

國立臺灣大學醫學院暨工學院醫學工程研究所

碩士論文

Department of Biomedical Engineering
College of Medicine and College of Engineering
National Taiwan University



低能量超音波刺激力學模組與神經細胞離子通道之
相關性研究

Interaction between Low-Intensity Ultrasound Stimulation Pattern
and Neuronal Cell Ion Channels

郭博丞

Po-Cheng Kuo

指導教授：王兆麟博士

Advisor: Jaw-Lin Wang, Ph.D.

中華民國 114 年 6 月

June, 2025

國立臺灣大學碩士學位論文

口試委員會審定書



MASTER'S THESIS ACCEPTANCE CERTIFICATE NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY

低能量超音波刺激力學模組與神經細胞離子通道之
相關性研究

Interaction between Low-Intensity Ultrasound Stimulation Pattern and
Neuronal Cell Ion Channels

本論文係 郭博丞 君（學號 R12528059）在國立臺灣大學醫學工程研究所完成之碩士學位論文，於民國 114 年 6 月 12 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明。

The undersigned, appointed by the Department of Biomedical Engineering on 12 June 2025 have examined a Master's thesis entitled above presented by Po Cheng Kuo (student ID: R12528059) candidate and hereby certify that it is worthy of acceptance.

口試委員 Oral examination committee :

王兆麟

(指導教授 Advisor)

李耿光

陳志邦

江文正

系主任/所長 Director :

林頌然

致謝



碩士研究的這段旅程充滿挑戰與成長，能夠順利完成論文與學業，深感幸運與感激。在此，謹向所有在這段期間給予我幫助與支持的人，致上最誠摯的謝意。首先，最深的感謝獻給我的指導教授 王兆麟老師。王老師在研究過程中不僅提供了專業且細緻的指導，也在我迷惘或面對困難時，給予我極大的耐心與鼓勵。老師嚴謹的學術態度與豐富的研究經驗，讓我受益良多，並深深影響了我對科研的熱情與堅持。感謝中央研究院生醫所 莊育嘉博士，在研究過程中提供了寶貴的實驗指導與技術協助，無論是實驗設計、數據分析或是細節操作，莊博士都給予我極大的幫助，讓我得以更深入地了解並完成本研究。謝謝一路支持與陪伴的學長姐，吳觀宇學長與張乃云學姐，在我初進實驗室時給予許多指導與建議，讓我能更快適應研究環境與實驗流程。感謝一路互相扶持的同學們：簡于涵、陳冠蓁、陳維貞、宋瑾瑜，無論是課業、實驗還是生活，大家總是彼此鼓勵與打氣，是我碩士生活中最重要的夥伴。同時也感謝實驗室的學弟妹們：黃浩瑋、張家誌、洪浩瑋、張芷蘋，你們的加入為實驗室注入活力，也讓這段時光增添了更多笑聲與回憶。最後，感謝我的家人長期以來的支持，讓我得以無後顧之憂地專注於研究與學習。

中文摘要

非侵入性神經調控技術迅速發展，其中低強度超音波(Low-Intensity Ultrasound, LIUS)因具備高穿透性、聚焦性佳與空間解析度高等優勢，逐漸成為調控深層腦區活動的重要工具。特別是在無需植入光纖或電極，LIUS 可與基因工程結合，發展為超音波遺傳學(Sonogenetics)的新興技術，使得特定細胞能對低強度超音波產生選擇性反應。然而，超音波在細胞層級誘發哪些離子通道及其對應的力學模組，目前仍缺乏系統性的研究。

本研究分為兩大部分。第一部分為超音波微管裝置物理性質的驗證，探討不同參數(如輸入電壓、佔空比)下，產生的聲輻射力與剪應力的變化，並量化其力學模組。第二部分為細胞層級實驗，利用小鼠神經母細胞瘤(N2a)與背根神經節細胞(DRG)進行超音波刺激，利用鈣離子螢光染劑(Fura-2)與 Metafluor 軟體即時量測細胞內鈣離子濃度變化。進一步透過離子通道抑制劑與基因剔除細胞株，釐清特定離子通道在細胞對超音波刺激反應中的作用。

實驗結果發現，N2a 細胞中對剪應力特別敏感，其鈣離子反應依賴三個離子通道：ASIC1a, Piezo1 與 TRPV1，本研究特別利用基因剔除與細胞轉染技術，驗證出 ASIC1a 扮演特別重要的角色。DRG 透過 LoxP-Cre 技術標記 ASIC1a^+ ，對於相同能量下，聲壓聲流主導的刺激皆無鈣離子反應的顯著變化；本體感覺與痛覺神經中，不論是低還是高能量輸出的力學模組，造成的鈣離子反應也無顯著變化。在本體感覺神經中，反應依賴 ASIC3 與 Piezo2；在痛覺神經中，反應除了依賴 Piezo2 之外，ASIC1a 與 ASIC3 也扮演重要角色。

本研究建立了一套可量化且具重現性的細胞層級超音波刺激系統，透過物理與生物指標的交叉分析，釐清低強度超音波刺激下，力學模組對不同細胞的活化具決定性影響，以及與特定離子通道(ASIC1a、ASIC3、Piezo2)之間的關聯，深化對神經細胞受超音波調控的認識，並為未來發展精準、非侵入性的神經調控技術提供理論基礎。

關鍵字：低強度超音波、超音波遺傳學、力學模組、機械敏感性離子通道、鈣離子反應

Abstract

Non-invasive neuromodulation has advanced rapidly, with low-intensity ultrasound (LIUS) emerging as a promising tool for deep brain modulation due to its high penetration and precise focus. When combined with genetic engineering, LIUS enables sonogenetics—a technique for selectively activating target cells without invasive implants. However, the specific ion channels and mechanical force modalities involved in ultrasound-induced cellular responses remain poorly understood.

This study is divided into two major parts. The first part involves characterizing the physical properties of the micropipette-guided ultrasound system, focusing on how variations in input voltage and duty cycle influence the resulting acoustic pressure and shear stress, thereby defining the mechanical force modalities. The second part consists of cellular-level experiments in which low-intensity ultrasound was applied to mouse neuroblastoma (N2a) cells and dorsal root ganglion (DRG) neurons. Calcium influx was monitored in real-time using the fluorescent calcium indicator Fura-2 and the Metafluor software. Specific ion channels involved in the ultrasound-induced calcium responses were further identified through the use of pharmacological inhibitors and genetically modified knockout cell lines.

Experimental results showed that N2a cells were particularly sensitive to shear stress, with calcium responses primarily mediated by ASIC1a, Piezo1, and TRPV1. Using gene knockout and transfection techniques, ASIC1a was confirmed to play a crucial role. In DRG neurons marked with ASIC1a⁺ via LoxP-Cre recombination, no significant calcium response was observed under either pressure- or shear-dominant conditions with equivalent acoustic energy. Across different DRG subtypes, no significant calcium response was noted under either low or high energy conditions. In proprioceptive neurons, responses were dependent on ASIC3 and Piezo2, while in nociceptive neurons, Piezo2, ASIC1a, and ASIC3 all played important roles.

This study successfully established a quantifiable and reproducible cellular-level ultrasound stimulation platform. Through integrated physical and biological analyses, it clarified how mechanical force modalities decisively influence cellular activation under low-intensity ultrasound and identified key mechanosensitive ion channels – ASIC1a, ASIC3, and Piezo2 – in this process. These findings deepen our understanding of how neural cells are modulated by ultrasound and provide a theoretical foundation for developing precise, non-invasive neuromodulation technologies in the future.

Keyword: Low-Intensity Ultrasound, Sonogenetics, Mechanical Modality, Mechanosensitive Ion Channels, Calcium Response

目次



論文審定書.....	ii
致謝.....	iii
中文摘要.....	iv
Abstract	v
目次.....	vi
圖目次.....	ix
表目次.....	xii
第一章 緒論	1
1-1 研究動機.....	1
1-2 研究背景.....	1
1-2-1 酸敏感性離子通道.....	1
1-2-2 機械力敏感性離子通道.....	4
1-2-3 超音波與聲學.....	6
1-2-3-1 聲波簡介.....	6
1-2-3-2 波傳遞模式.....	7
1-2-3-3 聲阻抗.....	10
1-2-4 超音波參數.....	11
1-2-4-1 脈衝重現週期與佔空比.....	11
1-2-4-2 聲強度.....	12
1-2-5 超音波物理效應.....	13
1-2-5-1 基本性質	13
1-2-5-2 聲壓(聲輻射力).....	14
1-2-5-3 聲流.....	15
1-2-5-4 空蝕效應.....	15
1-2-6 壓電原理.....	16
1-3 研究目的.....	17
1-4 研究架構.....	19
1-5 研究限制.....	20



第二章	研究材料與方法.....	21
2-1	實驗設備.....	21
2-1-1	整體實驗架構.....	21
2-1-2	超音波微管裝置.....	22
2-1-3	訊號產生器與放大器.....	23
2-1-4	溶液置換系統.....	23
2-1-5	鈣離子影像螢光顯微鏡.....	24
2-2	實驗細胞與材料.....	25
2-2-1	小鼠神經母細胞瘤(Neuro-2a neuroblastoma cells, N2a)	25
2-2-2	背根神經節細胞(Dorsal Root Ganglion neuron, DRG)	26
2-2-3	漢克平衡酸鹼緩衝溶液.....	26
2-2-4	鈣離子螢光染劑(Fura-2/AM).....	27
2-3	鈣離子影像分析方法.....	28
第三章	實驗設計.....	30
3-1	超音波微管之機械性質探討與量測.....	30
3-1-1	聲壓量測規畫.....	31
3-1-2	聲流量測規畫.....	32
3-2	小鼠神經母細胞瘤之鈣離子反應探討.....	33
3-2-1	檢驗不同力學模組與條件因素造成之鈣離子變化.....	34
3-2-2	利用不同試劑檢驗 N2a 細胞膜上離子通道	37
3-2-3	利用基因編輯檢驗 ASIC1a 的重要性.....	40
3-3	小鼠背根神經節細胞之鈣離子反應探討	41
第四章	實驗結果.....	45
4-1	超音波微管之聲壓量測結果.....	45
4-2	超音波微管之聲流量測結果.....	47
4-3	小鼠神經母細胞瘤之鈣離子反應實驗結果.....	53
4-3-1	N2a 細胞受力學模組刺激之反應結果	53
4-3-2	檢驗 N2a 細胞膜上離子通道實驗結果	60
4-3-3	基因編輯 N2a 細胞受力學模組刺激之反應結果	62
4-4	小鼠背根神經節(ASIC1a ⁺⁺)之鈣離子反應實驗結果	64



4-5	不同亞型 DRG 之鈣離子反應實驗結果	67
4-5-1	不同亞型 DRG 基因剔除之鈣離子反應實驗結果	68
4-5-2	不同亞型 DRG 藥理之鈣離子反應實驗結果	71
第五章	研究結論與討論	72
5-1	結論	72
5-2	討論	73
5-3	未來展望	75
	參考資料	76

圖目次



圖 1、酸敏感通道一型結構示意圖.....	2
圖 2、線蟲與哺乳類動物中，牽引模型 tether model 力學傳導分子結構示意圖.....	3
圖 3、Piezol1 通道受機械力刺激開啟示意圖	5
圖 4、TRP 通道受機械力刺激開啟示意圖	5
圖 5、聲波頻率分類.....	6
圖 6、疏密波示意圖.....	7
圖 7、不同應力對於細胞作用示意圖.....	7
圖 8、板波在有限厚度板內的傳播情形與運動模式.....	8
圖 9、板波相速度頻散曲線(phase-velocity dispersion curve)(玻璃).....	9
圖 10、超音波微管管壁厚度示意圖與實際量測圖	9
圖 11、洩漏萊姆波示意圖	10
圖 12、脈衝超音波示意圖	11
圖 13、聲強度種類.....	13
圖 14、點波源與遠近場示意圖	14
圖 15、細胞骨架受超音波刺激後的逆行模式.....	14
圖 16、玻璃微管在顯微鏡下平光圖與針尖開閉口示意圖	15
圖 17、超音波介導空蝕示意圖	16
圖 18、壓電效應原理	16
圖 19、痛覺傳遞路徑示意圖	17
圖 20、研究架構圖	20
圖 21、(A)實驗架設示意圖 (B)實驗裝置實體圖	21
圖 22、玻璃微管製作流程.....	22
圖 23、超音波微管裝置相關配件	22
圖 24、訊號產生器與放大器圖	23
圖 25、溶液置換系統圖	23
圖 26、轉動幫浦與實際實驗圖	24
圖 27、鈣離子影像螢光顯微鏡.....	24
圖 28、N2a 平光圖與螢光圖	25



圖 29、DRG 平光圖與螢光圖	26
圖 30、Fura-2 與鈣離子結合示意圖	27
圖 31、在不同鈣離子濃度下 Fura-2 融光激發光譜	27
圖 32、鈣離子影像變化圖	28
圖 33、細胞螢光平均灰階值的變化圖	28
圖 34、F340/F380 比例圖	29
圖 35、超音波微管裝置產生機械力之效果示意圖	30
圖 36、細胞受聲壓壓縮力示意圖	31
圖 37、聲壓量測設備架設圖	31
圖 38、聲壓量測示波器顯示圖	32
圖 39、細胞受聲流剪切力示意圖	32
圖 40、螢光珠保存容器與螢光珠平光圖	33
圖 41、螢光染色與玻片上機流程圖	33
圖 42、超音波刺激流程圖	34
圖 43、距離與角度因素示意圖	35
圖 44、細胞與細胞外基質示意圖	36
圖 45、N2a 細胞受超音波微管之連續刺激圖(吳觀宇碩論)	37
圖 46、溶液置換流程圖	37
圖 47、離子通道興奮劑與抑制劑關係圖	39
圖 48、DRG 自小鼠脊髓取得示意圖	41
圖 49、利用 LoxP-Cre 系統標記特定種類 DRG 示意圖	41
圖 50、利用 LoxP-Cre 系統標記有表現特定通道蛋白的 DRG 示意圖	42
圖 51、利用 LoxP-Cre 系統標記將 ASIC1a 剔除的 DRG 示意圖	43
圖 52、聲壓與距離關係圖	45
圖 53、不同輸入電壓與佔空比之聲壓結果圖	46
圖 54、固定佔空比為 30%，不同輸入電壓之聲壓結果圖	46
圖 55、流體剪應力示意圖	47
圖 56、超音波微管裝置產生之流場示意圖[39]與實際流場光軌圖	48
圖 57、螢光珠與針尖不同距離之下，不同力學模組之速度關係圖	49
圖 58、細胞實驗使用之力學模組流速圖	50



圖 59、不同輸入電壓與佔空比之剪應力結果圖	51
圖 60、固定佔空比，輸入電壓與剪應力關係圖	52
圖 61、N2a 細胞鈣離子影像螢光變化圖	53
圖 62、不同超音波力學模組刺激下 N2a 細胞的鈣離子反應	54
圖 63、相同流速下 N2a 鈣離子反應結果圖	55
圖 64、聲壓聲流主導刺激螢光比較圖	57
圖 65、超音波微管作用在不同位置之螢光比較圖	58
圖 66、不同距離之螢光比較圖	58
圖 67、不同 ECM 之螢光比較圖	59
圖 68、N2a 經不同試劑處理後受超音波刺激之螢光變化	60
圖 69、N2a 經不同刺激劑處理之螢光變化圖	61
圖 70、N2a 經不同抑制劑處理之螢光變化圖	61
圖 71、不同酸鹼度溶液對不同型態 N2a 的 patch clamp 結果	63
圖 72、ASIC1a knockout N2a 受不同力學模組結果	63
圖 73、N2a 細胞轉染 ASIC1a 受超音波刺激鈣離子反應	64
圖 74、背根神經節平光圖、Tdtomato 與 Fura2 染色	64
圖 75、不同超音波力學模組刺激下 DRG 細胞的鈣離子反應	65
圖 76、相同能量下，聲壓聲流主導之力學模組刺激 DRG 細胞的鈣離子反應	66
圖 77、不同能量下刺激不同亞型 DRG 的鈣離子反應	67
圖 78、DRG ^{ASIC1a+} 與不同 knockout 受不同力學模組之螢光變化	68
圖 79、DRG ^{Parv+} 與不同 knockout 受不同力學模組之螢光變化	69
圖 80、DRG ^{Nav+} 與不同 knockout 受不同力學模組之螢光變化	70
圖 81、DRG ^{Nav+} 經不同藥劑處理後受不同力學模組之螢光變化	71

表目次



表 1、各種材料之聲阻抗表.....	11
表 2、不同力學模組(刺激參數).....	35
表 3、ASIC1a-cre 驅動 knockout 組合表	44
表 4、Nav-cre 與 PV-cre 驅動 knockout 組合表	44
表 5、力學模組與流速關係(高速組別，在距離 300μm 處).....	51
表 6、力學模組與流速關係(中速組別，在距離 300μm 處).....	51
表 7、力學模組與流速關係(低速組別，在距離 300μm 處).....	51
表 8、不同力學模組之能量指標.....	56
表 9、不同力學模組之能量推算表.....	56

第一章 緒論



1-1 研究動機

隨著神經調控技術的進步，非侵入性的刺激方法逐漸受到重視，超音波具有穿透力強、空間解析度高、可聚焦等特性，被視為極具潛力的神經調控工具。其中，超音波遺傳學(Sonogenetics)是一項新興技術，結合超音波刺激與基因工程，將對超音波敏感的通道蛋白導入特定細胞，使其能夠在低能量刺激下產生選擇性反應。與光遺傳學相比，超音波遺傳學無需植入光纖或電極，屬於非侵入性手段，並具備穿透深層組織的能力，因此在研究深層腦區功能或發展潛在臨床應用方面更具優勢。

儘管如此，目前對於超音波與細胞間作用的機制理解仍有限，尤其在細胞層級所受的力學模組與離子通道作用機制方面仍缺乏系統性的探討。因此，本研究希望從細胞層面出發，釐清不同力學模組下，細胞內鈣離子反應的變化，以及探討潛在的機械力敏感的通道，為未來超音波應用於神經調控與精準醫療的發展提供基礎理論。

1-2 研究背景

1-2-1 酸敏感性離子通道

痛覺(nociception)是一種保護性機制，幫助生物體感知並避免可能造成組織損傷的刺激。在多種疼痛機制中，酸性環境(如組織缺血、發炎或腫瘤微環境)會導致疼痛的產生[1, 2]，而酸敏感性離子通道(ASICs)在此過程中發揮關鍵作用。ASICs 為質子門控鈉離子通道蛋白，當外界 pH 值降低時被活化，導致鈉離子和鈣離子由通道流入細胞內，進而產生神經興奮。這些通道在多種感覺神經元中表達，尤其在背根神經節(dorsal root ganglion, DRG)[3]和三叉神經節(trigeminal ganglion, TG)[4]中表現突出，與疼痛訊號傳導密切相關。

ASIC 家族至少包含 4 個基因，可轉譯成 6 種多肽(亞基)，分別為 ASIC1a、ASIC1b、ASIC2a、ASIC2b、ASIC3 和 ASIC4[5]。一個具有功能的 ASIC 通道需要三條多肽鏈組成同源三聚體或異源三聚體[1, 6]；舉 ASIC1 為例，圖 1A 為單一亞基(subunit A)的 domain 結構，需要由另外兩個單一亞基(subunit B, C)與 subunit A 結合為三聚體(trimer)(圖 1B)才為完整有功能性的酸敏感通道，圖 1C 黑色框框為其質子結合的位點(binding site)。

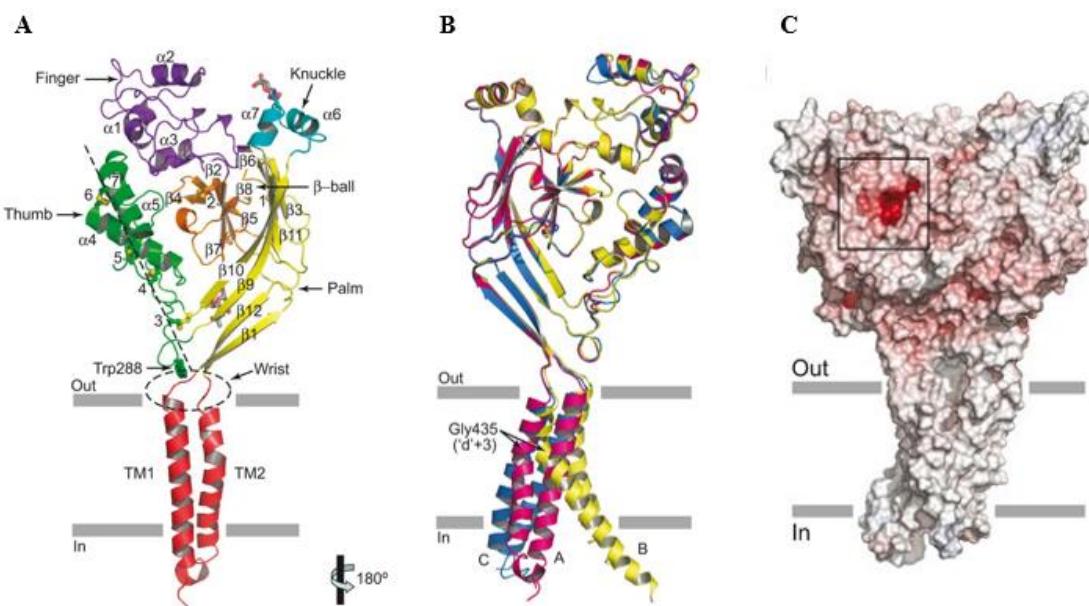


圖 1、酸敏感通道一型結構示意圖[6]

雖然 ASICS 主要因其對酸敏感而得名，但越來越多的遺傳學證據顯示，ASICS 可能也參與感覺神經的力學傳導(neurosensory mechanotransduction)(圖 2)。

MEC-4/MEC-10 模型展示了 *C. elegans* 觸覺受器神經元(touch receptor neurons, TRNs)中的力學傳導機制[7]，其中 MEC-4 和 MEC-10(ASICS 的同源物)與細胞外基質(extracellular matrix)和細胞骨架(cytoskeleton)有協同作用，透過「牽引模型」(tether model)將機械力傳遞到離子通道，啟動電訊號。在哺乳動物中，ASICS 亦與 stomatin-like 蛋白(如 STOML3)有交互作用[8, 9]，而在 STOML3 基因剔除小鼠中，發現其機械力接受器對於機械力刺激並不敏感[10]，進一步支持 ASICS 可能參與機械力感受的假設。

此外，ASICs 與 PDZ-domain protein(如 PICK1)的相互作用可能影響 ASICs 在細胞膜表面的表達[11]，增強 ASICs 在細胞膜上的聚集並調控通道活性，進而調節機械力感受的能力。綜合上述，ASICs 可能不僅是酸敏感性通道，也參與力學傳導的途徑之一，但其是否直接作為機械力敏感通道仍需進一步研究。

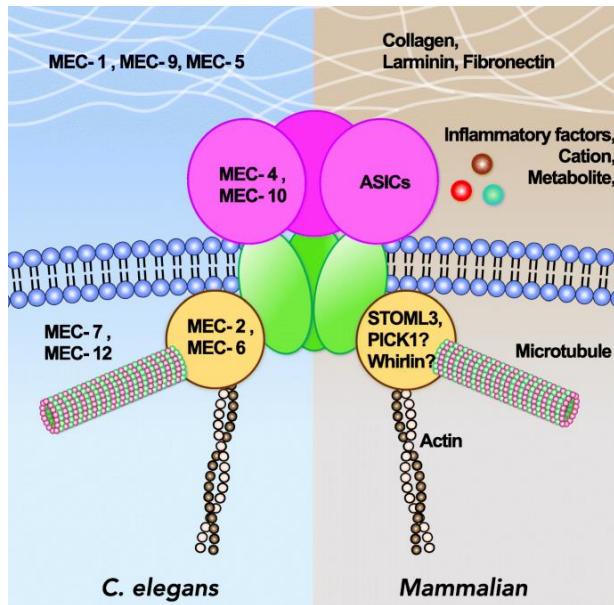


圖 2、線蟲與哺乳類動物中，牽引模型 tether model 力學傳導分子結構示意圖[1]

2021 年台大醫工所王兆麟實驗室與中研院生醫所陳志成實驗室合作發表了一篇文獻，在探討 ASIC1a 與機械力敏感通道的關聯[12]。研究發現，低強度超音波(low-intensity ultrasound, LIUS)能夠透過 ASIC1a 活化小鼠大腦中的神經元，並且參與機械傳導(mechanotransduction)的過程。透過鈣離子影像分析，發現 ASIC1a 和細胞骨架在超音波誘導神經元活化的過程中發揮重要作用，尤其是當使用 ASIC1a 抑制劑 - 蜘蛛毒素(Psalmotoxin, Pctx1)時，超音波誘導的鈣離子反應顯著減弱，進一步證實 ASIC1a 是此機制的關鍵分子。

在小鼠腦內實驗中，低強度超音波能夠促使 ERK 磷酸化(p-ERK)並促進特定腦區(如海馬迴)的神經新生(neurogenesis)。然而，在 ASIC1a 基因剔除小鼠($\text{ASIC1a}^{-/-}$)中，這些超音波誘導神經活化的現象被明顯減弱，再次顯示 ASIC1a 在該過程中的重要性。

此外，該研究也比較了 ASIC1a、Piezol 及 TRP 通道對超音波的反應，發現 ASIC1a 是低強度超音波機械力傳導的主要受體，而 Piezo 和 TRP 通道的影響相對較小，進一步強化 ASIC1a 作為機械力敏感通道的角色。



除了 ASIC1a 外，2023 年相同團隊也在探討 ASIC3 與機械力敏感通道的關聯[13]。研究發現，在小鼠纖維肌痛模型中，治療性超音波能夠透過活化 ASIC3，誘導肌肉傳入神經釋放物質 P(Substance P)，進而產生鎮痛效果。此外，該研究也指出 ASIC3 抑制劑(如 APETx2 等)能夠阻斷超音波所產生的鎮痛作用，證實了 ASIC3 對於機械力刺激的反應與疼痛調控中的重要性。

1-2-2 機械力敏感性離子通道

機械力敏感通道(Mechanosensitive Ion Channels, MSCs)是一類能夠接受機械力(如壓力、拉伸、剪應力等)刺激並轉換為電訊號的離子通道，在許多生理機制中發揮關鍵作用，包括觸覺、疼痛感知、血壓調控、細胞體積調節等[14-16]。這些通道可以直接對細胞膜的張力變化作出反應，或透過與細胞骨架、細胞外基質的交互作用來接受機械刺激[17]。

Piezol 和 Piezo2 是 2010 年由 Coste 等人發現的機械力敏感陽離子通道[18]，屬於高度保守的跨膜蛋白，對細胞膜的變形極為敏感。Piezol 主要表現在內皮細胞中，對於血流引起的剪應力(shear stress)特別敏感，與血壓調控、紅血球體積調節等生理功能相關[19]。Piezo2 則主要表現在感覺神經元中，參與觸覺、本體感覺(proprioception)等功能[20]。

當機械力刺激作用於細胞膜時，該應力會散布到所有地方，包括脂雙層、細胞骨架(CSK)和細胞外基質(ECM)，這些結構共同影響 Piezol 通道，促使其從關閉狀態轉變為開啟狀態。當 Piezol 通道開啟時，鈣離子(Ca^{2+})、鉀離子(K^+)和鈉離子(Na^+)會進入細胞(圖 3)，進一步活化細胞內的電訊號傳導路徑。

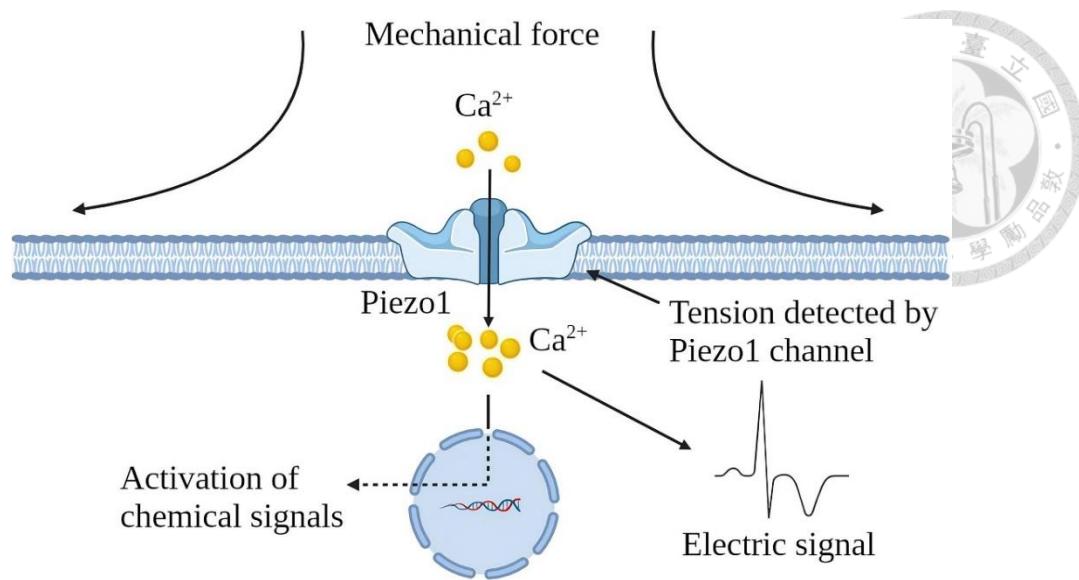


圖 3、Piezo1 通道受機械力刺激開啟示意圖[21]

除了 Piezo 通道外，有另一大類與機械力敏感有關的離子通道為 TRP 通道。瞬時受體電位 (Transient Receptor Potential, TRP) 是非選擇性陽離子通道 (nonselective cation channels)，同樣也被證實能被外界力學刺激開啟[22]，如圖 4 所示。在不同的亞集中，TRPV(Vanilloid)、TRPC(Canonical)、TRPA(Ankyrin)、TRPM(Melastatin)為對於力學刺激最為相關的幾個類別[23-26]。

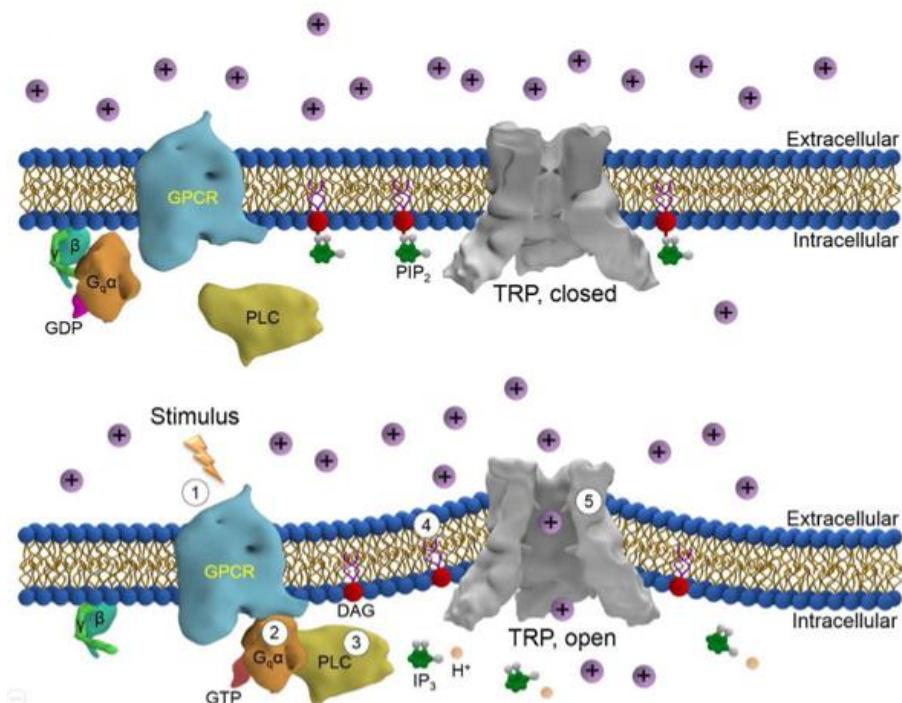


圖 4、TRP 通道受機械力刺激開啟示意圖[22]

其中在 TRPV 家族裡，TRPV4 對於溫度變化、滲透壓、機械力敏感，在內皮細胞、軟骨細胞、神經元等都有表現，與關節炎、痛覺等有關[27, 28]，確定為一機械力敏感通道。然而 TRPV1 却一直未得到證實；不過，TRPV1 在感覺神經元中可能參與機械性痛覺(mechanonociception)[29]。該研究指出，當 IL-23 打入小鼠體內時，它會促使巨噬細胞釋放 IL-17A，進而活化 TRPV1⁺的 C 纖維神經元，導致機械性疼痛的產生，這暗示著 TRPV1 不僅是熱或化學的刺激受體，也是會對機械力刺激產生反應。研究也顯示 TRPV1 剔除的小鼠對 IL-23 和 IL-17A 介導機械性疼痛的反應顯著降低，進一步證明了 TRPV1 在機械性痛覺的重要性。至於 TRPV1 是否為機械力敏感通道，與 ASIC 通道一樣仍需要更多實驗證實。

1-2-3 超音波與聲學

1-2-3-1 聲波簡介

聲波(Sound Waves)是指透過介質(如空氣、水、固體)傳播的機械波。當物體振動時，它會產生壓力變化，推動鄰近的分子振動產生縱波(longitudinal waves)來傳遞能量。依照每秒振動次數可以分為次聲波(infrasound,<20Hz)、人耳可聽到的範圍(20Hz-20kHz)以及超音波.ultrasound,>20kHz)，如圖 5 所示。

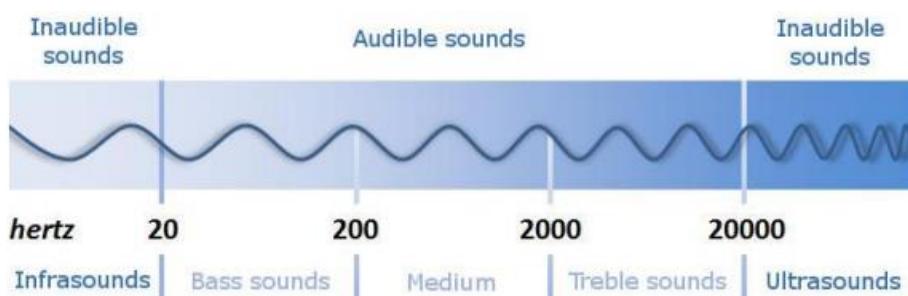


圖 5、聲波頻率分類

本研究使用的超音波頻率為 1MHz，常用於醫學治療、神經調控等。由於會將超音波用於細胞調控上，所以聲強度(Intensity)的大小對於本研究有重要影響；再者因為是利用波導(wave guide)方式傳遞聲波，所以在後面的章節也會簡介波傳導的模式、聲阻抗與所造成的物理效應等。



1-2-3.2 波傳遞模式

本研究所使用的裝置為我們實驗室所自行開發的超音波微管(Micropipette wave-guided device)，其工作原理為將壓電裸片(piezo probe)貼在玻璃微管上，利用裸片振動所產生超音波並透過玻璃傳遞，所以本小節中將介紹所需的基本概念。

縱波(longitudinal wave)為一質點振動方向與波傳遞方向平行的波，又因為是在波行進方向進行群體壓縮和膨脹，所以也稱作疏密波(rarefaction)，如圖 6 所示。

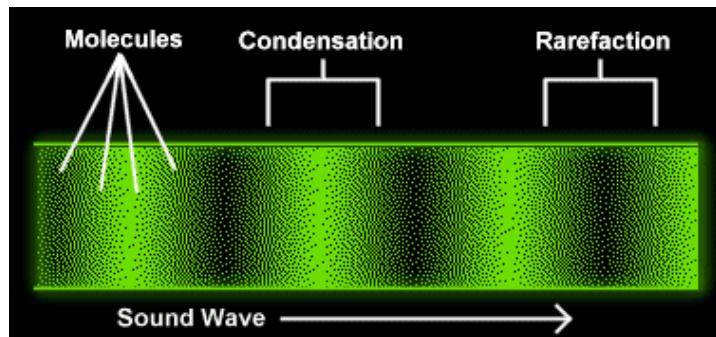


圖 6、疏密波示意圖

產生疏密現象涉及應力(Stress)與應變(Strain)的相互作用。應力是指作用在材料或介質上的內部力，單位為帕斯卡[Pa]，依據應力跟材料或介質截面接觸的方向，可以分為剪應力(Shear Stress, τ)與正應力(Normal Stress, σ)。前者為應力作用方向平行於材料的截面(圖 7A)，而後者再細分為拉應力(圖 7B)與壓應力(圖 7C)，分別使材料受到拉伸跟擠壓的形變。

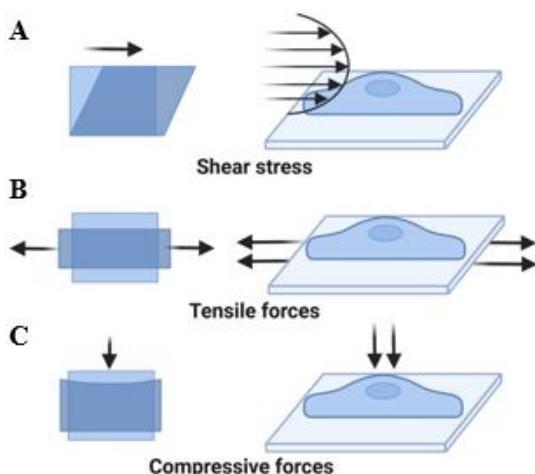


圖 7、不同應力對於細胞作用示意圖[30]

應變(Strain)是指物體受到應力產生的形變，所以計算上為形變量除以原長，為一比例關係因而沒有單位。剪應力造成的横向變形，會隨著波的傳播而推動相鄰粒子以形成橫波，但該變形僅在固體發生，因為固體具有剛性，能夠承受剪應力，有剪應變率。當固體受到剪應力時，分子間的鍵結會提供回復力，使得剪切變形(shear deformation)能夠傳播；液體和氣體無法有效承受剪應力，因為分子之間的作用力較弱，當施加剪應力時，液體或氣體分子會流動，而不會回復到原來的位置，剪應變率為零，因此橫波無法在流體中傳播。

在固體力學與波動學中，波的傳播方式受到邊界條件與介質特性的影響，導致不同類型的波動模式。板波(Plate waves)又稱之為萊姆波(Lame waves)，是由壓電裸片產生的縱波(longitudinal waves)傳入有限厚度的固體板後，縱波與橫波(shear waves)受限於此並進行全反射所產生的(圖 8A)，其運動模式受邊界條件影響，可分為對稱模式 S 和反對稱模式 A (圖 8B)。

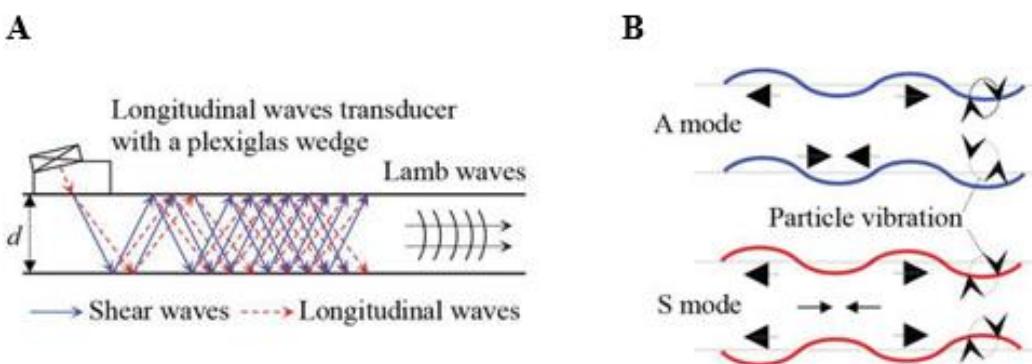


圖 8、板波在有限厚度板內的傳播情形與運動模式[31]

在板內的縱波與橫波會互相干涉，而板子的材質、厚度與振源頻率會決定兩者干涉的形式，由相速度頻散曲線(圖 9)中，相速度(Phase Velocity)與頻率-厚度乘積(Frequency-Thickness Product)之間的關係，可以得知板波的形式為何。本研究所使用的超音波微管為玻璃材質，其由內外徑相隔的薄壁組成的中空構造(圖 10A)；板的厚度為玻璃微管的管壁厚度，厚度為我們實驗室吳觀宇學長使用游標卡尺量測(圖 10B)，結果大約為 0.5mm；使用的超音波頻率為 1MHz。將上述的數據相乘，頻率-厚度值為 0.5MHz-mm。

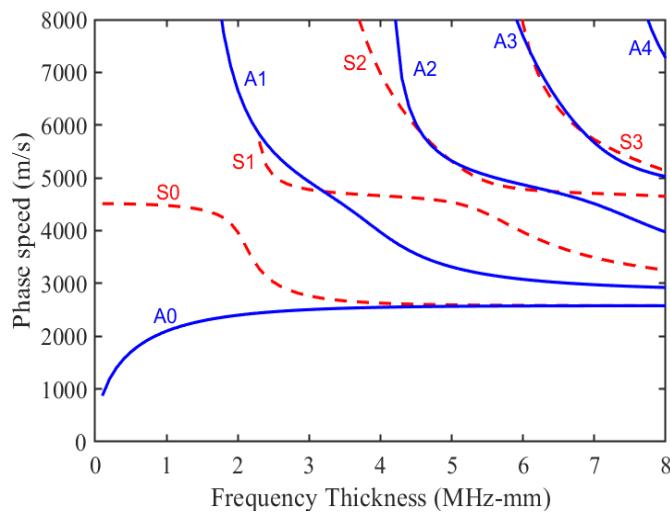


圖 9、板波相速度頻散曲線(phase-velocity dispersion curve)(玻璃)[32]

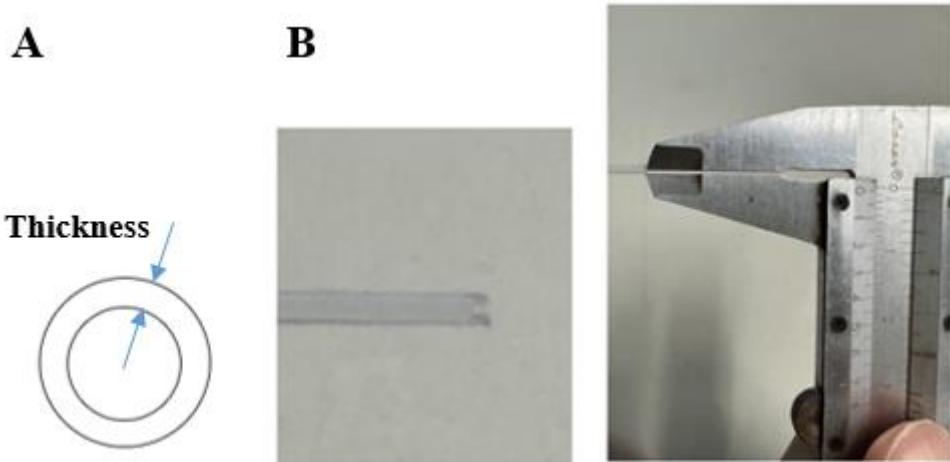


圖 10、超音波微管管壁厚度示意圖與實際量測圖

聲波在玻璃的傳遞速度約為 3980m/s ，本研究中裸片振動頻率與玻璃微管的頻率-厚度值為 $0.5\text{MHz}\cdot\text{mm}$ ，再將兩個數值代入圖 9 中進行比對，發現應為反對稱模式 A_0 與對稱模式 S_0 形式的萊姆波。反對稱模式可被視為對板的彎曲(flexural)；對稱模式可視為板相對中心軸的收縮與膨脹(extensional)，由於板彎曲時的抗彎剛度比膨脹收縮時的剛度低，所以反對稱模式更容易被激發。 A_0 與 S_0 中的數字 0 表示零階模式(0^{th} -order mode)，是最基本的萊姆波模式，比高階的模式容易被激發而且存在於所有頻率，所以比高階模式有更多的能量。

洩漏萊姆波(Leaky lamb waves)為一種流固耦合現象[33]。如同上段所述，玻璃微管的玻璃壁較薄，頻率厚度值為 0.5 而已，為萊姆波 A0, S0 的模式，加上 A0 比 S0 容易激發，所以假設只有 A0 模式會在板內傳遞，因此變形以彎曲為主。我們的微管尖端會浸在細胞培養液中，在液體中的玻璃部分會因震動推擠液體而造成一部份的能量洩漏至液體中(圖 11)，所以稱作洩漏萊姆波[34]。根據理論可以得知，我們超音波微管即是利用此種波傳機制，而且隨著浸入液體的部分越多，洩漏的能量以至於產生的波動也越大。

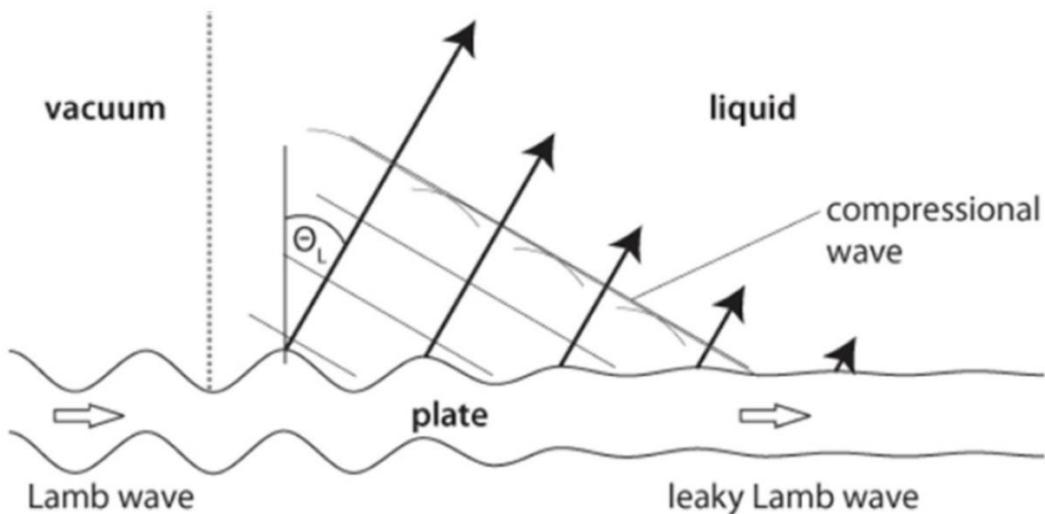
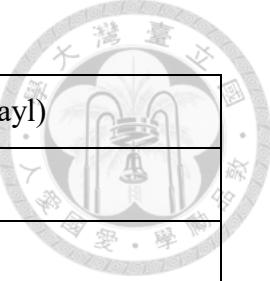


圖 11、洩漏萊姆波示意圖[35]

1-2-3.3 聲阻抗

聲波在介質中傳播時，介質對聲波流動的阻礙程度稱之為聲阻抗(Acoustic impedance)。它類似於電學中的電阻概念，在相同聲壓下，如果聲阻抗越大，越難讓物質振動。在本研究的超音波裝置中，壓電裸片會產生振動並傳導到玻璃，但裸片與玻璃間有空隙，存在著空氣；空氣聲阻抗為 0.0004 MRayl，而玻璃為 16.5 MRayl (表 1)，兩者差異過大，很顯然阻抗不匹配，聲波大部分會被反射，穿透率降低。因此為了要使聲波能順利傳導過去，所以會在裸片跟玻璃微管間塗抹耦合膠(Coupling gel)，讓超音波可以順利傳導。

表 1、各種材料之聲阻抗表



材料	聲阻抗(MRayl)
空氣	0.0004
水	1.48
軟組織	1.6
骨頭	8.0
玻璃	16.5
鋁	17.1
不鏽鋼	46.6

1-2-4 超音波參數

1-2-4.1 脈衝重現週期與佔空比

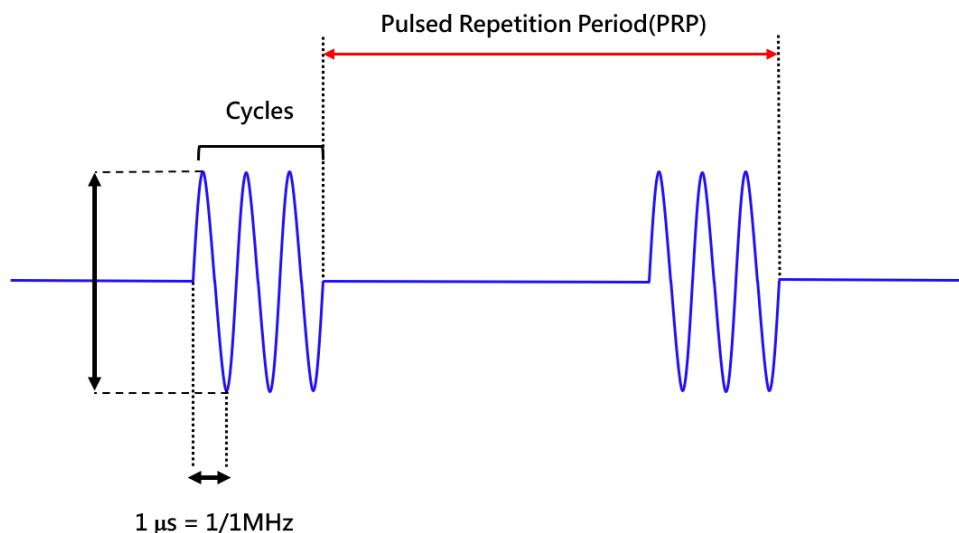


圖 12、脈衝超音波示意圖

本研究使用的是低能量的脈衝超音波，脈衝為間段式的輸出能量，所以在一個時間段內有部分時間有能量輸出而其餘時間則是停止。該時間段稱呼為脈衝重現週期(Pulsed Repetition Period, PRP)，而佔空比(Duty Factor, D.F.)則為 PRP 中有能量輸出的時間比例(圖 12)。

實驗用到的壓電裸片所產生的振動為 1MHz，所以發射的超音波週期為 $1\mu\text{s}$ 。PRP 也表示著下次超音波發射的時間間格，時間可以自行定義，本研究設的 PRP 為 1ms，因此若佔空比為 100%，表示整段 PRP 無時無刻都在輸出能量，此時產生的並非脈衝波(Pulse wave)而是連續波(Continuous wave)，所產生的波數(Cycles)為 $1\text{ms}/1\mu\text{s} = 1000 \text{ cycles}$ ；同理，若佔空比為 50%，表示為脈衝波並僅產生 500 個波(cycles)而已。

PRP 設好 1ms 後便不會再做更改，會變動的是輸入電壓(input voltage)與佔空比(D.F.)，前者為波的高度也就是振幅，透過訊號產生器(function generator)可以自行調整輸入電壓，所輸出的電訊號會傳給壓電裸片產生共振。根據實驗經驗，改變輸入電壓會影響聲壓與聲流；改變佔空比則會影響聲流，利用不同輸入電壓與佔空比的組合可以產生不同壓應力與剪應力的力學模組(Force modalities)。

1-2-4.2 聲強度

聲強度(Acoustic intensity)定義為單位面積下的聲功率，低的聲強度表示低的功率輸出，熱效應造成的影響低，比較多的影響為機械振動。聲強度的計算公式如下：

$$I = \frac{P^2}{2\rho c}$$

其中 I 為聲強度(W/cm^2)、P 為聲壓(Pa)、 ρ 為介質密度(kg/m^3)、c 為介質波速(m/s)；聲壓可以透過水聽器將量測到的方均根電壓(Vrms)轉換成壓力值(Prms)。

不同的量測方式會得到不同的聲強度，在空間上為空間峰值(spatial peak, SP)或空間平均值(spatial average, SA)；在時間上為暫態峰值(temporal peak, TP)、脈衝平均值(pulse average, PA)或暫態平均值(temporal average, TA)(圖 13)。水聽器量測後得到的方均根壓力，為空間平均值(SA)，還要乘上 $2\sqrt{2}$ 才會變成峰對峰壓力(Ppp)，為空間峰值(SP)；如果量測時是抓取脈衝平均值(PA)，則須考慮到佔空比(D.F.)才會得到暫態平均值(TA)。

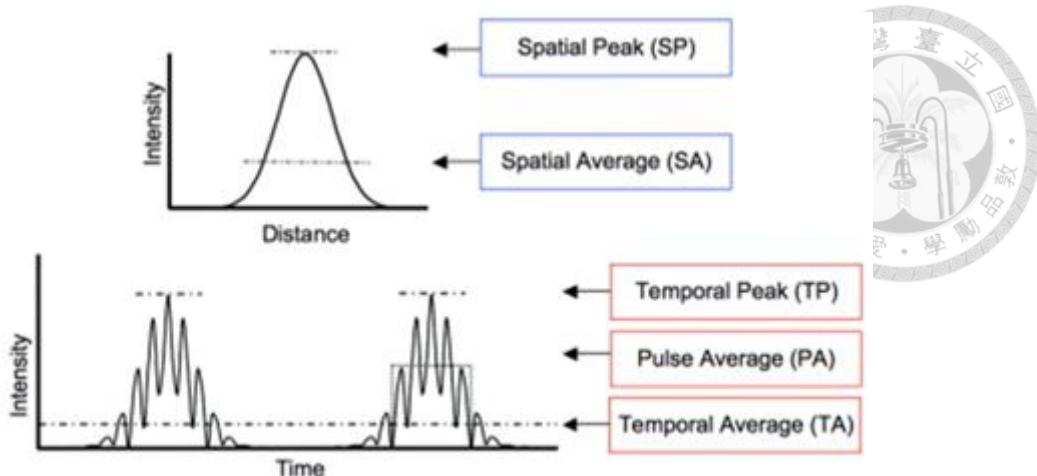


圖 13、聲強度種類[36]



1-2-5 超音波物理效應

1-2-5.1 基本性質

點波源(Point source)是一個理想的聲源，是指聲波從一個微小的點均勻向四周傳播。對於超音波，點波源會產生球面波(Spherical wave)，隨著距離增加，波前會逐漸展開(圖 14A)。根據與超音波聲源的距離不同，可分為近場(Near Field)與遠場(Far Field)。在近場時，聲場具有較強的干涉現象，聲壓分布不均，可能出現多個極大與極小值；遠場時，波前趨於平面波，聲場較為均勻，聲壓變化趨於穩定，而且聲壓與距離成反比(圖 14B)。近場距離的計算公式如下：

$$\text{Near Field} = \frac{D^2}{4\lambda}$$

其中 D 為超音波探頭直徑(m)、 λ 為超音波波長(m)。本研究使用的壓電裸片為 1MHz，波在水中的速度約為 1500m/s，所以波長為 1.5×10^{-3} m，而裸片的直徑約為 10^{-2} m，代入上述公式得到近場距離為：0.0167m(1.67cm)。但是，本研究並非直接由裸片輸出超音波來刺激細胞，而是利用波導的方式將波傳導至玻璃微管的尖端，所以 D 的直徑遠小於 10^{-2} m，約為 10^{-6} m 而已，以至於近場的距離可能小於 1μm。實驗中玻璃微管尖端與細胞的距離一定大於 1μm，因此推測細胞受刺激的範圍可能屬於遠場。

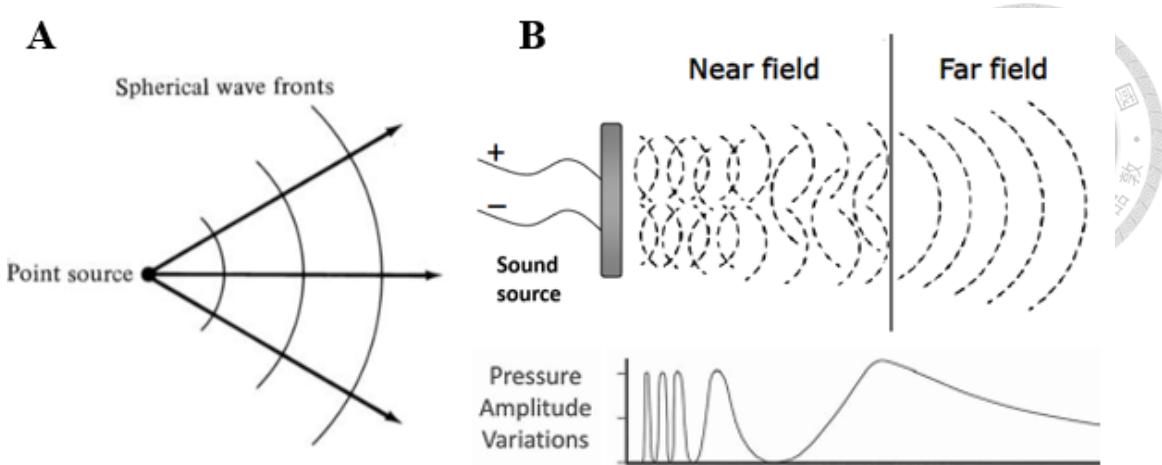


圖 14、點波源與遠近場示意圖

1-2-5.2 聲壓(聲輻射力)

聲輻射力(Acoustic Radiation Force, ARF)是由聲波作用在物體接觸面所產生的一個法線方向的力。當聲波在傳播過程中被吸收、散射或反射，或者因傳播速度的空間變化，導致能量與動量密度發生改變[37]，從而產生力作用在物體上，使得物體發生壓縮與膨脹的現象。舉例來說，細胞內細胞骨架的肌動蛋白(actin cytoskeletal)在超音波刺激下，造成「逆向運動(retrograde)」減少(圖 15A, B)，在沒有超音波刺激後細胞恢復原樣(圖 15C)。

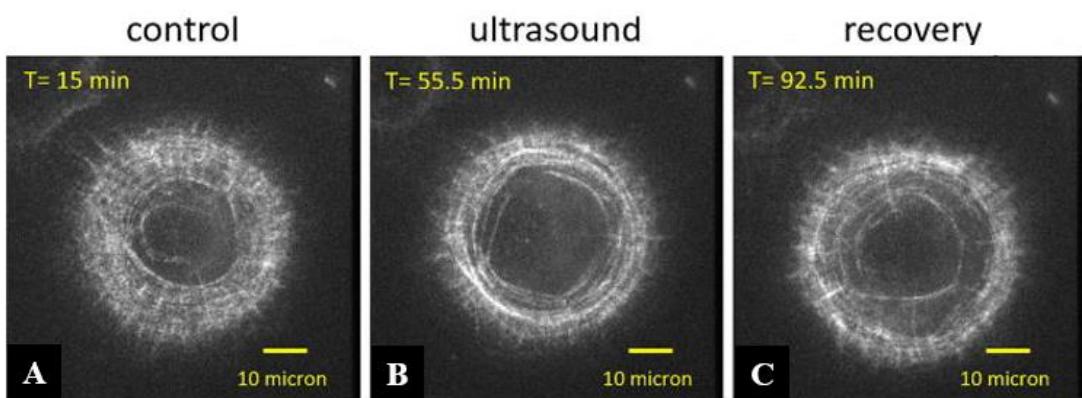


圖 15、細胞骨架受超音波刺激後的逆行模式[38]

在本研究中，我們可以用聲壓大小來量化細胞所受聲輻射力的大小，進而推估細胞膜上的離子通道所受的正應力大小為何，而聲壓的數值可以用水聽器(Hydrophone)量測得到的方均根電壓(Vrms)換算得知。



1-2-5.3 聲流

聲流(Acoustic Streaming)是指當聲波在流體傳播時，部分能量被吸收，導致介質內部的壓力分佈不均，進而驅動流體運動。在本研究中使用的刺激裝置為本實驗室開發的超音波微管，該微管的尖端為直徑約 $1\mu\text{m}$ (圖 16A)，尖端為封口或閉口對於流場的模式有不同的結果。根據實驗室先前發表的文獻，封口的尖端所造成的流場為向針尖流動(圖 16B)；開口的尖端則會遠離針尖排出去(圖 16C)，在本實驗中採取與文獻相同的閉口尖端。

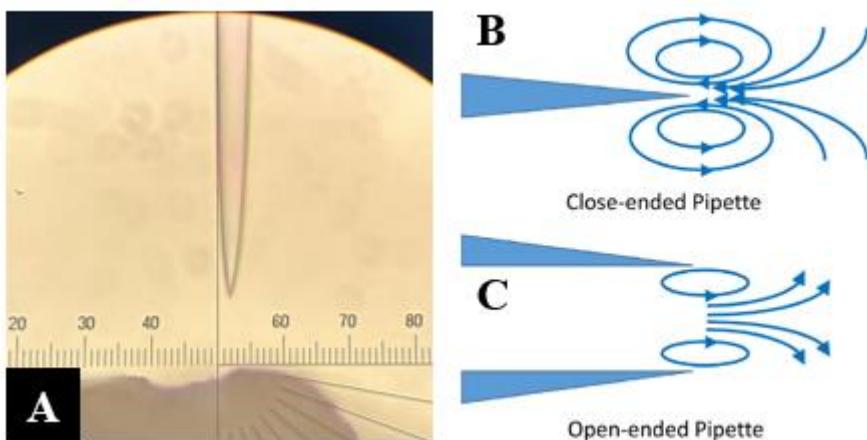


圖 16、玻璃微管在顯微鏡下平光圖與針尖開閉口示意圖[39]

1-2-5.4 空蝕效應

空蝕(Cavitation)是指液體內部因壓力變化而產生氣泡，並在壓力作用下快速崩塌的現象，如圖 17 所示。當液體受到強烈的超音波或流體作用時，可能會出現局部壓力下降至液體的蒸氣壓以下，導致液體內部形成微小氣泡，這些氣泡在壓力變化的過程中爆裂，產生強烈的衝擊波。

在本研究中，我們的超音波微管裝置產生的聲壓，如果是用在刺激細胞上不會高於 40kPa 。根據文獻，造成空蝕效應的聲壓需超過 101kPa [40]，所以基本上液體中不會產生微小氣泡，細胞不會受到氣泡爆裂產生衝擊波的影響。

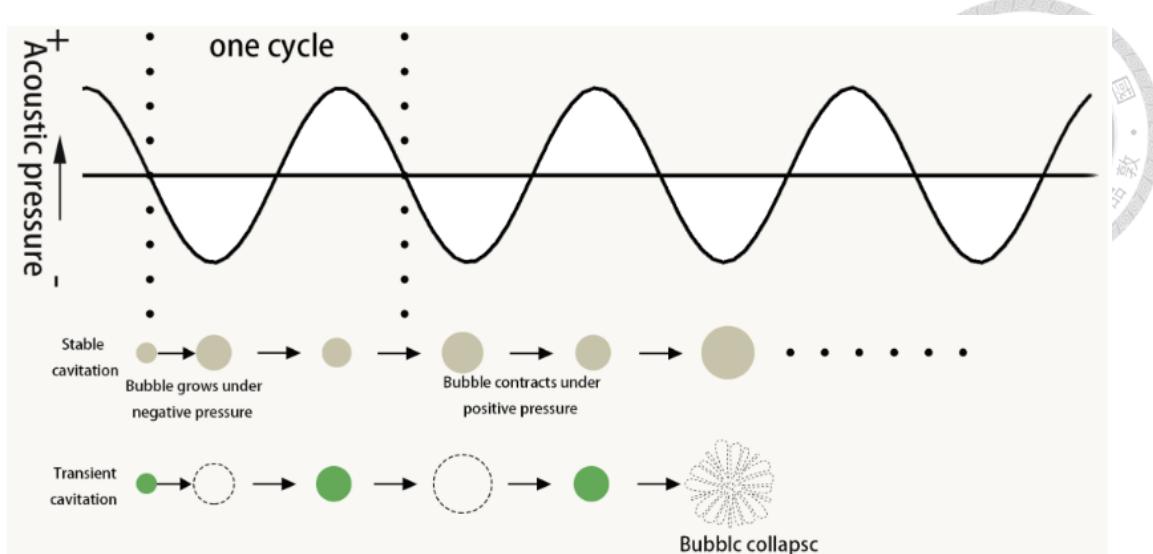


圖 17、超音波介導空蝕示意圖[41]

1-2-6 壓電原理

壓電效應(Piezoelectric Effect)分為正壓電效應(Direct Piezoelectric Effect)與逆壓電效應(Inverse Piezoelectric Effect)。前者為當某些材料在受到機械應力(mechanical stress)時，會在其表面產生電荷的現象(圖 18b, c)；後者為當對這些材料施加電場時，它們會產生形變(圖 18d, e)。本研究所使用的壓電裸片(Piezo probe)即是後者原理，也就是波形產生器的輸出電壓傳到裸片後，在壓電片上的偶極矩會自動順應電場變化產生拉伸或收縮來達到能量守恆。

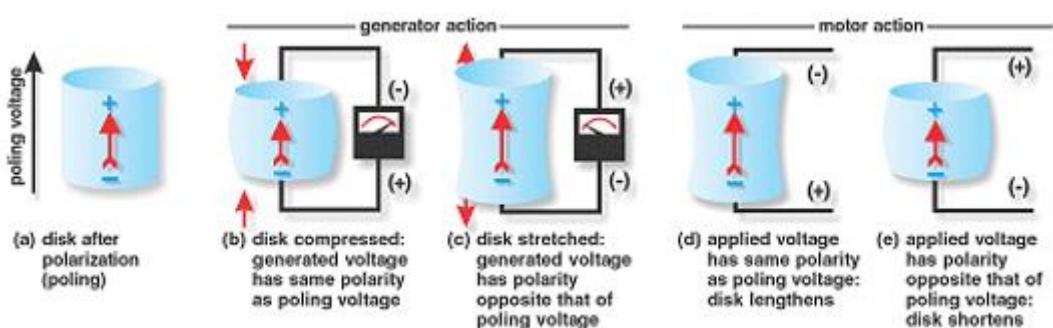


圖 18、壓電效應原理

1-3 研究目的



疼痛的傳遞過程涉及周圍感覺神經及背根神經節(dorsal root ganglion, DRG)的作用，並透過脊髓傳導至大腦以產生痛覺感知。根據圖 19 所示，當組織受傷時，會釋放如前列腺素(prostaglandins)、血清素(serotonin)及乙醯膽鹼(acetylcholine)等發炎因子，這些因子刺激痛覺受器(nociceptors)，引發動作電位並經由周圍神經傳導至 DRG。DRG 是感覺神經元的細胞本體聚集處，包含負責痛覺傳導的 nociceptive DRG，以及與本體感覺相關的 proprioceptive DRG。訊號進入 DRG 後，透過背根進入脊髓，並在脊髓丘腦束(spinothalamic tract)內上行傳導至視丘及大腦皮層，最終產生疼痛的感知與調控。

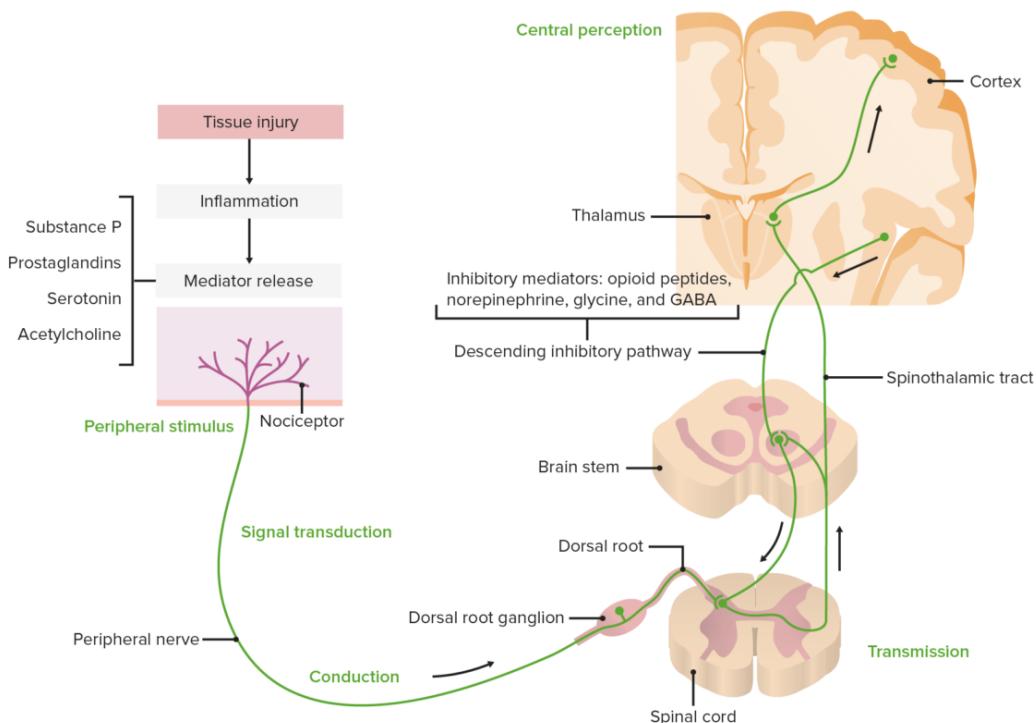


圖 19、痛覺傳遞路徑示意圖

在痛覺傳導的機制中，Piezo、TRP 及 ASICs 扮演關鍵角色。Piezo 通道是一種機械敏感性離子通道，負責偵測機械刺激，如壓力和觸覺訊號，在某些條件下也可參與痛覺傳導。TRP 通道，特別是 TRPV1，對熱、酸及辣椒素等刺激敏感，

並在發炎性疼痛與神經病理性疼痛中發揮作用。ASICs 通道則在酸性環境下被激活，例如在組織缺氧或發炎時，細胞外酸度升高，會導致 ASICs 開啟，促進疼痛訊號的傳遞。這些離子通道的協同作用，使神經系統能夠感知並回應不同類型的疼痛刺激。

綜合上述，本研究旨在探討低強度超音波(LIUS)刺激下，具機械力敏感的離子通道是否能被活化，特別聚焦於表現在痛覺相關神經元中的 ASICs、Piezo 與 TRP 等潛在目標。這些通道若同時具備能受機械力作用並對超音波敏感的雙重特性，將有望成為未來超音波調控疼痛的重要分子目標。考量超音波在細胞層級施加的力學環境有多樣性，包括以壓縮力為主的聲壓模式、以剪切力為主的聲流模式，或兩者混合的複合模式，本研究亦進一步比較不同力學模組對細胞鈣離子反應與通道活化的影響。透過分子與力學層次的系統性分析，本研究期望釐清超音波可活化的離子通道種類與對應的力學模式，為未來發展精準、非侵入性的神經調控技術，如超音波遺傳學(Sonogenetics)提供理論基礎。

近期研究指出，酸敏感性離子通道(Acid-sensing ion channels, ASICs)具備對低強度超音波刺激產生反應的能力，可透過聲波產生的聲壓縮輻射力、聲剪切力並與細胞外基質有相互作用(如 Tether model)而被活化。本研究將分析 ASICs 與傳統機械力敏感通道(Piezo, TRP channels)在不同細胞類型(N2a 與 DRG)中對低強度超音波的反應差異，並探討輸入電壓與佔空比等參數對其活化機制的影響。

為了達到此研究目的，我們設定了三個目標：

1. 探討 N2a 在不同力學模組下之鈣離子反應差異與其關鍵離子通道。
2. 探討 DRG 對於聲壓與聲流主導的刺激對鈣離子反應差異。
3. 探討不同亞型的 DRG(痛覺、本體感覺)對低強度超音波的敏感性及其對應離子通道表現。



1-4 研究架構

基於上述的三個目標，本研究分為兩大部分探討(圖 20)，第一部分為超音波微管物理性質的驗證。波型產生器可以藉由改變輸入電壓與佔空比的參數，將電訊號經放大器放大後傳入壓電裸片，產生相對應的振動。首先將探討在不同力學模組下，不同佔空比與不同輸入電壓在聲壓上的變化，進一步在佔空比固定的情況下，觀察聲壓變化的趨勢；其次，不同力學模組下，超音波微管會產生不同速度的聲流，某幾個模組卻會產生相似速度的聲流，所以會找到力學模組與流速的關係，並探究鈣離子反應是聲壓、聲流還是能量為主導。此外，距離遠近也是聲壓聲流中一個重要的變因，因為它改變細胞所受力的大小。最後，不論是聲壓或是聲流都會分別計算出聲輻射力大小與剪切力大小，作為後續細胞實驗時，可以開啟離子通道的受力大小的依據。

第二部分為細胞實驗，利用超音波微管當作刺激媒介，誘發細胞之鈣離子反應。本研究實驗細胞為小鼠神經母細胞瘤(N2a)與小鼠背根神經節(DRG)，把前者當作細胞模型，測試玻璃微管與細胞不同距離與位置時，鈣離子反應之大小變化；也會比較不同能量或流速時的細胞反應效果，接著再測試不同亞型(Nociceptive 與 Proprioceptive)的 DRG 對於超音波微管刺激的敏感性。野生型(Wild type)是本研究最初的實驗樣本，本研究也會利用基因編輯技術將我們的目標離子通道(ASIC1a, ASIC3 或是 Piezo2)剔除(Knock-out)，或是將有表現特定通道蛋白(ASIC1a)的細胞標記，再施予超音波刺激並觀察細胞螢光變化；此外也會加入通道抑制劑，將目標通道先暫時關閉，比較不同離子通道間何者對於超音波敏感並參與鈣離子反應，最終利用藥理實驗對通道的專一性，加以驗證其重要性。

最後將各項實驗結果進行整合與比較，藉此探討聲壓、聲流與細胞反應之間的關聯性，並驗證不同離子通道在超音波微管刺激下所扮演的角色。透過力學參數與生物反應的交叉分析，本研究期望能釐清超音波微管誘發鈣離子反應的主要機制，並建立一套可量化與可重現的刺激系統，未來可望將此系統應用於神經調控方面的研究。

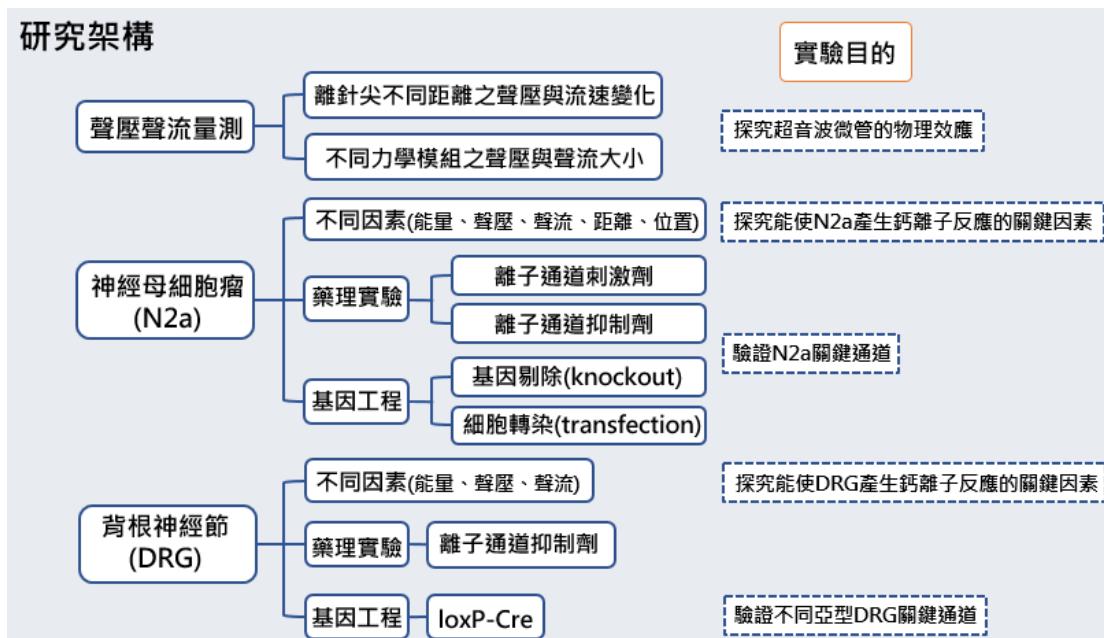


圖 20、研究架構圖

1-5 研究限制

超音波微管的特色在於尖端的尺度為細胞層級，針尖所釋放的聲壓很難量測到，因為針尖到細胞距離約為 $100\mu\text{m}$ ，距離近到怕不小心會傷到水聽筒。關於量測的結果我們是盡量讓玻璃微管的尖端與水聽筒無比接近，但沒有定義出到底多接近，所以沒有辦法真實還原細胞實驗時細胞所受的聲壓為何。

聲流的量測也是因實驗設備限制。量測結果的流速範圍是螢光珠與針尖距離約 $150\text{-}600$ 微米的距離(低流速)，而高流速為 $200\text{-}600$ 微米的距離，但我們實驗所刺激細胞的距離範圍為半徑 $50\text{-}150$ 微米的距離，在結果中所量測出來的流速低於實際刺激細胞的流速。但因為低於 150 微米的距離，螢光珠的光軌過於模糊，而且在太近距離螢光珠的運動軌跡為曲線，也難以計算出距離。

第二章 研究材料與方法



2-1 實驗設備

2-1-1 整體實驗架構

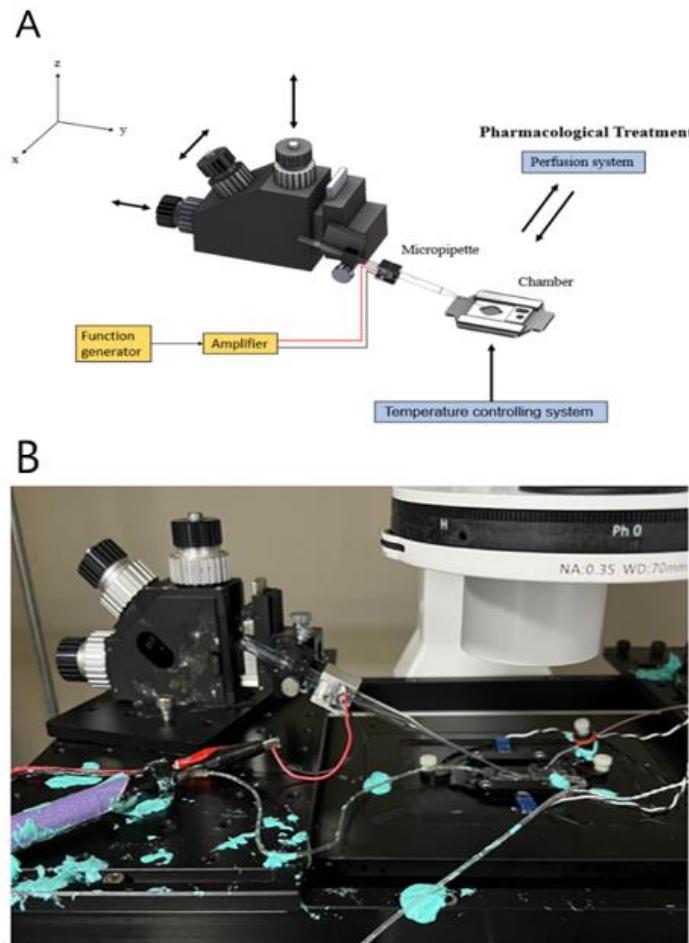


圖 21、(A)實驗架設示意圖 (B)實驗裝置實體圖

本實驗使用的設備與環境大致分為三大類：訊號產生器(function generator)與放大器(amplifier)，將電訊號放大然後輸出；壓電裸片與玻璃微管(glass micropipette)，前者會收到放大後的電訊號並與之共振，再將超音波藉由玻璃微管表面導出，後者為帶有封閉式尖端，作為一種波導裝置，可從其尖端產生輻射擴散的超音波；安置細胞的容器(chamber)，其受溫控系統將溫度維持在 37°C，模擬人體體溫，下方有螢光顯微鏡觀察細胞，並與溶液置換系統(perfusion system)的管線連接，可向輸入抑制劑或其他酸鹼度溶液，以進行相關實驗。

2-1-2 超音波微管裝置

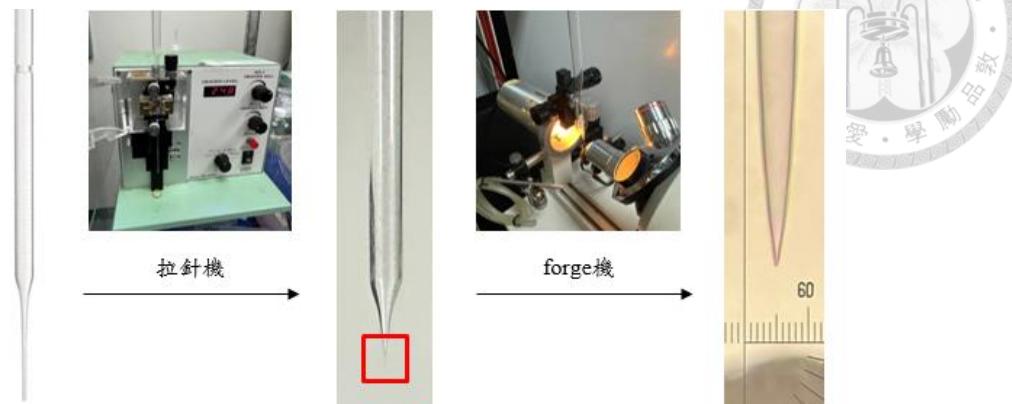


圖 22、玻璃微管製作流程



圖 23、超音波微管裝置相關配件

超音波微管裝置細分為玻璃微管、夾具、耦合膠、壓電裸片。首先玻璃微管的製程，如圖 22 所示，將分子生物實驗中吸取廢液的玻璃微管，其尖端用電生理使用的拉針機將玻璃燒熔並拉成細針狀，但因此時在玻璃微管的尖端仍為開口，故使用熔合機(forge 機)將尖端開口處燒熔並封口，使其成封閉式尖端，增加超音波輸出能量。其次，將其他相關配件組合在一起，如圖 23 所示，耦合膠塗抹在玻璃微管與壓電裸片上，此舉是為了防止裸片打出超音波能量時，因為和玻璃微管之間有空氣，使得空氣和裸片的聲阻抗不匹配，進而導致超音波振動無法傳遞。最後，將塗抹好耦合膠的裸片及玻璃微管用夾具將兩者固定，即完成超音波微管裝置之組裝。



2-1-3 訊號產生器與放大器



圖 24、訊號產生器與放大器圖

本研究使用之訊號產生器(圖 24)來自於太克電子儀器公司(Tektronix)，型號為 AFG1022。該機器可將 110V 轉化成特定波形與輸出電壓，也可以透過調整脈衝重現週期與 cycles 來滿足我們需要的佔空比，以呈現連續波(Continuous)或脈衝波(Burst)。本實驗波型選擇 sine wave，頻率為 1MHz，輸出的電壓範圍在 1mVpp 至 1Vpp 之間，佔空比為 1%至 100%之間，利用不同的輸入電壓與佔空比可以排列出不同組合的力學模組，不同力學模組可以產生不同能量或流速的效果以供後續細胞實驗。

若只用原先的訊號產生器直接與壓電裸片相接，輸入的電壓值不足以產生能量夠強的超音波，所以訊號產生器必須再接上訊號放大器，讓輸出的能量變大。本實驗使用的放大器(Amplifier)(圖 24)是由雅森科技股份有限公司生產，型號為 240L，將訊號放大 50 dB，最大承受的電壓負載量為 40 W。

2-1-4 溶液置換系統



圖 25、溶液置換系統圖

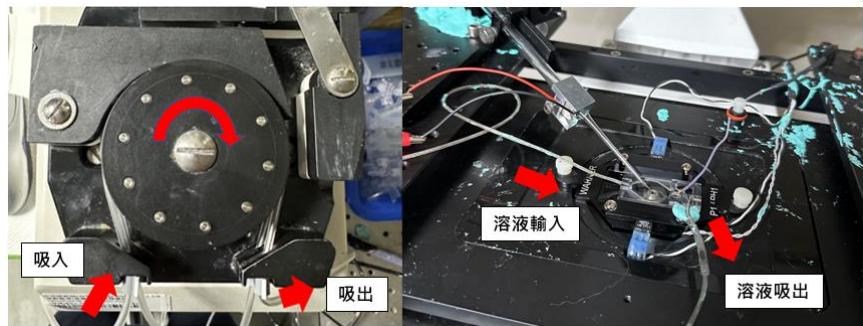


圖 26、轉動幫浦與實際實驗圖

本研究使用之溶液置換系統(Perfusion system)，如圖 25 所示，由針筒與控制閥、轉動幫浦構成，其中所使用的轉動幫浦是由 Gilson 公司所生產的，型號為 MINIPULS 3。在不同針筒中會放置數種溶液，包含離子通道抑制劑(Amiloride、PcTx1、Ruthenium red、Gadolinium、CPZ)、鈣離子螯合劑(EGTA)、離子通道興奮劑(pH5.0 HBSS、pH6.8 HBSS、CAP)等。最前端連接針的位置由塑膠軟管與控制閥相連，將其中一道控制閥開啟，只會有一種溶液流入主流管。轉動幫浦為使液體流動的動力來源，其驅動原理是依靠氣壓差，如圖 26 所示，當幫浦的輪軸往順時針轉動，擠壓主流管造成管內壓力不均，迫使管內液體朝著輪軸轉向移動，再傳入 Chamber 中，此為溶液輸入；同時，也依照相同原理，將原先在 Chamber 中的溶液吸出以達到置換的效果。

2-1-5 鈣離子影像螢光顯微鏡



圖 27、鈣離子影像螢光顯微鏡

本實驗使用蔡司公司生產的 Zeiss Axio Observer D1 鈣離子影像螢光顯微鏡，搭載影格率為 10 Hz 的相機，並配備多種螢光激發光道與濾鏡，以激發螢光染劑特定波段，使細胞或標的物發光。該顯微鏡的相機採用感光耦合元件(Charged-Couple Device, CCD)，能捕獲反射光並轉化為影像。此外，實驗搭配 MetaFluor 鈣離子影像分析軟體，可計算螢光影像的平均灰階值，並轉換為數值資料輸出，以利後續分析。

鈣離子影像單位像素的比例尺：

10 倍物鏡： $1.5504 \mu\text{m/pixel}$

20 倍物鏡： $0.7752 \mu\text{m/pixel}$

2-2 實驗細胞與材料

2-2-1 小鼠神經母細胞瘤(Neuro-2a neuroblastoma cells, N2a)

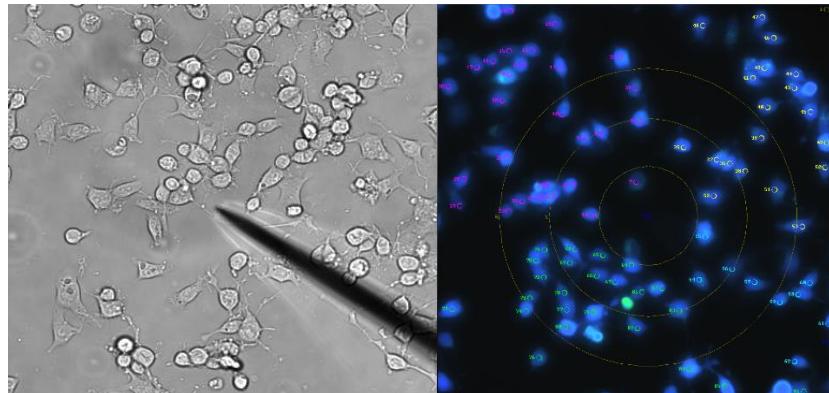


圖 28、N2a 平光圖與螢光圖

Neuro-2a 神經母細胞瘤細胞(N2a)，如圖 28 所示，是一種增殖速度快的小鼠神經母細胞纖維瘤細胞株，具有類神經元幹細胞形態。這些細胞能夠根據環境因素進行分化，分化後的細胞表現出許多神經元特徵，包括神經絲(neurofilaments)的存在。此外，文獻顯示 N2a 的細胞膜具有機械敏感性通道(mechanosensitive ion channel)，如 Piezo1 與 Piezo2，以及酸敏感性通道(acid-sensitive ion channel)，如 ASIC1a。



2-2-2 背根神經節細胞(Dorsal Root Ganglion neuron, DRG)

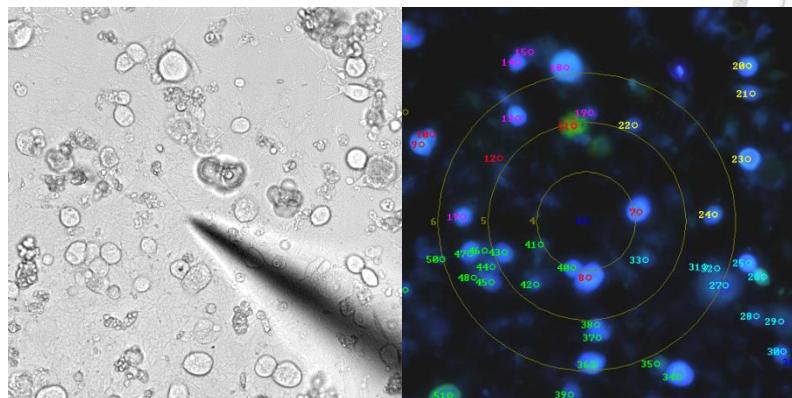


圖 29、DRG 平光圖與螢光圖

背根神經節(Dorsal Root Ganglion, DRG)神經元，如圖 29 所示，是一群偽單極感覺神經元的細胞聚集體，負責將外周感覺訊號傳遞至中樞神經系統(CNS)。此外，DRG 神經元表達的質子敏感的 G 蛋白偶聯受體(proton-sensing G protein-coupled receptors, GPCRs)，可能在酸誘導的疼痛感知(nociception)中發揮作用。在本實驗中，DRG 來自中研院陳志成實驗室的小鼠，該實驗室另用基因編輯的方式將 DRG 再細分成為本體感覺(Proprioception)或是痛覺(Nociception)的背根神經元，這將提供了更專一在某種特定 DRG 的機會，以研究機械敏感性通道(TRPV1 和 Piezo 家族)及酸敏感性通道(ASIC 家族)與其之間受力學模組的關聯。

2-2-3 漢克平衡酸鹼緩衝溶液

本研究使用漢克平衡鹽溶液(Hank's Balanced Salt Solution, HBSS)作為細胞培養的溶液。HBSS 是一種含有鈣離子、鎂離子和磷酸鹽的鹽類溶液，能夠維持適當的滲透壓與酸鹼平衡，以提供細胞存活所需的環境。本研究假設，當離子通道受到外力刺激時，會導致通道開啟，使細胞外的鈣離子進入細胞內，而 HBSS 則作為鈣離子的來源。

在細胞培養過程中，通常會透過培養箱中的二氣化碳來維持溶液的酸鹼平衡。然而，當細胞取出培養箱後，額外添加 HEPES 緩衝液(通常稀釋 50 倍)來穩定溶液的 pH 值，使其維持在中性，以確保實驗環境的穩定性。



2-2-4 鈣離子螢光染劑(Fura-2/AM)

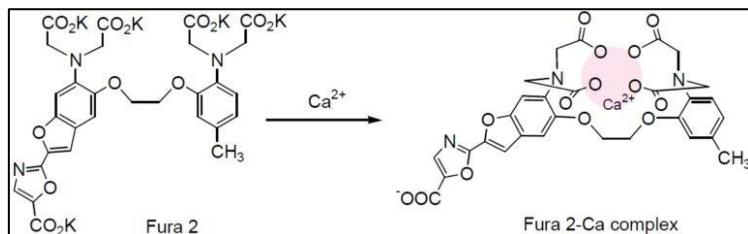


圖 30、Fura-2 與鈣離子結合示意圖

Fura-2 是一種氨基多羧酸，當其酸性基團失去氫離子後，便更容易與金屬離子結合(如圖 30 所示)。當 Fura-2 受到單色光照射時，能階會發生變化，並在回復至原始狀態時發出螢光。在未與鈣離子結合的情況下，Fura-2 主要受 380nm 波長的光激發，產生 505nm 的螢光。然而，當 Fura-2 與鈣離子結合後，則會改由 340nm 波長的光激發，仍發出 505nm 的螢光，如圖 31 所示。

通常，細胞內的鈣離子與 Fura-2 保持一定比例的結合狀態，使細胞內游離與結合的 Fura-2 維持濃度平衡。然而，當鈣離子流入細胞內，更多的 Fura-2 會與鈣離子結合，導致 380nm 激發的 505nm 螢光減少，而 340nm 激發的 505nm 螢光增加。透過分析這兩種光道的影像灰階值比率變化，即可反映細胞內鈣離子濃度的變化。

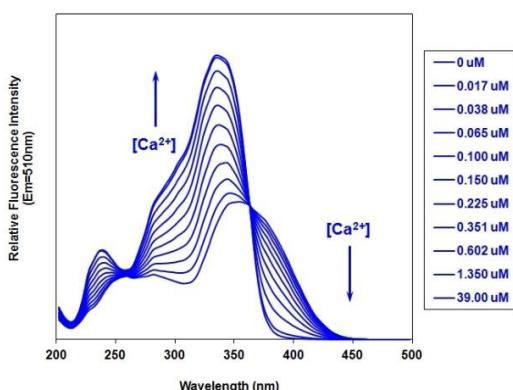


圖 31、在不同鈣離子濃度下 Fura-2 螢光激發光譜



2-3 鈣離子影像分析方法

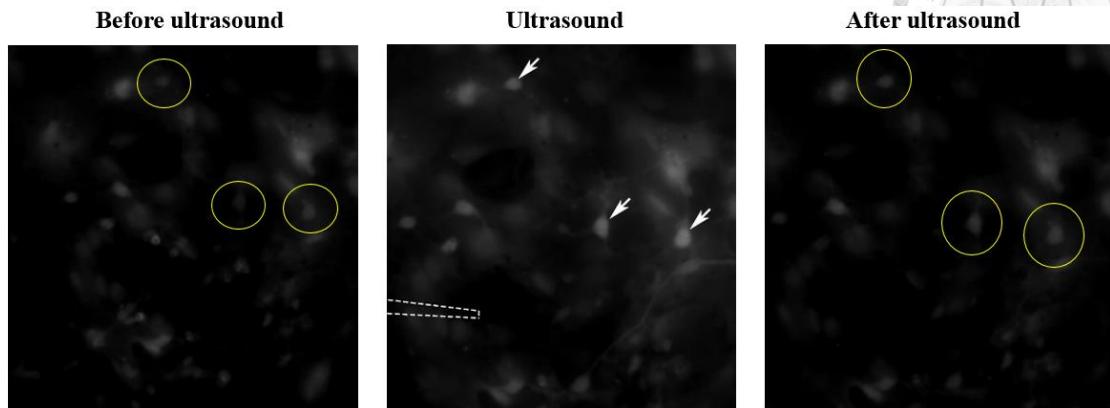


圖 32、鈣離子影像變化圖[12]

實際實驗鈣離子螢光影像，如圖 32 所示，該影像利用 MetaFluor 軟體中 340nm 光道的照片疊上 380nm 光道的照片。圖中的 Ultrasound 表示超音波刺激。當超音波透過玻璃傳導後，若細胞受刺激且成功誘發離子通道開啟的話，外鈣會由細胞外進入細胞內並與細胞內的 Fura-2 結合，該狀況下 340 nm 激發的螢光變多；原先未和鈣離子結合的染劑會受到 380 nm 光道的激發，因為未結合的染劑減少，所以 380 nm 激發的螢光就會變少。

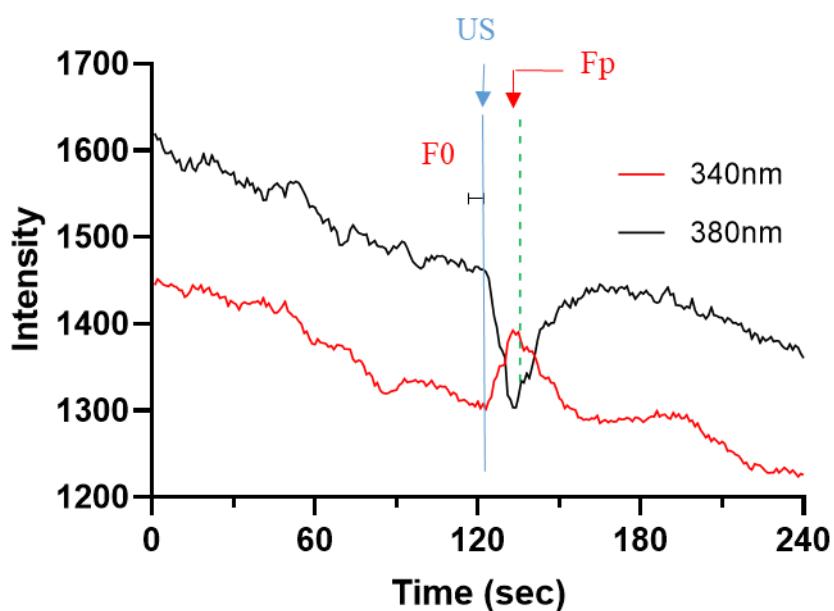


圖 33、細胞螢光平均灰階值的變化圖

利用 MetaFluor 軟體可以偵測每一顆圈選細胞的平均灰階值，如圖 10 所示，波長 340nm 所激發的螢光灰階值為紅色曲線；波長 380nm 激發的螢光灰階值為黑色曲線。當在時間 120 秒時，對於細胞施與超音波刺激後，紅色曲線往上升，而黑色曲線往下降，此即為因鈣離子進入細胞時所產生的現象。

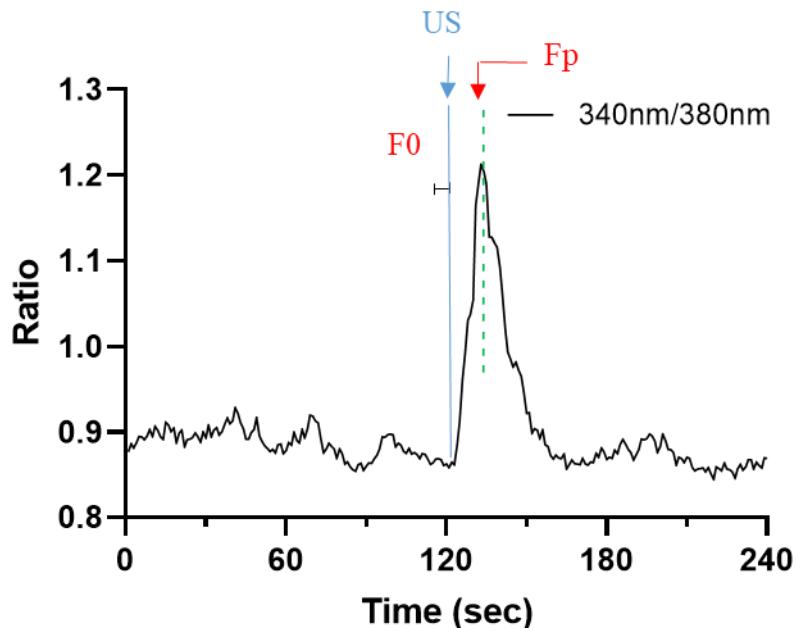


圖 34、F340/F380 比例圖

如果將紅色 340nm 的曲線除以黑色 380nm 曲線，會得到如圖 11 的 Ratio 值。在圖中，藍色標記 US 的地方為超音波刺激的時間點，刺激前 5 秒的平均值當作評估螢光數值有無變化的 Baseline，定義為 F0。受超音波刺激後 30 秒內，鈣離子流入和 Fura-2 結合最多的時候，340nm 的數值會有最高峰，而 380nm 的數值會有最低峰，兩者相除後得到的數值定義為 Fp。 $Fp - F0 = \Delta F$ 為螢光數值變化大小，與 F0 相除後可以表示刺激後的螢光變化為刺激前的多少倍，因此定義鈣子反應的大小，如下式：

$$\Delta F/F0 = (Fp - F0)/F0$$

第三章 實驗設計



3-1 超音波微管之機械性質探討與量測

超音波微管裝置是本研究中作為傳播低強度超音波的方法，超音波由該裝置的尖端輻射到溶液中以刺激細胞，細胞會受到兩種型式的機械力：聲壓(Acoustic Pressure)造成的壓縮力(Compression force)；聲流(Acoustic Streaming)造成的剪切力(Shear force)，如圖 35 所示。

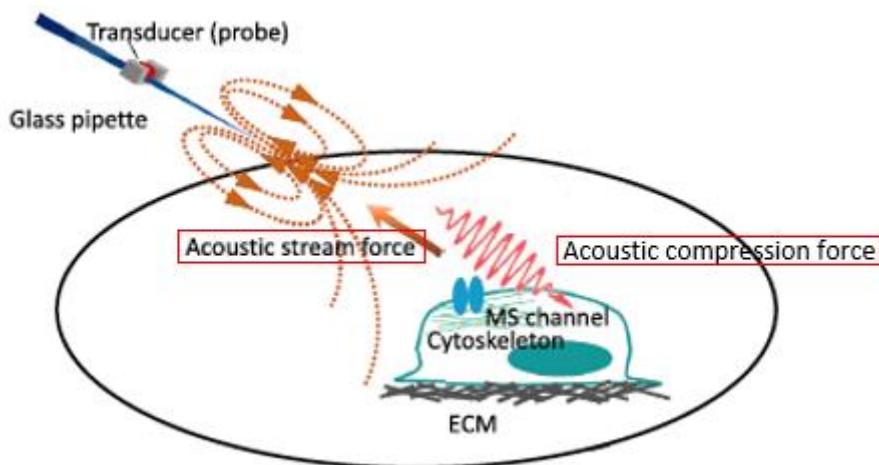
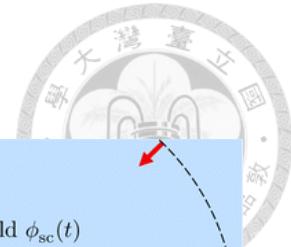


圖 35、超音波微管裝置產生機械力之效果示意圖

前者影響在傳播路徑上之細胞，對接觸表面施加法線方向的力，使其細胞有壓縮跟膨脹的特性，如圖 36 所示；後者則產生平行於細胞表面的力，如圖 39(A)所示，並與固定細胞在玻片的細胞外基質(Extracellular matrix, ECM)共同將細胞水平拉扯。這兩種機械力會因為透過調整訊號產生器的輸入電壓(Input voltage)及佔空比(Duty factor)來改變強度，利用不同參數的搭配產生不同的力學模組(Force modalities)，用以探究神經細胞(DRG、N2a)在何種力學模組下能打開何種離子通道，兩者是否有交互作用。



3-1-1 聲壓量測規畫

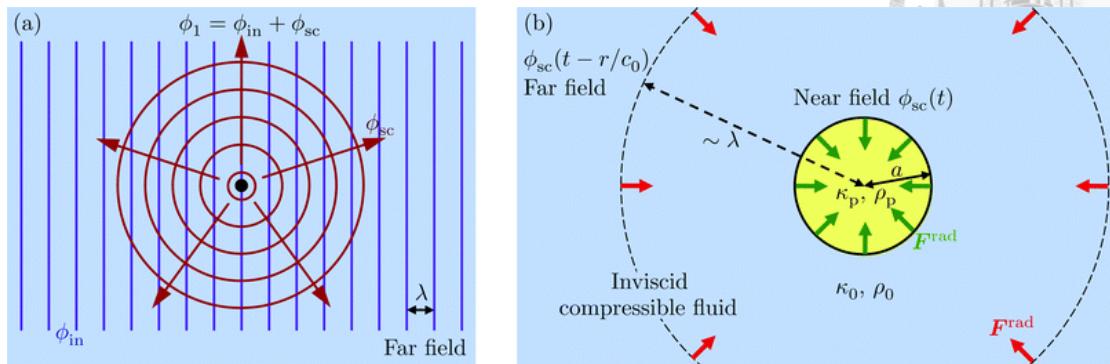


圖 36、細胞受聲壓壓縮力示意圖

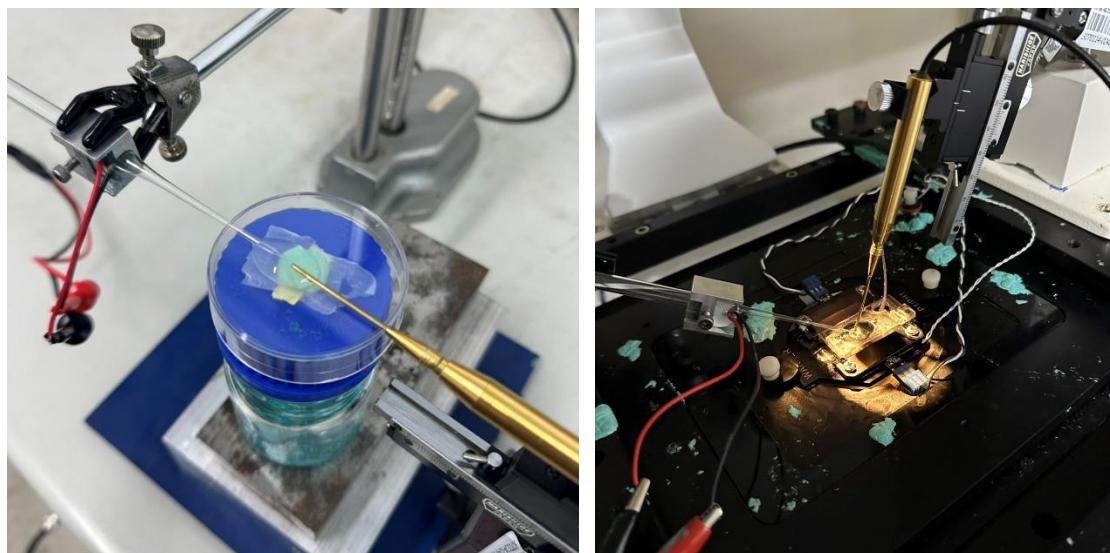


圖 37、聲壓量測設備架設圖

聲壓的機械特性可以利用水聽器(hydrophone)來進行量測，如圖 37 所示，左方裝置為本研究刺激裝置(2-1-2 小節)，該裝置會連接訊號產生器與放大器(2-1-3 小節)產生與細胞實驗相同力學模組的作用力(壓縮力與剪切力)；右方裝置為水聽器，其後會接上專用的放大器，將接收到的聲壓訊號，透過示波器顯示出波形。兩裝置的中間會用耦合膠使得波可以順利傳遞，由於玻璃微管產生的超音波會在耦合膠中不停的來回反射，所以我們只會取最前面的波段，即為示波器上黃色實線處的範圍(圖 38)。在施予特定參數的超音波後，示波器上會顯示該波段的方均根電壓(Vrms)，再將該數值乘以該水聽器的校正常數 $K(kPa/Vrms)$ ，可以得到該力學模組所產生的聲壓(Acoustic pressure)。

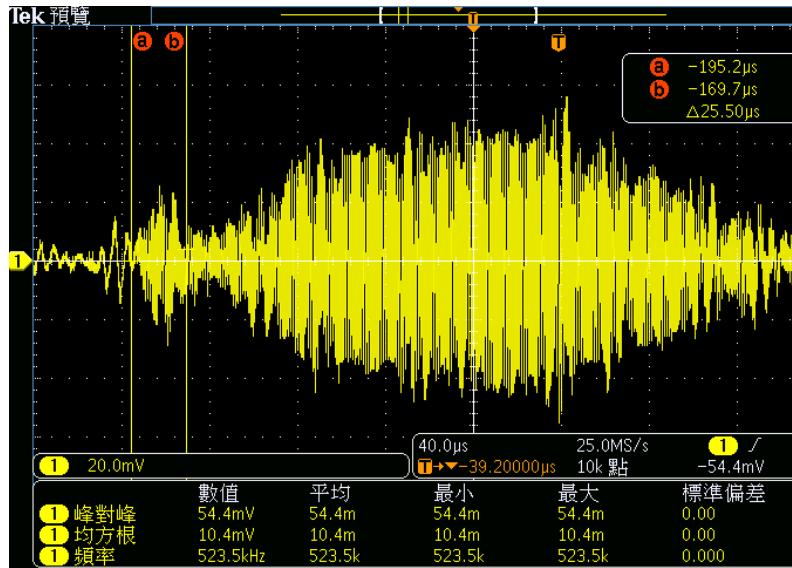


圖 38、聲壓量測示波器顯示圖

3-1-2 聲流量測規畫

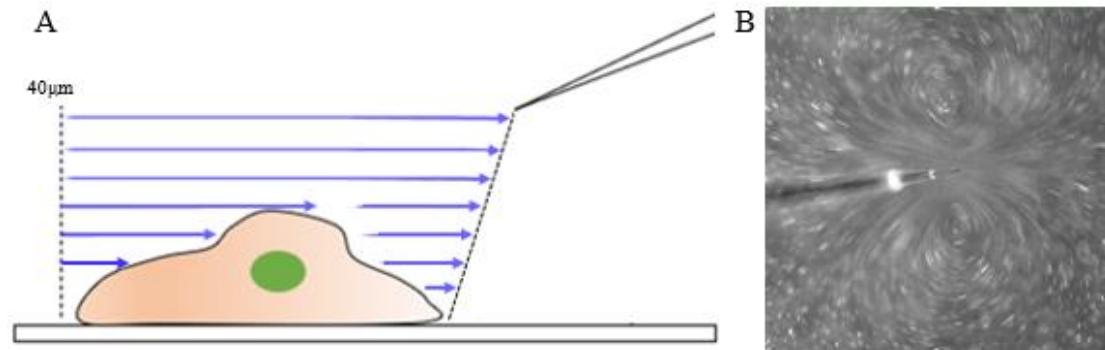


圖 39、細胞受聲流剪切力示意圖

聲流的機械特性(如流速)可透過螢光珠軌跡(Fluorescent bead tracing)進行驗證，其架設的設備如圖 21 一模一樣，只是 chamber 內的溶液換成螢光珠(FluroSpheres)(圖 40A)加 HBSS 以 1:5000 的比例稀釋，在 Metafluor 軟體中平光與螢光圖分別為如圖 40B 與圖 39B。在軟體中光軌的遠端點到針尖的長度定義為螢光珠到針尖距離，將光軌的圖利用 ImageJ 計算出的長度(μm)定義為每個 frame 間螢光珠移動的距離，把距離除以每個 frame 的曝光時間(ms)，所得到的速度(mm/s)即為該力學模組下，細胞與針尖不同距離間所產生的聲流(Acoustic streaming)流速。

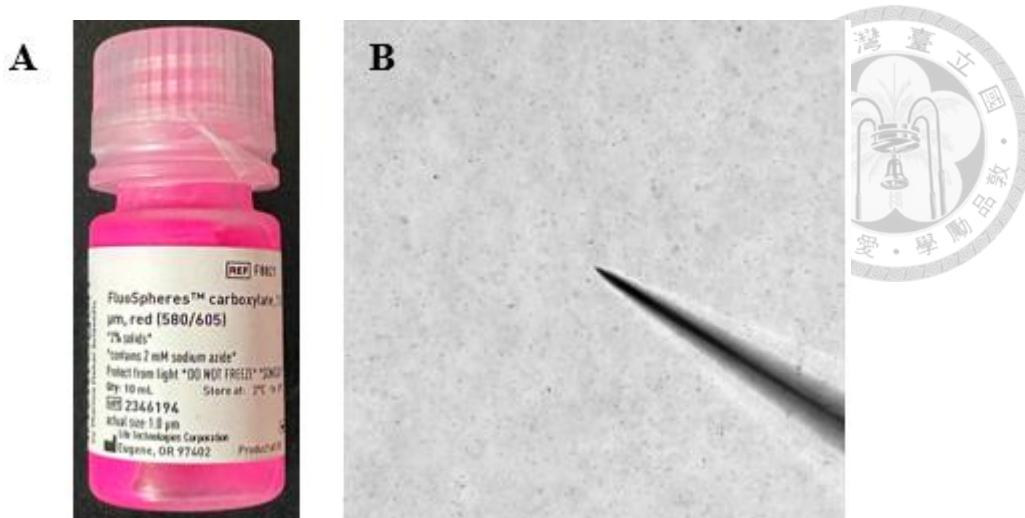


圖 40、螢光珠保存容器與螢光珠平光圖

3-2 小鼠神經母細胞瘤之鈣離子反應探討

N2a 細胞會種植在直徑 18mm 的玻璃玻片上，玻片上會先使用 Poly-L-Lysin(PLL)，目的在於增強細胞膜上帶負電的離子與培養基表面的靜電相互作用，促進細胞附著於固體基底；再將 Laminin coating 在已經塗有 PLL 的玻片上，支持細胞黏附、增殖和分化。我們會依 coating 的方式不同定義成兩種不同的細胞外基質，若同時有 PLL 跟 Laminin 標示為 P/L，而沒有 coating Laminin 則標示為 PLL，利用不同的細胞外基質來探討細胞膜上離子通道的開啟機制。

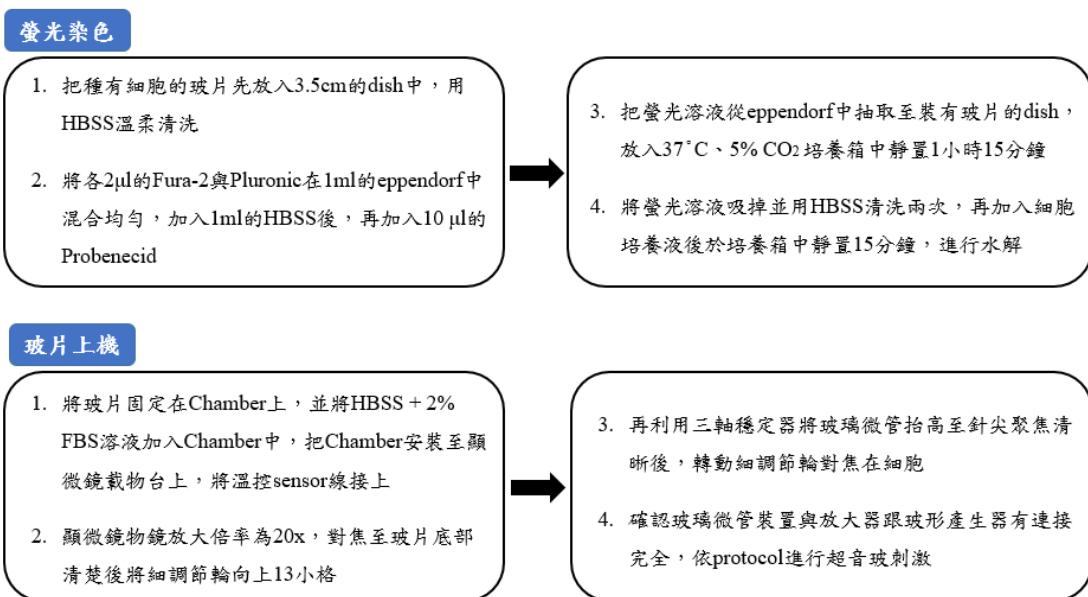


圖 41、螢光染色與玻片上機流程圖

螢光染劑的流程如圖 41 所示，Fura-2 於 3-1-4 小節有簡單介紹；Pluronic 與 Fura-2 以等比例混合，具有增強細胞膜的穿透性，幫助脂溶性染劑進入細胞；Probenecid 可以抑制有機陰離子轉運蛋白(OATs)，防止螢光染劑從細胞內被排出去。HBSS 作為溶劑，其餘藥劑的比例分別為：

HBSS : Fura-2 : Pluronic : Probenecid = 1000 μ l : 2 μ l : 2 μ l : 10 μ l

在加入上述染劑溶液至 3.5cm dish 前，會將待染色的細胞玻片先用 HBSS 洗兩次，其目的在於將原先玻片上的培養液與不好的鈣離子洗掉，再加入染劑溶液後不好的鈣離子才不會進入細胞。靜置 1 小時 15 分鐘後吸掉染劑用 HBSS 清洗，但要很溫柔的不要大力沖洗到細胞，一方面把染劑清洗，另一方面可以把原先在玻片上沒黏貼緊的細胞去除。最後將細胞培養液加入後在培養箱內靜置 15 分鐘，其目的是為了讓細胞將胞內與鈣離子結合後多餘的染劑排出，維持動態平衡，若不進行這項水解的步驟，在記錄時會觀察到很多不正常的自發性鈣離子反應 (Spontaneous calcium response)。

3-2-1 檢驗不同力學模組與條件因素造成之鈣離子變化

先前本實驗室的吳觀宇學長已經測試過在最低能誘發 N2a 鈣離子反應的力學模組為何，接著便要測試不同力學模組產生的能量與流速所造成的鈣離子反應；相同能量或流速中輸入電壓與佔空比的關係，並探討能量、流速(shear force)還是聲壓(高輸入電壓與低佔空比)為造成鈣離子反應的主要因素。

*US = Ultrasound Stimuli

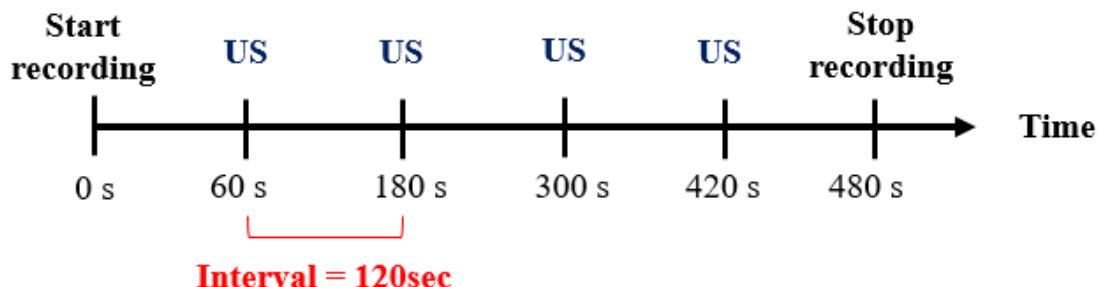


圖 42、超音波刺激流程圖

表 2、不同力學模組(刺激參數)

時間點 目的	60sec	180sec	300sec	420sec
相同流速 (3.75mm/s)	72mVpp, 20% D.F.	112mVpp, 10% D.F	192mVpp, 5% D.F	32mVpp, 100% D.F
相同能量	32mVpp, 100% D.F.	320mVpp, 1% D.F.	72mVpp, 20% D.F.	322mVpp, 1% D.F.
高輸入電壓 低佔空比	392mVpp, 1% D.F.	354mVpp, 2% D.F.	340mVpp, 2% D.F.	392mVpp, 3% D.F.

在本研究中，超音波刺激的流程如圖 42 所示，深藍色 US 代表超音波刺激的時間點，超音波刺激的參數與目的為表 2 所示，而每次刺激時間間隔皆為 120s，這個參數是由吳觀宇學長實驗測試出來的，當時測試 N2a 細胞刺激時間間隔(細胞休息時間)要至少 2 分鐘以上才會有相同強度的鈣離子反應，為了省時所以制定統一間隔時間為 2 分鐘。一個視野從開始記錄到結束紀錄約為 8 分鐘，首先我們是將 340nm 與 380nm 波段的光打在細胞上，讓細胞發出螢光，如果長時間紀錄也許或讓細胞型態發生改變，例如過度表達(overexpression)，使得螢光產生的 Intensity 過高或 Quench 過快，再者 chamber 內的 HBSS 因為有接溫度控制的裝置所以會溫度上升至體溫(37°C)，液體會蒸發因而液面的高度會下降，若長時間紀錄會讓液體蒸乾，一方面影響玻璃微管的作用效果，二方面也會影響細胞狀態，但在紀錄的過程中補液體會造成紀錄波形的不穩定，所以四次刺激為最好的一個視野的實驗長度。

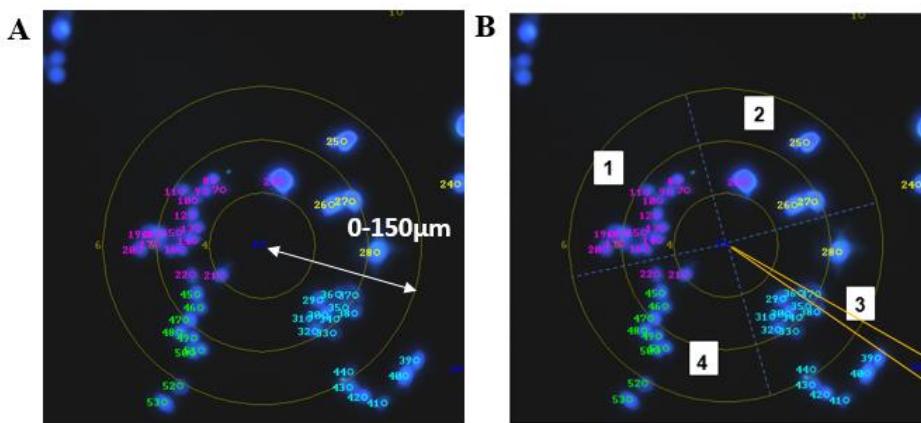


圖 43、距離與角度因素示意圖

玻璃微管造成的流場在不同的距離與角度會有不同的聲壓與聲流，所以我們會分析距離影響的螢光變化(圖 43A)，而會依位置分為四個部分(圖 43B)。在圖 43A 中有三個黃色的同心圓，其半徑分別為 $50\mu\text{m}$ 、 $100\mu\text{m}$ 、 $150\mu\text{m}$ ，但因為若分為三個區域，各個區域的細胞數目太少，所以便只選定一個特定區域，距離則是 $0\text{-}150\mu\text{m}$ 來進行統計。在圖 43B 中依玻璃微管的位置分成四個區域(標示數字 1-4)，四個區域中心交會處為針尖的位置，即為超音波釋放的地方，所以會定義區域 1 為針前、區域 3 為針後；區域 3 為針右邊、區域 4 為針左邊，比較這四個位置與鈣離子反應大小的關係，並探討在相同角度下，細胞跟針尖距離的影響。

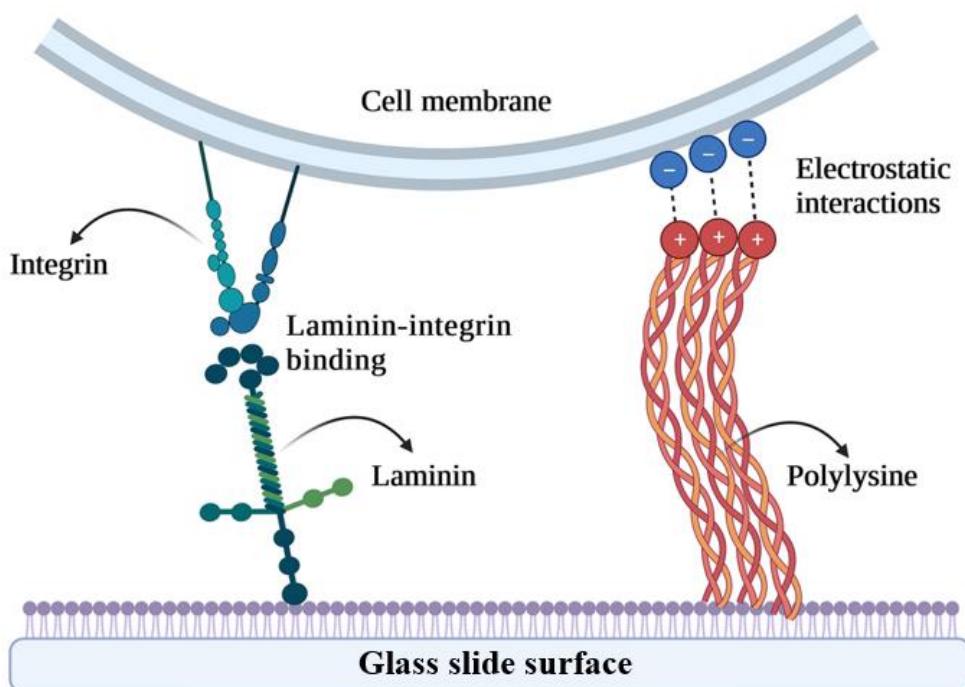


圖 44、細胞與細胞外基質示意圖

在圖 35 中有提到離子通道的開啟是由力作用在膜表面，與細胞外基質有交互作用，所以便好奇不同的細胞外基質對於鈣離子反應的變化。細胞會種植在兩種不同細胞外基質(ECM)的玻片上並比較其關係，ECM 分別為 Laminin/Poly-L-Lysine(L/P)與單純 Poly-L-Lysine(PLL)(圖 44)，刺激的流程如圖 42，而刺激參數如表 2 所示。



3-2-2 利用不同試劑檢驗 N2a 細胞膜上離子通道

根據實驗室吳觀宇學長的發現(圖 45)，超音波從 60 秒開始刺激(豎線表示超音波刺激的時間點，每次刺激 1 秒， 200 mVpp , 10% D.F.)，每隔 120 秒再進行第二次的刺激，一共能刺激出十次左右的鈣離子反應。

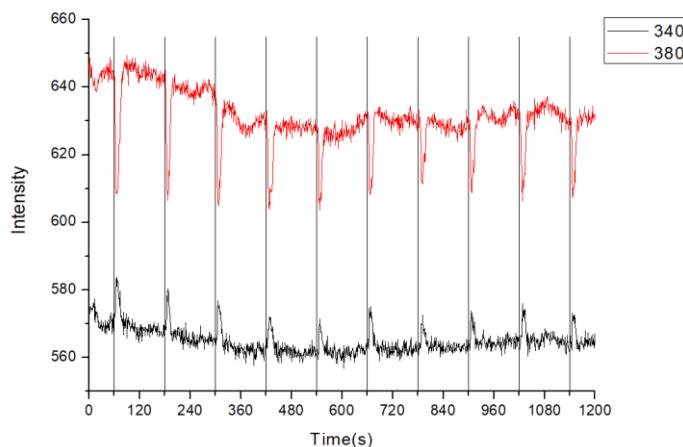


圖 45、N2a 細胞受超音波微管之連續刺激圖(吳觀宇碩論)

此實驗結果確定只要休息時間夠久，超音波可以連續刺激細胞，所以可以用來設計於利用不同試劑(藥物或其他酸鹼度溶液)，檢測 N2a 細胞膜上有那些離子通道可受超音波開啟。

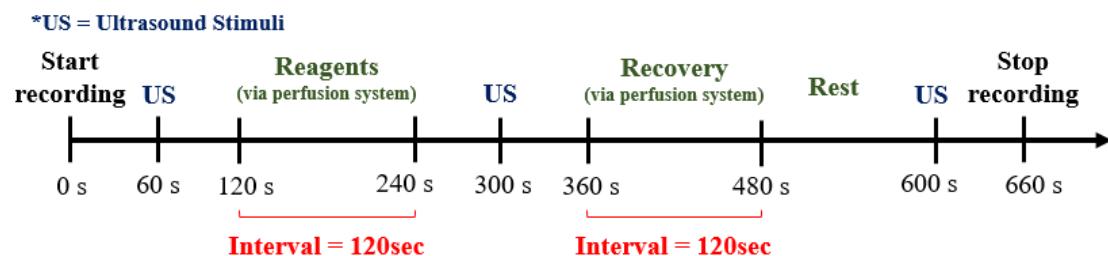


圖 46、溶液置換流程圖

實驗流程如圖 46 所示，先施予一次超音波當作 Control，之後將藥物或其他酸鹼度溶液，透過 perfusion system 加入 chamber 中，再施予一次超音波作為試劑影響組，待反應穩定後用 pH7.4 的 HBSS(原 chamber 內溶液)置換掉加入的藥物或其他酸鹼度溶液，休息 2 分鐘等細胞恢復正常狀態後再施予一次超音波觀察細胞是否有恢復。將這三個刺激後所產生的鈣離子反應(螢光變化)進行統計。

N2a 細胞膜上有多少種離子通道蛋白可能與鈣離子反應相關，要釐清這些通道與其的關係，方法之一就是利用離子通道的興奮劑或抑制劑去證明通道的存在及其與鈣離子反應有關。本研究探討的離子通道主要分為機械力敏感通道(Piezo、TRP)以及酸敏感通道(ASICs)，會使用多種試劑(reagents)去將其區分，種類如下：

EGTA 是一種鈣螯合劑，會強力結合 Ca^{2+} ，讓細胞外游離的鈣離子濃度降低。為了驗證鈣離子反應是透過離子通道從細胞外進到細胞內，而非細胞內排到細胞外，所以會使用該藥劑並觀察鈣離子反應變化，若該藥造成反應變化降低可以說明離子流動的方向。本實驗使用的濃度為 2mM。

Gadolinium (Gd^{3+}) 是一種機械力敏感的離子通道抑制劑，因為正電荷多所以能夠有效地與通道蛋白上的負電荷位點結合，其後會物理上阻擋離子通道開口，讓離子無法正常通過細胞膜。但並非專一性強的抑制劑，它可以抑制像 Piezo1, 2 或是 TRPV4 等受機械刺激或細胞外環境變化敏感的通道。本實驗使用的濃度為 50 μM 。

GsMTx4 是從蜘蛛毒素中分離出來的一種小型胜肽毒素(peptide toxin)，專一性強的機械力敏感通道抑制劑，特別對 Piezo 或 Stretch-activated channels (SACs) 特別有效。它會插入細胞膜的磷脂層，透過改變膜張力(membrane tension)和磷脂質微環境，來間接抑制通道的開啟。本實驗使用的濃度為 10 μM 。

Ruthenium Red (RR)也是一種非專一性的機械力敏感通道抑制劑，但會比較傾向 TRP 家族(TRPV1、TRPV2、TRPV3、TRPV4)。跟 Gd 不同，RR 會跟通道蛋白上的特定位點結合，改變通道蛋白的構造；影響膜表面的電荷分布，影響通道功能。本實驗使用的濃度為 10 μM 。

Capsaicin (CAP)為辣椒素，是 TRPV1 的促進劑(agonist)，直接結合到 TRPV1 蛋白的特定位點，改變 TRPV1 的構形，讓通道打開，鈣離子大量流入細胞。透過使用辣椒素證明細胞有 TRPV1 的表現，本實驗使用的濃度為 1 μM 。

Capsazepine (CPZ)為 TRPV1 的拮抗劑(antagonist)，與 Capsaicin 化學結構類似，會卡在 TRPV1 通道的結合位點，所以能競爭性地(competitive)結合到 TRPV1 上，但不會讓通道打開。經由 CAP 跟 CPZ 可以確定是否含有 TRPV1 通道，本實驗使用的濃度為 $10\mu\text{M}$ 。

HC-030031 為 TRPA1 的非共價性拮抗劑(non-covalent antagonist)，會直接結合到 TRPA1 的特定位點，阻止 TRPA1 打開。本實驗使用的濃度為 $10\mu\text{M}$ 。

ASIC Channels 顧名思義即為受氫離子(酸)會活化的離子通道，體液 pH7.4 為正常生理狀態下的酸鹼值，此時 ASICs 大多處於關閉狀態。當 pH 達 6.8 或 6.5 時會特別使 ASIC1a 開啟，而 pH5.0 則會讓所有 ASICs 開啟，因此本實驗特別使用 pH6.8 及 pH6.5 的 HBSS 溶液作為 ASIC1a 的興奮劑。

對於 ASICs 使用的通道抑制劑為 Amiloride，它非選擇性而且有可逆性，會與通道上特定位置結合，並卡住通道孔洞阻擋離子進出，本實驗使用的濃度為 $50\mu\text{M}$ 。APETx2 是一種來自海葵毒液的多肽毒素，對於 ASIC3 專一性高的抑制劑，會與 ASIC3 有高度親和力，與其胞外結構結合，穩定通道於非活化狀態，阻止氫離子活化 ASIC3，本實驗使用的濃度為 250nM 。Psalmotoxin-1 (PcTx1)則是對於 ASIC1a 有專一性的抑制劑，會跟 ASIC1a 的外部結構(extracellular domain)特異性結合，改變通道構形(conformation)，讓 ASIC1a 變得無法被酸活化，本實驗使用的濃度為 50nM 。

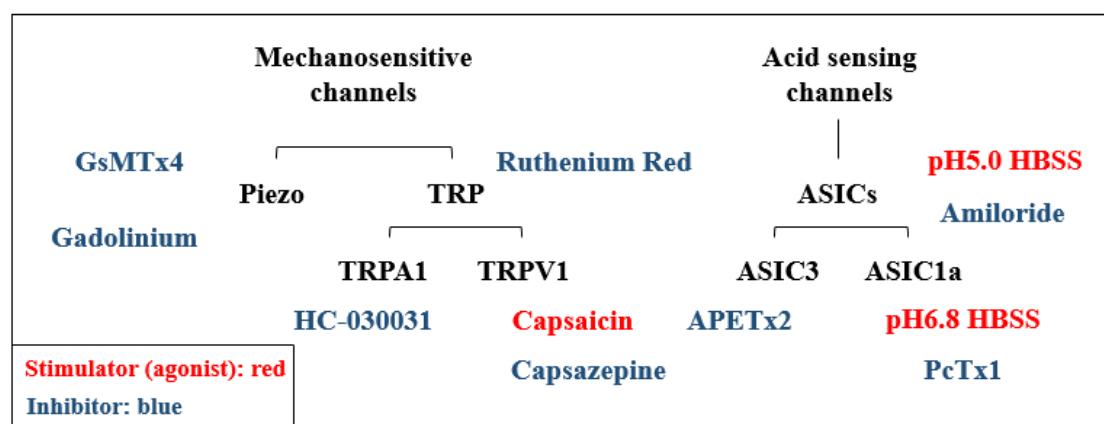


圖 47、離子通道興奮劑與抑制劑關係圖



3-2-3 利用基因編輯檢驗 ASIC1a 的重要性

在先前實驗室發表的文獻中表示 ASIC1a 可能為參與鈣離子反應的通道，而且也會對超音波敏感[12]，所以便利用基因編輯的方式探究該通道的重要性。本實驗利用 CRISPR-Cas9 技術將 N2a 細胞膜上 ASIC1a 這個通道蛋白剔除(knockout)，再施予超音波後觀察螢光變化。

首先，根據小鼠 ASIC1a 的基因序列設計一條特異性的引導 RNA(guide RNA, gRNA)，用以引導 Cas9 蛋白辨識並切割目標位點。接著，將 gRNA 和 Cas9 蛋白的表現序列構建於質體中，並利用脂質體轉染的方式將其導入 N2a 細胞內。導入後，Cas9 蛋白會在 gRNA 的導引下，切割 ASIC1a 基因的特定位點，造成 DNA 雙股斷裂。細胞在嘗試修復這一斷裂過程中，常會發生插入或刪除突變(Indels)，導致框架(reading frame)移動、終止密碼(stop codon)或錯誤的蛋白質轉譯，進而使 ASIC1a 功能喪失。最後，透過 PCR 驗證基因是否成功剔除。這樣處理後的 N2a 細胞將不再表達 ASIC1a。

除此之外，為了進一步驗證 ASIC1a 在鈣離子反應中扮演角色，在成功建立 ASIC1a 基因剔除的 N2a 細胞後，會將外源性 ASIC1a 基因的轉染回細胞，再施予超音波刺激觀察螢光變化。首先，選擇包含小鼠 ASIC1a cDNA 的表現載體(expression vector)，該載體可驅動 ASIC1a 在哺乳動物細胞中表達。接著，利用脂質體轉染法將載體導入 ASIC1a-knockout 的 N2a 細胞中。轉染後，細胞經過一段時間培養，待外源性 ASIC1a 表達穩定後，即可進行測試。

為了要快速確認細胞是否轉染成功，所以在轉染進細胞的載體中會再插入一段螢光蛋白作為報導基因(reporter gene)，該螢光蛋白受 587 nm 波長的光激發後會發 610 nm 波長的紅色螢光，所以在圈選細胞紀錄時要選擇有亮紅色螢光的細胞。不過，為了觀察 ASIC1a 在經轉染後的表現，還會將僅有 mCherry 這段基因轉染進細胞，比較兩者差異。

3-3 小鼠背根神經節細胞之鈣離子反應探討



圖 48、DRG 自小鼠脊髓取得示意圖[42]

背根神經節細胞取自小鼠的脊髓，是由中研院陳志成實驗室莊育嘉博士進行取得及細胞培養，簡單流程如圖 48 所示。DRG 細胞膜上也有許多離子通道蛋白，但鈣離子反應的機制與 N2a 相比複雜很多，所以會先嘗試不同的力學模組測試 DRG 在何種力的大小中可以產生鈣離子反應，實驗的流程如 3-2-1 小節中圖 42 所示；再進行藥理實驗來驗證何種通道參與鈣離子反應，實驗流程如 3-2-2 圖 46，而藥劑種類如圖 47 所示。

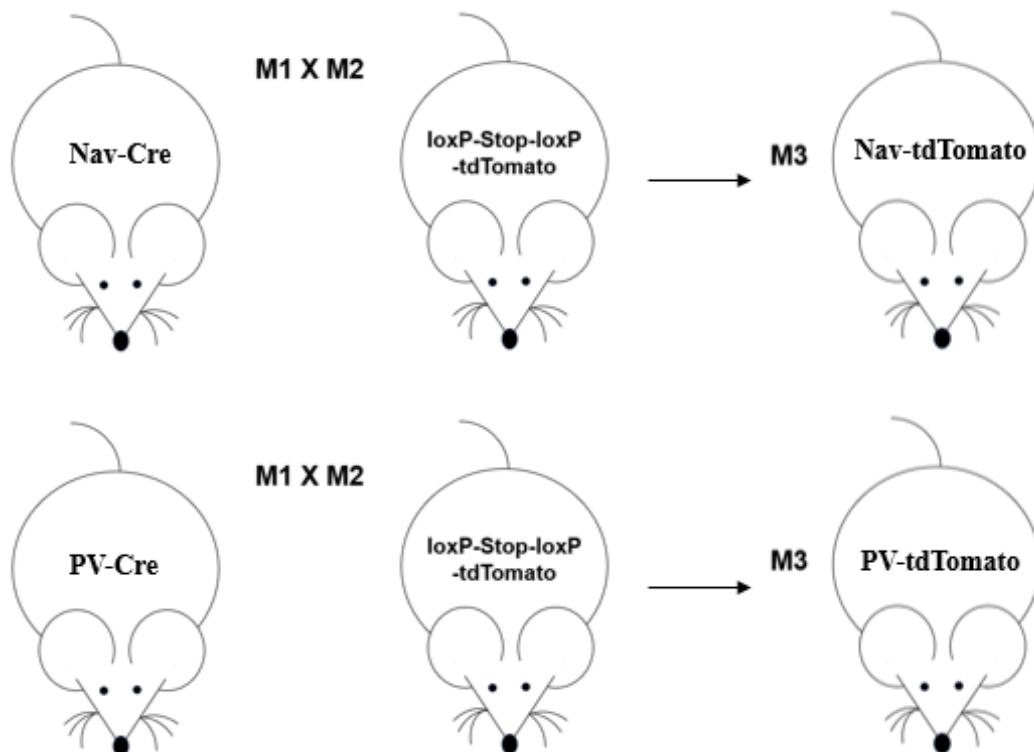


圖 49、利用 LoxP-Cre 系統標記特定種類 DRG 示意圖

DRG 有很多不同的類型(例如痛覺感覺神經元 Nociceptors 或本體感覺神經元 Proprioceptors)，如果要將特定感覺神經元作標記，則需要利用基因工程小鼠搭配 Cre-loxP 系統，達到細胞類型專一性的螢光標記，如圖 49 所示。首先會準備與目標感覺神經元特異性相關的 Cre driver 小鼠，例如使用 Nav-Cre 來標記痛覺神經元，或使用 Parvalbumin-Cre (PV-Cre)來標記本體感覺神經元。這些 Cre 小鼠與含有 loxP-Stop-loxP-tdTomato 的小鼠進行雜交，loxP 是被 Cre 重組酶辨識的 DNA 序列，所以子代中被 loxP 夾在中間的 Stop codon 會被切除，啟動 tdTomato 的表達。這些在背根神經節中特定感覺神經細胞會表現紅色螢光，方便在顯微鏡下區別其他非目標 DRG 細胞。

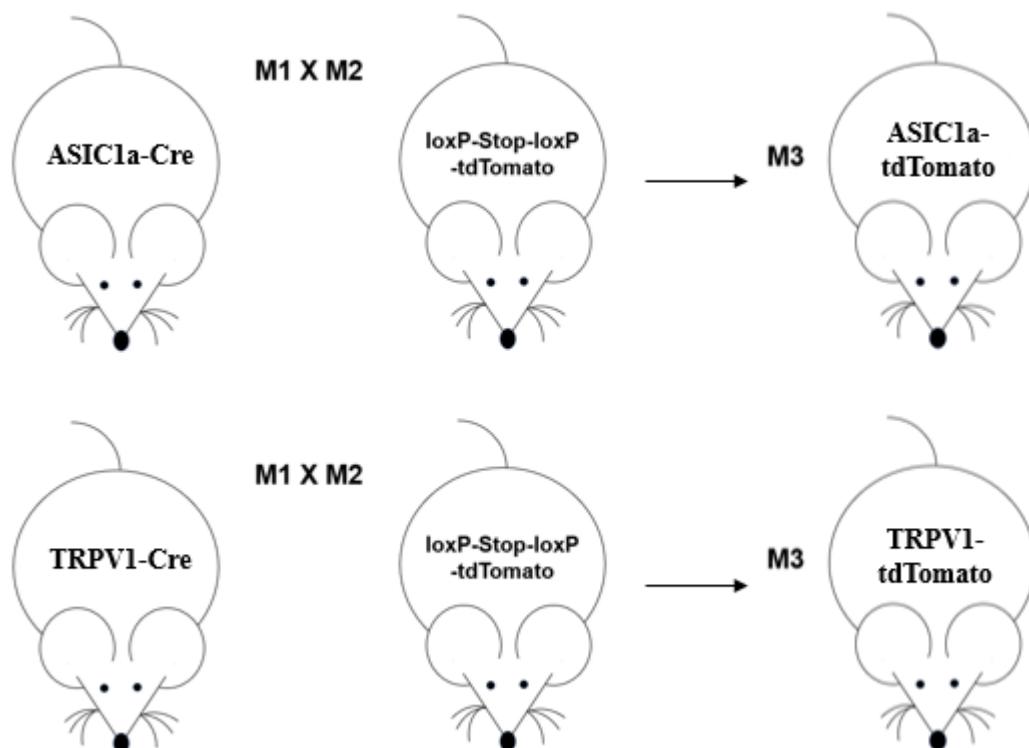


圖 50、利用 LoxP-Cre 系統標記有表現特定通道蛋白的 DRG 示意圖

ASIC1a 通道跟在 N2a 細胞中一樣是本實驗重點觀察的目標，所以會利用 LoxP-Cre 技術將該通道蛋白作標記，過程如圖 50 所示；除此之外，TRPV1 在過去 N2a 的實驗中，也對於鈣離子反應有關聯，所以在 DRG 中也會標記並觀察其受力學模組的關係，之後比較與 ASIC1a 的相關性。

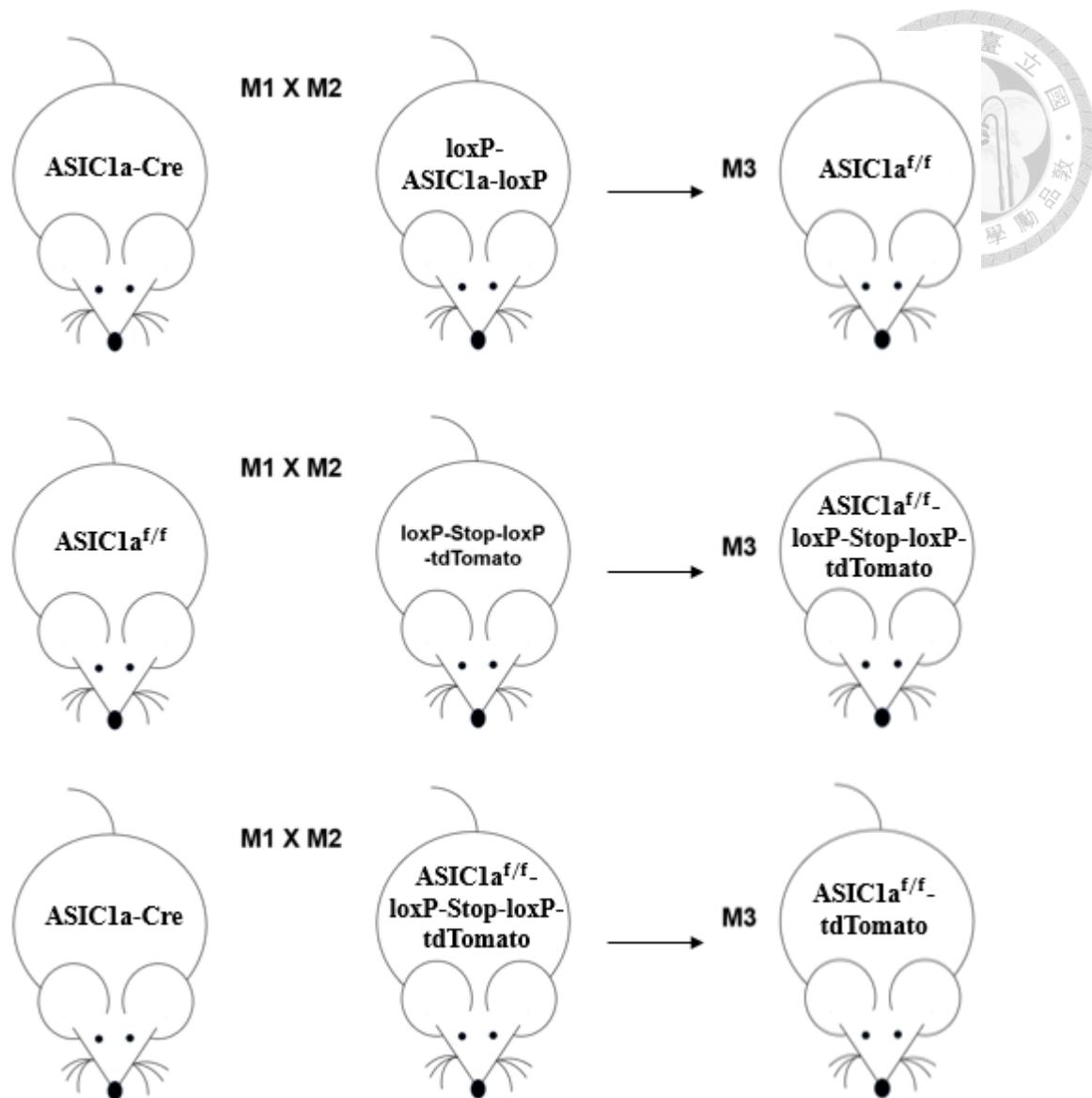


圖 51、利用 LoxP-Cre 系統標記將 ASIC1a 剔除的 DRG 示意圖

本實驗還會針對特定離子通道作剔除，運用到的也是基因工程小鼠搭配 LoxP-Cre。舉圖 51 中 ASIC1a^{f/f}為例，ASIC1a-Cre 小鼠中的 Cre 表現受 ASIC1a 啟動子控制，會在自然表現 ASIC1a 的細胞中活化。當這些細胞同時具有 loxP-ASIC1a-loxP 基因時，Cre 將辨識並剪除其兩側的 loxP 序列，導致 ASIC1a 基因在這些細胞中被剔除。此外，若該細胞也攜帶 loxP-Stop-loxP-tdTomato 片段，Cre 的活性同時也會移除 Stop 序列，使 tdTomato 蛋白得以表達，進而產生紅色螢光訊號。其他離子通道 knockout 的小鼠取得也是如法炮製，用 ASIC1a-cre 得到的 knockout 組合如表 3 所示。



表 3、ASIC1a-cre 驅動 knockout 組合表

ASIC1a-cre	ASIC1a ^{f/f}
	Piezo2 ^{f/f}
	ASIC1a ^{f/f} & Piezo2 ^{f/f}

前段提到的 Nav-cre 或是 PV-cre，分別表示 Cre 表現受 Nav 啟動子或 Parvalbumin(PV)啟動子控制，又因為 Nav 與 PV 分別是痛覺感覺神經跟本體感覺神經的分子標記(molecular marker)，所以兩者的 Cre 會個別在痛覺感覺神經或本體感覺神經中活化。這些不同類型的 Cre 再搭配不同 knockout 的 loxP-Stop-loxP-tdTomato 小鼠，會組合出想要觀察 DRG 類型與離子通道剔除的細胞，其組合結果如表 4 所示。舉 DRG 本體感覺神經並把 ASIC3 剔除會亮紅光為例，在標示上為 PV-cre :: ASIC3^{f/f} :: tdTomato。

表 4、Nav-cre 與 PV-cre 驅動 knockout 組合表

Nav-cre	Piezo2 ^{f/f}
	ASIC3 ^{f/f}
	ASIC1a ^{f/f}
	ASIC1a ^{f/f} & ASIC3 ^{f/f}
PV-cre	Piezo2 ^{f/f}
	ASIC3 ^{f/f}
	ASIC1a ^{f/f}
	ASIC1a ^{f/f} & Piezo2 ^{f/f}

通道蛋白間或許存在交互作用，當某個通道被剔除後，會導致其他通道蛋白的表現上升，這種現象稱為：功能補償(functional compensation)。補償現象可能是因為功能重疊(functional redundancy)，當兩種通道蛋白在功能上有部分重疊(例如都參與機械感受或酸感受)，細胞為了維持生理功能，可能會上調另一種通道來補償被剔除的那一種。舉例來說，在ASIC1^{-/-}小鼠中，肌肉發炎會導致 DRG 中 ASIC3 mRNA 表現顯著增加[43]，即是一種補償作用。

第四章 實驗結果



4-1 超音波微管之聲壓量測結果

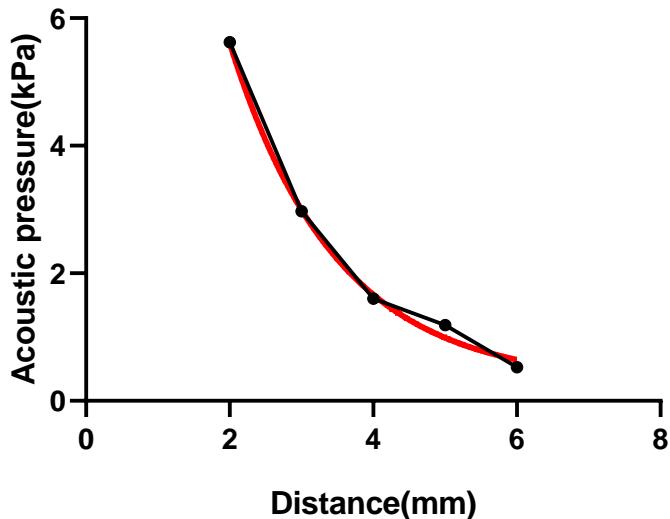


圖 52、聲壓與距離關係圖

根據 3-1-1 小節中圖 37 左邊的設置，先在台大做一個簡單的量測來確定距離與聲壓間的關係。由於 hydrophone 與針尖的距離沒辦法太靠近，所以大約為 2mm 左右，然後利用從中研院跨領域大樓借回來的微調手臂，讓兩者的距離可以固定以 1mm 的長度遞增，結果如圖 52 所示。用 Sigmoid 做 Curve fitting，決定系數 R^2 為 0.9965，所以聲壓與距離是以指數關係遞減。

為了更真實還原做細胞實驗時的聲壓，所以便利用中研院那邊實驗的環境進行架設如 3-1-1 小節中圖 37 右邊的設置，但由於顯微鏡的負責光圈的手臂會阻擋到 hydrophone 的放置，所以沒辦法從顯微鏡轉換到電腦的視角畫面中看到 hydrophone 到針尖的真實距離。為了避免 hydrophone 的損壞，所以只能以經驗上最接近的距離進行量測，結果如 53 所示。

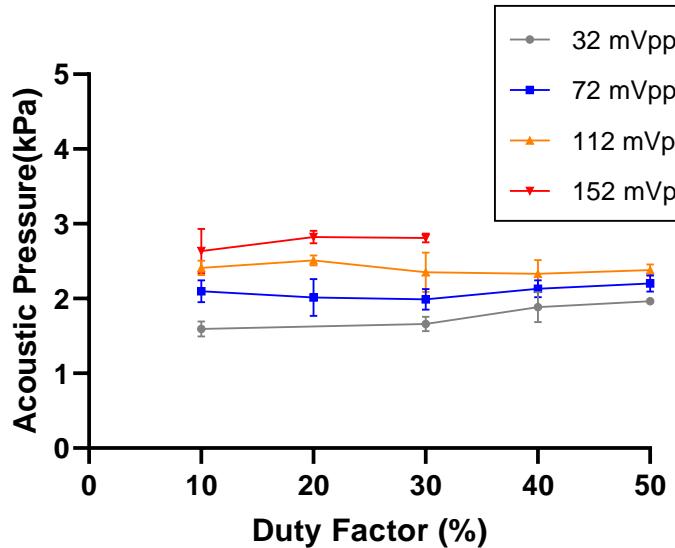


圖 53、不同輸入電壓與佔空比之聲壓結果圖

根據水聽筒量測出的結果得到圖 53，其展示了在不同輸入電壓與佔空比的條件下，聲壓的變化趨勢。橫軸為佔空比(Duty Factor, %)，縱軸為聲壓(Acoustic Pressure [kPa])，不同顏色曲線對應於不同的輸入電壓(32-152mVpp)。整體而言，輸入電壓越高，造成的聲壓較大，這符合聲壓與輸入功率呈正相關的概念。此外，在相同輸入電壓下，改變佔空比不會影響聲壓的輸出。

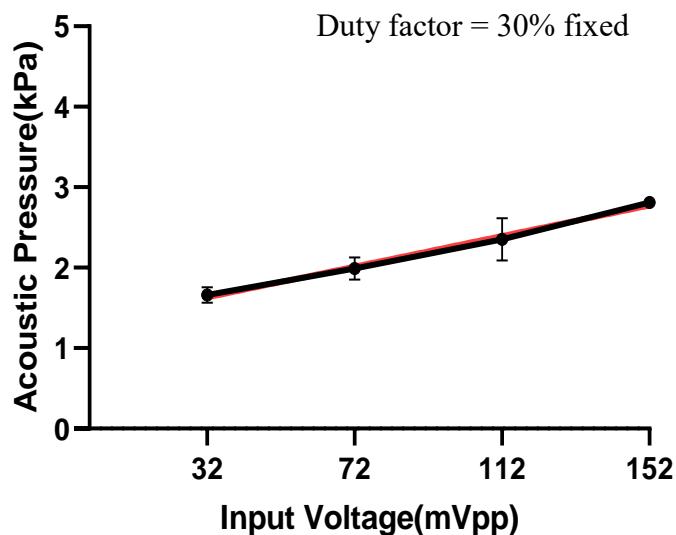


圖 54、固定佔空比為 30%，不同輸入電壓之聲壓結果圖

為了探討聲壓隨輸入電壓變化的關係，將佔空比固定為 30%，作出圖 54。橫軸為輸入電壓[mVpp]，縱軸為聲壓[kPa]，數據顯示聲壓隨輸入電壓增加而增大，並且呈線性關係，決定系數為 0.9914。



綜合來看，超音波微管裝置的聲壓僅受輸入電壓的影響，而非佔空比所以要提高聲壓，則需要提高輸入電壓而非提高佔空比，而且在固定佔空比的條件下，輸入電壓與聲壓呈線性關係。

4-2 超音波微管之聲流量測結果

超音波微管裝置產生的其中一項機械力為剪應力(shear force)，該力為超音波經玻璃傳導到針尖時，洩漏至液體的洩漏萊姆波(Leaky Lamb waves)所造成的流場作用在細胞的力。根據剪應力的公式，計算該力需要考量流速，所以流場的速度在本研究中占有重要的意義。

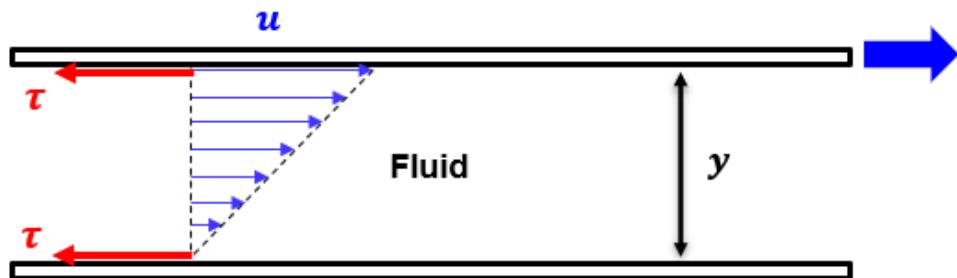


圖 55、流體剪應力示意圖

首先介紹流體剪應力，如圖 55 所示，在一對平行板之間充滿流體，當上方的板子向右移動時，由於流體的黏滯性(Viscosity)，流體會受到剪應力的影響而隨之流動，形成速度梯度。靠近移動板的流體速度與板子的速度相同，而靠近靜止板的流體速度則為零。這符合不滑移條件(No-slip condition)，即流體在與固體表面接觸時，其速度會與固體一致，因為流體與固體表面之間的分子作用力大於流體內部的內聚力，因此流體無法在固體表面發生相對滑移。

當上板移動時，它會透過黏滯力帶動鄰近的流體層，並逐層傳遞影響，使得流體的速度分佈呈現線性梯度。然而，儘管上板與下板的運動狀態不同，為了維持系統的力學平衡，流體對下板施加的剪應力與對上板的剪應力大小相等但方向相反，這確保了整體系統不會因內部力矩而產生額外的運動。

流體剪應力的公式如下：

$$\tau = \mu \frac{du}{dy} [\text{Pa}]$$

其中， τ 代表剪應力，單位是帕[Pa]； du 代表流速，單位是每秒公尺[m/s]； dy 代表深度，單位是公尺[m]。 μ 代表動黏度係數(Kinematic viscosity)，單位為 [mPa·s]，物理意義是物體流動時的內部摩擦特性，而相對應的靜黏度 (Absolute viscosity) 則表示流體在靜止時的黏滯度。

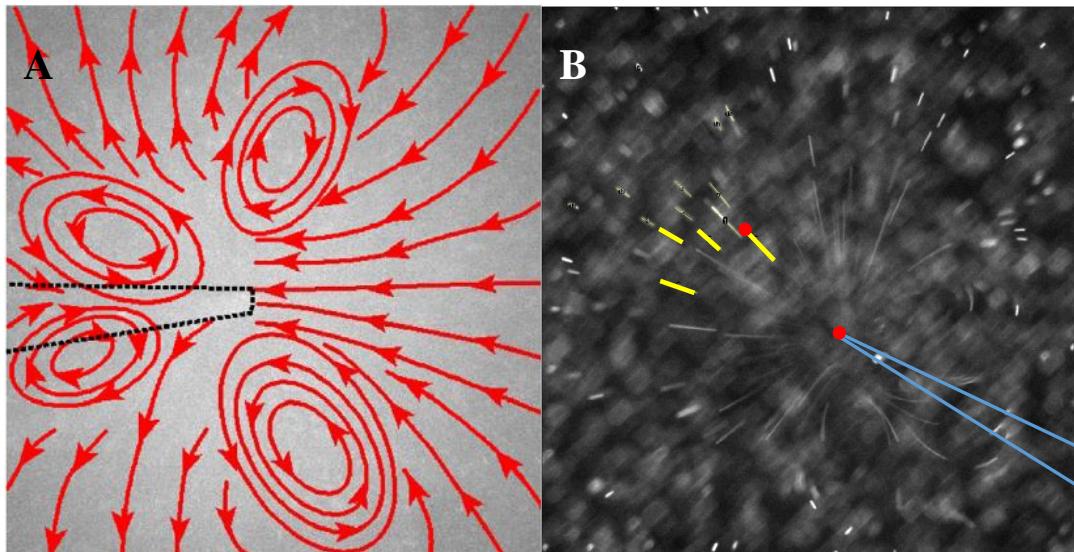


圖 56、超音波微管裝置產生之流場示意圖[39]與實際流場光軌圖

本研究每次刺激細胞的位置都固定；先使用顯微鏡盡量對焦在玻片底部，將玻璃微管往下調整至尖端微微抵到底部，確認針尖位置在整個 chamber 的底部，接著調整細調節輪，將細調節輪往上轉十三小格，根據校正一格約提升 $3\mu\text{m}$ 的距離，總共把針尖調高至約 $39\mu\text{m}$ 的高度。因而在量測聲流時，玻璃微管的高度比照射細胞時的實驗架設。

根據先前實驗室發表的論文結果，如圖 56(A)所示，只有在針尖前的位置其流場是偏線性的模式，而左右與下方則是有不規則的紊流，所以在標示光軌時只標示在針尖正前方的光軌，如圖 56(B)所示。量測方法如同前面 3-1-2 小節所述，最後得到的結果為螢光珠與針尖在不同距離時的速度變化。

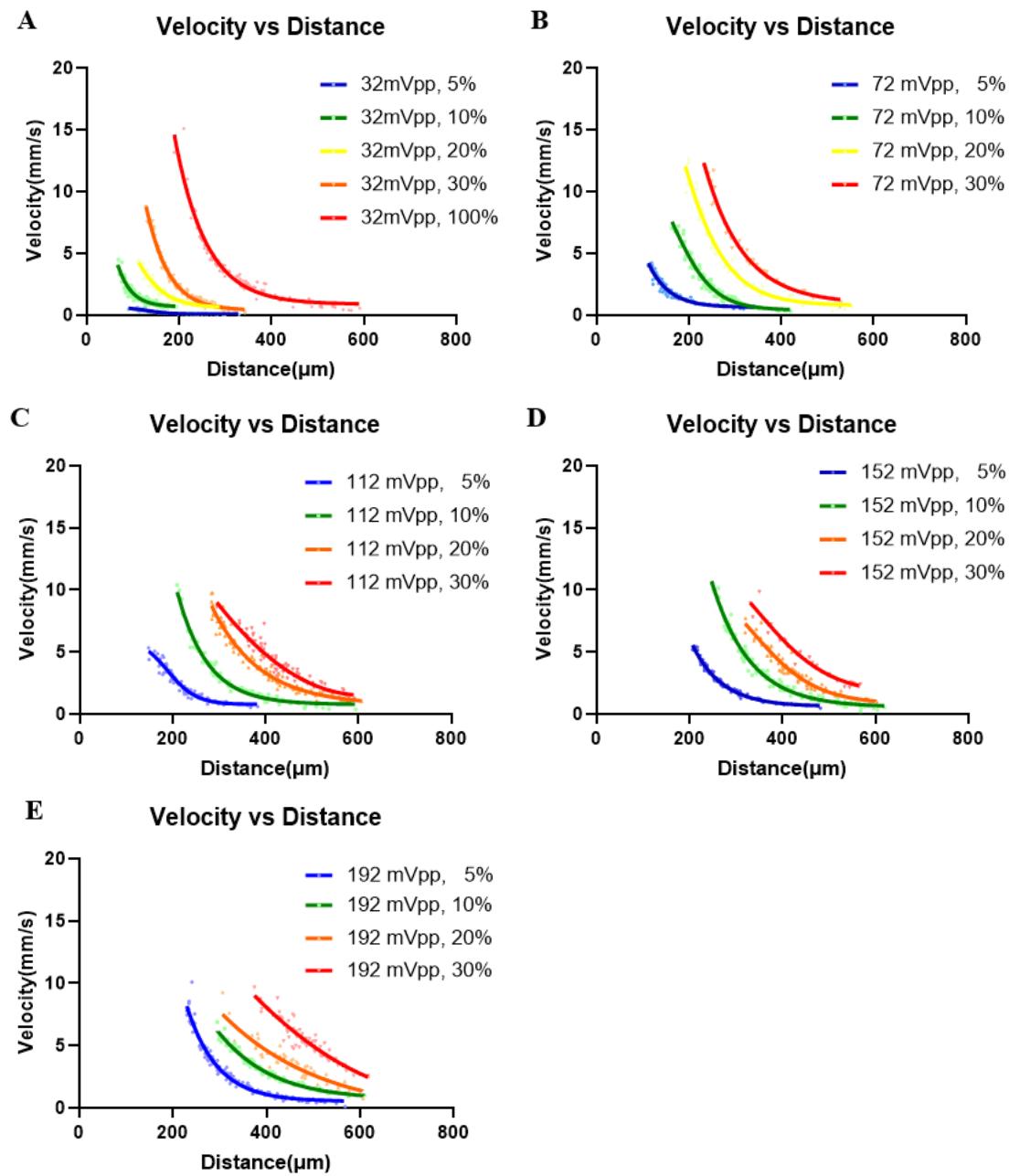


圖 57、螢光珠與針尖不同距離之下，不同力學模組之速度關係圖

不同的輸入電壓(32-192mVpp)與佔空比(5-30%)可以排列出數種力學模組，將這些力學模組所產生的超音波流場利用螢光珠呈現，並拉光軌與計算出流速後作圖，如圖 57 所示。圖 57(A-E)分別表示輸入電壓由小排到大時，不同佔空比的情況下，細胞距離針尖的速度關係。可以發現針尖距離細胞越遠，其流速越慢，這可以呼應一般直觀的物理現象；固定輸入電壓下，提高佔空比會使整體流速上升。

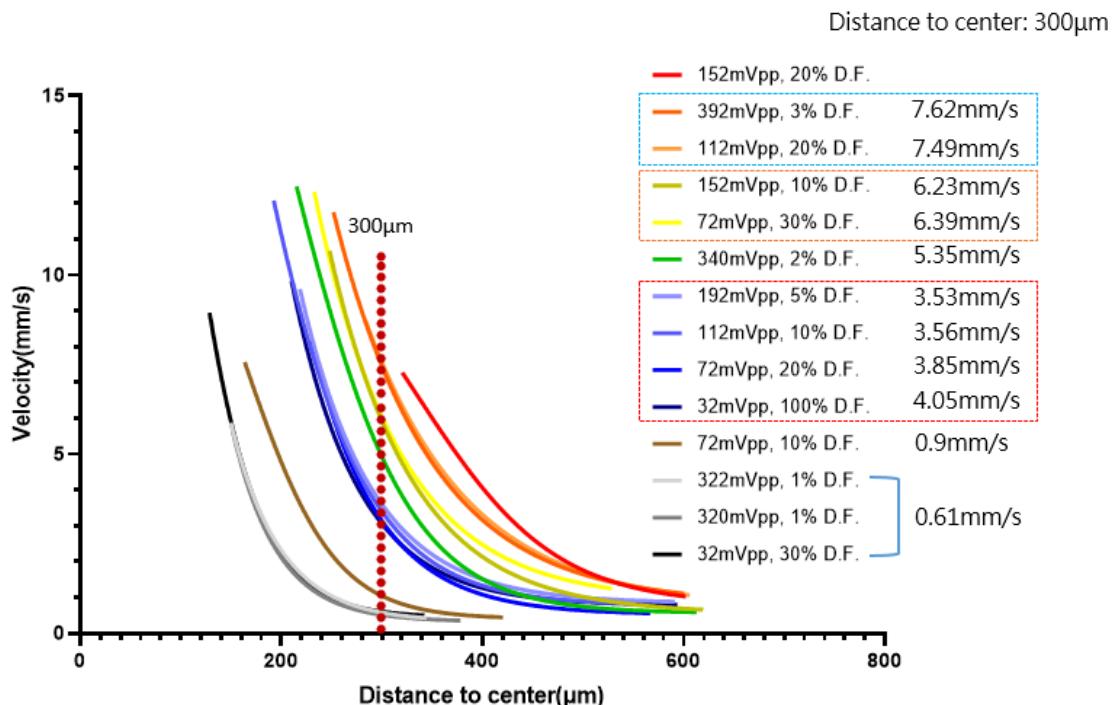


圖 58、細胞實驗使用之力學模組流速圖

根據圖 58 的數據，細胞實驗中所用到的超音波參數如下表 5 至表 7 所示，可以依速度大致分為三個群集：高速、中速、低速。高速中 392mVpp, 3% D.F. 與 112mVpp, 20% D.F. 這兩筆數據的曲線重疊所以定義為流速相同，在 300μm 的距離下流速約 7.56mm/s，同理 152 mVpp, 10% D.F. 與 72mVpp, 30% D.F.兩者流速也一樣，在 300μm 的距離下流速約 6.31mm/s；中速則為 192mVpp, 5% D.F.、112mVpp, 10% D.F.、72mVpp, 20% D.F.與 32mVpp, 100% D.F.，在 300μm 的距離下流速約 3.75mm/s；低速則為 322mVpp, 1% D.F.、320mVpp, 1% D.F.與 32mVpp, 30% D.F.，在 300μm 的距離下流速約 0.61mm/s。

表 5、力學模組與流速關係(高速組別，在距離 300μm 處)

力學模組	152mVpp, 20% D.F.	392mVpp, 3% D.F.	112mVpp, 20% D.F.	152mVpp, 10% D.F.	72mVpp, 30% D.F.
流速	10.07mm/s	7.62mm/s	7.49mm/s	6.23mm/s	6.39mm/s

表 6、力學模組與流速關係(中速組別，在距離 300μm 處)

力學模組	340mVpp, 2% D.F.	192mVpp, 5% D.F.	112mVpp, 10% D.F.	72mVpp, 20% D.F.	32mVpp, 100% D.F.
流速	5.35mm/s	3.53mm/s	3.56mm/s	3.85mm/s	4.05mm/s

表 7、力學模組與流速關係(低速組別，在距離 300μm 處)

力學模組	72mVpp, 10% D.F.	322mVpp, 1% D.F.	320mVpp, 1% D.F.	32mVpp, 30% D.F.
流速	0.9mm/s		0.61mm/s	

表格中相似的速度用相同顏色標記，最後的組別(灰色區域)因為流速實在太慢，故用相同流速表示，沒有個別計算出速度。

在實驗中，針尖到細胞的高度為 24μm，動黏滯系數為 0.6958 mPa·s，再搭配上述的流速，根據剪應力的公式可以得到剪應力大小。計算結果如圖 59 所示。

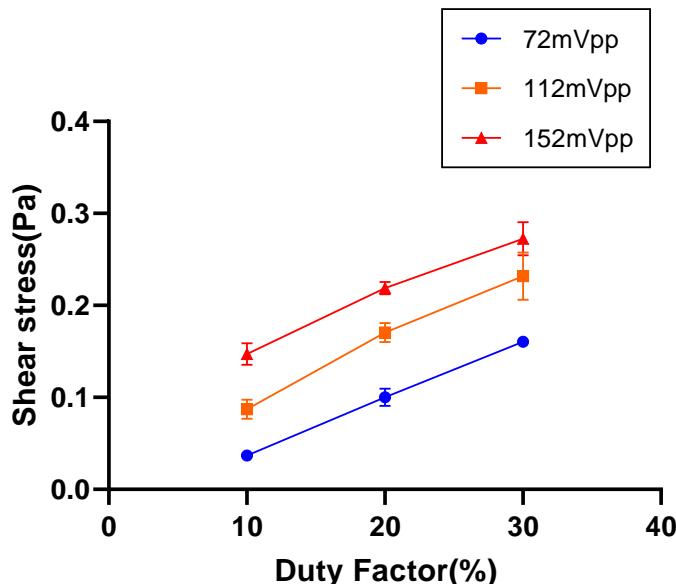


圖 59、不同輸入電壓與佔空比之剪應力結果圖

圖 59 中由下而上分別為 72mVpp、112mVpp 與 152mVpp 不同佔空比的曲線，根據線性回歸的結果，三者的決定系數分別為 0.9998、0.9923 與 0.9934，有極高的線性關係。不論是輸入電壓提高，抑或是佔空比提高，剪應力皆會提高，表示剪應力受輸入電壓與佔空比調控。

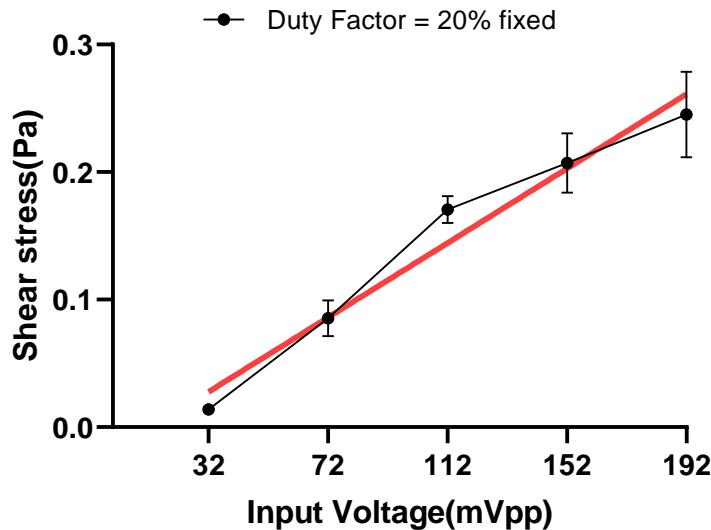


圖 60、固定佔空比，輸入電壓與剪應力關係圖

圖 60 為在固定佔空比 30% 的條件下，不同輸入電壓[mVpp]與剪應力[Pa]之間的變化。根據結果，固定佔空比，剪應力會隨著輸入電壓的增加而上升，而且線性回歸的決定系數為 0.9643，顯示出輸入電壓對於剪應力的有高度線性正相關。

綜合 4-1 與 4-2 小節超音波微管物理性質的結果，輸入電壓為主要影響聲壓的因素，而輸入電壓與佔空比皆會影響剪應力；由於量測設備架設的限制，實驗真實的聲壓、聲流應大於量測的聲壓，原因如 1-5 研究限制所述；距離與聲壓、剪應力為負相關，可以將超音波微管尖端視為點波源。



4-3 小鼠神經母細胞瘤之鈣離子反應實驗結果

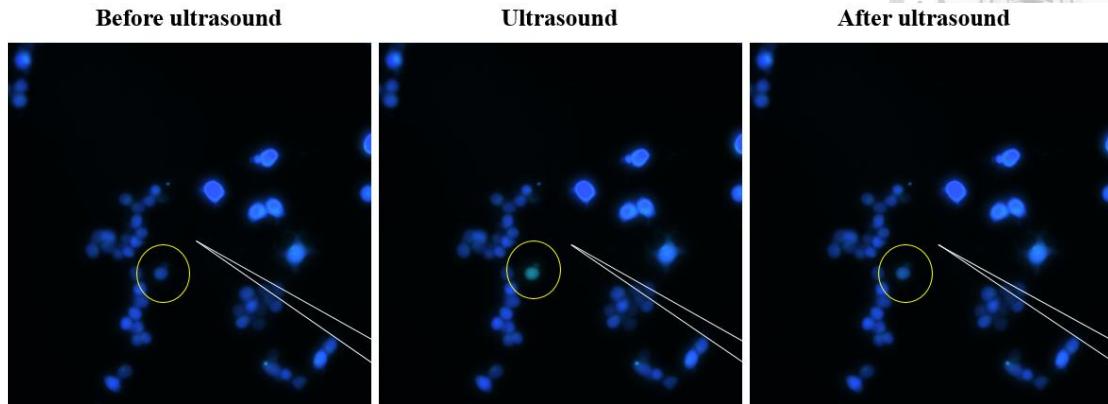


圖 61、N2a 細胞鈣離子影像螢光變化圖

若 N2a 細胞受超音波作用並成功開啟離子通道的話，細胞外鈣離子會進入細胞內與 Fura-2 結合，經 340nm 與 380nm 的光激發後，會造成波長 340nm 的曲線 Intensity 上升而波長 380nm 的曲線 Intensity 下降。藉由 3-4 小節提到的分析方法， $\Delta F/F_0$ 為螢光變化的評判標準，若圖 61 中的螢光變化越明顯，則 $\Delta F/F_0$ 的值也會越高。

4-3-1 N2a 細胞受力學模組刺激之反應結果

首先測試 N2a 細胞在何種力學模組開始可以誘發鈣離子反應，所以先從參數 32mVpp, 10% D.F. 開始刺激，接著往上調整佔空比至 30%，再搭配過去 N2a 實驗中螢光變化較大的 72mVpp, 10% 與 20% D.F.，透過 $\Delta F/F_0$ 來評估鈣離子反應。根據能量正比於輸入電壓的平方乘以佔空比，所以依能量高低由小到大排列，如圖 62 所示。

本實驗採用單因子變異數分析(One-Way ANOVA)進行生物統計分析。在各組實驗條件中，唯一的變因為超音波參數設定。統計分析結果會產生 p 值(p value)，當 p 值小於 0.05 時，表示組間存在顯著差異，並以星號(*)來標示。星號數量越多，代表 p 值越小，顯著性越高。

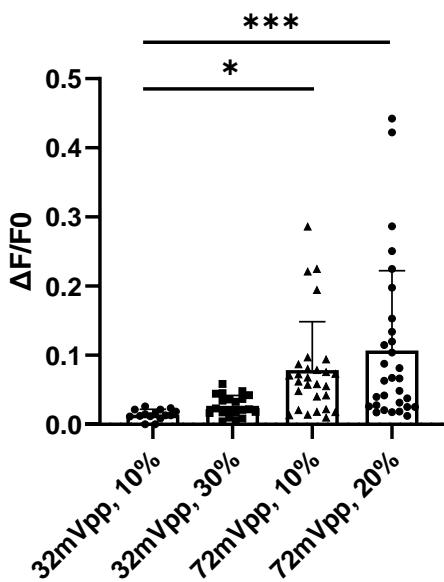


圖 62、不同超音波力學模組刺激下 N2a 細胞的鈣離子反應

圖 62 顯示不同超音波刺激參數對 N2a 鈣離子反應強度的影響，以點狀圖顯示每組條件下的細胞個體差異，柱狀圖則表示平均值與標準差。從圖 62 中可觀察到，當刺激的能量指標提高時，N2a 的 $\Delta F/F_0$ 也隨之上升，顯示鈣離子反應與能量呈現正相關。低能量條件(如 32 mVpp, 10% D.F.)產生的反應相對微弱，而高能量條件(如 72 mVpp, 20% D.F.)產生顯著更強的反應。統計檢定結果進一步支持此趨勢。參數 72 mVpp, 20% D.F. 與參數 32 mVpp, 10% D.F.相比，呈現高度顯著差異($p < 0.0001$)，而與 72 mVpp, 10% D.F.也顯示出顯著差異($p < 0.05$)。

根據聲壓聲流測量結果，72mVpp, 10% D.F. (能量：0.03mW/cm²，聲壓：2.1kPa，聲流剪應力：0.05Pa)為最低可以誘發鈣離子反應的力學模組。由於不一定聲壓超過 2.1kPa 且剪應力超過 0.05Pa 時，N2a 細胞才可被刺激並產生鈣離子反應，有可能聲壓比 2.1kPa 弱，剪應力比 0.05Pa 強，如 32mVpp, 100% (能量：0.07mW/cm²，聲壓：1.7kPa，聲流剪應力：0.11Pa)也會誘發鈣離子反應，所以推測能量才是誘發鈣離子反應的關鍵因素。

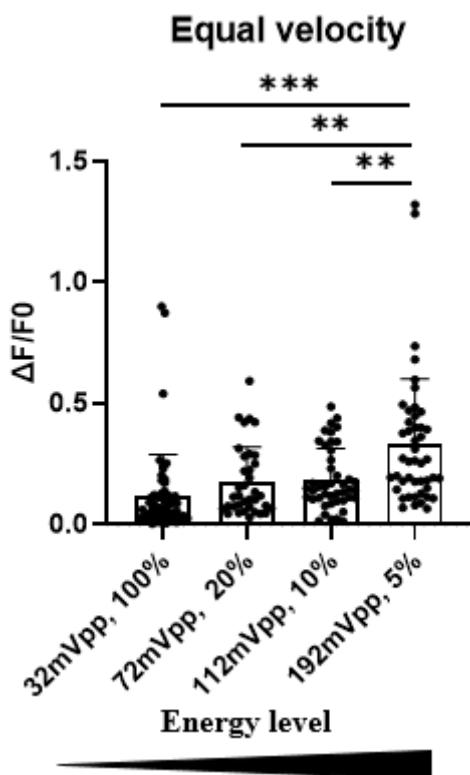


圖 63、相同流速下 N2a 鈣離子反應結果圖

證實誘發 N2a 細胞有鈣離子反應是在超音波參數 72mVpp, 10% D.F.之後，下一步則測試在流速一樣，也就是剪應力一樣的情況下，N2a 細胞會對不同的力學模組有怎樣的反應。我們利用表二中提到的中速組別，拿來作固定流速的超音波參數，該力學模組為 192mVpp, 5% D.F.、112mVpp, 10% D.F.、72mVpp, 20% D.F.與 32mVpp, 100% D.F.，流速大約為 3.75 mm/s，結果如圖 63 所示，橫軸不同的力學模組是依能量遞增的趨勢排列，縱軸表示 $\Delta F/F_0$ 的變化量，即鈣離子反應的大小。可以觀察到，隨著輸入能量的增加， $\Delta F/F_0$ 亦呈現增加的趨勢，特別是在 192mVpp, 5% D.F.的條件下，螢光變化的分佈範圍最廣，且平均值最高。這表明，即使速度相同，較高的能量輸入會導致更顯著的螢光變化，這也與聲壓的影響有關。

由於能量因素為本實驗中重要的考量，所以便希望能找到不同的力學模組但相同的能量，計算方式利用下列公式。N2a 細胞實驗使用的參數為低輸入電壓，但相對高佔空比，所以為了得到一樣的能量則要推算成高輸入電壓與低佔空比，此外也可以利用高輸入電壓與低輸入電壓的不同作為後續實驗的參數設定，換算結果如表 8 所示。

能量(E) \propto 輸入電壓(Input voltage) $^2 \times$ 佔空比(Duty factor)

表 8、不同力學模組之能量指標

能量指標 (Energy index)	mVpp, % D.F. (low voltage)	mVpp, % D.F. (high voltage)
102.4k	32,100	320, 1
103.68k	72, 20	322, 1
231.2k	152, 10	340, 2
250.88k	112, 20	354, 2
462.08k	152, 20	392, 3

然而這個能量指標只是實驗時初步判斷能量高低的簡便工具，算出實際能量的公式如下：

$$I_{SATA} = \frac{Prms^2}{\rho c} \times D.F.$$

其中， $Prms$ 為量測出來的聲壓、 $D.F.$ 為佔空比、 ρ 與 c 分別為水的密度與聲音在水中傳遞的速度，分別是 1000 kg/m^3 與 1455 m/s 。

表 9、不同力學模組之能量推算表

$I_{SATA} [\text{mW/cm}^2]$	mVpp, % D.F. (low voltage)	mVpp, % D.F. (high voltage)
0.01	32,100	320, 1
0.05	72, 20	322, 1
0.06	152, 10	340, 2
0.08	112, 20	354, 2
0.11	152, 20	392, 3

刺激參數利用表 9 的能量數據，以低輸入電壓(32mVpp)，但最高佔空比(100%)表示為剪應力(Shear force)主導的力學模組，而最高輸入電壓(320Vpp)，但最低佔空比(1%)為壓縮力(Compression force)主導的力學模組，兩者為相同能量的超音波參數，得到的結果如圖 64 所示。

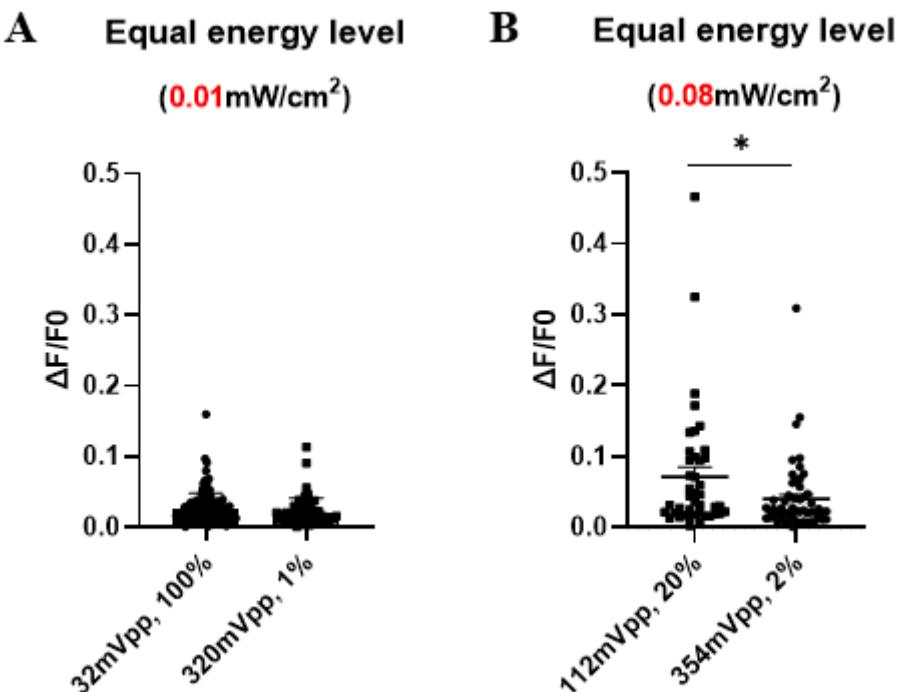


圖 64、聲壓聲流主導刺激螢光比較圖

從圖 64(A)可以觀察到，在能量相同的情況下，32mVpp, 100% D.F. (聲壓 1.7kPa、剪應力 0.11Pa)與 320 mVpp, 1% D.F. (聲壓 3.5kPa、剪應力 0.02Pa)並無顯著差異。趨勢上來看，佔空比 100%的那組力學模組表示雖然低電壓但仍持續刺激；相對於高電壓的短時間脈衝刺激(佔空比 1%)，整體螢光變化有略高的趨勢，但無顯著性。若換成較高能量的參數，如圖 64(B)得到的數據作 one-way ANOVA 的結果，112mVpp, 20% D.F. (聲壓 2.5kPa、剪應力 0.19Pa)與 354mVpp, 2% D.F.(聲壓 5.5kPa、剪應力 0.06 Pa)那組力學模組有一星($p<0.05$)的顯著差異，綜合圖 64 的結果，能量的因素還是主要影響 N2a 細胞鈣離子反應的條件。

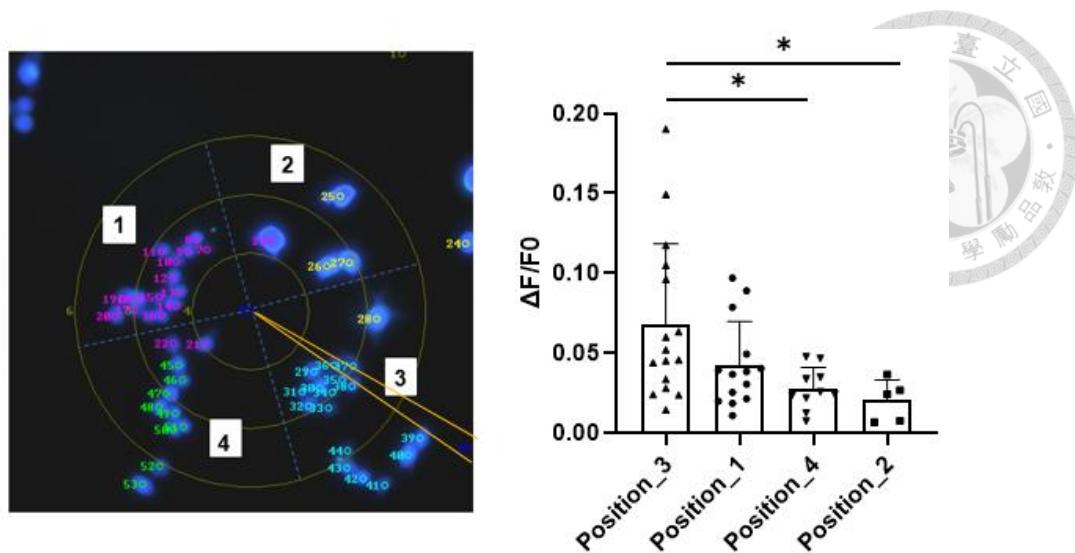


圖 65、超音波微管作用在不同位置之螢光比較圖

有鑑於圖 63 與圖 64 中 $\Delta F/F_0$ 分佈有不均的現象，除了可能是每顆細胞的個體差異以外，其中一個因素可能為位置的考量。根據實驗設計，將視野中細胞分布的位置分成四格區域(圖 65 左)，以數字標示 1 到 4 分別表示針前、針右側、針下與針左側。結果如圖 65 右側所示，超音波刺激使用的力學模組為 152mVpp, 20% D.F. (聲壓 2.8kPa、剪應力 0.22Pa)，觀察到針下的位置造成的螢光反應最好，其次是針前，最後是真的右側與左側，不過由於針的下方流場較紊亂，所以在計算流場大小時會採取 position_1 這個區域。

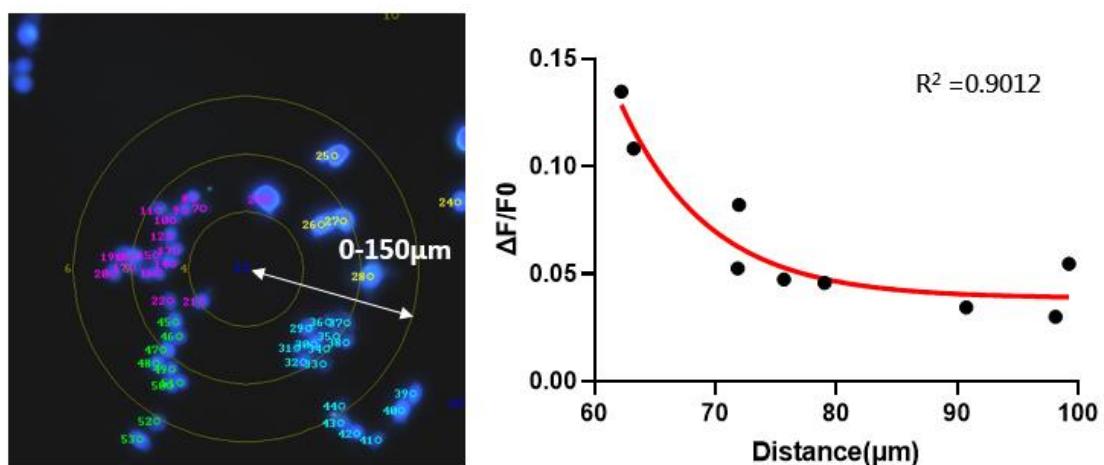


圖 66、不同距離之螢光比較圖

取 position_1 為分析區域，力學模組一樣為 152mVpp, 20% D.F. (聲壓 2.8kPa、剪應力 0.22Pa)，距離為從針尖往外 150μm，得到結果如圖 66 所示。隨著距離越遠，所受的壓力與剪應力也越小，螢光變化可想而知也變小，curve fitting 的結果，數據大致以 sigmoid 的趨勢下降。

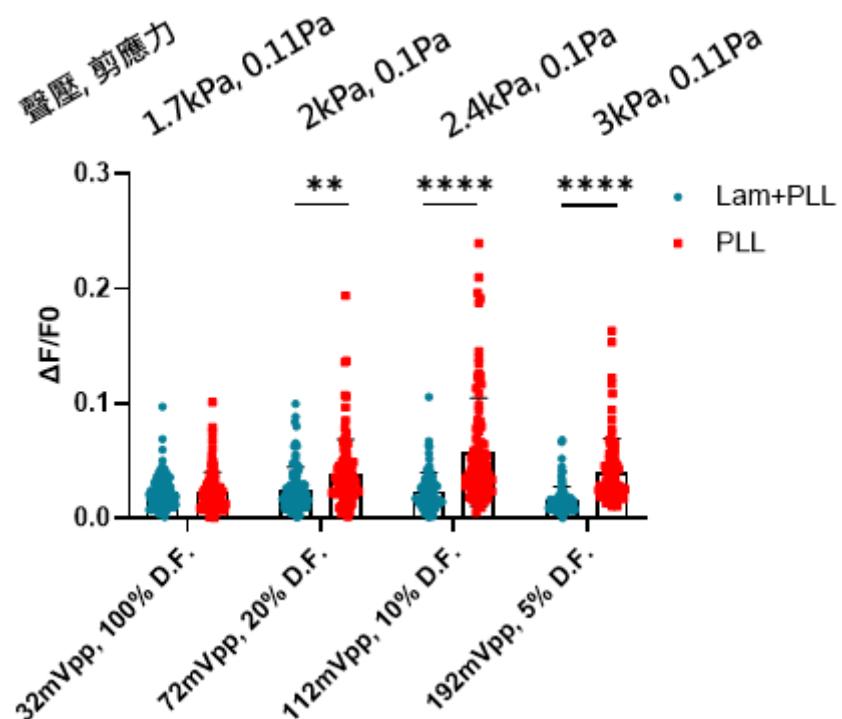


圖 67、不同 ECM 之螢光比較圖

本實驗 coating 的 ECM 為 Laminin(Lam)加 Poly-L-Lysine(PLL)，相對於單純 Poly-L-Lysine，它的吸附能力更好，所以讓細胞不易扯動，可以避免讓細胞有過度形變。不過也試著使用單純靠電性吸附的 PLL 做實驗，結果如圖 67 所示。在相同超音波條件下，PLL 上的細胞的反應顯著高於 Lam+PLL 的細胞，尤其在 72、112 與 192 mVpp 條件下達二星或四星的顯著($p < 0.01$ 或更低)。此結果指出，基質條件會明顯影響細胞對超音波刺激的反應能力，PLL 可能因吸附力較沒那麼強造成細胞有過多的扯動，使細胞在超音波產生的機械力下更容易活化，產生較強的鈣離子反應。這也進一步暗示附著環境，在超音波調控神經的實驗中可能扮演關鍵角色。

4-3-2 檢驗 N2a 細胞膜上離子通道實驗結果



根據 3-2-2 小節圖 45 的結果，N2a 可以受到約 10 次的連續刺激，由於可重複刺激的特性，可以運用在藥理實驗上，實驗的流程與使用的藥劑如圖 46、47 所示。首先先透過 EGTA 測試鈣離子是由細胞外還是細胞內，再將實驗用的 HBSS 有沒有加入 P/S (Penicillin/Streptomycin) 做為一個測試有沒有 Piezol1 的依據。結果如圖 68 所示。

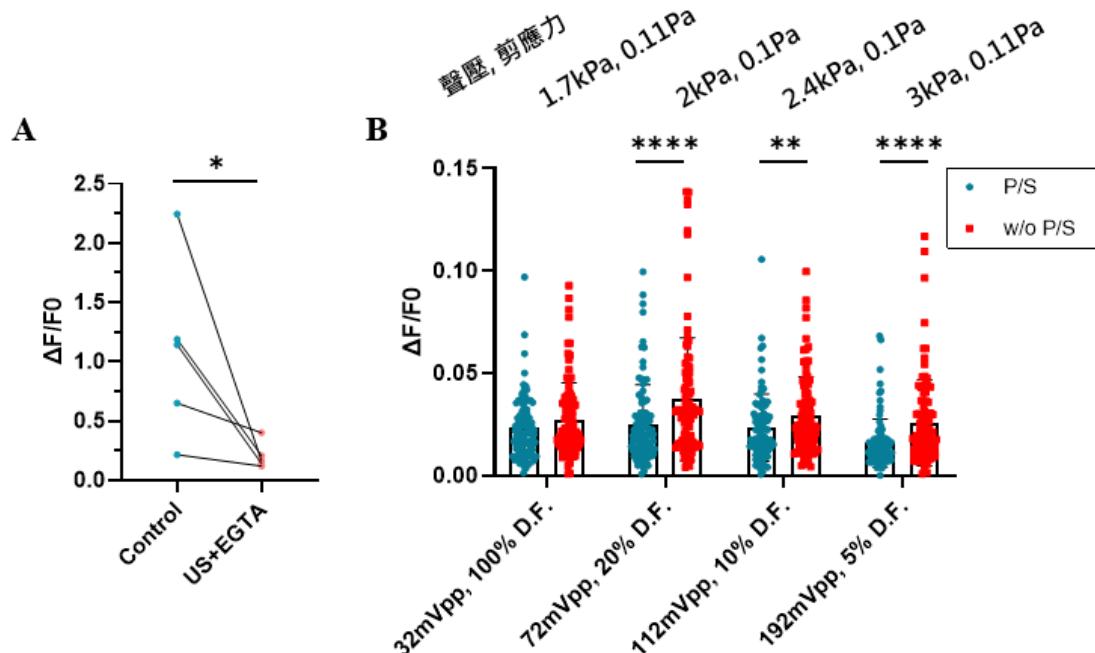


圖 68、N2a 經不同試劑處理後受超音波刺激之螢光變化

在 HBSS 溶液中加入 EGTA 把鈣離子螯合掉，如果鈣離子是由細胞外進入細胞內的話，會因為 HBSS 溶液沒鈣離子，而沒辦法與細胞內的 Fura-2 結合，所以沒有螢光變化。實驗使用的超音波力學模組為 112mVpp, 10% D.F. (聲壓 2.4kPa、剪應力 0.1Pa)，使用的 EGTA 濃度為 2mM，使用的統計方法為 student t-test。根據圖 68(A)結果，2mM 的 EGTA 有抑制的效果(p 值小於 0.05)，證實超音波誘導的鈣離子濃度變化是由鈣離子由外而內流所造成的。

Penicillin/Streptomycin (P/S)是我們在實驗中，因為不是在一個無菌的環境下，為了避免細菌的汙染，會添加的一種抗生素(antibiotics)，當中的 Streptomycin 為

stretch activated channels (SACs)的 blocker，而 Piezo 是一種 SAC[44]，N2a 也有表現 Piezol1，雖然說不是專一性的抑制，但經超音波刺激後螢光變化有下降的話，可以推測說 Piezol1 有參與鈣離子反應。根據圖 68(B)的結果，在有 P/S 的環境中螢光變化有顯著下降($p<0.001$)，而且在力學模組聲壓提高的情況下，效果更顯著，推測 N2a 有 Piezol1 參與反應，而且可以受低強度的超音波刺激。

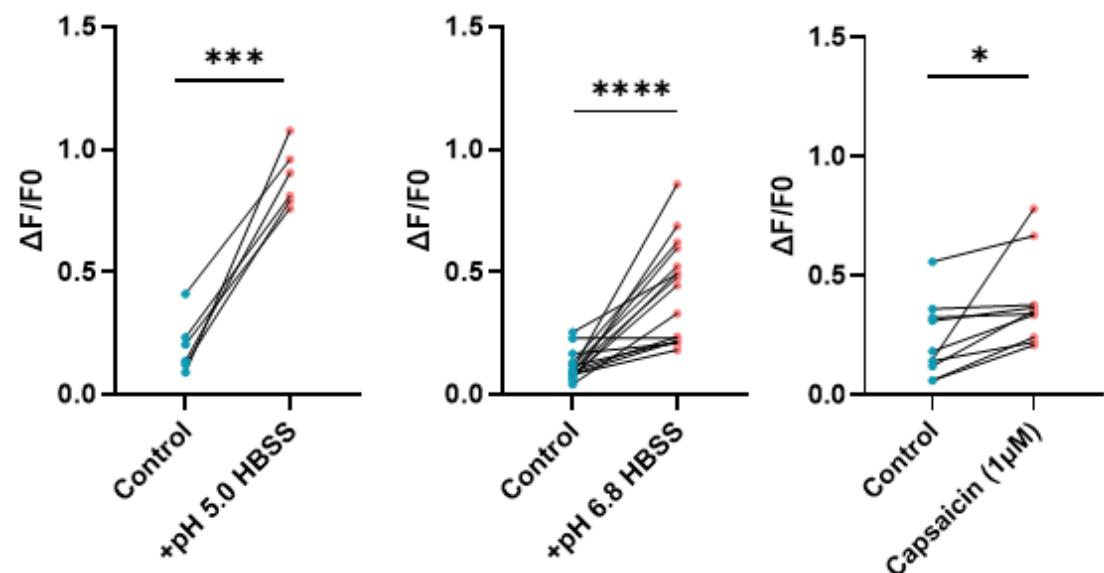


圖 69、N2a 經不同刺激劑處理之螢光變化圖

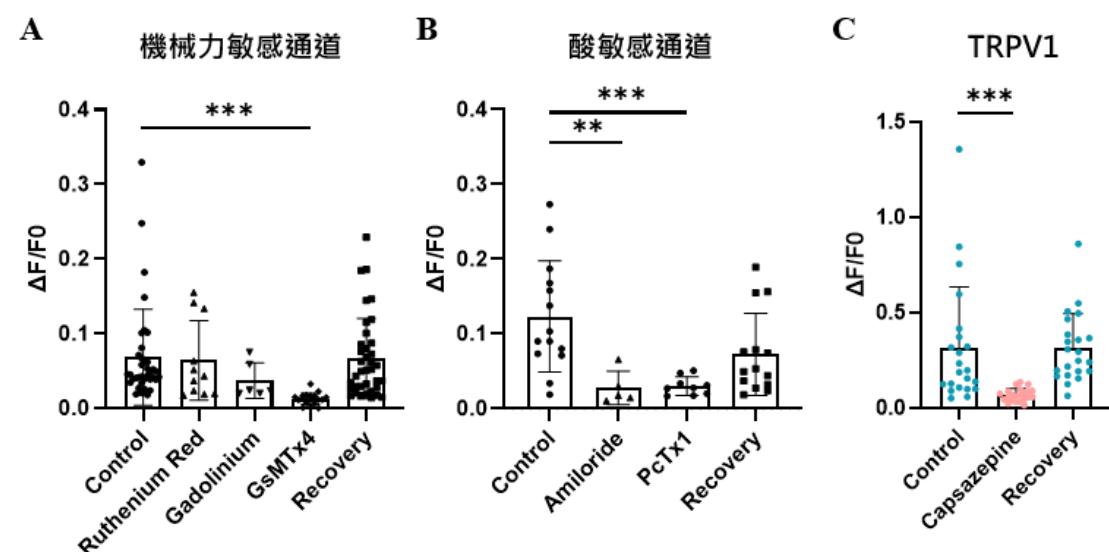


圖 70、N2a 經不同抑制劑處理之螢光變化圖

接著加入不同的刺激劑觀察 N2a 細胞有哪些通道包含其中，根據圖 69 結果，pH5.0 與 pH6.8 的酸性溶液皆造成螢光變化有上升，pH5.0 與 pH6.8 的溶液由中研院陳志成老師實驗室證實分別對酸敏感通道中的整個酸敏感通道家族(ASICs family)與 ASIC1a 有興奮的效果，由於先前研究提到 ASIC1a 在鈣離子反應中占有重要角色，故 pH6.8 的溶液對 N2a 有鈣離子反應表示確定有 ASIC1a channel 表現；此外，由於 TRPV1 是一種表現在感覺神經元上的電壓敏感性離子通道，其作用也受到研究。辣椒素(Capsaicin, CAP)為 TRPV1 的刺激劑，將 CAP 加入 HBSS 後能使 N2a 有鈣離子反應，表示細胞有該離子通道。

加入抑制劑再施打超音波的結果如圖 70 所示，使用的統計方法為 one-way ANOVA。圖 70(A)的藥劑對機械力敏感的通道有抑制的效果，Ruthenium Red 與 Gadolinium 的抑制效果都沒有顯著，但加入對 Piezo1/2 有專一性抑制的 GsMTx4 再給予超音波後，螢光變化有三顆星的顯著下降，但 N2a 中較少表現 Piezo2，再加上先前實驗結果，所以可以推測 Piezo1 對超音波敏感且參與鈣離子反應。圖 70(B)的藥劑對酸敏感的通道有抑制的效果，加入 Amiloride 與 PcTx1 再施打超音波後，螢光變化皆有顯著下降，其中後者的顯著性比前者更高，表示 ASIC1a 是一個對機械力敏感也是參與鈣離子反應的通道蛋白。最後，圖 70(C)的藥劑對 TRPV1 有抑制的效果，結果也有顯著差異，而且在洗去藥劑後，反應可恢復(Recovery)，TRPV1 在 N2a 參與鈣離子反應而且也對超音波敏感。

4-3-3 基因編輯 N2a 細胞受力學模組刺激之反應結果

由於發現 ASIC1a channel 可能為關鍵的離子通道，我們便想用基因編輯的方式將 ASIC1a 拿掉，觀察該通道是否對鈣離子反應有變化。提供 AISC1a knockout N2a 細胞的為中研院生醫所陳志成老師實驗室，首先會先進行電生理實驗，分別將 pH5.0 與 pH6.8 的溶液加 wild type 的 N2a 與 AISC1a 的 N2a，並量測細胞膜電位大小，若有 Inward current 表示通道有被打開。

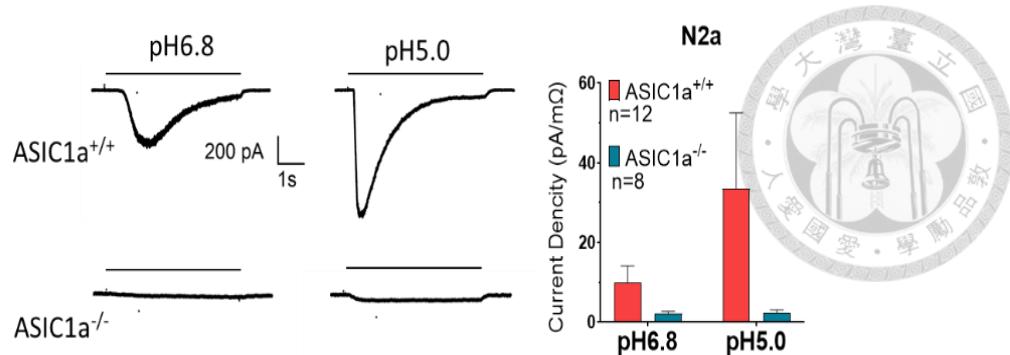


圖 71、不同酸鹼度溶液對不同型態 N2a 的 patch clamp 結果

根據圖 71 的結果，將 ASIC1a channel 拿掉後，不論是 pH6.8 或是 pH5.0 的溶液對 N2a 細胞皆有很低的 Current density，表示 ASIC1a channel 確實有成功被 knockout。

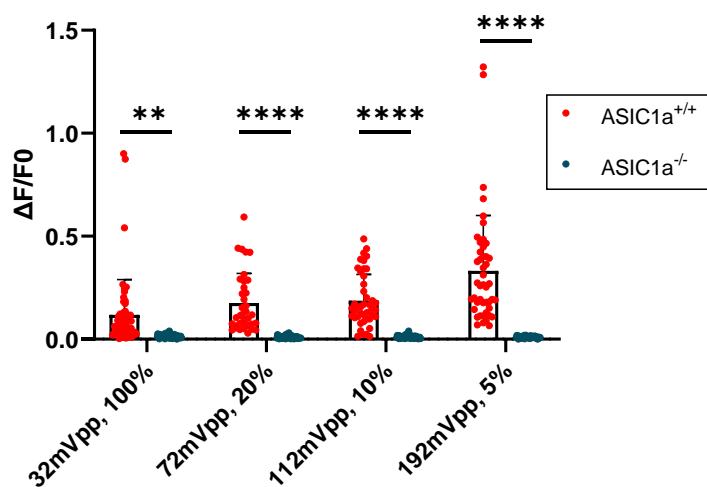


圖 72、ASIC1a knockout N2a 受不同力學模組結果

圖 72 結果中，在不同的力學模組下，ASIC1a knockout 與 wild type 相比，前者的螢光變化強度有顯著下降($p<0.0001$)，利用基因編輯的方式再次確認 ASIC1a 確實對於 N2a 鈣離子反應有重要的關係。

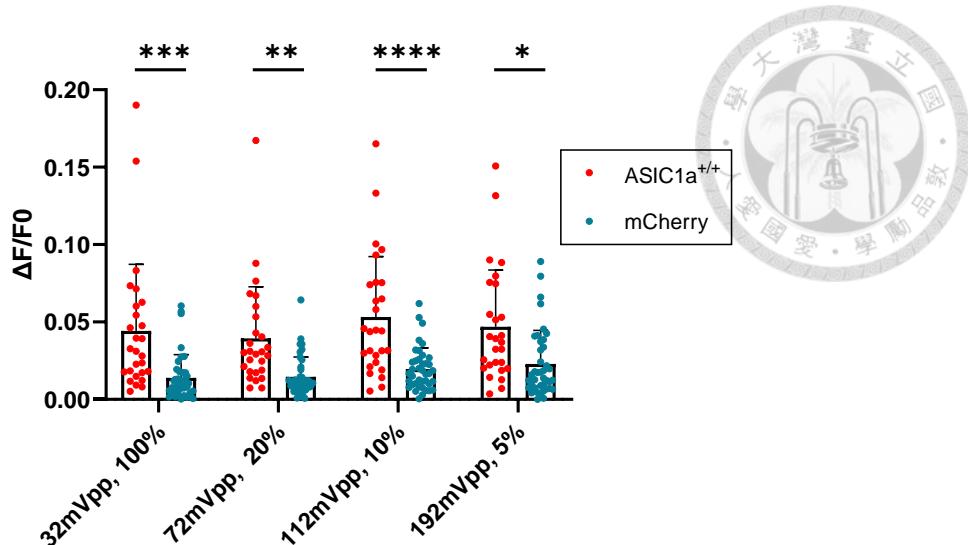


圖 73、N2a 細胞轉染 ASIC1a 受超音波刺激鈣離子反應

圖 73 中的 mCherry 組表示 ASIC1a knockout 的 N2a，轉染進去的載體中沒有表現 ASIC1a 的基因片段，僅有表現 mCherry 的，理論上細胞型態還是如同 ASIC1a knockout 的表現一樣；而 ASIC1a^{+/+}組則是轉染進去的載體中有表現 ASIC1a 的基因片段，也有表現 mCherry。結果顯示兩者不論在何種力學模組皆有顯著差異，再次驗證 ASIC1a 在 N2a 參與鈣離子反應的重要性。

4-4 小鼠背根神經節(ASIC1a^{+/+})之鈣離子反應實驗結果

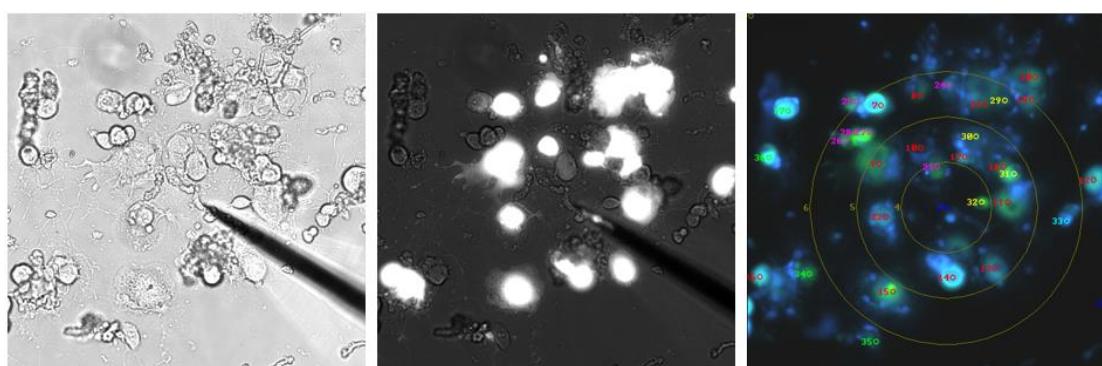


圖 74、背根神經節平光圖、Tdtomato 與 Fura2 染色

DRG 細胞是由中研院生醫所莊育嘉博士從小鼠身上取下再培養，該小鼠的 DRG 因為 loxP-Cre 技術，已經有 Tdtomato 做基因標記了，所以如果有 ASIC1a 的 DRG 細胞會被激發產生紅光(圖 74)，紅光表示為 wildtype 的 DRG。

首先測試 DRG 細胞在何種力學模組開始可以誘發鈣離子反應，所以先從參數 72mVpp, 10% D.F. (能量: 0.03mW/cm²、聲壓: 2.1kPa、剪應力: 0.05Pa) 開始刺激，因為這是在 N2a 中可以誘發反應的參數，接著往上調整輸入電壓至 112mVpp，再到 152mVpp。透過 $\Delta F/F_0$ 來評估鈣離子反應，使用 one-way ANOVA 進行統計，結果如圖 75 所示。

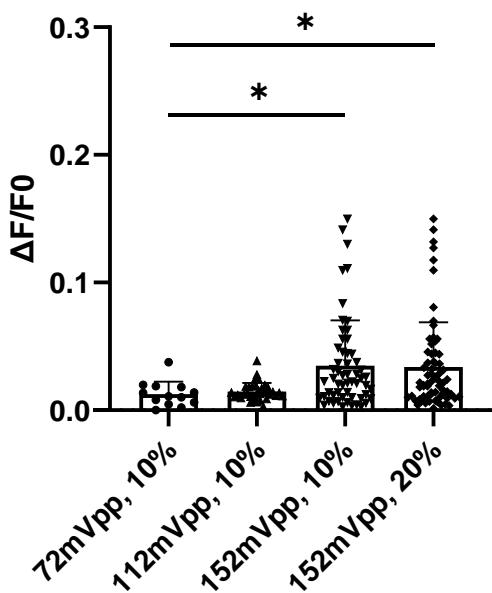


圖 75、不同超音波力學模組刺激下 DRG 細胞的鈣離子反應

根據結果，在參數 152mVpp, 10% D.F. (能量: 0.06mW/cm²、聲壓: 2.8kPa、剪應力: 0.16Pa) 與能誘發 N2a 鈣離子反應的參數 (72mVpp, 10% D.F.) 相比有顯著差異 ($p<0.05$)，推測為在 DRG 中可以誘發鈣離子反應的最低力學模組；跟 N2a 相比，所需能量更高。

DRG 刺激參數也利用表 9 的能量數據，以低輸入電壓，但高佔空比表示為剪應力(Shear stress)或是說聲流主導的力學模組，而高輸入電壓，但低佔空比為聲壓縮力(Compression force) 或是說聲壓主導的力學模組，兩者為相同能量的超音波參數，得到的結果如圖 76 所示。

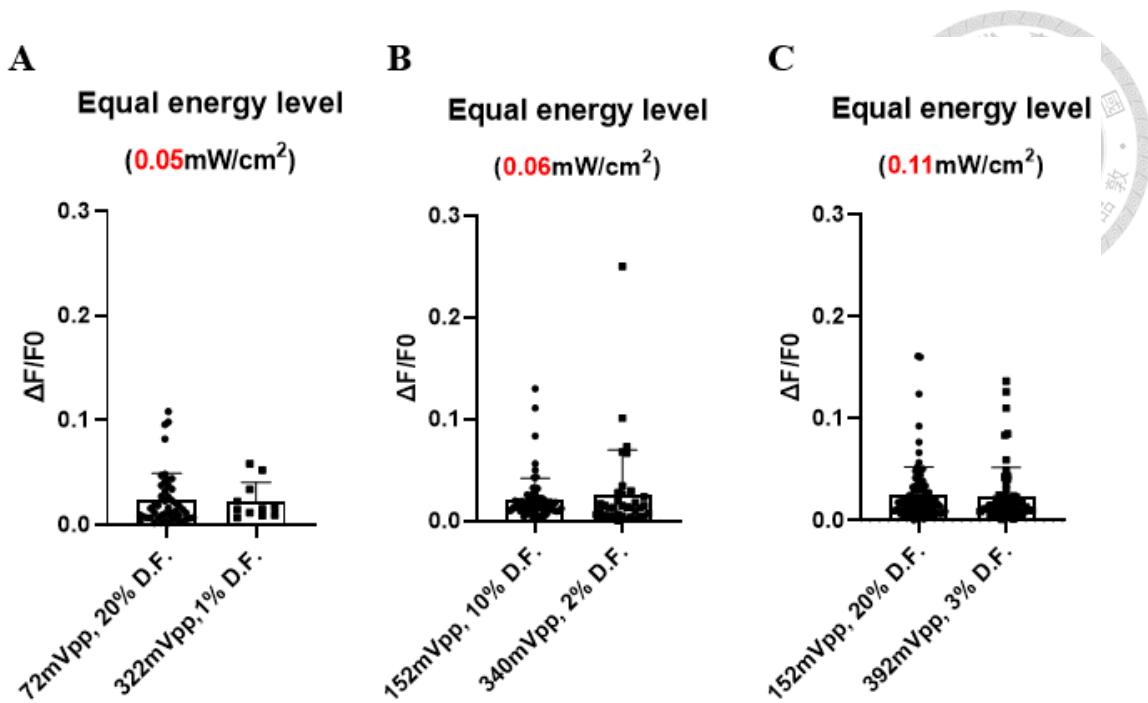


圖 76、相同能量下，聲壓聲流主導之力學模組刺激 DRG 細胞的鈣離子反應

從圖 76(A)可以觀察到，在能量相同的情況下，72mVpp, 20% D.F. (聲壓 2kPa、剪應力 0.1Pa)與 322 mVpp, 1% D.F. (聲壓 4.3kPa、剪應力 0.02Pa)並無顯著差異；將能量再提高一點，152 mVpp, 10% D.F. (聲壓 2.8kPa、剪應力 0.16Pa)與 340 mVpp, 2% D.F. (聲壓 5.2kPa、剪應力 0.14Pa)也無顯著差異；最終將能量提高到實驗中有最高流速的 152 mVpp, 20% D.F. (聲壓 2.8kPa、剪應力 0.22Pa)與聲壓最強的 392 mVpp, 3% D.F. (聲壓 6.2kPa、剪應力 0.16Pa)也無顯著差異。綜合上述，DRG 本身的反應機制比較複雜，在不同的能量中，聲壓跟聲流不同的搭配也無法激發較強的鈣離子反應；不像在 N2a 中，較高能量中，聲流主導的刺激較能產生鈣離子反應。

由於 DRG 主要負責傳遞來自周圍環境的感覺訊息，如疼痛、溫度、觸覺和本體感覺，所以依功能上也可分為機械感覺神經元(Mechanoreceptors)、本體感覺神經元(Proprioceptors)、溫度感覺神經元(Thermoreceptors)與痛覺感覺神經元(Nociceptors)。本研究特別拿痛覺感覺與本體感覺神經元作為後續 DRG 實驗的樣本。



4-5 不同亞型 DRG 之鈣離子反應實驗結果

後續的實驗中，利用 loxP-Cre 技術將不同基因編輯過的老鼠，互相交配後所生的子代，其 DRG 會剔除掉我們的目標基因片段，但並非百分之百都是，所以在剔除的基因片段後有 Tdtomato 標記，當有成功剔除後的 DRG 會亮紅光。此外，也會利用此方式將特定的 DRG 亞型給標記出來，例如用 Nav^{cre} 或 Parv^{cre} 的小鼠與將 tdTomato 前的 stop codon 拿掉，所以當亮紅光的話分別表示為痛覺感覺神經(Nociceptor)或本體感覺神經(Proprioceptor)。

這些標記為負責痛覺感覺的 DRG 或是負責本體感覺的 DRG 皆會使用不同聲壓與剪應力的力學模組進行測試，依能量高跟低分成兩組，每組依聲壓跟聲流主導的刺激再分成兩組參數，使用的分析方式是 two-way ANOVA，結果為圖 77 所示。

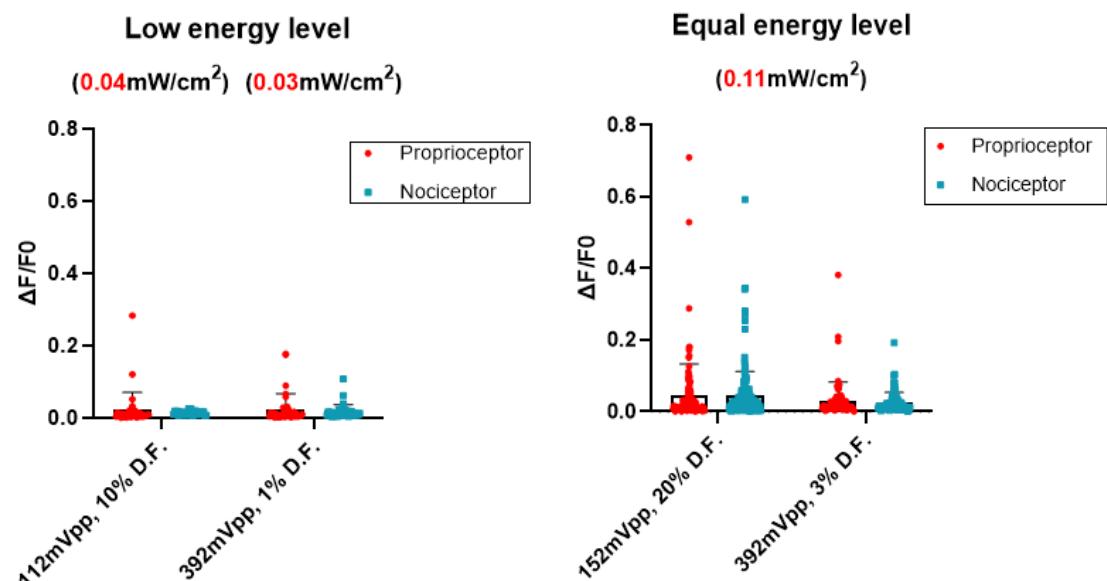


圖 77、不同能量下刺激不同亞型 DRG 的鈣離子反應

圖 77 左側中，給予兩組力學模組的刺激：112 mVpp, 10% D.F. (0.04 mW/cm^2) 與 392 mVpp, 1% D.F. (0.03 mW/cm^2)，整體屬於低能量的狀況。在此條件下，不論是 Proprioceptor(紅點)或 Nociceptor(藍點)，螢光反應 $\Delta F/F_0$ 的強度皆偏低，顯示在低能量刺激下，兩種細胞的反應均有限且差異不顯著，可能未達激發閾值。

圖 77 右側中，兩組條件(152 mVpp, 20% D.F. 與 392 mVpp, 3% D.F.)皆為相同的能量(0.11 mW/cm^2)。此情況下，不論是 Proprioceptor 或是 Nociceptor 皆對超音波刺激展現出明顯較高的反應，然而兩種亞型間皆無顯著差異。



4-5-1 不同亞型 DRG 基因剔除之鈣離子反應實驗結果

透過 loxP-Cre 技術，可以得到如實驗設計 3-3 中表 3 與表 4 整理的不同亞型間多種基因剔除的 DRG 細胞，這些不同 knockout 的細胞經會經過不同力學模組的測試。圖 78 呈現的是利用 $\text{ASIC1a}^{\text{cre}}$ 並搭配不同的 knockout，先使用最高的能量組(0.11 mW/cm^2)，聲流聲壓主導的參數分別為 152 mVpp, 20% D.F. (圖 78A)與 392 mVpp, 3% D.F. (圖 78B)進行測試。

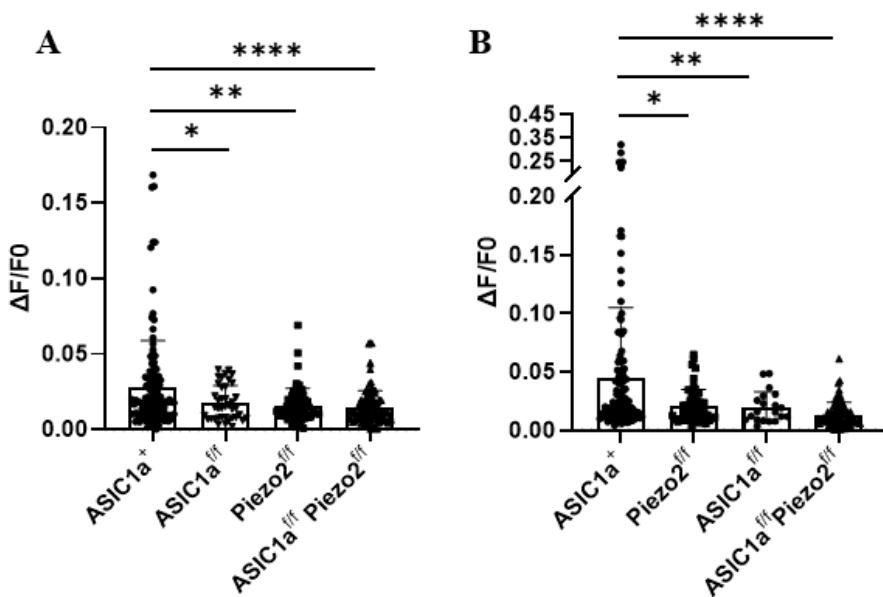


圖 78、 $\text{DRG}^{\text{ASIC1a}^+}$ 與不同 knockout 受不同力學模組之螢光變化

在圖 78A 中，野生型細胞(ASIC1a^+)的反應顯著高於 $\text{ASIC1a}^{\text{f/f}}$ 、 $\text{Piezo2}^{\text{f/f}}$ 的細胞，顯示在聲流主導的刺激條件下(152 mVpp, 20% D.F.)， $\text{ASIC1a}^{\text{f/f}}$ 與 Piezo2 的存在對於超音波誘發的鈣離子反應具有顯著貢獻(分別 $p < 0.05$, $p < 0.01$)。此外，與 $\text{ASIC1a}^{\text{f/f}}$ 與 $\text{Piezo2}^{\text{f/f}}$ 雙基因剔除的細胞間也有顯著差異($p < 0.0001$)，推測由於兩者對於鈣離子反應皆有貢獻，所以在此條件下兩者基因剔除與 ASIC1a^+ 相比顯著性極高。

圖 78B 則是在聲壓主導的刺激條件下(392 mVpp, 3% D.F.)進行比較，結果顯示野生型(ASIC1a⁺)仍具有顯著高於雙基因 flox 組的反應($p < 0.0001$)。ASIC1a^{f/f} 與 Piezo2^{f/f} 個別的反應也有顯著下降，顯示在聲壓上升時，兩者對整體反應均有貢獻。特別注意的是，ASIC1a^{f/f} 與 Piezo2^{f/f} 個別剔除顯著的星號數與低聲壓組是相反的，推測 ASIC1a 對於聲壓較為敏感。

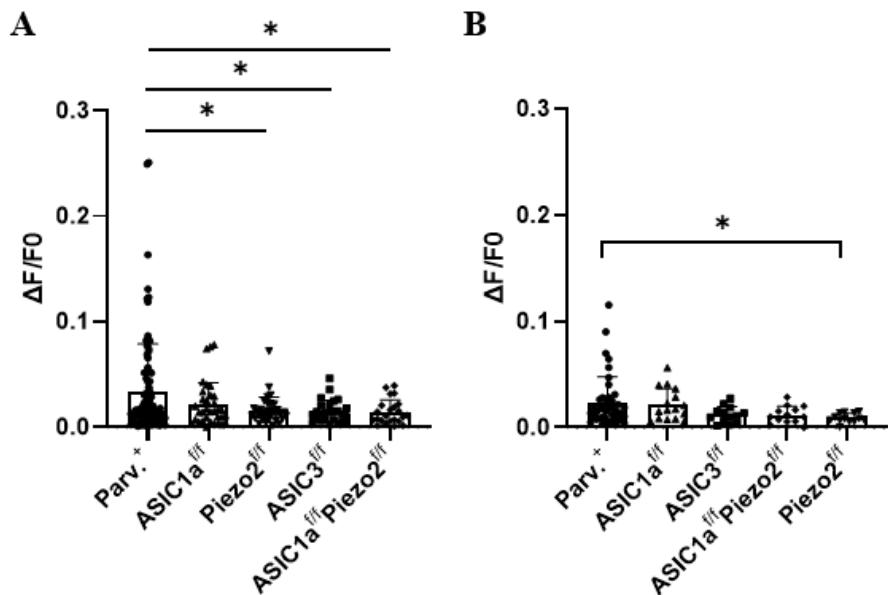


圖 79、DRG^{Parv+} 與不同 knockout 受不同力學模組之螢光變化

在圖 79A 所示的刺激條件(152mVpp, 10% D.F.)下，DRG^{Parv+} 表現出明顯的活化。相較於對照組，Piezo2^{f/f} 和 ASIC3^{f/f} 單基因剔除均反應減弱且有顯著($p < 0.05$)。值得注意的是，ASIC1a^{f/f} 與 Piezo2^{f/f} 雙基因剔除組的反應僅只有一星的顯著差異，而且 ASIC1a^{f/f} 沒有顯著差異，這暗示在這個超音波參數下，ASIC1a 可能在本體感覺中不是個重要的鈣離子通道。此外 ASIC3 通道對於本體感覺神經元的超音波感應有一定的重要性。

在圖 79B 所示的刺激條件(340mVpp, 2% D.F.)下，DRG^{Parv+} 平均反應沒有特別突出。值得注意的是，Piezo2^{f/f} 跟對照組相比有一星的顯著差異，推測可能在本體感覺神經 Piezo2 對於高聲壓敏感。ASIC1a^{f/f} 與 Piezo2^{f/f} 雙基因剔除組看似與 DRG^{Parv+} 相比抑制許多，但或許是資料點不足，讓顯著性也不能提升。

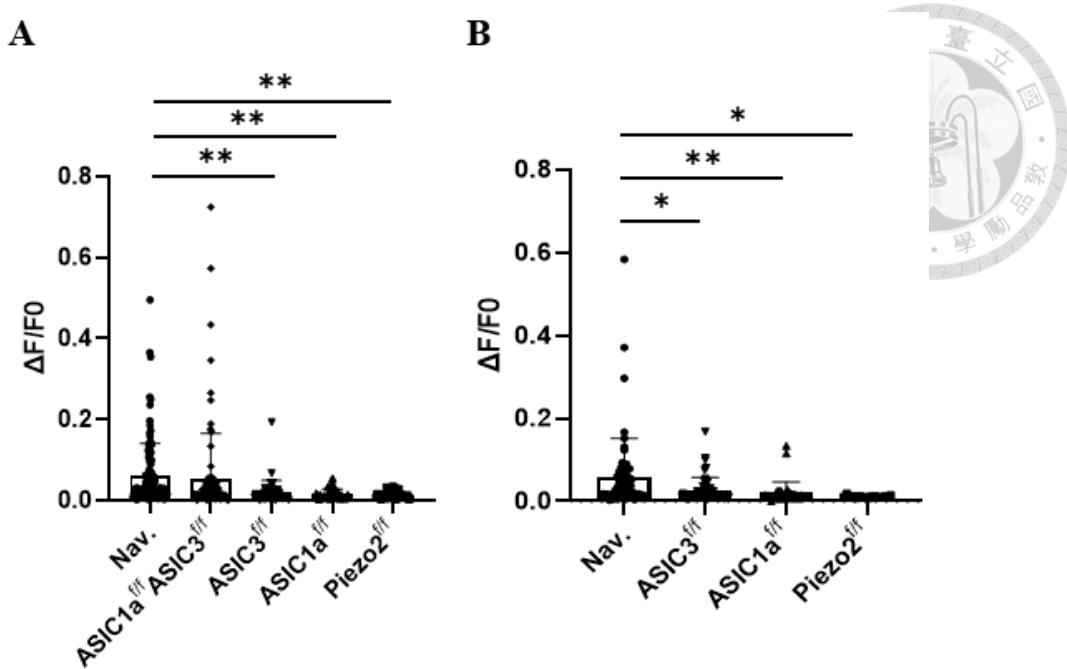


圖 80、 $\text{DRG}^{\text{Nav}^+}$ 與不同 knockout 受不同力學模組之螢光變化

在圖 80A 所示的刺激條件(152mVpp, 10% D.F.)下， $\text{DRG}^{\text{Nav}^+}$ 表現活化的程度偏高，所以與 $\text{Piezo2}^{\text{f/f}}$ 、 $\text{ASIC3}^{\text{f/f}}$ 跟 $\text{ASIC1a}^{\text{f/f}}$ 單基因剔除的螢光變化皆有兩星的顯著變化($p<0.001$)，推測除了在 DRG 表現多的 Piezo25 之外， ASIC1a 跟 ASIC3 在痛覺神經扮演重要角色。 $\text{ASIC3}^{\text{f/f}}$ 與 $\text{ASIC1a}^{\text{f/f}}$ 雙基因剔除的螢光變化卻有提高的趨勢，文獻顯示可能與抑制兩種通道會加強機械感受力有關[45]。

在圖 80B 所示的刺激條件(340mVpp, 2% D.F.)下， $\text{DRG}^{\text{Nav}^+}$ 與其他三組單基因剔除皆有顯著差異，由其是 $\text{ASIC1a}^{\text{f/f}}$ 組有兩顆星的顯著性($p<0.01$)，表示在高聲壓組 ASIC1a 與 ASIC3 相比較為敏感，不過 $\text{Piezo2}^{\text{f/f}}$ 看似抑制性比 $\text{ASIC1a}^{\text{f/f}}$ 更好，但由於資料點不足，導致顯著性沒有出來。

4-5-2 不同亞型 DRG 藥理之鈣離子反應實驗結果

除了上個小節的 LoxP-Cre 小鼠 DRG 的實驗外，還使用藥理的方式來驗證不同亞型中各個離子通道的重要性。首先測試的是痛覺神經(Nociceptor)，使用的抑制劑為對 TRP 通道抑制的 Ruthenium Red 與專一性抑制 TRPA1 的 HC-030031，還有對酸敏感通道有抑制的 Amiloride 與專一性抑制 ASIC1a 的 PCTx1，結果如圖 81 所示。

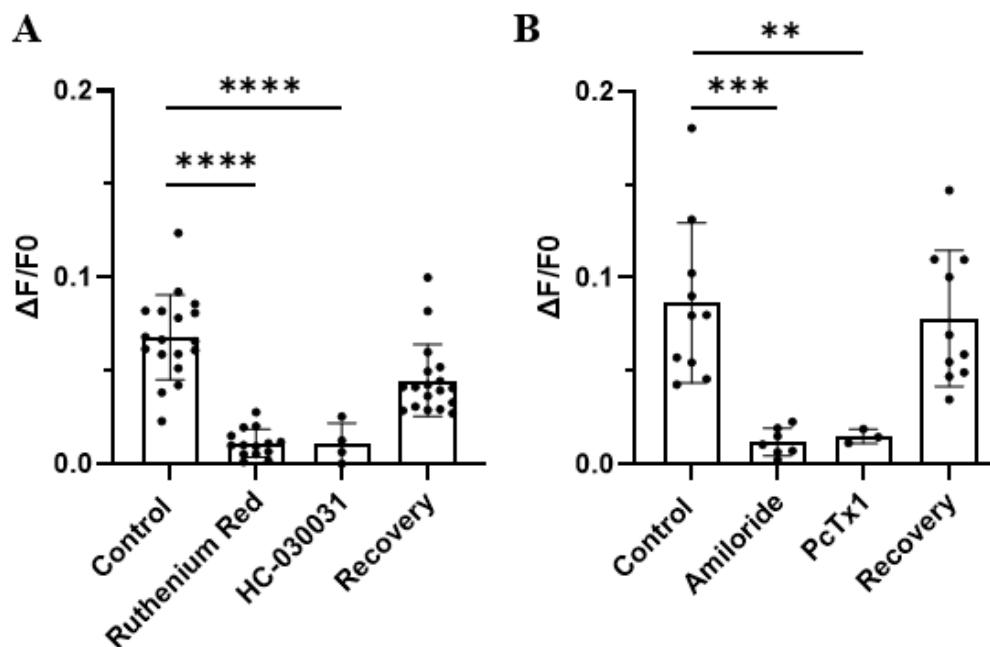


圖 81、DRG^{Nav⁺}經不同藥劑處理後受不同力學模組之螢光變化

在圖 81A 中，細胞在對照組下表現出明顯的鈣離子反應，當加入 Ruthenium Red 或 HC-030031 後， $\Delta F/F_0$ 顯著下降，表示這些 TRP 相關通道在超音波引起的反應中扮演重要角色。值得注意的是，在移除抑制劑 Recovery 後，細胞反應明顯回升，顯示反應具有可逆性、非細胞損傷所致。

在圖 81B 中，兩種抑制劑的加入皆顯著降低 $\Delta F/F_0$ ，表示 ASICs，特別是 ASIC1a，除了是典型酸敏感通道以外，在機械刺激也可以開啟通道，再次驗證了或許是對超音波敏感的分子之一。同樣地，在 Recovery 階段反應恢復，進一步支持作用具可逆性，並且非藥物毒性所造成。

第五章 研究結論與討論



5-1 結論

本研究針對三個研究目的進行探討，並設計四組對應的實驗加以驗證。這些實驗針對不同面向(如細胞類型、刺激條件或離子通道類型)進行系統性測試，藉由定量分析螢光的變化，來做為是否有鈣離子流入(反應)的依據。根據實驗數據的綜合分析，歸納出四個結論，

第一個，在 N2a 細胞中，本研究發現超音波引發的鈣離子反應與給予的能量有關。當剪應力固定，而聲壓提高時， $\Delta F/F_0$ 有顯著增加，聲壓提高能量也跟著提高，對反應強度具有決定性影響。在以聲流(Acoustic streaming)為主導的條件下(如低輸入電壓但高佔空比)，細胞的鈣離子反應顯著高於聲壓主導條件，指出剪應力可能是驅動 N2a 細胞產生鈣離子流入的因素之一。此外，藉由觀察螢光變化與超音波微管針尖的距離關係，也發現反應程度呈現指數遞減，表明刺激效應具有空間的限制，大約在 150μm 以內且細胞位於針尖前或針尖後時反應最為明顯，可能與超音波微管造成聲流分布特性有關。

第二個，為了釐清 N2a 細胞中對超音波敏感的分子為何，進一步使用藥理學方法與基因剔除、細胞轉染進行探討。結果顯示，Piezo1、ASIC1a 與 TRPV1 為三個主要參與鈣離子反應的離子通道。Piezo1 作為經典的機械力敏感通道，對剪應力極為敏感，其剔除會顯著降低細胞反應；ASIC1a 與 TRPV1 中，前者是典型的對酸有反應的通道，卻也會受機械力的作用，可能在超音波造成的微環境變化中間接活化 ASIC1a 結構中某個對力敏感的 component；後者為電壓敏感性通道，可能為超音波機械力刺激間接造成膜電位受到改變，進而引發鈣離子反應[46]。這些結果不僅支持多種通道在反應中可能協同參與，也凸顯超音波作為刺激來源，其機制可能橫跨不同物理條件(如壓力、剪應力與膜電位改變)。

第三個，與 N2a 細胞相比，從小鼠脊髓的背根神經節(DRG)需更高能量的超音波刺激才能誘發顯著的鈣離子反應，顯示其閾值較高。然而，當能量固定一樣，進一步比較聲壓主導與聲流主導條件時，發現在 DRG 細胞中兩者引發的反應無顯著差異，無論是在 DRG^{ASIC1a+}或不同亞型的痛覺神經(Nociceptor)與本體感覺神經(Proprioceptor)中皆有一樣現象。這結果暗示 DRG 細胞的反應不像 N2a 那樣明確受力學模組影響，可能與其生理功能或膜上通道表現型態的多樣性與敏感性有關，也指出 DRG 在機械力感受機制的複雜性。

第四個，在 DRG 不同亞型(如本體感覺與痛覺)中，實驗發現本體感覺神經的 ASIC3、Piezo2 對於超音波敏感；痛覺神經除了 Piezo2，ASIC1a 與 ASIC3 也同等參與鈣離子反應。透過藥理抑制的實驗，進一步確認痛覺神經的鈣離子反應與多種通道有關，包括 TRPV1、TRPA1、ASIC3 與 ASIC1a。這間接推測在 DRG 中有多種通道可能以組合方式參與機械刺激的反應途徑，並且通道之間可能存在補償作用，使得單一基因剔除未能完全地讓功能缺失。

5-2 討論

超音波微管物理性質的探討方面，在聲壓的量測中由於量測設備的限制，所以不能真實還原實驗時細胞所受的聲壓，細胞實驗中的針與細胞距離最多 150μm 左右，但量測聲壓時距離至少超過 1mm 以上，雖然有用顯微鏡輔助，但因為顯微鏡光圈的手臂會卡到控制水聽筒位置的微調手臂，所以轉換到電腦中的視野並非真實的影像，看到的黑影是水聽筒的影子並非水聽筒本身。示波器上顯示波形，在本研究中是取第一個波的方均根電壓來做計算，為了避免波的疊加讓量測出來超音波微管的數據不穩定，但細胞所受的力應該為疊加後的波所共同作用的，綜合上述，實際的聲壓大小應該比量測出來的大。

在聲流的量測中，因為文中所使用的剪應力公式為穩定狀態的流體，所以在量測流場時是讓底部基質是沒有細胞的，不過由於流速過快的緣故，在近距離

(150 μm)以內通常光軌是模糊的，只能在比較遠的地方才能得到比較清楚的光軌圖，所以計算出來的流速與剪應力是被低估的。本研究中的流速與剪應力大小為針尖與螢光珠距離約 300 μm 的數據所推估的，細胞實驗的距離小於這個的一半，可想而知速度會快非常多。底部基質有沒有細胞或許是一個重要的議題，因為實驗時的針尖距離底部才 39 μm 的長度，若有細胞的話再少去 15 μm ，底部凹凸不平的環境讓流場不是很穩定，就不能用穩態的剪應力公式做計算，再者可能會讓流場的速度減慢[47]。

細胞實驗中，N2a 細胞的變異性很大，常常因不同的 batch 而有不穩定的螢光變化，細胞膜蛋白的表現發現可能會因培養的時間而有變化[48]，所以我們在做實驗時會固定實驗時間以避免變異性太大，像是在前一天晚上 8 點種完細胞後，培養 18-20 小時後約莫下午 2 點才開始實驗，或是固定在傍晚 6 點時實驗。

根據本研究的結果，N2a 細胞種在不同基底會有不同程度的鈣離子反應，PLL(poly-l-lysine)比起 Laminin 有 integrin 幫助細胞黏貼，它僅靠電性吸附細胞而已並不牢靠，不過雖然黏的不夠緊，但或許是因為這個因素讓細胞形變量大，誘發了像是 Piezo 這些需要把較大的力作用的通道，才造成相對較強的鈣離子反應。根據文獻表示，要打開 Piezo1 需要的壓力約 1.9 pN/nm²[49]。

N2a 膜佈滿許多離子通道，除了 Piezo、ASICs 與 TRP 外，還有像是電壓門控離子通道(VGCCs)也會造成鈣離子反應，但並非直接受機械力作用，而是先讓 TRPC1 先被開啟後，使得 Na⁺流入細胞讓細胞膜去極化，才開啟 VGCC 讓鈣離子流入[50]。

在 DRG 的作用機制比 N2a 複雜很多。在背根神經節中，透過打開 Piezo1/2 讓離子流入來回應機械刺激，從而在神經元中產生電訊號[51]。除此之外，Voltage-Dependent Calcium Channels (VDCCs)也是參與 DRG 鈣離子反應路徑之一[52]，還有在痛覺神經參與 store-operated calcium entry (SOCE)的 TRPC3 也是[53]。

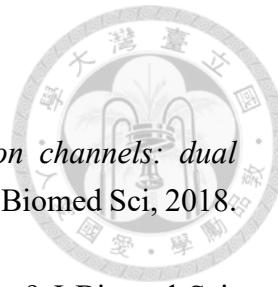


5-3 未來展望

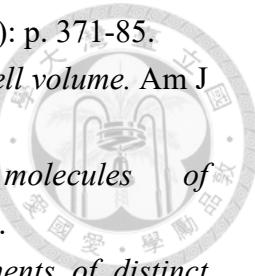
未來研究可進一步探討不同力學模組與離子通道間的交互關係，特別是如何透過更精細的實驗手段推測特定離子通道開啟所需的機械力大小。藉由結合多種離子通道抑制劑，亦有機會挖掘出其他對超音波具敏感性的未知離子通道，進一步釐清其在超音波刺激下的反應機制。

此外，本研究所使用的 N2a 與 DRG 細胞皆培養於玻璃基底上，其物理性質與人體組織仍有差距。未來計畫導入壓電性更接近人體的材料，例如石英片 (quartz)，以模擬更生理貼近的環境，並探討此類基底對細胞反應的影響。進一步亦可聚焦於可能受超音波誘發的電壓門控型離子通道(如 Nav、Cav 等)，深入評估其在超音波機械刺激下的功能角色與參與程度。

參考資料

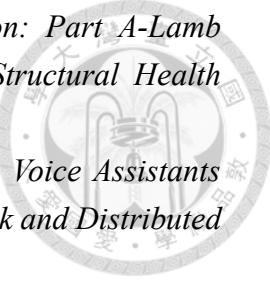


1. Cheng, Y.R., B.Y. Jiang, and C.C. Chen, *Acid-sensing ion channels: dual function proteins for chemo-sensing and mechano-sensing*. J Biomed Sci, 2018. **25**(1): p. 46.
2. Lin, J.H., et al., *Sensing acidosis: nociception or sngception?* J Biomed Sci, 2018. **25**(1): p. 85.
3. Papalampropoulou-Tsiridou, M., et al., *Distribution of acid-sensing ion channel subunits in human sensory neurons contrasts with that in rodents*. Brain Commun, 2022. **4**(6): p. fcac256.
4. Ichikawa, H. and T. Sugimoto, *The co-expression of ASIC3 with calcitonin gene-related peptide and parvalbumin in the rat trigeminal ganglion*. Brain Res, 2002. **943**(2): p. 287-91.
5. Lin, S.H., W.H. Sun, and C.C. Chen, *Genetic exploration of the role of acid-sensing ion channels*. Neuropharmacology, 2015. **94**: p. 99-118.
6. Jasti, J., et al., *Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH*. Nature, 2007. **449**(7160): p. 316-23.
7. Chalfie, M., *Neurosensory mechanotransduction*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(1): p. 44-52.
8. Omerbasic, D., et al., *ASICs and mammalian mechanoreceptor function*. Neuropharmacology, 2015. **94**: p. 80-6.
9. Moshourab, R.A., et al., *Stomatin-domain protein interactions with acid-sensing ion channels modulate nociceptor mechanosensitivity*. J Physiol, 2013. **591**(22): p. 5555-74.
10. Wetzel, C., et al., *A stomatin-domain protein essential for touch sensation in the mouse*. Nature, 2007. **445**(7124): p. 206-9.
11. Hruska-Hageman, A.M., et al., *Interaction of the synaptic protein PICK1 (protein interacting with C kinase 1) with the non-voltage gated sodium channels BNC1 (brain Na⁺ channel 1) and ASIC (acid-sensing ion channel)*. Biochemical Journal, 2002. **361**(3): p. 443-450.
12. Lim, J., et al., *ASIC1a is required for neuronal activation via low-intensity ultrasound stimulation in mouse brain*. Elife, 2021. **10**.
13. Han, D.S., et al., *Involvement of ASIC3 and Substance P in Therapeutic Ultrasound-Mediated Analgesia in Mouse Models of Fibromyalgia*. J Pain, 2023. **24**(8): p. 1493-1505.
14. Gu, Y. and C. Gu, *Physiological and pathological functions of mechanosensitive ion channels*. Mol Neurobiol, 2014. **50**(2): p. 339-47.
15. Inoue, R., Z. Jian, and Y. Kawarabayashi, *Mechanosensitive TRP channels in*



- cardiovascular pathophysiology.* Pharmacol Ther, 2009. **123**(3): p. 371-85.
16. Hua, S.Z., et al., *A mechanosensitive ion channel regulating cell volume.* Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **298**(6): p. C1424-30.
17. Martinac, B., *Mechanosensitive ion channels: molecules of mechanotransduction.* J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 12): p. 2449-60.
18. Coste, B., et al., *Piezol and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels.* Science, 2010. **330**(6000): p. 55-60.
19. Santana Nunez, D., et al., *Piezol induces endothelial responses to shear stress via soluble adenylyl Cyclase-IP(3)R2 circuit.* iScience, 2023. **26**(5): p. 106661.
20. Woo, S.H., et al., *Piezo2 is the principal mechanotransduction channel for proprioception.* Nat Neurosci, 2015. **18**(12): p. 1756-62.
21. Liu, H., et al., *Piezol Channels as Force Sensors in Mechanical Force-Related Chronic Inflammation.* Front Immunol, 2022. **13**: p. 816149.
22. Liu, C. and C. Montell, *Forcing open TRP channels: Mechanical gating as a unifying activation mechanism.* Biochem Biophys Res Commun, 2015. **460**(1): p. 22-5.
23. O'Neil, R.G. and S. Heller, *The mechanosensitive nature of TRPV channels.* Pflugers Arch, 2005. **451**(1): p. 193-203.
24. Dalrymple, A., et al., *Mechanical stretch regulates TRPC expression and calcium entry in human myometrial smooth muscle cells.* Mol Hum Reprod, 2007. **13**(3): p. 171-9.
25. Senatore, S., et al., *Response to mechanical stress is mediated by the TRPA channel painless in the Drosophila heart.* PLoS Genet, 2010. **6**(9): p. e1001088.
26. Xiao, E., et al., *Brief reports: TRPM7 Senses mechanical stimulation inducing osteogenesis in human bone marrow mesenchymal stem cells.* Stem Cells, 2015. **33**(2): p. 615-21.
27. Fu, S., et al., *Activation of TRPV4 by mechanical, osmotic or pharmaceutical stimulation is anti-inflammatory blocking IL-1 β mediated articular cartilage matrix destruction.* Osteoarthritis Cartilage, 2021. **29**(1): p. 89-99.
28. O'Conor, C.J., et al., *TRPV4-mediated mechanotransduction regulates the metabolic response of chondrocytes to dynamic loading.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(4): p. 1316-21.
29. Luo, X., et al., *IL-23/IL-17A/TRPV1 axis produces mechanical pain via macrophage-sensory neuron crosstalk in female mice.* Neuron, 2021. **109**(17): p. 2691-2706 e5.
30. Zoi, P. and A. Oliva, *Skin-on-a-Chip Technology: Microengineering Physiologically Relevant In Vitro Skin Models.* Pharmaceutics, 2022. **14**(3).
31. Liu, Z. and H. Chen, *Application and Challenges of Signal Processing*

Techniques for Lamb Waves Structural Integrity Evaluation: Part A-Lamb Waves Signals Emitting and Optimization Techniques, in *Structural Health Monitoring from Sensing to Processing*. 2018.

- 
32. Yan, Q., et al., *SurfingAttack: Interactive Hidden Attack on Voice Assistants Using Ultrasonic Guided Waves*, in *Proceedings 2020 Network and Distributed System Security Symposium*. 2020.
 33. Kiefer, D.A., et al., *Calculating the full leaky Lamb wave spectrum with exact fluid interaction*. J Acoust Soc Am, 2019. **145**(6): p. 3341.
 34. Park, S.-J., H.-W. Kim, and Y.-S. Joo, *Leaky Lamb Wave Radiation from a Waveguide Plate with Finite Width*. Applied Sciences, 2020. **10**(22).
 35. Vallée, J.-C., et al., *Edge and Notch Detection in a Plate Using Time Reversal Process of Leaky Lamb Waves*. Applied Sciences, 2021. **12**(1).
 36. Nelson, T.R., et al., *Ultrasound biosafety considerations for the practicing sonographer and sonologist*. J Ultrasound Med, 2009. **28**(2): p. 139-50.
 37. Sarvazyan, A.P., O.V. Rudenko, and W.L. Nyborg, *Biomedical applications of radiation force of ultrasound: historical roots and physical basis*. Ultrasound Med Biol, 2010. **36**(9): p. 1379-94.
 38. Chu, Y.C., et al., *Design of an ultrasound chamber for cellular excitation and observation*. J Acoust Soc Am, 2019. **145**(6): p. EL547.
 39. Chu, Y.C., et al., *Elevation of Intra-Cellular Calcium in Nucleus Pulposus Cells with Micro-Pipette-Guided Ultrasound*. Ultrasound Med Biol, 2021. **47**(7): p. 1775-1784.
 40. Smirnov, I. and N. Mikhailova, *An Analysis of Acoustic Cavitation Thresholds of Water Based on the Incubation Time Criterion Approach*. Fluids, 2021. **6**(4).
 41. Zhang, M., et al., *Application progress of ultrasonication in flour product processing: A review*. Ultrason Sonochem, 2023. **99**: p. 106538.
 42. Perner, C. and C.L. Sokol, *Protocol for dissection and culture of murine dorsal root ganglia neurons to study neuropeptide release*. STAR Protoc, 2021. **2**(1): p. 100333.
 43. Walder, R.Y., et al., *ASIC1 and ASIC3 play different roles in the development of Hyperalgesia after inflammatory muscle injury*. J Pain, 2010. **11**(3): p. 210-8.
 44. Gudipaty, S.A., et al., *Mechanical stretch triggers rapid epithelial cell division through Piezo1*. Nature, 2017. **543**(7643): p. 118-121.
 45. Kang, S., et al., *Simultaneous disruption of mouse ASIC1a, ASIC2 and ASIC3 genes enhances cutaneous mechanosensitivity*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35225.
 46. Zhai, K., et al., *Calcium Entry through TRPV1: A Potential Target for the Regulation of Proliferation and Apoptosis in Cancerous and Healthy Cells*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(11).

47. Wiklund, M., R. Green, and M. Ohlin, *Acoustofluidics 14: Applications of acoustic streaming in microfluidic devices*. Lab Chip, 2012. **12**(14): p. 2438-51.
48. Goaillard, J.M. and E. Marder, *Ion Channel Degeneracy, Variability, and Covariation in Neuron and Circuit Resilience*. Annu Rev Neurosci, 2021. **44**: p. 335-357.
49. Yang, X., et al., *Structure deformation and curvature sensing of PIEZO1 in lipid membranes*. Nature, 2022. **604**(7905): p. 377-383.
50. Burks, S.R., et al., *Focused ultrasound activates voltage-gated calcium channels through depolarizing TRPC1 sodium currents in kidney and skeletal muscle*. Theranostics, 2019. **9**(19): p. 5517-5531.
51. Lewis, A.H., et al., *Transduction of Repetitive Mechanical Stimuli by Piezo1 and Piezo2 Ion Channels*. Cell Rep, 2017. **19**(12): p. 2572-2585.
52. Fitzgerald, E.M., *Regulation of voltage-dependent calcium channels in rat sensory neurones involves a Ras-mitogen-activated protein kinase pathway*. J Physiol, 2000. **527 Pt 3**(Pt 3): p. 433-44.
53. Alkhani, H., et al., *Contribution of TRPC3 to Store-Operated Calcium Entry and Inflammatory Transductions in Primary Nociceptors*. Molecular Pain, 2014. **10**: p. 1744-8069-10-43.