

2025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	培養間葉幹細胞以了解三微環境對形成脂肪過程基因表現的影響

就讀學校	高雄市立高雄女子高級中學
指導教師	呂雲瑞
作者姓名	林采臻 魏語靚

關鍵詞	<u>間葉幹細胞、三維球形微孔、RNA定序</u>
-----	---------------------------

作者簡介



我們是來自高雄女中的學生。這次我們的研究方向屬於生物化學的領域, 透過實驗室中的儀器設備, 進行了為期一年的實驗與數據分析。從細胞培養到蛋白質分析, 每個步驟我們都親自執行, 並仔細記錄實驗數據。雖然過程中遇到許多失敗, 但這些經驗讓我們更了解實驗設計的重要性。感謝指導老師的協助, 讓我們能順利完成這項研究。

研究報告封面

2025 年臺灣國際科學展覽會

研究報告

區別：南區

科別：生物化學科

作品名稱：培養間葉幹細胞以了解三微環境對形成脂肪
過程基因表現的影響

關鍵詞：間葉幹細胞、三維球形微孔、RNA 定序（最多三
個）

編號：

摘要

本研究旨在比較人類間葉幹細胞 (human Mesenchymal Stem Cells, hMSCs) 在三維球形微孔和二維平面聚丙烯醯胺 (polyacrylamide, PA) 水凝膠上的生長和分化特性。我們製備了具有 60 μ m 直徑球形微孔陣列的 PA 水凝膠平面 PA 水凝膠，將 hMSCs 培養在這兩種不同的基質上，加入藥劑誘導向脂肪細胞分化七天。透過細胞計數、形態學觀察和成像分析，我們系統地比較了細胞在兩種環境下的形態變化、脂滴大小和分化進程。再透過 RNA-seq 分析，我們找出了三維及二維環境培養的細胞的差異表達基因，並做出火山圖與熱圖。

本研究建立一種新型三維球形微孔的培養環境，成功地為 hMSCs 提供更接近體內條件的微環境。進一步觀察 hMSCs 在三維環境中生長與分化，期許為組織工程和再生醫學領域提供新的見解和潛在的應用方向。

Abstract

This study aims to compare the growth and differentiation characteristics of human mesenchymal stem cells (hMSCs) in three-dimensional spherical micropore and two-dimensional planar polyacrylamide (PA) hydrogels. We prepared PA hydrogels with arrays of spherical micropores measuring 60 μm in diameter and cultured hMSCs on these two different substrates, inducing adipogenic differentiation with drugs over a period of seven days. Through cell counting, morphological observation, and imaging analysis, we systematically compared the morphological changes, lipid droplet sizes, and differentiation progress of cells in both environments. Additionally, RNA-seq analysis was performed to identify differentially expressed genes in cells cultured in three-dimensional and two-dimensional environments, producing volcano plots and heatmaps.

This study establishes a novel three-dimensional spherical micropore culture environment, successfully providing hMSCs with a microenvironment that closely resembles *in vivo* conditions. Further observations of hMSCs growth and differentiation in a three-dimensional environment aim to offer new insights and potential application directions for the fields of tissue engineering and regenerative medicine.

壹、前言

一、研究動機

在過去的研究中，人類間葉幹細胞 (human Mesenchymal Stem Cells, hMSCs) 已被證明具有多能分化潛力，能在適當條件下分化為骨頭、軟骨、脂肪細胞等 (Joyce et al., 2021)。隨著組織工程和再生醫學的快速發展，對於精確模擬人體微環境的培養系統需求日益迫切，特別是在脂肪組織工程中，開發能更好地模擬體內條件並支持脂肪細胞長期培養的環境，對於推進基礎研究和臨床應用具有重要意義。

傳統上，細胞的培養和分化多數在二維平面環境中進行，然而，體內環境通常更為複雜，細胞與三維微環境的互動更接近自然狀態 (Guilak et al., 2009)。因此，為了更準確地模擬體內環境，我們建立一種新型的三維球形微孔聚丙烯醯胺 (PA) 水凝膠，旨在為 hMSCs 提供一個更接近體內條件的培養環境。這種三維培養環境能夠提供比二維平面基質更接近體內的物理和幾何特性。最後，我們通過 RNA 定序來解析在不同培養基質上 hMSCs 的基因表達差異，進一步理解三維微環境如何影響細胞的基因表達和生物學行為。

二、研究目的

- (一) 建立三維球形微孔和二維平面聚丙烯醯胺 (PA) 水凝膠作為模擬體內微環境的新型培養基質。
- (二) 透過顯微鏡觀察和量化比較細胞在兩種環境下的形態變化、脂滴大小和分化進程。
- (三) 以轉錄組分析比較人類間葉幹細胞 (hMSCs) 在兩種環境下的生長特性和分化潛能。
- (四) 研究三維微環境曲率對 hMSCs 基因表達和向脂肪細胞分化的調控機制。
- (五) 比較自有 RNA-seq 數據和 NCBI 公開資料庫 GEO (Gene Expression Omnibus) 的人類脂肪細胞公開數據，探究不同培養環境下，hMSCs 的分化與基因表達較趨向何種人體內的脂肪細胞。

三、 文獻回顧

(一) 人類間葉幹細胞 (human Mesenchymal Stem Cells, hMSCs)

人類間葉幹細胞可以從多種來源提取，包括臍帶、骨髓、脂肪和牙髓等。作為一種多功能幹細胞，它們具備增殖和多向分化的能力，能轉化為多種具有特定功能的細胞，如骨細胞、脂肪細胞、肌肉細胞和神經細胞 (Rosen & MacDougald, 2006)。這些細胞的主要功能是促進細胞和組織的再生與修復，因此在未來的細胞療法、組織工程和再生醫學中，具有重要的應用價值和發展潛力 (Pittenger et al., 1999)。

(二) 聚丙烯醯胺 (Polyacrylamide, PA) 水凝膠

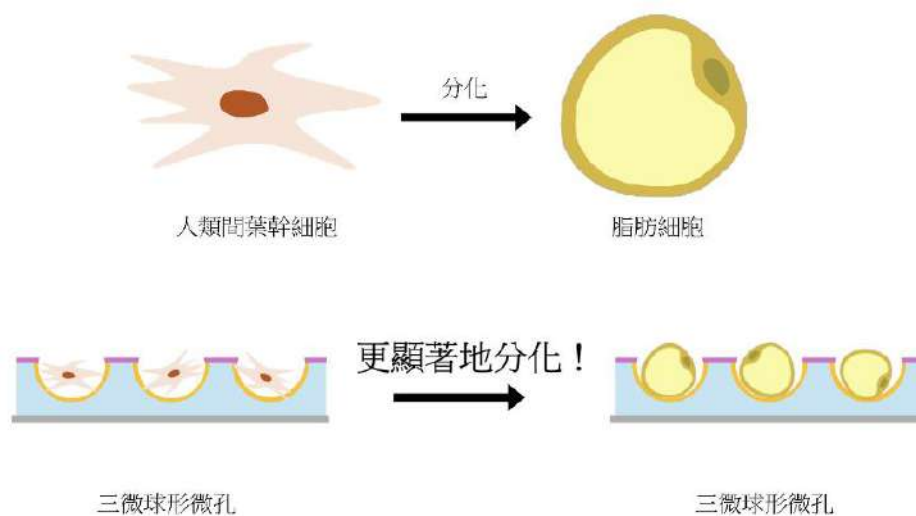
聚丙烯醯胺水凝膠是一種能夠吸收大量水分的三維網絡結構聚合物，它的分子結構由丙烯醯胺單體聚合而成，形成一個具有高度親水性的網絡結構。這種結構賦予了材料優異的吸水膨脹能力，可以吸收自身重量數百倍的水分，同時保持其基本形態和穩定性，為細胞提供一個近似生理環境的人工培養空間。水凝膠的高孔隙率和親水性使其能夠有效保持養分和水分，同時為細胞生長提供良好的微環境。

(三) 纖連蛋白 (Fibronectin)

纖連蛋白 (Fibronectin) 是一種存在於人體中重要的細胞外基質 (Extracellular Matrix, ECM) 醣蛋白。這種蛋白質由兩條相似的多肽鏈通過二硫鍵相連，形成一個龐大的二聚體結構。纖連蛋白作為 ECM 中的重要成分，在維持組織結構和功能方面扮演著核心角色。這種大型醣蛋白透過與 ECM 中的其他成分進行複雜的相互作用，構建起一個精密的三維網絡結構。纖連蛋白能與多種 ECM 蛋白質產生特異性結合，其中最主要的包括各類膠原蛋白、層粘連蛋白、彈性蛋白等。特別是在與膠原蛋白的相互作用中，纖連蛋白可以作為「橋樑分子」，連接細胞表面的整合素受體與 ECM 中的膠原纖維，從而建立起細胞-ECM 之間穩定的連接。

（四）脂肪細胞分化

脂肪細胞 (adipocyte) 的分化始於間葉幹細胞，在特定的誘導因素作用下，間葉幹細胞逐漸向脂肪前驅細胞 (preadipocyte) 轉變。分化過程可以大致分為幾個關鍵階段。首先是脂肪前驅細胞階段，此時細胞開始表現出特定的脂肪細胞標誌物，並逐漸改變其基因表達模式。隨著分化的深入，細胞進入成熟階段。此時，細胞體積顯著增大，細胞質中開始充滿脂滴。這些脂滴最初小而分散，隨著分化的進展，它們會逐漸融合，最終形成一個巨大的脂滴，將細胞核擠壓到細胞邊緣 (Potolitsyna et al., 2024)。



圖一、傳統脂肪細胞及本研究使用球形微孔培養後的分化進程示意圖

（圖片來源：作者親自製作）

（五）RNA-seq

RNA-sequencing (RNA-seq) 是一種利用次世代定序來分析細胞中 RNA 的技術。它可以測量基因在特定條件下的表達量，並識別各種 RNA 分子。本研究旨在分析非 rRNA (ribosomal RNA, 核糖體核糖核酸) 的 RNA 分子，因此所有的定序樣品在建庫過程皆有做 rRNA (rRNA depletion) 處理。

RNA-seq 相較於微陣列 (microarray) 和其他表達分析技術，有多項優勢。例如，RNA-seq 可以檢測到所有表達的轉錄本，包括低豐度的轉錄物，使得研究者能更全面地分析基因

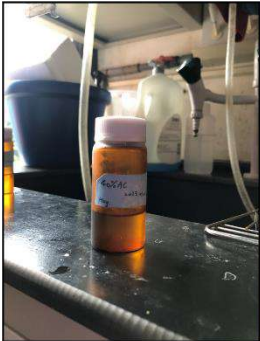
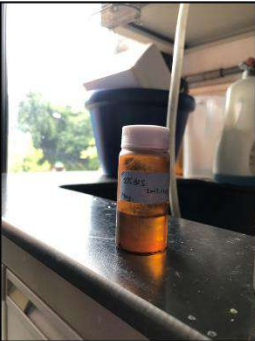
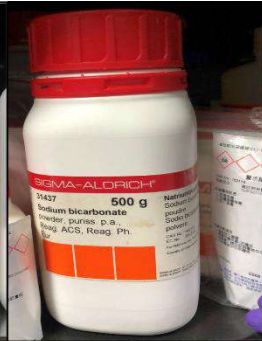
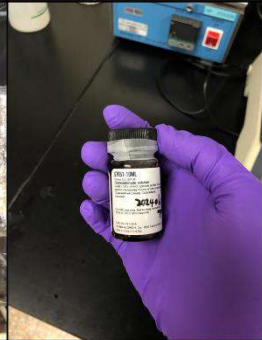
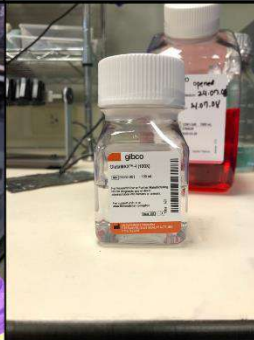
表達。RNA-seq 在靈敏度、精確度和全面性更優於傳統的基因表達技術。

RNA-seq 的過程包括從樣本中提取 RNA、將其反轉錄為 cDNA (complementary DNA，互補去氧核糖核酸)，並透過高通量定序技術讀取 cDNA 序列。這項技術廣泛應用於基因表達分析、轉錄組研究、疾病機制解析和藥物開發，能精確揭示基因調控的細節和生物學過程的變化。

貳、 研究設備與器材

一、 實驗藥品

表一、製作 PA 凝膠及製備細胞培養液所需藥品（圖片來源：作者親自拍攝）

				
40%丙烯醯胺(AC)	2%N,N'-亞甲基 雙丙烯醯胺(BIS)	四甲基乙二胺 (TEMED)	過硫酸銨 (APS)	碳酸氫鈉
				
磺基琥珀醯亞胺基 (Sulfo-SANPAH)	纖維蛋白(Fibronection)	青黴素-鏈黴素(PS)	磷酸鹽緩衝生理鹽水 (PBS)	戊二醛(Glutaraldehyde)
				
牛血清白蛋白(BSA)	最低必須培養基 (MEM-α)	胎牛血清 (FBS)	GlutaMAX添加劑	胰蛋白酶(Trypsin)

二、 分析工具

(一) ENCODE

ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) 是一個生物資訊學和基因組學研究計畫，致力於解析人類基因組中的功能性 DNA 片段。該計畫的網站提供了豐富的資料庫和分析工具，使研究人員能夠探索人類 DNA 的結構與功能。

本實驗使用 ENCODE 作為查找公開 RNA 定序資料的搜尋平台。

(二) GENCODE

GENCODE 是擴充自 ENCODE 的計畫，旨在識別和繪製 ENCODE 區域內的所有蛋白質編碼基因。GENCODE 網站目前提供人類與小鼠的基因組註釋資料，在生物資訊分析的領域中，GENCODE 的數據對於了解基因調控、疾病相關基因變異及其功能研究具有重要作用。

本研究使用了 GENCODE 的基因組註釋資料，以將 RNA 序列映射到人類轉錄組。

(三) SRA Toolkit

SRA Toolkit 是一組專門為處理 NCBI 的序列讀數歸檔 (Sequence Read Archive, SRA) 數據設計的工具集，能協助下載並處理公開的 SRA 數據。

本研究使用 SRA Toolkit 從 SRA 中下載定序數據，並轉換為 FASTQ 格式進行後續分析。

(四) Cutadapt

Cutadapt 是一款專門用於高通量定序數據處理的工具，在生物化學研究中尤其適合對 DNA 或 RNA 定序數據進行初步的質量控制。

本研究使用 Cutadapt 去除定序讀數中的接頭序列 (adapter sequences)，這些接頭序列在建庫過程中附加到 DNA 或 RNA 片段上，若不加以去除會干擾下游數據分析。

（五）FASTX Toolkit

FASTX Toolkit 是一套專為高通量定序數據處理設計的工具集，能提升 RNA-seq 數據的品質和準確性。這個工具集包含多個小工具，能對 FASTA 或 FASTQ 格式的序列數據進行處理，常見功能包括質量過濾、接頭序列修剪、序列長度篩選等。

本研究使用 FASTX Toolkit 來去除低品質的序列片段，保留品質較好的數據，對於後續的序列比對、基因組裝和基因表達分析等研究步驟來說尤為重要。

（六）Trinity

Trinity 是一個生物資訊分析的工具組，結合了 Bowtie2 和 RSEM 兩種工具，方便研究者進行分析：

1. Bowtie2

Bowtie2 是一種可將 DNA 或 RNA 序列對應到已知基因組或轉錄組的工具，常見應用包括基因組定序 (genome sequencing)、轉錄組學 (transcriptomics) 分析和變異檢測。它能快速找到樣本序列在參考基因組中的位置。

本研究使用 Bowtie2 將 RNA 序列對應到人類轉錄組，並進行基因表達分析，以探究 hMSCs 在不同培養環境下，各基因的表達量。

2. RSEM

RSEM (RNA-Seq by Expectation-Maximization) 是本研究用來估算轉錄本表達量的生物資訊分析工具。RSEM 透過統計方法處理定序讀數，解決了基因重疊區域或轉錄本間讀數歧義的問題。其核心算法基於期望最大化 (Expectation-Maximization, EM)，通過反覆計算來估計每個轉錄本的表達量，從而分配定序讀數。RSEM 的流程包括比對定序讀數到參考基因組或轉錄本集合，再通過 EM 演算法估算每個基因或轉錄本的表達值，最終生成標準化的表達量 (如 Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads, FPKM 或 Transcripts Per Million, TPM)。本研究使用 RSEM 來

生成 TPM，TPM 為標準化 RNA-seq 數據的一種基因表達量指標，旨在解決樣本間的定序深度和基因長度差異。TPM 的計算過程先將每個基因的讀數數量除以其轉錄本長度，然後將所有基因的結果標準化為總和為百萬的單位。

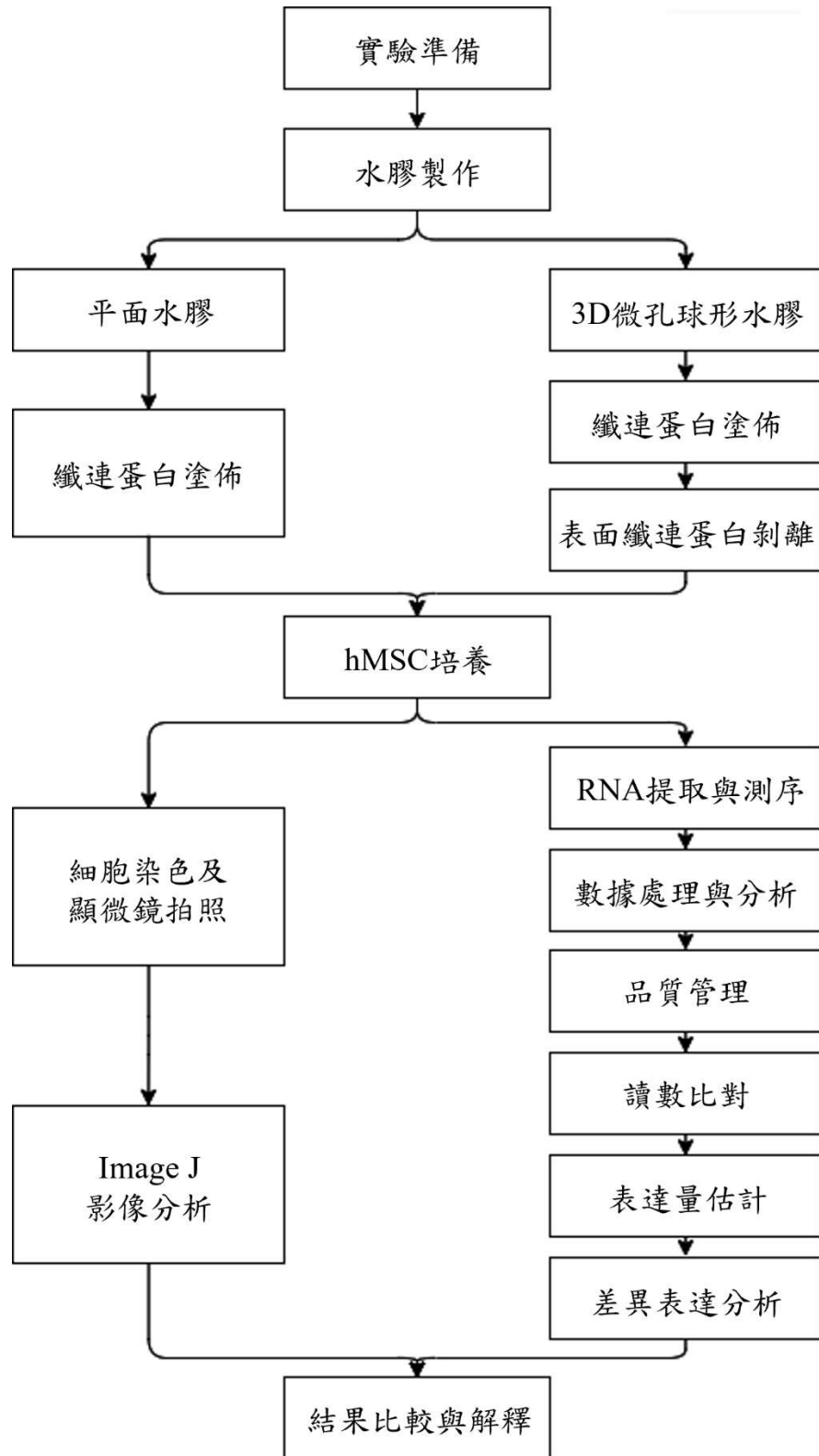
（七） EXPath Tool

EXPath Tool 是一款專門用於生化和基因組學研究的工具，特別適合研究代謝途徑 (metabolic pathways) 和基因功能註解。這個工具提供許多幫助研究人員進行系統性基因分析的功能。

本研究使用 EXPath Tool 做差異表達基因 (Differential Expression Gene, DEG) 的下游分析。

參、研究過程與方法

一、 本研究流程圖



(圖片來源：作者親自製作)

二、 研究方法

(一) 水膠製作

1. 清洗模具

- (1)從中間向外以去離子水沖洗
- (2)用氮氣槍風乾模具
- (3)在培養室通風櫃中，在紫外光下曝光 15 分鐘殺菌

2. 固化平面及三維球形微孔 PA 凝膠

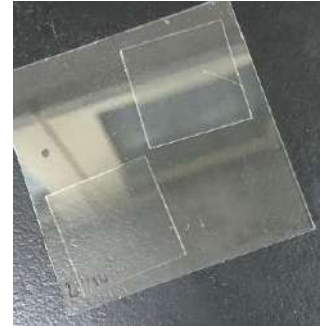
表二、聚丙烯醯胺水凝膠配製表

40% 丙烯醯胺 (AC)	175 μl
2% N,N'-亞甲基雙丙烯醯胺 (BIS)	175 μl
去離子水	585 μl
10% (v/v in 去離子水) 四甲基乙二胺 (TEMED) *暫不添加	15 μl (最終 %v/v = 0.15%)
10% (w/v in 去離子水) 過硫酸銨 (APS) *暫不添加	50 μl (最終 %v/v = 0.5%)
總體積	1000 μl

- (1)準備一個裝有冰的容器來存放溶液
- (2)分裝去離子水，然後先混合 40% 丙烯醯胺 (AC) 和 2% N,N'-亞甲基雙丙烯醯胺 (BIS) 於去離子水中
- (3)在真空乾燥器中以 400 Torr 脫氣 10 分鐘，並在氮氣中平衡 5~10 分鐘，去除溶液氣泡
- (4)先混合預混液（見表二）和四甲基乙二胺 (TEMED)，然後快速添加過硫酸銨 (APS) 以獲得最終的 PA 溶液

(5)對於每個分裝液:

- A. 吸吐 (pipetting) 混合物 2 次
- B. 快速將 PA 溶液滴到模具上
- C. 將 TM silanized cover-glass (表面經過矽烷化處理) 覆蓋在 PA 溶液上面



圖二、平面水膠固化過程 (圖片來源: 作者親自拍攝)

(6)平面 PA 凝膠在室溫下放置 15 分鐘; 微孔 PA 凝膠在室溫下放置 30 分鐘到邊緣收縮

(7)將樣品浸入裝有去離子水的玻璃盆中約 2 分鐘

(8)浸泡時, 用剃刀小心地將 PA 凝膠從模具夾層中剝離

(9)將剝離的 PA 凝膠放入裝有 2ml 水的乾淨 3.5cm 培養皿中清洗或浸泡

3. 纖維蛋白塗佈

(1) 在搖床上將 PA 凝膠浸泡著的去離子水, 置換成鹼性的碳酸氫鈉 0.1 M 溶液, 並去除 PA 凝膠上的多餘水分

(2) 下列步驟需快速操作、避光

- A. 將 Sulfo-SANPAH (約 150 μ l) 溶液均勻塗布在 PA 凝膠上
- B. 將樣品放在 365 nm λ UV 下照射 1-5 分鐘
- C. 樣品與光源的距離 2~3cm



圖三、滴加纖維蛋白至凝膠上 (圖片來源: 作者親自拍攝)

(3) 用 0.1 M 碳酸氫鈉沖洗 PA 凝膠, 並輕輕地在凝膠表面上吸吐洗滌液並去除多餘水分

(4) 滴加 150 μ l 纖維連接蛋白並放入 37°C 培養箱 1.5 小時

4. 表面纖維蛋白剝離

(1) 將氨基矽烷化蓋玻片 (aminosilanized coverslips) 浸入 2.5%戊二醛中, 並在室溫下放

置 30 分鐘，製作每個樣品各 3 份戊二醛蓋玻片

- (2) 在 Plasma-treated coverslips (等離子體處理過的蓋玻片) 上塗抹牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 溶液，放入 37°C 培養箱 1~2 小時
- (3) 用青黴素-鏈黴素 (Penicillin/Streptomycin, PS) 稀釋成 5 倍建議使用濃度 (5X) 於磷酸鹽緩衝生理鹽水 (Phosphate buffered saline, PBS) 的溶液 (5X PS in PBS) 來沖洗 PA 凝膠
- (4) 以 1000rpm 離心 20 秒去除多餘液體，然後在 37°C 培養箱中放置 1 分鐘
- (5) 將戊二醛蓋玻片放在 PA 凝膠上並放置重物 (~35g)，放入 37°C 培養箱 30~40 分鐘
- (6) 將上述夾層浸入 5X PS in PBS 中並分離蓋玻片和 PA 凝膠
- (7) 重複步驟 (2)~(6) 共 3 次
- (8) 將 BSA 蓋玻片(步驟 2) 置於 PA 凝膠上並放入培養箱 10 分鐘
- (9) 使用針頭尖端來分離凝膠和 BSA 蓋玻片
- (10) 將凝膠浸入 5X PS in PBS 沖洗 3 次



圖四、剝離水膠表面的纖連蛋白
(圖片來源：作者親自拍攝)

5. 細胞接種

表三、培養基 (含胎牛血清) 配製表

hMSC	50 ml
MEM-alpha (1X)培養基	44
FBS (final 10%)胎牛血清	5
PS (final 1%)	0.5
Glutamax	0.5

- (1) 用 PBS 沖洗凝膠 3 次以去除青黴素-鏈黴素
- (2) 在新的六孔盤裡放入不含胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) 的培養基，之後將凝膠轉移到新的六孔盤中浸泡，置於 37°C 培養箱內 30 分鐘

- (3) 以胰蛋白酶使 hMSC 細胞懸浮在培養基中，並均勻地將細胞接種到六孔盤內
- (4) 對於三微球形微孔凝膠，在 37°C 培養箱中放置 30 分鐘，然後更換為含 FBS 的培養基。對於平面凝膠，在 37°C 培養箱中放置 1 小時，然後更換為含 FBS 的培養基
- (5) 1 小時後，將凝膠轉移到新的六孔板中以避免凝膠表面上有多餘的細胞黏附
- (6) 記錄接種時間。定義：細胞接種後的第 24 小時作為分化第 0 天
- (7) 以顯微鏡中成像以觀察形態變化

(二) 數據分析

1. 自有 RNA-Seq 資料整理

- (1) 經由實驗室前輩及中研院新世代基因體定序核心實驗室協助，將平面及三維細胞樣品在分化第 0 天及第 7 天時收樣品進行 RNA 定序
- (2) 共獲得 12 筆 RNA 定序原始資料，將這 12 筆資料的詳細資訊紀錄如下圖，以利後續分析：

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Species	Genome_type	Condition_category	Condition_info	replicate	Development_stage	check_data_type	check PE	check_strand-specific	check_RNA_isolation
2	Homo sapiens	WT	LTT23-U01_S1_L001_R1_001.fastq.gz	flat D0	1	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
3	Homo sapiens	WT	LTT23-U01_S1_L001_R2_001.fastq.gz	flat D0	1	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
4	Homo sapiens	WT	LTT23-U01_S1_L002_R1_001.fastq.gz	flat D0	1	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
5	Homo sapiens	WT	LTT23-U01_S1_L002_R2_001.fastq.gz	flat D0	1	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
6	Homo sapiens	WT	LTT23-U03_S2_L001_R1_001.fastq.gz	flat D0	2	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
7	Homo sapiens	WT	LTT23-U03_S2_L001_R2_001.fastq.gz	flat D0	2	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
8	Homo sapiens	WT	LTT23-U03_S2_L002_R1_001.fastq.gz	flat D0	2	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
9	Homo sapiens	WT	LTT23-U03_S2_L002_R2_001.fastq.gz	flat D0	2	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
10	Homo sapiens	WT	LTT23-U04_S3_L001_R1_001.fastq.gz	flat D0	3	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
11	Homo sapiens	WT	LTT23-U04_S3_L001_R2_001.fastq.gz	flat D0	3	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
12	Homo sapiens	WT	LTT23-U04_S3_L002_R1_001.fastq.gz	flat D0	3	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
13	Homo sapiens	WT	LTT23-U04_S3_L002_R2_001.fastq.gz	flat D0	3	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
14	Homo sapiens	WT	LTT23-U05_S4_L001_R1_001.fastq.gz	flat D7	1	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
15	Homo sapiens	WT	LTT23-U05_S4_L001_R2_001.fastq.gz	flat D7	1	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
16	Homo sapiens	WT	LTT23-U05_S4_L002_R1_001.fastq.gz	flat D7	1	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
17	Homo sapiens	WT	LTT23-U05_S4_L002_R2_001.fastq.gz	flat D7	1	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
18	Homo sapiens	WT	LTT23-U07_S6_L001_R1_001.fastq.gz	flat D7	2	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
19	Homo sapiens	WT	LTT23-U07_S6_L001_R2_001.fastq.gz	flat D7	2	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
20	Homo sapiens	WT	LTT23-U07_S6_L002_R1_001.fastq.gz	flat D7	2	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
21	Homo sapiens	WT	LTT23-U07_S6_L002_R2_001.fastq.gz	flat D7	2	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
22	Homo sapiens	WT	LTT23-U18_S14_L001_R1_001.fastq.gz	flat D7	3	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
23	Homo sapiens	WT	LTT23-U18_S14_L001_R2_001.fastq.gz	flat D7	3	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
24	Homo sapiens	WT	LTT23-U18_S14_L002_R1_001.fastq.gz	flat D7	3	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
25	Homo sapiens	WT	LTT23-U18_S14_L002_R2_001.fastq.gz	flat D7	3	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
26	Homo sapiens	WT	LTT23-U09_S7_L001_R1_001.fastq.gz	well D0	1	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
27	Homo sapiens	WT	LTT23-U09_S7_L001_R2_001.fastq.gz	well D0	1	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
28	Homo sapiens	WT	LTT23-U09_S7_L002_R1_001.fastq.gz	well D0	1	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
29	Homo sapiens	WT	LTT23-U09_S7_L002_R2_001.fastq.gz	well D0	1	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
30	Homo sapiens	WT	LTT23-U12_S9_L001_R1_001.fastq.gz	well D0	2	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
31	Homo sapiens	WT	LTT23-U12_S9_L001_R2_001.fastq.gz	well D0	2	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
32	Homo sapiens	WT	LTT23-U12_S9_L002_R1_001.fastq.gz	well D0	2	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
33	Homo sapiens	WT	LTT23-U12_S9_L002_R2_001.fastq.gz	well D0	2	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
34	Homo sapiens	WT	LTT23-U19_S15_L001_R1_001.fastq.gz	well D0	3	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
35	Homo sapiens	WT	LTT23-U19_S15_L001_R2_001.fastq.gz	well D0	3	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
36	Homo sapiens	WT	LTT23-U19_S15_L002_R1_001.fastq.gz	well D0	3	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
37	Homo sapiens	WT	LTT23-U19_S15_L002_R2_001.fastq.gz	well D0	3	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
38	Homo sapiens	WT	LTT23-U14_S11_L001_R1_001.fastq.gz	well D7	1	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
39	Homo sapiens	WT	LTT23-U14_S11_L001_R2_001.fastq.gz	well D7	1	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
40	Homo sapiens	WT	LTT23-U14_S11_L002_R1_001.fastq.gz	well D7	1	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
41	Homo sapiens	WT	LTT23-U14_S11_L002_R2_001.fastq.gz	well D7	1	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
42	Homo sapiens	WT	LTT23-U15_S12_L001_R1_001.fastq.gz	well D7	2	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
43	Homo sapiens	WT	LTT23-U15_S12_L001_R2_001.fastq.gz	well D7	2	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
44	Homo sapiens	WT	LTT23-U15_S12_L002_R1_001.fastq.gz	well D7	2	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
45	Homo sapiens	WT	LTT23-U15_S12_L002_R2_001.fastq.gz	well D7	2	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
46	Homo sapiens	WT	LTT23-U20_S16_L001_R1_001.fastq.gz	well D7	3	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
47	Homo sapiens	WT	LTT23-U20_S16_L001_R2_001.fastq.gz	well D7	3	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
48	Homo sapiens	WT	LTT23-U20_S16_L002_R1_001.fastq.gz	well D7	3	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted
49	Homo sapiens	WT	LTT23-U20_S16_L002_R2_001.fastq.gz	well D7	3	hMSC	RNA-seq	PE	Yes	rRNA-depleted

圖五、RNA 定序原始資料整理（圖片來源：作者親自製作）

表格中 flat 表示平面凝膠，well 則為微孔凝膠。WT (wild type) 表示此 RNA-seq 資料為此物種的典型基因表現，而非經過突變或基因編輯。PE (Paired-End) 表示此資料為雙股定序，本研究所有自有數據皆為典型基因表現且雙股的定序資料。

2. 自有 RNA-Seq 資料整理

本研究使用 ENCODE 作為 RNA-seq 公開資料的搜尋平台。我們在 ENCODE 上設定以下幾個篩選條件：

- (1) Assay Type: Human adipose
- (2) Assay title: total RNA-seq
- (3) Organism: Homo sapiens
- (4) Data Type: Experiment

Experiment search

Filtering by: **human adipo** ✕

Clear all selections ✕

Assay

Assay type

Assay title

Search

Histone ChIP-seq	44
Control ChIP-seq	27
TF ChIP-seq	16
total RNA-seq	14
DNAme array	9
RAMPAGE	7
polyA plus RNA-seq	7
WGBS	6
DNase-seq	5
small RNA-seq	4

total RNA-seq ✕

Hide control experiments

Biosample

Organism

Homo sapiens 14

Biosample classification

Biosample

Search

omental fat pad	4
subcutaneous adipose tissue	4
breast epithelium	3
mesenchymal stem cell of adipose	1
mesenteric fat pad	1
subcutaneous preadipocyte	1

Organ

Search

connective tissue	11
adipose tissue	10
breast	3
epithelium	3

Cell

Systems

Sex

Life stage

Perturbation

not perturbed 14

Library

Platform

Run type

Library fragment size (nt)

Library material

Library depleted in

Analysis

Provenance

Quality

Other filters

Data Type

Dataset	14
Experiment	14

Experiment ✕

圖六、ENCODE 篩選條件（圖片來源：作者至 ENCODE 網站截圖）

共找到 14 筆可用資料，我們記錄了這些資料的基本資訊以利分析（如 UID、GSE 編號等），以下切分為兩段表格以利閱讀：

Species	UID	GSE	PMID	Genome_type	GSM	Tissue	Condition_category
Homo sapiens	200088065	GSE88065	22955616	WT	GSM2343284	subcutaneous adipose	female
Homo sapiens	200088317	GSE88317	22955616	WT	GSM2343775	subcutaneous adipose	female
Homo sapiens	200088451	GSE88451	22955616	WT	GSM2344003	subcutaneous adipose	male
Homo sapiens	200088482	GSE88482	22955616	WT	GSM2344057	subcutaneous adipose	male
Homo sapiens	200090271	GSE90271	22955616	WT	GSM2400238	mesenchymal stem cell of adipose	female
Homo sapiens	200090271	GSE90271	22955616	WT	GSM2400239	mesenchymal stem cell of adipose	female
Homo sapiens	200088497	GSE88497	22955616	WT	GSM2344082	omental fat pad	male
Homo sapiens	200088431	GSE88431	22955616	WT	GSM2343972	omental fat pad	female
Homo sapiens	200088010	GSE88010	22955616	WT	GSM2343187	omental fat pad	male
Homo sapiens	200088072	GSE88072	22955616	WT	GSM2343297	omental fat pad	female
Homo sapiens	200088273	GSE88273	22955616	WT	GSM2343705	breast epithelium	female
Homo sapiens	200088270	GSE88270	22955616	WT	GSM2343701	breast epithelium	female
Homo sapiens	200088024	GSE88024	22955616	WT	GSM2343212	epithelium tissue	male
Homo sapiens	200175251	GSE175251	22955616	WT	GSM5331166	mesenteric fat pad	female
Homo sapiens	200078615	GSE78615	22955616	WT	GSM2072476	subcutaneous preadipocyte	female
Homo sapiens	200078615	GSE78615	22955616	WT	GSM2072477	subcutaneous preadipocyte	male

replicate	Development_stage	SRA	SRA_Study	check_data_type	check PE	check_strand-specific	check_RNA_isolation
1	51 years old	SRR4421395	SRP013565	RNA-seq	Paired-End	Yes	rRNA-depleted
1	53 years old	SRR4421875	SRP013565	RNA-seq	Paired-End	Yes	rRNA-depleted
1	54 years old	SRR4422144	SRP013565	RNA-seq	Paired-End	Yes	rRNA-depleted
1	37 years old	SRR4422184	SRP013565	RNA-seq	Paired-End	Yes	rRNA-depleted
2	37 years old	SRR5048175	SRP013565	RNA-seq	Paired-End	Yes	rRNA-depleted
1	42 years old	SRR5048176	SRP013565	RNA-seq	Paired-End	Yes	rRNA-depleted
1	37 years old	SRR4422216	SRP013565	RNA-seq	Paired-End	Yes	rRNA-depleted
1	53 years old	SRR4422098	SRP013565	RNA-seq	Paired-End	Yes	rRNA-depleted
1	54 years old	SRR4422666	SRP013565	RNA-seq	Paired-End	Yes	rRNA-depleted
1	51 years old	SRR4421429	SRP013565	RNA-seq	Paired-End	Yes	rRNA-depleted
1	51 years old	SRR4421790	SRP013565	RNA-seq	Paired-End	Yes	rRNA-depleted
1	53 years old	SRR4421786	SRP013565	RNA-seq	Paired-End	Yes	rRNA-depleted
1	37 years old	SRR4422692	SRP013565	RNA-seq	Paired-End	Yes	rRNA-depleted
1	59 years old	SRR14638619	SRP012412	RNA-seq	Single-Read	Yes	N/A
1	62 years old	SRR3192541	SRP013565	RNA-seq	Paired-End	Yes	rRNA-depleted
2	65 years old	SRR3192542	SRP013565	RNA-seq	Paired-End	Yes	rRNA-depleted

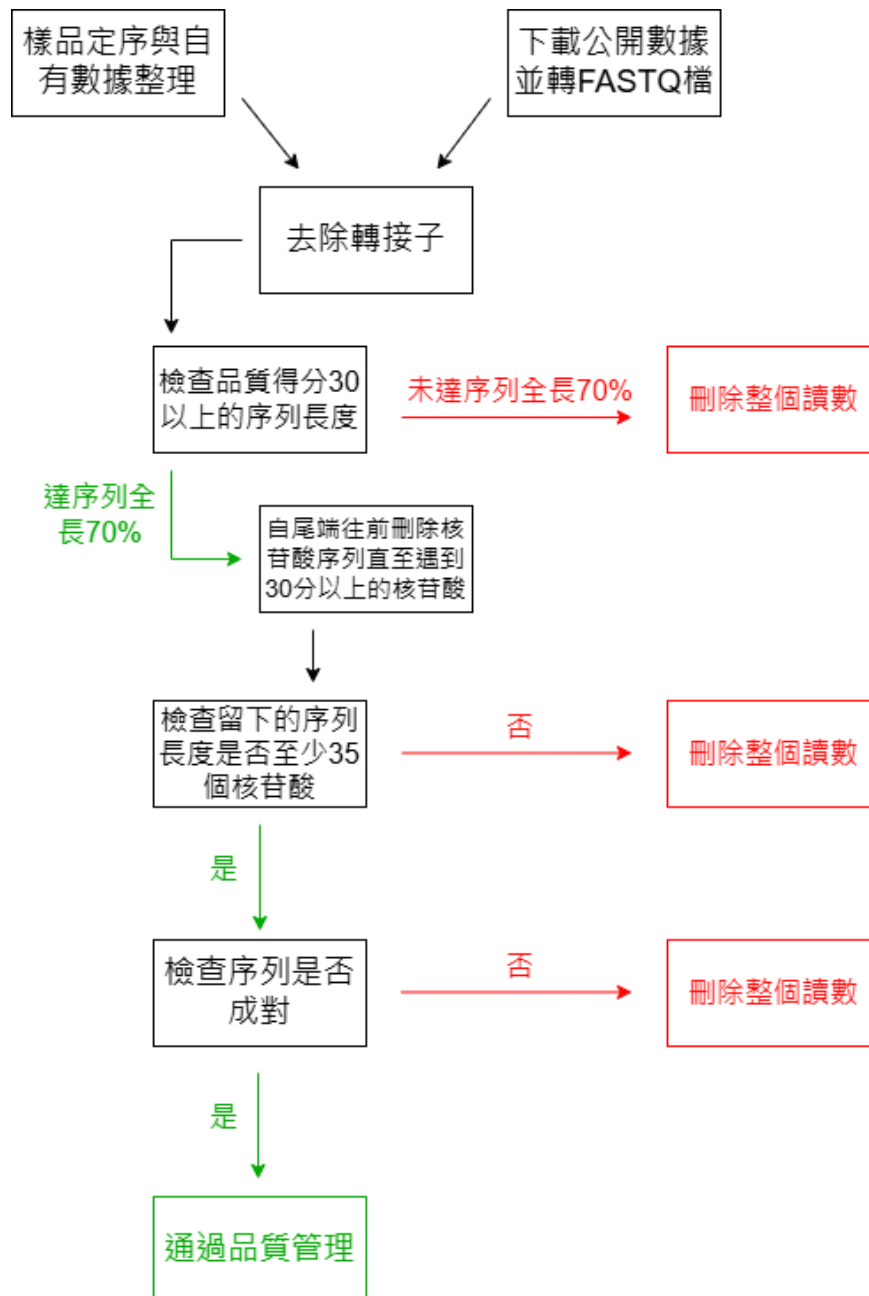
圖七、公開數據整理（圖片來源：作者親自製作）

這 14 筆公開數據中，考慮實驗結果的準確性，且自有數據皆為雙股定序 (Paired-End) ，我們決定刪除單股定序 (Single-Read) 的公開數據，使用另外 13 組數據進行分析。

為使用 SRA Toolkit 下載數據，且方便以後可以快速搜尋到該筆資料，表中紀錄了這些公開數據的 UID、GSE、GSM、SRA、SRA Study 等編號；也記錄了這些資料的來源組織、提供者性別與年齡等，以利進行分析。我們將這些資料用 SRA Toolkit 下載後轉為 FASTQ 格式進行後續分析流程。

3. 品質管理

針對自有 RNA-seq 數據和公開 RNA-seq 資料進行品質管理，流程圖如下：



圖八、品質管理流程圖（圖片來源：作者親自製作）

（一） 去除轉接子 (adapter)

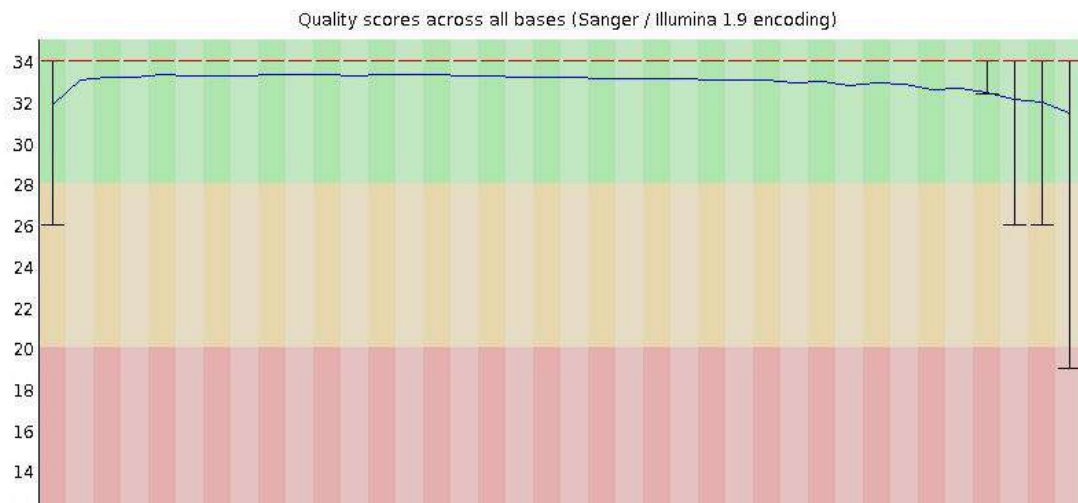
使用 Cutadapt 去除 RNA 序列中的接頭序列

（二） 品質過濾 (quality trimming)

使用 FASTX Toolkit 去除 RNA 序列中品質得分較低的序列。本實驗採用 Q33 算法來換算品質得分，篩選標準如下：

- A. 品質得分 30 分以上 (錯誤率 10%以下) 的序列至少佔全長 70%，否則刪除整個讀數 (reads)
- B. 自尾端往前篩選，刪除品質得分低於 30 分的核苷酸 (nucleotide) 直至出現 30 分以上的核苷酸為止
- C. 處理後留下的序列至少長 35nt，否則刪除整個讀數

在 RNA 定序過程中，參與反應的酶可能隨著反應的進行逐漸失去活性而導致準確度下降；此外，針對一些定序技術 (如本實驗使用的 Illumina)，讀數越長，光學檢測的準確性可能會下降，因此需要品質過濾來確保讀數的準確性。



圖九、本實驗的品質得分隨核苷酸在讀數中位置變化關係圖

(圖片來源：作者親自製作)

本實驗的 RNA 定序品質得分下降程度小，是品質高的 RNA 定序結果。

D. 去除未成對讀數

本實驗的 RNA-seq 資料皆為 Paired-End，為避免在前述操作中，造成互補序列其中一方有序列缺失，使得某些序列片段僅剩單股，會去除未成對的讀數。

4. RNA-seq 分析流程

1. 讀數比對

使用 Bowtie2 進行讀數比對。

2. 表達量估計

使用 RSEM 進行表達量估計並生成 TPM。

3. 繪製火山圖

(1) 使用 R 語言計算 Log₂ Fold Change

Log₂ Fold Change 是在基因表達分析中特別常用的度量，用來比較基因在兩個不同條件下的表達變化。Fold Change 表示一個基因的表達量在兩種條件間的倍數變化，本實驗中以微孔培養的細胞（實驗組）TPM 除以平面培養細胞的 TPM（對照組），以底數 2 取對數並用正值表示該基因在實驗組中的表達量增加，負值表示表達量減少。這種轉換有助於平衡極端數值，便於直觀分析和統計測試。

(2) 使用 R 語言計算 p-value

p-value 可用來評估分析結果是否具有顯著性的關鍵指標，特別是在本研究的大量數據分析中。透過統計檢定，p-value 可以協助判斷在比較兩組樣本觀察到的基因表現差異是否由隨機產生。

(3) 使用 R 語言繪製火山圖

火山圖以 Log₂ Fold Change 為橫軸，Log₁₀ p-value 為縱軸，繪出每個轉錄本資料的分布位置。火山圖有助於直觀判斷差異表現上調與下調的轉錄本量。

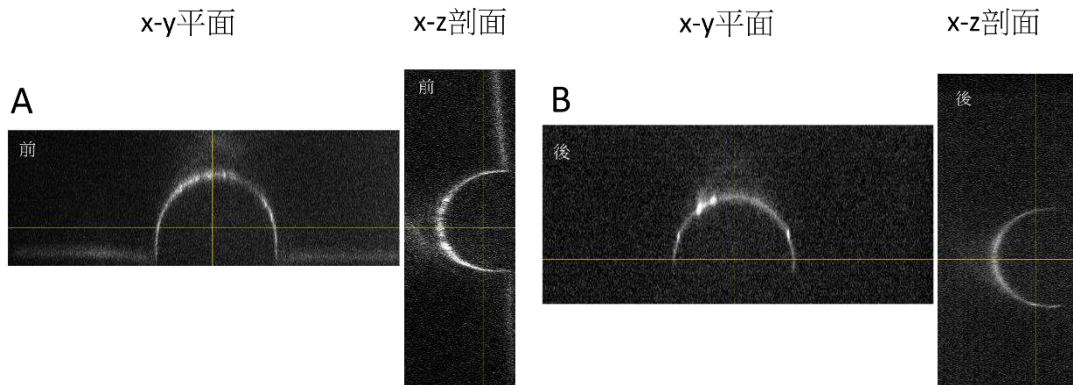
4. 繪製熱圖

本研究使用 R 語言取差異表現上調與下調最顯著的各 5 個轉錄本來繪製熱圖，並分析與解釋差異表達的原因。

肆、 研究結果與討論

一、 影像分析

(一) 表面纖連蛋白的成功剝離



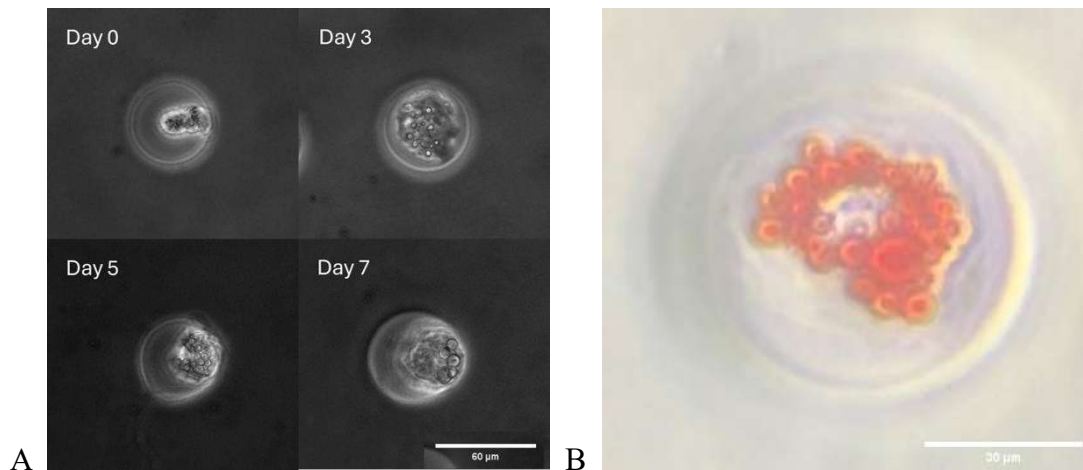
圖十、(A) 聚丙烯醯胺水凝膠剝離處理前的 x-y 平面與 x-z 剖面影像

(B) 聚丙烯醯胺進行三次剝離處理後的 x-y 平面與 x-z 剖面影像

(圖片來源：作者親自拍攝)

蛋白質剝離的主要目的是移除 PA 凝膠表面的細胞外基質蛋白（纖連蛋白），防止細胞在水凝膠表面生長。通過這個處理步驟，我們可以確保細胞只能在微孔內部生長，而不會黏附在水凝膠的表面。我們對處理前後的樣品進行了顯微鏡觀察，使用了螢光標定的纖連蛋白讓水凝膠表面在顯微鏡下可視化（培養細胞用的沒有螢光標定，以確保細胞健康生長）。透過 x-y 平面和 x-z 剖面的顯示，在進行三次連續的蛋白質剝離處理後，頂層表面的蛋白質被有效去除，而微孔內部的蛋白質則得以保留。

(二) 人類間葉幹細胞在平面和三維球形微孔凝膠中的生長與分化

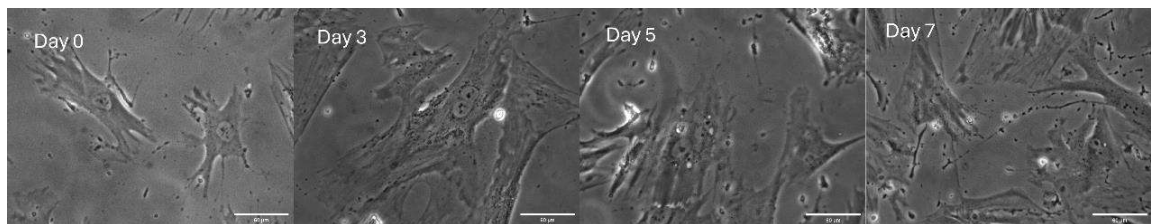


圖十一、(A) 球形微孔內人類間葉幹細胞的時序培養的明場影像

(B) 球形微孔內脂肪分化後第 7 天的 oil red 染色影像

(圖片來源：作者親自拍攝)

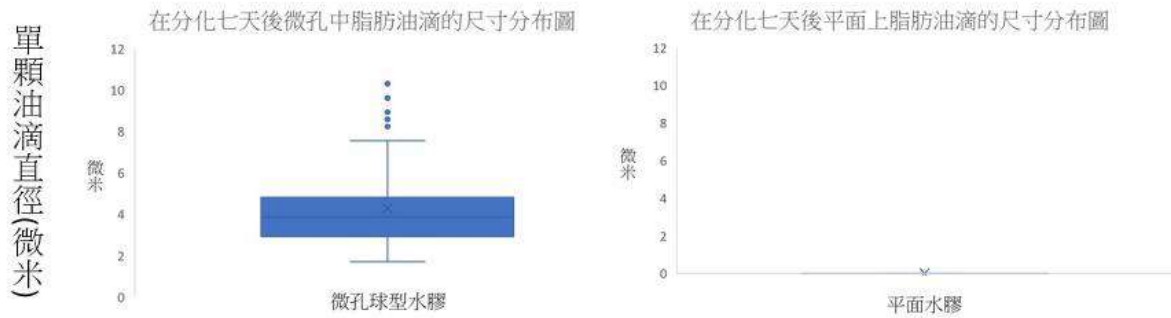
當人類間葉幹細胞在微孔中培養時，在培養初期 (第 0 天)，細胞均勻分布於微孔內部。隨著培養時間的推進，到第一天和第三天時，細胞開始在微孔環境中逐漸適應並發生形態改變。到第七天時，從明場 (Bright Field) 和脂滴 (Oil Red O) 染色的影像可以清楚觀察到微孔中的細胞成功生成出大量且尺寸明顯的脂滴。



圖十二、平面凝膠上人類間葉幹細胞的時序培養的明場影像 (圖片來源：作者親自拍攝)

當細胞培養在平面上時，觀察時序變化發現，在培養初期 (第 0 天) 細胞均勻附著於平面水凝膠表面。隨著培養時間推進到第一天和第三天，細胞保持了較為舒展的形態，並在平面上自由延展。到第 7 天時，儘管細胞經過相同的脂肪分化誘導條件，但只產生了數量較少且尺寸較小的脂滴 (明場不易觀察到)。具體而言，在下一個結果的螢光影像可以清楚觀察到，微孔環境 (圖十四 A) 細胞中，脂滴的形成程度明顯低於平面培養 (圖十四 B)。

在分化七天後細胞內的油滴的尺寸分布圖

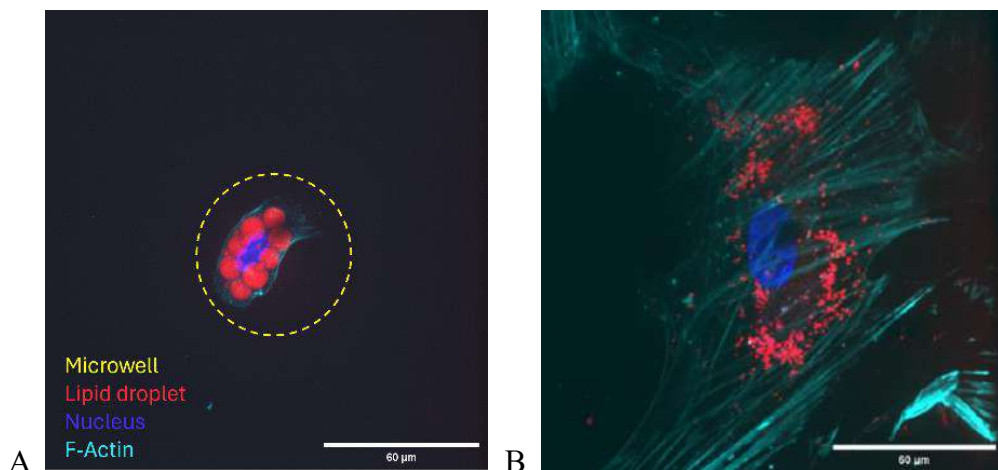


圖十三、在向脂肪細胞分化七天後，細胞內的油滴尺寸分布圖

(圖片來源：作者親自製作)

我們接著量化脂滴的直徑，在所測得的 703 個單顆油滴樣本中，第一四分位數 (Q1) 為 1.71 微米，第三四分位數 (Q3) 為 7.55 微米，中位數為 4.81 微米，四分位距 (IQR) 為 5.84 微米。而在樣本中觀察到少量較大粒徑的脂滴，最大可達 10.29 微米，同時還出現了數個介於 8-10 微米之間的離群值，具體包括 9.61、8.92、8.94 及 8.23 微米。

(三) 不同培養環境下人類間葉幹細胞的細胞骨架與脂滴分布



圖十四、 (A) 球形微孔內人類間葉幹細胞的螢光影像

(B) 平面凝膠上人類間葉幹細胞的螢光影像

(圖片來源：作者親自拍攝)

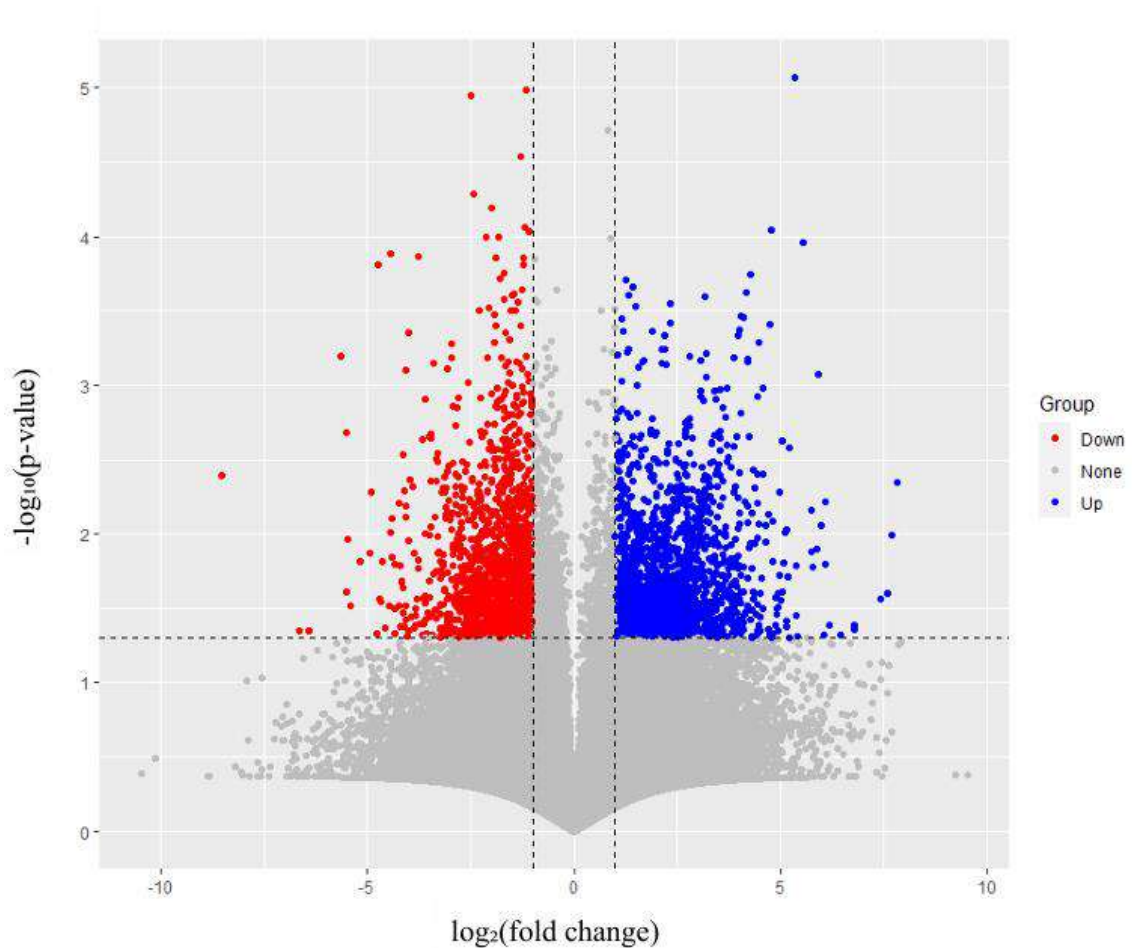
轉盤式共軛焦顯微鏡 (Spinning Disc Confocal Microscope) 的觀察結果顯示了人類間葉幹細胞在不同培養環境下的明顯差異。圖十四 (A) 展示了細胞在球形微孔環境中的狀態，紅色螢光的部分使用 BODIPY™ 493/503 標記表示脂滴的形成，藍色螢光部分使用 Hoechst 33342 標記顯示細胞核的位置，而青色螢光部分使用 SiR-Actin 則呈現了 F-actin 骨架的分布。在微孔環境中，細胞呈現出較為擁擠的形態，且脂滴的分布集中且數量可觀，顯示了良好的脂肪分化效果。黃色虛線圈出的區域清楚地標示了微孔的邊界，說明細胞確實被限制在三維空間生長。

相較之下，圖十四 (B) 展示了細胞在平面環境中的生長狀態。在此環境下，細胞的 F-actin 骨架 (青色) 呈現出明顯的延展狀態，顯示細胞在平面上有較大的延展空間。然而，紅色螢光標記的脂滴分布較為分散且數量相對較少，表明在相同的分化誘導條件下，平面培養環境可能不如球形微孔環境有利於脂肪分化的進行。細胞核 (藍色) 的分布也反映了細胞在平面上可能會被細胞骨架擠壓而較為扁平。

二、 RNA-seq 分析結果

(一) 火山圖

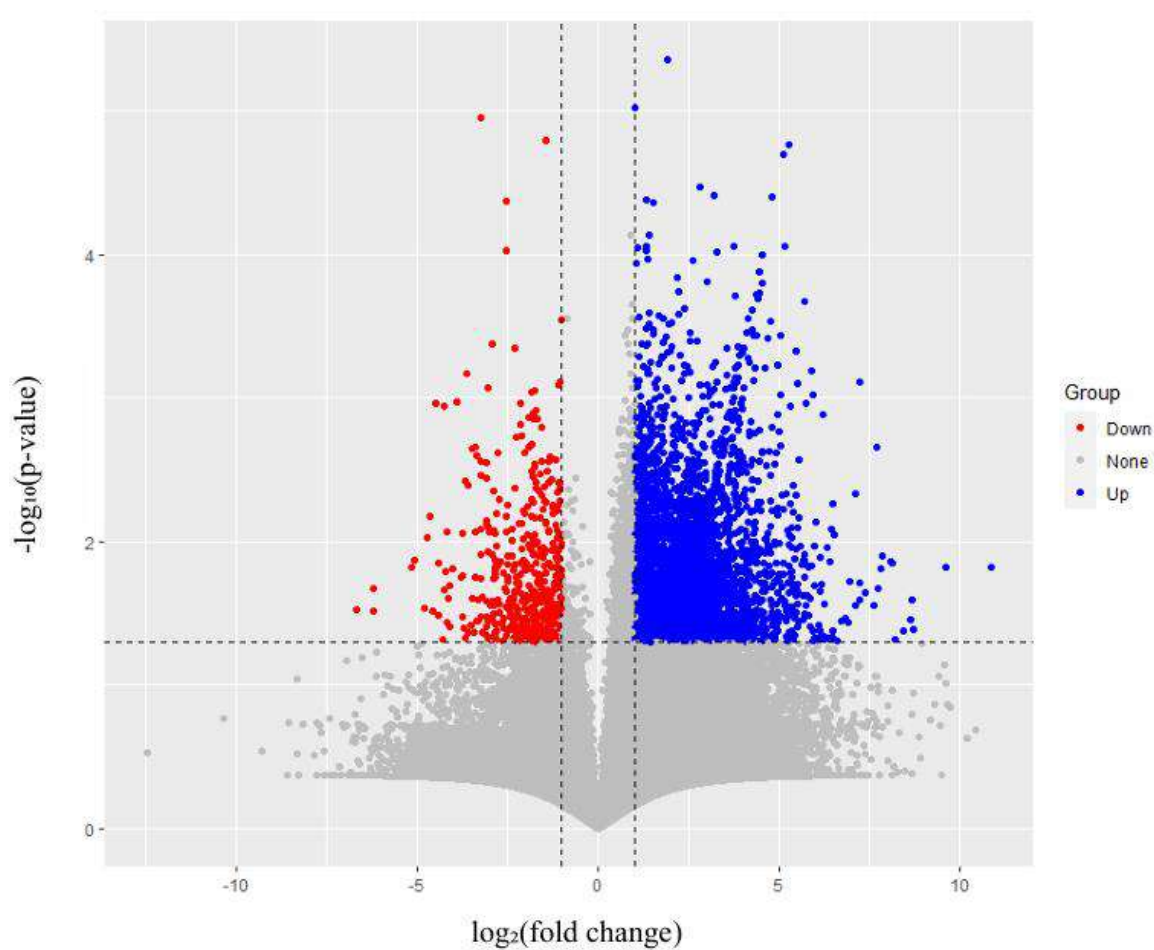
1. 第 0 天球形微孔內細胞對照平面凝膠上細胞的基因表達



圖十五、第 0 天差異表現火山圖（圖片來源：作者親自製作）

此圖中紅色表示下調轉錄本，藍色表示上調轉錄本。在第 0 天的球形微孔內，與在第 0 天平面凝膠上培養的細胞對比，表現量增加的轉錄本與表現量降低的轉錄本數量差異不大。

2. 第 7 天球形微孔內細胞對照平面凝膠上細胞的基因表達

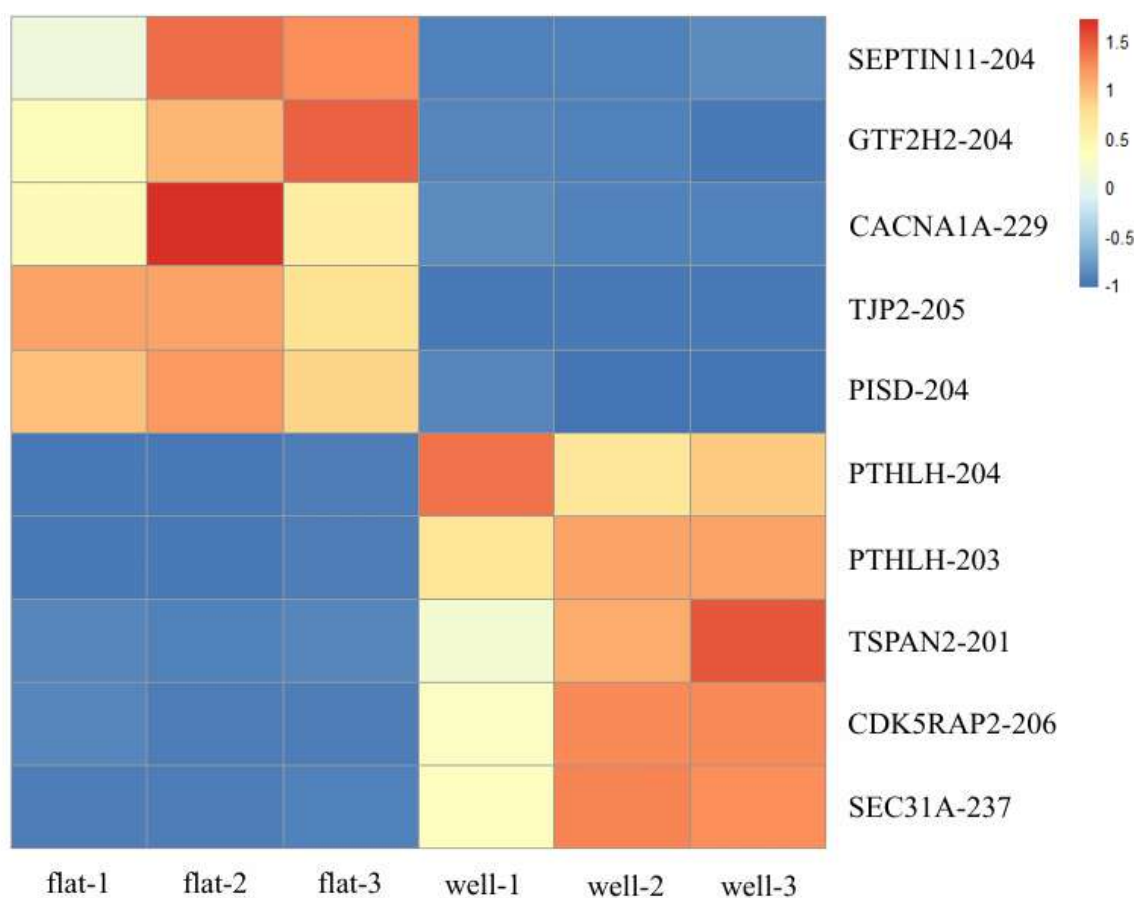


圖十六、第 7 天差異表現火山圖（圖片來源：作者親自製作）

此圖中紅色表示下調轉錄本，藍色表示上調轉錄本。在第 7 天的球形微孔內，與在第 7 天平面凝膠上培養的細胞對比，表現量增加的轉錄本顯著多於表現量降低的轉錄本。

(二) 熱圖

1. 第 0 天球形微孔內細胞對照平面凝膠上細胞的基因表達



圖十七、第 0 天差異表現熱圖（圖片來源：作者親自製作）

本實驗各取前 5 名差異表現上調的轉錄本與 5 名差異表現下調的轉錄本，並分析這些轉錄本對應基因的功能：

表四、第 0 天球形微孔與平面培養下，細胞差異表達的基因功能

TPM 變化	轉錄本名稱	對應基因功能
下調	SEPTIN11-204	SEPTIN11：形成細胞骨架、胞質分裂和囊泡運輸
	GTF2H2-204	GTF2H2：參與受損 DNA 的一般轉錄偶聯核苷酸切除修復 (NER)

	CACNA1A-229	CACNA1A：參與多種鈣依賴性過程
	TJP2-205	TJP2：編碼的蛋白質為上皮細胞和內皮細胞中緊密連接屏障的組成部分
	PISD-204	PISD：編碼的蛋白質在磷脂代謝和磷脂酰絲氨酸的胞器間運輸中具有活性
上調	PTHLH-204	PTHLH：調節乳腺和牙齒形成過程中的軟骨內骨發育和上皮間質的相互作用
	PTHLH-203	
	TSPAN2-201	TSPAN2：編碼的蛋白質為細胞表面蛋白，特徵為存在四個疏水結構域
	CDK5RAP2-206	CDK5RAP2：維持中心粒接合和內聚力
	SEC31A-237	SEC31A：編碼的蛋白質參與內質網 (ER) 的囊泡出芽

(資料來源：GeneCards)

我們對這些差異表現的結果進行討論：

第 0 天細胞處在初期適應的過程

(1) 從顯微鏡結果看到：

- A. PA 凝膠表面經過蛋白質剝離處理，確保細胞只能在微孔內生長
- B. 微孔內保留了細胞外基質蛋白
- C. 初期細胞在兩種環境中均勻分布

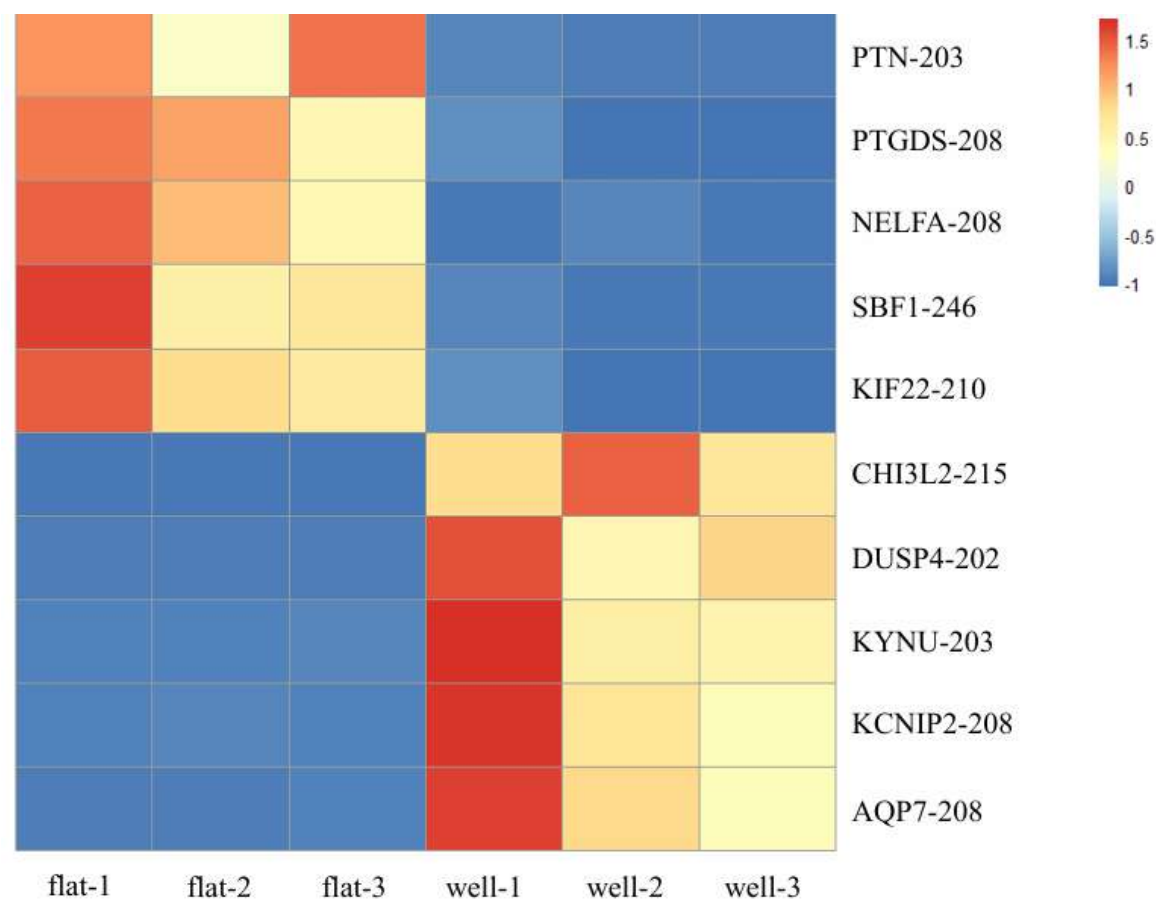
(2) 這些物理環境差異解釋了第 0 天的基因表達模式

- A. 平面培養高表達的轉錄本 (SEPTIN11-204、TJP2-205 等) 與細胞骨架和黏

附相關，這是因為細胞需要適應平面延展的生長環境

B. 微孔培養高表達 PTHLH-203、PTHLH-204 (激素相關) 和 TSPAN2-201 (膜蛋白)，反映了細胞開始感應三維限制空間，為後續分化做準備

2. 第 7 天球形微孔內細胞對照平面凝膠上細胞的基因表達



圖十八、第 7 天差異表現熱圖 (圖片來源：作者親自製作)

本實驗各取前 5 名差異表現上調的轉錄本與 5 名差異表現下調的轉錄本，並分析這些轉錄本對應基因的功能：

表五、第 7 天球形微孔與平面培養下，細胞差異表達的基因功能

TPM 變化	轉錄本名稱	對應基因功能
下調	PTN-203	PTN：編碼的蛋白質是一種分泌型肝炎結合生長因子
	PTGDS-208	PTGDS：基因優先在大腦中表現、催化前列腺素 H2

		轉化為後前列腺素 D2
	NELFA-208	NELFA：在胎兒組織中普遍表達，水平高於成人組織。編碼的蛋白質能夠與 HLA-A2 限制性和腫瘤特異性細胞毒性 T 淋巴細胞反應
	SBF1-246	SBF1：促進 GDP 到 GTP 的交換
	KIF22-210	KIF22：編碼的蛋白質在細胞內運輸細胞器，並在細胞分裂期間移動染色體
上調	CHI3L2-215	CHI3L2：編碼的蛋白質與細菌幾丁質酶相似，但缺乏幾丁質酶活性
	DUSP4-202	DUSP4：透過使 MAP 激酶 ERK1 和 ERK2 上的 Thr 和 Tyr 殘基去磷酸化來調節有絲分裂訊號傳導
	KYNU-203	KYNU：催化 L-犬尿氨酸 (L-Kyn) 和 L-3-羥基犬尿氨酸 (L-3OHKyn) 分別裂解為鄰氨基苯甲酸 (AA) 和 3-羥基鄰氨基苯甲酸 (3-OHAA)
	KCNIP2-208	KCNIP2：編碼的蛋白質 (鉀電壓門控通道交互作用蛋白 2) 可調節 A 型電流，從而響應細胞內鈣的變化來調節神經元的興奮性
	AQP7-208	AQP7：編碼的蛋白質位於質膜並允許水、甘油和尿素穿過細胞膜。該基因在脂肪組織中高度表達，且其編碼的蛋白質會促進甘油的流出

(資料來源：GeneCards)

我們對這些差異表現的結果進行討論：

第 7 天細胞處在型態改變與分化的過程

(1) 顯微鏡觀察到：

- A. 微孔中的細胞：呈現擁擠型態、產生大量且明顯的脂滴、F-actin 骨架較為緊湊、細胞核分布密集
- B. 平面培養的細胞：細胞骨架呈延展狀態、脂滴較少且分散、細胞核較扁平

(2) 這些形態差異可以解釋 Day 7 的基因表達改變：

A. 微孔培養環境：

I. AQP7-208 (水通道蛋白) 高表達：

- i. 因為脂肪分化需要調節細胞內水分和甘油運輸
- ii. 與觀察到的大量脂滴形成直接相關

II. KCNIP2-208 (鉀離子通道) 和 KYNU-203 (代謝相關) 上調：

- i. 反映了細胞在擁擠環境中的代謝適應
- ii. 支持脂肪分化過程所需的離子平衡

III. CHI3L2-215 (細胞外基質重塑) 高表達：

- i. 對應了細胞在限制空間內重組細胞外基質的需求
- ii. 有助於維持三維培養環境的穩定性

B. 平面培養環境：

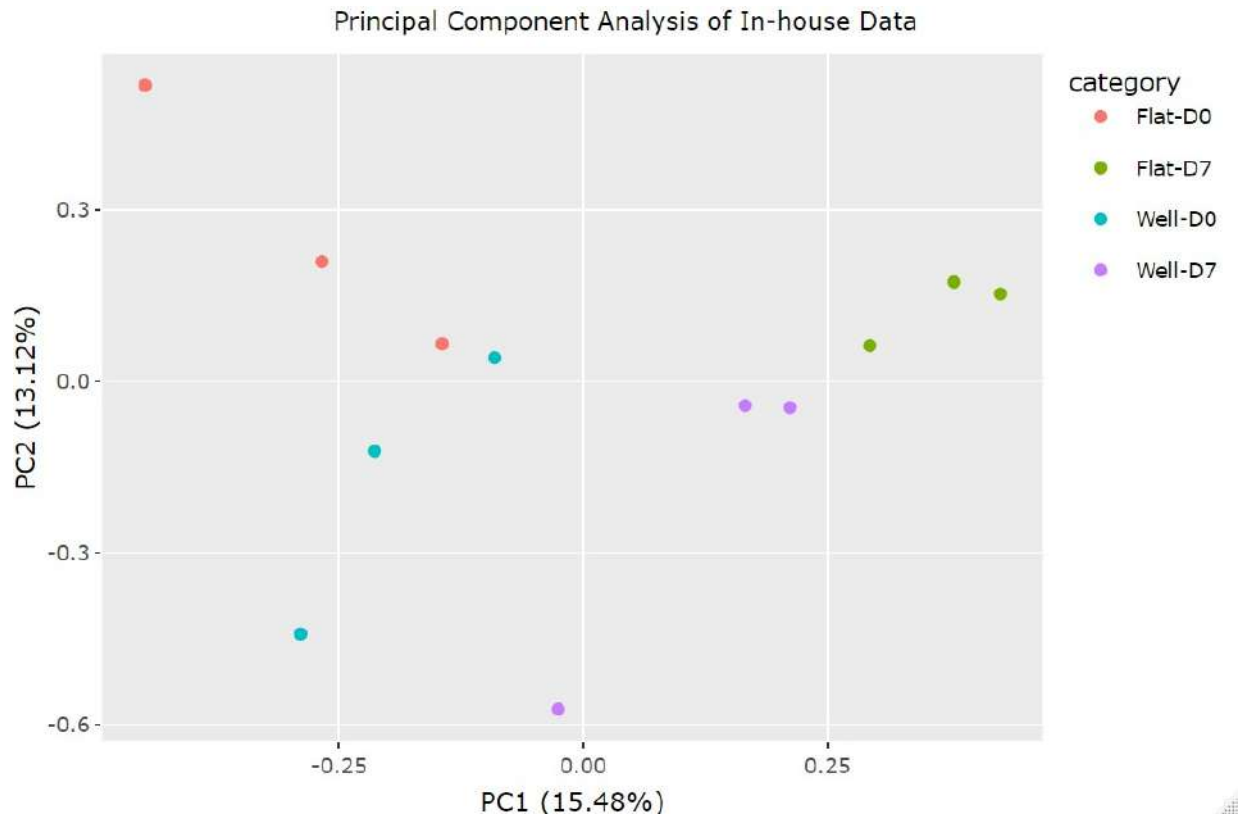
I. KIF22-210 (細胞分裂) 和 PTN-203 (生長因子) 上調：

- i. 與觀察到的細胞延展形態相符
- ii. 說明細胞傾向於增殖而非分化

II. SBF1-246 (訊號轉導) 和 PTGDS-208 (前列腺素合成) 高表達：

- i. 反映了細胞在平面環境中持續的生長信號
- ii. 解釋了為什麼這些細胞產生較少脂滴

(三) PCA (Principal Component Analysis)



圖十九、主成分分析圖（圖片來源：作者親自製作）

此圖顯示在第 0 天與第 7 天時，平面和微孔凝膠中的細胞基因表現分群明顯，證實三維球形微孔確實會造成 hMSC 基因表現的顯著差異。

(四) 討論與結論

1. 基因表達與培養環境的關聯

(1) 形態限制與基因表達

- A. 微孔的空間限制促進了脂肪分化相關基因的表達
- B. 平面環境的延展性維持了增殖相關基因的活性

(2) 細胞骨架與分化

- A. 微孔中緊湊的 F-actin 分布與代謝相關基因的上調相關
- B. 平面培養中延展的細胞骨架支持了增殖相關基因的表達

(3) 脂滴形成與代謝基因

- A. 微孔中觀察到的大量脂滴與脂質代謝相關轉錄本 (如 AQP7-208) 的高表達直接相關
- B. 平面培養中較少的脂滴形成反映在代謝相關基因的低表達

2. 結論

- (1) 培養環境對基因表達有顯著影響
- (2) 微孔培養更有利於脂肪分化，這與之前的形態學觀察結果一致
- (3) 平面培養的細胞傾向於維持增殖狀態
- (4) 這些基因表達差異可能解釋了為什麼微孔培養環境更有利於脂肪分化

伍、 未來展望

一、 自有數據與公開數據的比較與分析

- (一) 使用先前收集的公開 RNA-seq 數據與自有數據進行比較，分析微孔培養、平面培養和人體細胞三者的基因表達差異。
- (二) 找出微孔培養的人類間葉幹細胞，在分化後更接近何種人體脂肪細胞。

二、 功能性分析

- (一) 進行功能性分析 (Gene ontology, GO)

以理解這些數據在生物學層面的意涵，包括基因的生物過程 (biological process)、分子功能 (molecular function) 和細胞組分 (cellular component)，幫助識別特定基因的功能、參與的訊息通路及與其他基因的交互作用。

陸、 參考文獻

- 一、Guilak, F., Cohen, D. M., Estes, B. T., Gimble, J. M., Liedtke, W., & Chen, C. S. (2009). Control of Stem Cell Fate by Physical Interactions with the Extracellular Matrix. *Cell Stem Cell*, 5(1), 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.06.016>
- 二、Joyce, K., Fabra, G. T., Bozkurt, Y., & Pandit, A. (2021). Bioactive potential of natural biomaterials: Identification, retention and assessment of biological properties. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 1–28. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00512-8>
- 三、Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, 284(5411), 143–147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
- 四、Potelitsyna, E., Pickering, S. H., Bellanger, A., Germier, T., Collas, P., & Briand, N. (2024). Cytoskeletal rearrangement precedes nucleolar remodeling during adipogenesis. *Communications Biology*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06153-1>
- 五、Rosen, E. D., & MacDougald, O. A. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(12), 885–896. <https://doi.org/10.1038/nrm2066>
- 六、魏語靚. 建立RNA-Seq 生物資訊分析流程以了解微環境對脂肪細胞基因表現的影響. (2024). 國立臺灣科學教育館.

【評語】 080009

本研究旨在比較人類間葉幹細胞 (human Mesenchymal Stem Cells, hMSCs) 在三維球形微孔和二維平面聚丙稀醯胺 (polyacrylamide, PA) 水凝膠上的生長和分化特性。

優點：

1. 本研究建立一種新型三維球形微孔的培養環境，提供更接近體內條件的微環境。進一步觀察 hMSCs 在三維環境中生長與分化，期許組織工程和再生醫學領域提供新的見解和潛在的應用方向。
2. 本研究建立一種新型三維球形微孔的培養環境，成功地提供 hMSCs 更接近體內條件的微環境，並觀察 hMSCs 在三維環境中生長與分化。

建議：

1. 為何第 0 天球形微孔內細胞和平面凝膠上細胞的基因表現就有差異？不是一開始應該使用相同的間葉幹細胞？作者說明物理環境差異解釋了第 0 天的基因表達模式，要報告是經過物理環境差異多久後(幾小時)才產生基因表現差異。並要確定接觸這些環境差異前的幹細胞是相同的。

2. 觀察到的基因表達差異為何能解釋微孔培養環境更有利於脂肪分化應該詳加說明。就是這些有表達差異的基因如何影響分化？
3. 從文獻中這些表達差異的基因是否對幹細胞分化成其他細胞（非脂肪細胞）也會出現？可討論之。
4. 建議深入探討體內的微環境中可能的影響因子，以期提供組織工程和再生醫學領域新的見解與應用方向。