



國立臺灣大學生命科學院生化科技學系暨研究所

碩士論文

Department of Biochemical Science and Technology

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

開發以粒線體為標靶之奈米藥物載體

Development of nano drug carriers targeting mitochondria

翁松翎

Wong, Song-Ling

指導教授：何佳安 博士

Advisor : Ja-an Annie Ho, Ph.D.

中華民國 103 年 7 月

July 2014



謝誌

這篇謝誌獻給所有在這兩年中幫助過我的人，我必須很慚愧地說，沒有各位的協助，我什麼也做不到。尤其感謝何老師，我想我可能是最讓老師操心過的學生，沒有之一。老師寫給我的信，傳給我的簡訊我都一一留著，雖然老師曾經罵我罵得兇，但也是想盡辦法找人找資源，幫助我完成我的實驗，有這樣的指導教授是一件幸福的事。

再來感謝芳如學姊及您的老公小高學長在實驗上的幫忙，感謝楊老師和芝宇之前合成材料給我，感謝師丈吳老師常常給我意見，感謝徐老師在討論中給了我許多有用的建議，感謝莊老師偶爾來實驗室順便關心我。您們真的幫了我很多忙，要感謝的太多，就謝謝天讓我有機會遇見您們。

這裡要單獨一段特別感謝阿嬌和雅茹學姊，在實驗上，在我低落的時候，你們真的是把我的事當作自己的事在幫忙，回想起來幸虧有你們的幫忙與建議，我才能突破關卡繼續前進，否則現在還困在那裏。

最後感謝上面沒有提到，但同樣重要的實驗室的大家，你們是我兩年生活中重要的組成，就在我身邊和我一起做實驗吃飯聊天，很多美好的回憶是和你們有關的。以下依想到的順序列出：英風學長、念祖學長、廷洋學長、韋晴學姊，可樂、卡布、多芬、Luby、雨萱、JuJu、衍邦、亭宇、婉玲、介甫、睿霖、嘉慶、智雯、意琪、靜瑩、宜廷、Mandy、亞葳，謝謝你們充實了我碩班生活的每一刻。

謝謝大家，我能有這本論文離不開你們的幫忙。




中文摘要

近年來，以粒線體為標的開發抗癌藥物成為新一代癌症治療的重要研究方向。粒線體是細胞的能量以及死亡的調控中心，且腫瘤細胞粒線體的功能普遍異常，因此針對腫瘤細胞和正常細胞在代謝以及死亡調控上的顯著差異尋找標的，是重要的新藥發展策略。目前已經有多種以粒線體為標靶的藥物進入到臨床試驗階段。

以奈米藥物載體攜帶抗癌藥物有下列優點：1)奈米藥物載體可以透過 enhanced permeability and retention effect (EPR effect)使抗癌藥物累積在腫瘤，降低對正常組織及器官的副作用；2)可以使疏水性藥物均勻的分散在生物系統中，避免因使用助溶劑造成的副作用；3)可以在載體上做各種修飾增加不同功能(ex: targeting, imaging)，而不用改變藥物的分子結構。基於上述奈米藥物載體的優點，及以癌細胞粒線體為標靶之化學治療策略的發展，開發能有效運送藥物至粒線體之藥物載體有其必要性。

在本研究中，我們利用修飾有 triphenylphosphonium (TPP)分子之磷脂質來包覆金奈米粒子(phospholipid capped gold nanoparticles, PLGNP)表面，使其成為以粒線體為標靶之奈米粒子；並利用金奈米粒子可以透過感應耦合質譜儀(ICP-MS)準確量化的特點，來評估我們的修飾方法是否可以使奈米粒子有效地進入到粒線體。通過合成方法的最佳化，目前已經合成出適合用來做細胞實驗的 PLGNP-TPP。下一步將會使癌細胞與 PLGNP-TPP 共培養後，分離出粒線體並用 ICP-MS 評估其進入到粒線體的效率。若 ICP-MS 測得的數據證明 PLGNP-TPP 可以有效地進入到粒線體，則此修飾策略將可應用到其他不同種類的奈米藥物載體上，並且 PLGNP-TPP 也有機會成為研究奈米粒子與粒線體功能等基本研究的重要工具。

本研究也嘗試利用有無粒線體標靶分子修飾之 PLGNP 來闡明金奈米粒子對粒線體功能的影響。在細胞存活率試驗(MTT assay)發現 PLGNP-TPP 會影響 A549 肺



癌細胞的存活率，進一步測試和粒線體活性有關的指標，發現細胞中的 ATP level 下降，並有粒線體膜電位失常等現象。細胞中針對粒線體受損有一套處理的機制，受損的粒線體會被細胞自噬清除以維持細胞內整體粒線體的正常功能。觀察細胞自噬的 marker，即 microtubule-associated protein 1 light chain 3 的表現後我們發現，與 PLGNP-TPP 共培養後的細胞有活化細胞自噬的現象。初步的結果顯示 PLGNP-TPP 會造成細胞中粒線體的受損，並開啟細胞中修復粒線體受損的機制。詳細的過程還需要更進一步研究，以判斷 PLGNP-TPP 或是其他以粒線體為標靶的奈米藥物載體在使用上需注意的事項或是所需要的改良。

關鍵詞：奈米藥物載體、粒線體、藥物傳遞、金奈米粒子

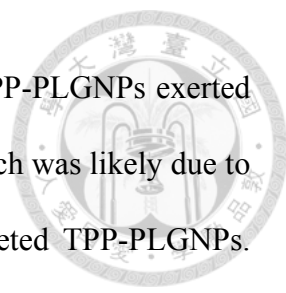
Abstract



In recent years, targeting mitochondria as a therapeutic target has become an emerging strategy in cancer treatment. Mitochondria are often referred to as a central hub for responses to cellular stress and cell injury; in addition, the well-established functions of mitochondria in energy supply/storage and apoptosis provide novel targets for tumor cell suicide. Therefore the alterations in cancer cells that protect cell from apoptosis can be utilized to inhibit proliferation of cancer cell. Furthermore, strategies of re-programming in cancer cells with metabolic differences from their normal counterparts may lead to alternative therapeutic approaches. Currently there are several drug candidates that are attempted to use in targeting mitochondria are in cancer clinical trials.

Nanodrugs are known to offer several key features, including: (i) site-directing nanodrug can be found to accumulate intensively in tumor site by enhanced permeability and retention effect (EPR effect), avoiding or minimizing side effects to the normal tissue; (ii) improved pharmacokinetic profile for drugs with poor solubility; (iii) versatility of nanodrugs (can be designed to obtain multi-functions, including imaging, hyperthermia, stimuli-controlled release). Considering the great potential offered by mitochondrially-targeted nanodrugs, the development of a reliable mitochondria-targeted nanocarrier is desirable.

In this study, the unique characteristics of triphenylphosphonium (TPP) was exploited to design a mitochondrial targeting nanodrug. It was achieved by developing a facile synthetic strategy to conjugate this mitochondria-targeted moiety onto the phospholipid layer of the gold nanoparticles functionalized with phospholipids



(TPP-PLGNPs). *In vitro* experimental results confirmed that our TPP-PLGNPs exerted inhibitory effects on the proliferation of lung cancer A549 cells, which was likely due to the malfunction of mitochondria caused by our mitochondria-targeted TPP-PLGNPs. Parallel studies were conducted to investigate the safety of non-TPP modified PEG-PLGNPs. Further the cellular adenosine triphosphate (ATP) levels was measured, and lower ATP level was observed in TPP-PLGNP treated group, as compared to the control group treated by PEG-PLGNP. Consistently, the mitochondria membrane potential was altered in the PLGNP-TPP treated group. It was well understood that a repairing system that deals with mitochondria damage, including digesting damaged mitochondria by autophagy, exists in mammalian cells. The modification of an autophagy marker, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), was thus monitored in this study. It was found that the PLGNP-TPP treated group seemed to trigger autophagy. Detailed mechanism will be thoroughly investigated. In summary, our preliminary results validated that, PLGNP-TPP induced mitochondria damage in A549 cancer cells, and autophagy was also activated. Further investigation is required to evaluate the targeting efficiency and biosafety of PLGNP-TPP *in vitro* and *in vivo*.

Key word: nano drug carrier, mitochondria, drug delivery, gold nanoparticles

目錄



謝誌.....	i
中文摘要.....	ii
Abstract.....	iv
圖目錄.....	viii
表目錄.....	x
第一章 緒論.....	1
第二章 文獻回顧.....	3
2.1 藥物動力學.....	3
2.2 奈米藥物載體.....	5
2.2.1 奈米藥物載體的發展現況.....	8
2.3 粒線體.....	11
2.3.1 粒線體與癌症.....	17
2.3.2 以粒線體為標靶之奈米藥物載體文獻回顧.....	21
2.4 結語.....	23
第三章 實驗藥品與儀器.....	24
3.1 實驗藥品 (Chemicals and reagents).....	24
3.2 實驗儀器 (Apparatus).....	27
3.3 癌細胞株 (Cancer cell lines).....	27
第四章 製備方法與鑑定.....	28
4.1 DSPE-PEG ₂₀₀₀ -TPP conjugate 合成.....	28
4.2 金奈米粒子製備.....	30
4.3 脂質包覆之金奈米粒子之製備.....	31
4.3. 細胞實驗.....	33

4.3.1 細胞存活率測試.....	33
4.3.2 偵測細胞內 ATP 含量.....	34
4.3.3 粒線體膜電位之觀測.....	35
4.3.4 細胞內酸性胞器染色.....	35
4.3.5 西方點墨法.....	36
第五章 結果與討論.....	40
5.1 DSPE-PEG ₂₀₀₀ -TPP conjugate 合成與鑑定.....	40
5.2 脂質包覆之金奈米粒子之製備與鑑定.....	42
5.3 脂質包覆之金奈米粒子之穩定性測試.....	47
5.4 PLGNP-TPP 造成細胞存活率下降.....	49
5.5 PLGNP-TPP 造成細胞內 ATP 含量下降.....	51
5.6 粒線體膜電位之觀測.....	53
5.7 PLGNP-TPP 活化細胞自噬.....	55
5.8 結論與未來展望.....	57
參考文獻.....	58



圖目錄



圖 一：典型的藥物在血液中之濃度對給藥後時間作圖 (a) 三種不同的給藥方式，(b)理想的緩釋型藥劑。 ¹	4
圖 二：EPR effect 示意圖，奈米藥物載體透過主動及被動 targeting 專一性的作用在腫瘤部位 ²⁹ ...	7
圖 三：奈米藥物載體的發展示意圖	10
圖 四：粒線體研究統計資料	12
圖 五：呼吸作用示意圖，圖中包含醱解作用的產生的 pyruvate 如何代謝成 Acetyl-CoA 進到檸檬酸循環；並且檸檬酸循環產生的 NADH 在電子傳遞鏈中的 complex I 中氧化成 NAD ⁺ ，提供源源不絕的電子不斷往下傳遞，電子最終在 complex IV 中由氧氣接收變成水。電子傳遞鏈的過程不斷產生電動勢，推動 complex V 合成 ATP。 ⁶⁶	15
圖 六：細胞凋亡示意圖 ⁷⁰	16
圖 七：以粒線體為標靶之抗癌藥物舉例 ⁶⁸	19
圖 八：粒線體標靶分子 ⁷⁴	20
圖 九：DSPE-PEG ₂₀₀₀ -TPP 合成步驟流程圖	29
圖 十：DSPE-PEG ₂₀₀₀ -TPP conjugate NMR 鑑定	41
圖 十一：最佳化 PLGNP 合成過程中 DMF：Water 比例與 TPP lipid 添加量	44
圖 十二：(a)PLGNP-PEG 之吸收光譜；(b)PLGNP-TPP 之吸收光譜	45
圖 十三：(a)PLGNP-PEG 以 DLS 量測 zeta potential 結果；(b) PLGNP-TPP 以 DLS 量測 zeta potential 結果	46
圖 十四：以模擬生物環境及 cell culture medium 的 buffer 測試 PLGNP-PEG 及 PLGNP-TPP 的穩定性	48
圖 十五：A549 肺癌腫瘤細胞與 PLGNP-TPP 共培養後對其細胞存活率作圖	50
圖 十六：與 PLGNP-TPP 共培養後細胞內 ATP level 偵測	52

圖 十七：JC-1 結構式 ⁹²	53
圖 十八：以 JC-1 染色觀察與 PLGNP 共培養的 A549 細胞粒線體受損.....	54
圖 十九：PLGNP-TPP 活化細胞自噬(a)酸性胞器染色結果，(b)細胞自噬 maker LC3 western blot 結果.....	56



表目錄



Table 1：奈米藥物載體改善傳統藥物的缺點 ²	6
Table 2：近兩年以粒線體為標靶之奈米藥物載體整理.....	22
Table 3：實驗藥品表單.....	24
Table 4：實驗儀器表單.....	27
Table 5：實驗細胞株表單.....	27




第一章 緒論

目前的新藥開發以及現有藥物多面臨到藥物動力學不佳以及副作用過強等問題，因而中止臨床研究或是在使用上有疑慮²；例如根據 2003 年的統計，目前新發展出的藥物有 40 % 是屬於疏水性藥物³，可能面臨藥物動力學不佳而中止臨床實驗。而 doxorubicin 及 paclitaxol 等常見的抗癌藥物皆對人體有一定的副作用。但透過奈米藥物載體來攜帶上述的藥物，有機會改善這些問題。以奈米藥物載體攜帶藥物有許多優點：1) 奈米藥物載體可以透過 enhanced permeability and retention effect (EPR effect) 使抗癌藥物累積在腫瘤，降低對正常組織及器官的副作用。奈米材料之大小可以穿過腫瘤周圍較為鬆散的微血管管壁，進而在腫瘤部位造成局部藥物濃度的上升，使奈米級的藥物傳遞系統具有被動靶向性 (passive targeting)。2) 可以使疏水性藥物均勻的分散在生物系統中，避免因使用助溶劑造成的副作用；3) 可以在載體上做各種修飾增加不同功能 (ex: targeting, imaging)，而不用改變藥物的分子結構。

近年來，以粒線體為標的開發抗癌藥物成為新一代癌症治療的重要研究方向。粒線體是細胞的能量以及死亡的調控中心，且腫瘤細胞粒線體的功能普遍異常，因此針對腫瘤細胞和正常細胞在代謝以及死亡調控上的顯著差異尋找標的，是重要的新藥發展策略。目前已經有多種以粒線體為標靶的藥物進入到臨床試驗階段。基於上述奈米藥物載體的優點，及以癌細胞粒線體為標靶之化學治療策略的發展，開發能有效運送藥物至粒線體之藥物載體有其必要性。

在本研究中，我們利用修飾有 triphenylphosphonium (TPP) 分子之磷脂質來包覆金奈米粒子 (phospholipid capped gold nanoparticles, PLGNP) 表面，使其成為以粒線體為標靶之奈米粒子；並利用金奈米粒子可以透過感應耦合質譜儀 (ICP-MS) 準



確量化的特點，來評估我們的修飾方法是否可以使奈米粒子有效地進入到粒線體。若 ICP-MS 測得的數據證明 PLGNP-TPP 可以有效地進入到粒線體，此修飾策略將可應用到其他不同種類的奈米藥物載體上，並且 PLGNP-TPP 也有機會成為研究奈米粒子與粒線體功能等基础研究的重要工具。

第二章 文獻回顧



2.1 藥物動力學

藥物動力學幫助我們了解施藥之後，藥物的濃度在血液中能否保持在一個合適的範圍以達到療效。因此藥物動力學會研究藥物在體內的吸收、分布、代謝、及排泄，並以此為依據作為給藥的參考。臨床一期的研究除了了解藥物的安全性之外，還要建立該藥物的藥物動力學資訊，以評估是否要繼續進行臨床研究以及依據其藥物動力學的特性制定臨床二期的給藥計畫⁴。

一個典型的血藥濃度與時間的關係如圖一所示，口服藥，肌肉注射，靜脈注射有不同的作用時間。靜脈注射最快，肌肉注射次之，最後是口服。如果藥物的使用有急迫性，如急救等情況，會使用靜脈注射來給藥。較不急迫的情況，則考慮肌肉注射或口服來降低副作用以及增加藥物作用時間等目的。一個理想的血藥濃度會希望藥物的濃度保持在有效濃度以上，造成毒性的濃度以下，如圖一(b)中的理想緩釋型藥物所示。

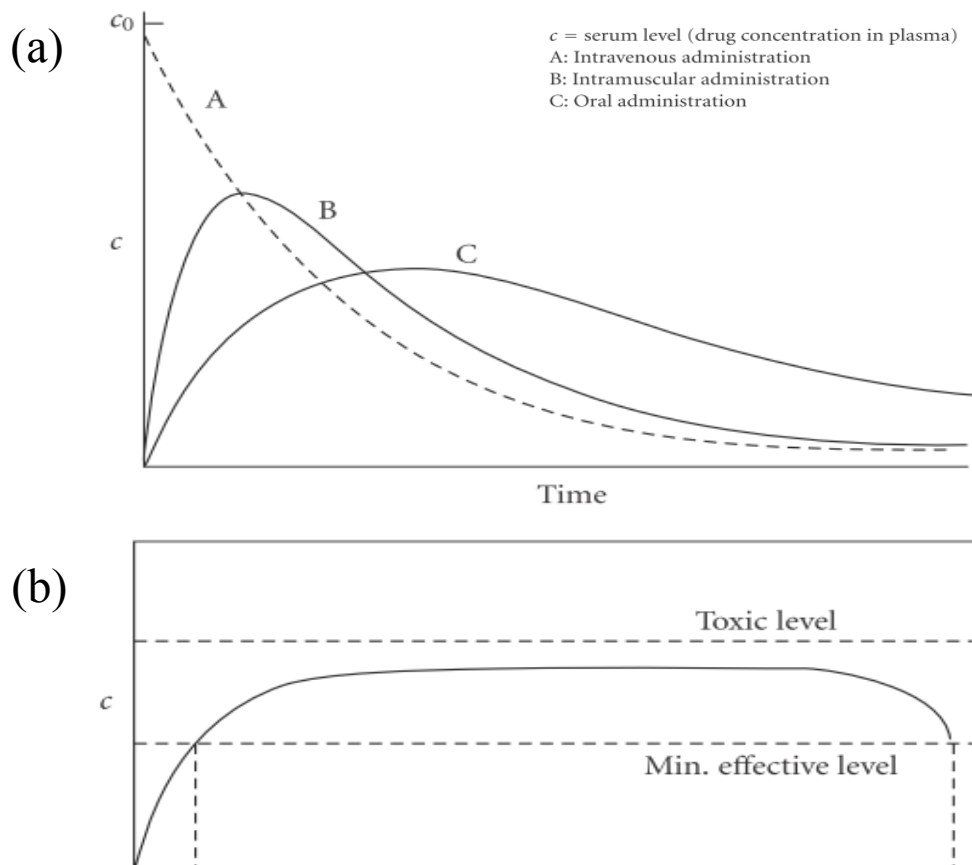
輝瑞的科學家曾經統計通過臨床一期的口服藥物特性，希望通過分析這些藥物的物化性質來得到其與藥物溶解度以及滲透性(permeability, 通過細胞膜等屏障的能力)的相關性，作為新藥篩選的參考。⁵ 以下是作者的結論，有下列特性的藥物可能因為溶解度以及滲透性不佳導致不能通過臨床一期藥物動力學以及生物分布(biodistribution)的測試：

1. 含有五個以上 H-bond donors 。
2. 分子量超過 500 。
3. Log P 大於 5 。
4. 超過十個 H-bond receptors 。

可以提供或接受氫鍵的基團太多會使得藥物分子不容易通過細胞膜以及腸胃道，

分子量太大以及 Log P (辛醇-水分配係數)太大都代表水溶性不佳，比較難抵達藥物在身體裡作用的位置；因此口服藥物需要有合適的親疏水性才會有較好的藥物動力學。這個規則並不是絕對的，比如一些抗生素可以透過細胞膜上的 transporter 運輸，就不在此限。⁵一些過於疏水的藥物只能搭配助溶並以劑靜脈注射的方式給藥，如抗癌藥物紫杉醇與他的助溶劑 Cremophor EL。這樣使用的缺點是助溶劑多少會有副作用，有安全性的疑慮。

由於現行藥物常碰到的藥物動力學問題，新的藥物傳遞科技如奈米藥物傳遞系統應運而生。奈米藥物傳遞系統不但可以改善這些問題，還有諸多其他優點，並且已經有獲得臨床許可的產品上市。²



圖一：典型的藥物在血液中之濃度對給藥後時間作圖 (a) 三種不同的給藥方式，(b)理想的緩釋型藥劑。¹



2.2 奈米藥物載體

以奈米藥物載體攜帶藥物基本上可以有下列優勢：1) 增加藥物的生物可利用性，即避免藥物在到達作用位置前，就被分解或是與其他分子產生化學反應失去活性；2)增加疏水藥物的 solubility/suspensibility；3)透過對組織、器官或腫瘤的專一性減少對身體其他正常組織或器官的副作用；4)增加 circulation time；5)可以在載體上做各種修飾增加不同功能(ex: targeting, imaging)，而不用改變藥物的分子結構；6)可以一次輸送不同的藥物而不用擔心不同藥物對血球蛋白的親和力是否影響藥物動力學。^{2,6} Table 1 是 Prof. Allen 對奈米藥物載體優點的整理(表中的 DDS 是 drug delivery system 的縮寫，但其實討論的只有奈米藥物載體)。

理想的奈米藥物載體大小應在 10-200 nm 之間，大於 10 nm 可以避免藥物載體被腎臟快速的排出體外⁷，小於 200 nm 則可以避免免疫系統的攻擊增加 circulation time⁸。此外，這個大小還能透過 enhanced permeability and retention effect (EPR effect) 使抗癌藥物累積在腫瘤，降低對正常組織及器官的副作用。奈米材料之大小可以穿過腫瘤周圍較為鬆散的微血管壁，進而在腫瘤部位造成局部藥物濃度的上升，使奈米級的藥物傳遞系統具有被動靶向性(passive targeting)。這個現象最初由 Matsumura 和 Maeda 兩位在 1986 年發表⁹，隨後被認為和腫瘤周圍的血管新生有關。腫瘤組織周圍旺盛的血管新生現象幫助腫瘤獲得許多養分以及氧氣供給腫瘤細胞快速的生長¹⁰⁻¹²，同時也造成腫瘤組織附近的血管壁較正常血管壁鬆散¹³。因此相較傳統藥物，奈米藥物載體只能穿透鬆散血管壁如腫瘤組織附近而不能夠自由穿透正常的血管壁，因此累積在腫瘤周圍，達到標靶腫瘤部位的效果。奈米藥物載體運用 EPR effect 的粒子有許多，包含微脂體¹⁴、micelles¹⁵⁻²²、dendrimers^{23, 24}、poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles (PLGA nanoparticles)^{25, 26}、hybrid nanoparticles²⁷ 等等。

表一：奈米藥物載體改善傳統藥物的缺點²



Problem	Implication	Effect of DDS
Poor solubility	A convenient pharmaceutical format is difficult to achieve, as hydrophobic drugs may precipitate in aqueous media. Toxicities are associated with the use of excipients such as Cremphor (the solubilizer for paclitaxel in Taxol).	DDS such as lipid micelles or liposomes provide both hydrophilic and hydrophobic environments, enhancing drug solubility.
Tissue damage on extravasation	Inadvertent extravasation of cytotoxic drugs leads to tissue damage, e.g., tissue necrosis with free doxorubicin.	Regulated drug release from the DDS can reduce or eliminate tissue damage on accidental extravasation.
Rapid breakdown of the drug in vivo	Loss of activity of the drug follows administration, e.g., loss of activity of camptothecins at physiological pH.	DDS protects the drug from premature degradation and functions as a sustained release system. Lower doses of drug are required.
Unfavorable pharmacokinetics	Drug is cleared too rapidly, by the kidney, for example, requiring high doses or continuous infusion.	DDS can substantially alter the PK of the drug and reduce clearance. Rapid renal clearance of small molecules is avoided.
Poor biodistribution	Drugs that have widespread distribution in the body can affect normal tissues, resulting in dose-limiting side effects, such as the cardiac toxicity of doxorubicin.	The particulate nature of DDS lowers the volume of distribution and helps to reduce side effects in sensitive, nontarget tissues.
Lack of selectivity for target tissues	Distribution of the drug to normal tissues leads to side effects that restrict the amount of drug that can be administered. Low concentrations of drugs in target tissues will result in suboptimal therapeutic effects.	DDS can increase drug concentrations in diseased tissues such as tumors by the EPR effect. Ligand-mediated targeting of the DDS can further improve drug specificity.

2.2.1 奈米藥物載體的發展現況

早期的奈米藥物載體研究現已有核准上市的产品，如 1995 年美國食品藥物管理局(FDA)核准的微脂體製劑 DOXIL、2005 年 FDA 核准的白蛋白作為藥物載體的 Abraxane 以及韓國食品藥物管理局核准的 PLGA nanoparticles Genexool-PM。這些产品都能有效的降低傳統上使用這些藥物帶來的副作用。例如 DOXIL 攜帶的 doxorubicin，原先對心血管有嚴重的副作用，因此在使用的劑量上必須審慎考慮；但以微脂體包裹後，可以明顯降低其對心血管的副作用，並增加藥物的 circulation half-life 以及療效。

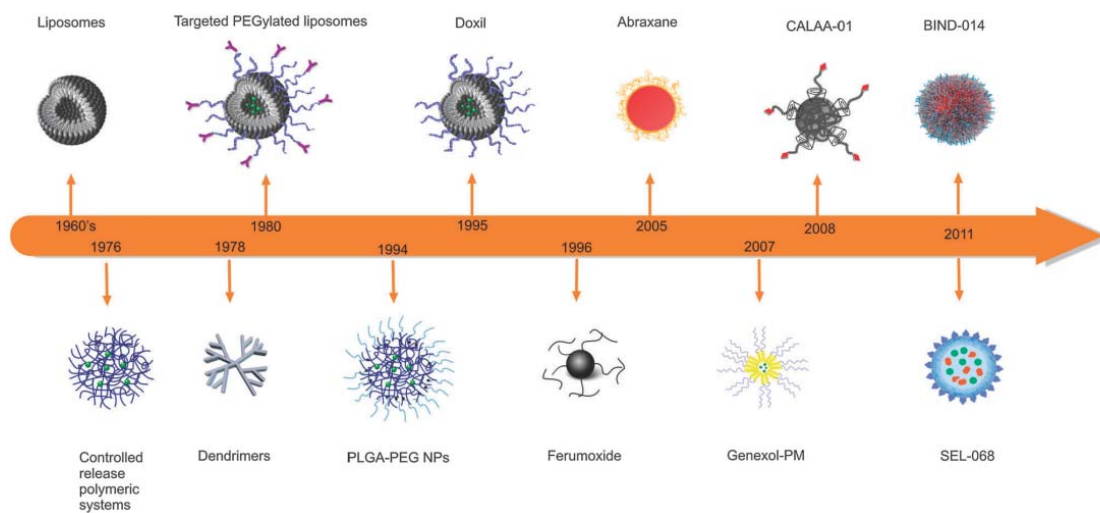
Abraxane 是第二種核准上市的奈米藥物載體，以白蛋白(albumin)結合抗癌藥物紫杉醇(paclitaxel)。與傳統使用助溶劑 Cremophor EL (Taxol)的製劑比較，Abraxane 在乳癌後期的病人有明顯較好的效果。²⁹除此之外，Abraxane 不使用助溶劑，減輕了來自助溶劑 Cremophor EL 的副作用。Genexol-PM 也是基於相同的理由發展的，但使用的是不同的奈米藥物載體，PLGA nanoparticle。這項产品已經在韓國、加拿大、澳洲等地上市，並已經在美國進行臨床二期的試驗。²⁹

具有主動標靶(active targeting)功能的奈米藥物載體被稱為是第二代的奈米藥物載體。這些載體靠著 ligand-receptor recognition 使奈米藥物載體被腫瘤細胞外大量表現的 receptor 給辨識，促使奈米藥物載體透過 receptor-mediated endocytosis 有選擇性的進入腫瘤細胞。這些 ligand 包含: folate³⁰⁻³⁴、transferrin³⁵⁻³⁷、epidermal growth factor^{38, 39}、RGD peptide⁴⁰⁻⁴² 或是 antibody⁴³。這些具有主動標靶功能的藥物載體，目前大多在臨床一期或二期。²⁹

更新一代的奈米藥物載體，利用奈米載體本身的可塑性，給予載體本身各式各樣的功能，使藥物不只有治療的一種用途，更可以結合光學顯影⁴⁴⁻⁵³、電腦斷層掃描^{47, 54-56}、X-ray 顯影⁵⁵、超音波顯影^{57, 58}、核磁共振造影^{45, 59-64} 達成 theranostic

的作用，在治療同時評估療效結果。⁶⁵ 另還有結合光熱治療、光動力治療、放射線治療等等的應用，展現了奈米藥物載體的未來的可能性。⁶⁵





圖三：奈米藥物載體的發展示意圖



2.3 粒線體

粒線體會和能量供應，細胞凋亡、生育能力、老化、性、體溫恆定、疾病有關。⁶⁶這是一個具有雙層膜以及自己的遺傳物質的胞器，是細胞呼吸作用的所在地以及細胞凋亡發起的中心。它是細胞內能量供應的核心，也是氧化壓力的主要來源，是一個非常重要的胞器，而非常重要也意味著和許多人類的疾病有關。粒線體的功能缺失分先天以及後天。先天的粒腺體缺失可能造成嬰兒猝死、生長遲緩、肌肉失去協調、視力或聽力問題、學習障礙、心血管疾病、身體重要臟器如肝腎等器官的問題以及呼吸困難。⁶⁷後天的粒腺體缺失和老化、癌症、心血管疾病、神經退化性疾病相關。⁶⁷粒線體和許多生命現象息息相關，也反映在學術界對粒腺體研究的投入上。自從發現粒腺體和細胞凋亡相關後開始，近二十年來和粒腺體有關的論文發表持續增長，就 2013 年而言，在論文資料庫 SCOPUS 中就有九千篇左右(請見圖四)。



Scopus

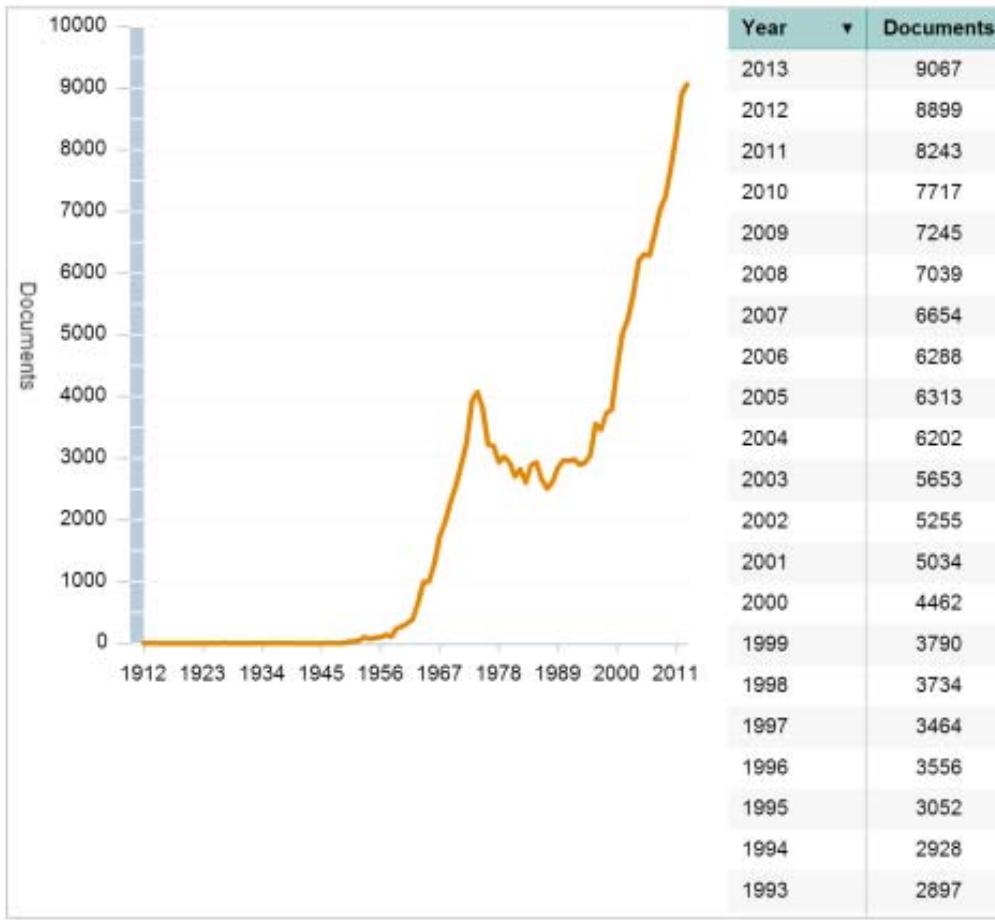
Print Analyze results by year

Date of Creation: 01 Jul 2014

Your query : TITLE-ABS-KEY(mitochondria) AND (EXCLUDE(PUBYEAR,2015) OR EXCLUDE(PUBYEAR,2014))


Year range : Only consider documents published from 1912 to 2013

This chart shows the total number of documents for this query by Year.



Copyright © 2014 Elsevier B.V. All rights reserved. Scopus™ is a trademark of Elsevier B.V.

圖 四：粒線體研究統計資料



雖然粒線體是如此重要，但是它的研究相對於另外一個重要的領域，即分子生物學來說，是困難重重。粒線體首先在十九世紀末被發現，一開始被認為是一種和細胞共生的細菌，之後隨著對呼吸作用的研究，才知道粒線體是細胞的能量工廠。德國科學家 Wabburg 發現細胞中會和氧反應的酵素。他從細胞中分離出其中的呼吸酶(respiratory ferment)，後來命名為細胞色素氧化酶(cytochrome c oxidase)，發現其會進行氧化還原作用並在沒辦法大量純化的情況下，以巧妙的方法定出呼吸酶的光譜。⁶⁷Wabburg 也因為對呼吸作用機制的貢獻而獲得 1931 年的諾貝爾生醫獎。但隨後關於粒線體與呼吸作用的研究陷入了瓶頸。雖然 Kerin、Kreb 等人紛紛解出呼吸作用的重要元件，諸如細胞色素及檸檬酸循環等⁶⁷，但是在這過程當中能量是如何儲存，而不是像燃燒一樣把能量全部釋放？一開始科學家認為呼吸作用中有一種高能的中間產物，由他把能量傳給 ATP，但這項中間產物從來沒有被分離出來過。這個問題困擾了整個研究呼吸作用的人三十年。直到 1960 年左右才由米歇爾提出化學滲透假說，引起無數同行的反駁與質疑，最後隨著支持的證據一一出現，化學滲透假說最後得到同行的認可，米歇爾並在 1978 年獲得諾貝爾化學獎，並且是唯一的受獎人。⁶⁷自此粒線體與呼吸作用的人密面紗才被揭開，請見圖五。最後沃克因為解出使用離子推動力製造 ATP 的 ATPase 結構，獲頒一九九七年的諾貝爾化學獎。⁶⁷

粒線體是細胞的死亡控制中心，細胞凋亡的控制中樞。不論是內因性、外因性，caspase dependent 或是 caspase independent 的細胞調亡，其核心的調亡機制都牽涉到粒線體內的蛋白質。細胞調亡一開始被研究變態的學者發現，因為線蟲發育的研究聲名大噪，也和癌化的進程有關，但直到 1995 年才知道控制這些計畫性死亡的竟然是粒線體，而不是細胞核。1995 科學家發現粒線體的膜電位去極化後出現含氧自由基大量生成，然後細胞走向調亡。^{68, 69}這些發現是內生性細胞調亡的

重要表現，抑制他們會延緩細胞凋亡。⁶⁹ 在失去粒線體膜電位之後，細胞色素 c 和其他蛋白質從粒線體是放到細胞質內，活化細胞內的蛋白酶分解細胞。細胞凋亡的示意圖請見圖六。



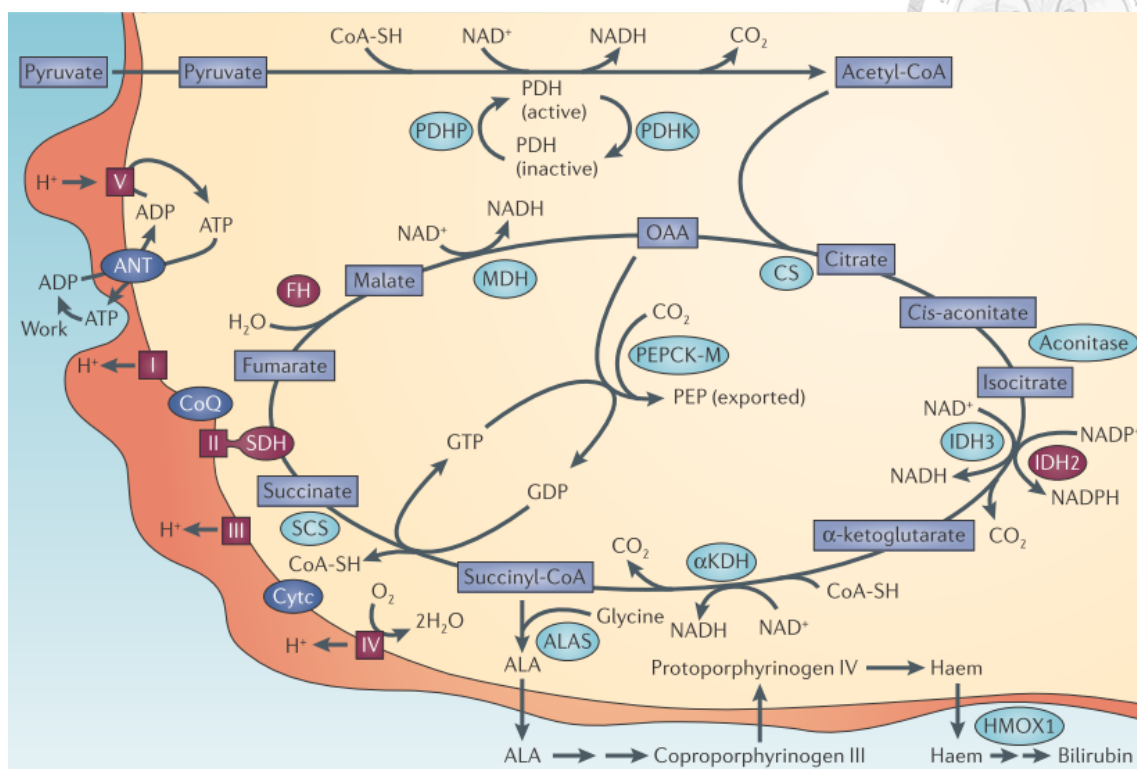


圖 五:呼吸作用示意圖,圖中包含醱解作用產生的 pyruvate 如何代謝成 Acetyl-CoA 進到檸檬酸循環;並且檸檬酸循環產生的 NADH 在電子傳遞鏈中的 complex I 中氧化成 NAD⁺, 提供源源不絕的電子不斷往下傳遞, 電子最終在 complex IV 中由氧氣接收變成水。電子傳遞鏈的過程不斷產生電動勢, 推動 complex V 合成 ATP。⁶⁶

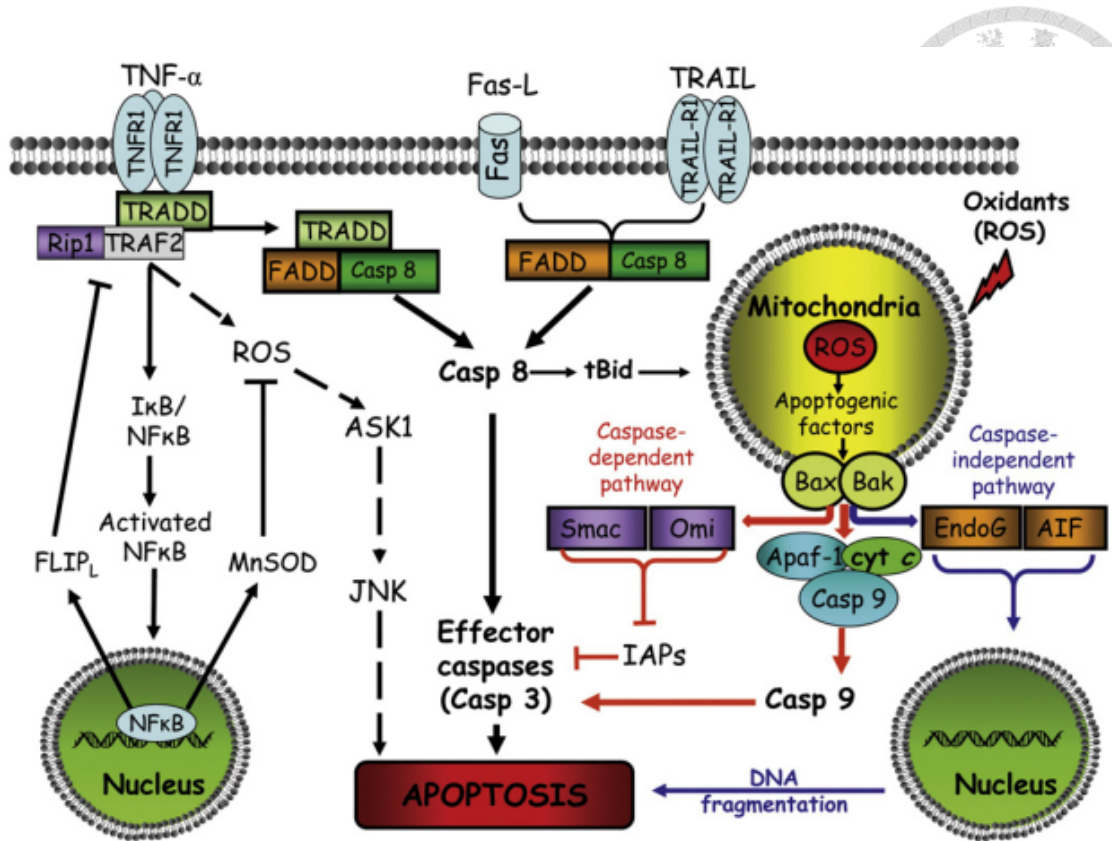


圖 六：細胞凋亡示意圖⁷⁰

2.3.1 粒線體與癌症

因為粒線體在能量代謝上以及細胞死亡扮演的重要角色，它的受損會和老化、癌症、心血管疾病、神經退化性疾病相關。目前已知粒線體受損的主因來自於它自身產生的氧化壓力。粒線體中進行的呼吸作用需要電子傳遞鏈上每個元件精密的配合，如果有些步驟速度變慢，電子就可能滲漏出來形成自由基。自由基會去攻擊粒線體的 DNA、蛋白質、磷脂質等等。而其中粒線體的遺傳物質並非像核內的 DNA 一樣受到良好的保護，直接暴露在自由基的攻擊之下。現在懷疑腫瘤細胞的粒線體可能有某種程度的突變影響癌細胞的代謝，也有許多的證據支持這樣的假設。⁶⁶

大約七十年前，Warburg 發現癌細胞在能量的產生上與正常細胞非常不同。在有氧氣的情況下，癌細胞仍會進行大量的無氧呼吸，這個現象被稱作 Warburg effect。^{66, 71} 雖然有少部分腫瘤細胞例外，但是其已經被應用在癌症的診斷上，利用具有同位素的葡萄糖類似物作為顯影劑，以正子造影偵測其累積的腫瘤部位。⁷² 後續研究 Warburg effect 的學者發現，有些與呼吸作用有關的 mtDNA 則有突變的情形(如 Succinate dehydrogenase、fumarate hydratase 等檸檬酸循環中的酵素)。⁶⁶ 在癌細胞的糖解作用方面，糖解作用第一步將葡萄糖磷酸化的蛋白 hexokinase II 被發現在癌細胞中會過量表現並結合在粒線體上，並與一些控制細胞凋亡的粒線體膜蛋白結合，可能具有抑制細胞凋亡的效果。⁷³



2.3.1.1 以粒線體為標靶之藥物發展

基於粒線體在癌症中的重要性，針對粒線體發展出來的抗癌藥物也就應運而生。現在主要有三個方向針對癌細胞中的粒線體作文章，分別是 1) 針對癌細胞的能量代謝；2) 針對粒線體中調控細胞凋亡的機制；3) 抑制粒線體中的電子傳遞鏈，造成 reactive oxygen species (ROS) 的上升。這三種方法都有發展不少藥物的候選者，而其中有些更是已經進入到臨床試驗。⁶⁸ 一些例子如圖七所示。

雖然科學界很早就對粒線體在癌症中扮演的角色有所了解，但是最早蓬勃發展出粒線體標靶分子的目的卻不是治療癌症，而是在老化研究方面。有一派的老化假說認為，老化是因為粒線體不斷的製造 ROS，使得粒線體不斷的受到損傷。這些學者認為，使用抗氧化劑去避免 ROS 造成粒線體損傷可以延緩老化的速度⁷⁴；這些嘗試後來並沒有太大的突破。這些嘗試失敗學者提出一項假說，可能不是這樣的策略有問題，而是抗氧化物質在進入到粒線體之前就已經和其他物質反應，因此沒有達到原先預期的效果。⁶⁷ 這樣的動機促使他們開始粒線體標靶分子以及其修飾在抗氧化物質的研究。雖然這樣的策略是否有效還不是很明確，但在標靶粒線體的分子上的確有一些研究成果。⁷⁴

這些分子可以分成兩類，lipophilic cation 和 mitochondria targeting peptide，如圖八。Lipophilic cation 同時具有可以自由穿梭在膜兩側的能力以及攜帶正電可以累積在帶負電的粒線體 matrix 中，因此具有標靶粒線體的能力。Mitochondria targeting peptide 的機制可能和 lipophilic cation 類似，或者是通過粒線体外膜的 transporter 運送到粒線體內。⁶⁸

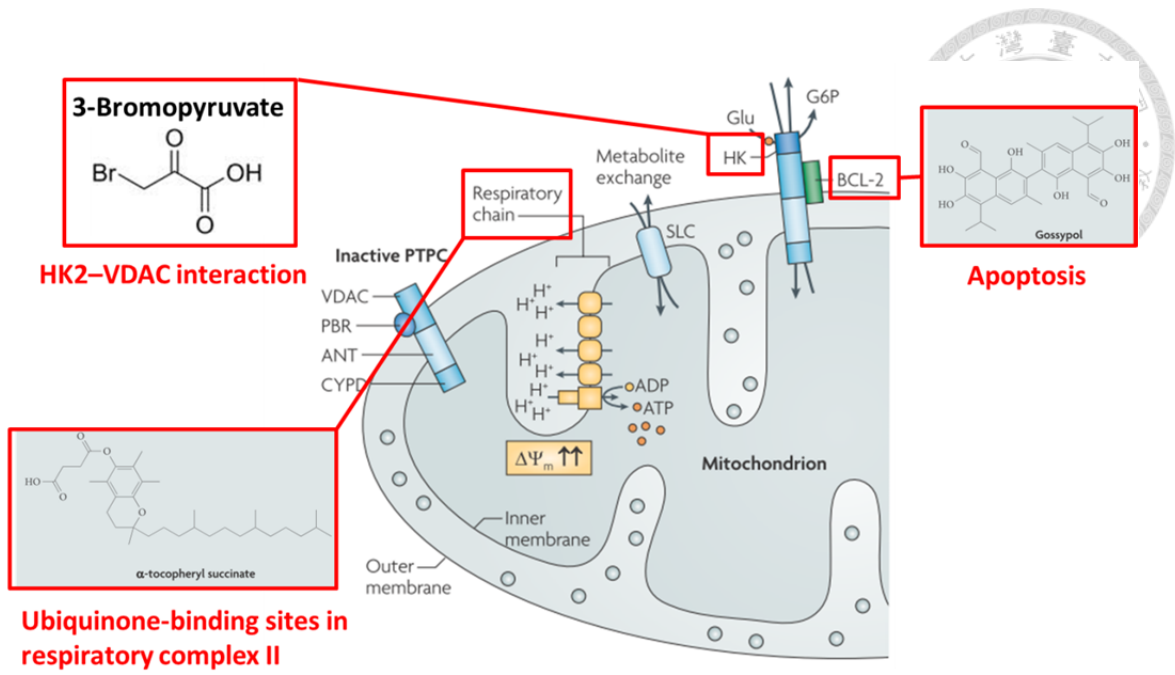


圖 七：以粒線體為標靶之抗癌藥物舉例⁶⁸

2.3.2 以粒線體為標靶之奈米藥物載體文獻回顧

近兩年來以粒線體為標靶之藥物載體整理如 Table 2 所示。這些奈米藥物載體大部分是採用修飾 lipophilic cation 的方法來 targeting 粒線體。其中最為傑出者是 Shanta Dhar 這名學者。雖然她投入這個領域的時間不久，但是對於一些以粒線體為標靶之奈米藥物載體是否真的達成他所宣稱的效果，Shanta Dhar 的證據是最具說服力的。在她 2012 年發表在 PNAS 的文章中，她以分離粒線體並以質譜儀分析奈米藥物載體攜帶的重金屬元素，做為評估標靶粒線體功效的方法。⁷⁵ 她以 PLGA 修飾 TPP 作為 model，建立了一個具有不同大小以及不同電性的奈米粒子 library。並發現奈米粒子大小越小，正電荷越多，越容易分布在粒線體。⁷⁵ 這個結論並沒有甚麼新奇之處，但是她是少數提供準確定量數據支持的人，如果看表中列出的其他例子，許多人仍用定性的方法證明他們的奈米藥物載體有抵達粒線體，其實並不是很嚴謹。

以電子穿透顯微鏡鑑定的證據，很難量化作為定量的數據，只能證明有少數以粒線體為標靶的奈米藥物有在粒線體中。而將粒線體分離出來以電子穿透顯微鏡鑑定，更有 artifact 之虞，因為分離粒線體的過程會有離心的步驟，無法排除細胞質中奈米粒子一起離下來的可能性。



表 二：近兩年以粒線體為標靶之奈米藥物載體整理

Author (*)	Material	Size	Zeta (mV)	Incubation time	Methods to assess MT targeting	Ref.
Shanta Dhar	PLGA-TPP	Systematic 79~200 nm	34	4-6 hr (confocal) 12 hr (ICPMS)	Confocal Fraction-> ICPMS	PNAS (2012) ⁷⁵
	Lipid capped PLGA-TPP	~123 nm	39	4 hr (confocal) 12 hr (ICPMS)	Confocal Fraction-> ICPMS, IVIS	PNAS (2013) ⁷⁶
Lu Wan-Liang	DQA- liposome	85 nm	1.93	24 hr	Confocal Fraction->flow	Biomaterials (2013) ⁷⁷
	DQA-liposome	65 nm	-0.52	4 hr (confocal) 6 hr (flow)	Confocal Fraction->flow	Biomaterials (2012) ⁷⁸
	TPP-liposome	83 nm	-0.09	4 hr	Confocal Fraction->flow	Biomaterials (2013) ⁷⁹
Maurizio Prato,Albe rto Bianco	MTS-CNT	直徑 30 nm 長 0.5 μm	no data	24 hr 20 min (isolated mitochondria)	TEM Mice liver mitochondria-> TEM*	Nanoscale, (2013) ⁸⁰
Wee Han Ang, Giorgia Pastorin	Rodamine123- CNT	直徑 30-60 nm 長 2-10 μm	no data	12 hr (confocal) 6 hr (TEM)	Confocal, TEM Fraction->TEM	Biomaterials (2014) ⁸¹



2.4 研究動機

目前的新藥開發以及現有藥物多面臨到藥物動力學不佳以及副作用過強等問題而中止臨床研究或是在使用上有疑慮，但透過奈米藥物載體來攜帶上述的藥物，有機會改善這些問題。以奈米藥物載體攜帶藥物有許多優點：1)奈米藥物載體可以透過 enhanced permeability and retention effect (EPR effect)使抗癌藥物累積在腫瘤，降低對正常組織及器官的副作用。2)可以使疏水性藥物均勻的分散在生物系統中，避免因使用助溶劑造成的副作用；3)可以在載體上做各種修飾增加不同功能(ex: targeting, imaging)，而不用改變藥物的分子結構。

近年來，以粒線體為標的開發抗癌藥物成為新一代癌症治療的重要研究方向。粒線體是細胞的能量以及死亡的調控中心，且腫瘤細胞粒線體的功能普遍異常，因此針對腫瘤細胞和正常細胞在代謝以及死亡調控上的顯著差異尋找標的，是重要的新藥發展策略。目前已經有多種以粒線體為標靶的藥物進入到臨床試驗階段。基於上述奈米藥物載體的優點，及以癌細胞粒線體為標靶之化學治療策略的發展，開發能有效運送藥物至粒線體之藥物載體有其必要性。

在本研究中，我們利用修飾有 triphenylphosphonium (TPP)分子之磷脂質來包覆金奈米粒子(phospholipid capped gold nanoparticles, PLGNP)表面，使其成為以粒線體為標靶之奈米粒子；並利用金奈米粒子可以透過感應耦合質譜儀(ICP-MS)準確量化的特點，來評估我們的修飾方法是否可以使奈米粒子有效地進入到粒線體。若 ICP-MS 測得的數據證明 PLGNP-TPP 可以有效地進入到粒線體，則此修飾策略將可應用到其他不同種類的奈米藥物載體上，並且 PLGNP-TPP 也有機會成為研究奈米粒子與粒線體功能等基础研究的重要工具。

第三章 實驗藥品與儀器



3.1 實驗藥品

Table 1：實驗藥品表單

藥品名稱, 縮寫	分子式/縮寫	製造廠商
Acrylamide/Bis solution		MDBio (Qingdao, China)
Ammonium persulfate	APS	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Bovine Serum Albumin	BSA	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Dimethyl Sulfoxide	DMSO	Fisher Chemico
EDTA-Trypsin		Gibco
Fetal Bovine Serum	FBS	Gibco
Glutamine		
Glycine		
Dulbecco's minimum essential medium	DMEM	Hyclone
N,N,N',N'-Tetra-methylethylenediamine	TEMED	Bio-Rad
Penicillin/streptomycin	PS	Biosource (Camarillo, MD, USA)
Thiazolyl blue tetrazolium bromide	MTT	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Tris-base		Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Tween 20		Sigma-Aldrich (St. Louis,

1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -3-phosphatidylcholine	DPPC	MO, USA) Avanti Polar Lipid (Alabaster, AL, USA)
1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3phosphoethanolamine- N-[amino(polyethylene glycol)-2000](ammoniumsalt)	DSPE-PEG ₂₀₀₀ - amine	Avanti Polar Lipid (Alabaster, AL, USA)
Dimethylformamide	DMF	J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)
Hydrogen tetrachloroaurate (III)	HAuCl ₄	Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA)
Sodium citrate		Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Sodium chloride	NaCl	Merck (Whitehouse Station, NJ, USA)
Sodium dodecyl sulfate	SDS	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
1-Dodecanethiol	1-DT	Fluka (St. Louis, MO, USA)
Hydrochloric acid	HCl	Riedel deHaen (Seelze, Germany)
Nitric acid	HNO ₃	Fluka (St. Louis, MO, USA)

1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (ammonium salt)	DPPE-PEG ₂₀₀₀	Avanti Polar Lipid (Alabaster, AL, USA)
Potassium phosphate dibasic	K ₂ HPO ₄	Riedel deHaen (Seelze, Germany)
Potassium phosphate monobasic	KH ₂ PO ₄	J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)
Triethylamine	TEA	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Dicyclohexylcarbodiimide	DCC	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
N-Hydroxysuccinimide	NHS	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
(3-Carboxypropyl)triphenylphosphonium bromide	CTPP	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

3.2 實驗儀器



Table 2：實驗儀器表單

儀器名稱, (英文, 縮寫)	廠牌型號
超聲波液體震盪器 (Ultrasonic Cleaner)	VWR scientific products, Aquasonic 75D (NY, USA)
動態光散射儀 (Dynamic light scattering, DLS)	Malvern Nano ZS (Worcestershire, UK)
高速離心機 (High speed centrifuge)	Hermle Z 36 HK (Wehingen, Germany)
冷凍乾燥機 (Freeze dryer)	Thermo Electron Corporation Modulyod-115 (MA, USA)
UV/vis 吸收光譜儀 (UV/vis spectrophotometer)	Varian Cary 300 UV-Vis Bio (Palo Alto, CA, USA)
螢光光譜儀 (Fluorescence spectrophotometer)	Varian Cary Eclipse (Palo, VIC, Australia)
微孔盤分析儀 (ELISA reader)	Tecan, Sunrise (Männedorf, Switzerland)

3.3 癌細胞株

Table 3：實驗細胞株表單

癌細胞株	所屬種類	取得來源
A-549	Human lung carcinoma	BCRC No.60074 (Hsinchu, Taiwan)

第四章 製備方法與鑑定



4.1 DSPE-PEG₂₀₀₀-TPP conjugate 合成

Reagents

Chemicals	Weight (mg)	mole	Molar ratio
CTPP (MW: 429.29)	11.6	27	17.3
PE-PEG ₂₀₀₀ -amine (MW: 2790.486)	40	14.4	1
DCC (MW: 206.33)	13.3	64.5	4.5
NHS (MW: 115.1)	7.4	64.5	4.5

1. 每毫升 chloroform 加入 20 μ L triethylamine，預混適當體積備用。
2. 準備一個圓底瓶，秤 11.6 mg CTPP (27 mmol) 先以 20 μ L DMSO 溶解後加入 1 mL triethylamine/chloroform, 13.4 mg DCC (64.5 mmol) 和 7.5 mg NHS (64.5 mmol)，室溫下攪拌 2hr。
3. 在第二個圓底瓶中加入 50 mg PE-PEG-amine (18 mmol) 和 2 mL chloroform (25 mg/mL)，將 lipid 加到步驟一的 CTPP 中，在室溫及氮氣環境下搖晃隔夜。
4. 減壓迴旋濃縮機抽去 chloroform。以 2 mL ddwater 回溶 lipid，加到 12-14K dialysis bag 中。(如果 dialysis bag 是新的，必須在使用前用大量 dH₂O 清洗及浸泡)
5. 準備一段透析管(dialysis tube)，長度為 $\frac{V \text{ mL}}{0.32} + 7 \text{ cm}$
 - i. 潤濕透析管並用大量一次水及二次水沖去 NaN₃
 - ii. 用透析專用的橘色夾一到兩個夾住底部，加入 lipid 溶液，在將頂部



夾住 (一邊夾兩個可確保夾緊避免在 dialysis 的過程中掉落)。量筒
內置入 600 mL 以上 ddH₂O，4°C 避光兩天，並定期換水。

- 6. Dialysate 凍乾後放-20°C 備用。
- 7. 以 NMR 鑑定 TPP 是否有接上 DSPE-PEG₂₀₀₀-amine。

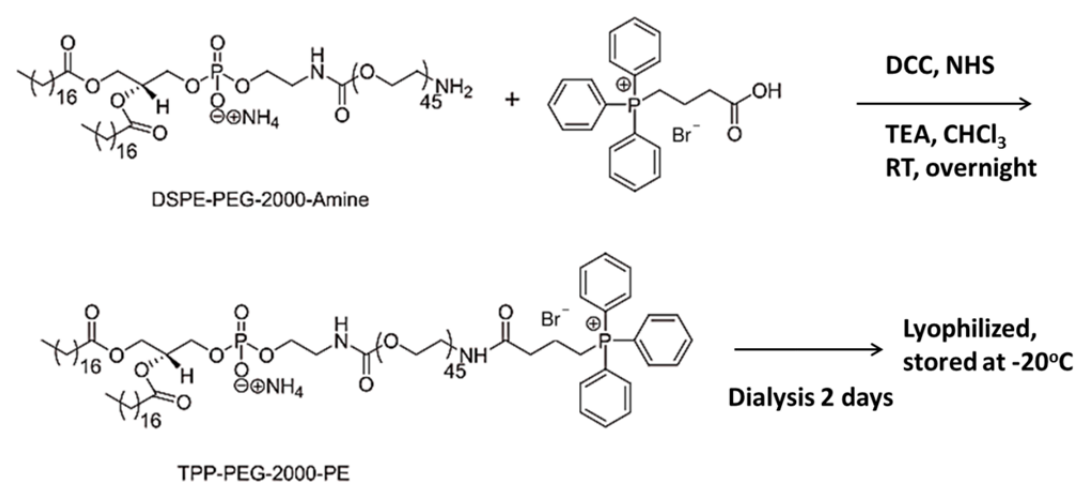


圖 九：DSPE-PEG₂₀₀₀-TPP 合成步驟流程圖



4.2 金奈米粒子製備

20 nm 金奈米粒子的合成是參考並修改自 Natan 等人的實驗步驟⁸²。合成前所有玻璃器皿都需要以王水(3:1 HCl/HNO₃)潤洗後再用大量去離子水以及二次水洗淨，避免重金屬汙染影響金奈米粒子之合成。詳細步驟如下：

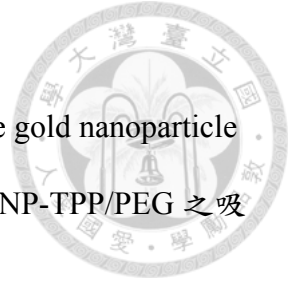
1. 取一 25 mL 圓底瓶，自 H₂AuCl₄ stock 溶液中取適量加水稀釋至體積 20 mL，濃度 1.71 mM。
2. 取 40 mg sodium citrate，以 1 mL 二次水溶解後備用
3. H₂Au Cl₄ 溶液水浴加熱至 95°C 並加入攪拌子攪拌，快速加入步驟 2 中的 sodium citrate 水溶液。
4. 此時可觀察到混和後的溶液先是黃色慢慢變澄清，隨後變黑，再變成酒紅色。顏色製酒紅色時繼續反應 15 min。
5. 移開水浴，金奈米粒子溶液繼續攪拌至冷卻。
6. 取 1mL 金奈米粒子溶液加到 Eppendorf 中，以 7000 rpm (約 3000 g) 離心 20 min，去除上清液，加入 0.7 mL DMF 回溶金奈米粒子。合成後的金奈米粒子若要進行 lipid capping，需要在一天內將溶劑置換成 DMF 保存，否則 lipid capping 容易失敗。



4.3 脂質包覆之金奈米粒子之製備

脂質包覆脂金奈米粒子的製備是參考實驗室先前的方法，並依據實驗的需要作修改⁸³。相較於先前的脂質包覆金奈米粒子，本論文中使用的脂質配方多了 DSPE-PEG₂₀₀₀-TPP 以及 DPPE-PEG₂₀₀₀，分別作為標靶粒線體以及對照組之用。合成的步驟如下：

1. 所有 lipid 以及 1-DT 放在 70°C 水浴備用。
2. 從上述 4.2 之 stock solution 中取 350 mL 金奈米粒子溶液加入 Eppendorf 中，70°C 水浴。
3. 在金奈米粒子溶液中加入 40 μ L DPPC (5mg/mL)及 120 μ L DSPE-PEG₂₀₀₀-TPP 或 DPPE-PEG₂₀₀₀ (1mg/mL)，等 5 min。
4. 加入 25 μ L 1-DT (625 μ M, in DMF)至金奈米粒子溶液中，70°C 水浴 1hr。
5. 加入 642 μ L 二次水(約 DMF 之 1.2 倍體積)，改變環境極性使 lipid 自組裝上金奈米粒子，70°C 反應 1hr。
6. 取出 Eppendorf，冷卻至室溫。
7. 以 12000 rpm (約 7000g 左右) 離心 20 min，去上清液。以二次水回溶金奈米粒子。重複此步驟至少三次以上以去除未自組裝到金奈米粒子的脂質及其他反應物。本論文稱合成完之脂質包覆金奈米粒子為 PLGNP-TPP 或 PLGNP-PEG (對照組)。



8. 參考 Thaxtan 等人在 2013 年 PNAS 的作法，以原始 bare gold nanoparticle 的吸光值估計脂質包覆金奈米粒子的濃度⁸⁴。測量 PLGNP-TPP/PEG 之吸收光譜，取吸收光譜的峰值並以 Beer's law:

$$A = \epsilon bc$$

A：吸光值

ϵ ：莫耳消光係數 ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)

b：樣品光徑長度 (cm)

c：樣品濃度 (M)

換算 PLGNP-TPP/PEG 之濃度。消光係數 $\epsilon_{\text{peak}} = 8.48 \times 10^8 (\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1})$ ，是參考 Mirkin 等人在 2006 年發表的數據⁸⁵。



4.3. 細胞實驗

人類肺腺癌細胞株是培養在添加了 10% FBS 及 1% penicillin/streptomycin 的 DMEM 培養液中，在 5% CO₂，37°C 環境下培養。每兩天繼代一次，繼代時的細胞約八到九分滿，即細胞與細胞外的在視野下的面積約 1:1 至 2:1。

4.3.1 細胞存活率測試

在餵藥的前一天，將 A549 細胞種 96-well plate 以 10000 cell/well，100 μL/well 的條件培養 24 hr。實驗當天先將 PLGNP 與 medium 預混，將各個 well 中的 medium 吸出後加入預混好的 PLGNP/medium，依實驗需求共培養不同的時間。共培養時間結束後，先將 medium 吸出，加入 50 μL PBS 潤洗兩次，洗去殘留之 PLGNP；此步驟要非常小心以免傷害細胞。加入 100 μL 與 MTT reagent 預混好之 medium 進行 MTT viability test。反應完成後移除 medium，加入 150 μL DMSO 在 shaker 上搖晃約 15 min，轉速以 DMSO 不濺出為準。以 ELISA reader 測 570 吸光值，以各時間之 control 組別之吸光值為存活率 100% 對各實驗數值 normalized 作圖。



4.3.2 偵測細胞內 ATP 含量

在餵藥的前一天，將 A549 細胞種 96-well plate 以 10000 cell/well，100 μ L/well 的條件培養 24 hr。實驗當天先將 PLGNP 與 medium 預混，將各個 well 中的 medium 吸出後加入預混好的 PLGNP/medium，培養 12hr。共培養時間結束後，先將 medium 吸出，加入 50 μ L PBS 潤洗兩次，洗去殘留之 PLGNP。ATP 之偵測是使用 PerkinElmer ATPlite™ 這個產品及所附的 protocol。這是一種利用 Luciferase 再有氧氣、ATP、substrate D-Luciferin 及催化劑 Mg^{2+} 時會產生螢光的反應來偵測 ATP。首先加入 50 μ L cell lysis solution 使 ATP 可以通過細胞膜到膜外；再加入 50 μ L substrate solution。反應完成以 plate reader 讀取螢光值，並用產品所附之 ATP 標準品製成之檢量線得到 ATP 之莫爾數。



4.3.3 粒線體膜電位之觀測

在餵藥的前一天，將 A549 細胞種 24-well plate 以 50000 cell/well，500 μ L/well 的條件培養 24 hr。實驗當天先將 PLGNP 與 medium 預混，將各個 well 中的 medium 吸出後加入預混好的 PLGNP/medium，培養 12hr。共培養時間結束後，先將 medium 吸出，加入 50 μ L PBS 潤洗兩次，洗去殘留之 PLGNP。粒線體膜電位之偵測是使用 Guava Technologies 的產品 Guava® EasyCyte™ MitoPotential™ Kit，參考 protocol 的指示使用。將 kit 中所附的 JC-1 dye 以新鮮的 medium 稀釋加入 well 中，共培養 30 min 後洗去 dye，以 PBS 潤洗兩次後在螢光顯微鏡下觀察。

4.3.4 細胞內酸性胞器染色

在餵藥的前一天，將 A549 細胞種 24-well plate 以 50000 cell/well，500 μ L/well 的條件培養 24 hr。實驗當天先將 PLGNP 與 medium 預混，將各個 well 中的 medium 吸出後加入預混好的 PLGNP/medium，培養 12hr。共培養時間結束後，先將 medium 吸出，加入 50 μ L PBS 潤洗兩次，洗去殘留之 PLGNP。將 Acridine orange 以新鮮的 medium 稀釋至 3 μ g/mL，染色 15 min 後移除 dye 並以 PBS 潤洗兩次。在螢光顯微鏡下觀察細胞內的酸性胞器。



4.3.5 西方點墨法

西方點墨法的步驟粗分為蛋白質萃取、蛋白質膠體電泳、蛋白質轉印以及抗體呈色。每個部份皆參考廠商建議的步驟，依照所要分析的蛋白質特性選擇合適的參數。蛋白質萃取步驟如下：

1. 將癌細胞培養於 6-well plate，待與奈米粒子共培養的實驗完成後，將細胞以 trypsin 處理，待細胞與培養盤的表面分離後，加入含血清的 medium 中指 trypsin 的反應，並離心分離細胞。
2. 去除上清液並以 PBS 使細胞重新懸浮，再離心一次，這樣可以去除先前步驟中的 serum 以及 trypsin。
3. 加入 100 μ L RIPA buffer (Radio Immuno Precipitation Assay buffer; 150 mM sodium chloride, 1.0% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH8.0) 及蛋白酶抑制劑(Sodium orthovanadate, 1mM; Leupeptin, 20 μ g/mL; PMSF, 100 μ g/mL)。RIPA buffer 可用於萃取 whole cell lysate、membrane bound protein、Nuclear protein 及 mitochondrial protein 等，適用於本研究要分析的所有蛋白質。
4. 在 4°C 下 sonicate 15 min，再以 4°C，12000 rpm 離心 30 min，核酸以及細胞碎片會在 Eppendorf 底部形成膠狀沉澱，而上清液即為 whole cell lysate。Lysate 可再-20°C 保存，但依蛋白質特性會有不同的保存時間，如果要測量易降解的蛋白質表現，如膜蛋白等，lysate 不能久放。最好馬上或一兩天內做完。
5. 取 3 μ L 之 lysate 以二次水稀釋至 30 μ L，以 Coomassie brilliant blue G250 定量蛋白質濃度。定量以 BSA 為標準品並參考廠商提供之步驟進行。




蛋白質膠體電泳的部分，是要上面萃取出來的蛋白質以膠體電泳方法按照分子量大小分離。其步驟如下：

1. 將 cell lysate 和 5x loading dye (DTT 77 $\mu\text{g}/\text{mL}$; SDS 0.1 g/mL ; Tris-base 0.5M, pH6.8; 50% Glycerol; 0.0015% Bromophenol Blue)混合並以 70°C 加熱 10 min (或是 100°C 5min)，加熱完後將樣品至於-20°C 冰箱快速冷卻，使用前離心使壁上樣品離下。這步驟將蛋白質降解，使其成為一級結構。加熱溫度的選擇是依蛋白質的需求根據廠商的建議做調整，因為 LC-3 是膜蛋白，使用較低的溫度可以避免膜蛋白變性聚集。
2. 鑄膠。依據下列表格配置 12%的 separation gel 以及 stacking gel：

12% separating gel (5mL)		Stacking gel(1mL)	
H₂O	1.6 mL	H₂O	0.7 mL
30% acrylamide	2 mL	30% acrylamide	0.16 mL
1.0 M Tris (pH8.8)	1.3 mL	1.0 M Tris (pH6.8)	0.125 mL
10% SDS	0.05 mL	10% SDS	0.01 mL
10% APS	0.05 mL	10% APS	0.01 mL
TEMED	0.002 mL	TEMED	0.001 mL

3. 將 running buffer (Tris-Base, 3g/L; Glycine, 14.4g/L; SDS, 1g/L)加入電泳槽外槽及內槽中，再把步驟一和 loading dye 反應完的蛋白質樣品根據實驗設計加到各自的 well 中。以 70 伏特電壓先跑 10 min 使蛋白質跑到上膠和下膠的分界，在以 100 伏特電壓繼續電泳直到 loading dye 的藍色色帶行進至膠片底部為止，約需要兩小時。



蛋白質轉印(electrotransfer)的部分，是要將膠片上的蛋白質轉印到 Polyvinylidene fluoride membrane (PVDF membrane)或是 Nitrocellulose paper 上。因為接下來 immunoblot 的步驟需要大量的搖晃及清洗，膠片容易碎裂，將蛋白質轉印到前述兩種膜上可以避免這樣的問題。將膠片取出，裁成合適的大小，蓋上與膠片大小相似(需事先剪裁過)的 PVDF membrane (事前需用 methanol 浸泡 2 min，避免轉印過程皺縮)，用兩張浸濕的濾紙夾住，再用轉印專用的海綿及卡夾固定並放入 Chamber 中。以 100 伏特跑 2 小時。組裝過程都在裝有 transfer buffer (Tris-Base, 3.1 g/L; Glycine, 14.4 g/L; Methanol, 20% in H₂O) 的容器進行。



Immunoblotting 的步驟如下：

1. 轉印完將 PDMF membrane 取出，裝載保鮮盒中以 5% blocking buffer (5% 脫脂牛奶溶於 TBS buffer 中)，在室溫下輕微搖晃 1 小時。
2. 移除 blocking buffer，以 TBS-tween buffer 清洗三次，每次輕微搖晃 10 分鐘。
3. 將一級抗體以 TBS-tween 按照廠商建議比例稀釋，以恰好淹過 membrane 的體積加入容器中。反應 1 小時。
4. 反應完後，如前清洗步驟清洗三次。
5. 加入二級抗體反應一小時，以恰好淹過 membrane 的體積加入容器中。
6. 清洗三次，最後加入 enhanced chemiluminescence 試劑和二抗上修飾的酵素進行反應，產生的冷光以冷光儀偵測並拍照。

第五章 結果與討論



5.1 DSPE-PEG₂₀₀₀-TPP conjugate 合成與鑑定

DSPE-PEG₂₀₀₀-TPP conjugate 的合成是利用 DSPE-PEG₂₀₀₀-amine 上的氨基和 CTPP 上的酸基反應形成醯胺鍵，反應加入 DCC 和 NHS 催化，並用透析法純化最後得到的產物。透析管的大小選擇 12-14K，這個大小可以留住 lipid 形成的 micelle 或是 liposome，但是沒有 conjugate 上的 CTPP 或其他反應物會因為分子量遠小於透析管的 cut off 值而擴散出透析管外。透析完後的產物凍乾並於-20°C 保存。

反應完成後以 NMR 鑑定最後的產物是否接上 TPP。TPP 上具有 aromatic hydrogen，在大約 7-8 ppm 會有 NMR 的訊號；因為 DSPE-PEG₂₀₀₀-amine 上沒有 aromatic hydrogen，所以如果 NMR 分析最後得到結果有這樣的訊號就代表修飾成功。分析的結果請見圖十。圖中是 CTPP 和產物的分析結果，可以發現 CTPP 上具有 aromatic hydrogen 約 7-8 ppm 的訊號，與預期相符；而且產物在相同位置也有訊號。另外注意到大約 3.6 ppm 的位置，文獻指出 PEG₂₀₀₀ 上長碳鏈的氫原子訊號會落在此處。⁷⁹ 我們的產物同時具有 DSPE-PEG₂₀₀₀ 以及 TPP 的訊號，又因為步驟中透析的過程去除了訊號來自兩者混合物的可能性，因此判斷 DSPE-PEG₂₀₀₀-TPP conjugate 的確有成功合成出來。




5.2 脂質包覆之金奈米粒子之製備與鑑定

製備 PLGNP-TPP 以及 PLGNP-PEG 的過程有置換穩定保護基(stabilizing ligand)，將檸檬酸置換成帶有硫基的 1-dodecanethiol。反應過程金奈米粒子缺少穩定保護基，因此實驗的各個條件關係到金奈米粒子是否會聚集。主要考慮的因素有：磷脂質的濃度、lipid 自組裝時水與 DMF 的比例、DSPE-PEG₂₀₀₀-TPP/PEG 的添加量。

磷脂質的濃度使用的依據如下：

1. 金奈米粒子的大小為 20 nm，一顆磷脂質所佔的表面積為 0.64 nm^2 。⁸⁶⁻⁸⁸
2. 以金的密度 19.3 g/cm^3 ，球的體積為 $\frac{4}{3} \pi r^3$ ，以及金的分子量 196.97 g/mol 計算，可得一顆 20 nm 金奈米粒粒子有 $3.70 \times 10^{-19} \text{ mol}$ 金原子，即 2.23×10^5 個金原子，此數據與文獻值接近。⁸⁹
3. 以實驗所使用的四氯金酸鹽總量為 $3.42 \times 10^{-5} \text{ mol}$ ，假設全部還原成金奈米粒子，由 2. 計算出之每個金奈米粒子所含之金原子數，可得每毫升金奈米粒子約有 4.62×10^{12} 顆金奈米粒子，即 $7.67 \times 10^{-9} \text{ M}$ 。
4. 以球的表面積 $4 \pi r^2$ 計算，20 nm 金奈米粒子的表面積約為 1256 nm^2 ，一顆 DPPC 表面積約是 0.64 nm^2 ，因此約需要 1.96×10^3 顆磷脂質可以鋪滿一顆金奈米粒子。
5. 由 3. 及 4. 可得，每毫升金奈米粒子約需要 9.06×10^{15} 顆磷脂質，即 $1.50 \times 10^{-8} \text{ mol}$ 。
6. 本實驗每次合成的金奈米粒子所需之磷脂質約為 $1.50 \times 10^{-8} \text{ mol}$ ，DPPC 的添加量約為 $2.54 \times 10^{-7} \text{ mol}$ ，lipid 約過量 17 倍左右。

水與 DMF 的比例決定了環境的極性，和 lipid 自組裝上 1-Dodecanethiol 修飾在金上的疏水性表面有關。這個過程成功與否大致決定合成是否成功。在此對 DMF 與水的比例做了最佳化的探討。之前實驗室的研究已經發現，比起 2:1、1:2，兩者比例 1:1 是較合適的比例。⁸³ 但進一步研究這個範圍內的其他參數，發現 1:1.2 可



能是較安全的一個比例。從圖十一中可以觀察到，1:0.8 有明顯顏色變紫的現象，而 1:1 和 1:1.2 兩組則維持原本金奈米粒子的紅色。這裡可以得知水必須和 DMF 相同比例或是稍微過量會有比較好的穩定性，而且因為 DMF 的沸點約 153°C 高於水的沸點，在熱水浴過程中可能因此水蒸發速度較快的現象，因此加稍微過量的水如 1:1.2 的比例會比較合適。之後也使用這樣的比例合成。

另外我們的 PLGNP-TPP 希望上面攜帶的 DSPE-PEG₂₀₀₀-TPP 在可以合成出來的前提下越多越好，因此對 DSPE-PEG₂₀₀₀-TPP/PEG 添加的量做了最佳化的研究。從圖十一中可以發現，添加到 150 µg/mL 的 DSPE-PEG₂₀₀₀-TPP 濃度時奈米粒子有明顯沉澱的現象，吸收光譜圖中的鑑定結果也發現這個組別的吸收鋒較寬(圖十二)，暗示有奈米粒子聚集造成吸收鋒變寬的結果。將這些組別的 PLGNP 以動態光散色儀做表面電荷的分析，預期將看到 PLGNP-TPP 的組別會較 PLGNP-PEG 的組別帶有更多的正電荷，而且隨著添加的 DSPE-PEG₂₀₀₀-TPP 量增加。鑑定的結果如圖十三。圖中的結果顯示，PLGNP-PEG 的各組別表面電荷沒有太大的差異，zeta potential 約在 -10 mV 左右，且整體而言都較 PLGNP-TPP 組帶較少正電。而 PLGNP-TPP 的各組隨著添加的 DSPE-PEG₂₀₀₀-TPP 量增加，有 zeta potential 越來越正的趨勢。根據以上結果，接下來選擇使用以合成條件為添加 DSPE-PEG₂₀₀₀-TPP µg/mL 的組別做接下來的實驗。

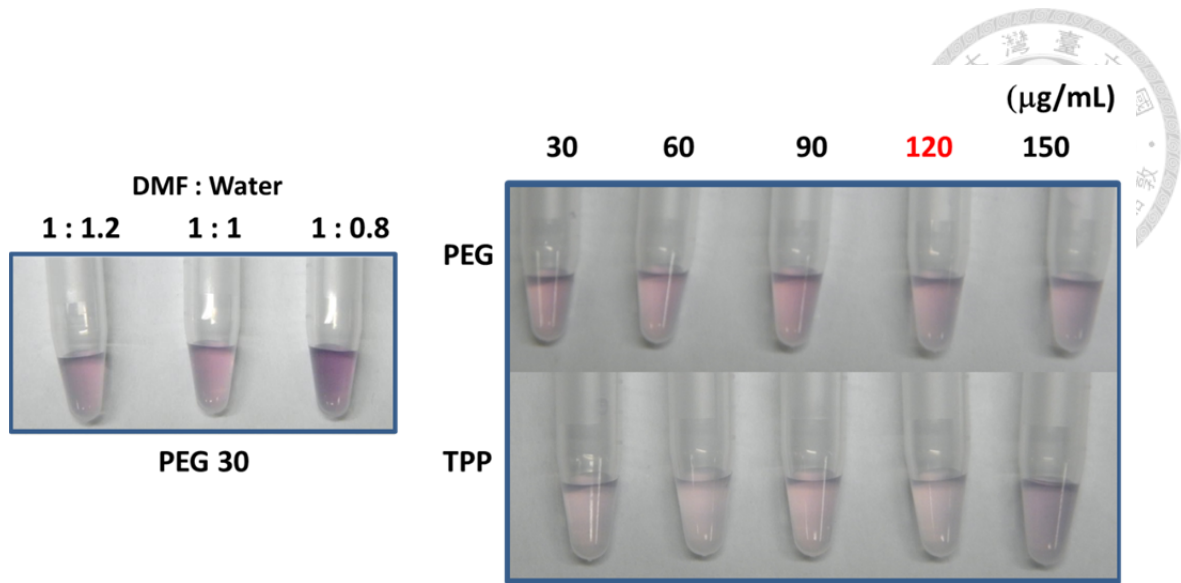


圖 十一：最佳化 PLGNP 合成過程中 DMF : Water 比例與 TPP lipid 添加量

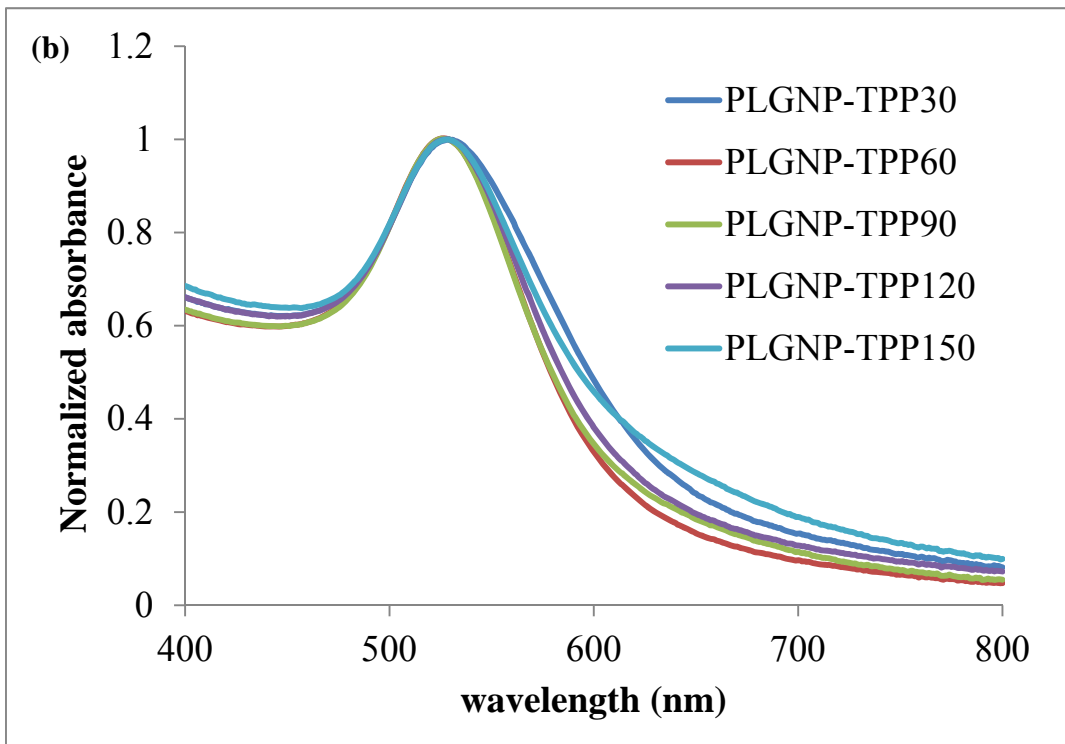
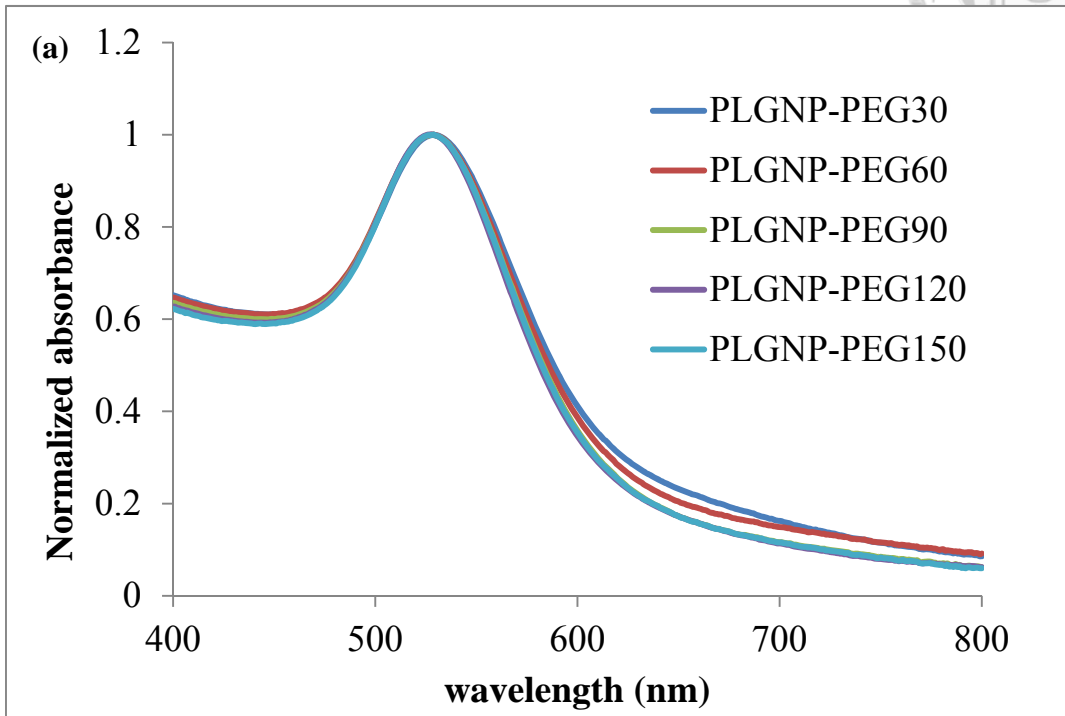


圖 十二：(a)PLGNP-PEG 之吸收光譜；(b)PLGNP-TPP 之吸收光譜

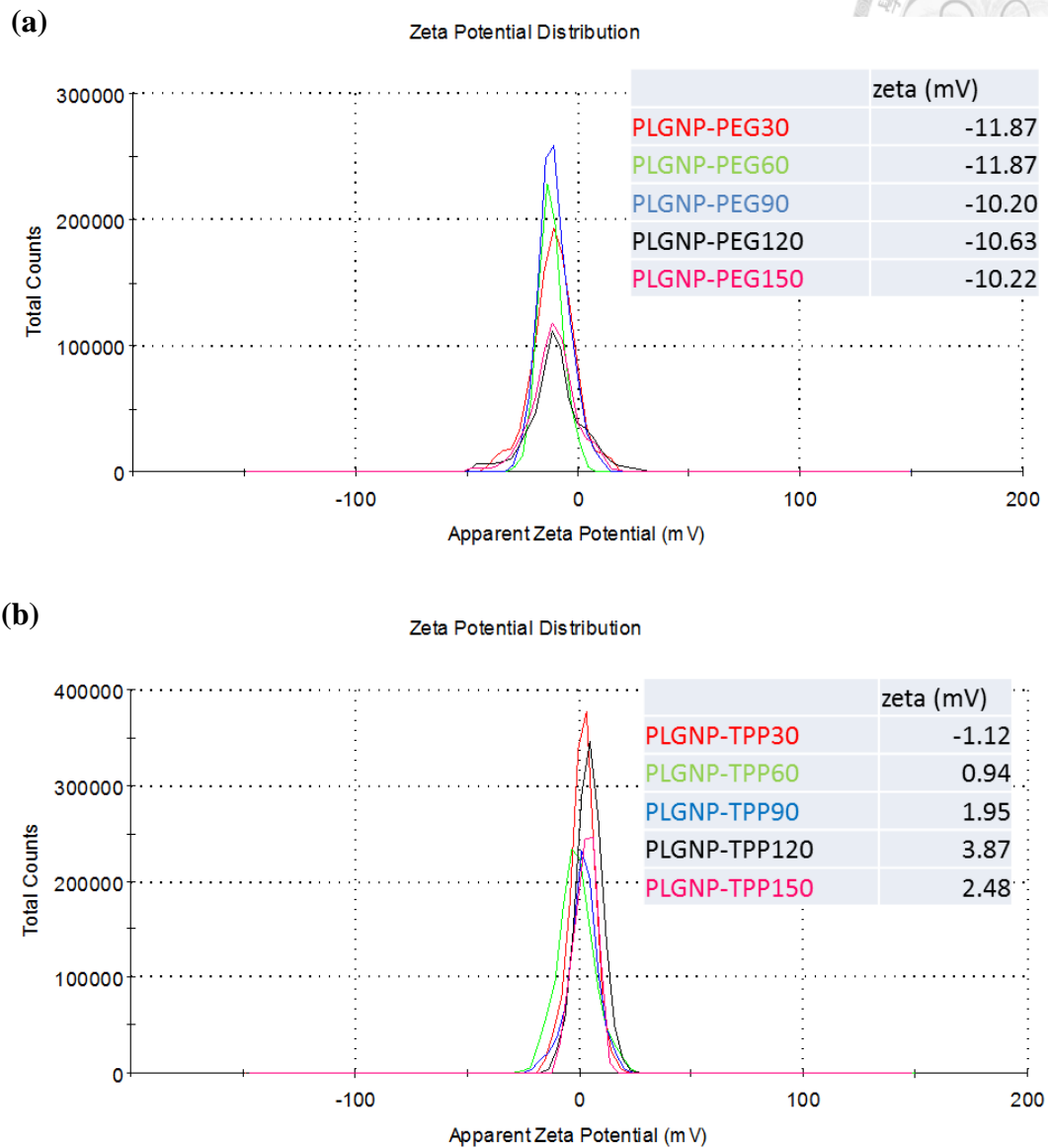
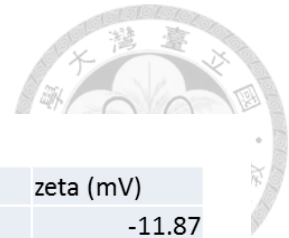


圖 十三：(a)PLGNP-PEG 以 DLS 量測 zeta potential 結果；(b) PLGNP-TPP 以 DLS 量測 zeta potential 結果



5.3 脂質包覆之金奈米粒子之穩定性測試

磷脂質包覆之奈米粒子可以增進其生物相容性，在水溶液中的穩定性，改善奈米粒子不耐鹽及分散性不佳容易沉澱等缺點。^{83, 84, 90, 91} 這些缺點在奈米藥物傳遞上是相當致命的，容易聚集的奈米粒子可能會造成血管堵塞，不只是無法將藥物送達作用位置，更可能造成嚴重的副作用。

我們將 PLGNP-PEG 和 PLGNP-TPP 在模擬生物環境的 buffer 以及 culture medium 中測試他們的穩定性。這些 buffer 分別是模擬人體鹽濃度的 PBS、模擬人體血液中白蛋白濃度的 PBS w/ 4% BSA、添加或沒有添加血清的 cell culture medium、模擬腫瘤組織 pH 值以及模擬 lysosome 內 pH 值的 PBS buffer。⁸³ 如果奈米粒子有聚集及沉澱的現象，我們會看到如圖十一中，溶液顏色變藍或是底部有沉澱的現象。實驗的結果如圖十四，可以發現不論是 PLGNP-PEG 和 PLGNP-TPP，在這些 buffer 中都有良好的穩定性，並沒有奈米粒子聚集造成顏色漸漸偏藍或是底部產生沉澱的現象。這樣的結果顯示我們的奈米粒子在細胞實驗中較不會受到奈米粒子不穩定而影響到實驗的結果。

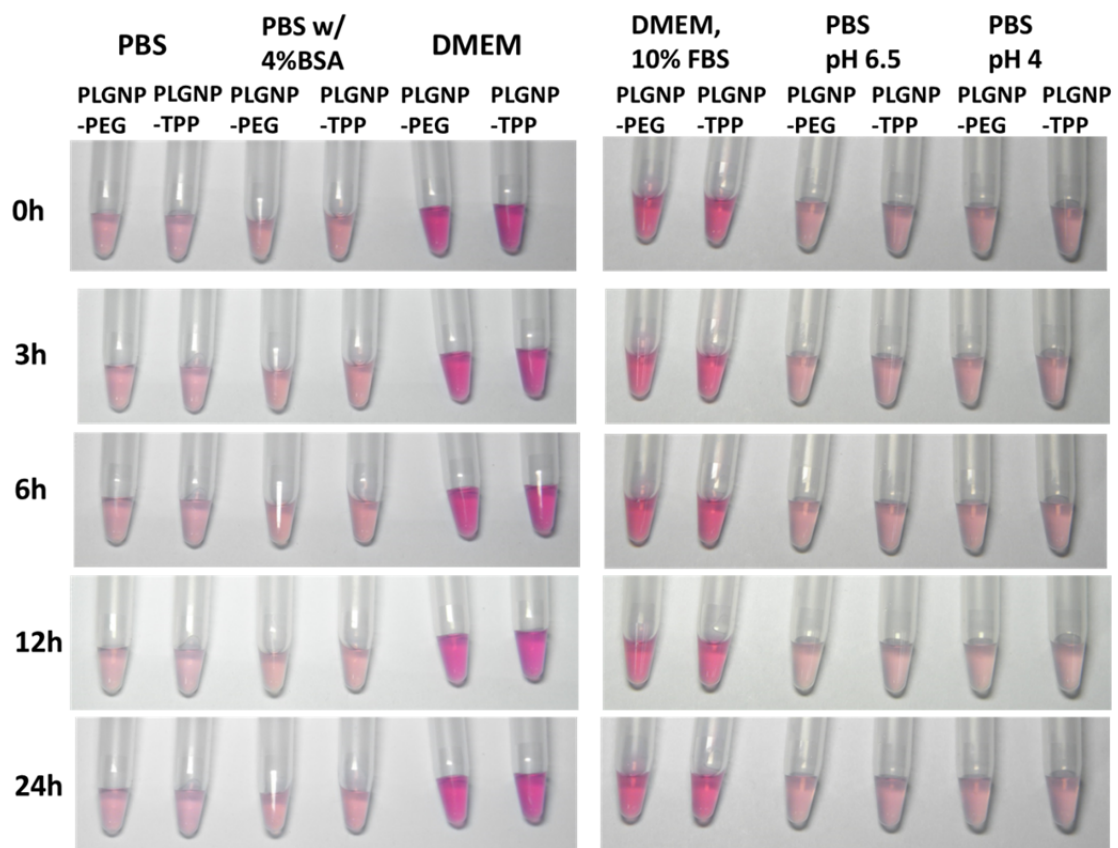


圖 十四：以模擬生物環境及 cell culture medium 的 buffer 測試 PLGNP-PEG 及 PLGNP-TPP 的穩定性



5.4 PLGNP-TPP 造成細胞存活率下降

將肺癌腫瘤細胞株 A549 與 PLGNP-TPP 共培養並偵測其細胞存活率來觀察 PLGNP-TPP 的毒性。在餵藥的前一天，將 A549 細胞種下並培養 24 hr。實驗當天先將 PLGNP 與 medium 預混，將各個 well 中的 medium 吸出後加入預混好的 PLGNP/medium，依實驗需求共培養 3-24 小時。共培養時間結束後，進行 MTT viability test。以 ELISA reader 測 570 nm 吸光值，以各時間之 control 組別之吸光值為存活率 100% 對各實驗數值 normalized 作圖如圖十五。可以觀察到與 PLGNP-PEG 共培養的控制組其最高濃度培養最長時間 24 小時的存活率大約在 85% 以上，顯示 PLGNP-PEG 沒有明顯的細胞毒性。但是觀察共培養 PLGNP-TPP 的實驗組可以發現，細胞存活率似乎隨著 PLGNP-TPP 濃度增加以及共培養時間增加有下降的趨勢。但是存活率的下降似乎有極限，大約在存活率 60% 左右再增加劑量或是共培養時間也不會造成更顯著的結果。

這樣的結果顯示 PLGNP-TPP 具有有限的細胞毒性，而關於以粒線體為標靶的奈米藥物載體文獻中，對這類型的奈米藥物載體造成的細胞毒性著墨相當少。^{75, 77, 78, 80} 基於我們的發現以及以上理由，我們認為研究以粒線體為標靶的奈米藥物載體造成的細胞毒性是重要的，無論是將來在這類型的藥物載體設計上或使用上，都需要這方面的研究提供改良的參考。因此以下對此做進一步的探討。

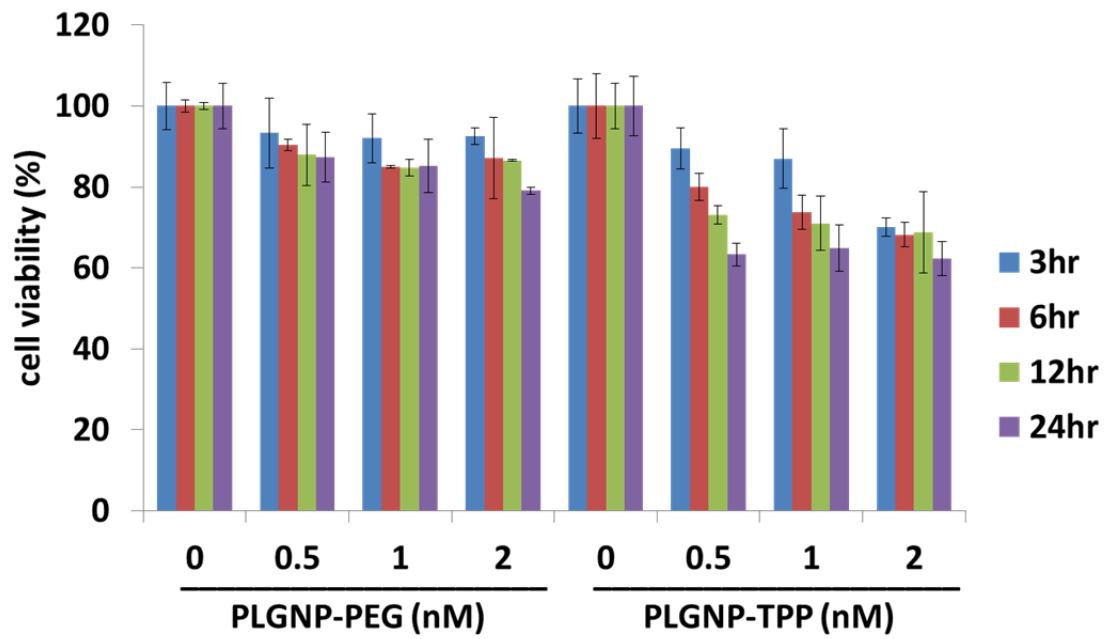



圖 十五：A549 肺癌腫瘤細胞與 PLGNP-TPP 共培養後對其細胞存活率作圖

5.5 PLGNP-TPP 造成細胞內 ATP 含量下降



因為 PLGNP-TPP 是一種以粒線體為標靶的奈米藥物載體，因此我們懷疑其造成的細胞毒性是來自對粒線體的傷害。粒線體受損的其中一個指標是細胞內的 ATP 含量下降。我們以 ATPlite 這個市售的 kit 測量細胞內 ATP 的含量。這是一種利用 Luciferase 在有氧氣、ATP、substrate D-Luciferin 及催化劑 Mg^{2+} 時會產生螢光的反應來偵測 ATP 的方法。首先加入 50 μ L cell lysis solution 使 ATP 可以通過細胞膜到膜外；再加入 50 μ L substrate solution 與 ATP 反應。反應完成後以 plate reader 讀取螢光值，並用產品所附之 ATP 標準品製成之檢量線得到 ATP 之莫爾數。為了避免各個組別細胞數目不一造成的 ATP 差別(如此一來 ATP 含量不同就可能只是細胞數不同)，因此測量各個 well 的蛋白質量來對 ATP 結果進行 normalize。結果如圖十六。可以發現與 PLGNP-TPP 共培養 12 小時的組別，其每 μ g 蛋白質所含的 ATP 莫爾數隨著 PLGNP-TPP 劑量的增加而減少。

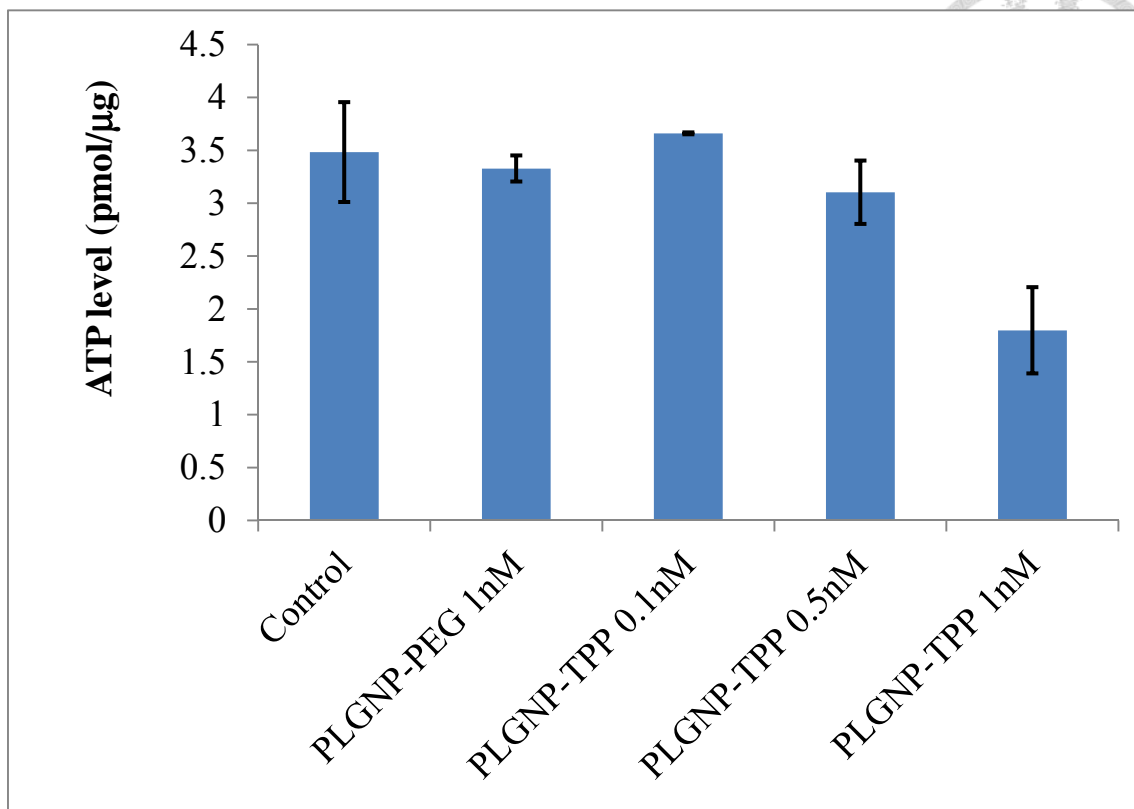


圖 十六：與 PLGNP-TPP 共培養後細胞內 ATP level 偵測



5.6 粒線體膜電位之觀測

健康的粒線體其內膜上的電子傳遞鍊正常運作，將 matrix 中的氫離子運送到 intermembrane space 形成推動 ATPase 的產生 ATP 電動勢(請見圖五)。粒線體的受損會使粒線體失去這樣的電動勢，這個現象可以用 lipophilic cationic dye 來觀測；JC-1 即是這一類的 dye，其結構式如圖十七。這是一個 membrane potential sensitive dye，excitation 是 490 nm，並有 527 nm 的放光。當 JC-1 累積在膜電位正常的粒線體 matrix 中，其會形成 J-aggregate 並且放光光譜會改變，從原本 527 nm 的綠光紅移到 590 的紅光，因此可以用來觀察粒線體的膜電位是否正常。正常細胞的粒線體在 JC-1 染色下會呈現紅色，失去粒線體膜電位的則會呈現綠色。以 JC-1 染色觀察與 PLGNP 共培養的 A549 細胞粒線體受損的結果如圖十八。可以看到與 PLGNP-TPP 共培養的組別的 A549 細胞有粒線體失去膜電位的現象，和之前所述 ATP level 下降的結果一起指向 PLGNP-TPP 可能會造成粒線體的損傷。

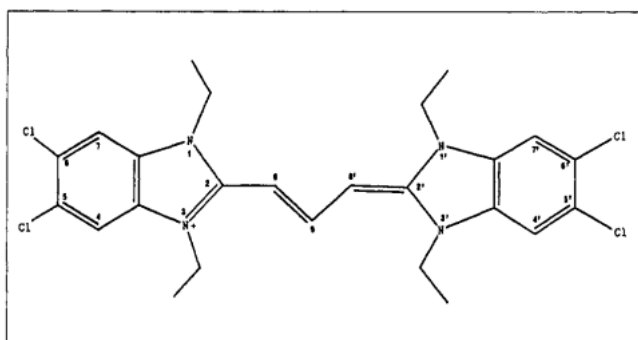


圖 十七：JC-1 結構式⁹²

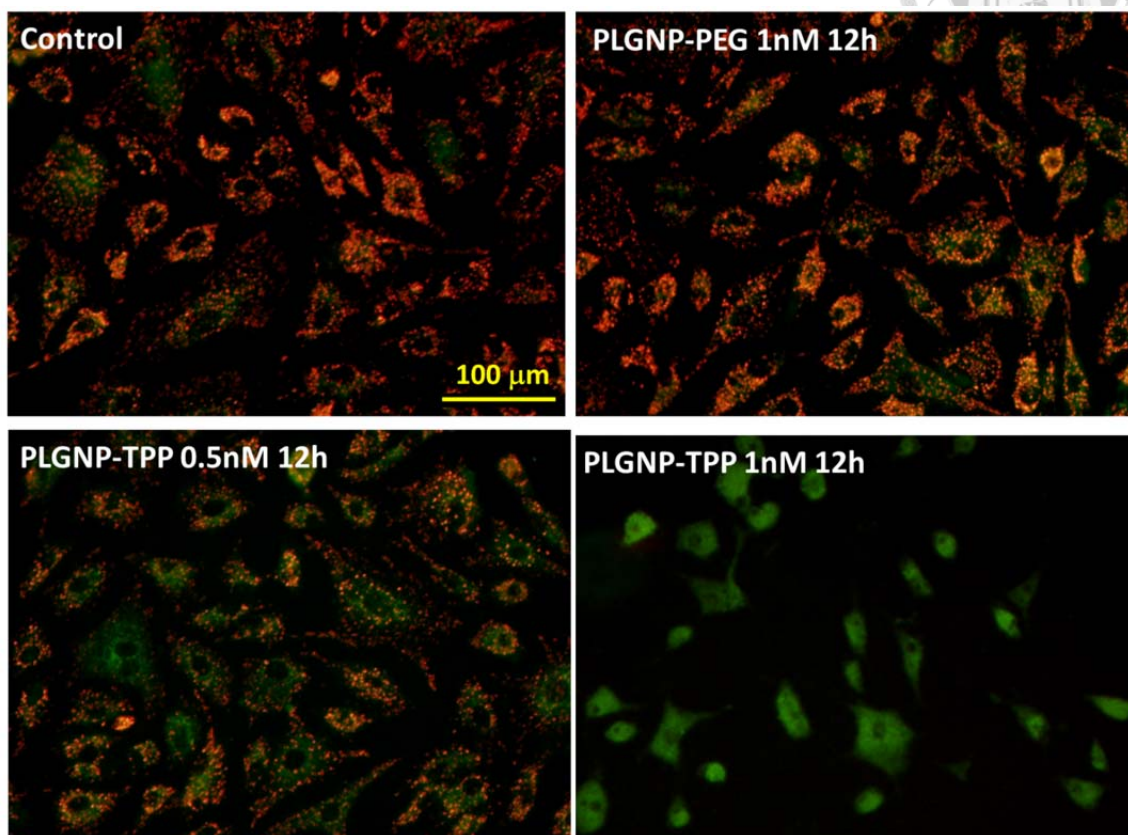
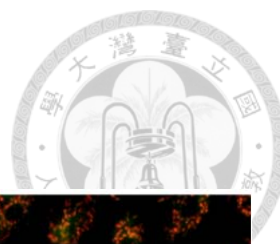


圖 十八：以 JC-1 染色觀察與 PLGNP 共培養的 A549 細胞粒線體受損



5.7 PLGNP-TPP 活化細胞自噬

細胞中針對粒線體受損有一套處理的機制，受損的粒線體會被細胞自噬清除以維持細胞內整體粒線體的正常功能。⁶⁹ 因此接下來我們觀察細胞自噬活化的現象是否會在和 PLGNP-TPP 共培養後的 A549 細胞中產生。我們以兩種方法觀察細胞自噬是否增加，第一種是酸性胞器染色，第二種是觀察細胞自噬的 marker，即 LC3 的表現。酸性胞器的染劑使用的是 acridine orange，在酸性胞器內會呈現紅色，在細胞質呈現綠色。這是一個初步判別細胞自噬產生的 autophagosome 有沒有增加的方法，但無法排除其他酸性胞器如 lysosome 的影響，結果如圖十九(a)。結果顯示 PLGNP-TPP 1nM 共培養 12 小時後 A549 細胞中的酸性胞器似乎有增多。以西方點墨法觀察 LC3 的表現，我們發現，與 PLGNP-TPP 共培養後的細胞有活化細胞自噬的現象。LC3 在正常情況下在細胞質內，但細胞自噬被活化後會和 autophagosome 上的 phosphatidylethanolamine conjugate 在一起⁹³，即圖十九(b) 中標示的 LC3II。觀察細胞自噬的 marker LC3 的表現後我們發現，與 PLGNP-TPP 共培養後的細胞有活化細胞自噬的現象。

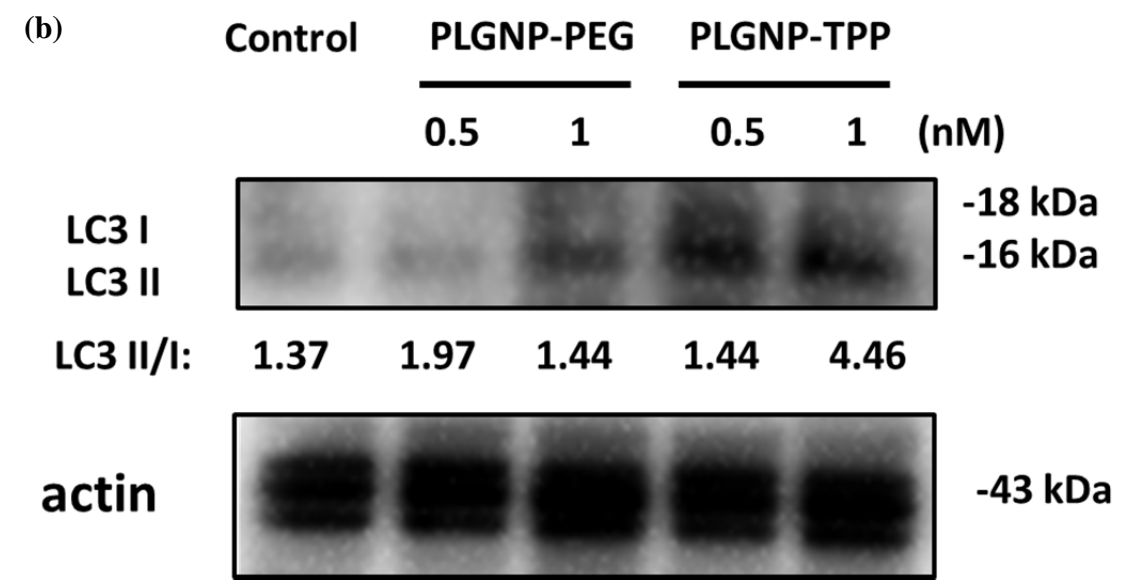
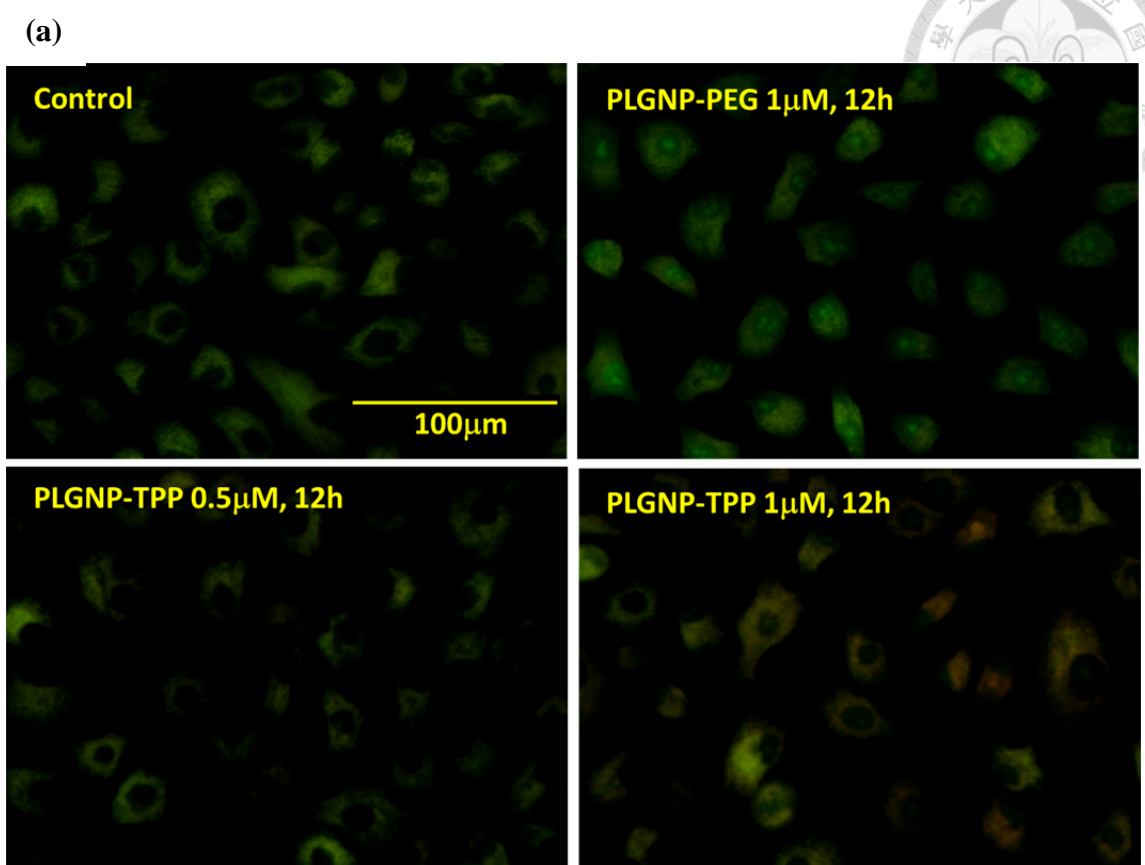
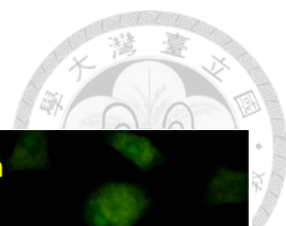


圖 十九：PLGNP-TPP 活化細胞自噬(a)酸性胞器染色結果，(b)細胞自噬 maker LC3 western blot 結果

第六章 結論與未來展望



在本研究中，我們利用修飾有 TPP 分子之磷脂質來包覆金奈米粒子 PLGNP 表面，使其成為以粒線體為標靶之奈米粒子；並利用金奈米粒子可以透過感應耦合質譜儀(ICP-MS)準確量化的特點，來評估我們的修飾方法是否可以使奈米粒子有效地進入到粒線體。通過合成方法的最佳化，目前已經合成出適合用來做細胞實驗的 PLGNP-TPP。下一步將會使癌細胞與 PLGNP-TPP 共培養後，分離出粒線體並用 ICP-MS 評估其進入到粒線體的效率。若 ICP-MS 測得的數據證明 PLGNP-TPP 可以有效地進入到粒線體，則此修飾策略將可應用到其他不同種類的奈米藥物載體上。

本研究也嘗試利用有無粒線體標靶分子修飾之 PLGNP 來闡明金奈米粒子對粒線體功能的影響。在細胞存活率試驗(MTT assay)發現 PLGNP-TPP 會影響 A549 肺癌細胞的存活率，進一步測試和粒線體活性有關的指標，發現細胞中的 ATP level 下降，並有粒線體膜電位失常等現象，兩者的結果一起指向 PLGNP-TPP 可能因為其會標靶粒線體的功能而造成粒線體的損傷，但詳細的機制仍需進一步釐清。細胞中針對粒線體受損有一套處理的機制，受損的粒線體會被細胞自噬清除以維持細胞內整體粒線體的正常功能。觀察細胞自噬的 marker LC3 的表現後我們發現，與 PLGNP-TPP 共培養後的細胞有活化細胞自噬的現象。以上的結果支持我們的假設，PLGNP-TPP 可能會造成細胞中粒線體的受損，並開啟細胞中修復粒線體受損的機制。詳細的過程還需要更進一步研究，以判斷 PLGNP-TPP 或是其他以粒線體為標靶的奈米藥物載體在使用上需注意的事項或是所需要的改良。

參考文獻



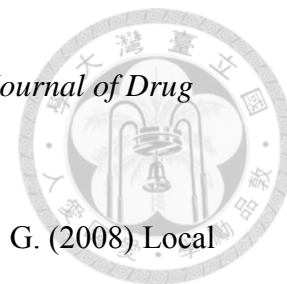
1. Neuse, E. W. (2008) Synthetic Polymers as Drug-Delivery Vehicles in Medicine, *Metal-Based Drugs 2008*.
2. Allen, T. M., and Cullis, P. R. (2004) Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream, *Science 303*, 1818-1822.
3. Straub, J. A., Chickering, D. E., Lovely, J. C., Zhang, H., Shah, B., Waud, W. R., and Bernstein, H. (2005) Intravenous Hydrophobic Drug Delivery: A Porous Particle Formulation of Paclitaxel (AI-850), *Pharmaceutical Research 22*, 347-355.
4. Roden, D. M. (2012) Chapter 5. Principles of Clinical Pharmacology, In *Harrison's Principles of Internal Medicine, 18e* (Longo, D. L., Fauci, A. S., Kasper, D. L., Hauser, S. L., Jameson, J. L., and Loscalzo, J., Eds.), The McGraw-Hill Companies, New York, NY.
5. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., and Feeney, P. J. (1997) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Advanced Drug Delivery Reviews 23*, 3-25.
6. Kamaly, N., Xiao, Z., Valencia, P. M., Radovic-Moreno, A. F., and Farokhzad, O. C. (2012) Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation, *Chemical Society Reviews 41*, 2971-3010.
7. Venturoli, D., and Rippe, B. (2005) Ficoll and dextran vs. globular proteins as probes for testing glomerular permselectivity: effects of molecular size, shape, charge, and deformability, *American Journal of Physiology. Renal Physiology*



- 288, F605-613.
8. Yuan, F. (1998) Transvascular drug delivery in solid tumors, *Seminars in Radiation Oncology* 8, 164-175.
 9. Matsumura, Y., and Maeda, H. (1986) A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs, *Cancer research* 46, 6387-6392.
 10. Dvorak, H. F. (2002) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy, *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 20, 4368-4380.
 11. Guidi, A. J., Schnitt, S. J., Fischer, L., Tognazzi, K., Harris, J. R., Dvorak, H. F., and Brown, L. F. (1997) Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in patients with ductal carcinoma in situ of the breast, *Cancer* 80, 1945-1953.
 12. Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., and Hori, K. (2000) Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review, *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society* 65, 271-284.
 13. Lembo, D., and Cavalli, R. (2010) Nanoparticulate delivery systems for antiviral drugs, *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 21, 53-70.
 14. Torchilin, V. P. (2005) Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers, *Nature Reviews. Drug Discovery* 4, 145-160.
 15. Murakami, Y., Yokoyama, M., Okano, T., Nishida, H., Tomizawa, Y., Endo, M.,



- and Kurosawa, H. (2007) A novel synthetic tissue-adhesive hydrogel using a crosslinkable polymeric micelle, *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* 80, 421-427.
16. Ponta, A., and Bae, Y. (2010) PEG-poly(amino acid) block copolymer micelles for tunable drug release, *Pharmaceutical research* 27, 2330-2342.
 17. Kim, S. H., Jeong, J. H., Lee, S. H., Kim, S. W., and Park, T. G. (2008) LHRH Receptor-Mediated Delivery of siRNA Using Polyelectrolyte Complex Micelles Self-Assembled from siRNA-PEG-LHRH Conjugate and PEI, *Bioconjugate Chemistry* 19, 2156-2162.
 18. Al-Abd, A. M., Lee, S. H., Kim, S. H., Cha, J. H., Park, T. G., Lee, S. J., and Kuh, H. J. (2009) Penetration and efficacy of VEGF siRNA using polyelectrolyte complex micelles in a human solid tumor model in-vitro, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 137, 130-135.
 19. Rajendran, R., Williams, C., Lappin, D. F., Millington, O., Martins, M., and Ramage, G. (2013) Extracellular DNA release acts as an antifungal resistance mechanism in mature *Aspergillus fumigatus* biofilms, *Eukaryotic cell* 12, 420-429.
 20. Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y., Suwa, S., and Kataoka, K. (1996) Introduction of cisplatin into polymeric micelle, *Journal of Controlled Release* 39, 351-356.
 21. Yokoyama, M., Opanasopit, P., Okano, T., Kawano, K., and Maitani, Y. (2004) Polymer design and incorporation methods for polymeric micelle carrier system



- containing water-insoluble anti-cancer agent camptothecin, *Journal of Drug Targeting* 12, 373-384.
22. Kim, S. H., Jeong, J. H., Lee, S. H., Kim, S. W., and Park, T. G. (2008) Local and systemic delivery of VEGF siRNA using polyelectrolyte complex micelles for effective treatment of cancer, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 129, 107-116.
23. Patil, M. L., Zhang, M., Taratula, O., Garbuzenko, O. B., He, H., and Minko, T. (2009) Internally Cationic Polyamidoamine PAMAM-OH Dendrimers for siRNA Delivery: Effect of the Degree of Quaternization and Cancer Targeting, *Biomacromolecules* 10, 258-266.
24. Tomalia, D. A., Reyna, L. A., and Svenson, S. (2007) Dendrimers as multi-purpose nanodevices for oncology drug delivery and diagnostic imaging, *Biochemical Society Transactions* 35, 61-67.
25. Cartiera, M. S., Johnson, K. M., Rajendran, V., Caplan, M. J., and Saltzman, W. M. (2009) The uptake and intracellular fate of PLGA nanoparticles in epithelial cells, *Biomaterials* 30, 2790-2798.
26. Kocbek, P., Obermajer, N., Cegnar, M., Kos, J., and Kristl, J. (2007) Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody, *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society* 120, 18-26.
27. Zhang, L., Chan, J. M., Gu, F. X., Rhee, J.-W., Wang, A. Z., Radovic-Moreno, A. F., Alexis, F., Langer, R., and Farokhzad, O. C. (2008) Self-Assembled Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles: A Robust Drug Delivery Platform, *ACS*



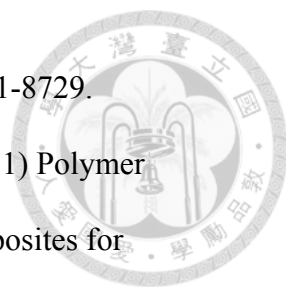
- Nano* 2, 1696-1702.
28. Adisheshaiah, P. P., Hall, J. B., and McNeil, S. E. (2010) Nanomaterial standards for efficacy and toxicity assessment, *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology* 2, 99-112.
 29. Kamaly, N., Xiao, Z., Valencia, P. M., Radovic-Moreno, A. F., and Farokhzad, O. C. (2012) Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation, *Chemical Society Reviews* 41, 2971-3010.
 30. Hilgenbrink, A. R., and Low, P. S. (2005) Folate receptor-mediated drug targeting: from therapeutics to diagnostics, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94, 2135-2146.
 31. Zhao, X., Li, H., and Lee, R. J. (2008) Targeted drug delivery via folate receptors, *Expert Opinion on Drug Delivery* 5, 309-319.
 32. Lu, Y., Sega, E., and Low, P. S. (2005) Folate receptor-targeted immunotherapy: induction of humoral and cellular immunity against hapten-decorated cancer cells, *International Journal of Cancer. Journal International du Cancer* 116, 710-719.
 33. Chen, H., Ahn, R., Van den Bossche, J., Thompson, D. H., and O'Halloran, T. V. (2009) Folate-mediated intracellular drug delivery increases the anticancer efficacy of nanoparticulate formulation of arsenic trioxide, *Molecular Cancer Therapeutics* 8, 1955-1963.
 34. Xia, W., and Low, P. S. (2010) Folate-targeted therapies for cancer, *Journal of Medicinal Chemistry* 53, 6811-6824.
 35. Xu, L., Pirollo, K. F., Tang, W. H., Rait, A., and Chang, E. H. (1999)

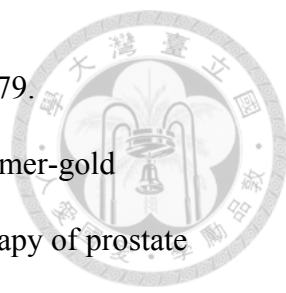


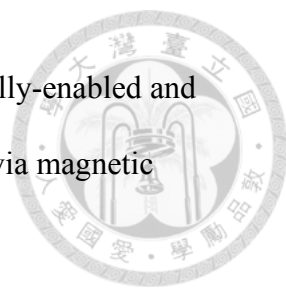
- Transferrin-liposome-mediated systemic p53 gene therapy in combination with radiation results in regression of human head and neck cancer xenografts, *Human Gene Therapy* 10, 2941-2952.
36. Daniels, T. R., Delgado, T., Rodriguez, J. A., Helguera, G., and Penichet, M. L. (2006) The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer, *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 121, 144-158.
 37. Xu, L., Pirolo, K. F., and Chang, E. H. (1997) Transferrin-liposome-mediated p53 sensitization of squamous cell carcinoma of the head and neck to radiation in vitro, *Human Gene Therapy* 8, 467-475.
 38. de Bruin, K., Ruthardt, N., von Gersdorff, K., Bausinger, R., Wagner, E., Ogris, M., and Brauchle, C. (2007) Cellular Dynamics of EGF Receptor-Targeted Synthetic Viruses, *Molecular Therapy* 15, 1297-1305.
 39. Carlsson, J., Blomquist, E., Gedda, L., Liljegren, A., Malmstrom, P. U., Sjostrom, A., Sundin, A., Westlin, J. E., Zhao, Q., Tolmachev, V., and Lundqvist, H. (1999) Conjugate chemistry and cellular processing of EGF-dextran, *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)* 38, 313-321.
 40. Odriljin, T. M., Haidaris, C. G., Lerner, N. B., and Simpson-Haidaris, P. J. (2001) Integrin alphavbeta3-mediated endocytosis of immobilized fibrinogen by A549 lung alveolar epithelial cells, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 24, 12-21.
 41. Cheng, S.-H., Lee, C.-H., Chen, M.-C., Souris, J. S., Tseng, F.-G., Yang, C.-S., Mou, C.-Y., Chen, C.-T., and Lo, L.-W. (2010) Tri-functionalization of




- mesoporous silica nanoparticles for comprehensive cancer theranostics-the trio of imaging, targeting and therapy, *Journal of Materials Chemistry* 20, 6149-6157.
42. Lu, J., Shi, M., and Shoichet, M. S. (2009) Click chemistry functionalized polymeric nanoparticles target corneal epithelial cells through RGD-cell surface receptors, *Bioconjugation Chemistry* 20, 87-94.
 43. Xu, L., Huang, C. C., Huang, W., Tang, W. H., Rait, A., Yin, Y. Z., Cruz, I., Xiang, L. M., Pirollo, K. F., and Chang, E. H. (2002) Systemic tumor-targeted gene delivery by anti-transferrin receptor scFv-immunoliposomes, *Molecular Cancer Therapeutics* 1, 337-346.
 44. Santra, S., Kaittani, C., Grimm, J., and Perez, J. M. (2009) Drug/dye-loaded, multifunctional iron oxide nanoparticles for combined targeted cancer therapy and dual optical/magnetic resonance imaging, *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 5, 1862-1868.
 45. Das, M., Mishra, D., Dhak, P., Gupta, S., Maiti, T. K., Basak, A., and Pramanik, P. (2009) Biofunctionalized, phosphonate-grafted, ultrasmall iron oxide nanoparticles for combined targeted cancer therapy and multimodal imaging, *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 5, 2883-2893.
 46. Huang, P., Li, Z., Lin, J., Yang, D., Gao, G., Xu, C., Bao, L., Zhang, C., Wang, K., Song, H., Hu, H., and Cui, D. (2011) Photosensitizer-conjugated magnetic nanoparticles for in vivo simultaneous magnetofluorescent imaging and targeting therapy, *Biomaterials* 32, 3447-3458.
 47. Cho, H., and Kwon, G. S. (2011) Polymeric micelles for neoadjuvant cancer

- 
- therapy and tumor-primed optical imaging, *ACS Nano* 5, 8721-8729.
48. Xu, H., Cheng, L., Wang, C., Ma, X., Li, Y., and Liu, Z. (2011) Polymer encapsulated upconversion nanoparticle/iron oxide nanocomposites for multimodal imaging and magnetic targeted drug delivery, *Biomaterials* 32, 9364-9373.
49. Na, J. H., Koo, H., Lee, S., Min, K. H., Park, K., Yoo, H., Lee, S. H., Park, J. H., Kwon, I. C., Jeong, S. Y., and Kim, K. (2011) Real-time and non-invasive optical imaging of tumor-targeting glycol chitosan nanoparticles in various tumor models, *Biomaterials* 32, 5252-5261.
50. Santra, S., and Perez, J. M. (2011) Selective N-alkylation of beta-alanine facilitates the synthesis of a poly(amino acid)-based theranostic nanoagent, *Biomacromolecules* 12, 3917-3927.
51. Melancon, M. P., Elliott, A., Ji, X., Shetty, A., Yang, Z., Tian, M., Taylor, B., Stafford, R. J., and Li, C. (2011) Theranostics with multifunctional magnetic gold nanoshells: photothermal therapy and t2* magnetic resonance imaging, *Investigative radiology* 46, 132-140.
52. Ma, M., Chen, H., Chen, Y., Wang, X., Chen, F., Cui, X., and Shi, J. (2012) Au capped magnetic core/mesoporous silica shell nanoparticles for combined photothermo-/chemo-therapy and multimodal imaging, *Biomaterials* 33, 989-998.
53. Wang, L. S., Wu, L. C., Lu, S. Y., Chang, L. L., Teng, I. T., Yang, C. M., and Ho, J. A. (2010) Biofunctionalized phospholipid-capped mesoporous silica nanoshuttles for targeted drug delivery: improved water suspensibility and


- 
- decreased nonspecific protein binding, *ACS Nano* 4, 4371-4379.
54. Kim, D., Jeong, Y. Y., and Jon, S. (2010) A drug-loaded aptamer-gold nanoparticle bioconjugate for combined CT imaging and therapy of prostate cancer, *ACS Nano* 4, 3689-3696.
55. Huang, P., Bao, L., Zhang, C., Lin, J., Luo, T., Yang, D., He, M., Li, Z., Gao, G., Gao, B., Fu, S., and Cui, D. (2011) Folic acid-conjugated silica-modified gold nanorods for X-ray/CT imaging-guided dual-mode radiation and photo-thermal therapy, *Biomaterials* 32, 9796-9809.
56. Lu, P. L., Chen, Y. C., Ou, T. W., Chen, H. H., Tsai, H. C., Wen, C. J., Lo, C. L., Wey, S. P., Lin, K. J., Yen, T. C., and Hsiue, G. H. (2011) Multifunctional hollow nanoparticles based on graft-diblock copolymers for doxorubicin delivery, *Biomaterials* 32, 2213-2221.
57. Moon, G. D., Choi, S. W., Cai, X., Li, W., Cho, E. C., Jeong, U., Wang, L. V., and Xia, Y. (2011) A new theranostic system based on gold nanocages and phase-change materials with unique features for photoacoustic imaging and controlled release, *Journal of the American Chemical Society* 133, 4762-4765.
58. Homan, K., Shah, J., Gomez, S., Gensler, H., Karpouk, A., Brannon-Peppas, L., and Emelianov, S. (2010) Silver nanosystems for photoacoustic imaging and image-guided therapy, *Journal of Biomedical Optics* 15, 021316.
59. Singh, A., Dilnawaz, F., Mewar, S., Sharma, U., Jagannathan, N. R., and Sahoo, S. K. (2011) Composite polymeric magnetic nanoparticles for co-delivery of hydrophobic and hydrophilic anticancer drugs and MRI imaging for cancer therapy, *ACS Applied Materials & Interfaces* 3, 842-856.

- 
60. Chertok, B., David, A. E., and Yang, V. C. (2011) Magnetically-enabled and MR-monitored selective brain tumor protein delivery in rats via magnetic nanocarriers, *Biomaterials* 32, 6245-6253.
61. Lim, E. K., Huh, Y. M., Yang, J., Lee, K., Suh, J. S., and Haam, S. (2011) pH-triggered drug-releasing magnetic nanoparticles for cancer therapy guided by molecular imaging by MRI, *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)* 23, 2436-2442.
62. Yallapu, M. M., Othman, S. F., Curtis, E. T., Gupta, B. K., Jaggi, M., and Chauhan, S. C. (2011) Multi-functional magnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging and cancer therapy, *Biomaterials* 32, 1890-1905.
63. Rastogi, R., Gulati, N., Kotnala, R. K., Sharma, U., Jayasundar, R., and Koul, V. (2011) Evaluation of folate conjugated pegylated thermosensitive magnetic nanocomposites for tumor imaging and therapy, *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* 82, 160-167.
64. Foy, S. P., Manthe, R. L., Foy, S. T., Dimitrijevic, S., Krishnamurthy, N., and Labhasetwar, V. (2010) Optical Imaging and Magnetic Field Targeting of Magnetic Nanoparticles in Tumors, *ACS Nano* 4, 5217-5224.
65. Wang, L. S., Chuang, M. C., and Ho, J. A. (2012) Nanotheranostics--a review of recent publications, *International Journal of Nanomedicine* 7, 4679-4695.
66. Wallace, D. C. (2012) Mitochondria and cancer, *Nat Rev Cancer* 12, 685-698.
67. Lane, N. (2005) *Power, sex, suicide : mitochondria and the meaning of life*, Oxford University Press, New York.
68. Fulda, S., Galluzzi, L., and Kroemer, G. (2010) Targeting mitochondria for

- 
- cancer therapy, *Nature reviews. Drug discovery* 9, 447-464.
69. Lee, J., Giordano, S., and Zhang, J. (2012) Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling, *The Biochemical Journal* 441, 523-540.
70. Circu, M. L., and Aw, T. Y. (2010) Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis, *Free Radical Biology & Medicine* 48, 749-762.
71. Warburg, O. (1956) On the Origin of Cancer Cells, *Science* 123, 309-314.
72. Kelloff, G. J., Hoffman, J. M., Johnson, B., Scher, H. I., Siegel, B. A., Cheng, E. Y., Cheson, B. D., O'Shaughnessy, J., Guyton, K. Z., Mankoff, D. A., Shankar, L., Larson, S. M., Sigman, C. C., Schilsky, R. L., and Sullivan, D. C. (2005) Progress and promise of FDG-PET imaging for cancer patient management and oncologic drug development, *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 11, 2785-2808.
73. Pedersen, P. L. (2012) 3-Bromopyruvate (3BP) a fast acting, promising, powerful, specific, and effective "small molecule" anti-cancer agent taken from labside to bedside: introduction to a special issue, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 44, 1-6.
74. Hoye, A. T., Davoren, J. E., Wipf, P., Fink, M. P., and Kagan, V. E. (2008) Targeting Mitochondria, *Accounts of Chemical Research* 41, 87-97.
75. Marrache, S., and Dhar, S. (2012) Engineering of blended nanoparticle platform for delivery of mitochondria-acting therapeutics, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 16288-16293.
76. Marrache, S., Tundup, S., Harn, D. A., and Dhar, S. (2013) Ex Vivo



- Programming of Dendritic Cells by Mitochondria-Targeted Nanoparticles to Produce Interferon-Gamma for Cancer Immunotherapy, *ACS Nano* 7, 7392-7402.
77. Li, N., Zhang, C. X., Wang, X. X., Zhang, L., Ma, X., Zhou, J., Ju, R. J., Li, X. Y., Zhao, W. Y., and Lu, W. L. (2013) Development of targeting lonidamine liposomes that circumvent drug-resistant cancer by acting on mitochondrial signaling pathways, *Biomaterials* 34, 3366-3380.
78. Yu, Y., Wang, Z. H., Zhang, L., Yao, H. J., Zhang, Y., Li, R. J., Ju, R. J., Wang, X. X., Zhou, J., Li, N., and Lu, W. L. (2012) Mitochondrial targeting topotecan-loaded liposomes for treating drug-resistant breast cancer and inhibiting invasive metastases of melanoma, *Biomaterials* 33, 1808-1820.
79. Zhou, J., Zhao, W. Y., Ma, X., Ju, R. J., Li, X. Y., Li, N., Sun, M. G., Shi, J. F., Zhang, C. X., and Lu, W. L. (2013) The anticancer efficacy of paclitaxel liposomes modified with mitochondrial targeting conjugate in resistant lung cancer, *Biomaterials* 34, 3626-3638.
80. Ma, X., Zhang, L.-H., Wang, L.-R., Xue, X., Sun, J.-H., Wu, Y., Zou, G., Wu, X., Wang, P. C., Wamer, W. G., Yin, J.-J., Zheng, K., and Liang, X.-J. (2012) Single-Walled Carbon Nanotubes Alter Cytochrome c Electron Transfer and Modulate Mitochondrial Function, *ACS Nano* 6, 10486-10496.
81. Yoong, S. L., Wong, B. S., Zhou, Q. L., Chin, C. F., Li, J., Venkatesan, T., Ho, H. K., Yu, V., Ang, W. H., and Pastorin, G. (2014) Enhanced cytotoxicity to cancer cells by mitochondria-targeting MWCNTs containing platinum(IV) prodrug of cisplatin, *Biomaterials* 35, 748-759.

- 
82. Grabar, K. C., Freeman, R. G., Hommer, M. B., and Natan, M. J. (1995) Preparation and Characterization of Au Colloid Monolayers, *Analytical Chemistry* 67, 735-743.
83. Chen, S.-H., Hsu, Y.-P., Lu, H.-Y., and Ho, J.-a. A. (2014) Gold/Phospholipid nanoconstructs as label-free optical probes for evaluating phospholipase A2 activity, *Biosensors and Bioelectronics* 52, 202-208.
84. Yang, S., Damiano, M. G., Zhang, H., Tripathy, S., Luthi, A. J., Rink, J. S., Ugolkov, A. V., T. K. Singh, A., Dave, S. S., Gordon, L. I., and Thaxton, C. S. (2013) Biomimetic, synthetic HDL nanostructures for lymphoma, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 2511-2516.
85. Lee, J.-S., Stoeva, S. I., and Mirkin, C. A. (2006) DNA-Induced Size-Selective Separation of Mixtures of Gold Nanoparticles, *Journal of the American Chemical Society* 128, 8899-8903.
86. Cuvillier, N., Millet, F., Petkova, V., Nedyalkov, M., and Benattar, J.-J. (2000) Structure of Freestanding Phospholipidic Bilayer Films, *Langmuir* 16, 5029-5035.
87. Ziblat, R., Leiserowitz, L., and Addadi, L. (2010) Crystalline domain structure and cholesterol crystal nucleation in single hydrated DPPC:cholesterol:POPC bilayers, *Journal of the American Chemical Society* 132, 9920-9927.
88. Hofsass, C., Lindahl, E., and Edholm, O. (2003) Molecular dynamics simulations of phospholipid bilayers with cholesterol, *Biophysical Journal* 84, 2192-2206.
89. He, Y. Q., Liu, S. P., Kong, L., and Liu, Z. F. (2005) A study on the sizes and



- concentrations of gold nanoparticles by spectra of absorption, resonance Rayleigh scattering and resonance non-linear scattering, *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 61, 2861-2866.
90. Wang, L.-S., Wu, L.-C., Lu, S.-Y., Chang, L.-L., Teng, I. T., Yang, C.-M., and Ho, J.-a. A. (2010) Biofunctionalized Phospholipid-Capped Mesoporous Silica Nanoshuttles for Targeted Drug Delivery: Improved Water Suspensibility and Decreased Nonspecific Protein Binding, *ACS Nano* 4, 4371-4379.
91. Marrache, S., and Dhar, S. (2013) Biodegradable synthetic high-density lipoprotein nanoparticles for atherosclerosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 9445-9450.
92. Reers, M., Smith, T. W., and Chen, L. B. (1991) J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential, *Biochemistry* 30, 4480-4486.
93. Tanida, I., Ueno, T., and Kominami, E. (2008) LC3 and Autophagy, *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 445, 77-88.