

# 中華民國第 56 屆中小學科學展覽會 作品說明書

---

高級中等學校組 動物與醫學學科

052004

**EGCG 與 NGF 對 PC12 細胞株生長型態的影響**

學校名稱：臺北市立建國高級中學

作者：  高二 劉千擘  高二 鄭治雲	指導老師：  童禕珊
---------------------------------	------------------

關鍵詞：PC12、NGF、EGCG

## 摘要

探討綠茶多酚（EGCG）與神經生長因子（NGF）加入含 PC12 細胞株（鼠腎上腺髓質嗜鉻細胞瘤細胞）的培養液後，對其生長型態之影響。

我們使用定量（細胞計數器估計，約 10000 個 / mL）的 PC12 細胞株，以不同濃度的藥物處理並在細胞培養箱中生長 5 天後，用 10% Paraformaldehyde 固定觀察。研究結果顯示，EGCG 對未加入 NGF 的細胞沒有明顯的效果；加入 NGF 的細胞當中，添加 EGCG 可使其細胞本體面積、突起數量較未加入 EGCG 的組別更大、更多，但只要 NGF 的濃度足夠，兩組細胞皆有明顯的生長情形。

在後續的實驗中，我們發現 EGCG 對 PC12 之突起長度的影響在 NGF 為原濃度的 0.2 倍（即  $10 \mu\text{g/L}$ ）時更加明顯，因此推測其對未完全分化的神經細胞之影響較顯著。未來會使用胞內鈣離子偵測探討 EGCG 對 PC12 細胞株的功能性影響。

## 壹、研究動機

我們對於神經系統如何重建很有興趣，因此決定著手查詢這方面的資料；我們知道神經系統能否成功地重建，神經細胞的發育狀況具有重要的影響；而神經纖維的延伸，影響著神經細胞間的連結，對於神經細胞功能的表現與重建極為重要。為了提升重建的成效，我們試著以鼎鼎大名的綠茶多酚為主要實驗藥物（前人研究中，曾提出綠茶多酚具有延緩阿茲海默症的效果，Dagmar E Ehrnhoefer, 2008），並使用 PC12 作為神經系統的模式細胞，開始了我們的研究，以期能在未來對人類做出貢獻。本研究中主要使用的藥品簡介如下：

### 一、NGF(神經生長因子)

在中樞神經系統中，NGF 是神經系統最重要的生物活性分子之一，具有誘導神經纖維定向生長、控制神經元存活數量、刺激胞體和樹突的發育、促進神經元分化發育和軸突生長的作用，因而對腦的功能維持有重要作用，同時也有抗癌功能（Kaplan DR, Martin-

Zanca D , Parada LF , 1991)。

## 二、PC12 細胞株(鼠腎上腺髓質嗜鉻細胞瘤細胞)

PC12 是由大鼠腎上腺髓質中嗜鉻細胞的瘤所分化而成，其加入 NGF 後會表現出神經細胞的特性（陸靜雯,2006），如代謝、儲存、回收、分泌（多巴胺、正腎上腺素等），又因其為癌細胞可大量分裂，故常作為神經細胞的模型。

## 三、EGCG(綠茶多酚)

EGCG 為綠茶中的主要有效成分。其具八個 OH 基且皆位於苯結構上(可提供自由基電子)，為極好的抗氧化劑。其他功效包括：透過蛋白質途徑抑制脂肪細胞增生、抗癌，也有研究指出其具有延緩阿茲海默症、抗病毒甚至抗輻射（Benila Richia, Raosaheb K. Kaleb, Ashu B Tikua,2012) 等功效。

# 貳、研究目的

- 一、證實 EGCG 會對發育完全的 PC12 生長型態產生影響
- 二、找出「NGF 濃度高低」與「EGCG 影響 PC12 生長型態顯著性」之間的關聯
- 三、找出使「EGCG 影響 PC12 分支長度最顯著」的 NGF 濃度
- 四、說明 EGCG 對 PC12 細胞的功能性影響

# 參、研究設備及器材

## 一、細胞繼代：

(一)器材：12 孔盤、培養皿、培養箱、離心機、細胞計數器

(二)藥物：細胞培養液、Trypsin、PBS、Trypan Blue、Paraformaldehyde

1.細胞培養液：DMEM+10%血清，現應用於快速生長的細胞。

2.Trypsin：一種胰蛋白酵素，其作用為分解細胞與瓶壁之附著蛋白，以及破壞細胞於培養皿之貼附。

3.PBS（phosphate buffer saline）：作為溶劑，可以溶解保護試劑。也用於清洗培養皿，因培養液會影響trypsin作用。

4.Trypan Blue：直接進入死細胞中而呈色以便於拍照。而活細胞膜完整且具有選擇性通透性，染料無法滲入而不會呈色。

5.Paraformaldehyde：固定細胞，使其易於觀察並拍照，醫學上常用來防腐與消毒，具蛋白質凝固作用。

二、細胞處理（藥物）：EGCG、NGF、H<sub>2</sub>O、細胞培養液

三、拍照（硬體）：顯微鏡、照相機、記憶卡、筆記型電腦

四、分析處理：ImageJ、NeuronJ、Sholl Analysis、Excel

(一)軟體：

1.ImageJ：承載所有數據處理相關軟件的基本面板，包括 NeuronJ、Sholl Analysis 等，都須 ImageJ 方能開啟，另也可用於測量細胞本體面積。

2.NeuronJ：專門處理神經細胞的軟體，主要用於測量細胞突起的長度及數量。

3.Sholl Analysis：以一趨勢圖說明各組細胞平均過後，細胞突起與不同半徑同心圓之交點數量的變化。

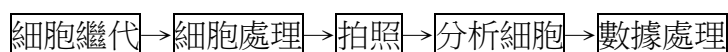
4.Excel：除了用於一般的統計數據之外，另 t 分析也是利用 excel 完成，幫助判別兩組數據之間是否有顯著差異。

## 肆、研究過程或方法

### 一、實驗設計與架構

給予時間生長之後拍照，並以 ImageJ、NeuronJ 等繪圖軟體以及 Sholl Analysis 軟件紀錄四組之突觸數量及長度資料，最後再以 excel 內建之 t 檢定運算有無加 EGCG 的兩組數據於統計學上是否有顯著影響（如表 1）。

表 1（實驗流程）



## 二、細胞繼代 ( cell-line passage )

- (一)將細胞培養液自培養皿中吸出。
- (二)倒入 PBS，清洗培養皿三次，再吸出 PBS。
- (三)倒入 3mL Trypsin 並使其混合均勻。
- (四)放回細胞培養器中，並靜置五分鐘。
- (五)取出，放入離心機，( 1000rpm ) 中，等待五分鐘。
- (六)倒出 Trypsin，重新加入新鮮之細胞培養液。
- (七)拿出 10  $\mu$ L 細胞液，加入 Trypan Blue，置於細胞計數器中。
- (八)數細胞，控制所需細胞之濃度。
- (九)加入細胞培養液以調整濃度，並倒入十二孔盤。
- (十)放回細胞培養箱。

## 三、細胞處理 ( 以前述細胞繼代為第一天，於第三天加藥 )

將 12 孔盤分成四組、每組三格(共十二格)。由於 EGCG 溶於水且 NGF 溶於 medium，因此未加 EGCG 或 NGF 的培養皿中皆須加入相同量 H<sub>2</sub>O 或 medium，建立加入 EGCG、NGF 的對照組。在證明了 NGF 主宰 PC12 的生長與否之後，後續實驗我們改變 NGF 的量以找出 EGCG 對 PC12 分支長度影響較明顯的狀況。四次實驗所加入的藥品濃度如下表。

表 2 ( 第一次實驗之藥品濃度 )

	EGCG	NGF
Control	無	無
EGCG	10nM	無
NGF	無	50 $\mu$ g / L
EGCG+NGF	10nM	50 $\mu$ g / L

表 3 ( 第二次實驗之藥品濃度 )

	EGCG	NGF
Control	無	無

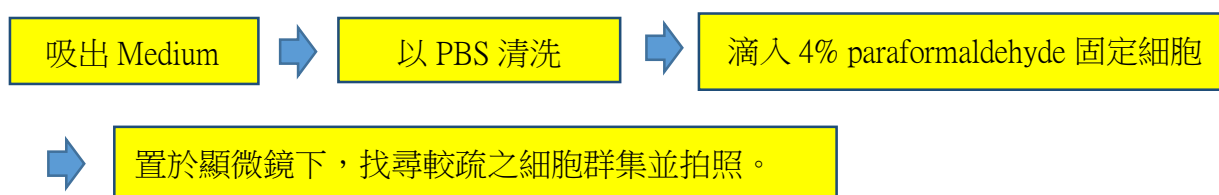
EGCG	10nM	無
NGF	無	5 $\mu$ g / L
EGCG+NGF	10nM	5 $\mu$ g / L

表 4 ( 第三、第四次之藥品濃度 )

	EGCG	NGF
Control	無	無
EGCG	10nM	無
NGF	無	10 $\mu$ g / L
EGCG+NGF	10nM	10 $\mu$ g / L

#### 四、拍照

##### (一)步驟



##### (二)拍照注意事項

- 1.要求：光線明亮、解析度佳，具立體感，細胞不能過於聚集。
- 2.操作技巧：
  - (1)調整光圈以找尋最佳亮度。
  - (2)需要先調整粗調節輪，才能調整鏡頭，避免撞到鏡頭。
  - (3)須尋找單獨細胞，才能完整觀察突起。
  - (4)拍照時，細調節輪須上下調整各拍數張，因相機看到最適合的焦距，與真正照片之最適合焦距不一定相同。

## 五、分析細胞

### (一)簡介

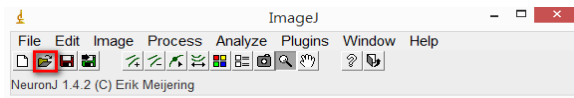
總共有三樣數據需要統計，長度、數量、面積。另外，我們以 Sholl Analysis 這個軟件去分析若從細胞中心點固定距離向外畫同心圓，交點的數量變化在何處(離細胞中心距離)有顯著影響，以推測藥品對細胞株生長型態的影響。

### (二)先備工作

以轉檔軟體 Faststone Image Viewer 將拍下的所有圖檔之尺寸轉成 640\*480(若為原圖 3072\*2304 之尺寸，於畫出細胞面積時，拖曳線容易卡住及偏移)，且須轉成 8-bit 以及黑白形式，否則無法進入 NeuronJ 插件編輯圖像。

### (三)長度、數量 (Neuron J)

1.載入圖片(如右圖 1)



(圖 1)

2.按下 Add tracings 並按照順時鐘 or 逆時鐘方向畫出細胞突起，一旦數據有誤即方便追蹤。primary 突起 (從細胞本體直接延伸的突起) 及 secondary 突起 (從 primary 上延伸出的突起) 需各畫一次 (如圖 2.3)

3.按下 measure 並將 Display tracing measurements 打勾，按 Run 顯示數據(如圖 4.5)。

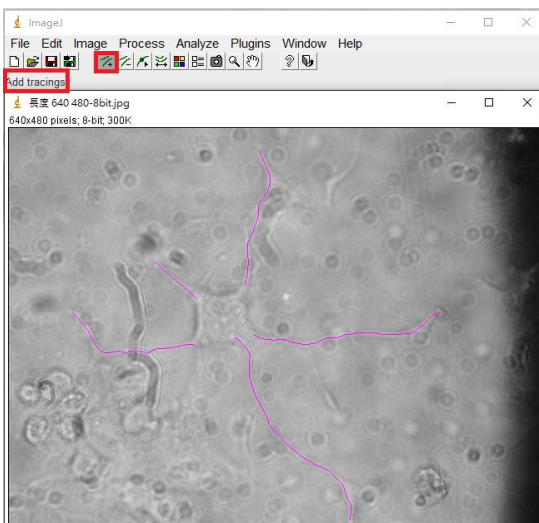


圖 2 ( Add tracings : Primary )

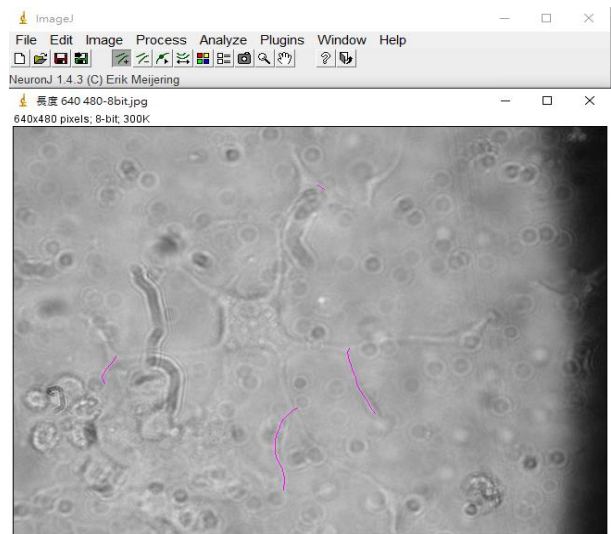


圖 3 ( Add tracings : Secondary )

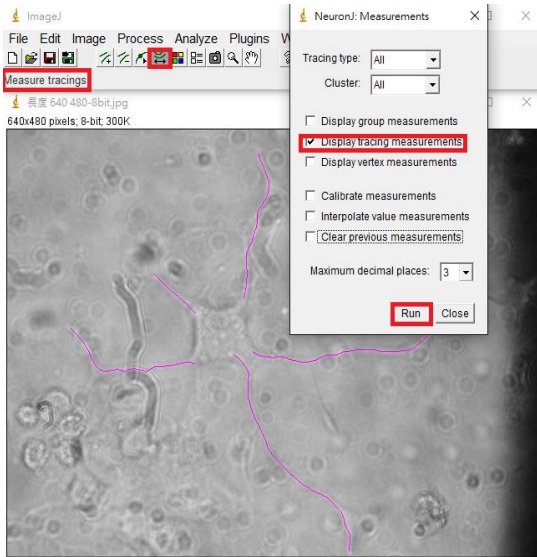


圖 4 ( Measure tracings 步驟 )

Image	Tracing	Cluster	Type	Label	Length [pix]
長度 640 480-8bit	N1	Default	Default	Default	65.957
長度 640 480-8bit	N2	Default	Default	Default	171.208
長度 640 480-8bit	N3	Default	Default	Default	237.782
長度 640 480-8bit	N4	Default	Default	Default	278.185
長度 640 480-8bit	N5	Default	Default	Default	177.075

圖 5 ( Primary Result )

4.紀錄並分析數據 ( 圖 5 中 length 即為長度 ) 。primary 及 secondary 突起的長度、數量需記錄於不同表格中(如圖 6.7)。

5.最後按下 snapshot，並僅將 Draw tracings 打勾，以免干擾處理數據 ( 圖 8.9 )

Snapshot 之後的圖須存檔作為後續分析 ( Sholl Analysis ) 之用途。

	A	B	C	D	E	F
59	14 N4		232.486			
60	15 N1		54.328			
61	15 N2		36.276			
62	15 N3		116.032			
63	16 N1		103.803			
64	16 N2		52.916			
65	16 N3		75.429			
66	16 N4		69.453			
67	16 N5		191.814			
68	17 N1		65.957			
69	17 N2		171.208			
70	17 N3		237.782			
71	17 N4		278.185			
72	17 N5		177.075			
73	18 N1		222.458			
74	18 N2		84.228			
75	19 N1		125.683			
76	19 N2		105.894			
77	19 N3		93.891			
78	19 N4		113.976			

圖 6 ( Primary 紀錄，紅字為此細胞 )

	A	B	C	D	E	F
1	細胞編號		長度			細胞
2	3 N1		22.924			
3	4 N1		41.229			
4	7 N1		129.683			
5	13 N1		60.246			
6	16 N1		33.509			
7	17 N1		46.874			
8	17 N2		26.862			
9	17 N3		53.814			
10	18 N1		19.527			
11	18 N2		38.596			
12	23 N1		139.825			
13	23 N2		68.439			
14	24 N1		49.107			
15	25 N1		59.579			
16	25 N2		7.729			
17	26 N1		36.162			
18	30 N9		65.081			
19						
20						

圖 7 ( Secondary 紀錄，紅字為此細胞 )



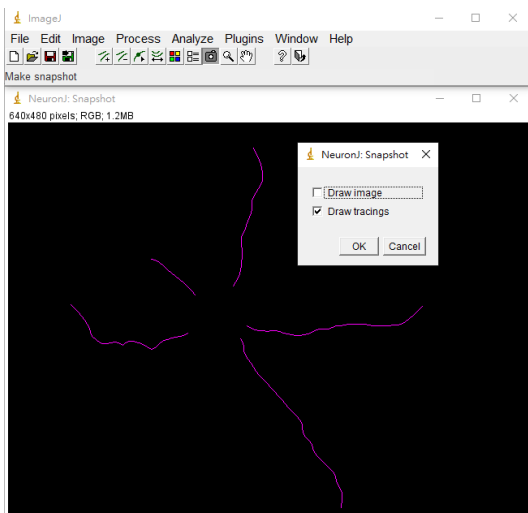


圖 8 ( snapshot 步驟)

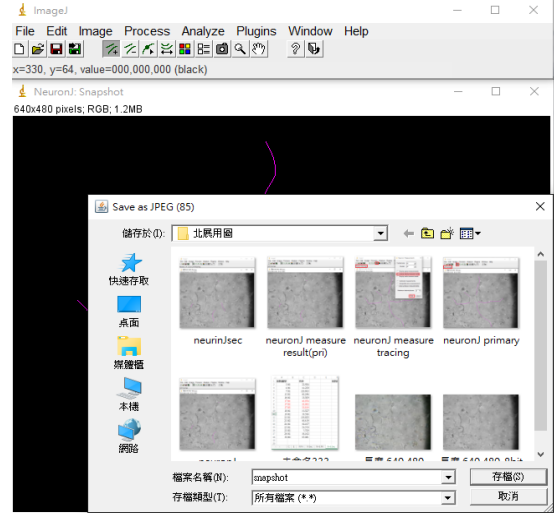
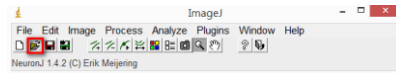


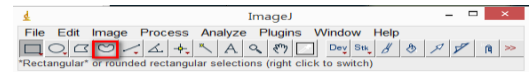
圖 9 ( snapshot 存檔 )

#### (四)面積測量 ( ImageJ )

1. 載入圖片，如右圖 10。( 圖 10)



2. 選取多邊形工具，如右圖 11。( 圖 11)



3. 框出細胞本體之範圍 ( Freehand Selections )，如圖 12。

4. 按下 measure 工作鍵即有剛剛框出區域之面積，如圖 13。

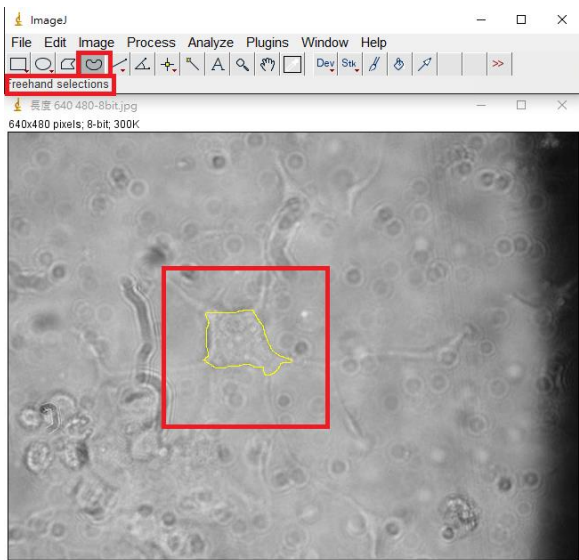


圖 12 ( Freehand Selections )

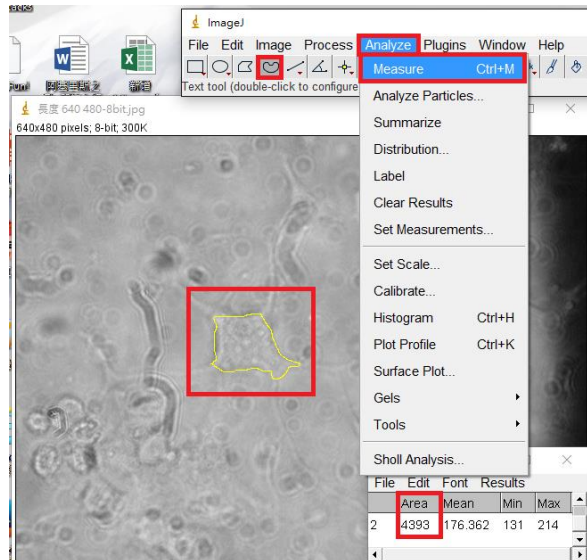


圖 13 ( 顯示細胞面積 )

#### (五)Sholl Analysis ( 需先下載插件 )

1. 載入已畫完分支且 snapshot 過的圖像

2. 將格式調為 8-bit，否則無法使用 Sholl Analysis ( 如圖 14 )

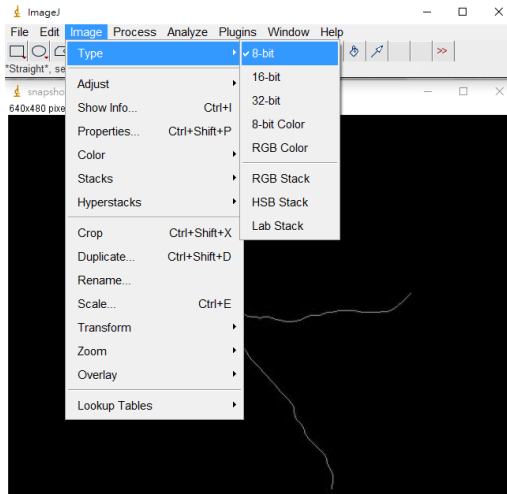


圖 14 ( 8-bit )

3.點出此細胞的中心，並拉出一條線段。

( 若無此步驟，也無法開啟 Sholl Analysis，如圖 15 )

4.設立門檻(threshold)，擷取一個範圍的亮度，將所有點分成此亮度範圍之內外兩種，並以兩種顏色區隔。若無此步驟，Sholl Analysis 也無法開啟，因其原理即以亮度之區隔作為判斷交點的依據 ( 如圖 16 )。

6.開啟 Sholl Analysis，調整設定，按下 OK ( 如圖 17 ) 即可讀取數據。

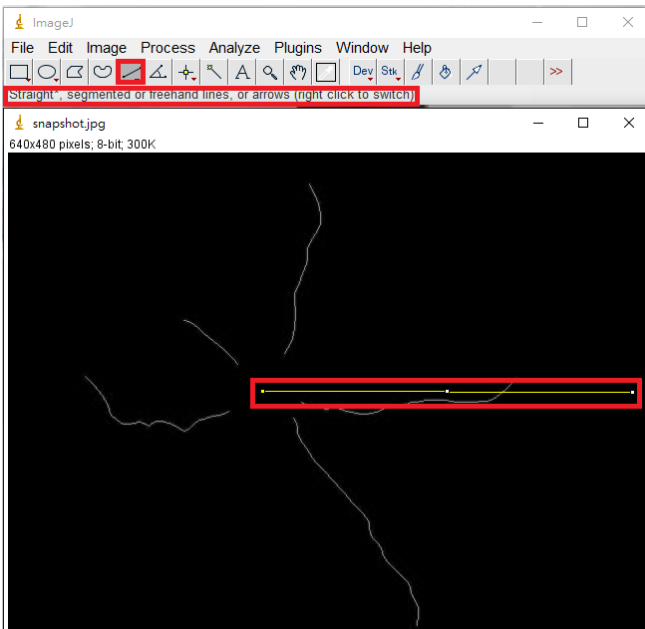


圖 15 ( 細胞中心及半徑 )

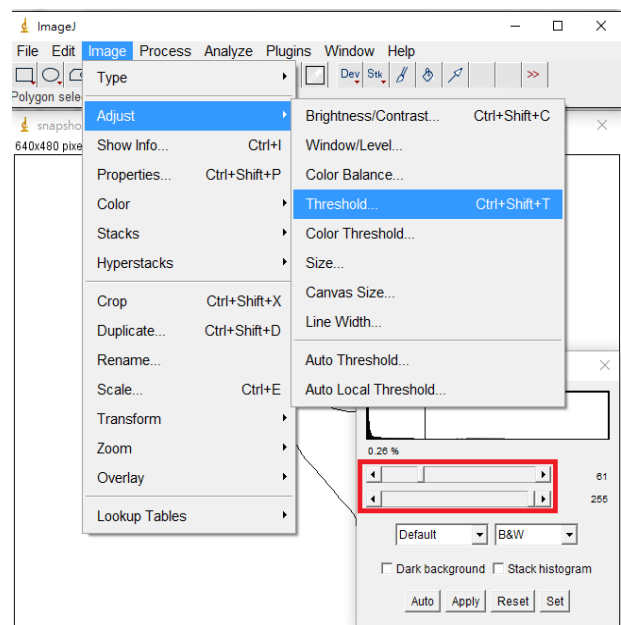


圖 16 ( Thershold )

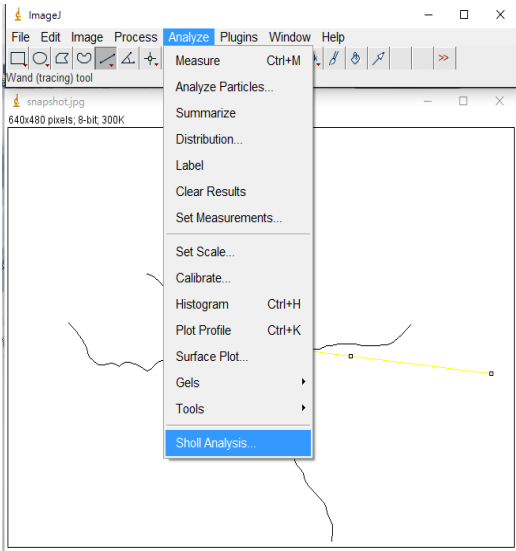


圖 17 ( Sholl Analysis )

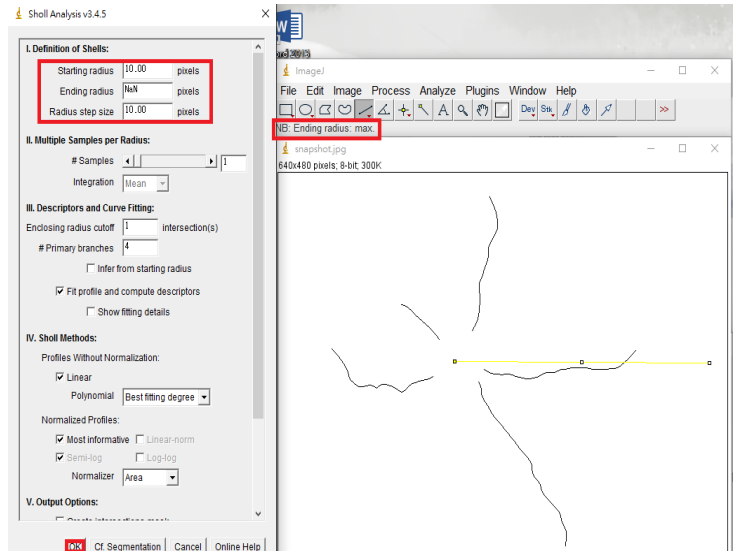


圖 18 ( Sholl Analysis )

名詞解釋：Sholl Analysis ( 如圖 19 )

Starting radius，起始半徑，第一個量測交點數量的半徑。

Ending radius，最末半徑，最後一個量測交點數量的點離中心點的距離。

Radius step size，即相鄰兩個量測半徑之間的差值。

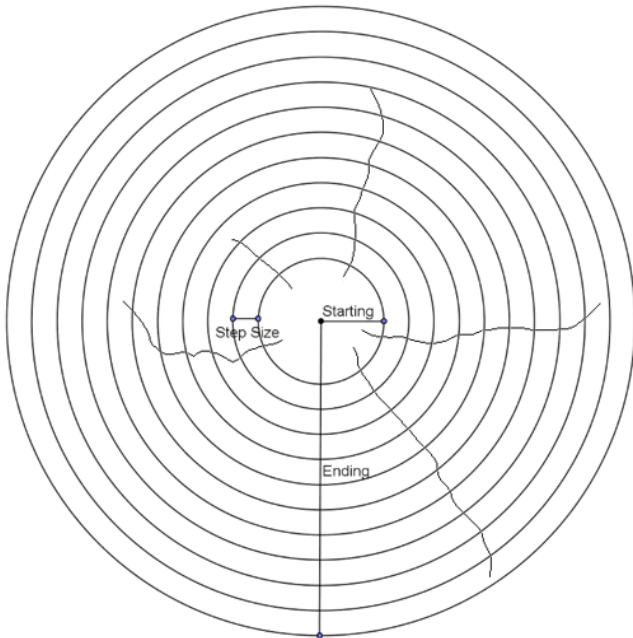


圖 19 ( Sholl Analysis 示意圖 )

圖 20 為 Sholl Analysis 之數據

Radius 表示同心圓的半徑

Inters.表示同心圓與突起的交點數目

Radius	Inters.	Inters. (Polynomial fit)
40	2	2.159
50	5	4.488
60	5	5.295
70	5	5.329
80	5	5.053
90	5	4.725
100	5	4.462
110	4	4.293
120	4	4.199
130	4	4.139
140	4	4.073
150	4	3.972
160	4	3.821
170	4	3.622
180	3	3.387
190	3	3.135
200	3	2.882
210	3	2.638
220	2	2.402
230	2	2.161
240	2	1.898
250	2	1.601
260	1	1.285
270	1	1.018
280	1	0.964

圖 20 : Sholl Analysis 數據呈現

#### 四、數據處理

##### (一)簡介

將所有數據複製至 Excel 上，以平均、標準誤差、t 分析等方式進行比較分析。

##### (二)數量、面積、長度的數據呈現(以第四次實驗的突起長度為例)

1.列出每一個細胞的每一根突起

2.以 Excel 算出長度的平均值以及每一組數據的標準誤差

(平均值 = average()；標準差 = stdev()；標準誤差 = 標準差 / n<sup>0.5</sup>)

3.以平均突起長度為縱軸、標準誤差為正負誤差做長條圖(如圖 21)

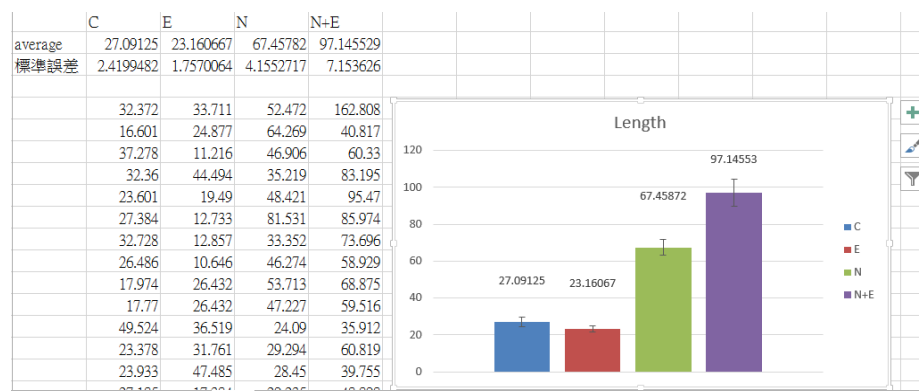


圖 21 (長條圖)

4.以 t 檢定(假設變異數不相等)觀察數據間是否具有顯著差異，如圖 22。

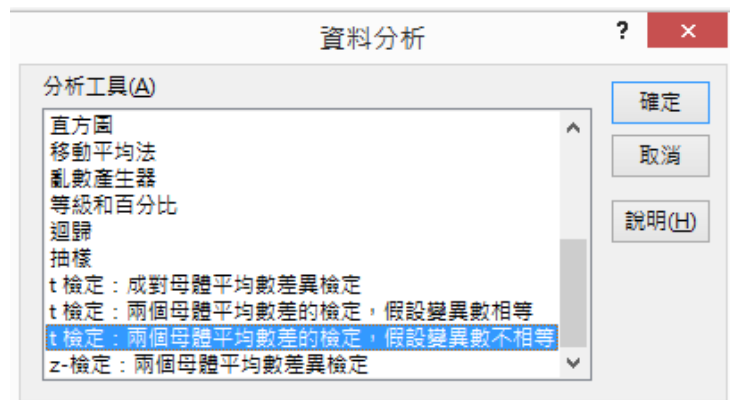


圖 22 (t 檢定步驟)

5.輸出結果，並查看「P(T<=t)單尾」之數據。若此數字小於 0.05，代表兩組數據「是同一組數據」的機率小於 5%。在決定假說(如加 EGCG 的 PC12 較

未加 EGCG 的 PC12 的面積更大、長度更長…)之後，即在統計學上我們可確定加了 EGCG 的組別之數據顯著大於另一組；若大於 0.05%則此兩組數據無顯著差異(如圖 23)。

t 檢定：兩個母體平均數差的檢定 ， 假設變異數不相等		
	變數 1	變數 2
平均數	70.29241	97.14553
變異數	2254.136	7164.411
觀察值個數	109	140
假設的均數差	0	
自由度	226	
t 統計	-3.16787	
P(T<=t) 單尾	0.000874	
臨界值：單尾	1.651624	
P(T<=t) 雙尾	0.001748	
臨界值：雙尾	1.970516	

圖 23 ( 此組數據的 t 檢定分析 )

「P(T<=t)單尾」的值<0.05，  
具顯著差異。

(三)Sholl Analysis 的數據呈現 ( 以第四次實驗為例 )

1.將所有細胞的 [ 半徑 / 交點 ] 數據整理過後，得到每組細胞內所有突起與每個半徑的總交點數。

2.每組以不同顏色表示，以半徑為橫軸、總交點數為縱軸作折線圖(如圖 24)

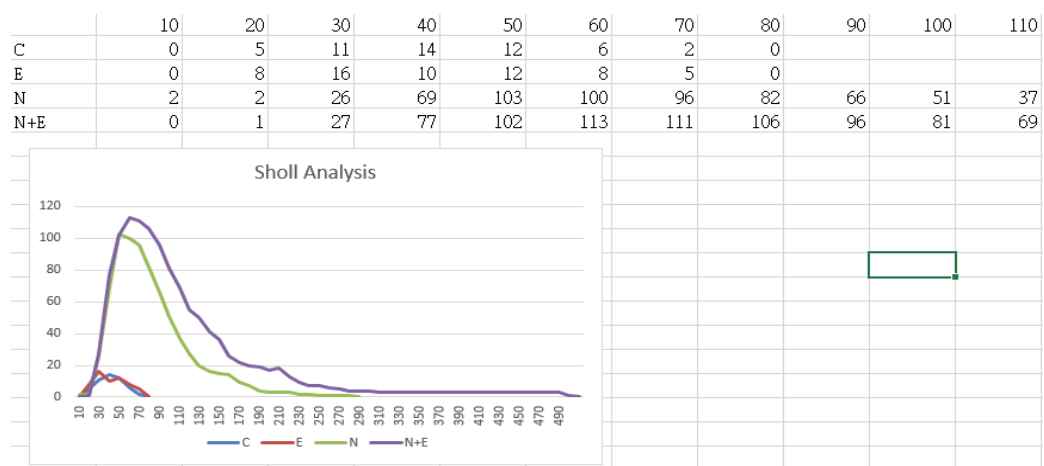


圖 24 ( Sholl Analysis 作圖 )

3.將所有數據加上誤差線（標準誤差），並檢測每個半徑下個組數據是否具有顯著差異，如圖 25。

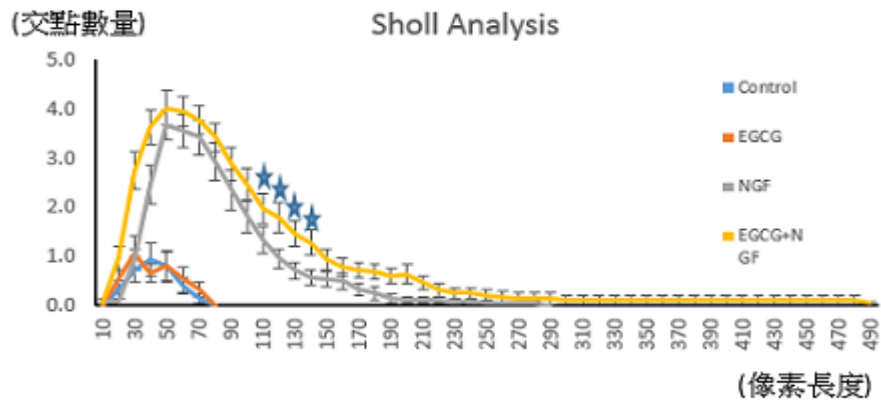


圖 25 ( Sholl Analysis 完成圖 )

## 伍、研究結果

### 一、說明

(一)、分析過後的數據將以三個層面顯示：

- 1.NGF 濃度是否足夠影響 PC12 生長。
- 2.EGCG 於無 NGF 的情況是否對 PC12 有影響。
- 3.EGCG 於實驗特定濃度的 NGF 之下的影響。

因實驗重點在於探討 NGF 與 EGCG 交互作用，因此若加了 NGF 的兩組數據經 t 檢測過後有顯著差異 ( $p < 0.05$ )，則於上方標註星號表示。

(二)、下述說明中，「差距」的定義為  $\frac{EGCG\text{-數據} - NGF\text{-數據}}{NGF\text{-數據}}$ ，即加了 EGCG 之後，與其餘人慣用 PC12 模型產生的差距。

(三)、誤差線正負皆取標準誤差 (Standard Error)

### 二、實驗數據

(一)、以 10 nM 的 EGCG、 $50 \mu\text{g} / \text{L}$  的 NGF 處理後，PC12 細胞株的生長情形

1. NGF 濃度是否足夠影響 PC12 生長？

如圖 26~圖 29 所示，加入 NGF 的數據皆顯著大於未加入 NGF 的細胞，顯

示此 NGF 濃度對於 PC12 的影響是足夠的。

## 2. EGCG 於無 NGF 的情況是否對 PC12 生長有影響？

如圖 26~圖 29 所示，未加入 NGF 的細胞在是否加入 EGCG 的所有數據中皆無顯著差異，顯示在未加入 NGF 的情況下，EGCG 對於 PC12 可說是毫無影響，如此可證實 EGCG 參與調控 PC12 的機制應位於生長期時，使其長得更好，而非未發育的時期，使其開始生長。

## 4. EGCG 於此濃度的 NGF 之下，是否對 PC12 生長有影響？

如圖 26、圖 27 所示，加入 EGCG 的細胞其分支數量及本體面積分別以 41.8%及 44.8%的差距顯著大於未加入 EGCG 的組別；至於分支長度，如圖 28 所示，是否加入 EGCG 並未造成顯著差異，且其差距僅 2.3%。由以上數據可知，EGCG 的確可在正常濃度 ( $50 \mu\text{g}/\text{L}$ ) NGF 培養之下，對 PC12 細胞的型態發育有所影響。

但是對人體的神經細胞而言，神經纖維的延伸與連結才是影響其功能的主要原因。然而我們實驗中，並未發現此實驗條件對其分支長度有顯著的影響，因此我們想進一步尋找更適合的培養條件。由文獻探討中知道，此實驗使用的 EGCG 濃度，已屬高劑量，再提高 EGCG 濃度的發展性不高。且我們已證明 EGCG 與 NGF 皆具有促使 PC12 生長的功能，因此為了解釋此現象，並進一步改善，我們推測兩者促進 PC12 分支變長的機制有部分重疊，即 EGCG 對於 PC12 長度的影響有部分被 NGF 掩蓋了。綜合以上兩點，我們下個實驗將調降 NGF 濃度至  $5 \mu\text{g}/\text{L}$ ，即原濃度之 0.1 倍，並再次分析。

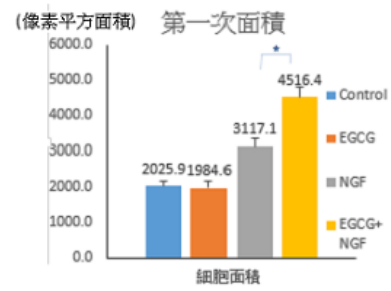
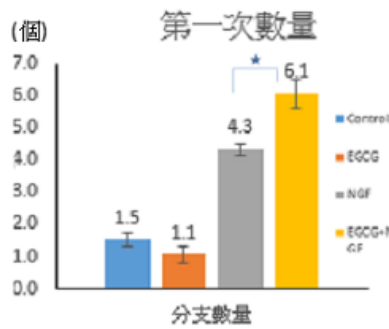


圖 26 ( 第一次實驗：分支數量， NGF 與 NGF+EGCG 兩組有顯著差異 )      圖 27 ( 第一次實驗：細胞面積， NGF 與 NGF+EGCG 兩組有顯著差異 )

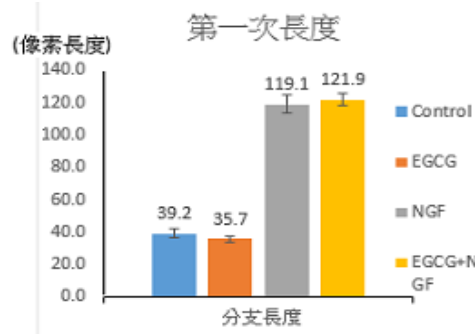


圖 28 ( 第一次實驗：分支長度，加入 NGF 的兩組無顯著差異 )

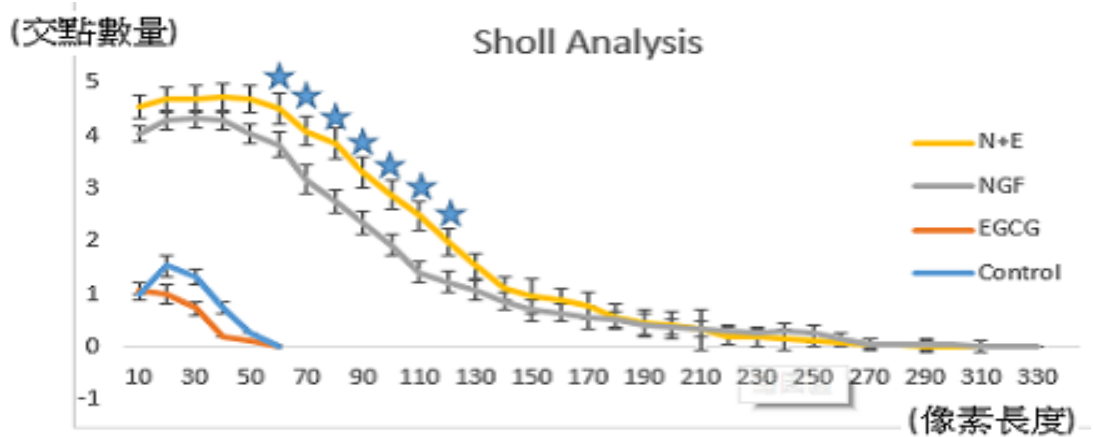


圖 29 ( 第一次實驗：Sholl Analysis，在中段產生顯著差異)

(二)、以 10 nM 的 EGCG、 $5 \mu\text{g/L}$  的 NGF 處理後，PC12 細胞株的生長情形

1. NGF 濃度是否足夠影響 PC12 生長？

如圖 30~圖 33 所示，我們發現有無 NGF 的數據接近，細胞面積以及突起的數量、長度皆無顯著差異。即 PC12 在此濃度的 NGF 之下，並無法被活化。因此我們認為，在這個培養環境下，EGCG 對 PC12 的影響將微乎其微，根據第一個實驗中「EGCG 於無 NGF 的情況是否對 PC12 有影響？」的結論，EGCG 不



易發揮其功用。下個實驗將調升 NGF 濃度至原濃度之 0.2 倍，即此實驗之兩倍濃度。

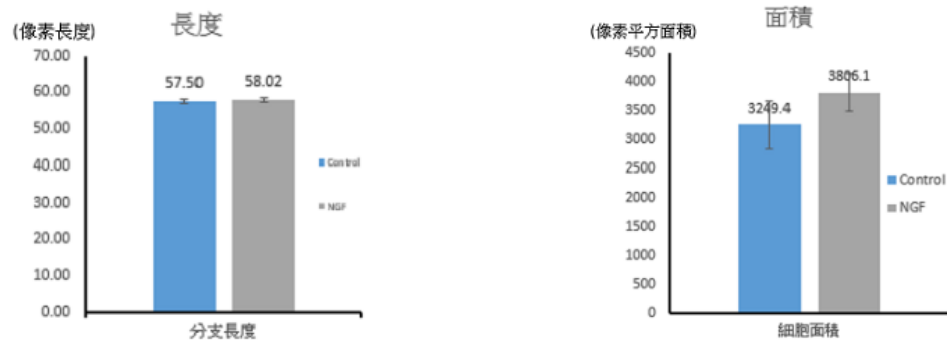


圖 30( 第二次實驗：分支長度 ) 圖 31( 第二次實驗：細胞本體面積 )

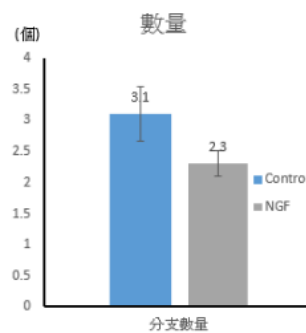


圖 32( 第二次實驗：分支數量 )

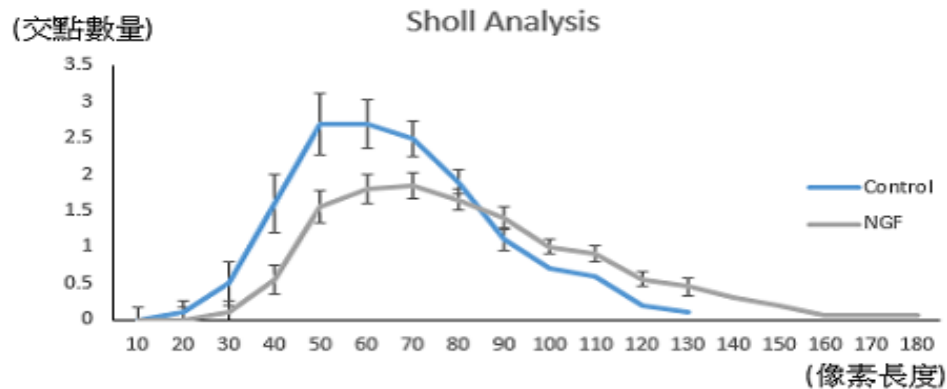


圖 33( 第二次實驗 Sholl Analysis )

(三)、以 10 nM 的 EGCG、 $10 \mu\text{g/L}$  的 NGF 處理後，PC12 細胞株的生長情形

1. NGF 濃度是否足夠影響 PC12 生長？

如圖 34~37，加入 NGF 的細胞其生長狀況皆明顯較未加入 NGF 的組別佳，顯示此濃度已足夠使 PC12 生長、分化。

3. EGCG 於無 NGF 的情況是否對 PC12 生長有影響？

如圖 34~37，未產生顯著差異。

4. EGCG 於此濃度 (10  $\mu\text{g/L}$ ) 的 NGF 之下，是否對 PC12 生長有影響？

相較 NGF 濃度為 50  $\mu\text{g/L}$  的實驗，加入 NGF 的狀況下以 EGCG 處理的細胞其本體面積及分支數量的差距降低，細胞本體面積依舊有顯著差異，但差距降為 15.84% (圖 34)，而分支數量不僅未產生顯著差異，差距也僅剩 6.23% (圖 35)。但其分支長度產生了顯著差異，差距也達 8.32% (圖 36)。我們認為是由於 NGF 減量，造成面積數量差距降低，不過分支長度的影響卻也因此而顯現，而產生了顯著差異。不過此實驗畢竟是單次結果，還需要經過重複驗證，我們決定以相同條件重新進行一次實驗，期盼能證實我們的猜測。

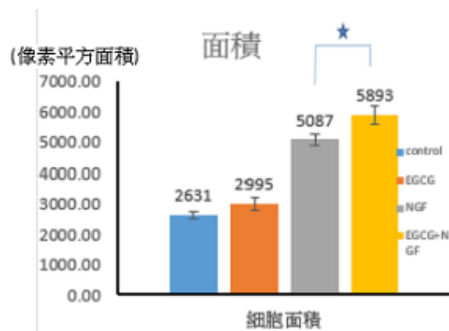


圖 34 (第三次實驗：細胞本體面積，加入 NGF 的細胞中 EGCG 的處理對本體面積產生顯著差異)

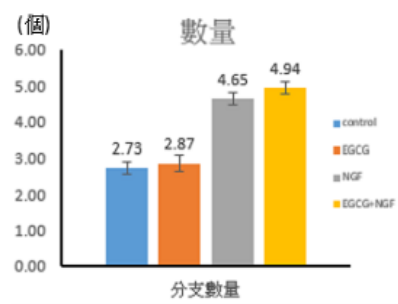


圖 35 (第三次實驗：分支數量，加入 NGF 的細胞中 EGCG 的處理對分支數量未產生顯著差異)

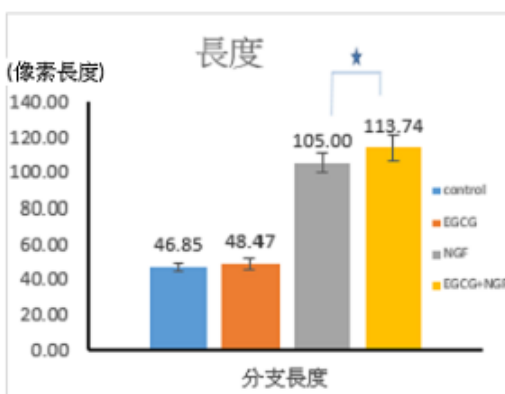


圖 36 (第三次實驗：分支長度，加入 NGF 的細胞中 EGCG 的處理對分支長度產生顯著差異)

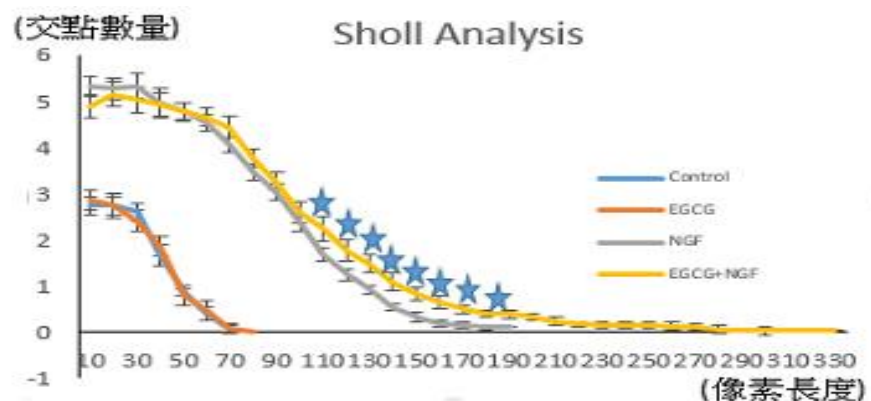


圖 37 (第三次實驗 Sholl Analysis，在中段產生顯著差異)

#### (四)、(三)之重複實驗

##### 1. 實驗條件

此次實驗條件與 (三) 相同，皆為  $10\mu\text{g/L}$  的 NGF 搭配  $10\text{nM}$  的 EGCG，期盼能重複上次實驗的結果。

##### 2. NGF 濃度是否足夠影響 PC12 生長？

如圖 38~圖 41，有無加入 NGF 的細胞皆產生顯著差異

##### 3. EGCG 於無 NGF 的情況是否對 PC12 生長有影響？

如圖 38~圖 41，未加入 NGF 下有無加入 NGF 皆未產生顯著差異。

##### 4. EGCG 於此濃度的 NGF 之下，是否對 PC12 生長有影響？

在分支數量部分，與前次實驗差距不大，未產生顯著差異，差距也僅 10.77% (圖 38)；細胞本體面積的結果則有些反常，兩組之間不但沒有顯著差異，第四組的值甚至較第三組小 (圖 39)。分支長度的部分延續上次結果，不僅產生顯著差異，加入 EGCG 的組別的差距更高達 44.01%，極為明顯 (圖 40)。

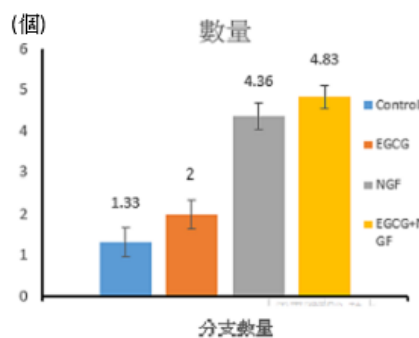


圖 38 (第四次實驗：分支數量)

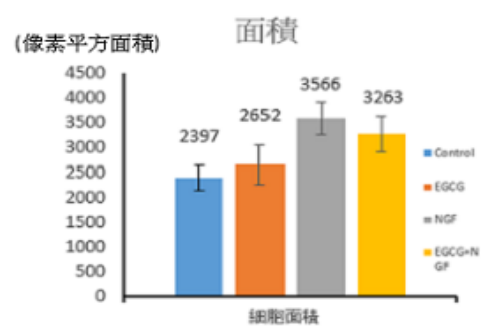


圖 39 (第四次實驗：細胞本體面積)

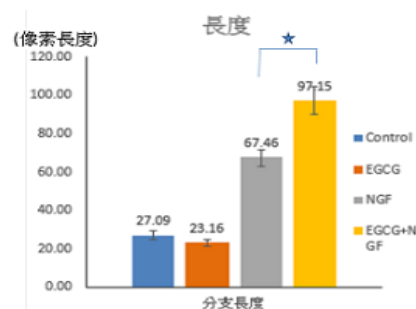


圖 40 (第四次實驗：分支長度，加入 NGF 之下有無 EGCG 處理的細胞產生極顯著的差異)

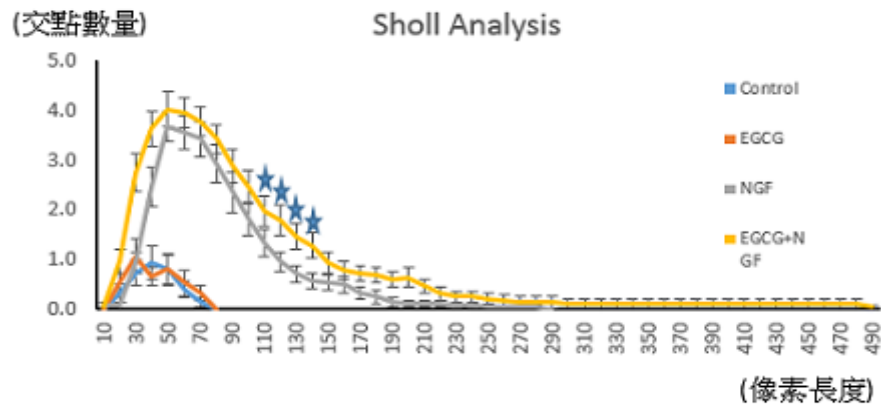


圖 41 ( 第四次實驗 Sholl Analysis，在中段產生顯著差異 )

## 陸、討論

綜合以上實驗，我們證實了 EGCG 會對成熟的 PC12 生長型態產生影響，也大致了解 EGCG 與 NGF 交互作用所產生的現象。未來，我們會將研究方向分成三部分：

第一部分為考慮調整 EGCG 濃度，看固定 NGF 濃度的條件之下，EGCG 對 PC12 的影響是否具有濃度梯度性。

第二部分則是繼續研究 EGCG 在  $50 \mu\text{g} / \text{L}$  的 NGF 之下對 PC12 的作用，但是將重心轉至研究 PC12 模擬神經系統的其餘功能是否受到影響，如代謝路徑、分泌物等，進一步即可延伸至其對人體是否有正負面影響的討論。

第三部分則可以探討 EGCG 在  $10 \mu\text{g} / \text{L}$  的 NGF 下對生長中的神經細胞是否有影響，進一步延伸即可以研究，此濃度的 EGCG 使分支長度差距更為顯著的功能，是否在人體中也有其作用。我們探討「生長中」的神經細胞的原因是，由參考資料中得知，PC12 於未發育的時候較傾向表現癌細胞特性，發育完成時較傾向表現神經細胞特性，又第三、第四次實驗結果顯示，在 NGF 的量較低的情況下，EGCG 對分支長度，一個神經系統功能性的指標，反而會顯現較顯著的差異，因此對應至神經細胞的模型，我們可以推測 EGCG 對於生長中、未成熟的神經細胞應有較顯著的影響。

## 柒、結論

- 一、若加入的 NGF 量過低(如  $5 \mu\text{g/L}$ )，PC12 細胞株將不會產生明顯的型態發育。
- 二、只要加入一定濃度上的 NGF ( 如  $10 \mu\text{g/L}$ )， $1\text{nM}$  的 EGCG 會使 PC12 的生長型態，如細胞本體面積、分支個數產生明顯的差異。
- 三、細胞本體面積、分支個數會隨著 NGF 量的降低，EGCG 所造成的差異也會較不明顯。
- 四、若深究至分支長度，即 PC12 模型中對應回人體，有關神經纖維延伸及連結的部分，太多量的 NGF 反而會蓋掉 EGCG 對 PC12 的影響。實驗過後，目前我們發現可使 EGCG 影響 PC12 最明顯的 NGF 量是  $10 \mu\text{g/L}$ ，而非一般實驗室慣用的  $50 \mu\text{g/L}$ ，或許將來在面對受損傷的神經系統時，可奠基於本實驗，利用 EGCG 輔助神經元的修復。

## 捌、參考資料及其他

1. Dagmar E Ehrnhoefer, Jan Bieschke, Annett Boeddrich, Martin Herbst, Laura Masino, Rudi Lurz, Sabine Engemann, Annalisa Pastore & Erich E Wanker (2008) EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nature Structural & Molecular Biology* **15**, 558 – 566
2. Benila Richia, Raosaheb K. Kaleb, Ashu B Tikua (2012) Radio-modulatory effects of Green Tea Catechin EGCG on pBR322 plasmid DNA and murine splenocytes against gamma-radiation induced damage.
3. Atanasio Pandiella-Alonso, Antonio Malgaroli, Lucia M. Vicentini, Jacopo Meldolesi (1986) Early rise of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  induced by NGF in PC12 and chromaffin cells. *View issue TOC, Volume 208, Issue 1*, 48 – 51
4. F. Casertaa, W.D. Eldred, E. Fernandezc, R.E. Hausmanb, L.R. Stanfordd, S.V. Buldereva., S. Schwarzer, H.E. Stanleya, (1995) Determination of fractal dimension of physiologically characterized neurons in two and three dimensions. *Journal of Neuroscience Methods*, Volume **56**, Issue **2**, 133 – 144

## 【評語】 052004

作者探討綠茶多酚(EGCG)是否可以 PC12 細胞株分化成神經細胞的能力，在原來的 NGF 劑量沒有影響後，他們將 NGF 劑量減半，便看到 EGCG 可促進分化，也降低鈣離子通透性。雖然整體研究有些小缺點，仍能克服困難，完成研究，相當難能可貴。