

國立交通大學

機械工程學系

碩士論文

肌肉母細胞分化之機械誘導

Mechanical Guidance of Myoblast Differentiation



研究生：駱炳江

指導教授：陳大潘 教授

中華民國九十九年七月

肌肉母細胞分化之機械誘導

Mechanical Guidance of Myoblast Differentiation

研究生：駱炳江

Student : Bing-Jiang Luo

指導教授：陳大潘

Advisor : Dr.Da-Pan Chan

國立交通大學  
機械工程學系  
碩士論文



Submitted to Department of Mechanical Engineering  
College of Engineering

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Science

in

Mechanical Engineering

July 2010

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十九年七月

# 肌肉母細胞分化之機械誘導

研究生：駱炳江

指導教授：陳大潘 教授

國立交通大學機械工程學系(研究所)碩士班

## 摘 要

本論文以聚二甲基矽氧烷(Polydimethylsiloxane, PDMS) 搭配微結構晶片 (Microsubstrate Chips) 翻模製做微結構模型，將製作之聚二甲基矽氧烷模型經明膠(Gelatin) 塗佈及紫外光處理後，利用微結構模型培養及誘導肌肉母細胞(Myoblasts) 分化，並觀察肌肉微管(Myotubes) 融合成肌肉纖維(Muscle Fibers) 的狀態。

# Mechanical Guidance of Myoblast Differentiation

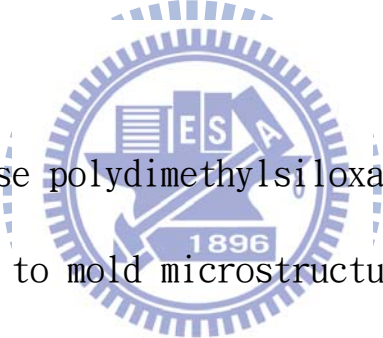
Student : Bing-Jiang Luo

Advisor : Dr.Da-Pan Chan

Department (Institute) of Mechanical Engineering

National Chiao Tung University

## ABSTRACT

The logo of National Chiao Tung University is a circular emblem. It features a central shield with a book, a lamp, and a gear. The letters 'ES' are on the left and 'A' is on the right of the shield. Below the shield is a banner with the year '1896'. The entire emblem is surrounded by a ring of small squares.

This research use polydimethylsiloxane matching microstructure chip to mold microstructure ,after the mold gelatin solution coating and UV irradiation, we culture myoblasts on polydimethylsiloxane and observe the myotubes fuse muscle fibers by mechanical guidance.



## 誌謝

首先要感謝陳大潘教授這兩年來用心指導與教誨，讓學生了解對於研究應有的嚴謹態度和方法，在此致上最誠摯的敬意與感謝。此外感謝學長(豐生、信謀、基信、一全、宣諭)、同伴(炫和、伯儒、建宇、佑麒、日韋、耀民、權峰、浩遠)與學弟(宜偉)，幫忙我解決研究上的問題，分享了很多對事情不同的觀點，另外要感謝生科學姊(聖慈)、同伴(俊傑、宜芳)在生物方面給予很多意見及協助。

最後感謝我的父母與家人及關心我的朋友，謝謝他們在這兩年來不斷的給我加油與鼓勵，在他們的支持下，我才能有動力完成學業。



# 目錄

中文摘要	i
英文摘要	ii
誌謝	iii
目錄	iv
圖目錄	vii
表目錄	xii
第一章 緒論	1
第二章 肌肉母細胞分化過程	3
2.1 肌肉母細胞分化過程與融合成肌肉纖維	3
2.2 文獻回顧	4
2.2.1 聚二甲基矽氧烷翻模產生微結構	4
2.2.2 肌肉母細胞培養在微結構	5
2.2.3 肌肉母細胞培養在無結構與微結構之結果	6
2.2.4 聚二甲基矽氧烷之製作與培養步驟	9
第三章 實驗設備及方法	12
3.1 實驗設備及耗材介紹	12
3.2 實驗步驟	19
3.2.1 微結構晶片之製作	21

3.2.2	聚二甲基矽氧烷製作-----	24
3.2.3	明膠配置過程-----	24
3.2.4	聚二甲基矽氧烷塗佈方法-----	25
3.2.5	肌肉母細胞繼代、培養肌肉纖維與冷凍保存-----	25
第四章	實驗結果-----	29
4.1	肌肉母細胞在不同基材培養成肌肉微管之結果-----	29
4.2	肌肉母細胞在不同基材培養成肌肉微管之角度-----	39
4.3	肌肉母細胞在不同基材培養成肌肉微管之總數量-----	41
4.4	肌肉母細胞在不同基材培養成肌肉微管之長度-----	46
4.5	肌肉母細胞在不同基材培養成肌肉微管之直徑-----	48
4.6	肌肉微管融合成肌肉纖維之過程-----	50
4.6.1	觀察培養皿融合之過程-----	50
4.6.2	觀察 PDMS 溝槽 1300nm、深度 300nm 融合之過程-----	51
4.6.3	觀察 PDMS 溝槽 100 $\mu\text{m}$ 、深度 20 $\mu\text{m}$ 融合之過程-----	52
4.7	肌肉微管融合成肌肉纖維之結果-----	52
4.7.1	肌肉纖維的判斷-----	54
第五章	實驗討論與結論-----	59
5.1	實驗培養細胞的細節與技巧-----	59
5.2	實驗討論-----	60

5.3 實驗結論-----61

參考文獻-----62



## 圖目錄

圖 2.1 肌肉母細胞分化過程與融合過程-----	4
圖 2.2 PDMS利用翻模產生微結構[6]-----	5
圖 2.3 肌肉母細胞培養在微結構 $6\mu\text{m}$ 之結果[6]-----	7
圖 2.4 肌肉母細胞培養在微結構 $6\mu\text{m}$ 與微結構方向之偏離角度[6]-----	7
圖 2.5 無結構與不同微結構培養肌肉母細胞之結果[6]-----	8
圖 2.6 無結構與不同微結構培養肌肉母細胞與微結構方向之偏離角度[6]--	8
圖 2.7 製造矽晶片鑄模與聚二甲基矽氧烷的步驟示意圖[7]-----	10
圖 3.1 (a)高溫高壓滅菌爐-----	12
圖 3.1 (b)冷凍冷藏冰箱-----	12
圖 3.2 (a)無菌操作台-----	13
圖 3.2 (b)二氧化碳培養箱-----	13
圖 3.3 (a)倒立式顯微鏡-----	14
圖 3.3 (b)恆溫水浴槽-----	14
圖 3.4 (a)自動吸放器-----	14
圖 3.4 (b)微量吸取器-----	14
圖 3.5 (a)培養基過濾器-----	15
圖 3.5 (b)真空馬達-----	15
圖 3.6 (a)細胞染色劑-----	16

圖3.6 (b)計數盤	16
圖3.7 (a)液態氮	17
圖3.7 (b)漸凍盒	17
圖3.8 (a)針頭式過濾器	17
圖3.8 (b)針筒	17
圖3.8 (c)負80°C冰箱	17
圖3.9 細胞培養耗材	18
圖3.10 肌肉母細胞培養實驗流程圖	20
圖3.11 微結構為溝槽 1300nm、間距 1000nm、深度 300nm	21
圖3.12 微結構為溝槽 30 $\mu\text{m}$ 、間距 30 $\mu\text{m}$ 、深度 20 $\mu\text{m}$	22
圖3.13 微結構為溝槽 60 $\mu\text{m}$ 、間距 60 $\mu\text{m}$ 、深度 20 $\mu\text{m}$	22
圖3.14 微結構為溝槽 100 $\mu\text{m}$ 、間距 100 $\mu\text{m}$ 、深度 20 $\mu\text{m}$	22
圖3.15 微結構為溝槽 30 $\mu\text{m}$ 、間距 30 $\mu\text{m}$ 、深度 17 $\mu\text{m}$	23
圖3.16 微結構為溝槽 60 $\mu\text{m}$ 、間距 60 $\mu\text{m}$ 、深度 40 $\mu\text{m}$	23
圖3.17 微結構為溝槽 100 $\mu\text{m}$ 、間距 100 $\mu\text{m}$ 、深度 60 $\mu\text{m}$	23
圖3.18 肌肉母細胞繼代與培養實驗流程圖	28
圖4.1 肌肉母細胞培養在低壓電漿培養皿 30 分鐘	29
圖4.2 肌肉母細胞培養在低壓電漿培養皿 1 天	29
圖4.3 肌肉母細胞培養在低壓電漿培養皿 2 天	30

圖 4.4 肌肉微管在低壓電漿培養皿 8 天-----	30
圖 4.5 肌肉母細胞培養在塗佈明膠培養皿 1 天-----	31
圖 4.6 肌肉母細胞培養在塗佈明膠培養皿 3 天-----	31
圖 4.7 肌肉母細胞培養在 PDMS 槽溝 1300nm、深度 300nm-----	32
圖 4.8 肌肉微管在 PDMS 槽溝 1300nm、深度 300nm 11 天-----	32
圖 4.9 肌肉母細胞培養在 PDMS 溝槽 30 $\mu\text{m}$ 、深度 20 $\mu\text{m}$ -----	33
圖 4.10 肌肉微管在 PDMS 溝槽 30 $\mu\text{m}$ 、深度 20 $\mu\text{m}$ 10 天-----	33
圖 4.11 肌肉母細胞培養在 PDMS 溝槽 60 $\mu\text{m}$ 、深度 20 $\mu\text{m}$ -----	34
圖 4.12 肌肉微管在 PDMS 溝槽 60 $\mu\text{m}$ 、深度 20 $\mu\text{m}$ 11 天-----	34
圖 4.13 肌肉母細胞培養在 PDMS 槽溝 100 $\mu\text{m}$ 、深度 20 $\mu\text{m}$ -----	35
圖 4.14 肌肉微管在 PDMS 槽溝 100 $\mu\text{m}$ 、深度 20 $\mu\text{m}$ 10 天-----	35
圖 4.15 肌肉母細胞培養在 PDMS 溝槽 30 $\mu\text{m}$ 、深度 17 $\mu\text{m}$ -----	36
圖 4.16 肌肉微管在 PDMS 溝槽 30 $\mu\text{m}$ 、深度 17 $\mu\text{m}$ 10 天-----	36
圖 4.17 肌肉母細胞培養在 PDMS 溝槽 60 $\mu\text{m}$ 、深度 40 $\mu\text{m}$ -----	37
圖 4.18 肌肉微管在 PDMS 溝槽 60 $\mu\text{m}$ 、深度 40 $\mu\text{m}$ 11 天-----	37
圖 4.19 肌肉母細胞培養在 PDMS 溝槽 100 $\mu\text{m}$ 、深度 60 $\mu\text{m}$ -----	38
圖 4.20 肌肉微管在 PDMS 溝槽 100 $\mu\text{m}$ 、深度 60 $\mu\text{m}$ 10 天-----	38
圖 4.21 不同基材培養成肌肉微管之角度分析-----	40
圖 4.22 量取肌肉微管之角度-----	41

圖 4.23 不同基材培養成肌肉微管之總數量分析-----	42
圖 4.24 培養皿之擷取面積-----	43
圖 4.25 PDMS 溝槽 1300nm、深度 300nm 之擷取面積-----	44
圖 4.26 PDMS 溝槽 30 $\mu\text{m}$ 、深度分別為(a)20 $\mu\text{m}$ 與(b)17 $\mu\text{m}$ 之擷取面積--	44
圖 4.27 PDMS 溝槽 60 $\mu\text{m}$ 、深度分別為(a)20 $\mu\text{m}$ 與(b)40 $\mu\text{m}$ 之擷取面積--	45
圖 4.28 PDMS 溝槽 100 $\mu\text{m}$ 、深度分別為(a)20 $\mu\text{m}$ 與(b)60 $\mu\text{m}$ 之擷取面積--	45
圖 4.29 不同基材培養成肌肉微管之長度分析-----	47
圖 4.30 量取肌肉微管之長度-----	48
圖 4.31 不同基材培養成肌肉微管之直徑分析-----	49
圖 4.32 量取肌肉微管之直徑-----	50
圖 4.33 培養皿融合過程-----	50
圖 4.34 PDMS 溝槽 1300nm、深度 300nm 融合過程-----	51
圖 4.35 PDMS 溝槽 100 $\mu\text{m}$ 、深度 20 $\mu\text{m}$ 融合過程-----	52
圖 4.36 觀察 PDMS 溝槽 1300nm、深度 300nm 融合之結果-----	53
圖 4.37 觀察 PDMS 溝槽 100 $\mu\text{m}$ 、深度 60 $\mu\text{m}$ 融合之結果-----	53
圖 4.38 肌肉母細胞分化肌肉微管與肌肉微管融合成肌肉纖維示意圖-----	54
圖 4.39 低壓電漿培養皿之肌肉纖維-----	55
圖 4.40 PDMS 溝槽 1300nm、深度 300nm 之肌肉纖維-----	55
圖 4.41 PDMS 溝槽 30 $\mu\text{m}$ 、深度 20 $\mu\text{m}$ 之肌肉纖維-----	56



圖 4.42 PDMS 溝槽  $60\ \mu\text{m}$ 、深度  $20\ \mu\text{m}$  之肌肉纖維-----56

圖 4.43 PDMS 溝槽  $30\ \mu\text{m}$ 、深度  $17\ \mu\text{m}$  之肌肉纖維-----57

圖 4.44 PDMS 溝槽  $60\ \mu\text{m}$ 、深度  $40\ \mu\text{m}$  之肌肉纖維-----57

圖 4.45 PDMS 溝槽  $100\ \mu\text{m}$ 、深度  $60\ \mu\text{m}$  之肌肉纖維-----58



## 表目錄

表2.1 肌肉母細胞培養於不同微結構方法與結果-----	9
表 3.1 細胞實驗所需藥品-----	19
表4.1 不同基材培養成肌肉微管之角度-----	39
表4.2 不同基材培養成肌肉微管之總數量-----	41
表4.3 不同基材培養成肌肉微管之長度-----	46
表4.4 不同基材培養成肌肉微管之直徑-----	48



# 第一章 緒論

隨著現在醫療不斷的進步，發現利用生醫結合其他專業的領域技術，可以在人體外大量、快速培養具有活性的特別細胞群，以植入人體內，用來修補、活化、補充、促進或維持原本遭受破壞或死亡的細胞與器官組織，使體內的循環、代謝作用能恢復正常的機制。

近年來隨著半導體工業的快速發展，可藉由聚二甲基矽氧烷翻模 (Polydimethylsiloxane, PDMS) 微結構 (Microsubstrates) 晶片 (Chips)，利用蛋白質塗佈在聚二甲基矽氧烷，使細胞培養在微結構的聚二甲基矽氧烷，細胞生長在微結構上，發現細胞會往微結構方向生長，進而調控細胞骨架的排列，引發某些細胞內部的生物作用，如細胞分裂、運動、吸附等。

這些蛋白質通常選用細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 成份，研究指出細胞外基質對細胞功能扮演著調控的重要角色，細胞可以容易在細胞外基質上進行貼附與分化機制，藉由微結構控制細胞生長方向，改變細胞與細胞融合後的型態，培養出與人體相似的細胞組織，對生醫方面可以直接拿來使用在人體上用來修補，快速的恢復身體的正常機制。

本實驗微結構晶片將聚二甲基矽氧烷翻模成微結構，接著將聚二

甲基矽氧烷塗佈濃度 0.1%明膠(Gelatin)溶液，經過無菌操作台紫外光(UV)照射隔夜過後，聚二甲基矽氧烷上種植固定肌肉母細胞(Myoblasts)數量，藉由微結構方向使肌肉微管(Myotubes)融合成肌肉纖維(Muscle Fibers)。

本論文第二章介紹文獻回顧，第三章介紹實驗設備及方法、第四章介紹實驗結果、第五章介紹實驗討論與結論。



## 第二章 肌肉母細胞分化過程

### 2.1 肌肉母細胞分化過程與融合成肌肉纖維

本實驗所採用細胞為老鼠肌肉母細胞(Mouse Myoblasts, C2C12)，此細胞為貼附型細胞，需貼附於基材表面才可進行生長、分裂、分化與融合機制，首先將肌肉母細胞種植於培養皿中，使用生長培養液(89%培養基+10%胎牛血清+1%抗生素)培養，放到培養箱(Incubator)裡培養經過 30 分後，肌肉母細胞將會貼附於基材表面，經過 2 小時後細胞偽足(Pseudopodium)開始伸展，再經兩天細胞成長約 9 成滿，更換分化培養液(97%培養基+2%馬血清+1%抗生素)進行細胞分化轉型，接著分別兩天、兩天換一次分化培養液，之後都以一天更換分化培養液，經過七天後肌肉母細胞偽足逐漸伸長與相鄰的肌肉母細胞相接分化成肌肉微管(Myotubes)，8 天以後肌肉微管開始融合成肌肉纖維(Muscle Fibers)可分為兩種，一種藉由肌肉母細胞偽足伸長與兩邊肌肉微管相接融合成肌肉纖維，另一種相鄰肌肉微管細胞膜接觸融合成肌肉纖維，等到培養到 16 天後細胞開始老化而與基材分離，如圖 2.1。

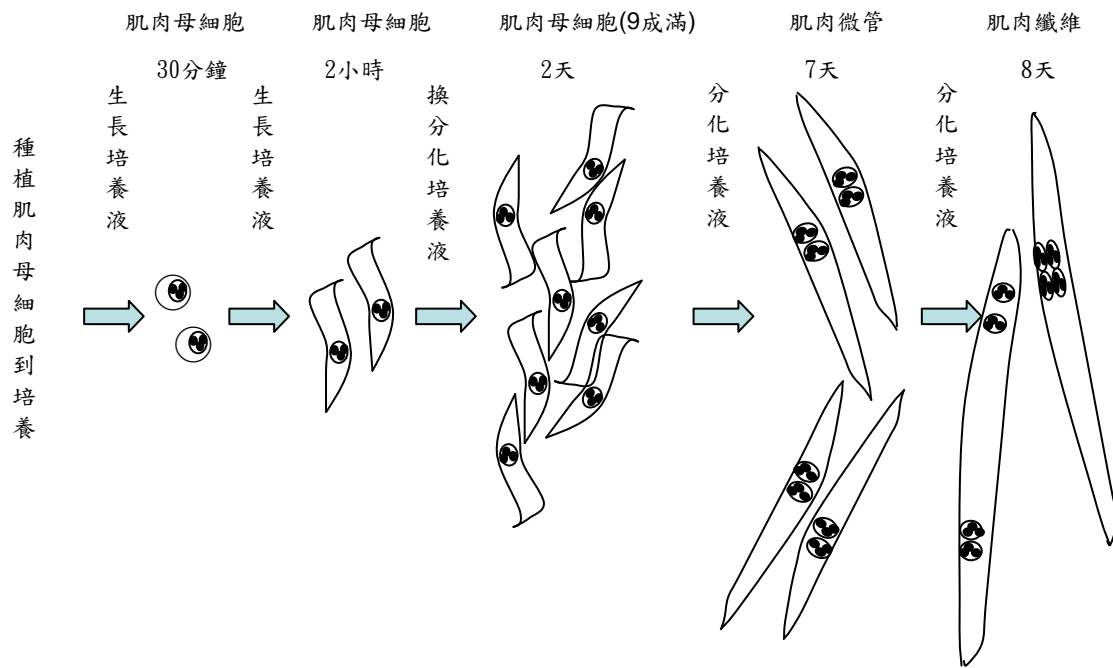


圖 2.1 肌肉母細胞分化過程與融合過程

## 2.2 文獻回顧

### 2.2.1 聚二甲基矽氧烷翻模產生微結構

Mai T. Lam<sup>a</sup> [1]以矽橡膠(Sylgard184)A、B溶劑分別以10:1、6.7:1和15:1的比例混合各別製作溝槽為 $3\mu\text{m}$ 、 $6\mu\text{m}$ 與 $12\mu\text{m}$ 微結構(Microsubstrates)的聚二甲基矽氧烷(PDMS)，微結構模子依據Jiang X及Bowden N[2][3]等學者製作方法，其特徵為近似正旋曲線，主要構想讓底部呈現與細胞相似之生長環境，更接近細胞生長過程，礙於技術上的問題，此溝槽沒辦法再製作更大的溝槽。Dunn GA[4]證實溝槽(Grooves)角度只要大於 $17^\circ$ 皆有誘導細胞生長方向，此結構皆大於

17<sup>0</sup>，如下圖2.2，利用掃描電子顯微鏡（SEM）得到（a）微結構為6  $\mu\text{m}$ 上視圖（b）微結構6  $\mu\text{m}$ 側視圖與（c）微結構12  $\mu\text{m}$ 側視圖。

## 2.2.2 肌肉母細胞培養在微結構

Mai T. Lam<sup>a</sup> 及 Dennis RG [1][5] 等學者將肌肉母細胞 (Myoblasts) 使用生長培養液 (79% 培養基 + 20% 胎牛血清 + 1% 抗生素) 培養於微結構 (Microsubstrates) 為 3  $\mu\text{m}$ 、6  $\mu\text{m}$ 、12  $\mu\text{m}$  溝槽 (Grooves)，此微結構需先塗佈層黏蛋白 (Laminin)，經過改良後，採用 2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  比例，讓肌肉母細胞可以貼附在薄膜上。一天後換分化培養液 (91.5% 培養基 + 7.5% 馬血清 + 1% 抗生素) 讓肌肉母細胞轉型，接著分別兩天、兩天換一次分化培養液，之後都以一天更換分化培養液，五天後肌肉母細胞分化之肌肉微管 (Myotubes) 可以藉由偽足 (Pseudopodium) 抓取微結構，使肌肉微管以微結構方向生長。

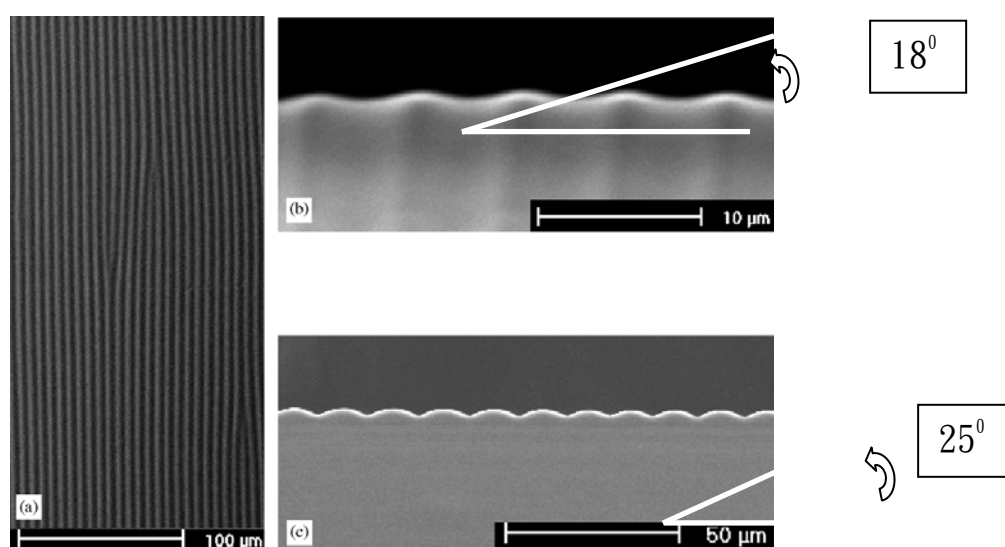


圖2.2 PDMS利用翻模產生微結構[6]

### 2.2.3 肌肉母細胞培養在無結構與微結構之結果

Mai T. Lam<sup>a</sup> [1]培養肌肉母細胞分化時發現種植密度是重要一環，首先採取三種不同之密度，分別為 $10 \times 10^4/\text{cm}^2$ 、 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 與 $2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 種植於 $6 \mu\text{m}$ 微結構(Microsubstrates)上，研究發現肌肉母細胞(Myoblasts)以密度 $2.5 \times 10^4$ (細胞數量/ $\text{cm}^2$ )種植，208小時後分化成肌肉微管(Myotubes)數量最多，此種植密度使肌肉母細胞不會因過滿而有提早老化現象，如圖2.3(i)。圖2.3(h)與(d)種植密度過高導致分化成肌肉微管時，肌肉母細胞提早老化而與基材分離只剩肌肉微管在基材上，圖2.3(g)為種植密集度越高會加快細胞老化現象。接著觀察三種不同密度在培養過程中與 $6 \mu\text{m}$ 微結構方向之偏離角度，偏離角度採用細胞長軸與微結構之夾角，由圖2.3發現在肌肉母細胞時偏離角度較大，分化成肌肉微管時偏離角度會變小，圖2.3(i)(h)可發現種植密度為 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 與 $2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 經培養208時後肌肉微管偏離角為 $6^\circ$ ，與圖2.3(i)(h)觀察可得 $2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 種植密度為最佳。

得到了最佳的種植密度，接著以種植密度 $2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 分別培養在無結構培養皿、 $3 \mu\text{m}$ 、 $6 \mu\text{m}$ 與 $12 \mu\text{m}$ 三種微結構之聚二甲基矽氧(PDMS)中，如圖2.5，以肌肉母細胞培養146小時，可觀察出 $6 \mu\text{m}$ 微結構之肌肉微管數量最多，從中可發現無結構之肌肉母細胞生長方向較不固定，沒有一定的方向性。接著觀察四種基材的偏離角度，可由圖2.6



得知培養到192小時， $3\mu\text{m}$ 、 $6\mu\text{m}$ 與 $12\mu\text{m}$ 三種微結構與肌肉微管生長方向之偏離角度分別為 $7.5^\circ$ 、 $4^\circ$ 、 $12^\circ$ ，無結構為 $45^\circ$ ，由圖2.5、圖2.6比較，可觀察出培養在 $6\mu\text{m}$ 微結構效果最佳。

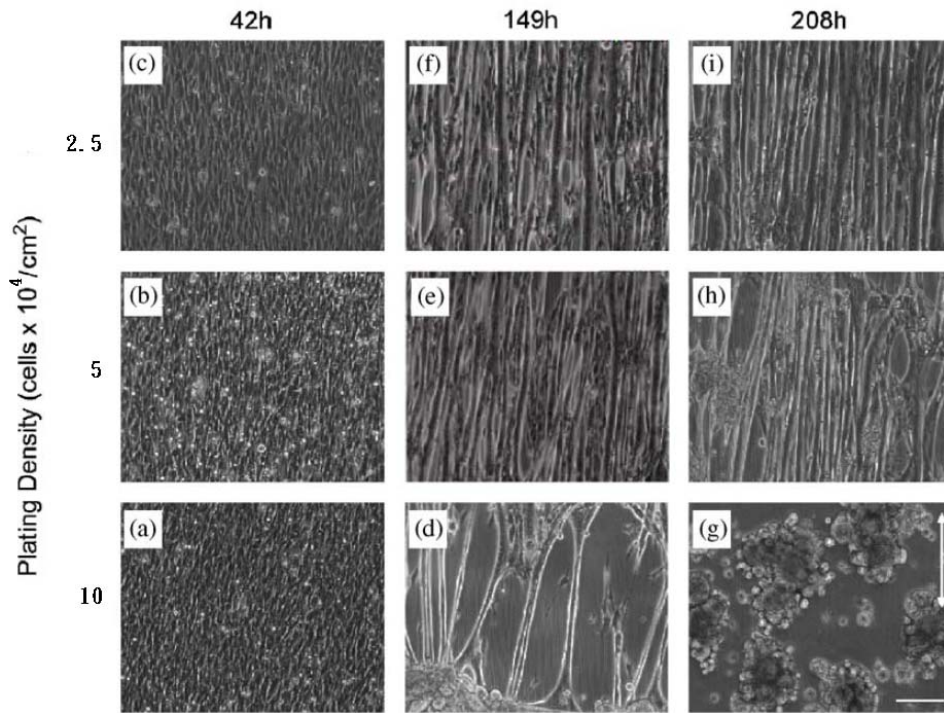


圖2.3 肌肉母細胞培養在微結構 $6\mu\text{m}$ 之結果[6]

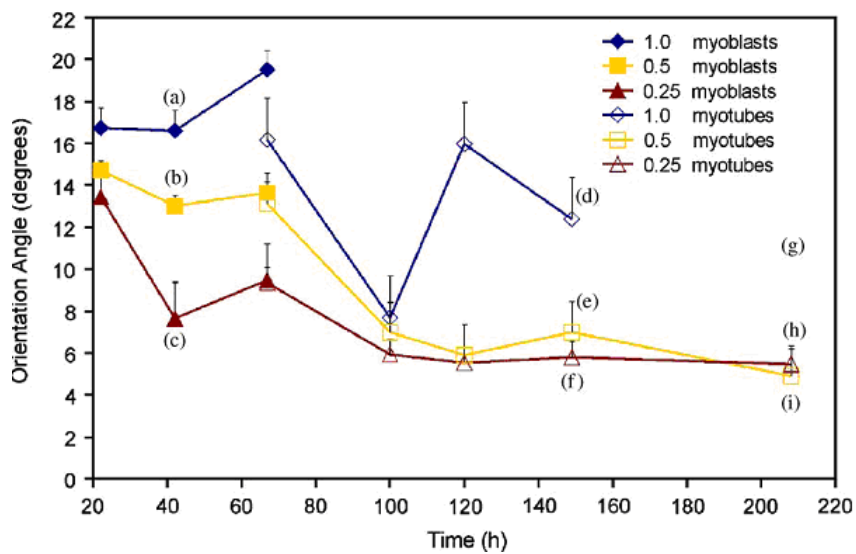


圖2.4 肌肉母細胞培養在微結構 $6\mu\text{m}$ 與微結構方向之偏離角度[6]

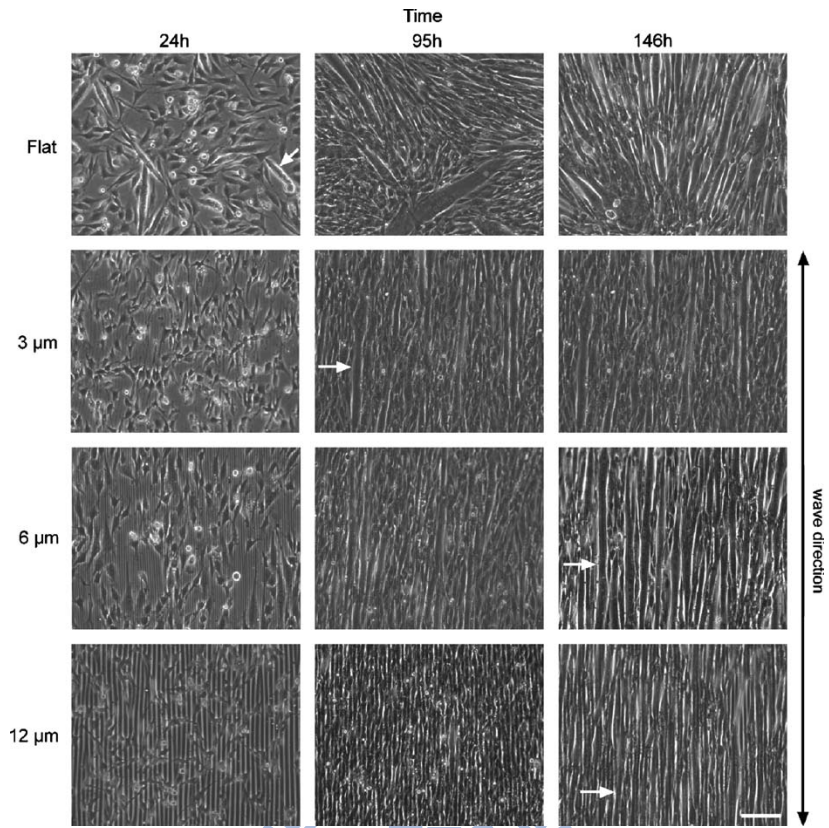


圖2.5 無結構與不同微結構培養肌肉母細胞之結果[6]

(a)

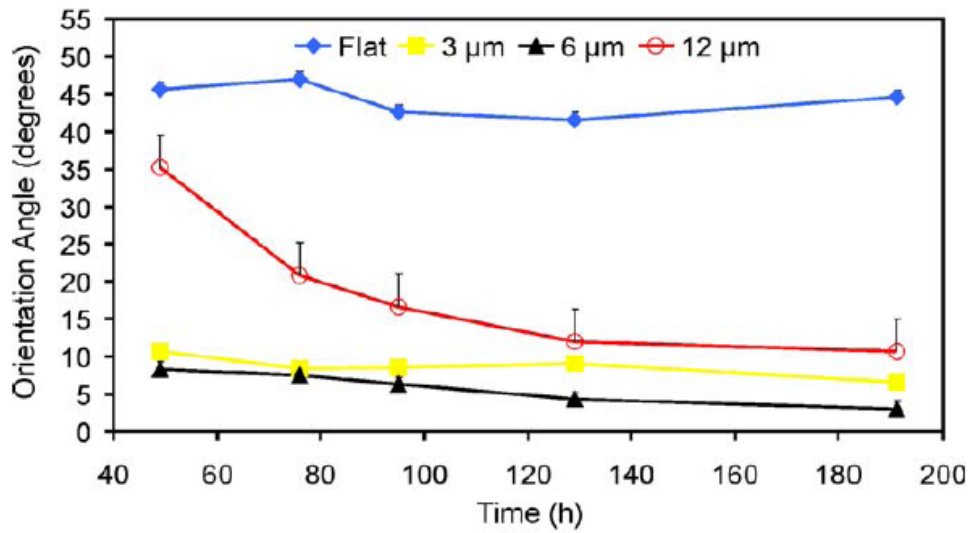


圖2.6 無結構與不同微結構培養肌肉母細胞與微結構方向之偏離角度[6]

表2.1 肌肉母細胞培養於不同微結構方法與結果

微結構尺寸	結構3 $\mu\text{m}$ 、深度400 nm	結構6 $\mu\text{m}$ 、深度670nm	結構12 $\mu\text{m}$ 、深度1700 nm
PDMS A、B劑比例	10:1	6.7:1	15:1
PDMS表面低壓電漿處理	90 豪陶爾(mTorr) (45min)	90 豪陶爾(mTorr) (60min)	300 豪陶爾(mTorr) (15min)
薄膜材質	層黏蛋白 (Laminin) $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	層黏蛋白 (Laminin) $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	層黏蛋白 (Laminin) $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$
種植密度	$2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$		
培養液	GM：培養基+20%胎牛血清+1%抗生素 DM：培養基+7.5%馬血清+1%抗生素		
培養於7天結果肌肉微管	肌肉微管與微結構夾角為 $12^\circ$	肌肉微管與微結構夾角為 $7.5^\circ$ ，肌肉微管數量最多	肌肉微管與微結構夾角為 $4^\circ$

## 2.2.4 聚二甲基矽氧烷之製作與培養步驟

聚二甲基矽氧烷(PDMS)之製作，因為作為培養細胞用，故採對細胞生長沒有毒性的醫療用聚二甲基矽氧烷，將調配好的聚二甲基矽氧烷倒入矽晶片模仁上，在真空烘箱室溫下以真空馬達除去內部氣泡，使矽膠完全密合在模板上，接著真空烘箱中加溫到 $70^\circ\text{C}$ 1小時，待硬化成型後取出，將模板與聚二甲基矽氧烷分離，即可得到具有表面構形的聚二甲基矽氧烷。製造流程的示意圖見圖2.6(e)、(f)、(g)、(h)。

在測試之前，所有樣品被裁切成 $4\text{cm}^2$ 大小的試片，Su WT[6]並以一系列清洗溶液洗滌。最後，所有樣品以75% 酒精消毒30分鐘，然後在細胞培養前，用生長培養液潤濕。

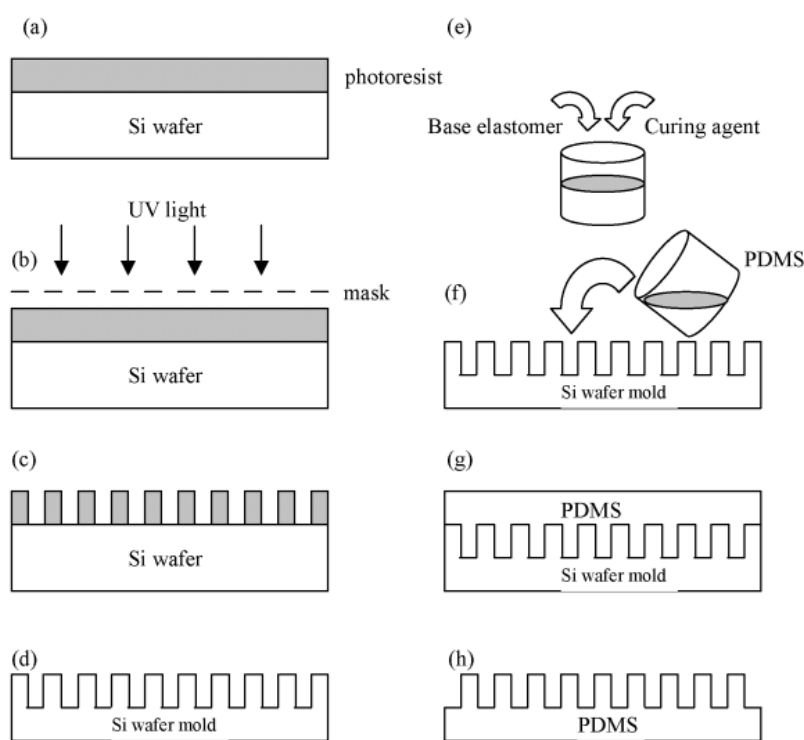


圖2.7 製造矽晶片鑄模與聚二甲基矽氧烷的步驟示意圖[7]

將設計好構形圖案的光罩，放在表面塗有光阻的矽晶片上，利用紫外光(UV)照射，把構形圖案上的光阻去除，並以乾蝕刻方式，蝕刻晶片表面呈構形圖案，再去除剩餘的光阻後，即可得到具有表面構形的矽晶片。晶片上構形圖案是平行凹槽，如圖2.7(a)(b)(c)(d)。

本實驗將採用不同生長培養液與分化培養液比例，培養前將聚二甲基矽氧烷塗佈濃度0.1%明膠(Gelatin)，接著將肌肉母細胞

(Myoblasts)培養在無結構培養皿與7種不同大小之微結構  
(Microsubstrates)，統計7種微結構分化出肌肉微管(Myotubes)生長  
角度、總數量、長度與直徑等數據，判斷那一種微結構最佳，並觀察  
肌肉微管因機械結構誘導成肌肉纖維(Muscle Fibers)之過程，最後  
依據肌肉纖維細胞核型態判斷肌肉微管。



## 第三章 實驗設備及方法

### 3.1. 實驗設備及耗材介紹

#### 【高溫高壓滅菌爐】與【冷凍冷藏冰箱】

高溫高壓滅菌爐其功能為實驗所需器材與耗材滅菌，例如 1000  $\mu$ l 滴管尖頭(Tips)、去離子水(DI Water)、血清瓶等，使用方法為將器材或耗材先放入，並將裡面本身的去離子水調到一定高度規格，然後鎖緊關上，溫度調到 121 $^{\circ}$ C，時間調到 40 分鐘即可，如圖 3.1(a)。

冷凍冷藏冰箱，下層冷藏方面主將生長培養液(89%培養基+10%胎牛血清(FBS)+1%抗生素(PS))、分化培養液(97%培養基+2%馬血清(HS)+1%抗生素)、磷酸鹽溶液(PBS)、胰蛋白酵素(Trypsin-EDTA)等儲存在 4 $^{\circ}$ C 冰箱備用。上層冷凍方面則是將胎牛血清、馬血清、胰蛋白酵素等儲存於負 20 $^{\circ}$ C，如圖 3.1(b)。

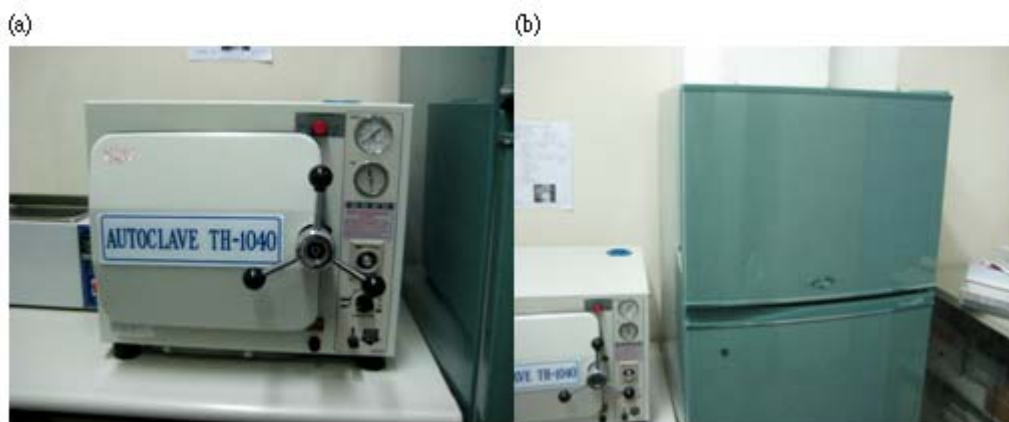


圖 3.1 (a)高溫高壓滅菌爐、(b)冷凍冷藏冰箱



## 【無菌操作台】與【二氧化碳培養箱】

細胞實驗過程都需要在無菌操作台操作，首先開啟無菌操作台(Larminar Flow)讓風扇運轉約3分鐘後，使空氣流動穩定，達到無菌的平台，才可開始進行實驗操作，實驗完畢後，將實驗物品帶出工作平台，以75%酒精(Ethanol)擦拭無菌操作台面，並開啟紫外光殺菌，如圖3.2(a)。二氧化碳培養箱(Incubator)為細胞培養的環境，細胞需要在恆溫 $37^{\circ}$ 與5%CO<sub>2</sub>中培養，需要定時補充滅菌水，如圖3.2(b)。

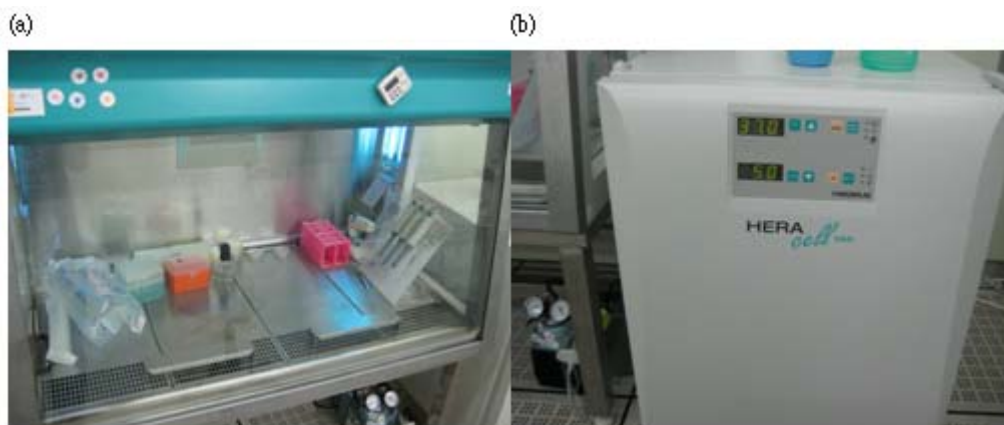


圖 3.2 (a)無菌操作台、(b)二氧化碳培養箱

## 【倒立式顯微鏡】與【恆溫水浴槽】

倒立式顯微鏡主要觀察細胞成長過程變化，並利用 Leica Application Suite V3.3.0 軟體拍照變化過程，將其圖片進行後續分析，如圖 3.3(a)。恆溫水浴槽先將溫度加熱  $37^{\circ}$ C，接著將實驗所需使用的耗材放入恆溫水浴槽加熱，等 25 分鐘讓溫度到達  $37^{\circ}$ C，即可將實驗所需使用的耗材取出，才可以開始進行細胞培養，實驗耗材

例如，生長培養液(GM)、分化培養液(DM)、磷酸鹽溶液(PBS)、胰蛋白酶(Trypsin-EDTA)等，如圖 3.3(b)。

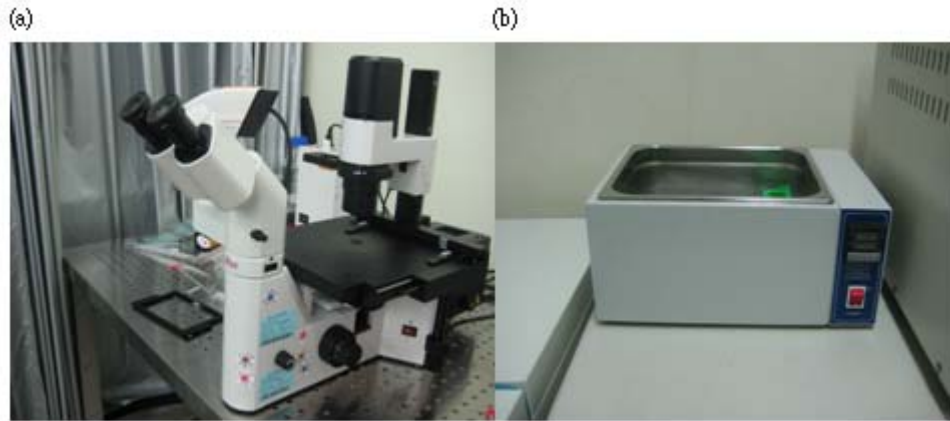


圖 3.3 (a)倒立式顯微鏡、(b)恆溫水浴槽

### 【自動吸放器】與【微量吸取器】

培養細胞過程用來吸取生長培養液(GM)、分化培養液(DM)、磷酸鹽溶液(PBS)、胰蛋白酶(Trypsin-EDTA)或廢液等液體，如圖 3.4(a)吸取液體範圍為 1~10ml，圖 3.8(b)三隻微量吸取器依左到右吸取液體範圍分別為 2~20  $\mu$ l、0.1~2.5  $\mu$ l、20~1000  $\mu$ l 等。

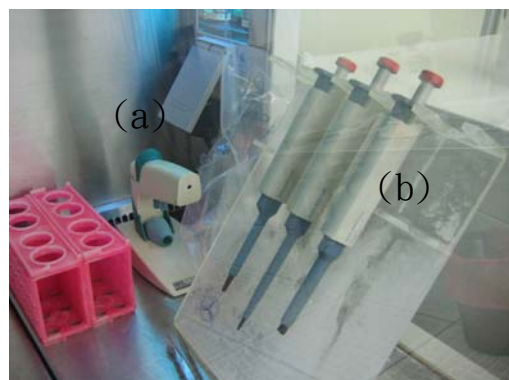


圖 3.4 (a)自動吸放器、(b)微量吸取器



## 【培養基過濾器】與【真空馬達】

培養基過濾器將培養基(DMEM)或磷酸鹽溶液(PBS)倒入過濾器(Filter)漏斗中，再經過濾器過濾才可以保證是無菌的，過濾時間相當緩慢，插入真空馬達，如圖 3.5(b)，可加快過濾速度，如圖 3.5(a)培養基過濾器為可棄式，500 ml 規格。

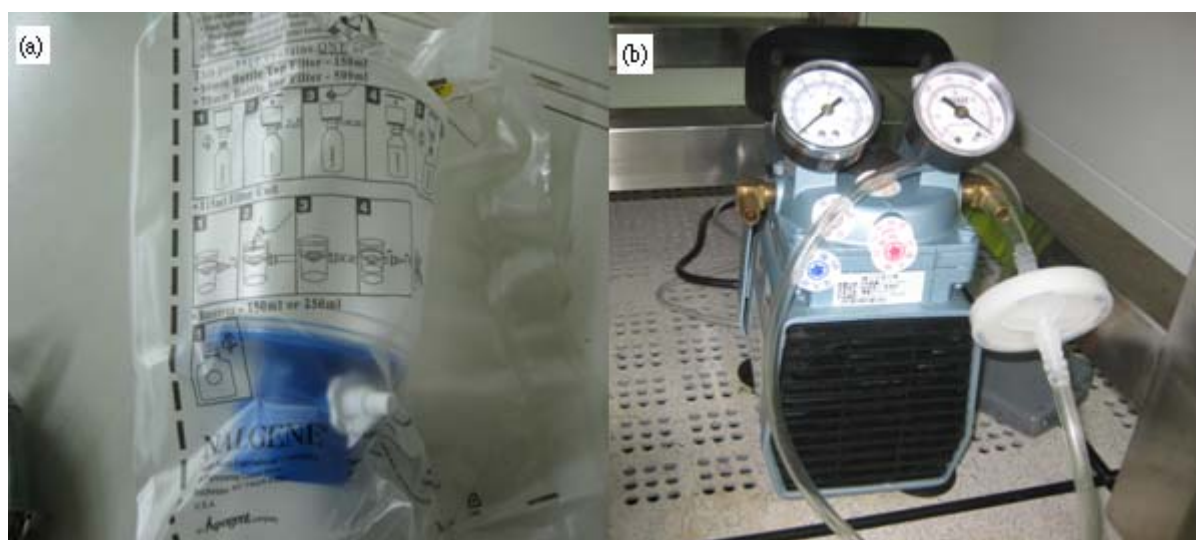


圖 3.5 (a)培養基過濾器、(b)真空馬達

## 【計數盤】與【細胞染色劑】

計數盤主要用來數細胞控制每次繼代數量與實驗種植細胞數量，使用時懸浮細胞液與細胞染色劑(Trypan Blue)一比一混合好，細胞染色劑可以將活細胞外圍染色，用顯微鏡觀察可以看到活細胞外圍是呈現白光，死細胞則會讓細胞染色劑滲入細胞裡使細胞整個呈現白光，接著使用 $0\sim 10\ \mu\text{l}$ 滴管尖頭(Tip)取 $10\ \mu\text{l}$ 注入計數盤中，再使用計數盤公式，既可以算出細胞數量，如圖3.6(a)、(b)。公式算法

為計數盤裡有正方形九公格，每一個面積為 $1\text{mm}^2$ ，深度為 $0.1\text{mm}$ ，每一格體積為 $1\text{mm}^2 \times 0.1\text{mm} = 1.0 \times 10^{-4}\text{ml}$ ，數細胞時取五個正方格來計算，分別為正方形四個外角與中間的正方格。

公式為  $(5\text{大格細胞總數} \times 2 \times 10^4) / 5 = (\text{細胞數}/\text{ml})$ 。



圖3.6 (a)細胞染色劑、(b)計數盤

### 【液態氮】與【漸凍盒】

液態氮溫度為負 $197^{\circ}\text{C}$ ，主要是將細胞冷凍保存在液態氮裡，可長期保存，使用細胞時再從液態氮裡拿出新細胞，漸凍盒主要是細胞冷凍過程放在負 $80^{\circ}\text{C}$ 冰箱可以慢慢降溫，一般盒子需先存放在負 $5^{\circ}\text{C}$ 與負 $20^{\circ}\text{C}$ 各30分鐘後，才可放到負 $80^{\circ}\text{C}$ ，等過夜或16小時候，再將冷凍管放入液態氮裡保存，如圖3.7(a)、(b)。

### 【針頭式過濾器】與【負 $80^{\circ}\text{C}$ 冰箱】

針頭式過濾器(Filter)孔徑為 $0.22\ \mu\text{m}$ ，配合針筒一起使用，過

濾完之液體為無菌，本實驗主要用來過濾濃度0.1%明膠(Gelatin)溶液，負80°C冰箱功能為冷凍細胞過程中需放在負80°C隔夜或16小時才可將冷凍管放入液態氮裡保存，如圖3.8(a)、(b)、(c)。

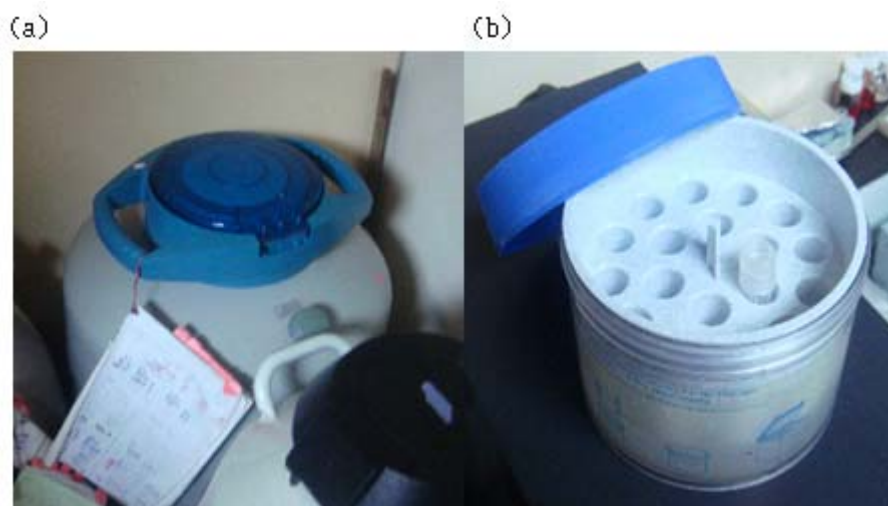


圖3.7 (a) 液態氮、(b) 漸凍盒



圖3.8 (a)針頭式過濾器、(b)針筒、(c)負80°C冰箱

### 【細胞培養耗材】

細胞培養耗材如圖 3.9 分別有 15ml 與 50ml 離心管、直徑 3.5、6cm 培養皿、1000  $\mu$ l 滴管尖頭(Tips)、T25-燒瓶(flasks)、10mL 玻

璃吸管等，使用時每個角落需徹底噴 75%酒精才可放入無菌操作台使用，為一次使用性不可重複使用。

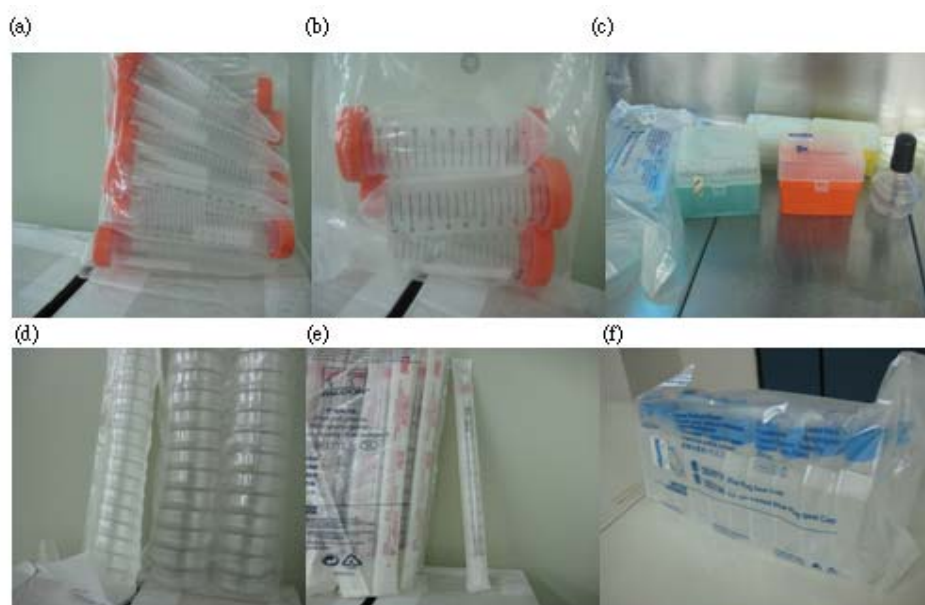


圖 3.9 細胞培養耗材

((a)15ml 離心管、(b)50ml 離心管、(c)1000  $\mu$ l 滴管尖頭(Tips)、  
(d)直徑 3.5、6cm 培養皿、(e)10ml 玻璃吸管、(f) T25-燒瓶(flasks))

### 【培養基的配法】與【磷酸鹽溶液】

首先各別將培養基放入 700ml 二次水與碳酸氫鈉溶液放入 200ml 二次水，利用磁石攪拌機攪拌 700ml 培養基，再將 200ml 之碳酸氫鈉水溶液慢慢加入，碳酸氫鈉才不破壞培養基之性質，接著利用過濾器(Filter)過濾，生長培養液(89%DMEM+10%FBS+1%PS)為 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)加入 10%胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)與 1%抗生素(100ug/ml Penicillin and

100ug/ml Streptomycin, PS)均勻沖散，分化培養液  
(97%DMEM+2%FBS+1%PS)為 DMEM 加入 2%馬血清(Horse Serum, HS)與  
1%抗生素均勻沖散。將一包磷酸鹽粉末(Phosphate-Buffered  
Saline, PBS)與 1000ml 二次水利用磁石攪拌均勻，接著利用過濾器  
(Filter)過濾。

表 3.1 細胞實驗所需藥品

藥品中文名稱	藥品英文名稱	生產公司
乙醇	ethanol $C_2H_5OH$	台糖
培養基	DMEM	Hyclone
胎牛血清	FBS	Hyclone
馬血清	HS	Hyclone
胰蛋白酵素	trypsin-EDTA	Hyclone
磷酸鹽溶液	PBS	Hyclone
冷凍培養基	DMSO	Hyclone
明膠	Gelatin	Hyclone
細胞染色劑	Trypan Blue	Hyclone
盤尼西林	Penicillin	Sigma
鏈黴素	Streptomycin	Sigma
碳酸氫鈉	$NaHCO_3$	Sigma

### 3.2. 實驗步驟

本實驗利用聚二甲基矽氧烷(PDMS)翻模微結構

(Microsubstrates)，將聚二甲基矽氧烷置於濃度 0.1%明膠溶液中，浸泡1Hr後取出，利用紫外光滅菌照射一天即可培養細胞，開始加入生長培養液(89%DMEM+10%FBS+1%PS)培養肌肉母細胞(Myoblasts)於無結構培養皿與微結構的聚二甲基矽氧烷，接著兩天換分化培養液(97%DMEM+2%HS+1%PS)，約5~7天培養出肌肉微管(Myotubes)，6~9天培養出肌肉纖維(Muscle Fibers)，如圖3.10肌肉母細胞培養實驗流程圖。

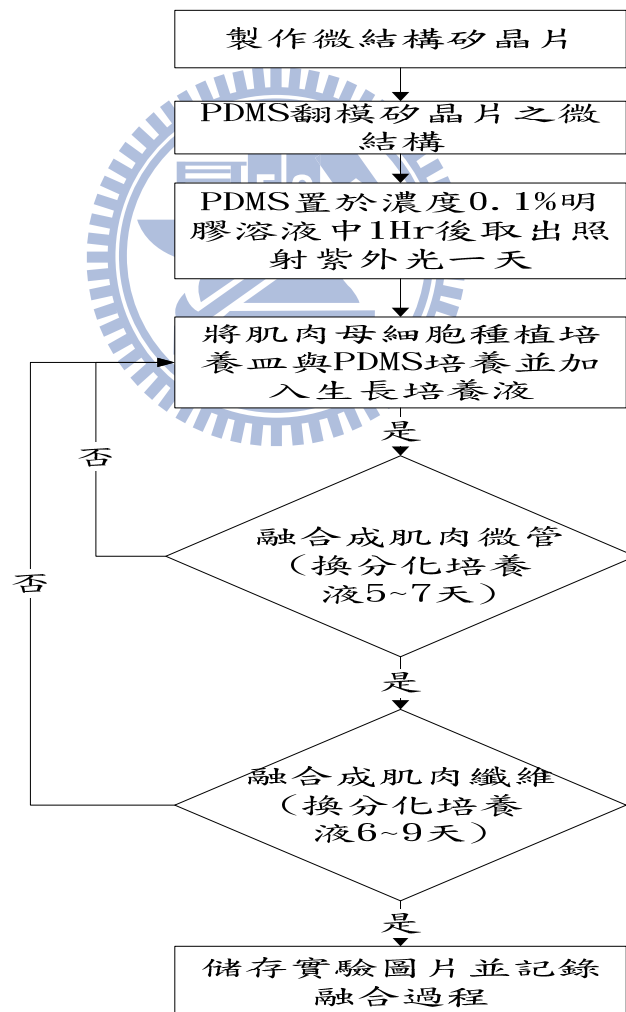


圖 3.10 肌肉母細胞培養實驗流程圖



### 3.2.1 微結構晶片之製作

矽基模板經由曝光微影與蝕刻技術製作，首先將光阻旋轉塗佈在矽基上，接著紫外光(UV)隔著一個光罩對矽基模板進行曝光顯影，之後再進行蝕刻，形成微結構(Microsubstrates)，本實驗經由聚二甲基矽氧烷(PDMS)翻模微結構尺寸分別為 (a) 溝槽(Grooves)1300nm、間距 1000nm、深度 300nm，(b) 溝槽  $30\mu\text{m}$ 、間距  $30\mu\text{m}$ 、深度  $20\mu\text{m}$ ，(c) 溝槽  $60\mu\text{m}$ 、間距  $60\mu\text{m}$ 、深度  $20\mu\text{m}$ ，(d) 溝槽  $100\mu\text{m}$ 、間距  $100\mu\text{m}$ 、深度  $20\mu\text{m}$  (e) 溝槽  $30\mu\text{m}$ 、間距  $30\mu\text{m}$ 、深度  $17\mu\text{m}$ ，(f) 溝槽  $60\mu\text{m}$ 、間距  $60\mu\text{m}$ 、深度  $40\mu\text{m}$ ，(g) 溝槽  $100\mu\text{m}$ 、間距  $100\mu\text{m}$ 、深度  $60\mu\text{m}$ ，分別為圖 3.11、圖 3.12、圖 3.13、圖 3.14、圖 3.15、圖 3.16、圖 3.17。

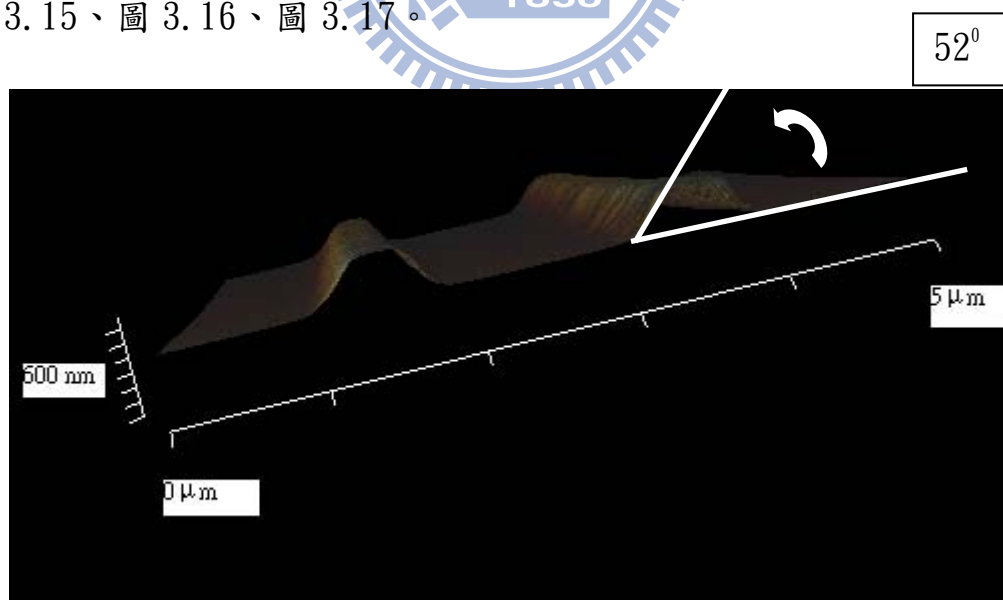


圖 3.11 微結構為溝槽 1300nm、間距 1000nm、深度 300nm

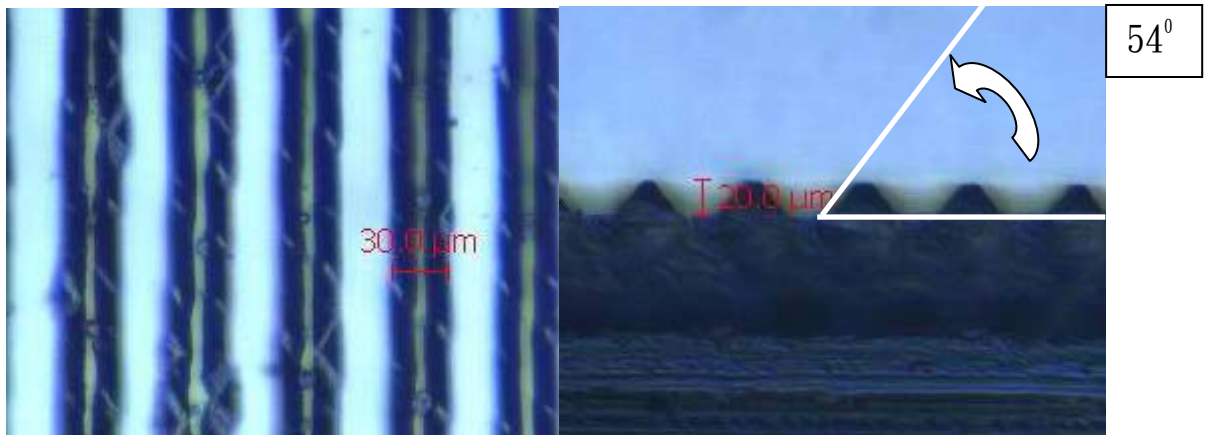


圖 3.12 微結構為溝槽 30 μm、間距 30 μm、深度 20 μm

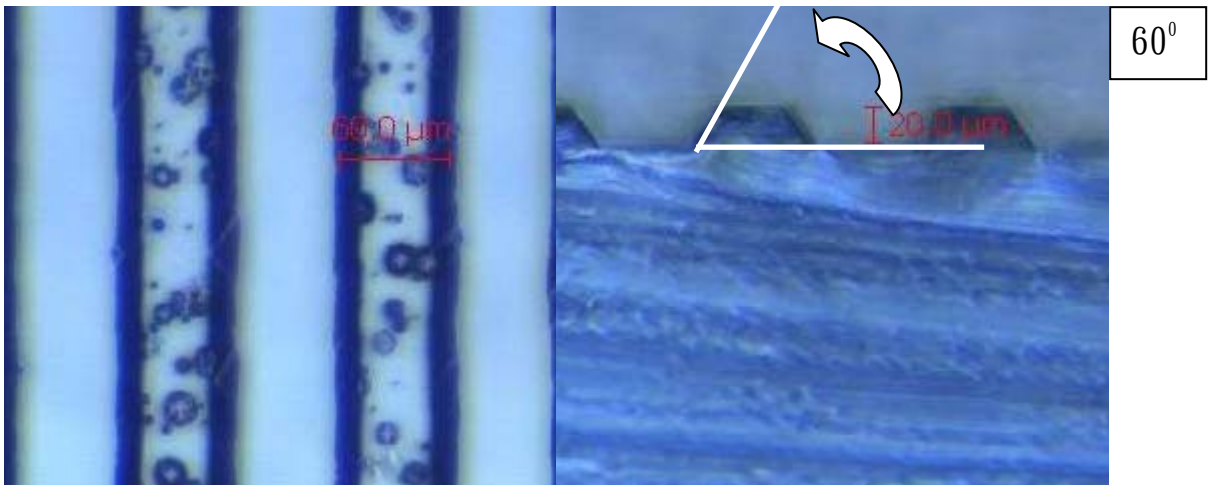


圖 3.13 微結構為溝槽 60 μm、間距 60 μm、深度 20 μm

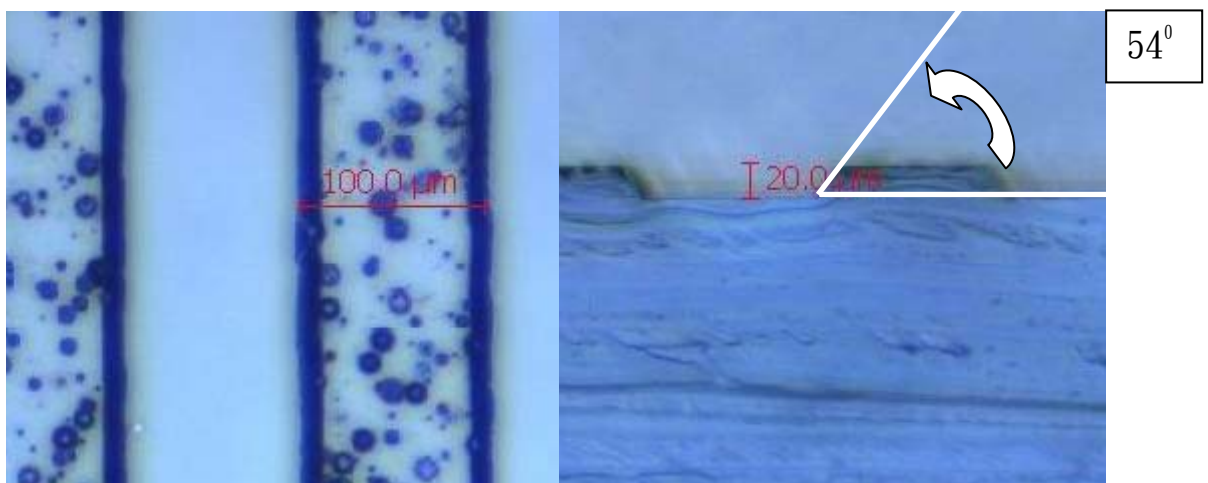


圖 3.14 微結構為溝槽 100 μm、間距 100 μm、深度 20 μm



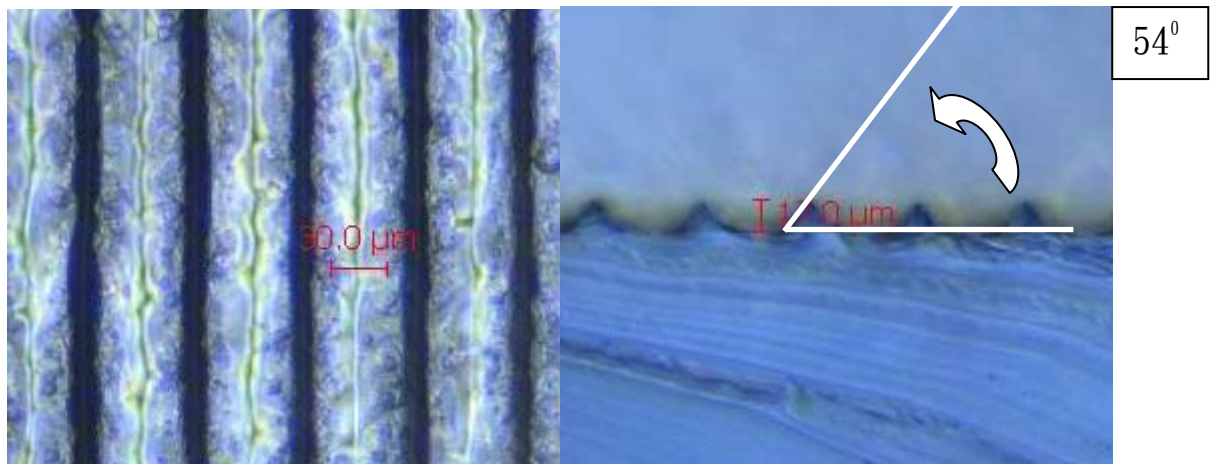


圖 3.15 微結構為溝槽 30 μm、間距 30 μm、深度 17 μm

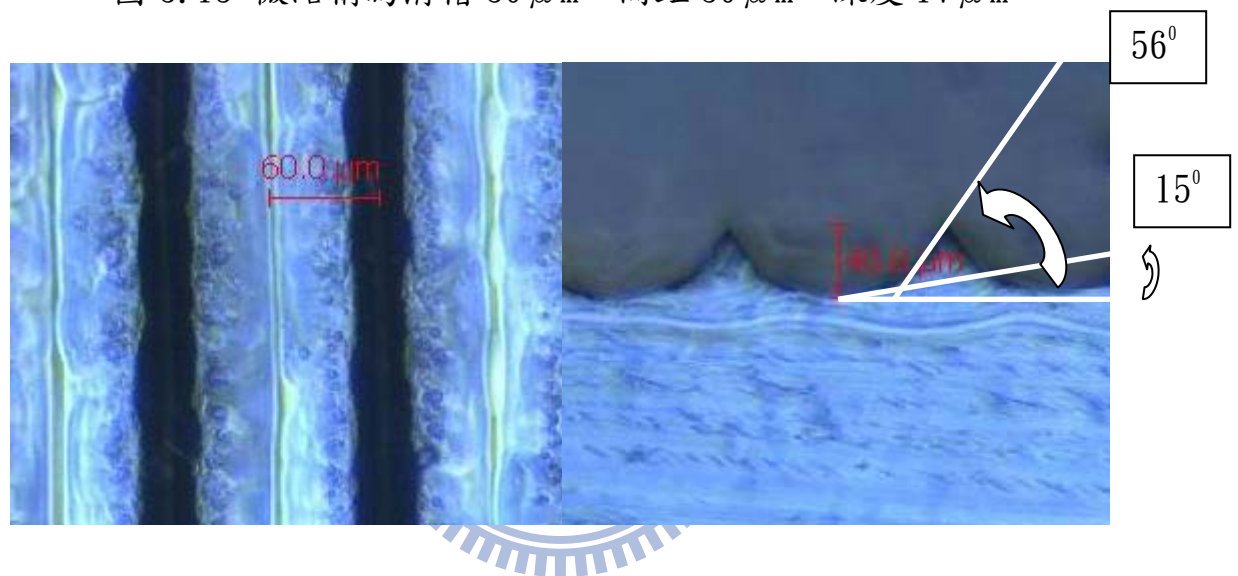


圖 3.16 微結構為溝槽 60 μm、間距 60 μm、深度 40 μm

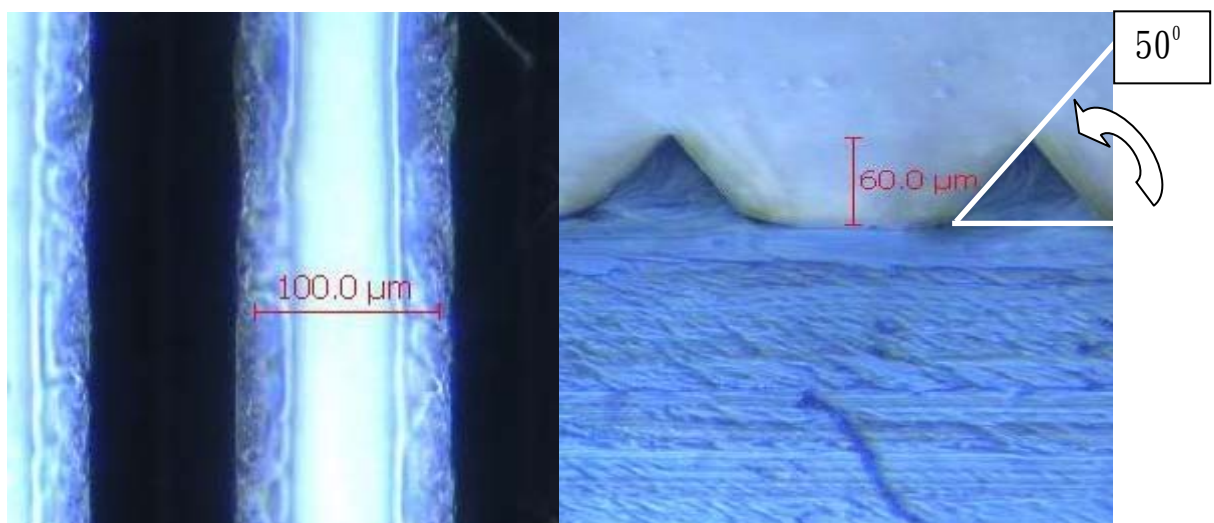


圖 3.17 微結構為溝槽 100 μm、間距 100 μm、深度 60 μm

微結構設計概念依據肌肉微管(Myotubes)直徑約 20~25  $\mu\text{m}$  為基準，首先藉由溝槽 1300nm 使肌肉母細胞(Myoblasts)利用偽足(Pseudopodium)抓取方式分化成肌肉微管，再經誘導融合成肌肉纖維(Muscle Fibers)比較生長在溝槽之差異性，接著設計三種溝槽尺寸讓肌肉微管生長在溝槽裡，第一種為溝槽為 30  $\mu\text{m}$ ，主要讓肌肉微管生長在裡面進行兩端融合成肌肉纖維，第二種為溝槽 60  $\mu\text{m}$ ，藉由相鄰肌肉微管可以融合在一起，第三種為溝槽 100  $\mu\text{m}$ ，讓相鄰肌肉微管融合次數過程增多，使肌肉纖維直徑變大，此三種採用兩種不同深度，並觀察不同深度對肌肉微管的引響。

### 3.2.2 聚二甲基矽氧烷製作

首先將矽橡膠(Sylgard184)A、B溶劑以10:1的比例混合，接著放入真空烘箱1個小時去除矽橡膠混合劑中的氣泡，接著再以矽基板當作模仁，放入直徑10cm培養皿中，倒入除泡後的矽橡膠混合劑覆蓋好矽基板，放入真空烘箱1.5小時去除矽橡膠混合劑中之氣泡，接著加溫到70<sup>0</sup>C烘烤1小時，即可使聚二甲基矽氧烷(PDMS)凝固成型，再進行脫模，其過程溫度越高烘烤使其凝固時間也會跟著縮短，但可能會造成聚二甲基矽氧烷品質不好原因。

### 3.2.3 明膠配置過程

首先將 0.1g 明膠(Gelatin)與 100ml 二次水(DIwater)加入血清

瓶混合，需利用磁石攪拌機加溫到 40~50<sup>0</sup>C 攪拌，才可將明膠溶於水中，溫度不可以超過 60<sup>0</sup>C，60<sup>0</sup>C 以上會破壞明膠性質，攪拌均勻後，利用 0.22um 無菌針筒過濾器(Filter)過濾到 50ml 離心管容器中，最後將濃度 0.1%明膠溶液冷藏 4<sup>0</sup>C 備用。

### 3.2.4 聚二甲基矽氧烷塗佈方法

使用時先將濃度 0.1%明膠溶液(Gelatin)放入恆溫水浴槽加溫到 37<sup>0</sup>，再將聚二甲基矽氧烷(PDMS)置於 50ml 離心管容器中浸泡一個小時後取出，利用紫外光(UV)滅菌照射一天即可培養細胞。

### 3.2.5 肌肉母細胞繼代、培養肌肉纖維與冷凍保存

#### 【繼代】與【培養肌肉纖維】

本實驗肌肉母細胞(Myoblasts)採用直徑 6 公分培養皿繼代，首先將培養皿之廢液清除，吸取 2ml 磷酸鹽溶液(PBS)以順時針方向繞著培養皿內側清洗，此步驟需做兩次，吸取 0.5ml 胰蛋白酵素(Trypsin-EDTA)加入培養皿，目的將肌肉母細胞與培養皿分離，接著放到培養箱(Incubator)一分半鐘後，吸取 2ml 生長培養液(89%DMEM+10%FBS+1%PS)加入培養皿，將肌肉母細胞脫離集中在培養液中，接著吸取全部細胞懸浮液加入到 15ml 離心管，使用 1000ul 滴管尖頭將細胞懸浮液均勻打散，取出 100ul 細胞懸浮液利用計數盤數

細胞，並將細胞懸浮液配製成  $6 \times 10^5$ /ml 比例，接著取 0.4ml 細胞懸浮液到培養皿，並加入 4ml 生長培養液沖散放入培養箱繼代，三天後重新以上步驟繼代。另外取  $3 \times 10^4$  /cm<sup>2</sup> 細胞懸浮液到培養皿與聚二甲基矽氧烷(PDMS)進行肌肉纖維(Muscle Fibers)之培養，培養皿直接加入 4ml 生長培養液沖散放入培養箱培養，聚二甲基矽氧烷表面需先用生長培養液潤溼，取  $3 \times 10^4$  /cm<sup>2</sup> 細胞懸浮液到培養皿等待 30 分鐘後，加入 4 ml 生長培養液放入培養箱培養，兩天後換分化培養液 (97%DMEM+2%HS+1%PS)，接著分別兩天、兩天換一次分化培養液，之後都以一天更換分化培養液，培養成肌肉微管(Myotubes) (約 5~7 天)；培養成肌肉纖維 (約 6~9 天)。如圖 3.18 肌肉母細胞繼代與培養流實驗程圖。



### 【冷凍保存】

取得肌肉母細胞(Myoblasts)為 12 代，首先肌肉母細胞是從液態氮取出來，運送過程中需要將冷凍管置於乾冰 (負 78.9<sup>0</sup>C) 中，30 分鐘內需要馬上解凍培養，一開始先將生長培養液(89%DMEM+10%FBS+1%PS)加溫到 37<sup>0</sup>C，並且將冷凍管解凍，另外拿一個 50ml 離心管，使用 1000  $\mu$ l 滴管尖頭加入 8ml 生長培養液與冷凍管之細胞懸浮液混和，接著均勻沖散細胞，將細胞懸浮液取 4.5ml 分別置於培養皿，隔天需將培養液更換，或做細胞繼代分盤，因為冷凍管裡面含有冷凍培

養基 (Dimethyl sulfoxide , DMSO) 會傷害細胞，解凍後細胞需經過一到兩次繼代後，活性才會恢復正常。三天細胞生長約 7~8 成滿，再將細胞冷棟保存，不可讓細胞生長超過 8 成否則可能造成細胞老化現象，一開始培養過程與繼代前面步驟相同，在細胞於懸浮狀態時，預先將 93%生長培養液與 7%冷凍培養基配好，因為冷凍培養基加到培養液中會有放熱現象，使其溫度升高，需經過幾分鐘冷卻，再將數好之細胞懸浮液利用離心機 (5 分鐘、1000rpm) 將細胞分離加入，才不會讓細胞因為溫度過高而導致死亡，接著各別分裝 1ml 到冷凍管，將其放置漸棟盒，放於負 80°C 冰箱冷藏，隔天拿到液態氮保存，冷凍管每管細胞數量控制在  $1.5 \times 10^6 / \text{ml}$ 。





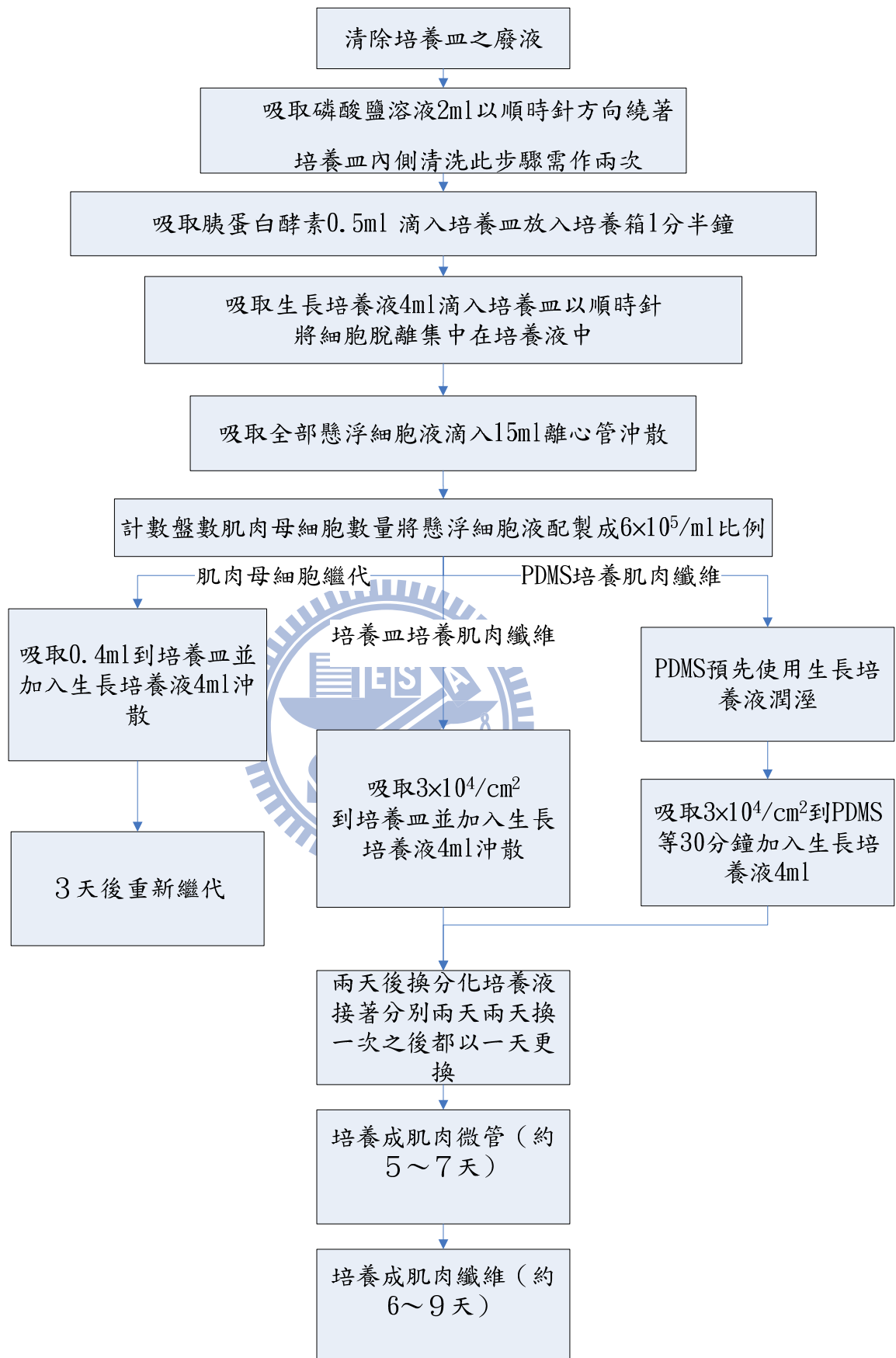


圖 3.18 肌肉母細胞繼代與培養實驗流程圖

## 第四章 實驗結果

### 4.1 肌肉母細胞在不同基材培養成肌肉微管之結果

#### 【肌肉母細胞培養在低壓電漿培養皿】

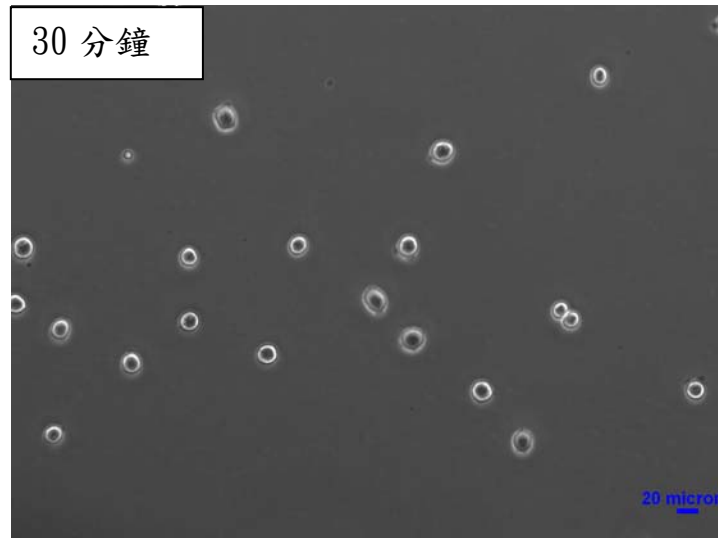


圖 4.1 肌肉母細胞培養在低壓電漿培養皿 30 分鐘

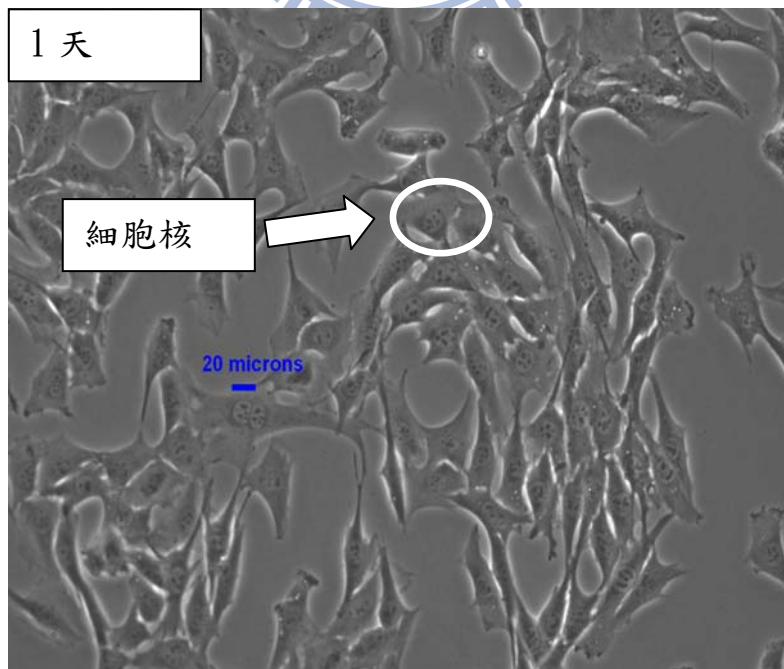


圖 4.2 肌肉母細胞培養在低壓電漿培養皿 1 天

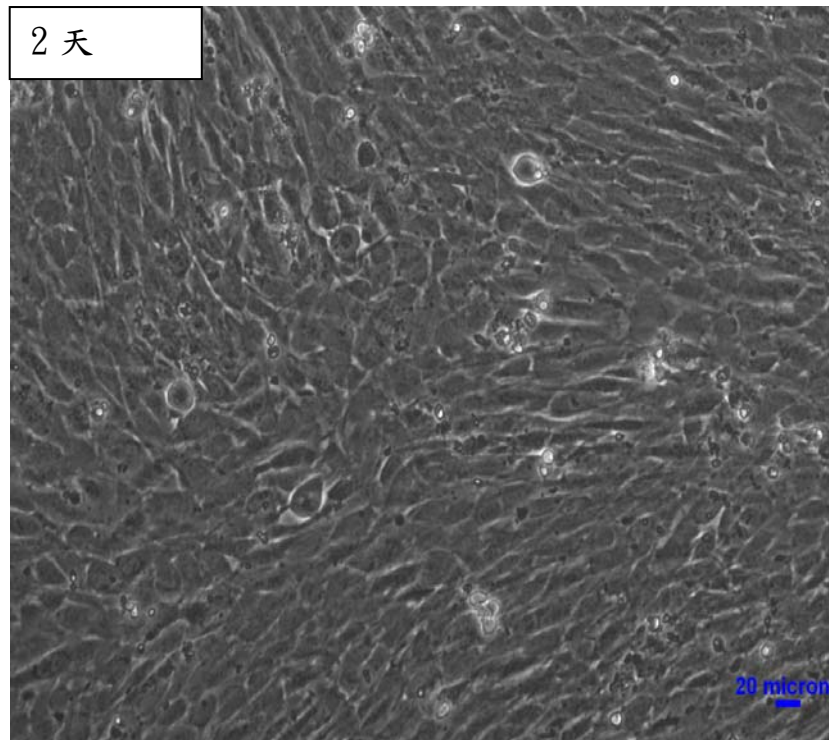


圖 4.3 肌肉母細胞培養在低壓電漿培養皿 2 天

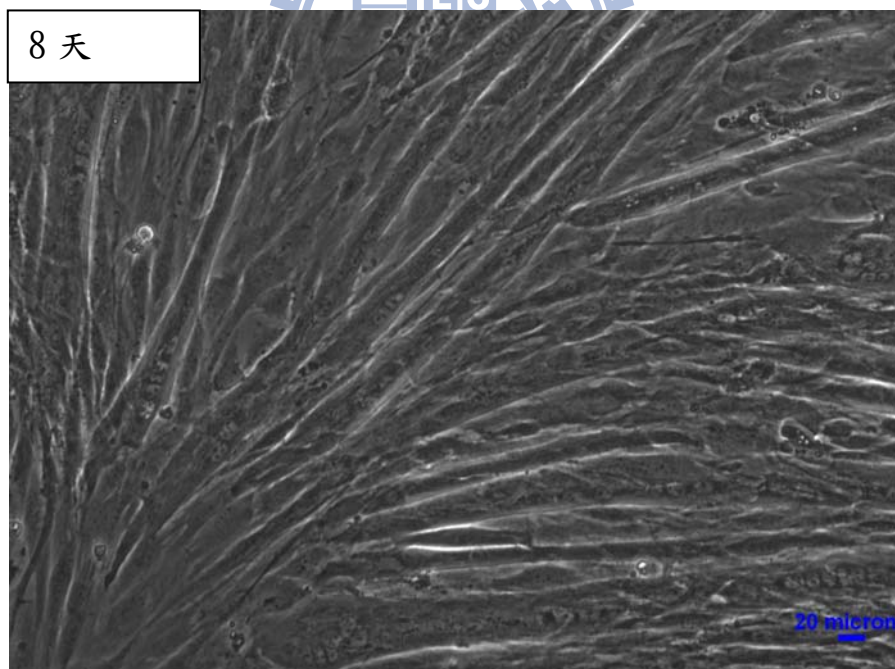


圖 4.4 肌肉微管在低壓電漿培養皿 8 天 (換馬血清 6 天)



## 【肌肉母細胞培養在塗佈明膠培養皿】

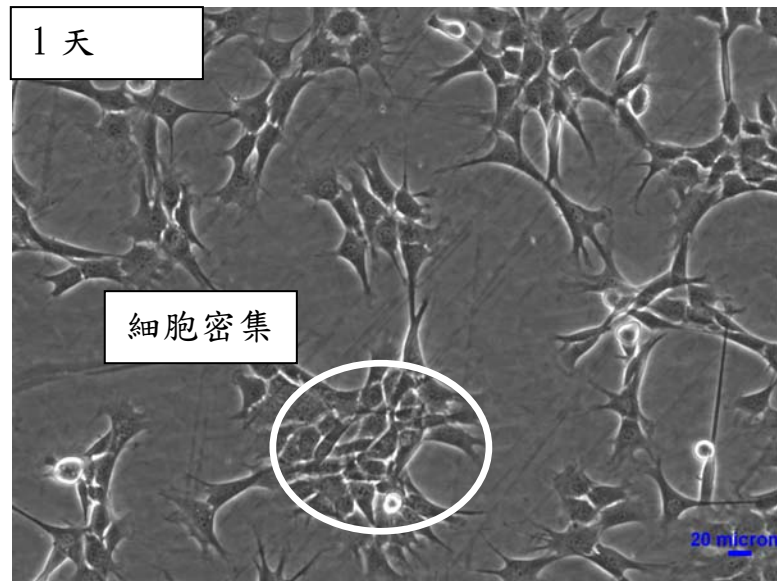


圖4.5肌肉母細胞培養在塗佈明膠培養皿 1天

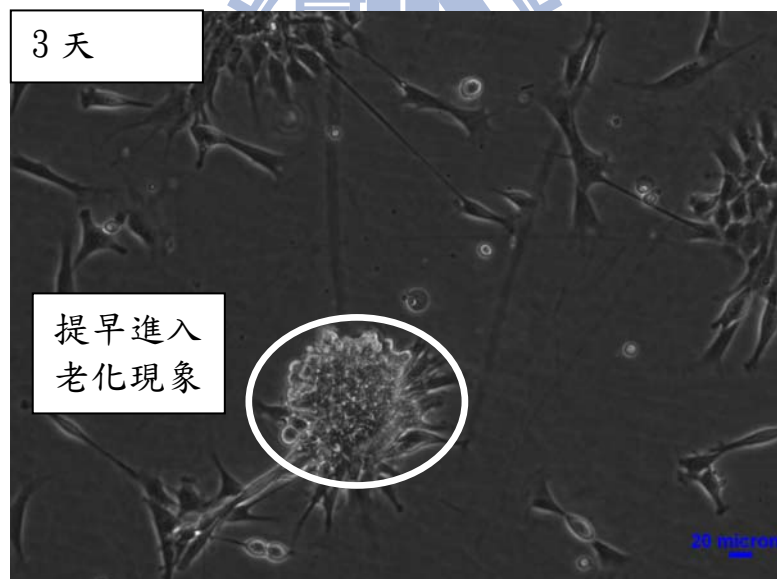


圖4.6肌肉母細胞培養在塗佈明膠培養皿 3天

【肌肉母細胞培養在PDMS槽溝1300nm、深度300nm】

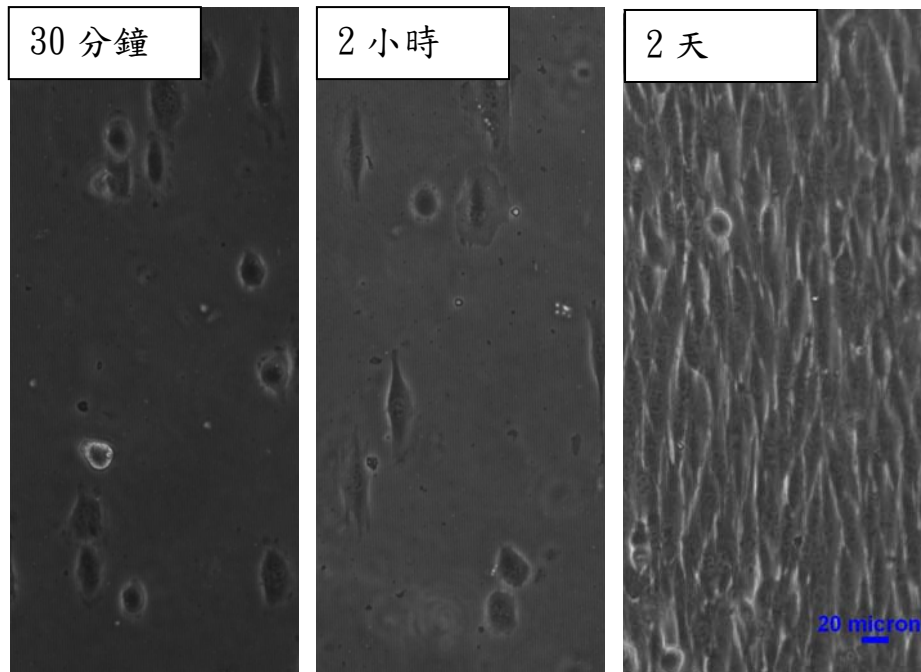


圖 4.7 肌肉母細胞培養在 PDMS 槽溝 1300nm、深度 300nm

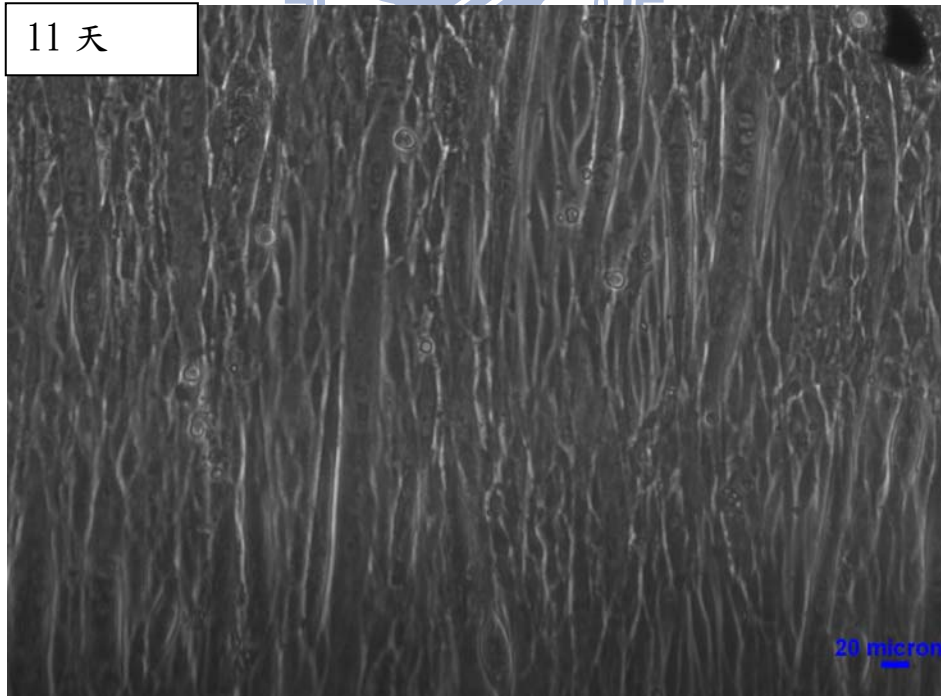


圖 4.8 肌肉微管在 PDMS 槽溝 1300nm、深度 300nm 11 天

(換馬血清 9 天)

【肌肉母細胞培養在PDMS溝槽30  $\mu\text{m}$ 、深度20  $\mu\text{m}$ 】

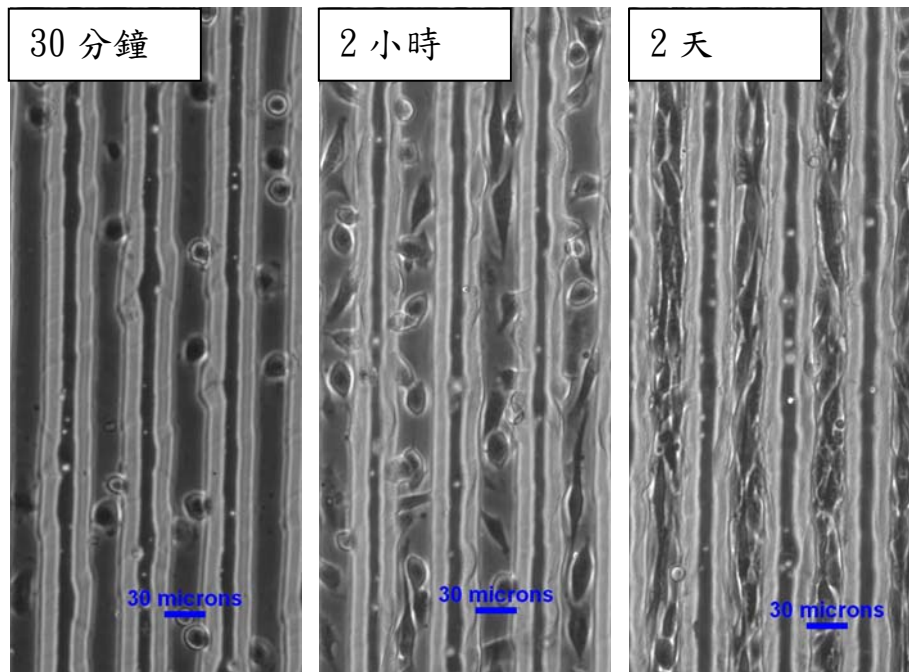


圖 4.9 肌肉母細胞培養在 PDMS 溝槽 30  $\mu\text{m}$ 、深度 20  $\mu\text{m}$

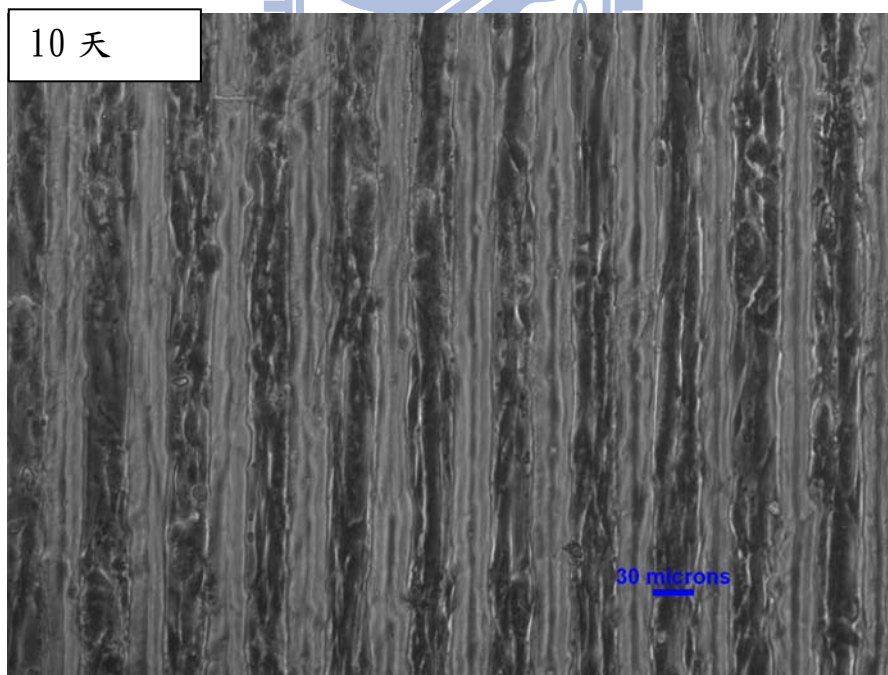


圖 4.10 肌肉微管在 PDMS 溝槽 30  $\mu\text{m}$ 、深度 20  $\mu\text{m}$  10 天

(換馬血清 8 天)

【肌肉母細胞培養在PDMS溝槽60  $\mu\text{m}$ 、深度20  $\mu\text{m}$ 】

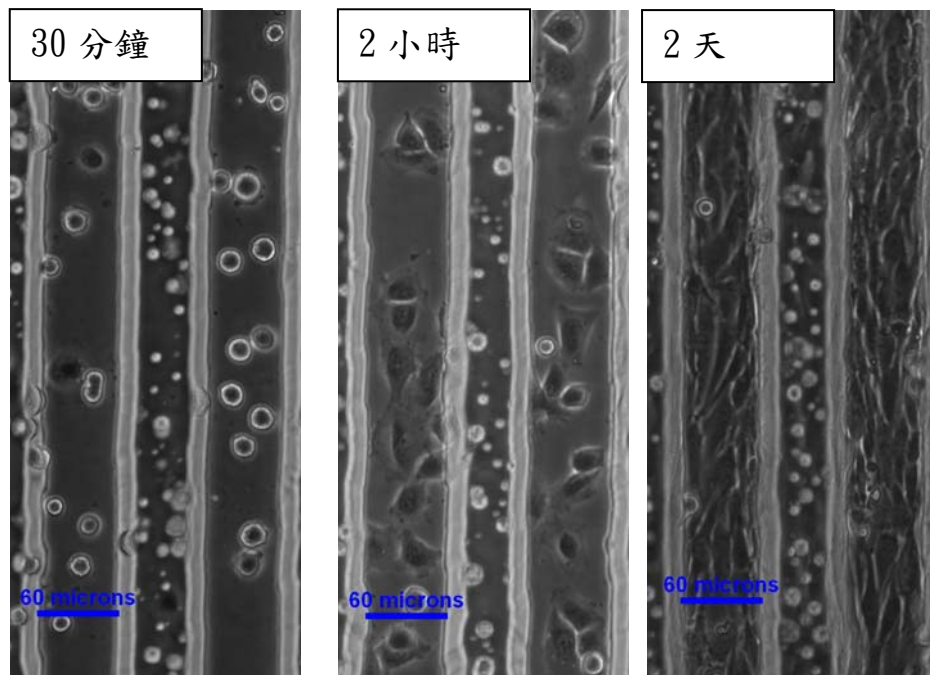


圖 4.11 肌肉母細胞培養在 PDMS 溝槽 60  $\mu\text{m}$ 、深度 20  $\mu\text{m}$

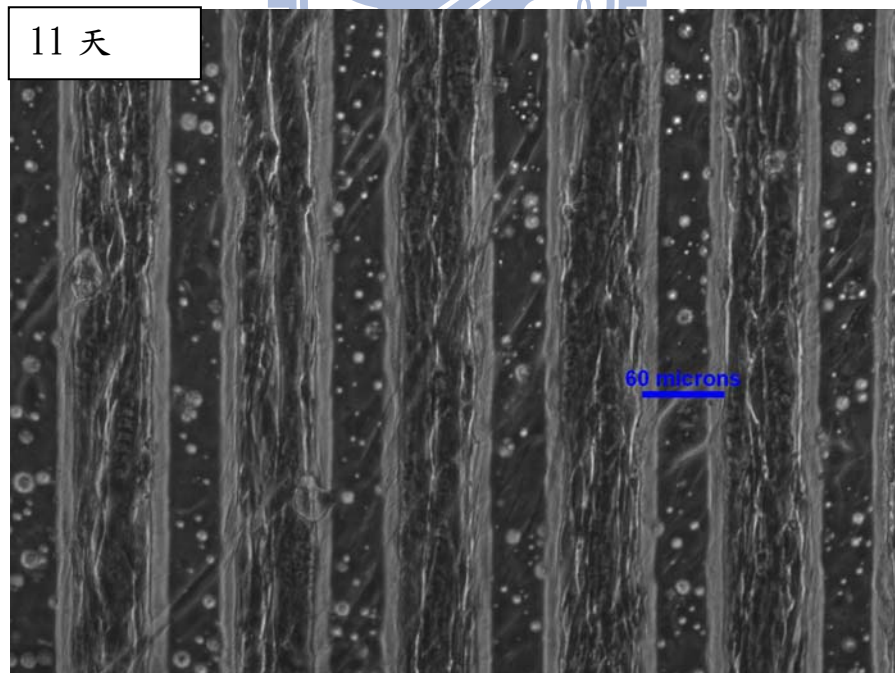


圖 4.12 肌肉微管在 PDMS 溝槽 60  $\mu\text{m}$ 、深度 20  $\mu\text{m}$  11 天

(換馬血清 9 天)



【肌肉母細胞培養在PDMS溝槽100  $\mu\text{m}$ 、深度20  $\mu\text{m}$ 】

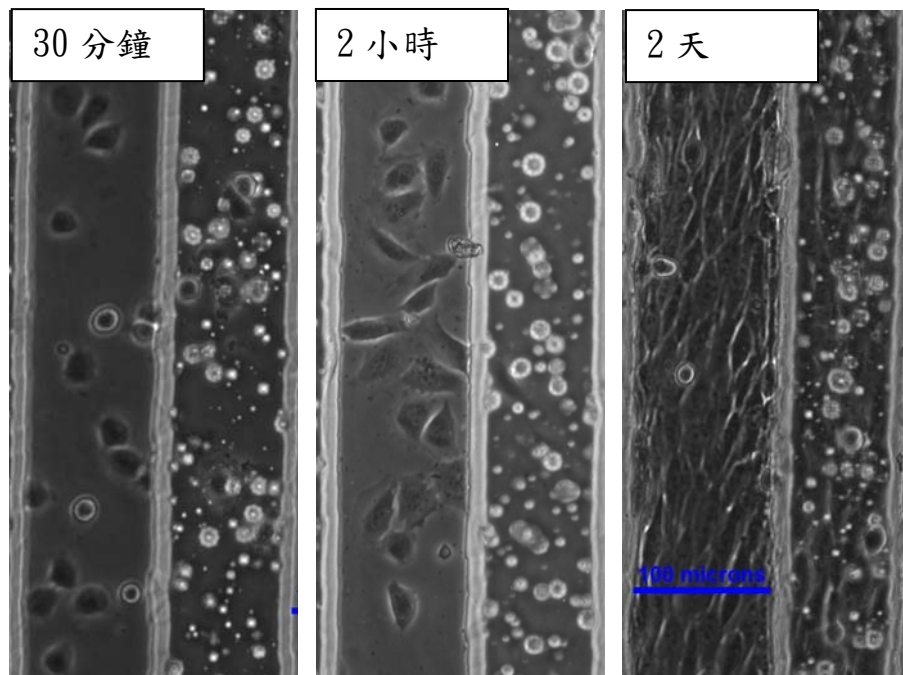


圖 4.13 肌肉母細胞培養在 PDMS 槽溝 100  $\mu\text{m}$ 、深度 20  $\mu\text{m}$

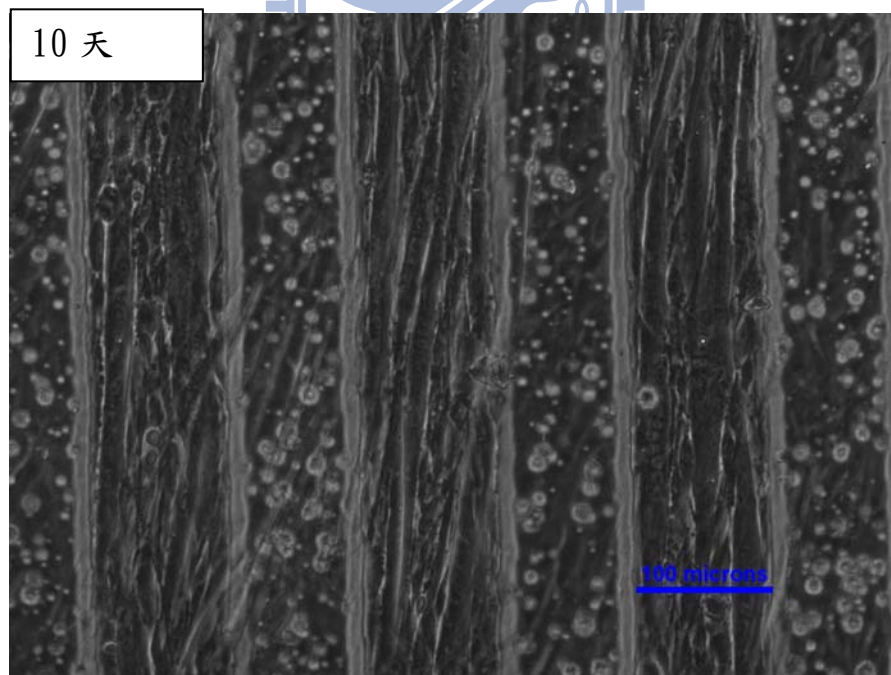


圖 4.14 肌肉微管在 PDMS 槽溝 100  $\mu\text{m}$ 、深度 20  $\mu\text{m}$  10 天

(換馬血清 8 天)

【肌肉母細胞培養在PDMS溝槽30  $\mu\text{m}$ 、深度17  $\mu\text{m}$ 】

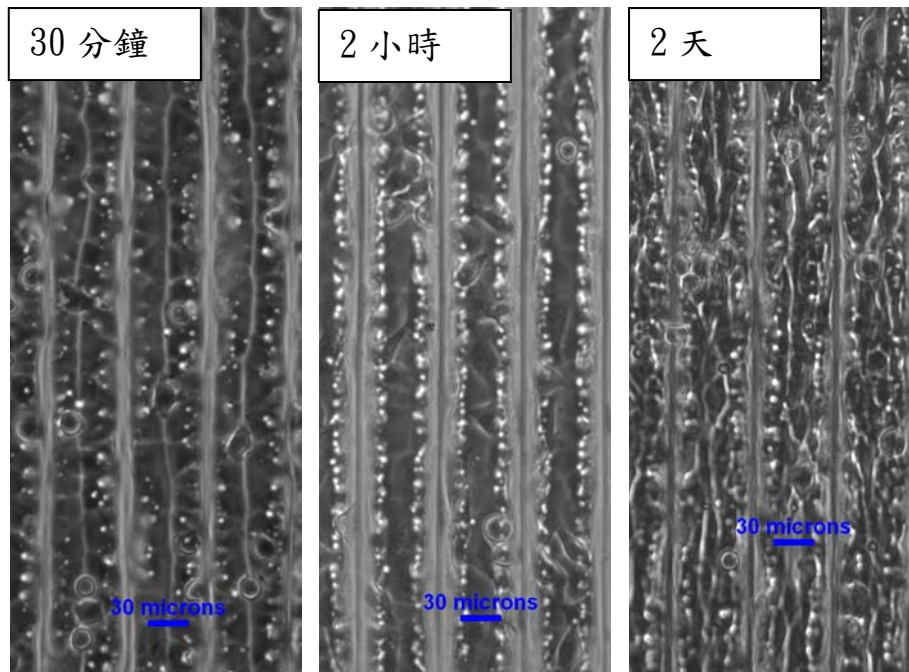


圖 4.15 肌肉母細胞培養在 PDMS 溝槽 30  $\mu\text{m}$ 、深度 17  $\mu\text{m}$

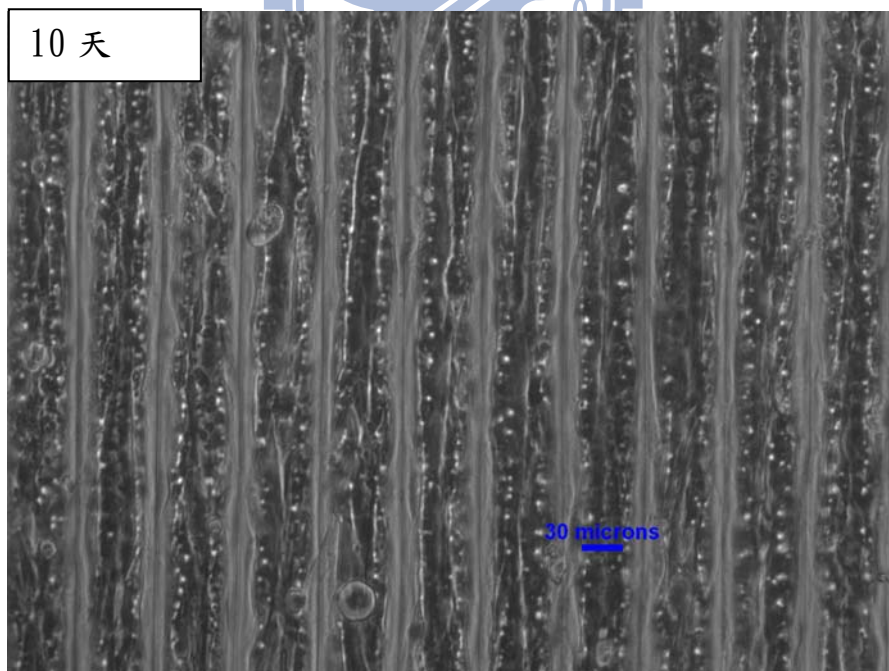


圖 4.16 肌肉微管在 PDMS 溝槽 30  $\mu\text{m}$ 、深度 17  $\mu\text{m}$  10 天

(換馬血清 8 天)

【肌肉母細胞培養在PDMS溝槽60  $\mu\text{m}$ 、深度40  $\mu\text{m}$ 】

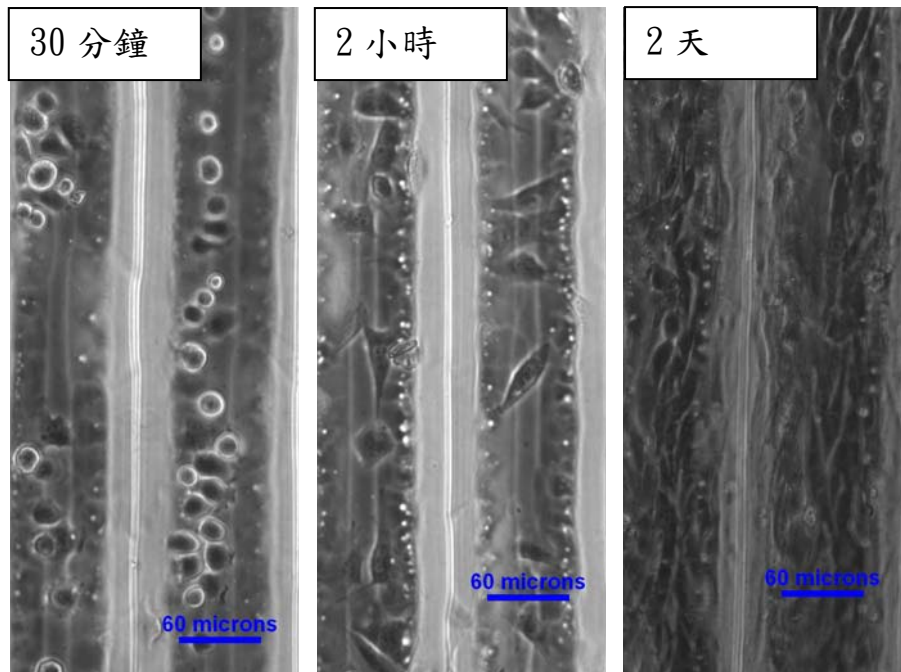


圖 4.17 肌肉母細胞培養在 PDMS 溝槽 60  $\mu\text{m}$ 、深度 40  $\mu\text{m}$

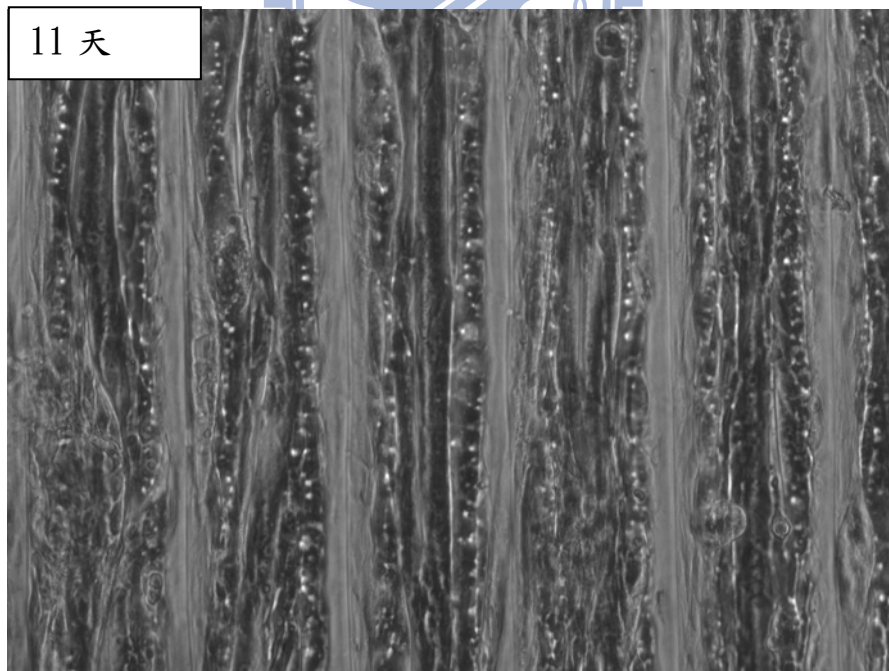


圖 4.18 肌肉微管在 PDMS 溝槽 60  $\mu\text{m}$ 、深度 40  $\mu\text{m}$  11 天

(換馬血清 9 天)



【肌肉母細胞培養在PDMS溝槽100  $\mu\text{m}$ 、深度60  $\mu\text{m}$ 】

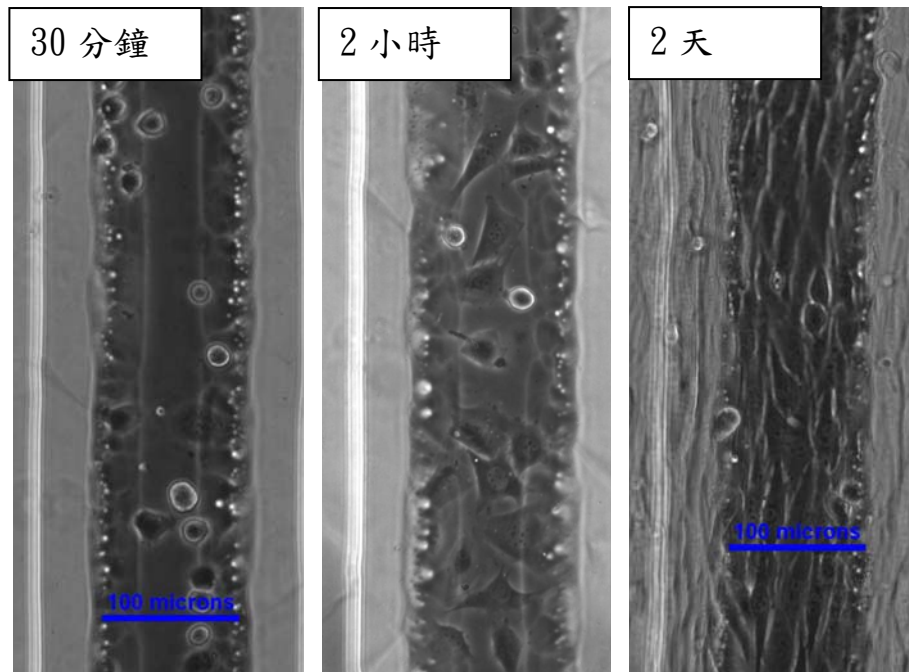


圖 4.19 肌肉母細胞培養在 PDMS 溝槽 100  $\mu\text{m}$ 、深度 60  $\mu\text{m}$

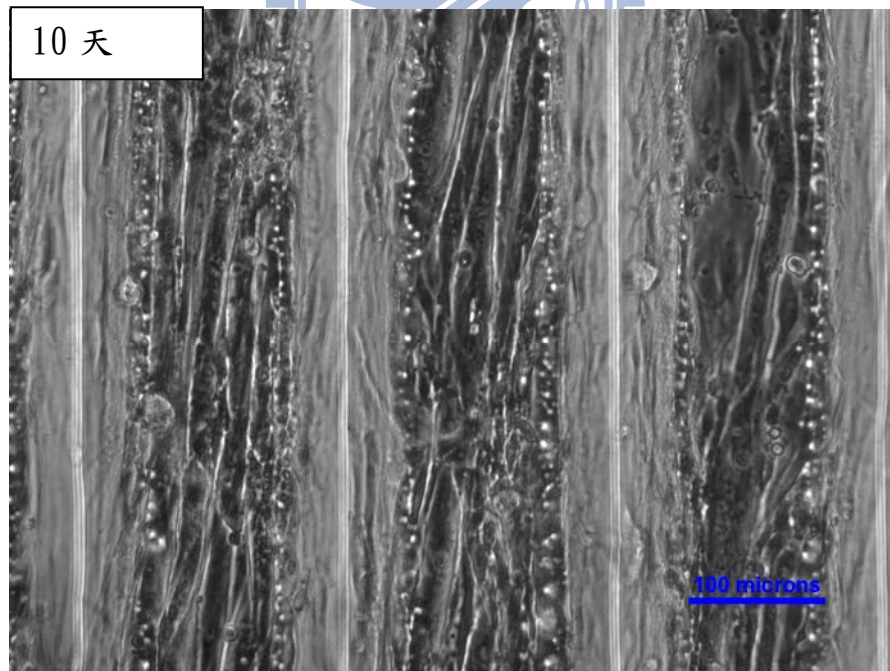


圖 4.20 肌肉微管在 PDMS 溝槽 100  $\mu\text{m}$ 、深度 60  $\mu\text{m}$  10 天

(換馬血清 8 天)



綜合上述觀察，在聚二甲基矽氧烷(PDMS)微結構 (Microsubstrates)上分化成肌肉微管(Myotubes)，比單以無結構培養皿分化略慢 2~3 天，此外，我們以不同微結構大小與無結構培養皿所得成果，分析肌肉微管生長角度、數量、長度、直徑等差異性。

## 4.2 肌肉母細胞在不同基材培養成肌肉微管之角度

表4.1 不同基材培養成肌肉微管之角度

基材	與溝槽 90 <sup>0</sup> 比較
培養皿 (dish)	42.2 <sup>0</sup>
PDMS 溝槽 1300nm、深度 300nm	85.6 <sup>0</sup>
PDMS 溝槽 30 $\mu\text{m}$ 、深度 20 $\mu\text{m}$	88.7 <sup>0</sup>
PDMS 溝槽 60 $\mu\text{m}$ 、深度 20 $\mu\text{m}$	86.6 <sup>0</sup>
PDMS 溝槽 100 $\mu\text{m}$ 、深度 20 $\mu\text{m}$	82.6 <sup>0</sup>
PDMS 溝槽 30 $\mu\text{m}$ 、深度 17 $\mu\text{m}$	88.4 <sup>0</sup>
PDMS 溝槽 60 $\mu\text{m}$ 、深度 40 $\mu\text{m}$	89.3 <sup>0</sup>
PDMS 溝槽 100 $\mu\text{m}$ 、深度 60 $\mu\text{m}$	83.2 <sup>0</sup>

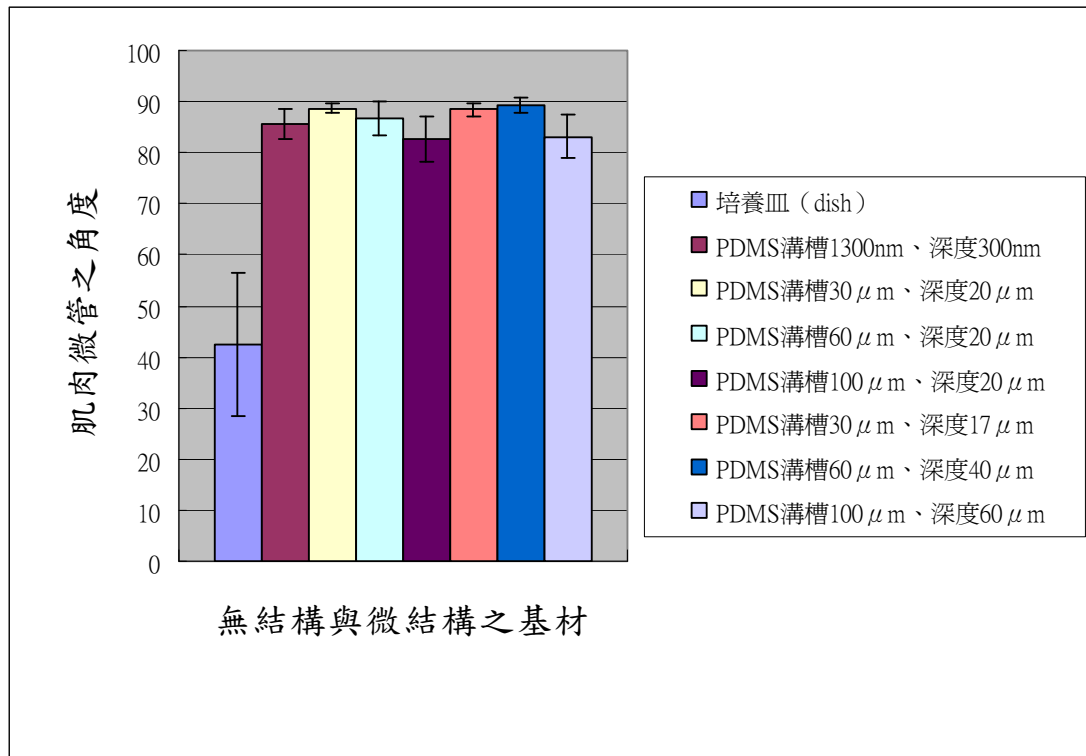


圖 4.21 不同基材培養成肌肉微管之角度分析

角度量取方法：擷取顯微鏡畫面像素得到視野面積為 ( $652 \mu\text{m} \times 487 \mu\text{m}$ )，畫面之肌肉微管(Myotubes)找出直徑兩端之中心畫成一條直線，利用量角器量取與水平之夾角，如圖4.22。每個基材取十個樣本做平均，如表4.1。由圖4.21所示，無結構培養皿的細胞培養過程無生長方向性，其中以PDMS溝槽分別為 $30 \mu\text{m}$ 與 $60 \mu\text{m}$ 各不同深度之四種微結構(Microsubstrates)比Jiang X[3]之 $4^\circ$ 佳。觀察得出肌肉微管之角度在PDMS溝槽 $30 \mu\text{m}$ 效果最好，隨著溝槽增加肌肉微管之角度也跟著增大，另外PDMS溝槽 $100 \mu\text{m}$ 、深度 $20 \mu\text{m}$ 與 $60 \mu\text{m}$ 分別與溝槽夾角為 $7.4^\circ$ 、 $6.8^\circ$ ，表示溝槽 $100 \mu\text{m}$ 過大，導致肌肉微管與溝槽夾角增加，當中以PDMS溝槽 $60 \mu\text{m}$ 、深度 $40 \mu\text{m}$ 比其他相同溝槽不同深度之數

據更好，我們判斷此溝槽底部中間向兩邊傾斜各 $15^{\circ}$ ，有助於肌肉微管更接近溝槽方向。

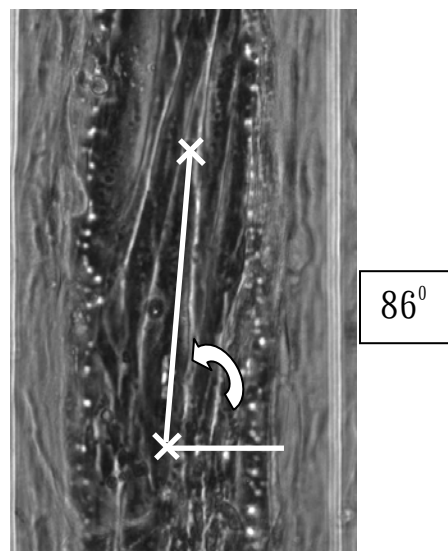


圖4.22 量取肌肉微管之角度

### 4.3 肌肉母細胞在不同基材培養成肌肉微管之總數量

表4.2 不同基材培養成肌肉微管之總數量

基材	總數量
培養皿 (dish)	22675
PDMS 溝槽 1300nm、深度 300nm	19274
PDMS 溝槽 $30\ \mu\text{m}$ 、深度 $20\ \mu\text{m}$	32854
PDMS 溝槽 $60\ \mu\text{m}$ 、深度 $20\ \mu\text{m}$	31485
PDMS 溝槽 $100\ \mu\text{m}$ 、深度 $20\ \mu\text{m}$	31211
PDMS 溝槽 $30\ \mu\text{m}$ 、深度 $17\ \mu\text{m}$	38329
PDMS 溝槽 $60\ \mu\text{m}$ 、深度 $40\ \mu\text{m}$	43805
PDMS 溝槽 $100\ \mu\text{m}$ 、深度 $60\ \mu\text{m}$	38603

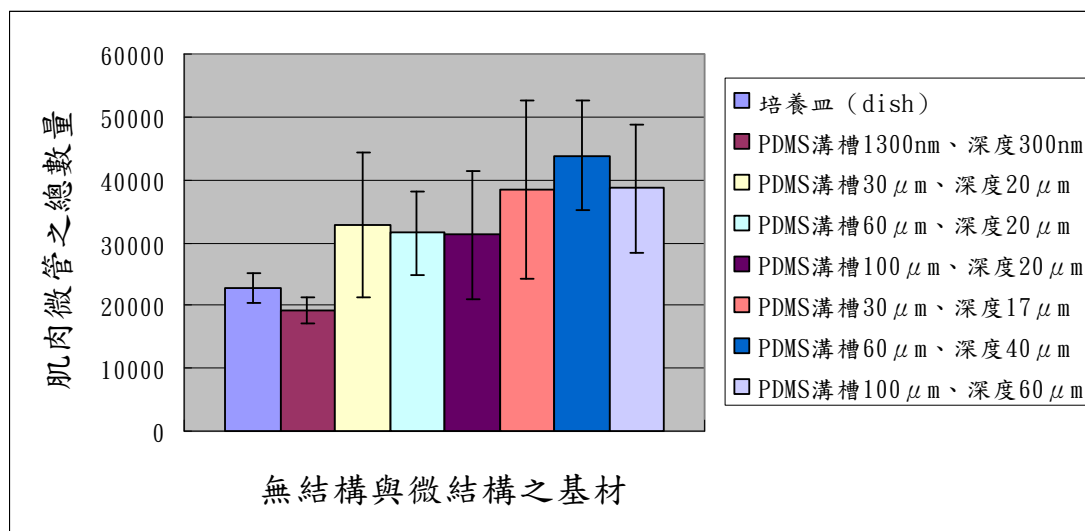


圖 4.23 不同基材培養成肌肉微管之總數量分析

計算肌肉微管(myotubes)總數量方法為擷取顯微鏡畫面像素得到視野面積為  $(652 \mu\text{m} \times 487 \mu\text{m})$ ，取十個擷取面積計算出肌肉微管平均數量，接著反推培養聚二甲基矽氧烷(PDMS)面積大小  $4\text{cm}^2$  之肌肉微管總數量，以下為推導公式。

**【培養皿與 PDMS 溝槽 1300nm、深度 300nm】**

擷取面積為  $487 \times 652 \mu\text{m}^2$ ，如圖 4.24、如圖 4.25

計算公式：

$$\text{肌肉微管平均數量} / (487 \times 652 \mu\text{m}^2) = \text{肌肉微管總數量} / (4\text{cm}^2)$$

$$\text{肌肉微管總數量} = \text{肌肉微管平均數量} \times 4 / (487 \times 652 \times 10^{-8})$$

**【PDMS 溝槽 30 μm、深度 20 μm 與 PDMS 溝槽 30 μm、深度 17 μm】**

擷取面積為  $487 \times 30 \mu\text{m}^2$ ，如圖 4.26

計算公式：

$$\text{肌肉微管平均數量}/(487 \times 30 \mu\text{m}^2) = \text{肌肉微管總數量}/(4\text{cm}^2)$$

$$\text{肌肉微管總數量} = \text{肌肉微管平均數量} \times 4 / (487 \times 30 \times 10^{-8})$$

**【PDMS 溝槽 60  $\mu\text{m}$ 、深度 20  $\mu\text{m}$  與 PDMS 溝槽 60  $\mu\text{m}$ 、深度 40  $\mu\text{m}$ 】**

擷取面積為  $487 \times 60 \mu\text{m}^2$ ，如圖 4.27

計算公式：

$$\text{肌肉微管平均數量}/(487 \times 30 \mu\text{m}^2) = \text{肌肉微管總數量}/(4\text{cm}^2)$$

$$\text{肌肉微管總數量} = \text{肌肉微管平均數量} \times 4 / (487 \times 60 \times 10^{-8})$$

**【PDMS 溝槽 100  $\mu\text{m}$ 、深度 20  $\mu\text{m}$  與 PDMS 溝槽 100  $\mu\text{m}$ 、深度 60  $\mu\text{m}$ 】**

擷取面積為  $487 \times 100 \mu\text{m}^2$ ，如圖 4.28

計算公式：

$$\text{肌肉微管平均數量}/(487 \times 30 \mu\text{m}^2) = \text{肌肉微管總數量}/(4\text{cm}^2)$$

$$\text{肌肉微管總數量} = \text{肌肉微管平均數量} \times 4 / (487 \times 100 \times 10^{-8})$$

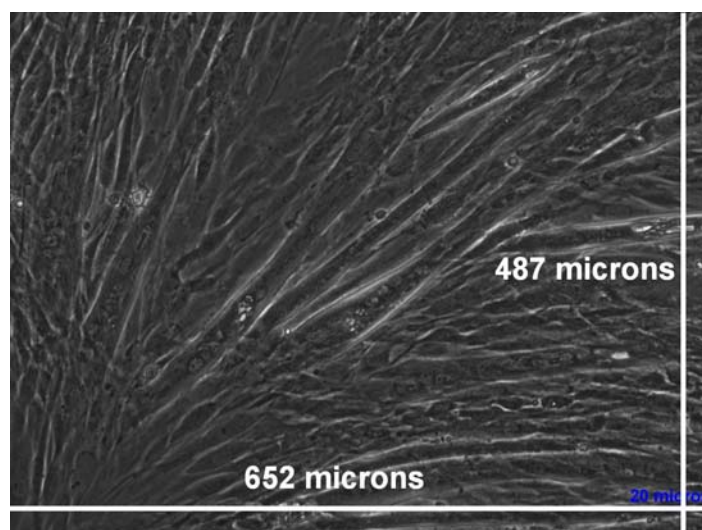


圖 4.24 培養皿之擷取面積

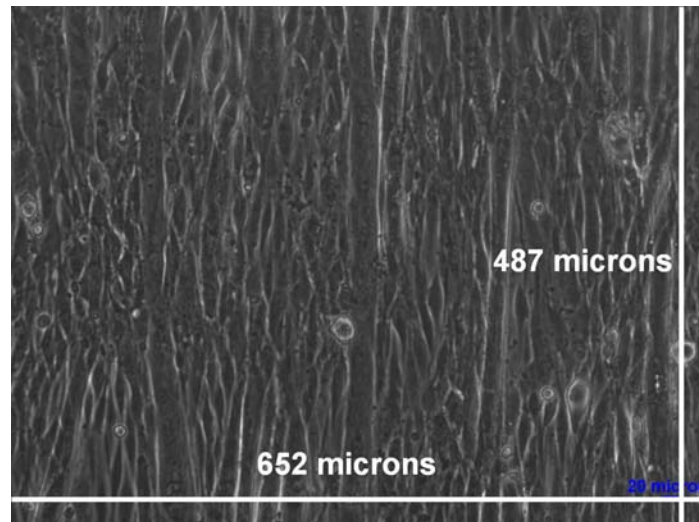


圖 4.25 PDMS 溝槽 1300nm、深度 300nm 之擷取面積

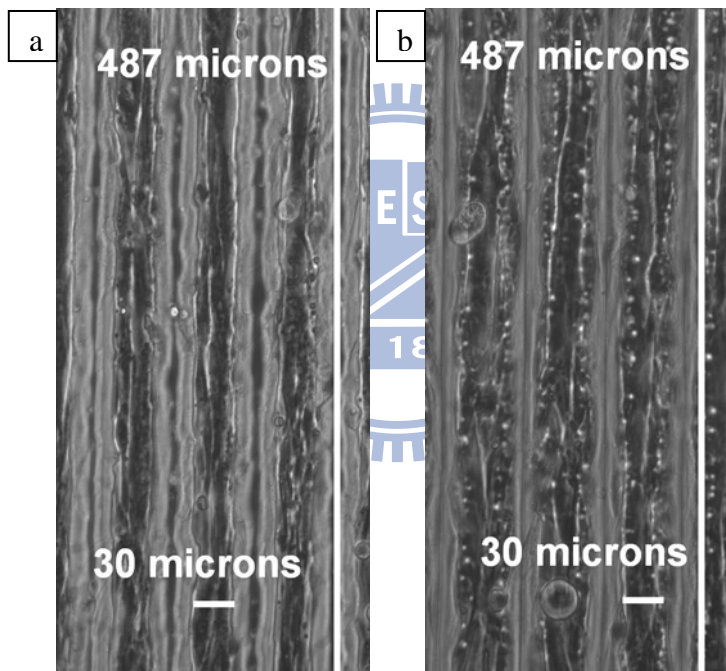


圖 4.26 PDMS 溝槽 30  $\mu\text{m}$ 、深度分別為(a)20  $\mu\text{m}$  與(b)17  $\mu\text{m}$  之擷取

面積



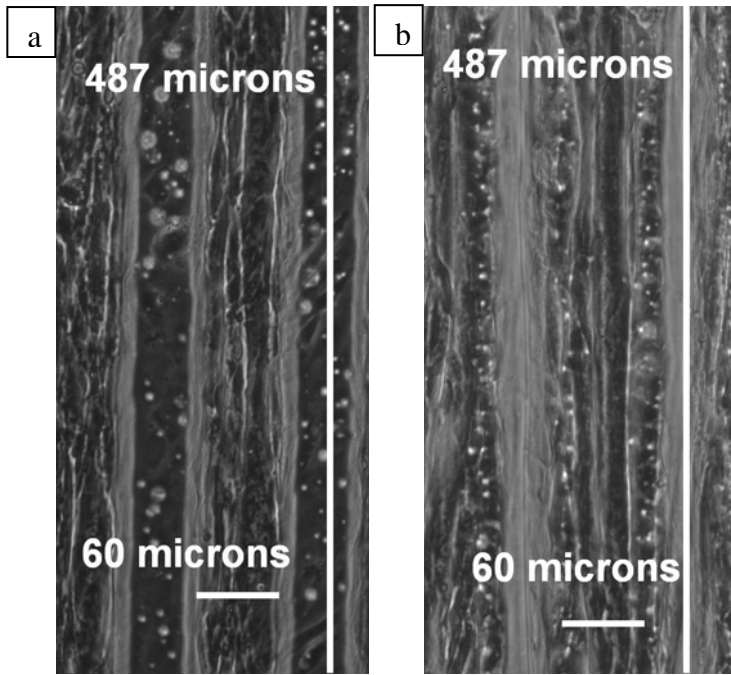


圖 4.27 PDMS 溝槽 60  $\mu\text{m}$ 、深度分別為(a)20  $\mu\text{m}$  與(b)40  $\mu\text{m}$  之擷取

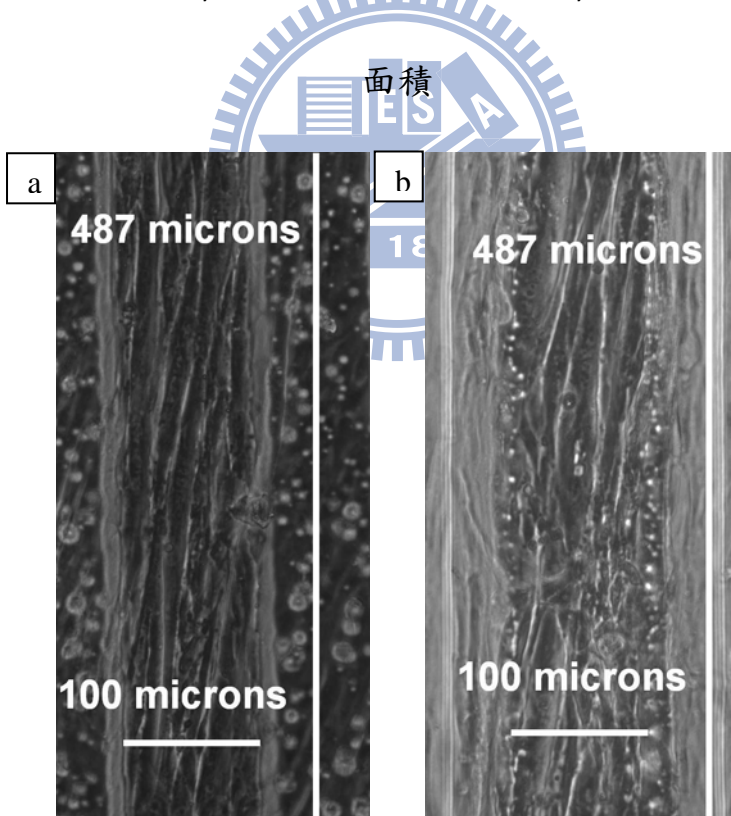


圖 4.28 PDMS 溝槽 100  $\mu\text{m}$ 、深度分別為(a)20  $\mu\text{m}$  與(b)60  $\mu\text{m}$  之擷取

面積

圖 4.23 所示，除 PDMS 溝槽 1300nm、深度 300nm 以外，其餘微結構(Microsubstrates)肌肉微管(Myotubes)的總數量都比無結構培養皿多，溝槽之深度加深對於總數量有往上增加的趨勢，可看出肌肉母細胞(Myoblasts)於微結構之誘導分化有明顯之效果。

#### 4.4 肌肉母細胞在不同基材培養成肌肉微管之長度

表4.3 不同基材培養成肌肉微管之長度

基材	長度( $\mu\text{m}$ )
培養皿 (dish)	447
PDMS 溝槽 1300nm、深度 300nm	407
PDMS 溝槽 30 $\mu\text{m}$ 、深度 20 $\mu\text{m}$	378
PDMS 溝槽 60 $\mu\text{m}$ 、深度 20 $\mu\text{m}$	404
PDMS 溝槽 100 $\mu\text{m}$ 、深度 20 $\mu\text{m}$	435
PDMS 溝槽 30 $\mu\text{m}$ 、深度 17 $\mu\text{m}$	387
PDMS 溝槽 60 $\mu\text{m}$ 、深度 40 $\mu\text{m}$	442
PDMS 溝槽 100 $\mu\text{m}$ 、深度 60 $\mu\text{m}$	403



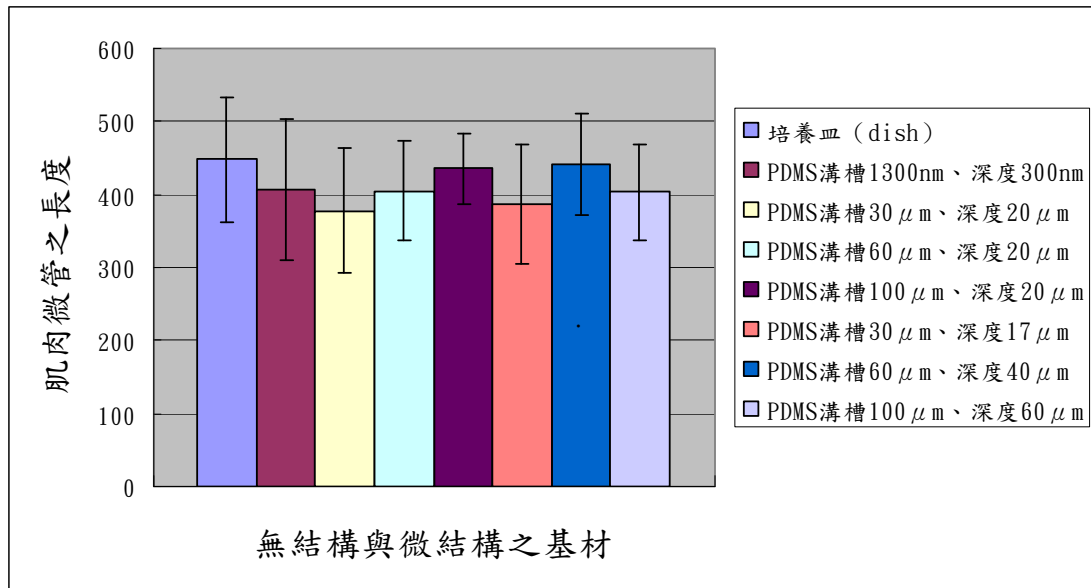


圖 4.29 不同基材培養成肌肉微管之長度分析

表 4.3 為不同基材培養成肌肉微管取 10 條，計算出長度做平均所得之數據。由圖 4.29 分析可看出肌肉微管(Myotubes)長度範圍在 370~450  $\mu\text{m}$  之間，而一般肌肉微管約在 200  $\mu\text{m}$  以上，有時候可發現培養出來的肌肉微管長度比較短約 200  $\mu\text{m}$  以下，主要原因是培養過程肌肉母細胞(Myoblasts)提早進入老化現象導致肌肉微管受到影響，由此可知微結構(Microsubstrates)培養出來之肌肉微管與無結構培養皿有相同效果。

長度計算方法：

擷取顯微鏡畫面像素得到視野面積為 (652  $\mu\text{m}$  × 487  $\mu\text{m}$ )，首先標示虛線尺寸，接著畫面之肌肉微管找出直徑兩端之中心畫成一條直線，利用量角器量取與虛線之夾角，如圖 4.29。

計算公式：

肌肉微管長度 = 虛線為顯微鏡標示尺寸  $\times \csc \theta$

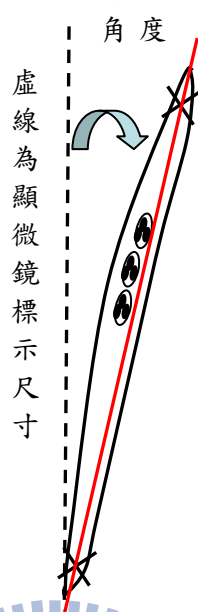


圖 4.30 量取肌肉微管之長度

#### 4.5 肌肉母細胞在不同基材培養成肌肉微管之直徑

表4.4 不同基材培養成肌肉微管之直徑

基材	直徑 ( $\mu\text{m}$ )
培養皿 (dish)	17.7
PDMS 溝槽 1300nm、深度 300nm	24.1
PDMS 溝槽 30 $\mu\text{m}$ 、深度 20 $\mu\text{m}$	17.9
PDMS 溝槽 60 $\mu\text{m}$ 、深度 20 $\mu\text{m}$	24.9
PDMS 溝槽 100 $\mu\text{m}$ 、深度 20 $\mu\text{m}$	25.2
PDMS 溝槽 30 $\mu\text{m}$ 、深度 17 $\mu\text{m}$	20.5
PDMS 溝槽 60 $\mu\text{m}$ 、深度 40 $\mu\text{m}$	21.7
PDMS 溝槽 100 $\mu\text{m}$ 、深度 60 $\mu\text{m}$	20.9

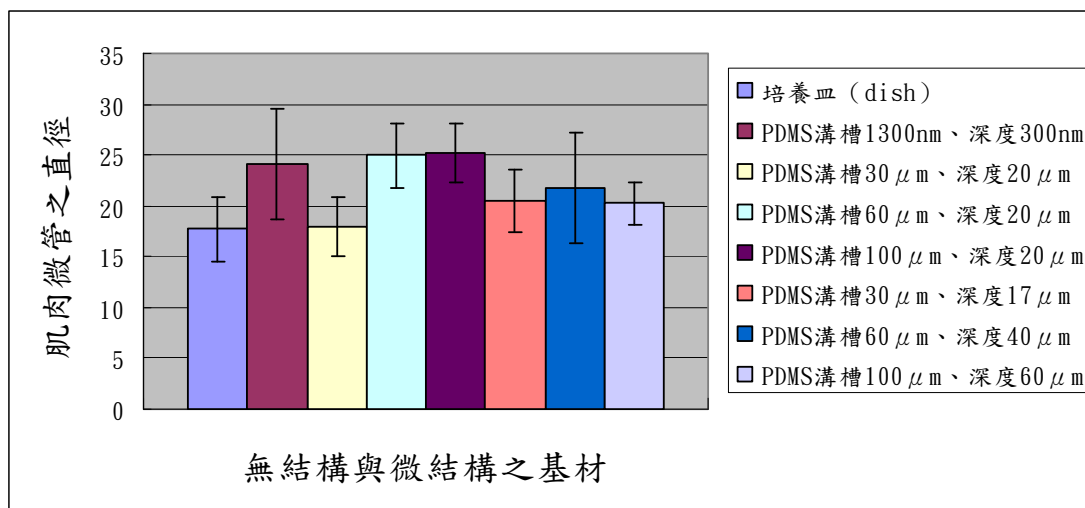


圖 4.31 不同基材培養成肌肉微管之直徑分析

表 4.4 為不同基材培養成肌肉微管(Myotubes)取 10 條，計算出直徑做平均所得之數據。由圖 4.31 分析可看出肌肉微管直徑範圍在 17~26 μm 之間，一般肌肉微管約在 20~25 μm 以上，可看出肌肉微管並沒有因為微結構誘導讓直徑大幅增加。

直徑計算方法：

擷取顯微鏡畫面像素得到視野面積為 (652 μm×487 μm)，首先標示虛線尺寸，接著畫面之肌肉微管找出直徑兩端之中心畫成一條直線，利用量角器量取與垂直線之夾角，如圖 4.32。

計算公式：

肌肉微管長度 = 虛線為顯微鏡標示尺寸 ×  $\csc \theta$

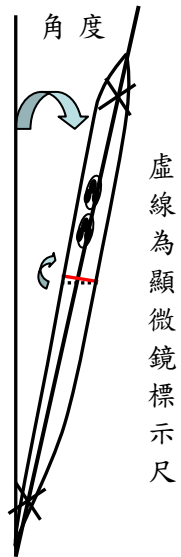


圖 4.32 量取肌肉微管之直徑

## 4.6 肌肉微管融合成肌肉纖維之過程

### 4.6.1 觀察培養皿融合之過程

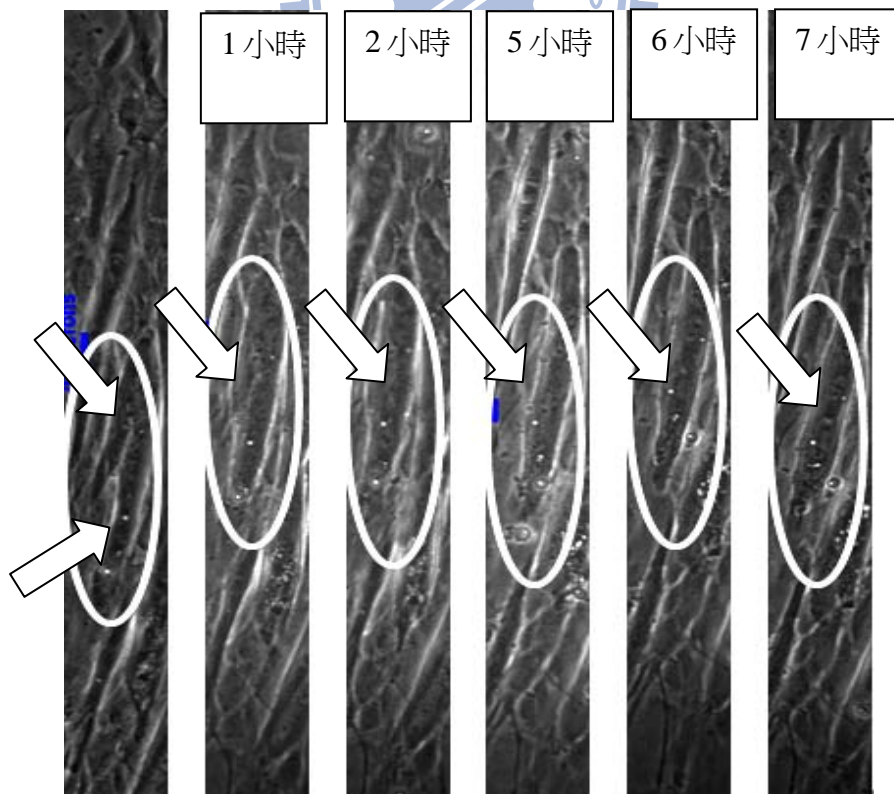


圖 4.33 培養皿融合過程

#### 4.6.2 觀察 PDMS 溝槽 1300nm、深度 300nm 融合之過程

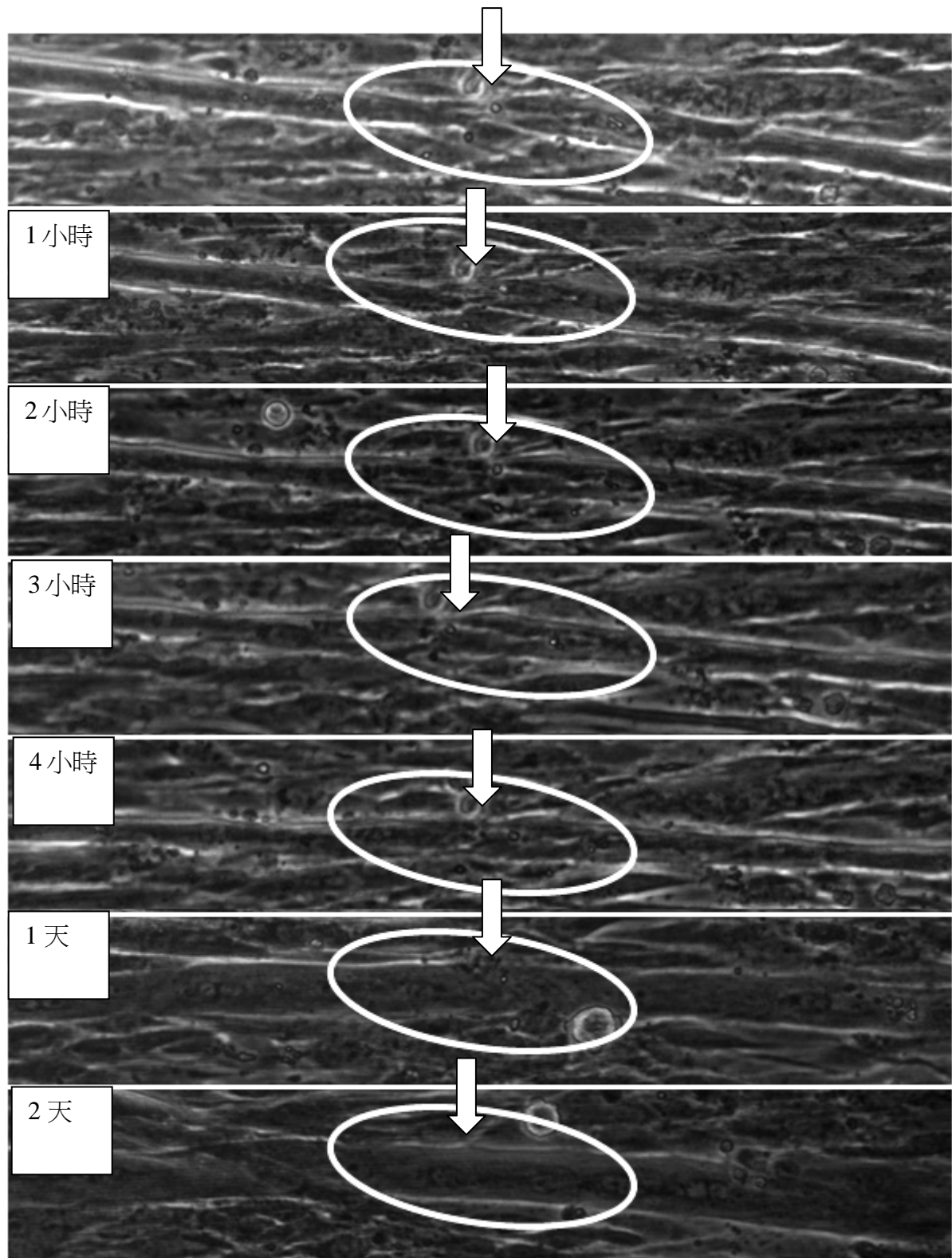


圖 4.34 PDMS 溝槽 1300nm、深度 300nm 融合過程

### 4.6.3 觀察 PDMS 溝槽 $100\ \mu\text{m}$ 、深度 $20\ \mu\text{m}$ 融合之過程

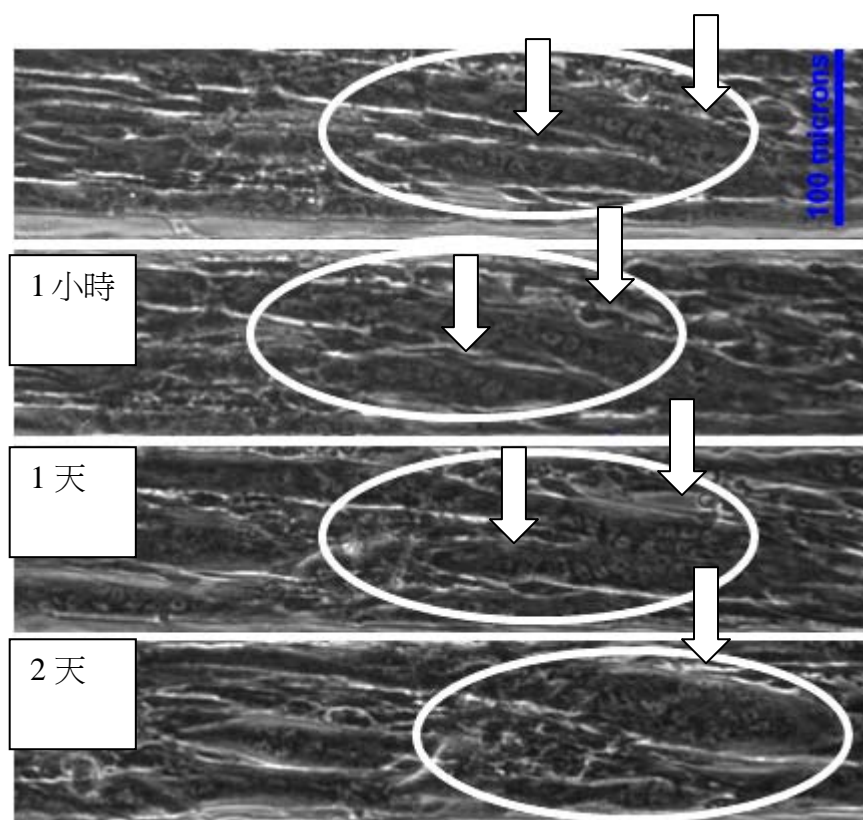


圖 4.35 PDMS 溝槽  $100\ \mu\text{m}$ 、深度  $20\ \mu\text{m}$  融合過程

綜合以上融合過程，所擷取之畫面間隔為 1Hr，如圖 4.34、圖 4.35 最後一張擷取畫面為第 2 天，表示要達到完全融合幾乎需要數十小時才可完成，判斷融合條件為兩邊肌肉微管(Myotubes)至少需要兩個細胞核，另由圖 4.35 白色箭頭肌肉微管裡有多量的細胞核集中在兩側，待完全融合成肌肉纖維(Muscle Fibers)，則細胞核全部集中在一起，呈現多排狀態，如圖 4.35(2 天)。

## 4.7 肌肉微管融合成肌肉纖維之結果

依據融合結果，融合成肌肉纖維(Muscle Fibers)的細胞核呈兩種情



況，一為細胞核分別生長於肌肉纖維兩端，如圖 4.36，每端呈現一排細胞核，另一種細胞核集中一起呈現多排狀態，如圖 4.37。

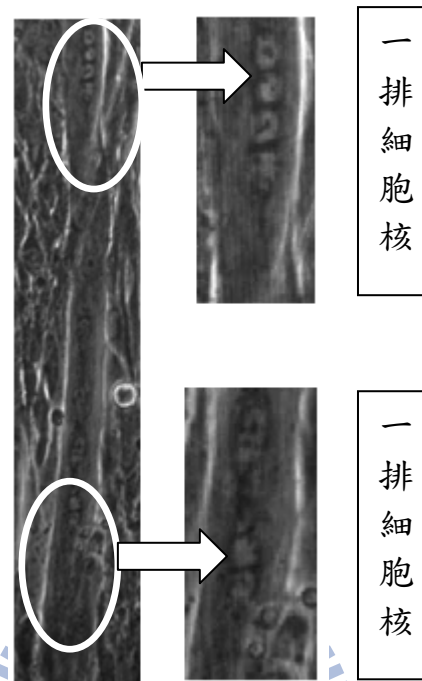


圖 4.36 觀察 PDMS 溝槽 1300nm、深度 300nm 融合之結果

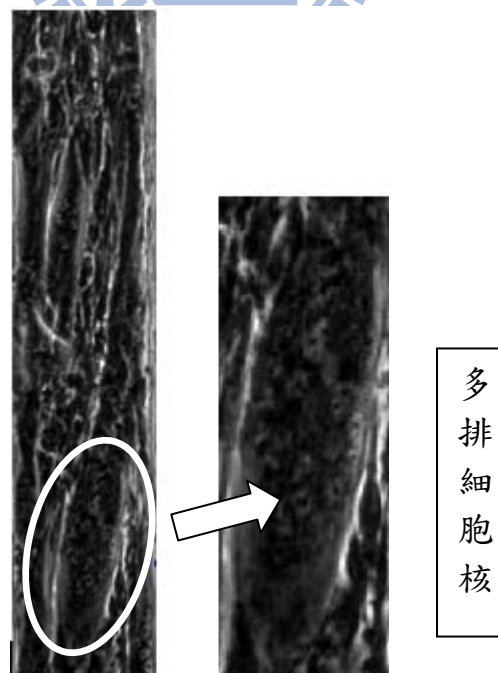


圖 4.37 觀察 PDMS 溝槽 100  $\mu\text{m}$ 、深度 60  $\mu\text{m}$  融合之結果



## 4.7.1 肌肉纖維的判斷

由於融合所需時間慢長，可藉相關資訊分析並判斷肌肉纖維(Muscle Fibers)，如細胞核的型態可將融合過程分成兩種情況示意圖，如圖 4.38，接著分別依據細胞核型態判斷其他微結構(Microsubstrates)之肌肉纖維。

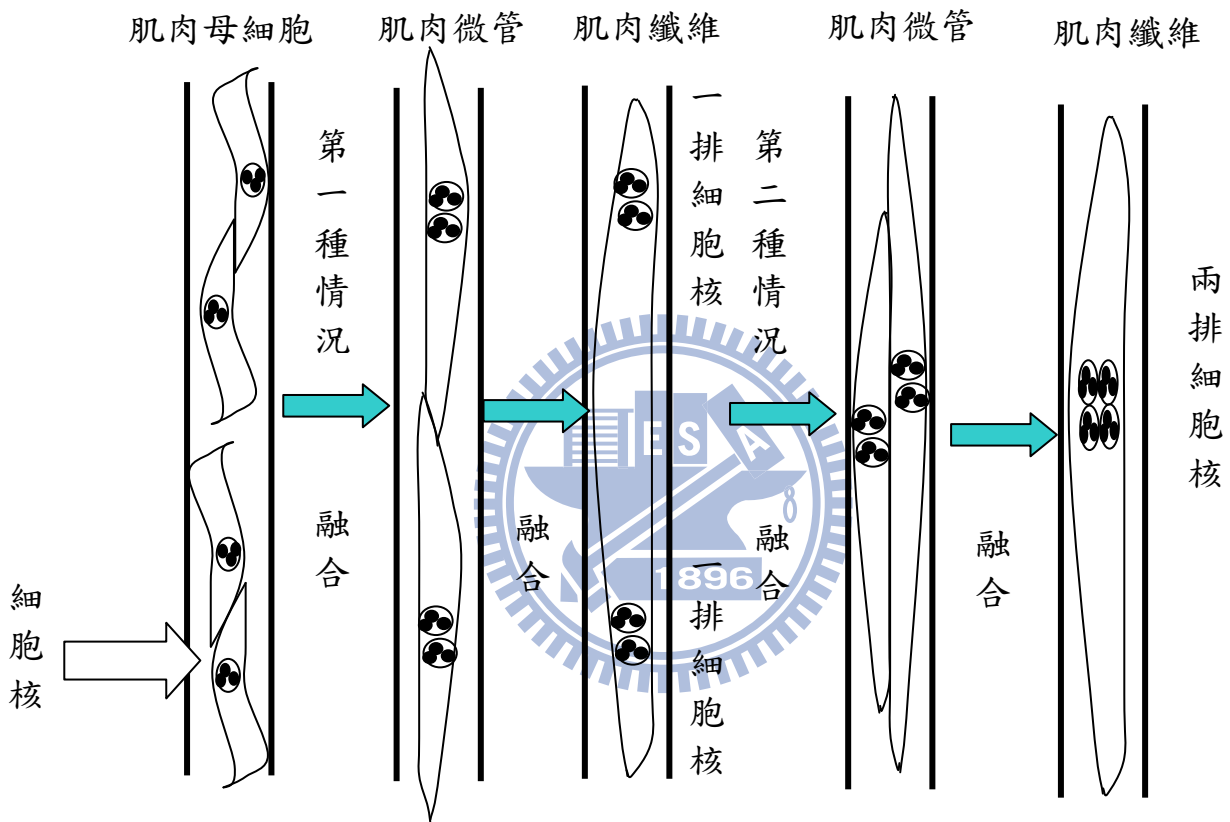


圖 4.38 肌肉母細胞分化肌肉微管與肌肉微管融合成肌肉纖維示意圖

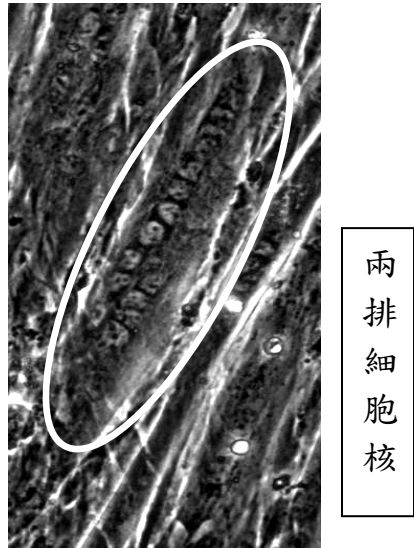


圖 4.39 低壓電漿培養皿之肌肉纖維

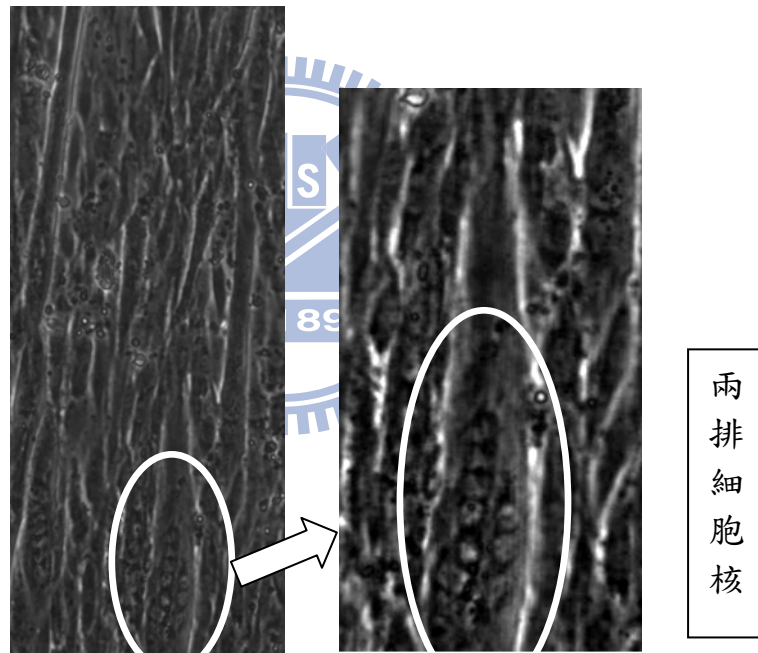


圖 4.40 PDMS 溝槽 1300nm、深度 300nm 之肌肉纖維

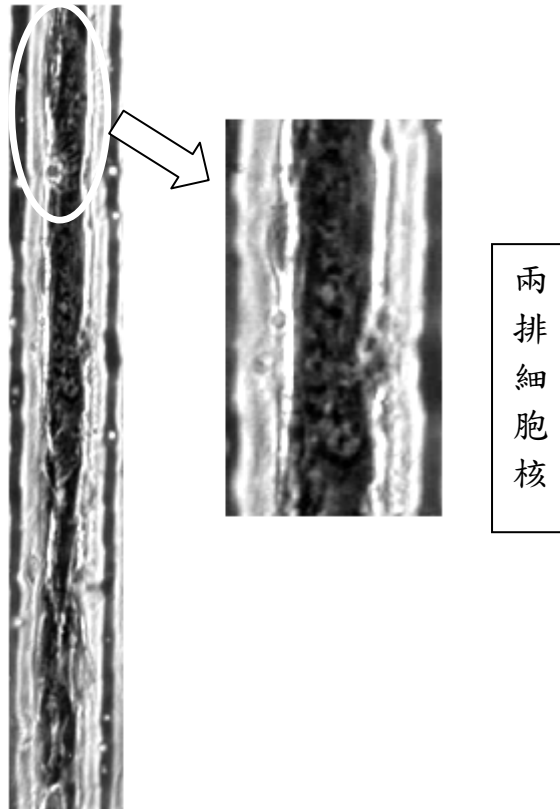


圖 4.41 PDMS 溝槽  $30\ \mu\text{m}$ 、深度  $20\ \mu\text{m}$  之肌肉纖維

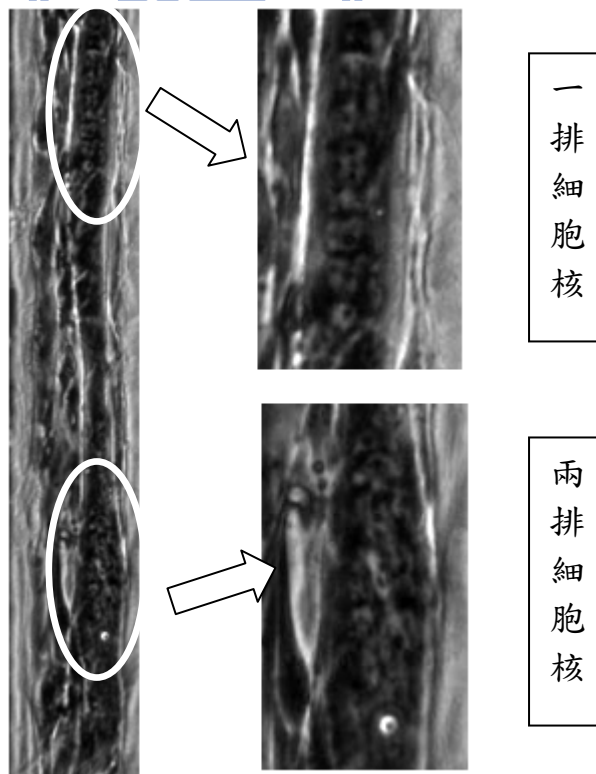


圖 4.42 PDMS 溝槽  $60\ \mu\text{m}$ 、深度  $20\ \mu\text{m}$  之肌肉纖維

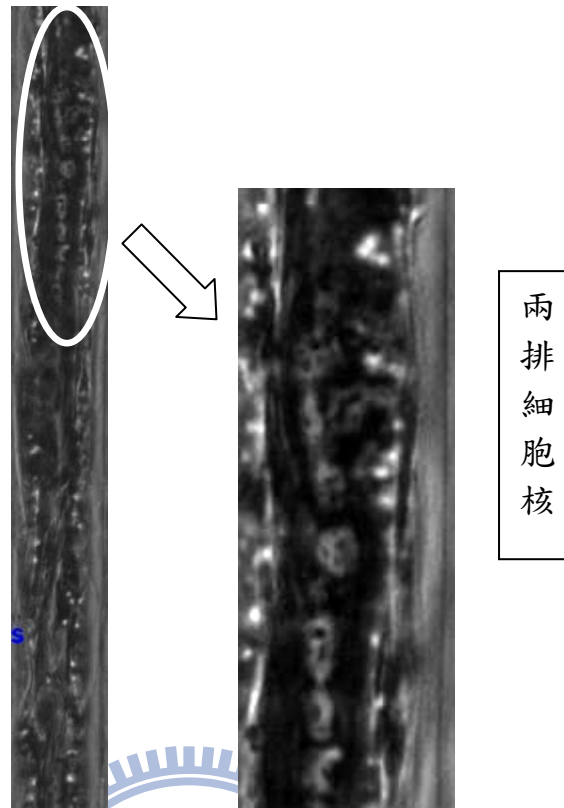


圖 4.43 PDMS 溝槽  $30\ \mu\text{m}$ 、深度  $17\ \mu\text{m}$  之肌肉纖維

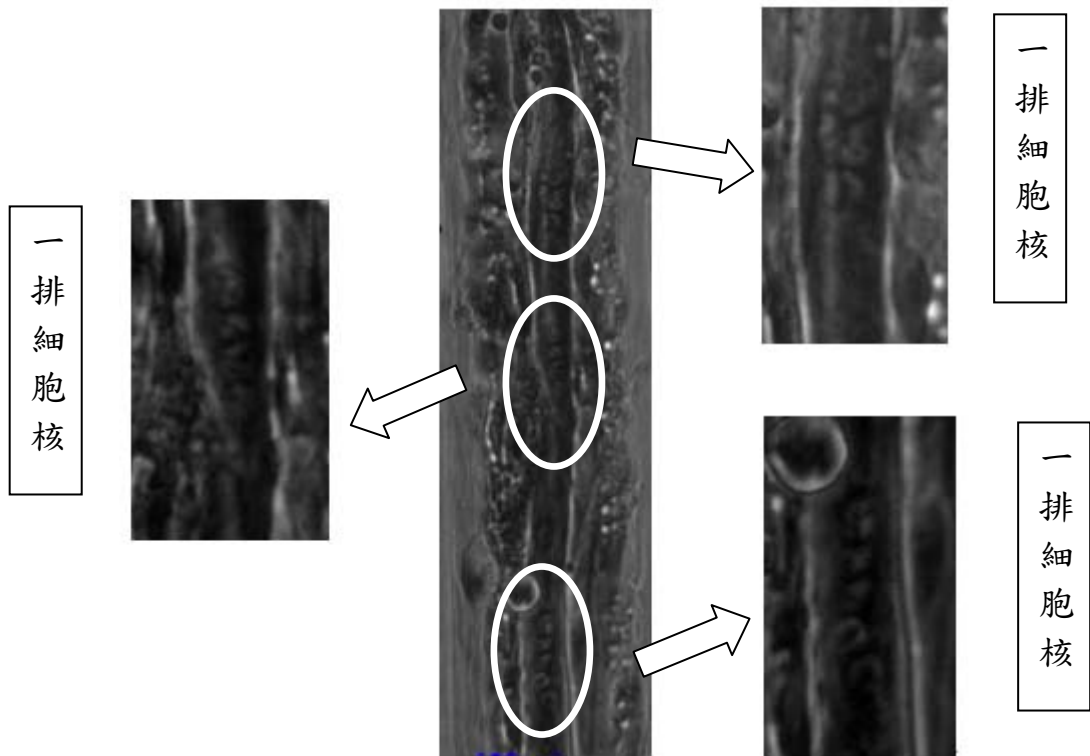


圖 4.44 PDMS 溝槽  $60\ \mu\text{m}$ 、深度  $40\ \mu\text{m}$  之肌肉纖維

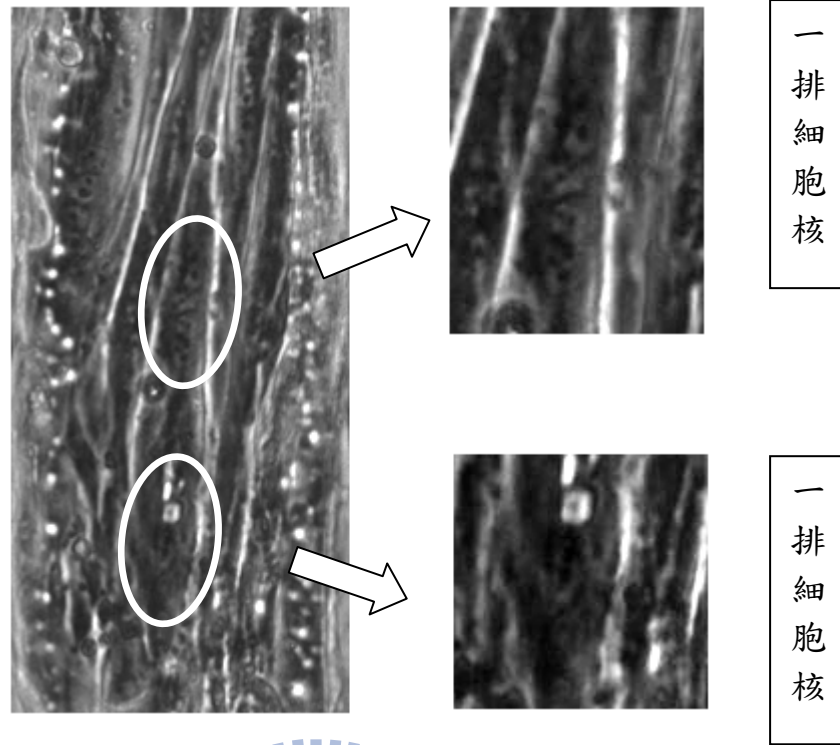
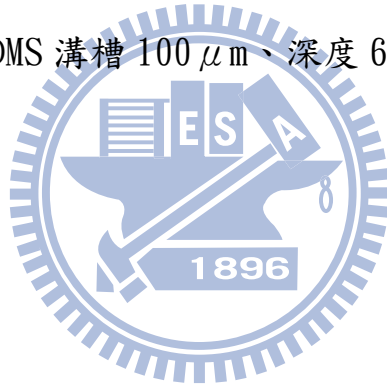


圖 4.45 PDMS 溝槽  $100\ \mu\text{m}$ 、深度  $60\ \mu\text{m}$  之肌肉纖維



## 第五章 實驗討論與結論

### 5.1 實驗培養細胞的細節與技巧

#### 【培養細胞細節】

培養過程中需要帶上無粉手套作實驗，無菌操作台裡盡量靠近酒精燈附近做實驗，培養過程中不可讓滴管尖頭(TIP)尖端觸碰到任何物品，培養皿在無菌操作台以外不可以打開，以上皆為減少細胞污染之可能性。

#### 【培養技巧】

本實驗聚二甲基矽氧烷(PDMS)塗佈薄膜採用明膠(Gelatin)，一般培養在培養皿的肌肉母細胞(Myoblasts)可以用 1000  $\mu$ l 滴管尖頭(TIP)以順時針方向將細胞沖散，培養在聚二甲基矽氧烷不可以使用此步驟，會導致基材與薄膜分離，需先將細胞懸浮液取到 15ml 離心管使用 1000  $\mu$ l 滴管尖頭均勻沖散，本時驗一開始採用 PBS 潤濕，發現細胞懸浮液慢慢滴入聚二甲基矽氧烷為疏水性，接著採用生長培養(89%DMEM+10%FBS+1%PS)即可讓細胞懸浮液呈現親水性之效果，讓細胞懸浮液高度一致，才可讓細胞均勻分布於每個地方，經過半小時讓肌肉母細胞貼附於基材上，再補足生長培養液即可。





## 5.2 實驗討論

本實驗研究以無結構培養皿與微結構(Microsubstrates)聚二甲基矽氧烷(PDMS)培養肌肉微管(Myotubes)，並比較差異，其針對肌肉微管的生長角度、總數量、長度、直徑分析可發現，生長角度與總數量有較佳的效果，PDMS 溝槽(Grooves)30  $\mu\text{m}$  讓肌肉微管生長方向最好，總數量深度增加到 40  $\mu\text{m}$  與 60  $\mu\text{m}$  讓肌肉微管數量便多趨勢，表示微結構尺寸對分化成肌肉微管數量和誘導肌肉微管方向有一定的作用。

其中，又以在聚二甲基矽氧烷溝槽 60  $\mu\text{m}$ 、深度 40  $\mu\text{m}$  的數據培養中最好，其主因為微結構底部中間向兩側傾斜 15<sup>0</sup>，使肌肉微管平均角度為 89.3<sup>0</sup> 與溝槽 90<sup>0</sup> 相當接近。

觀察融合的過程中，需先判斷肌肉微管的成形與否，主要觀察肌肉微管是否有兩個以上之細胞核，發現很多細胞核會集中呈現一排情況，待融合完成，可發現細胞核呈現兩種情況，一種為兩端各一排細胞核，另一種為細胞核集中一起呈現多排之現象。

培養過程中，發現種植密度是分化肌肉微管重要的一環，如果細胞種植密度在密集會導致細胞提早老化現象，以致於未分化成肌肉微管，肌肉母細胞(Myoblasts)因而死亡懸浮於培養液上方，最後以  $3 \times 10^4 \text{cm}^2$  為本實驗種植肌肉母細胞之密度，培養過程中發現培養在微結

構聚二甲基矽氧烷所分化之肌肉微管生長速度比培養皿慢 2~3 天，可能是基材的硬度與表面處理方式不同所導致。

### 5.3 實驗結論

微結構(Microsubstrates)分化肌肉微管(Myotubes)生長角度與總數量比無結構培養皿好，其中生長角度方面以溝槽 30  $\mu\text{m}$  最佳，總數量方面以深度 40  $\mu\text{m}$  與 60  $\mu\text{m}$  最佳，另外微結構底部中間向兩側傾斜一個角度，有助於肌肉微管生長角度更接近微結構與總數量增加。微結構對肌肉微管長度與直徑沒有太大改變，細胞種植密度約  $3 \times 10^4 \text{cm}^2$ ，可培養健全的肌肉微管。

肌肉微管融合成肌肉纖維(Muscle Fibers)由於機械誘導使肌肉微管可以有方向性生長，且讓肌肉微管只有微小移動有助於加快融合過程，相較之下會比培養皿同樣數量之肌肉微管融合成肌肉纖維數量多。

### 未來方向

1. 增加電漿之官能基時效性，以便培養成肌肉纖維。
2. 製作更好的微結構規格，溝槽與間距設計在 20~60  $\mu\text{m}$ ，深度方面 25~40  $\mu\text{m}$ ，底部兩邊呈現一個角度  $15^\circ \sim 25^\circ$ ，使肌肉母細胞分化更多肌肉微管。

## 參考文獻

- [1] Mai T. Lam<sup>a</sup>, et al , “ The effect of continuous wavy micropatterns on silicone substrates on the alignment of skeletal muscle myoblasts and myotubes” , *Biomaterials* 27 , 2006 , 4340 - 4347.
- [2] Jiang X, Takayama S, Qian X, Ostuni E, Wu H, Bowden N, et al, “ Controlling mammalian cell spreading and cytoskeletal arrangement with conveniently fabricated continuous wavy features on poly (dimethylsiloxane)” , *Langmuir* , 2002;18:3273 - 3280.
- [3] Bowden N, Huck W, Paul K, Whitesides G, “ The controlled formation of ordered sinusoidal structures by plasma oxidation of an elastomeric polymer” , *Appl Phys Lett* , 1999, 75(17):2557 - 2559.
- [4] Dunn GA, Heath JP, “ A new hypothesis of contact guidance of tissue cells” , *Exp Cell Res* , 1976, 101, 1-14.
- [5] Dennis RG, Kosnik PE II , “ Excitability and isometric contractile properties of mammalian skeletal muscle constructs engineered in vitro” , *In Vitro Cell Dev Biol*

Animal , 2000;36:327 - 335.

[6] Su WT, Yang JY, Lin CD, Chu IM, “ Control cell behavior on physical topographical surface” , Jpn J Appl Phys ,2004; 43: 3806-3809.

[7] 楊忠諺，「利用 PDMS 微溝槽基板誘導老鼠基質細胞能動性之研究」，國立清華大學，碩士論文，2007 年 7 月。

