

## 第四章 討 論



#### 4.1 螢光強度的數據分析

實際操作上，每一個樣本染上鈣離子指示劑的量皆不盡相同，除了細胞本身個體差異性外，撷取於玻片上的細胞個數、營養細胞與脂肪細胞的比例、共軛焦顯微鏡掃描的切面都會影響螢光強度。因為在共軛焦顯微鏡下觀察發現，脂肪細胞含有較大量的鈣離子，所以在螢光亮度上遠遠比營養細胞來的高(這項差異剛好提供我們另一個分辨這兩種細胞的方法)，因此當樣本中脂肪細胞出現比例較多時，整體的螢光強度就會偏高；此外，共軛焦顯微鏡可以精準的掃描樣本上某一特定高度的影像，所以即便是同一樣本，也會因為選取切面的不同，使得螢光強度有所的差別。

為了避免這些問題，我們統一選取細胞樣本能產生最大截面積的切面，並且挑選營養細胞與脂肪細胞個數比例約二比一的區域觀察。最後在分析數據時，採用百分比的方式表達，將所有樣本在觀測起點的螢光強度歸零，以方便所有數據的整合分析。

#### 4.2 鐵顆粒的超順磁現象

根據 Hsu 和 Li 在 1994 年提出的超順磁磁場導航機制，認為營養

細胞內的鐵顆粒含有許多奈米級的超順磁磁鐵顆粒，數目約一千多顆左右，隨機地分佈在鐵顆粒中。超順磁的物理特性是指某一磁性物質沒有固定的磁性方向，能夠依據外界磁場方向來調整自身的磁性方向。舉例來說：一個長條型磁鐵，有固定的 N 極與 S 極，不論此一磁鐵如何改變方位，N 極與 S 極依然固定不受改變；但是超順磁磁鐵則不然，如果原先磁鐵 S 極指向 N 極正好是南向北的方向，當另一 S 極指向 N 極是東向西方向的外加磁場加入，則超順磁磁鐵便會受後來東向西的外加磁場影響，使得原先 S 極指向 N 極的方向由南向北瞬間改變為東向西。

對蜜蜂而言，這些超順磁的物理特性，可以幫助蜜蜂隨時感應地球磁場的變化，因為蜜蜂覓食與遷移時的飛行方向是隨機的。由【圖 1.10】說明，當蜜蜂順著地磁方向移動時，鐵顆粒的左右兩邊因為超順磁磁鐵相互排斥而膨脹，形成橫橢圓的形狀；但是當蜜蜂垂直地磁方向移動時，鐵顆粒的左右兩邊則因為超順磁磁鐵相互吸引而收縮，於是鐵顆粒恢復成類圓形的形狀。

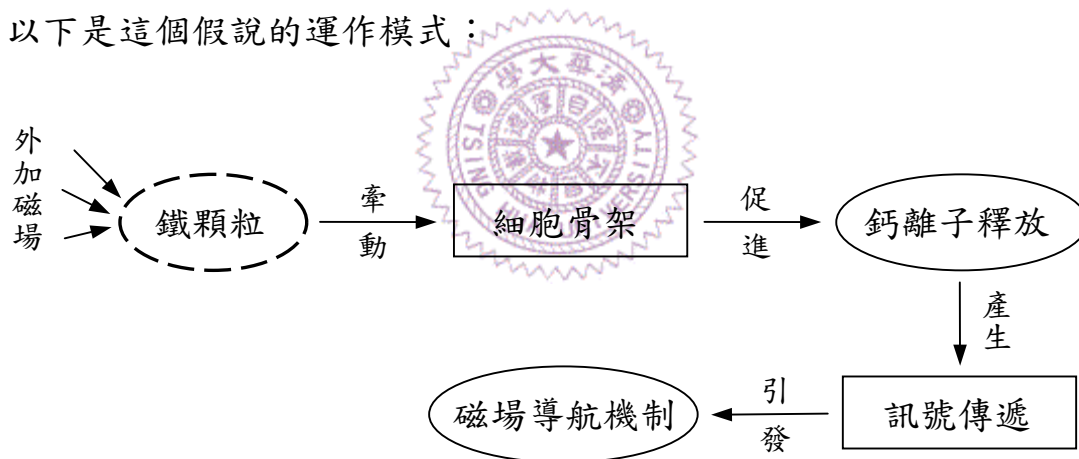
在 3.2 節實驗裡，我們運用了數位化影像放大的方式，觀察到營養細胞內部的鐵顆粒，這項發現，讓我們除了透過電子顯微鏡外，第一次在光學顯微鏡條件下觀察到鐵顆粒的蹤跡。此一實驗技術上的突破最大好處是，我們可以快速地觀察到鐵顆粒受外界環境作用的改

變，甚至可以直接觀察活體細胞，這些優點都是過去所未見的。

根據 3.2 節的結果，實驗觀察到的鐵顆粒變化的確符合了超順磁性的現象。因為此節實驗中，外加磁場方向是位在影像的左右側，於是鐵顆粒內的超順磁磁鐵 N/S 極會瞬間改變為左右方向，於是在左右方向會因為相鄰磁鐵前後端的 N/S 極互相吸引而收縮；反之，上下方向則因為相鄰磁鐵左右端 N/S 極互相排斥而膨脹，因此我們觀察到的影像，才有左右方向（寬度）收縮及上下方向（高度）膨脹的現象。

有了這項結果，我們得到蜜蜂磁場導航機制假說的第一步證據。

以下是這個假說的運作模式：



#### 4.3 磁場對於鈣離子的影響

從 3.3 節實驗結果的【圖 3.13】中，可以發現磁場對於鈣離子確實有影響，因為在未加磁場的前 10 秒，實驗組與對照組的曲線幾乎重疊，一直到外加磁場作用後實驗組的鈣離子才開始增加，最後增

加了約 7.63 %的鈣離子。

對照組後來的螢光強度稍微降低約 0.74 %，推測可能是因為短時間內連續接受 488 nm 的氬氦雷射照射，造成細胞樣本受激發部位產生些許漂白現象；亦或者連續性雷射造成細胞某種程度的傷害，使得鈣離子損失。

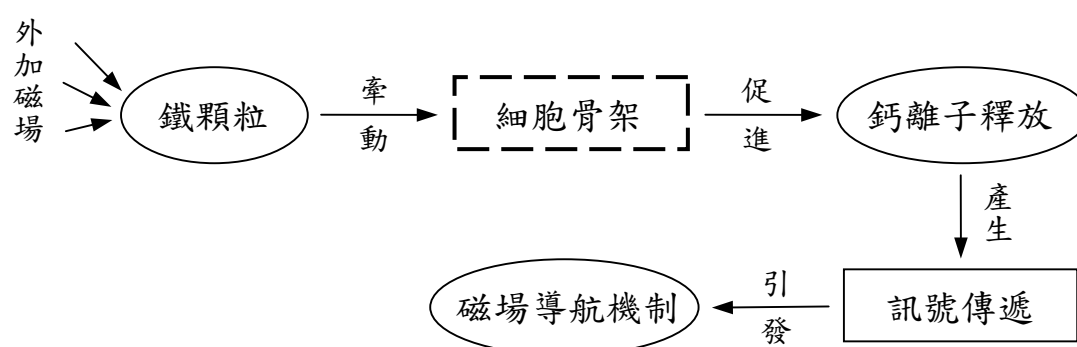
#### 4.4 細胞骨架在鈣離子訊號上扮演的角色

在 3.4 節細胞骨架抑制劑作用下磁場對於鈣離子的影響實驗中，我們發現受抑制劑作用的實驗組跟對照組，其差異性已經不如未受抑制作用的實驗明顯。以 Colchicine 為例，【圖 3.14】中對照組的鈣離子原則上沒有太大變動（增加 0.18 %），而實驗組的鈣離子則減少約 0.35 %，所以整體而言只有 0.53 %的差異，這個數值遠小於未受抑制作用時的 7.63 %，兩者相差約 14.4 倍。同理，在 Taxol 實驗中，實驗組與對照組僅有 0.20 %的差異，比起未受抑制作用時相差約 38.2 倍。

不過值得注意的是，採用 Taxol 這類抑制劑的效果可能不如 Colchicine 來的好，因為在 Taxol 實驗中的對照組曲線，並不如 Colchicine 實驗中的對照組曲線平整；此外，用 Taxol 抑制劑的實

驗組在外加磁場作用下，曲線變動情形明顯比用 Colchicine 抑制劑的實驗混亂。

有了這些實驗結果，我們推論鐵顆粒的磁場導航機制的確是需要細胞骨架的參與，其運作模式如下：



#### 4.5 移除磁場後鈣離子的影響



一開始的實驗我們觀察到磁場會促進鈣離子的增加，於是我們想探討這是否為可逆反應。經過先前的實驗經驗，發現長時間連續性的紀錄，會使細胞樣本接受過多雷射傷害，造成細胞損傷與染劑漂白等現象。為了避免上述原因影響實驗結果，我們將紀錄的間隔時間拉長，分為間隔 60 秒與 120 秒的兩組實驗。所謂間隔 60 秒指的是樣本一開始先接受外加磁場 60 秒，隨後將外加磁場移除，再分別紀錄 0 秒、60 秒、120 秒的結果；同樣的，間隔 120 秒則是將外加磁場時間改為 120 秒，並且分別於 0 秒、120 秒、和 240 秒做紀錄。由於先前

的實驗已經知道前半段時間鈣離子會有增加的趨勢，所以我們將觀察重心放在後半段時間內，藉以了解移除磁場會對鈣離子有何種影響。由【圖 3.16】與【圖 3.17】得知，移除磁場後，鈣離子仍有增加的趨勢。下表列出這兩組實驗的結果：

		前半段時間（外加磁場）	後半段時間（移除磁場）
間隔 60 秒	對照組	+ 0.12 %	+ 2.12 %
	實驗組	+ 4.48 %	+ 2.97 %
間隔 120 秒	對照組	+ 1.55 %	+ 1.59 %
	實驗組	+ 7.35 %	+ 8.40 %

+：表示鈣離子增加

由上表發現，不論是實驗組或對照組，鈣離子皆有增加的趨勢。前半段時間中，實驗組增加的趨勢遠大於對照組，這項結果符合了先前 3.3 節的實驗；後半段時間中，兩組實驗的結果則不盡相同，間隔 120 秒的實驗組增加幅度大於間隔 60 秒的結果，這個現象在前半段時間中也可以發現，所以我們認為外加磁場的時間越長，可以引發越大的鈣離子變化量。至於，移除磁場後鈣離子為何依然有增加的趨勢，這點我們尚未找到合理的解釋。推測可能的原因是因為營養細胞內回收鈣離子的機制較差所致。

由於發現移除磁場的實驗會使的鈣離子持續增加，所以我們希望找到外加磁場作用下營養細胞內鈣離子增加的最大值。因為間隔 120 秒時鈣離子增加的效應較明顯，所以我們選用此一條件，增加實驗時



間的時間數使得總時間增加為 480 秒。由【圖 3.18】中發現，當 360 秒過後，鈣離子增加的趨勢明顯減緩，幾乎維持水平。前三段時間中（0~360 秒），鈣離子每 120 秒平均增加約 7.40 %，然而第四段時間中（360~480 秒）僅增加約 0.41 %的鈣離子，兩者差異頗大。所以推測此高原值（約 22.60 %）即為營養細胞內鈣離子在磁場作用下能增加的最大值。

#### 4.6 脂肪細胞對實驗觀察的影響

由於樣本中混雜著這兩類細胞，所以不免質疑觀察到的鈣離子變化是否有可能是脂肪細胞所引起的。於是在 3.6 節實驗中，利用 LSCM 的電腦軟體分別圈選這兩類的細胞來進行鈣離子強度分析。分析的結果皆符合先前的假設，就是脂肪細胞內鈣離子受外加磁場作用產生的變動性遠小於營養細胞。以 3.3 節實驗組為例，由【圖 3.19】中可以發現純粹營養細胞內鈣離子受磁場影響的情形遠大於純粹脂肪細胞，營養細胞總共增加了約 12.58 %的鈣離子，而脂肪細胞僅增加約 3.54 %；同樣地，在對照組中，營養細胞總共減少約 3.63 %，脂肪細胞僅減少 0.42 %。所以單純觀察營養細胞得知，受外加磁場作用後，鈣離子總共增加了約 16.21 % ( $12.58 - (-3.63) = 16.21$ )；而脂肪



細胞受外加磁場作用後總共僅增加約 3.96 % ( $3.54 - (-0.42) = 3.96$ )。

因此，純粹營養細胞的整體表現量約是純粹脂肪細胞的 4.1 倍。由上述的分析結果，我們推論脂肪細胞相對於營養細胞而言，較不具有磁場感應的能力。脂肪細胞則可以當作營養細胞的對照組，顯示營養細胞的鈣離子上升可能是磁鐵顆粒受外加磁場感應所致。

#### 4.7 鈣離子的來源

營養細胞內鈣離子會受外加磁場作用而增加，而這些增加的鈣離子究竟從何而來呢？一般生物細胞內的鈣離子增加有兩種來源：一種來自於細胞內部的內質網 (endoplasmic reticulum, ER)，透過細胞骨架的牽動使得 ER 將其內儲存的鈣離子釋放出來；另一種則是透過細胞膜上的鈣離子通道 (calcium channel)，將細胞外部的鈣離子送入細胞內以增加濃度。一般細胞內鈣離子的濃度約  $0.1 \mu\text{M}$  到  $0.3 \mu\text{M}$  之間，而本實驗使用的 HBS 內的鈣離子濃度為  $1.8 \text{ mM}$ ，彼此相差約 10,000 倍，於是本實驗鈣離子增加的來源是否來自於細胞外的 HBS 溶液呢？根據實驗結果，我們認為營養細胞內的鈣離子增加是來自於 ER，而非來自於 HBS 溶液。因為在 3.4 節實驗裡，使用了細胞骨架抑制劑的樣本，其增加的鈣離子濃度皆不顯著，表示細胞骨架被抑制時

會影響鈣離子的釋放，此一結果恰好跟生物細胞由 ER 取得鈣離子的機制吻合。反之，若營養細胞是藉由鈣離子通道來增加鈣離子，則處理過細胞骨架抑制劑的樣本應該不受影響，鈣離子仍有增加的現象。

#### 4.8 受磁場作用產生鈣離子變動的其他範例

從本實驗中得知營養細胞會受外加磁場作用而增加細胞內的鈣離子，那生物界還有其他類似的例子嗎？

人類的嗜中性白血球 (neutrophils) 之 HL-60 細胞在受 0.15 T (1,500 G, 約 3,000 倍地磁強度) 的磁場作用下，細胞內鈣離子會由約 121 nM 的基礎濃度上升約 31 nM，約提高了 25.6 % 的鈣離子濃度 [Carson *et al.*, 1990]。

另外，人類的T細胞淋巴母細胞 (T cell lymphoblasts) 之 Jurkat E6-1 細胞同樣也會因為外加磁場而增加鈣離子的濃度。在 50 Hz 電磁場，約 65  $\mu$ T (0.65 G, 約 1.44 倍地磁強度) 的磁場作用下，鈣離子由約 50 nM 基礎濃度短暫升高到約 550 nM，上升幅度高達 10 倍 [Mattsson *et al.*, 2001]。

雖然上述兩者，不論在實驗條件或實驗結果上有很大的差異，但是都顯示出細胞內鈣離子會因為外加磁場的關係而有所增加。不過由

於上述兩種細胞皆無鐵顆粒，所以情況比較類似蜜蜂的脂肪細胞。

#### 4.9 造成鈣離子變動的其他範例

鈣離子是信息傳遞中很重要的二級訊息，所以鈣離子訊號（簡稱：鈣訊）常扮演許多生理調控的重要角色。

人類的嗜中性多核白血球存在於 40~65 % 的血液中，平均直徑約  $10\ \mu\text{m}$ ，1 c.c. 血液平均有  $3\sim5\times10^6$  個，人體一天產生  $10^{11}$  個，在血液中的壽命約 8~20 的小時，但是一旦進入組織中就可以存活數日。此細胞平時的鈣離子濃度約 100 nM，受化學趨化物刺激下，能在短時間內（約 30 秒）增加至  $1\ \mu\text{M}$ ，於是造成白血球的活性增加，以對抗外來的傷害。而升高鈣離子濃度則在數分鐘後恢復〔Krause *et al.*, 1990〕。

另外，鈣離子也負責調控骨骼肌的收縮機制。在休息狀態的骨骼肌，鈣離子濃度維持在  $10^{-7}\ \text{M}$ ，當鈣離子濃度升高至  $10^{-5}\ \text{M}$  時，鈣離子會與旋轉素（troponins）結合形成複合物（calcium-troponin complex），此一複合物會造成旋轉素結構上的改變，使的肌動蛋白（actin）上的肌凝蛋白結合位置（myosin-binding site）顯露出來，進而使得粗肌絲（thick filaments）上的肌凝蛋白接合頭（myosin

heads) 能順利地與肌動蛋白形成橫橋 (cross-bridges)，造成肌肉收縮，因此鈣離子濃度決定了橫橋形成的數目，也決定了肌肉收縮的強度。而這些影響肌肉收縮的鈣離子平日儲存於肌漿網 (sarcoplasmic reticulum, SR：專指肌肉細胞中功能類似 ER 的構造)，肌肉收縮時鈣離子會從 SR 中大量釋出；收縮後的肌肉放鬆則是因為鈣離子被主動運輸回肌漿網，使得細胞質中的鈣離子濃度降低，導致橫橋無法再與肌動蛋白結合作用 [Mathews *et al.*, 1999]。

上述這些和鈣離子變動有關的生理機制，說明了鈣離子的確是生物體不可或缺的。



#### 4.10 後續實驗的研究方向

從本實驗中，我們初步完成部分蜜蜂磁場導航的信息傳遞路徑之研究，後續的工作可以探討營養細胞與相連接神經元之間的關係，透過電生理的方法，研究營養細胞是否能將磁場感應的信息傳遞給神經元。此外，可以研究營養細胞內蛋白質的變化，透過二維電泳法分析磁場感應前後蛋白質組成的差異，觀察是否有新的蛋白質因為受磁場感應而產生，這項研究將提供更直接的證據來說明營養細胞與磁場感應的關係。