

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 利用奈米技術從細胞模數及遷移行為探討大蒜精油及其含 硫成分對類嗜中性球細胞遷移活性的影響 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 98-2221-E-009-029-  
執行期間：98年08月01日至99年07月31日  
執行單位：國立交通大學電子物理學系(所)

計畫主持人：徐琅  
共同主持人：劉承慈

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 99 年 10 月 29 日

利用奈米技術從細胞模數及遷移行為探討大蒜精油及其含  
硫成分對類嗜中性球細胞遷移活性的影響

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 98-2221-E-009-029

執行期間：2009年8月1日至2010年7月31日

執行機構及系所：國立交通大學電子物理所

計畫主持人：徐琅

共同主持人：劉承慈

計畫參與人員：陳豐榮，黃瀚平，魏頌揚

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

本計畫除繳交成果報告外，另須繳交以下出國心得報告：

赴國外出差或研習心得報告

赴大陸地區出差或研習心得報告

出席國際學術會議心得報告

國際合作研究計畫國外研究報告

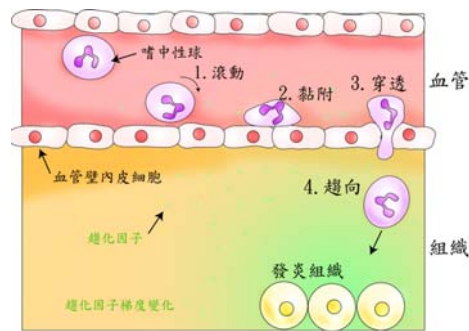
處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

中華民國 99 年 10 月 28 日

## 前言

本實驗選用由人類骨髓癌細胞 (HL-60) 加入 1.3 % Dimethyl sulfoxide (DMSO)，分化七天活化而成的類嗜中性球，因其具有嗜中性球的形變與遷移能力，且其存活力比嗜中性球強，因此常被用來研究嗜中性球的特性。嗜中性球是免疫系統中白血球的主力，其數量占各種白血球細胞總數的 40~75%。如圖一所示，當發炎反應發生時，發炎組織中的細胞受損或遭受病菌或病毒感染，會擴散釋放出趨化分子，活化在血管中巡弋的嗜中性球，藉由形變從血管壁細胞間的縫隙間鑽出浸潤組織，然後循趨化分子的濃度梯度方向遷移到發炎之處，一路消滅病菌、病毒與受損和正常的細胞。因此，嗜中性球的形變與遷移能力影響上述發炎反應的程度。過度的發炎反應不但消滅了受損組織，也破壞了鄰近的正常組織，甚至引發多重器官衰竭的敗血病。



圖一. 發炎反應中嗜中性球的形變與遷移

## 研究目的

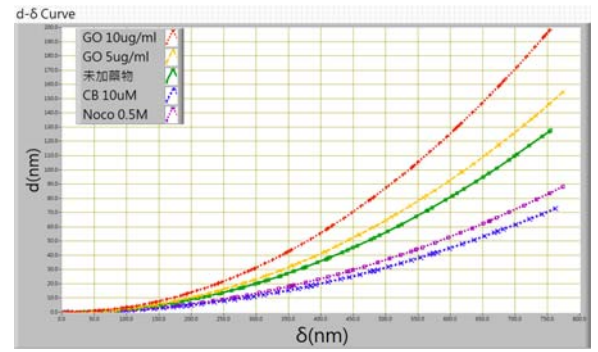
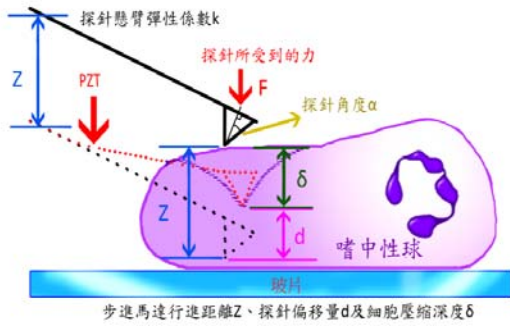
我們利用原子力顯微鏡 (Atomic Force Microscopy)，量測類嗜中性球細胞經大蒜精油等不同藥物處理之後其彈性模數的變化，藉以比較具抗發炎效果的大蒜精油在發炎反應中對免疫主力嗜中性球的形變與遷移的影響，以探討細胞彈性模數的大小和細胞骨架的聚合與解離的難易程度的關聯性。由於細胞骨架的聚合與解離和細胞的形變與遷移活性息息相關，因此本論文研究類嗜中性球細胞的彈性模數作為細胞形變與遷移能力指標的可行性。

## 文獻探討

AFM 探針所能量測到的不只是樣品的表面形貌。透過探針我們可以得知樣品表面凡得瓦力的大小，透過懸臂的彈簧回復力亦能量測生物力。我們生物物理實驗室除了原子力顯微鏡的實驗，還有雷射鑷夾 (Optical Tweezer, OT) 和光電鑷夾等自行設計的奈米級精密儀器，都能應用在生物力的研究。目前在微觀量測生物力的領域之中，各種儀器有其適合的測量尺度與力量範圍，像雷射鑷夾的量測力量大小約為數個皮牛頓 (pN)，約是蛋白質摺疊或是拉伸細胞線毛的力，而原子力顯微鏡可量測的生物力範圍大約從數十皮牛頓 (10 pN) 到數奈牛頓 (nN)，大約是細胞的彈力。我們實驗室的雷射鑷夾與原子力顯微鏡，正好可以互相彌補，從事細胞力量測的研究。由於原子力顯微鏡是用的範圍與我們要量測的生物特性相同，因此，我們將使用原子力顯微鏡來研究細胞的彈性模數。

## 研究方法

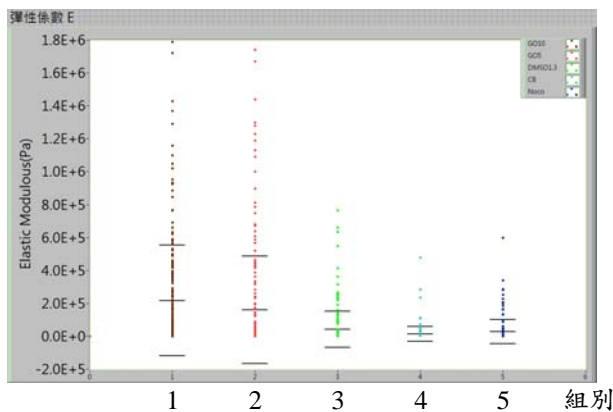
實驗時，我們利用原子力顯微鏡的探針逐一按壓上述五組共 105 個類嗜中性球細胞，如圖二所示，一共量測 738 次單一類嗜中性球表面的凹陷量  $\delta$  與按壓力  $F$  的關係，其中按壓力  $F = k d$ ， $k$  為探針懸臂的已知彈性係數， $d$  為探針受力的偏折量，可由 AFM 儀器自動監控。而凹陷量  $\delta = z - d$ ，其中  $z$  為探針的下移量，可自行操控。最後，我們根據赫茲模型 (Hertz Model; 附件一) 擬合出各個細胞的彈性模數，亦即楊氏係數  $E = k d / (\delta^2 \tan \alpha)$ ，其中  $\alpha$  為探針針尖的角度。



圖二. (a)嗜中性球受 AFM 探針下壓而凹陷的示意圖。(b)實驗量得的探針偏折量  $d$  與表面細胞表面凹陷量  $\delta$  的關係數據圖。

### 結果與討論

如圖三與表一所示，上述五組類嗜中性球的平均彈性模數分別為  $208.5 \text{ KPa}$ 、 $189.8 \text{ KPa}$ 、 $86.7 \text{ KPa}$ 、 $31.2 \text{ KPa}$  和  $3.90 \text{ KPa}$ ，其中  $1 \text{ KPa} = 10^3 \text{ N/m}^2$ 。和未添加任何藥物的類嗜中性球的彈性模數相比，我們發現細胞鬆弛素 B 與諾考達唑分別減小與增加類嗜中性球的彈性模數，而大蒜精油大幅增加類嗜中性球的彈性模數，且濃度愈濃、彈性模數愈大。此外，如圖四所示，我們也發現類嗜中性球的彈性模數，有隨著按壓次數增加而減小的趨勢。



圖三. 五組類嗜中性球經不同藥物處理過後的彈性模數及各組的平均值

類嗜中性球彈性模數					
組別	1	2	3	4	5
添加化學藥品劑量	大蒜精油 10 $\mu\text{g/ml}$	大蒜精油 5 $\mu\text{g/ml}$	未加藥物	細胞鬆弛素 B 10 $\mu\text{M}$	諾考達唑 0.5 $\mu\text{M}$
下壓次數	209	187	117	104	121
細胞數	28	23	18	16	20
彈性模數平均值 單位: $KPa$ ( $10^3 N/m^2$ )	208.5	189.8	86.7	31.2	3.90
標準差( $\times 10^3 N/m^2$ )	103.4	120.9	72.5	23.6	26.9
同一隻細胞的彈性模數平均值/標準差	0.69	0.82	0.83	0.73	0.54
F 值雙尾統計(小於 0.6 代表與對照組有顯著差異性)	<0.6	<0.6	-	<0.6	<0.6

表一. 經不同藥物處理下, 各組類嗜中性球的彈性模數與相關資訊

按壓次數較多次的中性球彈性模數					
組別	1	2	3	4	5
添加化學藥品劑量	大蒜精油 10 $\mu\text{g/ml}$	大蒜精油 5 $\mu\text{g/ml}$	未加藥物	細胞鬆弛素 B 10 $\mu\text{M}$	諾考達唑 0.5 $\mu\text{M}$
細胞數	14	11	11	9	15
彈性模數平均值 單位: $KPa$ ( $10^3 N/m^2$ )	156.6	94.8	31.5	19.1	55.7
標準差 ( $\times 10^3 N/m^2$ )	79.5	43.0	33.3	12.9	29.3
F 值雙尾統計(小於 0.6 代表與對照組有顯著差異性)	<0.6	<0.6	-	<0.6	<0.6

同一隻細胞的彈性模數平均值/標準差	0.60	0.54	0.73	0.60	0.43
每隻細胞第一次下壓的彈性模數平均值 單位: $KPa (10^3 N/m^2)$	263.7	98.1	44.5	29.6	63.5
標準差 ( $\times 10^3 N/m^2$ )	344.4	199.0	44.8	38.5	97.0

表二. 按壓次數較多的類嗜中性球的彈性係數

「標準差/平均值」表示資料相對於平均值分散的程度，是用單一類嗜中性球所量到的彈性模數標準差除以彈性模數平均值，表示單一類嗜中性球隨著按壓次數彈性模數的改變量。我們可以觀察到對照組的「標準差/平均值」最大，這可以推測是因為類嗜中性球會對外界刺激有反應的特性，所以類嗜中性球的彈性模數會隨著按壓次數有所變化。而諾考達唑的「標準差/平均值」是其中最小的，因為諾考達唑可以使細胞骨架的聚合與解離停止，所以這顯示出加了諾考達唑後，單一細胞的彈性模數隨按壓次數的差異分布較小，符合預期的結果。故我們可以推論，對照組(不加任何藥物)的彈性模數隨按壓次數變化最大，類嗜中性球添加了大蒜精油，會增加其平均彈性模數，而且在第一次壓時量到的彈性模數較大，隨著按壓次數增加，其彈性模數變小，整體的彈性模數隨按壓次數變化較大。添加了細胞鬆弛素 B 的類嗜中性球，其平均彈性模數會變小，但隨著按壓次數增加，其彈性模數仍會變小，諾考達唑對改變類嗜中性球的彈性模數較沒有顯著的影響，但會讓單一類嗜中性球彈性模數隨按壓次數的改變的量值較集中。

加了大蒜精油的類嗜中性球，其彈性模數仍會有較大的變化，整體上第一次壓時量到的彈性模數最大，接下來逐漸減小，而較不像諾考達唑，使單一類嗜中性球細胞的彈性模數按壓次數變化較小。故大蒜精油可能影響了細胞骨架的聚合，而不像諾考達唑能減緩細胞骨架的拆解聚合作用。

	對類嗜中性球平均彈性模數的影響	單一類嗜中性球彈性模數隨按壓次數的差異性
大蒜精油 $10 \mu g/ml$	增加較多	次大
大蒜精油 $5 \mu g/ml$	增加較少	次大
未加藥物	-	最大
細胞鬆弛素 B $10 \mu M$	減小	次大
諾考達唑 $0.5 \mu M$	較無明顯改變趨勢	最小

表三. 成果現象表

據此，我們推測大蒜精油有強化類嗜中性球細胞骨架強度的效果，不但增強類嗜中性球的彈性模數，而且也因而降低類嗜中性球變形從血管內鑽出浸潤到組織遷移的能力與數量。這個機制或許透露出大蒜抗發炎反應的原因，如此避免大量類嗜中性球撲殺發炎區域內的正常細胞，俾免更大發炎反應

的敗血症。此外，我們也看出類嗜中性球受外力刺激時，其彈性模數降低，變得柔軟而有助於形變與遷移的活化反應。雖然目前我們尚不明白大蒜精油增強類嗜中性球細胞骨架強度的機制為何，不過本論文有趣的發現讓我們得以一窺發炎反應的堂奧，可供未來進一步研究類嗜中性球細胞的彈性模數、細胞骨架、與不同藥物作用之間的關係。

## 參考文獻

1. H. Y. Su and C. T. Liu, “The effect of garlic oil and garlic organosulfur compounds—diallyl sulfide, diallyl disulfide, diallyl trisulfide—on the physiological activity of neutrophils in rats with systemic inflammation,” Chung Shan Medical University Institutional Repository, Item 310902500/1597, 2003.
2. P. C. Shih, L.Hsu, C. T. Liu, and C. H. Liu, “Effects of garlic oil on the migration of neutrophil-like cell studied by using a chemotactic gradient Labchip,” Ph. D. Thesis, National Chiao Tung University Repository, 2010.
3. C.P.Wen and L. Hsu, “Characterizing the Effect of Garlic Oil on the Elastic Modulus by Using a Home-Made AFM,” Master Thesis, National Chiao Tung University Repository, GT009421528, 2007.
4. S. Lin, D. V. Santi and J. A. Spudich, “Biochemical Studies on the Mode of Action of Cytochalasin B,” *The Journal of Biological Chemistry*, 249, pp. 2268-2274, 1974.
5. R. J. Vasquez, B. Howell, A. M. Yvon, P. Wadsworth and L. Cassimeris, “Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability in vivo and in vitro,” *Molecular Biology of The Cell*, 8, pp. 973-985, 1997.
6. G. Binnig, C. F. Quate, and C. Gerber, “Atomic Force Microscope,” *Physical Review Letters*, 56, pp. 930-933, 1986.

## 本計畫已有論文發表

1. P.C. Shih, C.H. Kuo, J.Y. Juang, C.H. Liu, L. Hsu, C.T. Liu, Effects of garlic oil on the migration of neutrophil-like cell studied by using a chemotactic gradient Labchip (*Journal of Biomedicine and Biotechnology*, (Accepted 2010/2/15 )
2. 國立交通大學電子物理所博士論文，施博真，” 探討發炎反應中大蒜精對人類嗜中性球趨化現象的影響” , 99.
3. 國立交通大學電子物理所碩士論文，魏頌揚，” 利用原子力顯微鏡探討大蒜精油 對類嗜中性球細胞機械特性的影響” , 99.

# 國科會補助專題研究計畫項下出席國際學術會議心得報告

日期：99年10月29日

計畫編號	NSC 98-2221-E-009-029		
計畫名稱	利用奈米技術從細胞模數及遷移行為探討大蒜精油及其含硫成分對類嗜中性球細胞遷移活性的影響		
出國人員姓名	魏頌揚	服務機構及職稱	國立交通大學電子物理所碩士生
會議時間	99年8月2日至 99年8月6日	會議地點	美國加州聖地牙哥
會議名稱	(中文)國際工程光學學會 (英文)SPIE (Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers)		
發表論文題目	(中文)用後散射光雷射鑷夾量測巨噬細胞的彈力係數 (英文)Measurement of macrophage adhesion by optical tweezers with backward-scattered detection		

## 一、參加會議經過

SPIE (Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers)國際工程光學協會創始於1955年，今年的2010年會在美國聖地牙哥國際會議中心(San Diego Convention Center)舉行，大會的主流是各種光學技術，我這次參加的是8/5日的海報，題目是Measurement of macrophage adhesion by optical tweezers with backward-scattered detection，屬於光學雷射鑷夾技術。

## 二、與會心得

本次會議讓我了解到世界上的光學系統尖端研究，由於我們主要研究項目是雷射鑷夾，所以本次我特別注意雷射鑷夾的相關研究。雷射鑷目前在世界上研究主要是與生物相關問題結合，像是用雷射鑷夾與微膠小球研究DNA解螺旋的力、使用雷射鑷夾做細胞分離等研究，這提供我們將來研究的方向與動力。

## 三、考察參觀活動(無是項活動者略)

本次會議結束後，我們到舊金山了解美國風情，看到了舊金山的金門大橋與漁人碼頭等景觀，也去看了中國城與金門公園，了解到美國與台灣的不同，並增廣了自己的國際觀。



#### 四、建議

生物與物理是奈米生技的基礎，目前台灣正推動奈米生技產業，物理、光學等是研究的基礎，而這些研究農發揮長處的領域在是生醫，台灣產官學在推動奈米生科技時，請同時重視基礎的培養與發展。

#### 五、攜回資料名稱及內容

大會議程集

(SPIE Optics+Photonics)

#### 六、其他

## Abstract

When tissue is damaged, macrophages, members of the leukocyte family, will extravasate from vessel. Then, leukocytes accumulate quickly to the infection site. The leukocyte extravasation process reveals that adhesion is an important part of the immune system. Optical tweezers have become a useful tool in force measurement, the trapped bead as a probe usually to measure the adhesive force between beads and cell. In this paper, using the ray-optics model calculated trapping stiffness and defined the linear displacement ranges. By the theoretical values of stiffness and linear displacement ranges, this study attempted to obtain a proper trapped particle size in measuring adhesive force. Finally, this work investigates real-time adhesion force measurements between human macrophages and trapped beads coated with lipopolysaccharides using optical tweezers with backscattered detection.

無衍生研發成果推廣資料

98 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：徐琅		計畫編號：98-2221-E-009-029-					
計畫名稱：利用奈米技術從細胞模數及遷移行為探討大蒜精油及其含硫成分對類嗜中性球細胞遷移活性的影響							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	2	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
博士後研究員		0	0	100%			
專任助理		0	0	100%			
國外	論文著作	期刊論文	1	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
博士後研究員		0	0	100%			
專任助理		0	0	100%			

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>99 年碩士畢業生魏頌揚碩士論文：利用原子力顯微鏡探討大蒜精油 對類嗜中性球細胞機械特性的影響。 99 年博士畢業生施博真博士論文：探討發炎反應中大蒜精對人類嗜中性球趨化現象的影響</p>
--	---

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	



# 國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無

專利： 已獲得  申請中  無

技轉： 已技轉  洽談中  無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

我們利用原子力顯微鏡(Atomic Force Microscope)，量測類嗜中性球細胞經大蒜精油等不同藥物處理之後其彈性模數的變化，據此，我們推測大蒜精油有強化類嗜中性球細胞骨架強度的效果，不但增強類嗜中性球的彈性模數，而且也因而降低嗜中性球變形從血管內鑽出浸潤到組織遷移的能力與數量。這個機制或許透露出大蒜能抗發炎反應的原因：阻止大量類嗜中性球撲殺發炎區域內的正常細胞，避免引發更大發炎反應造成敗血症。目前的結果顯示大蒜精油確實是一種具有抗發炎藥效的物品。在未來的展望上，希望可以利用此實驗及結論進一步的探討癌症細胞的轉移、免疫學以及微生物學的問題。另外，也可以變換其他抗發炎的藥物，例如中藥材的肉桂、靈芝和人參等，測試在發炎反應中對血球的影響效果。此外，本實驗所量測的細胞的彈性模數的變化，亦可以用在研究癌細胞的轉移機制上，以利後人可以對癌症的發展有進一步的瞭解。