

摘要

「培養皿微透析探針」是利用微透析技術直接在細胞培養皿上取樣的專利裝置，改進了以往細胞培養實驗時，取樣過程中繁複、瑣碎的步驟，同時減少在實驗過程中因待測時間的不同，而需同時準備大量細胞培養皿；利用此培養皿微透析探針，可針對同一盤細胞培養皿中之細胞株，細胞培養液中化學物質的變化作一長時間連續偵測，據以了解細胞株生理或病理現象的變異。

應用此一技術，我們探討離體細胞在正常或缺氧的情況下表現的生理或病理反應；從細胞釋放到培養液中的化學物質的含量變化，作為離體細胞從正常趨向病態的指標；本研究結果證實，此項裝置適用於嗜鉻腫瘤細胞及肝臟實質細胞的細胞培養，可同時偵測神經及能量相關化學物質及其代謝物等，以提供細胞培養液中化學成份之動態變化。

本分析技術提供一種快速偵測細胞培養液化學成份的方法，簡化以往經由放射線酵素標定、化合物萃取、離子交換樹脂或強酸去蛋白過濾等收集樣品再行偵測細胞培養液中化學物質的方式，同時提供「長時間連續性取樣」的優點，以探討離體細胞生理之動態變化。

Abstract

“Petri dish microdialysis probe” is a pattern device which uses microdialysis technique directly sampling on petri dish. It improves the complicated and trivial procedure during the sampling process while we used to do in cell culture. And, at the time, it reduces the amount of petri dishes according to different testing time. We use the probe to do a long-term continual detecting for the chemical substance changes in the cell culture medium, therefore, to know about the variation of the physiological or pathological phenomena to the cell line.

Applying this technique, we discuss the physiological or pathological reactions in vitro under normal or hypoxic condition and apply this amount changes of the chemical substances, which release from the cell into the medium, as a indicator of the cell changing from normal toward ill status. The experiment results reveals that this device is suitable for the cell culture of pheochromocytoma and primary liver cell, and in the mean while, by detecting the neurotransmitter and energy metabolism. It shows the dynamic changes in the chemical substances of the cell culture medium.

This analysis technique offers us a way to rapidly detect the chemical substance in the cell culture medium. It simplifies the way we used to detecting the chemical substences in the cell medium after sampling via isotop labling, chemical extraction, ion-exchange, or acid deprotein filtration. It advanteges us a long-term, continual sampling method to study the dynamic changes of the physiology of the in-vitro cell.

緒論

一、 微透析技術

微透析 (microdialysis) 技術是一特殊的化學物質取樣方法,於 1972 年係由西班牙之 Delgado 及瑞典之 Ungerstedt 等人自更早的壓抽導管 (push-pull cannula) 改進而來 (1)。鑑於壓抽導管會在灌流部位造成壓力破壞 (pressure lesions), 或是吸出並侵蝕器官組織, 因而容易造成器官組織破壞, 對動物實驗造成相當的影響或干擾(2,3); 因此提出將灌流液與細胞外液利用一半透膜分開的構想(4,5)。這些方法逐漸發展成現今所使用的微透析管探針 (microdialysis probe); 近十年來微透析技術的研究著重在透析膜改良及透析管的式樣, 並增進透析管的功能, 以配合各種離體或活體之應用需求。

微透析技術主要是針對活體細胞外液的取樣設計, 類似人造血管 (blood vessel) 功能, 使用的微型透析管可以減少實驗時細胞組織的傷害並取得生物檢體, 且不影響生物體細胞外液之流體體積。微透析管的設計可使用於不同目的用途; 例如可在麻醉或清醒動物之血液和各種不同的器官進行微透析取樣。而微透析膜因具有生物相容性和極佳的擴散性, 且透析管可保持於無菌情況, 故可減少對器官組織的刺激, 也可以應用於大型動物或人類的研究。

微透析技術直接取樣細胞外液之組織空間的化學物質以檢測其成分, 或是注入某種化學物質至該區域視其生物反應效果, 這種方法可降低取樣方式對於生物體的干擾, 且更能有效地反映出在微觀下各種生理、藥理或病理機轉(6)。同時此技術可取得活體 (in vivo) 或離體 (in vitro) 微

量的樣本，且有優於其他傳統取樣的優點，例如透過微透析管取樣時，可將局部之蛋白質或其他大分子排除在膜外，而可得到相當乾淨之檢體液體，故能直接送入分析儀器分析（高效液相層析儀或臨床微透析分析儀），而可同時偵測數種不同的化學物質(7,8,9)。總之，微透析技術主要的優點是：方便偵測細胞外液中化學物質濃度的相對變化，而且是非常簡單，可快速操作及高靈敏度的分析方法。

二、 微透析管探針 (microdialysis probe) 介紹

微透析管探針在市面上有許多不同的型式，而最常被利用的型式是針狀微透析管探針（如圖一），其設計分為內外管，分別運輸灌流液及蒐集透析物，微透析管探針的前端覆有一層透析膜，化學物質可利用濃度梯度為動力在膜的兩側移動，透析液是以微量幫浦推動一微量注射器，自內管注入而後由外管處回收後導出（如圖二）。當微透析管探針插至腦或其他組織時，膜外(細胞外液)的化學物質依濃度梯度擴散到微透析管探針中。此外，在透析液中亦可加入藥物或各種兒茶酚胺之激動劑 (agonists) 及拮抗劑 (antagonists)，經由透析膜滲出而產生局部之藥物作用 (10)。

而本研究報告所採用的微透析管探針 - 培養皿微透析探針（中華民國專利發明第 091762 號）(如圖三)，可應用於一般細胞培養皿或類似之密閉系統內，對其培養液或水溶液進行微透析取樣，以便利分析；因為在一般細胞培養時，對培養細胞所分泌或代謝之物質的偵測，通常得利用放射線物質偵測方法、染色方式，或是其他分析方法，對細胞培養液取樣後進行分析，這些系統分析的方法有共同的缺點，尤其在欲對細胞培養作長時期監控時，必須對單一盤細胞依不同

時間連續取樣，但經常此種取樣容易對培養皿之細胞造成污染或甚至永久的破壞；有時必須同時做若干盤細胞培養皿，再依不同時間取樣，如此雖可達成實驗與統計之目的，但是各盤細胞間的品質不同、取樣的人為誤差及耗力耗時，亦會對結果產生不同的影響，經常對此分析數據造成質疑或須花費數倍的研究時間。故利用此培養皿微透析探針則可針對上述問題，直接在二氧化碳培養箱內，對同一盤培養細胞做一長時間的偵測，又可透過自動化微透析取樣及自動化分析之設計，順利解決上述之多項問題。

此微透析取樣器的原理係於培養皿上蓋做一透析管，其透析膜管浸潤於細胞培養液中（如圖四），培養細胞所分泌或代謝的物質可經由培養液擴散至透析膜內，再由灌流系統將化學物質帶至收集系統收集，再送至偵測系統偵測，或直接連線偵測系統，進行線上自動取樣及自動分析的系統。

三、 微透析技術應用

微透析技術配合分析儀器之應用相當廣泛，自兒茶酚胺到藥物均可定性與定量的偵測。一般對於神經化學物質之測定，在進行離體或活體實驗時，可配合高效液相層析裝置或其他分析儀器分析所收集之透析液，而所測得的神經化學物質或藥物之含量，則可反映出離體或活體組織中之含量，更主要的是透析膜阻隔了體液中大量的蛋白質、酵素、免疫相關之因子，故可同時達到純化與取樣之目的。

近年來微透析技術已廣泛地應用於基礎與臨床神經醫學研究，在神經藥理學研究中，使用於人體或動物體偵測藥物分佈的濃度，所得到藥物動力學參數(11)，遠比傳統的方法更方便，這在歐美已成為藥理學研究的一個新的趨勢。微透

析技術在人體新陳代謝的臨床應用也有相當程度的進展，微透析應用於新陳代謝的研究，可以很容易的測得藥物或其他小分子的代謝物；將微透析探針置於人體脂肪和肌肉組織，可以連續測得在脂肪和肌肉組織不同的新陳代謝物質的濃度變化；例如葡萄糖、乳酸、丙酮酸（影響碳水化合物之新陳代謝）和甘油（影響脂質破壞而形成脂質分解），甚至亦可研究較易通過透析膜的小分子，如腺甘酸(adenosine)、尿素（urea）和胺基酸（amino acid）。此種分析使用相同探針可以同時偵測不同的代謝物並且可連續測得在脂肪和肌肉組織中代謝物濃度，所測得這些代謝物濃度也可與藥理學研究配合，將來在臨床醫學的應用可以整合上述的醫療研究與醫療行為，成為臨床微透析技術的一新的貢獻，這不僅是分析技術方面的突破，更可促進醫藥科學的發展。

四、 兒茶酚胺的偵測

另一方面利用微管柱高效液相層析儀偵測兒茶酚胺的技術亦為微透析技術的偵測提供相輔相成的效果。而關於體內兒茶酚胺的偵測研究始於 1949 年，主要是利用酵素進行分析(12)，但因實驗過程中須利用到放射性同位素物質，故此種分析方法接受度較差；1960 年代開始有人利用氣相層析技術（Gas Chromatography，GC）來偵測兒茶酚胺，而所使用的偵測器有電子捕獲偵測器（Electron-Capture Detector，ED）(13)、火燄離子偵測器（Flame Ionization Detector，FID）(14)和質譜儀（Mass Spectrometry，MS）(15,16)，但實驗過程的煩瑣程序與儀器的昂貴笨重，且須相當熟練之儀器操作技巧，是此分析技術的障礙因素；在 1970 年代有學者將高效液相層析技術應用在兒茶酚胺的研究上，而在偵測器方面則有紫外光偵測器、螢光偵測器(17,18)，雖然紫外光對流體流速和溫度改變的影響最小，

但其偵測極限約在 10^{-10} g/ml 之間，所以只有尿液中含量較高的兒茶酚胺可直接被偵測出來，而螢光偵測器雖具有敏感性高選擇性良好的優點，但因只有少數物質才能接受紫外光的照射而激發螢光，故雖可提高偵測極限至 10^{-11} g/ml，但仍不甚理想；因此尋求一個簡便又可靠的方法便成為一重要的課題；因為兒茶酚胺具有氧化還原的特性，在 1973 年 Kissinger 等人率先利用電化學偵測系統配合高效液相層析技術成功偵測鼠腦脊髓液中的兒茶酚胺及其代謝物質 (19)，而後在這十多年來不斷改良電化學偵測技術下，其靈敏度已達 10^{-12} g/ml；目前利用微管高效液相層析儀/電化學偵測器偵測微量之兒茶酚胺已被認為是最普遍且具高靈敏度的方法之一。

五、 能量代謝物質的偵測

此外在一般臨床生化檢驗項目中，乳酸和丙酮酸的數值通常代表著循環失調嚴重性的指標。如肝硬化、充血性心臟衰竭、糖尿病、神經肌肉方面失調和維生素 B₁、B₁₂ 缺乏等，乳酸和丙酮酸的數值均顯著上升 (20)。因此偵測乳酸和丙酮酸的數值可提供為細胞生理功能的表現指標 (21, 22)；我們找到一種分離管柱，藉以分離乳酸和丙酮酸，再配合紫外光偵測器偵測，而達到分析乳酸和丙酮酸數據的效果。

六、 在嗜鉻腫瘤細胞偵測兒茶酚胺的意義

藉由培養皿微透析探針的取樣和微管柱高效液相層析儀的技術，我們欲瞭解嗜鉻腫瘤細胞經由氰酸鉀處理後，兒茶酚胺釋放的改變與 PKC 的調節兩者之間的關係。

兒茶酚胺的釋放與細胞內鈣離子的濃度有關 (23)，而細胞內鈣離子濃度的恆定又與 ATP 產量的多少有關，同時 ATP

的產量與粒線體內氧化代謝的作用有絕對的關係(24)；因此我們使用發源於大白鼠腎上腺髓質 (Adrenal Medulla) 的嗜鉻腫瘤細胞 (Pheochromocytoma, PC-12) 為研究材料，因這些細胞能夠製造多巴胺 (Dopamine)，正腎上腺素 (Norepinephrine) 等兒茶酚胺(25)，所以當投予氰酸鉀 (KCN) 後，因其中氰酸根離子會抑制粒線體電子傳遞鏈中 Complex IV 的作用，進而阻止了氧氣的消耗及 ATP 的產生(26)，而這些作用則影響了與鈣離子相關的兒茶酚胺的釋放，又因細胞內鈣離子的濃度與 PKC 的調節有關(27)，所以藉由偵測嗜鉻母細胞瘤細胞所釋放出的兒茶酚胺的變化來探討「PKC 之抑制劑 – Staurosporin/G06976」和「葡萄糖的存在與否」兩個因素對細胞的生理作用所造成的影響。

七、 肝臟實質細胞在缺氧下偵測丙酮酸和乳酸的意義

肝細胞是人體中代謝、解毒功能的主要細胞，具有最齊全的酵素種類及含量，因此肝細胞培養液可以提供許多細胞生理上的訊息，作為檢測環境中有害因子的敏感指標，或作為篩選藥物的重要工具。

在缺氧的情況下，肝細胞的能量調整因氧氣供給斷絕，造成 ATP 利用殆盡，同時無氧呼吸作用引發乳酸堆積，致使細胞功能失調，最明顯的變化即在於細胞膜需能幫浦對電解質及滲透壓的調節失常，再加上代謝物的堆積，造成細胞腫脹，胞器失去功能，以致最終凋亡(28)。

偵測丙酮酸與乳酸的含量成為評估肝細胞正常與否的生理指標。因為細胞能量的產生，從葡萄糖開始，經由糖解作用 (Glycolysis) 形成丙酮酸後，分為兩條路徑：其一透過乳酸脫氫酶 (LDH) 轉變成乳酸，是為無氧呼吸；其二則進

入粒線體 (Mitochondrion) 內之檸檬酸循環 (TCA cycle) 產生 NADH , 再到電子傳遞鏈與氧作用產生 ATP , 為有氧呼吸 (圖四); 因此丙酮酸、乳酸的含量與氧的有無應有某種程度的關係。

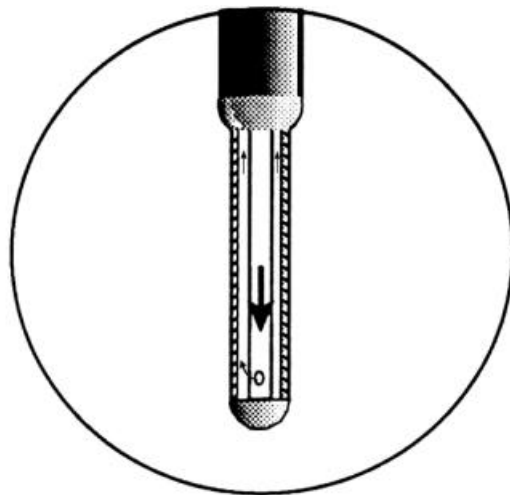
八、 研究目的

應用此培養皿微透析探針，我們擬以探討在正常或缺氧的情況下，肝細胞能量代謝物質-丙酮酸及乳酸的變化，以建立肝臟實質細胞在缺氧情況中所表現出的生理數值，這些變化也可以反映在臨床上，肝臟移植過程中，肝臟所處之的環境及可能表現的生理數值；另一方面，結合微管柱高效液相層析電化學偵測系統，偵測嗜鉻腫瘤細胞所釋放至培養液的兒茶酚胺的含量，探討嗜鉻腫瘤細胞，經氰酸鉀處理所模擬出缺氧的環境下，兒茶酚胺的釋放與 PKC 的調節兩者之間的關聯性，而這可反映出腦部細胞在缺氧的環境下可能表現出的生理數值。因此，藉由上述兩個實驗所得到的結果，我們得證實了培養皿微透析探針技術，應可用在廣泛的細胞培養實驗中。



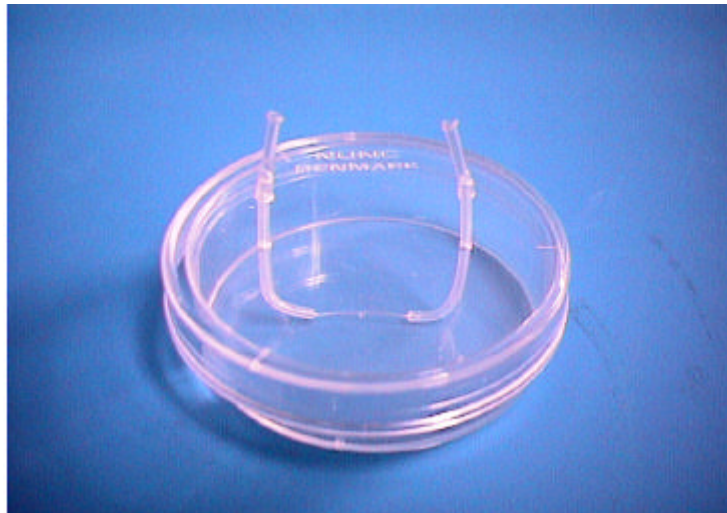
圖一、 針形微透析管探針

(CMA/12 Microdialysis Probe User's Manual)

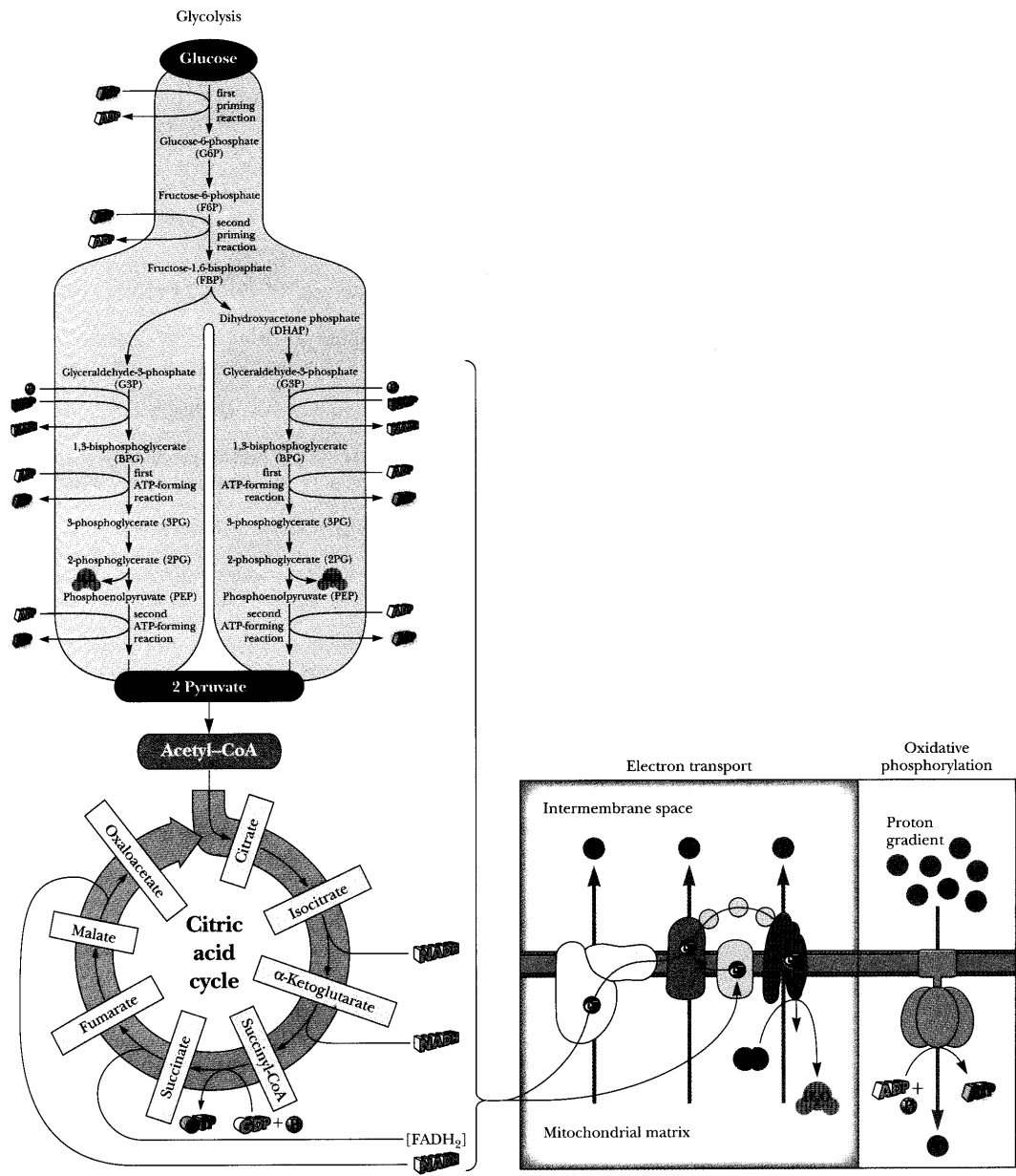


圖二、 灌流液在微透析管內的流向

(CMA/12 Microdialysis Probe User's Manual)



圖三、 培養皿微透析探針實體圖



圖四、能量代謝生化路徑圖

(Reginald, H. G., Charles, M. G. Biochemistry 1995 p.599)

材料及方法

一、實驗材料

1. 肝臟實質細胞培養之動物選擇

肝臟實質細胞之製備與分離，由台中榮民總醫院實驗動物繁殖研究中心提供 200 ~ 250 g 重之雄性 Sprague-Dawely 大白鼠。依據 Berry 和 Friend 與 Bonny 等人發表的報導(29,30)。

2. 試藥

化學藥劑

Norepinephrine (NE/HCl, Sigma)

Epinephrine (EPI/bitartrate salt, Sigma)

Dopamine (DA/HCl, Sigma)

Pyruvic acid ($C_3H_3O_3Na$, Sigma)

L(+)-Lactic acid ($C_3H_5O_3Li$, Sigma)

細胞培養用藥

Percoll (Pharmacia)

Collagenase A (Boehringer Mannheim)

Williams' Medium E (GibcoBRL)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Cat.No.12800, GibcoBRL)

Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, GibcoBRL)

A 液 (HBSS + 1ml 之 2N NaOH + 0.19g EDTA)

B 液 (HBSS + 0.1ml 之 2N NaOH + 0.019g EDTA)

N-2-Hydroxyethylethylpiperazine-N'-2-Ethane Sulfonic acid
(HEPES, GibcoBRL)

Sodium Hydrogen Carbonate (NaHCO_3 , Merck)

MEM Non-Essential Amino Acid Solution (GibcoBRL)

Penicillin-Streptomycin (Boehringer Mannheim)

反應用藥

KCN (Sigma)

HPLC 用藥

Monochloroacetic acid (CH_2ClCOOH , BDH)

Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA, Merck)

Sodium 1-octane sulfonate ($\text{C}_8\text{H}_{17}\text{O}_3\text{SNa}$, Sigma)

Acetonitrile (CH_3CN , BDH)

3. 儀器

貝克曼高效液相層析儀及電腦資料處理系統(Beckman HPLC Gradient Pump System 126, System Gold Data Analysis System, Interface I/O 406)。

自動微量注射系統 , CMA 200 (CMA, Stockholm, Sweden)

電化學偵測器 , BAS Amperometric Detector LC-4C (BAS, U.S.A.)

玻璃碳工作電極 , Glassy Carbon Working Electrode (BAS, U.S.A.)

Ag/AgCl 參考電極 (BAS, U.S.A.)

精密電動天秤 , (Chyo JPN-200W, Tokyo, Japan)

高速離心機 , (Centrifuge KUBOTA6700, Tokyo, Japan)

二次去離子水製造機 , (MilliporeMilli-Q pump, Tokyo, Japan)

高效液相層析分離管柱 , 1.0 mm x 150 mm I.D. Analytical microbore reversed-phase column filled with Inertsil ODS-2 (GSK-C18 , 5 μ m ODS, GL Sciences Inc., Tokyo, Japan)

Analytical column , 4.6 mm x 220 mm I.D. Polypore column (Bromneelab, U.S.A.)

微量幫浦注射器 , CMA/100, 含玻璃注射針。

檢體收集器 , CMA/140

微量自動注射器 , CMA/160

紫外光偵測器 , (BAS)

Brand name CO₂ 恆溫培養箱

5% CO₂ + 空氣混合氣體鋼瓶

5% CO₂ + 氮氣混合氣體鋼瓶

厭氧裝置 , Hypoxia chamber, (Billups-rothenberg Inc)

二、 實驗方法

1. 培養皿微透析探針的設計原理和製作方法

A. 透析膜的材質

透析膜孔徑大小和材質的不同,可以決定透析物質的分子量和極性,目前可使用透析膜的材質有 Cellulose、Polymer、Acrylic copolymer 等; Cellulose, 適合透析胺基酸、單胺物質、乙醯膽鹼等物質; Polymer, 適合透析胺基酸、單胺物質等物質; Acrylic copolymer, 則可以透析胺基酸、單胺物質、催產激素 (Oxytocin) 等物質。

同時回收率 (Recovery ratio) 除了與透析液流速有關外,也與透析膜的材質也有很大的關係;如 Cellulose 回收率約為 10 35%,而 Polyacrylonitrile copolymer 回收率則可高達 45 60%。

B. 透析探針與透析膜管之橫徑

對於透析探針和透析膜管之橫徑與回收率的影響必須先考慮圓柱體表面積的數學關係式:

$$A = 2 \pi r l$$

A: 表面積

r: 半 徑

l: 長 度

A 如果愈大，則可進行透析的區域就愈大，回收率相對也就愈高。而在此方程式中能影響 A 的變數只有 r 與 l 兩者，因為透析膜材質孔徑受限於廠商所能提供的固定規格，因此增大 l 的數值成為唯一的考量因素。

C. 微透析探針之製備材料與製作步驟

I. 製備材料

微透析通透膜 (Microdialysis membrane)

Polyacrylonitrile / Sodiummethallylsulfonat

I.D. 0.22 mm O.D. 0.31 mm

Cut off 5000-10000 Da

HOSPAL , BOLOGNA ITALY

引流導管 (Tubing)

Polyethylene

I.D. 0.38 mm O.D. 1.09 mm

CLAY ADAMS , PE-20 , U.S.A.

快速膠 (Instant Glue)

TOAGOSEI CO.,LTD Japan

II. 培養皿微透析探針之製作步驟

- i. 取 PE-20 管二根，長度約為 250 mm，一側用微火烤彎成 90 度，底部長度為 2 mm。如圖 1：

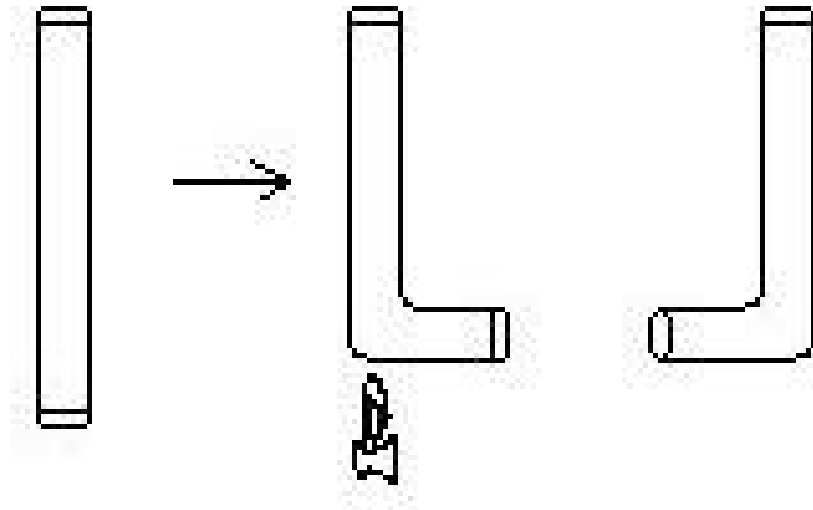


圖 1

- ii. 取透析膜管，長度約為 24 mm，將之穿入左右二支 PE-20 管的底部，其中以頭髮貫穿，接合處用快速膠密封。如圖 2：

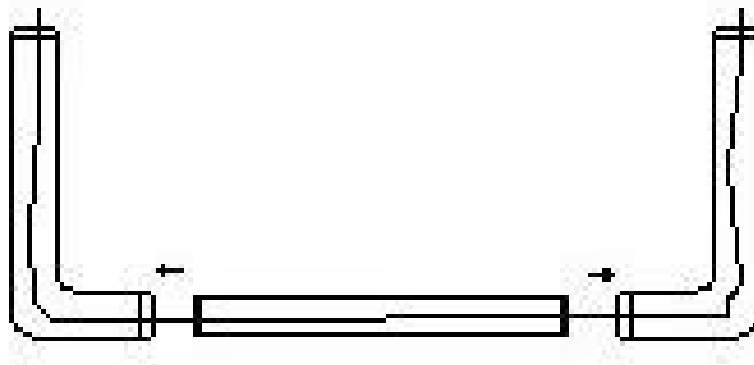


圖 2

- iii. 待膠乾了之後，抽出頭髮，一端灌入清水，測試接合處有無漏液的現象。如圖 3：

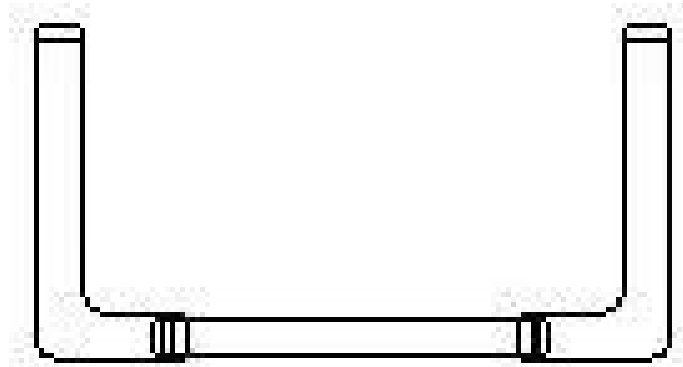


圖 3

- iv. 培養皿上蓋以小型電鑽鑽孔，直徑需與 PE-20 管的直徑相當，兩孔的距離為 24 mm。如圖 4：

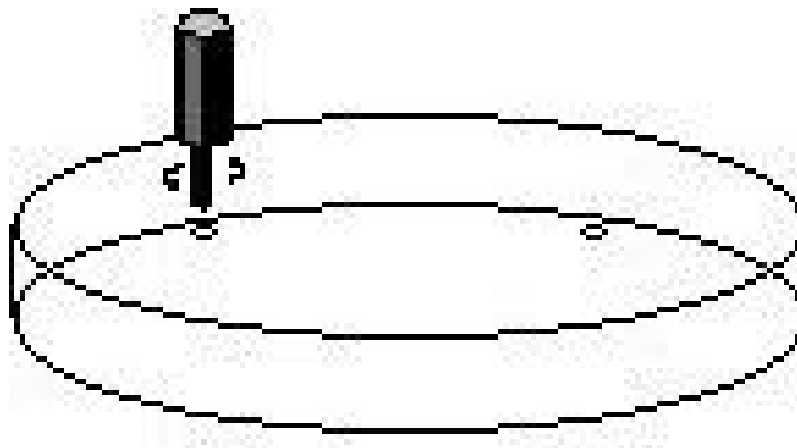


圖 4

v. 將圖 3 作好的半成品固定於圖 4 的培養皿上蓋。如圖 5：

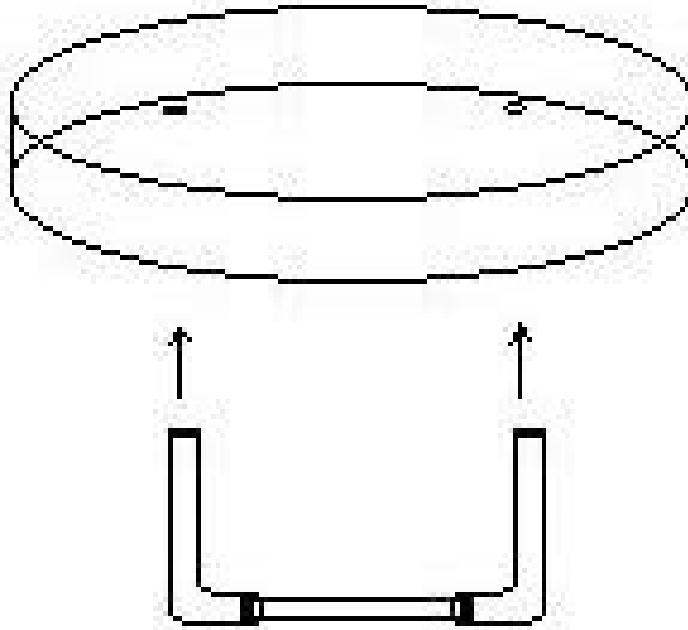


圖 5

- vi. 將兩端出口處套入 Adaper，置於下蓋，整個完成品以紫外線消毒封存。如圖 6：

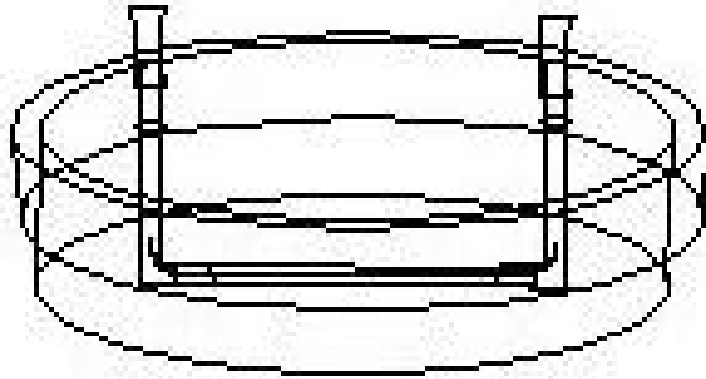


圖 6

2. 高效液相層析儀操作方法

A. 能量代謝物質測定

儀器：Beckman HPLC Gradient Pump System 126, UV Detector 166, Gold Data Analysis System, CMA/200 Autosampler。

高效液相層析分離管柱：Polypore column, 220 x 4.6 mm I.D.。

Mobil Phase：4 mM H₂SO₄ in H₂O；濃硫酸 112 μl in 11 H₂O。

操作方法：將培養皿探針及微透析系統之管路接受，並確認管路中並無氣泡產生，BAS-UV 光源設定為 214 nm，高壓幫浦流速設為每分鐘 0.5 毫升，通常系統約需 2 小時平衡時間，待平衡後，打入濃度為丙酮酸 10⁻⁵ M、乳酸 10⁻⁴ M 的標準品，確定管柱的分離效果及標準品濃度並無問題後，開始進行檢體分析。

B. 兒茶酚胺測定

儀器：BAS PM-80 Solvent Delivery System Pump, BAS LC-4C Electrochemical Amperometric Detector, BAS CC-5 Liquid Chromatograph, BAS Glassy Carbon Working Dural-Electrode, Beckman System Gold Analog Interface

Module 406 , CMA/200 Autosampler。

高效液相層析分離管柱：1.0 x 150 mm I.D. Microbore reversed-phase column filled with Inertsil ODS-2 (GSK-C18 , 5 μ m ODS, GL Sciences Inc., Tokyo, Japan)

Mobil Phase : Monochloroacetic acid (CH_2ClCOOH) 9.6 g , EDTA 10 mg , Sodium 1-octane sulfonate ($\text{C}_8\text{H}_{17}\text{O}_3\text{SNa}$) 160 mg , Acetonitrile (CH_3CN) 50 ml , 溶於 1 L 的二次去離子水中 , pH 值調為 3.0。

操作方法：將整個管路接上，確認管路中並無氣泡產生，氧化電位設為 0.55 伏特，還原電位設為 0.05 伏特，幫浦流速設為每分鐘 70 μ l，待系統平衡後，打入濃度為 NE、EPI、DOPAC 和 DA 均為 2 μ g/ml 濃度的標準品，其中標準品及檢體內均含有 10^{-7} M 的抗壞血酸 (Ascorbic acid) 及 0.1 N HCl 以防止神經傳遞物質因與空氣中的氧接觸而被氧化；確定管柱的分離效果及標準品濃度並無問題後，開始進行檢體分析。

3. 標準品混合液濃度與偵測系統分析數值之相關性實驗

為證實標準品混合液的濃度與偵測系統分析的數值 (Peak area) 是否呈現線性相關，以方便依內插法換算檢體的濃度。

A. 能量代謝物質之標準品混合液測定

配製 10^{-6} 10^{-3} mM 丙酮酸和 10^{-5} 10^{-2} mM 乳酸混合液。

取上述不同濃度之標準品，設定自動注射系統 (CMA/200) 並注射 10 μ l 進入高效液相層析儀偵測，求其所得的波峰面積 (Peak Area)，計算線性方程式。

B. 兒茶酚胺之標準品混合液測定

配製 0.2 400 pg/ μ l 濃度的 NE、EPI、DOPAC、DA 混合液。

取上述不同濃度之標準品，設定自動注射系統 (CMA/200) 並注射 5 μ l，求其所得的波峰面積，計算線性方程式。

4. 標準品混合液與透析檢體之精確度實驗

檢體自動注射系統 (Autosampler, CMA/200) 雖然很方便地將檢體注入偵測系統分析, 但因每次檢體分析時間約為 10 ~ 30 分鐘, 所以整批檢體分析前後, 其時間的差距往往有 6 ~ 8 小時以上, 在這時間內待測物可能因為本身的不穩定, 發生分解產生干擾物質, 所以為了明瞭時間差距是否造成分析的誤差, 以確保分析數據的可信度, 因此對實驗所採用的標準品和檢體均須作長時間之精確度實驗。

A. 能量代謝物質之精確度測定

配製 10^{-5} mM 丙酮酸和 10^{-4} mM 乳酸混合液。

取上述之標準品, 在 12 小時內, 每小時注射 $10 \mu\text{l}$ ($n=12$),

求其所得的波峰面積 (Peak Area), 計算變異係數

(Coefficient of Variation; CV)。

另將檢體數支集成一管, 同上述步驟測定。

B. 兒茶酚胺之精確度測定

配製 0.0002 和 0.01 ng/ μl 濃度的 NE、EPI、DOPAC、DA 混合液。

取上述之標準品, 在 12 小時內, 每小時注射 $5 \mu\text{l}$ ($n=12$),

求其所得的波峰面積, 計算變異係數。

另將檢體數支集合成一管，同上述步驟測定。

公式

$$CV = \frac{\text{Std. Dev.}}{\text{Mean}} \times 100 \%$$

CV : 變異係數。

Std. Dev. : 標準偏差。

Mean : 平均值。

5. 培養皿微透析探針的回收率測試

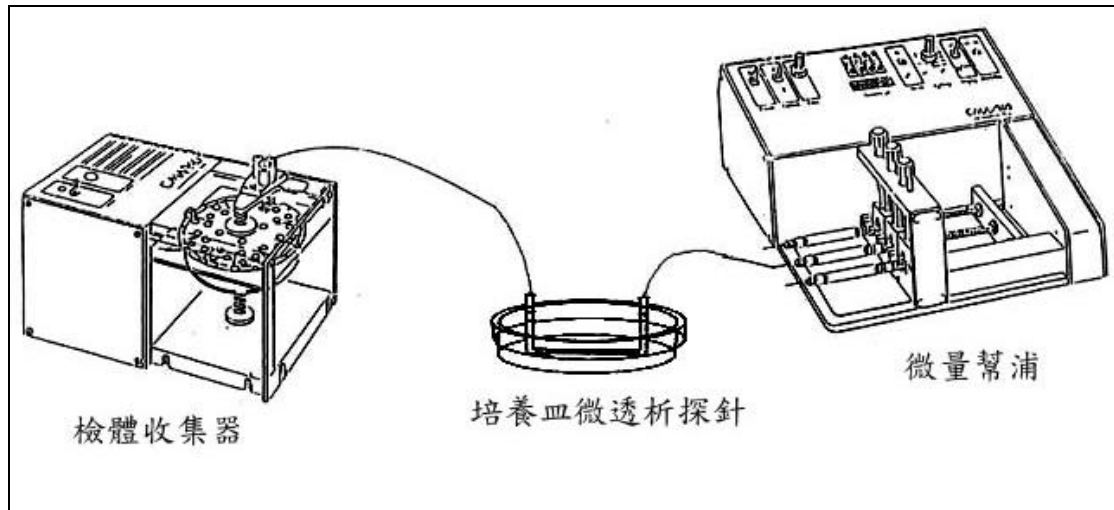
A. 能量代謝物質回收率測定

配製 10^{-4} mM 濃度的丙酮酸及 10^{-3} mM 乳酸混合液。

裝置培養皿微透析探針，一端以微細導管接至檢體收集器，同樣地，另一端以微細導管接至微量幫浦的注射針筒上，注射針筒內填充林格式液。將整個管路充滿林格式液，同時檢查有無外漏或不通的狀況；培養皿微透析探針裝置內放入丙酮酸、乳酸混合液 2 毫升，液面高度以能完全覆蓋透析膜管為原則，設定微量幫浦的流速為 $0.3 \sim 5 \mu\text{l} / \text{min}$ ，每 30 分鐘收集一管檢體(如圖五)，其中前 30 分鐘因未達平衡緣故，放棄不收集，只收集往後的五管微透析檢體，連同標準品(濃度為 0.2 mM)送入高效能液相層析儀，以 214 nm 波長的紫外線偵測分析，五管檢體的平均值除以標準品的數值得的百分比畫圖表示。

B. 兒茶酚胺回收率測定

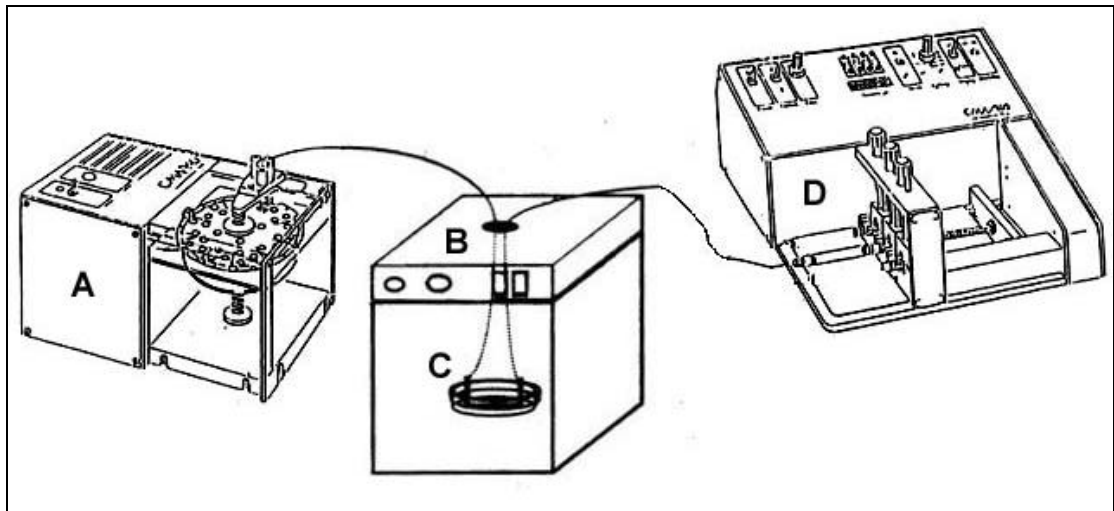
配製 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度的 NE、EPI、DOPAC、DA 混合液，培養皿微透析探針裝置內放入 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度的 NE、EPI、DOPAC、DA 混合液，其餘方法如同上述。



圖五、培養皿微透析探針的回收率實驗裝置圖

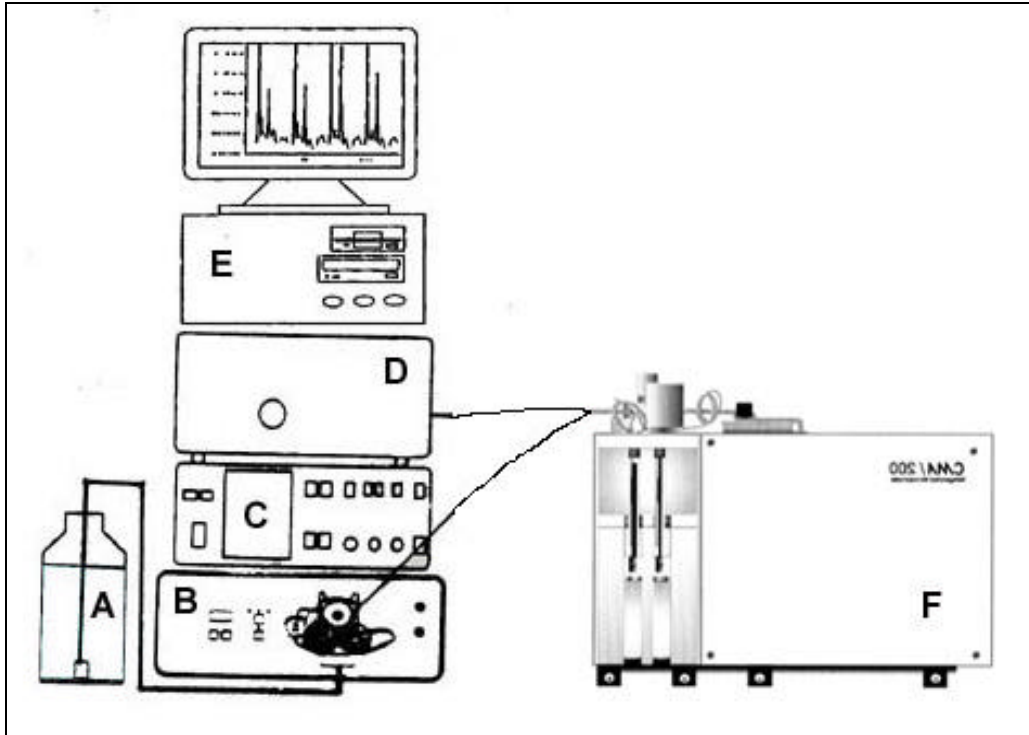
6. 嗜鉻腫瘤細胞 (Pheochromocytoma cell, PC-12) 微透析物質之收集與上線 (Off-Line)

培養 24 小時的 PC-12 細胞，先在顯微鏡下觀察其生長狀況是否良好，並予以照相存檔；更換培養基為 DMEM (不含酚瓠指示劑及血清)，此時將培養皿微透析探針置於 UV 燈下照射 5 分鐘滅菌，PC-12 細胞移入 CO₂ 培養箱中並把培養皿上蓋移除，置放入培養皿微透析探針，接好引流管路後，設定培養箱的 CO₂ 濃度為 10 % (如圖六)，在透析取樣的過程中，為避免透析液過份改變細胞培養基的成分 (因透析作用是雙向進行) 而影響細胞的生長環境，故微量幫浦注射針筒內的灌流液選擇已通過 0.22 μm 過濾膜過濾後的培養基液體 (DMEM，不含酚瓠指示劑及血清)，此時設定微量幫浦 (CMA/100) 的流速為每分鐘 2 μl，檢體收集器 (CMA/140) 設定為每 30 分鐘收集一支，實驗開始時先收集檢體 2 小時作為基礎值，再加入氰酸鉀 (模擬化學性缺氧的狀態，整個環境維持 0.5 mM KCN)，繼續收集檢體直到實驗結束，如此在不同環境下所收集到的檢體，依序由自動注射系統 (CMA/200) 送入 LC-ECD 中分析 NE、EPI、DOPAC 與 DA 含量的變化 (如圖七)。整個實驗流程如下 (如圖八)：



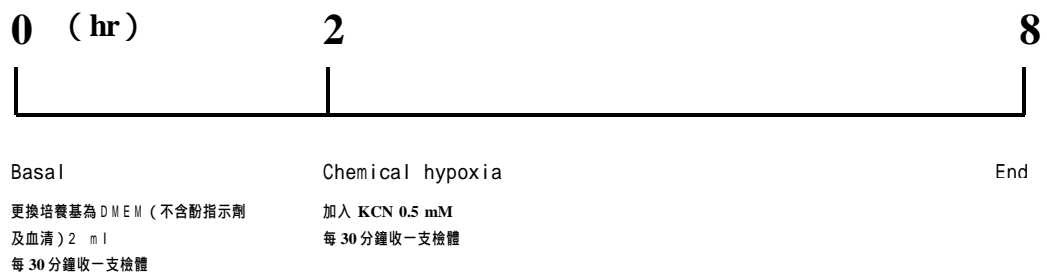
- A. 檢體收集器 (CMA/140)
- B. CO₂ 恆溫培養箱
- C. 培養皿微透析探針
- D. 微量幫浦注射器 (含玻璃注射針, CMA/100)

圖六、PC-12 細胞微透析檢體收集實際設備配置圖



- A. 流動相液劑 (Mobil phase)
- B. HPLC 幫浦
- C. 電化學偵測器
- D. 分離管柱置放盒
- E. Gold analysis system 分析電腦
- F. CMA/200 Microsampler

圖七、PC-12 細胞微透析物質之收集與上線檢體上線實際設備配置圖



圖八、PC-12 細胞微透析物質之收集與上線實驗流程圖

7. 大鼠肝臟實質細胞分離及培養

肝細胞分離法係依據 Berry 和 Friend (29) 與 Bonny (30) 等人發表的二階 (Collagenase) 灌流法分離。使用 Pentobarbital (10mg/100g) 將大鼠麻醉，以腹腔注射 (ip) 方式麻醉，固定大鼠，由肛門上方以 "V" 字形剪開腹腔，裸露腹腔，撥開內臟，找出肝門靜脈，將滯留針埋入肝門靜脈，待迴血後立刻接入灌流裝置；第一階段使用 A 液，以每分鐘 20 毫升的流速將肝臟的血液洗出，並隨時注意肝臟的變色狀況 (理想狀況顏色應由紅色轉為土黃色)，此時可施以肝臟按摩以加速血液循環；待 A 液沖洗約 100 毫升後，停止灌流，使用止血鉗夾住下腔靜脈。第二階段先將橫隔膜剪開，用利剪剪碎心臟後，使用 B 液 (含 膠 原 0 unit/ml) 灌流，此時流速降為每分鐘 10 毫升，持續按摩肝臟，並觀察肝臟組織有無 "碎裂" 現象，待分解作用完畢，換上 A 液灌流，洗去殘留組織中的膠原蛋白酵素，剪下肝臟移至 A 液浸泡冰浴。

冰浴之肝臟組織置放於篩網上，用剪刀剪碎，同時用 William E 液沖洗游離的肝臟組織細胞，分裝至離心管，離

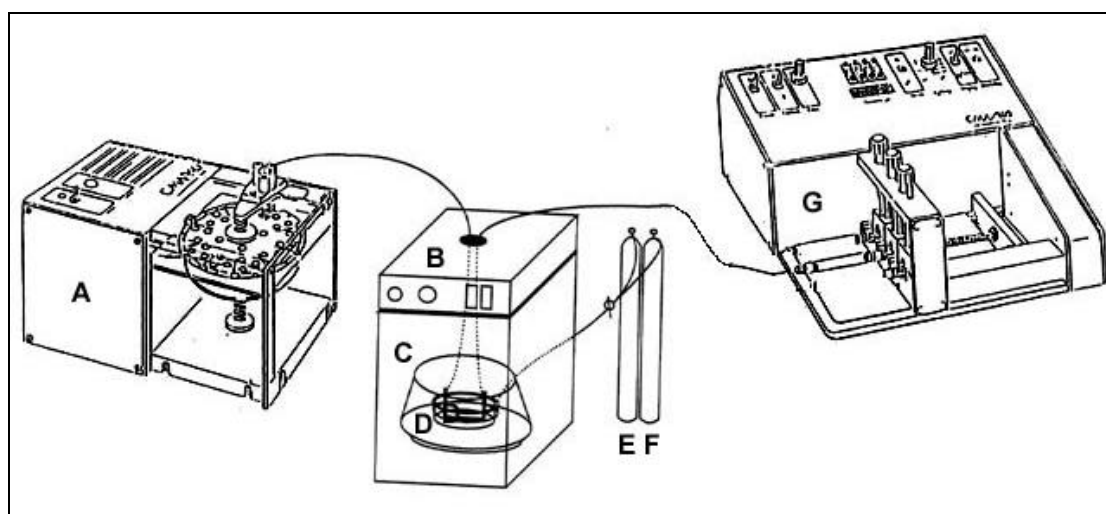
心 10 分鐘 ($\times 55\text{ g}$), 移除上清液後, 加入 William E :
percoll : 10X HBSS = 15 : 9 : 1 的混合液與細胞充分混合,
重覆上述離心步驟, 而得到肝臟實質細胞, 此方式乃依等密
度梯度離心的原理, 將肝臟實質細胞、受傷細胞、死細胞或
非肝臟實質細胞分開 (活肝臟實質細胞細胞在最下層); 而
後利用血球計數板計算活細胞數目, 以每個培養皿 3×10^5
活細胞數和 William E 為培養基分種於 3.5 公分的培養皿
後, 置於 CO_2 培養箱培養 4 小時, 使其細胞貼附於培養皿中,
再更換培養基為 William E + 10% 胚牛血清 (FBS) 繼續培
養至 24 小時。

8. 肝臟實質細胞微透析物質之收集與上線

(Off-Line)

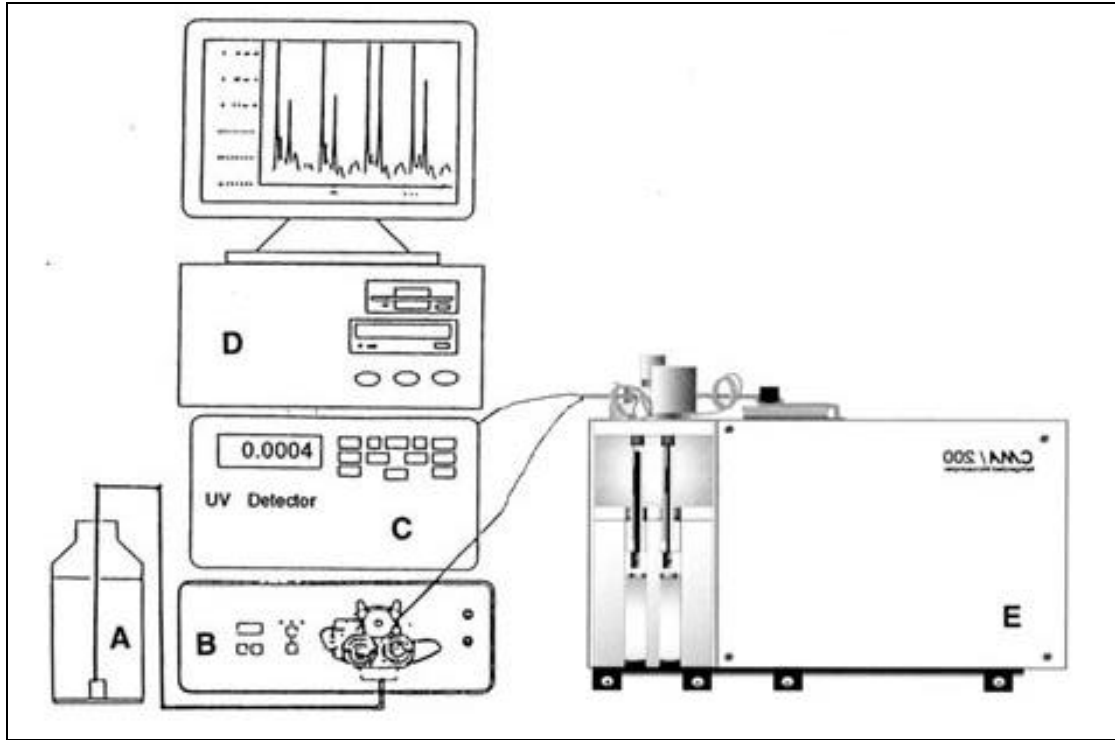
培養 24 小時的肝臟實質細胞，先在顯微鏡下觀察其生長狀況是否良好，並予以照相存檔；此時將培養皿微透析探針置於 UV 燈下照射 5 分鐘滅菌，肝臟實質細胞移入 CO₂ 培養箱中並把培養皿上蓋移除，置放入培養皿微透析探針，並將整個探針連同細胞移入 CO₂ 培養箱裏的厭氧箱 (Hypoxia chamber) 中，接好引流管路後，密合厭氧箱上蓋，通入 5 % CO₂ 和空氣的混合氣體 10 分鐘後關閉進氣口與出氣口 (如圖九)；在透析取樣的過程中，為避免透析液過份改變細胞培養基的成分 (因透析作用是雙向進行)，而影響細胞的生長環境，故微量幫浦注射針筒內的灌流液選擇已通過 0.22 μm 過濾膜過濾後的培養基液體 (DMEM，未含血清)，此時設定微量幫浦 (CMA/100) 的流速為每分鐘 2 μl，檢體收集器 (CMA/140) 設定為每 30 分鐘收集一支，實驗開始時厭氧箱內填充 5 % CO₂ 和空氣的混合氣體，待 2 小時後，內更換氣體為 5 % CO₂ 和氮氣 (N₂) 的混合氣體，以模擬缺氧的環境，4 小時後再度更換厭氧箱內的氣體為 5 % CO₂ 和空氣的混合氣體，以模擬再灌流時間 2 小時 (如圖十)，如此在不同環境

下所收集到的檢體,依序自動注射系統(CMA/200)送入 LC-UV
中分析丙酮酸與乳酸含量的變化。整個實驗流程 (如圖十
一):



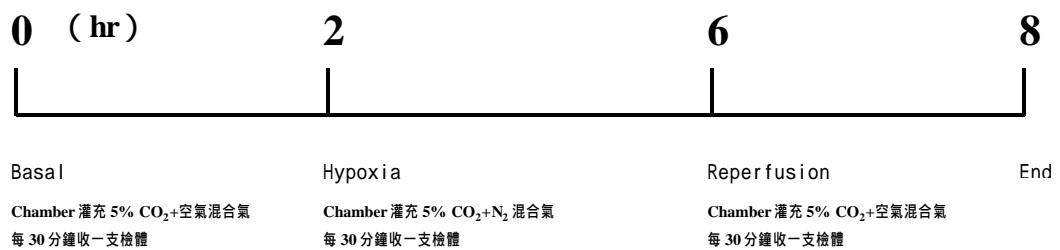
- D. 檢體收集器 (CMA/140)
- E. CO₂ 恆溫培養箱
- F. 厭氧裝置 (Hypoxia Chamber)
- G. 培養皿微透析探針
- H. 5 % CO₂ + 空氣混合氣體鋼瓶
- I. 5 % CO₂ + 氮氣混合氣體鋼瓶
- J. 微量幫浦注射器 (含玻璃注射針 , CMA/100)

圖九、肝臟實質細胞微透析檢體收集實際設備配置圖



- A. 流動相液劑 (Mobil phase)
- B. HPLC 幫浦
- C. 紫外光偵測器
- D. Gold analysis system 分析電腦
- E. CMA/200 Microsampler

圖十、肝臟實質細胞微透析物質之收集與上線實際設備配置圖



圖十一、肝臟實質細胞微透析物質之收集與上線實驗流程圖

結果與討論

一、兒茶酚胺的量與波峰面積的關聯性

NE、EPI、DOPAC 和 DA 的線性範圍從 1 pg 到 2000 pg 之間，經由微管柱高效液相電化學偵測儀分析後所得的波峰面積，經計算後其線性方程式的判定係數值 (R^2) 均趨近於 1，依此結果，爾後檢體濃度均可與標準品依內插法計算求得。(表一)

二、兒茶酚胺的標準品與嗜鉻腫瘤細胞透析液之精確度

標準溶液含 NE、EPI、DOPAC 和 DA 各 1 pg 和 50 pg 及嗜鉻腫瘤細胞透析液數支檢體集成一支，以每小時打入一次的時間隔連續打 12 小時，送入微管柱高效液相電化學偵測儀分析，其 CV 值各為 NE 3.9、EPI 5.7、DOPAC 6.2 和 DA 2.4。

另外取標準溶液含 NE、EPI、DOPAC 和 DA 各 50 pg (每天重新配製)，以一天打入一次的時間隔連續打六天，送入微管柱高效液相電化學偵測儀分析，其 CV 值則為 NE 2.3、EPI 3.5、DOPAC 4.2 和 DA 2.1。

由結果得知，DOPAC 由於本身就不穩定，所以在量少時其 CV 值較高，而嗜鉻腫瘤細胞透析液的 EPI 因量太少而無法偵測，其餘的 CV 值均在可接受範圍 ($< 5\%$)；此外由 Inter-assay 的 CV 值得到偵測儀器的精確度亦在合理範圍。而目前市面上可以買到的分析管柱，可偵測得到的範圍在

5~20 pg/ μ l 之間，使用微管管柱則提高偵測能力到 0.05 pg/ μ l 之間。(表二)

三、 兒茶酚胺的標準品在不同流速下，經由微透析 所得之回收率

由透析液測得的濃度 (C_{out})，並非細胞組織空間的實際濃度 (C_{in})，必須由透析管探針回收率校正，也就是在實驗之前求出回收率，簡單的算法如下：

$$\text{Recovery}_{in vitro} = C_{out} / C_{in}$$

$$C_{in} = C_{out} / \text{Recovery}_{in vitro}$$

微透析膜管的長度為 2 公分，透析時，微量幫浦的流速分別設定為 0.3 ~ 5 μ l / min，所得到之透析液分析數值與標準液分析數值作一比較，得出回收率；由結果得知，當微量幫浦的流速愈慢時，其回收率就愈高，但得到的透析液量就愈少，相對就必須延長收集時間，以得到足夠的檢體量；為使實驗中得到滿意的回收率和透析液量，往後的微量幫浦的流速設定為每分鐘 2 μ l，每支檢體收集 30 分鐘 (圖十二)

四、 兒茶酚胺之層析圖

A 圖是標準品混合液之層析圖譜，分析時間 30 分鐘，B 圖、C 圖分別是在 KCN 處理前後，從嗜鉻腫瘤細胞培養液所透析之檢體的層析圖譜，其中 EPI 偵測不到。(圖十三)

五、 嗜鉻腫瘤細胞在葡萄糖存在與否下，經氰酸鉀

處理後，NE 和 DA 釋出濃度測定

在葡萄糖缺乏，氰酸鉀處理後造成缺氧的情況下，NE 的釋出持續增高；而 DA 的釋出亦在缺氧後半小時內急速升高，而後再迅速下降，可知細胞雖因缺氧而造成能量缺乏，所以持續釋出 NE 和 DA，使得細胞外液的含量升高（因無能量供給，無法再回收到細胞內），同時得知，NE 的增加是持續升高，而 DA 的增加是呈現短暫(Transient)增高的現象。

反之，在葡萄糖存在，氰酸鉀處理後造成缺氧的情況下，NE 的釋出雖有增高，但增加的幅度不大；而 DA 的釋出狀況並不明顯，可知細胞雖因缺氧而造成能量缺乏，但因培養液中含有葡萄糖，仍有少許無氧呼吸作用得到較少的 ATP，嗜鉻腫瘤細胞應該可以得到些許能量，使得 NE 和 DA 可經再回收作用 (Reuptake) 回到細胞內，故經由細胞外液測得的 NE 和 DA 的含量並無明顯增高（圖十四）。

六、嗜鉻腫瘤細胞在葡萄糖缺乏下，經

Staurosporine 和 G06976 及氰酸鉀處理後，DA 釋出濃度測定

兒茶酚胺的釋放與細胞內鈣離子的濃度有關(23)，而細胞內的鈣離子濃度多少，主要由 PKC 這個蛋白質調控；Staurosporine 和 G06976 均為 PKC 的抑制劑，Staurosporine 非選擇性地抑制所有種類的 PKC，G06976 則選擇性地抑制 PKC_α、PKC_β和 PKC_γ，之前報告指出(31)，PKC_γ 在化學性缺氧下會被活化；由圖中得知，在葡萄糖缺乏的作用下，氰酸鉀處理後嗜鉻腫瘤細胞釋出 DA 的含量並無顯著升高的現象；可指出，嗜鉻腫瘤細胞在缺氧後，DA 的釋放應與細胞內 PKC

的活化調節有關。(圖十五)

綜合上述論點，微透析是使用於腦、器官、組織和血管中取樣化學物質的分析技術，目前微透析技術廣泛地應用於活體細胞外液空間的取樣及分析，而利用微透析取樣配合微管高效液相層析是一項新的技術，此種取樣和分析技術的配合可以對細胞培養液中之神經化學物質進行動態偵測外，同時因細胞外液空間是化學物質進出細胞的管道，可讓神經傳遞物質、代謝物、藥物、毒物等通過，因此可以進一步探討細胞培養液中這些化學物質的反應情況。本研究證實微透析技術除了應用在活體動物實驗上，亦可應用在培養細胞的實驗中。

本項「培養皿微透析探針」的專利裝置，針對以往細胞培養實驗時，樣品取得過程中須經過繁複、瑣碎的步驟，而利用微透析技術直接在細胞培養皿上取樣，可減少在實驗過程中因待測時間的不同而需準備細胞培養皿的數目；同時可針對「單一盤細胞培養皿」作一長時間連續偵測細胞組織空間待測物質的變化，據以了解細胞生理現象的變異。

嗜鉻腫瘤細胞是具有類似可合成、儲存多巴胺和正腎上腺素的腫瘤細胞，和神經細胞非常相似具有生理和藥理的性質，因此研究嗜鉻細胞瘤細胞中神經化學物質的釋放或吸收是有相當的學術應用價值。之前的研究指出，當嗜鉻腫瘤細胞經氰酸鉀處理而引發化學性缺氧時 (Chemical hypoxia)，會使得細胞釋放出多巴胺和正腎上腺素，而這作用是經由 PKC 活化來調控，並且和葡萄糖的存在與否有關；因此，我們應用此項裝置，重新測試嗜鉻腫瘤細胞經氰酸鉀處理後，

多巴胺和正腎上腺素的釋放情形，由圖十三的結果顯示，在培養液含有葡萄糖的情況下，經氰酸鉀處理的嗜鉻細胞瘤細胞釋放多巴胺和正腎上腺素的情形並不明顯，而在缺乏葡萄糖的情況下，正腎上腺素的分泌持續上升，多巴胺的分泌則在缺氧後半小時內升至最高，而後又急速下降回到正常值，多巴胺這種短暫上升的現象在此套偵測系統中清楚明顯的見到變化，這是以往偵測方法所無法達到的，此外，由圖十五的結果顯示，在不含葡萄糖的情況下，當給與 PKC 的抑制劑 - Staurosporine / G06976 後，嗜鉻腫瘤細胞雖經氰酸鉀處理，但多巴胺短暫上升的現象消失，此結果使我們更確切明瞭 PKC 的活化，在嗜鉻腫瘤細胞缺氧時，扮演一重要角色。

七、 丙酮酸和乳酸的濃度與波峰面積的關聯性

丙酮酸和乳酸的線性範圍從 0.1 nmole 到 100 nmole 之間，經由高效液相紫外光偵測儀分析後所得的波峰面積，經計算後其線性方程式的 R^2 數值均為 1，依此結果，爾後檢體濃度均可與標準品依內插法計算求得。（表三）

八、 丙酮酸和乳酸的標準品與肝臟實質細胞透析液之精確度測試

Intra-assay: 丙酮酸和乳酸分別配製 10 μ M 及 100 μ M，肝臟實質細胞透析液數支檢體集成一支，以每小時打入一次的時間連續打 12 小時，送高效液相紫外光偵測儀分析，標準品濃度誤差分別為丙酮酸 10.0 \pm 0.1 μ M，乳酸 100.4 \pm

2.1 μM ，其 CV 值分別為丙酮酸 1.3，乳酸 2.0，而肝臟實質細胞透析液濃度誤差分別為丙酮酸 $2.7 \pm 0.2 \mu\text{M}$ ，乳酸 $3.8 \pm 0.5 \mu\text{M}$ ，其 CV 值分別為丙酮酸 1.7，乳酸 1.2；另外 Inter-assay：丙酮酸和乳酸分別配製 10 μM 及 100 μM （每天新鮮配製），以一天打入一次的時間連續打六天，送入高效液相紫外光偵測儀分析，濃度誤差分別為丙酮酸 $10.0 \pm 0.2 \mu\text{M}$ ，乳酸 $100.0 \pm 3.3 \mu\text{M}$ ，其 CV 值分別為丙酮酸 1.7，乳酸 3.3；由結果得知，丙酮酸和乳酸標準品的 CV 值在接受範圍（ $< 5\%$ ），而肝臟實質細胞透析液的丙酮酸和乳酸因量少，其 CV 值較高；此外由 Inter-assay 的 CV 值得到偵測儀器的穩定度亦在合理範圍。（表四）

九、 丙酮酸和乳酸的標準品在不同流速下，經由微透析所得之回收率

同樣地，微透析膜管的長度為 2 公分，透析時，微量幫浦的流速分別設定為 0.3 5 $\mu\text{l} / \text{min}$ ，所得到之透析液分析數值與標準液分析數值作一比較，得出回收率；由結果得知，當微量幫浦的流速愈慢時，其回收率就愈高，但得到的透析液量就愈少；為使實驗中得到滿意的回收率和透析液量，往後的微量幫浦的流速設定為每分鐘 2 μl ，每支檢體收集 30 分鐘。（圖十六）

十、 能量代謝物質之層析圖

A 圖是標準品混合液之層析圖譜，分析時間 5 分鐘，B 圖、C 圖、D 圖分別是在缺氧處理前中後，從肝臟實質細胞培養液所透析之檢體的層析圖譜。（圖十七）

十一、 肝臟實質細胞在缺乏氧氣及回復供氧下，丙酮酸和乳酸濃度測定

肝臟實質細胞在正常供氧的情況下偵測 1.5 小時得到正常值 (Basal Value)，而後在缺氧箱填充 5 % CO₂ + N₂ 氣體 3.5 小時造成缺氧的環境，再度填充 5 % CO₂ + 空氣的混合氣體 2 小時，恢復正常供氧環境；由圖 A，圖 B，圖 C 得知，細胞在缺氧期間，丙酮酸的含量降低約 30 %，乳酸的含量升高約 10 %，乳酸和丙酮酸的比值則上升約 70 %；而在恢復供氧後，丙酮酸的含量上升，乳酸的含量升高漸緩且呈下降趨勢，乳酸和丙酮酸的比值則下降。(圖十八)

肝細胞是人體中代謝、解毒功能的主要細胞，在人體細胞中肝細胞具有最齊全的酵素，因此肝細胞培養液也可以提供許多細胞生理及病理上的訊息，作為檢測環境中有害因子的敏感指標，或作為篩選藥物的重要工具。此外，肝臟的移植，在臨床醫學方面是一項重要的手術，然而肝臟在移植過程中會經過離體之缺氧過程，移植至人體後再恢復供氧的狀況，在這兩個重要手術步驟之間的肝細胞生理狀況保存並不明朗，經常為手術成敗之關鍵，為得到此項數據以作為將來臨床上的參考，我們以偵測葡萄糖的兩個主要代謝物 - 丙酮酸和乳酸的含量為指標，應用「培養皿微透析探針」和「缺氧箱」，測量大白鼠的肝臟實質細胞經過缺氧及再供氧後，丙酮酸及乳酸含量的變化，由圖十八的結果顯示，缺氧時，丙酮酸的含量大約減少 30 %，乳酸的含量約上升 10 %，乳酸/丙酮酸的比值則上升 70 %；而再供氧後，丙酮酸含量上升，而乳酸含量上升趨緩且有下降趨勢，因此這個結果提供將來肝臟移植手術時，我們可在待移植肝臟植入一微透析探

針，連續監測丙酮酸及乳酸的含量，從監控數值上的變化，我們可預期肝臟保存時期的生理功能以確保手術之順利進行。

綜合以上兩個實驗結果，均得到我們預計的結果，證實了此項「培養皿微透析探針」應用方面的可行性；在嗜鉻腫瘤細胞和肝臟實質細胞研究，本研究亦可推廣至其他細胞株培養或培養神經實質細胞，除了本研究所偵測之兒茶酚胺及能量代謝產物外，對於細胞外容易測得的小分子，例如甘油（Glycerol）、腺甘酸(Adenosine)、尿素（Urea）和胺基酸（Amino acid）等，均可利用微透析的方法取得檢體，再經適合的偵測器分析；此外，此裝置亦適用於各式之細胞種類，這在臨床醫學的研究上，成為臨床微透析技術的一新的貢獻，不僅是分析技術方面的突破，更可促進醫藥科學的發展。

結論

應用微透析技術，我們發展出可直接在細胞培養皿上取樣的專利裝置-培養皿微透析探針，大大簡化了樣品取得過程中繁複、瑣碎的步驟，並可針對同一盤細胞培養皿中之細胞株，作長時間連續偵測細胞培養液中化學物質的變化，據以了解細胞株生理現象的變異。在實際應用上，探討不同細胞株在正常或缺氧的情況下表現的生理反應，並從偵測細胞釋放到培養液中的化學物質的含量變化，作為細胞生理病理學的指標。

應用此項裝置與微管柱高效液相電化學偵測系統，從嗜鉻腫瘤細胞實驗中，我們可使當細胞經氰酸鉀處理而引發化學性缺氧時，細胞釋放出多巴胺和正腎上腺素的含量動態變化，Staurosporine 和 G06976 抑制 PKC 的結果，也證實多巴胺和正腎上腺素的釋放作用必須經由 PKC 活化來調控，同時與葡萄糖的存在與否有關，當培養液中含有葡萄糖時，多巴胺和正腎上腺素的釋出就不明顯。

應用此項裝置與高效液相紫外光偵測系統，建立了肝臟實質細胞在缺氧和再供氧的情況下，能量代謝物丙酮酸與乳酸兩者的消長生理數據，這個結果提供臨床肝臟移植手術時，藉由在待移植肝臟植入微透析探針，連續監測丙酮酸及乳酸的含量，從數值上的變化告知我們肝臟生理功能正常與否的參考。

總之，本技術提供一種快速偵測細胞生理狀況的方法，簡化以往經由放射線酵素標定、化合物萃取、離子交換樹脂或強酸去蛋白過濾等收集樣品再行偵測細胞培養液中化學

物質的方式，經由實驗證實此項「培養皿微透析探針」裝置在其應用方面的可行性，並且「長時間連續性取樣」的優點，對於探討離體細胞生理變化的動態數據提供了很大的助益。

表一、兒茶酚胺的量與波峰面積的關聯性。

	Standard Curve Equation ^a	R ²
NE	$Y = 4109 X + 7$	1.000
EPI	$Y = 4245 X + 15$	0.999
DOPAC	$Y = 6021 X - 8$	1.000
DA	$Y = 5967 X + 12$	1.000

^aY = peak area measured ; X = amount of analytes in pg.

表二、兒茶酚胺的標準品與嗜鉻腫瘤細胞透析液之精確度。

	Coefficient of Variation (%)			
	NE	EPI	DOPAC	DA
Intra-assay				
Standard mixture in 0.1 M HCl (ca. 1 pg each)	3.9	5.7	6.2	2.4
(ca. 50 pg each)	2.3	3.5	4.2	2.1
PC-12 cells pooled dialysates	4.8	N.D.	5.2	3.3
Inter-assay				
Standard mixture in 0.1 M HCl (ca. 50 pg each)	4.3	5.2	5.3	4.0
N.D.: not detectable				

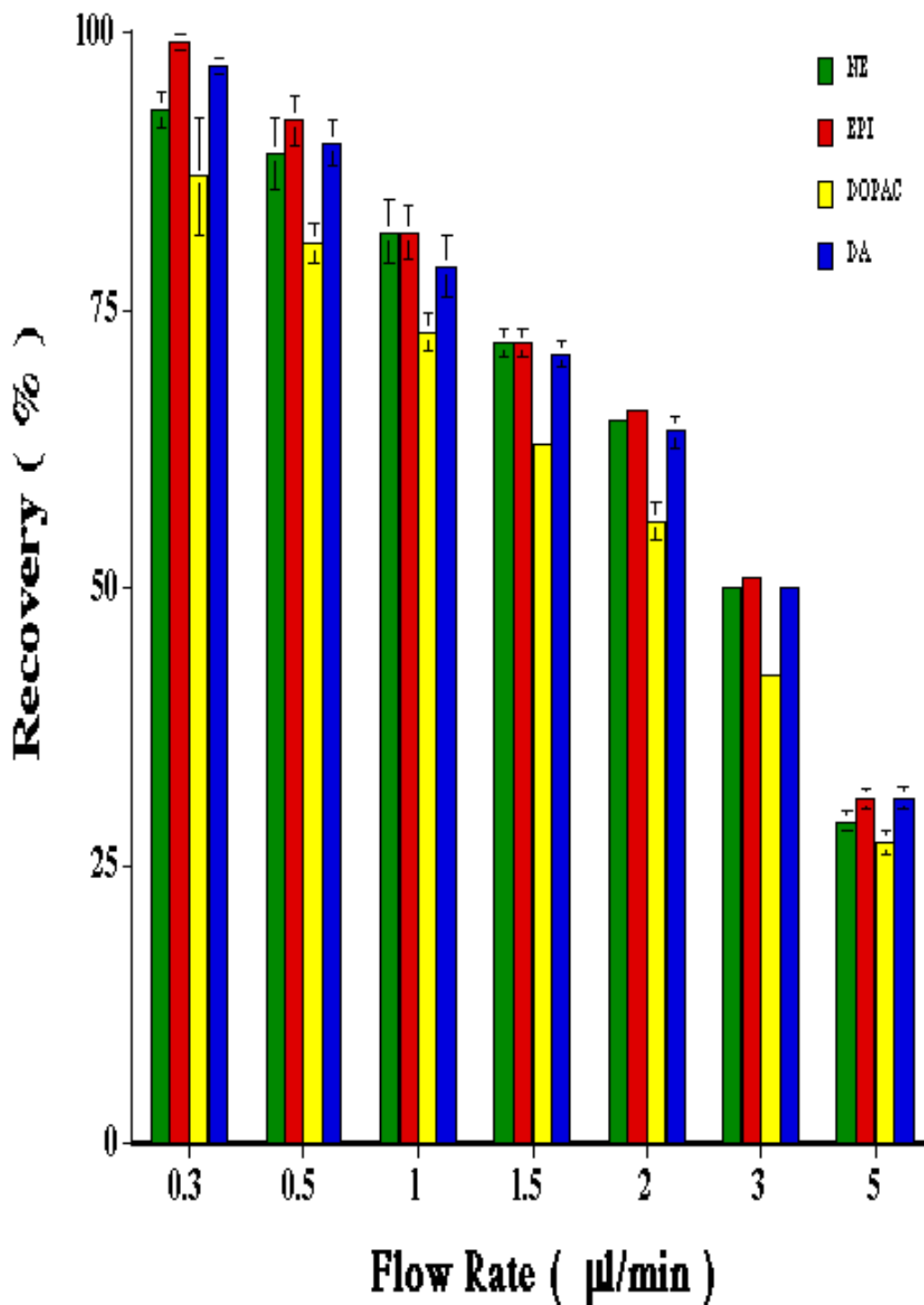
表三、丙酮酸和乳酸的濃度與波峰面積的關聯性。

	Standard Curve Equation ^a	R ²
Pyruvate	$Y = 12934 X + 0.0111$	1.000
Lactate	$Y = 766.76 X + 0.0104$	1.000

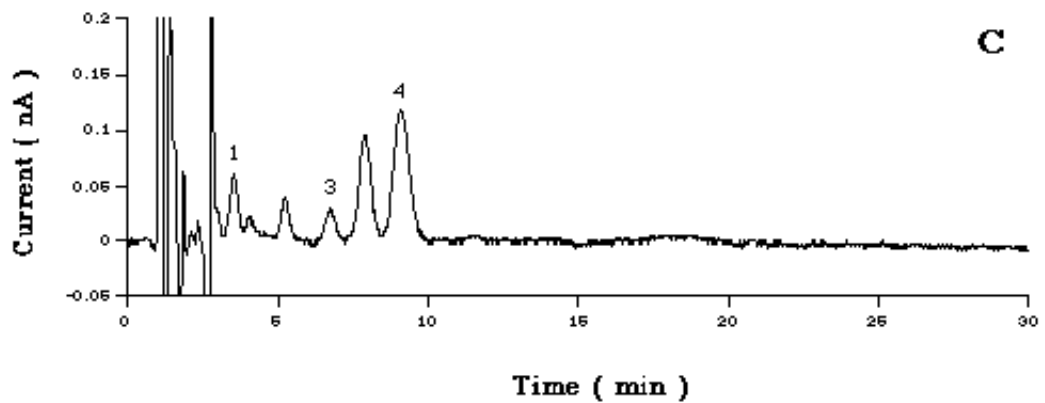
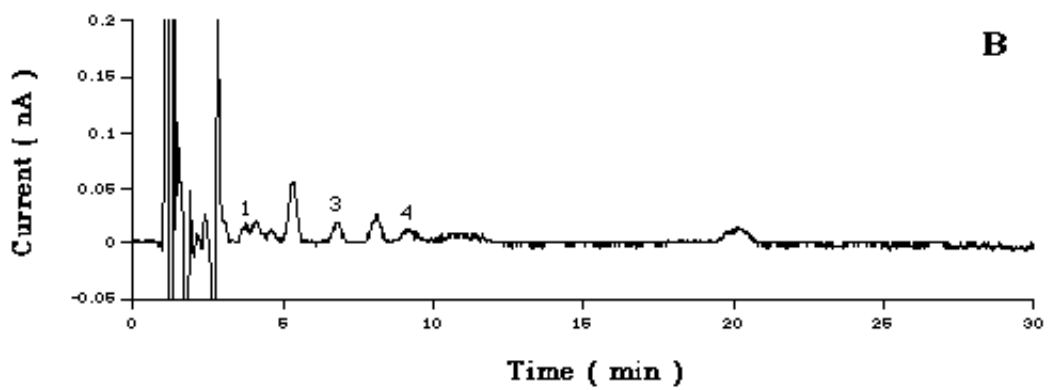
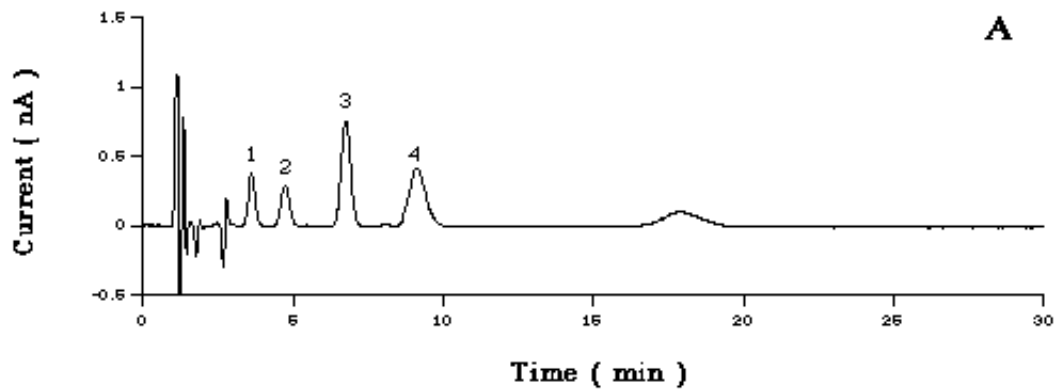
^aY = peak area measured ; X = amount of analytes in nmole.

表四、丙酮酸和乳酸的標準品與肝臟實質細胞透析液之精確度測試。

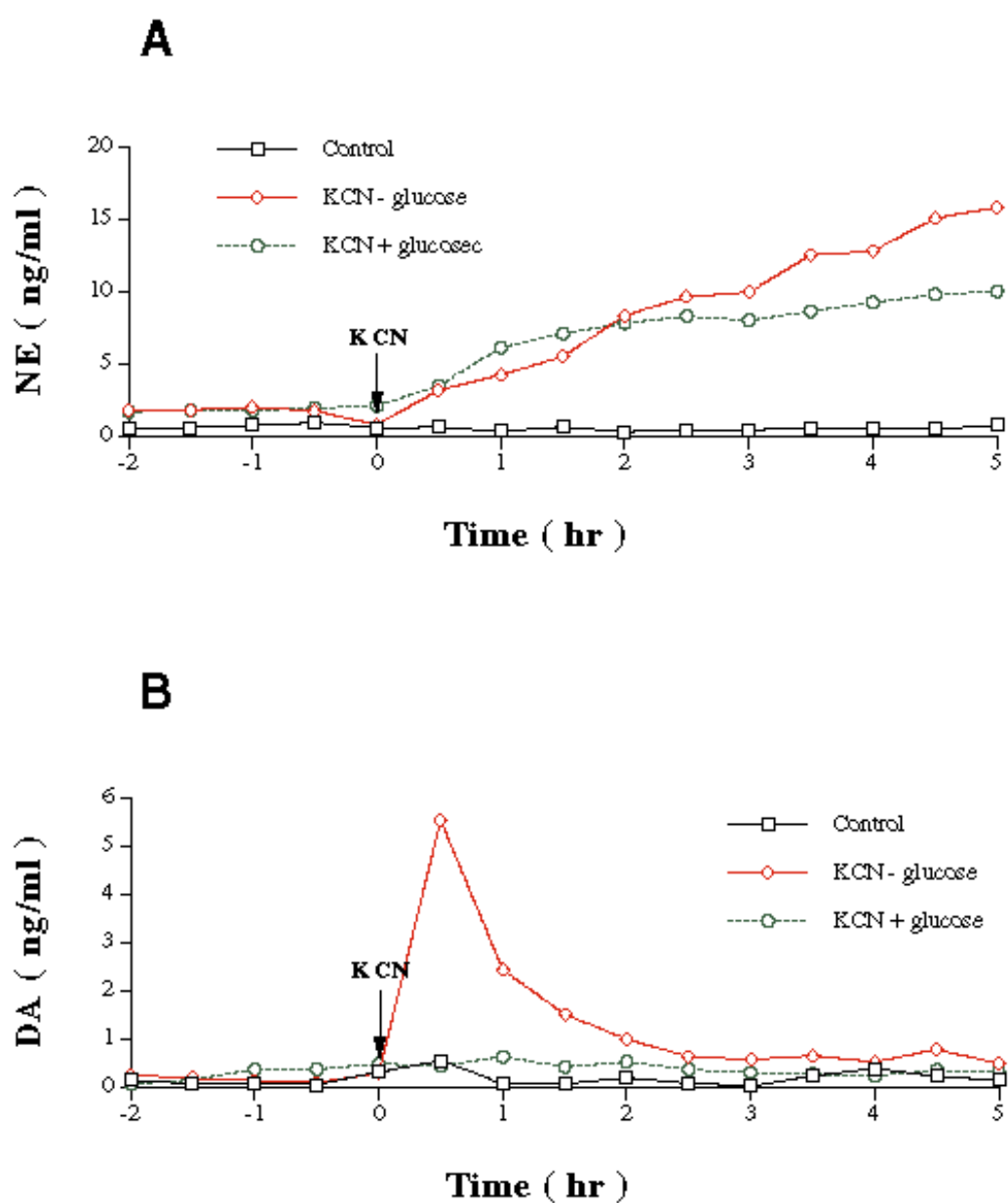
	Pyruvate		Lactate	
	<u>Conc.</u>	<u>CV(%)</u>	<u>Conc.</u>	<u>CV(%)</u>
Intra-assay				
Standard mixture in 4 mM H ₂ SO ₄	10.0±0.1 μM	1.3	100.4±2.1 μM	2.0
Primary liver cells				
pooled dialysates	2.7±0.2 μM	7.4	3.8±0.5 mM	1.2
Inter-assay				
Standard mixture in 4 mM H ₂ SO ₄	10.0±0.2 μM	1.7	100.0±3.3 μM	3.3



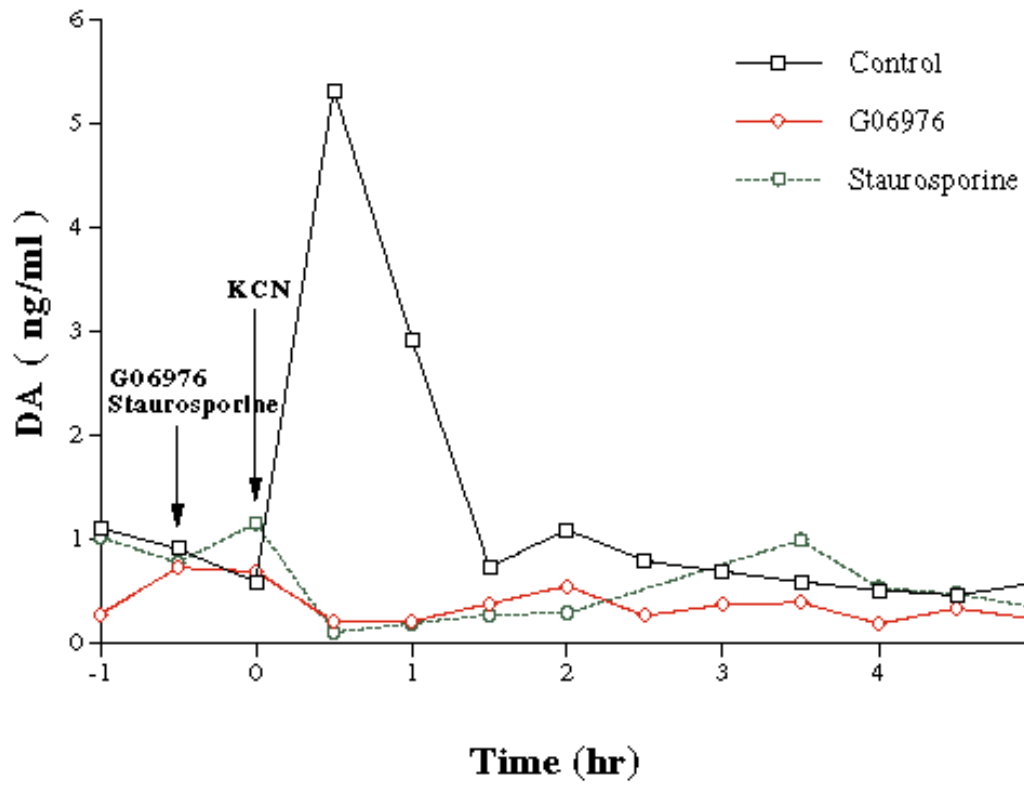
圖十二、兒茶酚胺的標準品在不同流速下，經由微透析所得之回收率。



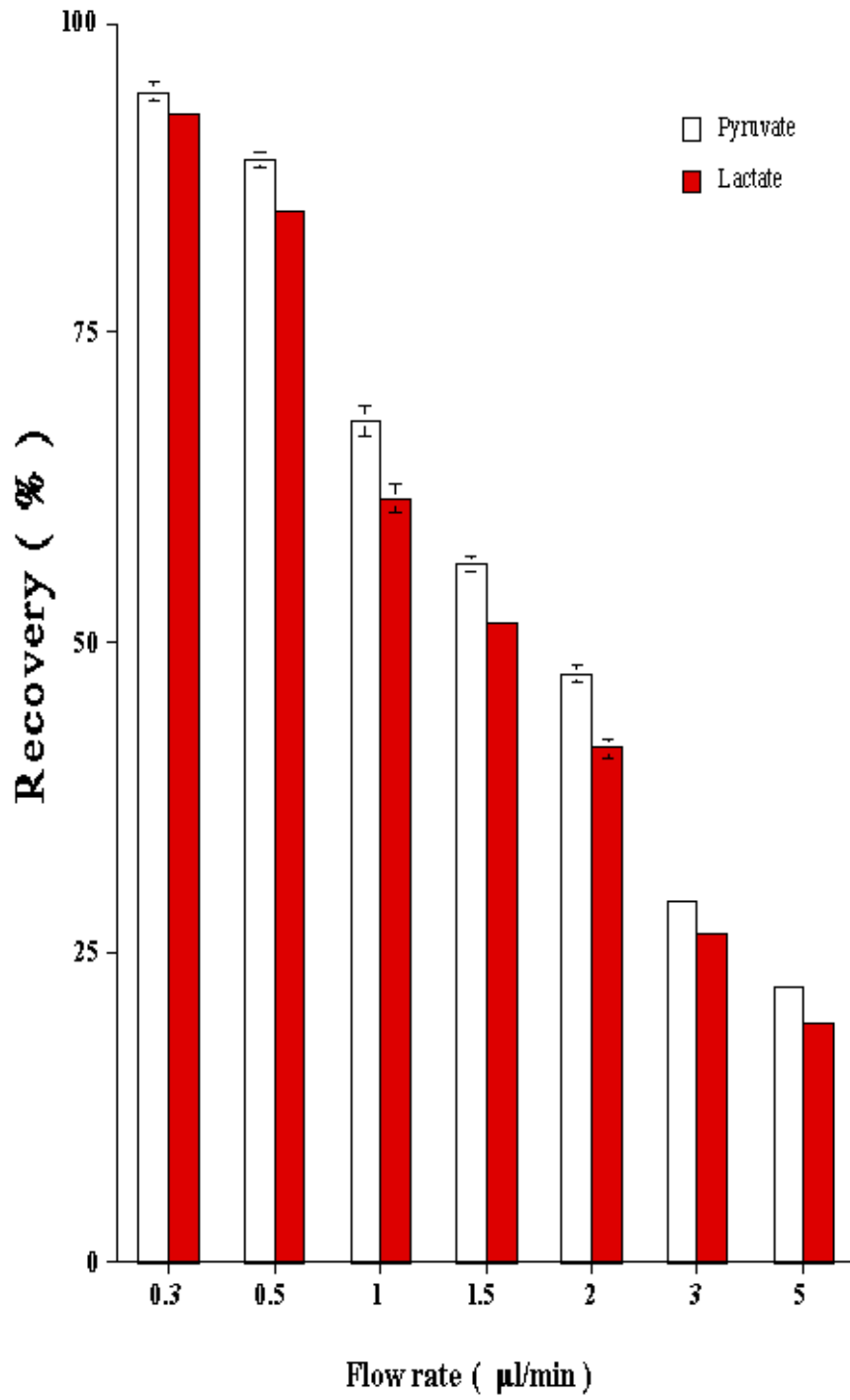
圖十三、兒茶酚胺之層析圖；圖 A 為標準品，其中 1 為 NE，2 為 EPI，3 為 DOPAC，4 為 DA。圖 B 為未經 KCN 處理前之圖譜。圖 C 為 KCN 處理後之圖譜。



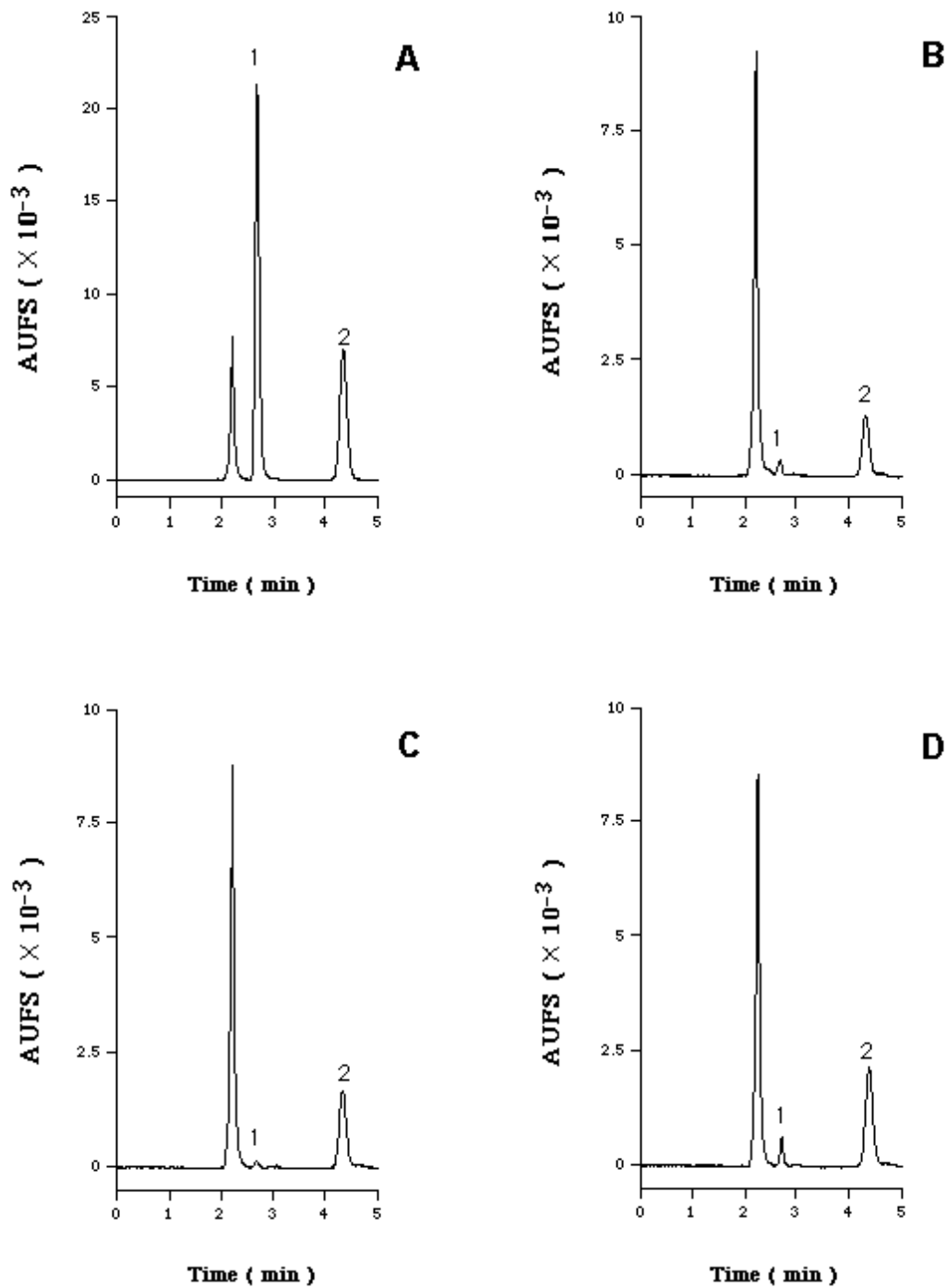
圖十四、嗜鉻腫瘤細胞在葡萄糖存在與否下，經氰酸鉀處理後，NE 和 DA 釋出濃度測定。



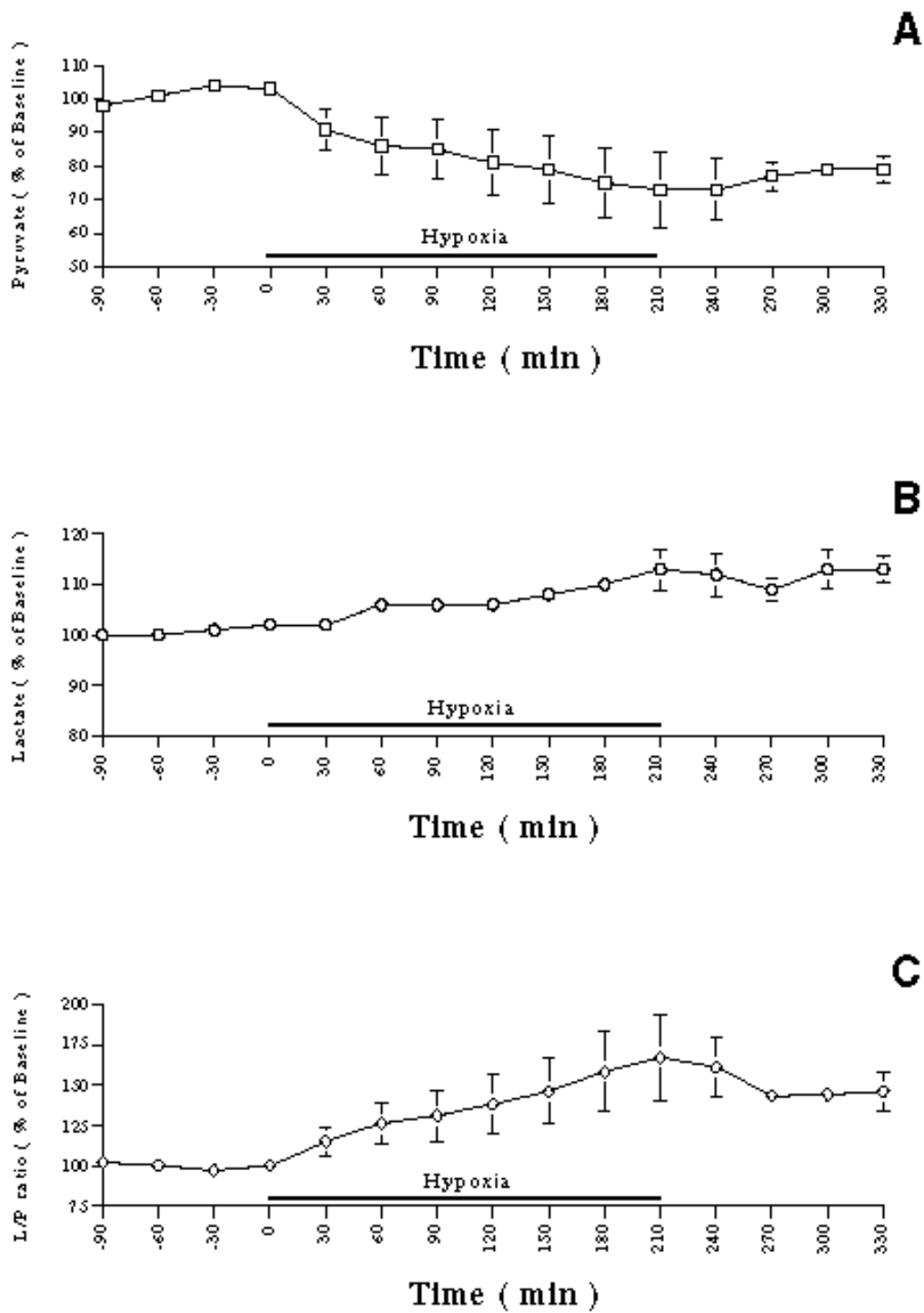
圖十五 嗜鉻腫瘤細胞在葡萄糖缺下,經 Staurosporine 和 G06976 及氰酸鉀處理後, DA 釋出濃度測定。



圖十六、丙酮酸和乳酸的標準品在不同流速下，經由微透析所得之回收率。



圖十七、丙酮酸與乳酸之層析圖；圖 A 為標準品，其中 1 為丙酮酸，2 為乳酸。圖 B 為未缺氧前之圖譜。圖 C 為缺氧時之圖譜。圖 D 為重新供氧後之圖譜。



圖十八、肝臟實質細胞在缺乏氧氣及回復供氧下，丙酮酸和乳酸濃度測定。

參考資料

1. Ungerstedt U. Microdialysis-A new bioanalytical sampling technique. *Current Separations* 7(1986) 2
2. Myers, R. D. Methods for perfusing structure of the brain. *Methods Psychobiol.* 2(1972)169-211
3. Redgrave, P. A modified push-pull system for the localised perfusion of brain tissue. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 6(4)(1977)471-4
4. Delgado, J. M. , DeFeudis, F. V. , Roth, R. H. , Ryugop, D. K. , Mitruka, B. M. Dialytrode for long term intracerebral perfusion in awake monkeys. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 198(1972) 9-21
5. Ungerstedt, U. , Pycock. C. Functional correlates of dopamine neurotransmission. *Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss.* 30(1-3)(1974)44-55
6. Devaud, L. L. , Hollingsworth E. B. Effects of the 5-HT₂ receptor antagonist, ritanserin, on biogenic amines in the rat nucleus accumbens. *European journal of pharmacology* 192(1991)427-429
7. Cheng, F. C., Shih, Y. , Liang, Y. J., Yang, L. L. ,Yang, C. S. New dual electrochemical detector for microbore liquid chromatography : Determination of dopamine and serotonin in rat striatum dialysates. *J. Chromatography B.* 682(1996)195-200
8. Cheng, F. C., Yang, L. L., Yang, D. Y., Tsai, T. H., Lee, C. W. , Cheng ,S.H. Monitoring of extracellular pruvate, lactate, and ascorbic acid during cerebral ischemia: a microdialysis study in awake gerbils. *J. Chromatography A.* 870(2000)389-394
9. Yang, L. L., Lee, M. S., Chen, Y. M., Wang, J. M., Yang, D.Y., Cheng, F.C. Simultaneous determination of glucose, pyruvate and lactate in a small volume of plasma suitable for pediatric monitoring. *J. Biomed Lab Sci.* 11(4)(1999) 134-139

10. Di Chiara G. In vivo brain dialysis of neurotransmitters. TIPS 11(1990)116-121
11. Tsai, T. H., Chen, C. F. Measurement and pharmacokinetic analysis of buspirone brain microdialysis coupled with electrochemical detection. J Chromatogr A. 762(1997)269-273
12. Natelson, S. , Walker, A. A. , Pincus, J. B., Chlordiazepoxide and diphenylhydantoin as antagonists to ACTH effect on serum calcium and citrate levels. Proc-Soc-Exp-Biol-Med. 122(3) (1966)689-92
13. Lhuguenot, J. C. , Maume, B. F. Improvements in quantitative gas phase analysis of catecholamines in the picomole range by electron-capture detection and mass fragmentography of their pentafluorobenzylimine-trimethylsilyl derivatives. J. Chromatogr. Sci. 12(1974)12:411
14. Chauhan, M. S., Dakshinamurti, K. Gas chromatographic method for the simultaneous determination of dopamine and norepinephrine metabolites. J. Chromator. 227(1982)323-330
15. Koslow, S. H., Cattabeni, F., Costa, E. Norepinephrine and dopamine: assay by mass fragmentography in the picomole range. Science 176(1972)177
16. Karoum, F., Cattabeni, F., Costa, E., Ruthven, C. R. J. , Sandler, M. Gas chromatographic assay of picomole concentrations of biogenic amines. Anal. Biochem. 47(2) (1972)550-61
17. Krstulovic, A. M., Matzura, C. T., Bertani-Dziedzic, L., Cerqueira, S. , Gitlow, S. E. Endogenous levels of free and conjugated urinary 3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol in control subjects and patients with pheochromocytoma determined by reversed-phase liquid chromatography with electrochemical detection. Clin. Chim. Acta. 103(1980)109
18. Krstulovic, A. M., Powell, A. M. Use of native fluorescence measurements and stopped-flow scanning technique in the

high-performance liquid chromatographic analysis of catecholamines and related compounds. *J. Chromatogr.* 171(1979)345

19. Abeling, N. G., Van Gennip, A. H., Overmars, H., Voute, P.A. Simultaneous determination of catecholamines and metanephrines in urine by HPLC with fluorometric detection. *Clin. Chim. Acta.* 173(1984)211

20. Sistare, F. D. , Haynes Jr, R. C. The interaction between the cytosolic pyridine nucleotide redox potential and gluconeogenesis from lactate/pyruvate in isolated rat hepatocytes. Implications for investigations of hormone action. *J. Biol. Chem.* 260(1985)12748-12753

21. Jill, O. T., Carl, F. N., Karl, L., Carol, J. D. ,Jon, D. L. H. Secretion of pyruvate *J. Exp. Med.* 165(1987)500-514

22. Avital, S., James, J. M., Ralphiel, S. P., Benjamin, M. R. An increase in lactate output by brain tissue serves to meet the energy needs of glutamate-activated neurons. *J. Neurosci.* 19(1)(1999)34-39

23. Martins, E., Inamura, K., Themner, K., Malmqvist, K. G., Siesjo, B. K. Accumulation of calcium and loss of potassium in the hippocampus following transient cerebral ischemia: a proton microprobe study. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 8(4)(1988) 531-538

24. Gibson, G. E., Manger, T., Toral Barza , L., Freeman, G. Cytosolic-free calcium and neurotransmitter release with decreased availability of glucose or oxygen. *Neurochem-Res.* 14(5)(1989) 437-43

25. Greene, L. A., Tischler, A. S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *PNAS U.S.A.* 73(7)(1976)2424-8

26. Maduh, E.U., Borowitz, J. L., Isom, G.E. Cyanide-induced alteration of the adenylate energy pool in a rat neurosecretory cell line. *J. Appl. Toxicol.* 11(2)(1991) 97-101

27. Maduh, E. U., Turek, J. .J, Borowitz, J. L., Rebar, A., Isom, G. E. Cyanide-induced neurotoxicity: calcium mediation of morphological changes in neuronal cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 103(2)(1990) 214-21
28. Harris, A. G., Leiderer, R., Peer, F., Messmer, K. Skeletal muscle microvascular and tissue injury after varying durations of ischemia. *American Journal of Physiology.* 271(1996)H2388-398
29. Berry, M. N., Friend, D. S. High yield production of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J. Cell Biol.* 43(3)(1969)506-520
30. Bonny, R. J., Becker, J. E., Walker, P. R., Potter, V. R. Primary monolayer cultures of adult rat liver parenchymal cells suitable for study of the regulation of enzyme synthesis. *In Vitro* 9(6)(1974)399-413
31. Huang, H. M., Weng, C. H., Ou, S. C., Hwang, T. Selective subcellular redistributions of protein kinase C isoforms by chemical hypoxia. *J. Neurosci. Res.* 56(6)(1999) 668-78