

I. 簡介 (Introduction) 與背景說明

神經系統分為(1)中樞神經系統(central nervous system, CNS)，包括腦和脊髓；(2)周圍神經系統(peripheral nervous system, PNS)包括神經纖維及神經細胞之小集合，即神經節。神經組織主要包括兩類型之細胞：一為神經細胞(nerve cells)或神經元(neuron)，為神經組織的實質功能細胞，通常具有許多長的神經突(neurite)；另一為神經膠細胞(glia cells; neuroglia)，用以支持或保護神經元及參與神經作用，神經營養和中樞神經之防衛作用。神經膠細胞包括星狀細胞(astrocyte)、寡樹突細胞(oligodendrocyte)、微神經膠細胞(microglia)及室管膜細胞(ependymal cells)。其中星狀細胞及寡樹突細胞合稱為巨神經膠細胞(macroglia)。

已分化完全的神經元不具分裂生長的功能，而它們的變質(degeneration)表示永久地失去作用。相對於神經元，神經膠可再分裂，因疾病或傷害而造成神經細胞損失所留下的空間，係由神經膠細胞所填補。

本實驗所取得的神經細胞是來自老鼠小腦皮質的顆粒層，小腦皮質有三層：外面是分子層(molecular layer)，中央是Purkinje氏細胞層(Purkinje layer)及內部之顆粒層(granular layer)。顆粒層之神經元是最小的(直徑約為 $5\mu\text{m}$)，並有著典型神經元的構造[1]。

培養神經細胞可作為(1)周邊神經系統(PNS)的重建：利用生醫材料作成導管，將受損或斷裂的周圍神經包覆起來，可避免其他組織入侵，加速周邊神經系統的接合。[2] (2)神經移植：利用生醫材料製成三度空間的多孔基材，並在其中培養神經細胞後，移植在中央神經系統(CNS)，以彌補因疾病或受傷所造成的缺損。[3] (3)生物感測元件(bio sensor)：利用神經細胞對於某些刺激特別敏感的特性，可以用來偵測環境中狀況的改變，如二氧化碳濃度的改變等。(4)類神經網路的應用：由生醫材料提供細胞可生長的环境，並且控制神經細胞軸突和樹突的方向，來模擬生物的神經網路分佈，以期達到類似動物神經組織功能，具思考及判斷功能。

根據近年來的研究，在材料上培養神經細胞時，會影響神經細胞生長的因素主要可分為以下四點：(1)材料本身的性質(2)基材的結構(3)促進生長物質(4)帶電性。而本實驗則是藉由fiberglass膜基材的結構來作為三度空間的神經細胞培養及神經再生。

II 關鍵材料及方法(Subject and Methods)

※玻璃纖維製備

本實驗之玻璃纖維使用直接融熔法，不需要先製成玻璃球，直接把各種原料按組成比例同時投入窯中熔融，熔態玻璃經澄清後通過窯中的數十塊白金拉絲板的小孔流出而獲得玻璃絲。

細胞培養

一. 基材前處理

在培養神經細胞之前，基材必須先經過一些前處理步驟：

- (1) 將基材以 UV 燈照射約一天。
- (2) 將滅菌好的基材置入 24 孔洞培養盤中。
- (3) 加入 70% 酒精浸泡約一天，並同時用 UV 燈照射，以達到滅菌的效果。再用 PBS 緩衝溶液沖洗浸泡，將酒精完全除去。

二. 初代培養步驟

主要在於取得小腦顆粒狀細胞 (cerebellum granule cells)，並培養在不同表面型態的膜材上。小腦顆粒狀細胞是來自小腦皮質，整個過程如下：

(1) 取得小腦皮質

先將手術器械以高壓蒸汽 (autoclave) 滅菌，將出生第七天大的 Wistar rat，用以過量的麻醉劑麻醉使致死 (0.1ml)，再以酒精擦拭老鼠體表，以避免污染。

要取腦部時，將頭和軀幹分離，左手以鑷子固定約在嘴的部位，剪開頭皮及頭殼，再用小鑷將頭殼打開，此時看見完整腦部，將大腦、喬腦、延腦、小腦等分離，並用鑷子取出小腦，將腦部置於 Kreb 's soln. 中，再將小腦髓質與皮質分離，仔細清除掉皮質外的腦膜及微血管。

(2) 純化細胞

將小腦皮質置於裝有 Kreb 's soln. 的燒杯中，以彎頭小剪將皮質組織剪碎至約 1mm^3 的大小，吸取小腦皮層碎塊，置於 50 ml 的離心管中，加入 10ml 的 Kreb 's soln. 及 1 ml 的胰蛋白酶溶液 (3.5%)，置於 37°C 水浴 30 分鐘以解碎組織。再加入胰蛋白酶抑制劑溶液 (3.5%) 1ml 以及 DNase soln. 0.1ml 和 10ml 的 Kreb 's soln.，放入 37°C 的水浴 30 分鐘以抑制胰蛋白酶對細胞的傷害。將離心管取出後離心， 350g 、5 分鐘，以移除上層液體。加約 10 ml 的 Kreb 's soln.，然後利用玻璃滴管將細胞用力沖散，再以 350g 離心 5 分鐘，移除上層液體，加入 BME medium 10ml，均勻混合後，作細胞計數。

(3) 接種細胞

將細胞稀釋至的濃度後，接種於已裝在有待測基材的 24 孔洞培養盤上，使細胞的密度最後達到 5×10^5 cells/cm²，每個材料以六重複的方式來作測試，在 18~24 小時後換含有 Ara C 的 BME medium，以抑制會分生的神經膠原細胞生長所造成的干擾[4]。

MTT 評估神經細胞之活性

MTT test 是利用活細胞中的粒線體可以將黃色的 MTT 代謝為藍色的 formazan 晶體，可以用來測量細胞的貼附及生長情形，其步驟如下：

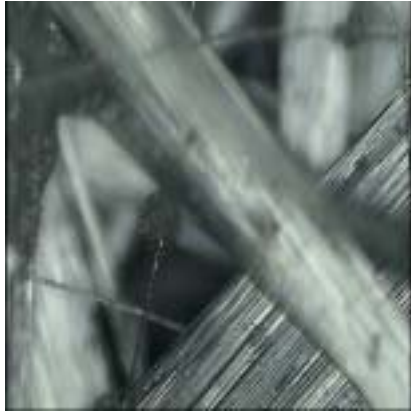
1. 將培養盤中的 medium 抽出並以 PBS 溶液沖洗兩次，將 0.1g 的 MTT 粉末溶於 50ml 的 PBS 溶液中，過濾滅菌，然後在每一個 well 中加入 0.1ml 的 MTT 溶液，置於 incubator 中作用 3 小時，整個過程需避光。
2. 在每個 well 中加入 0.2ml DMSO 溶液，在搖盪器 (shaker) 上搖 15 分鐘，使其均勻。將細胞內的 MTT 產物 formazan 溶出。
3. 取 0.1ml 溶液置於 96well 的培養盤中，以 ELISA Reader 讀取波長 570 nm 的吸光值。

穿透式光學顯微鏡之觀察

因為穿透式光學顯微鏡只能觀察光線可通過的樣本，所以只能用穿透式光學顯微鏡觀察培養在 TCPS 和有塗佈 poly-lysine 之 TCPS 上神經細胞生長的情形。

反射式光學顯微鏡之觀察

由於玻璃纖維複合材本身透光程度有限，以一般光學顯微鏡難以觀察神經細胞之生長狀況，因此以反射式光學顯微鏡的觀察、照相，來對做外觀上的觀察。樣本在觀察之前，需要以戊二醛(glutaraldehyde)做固定，再以酒精做序列脫水至無水酒精，最後再換至丙酮(Acetone)。



(a) fiberglass

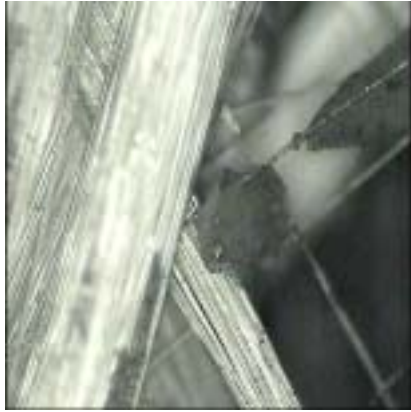


(b) coated poly-lysine



(c) TCPS

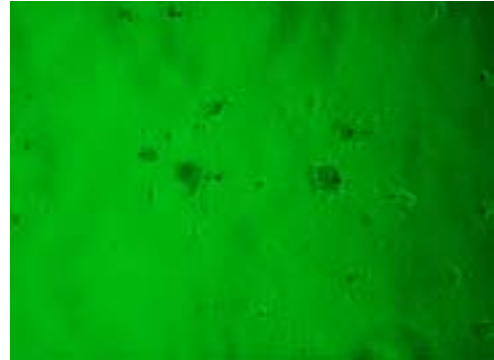
圖一. 神經細胞培養三天之光學顯微照片



(a) fiberglass

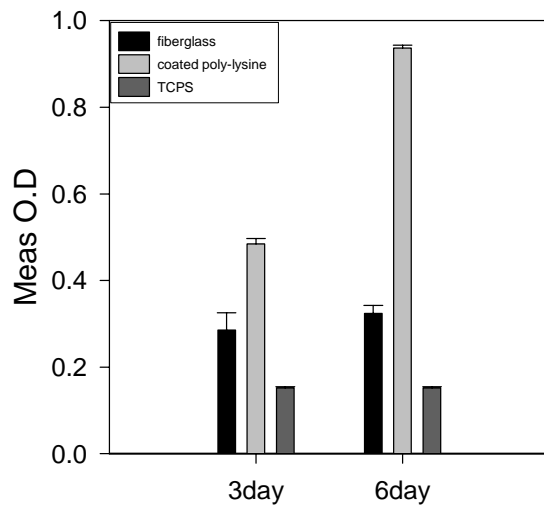


(b) coated poly-lysine



(c) TCPS

圖二.神經細胞培養六天之光學顯微照片



圖三.各種不同基材培養神經細胞之三天及六天 MTT 值

III.重要之結果 (Results)

由三天光學顯微照片可知, 玻璃纖維所構成之三度空間結構可讓神經細胞貼附其上 (如圖一(a)), 聚集在玻璃纖維上之神經細胞並沒有明顯分化之行為, 可

能是受限於所貼附之細胞數或玻璃纖維表面組成結構之影響。但在一般培養皿下（如圖一（c））神經細胞會呈現聚集之行為並且呈現大量分化之作用，神經細胞彼此胞體跟胞體接觸相連並堆疊起來呈現一立體結構，細胞聚集以後會在細胞團跟細胞團間長出神經細胞軸突，用來傳遞細胞間之訊息。而在有塗佈poly-lysine之培養皿上（如圖一（b））可以看到神經細胞聚集之現象大為降低，並且不會形成類似於一般培養皿之立體結構，而神經細胞分化也傾向以個體分化出較細短之樹突結構，而不像沒有塗佈的粗且長。

在六天光學顯微照片可觀察到玻璃纖維上之細胞貼附型態跟三天相似（如圖二（a）），細胞並沒有分化之行為，而在塗佈有poly-lysine之培養皿上（如圖二（b））則可發現細胞間的神經突生長的比三天還要密，並且神經細胞胞體更平貼於材料上。在一般培養皿下六天之結果相似於第三天（如圖二（c））。

由圖三測量細胞活性(MTT)之試驗可知，玻璃纖維在第三天之MTT值大約在0.25左右而在第六天時MTT值大約0.3，遠比在一般培養皿時要高，這可能代表玻璃纖維雖不能讓神經細胞產生分化的作用，但是其三度空間結構卻能讓細胞貼附的較牢固，反觀在一般培養皿上，雖然細胞體長出粗且長之神經軸突，但由於細胞之貼附力較小，而使得MTT讀值降低。在第三天有塗佈poly-lysine之培養皿的MTT讀值大約為0.5左右，這是因為細胞均勻分散並較緊貼於基材上，並且長出神經軸突所致，而在第六天時，細胞本身胞體的生長和神經軸突的增加致使MTT讀值上升到1左右。

VI. 討論 (Discussion) 與成果之貢獻

由上述之結果觀之，可以發現到各個材料對神經細胞都有顯著不同之影響，神經細胞會克服本身的重力遷移到具有三度空間結構之玻璃纖維上，但由於玻璃纖維所構成之孔洞遠比神經細胞之本體還要巨大，照一般情形而言細胞應會在底層之培養皿上而非在玻璃纖維上，推測可能玻璃纖維表面可能適合神經細胞之貼附，而讓神經細胞從培養皿遷移至玻璃纖維上[5]。聚集在玻璃纖維上之神經細胞並沒有明顯分化之行為，可能是受限於所貼附之細胞數或玻璃纖維表面組成結構之影響。對材料做塗佈(coating)貼附因子是最簡單的作法，如本實驗塗佈poly-lysine，事實上也的確具有效果，但是貼附因子價格昂貴，只能用在實驗室，並不適合大量使用，而且塗佈效果的一致性及實驗再現性不佳，再加上塗佈的貼附因子會隨著植入的時間漸長而隨著體液流失掉，無法長期附著，因此現在有許多研究都朝向表面改質，以得到表現穩定的材料[6]，依本實驗結果，如能在玻璃纖維上接枝poly-lysine，將玻璃纖維三度空間結構和poly-lysine促進神經細胞貼附及生長之特性結合起來，有機會成為新的神經細胞培養系統。

參考文獻 (References)

1. 鍾格瑞拉(Junquerira)原著，王世晞，陳德皓，徐志宏編著，“基礎組織學”，藝軒書局，273-331，1987
2. Y. S. Chen, C. L. Hsieh, C. C. Tsai, T. H. Chen, W. C. Cheng, C. L. Hu, & C. H. Yao, “Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with

- collagen, laminin, & fibronectin”, *Biomaterials* **21**, 1541-1547, 2000
3. S. Woerly, & D. J. Morassutti, “New aspects of neuroplantation”, *Neurosurg Rev* **16**, 93-104, 1993
 4. S. R. D’Mello, C. Galli, T. Ciotti, & P. Calissano, “Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: Inhibition of death by insulin-like growth factor I and CAMP”, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 10989-10993, 1993
 5. Processing, characterisation and biocompatibility of iron-phosphate glass fibres for tissue engineering. *Biomaterials*. 2004 Jul; 25(16):3223-32.
 6. J. A. Neff, P. A. Tresco, K. D. Caldwell, “Surface modification for controlled studies of cell-ligand interactions”, *Biomaterials* **20**, 2377-2393, 1999