

作品名稱：上皮細胞礁的研究

高中組 應用科學科 第一名

縣市：台北市

作者：陳宗佑、李維軒

凌茂盛

校名：台北市立建國高級中學

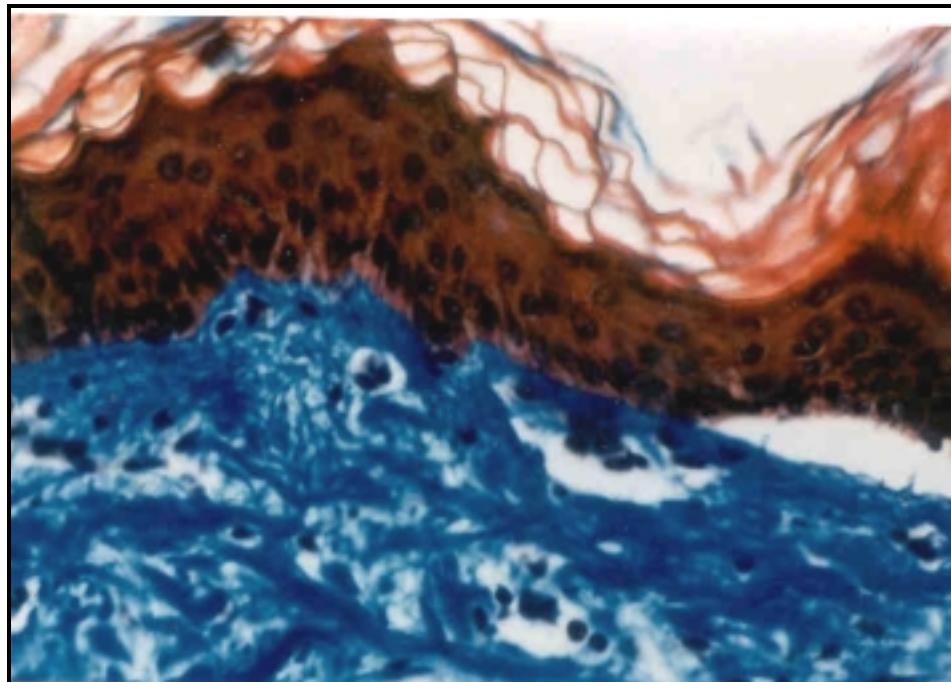
指導教師：湯炳垣、曹淇峰

關鍵詞：正常表皮細胞培養、真空濺射、鱗狀上皮、柱狀上皮、

過渡上皮、基底膜、膀胱、皮膚



Research on Epithelial Cell Reef
上皮細胞礁的探究
Artificial Basement Membrane Engineering
人造基底膜的化工製備



台北市立建國高級中學
陳宗佑、李維軒、凌茂盛
指導老師：湯炳垣、曹淇峰

摘要：

真空濺射技術，提供人們新的表面結合技術。極性和非極性的物質在真空中可以緊密的附著，高熔點及低熔點的分子即使在常溫下也可以互相黏合而不會破壞之間的構型。利用電子槍將親水 pyrex glass 濺射到 polystyrene 的表面，得到最合適哺乳類上皮細胞細胞生長的材料，進一步由這個塗層表面得到成功的正常鱗狀上皮，過渡細胞上皮，和子宮內膜的圓柱上皮細胞養殖。

Abstract:

Electron Beam Gun Evaporation was applied to deposit Pyrex glass (B2O3 25%, SiO₂ 75% and Al₂O₃) on 60-70% of polymer polystyrene surface. This composite surface give a simulated attachment and growth surface for normal epithelial cells .

一、研究動機及重要性:

細胞培養 Cell Culture 科學,現代生物學遲來的一枝:

細胞生物學和分子生物學可以說是現代的生物學發展的兩大領域。兩個領域時常環連一起，技術交互憑藉。細胞生物學更是現代病毒研究及疫苗製備的基石。然而過去臺灣細胞生物學的發展非常遲緩。一方面是探究這領域需要相當複雜的設備。一方面是培養所需要材料像胎牛血清和組織培養塑膠器皿，完全依賴國外輸入非常昂貴。中國大陸發展這範圍的科學技術也受上述條件的嚴重影響。

從細胞培養發展歷史來深入分析，參與這類工作的科學家要不是執行非常支援性的角色，就是非常獨立自主幾乎孤立的工作者。像第二次世界大戰時期的骨骼培養，近代的纖維脂肪細胞養殖，骨骼肌肉養殖及皮膚培養。英國和美國在這些研究工作，長時期獨佔鰲頭且保有若干程度技術機密。過去 20 年來 Corning 和 Falcon 兩大公司長久佔有世界市場乃不爭事實。Howard Green 近年來成功實現正常人類皮膚的體外培養，並且設立公司以利推廣。遺憾的是類似的技術加上預期的幾分商業意圖，被阻滯在美國北部 Boston 附近，無法廣泛的流行。

細胞礁

如同大海中的魚群需要礁石的庇護，細胞培養的細胞株須要附著於基底膜之上才能正常的生長

然而，並非所有細胞對於相同的基底膜都有生長的現象，根據膜性質的不同會有程度上的差異。究竟，各種細胞適合在何種基底膜上生長？細胞與基底膜之間又是因為何種緣故而造成生長間的差異性？有鑑於此，我們開始了細胞與細胞礁的實驗。

上皮細胞礁

21 世紀是人造器官的時代。器官的特殊性取決於該器官所含上皮細胞的種類和排列。自然界任何正常的上皮細胞(包括鱗狀皮膚細胞，過渡泌尿上皮細胞，子宮內膜圓柱細胞) 全部都平放生長在特殊的基底膜上面。正常組織裡上皮細胞和間質細胞幾乎沒有距離，推想正常上皮細胞培養的困難度遠超過間質細胞，其中最可能原因是正常的上皮細胞所固定而生長的培養環境遠不同於細胞自然的環境，然而間質細胞卻可以在這樣差異條件下滋長。我們進一步的探究什麼表面更有利於上皮的細胞的生長。

真空濺射的新技術

臺灣近來晶膜技術狂熱的發展，祖父是真空管時代的電機工程師，晚年也熱衷真空濺射的新技術，自學配裝巨大的裝備。從小在試驗中理解及熱愛它的低溫性和分子積層特性，利用這兩個特性，將熔點差異極大的不同材料鑲嵌成許多複合面，並且保有原始透明度，以便檢視。我們取中胚層細胞代表:3T3 細胞，外胚層細胞代表:鼠鱗狀上皮，試驗它們在不同表面的生存狀況。經歷許多的試驗我們發現 60-75% 的非親水塑膠表面使用硬玻璃真空濺射，或者 60-75% 酸性硫酸基的替

換塑膠表面將容許大規模的纖維細胞著床和生長。兩種方法結合製造的新產品將容許大面積表皮細胞的生長。最後，我們進一步的使用工業用 X-ray 機器照射處理胚胎細胞成為飼養者細胞 feeder cell，在玻璃沈積及酸性硝硫酸基的器皿成功的繁殖正常的鱗狀表皮，過渡和圓柱上皮。

二、研究目的：

在這個研究嘗試中經歷(1)物理方法把親水和疏水面顯微鏡交錯(2)化學官能基置放和(3)生化分子的伸展。我們成功製造容許正常上皮細胞生長及分化的材料表面。

1. 希望能夠找到最適合的細胞培養皿材質，能讓各種細胞株生長出細胞型態完整及數量可觀的繼代細胞。
2. 建立起國內培養動物細胞的基礎，以提供養殖及漁牧業的病理學研究環境。
3. 模擬人類及哺乳類表皮細胞生長的自然環境，進而發展出取代實驗動物的醫藥測試系統。
4. 了解從初步實驗到商業化大量製備細胞可能遭遇的問題，並試圖找出可行且實用的解決之道。
5. 運用塑膠和金屬氧化物互相黏合的真空濺射技術，研究自然與人工基底膜對細胞培養之間的差異。
6. 發展出體外複製器官的基本細胞培養技術，以求應用於臨床治療的用途。
7. 製造培養皿時所產生的油污對真空濺射技術與細胞生長的負面影響，研究有何改善的方法。
8. 受限於細胞培養的昂貴研究器材，如何以價格較低但成效卓越的材料取代。
9. 真空濺射技術的維修需要廠商的技術支援與政府的研究經費，如何建立起兩者間的溝通管道並建築出台灣的細胞株銀行將是我們未來的研究目標。

三、研究材料和設備

測試材料：

天然膠原纖維,重新構成膠原纖維,人造的聚合物:氯化聚乙烯(PVC),聚苯乙烯(PS),丙烯酸(Acrylic),纖維素(cellulose),各種玻璃,石英片(glass or quartz sheet).

以上原始表面及真空濺射或者化學,生物修飾過的新表面和正常上皮細胞的關係. 洋菜膠,胺基酸,抗生素,牛血清蛋白,膠原蛋白酶,EDTA,20%葡萄糖,1~2%葡萄糖,穀氨醯胺,甘油,生長因子,HEPES,HCl,1N,乳蛋白水解產物,NaHCO₃,NaOH,1N,酚紅,鹽水溶液,血清,枸鹽酸鈉,運鐵蛋白,胰蛋白,維生素,純水。

設備：

磁偏轉真空電子槍濺射,工業 X 光線機器,細胞培養箱,液態氮槽,-80°C 冰箱,組織培養 Hood,無菌操作台,細菌培養箱,5%二氧化碳鋼瓶,天平,殺菌裝置(高壓滅菌鍋),冷凍設備,倒相顯微鏡,水浴槽,離心機,純水裝置,液態氮絕熱瓶,血球計數器,磁性攪拌棒。

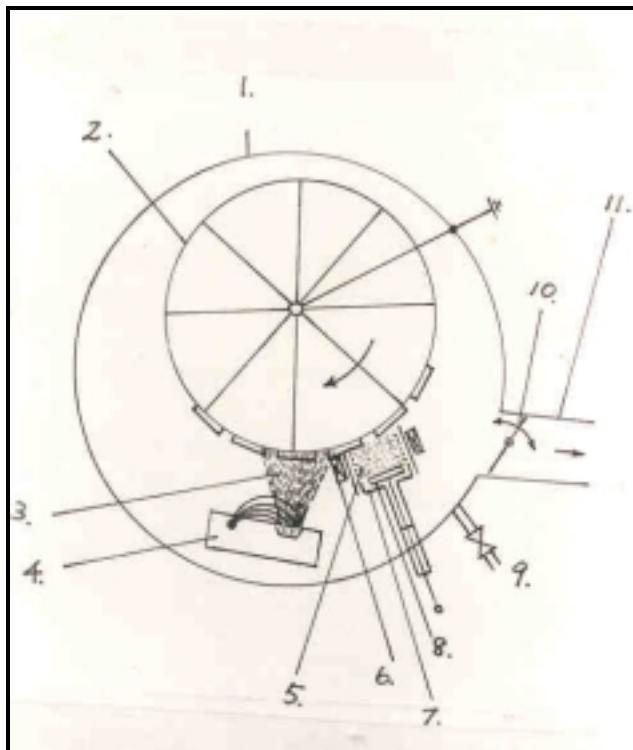


Fig.1 Electron Splash

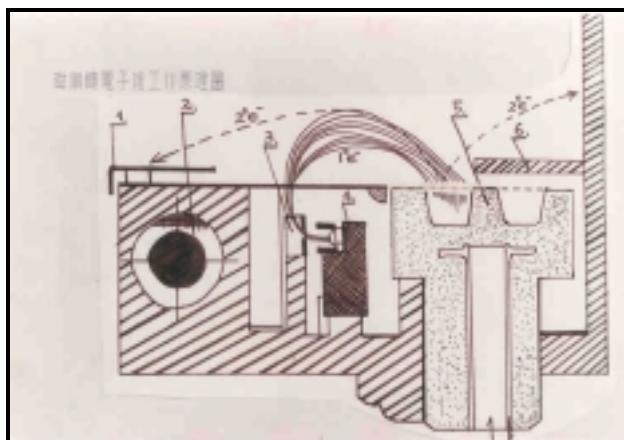


Fig.2 Electron Gun

這機器電子零件由陳丕謨先生在 1985-1990 年間,幫助購買配裝建造成功. 原先目標是在做筆記電腦殼的金屬真空電鍍,以消除外電波干擾.

[原理]

在一個完全密封的不鏽鋼櫃裡, 連貫兩個不同的泵(pump 幫浦) 一個機械旋轉油墊幫浦加上一個 silicon oil 硅油蒸氣擴散幫浦幫浦, 從 0.05 torr 減少到 0.0001 torr .

由直流電加熱的陰極發射的初級電子, 受陽極電場加速, 以大約 600,000 m/sec 速度穿過陽極孔. 受磁場影響, 電子束以 270° 偏轉射入坩堝. 入射坩堝的電子能量大 10KeV, 砲擊坩堝裡頭的物質產生極高的熱能, 物質熔化蒸發, 若干直接地昇華. 這些被激發的物質沈積在作為目標的塑膠物質.

四、研究過程及方法

活細胞的取得

3T3 cells 從新竹菌種中心購得。

正常鱗狀細胞從我們的實驗室 Winstar 鼠身上取得，方法如下。

剛出生或者剛出生一星期的小鼠，提供我們獲得上皮細胞的兩大特定來源。前者的無毛髮皮膚充滿龐大的 basal 細胞幹細胞，後者包含成千上萬的毛囊細胞。

皮膚的製備（附上不使用酵素,收集毛囊的方法）

1. 殺死動物
2. 將整隻動物浸泡在 70 % 酒精中，然後再浸入碘酒中將碘酒自動物表面以 PBS 緩衝液洗淨 (NaCl :8gm , KCl:0.2gm , NaPi :Dibasic 0.92gm and KPi: Monobasic 0.2gm in one liter of double distilled water) .
3. 從脖子至尾端把動物的皮膚剝除 PS. 切除下來的皮膚應以步驟二處理
4. 用精細的鑷子把脂肪與皮下組織剔除
5. 欲取得毛囊，在 PBS 緩衝液中用力刮除皮膚並使真皮面朝上。因為脂肪與毛囊的關係，溶液將會變得混濁。用低速離心（用 500G 離心半或一分鐘）去除沈澱物並保留溶液，這可以將脂肪（在上層）與毛囊分離（在離心管底部）。
6. 去除上清液然後將毛囊置於富營養物的培養液中做為立即的細胞培養。



Fig.3 Mouse hair follicle

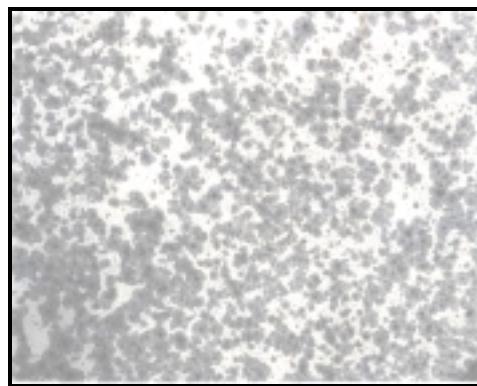


Fig.4 Small Epithelial Islands from Each Hair Follicle

早期鱗狀上皮細胞培養使用毛囊直接培養的方法(半組織半細胞培養):利用毛囊，容易生長出小的上皮島，不能獲得大面積的表皮，可是以此方式成長出上皮時常摻雜 50% 或者更多的纖維細胞將危害毀壞以後連續的上皮繁殖(Fig.2-3)。

PS:如果主要的目標是為了取得皮膚的基底細胞或有關的無毛樣本，步驟六必須省略並以下列步驟保存更多的基底細胞

表皮的製備

1. 延續上述步驟五製備皮膚的方法，將皮膚組織在 PBS 緩衝液中切成 2X2 見方的小塊
2. 通常需要二隻新生的老鼠或一隻新生大老鼠，以及直徑十公分的培養皿。在培養皿中，加入 10ml PBS 含有 2mg/ml 的酵素覆蓋在皮膚之上使之分解
3. 作用於 37°C 的環境中規律地搖盪 2 ~ 3 小時
4. 我們可以觀察到表皮細胞至組織碎片的邊緣分離。在真皮層朝上的緩衝液中更容易觀察到這種現象

輕壓真皮層的皮膚使之附著於培養皿的底部，擠壓真皮層的邊緣。我們可以觀察到分離的上皮細胞會比存留的真皮層細胞更薄更白 (Fig.4)。

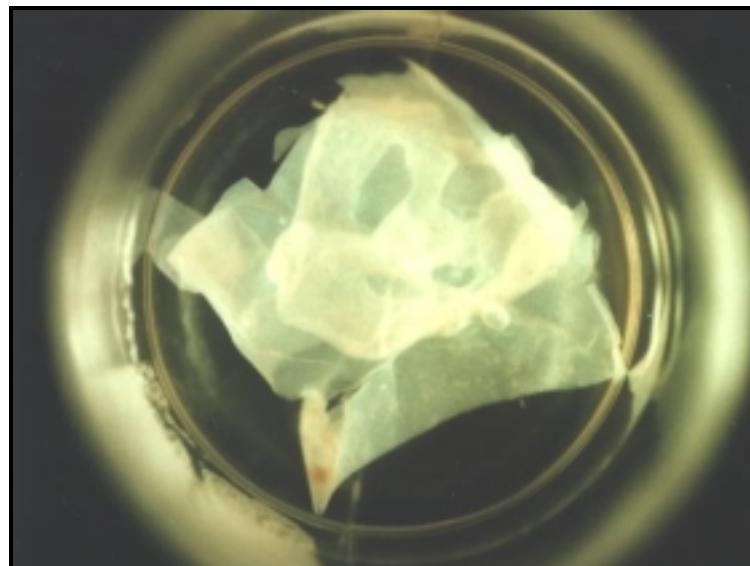


Fig.5 Separation of epithlium from the dermis

上皮顯露清澈的白色；真皮看來好像
牛奶白色。

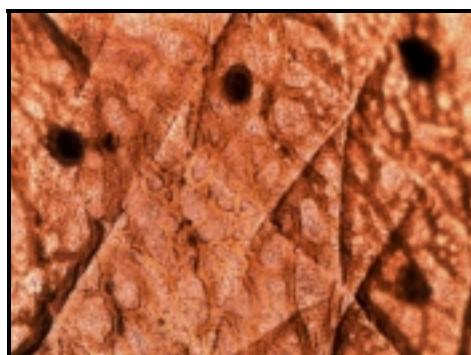
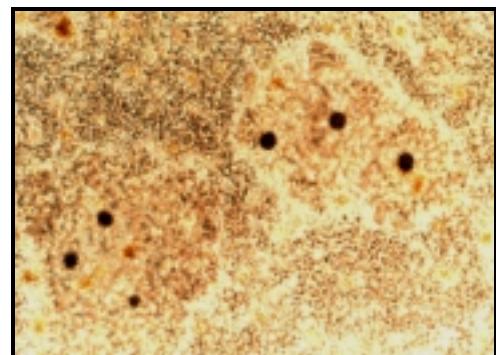


Fig.6 Living Epithelium Under Microscope
Treated



細胞培養的要點在扶持某個特殊種類細胞做無限制的成長。儘管許多的科學家聲稱 “programmed cell death” 說明 3-5 passages 以後細胞的老化及死亡，“無限制的無約束的生長”仍舊被發現在許多正常的 cell type. 在我們的最終實驗階段。新出生或者年輕鼠身體上皮的生長亦出現 unlimited 狀態。

正常上皮細胞的取得

1. 新出生的 rat 鼠或者 mouse 鼠，毛髮還沒長出體外面最佳。
2. Transcervical dislocation 以後，浸泡在外科的水性殺菌優碘液體中 2 分鐘，95% alcohol 30 秒，接著磷酸鹽緩衝液 2 分鐘去掉酒精和碘液。
3. 將 dispase (1mM) collagenase (0.2mM) 注入鼠體，並在 37°C 培養 15 分鐘，精巧使用鑷子末端將表皮和真皮分開 (Chen's Maneuver). 再吸住表皮使用移液管嘴的剪力讓所有的上皮細胞分散。
4. 從表皮撕下上皮細胞並且貯存於 20%DMEM 的完全胎牛血清培養液。
5. 觀察在上皮組織表面的基底細胞

以寬口的 10ml 微量滴管吸放上皮組織數次。基底細胞會以微小碎片的形態沈入溶液中，此時的樣本即可用於組織培養。為了提高培養的成功率，剩餘的上皮組織可以 0.25% 的 tris-EDTA 溶液處理，快速搖晃。許多單一的基底細胞將會浮在溶液中用 DMEM-FCS 完全培養液停止反應並以離心法保持基底細胞活著。

我們必須注意到次級培養的細胞會比初級培養慢的許多。在培養初級（在低密度接種狀態）細胞生長緩慢，主要是因為上皮組織的某些物質改變。這是因為這個細胞，顯然的有些物質在培養單一的細胞時遺失了，但這種現象在高密度的上皮細胞培養中並不會發生。這可能是因為缺乏核酸分子的緣故，這種分子可大幅提升組織培養的情形。不論是受紫外光或是藥物處理的輔助細胞，無法正常生產新的 DNA、mRNA 或其他相關的化合物，這些物質可能就是在細胞培養的過程被稀釋。為了維持上皮細胞內部正常的核甘酸濃度並且保護細胞在培養時被基質或不正常的核甘酸抑制，加入新鮮的核甘酸應是合理的動作。這顯現出加入新的腺嘌呤與鳥嘌呤在生長因子及賀爾蒙充足的 0.1mM 培養液中可提升單一細胞的培養率。

次級培養後的細胞，最適宜的培養液是含有腺嘌呤和鳥嘌呤的生長激素。第三次若僅使用 1/3 的培養液將不足以使低密度接種的細胞達到最適當的生長條件。

輔助細胞的製備

輔助細胞不僅提供上皮細胞在培養液中的生長條件，也提供了細胞間訊息傳遞的管道和接觸因子，使上皮細胞能夠培養。最常見的輔助細胞是 3T3，我們已經廣泛的應用 Bal b/c 3T3 做為皮膚培養的輔助細胞。

Bal b/c 3T3 細胞經培養過 28 代。培養液是 DMEM-FCS 20%L-glutamine 、 penicillin/streptomycin 和經過 0.25% tris-EDTA 處理的細胞。25 代之後，3T3 變得較肥胖且呈橢圓形。我們發現這些細胞具有較好的輔助能力

2. 使 Bal b/c 3T3 生長到滿佈的階段

3. 將培養液置於 10ml 完全溶液的培養皿並加入 mitomycin 使其濃度達到 $1 \mu \text{g/ml}$ 。將整個培養皿隔夜培養（最少 7~9 小時）
4. 用 10mlPBS 緩衝液洗淨培養液和 mitomycin 兩次，重新以 DMEM-FCS 完全溶液裝填培養皿。現在，輔助細胞已可供使用
5. 在培養皮膚的時候，長滿的輔助細胞是不適宜的。這或許是因為表面缺乏培養皮膚組織的附著面，所以，用酵素使長滿的輔助細胞分為二或三盤是重要步驟。細胞在經由 mitomycin 處理後仍像正常細胞工作，只是沒有能力再分裂。PS. 培養細胞時應使用新鮮的輔助細胞，他們在培養皿上最大的生長期間是 14 天。非初級或連續性的組織培養應採用 3 天或 3 天之後的輔助細胞

五、研究結果：

Table 1. 自然基質的研究

	3T3 細胞 附著 (5 小時)	鱗狀上皮 細胞附著 (5 小時)	3T3 細胞 生長 (3 天)	鱗狀上皮 細胞生長 (3 天)
銅片	3%	2%	沒有生長	沒有生長
鐵板	2%	2%	沒有生長	沒有生長
Silk cloth 絲布	5%	5%	沒有生長	沒有生長
Cotton cloth 棉布	5%	5%	沒有生長	沒有生長
Collagen 膠原蛋白	45%	35%	沒有生長	65%
Reconstituted Collagen 再重組膠原蛋白	70%	70%	15%	65%

開始的五小時細胞皆能附著在表面上，但是以膠原蛋白、再重組膠原蛋白的情形最好。七十二小時之後，3T3 細胞只能生長在再重組膠原蛋白的表面上，鱗狀上皮細胞則可以生長膠原蛋白和再重組膠原蛋白的表面上。

人造材料表面的研究：

Table 2 玻璃系列.

玻璃種類	3T3 細胞 附著 (5 小時)	鱗狀上皮 細胞附著 (5 小時)	3T3 細胞 生長 (3 天)	鱗狀上皮 細胞生長 (3 天)
Soft glass 軟玻璃(窗)	60%	35%	0.8 倍增長 細胞脫卸	沒有生長
Hard glass 硬玻璃 (實驗室)	65%	38%	1.0 倍增長 細胞脫卸	沒有生長
Pyrex glass	75%	50%	1.5 倍增長	沒有生長
Quartz glass 石英玻璃	65%	45%	0.8 倍增長 細胞脫卸	沒有生長

Table 2. 用 2 種不同的細胞觀察其在不同玻璃上之生長情形。由表中數據可知，Pyrex 玻璃似乎最適於細胞附著及生長，然而沒有任何玻璃可供鱗狀上皮細胞生長。

Table 3. 塑膠系列

	3T3 細胞 附著 (5 小時)	鱗狀上皮 細胞附著 (5 小時)	3T3 細胞 生長 (3 天)	鱗狀上皮 細胞生長 (3 天)
Polyethylene	0%	0%	No growth	No growth
Poly(vinyl chloride) High viscosity*	75%	35%	Confluent	No growth
Poly(vinyl chloride) low viscosity*	25%	15%	No growth	No growth
Polystyrene	Less than 1%	Less than 1%	No growth	No growth
Polyacrylonitrile (acrylic fiber)	55%	25%	80% confluent	No growth

Table 3 Different Cells on Different Plastic Surfaces

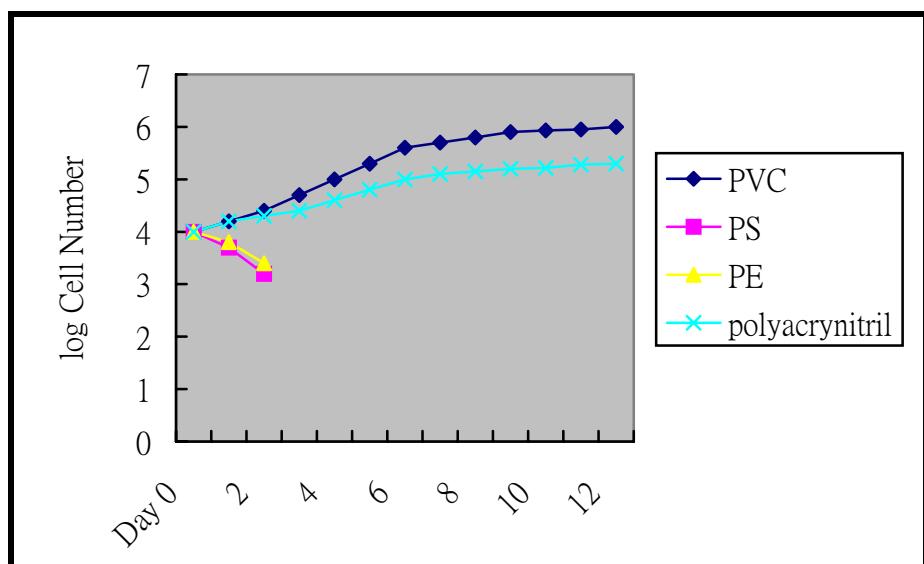


Figure 8. 3T3 Cell Growth Curves On Different Plastic Surfaces

試驗不同的塑膠表面上 3T3 細胞的生長狀況,記錄如上圖. PVC 的特性最適合細胞附著和生長,緊鄰的是壓克力表面也還可以支持細胞增殖生長 PS 和 PE 相對的非常不容許細胞附著生長,三天以後這些不依附的細胞完全地枯死,甚至轉移到 PVC 器皿 也不能活下.

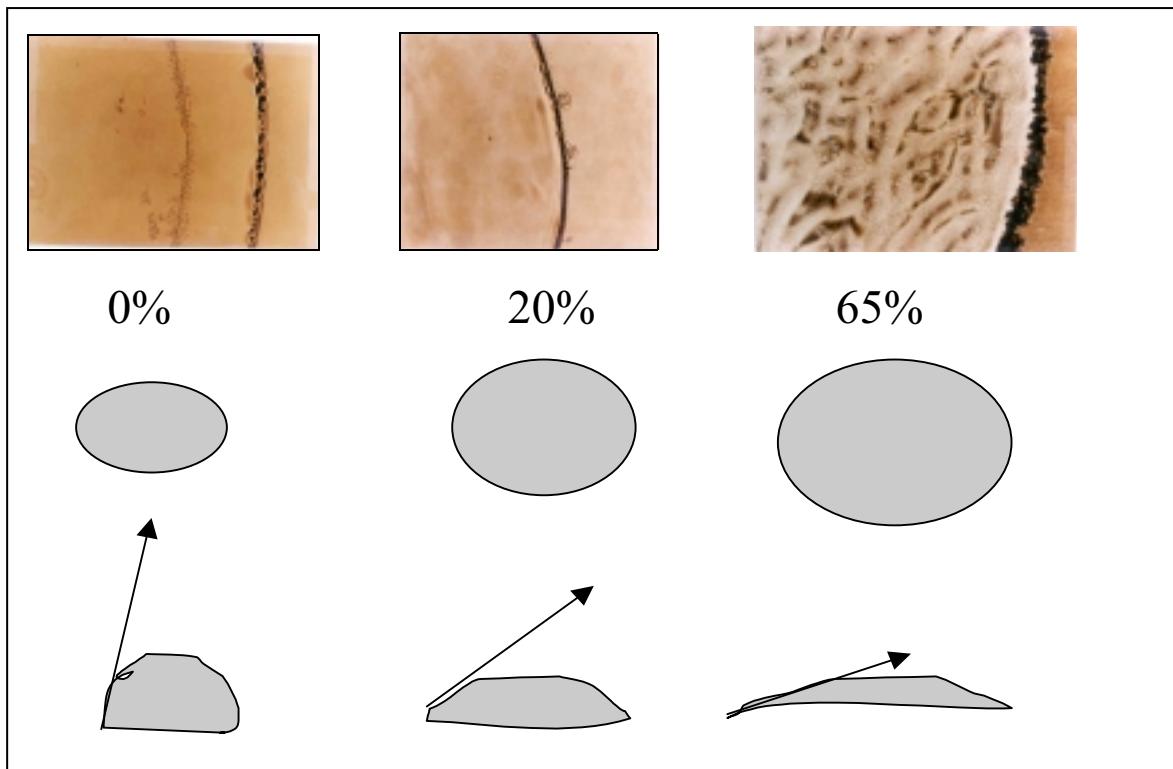


Fig.9 側面角度變化與不同比率的表面覆蓋範圍有密切聯繫。

兩個量測表面覆蓋範圍的方法，一個是經過四氯甲烷溶解再顯微鏡檢查。另一個辦法是測量固定的體積水滴在表面的直徑與側面水滴的 $\tan \theta = 2H/0.5D$ (H, D 分別是水滴側面的假想拋物線高 H 和距離 D)

$$\% = \frac{\tan \theta (100\% \text{PS}) - \tan \theta (\text{tested plate})}{\tan \theta (100\% \text{PS}) - \tan \theta (100\% \text{pyrex glass})}$$

壓克力在 UV 的光照射下或者酒精浸沒下格外脆碎。這個現象在未來工業量產時尤其需要考慮。搜尋純粹的 PVC 做細胞礁的材料很快地遭遇兩個巨大的工業問題。一是要預防 PVC 射出時殘餘的鹽酸 HCl 或者單體 VCM，這些在現代的高溫射出狀態下，全部不出現也非常困難的。二是為了工業的精確量產，射出成形的模式是唯一的選擇，降低射出成形的溫度必須添加石蠟類可塑劑的材料，然而不幸的是，可塑劑的附加帶來塑膠表面嚴重的非親水性增強，不再允許細胞生長。為了改進這個問題：利用疏水性的材料像 polystyrene PS 聚苯乙烯表面加以玻璃纖維的真空濺射，當 56% - 70% 的 PS 表面被親水的玻璃表面均勻地遮蓋時，這個材料誘發間質細胞出現極優秀的附著和生長。從實驗判斷硬玻璃的沈積更優於軟玻璃和石英玻璃的成果，這個結果顯示細胞的生長不只是單純的依靠 hydrophilic/hydrophobic 的比率而已。另一個處理的手段是化學置換，將苯環上的氫原子改變為有極性的硝酸基群，結果產生相當合適上皮細胞附著生長的環境。最後合併兩個辦法：首先添加苯環上的硝基，再提供硬玻璃的表面沈積。這最終的產物可以提供上皮及間質的細胞的分裂生長。

SiO₂, SiO₂-Al₂O₃-B₂O₃, TiO₂, WO₂, Pyrex 玻璃的比較

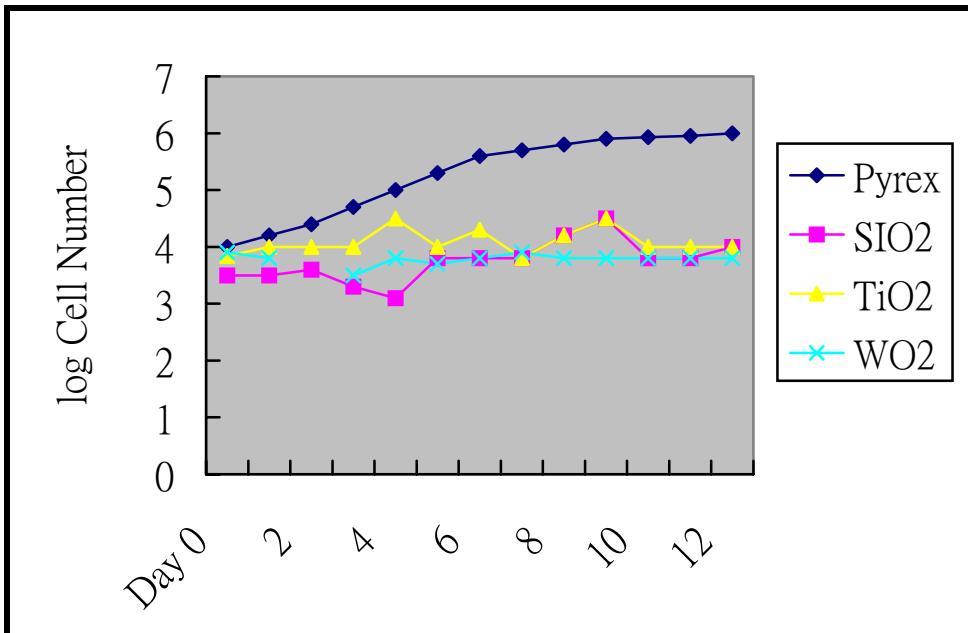


Figure 10. Cell Growth on Different Glasses

臺灣近來晶膜技術狂熱的發展，機器電子零件由祖父陳丕謨先生在 1985-1990 年間，幫助購買配裝建造成成功。他是真空管時代的電機工程師，晚年也熱衷真空濺射的新技術，自學配裝巨大的裝備，原先目標是在做筆記電腦殼的金屬真空電鍍，以消除外電波干擾。在一個完全密封的不鏽鋼櫃裡，連貫兩個不同的泵(pump 幫浦)一個機械旋轉油墊幫浦加上一個 silicon oil 硅油蒸氣擴散幫浦幫浦，從 0.05 torr 減少到 0.0001 torr。由直流電加熱的陰極發射的初級電子，受陽極電場加速，以大約 600,000 m/sec 速度穿過陽極孔。受磁場影響，電子束以 270° 偏轉射入坩堝。入射坩堝的電子能量大 10KeV，砲擊坩堝裡頭的物質產生極高的熱能，物質熔化蒸發，若干直接地昇華。這些被激發的物質沈積在作為目標的塑膠物質。試驗中理解及熱愛真空濺射的低溫性和分子積層特性，利用這兩個特性，將熔點差異極大的不同材料鑲嵌成許多複合面，並且保有原始透明度，以便檢視。經歷許多的試驗我們發現 60-75% 的非親水塑膠表面使用硬玻璃真空濺射，或者 60-75% 酸性基的替換塑膠表面將容許大規模的纖維細胞著床和生長。兩種方法結合製造的新產品容許大面積表皮細胞的生長。過去鉻-60 常用來照射纖維組織母細胞，達到幫助上皮細胞生長目的，花費昂貴也不近便處理。這個報告進一步的使用父親十年來在簡單的工業用 X-ray 機器照射處理胚胎細胞 250-300KV 5mA, 10 minutes 成為飼養者細胞 feeder cell 的經驗，在玻璃沈積及酸基處理的器皿成功的繁殖正常的鱗狀表皮，過渡和圓柱上皮。

Normal Transitional Epithelial Cell Culture

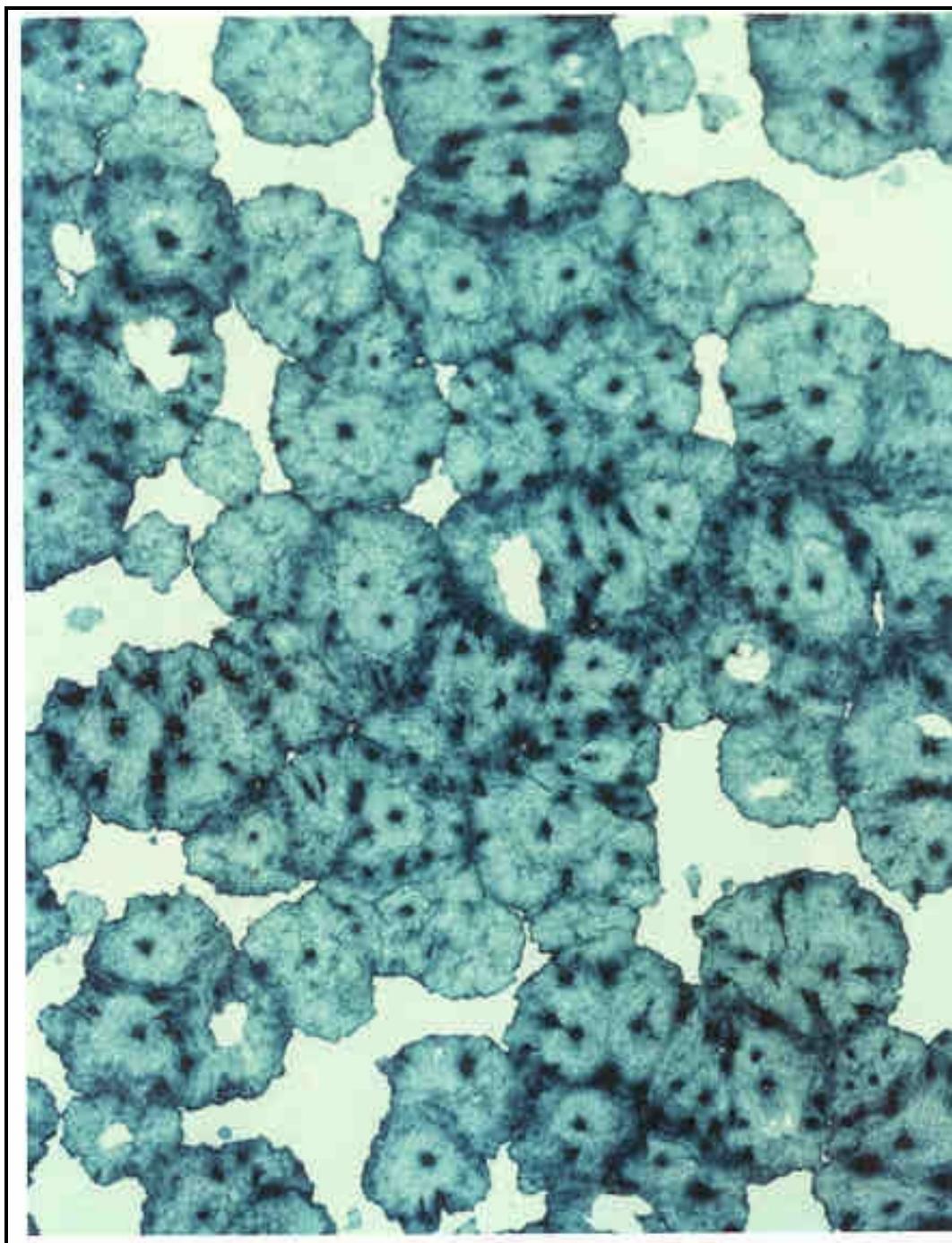


Fig 11. 正常老鼠膀胱細胞培養 (過渡表皮細胞, 培養一周)

老鼠麻醉後, 將心臟血管內血液用生理時鹽水洗出, 加入酵素液 Dispase(37 °C)全身灌注 20 分鐘, 取出膀胱, 用鑷子將膀胱表皮刮除, 培養方法如表皮細胞。

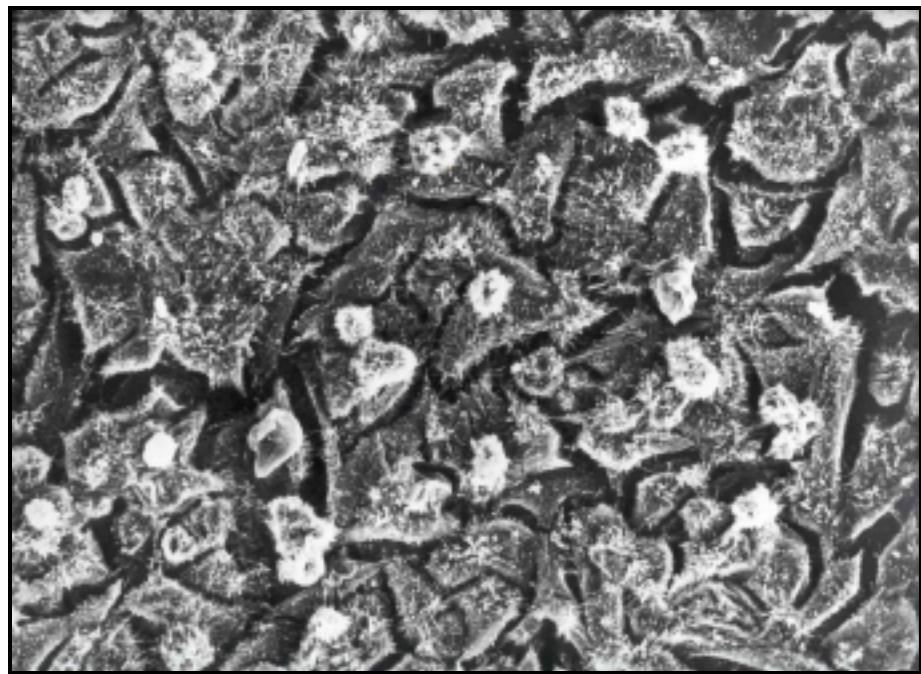


Fig.12.纖維素表面經過微量氧化物真空濺射處理成為非常合適正常鱗狀上皮細胞生長的表面.(enface view)

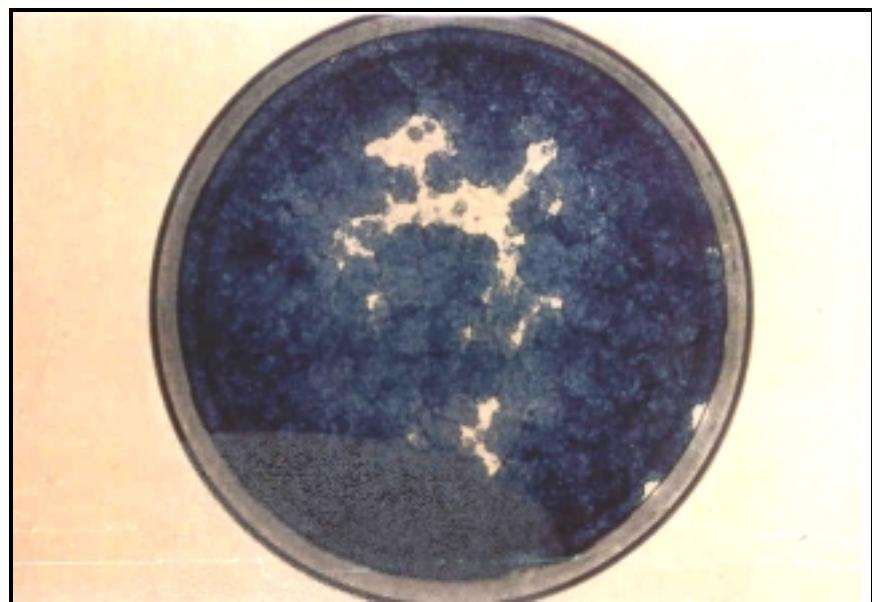


Fig. 13. Normal keratinocyte culture, amidoblack stained at confluent stage.

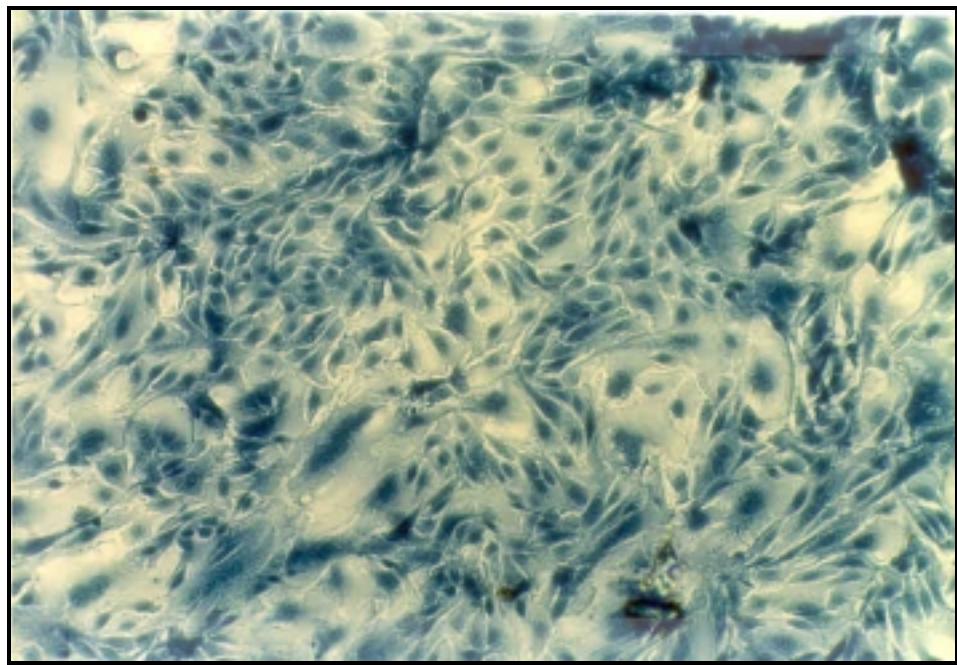


Fig.14. 老鼠子宮內膜細胞經過培養後以動情激素刺激(1 week)

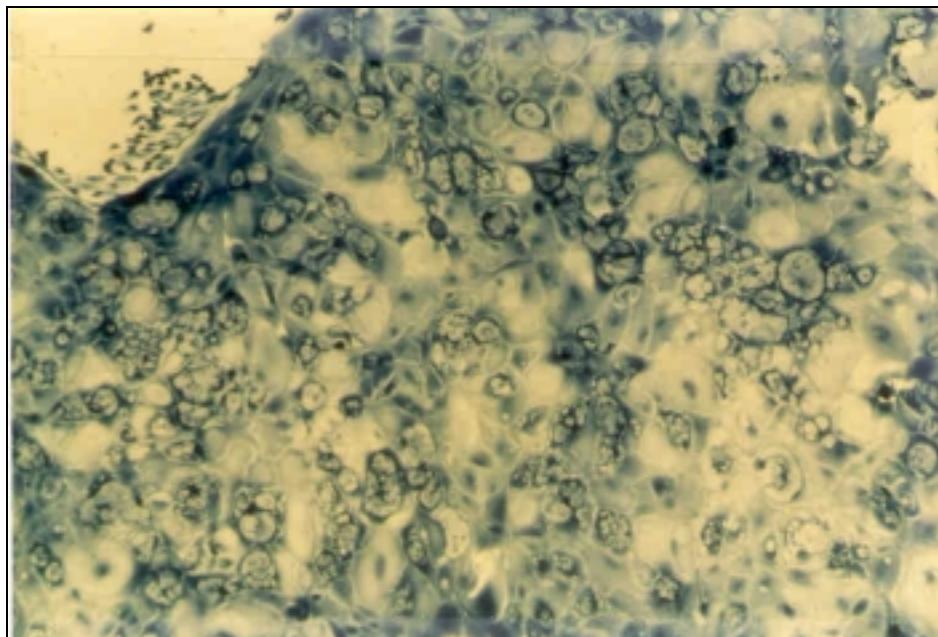


Fig.15.老鼠子宮內膜細胞經過培養後以黃體激素刺激(1 week)

老鼠子宮內膜細胞的培養方法詳見內文細胞培養敘述，所採用的人造基底膜為我們最後所研發之真空濺射處理塑膠。值得注意的是，我們培養出的老鼠子宮內膜細胞經黃體激素刺激後，產生泡狀，與一般子宮內膜細胞反應相同。

六、結論

天然材料的表面很少有非常適宜哺乳動物細胞附著而且生長者。在所有研究的材料裡，膠原纖維特別是出自動物皮下組織的最受上皮細胞歡迎。稠密的膠原纖維容許正常的和癌的上皮細胞附著遲緩的成長。然而此類材料幾乎完全不容許間質細胞的生長。另一個惱人的問題是膠原

纖維不透明,不合適顯微鏡下面做直接觀察。人爲的材料裡頭,玻璃,瓷器和 PVC 及壓克力表面能容許相當程度的間質細胞生長(Table 2)。相對的這些材料卻不容許上皮細胞附著生長。我初級的推論: 1.如果沒有附著應沒有上皮或者間皮固定細胞生長. 2. 太疏水的表面將不容許附著. 3.太親水的表面將攔阻正常的上皮細胞成長或者分裂。

爲了改進這個問題: 利用疏水性的材料像 polystyrene PS 聚苯乙烯表面加以玻璃纖維的真空濺射, 當 56% - 70% 的 PS 表面被親水的玻璃表面均勻地遮蓋時, 這個材料 induce 間質細胞出現極優秀的附著和生長。

從實驗判斷硬玻璃的沈積更優於軟玻璃和石英玻璃的成果, 這個結果顯示細胞的生長不只 是單純的依靠 hydrophilic/hydrophobic 的比率而已。另一個處理的手段是化學置換, 將苯環上的氫原子改變爲有極性的硝酸基群, 結果產生相當合適上皮細胞附著生長的環境。最後合併兩個辦法:首先添加苯環上的硝基, 再提供硬玻璃的表面沈積。

這最終的產物可以提供上皮及間質的細胞的分裂生長。三種正常的上皮細胞:鱗狀, 圓柱狀和過渡細胞被測試培養和繁殖, 胚胎間質飼養細胞 feeder cells 也被進一步應用來增進上皮細胞的增殖。實驗證實分離的上皮細胞可以在我處理的複合表面繁殖合併成爲完整的上皮, 而且仍舊保持增殖的潛力。利用上述技術設計人工小器官:使用非常薄的上皮細胞和間質細胞載體, 直接地埋置在動物皮下或者腹膜腔裡, 完成長時期維持該細胞的特性。

七、討論:

本論文使用本地的物質添加改變做高級的正常哺乳動物上皮的細胞培養。細胞培養材料在過去一向是仰賴先進國家的進口。Corning 和 Falcon 兩家公司所提供之產品的製造方法不同, 且都列爲商業機密, 一般通稱爲 treated 的表面。我們意外的觀摩到現代真空技術的應用解決這個問題。電子槍所遇到的困難, 第一:塑膠產品常附有矽油 (Silicone), 也相對造成塑膠表面的模糊。雖然只是工業上小小的困擾, 但卻是細胞培養皿的致命傷, 想要做出完全不帶任何油污的細胞培養皿, 就是要製造非常精密的模具, 但是會增加製作的成本。另一個電子槍先天的問題, 就是每一個 cycle 需要 20 分鐘, 但是真空與一大氣壓之間的轉換也需要 20 分鐘, 每天只能進行約 8 個 cycle, 因此這種生方法是不經濟的。延伸隧道式的真空方式可能解決這個問題。

感謝

感謝 SLEEK LABORATORY 陳家楨、陳丕謨先生資助電子槍的儀器與技術。

八、參考資料

- 1: Gargett CE, Bucak K, Rogers PA.
Isolation, characterization and long-term culture of human myometrial microvascular endothelial cells.
Hum Reprod. 2000 Feb;15(2):293-301.
PMID: 10655298; UI: 20122375
- 2: Iruela-Arispe ML, Rodriguez-Manzaneque JC, Abu-Jawdeh G.
Endometrial endothelial cells express estrogen and progesterone receptors and exhibit a tissue specific response to angiogenic growth factors.
Microcirculation. 1999 Jun;6(2):127-40.
PMID: 10466115; UI: 99395609
- 3: Witz CA, Montoya-Rodriguez IA, Miller DM, Schneider BG, Schenken RS.

Mesothelium expression of integrins in vivo and in vitro.

J Soc Gynecol Investig. 1998 Mar-Apr;5(2):87-93.

PMID: 9509387; UI: 98170126

4: Hamai Y, Fujii T, Yamashita T, Kozuma S, Okai T, Taketani Y.

Pathogenetic implication of interleukin-2 expressed in preeclamptic decidual tissues: a possible mechanism of deranged vasculature of the placenta associated with preeclampsia.

Am J Reprod Immunol. 1997 Aug;38(2):83-8.

PMID: 9272205; UI: 97418190

5: Tominaga T.

[Studies on the mechanism of embryo implantation].

Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi. 1996 Aug;48(8):591-603. Japanese.

PMID: 8808827; UI: 96404686

評語：

「上皮細胞礁的研究」探討以電子濺射技術製成複合面，以作為細胞培養之基底膜，並取中胚層細胞之 3T3 細胞，與外胚層細胞之鼠鱗狀上皮，試驗在天然物表面，玻璃系列表面，及塑膠系列表面之生長。試驗結果顯示 60—75% 的非親水塑膠表面使用硬玻璃真空濺射，或者 60—75% 酸性硫酸基的替換塑膠表面將容許大規模的纖維細胞著床和生長，兩種方法結合製造的新產品將容許大面積表皮細胞的生長；而 PS 碟偕同 45% 親水的表面覆蓋是最好的組織培養器皿，最適當 ejected 材料是實驗室 Pyrex 玻璃。國內細胞培養在過去一向是仰賴國外進口方式解決，耗用財力甚鉅，本作品所提出的電子濺射技術製成之複合面，開展了此領域新技術的大門，未來發展前途不可限量，故評審委員一致推薦其為應用科學高中組的第一名。

作者簡介

研究路深深幾許？文獻如淹，迷惑無重數。

好奇渴望徘徊處，霧稠不見來時路。

千嘗百試朝尋暮，靈機未現，結果留不住。

淚眼問書書不語，答案湧現實驗裡。

水滴凝結在燒杯透明的側面，好像正在飲泣實驗一連串的失敗，什麼人能理解過去一生失敗挫折的難熬和現實的對逆？成功只是多數失敗的小例外，我們在許多其餘的試驗也嚐盡苦頭。這個題材內含一個老學生三十年奮鬥，三世代的動機，比賽儘管暫時休息，真正有生命的實驗路才開始再要傳承走下去。月色依舊，算來算去想要成為科學家的年輕學生，多的像樹上枝兒，如今有幾枝還可回憶起當年梢頭得意春風的光景？