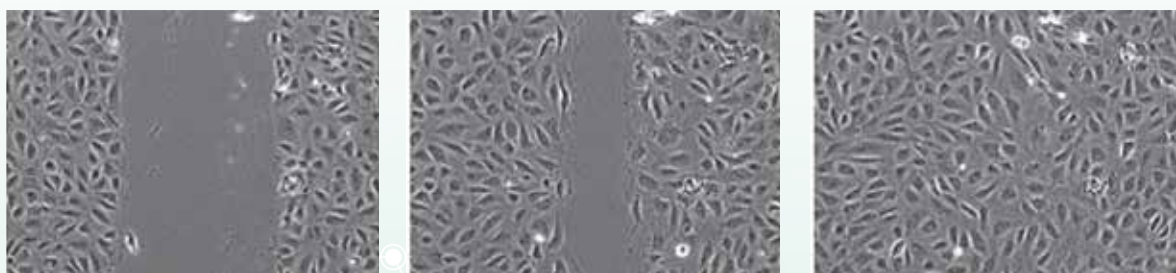


傷口癒合試驗的活細胞影像觀測再進化

撰稿:詹喬璋

細胞遷移(cell migration)泛指細胞由一個位置移動到另一個位置的過程，是反應細胞在該環境下所遇到的狀態。當細胞遷移至其他的位置，後續可能會發展成新的組織，尤其是當創傷發生或是體內發生發炎反應時，就會產生顯著的細胞遷移效應，這是為了修補傷口並避免感染。皮膚表面產生傷口時，傷口會觸發訊號，刺激周圍的纖維細胞增生及遷移至傷口處進行修復。傷口產生也可能被微生物感染而產生傷口周圍的發炎反應，發炎的區域會釋放出特殊的訊號吸引免疫細胞往發炎處移動，並針對感染原進行吞噬、溶解等免疫反應。當然除了正常的細胞遷移之外，癌細胞也可能透過細胞遷移離開原發器官轉移到其他的位置，進而產生了惡性轉移(Metastasis)。

傷口癒合試驗(Wound healing assay)便是觀察細胞遷移(Cell migration)的典型試驗之一。傳統的傷口癒合試驗是將細胞先養在盤上達約90%後，以tip等硬物直接在盤上畫出數道沒有細胞的區域，並以顯微鏡觀察這些區域邊緣細胞的生長。但是以手動方式畫出的區域難以維持穩定的範圍，且對於細胞也會先造成部分傷害。而後便又發展出了固定細胞生長區域的insert，等細胞長滿insert內部後將insert取走，便有大小固定的無細胞區供細胞生長。



圖一、典型的傷口癒合試驗。

但不不管是哪一種方式培養細胞，我們都必須將養在培養箱中的細胞不停地取出到外部以顯微鏡觀察並紀錄。如此頻繁的進出培養箱將造成觀測的樣本不停遭受環境變化，反而造成細胞本身的壓力致使實驗誤差。更甚者，頻繁的開關培養箱也會造成培養箱內的環境不穩定，除了影響自己的實驗，也同時影響了其他實驗室夥伴的實驗，並且提高了污染的風險。

因此，目前觀測Wound-healing assay的主流時間點一般都是在8-12小時觀察一次，這樣便可以大幅度的降低環境改變對細胞所造成的影響。雖然細胞的生長速度相對緩慢，但這麼長的觀察間隔，也造成另一個問題的產生，就是難以捕捉關鍵時刻。常發生前一次觀察時，細胞都還生長的非常旺盛，但下一個時間點就全變了樣，而這其間究竟發生了甚麼事卻完全沒有紀錄下來。而間隔時間過長的另一個缺點就是影像紀錄的位置幾乎無法固定，每一次拍攝的區域實際上都是不相同的，失去了所謂的『連續性』，也讓人有存疑的空間。

為了在進行傷口癒合試驗時，希望可以同時滿足『即時』又『長時間』觀察兩種看似截然矛盾的需求，藍光生物科技公司開發出了新一代的活細胞成像系統。專為培養箱內的高溫高濕環境所設計，並大幅縮小顯微影像系統的體積，使其可以直接置放在培養箱中，外部連結電腦隨時監測箱中細胞的狀態。讓您無須開啟培養箱便可即時觀察，同時可依自己的需求設定時間間隔，不錯過任何的關鍵時刻。一套軟體可控制四台主機，同時搭配Windows作業系統，可應用各類遠端桌面程式，讓你隨時都可以掌握細胞狀態與實驗走向。



因應再生醫學的蓬勃發展，傷口癒合試驗將是觀察實驗處理對細胞遷移的重要測試。細胞試驗逐漸多元化的現今，我們所要求的已經不再只是最終的結果，還必須包含整個過程的變化，因此連續式活細胞觀察系統將會是符合目前趨勢的最佳解答。

除了傷口癒合試驗之外，連續式活細胞觀察系統更是適合應用在組織工程的先期分析，以下為EzScope使用者的體驗分享：

脂肪幹細胞在明膠組織工程應用之先期分析

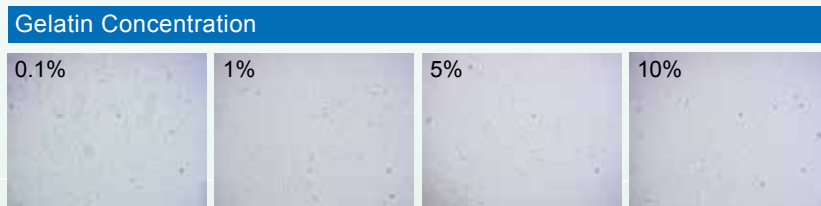
- ◆ **實驗目的：**本實驗室主要為研究方向為軟骨組織工程再生，利用生物材料製備3D生物支架，並評估細胞利用3D生物支架進行組織再生的可行性。不同生物材料所形成的微環境造成細胞狀態改變是常見的，因此進行3D生物支架製備的前驅實驗進行初步評估有其必要性。
- ◆ **過程簡述：**明膠(gelatin)為主要研究材料，以不同濃度明膠0.1%~10%於細胞培養盤上coating，用以後續細胞培養觀察。使用細胞為兔子初代培養脂肪幹細胞，由紐西蘭大白兔皮下脂肪分離培養。利用幹細胞對於環境容易反應之特性來觀察細胞型態，以及對於明膠層黏附狀況...等。
- ◆ **實驗結果：**
 1. 將細胞置於不同濃度明膠濃度coating培養盤，直接進行連續兩次10分鐘觀察(每20sec,共30張)，主要觀察細胞對於明膠層黏附速度。由影片中觀察得知，細胞於0.1% gelatin前十分鐘即可有細胞貼附以及展開，而同量同濃度細胞置於10% gelatin中細胞仍呈現懸浮狀態仍未貼盤。細胞對於明膠材料的黏附速度隨著濃度增加而降低。
 2. 讓脂肪幹細胞於不同濃度明膠濃度coating培養盤培養2天至細胞滿盤。觀察同面積下細胞量，以及細胞型態差異。於照片中可觀察到於1%、5%、10% gelatin組別細胞量明顯大於0.1%，推測細胞於明膠層中生長速度變快，但細胞型態未有太大改變。
 3. 脂肪幹細胞於不同濃度明膠培養，以脂肪細胞分化培養基進行脂肪細胞分化，觀察時間4天。不論細胞是否培養於明膠中均可觀察到細胞開始產生油滴，往脂肪細胞正常分化，可以得知明膠並不影響幹細胞分化特性。

細胞之原始狀態及該活細胞經過實驗方法後之照片

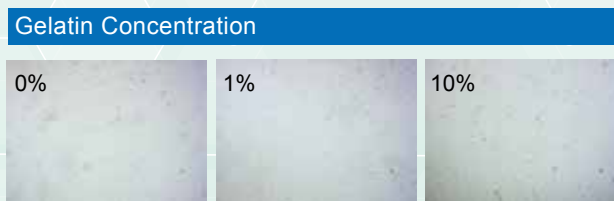
兔初代培養脂肪幹細胞原始狀態：



兔初代培養脂肪幹細胞於明膠培養：



幹細胞進行分化：



- ◆ **後續研究計劃簡述：**目前實驗觀察得知明膠對於細胞並無毒性，細胞可以良好生長，適合作為支架生物材料選擇。後續將利用明膠製作3D細胞支架，由於生物支架的硬度及彈性也是考量之一，後續研究將進行生物支架的力學物性分析，以找尋最佳濃度進行軟骨組織工程再生研究。