

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

發展 QCM 作為癌細胞培養之生長與藥物活性偵測 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 98-2113-M-040-001-
執行期間：98年08月01日至99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
共同主持人：張雯惠
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：許亞嫻

處理方式：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 100 年 02 月 09 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

發展 QCM 作為癌細胞培養之生長與藥物活性偵測

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 98 - 2113 - M - 040 - 001 -

執行期間：98 年 8 月 1 日至 99 年 12 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學應用化學系

計畫主持人：蔡惠燕

共同主持人：張雯惠

計畫參與人員：許亞嫻、蔡尚恆、鄧惠文

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

處理方式：涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

中 華 民 國 100 年 3 月 1 日

中文摘要及關鍵詞 (keywords)。(關鍵詞：石英微量天平，細胞培養)

癌症每年均高居先進國家十大死亡之一，是目前威脅人類健康和生命的頭號殺手，無論是製藥界或是學術界均積極地找尋有效的治療方式。抗癌藥物發展的第一階段就要先利用癌細胞培養測試新藥對癌細胞生長的抑制效用(即藥物活性,drug activity 或稱細胞毒性測試)。於實驗終了測試存活的細胞數，常用之檢測原理為活細胞粒線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。二甲基亞砷 (DMSO) 能溶解細胞中的甲臍，用酶聯免疫檢測儀在 500nm 或 570nm 波長處測定其光吸收值，可間接反應活細胞數量。此方法的缺點是無法分辨細胞毒性或細胞自然死亡。本研究是要利用 QCM 的技術，監測細胞培養時之生長曲線，QCM 頻率之改變與吸附在電極上之質量及晶片表面之黏滯性有關，本研究利用 MTT 及螢光顯微鏡照像雙重確認 QCM 之信號，建立信號與細胞生長之相關性 (correlation)。QCM 的頻率的改變可同時提供細胞生長的即時訊息。

英文摘要 (keywords: Quartz crystal microbalance, cell culture)

Development of chemotherapeutic drugs for treatment of variety cancers is an important issue nowadays. Cytotoxicity assay is the first step of new drug development. These assays measure the effect of a drug on the growth of a population of cells and the end point is an estimate of cell number. One of the most commonly used approaches is to determine the surviving cell numbers indirectly by tetrazolium dye (MTT) reduction. A drawback of the assay is that it does not distinguish between a cytotoxic and a cytostatic effect.

The quartz crystal microbalance (QCM) was used to monitor cell growth during cell cultures in this proposed research. The curve of frequency response for Chang liver cell was established. The QCM response is based on the coupling effects of loading mass and viscoelastic properties around the crystal surface. The frequency change of QCM during the cell culture was confirmed with traditional method of MTT and fluorescencet microscope. We will correlate the information of traditional methods and the information of QCM. The frequency responses may provide real-time information on the coverage of cancer cells on electrode.

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

I、前言：

癌症每年均高居先進國家十大死亡之一，是目前威脅人類健康和生命的頭號殺手，無論是製藥界或是學術界均積極地找尋有效的治療方式。抗癌藥物發展的第一階段就要先利用癌細胞培養測試新藥對癌細胞生長的抑制效用(即藥物活性,drug activity)。在細胞培養過程中我們對細胞週期的機制及其調控因素之瞭解，不僅可了解癌細胞形成的原因，並可作為將來發展新抗癌藥物的理論基礎，進行藥物篩選。在實驗過程中很多時候都要用到細胞活性測定技術，現在常用的細胞活性測定方法有細胞計數法、台盼藍染色法、克隆（集落）形成法、³H放射性同位素摻入法、MTT法(3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氫唑溴鹽)等^[1]。其中MTT法以其快速簡便，不需要特殊檢測儀器、無放射性同位素、適合大批量檢測的特點而得到廣泛的應用。檢測原理為活細胞粒線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。二甲基亞砷（DMSO）能溶解細胞中的甲臍，用酶聯免疫檢測儀在500nm或570nm波長處測定其光吸收值，可間接反應活細胞數量^[2]。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法形成的Formazan為非水溶性，需要加有機溶劑溶解，由於在去上清液操作時會有可能帶走小部分的Formazan，故有時重複性略差。用流式細胞儀測量的細胞活性指標通常包括細胞膜對核酸染料的通透性，代謝活性，膜電位等^[3]，膜電位測定原理為正常細胞的細胞膜兩側維持著一個胞內為負的膜電位為梯度，帶正電的親脂性染料，如Cyanines類能因電梯度而通過細胞的脂雙層膜聚積在活細胞內，帶負電的親脂性染料如oxonols會被排除在外。失去活性之細胞不再維持著膜電位梯度，則會吸收更多Oxonols類染料。流式細胞儀測量的優點是，靈敏，螢光強度精確定量，快速高通量的檢測逐個細胞，可同時檢測細胞的多個活性指標，提高可信度，結果具有統計意義；缺點是，實驗較MTT等複雜，費用較高，而且沒有流式細胞儀的地方沒法採用這種方法。

無論是利用上述那一種方法，都需要用到染料，對不同的cell lines 染料使用濃度及其反應之pH與時間，代謝酶存在部位等均會影響實驗結果，且只能定時間點一點一點去測再串聯起來做成細胞生長曲線，無法real-time-monitoring細胞生長曲線及藥物對細胞作用之kinetics.

II、研究目的:

此計畫利用本研究室自行建置之 QCM 系統，探討 QCM 系統在細胞培養之 real-time-monitoring 之可行性。

III、研究方法:

QCM 的基礎理論是依據 Sauerbrey (1959) equation^[4],

$$\Delta f = (f_c - f_q) = -\frac{2f_0^2}{A(\rho_q \mu_q)^{1/2}} \Delta m = -S_f \Delta m$$

f_0 是石英之原來震盪頻率(resonance frequency)， A 是 QCM 上電極之面積， Δm 是吸附之質量。一般常用之 AT-cut quartz crystal，石英密度 ρ_q 是 2.650 g cm^{-3} ，石英之剪力(shear modulus) μ_q 是 $2.947 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-2}$ ， S_f 即是質量校正曲線之斜率。Sauerbrey equation 是在假設晶片薄膜(film density)與剪力(shear modulus)不變的條件下推導所得之公式，因此只能應用於 uniform, rigid, thin-film deposits。後來 Kanazawa and Gordon (1985)^[5] 進一步推導出適用

於 Newtonian liquids。Kanazawa equation 如下 $\Delta f_l = -f_0^{3/2} \left(\frac{\eta_l \rho_l}{\pi \mu_q \rho_q} \right)^{1/2}$ η_l 是液體黏度， ρ_l

是液體密度。結合 Sauerbrey 與 Kanazawa and Gordon 所推導之概念，石英震盪微量天秤(quartz crystal microbalance, QCM)應用在 immunoassay 上已有很多文獻報導^[6]，近來亦有利用，如黏滯性的改變或阻抗的改變來測在晶片表面 biofilm 之形成^[7]及 bacteria growth^[8]，Liu, Y., et al^[9]用來做 *Real time kinetic analysis of the interaction between immunoglobulin G and histidine*，Tan, L. et. al.^[10] 亦用來 monitor cell agglutination，Jia, X. E. et. al.^[11] 更用來偵測 Breast Cancer Cell(MCF-7) 在金電極表面貼附及細胞增生(proliferation)，但尚未有文獻報導用來測藥物活性。

本研究利用本研究室自行開發之夾式QCM 組裝法，系統整合如 圖1，此組裝方式易消毒且組裝容易，對晶片吸附之質量靈敏度與傳統鎖式組裝沒有差異，但對液體密度之改變靈敏度較小。

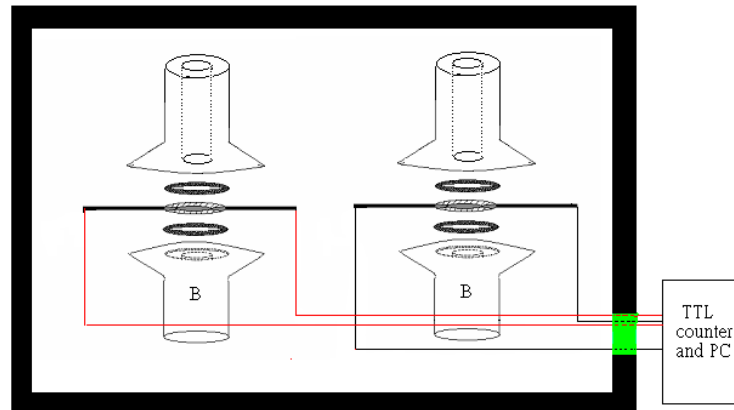
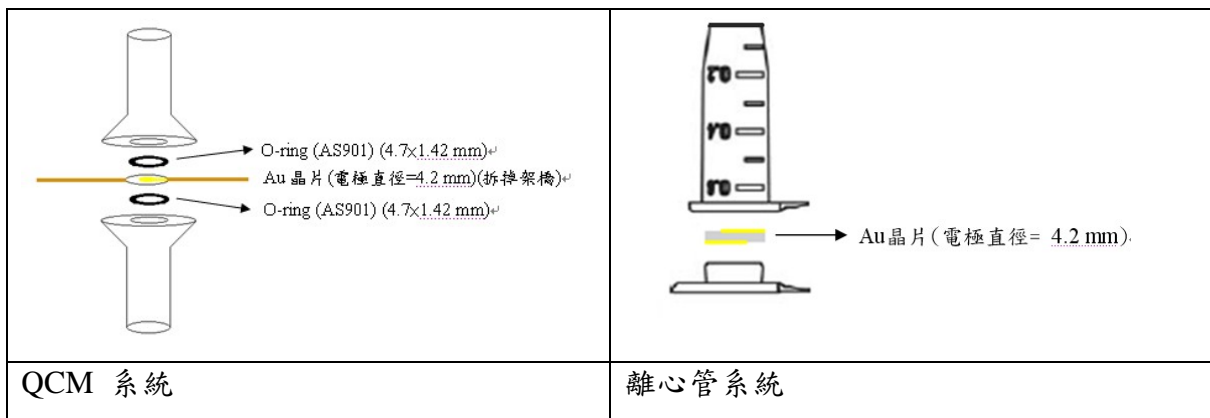


圖 1 CO₂ incubator with QCM system

實驗流程:

一、準備工作：

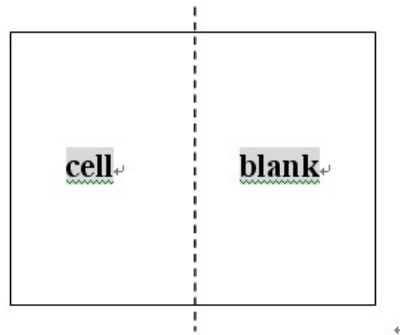
1. 使用稀釋過的 triton X-100 清洗 QCM 系統、1.5ml 離心管系統、O-rings (AS901, 食品工業級)等器具。
2. 將清洗、乾燥之上述器具，噴 70%酒精，再拿到無菌操作台中，每樣器具、晶片皆用 70%酒精浸泡消毒。
3. 再組裝系統(包含：QCM 系統、1.5ml 離心管系統)，並用 UV 燈照射 1 小時(消毒用)。



二、加入細胞：

✚ 1.5ml cell (共 3 個)和 QCM 系統(夾式不拆架橋系統)皆加入 100 μ l 的細胞。

✚ 96 well plate (共 1 盤)加入細胞之情況如下圖所示：

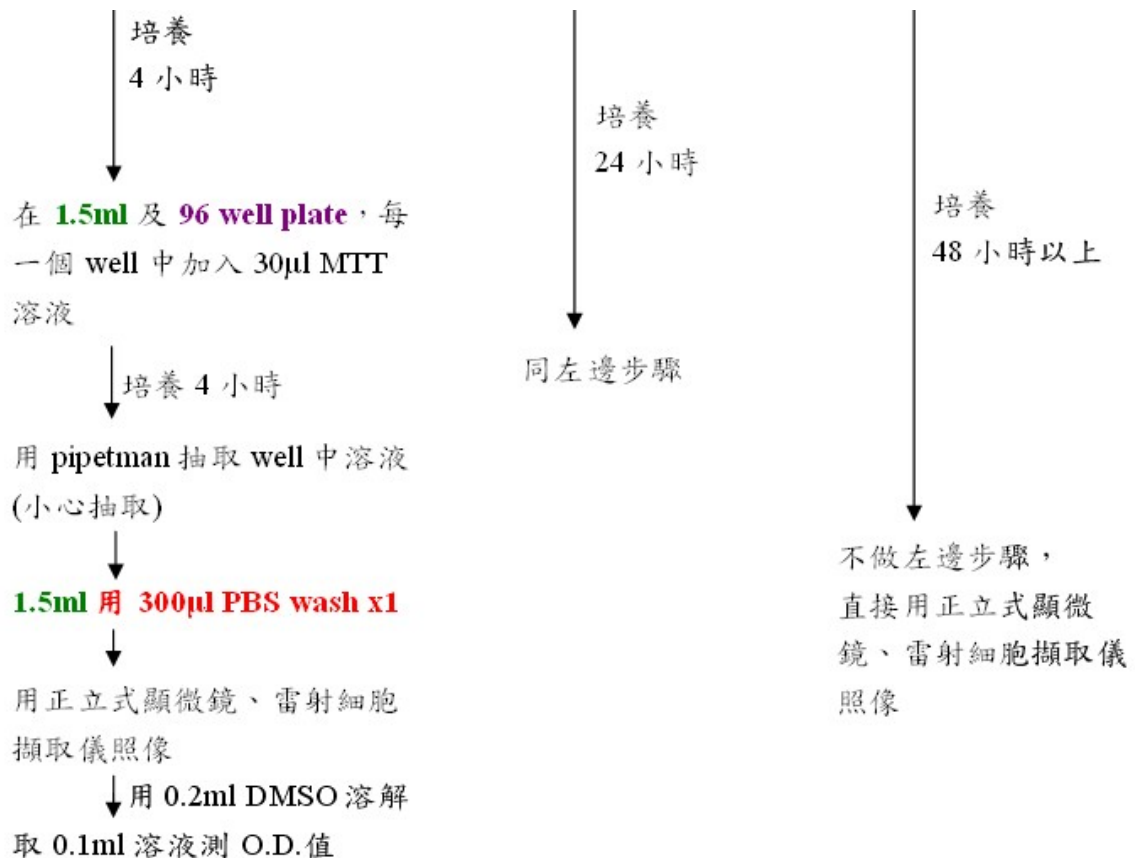


✓ cell 部分的 well 則加入 100 μ l cell → positive control

✓ blank 部分的 well 則加入 100 μ l medium → negative control

ps：細胞濃度皆為 10000 顆/100 μ l

(1) MTT 驗證細胞存活



(2) DAPI 染色驗證細胞存在量(染劑強度：凋亡細胞>正常細胞)

去除系統中所有 medium。 → 用 PBS wash $\times 3$ (1.5ml & QCM--0.5ml，24 well--1ml) → 加

入 4% 甲醛(當固定液)，在室溫下固定 30min。 →去除甲醛。 →PBS wash x2 →加入 0.1% triton-X-100，10min(打破細胞)。 →去除 triton-X-100 → 加入新鮮的 DAPI 染劑，室溫下反應 1 小時(stock solution : PBS = 1 : 10000)(stock solution=10mg/ml) 。 →螢光顯微鏡照像。

IV、結果與討論

本研究原本申請兩年計畫，與張雯惠老師研究室合作，以其建立的幾種癌細胞系(cell lines)作系統測試，由於癌細胞屬貼附性生長的細胞，但其生長週期並不相同，第一年計畫將先建立細胞生長之 QCM response 曲線，並利用顯微鏡及傳統 MTT 法，雙重驗證確認 QCM response 來自貼附的細胞量改變。第二年則以實際樣品測試,證明系統之實用性，做天然物對抗癌之活性，篩選可抑制癌細胞生長之天然物。但計畫只核准一年，因此只能做到可行性探討。

圖2 為 QCM 晶片經培養基培養，再加入 MTT 後，顯微鏡照相結果，此為 negative control, 從相片結果看不出 MTT 經細胞轉換之藍色物質，圖 3 為 QCM 系統在 Chang liver cell 細胞培養 16h 之後，再加入 MTT，從相片結果可清楚看到 MTT 經細胞轉換之藍色物質分布在晶片上。圖4 為 QCM 系統偵測後，細胞經固定化後，DAPI 染色，從螢光影像結果可清楚看到細胞在晶片上，由傳統染色法可知細胞均勻貼附在 QCM 晶片上，所以 QCM frequency change (圖5)來自細胞之貼附。

V. 結論與建議

本研究結果顯示，利用 QCM monitor 細胞生長是可行的。但本實驗所使用之 QCM TTL 系統為自己焊接的簡易系統，無過濾雜訊之處理，因此每次開啟培養箱均會造成雜訊干擾，需經過人工信號處理，且細胞培養需均勻貼附在晶片上，否則信號穩定度不佳需 baseline smooth 處理。

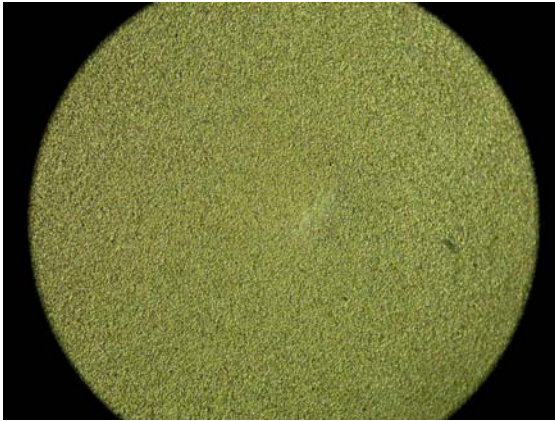


圖2 Negative control system, 經MTT 染色,幾乎看不出來藍色結晶 . (Nikon正立式顯微鏡)

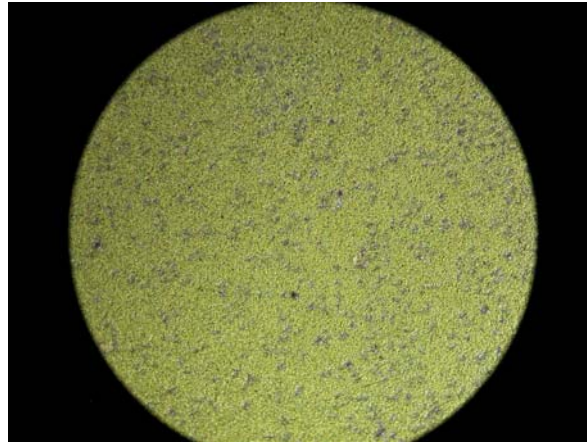


圖 3 QCM系統偵測 16 h 後, 經MTT 染色

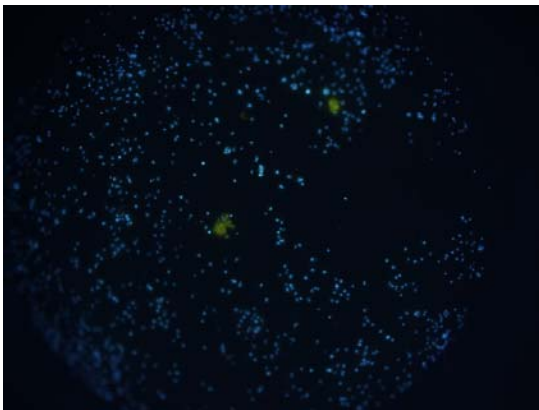


圖4 QCM系統偵測後, 經固定化後, DAPI 染色, 可清楚看到細胞在晶片上

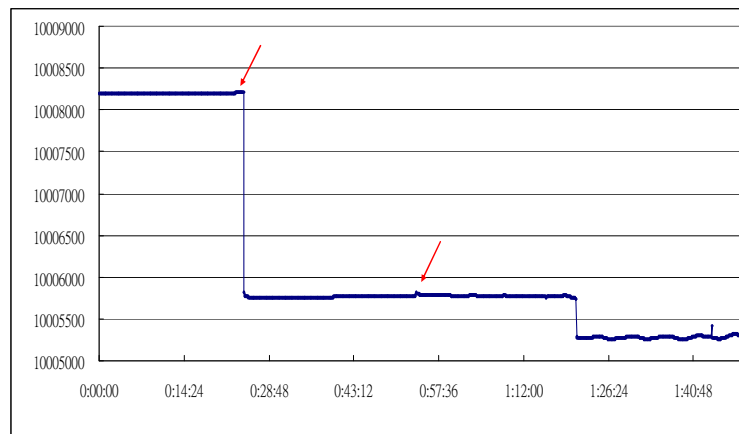


圖 5 QCM 信號, 第一個箭頭為加入D-MEM 培養基, 待訊號平穩後,加入 Chang liver cell (第二個箭號處)

參考文獻

1. 章靜波主編，「組織和細胞培養技術」，p128~135，合記圖書出版，台北，2005。
2. Simon P. Langdon, *Cancer Cell Culture—methods and protocols*, p165-169, Humana Press, New Jersey, 2004.
3. Simon P. Langdon, *Cancer Cell Culture—methods and protocols*, p247-255, Humana Press, New Jersey, 2004.
4. Sauerbrey, G., 1959. *Z. Phys.* 155, 206–222.
5. Kanazawa, K.K. and Gordon, J. G., Frequency of a quartz microbalance in contact with liquid, *Anal. Chem.* 1985, 57, 1770-1771.
6. Cooper, M. A.; Singleton, V. T., A survey of the 2001 to 2005 quartz crystal microbalance biosensor literature: Applications of acoustic physics to the analysis of biomolecular interactions. *Journal of Molecular Recognition* 2007, 20, (3), 154-184.
7. Reipa, V.; Almeida, J.; Cole, K. D., Long-term monitoring of biofilm growth and disinfection using a quartz crystal microbalance and reflectance measurements. *Journal of Microbiological Methods* 2006, 66, (3), 449-459.
8. Chang, K.-S.; Jang, H.-D.; Lee, C.-F.; Lee, Y.-G.; Yuan, C.-J.; Lee, S.-H., Series quartz crystal sensor for remote bacteria population monitoring in raw milk via the Internet. *Biosensors and Bioelectronics* 2006, 21, (8), 1581-1590.
9. Liu, Y.; Yu, X.; Zhao, R.; Shanguan, D.-H.; Bo, Z.; Liu, G., Real time kinetic analysis of the interaction between immunoglobulin G and histidine using quartz crystal microbalance biosensor in solution. *Biosensors & Bioelectronics* 2003, 18, (11), 1419-27.
10. Tan, L.; Jia, X. E.; Jiang, X.; Zhang, Y.; Tang, H.; Yao, S.; Xie, Q., Real-time monitoring of the cell agglutination process with a quartz crystal microbalance. *Analytical Biochemistry* 2008, 383, (1), 130-136.
11. Jia, X. E. et. al., QCM detection of adhesion, spreading and proliferation of human breast cancer cells (MCF-7) on a Gold surface. *Chinese Chemical Letters*, 2006, 17(4), 509-512.

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）

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）

- 由於共同主持人轉職，因此本實驗無法依原計畫分工完成，本研究室必須自行建立細胞培養技術，再進行 QCM 的測試，我們已建立細胞培養結合 QCM 系統之偵測，並透過 MTT 及 DAPI 等不同染色方式，確認細胞可貼附在金電極上造成 QCM 信號之改變。只要更進一步作條件最適化探討，將可提供細胞活性即時偵測。
- 因本計畫協助我們建立細胞培養技術，進而承接雜糧發展基金會的計畫探討不同產地蕎麥對肝細胞活性之影響。

無衍生研發成果推廣資料

98 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：98-2113-M-040-001-					
計畫名稱：發展 QCM 作為癌細胞培養之生長與藥物活性偵測							
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	1	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	1	100%		
		研討會論文	0	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	2	100%	人次	另有兩位大學不專題生協助，但此表格無適當欄位可填寫
		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	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	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>因本計畫協助我們建立細胞培養技術，進而承接雜糧發展基金會的計畫探討不同產地蕎麥對肝細胞活性之影響。</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）

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）

由於共同主持人轉職，因此本實驗無法依原計畫分工完成，本研究室必須自行建立細胞培養技術，再進行 QCM 的測試，我們已建立細胞培養結合 QCM 系統之偵測，並透過 MTT 及 DAPI 等不同染色方式，確認細胞可貼附在金電極上造成 QCM 信號之改變。只要更進一步作條件最適化探討，將可提供細胞活性及時偵測。