

第二章 實驗材料及方法



2.1 實驗材料

本實驗的材料是蜜蜂，種名為 *Apis mellifera*，取自於國內專業養蜂人家。目前蜜蜂被飼養於長庚大學第一醫學大樓 10 樓，為一室內空間，房間有一對外窗可以供蜜蜂自由進出。此外，房間備有電暖氣，可以調節溫度供蜜蜂禦寒。平日，讓蜜蜂自給自足；當食物匱乏時，則給予砂糖與花粉補充。

2.2 營養細胞之萃取



營養細胞位於蜜蜂腹側的腹部節片上，往往會與一大群脂肪細胞 (fat cells) 相互連接。這兩種細胞隨機排列成一大片單層的組織，每一節片上的細胞個數約有數千個左右。

首先，必須先製備蜜蜂的生理食鹽水 (Honeybee saline, HBS)，其成份如下：156.4 mM NaCl，2.7 mM KCl，1.8 mM CaCl₂，22.2 mM glucose，pH 7.3 [Hsu, 2006]。取出剛捕捉到的覓食工蜂 (foragers)，利用鑷子將蜜蜂的尾部毒針連同其他的消化道一併取出，盡可能將蜜蜂腹腔內的臟器清除乾淨，以避免其他雜質的污染。緊接著用剪刀將腹部的腹側節片整個剝離出來 (見【圖 2.1】)，浸置

於 HBS 中。依序將腹側節片一片片分離開來（見【圖 2.2】之 A），放置於 30 倍以上的解剖顯微鏡下，利用鑷子將一些殘存於節片上的氣管組織，神經纖維，神經節，肌肉組織等清除乾淨，以方便剝離出一大片完整含有營養細胞的細胞組織（見【圖 2.2】之 B、【圖 2.3】）。最後，將這些細胞組織浸置於 HBS 中暫時保存，以供後續實驗使用。

2.3 營養細胞內鈣離子的測定

2.3.1 鈣離子的指示劑

市面上的鈣離子指示劑（Calcium ion indicator）有很多種，大致上分為三類：

1. 受 UV 光激發的螢光鈣離子指示劑
2. 受可見光激發的螢光鈣離子指示劑
3. 其他螢光鈣離子指示劑的軛合物（conjugates）

早期的鈣離子指示劑都是以第一類居多，譬如最常見的 Fura-2（化學結構見【圖 2.4】）。Fura-2 的激發波長（excitation wavelength）介於 340~380 nm 之間，放射波長（emission wavelength）則為 510 nm。由於這一類的鈣離子指示劑所需的激發波長偏低，因此需要能量較高的光源，所以在實驗儀器上的要求

相對增加；再者，由於 UV 雷射短譜線高能量的特性亦會造成樣品受激發部位產生漂白 (bleaching)，灼燒 (burning) 及因光化學作用產生的毒性 (phototoxicity) 造成生物樣品壞死的情形（一般稱為 UV cytotoxicity），極不適合活體樣本的長時間觀測。雖然近些年已經發展出「雙光子超短脈衝雷射掃描共軛焦顯微鏡」(Two-photon pulse laser scanning confocal microscope) 技術來減少使用高能量激發光對於生物樣本的物理傷害，不過更多的科學家將目標轉移到第二類的鈣離子指示劑。

第二類的鈣離子指示劑便是將激發光源由 UV 光轉變成可見光範圍，目的便是改進上述用 UV 光源的缺點。最常見的有 Fluo-3、Fluo-4（化學結構見【圖 2.5】）。Fluo-3 是由 Tsien 與 Rink 發展出來的〔Tsien and Rink, 1980〕，最大的特色是其激發波長已經變為 488 nm 的可見光範圍，放射波長則為 525 nm。Fluo-3 對於鈣離子的 K_d 值為 390 nM，雖然其親和性 (affinity) 比不上 Fura-2 (K_d 值 140 nM)，但只需可見光範圍的激發光源以及減少對於生物樣本傷害的兩項優點，有逐漸取代第一類鈣離子指示劑的趨勢。

Fluo-4 是 Fluo-3 的類似物 (analog)，差別在將 Fluo-3 上的兩個氯元素 (Cl) 置換為氟元素 (F)，此一改變可以使 Fluo-4 對於鈣離子的 K_d 值降低為 350 nM，換言之，Fluo-4 相較於 Fluo-3

擁有更好的鈣離子親和性。Fluo-4 的激發波長同為 488 nm，放射波長則變為 515 nm。Fluo-4 除了具有較佳的親和性外，其放射光的螢光強度也比同條件的 Fluo-3 來的高，增加了 50 ~ 100 % 左右（見【圖 2.6】），大大提升了實驗觀察上的便利性〔Gee *et al.*, 2000〕。

本實驗選用的鈣離子指示劑為 Fluo-4 AM，採購自 Molecular Probe 公司。前述的 AM 指的是 acetoxymethyl ester，目的是幫助指示劑形成不帶電狀態，以便更容易穿透細胞膜而進入細胞之中。

2.3.2 培養含有鈣離子指示劑的營養細胞

首先，需要事先配製好 Fluo-4 AM 的貯存溶液（stock solution）。本實驗使用 Fluo-4 AM 的 stock solution 濃度為 500 μM ，調配的溶劑為 Dimethyl Sulfoxide (DMSO)，貯存溫度為 4 $^{\circ}\text{C}$ 。由於採購自 Molecular Probe 的 Fluo-4 AM 是採用每劑 50 μg 的特殊包裝，所以僅需外加 91.16 μl 的 DMSO 於每劑量 Fluo-4 AM 即可。

本階段的實驗操作方式是將分離出的營養細胞染上 Fluo-4 AM，先利用 HBS 稀釋 Fluo-4 AM 的 stock solution，使得最後的 Fluo-4 AM 濃度為 5 μM ，再將營養細胞放入 Fluo-4 AM 溶液中，培養於室溫下一個小時〔Haskew-Layton *et al.*, 2005〕。之後，將

這些染上 Fluo-4 的營養細胞利用新鮮的 HBS 沖洗兩次以上，以便將未進入營養細胞內多餘的 Fluo-4 清洗掉，避免這些散佈於細胞外的指示劑影響之後的觀察結果。清洗後的營養細胞利用轉速 10,000 g 的離心機將細胞收集起來，以備後續實驗使用。

2.3.3 鈣離子的測定

把前一步驟染好 Fluo-4 的營養細胞放置在載玻片之上，並且用蓋玻片與指甲油加以封片處理。由於是為了觀察鈣離子的變動，所以封片過程要避免細胞被過度擠壓，以免細胞因為受封片的應力 (stress) 影響造成其他的鈣離子訊號產生。最後，封片完成的樣本利用「雷射掃描共軛焦顯微鏡」(laser scanning confocal microscope) 來測量細胞內鈣離子的變動。

【圖 2.7】是處理過 Fluo-4 之營養細胞於共軛焦顯微鏡下的影像：A 是穿透光影像，B 是受 488 nm 氮氬雷射激發後的螢光影像，C 是將 A 與 B 重疊後的影像。

2.4 細胞骨架抑制劑對於營養細胞內鈣離子的影響

2.4.1 細胞骨架抑制劑 I：秋水仙素

2.4.1.1 秋水仙素的作用機制

秋水仙素 (Colchicine)，是一種含有劇毒的生物鹼（化學結構見【圖 2.8】）。最先是由兩位法國化學家 P.S. Pelletier 和 J. Caventon 從秋水仙 (colchicum) 萃取出來的，最早是用來治療痛風 (gout) [Pelletier and Caventon, 1820]。

Colchicine 最主要的生理功能是抑制 microtubules 的聚合作用 (polymerization)。Microtubules 是細胞骨架的一種，直徑約 25 nm，是所有已知三類 cytoskeletons 中尺寸最大的一類。以下列表簡述這三類 cytoskeletons 的差異 [Lodish *et al.*, 2003]：

Protein Subunits in Cytoskeletons

Protein subunits	MW	Expression	Function
<i>Microfilaments</i>			
Actin	42,000	Fungi, plant, animal	Structural support, motility
MerB	36,000	Rod-shaped bacteria	Width control
<i>Microtubules</i>			
Tubulin (α and β)	58,000	Fungi, plant, animal	Structural support, motility, cell polarity
FtsZ	58,000	Bacteria	Cell division
<i>Intermediate filaments</i>			
Lamins	Various	Plant, animal	Support for nuclear membrane
Desmin, keratin, others	Various	Animal	Cell adhesion

Colchicine 透過與 tubulin dimers (α 和 β) 結合，使得被結合的 tubulin dimers 不能再與 microtubules 終端上的 tubulin dimers 行聚合反應，進而抑制 microtubules 的增長，

達到終結 microtubules 功能的目的。

2.4.1.2 培養含有秋水仙素的營養細胞

首先，先配製 Colchicine 的 stock solution。本實驗的 Colchicine 採購自 Sigma 公司，將粉末狀的 Colchicine 溶解於 DMSO 中，最後調配成 1 mM，貯存於 4°C 冰箱中備用。

將新鮮萃取出的營養細胞放入利用 HBS 稀釋成 0.1 μ M 的 Colchicine 溶液中，培養於室溫下 30 分鐘，接著將營養細胞用新鮮的 HBS 清洗三次以上，以便將多餘的抑制劑清除乾淨〔Bianchi *et al.*, 2006b〕。

2.4.1.3 鈣離子的測定

由於要觀察營養細胞在細胞骨架被抑制的情況下，鈣離子訊號是否會受到影響，所以處理完 Colchicine 的營養細胞緊接著要進行鈣離子指示劑的處理，方法同步驟 2.3.2、2.3.3。

【圖 2.9】是處理過 Colchicine 之營養細胞於共軛焦顯微鏡下的影像：A 是穿透光影像，B 是受 488 nm 氬氫雷射激發後的螢光影像，C 是將 A 與 B 重疊後的影像。

2.4.2 細胞骨架抑制劑 II：太平洋紫杉醇

2.4.2.1 太平洋紫杉醇的作用機制

太平洋紫杉醇的英文名為 Taxol，最早是由一種為數不多，

生長緩慢的太平洋紫杉樹 (*Taxus brevifolia*) 的樹皮所提煉出來的，最常被用在卵巢癌與乳癌的治療上。由於 Taxol 本身非常稀有，所以近年來透過化學合成的方法，設計出類似 Taxol 的其他化學藥物，譬如：Paclitaxel (化學結構見【圖 2.10】)。

Taxol 最主要的生理功能是固定 microtubules，因為 Taxol 會與 β -tubulin 的 N-terminal 端結合，形成結構十分穩固的 microtubules，進而抵抗 microtubules 的解聚作用 (depolymerization)。所以在抑癌機轉上，藉由上述的機制，可以抑制癌細胞的細胞分裂，使得癌細胞停留在細胞週期中的 G₂/M phase，達到抗癌的效果。

2.4.2.2 培養含有太平洋紫杉醇的營養細胞

首先，先配製 Taxol 的 stock solution。本實驗是採用功能類似的其他化學藥品：Paclitaxel，採購自 Sigma 公司，將粉末狀的 Paclitaxel 溶解於 DMSO 中，最後調配成 3 mM，貯存於 4 °C 冰箱中備用。

將新鮮萃取出營養細胞放入利用 HBS 稀釋成 2 μ M 的 Paclitaxel 溶液中，培養於室溫下 30 分鐘，接著將營養細胞用新鮮的 HBS 清洗三次以上，以便將多餘的抑制劑清除乾淨 [Worthylake *et al.*, 2001]。

2.4.2.3 鈣離子的測定

由於要觀察營養細胞在細胞骨架被抑制的情況下，鈣離子訊號是否會受到影響，所以處理完 Taxol 的營養細胞緊接著要進行鈣離子指示劑的處理，方法同步驟 2.3.2、2.3.3。

【圖 2.11】是處理過 Taxol 之營養細胞於共軛焦顯微鏡下的影像：A 是穿透光影像，B 是受 488 nm 氬氖雷射激發後的螢光影像，C 是將 A 與 B 重疊後的影像。

2.5 觀察營養細胞內鐵顆粒分佈的情形



2.5.1 鐵氰化鉀

鐵氰化鉀 (Potassium ferricyanide) 是一種紅色的氰化物，化學分子式為： $K_3[Fe(CN)_6]$ ，為寶石紅 (ruby red) 的結晶狀粉末，在室溫與常壓環境下十分穩定，鐵氰化鉀易溶解於水中，其溶液還會顯現出些許的黃綠螢光。鐵氰化鉀在本實驗中最主要的功用是能与鐵原子結合，進而提供較佳的對比 (contrast) 的影像，所以在顯微鏡下觀察時，處理過鐵氰化鉀的營養細胞，其細胞內部的鐵顆粒比起未處理的樣本更加清楚，方便我們觀察營養細胞內鐵顆粒的分佈情形。不過由於處理鐵氰化鉀後，營養細胞會死亡，所以只能

提供一些營養細胞失去活性下的實驗結果。

2.5.2 培養含有鐵氰化鉀的營養細胞

首先，先製備各種所需的藥品：

2.5% glutaraldehyde (GA)：用 PBS buffer 為溶劑將市售

25% GA 予以稀釋

0.5% 鐵氰化鉀：將紅色粉末狀的鐵氰化鉀溶於 ddH₂O 至所

需濃度

0.5% HCl：利用 ddH₂O 將市售濃鹽酸稀釋至所需濃度

PBS buffer：成份為 0.3 M Na₂HPO₄ 與 0.3 M NaH₂PO₄，pH 6.8

將萃取出來的營養細胞利用 2.5% glutaraldehyde 固定 20 分鐘。之後，把固定好的細胞置入等體積的 0.5% 鐵氰化鉀與 0.5% HCl 溶液裡，培養於 60 °C 環境中 30 分鐘。最後，將培養好的營養細胞用 PBS buffer 清洗三次以上，以便將多餘的藥品去除。

2.5.3 營養細胞內鐵顆粒的觀察

將處理過鐵氰化鉀的營養細胞給予封片處理，透過雷射掃描共軛焦顯微鏡觀察細胞內的鐵顆粒分佈。另外，配合數位化影像放大的技術，可以精準的觀察到單一鐵顆粒的尺寸與形態，進而研究鐵顆粒內的超順磁鐵是否會受外加磁場影響而膨脹或縮小。

2.6 外加磁場

為了觀察磁場對於營養細胞內鈣離子變動的影響，所以本實驗配合雷射掃描共軛焦顯微鏡的規格，設計了外加磁場的裝置。本實驗是採兩邊各 10 個並排小磁鐵所組成的外加磁場，兩端距離約 3 公分，由於磁場強度會隨著與磁鐵距離不同而有所改變，所以我們便以兩端磁鐵相距的中心點位置為依準，取該點的磁場強度當作實驗中外加的磁場量。經過儀器測量，本實驗的外加磁場強度約 1 G (Gauss，高斯)，大約是地球磁場的 2.2 倍（桃園中壢附近的地球磁場強度約 45100 nT = 0.451 G，此資料由中央大學地科系顏宏元副教授提供）。

2.7 雷射掃描共軛焦顯微鏡

本實驗使用的雷射掃描共軛焦顯微鏡 (Laser Scanning Confocal Microscope, LSCM) 位於「長庚基因體醫學中心」下之「顯微鏡核心實驗室」，機型為 Leica TCS SP2 MP，此一系統主要是由雷射光源、顯微鏡、共軛焦掃描器、電腦操控工作站、與應用軟體所組成的。

由於在一般顯微鏡下觀察的影像，都有來自聚焦面 (focal plane) 及非聚焦面 (out-of focal plane) 的光，故所提供影像品質的解析

度較差，也無法一層一層的深入樣品內作顯微觀察。而雷射掃描共軛焦顯微技術則是利用通過光學針孔光圈（pinhole）蒐集來自樣品聚焦面的光所行成之影像，將非同一聚焦面的光排除於光學針孔光圈外所形成的共軛焦影像（confocal image），去除傳統顯微鏡影像的迷光（stray light），能提供更高的光學解析度，以及更佳的軸向（axial）及橫向（lateral）解析度。共軛焦顯微鏡的原理示意圖見【圖 2.12】。

本實驗配合 Fluo-4 的使用條件給予 488 nm 的氬氖雷射（HeNe laser）激發光源，隨後擷取波長 515 nm 的放射光加以觀察，利用電腦軟體測量放射螢光的強度，來分析螢光鈣離子的變動性。此外，透過數位化影像放大的技術，可以將觀察到的影像從原先光學顯微鏡條件下的 600 倍，一舉提升至等同電子顯微鏡條件下約 15,000 倍左右，這項技術可以幫助我們直接觀察到活體營養細胞內的鐵顆粒，成為研究超順磁鐵之磁場導航機制的一項利器。