

國立台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

探討適體標靶奈米藥物於乳癌治療的成效

Targeting MDA-MB-231 human breast cancer cells with

aptamer-functionalized nanoformulations :

A synergistic combination treatment with
photodynamic therapy and bioreductive therapy

溫竣歲


Jyun-Wei Wen

指導教授：何佳安 博士 Ja-an Annie Ho, Ph.D.

中華民國 106 年 7 月

July 2017

謝誌



在這漫長的碩士班三年裡頭我需要感謝的人太多了。在剛進來實驗室對藥傳完全沒概念時，感謝念祖學長的幫助，教導我很多化學上的知識，也提供我許多不錯的參考期刊及找 paper 的方法；感謝 Lulu 學姊在討論研究時幫助我不少，提供我很多改進的意見；感謝靜瑩學姊在碩一的時候，帶我和彥麟操作細胞實驗，從一開始一盤細胞都養不好到現在可以同時養三種不同的細胞株；感謝宜廷學長一步一步地帶我操作每個實驗，從測單線態氧分子、氣密袋的製備至整個細胞實驗，也提醒我許多實驗該注意的小細節；感謝智雯學姊在我碩三最需要幫忙的時候主動跑來和我討論實驗，讓我突破許多實驗上的盲點；感謝易德學長，不僅帶給我歡笑，也提供我許多有用的實驗經驗；感謝英風學長教我很多光學的知識，讓我學到以前沒接觸過的領域；感謝小賀學長陪著我，除了和我一起討論實驗遇到的問題外，還不厭其煩地幫我看論文；感謝 Amily 學姊，除了教我很多化學上的知識外，也在我快口試最緊要關頭的時刻幫我修改 ppt；感謝清大林芝宇學姊，除了幫我合成實驗的材料外，也教了我很多 MSN 的知識；感謝幼瑾、彥麟同學，每次實驗做到很晚時，還可以看到你們一起努力奮戰，讓我覺得不孤單，讓我更有動力撐下去；感謝和我同時畢業的學弟們——立斌、嘉予還有郁夫，除了實驗上的幫助外，也帶給我碩班生活上的歡樂；感謝小碩一的美女們——映晨、小劉、翎鈞、沛慈還有 Errorly；感謝本實驗室最帥的光頭——昱清哥，在百忙之中幫我照光。

最後我要感謝我的指導老師——何佳安老師，教導我最重要的邏輯思維以及解決問題的能力，不僅僅是在科學的研究上，在未來出社會也是相當授用。經過三年的洗禮後，相信現在的我已經比起三年前進步很多。

中文摘要

光動力治療是癌症常用的治療方法之一，其作用原理是透過光照來活化光敏劑，使環境中的氧氣轉換成活性氧化物質(如單線態氧分子)來毒殺癌症細胞。然而其療效會因為腫瘤微環境中的低氧濃度而降低，導致無法完全地根治癌症的病灶。本篇研究是利用在低氧環境下才具有毒殺效果的還原型前驅藥物 Tirapazamine (TPZ)與光敏劑 Protoporphyrin IX (PpIX)做搭配治療；藉由 PpIX 的作用，使腫瘤微環境中的氧氣濃度下降，藉此增強低氧還原型前驅藥物的毒殺範圍。

本篇研究的設計是將光敏劑分子修飾在具有良好生物相容性的多孔洞奈米二氧化矽球載體 (Mesoporous silica nanoparticle, MSN) 上，將 TPZ 裝載於其內，並在多孔奈米二氧化矽球的表面上再修飾對乳癌細胞株 MDA-MB-231 具有專一性的 DNA 適體 LXL-1，達到標靶治療的目標。

從本研究的結果中可以發現 PpIX 與 TPZ 兩種藥物在各個氧氣壓力下皆能產生協同作用，造成更有效的抗癌效果；帶有 LXL-1 適體修飾的 MSN 載體能夠專一性地被 MDA-MB-231 乳癌細胞吞噬，且兩種藥物裝載於載體內的毒殺效果較兩種藥物以 free drug 的方式更好，因此這樣複合型的治療策略是能夠有效的毒殺低氧環境下的惡性乳癌細胞。

關鍵字:光動力治療、腫瘤缺氧、低氧性生物還原型前驅藥物、多孔洞奈米二氧化矽球載體、DNA 適體

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) is one of common medical strategies for treating cancer. However, the hypoxic tumor microenvironment often impedes cancer cure rate and increases the likelihood of tumor recurrence. To solve this problem, we attempted to develop a new cancer treatment strategy by combining bioreductive therapy with PDT. It is anticipated that the photosensitizers PpIX will consume most of the oxygen at the tumor site, leading to the generation of singlet oxygen, and concurrently creating a low-oxygen level environment to activate the therapeutic function of bioreductive drug TPZ. Mesoporous silica nanoparticles (MSN) were chosen herein to serve as drug carriers, that were modified with photosensitizer and loaded with bioreductive drugs; in addition, a DNA aptamer LXL-1 was used to functionalize the outer surface of MSN, enabling targeted delivery of therapeutic agents to human breast cancer cell, MDA-MB-231.

Key words: Photodynamic therapy, Tumor hypoxia, Bioreductive prodrug, Mesoporous silica nanoparticle, DNA aptamer

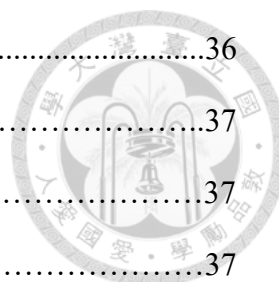
目錄



謝誌.....	I
中文摘要.....	II
Abstract.....	III
目錄.....	IV
圖目錄.....	VII
表目錄.....	IX
第一章 緒論.....	1
1-1 癌症缺氧的微環境.....	1
1-1.1 腫瘤微環境缺氧的成因與定義.....	1
1-1.2 缺氧環境對癌症細胞的影響.....	2
1-1.3 針對腫瘤缺氧環境的治療策略.....	3
1-2 癌症的光動力治療.....	5
1-2.1 光動力治療作用機制.....	5
1-2.2 光動力治療的優劣勢與轉型契機.....	8
1-3 光敏劑 PpIX (Protoporphyrin IX).....	9
1-4 低氧性還原型前驅藥物 TPZ (Tirapazamine).....	11
1-5 人類三陰性乳癌細胞株 MDA-MB-231.....	13
1-6 藥物傳輸系統.....	14
1-6.1 奈米載體.....	14
1-6.2 中孔洞奈米二氧化矽球.....	15
1-6.3 主動與被動標靶.....	16
1-7 LXL-1 DNA 適體.....	17
1-8 研究動機與發想.....	19



第二章 實驗材料、儀器與方法.....	21
2-1 實驗藥品與儀器.....	21
2-1.1 實驗藥品.....	21
2-1.2 實驗儀器.....	24
2-1.3 實驗細胞株.....	25
2-1.4 氣體.....	25
2-1.5 光源設備.....	25
2-1.6 氣密袋與低氧環境的操作.....	27
2-2 單線態氧分子的測定.....	28
2-2.1 PpIX 在不同濃度與不同照光時間下產生單線態氧分子之變化.....	28
2-2.2 PpIX 在不同氧氣濃度環境下產生單線態氧分子之變化.....	29
2-2.3 比較 PpIX、PpIX-MMT2 和 Apt-PpIX-MMT2 產生單線態氧分子之效率.....	29
2-3 PpIX-MMT2、Apt-PpIX-MMT2 及 TPZ@Apt-PpIX-MMT2 的合成.....	30
2-4 載體的鑑定.....	31
2-5 定量載體內的 PpIX.....	31
2-6 細胞培養.....	32
2-7 細胞內 ROS 測定.....	33
2-8 細胞存活率測試.....	34
2-8.1 PpIX 藥物在不同氧氣濃度下的毒殺實驗.....	35
2-8.2 TPZ 藥物在不同氧氣濃度下的毒殺實驗.....	35
2-8.3 PpIX 與 TPZ 兩種藥物的合併治療.....	35
2-8.4 載體毒殺實驗.....	36
2-8.5 Apt-PpIX-MMT2 毒殺實驗.....	36



2-8.6 TPZ@Apt-PpIX-MMT2 的毒殺實驗.....	36
2-9 細胞吞噬 Apt-PpIX-MMT2 實驗.....	37
2-9.1 流式細胞儀分析.....	37
2-9.2 萃取細胞內 PpIX 的含量.....	37
第三章 實驗結果與討論.....	39
3-1 實驗設計與目的.....	39
3-2 定量 PpIX 受到光照射後產生的單線態氧分子.....	42
3-3 比較 PpIX 於不同氧氣濃度下產生單線態氧分子之效率.....	43
3-4 比較不同氧氣濃度下 PpIX 對癌症細胞產生 ROS 量之差異.....	44
3-5 PpIX 於不同氧氣濃度下毒殺癌症細胞之結果.....	46
3-6 TPZ 藥物於不同氧氣濃度下對癌症細胞的毒殺結果.....	49
3-7 PpIX 與 TPZ 兩種藥物合併的細胞毒殺結果.....	51
3-8 載體的特性分析及 PpIX 定量結果.....	53
3-9 Apt-PpIX-MMT2 產生單線態氧分子之效率.....	57
3-10 載體毒殺性.....	58
3-11 Apt-PpIX-MMT2 對 MDA-MB-231 細胞的毒殺性.....	59
3-12 PpIX 與 Apt-PpIX-MMT2 對 MDA-MB-231 細胞吞噬結果.....	60
3-13 Apt-PpIX-MMT2 對不同細胞株的吞噬結果.....	61
3-14 TPZ@Apt-PpIX-MMT2 對乳癌細胞的毒殺結果.....	64
第四章 結論與未來展望.....	66
第五章 參考文獻.....	67

圖目錄



圖 1-1 光敏劑作用機制.....	5
圖 1-2 Protoporphyrin IX (PpIX)分子結構.....	10
圖 1-3 PpIX 分子的吸收光譜與螢光光譜.....	10
圖 1-4 Tiraparamine (TPZ)的分子結構.....	12
圖 1-5 TPZ 藥物作用機制.....	12
圖 1-6 MSN 構造.....	15
圖 1-7 MMT-2 之 TEM 圖.....	15
圖 1-8 LXL-1 適體 3D 結構.....	18
圖 1-9 利用 Cell-SELEX 篩選 DNA 適體步驟.....	18
圖 1-10 研究發想.....	20
圖 2-1 實驗光源.....	26
圖 2-2 光源擺設於 96 孔盤的方式.....	26
圖 2-3 氣密袋.....	27
圖 2-4 低氧環境操作.....	27
圖 2-5 DPBF 與單線態氧分子的反應式.....	28
圖 2-6 PpIX 濃度檢量線.....	31
圖 2-7 DCFDA 與 ROS 作用機制.....	33
圖 2-8 MTT assay 的反應式.....	34
圖 2-9 PpIX 螢光檢量線.....	38
圖 3-1 共價修飾方式.....	40
圖 3-2 定量 PpIX 在受到光激發後生成的單線態氧分子.....	42
圖 3-3 PpIX 在不同氧氣濃度下生成單線態氧分子之結果.....	43
圖 3-4 定量在不同氧氣濃度下 PpIX 經照光後對細胞產生的 ROS 量.....	45
圖 3-5 PpIX 在不同實驗條件下對 MDA-MB-231 細胞的毒殺結果.....	48

圖 3-6 TPZ 在不同濃度與氧氣濃度對細胞的毒殺性.....	50
圖 3-7 PpIX 與 TPZ 在不同氧氣濃度下的合併治療結果.....	52
圖 3-8 載體的分析及鑑定.....	56
圖 3-9 PpIX、PpIX-MMT2 與 Apt-PpIX-MMT2 單線態氧分子生成之結果.....	57
圖 3-10 載體對細胞之毒殺性.....	58
圖 3-11 Apt-PpIX-MMT2 對 MDA-MB-231 細胞之毒殺性.....	59
圖 3-12 MDA-MB-231 細胞吞噬 PpIX 及 Apt-PpIX-MMT2 後之 PpIX 定量結果....	60
圖 3-13 三種細胞株吞噬 Apt-PpIX-MMT2 之流式細胞分析結果.....	62
圖 3-14 MDA-MB-231、MCF-7 及 MCF-10A 三種細胞吞噬 Apt-PpIX-MMT2 後的 定量結果.....	63
圖 3-15 TPZ@Apt-PpIX-MMT2 毒殺 MDA-MB-231 癌症細胞株之結果.....	65

表目錄

表 1-1 HIF-1 轉錄因子調控的下游蛋白.....	3
表 2-1 實驗藥品.....	21
表 2-2 實驗儀器.....	24
表 2-3 實驗細胞株.....	25
表 2-4 實驗氣體.....	25
表 3-1 細胞存活率及 CDI 值.....	52
表 3-2 DLS 結果.....	56



第一章 緒論



1-1 腫瘤缺氧的微環境

1-1.1 腫瘤微環境缺氧的成因與定義

腫瘤在進程的過程中，因為需要大量的養分供給，造成大量的血管新生 (Angiogenesis)¹⁻³；而此現象所新生成的微血管卻與正常的微血管不同，其結構排列雜亂、微血管壁不完整性以及血液的分流，導致注入至腫瘤位置的血液量不足，微血管中的氣體交換率差，因此有氧氣分布不均的現象⁴⁻⁷；離微血管較遠的癌症細胞 (>70 μm) 因為所能供給到的氧氣量不足，而產生缺氧 (Hypoxia) 的性徵^{8,9}。

人體正常的組織環境內隨著血液從動脈血管中流到周邊組織的過程中，氧氣濃度也會隨之下降，因此在正常的周邊組織環境下的平均氧氣濃度約為 5% (38 mmHg) 的 O_2 ，氧氣濃度被定義為 Physoxia¹⁰。缺氧又可分為兩種，生理性缺氧 (Physiological hypoxia) 與病理性缺氧 (Pathological hypoxia)⁹。

生理性缺氧是當器官或組織受到缺氧的影響時，會透過生理反應，如血管舒張來增加血液的通透，使組織適時地調整至其適合的氧氣濃度¹¹。正常組織維持的氧氣濃度約為 3~7% 的 O_2 ，而生理性缺氧的氧氣濃度約為 2~6%，細胞會短暫地表現出 hypoxia-induced factor 1 (HIF1) 蛋白¹²；然而病理性缺氧是組織長期暴露於缺氧環境中所造成氧氣濃度無法透過恆定機制回復至原本所適合的濃度，其氧氣濃度通常在 2% O_2 (15 mmHg) 以下，組織的切片有大量的 HIF-1 蛋白表現³。

腫瘤缺氧的微環境屬於病理性缺氧，環境中氧氣濃度從 6% 至 0%，大部分的腫瘤組織氧氣濃度是小於 2% O_2 (15 mmHg)，平均約為 1.3% (10 mmHg) 左右⁹。

因此本篇研究以 5%、2%、1% 三種不同的氧氣濃度來進行實驗，欲模擬出藥物自進入腫瘤區域時所產生變異的療效。

1-1.2 缺氧環境對癌症細胞的影響

在缺氧的環境下，正常細胞無法正常地進行有氧代謝，因此將走向凋亡途徑；然而癌症細胞由於基因的改變，使用粒線體的方式與正常細胞不同，能透過無氧代謝而獲取能量，因此不會受到缺氧的因素而造成凋亡^{13,14}。

相較於正常氧壓下，在缺氧環境下生長的癌症細胞是更為惡化的^{13,15-19}，由於缺氧環境驅使癌症細胞表現出與缺氧相關的轉錄蛋白 HIF-1 (Hypoxia-induced factor-1)²⁰。HIF-1 蛋白為異二聚體 (Heterodimer)，由 HIF-1 α 與 HIF-1 β 兩個蛋白組成。HIF-1 β 蛋白是穩定地存在細胞中，然而在正常氧氣壓力環境下，HIF-1 α 蛋白會被 Von Hippel Lindau (VHL) E3 ubiquitin ligase 泛酸化 (Ubiquitination) 後再被降解，唯有在缺氧的環境下才能穩定的存在²¹⁻²³。穩定的 HIF-1 α 與 HIF-1 β 蛋白結合後，形成轉錄因子，進入到細胞核中與缺氧相關的促進子 Hypoxia-response element (HRE) 結合，轉錄出的下游蛋白有 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)²⁴、Glucose Transporter-1 (GLUT-1)²⁵、Insulin growth factor (IGF)²⁶、Platelet-derived growth factor (PDGF)²⁷、Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2)²⁸、P-glycoprotein (P-gp)²⁹ 等。

HIF-1 轉錄因子所轉錄出的下游蛋白及其功能如下表 1-1 所示，這些下游的蛋白因子皆與癌症的進程相關，像是促進癌症的血管新生³⁰；增加癌症細胞的糖解作用，使其能夠在缺氧的環境下仍能獲得能量；增加癌症細胞的生長與轉移³⁰；以及造成癌症細胞的多重抗藥性²⁹，使得癌症細胞更加難以根治。



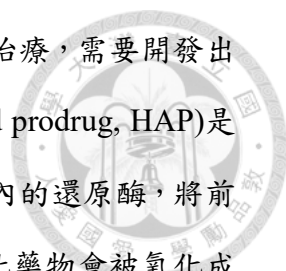
表 1-1 HIF-1 轉錄因子調控的下游蛋白

轉錄蛋白	造成現象	Reference
VEGF	促使癌症的血管新生	25,31
MMP-2	癌症細胞的轉移	32
IGF-2	癌症細胞的生長	33
GLUT-1	增加糖解作用	34
P-gp	多重藥物抗藥性	35

1-1.3 針對腫瘤缺氧環境的治療策略

最早於 1953 年 Gary 團隊發現氧氣濃度是影響臨床上治療效果的關鍵因素之一³⁶，缺氧條件會造成藥物無法發揮其完全之效用，造成這樣的原因可分成以下五種。

第一種原因是缺氧直接造成藥物失去活性³⁷，抗癌藥物如 Bleomycin³⁸、Melphalan³⁹ 等因需要氧氣的活化才能進行毒殺細胞，若這類藥物到達腫瘤的缺氧環境，將會因為氧氣的缺乏而無法產生毒殺能力；第二種原因是缺氧下的癌症細胞因其細胞週期較正常氧壓下的癌症細胞慢⁴⁰，對於大部分抑制 DNA 生成或是抑制細胞分裂的抗癌化療藥物較不敏感，無法對缺氧環境的細胞有很好的抑制效果⁴¹；第三種原因是由於缺氧的癌症細胞會表現較多的 DNA 修復因子和自由基清除分子 Glutathione，因此癌症細胞會減少一些透過自由基攻擊癌症細胞的藥物對細胞毒殺時所造成的傷害¹⁹；第四種原因，缺氧的癌症細胞因為表面會表現大量的 P-glycoprotein (P-gp) 蛋白⁴²，使常用的化療藥物如 Adriamycin、Paclitaxel、Actinomycin D 等藥物容易被此種細胞排出胞外，導致藥物無法有效的累積在細胞內，造成多重抗藥性(Multidrug resistance, MDR)的現象⁴³；第五種原因是由於腫瘤血管新生的不完整微血管使得藥物分子在腫瘤裡的擴散效率變差，藥物無法對更深層的癌症細胞進行毒殺^{44,45}。



針對腫瘤缺氧環境的毒殺，無法僅僅藉由傳統的化療方式治療，需要開發出新的毒殺策略。低氧性生物還原型前驅藥物 (Hypoxia-activated prodrug, HAP) 是針對毒殺缺氧環境下的腫瘤細胞，此類藥物的毒殺是受到細胞內的還原酶，將前驅藥物催化成具有毒殺作用的藥物⁴⁶；若在有氧氣的環境下，此藥物會被氧化成毒性低的原型藥物，因此這類的藥物只能作用於低氧的區域；然而腫瘤微環境的氧氣濃度是分布不均¹⁹，單單使用此藥物是無法全面性地毒殺腫瘤裡全部的癌症細胞，通常此類型藥物常被當成佐劑來進行治療，需要搭配另一種治療藥物來進行複合性治療，期望兩者藥物在氧氣變異性大的腫瘤微環境中達到一個相輔相成的毒殺效果。

本研究將選擇光動力治療與 HAP 藥物做搭配治療。據過去研究中發現⁴⁷，在進行光動力的治療時會形成血栓，造成腫瘤微環境的缺氧，此特點能夠擴大 HAP 藥物在腫瘤內的毒殺範圍，因此將選擇此兩種藥物的搭配來做複合型治療。



1-2 癌症的光動力治療

1-2.1 光動力治療作用機制

在進行光動力治療時，有三種缺一不可的元素：**光敏劑** (Photosensitizer, PS)、**光**以及**氧氣**⁴⁸。臨床上在進行光動力治療是先以靜脈注射方式施打光敏劑，待 48 至 72 小時後，光敏劑累積在腫瘤的位置後，再予以激發光照射，活化光敏劑⁴⁹。光動力治療主要是利用三種方式來毒殺腫瘤⁴⁸：第一種為直接對癌症細胞進行毒殺⁵⁰；第二種是破壞腫瘤處的血管⁵¹，形成血栓⁵²，減少養分到達腫瘤的位置；第三種是調節免疫系統⁵³，活化免疫細胞，如白血球、巨噬細胞、T 細胞等浸潤至腫瘤位置，來吞噬癌症細胞。

直接對癌症細胞毒殺

利用激發光來激發光敏劑，使其從原本穩定的基本單性態 (Ground singlet state)躍升成不穩定的激發單性態(Excited singlet state)；激發單性態的光敏劑會藉由系統間跨越(Intersystem crossing, ISC)的方式產生激發三性態(Excited triplet state)⁵⁴，如圖 1-1 所示：

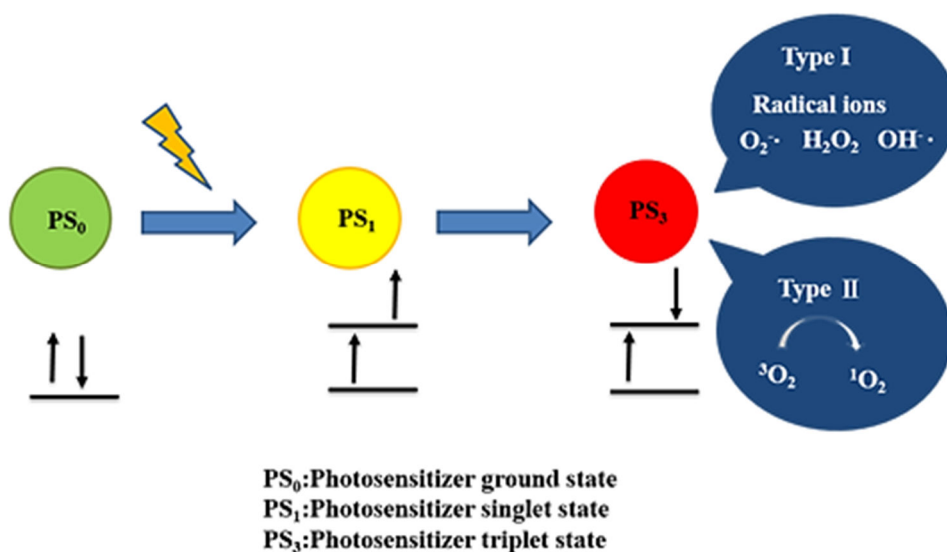



圖 1-1 光敏劑作用機制



激發三性態的光敏劑可以藉由兩種方式來進行細胞毒殺，第一種類型 type I 是直接與細胞中的基質，如細胞膜或分子進行反應，轉移質子或電子形成陽性或陰性自由基，自由基分子再與氧氣作用形成氧化產物 ROS (Reactive oxygen species)，如 $\text{OH}\cdot$ (Hydroxide)、 $\text{O}_2\cdot$ (Peroxide)、 H_2O_2 等，自由基分子再以擴散方式進入細胞內，對細胞產生氧化壓力及毒性；第二類型 type II 是激發三性態的光敏劑直接與氧氣作用，形成單線態氧分子 (Singlet oxygen)，單線態氧分子也是 ROS 的一種，會與細胞中蛋白質殘基作用，或是破壞 DNA 核酸的鹼基或 DNA 股上的五碳糖，來造成細胞的毒殺⁵⁴⁻⁵⁷。在進行照光時，兩者類型的作用機制都會同時出現。單線態氧分子與自由基分子在生物系統中的半生期皆非常地短，約小於 $0.04\ \mu\text{sec}$ ⁵⁸；其作用範圍約為 $0.02\ \mu\text{m}$ ⁵⁸，因此光動力治療直接所影響到的細胞為 ROS 生成的區域。

破壞血管降的養分供給

在過去十五年的文獻中都發現光動力治療會造成微血管的塌陷，使組織變得更為缺氧^{59,60}。在2002年美國加州的Miravant Medical Technologies的臨床前活體實驗中發現在施打光敏劑的小鼠會產生血管緊縮 (Vasoconstriction)的現象發生，隨後是血栓的形成，腫瘤血管的破壞使氧氣及養分無法運送至癌症細胞，因而抑制了腫瘤的生長⁵²。

破壞腫瘤附近的微血管雖然能達到抑制癌細胞生長的效果，但是卻也造成光動力治療的限制^{61,62}。局部的缺氧環境使光動力治療能產生的ROS下降⁶³；此外，缺氧的環境會造成癌症細胞產生更多的HIF-1 (Hypoxia-induced factor 1)蛋白，使癌症細胞對於光動力治療的反應降低⁶⁴。

調節免疫系統

在 1980 及 1990 的文獻中都發現在光動力治療下的癌症組織有淋巴細胞、白血球細胞以及巨噬細胞的浸潤，表示在光動力治療後局部組織會發生免疫反應^{48,65}。

光動力治療下會破壞內皮細胞，造成局部的發炎、血管擴張及血小板的凝聚⁶⁶；內皮細胞也會分泌血栓烷 (Thromboxane) 及一些細胞激素 (Cytokine)，如白細胞介素 (Interleukin) IL-1 β 、IL-6、IL-8 等，趨使單核球、嗜中性白血球及肥大細胞侵襲至腫瘤的位置⁶⁷；而受到光動力治療的癌症細胞因為在進行壞死或凋亡的過程中會產生 heat-shock 蛋白^{68,69}，此蛋白為樹突細胞或巨噬細胞的抗原蛋白，能夠更容易被樹突細胞辨識且吞噬，形成抗原呈現細胞；抗原呈現細胞會回到淋巴結活化 T 淋巴細胞，使其成為殺手 T 細胞，殺手 T 細胞會趨化至腫瘤位置，將腫瘤細胞清除⁷⁰。

1-2.2 光動力治療的優劣勢與轉型契機

光動力治療的優勢是因為其為非侵入性的治療方式，相較於一般開刀取出腫瘤的方式來說，可以減少因病菌感染而造成的併發症^{48,66}；此外因為其作用是局部性的，藉由光照範圍可控制治療的局部位置，較可以減低藥物對正常組織的副作用；現今也愈來愈多光動力治療搭配其他化療來進行治療，這樣的療程也是可以搭配其他的化療方式進行治療⁴⁹。

然而光動力治療在臨床上仍有其治療上的限制：光敏劑本身的疏水性，造成在靜脈注射後，無法更有效的到達腫瘤被細胞利用⁷¹；光敏劑無法到達更深層的組織，造成腫瘤的毒殺無法完全的根除⁷¹；治療的療效受限於光照的範圍，光所能穿透組織的深度⁷²；光動力治療本身在缺氧環境下的限制，以及其在治療時，造成腫瘤微環境更為缺氧，本身就會帶來其治療上的限制⁷³。

隨著科技的進步，光動力治療仍有轉型的契機。利用奈米載體可以使光敏劑的變得更親水性，以及載體的優勢可以將藥物送到更深層的組織；選擇波長較長的紅光或紅外光，可以使光照射更深層的組織；本篇的研究是同時載入另一種抗癌藥物，補足光動力治療毒殺能力所及的範圍。

1-3 光敏劑 PpIX (Protoporphyrin IX)

光敏劑 Protoporphyrin IX (PpIX)，化學名稱為 3,7,12,17-Tetramethyl-8,13-divinyl-2,18-porphinedipropionic acid，分子量為 562.66，分子結構如圖 1-2，結構中帶有 4 個吡咯(Pyrrole)，為 porphyrin-based 的光敏劑之一，是美國食品藥物管理局所核准可應用在臨床上的光動力治療藥物⁷⁴。PpIX 是在血紅素生成過程中的中間產物，藉由粒線體酵素 Protoporphyrinogen oxidase (PPOX)將 PpIX 前驅物轉換成 PpIX，最後受到另一個粒線體酵素 ferrochelatase (FECH)轉變成血紅素(Heme)⁷⁵。

PpIX 藥物常被用來做癌症的治療，包括食道癌、支氣管癌、皮膚癌、膀胱癌、乳癌、胃癌以及口腔癌等⁷⁶；此外，PpIX 若受到 400 至 410 nm 的光線照射後會釋放 635 nm 的紅色可見螢光，其光譜如圖 1-3，因此可用來偵測腫瘤位置及觀察治療的預後⁷⁷。除了應用在癌症的治療外，PpIX 也拿來做其他疾病的治療，如粉刺、鮑恩氏症、雄性禿及紅斑性狼瘡等⁷⁸；另外也發現 PpIX 具有抗格蘭氏陽性和陰性的細菌功效，因此也可被用來治療微生物相關的疾病^{79,80}。

PpIX 雖然在治療上帶來好處，但其藥物本身卻有很強的副作用。通常 PpIX 治療的病患最常出現急性卟啉症 (Porphyria)，不僅造成皮膚對陽光更加地敏感，照射陽光時會起水泡、潰爛等⁸¹，甚至會影響神經系統，造成腹痛、胸痛、昏眩、嘔吐、發燒等不適的症狀⁸²；此外，由於 PpIX 是疏水性的藥物，最後過多的藥物代謝物如 Erythropoietic protoporphyria (EPP)和 X-linked protoporphyria (XLP)等會累積於肝臟造成肝膽結石，甚至造成肝膽炎^{83,84}。

因此如何能夠有效地將 PpIX 傳送到疾病的位置，並且降低系統性的傷害，發揮 PpIX 在治療上的優點並將其缺點降至最低，是本研究要把 PpIX 以載體的方式輸送的原因。

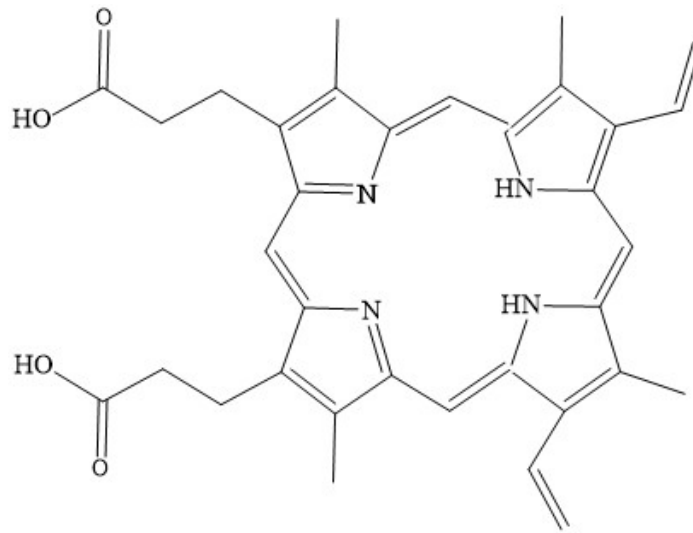


圖 1-2 Protoporphyrin IX (PpIX)分子結構

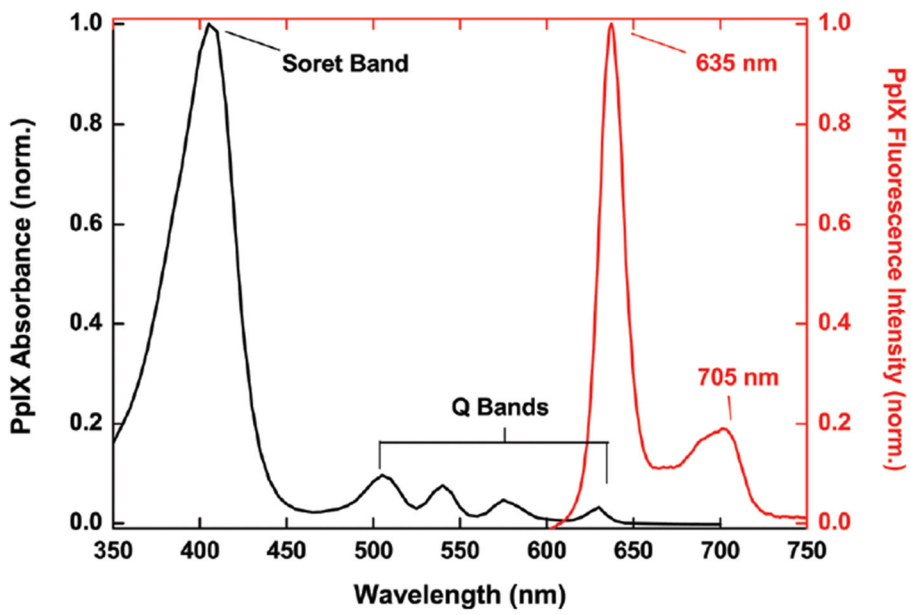


圖 1-3 PpIX 分子的吸收光譜與螢光光譜⁸⁵

1-4 低氧性還原型前驅藥物 TPZ (Tirapazamine)

TPZ (Tirapazamine) 為低氧性還原型藥物 (Hypoxia-activated prodrug, HAP)，化學分子式為 3-amino-1,2,4-benzotriazine-1,4 dioxide，分子結構如圖 1-4，為 aromatic N-oxides 類別，分子量 178.15，又稱為 SR4233 是臨床第三期試驗的抗癌用藥。

此藥物是 1986 年由 Martin Brown 團隊所發現的，據細胞實驗結果發現 TPZ 在缺氧環境下的毒殺效果是有氧環境的 50 至 200 倍⁸⁶。其毒殺的機制是受到細胞內單電子的還原酶 (One-electron reductase) 像是 NADPH-cytochrome P450 reductase (CYPOR) 或是 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 作用，將原型藥物還原成陰性自由基型態 (TPZ^{-•})，自由基型態的 TPZ 本身就會造成細胞核內的 DNA 裂解，但也會再經過衰變，產生 Hydroxyl radical (OH[•]) 或是 Benzotriazinyl radical (BTZ[•])，造成癌症細胞的 DNA 雙股斷裂^{87,88}，其作用機制如圖 1-5 所示。

自由基型態的 TPZ 在有氧氣的環境中會被氧化成低毒性的原型藥物，此現象限制了 TPZ 的毒殺能力。在臨床上的結果也發現到單獨使用 TPZ 藥物對治療癌症的效果不如預期來得好，可能的原因是小分子的 TPZ 藥物無法穿透至組織深層的核心區塊，因此沒辦法達到其累積的藥效⁸⁹；另一方面，TPZ 在血液運送的過程中就被還原成毒性較低的 SR4317 分子，導致到達腫瘤後的毒殺性降低⁹⁰。此外，TPZ 藥物在治療時也有許多的副作用，像是肌肉痙攣、噁心嘔吐、暈眩等⁹¹。

因此為了減少 TPZ 造成的副作用以及增強其在治療上的療效，我們需要將 TPZ 藥物裝載於載體裡面，希望藉由載體將小分子藥物送至腫瘤的核心內部，達到其在低氧下的毒殺效果；也避免藥物在尚未到達腫瘤位置時先被還原成毒性較低的 SR4317。



1-5 人類三陰性乳癌細胞株 MDA-MB-231

乳癌在 2017 女性癌症的統計中，女性罹患的案件數排名第一，致死率位居第二，僅次於肺癌，乳癌的高致死率因而有女性的隱性殺手之稱⁹²。依照乳癌的表面蛋白特性可以分為三種類型，分別為：HR (Hormone receptor)型、HER2/Neu (Human epidermal growth factor receptor)型以及三陰性 TNBC (Triple-negative breast cancer)型三種亞型^{93,94}。HR 型的乳癌是乳癌細胞表面具有 ER (Estrogen receptor)受體或 PR (Progesterone receptor)受體或兩者皆有，HR 型的乳癌依照有無 HER2/Neu 受體又可分成管狀 A 型 (luminal A)及管狀 B 型 (luminal B)；HER2/Neu 型乳癌細胞是其表面皆沒有 ER 或 PR 受體，只有 HER2/Neu 蛋白；而三陰性型乳癌細胞則是除了缺乏 HR 型的兩種受體外，也沒有 HER2/Neu 受體，此類的癌症細胞大多是屬於類基底型 (Basal-like)⁹⁵。

在這三種亞型的乳癌當中，三陰性乳癌因為缺乏受體，是最不易及早被檢測出來的，其五年存活率最低，且治療後的復發率高⁹⁶。這一類的乳癌在臨床上的治療也是較為困難，無法像 HR 型的乳癌一樣利用賀爾蒙結抗劑 Tamoxifen (Nolvadex)或 HER2 抗體 Trastuzumab (Herceptin)來抑制，目前只能藉由手術切除、傳統化療、放射線治療等方式進行治療⁹³。

人類乳癌細胞株 MDA-MB-231 在乳癌的分類是屬於三陰性乳癌細胞株，最早是在 1973 年從一位 51 歲白種人女性的胸腔積液中取得，其病理型態為腺癌，具有間葉型癌症細胞的特性，屬於較易轉移的癌症細胞株，尤其容易轉移至肺部^{97,98}。在治療上也是受到限制，由於三陰性的特性，無法利用抗體或賀爾蒙結抗劑來抑制⁹⁶；又此癌症細胞本身表面帶有大量的運輸蛋白 P-gp (P-glycoprotein)，因此在治療上常會有多重抗藥性的情形發生⁹⁹。

由於這一類的乳癌細胞株在傳統的治療上受到了限制，因此我們需要開發另一種治療策略；如何將現有的抗癌藥物成功地累積在癌症細胞中，且規避 P-gp 蛋白所造成的抗藥性影響是本篇研究想解決的問題。



1-6 藥物傳輸系統

在傳統進行治療時，主要給藥的方式是透過靜脈注射、肌肉注射或是口服用藥。當藥物進入體內後會經過四種過程，分別為吸收 (Absorption)、分散 (Distribution)、代謝 (Metabolism) 以及排出 (Excretion)，簡稱為 ADME¹⁰⁰。藥物本身的生物利用率 (Bioavailability) 會影響藥物在體內被組織或是細胞吸收的效率¹⁰¹，其與藥物分子的結構、電荷、親疏水性等息息相關，這些特性也會影響藥物在生物血液中的分散性；藥物的半生期 (Half-life) 也是影響藥效的重要因素之一，若藥物的半生期短，藥物在尚未到達治療的區域時就被體內的酵素代謝掉，就會減少其治療的療效；或是藥物是否容易被腎臟或肝臟這兩種臟器代謝，若藥物容易被代謝掉反而會降低其療效，反之若藥物不容易被代謝掉，反而會累積藥物所帶來的毒素，造成身體的副作用¹⁰²。因此，如何讓藥物進入體內能夠更有效的達到其治療效果及減少藥物所帶來的副作用是藥物傳輸系統希望解決的問題。

藥物傳輸系統 (Drug delivery system, DDS) 是改良藥物進入活體後的釋放、吸收、分布及代謝，或增加生物可用率，使得藥物能夠在靜脈注射後更有效地到達病灶之處，增強其治療效果以及減少藥物的副作用¹⁰³。

1-6.1 奈米載體

藥物傳輸系統通常會利用奈米大小的載體來傳輸藥物，通常這些載體的特性是生物相容性 (Biocompatibility) 好，對細胞的毒性小、生物可利用率高 (Bioavailability)，可以被生物體自行吸收或降解¹⁰⁴。常用的奈米載體有微脂體 (Liposome)、高分子微胞 (Polymeric micelle)、中孔洞奈米矽球 (Mesoporous silica nanoparticle) 等。奈米載體的大小是影響藥物傳輸系統的關鍵之一，通常其直徑是介於 10 到 200 nm 之間¹⁰³；小於 10 nm 大小的載體在生物體內容易被腎臟排出¹⁰⁵；若大於 200 nm，則容易被脾臟和肝臟的孔洞攔截¹⁰⁶。而這樣大小的載體又有另一項優勢，可以藉由 EPR 效應 (Enhanced permeability and retention) 使藥物能夠通透至腫瘤的微血管，並滯留在腫瘤的位置¹⁰⁷。

1-6.2 中孔洞奈米二氧化矽球

中孔洞奈米二氧化矽球 (Mesoporous silica nanoparticle, MSN) 是藥物傳輸系統中常用的奈米載體之一¹⁰⁸。其形狀呈現六角形蜂窩狀，如圖 1-6 所示¹⁰⁹，具有穩定的化學性質，可形成固體多孔的骨架，相較於其他載體較為穩定，能減少藥物在血液中傳輸的過程中被釋出；其表面積大，可在其表面做特殊的修飾，改變其表面的性質或是接上治療藥物分子¹⁰⁸；具有較高的負載力 (Loading capacity)，1 克的 MSN 最多可裝載至約 600 mg 的藥物，且能夠裝載不同種類的分子藥物¹¹⁰；具有較佳的生物相容性，對生物的組織、血液及細胞不會造成太大毒性¹⁰⁹。

MSN 的應用性也是相當的廣泛；除了用在藥物傳遞系統外，可應用於細胞的偵測與追蹤¹¹¹；另外也有將 MSN 與核磁共振 MRI (Magnetic resonance imaging) 結合，增強診斷時的顯影效果¹¹²；目前也有許多的研究是利用 MSN 載體將藥物傳遞與生物診斷做結合。

依照 MSN 的結構可分成 MCM-41、MCM-48 等，本篇研究所使用 MSN 為 MMT2，其大小介於 90~120 nm，為立方體 *Ia3d* 的結構；MMT2 的 MSN 為中間空心，且外殼壁薄，其 TEM 圖如圖 1-7 所示，因此能夠裝載的藥物量較傳統 MCM-41 劑型的 MSN 更多；此載體在生物體液的環境下，會以片斷式的方式分解，因此更能夠被細胞清除¹¹³。



圖 1-6 MSN 構造¹⁰⁹

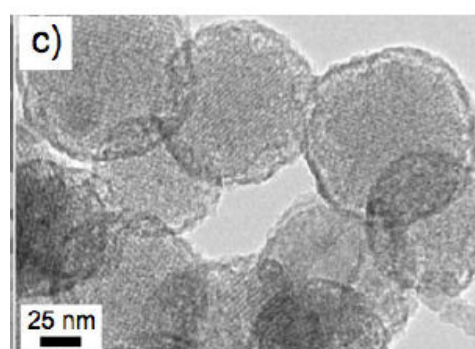


圖 1-7 MMT-2 之 TEM 圖¹¹³

1-6.3 主動與被動標靶

藥物傳輸系統中又可分為**被動標靶 (Passive targeting)**與**主動標靶 (Active targeting)**兩種類型¹¹⁴。被動標靶是奈米載體其表面未經過配體 (Ligand) 的修飾，以載體本身的大小 (10~200 nm)，表面的電荷與親疏水性，經靜脈注射後累積於腫瘤的位置，此現象稱為 EPR (Enhanced permeability and retention) 效應¹⁰⁷。

相較於被動標靶，主動標靶的奈米載體會在其表面多加配體的修飾，來增強其標靶的效率，以降低藥物對其他正常細胞造成的副作用。修飾在載體上的配體能夠與目標癌症細胞有專一性的結合，修飾的配體可以是小分子、抗體 (Antibody)、胜肽鏈 (Peptide) 或是適體 (Aptamer) 等¹¹⁵。

葉酸 (Folic acid) 是常用於主動標靶的營養分子，其能夠主動地標靶至過量表現葉酸受體的人癌症細胞，包括卵巢癌、直腸癌、肺癌、乳癌等¹¹⁶；除此之外，其他營養分子，如甘露糖 (Mannose) 也是具有標靶癌症細胞的功效¹¹⁷。

RGD 胜肽鏈，全名為 (Arginine-Glycine-Aspartate) 是常使用的主動標靶胜肽鏈，其與許多惡性癌症細胞表面上的整合素受體 (Integrin) $\alpha_v\beta_3$ 受體作用，使載體能夠以 Clathrin-mediate 方式胞吞進入細胞內，增加其被細胞吞噬的效果¹¹⁸。

適體 (Aptamer) 是近期常被使用的配體之一，是一段寡核酸或寡胜肽序列，長度約 15 至 70 個鹼基或胺基酸，能夠自我摺疊成 3D 構型與目標分子專一地結合；適體與目標分子之 Kd 值低，因此有很好的親和力。由於 DNA 相較於 RNA 穩定，故 DNA 適體的應用更為廣泛。相較於抗體，適體較容易合成，藉由活體外的實驗即可獲得；適體在高溫的環境下較抗體穩定，較易保存；適體對於活體的免疫反應較低；適體能夠結合的配體種類非常地廣泛，如小分子 (e.g., 金屬離子、有機分子、有機螢光、胺基酸等)、聚合分子 (e.g., 胜肽鏈、蛋白質等) 甚至是更為複雜的系統 (e.g., 病毒、細菌、整株活細胞體)。適體除了應用於診斷外，亦可應用於標靶治療¹¹⁹。

1-7 LXL-1 DNA 適體

LXL-1 是一段與 MDA-MB-231 乳癌細胞株具有專一性的 DNA 適體，其序列長度為 83 個鹼基，適體 3D 結構如圖 1-8，是由 2014 年 Chaoyong Yang 團隊利用 Cell-SELEX 的方式篩選出來¹¹⁹⁻¹²¹。Cell-SELEX 的步驟如圖 1-9 所示，分成正篩選與反篩選兩個步驟；正篩選是將設計不同序列的 DNA library 與目標細胞 (MDA-MB-231 惡性乳癌細胞) 一起培養，清洗掉無專一性的 DNA 序列後，再將具有專一性序列的 DNA 利用高溫改變 DNA 立體結構的方式釋出 DNA；反篩選是將具有專一性的 DNA 序列與正常細胞 (MCF-10 乳房上皮細胞) 進行反篩選，篩選出不會與此細胞結合的序列，經過 10 至 15 次的循環篩選後，即可得到與目標細胞具有高專一性的序列¹²²。

經由螢光訊號的測量，此序列與 MDA-MB-231 細胞株的 K_d 值約為 44 nM，具有很好的親和力。此外作者還將 LXL-1 與其他乳癌細胞株，如 MDA-MB-453、MCF-7、T-47D 等，及非乳癌細胞株，QSG-7701、QGY-7703、HepG2、Hela 等進行專一性的實驗，從結果可以確定此適體只有對 MDA-MB-231 的細胞株具有專一性¹²⁰；此團隊之後也利用 LXL-1 適體做乳癌的藥物標靶治療，也發現帶有 LXL-1 的載體能夠大量的累積在腫瘤位置，減少對其他器官組織的副作用¹²³。



LXL-1 DNA 適體序列：

5'- GAA TTC AGT CGG ACA GCG AAG TAG TTT TCC TTC TAA CCT AAG AAC

CCG CGG CAG TTT AAT GTA GAT GGA CGA ATA CGT CTC CC - 3'

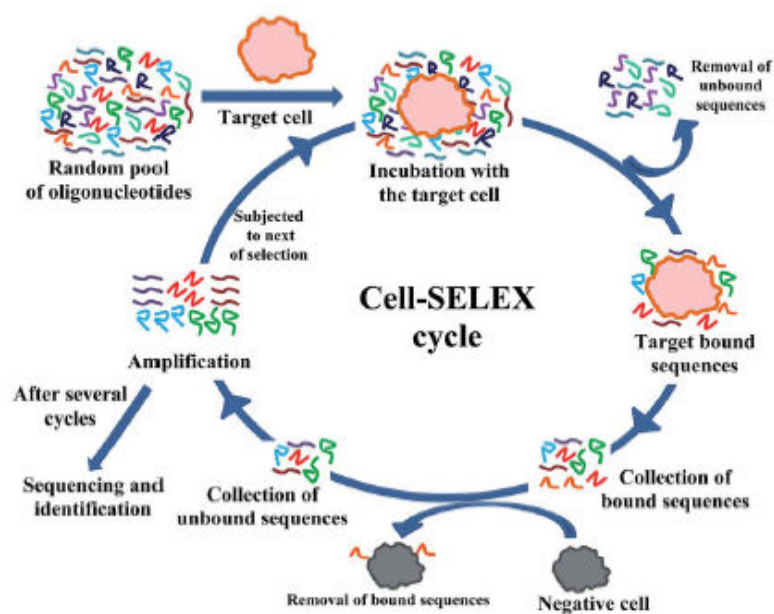
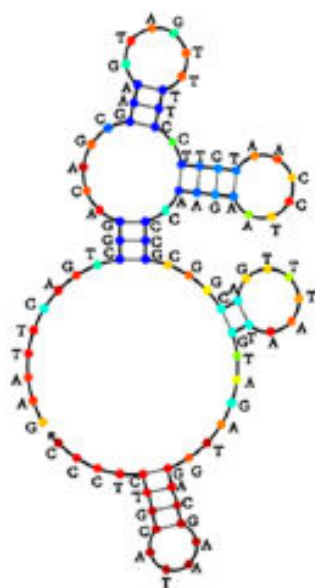


圖 1-8 LXL-1 適體 3D 結構¹²⁰

圖 1-9 利用 Cell-SELEX 篩選 DNA 適體步驟¹²¹



1-8 研究動機與發想

近日的研究中發現，腫瘤的低氧環境會造成癌症治療上的限制；如光動力治療在缺氧的環境中就會失去其產生單性氧分子的效能而降低其對癌症細胞的毒殺性；以及其本身在治療時，會造成局部微血管的破壞且產生血栓，雖然此現象是可以間接地殺死癌症細胞，但卻也造成其附近的微環境更為缺氧，而降低光動力產生單性氧分子，而降低其在活體上的療效。

因此本實驗的設計會利用兩種藥物來進行複合治療。利用常用的光敏劑 Protoporphyrin IX (PpIX) 以及在缺氧下才會被酵素活化的前驅型藥物 Tirapazamine (TPZ) 做複合型治療。

因為 TPZ 藥物的作用範圍是只限於缺氧環境下，若在有氧氣的存在會將其氧化成較無毒性的原型藥物；因此本研究的假設是希望透過光動力治療造成微環境中的氧氣下降，使 TPZ 維持在自由基型態 (TPZ \cdot)，增強其毒殺效果，將光動力治療原本的缺點在此搭配的治療下可以變成另一種治療上的優點。

由於兩種藥物的親疏水性不同，光敏劑 PpIX 較為疏水性，而 TPZ 相較於 PpIX 來說，較為親水性；因此當這兩種藥物做搭配治療時，藥物從血管進入到腫瘤的位置以及藥物被癌症細胞利用的效率會有所不同，將無法看到兩者藥物同時作用時所造成的協同效應。因此，本研究將利用一個可以載入大量藥物的奈米載體，中孔洞奈米矽球 (Mesoporous silica nanoparticle, MSN) MMT2 劑型，將光敏劑 PpIX 以共價修飾在載體內部，將 TPZ 負載於載體內，在 MMT2 的表面再修飾一段與人類乳癌細胞株 MDA-MB-231 親和力佳的 DNA 適體 LXL-1，這樣的適體除了可以做標靶治療之外，還可覆蓋於 MSN 表面之洞孔，減少內部的藥物 TPZ 的快速釋放(圖 1-10)。

希望藉由這樣的複合型的奈米載體藥物在以靜脈注射後，透過表面上的 DNA 適體 LXL-1 到達癌症的位置，減少對其他細胞的吞噬；再藉由載體的特性，

將藥物送至癌症更深層的組織內部，同時使兩種藥物同時作用以達到協同效應，達到更有效的癌症毒殺效果。

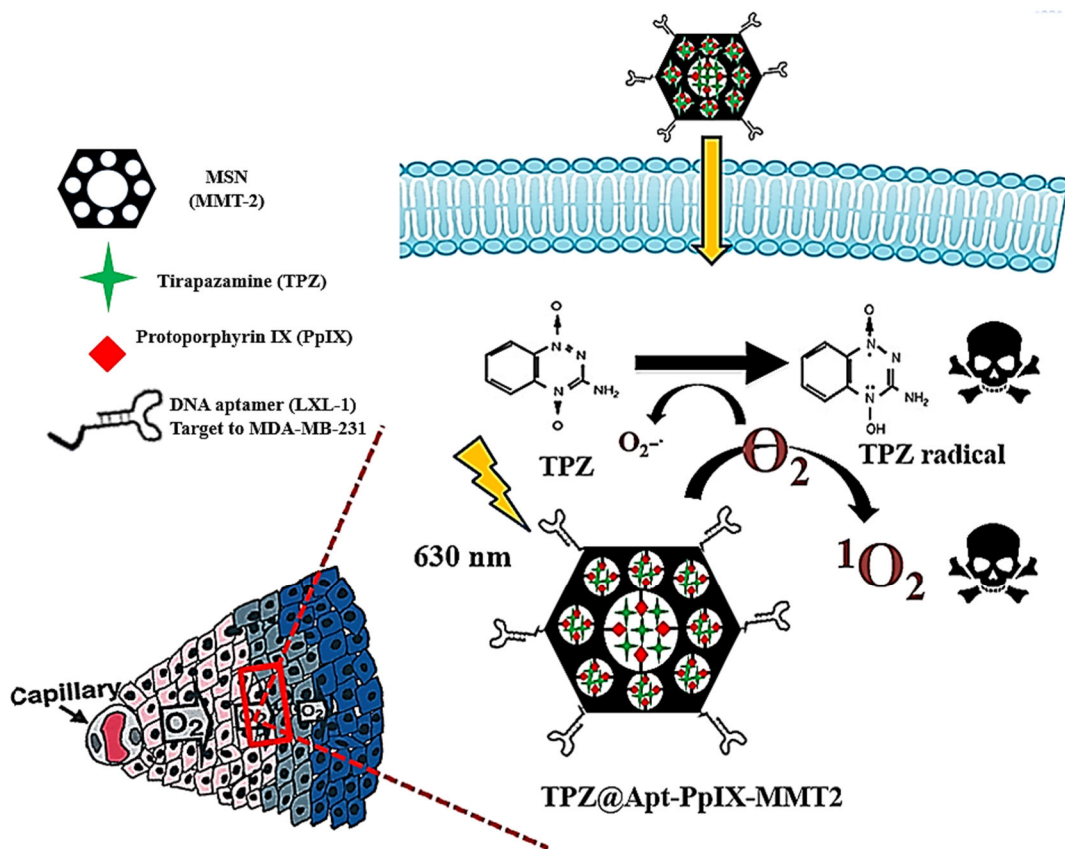


圖 1-10 研究發想

第二章 實驗材料、儀器與方法



2-1 實驗藥品與儀器

2-1.1 實驗藥品

表 2-1 實驗藥品

藥品名稱	分子式/縮寫	製造廠商
Acetonitrile	ACN	Avantor performance materials (Center Valley, PA, U.S.A.)
Bovine serum albumin	BSA	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate	DCFDA	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Dimethyl sulfoxide	DMSO	Fisher Chemico (Waltham, MA, USA)
1,3 Diphenylisobenzofuran	DPBF	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
DNA aptamer (LXL-1)	LXL-1 *	IDTDNA (Taoyuan, ROC)
EDTA-Tripsin		Gibco (Waltham, MA, USA)
Fetal bovine serum	FBS	Gibco (Waltham, MA, USA)
Minimum essential medium	MEM/EBSS	GE Healthcare Life Sciences HyClone (Logan, UT, USA)
Penicillin/Streptomycin	PS	Biosource (Camarillo, MD, USA)
Potassium chloride	KCl	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Potassium iodide	KI	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Potassium phosphate monobasic	KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Potassium phosphate dibasic	K_2HPO_4	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Propidium iodide	PI	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Protoporphyrin IX	PpIX	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Sodium chloride	NaCl	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Sodium dodecyl sulfate	SDS	J.T. Baker (Phillipsburg, USA)
Thiazolyl blue tetrazolium bromide	MTT	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Tirapazamine	TPZ	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Tris base		J.T. Baker (Phillipsburg, USA)
Tris(2-carboxyethyl)phosphine	TCEP	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Trypan blue solution		Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

*LXL-1 序列：

5' thio-GAA TTC AGT CGG ACA GCG AAG TAG TTT TCC TTC TAA CCT AAG
AAC CCG CGG CAG TTT AAT GTA GAT GGA CGA ATA CGT CTC CC – 3'

PBS(Phosphate buffer saline) 配方 (100 mM, 1L)

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na_2HPO_4	1.44 g
KH_2PO_4	0.24 g



RIPA 配方 (100 ml):

NaCl	0.8775 g
NP40 (Nonidet P40)	1 ml
Sodium deoxycholate	0.5 g
SDS	0.1 g
Tris base	0.60 g

2-1.2 實驗儀器

表 2-2 實驗儀器

儀器名稱(英文,縮寫)	廠牌型號
微孔盤分析儀 (ELISA reader)	Tecan Sunrise (Männedorf, Switzerland)
分光分析儀 (Microplate reader)	Thermo Scientific Varioskan Lux (Waltham, MA USA)
高速離心機 (High speed centrifuge)	Hermle Z 36 HK (Wehingen, Germany)
倒立式顯微鏡 (Microscope)	Olympus IX-71 (Tokyo, Japan)
恆溫水浴槽 (Water bath)	Thermo Scientific Precision 280 series (Waltham, MA USA)
恆溫培養箱 (Cell incubator)	ASTECSA-165DS (Japan)
酸鹼度計 (pH meter)	PB-10 Sartorius (Göttingen, Germany)
震盪器 (Vortex-Genie2)	G-560 Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
光功率計 (Optical power meter)	Newport Model 1916-C/-R (Irvine, CA, USA)
流式細胞儀 (Flow cytometry)	FACSCalibur Becton Dickinson (East Rutherford, NJ, USA)
無菌操作袋 (AtmosBag)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
超聲波液體震盪器 (Sonicator)	Aquanonic 75D VWR (NY, USA)
動態光散射儀 (Dynamic light scattering)	Zetasizer Nano ZS Malvern (Worcestershire, UK)
冷凍乾燥機 (Freeze dryer)	ModulydoD-115 Thermo (Logan, UT, USA)
影像顯影系統 (Imaging system)	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)

2-1.3 實驗細胞株

表 2-3 實驗細胞株

癌症細胞株	所屬種類	取得來源
MDA-MB-231	Human breast adenocarcinoma	BCRC No. 60425 (Hsinchu, Taiwan)
MCF-7	Human breast adenocarcinoma	BCRC No. 60436 (Hsinchu, Taiwan)
MCF-10A	Human breast epithelial cell	

2-1.4 氣體

表 2-4 實驗氣體

氣體比例	廠商
100% CO ₂	巧充 (Taipei, Taiwan)
1% O ₂ 、5% CO ₂ 、94% N ₂	信華 (Taipei, Taiwan)
2% O ₂ 、5% CO ₂ 、93% N ₂	信華 (Taipei, Taiwan)
5% O ₂ 、5% CO ₂ 、90% N ₂	信華 (Taipei, Taiwan)

2-1.5 光源設備

光源為 Edison LED 紅光燈泡，波長為 630 nm，燈泡以串聯方式連接，一排有 4 個燈泡，一共有 4 排；燈泡大小與 96 孔盤的孔徑吻合，燈泡的擺置間距為兩個 96 孔洞的距離，如圖 2-1 所示。為了減少光源色散的影響，照射的光線會先透過一個黑盤，將雜亂的光線過濾掉，最後再照射在白盤上，白色具有聚光的效果，能夠完全的使光源完全集中在孔盤中，光源的照射如圖 2-2 所示。

利用光功率計所測得的燈泡為 15.15 mW，將其瓦數乘以其光照的表面積 2.45 cm²，經過計算得到的結果為 37.12 mW；計算平均每個 well 照光 1 分鐘所得到的能量，將 37.12 mW 除以 96 孔盤的面積 0.3165 cm² 乘以照射時間 1 分鐘，計算的結果為 7.03 J/cm²，即為每個 well 受到光源照射時的能量。

$$15.15 \text{ mW} \times 2.45 \text{ cm}^2 = 37.12 \text{ mW}$$

$$37.12 \text{ mW} / 0.3165 \text{ cm}^2 \times 60 \text{ sec} = 7.03 \text{ J/cm}^2$$

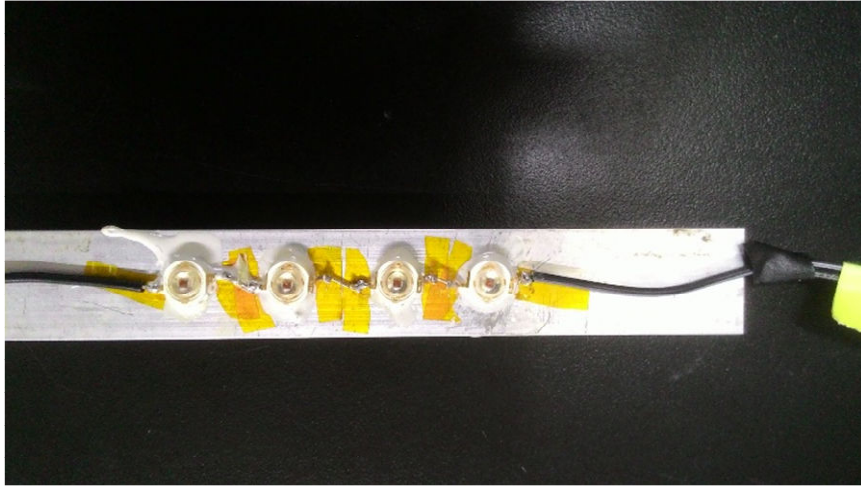


圖 2-1 實驗光源

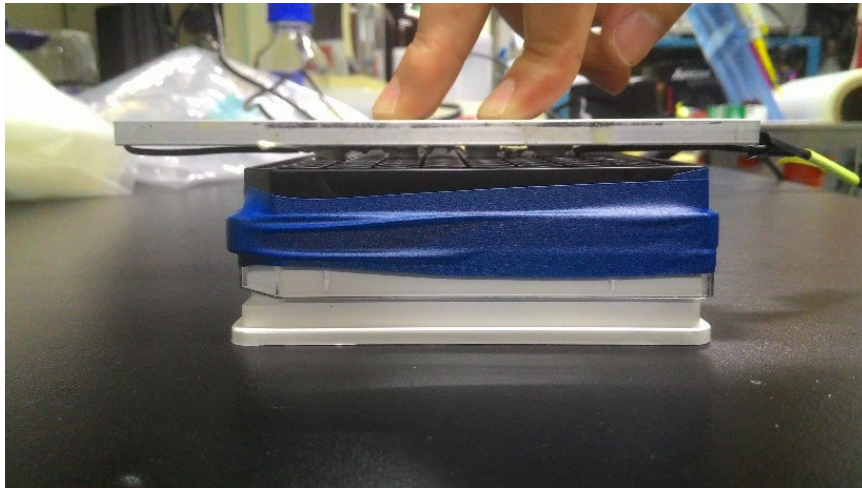


圖 2-2 光源擺設於 96 孔盤的方式

2-1.6 氣密袋與低氧環境的操作

密封氣體袋是參照 2014 年的文獻¹²⁴，利用具有氣密性質的透明聚乙烯袋子裁減成長 40 cm 寬 29 cm 氣密袋，一邊用封口機密封，另一邊在放入細胞後用密封夾封住，如圖 2-3 所示。

若要加入藥物處理或是需要照光時，會使用 Atmosbag 的無菌操作袋，其大小約為 39 x48 (inch)、可容納的氣體體積約為 280 L。操作前先將袋子裡的氣體完全抽出，再灌入實驗所需要的氣體操作，如圖 2-4 所示。



圖 2-3 氣密袋

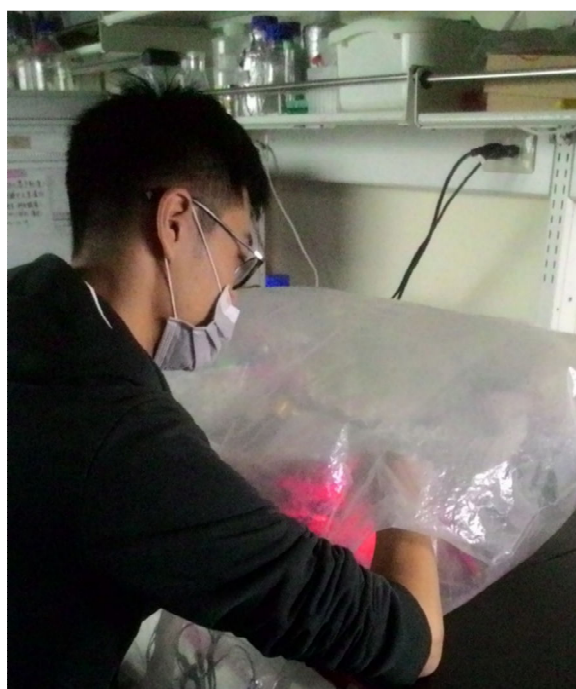


圖 2-4 低氧環境操作

2-2 單線態氧分子的測定

本研究利用 1973, Allen J. Bard, DPBF assay 來測定單線態氧分子¹²⁵。此方法的原理是因為 DPBF (1,3-Diphenylisobenzofuran) 與單線態氧分子作用後產生不可逆的化學反應，最終的產物為 DBB (o-Dibenzoylbenzene)，其反應式如圖 2-5；DPBF 分子在 410 nm 的光照射下有最強的吸收，而 DPBF 與單線態氧分子作用後之產物 DBB 無 410 nm 的光吸收，因此可藉由測得 410 nm 的吸收值下降，來推算單線態氧分子產生的多寡。

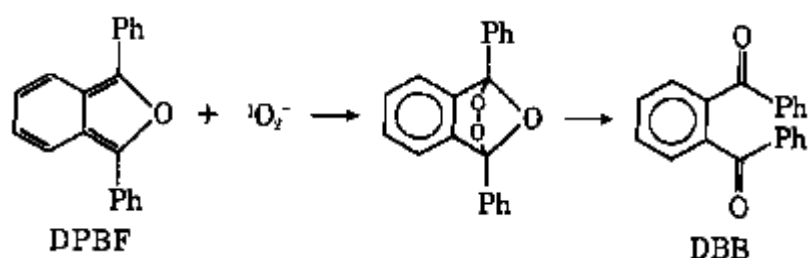


圖 2-5 DPBF 與單線態氧分子的反應式

2-2.1 PpIX 在不同濃度與不同照光時間下產生單線態氧分子之變化

- (1) 以 DMSO 當溶劑，配製濃度為 250 μM 的 DPBF 溶液。
- (2) 將不同濃度的 PpIX (0、0.2、0.4 以及 0.8 μM)，加入 250 μM DPBF 的溶液中，再將配製好的溶液以每個 well 100 μL 的體積加入 96 well 的孔盤中。
- (3) 予以紅光分別照射 10、20 及 30 秒。
- (4) 結果以 ELISA microplate reader 分析，測量樣品於 410 nm 的吸光值。以 DMSO 溶劑的 410 nm 吸光值當作空白組 (blank)，250 μM DPBF 溶液的 410 nm 吸光值當作控制組 (control)，sample 的吸光值扣除空白組再除以控制組後乘以 100%，即為 DPBF 在此反應中與單線態氧分子作用後所消耗的百分比。

2-2.2 PpIX 在不同氧氣濃度環境下產生單線態氧分子之變化

- (1) 將 DMSO 溶劑除去氣體約 10 分鐘，再灌入氮氣 10 分鐘將溶劑中的氧氣除去。
- (2) 將溶劑放於無菌手套袋中，先將袋中的氣體完全抽出，再灌入不同氧氣壓力的氣體，分別為 0%、1%和 5% 的 O₂ 混合氣體。
- (3) 在不同氧氣環境下配置 250 μM 的 DPBF 溶液；將 DPBF 與 0.8 μM 的 PpIX 混合，以每個 well 100 μL 的體積加入 96 孔盤中。
- (4) 予以紅光分別照射 10、20、30 秒。
- (5) 最後的結果藉由 ELISA microplate reader 分析。

2-2.3 比較 PpIX、PpIX-MMT2 和 Apt-PpIX-MMT2 產生單線態氧分子之效率

- (1) 以 DMSO 當溶劑，配製濃度為 250 μM 之 DPBF 溶液
- (2) 分別加入濃度為 0.4 μM 的 PpIX、PpIX-MMT2 及 Apt-PpIX-MMT2 三種組別
- (3) 將配製好的溶液以每個 well 為 100 μL 的體積加入 96 well 中。
- (4) 予以紅光分別照射 10、20、30、40 及 50 秒
- (5) 結果以 ELISA microplate reader 分析。

2-3 PpIX-MMT2、Apt-PpIX-MMT2 及 TPZ@Apt-PpIX-MMT2 的合成

本實驗是將 PpIX 和 aptamer 兩者以共價鍵的方式修飾於載體 MMT2 上，最後的 TPZ 藥物再以含浸的方式載入 MMT2 載體裡。MMT2、PpIX-MMT2 及 Maleimide-PpIX-MMT2 是由清大化學系楊家銘教授實驗室林芝宇同學合成，而 DNA 適體的修飾及 TPZ 藥物的含浸是在本實驗室合成。

DNA aptamer 修飾於載體的合成步驟

- (1) 第一步驟是還原帶有硫基修飾的 DNA aptamer。取 10 μL , 200 μM 具有硫基修飾的 aptamer 與 3.4 μL , 1 mM 的 TCEP 於室溫作用 30 分鐘。
- (2) 秤取 0.5 mg 的 Maleimide-PpIX-MMT2，以 500 μL 的 ddH₂O 回溶，用 60 Hz 的 sonicator 震 3 分鐘，將奈米粒子震勻。
- (3) 將經過還原的 aptamer 與 Maleimide-PpIX-MMT2 混合，再加入 500 μL , pH 值為 7.4 的 1mM 的 phosphate buffer，於室溫反應 4 小時。
- (4) 以 9,500 g 的轉速將反應後的產物 Apt-PpIX-MMT2 離心下來，並以 ddH₂O 清洗 3 次，最後以體積 500 μL 的 ddH₂O 回溶，並分成 5 管，以冷凍乾燥的方式將其中的水份去除，再放入 4°C 冰箱保存。

TPZ@Apt-PpIX-MMT2

- (1) 將 TPZ 溶於 ddH₂O 中，配置濃度為 1.2 mg/mL 的 TPZ 溶液。
- (2) 以莫爾數 PpIX: TPZ=0.4: 60 之比例將 TPZ 溶液含浸於粉末狀的 Apt-PpIX-MMT2，分次含浸，每次含浸的體積為 50 μL 。
- (3) 以加熱的方式將其中的水份揮發，即獲得 TPZ@Apt-PpIX-MMT2。



2-4 載體的鑑定

將 DNA aptamer 修飾在載體後，將利用 DLS (Dynamic light scattering)來鑑定載體之粒徑大小，以及 DNA Aptamer 修飾前後之載體介面電荷的變化。

DLS 鑑定

- (1) 將製備完的 Apt-PpIX-MMT2 以及未修飾適體的 Maleimide-PpIX-MMT2 以 0.01 mg/mL 的濃度溶於 pH 值為 7.4，濃度為 1 mM 的 Phosphate buffer。
- (2) 利用超音波震盪 3 分鐘。
- (3) 以動態光散射儀 (Dynamic light scattering, DLS)鑑定之。

2-5 定量載體內的 PpIX

本研究定量 PpIX 修飾於載體 (PpIX-MMT2)之 PpIX 含量的方法是參考 2009 年 Chung-Yuan Mou 團隊定量 PpIX-MSN 的方法¹²⁶。

- (1) 將 PpIX-MSN 溶於 DMSO 溶劑中
- (2) 用 PpIX-MSN 溶於 DMSO 溶劑中，測量 PpIX 在 405 nm 之吸光值
- (3) 做一條 Free drug PpIX 溶於 DMSO 之檢量線(圖 2-6)
- (4)將 PpIX-MSN 所測得的吸光值帶入檢量線中，即可回推 1 mg 的 PpIX-MSN 中含有多少 PpIX 分子。

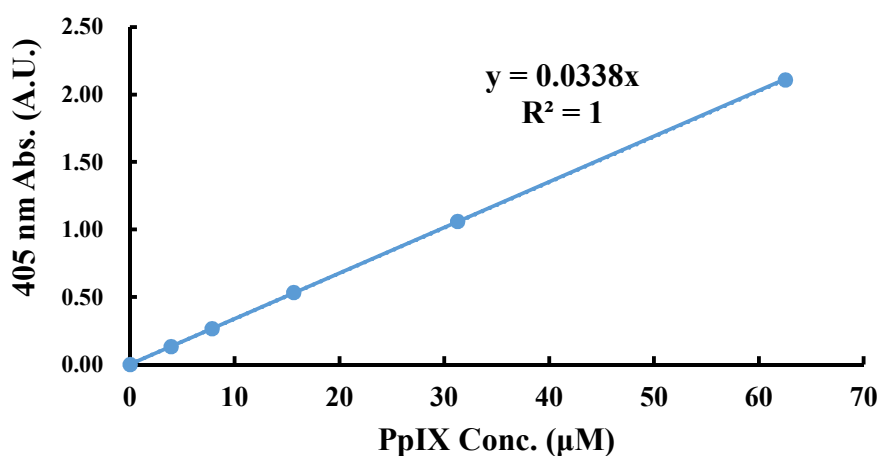


圖 2-6 PpIX 濃度檢量線

2-6 細胞培養

MDA-MB-231、MCF-7 和 MCF-10A 三種細胞株的皆培養於 10 公分盤中，培養環境維持在 5% CO₂，37°C 下。培養溶液分為 MEM (Minimum Essential Medium) 溶液、MEM (含 1mM 的 essential amino acid 以及 1mM 的 pyruvate acid) 以及 α-MEM 溶液。培養溶液另外再添加 10% 的小牛蛋白血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) 以及 1% 的抗生素 (penicillin/streptomycin, PS solution)，培養液 pH 值介於 7.2~7.4 間。每三天繼代一次，每次繼代的細胞數量約為 2x10⁶ 個細胞。

繼代步驟

- (1) 將八分滿的細胞盤的上清液去除。
- (2) 以 5 mL 的 PBS 清洗兩次。
- (3) 加入 500 μL 的 EDTA-trypsin 置於 37°C incubator 反應 5 分鐘。
- (4) 加入 500 μL 的 MEM 終止 EDTA-trypsin 的反應，並將細胞液裝入 1.7 mL 的 eppendorf 中。
- (5) 以 12,000 rpm 的轉速離心 5 分鐘將 EDTA-trypsin 去除，再用 1 mL 的 MEM 懸浮細胞液，以 2x10⁶ 個細胞數種至 10 cm 盤中。

冷凍細胞步驟

- (1) 將八分滿的細胞盤上清液去除。
- (2) 以 5 mL 的 PBS 清洗兩次。
- (3) 加入 500 μL 的 EDTA-trypsin 置於 37°C incubator 反應 5 分鐘。
- (4) 加入 500 μL 的 MEM 終止 EDTA-trypsin 的反應，並將細胞液裝入 1.7 mL 的 eppendorf 中。
- (5) 以 12,000 rpm 的轉速離心 5 分鐘將 EDTA-trypsin 去除，再用含有 7% DMSO 的 MEM 溶液懸浮細胞，以每管含有 2x10⁶ 顆細胞的數目裝至冷凍小管中。
- (6) 放入 4°C 冰箱 10 分鐘，再放入 -20°C 冰箱 30 分鐘，最後放入 -80°C 冰箱一天。
- (7) 再將冷凍的細胞株放進液態氮裡保存。

2-7 細胞內 ROS 測定

本研究利用 DCFDA (2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate) 的方式來觀察不同氧氣濃度下 PpIX 對細胞產生的 ROS 量。DCFDA 物質是不具有螢光，必須先進入到細胞內，被細胞內的酯酶(esterase)去醯化(deacetylation)形成 DCFH (2',7'-Dichlorohydrofluorescein)，此分子才能與 ROS 作用，且被 ROS 氧化後形成 DCF (2',7'-Dichlorofluorescein) 的綠色螢光分子，藉由 488 nm 的激發後會產生 525 nm 的綠光¹²⁷。化學反應式如圖 2-7 所示。

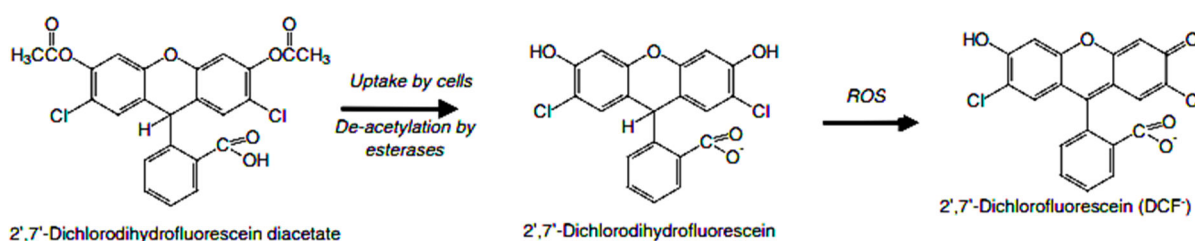


圖 2-7 DCFDA 與 ROS 作用機制

- (1) 將 MDA-MB-231 細胞以 10^4 個/100 μL 的密度種至 96 孔盤中，裝進不同氧氣濃度(5%, 2%, 1%)的氣密袋中培養細胞 18 小時。
- (2) 在無菌操作袋中加入 0.4 μM PpIX，培養 5 小時。
- (3) 在無菌操作袋分別予以照光 0、1、2、3 及 4 分鐘。
- (4) 加入 40 μM 的 DCFDA 溶液，培養 30 分鐘。
- (5) 利用 Microplate ELISA reader 來測量。激發光為 488 nm，產生的綠色螢光為 525 nm。
- (6) 結果處理是將未加入 DCFDA 組別的螢光值當作 blank。只有加入 DCFDA 和 PpIX，但未照光的組別的螢光值當作 control。各組別 normalize 的方式是將各組的 525 nm 螢光值扣掉 blank 再除以 control。

2-8 細胞存活率測試

本實驗檢視細胞存活率的方法使用 MTT assay，其原理為活體細胞中的琥珀酸脫氫酶 (Succinate dehydrogenase, SDH) 使添加的 MTT 分子 (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 還原成不溶於水的藍紫色結晶沉澱物 formazan，反應式如圖 2-8 所示。

MTT assay 步驟

- (1) 將細胞液上清液抽出
- (2) 加入 100 μL 濃度為 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液。
- (3) 放進 37°C incubator 培養 2 小時。
- (4) 去除 MTT 溶液，以 100 μL 的 DMSO 回溶紫色結晶物。
- (5) 以 ELISA reader 來測量 570 nm 的吸收值。

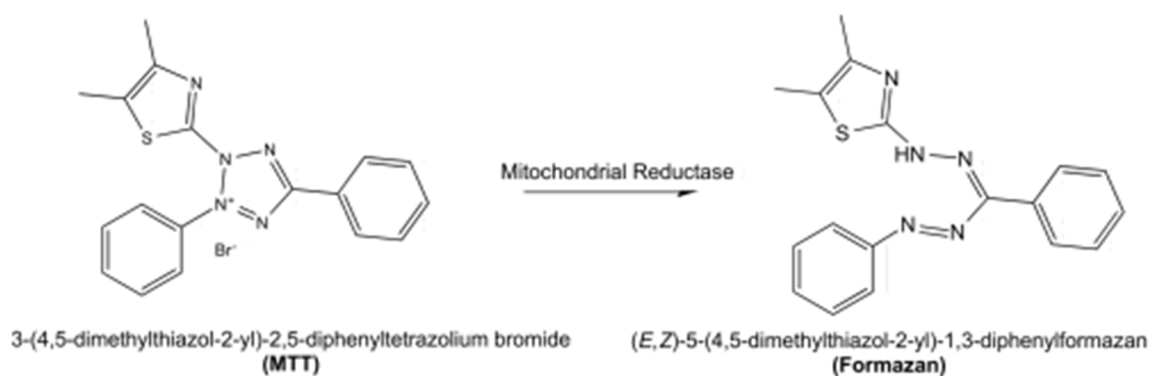


圖 2-8 MTT assay 的反應式



2-8.1 PpIX 藥物在不同氧氣濃度下的毒殺實驗

- (1) 將 MDA-MB-231 的癌症細胞以每 well 10^4 個/100 μ L 的密度種在 96 well 的白盤中。
- (2) 裝入氣密袋後分別灌入不同氧氣濃度的氣體 5%、2%、1%，再放入 incubator 中培養 18 小時。
- (3) 在無菌操作袋裡加藥，如圖 2-4 所示。PpIX 的濃度分別為 0、0.2、0.4 及 0.8 μ M。
- (4) 加藥完 5 個小時後予以照光，照光時間分別為 0、1、2、3 及 4 分鐘。照光後放入氣密袋裡培養 19 小時。
- (5) 進行 MTT assay 測量細胞的存活率。

2-8.2 TPZ 藥物在不同氧氣濃度下的毒殺實驗

- (1) 將 MDA-MB-231 的癌症細胞以每 well 10^4 個/100 μ L 的密度種於 96 well 的孔盤中。
- (2) 裝入氣密袋後分別灌入不同氧氣濃度的氣體 5%、2%、1%，放入 incubator 中培養 18 小時，培養完再放入無菌操作袋中下 TPZ 的藥物。TPZ 的濃度為 0、20、40、60 及 80 μ M，加藥完放入氣密袋中培養。
- (3) 下藥完待 24 小時後進行 MTT assay 測量細胞的存活率。

2-8.3 PpIX 與 TPZ 兩種藥物的合併治療

- (1) 將 MDA-MB-231 的癌症細胞以每 well 10^4 個/100 μ L 的密度種在 96 well 的孔白盤中。
- (2) 裝入氣密袋後分別灌入不同氧氣濃度的氣體 5%、2%、1%，放入 incubator 中培養 18 小時。
- (3) 在無菌操作袋中分別加入四種組別 Control、PpIX、TPZ 以及 PpIX 和 TPZ 的

合併組別。PpIX 濃度為 0.4 μ M、TPZ 濃度為 60 μ M。

(4) 待 5 小時後在無菌操作袋中進行照光，照光時間為 1 分鐘，再放入氣密袋培養 19 小時。

(5) 進行 MTT assay 測量細胞的存活率。



2-8.4 載體毒殺實驗

(1) 將 MDA-MB-231 的癌症細胞以每 well 10^4 個/100 μ L 的密度種在 96 well 孔盤中。

(2) 待 18 小時加入不同濃度的空載體 MMT2，載體濃度分別為 0、1.12、2.24、4.48、8.96 及 17.92 ppm。

(3) 待 19 小時進行 MTT assay 測量細胞的存活率。

2-8.5 Apt-PpIX-MMT2 毒殺實驗

(1) 將 MDA-MB-231 的癌症細胞以每 well 10^4 個/100 μ L 的密度種在 96 well 孔盤中。

(2) 待 18 小時加入不同濃度的 Apt-PpIX-MMT2，濃度分別為 0、0.585、1.17 及 2.34 ppm。

(3) 待 5 小時照光 1 分鐘。

(4) 待 19 小時進行 MTT assay 測量細胞的存活率。

2-8.4 TPZ@Apt-PpIX-MMT2 的毒殺實驗

(1) 將 MDA-MB-231 的癌症細胞以每 well 10^4 個/100 μ L 的密度種在 96 well 的孔盤中。

(2) 裝入氣密袋後分別灌入不同氧氣濃度的氣體 5%、2%、1%，放入 incubator 中培養 18 小時。

(3) 在無菌操作袋中加入 TPZ@Apt-PpIX-MMT2，待 5 小時後予以照光 1 分鐘。

(4) 放入氣密袋培養至 19 小時後再進行 MTT assay 測量細胞的存活率。



2-9 細胞吞噬 Apt-PpIX-MMT2 實驗

為了要看到修飾完 DNA 適體的載體具有對於人類 MDA-MB-231 乳癌細胞具有專一性，因此選用不同種類的細胞，MCF-7 人類乳癌細胞及 MCF-10A 人類乳房上皮細胞來當作對照組，觀察 Apt-PpIX-MMT2 是否能夠有效地針對 MDA-MB-231 乳癌細胞具有專一性。

2-9.1 流式細胞儀分析

- (1) 分別將 MDA-MB-231、MCF-7 及 MCF-10 三種細胞株以 2×10^5 個/1 mL 的密度種至 12 well 孔盤中。
- (2) 待 18 小時細胞貼盤後加入含有 $0.4 \mu\text{M}$ PpIX 的 Apt-PpIX-MMT2，靜置於 37°C 培養箱內 5 小時。
- (3) 抽去孔盤內的 medium，用 PBS 清洗兩次後再加入 EDTA-trypsin 將細胞從 plate 上收下，裝入 1 ml 的 eppendorf 中。
- (4) 用 12,000 rpm 離心 5 分鐘將 EDTA-trypsin 離去。
- (5) 以 $500 \mu\text{L}$ 的 PBS 回溶細胞沉澱。
- (6) 將回溶的細胞懸浮液通過流式細胞儀，定義細胞群大小集中的範圍，以一萬顆細胞做 gating，分析不同細胞處理藥物後，吞噬的 PpIX 的螢光強度。

2-9.2 萃取細胞內 PpIX 的含量

- (1) MDA-MB-231、MCF-7 及 MCF-10A 三種細胞株以 2×10^5 個/1 mL 的密度種於 24 well 的孔盤中。
- (2) 待 18 小時細胞貼盤後加入含有 $0.4 \mu\text{M}$ PpIX 的 Apt-PpIX-MMT2，靜置於 37°C 培養箱內 5 小時。
- (3) 處理完藥物後，用 PBS 清洗兩次。
- (4) 用 RIPA buffer 溶液混合貼盤的細胞株，用 vortex 震盪 15 分鐘，使細胞膜完全破裂。

- (5) 將細胞萃取液轉移至黑盤透明底的 96 孔盤，用 ELISA microplate reader 分析 PpIX 的螢光值，PpIX (Ex : 401 nm, Em : 635 nm)。
- (6) 做出不同濃度之 PpIX 螢光檢量線(圖 2-9)，再將細胞萃取液的 PpIX 螢光值代入檢量線中做運算，即可得到 PpIX 於不同細胞內之濃度。
- (7) 細胞的萃取液再利用 Bradford assay 來定量其中的蛋白濃度，將蛋白濃度當成每一實驗組別之 internal control，分析方式是將每一組別的 PpIX 濃度除以蛋白濃度，再進行比較。

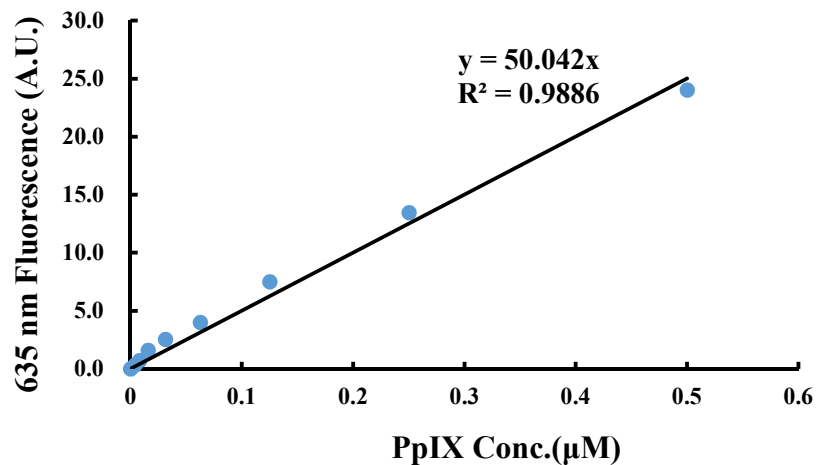


圖 2-9 PpIX 螢光檢量線

第三章 實驗結果與討論



3-1 實驗設計與目的

本實驗的設計中會先分別觀察兩種藥物，光敏劑 PpIX 和缺氧還原型藥物 TPZ 在不同氧氣濃度下對人類乳癌細胞 MDA-MB-231 的毒殺效果。氧氣的濃度設計分成 21%、5%、2%及 1%。據先前文獻指出，21%氧氣濃度是一般細胞培養的條件，但以生理的環境下，並無 21%的氧氣濃度。5%氧氣濃度是周邊組織的生理氧氣濃度，2%氧氣濃度是生理性缺氧，1%氧氣濃度是病理性缺氧¹⁷。因此三種氧氣濃度的設計是欲模擬兩種藥物於腫瘤為環境中不同氧氣濃度下之療效，藉挑選出兩種藥物最佳的比例及實驗條件。本研究也將深入探討 PpIX 光敏劑於不同氧氣濃度下產生的 $^1\text{O}_2$ 及 ROS 的效率，利用 DPBF assay 及 DCFDA assay 測量不同氧氣濃度對於照光後的 PpIX 產生的單線態氧分子及 ROS 之效率。

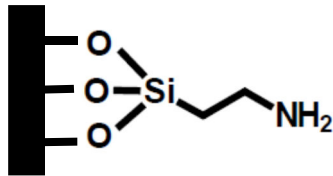
找出兩種藥物合併後最佳的比例及實驗條件後，接下來是將兩種藥物合併於載體內。本研究是將 PpIX 分子修飾於載體內，TPZ 藥物以含浸方式裝載於載體裡，此外於載體表面再修飾一段與 MDA-MB-231 乳癌細胞株具有專一性的 DNA 適體 LXL-1，來進行標靶合併治療。載體 MMT2 的製備、PpIX 藥物的修飾是由清大化學系楊家銘老師實驗室林芝宇博士合成；DNA 適體的修飾及 TPZ 藥物的含浸是於本實驗室合成。

合成步驟是先於載體 MMT2 移除表面活性劑之前進行表面外修飾，加入 APTMS ((3-Aminopropyl)trimethoxysilane) linker，使載體表面帶有胺基(Amine, NH_2)(圖 3-1A)，再加入 Sulfo-SMCC (Sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate)作用，將表面的胺基轉化成帶有 Maleimide 官能基(圖 3-1B)，以利後續與帶有巯基(Thiol, SH)的 DNA 適體鍵結(圖 3-1C)；之後再移除表面活性劑後，於內部裸露的孔洞上進行 PpIX 分子之修飾，這樣的修飾方式可將 PpIX 分子修飾於載體內部。

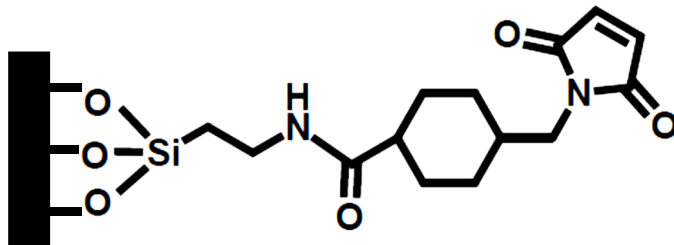
PpIX 的修飾方式

移除表面活性劑之後，加入 APTMS 使載體內部表面帶有胺基 (Amine, NH_2)。再利用 EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) / NHS (N-Hydroxysuccinimide) 的方式將 PpIX 上的羧基 (Carboxylate, COOH) 與載體上的胺基形成胺鍵 (Amide bond)，合成的產物如圖 3-1D 所示。

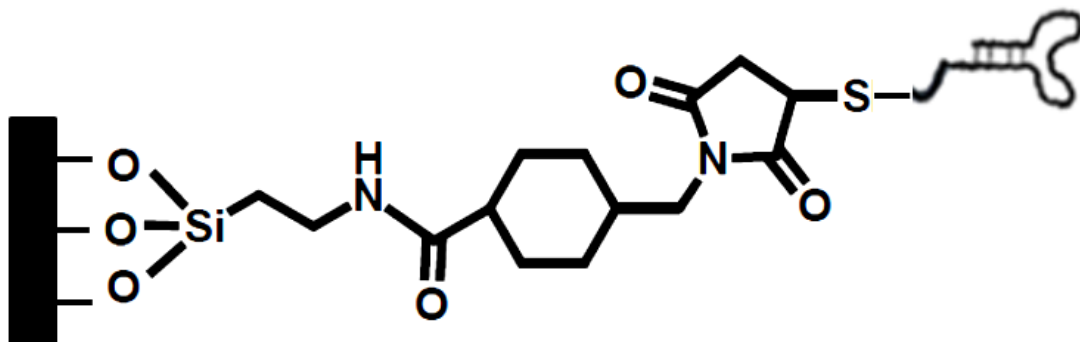
3-1 (A) APTMS-MMT2



3-1 (B) Maleimide-APTMS-MMT2



3-1 (C) Apt-MMT2



3-1 (D) PpIX-MMT2

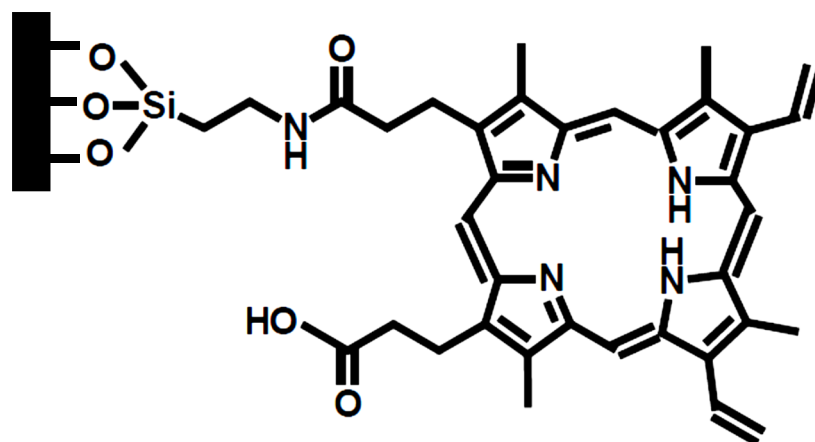


圖 3-1 共價修飾方式

修飾 DNA 適體後的載體 Apt-PpIX-MMT2 將利用 DLS (Dynamic light scattering) 鑑定載體之大小及修飾適體前後之介面電荷變化。

最後是比較 Apt-PpIX-MMT2 是否能夠針對 MDA-MB-231 乳癌細胞具有選擇性，利用 MCF-7 乳癌細胞及 MCF-10A 乳房上皮細胞進行細胞吞噬之比較。由於 PpIX 經由 405 nm 的光波激發後會釋放出 634 nm 螢光波長，可藉此特性觀察藥物在細胞內的累積量，利用流式細胞儀 (flow cytometry) 與萃取細胞內之 PpIX 兩種方式來證明 Apt-PpIX-MMT2 是否有效地被 MDA-MB-231 乳癌細胞所吞噬，探討適體的修飾降低其他細胞的吞噬率進而減少副作用。

最後是比較兩種藥物裝載的 TPZ@Apt-PpIX-MMT2 與 free drug 的形式對於 MDA-MB-231 乳癌細胞的毒殺效果，是否可藉由這樣的劑型來達到更有效的治療。

3-2 定量 PpIX 受到光照射後產生的單線態氧分子

此實驗為利用 DPBF (1,3 Diphenylisobenzofuran) assay 定量光敏劑 PpIX 受到 630 nm 的 LED 光激發後產生之單線態氧分子。其原理為 DPBF 分子與單線態氧分子作用後生成 DBB 分子(o-Dibenzoylbenzene)，由於 DPBF 分子在 410 nm 具有吸收峰而 DBB 分子在 410 nm 沒有，因此可藉由所測得的 410 nm 吸收值之減少進而定量單線態氧分子之生成量¹²⁵。圖 3-2 是不同濃度的 PpIX 在 21% 的氧氣濃度下經過不同照光時間後產生的單線態氧分子結果。結果中顯示 DPBF 分子會隨著 PpIX 的照光時間增加而減少，且 PpIX 分子的濃度愈高，DPBF 下降之斜率也愈大。由此可證明單線態氧分子的生成與 PpIX 濃度以及 PpIX 的照光時間成正比。由於 0.8 μM 的 PpIX 在經過 30 秒的照射後減少的 DPBF 最多，因此將以此濃度條件來進行不同氧氣濃度下產生單線態氧之條件。

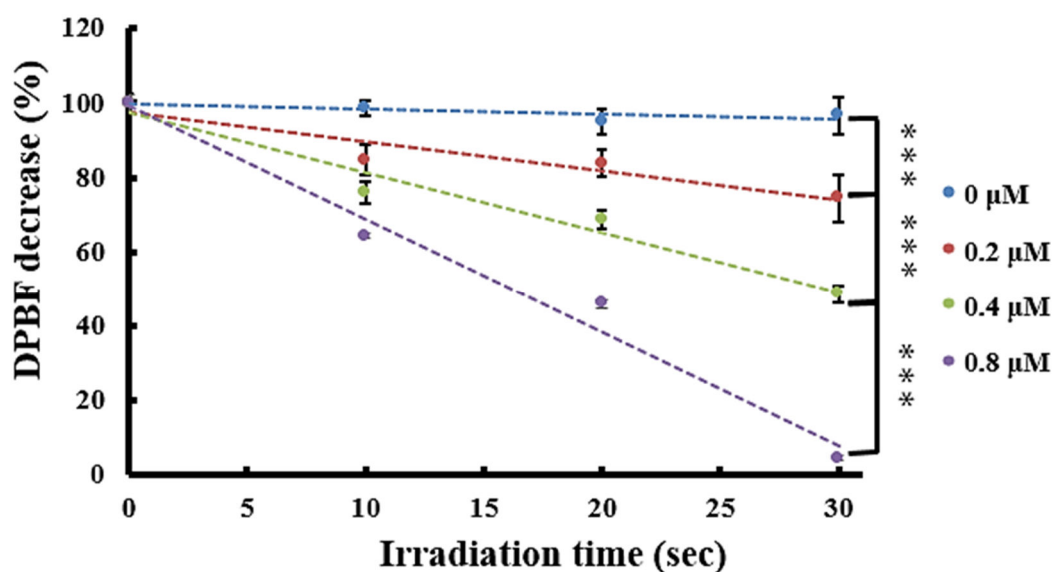


圖 3-2 定量 PpIX 在受到光激發後生成的單線態氧分子。PpIX 濃度分別為 0、0.2、0.4 和 0.8 μM ，照光時間為 10sec、20 sec、30 sec

3-3 比較 PpIX 於不同氧氣濃度下產生單線態氧分子之效率

光動力治療的三大基本元素是光敏劑、光以與氧氣⁴⁸。由圖 3-2 之結果看到單線態氧分子的生成會受到光敏劑之濃度以及光敏劑的照光時間而有所影響，因此接下來的實驗欲證明氧氣濃度是否影響光敏劑產生單線態氧分子之效率。本實驗利用 DPBF assay 來測量 0.8 μM 的 PpIX 分別在 0%、1%、5%及 21%的氧氣濃度下照光後產生單線態氧氣的效率。由圖 3-3 結果可以看到在 0%氧氣濃度下，PpIX 照射 30 秒後 DPBF 只減少約 12%；而 21%氧氣濃度的 PpIX 照射 30 秒後下降了 96%，代表單線態氧分子必須要在氧氣充足的條件下才能較有效地生成。5%氧氣濃度是組織的生理氧氣濃度，此氧氣濃度照光 30 秒後造成約 60%的 DPBF 減少，相較於一大氣壓下的氧氣濃度 21%的結果，產生單線態氧分子的效率明顯地減少， $P < 0.001$ ，由此解釋光動力治療目前仍只能應用於表層組織的癌症治療，如皮膚癌、口腔癌、頭頸癌等，對於更深層的癌症組織之治療仍是一大限制¹²⁸。

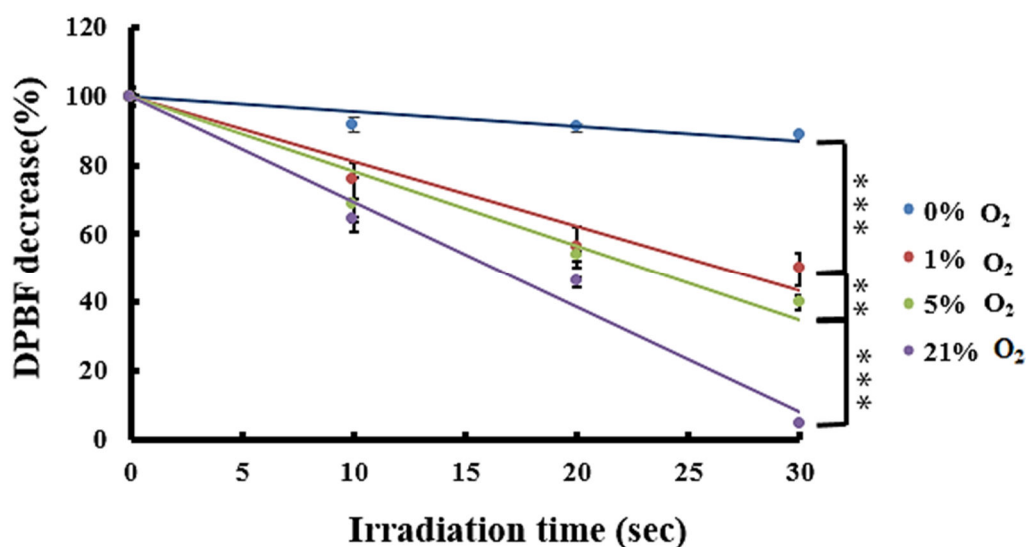


圖 3-3 PpIX 在不同氧氣濃度下生成單線態氧分子之結果。氧氣濃度為 0%、1%、5%、21%，PpIX 濃度為 0.8 μM ，照光時間 10 sec、20 sec、30 sec
n.s.(no significant)，* $P < 0.05$ (significant)，** $P < 0.01$ (highly significant)，
*** $P < 0.001$ (extremely significant)

3-4 比較不同氧氣濃度下 PpIX 對癌症細胞產生 ROS 量之差異

PpIX 受到光激發後產生的細胞毒殺分成兩種機制，第一種機制是將氧氣轉換成單線態氧分子進行癌症細胞核的毒殺，另一種機制則是激發後的 PpIX 與細胞基質作用產生自由基分子，自由基分子再與氧氣作用形成其他氧化產物 ROS (Reactive oxygen species)⁵⁷。由 DPBF 實驗結果可知 PpIX 在光的照射下直接地產生單線態氧分子，但若需觀察不同的氧氣濃度是否也會影響 PpIX 毒殺細胞的另一種機制，產生 ROS 之效率，則需利用 DCFDA (2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate) assay 進行 *in vitro* 測量¹²⁷。

DCFDA 的作用方式是進入細胞內與胞內的酯酶作用，形成 DCFH (2',7'-Dichlorohydrofluorescein)，此分子被 ROS 氧化形成帶有綠色螢光的 DCF (2',7'-Dichlorofluorescein)。藉由偵測 DCF 的螢光可定量細胞所受到的氧化壓力，螢光強度愈高代表細胞受到的氧化壓力愈強¹²⁷。

此實驗目的為觀察氧氣濃度下降時，除了會降低 PpIX 產生單線態氧分子的效率，是否也會影響藥物作用後對細胞的氧化壓力。圖 3-4 為 0.4 μ M PpIX 分別在 5%、2% 及 1% 氧氣濃度下產生 ROS 的結果。此結果可以發現隨著照光時間的增加，細胞產生綠色的螢光訊號愈大，代表 PpIX 隨著照光時間的增加，對細胞造成的氧化壓力愈大；固定相同照光時間，亦可看到氧氣濃度愈低，PpIX 對細胞產生的氧化壓力也有顯著的減少 ($P < 0.001$)。由上述的實驗可以總結氧氣濃度的減少不僅會減少 PpIX 照光後產生的單線態氧氣的生成，同時也會減少其對細胞造成的氧化壓力，氧氣的濃度皆會影響 PpIX 毒殺細胞的兩種機制。

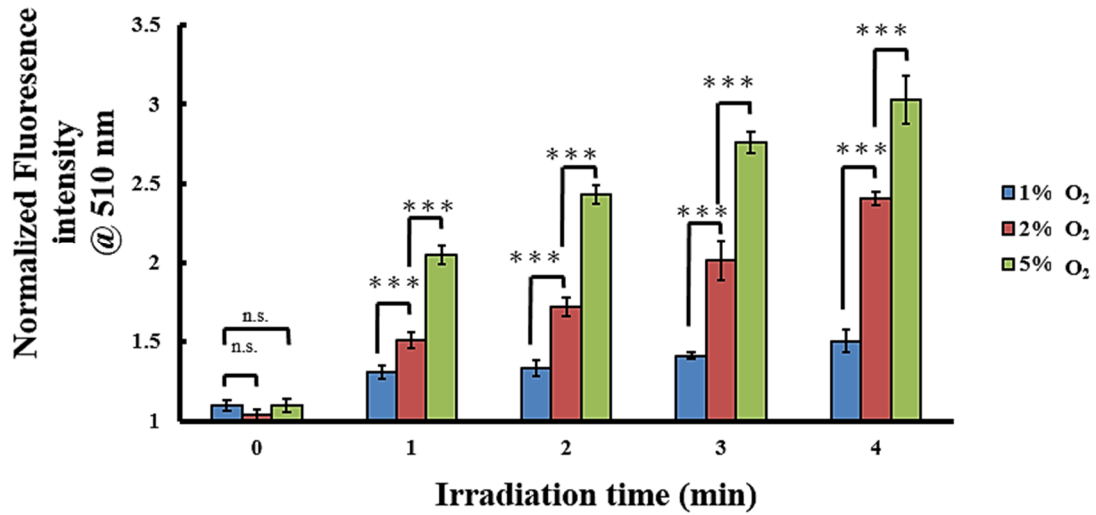


圖 3-4 定量在不同氧氣濃度下 PpIX 經照光後對細胞產生的 ROS 量。PpIX 濃度為 0.4 μM ，DCFDA 濃度 40 μM ，照光時間為 0、1、2、3 及 4 分鐘
n.s.(no significant)，* $P < 0.05$ (significant)，** $P < 0.01$ (highly significant)，*** $P < 0.001$ (extremely significant)

3-5 PpIX 於不同氧氣濃度下毒殺癌症細胞之結果

本實驗將乳癌細胞培養至 5%、2% 及 1% 的氧氣濃度，欲模擬出 PpIX 在腫瘤不均勻氧壓下的治療情形，另外也做一組 21% 氧氣濃度下 PpIX 對細胞毒殺的結果來做比較，最後目的是要找出 50% 的細胞存活率之條件，以利後續的合併治療。利用 MTT assay 來測量細胞存活率，其原理是藉由活細胞內粒線體的酵素琥珀酸去氫酶(Succinate dehydrogenase, SDH) 將 MTT 分子(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 還原成不溶於水的紫色結晶沉澱物 Formazan，由於產物 Formazan 的生成與細胞的數目成正比，因此可藉由此方法來推算細胞的存活率¹²⁹。由上一個實驗的結果得知若氧氣的濃度愈低，產生單線態氧分子及 ROS 的效率愈差，因此預期的細胞毒殺效果也會受到限制。

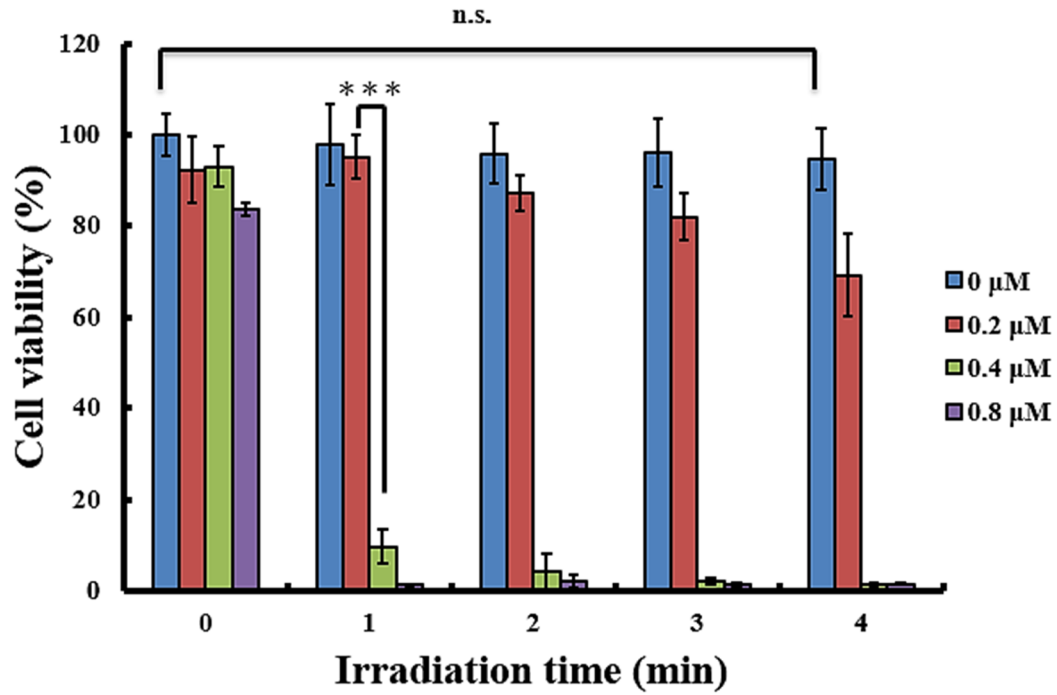
圖 3-5 為 PpIX 在不同濃度，不同照光時間以及不同氧氣濃度下對於細胞造成毒殺的結果。其中可以看到當固定照光時間時，若 PpIX 的濃度增加，造成細胞的毒殺效果愈強；當固定 PpIX 濃度時，可以看見隨著照光時間的增加，細胞存活率也明顯的下降(圖 3-5A, 圖 3-5B)；然而當氧氣的濃度下降時，PpIX 毒殺癌症細胞的效率也變差，比較圖 3-5A 與圖 3-5D 的結果可以發現 0.8 μM PpIX 在 21% 的氧氣濃度下照光 1 分鐘的條件下就能達到 10% 以下的細胞存活率，但 1% 的氧氣濃度下，相同濃度的 PpIX 即使增加照光時間至 4 分鐘，仍無法達到 50% 以下的細胞存活率，此結果與先前的 DPBF 實驗吻合，PpIX 需在氧氣充足的條件下作用才能有效地毒殺癌症細胞^{57,128}。

就 PpIX 毒殺細胞的結果，可以看到 0.4 μM 濃度的 PpIX 照光 1 分鐘後就可達到毒殺乳癌細胞至 50% 以下的細胞存活率；而 0.2 μM 濃度的 PpIX 照光 4 分鐘後仍有 50% 以上的細胞存活率，推測是由於 PpIX 的濃度太低，產生的單線態氧分子不足以有效地毒殺癌症細胞；0.8 μM PpIX 對於細胞的毒殺效果最強，照光時間 1 分鐘即可達到 10% 的細胞存活率。因此若 PpIX 濃度太低(0.2 μM)，則無法有效地抑制乳癌細胞的生長，但若 PpIX 的濃度太高(0.8 μM) 造成細胞的存活

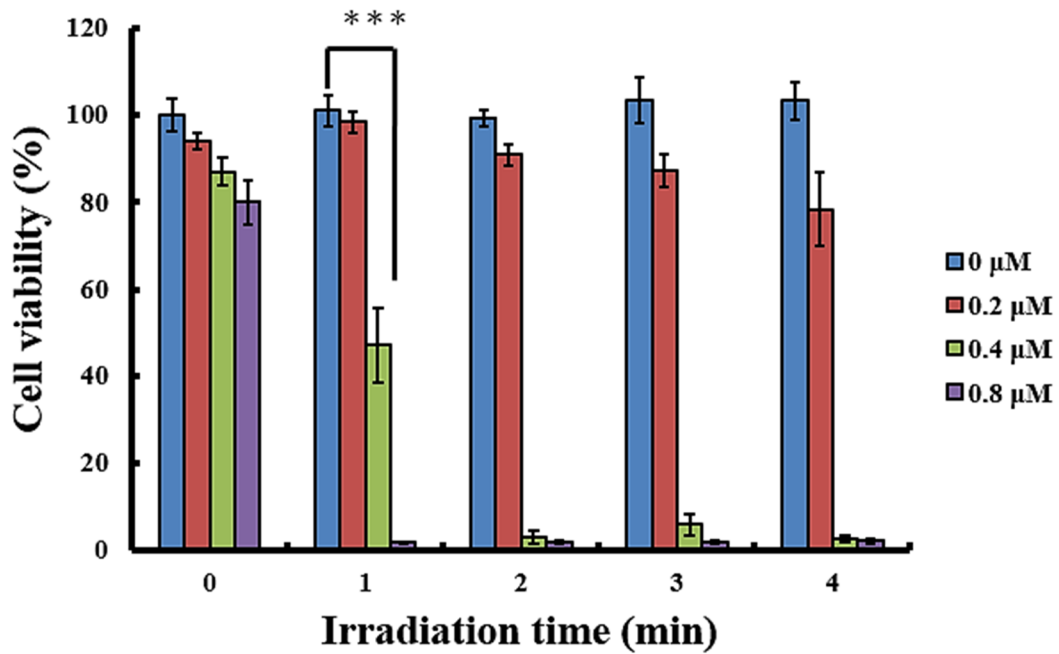
率太低，無法看到之後合併治療後產生協同效應的結果，因此本研究將選擇濃度為 $0.4\mu\text{M}$ 的 PpIX 以及照光時間為 1 分鐘之實驗條件進行後續的合併治療。



(A)

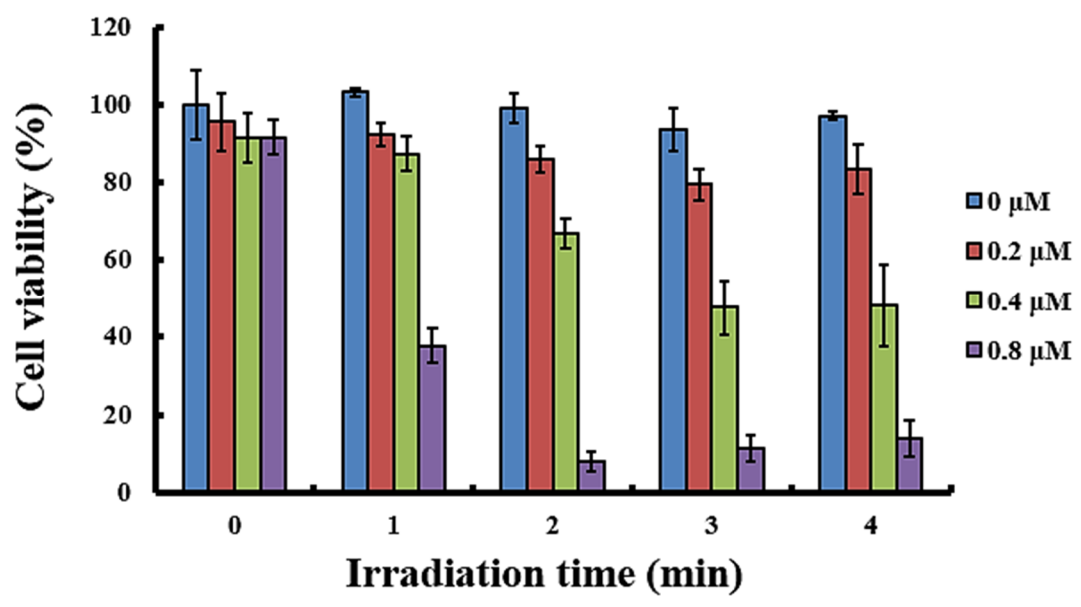


(B)





(C)



(D)

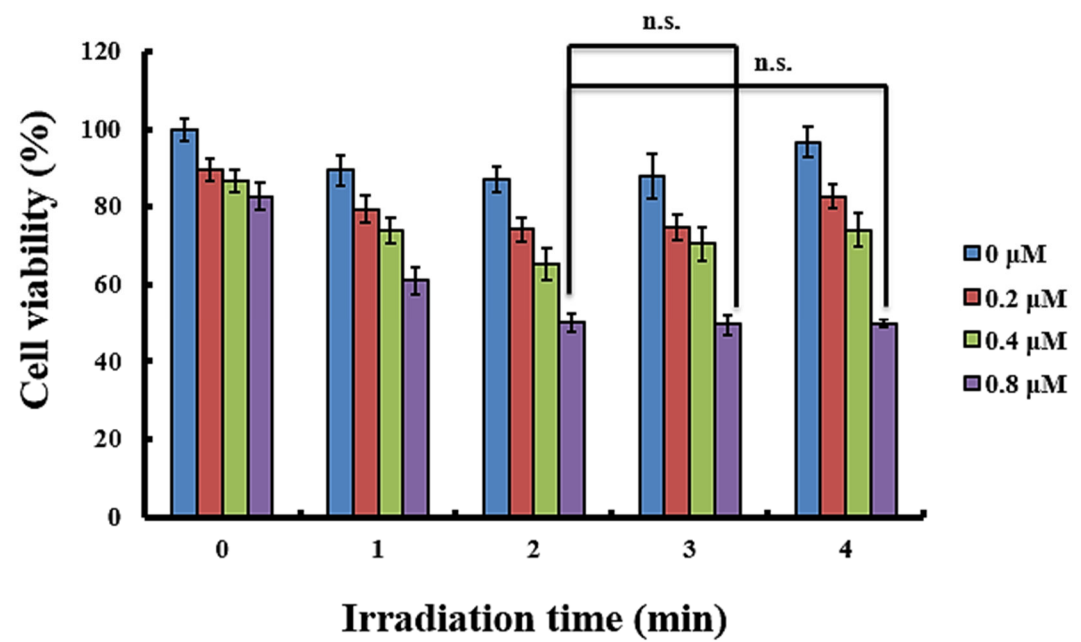


圖 3-5 PpIX 在不同實驗條件下對 MDA-MB-231 細胞的毒殺結果，PpIX 濃度為 0、0.2、0.4、和 0.8 μM ，照光時間是 1 至 4 分鐘。(A) 21% O_2 ；(B) 5% O_2 ；(C) 2% O_2 ；(D) 1% O_2
n.s.(no significant)，* $P < 0.05$ (significant)，** $P < 0.01$ (highly significant)，*** $P < 0.001$ (extremely significant)

3-6 TPZ 藥物於不同氧氣濃度下對癌症細胞的毒殺結果

與光動力治療相反，TPZ 藥物需要在低氧的環境下才會被細胞酵素還原成自由基型態，進而發揮其毒殺細胞的效用。本實驗利用 MTT assay 比較不同濃度的 TPZ 藥物在不同氧氣濃度環境下對細胞的毒殺效果，藉此找出合併治療的最佳濃度條件。從圖 3-6 的結果可以看到隨著 TPZ 濃度增加會造成細胞的存活率下降；在相同濃度的 TPZ 條件下，氧氣的濃度愈低造成細胞的存活率下降愈多，代表氧氣的濃度下降，能夠增強 TPZ 的毒殺效果。

TPZ 在 21% 的氧氣濃度下對於細胞的毒殺性不高，在 80 μM 的濃度下仍有約 80% 的細胞存活率，表示在氧氣充足的環境下，有較多的 TPZ 藥物沒有被活化成自由基型態，依然保持較低毒性之原型態；而在 5% 氧氣濃度下 TPZ 就有毒殺細胞的能力，且隨著氧氣濃度的降低，造成的細胞存活率有明顯的下降。

TPZ 藥物在濃度為 60 μM 的條件下可以將 5%、2% 和 1% 氧氣濃度的細胞毒殺至 50% 細胞存活率以下，然而濃度增加至 80 μM 其細胞毒殺的效果與 60 μM 濃度無明顯地增強（1% 氧氣濃度下，造成的細胞存活率分別為 34% 及 29%）。因此本研究最終選用 60 μM 的濃度作為後續複合治療的實驗條件。

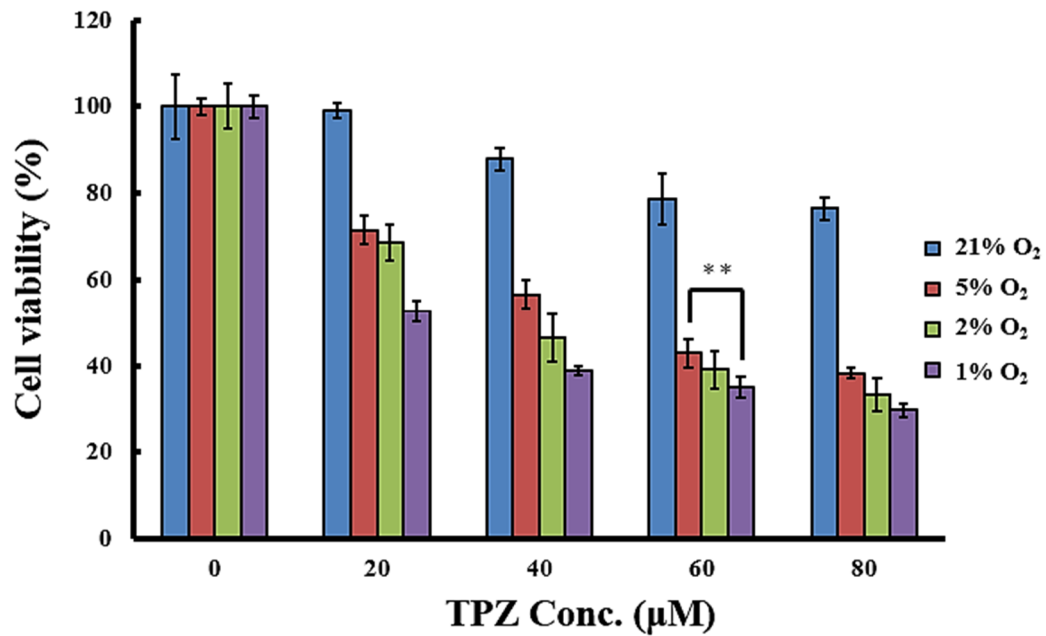


圖 3-6 TPZ 在不同濃度與氧氣濃度對細胞的毒殺性。TPZ 濃度分別為 0、20、40、60 和 80 μM ，氧氣濃度為 21%、5%、2%和 1%
n.s.(no significant)，* $P < 0.05$ (significant)，** $P < 0.01$ (highly significant)，
*** $P < 0.001$ (extremely significant)

3-7 PpIX 與 TPZ 兩種藥物合併的細胞毒殺結果

於前述之實驗結果中發現 PpIX 需要在氧氣充足的環境下作用，若氧氣濃度愈低，能造成細胞毒殺的效果會受到限制；而 TPZ 的細胞毒殺作用卻與 PpIX 相反，隨著氧氣濃度的下降，TPZ 能夠有效地被活化成自由基型態，進而毒殺細胞。因此接下來的實驗目的在測試兩種藥物合併使用後是否能夠在不同氧氣濃度下產生協同效應，將原本單獨使用時所遇到的限制，在合併治療後是否能夠達到更有效的毒殺癌症細胞效果。由先前分別單獨藥物毒殺癌症細胞的實驗中找到 0.4 μM 的 PpIX 照光一分鐘以及 60 μM TPZ 這兩個實驗條件下能將癌細胞的生存率下降至 50%，因此選用此條件來作為合併治療的實驗條件。

本實驗利用 MTT assay 來比較在不同氧氣濃度下單獨使用 PpIX 和 TPZ 以及合併治療後的細胞毒殺結果。由圖 3-7 的結果可以看到兩種藥物的合併後造成細胞的存活率皆低於分別單獨藥物的處理之組別，在 5%、2% 及 1% 的氧氣濃度下皆可看見此現象。分別將每個氧氣濃度下之兩種藥物的合併組別的細胞存活率除以兩種藥物單獨處理下的細胞存活率之乘積，即可得到 CDI (Coefficient of drug interaction) 值。

$$CDI = \frac{Cell\ viability_{combination}}{Cell\ viability_{PpIX} \times Cell\ viability_{TPZ}}$$

CDI 值若大於 1 表示兩種藥物為結抗作用，等於 1 表示兩種藥物是加成作用，小於 1 表示兩種藥物為協同作用^{130,131}。從表 3-1 的結果看到兩種藥物在不同氧氣濃度下計算出的 CDI 值皆小於 1，表示兩種藥物的合併確實能夠產生協同作用，增強兩種藥物因為氧氣濃度所造成毒殺癌症細胞的限制。

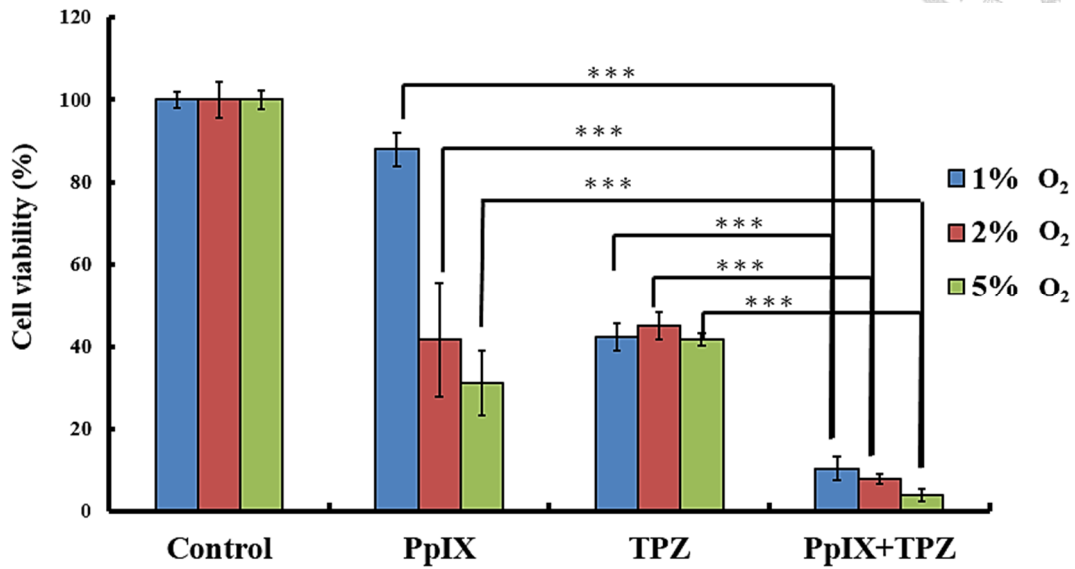


圖 3-7 PpIX 與 TPZ 在不同氧氣濃度下的合併治療結果。PpIX 濃度為 0.4 μM ，TPZ 濃度為 60 μM ，照光時間為 1 min，氧氣濃度分別為 1%、2%及 5% n.s.(no significant)，* $P < 0.05$ (significant)，** $P < 0.01$ (highly significant)，*** $P < 0.001$ (extremely significant)

表 3-1 細胞存活率及 CDI 值

O ₂ 濃度	PpIX	TPZ	Combine	CDI 值
5%	31%	42%	4%	0.31
2%	42%	45%	8%	0.42
1%	88%	42%	10%	0.27

3-8 載體的特性分析及 PpIX 定量結果

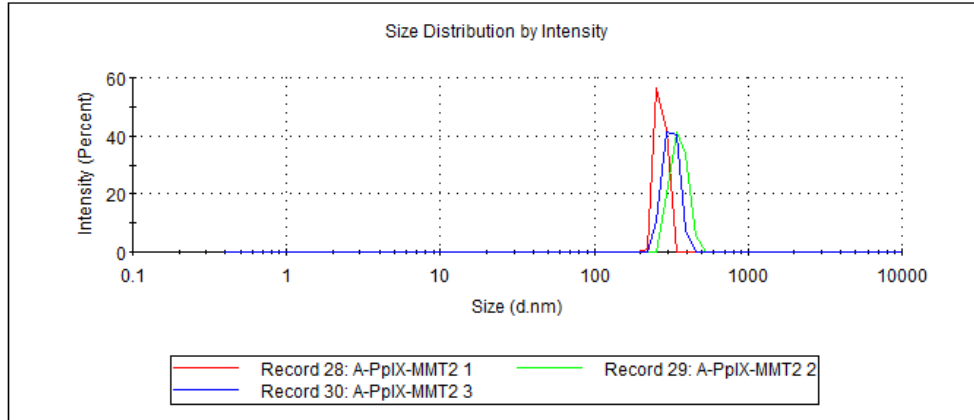
首先利用 DLS (Dynamic light scattering) 鑑定合成後載體之粒徑大小，**圖 3-8A** 和 **圖 3-8B** 分別為 DNA Aptamer 在修飾前及修飾後的大小， 345 ± 34.2 nm 及 317.6 ± 36.68 nm。結果顯示修飾 DNA Aptamer 前與修飾後的大小無顯著差異，於水中的粒徑大約於 300 nm 左右。DLS 的測量只能知道載體於水中的水合粒徑，由於二氧化矽材質的奈米粒子容易沉澱，因此若要知道實際載體之大小，需要透過 TEM(Transmission electron microscope)圖來輔助。**圖 3-8C** 和 **圖 3-8D** 是由清大楊家銘老師實驗室拍攝載體的 TEM 圖，由結果可計算出一類載體的平均大小約 120 nm。

鑑定完載體大小後，接下來是鑑定 DNA 適體是否修飾於載體表面上，本實驗是利用 DLS 測量粒子表面之介面電位(Zeta potential)。由於 DNA 帶負電荷，因此若 DNA 修飾於載體表面，將會使得載體之電荷下降。**圖 3-8E** 的結果可看到還未修飾 DNA Aptamer 的載體 (Maleimide-PpIX-MMT2)平均電荷約為-19.3 mV；而修飾 DNA Aptamer 後的載體 (Apt-PpIX-MMT2)平均電荷變成-38.8 mV(**圖 3-8F**)，由此證明 Apt-PpIX-MMT2 的載體表面確實有 DNA Aptamer 在載體的表面上。

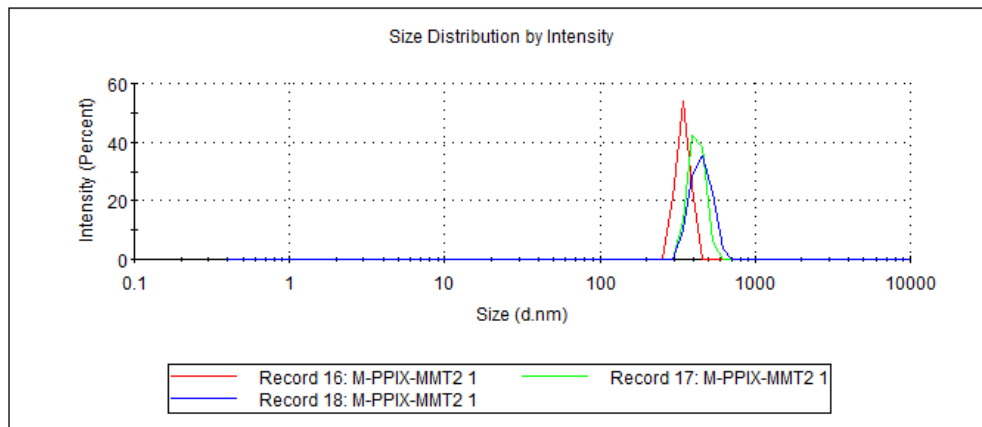
載體上的 PpIX 含量是藉由熱重力分析與 405 nm 吸收值來估算。熱重力分析是由清大楊家銘老師實驗室在製備後所測得的，其結果為每克 sample 上含有 0.336 mmole，而利用 405 nm 吸收值估算的結果是每克 sample 含有 0.343 mmole。結果顯示兩種所定量的 PpIX 濃度相差不大。經過計算後，1.17 ppm 的 Apt-PpIX-MMT2 含有 0.4 μ M PpIX。



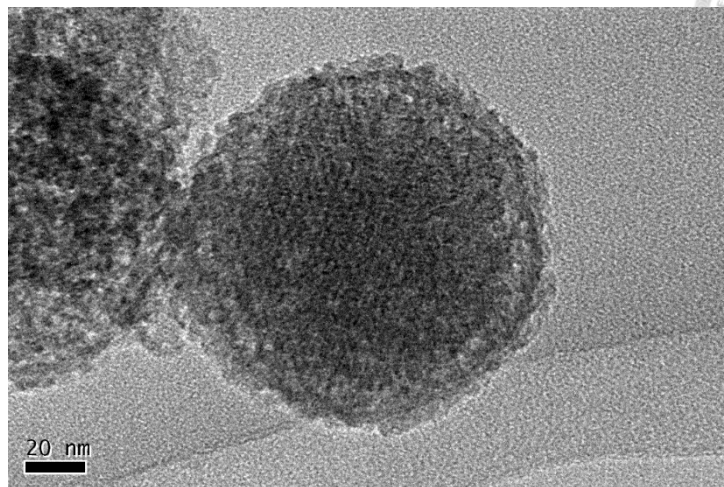
3-8 (A) Maleimide-PpIX-MMT2 粒徑分析



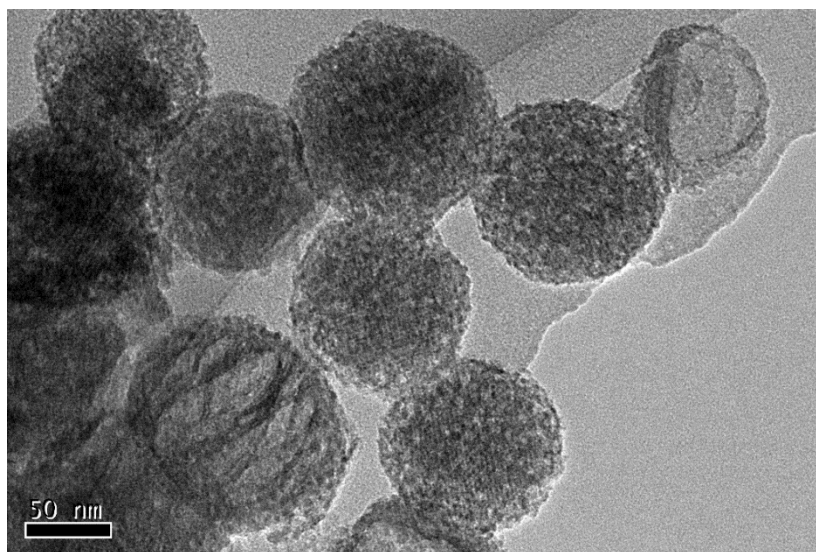
3-8 (B) Apt-PpIX-MMT2 粒徑分析



3-8 (C) MMT2 之 TEM 圖 (清大楊家銘老師實驗室)

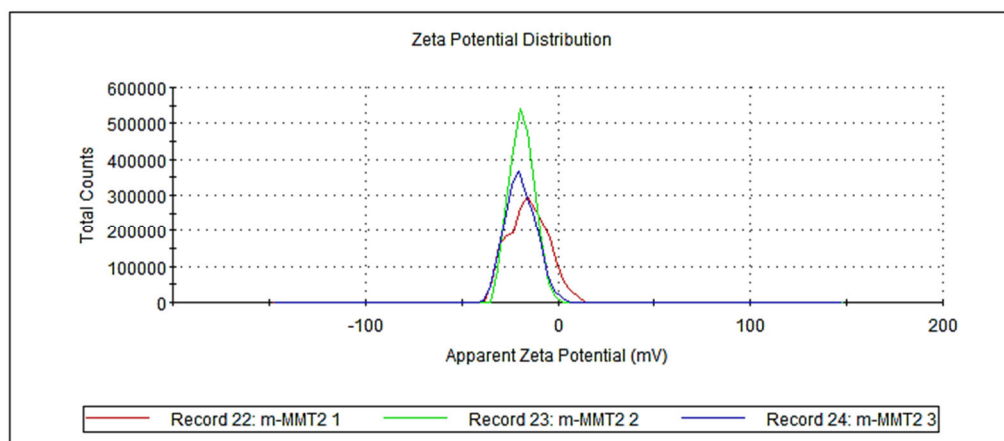


3-8 (D) Maleimide-PpIX-MMT2 之 TEM 圖 (清大楊家銘老師實驗室)





3-8 (E) Maleimide-PpIX-MMT2 介面電性分析



3-8 (F) Apt-PpIX-MMT2 介面電性分析

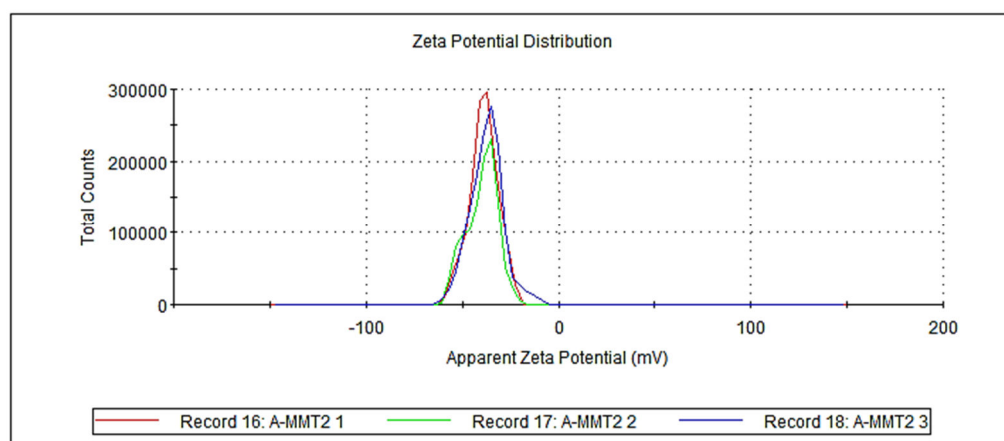


圖 3-8 載體的分析及鑑定

表 3-2 DLS 結果

Sample	Size (nm)	Zeta potential (mV)
Maleimide-PpIX-MMT2	345 ± 34.2 nm	-19.3
Apt-PpIX-MMT2	317.6 ± 36.68 nm	-38.8

3-9 Apt-PpIX-MMT2 產生單線態氧分子之效率

確認 DNA 適體修飾在載體表面後，進一步要確認載體 DNA 的修飾是否會影響 PpIX 產生單線態氧分子的效果。本實驗藉由 DPBF assay 來分別定量 0.4 μM 的 PpIX、1.17 ppm 的 PpIX-MMT2 以及 1.17 ppm 的 Apt-PpIX-MMT2 在照光後產生單線態氧之效率。圖 3-9 的結果可以看到 PpIX-MMT2 和 Apt-PpIX-MMT2 這兩個組別在照光後造成 DPBF 減少的斜率與 PpIX free drug 照光後減少 DPBF 的斜率無顯著差異，照射時間至 50 秒皆能將 DPBF 消耗約 90%，由此結果可證明 PpIX 分子修飾在 MMT2 載體後仍能正常地產生單線態氧分子，而且經過 DNA 適體之修飾後，PpIX 產生單線態氧分子的效率也不會受到影響，修飾在載體上的 PpIX 仍能發揮其正常之功效。

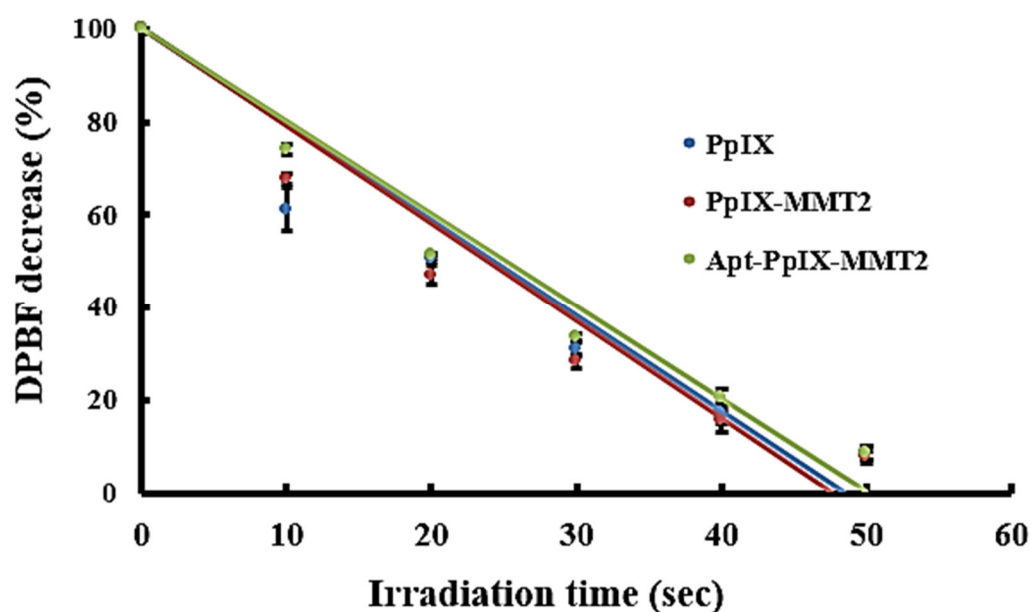


圖 3-9 PpIX、PpIX-MMT2 與 Apt-PpIX-MMT2 單線態氧分子生成之結果。DPBF 濃度為 250 μM 、PpIX 濃度為 0.4 μM 、PpIX-MMT2 濃度為 1.17 ppm、Apt-PpIX-MMT2 濃度為 1.17 ppm、照光時間為 0、10、20、30、40 及 50 秒

3-10 MMT2 載體毒殺性

MMT2 載體是二氧化矽奈米矽球，據先前研究指出此材質具有良好之生物相容性，能夠被細胞有效地降解，不會造成細胞的毒性¹⁰⁹，因此此實驗想確認 MMT2 載體對細胞造成的毒性。圖 3-10 為利用 MTT assay 方式測量細胞存活率之結果，其中可發現 MMT2 載體濃度從 1.12 至 17.92 ppm 對細胞仍有 90% 以上的存活率；此外，加入載體後對細胞照光，以及於載體表面修飾 DNA 適體也不會對細胞造成太大的影響。本研究最終會使用的載體濃度為 1.17 ppm，此濃度不會造成細胞的存活率下降，因此對後續的細胞實驗不會造成太大的影響。

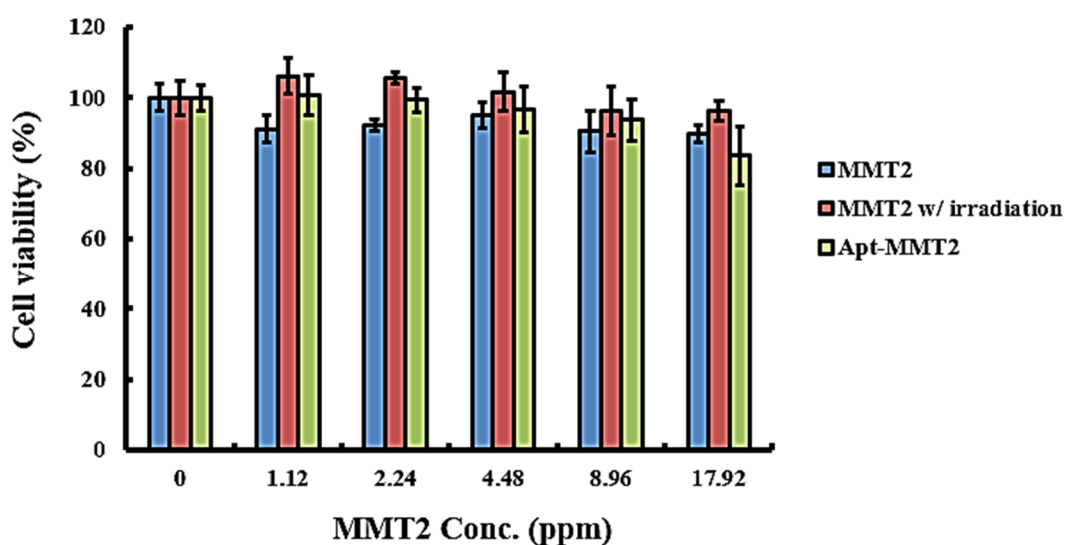


圖 3-10 載體對細胞之毒殺性，載體濃度分別為 0、1.12、2.24、4.48、8.96 及 17.92 ppm，組別分成 MMT2 不照光、MMT2 照光 1 分鐘以及修飾 DNA 適體的 Apt-MMT2

3-11 Apt-PpIX-MMT2 對 MDA-MB-231 細胞的毒殺性

於先前 DPBF 的實驗中證實 Apt-PpIX-MMT2 劑型的 PpIX 在照光後不會影響其產生單線態氧分子之效率，因此接下來是觀察 Apt-PpIX-MMT2 對 MDA-MB-231 人類乳癌細胞株的毒殺性。圖 3-11 是利用 MTT assay 來測量 PpIX free drug 及 Apt-PpIX-MMT2 在 21% 氧氣濃度下照光一分鐘後對 MDA-MB-231 細胞造成的毒殺性。結果顯示 Apt-PpIX-MMT2 在 1.17 ppm (含 0.4 μM PpIX) 的濃度下能造成 10% 以下的細胞存活率，且相較於以 free drug 方式，Apt-PpIX-MMT2 劑型造成細胞的存活率下降更多，表示 Apt-PpIX-MMT2 劑型在細胞中不僅能夠正常發揮其藥效，且能增加 free drug PpIX 對癌症細胞的毒性。

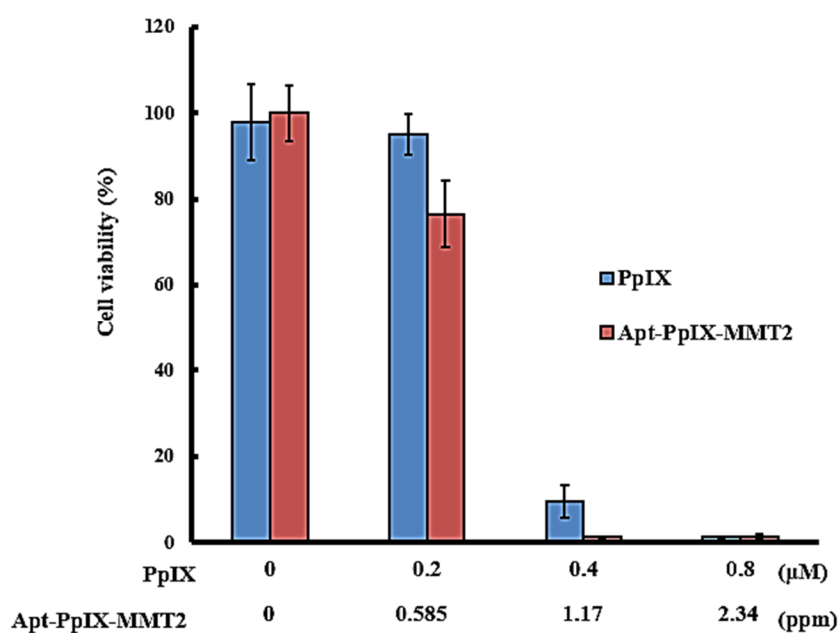


圖 3-11 Apt-PpIX-MMT2 對 MDA-MB-231 細胞之毒殺性，PpIX 濃度分別為 0、0.2、0.4 及 0.8 μM ，Apt-PpIX-MMT2 濃度分別為 0、0.585、1.17 及 2.34 ppm，照光時間為 1 分鐘

3-12 PpIX 與 Apt-PpIX-MMT2 對 MDA-MB-231 細胞吞噬結果

由前述 MTT assay 實驗發現 Apt-PpIX-MMT2 相較於 free drug PpIX 對於 MDA-MB-231 人類乳癌細胞造成更強之毒殺性，表示 Apt-PpIX-MMT2 此劑型能夠將更多的 PpIX 藥物送入癌症細胞中，因此本實驗是將 PpIX 和 Apt-PpIX-MMT2 兩種劑型處理 MDA-MB-231 細胞株，2 小時候培養後再利用 RIPA buffer 將細胞膜打破，定量其內部之 PpIX 螢光。圖 3-12 為定量後之結果，Apt-PpIX-MMT2 劑型確實能夠將更多的 PpIX 送進 MDA-MB-231 細胞中，約為 Free drug PpIX 的 4 倍。由於 MMT2 與細胞的相容性佳，再加上 DNA 適體的修飾，使得 Apt-PpIX-MMT2 能夠大量地被 MDA-MB-231 癌症細胞吞噬，PpIX 累積於細胞內也較多。

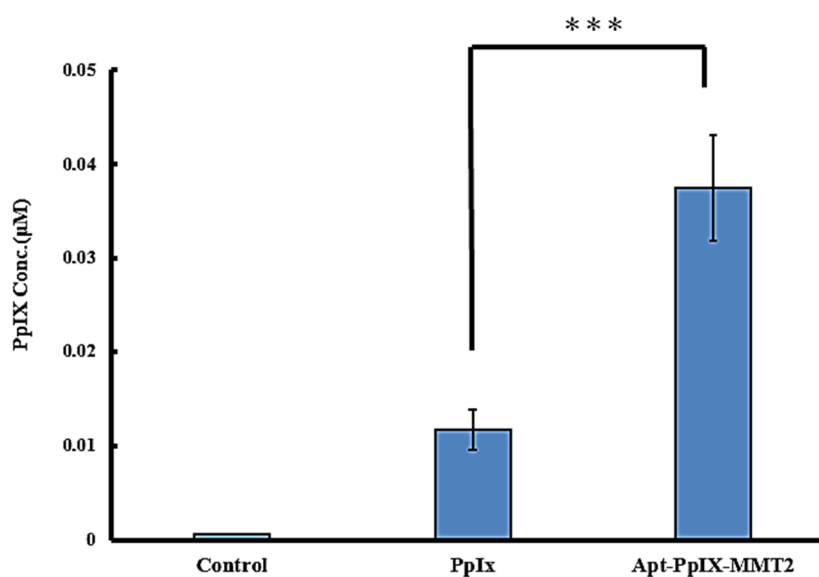


圖 3-12 MDA-MB-231 細胞吞噬 PpIX 及 Apt-PpIX-MMT2 後之 PpIX 定量結果。PpIX 濃度 0.4 µM，Apt-PpIX-MMT2 濃度為 1.17 ppm，吞噬時間 2 小時

3-13 Apt-PpIX-MMT2 對不同細胞株的吞噬結果

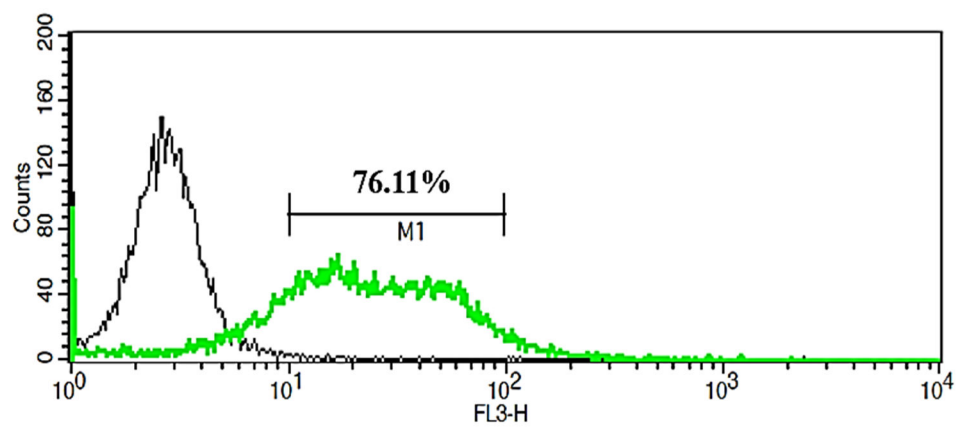
修飾 DNA Aptamer 後的 Apt-PpIX-MMT2 進行專一性地標靶至 MDA-MB-231 乳癌細胞株。本實驗選擇三種細胞株來進行吞噬比較，分別為 MDA-MB-231 人類乳癌細胞株、MCF-7 人類乳癌細胞株以及 MCF-10A 人類正常乳房表皮細胞株。本實驗將利用流式細胞儀的分析以及打破細胞膜定量其內部的 PpIX 含量兩種方式來觀察細胞吞噬 Apt-PpIX-MMT2 的情形。

圖 3-13 為流式細胞儀分析的結果，其中 MDA-MB-231 細胞株在吞噬 Apt-PpIX-MMT2 後的螢光訊號有顯著的增加(**圖 3-13A**)，約有 76.11%細胞的螢光訊號座落在 10^1 至 10^2 間，而 MCF-7 乳癌細胞約為 18.82% (**圖 3-13B**)，MCF-10A 細胞約為 51.95% (**圖 3-13C**)。MDA-MB-231 細胞株吞噬 Apt-PpIX-MMT2 載體是最多的。

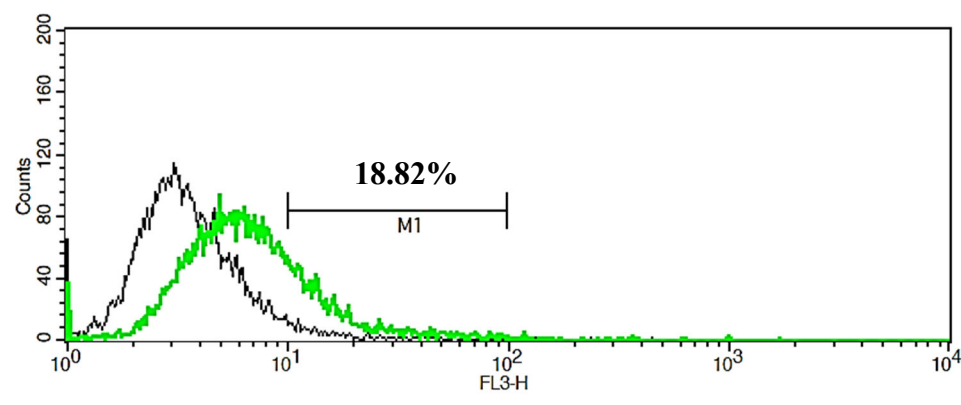
接下來是將吞噬 Apt-PpIX-MMT2 後的細胞株用 RIPA buffer 打破細胞膜，定量細胞萃取液中的 PpIX 含量。**圖 3-13** 的結果可看到 MDA-MB-231 細胞株萃取液的 PpIX 含量明顯比 MCF-7 與 MCF-10A 兩種細胞萃取液的 PpIX 含量多。由以上兩個實驗發現修飾適體後的 Apt-PpIX-MMT2 具有細胞的選擇性，能夠讓 MDA-MB-231 細胞株吞噬更多的 PpIX，達到標靶治療。



(A)



(B)



(C)

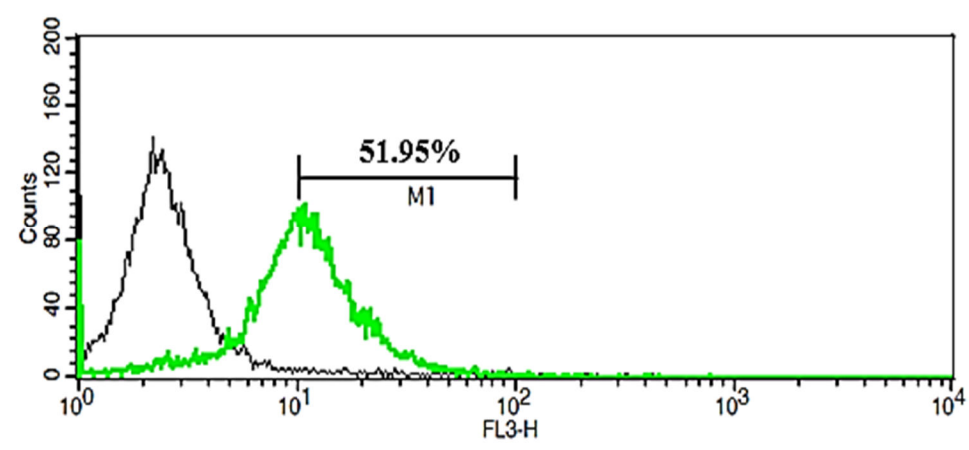


圖 3-13 三種細胞株吞噬 Apt-PpIX-MMT2 之流式細胞分析結果
(A)為 MDA-MB-231 細胞株；(B)為 MCF-7 細胞株；(C)為 MCF-10A 細胞株
Apt-PpIX-MMT2 濃度為 1.17 ppm，培養時間 5 小時

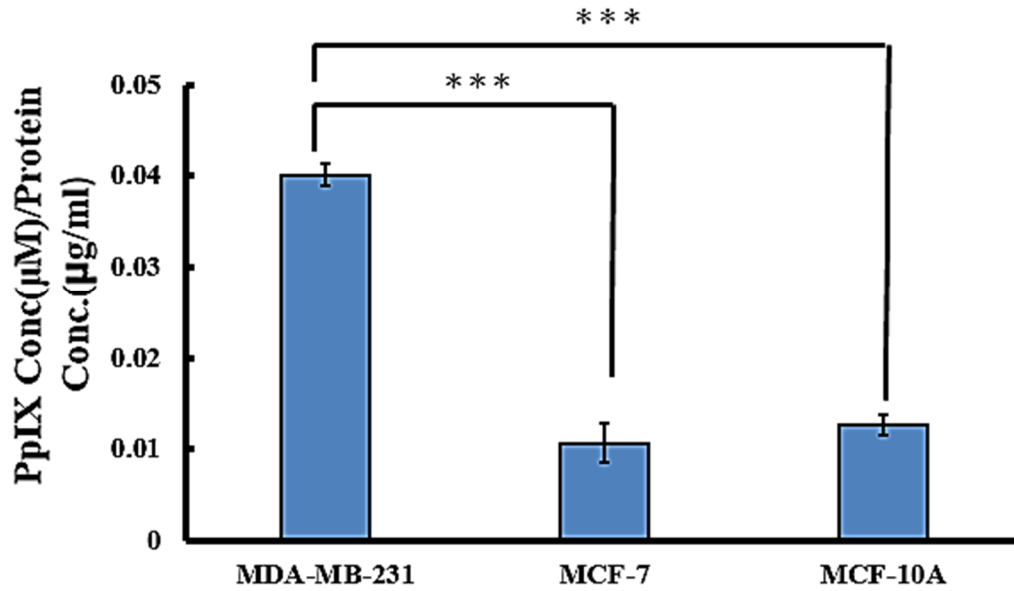



圖 3-14 MDA-MB-231、MCF-7 及 MCF-10A 三種細胞吞噬 Apt-PpIX-MMT2 後的定量結果。Apt-PpIX-MMT2 濃度為 1.17 ppm，培養時間 5 小時

3-14 TPZ@Apt-PpIX-MMT2 對乳癌細胞的毒殺結果



本實驗最後是比較 TPZ 含浸於 Apt-PpIX-MMT2 載體內(TPZ@Apt-PpIX-MMT2)與 TPZ 和 PpIX 以 free drug 的兩種合併治療方式對於 MDA-MB-231 乳癌細胞造成的毒殺性。圖 3-12 的結果中可看到合併治療未照光的組別，其造成細胞存活率在 5%、2%和 1%的氧氣濃度下分別為 52%、39%和 38%，此結果與圖 3-6 的結果相符，因未受到光激發，只有 TPZ 藥物造成的細胞毒殺；而 TPZ@Apt-PpIX-MMT2 未照光的組別所造成細胞的毒殺性卻顯著地提升，細胞存活率在 5%、2%和 1%的氧氣濃度下分別為 32.9%、14.6%和 12.3%，表示利用載體裝載 TPZ 的方式因為更能被細胞有效地利用，因此被細胞激素還原的自由基型態增加，對細胞造成的毒殺性也提高。合併治療照光的組別中可看到 2%與 5%氧氣濃度的結果皆能造成顯著的細胞毒殺結果，細胞存活率都小於 10%，TPZ@Apt-PpIX-MMT2 也是得到相同的結果，然而在 1%氧氣濃度條件下所造成的毒殺效果卻顯著的不同，以 free drug 方式造成的細胞存活率約 21%，雖然仍能看見 PpIX 造成的細胞毒殺，但因為氧氣濃度太低，其毒殺的效果是明顯地下降，而 TPZ@Apt-PpIX-MMT2 卻仍能在 1%氧氣濃度下作用，造成小於 10%的細胞存活率，表示利用載體裝載的方式能夠使兩種藥物造成的毒殺效果提升，突破低氧環境下受到的限制。

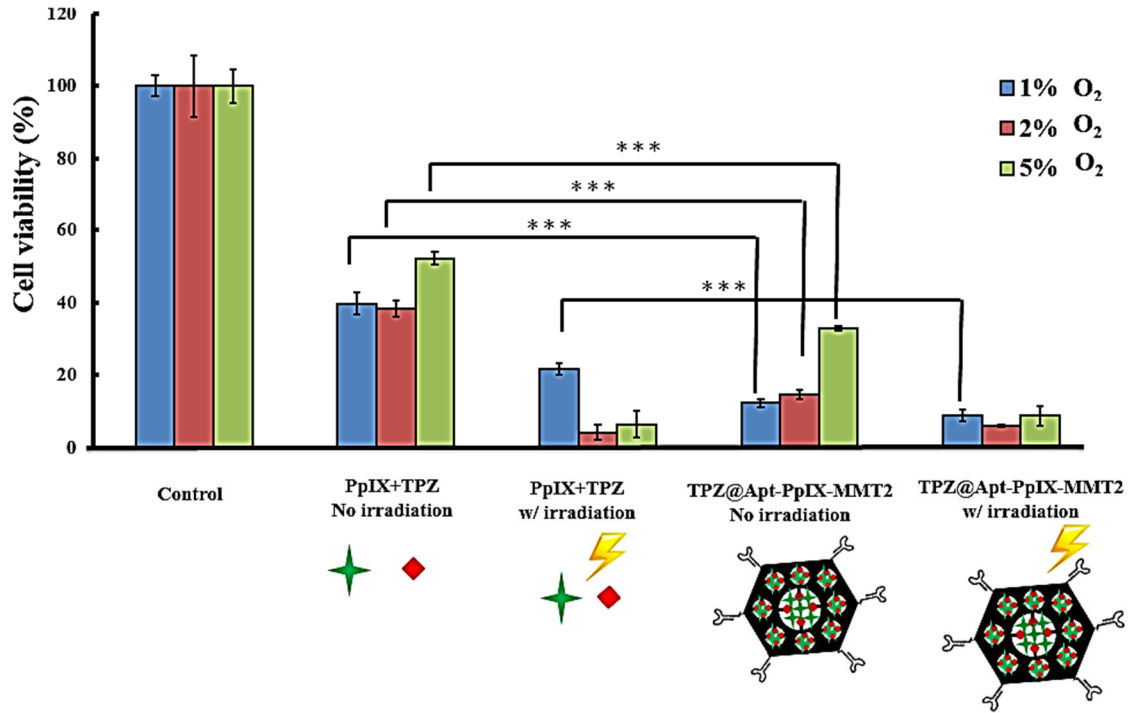


圖 3-15 TPZ@Apt-PpIX-MMT2 毒殺 MDA-MB-231 癌症細胞株之結果。PpIX 濃度 0.4 μ M，TPZ 濃度為 60 μ M，TPZ@Apt-PpIX-MMT2 濃度為 1.17 ppm，照光時間 1 分鐘

n.s.(no significant)，*P< 0.05(significant)，**P< 0.01(highly significant)，***P< 0.001(extremely significant)

第四章 結論與未來展望

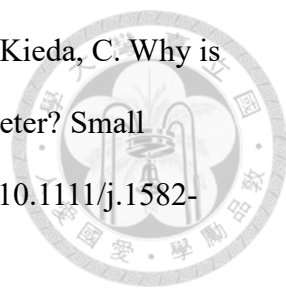
在本研究的結果中可看到 PpIX 與 TPZ 兩種藥物在氧氣不均的實驗條件下可達到協同作用，改善單一藥物在治療上的限制。PpIX 在缺氧環境下照光後產生的單線態氧分子和 ROS 量減少，因此儘管增長照光時間仍是無法使細胞達到 50% 的存活率，若藉由 TPZ 藥物的搭配，可將 PpIX 無法作用的區域變成具有毒殺之效用；對於 TPZ 藥物而言，PpIX 在照光後的作用會將環境中的氧氣消耗，促使更多 TPZ 往自由基反應進行，增強其毒殺效果，因此兩種藥物的搭配能達到彼此單獨治療上之限制。


早在 1993 年 Paul Bass 團隊研究就利用光動力治療與缺氧還原型藥物進行活體之治療¹³²，其結果卻未達到預期的功效，由於兩種藥物在活體的分布及代謝速率差異，無法同時作用而達到更有效的結果；然而隨著科技的進步，奈米劑型的出現將改變藥物動力差異的缺點。在 2015 年 Yanyan Liu 團隊利用 MSN 載體結合光動力治療與 TPZ 的作用¹³³，其結果在活體實驗上確實看到合併後顯著地增強療效，利用載體確實能達成兩種藥物因藥物動力差異的限制。本研究也是利用 MSN 載體來進行合併治療，而本研究與 Yanyan Liu 團隊不同之處是更深入地探討氧氣不均造成腫瘤環境的療效，作者只以 10% 氧氣濃度來模擬缺氧環境，然而腫瘤實際的氧氣濃度是在 5% 以下，且氧氣濃度是不均勻的⁹。在本研究中也發現利用載體裝載的 TPZ 達到的毒殺效果確實較 free drug 更好，且合併後的毒殺效果也有顯著的提升，期望在之後的動物實驗的結果也能看到利用載體裝載的兩種藥物在實際腫瘤環境中的毒殺效果。

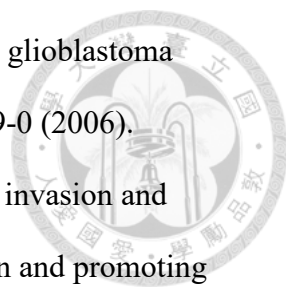
第五章 參考文獻



- 1 Kojiro, N. N. H. Y. T. N. T. K. M. Angiogenesis in cancer. *Vascular Health and Risk Management* **2**, 213-219 (2006).
- 2 Tahergorabi, Z. & Khazaei, M. A review on angiogenesis and its assays. *Iran J Basic Med Sci* **15**, 1110-1126 (2012).
- 3 Nussenbaum, F. & Herman, I. M. Tumor angiogenesis: insights and innovations. *J Oncol* **2010**, 132641, doi:10.1155/2010/132641 (2010).
- 4 Jain, R. K. Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy. *science* **307**, 58-62 (2005).
- 5 Horsman, M. R. & Vaupel, P. Pathophysiological Basis for the Formation of the Tumor Microenvironment. *Front Oncol* **6**, 66, doi:10.3389/fonc.2016.00066 (2016).
- 6 Pries, A. R. C., A. J.; Sloat, A. A.; Hinkeldey, M.; Dreher, M. R.; Hopfner, M.; Dewhirst, M. W.; Secomb, T. W. Structural adaptation and heterogeneity of normal and tumor microvascular networks. *PLoS Comput Biol* **5**, e1000394, doi:10.1371/journal.pcbi.1000394 (2009).
- 7 Pries, A. R. *et al.* Structural adaptation and heterogeneity of normal and tumor microvascular networks. *PLoS Comput Biol* **5**, e1000394, doi:10.1371/journal.pcbi.1000394 (2009).
- 8 Peggy L. Olive, P. D., Charline Vikse, A.A. and Martin J. Trotter, M.D., PH.D. Measurement of oxygen diffusion distance in tumor cubes using a fluorescent hypoxia probe. *Inf. J. Radiarmn Oncology Bid Phys.* **22**, 397-402 (1992).
- 9 McKeown, S. R. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours- implications for treatment response. *Br J Radiol* **87**, 20130676, doi:10.1259/bjr.20130676 (2014).

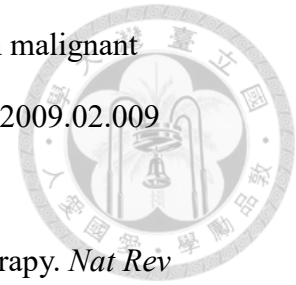
- 
- 10 Carreau, A., El Hafny-Rahbi, B., Matejuk, A., Grillon, C. & Kieda, C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med* **15**, 1239-1253, doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x (2011).
- 11 Cassavaugh, J. & Lounsbury, K. M. Hypoxia-mediated biological control. *J Cell Biochem* **112**, 735-744, doi:10.1002/jcb.22956 (2011).
- 12 Jiang, B. H., Semenza, G. L., Bauer, C. & Marti, H. H. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol* **271**, C1172-1180 (1996).
- 13 Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**, 1029-1033, doi:10.1126/science.1160809 (2009).
- 14 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
- 15 Ramachandran, S., Ient, J., Gottgens, E. L., Krieg, A. J. & Hammond, E. M. Epigenetic Therapy for Solid Tumors: Highlighting the Impact of Tumor Hypoxia. *Genes (Basel)* **6**, 935-956, doi:10.3390/genes6040935 (2015).
- 16 Shannon, A. M., Bouchier-Hayes, D. J., Condrón, C. M. & Toomey, D. Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer Treat Rev* **29**, 297-307 (2003).
- 17 Michael Höckel, P. V. Tumor Hypoxia: Definitions and Current Clinical, Biologic, and Molecular Aspects. *Journal of the National Cancer Institute* **93**, 266-276 (2001).
- 18 Dachs, G. U. & Tozer, G. M. Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. *Eur J Cancer* **36**, 1649-1660 (2000).

- 
- 19 Vaupel, P., Thews, O. & Hoeckel, M. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med Oncol* **18**, 243-259, doi:10.1385/MO:18:4:243 (2001).
- 20 Hong, S. S., Lee, H. & Kim, K. W. HIF-1alpha: a valid therapeutic target for tumor therapy. *Cancer Res Treat* **36**, 343-353, doi:10.4143/crt.2004.36.6.343 (2004).
- 21 Jiang, B. H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R. & Semenza, G. L. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* **271**, 17771-17778 (1996).
- 22 Maxwell, P. H. *et al.* The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* **399**, 271-275, doi:10.1038/20459 (1999).
- 23 Jaakkola, P. *et al.* Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**, 468-472, doi:10.1126/science.1059796 (2001).
- 24 Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. & Keshet, E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **359**, 843-845, doi:10.1038/359843a0 (1992).
- 25 Bashan, N., Burdett, E., Hundal, H. S. & Klip, A. Regulation of glucose transport and GLUT1 glucose transporter expression by O₂ in muscle cells in culture. *Am J Physiol* **262**, C682-690 (1992).
- 26 Treins, C., Giorgetti-Peraldi, S., Murdaca, J., Monthouel-Kartmann, M. N. & Van Obberghen, E. Regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 activity and expression of HIF hydroxylases in response to insulin-like growth factor I. *Mol Endocrinol* **19**, 1304-1317, doi:10.1210/me.2004-0239 (2005).
- 27 Yoshida, D., Kim, K., Noha, M. & Teramoto, A. Hypoxia inducible factor 1-

- 
- alpha regulates of platelet derived growth factor-B in human glioblastoma cells. *J Neurooncol* **76**, 13-21, doi:10.1007/s11060-005-3279-0 (2006).
- 28 Jing, S. W. *et al.* HIF-1alpha contributes to hypoxia-induced invasion and metastasis of esophageal carcinoma via inhibiting E-cadherin and promoting MMP-2 expression. *Acta Med Okayama* **66**, 399-407 (2012).
- 29 Comerford, K. M. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res* **62**, 3387-3394 (2002).
- 30 Maxwell, P. H. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8104-8109 (1997).
- 31 Zhang, L. *et al.* Tumor-derived vascular endothelial growth factor up-regulates angiopoietin-2 in host endothelium and destabilizes host vasculature, supporting angiogenesis in ovarian cancer. *Cancer Res* **63**, 3403-3412 (2003).
- 32 Jezierska, A. & Motyl, T. Matrix metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: a mini-review. *Med Sci Monit* **15**, RA32-40 (2009).
- 33 Livingstone, C. IGF2 and cancer. *Endocr Relat Cancer* **20**, R321-339, doi:10.1530/ERC-13-0231 (2013).
- 34 Shim, B. Y. *et al.* Glucose transporter 1 (GLUT1) of anaerobic glycolysis as predictive and prognostic values in neoadjuvant chemoradiotherapy and laparoscopic surgery for locally advanced rectal cancer. *Int J Colorectal Dis* **28**, 375-383, doi:10.1007/s00384-012-1542-3 (2013).
- 35 Cordon-Cardo, C. *et al.* Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem* **38**, 1277-1287, doi:10.1177/38.9.1974900 (1990).
- 36 Gray, L. H., Conger, A. D., Ebert, M., Hornsey, S. & Scott, O. C. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a

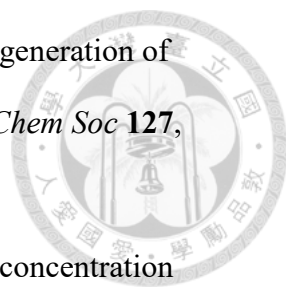
- factor in radiotherapy. *Br J Radiol* **26**, 638-648, doi:10.1259/0007-1285-26-312-638 (1953).
- 37 Teicher, B. A., Lazo, J. S. & Sartorelli, A. C. Classification of antineoplastic agents by their selective toxicities toward oxygenated and hypoxic tumor cells. *Cancer Res* **41**, 73-81 (1981).
- 38 Cunningham, M. L., Ringrose, P. S. & Lokesh, B. R. Inhibition of the genotoxicity of bleomycin by superoxide dismutase. *Mutat Res* **135**, 199-202 (1984).
- 39 Teicher, B. A., Holden, S. A. & Jacobs, J. L. Approaches to defining the mechanism of enhancement by Fluosol-DA 20% with carbogen of melphalan antitumor activity. *Cancer Res* **47**, 513-518 (1987).
- 40 Gardner, L. B. *et al.* Hypoxia inhibits G1/S transition through regulation of p27 expression. *J Biol Chem* **276**, 7919-7926, doi:10.1074/jbc.M010189200 (2001).
- 41 Amellem, O. & Pettersen, E. O. Cell inactivation and cell cycle inhibition as induced by extreme hypoxia: the possible role of cell cycle arrest as a protection against hypoxia-induced lethal damage. *Cell Prolif* **24**, 127-141 (1991).
- 42 Fardel, O., Lecreur, V. & Guillouzo, A. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Gen Pharmacol* **27**, 1283-1291 (1996).
- 43 Nooter, K. *et al.* Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in human cancers. *Clin Cancer Res* **1**, 1301-1310 (1995).
- 44 Vaupel, P., Kallinowski, F. & Okunieff, P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* **49**, 6449-6465 (1989).
- 45 Wong, M. L., Prawira, A., Kaye, A. H. & Hovens, C. M. Tumour

angiogenesis: its mechanism and therapeutic implications in malignant gliomas. *J Clin Neurosci* **16**, 1119-1130, doi:10.1016/j.jocn.2009.02.009 (2009).



- 46 Wilson, W. R. & Hay, M. P. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **11**, 393-410, doi:10.1038/nrc3064 (2011).
- 47 Bremner, J. C. *et al.* Increasing the effect of photodynamic therapy on the RIF-1 murine sarcoma, using the bioreductive drugs RSU1069 and RB6145. *Br J Cancer* **66**, 1070-1076 (1992).
- 48 Dolmans, D. E., Fukumura, D. & Jain, R. K. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* **3**, 380-387, doi:10.1038/nrc1071 (2003).
- 49 Detty, M. R., Gibson, S. L. & Wagner, S. J. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *J Med Chem* **47**, 3897-3915, doi:10.1021/jm040074b (2004).
- 50 Oleinick, N. L., Morris, R. L. & Belichenko, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci* **1**, 1-21 (2002).
- 51 Fingar, V. H. Vascular effects of photodynamic therapy. *J Clin Laser Med Surg* **14**, 323-328, doi:10.1089/clm.1996.14.323 (1996).
- 52 Dolmans, D. E. *et al.* Vascular accumulation of a novel photosensitizer, MV6401, causes selective thrombosis in tumor vessels after photodynamic therapy. *Cancer Res* **62**, 2151-2156 (2002).
- 53 Nowis, D. *et al.* The influence of photodynamic therapy on the immune response. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **2**, 283-298, doi:10.1016/S1572-1000(05)00098-0 (2005).
- 54 Castano, A. P., Demidova, T. N. & Hamblin, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular

- localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **1**, 279-293, doi:10.1016/S1572-1000(05)00007-4 (2004).
- 55 Almeida, R. D., Manadas, B. J., Carvalho, A. P. & Duarte, C. B. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta* **1704**, 59-86, doi:10.1016/j.bbcan.2004.05.003 (2004).
- 56 Plaetzer, K., Krammer, B., Berlanda, J., Berr, F. & Kiesslich, T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med Sci* **24**, 259-268, doi:10.1007/s10103-008-0539-1 (2009).
- 57 Robertson, C. A., Evans, D. H. & Abrahamse, H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J Photochem Photobiol B* **96**, 1-8, doi:10.1016/j.jphotobiol.2009.04.001 (2009).
- 58 Moan, J. & Berg, K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol* **53**, 549-553 (1991).
- 59 Star, W. M. *et al.* Destruction of rat mammary tumor and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin derivative photoradiation observed in vivo in sandwich observation chambers. *Cancer Res* **46**, 2532-2540 (1986).
- 60 Fingar, V. H. *et al.* Analysis of acute vascular damage after photodynamic therapy using benzoporphyrin derivative (BPD). *Br J Cancer* **79**, 1702-1708, doi:10.1038/sj.bjc.6690271 (1999).
- 61 Freitas, I. Role of hypoxia in photodynamic therapy of tumors. *Tumori* **71**, 251-259 (1985).
- 62 Moan, J. & Sommer, S. Oxygen dependence of the photosensitizing effect of hematoporphyrin derivative in NHIK 3025 cells. *Cancer Res* **45**, 1608-1610 (1985).

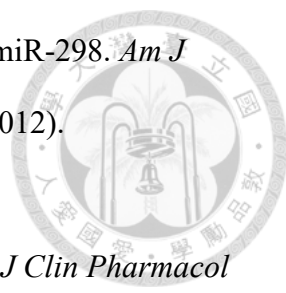
- 
- 63 Vakrat-Haglili, Y. *et al.* The microenvironment effect on the generation of reactive oxygen species by Pd-bacteriopheophorbide. *J Am Chem Soc* **127**, 6487-6497, doi:10.1021/ja046210j (2005).
- 64 Albert, I., Hefti, M. & Luginbuehl, V. Physiological oxygen concentration alters glioma cell malignancy and responsiveness to photodynamic therapy in vitro. *Neurol Res* **36**, 1001-1010, doi:10.1179/1743132814Y.0000000401 (2014).
- 65 Shumaker, B. P. & Hetzel, F. W. Clinical laser photodynamic therapy in the treatment of bladder carcinoma. *Photochem Photobiol* **46**, 899-901 (1987).
- 66 Castano, A. P., Mroz, P. & Hamblin, M. R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer* **6**, 535-545, doi:10.1038/nrc1894 (2006).
- 67 Yom, S. S. *et al.* Elevated serum cytokine levels in mesothelioma patients who have undergone pleurectomy or extrapleural pneumonectomy and adjuvant intraoperative photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* **78**, 75-81 (2003).
- 68 Verrico, A. K., Haylett, A. K. & Moore, J. V. In vivo expression of the collagen-related heat shock protein HSP47, following hyperthermia or photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* **16**, 192-198 (2001).
- 69 Hanlon, J. G., Adams, K., Rainbow, A. J., Gupta, R. S. & Singh, G. Induction of Hsp60 by Photofrin-mediated photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* **64**, 55-61 (2001).
- 70 Boumedine, R. S. & Roy, D. C. Elimination of alloreactive T cells using photodynamic therapy. *Cytotherapy* **7**, 134-143, doi:10.1080/14653240510027109 (2005).
- 71 Castano, A. P., Demidova, T. N. & Hamblin, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three-Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction.

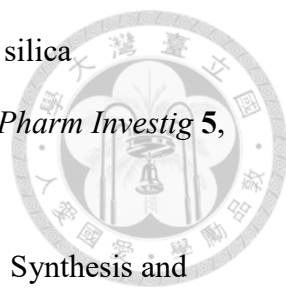
Photodiagnosis Photodyn Ther **2**, 91-106, doi:10.1016/S1572-1000(05)00060-8 (2005).

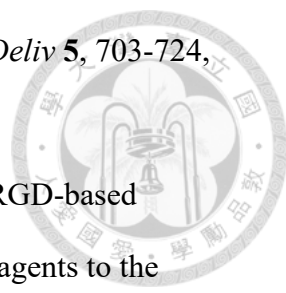
- 72 Webber, J., Herman, M., Kessel, D. & Fromm, D. Current concepts in gastrointestinal photodynamic therapy. *Ann Surg* **230**, 12-23 (1999).
- 73 Henderson, B. W. & Fingar, V. H. Relationship of tumor hypoxia and response to photodynamic treatment in an experimental mouse tumor. *Cancer Res* **47**, 3110-3114 (1987).
- 74 Sachar, M., Anderson, K. E. & Ma, X. Protoporphyrin IX: the Good, the Bad, and the Ugly. *J Pharmacol Exp Ther* **356**, 267-275, doi:10.1124/jpet.115.228130 (2016).
- 75 Ajioka, R. S., Phillips, J. D. & Kushner, J. P. Biosynthesis of heme in mammals. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 723-736, doi:10.1016/j.bbamcr.2006.05.005 (2006).
- 76 Pass, H. I. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *J Natl Cancer Inst* **85**, 443-456 (1993).
- 77 Lu, S. *et al.* Fluorescence detection of protoporphyrin IX in living cells: a comparative study on single- and two-photon excitation. *J Biomed Opt* **13**, 024014, doi:10.1117/1.2907316 (2008).
- 78 Gold, M. H. & Goldman, M. P. 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy: where we have been and where we are going. *Dermatol Surg* **30**, 1077-1083; discussion 1083-1074, doi:10.1111/j.1524-4725.2004.30331.x (2004).
- 79 Hamblin, M. R. & Hasan, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci* **3**, 436-450, doi:10.1039/b311900a (2004).
- 80 Akilov, O. E. *et al.* The role of photosensitizer molecular charge and structure on the efficacy of photodynamic therapy against Leishmania parasites. *Chem*

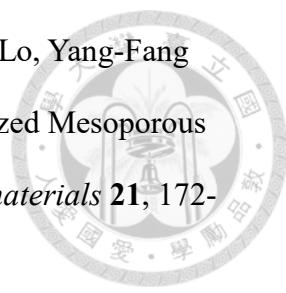
- Biol* **13**, 839-847, doi:10.1016/j.chembiol.2006.06.008 (2006).
- 81 Dubrey, S. W., Ghonim, S., Chehab, O. & Patel, K. Extreme photosensitivity in a patient with erythropoietic protoporphyria. *Br J Hosp Med (Lond)* **76**, 52-53, doi:10.12968/hmed.2015.76.1.52 (2015).
- 82 Rank, J. M., Carithers, R. & Bloomer, J. Evidence for neurological dysfunction in end-stage protoporphyric liver disease. *Hepatology* **18**, 1404-1409 (1993).
- 83 Bruguera, M. & Herrero, C. [Liver disease in erythropoietic protoporphyria]. *Gastroenterol Hepatol* **28**, 632-636 (2005).
- 84 Thapar, M. & Bonkovsky, H. L. The diagnosis and management of erythropoietic protoporphyria. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* **4**, 561-566 (2008).
- 85 Valentine, R. M., Ibbotson, S. H., Wood, K., Brown, C. T. & Moseley, H. Modelling fluorescence in clinical photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci* **12**, 203-213, doi:10.1039/c2pp25271f (2013).
- 86 Zeman, E. M., Brown, J. M., Lemmon, M. J., Hirst, V. K. & Lee, W. W. SR-4233: a new bioreductive agent with high selective toxicity for hypoxic mammalian cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **12**, 1239-1242 (1986).
- 87 Siim, B. G. *et al.* Selective potentiation of the hypoxic cytotoxicity of tirapazamine by its 1-N-oxide metabolite SR 4317. *Cancer Res* **64**, 736-742 (2004).
- 88 Reddy, S. B. & Williamson, S. K. Tirapazamine: a novel agent targeting hypoxic tumor cells. *Expert Opin Investig Drugs* **18**, 77-87, doi:10.1517/13543780802567250 (2009).
- 89 Hicks, K. O. *et al.* Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling identifies SN30000 and SN29751 as tirapazamine analogues with improved tissue penetration and hypoxic cell killing in tumors. *Clin Cancer Res* **16**, 4946-

- 4957, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1439 (2010).
- 90 Marcu, L. & Olver, I. Tirapazamine: from bench to clinical trials. *Curr Clin Pharmacol* **1**, 71-79 (2006).
- 91 Treat, J. *et al.* Tirapazamine with cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a phase II study. *J Clin Oncol* **16**, 3524-3527, doi:10.1200/JCO.1998.16.11.3524 (1998).
- 92 Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* **67**, 7-30, doi:10.3322/caac.21387 (2017).
- 93 Chavez, K. J., Garimella, S. V. & Lipkowitz, S. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Dis* **32**, 35-48, doi:10.3233/BD-2010-0307 (2010).
- 94 Tang, Y., Wang, Y., Kiani, M. F. & Wang, B. Classification, Treatment Strategy, and Associated Drug Resistance in Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer* **16**, 335-343, doi:10.1016/j.clbc.2016.05.012 (2016).
- 95 Dai, X. *et al.* Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res* **5**, 2929-2943 (2015).
- 96 Mendes, T. F. S., Kluskens, L. D. & Rodrigues, L. R. Triple Negative Breast Cancer: Nanosolutions for a Big Challenge. *Adv Sci* **2**, doi:ARTN 1500053 10.1002/advs.201500053 (2015).
- 97 Brinkley, B. R. *et al.* Variations in cell form and cytoskeleton in human breast carcinoma cells in vitro. *Cancer Res* **40**, 3118-3129 (1980).
- 98 Fillmore, C. M. & Kuperwasser, C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res* **10**, R25, doi:10.1186/bcr1982 (2008).
- 99 Bao, L. *et al.* Increased expression of P-glycoprotein and doxorubicin

- 
- chemoresistance of metastatic breast cancer is regulated by miR-298. *Am J Pathol* **180**, 2490-2503, doi:10.1016/j.ajpath.2012.02.024 (2012).
- 100 Meibohm, B. & Derendorf, H. Basic concepts of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) modelling. *Int J Clin Pharmacol Ther* **35**, 401-413 (1997).
- 101 Kostenbauder, H. B. *et al.* Bioavailability and single-dose pharmacokinetics of intramuscular phenytoin. *Clin Pharmacol Ther* **18**, 449-456 (1975).
- 102 Jain, R. K. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Adv Drug Deliv Rev* **46**, 149-168 (2001).
- 103 Allen, T. M. & Cullis, P. R. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science* **303**, 1818-1822, doi:10.1126/science.1095833 (2004).
- 104 Patel, S. *et al.* Nano delivers big: designing molecular missiles for cancer therapeutics. *Pharmaceutics* **3**, 34-52, doi:10.3390/pharmaceutics3010034 (2011).
- 105 Kobayashi, H. & Brechbiel, M. W. Nano-sized MRI contrast agents with dendrimer cores. *Adv Drug Deliv Rev* **57**, 2271-2286, doi:10.1016/j.addr.2005.09.016 (2005).
- 106 Kobayashi, H., Watanabe, R. & Choyke, P. L. Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; what is the appropriate target? *Theranostics* **4**, 81-89, doi:10.7150/thno.7193 (2013).
- 107 Maeda, H. Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: background and future prospects. *Bioconjug Chem* **21**, 797-802, doi:10.1021/bc100070g (2010).
- 108 Kwon, S. *et al.* Silica-based mesoporous nanoparticles for controlled drug delivery. *J Tissue Eng* **4**, 2041731413503357, doi:10.1177/2041731413503357 (2013).

- 
- 109 Bharti, C., Nagaich, U., Pal, A. K. & Gulati, N. Mesoporous silica nanoparticles in target drug delivery system: A review. *Int J Pharm Investig* **5**, 124-133, doi:10.4103/2230-973X.160844 (2015).
- 110 Trewyn, B. G., Slowing, II, Giri, S., Chen, H. T. & Lin, V. S. Synthesis and functionalization of a mesoporous silica nanoparticle based on the sol-gel process and applications in controlled release. *Acc Chem Res* **40**, 846-853, doi:10.1021/ar600032u (2007).
- 111 Du, H. *et al.* A facile synthesis of highly water-soluble, core-shell organo-silica nanoparticles with controllable size via sol-gel process. *J Colloid Interface Sci* **340**, 202-208, doi:10.1016/j.jcis.2009.08.032 (2009).
- 112 Wu, X., Wu, M. & Zhao, J. X. Recent development of silica nanoparticles as delivery vectors for cancer imaging and therapy. *Nanomedicine* **10**, 297-312, doi:10.1016/j.nano.2013.08.008 (2014).
- 113 Lai, N. *et al.* Hollow mesoporous 1a3d silica nanospheres with singleunit-cell-thick shell: Spontaneous formation and drug delivery application. *Nano Research* **7**, 1439-1448, doi:10.1007/s12274-014-0503-2 (2014).
- 114 Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z. G. & Shin, D. M. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res* **14**, 1310-1316, doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1441 (2008).
- 115 Lammers, T., Hennink, W. E. & Storm, G. Tumour-targeted nanomedicines: principles and practice. *Br J Cancer* **99**, 392-397, doi:10.1038/sj.bjc.6604483 (2008).
- 116 Low, P. S. & Antony, A. C. Folate receptor-targeted drugs for cancer and inflammatory diseases. *Adv Drug Deliv Rev* **56**, 1055-1058, doi:10.1016/j.addr.2004.02.003 (2004).
- 117 Irache, J. M., Salman, H. H., Gamazo, C. & Espuelas, S. Mannose-targeted

- 
- systems for the delivery of therapeutics. *Expert Opin Drug Deliv* **5**, 703-724, doi:10.1517/17425247.5.6.703 (2008).
- 118 Temming, K., Schiffelers, R. M., Molema, G. & Kok, R. J. RGD-based strategies for selective delivery of therapeutics and imaging agents to the tumour vasculature. *Drug Resist Updat* **8**, 381-402, doi:10.1016/j.drug.2005.10.002 (2005).
- 119 Zhu, Q., Liu, G. & Kai, M. DNA Aptamers in the Diagnosis and Treatment of Human Diseases. *Molecules* **20**, 20979-20997, doi:10.3390/molecules201219739 (2015).
- 120 Li, X. *et al.* In vitro selection of DNA aptamers for metastatic breast cancer cell recognition and tissue imaging. *Anal Chem* **86**, 6596-6603, doi:10.1021/ac501205q (2014).
- 121 Barman, J. Targeting cancer cells using aptamers: cell-SELEX approach and recent advancements. *Rsc Adv* **5**, 11724-11732, doi:10.1039/c4ra12407c (2015).
- 122 Lyu, Y. F. *et al.* Generating Cell Targeting Aptamers for Nanotheranostics Using Cell-SELEX. *Theranostics* **6**, 1440-1452, doi:10.7150/thno.15666 (2016).
- 123 Tian, J. W. *et al.* A Multifunctional Nanomicelle for Real-Time Targeted Imaging and Precise Near-Infrared Cancer Therapy. *Angew Chem Int Edit* **53**, 9544-9549, doi:10.1002/anie.201405490 (2014).
- 124 Wang, R., Jin, F. & Zhong, H. A novel experimental hypoxia chamber for cell culture. *Am J Cancer Res* **4**, 53-60 (2014).
- 125 Mayeda, E. A. & Bard, A. J. Production of Singlet Oxygen in Electrogenerated Radical Ion Electron-Transfer Reactions. *J Am Chem Soc* **95**, 6223-6226, doi:DOI 10.1021/ja00800a012 (1973).

- 
- 126 Hsiung-Lin Tu, Y.-S. L., Hsia-Yu Lin, Yann Hung, Leu-Wei Lo, Yang-Fang Chen, and Chung-Yuan Mou. In vitro Studies of Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles for Photodynamic Therapy. *advanced materials* **21**, 172-177, doi:10.1002/adma.200800548 (2009).
- 127 Halliwell, B. & Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* **142**, 231-255, doi:10.1038/sj.bjp.0705776 (2004).
- 128 Agostinis, P. *et al.* Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin* **61**, 250-281, doi:10.3322/caac.20114 (2011).
- 129 Marks, D. C., Belov, L., Davey, M. W., Davey, R. A. & Kidman, A. D. The MTT cell viability assay for cytotoxicity testing in multidrug-resistant human leukemic cells. *Leuk Res* **16**, 1165-1173 (1992).
- 130 Hao, J. Q., Li, Q., Xu, S. P., Shen, Y. X. & Sun, G. Y. Effect of lumiracoxib on proliferation and apoptosis of human nonsmall cell lung cancer cells in vitro. *Chin Med J (Engl)* **121**, 602-607 (2008).
- 131 Zhao, Y. *et al.* Cytotoxicity enhancement in MDA-MB-231 cells by the combination treatment of tetrahydropalmatine and berberine derived from *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang. *J Intercult Ethnopharmacol* **3**, 68-72, doi:10.5455/jice.20140123040224 (2014).
- 132 Baas, P., Oppelaar, H., Stavenuiter, M., Vanzandwijk, N. & Stewart, F. A. Interaction of the Bioreductive Drug Sr 4233 and Photodynamic Therapy Using Photofrin in a Mouse-Tumor Model. *Int J Radiat Oncol* **27**, 665-670 (1993).
- 133 Liu, Y. *et al.* Hypoxia Induced by Upconversion-Based Photodynamic Therapy: Towards Highly Effective Synergistic Bioreductive Therapy in

Tumors. *Angew Chem Int Ed Engl* **54**, 8105-8109,
doi:10.1002/anie.201500478 (2015).

