

2024年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號	080009
參展科別	生物化學
作品名稱	利用氧化應激法結合膠原蛋白微島嶼誘導人類 臍帶間質幹細胞分化
得獎獎項	一等獎 韓國科學博覽會 KSEF

就讀學校	臺北市立第一女子高級中學
指導教師	劉宛欣
作者姓名	廖思綺、邱筠雅

關鍵詞 膠原蛋白微島嶼、人類臍帶間質幹細胞、大氣電漿

作者簡介



我們是北一女中數資班的廖思綺、邱筠雅。一直以來，我們都對生物和化學很感興趣，也因此開啟了我們的生物化學專題研究，很開心可以到大學實驗室學習。雖然在過程中也遇到不少困難，但我們依然很喜歡現在專題研究的題目。這次能參與國際科展，看見更多優秀的研究作品，特別感謝指導教授及實驗室的學姊，在準備過程中非常用心的幫助我們，總是耐心仔細的指導我們，提供大量資源和建議，讓我們有很多成長的空間。感謝他們一直以來的協助，給我們如此寶貴的經驗。

摘要

再生醫學透過控制幹細胞分化以應用於修復受損或是建構新組織。目前誘導幹細胞分化的方法多為添加成長因子的化學誘導法，然而此方法具有高成本和費時等缺點。在本篇研究中，我們以人類臍帶間質幹細胞，作為誘導分化對象，使其貼附於具最適化圖形的膠原蛋白微島嶼，結合大氣電漿及 H_2O_2 二種氧化應激法刺激細胞，探討誘導 WJ-MSC 幹細胞分化的最佳條件。在本研究中，我們發現單獨使用大氣電漿處理可使成骨分化率增加，而大氣電漿處理再加上星形微島嶼培養細胞時，則更顯著的提高成骨分化率。未來嘗試以 H_2O_2 誘導幹細胞分化，並進一步探討大氣電漿和 H_2O_2 提高脂肪分化率的條件、影響分化的機制，期望能此新技術取代傳統化學誘導法，對組織工程做出貢獻。

Abstract

In the field of regenerative medicine, the ability to control differentiation of stem cells holds the potential for repairing damaged tissues or constructing new ones. Currently, most methods for inducing stem cell differentiation involve chemical induction with adding of growth factors, which have disadvantages such as high costs and time consumption. In this study, we focused on human umbilical cord Wharton's Jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSCs) as the target for induced differentiation. We let them attach to collagen microislands with optimized patterns, and applied two oxidative stress methods, atmospheric pressure plasma jet and H_2O_2 , to stimulate the cells. The aim was to investigate the best conditions for inducing differentiation of WJ-MSCs.

Our research found out that using atmospheric pressure plasma jet alone significantly increased the osteogenic differentiation rate of WJ-MSCs, and when combined with star-shaped microislands culture, it further enhanced the osteogenic

differentiation rate. Our future work will involve attempts to induce stem cell differentiation using H₂O₂. Also, we will make a deeper exploration of the conditions and mechanisms of how atmospheric pressure plasma jet and H₂O₂ increase adipogenic differentiation rates. We hope that this new technique can replace traditional chemical induction methods and make contributions to tissue engineering.

壹、前言

一、研究動機

目前透過手術治療的器官轉植面臨長時間捐贈器官不足的困境，以及可能引發免疫系統的排斥反應。因此，目前有許多關於組織工程的相關研究，欲利用幹細胞有潛力分化成特定細胞的特性，在體外培養幹細胞並使其增值和分化，進而建構出組織和器官，再植入體內修復原先的損傷 [8]。根據先前的研究，在體外誘導幹細胞分化方向的常規做法是使用化學誘導法，如生長因子(growth factors)、激素 (hormones)或市售誘導培養基 (commercial induction medium)。然而，化學誘導法通常具有低效率，費時或高成本等缺點 [4]。

最近的研究發現，可利用細胞圖案化技術，最適化幹細胞貼附基材的膠原蛋白微島嶼圖形，以利控制細胞的分化方向 [4]。透過將細胞培養於特定的微島嶼，結合外源光生物調節法 (extrinsic photobiomodulation, EPM)，可使細胞進行成骨分化的比例與化學方法誘導的分化率相近，即星型膠原蛋白微島嶼結合 EPM 處理有望取代化學方法誘導幹細胞行成骨分化 [5]。

在本研究中，我們希望結合大氣電漿 (Atmospheric Pressure Plasma Jet, APPJ) 和 H₂O₂ 處理法，將幹細胞培養於兩種最適化後的微島嶼圖形。因大氣電漿、H₂O₂ 處理法和先前研究中的 EPM 方法，同樣在處理過程中會產生活性氧物質 (Reactive oxygen species, ROS)，且大氣電漿目前已被應用於治療促使傷口癒合 [1]。另一方面，本研究將選用最適化後有利於成骨分化及脂肪分化的微島嶼圖形，

以進行二種不同分化型態的分化率測量。

我們以提高先前研究中人類臍帶間質幹細胞 (human umbilical cord Wharton's jelly mesenchymal stem cells, WJ-MSCs) 的分化率為目標，整合先前研究，提出有利於成骨分化和脂肪分化的幾何線索，利用大氣電漿和 H_2O_2 處理並結合特定的微島嶼圖形。透過不同實驗參數探討可使細胞分化率最高的條件，以利更有效地控制幹細胞分化為成骨細胞和脂肪細胞。

二、研究目的

(一) 最適化不同氧化應激法適合用於後續實驗的參數

1. 探討以不同時間 APPJ 處理 WJ-MSCs 的細胞存活率
2. 探討以不同濃度 H_2O_2 處理 WJ-MSCs 的細胞存活率

(二) 比較此二種方法處理下 WJ-MSCs 分化為成骨細胞的狀況

1. 探討以 APPJ 和膠原蛋白微島嶼處理 WJ-MSCs 後分化為成骨細胞的比例
2. 探討以 H_2O_2 和膠原蛋白微島嶼處理 WJ-MSCs 後分化為成骨細胞的比例

(三) 探討 APPJ 產生物質種類對細胞的影響

1. 探討 APPJ 處理後產生於培養液的物質成分，並定量 NO_2 濃度
2. 探討 APPJ 處理後，培養液內含的 H_2O_2 濃度

三、文獻回顧

(一) 幹細胞

幹細胞具有分化為特定細胞的潛力，因此被用於替換、修復、重建受損細胞和組織等許多再生醫學領域的治療方法。幹細胞可以依來源和分化潛能分類。若以來源做分類，可分為胚胎幹細胞與成體幹細胞。其中，成體幹細胞又可分為臍帶幹細胞、骨髓幹細胞等。而以依分化潛能做分類，則可分成全能幹細胞、多能幹細胞、多潛能幹細胞，以及單能幹細胞 [5]。

本研究使用的幹細胞為人類臍帶間質幹細胞 (WJ-MSCs)，其來源為人類的臍帶基質，並且是擁有自我更新以及分化成部分細胞的能力的多潛能幹細胞。WJ-MSCs 擁有分化成多種細胞的潛能，如脂肪細胞、軟骨細胞、骨細胞、平滑肌細胞、成纖維細胞和造血基質等，並且 WJ-MSCs 更具有較易於分離與培養及體外增生速度較快的特性。其分化潛能與易於收集的特性使 WJ-MSC 被廣泛用於再生醫學與組織工程領域 [8]。

(二) 已知的誘導細胞分化方法

1. 化學誘導法

目前常見的誘導細胞分化的化學誘導方式為使用添加化學誘導因子的培養基，文獻中使用成骨分化培養基 (Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation Medium, ODM)。常見的 ODM 組成為基本培養基、50 μM L-抗壞血酸-2-磷酸酯 (L-ascorbic acid 2-phosphate, AsA2-P)、100 nM 地塞米松 (Dexamethasone, Dex) 和 10 nM β -甘油磷酸酯 (beta-glycerophosphate, BGP)。添加於培養基的誘導因子對細胞有不同的作用，如促進細胞增殖和 I 型膠原蛋白的分泌，以及提過礦化所需的磷酸鹽等 [5]。

2. 物理訊號

近年來，由研究指出，細胞外部微環境的材質可以影響細胞從附著和遷移到分化以及新組織的產生，細胞黏附基底的奈米結構、微圖案和機械特性提供的物理線索可用於增強幹細胞沿有利方向的分化 [12]。與化學因子無關的基材微圖型對人類骨髓間質幹細胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cell, BM-MSCs) 的分化具有很大的影響。例如，有研究表明，具有奈米級纖維狀表面結構，可以促進人類間質幹細胞、人類胚胎幹細胞和人類誘導多能幹細胞分化為微神經譜系的細胞[11]。而當人類間質幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell, MSCs) 分別在矩形以及在具有五邊形對稱形狀的基材培養後，會顯示出不同的脂肪細胞生成和成骨細胞特徵 [7]。

此外，根據先前研究，較小的細胞黏附面積有利於間質幹細胞的成脂分化，而較大的細胞黏附面積則有利於成骨分化。研究同時也發現，高縱橫比的細胞黏附形態有利於神經源性分化，而縱橫比為 1 時有利於脂肪形成分化，縱橫比為 2 時則有利於成骨分化。由以上所述，幾何形狀線索可以引導 MSCs 走向適當的分化命運 [12]。

(三)成骨細胞的分化及判定

幹細胞分化是由主要調節因子 (master regulators) 基因所決定的。Runx2 基因的表達可以製造 Runt 相關轉錄因子二號 (Runx2)，使幹細胞進入分化為成骨細胞譜系的程序，這時候的細胞稱為前骨母細胞 (preosteoblasts)。前骨母細胞會增殖、成熟，和細胞外基質合成與礦化。在成熟的階段，細胞會產生骨鈣蛋白 (osteocalcin, OCN)，促使細胞外基質開始礦化 [5]。因為 OCN 是成骨細胞譜系的特徵，透過免疫染色法，將 OCN 以抗體標記並染色，可以檢測細胞是否分化為成骨細胞。

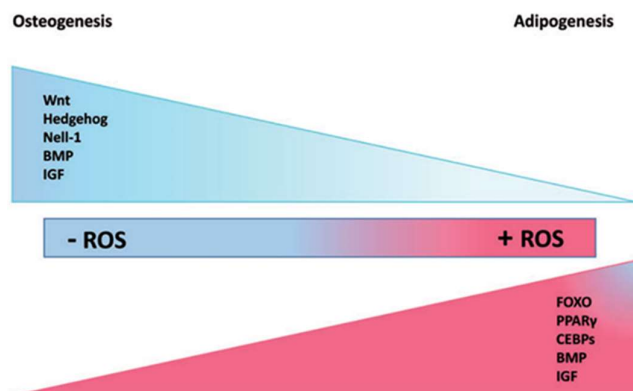
(四)細胞貼附基質與膠原蛋白

膠原蛋白具有完整的細胞外基質結構，廣泛使用於細胞培養中，具有使細胞貼附、生長、遷移和分化等功能 [13]。在先前的研究中，稀釋的膠原蛋白溶液已被廣泛運用於細胞培養基材的塗層，膠原蛋白的薄層支持細胞附著以及部分原代細胞的生長 [4]。膠原蛋白的來源可為人體或動物，I 型膠原蛋白是人體中含量最高的膠原蛋白，幾乎佔 90%。I 型膠原蛋白可用於含平面及立體基材的細胞培養 [5]。

(五)ROS 對細胞分化的影響

活性氧物質 (reactive oxygen species, ROS)，包含 NO、H₂O₂ 等，是自由基的一種。細胞內部的許多訊號途徑，如 Wnt、FOXO、Hedgehog、NEL 樣蛋白 1

(NELL-1)、胰島素樣生長因子 (IGF) 和骨形態發生蛋白 (BMP) 等，則決定了 MSCs 的命運。其中，Wnt/ β -catenin、MAPK (NELL-1) 和 Hedgehog 訊號傳導誘導骨生成，而 FOXO、PPAR γ 和 CEBPs 訊號傳導刺激脂肪生成 [5]。IGF 和 BMP 則具有雙重作用，也就是對於成骨細胞與脂肪細胞的分化都有促進效果，如圖一。透過這些途徑調節，造成脂肪生成和骨骼生成。當培養液中 H₂O₂ 濃度增加時，會促進分化為脂肪的途徑，使細胞分化為脂肪 [10]，濃度降低時則促進細胞分化為骨骼的途徑 [2, 9]。



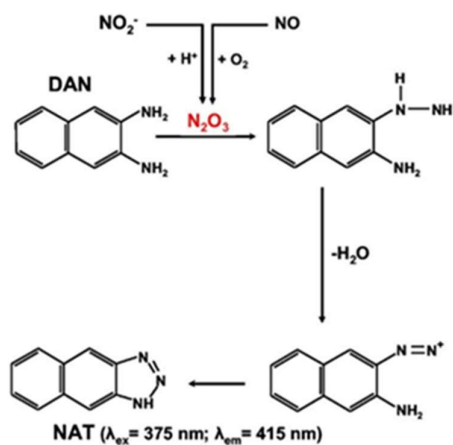
圖一、ROS 量對成骨與脂肪分化影響

(六) 微影製程的光罩及微島嶼圖形製備

微影製程是現今半導體元件製造製程中的一個關鍵步驟，利用曝光和顯影在光阻層上刻畫幾何圖形結構，透過蝕刻製程將光罩上的圖形轉移至基材，目的是在晶圓上製作微米大小的圖案。衍生技術為軟微影製程，使用軟性高分子為材料製備可撓性圖案化的基材，適合應用於生物科技，且成本較傳統微影技術低 [2]。根據先前文獻，常用於細胞培養基材微圖案化的高分子材料為：聚甲基丙烯酸甲酯 (polymethyl methacrylate, PMMA)、聚甲基矽氧 (polydimethylsiloxane, PDMS)、聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 和聚乙二醇二丙烯酸酯 (polyethylene glycol diacrylate, PEGDA)，待圖案置備完成後，用於細胞培養的基材需再修飾膠原蛋白等結構纖維蛋白於其上，以利細胞貼附和生長。

(七) 利用格里斯試驗檢測 NO₂ 濃度

亞硝酸根離子和格里斯試劑中的磺胺反應生成重氮離子，然後再與試劑中的 N-(1-萘基)乙二胺偶聯形成偶氮發色團 [3]，透過溶液產生的粉紅色來檢測和分析 NO₂ 濃度。格里斯試驗反應式如圖二所示：



圖二、格里斯試驗

(八) 提升成骨分化率的微圖形島嶼

根據先前研究，將細胞培養於星形微圖案具有較培養於長方形微圖案更高的成骨分化率 [5]。而在星形微圖案的最適化實驗中，以未經任何處理培養於組織培養皿的 WJ-MSCs (MM/TCPS) 和經化學誘導法後培養於組織培養皿的 WJ-MSCs (ODM/TCPS) 作為控制組，結合外源性光生物調節法 (EPM) 比較不同尖端數的星形微島嶼對細胞分化的影響，控制所有星形圖型長寬比皆為二 ($\text{AR} = 2$: $\text{AR} = R/r, r = 20 \mu\text{m}$)。實驗組別為: EPM/C3、EPM/C4、EPM/C5、EPM/C6 和 EPM/C7 (數字表示尖端數)，根據前人的最適化結果，C5 和 C6 有最高的平均分化比例，甚至超越 ODM 誘導的數值，而其餘組別則無顯著差異。

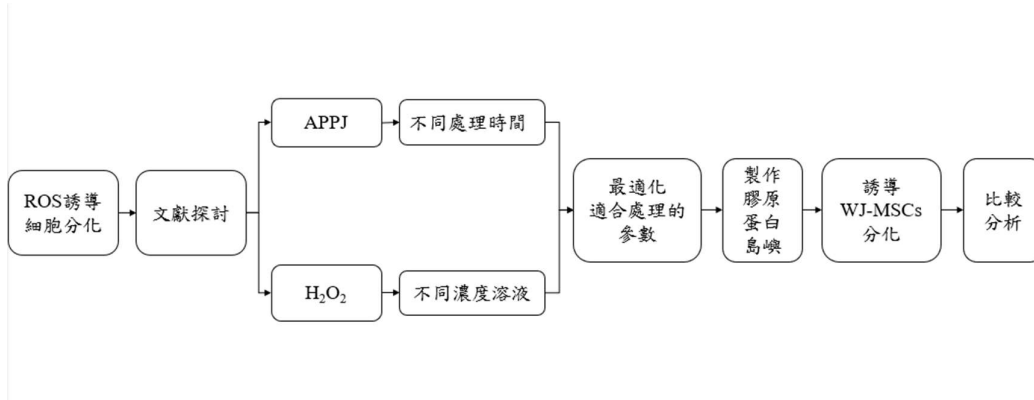
(九)大氣電漿

電漿是物質的第四態，為有等量正負粒子的離子化氣體。電漿是氣體中的自由電子被電場或磁場加速後，碰撞其他原子，並傳遞足夠能量使其電子游離，產生的電子再繼續碰撞其他原子，直到電子崩潰形成的。大氣電漿屬於低溫常壓電漿，因為其處理製程不需在真空外殼或腔室中進行，可以節省降低腔室氣壓的時間，使用上更有效率。電漿與空氣中的氮、氧和水等分子反應會產生 $\cdot\text{OH}$ 氫氧自由基與 $\cdot\text{NO}$ 氮氧自由基等活性氮氧物質 (Reactive oxygen species, ROS / Reactive Nitrogen Species, RNS)，因此被用於此研究中，為氧化應激法的一種，本研究中所使用的氬氣大氣電漿反應式如下 [3]:



貳、 研究方法或過程

一、 實驗流程圖



圖三、 實驗流程圖

二、 實驗設備與器材

(一) 設備

1. 紫外線燈 (ultraviolet lamp)
2. 振盪器 (oscillator)
3. 超音波洗淨機 (ultrasonic cleaner)
4. 流式細胞分選儀 (flow cytometer)
5. 自製光罩 (自行設計、委託國家半導體中心製作)
6. 細胞培養箱 (CO₂ incubator)
7. 無菌層流操作台 (laminar flow hood)
8. 恆溫水槽 (circulating water bath)
9. 離心機 (centrifuge)
10. 真空電漿 (vacuum plasma)
11. 大氣電漿 (atmospheric pressure plasma jet)

(二) 藥品

1. WJ-MSCs 培養:

Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM): 含 EBSS 平衡鹽試劑、胺基酸、
2 mM L-麩醯胺酸、1 mM 丙酮酸鈉和 1500 mg/L 碳酸氫鈉

2. H₂O₂ 處理細胞:

濃度 30 % (0.88 M) H₂O₂ 水溶液

3. MTT 試驗:

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

二甲基亞砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)

磷酸鹽緩衝生理鹽水 (phosphate buffered saline, PBS)

4. 膠原蛋白微島製備:

聚乙二醇二丙烯酸酯 (poly(ethylene glycol) diacrylate, PEGDA)

丙酮 (propan-2-one)

甲苯 (toluene)

三甲基鋁 (trimethylalane, TMA)

2-羥基-2-甲基苯丙酮 (2-hydroxy-2-methylpropiophenone, HOMPP)

膠原蛋白溶液 (collagen solution)

磷酸氫鈉 (sodium phosphate dibasic, Na₂HPO₄)

氯化鉀 (potassium chloride, KCl)

磷酸二氫鉀 (potassium phosphate monobasic, KH₂PO₄)

5. 格里斯試驗檢測二氧化氮濃度

磺胺 (American society of health-system pharmacists, AHFS)

N-(1-萘基)乙二胺(N1-(Naphthalen-1-yl)ethane-1,2-diamine)

6. H₂O₂ 定量

碘化鉀 (Potassium iodide, KI)

鉬酸銨 (Ammonium orthomolybdate, (NH₄)₂MoO₄)

過氧化氫 (Hydrogen Peroxide, H₂O₂) 30%w/w 溶液

7. 流式細胞儀分析

磷酸鹽緩衝生理鹽水 (phosphate buffered saline, PBS)

骨鈣蛋白一級抗體 (osteocalcin polyclonal antibody)

二級抗體 (goat anti-rabbit antibody)

甲醛 (Formaldehyde)

曲拉通 X-100 (Triton X-100)

(二) 器材與其他

1. 微量吸管

2. 玻璃基材

3. 氧氣 (N₂)

4. 氧氣 (O₂)

5. 氬氣 (Ar)

6. 吹球

7. 8 孔盤

8. 96 孔盤

9. 玻璃皿

10. 燒杯

11. 離心管

三、研究方法與步驟

(一) 最適化 APPJ 處理時間—以不同時間 APPJ 處理 WJ-MSCs

1. 將 WJ-MSC 以 24,000 cells/cm² 的密度培養在 8 孔盤 24 小時。
2. 開啟 APPJ，設定參數並待電漿至穩定狀態(約 20~30 分鐘)。
3. 用 APPJ 處理 WJ-MSCs，處理時間為 0、10、20、30、60 和 120 秒，

APPJ 設定如表(一)，APPJ 裝置如圖四。

表(一)、電漿處理參數

Parameters	
Frequency (kHz)	20
Applied voltage (kV)	7
Working gas	Ar
Flow rate (L/min)	1
Treatment time (s)	0, 10, 20, 30, 60, 120
Distance (cm)	2
Humidity (%)	57
Temperature (°C)	27.6



圖四、大氣電漿。電漿工作氣體為 Ar，電壓設定 7 kV，頻率 20 kHz，氣體流量 1 L/min

4. 處理結束 60 分鐘後更換培養液為未經處理的 EMEM。
5. 第一次處理結束後，培養三天，更換培養液，進行第二次處理。
6. 第二次處理後，培養兩天，進行 MTT 試驗，檢測細胞存活率。

(二) 最適化 H₂O₂ 溶液濃度—以不同濃度 H₂O₂ 處理 WJ-MSCs

1. 將 WJ-MSCs 以 24,000 cells/cm² 的密度培養在 8 孔盤 24 小時。
2. 以 EMEM 稀釋，配置含 0、10、25、50、100 和 200 μM H₂O₂ 的培養液，如表(二)。
3. 更換 WJ-MSCs 的培養液為含有 H₂O₂ 的培養液。

表(二)、 H₂O₂ 處理參數

H ₂ O ₂ 處理	
Concentration (μM)	0、10、25、50、100、200
Solvent	EMEM
Volume (μL/well)	250

4. 60 分鐘後更換為不含 H₂O₂ 的培養液。
5. 第一次處理結束後，培養三天，更換培養液，進行第二次處理。
6. 第二次處理後，培養兩天，進行 MTT 試驗。

(三) MTT 試驗檢測分別進行 APPJ 及 H₂O₂ 處理後的細胞存活率

1. 配置濃度 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液：取 25 mg 的 MTT 加 5 mL PBS 得到 5 mg/mL MTT 溶液。再取 1mL 的 5 mg/mL MTT 溶液，加 9 mL PBS 形成 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液。
2. 移除原先的培養液 (EMEM) 為 MTT 溶液，反應 4 小時。
3. 加入 DMSO，搖晃 30 分鐘，溶解 MTT 與細胞反應形成的 formazan 晶體。
4. 利用 ELISA reader (562 nm wavelength) 檢測吸光值。
5. 計算細胞存活率，細胞存活率 = $\frac{\text{實驗組吸光值}}{\text{對照組吸光值}} \times 100\%$ 。

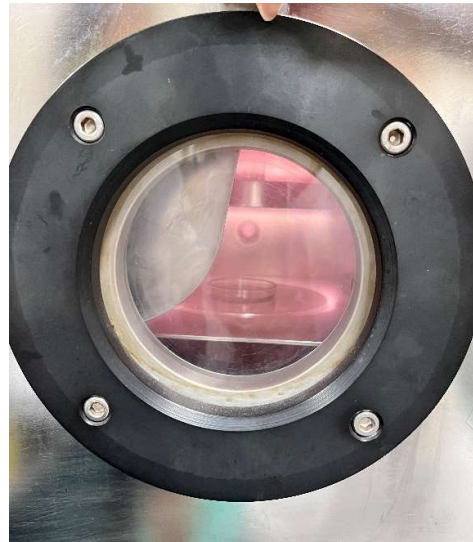
(四) 膠原蛋白微島嶼製備

1. 清洗大小為 0.8×0.8 (cm²) 的玻璃基材:
 - (1) 稀釋 5mL Glass-Klenz Glassware Detergent 於 50 mL 純水中，將玻璃基材置於其中，並超音波震洗 15 分鐘。
 - (2) 移除 Glass-Klenz 溶液，使用酒精將玻璃基材超音波震洗 15 分鐘。
 - (3) 以丙酮替換酒精，將玻璃基材超音波震洗 15 分鐘。
 - (4) 使用純水超音波震洗 15 分鐘。
2. 使用真空電漿處理玻璃基材，先以氦氣和氧氣清腔體，流量分別為 10 sccm 及 40 sccm，清腔體 10 分鐘。
3. 設定真空電漿工作氣體為 O₂，流量 20 sccm，電壓 40 W，處理 1 分鐘，真空電漿裝置如圖五。
4. 以甲苯稀釋 TMA，置備 1% 的 TMA 溶液，與玻璃基材反應 1 小時。
5. 移除 TMA 溶液，以甲苯潤洗，移除甲苯後，再以純水潤洗。
6. 配置 25% PEGDA 水溶液，內含 1% HOMPP，每個玻璃基材上滴 12 μ L 的 PEGDA 溶液。
7. 將玻璃基材置於具微島嶼圖案的光罩下，以波長 365 nm，控制光劑量為 500 mJ/cm² 的 UV 燈曝光 45 秒，實驗裝置示意圖如圖六。
8. 用純水移除曝光後的 PEGDA 溶液。
9. 沉積膠原蛋白於玻璃基材上。
 - (1) 配製膠原蛋白溶液:

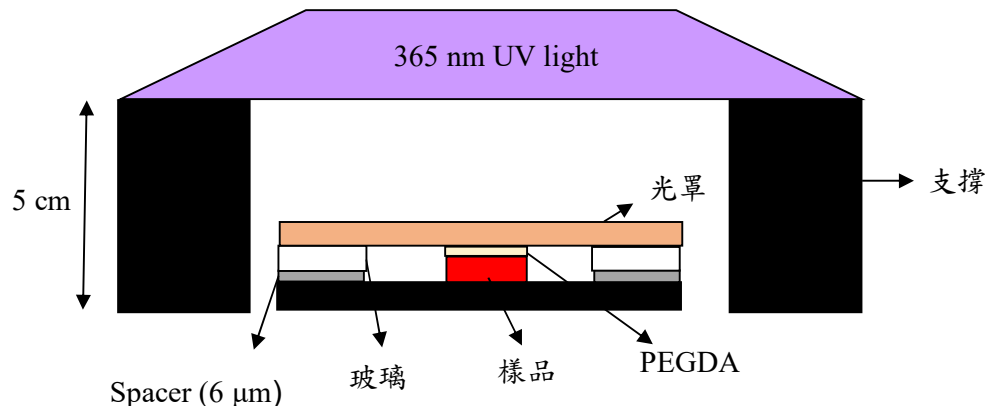
分開配製緩衝液及膠原蛋白液，以 5:1 的比例混合:

 - i. 緩衝液：內含 60 mM Na₂HPO₄、60 mM KH₂PO₄、275 mM KCl
 - ii. 膠原蛋白溶液：由 3 mg/mL 膠原蛋白醋酸溶液以水稀釋至濃度為 20 μ g/mL
 - (2) 取適量體積的膠原蛋白溶液，浸泡完成微圖案製備的玻璃基材，於 37 °C 的烘箱靜置兩小時，兩小時後取出樣本以去離子水清洗兩次，移除多餘的

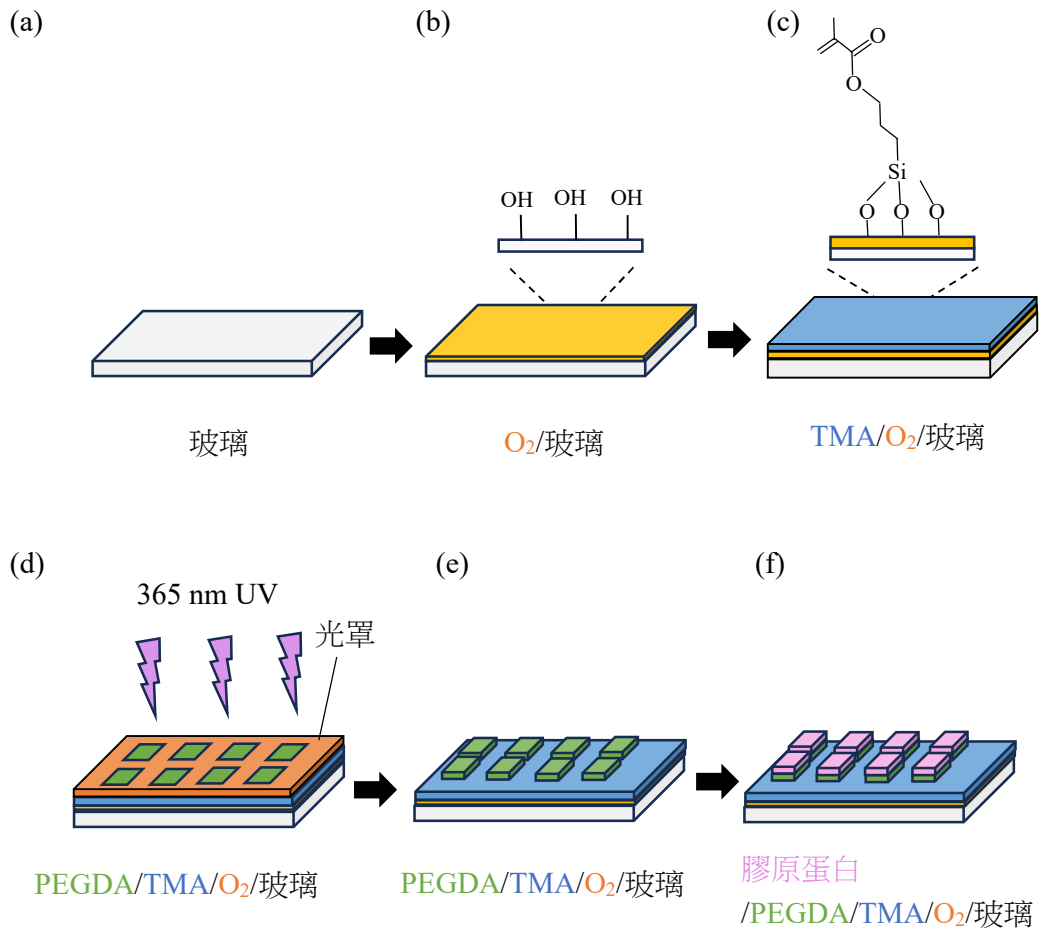
膠原蛋白。實驗步驟示意圖如圖七，成品如圖八。



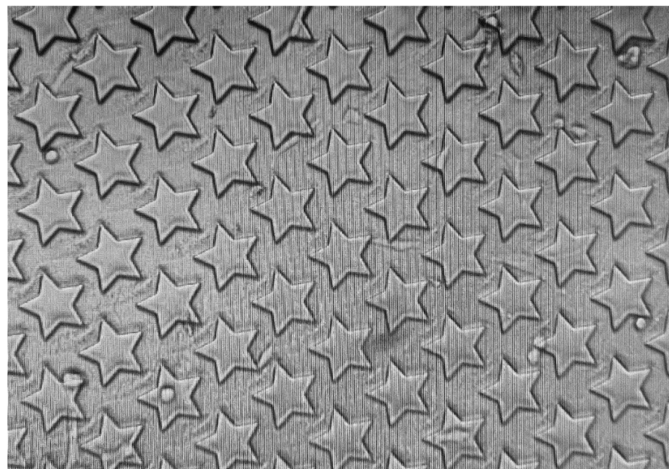
圖五、真空電漿。電漿工作氣體為 O_2 ，流量設定 20 sccm，電壓 40 W



圖六、UV 燈示意圖



圖七、沉積島嶼示意圖



圖八、C5 星型微圖案

(五) 以 APPJ 和膠原蛋白微島嶼誘導 WJ-MSCs 成骨分化

實驗組別：

- I. MM/TCPS: 未經任何處理培養於組織培養皿的 WJ-MSCs
 - II. ODM/TCPS: 經化學誘導法培養於組織培養皿的 WJ-MSCs
 - III. APPJ 10s: 經二次 10 秒 APPJ 處理培養於組織培養皿的 WJ-MSCs
 - IV. APPJ 30s: 經二次 30 秒 APPJ 處理培養於組織培養皿的 WJ-MSCs
 - V. APPJ 10s + pattern: 經二次 10 秒 APPJ 處理培養於 C5(AR 2) 星形膠原蛋白微島嶼的 WJ-MSCs
 - VI. APPJ 30s + pattern: 經二次 10 秒 APPJ 處理培養於 C5(AR 2) 星形膠原蛋白微島嶼的 WJ-MSCs
 - VII. pattern: 未經任何處理培養於 C5(AR 2) 星形膠原蛋白微島嶼的 WJ-MSCs
1. 將細胞分別培養於組織培養皿和膠原蛋白島嶼並置於 8 孔盤中。
 2. 24 小時後以 APPJ 處理 WJ-MSCs 10、30 秒。
 3. 60 分鐘後更換培養液為未經處理的 EMEM。
 4. 第一次處理結束後，培養三天，更換培養液，進行第二次處理。
 5. 第二次處理後，培養兩天，進行流式細胞儀分析，檢測細胞成骨分化率。

(六) 以 H₂O₂ 和膠原蛋白微島嶼誘導 WJ-MSCs 成骨分化

實驗組別：

- I. MM/TCPS: 未經任何處理培養於組織培養皿的 WJ-MSCs
- II. ODM/TCPS: 經化學誘導法培養於組織培養皿的 WJ-MSCs
- III. H₂O₂ 100 μ M: 經二次 H₂O₂ 100 μ M 處理培養於組織培養皿的 WJ-MSCs
- IV. H₂O₂ 100 μ M + pattern: 經二次 H₂O₂ 100 μ M 處理培養於 C5(AR 2) 星形膠原蛋白島嶼的 WJ-MSCs
- V. pattern: 未經任何處理培養於星形膠原蛋白微島嶼的 WJ-MSCs

1. 將細胞培養於組織培養皿和膠原蛋白島嶼並置於 8 孔盤中。
2. 24 小時後以濃度為 100 μ M 的 H₂O₂ 溶液處理 WJ-MSCs 60 分鐘。
3. 60 分鐘後更換培養液為不含 H₂O₂ 的 EMEM。
4. 第一次處理結束後，培養三天，更換培養液，進行第二次處理。
5. 第二次處理後，培養兩天，進行流式細胞儀分析，檢測細胞成骨分化率。

(七) 流式細胞儀分析

1. 從培養箱取出細胞，移除原培養液，以 PBS 潤洗細胞一次，加入 0.05% 胰蛋白酶使其脫附，將細胞從 8 孔盤移至微量離心管。
2. 轉速 2500 rpm 離心 5 分鐘，移除上清液，再使用 3.7% 甲醛水溶液沖散均勻細胞，同時也固定細胞 10 分鐘。
3. 在轉速 2500 rpm 下離心 5 分鐘，移除上清液，加入 0.1% triton X-100 將細胞均勻沖散，同時也裂解細胞膜 10 分鐘。
4. 在轉速 2500 rpm 下離心 5 分鐘，移除上清液。
5. 使用 PBS 以體積比 1:500 稀釋骨鈣蛋白一級抗體 (osteocalcin polyclonal antibody)和具有螢光分子團的二級抗體 (goat anti-rabbit antibody)。
6. 加入骨鈣蛋白一級抗體沖散均勻細胞一小時，再於轉速 2500 rpm 下離心 5 分鐘，移除多餘的一級抗體。
7. 加入二級抗體，並且冰浴反應一小時，於轉速 2500 rpm 下離心 5 分鐘，移除微反應的二級抗體。
8. 將細胞回溶於 PBS 並轉移至塑膠試管中。
9. 放入流式細胞儀檢測於波長 525nm 的螢光訊號，設定每一試管最多可採集 10,000 個細胞。

原理:

流式細胞儀可在細胞處於流體狀態下時，觀測並記錄細胞特質及個數。因使用免疫染色法，將特定的生物標記物用螢光分子團染色，無論是細胞膜表面、細胞質或細胞核內外，只要帶有螢光分子團皆可被偵測。流式細胞儀的應用相當廣

泛，除了檢測表面抗原外，也可用於細胞內 pH 值測定及分析細胞凋亡等。流式細胞儀主要由液流系統(fluid system)、光學系統(laser system)及電子系統(electronic system)，三部分組成。液流系統主要的目的是使細胞一顆一顆通過雷射光束。接著細胞受雷射光激發後所產生的特定光學訊號，會透過一連串的透鏡及濾鏡依波長及散射角度引導至不同的偵測器，再將此光學訊號轉為電子訊號，由電腦加以分析樣品中的細胞類型。流式細胞儀可分析的訊號主要有散射光訊號和螢光訊號。散射光訊號的可分析細胞的大小、型態及顆粒性等。螢光訊號則是指細胞受到螢光分子團染色後受到不同波長的光激發，會發射出不同波長的螢光，以顯示不同的螢光訊號，這些螢光訊號可反映不同細胞的特徵，在進行分化率結果分析時，主要參照螢光訊號的結果。

(八)定量 APPJ 處理後培養液內 NO₂ 濃度

1. 配置檢量線溶液：以 DI water 溶解 NaNO₂，配置 NO₂ 濃度為 0、1.25、2.5、5、10、20、30、40、50、100、150 和 200 μM 的檢量溶液。
2. 以 APPJ 處理 EMEM，每個樣品 250 μL，每個處理時間有三個樣品，處理時間為 0、10、20、30、60 和 120s。
3. 配置格里斯試劑：由溶解於水中的 1% 磺胺和溶解於 5% 磷酸中的 0.1% N-(1-萘基)乙二胺以 1:1 比例混合。
4. 將格里斯試劑和水以 13:2 的比例混合，加入檢量溶液及 APPJ 處理後的 EMEM 中，靜置一段時間。
5. 利用 ELISA reader (540 nm wavelength) 檢測吸光值。繪製 NO₂ 濃度的檢量線。
6. 以檢量線計算各樣本 NO₂ 濃度並比較差異。

(九) 定量 APPJ 處理後培養液內 H₂O₂ 濃度

1. 配置檢量線溶液：配置 H₂O₂ 濃度為 0、2、6、10、14、18、和 20 ppm 的檢量線溶液，再將各別濃度的 H₂O₂ 溶液以水稀釋一倍。
2. 配置 10% 碘化鉀溶液和 0.1% 鉬酸銨溶液，再將兩溶液以 1：1 比例均勻混合。
3. APPJ 處理處理的 EMEM，每個樣品 250 μ l，每個處理時間有三個樣品，處理時間為 0、10、20、30、60 和 120s。
4. 將不同濃度的 H₂O₂ 標準液和不同 APPJ 處理時間的 EMEM 培養液，各取 100 μ l 置 96 孔盤，並加入 10% 碘化鉀溶液和 0.1% 鉬酸銨的混合溶液，靜置 5 分鐘。
5. 利用 ELISA reader (350 nm wavelength) 檢測吸光值。繪製 H₂O₂ 濃度的檢量線。
6. 以檢量線計算各樣本 H₂O₂ 濃度並比較差異。

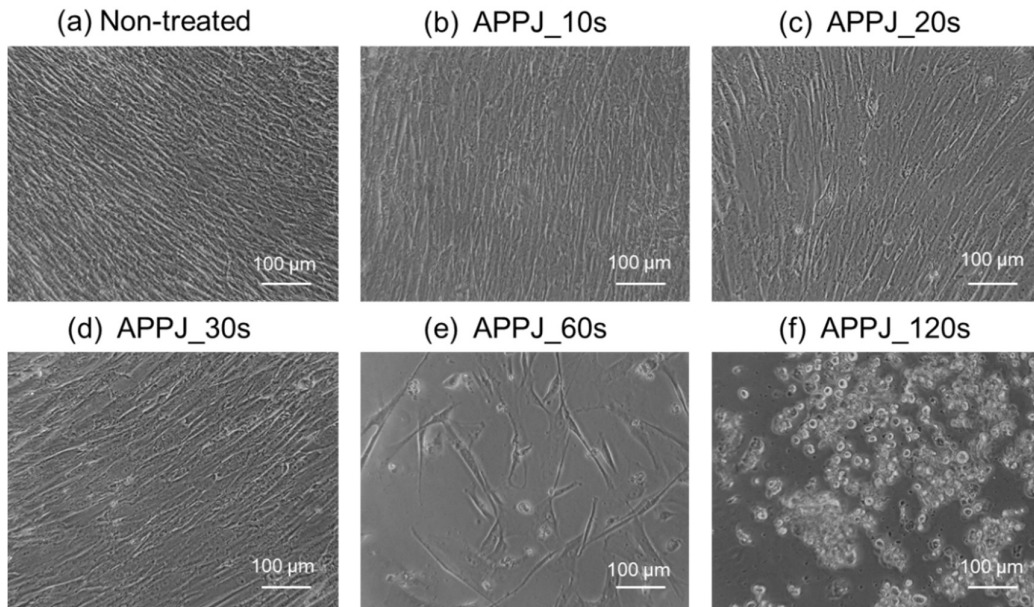
參、 研究結果與討論

一、最適化 APPJ 處理時間、H₂O₂ 溶液濃度

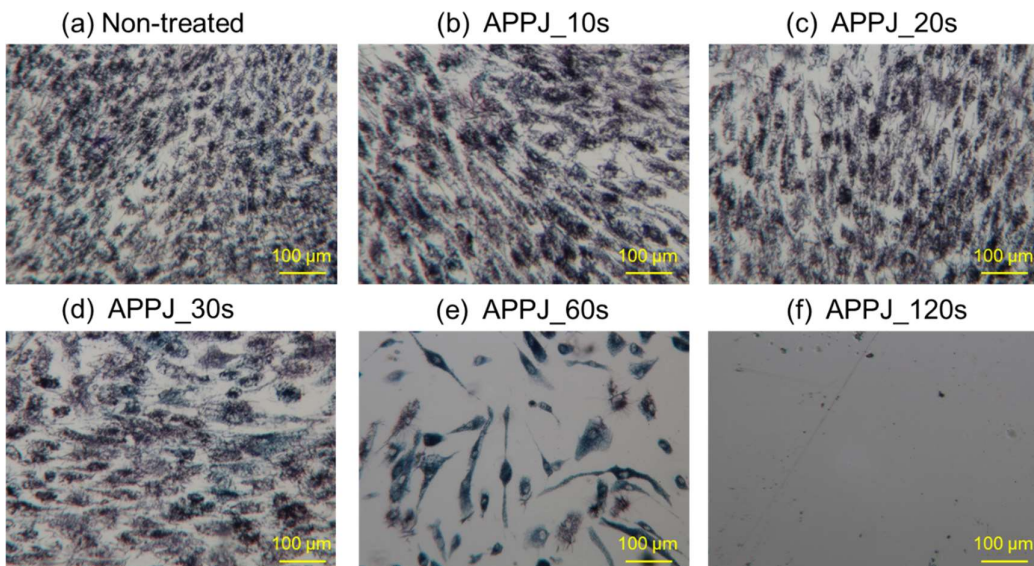
(一) APPJ 以不同時間參數處理 WJ-MSCs

如圖(七)，在使用 APPJ 對 WJ-MSCs 處理不同時間，並培養到實驗第五天後，我們從顯微鏡觀察到在 APPJ 處理 10s 至 30s(圖九 (b)~(d)) 細胞皆有貼附，型態呈長條形，但細胞密度較處理 0s (圖九之 (a)) 控制組下降，且細胞大小較對照組大；處理 60s(圖九之 (e)) WJ-MSCs 型態明顯改變，呈長紡錘狀，細胞大小比電漿處理 0s 至 30s (圖九 (a) ~ (d))更大；處理 120s (圖九之 (f)) WJ-MSCs 懸浮，細胞死亡。另外，加入 MTT 試劑反應 4 小時後的 WJ-MSCs 之甲臍(formazan) 結晶如圖十。

同時參考觀察到的細胞型態 (如圖九)與計算得的細胞存活率 (如圖十一)後，我們發現處理 10s、20s 和 30s (圖九之 (b)~(d)) 組別的 WJ-MSCs 的細胞數皆大於 60%。而處理 20s 及 30s (圖九之 (c)、(d)) 的細胞存活率則沒有明顯差異，且光學顯微鏡視野下的培養面積將近 90% 被細胞覆蓋。雖然在 MTT 分析中，10s、20s 和 30s (圖九 (b)~(d)) 處理後細胞存活率和處理 0s (圖九之 (a)) 控制組相比皆下降，但培養第五天的細胞並沒有脫附，且皆有延展，細胞之間貼附緊密，生長狀態良好，因此選擇 30s 作為後續實驗的 APPJ 處理時間參數。

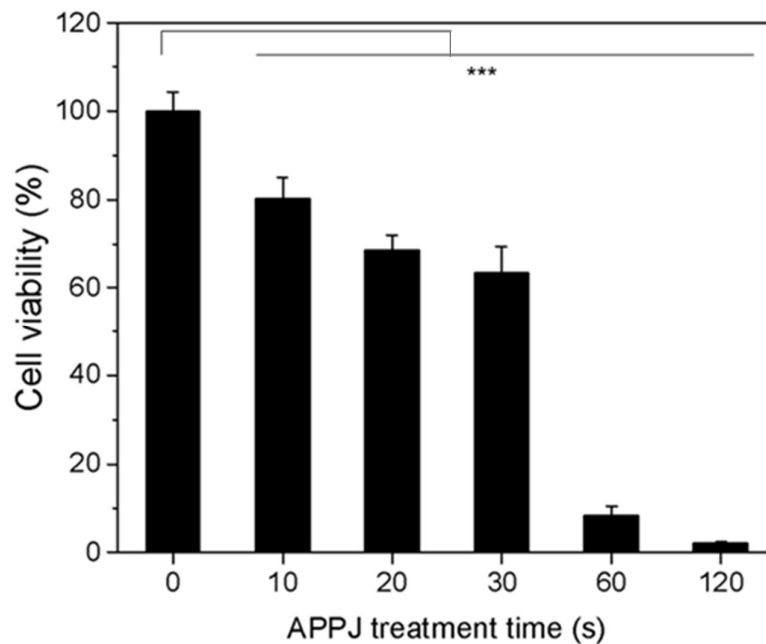


圖九、WJ-MSCs 種植於 TCPS 並培養 5 天，在培養後 24 小時 (第 0 天) 和第 3 天利用 APPJ 處理，在顯微鏡下觀察的細胞形態圖。處理時間為 (a) 0s、(b) 10s、(c) 20s、(d) 30s、(e) 60s 和 (f) 120s。(WJ-MSC 密度: 24,000 cells/cm², scale bar: 100 μm)



圖十、WJ-MSCs 種植於 TCPS 並培養 5 天，在培養後 24 小時 (第 0 天) 和第 3 天利用 APPJ 處理，在加入 MTT 試劑反應四小時後的結晶。處理時間為 (a) 0s、(b) 10s、(c) 20s、(d) 30s、(e) 60s 和 (f) 120s。(WJ-MSCs 密度: 24,000

cells/cm², scale bar: 100 μm)



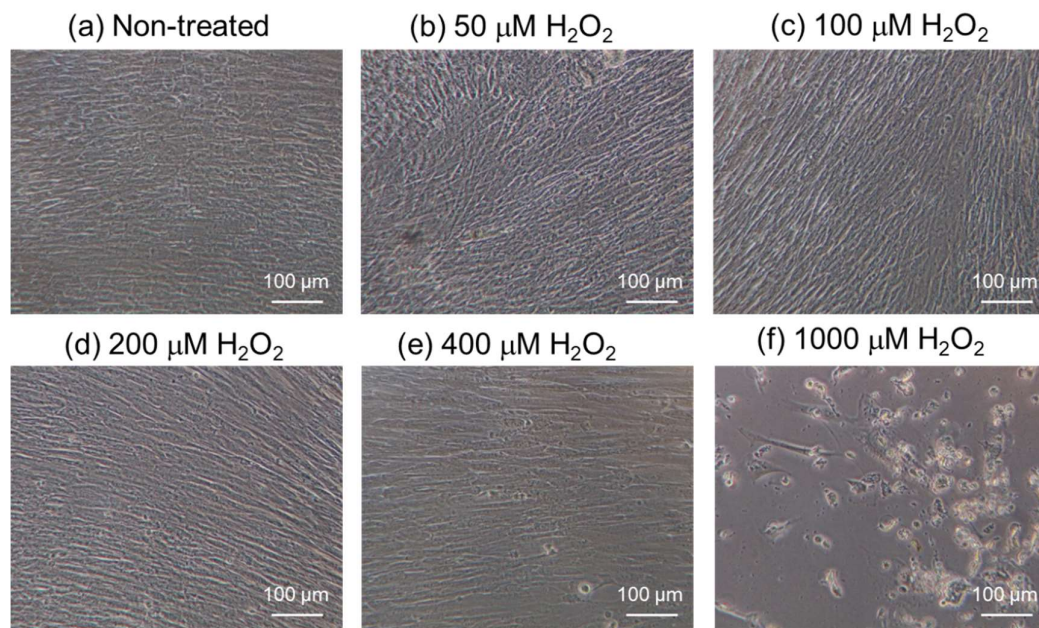
圖十一、MTT Assay：WJ-MSCs 種植於 TCPS 並培養 5 天，在培養後 24 小時 (第 0 天) 和第 3 天利用 APPJ 處理，處理時間為 0、10、20、30、60 和 120 s，利用 MTT 試驗和 ELISA reader 檢測結果計算得的細胞存活率 (%) 分別為：100、80.2、68.2、63.3、8.2 和 2.2。(WJ-MSCs 密度:24,000 cells/cm², ***: p<0.001)

(二) H₂O₂ 以不同溶液濃度處理 WJ-MSCs

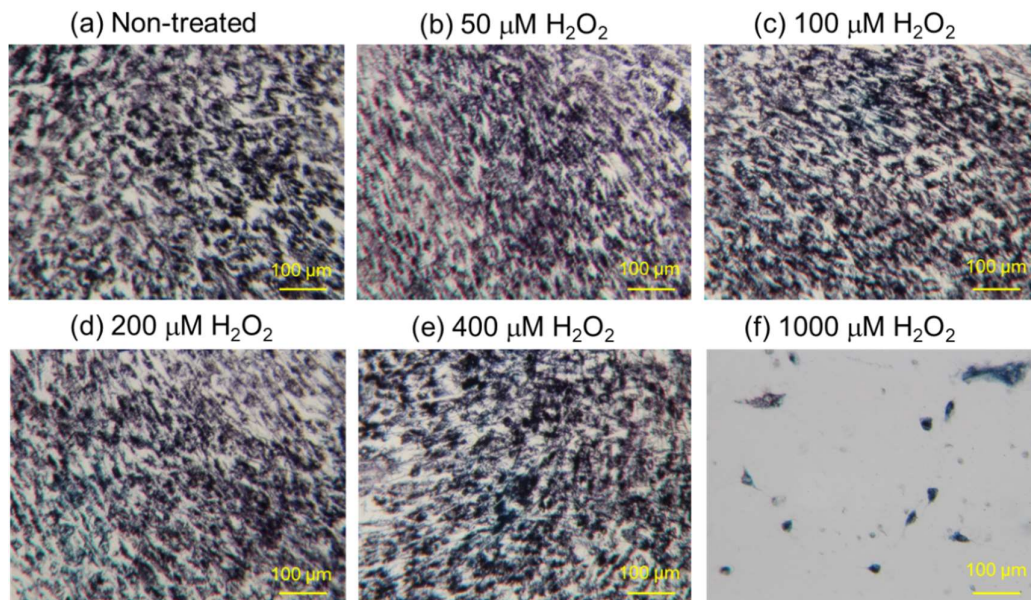
分別以 0、50、100、200、400 和 1000 μM 的 H₂O₂ 溶液，於培養第一天和第三天處理 WJ-MSCs 兩次後，於培養第五天進行細胞存活率分析。第五天時的 WJ-MSCs 細胞型態如圖十二。在第五天時，濃度為 50、100、200 和 400 μM 的組別細胞都有貼附 (如圖十二 (a)~(e))，細胞型態呈長條狀互相緊貼，整體形狀較濃度 0 μM 的控制組為細長，且單一細胞面積較大。在濃度 400 μM 的組別，細胞之間的邊界較明顯。而在經 1000 μM H₂O₂ 處理後出現大量壞死的 WJ-MSCs

(如圖十二 (f))。除 50 μM 外，所有經過 H_2O_2 處理的細胞中都有少量圓球顆粒狀結構。此外，在加入 MTT 試劑反應 4 小時後的 WJ-MSCs 之甲臍 (formazan) 結晶如圖十三。

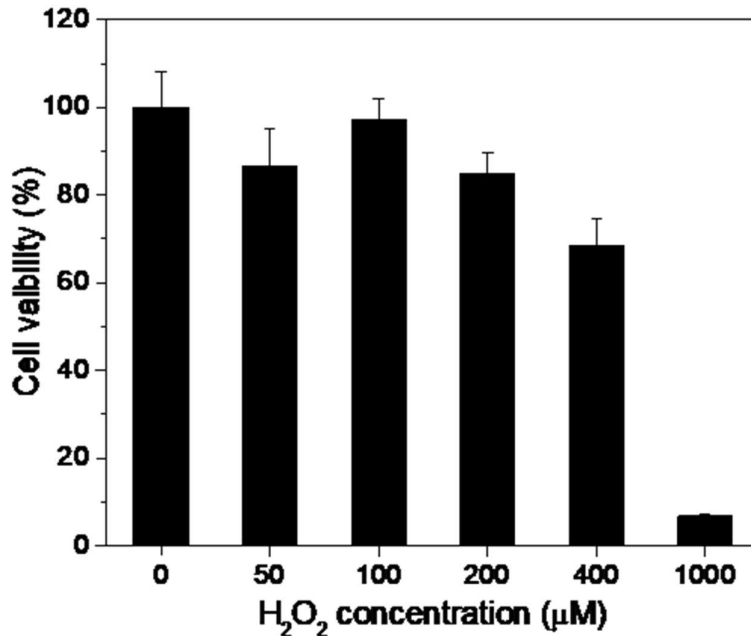
根據 MTT assay 的結果 (圖十四)，WJ-MSCs 在 100 mM H_2O_2 中培養兩次後表現出相較於其他實驗組更高的活力，高達 97.2%。而當濃度在 200 至 1000 μM 時，WJ-MSCs 的存活率呈遞減。因此選擇 100 μM 作為後續實驗的 H_2O_2 處理濃度。



圖十二、WJ-MSCs 種植於 TCPS 並培養 5 天，在培養後 24 小時 (第 0 天) 和第 3 天利用 H_2O_2 處理，第五天時的 WJ-MSCs 細胞型態， H_2O_2 處理濃度為 (a) 0 μM 、(b) 50 μM 、(c) 100 μM 、(d) 200 μM 、(e) 400 μM 和 (f) 1000 μM (WJ-MSCs 密度: 16,000 cells/ cm^2 , scale bar: 100 μm)



圖十三、WJ-MSCs 種植於 TCPS 並培養 5 天，在培養後 24 小時 (第 0 天) 和第 3 天利用 H_2O_2 處理，第五天時加入 MTT 試劑反應四小時後的結晶呈色， H_2O_2 處理濃度為 (a) $0 \mu M$ 、(b) $50 \mu M$ 、(c) $100 \mu M$ 、(d) $200 \mu M$ 、(e) $400 \mu M$ 和 (f) $1000 \mu M$ (WJ-MSCs (WJ-MSCs 密度: $16,000 \text{ cells/cm}^2$, scale bar: $100 \mu m$)



圖十四、MTT Assay：WJ-MSCs 種植於 TCPS 並培養 5 天，在培養後 24 時 (第 0 天) 和第 3 天利用 H₂O₂ 處理，處理時間為 0、10、20、30、60 和 120 s，利用 MTT 試驗和 ELISA reader 測格結果計算得的細胞存活率 (%) 分別為：100、86.6、97.2、84.8、68.4 和 6.68。(細胞密度：24,000 cells/cm²)

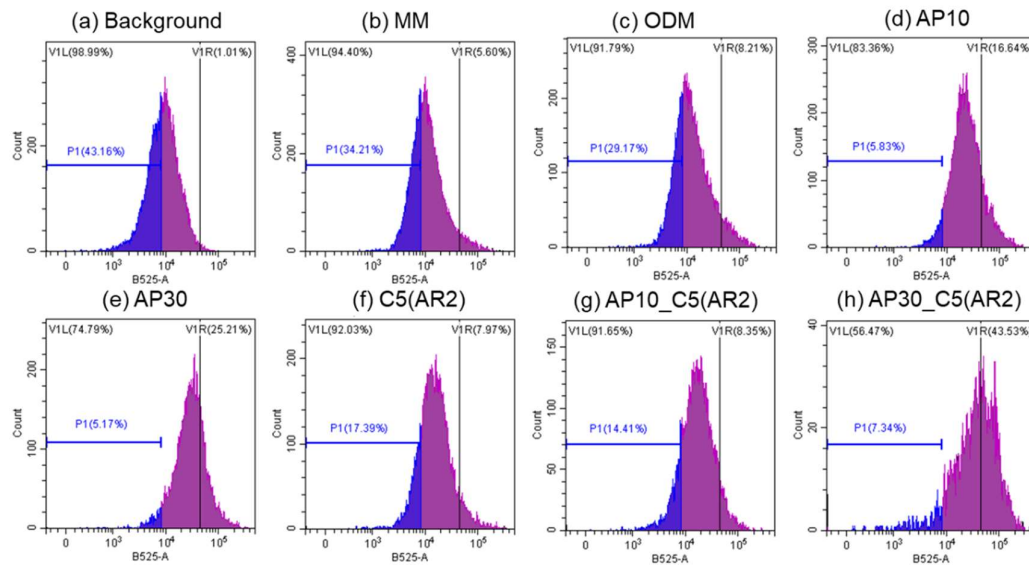
二、比較不同情況下 WJ-MSCs 分化為成骨細胞的狀況

(一) 探討以 APPJ 和膠原蛋白微島嶼處理 WJ-MSCs 後分化為成骨細胞的比例

在以 MM、ODM、APPJ 10s、APPJ 30s、APPJ 10s + pattern、APPJ 30s + pattern 和 pattern 等方法處理 WJ-MSCs 後，以流式細胞儀檢測螢光強度 (圖十五)，將繼代培養的 WJ-MSCs 作為背景值，並假設此未處理的細胞 (圖十五 (a)) 分化率為 1%，設定螢光訊號閾值，計算每個樣本中超越螢光閾值的細胞數，再除以該樣本蒐集的細胞總數計算細胞成骨分化率 (圖十六 (a))。我們發現與陰性控制組 (MM，圖十五 (b)) 比較，APPJ 10s 和 APPJ 30s (圖十五 (c)、(d)) 組別成骨細胞分化率都有明顯提高，分別提高 11.04% 和 19.61%，且 APPJ 30s 的成骨分化率 (圖十五 (d)) 相較 APPJ 10s (圖十五 (c)) 高出 8.57%。在 APPJ 時間參數相同的情況下，添加 C5 (AR 2, AR = R/r, r = 20 µm) 星形膠原蛋白微島嶼，APPJ

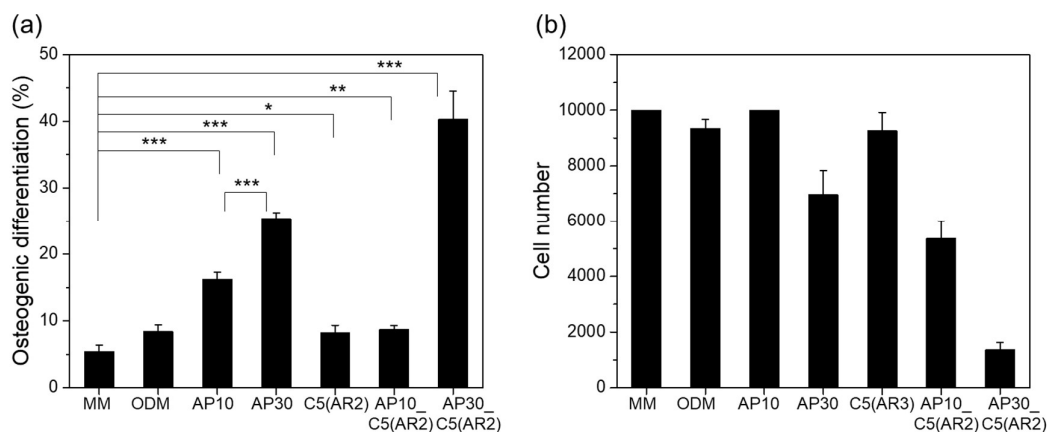
10s + pattern 之成骨分化率 (圖十五 (g)) 較 APPJ 10s 低 8.29 %，APPJ 30s + pattern 之成骨分化率則高於 APPJ 30s 的組別 18.32 %。另外，APPJ 30s + pattern (圖十五 (h)) 作為成骨分化率最高的組別，與 MM (圖十五 (b)) 相比，成骨細胞分化率明顯提高 37.93% (如圖十六)，亦高於 ODM 組的分化率。由此推測，APPJ 及膠原蛋白微島嶼皆能促進 WJ-MSCs 分化為成骨細胞。

在比較細胞數時 (圖 16 (b))，發現在以 APPJ 30s 和 APPJ 30s + pattern 的組別中，流式細胞儀所檢測到的細胞數較少。培養於 C5(AR2) 星形膠原蛋白微島嶼並以 APPJ 處理的組別和沒有培養於島嶼上的組別相比，細胞數量也較少，但分化率相對陰性控制組 MM 較高。推測造成此現象的原因有可能是細胞在處理過程中死亡，或者因為細胞分化後離開細胞週期，進入 G0 期而停止分裂。



圖十五、WJ-MSCs 培養於 TCPS 和星形膠原蛋白島嶼並培養 5 天，在第 0 天和第 3 天利用大氣電漿處理 10 和 30 秒。成骨細胞分化的直方圖：(a) MM、(b) ODM、(c) AP10、(d) AP_30、(e) C5(AR2) (Stellate microislands)、(f) AP10_C5(AR2) 和 (g) AP30_C5(AR2) 以不同處理時間的 APPJ 和膠原蛋白微島嶼處理 WJ-MSCs，並以免疫染色法染色後以流式細胞儀檢測得的螢光強度。(細胞密度：24,000 cells/cm²) (MM: EMEM 培養液，ODM: 成骨細胞誘導培養液，AP:

大氣電漿處理，時間處理為 10 和 30 秒。



圖十六、WJ-MSCs 培養於 TCPS 和星形膠原蛋白島嶼並培養 5 天，在第 0 天和第 3 天利用大氣電漿處理 10 和 30 秒。(a) 成骨細胞分化率：MM、ODM、AP10、AP30、C5(AR2) (Stellate microislands)、AP10_C5(AR2) 和 AP30_C5(AR2) 分別為 0.07、1.01、5.60、8.21、16.64、25.21、7.97、8.35 和 43.53%。(細胞密度：24,000 cells/cm², *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001)。(b) 流式細胞儀測得的細胞數 (個)：10000、9352、9992、6965、9263、5370 和 1368。(MM：EMEM 培養液，ODM：成骨細胞誘導培養液，AP：大氣電漿處理，時間處理為 10 和 30 秒)。

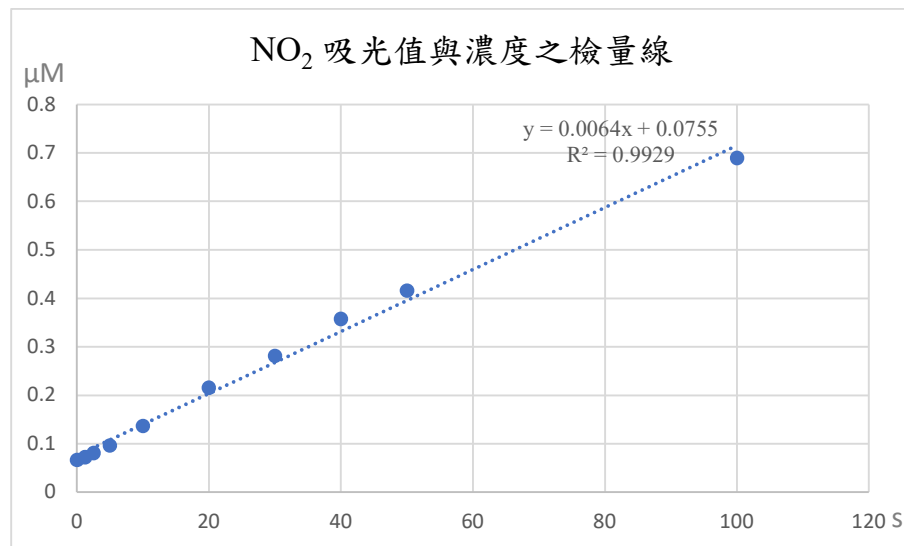
三、 定量 APPJ 處理後培養液中的 ROS 和 RNS 組成

(二) 定量 APPJ 處理後培養液中的 NO₂ 濃度

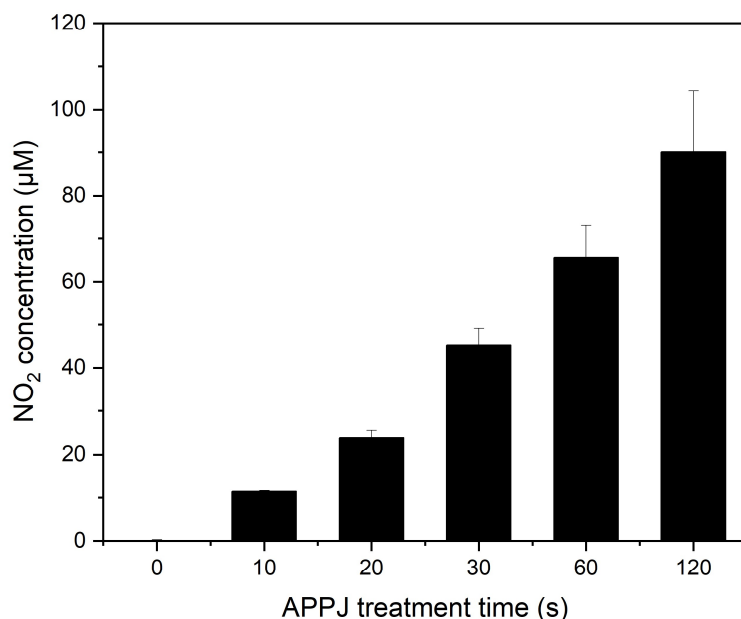
計算 NO₂ 濃度方式為：各樣本在 ELISA Reader 540 nm 下的吸光值扣除處理 0s 之對照組在 540nm 的溶液吸光值，由於 NO₂ 是 APPJ 處理後培養液所含的產物，因此訂定 APPJ 未處理時培養液內 NO₂ 濃度為 0μM，校正處理 0s~120s 所測得的吸光值。控制 NO₂ 濃度為 0 μM、1.25 μM、2.5 μM、5 μM、10 μM、20 μM、30 μM、40 μM、50 μM 和 100 μM，並利用這些濃度實際測得在 540 nm 下的吸光值，繪製 NO₂ 濃度與吸光值的檢量線 (如圖十七)，橫坐標為 NO₂ 濃

度，縱座標為吸光值。且檢量線 R^2 值大於 0.99，為有效之檢量線。

根據格里斯試驗並帶入檢量線公式的結果 (如圖十八)，在未處理時的 NO_2 濃度為 $0\mu\text{M}$ ，在處理 10s 後，培養液 NO_2 濃度提升至 $11.4\mu\text{M}$ 。根據 0s、10s、20s、30s、60s 和 120s 的濃度數值，隨著處理時間加長，培養液中的 NO_2 濃度有穩定增加之趨勢。



圖十七、由 NO_2 濃度為 0、1.25、2.5、5、10、20、30、40、50 和 $100\mu\text{M}$ 的培養液，和其加入格里斯試劑並在 ELISA Reader 波長 540 nm 下測得的吸光值繪製而成的檢量線。檢量線公式為 $y=0.0064x+0.0755$ ， R^2 值為 0.9929。



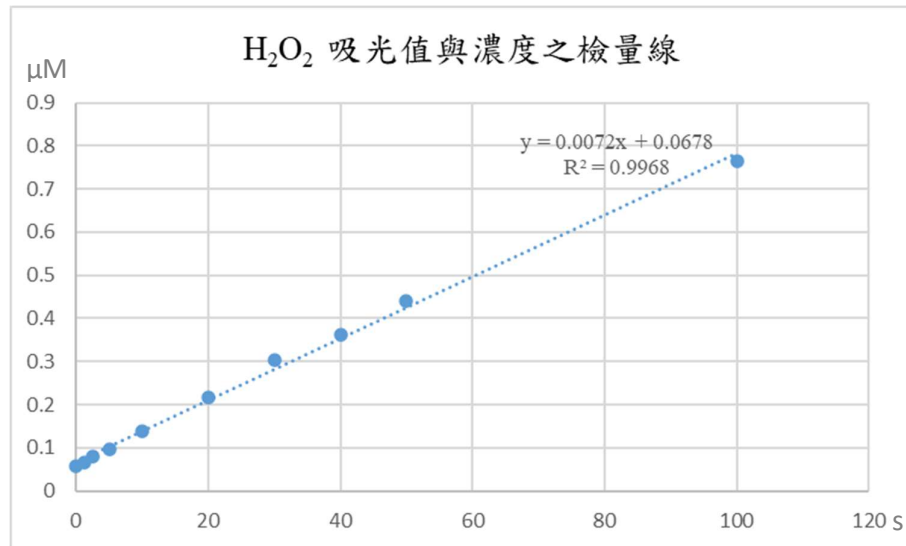
圖十八: EMEM 培養液在 APPJ 處理時間為: 0、10、20、30、60 和 120 s 的 NO₂ 濃度定量。NO₂ 濃度(µM)分別為 0、11.40、23.85、45.21、65.59 和 90.06。

(一) 定量 APPJ 處理後培養液中的 H₂O₂ 濃度

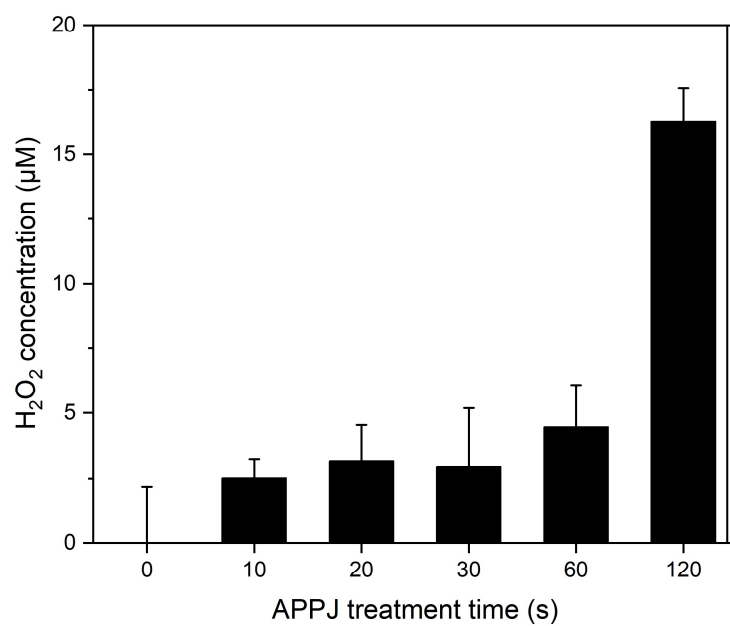
計算 APPJ 處理後培養液中 H₂O₂ 濃度方式為：各樣本在 350 nm 下的吸光值扣除處理 0s 之對照組在 ELISA Reader 350 nm 的溶液吸光值，由於 H₂O₂ 屬於 ROS，為 APPJ 處理過程中產生之物質，因此訂定 APPJ 處理 0s 時培養液內 H₂O₂ 濃度為 0 µM，校正處理 0s ~120s 所測得的吸光值。控制 H₂O₂ 濃度為 0、1.25、2.5、5、10、20、30、40、50 和 100 µM，並利用這些濃度實際測得在 ELISA Reader 350 nm 下的吸光值，繪製 H₂O₂ 濃度與吸光值的檢量線 (如圖十六)，橫坐標為 H₂O₂ 濃度，縱座標為吸光值。且檢量線 R² 值高於 0.99，為可用之檢量線。

根據計算結果，在未處理時的 H₂O₂ 濃度為 0µM，在處理 10s 後，培養液 H₂O₂ 濃度提升至 2.53µM。根據 0s、10s、20s、30s、60s 和 120s 的濃度數值，在 APPJ 處理 0s ~ 60s 的組別中，隨著處理時間增加，培養液中的 H₂O₂ 濃度

略為增高。而當處理時間由 60s 加長至 120s 時，所測得的 H_2O_2 濃度顯著增加 $11.83 \mu\text{M}$ (如圖十七)。



圖十六、 H_2O_2 濃度標準液為 0、1.25、2.5、5、10、20、30、40、50 和 $100 \mu\text{M}$ 的培養液和加入碘化鉀和鉬酸胺混合液後，在 ELISA Reader 波長 350nm 下測得的吸光值繪製而成的檢量線。檢量線公式為 $y=0.0072x+0.0678$ ， R^2 值為 0.9968。



圖十七、利用 APPJ 處理以 0、10、20、30、60 和 120 秒的處理時間處理 EMEM 培養液，再利用碘化鉀和鉬酸胺混合液定量 H₂O₂ 濃度。H₂O₂ 濃度分別為 0、2.53、3.17、2.96、4.46 和 16.29 μM。

肆、結論與應用

本研究以探討 APPJ、 H_2O_2 及膠原蛋白微島嶼對於 WJ-MSCs 分化的影響為目標。目前我們完成了三個目標：最適化 APPJ 和 H_2O_2 處理參數、檢測 APPJ 及膠原蛋白微島嶼處理 WJ-MSCs 成骨分化率，及定量 APPJ 處理後 EMEM 的 NO_2 和 H_2O_2 濃度。

最適化 APPJ 和 H_2O_2 處理參數時，經探討後，我們認為 APPJ 處理 WJ-MSCs 10s、20s、30s 皆對細胞存活率無太大影響，且 20s、30s 處理時間細胞存活率相近，故選擇 10s、30s 作為後續實驗參數。另一部分，WJ-MSCs 在 100 mM H_2O_2 中具有較高存活率，故選擇 100 μ M H_2O_2 作為後續實驗的參數。

將 WJ-MSCs 以 APPJ 結合膠原蛋白微島嶼處理後，我們發現經過 APPJ 處理的 WJ-MSCs 皆有較高的成骨分化率，且處理 30s 分化率大於 10s。培養於膠原蛋白微島嶼上也較未培養於島嶼上的組別有較高的分化率。其中分化率最高的為 APPJ 處理 30s，並培養於 C5(AR 2) 星形膠原蛋白微島嶼上的組別。由此得知 APPJ 處理及膠原蛋白微島嶼皆對成骨分化有促進的作用。

定量 APPJ 處理後 EMEM 的 NO_2 和 H_2O_2 濃度後，我們發現 NO_2 和 H_2O_2 濃度皆隨著 APPJ 處理時間增加而上升。由於在進行成骨分化率分析時，發現 APPJ 處理 30s 之細胞分化率高於 APPJ 處理 10s 之組別，因此，我們推測 APPJ 影響細胞分化的機制可能與其於培養液中產生的 NO_2 和 H_2O_2 有關。

未來我們將繼續進行 H_2O_2 及膠原蛋白微島嶼誘導 WJ-MSCs 進行成骨分化，以及 APPJ、 H_2O_2 結合膠原蛋白微島嶼誘導分化為脂肪細胞的實驗。進一步探討以上處理法對細胞分化造成的影響的機制及原因，以及是否可做為一種更精確控制細胞分化方向的方法。

伍、參考文獻

1. 李志家. (2019)。利用通用大氣電漿束於增進大鼠慢性傷口癒合之研究。
<https://hdl.handle.net/11296/zwxx4d>
2. 軟微影製程－Soft Lithography. (2005, April 5). 材料世界網。
<https://www.materialsnet.com.tw/DocView.aspx?id=4572>
3. 黃雪芳. (2019). 結合氧化應激與過濾擠壓法製備細胞外奈米囊泡並應用於癌症疫苗. 台灣碩博士論文加值系統. <https://hdl.handle.net/11296/68qqbf>
4. 蔡冠英、王孟菊(2022)。利用電將改植生醫材料表面應用於誘導幹細胞分化。化工，69 (5)，21-29。
http://www.twiche.org.tw/ezfiles/0/1000/attach/81/pta_1911_6449213_69019.pdf
5. 羅立凌 (2022)。利用外源光生物調節法結合膠原蛋白微島嶼控制幹細胞進行成骨分化。〔碩士論文。國立臺灣科技大學〕臺灣博碩士論文知識加值系統。
<https://hdl.handle.net/11296/8mrss2>
6. 蘇正偉 (2008)。插入蛋白族對細胞貼附能力影響之研究。〔碩士論文。國立嘉義大學〕臺灣博碩士論文知識加值系統。
<https://hdl.handle.net/11296/hmmvm3>
7. Anselme, K., Wakhloo, N. T., Rougerie, P., & Pieuchot, L. (2018). Role of the Nucleus as a Sensor of Cell Environment Topography. *Advanced healthcare materials*, 7(8), e1701154. <https://doi.org/10.1002/adhm.201701154>
8. Atala, A. (2012). Regenerative Medicine Strategies. *Journal of Pediatric Surgery*, 47(1), 17–28.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2011.10.013>
9. Atashi, F., Modarressi, A., & Pepper, M. S. (2015). The Role of Reactive Oxygen Species in Mesenchymal Stem Cell Adipogenic and Osteogenic Differentiation: A Review. *Stem Cells and Development*, 24(10), 1150–1163.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1089/scd.2014.0484>
10. Higuchi, M., Dusting, G. j, Peshavariya, H., Jiang, F., Hsiao, S. tzu-feng, Chan, E. C., & Liu, G. (2012). Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells into Fat Involves Reactive Oxygen Species and Forkhead Box O1 Mediated Upregulation of Antioxidant Enzymes. *Stem Cells and Development*, 22(6).
<https://doi.org/10.1089/scd.2012.0306>
11. Lee, M. ryul, Kwon, keon woo, Jung, H., Kim, H. nam, Suh, kahp Y. , Kim, K., & Kim, kye-seong. (2010). Direct Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Selective Neurons on Nanoscale Ridge/Groove Pattern Arrays. *Biomaterials*, 31(15), 4360–4366.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.02.012>

12. Martínez, E., Engel, E., Planell, J. A., & Samitier, J. (2009). Effects of artificial micro- and nano-structured surfaces on cell behaviour. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft*, 191(1), 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2008.05.006>
13. Somaiah C, Kumar A, Mawrie D, Sharma A, Patil SD, Bhattacharyya J, et al. (2015) Collagen Promotes Higher Adhesion, Survival and Proliferation of Mesenchymal Stem Cells. *PLoS ONE* 10(12): e0145068. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145068>

【評語】 080009

本篇研究以人類臍帶間質幹細胞，作為誘導分化對象，使其貼附於具最適化圖形的膠原蛋白微島嶼，結合大氣電漿及 H₂O₂ 二種氧化應激法刺激細胞，探討誘導 WJ-MSC 幹細胞分化的最佳條件。本研究發現單獨使用大氣電漿處理可使成骨分化率增加，而大氣電漿處理再加上星形微島嶼培養細胞時，則更顯著的提高成骨分化率。

優點：

再生醫學透過控制幹細胞分化以應用於修復受損或是建構新組織。目前誘導幹細胞分化的方法多為添加成長因子的化學誘導法，然而此方法具有高成本和費時等缺點。本研究期望能此新技術取代傳統化學誘導法，對組織工程做出貢獻。

建議：

1. 利用大氣電漿和 H₂O₂ 處理並結合特定的微島嶼圖形。透過不同實驗參數探討可使細胞分化率最高的條件，以期更有效地控

制幹細胞分化為成骨細胞和脂肪細胞。但需要確定此分化成的骨細胞和脂肪細胞功能是否健全。並比較使用添加化學誘導因子的培養基分化成的骨細胞和脂肪細胞功能差異性，以確定新方法可行。

2. 應說明一開始如何知道用大氣電漿和 H₂O₂ 來控制幹細胞分化。