

2023 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 080003

參展科別 生物化學

作品名稱 新型奈米氧化鐵標定之間葉幹細胞用於治療腎臟疾病及磁振造影的應用

得獎獎項

就讀學校 臺北市私立復興實驗高級中學

指導教師 馬瑪宣、蕭仲凱

作者姓名 郭冠承

關鍵詞 幹細胞治療、奈米氧化鐵造影劑、細胞治療

作者簡介



我出生醫生家庭，自幼耳濡目染下，從小就對自然和生物方面很感興趣，也希望當上一位醫生。在上國中後，便努力對生物方面進行學習，國中也有參加科展，也非常喜歡做實驗的感覺。國中在科學探究競賽-國中組入選以及最佳網路人氣獎。上了高中，我考上了清大生物人才培訓，現在的我期望自己能夠成為一個更優秀的人。

摘要

在幹細胞治療中，並無法去偵測打入之幹細胞在人體內的位置及存在狀態。本研究創新在於(1)藉由使用新型奈米氧化鐵(IOP, iron oxide nanoparticles)來標定間葉幹細胞(MSCs, mesenchymal stem cells)，並能順利在磁振造影下成像 (2)同時確認 IOP 其安全性及效能。在實驗中先以 X 光繞射確認 IOP 粒徑平均 10.4 nm，磁滯曲線證實不會產生磁性，CCK-8 細胞測試中證實高濃度 IOP(400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)對間葉幹細胞存活影響小於 17%，接著以普魯士藍染色觀察到 IOP 濃度愈高被幹細胞吸收愈多，平均每個細胞攝入 2.79 顆粒增加至 3.47 顆粒，並同時在磁振造影成像證實。最後高濃度 IOP (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)會造成 PGE2 顯著性的下降 55%，證實 IOP 可影響免疫調節但其角色仍待進一步研究。

Abstract

In stem cell therapy, it is difficult to detect the location and existence of the injected stem cells in the human body. The innovation of this study lies in (1) the use of a novel iron oxide nanoparticles (IOP) to demarcate mesenchymal stem cells (MSCs), which can be successfully imaged under magnetic resonance imaging (2) confirm the safety and performance of IOP. In our experiment, X-ray diffraction was used to confirm that the average particle size of IOP was 10.4 nm, and the magnetic hysteresis curve was used to confirm it did not produce magnetism. In the CCK-8 assay, it was confirmed that high concentration of IOP (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on the survival of mesenchymal stem cells was less than 17%. Then, it was observed by Prussian blue staining that the higher the concentration of IOP, the more absorbed by the mesenchymal stem cells. The average uptake of each cell increased from 2.79 particles to 3.47 particles, which was confirmed by MRI imaging. Finally, high concentrations of IOP (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) can cause a significant 55% decrease in PGE2, confirming that IOP can affect immune regulation, but its role remains to be further studied.

壹、前言

一、研究動機

幹細胞療法是再生醫學研究中一個快速發展的領域。使用幹細胞治療在理論上有可能治療某些腎臟疾病。而能夠監測體內移植細胞的命運對於開發成功的細胞療法至關重要。此外，理想的細胞追蹤需要一種有效、無創、無毒的方法。磁共振成像(MRI) 提供了極好的空間分辨率和標記細胞的重複無創成像，並且一直是細胞成像最有吸引力的方式。MRI 成像細胞需要在內部用造影劑進行標記，超順磁性氧化鐵(SPIO)奈米顆粒和釷基螯合物為主要兩種造影劑。SPIO 是市售惰性的、能夠最終代謝的生物相容性奈米材料，並且已經 FDA 批准用於人類，但尚未用於細胞內標記。為了實現高效 MRI 對 SPIO 奈米顆粒的充分細胞內攝取，大多數研究使用轉染劑，然而這些試劑大多數是有毒性的。最近一項研究顯示一種新型奈米氧化鐵，可以做為磁振造影(MRI)的造影劑，此外內化到細胞內後，奈米氧化鐵可以轉移到溶酶體中降解，游離鐵可以釋放到細胞質中。眾所周知，鐵在細胞週期進程、細胞增殖和凋亡中起重要作用。因此本實驗使用新型奈米氧化鐵來做為追蹤幹細胞的造影劑，研究其在於間葉幹細胞的吸收、毒性以及 MRI 造影成像的效果，和細胞治療的效果。

二、研究背景

(一)醫學臨床使用的造影方式

目前台灣常用於醫療影像醫學中臨床使用的造影方式有磁振造影(MRI, Magnetic Resonance Imaging)、電腦斷層 (CT ,Computed Tomography)、X 光 (x-ray imaging)、超音波 (Ultrasonography) 等各種不同的方式。各項技術皆有其瓶頸存在，電腦斷層與 X 光皆由輻射與對照物產生影像，而超音波非常考驗影像操作者的經驗以及細心程度。MRI 影像藉由磁場的改變給予被照物通一磁場使其磁場排序後再給予激發磁場再經由操作台軟體收訊號後處理產生成像，是一種安全性高的成像方式，配合所使用的造影對比劑可以對病人的病灶進行追蹤以利病人病情的診斷幫助病人達到更好的醫療成效。(參考資料 1, 2)

(二)奈米氧化鐵(IOP)

奈米氧化鐵注射液(IOP Injection)編號 MPB-1523，由巨生醫股份有限公司(MegaPro Biomedical Co., Ltd)所研發，是一種與可溶於水的甲氧基-聚乙二醇-矽烷(m-PEG-silane)化學結合的超順磁氧化鐵奈米粒子(SPIO)。奈米氧化鐵是一種無菌、水性、膠體之溶液，含有 20 mg/mL 元素鐵，粒徑範圍為 45-65 nm。該製劑是等滲的，滲透壓為 260-340 mOsm/L，pH 範

圍為 5.5 至 7.5 (表 1)。藉由巨生醫的晶型調控及表面修飾技術，MPB-1523 具有高核磁鬆弛性及高效率巨噬細胞吞噬能力，適合應用組織和器官的顯影。(參考資料 3)

表 1. IOP 注射液之穩定數據 批號: MPB-1523

項目	驗收標準	IOP 注射液 (批號: MPB-1523)	
		條件: 5±3 °C	
		測試間隔, 月	
		0	12
外觀	深棕至黑色溶液	確認	確認
鑑別	對應於參考值	確認	確認
化驗	20.0 ± 2.0 mg/ml	20.6 mg/mL	20.2 mg/mL
顆粒大小	平均粒徑: 65 ± 20 nm; (PDI < 0.3)	60 nm; PDI=0.2	61 nm; PDI=0.2
界達電位	0~-20 mV	-2 mV	-2 mV
細菌內毒素	NMT 6 EU/mL	< 6 EU/mL	< 6 EU/mL
無菌狀態	無菌	無菌	無菌
酸鹼值(pH)	5.5-7.5	6.3	5.7
雜質	個別雜質: < 0.5% 總和雜質: < 3.0%	個別雜質: ND 總和雜質: ND	rrt 1.00: 0.4% rrt 1.20: 0.4% rrt 1.24: 0.4% 總和雜質: 1.3%

rrt, 相對保留時間

(三)間葉幹細胞

幹細胞 (Stem Cells) 來自胚胎、骨髓、臍帶血及周邊血液，是具備獨立分化能力的細胞，可分裂成另一個與本身完全相同的細胞，或是分化成多種特定的細胞，其幹細胞在人體上負責組織及器官的細胞更新、受傷修復等重要事件。間葉幹細胞主要存在於骨髓，能夠分化成源自胚胎時期中胚層的各種組織細胞，如脂肪細胞、成骨細胞及軟骨細胞，進而形成脂肪、硬骨、及軟骨等。因為其良好的增殖及多重分化能力，使得間葉幹細胞成為近年來熱門研究之一。除了取代與修復受損細胞與組織，間葉幹細胞也會表現一些細胞激素(如:TGF-β, IL-10, IDO, PGE2)與免疫細胞作用，因此能調控免疫反應，抑制發炎反應並增進治療的效果。(參考資料 4, 5)

(四)幹細胞治療

幹細胞醫療技術的臨床應用始於 1968 年，當年完成了世界上第一例骨髓移植術，其有效成分是造血幹細胞。造血幹細胞移植此後被大量用於治療某些惡性血液病和腫瘤，而造血幹細胞的來源逐漸從骨髓中抽取，之後更進一步變成臍帶血。現在全球每年都有進行約進行 6 萬例骨髓移植術，其中使用自體和同種異體造血幹細胞完成骨髓移植術的患者人數分別為

近 3.5 萬和 2.5 萬例。截止 2014 年，全球進行了接近 4 萬例的臍血移植術。除骨髓移植、臍血移植之外，其它來源的幹細胞產品正逐漸步入臨床應用階段，許多以前臨床面臨的醫療挑戰也漸漸的有新的方式可以做進一步的治療，提高病人的醫療品質。(參考資料 6)

貳、研究過程與方法

一、實驗流程

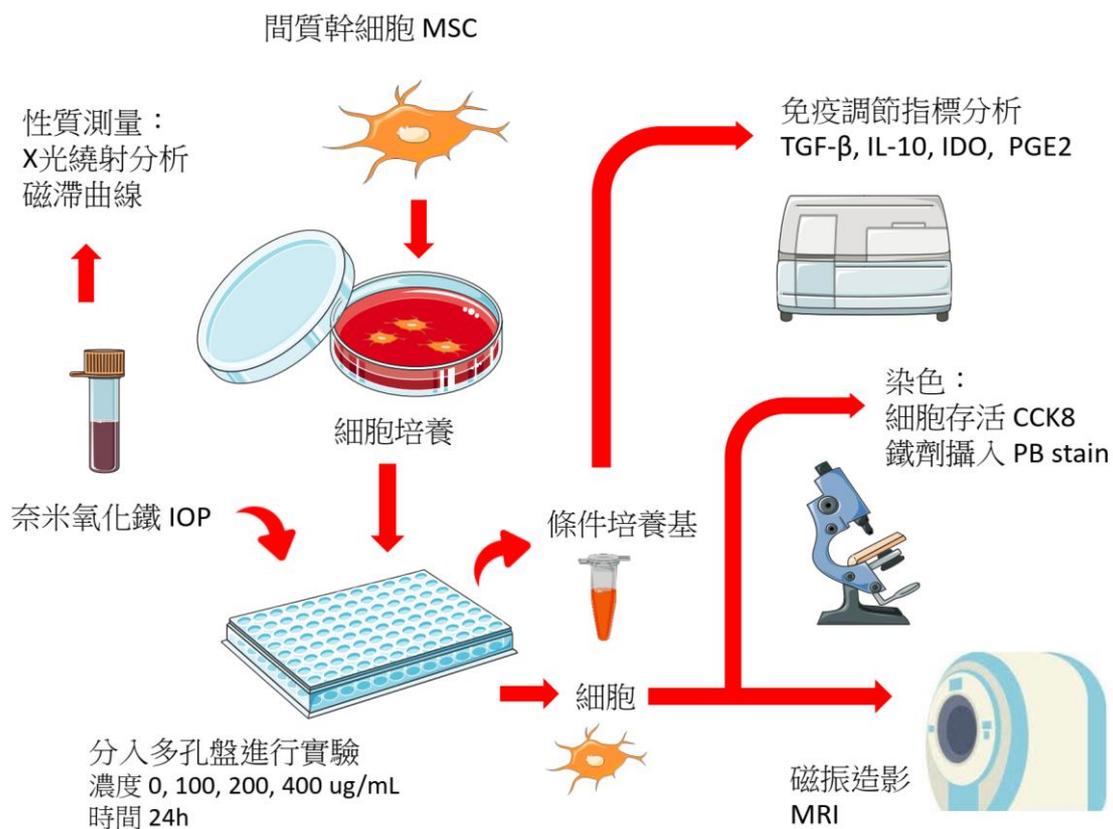


圖 1. 實驗流程圖

二、研究設備及器材

1. 實驗試劑與材料

細胞定量套組(CCK-8 kit)、酵素結合免疫吸附分析套組(BT lab ELISA kit)、Trypsin、HEPES、NaHCO₃、Fetal Bovine Serum (FBS)、抗生素 P/S、milli-Q 水(超純水)、血清瓶、PSB 溶液、奈米氧化鐵(IOP)、Prussian blue 粉末、4%paraformaldehyd、DMSO、PCR tube、MRI 試架、10 公分細胞培養盤、96 孔黑盤、50ml 離心管、50ml 試管 10 ml 試管、5ml 試管、微量試管 1ml、微量試管 200ul、微量試管 100ul、微量試管 10ul、拭鏡紙、75% ETOH (酒精)。

2. 實驗儀器

細胞培養級抽氣櫃、高速離心機、螢光顯微鏡、X 光繞射分析儀、磁振造影 MRI (1.5 Tesla Magnetic Resonance Imaging system)、微量盤分析儀。

三、X 光繞射分析

1.原理: X 光繞射技術是常應用於分析晶體結構的方法，利用射入晶體時在特定角度產生的繞射波圖譜能夠解析晶體。透過資料庫比對與快速發展的電腦運算技術程式分析，研究者可以精確地獲得細部的晶體參數，了解材料基礎性質與物性機制。一張繞射譜圖需能提供精確的繞射峰位置、半高寬與正確的繞射峰相對強度比，如圖所示。由此三個參數便可獲得晶體的晶形、晶格常數、鍵長、鍵角、原子熱運動之平均振幅、粒徑大小與所受到的應變等資訊。

(參考資料 7)

2.操作步驟:

- (1) 將 IOP 樣品放置於載物台上(圖 2)。
- (2) 調整 X 光以不同的角度入射(圖 2)。
- (3) 得出樣品 X 光射線圖譜與資料庫比對，並計算分析樣品粒徑(圖 3)。

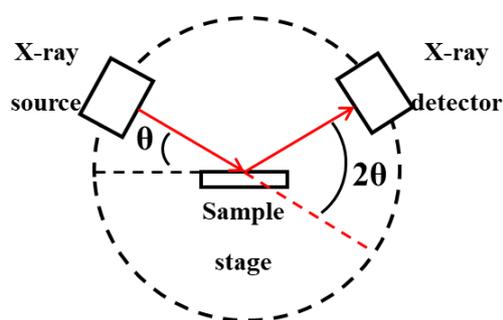


圖 2. X 光繞射儀基本架設圖

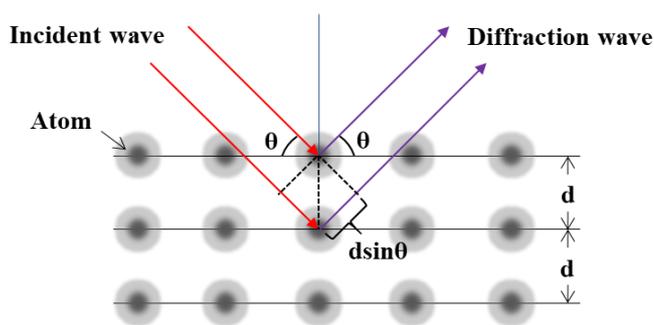


圖 3. X 光繞射原理

三、磁滯曲線

利用零場降溫(zero field cooled, ZFC)至 5K 後，固定溫度之下外加磁場量測磁滯曲線，以分析奈米氧化鐵的磁性。

四、細胞培養

(一)、細胞培養

1. 大鼠間葉幹細胞(rMSC-RFP)取自台北慈濟醫院影像醫學部蕭仲凱教授實驗室。幹細胞(rMSC)有轉染紅色螢光蛋白(RFP)，這個蛋白的優勢是可以讓細胞本身就會表現紅螢光因此當間質幹細胞如果有分化成其餘的細胞形態的時候可以從檢體上分辨出這些細胞是否是從給予治療的間質幹細胞分化而來。

2. 培養條件:

DMEM -high glucose : powder *1 (For 1L)

HEPES : 2.6g/L

NaHCO₃: 2.38g/L

Fetal Bovine Serum (FBS) : 100ml (final 10%)

P/S : 10ml

Glutamax : 10ml

Solution : milli-Q 水 (超純水)

3. DMEM-H 培養液步驟:

(1)實驗用血清瓶使用高溫高壓機滅菌 50 分鐘後取出空瓶所緊瓶蓋放入 4°C 冰箱冷卻,冷卻後的瓶子連同無菌過濾杯一同放入細胞操作櫃中照射 UV 40 分鐘再次殺菌。

(2)取約 750 ml 的二次過濾水(超純水)後倒入 DMEM-H 粉包並加入 HEPES :2.6g、NaHCO₃: 2.38g 後使用酸鹼值讀機器調整培養液數值直到數值呈現約 7.2。(圖 4)

(3)將回溫後的小牛血清(Fetal bovine Serum :FBS) 100ml 以及抗生素 P/S 10ml 和 Glutamax 10ml 加入培養液並補純水直至培養基總量為 1000ml 並且使用無菌過濾杯過濾後裝入已經滅過後的血清瓶中。(圖 5)

(4)從配好的培養基中取約 5ml 至 3 公分培養盤中放入 37°C, 5% CO₂ 培養箱做培養測試，三天後培養基仍然乾淨即可使用，調配好的培養基需要放 4°C 冰箱保存。

(5)rMSC-RFP 使用 10 公分培養盤(10 公分培養盤細胞數量極限為:1*10⁷)並在培養盤中加入約 10ml 的 DMEM-H 培養基以保持細胞活性健康，並放在條件設定為 37°C 以及 5% CO₂ 環境的培養箱生長。(圖 6)



圖 4. 酸鹼計讀器



圖 5. 配好的 DMEM-H

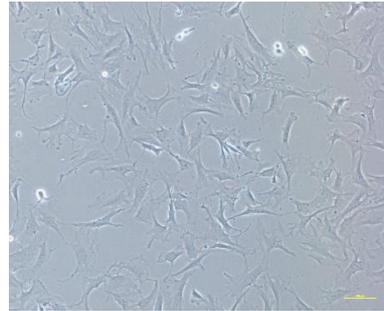


圖 6. rMSC-RPF 細胞形態(scale bar: 100 μm)

(二)、細胞繼代

當觀察細胞約達到約 10 公分滿的 80%時就會進行細胞繼代，先將細胞盤中原本的培養基吸乾淨後,用 1 倍的緩衝液 PBS(Phosphate buffered saline)清洗一次把培養基洗乾淨(這個步驟可以確保在下一個步驟中加入的胰蛋白酶 (Trypsin)不會因為跟殘餘的培養基作用導致反應不佳)，然後加入 Trypsin 約 1ml 進細胞盤中並放回原本的細胞培養箱中等待反應約 2 分鐘，之後拿出細胞盤並輕輕拍打培養盤邊緣後放於顯微鏡下觀察反應是否完成(如果反應未完成可以再放回培養箱中等,或者注意是否是清洗不完全或細胞已經產生變質)。

再來取 9ml 的 DMEM-H 培養基跟細胞盤中的 Trypsin 混合後裝入 50ml 試管中離心，離心機設定為: 轉速 1500 RPM、溫度:4 度、時間:5 分鐘，之後把試管中的上清液吸除後再加入 1ml 的 DMEM-H 打散細胞並計數試管中細胞數，取需要的細胞數量到新的 10 公分細胞培養盤並加入 10ml 的培養液要晃使細胞均勻分散在盤中。

(三)、細胞計數

細胞計數有專用的細胞計數用載玻片，這個玻片上有刻上 9 宮格標計。將細胞與 trypan blue 染計做混合後滴上玻片計數範圍內細胞再套用到計數公式就可以回推估計代步驟中離心後試管內的細胞數量。

- 1.取 10 ul 細胞懸浮液與 90 ul trypan blue 混合均勻。
- 2.取少許混合液(10ul)滴在蓋上蓋玻片的計數盤中，從上方凹槽加入，在適當的視野下的倒立顯微鏡下觀察看細胞數量，活細胞不染色呈現頭明白色，已經死亡的細胞則為藍色。
- 3.計數四個大方格之細胞總數，再除 4，乘以稀釋倍數，最後乘以 10000，即為每 ml 中細胞懸浮液之細胞數。

五、免疫螢光染色

1. 將細胞培養基吸去，PBS 清洗三次。
2. 加入對應抗體(CD29, CD45, CD90)，稀釋濃度 1:500，避光作用一小時。

3. PBS 清洗三次
4. 加入螢光標定的二集抗體，稀釋濃度 1:1000，避光作用一小時。
5. PBS 清洗三次
6. 以含螢光保護劑的封片膠進行封片以降低螢光衰退
7. 螢光顯微鏡拍照



圖 7. 正立式螢光顯微鏡

六、添加奈米氧化鐵(IOP)

奈米氧化鐵(IOP)取自於巨生醫股份有限公司(MegaPro Biomedical Co., Ltd)編號 MPB-1523，鐵劑原液濃度為 19.7mg/mL (圖 8)。細胞實驗中將鐵劑以培養基稀釋，使用最終鐵劑濃度分別為 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$ (圖 9)，培養時間為 24 小時。



圖 8. IOP 原液

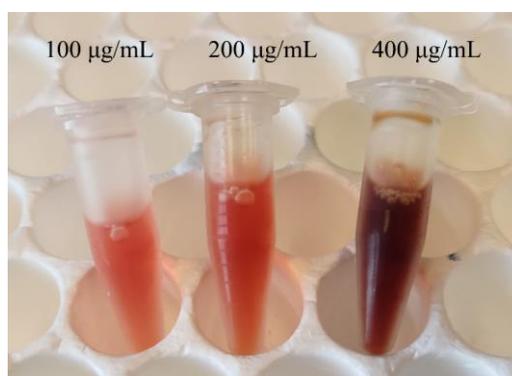


圖 9. IOP 不同濃度稀釋液

七、磁振造影(MRI)

細胞團塊收集：先將細胞盤中原本的培養基用細胞操作櫃中的自動吸取試管把舊的培養基吸乾淨後，用 1 倍的緩衝液 PBS(Phosphate buffered saline)清洗一次把培養基洗乾淨，然後加入胰蛋白酶(trypsin)約 1ml 進細胞盤中並放回原本的細胞培養箱(Incubator)中等待反應約 2 分鐘，之後拿出細胞盤並輕輕拍打培養盤邊緣後放於顯微鏡下觀察。再來取 9ml 的 DMEM-H 培養基跟細胞盤中的胰蛋白酶 (trypsin)混合後裝入 50ml 試管中離心，離心機的設定為：轉速 1500 RPM、溫度:4 度、時間:5 分鐘，之後把試管中的上清液吸除後再加入 250ul 的 PBS 先打

散細胞後將 PBS 全部收集起來滴入 PCR 試管中再用離心機離心一次，這次離心機條件設定為 1000 RPM、溫度:4 度、時間:10 分鐘。(不使用過高轉速的原因是因為轉速越高會導致細胞在試管壁會因為離心力的關係導致整體斜面拉長，且有可能導致細胞破裂受損)

核磁共振成像的「核」指的是氫原子核，因為人體大約 70%是由水組成的，MRI 即依賴水中氫原子。當把物體放置在磁場中，藉由主磁場用適當的電磁波，以改變氫原子的旋轉排列方向，然後再加入激發電磁波使之我們選定的範圍共振，然後經由電腦軟體分析被掃描物品釋放的電磁波由於不同的組織會產生不同的電磁波訊號，就可以得知構成這一物體的原子核的位置和種類，繪製成物體內部的精確立體圖像。因此在樣品上機前壓克力試架需要裝滿水並且注意裡面不可以有微小氣泡不然會影響影像品質。

MRI 參數：

T1 image :Matrix size: 256*180, FOV:100*140, TR (ms) = 700TE (ms) = 20Thickness (mm) = 1.5 ,Flip angle = 90,NEX =3

T2 image :Matrix size: 256*180, FOV:100*140, TR (ms) = 1300TE (ms) = 266 Thickness (mm) = 1.5 ,Flip angle = 90,NEX =2



圖 10. MRI 儀器

八、普魯士藍染色(PB-Stain)

1.原理：普魯士藍染色法,簡稱 PB stain 所用的原理用於鑑別組織中的非血紅素鐵，例如鐵蛋白和含鐵血黃素，該程序不會染色與形成血紅素（例如血紅蛋白和肌紅蛋白）的卟啉結合的鐵。染色劑是一種重要的組織化學染色劑，可以提供除了目視以及影像之外的另一種證明手段。

2.普魯士藍試劑溶液(5%)配製：超純水 20ml 加入 2g 的普魯士藍粉末，這樣濃度是 10%。然後將混好的溶液跟 1 倍的 HCL 做 1 比 1 等比體積稀釋，這樣最終的濃度就是 5%的普魯士藍試劑溶液。

3.操作步驟：

把細胞盤中已經加入 IOP 後的細胞盤先從培養箱中取出，並將原本的培養液體吸取乾淨之後用 1X 的緩衝溶液 PBS 清洗細胞盤將殘餘的藥劑以及培養液清除，然後使用 4% paraformaldehyde 固定細胞 15 分鐘，最後將 paraformaldehyde 清除後加入普魯士藍染劑呈色 5 分鐘。等呈色時間結束後就可以拿到顯微鏡下透過白光視野觀察結果。

九、DAPI 細胞核染色

1.原理：4',6-二脒基-2-苯基吲哚（4',6-diamidino-2-phenylindole）簡稱 DAPI，是一種能夠與 DNA 強力結合的螢光染料，可以通過細胞膜染色細胞核內的 DNA，再以螢光顯微鏡觀測，被用來作為標定與觀察細胞核位置的染色方式。

2.操作步驟：

- (1)將 DAPI 染色原液稀釋成 300nM
- (2)PBS 清洗細胞後吸乾，加入 300nM DAPI 染色
- (3)避光作用 3 分鐘
- (4)PBS 清洗 3 次
- (5)螢光顯微鏡觀察(Excitation/Emission 358/461nm)

十、CCK-8 Assay

1.原理：CCK8 Assay 全名 Cell Counting Kit 8 Assay，是一種簡單且經濟的細胞存活測試。淡黃色之 WST8 (Water Soluble Tetrazolium 8)水溶液，在受到活細胞內脫氫酶的一連串氧化還原反應後，會被還原為橘色水溶性之甲臍(formazan)產物。可以藉由偵測甲臍之吸光值(波長 450 nm)大小，來統計活細胞增殖多寡，進而分析細胞的存活比例。

2. 操作步驟：

- (1)將 100 μ L 細胞懸浮液培養於 96 孔盤中，再放進細胞培養箱中培養 24 小時(37°C,5% CO₂)。
- (2)移除原細胞培養之上清液後，於每個孔洞添加含有 10 μ L CCK8 的細胞培養液 100 μ L (將 CCK8 以細胞培養液稀釋 10 倍後，於每個孔洞添加 100 μ L)。
- (3)放置上述混合液於細胞培養箱內，培養 2 至 4 小時(37°C, 5% CO₂)。
- (4)利用微量盤分析儀(Microplate reader)測量混合液之 450nm 的吸光值。(圖 11)



圖 11. 微量盤分析儀

十一、酵素結合免疫吸附分析法(ELISA)

1.原理：為常用的一種分子生物檢測技術，其原理利用抗體與抗原專一性結合的特性，以對應抗體來偵測特定抗原，藉由抗體上連接的酵素配合呈色劑反應，能以呈色深淺來定量樣品中特定目標蛋白質的含量。

2.設計：將細胞培養的條件培養基收集，以酵素結合免疫吸附分析法(ELISA)分析 MSC 的免疫調節指標:TGF- β , IL-10, IDO, PGE2，計算條件培養基中各項免疫調節指標的濃度。本實驗 ELISA kit 購自 Bioassay Technology Laboratory (BT Lab)，操作依循操作指南(圖 12)。

3.操作步驟：

- (1)序列稀釋標準液。
- (2)將 40ul 條件培養基、標準液加入 96 孔盤。
- (3)再各加入 10ul 對應抗體、50ul HRP 標記二級抗體。
- (4)置於 37 度一小時，以清洗溶液清洗 96 孔盤五次。
- (5)各加入 50ul 成色受質溶液 A 與 50ul 成色受質溶液 B，避光靜置 37 度 10 分鐘。
- (6)再加入 50ul 作用停止溶液，混合均勻。
- (7)以微量盤分析儀測定吸光值(450nm)。
- (8)以標準組繪製標準曲線，內插法計算實驗組濃度數值。



圖 12. BT lab ELISA kit

參、研究結果與討論

一、IOP 顆粒結構測量

1. IOP 放置於鋁箔紙樣品台的 X 光繞射譜圖顯現出含 3 個分量。(圖 13)
2. 繞射訊號最強的分量在圖 13 中以 ▼ 標示，可用 Fe_3O_4 結構來標示，各繞射峰的米勒標示亦示於圖中。
3. Fe_3O_4 繞射峰的寬度較儀器解析度寬甚多，顯示 Fe_3O_4 顆粒大小在奈米尺度。
4. 利用繞射峰寬度，依照 Scherrer-Wilson 公式 $\left(\frac{\beta}{\tan \theta_0}\right)^2 = \frac{k\lambda}{L} \left(\frac{\beta}{\tan \theta_0 \sin \theta_0}\right)$ 繪製 $\left(\frac{\beta}{\tan \theta_0}\right)^2$ 對 $\left(\frac{\beta}{\tan \theta_0 \sin \theta_0}\right)$ 關係圖，以斜率計算得 Fe_3O_4 顆粒的平均粒徑 $L=10.4$ nm。(圖 14)
5. 繞射譜圖中亦出現 4 個峰寬較窄的繞射峰，該繞射峰來自於鋁箔紙樣品台，不屬於 IOP 樣品。
6. 繞射譜圖也出現一個散射角在 40 度附近，峰形極寬橫跨全譜圖的繞射訊號，該訊號來自於 IOP 樣品中的水。
7. 來自於水的總繞射強度不亞於來自於 Fe_3O_4 顆粒的總繞射強度，顯示 IOP 樣品中，水的質量不亞於 Fe_3O_4 顆粒的質量。
8. IOP 樣品中主要分量為 10.4 nm 的 Fe_3O_4 及水。

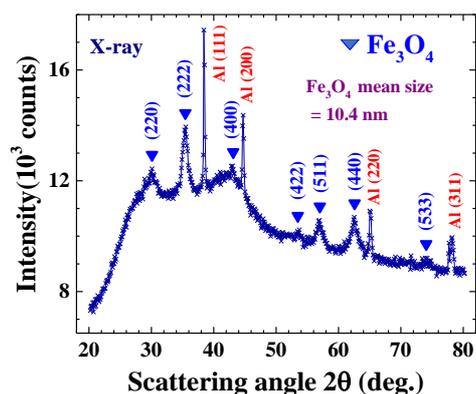


圖 13. X 光繞射圖譜

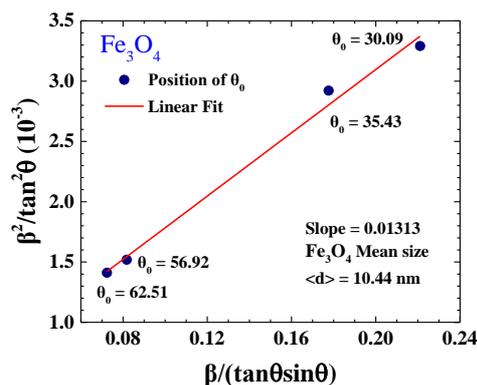


圖 14. 粒徑計算

二、奈米氧化鐵磁性測量

1. 樣品烘乾後得 56mg Fe_3O_4 ，樣品置於直徑 4mm 的圓柱形紙管內。
2. 外加磁場，量測磁矩(magnetization)，正向磁場強度由 0 逐漸增到 1000 高斯後，磁場強度逐漸下降到 0 後，磁場反向強度逐漸增到 1000 高斯後，磁場強度逐漸下降到 0，其間每 50 高斯量測一次磁矩。(圖 15)
3. 量測圓柱形紙管的磁矩(圖 16 中黑色曲線)，呈現一直線，顯現出紙內微小磁矩沿磁場方向排列的順磁(paramagnetic)效應；磁場強度逐漸上升曲線與磁場強度逐漸下降曲線，無明顯區別，無磁滯效應。
4. 圓柱形紙管加 56mg 的 Fe_3O_4 的磁矩(圖 16 中紅色曲線)，與圓柱形紙管的磁矩(圖 16 中黑色曲線)，無明顯區別，顯示 Fe_3O_4 無顯著的順磁效應，且無顯著的鐵磁(ferromagnetic)分量。

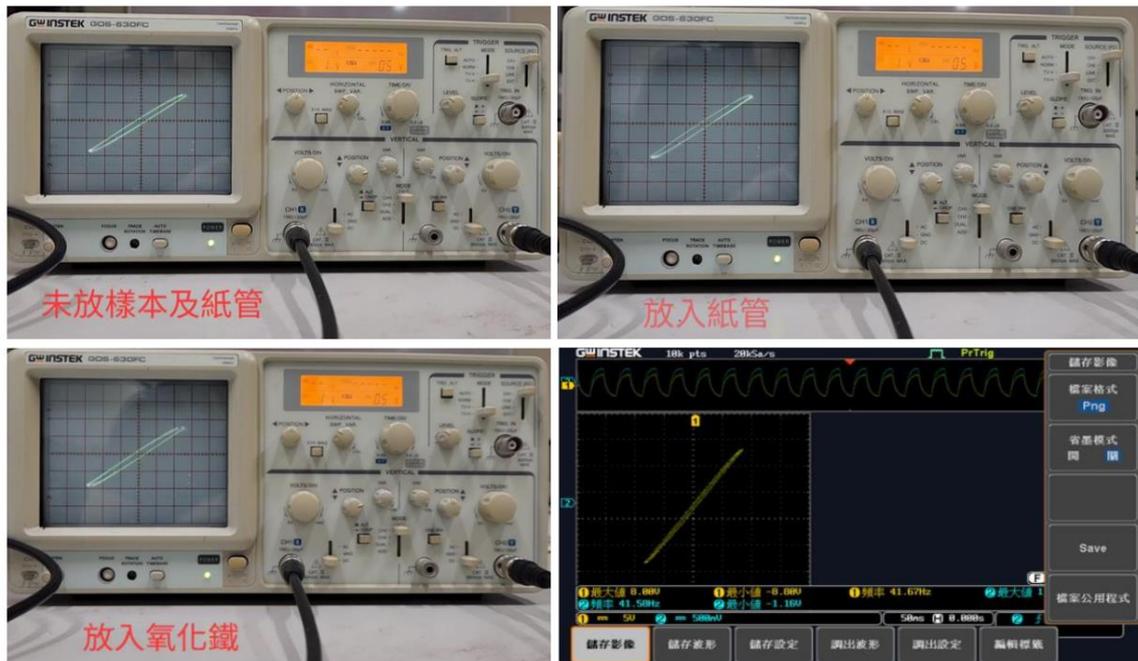
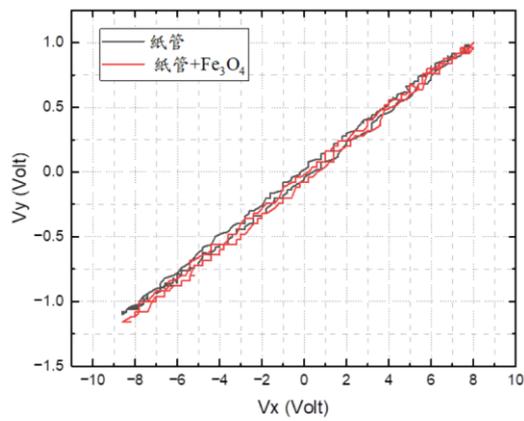


圖 15. 磁矩測量



紙管+氧化鐵
X軸：5V / 格
Y軸：0.5V / 格

圖 16. 磁矩曲線圖

三、MSC 細胞鑑別

1. 為了確認生長細胞確實為 MSC，以下免疫細胞指標作為鑑定：CD29、CD90 與 CD45。
2. 從螢光染色中能看到細胞表達 CD29、CD90，但不表達 CD45 為 MSC 特徵，確認細胞確實為 MSC。(圖 17)

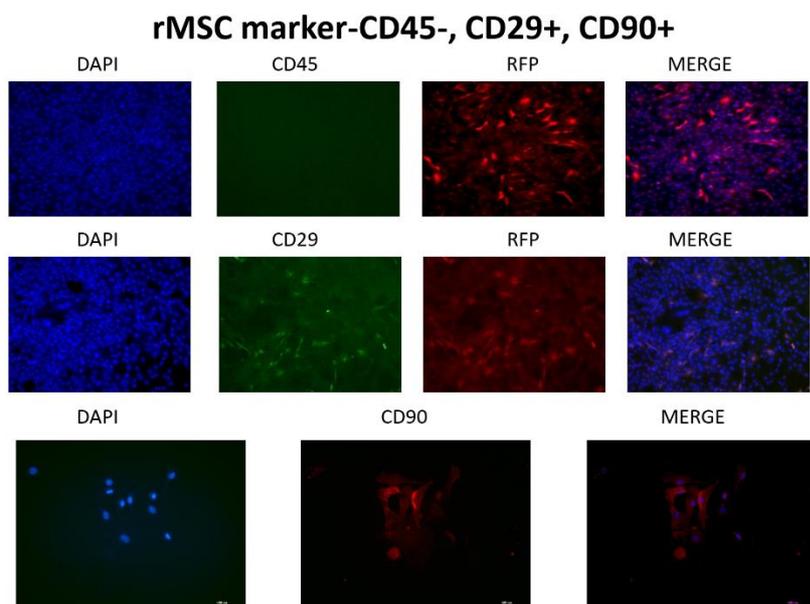


圖 17. MSC 指標螢光染色(scale bar: 100 μm)

四、IOP 對 MSC 存活影響

1. MSC 細胞分別加入不同濃度 IOP，培養 24 小時後以 CCK-8 assay 成色，測量吸光值計算細胞的存活比例(圖 18)。
2. 如圖 19，在 100, 200 與 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IOP 中，細胞存活比率分別為 92%、84%、83%。
3. 24 小時內 IOP 濃度越高造成細胞傷害略為增加，但差異皆小於 20%。

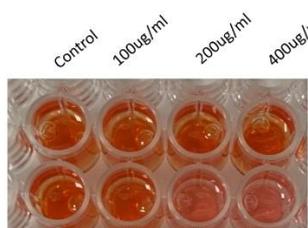


圖 18. CCK-8 成色

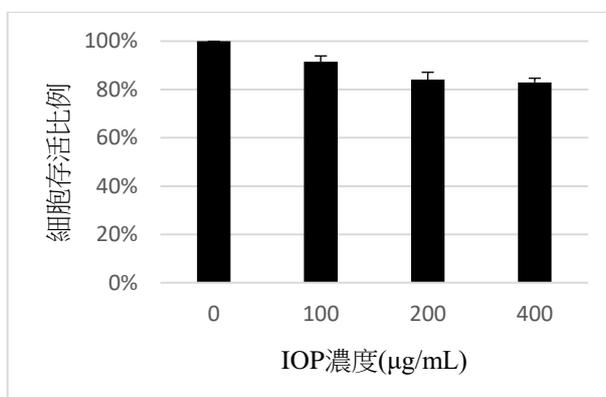


圖 19. IOP 對 MSC 存活率影響

五、MSC 攝入 IOP 情形

1. MSC 細胞分別加入不同濃度 IOP，100, 200 與 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，培養 24 小時後以 PB 染色，如圖 20 能夠看到 MSC 攝入了 IOP 顆粒。

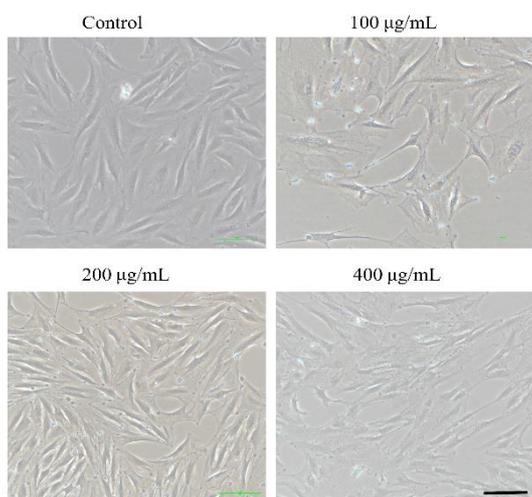


圖 20. PB 染色下的 IOP 顆粒 (scale bar: 100 μm)

2. 加染 DAPI 標定細胞核，在螢光顯微鏡下拍照。將 PB 染色與 DAPI 染色合併的相片於照相軟體中合併(merge)顯示，能更清楚看出每個細胞的位置與狀態，並且能以一個視野中[IOP 顆粒數目/細胞核數目]來估算平均一個細胞攝入的 IOP 顆粒數量。(圖 21)

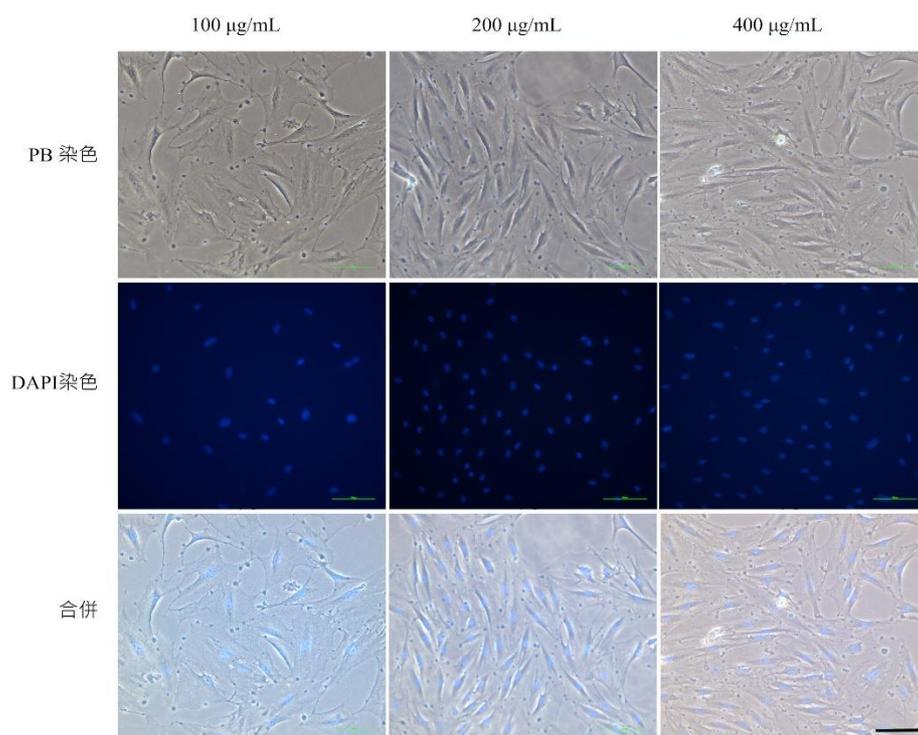


圖 21. PB 染色與 DAPI 染色合併 (scale bar: 100 μm)

3. 每一個濃度隨機選擇三個視野，將視野中 IOP 數量除以 DAPI 數量得出平均每個 MSC 攝入的 IOP 顆粒數。從圖中可看出攝入顆粒數目隨著 IOP 濃度增加而上升，濃

度 400 $\mu\text{g/mL}$ 與 100 $\mu\text{g/mL}$ 統計上有顯著差異 ($p < 0.05$)，但其他兩組互比未達統計差異。(表 2, 圖 22)

表 2. IOP 攝入顆粒計算

IOP 濃度		IOP	DAPI	IOP/DAPI	平均值	標準差
100 $\mu\text{g/mL}$	視野 1	27	9	3		
	視野 2	32	12	2.67		
	視野 3	35	13	2.69	2.79	0.15
200 $\mu\text{g/mL}$	視野 1	35	12	2.92		
	視野 2	53	20	2.65		
	視野 3	53	16	3.31	2.96	0.27
400 $\mu\text{g/mL}$	視野 1	65	18	3.61		
	視野 2	46	14	3.29		
	視野 3	42	12	3.5	3.47	0.14

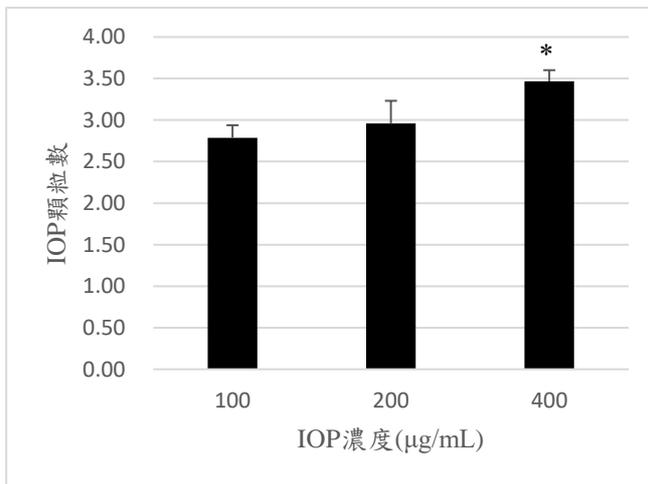


圖 22. 細胞攝入 IOP 顆粒統計圖

4. 將 MSC 從細胞盤上刮下並離心，細胞沉澱 PB 染色的顏色也隨 IOP 濃度明顯加深。

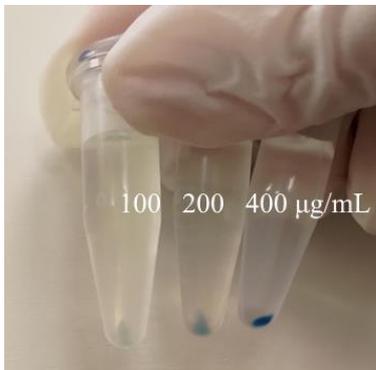


圖 23. PB 染色的細胞沉澱

5. 藉由 PB 染色可確實觀察到 MSC 細胞將 IOP 攝入，攝入數量隨濃度增加而上昇

五、核磁造影

1. IOP 處理後的 MSC 細胞刮下來收集到離心管後，以圖 24 條件放入 MRI 儀器中分析。
2. 造影結果如圖 25，細胞數量較少，訊號也較微弱，但仍能看見 IOP 處理的細胞團塊有深色的訊號反應，隨著濃度增加更為明顯。

T1-Axial view		T1-coronal view		T2-Axial view		T2-coronal view	
Matrix =256x180	TR (ms) = 700	Matrix =184x256	TR (ms) = 700	Matrix =256x180	TR (ms) = 1300	Matrix =184x256	TR (ms) = 1300
FOV (mm) = 100x140	TE (ms) = 20	FOV (mm) = 100x140	TE (ms) = 20	FOV (mm) = 100x140	TE (ms) = 266	FOV (mm) = 100x140	TE (ms) = 266
Thickness (mm) = 1.5	Flip angle = 90	Thickness (mm) = 1.5	Flip angle = 90	Thickness (mm) = 1.5	Flip angle = 90	Thickness (mm) = 1.5	Flip angle = 90
NEX = 3		NEX = 3		NEX = 2		NEX = 2	

圖 24. MRI 設定條件

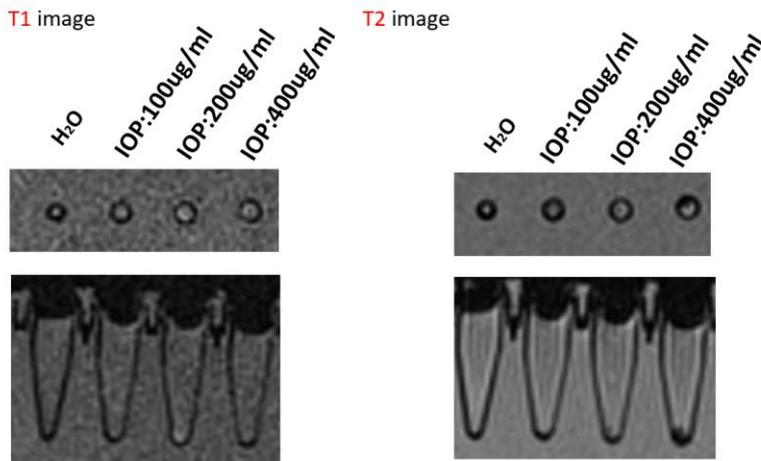


圖 25. MRI 造影成象

六、免疫調節指標影響

1. 將細胞培養的條件培養基收集，分別以 ELISA kit 分析免疫調節指標: IDO, IL-10, TGF- β , PGE2 的 ELISA。最後成色結果測定吸光值(如圖 26)，標準品做出標準曲線 R^2 值皆大於 0.99，以內差法自樣品吸光值計算出對應濃度(圖 27 A-D)。



圖 26. ELISA 酵素成色

- 以 100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ IOP 處理的 MSC 培養基中，IDO 濃度分別為 738.3、579.2、431.3 ng/L ，對比於沒有處理 IOP 的組別 606.3 ng/L 分別為上升 21.7%、下降 4.5%、下降 29%，但皆未達統計差異(圖 27E)。
- 以 100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ IOP 處理的 MSC 培養基中，IL-10 濃度分別為 196.5、140.6、94.6 pg/L ，對比於沒有處理 IOP 的組別 171.2 pg/L 分別為上升 14.8%、下降 17.9%、下降 44.7%，但皆未達統計差異(圖 27F)。
- 以 100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ IOP 處理的 MSC 培養基中，TGF- β 濃度分別為 330.3、392.3、457.7 ng/L ，對比於沒有處理 IOP 的組別 368.9 ng/L 分別下降 10.4%、上升 6.4%、上升 24.1%，但皆未達統計差異(圖 27G)。
- 以 100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ IOP 處理的 MSC 培養基中，PGE2 濃度分別為 4.69、3.54、2.57 ng/L ，對比於沒有處理 IOP 的組別 5.73 ng/L 分別下降 18.2%、下降 38.2%、下降 55.1%。200、400 $\mu\text{g/mL}$ IOP 這兩組的下降達統計差異，P 值小於 0.05(圖 27H)。
- 除了 TGF- β 有隨著 IOP 濃度增加而上升的趨勢，其他免疫調節指標在高濃度 IOP 處理下皆有下降的趨勢，但僅有 PGE2 有統計上的顯著差異。

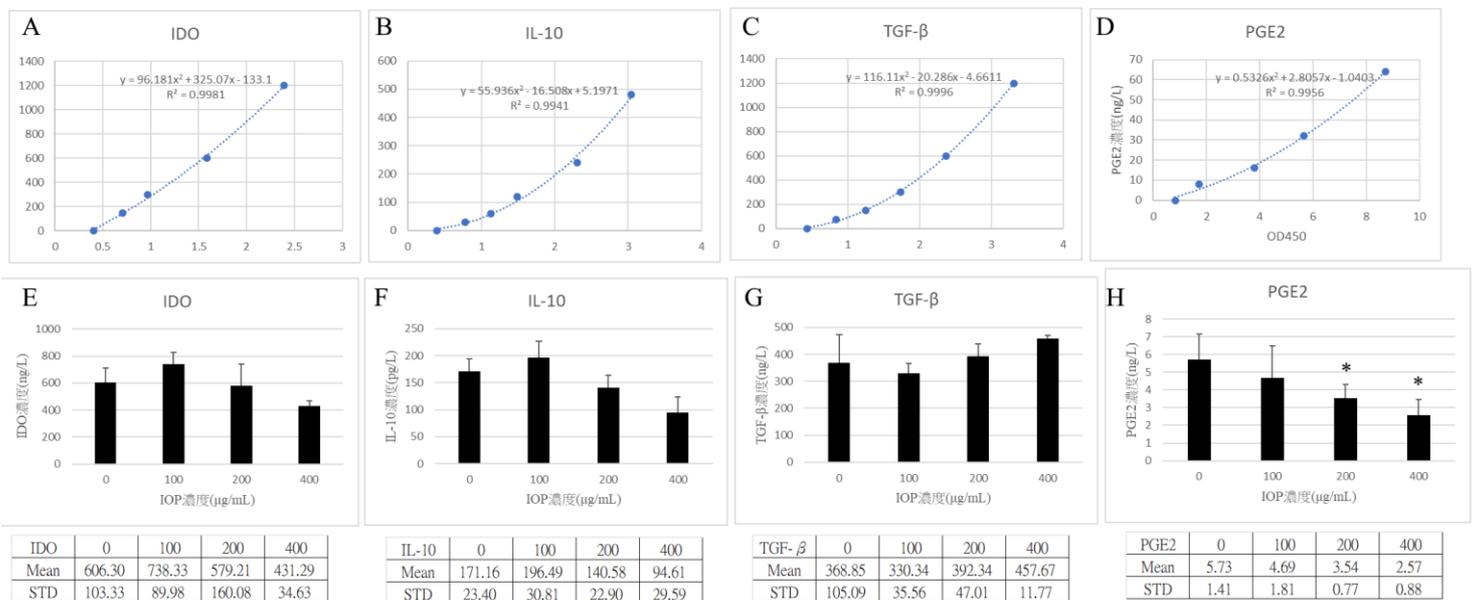


圖 27. ELISA 免疫調節指標分析圖

肆、結論與應用

一、結論

1. 本研究所使用的奈米氧化鐵為前工研院團隊所研發而成，起初設定為顯影劑，且已通過臨床二期試驗，而本研究的前端也證實了此類新型奈米氧化鐵(IOP)，並不會產生磁性，也就是在體內的時候並不會產生凝聚進而產生可能的小血管阻塞風險，也就是說以物理角度而言有其安全性。
2. 接著在與間葉幹細胞共同培養的狀態下，發現隨著奈米氧化鐵(IOP)濃度的增加，幹細胞吞噬奈米氧化鐵(IOP)的數目也會增加，但是對幹細胞存活率影響不大，所以在細胞層面可以證實安全性，甚至有可能的療效。
3. 奈米氧化鐵(IOP)濃度也會影響一些免疫調節指標，高濃度奈米氧化鐵(IOP)會造成PGE2顯著性的下降。在之前研究中 PEG2 在心臟幹細胞的修復與心肌再生能力有重要的影響(參考資料 8)，但是目前結果資料仍不足，實際上奈米氧化鐵(IOP)在免疫調節的角色與效果還待進一步商榷。
4. 由於間葉幹細胞又可以分化成不同的體細胞，例如：軟骨細胞分化(Chondrogenesis)、成骨細胞分化(Osteogenesis)、脂肪細胞分化(Adipogenesis)、神經細胞分化(Neuron cell)等。本研究待完成的部分:之後會加入不同生長因此去誘導間質幹細胞分化後讓再一次重複內文中的實驗已確認在分化後奈米氧化鐵和細胞在其扮演的角色是否如我們的預期仍可以發揮作用。並且因為分化後的細胞與原生間質幹細胞的不同，會加入不同的鑑定方式;例如;分化成軟骨細胞(chondrocyte)使用 Alcian blue stain、脂肪細胞(adipocyte)使用 Oil red O stain 硬骨細胞(osteocytes)使用 alizarin red s (ARS) stain。
5. 最後應用細胞上的觀察可以進行腎臟病鼠的動物實驗，將標定奈米氧化鐵(IOP)的幹細胞以靜脈注射的方式打入腎臟病鼠的體內之後再用 MRI 以非侵襲性且不犧牲動物的方式來追蹤幹細胞的位置以及代謝。

二、應用

以現今細胞治療法而言，在細胞治療時將幹細胞植入人體內之後，通常沒有方法可以追蹤幹細胞所在的位置，也不知是否能夠存在體內而追蹤其可能的成效(例如施打幾個劑量的幹細胞治療)，本研究若能成功執行安全性以及可行性，相信對未來幹細胞治療時對於幹細胞的追蹤提供一個新型但並非侵襲性的追蹤模式。

伍、參考文獻

1. Willeminck MJ, Noël PB. The evolution of image reconstruction for CT-from filtered back projection to artificial intelligence. *Eur Radiol.* 2019 May;29(5):2185-2195. doi: 10.1007/s00330-018-5810-7.
2. Wang G, Ye JC & De Man B. Deep learning for tomographic image reconstruction. *Nat Mach Intell* 2020;2: 737–748. <https://doi.org/10.1038/s42256-020-00273-z> (2020) 2:737–748
3. 生策會新聞：MPB-1523 MRI 顯影劑獲美 FDA 准予進刑臨床二期試驗
https://ibmi.taiwan-healthcare.org/zh/member_news_detail.php?REFDOCID=0p3sacy33hhbvec
4. Wu MR, Lee CH, Hsiao JK. Bidirectional Enhancement of Cell Proliferation Between Iron Oxide Nanoparticle-Labeled Mesenchymal Stem Cells and Choroid Plexus in a Cell-Based Therapy Model of Ischemic Stroke. *Int J Nanomedicine.* 2020 Nov 19;15:9181-9195. doi: 10.2147/IJN.S278687.
5. Tseng HC, Wu MR, Lee CH, Hsiao JK. Differentiation Capacity of Bone Marrow-Derived Rat Mesenchymal Stem Cells from DsRed and Cre Transgenic Cre/loxP Models. *Cells.* 2022 Sep 5;11(17):2769. doi: 10.3390/cells11172769. PMID: 36078177; PMCID: PMC9455627.
6. 賽亞基因科技健康新知：幹細胞療法的歷史,現狀與未來
http://www.vitagénomics.com/portal_c3_cnt_page.php?owner_num=c3_292772&button_num=c3&folder_id=1294&cnt_id=2164&order_field=&order_type=&search_field=&search_word=&search_field2=&search_word2=&search_field3=&search_word3=&bool1=&bool2=&search_type=1&up_page=7
7. 楊仲準，X 光繞射分析技術與應用，科儀新知第三十二卷第六期 100.6)
8. Hsueh YC, Wu JM, Yu CK, Wu KK, Hsieh PC. Prostaglandin E₂ promotes post-infarction cardiomyocyte replenishment by endogenous stem cells. *EMBO Mol Med.* 2014 Apr;6(4):496-503. doi: 10.1002/emmm.201303687..

【評語】 080003

利用細胞生物學技術研究奈米材料之安全性及效能對高中生而言是個不易的挑戰，使用奈米氧化鐵(IOP)做為磁振造影也許有實用價值，能獲致初步結果值得肯定。

建議：

1. 超順磁性氧化鐵(SPIO)奈米顆粒和釷基螯合物為主要兩種造影劑。SPIO 是市售惰性的、能夠最終代謝的生物相容性奈米材料，並且已經 FDA 批准用於人類，但尚未用於細胞內標記。因此，本研究應使用 SPIO 做為對照以比較二種材料的優缺點。
2. 本研究所使用的是奈米氧化鐵注射液(IOP Injection)編號 MPB-1523，由巨生醫股份有限公司(MegaPro Biomedical Co., Ltd)所研發，前工研院團隊所研發而成，是一種與可溶於水的甲氧基-聚乙二醇-矽烷(m-PEG-silane)化學結合的超順磁氧化鐵奈米粒子(SPIO)，非本研究者所研發製造，減少創新性。

本研究所使用的高濃度奈米氧化鐵(IOP)會造成 PGE2 顯著性的下降，這在磁振造影的應用可能是缺點。