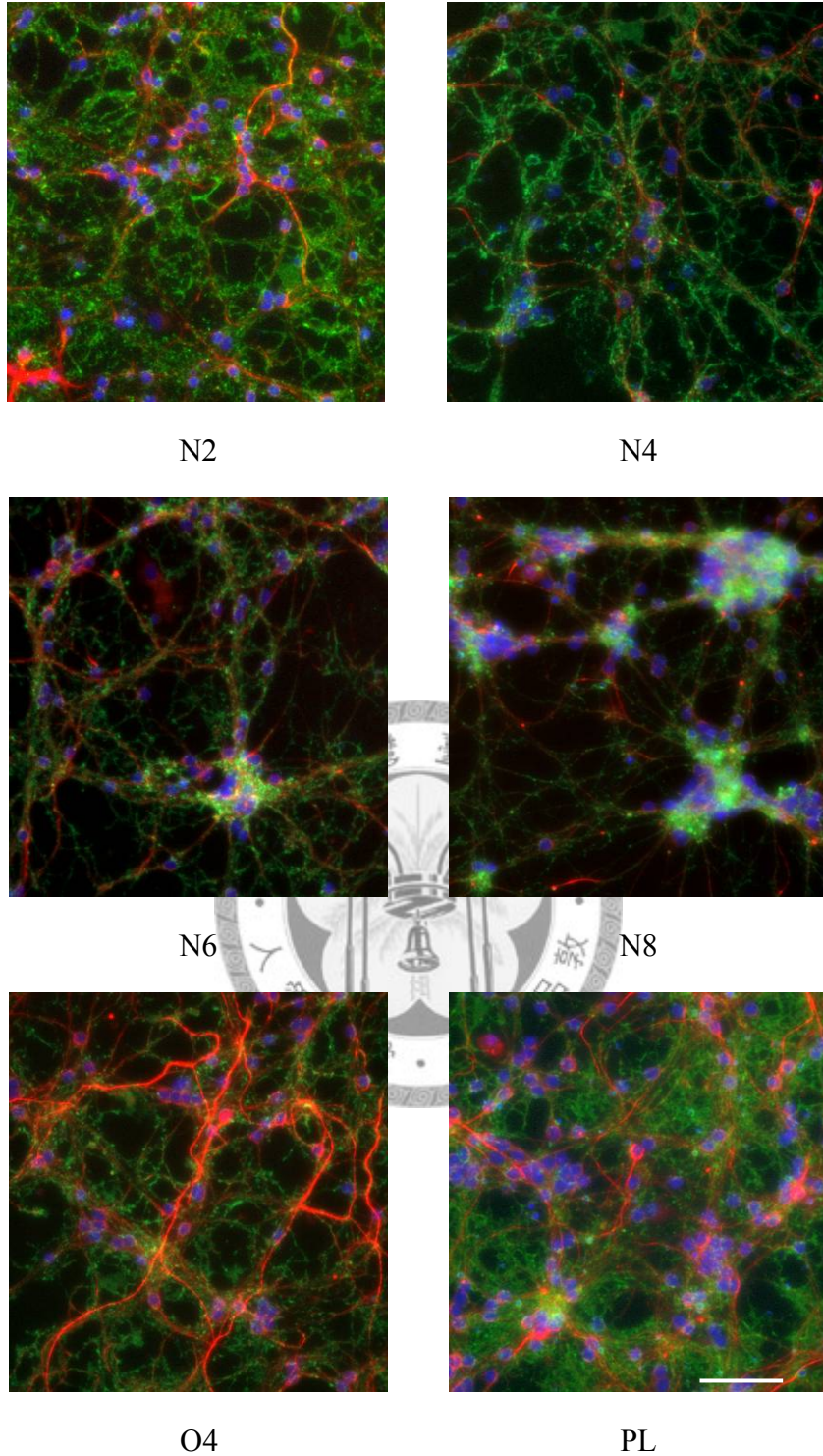
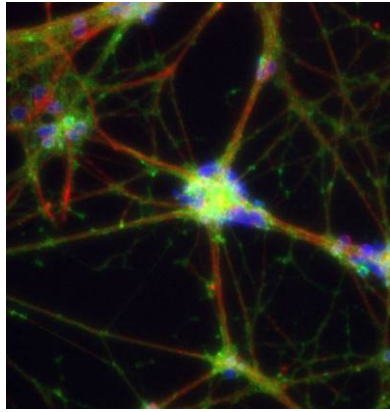


圖 4-7 所有材料在高濃度塗佈的免疫螢光形態(9DIV) (3)

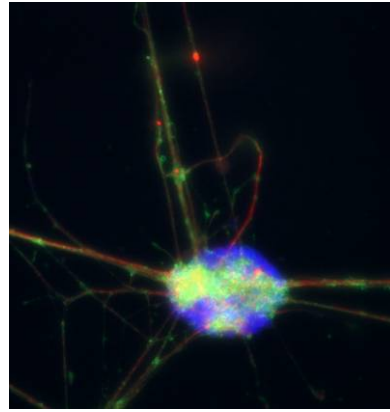
(green : synaptophysin 、 red : neurofilament 、 blue:DAPI)

Scale bar:50  $\mu$ m

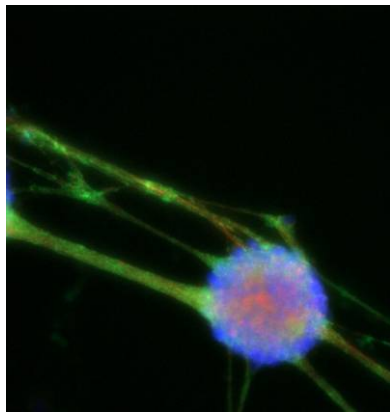
各材料高濃度的 coating 濃度請參照表 4-2。synaptophysin 也是神經重要的功能蛋白，neurofilament 是分化神經的骨架，DAPI 則是細胞核。由此同樣可證明各材料的神經都有功能的表現。



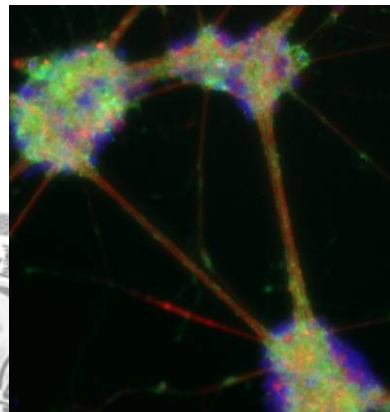
N2



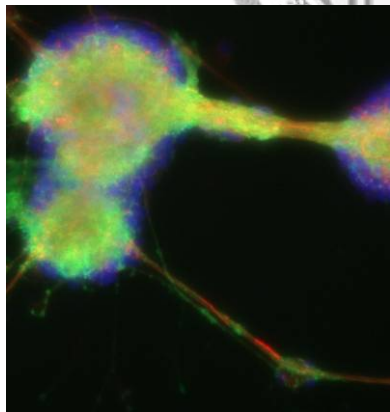
N4



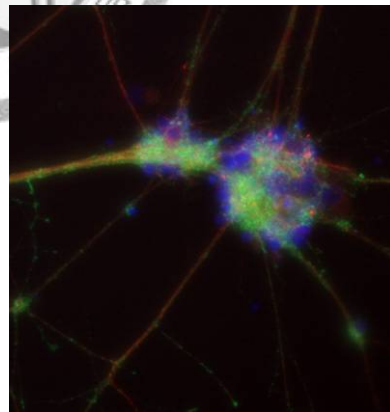
N6



N8



O4



PL

圖 4-8 所有材料在低濃度塗佈的免疫螢光形態(9DIV) (4)

(green : synaptophysin 、 red : neurofilament 、 blue:DAPI)

Scale bar:50  $\mu$ m

各材料低濃度的 coating 濃度請參照表 4-2。synaptophysin 也是神經重要的功能蛋白，neurofilament 是分化神經的骨架，DAPI 則是細胞核。降低 coating 量，神經還是可以表現功能。

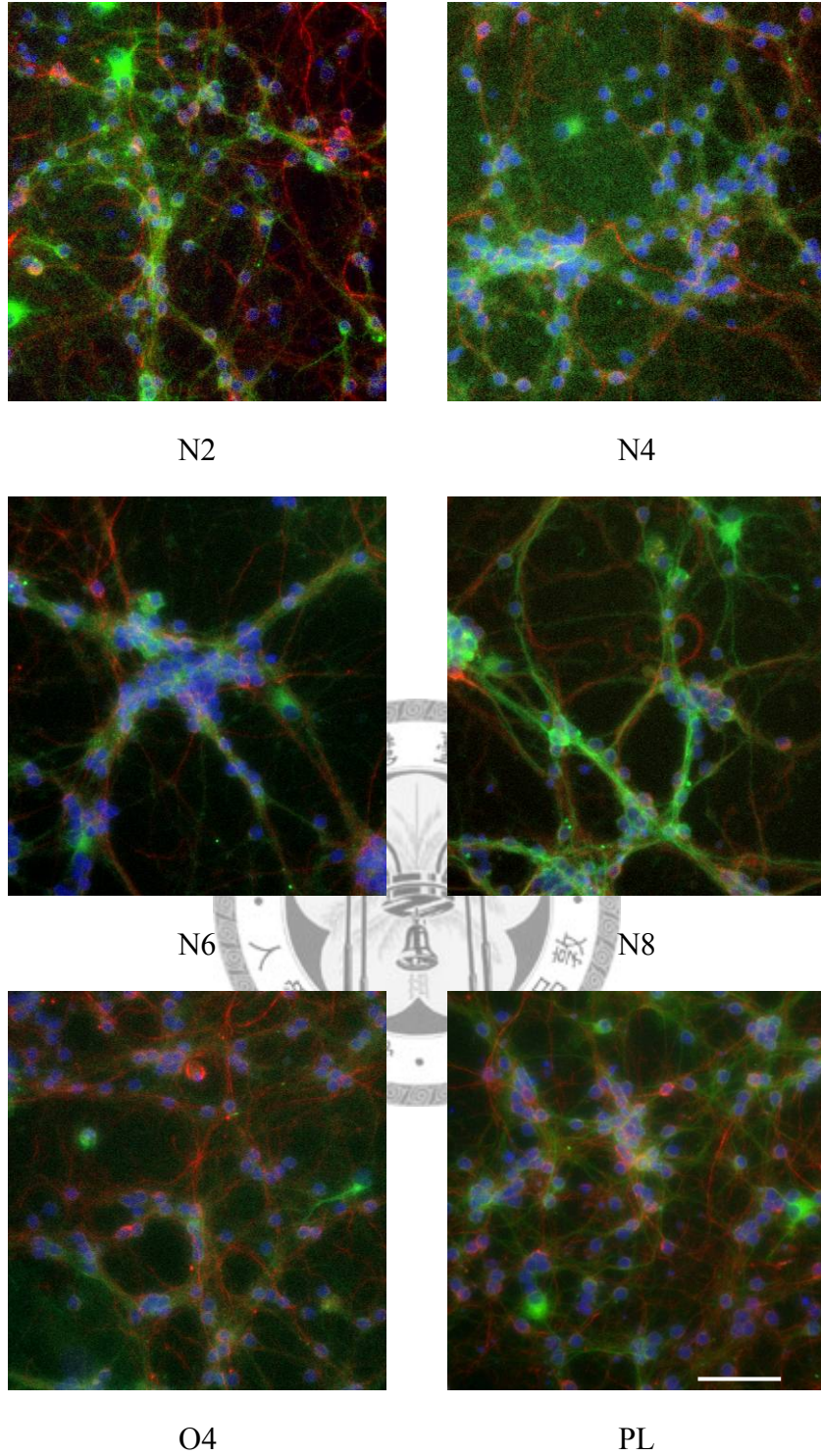


圖 4-9 所有材料在高濃度塗佈的免疫螢光形態(9DIV) (5)

(green : MAP-2 、 red : neurofilament 、 blue:DAPI)

Scale bar:50 μm

各材料高濃度的 coating 濃度請參照表 4-2。MAP-2 常用於標定神經位置，尤其是樹突部分，由於我們所用的 granule cells 的樹突通常較短，故 MAP-2 常分佈於核旁邊。

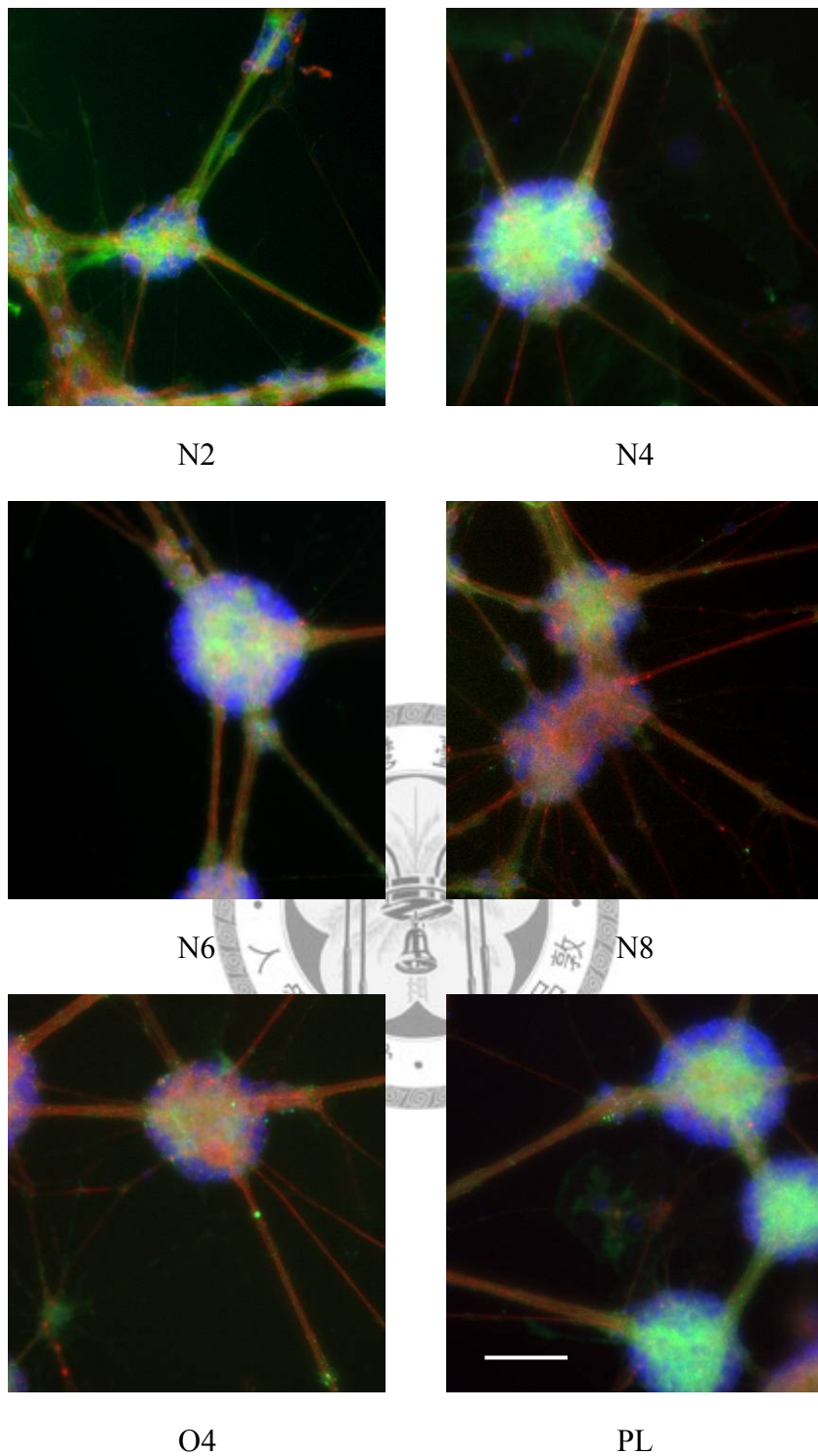


圖 4-10 所有材料在低濃度塗佈的免疫螢光形態(9DIV) (6)

(green : MAP-2 、 red : neurofilament 、 blue:DAPI)

Scale bar:50  $\mu$ m

各材料低濃度的 coating 濃度請參照表 4-2。MAP-2 常用於標定神經位置，尤其是樹突部分，在低濃度 coating 的情況，cell body 會聚集在一起，加上 granule cells 的樹突短，故照片中 MAP-2 會集中在細胞團中。

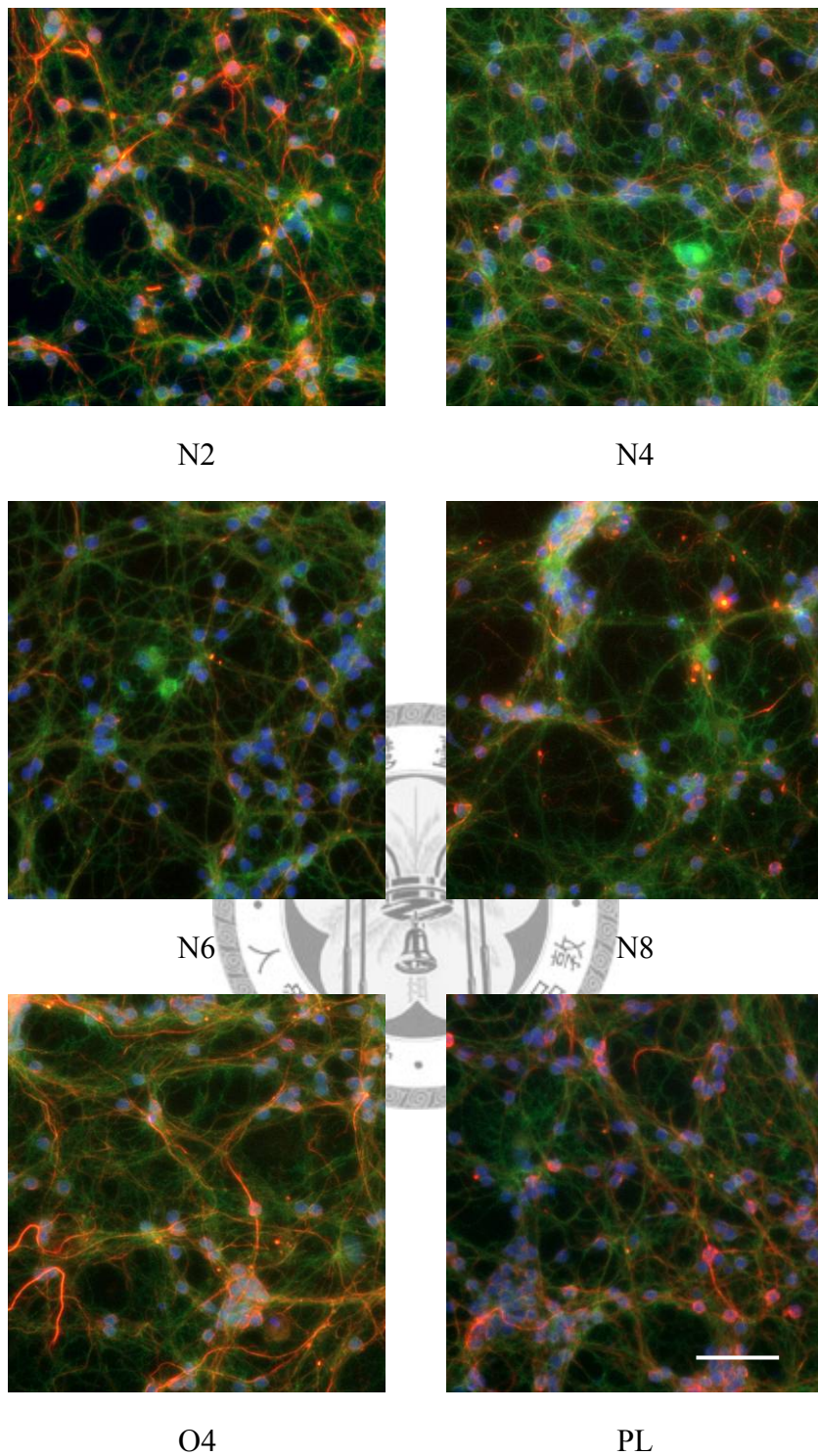


圖 4-11 所有材料在高濃度塗佈的免疫螢光形態(9DIV) (7)

(green : GAP-43 、 red : neurofilament 、 blue:DAPI)

Scale bar:50  $\mu$ m

各材料高濃度的 coating 濃度請參照表 4-2。GAP-43 是神經生長點的 marker，由圖可知各種材料培養的神經都有再生的能力，如果要做神經移植的話，能再生是很重要的現象。

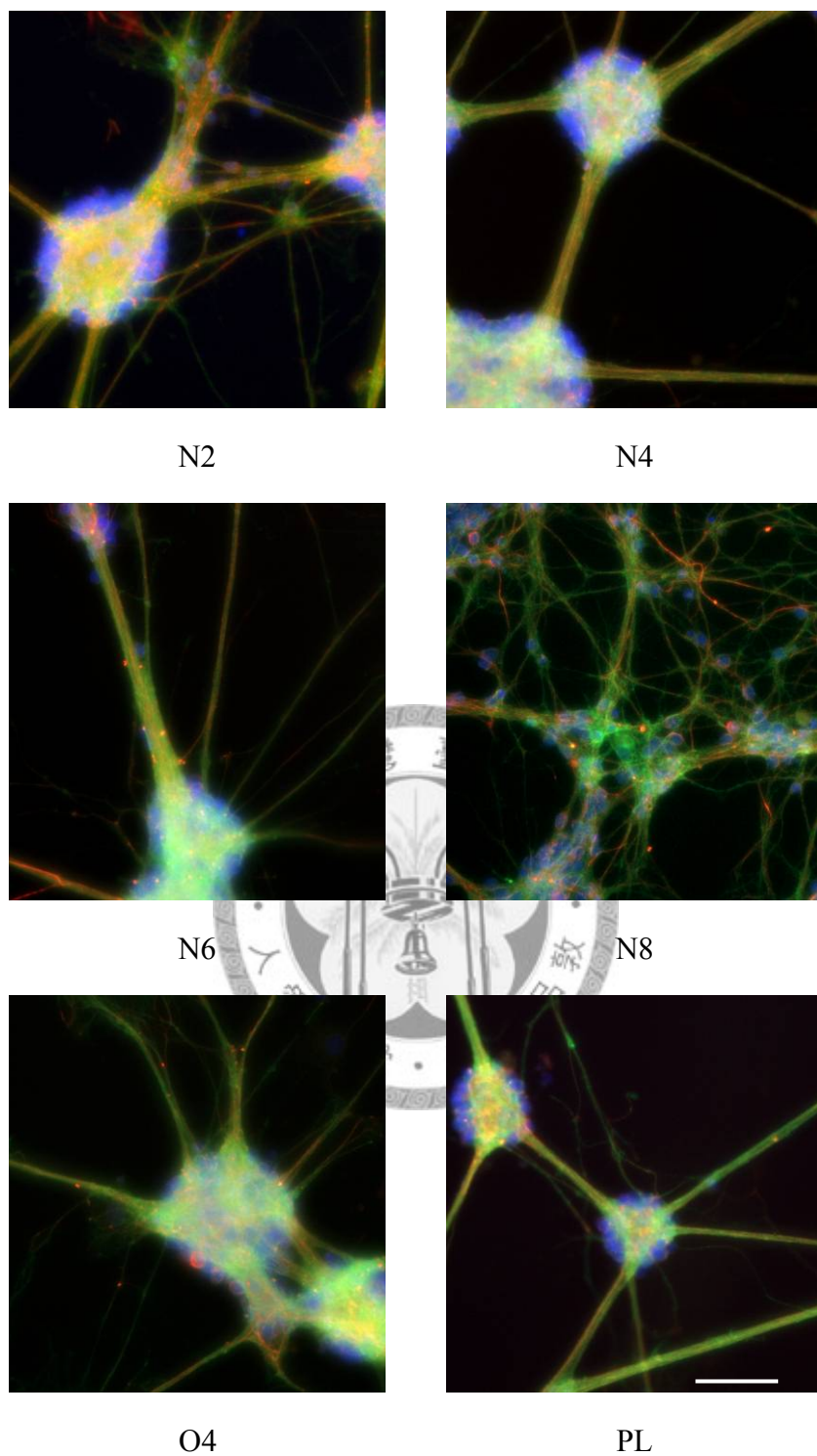


圖 4-12 所有材料在低濃度塗佈的免疫螢光形態(9DIV) (8)

(green : GAP-43、red : neurofilament、blue:DAPI)

Scale bar:50  $\mu$ m

各材料低濃度的 coating 濃度請參照表 4-2。GAP-43 是神經生長點的 marker，由圖可知降低濃度 coating 的各種材料的神經都還有再生的能力，對移植神經治療來說，是很重要的現象。



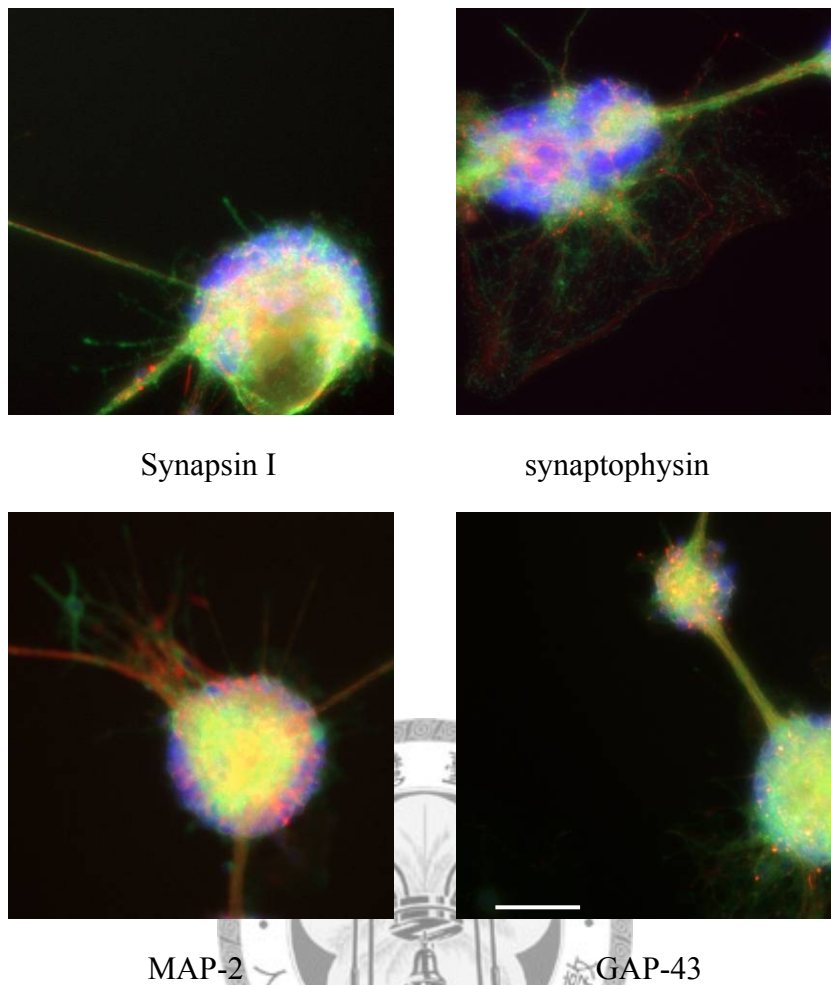


圖 4-13 沒有任何塗佈的對照組(TCPS)免疫螢光形態(9DIV)

(green:標示於圖下方、red : neurofilament、blue:DAPI)

Scale bar:50  $\mu$ m

TCPS 的各種蛋白表現，雖然功能蛋白有表現，但比起低濃度 coating 的各材料來說，神經彼此很難連結(圖 4-4)，神經如果無法連結自然會失去功能，故 TCPS 一直都不是好的神經培養材料，需要額外改質或是 coating 其他材料。

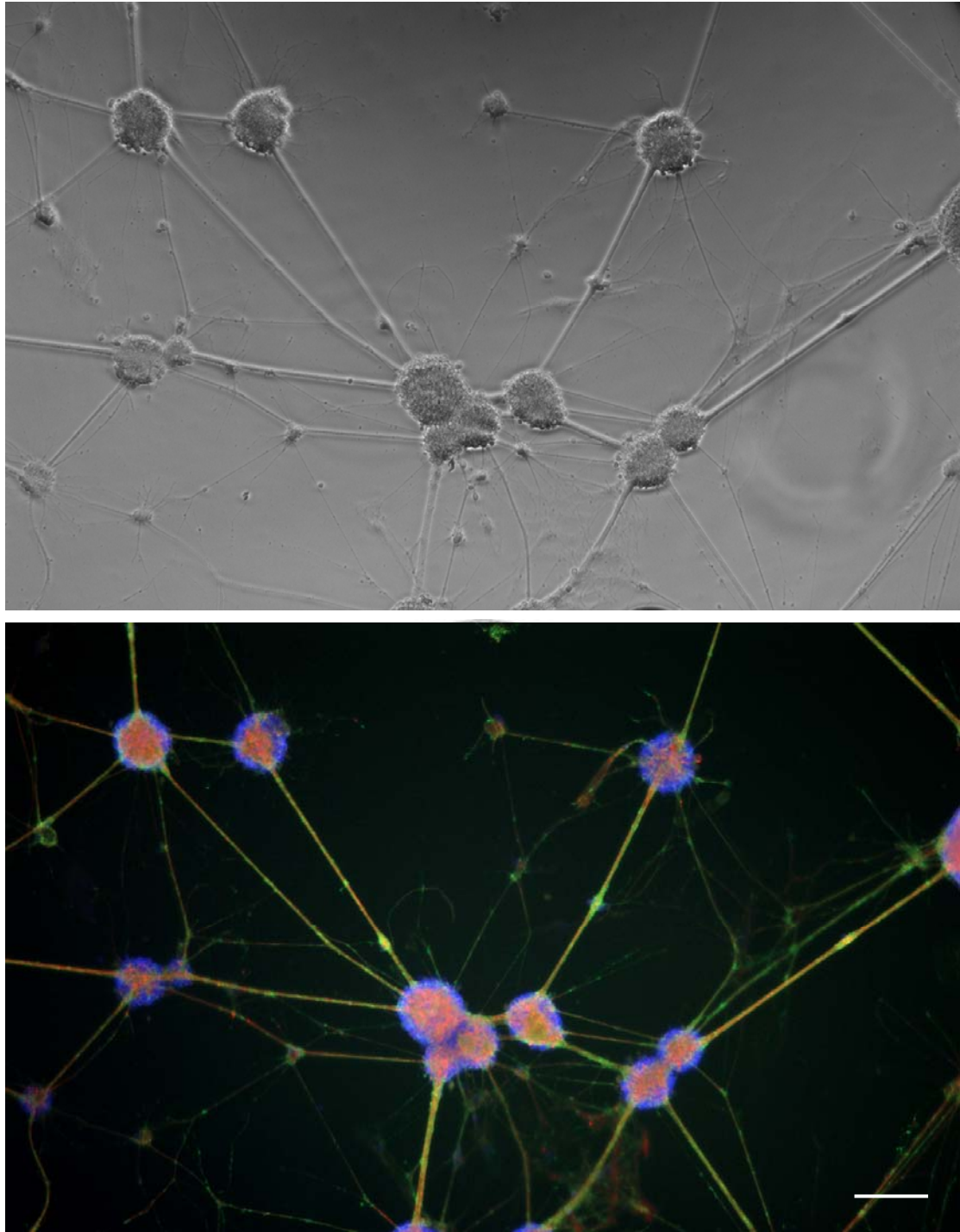


圖 4-14 低濃度塗佈的免疫螢光形態(9DIV) (1)

上:穿透光，下: (green : synapsin I、red : neurofilament、blue:DAPI)

Scale bar:100  $\mu$ m

在低濃度 coating 的情況，synapsin I 還是能有表現。在這種情況下，neurites 可以伸的很長彼此連接，這對於 plasticity 也許是好事。

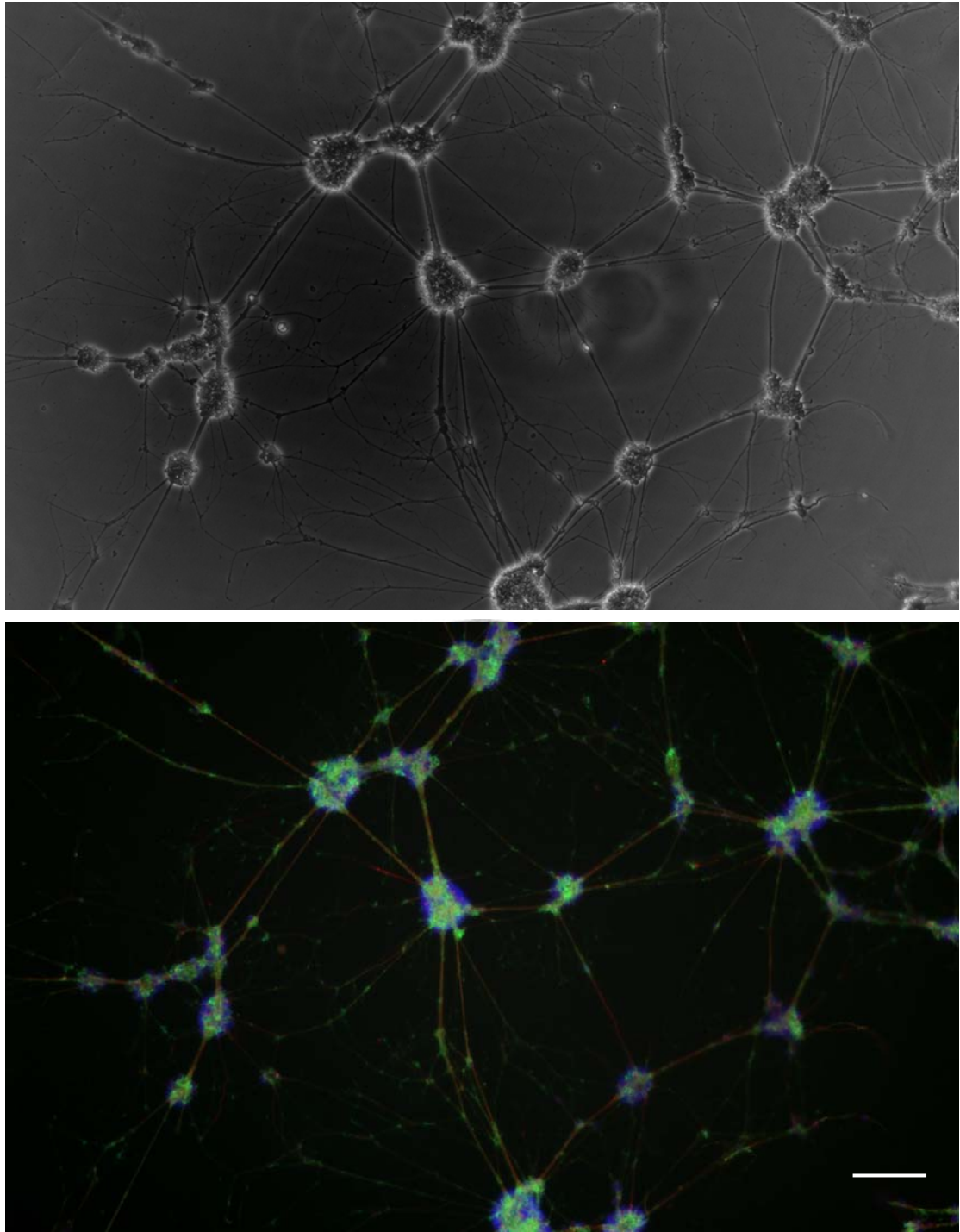


圖 4-15 低濃度塗佈的免疫螢光形態(9DIV) (2)

上: 穿透光, 下: (green : synaptophysin、red : neurofilament、blue:DAPI)

Scale bar: 100  $\mu$ m

synaptophysin 聚集於 cell body 附近, 是因為樹突常分佈於 granule cells 的核附近。這同樣證明功能表現正常。

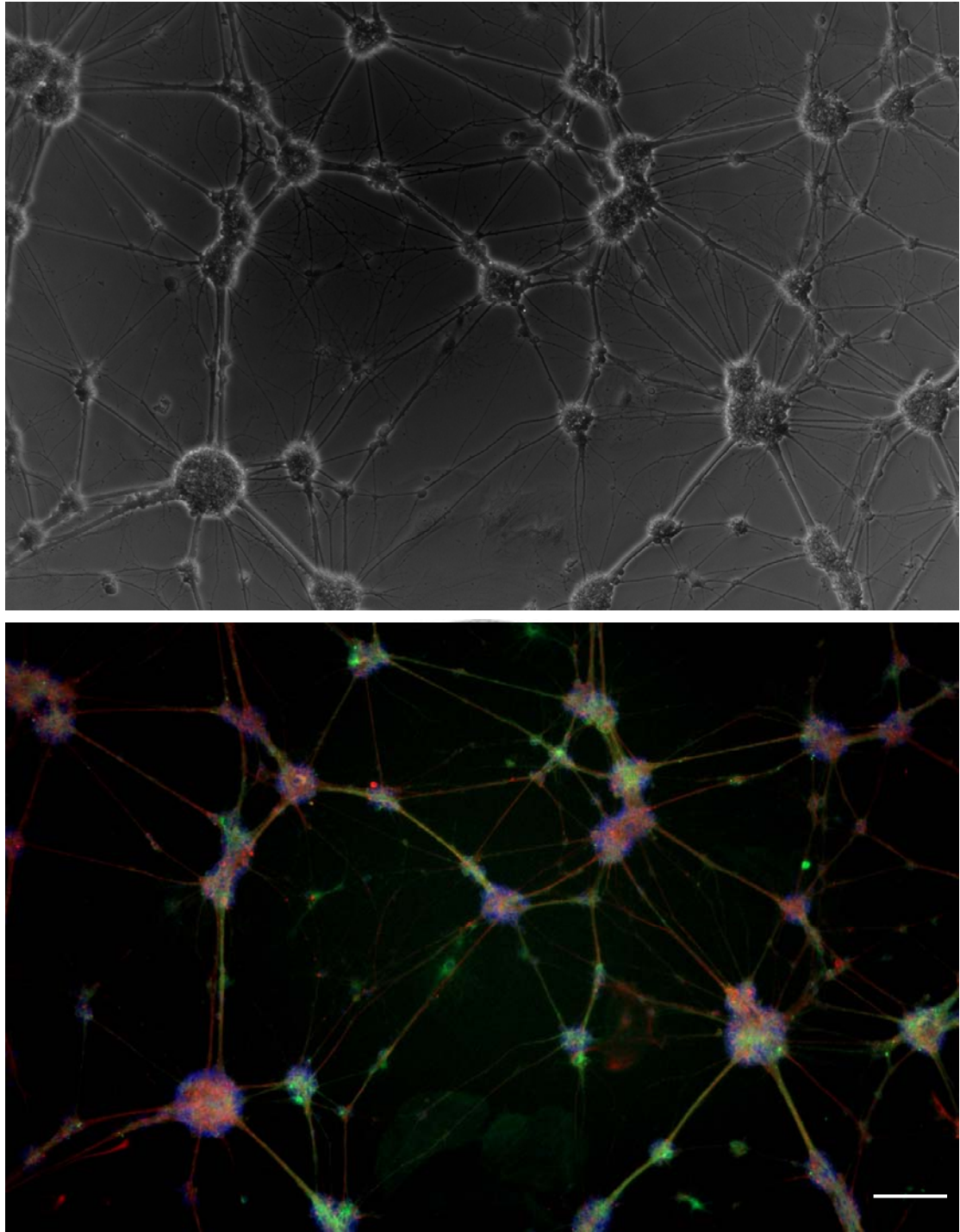


圖 4-16 低濃度塗佈的免疫螢光形態(9DIV) (3)

上:穿透光，下: (green : MAP-2、red : neurofilament、blue:DAPI)

Scale bar:100  $\mu$ m

MAP-2 常用於標定神經位置，尤其是樹突部分。

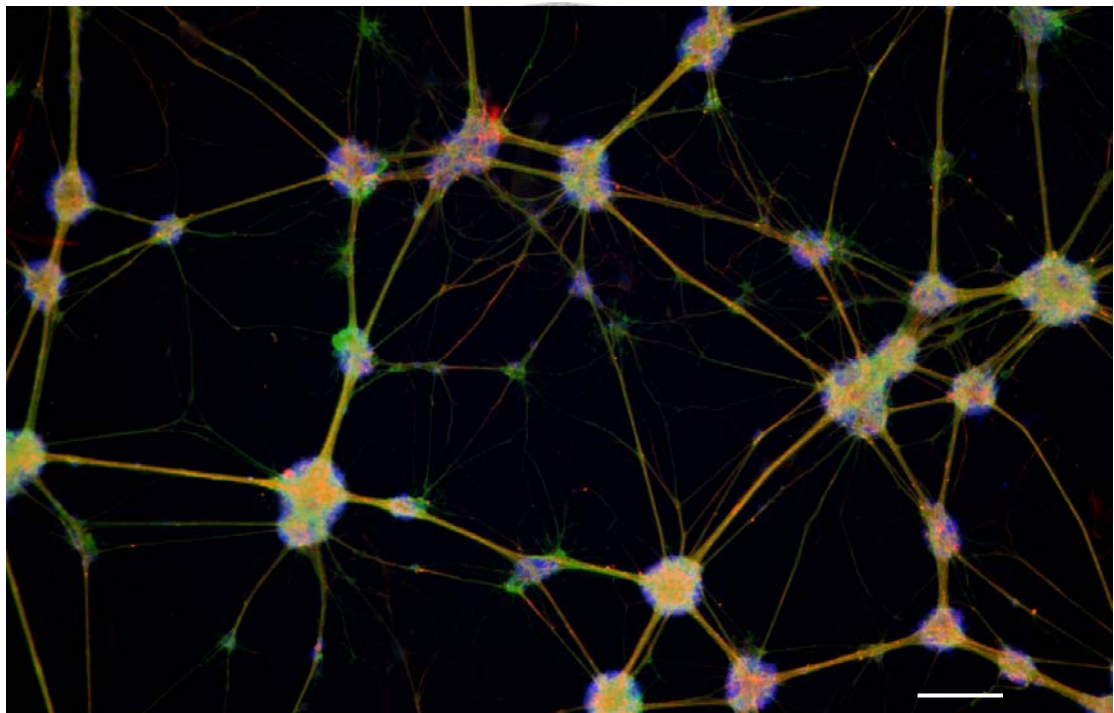
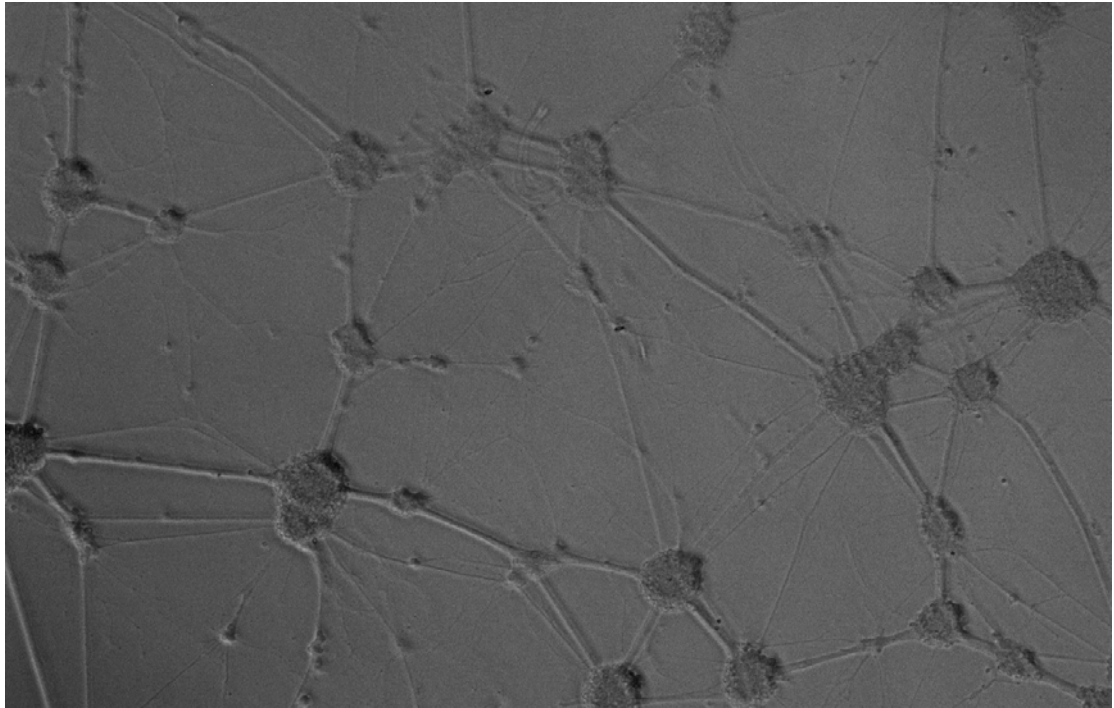


圖 4-17 低濃度塗佈的免疫螢光形態(9DIV) (4)

上:穿透光，下:(green : GAP-43、red : neurofilament、blue:DAPI)

Scale bar:100  $\mu$ m

GAP-43 是神經生長點的 marker，雖然形成大格子的網路型態，還是能有再生能力。

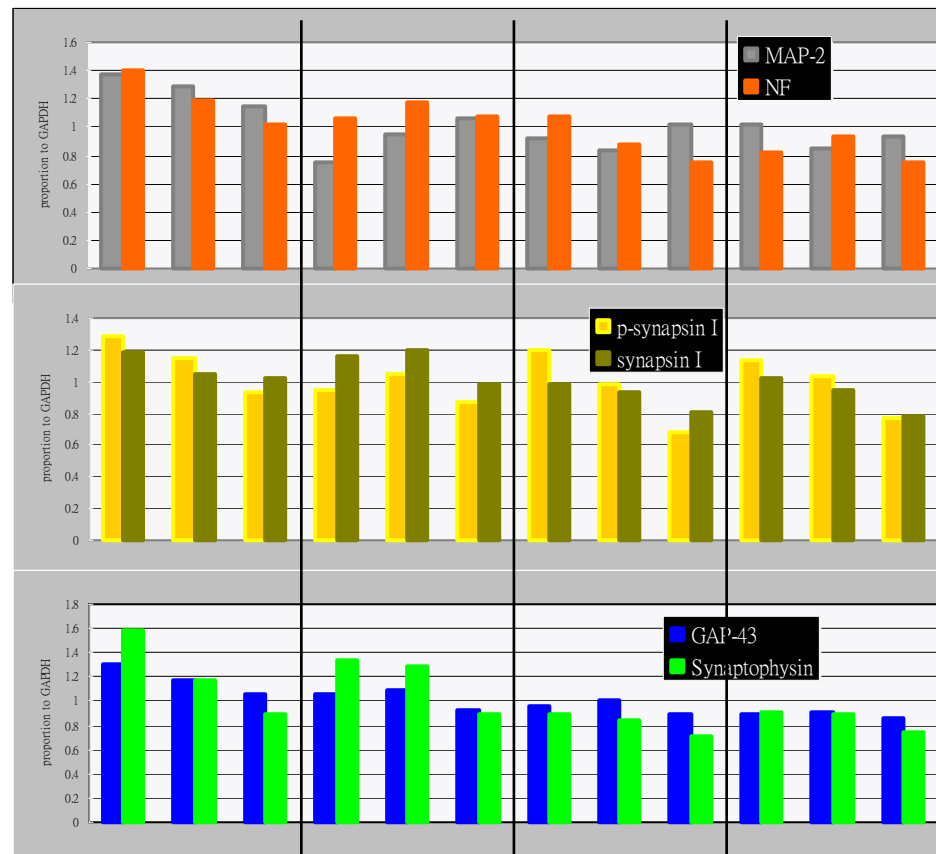
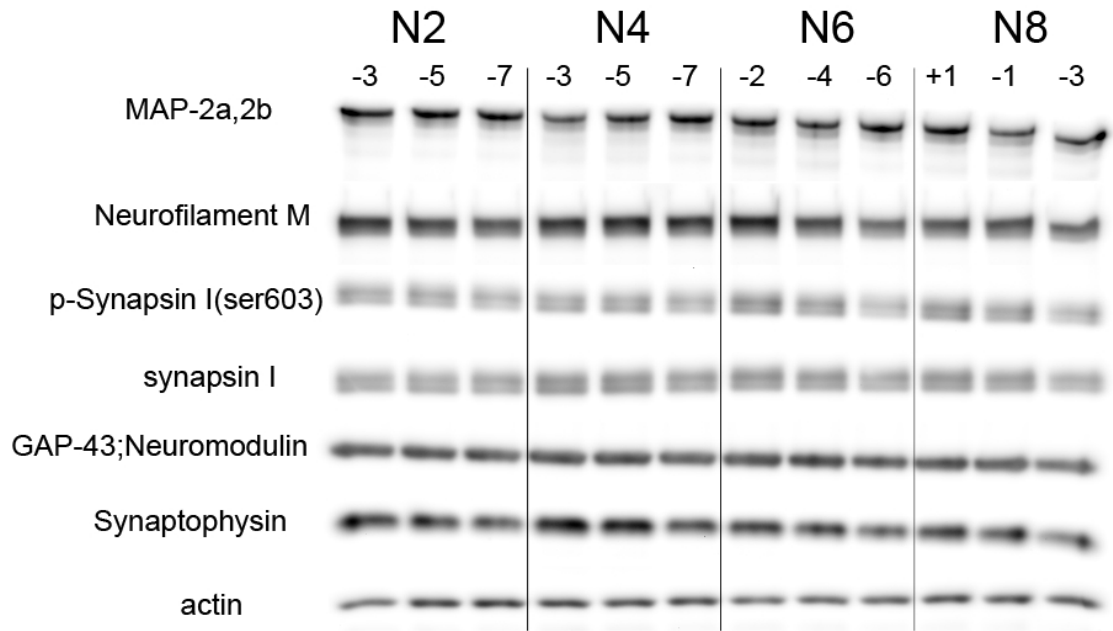


圖 4-18 細胞於不同條件塗佈的蛋白質表現量(8DIV) (1)

(濃度表示請參照表 4-1)雖然在形態上(圖 4-4)有顯著差異，但從蛋白表現上，不管是不同濃度或是不同材料間，都沒有太大差異。

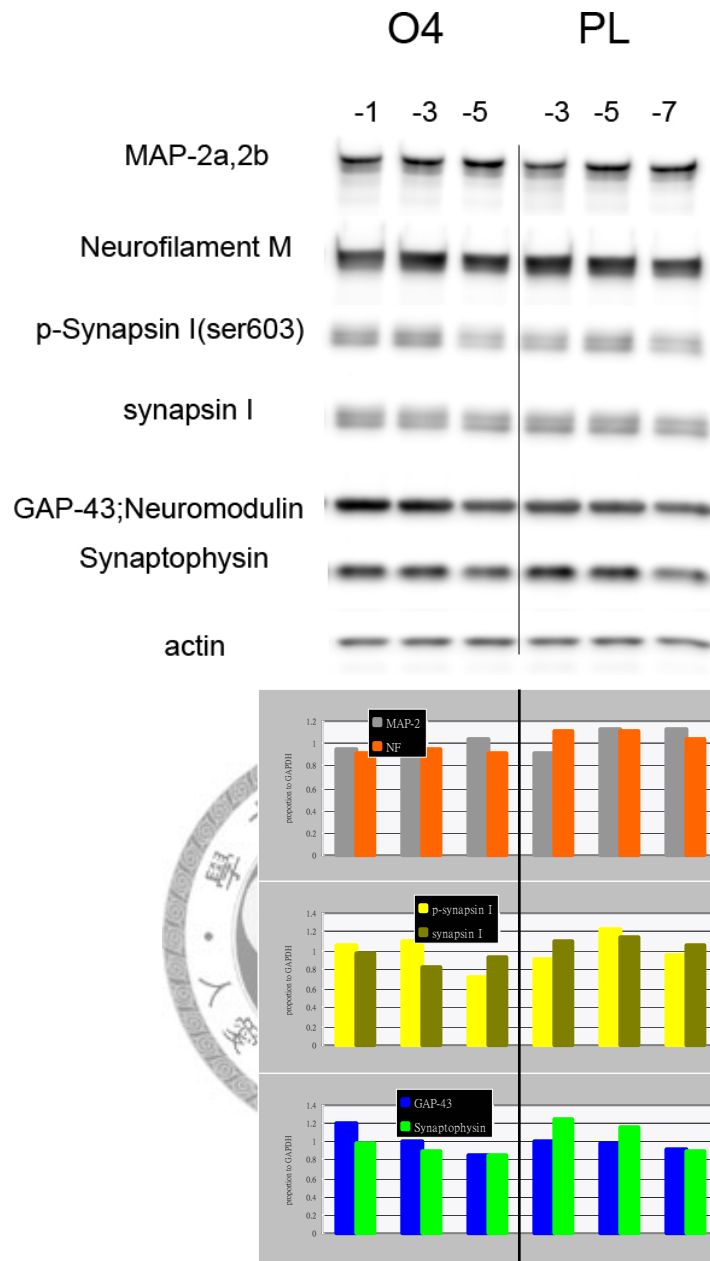


圖 4-19 細胞於不同條件塗佈的蛋白質表現量(8DIV) (2)

(濃度表示請參照表 4-1)雖然在形態上有顯著差異，但從蛋白表現上，卻沒有太大差異。

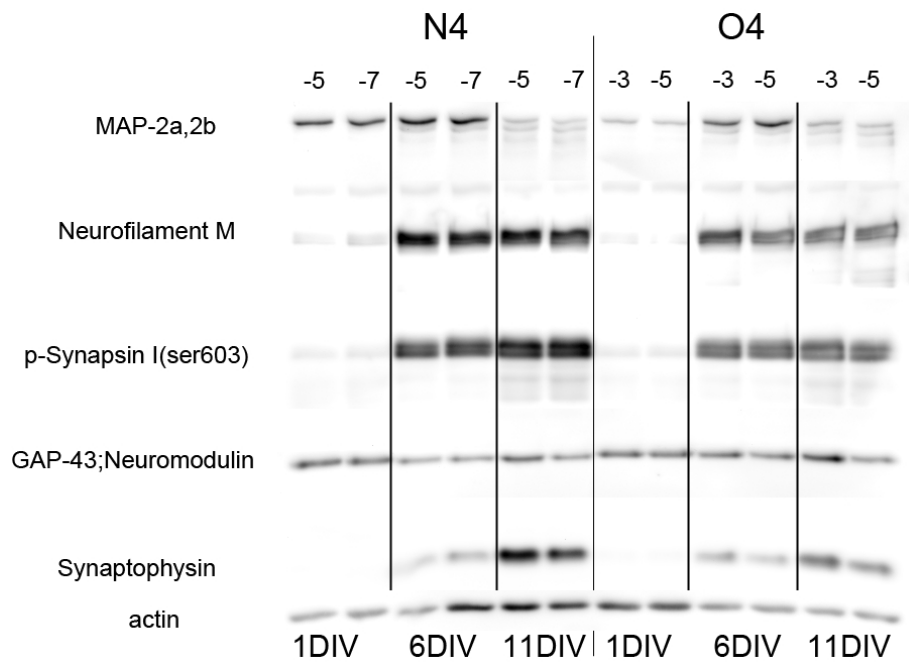


圖 4-20 細胞於不同天期的蛋白質表現量(1)

(濃度表示請參照表 4-1)下方數字為體外培養天數(days in vitro)。

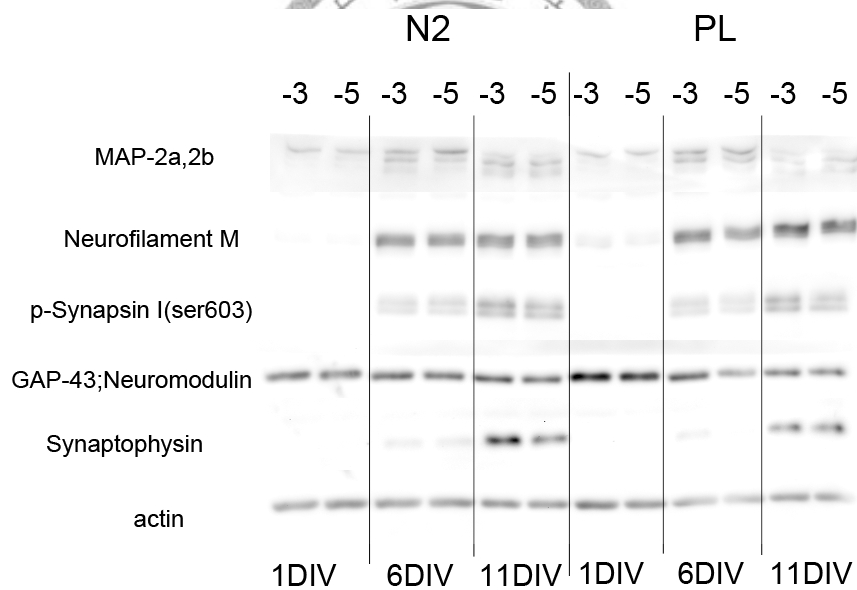


圖 4-21 細胞於不同天期的蛋白質表現量(2)

(濃度表示請參照表 4-1)下方數字為體外培養天數(days in vitro)。



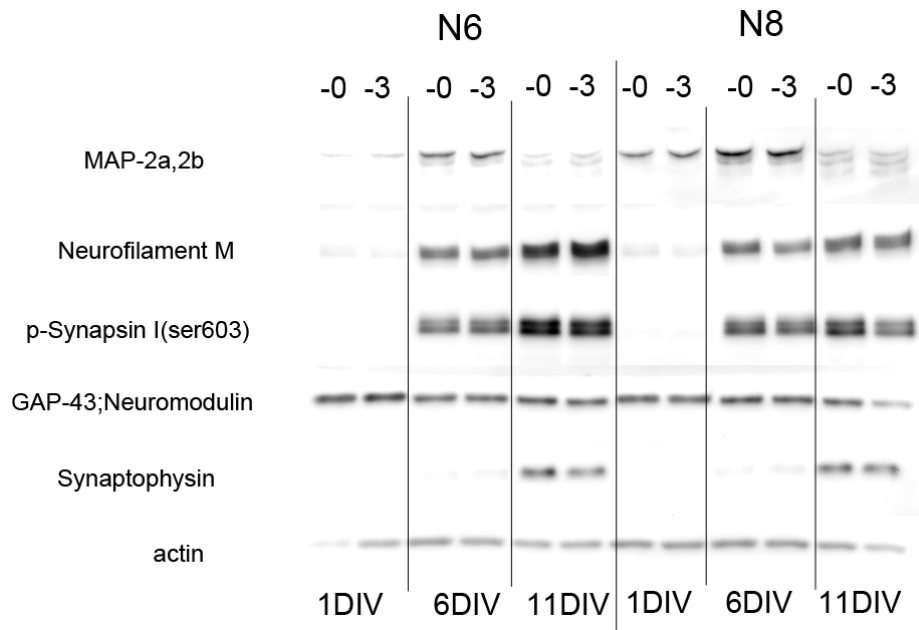


圖 4-22 細胞於不同天期的蛋白質表現量(3)

(濃度表示請參照表 4-1)下方數字為體外培養天數(days in vitro)

從不同天期的表現可發現不同材料下，蛋白的變化趨勢是一樣的。這和圖 4-1 不同天期的相對趨勢固定是一樣的結果。



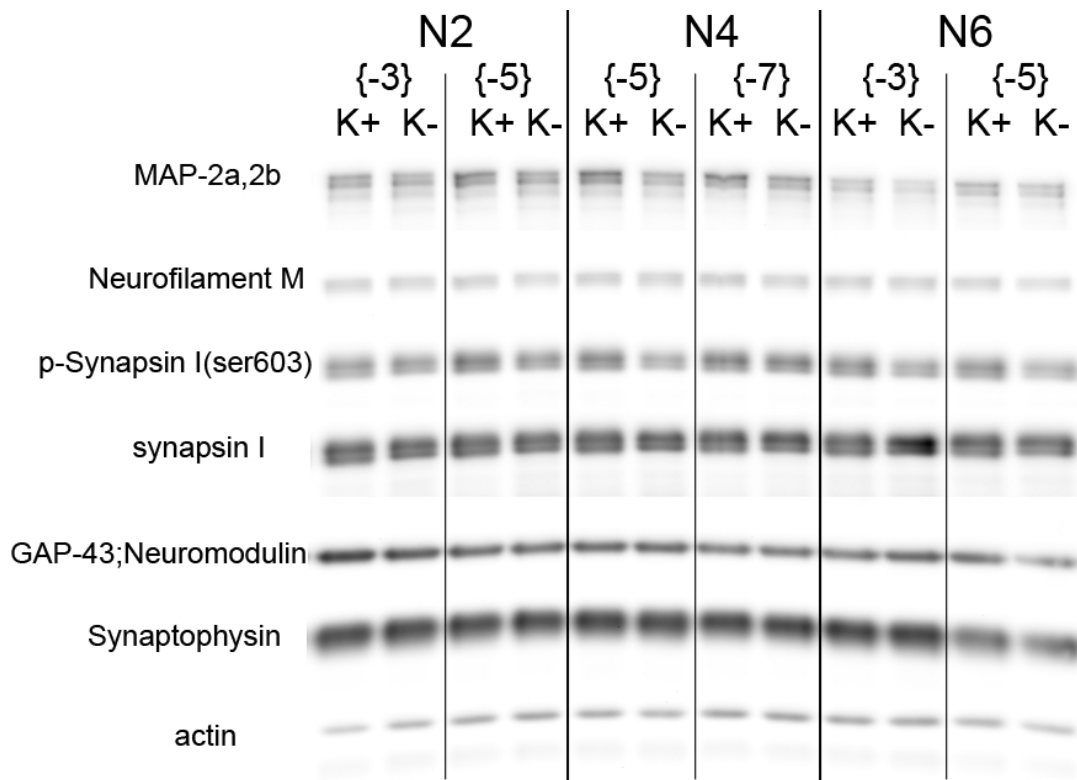


圖 4-23 細胞於不同條件下，鉀離子刺激的蛋白質表現量(8DIV) (1)

正負號代表是否有使用高鉀離子刺激，濃度表示請參照表 4-2。

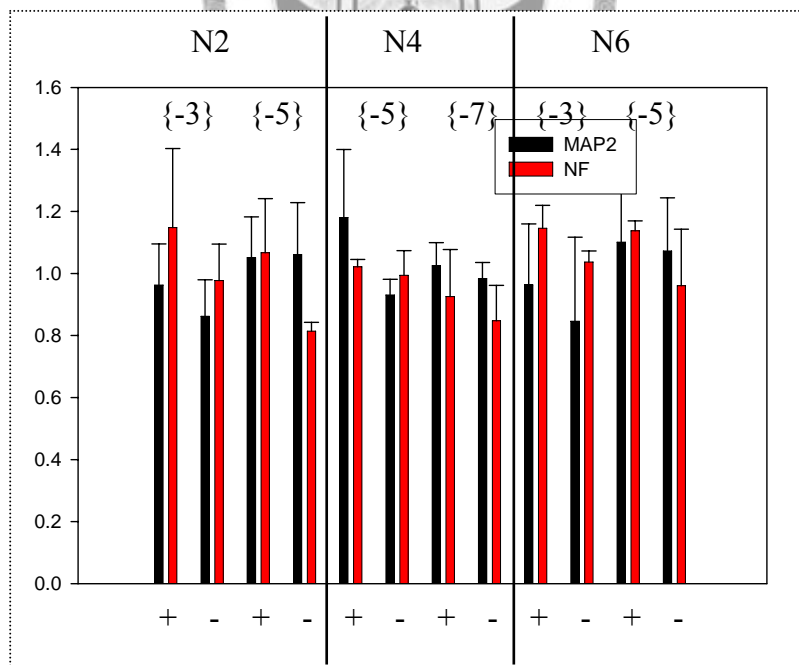


圖 4-24 細胞於不同條件下，鉀離子刺激的蛋白質表現量統計(1-1)

由圖 4-23 定量 MAP-2 和 neurofilament 的值，結果由三次獨立實驗所得數值做統計。

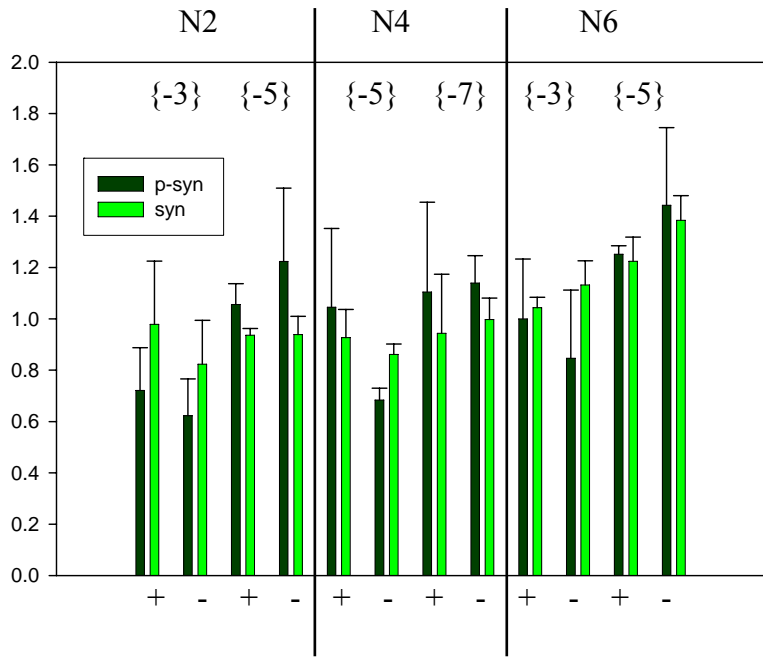


圖 4-25 細胞於不同條件下，鉀離子刺激的蛋白質表現量統計(1-2)

由圖 4-23 定量 p-synapsin I 和 synapsin I 的值，結果由三次獨立實驗所得數值做統計。

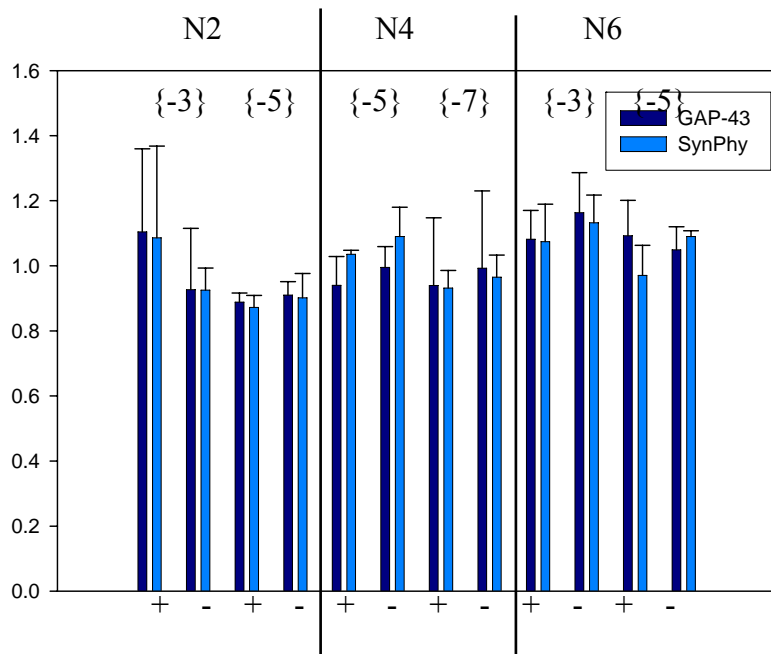


圖 4-26 細胞於不同條件下，鉀離子刺激的蛋白質表現量統計(1-3)

由圖 4-23 定量 GAP-43 和 synaptophysin 的值，結果由三次獨立實驗所得數值做統計。N2,N4,N6 的材料，不論形態是分散貼附或是聚集成大格子網路狀，我們所選用的幾種 protein marker 都顯示不出明顯差異。而用高鉀的刺激也顯示不出差異。

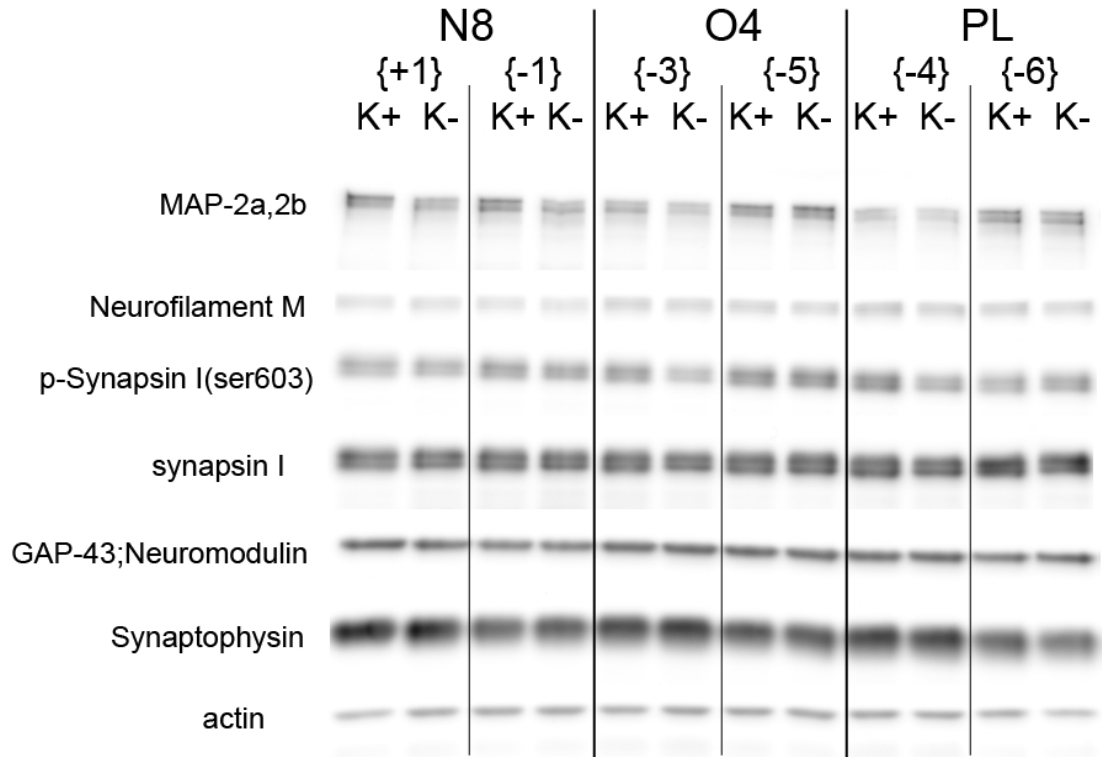


圖 4-27 細胞於不同條件下，鉀離子刺激的蛋白質表現量(8DIV) (2)

正負號代表是否有使用高鉀離子刺激，濃度表示請參照表 4-2。

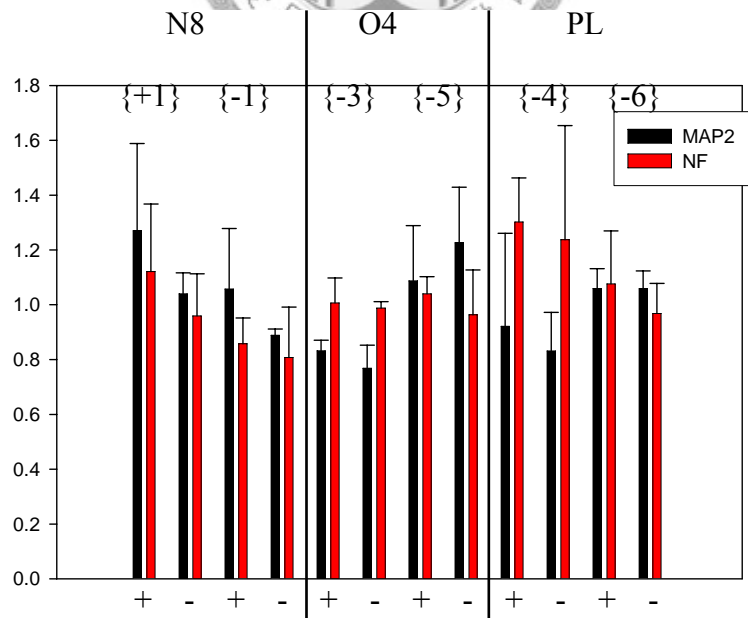


圖 4-28 細胞於不同條件下，鉀離子刺激的蛋白質表現量統計(2-1)

由圖 4-27 定量 MAP-2 和 neurofilament 的值，結果由三次獨立實驗所得數值做統計。

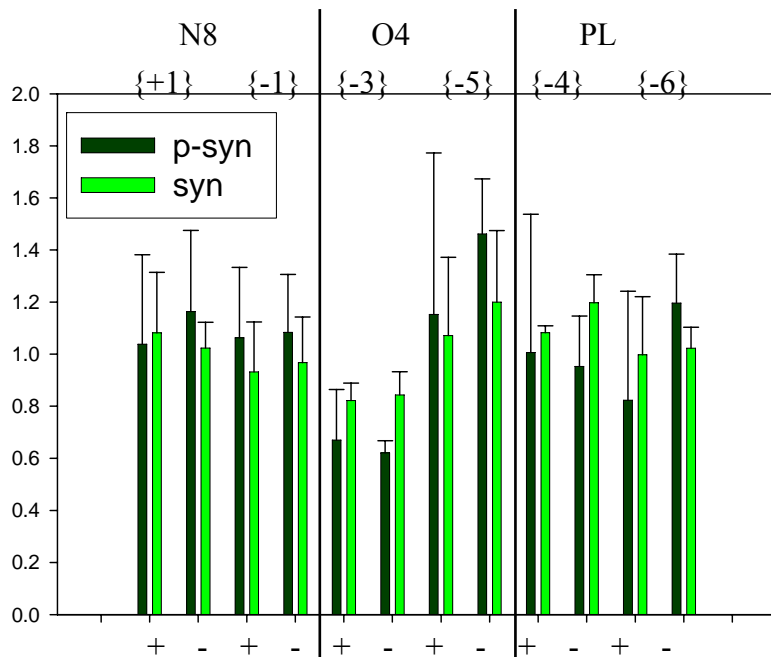


圖 4-29 細胞於不同條件下，鉀離子刺激的蛋白質表現量統計(2-2)

由圖 4-27 定量 p-synapsin I 和 synapsin I 的值，結果由三次獨立實驗所得數值做統計。

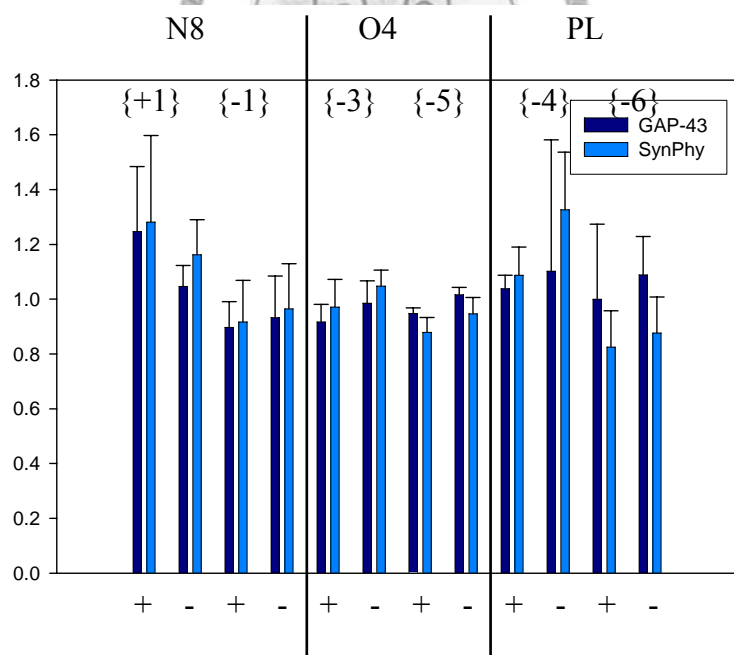


圖 4-30 細胞於不同條件下，鉀離子刺激的蛋白質表現量統計(2-3)

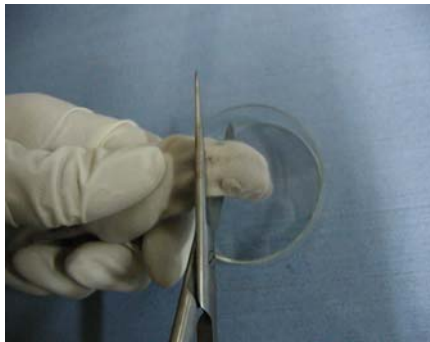
由圖 4-27 定量 GAP-43 和 synaptophysin 的值，結果由三次獨立實驗所得數值做統計。N8,O4,PL 的材料，不論形態是分散貼附或是聚集成大格子網路狀，我們所選用的幾種 protein marker 都顯示不出明顯差異。而用高鉀的刺激也顯示不出差異。



(a) 七天大 wistar rat



(b) 麻醉



(c) 分離頭和軀幹



(d) 剪開頭皮



(e) 檢開頭殼

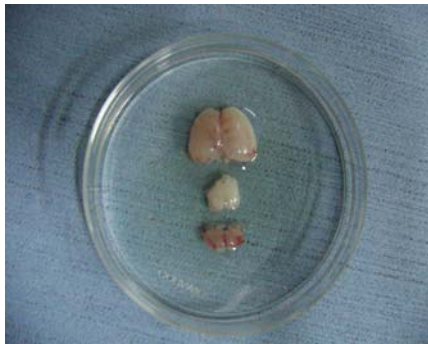


(f) 將腦部取出

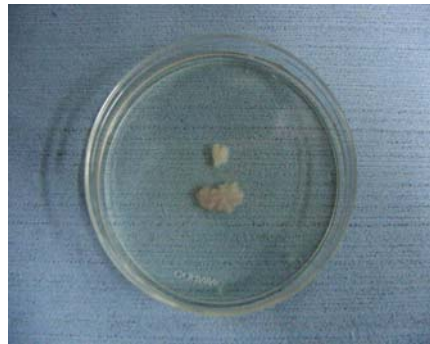
(接下頁)

圖 4-31 初代小腦顆粒型神經細胞動物實驗步驟

(接上頁)



(g) 分離大腦、喬腦、延腦、小腦



(i) 分離皮質和髓質

圖 4-31 初代小腦顆粒型神經細胞動物實驗步驟

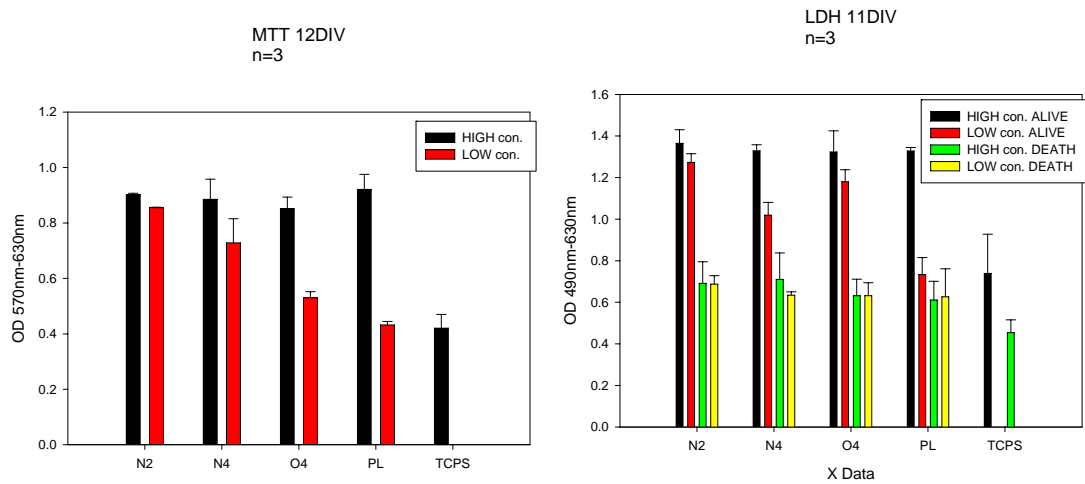


圖 4-32 LDH 和 MTT 的比較 (1)

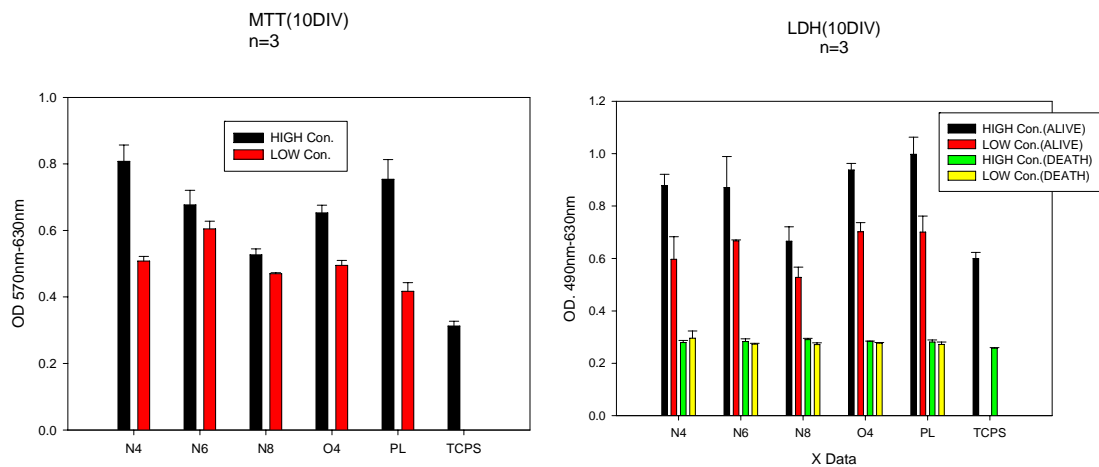


圖 4-33 LDH 和 MTT 的比較 (2)

MTT 的變化和 LDH 相近，表示 MTT 的變化很可能只是單純細胞數的關係。單一細胞的表現沒太大差異，這點可以和 western blot 的結果呼應。

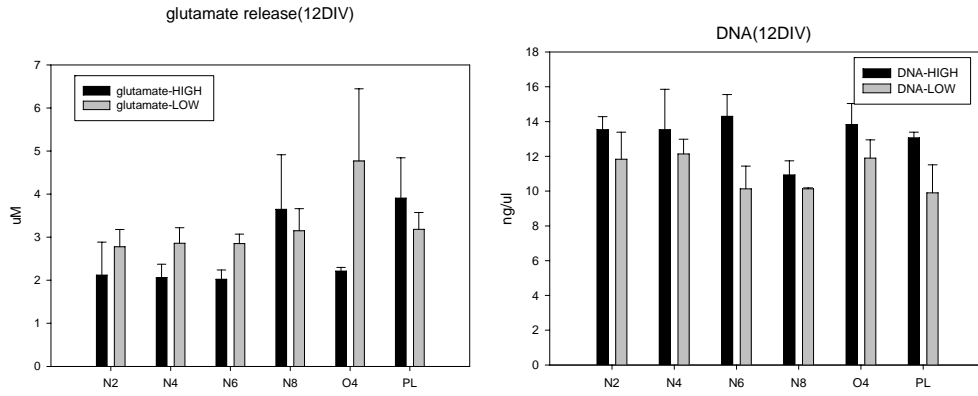


圖 4-34 glutamate release 和 DNA 定量細胞數的比較

左圖 Glutamate release 的結果，可以發現低濃度 coating 的 glutamate 釋放量(LOW)比較高，而右圖低濃度 coating 的 DNA 定量的細胞數(LOW)比較低，可以確定單位細胞釋放 glutamate 量會比較高。由於神經傳導能力對於神經移植也是很重要的考量，因此低濃度 coating 的大格子網路形態，是有可以嘗試成新的培養模式。



MTT 8DIV  
n=3

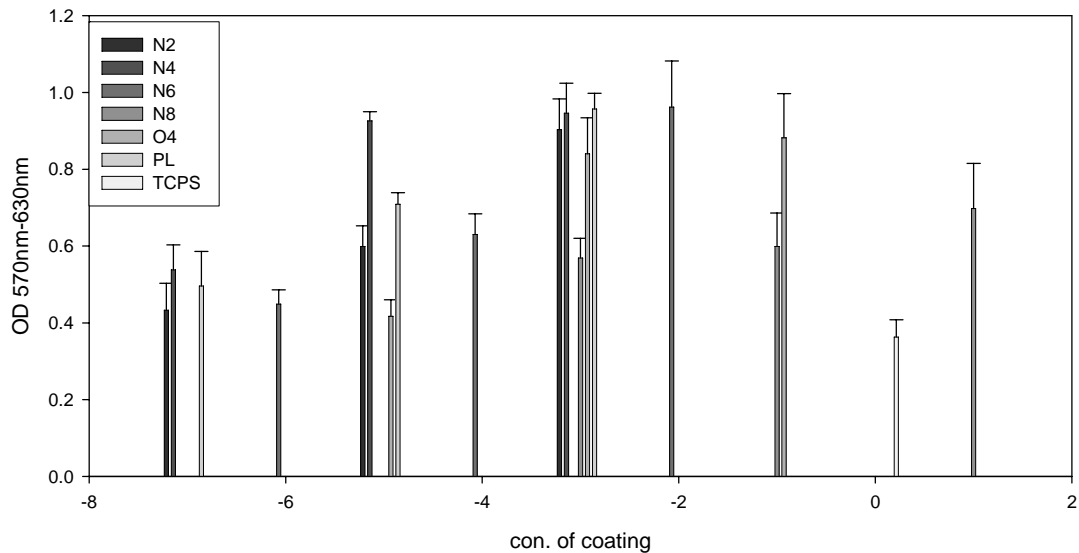


圖 4-35 從圖 4-3 整合到一起的 MTT 讀值



## 第7章 參考文獻

- <sup>1</sup> Kempermann, G. and Gage, F. H., New nerve cells for the adult brain. *Sci Am* **280** (5), 48 (1999).
- <sup>2</sup> Crompton, K. E. et al., Polylysine-functionalised thermoresponsive chitosan hydrogel for neural tissue engineering. *Biomaterials* **28** (3), 441 (2007).
- <sup>3</sup> Cargill, R. S., Dee, K. C., and Malcolm, S., An assessment of the strength of NG108-15 cell adhesion to chemically modified surfaces. *Biomaterials* **20** (23-24), 2417 (1999).
- <sup>4</sup> Chen, Y. S. et al., Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin. *Biomaterials* **21** (15), 1541 (2000).
- <sup>5</sup> Webb, K. et al., Substrate-bound human recombinant L1 selectively promotes neuronal attachment and outgrowth in the presence of astrocytes and fibroblasts. *Biomaterials* **22** (10), 1017 (2001).
- <sup>6</sup> Gillis, A. J., Schuller, A. P., and Skordalakes, E., Structure of the *Tribolium castaneum* telomerase catalytic subunit TERT. *Nature* **455** (7213), 633 (2008).
- <sup>7</sup> Arikath, J. and Reichardt, L. F., Cadherins and catenins at synapses: roles in synaptogenesis and synaptic plasticity. *Trends Neurosci* **31** (9), 487 (2008).
- <sup>8</sup> Schuman, E. M. and Murase, S., Cadherins and synaptic plasticity: activity-dependent cyclin-dependent kinase 5 regulation of synaptic beta-catenin-cadherin interactions. *Philos T Roy Soc B* **358** (1432), 749 (2003).
- <sup>9</sup> Tai, C. Y., Mysore, S. P., Chiu, C., and Schuman, E. M., Activity-regulated N-cadherin endocytosis. *Neuron* **54** (5), 771 (2007).
- <sup>10</sup> Woerly, S. and Morassutti, D. J., New Aspects of Neurotransplantation. *Neurosurgical Review* **16** (2), 93 (1993).
- <sup>11</sup> Carbonetto, S. T., Gruver, M. M., and Turner, D. C., Nerve-Fiber Growth on Defined Hydrogel Substrates. *Science* **216** (4548), 897 (1982).
- <sup>12</sup> Bellamkonda, R., Ranieri, J. P., Bouche, N., and Aebischer, P., Hydrogel-Based 3-Dimensional Matrix for Neural Cells. *J Biomed Mater Res* **29** (5), 663 (1995).
- <sup>13</sup> Aebischer, P. et al., Piezoelectric Guidance Channels Enhance Regeneration in the Mouse Sciatic-Nerve after Axotomy. *Brain Research* **436** (1), 165 (1987).
- <sup>14</sup> Dendunnen, W. F. A. et al., Long-Term Evaluation of Nerve Regeneration in a Biodegradable Nerve Guide. *Microsurg* **14** (8), 508 (1993).
- <sup>15</sup> Borkenhagen, M. et al., In vivo performance of a new biodegradable polyester

- urethane system used as a nerve guidance channel. *Biomaterials* **19** (23), 2155 (1998).
- <sup>16</sup> Li, N. Z. and Folch, A., Integration of topographical and biochemical cues by axons during growth on microfabricated 3-D substrates. *Exp Cell Res* **311** (2), 307 (2005).
- <sup>17</sup> Yang, F., Murugan, R., Wang, S., and Ramakrishna, S., Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials* **26** (15), 2603 (2005).
- <sup>18</sup> Harsch, A., Calderon, J., Timmons, R. B., and Gross, G. W., Pulsed plasma deposition of allylamine on polysiloxane: a stable surface for neuronal cell adhesion. *J Neurosci Meth* **98** (2), 135 (2000).
- <sup>19</sup> Li, B., Ma, Y. X., Wang, S., and Moran, P. M., Influence of carboxyl group density on neuron cell attachment and differentiation behavior: Gradient-guided neurite outgrowth. *Biomaterials* **26** (24), 4956 (2005).
- <sup>20</sup> Greengard, P., Valtorta, F., Czernik, A. J., and Benfenati, F., Synaptic Vesicle Phosphoproteins and Regulation of Synaptic Function. *Science* **259** (5096), 780 (1993).
- <sup>21</sup> Kiryushko, D. et al., A synthetic peptide ligand of neural cell adhesion molecule (NCAM), C3d, promotes neuritogenesis and synaptogenesis and modulates presynaptic function in primary cultures of rat hippocampal neurons. *J Biol Chem* **278** (14), 12325 (2003).
- <sup>22</sup> Levi, G., Aloisi, F., Ciotti, M. T., and Gallo, V., Autoradiographic Localization and Depolarization-Induced Release of Acidic Amino-Acids in Differentiating Cerebellar Granule Cell-Cultures. *Brain Research* **290** (1), 77 (1984).
- <sup>23</sup> Volonte, C., Ciotti, M. T., and Battistini, L., Development of a Method for Measuring Cell Number - Application to Cns Primary Neuronal Cultures. *Cytometry* **17** (3), 274 (1994).
- <sup>24</sup> Lau, B. H. S., Li, L., and Yoon, P., Thymic Peptide Protects Vascular Endothelial-Cells from Hydrogen Peroxide-Induced Oxidant Injury. *Life Sci* **52** (22), 1787 (1993).
- <sup>25</sup> Koh, J. Y. and Choi, D. W., Quantitative-Determination of Glutamate Mediated Cortical Neuronal Injury in Cell-Culture by Lactate-Dehydrogenase Efflux Assay. *J Neurosci Meth* **20** (1), 83 (1987).
- <sup>26</sup> Cook, J. A. and Mitchell, J. B., Viability Measurements in Mammalian-Cell Systems. *Anal Biochem* **179** (1), 1 (1989).

## 第8章 附錄

### 8-1 儀器詳細資料

1. 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

2. 離心機 (Centrifuge)

廠牌：Beckman, Germany

型號：GS-15R

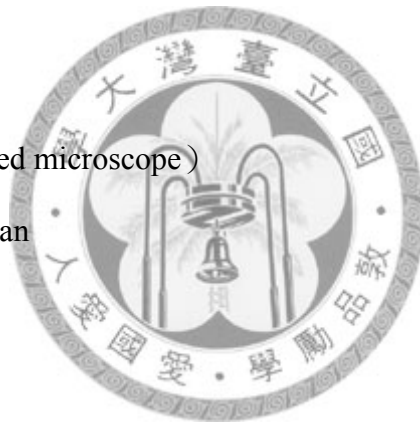
台大醫工所

3. 光學顯微鏡 (Inverted microscope)

廠牌：Olympus, Japan

型號：IX71

台大醫工所



4. 光學顯微鏡 (Inverted microscope)

廠牌：Leica, Germany

型號：DMI 6000 B

台大醫工所

5. 冰箱 (Refrigerator)

廠牌：台灣三洋公司

型號：Medicool MPR-411F

台大醫工所

6. 烘箱 (Oven)

廠牌：台灣超技儀器公司

型號：HT-SI-45A

台大醫工所

7. 磁石攪拌器(Stirrer/Hotplate)

廠牌：Costar, USA

型號：PC-320

台大醫工所

8. 酵素免疫分析自動判讀機(ELISA Reader)

廠牌：Molecular Devices, USA

型號：*SpectraMax M2e*

台大醫工所

9. 迴轉式恆溫振盪水槽 (Shaking bath)

廠牌：Firstek scientific, USA

型號：B601

台大醫工所

10. 電子微量天平 (electronic microbalance)

廠牌：Precisa, Switzerland

型號：205A

台大醫工所

11. 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

12. 超音波振盪洗滌器 (Ultrasonic cleaner)

廠牌：NEY

型號：Ultrasonik 57H

台大醫工所



13. 振盪器 (Shaker)

廠牌：Lab. Rotator, USA

型號：2800A

台大醫工所

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

廠牌：Nuaire

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

台大醫工所

15. 轉動式真空幫浦 (Rotary vacuum pump)

廠牌：台灣東元公司

型號：BSGW

台大醫工所

16. 酸鹼度計 (pH meter)

廠牌：SUNTEX, Taiwan

型號：SP-701

台大醫工所



17. 血球計數盤 (Hemocytometer)

廠牌：Hausser scientific, USA

型號：Bright line

台大醫工所

18. 電子耦合裝置 (Charge couple device, CCD)

廠牌：Marscam, Taiwan

型號：MK-1340E

台大醫工所

19. 震盪混合器 (Mixer)

廠牌：VORTEX MIXER, Taiwan

型號：VM-1000

台大醫工所

20. 微小型離心機(small type micro centrifuge)

廠牌：Tomy, USA

型號：HF-120

台大醫工所

21. 電源供應器(Power Supply)

廠牌：京士敦, 台灣

型號：MP-250

台大醫工所

22. 影像擷取卡

廠牌：V-Gear, Taiwan

型號：NTSC-M/M

台大醫工所

23. Macro Zoom Lenses

廠牌：computar,Japan

型號：MLH-10X

台大醫工所

24. 螢冷光影像擷取系統(UVP Biospectrum)

廠牌：UVP

型號：UVP Biospectrum AC System

第八共同研究室

25. Mini-PROTEAN Tetra Cell

廠牌：Bio-Rad, USA

26. Trans-Blot SD: 221BR,

廠牌：Bio-Rad, USA



型號:Trans-Blot SD: 221BR

台大醫工所

27. Power Supply: PowerPac 041BR, Bio-Rad, USA

廠牌:Bio-Rad, USA

型號: PowerPac 041BR

台大醫工所

