

# 活體細胞行為之光、電與力學即時監測技術發展

## Optical, Electrical and Mechanical Technologies for Living Cellular Behaviors Monitoring

張景裕、陳盈廷、沈孟儒、張憲彰

Ching-Yu Chang, Ying-Ting Chen, Meng-Ru Shen, Hsien-Chang Chang

細胞如何感知其外部環境的變化，並據以作出適當的對應，一直是細胞生理研究的熱門話題。人們試著操控物理性、化學性以及生物性等不同刺激方式，藉由細胞對這些刺激所產生的代謝、趨化、胞內分子調控以及凋亡等反應，企圖解開複雜的細胞生理反應機制。因應此一研究需求，各種不同細胞監測技術陸續被開發，用以觀察細胞內外不同的生理反應。本文回顧過往細胞檢測相關技術，就細胞分泌、蛋白質調控以及細胞力學等不同研究標的，比較各別檢測技術優勢以及使用限制，並探討不同方法相互整合可能產生的優點，嘗試歸納未來細胞監測技術整合與應用的趨勢。

Cells can sense chemical, biological and physical changes around their environment and regulate a proper response to different stimulus. It is an attractive topic for most researchers to elucidate different cell mechanisms based on the observation of cellular behaviors. People tried to induce various stimulations by using chemical reagents, immunological proteins or mechanical indentation, and then cellular behaviors e.g. intracellular molecules modulation, cell movement, secretion were associated with these stimulus. Based on the established correlations, cell physiology was investigated and several hypotheses were proved. In the past year, several monitoring techniques were developed to meet different requirements of cell measurement. In this article, we reviewed the reported techniques and compared their application limitations, respectively. The advantages of integration with different technologies for cellular behaviors were discussed. Also, the future trend of cellular monitoring was proposed based on the reviewed evidences.

### 一、前言

細胞是構成人體最小的單位，藉由不同細胞間的協調，人體方可正常運作。在正常生理條件下，細胞藉由分布在細胞膜表面的不同受器，感測外界

環境的變化以及其他細胞所傳送的訊息，並依據所感受到的不同訊息，產生代謝 (metabolism)、移動 (movement)、趨化 (chemotaxis)、增殖 (proliferation)、分化 (differentiation) 與死亡 (death) 等不同細胞行為 (cellular behaviors)。細胞行為與其所感受到的外

界刺激具有密切關係，透過不同刺激物的操控以及細胞響應的觀測，有助於釐清各種疾病成因，因此不同的細胞監測技術遂成為生物感測技術發展的重點。對於細胞行為之觀測概可區分為胞內與胞外兩大類，其中胞外行為包括胞吐 (exocytosis)、移動、分化以及細胞膜表面的機械特性表現等。而胞內反應主要以細胞內部蛋白或細胞骨架分子的調控為觀測標的。由於細胞固有行為須在活體細胞中方可自然呈現，如何在量測時維持細胞的活性，遂成為此類檢測技術應用的挑戰。此外，細胞外在行為的表現往往受到胞內蛋白調控，對於細胞內外行為的同步觀測，可從分子層級解析細胞的種種巨觀行為，逐漸成為近來細胞生理研究的主要趨勢。然而，對於細胞的觀測，吾人就類似瞎子摸象般地，往往必須整合兩種以上的檢測技術，同步觀測單一細胞。本文回顧了過往細胞檢測相關技術，並比較不同細胞行為量測的挑戰，嘗試歸納出未來不同技術整合的趨勢。

## 二、現有檢測技術與其應用

現今對於活體細胞的觀測，主要有細胞分泌、移動 (或趨化)、細胞機械特性以及胞內分子的調控等幾個主要項目，以下就不同的細胞檢測技術作進一步說明。

### 1. 微小電極與細胞分泌檢測

#### (1) 細胞分泌機制與檢測

幾乎所有細胞都具有分泌的機制，胞內生成的分子在高基氏體 (Golgi apparatus) 形成微胞 (vesicle) 後，便透過 trans Golgi 網路將這些含有不同分子的微泡送往細胞膜表面，進而將其分泌於胞外或表現在細胞膜上。某些特殊的分泌型細胞 (如神經細胞與內分泌細胞)，更具有可調控的胞吐機制，用以調控這些微胞的分泌<sup>(1)</sup>。刺激細胞分泌的信號有 (1) 化學分子：如荷爾蒙或受質，當其與細胞表面受體結合後，會引發胞內游離鈣離子濃度上升，促進胞吐作用的進行。(2) 動作電位 (action potential) 刺激：特別是神經細胞的分泌大都藉由此一機制作用，當細胞受到動作電位刺激後，導致

細胞膜表面的鈣離子通道開啟，鈣離子進入細胞內部引發胞吐作用。經由胞吐作用分泌的物質，可能含有小分子 (如 histamine、catecholamine) 或者蛋白質 (如荷爾蒙以及酵素) 等。胞吐信號所需之量測技術必須同時具有優異的空間 (spatial) 與時間 (temporal) 解析能力始能為功<sup>(2-4)</sup>。針對上述需求，微小電極的發展為細胞分泌檢測提供了一項有利工具，將直徑約數微米或更小的微小電極接近於細胞膜表面，在適當的檢測電位下，細胞所分泌的物質在其擴散前即為電極所偵測，且因電極面積小，電雙層效應大幅降低，使得此類檢測法的時間解析度可達數微秒。

#### (2) 掃描式電化學顯微鏡與安培法

利用微小電極搭配精密操控器 (manipulator) 的使用，發展出掃描式電化學顯微術 (scanning electrochemical microscopy, SECM) 以及安培法 (amperometry) 兩種常見的單細胞檢測技術。由於兩種方法均使用微小電極作為感測器，因此均具備了優異的空間與時間解析能力，且可在一般細胞的正常生理條件下進行檢測。SECM 藉由微小電極的操控，在細胞上方以固定高度 (constant height) 方式掃引，利用不同位置所得到的反應電流，重建細胞外部特定物質的二維濃度分布，亦或藉由氧氣濃度的檢測，觀測細胞表面不同區域的氧氣消耗做為細胞活性的評估工具<sup>(5,6)</sup>。然而，細胞與電極間的距離與反應電流有關，以固定距離 (constant distance) 的方式在細胞表面上掃引，可得到較正確的濃度分布。

針對此一問題，利用切變力 (shear-force) 或導電度等參數<sup>(7)</sup> 作為距離回饋的方式紛紛被提出，藉以維持電極與細胞表面的固定距離。SECM 的優點，在於提供細胞與其週遭環境空間上的資訊，然而因電極無法快速掃描，其在時間的解析能力上明顯不足。若欲觀測胞吐作用的動態表現，則必須利用安培電流法。

利用精密操控器將微小電極貼近到細胞表面，並在電極上外加一檢測電位，可將細胞分泌的電化學活性物質瞬間氧化，產生一突波狀安培圖譜 (amperogram)。藉此圖譜的解析，可觀測到細胞分

泌前顆粒球與細胞膜融合產生的預先突波 (foot)，以及顆粒內物質釋放到所造成的突波 (spike) 信號。透過對突波時間與電流響應分析，可估算胞吐速度與其內含物的含量，搭配電子顯微鏡對於顆粒大小的觀測，更可推算出顆粒內部的物質濃度。然而，無論 SECM 或安培電流法，僅能利用不同檢測電位的改變，來選擇所欲偵測的物質，當兩種以上待測物質同時存在顆粒內時，往往會產生相互干擾的問題，面對這個困難，快速伏安法 (fast scan cyclic voltammetry, FSCV) 是另一可能的解決方法。由於微小電極之充電電流較小，可利用快速電位掃描 (每秒約數百伏特變化)，在不同物質氧化電位間切換，當第一項物質被氧化後，受限於擴散速度，無法立即由外部溶液補充，此時將電位切換至第二種物質檢測電位，可降低不同待測物間的相互干擾。

### (3) 微小電極的製作

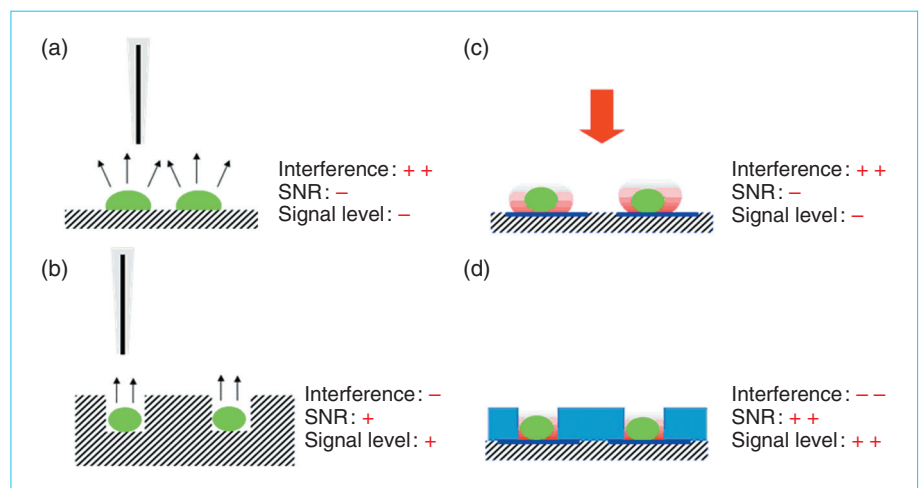
微小電極是成功檢測細胞分泌的關鍵，早期微小電極的製作，多利用碳纖維 (carbon fiber) 或貴金屬 (Pt, Au) 絲，將其包埋於拉伸的玻璃細管，並以管壁封口。隨後將電極尖端拋光研磨，以拋光後的截面作為電極，此一作法所完成的微小電極直徑約數微米，空間解析度無法滿足單細胞影像的需求，因而這類電極大部分與安培電流法搭配用於胞吐作用的量測。隨著電極尖端尺寸的微小化，傳統的玻璃封口製程難以適用於超微小電極

(ultramicroelectrode, UME) 的製作。一般商用的碳纖維以及貴金屬絲的線徑約在 5 微米以上，為獲得奈米尺寸的線徑，須預先以化學蝕刻方式，將電極尖端縮小至奈米尺寸，並改以電聚合高分子或 parylene 在電極表面形成絕緣膜，再以電子束於切割電極前端，方可製作出直徑約數十奈米的超微小電極<sup>(8)</sup>。另一方面，也可以光學微影 (photolithography) 方式，在玻璃或矽基材上配置平板電極導線<sup>(9)</sup>，藉由光阻定義出個別微小電極的面積，此一方法大大地簡化了微小電極的製作流程，且可一次形成多個電極陣列。然而，不同於傳統以微小電極操控方式，平板式微小電極必須把細胞定址 (addressed) 到電極表面，並且加以固定。因此必須搭配單細胞操控技術，提供待測細胞一安置的空間，確保檢測系統的穩定 (如圖 1 所示)。

### (4) 電化學檢測的限制

微小電極是檢測細胞分泌的恰當工具，因細胞可在正常生理狀況下量測，所得結果較接近真實的細胞生理反應。特別是在神經生理研究中，大部分的神經傳導物質具有電化學活性，可直接在電極表面產生氧化電流。然而，對於其他蛋白質的分泌，電化學檢測就顯得力有未逮，因一般的蛋白質往往不具有電化學活性，無法以電化學檢測。雖然酵素具催化性，可在含有基質的溶液中偵測，然而對於其他蛋白質的分泌，仍難以電化學檢測方式達成。另外，若觀察標的物為細胞膜表面抗原或受體時，

圖 1. 單細胞電化學量測技術。令細胞貼附 (a) 或落入微孔中 (b) 再以微小電極貼近細胞表面檢測。另一方面將細胞操控於平板電極 (c) 或微孔電極 (d) 上亦可達到電化學偵測的目的。



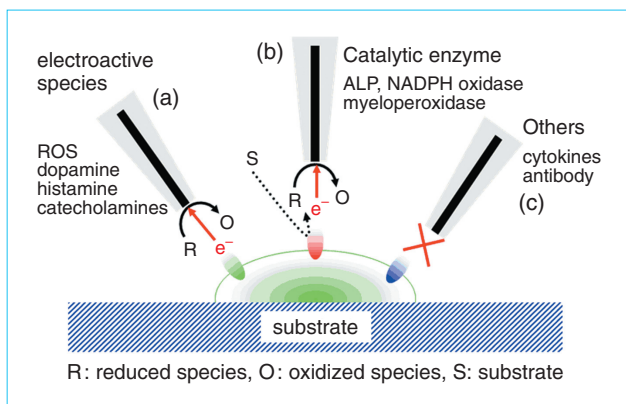


圖 2. 微小電極針對各種不同細胞分泌物質之檢測策略。將偏壓電極靠近細胞表面約數微米處，可直接偵測電化學活性分泌物 (a)。催化性分泌物 (b) 則可在含適當基質溶液中，以催化產物為標的間接偵測。但對於其他分泌物 (c)，電化學法尚難直接檢測。

常須借助具氧化還原或分解活性之酵素標定抗體來結合，方可對細胞膜表面的分子進行觀測。如高橋等人<sup>(10)</sup> 利用帶有鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase) 之標示抗體，結合於細胞膜表面，並在含有 p-aminophenylphosphate 基質的溶液中以微小電極成功地觀測到細胞膜上皮生長因子接受器 (epidermal growth factor receptor) 的表現。微小電極的空間解析度雖可觀測細胞膜表面之分泌，但細胞的分泌常具有極性，單一電極所測得胞吐信號，無法完全呈現不同部位的分泌活性。Zhang 等人<sup>(11)</sup> 嘗試以微小電極陣列，量測不同區域的胞吐活性，然若要完整呈現整體細胞膜表面的分泌活性，現有微小電極檢測技術仍無法滿足。

## 2. 共軛焦顯微鏡與胞內分子觀測

### (1) 胞內分子的觀測技術

螢光染劑發明前，細胞內部的影像僅能藉由相差 (phase) 與干涉 (differential interference contrast, DIC) 顯微鏡，粗略的呈現胞器 (例如細胞核、較粗之細胞骨架) 輪廓。1941 年 Coons 以螢光染劑結合特殊抗體，發展出免疫螢光標定法後，螢光標記技術開始大量被應用於胞內特殊蛋白質解析與定量。臨床上行之多年的螢光原位雜交法 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH)，即是利用具螢光標定特殊遺傳基因序列作為核酸探針，進行胎兒遺傳疾病的篩檢。

螢光標定的方式，雖可以將細胞內部的胞器清楚地呈現，但卻僅限於平面的解析，不足以重現分子在細胞內分布的立體影像。雖然藉由電子顯微鏡搭配奈米粒子的標定 (labeling)，以切片方式可觀測胞內分子的分布，但無論是穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscopy, TEM)、或是掃描式電子顯微鏡 (scanning electron microscopy, SEM) 技術，均無法在細胞正常生理條件下操作，遑論細胞即時動態行為的觀測。1955 年 Minsky 及多位學者開發出共軛焦顯微鏡 (confocal microscopy) 後，活體細胞內部之立體影像以及其動態變化，得以透過螢光標定技術清楚呈現。其工作原理如圖 3 所示，當光線聚焦於樣本上時，聚焦點之斷面稱為聚焦面 (focal plane)。當不同聚焦面的光線通過針孔光圈 (pinhole) 後，僅有聚焦面之影像可以清楚的成像。以此原理，只須調整針孔光圈與細胞的距離，便截取不同聚焦面的影像，透過影像技術重建細胞的三維影像，搭配不同時間的紀錄，可進一步成為動態的四維影像<sup>(12-15)</sup>。

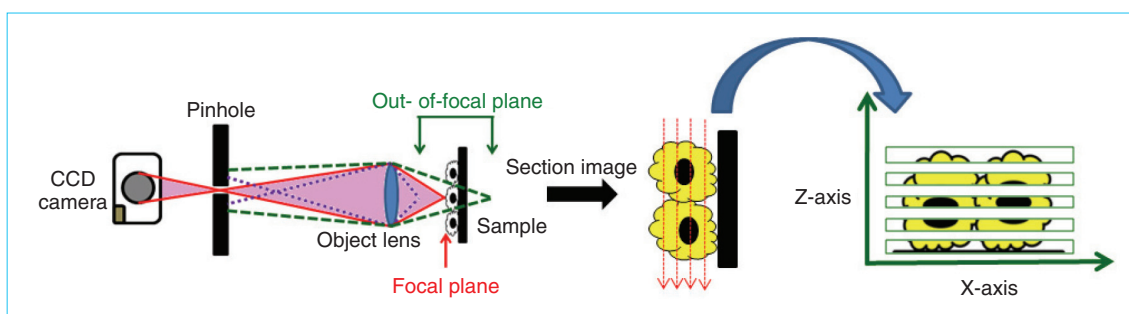


圖 3. 共軛焦顯微鏡法對細胞成像原理概念圖。

## (2) 螢光分子的選擇與應用

除了共軛焦顯微技術的突破外，各種不同螢光探針藉由擴散、注入或基因轉殖等方式進入細胞內部，將細胞內不同蛋白質分布呈現，提供蛋白質調控研究更多的資訊。目前可用螢光標記分子種類繁多(如表 1)，主要包含結合型探針 (conjugated probes)、分子探針 (molecular probes)、核酸探針 (nucleic acid probes)、細胞功能性探針 (cell function probes)、螢光蛋白 (fluorescent proteins) 以及量子點 (quantum dot) 等<sup>(16)</sup>。以下逐項做簡單說明。

- ① 結合型探針 (conjugated probes)：如 Cy2、Cy3、Cy5 染劑，因激發與散射波長間距窄，不易與其他波長螢光交互影響，且對胺基酸上的胺基 (amide group) 親和性高，廣泛地應用於蛋白質標定。
- ② 分子探針 (molecular probes)：Alexa 系列的螢光染劑，激發光波長涵蓋紫外光到近紅外光，可

鍵結於特定抗體上，作為免疫螢光染色，由於可用的激發波長較多，方便對不同特定蛋白同步觀察。

- ③ 核酸探針 (nucleic acid probes)：Hoechst 33342/33258、DAPI 與 ethidium bromide (EtBr) 對核酸中的腺嘌呤-胸腺嘧啶鹼基對 (adenine-thymine pair) 具高親和性，適用於核酸染色，與細胞中核酸含量呈正比關係，故 EtBr 常用於聚合酶鏈鎖反應後的 DNA 半定量染色分析。另外，propidium iodide (PI) 則常見於細胞週期 (cell cycle) 分析。
- ④ 細胞功能性探針 (cell function probes)：細胞內鈣離子參與多項生理調控。Indo-1 是常見的鈣離子螢光探針，Indo-1 螢光強度與細胞內鈣離子濃度成正比。此外，dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) 染劑可穿透細胞膜，在細胞內經  $H_2O_2$  反應生成 dichlorofluorescein (DCF)

表 1. 生物醫學上常用之螢光分子種類及波長範圍<sup>(16)</sup>。

	名稱	激發波長 (nm)	散射波長 (nm)	位移量 (nm)	應用
結合型探針 (conjugated probes)	Cy2	490	510	20	蛋白質大分子的結合
	Cy3	540	590	50	
	Cy5	620	680	60	
	Texas red	589	615	26	
分子探針 (molecular probes)	Alexa 350	346	445	1	鍵結於抗體上做免疫螢光染色，種類繁多
	Alexa 388	494	517	23	
	Alexa 594	590	617	27	
	Alexa 647	650	668	18	
核酸探針 (nucleic acid probes)	DAPI	345	455	10	細胞週期測定、DNA 晶片、免疫螢光染色
	Hoechst 33342/Hochst 33258	343	483	140	
	Ethidium bromide	493	620	127	
	Propidium iodide (PI)	536	617	81	
細胞功能性探針 (cell function probes)	Iodin-1	361/330	490/405	129/75	細胞內鈣離子測定
	Fluo-3	506	526	20	
	DCFH	505	535	30	偵測細胞內氧化作用
螢光蛋白 (fluorescent proteins)	GFP	488	558	70	胞內蛋白質調控與運送之監測

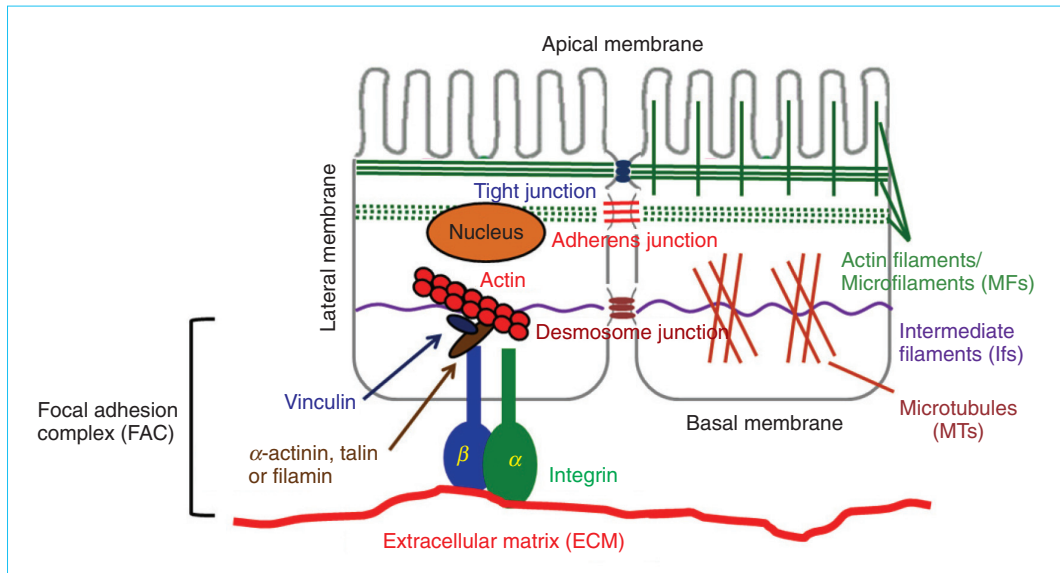


圖 4. 上皮細胞排列示意圖。正常生理環境下，細胞會藉由焦點附著複合體貼附於細胞外基質，並透過不同的連接蛋白 (junction protein) 將彼此緊密連接。一般相信細胞內的機械性質主要由三種細胞骨架所提供，分別為微管絲 (microtubules, MTs)、中間絲 (intermediate filaments, IFs) 與肌動蛋白絲 (actin filaments or microfilaments, MFs)<sup>(18)</sup>。

綠色螢光，可做為細胞內氧化傷害的程度指標。

- ⑤ 螢光蛋白 (fluorescent proteins)：生物螢光的水母 (*Aequorea victoria*) 體內所發現的綠色螢光蛋白 (green fluorescent protein, GFP)，透過螢光蛋白基因殖入特定蛋白質表現載體，可令轉殖細胞產生自發性螢光蛋白，此一做法可避免螢光分子對細胞的傷害，並觀測特定蛋白質表現以及其在細胞內的動態調控<sup>(17)</sup>。

雖然螢光染色搭配共軛焦顯微鏡，可觀察蛋白質或細胞體動態分布，但大部分螢光分子並不穩定，其發光強度易隨著照射時間或強度增加而不斷減弱，產生漂白效應 (bleaching effect)，不利於定量分析。此外，不同螢光染劑須搭配不同的激發光源，在多種螢光同時觀測的需求下，恐因照射光源與散射光的相互干擾，在在限制了可用染劑的種類。近來量子點的物理特性，有機會解決螢光染劑的困境，這些小型奈米微粒可以反覆耐受更多的激發與散射，使得螢光時間可延長數千倍，以供長期追蹤，就螢光亮度以及穩定性而論，可望成為細胞影像觀測的一大利器。

### 3. 物理性感測器 (Physical Sensor) 在細胞力學的應用

#### (1) 細胞力學之生理意義

有關細胞骨架蛋白在細胞力學 (如移動、貼附、伸展等運動) 所扮演的角色，以及其與不同刺激間的反應機制，迄今仍不明瞭，相關研究也面臨很多瓶頸。1997 年 Chen<sup>(18)</sup> 將人類及牛血管內皮細胞，培養於不同面積的纖維連接蛋白 (fibronectin) 基質上，發現當基質面積小於 5 微米見方，細胞因無法有效攤附 (spreading)，而導致凋亡 (apoptosis)。該團隊認為細胞的生死與其能否維持本身結構的張力有關，此一論點突顯細胞生理的調控因子，除了酵素、醣類、蛋白質、脂質等化學或生物分子外，更包含維持細胞構造的骨架分子，開啟了後續細胞力學研究的熱潮。極性 (polarity) 排列上皮細胞 (如圖 4) 即是細胞力學研究最典型的例子，細胞內部經由微管絲 (microtubules, MTs)、中間絲 (intermediate filaments, IFs) 與肌動蛋白絲 (actin filaments or microfilaments, MFs) 等三種纖維蛋白，構成細胞骨架 (cytoskeletons) 維持細胞膜張力與形狀，細胞間則藉由連接蛋白 (tight junction,

adherens junction, desmosome) 與集中附著點/局部貼附 (focal adhesion) 彼此緊密結合，並將細胞固定在胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 上。胞外基質對細胞骨架之機械性質及相鄰細胞間的連接，具有重要的調控作用。如圖 4 所示，以細胞骨架調控假說為基礎，藉由細胞膜上的整合素 (integrin)，將胞外基質與細胞骨架相互連結，因而細胞得以附著在胞外基質上<sup>(17)</sup>。在細胞移動過程中，內部的骨架分子將不斷分解、運送並且重新組合，此時胞內的蛋白質將聚集成一緻密的複合體，稱為焦點附著複合體 (focal adhesion complex, FAC)<sup>(18)</sup>。

另外，細胞力學訊息傳遞 (mechanotransduction) 機制顯示<sup>(19)</sup>，細胞與胞外基質或相鄰細胞間之力學刺激，會透過機械感受器轉換成內部的調控訊息，影響細胞骨架蛋白與貼附因子的生成或重組。透過分子層級的細胞力學探討，有助於闡明細胞之生長、趨化或凋亡等生理反應，並可對細胞骨架分子調控與細胞機械性質間，提供互相佐證的直接證據，因此成為近年來細胞生理研究上相當重要的方向。

## (2) 細胞力學量測技術與應用

由於細胞骨架調控為一動態行為，且須在活體細胞中方可觀測，在此條件下進行微弱力學量測相當不利。且須對胞內分子與胞外力學參數同步觀測，方可解析出兩者之間的關聯性，在在挑戰細胞力學研究的發展。如表 2 所示，有關細胞力學的研究，概可歸納成細胞黏彈力 (viscoelastic force)、貼附力 (adhesion force) 以及收縮力 (contraction force) 等三項。以下將其各參數的量測方式分述。

① 細胞黏彈力：細胞之黏彈特性與微管絲、中間絲及肌動蛋白絲三種細胞骨架分子在細胞內分布以及結合的緊密程度有關。已開發之量測方法如下：

(i) 磁扭轉細胞儀 (magnetic twisting cytometry, MTC)：1993 年 Wang 與 Ingber 兩位學者，將氧化鐵磁性微珠透過接受器接合於平滑細胞表面，再以水平磁場轉動磁珠，藉由磁珠轉動與位移的觀察，推估細胞表面的黏彈力<sup>(20)</sup>。

(ii) 微管吸入法 (micropipette aspiration)：利用玻璃微管內外壓力差將細胞吸入，因不同細胞

黏彈係數的差異，影響了細胞在微管內所受牽引力的尺寸，藉由微管內外壓力差與細胞牽引速度，計算細胞黏彈力<sup>(21-22)</sup>。

(iii) 原子力顯微鏡 (atomic force microscope, AFM)：利用探針懸臂桿 (cantilever) 在特定共振頻率下，以固定振幅掃描細胞表面，當探針經過細胞不同黏彈特性區域時，引發懸臂桿擺動相位偏移，經鎖相迴路可測得相位差變化量，藉以計算細胞表面特定位點之黏彈。目前也被廣泛地應用在細胞型態以及軟組織或分子間力學研究<sup>(23-24)</sup>。

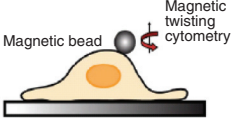
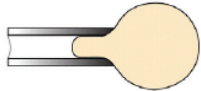
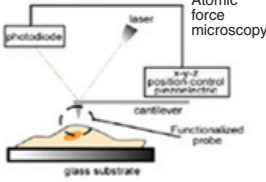
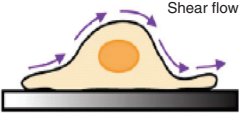
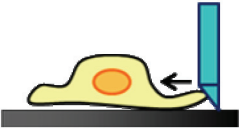
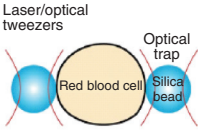
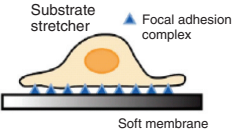
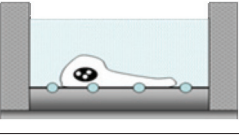
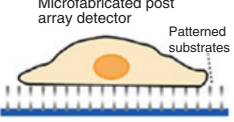
② 細胞附著力：貼附型細胞藉由細胞膜表面之整合素，透過 FAC 貼附於外部基質，這些分子鍵結的強弱與細胞附著力有關，評估方法有如下幾種：

(i) 微流場分析法 (microflow filed)：早在 19 世紀即有學者利用流場模型分析細胞對於基材的黏著力大小，主要以黏著能密度 (adhesion energy density) 為參考物理量，定義剝離單位面積黏膜所需要的功<sup>(25)</sup>。相同原理也可利用流體在微管道內流動時，在管壁產生剪應力剝離管道中的細胞。藉由不同流速的操控以及管壁內部修飾，探討細胞在不同材料表面的貼附力<sup>(26)</sup>。

(ii) 微玻璃管脫附法 (cytodetacher)：此技術於 1999 年由 Athanasiou 等人提出，作法是將一直徑 7 微米、長度 2 公分的微玻璃碳管貼附在玻璃探針 (直徑 75 微米) 上，以顯微鏡觀察玻璃探針撥動細胞時所產生的位移量，藉由玻璃探針之變形量，估算細胞在基材上之附著力。發現軟骨細胞在未處理之基材表面，造成微玻璃探針變形約 8 微米，推測細胞貼附力約為  $38.9 \pm 10.6$  皮牛頓 (pN)<sup>(27)</sup>。

(iii) 雷射鑷 (laser tweezers)：原理為當平行的雷射光束經過顯微物鏡聚焦後，光子在穿透圓形粒子的過程中，因折射而產生動量變化，造成圓粒子的反作用力，使得粒子被拉向雷射光聚焦的焦點上。光學鑷可操作的力量範圍約數皮牛頓，但細胞完全貼附於基材上時其附著力可高達微牛頓。因此此方法不適用於細胞剝離的應用<sup>(28)</sup>。

表 2. 細胞力學參數及其量測技術<sup>(33)</sup>。

細胞力學行為	細胞微力學評估技術		應用限制
	名稱	圖例	
黏彈力	磁場微珠		適合細胞整體黏彈力的評估技術，不適合單分子對細胞黏彈力之量測。
	微管吸附		
	原子力顯微鏡		
附著力	微流場		僅適用於巨觀的細胞貼附力學評估，無法對細胞特定區域之附著力進行量測。
	細胞脫附		細胞受力受玻璃探管與基材間距影響，實際操作時不易確定細胞是否確實由基底刮除。
	光學／雷射鐳		產生的力量較微弱，僅適合細胞貼附初期附著力的評估，無法撥動已緊密貼附之細胞。
收縮力	可皺摺式基材		受漣漪效應影響，觀測時難以精確地分辨不同區域的細胞收縮力量。
	鑲嵌微珠彈性基材		雖較可皺摺式基材法容易，但仍難分辨出細胞在單一附著點的力學表現。
	微柱陣列偵測器		微柱結構可能造成細胞刺激，其設計須符合最大排列密度原則，但製作困難。

③ 細胞收縮力：此力量主要為細胞攀爬與遷移時，骨架內之肌動蛋白絲與肌凝蛋白交互運動產生<sup>(29)</sup>，已發展的量測技術如下：

(i) 可皺摺式基材 (wrinklable substrate)：主要原

理是在液態矽樹脂上覆蓋一層矽樹脂橡皮薄膜，作為細胞生長貼附的基材。Harris 等人研究纖維母細胞遷移時，利用薄膜造成的皺摺形變，推估出細胞的收縮力<sup>(30)</sup>。但基材拉

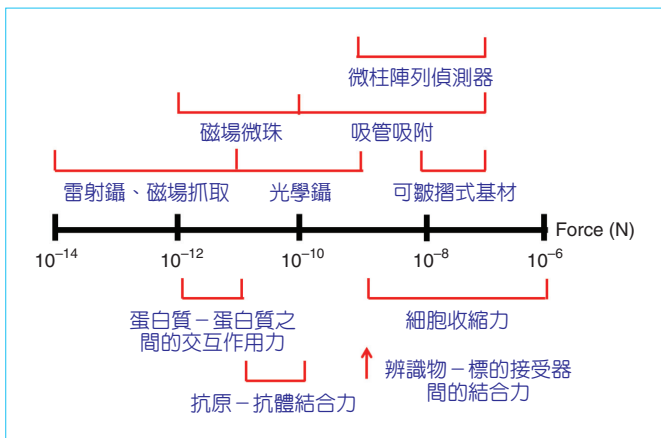


圖 5. 細胞力學評估工具與其微力量測對應圖<sup>(33)</sup>。

扯時會產生漣漪效應，難以精確地分辨不同區域的細胞收縮力量。

- (ii) 鑲嵌微珠彈性凝膠 (embed beads elastic gels)：利用鑲入矽樹脂基材中的微珠作為位置標記，透過細胞遷移過程中微珠位移量觀測，估算細胞移動所產生的收縮力<sup>(31)</sup>。此技術的定量分析雖較可皺摺式基材容易，但仍不足以分辨細胞在單一附著點的力學表現。
- (iii) 陣列微柱 (microfabricated post array detector, mPAD)：Tan 等學者亦於 2003 年設計出陣列微柱作為細胞生長的基材，以矽膠高分子 (PDMS) 製作微柱陣列，觀察細胞拉在微柱上攀爬時的微柱形變，以微柱中心點偏移量作為細胞牽引力量的參考物理量<sup>(32)</sup>。由於此技術較其他方法更能得到細胞在單一收縮點力量的大小，故成為近年來評估細胞收縮力常見之平台。

### (3) 細胞力學量測技術之挑戰

Subra Suresh 等人<sup>(33)</sup> 於 2007 年比較不同細胞力量測技術，及其適用的量測範圍 (如圖 5 所示)，顯示雖然因不同樣品、量測環境、參數等可能影響檢測極限，但 AFM 無論在操作技術、樣品製備以及檢測範圍的表現，最適合細胞力學的應用。藉探針垂直方向偏移量，以及掃描器移動所得之力距離曲線 (force-distance curve)，可計算細胞之楊氏模數 (Young's modules)，然在實際量測時卻因基材效應

(substrate effect) 的影響而高估。1965 年 Sneddon<sup>(34)</sup> 將力量與壓深 (indentation) 關係表示如下：

$$F = \delta^2 \frac{2}{\pi} \frac{E}{(1 - \nu^2)} \tan(\alpha) \quad (1)$$

其中  $F$  為作用力， $E$  為樣本楊氏模數， $\nu$  為樣本的波松比， $\delta$  為壓深， $\alpha$  為探針角錐半張角。

但因細胞膜周圍較薄，無法適用 Sneddon 公式。針對這個問題，Wei 和 Lin 同樣利用力量與壓深關係，發展出以下的薄層理論公式<sup>(35)</sup>：

$$P_L(h) = \exp(r \times h)P_f(h) + [1 - \exp(r \times h)]P_s(h) \quad (2)$$

其中基材受力為  $P_s$ ，基材及薄膜或細胞複合系統受力為  $P_L$ ，薄膜或細胞受力為  $P_f$ ，壓深為  $h$ ， $r$  為權重因子。

透過這項薄層理論的修正，使得基材與薄膜的受力可個別估算，藉以排除基材效應的影響。

## 三、整合應用例

### 1. 螢光與電化學結合

微小電極檢測法具優異的時間解析能力，使得單一細胞分泌的動態行為得以量測與量化。相反的，以共軛焦顯微鏡為基礎所發展的量測技術，則可對細胞內部的分子進行觀測，提供分泌前後顆粒球在細胞內部與膜上的影像 (如移動、融合與釋放)。Hafez<sup>(36)</sup> 利用平板白金電極陣列搭配螢光影像，同步觀測嗜鉻細胞之顆粒球螢光標記吡啶橙

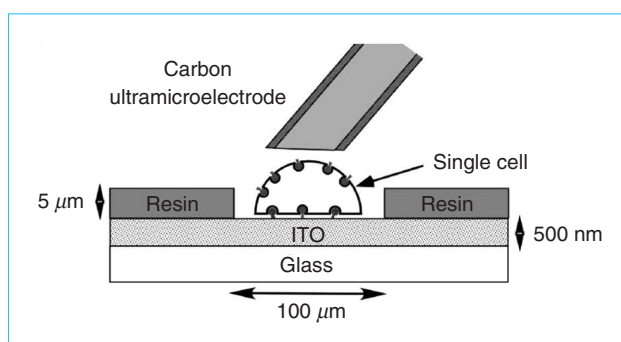


圖 6. 結合微小電極與光學檢測之單細胞檢測技術<sup>(38)</sup>。

(acridine orange) 以及兒茶酚胺 (catecholamine) 分泌信號，發現因電極氧化消耗緣故，兒茶酚胺信號出現的時間較螢光信號短。藉由個別陣列電極測得之信號時間差，搭配螢光出現的位置，構建出不同胞吐點的電化學影像。大部分細胞分泌受到胞內鈣離子濃度的調控，螢光顯微鏡與微小電極的整合，可對細胞分泌調控提供直接的印證。如圖 6 所示，Amatore 等人<sup>(37)</sup> 以 ITO 透明電極螢光顯微鏡，同時對嗜鉻細胞底部之分泌以及胞內鈣離子進行量測。此一設計亦可搭配另一組微小電極於細胞頂部，同步觀測細胞內部顆粒球，在頂部 (apical) 與底部 (basal) 兩側的運送行為的差異。

#### 四、螢光與原子力顯微鏡結合

2003 年 Chen 等人將老鼠纖維母細胞培養於經纖維黏附素 (fibronectin) 修飾的彈性高分子陣列微柱上，經由螢光抗體標定 FAC 中的 vinculin 蛋白後，不但可藉由微柱中心偏移量計算細胞收縮力，更能由螢光顯微鏡定出焦點黏著面積及 vinculin 蛋白表現，觀測細胞附著力與貼附面積之關係<sup>(32)</sup>。其結果顯示細胞周圍收縮力表現 (~50 nN) 大於中心部位，且收縮力大小與貼附點面積成正相關，顯示細胞內部拉力和細胞-基質間的交互作用有關。筆者研究室目前也透過自發性螢光即時攝影，探討細胞作用力與細胞骨架蛋白間之相互作用。如圖 7 所示，將結合 GFP 螢光之 stromal-interacting molecule (STIM1) 基因送入子宮頸癌上皮細胞株，再將轉殖成功的細胞培養於經螢光標定的微柱陣列表面，利

用共軛焦顯微鏡定出微柱頂與底部切面，比對圓心位移距離計算細胞收縮力。由右圖觀察發現，上皮生長因子 (epithelial cell growth factor, EGF) 刺激時間與微柱偏折量呈正相關，顯示收縮力隨 EGF 刺激時間累積而加強。同時由綠色螢光的變化發現，STIM1 分子聚集於微柱表面，顯示生長因子能刺激 STIM1 分子聚集，並驅動細胞產生更大的收縮力量。

#### 五、應用策略與未來發展

共軛焦顯微鏡、微小電極以及原子力顯微鏡是現有細胞檢測技術的主流，二者或三者間的整合可以補足不同檢測方法的缺點，並可對不同的細胞行為同時予以監測。由於微小電極與原子力顯微鏡均利用微小探針進行量測，並不適用活體細胞內部分子的觀測，恰好共軛焦螢光顯微鏡可以彌補此一缺憾。另外，螢光分子空間解析度不足的缺點，也可由微小電極或原子力顯微鏡探針補足。筆者認為將來技術的整合，會是以光學檢測搭配胞外各種電、化學與機械力學的量測。然而隨著探針製作技術的精進，將來線徑數奈米的微小電極，在不影響細胞正常生理的條件下進入細胞體內，進而以電化學方式偵測胞內物質也不無可能。

單細胞檢測是細胞行為研究的基礎，各別技術發展雖可改善細胞內外行為觀測，但單細胞檢測普遍有實驗數量不足的疑慮。現有檢測方法相當耗時，如何提升檢測的速度，藉以提高實驗結果的可信度，會是未來發展的一個重點。其中將微製程開

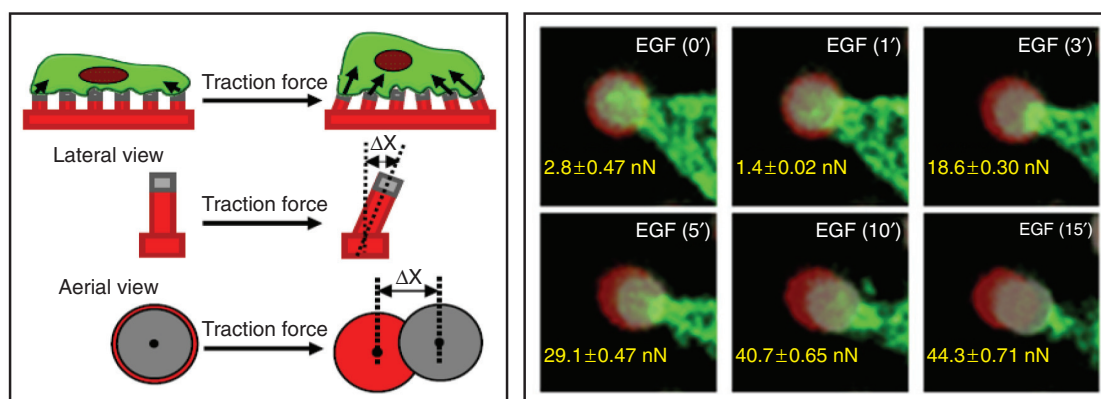


圖 7. GFP-STIM1 螢光表現之子宮頸癌上皮細胞株於微柱陣列表面，其收縮力與胞內分子分布現象。

發出的單細胞陣列 (single cell array) 晶片與微流體系統整合，搭配影像或多通道電化學檢測技術，可望大幅提升單細胞檢測的速度。至於細胞力學量測，因探針操控不易，較難發展成多工量測平台。最後，構建兩種或三種以上技術整合於顯微影像平台，可對胞內蛋白調控與胞吐或細胞力學進行同步觀測，預期可為細胞骨架調控、癌細胞轉移及免疫調控等基本的細胞生理機轉，開發出許多有利的研究工具。

## 參考文獻

1. A. Jeremic, *J. Cell Mol. Med.*, **12**, 1151 (2008).
2. W. Wang, S. H. Zhang, L. M. Li, Z. L. Wang, J. K. Cheng, and W. H. Huang, *Anal. Bioanal. Chem.*, **394**, 17 (2009).
3. F. Reimann, A. M. Habib, G. Tolhurst, H. E. Parker, G. J. Rogers, and F. M. Gribble, *Cell Metab.*, **8**, 532 (2008).
4. R. Miranda-Ferreira, R. de Pascual, A. M. de Diego, A. Caricati-Neto, L. Gandia, A. Jurkiewicz, and A. G. Garcia, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **324**, 685 (2008).
5. A. Schulte and W. Schuhmann, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **46**, 8760 (2007).
6. R. M. Wightman, *Science*, **311**, 1570 (2006).
7. H. Yamada, H. Fukumoto, T. Yokoyama, and T. Koike, *Anal. Chem.*, **77**, 1785 (2005).
8. Z. Y. Li, W. Zhou, Z. X. Wu, R. Y. Zhang, and T. Xu, *Biosens. Bioelectron.*, **24**, 1358 (2009).
9. C. Y. Chang, Y. Takahashi, T. Murata, H. Shiku, H. C. Chang, and T. Matsue, *Lab Chip*, **9**, 1185 (2009).
10. Y. Takahashi, T. Miyamoto, H. Shiku, R. Asano, T. Yasukawa, I. Kumagai, and T. Matsue, *Anal. Chem.*, **81**, 2785 (2009).
11. B. Zhang, K. L. Adams, S. J. Lubber, D. J. Eves, M. L. Heien, and A. G. Ewing, *Anal. Chem.*, **80**, 1394 (2008).
12. S. J. Tseng, Y. H. Lee, Z. H. Chen, H. H. Lin, C. Y. Lin, and S. C. Tang, *J. Biomed. Opt.*, **14**, 044004 (2009).
13. B. Huang, M. Bates, and X. Zhuang, *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 993 (2009).
14. X. Darzacq, J. Yao, D. R. Larson, S. Z. Causse, L. Bosanac, V. de Turriz, V. M. Ruda, T. Lionnet, D. Zenklusen, B. Guglielmi, R. Tjian, and R. H. Singer, *Annu. Rev. Biophys.*, **38**, 173 (2009).
15. J. A. Conchello and J. W. Lichtman, *Nat. Methods*, **2**, 920 (2005).
16. <http://pingu.salk.edu/flow/fluo.html>.
17. C. Y. Chou, M. R. Shen, and S. N. Wu, *Cancer Res.*, **55**, 6077 (1995).
18. C. S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides, and D. E. Ingber, *Science*, **276**, 1425 (1997).
19. F. H. Silver and L. M. Siperko, *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, **31**, 255 (2003).
20. B. Fabry, G. N. Maksym, R. D. Hubmayr, J. P. Butler, and J. J. Fredberg, *J. Magn. Magn. Mater.*, **194**, 120 (1999).
21. W. R. Jones, H. P. Ting-Beall, G. M. Lee, S. S. Kelley, R. M. Hochmuth, and F. Guilak, *J. Biomech.*, **32**, 119 (1999).
22. K. J. V. Vliet, G. Bao, and S. Suresh, *Acta Materialia*, **51**, 5881 (2003).
23. M. Gelbert, A. Roters, M. Schimmel, J. Ruhe, and D. Johannsmann, *Surf. Interface Anal.*, **27**, 572 (1999).
24. G. T. Charras, P. P. Lehenkari, and M. A. Horton, *Ultramicroscopy*, **86**, 85 (2001).
25. D. A. Hammer and D. A. Lauffenburger, *Biophys. J.*, **52**, 475 (1987).
26. H. Lu, L. Y. Koo, W. M. Wang, D. A. Lauffenburger, L. G. Griffith, and K. F. Jensen, *Anal. Chem.*, **76**, 5257 (2004).
27. K. A. Athanasiou, B. S. Thoma, D. R. Lanctot, D. Shin, C. M. Agrawal, and R. G. LeBaron, *Biomaterials*, **20**, 2405 (1999).
28. A. Ashkin, *Science*, **210**, 1081 (1980).
29. D. R. Critchley, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **12**, 133 (2000).
30. A. K. Harris, P. Wild, and D. Stopak, *Science*, **208**, 177 (1980).
31. J. Lee, M. Leonard, T. Oliver, A. Ishihara, and K. Jacobson, *J. Cell Biol.*, **127**, 1957 (1994).
32. J. L. Tan, J. Tien, D. M. Pirone, D. S. Gray, K. Bhadriraju, and C. S. Chen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 1484 (2003).
33. S. Suresh, *Acta Biomater*, **3**, 413 (2007).
34. I. N. Sneddon, *Int. J. Eng. Sci.*, **3**, 47 (1965).
35. P.-J. Wei and J.-F. Lin, *Surface and Coatings Technology*, **200**, 2489 (2005).
36. I. Hafez, K. Kisler, K. Berberian, G. Dernick, V. Valero, M. G. Yong, H. G. Craighead, and M. Lindau, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 13879 (2005).
37. C. Amatore, S. Arbault, Y. Chen, C. Crozatier, F. Lemaitre, and Y. Verchier, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **45**, 4000 (2006).
38. C. Amatore, S. Arbault, I. Bonifas, M. Guille, F. Lemaitre, and Y. Verchier, *Biophys. Chem.*, **129**, 181 (2007).



張景裕先生為國立成功大學醫學工程博士，現任國立成功大學醫學工程研究所博士後研究員。

Ching-Yu Chang received his Ph.D. in biomedical engineering from National Cheng Kung University. He is currently a postdoctoral fellow in the Institute of Biomedical Engineering at National Cheng Kung University.



陳盈廷小姐現為國立成功大學醫學工程研究所博士班學生。

Ying-Ting Chen is currently a Ph.D. student in the Institute of Biomedical Engineering at National Cheng Kung University.



沈孟儒先生為英國牛津大學生理學博士，現任國立成功大學藥理學研究所教授及國立成功大學附設醫院婦產科醫師。

Meng-Ru Shen received his Ph.D. in physiology from Oxford University, England. He is currently a professor in the Department of Pharmacology at National Cheng Kung University and also a gynecologist of Obstetrics and Gynecology at National Cheng Kung University Hospital.



張憲彰先生為日本東北大學應用化學博士，現任國立成功大學醫學工程研究所教授。

Hsien-Chang Chang received his Ph.D. in applied chemistry engineering from Tohoku University, Japan. He is currently a distinguished professor of the Institute of Biomedical Engineering at National Cheng Kung University, Taiwan.