

## 致謝

首先非常感謝我的指導老師鄭葳老師，鄭葳老師在大學所開的細胞生物學是引起我對細胞和細胞內的分子之間的交互關係產生興趣與好奇心。在我進入研究所後，鄭葳老師對於實驗的邏輯和實驗方法的指導也幫助我的研究能夠順利完成，另外在指導我報告的口語表達、前後連貫、組織能力和實驗結果的詮釋也使我受益良多。很感謝鄭葳老師的指導和幫助，也很榮幸能夠讓這麼經驗豐富並且有耐心的老師教我學習的正確態度。

另外也需要感謝在實驗室教導我種實驗技術的學長們，郭展延和林玉俊學長非常的熱心幫助我對於習驗技巧的學習，也感謝蔡書槐學長把進行人工血管實驗相關的重要技術傳授給我，這些學長把我從對實驗技術完全不懂教導到可以順利的自己安排管理各種實驗。當然還要感謝許多各實驗室的老師、學長姐、同學對我不同方面的幫助，以及台中榮總婦產部提供的羊膜。

最後要感謝美麗的東海大學，讓我認識許多不同的人，學習人生的道理，還有各種不同領域的知識。

目錄	1-2
中文摘要	3-4
英文摘要	5-6
實驗背景	7-12
組織工程人工血管的需求	
羊膜的特性及應用	
內皮細胞黏著分子	
流體切應力 (shear stress) 對天然血管及人工血管內皮細胞的影響	
實驗目的	13-14
探討羊膜所建構的人工血管內皮細胞對流體切應力的承受能力	
流體切應力對於人工血管內皮細胞的 cell-cell junction 和 cell adhesion 的影響	
流體切應力對於人工血管內皮細胞的型態與排列的影響	
材料與方法	15-21
內皮細胞培養	
羊膜管的製備成形	
人工血管切應力沖刷實驗	
細胞貼附能力	
免疫螢光染色	
西方點墨法	

實驗結果-----	22-25
-----------	-------

人工血管內皮細胞在流體切應力下的貼附力測試

人工血管內皮細胞延長切應力處理時間測試

人工血管內皮細胞在流體切應力下的排列與型態

人工血管內皮細胞在流體切應力下的 integrins 表現位置

人工血管內皮細胞在流體切應力下的 cell-cell junction 和 cell adhesion 蛋白  
表現量

討論 -----	26-28
----------	-------

參考文獻-----	29-31
-----------	-------

圖目-----	32
---------	----

圖與附圖-----	33-45
-----------	-------

個人資料-----	46
-----------	----

## 摘要

血管移植手術時常被用來治療動脈硬化和周邊血管病變。患者自身的血管常不足以提供和重複用來進行繞道或移植手術，因此發展生物性質相容並且不會產生血栓的小管徑血管的人工替代品有急切的必要性。我們實驗室先前已經利用羊膜做為生物性的基底膜並在其上培養豬的內皮細胞，建構成全生物性的原生形人工血管。為了衡量原生形人工血管中的內皮細胞是否有足夠的血流相容性，我們利用生物反應器 (bio-reactor) 給予原生形人工血管流體切應力 (shear stress) 來觀察血流對人工血管的影響。我們施予人工血管九組不同強度的切應力 (0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 dyne/cm<sup>2</sup>) 二到四天，來研究內皮細胞的附著力，並選擇生理血流切應力 12 dyne/cm<sup>2</sup> 分析切應力對於內皮細胞與細胞之間的貼附分子和細胞與基底膜之間貼附分子表現的影響，並以共軛焦螢光顯微鏡和西方點墨法觀察分析。結果顯示施予 12 dyne/cm<sup>2</sup> 切應力二天後，人工血管中內皮細胞數量沒有明顯降低，而在 12 dyne/cm<sup>2</sup> 切應力刺激二天與四天後，由 F-actin 的螢光染色，可觀察到細胞明顯排列成單一方向並和液體流向平行。由共軛焦螢光顯微鏡及西方點墨法證明在經過切應力刺激後，PECAM-1、VE-cadherin 和 integrin  $\beta_1$ 、integrin  $\alpha_v/\beta_3$  表現量顯著增加。從以上

實驗結果推測由羊膜建構的組織工程人工血管在經過流體切應力處理後，生物相容性更好，對未來動物移植實驗成功的可能性相對提高。

## Abstract

Blood vessel replacements are frequently necessary in the treatment of atherosclerosis and peripheral vascular diseases. The supply of native vessels may not be sufficient for multiple bypass or repeated procedures. It is, therefore, desirable to develop a biocompatible small-diameter artificial blood vessel substitute with no thrombosis concerns. In our previous study, we have fabricated a prototype tissue-engineered blood vessel equivalents (BVEs) by amniotic membrane (AM) as a biological scaffold. The results showed that AM might be an ideal matrix to develop a functional endothelium in BVEs construction. To evaluate whether the endothelial cells in the BVEs could confer the necessary hemocompatible properties, the responses of endothelial cells (ECs) to fluid shear stress were assessed in this study. Nine different shear stresses (0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 dyne/cm<sup>2</sup>) were applied to the BVEs in a flow chamber and each shear stress was maintained for 2~4 days to investigate the effects of shear stress on the ECs adhesive strength. The expressions of cell adhesion molecules such as PECAM, VE-cadherin, and focal adhesion molecule, integrins, were analyzed by confocal microscopy and western blot analysis. The data showed that the cell numbers on the AM didn't decrease after applying the physiological shear stress (12 dyne/cm<sup>2</sup>) for 2 days. Under this condition, the immunofluorescence staining of F-actin showed that the cells aligned uni-directionally and paralleled with the direction of fluid flow. Confocal immunomicroscopy and Western blot analysis demonstrated that the

expressions of PECAM-1, VE-cadherin and integrin  $\beta_1$ , integrin  $\alpha_v/\beta_3$ , increased. From these results, we conclude that the AM-fabricated tissue-engineered BVEs after fluid shear stress are more biocompatible and can be used on the vessel implantation in the animal models.

## 實驗背景

### 組織工程人工血管的需求

冠狀動脈粥瘤硬化 (atherosclerosis) 是先進國家常見的心血管疾病，由於冠狀動脈產生粥瘤，造成血管壁增厚、管徑縮小甚至阻塞，最後導致心肌缺血而引發心臟病 (Glass and Witztum, 2001)。目前主要有兩種治療冠狀動脈硬化的手術方法，包括冠狀動脈繞道手術 (coronary artery bypass grafting, CAPG)、及經皮介入性治療 (percutaneous coronary intervention, PCI；如氣球擴張術)。由於經皮介入性治療具有傷口小、恢復時間短等優點，在近幾年成為主要用於冠狀動脈疾病的手術；但是經皮介入性治療仍有許多病患 (如多區域阻塞) 不適用，且有血管再狹窄等問題，因此冠狀動脈繞道手術每年仍維持一定的手術比例 (Rosamond et al., 2008)。而冠狀動脈繞道手術，必須有合適的血管來進行移植，目前標準的替代血管為患者自身的血管，如隱靜脈 (saphenous vein) 和內乳動脈 (internal mammary artery)。使用自身血管不會有排斥反應，並且是完整成熟的血管；但患者有可能同時有其他的血管病變，或者曾經接受過相似手術或截肢，亦可能造成患者缺乏合適的自身替代血管，因此發展人工血管有急



迫的必要性。化工合成的高分子材料如 Dacron、expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE)、polyurethane (PU) 等，由於物理特性良好且容易加工，被認為是適當的人工血管材料 (Kannan et al., 2005)，且被成功的應用於大管徑血管的替代手術中；但是冠狀動脈屬於小管徑血管 (< 6mm)，由於小管徑血管內的血流流速較低，化工合成的人工血管容易產生血栓 (thrombus) 及排斥反應 (foreign body reaction) 的問題，因此利用組織工程技術來建構生物相容性佳的人工血管成為重要的研究方向 (Thomas et al., 2003)。

要建構一個成功的人造血管有兩個基本條件：(1) 人造血管必須具有完整、且有功能的內皮層。在正常的血管中，內皮細胞位於血管壁的最內層，具有抗白血球沾黏、血小板堆積和分解血栓的功能，因此可減少血管中發生血栓及排斥反應的機會；(2) 人造血管必須具備良好的物理性質，如彈性、抗張性、順應性等。在生理狀況下，血管必須承受及傳導血壓，因此人工血管必須具備足夠的張力，同時須具有彈性及順應性 (Mitchell and Niklason, 2003; Rémy-Zolghadri et al., 2004)。

### 羊膜的特性及應用

羊膜 (amniotic membrane) 在胚胎中最內層，直接包覆羊水及胎

兒，羊膜可被分成三層，依序是上皮細胞層 (epithelium) 、基底膜 (basement membrane) 、及基質層 (stromal matrix) 。羊膜的基底膜在人類組織中屬於較厚的基底膜，其主要成分為膠原蛋白第四型 (collagen IV) 及 laminin (Timpl, 1996) ，有極佳的強度。在組織工程的使用上，被認為具有幫助上皮組織形成、及抑制纖維化的作用 (Solomon et al., 2005) ，並且羊膜目前已經被成功的應用於眼角膜的移植手術上 (Burman et al., 2004) 。我們實驗室先前證實羊膜具有促進血管內皮細胞 (endothelial cells) 生長、附著和抗發炎等特性 (Tsai et al., 2007) 。

目前，利用組織工程技術建構人工血管的方法主要可以分成三大類 (Mitchell and Niklason, 2003; Kakisis et al., 2005) ： (1) 利用細胞外基質 (collagen、fibrin) 與細胞混合培養成管狀 ； (2) 將平滑肌細胞及纖維母細胞培養成片狀後，將成片的細胞捲成管狀 ； (3) 將生物可分解的高分子網膜製成管狀，將細胞培養於高分子網膜中，經過長時間的培養後，細胞產生的細胞外基質可逐漸取代高分子網膜，而我們實驗室曾以羊膜為基底膜建構組織工程人工血管並且以高分子材料網膜 (PLGA、PCL) 來增加人工血管強度。但是羊膜與高分子材料的相容性不佳，最後我們直接以多層羊膜替代高分子材料增加組織工程人工血管的強度，進一步來建

構組織工程人工血管。

### 內皮細胞黏著分子

內皮細胞表現的黏著分子可以分成三類：(1) 內皮細胞與細胞間的黏著分子，如 platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31)、vascular endothelial – cadherin (VE-cadherin, CD144)、claudins 等，其中 PECAM-1 及 VE-cadherin 為內皮細胞特有的黏著分子，並且共同形成內皮細胞感受流體切應力的機械力感受器複合體 (Tzima et al., 2005)。(2) 內皮細胞與細胞外基質 (extracellular matrix) 之間黏著分子，主要為 integrin 分子，這些與胞外基質連接的分子會聚集並與細胞骨架連接，形成 hemi-desmosome 結構 (Davis and Senger, 2005) 或 focal adhesion 主導細胞與外基質之間的附著。(3) 與發炎反應相關的細胞黏著分子，如 E-selectin、P-selectin、intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)，這些分子會促進白血球與內皮細胞間的沾黏 (Carlos and Harlan, 1994; Ruiz-Torres et al., 2006)。人工血管中如果具有完整單層內皮細胞，以提供抗血栓、抗發炎等作用，並且內皮細胞表現較高的內皮細胞間黏著分子與內皮細胞與細胞外基之間黏著分子，並表現較少的發炎相關黏著分子，則被認為具有較高的移植成功機會 (Mitchell and Niklason, 2003; Rémy-Zolghadri et al.,

2004)。

### 流體切應力 (shear stress) 對天然血管及人工血管內皮細胞的影響

正常的血管必須承受血液所產生的各種物理性因子，包括壓力 (pressure)、張力 (tension)、及切應力。切應力是指當流體流過表面時所產生與表面平行的作用力，由於在血管中內皮細胞直接接觸血液，因此血液流動所產生的切應力直接作用在內皮細胞上。內皮細胞上的許多分子和結構都被認為是切應力的感受器，例如：ion channels ( $\text{Ca}^{2+}$  channel)、Tyrosine kinase receptor (VEGFR)、G proteins and G protein coupled receptors、caveolae (caveolin-1)、adhesion proteins (integrins)、cytoskeleton (microtubules、actin filaments)、glycocalyx、primary cilia、cell-cell junction proteins (PECAM-1、VE-cadherin) (Ando and Yamamoto., 2009；Tzima et al., 2005)。當內皮細胞上具有這些切應力感受器上時，感受器感受到外界切應力時產生蛋白質構形改變，並且在細胞質內產生 MAPK 訊號傳遞鏈的訊號傳遞 (Ando and Yamamoto., 2009)，內皮細胞對於不同的血流狀態會產生反應；在生物體內血流方向穩定且切應力高的血管壁上內皮細胞呈現較少的發炎相關黏著分子 (ICAM-1、VCAM-1)，而在有亂流並且切應力較低的血管壁上的內皮細胞，則發炎相關黏著分子表現量

增加 (Chen and Tzima, 2009, White et al., 2007) 。在目前已知內皮細胞在體外培養會受切應力影響而改變其形態，並排列成順應液體流向 (Chein, 2007; Davies et al., 1986) 。文獻並指出，當人工血管在體外先接受切應力的刺激時，可以促進血管成形 (Niklason et al., 1999; Niklason et al., 2001) 。

## 實驗目的

### 探討羊膜所建構的人工血管內皮細胞對流體切應力的承受能力

由於使用羊膜的人工血管建構方法是由本實驗室所建立的新方法，對於這種新方式建構出的組織工程人工血管之中，想進一步分析內皮細胞的貼附力是否能夠承受生理強度的流體切應力。在生理狀態下，3 mm的血管中的流體切應力大約是  $12 \text{ dyne/cm}^2$ ，所以我們將最高流體切應力強度設定為  $12 \text{ dyne/cm}^2$ ，以確定人工血管是否可以承受生理強度切應力。

### 流體切應力對於人工血管內皮細胞的型態與排列的影響

過去文獻曾報導內皮細胞會對流體產生反應，其中可直接觀察到的就是細胞的形態與排列的改變 (Chein, 2007; Davies et al., 1986)。內皮細胞因應流體而排列成與液流方向平行，符合實際生理情形，所以藉由觀察人工血管的內細胞排列可知人工血管在型態與排列上是否因切應力的處理而更加與天然血管類似。

### 流體切應力對於人工血管內皮細胞的cell-cell junction和cell adhesion的影響

當液體流經細胞表面的時候，在cell-cell junction之處會產生最大

的拉力 (Fung and Liu, 1993; Dusserre et al., 2004) ，並且cell junction蛋白PECAM-1 在細胞質中會產生磷酸化現象 (Osawa et al., 2002) ，而短時間的shear stress會造成cell adhesion蛋白integrin的活化。 Cell-cell junction和cell adhesion對於內皮細胞與細胞之間及內皮細胞與外基質之間的附著力亦有直接的關係，故觀察cell-cell junction和cell adhesion蛋白的表現量、表現位置，可以判斷人工血管內皮細胞在流體切應力處理後的穩定程度。

## 材料與方法

### 內皮細胞培養

取得一般食用豬的升主動脈，以含有 150 U/ml penicillin，150 µg/ml streptomycin 的 phosphate-buffered saline (PBS, 1.3M NaCl, 0.27M KCl, 79.6mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 14.7mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 清洗並去除結締組織與血塊，再將動脈縱向剖開成平面，使用 0.25% trypsin 處理 10 分鐘後，以手術刀刮取內皮細胞，將刮取下的內皮細胞以 M199 培養液 (Gibco) 打散並培養在 M199 含 10% FBS、150 U/ml penicillin、150 µg/ml streptomycin、0.25 µg/ml amphotericin B 的培養液中，在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 環境下培養。每天更換一次培養液，細胞在培養皿中長滿後，以 0.25% trypsin 將細胞分離並取下做繼代培養，繼代培養 1 次後將培養液逐漸降低抗生素濃度至一般培養狀態 (10% FBS、50U/ml penicillin、50 µg/ml streptomycin)。內皮細胞在繼代培養第三代長滿後，以 0.25% trypsin 分離並取下細胞，以 recovery cell culture freezing medium (Gibco) 將細胞冷凍供後續實驗使用，實驗所採用的內皮細胞取自第三代到第四代的細胞。

### 羊膜管的製備成形



羊膜由台中榮總婦產科提供，取得羊膜後以含有 150 U/ml penicillin、150 µg/ml streptomycin 之 PBS 緩衝液清洗乾淨後，以 0.25% trypsin 在 37°C 下處理 20 分鐘後，使用細胞刮刀將羊膜表面上的上皮細胞輕輕刮除，露出基底膜，再以滅菌二次去離子水清洗乾淨。將羊膜裁切成適當大小，鋪平後以 0.3 cm 外徑的鐵氟龍管為軸，將羊膜捲成約 10~15 層長度約 5 cm 的圓筒結構，將此多層羊膜靜置在無菌層流操作台內風乾，羊膜風乾後抽出鐵氟龍管形成一管狀結構。風乾後的羊膜管以 0.1 % 二戊醛（溶於 0.01N 醋酸中）於 4°C 下作用 24 小時進行化學交聯反應 (cross-linking)，接下來將羊膜管置於 0.1M 甘胺酸 (glycine) 溶液中，以超音波震盪 30 分鐘，中和未作用完全的醛基，再以無菌二次去離子水清洗保存，供後續實驗使用。

### 人工血管切應力沖刷實驗

在進行切應力處理實驗前二天，將約  $10^7$  個細胞注入羊膜管內層，培養出緊密單層結構的細胞層 ( $2 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>)。

人工血管置入生物反應器進行切應力沖刷實驗。生物反應器由培養基貯存瓶 (medium reservoir)、蠕動幫浦 (Pulsatile pump)、連接管、及安裝人工血管的反應盒構成。生物反應器架設在 37°C 恆溫培養箱中維持溫度恆定。生物反應器灌流所使用的 M199 培養

液以 Hank's buffered salt solution (HBSS) 為緩衝溶液，並加入 HEPES (Sigma-Aldrich) 加強緩衝能力，因此 M199 培養基可在密閉的系統中維持固定的酸鹼值，不需外加二氧化碳。人工血管內的切應力可以利用下列的公式來推導：

$$\tau = \frac{32\eta Q}{\pi d^3}$$

其中  $\tau$  為人工血管內的切應力，單位為  $\text{dyne/cm}^2$ ； $\eta$  為流體的黏滯度 (viscosity)，單位為  $\text{g} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ； $Q$  為流體的每秒流量，單位為  $\text{cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ ； $\pi$  為圓周率； $d$  為人工血管的內徑 (Reneman and Hoeks, 2008)。M199 培養液在  $37^\circ\text{C}$  時的黏滯度為  $0.7 \text{ centipoise} = 7 \times 10^{-3} \text{ g/cm} \cdot \text{s}$ ，人工血管的內徑為  $0.3 \text{ cm}$ ，將以上數值代入公式，可以得知切應力  $\tau = 2.64 Q$ ，所以可以藉由改變蠕動幫浦轉速進而改變流體每秒流量，即可改變所需的切應力。以  $12 \text{ dyne/cm}^2$  為例，每秒有  $4.5 \text{ ml}$  的液體流經人工血管。

### 細胞附著能力

人工血管在靜止狀態下培養二天後將人工血管安裝至生物反應器以 (1) 不同強度的切應力 ( $0 \cdot 0.5 \cdot 1 \cdot 2 \cdot 3 \cdot 4 \cdot 6 \cdot 8 \cdot 10 \cdot 12 \text{ dyne/cm}^2$ ) 沖刷處理二天；(2)  $6 \text{ dyne/cm}^2$  切應力處理 2 天後，提升到  $8 \text{ dyne/cm}^2$  處理 2 天再提升到  $12 \text{ dyne/cm}^2$  處理 2 天；(3)  $8 \text{ dyne/cm}^2$  處理 4 天；(4)  $12 \text{ dyne/cm}^2$  處理 4 天。切應力沖刷處理之後取下

人工血管，以 4% 的 paraformaldehyde 固定，並使用 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1:1000, v/v) (Molecular Probes) 進行細胞核染色，染色完後縱向剪開人工血管，分離下最內層內皮細胞生長的羊膜並將細胞層朝上平鋪於玻片，封片後以螢光顯微鏡觀察人工血管中內皮細胞數量。

### 免疫螢光染色

人工血管在靜止狀態下培養二天後，實驗組：將人工血管安裝至生物反應器以 12 dyne/cm<sup>2</sup> 的切應力沖刷處理二天，控制組：人工血管在靜止狀態下再培養二天。將實驗組與控制組的人工血管取下置於 4°C 冷卻 20 分鐘，以冰的 PBS 清洗 3 次洗去培養液，再以 4% 的 paraformaldehyde 固定，PBS 緩衝液清洗 10 分鐘 3 次洗去 paraformaldehyde，利用小鼠抗大鼠 PECAM-1 抗體 (1: 50, v/v) (BD bioscience)、大鼠抗豬 VE-cadherin 抗體 (1: 20, v/v) (Serotec)、小鼠抗豬 integrin  $\beta_1$  抗體 (1: 50, v/v) (BD Bioscience) 或 Phalloidin, FITC labeled (1: 200, v/v) (Sigma-Aldrich) 室溫下作用 1 小時後，以 PBS 緩衝液清洗 10 分鐘 3 次，以 1: 200 的稀釋比例加入相對應的山羊抗小鼠 Cy5 接合次級抗體或山羊抗大鼠 Cy5 接合次級抗體，室溫下作用 1 小時後以 PBS 緩衝液清洗 10 分鐘 3 次，最後以 1: 700 的稀釋比例用 propidium iodide 染細胞核

10 分鐘，以 PBS 緩衝液清洗 10 分鐘 3 次，風乾後封片，以共軛焦螢光顯微鏡 (LSM 510, Zeiss) 觀察，以 488 nm 波長激發光觀察 FITC 螢光，543 nm 波長激發光觀察 propidium iodide 螢光，543 nm 波長激發光觀察 Cy5 螢光。

### 西方點墨法

人工血管在靜止狀態下培養二天後，實驗組：將人工血管安裝至生物反應器以  $12 \text{ dyne/cm}^2$  的切應力沖刷處理二天，控制組：人工血管在靜止狀態下再培養二天。將實驗組與控制組的人工血管取下，以 PBS 洗去培養基，再用 enzyme-free cell dissociation buffer  $37^\circ\text{C}$  下作用 15 分鐘後在  $4^\circ\text{C}$  下超音波震盪，使內皮細胞從人工血管上脫落，離心後取出沉澱，以 RIPA buffer (25mM Tris-HCl pH=7.6, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1%SDS) 打散細胞， $4^\circ\text{C}$  超音波震盪 30 分鐘，將均質化的細胞液以  $4^\circ\text{C}$  800 g 的速度離心 10 分鐘，收集上清液，以 bicinchoninic acid (BCA) 蛋白質分析試劑，用掃描光譜儀 (DU-65 spectrophotometer, Beckman) 於 562 nm 的波長測量吸光度，以獲得蛋白質濃度。

將定量的樣品加入四分之一體積的 loading dye (1% SDS, 5% mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.1% BPB : Bromo-phenol-blue,

50mM Tris-HCl pH6.8) ，利用 8%濃度的十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳 (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PGE) ，將樣品注入膠體孔槽中，以 50 V 電壓通過 stacking gel 後，提高電壓至 70 V 進行電泳，直到樣品電泳至膠體底部。將 PVDF (Immobilon<sup>TM</sup>, Transfer membrane, MILLIPORE) 剪裁至與蛋白質電泳膠同樣大小，並浸泡於 100% methanol 10~15 秒後，倒棄 methanol，並且利用 ddH<sub>2</sub>O 清洗 1 分鐘二次，再將 PVDF 轉移到轉漬緩衝溶液 (transfer buffer) 中約 15-30 分鐘，另外再剪裁六片同樣大小的濾紙浸濕，待蛋白質進行電泳分離後，將蛋白質電泳膠取出，去掉 stacking gel 的部份，浸泡於轉漬緩衝液中約 15 分鐘。利用半乾式轉漬儀 (Trans-Blot®SD, Semi-Dry Transfer Cell, Bio-rad) ，將蛋白質從電泳膠轉移至硝酸纖維膜上。先將 3 張濾紙置於陽極版上，再依序放上硝酸纖維膜、蛋白質電泳膠及另外 3 張濾紙，注意避免氣泡產生。之後，蓋上陰極版及安全蓋，以 20 V 的電壓進行轉移 30 分鐘。轉漬完成的硝酸纖維膜，以 PBST 緩衝溶液 (PBS-0.05% Tween 20 buffer, PBST) 浸濕，然後加入含有 5% 脫脂奶粉 (skimmed milk) 的 PBST 緩衝溶液，在室溫下反應約 1 小時，將其他未被蛋白質接合的部位覆蓋。再以 PBST 緩衝溶液清洗 3 次，每次 10 分鐘後，加

入特定稀釋比例的一級抗體：小鼠抗大鼠 PECAM-1 抗體 (1: 1000, v/v) (BD bioscience) 、大鼠抗豬 VE-cadherin 抗體 (1: 3000, v/v) (Serotec) 、小鼠抗豬 integrin  $\beta_1$  抗體 (1:5000, v/v) (BD Bioscience) 、小鼠抗人類 integrin  $\alpha_v\beta_3$  (1:1500, v/v) (Chemicon) ，在室溫下作用 1 小時後，以 PBST 緩衝溶液清洗 3 次，每次 10 分鐘後，加入特定稀釋比例的 HRP 二級抗體：HRP 接合山羊抗小鼠二級抗體 (1:5000, v/v) (Zymed) 、HRP 接合山羊抗大鼠二級抗體 (1:5000, v/v) (Zymed) 室溫下作用 1 小時後，以 PBST 緩衝溶液清洗 3 次，每次 10 分鐘，以 chemiluminescent HRP 冷光試劑 (Millipore) 顯色，並在冷光影像感應系統 (Fuji) 下照相。

## 實驗結果

### 人工血管內皮細胞在切應力下的貼附力測試

為探討羊膜所建構的組織工程人工血管中的內皮所能承受的流體切應力的強度，我們將建構完成的人工血管注入密度  $10^7$  個內皮細胞，培養出大約  $2 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> 的單層內皮細胞 2 天之後，再處理 2 天 0.5、1、2、3、4、6、8、10、12 dyne/cm<sup>2</sup> 不同強度的切應力並與 static control 作比較，對人工血管內壁進行細胞和染色，換算每平方公分細胞數量，從人工血管中內皮細胞數量的柱狀圖，可知人工血管處理 0.5、1、2、3、4、6、8、10、12 dyne/cm<sup>2</sup> 的切應力 2 天後，分別與 static control 做統計比較，發現內皮細胞在處理不同強度切應力後數量並沒有顯著的下降（圖一），所以我們使用羊膜所建構的人工血管可以承受 12 dyne/cm<sup>2</sup> 強度的流體切應力。

### 人工血管內皮細胞延長切應力處理時間測試

在我們進行到 6 dyne/cm<sup>2</sup> 時因為有不錯的結果，所以決定延長流體切應力處理天數，首先我們進行 6 dyne/cm<sup>2</sup> 切應力處理 2 天後，提升到 8 dyne/cm<sup>2</sup> 處理 2 天再提升到 12 dyne/cm<sup>2</sup> 處理 2 天，發現人工血管中細胞數量明顯降低，並且在相同天數的 static control

也有細胞掉落的情形(圖二 A)。於是我們縮短處理的時間為 4 天，分別行了 8 dyne/cm<sup>2</sup>、12 dyne/cm<sup>2</sup> 與相同天數的 static control 的處理，可以看到 8 dyne/cm<sup>2</sup> 與 12 dyne/cm<sup>2</sup> 細胞數量均下降，而 static control 則無掉落(圖三 B)，因為延長切應力處理時間的結果不理想，所以後續沒有進行更長時間的實驗。

### 人工血管內皮細胞在切應力下的排列與型態

在人工血管處理 12 dyne/cm<sup>2</sup> 的切應力 2 天與 4 天後，將人工血管固定，對人工血管中內皮細胞進行細胞骨架螢光染色，從細胞骨架 (F-actin) 的螢光染色可觀察到 actin 排列的情形。在切應力處理後的人工血管中內皮細胞 actin 排列方向一致並且與液體的流動方向平行，而 static control 人工血管中內皮細胞的 actin 排列並沒有方向性 (圖三)。

我們同樣將人工血管處理 12 dyne/cm<sup>2</sup> 的切應力 2 天後，對於 cell-cell junction 進行免疫螢光染色，從 cell junction protein (PECAM-1、VE-cadherin) 的免疫螢光染色，可以觀看到 PECAM-1 分佈，在經過切應力處理後，在 cell-cell junction 的情形更加明顯 (圖四 A-D)。螢光染色亦顯示 VE-cadherin 分佈在細胞周圍，細胞型態呈現梭狀，並且與液體流動方向平行的排列方式 (圖四 E、F)。



### 人工血管內皮細胞在切應力下的integrins表現位置

Integrin 主要是負責內皮細胞與細胞與羊膜之間的連接形成 focal adhesion，和內皮細胞的貼附力有直接關係。而人工血管處理 12 dyne/cm<sup>2</sup> 的切應力 2 天後，從 integrin  $\beta_1$  的螢光染色發現在切應力處理後，內皮細胞的 integrin  $\beta_1$  的分佈似乎在 cell-cell junction 處增加 (圖五 A、B、C、D)，Z 軸剖面圖可以看到切應力處理後 integrin  $\beta_1$  從細胞底部分佈細胞之間 (圖五 E、F)，而 integrin  $\alpha_v\beta_3$  的分佈則沒有因為切應力的處理產生改變 (圖六 A - F)，從 Z 軸剖面圖可以看到 integrin  $\alpha_v\beta_3$  static control 與 shear 皆分布在細胞底部 (圖六 E、F)。

### 人工血管內皮細胞在切應力下的cell-cell junction和cell adhesion蛋白表現量

Cell-cell junction 是細胞之間穩定度的關鍵，從 cell junction 蛋白表達量可以知道 cell-cell junction 是否更加穩定。從西方點墨法結果可以看出人工血管中內皮細胞處理 12 dyne/cm<sup>2</sup> 的切應力 2 天後，內皮細胞的 cell junction 蛋白 PECAM-1 (圖七 A) 和 VE-cadherin (圖七 B) 的表達量與 static control 比較，切應力處理後的 PECAM-1 表達量提升到大約是 static control 的 1.72 倍，VE-cadherin 的表達量提升到約是 1.67 倍，由此得知人工血管中的

內皮細胞 cell-cell junction 因流體切應力的處理表現量增加而更加穩定。

另外 cell adhesion 主導細胞與外基質貼附的穩定度，而其中 integrin 家族中的 integrin  $\beta_1$  又稱做 fibronectin receptor  $\beta$ 、integrin  $\alpha_v/\beta_3$  又稱做 vitronectin receptor，可和許多不同種類細胞外基質結合，屬於形成 focal adhesion 的重要 integrin。

從 cell adhesion 蛋白的西方點墨法結果可觀察到人工血管中內皮細胞處理 12 dyne/cm<sup>2</sup> 的流體切應力 2 天後，細胞的 cell adhesion 蛋白 integrin  $\beta_1$  總蛋白的表現量提升，約是 static control 的 1.25 倍 (圖八 A)，但是活化態的 integrin  $\beta_1$  卻降低為 static control 的 0.85 倍 (圖八 B)，這和我們預期結果不同；另外 integrin  $\alpha_v/\beta_3$  總蛋白的表現量在流體切應力處理後也提升，integrin  $\alpha_v$  約達到 static control 的 1.29 倍，integrin  $\beta_3$  約達到 static control 的 1.53 倍 (圖八 C)。可以得知人工血管中的內皮細胞 cell adhesion 蛋白因流體切應力的處理表達量變多，可能對於 focal adhesion 的強度是有幫助的，而活化態的 integrin  $\beta_1$  為何降低，則需進一步探討。

## 討論

目前因為進行冠狀動脈繞道手術或血管置換手術時，部分患者有  
人工血管的需求，而高分子聚合人工血管不適用於小管徑血管等  
原因，數十年來許多研究希望可以成功建構出小管徑血管的人工  
血管，但是用不同的方法建構出的血管都不理想。使用高分子材  
料的人工血管內皮細胞有貼附性不佳的問題 (Ott and Ballermann,  
1995) ，而使用膠原蛋白與平滑肌細胞共同培養的人工血管有強  
度不足的問題 (Girton et al., 2000) ，使用複合型材料則有材料之  
間相容性不佳的問題 (L'Heureux et al., 1998) ，至今仍無可實際  
應用的小管徑人工血管成功被建構出來 (Isenberg et al., 2006) 。  
從我們的實驗結果發現以多層羊膜為基礎所建構的人工血管，在  
經過生物反應器的流體切應力處理後，人工血管中的內皮細胞所  
呈現出來的各種貼附性與順應性都得到不錯的結果。經過生物反  
應器的流體切應力處理 2 天後，可以承受生理強度  $12 \text{ dyne/cm}^2$  的  
沖刷，但是在我們 *vitro* 實驗中內皮細胞無法進行更長時間的實驗  
處理，這點需要進一步克服，或者在動物實驗中觀察是否 *vivo* 的  
環境下內皮生長天數可以延長。流體切應力處理  $12 \text{ dyne/cm}^2$  後內  
皮細胞的排列皆順應流體的方向，cell-cell junction 明確分佈於細

胞與細胞連接處並且連接分子表達量上升，cell adhesion 蛋白也有增加的趨勢。Cell junction 蛋白: PECAM-1 和 VE-cadherin 除了是維持細胞之間的穩定度之外，也被認為是流體切應力的機械感受器 (Tzima et al., 2005) ，我們認為切應力感受器 (PECAM、VE-cadherin) 在接受到切應力刺激之後導致更多的機械感受器表達，而切應力與切應力感受器之間存在著正向回饋的機制，這樣的機制除了維持內皮細胞對於流體反應之外，也進一步增強了細胞間的穩定性、降低了發炎反應與細胞分裂 (Ando and Yamamoto, 2009) 。

在我們的實驗結果中與我們預期比較不同的是雖然人工血管經過切應力處理後內皮細胞的 cell adhesion 蛋白 integrin  $\beta_1$  和 integrin  $\alpha_v/\beta_3$  的總蛋白表達量增加，但是 integrin  $\beta_1$  的蛋白分佈出現在細胞周圍，並且 integrin  $\beta_1$  的活化態卻減少，而 integrin 的活化要就是為了和細胞外基質之間結合並且分佈在細胞底部與細胞外基質形成 focal adhesion; 另外在過去文獻也提到 30 分鐘內切應力的刺激會使內皮細胞的 integrin 活化 (Tzima et al., 2001) ，而在本實驗中，integrin  $\beta_1$  蛋白表現量因 2 天切應力處理而提升，但是其活化態的表現量卻降低。且在經過切應力處理後，F-actin 重新排列，使細胞由無方向性改變為梭形，並且順應流體的流動方向。由前

人研究與本實驗結果推測，可能短時間 (30 min) 切應力的處理造成了 integrin 活化，但需較長時間的切應力使 integrin  $\beta_1$  蛋白總表現量增加，但是所增加的 integrin  $\beta_1$  可能不是全部都參與在 focal adhesion 的形成，有一部分是和機械力感受器複合體 (PECAM-1、VE-cadherin、VEGFR2) 共同參與細胞質內訊號的傳遞，或是幫助細胞 actin 的排列，因此活化態的 integrin  $\beta_1$  表現量在長時間切應力下並沒有跟著增加。而 integrin  $\alpha_v/\beta_3$  的蛋白分佈則沒有看到類似 integrin  $\beta_1$  分佈改變的情形，因此這兩類的 integrin 在切應力環境下是否有不同的功能，值得進一步去探討。

我們以多層羊膜所建立的組織工程人工血管在切應力處理後得到不錯的實驗結果，也解決了強度問題與不同材質不相容的問題，細胞貼附性也十分良好，管徑 3 公厘血管可以承受  $12 \text{ dyne/cm}^2$  生理強度的沖刷，該結果值得進一步進行動物實驗以確定所建構的人工血管是否未來有臨床價值的可能性。

## References

Ando J., Yamamoto K. Vascular mechanobiology: endothelial cell responses to fluid shear stress. *Circ. J.* 73, 1983 – 1992. (2009)

Burman S., Tejwani S., Vemuganti G.K., Gopinathan U., Sangwan V.S. Ophthalmic applications of preserved human amniotic membrane: A review of current indications. *Cell Tissue Bank* 5, 161-175. (2004)

Chen Z., Tzima E. PECAM-1 is necessary for flow-induced vascular remodeling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 1067-1073. (2009)

Chen K.D., Li Y.S., Kim M., Li S., Yuan S., Chien S., Shyy J.Y. Mechanotransduction in response to shear stress. Roles of receptor tyrosine kinases, integrins, and Shc. *J. Biol. Chem.* 274, 18393-18400. (1999)

Davies P.F., Remuzzi A., Gordon E.J., Dewey C.F. Jr., Gimbrone M.A. Jr. Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2114-2117. (1986)

Dusserre N., L'Heureux N., Bell K.S., Stevens H.Y., Yeh J., Otte L.A., Loufrani L., Frangos J.A. PECAM-1 interacts with nitric oxide synthase in human endothelial cells: implication for flow-induced nitric oxide synthase activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1796-1802. (2004)

Fung Y.C., Liu S.Q. Elementary mechanics of the endothelium of blood vessels. *J. Biomech. Eng.* 115, 1-12. (1993)

Girton T.S., Oegema T.R., Grassl E.D., Isenberg B.C, Tranquillo R.T. Mechanisms of stiffening and strengthening in media-equivalents fabricated using glycation. *J. Biomech. Eng.* 122, 216-223. (2000)

Glass C.K. and Witztum J.L. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell* 104, 504-516. (2001)

Isenberg B.C., Williams C., Tranquillo R.T. Small-diameter artificial arteries engineered in vitro. *Circ. Res.* 98, 25-35. (2006)

Kakisis J.D., Liapis C.D., Breuer C., Sumpio B.E. Artificial blood vessel: The Holy Grail of peripheral vascular surgery. *J. Vasc. Surg.* 41, 349-354. (2005)

Kannan R.Y., Salacinski H.J., Butler P.E., Hamilton G., Seifalian A.M. Current status of prosthetic bypass grafts: a review. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 74, 570-581. (2005)

L'Heureux N., Paquet S., Labbe R., Germain L., Auger F.A. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J.* 12, 47-56. (1998)

Mitchell S.L., Niklason L.E. Requirements for growing tissue-engineered vascular grafts. *Cardiovasc. Pathol.* 12, 59-64. (2003)

Osawa M., Masuda M., Kusano K., Fujiwara K. Evidence for a role of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in endothelial cell mechanosignal transduction: is it a mechanoresponsive molecule? *J. Cell Biol.* 158, 773-785. (2002)

Otte L.A., Bell K.S., Loufrani L., Yeh J.C., Melchior B, Dao D.N., Stevens H.Y., White C.R. Frangos J.A. Rapid changes in shear stress induce dissociation of a  $G\alpha_{q/11}$ -platelet endothelial cell adhesion molecule-1 complex. *J. Physiol.* 587, 2365-2373. (2009)

Ott M.J., Ballermann B.J. Shear stress-conditioned, endothelial cell-seeded vascular grafts: improved cell adherence in response to in vitro shear stress. *Surgery* 117, 334-339. (1995)

Rémy-Zolghadri M., Laganière J., Oligny J.F., Germain L., Auger F.A. Endothelium properties of a tissue-engineered blood vessel for small-diameter vascular reconstruction. *J. Vasc. Surg.* 39, 613-620. (2004)

Rosamond W., Flegal K., Furie K., Go, A., Greenlund K., Haase N., Hailpern S.M., Ho M., Howard V., Kissela B., Kittner S., Lloyd-Jones D.,

McDermott M., Meigs J., Moy C., Nichol G., O'Donnell C., Roger V., Sorlie P., Steinberger J., Thom T., Wilson M., Hong Y. Heart disease and stroke statistics—2008 update. *Circulation* 117, e25-e146. (2008)

Ruiz-Torres M.P., Pérez-Rivero G., Rodríguez-Puyol M., Rodríguez-Puyol D., Díez-Marqués M.L. The leukocyte-endothelial cell interactions are modulated by extracellular matrix proteins. *Cell Physiol. Biochem.* 17, 221-232. (2006)

Solomon A., Wajngarten M., Alviano F., Anteby I., Elchalal U., Pe'er J., Levi-Schaffer F. Suppression of inflammatory and fibrotic responses in allergic inflammation by the amniotic membrane stromal matrix. *Clin. Exp. Allergy* 35, 941-948. (2005)

Thomas A.C., Campbell G.R., Campbell J.H. Advances in vascular tissue engineering. *Cardiovasc. Pathol.* 12, 271-276. (2003)

Timpl R. Macromolecular organization of basement membranes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 618-624. (1996)

Tsai S.H., Liu Y.W., Tang W.C., Zhou Z.W., Hwang C.Y., Hwang G.Y., Ou B.R., Hu C.P., Yang V.C., Chen J.K. Characterization of porcine arterial endothelial cells cultured on amniotic membrane, a potential matrix for vascular tissue engineering. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357, 984-990. (2007)

Tzima E., Angel del Pozo M., Shattil S.J., Chien S., Schwartz M.A. Activation of integrins in endothelial cells by fluid shear stress mediates Rho-dependent cytoskeletal alignment. *EMBO J.* 20, 4639-4647. (2001)

Tzima E., Irani-Tehrani M., Kiosses W.B., Dejana E., Schultz D.A., Engelhardt B., Cao G., DeLisser H., Schwartz M.A. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* 437, 426-431. (2005)

White C.R. and Frangos J.A. The shear stress of it all: the cell membrane and mechanochemical transduction. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 362, 1459-1467. (2007)



## 圖目錄

附圖一、多層羊膜人工血管建構模式

附圖二、生物反應器結構

附圖三、內皮細胞的鑑定

圖一、人工血管在不同強度流體切應力處理後內皮細胞的存留數量

圖二、人工血管內皮細胞延長切應力處理時間測試

圖三、人工血管內皮細胞的排列情形

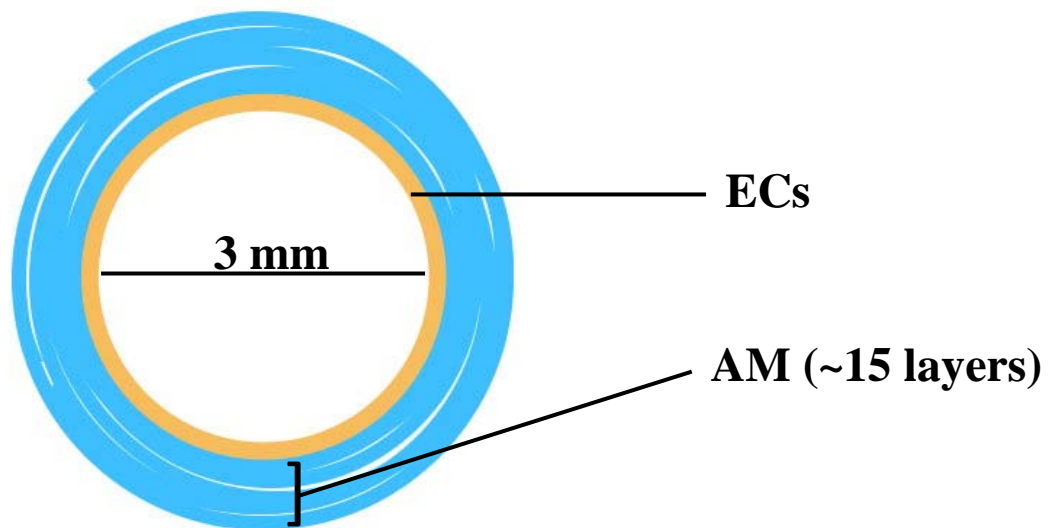
圖四、人工血管內皮細胞 cell-cell junction 免疫螢光染色

圖五、人工血管內皮細胞的 integrins  $\beta_1$  表現位置

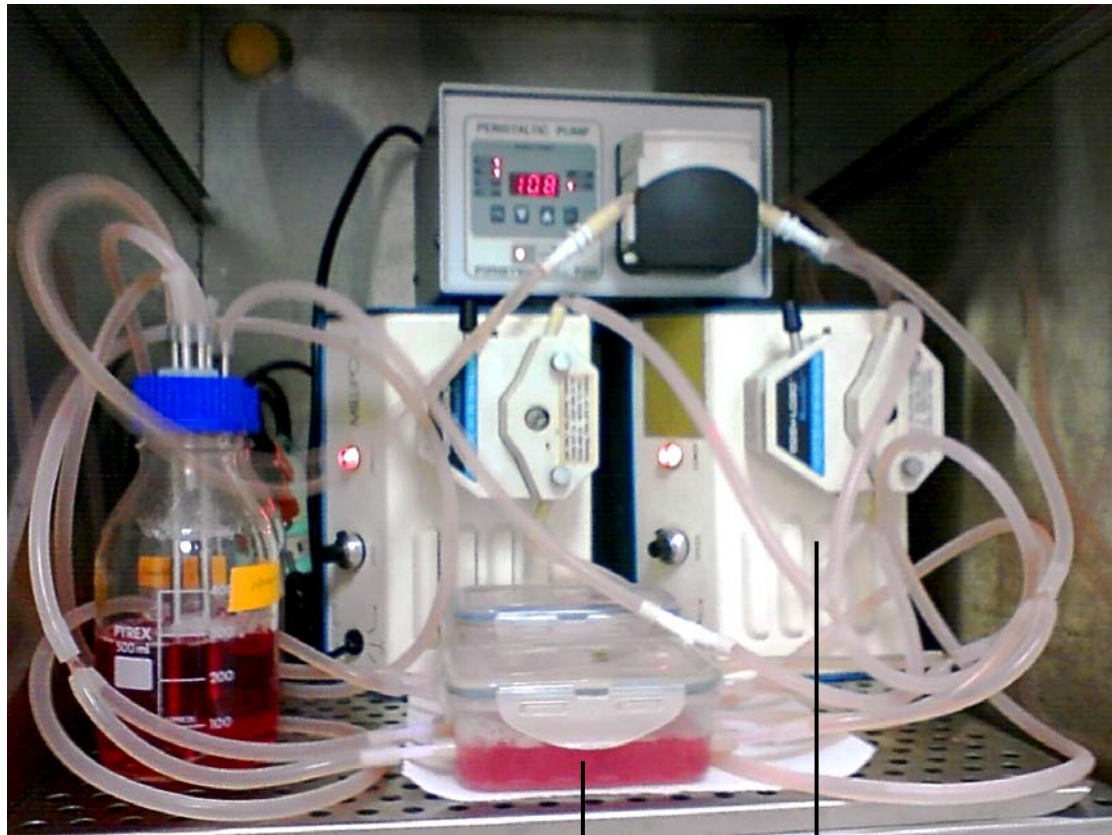
圖六、人工血管中內皮細胞的 integrin  $\alpha_v\beta_3$  表現位置

圖七、人工血管內皮細胞的 cell-cell junction 蛋白的表達量

圖八、人工血管內皮細胞 cell adhesion 蛋白表達量



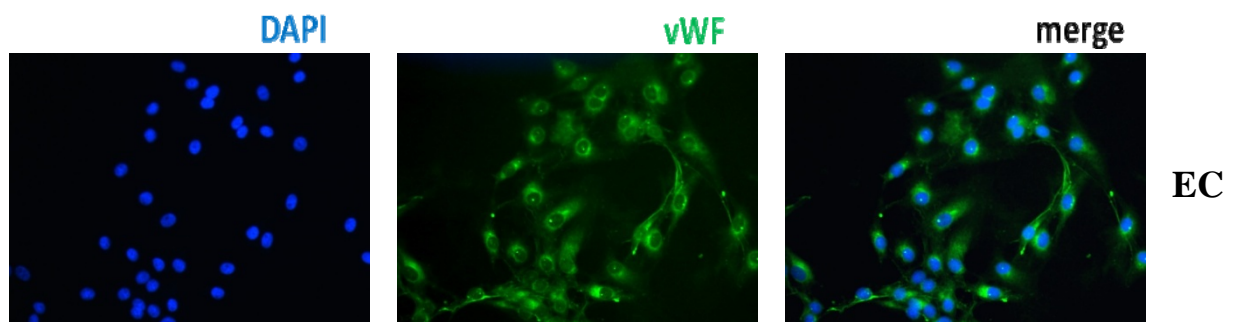
附圖一、 利用化學交聯法建構多層羊膜管，並將內皮細胞培養在羊膜管最內層，內管徑 3 mm、長度約 5 cm。



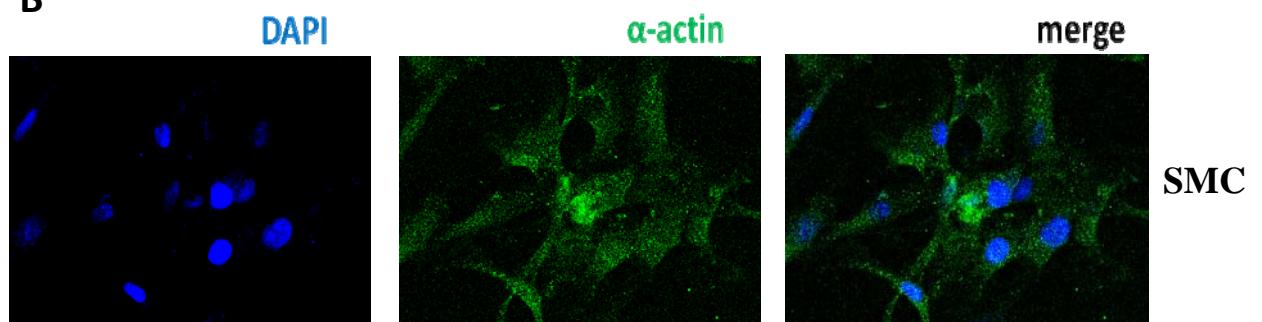
反應盒      pulsatile pump

附圖二、生物反應器實際構造，人工血管在反應盒中進行流體切應力處理，pulsatile pump 提供推動流體的力量，調整轉速可改變每秒液體流量。

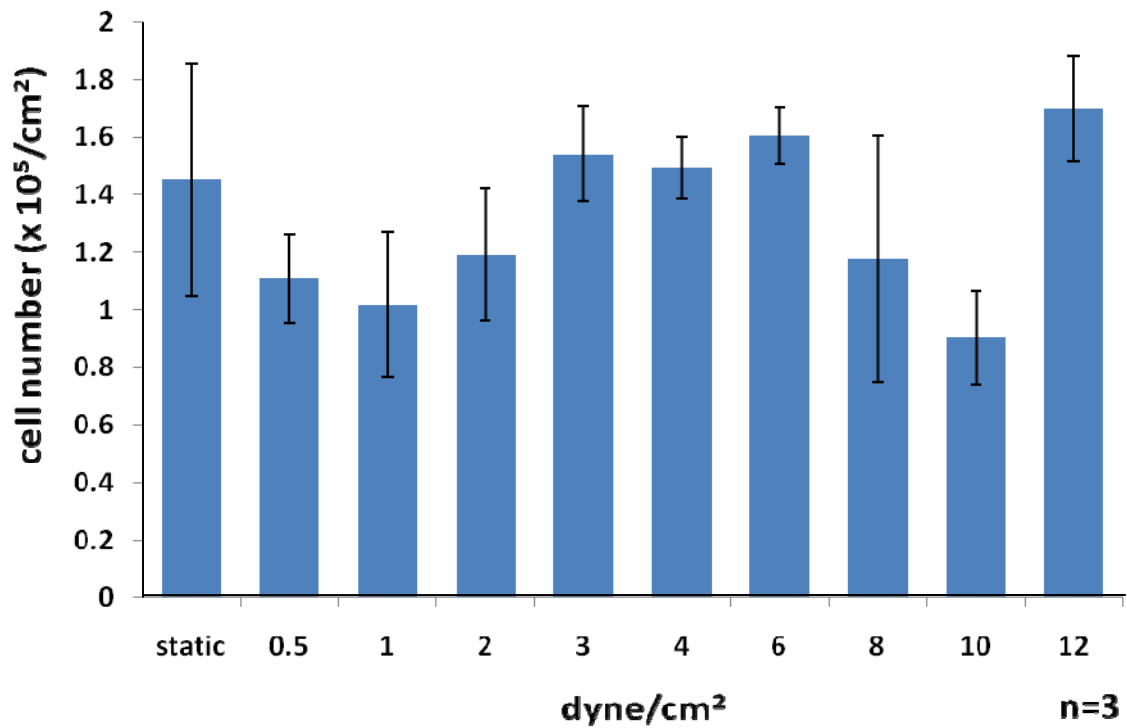
A



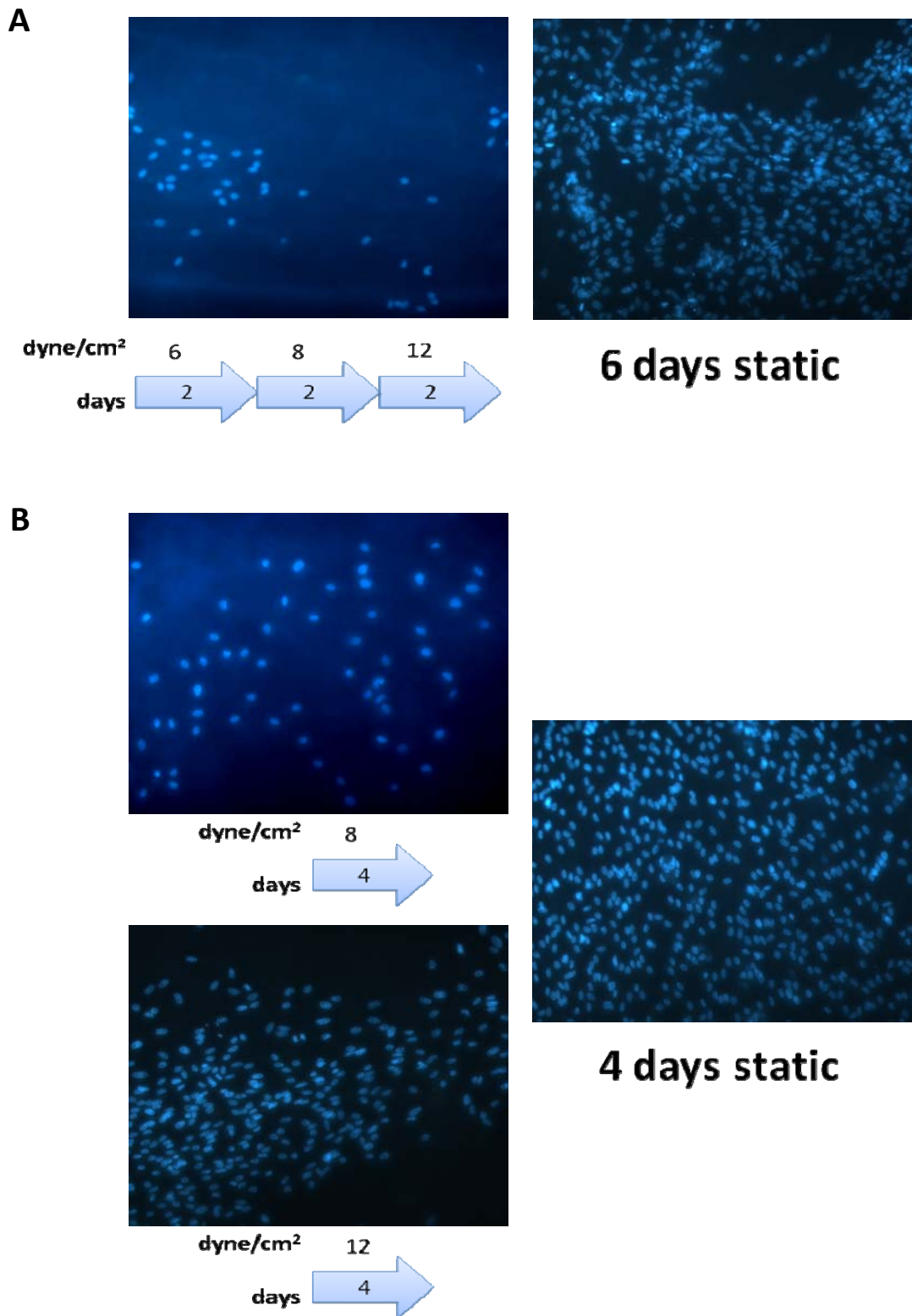
B



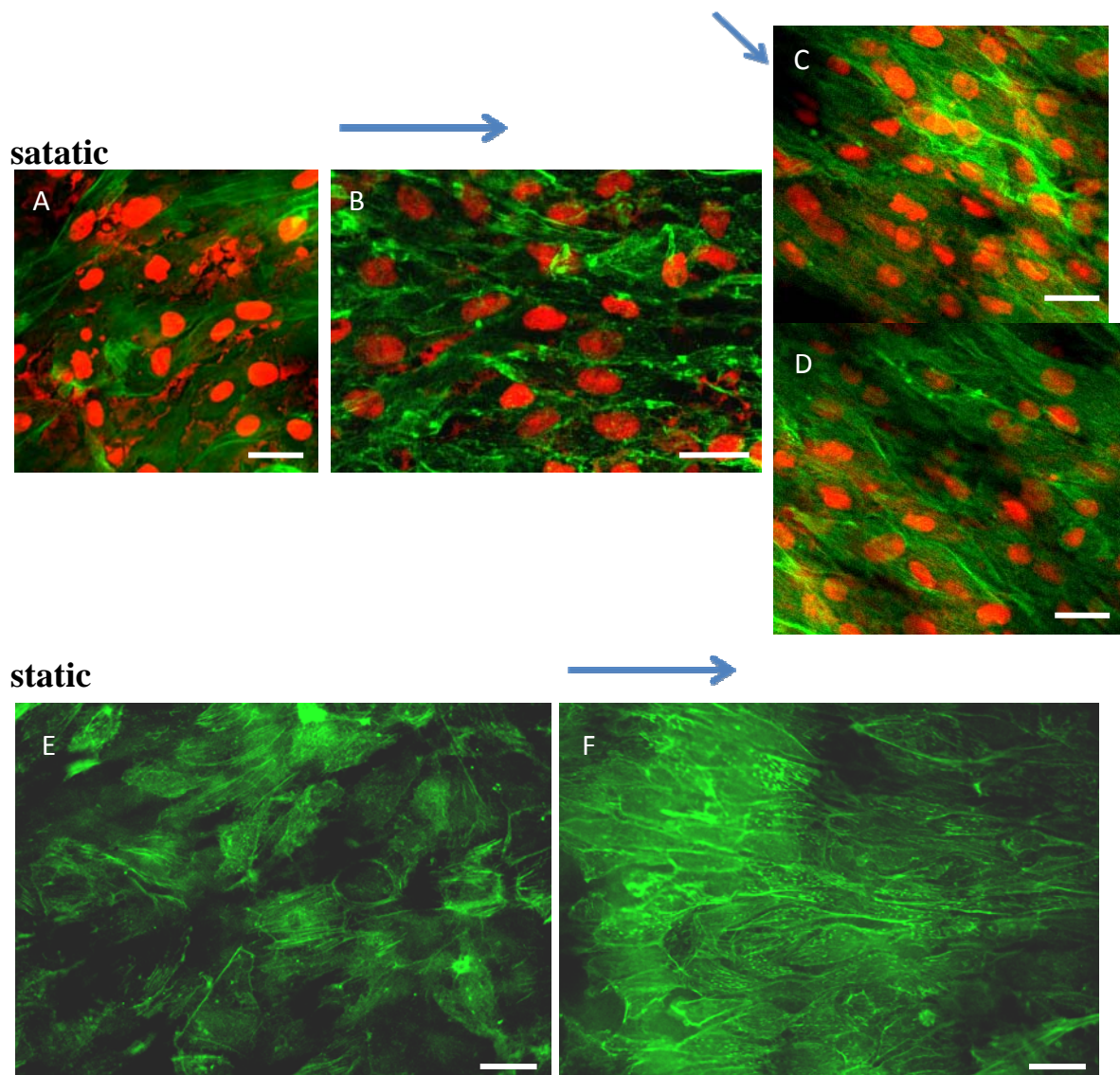
附圖三、內皮細胞的鑑定:內皮細胞從豬的大動脈分離下來後，進行內皮細胞 (EC) 的 cell marker, Von Willebrand factor (vWF) 免疫螢光染色，確認所培養的全是內皮細胞 (A) 。平滑肌細胞 (SMC) 為 positive control 以  $\alpha$ -actin 做為 marker (B) 。



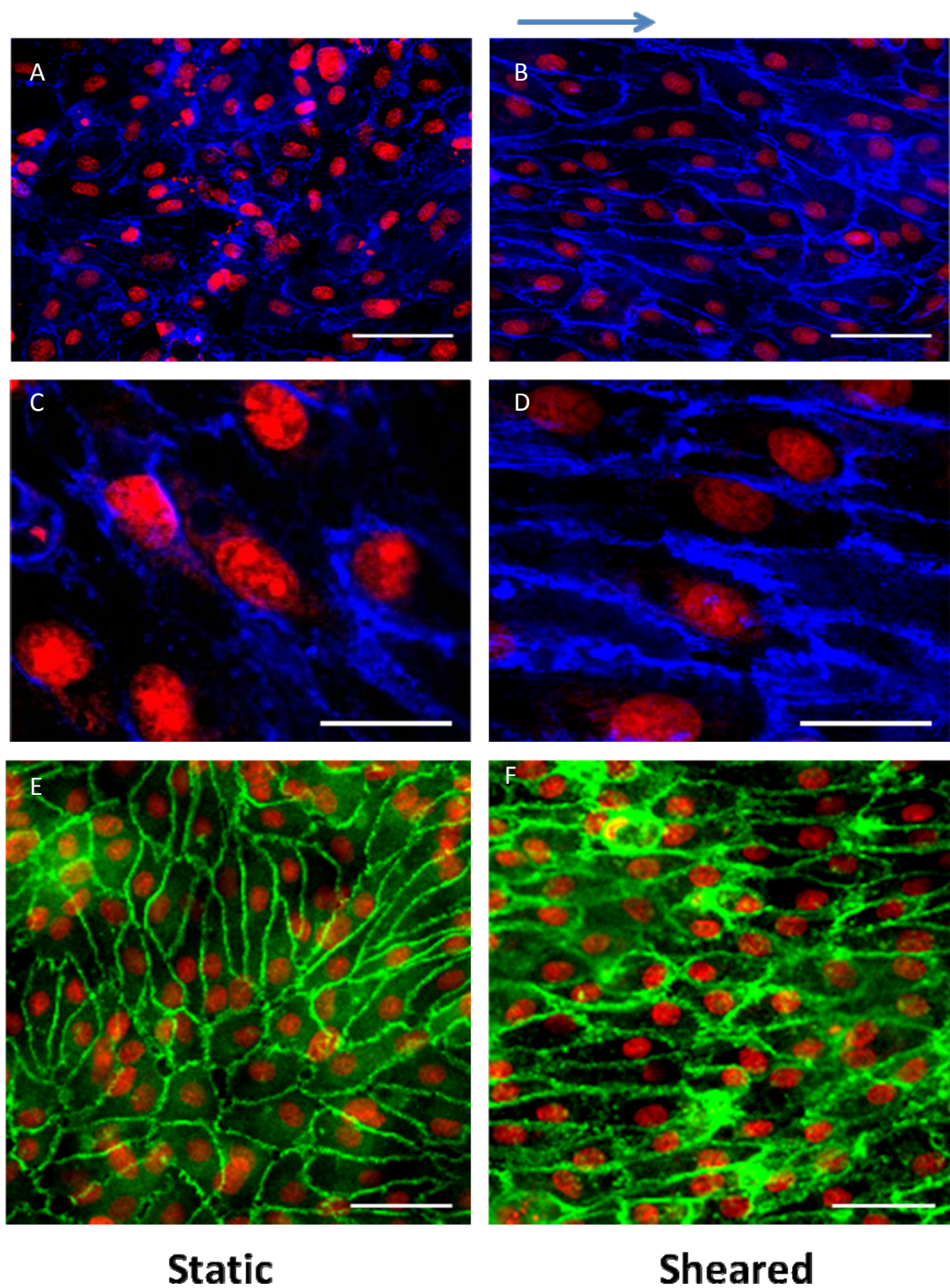
圖一、人工血管中內皮細胞在經過不同強度流體切應力處理 2 天後與 static control 以 Student's t-test 比較，並無顯著下降，並且能夠承受 12 dyne/cm<sup>2</sup> 的切應力。



圖二、人工血管流體切應力處理時間延長，人工血管經過 6 dyne/cm<sup>2</sup> 切應力處理 2 天後，提升到 8 dyne/cm<sup>2</sup> 處理 2 天再提升到 12 dyne/cm<sup>2</sup> 處理 2 天，共 6 天(A)，8 dyne/cm<sup>2</sup> 與 12 dyne/cm<sup>2</sup> 各別處理 4 天(B)。



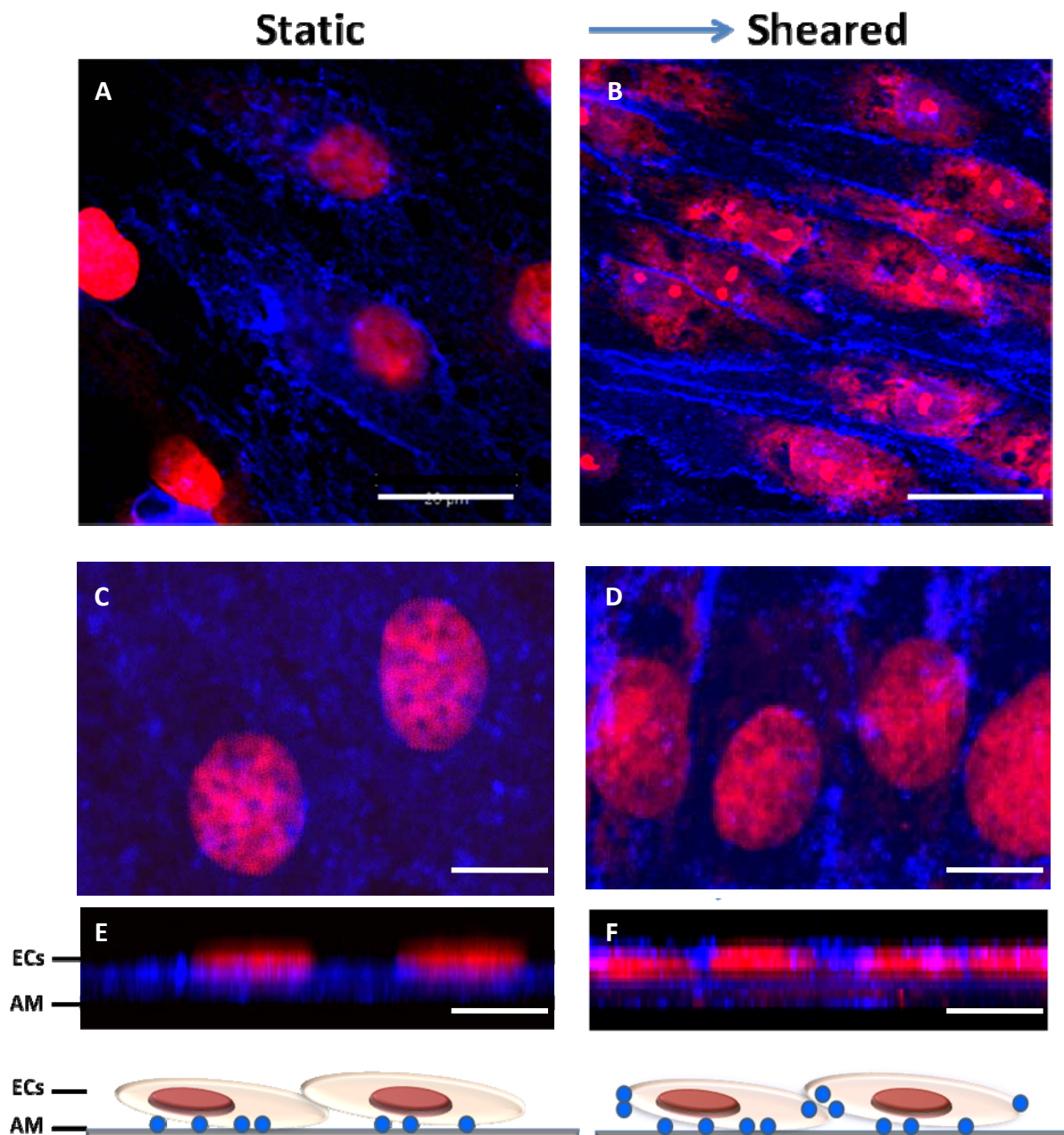
圖三、人工血管中內皮細胞細胞骨架 (F-actin, 綠色) 與細胞核 (紅色) 的排列情形，Static control (A、E) 的細胞核與細胞骨架的排列沒有方向性，而經過 2 天 (B、F) 與 4 天 (C、D)  $12 \text{ dyne/cm}^2$  流體切應力的處理後，細胞骨架與細胞排列方向順應流體流動方向，藍色箭頭代表流體方向。(bar =  $20 \mu\text{m}$ )



圖四、人工血管內皮細胞 cell-cell junction 免疫螢光染色，PECAM-1 (藍色)、VE-cadherin (綠色)、細胞核 (紅色)，箭頭所指為流體方



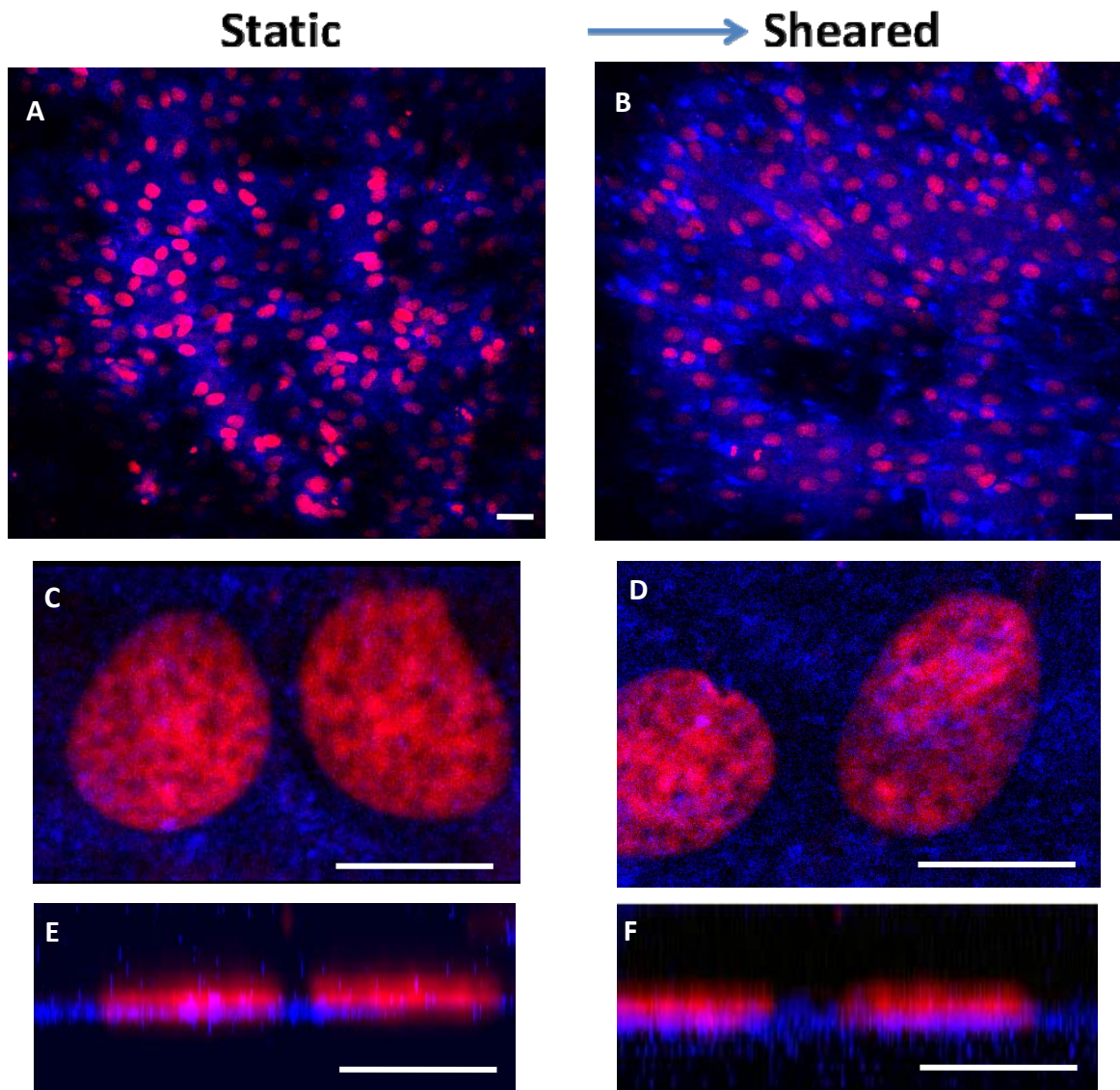
向。A、C、E：static control；B、D、F：shear。切應力處理後，PECAM-1 (藍色) 完整的分佈在 cell-cell junction (B、D)；VE-cadherin (綠色) 也順應流體方向，分佈在 cell-cell junction，內皮細胞排列整齊，並且細胞呈現梭形 (F)。(A、B、E、F，bar = 50  $\mu\text{m}$ ；C、D，bar = 20  $\mu\text{m}$ )



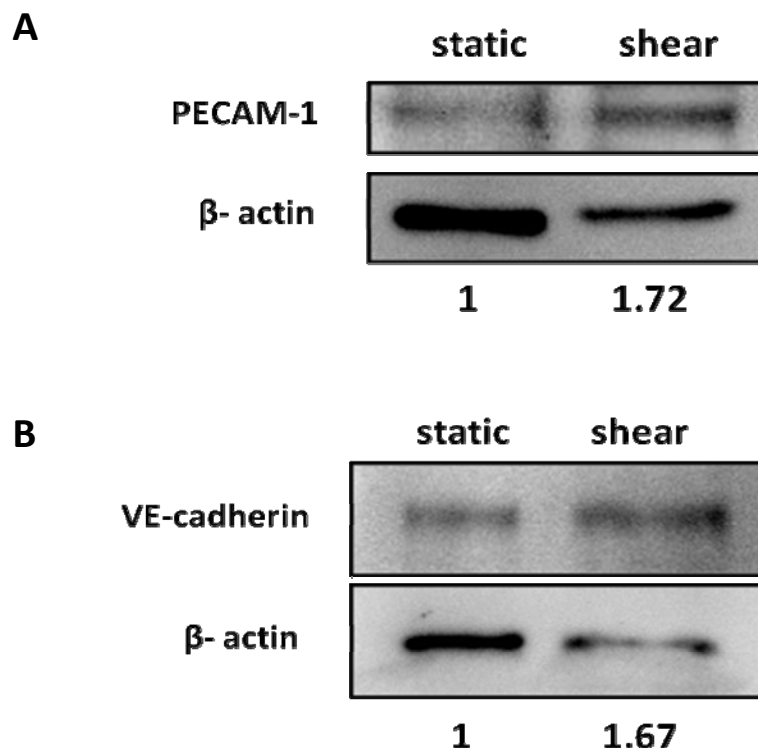
圖五、人工血管中內皮細胞的 integrin  $\beta_1$  表現位置。細胞未經切應力處理的 integrin  $\beta_1$  (藍色) 分佈在細胞底部與羊膜連接處 (A、C、E)，細胞經切應力處理後，integrin  $\beta_1$  分佈在 cell-cell junction 處且有增加趨勢 (B、D、F)。E、F 分別為 C、D 相對應的 Z 軸剖面圖，可以看到未經切應力處理的 integrin  $\beta_1$  分佈在細胞底部 (E)，細胞經切應力

處理後，integrin  $\beta_1$  分佈在 cell-cell junction 之間 (F) 。細胞核 (紅色)

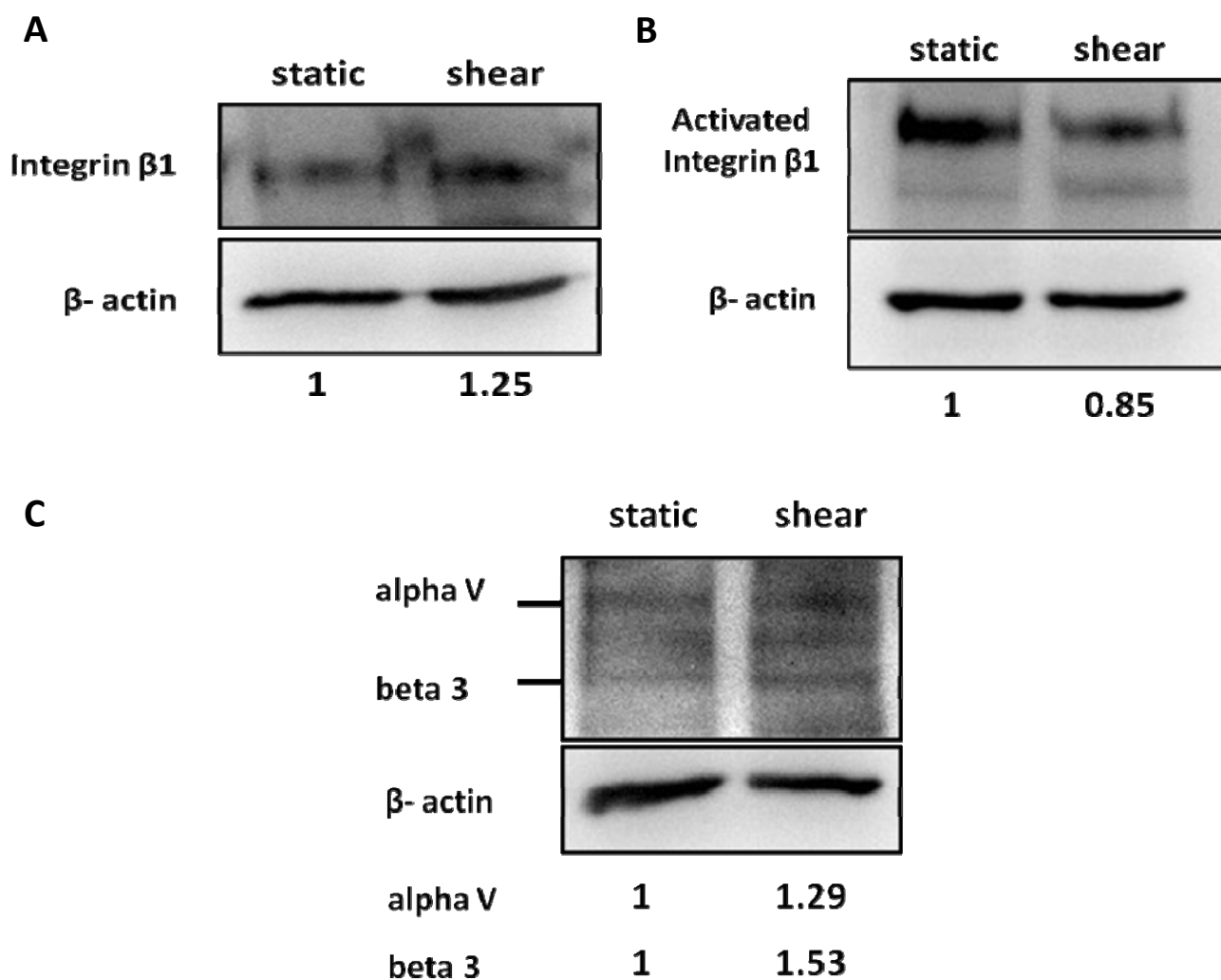
(A、B，bar = 20  $\mu\text{m}$ ；C、D、E、F，bar = 10  $\mu\text{m}$ )



圖六、人工血管中內皮細胞的 integrin  $\alpha_v\beta_3$  表現位置。內皮細胞的 integrin  $\alpha_v\beta_3$  (藍色) 表現位置分佈在細胞底部與羊膜連接處，integrin  $\alpha_v\beta_3$  的分佈沒有因為切應力的處理而改變 (A、C、E, static; B、D、F, shear)。E、F 分別為 C、D 相對應的 Z 軸剖面圖，可以看到 integrin  $\alpha_v\beta_3$  分佈皆在細胞底部 (E、F)。(A、B, bar = 20  $\mu\text{m}$ ; C、D、E、F, bar = 10  $\mu\text{m}$ )



圖七、內皮細胞的 cell junction 蛋白的表達量。經過三次重複平均顯示 PECAM-1 表達量提升到大約是 static control 的 1.72 倍 (A) ， VE-cadherin 的表達量提升到約是 1.67 倍 (B) 。



圖八、人工血管中內皮細胞 cell adhesion 蛋白表達量。經過三次重複平均顯示切應力處理後，integrin  $\beta_1$  總蛋白的表現量提升，約是 static control 的 1.25 倍 (A)，但是活化態的 integrin  $\beta_1$  降為 static control 的 0.85 倍 (B)。integrin  $\alpha_v/\beta_3$  總蛋白的表現量提升，integrin  $\alpha_v$  約達到 static control 的 1.29 倍，integrin  $\beta_3$  約達到 static control 的 1.53 倍 (C)。

## 一、基本資料

姓名：李柏翰

英文名：Lee Po-Han

住址：台南縣新化鎮信義路 316 號

電話：(06)5906219、0963207031

e-mail：g97231009@thu.edu.tw

p0517917@yahoo.com.tw

## 二、學歷

私立東海大學生命科學系學士

國立台南第一高級中學

台南縣新化國民中學

台南縣新化國民小學

## 三、系上助教經驗

生命科學系遺傳學實驗助教(碩一上)

生命科學系普通生物學數位平台教學助理(碩一上)

生命科學系細胞生物學數位平台教學助理(碩一上)

生命科學系動物組織學實驗助教(碩一下)

## 四、工作經歷

榮東計畫實驗助理(碩一、碩二)

國科會計畫實驗助理(碩二)