

中華民國第 60 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學科

第一名

052002

探討胞外基質軟硬度對神經突生長發育的影響

學校名稱：臺北市立第一女子高級中學

作者： 高二 楊子萱	指導老師： 李宏孝 許一懿
---------------	---------------------

關鍵詞：細胞骨架蛋白、基質軟硬度、神經生長

得獎感言

眼中的光芒

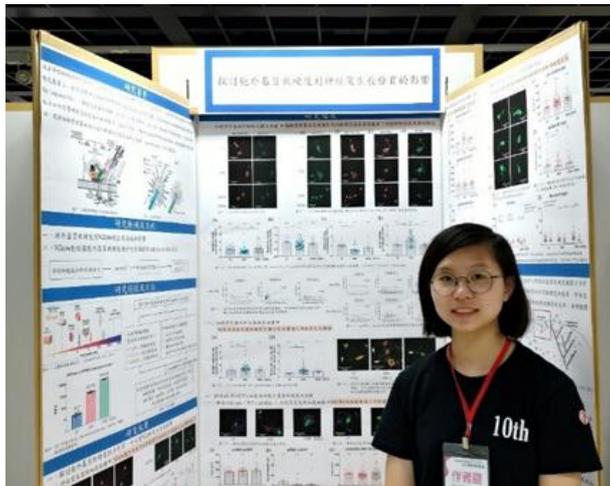
自去年三月中進入實驗室到現在，不知不覺間已經與神經細胞們相伴 500 多天，從國中第一次接觸科展到現在五年了，也經歷過兩次全國科展的旅程，想當初國中比完全國科展隔天，起來時的第一個想法是好累喔，再也不要做了！當初大概完全沒有想過，自己會在更加忙碌的高中生涯毅然決然再次踏上探索科學的旅程。

懵懂的選定題目後，我的實驗初期充滿了瓶頸，不斷花費時間在嘗試適合的細胞密度與染色、轉染方式，因此一直沒有實質數據產出。三天兩頭奔波往返實驗室卻依舊進度緩慢，再加上高中的社團、課業壓力，國中做科展時體驗到那種研究中的快樂和成就感好像消失了，取而代之的是巨大的茫然與徬徨。幸虧在這時受到了許多人的幫助，例如實驗室莊育嘉學長總是耐心的教我做實驗和分析數據、生專的宏孝老師對我各種突發情況的包容與建議，以及接送我往返實驗室、陪我度過情緒低潮的家人、給了我心靈避風港的二年良班，還有好多好多數不清的人們。是因為有了這些人的幫助，我才得以繼續在研究的路上堅持前進。接受這些幫助時我一度很緊張，如同被一種難以名狀、滿懷感激的壓力所籠罩，因為太感謝了，而恐懼自己會辜負那些幫助我那麼久的人，幸好最後所有的努力都沒有白費，雖然中途跌跌撞撞、屢經挫折，但實驗也終於漸漸有了起色，讓我得以獲得夢寐以求的入場票，再次走進全國科展的比賽會場。

要第一次向評審老師介紹作品前心臟跳的好快，太多回憶夾雜著惴惴不安的心情，彷彿要帶著心臟逃離胸口，但到了開口後、聲音從聲帶傾洩而出的那一剎那，總覺得自己很自然的笑了，將那些思緒與得失心拋到腦後，只覺得好高興能在這樣的環境下做自己喜歡的研究、能將成果與領域中的佼佼者分享。一個我很喜歡的脫口秀演員在演講中說到：「當你看到一個人在講最有熱誠的事情的時候，他的眼睛其實是在發光的。如果你要我用一個視覺意象來畫出活著是怎麼樣的話，我就會畫那個眼睛裡面的光。」或許在當時我的眼睛也是發著光的吧，在科展中，我找回了最初對生物純粹的熱忱和初心，而這份悸動，我想便是科展帶給我最好的禮物。

雖然這次全國科展因疫情的影響而少了在公開展覽中，與同樣熱愛科學的各縣市菁英們交流討論的機會，但還是非常高興自己的作品能得到評審老師們的認可。研究的旅途從來沒

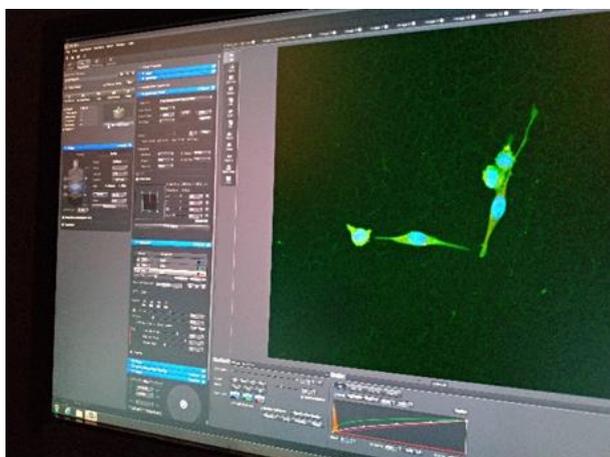
有句點，未來的我依舊想在生命科學的殿堂中緩緩而行，帶著好奇心推開那些充滿未知和可能性的門扉，為研究之路續寫下一個嶄新的篇章。



全國科展時與海報合照



在實驗室學長指導下使用顯微鏡



陪我度過這一年半的軟體 zen 與 N2a 細胞

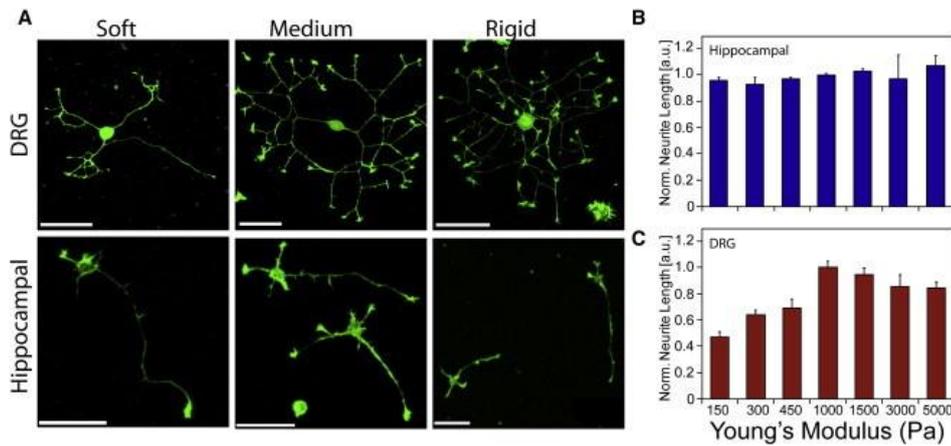
摘要

本研究以神經母細胞瘤 Neuro-2a 進行基質軟硬度對神經細胞生長影響的探討，分析不同軟硬度基質上 N2a 細胞面積、神經突長度。結果顯示分化後 N2a 細胞在 100 KPa 基質上面積大且神經突較長，說明 N2a 能偵測基質軟硬度並進行生長調控。同時 advillin、paxillin、myosin IIa 和 pFAK 等細胞骨架蛋白於細胞本體表現量在不同軟硬度基質上有所差異，但未與神經突長度相關。advillin 為肌動蛋白接合蛋白，能與 myosin IIa、pFAK 結合調控生長錐形成。觀察生長錐上細胞骨架蛋白表現量，發現於不同軟硬度具有差異且與神經突長度趨勢吻合，說明 advillin 可活化生長錐調控神經突生長。未分化 N2a 細胞轉染 pAdvillin-IRES-hrGFP 和 pS1S3-HP-FLAG 後長出神經突，且根據基質軟硬度生長情形不同，但轉染 pS1S3-HP-FLAG 長出的神經突長度較短，說明 advillin 的 nucleation 功能在神經突生長扮演重要角色。

壹、研究動機

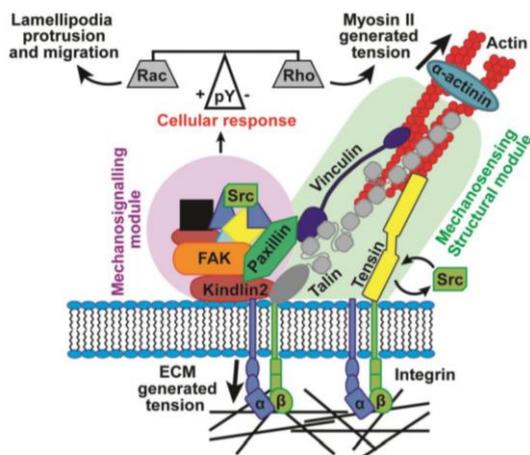
一、文獻探討

意外事故、運動傷害，以及多種慢性疾病導致的神經病變都可能造成周邊神經損傷，進而引發疼痛或肢體麻木等異常感覺，嚴重影響病患生活品質。臨床上，神經導管可作為連接神經組織的橋樑，協助神經再生。我國國衛院曾發表研究指出，將導管填充促進神經細胞再生的細胞激素可協助神經修復再生 (Lee DC, *et al.*, 2016)。但除了化學性因素外，神經導管的物理性質，諸如導管所提供的機械力支撐，也會對神經修復產生重要的影響，舉例而言，由於人體各組織的軟硬程度有所不同，若針對不同組織調整適切軟硬度能更有效協助神經再生 (Wang SF, *et al.*, 2015)。目前已有諸多研究發現胞外基質 (Extracellular matrix, ECM) 的軟硬度在神經生長上扮演重要的角色。研究指出若將屬於周邊神經的背根神經節細胞 (Dorsal root ganglion, DRG) 培養在軟硬度介於 0.15~5 KPa 的基質上，在 1 KPa 上神經突 (neurite) 表現出較佳的生長狀況，說明 DRG 能感知周邊環境軟硬度並造成神經突生長的差異 (Koch D, *et al.*, 2012)。

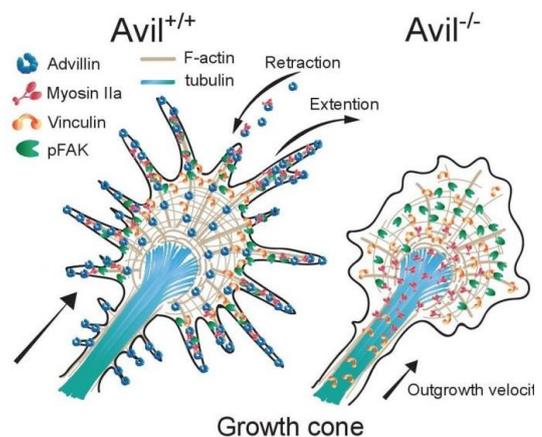


圖一、在不同軟硬度基質上生長的 DRG 和海馬迴神經元細胞，螢光染色部分為肌動蛋白。

目前已知，神經細胞感知機械力的機轉透過細胞骨架蛋白進行，位於細胞膜上的整聯蛋白 (integrin) 主導細胞外基質和細胞骨架蛋白之間的雙向信號傳導 (圖二)，將信號傳入後藉由肌凝蛋白 IIa (myosin IIa)、磷酸化粘著斑激酶 (phosphorylation focal adhesion kinase, pFAK) 以及樁蛋白 (paxillin) 等細胞骨架蛋白進行訊息的傳遞 (Clark K, *et al.*, 2007)，但目前神經細胞感知機械力後如何影響神經突的生長尚未被釐清。另一方面，文獻中提到一種特殊的神經細胞骨架蛋白 *advillin*，負責帶領神經突末端的生長錐 (growth cone) 向四周探索再生，若將其自細胞中移除，神經軸突纖維的生長速度、活動性及分支數量皆會明顯下降 (Chuang YC, *et al.*, 2018)。*advillin* 為一種肌動蛋白接合蛋白 (actin-binding protein)，能與細胞骨架蛋白結合，例如肌動蛋白纖維 (actin filament) 和局部接合蛋白質複合體 (focal adhesion complex) 等，進而影響神經突的生長 (圖三)。



圖二、細胞骨架蛋白參與機械力傳導



圖三、advillin 與細胞骨架蛋白結合帶領生長錐生長 (來源:中研院生醫所新聞稿)

二、實驗動機

透過文獻可知，周邊神經能感知環境的軟硬度而做出適切的反應，而幫助神經修補再生的神經導管也能透過調整材質的軟硬程度來更有效地促進生長，為了進一步釐清其詳細的機轉，本研究探究神經母細胞瘤細胞株在不同軟硬基質上的生長反應，觀察並分析與機械力感應有關的細胞骨架蛋白，例如肌凝蛋白 IIa、磷酸化粘著斑激酶、樁蛋白，和影響周邊神經再生的 *advillin*，希望能了解基質感應與細胞骨架調控的關係，以期未來應用於神經再生醫學上。本研究中選用常作為神經細胞模式的神經母細胞瘤細胞株中，較接近周邊神經 (Tremblay RG, *et al.*2010) 且已被證實對機械力敏感 (Coste *et al.*2010) 的小鼠 N2a 細胞作為研究對象，該細胞株能在分化後生長出神經突，測量後可用作細胞對於基質感應後的反饋。

貳、研究目的

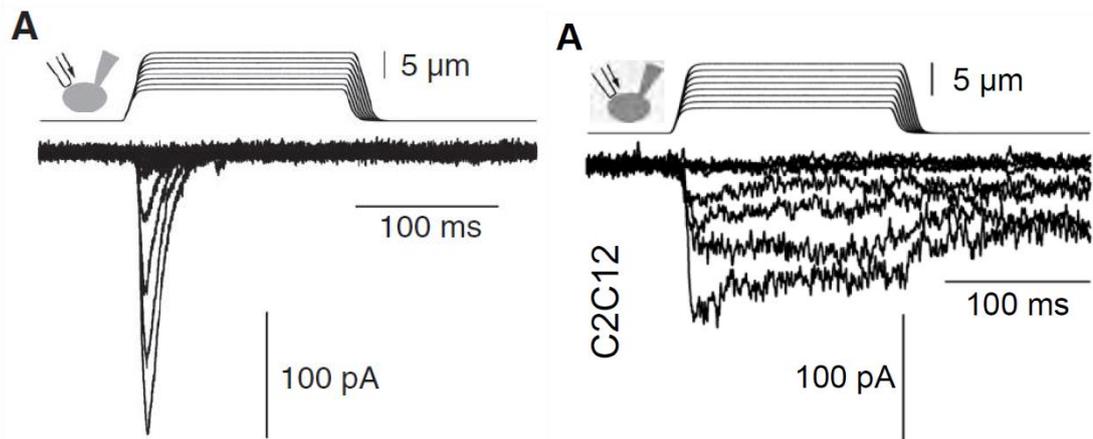
- 一、探討胞外基質軟硬度對 N2a 細胞生長造成的影響
- 二、探討 N2a 細胞根據胞外基質軟硬度進行生長調控機轉中 *advillin* 所扮演的角色

參、研究設備及器材

一、細胞培養

(一) 細胞株：

本研究採用的細胞株為神經母細胞瘤 Neuro-2a (N2a)，為一種從小鼠腫瘤分離出來的細胞株 (由實驗室提供)，N2a 細胞經由誘導後可分化成類神經元細胞，具有細長的神經突 (*neurite*) 並表現神經元特有蛋白 (施宛昀, 2011)，且已被實驗證實對機械力敏感 (圖四)，因此選用此細胞當作實驗對象。



圖四、通過玻璃探針對細胞表面施加機械力刺激後，N2a 細胞較骨骼肌細胞株 C2C12 表現出規律性生理電訊號變化，可知其對機械力敏感。（圖片來源：Coste B, *et al.*, 2010）

- (二) 培養液：N2a 細胞培養基（MEM α 培養基 + 10 % 胎牛血清 FBS + 100 units/mL penicillin + 100 g/mL streptomycin + 10 mM HEPES）
- (三) 細胞生長基質（culture substrate with different stiffness）：聚二甲基矽氧烷（Polydimethylsiloxane, PDMS）膠體、攪拌器，桌上型旋轉塗佈機（spin coater）、圓形蓋玻片（直徑 15 mm）、真空泵、烘箱
- (四) 其他：胰蛋白酶（trypsin）、PBS、二氧化碳培養箱、細胞培養盤（12、24 well）、微量滴管、離心機、離心管、光學顯微鏡

二、免疫螢光染色

- (一) 試劑：含有 4 % paraformaldehyde (PFA) 的 PBS、含有 0.1 % triton-X100 的 PBS、阻隔劑（blocking solution: PBS with 5% bovine serum albumin, 0.1 % tween 20, 0.01 % sodium azide）、抗體(列於實驗方法中)、螢光封片劑(anti-fading mounting solution)
- (二) 儀器：共軛焦顯微鏡（LEICA LSM 700 confocal microscopy）

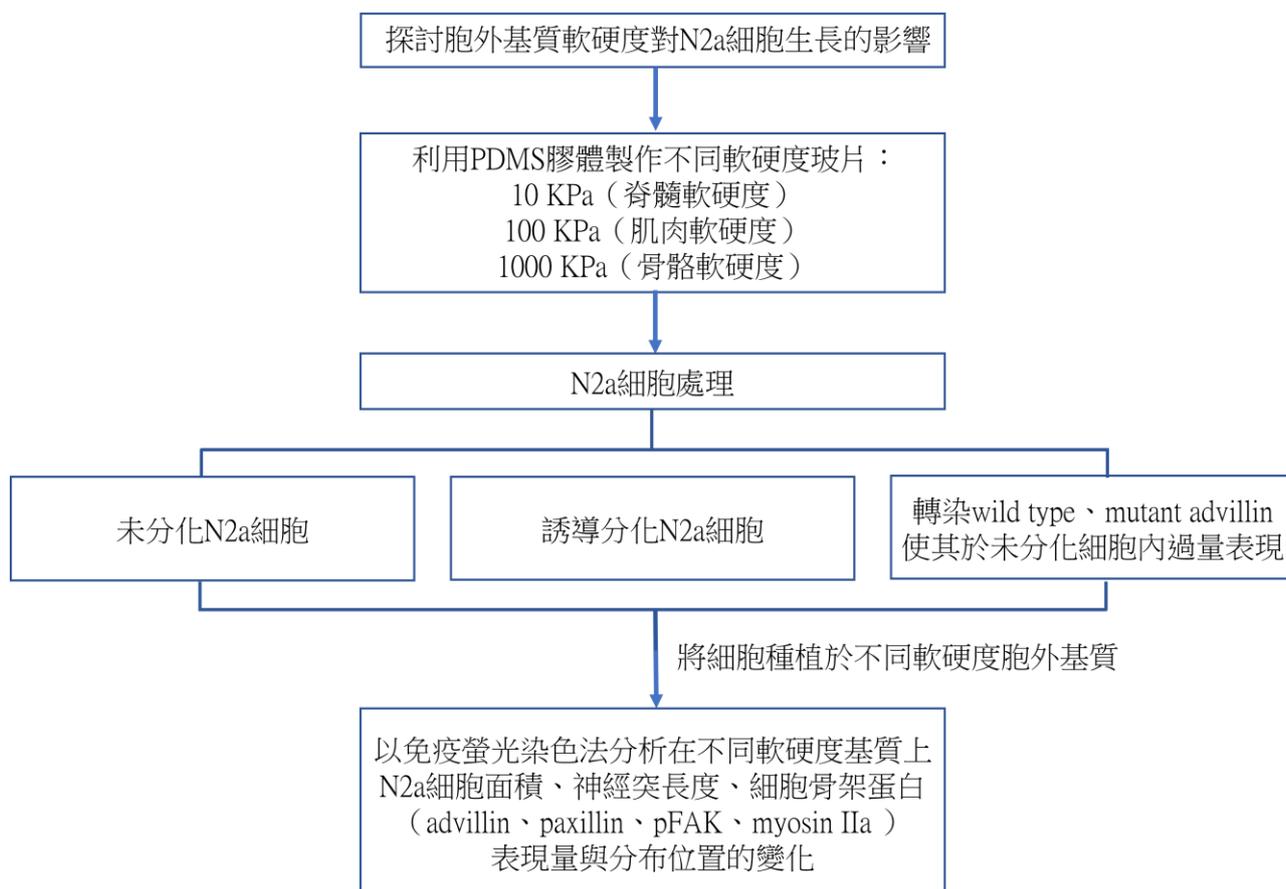
三、DNA 轉染

- (一) DNA：pAdvillin-IRES-hrGFP、pIRES-hrGFP、pS1S3-HP-FLAG（實驗室提供）

(二) 其他：opti-MEM、Lipofectamine 2000 微脂體、未含抗生素的 N2a 細胞培養基

肆、研究過程或方法

一、研究架構圖



圖五、研究架構圖

二、細胞株及細胞培養

吸除細胞上方的舊培養液，以 3 ml 的 PBS 清洗貼附在底部的細胞，洗掉殘餘的培養基，將 PBS 吸除，加入 1ml trypsin，放入二氧化碳培養箱等待 3 分鐘使細胞懸浮。加入 10 ml 含有 FBS 的 MEM 中和 trypsin，將培養皿中的液體移至離心管，離心（1000 rpm、3 min）後抽掉上清液，加入 10 ml MEM 沖散細胞，再取所需求量滴入裝好培養液的 10 cm 培養盤中。細胞培養於 37 °C、5 %二氧化碳的恆溫培養箱中。

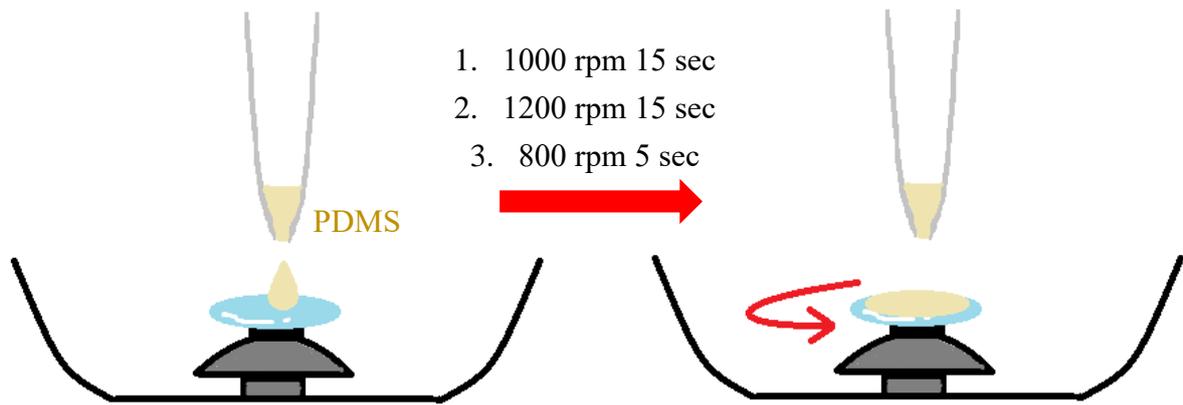
三、製備 PDMS 基質

參考文獻(Palchesko RN, *et al.* 2012)後，決定以聚二甲基矽氧烷(Polydimethylsiloxane, PDMS)膠體製備不同軟硬程度的基質，所使用的原料為 SYLGARD 184 和 527 灌封膠，調配分為主劑與固化劑，經特定比例調和可備置不同軟硬度的 PDMS 膠體，固化後的膠體軟硬度以楊氏模數 (Young's modulus) 表示。表格中比例為固化劑：主劑。

表一、PDMS 膠體軟硬度與調配比例

軟硬度	調製膠體比例
10 KPa	Sylgard527 1 : 1
100 KPa	Sylgard184 1 : 35
1000 KPa	Sylgard184 1 : 10

以攪拌器混合好的 PDMS 以真空泵抽除膠體中的空氣三小時，其後將 PDMS 膠體 75 μ l 滴於圓形蓋玻片上，放置於桌上型旋轉塗佈機基座上能夠吸附玻片的位置，開啟塗佈機讓玻片快速旋轉，使膠體在玻片上平鋪均勻 (三階段轉速分別為 1000、1200、800 rpm)，接著將 PDMS 玻片以 80 °C 固化 16 hr，製備出覆有 PDMS 膠體的玻片。進行細胞培養前，PDMS 玻片以 UV 燈照射滅菌，再塗佈 (coating) 聚離胺酸 (PLL) 以及層連結蛋白 (laminin)。聚離胺酸為帶正電聚合物，能與帶負電的細胞行交互作用進而使細胞黏附於基質上，層連結蛋白為構成基底膜 (basement membrane) 的主要蛋白，同樣能夠協助神經細胞附著在基質上。塗佈過程簡述如下: 將 PDMS 玻片置於 12 well 細胞培養盤中，加入 1 ml 的聚離胺酸，放置 15 分鐘，從 12 well 培養皿中取出風乾，放入 24 well 細胞培養盤中，加入 300 μ l 層連結蛋白，放入 37 °C 培養箱中 3 小時，將 PDMS 玻片取出以 PBS 清洗，即完成 PDMS 基質的備製。



圖六、製備 PDMS 基質方式示意圖

四、誘發細胞分化

視黃酸 (retinoic acid, RA) 能夠促使 N2a 細胞分化 (You Q, *et al.*, 2019)。將製備好的玻片放入 12 well 細胞培養盤中，每個 well 種植 1.5×10^4 個細胞，隔天將舊 N2a 細胞培養基抽掉，替換成含 $10 \mu\text{M}$ 視黃酸和 1 %胎牛血清的細胞培養基，培養 48 小時。

五、DNA 轉染

(一) Wild type advillin (WT advillin)

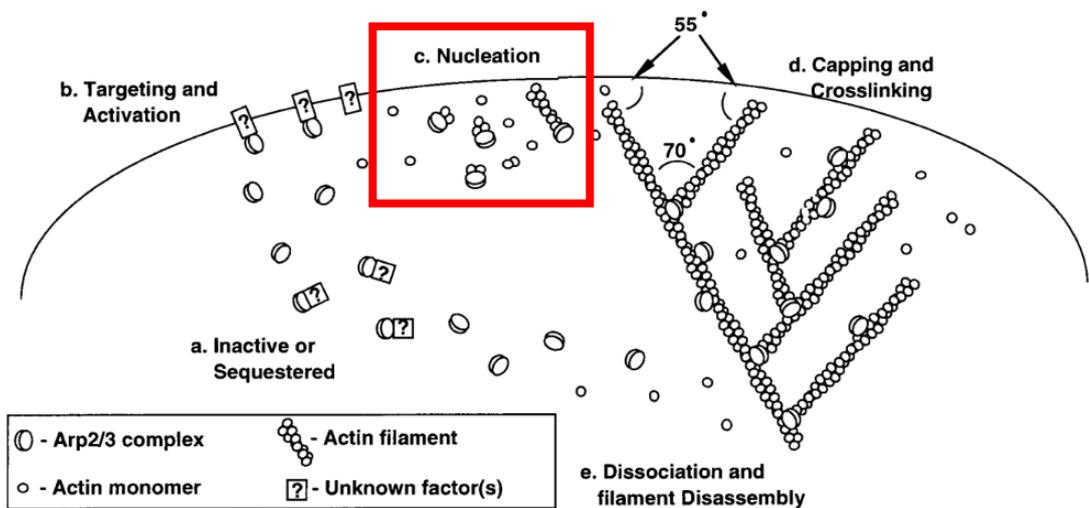
轉染實驗組使用的質體 DNA 為 pAdvillin-IRES-hrGFP，該質體能表現小鼠的 WT advillin 蛋白，並同時表現 GFP 螢光蛋白；對照組則轉染 pIRES-hrGFP 綠色螢光蛋白。實驗前一天將 N2a 細胞種入 3.5 公分培養皿中，使實驗當天的細胞密度介於八至九成滿。將舊培養液吸乾後加入 2.5 ml 不含抗生素的培養液。在 250 μl opti MEM 中分別加入 2 μg DNA 以及 5 μl lipo 2000，均勻混和後靜置 20 分鐘。將小離心管中溶液取出分散滴入培養皿中，並於轉染隔天更換回原培養液。48 小時後將細胞重新種植到 12 孔盤中的 PDMS 玻片上培養 24 小時。

(二) pS1S3-HP-FLAG (mutant advillin)

Advillin 目前尚未有分子特性上的研究，其分子功能僅能參考與其高度同源的 villin。目前已知 villin 蛋白受鈣離子調控，具有四種不同的生化活性以調控細胞骨架蛋白，分別是連結 (bundling)、切割 (severing)、加帽 (capping) 和 nucleation。對應不同功能所設計的突變蛋白，多被證實能影響 villin 調節微絨毛 (microvilli) 的形成，而其中去除 V4 至 V6 結構基 (domain) 的 V1-V3+HP，已被證實會使 villin 喪失 nucleation 功能 (Revenu C, *et al.*, 2007; Friederich E, *et al.*, 1999)。實驗室藉此設計不具有 nucleation 功能的 advillin 突變蛋白，命名為 S1S3-HP。本實驗希望了解 advillin 的何項功能對於 N2a 細胞感知基質軟硬度並產生神經突生長差異最為重要，因此將未分化 N2a 細胞轉染 pS1S3-HP-FLAG 質體後，觀察其生長上的變化。

	Microvilli growth	Stress fibre disruption	Bundling In the presence of EGTA	F-actin binding In the presence of EGTA	Severing	Nucleation In the presence of Ca ⁺⁺	Capping
1 wild type villin (1-826) [1][2][3][4][5][6][7]	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2 villin core (1-749) [1][2][3][4][5][6]	-	+++*	-	-	+++	+++	+++
3 V1-3+HP (Δ 412-713) [1][2][3] [7]	++	++	++	+++	+++	-	+++

圖七、villin 結構基功能。文獻實驗證實去除 V4 至 V6 結構基的 V1-V3+HP villin mutant form 將缺乏 nucleation 功能 (圖片來源: Evelyne Friederich, *et al.*, 1999)



圖八、Nucleation 功能示意圖 (紅框處)，將肌動蛋白單體 (actin monomer) 聚集形成肌動蛋白絲 (actin filament) (圖片來源: R. dyche mullins, *et al.*, 1998)

六、免疫螢光染色

免疫螢光染色法是指在抗體上結合螢光，利用免疫學原理中抗原和抗體專一性的結合反應，檢測細胞或組織中是否有目標抗原的存在，此方式不只可以用來測知抗原的表現量也可觀察抗原所表現的位置。將欲進行免疫螢光染色的培養細胞，吸去培養液，以 PBS 清洗一次後，加入 4% PFA 固定細胞 15 分鐘，用 PBS 清洗三次，每次 5 分鐘。接著以含有 0.1% triton x 100 的 PBS 處理細胞 3 分鐘，並以 PBS 清洗三次，每次 5 分鐘。加入含有 5% Bovine serum albumin (BSA) 的阻隔劑 (blocking solution)，在室溫作用 1 小時以避免抗體非專一性結合現象。加入一級抗體，於 4 °C 過夜後以 PBS 清洗三次，每次 5 分鐘。避光加入稀釋的二級抗體，在室溫作用 1.5 小時，接著以 PBS 清洗三次，每次 5 分鐘。將液體吸去，加入含有 DAPI 的 PBS 染細胞核，以 PBS 清洗之後，以螢光封片劑將 PDMS 玻片固定在載玻片上。抗體的名稱及實驗條件如表。

表二、螢光免疫染色抗體名稱及實驗條件

標示蛋白	一級抗體 (稀釋比例)	二級抗體 (皆為 1 : 500 稀釋)
advillin	rabbit anti advillin (1 : 1000)	Goat anti rabbit IgG (Alex 488)
		Goat anti rabbit IgG (Alex 647)
paxillin	mouse anti axillin (1 : 1000)	Goat anti mouse IgG (Alex 647)
myosin IIa	mouse anti myosin IIa (1 : 1000)	Goat anti mouse IgG (Alex 594)
pFAK	rabbit anti pFAK (1 : 1000)	Goat anti rabbit IgG (Alex 594)
laminin	rabbit anti laminin (1 : 1500)	Goat anti rabbit IgG (Alex 594)

七、數據分析

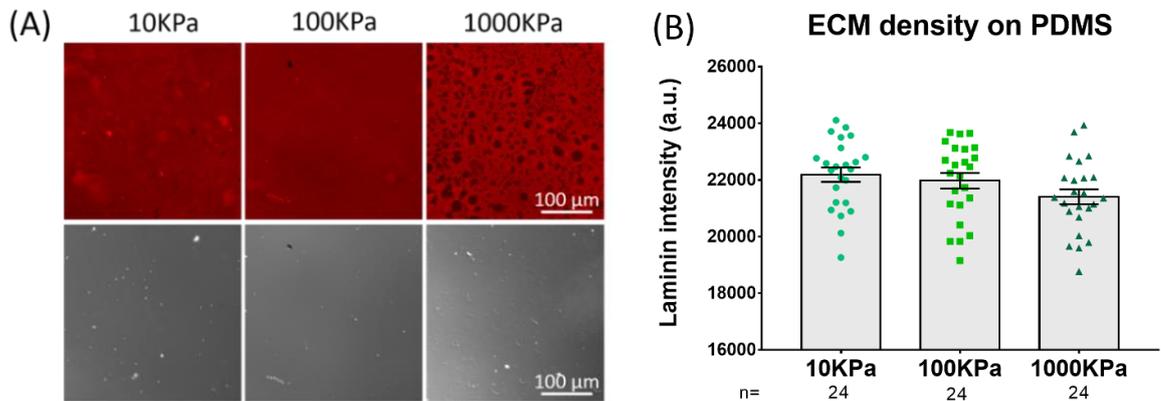
將共軛焦顯微鏡下所拍攝的照片進行統一的疊圖，以相同參數調整螢光強度，並以 ImageJ 軟體測量各個軟硬程度 PDMS 玻片上 N2a 細胞的細胞大小、神經突長度、分支點數目、advillin 蛋白表現量以及其他神經生長相關蛋白的表現量。為了標準化每次拍攝的螢光強度，以每一次拍攝的 10 KPa 為標準化的目標。將所得數據以 GraphPad Prism 4.0 軟體進行變異數分析 (one-way ANOVA)。

伍、研究結果

一、探討胞外基質軟硬度對 N2a 細胞生長造成的影響

(一) 層連結蛋白 (laminin) 於胞外基質上的塗佈情況

將細胞種植到 PDMS 基質前，為了讓細胞能附著於斥水的 PDMS，會在 PDMS 玻片上塗佈 laminin 以利神經細胞附著。為避免不同軟硬程度基質的表面黏性不同造成 laminin 覆蓋狀況有所差異，在正式進行實驗前針對塗佈 laminin 的玻片進行免疫螢光染色並拍攝照片，隨機在三種軟硬度上挑選 200 x 200 pixel 的面積 24 塊測量其螢光強度並進行統計 (one-way ANOVA)，確認 laminin 含量無顯著差異。



圖九、(A) laminin 免疫螢光染色，因發現 10 KPa 上 laminin 的分布方式受

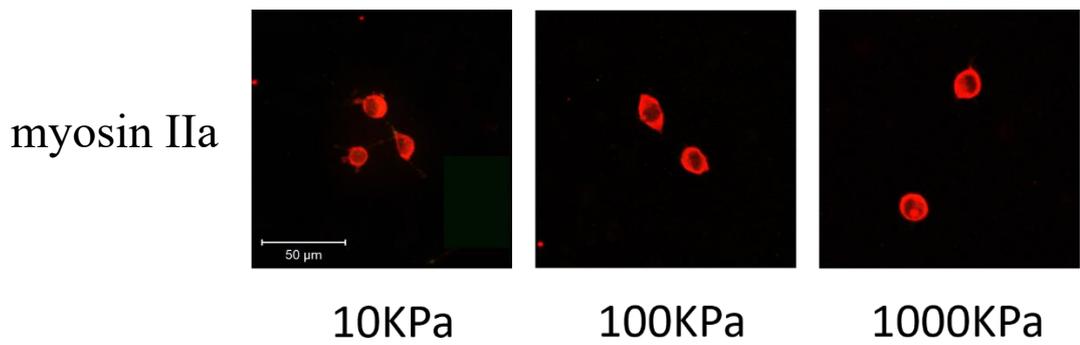
PDMS 表面結構影響而與另外兩者有些微不同，決定以隨機方式測量 laminin 螢光強度。(上：laminin 螢光染色；下：對應顯微鏡視野)

(B) 三種軟硬程度上 laminin 螢光強度，三者間不具統計差異 (one-way ANOVA)，確認三種軟硬程度玻片上 laminin 的量皆相同。

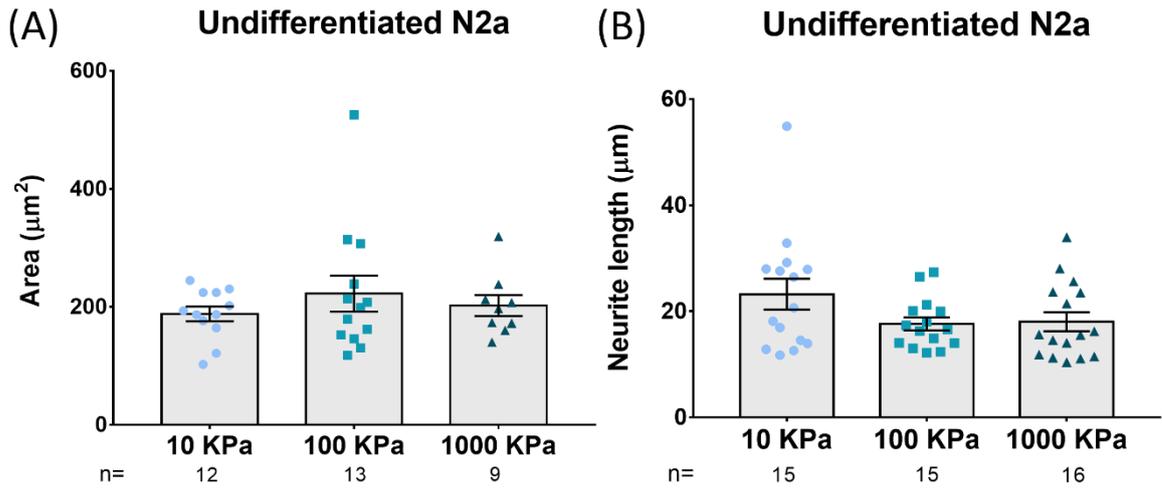
(二) N2a 細胞在不同軟硬度胞外基質上細胞面積、神經突長度的差異

1. 未分化 N2a 細胞

未經誘導分化的 N2a 細胞在三種軟硬度基質上細胞面積不具有差異 (圖十一)，且大部分細胞沒有神經突 (在本研究中定義為自細胞本體延伸，長度超過 10 μm 的絲狀結構)，少數自主分化的細胞所長出的神經突，其長度在三種軟硬度基質上也不具差異 (圖十一)，說明 N2a 細胞在未分化為類神經細胞前，無法感知胞外基質軟硬度而產生生長差異。



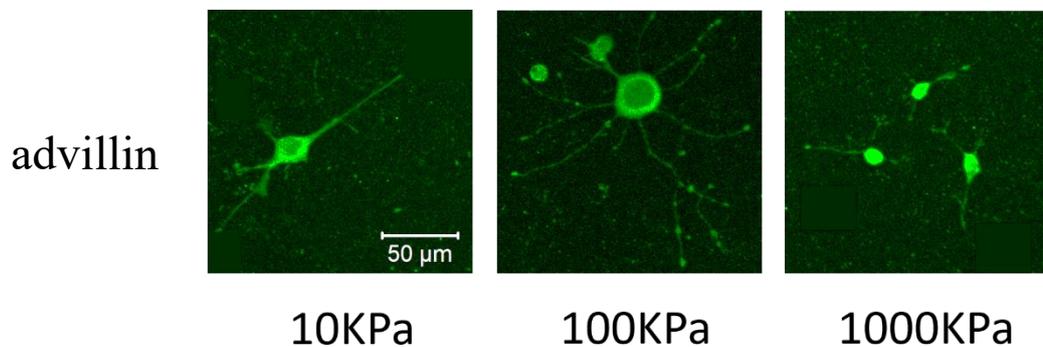
圖十、未分化 N2a 細胞在不同軟硬度基質上的生長情形，以 myosin IIa 顯示細胞的形態



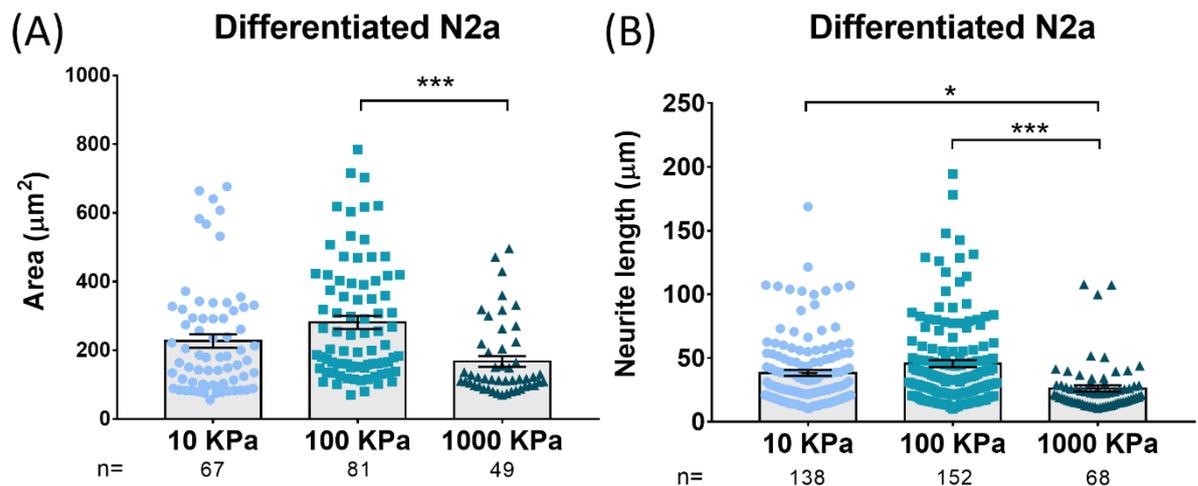
圖十一、未分化 N2a 細胞 (A) 細胞面積 (B) 神經突長度

2. 誘導分化後 N2a 細胞

加入視黃酸 48 小時誘導 N2a 細胞分化，並將其種植在不同軟硬度基質後，觀察其細胞面積與神經突長度。結果顯示在不同軟硬程度基質上生長時，N2a 細胞面積以及神經突長度均具有差異，在 100 KPa 上的細胞面積最大，神經突長度也最長，與 1000 KPa 間呈現顯著差異 (圖十三)。



圖十二、分化後 N2a 細胞在不同軟硬度基質上的生長情形



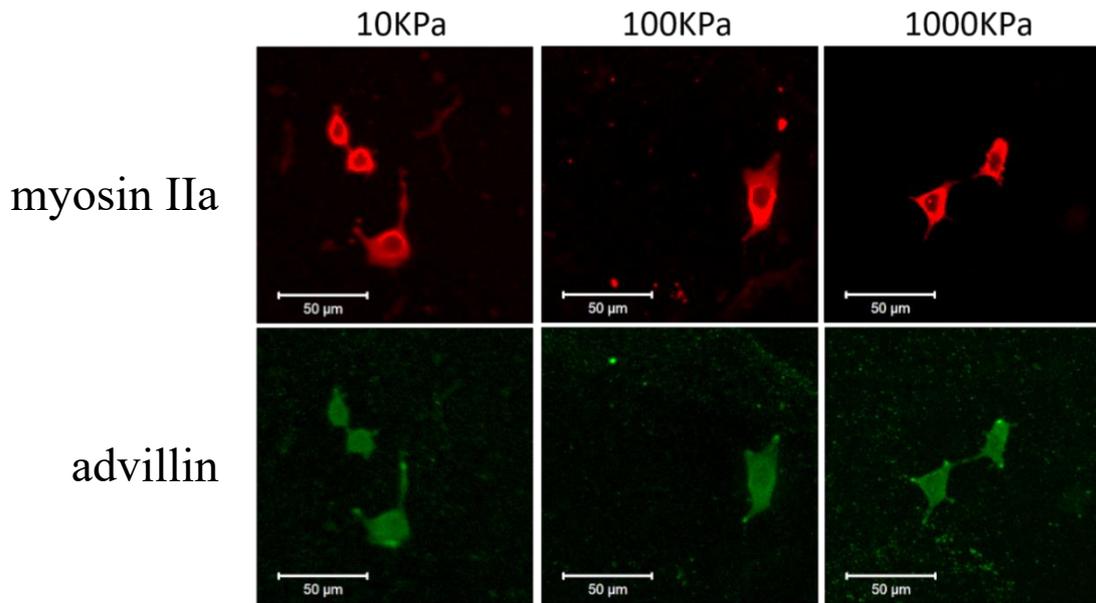
圖十三、分化後 N2a 細胞 (A) 細胞面積 (B) 神經突長度

(三) N2a 細胞在不同軟硬度胞外基質上細胞骨架蛋白表現量的差異

上述的實驗已確認在不同軟硬度基質上，已分化 N2a 細胞的細胞面積以及神經突長度會有不同，說明 N2a 細胞會根據胞外基質軟硬度不同進行生長調控。為了瞭解其機轉，接下來本研究分析 advillin 以及肌凝蛋白 IIa (myosin IIa) (Kristopher Clark *et al.*, 2007)、磷酸化粘著斑激酶 (phosphorylation focal adhesion kinase, pFAK)、樁蛋白 (paxillin) 等已被證實參與感知機械力的細胞骨架蛋白表現量，了解 N2a 細胞因胞外基質軟硬度不同進行生長調控過程中，是否有細胞骨架蛋白參與。

1. 未分化 N2a 細胞

未分化 N2a 細胞在三種軟硬程度基質上的 advillin 及細胞骨架蛋白 myosin IIa 的螢光表現量上不具有差異，且 advillin 蛋白表現量很少，僅在部分自主性分化的 N2a 細胞所長出的神經突頂端 (terminal) 有較明顯的表現。

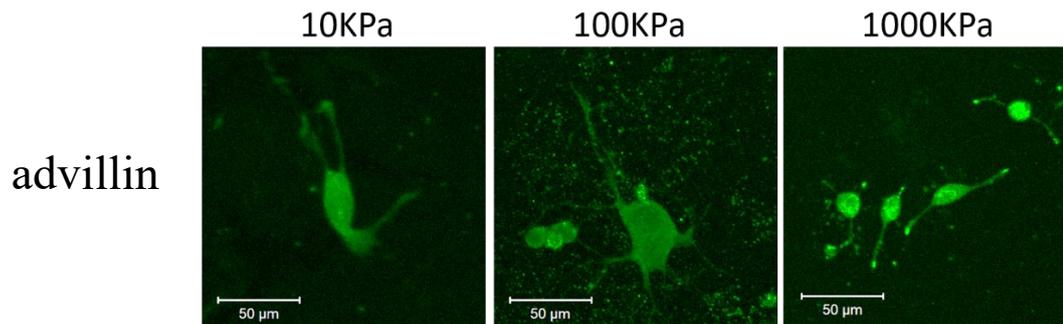


圖十四、未分化 N2a 細胞 advillin 及 myosin IIa 免疫螢光染色

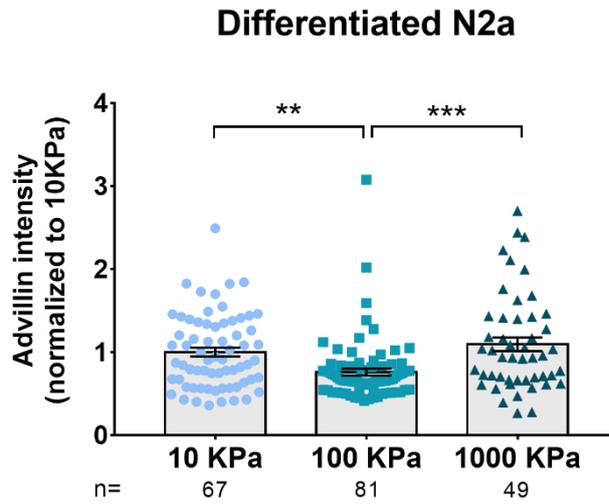
2. 誘導分化後 N2a 細胞

(1) 不同軟硬度胞外基質上 advillin 表現量的差異

在不同軟硬程度基質上，分化後 N2a 細胞的 advillin 表現量有所差別，種植在 100 KPa 基質的細胞 advillin 表現量低於其他兩者，呈現統計上顯著差異（圖十六）。



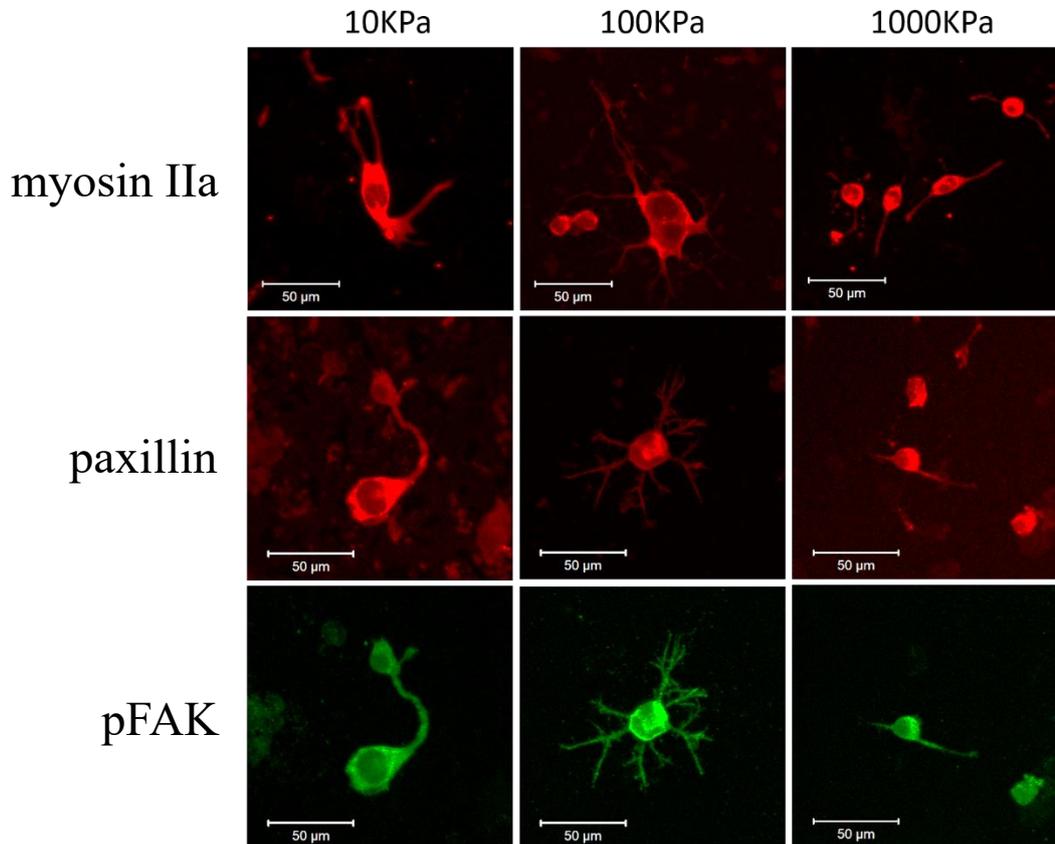
圖十五、分化後 N2a 細胞 advillin 免疫螢光染色



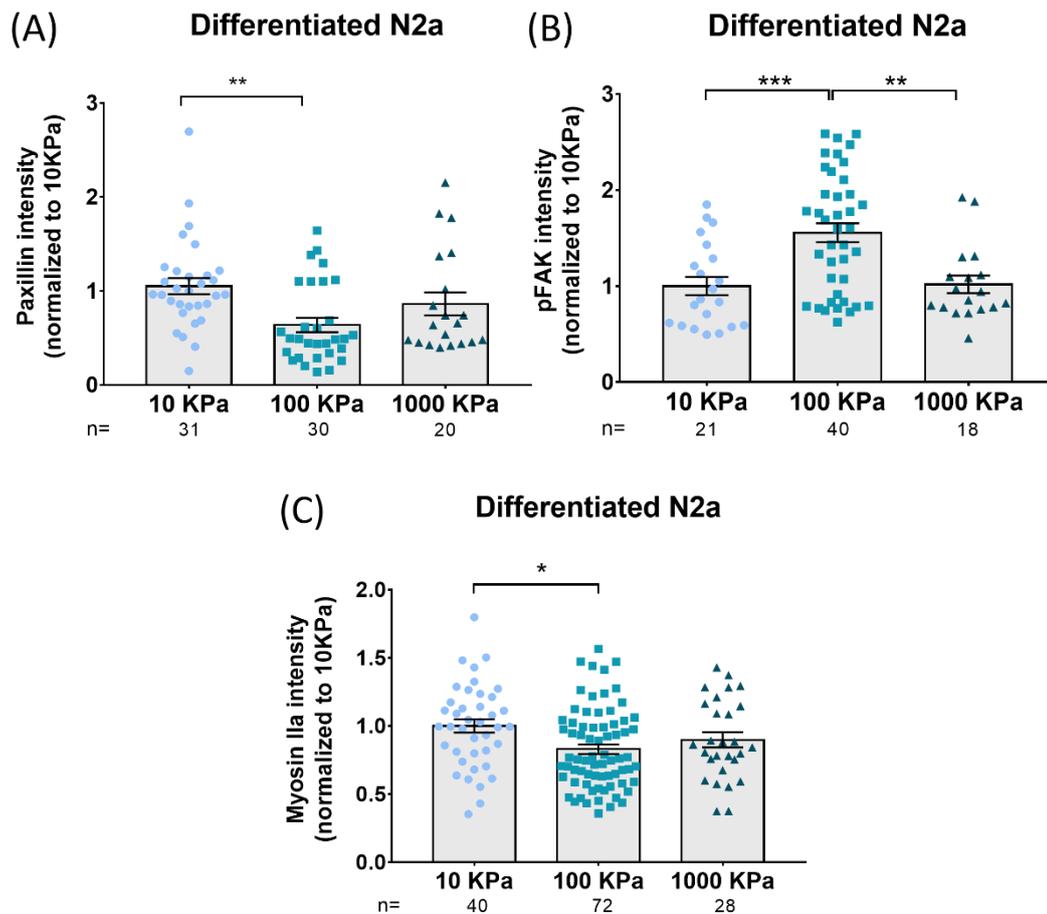
圖十六、分化後 N2a 細胞 advillin 蛋白表現量

(2) 在不同軟硬度胞外基質上細胞骨架蛋白表現量的差異

在 100 KPa 基質上生長的 N2a 細胞 myosin IIa 與 paxillin 表現量較其他兩種軟硬度低，與 10 KPa 之間呈現顯著差異；pFAK 則在 100 KPa 基質上表現量較多，與 10 KPa 與 1000 KPa 呈現顯著差異（圖十八）。



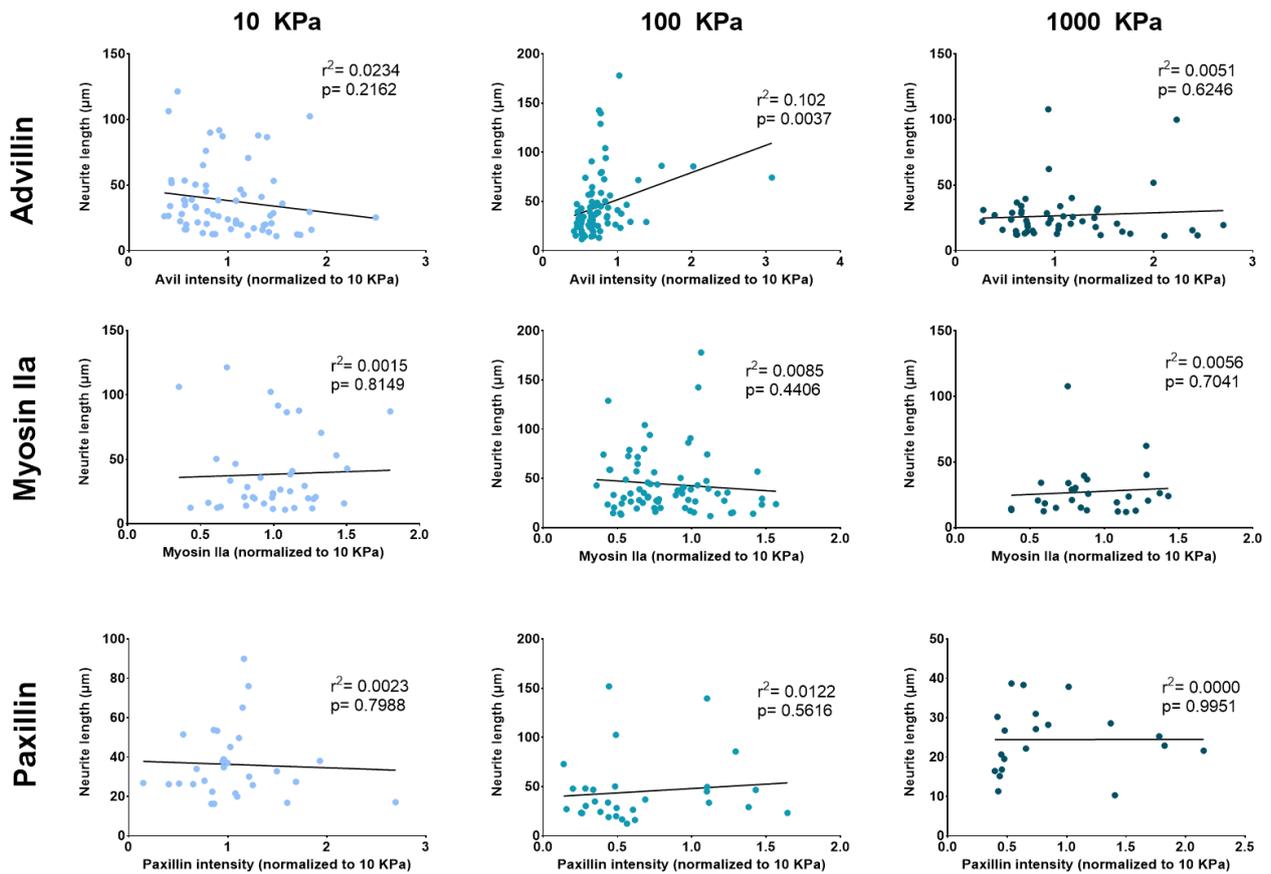
圖十七、分化後 N2a 細胞 myosin IIa、paxillin、pFAK 免疫螢光染色



圖十八、分化後 N2a 細胞本體 (A) paxillin (B) myosin IIa (C) pFAK 表現量

(3) Advillin、細胞骨架蛋白與神經突長度之間的關聯性

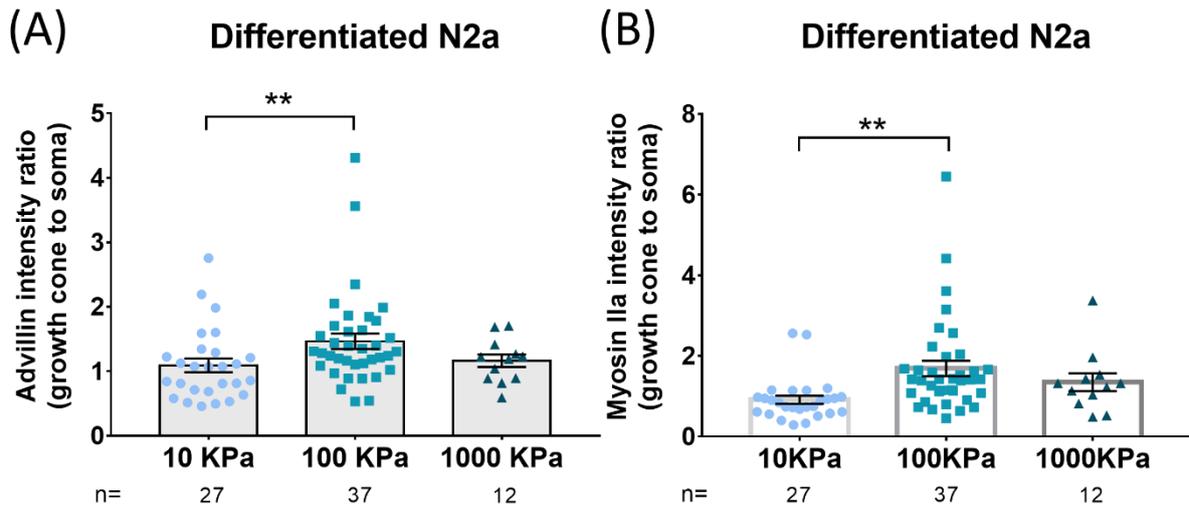
進行神經突長度以及蛋白表現量的測量後，發現到 N2a 細胞神經突長度最長的 100 KPa 基質上，advillin 以及細胞骨架蛋白表現量卻低於其他兩者，因此我們以蛋白表現量與神經突長度進行相關性分析，結果顯示在 100KPa 的基質上，advillin 蛋白的表現量與神經突生長長度具有相關性 (p 值 <0.05) 且呈現正相關，在 10 KPa 以及 1000 KPa 的基質上兩者則相關性不大，但即使是在 100 KPa 的基質上，paxillin 以及 myosin IIa 表現量與神經突的生長長度依舊未具有相關性。因此推測，advillin 影響神經突的生長並非藉由調控細胞骨架蛋白 paxillin、myosin IIa 的表現量進行，可能是透過改變細胞骨架蛋白分布位置等其他方式。



圖十九、advillin 蛋白、myosin IIa 與 paxillin 表現量與神經突長度的相關性

(4) 在不同軟硬度胞外基質上細胞骨架蛋白於生長錐上的表現量

針對分化後 N2a 細胞生長錐 (growth cone, 生長中神經突前端的可動結構, 負責探測胞外環境中的信號, 從而指引神經突的生長方向, 在本研究中定義為位於神經突末端, 且寬度大於神經突兩倍的特化結構) 上細胞骨架蛋白的表現量進行分析後, 發現 advillin 和 myosin IIa 在生長錐上的表現量於種植在 100 KPa 的基質時較高。



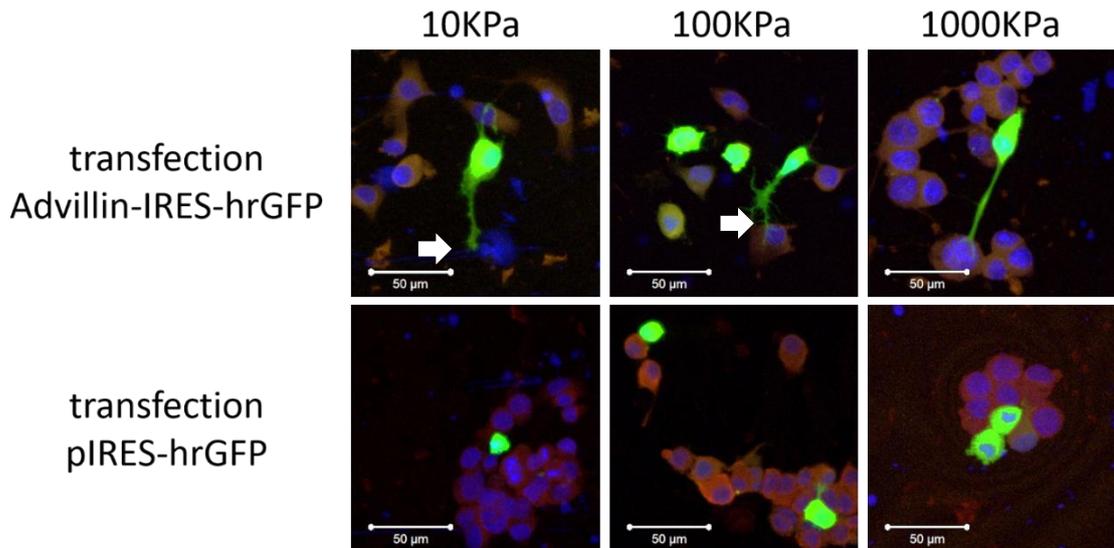
圖二十、(A) advillin 與 (B) myosin IIa 於生長錐上的表現量

二、探討 N2a 細胞根據胞外基質軟硬度進行生長調控機轉中 advillin 所扮演的角色

經過以上的實驗，已證實分化後 N2a 細胞具有感知胞外基質軟硬度，並進行不同生長調控的能力，為了瞭解 advillin 在此過程中扮演的角色，我們將未分化的 N2a 細胞轉染入 pAdvillin-IRES-hrGFP DNA，使其過量表現 advillin，並以轉染 pIRES-hrGFP 綠色螢光蛋白的未分化 N2a 細胞作為對照組。

(一) 未分化 N2a 細胞轉染 advillin 後神經突生長情形

未分化 N2a 細胞轉染 advillin 後，會長出神經突或類似神經突的結構以及生長錐的神經突末梢結構。而轉染綠色螢光蛋白的未分化 N2a 細胞則大多維持未分化的細胞型態，僅少數會因自主分化長出神經突（圖二十一）。說明轉染 advillin 能夠促進未分化 N2a 細胞表現出神經細胞的特徵。

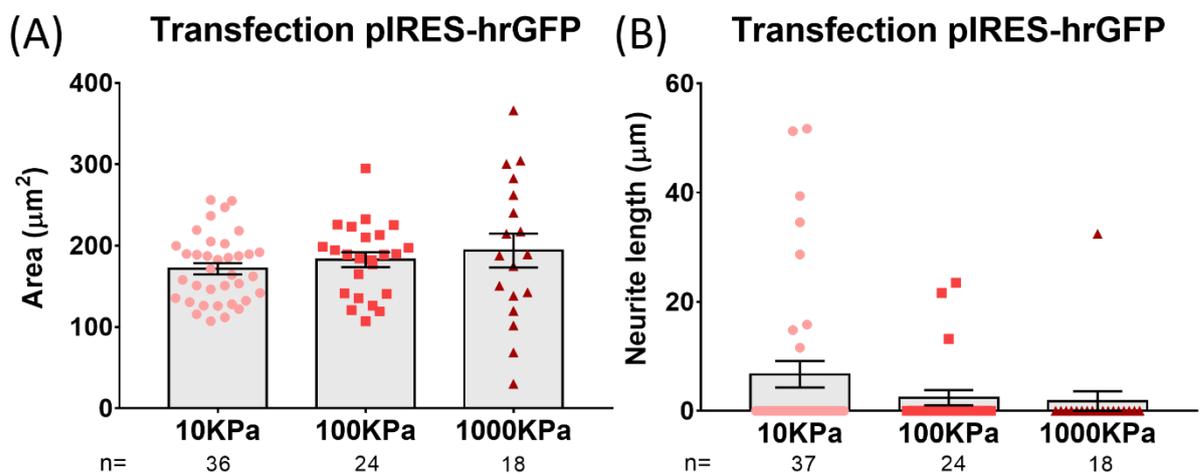


圖二十一、轉染 *advillin* 的未分化 N2a 細胞免疫螢光染色。上圖為 p*Advillin*-IRES-hrGFP 的轉染細胞，下圖為 pIRES-hrGFP 的轉染細胞以做為控制組。此圖綠色為 GFP 的螢光影像，紅色為 *myosin* 的螢光影像。箭頭指出具有生長錐型態的神經突末梢。

(二) 未分化 N2a 細胞轉染 *advillin* 後在不同軟硬度基質上細胞面積、神經突長度的差異

1. 轉染 pIRES-hrGFP 的未分化 N2a 細胞

以轉染 pIRES-hrGFP 的未分化 N2a 細胞為控制組，統計所有表現螢光蛋白的細胞，在三種軟硬程度上細胞神經突長度與細胞面積無顯著差異 (one-way ANOVA) (圖二十二)

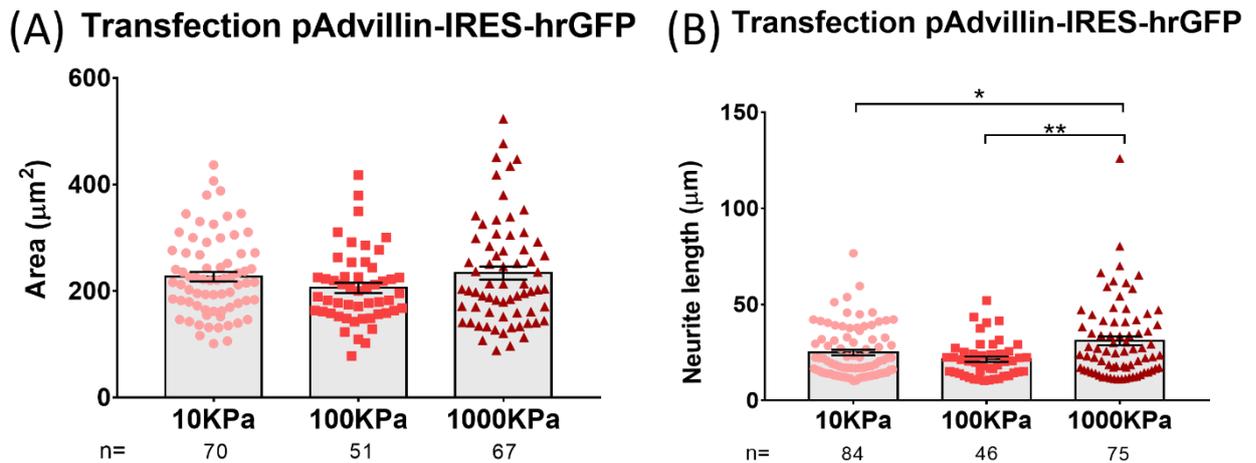


圖二十二、轉染綠色螢光蛋白 N2a 細胞 (A) 細胞面積 (B) 神經突長度。

2. 轉染 pAdvillin-IRES-hrGFP 的未分化 N2a 細胞

(1) 不同軟硬度基質上細胞面積、神經突長度的差異

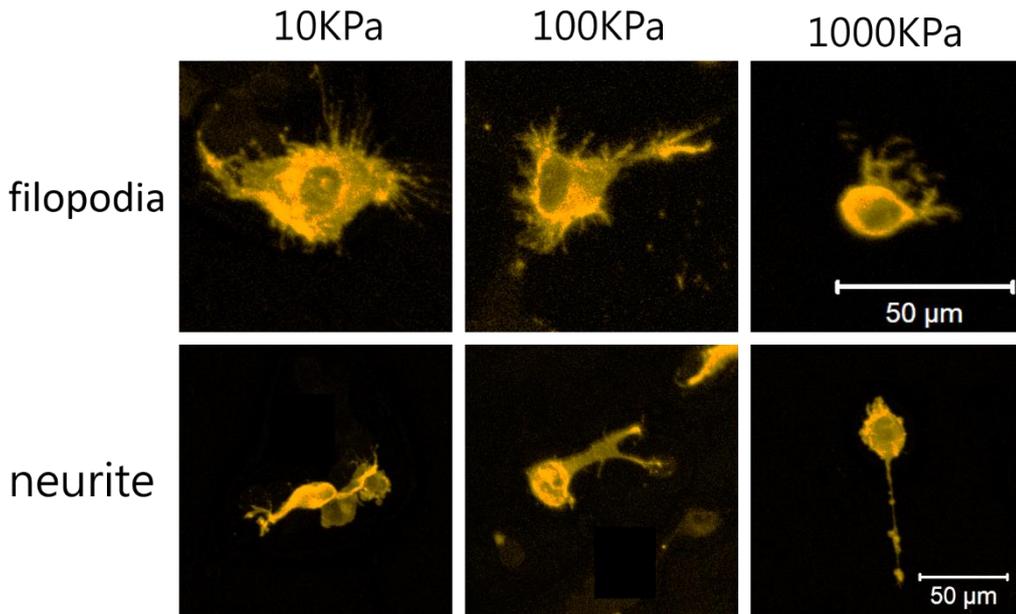
細胞面積在不同軟硬程度的基質上未表現出差異。但在 1000 KPa 基質上 N2a 細胞神經突較長，與 10 KPa 和 100 KPa 間呈現顯著差異（圖二十三）。此結果說明未分化 N2a 細胞經過轉染 advillin 後便能針對不同軟硬度基質進行生長調控，顯示 advillin 確實為此過程中的重要調控因子。



圖二十三、轉染 advillin 後 N2a 細胞 (A) 細胞面積、(B) 神經突長度

(2) 不同軟硬度基質上具有絲狀偽足 (filopodia) 構造細胞比例的差異

計算神經突長度時，有時會看見一些長度不足以符合神經元定義的凸起，查詢文獻資料後認為其應為絲狀偽足，絲狀偽足的定義為：長度較神經突短，且不具有微管 (tubulin) 的細胞質凸起物 (Rajiv Sainath and Gianluca Gallo, 2015)，但由於本實驗進行免疫螢光染色時並未進行微管的染色，因此分析時僅依據其長度定義。觀察後發現經過轉染 advillin 的細胞較易發現絲狀偽足的結構，且在 1000 KPa 基質上具有絲狀偽足的細胞比例較提他兩種軟硬度高 (表三)。



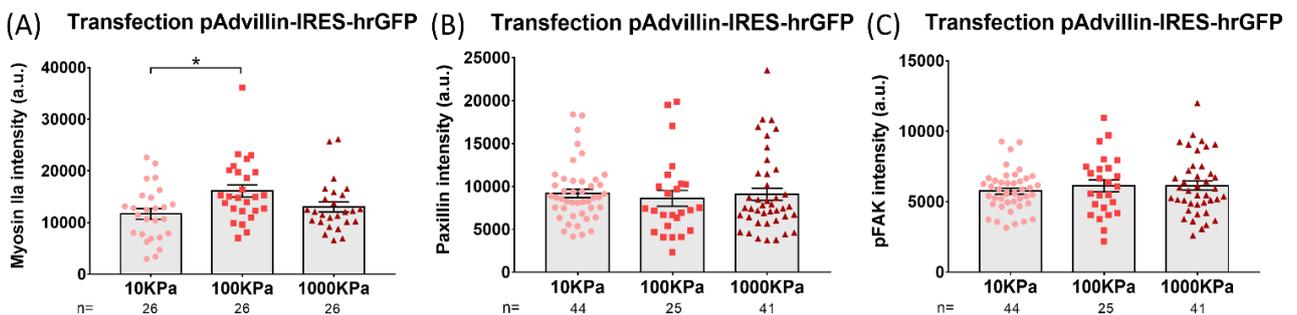
圖二十四、各軟硬度介值上 N2a 細胞絲狀偽足與神經突（橘色訊號為 advillin）

表三、各軟硬度基質上具有絲狀偽足的細胞比例

	10 KPa	100 KPa	1000 KPa
比例(%)	25.7	25.4	33.3

(3) 不同軟硬度基質上細胞骨架蛋白表現量的差異

除了 10 KPa 基質上的 N2a 細胞，其 myosin IIa 的表現量低於 100 KPa，兩者間呈現顯著差異外，其餘皆不具顯著差異（圖二十五）。



圖二十五、轉染 advillin 後 N2a 細胞本體 (A) myosin IIa (B) paxillin (C) pFAK 表現量

(4) 不同軟硬度基質上神經突末端生長錐構造的差異

統計後發現神經突末梢的生長錐數量在不同軟硬度上有所差別，在 100 KPa 的基質上具有生長錐的細胞比例較高，而細胞骨架蛋白表現量由於 n 值過少，未能進行分析

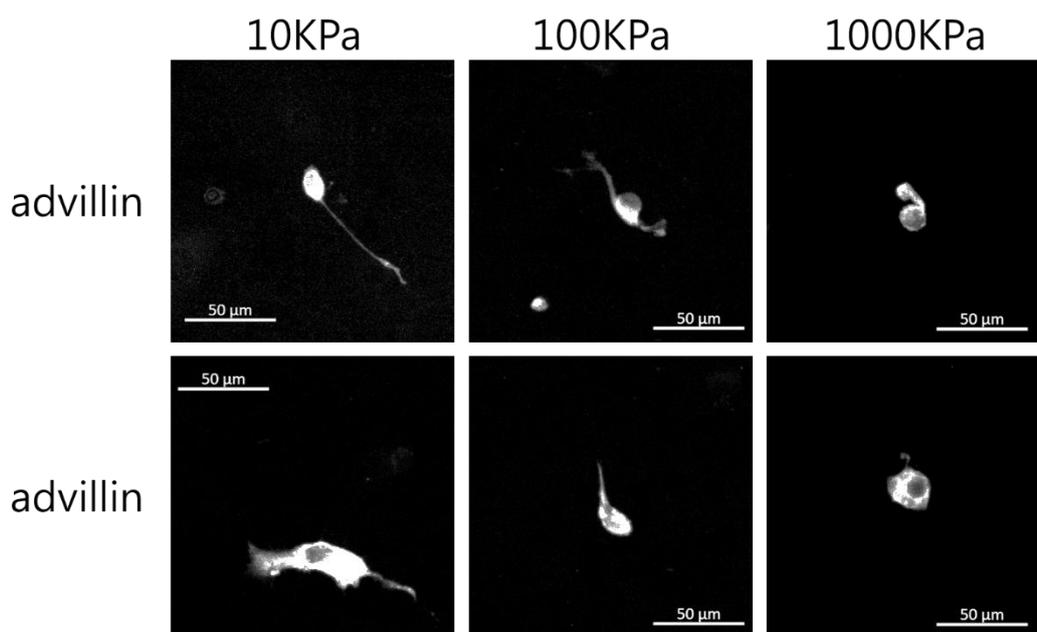
表四、分化後 N2a 細胞在不同軟硬度基質上具有生長錐結構的細胞比例

	10 KPa	100 KPa	1000 KPa
比例	31.3 %	40.7 %	27.2 %

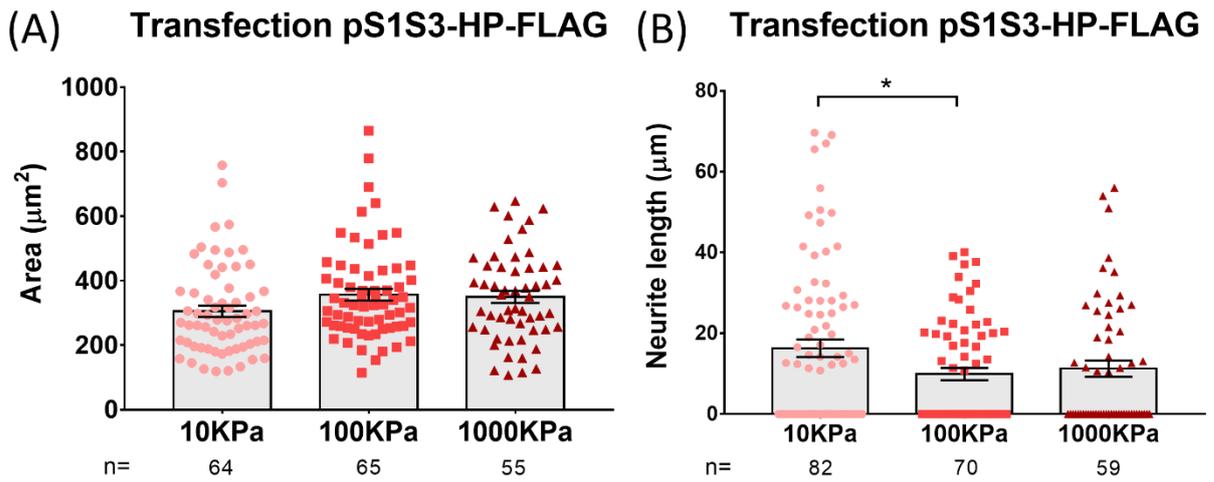
3. 轉染 pS1S3-HP-FLAG (mutant advillin) 的未分化 N2a 細胞

(1) 不同軟硬度基質上細胞面積、神經突長度的差異

轉染 pS1S3-HP-FLAG 的未分化 N2a 細胞其型態與轉染 pAdvillin-IRES-hrGFP 時有所差異，神經突形同細胞質的延伸且幾乎沒有觀察到生長錐的結構（圖二十六）。經過 one-way ANOVA 分析後，結果顯示 N2a 細胞面積在不同軟硬程度的基質上未表現出差異，但在 10 KPa 基質上神經突較長，與 100 KPa 間呈現顯著差異（圖二十七）。說明缺乏 nucleation 功能的 advillin 依舊能使 N2a 細胞針對不同軟硬度基質進行生長調控。



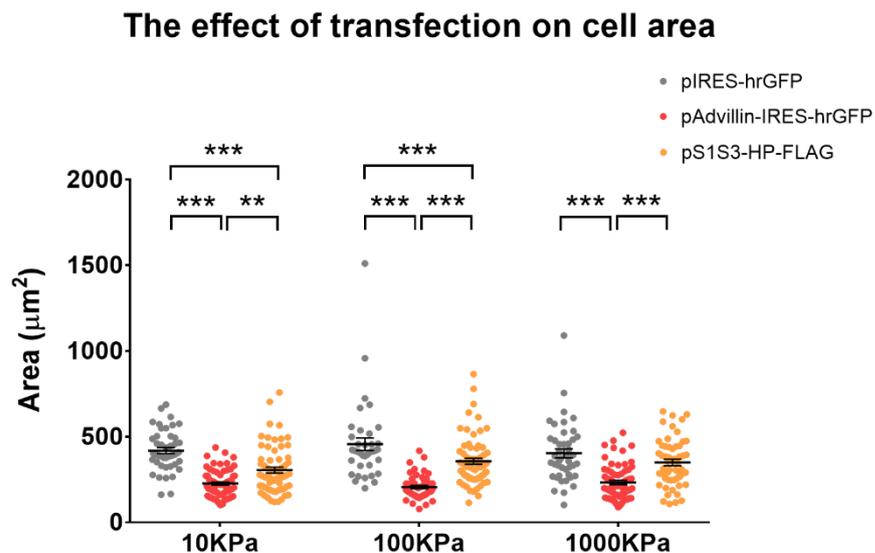
圖二十六、轉染 pS1S3-HP-FLAG (mutant advillin) 的未分化 N2a 細胞型態



圖二十七、轉染 pS1S3-HP-FLAG 後 N2a 細胞 (A) 細胞面積 (B) 神經突長度

(2) 與轉染 pAdvillin-IRES-hrGFP (WT advillin)、pIRES-hrGFP 細胞進行細胞面積的比較

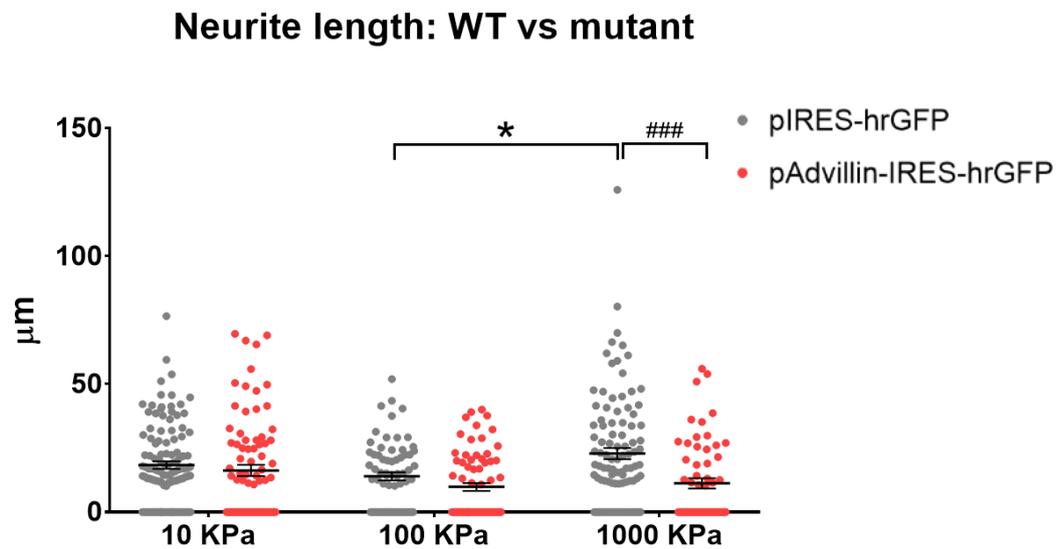
經過 two-way ANOVA 分析後，結果顯示不同軟硬度組別間細胞面積並未呈現顯著差異，說明轉染 advillin 並不會使未分化 N2a 細胞在不同軟硬度基質上的細胞面積有所不同。但將轉染 pAdvillin-IRES-hrGFP、pIRES-hrGFP 以及 pS1S3-HP-FLAG 的細胞進行比較後，發現三組之間細胞面積皆具有顯著差異。說明轉染 pAdvillin-IRES-hrGFP 和 pS1S3-HP-FLAG 會使細胞面積變小，且有程度上的差別 (圖二十八)。



圖二十八、轉染 pIRES-hrGFP、pAdvillin-IRES-hrGFP、pS1S3-HP-FLAG 的 N2a 細胞面積

(3) 與轉染 pAdvillin-IRES-hrGFP (WT advillin) 細胞進行神經突長度的比較

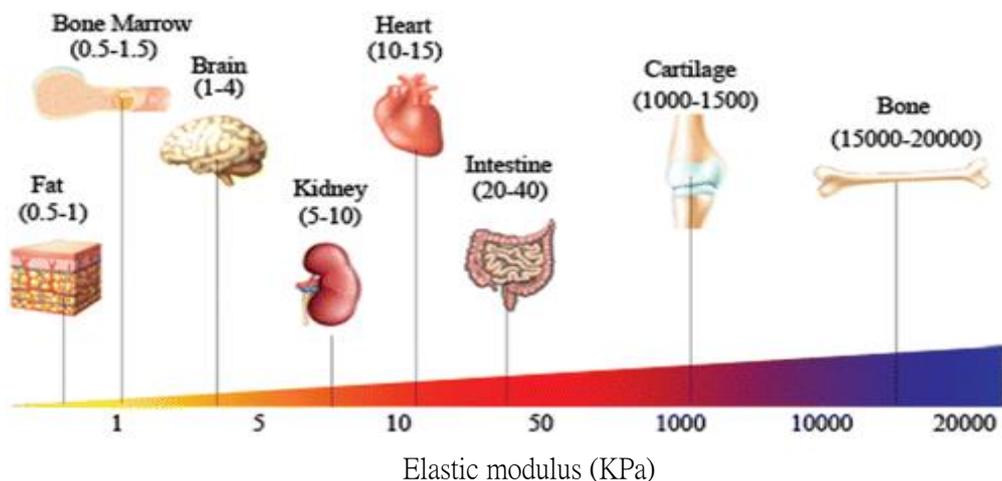
經 two-way ANOVA 分析後，結果顯示轉染 pS1S3-HP-FLAG 的細胞長出的神經突長度較轉染 pAdvillin-IRES-hrGFP 的細胞短，在 1000 KPa 的基質上呈現顯著差異 (圖二十九)，說明 advillin 的 nucleation 功能會對神經突生長造成影響，能夠促進 neurite 在 1000 KPa 基質上的生長。



圖二十九、轉染 pAdvillin-IRES-hrGFP、pIRES-hrGFP 以及 pS1S3-HP-FLAG 的未分化 N2a 細胞神經突長度，* 號代表組間具有顯著差異 (p 值 < 0.05)，### 號代表組內具有顯著差異 (p 值 < 0.001)

陸、討論

細胞的機械力感應能力主要分為兩類：被動感應 (passive mechanosensing) 與主動接觸 (active touch)。前者負責機械力相關的刺激反應，後者則關係到細胞在細胞間基質上的生長，諸如細胞移動、增生和分化便與細胞對基質軟硬度的感應有關。目前已知細胞透過機械力敏感通道 (mechanosensitive channels)、肌動蛋白張力絲 (actin stress fibers) 和細胞骨架蛋白，與細胞間基質形成牽引力 (traction forces)，藉以感測周邊環境的軟硬程度並作出不同反應 (Kobayashi, *et al.*, 2010)。但前人研究中所探究的基質軟硬度範圍偏小且偏軟 (0.15 KPa ~ 5 KPa)，並未適切反映周邊組織的性質 (圖三十)。且關於細胞如何針對其感知到的軟硬度進行生長調控、有哪些細胞骨架蛋白參與機轉等問題都尚未被釐清。



圖三十、人體各組織的軟硬程度，可看出周邊神經分布的組織所涵蓋的軟硬程度大，自 1 KPa ~ 20000 KPa 皆有包含 (Handorf, *et al.*, 2015)

為全面了解神經細胞如何針對其感知到的軟硬度進行生長調控，本研究建構三種不同軟硬程度的 PDMS 玻片以種植細胞，其軟硬度分別對應到脊髓 (10 KPa)、肌肉 (100 KPa) 和骨骼 (1000 KPa)，原先我們想嘗試使用更少的固化劑以做出更軟的基質來模擬腦組織 (0.5 ~ 1.5 KPa) 的環境，但是此時 PDMS 將無法順利固化在玻片上，變成具有流動性的黏液。文獻中所使用的軟基質多半是使用十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺 (polyacrylamide gel, PA gel) 所建構，軟硬程度可以到非常軟 (0.1 KPa)，但文獻也指出

此種基質在不同軟硬度時基質拓撲結構具有差異，其較軟時表面的空隙大，較硬時表面則較為緻密 (Trappmann B, *et al.*, 2012)，我們認為這樣的情況會影響細胞生長情況，增加變因，而非單純由基質軟硬性質決定。相較於此，PDMS 在不同軟硬度下表面結構較為均質 (Trappmann B, *et al.*, 2012)，因此最終依舊選擇 PDMS 作為建構基質的材料。

根據實驗結果，我們發現未分化 N2a 細胞在不同軟硬度基質上，細胞面積與神經突長度不具有差異，但分化成類神經細胞後，在 100 KPa 的基質上神經突長度較長，細胞面積也較大，顯示分化後的 N2a 細胞確實能感知胞外基質軟硬度並進行生長調控。確認分化後 N2a 細胞會根據胞外基質軟硬度進行生長調控後，本研究著手探討細胞骨架蛋白於機轉中扮演的角色，根據實驗，分化後 N2a 細胞 *advillin* 表現量較未分化 N2a 細多，且在不同軟硬度基質上具有差異，說明分化後 N2a 細胞會依據胞外基質的軟硬度不同對 *advillin* 表現量進行調控。未分化的 N2a 細胞經由轉染 *advillin* 後便能長出神經突與生長錐等結構，神經突長度在不同軟硬程度的基質上亦呈現顯著差異，說明 *advillin* 能使細胞具有感知基質軟硬度並進行生長調控的能力，為此機轉中的重要因子。

接下來，本研究想了解 *advillin* 如何透過調控其他細胞骨架蛋白使細胞能根據基質軟硬度進行生長調控。分析 N2a 細胞本體的細胞骨架蛋白表現量後，發現其於不同軟硬度基質上具有差異，但與神經突長度不具有相關性，說明 *advillin* 並非藉由調控細胞本體的細胞骨架蛋白表現量來調控 N2a 細胞神經突生長。而在生長錐上，細胞骨架蛋白的表現量與神經突生長長度的趨勢較為吻合：當神經突生長長度較長時，*advillin* 和 *myosin IIa* 表現量較多，似乎說明生長錐上的蛋白表現量才是影響神經突生長長度的關鍵。至此，我們了解到 *advillin* 和 *myosin IIa* 在生長錐上的交互作用可促進生長錐的活性，進而調控神經突生長長度，惟目前調控 *advillin* 的上游訊息路徑未知，其下游調控的數種細胞骨架蛋白也尚未被完整發現，待日後的研究分析才能做進一步的解釋。

Advillin 具有四種生化功能以調控細胞骨架蛋白，實驗結果顯示轉染不具 nucleation 功能的 advillin 後，N2a 細胞仍會長出神經突，且在不同軟硬度基質上神經突生長長度具有顯著差異。但其所長出的神經突長度較 WT advillin 短，在 1000KPa 的基質上具有顯著差異，說明若 advillin 缺乏 nucleation 功能，將對神經突生長造成影響。文獻指出 nucleation 功能與肌動蛋白絲和單體肌動蛋白的動態平衡有關 (Higashida C, *et al.*, 2013)。因此我們認為 N2a 細胞轉染 pS1S3-HP-FLAG 後，此動態平衡會改變，進而造成神經突生長長度上的差異，未來也希望能設計實驗證實此推測。

隨著材料科學的發展與對神經修復機轉的了解，神經導管已經發展至第三代 (Gaudin R, *et al.*, 2016)，文獻指出神經再生的過程受到導管材質的軟硬度和表面拓樸結構的影響，有些甚至指出神經細胞會因為在堅硬的材質上產生不適切的牽引力，而無法有效地再生 (Zhang BG, *et al.*, 2014)。但其中涉及的調控機轉和影響基質感應的相關蛋白卻不甚清楚，適合神經細胞生長的軟硬度範圍也受限於不同的實驗設計和使用的神經細胞類別而有所不同，因此找到關鍵的蛋白和訊息傳導路徑以建立有效的系統，方能針對導管軟硬度進行調整非常重要。本研究發現 advillin 參與細胞根據基質軟硬度的感應機轉，諸如神經突的生長或細胞骨架蛋白的調控，而其在 1000 KPa 的基質上能展現更明顯促進神經突生長的功能。未來希望透過使用不同材料建立更多軟硬度胞外基質，模仿其他組織軟硬度，以全面了解神經細胞於不同軟硬度組織上生長時的生長調控機轉，進而應用於神經再生醫學上，本研究目前提供初步結果可供未來發展使用。

柒、結論

- 一、未分化 N2a 細胞在不同軟硬度基質上，細胞面積與神經突長度不具有差異，分化成類神經細胞後，在 100 KPa 的基質上神經突長度較長，細胞面積也較大，顯示 N2a 細胞能夠感應基質軟硬度並進行生長調控。
- 二、誘導分化後的 N2a 細胞在不同軟硬度基質上 advillin 表現量不同，且在 100 KPa 基質上 advillin 表現量與神經突長度呈現正相關。未分化 N2a 細胞轉染 advillin 後長出絲狀偽足和神經突等結構，且神經突長度在不同軟硬度上有所不同，說明 advillin 確實為使細胞能夠根據基質軟硬度做出生長調控的重要因子。
- 三、在不同軟硬度基質上，分化後 N2a 細胞的細胞骨架蛋白於細胞本體的表現量具有顯著差異，但並未跟神經突長度具有相關性，說明細胞會根據基質軟硬度調整細胞骨架蛋白在細胞本體的表現量，但並未與神經突生長長度有關。因此我們轉而分析與神經突探索胞外基質環境相關的生長錐，結果顯示 advillin 與 myosin IIa 在生長錐上的表現量多寡與神經突生長長度吻合，推測 N2a 細胞應是透過調控生長錐上細胞骨架蛋白的表現量與分布位置，進行神經突生長長度的調控。
- 四、未分化 N2a 細胞轉染不具 nucleation 功能的 pS1S3-HP-FLAG 後，仍具有感知胞外基質軟硬度並進行神經突生長調控的功能。但其所生長出的神經突長度普遍較 WT advillin 短，說明若 advillin 缺乏 nucleation 功能將不利於神經突生長。

捌、參考資料

施宛昀 (2011) 闡明維他命 A 酸誘導之 N2a 神經母細胞瘤分化及 P2X7 受器表現量下降的機制。國立陽明大學神經科學研究所：碩士論文。

Chuang YC, Lee CH, Sun WH, Chen CC. (2018) Involvement of advillin in somatosensory neuron subtype-specific axon regeneration and neuropathic pain. PNAS, 115: 8557-8566

Clark K, Langeslag M, Figdor CG, Leeuwen FN. (2007) MyosinII and mechanotransduction : a balancing act. Trends Cell Biol. 17: 178-186

Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, Dubin AE, Patapoutian A. (2010). Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. Science, 330: 55-60

Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. (2006) Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. Cell. 126: 677-689.

Friederich E, Vancompernelle K, Louvard D, Vandekerckhove J. (1999) Villin function in the organization of the actin cytoskeleton. Correlation of in vivo effects to its biochemical activities in vitro. J Biol. Chem. 17;274: 26751-60.

Gaudin R, Knipfer C, Henningsen A, Smeets R, Heiland M, Hadlock T. (2016) Approaches to peripheral nerve repair: generations of biomaterial conduits yielding to replacing autologous nerve grafts in craniomaxillofacial surgery. BioMed Res. Int. 2016: 3856262.

Handorf AM, Zhou Y, Halanski MA, Li WJ. (2015). Tissue stiffness dictates development, homeostasis, and disease progression. Organogenesis. 11: 1-15

Higashida, C., Kiuchi, T., Akiba, Y. *et al.* (2013) F- and G-actin homeostasis regulates mechanosensitive actin nucleation by formins. Nat. Cell Biol. 15, 395-405

Jia Rao, *et al.*, (2017) Advillin acts upstream of phospholipase C ϵ 1 in steroid-resistant nephrotic syndrome. J Clin Invest. 127: 4257–4269

Kobayashi T, Sokabe M. (2010) Sensing substrate rigidity by mechanosensitive ion channels with stress fibers and focal adhesions. Curr. Opin. Cell Biol. 2010, 22:669–676

Koch D, *et al.*, (2012). Strength in the periphery: growth cone biomechanics and substrate rigidity response in peripheral and central nervous system neurons. *Biophys. J.* 102: 452-460

Lee DC, Chen JH, Hsu TY, Chang LH, Chang H, Chi YH, Chiu IM. (2016) Neural stem cells promote nerve regeneration through IL12-induced Schwann cell differentiation. *Mol Cell Neurosci.* 79: 1-11.

Lee J, Abdeen AA, Kilian KA. (2014). Rewiring mesenchymal stem cell lineage specification by switching the biophysical microenvironment. *Sci. Rep.* 4:5188

Palchesko RN, *et al.*, (2012) Development of polydimethylsiloxane substrates with tunable elastic modulus to study cell mechanobiology in muscle and nerve. *PLoS ONE* 7: e51499.

Revenu C, Courtois M, Michelot A, Sykes C, Louvard D, Robine S. (2007) Villin severing activity enhances actin-based motility in vivo. *Mol. Biol. Cell.* 18: 827-38.

Sainath R, Gallo G. (2015). Cytoskeletal and signaling mechanisms of neurite formation. *Cell Tissue Res.* 2015, 359: 267–278

Stutchbury B, Atherton P, Tsang R, Wang DY, Ballestrem C. (2017). Distinct focal adhesion protein modules control different aspects of mechanotransduction. *J Cell Sci.* 130: 1612-1624

Trappmann B, Gautrot JE, Connelly JT, Strange DGT, Li Y, Oyen ML, Cohen MA, Boehm SH, Li B, Vogel V, Spatz JP, Watt FM, Huck WTS. (2012) Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate. *Nat. Mater.* 11: 642–649

Tremblay RG, Sikorska M, Sandhu JK, Lanthier P, Ribocco-Lutkiewicz M, Bani-Yaghoub M. (2010) *J. Neurosci. Methods.* 30;186: 60-7

Vogel V, Sheetz MP. (2006) Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7: 265-275.

Wang SF, Kempen D, Ruitter G, Lei C, Spinner R, Windebank AJ, Yaszemski MJ, Lu L. (2015) Molecularly engineered biodegradable polymer networks with a wide range of stiffness for bone and peripheral nerve regeneration. *Adv. Funct. Mater* 25: 2715–2724

Zhang BG, Quigley AF, Myers DE, Wallace GG, Kapsa RM, Choong PF. (2014) Recent advances in nerve tissue engineering. *IJAO* 37: 277-91.

【評語】 052002

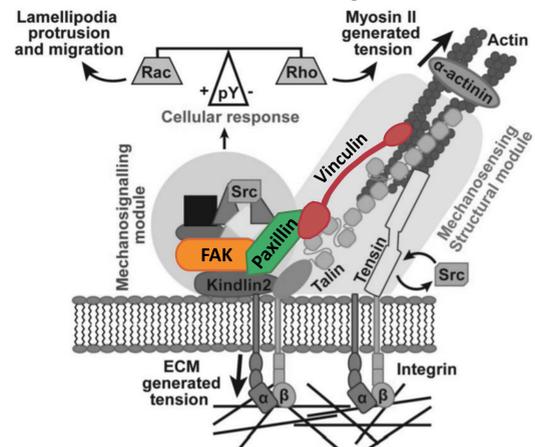
本研究以神經母細胞瘤 Neuro-2a 進行基質軟硬度對神經細胞生長影響的探討，分析不同軟硬度基質上 N2a 細胞面積、神經突長度。並探討 N2a 細胞根據胞外基質軟硬度進行生長調控機轉中 advillin 所扮演的角色。

結果顯示分化後 N2a 細胞在 100 KPa 基質上面積大且神經突較長，說明 N2a 能偵測基質軟硬度並進行生長調控。同時 advillin、paxillin、myosin IIa 和 pFAK 等細胞骨架蛋白於細胞本體表現量在不同軟硬度基質上有所差異，但未與神經突長度相關。advillin 為肌動蛋白接合蛋白，能與 myosin IIa、pFAK 結合調控生長錐形成。觀察生長錐上細胞骨架蛋白表現量，發現於不同軟硬度具有差異且與神經突長度趨勢吻合，說明 advillin 可活化生長錐調控神經突生長。

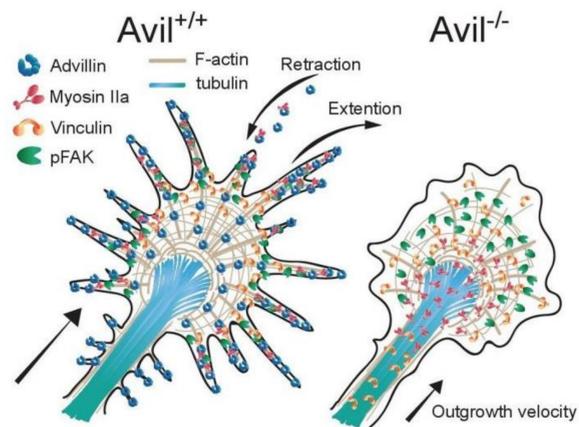
本研究實驗使用方法紮實，顯微鏡的使用具有相當水準。作者有確實掌握到實驗要點，對於科學問題與實驗方法均能詳細回答。實驗報告的記錄，與統計方法的使用也都正確。研究結果的呈現更在水準以上。所得到的結果，發現 advillin 在不同軟硬度的基質上與神經軸突長度的關係，具有學術意義。是不可多得的高中研究成果。

研究背景

過去神經細胞的研究多聚焦於化學因子對神經突生長造成的影響，原因是較難針對物理因子進行操作。但透過建構不同軟硬度基質，目前已證實神經細胞對物理性刺激能夠進行偵測與反饋。神經細胞感知機械力的機轉透過肌凝蛋白IIa (myosin IIa)、磷酸化粘著斑激酶 (pFAK) 以及樁蛋白 (paxillin) 等細胞骨架蛋白進行，能使其在不同軟硬度基質上做出不同生長調控，但目前機械力如何影響神經突的生長尚未被釐清。文獻中提到一種神經細胞骨架蛋白advillin，為一種肌動蛋白接合蛋白，能與細胞骨架蛋白結合進而帶領神經突末端的生長錐 (growth cone) 向四周探索。



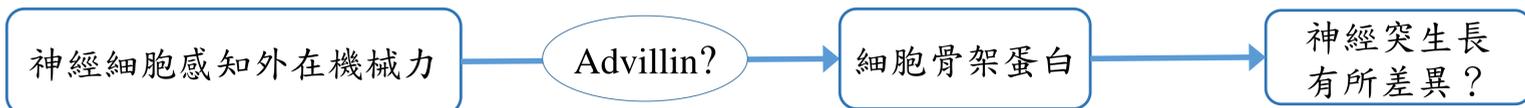
圖一、細胞骨架蛋白參與感知機械力。



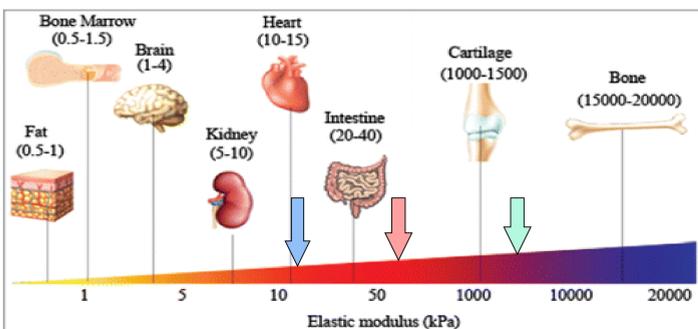
圖二、advillin功能。

研究動機及目的

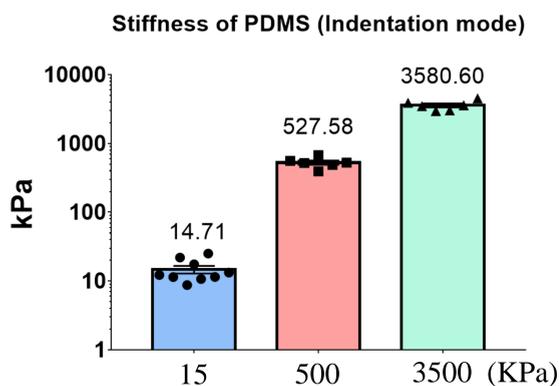
- 一、胞外基質軟硬度對N2a細胞生長造成的影響
- 二、N2a細胞根據胞外基質軟硬度進行生長調控時 advillin 扮演的角色



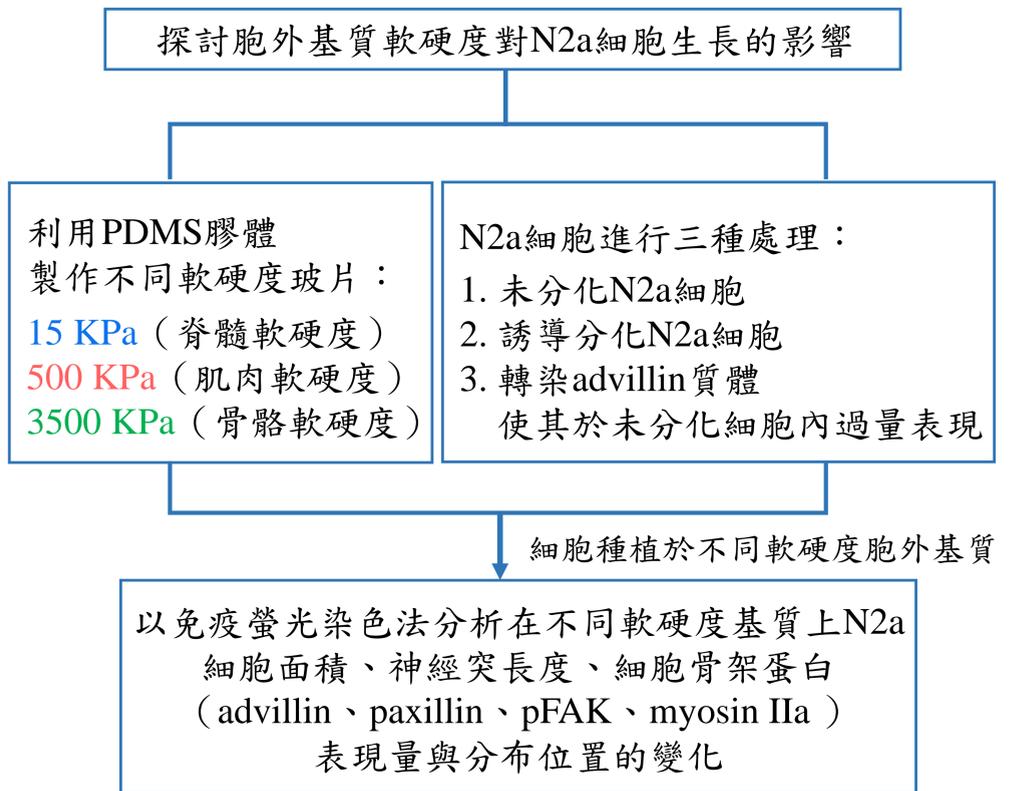
研究過程及方法



圖三、人體組織軟硬程度。(Handorf AM, et al., 2015)



圖四、聚二甲基矽氧烷 (Polydimethylsiloxane, PDMS) 膠體軟硬度測量結果。

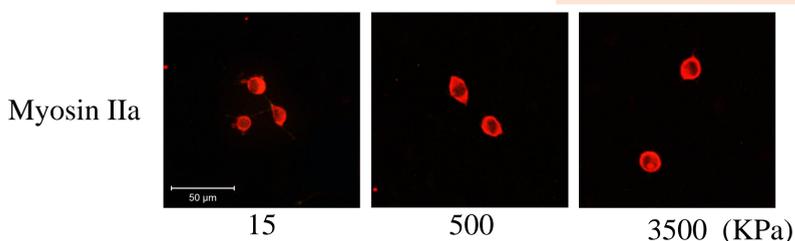


圖五、研究流程圖

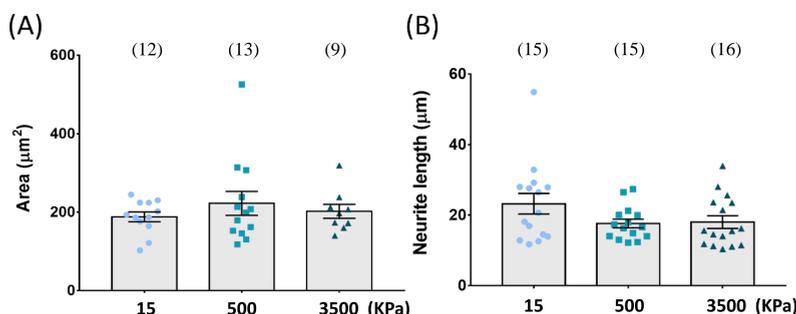
研究結果

- 一、探討胞外基質軟硬度對分化前、分化後N2a細胞生長的影響

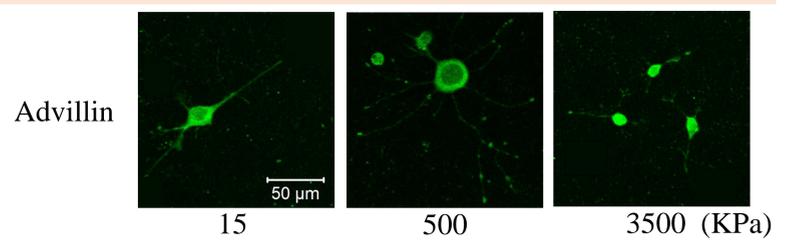
(一) 神經突長度與細胞面積 → N2a細胞分化後具有根據基質軟硬度不同進行生長調控的能力



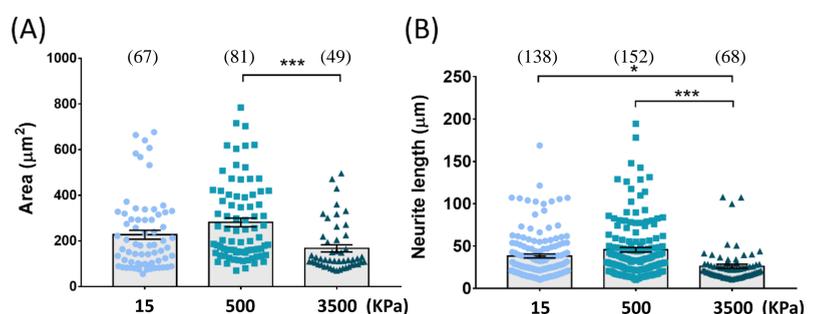
圖六、未分化N2a細胞免疫光染色



圖七、未分化N2a細胞 (A) 細胞面積 (B) 神經突長度



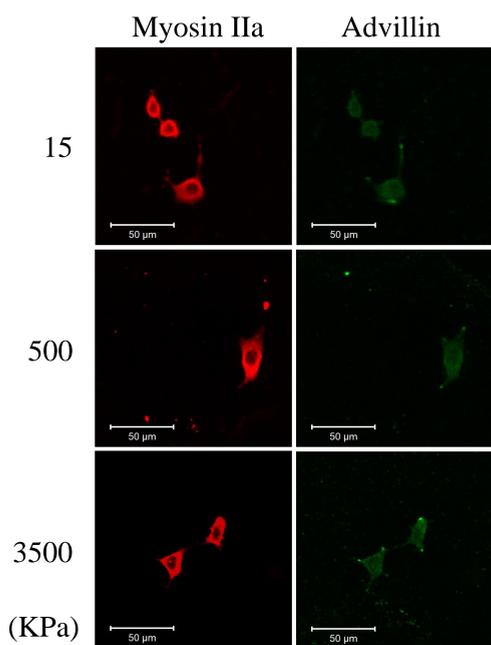
圖八、分化N2a細胞免疫光染色



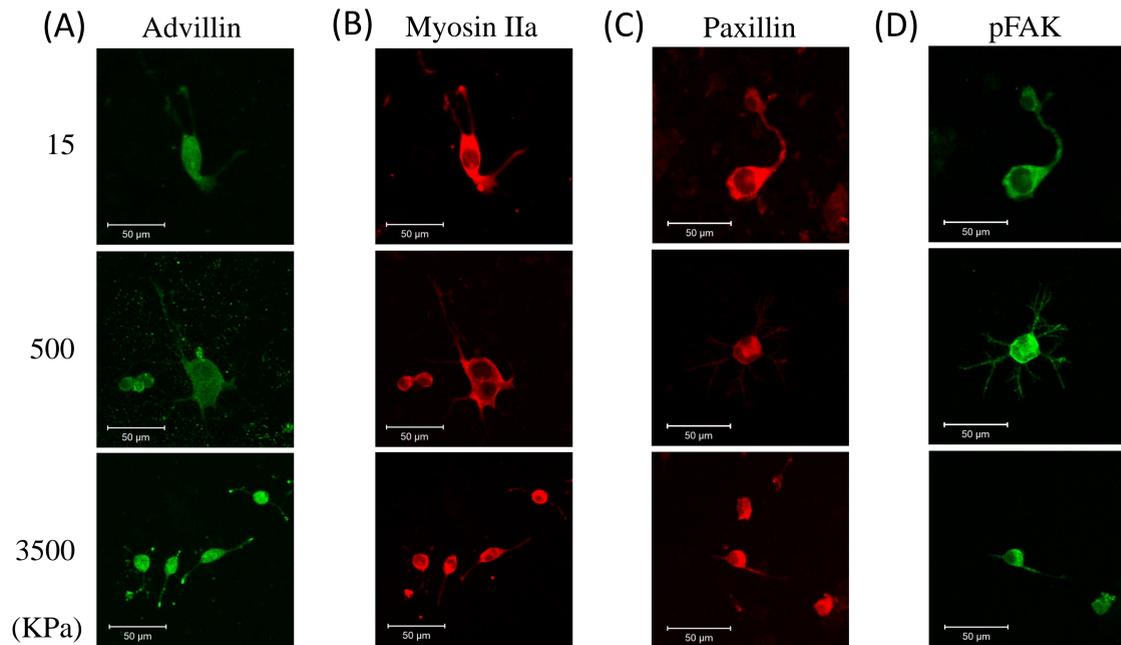
圖九、分化後N2a細胞 (A) 細胞面積 (B) 神經突長度 (*p<0.05, ***p<0.001)

研究結果

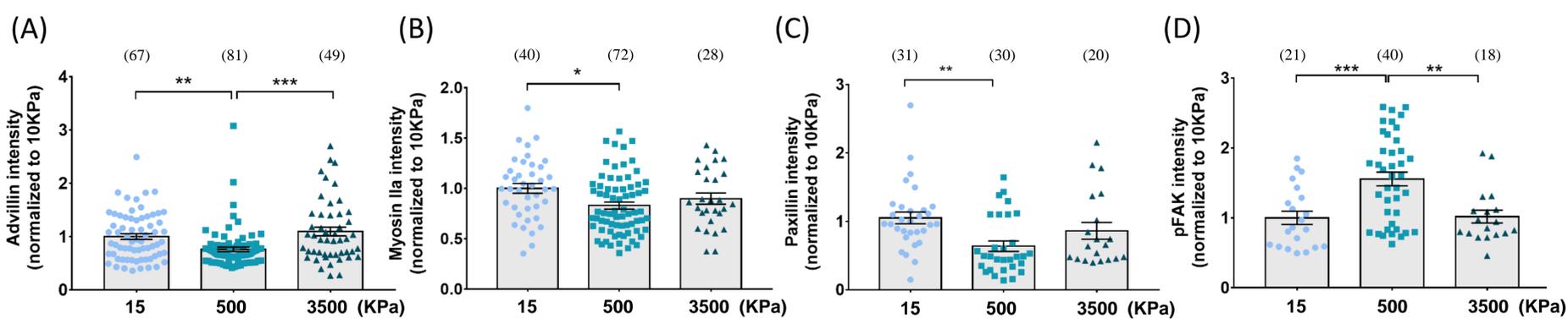
(二) 細胞骨架蛋白於細胞本體表現量 → 細胞骨架蛋白表現量於不同軟硬度基質有所差異，但與神經突長度無相關性



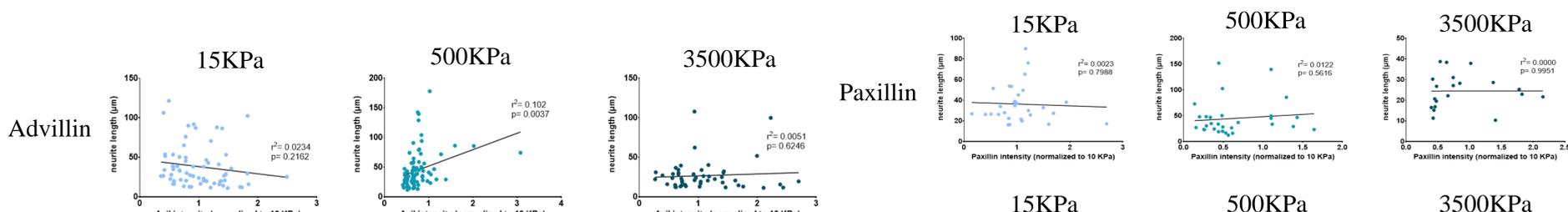
圖十、未分化N2a細胞免疫光染色



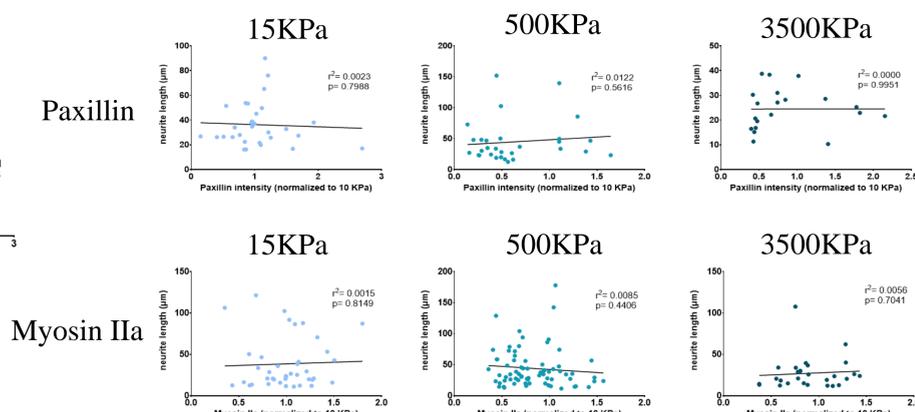
圖十一、分化N2a細胞 (A) advillin (B) myosin IIa (C) paxillin (D) pFAK 免疫螢光染色



圖十二、分化N2a細胞 (A) advillin (B) myosin IIa (C) paxillin (D) pFAK 於不同軟硬程度基質上表現量。(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)



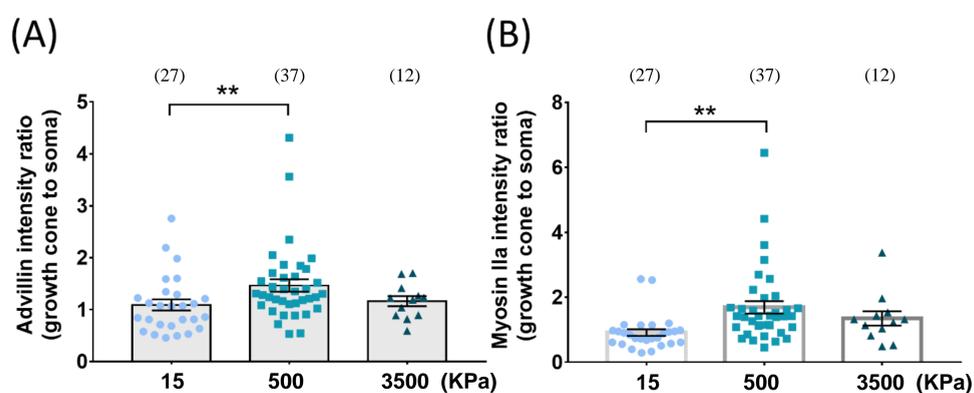
圖十三、advillin表現量與神經突長度之間的相關性，於500KPa介質上p值<0.05，顯示advillin表現量與神經突生長長度之關聯性



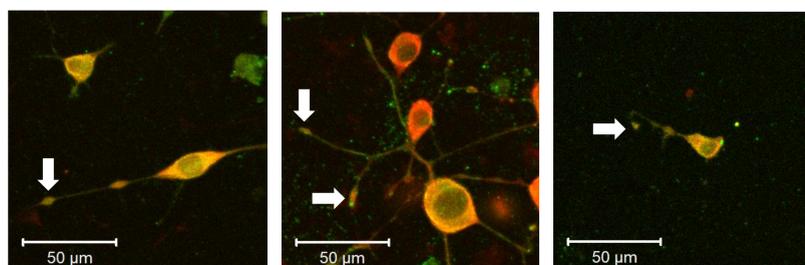
圖十四、paxillin、myosin IIa表現量與神經突長度之間的相關性

(三) 細胞骨架蛋白於生長錐表現量 →

細胞透過生長錐細胞骨架蛋白表現量進行神經突生長調控



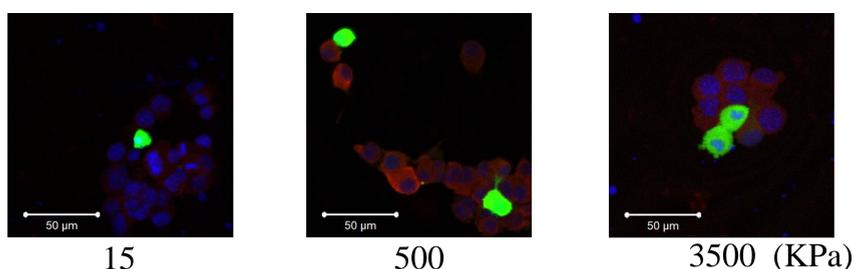
圖十五、(A) advillin與 (B) myosin IIa於生長錐上的表現量



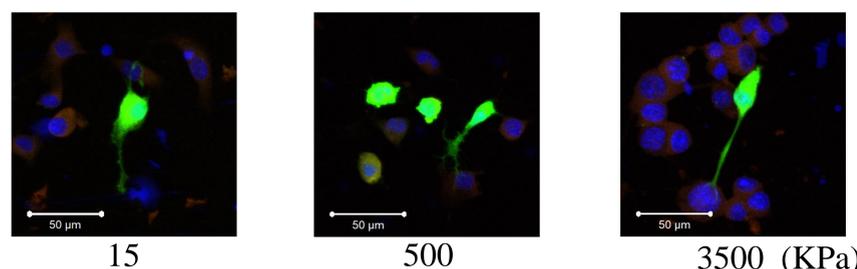
圖十六、分化N2a細胞生長錐結構免疫螢光染色，箭頭所指處為生長錐結構；下方括號則表示分化後N2a細胞在不同軟硬度介質上具有生長錐結構的細胞比例。

二、探討advillin在N2a細胞偵測胞外基質軟硬度之功能

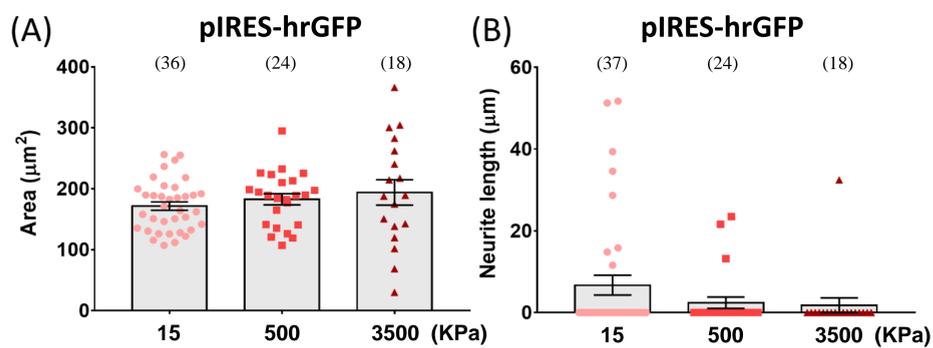
(一) 轉染wild type advillin 1. 神經突長度與細胞面積 → advillin為細胞根據不同軟硬度基質做出生長調控之關鍵因子



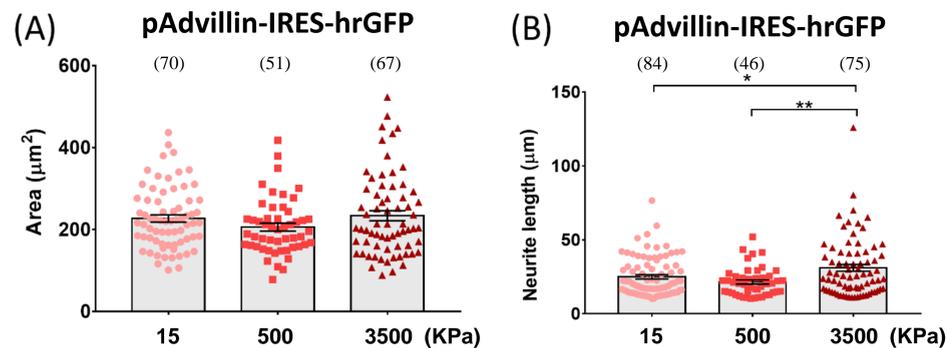
圖十七、轉染pIRES-hrGFP N2a細胞免疫光染色。



圖十九、轉染advillin N2a細胞免疫光染色。



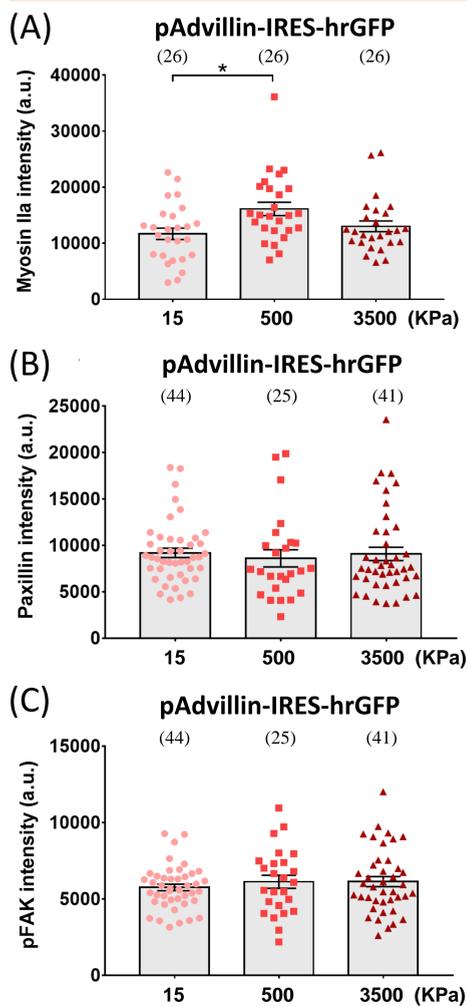
圖十八、轉染pIRES-hrGFP N2a細胞 (A)細胞面積 (B) 神經突長度。



圖二十、轉染advillin N2a細胞 (A)細胞面積 (B) 神經突長度。

2. 細胞骨架蛋白於細胞本體表現量

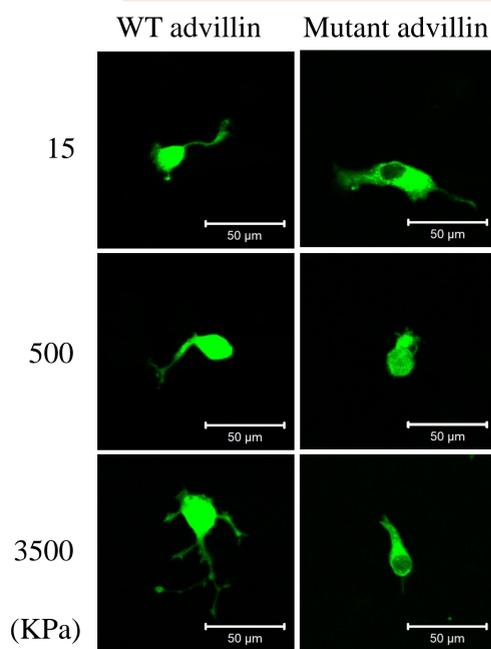
→ 於不同軟硬度基質上無差異



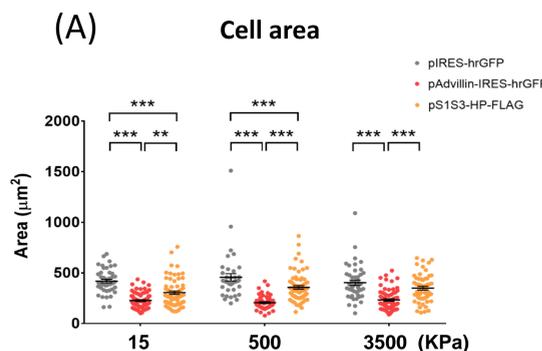
圖二十一、轉染advillin細胞 (A) myosin IIa (B) paxillin (C) pFAK 於不同軟硬度基質上表現量。(*p<0.05)

(二) 轉染pS1S3-HP-flag (mutant advillin)

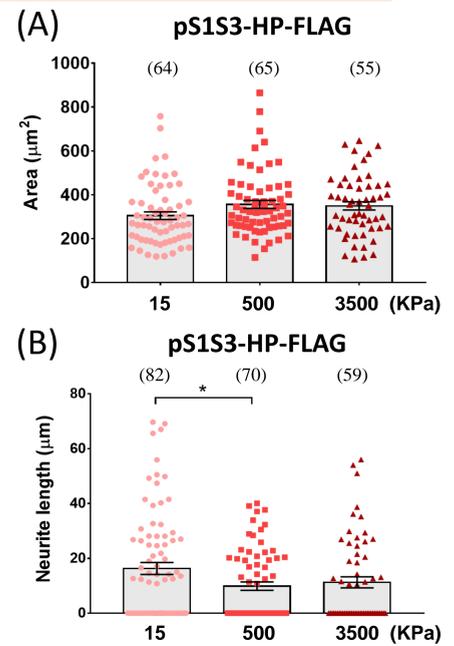
→ 若advillin缺乏nucleation功能將不利於神經突生長



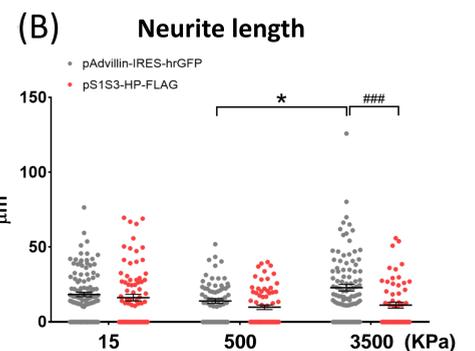
圖二十二、轉染WT advillin / pS1S3-HP-FLAG未分化N2a細胞免疫光染色。



圖二十四、(A)轉染pIRES-hrGFP、WT advillin、mutant advillin的N2a細胞面積 (B)轉染WT advillin、mutant advillin的N2a細胞神經突長度。(*p<0.05,***p<0.001)



圖二十三、轉染pS1S3-HP-FLAG N2a細胞 (A) 細胞面積 (B) 神經突長度。



討論

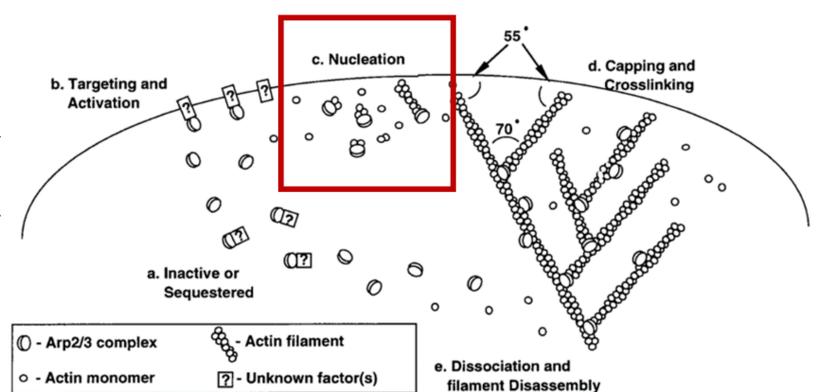
目前已知細胞透過與細胞間基質形成牽引力 (traction forces) 以感測周邊環境的軟硬程度並作出不同反應 (Kobayashi, et al., 2010)。但前人研究中所探究的基質軟硬度範圍小且軟 (0.15 KPa ~ 5 KPa)，未能適切反映周邊組織的性質。

本研究以PDMS製作不同軟硬度的基質，原先想嘗試以PA gel模擬更軟組織的環境，但文獻指出此種基質在不同軟硬度時拓撲結構具有差異，且所能製備的軟硬度範圍有限，因此選擇PDMS。

分析N2a細胞本體與生長錐上的細胞骨架蛋白表現量後，發現生長錐上的蛋白表現量為影響神經突生長長度關鍵，但目前調控advillin的上游訊息路徑未知，其下游調控的細胞骨架蛋白也尚未被完整發現。實驗結果也顯示若advillin缺乏nucleation功能，將對神經突生長造成負面影響。查閱文獻後認為此影響與nucleation功能調整肌動蛋白絲和單體肌動蛋白的動態平衡有關

(Higashida C, et al., 2013)。

文獻指出神經細胞會因為在堅硬的材質上產生不適切的牽引力而無法有效再生 (Zhang BG, et al., 2014)。但其中涉及的機轉卻不甚清楚，因此找到關鍵的蛋白和訊息傳導路徑，方能針對導管軟硬度進行調整。本研究確認advillin參與此機轉，且在3500 KPa的基質上展現更明顯促進神經突生長的功能。未來希望透過使用不同材料模仿其他組織軟硬度，進而應用於神經再生醫學上。



圖二十四、Nucleation功能 (紅框處) 示意圖。(Higashida C, et al., 2013)

結論

- 一、N2a細胞分化後在不同軟硬度基質上的細胞面積及神經突長度具有差異，顯示N2a細胞能夠感應基質軟硬度並根據其進行生長調控。
- 二、未分化N2a細胞轉染advillin後長出神經突且長度在不同軟硬度介質上不同，說明advillin確實為使細胞能夠根據基質軟硬度做出生長調控的重要因子。
- 三、分化後N2a細胞的細胞骨架蛋白於細胞本體的表現量具有顯著差異，但並未跟神經突長度具有相關性。N2a細胞應是透過調控生長錐上細胞骨架蛋白的表現量進行神經突生長長度的調控。
- 四、未分化N2a細胞轉染mutant advillin後仍具有根據基質軟硬度並進行神經突生長調控的功能，但其所生長出的神經突長度較WT advillin短，說明若advillin缺乏成核化功能將不利於神經突生長。

參考文獻

- 一、Handorf AM, Zhou Y, Halanski MA, Li WJ. (2015). Tissue stiffness dictates development, homeostasis, and disease progression. *Organogenesis*. 11: 1-15
- 二、Higashida, C., Kiuchi, T., Akiba, Y. et al. (2013) F- and G-actin homeostasis regulates mechanosensitive actin nucleation by formins. *Nat. Cell Biol.* 15, 395-405
- 三、Kobayashi T, Sokabe M. (2010) Sensing substrate rigidity by mechanosensitive ion channels with stress fibers and focal adhesions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2010, 22:669-676
- 四、Zhang BG, Quigley AF, Myers DE, Wallace GG, Kapsa RM, Choong PF. (2014) Recent advances in nerve tissue engineering. *IJAO* 37: 277-91.