

2016 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 090004

參展科別 醫學與健康科

作品名稱 以體外培養模式驗證魚鱗可作為細胞移植
載體用於修復眼角膜內皮

得獎獎項 大會獎：四等獎

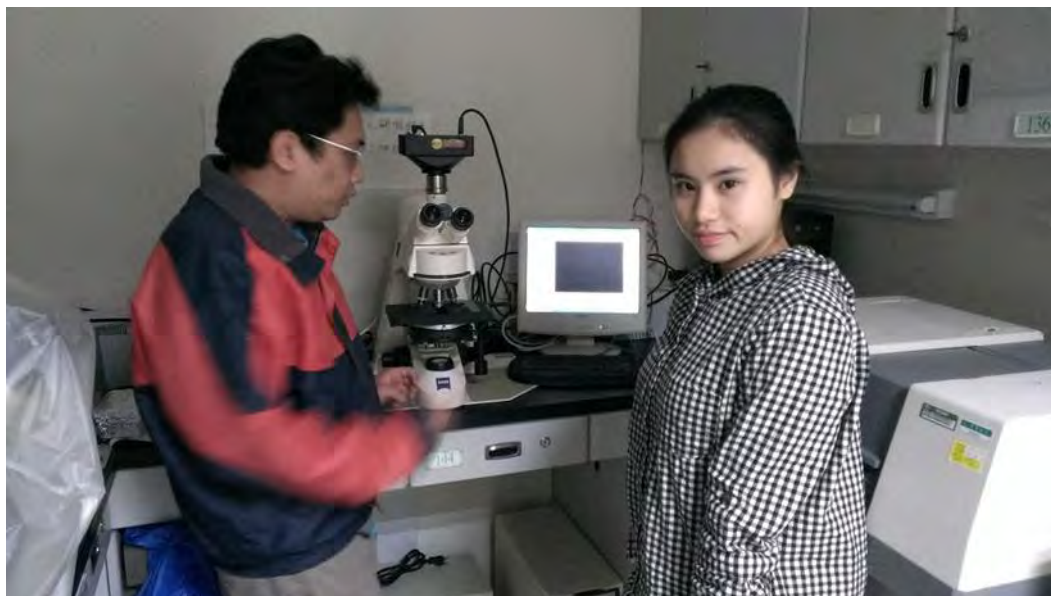
就讀學校 臺北市私立薇閣高級中學

指導教師 鐘勇庭、陳宏吉

作者姓名 馬聖荃

關鍵字 魚鱗、細胞貼附、表面改質

作者簡介



我是馬聖荃，就讀薇閣高中。國中時開始接觸到生物學，就覺得特別有興趣。為了探索細胞的奧秘，經老師介紹從高一開始我進入了林口長庚醫院的眼科幹細胞實驗室。感謝陳宏吉教授與薛詒仁博士的熱心指導，使我能參與他們以體外培養模式驗證魚鱗可作為細胞移植載體的計畫。希望這實驗之結果有助於培養角膜內皮細胞移植早日實現。

摘要

研究目的：

探討魚鱗可否做為細胞移植載體以及其表面改良之方法，並了解相關之調控機轉。

研究過程：

魚鱗表面分別以纖維黏連蛋白、層黏連蛋白、第四型膠原蛋白或 FNC® coating mix 等胞外基質塗佈後，觀察 B4G12 細胞(人類角膜內皮細胞株)的貼附與增生是否有改善，並以基因微陣列探討 FNC 塗佈後對 B4G12 細胞基因表現的影響。

研究結果：

魚鱗表面塗佈能幫助 B4G12 細胞的貼附與增生，以交聯劑固定魚鱗表面塗佈不會影響其效果。基因微陣列、定量 PCR 與西方墨點法實驗結果顯示表面塗佈處理能 1.上調整合素途徑以及其下游 Wnt 途徑的活化，有利於細胞增生、2.上調醣類代謝相關酵素(PFKP)，使細胞有更高之代謝活性、3.上調與液體運輸相關的第 12 型碳酸酐酶 (CA12)。抑制 ILK 可下調 CA12 的蛋白質表現，顯示 CA12 之調控受 ILK 途徑影響。

研究結論：

表面塗佈後魚鱗可做為細胞載體。塗佈可活化整合素途徑，促進 B4G12 細胞貼附與增生。整合素徑亦可能經由調控 CA12 表現調節水分運輸。此外，表面塗佈亦可能經由上調醣類代謝酵素增加細胞代謝活性。

應用性：

此研究提供了一種創新的細胞載體及其改進策略，或可促進角膜內皮細胞療法之實現。

Abstract

Purpose

To investigate the feasibility of using fish scale as a cell transplantation carrier, its modification, and underlying mechanism.

Process

Decalcified fish scales of *Taiwan Tilapia* were coated with fibronectin, laminin, collagen IV, or FNC® coating mix (FNC) with or without further cross-linking with EDC/NHS. Attachment and proliferation of human corneal endothelial cell line B4G12 cells cultured on the scales were evaluated. cDNA microarray was used to compare gene expression profile in B4G12 cells cultured on FNC-coated fish scale.

Results

Surface coating with extracellular matrix (ECM) proteins significantly increased the attachment and proliferation of B4G12 cells on fish scale, which expressed normal endothelial cell differentiation markers ZO-1 and $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase. Cross-linking of ECM proteins to fish scales did not affect the attachment-promoting effect of ECM. Results from cDNA microarray, Q-PCR, and Western blot showed that ECM coating may: 1. Up-regulate integrin signaling pathway, which in turn up-regulates the Wnt pathway, facilitating cell proliferation. 2. Up-regulate enzymes associated with sugar metabolism, so that the cells are more metabolic active. 3. Up-regulate carbonic anhydrase 12, a fluid transport-associated enzyme. Silencing ILK expression by siRNA may down-regulate CA12 expression, suggesting that transcription control of CA12 is under the influence of ILK pathway.

By surface coating with ECM proteins, we have demonstrated that fish scale is capable of being used as a culture substrate and carrier for corneal endothelial cells. By activating integrin pathway, surface coating promotes the attachment and proliferation of B4G12 cells. Integrin pathway may also up-regulate CA12 expression to facilitate fluid transport in corneal endothelial cells. Furthermore, ECM coating may up-regulate enzymes associated with sugar metabolism to increase metabolic activity of the cells.

Application

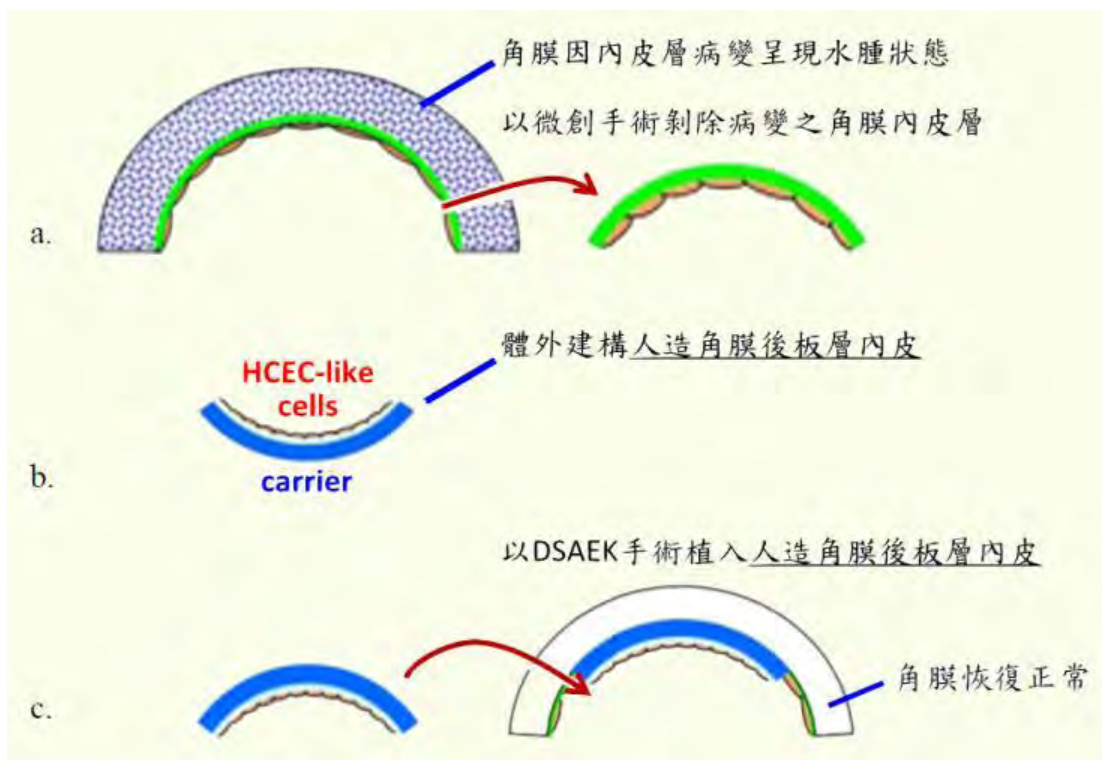
This research provides a novel cell carrier and its modification strategy. Hopefully this can promote the realization of cell therapy using cultivated human corneal endothelial cells.

(一)、前言（含研究動機、目的）

1、研究動機

細胞療法(cell therapy)屬於再生醫學領域(regenerative medicine)中不可或缺之要素。傳統上，當組織缺損或失去功能時，如果組織本身缺乏再生能力，便需要以功能正常的捐贈組織來取代。然而，當捐贈來源匱乏時，細胞療法便成為可能的替代方案。

人類的角膜內皮細胞在體內和神經細胞一樣，缺乏再生能力，因此一旦失去功能便需要進行角膜移植。在台灣，由於捐贈角膜來源缺乏，病患通常需要長時間等待捐贈，影響生活品質。因此，若能開發適合角膜內皮細胞貼附生長之移植載體，便能應用於建構「人造角膜內皮板層」以供移植使用(圖一)。



圖一、組織工程角膜內皮後板層之手術植入示意圖(圖片改編自 www.uniklinik-freiburg.de)。

2、研究背景

角膜位於眼球正前方，略向外凸，為鞏膜前端特化而成的透明狀構造。當角膜變得混濁時，光線便無法穿透至視網膜而造成視力變差，甚至會導致失明。角膜由上皮層(corneal epithelium)、包氏膜(Bowman's membrane)、基質層(stroma)、德氏膜(Descemet's membrane; DM)和內皮層(corneal endothelium)所組成。角膜內皮層細胞對基質層內含的水分的正常調節是能維持角膜清澈的主因。

角膜後表面的內皮層由單層的角膜內皮細胞構成，對角膜基質的水含量調節主要是經由 zona occlusion-1 (ZO-1)蛋白所構成的細胞間緊密連結屏障[Iwamoto and Smelser, 1965; Kreutziger, 1976]和 Na-K ATPase 幫浦的離子泵功能[Maurice, 1972; Geroski and Edelhauser, 1984]來維持角膜透明。Na-K ATPase 幫浦可以主動運輸之方式，將水分自角膜基質排到後方的前房(anterior chamber)裡，使眼角膜不會水腫而維持透明。角膜內皮細胞源自神經嵴(neural crest)，從神經外胚層發育而來。人類角膜內皮細胞(human corneal endothelial cell; HCEC)在正常生理情況下不會再增生。剛出生時角膜內皮的細胞密度約為 $3,500 \sim 4,000/\text{mm}^2$ ，隨著年齡增加，細胞密度穩定減少直到 $2,000 \sim 3,000/\text{mm}^2$ 。當 HCEC 缺損時，鄰近細胞經由細胞肥大、增加覆蓋面積和遷移來填補空缺[Sherrard, 1976; Kaufman and Katz, 1977; Joyce et al., 1990]。當內皮細胞密度低於 $1,000/\text{mm}^2$ ，角膜內皮層便開始失去水分調節功能。

一旦角膜內皮失去功能(常見於白內障手術之傷害，先天性角膜疾病、或青光眼等)，便導致角膜水腫，傳統上便需要進行全角膜移植(penetrating keratoplasty)以回復視力。近十年來，角膜移植有由分層角膜移植取代全層角膜移植之趨勢，亦即只替換角膜受損的部位，而不需全層置換，因此不但可維持角膜之機械強度，更可以降低移植排斥之機會。根據美國眼庫協會的統計 2011 年在美國進行的角膜移植有近半是內皮移植。另外，台灣每年約五百例的角膜移植中也有 60%是因內皮細胞失去功能，因此對於此類病患逐漸以角膜內皮層移植(Endothelial Keratoplasty)取代全層角膜移植是很有意義的。

剝除德氏膜之自動化角膜內皮移植(Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty; DSAEK)手術，是 Gorovoy 醫師在 2006 年發表的角膜內皮移植技術。該方法是將病患的德氏膜和內皮細胞層剝除後，植入預先以角膜板層刀切割好的捐贈角膜的後板層

(包含部分基質層、德氏膜和內皮層)。接受此手術因能減少術後屈光度之變化、傷口癒合更快、維持眼球之完整性、對外力撞擊之抵抗力大增、並降低排斥機率，因此逐漸成為內皮移植的主要手術方式。

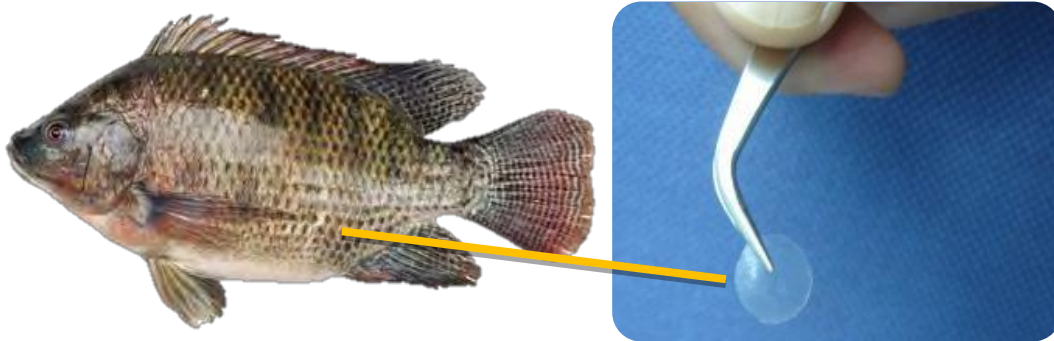
然而，即便是DSAEK手術仍須有捐贈角膜之來源。由於在亞洲捐贈角膜長期處於短缺狀態，而捐贈角膜普遍有年紀老化和內皮細胞密度較少的現象，因此發展培養HCEC移植技術有其重要性。鄰國日本是目前全世界進行培養HCEC移植最積極的國家。2009年Honda等人已報導將HCEC培養在去內皮細胞的角模板層上，以DSAEK手術法將該細胞產物植入兔眼內，使已浮腫之眼角膜再次恢復澄清[Honda et al., 2009]。此種將培養之HCEC以DSAEK手術法植入眼內之方法，被稱之為c-DSAEK (culture-based DSAEK)。如圖一所示，我們可經由將HCEC培養於移植載體(carrier)表面的方式，於體外建構人造角膜後板層內皮(tissue-engineered posterior lamellar endothelium)以供c-DSAEK手術所用。

關於人類角膜內皮細胞(HCEC)移植載體開發，自2003年起Doillon等人開始嘗試運用膠原蛋白作為載體材料[Doillon et al., 2003]。此外各種生醫材料：包含交聯化玻尿酸[Lu et al., 2008]、膠原蛋白/甲殼素[Rafat et al., 2008]、甲殼素/PCA[Wang et al., 2012]、肝素修飾明膠[Niu et al., 2014]、PGS/PCL[Salehi et al., 2014]、電紡SF/P(LLA-CL)[Chen et al., 2015]，皆曾被發表運用為HCEC移植載體。然而上述材料之細胞適應性仍有改良空間。

由於化工合成的生醫材料，其結構之複雜性遠不及於活體之組織，因此另一途徑是利用去細胞、以減除排斥反應的動物組織，例如豬或牛的心瓣膜或豬皮，已廣為運用於臨床。關於以膠原蛋白為基礎之細胞移植載體，台灣鯛(Taiwan Tilapia；即俗稱之吳郭魚)之魚鱗(fish scale)(圖二)是一種具有生物降解性(biodegradable)的天然材料，主要由第一型膠原蛋白(collagen)與氫氧基磷灰石(hydroxyapatite)構成。台灣鯛的魚鱗在脫鈣、脫灰質處理後能有很好的透明性(圖三)，且其膠原蛋白整齊的層狀排列，恰與角膜基質非常相似，同樣為規則垂直交錯有很好的透光性(圖四)。因此我們嘗試將其運用為角膜內皮細胞移植載體。

本計劃使用魚鱗材料為已商品化之產品，此研究為既有產品之新應用方向開發。最近報導，此魚鱗製品因其生物降解性與低排斥等特性，可製成骨釘做為骨折內固定物協助骨癒合[Chou et al., 2014]。此魚鱗製品因其透光性亦可用來做為人工眼角膜[van Essen et al., 2013]，

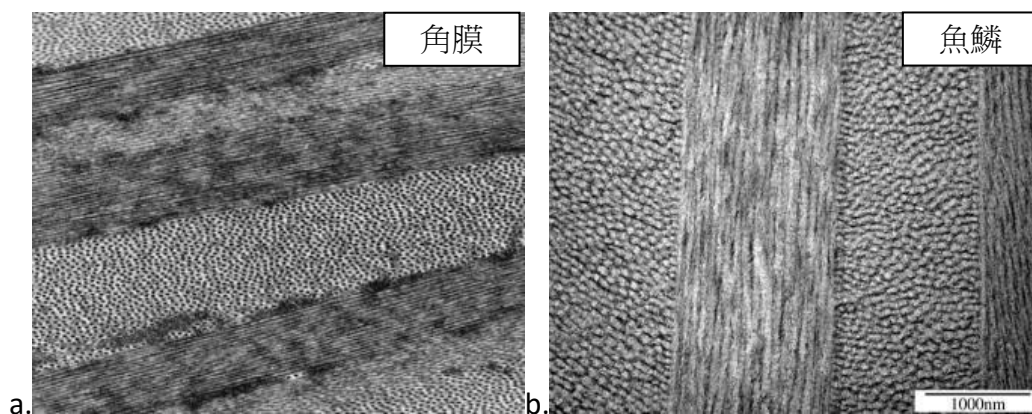
但是用魚鱗來做細胞移植載體還沒有人曾嘗試應用。



圖二、台灣鯛(*Taiwan Tilapia*)的腹部鱗片



圖三、台灣鯛鱗片的加工處理。a. 未處理之魚鱗。b. 經去細胞、脫鈣、脫灰質後之魚鱗較為透明。c. 魚鱗有很好的可塑性(由左而右分別進行壓平打圓、打薄、軟化壓模處理)。d. 處理後之魚鱗有很好的透光性(transparency)。



圖四、角膜與台灣鯛鱗片的電顯觀察比較。(圖片引用自[Ikoma et al., 2003; Ruberti and Zieske, 2008])

3、研究目的

本研究將探討以魚鱗作為培養角膜內皮細胞載體之可行性，並嘗試以胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 蛋白塗佈或化學交聯等改進方法作用於魚鱗表面，觀察是否能進一步幫助角膜內皮細胞之貼附，並探討表面塗佈對細胞影響的可能機制。此研究可應用於實現 C-DSAEK 之再生醫學治療技術，希望此基礎研究成果能有助於開發新穎組織工程方法，而在角膜再生醫學領域作出具體貢獻。具體步驟如下：

- (1). 比較魚鱗與其他生物性載體材料(明膠或幾丁質)的物理特性
- (2). 角膜內皮細胞株B4G12細胞的培養觀察
- (3). 魚鱗表面的B4G12細胞適應性測試
- (4). 表面塗佈處理後，魚鱗表面的B4G12細胞貼附與增生測試
- (5). 以化學交聯法固定塗佈蛋白於魚鱗表面，並測試該處理對B4G12細胞適應性的影響
- (6). 比較表面塗佈對整合素相關路徑(integrin pathway)與細胞增生調控的影響
- (7). 比較表面塗佈對B4G12細胞基因表現的影響
- (8). 比較表面塗佈對醣類代謝酵素(PFKP)與細胞代謝活性的影響
- (9). 比較表面塗佈對第12型碳酸酐酶(carbonic anhydrase 12)表現的影響
- (10). 觀察ILK途徑是否參與PFKP和CA12表現的調控

(二)、研究方法或過程

1、實驗原理：

角膜內皮細胞和血管內皮細胞不同，與表皮細胞同樣源自於外胚層，同樣會分泌基底膜並經由半橋粒小體(hemidesmosomes)與基底膜蛋白連結。半橋粒小體由整合素(integrin)構成，細胞經由 integrin 與存在於基底膜蛋白的 ligand 結合貼附於基底膜表面。因此我們可利用表面塗佈 ECM 蛋白的方式，增加魚鱗表面的 integrin ligand，進而增加細胞貼附能力。

2、研究方法：

(1). 細胞培養：

本研究使用之角膜內皮細胞株(B4G12 cell line)購自 Creative Bioarray (NY, USA)，細胞以含有 2%胎牛血清，另含 10 ng/mL EGF 之 human endothelium serum free medium (HESFM)培養。培養液每兩天更換一次。

(2). 材質物理特性測試：

a. 光穿透度測試

將所有樣品浸泡於去離子水中 24 小時。並將採用拭鏡紙樣品從水溶液中移除並擦拭乾淨後放置於光穿透儀(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)中進行 400-700 nm 偵測，在偵測過程中需要採用樣品夾將樣品進行固定，實驗完成後利用電腦軟體分析數據結果。

b. 機械強度測試

所有測試樣品均於 25°C，濕度環境 50%下進行機械性質測試。樣品於試驗前需裁切成直方形(2.0cm*0.5cm)後並採用 Instron Mini 44 universal testing machine (Canton, MA, USA)進行量測機械強度，再利用電腦軟體分析。

c. 材料降解實驗

在含有膠原蛋白酶(type I Clostridium histolyticum; EC 3.4.24.3)之 34°C 均衡鹽溶液(balanced salt solution, BSS)下，進行共聚物凝膠降解。在真空乾燥後，記錄初始樣本乾重(Wi)。之後時間點的共聚物同樣進行真空乾燥，記錄乾重(Wd)， $\text{weight remaining (\%)} = (Wd/Wi) \times 100\%$ 。降解程度量測 14 天中，定期置換新的含相同濃度膠原蛋白酶之 BSS 溶液。

(3). 魚鱗表面處理：

本計劃使用之魚鱗材料為已商品化之產品(Body Organ Biomedical Corporation, Taipei)，魚鱗原內含之細胞與雜質皆已去除，僅存膠原蛋白(collagen)與氫氧基磷灰石。將處理過的魚鱗以抗生素處理後以 PBS 洗去殘留之抗生素，靜置於 ECM 蛋白溶液中，包括 fibronectin ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, Sigma-Aldrich, St Louis, MO)、laminin ($2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, Sigma-Aldrich)、collagen IV ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, Acton, MA)、以及 FNC® coating mix (Athena Environmental Sciences, Inc. Baltimore；成分包括白蛋白、第一型膠原蛋白、與 fibronectin)，半小時後取出魚鱗風乾。部分已塗佈魚鱗接著進行交聯化處理，簡述流程於下：先將塗佈後之魚鱗浸泡於 MES buffer (0.1 M 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid (MES), pH 5.0)一小時，接著置換含有 5:1 (EDC:NHS)的 MES buffer 24 小時 (每毫克魚鱗添加 EDC 0.05mmol)。接著，交聯化後之魚鱗以二次水洗淨後置於 PBS 中備用。

(4). 表面塗佈交聯化處理

將樣品浸泡於 1×10^{-3} M 緩衝溶液(2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid，MES buffer)，加入 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亞胺鹽酸鹽(EDC)活化劑和 N-羥基琥珀酰亞胺(N-hydroxysuccinimide，NHS)反應 24 小時後置於 PBS 溶液備用。

(5). 細胞貼附能力測試：

將魚鱗置於 24 孔培養盤(面積 1.9cm^2)後，先將溶液置換為 HESFM 隔夜，再將 B4G12 細胞(25 萬細胞/well)繼代至魚鱗表面，兩天後以相位差顯微鏡或掃描式電子顯微鏡觀察細胞貼附狀態。或是以 trypsin 分離出細胞後進行後續分析。

(6). 測量細胞增生

a. BrdU 標記染色法

Bromodeoxyuridine (BrdU) 是胸腺嘧啶(thymidine)之相似物，DNA 複製時可被併入核酸鏈。因此 BrdU 標記可用為確認細胞具有增生能力的指標。我們將不同處理組別的培養細胞按指示以 BrdU 標記 2.5 小時(Cell Proliferation Kit, Amersham)，接著以冰 PBS 洗去培養液後，以 100%冰甲醇固定細胞 10 分鐘，先加 5%牛血清白蛋白作用 30 分鐘以阻斷非特異性結合，再將 anti-BrdU 單株抗體與 DNase-1 混合，室溫下作用 1 小時。然後加入小鼠 Cy3 (Chemicon)

二次抗體 (1 : 100) 室溫作用 30 min.，再以 Hoechst 33342 染核並封片。然後以免疫螢光共軛顯微鏡(TCS SP2-MP system; Leica)檢查標本。

b. 細胞數計算法

我們直接以細胞記數法評估 B4G12 細胞在魚鱗上的增生狀態。魚鱗置於 24 孔塑膠培養盤中，每孔置入 3×10^5 個細胞，待細胞貼附於魚鱗表面後，將魚鱗轉置至另一個 24 孔塑膠培養盤中。隔日將培養液置換為無血清培養液。接著分別於第 1 至 5 天，將細胞以 0.5 mL trypsin 處理後取 100 uL 細胞懸浮液與 100 uL trypan blue 等體積混合均勻。接著取 20uL 混合液自血球計數盤上方凹槽加入，蓋上蓋玻片，於 100 倍倒立顯微鏡下觀察，計數四個大方格之細胞總數平均後，乘以稀釋倍數再乘以 10^4 即為每 mL 中細胞懸浮液之細胞數，每個組別皆進行 3 重複測試。

(7). 表面微結構觀察：

將樣品以掃描式電子顯微鏡 (scanning electron micrographs, SEM) 觀察。首先將樣品以磷酸緩衝溶液 (pH 7.5) 重複清洗 3 次，加入 2 %戊二醛 (glutaraldehyde) -磷酸緩衝溶液，固定 2 小時後，去上清液，以磷酸緩衝溶液重複清洗 3 次；加入鐵酸 (OSO₄) -磷酸緩衝溶液，固定 2 小時後，去上清液，以 DDW 重複清洗 4 次；再以 30%、50%、70%、90%、95%、100%、100%、100%酒精進行系列脫水 (每次脫水 20 分鐘，去上清液，再加入新的酒精)，置入 iso-amylacetate 溶液置換 2 次(各 20 分鐘)，以 CO₂ 臨界點乾燥機 (LADD, USA)乾燥。接著將乾燥之樣品置於載盤上，以鍍金機(SC502 Bio-Rad, California, USA)進行白金塗佈後以掃描式電子顯微鏡(ABT-32, JP)觀察。

(8). 免疫螢光染色(Immunofluorescence)：

我們以免疫細胞螢光染色法觀察蛋白質在細胞的表現及其位置。將細胞培養於 8-well chamber slide 上，以 4% formaldehyde 固定 15 分鐘後以冰磷酸緩衝鹽溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗去固定液。再以 0.2% Triton X-100 處理 15 分鐘，洗去細胞膜脂質後，先加 5% 牛血清白蛋白作用 30 分鐘阻斷非特異性結合，再將初級抗體 ZO-1 (Invitrogen; Carlsbad, CA) 或 ATPase (Upstate, Millipore; Billerica, MA)於室溫下作用 1 小時。然後加入二次抗體室溫作用 30 min.，再以 Hoechst 33342 染核並封片。最後以免疫螢光共軛顯微鏡(TCS SP2-MP system;

Leica)檢查標本。

(9). 抽取蛋白質(Protein Extraction)：

a. 抽取核蛋白

我們使用 Panomics 公司的 Nuclear Extraction Kit (AY2002)。該 kit 先使用低張溶液(Buffer A)漲破細胞，去除細胞質碎片後，再以高張溶液(Buffer B)處理，使得細胞核內的蛋白質被滲透壓擠出細胞核外。

於實驗前先配置 Buffer A 低張溶液(2.5 mL 1X Buffer A, 25 μ L 100 mM DTT, 25 μ L 100 mM DTT, 25 μ L protease inhibitor, and 25 μ L phosphatase inhibitor)，將這些成分輕輕地混合均勻置於冰上。將培養細胞以預冷之 PBS 洗去培養液後倒入適量 Buffer A 溶液，置於冰上等待 15 分鐘。再用刮勺將細胞刮離培養皿後連同溶液移到預冷的離心管中，在 4°C 14000xg 下離心 3 分鐘。倒去上清液，底部即為細胞核的沉積。再加入 150 μ L of Buffer B (145.5 μ L 1X Buffer B, 1.5 μ L protease inhibitor, 1.5 μ L phosphatase inhibitor, 1.5 μ L 100 mM DTT)，用渦流發生器(vortex generator)最高速 10 秒將其打散。將離心管置於冰上 1 小時，期間每 20 分鐘搖晃一次。結束後在 4°C 14000xg 下離心 5 分鐘，再將上清液裝到另一個乾淨的管子中，此即為組織細胞之核蛋白溶液。

b. 抽取總蛋白質

用冰上預冷過的 1X PBS 將細胞清洗後浸置於 Tissue Cells Protein Extraction Reagent (T-PER)蛋白質萃取液(2.5 mL T-PER, 25 μ L protease inhibitor, 25 μ L phosphatase inhibitor)10 分鐘。以刮勺將細胞刮離培養皿後連同溶液集中於 1.5 mL Eppendoff 離心管後，於冰上用超音波震盪儀將細胞膜打破。4°C 下離心 15 分鐘，上清液即為懸浮的細胞總蛋白質溶液。

c. 蛋白質定量

將 5X Coomassie brilliant blue，加水稀釋到 1X。將 10 μ L 待測標本稀釋 20 倍後，再加入 200 μ L 的 1X Coomassie brilliant blue 進行 Protein 檢測。將 2 mg/L 的白蛋白標準液(albumin standard)稀釋成 0.2mg/L、0.1mg/L、0.05mg/L、0.025mg/L 等梯度濃度以供比較。將待測的蛋白質樣品加到 96 孔盤進行檢測。以 Megellan 檢測其 595 nm 波長吸光值後，用 Excel 軟體計算出原始濃度。

(10).西方墨點轉漬法(Immunoblotting)：

將蛋白質樣品經過定量後和 6 倍的 protein loading dye 混合隔水加熱 4 分鐘後置於冰上。以 10% SDS-polyacrylamide gels 電泳分離。各組取 10 μ g 的蛋白質設定電流 20 mA 進行電泳，約一個半小時後取下凝膠後，依 Whatman 3MM 濾紙-凝膠-PVDF membrane-3MM 濾紙的順序由上而下疊好，趕出因覆蓋時所產生的氣泡後將此組合放置於半乾式轉漬槽中。設定電流 (1 mA/cm^2)，1 小時後可將蛋白質由凝膠轉漬到 PVDF 膜上。PVDF 膜加入 blocking reagent (5% BSA in 1x TTBS) 1 小時後，浸泡一抗 IgG 後置於 4°C 冷藏櫃中。隔日以 TTBS 清洗三次，再加入二抗 IgG-HRP 室溫 1 小時後同樣清洗三次，使用 GE Healthcare Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents and Analysis System Kit 進行顯影。取 Reagent 1 和 Reagent 2 各 1mL 混合均勻，將 PVDF membrane 兩面沾取混合均勻的液體，靜置在黑暗中待其作用 1 分鐘。在暗房中曝光顯影，再以 Kodak 沖片機進行沖片。

(11). 定量聚合酶連鎖反應與 cDNA 微基因陣列 (q-PCR and cDNA microarray)：

a. RNA 萃取

以冰上預冷過的 1X PBS 將樣品清洗乾淨後加入 10 倍體積的 TRIzol reagent。用 10 號手術刀片刮取魚鱗表面的 B4G12 細胞後，依照 TRIzol reagent 說明書的操作步驟，每毫升加入 200 μ l 氯仿(chloroform)，此時 DNA 及蛋白質溶入有機層 (organic phase) 中，RNA 則會留在水層 (aqueous phase)。離心後抽取水層部分並加入等體積異丙醇(isopropanol)和 20 μ g 肝糖 (glycogen)，置於 -80°C 半小時以沉澱 RNA，再經過 75% 酒精清洗後加入 DEPC 水回溶。

b. cDNA 微基因陣列分析

將 total RNA 用 RNeasy column (Qiagen, CA) 純化，將 RNA 樣品以乾冰保存送至長庚醫院林口院區基因體核心實驗室進行分析。該實驗室會先用 RNA 分析儀 (Bioanalyzer®, Agilent Technologies, CA) 來檢測的品質，再將 RNA 轉成 cDNA。實驗組與對照組的 cDNA 分別以 cy-3 或 cy-5 螢光標記後混和，先去除 RNA 後再以 cDNA clean-up spin column (Affymetrix, CA) 純化，並回溶於 1X SSC buffer (15 mM sodium citrate, 150 mM NaCl) 中。將 cDNA 和 Human Whole genome oligo array chip (包含 41 K human unique genes, Agilent Technologies) 雜交。以 Gene array scanner (Agilent Technologies) 掃描。掃描結果用 Microarray Suite Version 5 software

(Affymetrix)以及 Probe Profiler software (v1.3.11; Corimbia, Inc., Berkeley, CA)分析後，即可將結果轉換為gene expression level (EScores)。

c. 定量PCR (q-PCR)分析

本實驗使用Power SYBR® Green PCR Master Mix(Applied Biosystems)進行定量 PCR，所有反應均以 ABI StepOne7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)進行，PCR反應引子與條件列於表一，首先進行40 個循環的放大反應，在放大反應結束後，以 60℃反應 1 分鐘來進行 melt curve 分析。最後利用Step One Software v2.0軟體 (Applied Biosystems) 分析其擴增曲線圖與 ΔCt 值。各基因之表現量皆以同樣品之GAPDH表現量作為內控對照組。各基因進行3重複分析後，將 ΔCt 值除以GAPDH之 ΔCt 值後計算平均值與標準差。

表一：定量PCR的引子與反應條件

基因名稱	Forward Primer	Reverse Primer	Length	Tm
ATP1A1	CTGTGGATTGGAGCGATTCTT	TTACAACGGCTGATAGCACCA	112	60
ZO1	CAACATACAGTGACGCTTCACA	CACTATTGACGTTTCCCCACTC	105	60
PFKFB4	GGAGTTCAATGTTGGCCAGT	TCAGGATCCACACAGATGGA	276	60
PFKP	GCATGGGTATCTACGTGGGG	CTCTGCGATGTTTGAGCCTC	86	60
FN1	CGGTGGCTGTCAGTCAAAG	AAACCTCGGCTTCCTCCATAA	130	60
LAMA4	AGGAACCCGAGTTCAGCTAC	CACGTCGAGGTCACCGAAAG	103	61
CA9	GGATCTACCTACTGTTGAGGCT	CATAGCGCCAATGACTCTGGT	98	60
CA12	AGTGACATCCTCCAGTATGACG	GTGGCACTGTAGCGAGACT	164	61

(12).MTT 分析：

將3-(4,5-cimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 以1X PBS稀釋為2.5 mg/mL，冰存於-20℃冰箱冷凍保存。取50 μ L MTT溶液加在24孔盤 (500 μ L/well) 已培養B4G12細胞的魚鱗上，置入37℃培養箱培養4小時後，加入含0.04 N HCl-isopropanol以溶解紫色的MTT formazan，將溶液吸出加入96孔盤，置入ELISA分析儀 (Synergy HT, BioTek) 測量OD 595 nm。

(13).ILK RNA silencing：

B4G12 細胞培養 7 天後先將培養液置換為 Opti-MEM 隔夜，再用 lipofectamin 2000 試劑，

將 50 nM 的 ILK siRNA (Santa Cruz Biotechnology)轉染入細胞內。待細胞轉染 6 小時後更新培養液，之後繼續培養 48 小時進行後續西方墨點分析。

(14).統計分析：

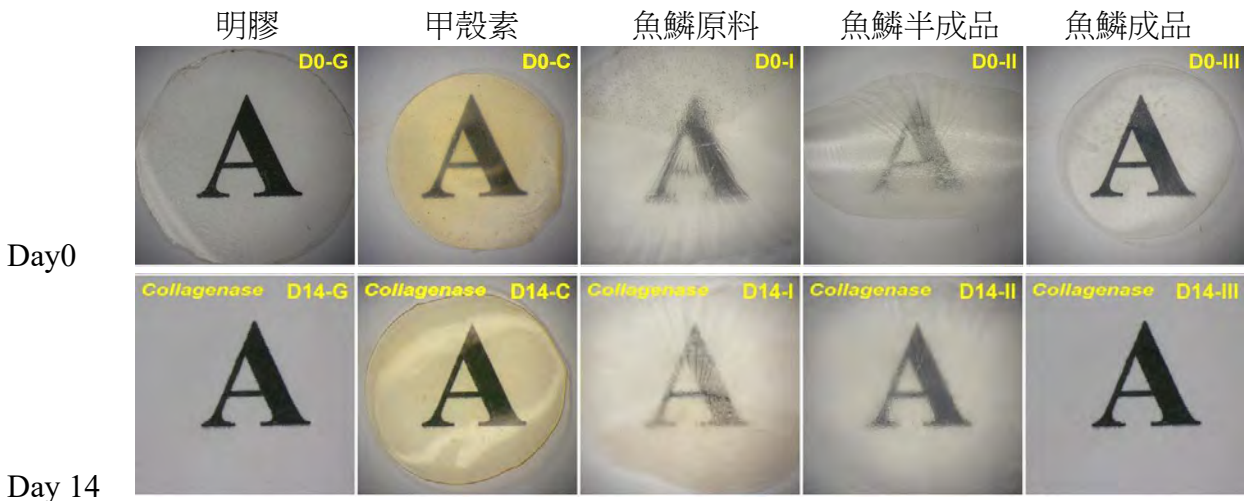
所有的試驗皆進行至少三重覆，數據以平均值±標準差表示。所有數據皆以 Microsoft Excel ver. 2010 (Microsoft, Redmont, WA)計算 Student's unpaired t-test 以評估差異， $p < 0.05^*$ 和 $p < 0.01^{**}$ 代表組別間有顯著差異。

(三)、研究結果與討論

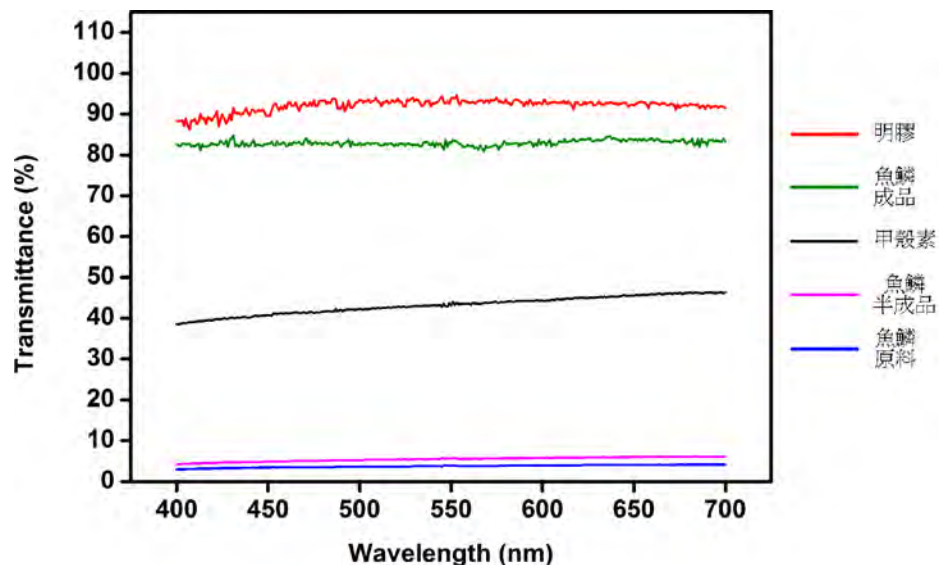
1、生物性細胞載體材料之觀察與物理性質比較

如前言所述，明膠與甲殼素皆曾經被應用為人類角膜內皮細胞(HCEC)的移植載體。因此我們先進行物理性質觀察，比較魚鱗是否較現有材質適合作為細胞載體。

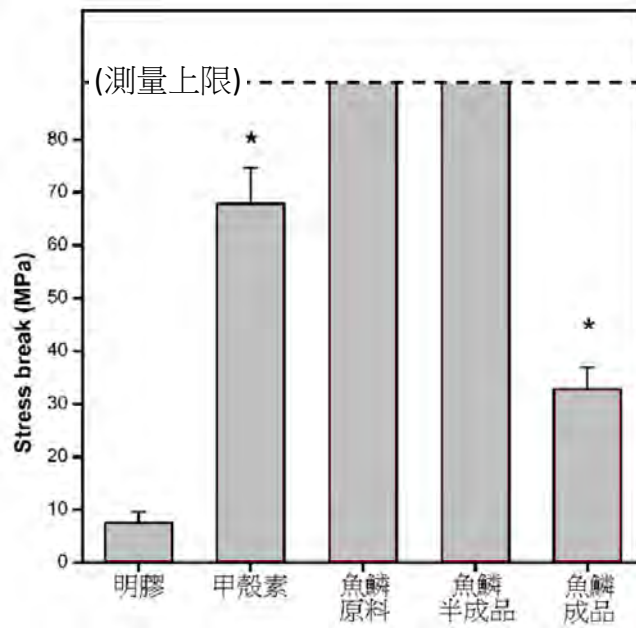
從材質外觀與透明度測試結果可見(圖五、六)，魚鱗成品有很高的透光度，優於甲殼素材質，已相當接近明膠材質，也與正常人類眼角膜相近，後者對可見光的平均透光度大約是80%左右。從圖七結果可見，明膠材質雖然有很好的透光度，然而由於其材質強度不佳，不易於手術操作，容易在移植過程中破損。而魚鱗材質有一定的物理強度及柔軟度，足以提供手術操作。此外，從膠原蛋白酶降解測試結果可見(圖八)，魚鱗材質有恰當的生物降解性。因此當魚鱗作為細胞載體移植入體內後，可經由組織重組(tissue remodeling)的過程被體內吸收，。不至於太快溶解，也不會一成不變。



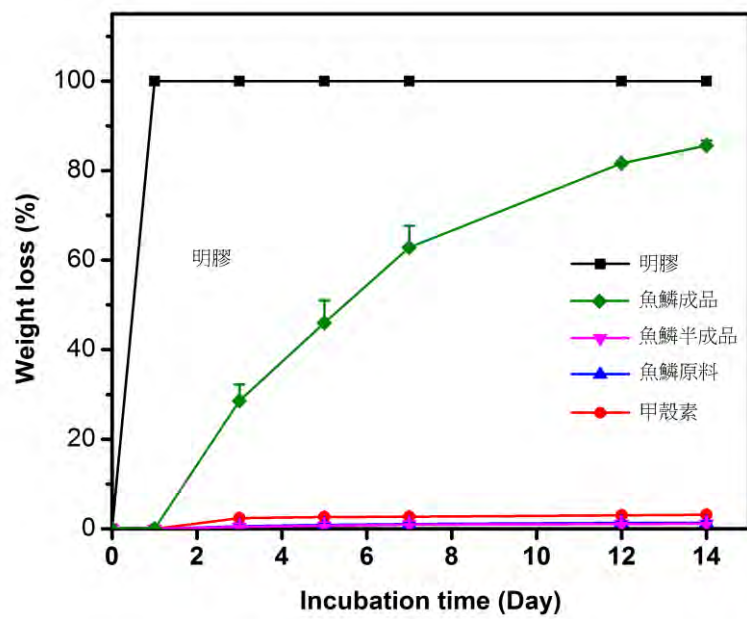
圖五、不同細胞載體材質的外觀與材質經膠原蛋白酶降解處理後的外觀比較



圖六、不同細胞載體材質的透明度測試



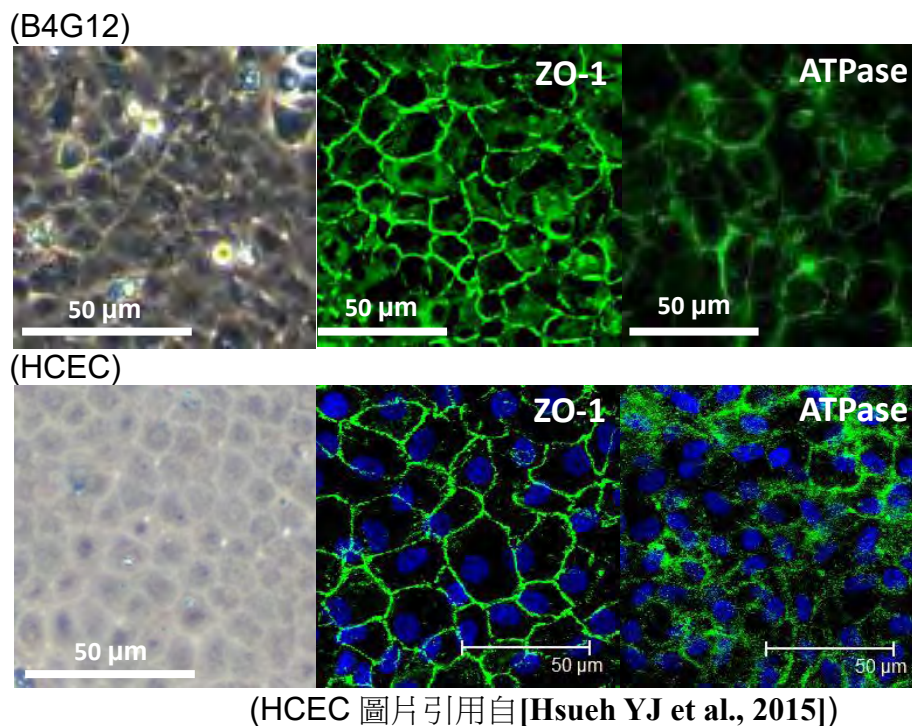
圖七、不同細胞載體材質的張力測試



圖八、不同材質細胞載體與魚鱗的膠原蛋白酶降解測試

2、B4G12 細胞培養觀察 (含 ZO-1 免疫細胞染色)

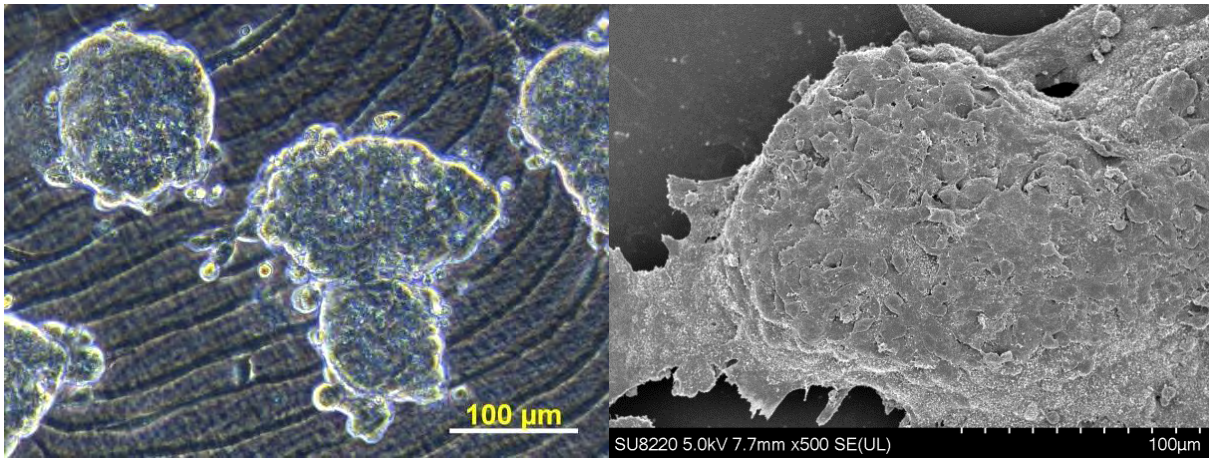
B4G12 細胞株為正常人類角膜內皮細胞(HCEC)經 SV-40 病毒轉型癌化後，篩選保有角膜內皮細胞型態的 clonal cell lines[Valtink et al., 2008]。將此細胞培養於培養皿後觀察形態與 HCEC 標記蛋白(ZO-1 & ATPase)表現。從圖九的結果可見 B4G12 細胞表現和 HCEC 相同的多角形型態與分化標記蛋白(ZO-1 和 ATPase)表現。因此我們選用此細胞株模式取代人類角膜內皮細胞進行後續試驗。



圖九、B4G12 細胞株與正常人類角膜內皮細胞(HCEC)型態與角膜內皮標記蛋白表現之比較 (A).以相位差顯微鏡觀察細胞型態。(B).以免疫細胞染色法觀察 B4G12 與 HCEC 的 Zona occludens-1 (ZO-1)和 Na/K-ATPase 蛋白表現。

3、魚鱗表面細胞適應性(cytocompatibility)測試

將 B4G12 細胞繼代培養於魚鱗表面後，從圖十的結果可見細胞在魚鱗表面形成團塊狀聚集無法擴展(expansion)，此現象直到培養兩週後依然存在。從 SEM 電顯可以觀察到聚集成細胞團塊的各細胞單體。



相位差 SEM 電顯

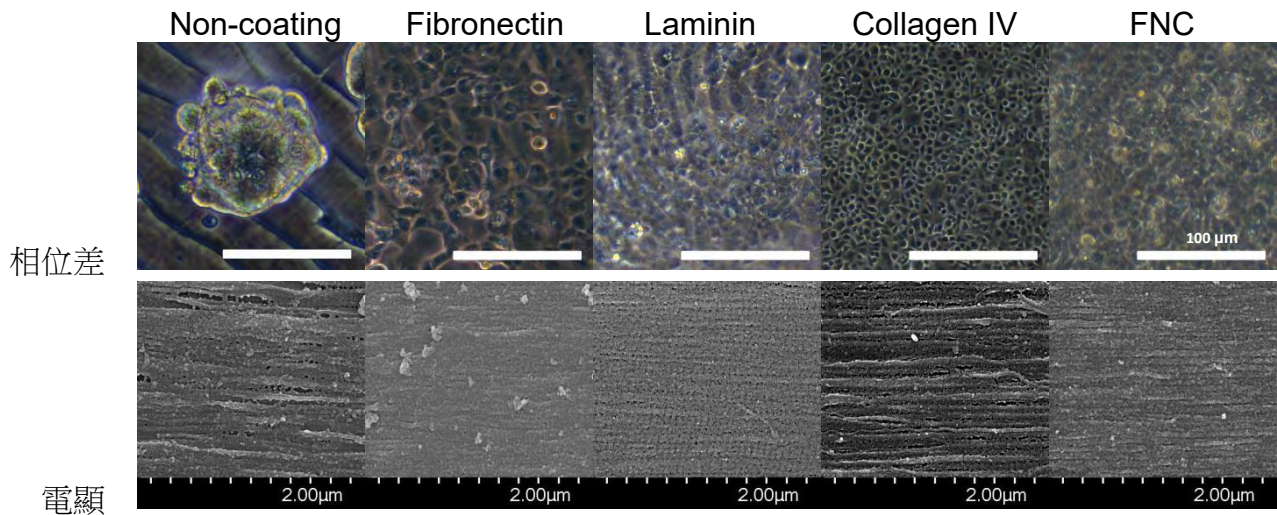
圖十、魚鱗表面的細胞貼附適應性(cytocompatibility)測試。將B4G12細胞培養於魚鱗表面後，以相位差顯微鏡與表面掃描式電子顯微鏡(SEM)觀察細胞適應性。

測試結果觀察發現魚鱗表面不適合內皮細胞貼附(圖十)。這其實並不令人意外，因為即便在培養皿上種植正常人類角膜內皮細胞時，也需要用像laminin或collagen IV等胞外基質塗佈表面，細胞才能貼附與生長。因此本研究嘗試以表面塗佈胞外基質蛋白的方法以改良魚鱗材質表面，以增進此材料的細胞貼附能力，有助於發展魚鱗材質做為臨床用細胞移植載體。

4、魚鱗表面塗佈處理對細胞適應性的影響

將魚鱗表面以不同胞外基質蛋白塗佈後，再將 B4G12 繼代培養於其表面。從相位差顯微鏡可以觀察到魚鱗表面塗佈胞外基質能有效協助 B4G12 細胞貼附(圖十一)，細胞可貼附並擴展於塗佈後之魚鱗表面。其中，以 laminin 和 FNC® coating mix 塗佈之魚鱗呈現較高的細胞密度與多邊形型態。Collagen IV 塗佈的魚鱗所培養之細胞密度較低，而 fibronectin 塗佈的魚鱗不但細胞密度低，細胞型態也較不規則。

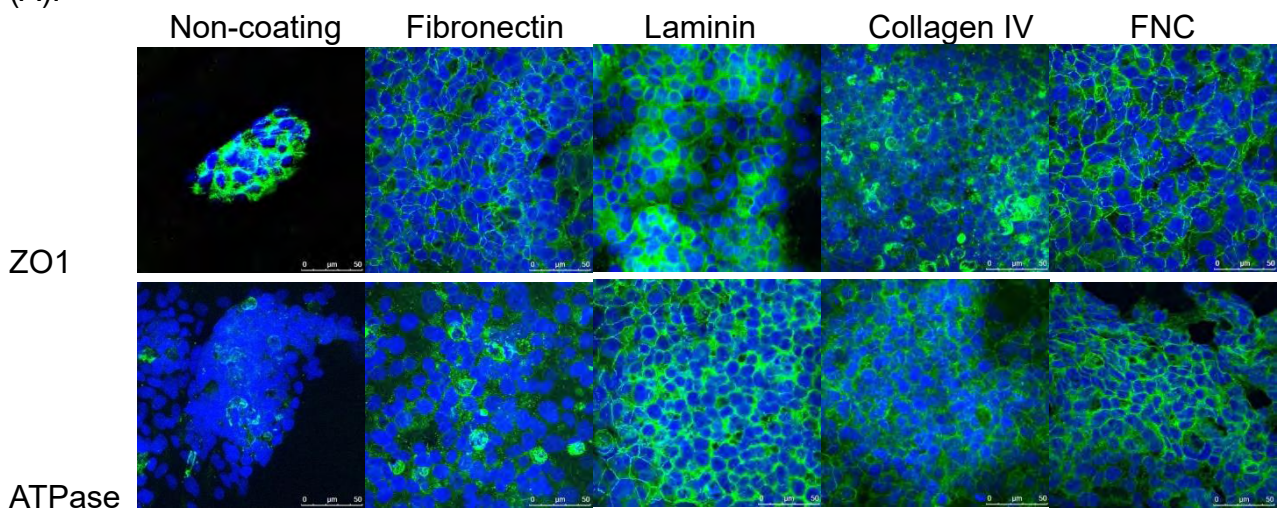
以 SEM 電顯觀察塗佈後魚鱗表面，可以看到塗佈前魚鱗表面呈現平行疏鬆的纖維狀排列，fibronectin、laminin、FNC® coating mix 塗佈後的魚鱗表面都較為緊緻。與細胞增生圖表(圖十五)對照，可以發現細胞貼附的數目與表面緊緻程度有關。然而細胞增生的速度則與表面塗佈的蛋白種類有關。



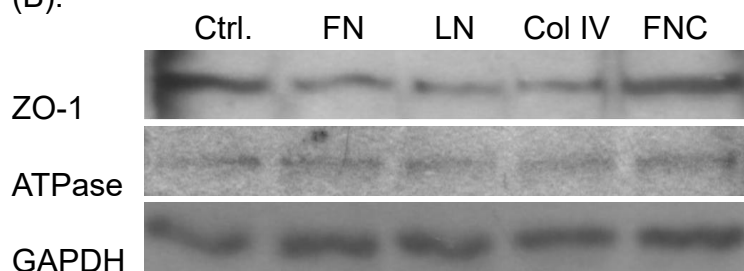
圖十一、將 B4G12 細胞繼代培養至塗布胞外基質蛋白後之魚鱗表面。以相位差顯微鏡觀察細胞適應性。另外以 SEM 電顯觀察表面塗佈後之魚鱗表面微結構。

以免疫螢光法(IF)觀察角膜內皮細胞分化標記的表現(圖十二 A)，可以觀察到無論細胞是否貼附，都可在細胞邊緣看到很強的 ZO-1 蛋白表現。而 ATPase 蛋白僅能在貼附較好的組別(laminin、Collagen IV、FNC)的細胞邊緣被觀察到。由於免疫螢光染色不適合定量分析，因此我們另外以定量 PCR 和免疫轉漬法(IB)觀察 ZO-1 和 ATPase 的表現(圖十二 B-C)。結果發現無論細胞是否貼附，ZO1 和 ATPase 的表現量皆無明顯差異。關於 IF 和 IB 在 ATPase 表現的結果差異，我們相信 ATPase 蛋白在 B4G12 細胞中持續表現，然而此蛋白需於貼附於材質表面後，才能定位到細胞膜表面與細胞間交界處。

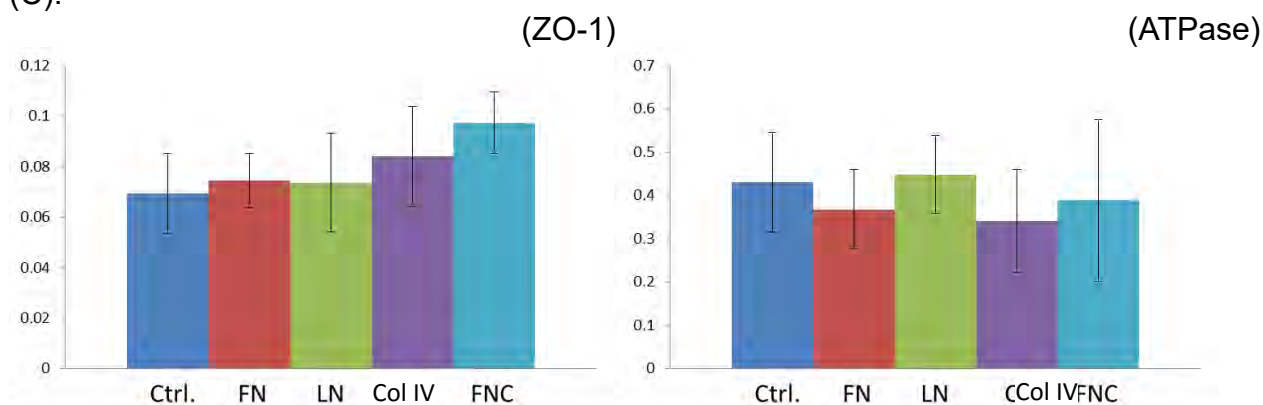
(A).



(B).



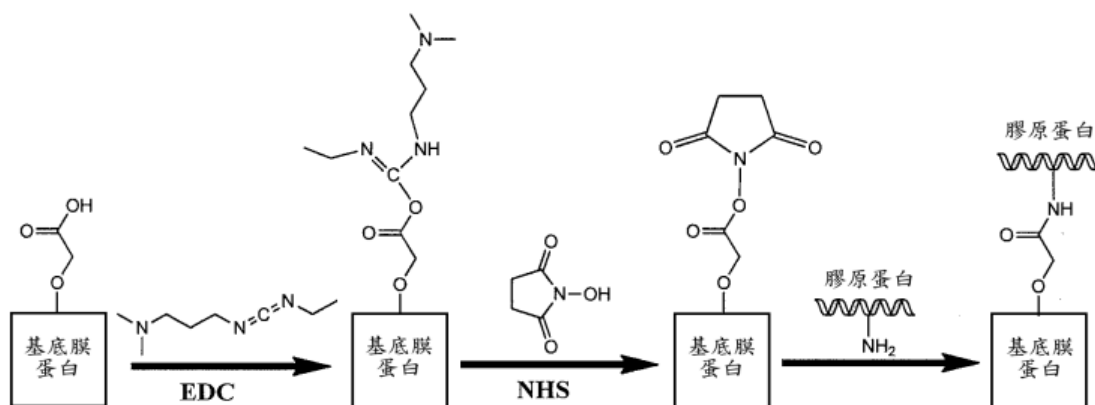
(C).



圖十二、將 B4G12 細胞繼代培養至塗佈胞外基質蛋白後之魚鱗表面，以免疫螢光法(A)、免疫轉漬法(B)、或定量 PCR(C)觀察角膜內皮細胞分化標記(ZO-1 和 ATPase)的表現。

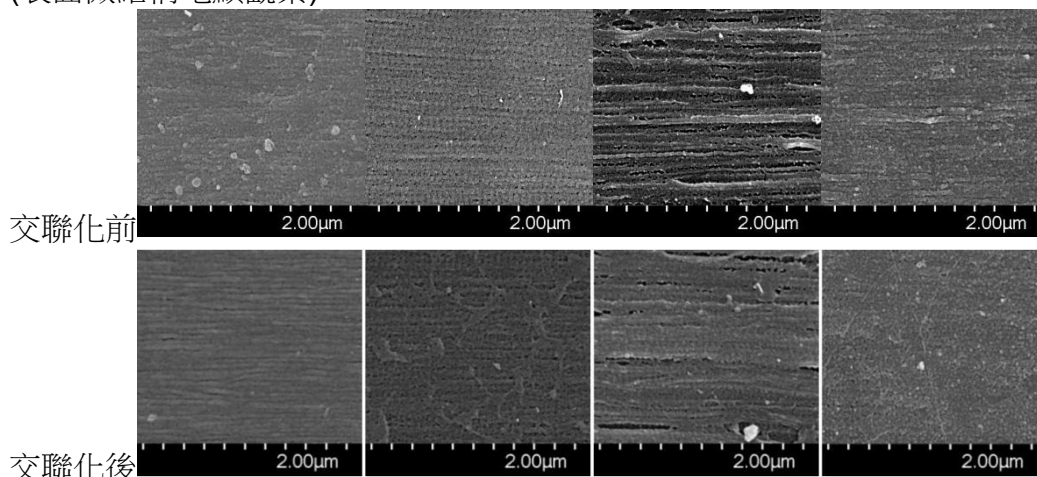
5、測試交聯化處理對細胞適應性的影響

為了防止塗佈於魚鱗表面之胞外基質蛋白剝離，我們接著以 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC)/N-hydroxysuccinimide (NHS)交聯化方法進行蛋白質肽鏈間的共價鍵連結修飾(圖十三)。如圖十四所示，從 SEM 電顯觀察表面微結構結果可見交聯化處理不會影響表面微結構，同時從細胞貼附測試結果可見交聯化處理也不會干擾表面塗佈協助細胞貼附的效果。

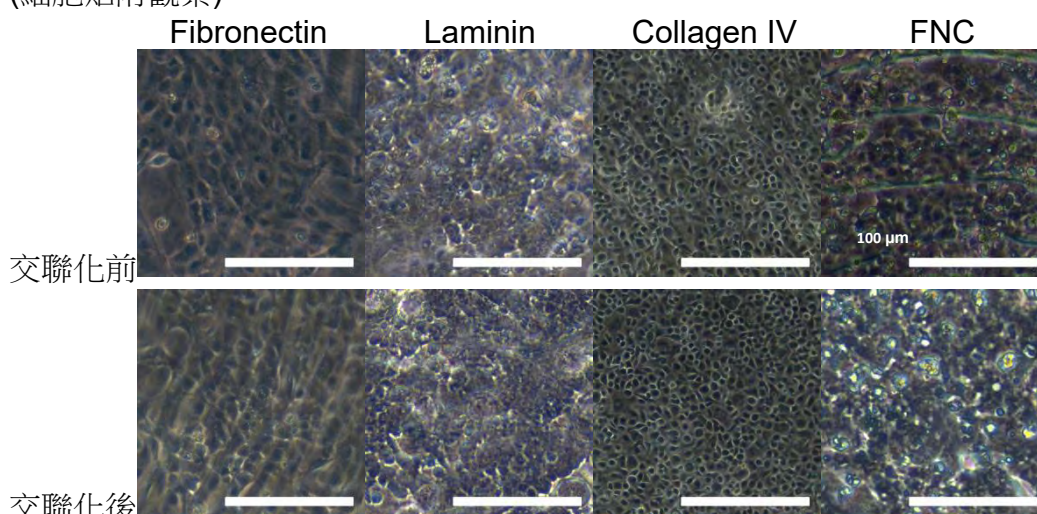


圖十三、將以交聯劑 EDC/NHS 建立魚鱗內膠原蛋白與基底膜蛋白間之共價連結原理流程示意圖。

(表面微結構電顯觀察)



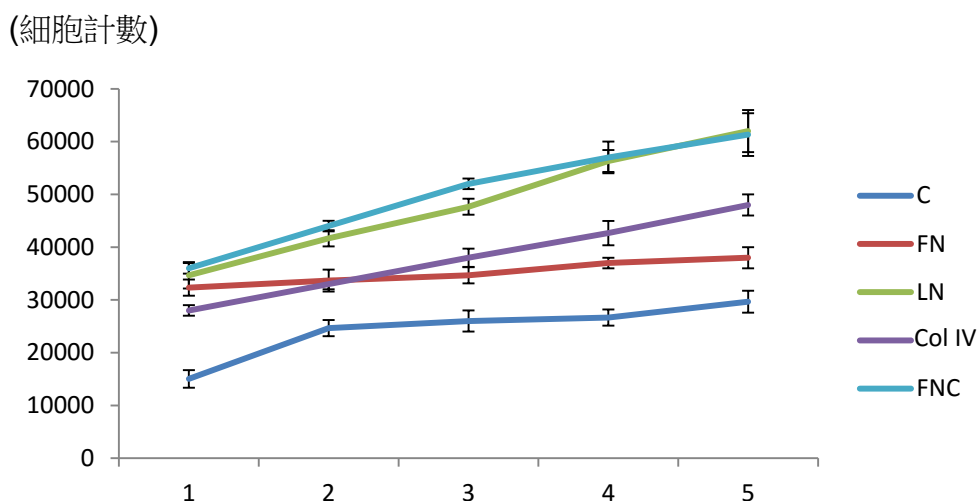
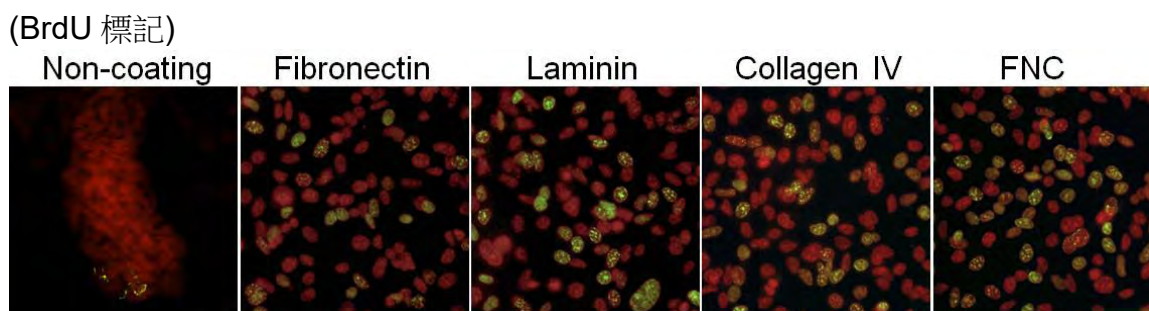
(細胞貼附觀察)



圖十四、測試交聯化處理對細胞適應性的影響。塗佈胞外基質蛋白用交聯劑處理後，以 SEM 電顯觀察表面微結構。並將 B4G12 細胞繼代培養至材質表面，再於培養 7 天後以相位差顯微鏡觀察細胞適應性。

6、比較表面處理對 B4G12 細胞增生的影響

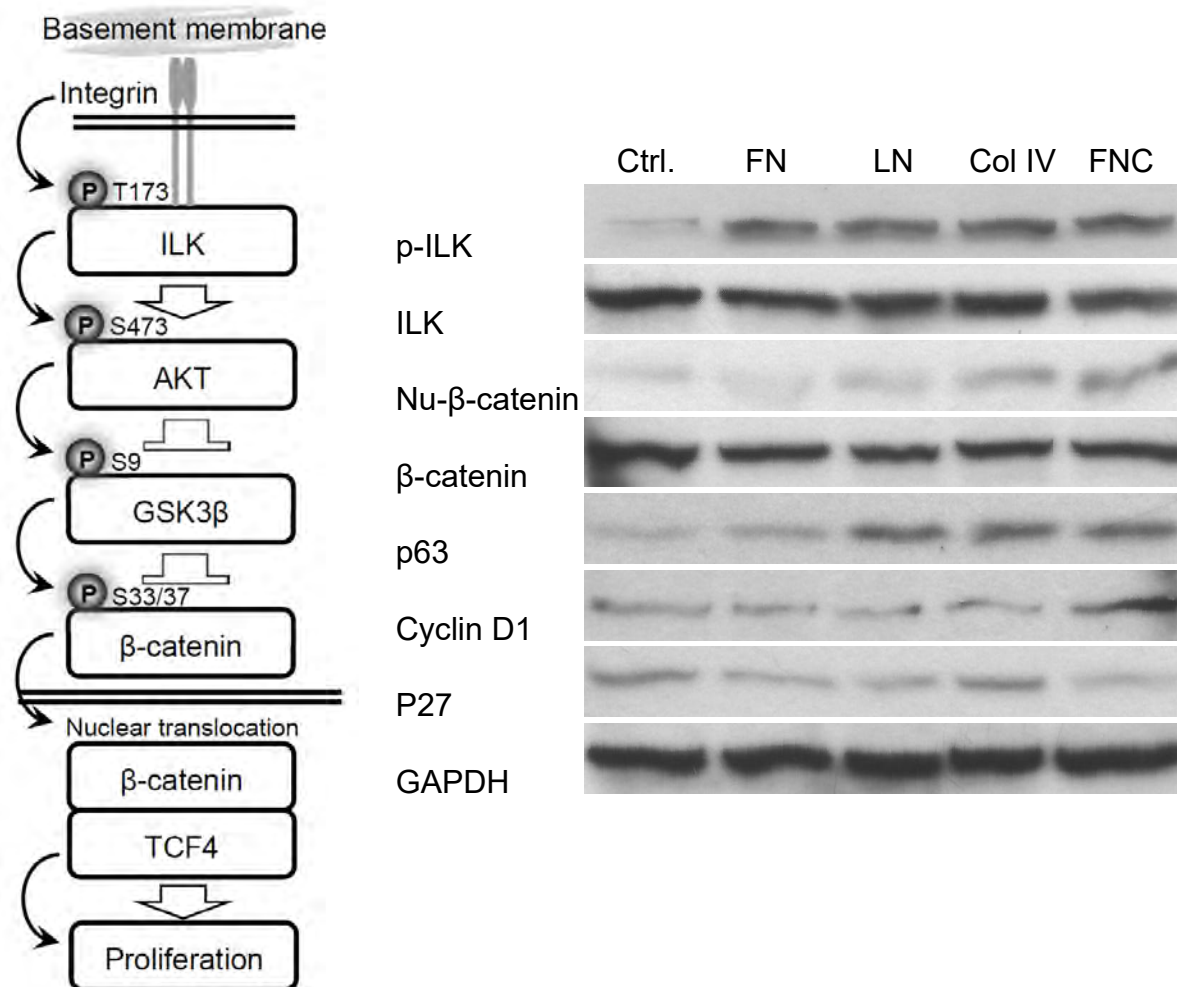
接著我們以 BrdU 標記法和細胞記數法，觀察表面塗佈對細胞增生的影響(圖十五)。我們將不同表面塗佈處理的細胞以 BrdU 標記 2.5 小時後，觀察 BrdU uptake 細胞的密度，結果可見 BrdU+細胞的密度在 laminin、Collagen IV、FNC 處理的組別中，顯著較未塗佈與 Fibronectin 處理的組高。我們在細胞記數測試結果中看到相同的結果，顯示表面塗佈 ECM 蛋白除了協助細胞貼附、亦能幫助細胞增生。



圖十五、以 BrdU 標記法和細胞計數法，觀察表面塗佈胞外基質蛋白對細胞增生的影響

7、比較表面處理對 B4G12 細胞 ILK/ β -catenin 路徑與細胞增生調控的影響

由於表面塗佈胞外基質蛋白提供了細胞黏附蛋白整合素(integrin)所需的 ligand，因此我們推論此時 integrin 訊息傳遞路徑很可能會受到影響。我們過去曾觀察過細胞培養載體的結構改變會經由影響 integrin 下游的 integrin-linked kinase (ILK)路徑改變 GSK3- β 的活性，進而調控 β -catenin 路徑與影響細胞增生。因此我們以免疫轉漬法觀察 ILK/ β -catenin 路徑相關因子的變化。從從圖十六結果可見表面塗佈後，培養於魚鱗表面之 B4G12 細胞 phospho-ILK(T173)的表現增加與 β -catenin的核轉移上升。同時，細胞增生調控轉錄因子 p63、和細胞週期調控蛋白 cyclinD1 的表現增加，與 CDK 抑制酵素 p27 的蛋白質表現減少，顯示 ILK/ β -catenin 途徑在表面塗佈的組別中被活化，並且影響了細胞增生調控因子的表現。



圖十六. 以免疫轉漬法分析表面處理對 B4G12 細胞 ILK/ β-catenin 途徑與細胞增生調控因子的影響。

8、比較表面塗佈處理對細胞基因表現的影響 (cDNA 微基因陣列結果)

為了要進一步了解是否有其他機制受表面塗佈影響，我們將培養於魚鱗表面的細胞萃取出 RNA 後，以微基因陣列(microarray)分析比較表面塗佈 FNC® coating mix 對基因表現的改變。從分析結果中我們找到了 116 種已知基因有兩倍以上的顯著增加(圖十七)。以 Gene Set Enrichment Analysis 網路資料庫(www.broadinstitute.org)分析比對後，從關聯性分析結果可得除了細胞外基質調控途徑 (ECM regulators)和整合素途徑(integrin pathway)外，我們篩選出了醣類代謝路徑亦可能也受到影響。

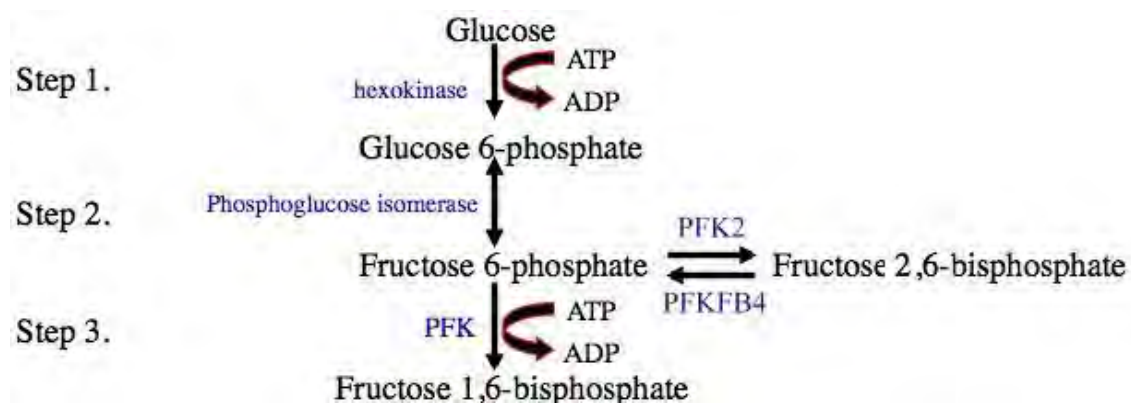
9、比較表面塗佈對 B4G12 細胞醣類代謝路徑的影響

從 cDNA 微基因陣列結果可以看到 PFKP 和 PFKPB4 這兩種醣類代謝調控關鍵酵素的表現顯著較高(圖十八)，因此我們進而以定量 PCR 和西方墨點法驗證，結果顯示 PFKP 的表现在表面塗佈的組別明顯較高(圖十九)。為了評估醣類代謝路徑是否會受表面塗佈影響，我們又以 MTT assay 觀察細胞代謝活性是否有差異。從圖二十結果可見相較於未塗佈胞外間質蛋白的組別，培養於塗佈後魚鱗表面的細胞有較高的代謝活性。然而 MTT 的結果和 PFKP 的表现變化並不完全一致，反而和細胞增生狀態較為接近。我們相信如要更精確的比較 PFKP 的酵素活性變化，需要另外進行酵素活性測試(PFK Activity Colorimetric assay)。

(c-DNA microarray)

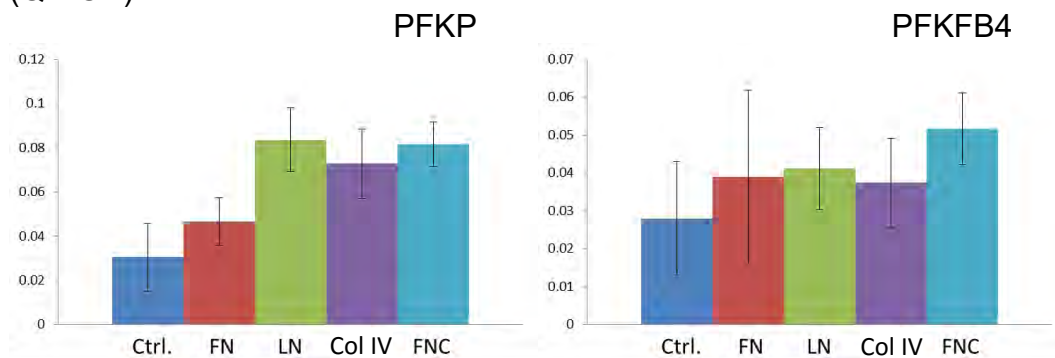
ΔCt		Fold change	Gene symbol	Gene Description
coat	non-coat			
11.933	10.693	2.36	GYS1	glycogen synthase 1
11.262	10.116	2.21	PFKP	phosphofructokinase, platelet
9.149	8.116	2.05	SLC25A10	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; dicarboxylate transporter), member 10
8.089	6.566	2.87	PFKFB4	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4

(Glycolysis pathway)

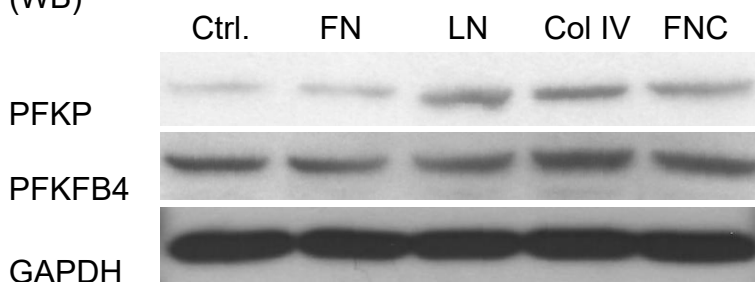


圖十八、c-DNA 微基因陣列篩選出的 PFKP 和 PFKFB4 基因在醣解路徑中扮演的角色。

(Q-PCR)

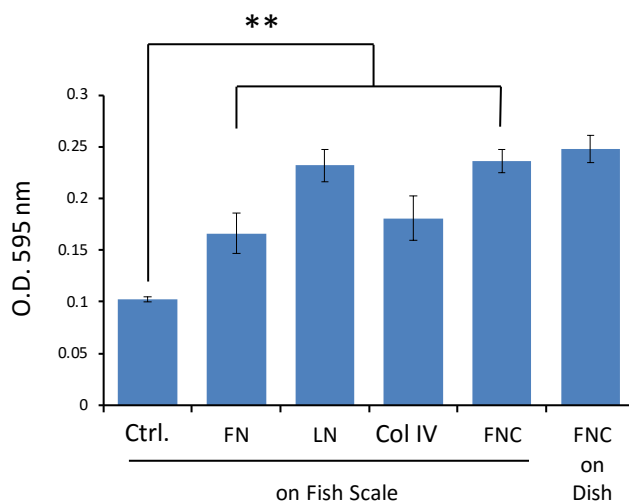


(WB)



圖十九、比較表面塗佈對 **B4G12** 細胞醣類代謝酵素表現的影響。

(MTT assay)



圖二十、比較表面塗佈對 **B4G12** 細胞代謝活性的影響。**B4G12** 細胞分別繼代培養到未經表面處理的魚鱗(Ctrl.)、經塗佈處理的魚鱗(FN, LN, Col IV, FNC)和經 FNC 塗佈處理的培養皿表面後，以 MTT assay 分析細胞代謝活性。

10、比較 cDNA 微基因陣列觀察到的其他重要基因

除了進行路徑關聯性分析，我們亦直接去比對 cDNA 微基因陣列分析結果中，116 種有顯著差異基因的功能。從圖 21 結果中可以看到 fibronectin (FN1)、laminin (LAMA4)、carbonic anhydrase 9 (CA9)、carbonic anhydrase 12 (CA12)等基因有顯著差異。近年研究指出 CA9 和 CA12 對於角膜內皮細胞的 water pump 功能扮演重要的角色(圖 22)，根據定量 PCR 和免疫轉漬法的實驗結果(圖 23)，我們也觀察到表面塗佈能明顯上調 CA12 的表現。我們同時可以看到 laminin 塗佈的組別，LAMA4 基因表現顯著較高，顯示其表現存在 auto-regulation 機制。

(c-DNA microarray)

ΔCt		Fold change	Gene symbol	Gene Description
coat	non-coat			
10.545	9.249	2.46	FN1	fibronectin 1
7.545	6.25	2.45	LAMA4	laminin, alpha 4
12.698	9.715	7.91	CA9	carbonic anhydrase IX
10.078	8.186	3.71	CA12	carbonic anhydrase XII

圖 21、c-DNA 微基因陣列篩選出的其他重要基因

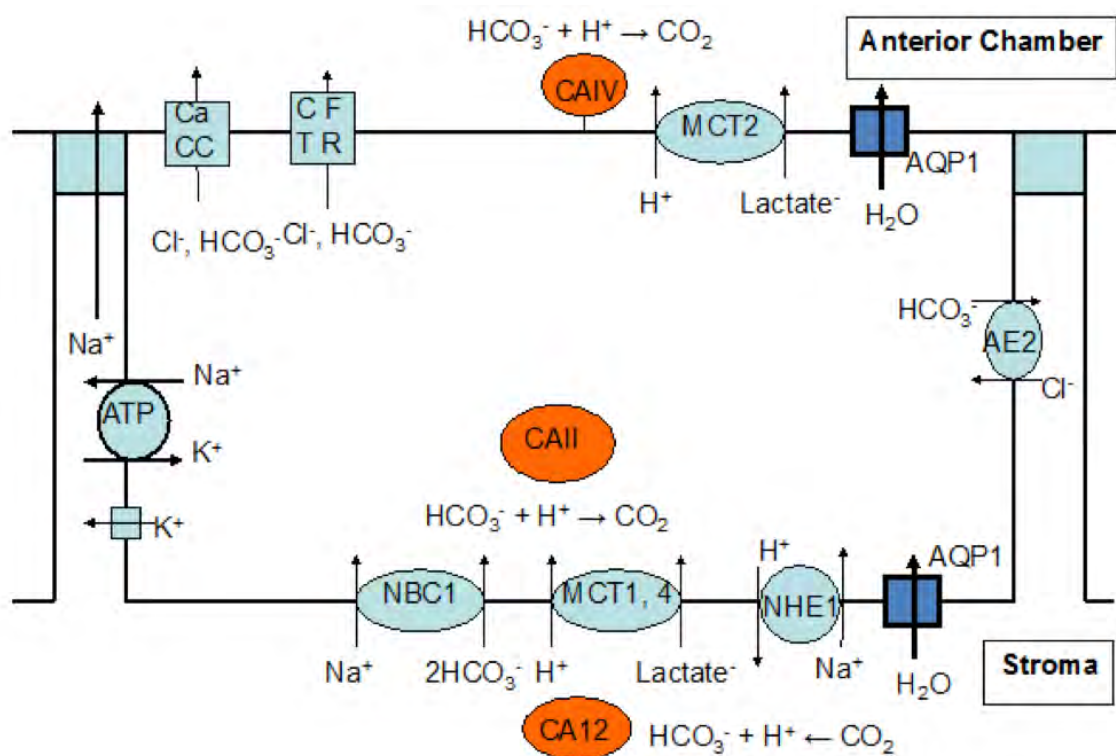


圖 22、CA12 在角膜內皮細胞水分運輸中扮演的角色。(圖片引用自 from Joseph A. Bonanno website)

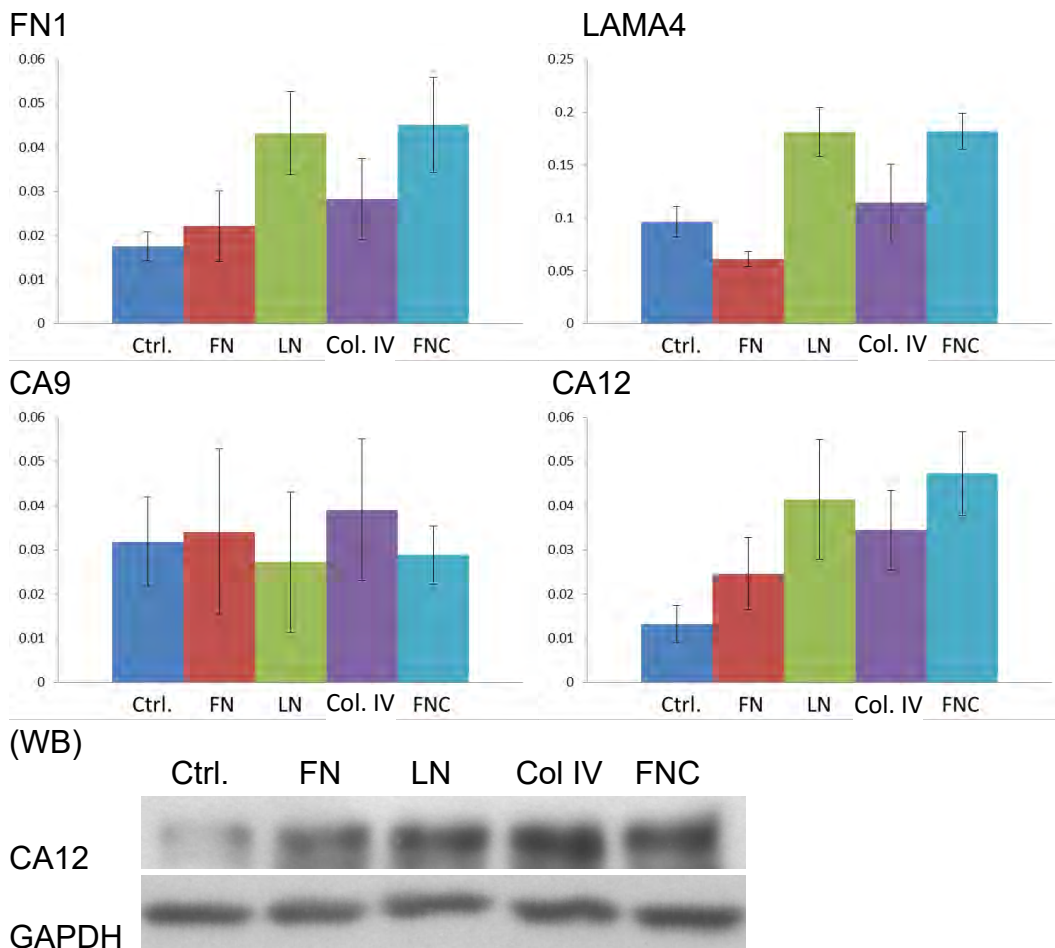


圖 23、以定量 PCR 和免疫轉漬法觀察 cDNA 微基因陣列篩選出的其他重要基因

11、測試 ILK 對醣類代謝酵素(PFKP)和調控水分輸送酵素(CA12)的影響

最後，為了瞭解表面塗佈對 PFKP 和 CA12 的影響是否與 ILK 路徑有關。我們以 siRNA 專一性地抑制 ILK 作用後，根據圖 24 結果可以觀察到 CA12 的表現顯著受到 ILK silence 影響，相較之下 PFKP 的表現沒有變化，顯示 CA12 可能受到 ILK 路徑調控，而 PFKP 不是。

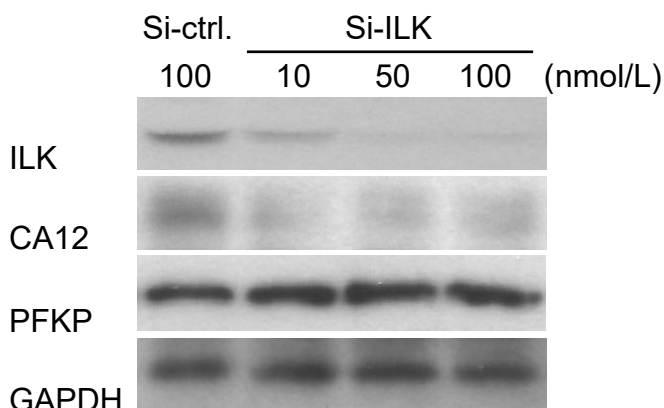


圖 24、將 B4G12 細胞繼代培養至 FNC 表面塗佈後的魚鱗表面。以 ILK 的 siRNA 抑制其表現後觀察 CA12 和 PFKP 的蛋白質表現。

(四)、結論與應用

細胞移植載體在細胞療法中扮演不可或缺的角色。移植載體除了能輔助手術操作，近年研究指出移植載體提供細胞生長微環境，進而調節細胞的生理生化反應。因此相關之研究應用為組織工程學門中非常關鍵的環節。

於本研究中我們證實了：

1. 經過加工處理後，魚鱗製品比甲殼素有更好的透光性，比明膠有更好的材質強度，同時有適當的生物降解性，因此適合用來做為手術植入的細胞載體。
2. 魚鱗表面塗佈胞外間質蛋白能有效幫助角膜內皮細胞之貼附與增生。
3. 以化學交聯法固定塗佈於魚鱗表面的胞外間質蛋白，不會影響角膜內皮細胞之貼附與增生。
4. 表面塗佈能促進integrin/ILK/ β -catenin途徑，同時能上調細胞增生調控轉錄因子p63與細胞週期調控因子cyclin D1，下調細胞週期抑制酵素p27。
5. 表面塗佈胞外間質蛋白能上調醣類代謝關鍵酵素(PFKP)表現，可推論此時B4G12細胞有較好的代謝活性。
6. 表面塗佈胞外間質蛋白誘導ILK途徑活化，進而參與水份輸送調控酵素(CA12)表現的調控。

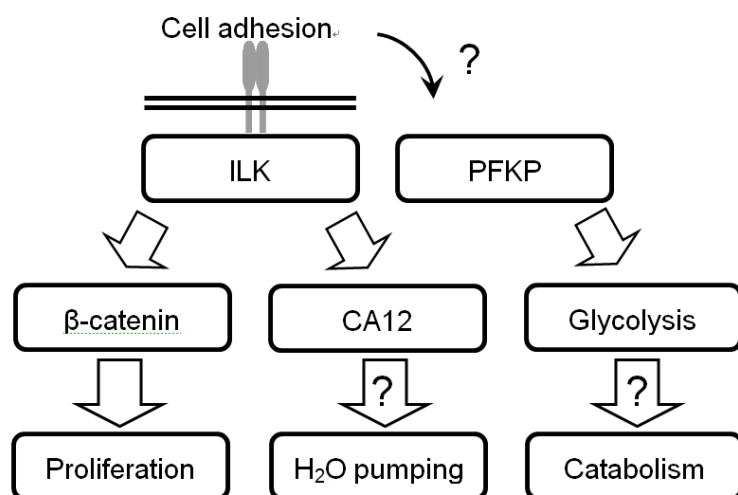


圖25、胞外間質蛋白表面塗佈對影響細胞貼附、細胞增生、水分輸送與能量代謝現象之可能訊息傳遞途徑示意圖

將本土物種台灣鯛的魚鱗用來作為生醫材料，是我國生醫產業近年來重要的成果之一，惟在此之前並沒有將魚鱗用作細胞移植載體之研究。本研究性質為發展組織工程技術，屬於

生物製品新功能開發。經由本次研究取得之正向結果，我們認為此材料值得進行後續開發。往後如能繼續完成動物模式之功能性驗證，此材料將有機會應用於臨床細胞療法(如c-DSAEK)。此外，根據本次研究成果，我們相信除了表面塗佈法，將來亦可開發其他影響ILK途徑的方式(例如表面改質增加魚鱗表面暴露之RGD domain)改良魚鱗的細胞貼附效果以作為細胞移植載體所用。

(五)、參考文獻

- Chen, J., Yan, C., Zhu, M., Yao, Q., Shao, C., Lu, W., Wang, J., Mo, X., Gu, P., Fu, Y. et al.** (2015). Electrospun nanofibrous SF/P(LLA-CL) membrane: a potential substratum for endothelial keratoplasty. *Int J Nanomedicine***10**, 3337-3350.
- Chou, C. H., Chen, Y. G., Lin, C. C., Lin, S. M., Yang, K. C. and Chang, S. H.** (2014). Bioabsorbable fish scale for the internal fixation of fracture: a preliminary study. *Tissue Eng Part A***20**, 2493-2502.
- Doillon, C. J., Watsky, M. A., Hakim, M., Wang, J., Munger, R., Laycock, N., Osborne, R. and Griffith, M.** (2003). A collagen-based scaffold for a tissue engineered human cornea: physical and physiological properties. *Int J Artif Organs***26**, 764-773.
- Geroski, D. H. and Edelhauser, H. F.** (1984). Quantitation of Na/K ATPase pump sites in the rabbit corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci***25**, 1056-1060.
- Honda, N., Mimura, T., Usui, T. and Amano, S.** (2009). Descemet stripping automated endothelial keratoplasty using cultured corneal endothelial cells in a rabbit model. *Arch Ophthalmol***127**, 1321-1326.
- Ikoma, T., Kobayashi, H., Tanaka, J., Walsh, D. and Mann, S.** (2003). Microstructure, mechanical, and biomimetic properties of fish scales from *Pagrus major*. *J Struct Biol***142**, 327-333.
- Iwamoto, T. and Smelser, G. K.** (1965). Electron Microscopy of the Human Corneal Endothelium with Reference to Transport Mechanisms. *Invest Ophthalmol***4**, 270-284.

- Joyce, N. C., Meklir, B. and Neufeld, A. H.** (1990). In vitro pharmacologic separation of corneal endothelial migration and spreading responses. *Invest Ophthalmol Vis Sci***31**, 1816-1826.
- Kaufman, H. E. and Katz, J. I.** (1977). Pathology of the corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci***16**, 265-268.
- Kreutziger, G. O.** (1976). Lateral membrane morphology and gap junction structure in rabbit corneal endothelium. *Exp Eye Res***23**, 285-293.
- Lu, P. L., Lai, J. Y., Ma, D. H. and Hsiue, G. H.** (2008). Carbodiimide cross-linked hyaluronic acid hydrogels as cell sheet delivery vehicles: characterization and interaction with corneal endothelial cells. *J Biomater Sci Polym Ed***19**, 1-18.
- Maurice, D. M.** (1972). The location of the fluid pump in the cornea. *J Physiol***221**, 43-54.
- Niu, G., Choi, J. S., Wang, Z., Skardal, A., Giegegack, M. and Soker, S.** (2014). Heparin-modified gelatin scaffolds for human corneal endothelial cell transplantation. *Biomaterials***35**, 4005-4014.
- Rafat, M., Li, F., Fagerholm, P., Lagali, N. S., Watsky, M. A., Munger, R., Matsuura, T. and Griffith, M.** (2008). PEG-stabilized carbodiimide crosslinked collagen-chitosan hydrogels for corneal tissue engineering. *Biomaterials***29**, 3960-3972.
- Ruberti, J. W. and Zieske, J. D.** (2008). Prelude to corneal tissue engineering - gaining control of collagen organization. *Prog Retin Eye Res***27**, 549-577.
- Salehi, S., Grunert, A. K., Bahners, T., Gutmann, J. S., Steuhl, K. P., Czugala, M., Singer, B. B. and Fuchsluger, T. A.** (2014). [New nanofibrous scaffold for corneal tissue engineering]. *Klin Monbl Augenheilkd***231**, 626-630.
- Sherrard, E. S.** (1976). The corneal endothelium in vivo: its response to mild trauma. *Exp Eye Res***22**, 347-357.
- Valtink, M., Gruschwitz, R., Funk, R. H. and Engelmann, K.** (2008). Two clonal cell lines of immortalized human corneal endothelial cells show either differentiated or precursor cell characteristics. *Cells Tissues Organs***187**, 286-294.

- van Essen, T. H., Lin, C. C., Hussain, A. K., Maas, S., Lai, H. J., Linnartz, H., van den Berg, T. J., Salvatori, D. C., Luyten, G. P. and Jager, M. J.** (2013). A fish scale-derived collagen matrix as artificial cornea in rats: properties and potential. *Invest Ophthalmol Vis Sci***54**, 3224-3233.
- Wang, T. J., Wang, I. J., Chen, S., Chen, Y. H. and Young, T. H.** (2012). The phenotypic response of bovine corneal endothelial cells on chitosan/polycaprolactone blends. *Colloids Surf B Biointerfaces***90**, 236-243.

【評語】 090004

本計畫用台灣鯛魚鱗，以含基底膜蛋白：FNC，突於表面，改用 EDC/NHS 交聯劑固定，以觀察角膜內細胞株(BAF12)細胞貼附；觀察增生能力；觀察並用基因微陣列探討，結果顯示 FNC 塗佈處理，能改善結果並用 MTT 改改善其細胞凋亡，如能分析 FNC；主成份調控其作用，則成果更佳。