

# 利用螢光生命期顯微術觀測細胞新陳代謝過程

## Monitoring the Cellular Metabolism via Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy

林伯彥、郭宗霖、高甫仁

Po-Yen Lin, Tsung-Lin Kuo, Fu-Jen Kao

氧化磷酸化是細胞代謝裡一個重要的生化過程，且與生物體內能量生成與利用有關。參與過程的重要分子—NADH 具有自發螢光的特性，使我們能利用螢光技術進行非侵入式的觀測及研究。在本研究裡，利用螢光生命期顯微技術觀察細胞代謝過程中 NADH 自發螢光生命期的變化，希望能建立生命期參數與細胞生理(細胞密度、凋亡與壞死)及病理狀態(阻斷電子傳遞鏈)間之關連性。

Oxidative phosphorylation is an important metabolic pathway that uses energy released by the oxidation of nutrients to produce adenosine triphosphate (ATP). Nicotinamide adenine dinucleotide reduced (NADH) participated in this process provides detectable fluorescence signal make it possible to utilize the non-invasive optical technique for further observation. In this study, fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) is employed to monitor the function/conformational state of NADH associated with cellular metabolism in physiological (cell density, apoptosis, necrosis) and pathological states (inhibition of the electron transfer chain).

### 一、前言

光學顯微鏡是觀察生物細胞與組織極重要的儀器之一，除了非破壞性及適當的觀測環境優點外，並提供次微米左右(約光波長一半)的空間解析能力。在生物組織體內，存在一些自發螢光的分子(endogenous fluorophore)，如芳香氨基酸(Trp, Tyr, Phe)、膠原蛋白(collagen)及煙醯胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD<sup>+</sup>)等，觀察這些螢光分子的螢光特性，能探究出生物組織其週遭

微奈米環境，進而反映許多生理及病理狀態<sup>(1-6)</sup>。在利用單光子激發為主的顯微光譜技術中，往往會遭遇許多問題，如組織吸收與散射，並造成穿透距離受限等<sup>(7, 8)</sup>，多光子顯微技術(multiphoton microscopy)可用以克服這些問題<sup>(9-12)</sup>，由於使用波長較長，因此能有較深的穿透距離，同時對樣品產生較少的破壞(photobleach and photodamage)<sup>(13, 14)</sup>。多光子顯微術所使用的光源為鈦藍寶石飛秒雷射(Ti:sapphire)，波長範圍約在 700–1000 奈米，所對應之雙光子激發波段非常適合探生物組織內的自

發螢光分子，如 NADH (NAD reduce) 的激發吸收峰約 340 nm，發出的螢光光譜最大值約在 460 nm。在本實驗裡，主要研究 NADH 的自發螢光特性與細胞代謝過程的相關性，雖然 NADPH (NAD phosphate) 也有類似的激發及放射波長範圍，使得在量測上無法從光譜上區分這兩種分子，然而在細胞代謝反應參與過程中 NADH 較為重要，NADPH 則主要貢獻在合成反應中，因此 NADH 所提供的螢光便成為探索細胞代謝過程中重要的線索。

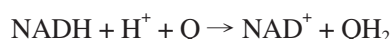
## 二、細胞代謝

在生物體中，細胞內生理的新陳代謝 (metabolism) 為維持生命循環所必需之化學反應，主要可分為代謝 (catabolism) 和合成 (anabolism)。代謝作用為氧化反應，將大分子經降解成小分子，如： $H_2O$ 、 $CO_2$ ，同時伴隨能量 (ATP、NADH 等) 的產生，能量又再被合成作用所利用，將簡單型式的前驅物 (胺基酸、核酸、單醣類) 轉換成大分子 (蛋白質、核醣核酸、多醣體)。

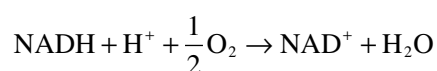
NADH 的產生主要發生在醣類、脂質、胺基酸代謝的過程。細胞在有氧的環境下進行的新陳代謝，稱之為呼吸作用 (respiration)，大分子經氧化分解為二碳分子乙醯輔酶 (acetyl-CoA) 後，會進入檸檬酸循環 (citric acid cycle)，藉由許多酵素氧化成二氧化碳，同時還原輔酶  $NAD^+$  和 FAD，使其

攜帶電子而成 NADH 和  $FADH_2$ ，進入生物代謝最終步驟，電子傳遞鏈及氧化磷酸化反應 (oxidative phosphorylation)，此氧化反應產生的效用將促使細胞合成 ATP。

NADH 存在兩種狀態：自由態與束縛態 (free and bound form)，束縛態指的是與另一分子結合成複合物時的狀態，例如，與粒腺體上的膜蛋白結合後形成複合物 (complex I)，這個複合物具調節從 NADH 到氧的電子傳輸功能，NADH 作為呼吸作用中電子的供應者 (donor)，在 complex I 上將兩個電子釋放進入傳遞鏈 (electron transfer chain)，如圖 1 所示：



此兩個電子經由呼吸鏈傳遞至 complex IV (細胞色素氧化酶, cytochrome oxidase) 後，由氧分子接收：



此反應為放能反應，產生的能量用於將質子 (proton) 從基質 (matrix) 送到內膜區 (intermembrane space)，使內膜兩側質子濃度產生差異，此質子濃度梯度驅動 ATP 合成酶的活化，進而產生 ATP。因此束縛態的 NADH 可反映生物體細胞代謝的速率與程度，同時與生物體內能量來

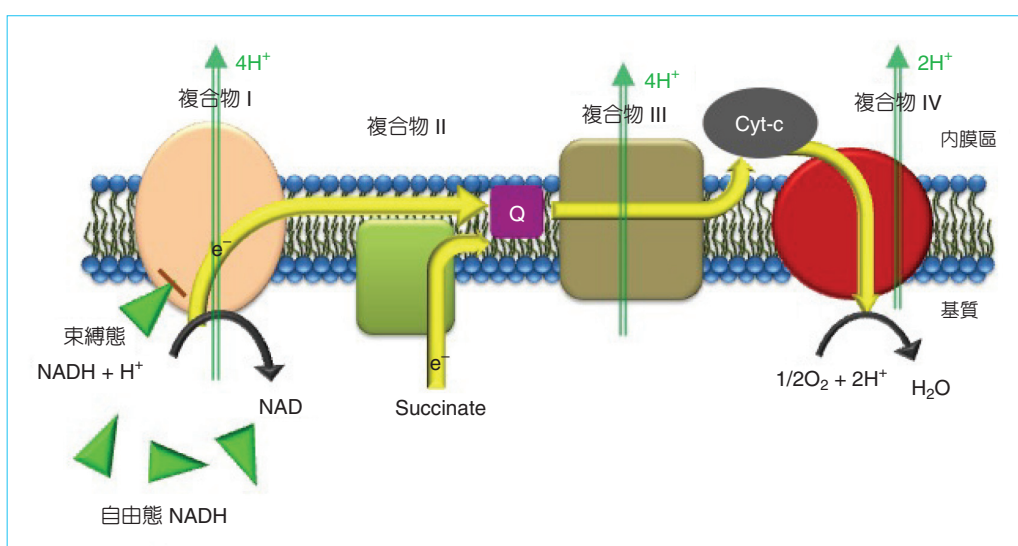


圖 1.  
電子傳遞鏈示意圖。

源 ATP 的生成有關。

NADH 在自由態與束縛態時的螢光光譜差異不明顯，因此應用於細胞代謝研究上較為不易。然而螢光生命期 (fluorescence lifetime) 則提供我們觀察的另一指標，螢光生命期表示分子在激發態平均暫留的時間，並會受分子周圍環境及狀態影響<sup>(15)</sup>，因此藉由測量 NADH 的螢光生命期，可以了解細胞在代謝過程的變化。NADH 的激發波長約為 340 nm，在溶液中其自由態螢光生命期約為 0.3–0.7 ns，而峰值在 0.4 ns 左右；與蛋白質或酵素結合之束縛態 (bound form)，其螢光生命期約在 2.5–3.0 ns，而形成複合物之 NADH 表示其可能參與電子傳遞鏈上之反應。在觀測生物體內 NADH 的螢光顯微術中，最值得關注的部分在於癌症細胞的演變，因其能量代謝上的需求較正常細胞來得頻繁，且獲取 ATP 的方式亦不同，癌化細胞在醱解過程迫使細胞以無氧代謝的方式製造 ATP，並不經由粒腺體的氧化磷酸化反應，因此可由 NADH 自由態和結合態的比例來分析細胞型態。在筆者的研究中，利用螢光生命期顯微術 (fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM) 來觀察 NADH 在細胞代謝過程中螢光生命期的變化。

### 三、螢光生命期顯微術的應用

螢光生命期顯微術是結合共焦掃描顯微術及時間相關單光子計數系統 (time-correlated single photon counting, TCSPC)<sup>(16)</sup> 的先進光學顯微術。FLIM 影像中每個像素所表示的螢光生命週期係透過 TCSPC 所測量的螢光衰減曲線經計算後擬合求得。TCSPC 運用與碼錶計時類似的原理，測量螢光生命期需要記錄脈衝雷射將分子激發到受激態的時間點，即透過高速光偵測器送出觸發的訊號到時間電壓轉換器 (time-to-amplitude converter, TAC) 作為計時的起始點 (start)，當受激分子在一段時間後將能量以光的形式釋放出並回到基態，經由另一高速偵測器測得光子後送出作為停止 (stop) 的觸發訊號至 TAC，之後 TAC 將「開始至停止」間所累積的電壓以脈衝訊號形式傳送多通道分析器 (multichannel analyzer, MCA)，脈衝訊號的電壓和

「開始至停止」的時間間隔呈正比，MCA 則透過類比數位轉換器 (analog-to-digital converter) 將脈衝訊號轉換至時間通道 (time channel)，因此不同長短的「開始至停止」時間間隔，即分子從吸收到放出這段時間差將記錄在不同的時間通道上，經由多次的累積，會得到光子數與時間通道的統計圖 (histogram)，經由進一步分析可得到分子螢光生命週期。

實驗上，系統架設如圖 2 所示，我們使用共焦掃描顯微鏡作為觀察平台 (Olympus FV300 及 IX-71)，並利用鈦藍寶石飛秒雷射 (Mira 900, Coherent USA) 作為雷射光源，波長則設定在 750 奈米，使用雷射平均強度約 4 毫瓦，偵測器部分則使用冷卻式光子計數光電倍增管 (H7422P-40, Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japan)。在光子計數光電倍增管前放置一濾片 (477/30 Semrock, NY)，以將 NADH 的螢光訊號從背景中分離出。

在數據分析方面，因為 NADH 存在兩種狀態，分別表現二種螢光生命期，因此我們使用雙重指數遞減模型 (double-exponential decay) 來描述 NADH 的螢光衰減過程，如方程式 (1)，

$$F(t) = a_1 e^{-t/\tau_1} + a_2 e^{-t/\tau_2} \quad (1)$$

其中， $a_1 e^{-t/\tau_1}$  與  $a_2 e^{-t/\tau_2}$  分別代表 NADH 兩個不同螢光生命期的貢獻， $\tau_1$  和  $\tau_2$  為所對應的螢光生命期， $a_1$  和  $a_2$  為相對振幅，平均螢光生命期為  $\tau_a$ ：

$$\tau_a = \frac{a_1 \tau_1 + a_2 \tau_2}{a_1 + a_2} \quad (2)$$

這些模型參數的決定 ( $a_i$  與  $\tau_i$ ) 則由方程式 (3) 去擬合 TCSPC 測量到的螢光衰減分布  $I_a$  而求得，方程式 (3) 為理論模型曲線  $F(t)$  與系統響應函數 (instrument response function, IRF) 的迴旋積 (convolution integration) 結果  $I_c$ 。

$$I_c(t) = \int_{-\infty}^{\infty} I_{\text{IRF}}(t)[I_0 + F(t)]dt \quad (3)$$

其中， $I_0$  為背景雜訊， $I_{\text{IRF}}$  為系統響應函數，可透

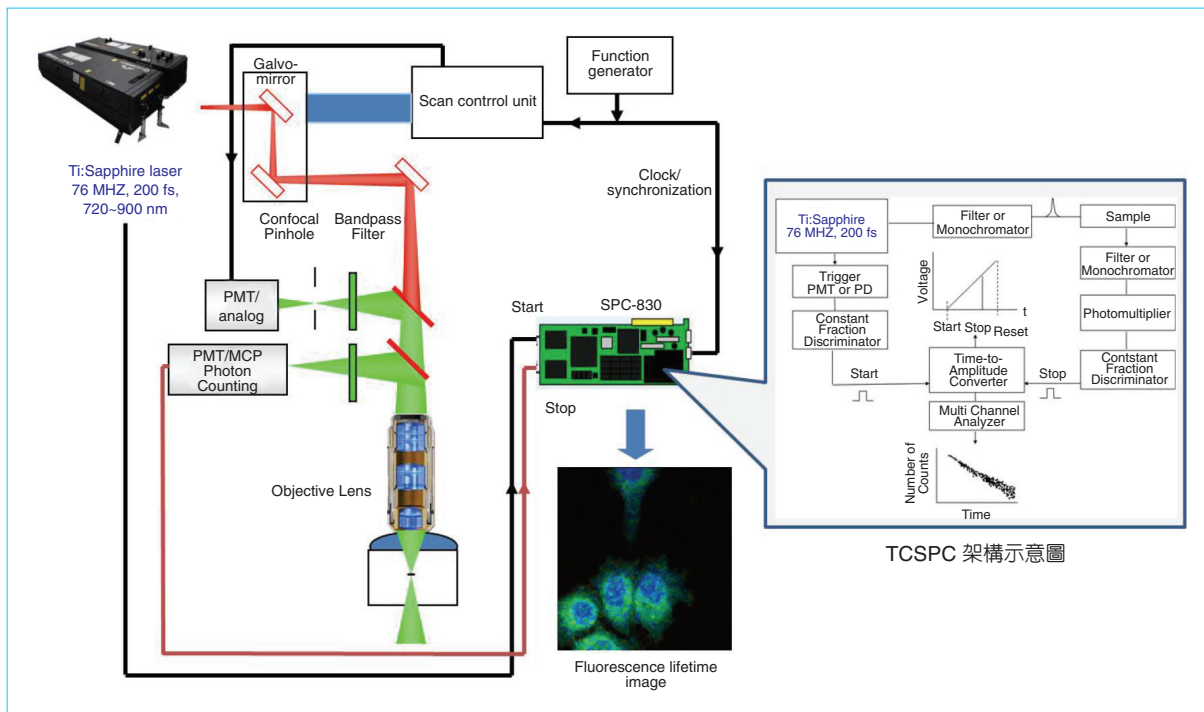


圖 2. 雙光子螢光生命期顯微系統架設圖。

過測量倍頻訊號來決定，本實驗系統裡  $I_{IRF}$  的半高寬 (full width at half maximum, FWHM) 約為 330 ps。進一步透過適合度檢定 (goodness-of-fit)  $\chi^2_R$  來判斷  $I_c$  與  $I_a$  之最佳擬合結果<sup>(17)</sup>。

## 四、NADH 螢光生命期應用於細胞生理狀態之觀測

### 1. 細胞密度的影響

在筆者的研究裡，希望透過觀察 NADH 的螢光生命期變化來探究細胞生理及病理的狀況。過去的研究發現，細胞的代謝反應會受到細胞密度的影響<sup>(18)</sup>，愈高的細胞濃度條件下，其 NADH 所呈現的平均螢光生命期也愈短，同時對應細胞生成曲線發現，NADH 自由態及束縛態 ( $a_1/a_2$ ) 的數值隨著細胞增多而增加，在有限的氧氣供應下，細胞密度愈高，細胞所獲得的氧氣供應就愈少，這樣的結果影響其氧化磷酸化及耗氧的代謝反應，即參與這些反應的束縛態 NADH 比例變少，因此從  $a_1/a_2$  (free/bound) 的數值比例，我們可以推估細胞代謝

的程度。另一方面，可透過添加阻斷電子傳遞鏈的藥品 (potassium cyanide, KCN) 來驗證這樣的結果，KCN 會抑制粒腺體內膜上第四種複合物的功能，藉以阻斷電子傳遞的過程來影響代謝過程。實驗上，我們觀察細胞在不同成長期 NADH 的螢光生命期。在前三天裡，細胞開始貼附及伸展在玻片上，此時細胞數目呈現平緩上升趨勢，稱為 lag phase，所觀察的 NADH 自由與束縛態比例 ( $a_1/a_2$ ) 由 3.8 些微增加到 4.0。第四到第六天裡，細胞數目急速成長，稱為 exponential phase，此時  $a_1/a_2$  下降到 3.3，表示有愈來愈多的束縛態 NADH 形成，即細胞代謝反應增多。到第七天後，因為養份殆耗及空間限制，使得細胞數目成長達到飽和，稱為 stationary phase， $a_1/a_2$  維持在 3.3 的數值。

在觀察細胞成長的過程中，我們發現一個有趣的現象。在集群 (colony) 中心與邊緣區域的細胞，表現出不同的  $a_1/a_2$  數值，如圖 3 所示，於 exponential phase 時，在集群邊緣的細胞比中心區域的細胞呈現出較高  $a_1/a_2$  數值 ( $3.59 \pm 0.49:3.11 \pm 0.14$ )，這顯示細胞代謝活性可能不只受氧氣不足

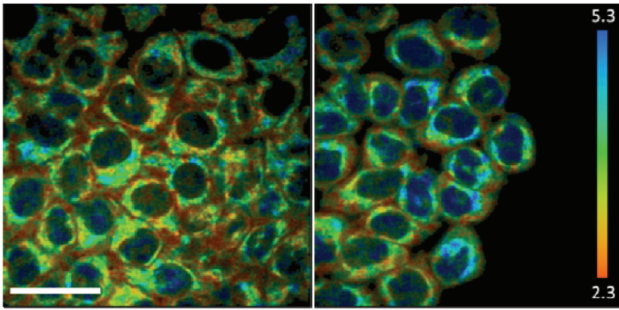


圖 3. 集群中央與邊緣區域 NADH 自由與束縛態 ( $a_1/a_2$ ) 比例對照圖<sup>(20)</sup>，比例尺為 100  $\mu\text{m}$ 。

所影響，在 exponential phase 細胞數目急速增加時，細胞週期不同階段 (cell cycle stage) 是造成  $a_1/a_2$  減少的主要原因，也就是代謝反應可能受到細胞的形貌 (morphology) 與細胞骨架成長狀態所影響<sup>(19)</sup>。

## 2. 凋亡與壞死

非侵入式偵測細胞死亡對於癌症治療範圍的評估相當重要。光動力治療法 (PDT) 為一種局部及系統性的光感藥物結合光照而達到殺死目標細胞的治療方式。雖然光感藥物會因化學性質不同而作用目標器官不同，但其作用方式皆為利用光激發藥物產生活性氧化物質 (reactive oxygen species, ROS)，間接造成細胞凋亡 (apoptosis) 和壞死 (necrosis)。由於此治療可能造成不同的細胞死亡路徑，因此在光感藥物的使用上，必須有最佳的劑量調控。

在細胞凋亡與壞死的過程，第一個步驟都是粒腺體功能的喪失，因此可藉由觀察參與氧化磷酸化反應的螢光分子來評估治療的效果。早期的文獻中<sup>(21)</sup>，利用光感藥物 verteporfin 施打於老鼠腿部肌肉，相較於未施打的細胞，其 NADH 的螢光生命週期，從未施打的  $2.1 \pm 0.5 \text{ ns}$  降為  $1.5 \pm 0.2 \text{ ns}$ 。研究者強調排除實驗的誤差，其實螢光生命週期沒有太大的改變，但螢光強度確實有明顯的下降。在本實驗中，筆者利用子宮頸癌上皮細胞 (HeLa) 和骨肉瘤細胞 (osteosarcoma, 143B) 作為觀察細胞死亡路徑的樣品。使用誘導細胞凋亡的藥物 staurosporine (STS) 以及會造成細胞壞死的高濃度雙氧水。首先，我們觀察到，加入 1  $\mu\text{M}$  STS 的

HeLa 細胞，平均螢光生命期立刻從  $1.36 \pm 0.24 \text{ ns}$  上升至  $3.6 \pm 0.56 \text{ ns}$ ，而 143 B 細胞的則從  $1.26 \pm 0.49 \text{ ns}$  上升至  $3.45 \pm 0.76 \text{ ns}$ 。由於受限於系統測量時間限制，目前我們無法觀測到 NADH 螢光生命期在加入 STS 後急速變化的過程，但仍可得知，在細胞凋亡時，造成 NADH 平均螢光生命期增加，即束縛態比例增多的現象。

為驗證此變化是由自由態和束縛態的相對比例改變而造成，因此進一步追蹤觀察。施加 STS 後，自由態的 NADH 明顯減少，當我們使用 single-exponential 模型來擬合實驗數據時，發現  $\chi_R^2$  有隨著時間改變而增加的趨勢，且  $\chi_R^2$  分布圖變得比較分散，如圖 4(a) 所示，這表示 single-exponential 的模型「逐漸地」不適合用來擬合實驗數據，即自由態 NADH 的比例隨時間增加而回復。同時由圖 4(b) 中也可發現  $a_1$  逐漸上升，在觀察的第十個小時達到 55%，因此使得螢光生命週期下降。另一方面，在加入 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  引發 HeLa 細胞壞死的實驗中，如圖 5 所示，發現其生命週期的變化不明顯，從  $1.36 \pm 0.24 \text{ ns}$  上升到  $1.51 \pm 0.51 \text{ ns}$ ，除了螢光強度減弱外，所有其他時間間隔測量都呈現同樣的結果。其中值得關注的是，在早期的研究發現，酵母菌在刺激細胞凋亡過程時，NADH 螢光強度會迅速上升，然後才逐漸減弱<sup>(22)</sup>。

## 五、NADH 螢光生命期應用於細胞病理狀態之觀測

除了細胞的凋亡及壞死的辨別外，也可利用 NADH-FLIM 來評估細胞病理狀態 (pathological state)。例如粒腺體呼吸鏈功能的缺陷是許多疾病的主因，像是肌肉病變 (myopathies) 及神經退化性疾病 (neurodegenerative disease) 等。我們利用兩種抑制粒腺體內膜上不同蛋白的藥物來影響其功能：魚藤酮 (rotenone, inhibitor of complex I) 及氫酸鉀 (KCN, inhibitor of complex IV)。這兩種藥物分別抑制電子傳遞鏈上不同的複合物；魚藤酮的作用是抑制泛醌氧化還原酶 (ubiquinone oxidoreductase) 與 NADH 的結合，氫酸鉀則是藉由抑制 complex IV

的功能來阻斷電子的傳遞。我們同時觀察這兩種藥物對 HeLa 與纖維母細胞 (fibroblast WI-38) 的影響，如圖 6 所示。圖 6(a) 和 (b) 分別代表 HeLa 與 WI-38 加入 KCN 後的反應，在加入 KCN 後兩種細胞的  $a_1/a_2$  都呈現增加的現象，在一段時間後  $a_1/a_2$  數值會下降，表示束縛態 NADH 的比例有回復的趨勢。再進一步比較 rotenone 的作用，如圖 6(c) 所示，HeLa 加入 rotenone 後， $a_1/a_2$  也觀察到增加的現象，但一段時間後，並沒有如 KCN 般有下降情形，即束縛態 NADH 的比例並沒有回復。儘管這些抑制劑對細胞代謝的影響仍需進一步研究，但這些結果顯示可透過觀察 NADH 的螢光生命期變化來研究細胞電子傳遞鏈缺陷的回復情況。

## 六、結論與未來展望

螢光生命期能反映分子微奈米環境及其本身狀

態變化，透過測量螢光生命期能夠幫助我們了解及探究微觀尺度下分子交互作用的行為。本文介紹如何應用 FLIM 技術觀察 NADH 螢光生命期變化，並顯示細胞在生理與病理狀態下，其新陳代謝變化過程中不同的反應。在觀察細胞凋亡與壞死過程裡所反映出 NADH 螢光生命期變化的差異，對於治療上藥劑用量的調整提供參考依據，另外，由粒腺體病變造成細胞代謝的變異，同樣可透過 NADH-FLIM 技術來進行觀測。未來更可結合其他光學量測技術，如偏振 (polarization) 顯微技術，藉由其所反映出的分子異向性 (anisotropy) 資訊，可幫助我們更加了解細胞代謝過程裡分子交互作用的情形。在觀測生物體內生理及病理狀態過程中自發螢光之特性時，其關連性仍需透過進一步的生物化學方法獲得確認。我們相信以光學技術為基礎的檢測平台，所提供高靈敏度及非侵入式的觀測能力，在未來應用上具有極大潛力。

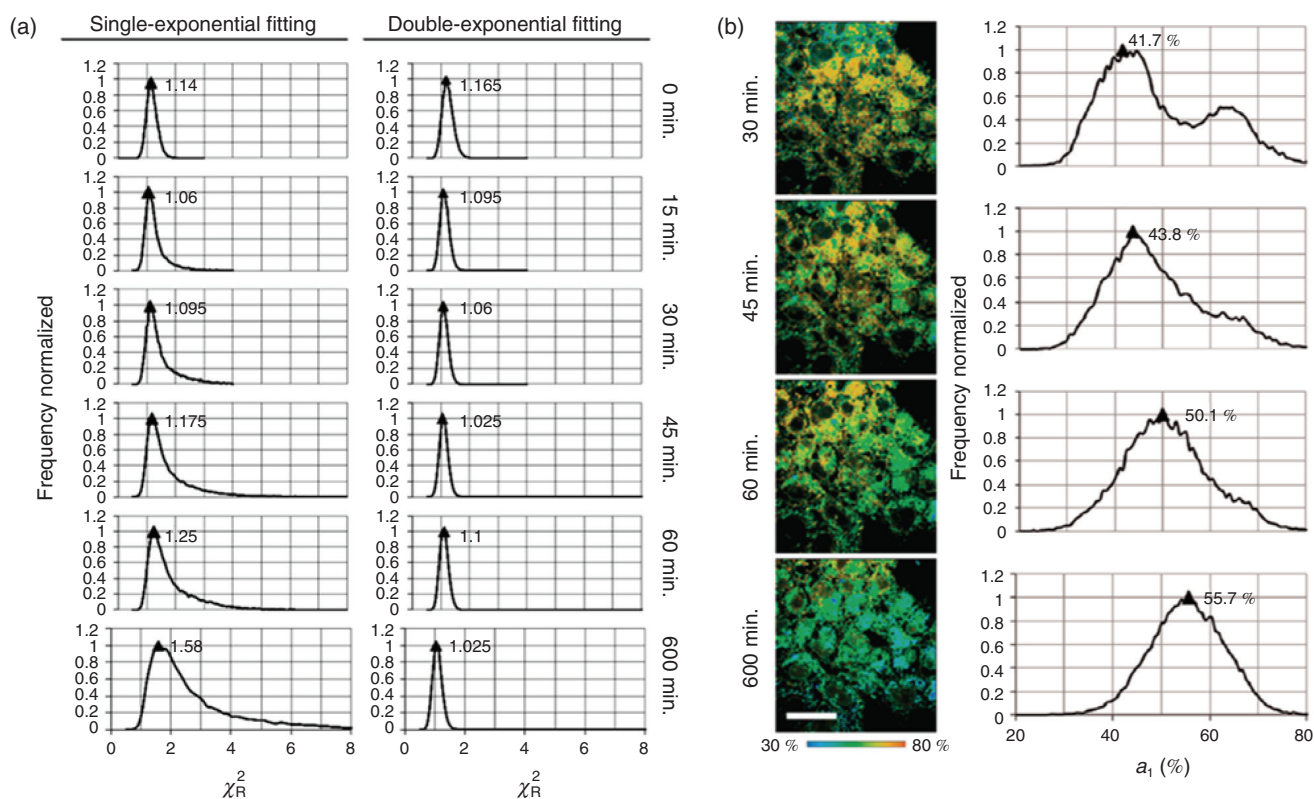


圖 4. (a) 143B 細胞 NADH 生命期擬合之  $\chi_R^2$  分布圖，(b) 143 B 細胞經 1 mM STS 處理，NADH 螢光生命期 ( $a_1/a_2$ ) 比例對照圖，顯示  $a_1$  (自由態) 比例有逐漸回復趨勢<sup>(20)</sup>。比例尺為 100  $\mu\text{m}$ 。

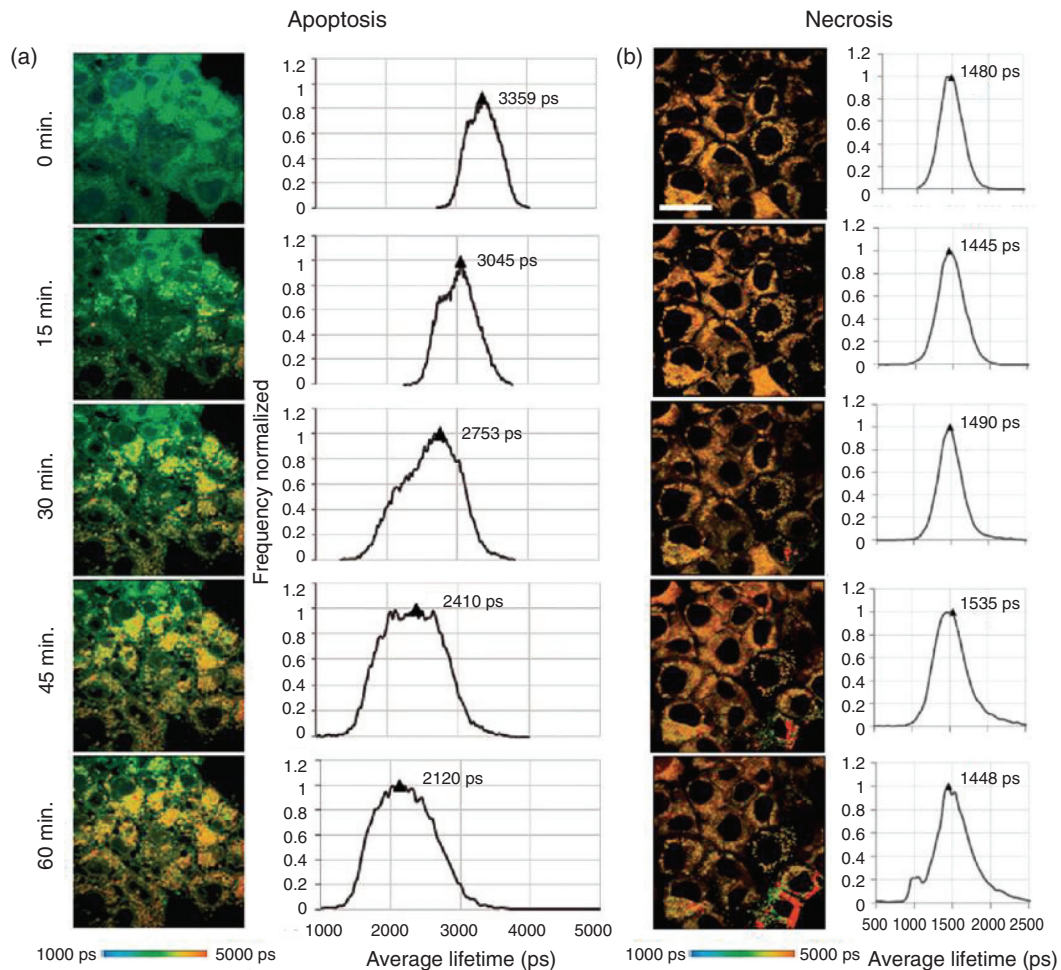


圖 5. 細胞凋亡與壞死 NADH 螢光生命期影像。(a) 143B 細胞經 1 mM STS 處理後引發細胞凋亡反應，(b) HeLa 細胞經 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理引發細胞壞死<sup>(20)</sup>。比例尺為 100 μm。

## 參考文獻

1. D. H Williamson, P. Lund, and H. A. Krebs, *Biochem. J.*, **103** (2), 514 (1967).
2. O. Warburg, *The Metabolism of Tumors*, London: Constable (1930).
3. W. S. Kunz and W. Kunz, *Biochim. Biophys. Acta*, **841**, 237 (1995).
4. B. Chance, P. Cohen, F. Jobsis, and B. Schoener, *Science*, **137**, 499 (1962).
5. B. Chance and G. R. Williams, *J. Biol. Chem.*, **217**, 395 (1955).
6. O. Kann, R. Kovacs, M. Njunting, C. J. Behrens, J. Otahal, T. N. Lehmann, S. Gabriel, and U. Heinemann, *Brain*, **128**, 2396 (2005).
7. Y. Liu, D. K Cheng, G. J. Sonek, M. W. Berns, C. F. Chapman, and B. J. Tromberg, *Biophys. J.* **68**, 2137 (1995).
8. J. A. Conchello and J. W. Lichtman, *Nat. Methods*, **2**, 920 (2005).
9. S. H. Huang, A. A. Heikal, and W. W. Webb, *Biophys. J.*, **82**, 2811 (2002).
10. W. R. Zipfel, R. M. Williams, and W. W. Webb, *Nat. Biotechnol.*, **21** (11), 1369 (2003).
11. E. Gratton, S. Breusegem, J. Sutin, Q. Ruan, and N. Barry, *J. Biomed. Opt.*, **8** (3), 381 (2003).
12. C. Xu and W. W. Webb, *Multiphoton Excitation of Molecular Fluorophores and Nonlinear Laser Microscopy*, In *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, New York: Plenum Press, 5 (1997).
13. K. König, W. Becker, P. Fischer, I. Riemann, and K. J. Halbhuber, *Opt. Lett.*, **24**, 113 (1999).
14. I.-H. Chen, S.-W. Chu, C.-K. Sun, P.-C. Cheng, and B.-L. Lin, *Opt. Quant. Electr.*, **34**, 1251 (2002).
15. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd

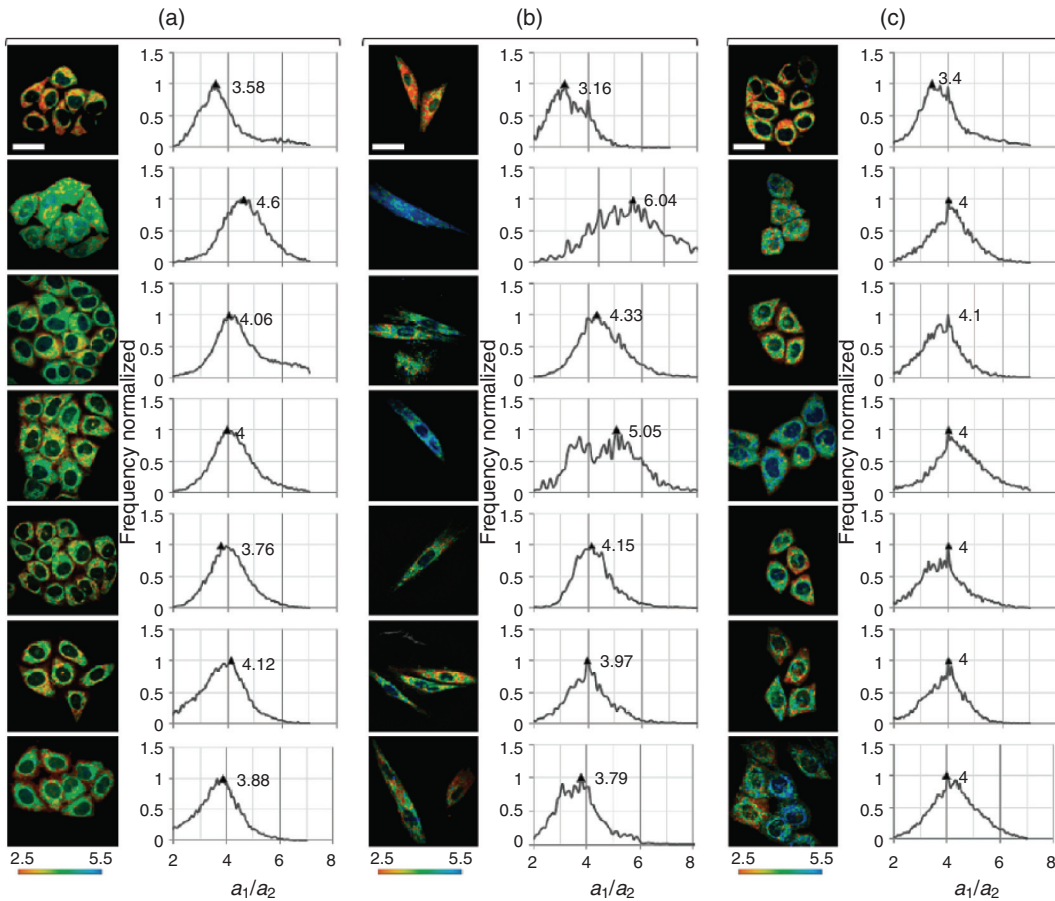


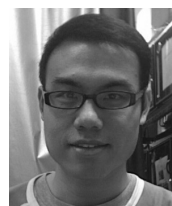
圖 6. 電子傳遞鏈抑制劑對 NADH 生命期影響，(a) HeLa 與 (b) WI-38 以 20 mM KCN 處理後螢光生命期影像，(c) HeLa 細胞以 1  $\mu$ M rotenone 處理<sup>(20)</sup>。比例尺為 100  $\mu$ m。

- ed., New York, (2006).
16. W. Becker, *Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Techniques*, Springer (2005).
  17. P. R. Bevington and D. K. Robinson, *Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences*, 3rd ed. McGraw-Hill (2002).
  18. J. Bereiter-Hahn, A. Munnich, and P. Woiteneck, *Cell Struct. Funct.*, **23**, 85 (1998).
  19. R. R. Duncan, A. Bergmann, M. A. Cousin, D. K. Apps, and M. J. Shipston, *J. Microsc.*, **215** (1), 1 (2004).
  20. V. V. Ghukasyan and F. J. Kao, *J. Phys. Chem. C.*, **113**, 11532 (2009).
  21. B. W. Pogue, J. D. Pitts, M.-A. Mycek, R. D. Sloboda, C. M. Wilmot, J. F. Brandsema, and J. A. O'Hara, *Photochem. Photobiol.*, **74** (6), 817 (2001).
  22. J. Liang, W. L. Wu, Z. H. Liu, Y. H. Mei, R. X. Cai, and P. Shen, *Spectrochim. Acta, Part A*, **67**, 355 (2007).



林伯彥先生目前為陽明生醫光電研究所博士班學生

Po-Yen Lin is currently a Ph.D. student in the Institute of Biophotonics at National Yang-Ming University.



郭宗霖先生目前為陽明生醫光電研究所碩士班學生

Tsung-Lin Kuo is currently a M.S. student in the Institute of Biophotonics at National Yang-Ming University.



高甫仁先生為美國紐約州康乃爾大學物理博士，現任國立陽明大學生醫光電研究所教授兼所長與副研發長

Fu-Jen Kao received his Ph.D. in physics from Cornell University, USA. He is currently a professor in the Institute of Biophotonics and the associate dean in the Office of Research and Development at National Yang-Ming University.