

國立交通大學  
分子科學研究所

碩士論文

開發「鎖相放大倍頻顯微技術」於肌纖維收縮之  
觀測

Myocyte contraction visualized with lock-in  
amplified second-harmonic generation microscopy

研究生：Chia-Jen Chang (張嘉仁)

指導教授：Dr. Ian Liau (廖奕翰 博士)

中華民國 99 年 9 月

開發「鎖相放大倍頻顯微技術」於肌纖維收縮之觀測

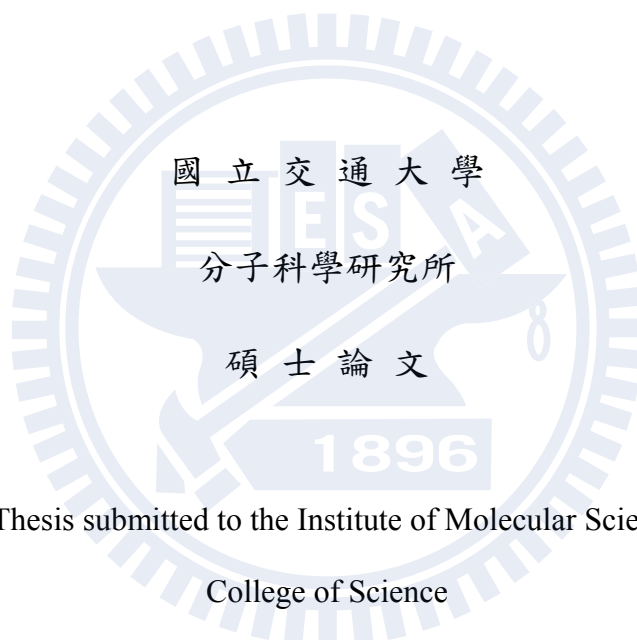
Myocyte contraction visualized with lock-in amplified  
second-harmonic generation microscopy

研究生：張嘉仁

Student: Chia-Jen Chang

指導教授：廖奕翰 助理教授

Advisor: Ass. Prof. Ian Liao



A Thesis submitted to the Institute of Molecular Science,  
College of Science

National Chiao Tung University

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master  
in the Institute of Molecular Science

September 2010

Hsinchu, Taiwan

中華民國 九十九 年 九 月

# 開發「鎖相放大掃描式倍頻顯微技術」於肌纖維收縮之觀測

學生：張嘉仁

指導教授：廖奕翰博士

國立交通大學 分子科學研究所

## 摘要

掃描式光學影像顯微技術依照掃描方式可以分為雷射光束掃描與樣品移動式掃描兩種。前者成像速度較快(約每秒一張)，而後者可結合「鎖像放大」或「光子計數」技術大幅提升訊雜比。我們自行開發一套全新的光學成像系統，將鎖相放大技術與雷射光束掃描式倍頻顯微技術結合，可獲得高訊雜比的動態影像，並將此系統應用於觀測肌肉細胞之誘發收縮與心肌細胞之自主收縮。本論文首先介紹實驗系統，並展現雙光子激發螢光訊號的提升，藉以驗證實驗系統之可行性。接著應用此「鎖相放大掃描式倍頻光學顯微影像技術」觀察肌肉細胞株受電脈衝刺激誘發之肌纖維收縮，並獲得肌小節收縮頻率與肌小節長度之變化。我們也應用此系統觀察雞胚胎心肌細胞之自發性收縮，並透過影像分析獲得肌小節長度變化與肌小節收縮與放鬆速度。我們初步發現肌纖維的位移與肌纖維內部肌小節長度的改變雖然頻率近似，但在時間上並不完全同步，而有一定的相位差。肌小節每次收縮的長度變化量也並不固定。在腎上腺素刺激後，肌小節之收縮速度有明顯增加而放鬆速度則無顯著改變。我們的結果顯示，鎖相放大倍掃描式頻顯微成像技術極適合應用於研究肌肉細胞的動態過程，除了可應用於研究肌纖維收縮之基礎生理研究之外，也可應用於探討藥物或毒物對心肌收縮之影響。

# Myocyte contraction visualized with lock-in amplified second-harmonic generation scanning microscopy

Student: Chia-Jen Chang

Advisor: Dr. Ian Liao

Institute of Molecular Science National Chiao-Tung University

## ABSTRACT

Optical microscopy, especially laser scanning microscopy, has been a powerful tool for biomedical research. Concerning laser scanning optical microscopy, a two-dimensional image is constructed by scanning the focus of a laser beam across a fixed sample or *vice versa*. The frame rate of the former is larger, but the latter allows incorporation of techniques such as lock-in amplification or photon counting to improve signal-to-noise ratio. We have developed a novel lock-in amplified laser scanning second-harmonic generation (SHG) microscopy system, by firstly integrating a pulsed laser into a commercial confocal microscope, and secondly incorporating modulation-demodulation technique into the system. The signal-to-noise ratio is significantly improved while maintaining fast frame rate. The thesis first details the setup of the system including the setting of experiment parameters, and follows with demonstration of the system to image the contraction of two distinct kinds of myocytes: electrically stimulated skeletal muscle cell line and spontaneously contracting chick embryo cardiomyocytes. We show that we can follow the contracting-resting cycle of either electrically induced contraction of skeletal muscles or spontaneous contraction of primary cardiomyocytes. Through image analysis, we can determine the change of sarcomere length during electrically stimulated or spontaneous contraction and examine the effect of hormone on sarcomere contractions.



## 致謝

在這兩年的研究生活裡，認識了許多的新朋友，也在實驗室裡有一群共同努力的好伙伴，使這段艱辛的工作中依然保持著愉悅的心情、謹慎的態度面對每次的實驗。

首先感謝在剛進入實驗室時，美芳、小龜、Bush、逸群、小聰，這些學長姐的帶領下使我了解實驗室的運作方式及學業上的協助。並且感謝 Bush、逸群在二倍頻顯微影像系統架設的啟蒙，使我在往後的日子裡，有足夠的能力去完成整個系統的架設。感謝學翰在掃描影像系統的維護以及架設光路的討論。感謝慧貞學姐、大衛與艾瑞克指導細胞的培養。還有感謝士豪、意玲、盈嘉以及實驗室的同仁在日常生活的照顧，讓我的每一天都過的多彩多姿。另外還有一群專題生，大胖、10、老人、艾瑞克、嘟嘟、小傑、土豆，每天幾乎會上演幾場暴笑短劇，豐富了這兩年的生活。

除了這些朋友，也要感謝廖奕翰老師，他不僅在這兩年中指導我學術上的研究，更重要的是他教導我做事該有的態度，有條理性的解決問題，對自己負起責任，讓我受益良多。

最後，感謝我的家人，在這兩年裡給我的關心與支持，讓我在衣食無缺的環境下更專注於我的研究。感謝大家。

# 目錄

摘要.....	i
ABSTRACT.....	ii
致謝.....	iii
目錄.....	iv
圖目錄.....	v
第一章、背景介紹.....	1
1-1 掃描式光學顯微影像技術.....	1
1-2 鎖相放大 (lock-in amplification) 技術.....	4
1-3 肌肉簡介與相關文獻回顧.....	10
第二章、研究方法與實驗.....	18
2-1 骨骼肌細胞株 (C2C12) 之培養流程.....	18
2-2 雞胚胎心肌細胞 (chicken embryo cardiomyocyte) 之培養流程.....	21
2-3 二倍頻 (second-harmonic generation, SHG) 系統的架設與調整方式.....	24
2-4 電刺激的裝置設計.....	32
2-5 實驗前的環境控制與樣品量測方法.....	34
2-6 影像轉換為數據的方法.....	36
第三章、結果與討論.....	38
3-1 使用鎖相放大器技術對於影像的訊號雜訊比之影響.....	38
3-2 雷射光掃描技術與鎖相放大器技術之結合.....	43
3-3 骨骼肌細胞之二倍頻影像及三維組圖.....	48
3-4 骨骼肌細胞收縮與放鬆之二倍頻動態影像.....	51
3-5 雞胚胎心肌細胞自主性收縮過程之量測.....	55
3-6 腎上腺素 (epinephrine) 對雞胚胎心肌細胞收縮之影響.....	61
第四章、結論與未來展望.....	65

## 圖目錄

圖 1-1 雷射光束掃描示意圖 .....	3
圖 1-2 光學截波器產生之參考訊號與調變訊號、鎖相放大器內部參考訊號之時間關係.....	7
圖 1-3 訊號處理的流程圖 .....	8
圖 1-4 經由傅立葉轉換得到訊號頻率的分布 .....	9
圖 1-5 肌小節結構圖與肌纖維之二倍頻訊號來源 .....	15
圖 2-1 骨骼肌細胞影像 .....	20
圖 2-2 雞胚胎心肌細胞影像.....	23
圖 2-3 二倍頻雷射掃描影像系統與電光調製器之配置示意圖 .....	27
圖 2-4 鈦藍寶石脈衝雷射 (Tsunami) 內部光路圖 .....	28
圖 2-5 電光調製器 (electro optical modulator) .....	29
圖 2-6 電光調節器與電壓功率放大器 .....	30
圖 2-7 電刺激骨骼肌細胞裝置圖 .....	33
圖 2-8 二氧化碳培養箱與自製的上蓋 .....	35
圖 2-9 影像數據化過程 .....	37
圖 3-1 工作週期 .....	41
圖 3-2 不同的參數掃描同一個樣品得到的二倍頻影像 .....	46
圖 3-3 老鼠尾巴組織切片的二倍頻影像 .....	47
圖 3-4 骨骼肌細胞二倍頻影像 .....	49
圖 3-5 骨骼肌細胞二倍頻訊號三維影像 .....	50
圖 3-6 不同電刺激頻率下的二倍頻影像 .....	53
圖 3-7 強度對位置與影像作圖 .....	54
圖 3-8 收縮-放鬆中的心肌細胞 .....	56
圖 3-9 心肌細胞一維掃描的二倍頻影像與時間對位置的關係圖 .....	57
圖 3-10 肌小節長度隨時間變化的關係圖 .....	58
圖 3-11 肌小節收縮與放鬆的平均速度 .....	59
圖 3-12 正常情況下心肌細胞收縮與放鬆的分析圖 .....	60
圖 3-13 加入腎上腺素後心肌細胞收縮與放鬆的分析圖 .....	62
圖 3-14 加入腎上腺素對肌小節收縮與放鬆平均速度的影響 .....	63
圖 3-15 加入腎上腺素對肌小節長度變化百分比的影響 .....	64

## 表目錄

表 2-1 實驗參數 .....	31
表 3-1 不同調控頻率的訊雜比 .....	40
表 3-2 工作週期對於訊雜比的影響 .....	42

# 第一章、背景介紹

## 1-1 掃描式光學顯微影像技術

在生物醫學上雷射掃描式光學顯微影像技術，已經充分運用於細胞、組織甚至生物個體的觀察。從細胞上抗體抗原的螢光辨識<sup>1</sup>、肝臟脂肪含量的定量分析<sup>2</sup>以及活體內腫瘤周圍的膠原蛋白動態調節過程<sup>3</sup>，都顯示此技術運用於生醫研究上的價值。

依照掃描樣品的方式，可分為兩類，一種是雷射光束掃描 (beam scanning)，一種是樣品移動式掃描 (sample scanning)。雷射光束掃描是利用一對 galvanometer mirror scanners，使雷射光點在樣品上做二維掃描。其中一個掃描器以 57 Hz ~ 2 kHz 快速擺動，使雷射光點有規律性的來回移動。另一個掃描器以 0.02 Hz ~ 4 Hz 的速度擺動，將雷射光以另一個軸向量移動，使雷射光可以完整的行經一個平面 (圖 1-1)。此種掃描方式的優點是可以在短時間內得到一張完整的影像，掃描一張像素面積為 512 × 512 的影像只需要約 1 秒。由於快速掃描，雷射在樣品的每個點停留時間極短，約數十微秒 (μs) 左右，訊號強度因此很小。增強雷射的功率或者使用更高收光效率及更小背景雜訊值的偵測器，如：雪崩光電二極管 (avalanche photodiode, APD)，此二種方式皆可提高影像的訊雜比，然而增強雷射功率容易使樣品受到破壞，選用後者則價錢昂貴且訊號過大時易壞損。因此雷射光束掃描式成像技術較不適合運用在訊號強度太微弱的樣品。對於大部分應用螢光成像的研究，雷射光束掃描式成像技術卻可以在短時間內提供大量的資訊，故絕大多數商品化的雷射掃描顯微影像系統即是使用雷射光束掃描的方式。

樣品移動式掃描的特性在於雷射光點保持固定，測量的樣品透過三軸移動壓電平台 (piezo scanning stage) 移動樣品，讓樣品的每一個位置依序受到雷射光的激發釋放訊號。壓電平台每次移動所需的時間約數十至數百微秒，相較於雷射光

束式掃描，樣品移動式掃描需要的時間較長。雖然需要花費較多的時間，但也因為掃描的速度較慢，樣品單位面積受到雷射光照射的時間長，訊號的強度也相對增強。當遇到訊號強度微弱時，可以搭配鎖相放大 (lock-in amplification) 技術或光子計數 (photon counting) 技術，增加訊號雜訊比值，大幅提高訊號影像強度。

以上兩種掃描的方式都適合用來研究生物相關的問題，對於不同研究的主題選擇適合的方式。當實驗上需要好的時間解析時，快速掃描的雷射光束掃描會是一項很有利的工具。而樣品移動式掃描則可以用於分析微弱的樣品訊號，還能配合鎖相放大技術及光子計數技術一起使用達到更好的效果。



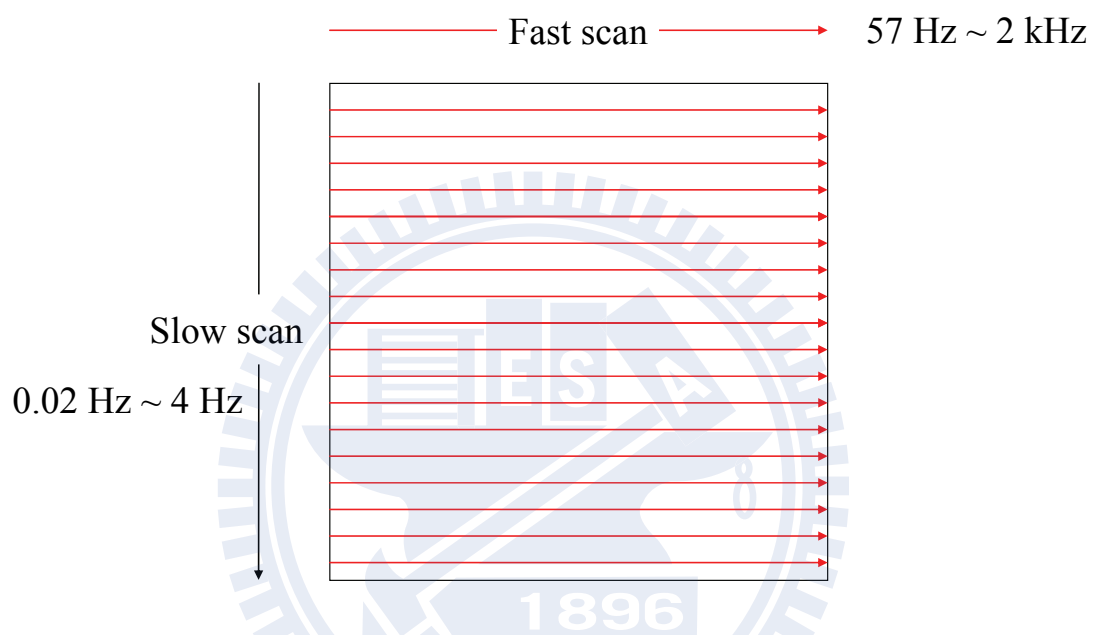


圖 1-1 雷射光束掃描示意圖

雷射光束掃描式 (beam scanning)成像是利用一對 galvanometer mirror scanners 各自以固定的頻率來回擺動，完成二維影像的掃描。

## 1-2 鎖相放大 (lock-in amplification) 技術

如上節描述，今天要掃描的樣品訊號強度很小時，就可以使用樣品移動式掃描技術與鎖相放大器增大訊號與雜訊之間的比值 (signal-to-noise ratio)。鎖相放大技術常被用來偵測極小的交流訊號，偵測極限可達數個 nV。甚至可以從千倍大的背景雜訊中，得到正確訊號值。它的基本運作方式是擷取特定相位與頻率的交流訊號，經由訊號處理，從中取出交流訊號的振幅。實驗上讓雷射通過光學截波器 (optical chopper)，旋轉的扇葉會阻擋雷射即可讓雷射強度有規律性的變化，嵌入一個特定的頻率 ( $\omega_R$ )。此過程稱之為調變 (modulation)。因為訊號是由雷射激發產生的，所以帶有相同頻率的交流訊號，表示為

$$V_I \sin(\omega_R t + \theta_I)$$

其中  $V_I$  表示訊號強度或是雷射有無照射於樣品之訊號差； $\theta_I$  為相位角，是交流訊號與光學截波器產生的參考訊號的相位差值。另一方面，鎖相放大器也會產生一個與參考訊號相同頻率的參考訊號，表示為

$$V_R \sin(\omega_R t + \theta_R)$$

其中  $V_R$  由鎖相放大器自行擬定的，為一個常數， $\theta_R$  為內部參考訊號與光學截波器參考訊號的相位差值。

鎖相放大器會將這兩組訊號相乘後得到以下的結果

$$\begin{aligned} & V_I V_R \sin(\omega_R t + \theta_I) \sin(\omega_R t + \theta_R) \\ &= \frac{1}{2} V_I V_R \cos(\theta_R - \theta_I) + \frac{1}{2} V_I V_R \cos(2\omega_R t + \theta_R + \theta_I) \end{aligned}$$

得到一組頻率為零的直流訊號，另一組頻率為  $2\omega_R$  的交流訊號。經由低通濾波器 (low pass filter) 除去交流訊號後得到的直流訊號，以 X 表示：

$$X = \frac{1}{2} V_I V_R \cos(\theta_R - \theta_I)$$

由上述式子中可以看出 X 值的大小與相位差， $\theta_R - \theta_I$  有關。為了移除此因素，現在雙通道 (dual-channel) 鎖相放大器會產生另一組與前述內部參考訊號相位差



90° 的內部參考訊號

$$V_R \sin(\omega_R t + \theta_R + 90)$$

經過相同的運算與低通濾波器的篩選後，得到直流訊號以 Y 表示輸出訊號。

$$Y = \frac{1}{2} V_I V_R \sin(\theta_R - \theta_I)$$

若將 X 與 Y 平方後相加便可除去相位差的影響。最後除去常數項次便可得到原使訊號項，其結果以 R 表示：

$$R = \frac{2}{V_R} (X^2 + Y^2)^{\frac{1}{2}} = V_I$$

一般實驗中均紀錄 R 值隨時間的變化。

在此，我們舉一個例子說明鎖相放大技術的運作（圖 1-3）。假設有一個理想的直流訊號其值大小為 1 伏特，經由光學截波器設定為 200 赫茲的調節下，訊號會形成帶有 200 赫茲的交流訊號，當它同時受到頻率為 60 赫茲，強度為 -1~1 伏特的交流電雜訊與頻率不規則強度為 -1~1 伏特的背景雜訊干擾，最後形成一組雜亂的訊號總和，傳送至鎖相放大器。鎖相放大器本身也會產生一個與光學截波器相同頻率的內部參考訊號。訊號總和與內部參考訊號經由鎖相放大器處理後，將得到的訊號經過傅立葉轉換後得到圖 1-4 的結果。從圖上可以得知頻率在 0 赫茲的地方會有最初假設的直流訊號，經低通濾波器移除高頻交流訊號即可得到不受雜訊影響的直流訊號。另外，圖上有數個特定頻率的訊號其訊號值較大，分別為光學截波器設定的 200 赫茲、與交流電雜訊形成的差頻 140 赫茲與合頻 260 赫茲、還有訊號處理後產生 400 赫茲的二倍頻交流訊號。這說明了雜訊會受到光學截波器設定頻率的影響，移至高頻率的位置。

低通濾波器的效能與「時間常數 (time constant)」值有所改變。效能越高代表可以通過的頻率寬度越窄，只有接近設定頻率的訊號可以通過，因此濾除雜訊的效果越好，所得到的效能與時間常數的關係如下

$$\Delta F_{LP} = a / (2\pi\tau)$$

$\Delta F_{LP}$  是濾波器的寬度， $\tau$  則是儀器面板上可以調整的時間常數值。a 值的大小



與選擇的過慮器值有關，在此先不考慮  $a$  值的影響。從關係式可以得知時間常數值設定越高，低通濾波器的寬度越窄，能通過濾波器的雜訊比例越低，因此訊雜比越高。除了上述的方法可以提高訊雜比外，也可以增加光學截波器調節的頻率，將大部分的雜訊移至高頻，遠離直流訊號，此時儘管使用寬度較寬的低通濾波器，同樣也可以提高訊雜比。

實驗室使用「同調反史托克拉曼散射顯微技術」的研究中，為了讓低通濾波器有效分離訊號與雜訊，光學截波器頻率設定為 2670 赫茲，時間常數設定在 3~10 ms，以得到高訊雜比的影像。



### 光學截波器產生的參考訊號

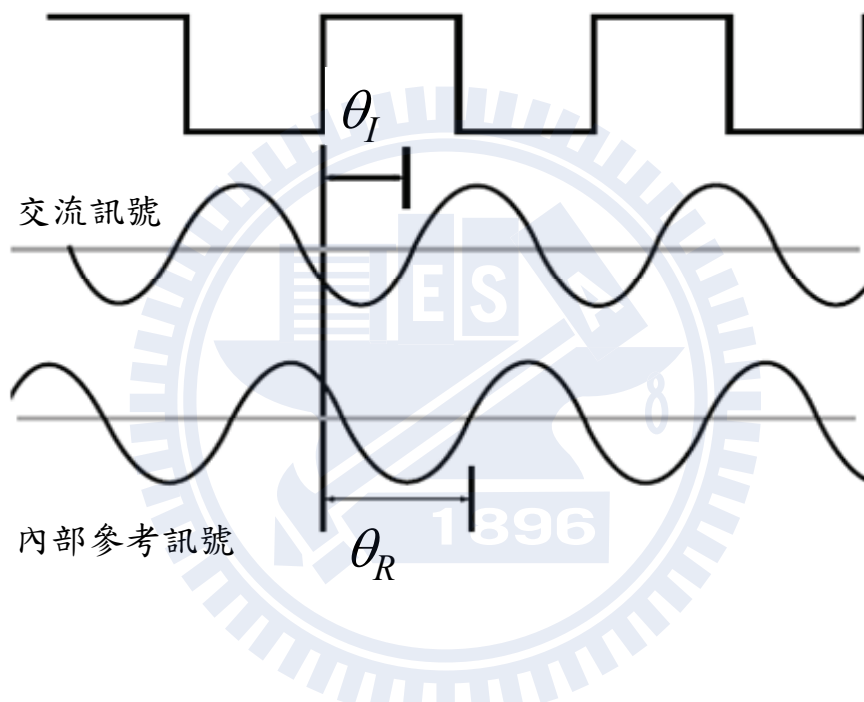


圖 1-2 光學截波器產生之參考訊號與調變訊號、鎖相放大器內部參考訊號之時間關係

- (a) 光學截波器產生的參考訊號。由光學截波器產生，雷射光在經過截波器後會帶有相同的頻率。(b) 交流訊號。當樣品受到雷射光激發後，產生的訊號也會有相同的頻率。(c) 內部參考訊號。解頻的過程中鎖相放大器會依照外部參考頻率產生相同頻率的訊號。訊號彼此間會有固定相位差，使解頻後的訊號強度受影響。

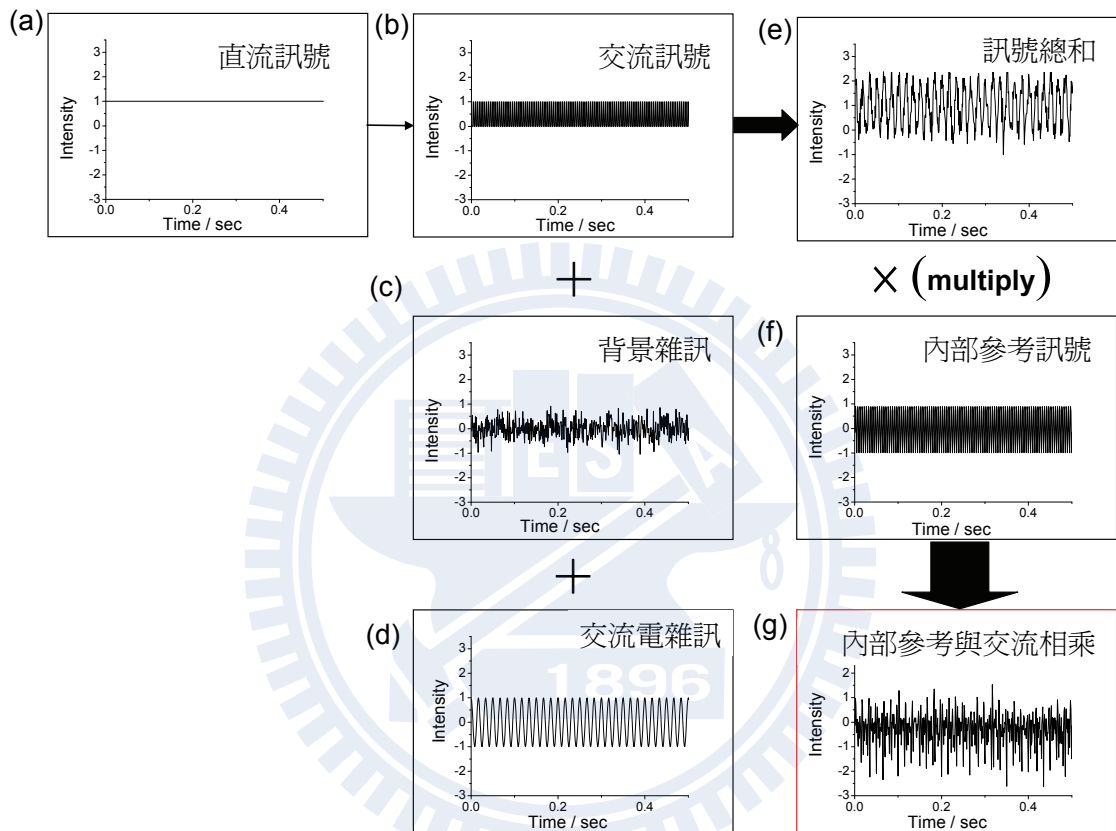


圖 1-3 訊號處理的流程圖

直流訊號 (a)。直流訊號經過光學截波器以頻率 200 赫茲規律性的阻斷，形成交流訊號 (b)。交流訊號受到 -1~1 伏特的亂數背景雜訊 (c) 與 -1~1 伏特、60 赫茲的交流電雜訊 (d) 影響，使交流訊號埋沒在混亂的雜訊中，形成訊號總和 (e) 一併傳送至鎖相放大器。鎖相放大器產生的內部參考訊號 (f) 會與訊號總和相乘得到 (g)，並進行下一步的處理。

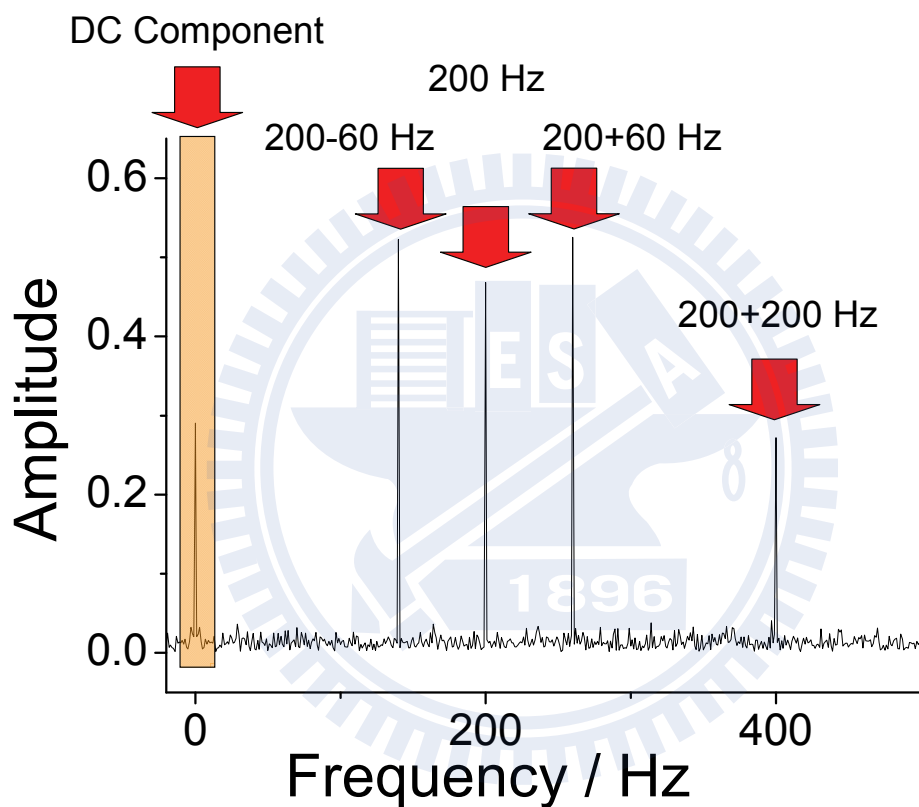


圖 1-4 經由傅立葉轉換得到訊號頻率的分佈

由圖 1-3 (g) 的訊號經過傅立葉轉換，在 0 赫茲的地方會有最初的直流訊號，經過低通濾波器(橘色區域代表)，擷取直流訊號。

### 1-3 肌肉簡介與相關文獻回顧

肌肉組織中單一肌肉細胞稱為肌纖維 (muscle fiber)，肌纖維內有許多排列整齊的肌原纖維 (myofibril)。構成肌原纖維的主要成分為 myosin, actin 與 Z-line (圖 1-5)，他們依照固定的排列方式重複出現在肌原纖維內，我們稱此結構單位為肌小節 (sarcomere)。肌小節長度判斷的方式為 Z-line 到 Z-line 之間的距離。在 1958 年 Huxley 與 Taylor<sup>4</sup> 發現在偏光顯微鏡下，肌肉影像有明帶 (isotropic) 與暗帶 (anisotropic) 的區分，因此 myosin 與 actin 重疊的區域也稱為 A band，而單獨只有 actin 的位置則稱為 I band。肌肉收縮的過程中，myosin 上的 myosin head 會牽動 actin，使 myosin 與 actin 的重疊部分增多，肌小節的長度縮短。另外，在 1997 年 Geo<sup>5</sup> 首次利用二倍頻影像系統對骨骼肌進行低解析的掃描，發現肌小節有二倍頻訊號。經過幾年的研究，目前已經確定二倍頻影像訊號是由 myosin 產生<sup>6</sup>。

以下將會討論肌小節長度的測量方式與收縮-放鬆過程中力和鈣離子濃度的測量方式，以及二倍頻影像技術。

#### 肌小節長度的測量方式

**光學繞射技術(diffraction techniques)** 早在 1874 年 Ranvier<sup>7</sup> 就使用單色光照射青蛙與兔子的肌肉，並且得到繞射條紋。繞射條紋是由 A-I band 交叉排列產生，所以由繞射條紋可以知道 A-I band 之間的距離，得到肌小節的長度。也可以動態的監測肌肉的運動，所以有許多學者用此技術觀察分離的心肌細胞<sup>8,9</sup>。在 1994 年 Lieber<sup>10</sup> 將此技術利用在人類身上。實驗上自願者將手臂表皮切開露出肌肉，接著利用稜鏡將雷射光以一個角度引入照射肌肉，產生的繞射光會以另一個角度散出，不受入射光的干擾，最後藉由繞射的結果，得到肌小節的

長度為 2.6 ~ 3.4  $\mu\text{m}$ ，肌小節收縮量最大值為 0.15  $\mu\text{m}$ 。

**電子顯微技術 (electron microscopy)** 在 1950 年英國生物學家 Hugu Huxley 利用電子顯微影像觀察骨骼肌，建立 myosin 與 actin 兩者間的位置關係。1978 年 Powell<sup>11</sup> 利用電子顯微鏡觀察大鼠的心臟組織切片，得到肌小節的長度為  $1.64 \pm 0.21 \mu\text{m}$ 。1987 年 Nassar<sup>12</sup> 觀察成熟心肌細胞與未成熟心肌細胞形貌的差異性，作者發現未成熟的細胞僅有一層薄薄的肌原纖維環繞在四周，細胞中央僅有鬆散的肌原纖維、線粒體和細胞核。但在成年細胞，細胞骨架支撐起整個細胞，使細胞呈現方形，粒線體整齊的穿插在肌原纖維旁，肌原纖維則並列在細胞內。

**光學成像 (optical imaging)** 此技術的演進有賴於偵測器的進步，因此是屬於稍晚才興起的一項技術。1987 年 Roos<sup>13</sup> 使用單行陣列攝電荷耦合元件 (charge coupled device single-line) 截取肌肉細胞收縮放鬆的一維影像，得到肌小節的長度為 1.818 ~ 1.928  $\mu\text{m}$ 。1982 年 Roos<sup>14</sup> 使用自掃描式電荷耦合元件 (self-scanning charge coupled device) 觀測收縮的動態過程。此實驗使用之細胞取自成熟大鼠的心臟，利用酵素破壞細胞外基質的連結取出心肌細胞，成熟心肌細胞的外觀可以明顯看到排列整齊的肌小節。在實驗的過程中變更不同鈣離子濃度的培養液控制細胞的收縮與放鬆，並由電荷耦合元件記錄影像後得到位移對時間的圖形，推得肌肉細胞收縮的長度與收縮的速率。1987 年 Nassar<sup>12</sup> 使用 60 Hz 截取速度的二維成像電荷耦合元件測量心肌細胞肌小節的長度，得到成熟的心肌細胞的肌小節平均長度為  $1.91 \pm 0.07 \mu\text{m}$ ，未成熟的肌小節平均長度為  $1.82 \pm 0.09 \mu\text{m}$ 。2009 年 Kamgoue<sup>15</sup> 所使用的電荷耦合元件截取速度已經高達 20MHz，在高速取得的影像中定量分析心肌細胞的收縮，觀察整個心臟細胞的肌小節彼此傳遞的過程。

以上這些方式皆可以得到肌小節的長度，但是仍然有美中不足的地方。光學繞射方法實際上是得到繞射圖形，是由多組肌小節相互影響的結果，不是直接得到肌小節的長度。當細胞表面出現不規則形變，破壞原有 A-I band 排列的規律

性，會使繞射條紋受到干擾。所以此技術不適合用在外觀排列不均勻的樣品，或是測量過程中會產生不同步行為。電子顯微技術可以不用染色就有極高的解析度與辨識能力，但是製作過程相當繁瑣，而且需要在乾燥、抽真空的環境才能進行測量，因此不可能使用在活體。另外，在 1985 年 Severs<sup>16</sup> 提出樣品的製備方法會影響到測量的長度，作者將肌肉組織切片固定後得到肌小節的長度為  $1.65 \pm 0.04 \mu\text{m}$ ，而厚的組織得到的長度為  $1.86 \pm 0.03 \mu\text{m}$ 。這件事顯示樣品處理的方式會造成不同的結果，失去準確性。光學成像技術在 CCD 的進步下得到的結果已經有顯著的提升，得到的影像直接表示肌小節的長度，便利於數據分析，然而對於一些反差性較低的樣品，得到的影像將不易判斷肌小節長度，而且在空間解析能力光學成像技術仍然有進步空間。

肌肉收縮除了肌小節的長度發生改變外，過程中還會伴隨著力的產生與鈣離子濃度的改變。對此也有不同的研究方式。

### 收縮-放鬆過程中力和鈣離子濃度的測量方式

大多數的實驗藉由改變外在環境的鈣離子濃度，刺激肌肉產生收縮與放鬆的行為，並藉由鈣離子螢光探測分子測量細胞內鈣離子濃度的改變。在 2003 年 Rubart<sup>17</sup> 用 MHC-EGFP 基因轉殖老鼠使老鼠肌肉的 myosin heavy chain 蛋白發出螢光訊號，並且加入 rhod-2 偵測鈣離子濃度。實驗上作者將 MHC-EGFP 老鼠的心臟細胞移植到未基因轉殖的老鼠心臟，觀察心臟跳動時移植的細胞與宿主細胞兩者的鈣離子傳遞關係。最後的結果證明移植的細胞可以與宿主細胞形成有功能性的合體細胞(functional syncytium)。

細胞力量的測量在 2000 年 Velden<sup>18</sup> 嘗試測量。作者使用捐贈者的心肌細胞作為樣品，將萃取出來的細胞移至玻片上，利用倒立式顯微鏡觀察心肌細胞在鈣離子濃度的變化下，對於肌小節長度的影響。並在細胞兩端黏上不鏽鋼針，偵測細胞的收縮力。不同長度的肌小節產生的力也不盡相同，長度為  $2.2 \mu\text{m}$  的肌



小節在鈣離子濃度為  $3.16 \times 10^{-5}$  測得力為  $22 \mu\text{N}$ ， $1.8\mu\text{m}$  的肌小節在鈣離子濃度為  $3.16 \times 10^{-5}$  測得力為  $15 \mu\text{N}$ 。在 2001 年 Shevchuk<sup>19</sup> 將掃描離子電導顯微術 (scanning ion conductance microscopy, SICM) 與雷射掃描顯微鏡結合，在樣品中加入 Fluo-3 發光物質偵測鈣離子濃度變化，SICM 測量細胞收縮時向上振動的幅度，達到同時測量心肌細胞的跳動與鈣離子的變化。2002 年 Stehle<sup>20</sup> 在顯微鏡上加裝原子力懸臂系統，利用鈣離子濃度的變化讓肌原纖維收縮，測量肌肉收縮時產生的力量。並且觀察移除鈣離子後肌原纖維回到放鬆狀態所需要的時間，最後還有比較磷酸根的濃度對於收縮的力量與放鬆的時間做探討。2006 年 Telley<sup>21</sup> 使用螢光抗體染色技術在蛋白質  $\alpha$ -actinin 的位置標記螢光訊號，使 Z-line ( $\alpha$ -actinin 含量較多，螢光強度較強) 與 M-band ( $\alpha$ -actinin 含量較少，螢光強度較弱) 產生螢光訊號。此外作者在顯微鏡上架設原子力懸臂系統，將探針接在肌原纖維的一端，肌原纖維的另一端固定在物台上，當肌肉在收縮時會去拉動探針，改變探針的位置，推得力的大小。藉由螢光訊號的間隔得知肌小節的長度、探針的移動量測量收縮力的大小，得知多組肌小節相互的化學與機械力的相關性。

最後，我們將對本文中使用的實驗技術做相關的文獻回顧與使用在肌肉組織的探討。

## 二倍頻顯微技術

二倍頻顯微技術為非線性光學的應用之一。因為雷射波長選用紅外光或近紅外光，所以對於樣品的破壞性較小，在掃描易造成散射的樣品時，雷射在聚焦的過程中損失的能量較少，因此可以掃描較深層的影像<sup>22</sup>。二倍頻訊號在 1961 年由 Franken<sup>23</sup> 發現。在 1978 年 Sheppard<sup>24</sup> 將二倍頻顯微技術與光學顯微鏡結合。2002 年 Campagnola<sup>25</sup> 發展出掃描式二倍頻顯微影像系統，可以快速得到一張三維影像。有些非中心對稱的生物分子會產生此訊號，如細胞外基質富含的



膠原蛋白<sup>26</sup>，肌纖維<sup>27</sup>。

在得知肌纖維會產生二倍頻訊號後，科學家對於訊號是從哪裡產生的開始感到興趣。在 2003 年 Both<sup>28</sup> 提到 actomyosin 為訊號來源。同年 Mohler<sup>29</sup> 則提出 myosin heavy chain 為訊號來源。2006 年 Plotnikov<sup>30</sup> 將 myosin head 移除後二倍頻訊號的強度沒有受到影響，證實訊號的來源不是由 myosin head 產生。接著作者進行極化各向異性 (polarization anisotropy) 證實訊號的產生是來自於 myosin rod。

另外有學者實際運用二倍頻影像探討肌小節形體上的改變。在 2006 年 Plotnikov<sup>30</sup> 利用免疫染色的方法標定 Z-line 的位置，觀察肌肉在不同收縮階段螢光訊號與二倍頻訊號之間的距離。在 2008 年 Llewellyn 結合內視鏡與超快雷射顯微影像系統，將直徑 350~1000  $\mu\text{m}$  的內視鏡植入活體動物的肌肉上，觀察肌肉在收縮的過程中二倍頻訊號的變化，最後也將此技術運用在人體測量肌肉的收縮。2008 年 Wallace<sup>31</sup> 使用波長 830 nm, 100 fs 的超快雷射激發成熟的心肌細胞，在沒有染色的情況下獲得二倍頻訊號與細胞自體的雙光子激發螢光訊號 (two photon excited fluorescence, TPEF)，這兩種訊號提供豐富的細胞資訊，二倍頻訊號辨識細胞內肌小節的分布，雙光子激發螢光訊號可以看到細胞的形貌甚至是細胞核的數目，最後藉由兩種訊號定量出細胞的體積。

病理上也有學者使用二倍頻顯微影像系統觀察肌肉組織的破壞。在 2004 年 Boulesteix<sup>32</sup> 用二倍頻顯微技術掃描青蛙的心肌細胞，並且對細胞加入貝類毒素使肌肉細胞收縮。2008 年 Plotnikov<sup>33</sup> 觀察基因改造鼠，使肌肉細胞萎縮，觀察肌小節長度的變化與整體形貌的改變。由上述的文獻顯示，二倍頻訊號影像系統不僅可以在活體上進行實驗，而且訊號有其專一性，可以貼近真實生物體生理上的反應。

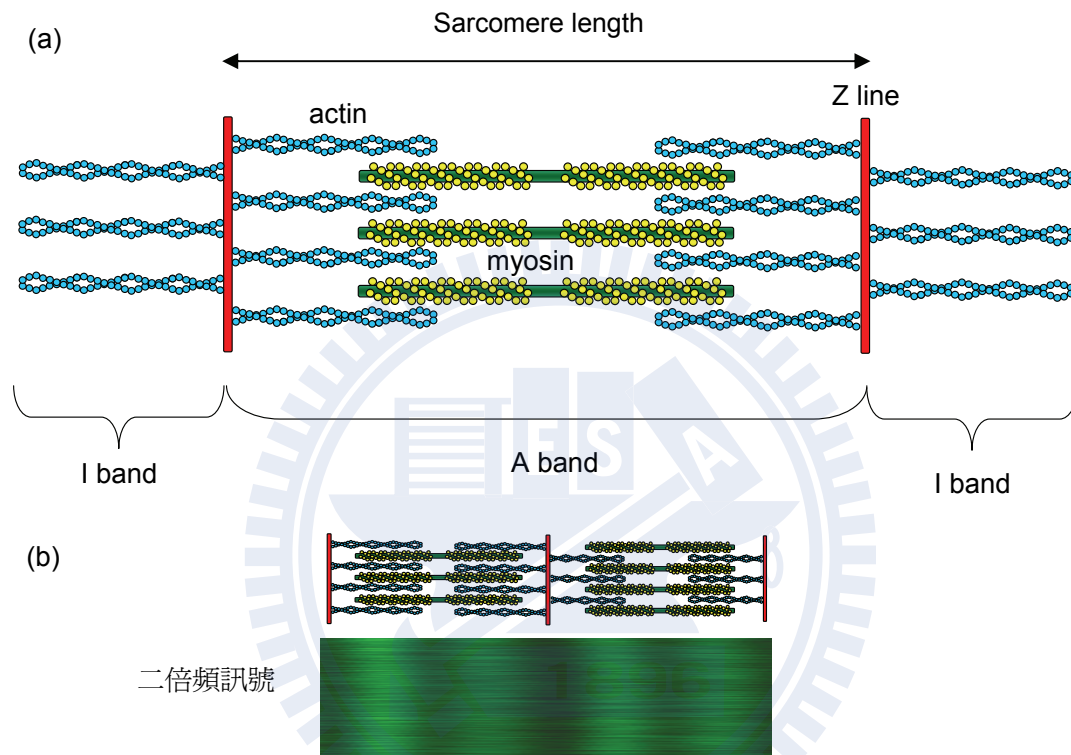


圖 1-5 肌小節結構圖與肌纖維之二倍頻訊號來源

(a) 肌小節最主要由 myosin 與 actin 組成。肌小節的長度定義為 z-line 到 z-line 的距離。(b) 肌纖維的二倍頻訊號來源是由肌小節中 myosin 產生。

#### 1-4 研究動機及目標

雷射掃描技術<sup>34,35</sup>與樣品移動技術<sup>36,37</sup>在生物醫學的研究上已成為主要研究工具之一。雷射掃描技術取得一張像素面積為 512 × 512 的影像只需要約一秒鐘，然而當使用在訊號強度很小的樣品時，得到的影像因為訊號過小會顯的背景雜訊過大。樣品移動技術雖然可以藉由鎖相放大技術或光子計數技術得到較好的訊雜比，但是掃描一張影像需要耗費數分鐘，所以他不適合使用在快速變化的樣品。有鑒於此，我們希望將兩種光學影像技術的優點結合。將雷射掃描技術與鎖相放大器技術結合，並且使用它測量自發性跳動的心肌細胞，觀察收縮與放鬆過程中肌小節的變化。

過去測量肌小節長度的方式大多使用侵入性的方式，例如：組織切片染色、電子顯微鏡。染色可以標定出每個肌小節的距離，但是製作樣品的過程卻也會對其造成傷害，使組織失去原始的形貌。使用電子顯微鏡觀察可以不用染色就有極高的解析度與辨識能力，但是製作過程中相當繁瑣，且需要乾燥、抽真空的環境才能進行測量，因此不適合用在活體上。有一種較為簡便且非侵入性的方式為亮視野 (bright field) 的觀察，但是他需要樣品本身形貌上有明顯的變化否則對比度不高，並且沒有任何特定的專一性以及空間解析能力尚有進步的空間。比起以上的方式，二倍頻訊號影像的優點在於樣品不需要複雜的前置工作甚至可以直接量取，訊號有專一性，在肌肉組織中只有 myosin 才會有訊號，不會受到肌肉周圍的組織或者是細胞內胞器的影響，此外最大的優點是對於樣品的破壞性很小，可以在活體上進行實驗<sup>3,26,38</sup>。

關於研究的部份，首先我們會先了解使用鎖相放大器對於訊雜比的提升程度，並且找尋最適合的實驗條件。接著將超快雷射引進雷射光束掃描系統，建立光束掃描式二倍頻影像系統，並且與鎖相放大技術結合。使用骨骼肌細胞株 C2C12 作為樣品，此細胞受到電壓的刺激會產生非自主性收縮，在收縮與放鬆

的過程中使用自行建立的系統追蹤整個過程，確認系統的可行性與靈敏度。最後使用原代肌胚胎心肌細胞作為樣品，觀察加入腎上腺素觀察微觀上的變化。大部分的研究使用動物體取下發育成熟的心肌細胞進行實驗，但是這種細胞不會有自主性的跳動，必須藉由鈣離子濃度的調控與含有 ATP、 $Mg^{2+}$  等物質的培養液，刺激它收縮。相較於活體上的心肌細胞其生理狀況已經完全不同。我們選用的胚胎心臟細胞是標準研究心臟的生物模型，本身會有自發性的跳動，並且達到一定的密度後，所有的細胞跳動頻率會同步。



## 第二章、研究方法與實驗

### 2-1 骨骼肌細胞株 (C2C12) 之培養流程

本實驗使用的骨骼肌細胞自食品工業發展研究所生資中心 (bioresource collection and research center, BCRC) 為老鼠的肌母細胞 (myoblast) 株 C2C12 (BCRC number: 60083, ATCC number: CRL-1772)，在培養的過程中變更培養液就可以使肌母細胞分化成肌小管細胞 (myotube)，是一個常用來研究骨骼肌表現的細胞株。培養的步驟如下：

步驟 1：培養液的配製。C2C12 培養液分為分化前與分化後兩種，分化前的培養液是由 500 ml 的 DMEM (11965, Invitrogen, U.S.A.) 加入 10% 胎牛血清 (FBS, 26140, Invitrogen, U.S.A.) 及 1% 青黴素-鏈黴素溶液 (PS, 10378, Invitrogen, U.S.A.) 混合均勻。分化後的培養液是將 10% 胎牛血清改成 10% 馬血清 (Horse serum, HS, 16050, Invitrogen, U.S.A.) 即可。

步驟 2：將細胞解凍後加入分化前培養液至 5 ml，並移至 25T 長頸瓶 (flask, 353108, BD Falcon, U.S.A.)，最後移到 37°C，5% CO<sub>2</sub> 的培養箱 (Incubator, NU-5500, Nuaire, U.S.A.)。

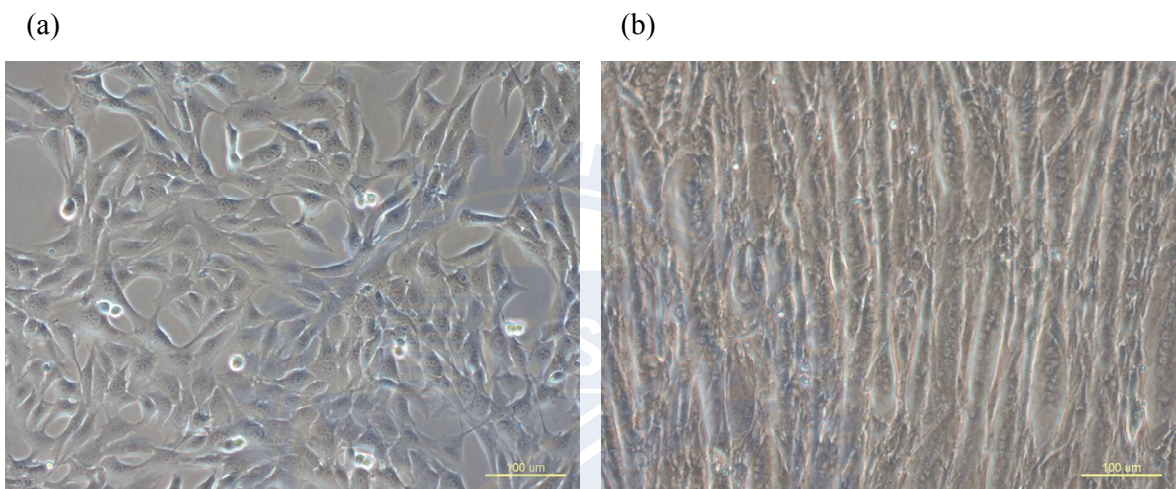
步驟 3：持續培養細胞 2~3 個繼代，讓細胞生理活性與機能回覆到正常的狀態 (圖 2-1(a))，以細胞密度 10<sup>5</sup> 個 / ml 將細胞種植到玻璃式培養皿 (glass bottom culture dishes, P35GCol-1.5-14-C, MatTek Corporation, U.S.A.)。

步驟 4：當細胞達到培養盤面積 60~70% 時 (約兩天) 將培養液置換成分化後的

培養液，刺激肌母細胞分化。之後每兩天需要更新分化後培養液，持續 5~7 天就會有肌管細胞的生成。圖 2-1 (b) 是分化 10 天後肌管細胞的形貌。肌肉細胞會從單核的肌母細胞演變成多核的肌管細胞，細胞的形貌也由紡錘狀轉為長柱狀。







**圖 2-1 骨骼肌細胞影像**

(a) 肌母細胞。 (b) 肌管細胞。將肌母細胞培養在分化後培養液 10 天後的影像。兩種時期細胞的個體大小差異很大，並且形貌上會從紡錘狀轉變成柱狀形。

## 2-2 雞胚胎心肌細胞 (chicken embryo cardiomyocyte) 之培養流程

實驗上使用的細胞為初代培養細胞 (primary cell culture)<sup>39</sup>。與細胞株不同的地方在於初代培養細胞是直接從生物體中取出的細胞，他的形貌、狀態與活性更接近活體但是缺點是細胞只能培養一小段時間，因此必須時常從生物體上取用。

步驟 1：製備培養液 Barry's salt solution。由五種不同的溶液混合成。以下為此五種溶液的配方：

Solution A (500 ml): NaCl 33.895 g + KCl 440 mg + MgSO<sub>4</sub> 481.5 mg +  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 600 mg + 500 ml H<sub>2</sub>O

Stock solution (50 ml):

1. KCl (2.0 M) : 7.45 g
2. CaCl<sub>2</sub> (0.2 M) : 1.11 g
3. Glucose (10X) : 5 g
4. NaHCO<sub>3</sub> (7.5 %) : 3.75 g

最後將 50 ml Solution A + 12.34 ml solution 4. + 0.33 ml solution 1. + 5 ml solution 3. + 380 ml H<sub>2</sub>O 混合均勻，再將 2.175 ml solution 2. 加入 50ml H<sub>2</sub>O，緩緩滴入上述溶液，配出 500 ml 的 Barry's salt solution。

步驟 2：由雞蛋尖端處敲碎蛋殼，倒出受精後第 11 天的雞胚胎於 10 cm 的培養皿 (cell culture dish, 430167, Corning, USA) 中，使用剪刀與鑷子取出心臟後移除週邊的組織，將心臟至於 Hanks' balanced salt solution (HBSS, 14175, Invitrogen, U.S.A.) 的培養皿中，破壞細胞間的聯結，使細胞各自分離。



步驟 3：將心臟用剪刀剪至 1~2 mm 小塊後，置入 50 ml 離心管，加入 8~10 ml TS，接著拿到 37°C 水浴槽加熱 8 分鐘。

步驟 4：將上層懸浮液移至另一個 50 ml 離心管，加入 15 ml TSS (trypsin stop solution, Invitrogen, U.S.A.)後，在 1200 rpm、4°C 的條件下離心 5 分鐘，移除上清液，在加入 5 ml TSS，重複上述步驟 5 次。最後一次離心之後，再加入 5 ml TSS，接著用 70  $\mu$ m 的濾膜 (strainer, 352350, BD Falcon, U.S.A.) 濾至 50 ml 離心管。

步驟 5：同樣的條件離心 5 min 後，移除上清液，用 20 ml 培養液回溶，接著倒入 10 cm 培養皿中，將培養皿放入培養箱 45 min。

步驟 6：將靜待 45 min 後的培養皿取出，吸取懸浮液並將液體移至 50 ml 離心管離心 5 min 後，移除上清液，再加入 3 ml 培養液，分裝至數個玻璃式培養皿，置入細胞培養中培養。

步驟 7：經 12~18 小時後更換新的培養液。之後每三天換一次培養液。實驗上使用的細胞約在此階段後的 4~6 天，細胞密度與個體的大小都如圖 2-2 所示。

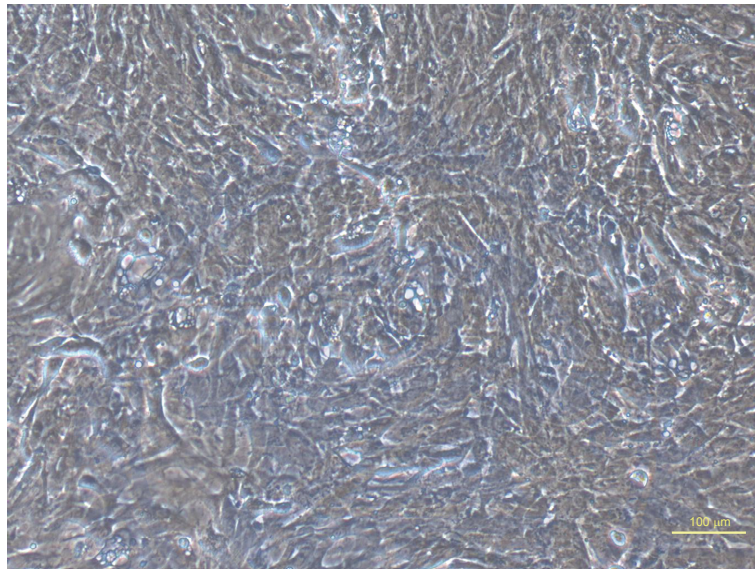


圖 2-2 雞胚胎心肌細胞影像

由受精後 11 天的雞胚胎取下的心肌細胞，以細胞密度  $10^5$  cells/ml 種在培養皿  
4 天後的情形。

## 2-3 二倍頻 (second-harmonic generation, SHG) 系統的架設與調整方式

整套系統的設置如圖 2-3。我們使用鈦藍寶石脈衝雷射 (Ti-Sapphire laser, Tsunami broad band fs, Spectra-Physics, U.S.A.) 做為激發光源。鈦藍寶石脈衝雷射由一台最大功率為 10 W，雷射波長為 532 nm 的固態雷射 (Millennia X, Spectra-Physics, U.S.A.) 做為驅動光源 (pump source)。鈦藍寶石脈衝雷射的波長可在 700~1000 nm 之間調節，調整的方式是藉著改變光程與狹縫的位置選取出我們所需的波長。鈦藍寶石脈衝雷射有兩組藍色與綠色旋鈕，分別可以改變正下方鏡面架水平與垂直傾斜的角度。裝設在此鏡架上的高反射係數鏡面，會反射共振腔內所有的光源，包含雷射與螢光。轉動旋鈕改變鏡面的角度，會造成來回穿梭的光路徑長度改變 (圖 2-4 (a))。而鈦藍寶石晶體產生的螢光，在共振腔內會經過由 4 個稜鏡組成的稜鏡對壓縮器 (prism-pair compressor)，雷射光通過第一面稜鏡會有散色現象，延伸成一條垂直於行徑方向的線前進，到達第二面稜鏡時散色的光源受到補償，形成一條不再發散的光，並且會照著波長依序排列 (圖 2-4 (b))。利用一組可調位置的狹縫做篩選，挑出我們需要的波長，之後光源又依照相反的方式由直線變成點光源前進。在此選用 810 nm 最為激發光源。調整雷射輸出波長的方式如下：

1. 首先在雷射出口處放置雷射功率計並反射部份雷射光引入光譜儀 (USB2000, Ocean Optics, U.S.A.) 的光纖。
2. 以有輸出雷射脈衝為前提下，調控狹縫的位置使輸出的雷射波長靠近我們所需要的波長。
3. 轉動 Tsunami 上方的調節器。每次僅調整單一方向(相同顏色的調節器)讓雷射功率上升。在此過程中雷射波長也會有所改變。

4. 不斷的重複步驟 2、3 一直到雷射輸出最大功率。
5. 最後按下 Model 3930 上的 Lock 鍵，發光二極體指示燈固定在一點定點上不隨意移動即可。

鈦藍寶石脈衝雷射產生的雷射引進 FV 300 共焦顯微鏡前會先經過電光調製器(electro optical modulator, EOM, 360-80, Conoptics, U.S.A.)。在此使用電光調製器的目的和使用光學遮斷器的功能相似，藉由改變雷射的極化方向，讓特定極化方向的雷射通電光調製器，使雷射強度有規律性的變化，過這個動作我們稱為調變 (modulate)。電光調製器在使用上先將它固定在自製的固定座，固定座上有兩組固定環可以調整電光調製器頭尾的擺設方向、傾斜角以及 Z 方向的旋轉角度 (圖 2-5 (a,b))。這裡需要特別注意，電光調製器上有一個開口 (圖 2-5 (c))，用來反射不同極化方向的雷射光，因此在調整的過程中要避免反射的光直射眼睛。調整的方式如下：

1. 降低雷射功率，在校正過程中雷射的能量要控制在 200 mW 以下，因為過高的雷射功率在調整的過程中很有可能讓儀器內部光學元件受損。
2. 在電光調節器後架設功率計測量通過後雷射的功率。
3. 調整固定夾的位置與 Z 方向的旋轉角度，讓輸出的雷射功率達到最大值。
4. 轉動電光調製器約 45°旋轉角後即完成。

連接電光調製器上的 REF IN、REF OUT 與 Volt. 到電壓功率放大器 (high voltage power amplifier, Model 25D, Conoptics, U.S.A.)，連接方式如圖 2-6。電壓功率放大器最多可以同時與兩台電光調製器一起使用，Volt. 選擇任何一個 Bias 連結即可。接著設定任意波型產生器 (arbitrary waveform generator, AFG3022B, Tektronix, U.S.A.)，它可以同時輸出兩組訊號。其中一個通道設定脈衝頻率為 1.3~1.6 MHz，最高電壓值設定在 3.5 V，最低電壓值設定在 0 V，之

後接到電壓功率放大器的“VIDEO INPUT”。另一通道脈衝頻率設定相同，電壓最高值設定在 0.5 V，最低設定在 0 V，之後接到鎖相放大器上的“reference input”。電壓功率放大器主要有兩個調節環(圖 2-6)：驅動電壓 (drive voltage) 與偏壓電壓 (bias voltage)。轉動「偏壓電壓」調節環使雷射經過電光調節器後輸出最低功率。接著再調整驅動電壓，設定實驗需要的雷射功率即可。電壓功率放大器輸入的電壓閾值為 3 V，當輸入電壓低於 3 V 時，驅動電壓將不會影響雷射通過電光調節器的功率。

最後雷射會經過四分之一相差板 (quarter wave plate, WPQ05M-808, Thorlabs, U.S.A.)，將線性偏極光轉換成橢圓偏極光。因為產生倍頻訊號分子的偶極方向與雷射極化方向的夾角，會影響二倍頻訊號的強度，因此我們將雷射的極化方向由線性轉成圓形，避免此因素的影響。

共焦倒立式顯微系統 (FV300, Olympus, Japan) 裡使用雙色性濾光鏡 (780 DCSPXR, AHF, Germany)，搭配物鏡為 60 倍水鏡 (UPLSAPO 60XW, N.A. = 1.20, Olympus, Japan)。產生的二倍頻訊號由 N.A. 0.55 的聚光鏡 (condenser) 收集訊號後經過雙色性濾光鏡 (HQ560LP, Chroma, U.S.A.) 讓波長大於 560 nm 的光穿透，反射二倍頻的訊號到光電倍增管 (PMT, H7422-40, HAMAMATSU, Japan)，光電倍增管前方裝有濾片 (SP01-785RU, and FF01-405/10, Semrock, U.S.A.)，收光的波長在 400~410 nm。偵測到的訊號先經過訊號放大器 (pre-amplifier, DHPKA-100, Femto, Germany)將光電倍增管輸出的電流轉換成電壓並且放大訊號，接著傳送至鎖相放大器 (lock-in amplifier, SR844, Stanford Research System, U.S.A.) 將得到的訊號解調 (demodulate) 後，傳送至電腦軟體 (Fluoview, Olympus, Japan) 繪製出影像。

實驗上的參數設定統整在表 2-1。

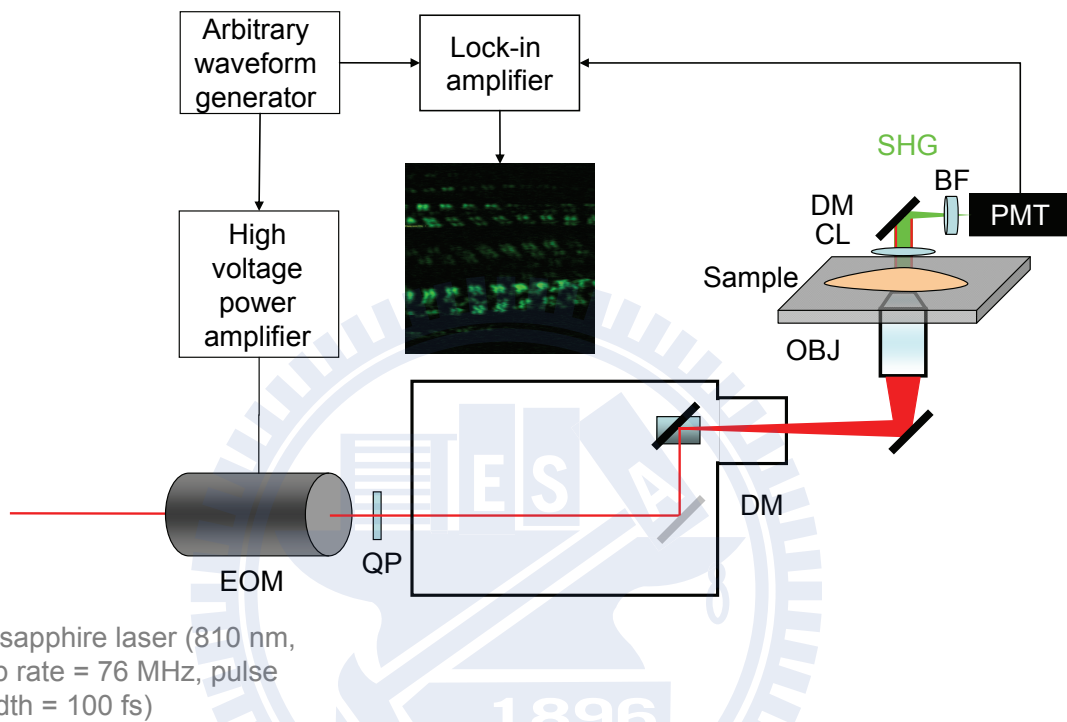


圖 2-3 二倍頻雷射掃瞄影像系統與電光調製器之配置示意圖

EOM: electro optical modulator. QP: quarter wave plate. OBJ: microscopic objective.

CL: condenser lens. DM: dichroic mirror. BP: band-pass filter. SHG:

second-harmonic generation. PMT: Photomultipliers.



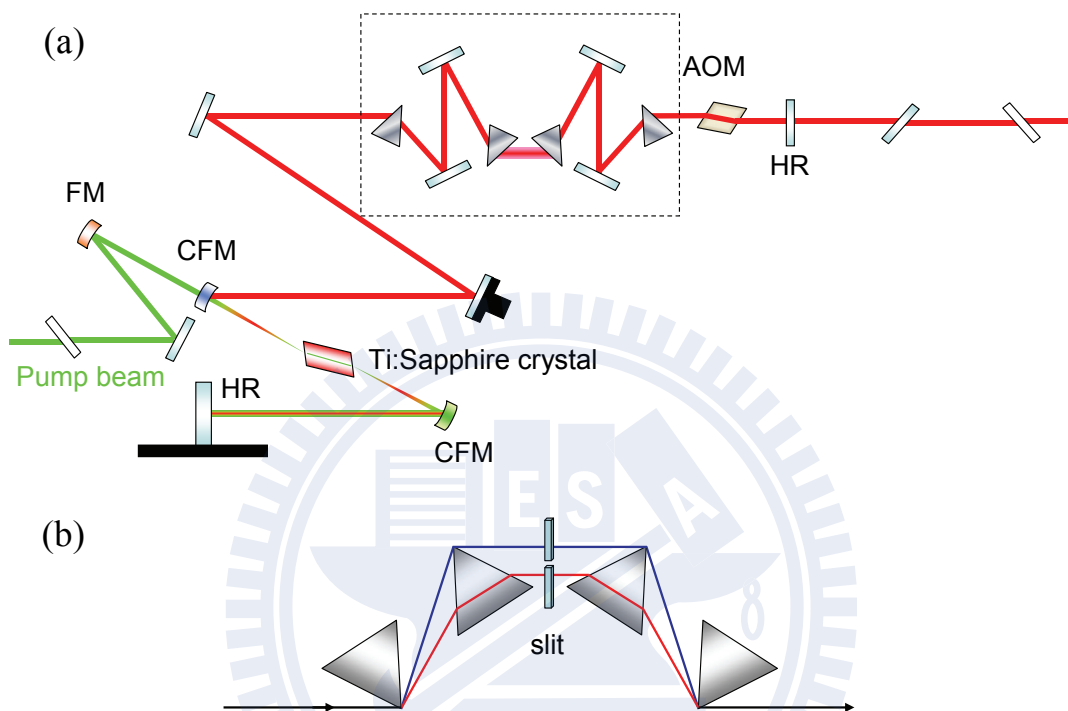


圖 2-4 鈦藍寶石脈衝雷射 (Tsunami) 內部光路圖

(a) FM: focus mirror. CFM: cavity focus mirror. HR: high reflector. AOM: acousto-optical modulator. (b) 譜帶較寬的光源經過稜鏡，因不同波長的折射率不同，因此點光源就被發散成線光源。在經過另一個稜鏡將發散的光矯正回平行光。由狹縫選擇通過的波長，再縮成點光源。

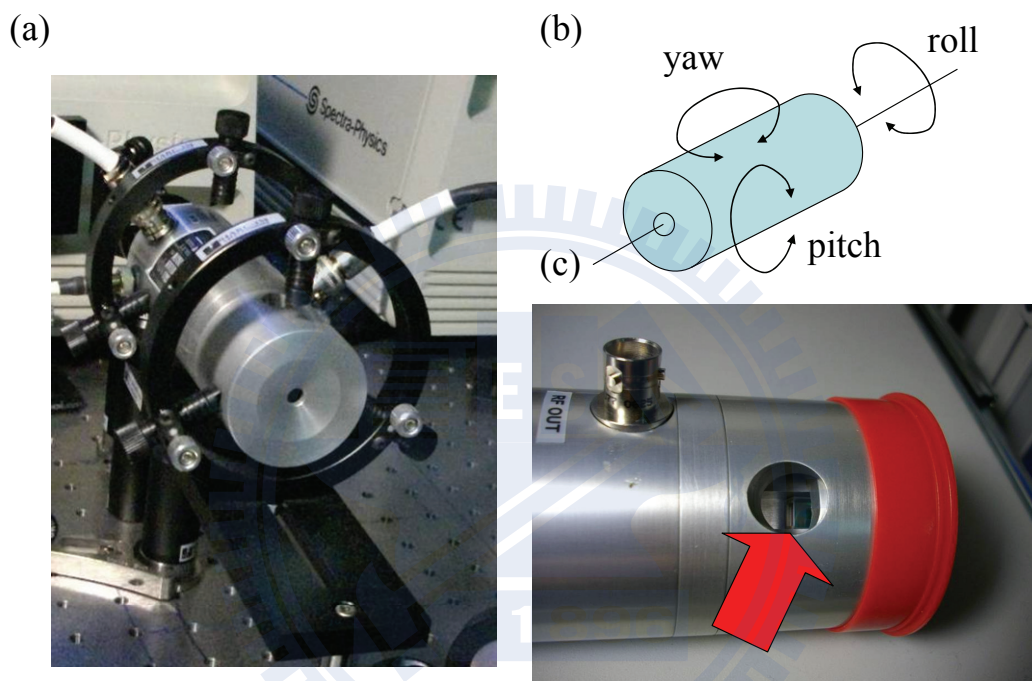


圖 2-5 電光調製器 (electro optical modulator)

(a) 電光調製器自製固定座。前後各有三個懸軸支撐。(b) 在調整電光調製器的過程中，必須要注意到的三種旋轉向量。(c) 反射不同極化方向的窗口。內有偏光晶體。





圖 2-6 電光調節器與電壓功率放大器

上層為電光調節器，中、下層是電壓功率放大器的背面與正面圖。電壓功率放大器 VIDEO INPUT 的位置有描述限制電壓大小在 1 V<sub>p.p</sub>。這是與同步計數系統 (synchronous countdown system) 一併使用時，需要注意輸入的類比訊號值，與本次實驗無關。

表 2-1 實驗參數

<b>Arbitrary waveform generator</b>	
Channel 1 connect to high voltage power amplifier	
Frequency	1.3 ~ 1.6 MHz
Voltage	0 ~ 3.5 V
Channel 2 connect to lock-in amplifier	
Frequency	1.3 ~ 1.6 MHz
Voltage	0 ~ 0.5 V

<b>FV300</b>	
scan size	2048 × 2048
scan speed	slow
zoom in	7 ~ 10

<b>PMT</b>	
Gain	0.8

<b>Pre-amplifier</b>	
Gain setting (low noise)	$10^4$ V/A

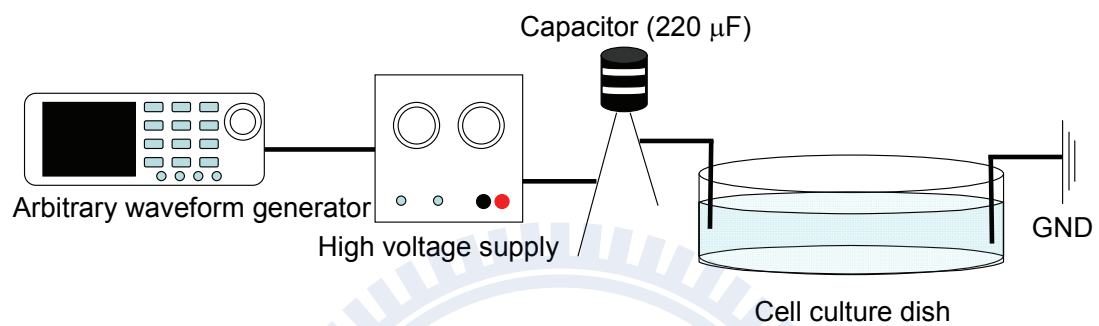
<b>Lock-in amplifier</b>	
Time constant	100 ms
Sensitivity	10 mV

<b>Laser power</b>	
Millennia	7 W
Output power (810 nm)	350 ~ 410 mW
Before EOM	350 ~ 410 mW
After EOM (bias voltage)	3 ~ 4 mW
After EOM ( bias voltage + drive voltage )	176~207 mW
Before objective	16 mW

## 2-4 電刺激的裝置設計

骨骼肌細胞株不會有自發性收縮，為了使細胞有收縮現象，我們對細胞施加固定頻率的脈衝電壓。當細胞受到電的刺激後會造成細胞膜內外電位差的改變，刺激肌質網釋放鈣離子使細胞質中鈣離子濃度上升，鈣離子將會與 myosin 鍵結改變構形，讓肌動蛋白上的結合位置露出使肌凝蛋白可以銜接，進行橫橋週期 (cross-bridge cycle) 一連串的肌肉動作。

實驗裝置如圖 2-8。任意波形產生器電壓輸出值設定在 5 V、脈衝寬度 (pulse width) 設為 30 ms。輸出的電壓透過客製的電壓放大器 (Instrument Technology Research Center, Taiwan) 增強電壓並由三用電錶測量得知最後輸出的電壓為 53 V。在刺激的過程中，為了避免培養液遭電解，我們在裝置上加裝 220  $\mu\text{F}$  的電容器位於電壓放大器與電極間<sup>40</sup>，並挑選鉑線做為電極。實驗時將電極浸泡在培養液裡，但要小心避免刮到底層的細胞，否則實驗時會有細胞集體漂浮的現象。



**圖 2-7 電刺激骨骼肌細胞裝置圖**

首先由波形產生器產生訊號，經過電壓放大器增強電壓再導入培養液。假使實驗進行超過數十小時，會有培養液蒸發的情形，會導致電極端未末入液面，此時就需要再添加回溫的培養液。

## 2-5 實驗前的環境控制與樣品量測方法

為了在實驗的過程中確保細胞正常的機能，我們在顯微鏡平台上方架設二氧化碳培養箱 (CO<sub>2</sub> incubator, MIU-IBC, Olympus, Japan)，比照細胞生存的環境。因為二氧化碳培養箱的上蓋會引響到二倍頻訊號的接收，所以上蓋加熱器的部份就沒有使用，改以自製的厚紙板罩蓋住。細胞最理想的生存溫度在 37°C，為了達成此溫度我們將底盤加熱器設定在 37 °C，物鏡加熱器也調整到 37°C，水域槽的溫度控制在 45°C 並在實驗時之前以 5% 二氧化碳混合氣體置換周圍空氣。

當控制好環境後即可將樣品移入。因為四周的光學零件較多，在放入樣品時要非常小心。由於聚光鏡的位置無法任意的移動而且培養箱放置培養皿的空間很小，所以建議使用鑷子為輔助移取樣品，避免碰撞到聚焦鏡上的雙色性濾光鏡。掃描樣品時為了減少對樣品的傷害，會先掃描範圍較大的區域選擇適合的位置後再進一步以高取樣數做較精緻的掃描。細胞的二倍頻訊號強度很小不易觀察，而且細胞的厚度僅不到 5 μm，移動焦點的位置不能改變太快不然容易錯失訊號。接下來改變參數得到一張清晰的影像，從影像上判斷肌小節的方向並畫上掃描區域就可以開始做長度對時間的線性掃描。



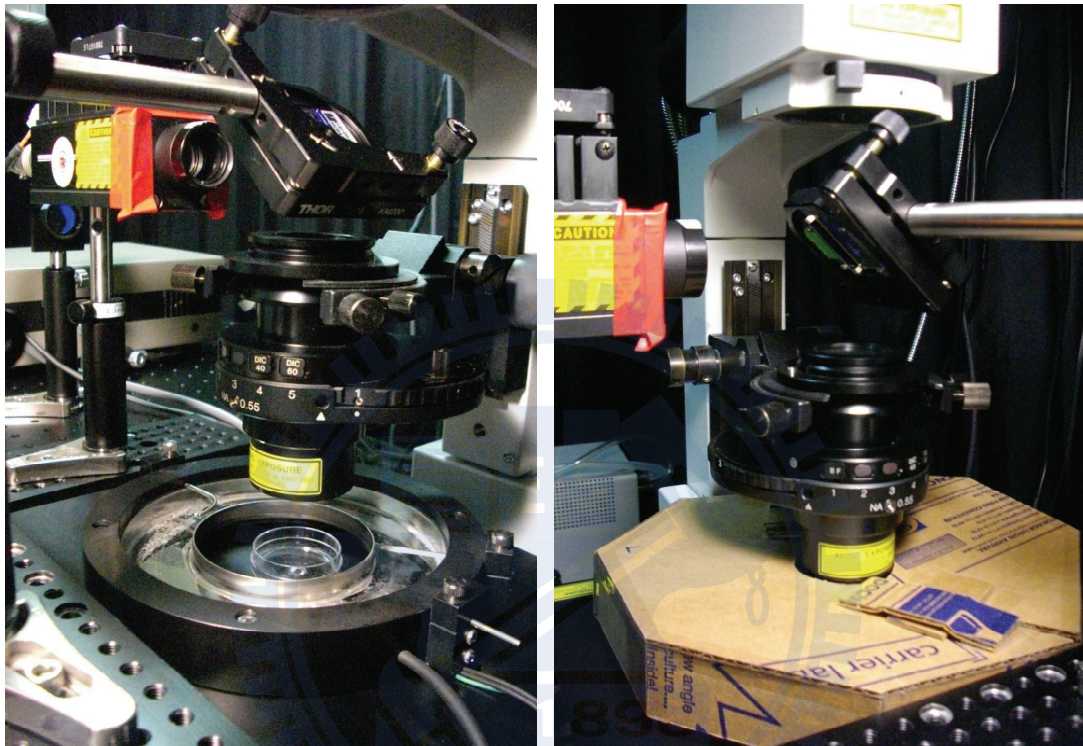


圖 2-8 二氧化碳培養箱與自製的上蓋

左圖為二氧化碳培養箱架設在顯微鏡移動平台上。右圖是自製的上蓋，可覆蓋於整個二氧化碳培養箱。因為二倍頻訊號需要由平台上方的聚光鏡收集，因此我們沒有使用培養箱的上蓋，改以自製的蓋子取代。刻意在上蓋的中央挖空，讓整體環境更加緊密，確保實驗過程溫度與二氧化碳的穩定，避免環境上的改變造成實驗上的誤差。

## 2-6 影像轉換為數據的方法

在本實驗中，我們最後取的資料皆為影像，因此在數據分析之前需要先將影像的顯現的強度轉換為數值。整個流程如圖 2-9 所示。首先，使用「Image-Pro Plus」繪圖軟體，將得到的圖像先以 12 bits 灰階顯示【Edit】→【Convert To】→【Gray Scale 12】，之後選擇【Measure】→【Bitmap Analysis】轉為數值大小後匯出至「Origin 8」。從選單【Worksheet】→【Convert to Matrix】將數據轉為矩陣。接著執行【Plot】→【Contour】→【Profiles】即可將矩陣重新繪圖，並且可由上方的 cross section 得知波峰的位置。記錄每一個時間軸的波峰位置，在將紀錄的數據依照時間做圖，即可重新繪製成二倍頻訊號位置隨時間改變的關係圖。





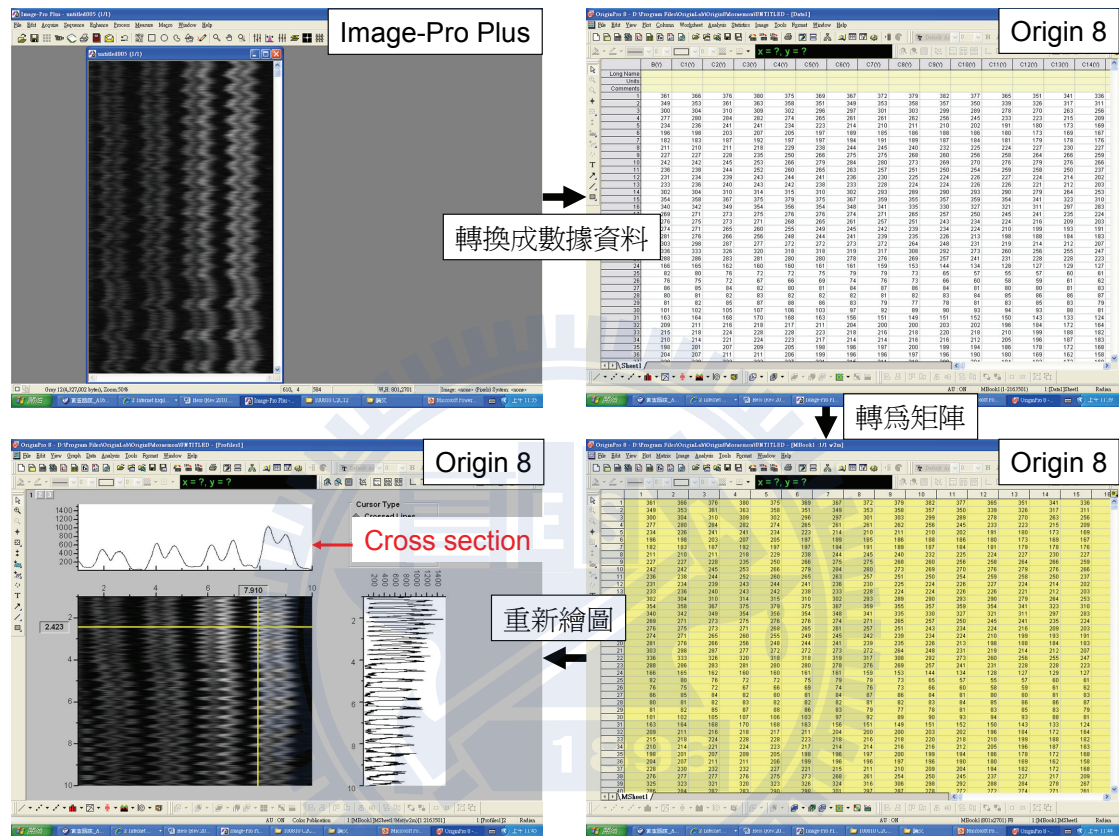


圖 2-9 影像數據化過程

先將三原色的影像轉化灰階後，將強度值匯入 Origin 8。利用 Origin 8 將數據換成矩陣重新繪圖，最後取出各點的波峰值，紀錄後再重新繪圖。

## 第三章、結果與討論

### 3-1 使用鎖相放大器技術對於影像的訊號雜訊比之影響

首先我們改變各種不同調變頻率，比較訊雜比的變化，並觀察使用鎖相放大器對於訊雜比的提升。實驗上選擇易測量訊號的螢光染劑-R6G (R634, Invitrogen, U.S.A.) 做為樣品，測量雙光子激發螢光的強度。螢光訊號強度即為光電倍增管測量之訊號強度扣除背景值所得。雜訊的部份以水做為樣品，水本身不含螢光訊號，所以測量到的強度為背景值，訊號的擾動量代表雜訊。實驗時將雷射的功率設定在 20 mW，測量訊號雜訊比。之後開啟電光調節器，調節頻率設定在 1 kHz ~ 2 MHz，工作週期為 50%，雷射平均功率同樣為 20 mW，鎖相放大器上時間常數的設定值為調控頻率倒數的 3~6 倍。取樣率在有使用鎖相放大器時設定為時間常數的 2 倍，未使用的情形下每秒取 5000 筆資料。結果顯示在表 3-1。頻率 1 kHz ~ 20 kHz 使用的鎖相放大器 (SR830, Stanford Research Systems, U.S.A.) 與頻率 50 kHz ~ 2 MHz 使用的鎖相放大器 (SR844, Stanford Research Systems, U.S.A.) 不同，因為儀器上的限制所以必須使用兩種不同型號的鎖相放大器。從結果顯示，在設定調節頻率 20 kHz 與 50 kHz 之間有明顯訊雜比的差距，很有可能是因為使用不同儀器造成的結果。調節的頻率越高，訊雜比的值反而越低，此結果或許是儀器在如此高頻的情形下，電光調節器或是任意波形產生器產生額外的雜訊。儘管如此，使用鎖相放大器可以提升約 1127~11551 倍。

得到頻率與訊雜比的關係後，我們改變波形產生器的工作週期 (duty cycle)，觀察不同工作週期對於訊雜比的影響。如圖 (3-1)。脈衝持續時間會影響電壓功率放大器的運作，當波形產生器輸入的電壓值達到電壓功率放大器的閾值時它才會去控制電光調節器，調整雷射在電光調節器內穿透與反射的比例，造成不同輸出功率。實驗上以相同功率的雷射引進電光調節器，改變工作週期輸出不同雷射功率，在脈衝強度皆相同的情況下，觀察訊雜比的影響。最後由圖 3-2 顯

示工作週期設定在 40% 時，相同脈衝強度下以較短脈衝持續時間激發樣品，得到最佳的訊雜比，減少雷射對於樣品的破壞。



Modulation frequency	Signal of R6G	S.D.	Signal of water	S.D.	S/N
1k	2.23	$1.6 \times 10^{-2}$	$3.8 \times 10^{-3}$	$1.2 \times 10^{-3}$	1866.7
2k	2.19	$1.8 \times 10^{-2}$	$1.3 \times 10^{-3}$	$7.9 \times 10^{-4}$	2768.6
5k	2.19	$2.1 \times 10^{-2}$	$1.5 \times 10^{-3}$	$7.9 \times 10^{-4}$	2772.2
10k	2.15	$3.4 \times 10^{-2}$	$4.0 \times 10^{-3}$	$9.7 \times 10^{-4}$	2214.2
20k	2.15	$3.58 \times 10^{-2}$	$1.4 \times 10^{-3}$	$8.5 \times 10^{-4}$	2529.4
50k	1.17	$3.2 \times 10^{-2}$	$1.2 \times 10^{-3}$	$1.3 \times 10^{-3}$	900
100k	1.14	$3.2 \times 10^{-2}$	$1.1 \times 10^{-3}$	$1.2 \times 10^{-3}$	950
200k	1.06	$3.1 \times 10^{-2}$	$7.6 \times 10^{-4}$	$1.1 \times 10^{-3}$	963.6
500k	0.89	$3.1 \times 10^{-2}$	$3.2 \times 10^{-3}$	$2.3 \times 10^{-3}$	387.0
1M	0.54	$2.2 \times 10^{-2}$	$4.7 \times 10^{-3}$	$1.7 \times 10^{-3}$	317.6
2M	0.46	$1.6 \times 10^{-2}$	$3.9 \times 10^{-2}$	$1.7 \times 10^{-3}$	270.6
non	$9 \times 10^{-5}$	$7.3 \times 10^{-4}$	$8.9 \times 10^{-4}$	$3.7 \times 10^{-4}$	0.24

表 3-1 不同調控頻率的訊雜比

在相同的樣品濃度與雷射功率下，比較不同調控頻率對於訊雜比的影響。最下面一欄是沒有使用鎖相放大器時得到的訊號強度。使用鎖相放大器在調節頻率 2MHz 時訊雜比依然提升 1127 倍。

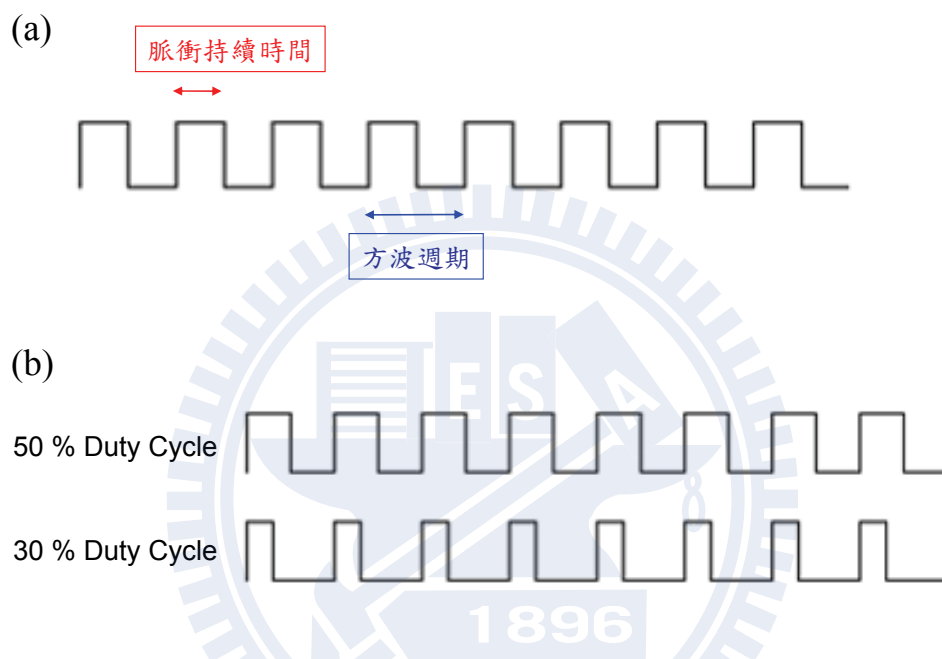


圖 3-1 工作週期

(a) 工作週期是指產生的脈衝訊號經歷高電壓的時間週期與脈衝週期的比例。(b) 相同頻率下不同的工作週期輸出的方波。

Duty cycle	Signal of R6G	S.D.	Signal of water	S.D.	S/N
20%	0.24	$3.8 \times 10^{-2}$	$5.5 \times 10^{-2}$	$1.9 \times 10^{-2}$	12.6
30%	0.35	$4.5 \times 10^{-2}$	$5.7 \times 10^{-2}$	$1.9 \times 10^{-2}$	18.4
40%	0.45	$4.9 \times 10^{-2}$	$9.0 \times 10^{-2}$	$1.9 \times 10^{-2}$	23.7
50%	0.43	$5.0 \times 10^{-2}$	$6.3 \times 10^{-2}$	$1.9 \times 10^{-2}$	23.6
60%	0.45	$5.2 \times 10^{-2}$	$6.1 \times 10^{-2}$	$1.9 \times 10^{-2}$	23.7
70%	0.42	$5.6 \times 10^{-2}$	$8.0 \times 10^{-2}$	$1.9 \times 10^{-2}$	22.1
80%	0.29	$6.1 \times 10^{-2}$	$4.3 \times 10^{-2}$	$1.9 \times 10^{-2}$	15.3

表 3-2 工作週期對於訊雜比的影響

相同脈衝強度下，工作週期設定在 40% 可以得到最佳的訊雜比。雖然工作週期設定在 60% 可以得到相同的訊雜比，但是雷射輸出功率大，對生物樣品的破壞性相對也較高。

### 3-2 雷射光掃描技術與鎖相放大器技術之結合

要將兩種技術結合，首先要先了解各個參數設定代表的意義與使用上的限制。共焦顯微技術控制程式“Fluoview”有三種參數與掃描影像的面積或掃描時間有關，分別為像素面積 (scan size)、掃描速度 (scan speed) 與顯示放大 (zoom in)。像素面積代表一張影像由多少像素組合成，因掃描每單位像素需要花費的時間是相同的，所以越多像素組成的影像需要越久的時間。而像素面積與掃描所得的影像大小無關，但卻會影響最後取得影像的解析度，若像素面積越大則影像解析度越好。當每單位像素的面積大於光學解析極限時，影像的解析度即由單位像素的面積決定，反之則由光學解析度決定。

掃描速度會影響掃描每單位像素面積所需要的時間，掃描速度越快雜訊越高。如：一張像素面積為  $512 \times 512$  的影像最快只需要 0.25 秒，最慢則需要 2.71 秒。

顯示放大跟掃描影像的實際範圍有關，範圍由 1 到 10。參數設定在 1 時掃描範圍最大，其餘的掃描面積大小依照最大面積除以設定的參數值。例如使用 60 倍物鏡，顯示放大設定為 1，得到一張影像邊長為  $235 \mu\text{m}$ ，若更改為 5，則影像的邊長為  $47 \mu\text{m}$ 。顯示大會影響實際掃描的面積，因此也會影響像素的解析度。

鎖相放大器的時間常數值會影響到數據的處理時間。時間常數值設定為  $100 \mu\text{s}$ , 12 dB 的條件下，訊號更新速率大約 12-24 kHz，大約  $50 \mu\text{sec}$  改變一次，對於共焦顯微技術而言，若以像素面積:  $512 \times 512$ ，顯示放大: 1.0，掃描速度: 慢，60X 物鏡，一張  $235 \mu\text{m} \times 235 \mu\text{m}$  影像為實驗條件下，鎖相放大器輸出一個訊號的間隔時間，影像已經掃描  $2.22 \mu\text{m}$ ，從影像上觀察會有 5 組相鄰的像素顯示相同的訊號強度，也代表此時解析度為  $2.22 \mu\text{m}$ 。在這種實驗條件下得到的影像，它的訊號雜訊比跟未使用鎖相放大器的共焦顯微影像，其值較大，但是因為



解析度的關係影像看起來卻較為模糊。若是將像素面積的大小調整成  $2048 \times 2048$ ，其餘不變，則此時的解析度為  $0.67 \mu\text{m}$ 。改變顯示放大設定為 10，像素面積:  $512 \times 512$ ，解析度為  $0.45 \mu\text{m}$ ；像素面積:  $2048 \times 2048$  時，此理論的解析度為  $0.13 \mu\text{m}$ 。 $0.13 \mu\text{m}$  已經低於光學解析度，影像上看起來也不會有因為使用鎖相放大器造成失真的問題。

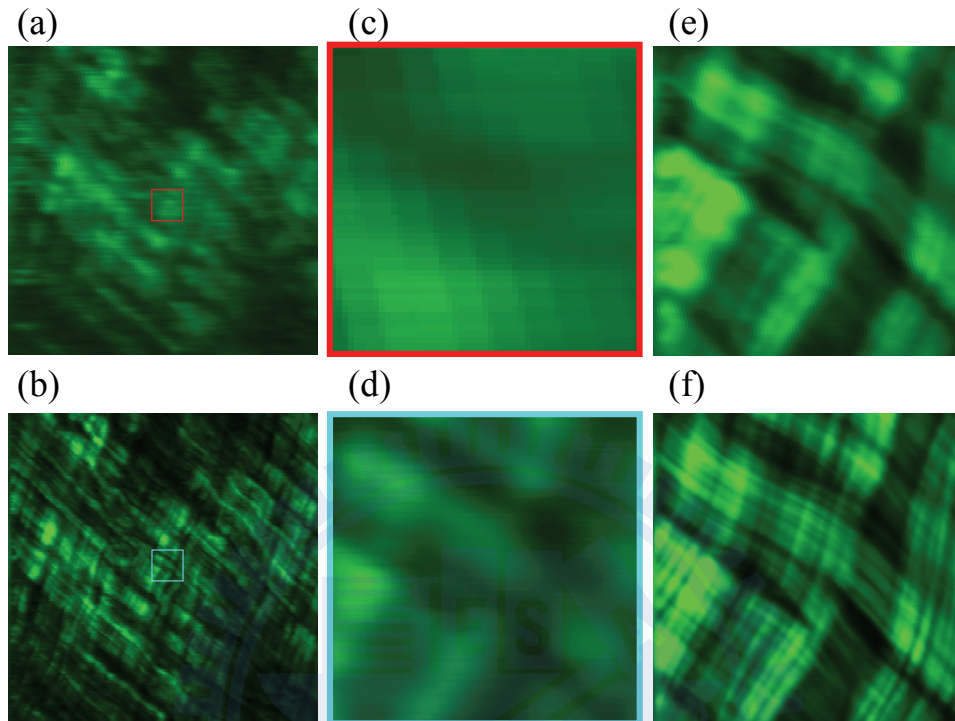
在實驗上要掃描一張範圍較大的影像，建議使用像素面積:  $2048 \times 2048$ ，顯示放大: 5~10，掃描的影像邊長約  $117.5 \sim 23.5 \mu\text{m}$  所需時間一張約 36 秒。不限掃描的範圍時像素面積:  $512 \times 512$ ，顯示放大: 10 影像邊長  $23.5 \mu\text{m}$  一張影像需要的時間約 3 秒，可以較快得到一張影像。

將上述分析的結果以實際的樣品進行測試，樣品使用老鼠尾巴組織切片以不同的參數進行掃描，獲取二倍頻訊號影像。首先以像素面積:  $512 \times 512$ ，顯示放大: 1.0，掃描速度: 慢，60X 物鏡進行掃描，掃描一張邊長  $235 \mu\text{m}$  影像需要 2.71 秒，影像上的解析度為  $2.22 \mu\text{m}$ 。得到的影像只能初略看出老鼠尾巴有呈現絲狀的二倍頻訊號(圖 3-2 (a))。將像素面積調整成  $2048 \times 2048$ ，其餘的參數不變，一張影像需要花費 35.9 秒。得到的結果如圖 3-2 (b)。此張影像可以比較清楚的觀察到細絲狀的結構，解析度為  $0.67 \mu\text{m}$ 。將得到的兩張影像放大十倍後，觀察正中央  $23.5 \mu\text{m}$  內的影像 (圖 3-2 (c, d)) 與顯示放大設定 10 做比較(圖 3-2 (e, f))。圖 3-2 (e) 像素面積:  $512 \times 512$ ，顯示放大: 10，掃描速度: 慢，影像的邊長為  $23.5 \mu\text{m}$ ，掃描時間為 2.71 秒，此時解析度為  $0.45 \mu\text{m}$ ，與圖 3-2 (d) 做比較，當解析度越高看到的影像將越清晰。圖 3-2 (f) 像素解析度高達  $1.15 \times 10^{-2} \mu\text{m}$ ，已低於光學解析度，所得影像的畫面最清晰。藉由這六張影像的結果，了解像素面積選用越大或掃描整張影像的範圍越小，所得到的影像越清晰。

到目前為止，已經知道使用鎖相放大器有助於訊號雜訊比的提升，也統整出雷射光束掃描技術與鎖相放大技術一起使用時，最佳的參數設定。最後我們藉由掃描得到的影像，了解鎖相放大技術對訊雜比的提升。樣品同樣使用老鼠尾巴組織切片進行二倍頻訊號影像掃描。結果如圖 3-3 所示，將二倍頻影像進行訊號

強度的分析，沒有使用鎖相放大技術的分析結果顯示二倍頻訊號的強度幾乎比雜訊還小，訊號上下擾動的起伏已經嚴重影響對於二倍頻訊號強度的判斷。使用鎖相放大技術後的結果顯示真正的二倍頻訊號經由鎖相放大器的放大後，已比雜訊來的大。由以上的結果很清楚的說明使用鎖相放大技術對於訊雜比的提升。





**圖 3-2 不同的參數掃描同一個樣品得到的二倍頻影像**

樣品使用含有豐富膠原蛋白的老鼠尾巴組織切片進行掃描 (Laser power: 7 mW; scan speed: slow; time constant: 100  $\mu\text{m}$ ; sensitivity: 10 mV)。(a) 像素面積：512  $\times$  512，顯示放大：1，影像大小：235  $\mu\text{m}$ 。(b) 像素面積：2048  $\times$  2048，顯示放大：1，影像大小：235  $\mu\text{m}$ 。(c) 將圖 (a) 的影像放大 10 倍後，觀察正中間 23.5  $\mu\text{m}$  的影像。(d) 將圖 (b) 的影像放大 10 倍後，觀察正中間 23.5  $\mu\text{m}$  的影像。(e) 像素面積：512  $\times$  512，顯示放大：10，影像大小：23.5  $\mu\text{m}$ 。(f) 像素面積：2048  $\times$  2048，顯示放大：10，影像大小：23.5  $\mu\text{m}$ 。相同影像大小，像素越多解析度越高，得到的影像越清晰。

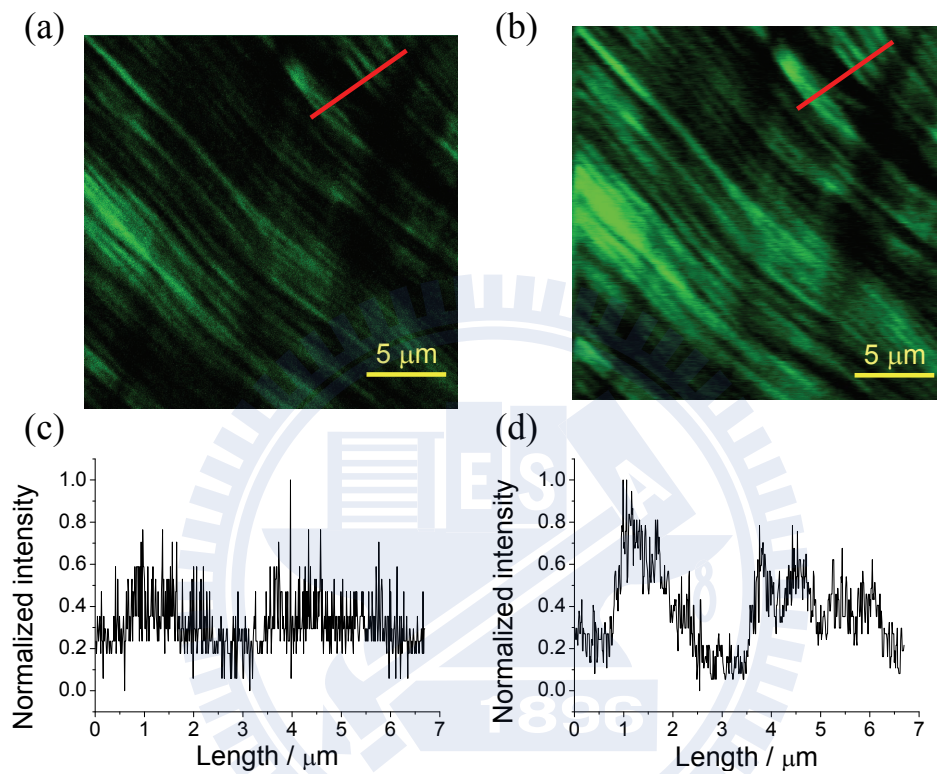


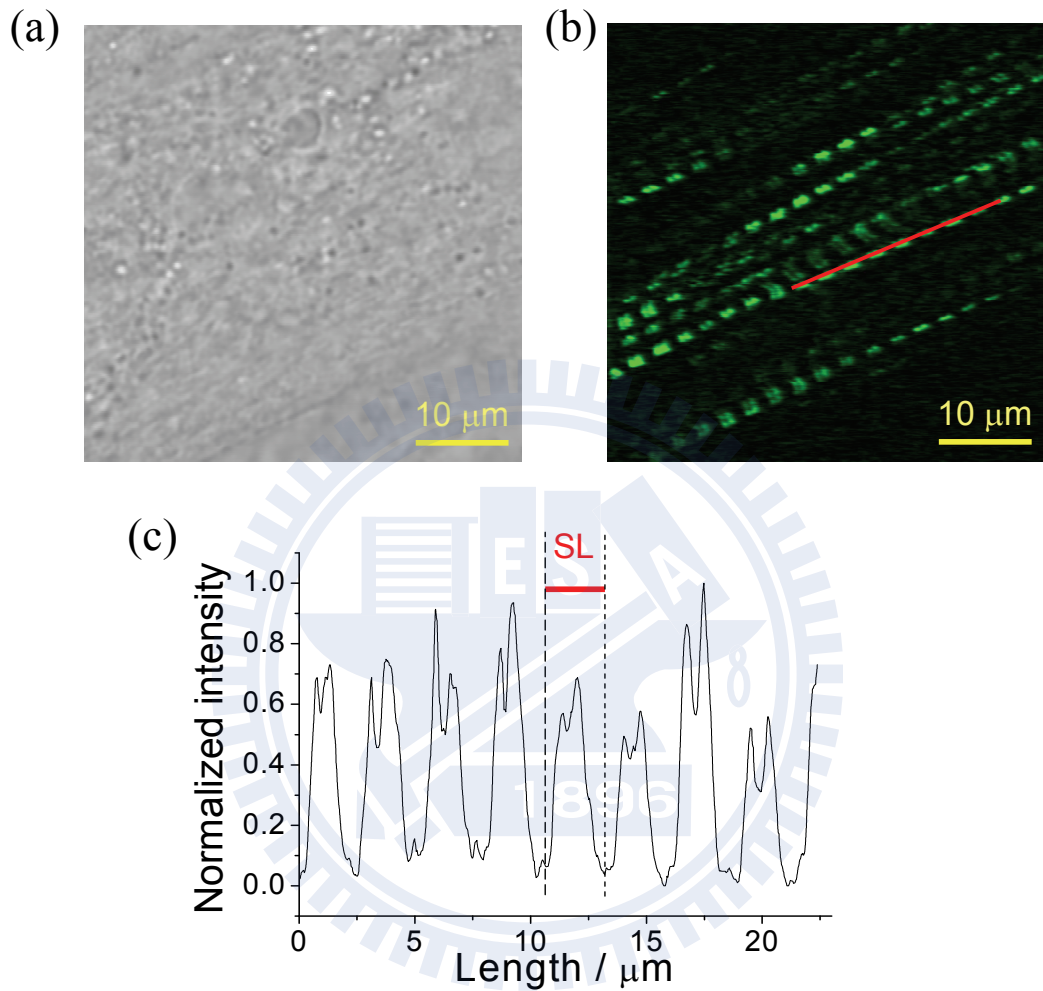
圖 3-3 老鼠尾巴組織切片的二倍頻影像

(a) 未使用鎖相放大器得到的結果。(b) 相同的位置在使用鎖相放大器後得到的影像。(c, d)分別對紅線位置作強度的分布。由 (c, d)的結果可以得知使用鎖相放大器後，可以在雜訊很大的情況下分離出訊號值並且放大。(laser power: 3 mW; scan size: 2048 × 2048; zoom in: 10; scan speed: slow; time constant: 100 μm; sensitivity: 10 mV; PMT: H7827-012 (HAMAMATSU, Japan); gain: 0.9)

### 3-3 骨骼肌細胞之二倍頻影像及三維組圖

在掃描初代心肌細胞之前，先嘗試以肌肉細胞作為樣品進行掃描。在高解析度的掃描下，可以清楚看到 myosin 一節一節的排列，並藉由二倍頻訊號來判斷肌小節的長度。肌小節的判定方式是從影像上取一條垂直的線，依強度與距離作圖，波谷到波谷的距離即為肌小節的長度（圖 3-4）。得知肌小節的長度  $2.711 \pm 0.084 \mu\text{m}$ 。另外，因為二倍頻訊號有很高的空間解析度，因此也可掃描 XYZ 三軸影像後，再組成三維圖，觀看肌小節在空間上的分布情況（圖 3-5）。藉由掃描不同 Z 軸影像，我們可以推估細胞的厚度。本次實驗 Z step size 為  $0.5 \mu\text{m}$ ，共有 8 張影像有二倍頻訊，得知細胞厚度大約  $3.5 \mu\text{m}$ 。





**圖 3-4 骨骼肌細胞二倍頻影像**

分化第 10 天後的肌管細胞進行二倍頻影像掃描 (laser power: 16 mW; scan size: 2048 × 2048; zoom in: 5; scan speed: slow; time constant: 100 μm; sensitivity: 10 mV; PMT: H7422-40; PMT gain: 0.8)。SL : sarcomere length。 (a) 穿透影像。 (b) 二倍頻訊號影像。 (c) 由圖 (b) 紅線位置的訊號強度對距離作圖，得到八組肌小節長度。經過平均後得到肌小節的長度為  $2.711 \pm 0.084 \mu\text{m}$ 。



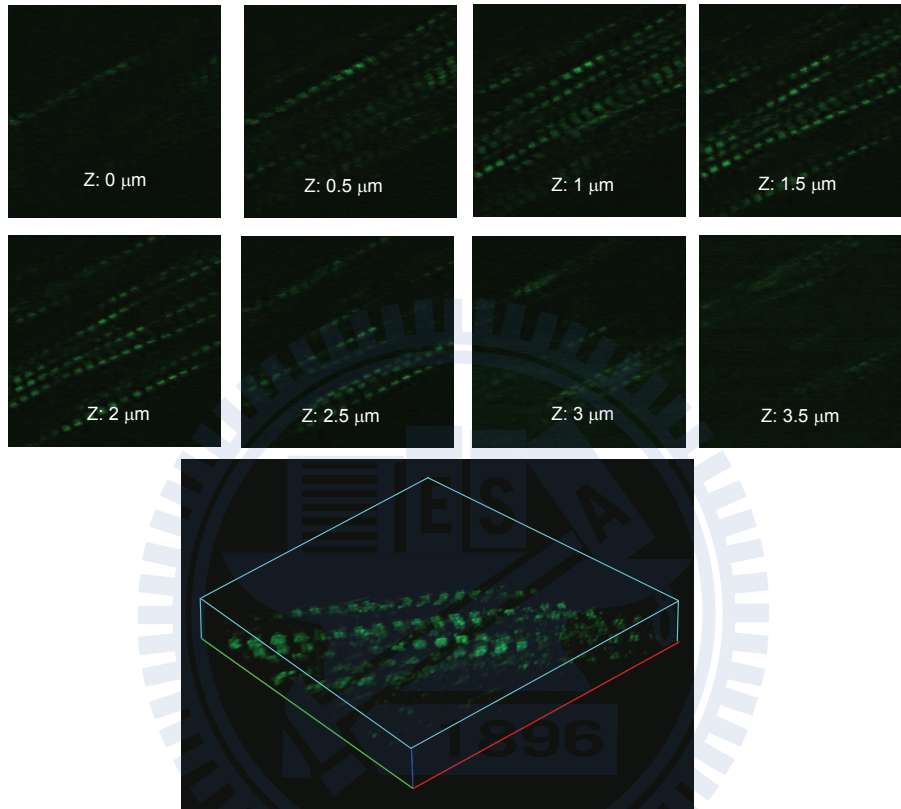


圖 3-5 骨骼肌細胞二倍頻訊號三維影像

Laser power: 16 mW; scan size:  $2048 \times 2048$ ; zoom in: 5; scan speed: slow; Z step:

$0.5 \mu\text{m}$ ; time constant:  $100 \mu\text{s}$ ; sensitivity: 10 mV; PMT: H7422-40; PMT gain: 0.8。

由 8 張影像組合成的立體圖。影像長寬分別為  $47.104 \mu\text{m}$ ，厚度為  $3.5 \mu\text{m}$ 。



### 3-4 骨骼肌細胞收縮與放鬆之二倍頻動態影像

目前已確認在靜止的肌肉細胞我們可以得到清晰的二倍頻影像，並且可以分析肌小節的長度與空間上的分布。接下來將試著對細胞進行電脈衝的刺激，觀察收縮放鬆過程中肌小節的變化。細胞表面的離子通道受到電流的刺激下，鈉鉀離子通道將逐一開啟，生成一個動作電位由細胞膜往細胞內傳遞。此動作電位將會刺激細胞內鈣離子濃度的變化，促使肌肉細胞收縮。實驗上我們改變電流的頻率，觀察細胞的收縮與放鬆過程。

任意波型產生器設定頻率為 1~2 Hz，脈衝寬度為 30 ms，電壓值為 5 V。經由電壓放大器放大至 53 V 後再導入培養液。首先，先掃描一張 2D 影像 (scan size: 2048 × 2048, zoom in 10)，選取一段有二倍頻訊號的區域進行一維掃描 (圖 3-6 (a))，得到二倍頻訊號位置與時間的關係圖 (圖 3-6 (b))。二倍頻訊號的位移量代表肌小節 myosin 的移動量，是所有肌小節收縮或放鬆過程的總和。過程中改變電脈衝頻率，由初始設定的 2 Hz 降為 1 Hz。為了進行分析，必須先將影像轉換為數據資料，步驟如下：

1. 將每一條一維掃描影像轉換為強度對位置關係圖 (圖 3-6 (c))。
2. 記錄每個波峰位置。
3. 找出各波峰對應到不同時間的位置。
4. 重新繪製位移對時間的關係圖。

最後我們選取其中一條二倍頻影像 (圖 3-6 (d)) 進行分析。在改變脈衝頻率時，肌肉會有一小段時期跳動不規律，因此數據分析上選取 0~5 秒與 10~20 秒進行傅立葉轉換 (圖 3-6 (e))。得到二倍頻訊號的變化頻率與電脈衝設定頻率相同。另外也可藉由繪製強度、時間、與距離的 3D 影像圖，找出各波峰對應到不同時間的位置，方便我們判斷每一組肌小節的位置 (圖 3-7)。

試著改變電壓的脈衝寬度與電壓值的大小，在亮視野上觀察細胞的變化。電

壓值在小於 53 V 之前細胞沒有收縮與放鬆的行為，施加的電壓大於 100 V 後，細胞膜會開始出現氣泡最後破裂。當施加電壓的脈衝寬度越寬，細胞收縮的速度越快。



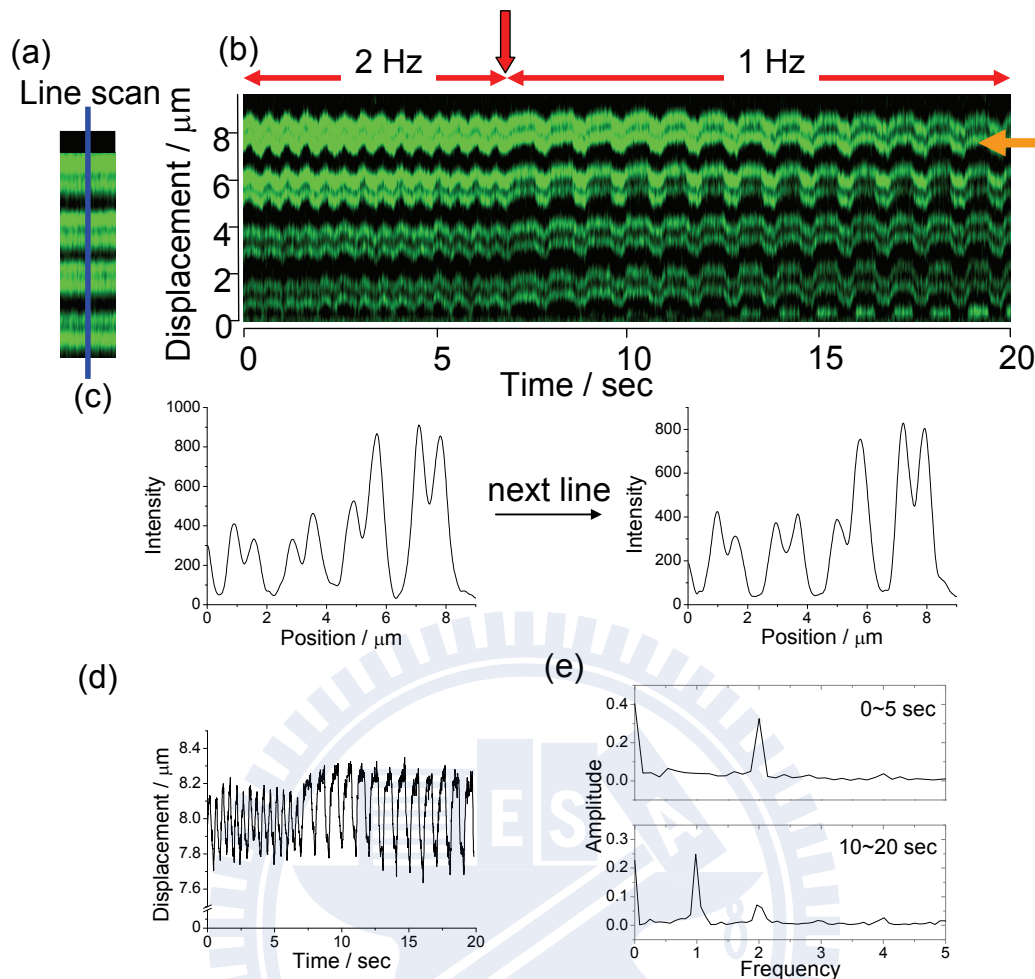


圖 3-6 不同電刺激頻率下的二倍頻影像

(a) 掃描一張 2D 影像後，選取一段區域進行一維掃描的掃描，如藍色線條所示。(b) 二倍頻訊號位置隨時間的關係圖。一維掃描的時間間隔為 5 ms。掃描的長度為 9.108  $\mu\text{m}$ ，掃描時間為 20.3 秒。紅色箭頭處表示刺激頻率改變的時間。(c) 將一維掃描得到的訊號繪製成訊號強度與位置關係圖。(d) 圖(b)橘色箭頭所指示的二倍頻訊號影像重新描繪成位置與時間關係圖。(e) 對圖 (d) 做傅立葉轉換。分別對 0~5 秒與 10~20 秒 線條進行分析。在 0~5 秒電壓脈衝頻率為 2 Hz，10~20 秒電壓脈衝為 1 Hz，二倍頻 訊號的變化頻率正好吻合這兩個數值。(laser power: 16 mW; scan size: 2048  $\times$  2048; zoom in: 5; scan speed: slow; time constant: 100  $\mu\text{m}$ ; sensitivity: 10 mV; PMT: H7422-40; PMT gain: 0.8)

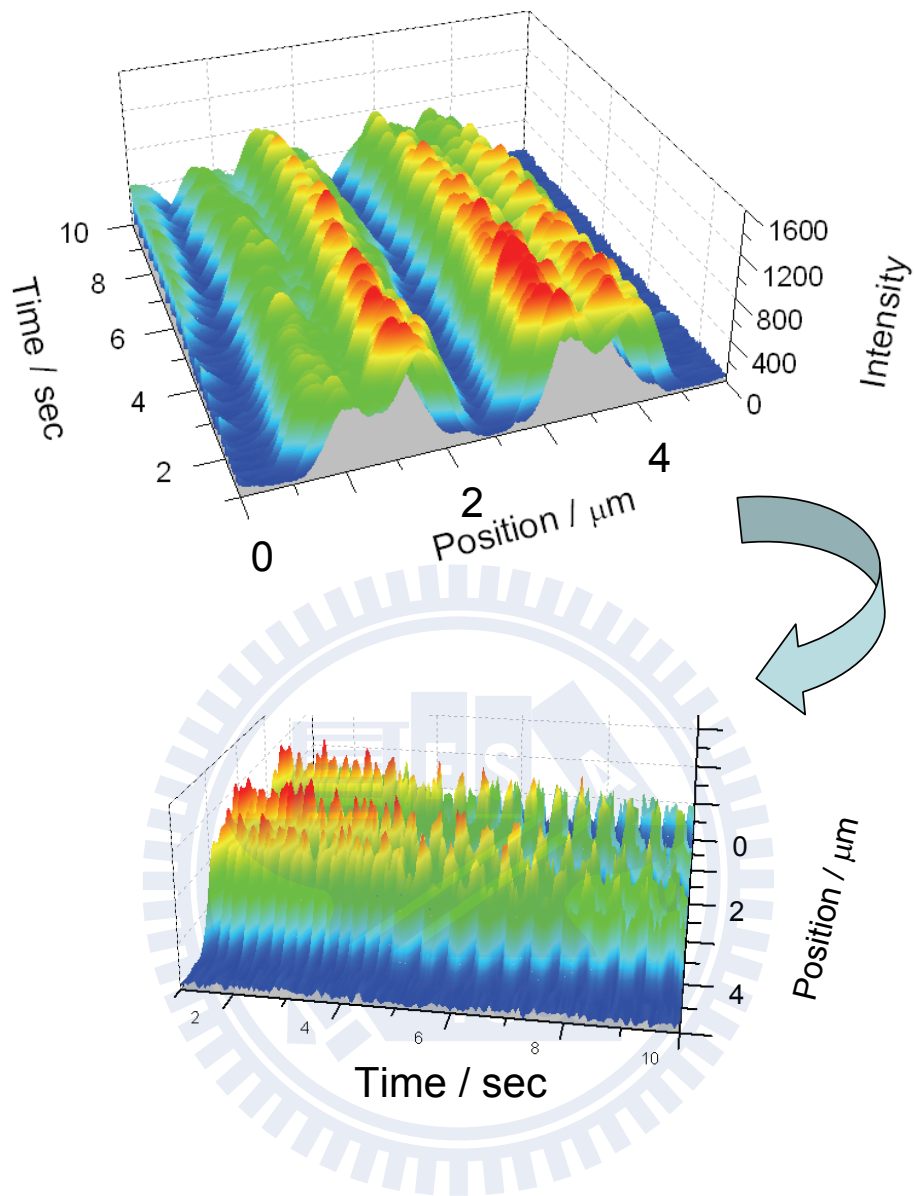


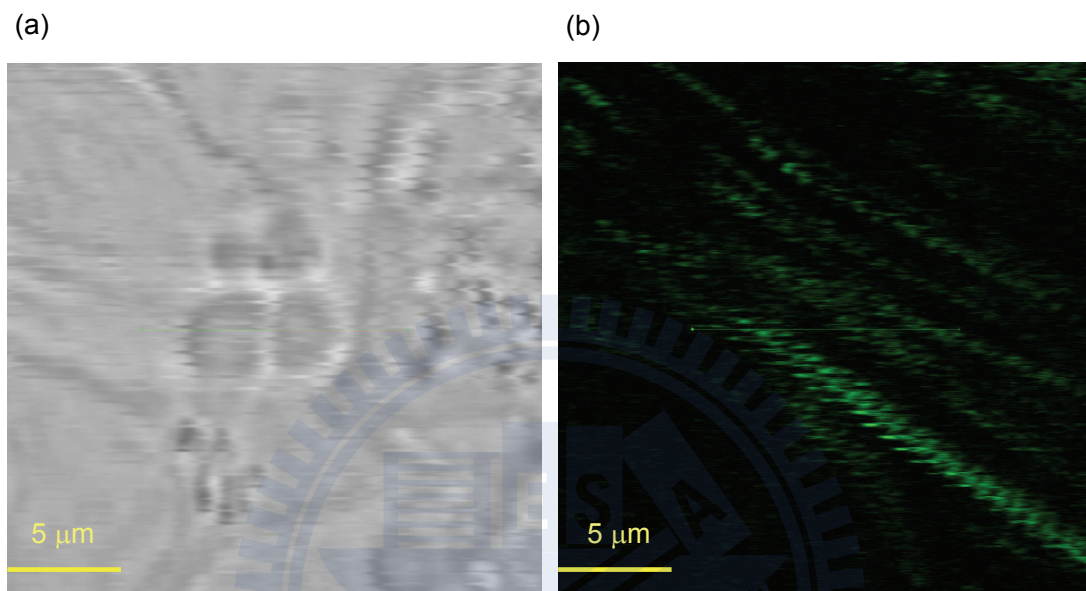
圖 3-7 強度對位置與影像作圖

由 3D 影像可以判斷肌小節的長度與相對應 double peaks 的二倍頻訊號，並且受到電壓調控而造成排列疏密不等的波形。

### 3-5 雞胚胎心肌細胞自主性收縮過程之量測

測量骨骼肌細胞動態收縮過程的結果，顯示細胞的收縮頻率會受到刺激頻率的調控，也顯示此系統在追蹤肌小節長度變化的過程中，影像上可以準確的測量肌肉細胞的收縮過程，且經由分析二倍頻訊號的移動量，得到訊號改變的頻率與刺激頻率完全相同。在此，我們已可確定系統運用在觀察心肌細胞自主性收縮的可行性。以下實驗將會掃描雞胚胎分離出的心肌細胞。

首先，先掃描一張二維的影像。因為心肌細胞正處於跳動的狀態，所以二維影像可以觀察到二倍頻訊號有拖尾的痕跡（圖 3-8 (a)），由透射影像 (transmission image) 也可以看到規律性的位移軌跡。穿透影像不適合使用在這次實驗中，因為我們使用的心肌細胞，細胞外觀沒有清楚的 A-I band 間隔<sup>12</sup>，只能得到細胞內胞器的輪廓（圖 3-8 (b)）。取二維影像時，先使用像素面積為  $512 \times 512$  快速尋找正確的 Z 軸位置，再掃描一張像素面積  $2048 \times 2048$  高解析度的影像。選擇二倍頻訊號強度強且均勻的肌小節進行一維掃描。得到的一維掃描影像如圖 3-9 (a) 所示。接著分析每個時間點二倍頻訊號最高峰的位置，將它重新繪製成位置隨時間的關係圖（圖 3-9 (b)）。我們發現二倍頻訊號的位置有規律性的頻率，而且位移量也相似，但是肌小節長度變化量則顯得較為雜亂，每次的變化量均不相同並且變化的頻率也沒有規律性（圖 3-10）。此現象可能原因是細胞中每個肌小節收縮的時間不同所導致的現象，因為細胞本體的運動是由內部每個肌小節各自的收縮與放鬆累計的結果。得到這些數據後便可以分析肌小節收縮與放鬆的平均速度與肌小節改變量（圖 3-11）。心肌細胞在收縮時的速度為  $0.19 \pm 0.11 \mu\text{m}/\text{sec}$  ( $n=10$ )，長度變化百分比為  $4.78 \pm 1.23 \%$ 。放鬆時的速度為  $0.26 \pm 0.13 \mu\text{m}/\text{sec}$  ( $n=11$ )，長度變化百分比為  $5.03 \pm 2.38 \%$ 。實驗得到的結果顯示在圖 3-12。



**圖 3-8 收縮-放鬆中的心肌細胞**

(a) 透射影像。在此無法由透射影像看到整齊排列的肌小節。(b) 心肌細胞的二倍頻影像。影像中的訊號因為肌小節的移動而出現位移。圖上訊號強度較強的位置進行一維掃描選擇一維掃描的區段可以判斷肌小節排列方向。進行一維掃描時會選擇訊號強度較強且均勻的位置，避免肌肉在收縮與放鬆時 Z 軸的移動。(Laser power: 16 mW; scan size: 2048 × 2048; zoom in: 10; scan speed: slow; time constant: 100 μm; sensitivity: 10 mV; PMT: H7422-40; PMT gain: 0.8)。



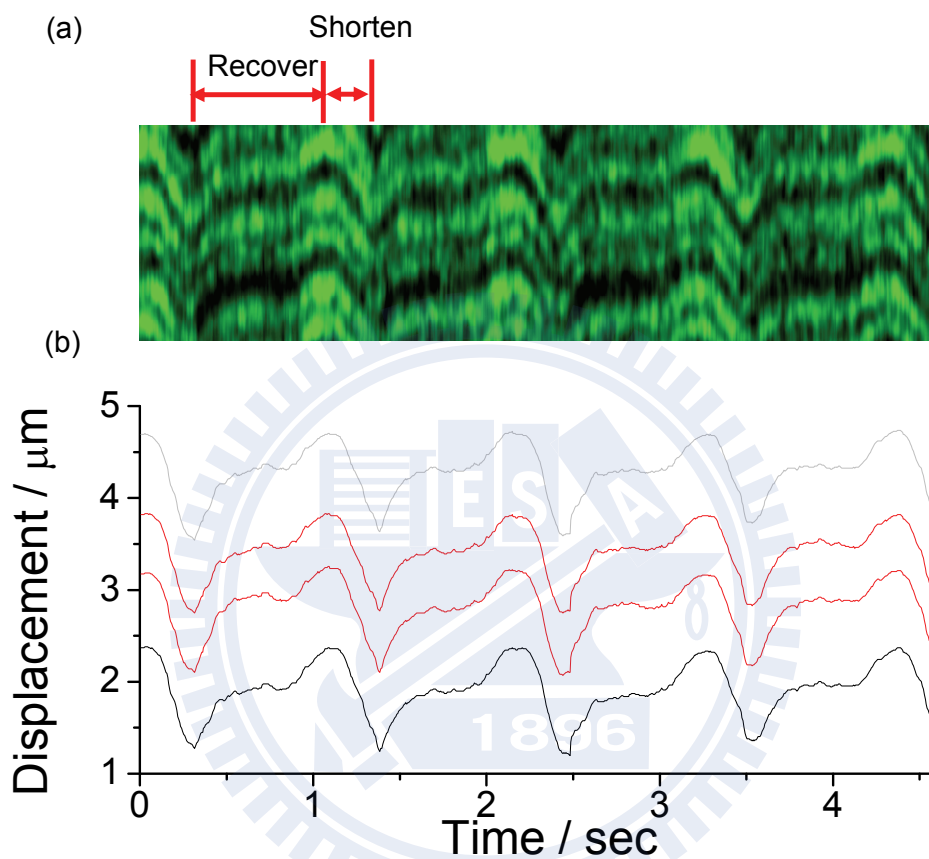


圖 3-9 心肌細胞一維掃描的二倍頻影像與時間對位置的關係圖

(a) 進行一維掃描後得到的影像。由亮視野觀察到細胞整體的縮短與恢復。(b) 標示出二倍頻訊號的位置並利用顏色區分每一條肌小節代表的二倍頻訊號。Myosin 在收縮與放鬆的過程中，移動的速度不相同，並且移動的軌跡沒有很平順，表示肌小節彼此間有互相拉引，才會有此現象。(Laser power: 16 mW; scan size: 2048 × 2048; zoom in: 10; scan speed: slow; time constant: 100 μm; sensitivity: 10 mV; PMT: H7422-40; PMT gain: 0.8)。



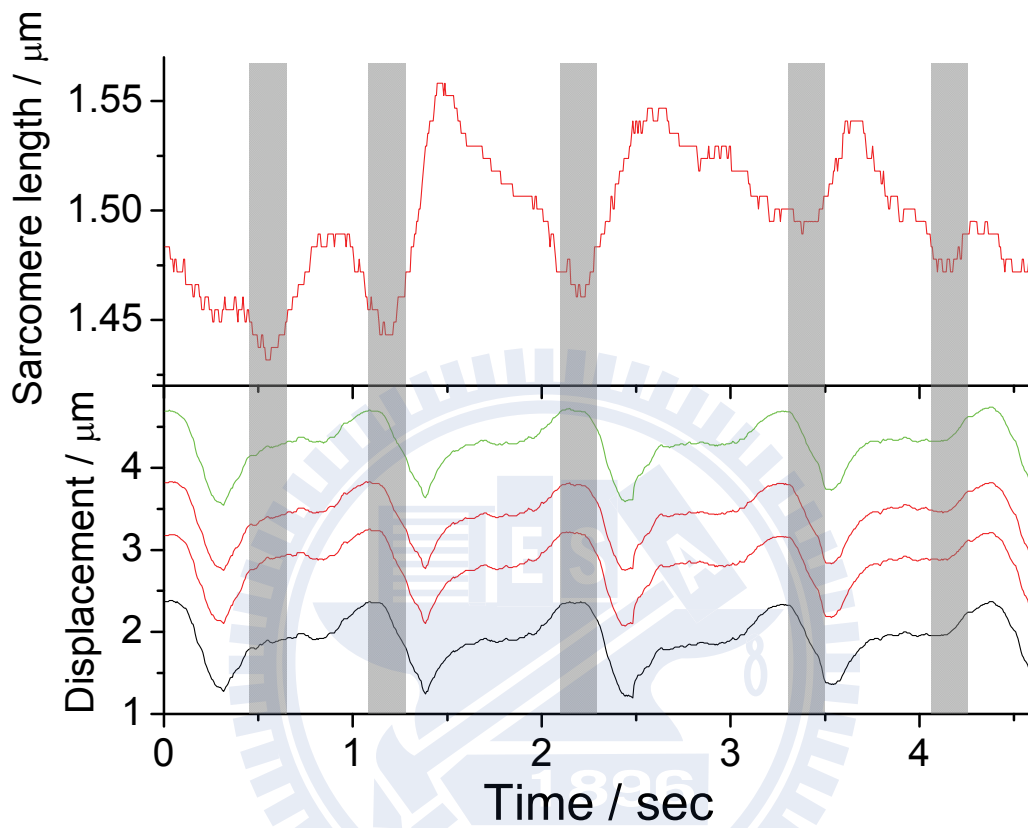


圖 3-10 肌小節長度隨時間變化的關係圖

由二倍頻訊號的位置判斷肌小節的長度，再對時間進行做圖。灰色區域表示肌小節收縮的時間。比對心肌細胞的位移就會發現兩者沒有同步的情形，彼此間會有一定的時間差。

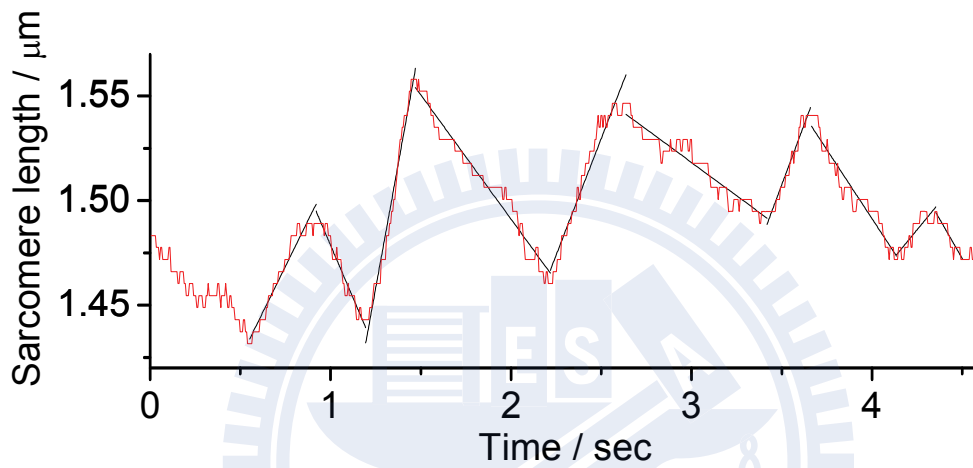


圖 3-11 肌小節收縮與放鬆的平均速度

肌小節收縮與放鬆的平均速度取波峰與波谷之間的斜率值。黑色線由肌小節長度的變化量取平均速度後重新繪製。肌小節收縮與放鬆時長度的百分比定義如下：收縮百分比 (縮短量 / 收縮前的長度)，放鬆百分比 (伸長量 / 放鬆前的長度)。

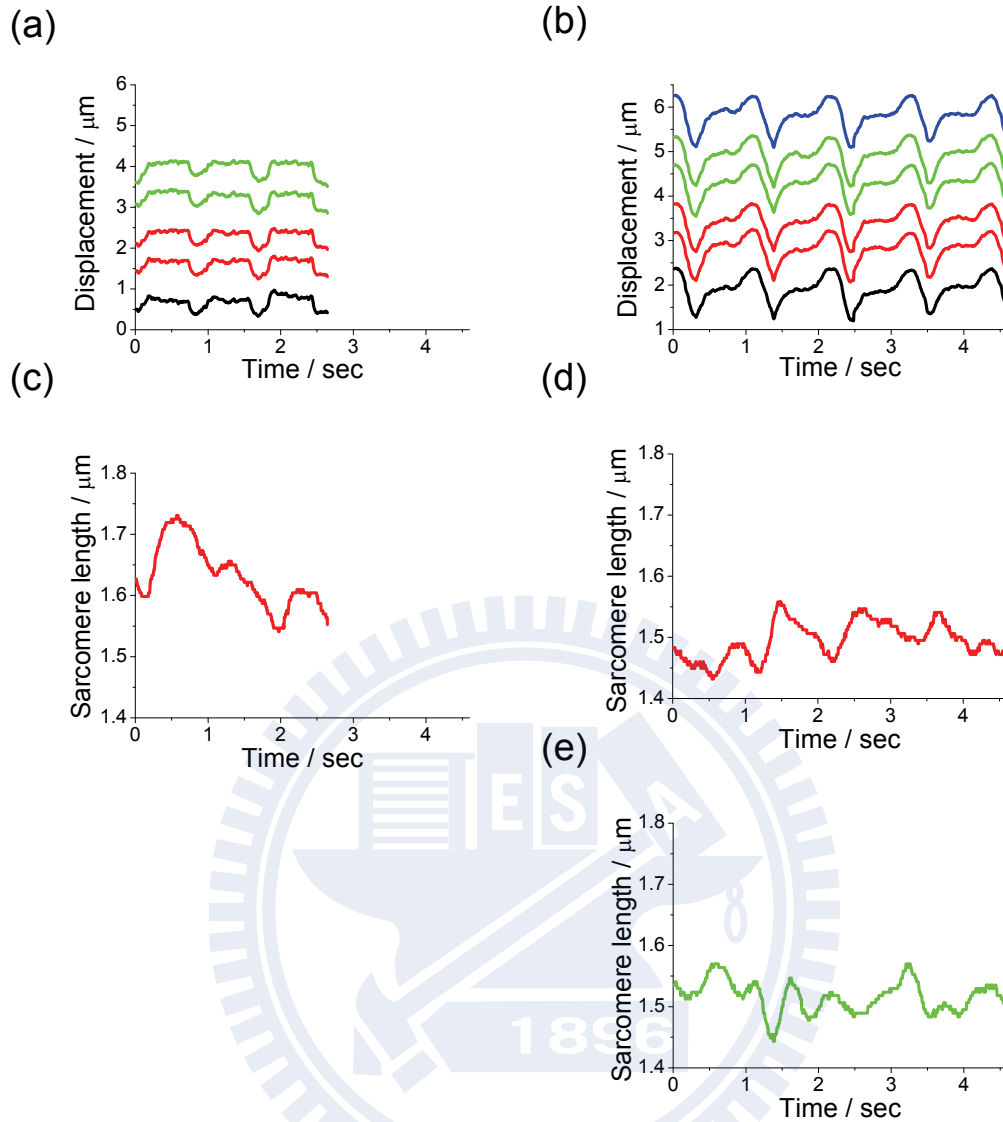


圖 3-12 正常情況下心肌細胞收縮與放鬆的分析圖

(a, b) 二倍頻訊號隨著時間的位移圖，不同的顏色代表不同的肌小節。(c) 為圖 (a) 肌小節長度隨著時間變化的示意圖，顏色對應到上方的位移圖。(d, e) 為圖 (b) 肌小節長度隨著時間變化的示意圖。肌小節的長度每隻細胞都不太一樣，但是相同細胞內的肌小節長度則變化幅度較小。二倍頻訊號移動的方向皆不相同，此現象有可能是因為每個肌小節受到鄰近的肌小節影響，彼此受力程度皆不同。(Laser power: 16 mW; scan size: 2048 × 2048; zoom in: 10; scan speed: slow; time constant: 100 μm; sensitivity: 10 mV; PMT: H7422-40; PMT gain: 0.8)

### 3-6 腎上腺素 (epinephrine) 對雞胚胎心肌細胞收縮之影響

根據上述的實驗結果，我們可以成功利用一維掃描方式獲取二倍頻訊號影像，追蹤肌小節動態的收縮放鬆過程。我們將此技術更進一步應用在腎上腺素對心肌細胞的影響。

腎上腺素是一種激素和神經傳導物質。當作用於心臟時，可以使心臟的收縮力上升，心輸出量增多<sup>41</sup>。實驗上我們使用移液管加入 3.6 mg/ml 腎上腺素到實驗細胞的培養液，並小心的將他與培養液混合均勻，腎上腺素的最終濃度為  $10^{-5}$  M。掃描影像的方式同樣的先取得一張二微的影像，再對樣品進行區段性掃描。加入腎上腺素之後的心肌細胞在收縮時的速度為  $0.33 \pm 0.20 \mu\text{m}/\text{sec}$  (n=16)，縮短的百分比為  $5.77 \pm 2.81 \%$ 。放鬆時的速度為  $0.26 \pm 0.09 \mu\text{m}/\text{sec}$  (n=16)，伸長的百分比為  $5.88 \pm 2.84 \%$ 。實驗得到的結果顯示在圖 3-13。加入腎上腺素後收縮放鬆的長短差異性不大，但是速度會有差別，從圖中也可觀察到許多位置的斜率比正常的情況大。與正常的心肌細胞相比，加入腎上腺素後肌小節的收縮速度有顯著的提升 (圖 3-14)，然而肌小節在收縮與放鬆的過程中長度的變化百分比卻沒有顯著改變 (圖 3-15)。

由上述的實驗，我們發現加入腎上腺素會使肌小節收縮的速度上升，但是對於伸縮量與放鬆速度卻沒有太大的改變。在文獻上有提到腎上腺素與相關的前驅物如: norepinephrine，會增加細胞內鈣離子的濃度，進而增強收縮幅度和收縮頻率<sup>42</sup>。本次實驗中同樣的也比較有無加入腎上腺素對於收縮頻率的影響。以肌小節變化的次數做為肌肉收縮的次數，在正常的條件下得到心肌細胞跳動的頻率為 1.32 赫茲 (n=2)，在加入腎上腺素後細胞的跳動頻率為 1.19 赫茲 (n=3)。由於實驗樣本數不多且每盤細胞的狀況皆不同，因此實驗出來的數據與文獻上有差異。

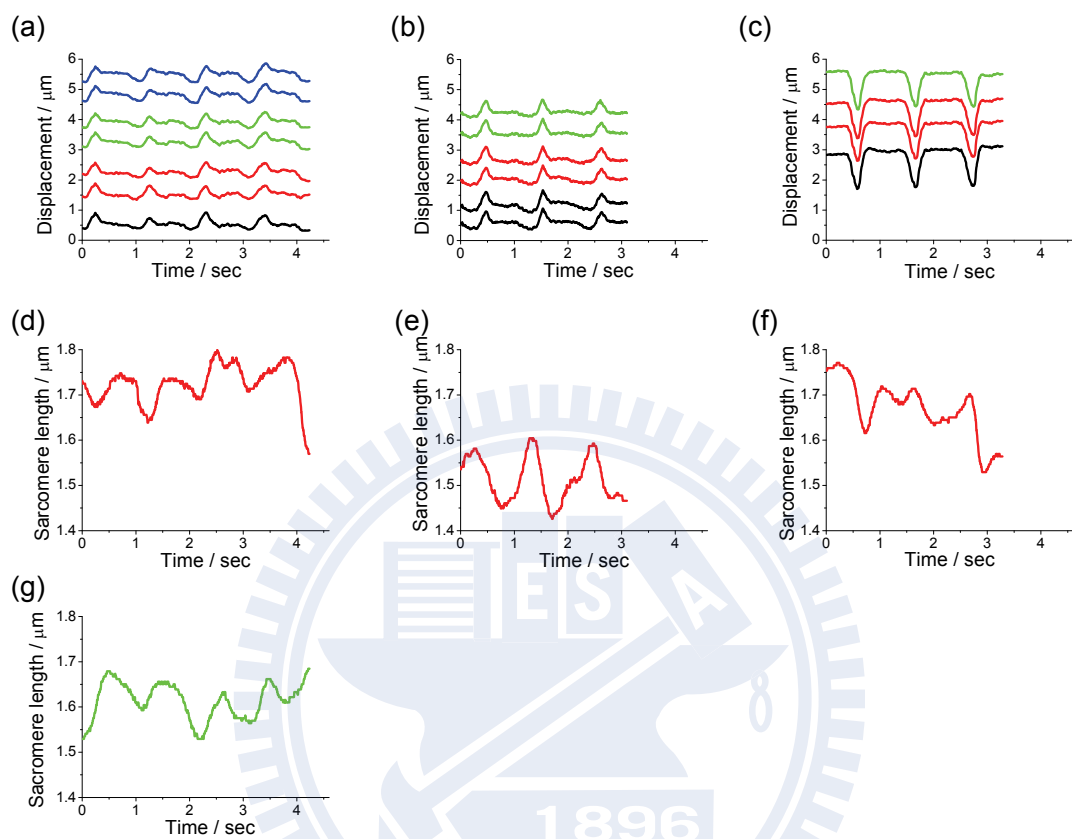


圖 3-13 加入腎上腺素後心肌細胞收縮與放鬆的分析圖

(a ~ c) 二倍頻訊號隨時間的位移圖。(d ~ g) 肌小節長度隨著時間變化的示意圖。(Laser power: 16 mW; scan size:  $2048 \times 2048$ ; zoom in: 10; scan speed: slow; time constant:  $100 \mu\text{m}$ ; sensitivity: 10 mV; PMT: H7422-40; PMT gain: 0.8).

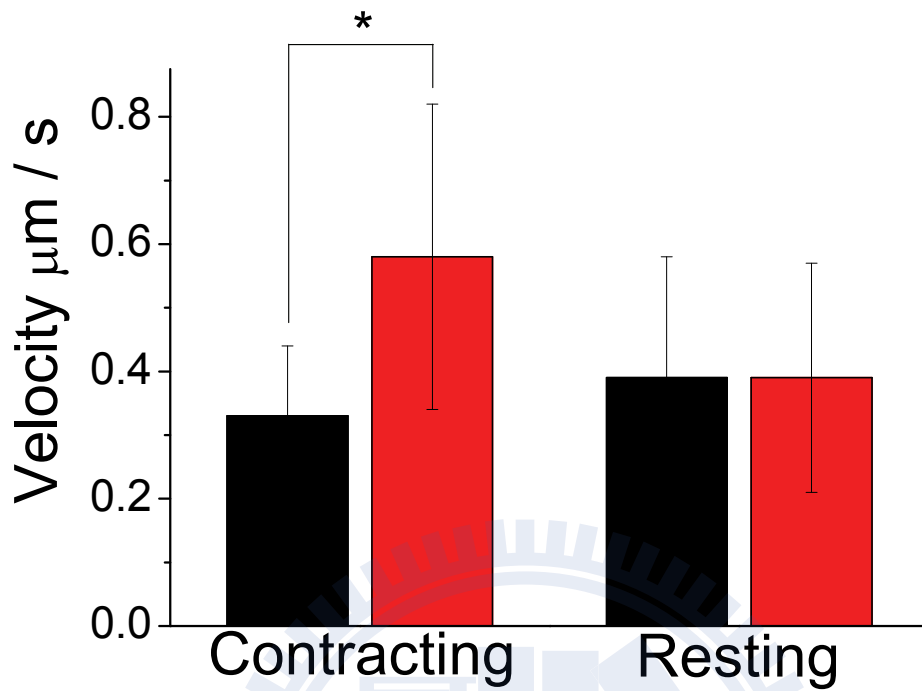


圖 3-14 加入腎上腺素對肌小節收縮與放鬆平均速度的影響

黑色為正常的心肌細胞，紅色為培養液中含有 epinephrine ( $10^{-5}$  M) 的心肌細胞。肌小節收縮的速度在加入 epinephrine 後會有加快的趨勢 ( $p = 2.9 \times 10^{-2}$ )。關於放鬆的速度兩者的差異性很小 ( $p = 0.95$ )。\*: significantly different from control ( $p < 0.05$ )。



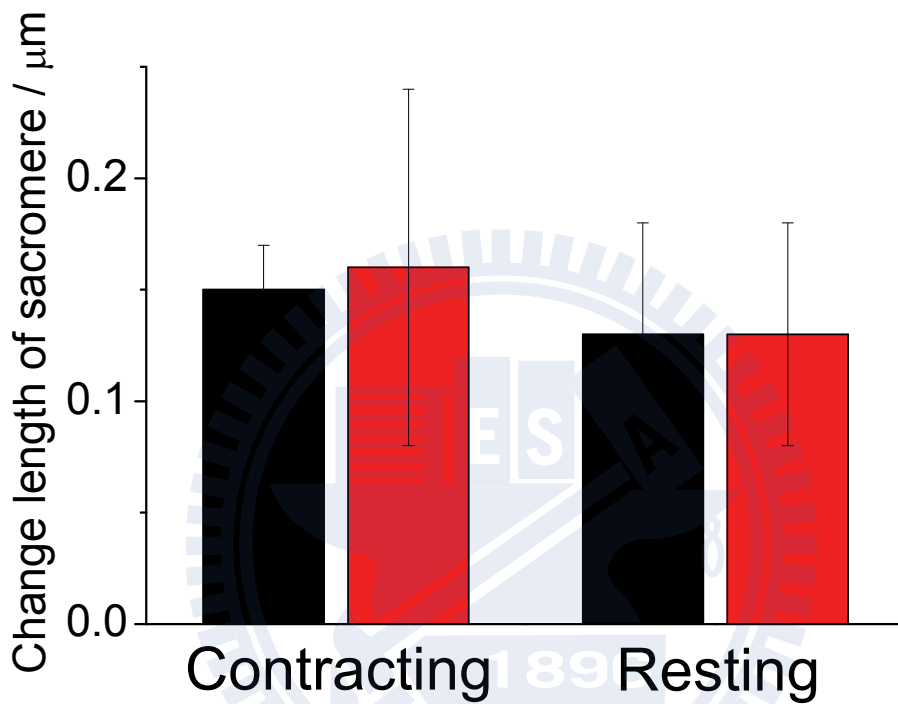


圖 3-15 加入腎上腺素對肌小節長度變化百分比的影響

黑色為正常的心肌細胞，紅色為培養液中含有腎上腺素 ( $10^{-5}$  M) 的心肌細胞

。在收縮或放鬆的階段，肌小節長度的變化百分比不會因為加入腎上腺素而有顯著的差異性 (contracting,  $p = 0.299$ ; resting,  $p = 0.506$ )。

## 第四章、結論與未來展望

本論文中，我們成功的將雷射光束掃描技術與鎖相放大器結合使用，開發出一套高訊雜比與靈敏度的掃描技術。先利用老鼠尾巴富含的膠原蛋白作為樣品接收二倍頻訊號，改變掃描的速度、像素面積、顯示大小等參數，找尋最適當的條件。接著掃描骨骼肌細胞株。在不同的電脈衝刺激頻率下，肌肉收縮的頻率也隨之改變，由分析所得的結果顯示，我們自行架設的系統可以測量動態的變化過程，進行一維掃描時，每掃描一條線僅需要 5 ms，對於細胞的變化頻率 2 Hz 而言，總共有 100 的點去描述肌小節的動態變化過程，最後得到肌小節的變化頻率與刺激頻率相同。同時也利用非線性光學影像的特性，掃描骨骼肌細胞的三維立體影像圖，了解肌小節在細胞內的分布。最後掃描自發性收縮的肌胚胎心肌細胞，觀察收縮與放鬆速度與長度的變化，並且比較加入腎上腺素後的影響。肌小節收縮的速度在正常的情況下測得  $0.19 \pm 0.11 \mu\text{m}/\text{sec}$ ，放鬆的速度為  $0.26 \pm 0.13 \mu\text{m}/\text{sec}$ 。然而進入腎上腺素後，收縮的速度加快為  $0.33 \pm 0.20 \mu\text{m}/\text{sec}$  ( $p = 0.029$ )，但是放鬆的速度為  $0.26 \pm 0.09 \mu\text{m}/\text{sec}$  與正常的心肌細胞相似。長度百分比變化量也試沒有太大的改變。

今後，我們會繼續使用此系統研究骨骼肌細胞株在不同電壓的刺激下以及改變電壓脈衝的寬度，觀察對細胞的影響。此外還可加入其他的藥物，觀察對初代心肌細胞的影響，在細胞層次下了解藥物的作用，做為動物實驗前的依據。不同於其他技術與樣品，它可以簡單又快速的得到肌小節動態過程的變化。

## 第五章、參考文獻

1. Haupt, B.; Pelling, A.; Horton, M., Integrated confocal and scanning probe microscopy for biomedical research. *The Scientific World Journal* **2006**, *6*, 1609-1618.
2. Wu, Y.; Chen, H.; Chang, W.; Jhan, J.; Lin, H.; Liao, I., Quantitative assessment of hepatic fat of intact liver tissues with coherent anti-stokes Raman scattering microscopy. *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 1496-1504.
3. Brown, E.; McKee, T., Dynamic imaging of collagen and its modulation in tumors in vivo using second-harmonic generation. *Nature Medicine* **2003**, *9*, 796-800.
4. Huxley, A.; Taylor, R., Local activation of striated muscle fibres. *The Journal of Physiology* **1958**, *144*, 426-441.
5. Guo, Y.; Ho, P.; Savage, H.; Harris, D.; Sacks, P.; Schantz, S.; Liu, F.; Zhadin, N.; Alfano, R., Second-harmonic tomography of tissues. *Optics Letters* **1997**, *22*, 1323-1325.
6. Guo, B.; Guilford, W., The tail of myosin reduces actin filament velocity in the in vitro motility assay. *Cell motility and the cytoskeleton* **2004**, *59*, 264-272.
7. Ranvier, L., Du spectre produit par les muscles striés. *Arch Physiol* **1874**, *6*, 274-281.
8. Mann, D.; Urabe, Y.; Kent, R.; Vinciguerra, S.; Cooper, G., Cellular versus myocardial basis for the contractile dysfunction of hypertrophied myocardium. *Circulation Research* **1991**, *68*, 402-415.
9. Yelamarty, R.; Moore, R.; Yu, F.; Elensky, M.; Semanchick, A.; Cheung, J., Relaxation abnormalities in single cardiac myocytes from renovascular hypertensive rats. *American Journal of Physiology- Cell Physiology* **1992**, *262*, 980-990.
10. Lieber, R.; Loren, G.; Friden, J., In vivo measurement of human wrist extensor muscle sarcomere length changes. *Journal of Neurophysiology* **1994**, *71*, 874-881.
11. Powell, T.; Steen, E.; Twist, V.; Woolf, N., Surface characteristics of cells isolated from adult rat myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **1978**, *10*, 287-290.
12. Nassar, R.; Reedy, M.; Anderson, P., Developmental changes in the ultrastructure and sarcomere shortening of the isolated rabbit ventricular myocyte. *Circulation Research* **1987**, *61*, 465-483.
13. Roos, K.; Leung, A., Theoretical Fraunhofer light diffraction patterns calculated

- from three-dimensional sarcomere arrays imaged from isolated cardiac cells at rest. *Biophysical Journal* **1987**, *52*, 329-341.
14. Roos, K.; Brady, A., Individual sarcomere length determination from isolated cardiac cells using high-resolution optical microscopy and digital image processing. *Biophysical Journal* **1982**, *40*, 233-244.
  15. Kamgoue, A.; Ohayon, J.; Usson, Y.; Riou, L.; Tracqui, P., Quantification of cardiomyocyte contraction based on image correlation analysis. *Cytometry Part A* **2009**, *75*, 298-308.
  16. Severs, N.; Slade, A.; Powell, T.; Twist, V.; Jones, G., Morphometric analysis of the isolated calcium-tolerant cardiac myocyte. *Cell and Tissue Research* **1985**, *240*, 159-168.
  17. Rubart, M.; Pasumarthi, K.; Nakajima, H.; Soonpaa, M.; Nakajima, H.; Field, L., Physiological coupling of donor and host cardiomyocytes after cellular transplantation. *Circulation Research* **2003**, *92*, 1217-1224.
  18. Van der Velden, J.; de Jong, J.; Owen, V.; Burton, P.; Stienen, G., Effect of protein kinase A on calcium sensitivity of force and its sarcomere length dependence in human cardiomyocytes. *Cardiovascular Research* **2000**, *46*, 487-495.
  19. Shevchuk, A.; Gorelik, J.; Harding, S.; Lab, M.; Klenerman, D.; Korchev, Y., Simultaneous measurement of  $\text{Ca}^{2+}$  and cellular dynamics: combined scanning ion conductance and optical microscopy to study contracting cardiac myocytes. *Biophysical Journal* **2001**, *81*, 1759-1764.
  20. Stehle, R.; Kruger, M.; Pfitzer, G., Force kinetics and individual sarcomere dynamics in cardiac myofibrils after rapid  $\text{Ca}^{2+}$  changes. *Biophysical Journal* **2002**, *83*, 2152-2161.
  21. Telley, I.; Denoth, J.; Stussi, E.; Pfitzer, G.; Stehle, R., Half-sarcomere dynamics in myofibrils during activation and relaxation studied by tracking fluorescent markers. *Biophysical Journal* **2006**, *90*, 514-530.
  22. Helmchen, F.; Denk, W., Deep tissue two-photon microscopy. *Nature Methods* **2005**, *2*, 932-940.
  23. Franken, P.; Hill, A.; Peters, C.; Weinreich, G., Generation of optical harmonics. *Physical Review Letters* **1961**, *7*, 118-119.
  24. Gannaway, J.; Sheppard, C., Second-harmonic imaging in the scanning optical microscope. *Optical and Quantum Electronics* **1978**, *10*, 435-439.
  25. Campagnola, P.; Millard, A.; Terasaki, M.; Hoppe, P.; Malone, C.; Mohler, W., Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues. *Biophysical Journal* **2002**, *82*, 493-508.

26. Perentes, J.; McKee, T.; Ley, C.; Mathiew, H.; Dawson, M.; Padera, T.; Munn, L.; Jain, R.; Boucher, Y., In vivo imaging of extracellular matrix remodeling by tumor-associated fibroblasts. *Nature Methods* **2009**, *6*, 143-145.
27. Campagnola, P.; Loew, L., Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms. *Nature Biotechnology* **2003**, *21*, 1356-1360.
28. Both, M.; Vogel, M.; Fink, R.; Uttenweiler, D., Second-harmonic generation imaging in muscle fibers. *Confocal, Multiphoton, and Nonlinear Microscopic Imaging* **2003**.
29. Mohler, W.; Millard, A.; Campagnola, P., Second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins. *Methods* **2003**, *29* (1), 97-109.
30. Plotnikov, S.; Millard, A.; Campagnola, P.; Mohler, W., Characterization of the myosin-based source for second-harmonic generation from muscle sarcomeres. *Biophysical Journal* **2006**, *90*, 693-703.
31. Wallace, S.; Morrison, J.; Botting, K.; Kee, T., Second-harmonic generation and two-photon-excited autofluorescence microscopy of cardiomyocytes: quantification of cell volume and myosin filaments. *Journal of Biomedical Optics* **2008**, *13*, 4018-4023.
32. Boulesteix, T.; Beaurepaire, E.; Sauviat, M.; Schanne-Klein, M., Second-harmonic microscopy of unstained living cardiac myocytes: measurements of sarcomere length with 20-nm accuracy. *Optics Letters* **2004**, *29*, 2031-2033.
33. Plotnikov, S.; Kenny, A.; Walsh, S.; Zubrowski, B.; Joseph, C.; Scranton, V.; Kuchel, G.; Dauser, D.; Xu, M.; Pilbeam, C., Measurement of muscle disease by quantitative second-harmonic generation imaging. *Journal of Biomedical Optics* **2008**, *13*, 4018-4028.
34. Both, M.; Vogel, M.; Friedrich, O.; von Wegner, F.; Kunsting, T.; Fink, R.; Uttenweiler, D., Second harmonic imaging of intrinsic signals in muscle fibers in situ. *Journal of Biomedical Optics* **2004**, *9*, 882-892.
35. Zoumi, A.; Yeh, A.; Tromberg, B., Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 11014-11019.
36. Zumbusch, A.; Holtom, G.; Xie, X., Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-Stokes Raman scattering. *Physical Review Letters* **1999**, *82*, 4142-4145.
37. Jhan, J.; Chang, W.; Chen, H.; Wu, M.; Lee, Y.; Chen, C.; Liao, I., Integrated multiple multi-photon imaging and Raman spectroscopy for characterizing

- structure-constituent correlation of tissues. *Optics Express* **2008**, *16*, 16431-16441.
38. Llewellyn, M.; Barretto, R.; Delp, S.; Schnitzer, M., Minimally invasive high-speed imaging of sarcomere contractile dynamics in mice and humans. *Nature* **2008**, *454*, 784-788.
  39. Hamburger, V.; Hamilton, H., A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology* **1951**, *88*, 49-92.
  40. Akiyama, Y.; Furukawa, Y.; Morishima, K. In *Controllable bio-microactuator powered by muscle cells*, 2006; pp 6565-6568.
  41. Suga, H.; Sagawa, K.; Shoukas, A., Load independence of the instantaneous pressure-volume ratio of the canine left ventricle and effects of epinephrine and heart rate on the ratio. *Circulation Research* **1973**, *32*, 314-322.
  42. Song, L.; Wang, S.; Xiao, R.; Spurgeon, H.; Lakatta, E.; Cheng, H.,  $\beta$ -Adrenergic stimulation synchronizes intracellular  $Ca^{2+}$  release during excitation-contraction coupling in cardiac myocytes. *Circulation Research* **2001**, *88*, 794-801.

