

純機械式非酵素型神經球單細胞分離 微流晶片

A Microfluidic Chip for Mechanical Enzyme-Free Dissociation of Neurospheres into Single Cells

林璟暉、李東慶、張浩禎、蕭怡馨、何誠堃、莊堵安、葉鵬鳳、邱英明、許佳賢
Ching-Hui Lin, Don-Ching Lee, Hao-Chen Chang, Yi-Hsing Hsiao, Cheng-Kun He, Duane S. Juang,
Chuan-Feng Yeh, Ing-Ming Chiu, Chia-Hsien Hsu

到目前為止，還未有一個有效的非酵素型分離方式可以自由神經幹細胞所形成之神經球中分離出大量的活單細胞。因此，本研究利用微流體技術設計一款具有微柱結構的純機械力式非酵素型神經球單細胞分離晶片，我們證明此微流晶片可以將來自老鼠的神經幹細胞 KT98 及 DC115 所形成之神經球（培養代數介於 3–8 代、神經球直徑介於 40–250 μm ），以 90% 及 95% 的高效率分離出大量的單細胞，且經此晶片所分離之單細胞具有 80–85% 的高存活率。此外，經此晶片所分離出的活單細胞依然保有神經幹細胞之特性，可於神經球培養液中再次培養並形成神經球，並且這些神經幹細胞也保有其幹細胞的分化能力，可在誘導分化的培養條件下成功分化成三種中樞神經系統的主要神經細胞，包含神經元細胞 (neurons)、星形膠質細胞 (astrocytes) 及寡突膠質細胞 (oligodendrocytes)，故此晶片適合應用於日常性的神經球培養相關實驗上。且因本微流晶片不需酵素參與即可從神經球中分離出大量之活單細胞，故可以降低外源性物質污染樣品及細胞的風險，很適合使用在需要將神經球分離成單細胞的應用上，並可做為一個廣用的細胞團塊單細胞分離方法。

In this study, we aim to develop new platforms for neurosphere assay and single cell manipulation for neural stem cell research. Neurosphere assay is a common method for identification of neural stem/progenitor cells, but obtaining single cells from dissociated neurospheres is difficult using non-enzymatic methods. We developed a microfluidic-chip-based approach that utilizes flow and microstructures to dissociate neurospheres. Results show that this microfluidic-chip-based neurosphere dissociation method can generate high yields of single cells from dissociated neurospheres of mouse KT98 and DC115 cell models for 90% and 95%, respectively. The microfluidic-chip-dissociated cells had high viabilities (80–85%) and the ability to re-grow into neurospheres, demonstrating the applicability of this device to neurosphere-assay applications. In addition, the dissociated cells retained their normal differentiation potentials, as shown by their capabilities to differentiate into three neural lineages (neurons, astroglia, and oligodendrocytes) when cultured in differentiation culture conditions.

一、前言

在我國逐漸步入高齡化社會的情況下，因老化而引起的神經相關疾病如帕金森氏症 (Parkinson's disease) 及阿茲海默氏症 (Alzheimer's disease) 患者人數也逐日增加，因此如何治療神經相關疾病的需求也日趨重要。幹細胞治療為近年來新興發展的醫療技術，但如何獲得大量具有高純度、高活性的幹細胞則是研究人員努力的方向。而神經球是由神經幹細胞／祖細胞 (neural stem/progenitor cells, NSPCs)，經由懸浮培養所形成的細胞團⁽¹⁾。當以神經球培養液培養神經幹細胞／祖細胞時，可使其增殖並形成一具有異質性的細胞群，其中包含神經幹細胞／祖細胞及神經前驅細胞 (neural precursor cells)^(2, 3)。“神經球試驗” (neurosphere assay, NSA) 為一種將神經幹細胞／祖細胞培養成神經球的方法，由於其具有操作容易且穩定的特性，已被廣泛地應用於神經幹細胞鑑定以及神經幹細胞自我更新及分化能力之研究，同時也被用來作為治療中樞神經系統 (central nervous system, CNS) 損傷及疾病的細胞模型⁽⁴⁾。這些研究對於開發新的方式來治療中樞神經系統損傷、帕金森氏症及阿茲海默氏症是相當重要的⁽⁵⁾。除了神經幹細胞外，腦腫瘤細胞也可在神經球培養系統培養下形成球體，例如多形性神經膠質母細胞瘤 (glioblastoma multiforme, GBM) 及神經管胚細胞瘤 (medulloblastoma)⁽⁶⁾。腦腫瘤細胞具有的自我更新及分化能力，同時也能表達神經細胞的生物標誌 (biomarkers)，其特徵與神經幹細胞極為相似，表示在腦腫瘤細胞中可能存在著一群類神經幹細胞的多能性細胞，而研究這些多能性神經細胞 (nestin+) 則可以進一步了解腦腫瘤的生成原因⁽⁷⁾。在這些相關研究中，必須先將這些細胞培養成神經球，一段時間後又需將神經球分離成單一神經細胞，接著再重新培養生長成神經球，此過程的目的是為繼代培養神經幹細胞 (增加細胞的數量或保持神經幹細胞的純度)⁽⁸⁾ 或是將神經球中的神經幹細胞取出來做後續分析⁽⁹⁾。為了分離神經球中之細胞，通常會在分離前先加入酵素作用一段時間，再將酵素作用後之神經球以機械

力方式 (通常為 pipetting) 來分離，進而獲得單一細胞，此方法可獲得大量的單細胞及具有再現性。然而，目前大多數所使用的酵素來源皆為動物，而這將會提高對於臨床應用安全性之顧慮。重組合成酵素 (recombinant enzymes) 的發展有助於緩解這些顧慮，但這些酵素的作用機制依然是透過降解細胞膜表面蛋白質的方式來達成，還是具有傷害細胞膜表面重要蛋白質的可能性⁽¹⁰⁾。以應用性來說，以酵素或化學藥劑來將細胞團分離成單細胞都非最理想之選擇，而 trituration 分離法 (利用和緩來回吸放 pipette 的方式) 是一種利用純機械力的方式來將生物組織或細胞團內之細胞分離的普遍做法。然而，若在不使用酵素而單獨使用 trituration 分離法來分散神經球內之細胞的情況下，會導致超過 50% 以上的細胞死亡⁽¹¹⁾。在先前的研究中，研究人員利用不同的機械式分離方法，來解決使用酵素所帶來的缺點，其中包括使用手術刀以人工方式將球體切成較小細胞團⁽¹²⁾，或使用微型剪刀⁽¹³⁾、組織切片機^(14, 15) 及利用微製造技術所開發的新裝置—biogrid 來分離神經球內之細胞⁽¹⁶⁾。雖然手術刀、微型剪刀和組織切片機的使用方式簡單直接，另 biogrid 裝置具有能在封閉系統中處理大量細胞的優點。但這些機械式分離方法卻只能將神經球初步分離成小的細胞團塊，而非後續應用如細胞分析及流式細胞儀篩選^(17, 18)、幹細胞分化⁽¹⁹⁻²¹⁾ 及臨床應用上之細胞增殖所需之單細胞^(4, 5, 22)。因此我們利用微流體技術微小化之特色，開發出一款純機械式非酵素型微流細胞團分離晶片 (microfluidic cell dissociation chip, μ -CDC)，用來將神經球內之細胞以純機械力方式分離成單細胞。我們的實驗結果證實， μ -CDC 晶片可以成功地將神經球內之細胞分離並獲得大量的單細胞，而被分離之細胞具有良好的細胞存活率且保有神經幹細胞的特徵可重新長成神經球，並可在誘導分化條件下成功分化成中樞神經系統中之主要神經細胞譜系，顯示此種分離方式在操作過程中並不會對神經幹細胞產生顯著的不利影響。

二、實驗所使用之材料與方法

1. 微流晶片設計與製作

此微流體晶片是由聚二甲基矽氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 經由軟蝕刻技術 (soft lithography) 翻模製作而成⁽²³⁾。簡單來說，用於翻模製作 PDMS 微流道結構之模板是將負光阻 (SU-8 100, MicroChem, Newton, MA, USA) 透過光學蝕刻的方式印製在 4 吋矽晶圓基板上製作而成，並以掃描式雷射表面輪廓儀 (VK-X 100, Keyence, Japan) 進行高度量測，測得此 SU-8 結構高度為 $167 \pm 2 \mu\text{m}$ 。模板完成後，將 PDMS Sylgard 184 (Dow Corning, USA) 混和均勻後倒入模板，並放置於 65°C 烘箱 24 小時進行固化，接著將固化後之 PDMS 微流道由模板上取下，並以內徑 1.00 mm 之打孔器 Harris Uni-Core, Ted Pella, USA) 製作出此晶片流道之流體入口與流體出口，將打孔完成之 PDMS 晶片與載玻片經由氧電漿機處理改變其表層化學特性後貼合以形成完整之封閉式流道，最後把晶片放置於 70°C 加熱盤上加熱 2 小時，用以加強 PDMS 晶片與載玻片貼合效果。

2. 神經幹細胞及所形成之神經球培養

我們選用 DC115 及 KT98 細胞株作為神經幹細胞模型進行研究，DC115 細胞分離自 FVB 品系之老鼠的腦側壁，而 KT98 細胞則是由 F1B-TAg 之基因轉殖鼠的腦部細胞分離純化而得⁽²⁴⁾。我們將 1×10^5 個 DC115 神經幹細胞培養於 100 mm 皮式培養皿 (Petri dish) 中，加入 10 mL 的神經球培養液並放置於飽和溼度之 5% 二氧化碳細胞培養箱中，以 37°C 培養 7 天。本研究所使用之神經球細胞培養液成分包含 DMEM/F12 (Gibco, USA) 以及 1% N-2 (Gibco, USA)、2% B27 (Gibco, USA)、20 ng/mL 的 hFGF2 (PeproTech, USA)、20 ng/mL 的 hEGF (PeproTech, USA) 及 $2 \mu\text{g/mL}$ heparin 等添加物。而 KT98 細胞平時培養於含有 10 mL 細胞培養液之 100 mm 組織培養皿中，此培養液成分包含 DMEM/F12 基礎培養液與 10% 胎牛血清 (FBS, Hyclone Thermo, USA)，並放置於飽和溼度之 5% 二氧化碳細胞培養箱中以 37°C 培養。當細胞於

培養皿中生長至約 70–80% 滿時，使用 0.25% 的 trypsin-EDTA (Biowest, France) 以標準細胞繼代程序進行繼代培養。若要將 KT98 細胞進行神經球培養時，取出 1×10^5 個細胞並加入 10 mL 與上述相同但不含 N-2 添加物之神經球培養液後，培養於 100 mm 皮式培養皿中，並放置於相同之二氧化碳細胞培養箱。

3. 神經球之細胞分離方式

將已培養 7 天後之 DC115 和 KT98 神經球細胞收集後，通過孔徑為 $40 \mu\text{m}$ 的細胞濾網 (BD Falcon, USA) 後，除去單細胞及直徑小於 $40 \mu\text{m}$ 之神經球。並將過濾後的神經球以 300 g 的速度離心 3 分鐘後，加入 1 mL 的磷酸緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS) 將神經球重新懸浮於 PBS 溶液中，接著把此神經球懸浮液抽取至 1 mL 的塑膠針筒中 (BD Falcon, USA)，用來將懸浮液導入微流晶片中以進行神經球之細胞分離。 μ -CDC 晶片於實驗前先導入含有 5% 牛血清白蛋白之 PBS 溶液後，於 25°C 靜置 2 小時，將含有神經球懸浮液之塑膠針筒接上 21 號平口針後 (Ever Sharp Technology, Inc., Taiwan)，把內徑 0.51 mm 外徑 0.82 mm 的鐵氟龍管 (Ever Sharp Technology, Inc., Taiwan) 裁成適當長度，並使其一端連接至塑膠針筒之平口針頭，而另一端則連接至微流晶片之流道入口，再使用相同長度之鐵氟龍管連接晶片流道出口與 15 mL 離心管收集被 μ -CDC 晶片所分離之神經球細胞。

我們使用針筒幫浦 (KDS230, KD Scientific, USA) 以流速 $500 \mu\text{L/min}$ 導入 $800 \mu\text{L}$ 之 DC115 神經球懸浮液至 μ -CDC 晶片中，再將 10 mL 之 PBS 溶液導入並提升流速至 10 mL/min 用來分離神經球細胞，而 KT98 神經球懸浮液則以相同流速導入 μ -CDC 晶片中，利用 10 mL 再分別使用流速 3、5、10 及 15 mL/min 來推動 10 mL 之 PBS 溶液來分離神經球細胞。在實驗操作過程中，必須將架好塑膠針筒的針筒幫浦垂直放置以避免細胞沉積在針筒一側。

在酵素化學分離之實驗對照組中，我們使用市售之細胞分離酵素試劑 HyQTase (Hyclone

Thermo, USA) 作用於神經球細胞膜上之蛋白質並將之分離成單細胞⁽²⁵⁾。在操作過程中，我們將神經球懸浮液吸入塑膠針筒中，且此塑膠針筒與相同長度之鐵氟龍管連接，並以相同的流速 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ 直接推出 800 μL 之神經球懸浮液並收集於 15 mL 離心管中。收集完成之神經球懸浮液以 300 g 離心 3 分鐘，而後移除其上清液並加入 500 μL 之 HyQTase 酵素溶液並放置於 37 °C 中作用 7.5 分鐘。HyQTase 酵素作用完成後加入等量之 PBS 溶液以中和酵素作用，並配合 pipette 以機械力方式來回和緩吸放 30 次使得神經球分離成單細胞。

在傳統純機械力分離之對照組中，我們使用和緩來回吸放 pipette 的方式來達成神經球之細胞分離，利用滅菌之 1 mL pipette tips 和緩來回吸放 70 次以分離神經球內之細胞。

4. 分離細胞中之單細胞獲取效率計算

在三種分離方法完成後，將各方法所分離的細胞再次離心並重新懸浮於 1 mL 的 PBS 溶液中，取出 30 μL 的細胞懸浮液，並放置於載玻片上並蓋上蓋玻片。接下來，將載玻片放置於倒立顯微鏡上 (Nikon Ti-E inverted fluorescence microscope, Japan)，隨機選取 20 個位置以 10 倍物鏡進行拍攝，所拍攝的照片則利用美國國家衛生研究院開發的免費影像分析軟體 (ImageJ, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) 進行單細胞比例之計算。首先，先量測單一細胞平均面積和數目，接著量測大於兩個細胞的細胞團面積並加總其總和，再將細胞團之總面積除以單一細胞平均面積即可推估照片中之細胞團內細胞數。並以此計算方式分析所有拍攝之照片 (每組實驗 20 張)，在分離後之細胞懸浮液中，單細胞的獲取效率則以下列公式計算 $a = b/c$ ，其中 b 為單細胞數量而 c 則為全部細胞之總數量。

5. 被分離細胞之回收率及細胞存活率測定

將被 $\mu\text{-CDC}$ 晶片分離的細胞重新懸浮於 1 mL 的 PBS 溶液中，取出 10 μL 的細胞懸浮液並注入細胞計數器 (hemocytometer) 內以人工方式計算細胞數量。細胞回收率之計算為 $d = e/f$ ，其中 e 為經 $\mu\text{-CDC}$ 晶片所分離之細胞數量而 f 則為經

HyQTase 作用後分離所獲得的細胞數量；細胞存活率也以相同的方法進行測定，但在注入細胞計數器前先與等體積的 trypan blue 溶液均勻混和後再注入細胞計數器，trypan blue 溶液是作為細胞是否存活的判讀依據。細胞存活率之計算為 $g = h/i$ ，其中 e 為活細胞數目而 f 為總體細胞數目。

6. 被分離細胞之再球化分析

將被 $\mu\text{-CDC}$ 晶片及 HyQTase 作用而分離之單細胞以前述之神經球培養條件再次培養而形成神經球，兩種分離方法的處理組皆在 28 天內 (每 7 天為一個培養期間) 經過連續四次的分離及再球化培養。取經過兩種不同分離方法所分離後之細胞，製備成低密度 (200 cells/mL) 的細胞懸浮液並取出其中 5 mL 的細胞懸浮液培養在 60 mm 的皮式培養皿中，並放置於與前述相同之二氧化碳細胞培養箱中以 37 °C 培養 7 天。將培養完後之培養皿放置於顯微鏡下直接目視觀察並計算其數目，以評估其再球化之能力。在神經球形成率之估算中，單細胞所形成之神經球直徑需大於 100 μm 才被認為是一顆成熟之神經球並列入計數。本實驗需使用低密度培養單細胞，因低細胞密度可避免在神經球在形成過程中與鄰近神經球碰撞而聚集融合，導致判斷錯誤的情況發生⁽²⁶⁾。

7. 被分離幹細胞之神經細胞分化

將被 $\mu\text{-CDC}$ 晶片所分離之 KT98 單細胞培養於一個經聚離胺酸 poly-D-lysine 所修飾的 8 孔載玻片上 (Nunc Lab-Tek II Chamber Slide System, Thermo, Thomas Scientific, USA)，加入含有 2% FBS 之 DMEM/F12 培養液後，培養於與前述相同之二氧化碳細胞培養箱中 24 小時⁽²⁷⁾。隨後，將不同孔洞中之神經細胞培養液置換成不同神經細胞譜系之專屬分化培養液，使其分化成三種中樞神經系統之主要細胞。在神經元的分化中，使用 DMEM/F12 培養液並額外添加 2% FBS、10 ng/mL 的血小板衍生生長因子 (PDGF-BB, R&D systems, USA)、50 ng/mL 大腦衍生神經滋養因子 (BDNF, R&D systems) 及 50 ng/mL 的神經膠質細胞衍生神經滋養因子 (GDNF, R&D systems)；在星狀膠質細胞的

分化中，使用 DMEM/F12 培養液並額外添加 2% FBS 及睫狀神經滋養因子 (CNTF, R&D systems)；最後，在寡突膠質細胞的分化中，先使用 DMEM/F12 培養液並額外添加 2% FBS 及 50 ng/mL CNTF 培養 24 小時後，再加入 10 ng/mL 三碘甲腺原氨酸 (T3, Sigma, USA) 進行培養。於培養 7 天後進行免疫熒光染色，以驗證幹細胞的神經分化能力，三種譜系的分化細胞分別使用 MAP2 (MAB378, Millipore, USA)，GFAP (MAB3402, Millipore) 及 Galc (MAB342, Millipore) 抗體進行免疫染色並放置於 4 °C 冰箱中至隔天，接著將細胞與帶有 rhodamine 的二抗於室溫中進行螢光染色 1 小時，最後所有細胞都使用 Hoechst 33258 (Sigma, USA) 染劑作為細胞核判斷依據。

8. 細胞影像擷取

μ -CDC 晶片的神經球分離過程及分離結果的細胞影像擷取是使用倒立式螢光顯微鏡 (Nikon Ti-E inverted fluorescence microscope, Japan) 與其附加一個感光耦合元件 (charge-coupled device) (RT3, SPOT™ Imaging Solutions, USA) 及 SPOT 控制軟體 (version 4.7, SPOT™ Imaging Solutions)。而神經細胞分化的結果的影像擷取是使用 Leica 共軛焦顯微鏡 (Leica TCS SP5 II, Germany) 與 Leica LAS AF (Leica Application Suite Advanced Fluorescence) 控制軟體。

9. 統計分析

所有實驗皆進行三重複，而數據的表示方式皆為平均值 (Means) \pm 標準偏差 (Standard deviation, SD)。在各處理組間的統計分析方法則是選用單因子變異數分析 (One-way ANOVA) 運算。各處理組間之顯著差異表示方式為 * $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ，另在表 1 中， $p < 0.001$ 的顯著差異以不同字母表示之。

三、實驗結果

1. 晶片之設計與操作

如圖 1 所示， μ -CDC 晶片是由一微流道內含有 142×10 (1420 個) 微柱陣列所組成，每個微柱

的尺寸為 $240 \times 50 \mu\text{m}$ (長 \times 寬)，而橫軸方向之相鄰兩微柱間距為 $20 \mu\text{m}$ ，縱軸方向為 $100 \mu\text{m}$ 。且因為神經球的體積較大，我們將流道高度設計為約 $167 \mu\text{m}$ ，此項設計可避免神經球堵塞於晶片流道中。相鄰微柱間的微小間距能促使神經球內之細胞被分離成單細胞和小細胞團，而為增加神經球的分離效率，我們設計讓每顆細胞都需通過數排的微柱陣列後才能流出晶片，此過程可使細胞團有充分的機會與微柱產生作用，進而提升單細胞獲取率。 μ -CDC 晶片的操作方式十分容易如圖 2 所示，先將神經球懸浮液導入晶片流道內，然後利用提高流速的方式加壓液體並將神經球擠壓通過微柱陣列。

2. μ -CDC 晶片之 DC115 和 KT98 神經球分離效率

我們選用 DC115 與 KT98 神經幹細胞作為 μ -CDC 晶片之神經球分離效率測試的模式細胞。在經過 7 天培養後，DC115 和 KT98 細胞可長成直徑超過 $100 \mu\text{m}$ 神經球 (圖 3(a)、(b))，我們利用這些神經球進行三種不同的細胞分離法測試：(1) 利用和緩來回吸放 pipette 的方式來達成將 pipette tips 內之神經球懸浮液做純機械式的細胞分離 (trituration)，(2) 利用 HyQTase 做酵素分離，以及 (3) 利用 μ -CDC 晶片做純機械式分離。結果顯示利用 trituration 方式所分離的 KT98 神經球其效率不佳，不但會留下大量未完整分離的細胞團 (圖 3G) 且單細胞的分離率僅有 32.51%，另一方面，利用 HyQTase 酵素或 μ -CDC 晶片皆能高效率的將 DC115 和 KT98 神經球分離成單細胞 (圖 3(c)–(f))。此結果顯示 μ -CDC 晶片的神經球單細胞分離效率跟目前常用的酵素分離法一樣高，但與傳統常用的純機械式 trituration 分離法相比高出許多 (圖 3(h))。另外，經過 μ -CDC 晶片處理完後剩下的細胞團都非常小，每個細胞團僅含有 2–5 顆細胞的大小 (圖 3(c)、(d))，比 trituration 分離法所產生的細胞團要小上許多 (圖 3G)。而為了進一步了解所使用的加壓流速對 μ -CDC 晶片於單細胞分離效率的影響，我們選用四種不同的流速 (3、5、10 及 15 mL/min) 來分離 KT98 神經球。結果顯示當流速從 3 mL/min 增加到 10 mL/min 時，神經球單細胞分離效率從 79.17% 顯著的提升到 90.63% (圖

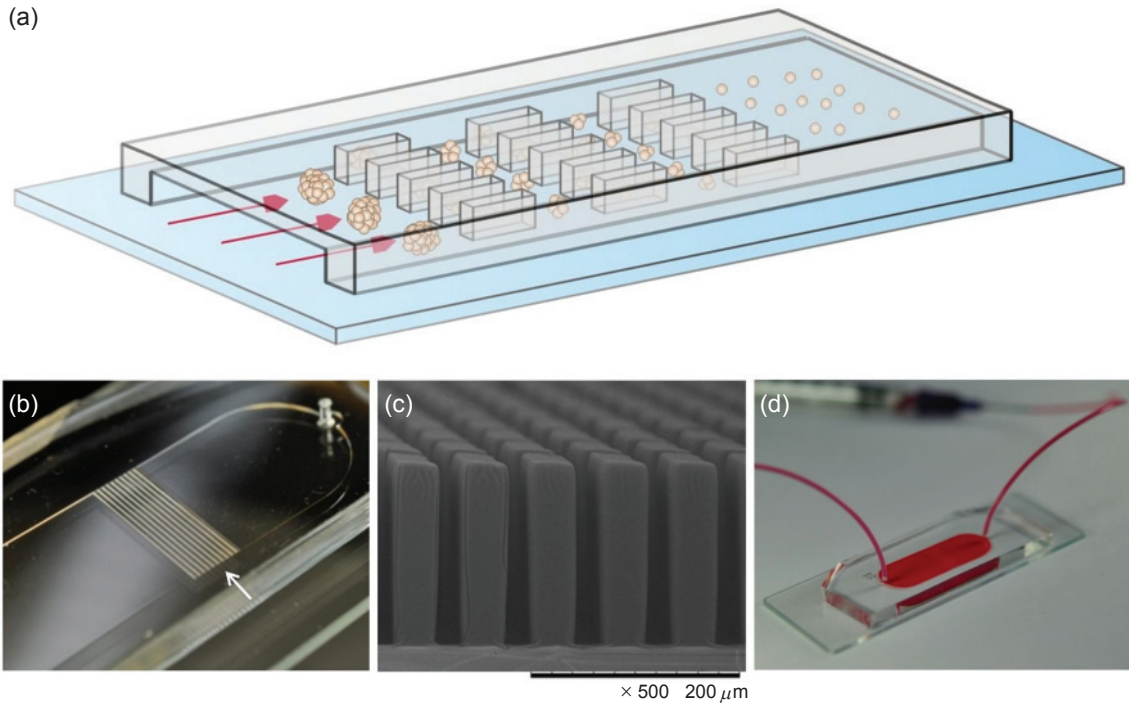


圖 1. 微流細胞團分離晶片 (microfluidic cell dissociation chip, μ -CDC) 示意圖。(a) μ -CDC 晶片示意圖及其細胞團單細胞分離原理。(b) 以 PDMS 軟微影製程技術所製作之 μ -CDC 晶片外觀。(c) μ -CDC 晶片內細胞團分離微柱之掃描式電子顯微鏡構造圖。每個微柱尺寸為 $240 \times 50 \times 167 \mu\text{m}$ ；而相鄰兩微柱間間隙為 $20 \mu\text{m}$ 。(d) μ -CDC 晶片含有一個流體入口及一個流體出口分別位於其流道的最前端及最後端，將神經球注入流道並通過微柱結構 (如圖 1(b) 箭頭所示) 後可獲得被分離之單細胞。

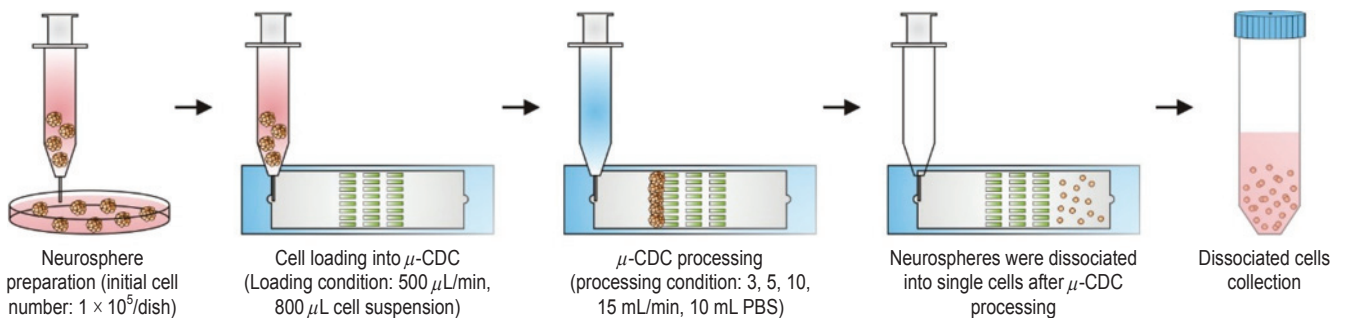


圖 2. μ -CDC 晶片用於神經球單細胞分離之操作流程示意圖。

3H)，但進一步提高流速到 $15\text{mL}/\text{min}$ 時分離效率則沒有持續增加。

3. μ -CDC 晶片分離之 DC115 和 KT98 細胞存活率

先前研究指出，神經球利用純機械式 trituration 分離會導致超過 50% 的細胞死亡，但使用酵素分離的細胞存活率可達約 90%。在本實驗

中，我們測試了上述三種細胞分離法對細胞存活率的影響 (表 1)。KT98 神經球利用 μ -CDC 晶片分離後的細胞存活率介於 78% 至 83% 之間，與使用 HyQTase 酵素分離結果相似，而使用 trituration 分離後僅有約 53% 的細胞存活。另 DC115 神經球利用 μ -CDC 晶片分離後的細胞存活率約為 84%，而使用 HyQTase 酵素分離的細胞存活率為 94.22%。

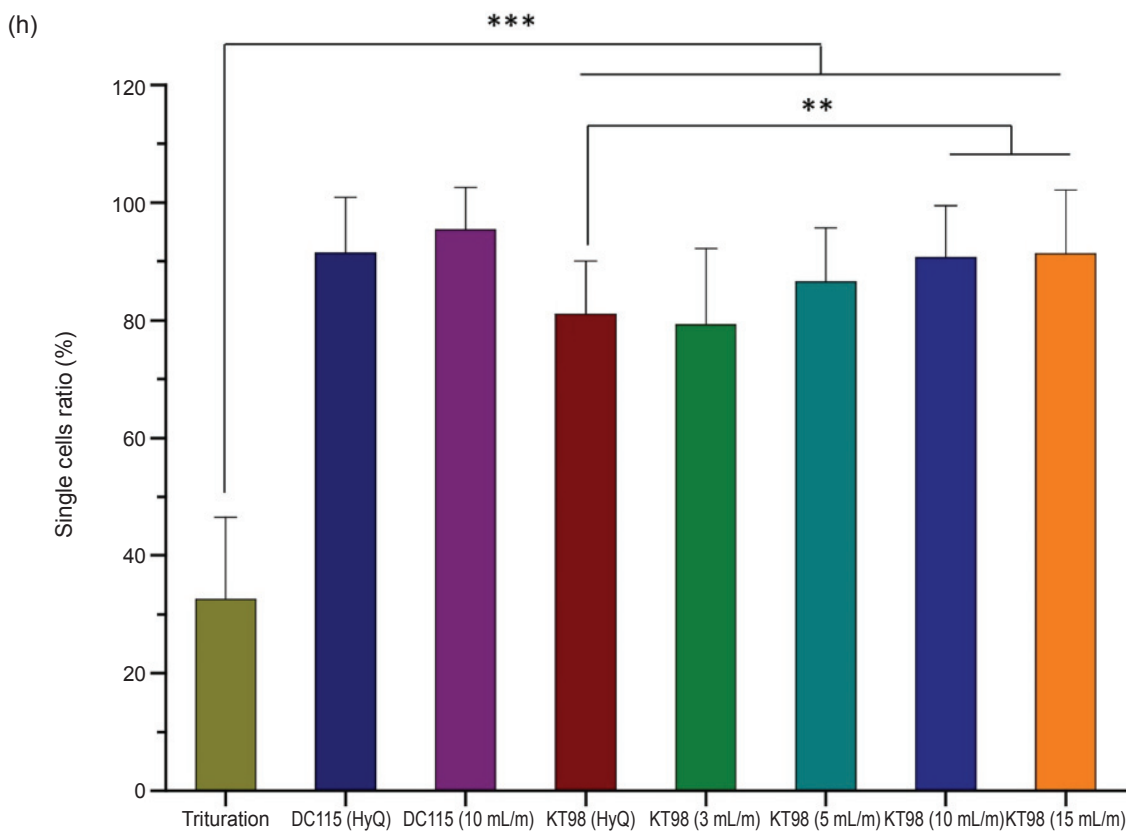
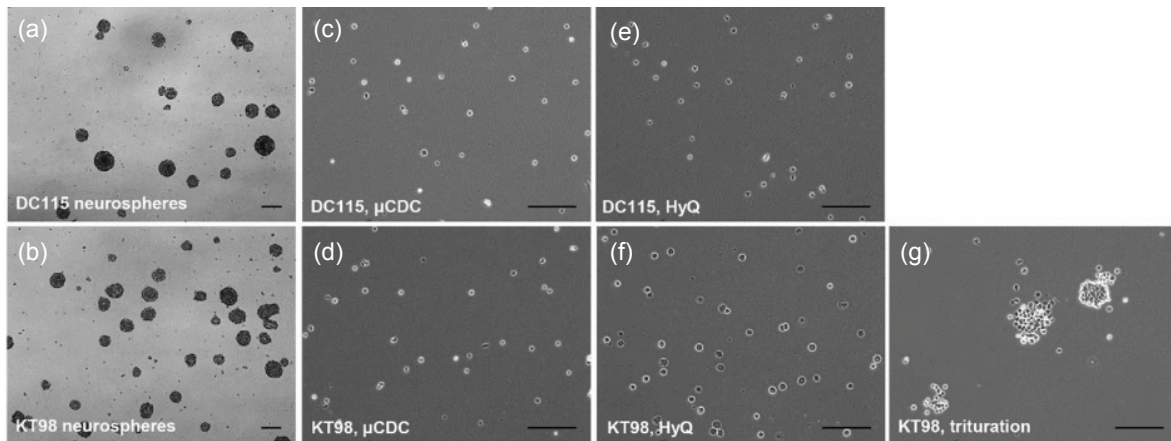


圖 3. DC115 及 KT98 神經球分別以 μ -CDC 晶片、HyQTase 及純機械式 trituration 分離法作用後之單細胞分離效率比較。(a) DC115 細胞於神經球培養液培養 7 天後所形成之神經球外觀。(b) KT98 細胞於神經球培養液培養 7 天後所形成之神經球外觀。(c)–(d) 利用 μ -CDC 晶片分離神經球後所得到之 DC115 及 KT98 神經幹細胞。注意：絕大多數的細胞皆為單細胞。(e)–(f) 利用 HyQTase 酵素作用後所獲得之 DC115 及 KT98 神經幹細胞。與使用 μ -CDC 晶片時相同，HyQTase 酵素作用後也可獲得大量的單細胞。(g) KT98 神經球以純機械式 trituration 分離法分離後只能獲得少量單細胞，且會伴隨大量的神經球團塊出現。(h) 以 μ -CDC 晶片、HyQTase 及純機械式 trituration 分離法分離後之單細胞獲取效率比較。使用純機械式 trituration 分離法只能得到少量的單細胞 (32.51%)，而大多數皆還是神經球團塊；而使用 μ -CDC 晶片並控制流速為 10 mL/m 時，則可獲得大量之 DC115 (95.32%) 及 KT98 (90.63%) 單細胞。每組實驗皆進行三重複。誤差線所代表的是正負標準偏差 (\pm SD)。

傳統方式	細胞存活率 (%)	μ -CDC 晶片	細胞存活率 (%)
DC115 (HyQTase)	94.22 \pm 0.78	DC115 (10 mL/min)	84.52 \pm 3.87
KT98 (HyQTase)	85.39 \pm 1.97 ^a	KT98 (3 mL/min)	83.27 \pm 3.96 ^a
KT98 (Trituration)	52.74 \pm 5.69 ^b	KT98 (5 mL/min)	80.74 \pm 5.89 ^a
		KT98 (10 mL/min)	79.37 \pm 3.77 ^a
		KT98 (15 mL/min)	81.67 \pm 3.43 ^a

表1. DC115 與 KT98 經 μ -CDC 晶片、HyQTase 酵素及 trituration 分離法。

4. μ -CDC 晶片分離神經球之細胞回收率

我們觀察到使用 μ -CDC 晶片分離神經球後會有部分細胞團卡在晶片的微柱結構縫隙之間，因此我們比較了 μ -CDC 晶片與酵素處理的細胞回收率。圖 4(a) 顯示 μ -CDC 晶片分離 DC115 神經球後之細胞回收率約為 92%，而 HyQTase 酵素處理的細胞回收率則為 100%。另外 KT98 神經球的細胞回收率隨著流速提高 (從 3 到 10 mL/min) 也有顯著的增加 (從 48% 至 74%) (圖 4(a))，但若將流速進一步提高至 15 mL/min 時細胞回收率並沒有持續增加。使用 μ -CDC 晶片會出現部分細胞流失，顯然是由於細胞團在分離過程中被卡在晶片微柱間所致 (圖 4(b) 和 (c))。有趣的是，我們發現兩種不同的模式細胞竟然會產生不同的細胞回收率，顯示來自不同品系小鼠及不同腦區所得到之神經幹細胞所形成的神經球可能具有不同程度的細胞與細胞間連結 (cell-cell junctions)。另一個可能原因是由於被卡在晶片內的細胞為具有較強細胞間連結的一個細胞亞群。然而，因為我們的 μ -CDC 晶片具有高單細胞分離效率、回收率及存活率，可作為一良好的純機械式非酵素型分離工具，進而取代酵素做為神經球單細胞分離的有效工具。

5. μ -CDC 晶片所分離之 KT98 細胞的再球化及分化能力

為了了解 μ -CDC 晶片之分離方式是否會對神經幹細胞的自我更新及分裂能力造成影響，我們將分離後的 KT98 細胞經過多次繼代分離及再球化培養形成神經球。結果顯示，無論使用 μ -CDC 晶片或 HyQTase 酵素分離後的 KT98 細胞皆可在神經球培養液中培養 7 天後長成神經球，且在連續四次的繼代分離及再球化實驗中， μ -CDC 晶片

與 HyQTase 酵素分離後的 KT98 細胞在神經球形成率上並無顯著差異 (圖 6(a))。且 μ -CDC 晶片分離後的 KT98 細胞所形成的神經球在形態上也跟 HyQTase 酵素處理後所形成之神經球極為相似 (圖 6(b) 和 (c))。另一方面，以 μ -CDC 晶片所分離的 KT98 細胞會表現 Nestin 和 SOX2 等神經幹細胞的幹性標記 mRNA，顯示分離後的細胞仍保持良好的幹細胞幹性 (圖 5)。細胞的分化能力是幹細胞的另外一個重要指標，因此我們也測試了 μ -CDC 分離後之 KT98 細胞的神經分化能力。由免疫螢光染色結果顯示， μ -CDC 分離後的 KT98 細胞可高效率的分化成三種中樞神經系統的主要神經細胞—包括神經元細胞 (表現其特有之 MAP2 標記)，星形膠質細胞 (表現其特有之 GFAP 標記) 以及寡突膠質細胞 (表現其特有之 Galc 標記) (圖 6(d)–(f))。

四、討論

微流體系統可以準確地操作流體⁽²⁸⁾ 與細胞^(29, 30)，因此在生物學的應用與細胞實驗上都是非常有用的工具⁽³¹⁻³³⁾。本研究開發一個新的微流體工具 (μ -CDC)，它具有以純機械式非酵素型方式來將神經球內之細胞分離成單細胞，其結果顯著較傳統的純機械式 trituration 分離方式擁有更高的單細胞分離效率及細胞存活率。在 DC115 細胞株測試中，展現了高單細胞分離效率 (~95%)、高細胞存活率 (~84%) 以及高細胞回收率 (~93%)；而在 KT98 細胞株測試中，同樣具有高單細胞分離效率 (~91%)、高細胞存活率 (~80%)，但其細胞回收率則較低 (~75%)。KT98 細胞具有較低之回收率表示有某部分的 KT98 神經球較難以被分離，這樣的結果顯示 μ -CDC 晶片在單細胞分離應用上會依細胞

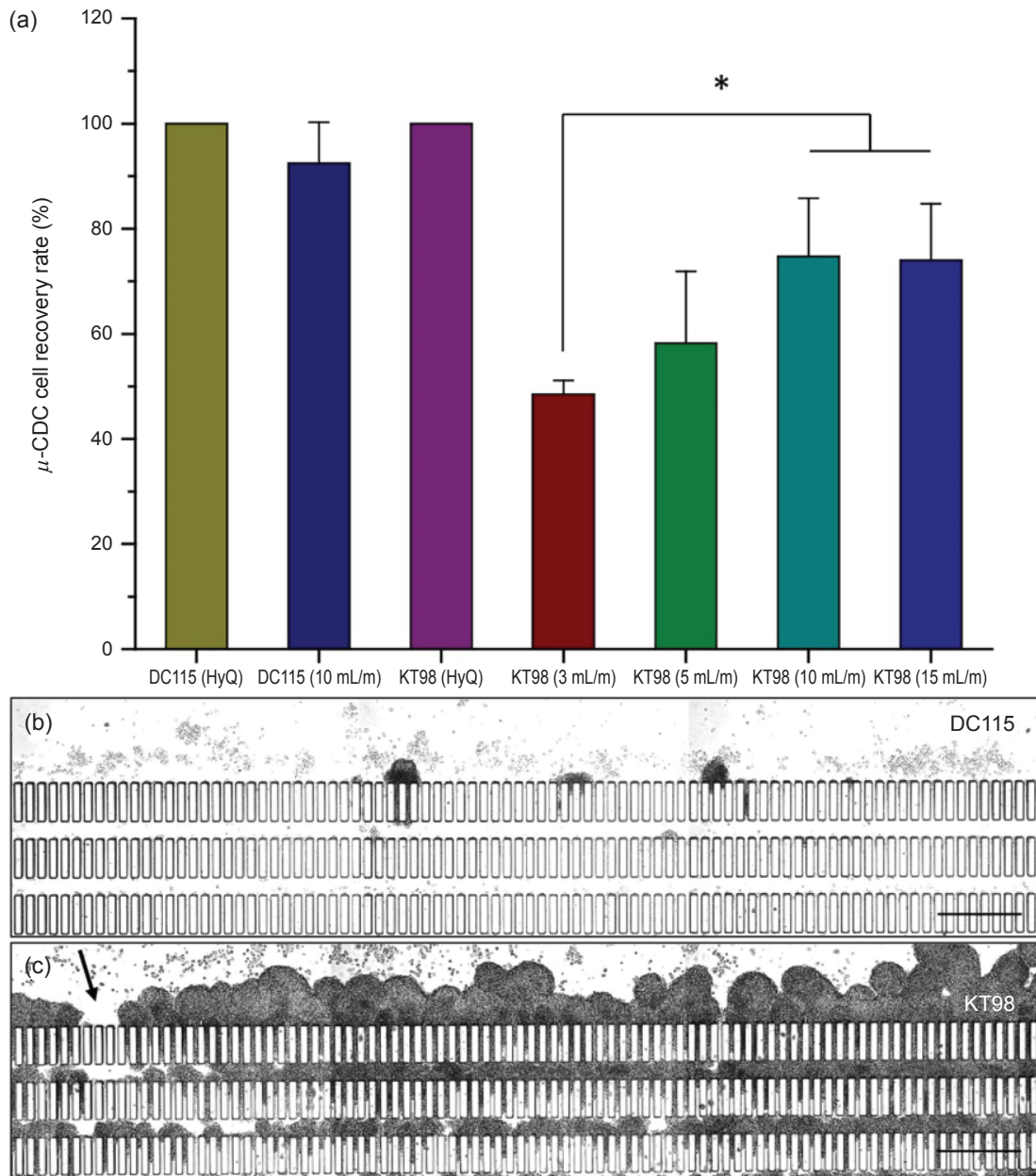


圖 4. 經 μ -CDC 晶片分離神經球後之 DC115 及 KT98 細胞回收率。(a) 以使用 HyQTase 酵素處理的 DC115 及 KT98 的細胞回收率當作 100% 的對照組，相比之下，使用 μ -CDC 晶片的 DC115 細胞有 $92.5 \pm 7.76\%$ 的細胞回收率 (流速為 10 mL/m)，而 KT98 之細胞回收率則是伴隨流速增加而提高，分別為自流速 3 mL/m 時的 $48.54 \pm 2.57\%$ ，5 mL/m 時的 $58.22 \pm 13.65\%$ ，10 mL/m 時的 $74.72 \pm 11.11\%$ 至 15 mL/m 時的 $74.04 \pm 10.68\%$ 。(b)–(c) DC115 神經球絕大部分都可以通過微柱結構，但未被分離的 KT98 神經球則有部分會被微柱抓住。黑色箭號所標示的為相鄰兩微柱間的空隙，這個空隙可讓流體快速通過進而降低兩邊之壓力差導致回收率下降。Scale bar: 500 μ m。每組實驗皆進行三重複。誤差線所代表的是正負標準偏差 (\pm SD)。

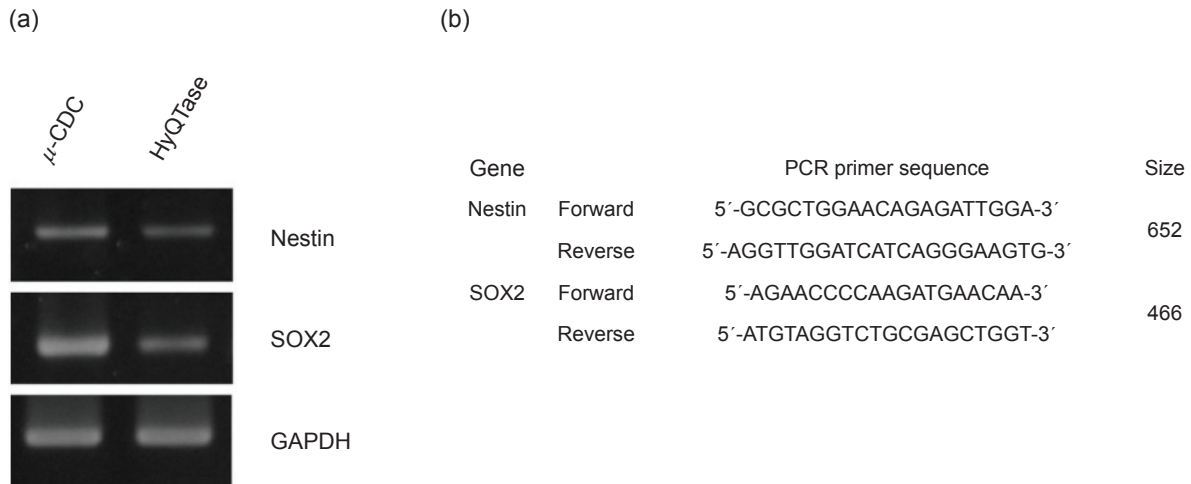


圖 5. 使用 μ -CDC 晶片及 HyQTase 分離後之 KT98 單細胞幹性標記 Nestin 及 SOX2 的 mRNA 表現分析。(a) 經過 μ -CDC 晶片分離後之 KT98 細胞可表現神經幹細胞幹性標記 Nestin 及 SOX2，此結果與使用 HyQTase 酵素分離法相同，顯示 μ -CDC 晶片並不會對神經幹細胞的幹細胞特性造成傷害。(b) 本實驗所使用的 Nestin 及 SOX2 之 PCR 引子序列及大小。

不同而有不同效率，其原因可能取決於細胞與細胞間的連結強度。然而在大部分的應用中，少量的細胞損失則是可以被接受的 (例如，細胞繼代)。 μ -CDC 晶片的細胞分離效果可以藉由優化設計 (例如，微柱的幾何形狀和尺寸) 及改變操作參數 (例如，液體流速) 而進一步提升。在本實驗中，我們選用 10 mL/min 的流速所分離之單細胞進行後續的再球化和幹細胞分化實驗，因為在 KT98 細胞的測試中，此流速具有高單細胞分離效率、存活率及回收率。而分離後之結果也顯示出 μ -CDC 晶片所分離之 KT98 細胞具有良好的細胞型態，且能進行再球化，此兩項特性與使用 HyQTase 所分離之細胞在細胞型態上並無差異 (圖 3(d) 及 (f)、圖 6(b) 及 (c))。若比較此兩種方法所分離之細胞再球化後所形成之神經球比率上 (圖 6(a))，經 μ -CDC 晶片分離後的細胞較 HyQTase 分離要來的低，但在統計學上並無顯著差異。此結果與之前研究人員的報告結果相似，經過酵素分離的細胞比利用純機械式分離的細胞具有較高的再球化效率 16。但這個現象的實際機制尚不明確，我們推測可能是由於在純機械式的分離過程中會受到較高的液體作用力擠壓，而導致其再球化效率些微下降。為了瞭解細胞在 μ -CDC 晶片的分離過程中所受到的液體剪應

力，我們使用 COMSOL Multiphysics 軟體進行有限元素模擬分析，來模擬在分離過程中微流道內之牆壁所受到的液體剪應力 (τ , shear stress)。模擬結果顯示最大的剪應力發生在微柱的側壁上，若在 10 mL/min 的流速下，其剪應力大約為 10–12 Pa；而當流速提升到 15 mL/min 時，其側壁所受到之最大剪應力大約增加至 16–18 Pa (圖 7)。由於細胞先天具有機械力敏感性 (mechanosensitive) 的特性，故若在遭受到機械力的情況下可能促使細胞改變其行為及細胞命運。先前研究指出，將大鼠肝臟細胞培養在含有內膜氧合器 (internal membrane oxygenator) 之生物反應器 (bioreactor) 三天，其間分別承受 5、10 及 21 dyn/cm^2 的剪應力，會使得其每日白蛋白和尿素合成率顯著減少⁽³⁴⁾；而 MC3T3-E 及 MLO-Y4 細胞在經歷 20 dyn/cm^2 的剪應力作用 3 小時後，也會導致細胞存活率小幅下降⁽³⁵⁾。以上實驗結果都顯示細胞在經過流體的剪應力作用後，會降低其正常功能表現與細胞存活率。此外有些研究指出，機械力的作用與幹細胞的分化命運是有關連的，舉例來說，表現 Flk-1 的胚胎幹細胞會在環境中存在 1.5 及 5 dyn/cm^2 的流體剪應力下，分化成血管內皮細胞⁽³⁶⁾；而小鼠胚胎間質幹細胞也會在經 6 小時的 15 dyn/cm^2 剪應

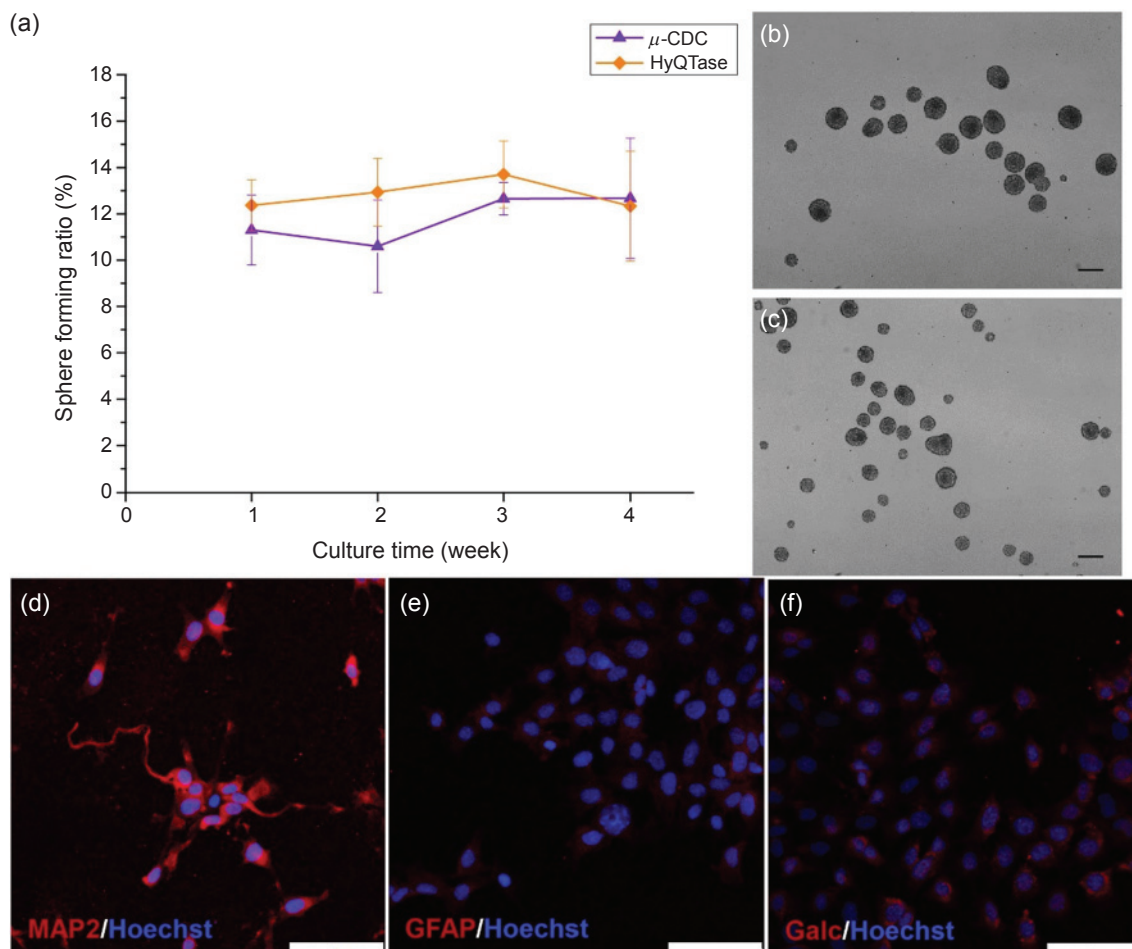


圖 6. 使用 μ -CDC 晶片及 HyQTase 酵素分離後之 KT98 神經幹細胞特性 (再球化及幹細胞分化潛力) 分析。(a) 使用 μ -CDC 晶片及 HyQTase 酵素所分離的 KT98 神經幹細胞經連續操作 1-4 週後的再球化效率分析。(b) 經過 μ -CDC 晶片分離及再球化一個月 (四次) 後的 KT98 神經幹細胞所形成之神經球外觀。(c) 經過 HyQTase 酵素分離及再球化一個月 (四次) 後的 KT98 神經幹細胞所形成之神經球外觀。兩種方式所分離的神經球細胞經過再球化後表現出極為相似的細胞型態。Scale bar: 200 μ m。而 μ -CDC 晶片分離過程並不會傷害神經幹細胞本身特性，故所分離的 KT98 細胞依然保有神經幹細胞三種主要中樞神經系統神經細胞分化特性，分別為 (d) 神經元細胞 (neurons)，表現 MAP2 蛋白質標記、(e) 星形膠質細胞 (astrocytes)，表現 GFAP 蛋白質標記及 (f) 寡突膠質細胞 (oligodendrocytes)，表現 Galc 蛋白質標記。三種神經細胞的分化效率分別為神經元細胞 98%、星形膠質細胞 94% 及寡突膠質細胞 83%。Scale bar: 100 μ m。每組實驗皆進行三重複。誤差線所代表的是正負標準偏差 (\pm SD)。

力作用下，分化成內皮前驅細胞⁽³⁷⁾。另外有研究結果指出，脂肪來源的間質幹細胞在承受脈衝式流體 (pulsating fluid flow) 的成骨化刺激 (osteogenic stimulation) 後，會表現出相似於骨細胞的特徵⁽³⁸⁾；而若將人類神經幹細胞/祖細胞放置於 -670 到 760 mmHg (約是 -8.93×10^4 到 1.01×10^5 Pa) 的靜

水壓力下不超過 20 秒後，會增加其乳酸脫氫酶 (LDH) 的釋放，但持續培養 2 天後並不會觀察到細胞有型態上的損傷⁽¹⁶⁾。綜合上述結果，機械力作用對於細胞行為與存活率的影響，很顯然地與作用力大小和持續時間有關。在我們的操作過程中，神經幹細胞僅會在短時間內 (少於 1 分鐘) 遭受機械

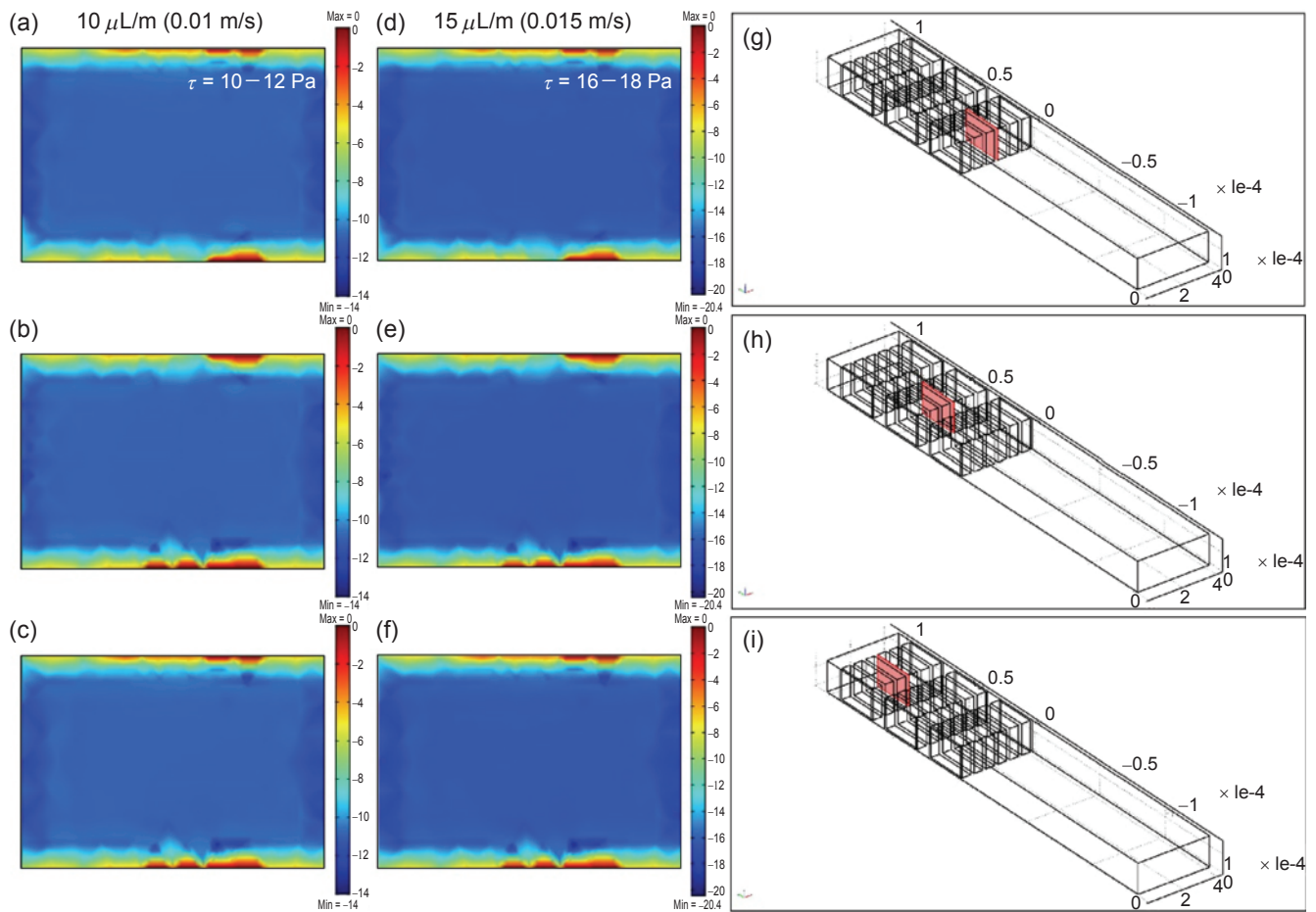


圖 7. 細胞在流道內及微柱間所受到的剪應力 (τ , shear stress) 有限元素分析。(a)–(c) 三個不同位置之微柱側牆所受到的剪應力，當使用 $10 \mu\text{L}/\text{m}$ (0.01 m/s) 的流速施加於流道入口時，微柱側牆中央所受到的最大剪應力介於 $10\text{--}12 \text{ Pa}$ (y 方向)，反之細胞所受到的相對剪應力最大為 $10\text{--}12 \text{ Pa}$ 。(d)–(f) 當使用 $15 \mu\text{L}/\text{m}$ (0.015 m/s) 的流速施加於流道入口時，微柱側牆中央所受到的最大剪應力介於 $16\text{--}18 \text{ Pa}$ (y 方向)，反之細胞所受到的相對剪應力最大為 $16\text{--}18 \text{ Pa}$ 。(g)–(i) 模型前端為流道入口 (施加壓力處)，而另一端則為流道出口 (壓力 = 0)。流道左側及右側設定為連續式對稱結構，其餘表面則設定為無法滑動的牆壁。

力 ($10\text{--}12 \text{ Pa}$ 在 $10 \text{ mL}/\text{min}$ 的流速) 作用，所以大部細胞在經過分離後，依然保有良好之細胞存活率。且經過 $\mu\text{-CDC}$ 晶片分離後的 KT98 細胞具有再球化的能力且可以成功分化成三種中樞神經系統的主要神經細胞，而其中分化後的神經元細胞也會表現出許多神經分支 (neuronal processes，一種成熟神經元的特徵) (圖 6(d))，這些結果顯示我們的分離方式只會對細胞產生非常小的傷害。

五、結論

我們成功開發了一款簡單的純機械式非酵素型神經球單細胞分離晶片 $\mu\text{-CDC}$ 。我們利用 DC115 及 KT98 神經幹細胞所形成之神經球當作細胞模型，證明此晶片具有極佳的單細胞分離效率及良好的細胞存活率。而被以純機械力方式分離之單細胞依然保有其神經幹細胞的特性，可於神經球培養液中持續生長並形成神經球並，同時並具有中樞神經系統的主要三種神經細胞 (神經元、星狀膠質細

胞、寡突膠質細胞) 的分化能力。綜合以上結論， μ -CDC 晶片是一個新穎的高效率純機械式非酵素型單細胞分離方法，我們期許未來此 μ -CDC 晶片可以應用在更多的細胞團塊或動物組織的單細胞分離上。

參考文獻

1. B. A. Reynolds and S. Weiss, *Science*, **255**, 1707 (1992).
2. O. N. Suslov, V. G. Kukekov, T. N. Ignatova and D. A. Steindler, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 14506 (2002).
3. A. Bez, E. Corsini, D. Curti, M. Biggiogera, A. Colombo, R. F. Nicosia, S. F. Pagano and E. A. Parati, *Brain Res*, **993**, 18 (2003).
4. S. Ahmed, *Journal of Cellular Biochemistry*, **106**, 1 (2009).
5. O. Lindvall and Z. Kokaia, *Nature*, **441**, 1094 (2006).
6. T. N. Ignatova, V. G. Kukekov, E. D. Laywell, O. N. Suslov, F. D. Vrionis and D. A. Steindler, *Glia*, **39**, 193 (2002).
7. A. L. Vescovi, R. Galli and B. A. Reynolds, *Nat Rev Cancer*, **6**, 425 (2006).
8. L. P. Deleyrolle and B. A. Reynolds, *Methods Mol Biol*, **549**, 91 (2009).
9. H. Mori, K. Ninomiya, M. Kino-oka, T. Shofuda, M. O. Islam, M. Yamasaki, H. Kano, M. Taya and Y. Kanemura, *Journal of Neuroscience Research*, **84**, 1682 (2006).
10. L. S. Campos, *J Neurosci Res*, **78**, 761 (2004).
11. M. Serra, S. B. Leite, C. Brito, J. Costa, M. J. Carrondo and P. M. Alves, *J Neurosci Res*, **85**, 3557 (2007).
12. L. Ziegler, Y. Segal-Ruder, G. Coppola, A. Reis, D. Geschwind, M. Fainzilber and R. S. Goldstein, *Exp Neurol*, **223**, 119 (2010).
13. G. J. R. Delcroix, M. Jacquart, L. Lemaire, L. Sindji, F. Franconi, J. J. Le Jeune and C. N. Montero-Menei, *Brain Research*, **1255**, 18 (2009).
14. A. D. Nelson, M. Suzuki and C. N. Svendsen, *Stem Cells*, **26**, 348 (2008).
15. P. S. Jensen, L. Lyck, P. Jensen, J. Zimmer and M. Meyer, *Stem Cells Int*, **2012**, 761843 (2012).
16. L. Wallman, E. Akesson, D. Ceric, P. H. Andersson, K. Day, O. Hovatta, S. Falci, T. Laurell and E. Sundstrom, *Lab Chip*, **11**, 3241 (2011).
17. L. Conti and E. Cattaneo, *Nature Reviews Neuroscience*, **11**, 782 (2010).
18. C. Cusulin, E. Monni, H. Ahlenius, J. Wood, J. C. Brune, O. Lindvall and Z. Kokaia, *Stem Cells*, **30**, 2657 (2012).
19. D. C. Lee, Y. C. Hsu, Y. F. Chung, C. Y. Hsiao, S. L. Chen, M. S. Chen, H. K. Lin and I. M. Chiu, *Mol Cell Neurosci*, **41**, 348 (2009).
20. J. D. Hoeck, A. Jandke, S. M. Blake, E. Nye, B. Spencer-Dene, S. Brandner and A. Behrens, *Nature Neuroscience*, **13**, 1365 (2010).
21. S. Han, K. Yang, Y. Shin, J. S. Lee, R. D. Kamm, S. Chung and S. W. Cho, *Lab on a Chip*, **12**, 2305 (2012).
22. B. A. Reynolds and R. L. Rietze, *Nature Methods*, **2**, 333 (2005).
23. D. B. Wolfe, D. Qin and G. M. Whitesides, *Methods Mol Biol*, **583**, 81 (2010).
24. I. M. Chiu, K. Touhalisky, Y. Liu, A. Yates and A. Frosthalm, *Oncogene*, **19**, 6229 (2000).
25. S. K. Fineberg, P. Datta, C. S. Stein and B. L. Davidson, *PLoS One*, **7**, e38562 (2012).
26. B. L. K. Coles-Takabe, I. Brain, K. A. Purpura, P. Karpowicz, P. W. Zandstra, C. M. Morshead and D. Van der Kooy, *Stem Cells*, **26**, 2938 (2008).
27. Y. C. Hsu, D. C. Lee, S. L. Chen, W. C. Liao, J. W. Lin, W. T. Chiu and I. M. Chiu, *Dev Dyn*, **238**, 302 (2009).
28. C. H. Hsu, D. Di Carlo, C. C. Chen, D. Irimia and M. Toner, *Lab on a Chip*, **8**, 2128 (2008).
29. A. M. Skelley, O. Kirak, H. Suh, R. Jaenisch and J. Voldman, *Nature Methods*, **6**, 147 (2009).
30. S. L. Stott, C. H. Hsu, D. I. Tsukrov, M. Yu, D. T. Miyamoto, B. A. Waltman, S. M. Rothenberg, A. M. Shah, M. E. Smas, G. K. Korir, F. P. Floyd, A. J. Gilman, J. B. Lord, D. Winokur, S. Springer, D. Irimia, S. Nagrath, L. V. Sequist, R. J. Lee, K. J. Isselbacher, S. Maheswaran, D. A. Haber and M. Toner, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 18392 (2010).
31. B. G. Chung, L. A. Flanagan, S. W. Rhee, P. H. Schwartz, A. P. Lee, E. S. Monuki and N. L. Jeon, *Lab on a Chip*, **5**, 401 (2005).
32. T. M. Pearce and J. C. Williams, *Lab on a Chip*, **7**, 30 (2007).
33. J. Y. Wang, L. Ren, L. Li, W. M. Liu, J. Zhou, W. H. Yu, D. W. Tong and S. L. Chen, *Lab on a Chip*, **9**, 644 (2009).
34. A. W. Tilles, H. Baskaran, P. Roy, M. L. Yarmush and M. Toner, *Biotechnol Bioeng*, **73**, 379 (2001).
35. M. M. Thi, T. Kojima, S. C. Cowin, S. Weinbaum and D. C. Spray, *Am J Physiol Cell Physiol*, **284**, C389 (2003).
36. K. Yamamoto, T. Sokabe, T. Watabe, K. Miyazono, J. K. Yamashita, S. Obi, N. Ohura, A. Matsushita, A. Kamiya and J. Ando, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **288**, H1915 (2005).
37. H. Wang, G. M. Riha, S. Yan, M. Li, H. Chai, H. Yang, Q. Yao and C. Chen, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **25**, 1817 (2005).
38. M. Knippenberg, M. N. Helder, B. Z. Doulabi, C. M. Semeins, P. I. Wuisman and J. Klein-Nulend, *Tissue Eng*, **11**, 1780 (2005).



林璟暉先生現為國家衛生研究院生醫工程與奈米醫學研究所與國立中興大學組織工程與再生醫學學程博士班學生。

Ching-Hui Lin is currently a Ph.D. student in the Institute of Biomedical Engineering and Nanomedicine at National Health Research Institutes and Ph.D. Program in Tissue Engineering and Regenerative Medicine at National Chung Hsing University.



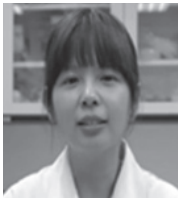
李東慶先生現為國家衛生研究院細胞與系統醫學研究所研究助理。

Don-Ching Lee is currently a research assistant in Institute of Cellular and System Medicine at National Health

Research Institutes.

張浩禎小姐現為國家衛生研究院生醫工程與奈米醫學研究所與國立中興大學組織工程與再生醫學學程博士班學生。

Hao-Chen Chang is currently a Ph.D. student in the Institute of Biomedical Engineering and Nanomedicine at National Health Research Institutes and Ph.D. Program in Tissue Engineering and Regenerative Medicine at National Chung Hsing University.



蕭怡馨小姐現為國家衛生研究院生醫工程與奈米醫學研究所與國立清華大學奈米工程與微系統研究所博士班學生。

Yi-Hsing Hsiao is currently a Ph.D. student in the Institute of Biomedical Engineering and Nanomedicine at National Health Research Institutes and the Institute of NanoEngineering and MicroSystems at National Tsing Hua University.



何誠堃先生現為國家衛生研究院生醫工程與奈米醫學研究所與國立中興大學組織工程與再生醫學學程博士班學生。

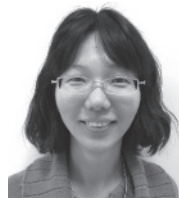
Cheng-Kun He is currently a Ph.D. student in the Institute of Biomedical Engineering and Nanomedicine at National Health Research Institutes and Ph.D. Program in Tissue Engineering and Regenerative Medicine at National Chung Hsing University.



莊堵安先生現為國立清華大學生命科學系大學部學生。

Duane S. Juang is currently an undergraduate student in the Department of Life Science at National

Tsing Hua University.



葉鵬鳳小姐現為國家衛生研究院生醫工程與奈米醫學研究所研究助理。

Chuan-Feng Yeh is currently a research assistant in Institute of Biomedical Engineering and Nanomedicine at

National Health Research Institutes.



邱英明先生為美國佛羅里達大學生物化學博士，現任國家衛生研究院細胞與系統醫學研究所特聘研究員與國立中興大學生命科學系教授。

Dr. Ing-Ming Chiu received his Ph.D. degree in Biochemistry from Florida State University. He is currently a Distinguished Investigator in Institute of Cellular and System Medicine at National Health Research Institutes and a Professor at in Department of Life Sciences at National Chung Hsing University.



許佳賢先生為美國華盛頓大學機械工程博士，現任國家衛生研究院生醫工程與奈米醫學研究所助研究員與國立清華大學奈米工程與微系統研究所助理教授。

Dr. Chia-Hsien Hsu received his Ph.D. degree in Mechanical Engineering from University of Washington. He is currently an Assistant Investigator in Institute of Biomedical Engineering and Nanomedicine at National Health Research Institutes and an Assistant Professor in Institute of NanoEngineering and MicroSystems at National Tsing Hua University.