

動態三維影像技術於斑馬魚心臟收縮功能定量及鈣離子成像

Dynamic 3D Cardiac Imaging of Zebrafish for the Quantification of Cardiac Function and Calcium Imaging

廖奕翰、莊育丞

Ian Liao, Yu-Cheng Chuang

開發定量模式生物心臟收縮功能及鈣離子成像的技術對各種心臟相關研究，例如：生理學、致病機轉、藥物毒性、發育生物學及再生醫學等，都扮演重要的角色。斑馬魚的胚胎發育快、基因及心臟電生理與人類相近，因此常用於心臟相關研究。斑馬魚幼魚的身體小且透明度高，可直接以光學顯微鏡觀察心臟。但由於其心臟快速跳動，因此獲得精確的心臟收縮功能及鈣離子成像仍是一大挑戰。在此文，我們將介紹如何結合影像處理以及光學成像技術，重建活體斑馬魚心臟腔室的動態三維成像以及動態三維的心臟鈣離子影像。此技術可在同一隻斑馬魚同時獲得心室收縮功能參數、跳動心臟中心肌細胞鈣離子瞬態、心臟電生理訊號傳導等重要生理訊息，預期有機會開啟心臟相關全新研究方向及生醫應用。

Quantification of the contractile function and the calcium dynamics of the heart of model organisms is important for research areas ranging from the pathophysiology of heart diseases, the cardiotoxicity of drugs, to the developmental and regenerative biology of the heart. The zebrafish heart develops rapidly and has high genomic and electrophysiological conservation relative to its human counterpart, and hence the zebrafish has long been a popular model animal for cardiac research. While optical imaging of the small and translucent larval zebrafish is straightforward, precise determination of the cardiac function and the calcium dynamic on a rapidly beating heart remains challenging. Here we introduce dynamic three-dimensional (3D) cardiac imaging of larval zebrafish through image reconstruction and demonstrate the simultaneous determination of the cardiac contractile function, the local calcium transient and the electrophysiological conduction on a living zebrafish. In view of the growing interest of using zebrafish in cardiac research, we envisage that our approach should benefit not only contemporary pharmaceutical development but also exploratory research targeting heart diseases.

一、前言

從生物分子到人體器官的長度尺度跨越大約九個數量級，也因此發展出各式的顯微成像技術。如圖 1 所示，從最小尺度開始，可解析生物大分子 (例如蛋白質) 中個別原子位置的冷凍電子顯微鏡技術⁽¹⁾、能在細胞內觀察胞器細微結構的超高解析光學成像技術⁽²⁾、已經發展許久且已獲得廣大應用特別是神經科學領域的單光子或雙光子顯微螢光成像技術⁽³⁾。科學的進展是學理加上創意的結合，而創意的來源往往能從歷史中獲得靈感。對於更大的尺度例如動物器官的細胞尺度顯微成像，過去必須將組織切片後才能用電子或光學顯微鏡成像，除了曠日費時，切片過程難免造成組織扭曲及破壞。為解決此問題，有科學家將兩個已有百年歷史的古老技術 (層光激發截面成像以及組織澄清化) 結合且進一步發展，目前已能在完整的動物器官達到次細胞級的高解析顯微成像⁽⁴⁾。

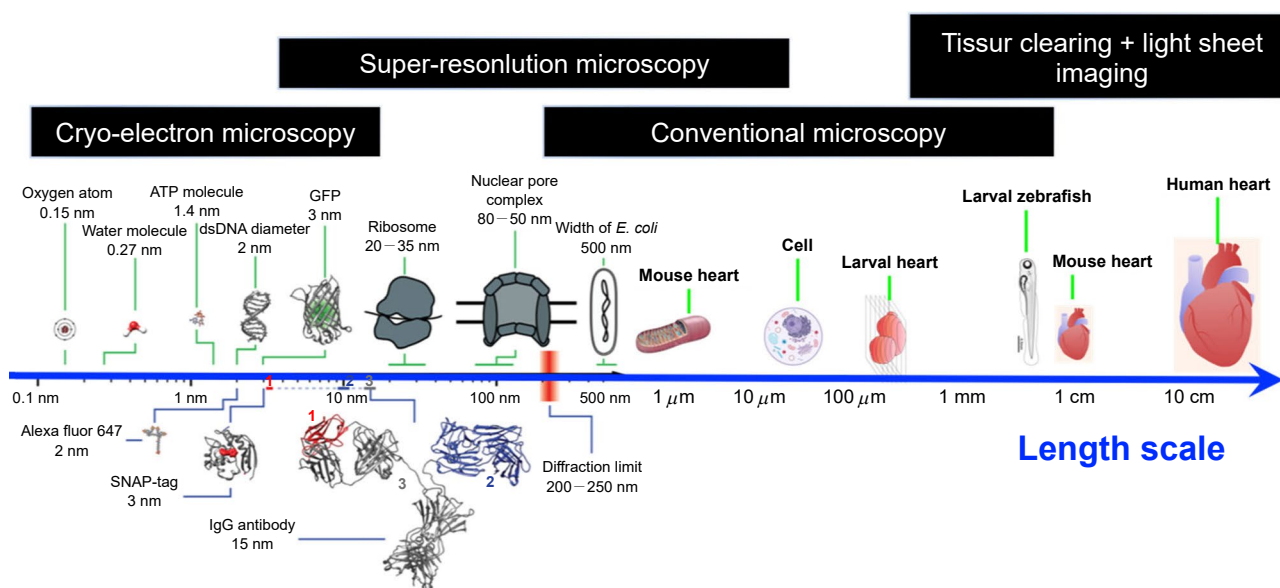


圖 1. 生物分子到動物器官的長度尺度以及對應到的顯微成像技術 (修改自⁽⁶⁾)。

從生物學家、化學家到物理學家有一個共同信念，亦即「了解結構即能了解功能」或所謂「結構-功能相關性 (structure-function interplay)」。因此，三維成像早已是上述成像技術的必要功能。例如透過冷凍電子顯微鏡技術獲得生物分子中個別原子在三度空間的位置訊息可以幫助了解酵素的功能⁽¹⁾、透過超高解析光學成像技術觀察分子馬達的三維結構可以獲知其運作機轉⁽²⁾、利用雷射掃描或是層光顯微成像技術觀察個別細胞在腦組織中的位置可以探索各個神經細胞之間的功能性連結^(3, 4)。在另一方面，了解心臟的收縮功能及鈣離子動態對於各種心臟相關研究例如：生理學、致病機轉、藥物毒性、發育生物學及再生醫學等領域，都扮演重要的角色⁽⁵⁾。精確量測心臟的收縮功能及鈣離子動態則需要獲得心臟的動態三維成像。然而，即便顯微成像前沿技術的蓬勃發展，由於心臟快速跳動及收縮，上述主要針對靜態樣品的三維成像技術應用在模式生物心臟的動態三維成像仍是一大挑戰。

斑馬魚的胚胎發育快、基因及心臟電生理與人類相近，因此很早即被用於心臟相關研究，再加上斑馬魚幼魚的身體小且透明，更有助於直接以光學顯微鏡觀察心臟⁽⁷⁾。在此文，我們將介紹如何結合影像處理以及光學成像技術，重建活體斑馬魚心臟腔室的動態三維成像，同時更將上述技術擴展至動態三維的心臟鈣離子影像。此技術可在同一隻斑馬魚同時獲得心室收縮功能參數、心肌細胞鈣離子瞬態、心臟電生理訊號傳導等重要生理訊息，預期有機會開啟全新的心臟相關研究方向以及生醫應用。

二、利用影像同步重建斑馬魚心臟之動態三維影像

前文提到透過動態三維成像獲得模式生物心臟的收縮功能及鈣離子動態仍是一大挑戰。我們以斑馬魚為例，分析此技術困難點。首先斑馬魚的心搏每分鐘約 200 次 (或心搏週期約 300 ms)，為了清楚解析心臟腔室的三維運動，我們假定每個心搏週期至少需取得十組三維影像 (或是每秒鐘 33 組三維影像)。斑馬魚幼魚心臟大小尺度約 200 μm ，以雷射共焦顯微鏡為例，完成一張三維影像需將物鏡或樣品延著軸向掃描，以間距為 2 μm 擷取約 100 張二維截面影像。雖然先進的高速攝影機可輕易達到每秒數千張的二維影像截取速度，但由於物鏡或樣品一般而言有較大慣性，因此不容易高速沿著成像軸來回掃描，也因此現今商業化的雷射共焦顯微鏡仍無法獲取清晰的即時心臟動態三維影像。為了克服此技術挑戰，科學家利用心臟週期性跳動的特性，利用離線影像重組，重建斑馬魚心臟的動態三維影像⁽⁸⁾。

圖 2 為利用離線影像重組，重建斑馬魚心臟的動態三維影像原理的示意圖。首先，利用雷射共焦或層光顯微成像技術，對心肌細胞表現螢光蛋白 (或是以顯微注射技術在血管內注入螢光染劑) 的斑馬魚在每一個適當軸向間距 (例如 2 μm) 取一段時間 (至少超過一個心搏週期) 的動態二維螢光影像，然後將每一橫列 (row) 中的二維影像根據該影像在一個心搏週期中的「相位」依序排列。排列完成後，便可將每一縱列 (column) 的二維影像重組，此重組的三維影像即代表心臟在心搏週期中一特定時間點 (或是「相位」) 的三維影像。最後，如圖所示可再利用影像軟體，將不同時間的三維影像建構成跳動中心臟的動態三維影片。若將重排後某一時間點的三維影像中每一層二維截面的腔室面積相加，再乘上軸向間距 (2 μm)，便可得到時間點的心臟腔室體積。

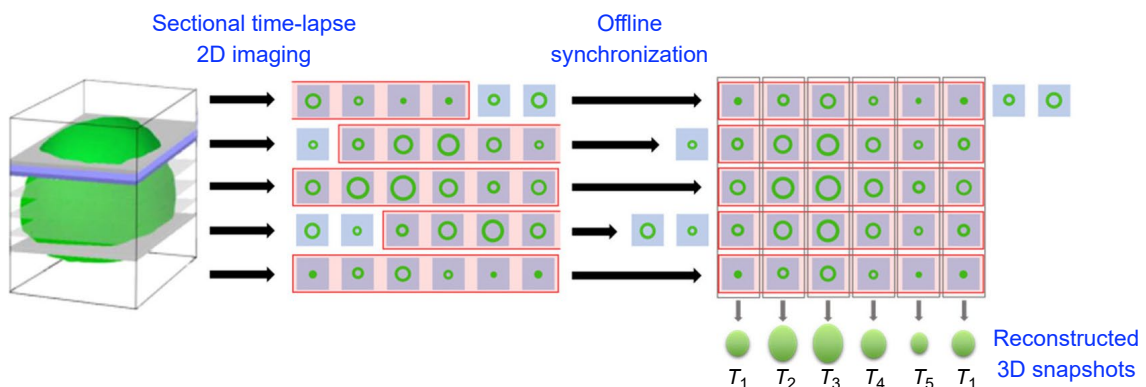


圖 2. 利用離線影像重組建構心臟動態三維影像的原理示意圖。

三、斑馬魚心臟動態三維成像技術之生醫應用

前文已經說明如何利用同步影像技術重建斑馬魚心臟動態三維影像，接著將介紹此技術在心臟相關研究的可能應用。

圖 3 節錄自我們過去發表的研究成果⁽⁹⁾。如前文所述，應用動態三維心臟成像技術，可以獲得心室的體積在心搏週期中隨時間的變化。圖 3(a) 上方的三維影像為受精後六天大斑馬魚幼魚的心室在三個心搏週期中代表性時間點：心室擴張終點 (ventricular end-diastole)、心室收縮期中間點、心室收縮終點 (ventricular end-systole) 的瞬間心室腔體三維影像。根據定義，心室擴張至最大時的體積為「心室擴張終點體積 (ventricular end-diastolic volume, EDV)」，而心室收縮至最小時的體積為「心室收縮終點體積 (ventricular end-systolic volume, ESV)」。從圖中數據也可以立即獲得心搏週期以及心律 (heart rate) 的訊息。根據上述結果，套入個別心室收縮功能參數的定義：

$$\begin{aligned} \text{Stroke volume (SV)} / \text{nL} &\equiv \text{EDV} - \text{ESV} \\ \text{Ejection fraction (EF)} / \% &\equiv (\text{SV} / \text{EDV}) \times 100 \\ \text{Cardiac output (CO)} / (\text{nL} / \text{min}) &\equiv \text{SV} \times \text{HR} \end{aligned}$$

便可以獲得完整的心室收縮功能參數。圖 3(b) 的表格列出統計十五隻受精後六天大 (day-post fertilization, dpf) 的斑馬魚幼魚各種心室收縮功能參數的平均值及標準差⁽⁸⁾。

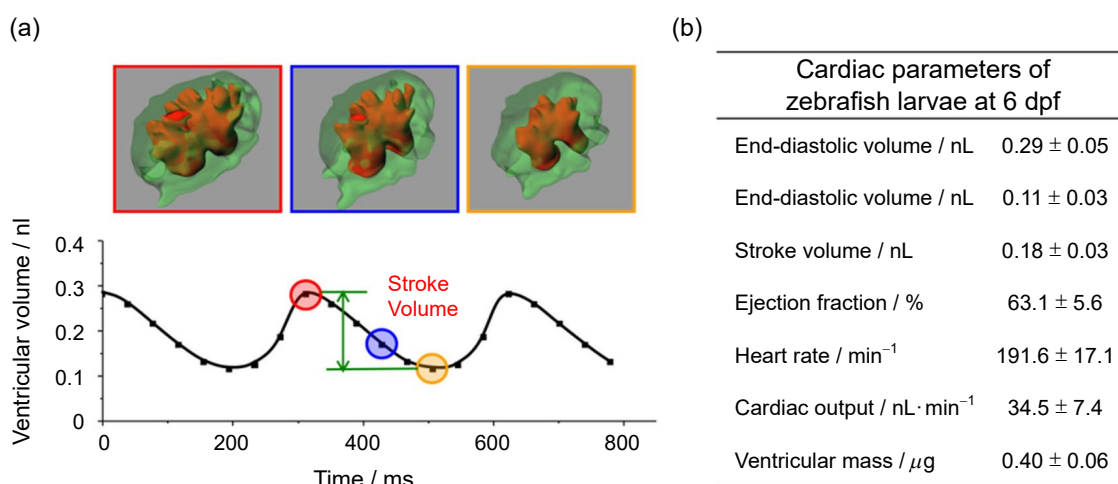


圖 3. 動態三維心臟成像應用於心室收縮功能定量⁽⁹⁾。(a) 上方的三個三維影像為受精後六天大斑馬魚幼魚的心室 (ventricle) 在三個心搏週期中代表性時間：心室擴張終點 (end-diastole)、收縮期中間點、收縮終點 (end-systole) 的瞬間心室腔體三維影像。下方的數據則為心室體積在心搏週期中隨時間的變化。(b) 此表格為六天大的斑馬魚幼魚心室收縮功能參數的統計平均數值 ($n = 15$)。

由於定量跳動中心臟腔室體積的困難，過去常用的方法為，先由心臟的二維影像獲得心臟腔室長軸及短軸的長度，再假設心臟腔室為一橢圓體，估算出心臟腔室的體積。為了評估此「二維近似方法」的準確性，在同一文章中，我們針對相同的十五隻斑馬魚幼魚，以上述

近似方法估算心室收縮功能參數。發現二維近似方法的結果產生極大的誤差，也放大個體間的差異，同時此誤差無法以簡單方式校正⁽⁹⁾。此結果說明以動態三維心臟成像來定量心室收縮功能參數確實有其必要性，同時也顯示文獻上根據二維近似方法決定心室收縮功能參數得到的實驗結論可能需小心評估。

此外我們也以幾種已知在人類可調控心臟功能或是具有心臟毒性的藥物，評估動態三維心臟成像技術在藥物篩選可能的應用。結果顯示，這些藥物在調控斑馬魚心臟功能例如心室收縮量 (ventricular stroke volume)、心室射出分率 (ventricular ejection fraction)、心律 (heart rate) 均呈現與調控人類心臟功能相同的趨勢，更詳細的說明請詳見參考文獻⁽⁹⁾。

有鑒於新藥開發耗費大量時間及金錢，而藥物引起未預期的心臟毒性是藥物開發過程中止甚至是臨床藥物上市後被回收下市的主要原因⁽¹⁰⁾。未來若能以斑馬魚為模式生物結合此動態三維心臟成像技術發展成臨床前新藥開發階段的藥物心臟毒性初級篩選平台，應可以減少藥物開發的時間及金錢成本。為了展現此應用的潛力，我們與合作團隊探討以奈米載體包覆抗癌藥物是否能降低抗癌藥物的心臟毒性同時保留其抗癌效力。在此工作中，我們建立人類癌症的斑馬魚模型，透過非破壞性的三維螢光成像技術，可以針對同一隻斑馬魚，長期觀察其癌組織的大小以及心臟功能的變化。更詳細的說明及結果，詳見參考文獻⁽¹¹⁾。

前文有提到，斑馬魚發育相當快速，而且在胚胎時期透明度高，因此很適合以斑馬魚為模式生物來研究脊椎動物心臟的發育生物學。我們利用心肌細胞表現螢光蛋白的斑馬魚或是以顯微注射技術將螢光染劑注入斑馬魚胚胎的血管之中，配合上述動態三維心臟成像技術，可以清楚呈現胚胎不同發育階段心臟腔室發育及收縮方式的變化。如圖 4 所示，受精後 30、48 以及 144 小時 (hour-post fertilization, hpf)，斑馬魚胚胎的心臟由長條管狀 (30 hpf) 逐漸發育成兩個規律收縮的腔室 (144 hpf)。從不同發育階段心臟腔室形貌的動態變化也可以看出，在不同的胚胎發育階段，心臟腔室透過高度協調的收縮及舒張運動以推出血液的機制，似乎有所不同。

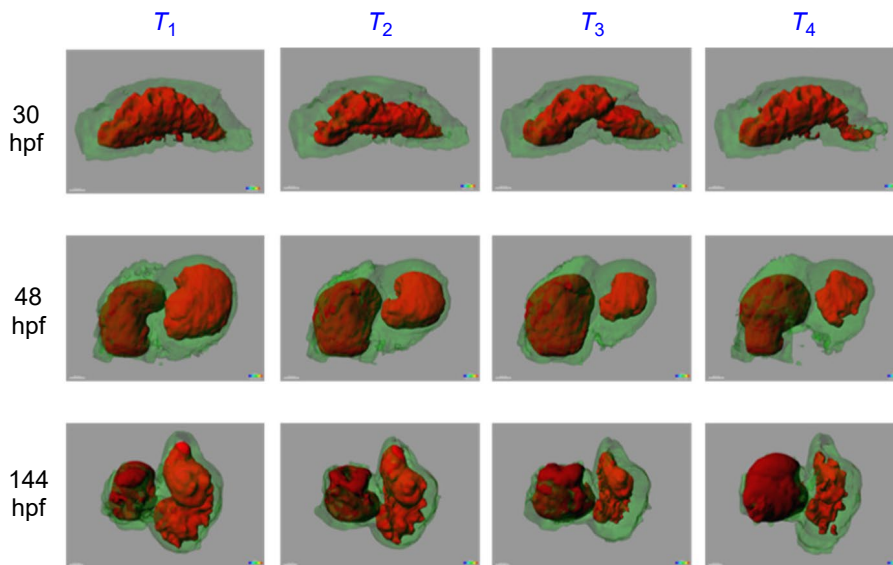


圖 4. 斑馬魚不同胚胎發育時期心臟之三維影像。動態三維心臟成像技術清楚呈現斑馬魚胚胎在不同的發育階段 (30, 48 以及 144 hour-post fertilization) 心臟腔室發育的情況以及協調收縮及舒張運動。

使用斑馬魚作為模式生物的一大好處是容易將螢光蛋白表現在特定種類細胞上，製造出各種轉基因螢光斑馬魚品系。以圖 5(a) 為例，利用心肌細胞的細胞核表現螢光蛋白的轉基因斑馬魚，配合上述動態三維心臟成像技術，可以清楚分辨活體斑馬魚心臟腔室中心肌細胞的數目，甚至還能追蹤個別心肌細胞在心搏週期中的移動軌跡。圖 5(b) 顯示了兩個特定心肌細胞在心搏週期中四個相對時間點的位置變化。

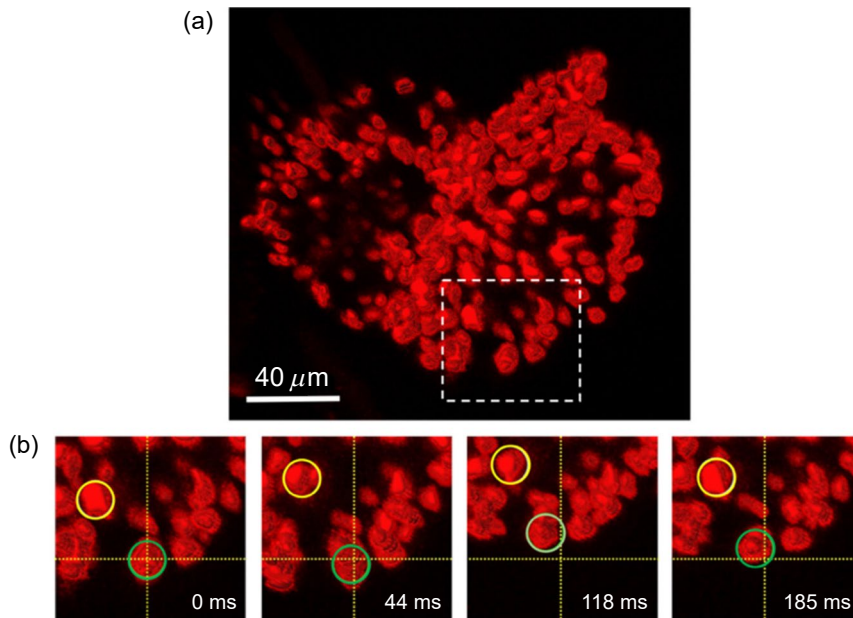


圖 5. 動態三維心臟成像技術清楚呈現斑馬魚幼魚心肌細胞的動態軌跡。(a) 利用心肌細胞表現螢光蛋白的轉基因斑馬魚，配合動態三維心臟成像技術，可以得到個別心肌細胞在心搏週期中的移動軌跡。
(b) 心肌細胞在心搏週期中四個相對時間點的位置變化。

這樣的技術預期將可應用於心臟發育生物學的研究，或是以斑馬魚為模式生物探討心臟受傷後心肌細胞再生的機轉以及幹細胞療法於心臟疾病治療的研究。

四、斑馬魚心臟鈣離子成像以及定量細胞內鈣離子瞬態變化及心臟電生理訊號傳導

心房及心室高度協調的收縮主要受電生理訊號 (electrophysiological signaling) 在心臟傳導的調控，而心臟腔室中個別心肌細胞的規律收縮則是藉由細胞動作電位 (action potential) 及肌小節 (sarcomere) 收縮來調控。而其中心肌細胞內鈣離子濃度動態變化扮演重要的角色⁽⁵⁾。也因此，測量心肌細胞內鈣離子濃度動態變化 (或稱「鈣離子瞬態」) 有其重要性。由於近年螢光染劑以及螢光蛋白技術的發展^(12, 13)，現在已可透過螢光顯微成像定量細胞或是組織內的鈣離子濃度變化。然而，跳動心臟中的心肌細胞除了在空間上快速位移，其體積也有明顯變化。也因此，透過顯微成像量測上述螢光感測分子的螢光強度來定量跳動心臟中心肌

細胞內的鈣離子濃度變化仍有其困難。受限於此，傳統上活體斑馬魚心臟的鈣離子螢光成像均先透過藥物或是分子生物學技術使心臟暫時跳動來達成^(14, 15)。但這些方法除了無法同時決定心臟收縮功能之外，過去研究也已報導在胚胎時期停止心搏可能會影響心臟發育⁽¹⁶⁾。為了解決此問題，我們提出一個創新的做法，可以在跳動心臟定量心肌細胞鈣離子動態變化。透過量測心房及心室心肌細胞鈣離子瞬態的時間差，也可獲得電生理訊號傳導的資訊。除了上述電生理的資訊，由於我們的方法無需停止心搏，也能同時獲得心室收縮功能。

圖 6(a) 為定量心臟上個別區域鈣離子濃度瞬態變化技術的示意圖。首先我們使用心肌細胞表現兩種螢光蛋白的轉基因斑馬魚。其中一種螢光蛋白 (GCaMP) 的螢光強度與細胞內鈣離子濃度相關，而另一種則選擇其螢光強度與細胞內鈣離子濃度無關的螢光蛋白 (DsRed)。接著我們利用前述的方法分別以兩種螢光建構兩組心臟的動態三維影像，結果如圖 6(b)。由於兩種螢光蛋白同時隨心肌細胞移動，其細胞內濃度也隨心肌細胞收縮同步改變，因此只要將特定區域 (region of interest, ROI) 內兩種螢光強度相除，便可以消除因細胞移動及收縮造成的定量誤差。如圖 6(a) 或 (b) 所示，可以在心房及心室各選取一特定區域，經計算獲得個別區域校正後的鈣離子濃度瞬態變化，結果如圖 6(c) 所示。由此可以獲知電生理訊號從心房某一特定區域傳導到心室某一特定區域所需要的時間 (Δt_{AV}) 以及心搏週期 (Δt_{AA})。

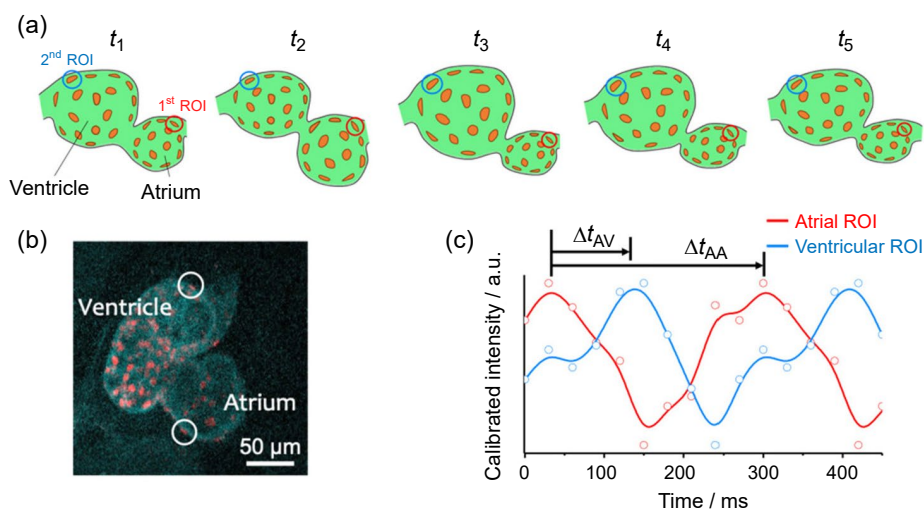


圖 6. 定量心臟上個別區域鈣離子濃度瞬態變化及電生理訊號傳導。(a) 原理示意圖。(b) 利用螢光強度與細胞內鈣離子濃度相關的螢光蛋白 (GCaMP) 以及無關的螢光蛋白 (DsRed) 重建的動態三維心臟影像。(c) 心房及心室各一特定區域校正後的鈣離子濃度動態變化。其中時間差 Δt_{AA} 代表心搏週期，而 Δt_{AV} 代表電生理訊號從心房特定區域傳導到心室特定區域所需要的時間。

值得一提的是，我們提出的創新方法無須透過藥物或是分子生物學技術使心臟暫時跳動，因此可在最小干擾的條件下，針對同一隻實驗動物同時獲得心室收縮功能參數、心肌細胞鈣離子瞬態、心臟電生理訊號傳導等重要生理訊息。我們預期上述技術除了有助於心臟病理及生理的基礎研究方向，也可能發展全新的生醫應用。

五、應用層光顯微成像 (light-sheet imaging) 技術於斑馬魚動態三維心臟鈣離子成像

上述創新想法雖然使我們成功獲得跳動心臟中心臟腔室個別區域的鈣離子濃度瞬態變化，以及電生理訊號傳導時間，但是仍有可以改進之處。從圖 6(b) 可以看出重建後的螢光影像的反差或是螢光訊號的訊噪比並不夠理想。更重要的是，受限於雷射共焦顯微鏡的掃描成像速度，目前每秒只能獲得三十組 (相當於每一個心搏週期約十組) 心臟的動態三維影像。如圖 6(c) 所示，上述限制使我們不易清楚分辨心臟腔室不同區域的細胞內鈣離子濃度瞬態變化的細微差異，此外也使定量傳導時間的精確度有所不足。

為了改進上述缺失，我們自行建構了一套層光顯微成像 (light-sheet imaging) 系統。層光顯微成像的原理及應用請參考本期其他文章，在此不再贅述。值得一提的是，我們建構的系統結構簡單，非常適用於活體斑馬魚細胞級成像的應用。此系統的核心部分如圖 7(a) 中相片所示，整個系統包含兩個激發光源，樣品腔室的左右分別各一組物鏡及光學元件用於產生對向照射的激發層光 (在焦點處之厚度約 $3\ \mu\text{m}$)，另外在層光平面的垂直方向有一個用於接收螢光訊號的物鏡。接受到的螢光則透過分光系統，將不同顏色的螢光分別投影於高靈敏度 CMOS 相機感光元件的左右兩部分同時成像。圖 7(a) 左上角的小圖則為斑馬魚幼魚麻醉後放置在以洋菜膠固定的管柱中的情況。成像前此管柱由上方插入充滿水的樣品腔室。藉由精密移動平台控制管柱位置，可得到不同焦距的心臟二維截面影像。

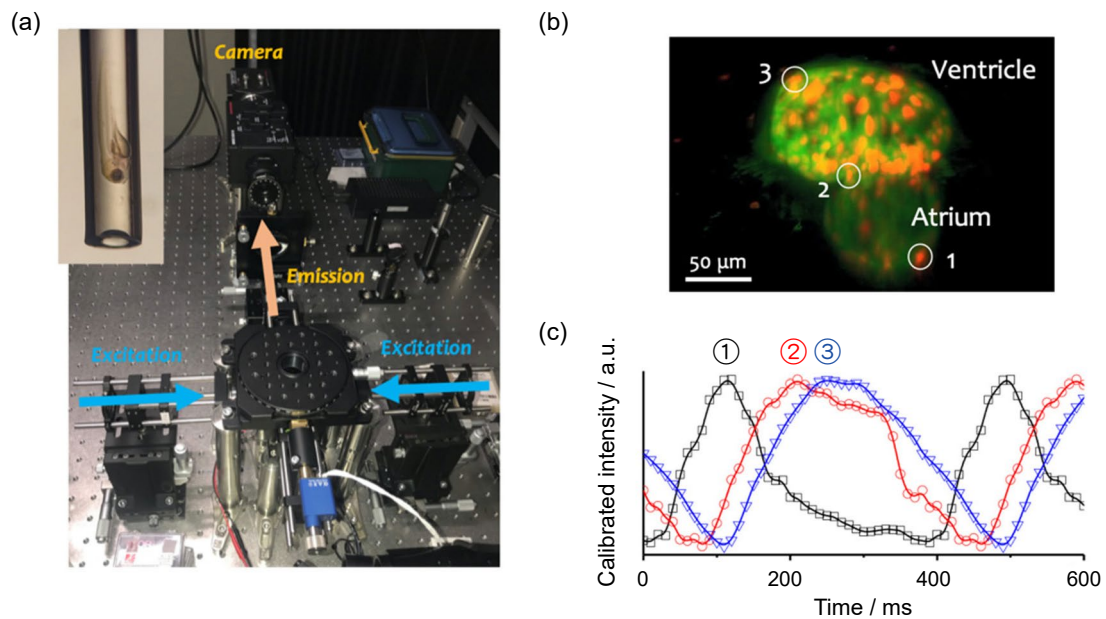


圖 7. 將層光顯微成像 (light-sheet imaging) 技術與心臟三維影像重建技術結合，可顯著改善影像的反差、訊噪比以及時間解析度。(a) 本實驗室自行建構的層光顯微成像系統。左上角的小圖則為斑馬魚幼魚麻醉後放置在以洋菜膠固定的管柱中的情況。(b) 圖示表現兩種螢光蛋白的轉基因斑馬魚的心臟三維影像。影像上面標誌的三個點分別代表心房起點、心房心室接口、及心室終點的約略位置。(c) 斑馬魚幼魚心臟在上述三個區域位置上鈣離子濃度隨時間的變化。此結果除了呈現不同區域心肌細胞的鈣離子濃度動態變化不同之外，也可以獲得電生理訊號在心臟上傳導所需要的時間。

圖 7(b) 為使用我們自行建構的層光顯微成像系統獲得的斑馬魚幼魚心臟重建後的動態三維影像。與先前以雷射共焦顯微鏡獲得的結果相比較，可以很明顯的看出螢光影像的反差以及訊噪比都大大的提升。受惠於 CMOS 相機較高的影像截取速度，影像重建後等同於得到每秒一百組 (或是每一個心搏週期約三十組) 心臟動態三維影像，大大提高時間解析度。圖 7(b) 影像上面標誌的三個點分別代表心房起點、心房心室接口、及心室終點的約略位置。上述三個特定位置心肌細胞的鈣離子瞬態變化則呈現在圖 7(c)。結果清楚的顯示，與心室心肌細胞相比，心房心肌細胞的鈣離子瞬態變化明顯較快 (半高寬較窄)。此外，上述結果也可以更精確定量電生理訊號在心臟不同腔室的傳導時間。以此組數據為例，心搏週期為 370 ms。電生理訊號由心房起點傳導至心房心室接口約需 90 ms，而由心房心室接口傳導至心室終點明顯較快，只需約 50 ms。

一般來說，我們在每個焦距停留一秒擷取約 100 張 (約二至三個心搏週期) 二維截面影像。為重建細胞級解析度的斑馬魚心臟動態三維影像，我們以步距 $2\ \mu\text{m}$ 移動 100 層。完成擷取 10000 張的二維截面影像花費約三分鐘。目前我們正致力於降低完成整組影像擷取所需時間。透過加大移動平台步距、降低每個焦距停留時間、降低影像的畫素 (pixel) 數目以及每個畫素數據的動態範圍 (dynamic range)、提高數據傳輸以及記憶體或硬碟寫入速度，完成整組影像擷取時間有機會降低至一分鐘之內。此外，為了普及我們的技術的應用，我們也致力於將二維影像排列、重組三維影像、計算腔室體積、計算區域鈣離子瞬態以及計算區域之間電生理訊號傳導時間等過程自動化並整合成單一程式。目標是在未來提供生物學家一個可方便定量斑馬魚心收縮功能及鈣離子動態的生物分析工具。

五、結論

本文介紹一種透過離線影像重組，建構斑馬魚幼魚心臟的動態三維影像的技術。此外，我們更將此技術擴展至斑馬魚心臟的鈣離子成像。總結來說，此技術可針對同一隻實驗動物同時獲得心室收縮功能參數、跳動心臟中單一心肌細胞鈣離子瞬態、心臟電生理訊號傳導等重要生理訊息。此技術預期有助於心臟相關生理及病理研究、藥物開發中心臟毒性篩選以及針對心臟的新穎治療方式的開發。最後，為普及此技術的應用，我們也致力於將影像重組、分析及提取定量訊息等過程自動化並整合成單一程式。目標是發展出一個基於影像技術定量斑馬魚心臟生理功能的分析工具。

誌謝

此研究工作獲得科技部「光學方法於斑馬魚心血管疾病模型 - 轉譯醫學及藥物篩選應用 (106-109)」以及「建構以先進光學成像技術及影像處理分析演算法為主體之跨域心臟醫學研究及藥物篩選平台 - 著眼於單一心肌細胞到活體心臟之鈣離子瞬態及心肌收縮動力學」(109-110) 的研究經費補助。文章內容除了部分源自莊育丞先生碩士班期間的研究成果之外，也包含其他畢業碩士班學生 (林琨祐、陳彥伶、桑沛克) 的貢獻，在此一併感謝。

參考文獻

1. Chen CY, et al. *Journal of the American Chemical Society*, **141** (15), 6136 (2019).
2. Yang TT, et al. *Nature Communications*, **9** (1), 2023 (2018).
3. Huang C, et al. *iScience*, **22**, 133 (2019).
4. Chen Y, et al. *Cell Report*, **33** (5), 1083 (2020).
5. Park DS, et al. *Circulation*, **123**, 904 (2011).
6. Dooley K, et al. *Current Opinion in Genetics and Development*, **10** (3), 252 (2000).
7. Turkowyd B, et al. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, **408**, 6885 (2016)
8. Forouhar AS, et al. *Science*, **312** (5774), 751 (2006).
9. Lin KY, et al. *Analytical Chemistry*, **86** (4), 2213 (2014).
10. Lenneman CG, et al. *Circulation Research*, **118** (6), 1008 (2016).
11. Tu WM, et al. *Analytica Chimica Acta*, **1095**, 129 (2020).
12. Kim HM, et al. *Accounts of Chemical Research*, **42** (7), 863 (2009).
13. Lin MZ et al. *Nature Neuroscience*, **19** (9), 1142 (2016).
14. Jou CJ, et al. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **25** (4-5), 419 (2010).
15. Sehnert AJ, et al. *Nature Genetics*, **31** (1), 106 (2002).
16. Rasouli SJ, et al. *Nature Communications*, **8** (1), 15281 (2017).

作者簡介

廖奕翰博士畢業於美國芝加哥大學化學系，現為國立交通大學應用化學系暨分子科學研究所教授，同時為國立交通大學生物科技系合聘教授。

Professor Ian Liau received his Ph.D. of physical chemistry from the University of Chicago (Chicago, Illinois, U.S.A.). He is currently a professor of Department of Applied Chemistry and Institute of Molecular Science at National Chiao Tung University. He is also a professor (joint appointment) of Department of Biological Science and Technology at the same university.

莊育丞先生為國立交通大學應用化學系暨分子科學研究所碩士，現正服役中。

Mr. Yu-Cheng Chuang received his M.S. from Department of Applied Chemistry and Institute of Molecular Science at the National Chiao Tung University. He is currently serving the compulsory military service.