

# 以原子力顯微鏡量測經紫外線照射後紅血球細胞膜剛性係數之研究

國立嘉義大學生物機電工程學系 連振昌 劉明鑫 艾群

【關鍵詞】 AFM、細胞膜剛性係數、中波紫外線

## 一、前言

1986年所發展出掃描穿隧顯微鏡(Scanning Tunneling Microscope, STM)，使得科學家在原子尺寸的量測及操作上，有了革命性的進展，也因此衍生出一系列掃描探針顯微鏡(Scanning Probe Microscope, SPM)，其後更發展出利用原子間作用力呈像的原子力顯微鏡(Atomic Force Microscope, AFM)。掃描式探針可以在多種環境下操作(液相、氣相、真空)，樣本不需要複雜的處理程序，且具有極高度的解析力，以及三維立體的成像能力。人體是否健康，和是否有健康的血流有關、血液是人體的運輸工具，將氧氣及養份運輸到全身；全身血液中紅血球細胞數減少，或所含血紅蛋白量不足，紅血球細胞受到破壞為其主因之一。人類紅血球照射一定劑量的中波紫外線(UVB)之後，會抑制紅血球細胞膜上部份酵素的產生，並且破壞其細胞骨架，進而導致紅血球變形、破裂，進而發生溶血作用，此與紅血球的力學性質有關連。本研究目的是由 Wistar 大鼠取得紅血球細胞，照射不同劑量的 UVB 後，利用 AFM 探針對紅血球細胞做力量-位移測試，由量測到的力量-位移曲線探討在微觀下紅血球細胞膜其力學性質的改變及關聯性，進一步規劃在大鼠上照射不同劑量的 UVB 後取得紅血球細胞，探究紅血球細胞膜其力學性質的改變及關聯性。

## 二、實驗設備與方法

### 1. 實驗設備

本研究中使用之原子力顯微鏡的機台型式為德國 JPK Nanowizard™ AFM，安裝於 Zeiss(Aziovert 200)倒立式光學顯微鏡上。實驗材料的紅血球細胞乃由 Wistar 大鼠尾巴靜脈抽取之血液中純化取得，使用的藥品包含了麻醉劑 Pento、抗凝血劑 Heparin，由微量高速冷凍分離機離心純化紅血球細胞，並以聚-L-賴氨酸(ploy-L-lysine)、戊二醛(gliutaradehyde)將紅血球細胞固定於經過超音波清洗過之玻璃基板上，使用 0.9%生理食鹽水作為緩衝液，存放於 4°C 環境下；紫外線照射系統包括紫外線觀察暗箱、紫外線燈管、紫外線強度測量儀。

### 2. 實驗方法

施打麻醉劑(Pento, 濃度 50mg/mL, 劑量 1mL/kg)，由 Wistar 大鼠尾巴靜脈抽血至含有 Heparin 抗凝劑之針筒(0.1ml Heparin/1ml Blood)混合均勻，以 1500 rpm 離心五分鐘，使血液產生分離層，小心移除白血球衣以上之物質，加入 0.9%生理食鹽水混合均勻，再以 3400rpm 離心一分鐘，小心移除上清液；重複以上步驟 3-5 次取得純化的紅血球溶液，加入 0.9%生理食鹽水存放於 4°C 冰箱。吸取 0.01% w/v 的 ploy-L-lysine 200 $\mu$ l 滴覆於玻璃基板上，將玻璃基板置於加熱板，維持 60°C 加熱 1 小時後，以 2%的戊二醛輕輕沖洗玻璃基板表面，靜置等待表面乾燥後以去離子水輕輕沖洗玻璃基板表面，靜置等待表面乾燥後將純化的紅血球細胞溶液滴覆於玻璃基板表面，保持 4°C 靜置約 3 小時後，以 0.9%生理食鹽水輕輕沖掉尚未附著於玻璃基板表面的紅血球細胞，靜置約 2 小時即固定完成。實驗分成三組，一組將固定完成的紅血球細胞置放於距離紫外線燈管 16cm 處，照射平均強度 5 W/m<sup>2</sup> 紫外光 240 min，劑量為 7.2 $\times 10^3$  J/m<sup>2</sup>，另外兩組不照射紫外光，存放於 4°C 環境與存放於室溫下之紅血球細胞 240 min 各一組做為對照組；AFM 設定施加外力為 3-10nN，懸臂下針量為 1 $\mu$ m 量測各組各 10 個細胞之力量-位移曲線，得到其細胞膜剛性係數，探討在不同情況下的差異。

## 三、實驗與結果討論

1. 圖 1 為各條件下細胞膜剛性係數典型之力量-位移曲線圖，實驗中對於紅血球細胞進行受力曲線；圖 1(a)紅色箭頭為上針方向，藍色箭頭為下針方向，因上針時會受到紅血球細胞的黏彈回復力影響，量測時就多了一個不穩定的因子，所以膜的剛性係數以下針時所得的曲線斜率為依據。表 1 為不同情況下紅血球細胞膜剛性係數摘要統計表，存放於 4°C 環境下的紅血球膜剛性係數平均為 108.13 $\times 10^{-3}$  N/m，標準差為 4.45 N/m；而存放室溫下之紅血球細胞膜剛性係數平均為 105.02 $\times 10^{-3}$  N/m，標準差為 2.84 N/m；於室溫環境下存放 240 min 後之紅血球細胞膜與 4°C 環境比較其剛性係數雖略微減少，但由 Sheffer 檢定可得兩者間沒有顯著性差異。

2. 照射 240 min 之紅血球細胞膜剛性係數平均為  $93.21 \times 10^{-3}$  N/m，標準差為 3.67 N/m；此與室溫環境下紅血球細胞膜剛性係數明顯降低，由Sheffe檢定得到兩者間有顯著性差異。亦即正常紅血球細胞在室溫下，照射平均強度  $5 \text{ W/m}^2$  紫外光 240 min 的紫外光，劑量為  $7.2 \times 10^3 \text{ J/m}^2$  後的紅血球細胞膜剛性係數明顯降低；此推測是紅血球細胞經過紫外線照射之後，細胞膜的細胞骨架受到破壞，細胞骨架被破壞之後即無法支撐細胞外型，使得細胞變形、變軟，因而使細胞膜剛性係數降低。
3. 目前正設計將大鼠全身刮毛，直接照射不同劑量的UVB後取其紅血球細胞做量測，探究紅血球細胞膜力學性質的改變；並與直接將紅血球細胞照射不同劑量UVB所得之膜剛性係數做比較，研究不同條件之間的關聯性。

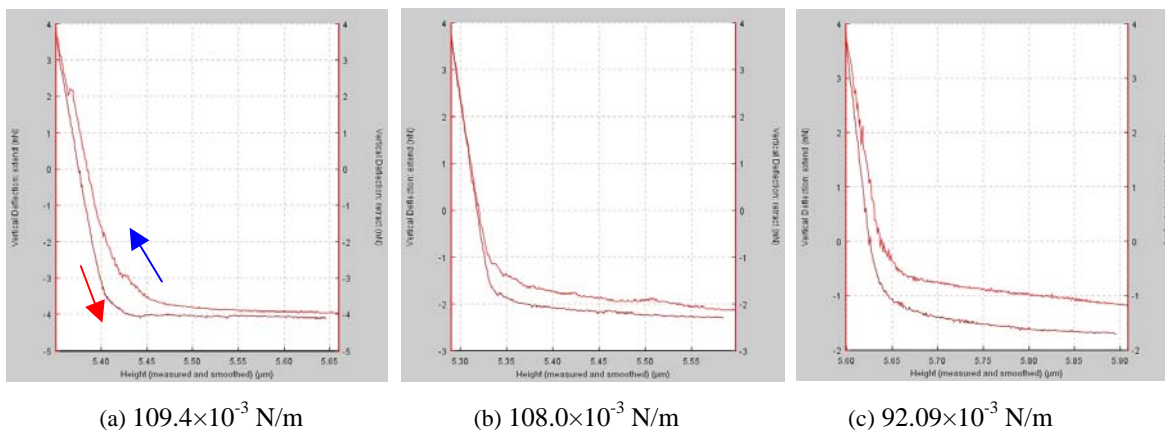


圖 1 (a) 4°C 環境(b)室溫環境與(c)照射紫外光之後典型的紅血球膜剛性係數之力量-位移曲線圖

表 1 不同情況下紅血球細胞膜剛性係數摘要統計表

	膜剛性係數 (N/m)		
	4°C	室溫下	$7.2 \times 10^3 \text{ J/m}^2$
樣本數	10	10	10
平均值*	$108.13 \times 10^{-3} \text{ a}$	$105.02 \times 10^{-3} \text{ a}$	$93.21 \times 10^{-3} \text{ b}$
標準差	4.45	2.84	3.67

\*使用Sheffe檢定，在同一列上不同的上標表示平均值±標準差彼此有顯著性差異