

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

利用電化學法及網版印刷電極偵測肝細胞活性 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 99-2113-M-040-002-
執行期間：99年08月01日至100年12月31日
執行單位：中山醫學大學應用化學系(所)

計畫主持人：蔡惠燕

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：蔡尚恆
大專生-兼任助理人員：張晏禎
大專生-兼任助理人員：翁鈺鼎
大專生-兼任助理人員：古涵如

公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 101 年 03 月 16 日

中文摘要： 利用細胞培養應用於藥物篩選已非常普遍，對於細胞存活的測定目前最常用的是台盼藍(Trypan blue stain)染色法檢測存活細胞數、或 MTT(3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴鹽)比色法測吸光值相對於對照組計算細胞存活率，但此方法非常耗時。動物肝細胞之活性是在藥物肝毒性篩選試驗的重要一環，本計畫利用電化學方式建立一快速、簡便的肝細胞活性評估方法。本計畫利用網版印刷電極開發一滴試劑檢驗法，並有系統的探討介質(mediator)對偵測信號之影響及利用統計處理比較電化學結果與 MTT 測量結果之可替代性。

利用 chronoamperometry 結合網版印刷電極，可直接測細胞培養液中的黃血鹽，在 0.03~1.0 mM 濃度範圍有很好的線性 ($R^2=0.9923$)，偵測極限(S/N=3)為 32 卅 M。肝細胞活性測量結果與傳統 MTT assay 的結果比較，無顯著差異。

中文關鍵詞： 電化學分析，網版印刷電極，肝細胞活性

英文摘要： We evaluated the respiratory activity of primary liver cells using both the MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) viability assay and the chronoamperometric method, based on screen-printed carbon electrodes (SPE). The chronoamperometric method using SPE shows that the current responses are proportional to the ferrocyanide concentrations, with a linear range of 0.03~ 1.0 mM ($R^2=0.9923$), and detection limit (S/N=3) at 32 卅 M. The results of paired t-test analysis indicates that assessment of hepatocyte viabilities based on the chronoamperometric method were comparable to those of the MTT viability assay. The chronoamperometric method can be used as a quick alternative method for assessing liver-cell viability.

英文關鍵詞： Chronoamperometry, screen-printed electrodes, liver cellular viability

報告內容：包括前言、研究目的、文獻探討、研究方法、結果與討論（含結論與建議）...等

（一）研究計畫之背景及目的

隨著科技的快速發展，在藥物開發上有了很大的進步，如以基因工程、細胞工程、酵素工程、醱酵工程為主體的生物技術和組合化學技術，因此有大量化合物進入臨床前的藥理、毒理學、藥效學等研究和篩選。雖然在體內存在著許多因素可能對藥物進行修飾，導致藥物作用之增強或減弱，由無致癌性轉變成致癌性，所以在細胞培養條件下所得結果可能不一定適用。但細胞培養應用於藥物篩選，可用於高通量藥物篩選(high throughput screen, HTS)^[1]，且可一藥多篩，由於這類藥物篩選模型所需樣品很少，可以使珍貴的藥物在多模型進行篩選，不但擴大了新藥的範圍，而且有助於從老藥中發現新用途。

利用細胞培養應用於藥物篩選，可觀測細胞型態、化學成分檢測、細胞死亡或存活測定...等。與動物實驗一樣，宜測出藥物半效應劑量(median infective dose, ID50)、藥物作用時間。細胞死亡檢測是藥物毒性及抗腫瘤藥之藥效評估之重要指標，對於細胞增殖和存活的測定目前最常用的是台盼藍(Trypan blue stain)染色法檢測存活細胞數、或 MTT(3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴鹽)比色法測吸光值相對於對照組計算細胞存活率。MTT 檢測原理為活細胞線粒體中的琥珀酸脫氫酶能使外源性 MTT 還原為水不溶性的藍紫色結晶甲臍 (Formazan) 並沉積在細胞中，而死細胞無此功能。在一定細胞數範圍內，MTT 結晶形成的量與細胞數成正比，但 MTT 法通常在加入 MTT 後，細胞需繼續培養 3~4 小時，形成的 Formazan 為水不溶性的，需要加有機溶劑（一般用 DMSO 或異丙醇）溶解，若是懸浮細胞，需離心吸去培養液，由於在去上清操作時會有可能帶走小部分的細胞，故有時重複性略差。

電化學法主要是利用細胞進行呼吸作用時，在粒線體 (mitochondrial) 內膜中，電子傳遞(electron transport)可將電化學介質(mediator)氧化或還原，再利用安培法測其產物，由信號大小評估細胞之存活率。1990 年 Doris Mayer 等人以 2,6-dichlorophenolindophenol(DICP) 當介質 (mediator) 利用安培法

(amperometric methods)測不同抑制劑(inhibitor)對細胞代謝之影響^[2]。其原理是活細胞進行呼吸作用時可把 DICP 還原，再利用安培法測還原態的 DCIP，間接比較細胞代謝速度，但在氧氣存在下，還原態的 DCIP 會被氧氣再度氧化，必須加入 KCN 抑制氧分子的電子傳遞，而 KCN 會危害實驗操作者的健康且目前是毒性管制藥品，需提出特別申請才能購買。所以近年來利用電化學法主要應用於厭氧條件下測酵母菌細胞^[3-6]培養測藥物之生物毒性。動物肝細胞之活性是在藥物肝毒性篩選試驗的重要一環，但尚未有文獻報導利用電化學方式來測量動物肝細胞之活性，因此本計畫希望建立一快速、簡便的肝細胞活性評估方法。

(二) 研究方法

上述文獻主要是以赤血鹽(ferricyanide)為介質，有的搭配 menadione 或 succinate 形成雙介質系統，其作用原理如圖 1，在細胞膜內粒線體的呼吸作用進行 TCA cycle，其電子傳遞還原 menadione，由於 menadione 之親脂性(lipophilicity)還原之 menadione 可擴散至細胞外間質中(extracellular)，而被 ferricyanide 再度氧化，ferricyanide 則還原成 ferrocyanide，menadione 可擴散回細胞內(intracellular)繼續催化 redox cycling，親水性(hydrophilic)的 ferrocyanide 則留在細胞外間質中作為測量細胞活性之指標。不同細胞其細胞膜對介質的通透性不同，本實驗將以此為基礎，探討適當的 electrochemical mediators 及不同電化學分析法，做有系統的探討。研究步驟詳列於下：

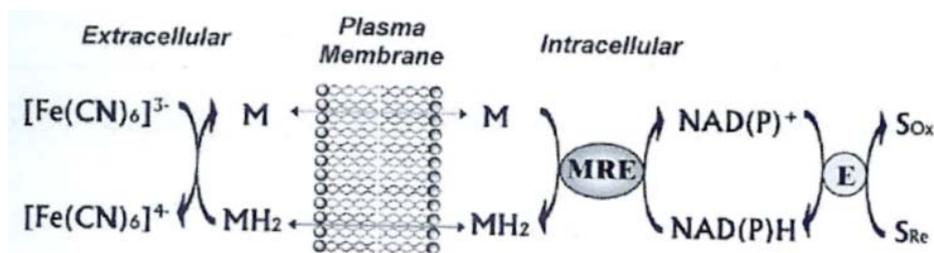


圖 1 活細胞氧化還原活性評估利用 mediator-assisted 電子轉移之示意圖^[6]

(1) 電化學方法探討

- (A). 環伏安法探討不同介質的特性及細胞培養基是否干擾訊號測量。
- (B). 利用網版印刷電極作一滴試劑庫倫法探討不同電位及時間所得信號之靈敏度，開發一滴試劑庫倫法作細胞培養時的活性監測。網版印刷三電極系統約需 50 ul 試劑即可蓋滿電極，可以節省反應試劑。
- (C). Flow Injection Analysis 安培法探討不同電位及流速所得信號之靈敏度
- (D) 比較兩種電化學法之適用性，選擇最佳方法做後續應用。

- (2) 介質之探討：將從文獻蒐尋常用之電化學 mediator 如 ferricyanide、menadione、succinate 等，做系統性的探討並與 MTT 測量結果做統計分析比較，希望建立一快速、簡便的肝細胞活性評估方法。

(三) 結果與討論

3.1 偵測方法比較與條件最適化

3.1.1 Flow injection analysis (FIA)

圖 2 為流體動力學伏安圖 (Hydrodynamic voltammogram)，在 FIA 系統中探討黃血鹽在含赤血鹽的溶液中之最佳偵測電位。由圖可知在偵測電位 0.3~0.5 V 中各基質的訊號表現，PBS 流洗溶液(carrier)中不含氧化還原物質，在各電位下並無顯著的訊號；黃血鹽為還原態物質，訊號隨著氧化電位增加而提高，且在 0.4 V 以上電流訊號趨於平穩(達 plateau)；赤血鹽為氧化態物質，在低電位(0.3 V)產生部分還原訊號，0.35 V 電位以上因赤血鹽還原信號減弱，而本實驗所用赤血鹽為 Sigma bioUltra 等級，內部含微量的黃血鹽，所以當電位升高會有微小的氧化信號。電化學偵測使用電位愈高，溶液中其他物質產生氧化的可能性增加，會干擾偵測，故選擇 0.4 V 為黃血鹽最佳偵測電位。

基於上述實驗之最佳偵測電位，比較在不同溶液環境中 FIA 偵測黃血鹽之校正曲線，由圖 3 可發現以 FIA 方法偵測黃血鹽雖在 PBS 溶液中靈敏度及線性有不錯的表現(slope =13.647 , $R^2 = 0.9957$, LOD = 4 μM)，但在 DMEM 細胞培養液中卻並不理想(slope = 0.1172 , $R^2 = 0.7611$)。主要原因應是在流動系統中黃血鹽停留於電

利用電化學分析法偵測肝細胞活性

極表面的時間較短，而細胞培養液含胎牛血清，血清蛋白質與碳電極表面產生吸附，導致電極毒化，使電子傳遞受到阻礙，只能偵測到微弱的氧化電流。

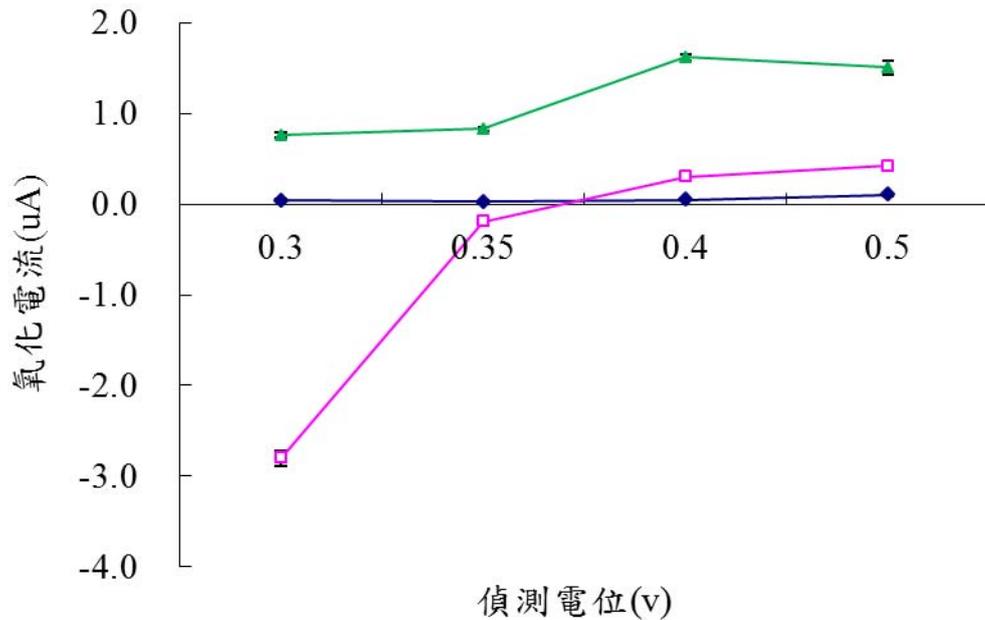


圖 2 流體動力學伏安圖(Hydrodynamic voltammogram)。注射樣品為 10mM 赤血鹽 (—□—), 0.1mM 黃血鹽(—▲—)及空白試液(PBS 溶液) (—◆—)。FIA 之流洗液(carrier)為 PBS 溶液，流速 0.8 mL/min。

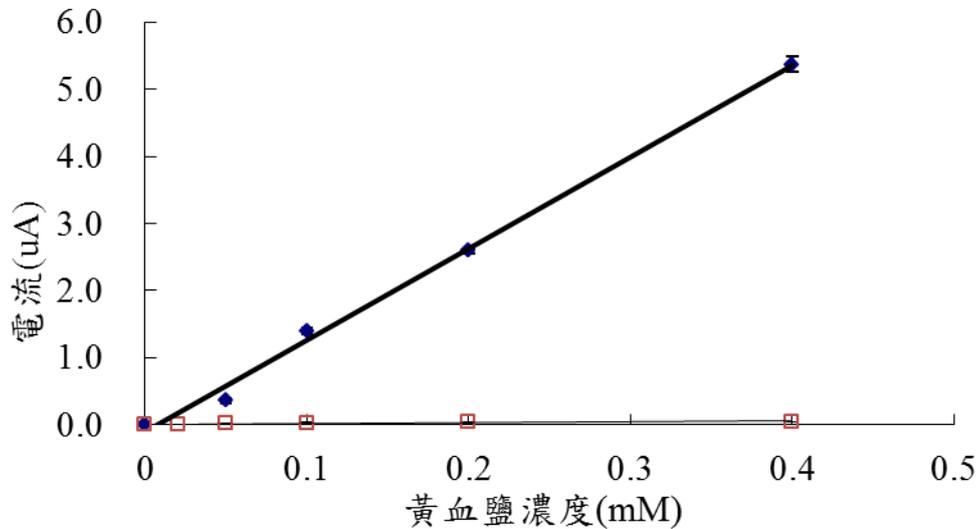


圖 3 黃血鹽電化學訊號之校正曲線。FIA 偵測電位 0.4 V，流速 0.8 mL/min。樣品為黃血鹽配製於含 10mM 赤血鹽及 5mM 丁二酸之 PBS (◆)或細胞培養液 (□)。

3-1-2 計時安培分析法(Chronoamperometry)

在 Chronoamperometry 系統中，探討黃血鹽在含赤血鹽及細胞培養液基質中之最佳偵測電位。網版印刷三電極中的參考電極-Ag 電極，在高電位的偵測過程中容易逐漸氧化，而使偵測變因增加，影響偵測結果。故利用電位預氧化 Ag 電極 (pseudo-Ag)，使得偵測過程中的電位較穩定。由圖 4 可知在不同參考電極中，偵測電位 0.2~0.7V 的訊號表現，(A) pseudo-Ag 參考電極最佳偵測電位為 0.4 V、(B) Ag/AgCl 參考電極最佳偵測電位為 0.6 V。而本實驗在高電位下的結果與圖 2 略有差異，原因來自本實驗的溶液為細胞培養液，在高電位下細胞培養液中的蛋白質產生吸附現象加劇，導致電極表面電子傳遞效果減弱，使得在高電位下偵測訊號反而降低。比較 pseudo-Ag 與 Ag/AgCl 電極可發現 pseudo-Ag 再現性較佳(N=3)，且以 pseudo-Ag 進行實驗，只需用微量樣品滴覆於電極表面進行偵測，大大減低樣品使用量，操作也較容易。網版印刷電極上的銀電極經過 CV 掃瞄 0~1 V 電位進行預氧化時，掃瞄第一圈時可明顯得到銀電極氧化訊號；掃瞄第二圈時銀電極氧化訊號趨平，且銀電極表面由銀白色轉為黑色，顯示銀電極在經過電位氧化後，電極性質確實產生變化。以 pseudo-Ag 電極檢測細胞培養液中黃血鹽含量其電極再現性，平均

RDS 為 5.4%。

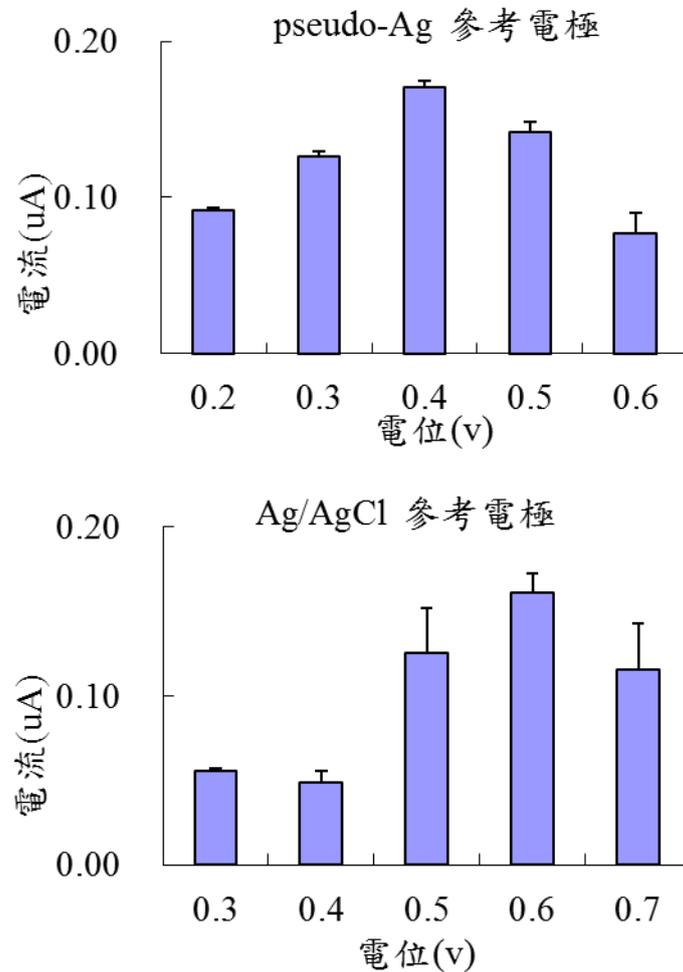


圖 4 計時電流法最佳電位探討。計時電流法使用網版印刷三電極(SPE)，工作電極為碳電極，輔助電極亦為碳電極，參考電極為 pseudo-Ag (圖 A) 或外加 Ag/AgCl 電極(圖 B)。在每一偵測電位下做 45 s，Sample Interval 為 0.1 s，取 39~40 秒之電流訊號平均值。SPE 上之 Ag 電極於 PBS 中，以 CV 掃描電位 0 V~1 V，2 圈，scan rate:0.1 V/s，使 Ag 電極預氧化為 pseudo-Ag 電極。樣品為 0.1mM 黃血鹽溶於含 5mM 赤血鹽之細胞培養基。

基於上述實驗之 pseudo-Ag 電極最佳條件及黃血鹽偵測電位，比較在不同溶液環境中 Chronoamperometry 偵測黃血鹽之結果，由圖 5 黃血鹽的偵測校正曲線可發現，以 Chronoamperometry 方法偵測黃血鹽在 PBS 溶液中的結果為 $\text{slope} = 1.8603$, $R^2 = 0.9958$, $\text{LOD} = 7 \text{ uM}$, 在 DMEM 溶液中的結果為 $\text{slope} = 1.8048$, $R^2 = 0.9852$, $\text{LOD} = 2 \text{ uM}$, 兩者 slope 偏差在 $\pm 3\%$ 以內，無顯著差異。與 FIA 方法比較(圖 3)，Chronoamperometry 方法因每次測量即換新的 SPE，所以可以避免蛋白質吸附現象所造成的偵測干擾，且偵測極限較低，在低濃度範圍也能得到良好線性。因此，往後實驗之電化學偵測選擇 Chronoamperometry 方法偵測黃血鹽含量。

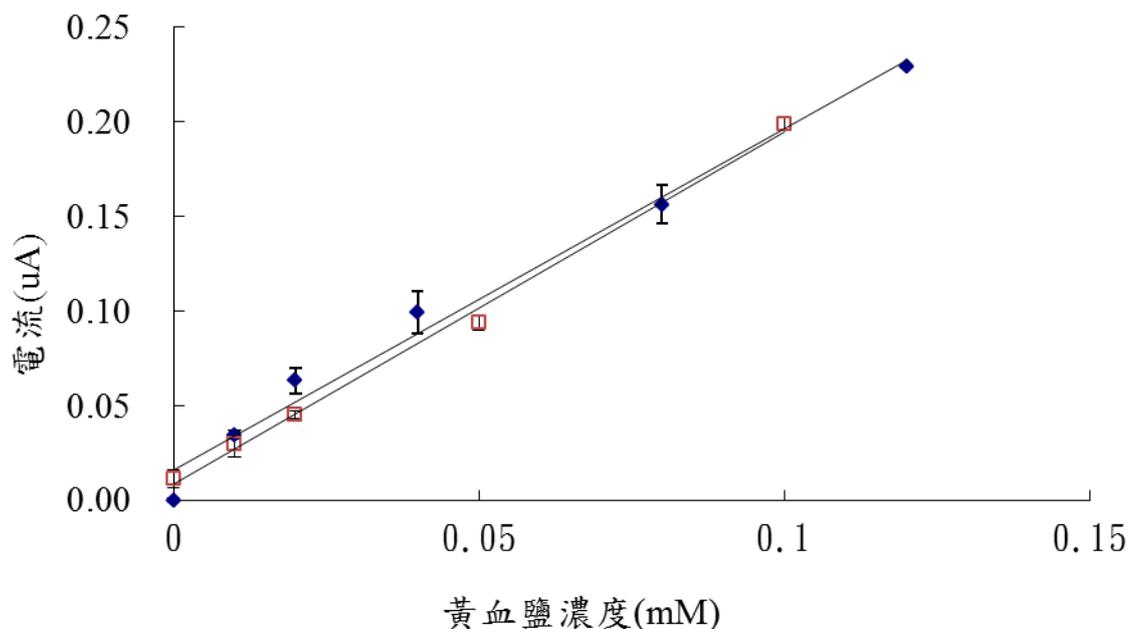


圖 5 黃血鹽電化學訊號之校正曲線。Chronoamperometry 偵測同圖 4。樣品為各濃度黃血鹽溶於含 10mM 赤血鹽及 5mM 丁二酸之 PBS (□)或細胞培養液(◆)。

3.2 細胞活性偵測

3-2-1 電化學介質最適化探討

最佳雙介質及其濃度最適化探討，電化學結果(圖 6A)顯示培養液加入 menadione (Vit K3)，其電化學訊號隨著 Vit K3 濃度增加而下降；在丁二酸部份，濃度在 1mM 以下其電化學訊號較低，濃度 5mM 以上有較佳的電化學訊號表現。由 MTT 結果(圖 6B)可知 Vit K3 濃度在 10 μ M 以上培養 20 分鐘對肝細胞即產生傷害；而丁二酸濃度在 1mM 以上亦會對肝細胞產生輕微的毒性。比較添加 Vit K3 10~100 μ M 的細胞活性 (MTT assay) 與電化學信號是一致的(Person 相關係數 0.9996)，顯示 Vit K3 形成的 semiquinone radicals 對老鼠肝細胞所造成嚴重的超陰氧離子(O₂⁻)、過氧化氫 (H₂O₂) 及 氫氧自由基 (\cdot OH) 氧化傷害，以致 Vit K3 不適合作為老鼠肝細胞 電化學檢測之介質；而丁二酸儘管在高濃度中仍對老鼠肝細胞產生毒性，但在電化學訊號可檢測之最佳濃度其細胞仍可維持存活率在 80% 以上，故選用 5mM 丁二酸作為老鼠肝細胞 電化學檢測之介質最佳濃度。

3-2-2 赤血鹽濃度最適化探討

圖 7 的結果顯示訊號隨著介質與細胞反應時間增加而增加，赤血鹽濃度愈大訊號愈大，在 3x10⁶ cells/dish 的培養密度下，5 mM 赤血鹽已達細胞呼吸轉換極限 (rate limit)，黃血鹽生成量與赤血鹽濃度增加無關。避免高濃度赤血鹽對細胞產生傷害，故取 5mM 赤血鹽濃度(並添加 5mM 丁二酸)進行老鼠肝細胞活性試驗。

3-2-3 電化學偵測信號與細胞活性

以上述所得最佳雙介條件，即以 W.E.培養液含有 5mM 赤血鹽及 5mM 丁二酸之電化學基質(培養基 D)，添加黃血鹽標準品，以 chronoamperometry 偵測黃血鹽含量，確認在培養基溶液中，偵測訊號與黃血鹽有良好的線性關係(圖 8)

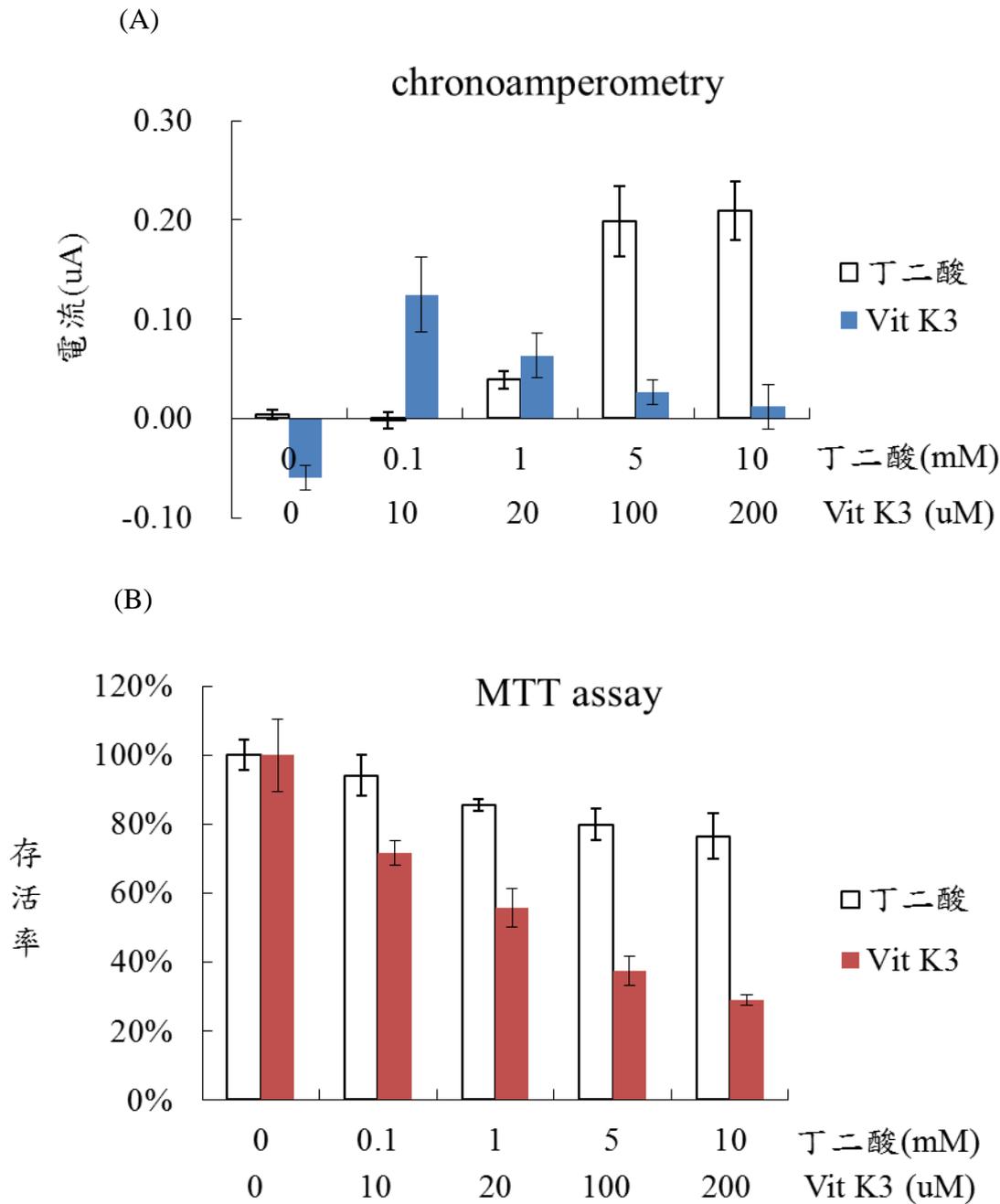


圖 6。探討不同介質與其濃度對細胞呼吸轉換赤血鹽的量及細胞傷害評估。老鼠肝細胞 (Rat liver cells) 於 24well 培養盤培養一天後 (2×10^5 cells/well)，抽出原培養液，再加入含 5mM 赤血鹽及各濃度 Vit K3 或丁二酸之 WE 培養液，繼續培養 20min 後，取出培養液以 chronoamperometry 偵測其黃血鹽之生成量 (A)，Chronoamperometry 偵測條件同圖 4。取出培養液後的細胞以 MTT assay 觀察細胞活性 (B)。

利用電化學分析法偵測肝細胞活性

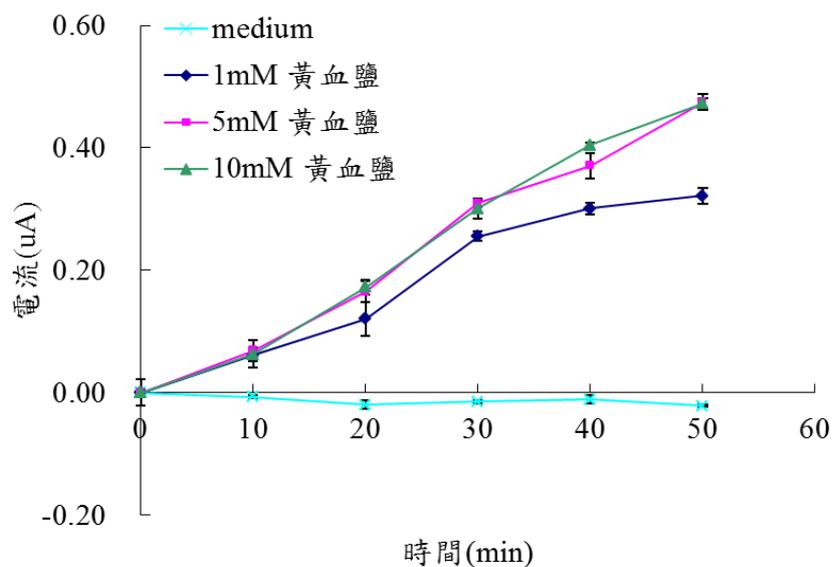


圖 7 老鼠肝細胞於 10cm dish 培養一天後(3×10^6 cells/dish)，抽出原培養液，加入各濃度赤血鹽及 5mM 丁二酸 (in W.E.)繼續培養，在不同時間點取出培養液以 chronoamperometry 偵測其黃血鹽之生成量。Chronoamperometry 偵測條件同圖 4。

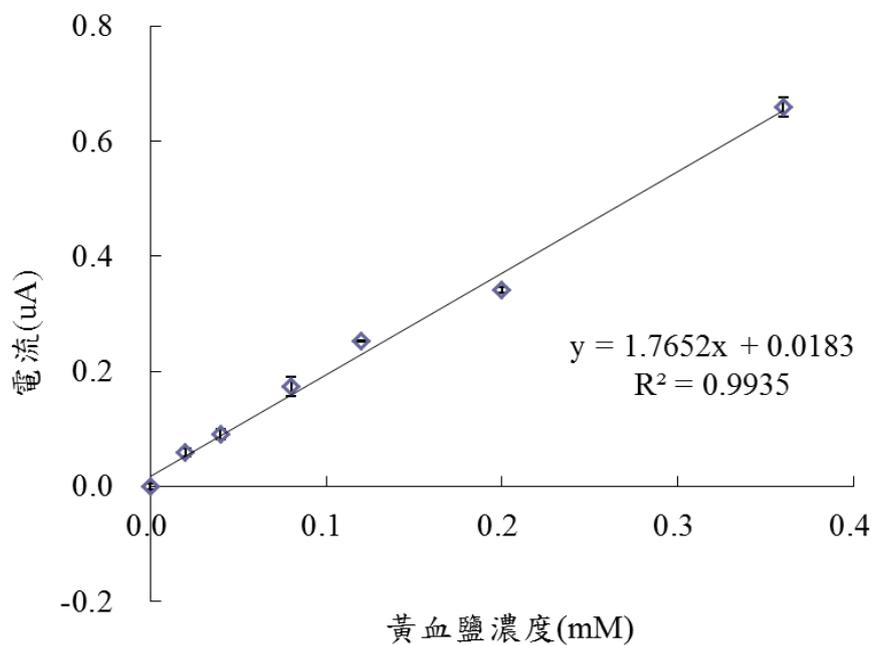


圖 8 黃血鹽偵測校正曲線。樣品為各濃度黃血鹽配製於培養基 D，Chronoamperometry 偵測同圖 4。

3-2-3 Chronoamperometry 細胞活性偵測

圖 9 結果顯示細胞濃度範圍在 $0\sim 10^5$ cells/well 具其電化學信號與細胞濃度呈線性關係($R^2 = 0.9944$)，在此偵測條件下，最低可偵測細胞量 (LOD) 為 7.6×10^4 Cells/well。證明以赤血鹽及丁二酸作為電化學雙介質與細胞培養，可透過偵測黃血鹽的生成量間接偵測細胞呼吸代謝活性。

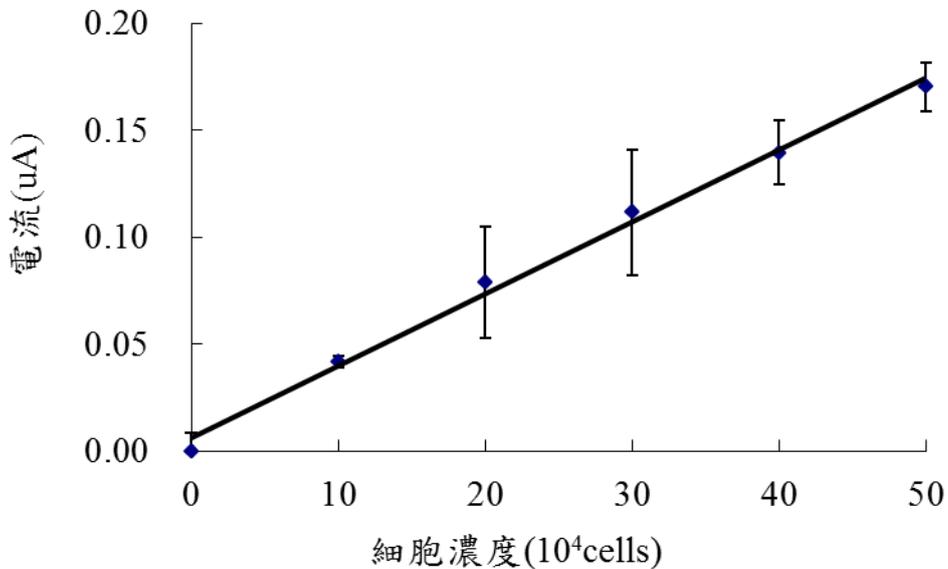


圖 9 老鼠肝細胞於 24 well 培養盤培養一天後($0\sim 5 \times 10^5$ cells/well)，抽出原培養液，加入培養基 D 培養，20min 後取出培養液以 chronoamperometry 偵測其黃血鹽生成量。

Chronoamperometry 偵測同圖 4。

(四)結論

本研究成功地建立偵測肝細胞活性的最適化條件，5 mM 的丁二酸及 5 mM 赤血鹽與細胞共同培養 20 min 後，利用 Chronoamperometry 結合網版印刷三電極，電位設定 0.4 V (vs. pseudo-Ag 參考電極)，取 39~40 sec 信號之平均值可以肝細胞量呈良好的線性關係，未來可利用此方法探討藥物之肝毒性。相較於 MTT assay，此方法可快速得到結果，且網版印刷三電極僅需數十微升(uL)就可偵測，可降低細胞培養量及實驗成本。

(五) 參考資料:

1. 章靜波主編，組織和細胞培養技術，合記圖書出版社，2005。
2. Mayer, D., Naumann, R., Edler, L., Bannasch, P., *Biochim. Biophys. Acta.* 1015 1990, 1015, 258~263.
3. Roustan, J.-L.; Sablayrolles, J.-M., Feasibility of measuring ferricyanide reduction by yeasts to estimate their activity during alcoholic fermentation in wine-making conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2003, 96, (5), 434-437.
4. Zhao, J.; Wang, M.; Yang, Z.; Wang, Z.; Wang, H.; Yang, Z., The different behaviors of three oxidative mediators in probing the redox activities of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Analytica Chimica Acta* 2007, 597, (1), 67-74.
5. Shkil, H.; Stoica, L.; Dmytruk, K.; Smutok, O.; Gonchar, M.; Sibirny, A.; Schuhmann, W., Bioelectrochemical detection of L-lactate respiration using genetically modified *Hansenula polymorpha* yeast cells overexpressing flavocytochrome b2. *Bioelectrochemistry* 2009, 76, (1-2), 175-179.
6. Zhao, J., Wang, Z., Fu, C., Wang, M., He, Q. The mediated electrochemical method for rapid fermentation ability assessment, *Electroanalysis*, 2008, 20 (14) 1587-1592.



國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2012/02/20

國科會補助計畫	計畫名稱: 利用電化學法及網版印刷電極偵測肝細胞活性
	計畫主持人: 蔡惠燕
	計畫編號: 99-2113-M-040-002- 學門領域: 分析化學
無研發成果推廣資料	

99 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：蔡惠燕		計畫編號：99-2113-M-040-002-					
計畫名稱：利用電化學法及網版印刷電極偵測肝細胞活性							
成果項目		量化			單位	備註(質化說明： 如數個計畫共同 成果、成果列為該 期刊之封面故 事...等)	
		實際已達成 數(被接受 或已發表)	預期總達成 數(含實際已 達成數)	本計畫實 際貢獻百 分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	1	1	100%		
		研討會論文	1	1	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 (本國籍)	碩士生	1	1	50%	人次	因經費不足碩士津貼 由業界計畫支付
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	1	1	80%	篇	部分內容為 NSC 100-2113-M-040-002 之成果
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	1	1	100%		
		專書	0	0	100%		章/本
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 (外國籍)	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果 (無法以量化表達之 成果如辦理學術活 動、獲得獎項、重要 國際合作、研究成果 國際影響力及其他協 助產業技術發展之具 體效益事項等，請以 文字敘述填列。)</p>	<p>利用電化學方式偵測細胞活性，將可快速取得相關實驗數據，節省實驗的時間，減少研發的成本。對於參與之工作人員，透過本研究，學生可進一步了解電化學相關技術與其應用，亦可培育研究生實驗設計，困難解決等能力。參與研究的三位大專學生均順利推甄上國立大學研究所。</p>
---	---

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

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

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

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

相關成果已在 2011 化學年會發表，全文已被 Proceedings of 2012 International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology 接受

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

電化學偵測細胞活性雖已有所見，但未有應用於初代肝細胞，本研究建立初代肝細胞呼吸活性之快速偵測方法，利用網版印刷電極可減少樣品量，對細胞使用量及培養液都可省下一筆經費，在藥物開發過程中探討藥物肝毒性的實驗有其貢獻價值。